



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ (Ι) ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΣΥΝΘΕΣΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΚΑΙ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΤΟΥΣ ΣΕ ΒΙΟΔΙΑΣΠΩΜΕΝΑ ΡLGA ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ. IN VITRO ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΤΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ.



ΣΠΟΥΔΑΣΤΗΣ: ΛΕΩΝΙΔΑΣ ΓΚΙΩΝΗΣ
ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΔΕΤΣΗ,
ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΕΜΠ

ΑΘΗΝΑ, ΙΟΥΝΙΟΣ 2015

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, κατά το ακαδημαϊκό έτος 2014 – 2015.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα, Δρ. Αναστασία Δέτση, Επίκουρη Καθηγήτρια ΕΜΠ, για την ανάθεση της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας, την πολύτιμη καθοδήγηση της σε γνωστικό και εργαστηριακό επίπεδο αλλά και την εμπιστοσύνη που μου επέδειξε καθ' όλη την διάρκεια διεξαγωγής της εργασίας.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω θερμά την Δρ. Αγγελική Χρόνη, Ερευνήτρια Β' του Ινστιτούτου Βιοεπισημών και Εφαρμογών ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», για την εξαιρετη συνεργασία, την πολύτιμη συμβολή της στην ολοκλήρωση της εργασίας όσον αφορά το βιολογικό μέρος αυτής αλλά και για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ μέσα σε ένα σύγχρονο και άρτια εξοπλισμένο εργαστήριο.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες απευθύνω στα μέλη της τριμελούς επιτροπής και πιο συγκεκριμένα: Την Δρ. Σταματίνα Βουγιούκα, Επίκουρο Καθηγήτρια ΕΜΠ, για την πολύτιμη βοήθεια της και τις χρήσιμες συμβουλές της σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας και την Δρ. Ευαγγελία Παυλάτου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΜΠ, για τις εύστοχες παρατηρήσεις της.

Επιπλέον ευχαριστώ ιδιαίτερως:

Την Ελένη Καβέτσου, Υποψήφια Διδάκτορα του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας ΕΜΠ, για το εξαιρετικό κλίμα συνεργασίας, την υπομονή και τη συμπαράσταση που μου έδειξε σε κάθε βήμα της ερευνητικής αυτής εργασίας.

Την Λέττα Αργύρη, Υποψήφια Διδάκτορα του Εργαστηρίου Βιοχημείας/Παθοβιολογίας Κυττάρων & Εξωκυττάρου Χώρου ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», για τις συμβουλευτικές της παρααινέσεις και την πολύτιμη καθοδήγηση της στα in vitro κυτταρικά πειράματα.

Την καθηγήτρια Δήμητρα Χατζηπαύλου-Λίτινα, στον Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Αριστοτέλειου Πανεπιστήμιου Θεσσαλονίκης, για τη διεξαγωγή των in vitro βιοδοκιμασιών σχετικά με την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης των παραγόμενων ενώσεων.

Θα επιθυμούσα, τέλος, να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας ΕΜΠ αλλά και του Εργαστηρίου Βιοχημείας/Παθοβιολογίας Κυττάρων & Εξωκυττάρου Χώρου ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», για το φιλικό κλίμα και την ομαδικότητα που επέδειξαν, καθιστώντας ευκολότερη τη διεξαγωγή της εργασίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι κουμαρίνες αποτελούν βενζοπυρονικά παράγωγα ευρέως διαδεδομένα στην φύση. Ο συμπυκνμένος ετεροκυκλικός πυρήνας που διαθέτουν χρησιμεύει ως πρωτότυπη βάση για την σύνθεση ποικίλων βιοδραστικών αναλόγων. Οι κουμαρίνες χαρακτηρίζονται από ένα ευρύ φάσμα βιολογικών ιδιοτήτων όπως η αντιοξειδωτική, αντικαρκινική, αγγειοπροστατευτική, αντιϊκή και αντιφλεγμονώδης τους δράση.

Ο εγκλεισμός δραστικών ενώσεων σε κολλοειδή συστήματα νανοφορέων έχει αποκτήσει τα τελευταία χρόνια ιδιαίτερο ενδιαφέρον στον χώρο της φαρμακευτικής και κοσμητικής βιομηχανίας. Η ενθυλάκωση του φαρμάκου στο φορέα μεταφοράς συμβάλλει στη βελτίωση των φυσικοχημικών του ιδιοτήτων καθώς και στην ελεγχόμενη και συνάμα αποτελεσματική του αποδέσμευση.

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η σύνθεση, ο χαρακτηρισμός και η μελέτη της βιολογικής δράσης νέων κουμαρινικών αναλόγων. Επιπλέον, προκειμένου να προσαρμοστούν τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά (υδροφοβικότητα, φωτοευαισθησία) ακολούθησε εγκλεισμός τους σε νανοσωματίδια πολυ(γαλακτικού-γλυκολικού) οξέος (PLGA). Το συγκεκριμένο πολυμερές χρησιμοποιείται ευρέως σε θεραπευτικές εφαρμογές λόγω της υψηλής βιοσυμβατότητας αλλά και του βιοδιασπώμενου χαρακτήρα που διαθέτει.

Ο χαρακτηρισμός δομής των νέων ενώσεων πραγματοποιήθηκε μέσω της Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) ενώ οι αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες τους μέσω διαφόρων *in vitro* δοκιμασιών. Ο εγκλεισμός στα βιοπολυμερικά σωματίδια έγινε μέσω της μεθόδου γαλακτωματοποίησης με ταυτόχρονη εξάτμιση διαλύτη. Το μέγεθος, η πολυδιασπορά και το ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων μετρήθηκε μέσω της μεθόδου Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS), ενώ η απόδοση εγκλεισμού των ενώσεων υπολογίστηκε έμμεσα μέσω φασματοσκοπίας απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-Vis). Τέλος, αξιολογήθηκε η κυτοτοξικότητα των εγκλεισμένων και μη ενώσεων μέσω της μέτρησης κυτταρικής βιωσιμότητας με τη δοκιμασία MTT σε κυτταρικές σειρές ανθρώπινου νευροβλαστώματος SK-N-SH.

Επιστημονική περιοχή: Οργανική χημεία, Χημεία πολυμερών

Λέξεις Κλειδιά: κουμαρίνες, αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδης δράση, νανοεγκλεισμός, πολυ(γαλακτικό-γλυκολικό) οξύ, δοκιμασία κυτταρικής επιβίωσης

ABSTRACT

Coumarins are benzopyrone analogues widely distributed in nature. The fused heterocyclic framework of coumarins has served as the prototype scaffold for the synthesis of a wide variety of analogues in order to investigate their biological activity. Coumarins possess a remarkable range of biological properties including antioxidant, anticancer, vasorelaxant, antiviral and anti-inflammatory.

In recent years, encapsulation of active ingredients in colloidal nanocarriers has tremendous potential for drug delivery in the pharmaceutical and cosmetics industry. It consists of the entrapment of a drug/compound inside a carrier material, in the aim of enhancing several physicochemical characteristics of the encapsulated substance while obtaining a more efficient and controlled drug delivery as well.

This work details the synthesis, structure characterization and evaluation of biological activity of natural and synthetic coumarin analogues. Moreover, in order to tailor the physicochemical characteristics of the compounds (such as low water solubility, potential photosensitivity and air-oxidative decomposition), their encapsulation in PLGA nanoparticles was studied. PLGA was the polymer of choice as it is a biodegradable and biocompatible polymer which has been approved for use in therapeutic devices.

The structure characterization of the compounds was performed using NMR spectroscopy whereas their antioxidant and anti-inflammatory activity was investigated using different in vitro assays. Encapsulation in PLGA nanoparticles was achieved via the emulsification-solvent evaporation technique. Size, polydispersity index and ζ -potential of the nanoparticles were measured by Dynamic Light Scattering method whereas the Encapsulation Efficiency (EE) was determined indirectly, using UV-Vis spectroscopy. The cytotoxicity of both the encapsulated and the non-encapsulated compounds was tested by the MTT assay in the human neuroblastoma cell line SK-N-SH.

Scientific area: Organic and polymer chemistry

Keywords: coumarins, antioxidant, anti-inflammatory activity, nanoencapsulation, PLGA, cell viability assay

Πίνακας περιεχομένων

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	2
ABSTRACT	3
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1. Φυσικά Βιοδραστικά Προϊόντα.....	6
1.1. Προέλευση Κουμαρινών	6
1.2. Χημική Δομή και Ταξινόμηση Φυσικών Κουμαρινών.....	7
1.3. Φαρμακευτικές & Βιολογικές Ιδιότητες Κουμαρινών	10
1.3.1. Αντικαρκινική Δράση	11
1.3.2. Αντιφλεγμονώδης Δράση	13
1.3.3. Αντιθρομβωτική-Αντιπηκτική Δράση	14
1.3.4. Αντιοξειδωτική Δράση.....	16
1.3.5. Νευροπροστατευτική Δράση.....	19
1.4. Φαρμακευτικό Προφίλ των Ισοπρενυλοξυ Κουμαρινών	21
1.5. Φαρμακευτικό Προφίλ Φαινολικών Οξέων.....	24
1.6. Συνθετική Πορεία Κουμαρινικών Αναλόγων	26
1.6.1. Αντίδραση Pechmann.....	26
1.6.2. Αντίδραση Αιθεροποίησης (<i>Williamson ether synthesis</i>).....	28
1.6.3. Αντίδραση Πυρηνόφιλης ακυλο υποκατάστασης.....	29
2. Συστήματα Μεταφοράς Φαρμάκων (<i>Drug Delivery Systems</i>)	31
2.1. Βιοδιασπώμενα Νανοσυστήματα	33
2.2. . Είδη Νανοσωματιδιακών Μορφών.....	33
I. Πολυμερή με βάση τον άνθρακα	34
II. Πολυμερικά νανοσωματίδια	34
III. Δενδριμερή.....	35
IV. Λιποσώματα	35
V. Μεταλλικά νανοσωματίδια	36
VI. Κβαντικές τελείες	36
2.3. Χαρακτηριστικά των Νανοσωματιδίων	37
2.3.1. Μέγεθος (<i>size</i>)	37
2.3.2. ζ-δυναμικό (<i>zeta potential</i>).....	38
2.3.3. Φυσικοχημική σταθερότητα (<i>stability</i>)	38
2.4. Μέθοδοι Παρασκευής Πολυμερικών Νανοσωματιδίων	39
1) Μέθοδος γαλακτωματοποίησης με εξάτμιση του οργανικού διαλύτη.....	40
2) Μέθοδος εκτόπισης οργανικού διαλύτη και διεπιφανειακής εναπόθεσης -Νανοκαταβύθιση (<i>nanoprecipitation</i>)	42
3) Μέθοδος γαλακτωματοποίησης με διάχυση διαλύτη (<i>Emulsification/solvent diffusion</i>)	43
4) Μέθοδος εξαλάτωσης με συνθετικά πολυμερή (<i>Salting out method</i>).....	44
2.4.1. Επίδραση του Οργανικού Διαλύτη στις Τεχνικές Νανοεγκλεισμού.....	44
2.5. Νανοσωματίδια πολυ(γαλακτικού-γλυκολικού) οξέος (PLGA NPs)	49

2.5.1. Πολυ(γαλακτικό-γλυκολικό) οξύ (PLGA).....	49
2.5.2. Φαρμακευτικό Προφίλ και βιοκατανομή PLGA σωματιδίων.....	50
2.5.3. Συμπεριφορά αποδέσμευσης φαρμάκου-Διφασική αποδέσμευση.....	52
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	54
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	55
1. Σύνθεση κουμαρινικών αναλόγων.....	55
1.1. Όργανα και Συσκευές	55
1.2. Συνθετική Πορεία των νέων ενώσεων	55
2. Σχηματισμός Νανοσωματιδίων-Εγκλεισμός ενώσεων.....	61
2.1. Υλικά & Μέθοδοι.....	61
2.2. Όργανα και Συσκευές	61
2.3. Παρασκευή υδατικού διαλύματος πολυ(βινυλικής αλκοόλης) (PVA)	61
2.4. Παρασκευή νανοσωματιδίων πολυ(γαλακτικού-γλυκολικού) οξέος (PLGA)	62
2.5. Εγκλεισμός κουμαρινικών αναλόγων σε πολυμερικά νανοσωματίδια PLGA.....	63
2.6. Χαρακτηρισμός Νανοσωματιδίων.....	63
2.6.1. Μέγεθος, κατανομή μεγέθους & ζ-δυναμικό	63
2.6.2. Ποσοστό εγκλεισμού των κουμαρινικών αναλόγων στα PLGA νανοσωματίδια (EE%)	64
3. In vitro κυτοτοξική δοκιμασία.....	65
3.1. Καλλιέργειες κυτταρικών σειρών ανθρώπινου νευροβλαστώματος SK-N-SH.....	65
3.2. Διατήρηση και ανάπτυξη καλλιιεργειών SK-N-SH.....	65
3.3. Μέτρηση κυτταρικής βιωσιμότητας με τη δοκιμασία MTT	66
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ	68
1. Αξιολόγηση της βιολογικής δράσης των κουμαρινικών αναλόγων.....	68
1.1. Μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης	68
1.1.1. Ικανότητα δέσμευσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH	68
1.1.2. Αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης	69
1.2. Μελέτη αντιφλεγμονώδους δράσης	71
1.2.1. Ικανότητας αναστολής της δράσης του ενζύμου λιποξυγονάση από σόγια.....	71
2. Χαρακτηρισμός PLGA νανοσωματιδίων.....	74
2.1. Μέγεθος, δείκτης διασποράς και ζ- δυναμικό των PLGA κενών Νανοσωματιδίων	74
2.2. Επίδραση του Οργανικού διαλύτη στα χαρακτηριστικά των PLGA Νανοσωματιδίων	75
2.3. Απόδοση Εγκλεισμού κουμαρινών.....	79
3. In vitro κυτοτοξική μελέτη.....	84
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	94
ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ	96
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	97
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	107
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΙΚΟΝΩΝ	109
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	112
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΠΙΝΑΚΩΝ	113
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	114

1. Φυσικά Βιοδραστικά Προϊόντα

Πολυάριθμα φυσικά προϊόντα, προερχόμενα από φυτικά εκχυλίσματα, προσφέρουν ένα σημαντικό μεγάλο εύρος ευκαιριών για την ανακάλυψη νέων καινοτόμων φαρμακευτικών ή καλλυντικών σκευασμάτων, λόγω της απaráμιλλης χημικής ποικιλομορφίας που διαθέτουν^[1]. Με τον όρο φυτικά βιοδραστικά προϊόντα ορίζονται όλα εκείνα τα χημικά παράγωγα που προέρχονται από ποικίλα φυτικά είδη και τα οποία παρουσιάζουν έντονο φαρμακευτικό ή τοξικολογικό ενδιαφέρον αναφορικά με την χρήση τους στον άνθρωπο ή στα ζώα αντίστοιχα. Οι περισσότερες φυτικές βιοδραστικές ενώσεις παράγονται στην πλειοψηφία τους ως δευτερογενείς μεταβολίτες, μέσω διαφόρων πολύπλοκων βιοχημικών και μεταβολικών οδών που λαμβάνουν χώρα στα φυτά^[2].

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), πάνω από το 80% του παγκόσμιου πληθυσμού βασίζεται στις αρχές της παραδοσιακής ιατρικής για την αντιμετώπιση διάφορων χρόνιων και λοιμωδών παθήσεων, με τα φυτικά φαρμακευτικά σκευάσματα να κατέχουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο σε αυτό. Η χρήση των φυτικών φαρμάκων άρχισε να εντείνεται περισσότερο λόγω της ανάπτυξης σοβαρών παρενεργειών αλλά και της μικροβιακής αντοχής που επέδειξαν πολλά χημικά σύνθετα σκευάσματα, με την πάροδο του χρόνου. Πολλά είναι τα οφέλη που προκύπτουν από τη χρήση των φυτικών σκευασμάτων, λόγω της σαφώς ελαττωμένης έκτασης των παρενεργειών που προκαλούν στον οργανισμό, αλλά και για τις πολυάριθμες βιολογικές ιδιότητες τους ανάμεσα στις οποίες συγκαταλέγονται η αντιοξειδωτική, αντικαρκινική, αντιφλεγμονώδης, αντιϊκή, αντιμικροβιακή και αναλγητική δράση αυτών^[1].

Τα φυτοδραστικά παράγωγα ταξινομούνται σε διάφορες οικογένειες ανάλογα με τη χημική δομή που παρουσιάζουν αλλά και βάσει της εξειδικευμένης βιολογικής τους δράσης, κατά την εφαρμογή τους στις κλινικές μελέτες. Μερικές από τις κυριότερες οικογένειες φυτοδραστικών ενώσεων είναι οι γλυκοζίτες, τα φλαβονοειδή, οι προανθοκυανιδίνες, οι τανίνες, τα μονο- και σεσκι-τερπένια, τα διτερπενοειδή, τα φαινυλοπροπανοειδή, οι ρητίνες, τα αλκαλοειδή, οι λιγνάνες και οι βενζοπυρόνες, στις οποίες συγκαταλέγονται οι κουμαρίνες^[2].

1.1. Προέλευση Κουμαρινών

Η μελέτη των κουμαρινών έχει ξεκινήσει συνολικά πάνω από 200 χρόνια. Η ονομασία της συγκεκριμένης οικογένειας χημικών ενώσεων προήλθε από το φυτικό είδος *Coumarouna odorata Aube (Dipteryx odorata)*, από το οποίο αρχικά εξήχθη η απλούστερη δομικά μορφή της κουμαρίνης. Η κουμαρίνη αποτελεί έναν δευτερογενή μεταβολίτη, ο οποίος προκύπτει φυσικά από μια μεγάλη οικογένεια φυτικών ειδών και αιθέριων ελαίων (έλαιο λεβάντας, κανέλλας, κασσίας κ.α.) αλλά και στελεχών εξειδικευμένων μικροοργανισμών. Για την

ακρίβεια πάνω από 800 φυτικά και μη είδη έχουν συνολικά μελετηθεί ως προς την παραγωγή τουλάχιστον 1300 κουμαρινικών παραγώγων^[3].

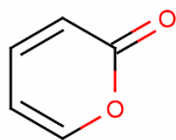
Οι κουμαρίνες βρίσκονται ελεύθερες σε πολλές δικοτυλήδονες φυτικές οικογένειες, συμπεριλαμβανομένων των *Ariaceae* (*Amni majus*), *Asteraceae* (*Trilisa odoratissima*), *Fabiaceae* (*Melilotus officinalis*), *Rosaceae* (*Prunus mahaleb*), *Rubiaceae* (*Asperula odorata*), *Solonaceae* (*Atropa belladonna*) κ.α. Επίσης, αρκετά μονοκοτυλήδονα φυτά, όπως το Gramineae και οι ορχιδέες, περιλαμβάνουν αξιόλογες ποσότητες κουμαρινών. Τα κουμαρινικά παράγωγα εκχυλίζονται με ειδικούς οργανικούς διαλύτες, από διάφορα φυτικά στελέχη όπως φυλλώματα, φλοιούς, καρπούς, φρούτα και ρίζες. Παραδείγματος χάριν, σημαντική ποσότητα κουμαρίνης έχει εντοπιστεί σε φρούτα όπως βερίκοκα, κεράσια, διάφορα είδη άγριων βατόμουρων και φράουλες αλλά και σε βότανα όπως το πράσινο τσάι, τη λεβάντα, το γλυκό τριφύλλι, σε σπόρους κανέλλας ή καπνού και τέλος σε ποικιλίες από καρπούς φασολιών, ιδίως στα φασόλια *topka*. Όσον αφορά στην παραγωγή τους από μικροοργανισμούς, ανάμεσα στα διάφορα εξεταζόμενα στελέχη, συγκαταλέγονται τα είδη *Aspergillus* και *Streptomyces*, τα οποία δίνουν κουμαρινικά παράγωγα γνωστά ως αφλατοξίνες και νοβοβιοκίνες (*novobiocins*) αντίστοιχα^[4-5].



Εικόνα 1. Φυτικά είδη πλούσια σε κουμαρινικά παράγωγα.

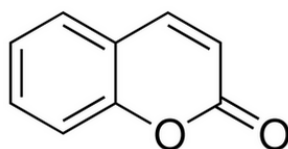
1.2. Χημική Δομή και Ταξινόμηση Φυσικών Κουμαρινών

Οι κουμαρίνες συγκαταλέγονται στην οικογένεια χημικών ενώσεων γνωστές ως βενζοπυρόνες, οι οποίες απαρτίζονται από ένα βενζολικό δακτύλιο συνδεδεμένο με μια ομάδα πυρόνης (*pyrone*) – ένας 6μελής ετεροκυκλικός δακτύλιος που περιέχει ένα άτομο οξυγόνου και πέντε sp^2 υβριδικούς άνθρακες. Οι πυρόνες διακρίνονται στις α - και τις γ -πυρόνες, με τη διαφορά στην θέση πρόσδεσης του οξυγόνου στην δομή του μορίου. Στην **εικόνα 2** που ακολουθεί απεικονίζεται η δομή μιας τυπικής α -πυρόνης.



Εικόνα 2. Χημική δομή μιας τυπικής α-πυρόνης.

Η κουμαρίνη και γενικά όλα τα γνωστά κουμαρινικά παράγωγα ανήκουν στις βενζο-α-πυρόνες ή αλλιώς κατά την IUPAC στις *2H-1-benzopyran-2-one* ενώσεις, ενώ άλλες παρόμοιες χημικές ομάδες όπως τα φλαβονοειδή ανήκουν στις βενζο-γ-πυρόνες. Η απλούστερη δομικά μορφή της κουμαρίνης ή της 1,2 βενζοπυρόνης όπως ονομάζεται εναλλακτικά, δίνεται παρακάτω.



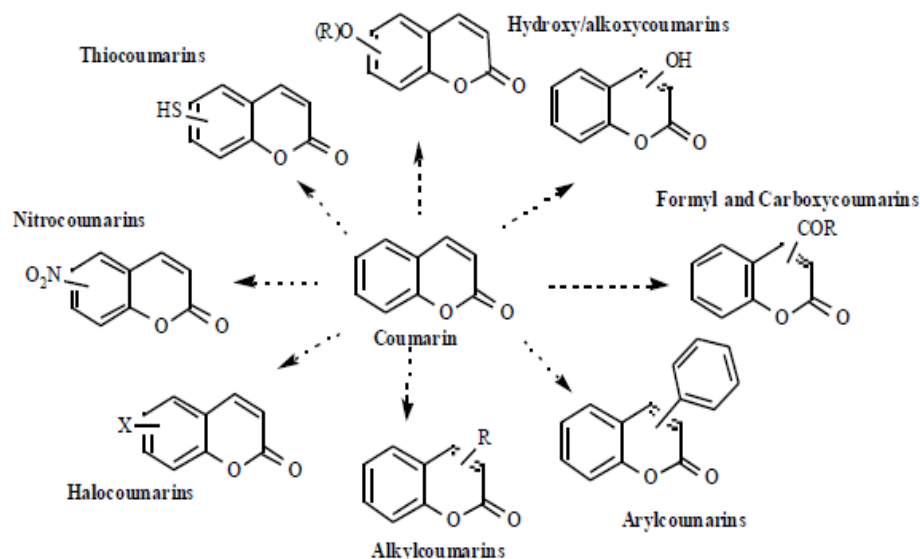
Εικόνα 3. Χημική δομή Κουμαρίνης.

Οι κουμαρίνες εμφανίζουν γενικά ένα πλήρως καθορισμένο φάσμα απορρόφησης και χαρακτηρίζονται από την τάση τους να δίνουν φωσφορίζοντα αποτυπώματα, όταν εκτίθενται σε πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας. Μέσω μιας ποικιλίας χρωματογραφικών και φασματομετρικών μεθόδων ανάλυσης έχουν ταυτοποιηθεί αρκετά κουμαρινικά παράγωγα, που είτε προήλθαν από χημική σύνθεση είτε απομονώθηκαν φυσικά μέσω εκχύλισης. Οι κυριότερες κατηγορίες κουμαρινών που έχουν ταξινομηθεί βάσει ιδιοτήτων, είναι οι ακόλουθες^[4]:

- a) **Οι απλές κουμαρίνες**, προερχόμενες από την κεντρική δομή της 1,2-βενζοπυρόνης. Τα παράγωγα αυτά είτε έχουν αλκοξυλιωθεί, υδροξυλιωθεί ή αλκυλιωθεί μέσω βιοχημικών αντιδράσεων, είτε πολλές φορές έχουν υποστεί γλυκοζυλίωση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η 7-υδροξυ-κουμαρίνη γνωστή και ως ουμπελιφερόνη (*umbelliferone*) αλλά και η σκοπελετίνη.



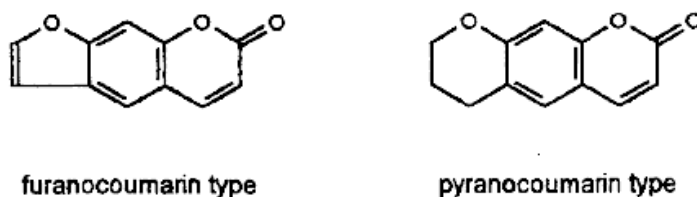
Εικόνα 4. Χημική δομή της 7-υδροξυ-κουμαρίνης (*Umbelliferone*) και της σκοπελετίνης, αντίστοιχα.



Εικόνα 5. Η κουμαρίνη ως βασικός πυρήνας για την σύνθεση νέων απλών κουμαρινικών αναλόγων^[3].

b) **Φουρανοκουμαρίνες (furanocoumarins)**. Αποτελούνται από έναν 5μελή φουρανικό δακτύλιο, συνδεδεμένο με τον πυρήνα της κεντρικής κουμαρινικής ένωσης. Τα κυριότερα παράγωγα είναι το γραμμικό μόριο του ψωραλενίου (*psoralen*) και το κυρτό/γωνιακό, ως προς τον προσανατολισμό του φουρανικού δακτυλίου, μόριο της αγγελικίνης (*angelicin*). Ακόμη, οι διυδροφουρανοκουμαρίνες αλλά και οι διυδροπυρανοκουμαρίνες συγκαταλέγονται στην κατηγορία αυτή.

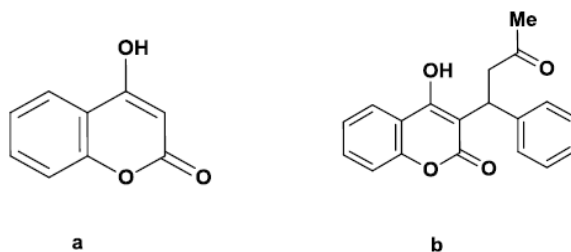
c) **Πυρανοκουμαρίνες (pyranocoumarins)**. Είναι παρόμοιες δομικά με τις φουρανοκουμαρίνες με την διαφορά ότι αποτελούνται από έναν 6μελή πυρανικό δακτύλιο, συνδεδεμένο με τον πυρήνα της κεντρικής ένωσης.



Εικόνα 6. Τυπική δομή φουρανοκουμαρινών και πυρανοκουμαρινών, αντίστοιχα.

d) **Κουμαρίνες υποκατεστημένες στον πυρονικό δακτύλιο**. Περιλαμβάνονται οι υποκατεστημένες κουμαρίνες στην 3- ή στην 4- θέση ή και στις δύο θέσεις του δακτυλίου, καθώς και 3,4-σμπυκνωμένες κουμαρίνες. Δύο χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η 4-υδροξυ-κουμαρίνη, που συχνά χρησιμοποιείται για την ανίχνευση βακτηριακής επιμόλυνσης σε αποθέματα νερού, και η βαρφαρίνη, η

οποία χρησιμοποιείται ως αντιπηκτική ουσία αλλά και ως ποντικοκτόνο^[4-6].



Εικόνα 7. Χημικός τύπος της 4-υδροξυ-κουμαρίνης (a) και της βαρφαρίνης (b), αντίστοιχα.

1.3. Φαρμακευτικές & Βιολογικές Ιδιότητες Κουμαρινών

Πολυάριθμες βιοδραστικές ενώσεις έχουν εξεταστεί κατά καιρούς σε κλινικές μελέτες για τις πιθανές θεραπευτικές τους ιδιότητες, με ένα μεγάλο ποσοστό αυτών των ενώσεων να κρίνονται εν τέλει ακατάλληλες για χρήση λόγω της τοξικής, μεταλλαξογόνου ή και καρκινογόνου δράσης τους. Η μεγάλη ποικιλία βοτάνων και φυτικών εκχυλισμάτων που κατέχει ο άνθρωπος στα χέρια του, παρέχει ωστόσο την δυνατότητα αξιοποίησης πολλών και διαφορετικών φυτοχημικών ενώσεων με διευρυμένες βιολογικές και θεραπευτικές δράσεις. Οι κουμαρίνες αποτελούν μια τέτοιου τύπου ομάδα φυτοδραστικών ενώσεων, η φύση των οποίων έχει πολλάκις μελετηθεί αναφορικά με τη βιολογική τους επίδραση σε διαφορετικά κυτταρικά συστήματα.

Ιδιαίτερα αξιόλογη έχει χαρακτηριστεί η βιολογική δραστηριότητα των κουμαρινών, λόγω της μοναδικής δομικής ποικιλομορφίας που παρουσιάζουν, συμπεριλαμβανομένης της αντιοξειδωτικής, αντιφλεγμονώδους, αντιμικροβιακής, αντιϊκής, αντικαρκινικής και νευροπροστατευτικής τους δράσης. Ακόμη αρκετές κουμαρινικές ενώσεις δρουν ως ενζυμικοί αναστολείς ή ορμονικοί ρυθμιστές, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο τόσο στη φυτική όσο και στη ζωική βιοχημεία- φυσιολογία^[7].

Οι κουμαρίνες διαθέτουν ένα πλούσιο ηλεκτρονικά σύστημα π-π σύζευξης, το οποίο συμβάλλει σε συνδυασμό με τη δομική τους διαμόρφωση (σύντηξη του βενζολικού δακτυλίου με την α-πυρόνη) στην ανάπτυξη ενός αρκετά 'ευέλικτου' συστήματος μεταφοράς φορτίων. Οι κουμαρίνες έχουν την ιδιότητα να αναπτύσσουν συν τοις άλλοις μη ομοιοπολικούς δεσμούς (υδρόφοβες, π-π και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, δεσμούς υδρογόνου, δυνάμεις *van der Waals*, μεταλλικούς συντονισμούς κ.α.) στις διάφορες δραστικές θέσεις του κυτταρικού μεταβολικού συστήματος και έτσι γι' αυτόν το λόγο εμφανίζουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών ιδιοτήτων, όπως προαναφέρθηκε. Επιπλέον, οι μοναδικές ικανότητες φθορισμού των κουμαρινών, παρέχουν την δυνατότητα ανάπτυξης καινοτόμων τεχνητών ιοντικών υποδοχέων και ανιχνευτών φθορίζουσας δράσης για την παρακολούθηση σημαντικών βιολογικών και φαρμακοκινητικών αντιδράσεων^[8-9].

1.3.1. Αντικαρκινική Δράση

Ο καρκίνος αποτελεί μια από τις απειλητικότερες ασθένειες της σύγχρονης εποχής για την υγεία του ανθρώπου. Η συγκεκριμένη πάθηση σχετίζεται με τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό που συντελείται στον ανθρωπινό οργανισμό, από την στιγμή που διαταράσσεται η φυσιολογική ροή της κυτταρικής διαφοροποίησης με την αναστολή της κυτταρικής απόπτωσης και ως εκ τούτου την μη ελεγχόμενη ανάπτυξη κυττάρων^[10].

Διάφορα αντικαρκινικά φάρμακα έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς για την αντιμετώπιση της νόσου, στοχεύοντας στην διακοπή της κυτταρικής διαίρεσης. Τα φάρμακα αυτά περιλαμβάνουν διάφορους παράγοντες που δρουν ως αναστολείς/παρεμποδιστές του γονιδιώματος (DNA) μέσω των στερεοχημικών αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσουν με αυτό (cross-linking agents), ως αναστολείς της τοποϊσομεράσης, ως αντιμεταβολίτες (π.χ. μερκαπτοπουρίνη) και γενικά η χρήση τους αφορά ένα ευρύ βιολογικό φάσμα ιδιοτήτων. Οι κυτοτοξικοί αυτοί παράγοντες, αν και αποτελεσματικοί στην χρήση τους, είναι φυσικό να προκαλούν διάφορες παρενέργειες στα φυσιολογικά κύτταρα/ιστούς του οργανισμού, παραδείγματος χάριν επηρεάζοντας αρνητικά το αιμοποιητικό σύστημα. Ο συνδυασμός χημειοθεραπείας, ακτινοθεραπείας και χειρουργικής επέμβασης αποτελεί την αποτελεσματικότερη μέθοδο ίασης για τους ασθενείς, παρουσιάζοντας μάλιστα εξειδικεύσεις ανά περίπτωση καρκινικού τύπου ή μορφώματος^[11].

Η παρουσία των κουμαρινών σε πολλά φυσικά σκευάσματα δεν θα μπορούσε να αφήσει αδιάφορη την επιστημονική κοινότητα σχετικά με την αποτελεσματικότητα των ενώσεων αυτών στην καταπολέμηση του καρκίνου. Έχει διαπιστωθεί ότι ποικίλα κουμαρινικά είδη όχι μόνο συμβάλλουν στην αντιμετώπιση της νόσου αλλά μπορούν παράλληλα να δράσουν θετικά στην ελαχιστοποίηση των παρενεργειών της συνδυασμένης ακτινοθεραπείας. Πιο συγκεκριμένα, πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η συνδυαστική χρήση της κουμαρίνης με το φλαβονοειδές troxerutin συμβάλλουν στην προστασία των σιελογόνων αδένων και του βλεννογόνου σε ασθενείς που υποβάλλονται σε ακτινοθεραπεία της περιοχής του λαιμού και της κεφαλής^[12]. Επιπλέον, μελέτες *in vivo* σε αλμπίνο ποντίκια εργαστηρίου, έδειξαν ότι η ημερήσια χορήγηση ουμπελιφερόνης (7-υδροξυκουμαρίνη) συμβάλλει στην προστασία των ποντικών από την έκθεση τους σε γ-ακτινοβολία, τόσο σε επίπεδο γενετικής βλάβης όσο και στο οξειδωτικό στρες που προξενείται από την ακτινοβολία^[13].

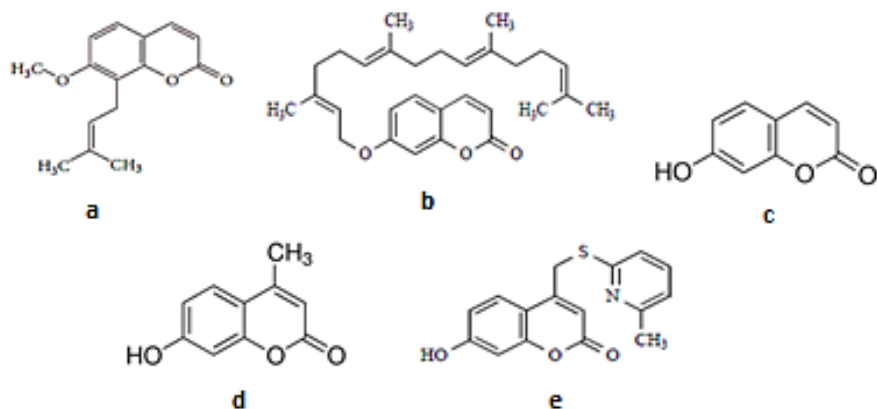
Ποικίλα παραδείγματα της χρήσης κουμαρινών σε *in vitro* αλλά και *in vivo* δοκιμασίες επιβεβαιώνουν την αντικαρκινική δράση των βιοδραστικών αυτών ενώσεων. Η κουμαρίνη οσθόλη (osthole) για παράδειγμα, έχει μελετηθεί για την αναστολή της μεταστατικής συμπεριφοράς του καρκίνου του μαστού, αφού ποικίλες αναφορές κάνουν λόγο για την παρεμποδιστική δράση που εμφανίζει έναντι της δράσης των μεταλλοπρωτεασών εξωκυττάρου δικτύου. Οι μεταλλοπρωτεάσες είναι ένζυμα, η δραστηριότητά των οποίων κατέχει κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκινικού όγκου και των πολλαπλών διεργασιών της εισβολής και της μετάστασης αυτού, μέσω της πρωτεολυτικής αποικοδόμησης της

εξωκυττάριας μήτρας (ECM), την αλλοίωση των διακυτταρικών αλληλεπιδράσεων και των αλληλεπιδράσεων κυττάρου-ECM^[14].

Η *γερανυλογερανυλόξυ κουμαρίνη*, μια ισοπρενυλόξυ κουμαρίνη, έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζει σε *in vitro* μελέτες ισχυρή κυτταροτοξική δράση ενάντι καρκινικών κυτταρικών σειρών του παγκρέατος (PC₁₀₀ στα 6.25 μM). Η μακριά αιθερική αλυσίδα στην 7- θέση του κουμαρινικού δακτυλίου δείχνει να παίζει σημαντικό ρόλο στην αντικαρκινική δραστηριότητα των ενώσεων αυτών^[15].

Ο καρκίνος του προστάτη, ο οποίος εμφανίζει μεγάλη συχνότητα εμφάνισης στους ενήλικες άνδρες, αποτελεί έναν από τους πιο δύσκολα θεραπεύσιμους καρκίνους. Μια από τις μεθόδους καταπολέμησης της νόσου είναι η εκλεκτική ρύθμιση της βιοσύνθεσης ή της δράσης των ανδρογόνων στον αντίστοιχο υποδοχέα τους. Η 17β-υδροξυστεροειδής αφυδρογονάση τύπου 3 καταλύει το τελικό στάδιο της βιοσύνθεσης των ανδρογόνων και μελέτες έχουν δείξει ότι υπερεκφράζεται σε ιστούς που παρουσιάζουν δείγματα καρκίνου του προστάτη. Η 4-υποκατεστημένη-7-υδροξυκουμαρίνη της **εικόνας 8** έχει αποδειχθεί ότι κατέχει έντονη παρεμποδιστική δράση έναντι της 17β-υδροξυστεροειδούς αφυδρογονάσης τύπου 3, με τιμή IC₅₀ στα 1,50 nM. Η υποκατάσταση της θειοαιθερικής ομάδας στην θέση 4- του κουμαρινικού δακτυλίου, η μεθυλο ομάδα-δότης ηλεκτρονίων καθώς και ο βασικός χαρακτήρας του αζώτου προσδίδουν όλα μαζί τις ισχυρές ιδιότητες αυτού του μορίου^[16]. Επίσης η κουμαρίνη και το παράγωγο αυτής η 7-υδροξυκουμαρίνη έχουν αναφερθεί ότι αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό διαφόρων κακοήθων κυτταρικών σειρών ανάμεσα στις οποίες ο καρκίνος του προστάτη, το κακοήθες μελάνωμα, καρκίνωμα του πνεύμονα και το μεταστατικό νεφρικό καρκίνωμα^[17].

Τέλος, *in vitro* πειραματικές μελέτες σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας αλλά και σε αντίστοιχες κυτταρικές σειρές ποντικών, έδειξαν ότι η 4-μεθυλο-7-υδροξυκουμαρίνη, γνωστή και ως 4-μεθυλουμπελιφερόνη (4MU), αποτελεί παράγοντα αναστολής της σύνθεσης του υαλουρονικού οξέος. Η εν λόγω κουμαρίνη συμβάλλει στον περιορισμό της σύνθεσης του υαλουρονικού οξέος και στην αναστολή της εξωγενούς αλληλεπίδρασης του με τους κυτταρικούς υποδοχείς CD44 και/ή RHAMM, που βρίσκονται στην κυτταρική επιφάνεια. Ποικίλες αναφορές κάνουν λόγο για τον ρόλο που διαδραματίζει η παρουσία του υαλουρονικού οξέος στις περιπτώσεις ογκογένεσης, κυρίως συμπαγών όγκων όπως τους γαστρικούς, μαστικούς ή των ωοθηκών όγκους, ενώ λιγότερα στοιχεία υποστηρίζουν την ίδια άποψη σχετικά με καρκίνους που σχετίζονται με αιματολογικές κακοήθειες^[18].



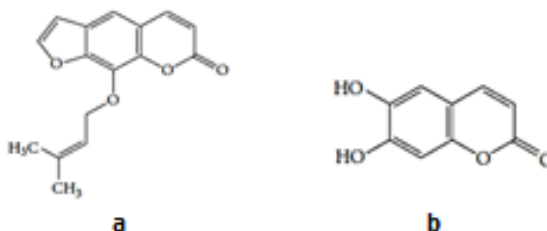
Εικόνα 8. Χημική δομή των φυσικών αντικαρκινικών κουμαρινών οσθόλη (a), γερανυλογερανυλόξυ κουμαρίνη (b), ουμπελιφερόνη (c), 4-μεθυλουμπελιφερόνη (d) και του χημικά σύνθετου 4-υποκατεστημένου θειοαιθερικού κουμαρινικού αναλόγου (e), αντίστοιχα.

1.3.2. Αντιφλεγμονώδης Δράση

Η φλεγμονή είναι ένα αρκετά περίπλοκο φαινόμενο που σχετίζεται με το αμυντικό σύστημα του ανθρώπινου οργανισμού. Το φαινόμενο αυτό προκύπτει μέσα από διάφορες χημικές και κυτταρικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στον οργανισμό λόγω της παρουσίας επιβλαβών ερεθισμάτων (επιμόλυνση, παρουσία ξένων αντισωμάτων, φυσικός τραυματισμός), και ανάλογα τη σοβαρότητα της κατάστασης λαμβάνει τοπικό ή γενικευμένο χαρακτήρα βάσει του ποσοστού συσσώρευσης μεσοκυττάρων υγρών και λευκοκυττάρων. Τυπικά συμπτώματα της φλεγμονής είναι η εμφάνιση πόνου, οιδήματος και τοπική αύξηση της θερμοκρασίας στο πάσχον ιστό του σώματος. Στις χρόνιες και οξείες περιπτώσεις φλεγμονών, η φλεγμονώδης απόκριση ενεργοποιείται από ποικίλους ανοσολογικούς παράγοντες-διαμεσολαβητές του οργανισμού. Διάφορα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα χρησιμοποιούνται για την θεραπεία φλεγμονωδών παθήσεων, πολλά μάλιστα εκ των οποίων προξενούν ανεπιθύμητες παρενέργειες στους ασθενείς όπως γαστρεντερικά έλκη και αιμορραγίες. Στην προσπάθεια εύρεσης νέων μη στεροειδών φαρμάκων κατά των φλεγμονών με ισχυρή δράση και παράλληλα περιορισμένη εμφάνιση παρενεργειών, οι κουμαρίνες φαίνεται να κατέχουν ένα πολλά υποσχόμενο μέλλον^[19].

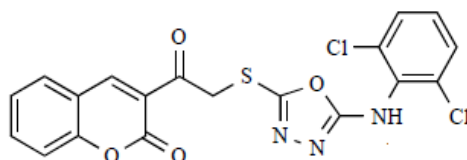
Διάφορα ετεροκυκλικά κουμαρινικά παράγωγα έχουν αποδειχθεί ότι κατέχουν σημαντικές αντιφλεγμονώδεις και αναλγητικές ιδιότητες, όπως η κουμαρίνη *ιμπερατορίνη* (imperatorin). Η εν λόγω κουμαρίνη έχει δείξει σε *in vitro* μελέτες ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση στην ανοσολογική απόκριση διαφόρων λιποπολυσακχαριτών (πρωτότυπες ενδοτοξίνες) σε μακροφάγα κύτταρα ποντικών αλλά και σε *in vivo* μελέτες σε ποντίκια εργαστηρίου, τα οποία έπασχαν από οίδημα του πέλματος λόγω της φλεγμονώδους δράσης της καραγενάνης. Η ιμπερατορίνη προκαλεί ανατολή της πρωτεϊνικής έκφρασης της συνθετάσης του νιτρικού οξειδίου και της κυκλοοξυγονάσης-2 (ένζυμο υπεύθυνο για την σύνθεση των προστανοειδών, τα οποία εμπλέκονται σε πλήθος παθοφυσιολογικών λειτουργιών, όπως τη δημιουργία φλεγμονών). Η αναστολή των ενζύμων αυτών επιφέρει ανακούφιση από τα συμπτώματα πόνου της φλεγμονής^[20].

Επίσης, η εσκουλετίνη (esculetin) έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζει αντιφλεγμονώδη δραστηριότητα σε συμπτώματα κολίτιδας αρουραίων που προκαλούνται από την δράση του τρινιτροβενζολιοσουλφονικού οξέος (trinitrobenzenesulfonic acid). Η εσκουλετίνη αναστέλλει, επίσης, την δράση των ενζύμων κυκλοοξυγονάση και λιποξυγονάση (οικογένεια μεταλλοενζύμων που καταλύουν την διοξυγόνωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων) αλλά και το σχηματισμό των ουδετερόφιλων ανιόντων υπεροξειδίου [21-22].



Εικόνα 9. Χημική δομή ιμπερατορίνης (a) και εσκουλετίνης (b), αντίστοιχα.

Ακόμη, μεγάλη ερευνητική προσπάθεια γίνεται για τη σύνθεση νέων κουμαρινικών αναλόγων, με σκοπό να «ενσωματωθεί» στον κουμαρινικό σκελετό η δράση ποικίλων αξιόλογων βιοδραστικών ενώσεων όπως οι πυραζολίνες, οι πυριμιδίνες και οι οξαδιαζόλες. *In vivo* πειραματικές μελέτες, για παράδειγμα, έχουν δείξει ότι καινοτόμα οξαδιαζολικά παράγωγα κουμαρινών εμφανίζουν έντονη αντιφλεγμονώδη και αναλγητική δράση μετά από 3ωρη και 5ωρη χορήγηση σε ποντίκια εργαστηρίου (έως και 81.3% μείωση της φλεγμονής). Η χημική δομή ενός από τα εξεταζόμενα παράγωγα της εν λόγω ερευνητικής μελέτης, παρουσιάζεται στην **εικόνα 10** που ακολουθεί [23].



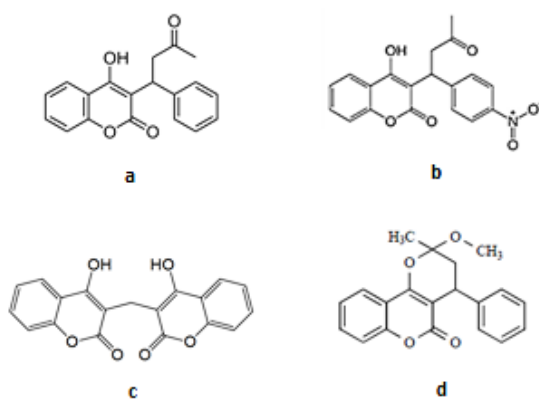
Εικόνα 10. Αντιφλεγμονώδες οξαδιαζολικό παράγωγο κουμαρίνης.

1.3.3. Αντιθρομβωτική-Αντιπηκτική Δράση

Η δράση των φυσιολογικών συστημάτων που ελέγχουν τη κυκλοφορία του αίματος στον ανθρώπινο οργανισμό θεωρείται αρκετά πολύπλοκη. Η ροή του αίματος πρέπει να παραμείνει συνεχής και σταθερή στο εσωτερικό του αγγειακού συστήματος ενώ αντίθετα το αίμα πρέπει να αποκτά γρήγορα μια πιο πηκτή μορφή όταν εκτίθεται σε μη ενδοθηλιακές επιφάνειες ενός τραυματισμένου αγγείου. Όταν σχηματίζονται ενδοαγγειακοί θρόμβοι τότε ένα σύστημα ινωδόλυσης ενεργοποιείται για την αποκατάσταση της ρευστότητας του αίματος, ώστε να αποτραπούν τόσο η θρόμβωση όσο αντιθέτως και η περίπτωση αιμορραγίας. Ακριβώς επειδή πρέπει να υπάρχει μια αυστηρή ισοστάθμιση της πήξης και αντίστοιχα της ροής του αίματος στον οργανισμό για την

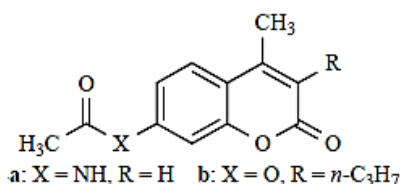
πρόληψη σοβαρών παθήσεων, η ανάγκη για εύρεση νέων αντιθρομβωτικών φαρμάκων, μη τοξικών, θεωρείται επιτακτική. Τα συνήθη αντιπηκτικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται στις μέρες μας, συνήθως στοχεύουν στην αποτροπή της επέκτασης των σχηματιζόμενων θρόμβων στις περιπτώσεις φλεβίτιδας και βαριάς φλεβικής θρόμβωσης. Με αυτόν τον τρόπο εγκεφαλικά επεισόδια, εμβολές, καρδιοαγγειακά νοσήματα και διαφόρων ειδών θρομβώσεις αποτρέπονται στο μέγιστο δυνατό βαθμό^[24].

Οι κουμαρίνες και τα παράγωγα αυτών μπορούν να δράσουν ως αντιπηκτικοί παράγοντες είτε ως αναστολείς της συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων είτε ως ανταγωνιστές της βιταμίνης-Κ στην σύνθεση της προθρομβίνης, η οποία και αποτελεί ένας από τους πολλούς παράγοντες της πήξης. Κουμαρινικά αντιπηκτικά αποτελούν η *βαρφαρίνη*, η *ακενοκουμαρόλη*, η *δικουμαρόλη* και η *κυκλοκουμαρόλη* εδώ και αρκετές δεκαετίες. Η βαρφαρίνη συγκεκριμένα χρησιμοποιείται ευρέως λόγω της καλής και γρήγορης απορρόφησης της μέσω της γαστρεντερικής οδού. Ωστόσο λόγω των περιορισμένων θεραπευτικών δυνατοτήτων και του κινδύνου που εμφανίζουν πολλοί ασθενείς κατά την αντιπηκτική αγωγή λόγω ηλικίας ή διαφόρων συνθηκών, η κλινική τους δράση παραμένει κάπως περιορισμένη^[25-27].



Εικόνα 11. Χημική δομή των αντιπηκτικών κουμαρινών βαρφαρίνη (a), ακενοκουμαρόλη (b), δικουμαρόλη (c) και κυκλοκουμαρόλη (d), αντίστοιχα.

Πολλές επιστημονικές μελέτες έχουν στραφεί στην εύρεση νέων κουμαρινικών αντιπηκτικών με διευρυμένες δυνατότητες χρήσης και ελαττωμένες παρενέργειες. Οι ακεταμιδο-υποκατεστημένες κουμαρίνες, για παράδειγμα, έχουν αποδειχθεί κατάλληλα υποστρώματα των τρανσακετυλασών καλρετικουλίνης των αιμοπεταλίων, επηρεάζοντας έτσι τα επίπεδα νιτρικού οξειδίου στα ανθρώπινα αιμοπετάλια^[28]. Πιο συγκεκριμένα, η παρουσία της 7-N-ακετυλοαμινο ομάδας στον κουμαρινικό σκελετό ασκεί σημαντική επίδραση στην δράση των ενζύμων αυτών. Ακόμη οι ακετοξυ-υποκατεστημένες κουμαρίνες έχουν δείξει σε μελέτες να αναστέλλουν επιτυχώς την τάση των αιμοπεταλίων για συσσωμάτωση. Η δράση ωστόσο των παραγώγων αυτών μπορεί να ελαττωθεί με την υποκατάσταση στην θέση 3- μεγάλων ακυλο ομάδων, λόγω της στερεοχημικής παρεμπόδισης των ακετοξυ υποστρωμάτων ως προς την πρόσβαση τους στο ενεργό κέντρο της τρανσακετυλάσης της καλρετικουλίνης^[29].



Εικόνα 12. Χημικός τύπος της ακεταμιδο-υποκατεστημένης (a) και ακετοξυ-υποκατεστημένης (b) κουμαρίνης.

1.3.4. Αντιοξειδωτική Δράση

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (*Reactive Oxygen Species*) αποτελούν ένα πλήθος ασταθών παραπροϊόντων των ενεργών κυττάρων των αερόβιων οργανισμών. Η φυσιολογική παραγωγή τους κυμαίνεται σε χαμηλά ή μέτρια επίπεδα, ενώ σε φυσιοπαθολογικές περιπτώσεις όπως η φλεγμονή, η παραγωγή τους γίνεται πιο εκτεταμένη. Οι ενώσεις αυτές περιέχουν ένα ή περισσότερα αδέσμευτα ζεύγη ηλεκτρονίων και ταξινομούνται σε τέσσερις κατηγορίες: τις ελεύθερες ρίζες, όπως η ρίζα υδροξυλίου (OH^-), τα ιόντα, όπως το υποχλωριώδες ανιόν (ClO^-) που προκύπτει από τη διάσπαση του υποχλωριώδους οξέως ($HClO$), το μοριακό μίγμα ελευθέρων ριζών και ιόντων, όπως το ανιόν υπεροξειδίου ($\cdot O_2^-$) και τέλος σε περιορισμένες μοριακές μορφές όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2). Η κυριότερη πηγή παραγωγής των ομάδων ROS στον ανθρώπινο οργανισμό είναι τα μιτοχόνδρια, μέσω των ενδογενών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση, αλλά και το σύστημα του κυτοχρώματος P450 καθώς και το ένζυμο οξειδάση της ξανθίνης^[30-31].

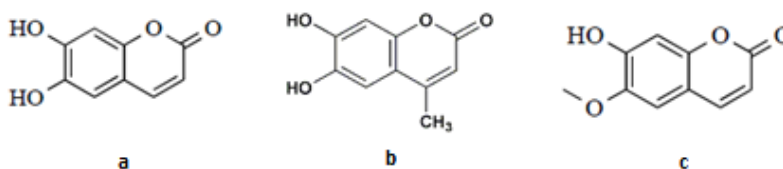
Τόσο οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) όσο και οι δραστικές μορφές αζώτου (RNS) όντας σε επιτρεπτά επίπεδα συγκέντρωσης, παίζουν καθοριστικό ρόλο σε πολλές φυσιολογικές αντιδράσεις όπως οι αντιδράσεις μεταγωγής σήματος στις κυτταρικές αλληλεπιδράσεις, η μιτογονική απόκριση αλλά και η παραγωγή τους από τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα του οργανισμού συμβάλλει στην άμυνα έναντι παθογόνων μικροοργανισμών^[32-33].

Ωστόσο, η αυξημένη συσσώρευση ελευθέρων ριζών στον οργανισμό επιφέρει σοβαρές επιπτώσεις για την ομαλή λειτουργία του, εφόσον διαταράσσεται το αμυντικό σύστημα του οργανισμού, η πλειοψηφία των ιστών πλήγεται και ως αποτέλεσμα αυτής της γενικευμένης ανισορροπίας δημιουργείται ένα έντονο οξειδωτικό στρες. Το οξειδωτικό στρες σχετίζεται με πολλές παθολογικές καταστάσεις όπως οι γενετικές βλάβες και οι βλάβες σε πρωτεϊνικό και λιπιδιακό επίπεδο, οι οποίες είναι υπεύθυνες για παθήσεις όπως ο καρκίνος, η κυτταρική γήρανση, διάφορες εκφυλιστικές διαταραχές νευρικής φύσεως όπως η πολλαπλή σκλήρυνση, φλεγμονές, αθηρογένεση και άλλες πολλές ακόμη^[34-36].

Ως εκ τούτου, θεωρείται αναγκαία η εφαρμογή και παράλληλα η εύρεση νέων φαρμάκων που εμφανίζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση για την καταπολέμηση του οξειδωτικού στρες και την πρόληψη διαφόρων παθήσεων. Οι αντιοξειδωτικοί παράγοντες αναστέλλουν τον σχηματισμό των ROS είτε συμβάλλουν στην πλήρη εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών. Οι κουμαρίνες με τα πολυάριθμα φυσικά ή χημικά σύνθετα παράγωγα τους,

χαρακτηρίζονται μαζί με τα φλαβονοειδή, ως ενώσεις με ιδιαίτερα ισχυρή αντιοξειδωτική δράση [37-38].

Η αντιοξειδωτική δράση των κουμαρινών περιλαμβάνει πολλούς διαφορετικούς μοριακούς μηχανισμούς ανάλογων με αυτών των φλαβονοειδών. Η θέση και το είδος της υποκατάστασης στον αρωματικό δακτύλιο του κουμαρινικού σκελετού, επηρεάζει σημαντικά την αντιοξειδωτική δράση των ενώσεων αυτών [39]. Το πλήθος των ομάδων υδροξυλίου στον κουμαρινικό δακτύλιο σχετίζεται άμεσα με την καταστολή των ιδιοτήτων των ελεύθερων ριζών. Παραδείγματος χάριν, η κουμαρίνη *εσκουλετίνη* και το αντίστοιχο παράγωγο αυτής, η *4-μεθυλο εσκουλετίνη*, λόγω της παρουσίας δύο υδροξυλο ομάδων στο βενζολικό δακτύλιο, εμφάνισαν αρκετά υψηλή αντιοξειδωτική δραστηριότητα, μέσω της πρόσδεσης τους στο ένζυμο οξειδάση της ξανθίνης. Το αντίστοιχο μεθοξυ-υποκατεστημένο κουμαρινικό παράγωγο, *σκοπολετίνη*, εμφάνισε συγκριτικά με τα δύο προαναφερθέντα μόρια, μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στις διαφορετικές δομές συντονισμού που εμφανίζει η οξειδωμένη μορφή της εσκουλετίνης, λόγω της σταθερότητας που της παρέχει ο ορθο-κινονικός της χαρακτήρας [40].

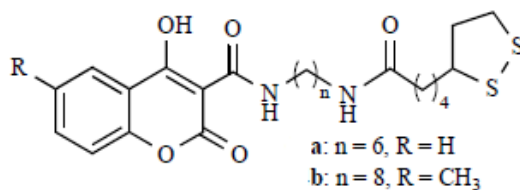


Εικόνα 13. Μοριακή δομή της εσκουλετίνης (a), της 4-μεθυλο εσκουλετίνης (b) και της σκοπελετίνης (c), αντίστοιχα.

Γενικά η θέση των δύο υδροξυλίων στον βενζολικό δακτύλιο έχει βρεθεί ότι επηρεάζει εμφανώς και την δράση των διυδροξυ-4-μεθυλο-υποκατεστημένων κουμαρινών, με τις ορθο-OH υποκατεστημένες κουμαρίνες να εμφανίζουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τα αντίστοιχα μετα-υποκατεστημένα ανάλογα. Μια πιθανή εξήγηση αυτής της διαφοράς αποδίδεται στην αυξημένη σταθερότητα της κατεχολικής ρίζας των ορθο-OH (αυξημένη ικανότητα ανταλλαγής ηλεκτρονίων) αλλά και στην ικανότητα τους να σχηματίζουν χηλικά μεταλλικά σύμπλοκα [41-42]. Ωστόσο αν συγκρίνει κανείς τα ορθο-OH υποκατεστημένα ανάλογα θα παρατηρήσει σημαντικές διαφορές στην δράση τους. Τα 7,8-υποκατεστημένα ανάλογα έχουν δείξει σε έρευνες αποτελεσματικότερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα 6,7-ανάλογα. Έχει προταθεί ότι πιθανή αιτία αυτής της διαφορετικής συμπεριφοράς είναι η υψηλότερη ικανότητα των 7,8-υποκατεστημένων αναλόγων να επισυνάπτουν ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου, οι οποίοι προστατεύουν την ομάδα υδροξυλίου από το σχηματισμό πιθανών διαμοριακών δεσμών υδρογόνου με τον διαλύτη του συστήματος, χάνουν έτσι την ικανότητα τους να αποσπούν άτομα υδρογόνου [43].

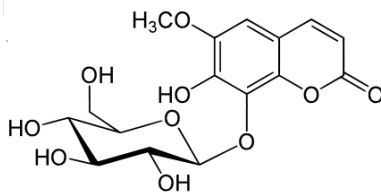
Προσφάτως σε έρευνα τους οι Rodríguez και συνεργάτες (2011) υποστήριξαν ότι η παρουσία των 3-αρυλο υποκαταστατών οδηγεί σε παράγωγα με ιδιαίτερως υψηλή

αντιοξειδωτική δράση^[44]. Επίσης, διάφορα 3-καρβοξαμидικά κουμαρινικά ανάλογα έδειξαν σημαντική *in vivo* αντιφλεγμονώδη δράση, η οποία και αποδίδεται στην υψηλή αντιοξειδωτική τους ιδιότητα στην εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών OH^- . Το λιποϊκό οξύ, ένα φυσικά απαντώμενο οξύ, βρίσκεται τόσο στα ευκαρυωτικά όσο και στα προκαρυωτικά κύτταρα σε δύο βασικές μορφές: την ανηγμένη διθειολική μορφή και την οξειδωμένη δισουλφιδική μορφή. *In vitro* και *in vivo* μελέτες έδειξαν ότι η αντιοξειδωτική δράση του α-λιποϊκού οξέος φαίνεται να ενισχύεται δραστικά μετά από την σύμπτυξη του με το κουμαρινικό υπόστρωμα, οδηγώντας έτσι σε υψηλότερες επιδόσεις ως προς την εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών OH^- ^[45].



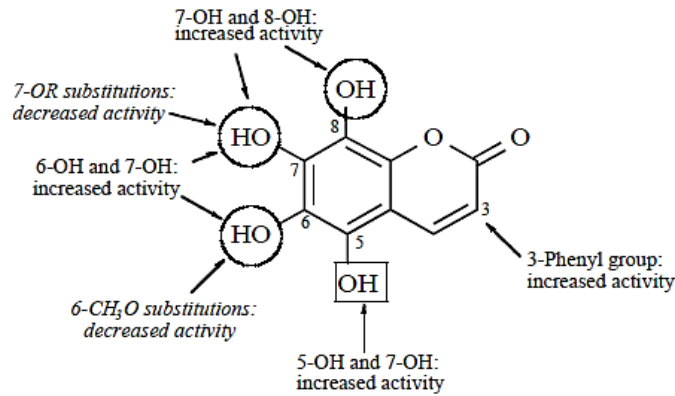
Εικόνα 14. Κουμαρινικά παράγωγα του λιποϊκού οξέος.

Τέλος, η γλυκοζυλιωμένη μορφή της φραξετίνης, η κουμαρίνη *φραξίνη* (fraxin), των φυτικών στελεχών *Weigela florida*, έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζει εντυπωσιακή ικανότητα στην εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών ενώ παράλληλα προστατεύει τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες που προκαλεί η δράση του υπεροξειδίου του υδρογόνου^[46].



Εικόνα 15. Χημική δομή της φραξίνης.

Εν κατακλείδι, λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω δομικά χαρακτηριστικά, η αντιοξειδωτική ικανότητα των κουμαρινών συναρτήσεται της δομικής τους ποικιλομορφίας παρουσιάζεται συγκεντρωτικά στην **εικόνα 16** που ακολουθεί^[47].



Εικόνα 16. Συνοπτική απεικόνιση της αντιοξειδωτικής δράσης των κουμαρινών συναρτήσει των δομικών τους χαρακτηριστικών.^[47]

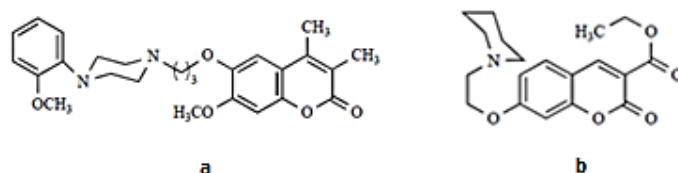
1.3.5. Νευροπροστατευτική Δράση

Οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις αφορούν ένα μεγάλο εύρος χρόνιων και προοδευτικά εξελισσόμενων παθήσεων οι οποίες σχετίζονται με τις διαταραχές του νευρικού συστήματος. Μερικές από τις συχνότερες νευροεκφυλιστικές νόσους της σύγχρονης εποχής είναι το Αλτσχάιμερ, η νόσος του Parkinson, η πολλαπλή σκλήρυνση, η νόσος του Huntington και άλλες πολλές. Παρά το γεγονός ότι οι αιτίες εμφάνισης και τα παθολογικά χαρακτηριστικά κάθε μίας από αυτές τις παθήσεις διαφέρουν μεταξύ τους, το τελικό αποτέλεσμα παραμένει το ίδιο και αφορά τον εκφυλισμό των νευρικών κυττάρων.

Πιο συγκεκριμένα, η νόσος του Αλτσχάιμερ αποτελεί ίσως την συχνότερα εμφανιζόμενη νευροεκφυλιστική νόσο για τα άτομα της τρίτης ηλικίας στον σύγχρονο δυτικό κόσμο. Η πάθηση αυτή σχετίζεται με διάφορες περιπτώσεις φλεγμονής του οργανισμού, με την συσσώματωση των τ πρωτεϊνών, την ιζηματοποίηση των β -αμυλοειδών πρωτεϊνών, το έντονο οξειδωτικό στρες και την δυσλειτουργία σήμανσης της ακετυλοχολίνης στο βασικό πρόσθιο εγκέφαλο. Πολλές ερευνητικές μελέτες έχουν γενικά διεξαχθεί για την εύρεση φαρμάκων που να αποτρέπουν ή έστω να περιορίζουν την εκδήλωση της πάθησης, συμπεριλαμβανομένων σε αυτά και διαφόρων κουμαρινών αναλόγων^[48-49].

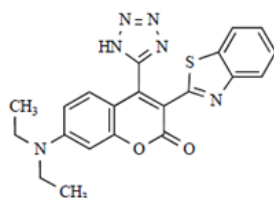
Η ακετυλοχολινεστεράση (AChE) αποτελεί ένα από τα κυρίαρχα ένζυμα του μυϊκού και νευρικού συστήματος, η οποία παίζει καταλυτικό ρόλο στην διαβίβαση των νευρικών ερεθισμάτων. Το συγκεκριμένο ένζυμο καταλύει την αντίδραση υδρολυτικής διάσπασης του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη, στις χολινεργικές και νευρομυϊκές συνάψεις, με αποτέλεσμα να διακόπτεται η διέγερση των νευρώνων κατά τη μετάδοση του σήματος. Η σύνθεση καινοτόμων φαρμάκων που να δρουν ως αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης θεωρείται επομένως επιτακτική ανάγκη. Η κουμαρίνη *ενσακουλίνη* (Ensaaculin) αποτελεί έναν γνωστό αναστολέα της AChE για την θεραπεία της νόσου του Αλτσχάιμερ, με κλινική χρήση της υδροχλωριωμένης της μορφής KA-672^[50-51].

Οι Joyce Izidoro da Silva και συνεργάτες (2013) απέδειξαν μέσω του ερευνητικού τους έργου ότι η *πιπεριδυλο κουμαρίνη* (piperidyl coumarin) της **εικόνας 18** μπορεί να χαρακτηριστεί ως ιδιαίτερα ισχυρός αναστολέας της AChE με παρεμποδιστική δράση έως και 85% στα 200μM. Η παρουσία της πιπεριδυλο ομάδας φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά την δράση του συγκεκριμένου αναλόγου, βελτιώνοντας κατά πολύ την παρεμποδιστική του ικανότητα ^[52].



Εικόνα 17. Η ενσακουλίνη (a) και το καινοτόμο πιπεριδυλο κουμαρινικό ανάλογο (b), ως αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης, αντίστοιχα.

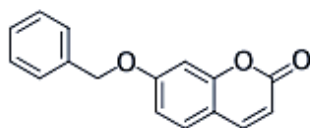
Επίσης, διάφορα κουμαρινικά είδη έχουν εξεταστεί για την δράση τους κατά της ιζηματοποίησης των β-αμυλοειδών πρωτεϊνών στον εγκέφαλο, με σκοπό την πρόληψη της κυτταρικής απόπτωσης των νευρικών κυττάρων ^[53]. Η τετραζολο τροποποιημένη κουμαρίνη της **εικόνας 18** για παράδειγμα, έχει δείξει πειραματικά αξιόλογη παρεμποδιστική δράση στην τάση συσσωμάτωσης των β-αμυλοειδών πρωτεϊνών ^[54]. Η παρουσία της βενζοθειαζολικής ομάδας και της ομάδας του τετραζολίου υποστηρίζεται ότι αποδίδουν στο μόριο την ισχυρή παρεμποδιστική του δράση, με την πολλαπλή διακοπή της εξάπλωσης της νόσου σε διάφορες θέσεις.



Εικόνα 18. Δομή του anti-Alzheimer τετραζολο κουμαρινικού αναλόγου.

Ακόμη, αξιοσημείωτη θεωρείται η εφαρμογή διαφόρων κουμαρινικών ειδών για την καταπολέμηση της εκφυλιστικής νόσου του Parkinson, δρώντας ως αναστολείς της μονοαμινοξειδάσης (MAO). Η μονοαμινοξειδάση είναι ένα ένζυμο που ευθύνεται για την οξειδωτική αποαμίνωση των ενδογενών μονοαμινο νευροδιαβιβαστών. Το ένζυμο παρουσιάζεται σε δύο βασικές μορφές, την MAO-A και MAO-B μορφή, που είναι διαφορετικά κατανομημένες στους ιστούς. Κατά κύριο λόγο μόνο αναστολείς της MAO-B μορφής έχουν μέχρι στιγμής χρησιμοποιηθεί για την θεραπεία της νόσου ^[55-56].

Βιβλιογραφικές αναφορές κάνουν λόγο για κουμαρινικά είδη με ακυλο ή βενζυλοξυ υποκατεστημένες ομάδες στις θέσεις 3- ή 7- του κουμαρινικού υποστρώματος, τα οποία εμφανίζουν βελτιωμένες ιδιότητες ως προς την αναστολή της MAO-B. Ανάμεσα στα παράγωγα αυτά, η 7-βενζυλοξυ κουμαρίνη φαίνεται να έχει δείξει πειραματικά καλή παρεμποδιστική δραστηριότητα ^[57].



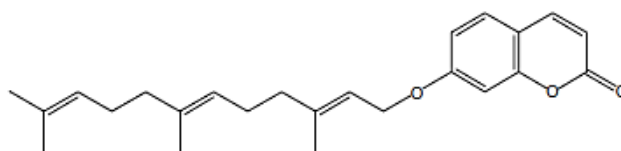
Εικόνα 19. Χημική δομή της αντιοξειδωτικής 7-βενζυλοξυ κουμαρίνης.

Τέλος, η κουμαρίνη *οσθόλη* έχει προταθεί για πιθανή θεραπευτική χρήση έναντι της πολλαπλής σκλήρυνσης, μιας ευρέως διαδεδομένης νευρολογικής πάθησης ^[58].

1.4. Φαρμακευτικό Προφίλ των Ισοπρενυλοξυ Κουμαρινών

Η ανάπτυξη και συνάμα η εφαρμογή νέων αποτελεσματικότερων και ασφαλέστερων χημειοπροστατευτικών παραγόντων θεωρείται ένα από τα φλέγοντα αντικείμενα μελέτης, της σύγχρονης εποχής. Πολλά φυσικά προϊόντα έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί για τις εξαιρετικές τους χημειοπροστατευτικές δράσεις. Ανάμεσα σε αυτά συγκαταλέγονται οι τερπενοειδείς κουμαρίνες και τα παράγωγα τους. Πολλές ισοπρενυλοξυ κουμαρίνες έχουν απομονωθεί από φυτικά είδη του γένους *Ferula* και φαίνεται να κατέχουν αξιοσημείωτες αντικαρκινικές ιδιότητες σε ειδικές πειραματικές μελέτες που έχουν μέχρι στιγμής διεξαχθεί. Για παράδειγμα, το μηδικό σίλφιο (*asafoetida*), ένα ελαιορητινώδες κόμμα, έχει βρεθεί ότι κατέχει πολλά αξιόλογα βιοδραστικά αντικαρκινικά συστατικά, ανάμεσα στα οποία και πολλά σεσκιτερπενοειδή κουμαρινικά ανάλογα όπως η ουμπελιπρενίνη (*umbelliprenin*), η ωραπτένη (*aurartene*), η φαρνεσουφερόλη, η κονφερόνη (*conferone*), η *diversin* και άλλα πολλά ακόμη ^[59].

Πιο συγκεκριμένα, η 7-φαρνεζυλοξυ κουμαρίνη, γνωστή ως ουμπελιπρενίνη, έχει βρεθεί σε πολλά φυτικά είδη της οικογένειας *Ferula*, όπως το *Citrus Limon*. Η ουμπελιπρενίνη έχει εξετασθεί σε διάφορες ερευνητικές μελέτες για τις φαρμακευτικές και βιολογικές της ιδιότητες. Έχει αναφερθεί ότι η συγκεκριμένη ένωση κατέχει σημαντική παρεμποδιστική δράση έναντι της δράσης των μεταλλοπρωτεασών εξωκυττάριου δικτύου. Οι μεταλλοπρωτεάσες είναι ένζυμα, η δραστηριότητά των οποίων κατέχει κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη των καρκινικών όγκων και των πολλαπλών διεργασιών της εισβολής και της μετάστασης αυτών. Πέραν βέβαια της κατασταλτικής επίδρασης που ασκεί η ουμπελιπρενίνη στα καρκινικά κύτταρα, συμβάλλει παράλληλα στην πρόληψη γενετικών ή χρωμοσωμικών βλαβών, επαγόμενες από την δράση του H_2O_2 ^[60-61]. Επιπλέον, επιστημονικές αναφορές κάνουν λόγο για την δράση της ουμπελιπρενίνης ως αναστολέα της παραγωγής της κόκκινης χρωστικής *Serratia marcescens* ^[62], για την αντιεϊσμανιακή της δράση απέναντι στα προμαστιγοφόρα ^[63] αλλά και για την αποπτωτική της δράση έναντι των κυτταρικών σειρών κακοήθους μελανώματος M4Beu. Τα καρκινικά κύτταρα M4Beu παρουσίασαν μεγάλη ευαισθησία στην δράση της ουμπελιπρενίνης, συγκριτικά με την αντικαρκινική κουμαρίνη σισπλατίνη ^[64].



Εικόνα 20. Δομή ουμπελιπρενίνης.

Οι Maria Jun και συνεργάτες (2014) αναφέρουν σε έρευνα τους ότι η ουμπελιπρενίνη παρουσιάζει αξιολογητέα κυτοτοξική δράση έναντι των παγκρεατικών καρκινικών σειρών PANC-1. Συγκεκριμένα, η μελέτη αφορά την σύνθεση και τον χαρακτηρισμό διαφόρων 3-, 6- και 7-ισοπρενυλο κουμαρινικών αναλόγων. Η κυτοτοξική δράση των αναλόγων καθορίζεται τόσο από το μήκος της ισοπρενυλο αλυσίδας (prenyl (5C), geranyl (10C), farnesyl (15C) group) όσο και από την στόχευση αυτής στις διάφορες θέσεις του κουμαρινικού σκελετού, όπως φαίνεται ενδεικτικά στον **Πίνακα 1** παρακάτω. Παρατηρείται ότι οι ισοπρενυλο υποκατεστημένες κουμαρίνες με την μακρύτερη σεσκιτερπενική αλυσίδα, αυτή του φαρνεσυλίου, εμφανίζουν ισχυρότερη κυτοτοξική δράση σε σχέση με τις υπόλοιπες [65]. Αυτό δικαιολογείται και βιβλιογραφικά, εφόσον η ισοπρενοειδής αλκοόλη, φαρνεσόλη, έχει παρατηρηθεί ότι επιφέρει αποπτωτική επίδραση και γενικά διακοπή του κυτταρικού κύκλου σε διάφορα είδη καρκινώματος. Η αντικαρκινική και χημειοπροστατευτική δράση της φαρνεσόλης μπορεί να ενεργήσει είτε στην αρχή είτε και σε μεταγενέστερο στάδιο εξάπλωσης της καρκινογένεσης, με τον περιορισμό της ζημιάς που υφίστανται οι κλώνοι DNA από την δράση των καρκινογόνων ουσιών. Η φαρνεσόλη συν τοις άλλοις, συμβάλλει στην αναστολή της ζημιογόνου δράσης των ελευθέρων ριζών (ROS) που πολλές φορές οδηγούν στην ανάπτυξη σοβαρών παθολογιών, με την ενεργοποίηση για παράδειγμα του μονοπατιού *NP-jb* και την έκφραση ειδικών φλεγμονωδών γονιδίων ως μέρος της πρωτεϊνικής απόκρισης των ξεδιπλωμένων πρωτεϊνικών υποστρωμάτων (UPR) [66].

Πίνακας 1. *In vitro* κυτοτοξική αξιολόγηση (LC₅₀/μM) των χημικά σύνθετων ισοπρενυλο κουμαρινών 1-9 στις παγκρεατικές κυτταρικές σειρές PANC-1, υπό συνθήκες πλούσιες (ND) και μη (NR) σε θρεπτικά συστατικά. [65]

Series	Compound	LC ₅₀ (μM) ND	LC ₅₀ (μM) NR
1	1	>100	>100
	2	37	>100
	3	12 ¹⁶	>100
2	4	>100	>100
	5	12	>100
	6	4	>100
3	7	83 ¹⁶	>100
	8	21	>100
	9	18	>100

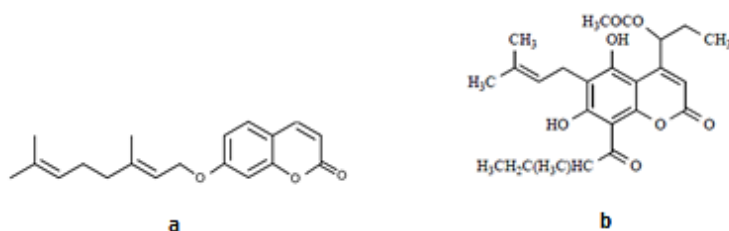
Οι Iranshahi, M. και συνεργάτες (2009) εξέτασαν *in vitro* την ουμπελιπρενίνη για την αντιοξειδωτική –αντιφλεγμονώδη δράση της έναντι του ενζύμου λιποξυγονάση (ένζυμο που

καταλύει την λιπιδιακή οξυγόνωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων) και βρήκαν ότι κατέχει μέτρια δράση στην εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών και την αναστολή της λιπιδιακής υπεροξειδωσης αλλά αξιοσημείωτη δράση στην αναστολή της λιποξυγονάσης^[67]. Η ίδια ερευνητική ομάδα σε *in vivo* μελέτη αξιολόγησε την χημειοπροστατευτική δράση της ουμπελιπρενίνης σε μοντέλα ποντικών δύο σταδίων, που εμφάνιζαν δερματικούς όγκους λόγω της χρήσης των καρκινικών διαμεσολαβητών περοξινιτρίτη (peroxynitrite) και TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate). Το δερματικά θηλώματα μειώθηκαν από 33,3 έως 86,6% κατά την θεραπεία των 9 έως και 20 εβδομάδων αντίστοιχα. Οι όγκοι των ποντικών μειώθηκαν έως 45% κατά το στάδιο ανάπτυξης τους στην 20η εβδομάδα, ποσοστό σχεδόν ισοδύναμο με τα δείγματα αναφοράς της κουρκουμίνης^[68].

Επίσης, πολυάριθμες αναφορές έχουν γίνει για την δράση της φυσικής αντιοξειδωτικής ισοπρένυλης κουμαρίνης, ωραπτένης (7-γερανυλοξυ κουμαρίνη). Η συγκεκριμένη τερπενοειδής κουμαρίνη έχει απομονωθεί από διάφορα φυτικά είδη της οικογένειας Rutaceae, όπως το εσπεριδοειδές *grapefruit*. Η ωραπτένη έχει αναφερθεί ότι κατέχει σημαντική χημειοπροστατευτική δράση έναντι της χημικώς προκαλούμενη καρκινογένεσης. Έχει παρατηρηθεί ότι μέσω συστηματικής διατροφικής χορήγησης, η ωραπτένη έχει αυξήσει σημαντικά την δραστηριότητα των αποτοξινωτικών ενζύμων, αναγωγή της κινόνης και τρανσφεράση-S της γλουταθειόνης, στο συκώτι και το παχύ έντερο των ποντικών εργαστηρίου. Περαιτέρω *in vivo* μελέτες έχουν δείξει ότι η χορήγηση της ωραπτένης συμβάλλει στην αύξηση των μακροφάγων και των λεμφοκυττάρων του οργανισμού των ποντικών, κάνοντας έμμεσα αναφορά στην αντινεοπλασματική της δράση. Πιθανές αιτίες θεωρούνται η μιτογόνα ενεργότητα της ωραπτένης, η οποία οδηγεί στην αύξηση της λεμφοκυτταρικής απόκρισης αλλά και η συμβολή της στην έγκαιρη ενεργοποίηση των μακροφάγων. Ωστόσο, οι ακριβείς ρυθμιστικές επιδράσεις της ωραπτένης στην ανοσολογική λειτουργία των ανώτερων οργανισμών δεν έχουν πλήρως μελετηθεί. Επιπλέον, οι Murakami A. και συνεργάτες (2000) αναφέρουν ότι η ωραπτένη καταστέλλει την παραγωγή των ανιόντων υπεροξειδίου από πάσχοντα φλεγμονώδη λεμφοκύτταρα. Στην ίδια μελέτη εξετάστηκε η αντιφλεγμονώδης δράση του μορίου, συγκριτικά με το ανάλογο της, την ουμπελιφερόνη, σε ένα πρότυπο μοντέλο δέρματος ποντικού. Η χορήγηση της ωραπτένης κατέστειλε σημαντικά τον σχηματισμό οιδήματος καθώς και την παραγωγή των ελευθέρων ριζών εν αντιθέσει με την ουμπελιφερόνη. Η παρουσία της γερανυλοξυ ομάδας φαίνεται να ενισχύει την κυτταρική πρόσληψη/ενσωμάτωση της ωραπτένης και έτσι μπορεί να επιδρά αποτελεσματικότερα στις βιοχημικές διεργασίες που επιτελούνται στον οργανισμό^[69-70].

Τέλος, οι κουμαρίνες τύπου *Mammea* αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια ισοπρένυλοξυ 5,7-διυδροξυ-κουμαρινικών μεταβολιτών του είδους *Mammea Americana L.* και άλλων συναφών φυτικών ειδών με εξαιρετικές βιολογικές ιδιότητες. Η κουμαρίνη *Mammea E/BB* της **εικόνας 21** έχει εξεταστεί πειραματικά ότι αναστέλλει σημαντικά την ενεργότητα του παράγοντα (HIF-1), υπεύθυνο για τη διέγερση υποξικών συνθηκών στις καρκινικές

κυτταρικές σειρές μαστού T47D. Ακόμη, η ένωση αυτή μπορεί να καταστείλει την μεταστατική δράση των καρκινικών μαστικών κυττάρων MDA-MB-231, σε αρκετά χαμηλές συγκεντρώσεις μέσω της αλληλεπίδρασης που ασκεί στην μιτοχονδριακή δραστηριότητα των κυττάρων^[71].

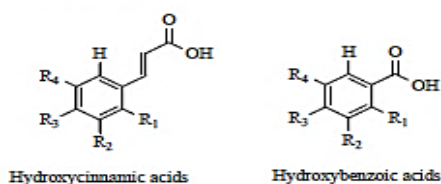


Εικόνα 21. Δομή των ισοπρενυλοξυ κουμαρινών ωραπτένη (a) και *Mammea E/BB* (b), αντίστοιχα.

1.5. Φαρμακευτικό Προφίλ Φαινολικών Οξέων

Τα φαινολικά οξέα αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες ευρέως διαδεδομένους σε πολυάριθμα φυτικά είδη. Όπως προδίδει το όνομα τους, πρόκειται ουσιαστικά για φαινόλες οι οποίες διαθέτουν καρβοξυλικό χαρακτήρα. Τα φυσικά φαινολικά οξέα ταξινομούνται από δύο μεγάλες δομικές κατηγορίες, τις υδροξυκιναμικές και τις υδροξυβενζοϊκές δομές. Παρά το γεγονός ότι ο βασικός σκελετός παραμένει ο ίδιος, το πλήθος και οι θέσεις των υδροξυ ομάδων στον αρωματικό δακτύλιο δημιουργούν μια μεγάλη ποικιλία ενώσεων, όπως φαίνεται και στο **Πίνακα 2**. Σε πολλές περιπτώσεις αλδεϋδικά ανάλογα προστίθενται στον κεντρικό δακτύλιο σχηματίζοντας νέες δομές, όπως η ένωση βανιλίνη για παράδειγμα. Μερικά από τα γνωστότερα φαινολικά οξέα είναι το κινναμικό, το καφεϊκό, το φερουλικό, το p-κουμαρικό, το γαλλικό, το γεντισικό, κ.α.

Πίνακας 2. Παράγωγα των φαινολικών οξέων βάσει της υδροξυκιναμικής και υδροξυβενζοϊκής δομής αντίστοιχα.



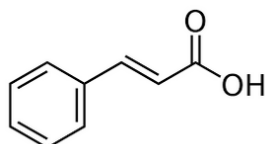
Derived from cinnamic acid:				
Ferulic acid:	R ₁ =H	R ₂ =OCH ₃	R ₃ =OH	R ₄ =H
p-Coumaric acid:	R ₁ =H	R ₂ =H	R ₃ =OH	R ₄ =H
Caffeic acid:	R ₁ =H	R ₂ =OH	R ₃ =OH	R ₄ =H
Sinapic acid:	R ₁ =H	R ₂ =OCH ₃	R ₃ =OH	R ₄ =OCH ₃
Cinnamic acid:	R ₁ =H	R ₂ =H	R ₃ =H	R ₄ =H
Derived from benzoic acid:				
Gallic acid:	R ₁ =H	R ₂ =OH	R ₃ =OH	R ₄ =OH
Vanillic acid:	R ₁ =H	R ₂ =OCH ₃	R ₃ =OH	R ₄ =H
Protocatechuic acid:	R ₁ =H	R ₂ =OH	R ₃ =OH	R ₄ =H
Gentistic acid:	R ₁ =OH	R ₂ =H	R ₃ =H	R ₄ =OH
Benzoic acid:	R ₁ =H	R ₂ =H	R ₃ =H	R ₄ =H

Τα φαινολικά οξέα σχετίζονται με ποικίλες βιολογικές διεργασίες του φυτικού συστήματος όπως την πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων, την πρωτεϊνική σύνθεση, διάφορες ενζυμικές δραστηριότητες, την φωτοσύνθεση, την αλληλοπάθεια και άλλες πολλές. Τα κινναμικά και βενζοϊκά παράγωγα βρίσκονται διεσπαρμένα σχεδόν σε όλα τα φυτικά είδη (φρούτα, λαχανικά, βότανα, δημητριακά). Ελάχιστα από αυτά μπορούν να βρεθούν ως αμιγώς «ελεύθερα» οξέα. Η πλειοψηφία τους σχηματίζει εστερικούς, αιθερικούς ή ακετυλοδεσμούς με διάφορα δομικά συστατικών των φυτών (πρωτεΐνες, λιγνίνη, κυτταρίνη), με φλαβονοειδή, με τερπένια αλλά και με μικρότερα χημικά μόρια όπως η γλυκόζη, το μηλικό ή το τρυγικό οξύ.

Τα φαινολικά οξέα χαρακτηρίζονται για την εξαιρετική αντιοξειδωτική τους δράση, που κατά κύριο λόγο οφείλεται στην δραστικότητα της φαινολικής ομάδας και των υδροξυ υποκαταστάσεων που διενεργούνται σε αυτή. Τα φαινολικά οξέα συμβάλλουν δραστικά στην εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών με την πρόσδοση πρωτονίων και την γενική ηλεκτρονιακή αλληλεπίδραση που αναπτύσσουν με αυτές. Οι υποκαταστάσεις του αρωματικού δακτυλίου επηρεάζουν σημαντικά την σταθερότητα της αντιοξειδωτικής τους δράσης, εφόσον οι ελεύθερες, οι εστεροποιημένες, οι γλυκοζυλιωμένες και μη δομές τους εμφανίζουν ελαφρώς διαφορετική δραστικότητα ^[72].

Αναφορικά με την επίδραση τους στην υγεία και την φυσιολογία του ανθρώπου, πολυάριθμες βιβλιογραφικές αναφορές κάνουν λόγο για την ευεργετική επίδραση της κατανάλωσης φυτικών τροφών, κυρίως φρούτων και λαχανικών, πλούσιων σε αντιοξειδωτικά συστατικά. Η δράση των αντιοξειδωτικών παραγόντων κατά του οξειδωτικού στρες που προκαλείται στον οργανισμό από την παραγωγή των ελευθέρων ριζών, συντελεί στην πρόληψη σοβαρών παθήσεων όπως ο καρκίνος, διάφορα ισχαιμικά και καρδιαγγειακά επεισόδια, φλεγμονές και νευροεκφυλιστικές παθήσεις. Παρά το γεγονός ότι η πλειοψηφία των φαινολικών παραγόμενων ενώσεων αφορά τα φλαβονοειδή, το 1/3 αυτής ωστόσο, αντιστοιχεί στα φαινολικά οξέα. Η μεταβολική δράση του φερολικού, του καφεϊκού, του χλωρογενικού και του σιναπικού οξέος έχει ερευνητικά μελετηθεί σε διάφορες *in vitro* και *in vivo* δοκιμασίες. Έχει βρεθεί ότι το 11-25% του φερούλικού οξέος που προσλαμβάνεται από τον οργανισμό, εκκρίνεται στα ούρα είτε γλυκοζυλιωμένο είτε στην αρχική του μορφή ^[73]. Το καφεϊκό οξύ έχει παρατηρηθεί επίσης ότι αναστέλλει την βιοσύνθεση των λευκοτριενίων, στοιχείων που συμμετέχουν στην εκδήλωση ανοσολογικών παθήσεων όπως το άσθμα ή άλλες οι αλλεργικές αντιδράσεις ^[74]. Επιστημονικές μελέτες έχουν δείξει συντοίς άλλους ότι το καφεϊκό οξύ και διάφορα εστερικά παράγωγα του μπορούν να δράσουν ως αντικαρκινικοί παράγοντες έναντι της καρκινογένεσης του παχέος εντέρου αλλά και ως αναστολείς της ανοσοκατασταλτικής δράσης του ιού HIV-1 ^[75-76]. Οι Maggi-Carveron και συνεργάτες (2001) έχουν συνδέσει μια σειρά φαινολικών οξέων με την αναστολή της AP-1 μεταγραφικής δραστηριότητας. Η AP-1 είναι μια πρωτεΐνη ενεργοποιητής που εμπλέκεται στις διεργασίες ελέγχου των φλεγμονών, στον κυτταρική διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμό ^[77].

Το κινναμικό οξύ, ένα ιδιαίτερα γνωστό φαινολικό οξύ, έχει ερευνητικά μελετηθεί για τις βιολογικές του ιδιότητες, όπως την αντιοξειδωτική, αντικαρκινική, αντιδιαβητική, ηπατοπροστατευτική, νευροπροστατευτική, αντιμικροβιακή και αντιχοληστερολαιμική του δράση. Το κινναμικό και τα παράγωγα του συμβάλλουν στην πρόληψη της πρωτεϊνικής οξειδωτικής βλάβης, στην μείωση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα αλλά και στην μείωση της χοληστερόλης (κυρίως της LDL) και των τριγλυκεριδίων^[78]. Η αντισπλασματική του δράση έναντι της λευχαιμικών κυτταρικών σειρών K562 καθώς και η αποπτωτική του δράση κατά των καρκινικών σειρών κακοήθους μελανώματος HT-144, έχουν αναφερθεί βιβλιογραφικά^[79-80]. Το κινναμικό οξύ έχει ακόμη μελετηθεί για την προστατευτική του δράση κατά της ιονίζουσας ακτινοβολίας. Σε *in vitro* μελέτη αποδείχθηκε ότι το κινναμικό οξύ απέτρεψε την πρόκληση γενετικών βλαβών λόγω της έκθεσης σε ακτινοβολία που υπέστησαν κυτταρικές σειρές ανθρώπινων λεμφοκυττάρων. Η ισχυρή αντιοξειδωτική δράση του κινναμικού οξέος απέναντι στις παραγόμενες δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και τις ελεύθερες ρίζες γενικά, μείωσε δραστικά τις βλάβες DNA που προκλήθηκαν στα κύτταρα^[81].

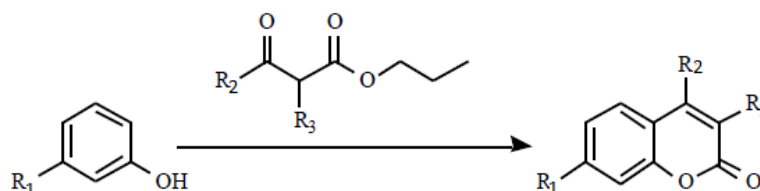


Εικόνα 22. Χημική δομή κινναμικού οξέος.

1.6. Συνθετική Πορεία Κουμαρινικών Αναλόγων

1.6.1. Αντίδραση Pechmann

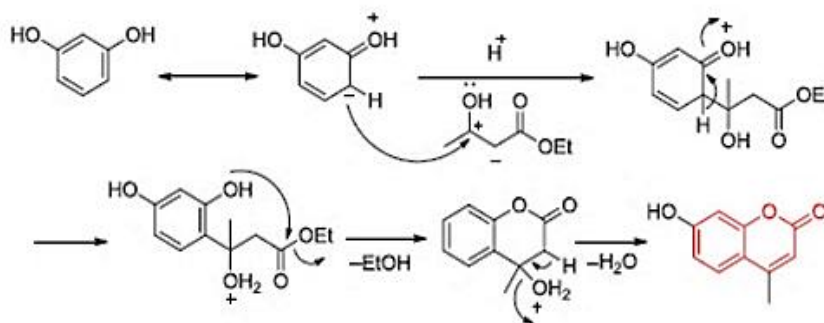
Η αντίδραση Pechmann χρησιμοποιείται ευρέως για την σύνθεση κουμαρινών. Συγκεκριμένα οι 4-υποκατεστημένες ή οι 3,4-διυποκατεστημένες κουμαρίνες προκύπτουν από την συμπύκνωση των φαινολών με β-κετοεστέρες, παρουσία όξινων καταλυτών, όπως το θειικό οξύ, το πεντοξείδιο του φωσφόρου, το τριφθορικό οξύ κ.α.. Στο **σχήμα 1** που ακολουθεί, απεικονίζεται συνοπτικά ο μηχανισμός της αντίδρασης Pechmann. Στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται ακετοξικοί εστέρες και παράγωγα αυτών, η αντίδραση αναφέρεται και ως Pechmann-Duisberg^{[82],[84-85]}.



Σχήμα 1. Σύνθεση κουμαρινών μέσω της αντίδρασης Pechmann^[3].

Όπως φαίνεται αναλυτικότερα στο **σχήμα 2**, η αντίδραση σύνθεσης μιας απλής 4-υποκατεστημένης κουμαρίνης, της 7-υδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνης, όπως υποστηρίχθηκε

από τους V. Calvino-Casilda et al., ξεκινάει με ηλεκτρονιόφιλη αρωματική υποκατάσταση στη φαινόλη (ρεσορκινόλη) και συγκεκριμένα στην ο-θέση ως προς το υδροξύλιο, από τον άνθρακα της καρβονυλικής ομάδας του β-κετοεστέρα (ακετοξικός αιθυλεστέρας), προς σχηματισμό των ενδιάμεσων. Μετέπειτα ακολουθεί λακτονοποίηση με απόσπαση νερού και αιθανόλης για τον σχηματισμό του κουμαρινικού συστήματος. Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου εξαρτάται από τον καταλύτη, τους υποκαταστάτες της φαινόλης αλλά και από το είδος του β-κετοεστέρα. Γενικά, η συμπύκνωση των φαινολών που περιέχουν υποκαταστάτες δότες ηλεκτρονίων σε m-θέση ως προς το υδροξύλιο ευνοείται, ενώ όταν βρίσκονται σε ο- και p-θέσεις δεν επηρεάζουν τη δραστηριότητα των φαινολών ^[83-84].



Σχήμα 2. Στάδια της αντίδρασης Pechmann κατά τον σχηματισμό της 7-υδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνης ^[84].

Η συγκεκριμένη συνθετική δράση βρίσκει εφαρμογή ευρέως για την παραλαβή φυσικών κουμαρινών και διαφόρων βενζοπυρονών, με έντονο βιολογικό και βιομηχανικό ενδιαφέρον. Ακόμη, μέσω αυτής της μεθόδου συνθέτονται φορείς κουμαρινικών παραγώγων με φθορίζουσα δράση, όντας ακινητοποιημένοι ομοιοπολικά επί μίας μεμβράνης ανιχνεύσεως.

Ωστόσο πρέπει να αναφερθεί ότι, αν και η μέθοδος Pechmann αποτελεί μια κλασική πεπειραμένη συνθετική οδό διαφόρων βιοχημικών προϊόντων, ολοένα και περισσότερες καινοτόμες δοκιμές λαμβάνουν χώρα για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών και της αποτελεσματικότητας των αντιδράσεων. Ενδεικτικά παραδείγματα αποτελούν η βελτιστοποίηση των παραμέτρων για την σύνθεση των ενώσεων 3-υδροξυ-6,7-διμεθυλοξικουμαρίνη και της εσκουλετίνης, με σκοπό να περιοριστεί ο χρόνος αντίδρασης και η παραγωγή διαφόρων παραπροϊόντων ^[86].

Επίσης, η χρήση νανოსύνθετων καταλυτικών φορέων Nafion ρητίνης/πυριτίου βρίσκει εφαρμογή στη σύνθεση των 7-υδροξικουμαρινών από ρεσορκινόλη και ακετοξικού αιθυλεστέρα σε διαλύτη τολουόλιο. Μέσω της όξινης ετερογενούς κατάλυσης που λαμβάνει χώρα, μπορεί να επιτευχθεί μείωση της διάβρωσης του εξοπλισμού, βελτίωση των συνθηκών λειτουργίας του συστήματος, δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης του καταλύτη καθώς και αποδόσεις της τάξης του 81-96%. Ως καταλύτες έχουν προταθεί τα είδη Nafion-H, zeolite H-BEA, Amberlyst 15 και άλλα διάφορα στερεά οξέα. Το καθαρό Nafion αποτελεί ουσιαστικά ένα ιονομερές με έναν χημικώς ανθεκτικό πολυμερικό σκελετό,

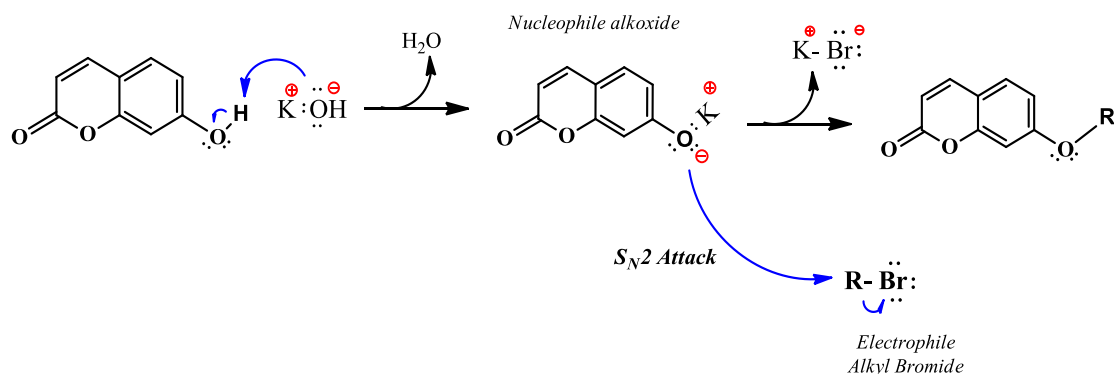
αποτελούμενο από σουλφονικές ομάδες αλλά και υδρόφοβες ($-\text{CF}_2\text{CF}_2-$) και υδρόφιλες περιοχές ($-\text{SO}_3\text{H}$)^[87].

Τέλος, η εναλλακτική εφαρμογή ακτινοβολίας μικροκυμάτων για τη σύνθεση των 4-υποκατεστημένων-7-αμινοκουμαρινών επί όξινου στερεού υποστρώματος (γραφίτη/μοντμοριλλονίτου (montmorillonite) πηλού K10), έχει ομοίως προταθεί βιβλιογραφικά. Μέσω της εφαρμογής αυτής επιτυγχάνονται μικρότεροι χρόνοι αντίδρασης και αποδόσεις κοντά στο 40%. Το έντονο θερμικό φαινόμενο που εκδηλώνεται, βασίζεται στην αλληλεπίδραση των μικροκυμάτων του γραφίτη με τον όξινο καταλυτικό ρόλο του πηλού^[88].

1.6.2. Αντίδραση Αιθεροποίησης (*Williamson ether synthesis*)

Η μέθοδος αιθεροποίησης κατά Williamson χρησιμοποιείται ευρέως από το 1850, για την σύνθεση αλκυλ- ή/και αρυλ-αιθέρων, τόσο συμμετρικών όσο και ασύμμετρων. Η σύνθεση των αλκυλ- ή/και αρυλ-αιθέρων κατά Williamson επιτυγχάνεται με την αντίδραση των αλκοξειδίων των μετάλλων με πρωτοταγή αλκυλ- ή αρυλαλογονίδια αντίστοιχα. Από μηχανιστική άποψη, η συγκεκριμένη αντίδραση αποτελεί μια απλή αντίδραση υποκατάστασης $\text{S}_{\text{N}}2$, μεταξύ ενός ηλεκτρονιόφιλου ιόντος αλογόνου με ένα πυρηνόφιλο ιόν αλκοξειδίου. Τα αλκοξείδια που απαιτούνται σε μια σύνθεση Williamson παρασκευάζονται συνήθως από την αντίδραση αλκοολών (αρκετά συχνή η χρήση των φαινολών, λόγω της αυξημένης οξύτητας που παρουσιάζουν) με ισχυρές βάσεις, όπως το υδρίδιου το νατρίου (NaNH), το υδροξείδιο του νάτριου (NaOH), το οξείδιο του αργύρου (Ag_2O) αλλά και διαφόρων βασικών αλάτων όπως το ανθρακικό κάλιο (K_2CO_3). Η παρουσία της βάσης στο διάλυμα ουσιαστικά συμβάλλει στην αποπρωτονίωση του υδροξυλίου ($\text{OH}-$) της αλκοόλης, αυξάνοντας έτσι τον πυρηνόφιλο χαρακτήρα της. Τα αλκυλαλογονίδια που προτιμώνται συνήθως στις αντιδράσεις σύνθεσης αιθέρων, είναι πρωτοταγή για τον λόγο ότι δρουν ως καλύτερα υποστρώματα σε σύγκριση με τα περισσότερο στερεοχημικά παρεμποδισμένα υποστρώματα, στα οποία μπορεί να λάβει χώρα ανταγωνιστική απόσπαση της ομάδας HX με μηχανισμό $\text{E}2$. Πιο συγκεκριμένα, τα αλκυλοβρωμίδια ευνοούν σε μεγαλύτερο βαθμό τις συγκεκριμένες αντιδράσεις, επειδή εμφανίζουν μεγαλύτερη δραστικότητα από τα αλκυλοχλωρίδια και είναι αντίστοιχα λιγότερο επιρρεπή στις $\text{E}2$ αποσπάσεις σε σχέση με τα αλκυλοϊώδια. Τέλος, η χρήση πολικών μη πρωτικών διαλυτών, όπως η ακετόνη, προτιμάται στην σύνθεση αιθέρων κατά Williamson^[89-90].

Στο **σχήμα 3** που εικονίζεται, παρουσιάζεται συνοπτικά ο μηχανισμός σύνθεσης κουμαρινικών αιθέρων κατά Williamson. Η 7-υδροξυ-κουμαρίνη, η οποία δρα ως αλκοόλη στην περίπτωση μας, αποπρωτονιώνεται από την βάση KOH σχηματίζοντας το αντίστοιχο αλκοξείδιο. Εν συνεχεία, το παραγόμενο πυρηνόφιλο αλκοξείδιο προσβάλλει το ηλεκτρονιόφιλο αλκυλοβρωμίδιο, με αποτέλεσμα την απομάκρυνση της αποχωρούσας ομάδας του βρωμιδίου και τελικά την παραγωγή του επιθυμητού αιθέρα.



Σχήμα 3. Μηχανισμός σύνθεσης κουμαρινικών αιθέρων κατά Williamson.

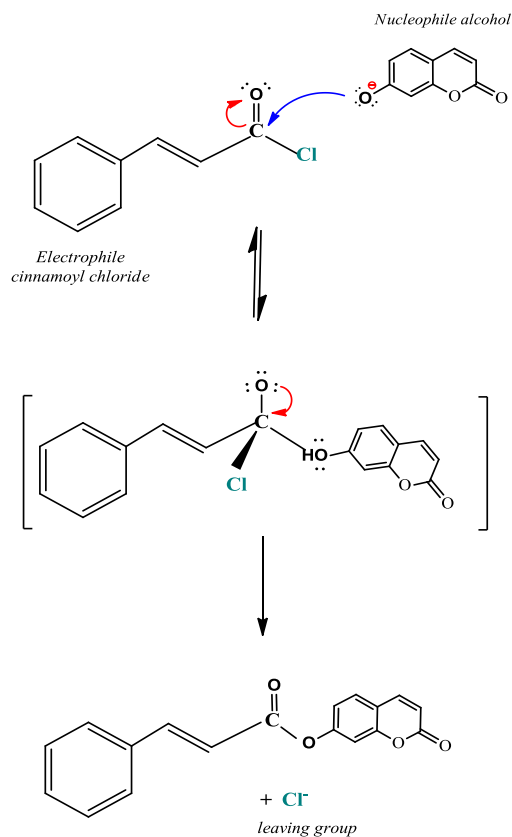
1.6.3. Αντίδραση Πυρηνόφιλης ακυλο υποκατάστασης

Τα παράγωγα των καρβοξυλικών οξέων είναι ενώσεις στις οποίες η ακυλο ομάδα συνδέεται με ένα ηλεκτραρνητικότερο άτομο ή έναν υποκαταστάτη $-Y$, που μπορεί να δράσει ως αποχωρούσα ομάδα σε αντιδράσεις υποκατάστασης. Πέντε από τα βασικότερα είδη παραγώγων οξέων είναι τα αλογονίδια οξέων, τα αμίδια, τα νιτρίλια, οι ανυδρίτες οξέων και οι εστέρες.

Η προσθήκη ενός πυρηνόφιλου παράγοντα στον πολικό δεσμό του καρβονυλίου ($-C=O$) αποτελεί το στάδιο «κλειδί» στις τρεις από τις τέσσερις θεμελιώδεις αντιδράσεις που παρέχει η καρβonyλομάδα. Στην περίπτωση που τα πυρηνόφιλα προστίθενται σε αλδεΐδες ή κετόνες, το τετραεδρικό ενδιάμεσο που σχηματίζεται μπορεί είτε να πρωτονιωθεί σχηματίζοντας μια αλκοόλη είτε πραγματοποιείται απόσπαση του καρβονυλικού οξυγόνου, οδηγώντας στον σχηματισμό δεσμού ανάμεσα στον άνθρακα και το πυρηνόφιλο. Στα καρβοξυλικά οξέα ωστόσο, ακολουθείται μια διαφορετική αλληλουχία αντιδράσεων κατά την προσθήκη ενός πυρηνόφιλου. Εδώ από το σχηματιζόμενο τετραεδρικό ενδιάμεσο αρχικά αποσπάται ο υποκαταστάτης Y και έτσι οδηγούμαστε σε μια καθαρή πυρηνόφιλη ακυλο υποκατάσταση. Με τον σχηματισμό του τετραεδρικού ενδιάμεσου, η καλή αποχωρούσα ομάδα του καρβονυλικού άνθρακα, αποβάλλεται και έτσι παράγεται μια νέα καρβονυλική ένωση. Αυτό ουσιαστικά διαφοροποιεί τα καρβοξυλικά οξέα από τις αλδεΐδες ή τις κετόνες, εφόσον αυτές δεν διαθέτουν τέτοια αποχωρούσα ομάδα και άρα δεν υφίστανται υποκατάσταση ^[90].

Όπως φαίνεται στο **σχήμα 4** που ακολουθεί, η ακυλο υποκατάσταση ενός αλογονιδίου οξέος, του κινναμικού χλωριδίου, πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Αρχικά η προσθήκη της πυρηνόφιλης 7-υδροξυ-κουμαρίνης στον καρβονυλικό άνθρακα του χλωριδίου οδηγεί στον σχηματισμό ενός τετραεδρικού ενδιάμεσου. Στο σημείο αυτό ένα ζεύγος ηλεκτρονίων του καρβονυλικού οξυγόνου εκτοπίζει την αποχωρούσα ομάδα, το ανιόν χλωρίου δηλαδή, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό μιας νέας καρβονυλικής ένωσης. Τα χλωρίδια οξέων θεωρούνται γενικά πολύ πιο δραστικά σε σχέση με τα υπόλοιπα παράγωγα οξέων, εφόσον από ηλεκτρονική άποψη ως τα ισχυρότερα πολωμένα παράγωγα οξέων προσβάλλονται πολύ πιο γρήγορα από τα λιγότερο πολικά. Κατά γενική ομολογία, αν και η συγκεκριμένη αντίδραση υποκατάστασης θυμίζει με μια πρώτη ματιά την πυρηνόφιλη υποκατάσταση

αντιδράσεων S_N2, ωστόσο οι αντιδράσεις αυτές διαφέρουν στον μηχανισμό διεξαγωγής τους και αυτό γιατί οι αντιδράσεις S_N2 πραγματοποιούνται σε ένα και μοναδικό στάδιο με «εκ των όπισθεν» υποκατάσταση της αποχωρούσα ομάδας [90].



Σχήμα 4. Μηχανισμός αντίδρασης πυρηνόφιλης ακυλο υποκατάστασης του κινναμικού χλωριδίου από την 7-υδροξυ-κουμαρίνη.

2. Συστήματα Μεταφοράς Φαρμάκων (*Drug Delivery Systems*)

Η εφαρμογή της νανοτεχνολογίας στη ιατρική έχει αποκτήσει ιδιαίτερα μεγάλο ενδιαφέρον τις τελευταίες δεκαετίες, από την στιγμή που παρέχει τη δυνατότητα κατανόησης νέων φαινομένων και παράλληλα την ανάδειξη νέων ιδιοτήτων των υλικών. Βασικός στόχος της Νανοϊατρικής αποτελεί η βελτίωση τόσο της διαγνωστικής όσο και της θεραπευτικής ιατρικής, μέσω της ανάπτυξης καινοτόμων φαρμακευτικών και διαγνωστικών συστημάτων.

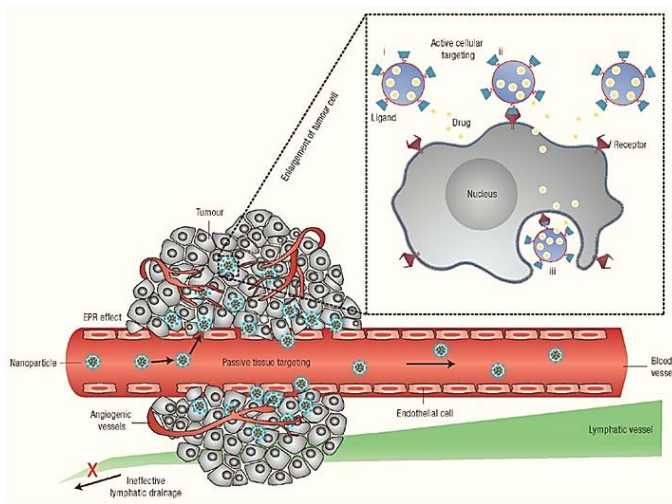
Τα νανοσυστήματα αποτελούν μικροκολλοειδείς δομές της κλίμακας των 10 έως 1000nm και η χρήση τους ως προς την ελεγχόμενη και στοχευόμενη μεταφορά φαρμακευτικών ουσιών και άλλων μεγαλομορίων όπως νουκλειικά οξέα, πεπτίδια, πρωτεΐνες ή ορμόνες, έχει φέρει επανάσταση στον χώρο της επιστήμης. Η συμβολή των νανοσωματιδίων στον εγκλεισμό ευαίσθητων χημικών ουσιών είναι σημαντική εφόσον έτσι διαφυλάσσονται τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των ενώσεων από διάφορες εξωγενείς ή ενδογενείς συνθήκες όπως η επίδραση του pH, η ενζυμική υδρόλυση, η φαγοκυττάρωση, η θερμική υποβάθμιση, η φωτοξείδωση κ.α. Ο εγκλεισμός υδρόφοβων ή υδρόφιλων φαρμάκων που εμφανίζουν μειωμένη βιοσυμβατότητα, μέσα σε νανοσωματιδιακές δομές οδηγεί αφενός στην αποτελεσματικότερη μεταφορά τους στον ανθρώπινο οργανισμό (βελτίωση του φαρμακοκινητικού προφίλ) και αφετέρου ελαττώνει την τοξικότητα τους ^[91-92].

Η εκλεκτική στόχευση που παρέχουν τα νανοσωματίδια σε συνδυασμό με την ελεγχόμενη αποδέσμευση των εγκλεισμένων ουσιών κατά την κυκλοφορία τους στο λεμφικό και αγγειακό σύστημα, οδηγούν στην καταπολέμηση σοβαρών παθήσεων όπως ο καρκίνος, μετρίζοντας ταυτόχρονα την εμφάνιση παρενεργειών για τους ασθενείς. Το μέγεθος των νανοδομών αλλά και τα χαρακτηριστικά της επιφανειακής τους δομής παίζουν καταλυτικό ρόλο στην αποτελεσματικότητα της δράσης τους. Τα νανοσυστήματα μπορούν να χορηγηθούν στους ασθενείς ενδοφλέβια είτε υποδόρια καθώς επίσης και μέσω διαφορετικών οδών συμπεριλαμβανομένης της στοματικής, ρινικής και παρεντερικής οδού. Η επιφανειακή τροποποίηση των νανοσωματιδίων μέσω της σύζευξης εξειδικευμένων βιομορίων (πεπτίδια, αντισώματα, ορμόνες) προσφέρει την δυνατότητα ανάπτυξης καινοτόμων νανοσυσκευών για την στοχευόμενη μεταφορά τους στους πάσχοντες ιστούς (π.χ. καρκινικούς όγκους), περιορίζοντας την εμφάνιση βλάβης στα γειτονικά υγιή μέρη του οργανισμού. Ακόμη, οι βιοδείκτες αυτοί ανάλογα τις ιδιότητες τους, όπως ο φθορισμός για παράδειγμα, προσφέρουν την δυνατότητα νανοανίχνευσης για την συστηματική παρακολούθηση και οπτικοποίηση των σταδίων συγκεκριμένων παθήσεων. Το συγκεκριμένο είδος στόχευσης ονομάζεται ενεργητική στόχευση ^[92-93].

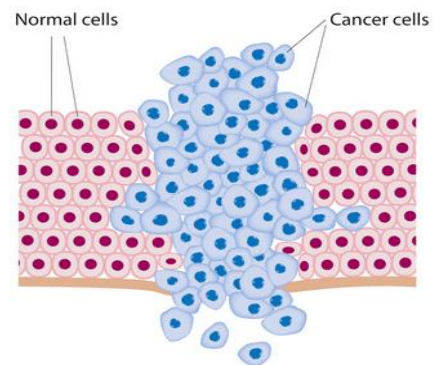
Όπως προαναφέρθηκε, θεωρείται αρκετά σημαντικό το μέγεθος των νανοσωματιδίων να είναι όσο το δυνατόν μικρότερο (10-150nm) ώστε να προσληφθούν παθητικά μέσω των κυττάρων. Πολλά είδη νανοσωματιδίων έχουν την τάση να συσσωρεύονται σε καρκινικούς ιστούς, φλεγμονές και σημεία μόλυνσης, εξαιτίας του φαινομένου ενισχυμένης διαπερατότητας και κατακράτησης (Enhanced Permeability & Retention Effect) που εμφανίζουν τα αγγεία της πάσχουσας περιοχής, λόγω της μη φυσιολογικής λειτουργίας. Το

φαινόμενο αυτό συναντάται κατά βάση στην περιοχές ανάπτυξης καρκινικής αγγειογένεσης, όπου σχηματίζεται λόγω της αυξημένης υπεραϊμάτωσης ένα ακανόνιστο αγγειακό πλέγμα. Τα αγγεία των όγκων εμφανίζουν γενικά διαρροή, λόγω ανωμαλιών της βασικής μεμβράνης και της μείωσης του αριθμού των ταχέως πολλαπλασιαζόμενων ενδοθηλιακών κυττάρων της περιοχής. Το μέγεθος των κενών μεταξύ των διαρρηγμένων ενδοθηλιακών κυττάρων κυμαίνεται μεταξύ 100 και 780 nm ανάλογα με τον τύπο των κυττάρων ενώ αντιθέτως οι σφιχτοί ενδοθηλιακοί σύνδεσμοι των φυσιολογικών αγγείων έχουν μέγεθος 5 έως 10nm.

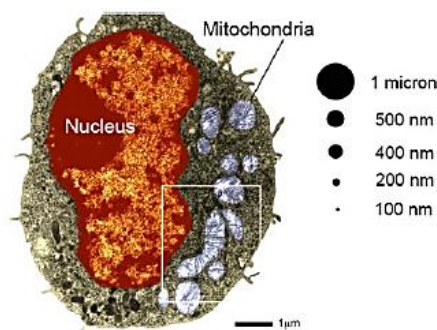
Η παθητική στόχευση όπως αποκαλείται, είναι ο εναλλακτικός τρόπος πρόσληψης των νανοσωματιδίων από τον οργανισμό. Εδώ τα νανοσωματίδια πρέπει να παραμείνουν σταθερά για ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα κατά την κυκλοφορία τους στο αίμα, ώστε να καταλήξουν σε εκλεκτική στόχευση των ασθενών ιστών ή κυττάρων, χωρίς όμως να τροποποιηθούν τα χαρακτηριστικά και η δομή τους [93-94].



Εικόνα 23. Σχηματική απεικόνιση της δράσης των νανοσωματιδίων ως μεταφορείς φαρμάκων σε καρκινικούς ιστούς, μέσω του EPR φαινομένου [95].



Εικόνα 24. Πολλαπλασιαστική τάση καρκινικών κυττάρων για τον σχηματισμό καρκινικού όγκου.



Εικόνα 25. Σύγκριση μεγέθους μεταξύ νανοσωματιδιακών μορφών και μακροφάγου κύτταρου ποντικού. Το ανθρώπινο μακροφάγο κύτταρο είναι δυο φορές μεγαλύτερο από το απεικονιζόμενο [96].

Ωστόσο, τα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων είναι δυνατό να εμφανίσουν και ορισμένα μειονεκτήματα, όπως αυξημένο κόστος παρασκευής σε σύγκριση με τις συμβατικές φαρμακομορφές, τοξικότητα λόγω των υλικών που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή αυτών ή λόγω των προϊόντων βιοδιάσπασης τους, κίνδυνο υπέρβασης των τοξικών επιπέδων του εγκλεισμένου φαρμάκου στην περίπτωση απότομης απελευθέρωσης του (dose dumping effect) και ελάττωση της βιοδιαθεσιμότητας του φαρμάκου^[92].

2.1. Βιοδιασπώμενα Νανοσυστήματα

Η χρήση βιοδιασπώμενων νανοσωματιδίων για την στοχευόμενη μεταφορά φαρμάκων θεωρείται η πλέον προτιμητέα επιλογή στην ανάπτυξη καινοτόμων νανοσυστημάτων. Τα βιοδιασπώμενα σωματίδια μετά το πέρας της χρήσης τους αποδομούνται σε μικρότερες λειτουργικές δομές μη τοξικές για τον οργανισμό και ως αποτέλεσμα αυτού αποτρέπεται η ανεπιθύμητη συσσώρευση τους σε υγιείς ιστούς ή κύτταρα. Για αυτόν ακριβώς το λόγο νανοσωματίδια μη βιοδιασπώμενα (μεταλλικά κolloειδή, κεραμικά) φαίνεται να χάνουν ολοένα και περισσότερο έφοδος με την πάροδο του χρόνου. Η αυξανόμενη συσσώρευση τους σε μονοπύρνα μακροφάγα κύτταρα της σπλήνας ή του συκωτιού για παράδειγμα, οδηγεί στην ανάπτυξη σοβαρών τοξικών παρενεργειών^[97-98].

Τα βιοδιασπώμενα νανοσωματίδια παρασκευάζονται από μια μεγάλη ποικιλία υλικών όπως πρωτεΐνες (ζελατίνη), πολυσακχαρίτες (χιτοζάνη), και συνθετικά βιοδιασπώμενα πολυμερή με πιο συνηθισμένα πολυμερή αυτά του πολυ(γαλακτικού-γλυκολικού) οξέος (PLGA), του πολυ(γαλακτικού) οξέος (PLA) και της πολύ(ε-καπρολακτόνης) (PCL). Η επιλογή του κατάλληλου πολυμερούς εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως το τελικό μέγεθος των σχηματιζόμενων νανοσωματιδίων, οι ιδιότητες του εγκλεισμένου φαρμάκου (σταθερότητα, υδροφοβικότητα κ.α.), τα επιφανειακά χαρακτηριστικά και η λειτουργικότητα των σωματιδίων, ο βαθμός βιοδιάσπασης και βιοσυμβατότητας και το φαρμακοκινητικό προφίλ αποδέσμευσης του φαρμάκου. Προφανώς χρειάζεται να γίνουν περαιτέρω μελέτες για την πλήρη κατανόηση της συμπεριφοράς των συγκεκριμένων συστημάτων και την αλληλεπίδραση τους με το ανοσολογικό σύστημα του ανθρώπου^[99-100].

2.2. Είδη Νανοσωματιδιακών Μορφών

Τα νανοσωματίδια εμφανίζουν μια μεγάλη ποικιλία μεγεθών, σχημάτων και συνθέσεων. Ορισμένα συστήματα νανοφορέων έχουν εγκριθεί για κλινική χρήση ενώ άλλα ακόμα διερευνώνται πειραματικά. Οι κυριότερες κατηγορίες νανοσωματιδίων είναι οι ακόλουθες:

I. Πολυμερή με βάση τον άνθρακα

Οι πολυμερικές δομές με βάση τον άνθρακα ελκύουν αρκετά μεγάλο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια και θεωρούνται ως πολλά υποσχόμενες για την ανάπτυξη καινοτόμων νανοσυστημάτων. Δομές όπως το γραφένιο, το φουλερένιο (C₆₀), οι ανθρακικές τελείες και γενικώς οι νανοσωλήνες άνθρακα έχουν προταθεί τόσο για την δομική ενίσχυση των υπαρχόντων υλικών όσο και για βιοϊατρική χρήση στα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων. Οι νανοσωλήνες άνθρακα είναι ουσιαστικά απλές στρώσεις γραφίτη, προσαρμοσμένες σε κυλινδρική δομή μονοδιαστρωματικής ή πολυστρωματικής μορφολογίας. Η ιδιαίτερη δόμηση τους επιτρέπει την εύκολη διείσδυση/σύζευξη τους στα κύτταρα του οργανισμού, πράγμα που τους καθιστά ως υποψήφιους για χρήση σε *in vivo* δοκιμασίες μεταφοράς φαρμάκων. Η επιφανειακή τροποποίηση των νανοσωλήνων άνθρακα οδηγεί στον σχηματισμό ετερογενών δομών υδατοδιαλυτών και εν γένει βιοσυμβατών. Βέβαια έχουν γίνει διάφορες αναφορές για πρόκληση φλεγμονών, κυτταρική απόπτωση, εκδήλωση οξειδωτικού στρες, μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και διαφοροποίηση στην κυτταρική μορφολογία από την χρήση νανοσωλήνων άνθρακα, που τυχόν έφεραν μεταλλικά υπολείμματα από την διεργασία σύνθεσης τους. Θεωρείται επομένως σημαντικό να ακολουθείται προσεκτικός καθαρισμός των νανοσωλήνων που προορίζονται για βιολογική χρήση, πιθανή τροποποίηση τους με γνωστά βιολικά (επικαλύψεις κατά κύριο λόγο) και γενικώς περισσότερες μελέτες να διεξαχθούν πάνω στο πεδίο αυτό^[101].

II. Πολυμερικά νανοσωματίδια

Τα πολυμερικά νανοσωματίδια προέρχονται από την χρήση φυσικών, σύνθετων και ψευδοσυνθετικών πολυμερών (π.χ. συνθετικά πολυπεπίδια). Η αρχιτεκτονική των πολυμερικών δομών, η σταθερότητα και η υδροφιλικότητα που εμφανίζουν παίζουν καταλυτικό ρόλο στην αποτελεσματικότητα τους ως μεταφορείς φαρμάκων. Η αρχιτεκτονική πολυμερική δομή καθορίζει τις φυσικοχημικές ιδιότητες του νανοφορέα, το ποσοστό φόρτωσης του φαρμάκου, το ρυθμό απελευθέρωσης του και την βιοκατανομή του. Τα πολυμερή θεωρούνται γενικά ως καλοί φορείς φαρμάκων εφόσον επιτυγχάνουν ελεγχόμενη αποδέσμευση της ουσίας, προστατεύουν το εγκλεισμένο μόριο από ενδογενείς ενζυμικές αντιδράσεις, παρέχουν δυνατότητα στόχευσης κατά την παθητική συσσώρευση των σωματιδίων στους όγκους και εμφανίζουν ανοσοενισχυτικά χαρακτηριστικά. Η χρήση των βιοπολυμερών συμβάλλει ακόμη στον εγκλεισμό υδρόφοβων φαρμάκων με χημειοπροστατευτική και αντινεοπλασματική δράση. Παρόλα αυτά τα πολυμερικά νανοσωματίδια προσβάλλονται εύκολα από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και για αυτόν το λόγο μεγάλη προσοχή πρέπει να δίνεται στην ανοσοσυμβατότητα τους. Παραδείγματος χάριν, τα πολυκατιόντα έχουν κατηγορηθεί ότι ενώ δεν είναι κυττοτοξικά μπορούν ωστόσο να προκαλέσουν αιμόλυση όπως και ότι τα πολυανιόντα, τα οποία θεωρούνται ακόμη πιο ακίνδυνα, προκαλούν αντιπηκτική δράση και απελευθέρωση της κυτοκίνης.

Ορισμένα από τα πιο γνωστά πολυμερικά νανοσωματίδια που εφαρμόζονται σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκων είναι τα νανοσωματίδια πολυ(γαλακτικού-γλυκολικού) οξέος (PLGA NPs), λόγω της εξακριβωμένης βιοδιασπώμενης και βιοσυμβατής τους φύσης. Η χρήση τους έχει εκτενώς μελετηθεί για τον εγκλεισμό του αντικαρκινικού φαρμάκου paclitaxel. Όπως είναι φυσικό ωστόσο, δύσκολα μπορεί να προβλεφθεί η φαγοκυτταρική συμπεριφορά μεταγενέστερη της πρόσληψης των σωματιδίων. Οι Nicolette και συνεργάτες (2011) εξέτασαν την κυτταρική πρόσληψη κενών PLGA νανο- και μικροσωματιδίων από μακροφάγα αλλά και την *in vitro* επίδραση που επιφέρουν στην παραγωγή προφλεγμονώδων κυτοκινών, όπως της TNF- α και IL-1 β . Αυτό που βρήκαν τελικά είναι ότι τα μικροσωματίδια μεγέθους 6,5 μ M επικάθονται στην κυτταρική επιφάνεια στις 2 και 4 ώρες επώασης, με αποτέλεσμα λίγα εξ αυτών να υπεισέρχονται στα κύτταρα σε αντίθεση με τα αντίστοιχα νανοσωματίδια. Τέλος, τα PLGA νανοσωματίδια φαίνεται γενικά να προτιμώνται στα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων συγκριτικά με τα PLA σωματίδια, για τον λόγο ότι εμφανίζουν μικρότερο χρόνο βιοδιάσπασης^[101].

III. Δενδριμερή

Τα δενδριμερή είναι πολυδιακλαδισμένα πολυμερή καθορισμένου σχήματος, μεγέθους, μήκους διακλάδωσης, πυκνότητας και επιφανειακής λειτουργικότητας. Προερχόμενα από ένα μικροσκοπικό πυρήνα, τα δενδριμερή αναπτύσσονται με την συνεχή πρόσδεση πολυμερικών αλυσίδων σε στοχευόμενες θέσεις του συστήματος, σχηματίζοντας κοιλότητες σε όλη την έκταση του μορίου. Οι εσωτερικές κοιλότητες και οι δίοδοι που σχηματίζονται επιτρέπουν τον φυσικό εγκλεισμό φαρμακευτικών ουσιών. Επίσης αρνητικά φορτισμένα φαρμακευτικά μόρια μπορούν να αναπτύξουν ηλεκτροστατικές δυνάμεις με τον κεντρικό κορμό του δενδριμερούς, εάν αυτό αποτελείται από άμινο ομάδες, επιτυγχάνοντας έτσι την ενσωμάτωση τους σε αυτό. Τα δενδριμερή είναι γενικώς επιδεκτικά στην επιφανειακή τροποποίηση τους, που αποσκοπεί στην βελτίωση της βιοσυμβατότητας και της εκλεκτικής τους στόχευσης. Δενδριμερή με θετικά φορτισμένες επιφανειακές ομάδες μπορούν να προκαλέσουν για παράδειγμα λύση των κυττάρων. Η έλλειψη εκτενής έρευνας και κλινικών δοκιμών των δενδριμερών συστημάτων δυστυχώς δημιουργεί μια ασάφεια σχετικά με την πάγια γενίκευση περί πρόκλησης ή μη τοξικών παρενεργειών της χρήσης τους στον οργανισμό. Οι μοναδικές ιδιότητες των δενδριμερών έχουν κινήσει το ενδιαφέρον των επιστημόνων για την εφαρμογή τους σε αντικαρκινικές, αντιμικροβιακές και αντιϊκές μελέτες^[101].

IV. Λιποσώματα

Τα λιποσώματα αποτελούνται από αμφίφιλα μόρια, τα οποία περιλαμβάνουν ένα πολικό και ένα μη πολικό μέρος, και δημιουργούν αυθορμήτως κολλοειδή σωματίδια. Η συγκεκριμένη αυτό-συγκρότηση παράγει μια σφαιρική δομή με τα πολικά της μέρη να βρίσκονται στο εξωτερικό πολικό περιβάλλον και τα μη πολικά στο αντίστοιχο εσωτερικό περιβάλλον. Η πιο κοινή ταξινόμηση των λιποσωμάτων γίνεται βάσει της λιπαδιακής διαστρωμάτωσης της κολλοειδούς τους δομής, όπου τα μονοστοιβαδικά λιποσώματα

περιέχουν μόνο μια λιπιδιακή διπλοστιβάδα ενώ τα πολυφολιδωτά λιποσώματα περιέχουν πολλαπλές διπλές στιβάδες λιπιδίων. Λόγω του αμφίφιλου χαρακτήρα τους, τα λιποσώματα μπορούν να εγκλείσουν τόσο πολικά όσο και μη πολικά μόρια ^[102].

Τα λιποσώματα αποτελούν ελκυστικούς νανοφορείς τόσο φαρμάκων όσο και γενετικού υλικού για δάιφορους λόγους, όπως η ιδιότητα τους να προσομοιάζουν την κυτταρική μεμβράνη τόσο δομικά όσο και στην σύνθεσή τους. Επιπλέον, τα λιποσώματα είναι μη τοξικά, μη ανοσογόνα και φυσικά βιοδιασπώμενα. Ωστόσο, χαρακτηρίζονται ως ελαφρώς στερεοχημικά ασταθή και «καθαρίζονται» πολύ γρήγορα κατά την κυκλοφορία τους στο αίμα. Η συγκεκριμένη δυσλειτουργία τους μπορεί να αντισταθμιστεί μέσω της επιφανειακής τροποποίησης με πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG), η οποία τους προσδίδει μεγαλύτερη στερεοχημική σταθερότητα. Στην εξωτερική τους επιφάνεια μπορεί επίσης να επιτευχθεί σύζευξη διαφόρων βιομορίων για ενεργητική στόχευση. Το πρώτο Pegylated-λιπόσωμα που χορηγήθηκε για την θεραπεία του καρκίνου περιήχε εγκλεισμένη την αντικαρκινική ένωση δοξορουβικίνη και ονομάζεται Doxil ^[102-103].

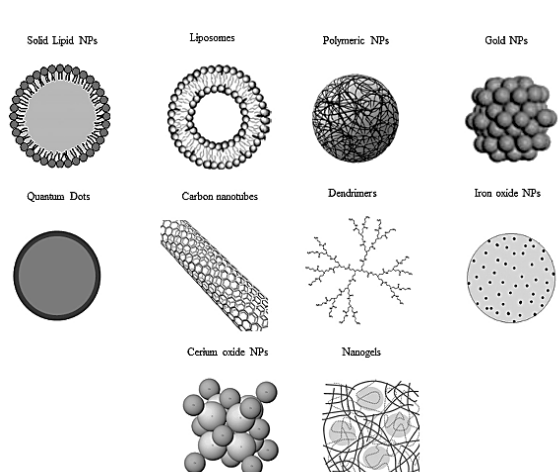
V. Μεταλλικά νανοσωματίδια

Η χρήση των μεταλλικών νανοφορέων θεωρείται αρκετά σημαντική τόσο στην διαγνωστική απεικόνιση όσο και στην θεραπευτική στόχευση των συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων. Τα μεταλλικά νανοσωματίδια μεταφέρονται υπό στερεά κολλοειδή μορφή και συμβάλλουν γενικά στην ενίσχυση της θεραπευτικής δράσης των εγκλεισμένων φαρμάκων και δη των αντικαρκινικών μέσω της ενεργητικής ή παθητικής στόχευσης που παρέχουν και τον περιορισμό των παρενεργειών που επιτυγχάνουν στα υγιή κύτταρα. Επίσης οι μεταλλικοί νανοφορείς επιτρέπουν αυξημένο ποσοστό φόρτωσης της φαρμακευτικής ουσίας και εμφανίζουν καλύτερους χρόνους ημιζωής κατά την κυκλοφορία τους στο αίμα. Επίσης η επιφανειακή τους τροποποίηση είναι εφικτή εφόσον ο λόγος της επιφάνειας προς τον όγκο τους είναι μεγάλος. Κολλοειδή σωματίδια χρυσού έχουν αναφερθεί ότι χρησιμοποιούνταν για την θεραπεία της φυματίωσης, από το 1920 ^[104]. Η χρήση των νανοσωματιδίων χρυσού για την μεταφορά συστημάτων φαρμάκων και γενετικού υλικού έχει ιδιαίτερος μελετηθεί, εφόσον διαθέτουν αρκετά πλεονεκτήματα σχετικά με την ευκολία σύνθεσης και τροποποίησης τους αλλά και λόγω της βιοσυμβατότητας που εμφανίζουν κατά την κυτταρική πρόσληψη χωρίς να επιφέρουν κυτοτοξική δράση ^[105].

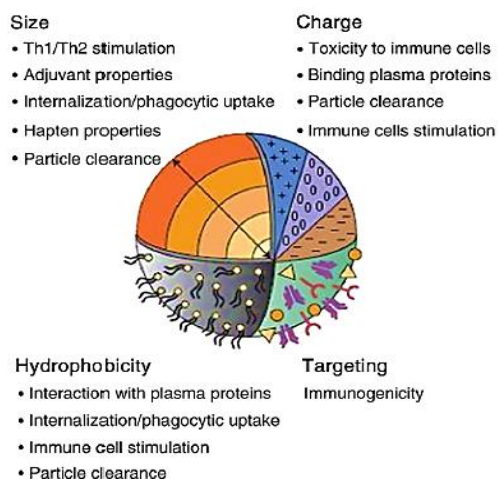
VI. Κβαντικές τελείες

Τα τελευταία χρόνια οι ημιαγώγιμες κβαντικές τελείες (QDs) έχουν κεντρίσει το επιστημονικό ενδιαφέρον για την αξιολογη δράση τους σε τεχνολογικούς τομείς όπως η μικροηλεκτρονική, η οπτοηλεκτρονική και η κυτταρική απεικόνιση. Οι κβαντικές τελείες αποτελούν μια νέα κατηγορία φθορίζοντων δεικτών, εφόσον το εύρος απορρόφησης τους και τα χαρακτηριστικά εκπομπής τους καθιστούν δυνατή την εκτέλεση πολύχρωμης απεικόνισης με μια μόνο ενιαία πηγής διέγερσης. Η υψηλή κβαντική απόδοση φθορισμού

που παρουσιάζουν, η αντοχή τους στον φωτοαποχρωματισμό και οι μοναδικές φυσικές, χημικές και οπτικές τους ιδιότητες τις καθιστούν υποψήφιες για εφαρμογές φθορίζουσας σήμανσης σε *in vivo* κυτταρικές και μοριακές μελέτες απεικόνισης. Ο συνδυασμός θεραπευτικής και διαγνωστικής ιατρικής καθίσταται πλέον εφικτός με την χρήση των κβαντικών τελειών χάρις στην υψηλή τους ευαισθησία και την εκλεκτική στόχευση. Πειραματικές μελέτες διεξάγονται για τον έλεγχο πιθανής τοξικής δράσης που μπορεί να επιφέρουν οι κβαντικές τελείες λόγω των υλικών παρασκευής τους, αν και επιστημονικές αναφορές κάνουν λόγο για επικάλυψη των κβαντικών τελειών με βιοσυμβατά υλικά όπως η πολυαιθυλενογλυκόλη που μπορούν να αυξήσουν την βιοσυμβατότητα τους στον οργανισμό [106].



Εικόνα 26. Διάφορα είδη νανοσωματιδίων για βιοϊατρική χρήση [107].



Εικόνα 37. Οι ιδιότητες των νανοσωματιδίων καθορίζουν την δράση τους στον ανθρώπινο οργανισμό [101].

2.3. Χαρακτηριστικά των Νανοσωματιδίων

2.3.1. Μέγεθος (*size*)

Το επιθυμητό μέγεθος των σχηματιζόμενων νανοσωματιδίων αλλάζει ανάλογα με την εκάστοτε εφαρμογή. Εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το είδος του πολυμερούς και της δραστικής ουσίας, αλλά και από τις παραμέτρους και τις συνθήκες της παρασκευαστικής διεργασίας. Θεωρητικά, το μέγεθος των νανοσφαιρών κυμαίνεται από 100 έως 200nm, ενώ των νανοκαψουλών μεταξύ 100-300 nm [108].

Γενικώς, οι περιορισμοί γύρω από το μέγεθος των νανοσωματιδίων είναι μεγάλοι. Υπάρχουν περιπτώσεις στις οποίες τα νανοσωματίδια δεν πρέπει να υπερβαίνουν ένα συγκεκριμένο μέγεθος, και αντίστοιχα άλλες που δεν επιτρέπεται να είναι μικρότερα από ένα προκαθορισμένο μέγεθος. Για παράδειγμα, σε φαρμακευτικές εφαρμογές όπου τα νανοσωματίδια χορηγούνται ενδοφλέβια, το μέγεθός τους δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 5μm, αλλά και η διάμετρός τους να είναι μικρότερη από 200 nm, ώστε να μην διηθούνται

από την σπλήνα. Το μικρό μέγεθος των νανοσωματιδίων παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα σχετικά με τη χρήση τους. Συγκεκριμένα, τα νανοσωματίδια σε σύγκριση με τα μικροσωματίδια, παρουσιάζουν μεγαλύτερη ενδοκυτταρική πρόσληψη. Έχει αποδειχθεί ότι νανοσωματίδια μεγέθους 100nm έχουν 2,5 φορές μεγαλύτερη πρόσληψη στην κυτταρική μεμβράνη του CaCO₂ σε σχέση με σωματίδια μεγέθους 1μm και 6 φορές μεγαλύτερη πρόσληψη συγκριτικά με σωματίδια μεγέθους 10μm. Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν όταν ίδιας σύνθεσης νανοσωματίδια και μικροσωματίδια δοκιμάστηκαν *in situ* σε ποντίκια εργαστηρίου, με τα νανοσωματίδια (100nm) να έχουν περίπου 16 φορές μεγαλύτερη πρόσληψη σε σχέση με τα αντίστοιχα μικροσωματίδια (1 και 10 μm) ^[109].

2.3.2. ζ-δυναμικό (*zeta potential*)

Η εμφάνιση επιφανειακού φορτίου στα περισσότερα υδατικά εναιωρήματα σωματιδίων οφείλεται στην ύπαρξη φορτισμένων ομάδων των σωματιδίων ή στην προσρόφηση ιόντων από το μέσο διασποράς. Τα ιόντα, που είναι συνήθως αρνητικά φορτισμένα, έλκουν από το διάλυμα θετικά ιόντα δημιουργώντας το ηλεκτροκινητικό ή ζ-δυναμικό, το οποίο αποτελεί την διαφορά δυναμικού μεταξύ της σταθερά δεσμευμένης στοιβάδας ιόντων στην επιφάνεια των σωματιδίων με την ηλεκτρικά ουδέτερη περιοχή του διαλύματος. Στην διάχυτη στοιβάδα το δυναμικό μηδενίζεται. Κατά την κίνηση του σωματιδίου, η διάχυτη στοιβάδα απομακρύνεται και αποκαλύπτει το δυναμικό επιφάνειας, το οποίο και ονομάζεται ζ-δυναμικό. Η τιμή του δυναμικού επηρεάζεται από το φορτίο των διαφορετικών συστατικών των νανοσωματιδίων (κυρίως των ιονικών επιφανειοδραστικών) και την σύνθεση του μέσου διασποράς. Υπολογίζεται με μετρήσεις της κινητικότητας των σωματιδίων, παρουσία ηλεκτρικού πεδίου ^[110].

Το ζ-δυναμικό σχετίζεται άμεσα με τη σταθερότητα των νανοσωματιδίων. Για σωματίδια μικρού μεγέθους ένα υψηλό ζ-δυναμικό θα προσδώσει στο σύστημα σταθερότητα, δηλαδή το διάλυμα ή η διασπορά θα αντιστέκονται στη δημιουργία συσσωματωμάτων. Όταν το δυναμικό είναι χαμηλό, η έλξη υπερβαίνει την άπωση και η διασπορά θα αρχίσει να εμφανίζει φαινόμενα κροκίδωσης και συσσωματωμάτων. Έτσι, τα συστήματα με υψηλό ζ-δυναμικό (αρνητικό ή θετικό) είναι ηλεκτρικά σταθεροποιημένα ενώ τα συστήματα με χαμηλό δυναμικό τείνουν να κροκιδώνονται ^[111-112].

2.3.3. Φυσικοχημική Σταθερότητα (*stability*)

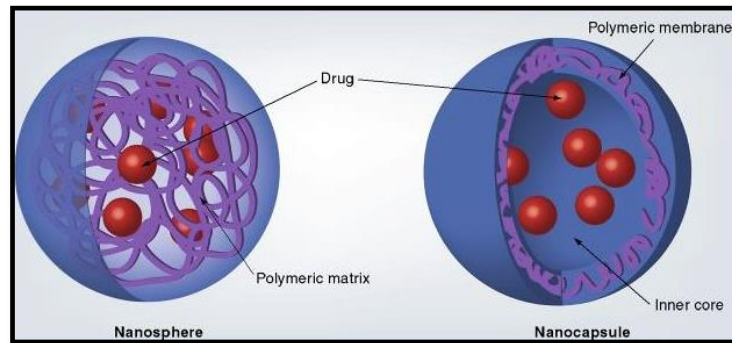
Η σταθερότητα των νανοσωματιδίων εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως το pH της υδατικής διασποράς, τον τύπο του πολυμερούς, τη χημική σταθερότητα της δραστικής ουσίας και τη θερμοκρασία αποθήκευσης. Ένας βασικό μειονέκτημα των πολυμερικών νανοσωματιδίων είναι η αστάθειά που παρουσιάζουν στα διαλύματα διασποράς τους. Όταν υδατικά διαλύματα πολυμερικών νανοσωματιδίων αποθηκεύονται για μεγάλο χρονικό διάστημα παρατηρείται συχνά δημιουργία συσσωματωμάτων (φυσική αστάθεια) ή/και

υδρόλυση του πολυμερούς με αποτέλεσμα την διαρροή της δραστικής ουσίας (χημική αστάθεια) ^[113].

Για να επιτευχθεί τόσο φυσική όσο και χημική σταθερότητα των σωματιδίων χρειάζεται αρχικά να απομακρυνθεί η υδατική φάση. Η πιο γνωστή διεργασία που επιτρέπει τη μετατροπή διαλυμάτων ή εναιωρημάτων σε στερεά, με επαρκή σταθερότητα ώστε να χρησιμοποιηθούν σε φαρμακευτικές εφαρμογές είναι η λυοφιλοποίηση (freeze drying) ^[114]. Η διεργασία αυτή βασίζεται στην απομάκρυνση του νερού από ένα παγωμένο δείγμα μέσω εξάχνωσης και εκρόφησης υπό κενό. Παρόλα αυτά η διεργασία αυτή προκαλεί αναπόφευκτα αρκετές καταπονήσεις στο δείγμα. Επομένως, καθίσταται πολλές φορές αναγκαία η προσθήκη διαφόρων συστατικών που θα εξασφαλίσουν την σταθερότητα του δείγματος. Σταθεροποιητές και διογκωτικοί παράγοντες όπως η σουκρόζη, η τρεχαλόζη και η L-αργινίνη χρησιμοποιούνται συχνά ως κρουπροστατευτικοί φορείς στις διεργασίες λυοφιλοποίησης. Είναι χημικά αβλαβείς και μπορούν εύκολα να υαλοποιηθούν κατά την διάρκεια της κατάψυξης. Ένας ακόμη λόγος που προτιμώνται είναι επειδή η παρουσία τους επιδρά στην θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (T_g) των πολυμερών ^[115-116].

2.4. Μέθοδοι Παρασκευής Πολυμερικών Νανοσωματιδίων

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα πολυμερικά νανοσωματίδια προκύπτουν από βιοδιασπώμενα και βιοσυμβατά πολυμερή δίνοντας σωματιδιακές μορφές μεγέθους 10-1000nm στις οποίες είναι εγκλεισμένη επιθυμητή δραστική ουσία. Ανάλογα τον τρόπο παρασκευής των σωματιδίων, προκύπτουν οι νανόσφαιρες και οι νανοκάψουλες. Οι νανόσφαιρες αποτελούν πολυμερικές μήτρες στις οποίες το φάρμακο είναι φυσικά και ομοιόμορφα διεσπαρμένο, ενώ αντίστοιχα οι νανοκάψουλες είναι συστήματα στα οποία η φαρμακευτική ουσία είναι ενθυλακωμένη σε μια κοιλότητα που περιβάλλεται από μια ενιαία πολυμερική μεμβράνη. Αρκετές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί τις τελευταίες δεκαετίες για την παρασκευή πολυμερικών νανοσωματιδίων. Οι τεχνικές παρασκευής ταξινομούνται σε δύο μεγάλες κατηγορίες. Η πρώτη σχετίζεται με τον σχηματισμό των σωματιδίων από τις αντιδράσεις πολυμερισμού των μονομερών συστατικών, ενώ η δεύτερη κατηγορία αφορά την παρασκευή νανοσωματιδίων από προσχηματισμένα πολυμερή και μακρομόρια ή μέσω της ιοντικής μεθόδου ζελατινοποίησης ^[117].



Εικόνα 28. Οι δύο βασικές μορφές των πολυμερικών νανοσωματιδίων. Νανόςφαιρες (αριστερά) και νανοκάψουλες (δεξιά) αντίστοιχα ^[117].

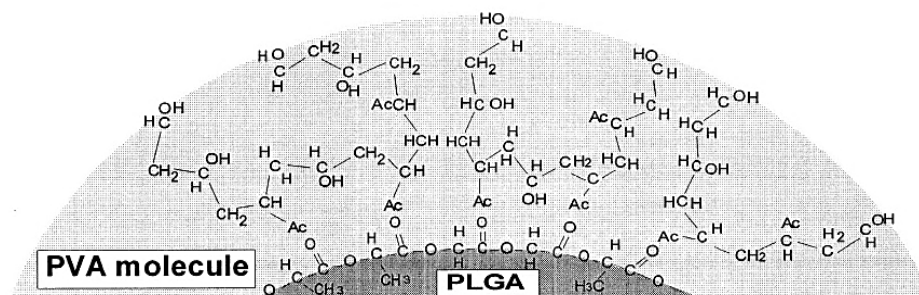
Ορισμένες μέθοδοι παρασκευής πολυμερικών νανοσωματιδίων από την διασπορά προσχηματισμένων πολυμερών είναι οι εξής:

1. Μέθοδος γαλακτωματοποίησης με εξάτμιση του οργανικού διαλύτη

Η τεχνική νανοεγκλεισμού με εξάτμιση του οργανικού διαλύτη εφαρμόζεται ευρέως στη φαρμακευτική βιομηχανία για την ανάπτυξη φαρμακευτικών νανοσυστημάτων ελεγχόμενης αποδέσμευσης. Γενικά υπάρχουν διάφορες τεχνικές που εφαρμόζονται στη μέθοδο νανοεγκλεισμού με ταυτόχρονη εξάτμιση του οργανικού διαλύτη και αυτό κατά βάση εξαρτάται από την υδροφοβικότητα ή την υδροφιλικότητα του εγκλεισμένου φαρμάκου. Για υδρόφοβα φάρμακα, η μέθοδος ελαίου σε νερό (o/w method) είναι η πιο συνήθης. Η συγκεκριμένη μέθοδος αποτελείται από τέσσερα στάδια, ως εξής:

- 1) Την διάλυση του υδρόφοβου φαρμάκου και του πολυμερούς σε έναν πτητικό οργανικό διαλύτη μερικώς αναμίξιμο ή μη αναμίξιμο με το νερό.
- 2) Την γαλακτωματοποίηση της οργανικής φάσης, ή αλλιώς διεσπαρμένης φάσης, σε αναδεύσιμη υδατική φάση (συνεχής φάση), παρουσία ενός επιφανειοδραστικού παράγοντα ^[118]. Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας, γνωστός και ως τασιενεργός παράγοντας, συμβάλλει στην διασπορά των δύο μη αναμίξιμων φάσεων και στην σταθερότητα του παραγόμενου γαλακτώματος. Ουσιαστικά ελαττώνει την επιφανειακή τάση της συνεχούς φάσης και αποτρέπει την συσσωμάτωση των σωματιδίων. Ακόμη, η δράση του σταθεροποιητή εξασφαλίζει στις νανόςφαιρες μικρό μέγεθος και ομοιόμορφη κατανομή, που με την σειρά τους οδηγούν σε πιο σταθερή και ελεγχόμενη αποδέσμευση της ουσίας. Ο χαρακτήρας των σταθεροποιητών είναι αμφίφιλος, με το ένα μέρος του μορίου να εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια με το υδατικό (πολικό) περιβάλλον και το άλλο με το οργανικό. Το υδρόφοβο μέρος του σταθεροποιητή καλύπτει την επιφάνεια των πολυμερικών σωματιδίων. Οι

επιφανειοδραστικοί παράγοντες ανάλογα την φύση του υδρόφιλου μέρους διακρίνονται σε ανιονικούς, κατιονικούς, αμφοτερικούς και μη ιονικούς. Οι πιο συνήθεις επιφανειοδραστικοί παράγοντες είναι η PVA, το TWEEN80, η μεθυλοκυτταρίνη κ.α. Στην **εικόνα 29** απεικονίζεται σχηματικά η αλληλεπίδραση των καρβοκυλικών ομάδων της PVA με τις ακετυλες ομάδες του πολυμερούς PLGA μέσω των υδροφοβικών δεσμών που αναπτύσσουν ^[119].



Εικόνα 29. Σχηματική απεικόνιση των μοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της PVA και των επιφανειακών μορίων του πολυμερούς PLGA ^[119].

- 3) Απόσπαση του διαλύτη από την οργανική στην υδατική φάση με ταυτόχρονη εξάτμιση του, οδηγώντας στον σχηματισμό μικρο- και νανοσταγόνων (nanodroplets) υπό την μορφή στερεών σωματιδίων.
- 4) Τέλος, ανάκτηση και ξήρανση των σωματιδίων για την εξάλειψη του υπολειμματικού διαλύτη ^[118].

Αν και η συγκεκριμένη μέθοδος ενδείκνυται για τον εγκλεισμό υδρόφοβων φαρμακευτικών ουσιών, το ακριβώς αντίθετο ισχύει για τα υδατοδιαλυτά σκευάσματα. Οι δυο βασικοί λόγοι είναι ότι πρώτον το υδρόφιλο φάρμακο θα παρουσιάζει προβλήματα διαλυτότητας στην οργανική φάση και δεύτερον ότι κατά το στάδιο γαλακτωματοποίησης θα διαχέεται στην συνεχή φάση με αποτέλεσμα την μικρή απόδοση εγκλεισμού του. Για να ξεπεραστούν οι συγκεκριμένοι σκόπελοι αναπτύχθηκαν εναλλακτικές τεχνικές της μεθόδου αυτής, όπως η μέθοδος διπλής γαλακτωματοποίησης (w/o/w double emulsion method), η μέθοδος γαλακτωματοποίησης ελαίου σε νερό παρουσία οργανικού συνδιαλύτη (o/w co-solvent method), η μέθοδος διασποράς ελαίου σε νερό (o/w dispersion method) και η μη υδατική μέθοδος γαλακτωματοποίησης με εξάτμιση οργανικού διαλύτη (o/o non-aqueous solvent evaporation method).

Ο εικονιζόμενος **Πίνακας 3** περιλαμβάνει μερικούς από τους πιο γνωστούς οργανικούς διαλύτες που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο γαλακτωματοποίησης υπό εξάτμιση διαλύτη. Το διχλωρομεθάνιο και το χλωροφόρμιο αν και δίνουν καλά αποτελέσματα στον σχηματισμό των νανοσωματιδίων, λόγω τοξικότητας έχουν εγκαταλειφθεί τα τελευταία

χρόνια δίνοντας έτσι προτεραιότητα σε διαλύτες με καλύτερο τοξικολογικό προφίλ και εξίσου αποτελεσματικούς, όπως ο οξικός αιθυλεστέρας ^[118].

Πίνακας 3. Λίστα ορισμένων οργανικών διαλυτών που χρησιμοποιούνται συχνότερα στην μέθοδο γαλακτωματοποίησης υπό εξάτμιση διαλύτη ^[118].

Name	Vapour pressure (mbar) at 20 °C; boiling point (°C); solubility in water (g/L) at 20 °C	Advantages disadvantages
Chloroform	212; 61; 8	Low solubility in water; higher toxicity than dichloromethane
Dichloromethane (methylene chloride)	453; 39.7; 20	Dissolution of most of the polymers; almost immiscible in water; high volatility and quite low boiling temperature; high toxicity
Ethyl acetate	100; 77; 90	Low toxicity; partially soluble in water; very low vapour pressure
Ethyl formate	259; 54; 105	Low toxicity; partially soluble in water

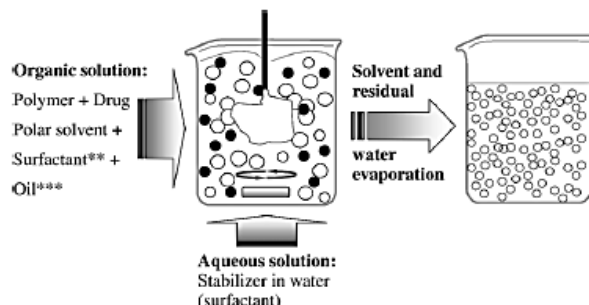
2. Μέθοδος εκτόπισης οργανικού διαλύτη και διεπιφανειακής εναπόθεσης – Νανοκαταβύθιση (*nanoprecipitation*).

Η μέθοδος εκτόπισης οργανικού διαλύτη και η διεπιφανειακή εναπόθεση αποτελούν συγγενείς μεθόδους στον σχηματισμό νανοσωματιδίων μέσω της τεχνικής της γαλακτωματοποίησης, με την διαφορά ότι η πρώτη μέθοδος παράγει είτε νανόσφαιρες είτε νανοκάψουλες ενώ η δεύτερη μόνο νανοκάψουλες.

Η μέθοδος εκτόπισης διαλύτη περιλαμβάνει την καταβύθιση ενός προσχηματισμένου πολυμερούς από έναν οργανικό διαλύτη και την διάχυση της οργανικής φάσης στο συνεχές υδατικό μέσο παρουσία ή μη επιφανειοδραστικού παράγοντα. Το πολυμερές διαλύεται σε έναν υδατικά αναμίξιμο διαλύτη μέσης πολικότητας, για την καταβύθιση των νανοσφαιρών. Η φάση αυτή εγχέεται κατόπιν στο αναδευόμενο υδατικό διάλυμα. Η εναπόθεση του πολυμερούς στην διεπιφάνεια του νερού και του οργανικού διαλύτη, που προκαλείται από την ταχεία διάχυση του διαλύτη, οδηγεί τελικά στον αυθόρμητο σχηματισμό ενός κολλοειδούς αιωρήματος. Για να διευκολυνθεί ο σχηματισμό των κολλοειδών σωματιδίων κατά το πρώτο στάδιο της διεργασίας, πραγματοποιείται διαχωρισμός φάσεων με έναν πλήρως αναμίξιμο με το νερό οργανικό διαλύτη, ο οποίος όμως δεν επιδρά καθόλου στην διαλυτότητα του πολυμερούς. Η συγκεκριμένη μέθοδος επιτρέπει την παραγωγή νανοκάψουλων με την προσθήκη μικρής ποσότητας ενός μη τοξικού ελαίου στην οργανική φάση. Η χρησιμότητα αυτής της απλής τεχνικής περιορίζεται στους υδατικά αναμίξιμους νερό διαλύτες, στο οποίους ο ρυθμός διάχυσης είναι έντονος ώστε να προάγουν αυθόρμητη/πρώρη γαλακτωματοποίηση. Η μέθοδος ενδείκνυται κυρίως για τον εγκλεισμό λιπόφιλων φαρμάκων ^[120].

Η διεπιφανειακή εναπόθεση αποτελεί μια διεργασία γαλακτωματοποίησης που εφαρμόζεται για τον σχηματισμό νανοκάψουλων, με την προθήκη ενός λιπόφιλου συστατικού διαλυτού στον οργανικό διαλύτη του πολυμερούς αλλά αδιάλυτου με το

υπόλοιπο μίγμα. Εδώ το πολυμερές εναποτίθεται στην διεπιφάνεια μεταξύ των διεσπαρμένων ελαιωδών σταγόνων και της υδατικής φάσης, σχηματίζοντας νανοκάψουλες. Ένα υδατικό διάλυμα δρα ως μέσο διασποράς. Τα πολυμερή εδώ διαλύονται μαζί με το φάρμακο σε ένα μίγμα διαλυτών, π.χ. ακετόνης, βενζοϊκού βενζυλεστέρα και φωσφολιπιδίων και εν συνεχεία εισάγονται στο υδατικό μέσο ^[120].

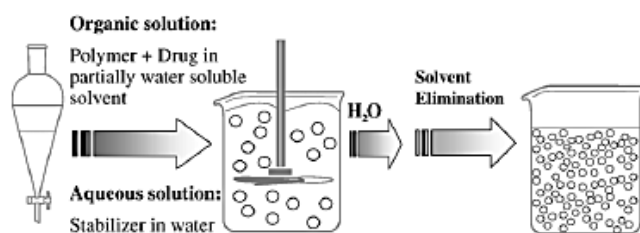


Εικόνα 30. Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου εκτόπισης οργανικού διαλύτη για τον σχηματισμό πολυμερικών νανοσωματιδίων ^[120].

3. Μέθοδος γαλακτωματοποίησης με διάχυση διαλύτη (*Emulsification/solvent diffusion*)

Η μέθοδος γαλακτωματοποίησης με διάχυση διαλύτη αποτελεί μια παραλλαγή της προαναφερθείσας μεθόδου γαλακτώματος υπό εξάτμιση διαλύτη. Εδώ το πολυμερές διαλύεται αρχικά σε έναν μερικά αναμίξιμο με το νερό διαλύτη, όπως η ακετόνη, η μεθανόλη ή η αιθανόλη, ενώ ακολουθεί κορεσμός του με μικρή ποσότητα νερού για να επιτευχθεί θερμοδυναμική ισορροπία μεταξύ των δύο φάσεων. Προκειμένου να προωθηθεί η καταβύθιση των πολυμερικών σωματιδίων απαιτείται να εξασφαλιστεί επαρκής διάχυση του οργανικού διαλύτη στην διεσπαρμένη φάση με περαιτέρω αραίωση του μίγματος με περίσσεια νερού αν ο διαλύτης είναι μερικά αναμίξιμος ή με την χρήση ενός δεύτερου συμπληρωματικού διαλύτη πλήρως αναμίξιμου με το νερό. Η οργανική φάση κατά τα γνωστά, εισάγεται μετέπειτα στην αναδευόμενη υδατική δάση παρουσία επιφανειοδραστικού παράγοντα. Ο οργανικός διαλύτης εξατμίζεται στο τέλος, και τα σωματίδια ανακτούνται με τις γνωστές τεχνικές συλλογής, όπως η φυγοκέντρηση ή το φιλτράρισμα.

Η τεχνική παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα όπως υψηλές αποδόσεις εγκλεισμού φαρμάκων και δη υδρόφοβων, επαναληψιμότητα, ευκολία, εύκολη κλιμάκωση της παρτίδας, στενή κατανομή μεγέθους καθώς επίσης δεν χρειάζεται ομογενοποίηση. Ωστόσο, η μέθοδος δεν προτιμάται ιδιαίτερα για τον εγκλεισμό υδρόφιλων φαρμάκων από την στιγμή που χρησιμοποιούνται μεγάλες ποσότητες νερού και έτσι μπορεί να διαλυθεί μέρος αυτών στην υδατική φάση οδηγώντας σε ελάττωση της απόδοσης εγκλεισμού ^[120].



Εικόνα 31. Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου γαλακτωματοποίησης με διάχυση διαλύτη ^[120].

4. Μέθοδος εξαλάτωσης με συνθετικά πολυμερή (*Salting out method*)

Η μέθοδος εξαλάτωσης βασίζεται στον διαχωρισμό ενός υδατικά αναμίξιμου διαλύτη από ένα υδατικό μέσο μέσω της τεχνικής της εξαλάτωσης. Το πολυμερές και το φάρμακο διαλύονται αρχικά σε έναν οργανικό διαλύτη όπως η ακετόνη, και εν συνεχεία ακολουθεί γαλακτωματοποίηση σε υδατική γέλη, η οποία περιέχει παράγοντες εξαλάτωσης (ηλεκτρολύτες σαν το χλωρίδιο του μαγνησίου ή του ασβεστίου και το οξικό μαγνήσιο καθώς και μη ηλεκτρολύτες σαν την σουκρόζη) και έναν κolloειδή σταθεροποιητή, όπως η πολυ(βινυλοπυρρολιδόνη) και η υδροξυαιθυλοκυτταρίνη. Κατόπιν, το ο/w γαλάκτωμα αραιώνεται με επαρκή ποσότητα ενός υδατικού διαλύματος ώστε να ενισχυθεί η διάχυση του διαλύτη στην υδατική φάση, καταλήγοντας στον σχηματισμό νανοσωματιδίων. Τόσο ο διαλύτης όσο και ο παράγοντας εξαλάτωσης αποβάλλονται με διήθηση διασταυρούμενης ροής. Η συγκεκριμένη πρακτική πλεονεκτεί στα συστήματα εγκλεισμού πρωτεϊνών εφόσον περιορίζει σημαντικά την καταπόνηση που υφίστανται. Επειδή δεν περιλαμβάνει στάδια θερμικής επεξεργασίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί ευρέως σε διεργασίες νανοεγκλεισμού που περιλαμβάνουν θερμικά ευαίσθητα υλικά. Δεν συνιστάται για εγκλεισμό λιπόφιλων φαρμάκων ^[120].

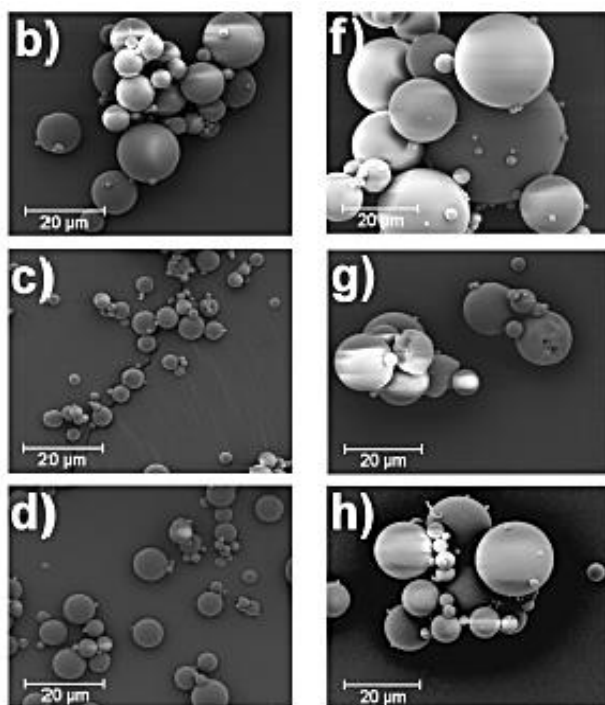
2.4.1. Επίδραση του Οργανικού Διαλύτη στις Τεχνικές Νανοεγκλεισμού

Η χρήση των πτητικών οργανικών διαλυτών στις τεχνικές νανοεγκλεισμού είναι απαραίτητη τόσο για την διάλυση των πολυμερών όσο και των εγκλεισμένων υδρόφοβων φαρμάκων σε αυτά. Πέραν του αν ο οργανικός διαλύτης μπορεί να διαλύσει ικανοποιητικά το πολυμερές και το φάρμακο μαζί, πολλά ακόμη χαρακτηριστικά της φύσης του πρέπει να ληφθούν υπόψη μιας και όλα μαζί συμβάλλουν στο μέγεθος και την μορφολογία των μικροσωματιδίων, στην αποδέσμευση του φαρμάκου και στο ποσοστό υπολείμματος του διαλύτη πάνω στην σωματιδιακή επιφάνεια.

Η υδατική διαλυτότητα του οργανικού διαλύτη παίζει σημαντικό ρόλο στην αρχική εκχύλιση του κατά τον σχηματισμό των σωματιδίων. Η γρήγορη καταβύθιση του πολυμερούς, λόγω της αρχικής εκροής του διαλύτη στη εξωτερική φάση, θεωρείται επωφελής για την επίτευξη υψηλών αποδόσεων εγκλεισμού. Ωστόσο, αν το διαλύτης παρουσιάζει πολύ μεγάλη διαλυτότητα με το νερό τότε, στις συνήθεις τεχνικές

γαλακτωματοποίησης, θα προκύψει απότομη στερεοποίηση του πολυμερούς οδηγώντας στον σχηματισμό ενός πυκνού πολυμερικού κελύφους γύρω από τα σταγονίδια, αδύνατο να συρρικνωθεί, και άρα κενά σωματίδια με κοιλότητες θα κάνουν την εμφάνιση τους ή στην χειρότερη συσσωματωμένες μάζες σωματιδίων. Αν αντιθέτως ο διαλύτης εμφανίζει ελαττωμένη υδατοδιαλυτότητα, όπως ο οξικός αιθυλεστέρας, τότε η γρήγορη εκροή διαλύτη από την οργανική φάση μπορεί να διασπάσει τα σταγονίδια του γαλακτώματος, συρρικνώνοντας τα ομοιόμορφα και άρα καταλήγοντας σε μικρότερα σωματίδια. Προκειμένου γενικά να αποτρέψουμε την γρήγορη στερεοποίηση του πολυμερούς, ο κορεσμός της συνεχούς υδατικής φάσης με τον προς χρήση διαλύτη πριν την εισαγωγή της οργανική φάσης, συνίσταται μιας και τόσο η εκχύλιση όσο και η τελική σκλήρυνση καθυστερούν και έτσι τα σωματίδια καταφέρνουν να συρρικνωθούν προς μικρότερα μεγέθη. Η συγκεκριμένη τεχνική εξυπηρετεί ιδιαίτερα στην χρήση υψηλών συγκεντρώσεων πολυμερών. Για την μέθοδο γαλακτωματοποίησης ελαίου σε νερό (o/w method) η υψηλή υδατοδιαλυτότητα του οργανικού διαλύτη μόνο αρνητικά μπορεί να λειτουργήσει εφόσον μπορούν να χαθούν ποσότητες του εγκλεισμένου φαρμάκου στην υδατική φάση, μειώνοντας την απόδοση εγκλεισμού^[121].

Όπως παρατηρείται στην **εικόνα 32** σε πειράματα παρασκευής PLGA νανοσωματιδίων με την (o/w) μέθοδο γαλακτωματοποίησης υπό εξάτμιση διαλύτη, η χαμηλότερη συγκέντρωση πολυμερούς οδηγεί σε σωματίδια μικρότερου μεγέθους λόγω ελαττωμένης ιξώδους τάσης της οργανικής φάσης. Ακόμη, τα άμορφα σωματίδια που προέκυψαν από την παρουσία του οξικού αιθυλεστέρα ως διαλύτη (**εικόνα g**), λόγω της γρήγορης καταβύθισης, φαίνεται να απουσιάζουν στην **εικόνα h**, όπου εδώ είχε εφαρμοστεί η τεχνική κορεσμού της υδατικής φάσης με τον οργανικό διαλύτη κατά την ανάδευσης της^[121].



Εικόνα 32. Επίδραση της οργανική φάσης και την συγκέντρωσης πολυμερούς στην κατανομή μεγέθους και την μικροδομή των σχηματιζόμενων σωματιδίων, από την (o/w) μέθοδο γαλακτωματοποίησης υπό εξάτμιση

διαλύτη. Η συγκέντρωση του PLGA πολυμερούς (Resomer® RG 503H) είναι 100mg/ml για τις εικόνες (b–d) και 200 mg/ml για τις εικόνες (f–h), αντίστοιχα. Επίσης, ο οργανικός διαλύτης για τις εικόνες είναι (b και f), το μεθυλοχλωρίδιο, για τις (c και g) ο οξικός αιθυλεστέρας και για τις (d και h) ο οξικός αιθυλεστέρας οργανικά κορεσμένης υδατική φάσης ^[121].

Επιπλέον, η διαλυτότητα του νερού στην οργανική φάση επηρεάζει τυπικά την αντίστροφη εκροή της συνεχούς φάσης και ως εκ τούτου το πορώδες των σωματιδίων. Σωματίδια με υψηλό πορώδες επιτρέπουν την αποδέσμευση των εγκλεισμένων ενώσεων στο υδατικό μέσο μέσω φαινομένων διάχυσης. Η γρήγορη στερεοποίηση των σωματιδίων μπορεί βέβαια να αποτρέψει την πρόσληψη νερού στους πόρους του πολυμερούς και αυτό κατά βάση επιτυγχάνεται είτε με την αύξηση της συγκέντρωσης του πολυμερούς είτε με την εφαρμογή κενού για την εξάτμιση του διαλύτη ^[121].

Αξίζει επίσης να αναφερθεί η παρουσία των συνδιαλυτών στο σύστημα της διεσπαρμένης οργανικής φάσης, όταν το πολυμερές και το φάρμακο δεν διαλύονται στον ίδιο διαλύτη. Οι συνδιαλύτες είναι κυρίως υδατικά αναμίξιμοι διαλύτες όπως η μεθανόλη, η αιθανόλη, η ακετόνη, το διμεθυλο σουλφοξείδιο (DMSO), το διμεθυλο φορμαμίδιο, το ακετονιτρίλιο και διάφοροι αιθέρες, οι οποίοι κάνουν πολυπλοκότερο το σύστημα και εν δυνάμει ελαττώνουν το ποσοστό εγκλεισμού ενώ μπορεί να αυξάνουν τη επιφανειακή κρυστάλλωση του φάρμακου.

Η παρουσία υδατικά αναμίξιμων συνδιαλυτών στο μίγμα μεθυλοχλωριδίου για παράδειγμα, οδηγεί στην πρόωρη εκχύλιση των διαλυτών αυτών καθυστερώντας την διάχυση του μεθυλοχλωριδίου. Εάν ο συνδιαλύτης δεν επιδρά στην διαλυτότητα του πολυμερούς, τότε περιμένουμε να σχηματιστούν στην οργανική φάση περιοχές πλούσιες και μη σε πολυμερές, που αντιστοιχούν στο σύστημα αλληλεπίδρασης πολυμερούς/μεθυλοχλωριδίου και συνδιαλύτη/φαρμάκου αντίστοιχα. Έτσι το εισερχόμενο νερό στην διεσπαρμένη φάση εκκρίει ανάλογα την ποσότητα του συνδιαλύτη σε διαφορετικά ποσοστά επηρεάζοντας το τελικό πορώδες των σωματιδίων. Επίσης προκειμένου να γίνει αποτελεσματική ενθυλάκωση υδρόφοβων φαρμάκων πρέπει η ποσότητα του συνδιαλύτη να παραμένει σε μικρά επίπεδα μέσα στο σύστημα, ώστε το μέρος του φαρμάκου που διαφεύγει με τον συνδιαλύτη να είναι όσο το δυνατόν μικρότερο ^[121].

Αναφορικά με όλα τα παραπάνω, οι Ki Chang Song και συνεργάτες (2006) σε μελέτη τους εξέτασαν την επίδραση διαφόρων οργανικών διαλυτών (πλήρως, μερικώς και καθόλου αναμίξιμων με το νερό) στον σχηματισμό PLGA νανοσωματιδίων με την μέθοδο γαλακτωματοποίησης με διάχυση του διαλύτη (ESD method).

Στον **Πίνακα 4** που ακολουθεί παρουσιάζεται το είδος διαλυτότητας των οργανικών διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν πειραματικά για την διάλυση του πολυμερούς PLGA. Η ακετόνη θεωρείται πλήρως υδατικά αναμίξιμος διαλύτης. Ακολουθεί ο ανθρακικός προπυλεστέρας και αντίστοιχα ο οξικός αιθυλεστέρας ως μερικώς αναμίξιμοι διαλύτες και

τέλος το μη αναμίξιμο διχλωρομεθάνιο, το οποίο φαίνεται να έχει την καλύτερη αλληλεπίδραση με το πολυμερές ^[122].

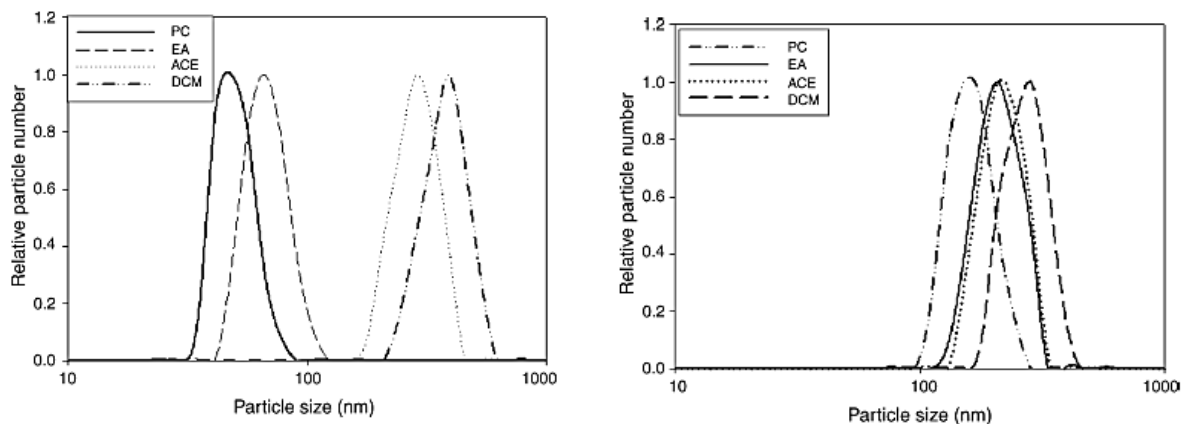
Πίνακας 4. Υδατική αναμιξιμότητα οργανικών διαλυτών που χρησιμοποιούνται στις τεχνικές νανοεγκλεισμού PLGA νανοσωματιδίων ^[122].

	Ethyl acetate (EA)	Propylene carbonate (PC)	Acetone (ACE)	Dichloromethane (DCM)
Water	Slightly soluble (10% (v/v) at 25 °C)	Slightly soluble (17.5% (v/v) at 25 °C)	Very soluble (infinitely at 25 °C)	Immiscible (2% (v/v) at 25 °C)
PLGA	Good solvent	Good solvent	Good solvent	Excellent solvent

Στο **σχήμα 5** που ακολουθεί εικονίζεται η κατανομή μεγέθους των σχηματιζόμενων PLGA νανοσωματιδίων κατά την παρασκευή τους με τους τέσσερις διαφορετικούς οργανικούς διαλύτες και με σταθεροποιητή την ουσία DMAB συγκέντρωσης 1% (w/v). Τα μικρότερα σε μέγεθος σωματίδια (<100nm) παρατηρούνται για την χρήση των μερικώς αναμιξιμων διαλυτών, δηλαδή του οξικού αιθυλεστέρα και του ανθρακικού προπυλεστέρα, ενώ τα μεγαλύτερα νανοσωματίδια (σχεδόν πάνω από 290nm) έδωσε η ακετόνη και το διχλωρομεθάνιο. Ακόμη όπως υποστηρίζει η ερευνητική ομάδα τα διαλύματα των σωματιδίων των μερικώς αναμιξιμων διαλυτών ήταν πιο διαυγή στην όψη σε σύγκριση με τα υπόλοιπα. Καθώς τα σωματίδια σχηματίζονται από τα σταγονίδια του γαλακτώματος μετά τη διάχυση του οργανικού διαλύτη, το μέγεθός τους εξαρτάται άμεσα από τη σταθερότητα των σταγονιδίων αυτών, τα οποία συγκρούονται και συσσωματώνονται μεταξύ τους. Η παρουσία του γαλακτωματοποιητή στην διεπιφάνεια των δύο υγρών φάσεων δίνει την απαραίτητη σταθερότητα στο σύστημα. Η χαμηλή επιφανειακή τάση μεταξύ της οργανικής και υδατικής φάσης προσδίδεται στην φύση των μερικώς υδατικά αναμιξιμων διαλυτών. Όταν χρησιμοποιήθηκε το διχλωρομεθάνιο ως οργανικός διαλύτης, σχεδόν κάθε σταγονίδιο που σχηματίστηκε στο γαλάκτωμα κατέληξε αυθορμήτως στον σχηματισμό μεγάλων συσσωματωμάτων, λόγω του μη υδατοδιαλυτού χαρακτήρα του, όπου ο σταθεροποιητής DMAB δεν μπόρεσε να αποτρέψει. Αυτό οδήγησε αναπόφευκτα σε σωματίδια μεγάλου μεγέθους. Η ακετόνη, από την άλλη, λόγω της μεγαλύτερης υδατοδιαλυτότητας που εμφανίζει, οδήγησε ομοίως στον σχηματισμό μεγάλων σωματιδίων, τα οποία καταβυθίζονταν ως μικροσωματίδια κατά την ανάμιξη των δύο φάσεων.

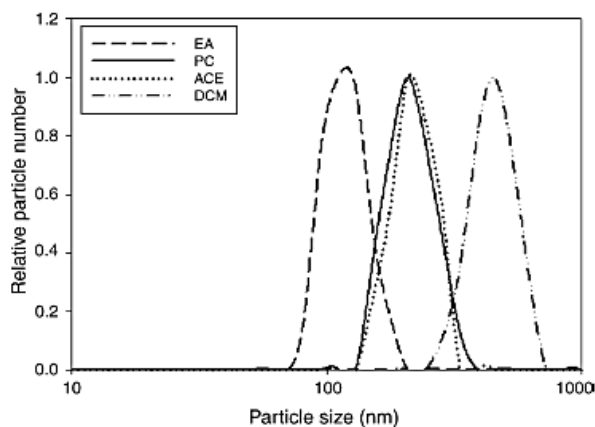
Αντίστοιχα στα **σχήματα 6** και **7** εικονίζεται η κατανομή μεγέθους των σχηματιζόμενων PLGA νανοσωματιδίων κατά την παρασκευή τους με τους ίδιους οργανικούς διαλύτες αλλά στην πρώτη περίπτωση με σταθεροποιητή την ουσία PVA συγκέντρωσης 1% (w/v) ενώ στην δεύτερη το Pluronic F68. Σε σύγκριση με τα αποτελέσματα των DMAB δειγμάτων, εδώ παρατηρούνται τα εξής. Συγκεκριμένα για την PVA δεν παρατηρούνται μεγάλες διακυμάνσεις μεταξύ των διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν μιας και όλοι έδωσαν σωματίδια πάνω από 100nm. Όσον αφορά όμως το Pluronic F68, είναι εμφανές ότι ο οξικός αιθυλεστέρας συμβάλλει σημαντικά στον σχηματισμό μικρότερων σωματιδίων συγκριτικά με τον ανθρακικό προπυλεστέρα.

Γενικά, θα πρέπει να τονιστεί ότι στους μη ιοντικούς σταθεροποιητές (PVA και Pluronic F68) η σταθεροποίηση των σωματιδίων επιτεύχθηκε μέσω στερεοχημικής παρεμπόδισης ενώ στον ανιοντικό DMAB μέσω ηλεκτροστατικής άπωσης, η οποία έδωσε εν τέλει και τα μικρότερα σε μέγεθος σωματίδια ^[122].



Σχήμα 5. Επίδραση του οργανικού διαλύτη στον σχηματισμό PLGA νανοσωματιδίων παρουσία σταθεροποιητή DMAB συγκέντρωσης 1% (w/v) ^[122].

Σχήμα 6. Επίδραση του οργανικού διαλύτη στον σχηματισμό PLGA νανοσωματιδίων παρουσία σταθεροποιητή PVA συγκέντρωσης 1% (w/v) ^[122].

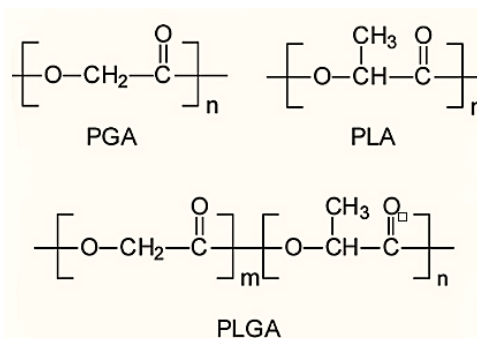


Σχήμα 7. Επίδραση του οργανικού διαλύτη στον σχηματισμό PLGA νανοσωματιδίων παρουσία σταθεροποιητή Pluronic F68 συγκέντρωσης 1% (w/v) ^[122].

2.5. Νανοσωματίδια πολυ(γαλακτικού-γλυκολικού) οξέος (PLGA NPs)

2.5.1. Πολυ(γαλακτικό-γλυκολικό) οξύ (PLGA)

Ο πολυεστέρας του πολυ(γαλακτικού-γλυκολικού) οξέος αποτελεί ένα συμπολυμερές του πολυ(γαλακτικού) οξέος (PLA) και του πολυ(γλυκολικού) οξέος (PGA) αντίστοιχα. Θεωρείται ένα από τα καταλληλότερα βιολικά για εφαρμογές σχετικές με συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, αναγνωρισμένο τόσο από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) όσο και από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (EMA). Το πολυ(γαλακτικό) οξύ περιέχει έναν ασύμμετρο α -άνθρακα που συνήθως περιγράφεται ως D ή L μορφή σε κλασικούς στερεοχημικούς όρους. Οι εναντιομερείς μορφές του πολυμερούς PLA είναι το πολυ-D-γαλακτικό οξύ και το αντίστοιχο πολυ-L-γαλακτικό οξύ.



Εικόνα 33. Χημική δομή πολυ(γαλακτικού-γλυκολικού) οξέος (PLGA) και των μονομερών του PLA και PGA.

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των οπτικά ενεργών D και L μορφών του πολυ(γαλακτικού) οξέος είναι σχεδόν ίδιες. Γενικά, το πολυ(γαλακτικό) οξύ μπορεί να αποκτήσει είτε κρυσταλλική είτε άμορφη εμφάνιση λόγω της ασύμμετρης διάταξης των πολυμερικών του αλυσίδων. Το πολυ(γλυκολικό) οξύ αντίθετα επειδή δεν περιέχει μεθυλο ομάδες στην δομή του εμφανίζει έντονη κρυσταλλική μορφή.

Το PLGA μπορεί να παραχθεί υπό οποιαδήποτε μορφή και μέγεθος. Είναι διαλυτό σε ποικίλους οργανικούς διαλύτες όπως τον οξικό αιθυλεστέρα, την ακετόνη, το τετραυδροφουράνιο και σε άλλους χλωριομένους διαλύτες. Στο νερό το PLGA υδrolύεται στα σημεία σύνδεσης των εστέρων του. Η παρουσία των πλευρικών μεθυλο ομάδων του PLA κάνει πιο υδρόφοβο το μόριο αυτό σε σχέση με το PGA και ως εκ τούτου ένα συμπολυμερές PLGA πλούσιο σε τμήματα PLA παρουσιάζει λιγότερο υδρόφιλο χαρακτήρα, απορροφώντας λιγότερο νερό και άρα αποικοδομείται με πιο αργό ρυθμό.

Η αλλαγή των ιδιοτήτων του PLGA κατά την βιοδιάσπαση του επηρεάζει τον ρυθμό αποδέσμευσης και αποικοδόμησης των εγκλεισμένων ενώσεων. Γενικά οι ιδιότητες του πολυμερούς εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες όπως το μοριακό βάρος, η αναλογία γλυκολιδίου/γαλακτιδίου, η έκθεση στο νερό καθώς και η θερμοκρασία αποθήκευσης. Η μηχανική αντοχή του PLGA επηρεάζεται για παράδειγμα από φυσικές ιδιότητες όπως το μοριακό βάρος και ο δείκτης πολυδιασποράς του.

Γενικά η μηχανική αντοχή, η τάση διόγκωσης, η ικανότητα να υφίσταται υδρόλυση και ο ρυθμός βιοαποικοδόμησης του πολυμερούς επηρεάζονται άμεσα από τον βαθμό κρυσταλλικότητας του PLGA, η οποίος με τη σειρά του εξαρτάται από το είδος και την μοριακή αναλογία των μονομερών συστατικών στην αλυσίδα του συμπολυμερούς PLGA. Το κρυσταλλικό πολυμερές PGA, όταν συμπολυμερίζεται με το PLA, μειώνει το βαθμό κρυσταλλικότητας του σχηματιζόμενου PLGA και ως αποτέλεσμα αυξάνει το ποσοστό της ενυδάτωσης και της υδρόλυσης του. Κατά κανόνα, η υψηλότερη περιεκτικότητα σε PGA οδηγεί σε ταχύτερο ρυθμό αποικοδόμησης με μοναδική εξαίρεση την (50:50) αναλογία PLA /PGA, η οποία παρουσιάζει την ταχύτερη αποικοδόμηση. Ακόμη, η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (Tg) του PLGA πολυμερούς αναφέρεται ότι είναι πάνω από τη φυσιολογική θερμοκρασία των 37°C και ως εκ τούτου βρίσκεται φυσικά σε υαλώδη κατάσταση εμφανίζοντας έτσι αρκετά άκαμπτη δομή. Τα εμπορικά διαθέσιμα πολυμερή PLGA χαρακτηρίζονται συνήθως από την τιμή του εγγενούς ιξώδους που έχουν, η οποία και σχετίζεται άμεσα με τα μοριακά τους βάρη.

Από τοξικολογική άποψη, μελέτες έχουν δείξει ότι διάφορα PLGA συστήματα αναπτύσσουν αντιδράσεις τοπικά στους ιστούς που εφαρμόζονται. Αν και οι συγκεκριμένες βιολογικές αντιδράσεις κρίνονται γενικά ήπιες και το PLGA θεωρείται ασφαλές υλικό για εφαρμογή σε μικροσωματιδικά συστήματα, εντούτοις χρειάζεται περισσότερη προσοχή και μελέτη η χρήση του σε βιολογικές δοκιμασίες ^[123].

2.5.2. Φαρμακευτικό προφίλ και Βιοκατανομή PLGA σωματιδίων

Τα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων αποσκοπούν στην εκλεκτική μεταφορά των εγκλεισμένων φορτίων τους μέσα σε καθορισμένο χρόνο, ελεγχόμενη βιοκατανομή και συγκέντρωση.

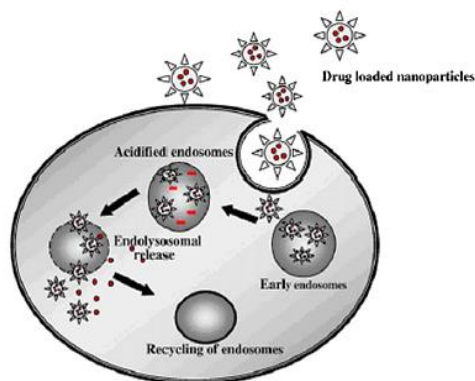
Η βιοκατανομή και το φαρμακοκινητικό προφίλ του PLGA ακολουθεί μια μη-γραμμική και δοσοεξαρτώμενη συμπεριφορά. Μελέτες δείχνουν ότι τόσο η απομάκρυνση από το αίμα όσο και η πρόσληψη από το σύστημα μονοπύρηνων φαγοκυττάρων (MPS) εξαρτώνται από την δόση και την σύνθεση των PLGA νανοσωματιδίων. Τα PLGA νανοσωματίδια έχουν αναφερθεί ότι συγκεντρώνονται ταχέως στο ήπαρ, τον μυελό οστών, τους λεμφαδένες, την σπλήνα και στα περιτοναϊκά μακροφάγα. Η βιοδιάσπαση των PLGA σωματιδίων είναι γρήγορη στο αρχικό της στάδιο (περίπου 30%) ενώ επιβραδύνεται σταδιακά μέχρι να εκκαθαριστεί από το αναπνευστικό σύστημα ^[123].

Τα PLGA νανοσωματίδια προσλαμβάνονται από τα κύτταρα εν μέρει μέσω της υγρής φάσης της πινοκυττάρωσης καθώς και από την ενδοκύττωση μέσω κλαθρίνης. Τα PLGA νανοσωματίδια μπορούν και ξεφεύγουν γρήγορα από τα ενδολυσosomal και εισάγονται γρήγορα στο κυτταρόπλασμα εντός 10 λεπτών. Αυτό διευκολύνει τις αλληλεπιδράσεις των νανοσωματιδίων με τις κυστικές μεμβράνες οδηγώντας σε παροδική και εντοπισμένη

αποσταθεροποίηση των μεμβρανών με αποτέλεσμα την διαφυγή των νανοσωματιδίων στο κυττόςολιο [124].

Γενικά, το σώμα αναγνωρίζει τα υδρόφοβα σωματίδια ως ξενιστές. Το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα (RES) εξαλείφει τα σωματίδια από την κυκλοφορία του αίματος και τα οδηγεί στο ήπαρ ή την σπλήνα. Αυτή η διαδικασία αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά βιολογικά εμπόδια που καλούνται να ξεπεράσουν τα νανοσωματιδιακά συστήματα. Η σύνδεση των πρωτεϊνών οψωνίνης, που βρίσκονται παρούσες στον ορό του αίματος, πάνω στα εισερχόμενα νανοσωματίδια οδηγεί στον εντοπισμό των σωματιδίων από τα μακροφάγα με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της διεργασίας της φαγοκυττάρωσης. Για την αντιμετώπιση αυτών των προβλημάτων, αρκετές μέθοδοι επιφανειακής τροποποίησης των σωματιδίων έχουν αναπτυχθεί ώστε τα εισερχόμενα στον οργανισμό νανοσωματίδια να μην αναγνωρίζονται από το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα. Τα νανοσωματίδια μπορούν να επικαλυφθούν με μόρια ικανά να κρύψουν τον υδρόφοβο χαρακτήρα τους, παρέχοντας έτσι ένα υδρόφιλο στρώμα στην επιφάνεια τους. Η πιο κοινή χαρακτηριστική ομάδα για την τροποποίηση της επιφάνειας είναι το υδρόφιλο και μη ιονικό πολυμερές της πολυ(αιθυλενογλυκόλης) (PEG). Έχει αποδειχθεί ότι η «PEG-υλίωση» όπως αποκαλείται, αυξάνει σημαντικά τον χρόνο ημιζωής των νανοσωματιδίων στην κυκλοφορία του αίματος. Επιπλέον, η PEG επιδεικνύει μια εξαιρετική βιοσυμβατότητα. Το Proloxamer, οι πολοξαμίμες και η χιτοζάνη έχουν επίσης μελετηθεί για την τροποποίηση της επιφάνειας των νανοσωματιδίων. Οι συγκεκριμένες ομάδες μπλοκάρουν τις ηλεκτροστατικές και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις που ωθούν τις οψώνες να προσδεθούν στην επιφάνεια των σωματιδίων [124].

Τέλος, το επιφανειακό φορτίο των νανοσωματιδίων επηρεάζει σημαντικά την εσωτερίκευση τους στα κύτταρα. Τα θετικά φορτισμένα σωματίδια εμφανίζουν μεγαλύτερη τάση κυτταρικής πρόσληψης, προφανώς λόγω των ιοντικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της θετικά φορτισμένης επιφάνειας τους με τις αρνητικά φορτισμένες κυτταρικές μεμβράνες. Επιπλέον τα θετικά φορτισμένα σωματίδια δραπέτεύουν ευκολότερα από τα λυσοσώματα ενώ τα αρνητικά και ουδέτερα φορτισμένα νανοσωματίδια, όπως τα PLGA σωματίδια, προτιμούν να συνεντοπίζονται (colocalize) με τα λυσοσώματα [124].



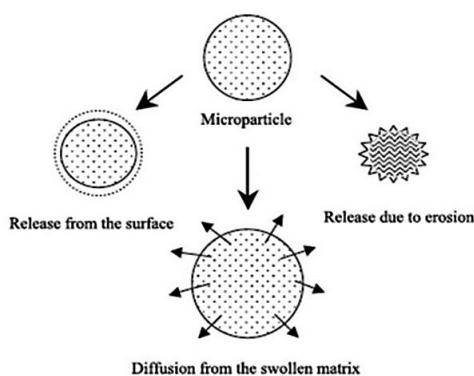
Εικόνα 34. Μηχανισμός κυτταρικής πρόσληψης νανοσωματιδίων [124].

2.5.3. Συμπεριφορά αποδέσμευσης φαρμάκου- Διφασική αποδέσμευση

Το συμπολυμερές PLGA υπόκειται σε αποικοδόμηση είτε μέσω υδρολυτικής διεργασίας είτε μέσω βιοδιάσπασης των εστερικών του συνάψεων, καταλήγοντας στα μονομερή του συστατικά. Η διαδικασία αποδόμησης αυτών των πολυμερών ξεκινά κατά κύριο λόγο ομοιόμορφα από την πολυμερική μήτρα λόγω της διείσδυσης ποσοτήτων νερού σε αυτή, με ρυθμό μεγαλύτερο από τον φυσικό ρυθμό αποικοδόμησης του πολυμερούς. Επιπλέον η αύξηση των εξωτερικών καρβοξυλικών ομάδων ως αποτέλεσμα της βιοδιάσπασης συμβάλλει στην αυτοκατάλυση της διεργασίας. Γενικά η αποδόμηση του PLGA συμπολυμερούς είναι ένα συνονθύλευμα των διεργασιών επιφανειακής και εσωτερικής διάχυσης και διάβρωσης. Ο ρυθμός βιοδιάσπασης των PLGA πολυμερών είναι συχνά απρόβλεπτος, ενώ εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως η αναλογία γαλακτικών και γλυκολικών ομάδων στην πολυμερική αλυσίδα, το μοριακό βάρος του πολυμερούς, ο βαθμός κρυσταλλοποίησης και η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης.

Η αποδέσμευση τώρα του εγκλεισμένου φαρμάκου από την ομοιογενώς αποδομημένη πολυμερική μήτρα θεωρείται πιο πολύπλοκη διαδικασία. Η αποδέσμευση ακολουθεί τα εξής μοτίβα:

1. Την αρχική «έκρηξη» αποδέσμευσης η οποία σχετίζεται άμεσα με το είδος και την συγκέντρωση του φαρμάκου αλλά και με την υδροφοβικότητα του πολυμερούς. Το φάρμακο που βρίσκεται στην επιφάνεια του πολυμερούς και είναι σε επαφή με το υδατικό μέσο, απελευθερώνεται συναρτήσει της διαλυτότητας που εμφανίζει και του ποσοστού διείσδυσης νερού στην πολυμερική μήτρα.
2. Την δεύτερη φάση αποδέσμευσης, όπου εδώ το φάρμακο απελευθερώνεται σταδιακά μέσα από το εσωτερικό παχύτερο στρώμα. Η υδρολυτική διάσπαση του πολυμερούς στα μονομερή του, οδηγεί στην διάνοιξη διόδων όπου μέσω διάχυσης και συνάμα διάβρωσης το φάρμακο αποδεσμεύεται μέχρι να διαλυτοποιηθεί πλήρως το πολυμερικό δίκτυο. Ο ρόλος των ενζύμων φαίνεται να είναι επίσης σημαντικός στην διεργασία βιοδιάσπασης των PLGA πολυμερών.



Εικόνα 35. Μηχανισμοί αποδέσμευσης φαρμάκου από πολυμερικά νανοσωματίδια [125].

Κατά την διεργασία βιοαποικοδόμησης του PLGA, το γαλακτικό οξύ του εισέρχεται στον κύκλο του Krebs, και εκεί μεταβολίζεται δίνοντας διοξείδιο του άνθρακα και νερό. Το γλυκολικό οξύ από την άλλη είτε εκκρίνεται ως έχει από τα νεφρά είτε ομοίως εισέρχεται στον κύκλο του Krebs ^[123].

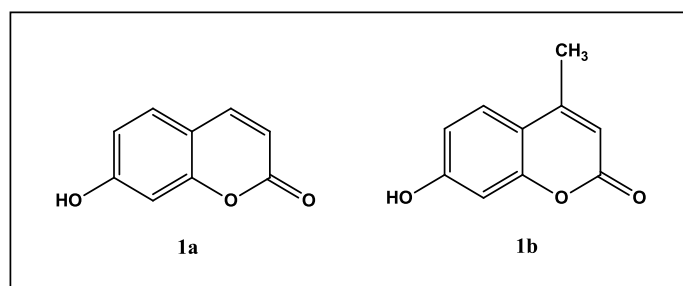
Οι βασικότεροι παράγοντες που επηρεάζουν την βιοδιάσπαση των PLGA πολυμερών είναι οι ακόλουθοι ^[123].

- I. **Η σύνθεση του συμπολυμερούς**, γιατί καθορίζει την υδροφιλικότητα του και τον ρυθμό αποδόμησης της πολυμερικής μήτρας. Αύξηση των μονομερών ομάδων γλυκολικού οξέος στο PLGA συμπολυμερές έχει βρεθεί ότι προωθεί την βιοδιάσπαση του.
- II. **Η κρυσταλλικότητα του συμπολυμερούς**. Συγκρουόμενες επιστημονικές μελέτες υποστηρίζουν ότι αύξηση της κρυσταλλικότητας επιφέρει είτε ελάττωση είτε άλλοτε ενίσχυση του ρυθμού βιοαποικοδόμησης.
- III. **Το μοριακό βάρος**. Πολυμερή με υψηλό μοριακό βάρος χαρακτηρίζονται γενικά από μειωμένους ρυθμούς βιοαποικοδόμησης, λόγω της παρουσίας μακρύτερων μοριακών αλυσίδων που χρειάζονται περισσότερο χρόνο να διασπαστούν.
- IV. **Το είδος του εγκλεισμένου φαρμάκου**. Ο μηχανισμός αποικοδόμησης φαρμάκου-πολυμερική μήτρα εξαρτάται από πολλές παραμέτρους σχετικά με την χημεία του φαρμάκου και τον ρυθμό αποδέσμευσης του.
- V. **Το μέγεθος και το σχήμα της πολυμερικής μήτρας**. Η αναλογία της επιφάνειας προ του όγκου του πολυμερούς επηρεάζει σημαντικά τον ρυθμό διάσπασης του. Υψηλότερη αναλογία επιφάνειας οδηγεί σε μεγαλύτερο ρυθμό διάσπασης.
- VI. **Το pH**. Η *in vitro* μελέτη αποδέσμευσης PLGA σωματιδίων έχει δείξει ότι τόσο το όξινο όσο και το ισχυρά αλκαλικό περιβάλλον επιταχύνουν τον ρυθμό βιοδιάσπασης του πολυμερούς.
- VII. **Η δράση των ενζύμων**. Αν και ο κύριος μηχανισμός διάσπασης των PLGA πολυμερών *in vivo* είναι η υδρολυτική διάσπαση, η παρουσία διαφόρων ενζύμων έχει αναφερθεί ότι συμβάλλει περαιτέρω στην διαδικασία αυτή.
- VIII. **Το ποσοστό φόρτωσης του φαρμάκου**. Οι πολυμερικές μήτρες που έχουν δεχθεί μεγαλύτερη ποσότητα φάρμακου εμφανίζουν και μεγαλύτερη αρχική «έκρηξη» αποδέσμευσης αυτού. Ωστόσο, όταν η περιεκτικότητα σε φάρμακο φτάσει σε ένα ορισμένο επίπεδο, ανάλογα με το είδος του βέβαια, η συγκεκριμένη επίδραση εξασθενεί σταδιακά.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε με στόχο τη σύνθεση καινοτόμων κουμαρινικών αναλόγων, τα οποία θα εξεταστούν για την αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση τους σε ειδικές *in vitro* δοκιμασίες. Ακόμη θα γίνει μελέτη της κυτοτοξικότητάς τους σε κυτταρικές σειρές ανθρώπινου νευροβλαστώματος SK-N-SH μέσω της δοκιμασίας MTT.

Πιο συγκεκριμένα για τον σχεδιασμό και την σύνθεση των κουμαρινικών αναλόγων χρησιμοποιήθηκαν οι ενώσεις **1a** και **1b** (Σχήμα 8) ως μόρια-οδηγοί. Η ένωση **1a** είναι η 7-υδροξυ-κουμαρίνη, το φυσικό προϊόν ουμπελιφερόνη, ενώ η ένωση **1b** είναι η 7-υδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνη. Οι εν λόγω ενώσεις αποτελούν μέρος της τρέχουσας ερευνητικής δραστηριότητας του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας ΕΜΠ, έχοντας γενικώς χαρακτηριστεί για την αξιόλογη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση τους, όπως αυτή εκφράζεται με την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου λιποξυγονάση από σόγια.



Σχήμα 8. Κουμαρινικά ανάλογα με αξιόλογη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της 7-υδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνης, ενώ η 7-υδροξυ-κουμαρίνη λήφθηκε εμπορικά. Μέσα από την αντίδραση αιθεροποίησης κατά Williamson σχηματίστηκαν οι φαρνεσυλοξυ κουμαρίνες, από τα αντίστοιχα μόρια-οδηγούς. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ακυλίωση της 7-υδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνης με το κινναμοϋλο-χλωρίδιο, προκειμένου να παρασκευαστεί ο αντίστοιχος εστέρας του κινναμικού οξέος. Οι εστέρες αυτοί παρουσιάζουν ενδιαφέρον καθώς συνδυάζουν σε ένα μόριο τα δομικά χαρακτηριστικά της κουμαρίνης και ενός φαινολικού οξέος που είναι γνωστό για την ισχυρή αντιοξειδωτική του δράση. Η ταυτοποίηση της δομής των ενώσεων πραγματοποιήθηκε μέσω της Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR).

Μελετήθηκε επίσης η δυνατότητα εγκλεισμού των νέων ενώσεων σε βιοδιασπώμενα νανοσωματίδια πολυ(γαλακτικού-γλυκολικού) οξέος (PLGA) μέσω της τεχνικής γαλακτωματοποίησης με ταυτόχρονη εξάτμιση του οργανικού διαλύτη. Ο νανοεγκλεισμός των ενώσεων συμβάλλει στην προσαρμογή των φυσικοχημικών τους χαρακτηριστικών (υδροφοβικότητα, φωτοευαισθησία) και στην βελτίωση της σταθερότητάς τους. Το μέγεθος, η πολυδιασπορά και το ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων μετρήθηκε μέσω της μεθόδου Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS), ενώ η απόδοση εγκλεισμού των ενώσεων υπολογίστηκε έμμεσα μέσω φασματοσκοπίας απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-Vis).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Σύνθεση κουμαρινικών αναλόγων

1.1. Όργανα και Συσκευές

Στο συγκεκριμένο υποκεφάλαιο γίνεται αναφορά στα όργανα και τις συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν για τον χαρακτηρισμό των παραχθέντων προϊόντων αλλά και για τον προσδιορισμό των ιδιοτήτων τους, όπως το σημείο τήξεως.

Ο χαρακτηρισμός των προϊόντων διεξήχθη μέσω της μεθόδου της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητισμού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance). Τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου ^1H NMR κατεγράφησαν με το όργανο:

VarianGemini 300MHz

Οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων δίνονται σε ppm, ενώ η πολλαπλότητα των σημάτων στα φάσματα ^1H NMR αναφέρονται ως: s (singlet, απλό), d (doublet, διπλό), t (triplet, τριπλό), q (quartet, τετραπλό), m (multiplet, πολλαπλό) και br (broad, ευρύ). Οι σταθερές συζεύξεως J δίνονται σε Hz.

Τέλος, για τον προσδιορισμό των σημείων τήξεως των προϊόντων χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Gallenkamp, ενώ για την συμπύκνωση των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε Περιστροφικός εξατμιστήρας (Buchi Rotavapor® R-210).

1.2. Συνθετική Πορεία των νέων ενώσεων

❖ Γενική μέθοδος παρασκευής της 4-μεθυλο-7-υδροξυ κουμαρίνης

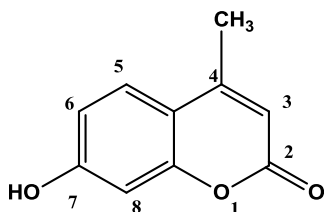
Σε μικρή κωνική φιάλη προστίθενται κατάλληλη ποσότητα ρεσορκινόλης και ακετοξικού αιθυλεστέρα και τοποθετούνται σε λουτρό υπερήχων, με σκοπό την πλήρη διάλυση του στερεού. Κατόπιν εισάγονται σε σφαιρική φιάλη παρουσία πυκνού θειικού οξέος (H_2SO_4). Η σφαιρική φιάλη είναι τοποθετημένη σε παγόλουτρο, κατά την προσθήκη των αντιδρώντων, λόγω του εξώθερμου χαρακτήρα της αντίδρασης, με σκοπό την διατήρηση της θερμοκρασίας κάτω των $10\text{ }^\circ\text{C}$.

Η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση για 24 ώρες, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography) σε σύστημα διαλυτών 50% πετρελαϊκού αιθέρα (PE)/ 50% οξικού αιθυλεστέρα (EtOAc) ή 10% μεθανόλης (MeOH)/ 90% διχλωρομεθάνιου (DCM). Μετά το πέρας της αντίδρασης, το μίγμα της σφαιρικής αναμιγνύεται με πάγο και αναδεύεται έντονα, μέχρι να δημιουργηθεί στερεό προϊόν. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό για την παραλαβή του στερεού. Τέλος, για τον πλήρη καθαρισμό του προϊόντος

πραγματοποιείται η τεχνική της ανακρυστάλλωσης από καθαρή αιθανόλη. Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία ^1H NMR.

7-υδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνη (**1b**) ^[126]

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης απλών υδροξυλιωμένων κουμαρινών, σε 100 mL πυκνού θειικού οξέος, προστίθενται 90,8 mmol (10 g) ρεσορκινόλης και 95 mmol (12 mL) ακετοξικού αιθυλεστέρα. Το προϊόν λαμβάνεται υπό τη μορφή ελαφρώς πορτοκαλί στερεού.

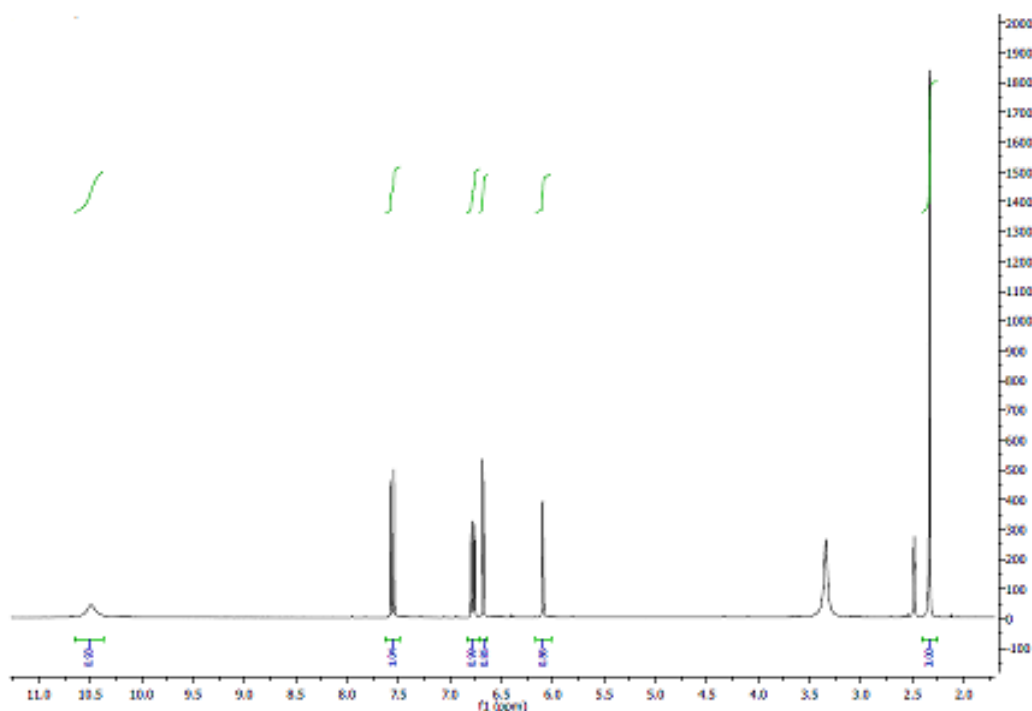


Απόδοση: 8g (50 %)

Σημείο τήξεως: 186-187 °C, (σ.τ. βιβλιογραφίας ^[126]: 186-191 °C)

Φθορίζον αποτύπωμα (εμφάνιση σε UV)

^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 10.49 (s, 1H, OH), 7.55 (d, $J_{5,6}$ =8.7 Hz, 1H, H-5), 6.68 (d, $J_{8,6}$ =2.4 Hz, 1H, H-8), 6.77 ppm (dd, $J_{6,5}$ =8.7 Hz, $J_{6,8}$ =2.4 Hz, 1H, H-6), 6.09 (s, 1H, H-3), 2.34 (s, 3H, CH₃).



Εικόνα 36. Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) της κουμαρίνης **1b**.

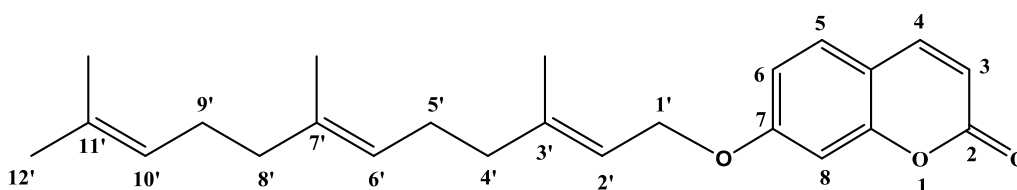
❖ Γενική μέθοδος παρασκευής των 7-υδροξυ αλκοξυλιωμένων κουμαρινών

Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται κατάλληλη ποσότητα ξηρής ακετόνης, η αντίστοιχη 7-υποκατεστημένη κουμαρίνη και το ξηρό ανθρακικό κάλιο (K_2CO_3). Εν συνεχεία, εισάγεται στην σφαιρική και το αντιδρών αλκυλοβρωμίδιο, το βρωμιούχο φαρνεσύλιο (*trans,trans*-Farnesyl bromide) και το μίγμα αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση για 24 ώρες, παρουσία κάθετου ψυκτήρα, στους $80^\circ C$.

Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 60% (PE)/ 40% (EtOAc) ή 10% (MeOH)/ 90% (DCM). Το χρώμα του διαλύματος παρατηρήθηκε να αλλάζει προς κίτρινο. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου και διηθείται υπό κενό με ακετόνη, για απομάκρυνση του άλατος K_2CO_3 . Το διήθημα κατόπιν εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση για απομάκρυνση του διαλύτη. Τέλος, το στερεό προϊόν που προκύπτει προκειμένου να καθαριστεί, ανακρυσταλλώνεται με κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης και εξανίου. Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία 1H NMR.

7-Φαρνεζυλοξυ-κουμαρίνη (Umbelliprenin) (2a) ^[127]

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης των 7-υδροξυ αλκοξυλιωμένων κουμαρινών, σε 21,6 mL ξηρής ακετόνης, προστίθενται 1,54 mmol (250 mg) 7-υδροξυ-κουμαρίνης (Umbelliferone) (1a), 1,54 mmol (213 mg) ξηρού ανθρακικού καλίου και 1,85 mmol (0,5 mL) βρωμιούχου φαρνεσουλίου. Το προϊόν λαμβάνεται υπό τη μορφή βαθύ κίτρινου στερεού.

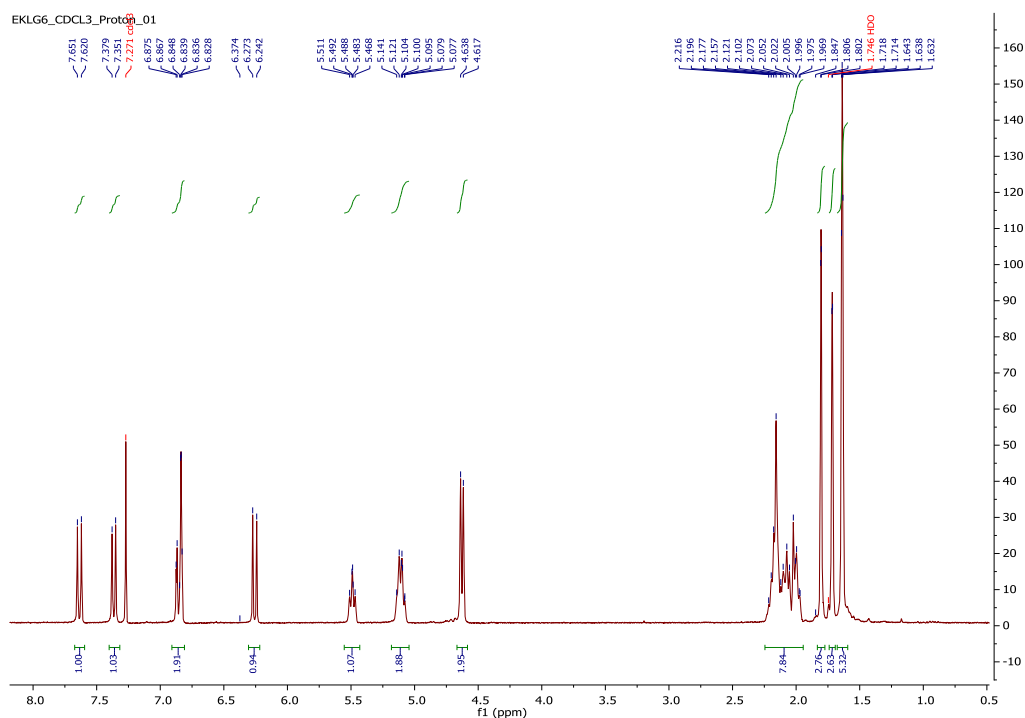


Απόδοση: 57,5mg (11 %)

Σημείο τήξεως: $65-66^\circ C$, (σ.τ. βιβλιογραφίας ^[127]: $61-63^\circ C$)

Φθορίζον αποτύπωμα (εμφάνιση σε UV)

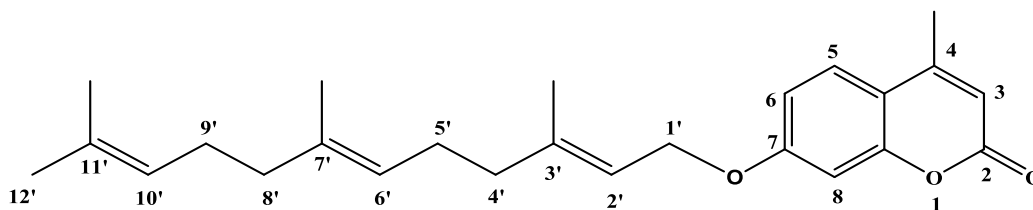
1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.64 (d, $J_{4,3}=9.3Hz$, 1H, H-4) , 7.36 (d, $J_{5,6}=8.4Hz$, 1H, H-5), 6.87 (d, $J=2.4Hz$, 1H, H-8), 6.85- 6.83 (m, 1H, H-6), 6.25 (d, $J_{3,4} = 9.3Hz$, 1H, H-3), 5.49 (t, $J=6.9Hz$, 1H, H-2'), 5.14- 5.08 (m, 1H, H-6'), 4.63 (d, $J = 6.3Hz$, 1H, H-10'), 2.22 -1.97 (m, 8H, $CH_2-4',5',8',9'$), 1.81 (s, 3H, 3'- CH_3), 1.71 (s, 3H, 7'- CH_3), 1.64 (s, 6H, H-12' & 11'- CH_3)



Εικόνα 37. Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, DMSO-d_6) της κουμαρίνης **2a**.

4-μεθυλο-7-Φαρνεζυλοξυ-κουμαρίνη (**2b**)

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης των 7-υδροξυ αλκοξυλιωμένων κουμαρινών, σε 19,9 mL ξηρής ακετόνης, προστίθενται 1,42 mmol (250 mg) 7-υδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνης (**1b**), 1,42 mmol (196,1 mg) ξηρού ανθρακικού καλίου και 1,7 mmol (0,46 mL) βρωμιούχου φαρνεσυλίου. Το προϊόν λαμβάνεται υπό τη μορφή βαθύ κίτρινου στερεού, κολλώδους υφής.

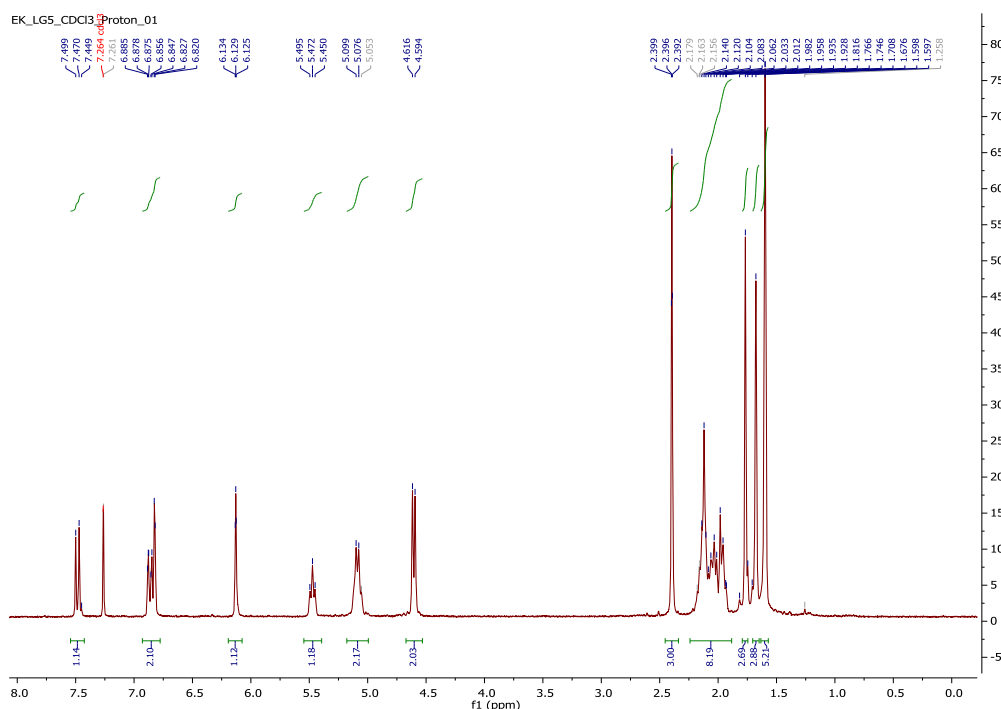


Απόδοση: 240,7 mg (45 %)

Σημείο τήξεως: 45-46 °C

Φθορίζον αποτύπωμα (εμφάνιση σε UV)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7.48 (d, $J=8.7\text{Hz}$, 1H, H-5), 6.88-6.82 (m, 2H, H-6 & H-8), 6.13 (s, 1H, H-3), 5.47 (t, $J=6.9\text{Hz}$, 1H, H-2'), 5.10- 5.05 (m, 1H, H-6'), 4.60 (d, $J = 6.6\text{Hz}$, 1H, H-10'), 2.40 (s, 3H, 4- CH_3), 2.18-1.93(m, 8H, CH_2 -4',5',8',9'), 1.77 (s, 3H, 3'- CH_3), 1.68(s, 3H, 7'- CH_3), 1.60(s, 6H, H-12' & 11'- CH_3).



Εικόνα 38. Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, DMSO-d_6) της κουμαρίνης **2b**.

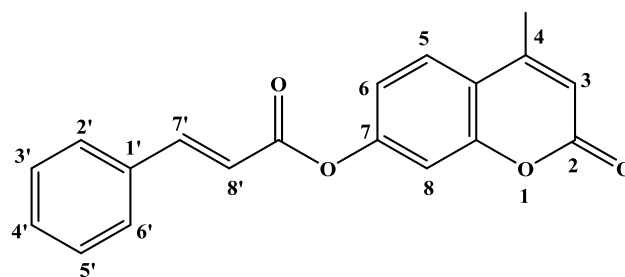
❖ Γενική μέθοδος παρασκευής του Κιναμικού 4-μεθυλ-2-οξο-2H-χρώμεν-7-υλ εστέρα

Ποσότητα της 7-υδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνης (**1b**) (1eq), προστίθεται σε σφαιρική φιάλη μαζί με κατάλληλη ποσότητα του κινναμούλο-χλωριδίου (1,5eq) και της βάσης τριαιθυλαμίνη (Et_3N) παρουσία διαλύτη τετραϋδροφουράνιο (THF). Το μίγμα αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση για 24 ώρες, παρουσία κάθετου ψυκτήρα, σε θερμοκρασία 50°C . Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 60% (PE)/ 40% (EtOAc). Το διάλυμα παρατηρείται να αποκτά ελαφρώς γαλακτώδη υφή και λευκό χρώμα.

Αφότου ολοκληρώθηκε η αντίδραση, προστέθηκε ποσότητα πάγου στο μίγμα και στην συνέχεια η υδατική στιβάδα εκχυλίστηκε με διχλωρομεθάνιο (DCM). Ακολουθεί ξήρανση των οργανικών εκχυλισμάτων με την προσθήκη θειικού νατρίου (Na_2SO_4). Ακολούθησε εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση για απομάκρυνση του διαλύτη, όπου και παρατηρήθηκε η εμφάνιση στερεού προϊόντος στην σφαιρική φιάλη. Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία ^1H NMR.

Κιναμικός 4-μεθυλ-2-οξο-2H-χρώμεν-7-υλ εστέρας (**3**)

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης του 7-υδροξυ-4-μεθυλο-κινναμικού κουμαρινυλ-εστέρα, σε 7,1mL τετραϋδροφουράνιο (THF) προστίθενται 1,42 mmol (250 mg) 7-υδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνης (**1b**) και 2,13 mmol (356 mg) κινναμούλο-χλωριδίου και 5,5mL τριαιθυλαμίνη (Et_3N). Το προϊόν λαμβάνεται υπό τη μορφή λευκού στερεού.

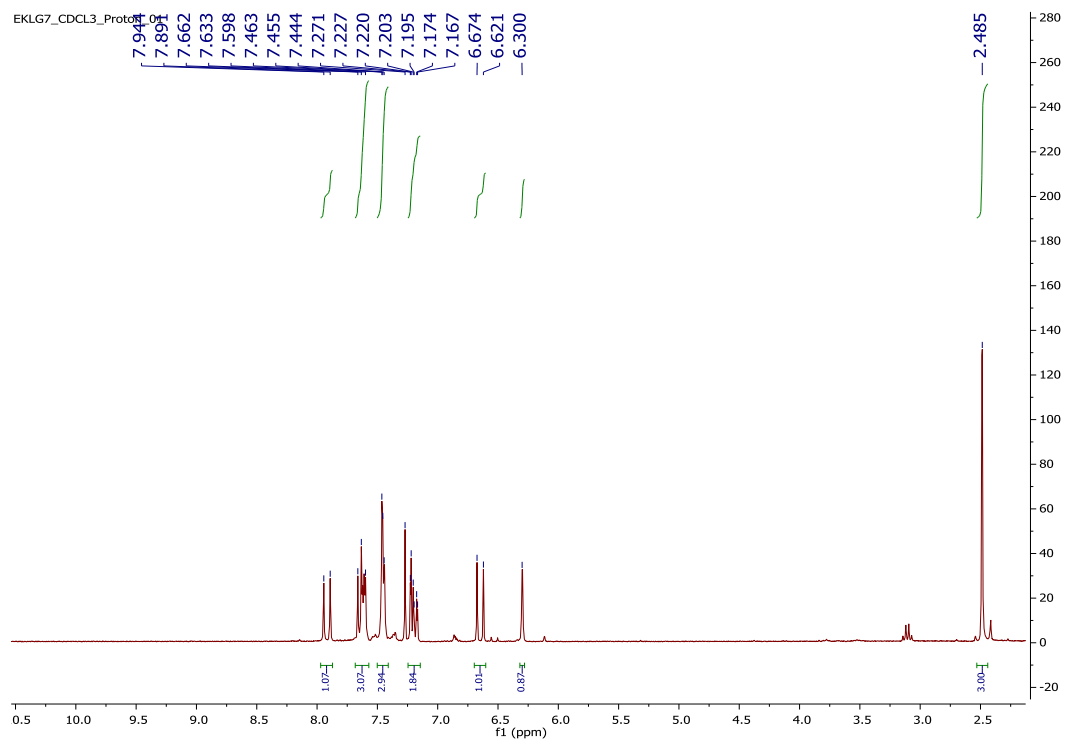


Απόδοση: 335,3 mg (77 %)

Σημείο τήξεως: 145-146 °C

Φθορίζον αποτύπωμα (εμφάνιση σε UV)

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7.92 (d, $J = 15.9\text{Hz}$, H-8'), 7.66-7.60 (m, 3H, αρωματικά H), 7.46-7.44 (m, 3H, αρωματικά H), 7.23-7.17 (m, 2H, αρωματικά H), 6.65 (d, $J=15.9\text{Hz}$, 1H, H-7'), 6.30 (s, 1H, H-3), 2.49 (s, 3H, 4- CH_3).



Εικόνα 39. Φάσμα πρωτονίου $^1\text{H NMR}$ (300MHz, DMSO-d_6) του εστέρα **3**.

2. Σχηματισμός Νανοσωματιδίων - Εγκλεισμός ενώσεων

2.1. Υλικά & Μέθοδοι

- PLGA πολυμερές (PURASORB® PDLG 5002A)
- Ακετόνη (PANREAC)
- Οξικός αιθυλεστέρας (Fisher Scientific)
- Μεθανόλη (Carlo Erba Reagents)
- Αιθανόλη (absolute) (Emsure ACS, Merck)
- Πολυ(βινυλική αλκοόλη) (PVA), 87-89% hydrolyzed, (Alfa Aesar)
- Απιονισμένο νερό

2.2. Όργανα και συσκευές

Τα όργανα και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι:

- Φασματογράφος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) Varian Gemini 2000 (300MHz)
- Φυγόκεντρος 4239R ALC International
- Συσκευή Temperature Controlled Shaker (Gallenkamp)
- Συσκευή Malvern Zetasizer Nano ZSP, για μέτρηση δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS)
- Ψηφιακό φασματοφωτόμετρο πολλαπλών θέσεων Unicam Helios α (Spectronic Unicam EMEA, Cambridge, United Kingdom)

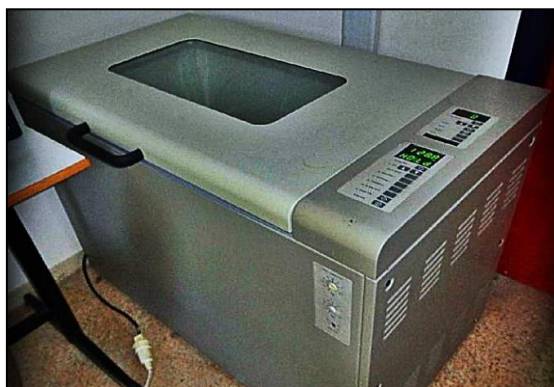
2.3. Παρασκευή υδατικού διαλύματος πολυ(βινυλικής αλκοόλης) (PVA)

Την υδατική φάση των πειραμάτων νανοεγκλεισμού αποτέλεσε υδατικό διάλυμα πολυ(βινυλικής αλκοόλης) (PVA) περιεκτικότητας 1% (w/v). Για την παρασκευή 100 mL διαλύματος PVA 1% (w/v), εισήχθησαν σε ποτήρι ζέσεως των 250mL, 1g πολυ(βινυλικής αλκοόλης) και 100 mL απιονισμένου νερού. Το διάλυμα αφέθηκε υπό ανάδευση για 24 ώρες σε μαγνητικό αναδευτήρα στους 50 °C. Τέλος όταν το διάλυμα επήλθε σε θερμοκρασία δωματίου, τοποθετήθηκε προς φύλαξη σε κλειστό γυάλινο μπουκάλι, από το οποίο λαμβανόταν κάθε φορά κατάλληλη ποσότητα για το εκάστοτε πείραμα.

2.4. Παρασκευή νανοσωματιδίων πολυ(γαλακτικού-γλυκολικού) οξέος (PLGA)

Αρχικά, παρασκευάστηκε διάλυμα πολυ(γαλακτικού-γλυκολικού) οξέος (PLGA), συγκέντρωσης 10 mg/ml. Πιο συγκεκριμένα, 15mg PLGA και 1,5mL οργανικού διαλύτη (ακετόνη ή αντίστοιχα οξικός αιθυλεστέρας), τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα και αναδεύτηκαν για περίπου 10min σε αναδευτήρα Vortex μέχρι την πλήρη διαλυτοποίηση του πολυμερούς.

Παράλληλα, 15mL υδατικού διαλύματος PVA 1% (w/v) εισήχθησαν σε ποτήρι ζέσεως και αφέθηκαν υπό ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα σε θερμοκρασία δωματίου. Εν συνεχεία, ακολούθησε έγχυση της οργανικής φάσης του πολυμερούς με την χρήση σύριγγας, στην αναδευόμενη υδατική φάση με σταθερό ρυθμό, όπου και παρατηρήθηκε ο σχηματισμός γαλακτώματος. Η ανάδευση συνεχίστηκε για 10min στο μαγνητικό αναδευτήρα ενώ αργότερα ακολούθησε τοποθέτηση του γαλακτώματος σε αναδευτήρα (shaker), στα 100 rpm και 27°C για 24h, με στόχο την αργή εξάτμιση του οργανικού διαλύτη και τον τελικό σχηματισμό των PLGA σωματιδίων.



Εικόνα 40. Shaker Gallenkamp.

Η απομόνωση των σωματιδίων από το υδατικό διάλυμα πραγματοποιήθηκε με τρεις διαδοχικές φυγοκεντρήσεις. Σε πρώτη φάση το γαλάκτωμα διαμοιράστηκε σε eppendorcf των 1,5mL. Η πρώτη φυγοκέντρωση εφαρμόστηκε στις 17.000 στροφές/λεπτό για 20min και στους 10°C, με στόχο την καταβύθιση όλων των σωματιδίων. Το υπερκείμενο αυτής της φυγοκέντρωσης (S1) απομακρύνθηκε και συλλέχθηκε σε φιαλίδιο, ενώ τα νανοσωματίδια που σχηματίστηκαν, ξεπλένονται με απιονισμένο νερό, για απομάκρυνση της PVA που έχει τυχόν κατακαθίσει παρασυρόμενη από τα PLGA σωματίδια.

Κατόπιν, ακολούθησε διασπορά των σωματιδίων και τοποθέτηση τους για την δεύτερη φυγοκέντρωση, ιδίων συνθηκών, στις 17.000 στροφές/λεπτό για 20min, στους 10°C κατά την οποία συλλέγεται το υπερκείμενο διάλυμα (S2). Μετα το τέλος και της τρίτης φυγοκέντρου αφου αντίστοιχα συλλέγεται το υπερκείμενο διάλυμα (S3) τα καταβυθισμένα σωματίδια, επαναδιασπείρονται σε 4mL δις-απιονισμένου νερού και είτε αποθηκεύονται σε φιαλίδιο στους 4°C είτε οδηγούνται προς λυοφιλοποίηση.

2.5. Εγκλεισμός κουμαρινικών αναλόγων σε πολυμερικά νανοσωματίδια PLGA

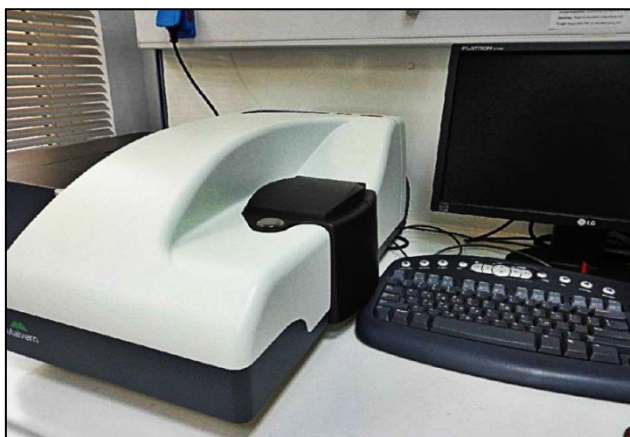
Η διαδικασία που ακολουθείται στο στάδιο αυτό είναι παρόμοια με την προαναφερθείσα για την παρασκευή των τυφλών πολυμερικών σωματιδίων, με την μόνη διαφορά την προσθήκη της δραστικής ένωσης (ποσοστό φόρτωσης 20%). Συγκεκριμένα, 15mg πολυ(γαλακτικού-γλυκολικού) οξέος (PLGA) και 1,5mL ακετόνης ή αντίστοιχα οξικού αιθυλεστέρα, τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα και αναδεύτηκαν για περίπου 10min σε αναδευτήρα Vortex μέχρι την πλήρη διαλυτοποίηση του πολυμερούς. Επιπροσθέτως, διαλύθηκαν 3mg της κάθε κουμαρίνης σε 0,3mL οργανικού διαλύτη (μεθανόλης, αιθανόλης ή ακετόνης κατά περίπτωση). Οι δύο οργανικές φάσεις αναμείχθηκαν και με χρήση σύριγγας προστέθηκαν σε 15 mL υδατικού διαλύματος PVA, 1% (w/v), το οποίο βρισκόταν υπό έντονη ανάδευση. Το διάλυμα μετά από ανάδευση 10min, τοποθετήθηκε στο shaker για 24h και την επομένη διεξήχθησαν οι φυγοκεντρήσεις και η συλλογή των σωματιδίων, σύμφωνα με την διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω.

2.6. Χαρακτηρισμός Νανοσωματιδίων

2.6.1. Μέγεθος, κατανομή μεγέθους & ζ-δυναμικό

Ο χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων σχετικά με το μέγεθος, το δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό, πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (Dynamic Light Scattering).

Συγκεκριμένα παρασκευάζεται διάλυμα νανοσωματιδίων σε δις-απιονισμένο νερό, συγκέντρωσης 0,05mg /mL. Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα για περίπου 2ώρες μέχρις ότου αποκτήσει καλή διασπορά. Κατόπιν, το διάλυμα τοποθετείται σε κυψελίδα disposable capillary cell (DTS1070) για τη λήψη των μετρήσεων, αφού πρώτα διέλθει από ειδικό φίλτρο διαμέτρου 0,45μm. Για κάθε δείγμα πραγματοποιούνται τρεις μετρήσεις και λαμβάνεται ο μέσος όρος. Στις ρυθμίσεις του οργάνου ως δείκτης διάθλασης, λαμβάνεται ο δείκτης διάθλασης του νερού $n_{D,20} = 1.330$.



Εικόνα 41. Συσκευή Malvern Zetasizer Nano ZSP, για τις μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS).

2.6.2. Ποσοστό εγκλεισμού των κουμαρινικών αναλόγων στα PLGA νανοσωματίδια (EE%)

Η απόδοση εγκλεισμού (Encapsulation Efficiency) των κουμαρινικών αναλόγων στα PLGA σωματίδια προσδιορίστηκε έμμεσα, με τη χρήση φασματοσκοπίας απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-Vis).



Εικόνα 42. Όργανο φασματοσκοπίας απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-Vis).

Για την ακρίβεια ποσοτικοποιήθηκε η συγκέντρωση της μη εγκλεισμένης ουσίας στα υπερκείμενα διαλύματα των φυγοκεντρήσεων (S1,S2 και S3). Για την ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης, κατασκευάστηκε αρχικά καμπύλη αναφοράς, με χρήση πρότυπων διαλυμάτων του εκάστοτε κουμαρινικού αναλόγου, γνωστής συγκέντρωσης και απορρόφησης. Το ποσοστό εγκλεισμού υπολογίστηκε ως εξής:

$$EE (\%) = \frac{\text{μάζα εγκλεισμένης ένωσης (mg)}}{\text{ολική μάζα ένωσης (mg)}} \times 100$$

3. In vitro κυττοτοξική δοκιμασία

3.1. Καλλιέργειες κυτταρικών σειρών ανθρώπινου νευροβλαστώματος SK-N-SH

Υλικά & μέθοδοι

- Κύτταρα SK-N-SH (American Type Culture Collection).
- Θρεπτικό μέσο καλλιιεργειών, Minimum Essential Medium Eagle, MEM-Earl (Biochrom AG), εμπλουτισμένο με (MEM-Earl Complete):
 - 10% ορός εμβρύου βοός, Fetal Bovin Serum, FBS (Sigma).
 - 2mM L-γλουταμίνη (Biochrom AG).
 - 1.5g/L όξινο ανθρακικό νάτριο (Biochrom AG).
 - 0.1mM διαλύματος μη απαραίτητων αμινοξέων (Biochrom AG).
 - 1mM πυροσταφυλικό νάτριο (Biochrom AG).
 - 100U/ml πενικιλίνη και 100μg/ml στρεπτομυκίνη (Sigma-Aldrich).
- Διάλυμα θρυψίνης 0.05%(w/v) /Na₂EDTA 0.02% (w/v) σε PBS χωρίς Ca⁺² και Mg⁺² (Biochrom AG).
- DMSO, ειδικό για κυτταροκαλλιέργειες (Sigma-Aldrich).
- Αποστειρωμένες φιάλες καλλιιεργειών επιφάνειας 25 και 75cm² (Geiner Bio-one).
- Αποστειρωμένοι σωλήνες τύπου falcon 15 και 50ml (Geiner Bio-one).
- Αποστειρωμένα σιφώνια (Geiner Bio-one).
- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (NUANRE, Biological Safety Cabinets).
- Επωαστήρας κυττάρων ατμόσφαιρας 5% (v/v) CO₂ σε αέρα και θερμοκρασίας 37°C (Thermo Scientific).
- Οπτικό μικροσκόπιο (Olympus).
- Υδατόλουτρο 37°C.
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος (Heraeus, Labofuge 400R).

3.2. Διατήρηση και ανάπτυξη καλλιιεργειών SK-N-SH.

Τα κύτταρα εναποτίθενται σε φλάσκες καλλιιεργειας των 25 ή 75cm², στις οποίες προστίθενται αντίστοιχα 5 ή 15ml θρεπτικού υλικού MEM-Earl Complete (δες υλικά πάνω). Τα κύτταρα επωάζονται σε ειδική συσκευή επώασης, σε συνθήκες 5% (v/v) CO₂ και 37°C, όπου η ανάπτυξη τους παρατηρείται ανά τακτά διαστήματα, με τη χρήση μικροσκοπίου. Όταν η κυτταρική ανάπτυξη φτάσει στο 85-90% της κατάστασης συμβολής, γίνεται ανακαλλιιεργεια των κυττάρων με θρυψινοποίηση. Κατά την διεργασία θρυψινοποίησης αφαιρείται το ήδη υπάρχον θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα επωάζονται στους 37°C, για διάστημα 5min με την προσθήκη 1ml θρυψίνης (0.05% /25cm² φλάσκα καλλιιεργειας), έως

όπου τα κύτταρα αποκολληθούν πλήρως από την επιφάνεια της φλάσκας. Κατόπιν, ακολουθεί προσθήκη ορού FBS, ίσου όγκου με αυτόν της θρυψίνης. Ο ορός περιέχει αναστολείς του ενζύμου και επομένως το απενεργοποιεί. Το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρεται σε 15ml σωλήνες τύπου falcon και φυγοκεντρείται στα 300x g, για 10min. Το υπερκείμενο διάλυμα απορρίπτεται ενώ ακολουθεί αναδιασπορά των κυττάρων σε καθορισμένο όγκο, φρέσκου θρεπτικού υλικού (MEM-Earl Complete). Συνήθως μόνο το 1/4 του αρχικού κυτταρικού πληθυσμού μεταφέρεται σε νέες φλάσκες καλλιέργειας. Τέλος, οι φλάσκες καλλιέργειας τοποθετούνται στον επωαστήρα μέχρι την επόμενη ανακαλλιέργεια.

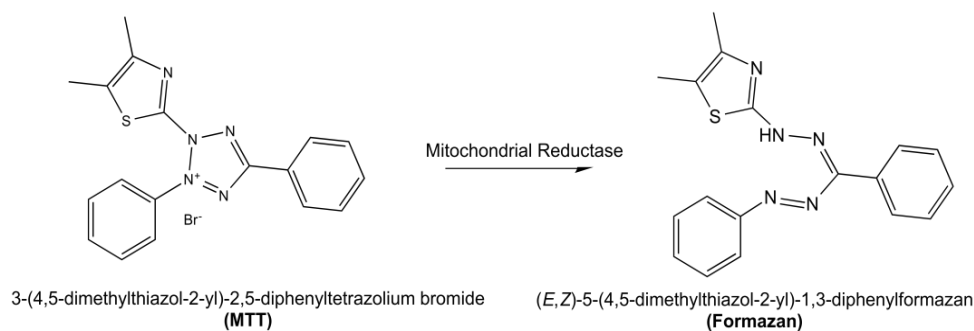
3.3. Μέτρηση κυτταρικής βιωσιμότητας με τη δοκιμασία MTT

Υλικά & μέθοδοι

- Καλλιέργειες κυτταρικών σειρών ανθρώπινου νευροβλαστώματος SK-N-SH.
- Διαλύματα κουμαρινικών αναλόγων σε DMSO και διαλύματα PLGA νανοσωματιδίων σε 1x PBS.
- 3-(4,5-διμεθυλθειαζολ-2-υλ-)-2,5-διφαινυλτετραζόλιο βρωμίδιο (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT), (Sigma-Aldrich).
- DMSO, (Sigma-Aldrich).
- Επωαστήρας κυττάρων ατμόσφαιρας 5% (v/v) CO₂ σε αέρα και θερμοκρασίας 37°C (Thermo Scientific)
- Πλακίδια 96 θέσεων (Geiner Bio-one)
- Μετρητής απορρόφησης φθορισμού πλακιδίων (TECAN Infinite®M200)

Πολλές βιολογικές δοκιμασίες προβαίνουν στην μέτρηση της κυτταρικής επιβίωσης ή/ και πολλαπλασιασμού στα κύτταρα των θηλαστικών, μέσω διαφόρων τεχνικών όπως την βαφή των κυττάρων με χρωστικές ουσίες, την μέτρηση της ενσωμάτωσης ραδιενεργών νουκλεοτιδίων (³H θυμιδίνης ή [¹²⁵I] ιωδοδεοξουριδίνης) κατά την διάρκεια του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και άλλες πολλές ακόμη. Μια απλή και γρήγορη ποσοτική δοκιμασία μέτρησης της κυτταρικής επιβίωσης, ικανή να χειριστεί μεγάλο αριθμό δειγμάτων, αποτελεί η μέθοδος MTT, η οποία περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Mosmann T. το 1983. Η τεχνική βασίζεται στην μετατροπή των αλάτων τετραζολίου σε μη διαλυτά παράγωγα φορμαζάνης. Η χρήση των αλάτων τετραζολίου θεωρήθηκε αρκετά ελκυστική, από την στιγμή που τα συγκεκριμένα άλατα μπορούν να μετρήσουν την ενεργότητα διαφόρων ενζύμων της οικογένειας των αφυδρογονασών (dehydrogenase). Πιο συγκεκριμένα το κίτρινο χρώματος άλας τετραζολίου, MTT, οξειδώνεται από τις αφυδρογονάσες των μιτοχονδρίων των ζωντανών κυττάρων (ουσιαστικά πραγματοποιείται ρήξη του δακτυλίου του τετραζολίου), με αποτέλεσμα την παραγωγή πορφυρού χρώματος κρυστάλλων φορμαζάνης, οι οποίοι και συσσωρεύονται στα μιτοχόνδρια του κυττάρου. Η οξείδωση του MTT πραγματοποιείται μόνον όταν τα μιτοχονδριακά ένζυμα είναι μεταβολικός ενεργά και επομένως η παραγωγή των κρυστάλλων φορμαζάνης είναι ανάλογη του αριθμού βιώσιμων κυττάρων. Το προϊόν της αντίδρασης διαλυτοποιείται με

την προσθήκη DMSO και απελευθερώνεται στον εξωκυττάριο χώρο. Το παραγόμενο χρώμα υπολογίζεται φασματοφωτομετρικά^[128].



Εικόνα 43. Αναγωγή του αλάτος τετραζολίου σε φορμαζάνη μέσω της δράσης των μιτοχονδριακών αναγωγάσων.

Σε πλακίδιο 96 θέσεων επιστρώνονται 2×10^4 κύτταρα SK-N-SH/πηγάδι σε πλήρες θρεπτικό υλικό. Οι κουμαρινικές ενώσεις διαλυτοποιούνται σε DMSO ενώ τα νανοσωματίδια των εγκλεισμένων ενώσεων σε 1x PBS και εν συνεχεία αραιώνονται σε κατάλληλες συγκεντρώσεις στο μέσο καλλιέργειας. Η τελική συγκέντρωση DMSO σε κάθε πηγάδι είναι της τάξης του 0.5% (v/v). Τα κύτταρα επωάζονται σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού, το οποίο περιέχει τα διαλύματα των εγκλεισμένων και μη κουμαρινών, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις των 5, 10, 50, 100, 250 και 500 μM , για 48 ώρες στους 37°C. Ακόμη, σε κάποια πηγάδια προστίθενται παρά μόνο κενά νανοσωματίδια και 0,5% DMSO, αντίστοιχα, τα οποία χρησιμοποιούνται ως δείγματα αναφοράς. Μετά από διάστημα 48 ωρών αφαιρείται το παλιό θρεπτικό υλικό από κάθε πηγάδι και αντικαθιστάται με καινούριο απουσία ορού. Στο σημείο αυτό προστίθεται σε κάθε πηγάδι διάλυμα MTT συγκέντρωσης 0,65 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ και τα κύτταρα επωάζονται για διάστημα τριών (3) ωρών στους 37°C. Μετά το πέρας της επώασης, αφαιρείται από κάθε πηγάδι το θρεπτικό μέσο και κατάλληλη ποσότητα DMSO προστίθεται για την διάλυση των σκουρόχρωμων κρυστάλλων φορμαζάνης. Η απορρόφηση του χρώματος γίνεται στον ειδικό μετρητή πλακιδίων TEKAN Infinite® στα 570nm. Η βιωσιμότητα των κυττάρων εκφράζεται ως το % ποσοστό της βιωσιμότητας των κυττάρων αναφοράς.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Αξιολόγηση της βιολογικής δράσης των κουμαρινικών αναλόγων

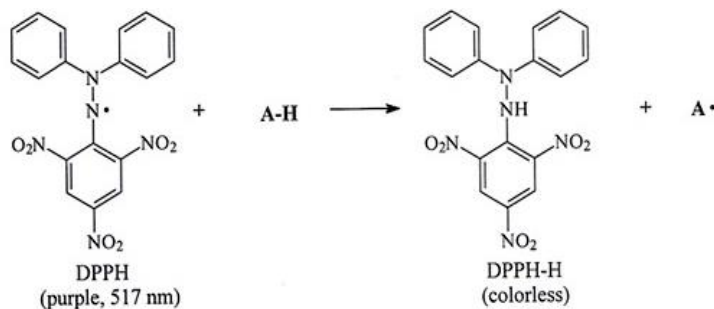
1.1. Μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης

Η αντιοξειδωτική δράση των ενώσεων αξιολογήθηκε μέσω δύο διαφορετικών *in vitro* δοκιμασιών:

1. Την ικανότητα δέσμευσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH
2. Την αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης του λινολεϊκού οξέος που επάγεται από τη ρίζα AAPH.

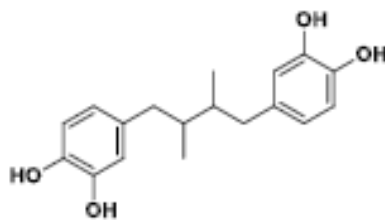
1.1.1. Ικανότητα δέσμευσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH

Ως DPPH ορίζεται η σταθερή ελεύθερη ρίζα της 2,2- διφαινυλ-1-πικρυλυδραζιλής. Η ρίζα DPPH δεν αποσυντίθεται και δεν διμερίζεται ούτε επίσης αντιδρά με το οξυγόνο, πράγμα που την καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμη σε διεργασίες όπως η αναστολή του πολυμερισμού των ριζών και ο προσδιορισμός των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων των αμινών, φαινολών ή άλλων φυσικών ουσιών (βιταμινών, φυτικών εκχυλισμάτων, φαρμακευτικών σκευασμάτων). Η ελεύθερη ρίζα DPPH κατά την οξειδοαναγωγική αντίδραση της και την απόσπαση ενός ατόμου υδρογόνου, δίνει το ανηγμένο παραπροϊόν DPPH-H όπως φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα.



Σχήμα 9. Χημική δομή της ρίζας DPPH πριν και μετά την αντίδραση της με τον αντιοξειδωτικό παράγοντα (AH).

Σε άλλες περιπτώσεις, η προσθήκη του DPPH μπορεί να δώσει R-DPPH-H υποκατεστημένα παράγωγα. Όπως επίσης το ανιόν DPPH⁻, DPPH⁻ μπορεί να οξειδωθεί δίνοντας την ελεύθερη ρίζα. Η ρίζα DPPH χρησιμοποιείται συχνά σαν δείκτης αντιοξειδωτικής ικανότητας του ανθρώπινου πλάσματος, χάρις της ιδιότητας της να αλλάζει χρώμα κατά τον σχηματισμό του παραπροϊόντος DPPH-H (απαλό κίτρινο) το οποίο απορροφά στην περιοχή του ορατού φάσματος στα 520-330 nm. Ως ένωση αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδης ένωση NDGA (Nordihydroguaiaretic acid).



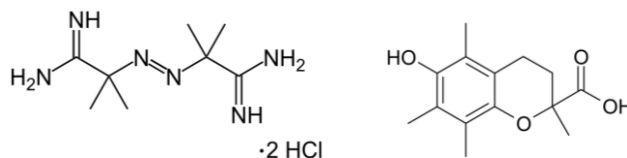
Εικόνα 44. Δομή NDGA.

1.1.2. Αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης.

Τα υδροϋπεροξειδία των λιπιδίων αποτελούν ενδιάμεσα προϊόντα που δεν εμφανίζουν τη μορφή ριζών και προέρχονται κατά βάση από ακόρεστα λιπαρά οξέα, φωσφολιπίδια, γλυκολιπίδια, και εστέρες χοληστερόλης. Ο σχηματισμός τους λαμβάνει χώρα σε ενζυματικές ή μη αντιδράσεις, που περιλαμβάνουν παραγόμενες δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), όπως το ανιόν υπεροξειδίου, τις ρίζες υδροξυλίου, το μονοατομικό οξυγόνο, το υπεροξυνιτρικό ανιόν κ.α. Οι τελευταίες είναι υπεύθυνες για την πρόκληση τοξικών επιδράσεων στον οργανισμό οδηγώντας σε βλάβες των ιστών και όχι μόνο. Οι χημικές αυτές μορφές ορίζονται σαν ενώσεις ικανές να δρουν ανεξάρτητα εφόσον περιέχουν ένα ή περισσότερα μη δεσμικά ηλεκτρόνια. Ο σχηματισμός τους οφείλεται είτε στην απώλεια ενός ηλεκτρονίου από μία μη-ρίζα, είτε αντίστοιχα από την πρόσληψη ενός ηλεκτρονίου. Μπορούν πολύ εύκολα να σχηματιστούν όταν σπάσει ένας ομοιοπολικός δεσμός και παραμείνει ένα ηλεκτρόνιο σε κάθε άτομο, μηχανισμός που ονομάζεται ως ομολυτική σχάση.

Το 2,2αζοδις-(2-αμιδινοπροπανο)υδροχλωρίδιο (AAPH) αποτελεί έναν εκκινητή ελευθέρων ριζών προκαλώντας την οξείδωση του λινολεϊκού οξέος. Η μέθοδος μέτρησης της αντιοξειδωτικής δράσης με AAPH είναι μία γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδος που χρησιμοποιείται ιδιαίτερα στον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης διαφόρων βιοδραστικών ενώσεων. Βασίζεται στην αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης του λινολεϊκού οξέος και αποτελεί μέτρο της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εξεταζόμενων ουσιών ^[129].

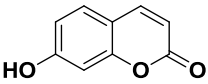
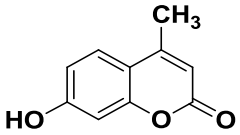
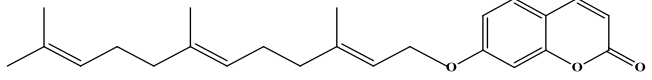
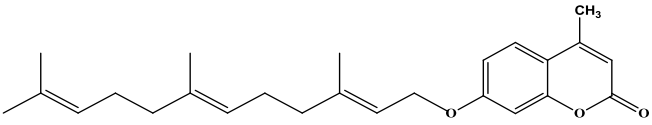
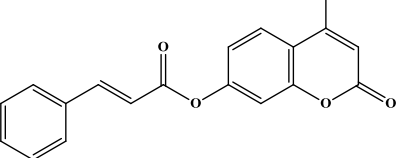
Για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο του AAPH, χρησιμοποιήθηκε ως ένωση αναφοράς το Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), ένα υδατοδιαλυτό ανάλογο της βιταμίνης E.



Εικόνα 45. Δομή AAPH και Trolox αντίστοιχα.

Στον **Πίνακα 5** που ακολουθεί, παρατίθενται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα των αντιοξειδωτικών δοκιμών για το σύνολο των κουμαρινικών παραγώγων.

Πίνακας 5. Αποτελέσματα της in vitro αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής δράσης των παραγόμενων κουμαρινικών αναλόγων.

Δείγμα	Αλληλεπίδραση με την ελεύθερη ρίζα DPPH (%100 μΜ) 20/60 min	Αναστολή της υπεροξειδώσης του λινολεϊκού οξέος (% 100 μΜ)
 (1a)	1/2	92
 (1b)	No/No	93
 (2a)	45/47	92
 (2b)	31/4	47
 (3)	22/2	68
NDGA	93/97	-
Trolox	-	63

Είναι εμφανές ότι την καλύτερη απόδοση στην μέθοδο DPPH παρουσίασε η ένωση **2a** ακολουθώντας δεύτερο στην σειρά το μεθυλιωμένο της παράγωγο **2b**. Γενικά η αντιοξειδωτική δράση των προς εξέτασιν ενώσεων, κατά την αντίδραση τους με τη ρίζα DPPH, χαρακτηρίζεται αρκετά μέτρια γεγονός που δικαιολογείται από την απουσία ελευθέρων υδροξυλίων στο μόριο τους. Οι μόνες ενώσεις που φέρουν ελεύθερο υδροξύλιο είναι η ένωση **1a** και **1b** αντίστοιχα, οι οποίες παραδόξως εμφάνισαν τα χαμηλότερα ποσοστά δραστηριότητας.

Όσον αφορά τη μέθοδο AAPH, εδώ παρατηρείται αξιοσημείωτη δραστηριότητα των αντίστοιχων ενώσεων, δηλαδή της ουμπελιφερόνης (**1a**) και της 4-μεθυλο ουμπελιφερόνης (**1b**). Τα ποσοστά που εμφανίζουν σχετικά με την αναστολή που επιφέρουν στην υπεροξειδωση του λινολεϊκού οξέος, ξεπερνούν κατά πολύ το ποσοστό της ένωσης αναφοράς Trolox. Το ίδιο ακριβώς ισχύει και για την φαρνεζυλιωμένη ένωση **2a**, η οποία παρουσιάζει αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση. Ενδιαφέρον ωστόσο προκαλεί η περίπτωση του 4-μεθυλο παραγώγου της εν λόγω ένωσης το οποίο εμφανίζει σχεδόν την υποδιπλάσια δράση σε σχέση με αυτή. Η υποκατάσταση της μεθυλο ομάδας στην θέση C-4 του κουμαρινικού δακτυλίου φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά την βιολογική του δραση. Τέλος, ο κινναμικός κουμαρινυλ-εστέρας **3** διαθέτει ικανοποιητική αντιοξειδωτική συμπεριφορά σε σύγκριση με την ένωση αναφοράς, την οποία μάλιστα ξεπερνά στο ποσοστό απόδοσης του.

1.2. Μελέτη αντιφλεγμονώδους δράσης

1.2.1. Ικανότητας αναστολής της δράσης του ενζύμου λιποξυγονάση από σόγια

Οι λιποξυγενάσες (LO) αποτελούν μια οικογένεια μεταλλοενζύμων, τα οποία απαντώνται ευρέως τόσο στα φυτά όσο και στα ζώα. Καταλύουν την οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων όπως το φυτικό λινολεϊκό οξύ και το αραχιδονικό οξύ (στα θηλαστικά), σε συγκεκριμένες θέσεις οδηγώντας στον σχηματισμό υδροϋπεροξειδίων ^[129].

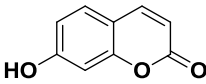
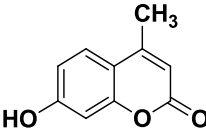
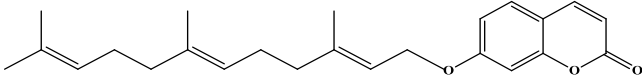
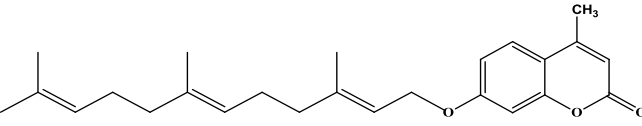
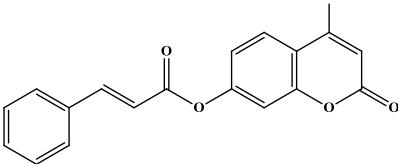
Η λιποξυγονάση φαίνεται να κατέχει σημαντικό ρόλο όσον αφορά τη φυσιολογία του ανθρώπου, εφόσον συμβάλλει στη βιοσύνθεση των λευκοτριενίων, δηλαδή των φλεγμονωδών πρόδρομων ενώσεων που ελευθερώνονται από κύτταρα μυελού των οστών. Ακόμη, ο τρόπος με τον οποίο επιδρά η 5-LO συνδέεται με την αθηροσκλήρυνση, την οστεοπόρωση ^[130], καθώς επίσης και με διάφορες μορφές καρκίνου, όπως το νευροβλάστωμα και ο καρκίνος του προστάτη ^[131]. Επομένως, ιδιαίτερο ενδιαφέρον αποκτά η σύνθεση νέων αναστολέων της λιποξυγονάσης για την αποτελεσματική θεραπεία φλεγμονών, αλλεργιών και άλλων σχετιζόμενων παθήσεων.

Έχει παρατηρηθεί ότι πολλά φλαβονοειδή και φαινολικά παράγωγα αναστέλλουν την δράση της λιποξυγονάσης από σόγια. Αυτή η αναστολή σχετίζεται με την ικανότητά τους να ανάγουν τα ιόντα Fe^{3+} του ενεργού κέντρου στην καταλυτικά ανενεργή μορφή Fe^{2+} . Οι

περισσότεροι από τους LO αναστολείς χαρακτηρίζονται για την αντιοξειδωτική τους δράση και την ικανότητα τους να εξουδετερώνουν τις παραγόμενες ελεύθερες ρίζες ^[132].

Στον **Πίνακα 6** που ακολουθεί παρουσιάζεται η (%) αναστολή της δράσης του ενζύμου λιποξυγονάση (LOX) για το κάθε κουμαρινικό παράγωγο. Ως ένωση αναφοράς χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας της λιποξυγονάσης, NDGA (Nordihydroguaiaretic acid).

Πίνακας 6. Αξιολόγηση της αντιφλεγμονώδους δράσης των παραγόμενων κουμαρινικών αναλόγων.

Δείγμα	Ικανότητα αναστολής της λιποξυγονάσης (LOX) (% σε συγκέντρωση 100μΜ)
 <p>(1a)</p>	100
 <p>(1b)</p>	No
 <p>(2a)</p>	4
 <p>(2b)</p>	77
 <p>(3)</p> <p>NDGA</p>	100
	86

Όπως παρατηρείται τη μέγιστη παρεμποδιστική ικανότητα παρουσιάζει η ουμπελιφερόνη (**1a**) που φαίνεται να αναστέλλει πλήρως την δράση του ενζύμου. Το μεθυλο παράγωγο αυτής, η ένωση **1b** καθίσταται ανενεργό στην παρεμποδιστική του δράση και αυτό με την προσθήκη μόνο ενός μεθυλίου στη θέση C4 του μορίου. Αντίθετα στα φαρνεζυλιωμένα ανάλογα παρατηρούμε ότι η προσθήκη της μεθυλο ομάδας στη θέση C4 του δακτυλίου βελτιώνει την δράση του μορίου **2b** σχεδόν 20 φορές πιο πάνω από το αντίστοιχο παράγωγο του. Το υψηλό ποσοστό του 77% φαίνεται να πλησιάζει αρκετά αυτό της ένωσης αναφοράς. Τέλος, ο κινναμικός κουμαρινυλ-εστέρας **3** παρουσιάζει αξιόλογη ικανότητα αναστολής του ενζύμου (ποσοστό 100%). Η εστεροποίηση της 7-υδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνης (**1b**) με το κινναμικό οξύ οδηγεί σε ένα πολύ δραστικό παράγωγο, σε σχέση με την αρχική ένωση.

2. Χαρακτηρισμός PLGA νανοσωματιδίων

2.1. Μέγεθος, δείκτης διασποράς και ζ- δυναμικό των PLGA κενών Νανοσωματιδίων

Στην συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκε ο εγκλεισμός διαφόρων κουμαρινικών αναλόγων σε βιοδιασπώμενα PLGA νανοσωματίδια. Η μόνη παράμετρος που μετεβλήθη προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδρασή της στα χαρακτηριστικά των σωματιδίων και την απόδοση εγκλεισμού, ήταν το είδος του οργανικού διαλύτη που απαρτίζει την διεσπαρμένη φάση του συστήματος.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ο σχηματισμός κενών (blank) PLGA νανοσωματιδίων. Οι πειραματικές συνθήκες που εφαρμόστηκαν παρουσιάζονται αναλυτικά στον **Πίνακα 7**. Ο χαρακτηρισμός των παραγόμενων νανοσωματιδίων έγινε μέσω της μεθόδου Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων (ως ο Μ.Ο. τριών μετρήσεων συνολικά) φαίνονται στον **Πίνακα 8**.

Πίνακας 7. Συνθήκες παραγωγής κενών PLGA νανοσωματιδίων.

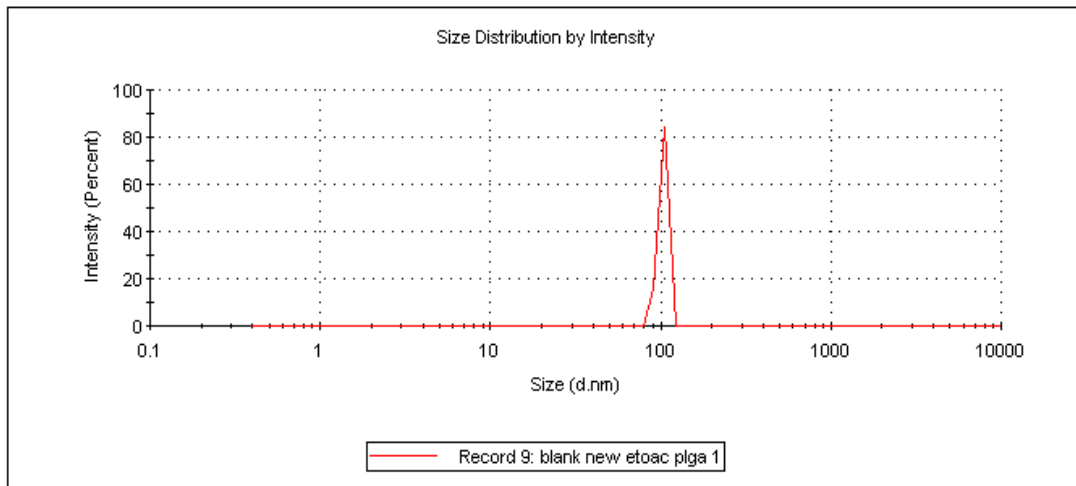
Πολυμερές	Mw PLA (g mol ⁻¹)	Θερμοκρασία (°C)	Ποσοστό Φόρτωσης	Ρυθμός Ανάδευσης (rpm)	Αναλογία όγκου οργανικής/υδατικής φάσης	% PVA
PLGA (50:50)	15000	25	-	350	0.1	1

Πίνακας 8. Αποτελέσματα μετρήσεων DLS για το μέγεθος, την πολυδιασπορά και το ζ-δυναμικό παραγόμενων κενών PLGA νανοσωματιδίων.

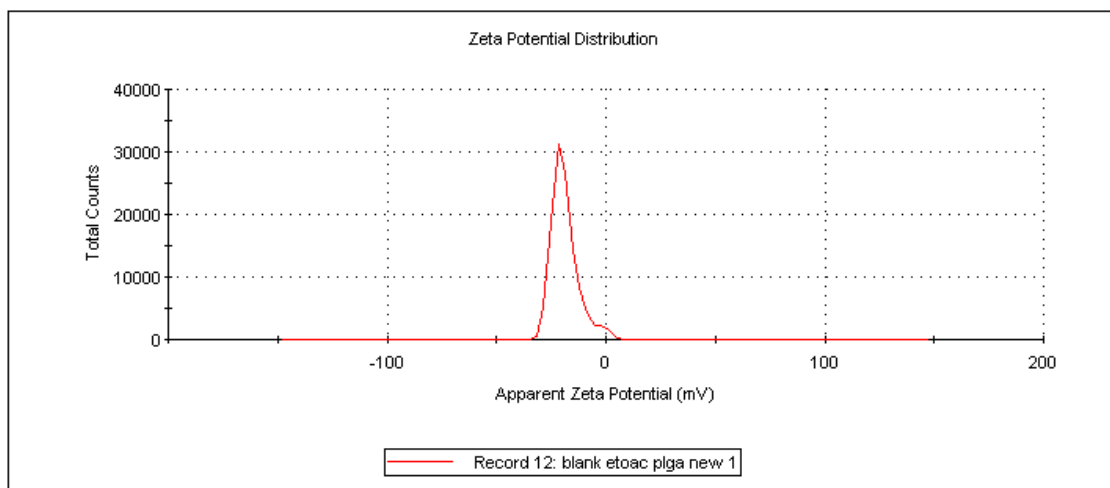
Δείγμα	Μέγεθος (nm)	PDI	Z-δυναμικό (mV)
Blank PLGA NPs	135.8±3.4	0.363±0.013	-19.3±2.4

Παρατηρείται ότι το μέγεθος των κενών νανοσωματιδίων είναι αρκετά ικανοποιητικό όπως και η μεγάλη τιμή του ζ-δυναμικού τους, η οποία υποδηλώνει σταθερές νανοσωματιδιακές δομές. Ακόμη, παρατηρείται σχετικά ικανοποιητική διασπορά στο διάλυμα των νανοσωματιδίων μιας και ο δείκτης πολυδιασποράς έχει τιμή μικρότερη της μονάδας.

Ενδεικτικά, παρατίθενται τα διαγράμματα της μέσης κατανομής μεγέθους καθώς και της κατανομής δυναμικού επιφάνειας του τυχαίου δείγματος Blank_EtOAc, όπως προέκυψαν από την μέτρηση DLS.



Διάγραμμα 1. Κατανομή μεγέθους του δείγματος Blank_EtOAc.



Διάγραμμα 2. Κατανομή δυναμικού επιφάνειας του δείγματος Blank_EtOAc.

2.2. Επίδραση του Οργανικού διαλύτη στα χαρακτηριστικά των PLGA Νανοσωματιδίων

Όπως αναφέρθηκε στο Κεφ. 2.4.1., το είδος του οργανικού διαλύτη παίζει σημαντικό ρόλο στον τελικό σχηματισμό των πολυμερικών νανοσωματιδίων, επιδρώντας με διαφορετικό τρόπο στα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά.

Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικοί οργανικοί διαλύτες στην τεχνική νανοεγκλεισμού που ακολουθήσαμε, προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση τους στα παραγόμενα PLGA νανοσωματίδια. Ο πρώτος διαλύτης ήταν η Ακετόνη, ένας πτητικός οργανικός διαλύτης, πλήρως αναμίξιμος με το νερό, ενώ ο δεύτερος ήταν ο Οξικός αιθυλεστέρας που διαφέρει ουσιαστικά ως προς την υδατοδιαλυτότητα του, μιας και

θεωρείται μερικώς αναμίξιμος με το νερό. Γενικά, και οι δύο οργανικοί διαλύτες επιλέχθηκαν με βάση το κύριο γνώρισμα τους, ότι συγκαταλέγονται στην λίστα των ασφαλών και μη τοξικών προς τον άνθρωπο διαλυτών. Ένας σημαντικός λόγος που καθόρισε περαιτέρω την απόφαση αυτή, ήταν ότι τα δείγματα που επρόκειτο να παρασκευαστούν θα οδηγούνταν μετέπειτα σε in vitro κυτοτοξική μελέτη, και άρα η ανάγκη για φιλικότερα προς τα κύτταρα υλικά ήταν σαφώς μεγαλύτερη. Ακόμη πρέπει να αναφερθεί η παρουσία συνδιαλυτών στο σύστημα σχετικά με την συμβολή τους ως προς τη διάλυση των δραστικών ενώσεων, και συγκεκριμένα της μεθανόλης, αιθανόλης και ακετόνης ανά περίπτωση.

Στον **Πίνακα 9** που ακολουθεί, παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα των μετρήσεων DLS για το μέγεθος, την πολυδιασπορά και το ζ-δυναμικό των παραγόμενων PLGA σωματιδίων υπό την επίδραση κάθε διαλύτη ξεχωριστά

Πίνακας 9. Επίδραση του οργανικού διαλύτη στο μέγεθος, το δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό των PLGA νανοσωματιδίων.

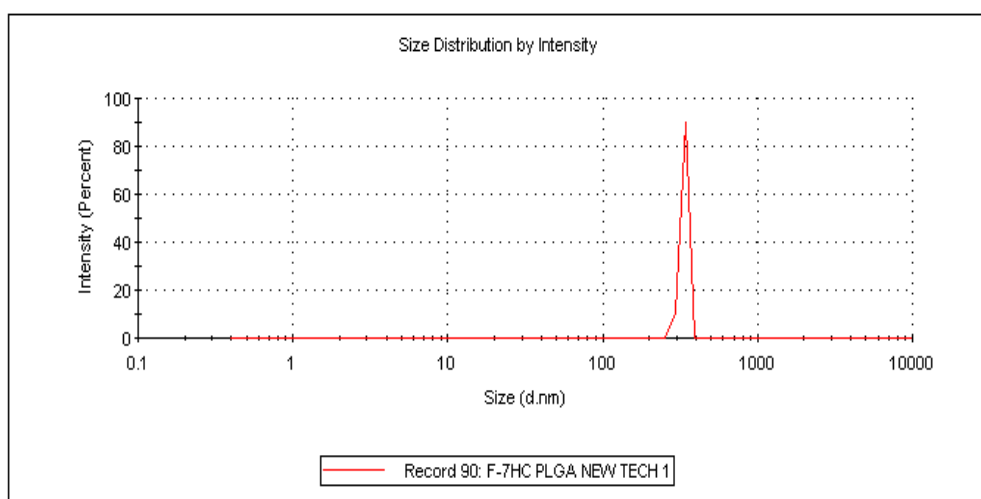
Δείγματα	Διαλύτης Ακετόνη			Διαλύτης Οξικός Αιθυλεστέρας		
	Μέγεθος (nm)	Z-δυναμικό (mV)	PDI	Μέγεθος (nm)	Z-δυναμικό (mV)	PDI
Κενά NPs	135.8±3.4	-19.3±2.4	0.363±0.013	179.7±9.9	-21.8 ±4.7	0.23±0.035
7-υδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνη NPs (1b-NPs)	164.9±22.6	-22.0±2.2	0.330±0.024	165.6±9.9	-13.5±3.9	0.664±0.102
7-υδροξυ-κουμαρίνη NPs (1a -NPs)	185.7±33.2	-9.8±3.8	0.561±0.133	193±16.4	-26.7±3.5	0.546±0.022
Ουμπελιπρενίνη NPs (2a-NPs)	442.4±238	-21.4±1.8	0.65±0.187	141.7±16.9	-11.1±3.4	0.59±0.209
4-μεθυλο-ουμπελιπρενίνη NPs (2b-NPs)	187.3±75.3	-9.1±0.2	0.397±0.128	149±17.4	-14.8±3.3	0.54±0.032
Κιναμικός κουμαρινοϋλεστέρας NPs (3-NPs)	187.5±55.9	-22.6±4.8	0.343±0.096	175.9±32.3	-24.8±3.4	0.36±0.028

Παρατηρείται ότι το μέγεθος των νανοσωματιδίων εμφανίζει ελαφρώς χαμηλότερη τιμή για τα δείγματα που παρασκευάστηκαν με τον οξικό αιθυλεστέρα. Βέβαια, όσον αφορά το δείγμα **Ουμπελιπρενίνη NPs (2a-NPs)**, εδώ η χρήση του οξικού αιθυλεστέρα φαίνεται να ελαττώνει σημαντικά το μέγεθος του σε υποτριπλάσιο επίπεδο.

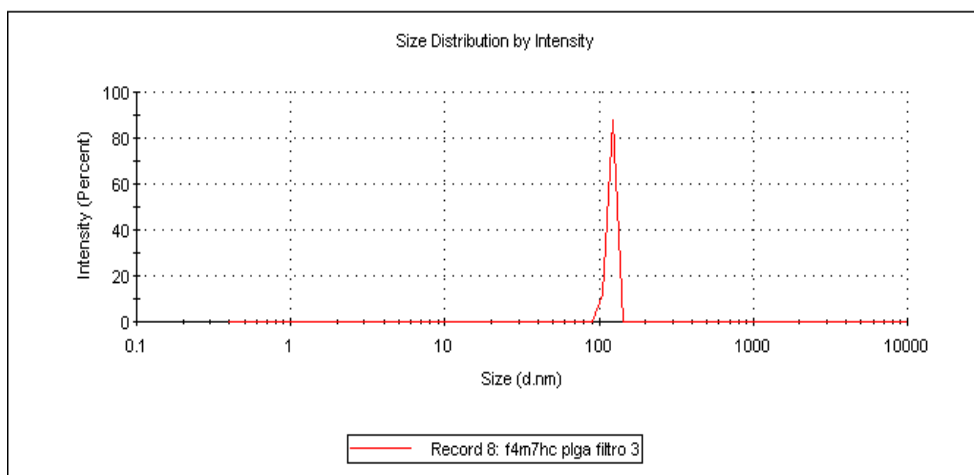
Ιδιαίτερα σημαντική για την συμπεριφορά των νανοσωματιδίων θεωρείται και η κατανομή του μεγέθους τους. Διαλύματα ετερογενή, με μεγάλες διακυμάνσεις ως προς το μέγεθος των σωματιδίων τους, χαρακτηρίζονται συν τοις άλλοις από χαμηλά ποσοστά φόρτωσης των ενώσεων, μη σταθερό ρυθμό αποδέσμευσης και γενικά εμφανίζουν αναποτελεσματικότητα στην δράση τους. Υψηλές τιμές του δείκτη πολυδιασποράς, με μέγιστο την μονάδα, υποδεικνύουν ευρεία κατανομή μεγέθους και ανομοιογένεια. Η πολυδιασπορά του συστημάτων μας φαίνεται να μην επηρεάζεται σημαντικά από την χρήση των διαφορετικών διαλυτών. Τα επίπεδα PDI είναι σχετικά χαμηλά, και στις δύο περιπτώσεις, με τα δείγματα του οξικού αιθυλεστέρα μόνο να εμφανίζουν λίγο πιο ανεβασμένες τιμές σε σύγκριση με αυτά της ακετόνης.

Όσον αφορά το ζ-δυναμικό, το οποίο αποτελεί και παράγοντα σταθερότητας του συστήματος, παρατηρείται ότι η πλειοψηφία των δειγμάτων εμφανίζει υψηλές αρνητικές τιμές που είναι και το ζητούμενο. Επομένως μιλάμε για ένα σύστημα σταθερό, που αποτρέπει τη δημιουργία συσσωματωμάτων.

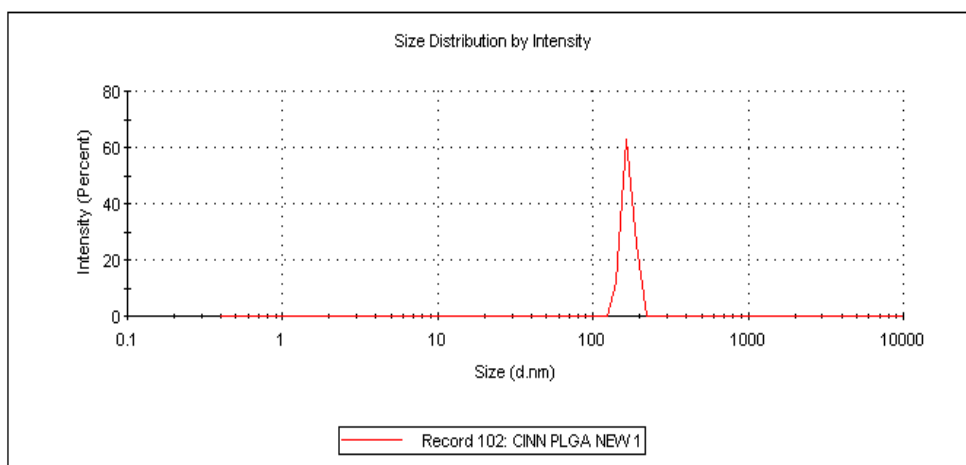
Ενδεικτικά, παρατίθενται τα διαγράμματα της μέσης κατανομής μεγέθους καθώς και της κατανομής δυναμικού επιφάνειας των δειγμάτων Ουμπελιπρενίνη (2a-NPs)_EtOAc, 4-μεθυλο-ουμπελιπρενίνη (2b-NPs)_EtOAc και Κιναμικός κουμαρινοϋλ-εστέρας (3-NPs)_EtOAc, όπως προέκυψαν από την μέτρηση DLS.



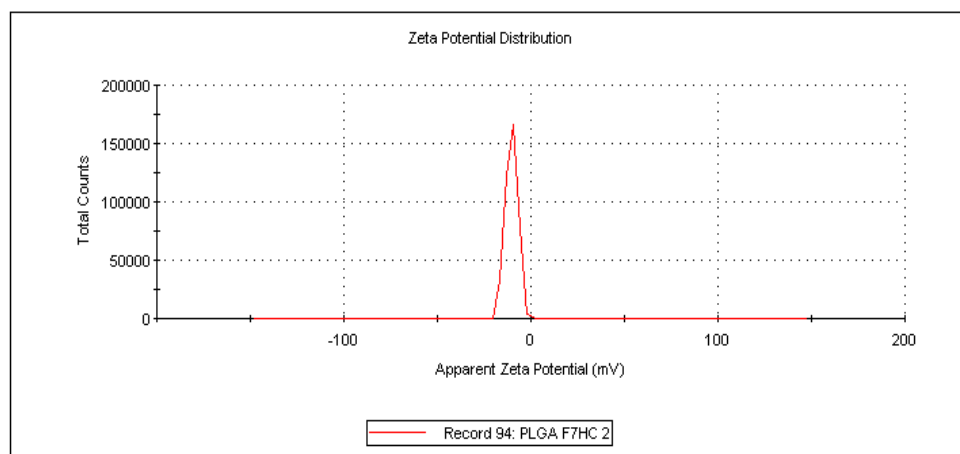
Διάγραμμα 3. Κατανομή μεγέθους του δείγματος Ουμπελιπρενίνη (2a-NPs)_EtOAc.



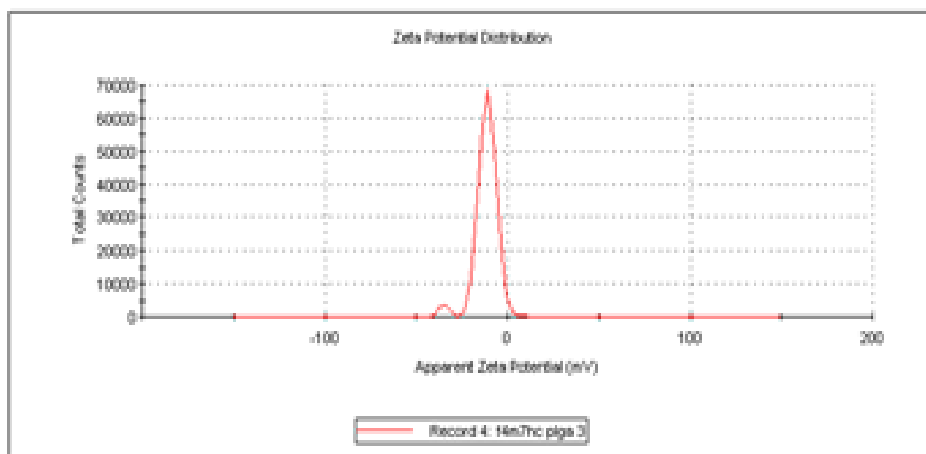
Διάγραμμα 4. Κατανομή μεγέθους του δείγματος 4-μεθυλο-ουμπελιπρενίνη (2b-NPs)_EtOAc.



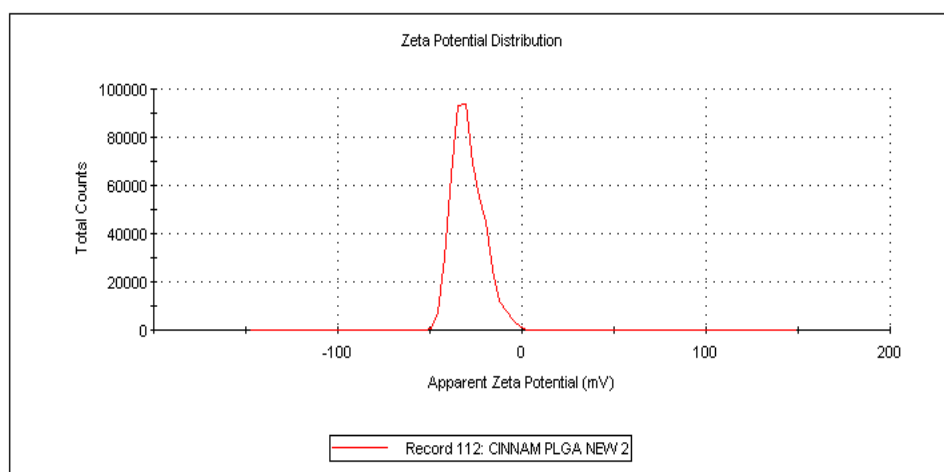
Διάγραμμα 5. Κατανομή μεγέθους του δείγματος Κινναμικός κουμαρινούλ-εστέρας (3-NPs)_EtOAc.



Διάγραμμα 6. Κατανομή δυναμικού επιφάνειας του δείγματος Ουμπελιπρενίνη (2a-NPs)_EtOAc.



Διάγραμμα 7. Κατανομή δυναμικού επιφάνειας του δείγματος 4-μεθυλο-ουμπελιπρενίνη (2b-NPs)_EtOAc.



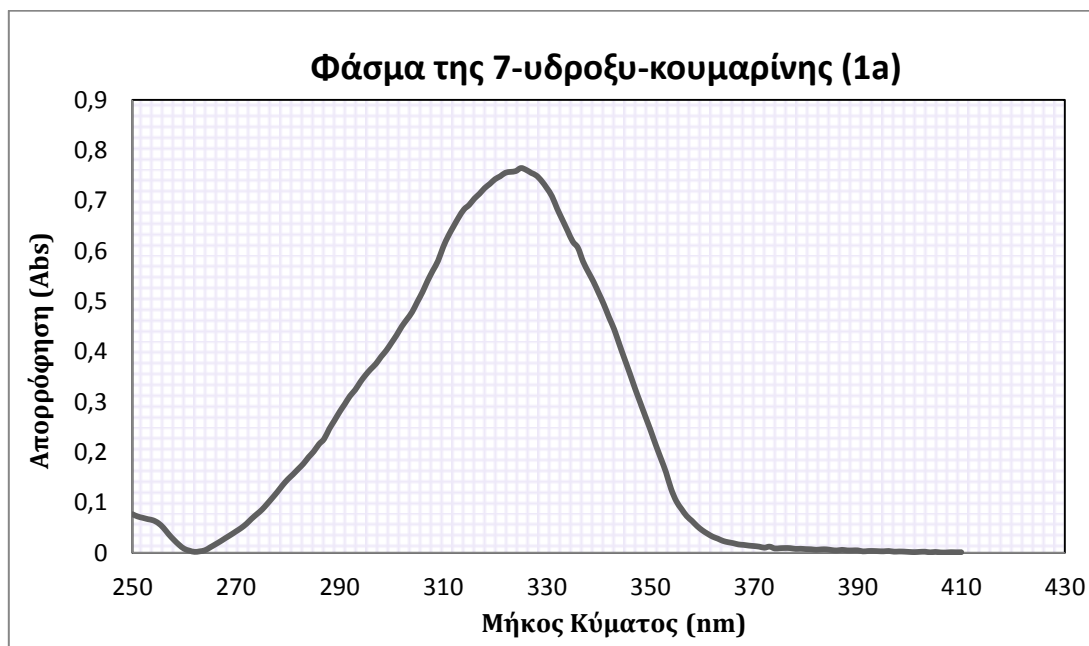
Διάγραμμα 8. Κατανομή δυναμικού επιφάνειας του δείγματος Κινναμικός κουμαρινοϋλ-εστέρας (3-NPs)_EtOAc.

2.3. Απόδοση Εγκλεισμού κουμαρινών

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα των μετρήσεων DLS για τα χαρακτηριστικά των παραγόμενων PLGA νανοσωματιδίων, καταλήξαμε ότι η χρήση του οξικού αιθυλεστέρα ως βασικό διαλύτη της οργανικής φάσης, είναι προτιμητέα για την τεχνική νανοεγκλεισμού που εφαρμόζεται. Ο συγκεκριμένος διαλύτης συνεισφέρει στο μικρό μέγεθος των σωματιδίων που είναι και το ζητούμενο, στην σταθερότητα του διαλύματος ενώ το γεγονός ότι είναι ένας φιλικός διαλύτης για την ανθρώπινη υγεία, τον κάνει ακόμα πιο ελκυστικό για χρήση.

Ο προσδιορισμός της ικανότητας εγκλεισμού (Encapsulation Efficiency, EE%) των κουμαρινικών αναλόγων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση φασματοσκοπίας απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-Vis). Αρχικά, κατασκευάστηκε η καμπύλη απορρόφησης κάθε ένωσης, στο όργανο UV-Vis που χρησιμοποιήθηκε, συναρτήσει της συγκέντρωσης.

Πιο συγκεκριμένα, για την 7-υδροξυ-κουμαρίνη (**1a**), ελήφθη το φάσμα απορρόφησης της ένωσης προκειμένου να προσδιοριστεί το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης. Όταν αυτό προσδιορίστηκε στα 325 nm (**Διάγραμμα 9**), ακολούθησε μέτρηση των πρότυπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης στο συγκεκριμένο μήκος κύματος.



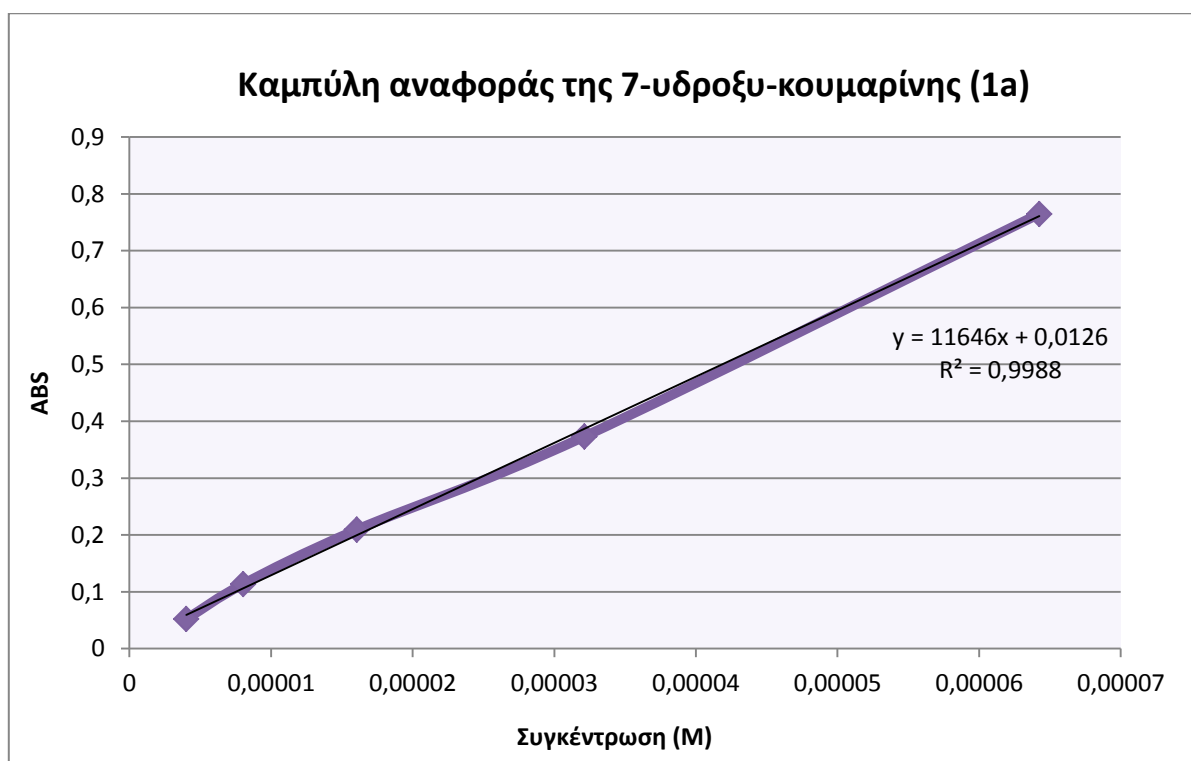
Διάγραμμα 9. Φάσμα απορρόφησης της 7-υδροξυκουμαρίνης (**1a**).

Για γνωστές συγκεντρώσεις πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις που παρουσιάζονται ακολούθως:

Πίνακας 10. Αποτελέσματα μετρήσεων πρότυπων διαλυμάτων για κατασκευή της καμπύλης αναφοράς της 7-υδροξυ-κουμαρίνης (**1a**).

Συγκέντρωση (Mole/L)	Απορρόφηση (ABS)
6,425E-05	0,7648
3,212E-05	0,3713
1,606E-05	0,2092
8,031E-06	0,1136
4,015E-06	0,0521

Βάσει των παραπάνω μετρήσεων κατασκευάζεται η καμπύλη αναφοράς της 7-υδροξυ-κουμαρίνης (**1a**) στα 325 nm, όπως φαίνεται στο **Διάγραμμα 10**.



Διάγραμμα 10. Καμπύλη αναφοράς της 7-υδροξυκουμαρίνης (**1a**) στα 352nm.

Εν συνεχεία, η ποσοτικοποίηση της μάζας της μη εγκλεισμένης ένωσης στα υπερκείμενα S1, S2 και S3 των φυγοκεντρήσεων, γίνεται μέσω της καμπύλης αναφοράς της ένωσης. Πιο συγκεκριμένα, για το κάθε υπερκείμενο προσδιορίζεται η μέγιστη απορρόφηση του στα 325nm. Όσα εκ των δειγμάτων, υπερέβαιναν το εύρος τιμών της καμπύλης αναφοράς, αραιώνονταν κατάλληλα με τον διαλύτη αναφοράς, δηλαδή με απιονισμένο νερό. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στον **Πίνακα 11** που ακολουθεί.

Πίνακας 11. Αποτελέσματα μετρήσεων UV-Vis των υπερκειμένων δ/των της ένωσης **1a**.

Δείγμα	Συγκέντρωση (M)	Απορρόφηση (Abs)	Όγκος διαλύματος (ml)	Μάζα (mg)
S1	0,001178	0,287	12	2,2922
S2	2,962E-05	0,0195	12	0,0576
S3	2,868E-06	0,046	12	0,0056
Συνολικά				2,3554

Έτσι, υποθέτοντας ως θεωρητική, μέγιστη μάζα της ένωσης τα 3mg καταλήγουμε σε ποσοστό εγκλεισμού ίσο με:

$$EE (\%) = \frac{3 - 2,3554 (mg)}{3 (mg)} \times 100 = 21,49\%$$

Η ίδια ακριβώς διαδικασία πραγματοποιήθηκε για όλα τα κουμαρινικά παράγωγα που συντέθηκαν στην εργασία αυτή. Το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης κάθε ένωσης παρουσιάζεται στον **Πίνακα 12**.

Πίνακας 12. Μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης των κουμαρινικών αναλόγων **1a-3a**.

Ένωση	Μήκος κύματος (nm)
4-μεθυλο-ουμπελιπρενίνη (2b)	322
4-μεθυλο-ουμπελιφερόνη (1b)	323
Ουμπελιπρενίνη (2a)	324
Κιναμικός κουμαρινυλ-εστέρας (3)	329

Τέλος, η απόδοση εγκλεισμού κάθε κουμαρινικής ένωσης παρουσιάζεται συγκεντρωτικά στον εικονιζόμενο **Πίνακα 13**.

Πίνακας 13. Απόδοση εγκλεισμού των κουμαρινικών αναλόγων **1a-3a**.

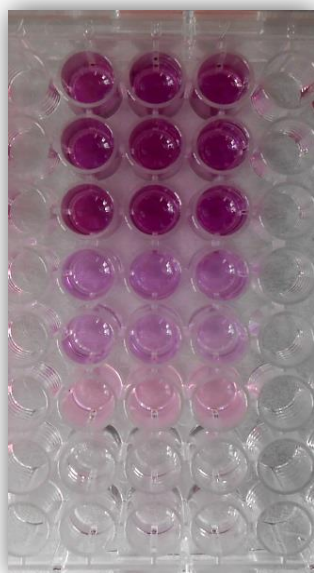
Ένωση	Απόδοση Εγκλεισμού (%)
Ουμπελιφερόνη (1a)	21,49
4-μεθυλο-ουμπελιφερόνη (1b)	55,44
Ουμπελιπρενίνη (2a)	94,87
4-μεθυλο-ουμπελιπρενίνη (2b)	89,46
Κιναμικός κουμαρινυλ-εστέρας (3)	92,88

Παρατηρείται ότι η απόδοση εγκλεισμού των ισοπρενυλοξυ κουμαρινών **2a** και **2b** αλλά και του κινναμικού εστέρα **3**, χαρακτηρίζεται ιδιαίτερα υψηλή με εντυπωσιακά ποσοστά εγκλεισμού. Το χαμηλότερο ποσοστό εγκλεισμού κατέχει η 7-υδροξυκουμαρίνη ή αλλιώς ουμπελιφερόνη (**1a**), ενώ σχεδόν την διπλάσια απόδοση και λίγο παραπάνω έχει το 4-μεθυλο παράγωγο της. Πιθανόν αυτό να οφείλεται στο γεγονός ότι τα συγκεκριμένα μόρια χαρακτηρίζονται από ελαφρώς μεγαλύτερη τάση υδροφιλικότητας σε σχέση με τα ισοπρενυλιωμένα παράγωγα τους ή τον κινναμικό κουμαρινυλ-εστέρα αντίστοιχα. Θεωρητικά όσο πιο υδρόφοβο χαρακτήρα εμφανίζει η εγκλεισμένη ένωση τόσο πιο μεγάλη συνάφεια και ισχυρότερη αλληλεπίδραση θα έχει με το εξίσου υδρόφοβο συμπολυμερές PLGA.

3. In vitro κυτοτοξική μελέτη

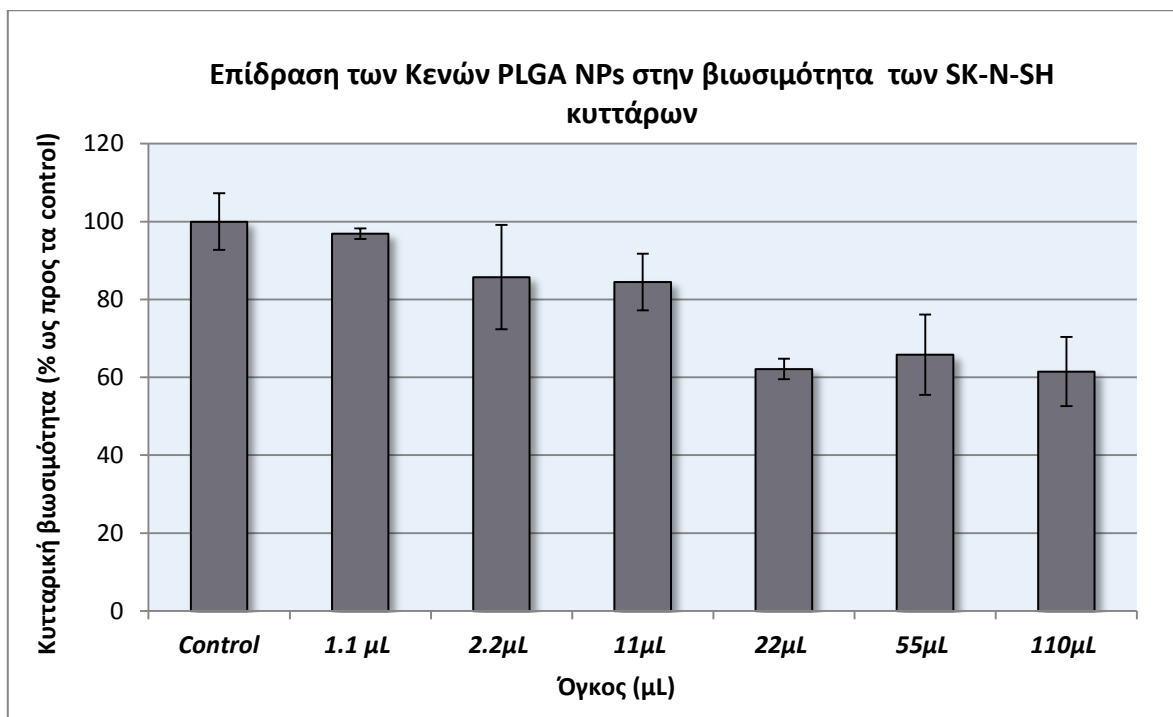
Η δοκιμή MTT χρησιμοποιήθηκε για την διερεύνηση της βιωσιμότητας κυττάρων ανθρώπινου νευροβλαστώματος έπειτα από 48 ώρες επώασης με τα δείγματα των εγκλεισμένων και μη κουμαρινικών ενώσεων. Ποικίλες αναφορές έχουν γίνει για την κυτοτοξική δράση διαφόρων κουμαρινών μέσω της επίδρασης που ασκούν στην μιτοχονδριακή δραστηριότητα. Η αύξηση των επιπέδων των ελεύθερων δραστικών ριζών και η απελευθέρωση του κυτοχρώματος C στο κυτταρόπλασμα, θεωρούνται εν δυνάμει κυτοτοξικοί μηχανισμοί, αποτέλεσμα τόσο της δράσης των κουμαρινών όσο και της συνεργιστικής δράσης διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων των κυττάρων^[133].

Αρχικά, παρατίθεται ενδεικτικά η εικόνα ενός δείγματος της δοκιμασίας MTT, όπου τα σκουρόχρωμα από την φορμαζάνη πηγάδια αντιστοιχούν σε δείγματα υψηλής βιωσιμότητας κυττάρων ενώ όσο εξασθενεί σταδιακά το χρώμα, η βιωσιμότητα ελαττώνεται αντιστοίχως.



Εικόνα 46. Τυπικό δείγμα MTT.

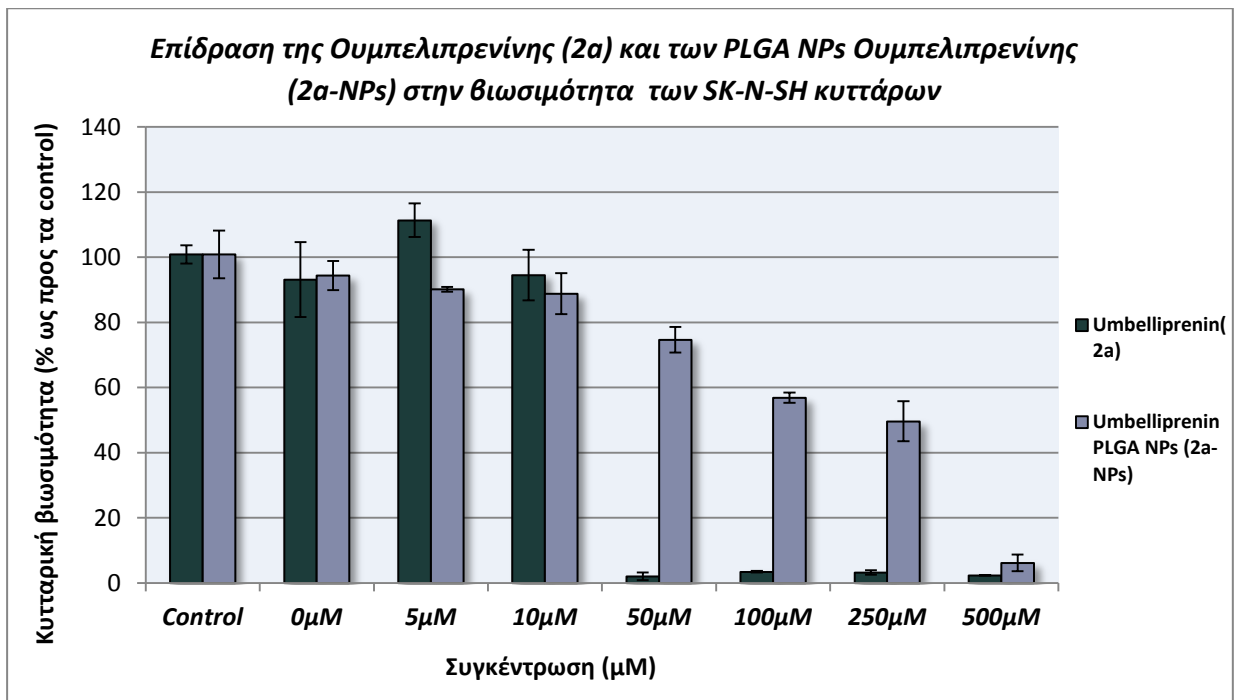
Η πρώτη δοκιμασία MTT πραγματοποιήθηκε για τα Κενά PLGA NPS σε διάφορους όγκους, με μέγιστο τα 110μL που αντιστοιχούν στην συγκέντρωση των 500μM ένωσης. Τα δείγματα λυοφιλοποιήθηκαν μετά την παρασκευή τους, χωρίς προσθήκη κρυοπροστατευτικής ένωσης και χρησιμοποιήθηκαν για την κυτταρική δοκιμασία. Ως *control* αναφέρονται τα δείγματα κυττάρων στα οποία δεν έγινε προσθήκη ένωσης ή νανοσωματιδίων.



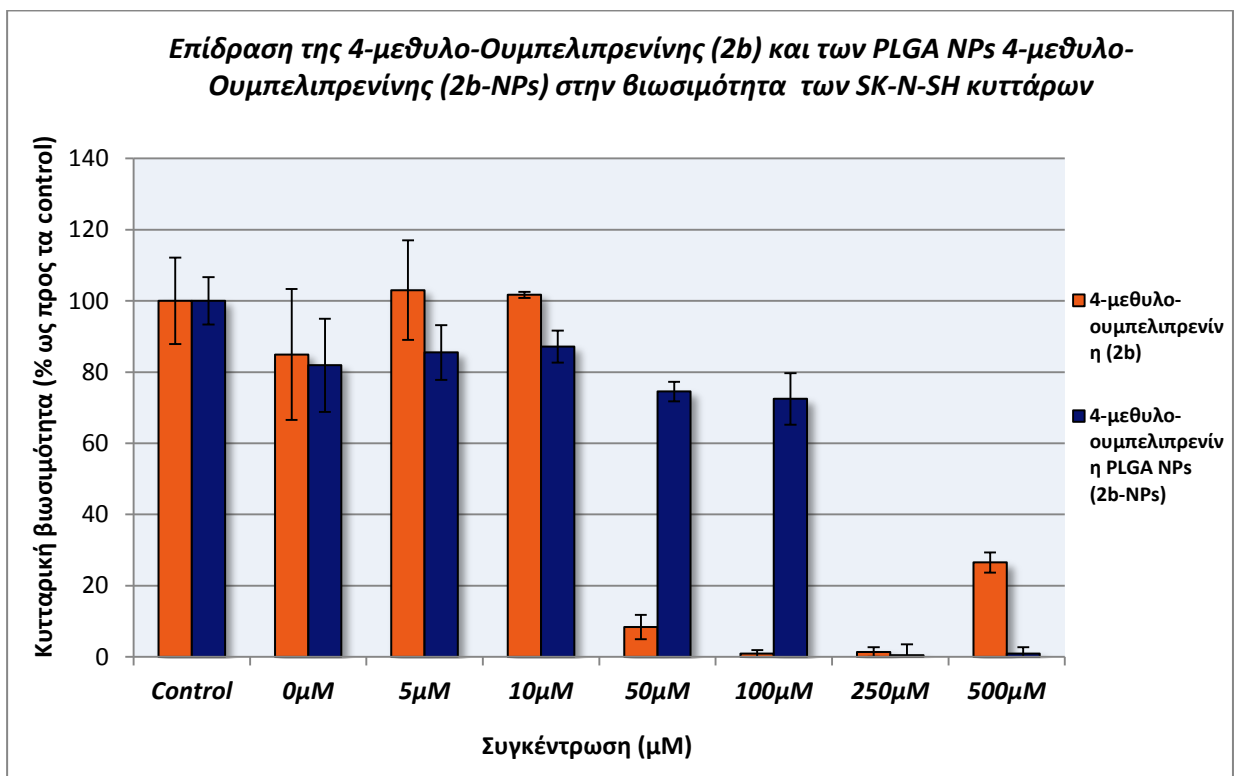
Διάγραμμα 11. Επίδραση των Κενών PLGA NPs στην βιωσιμότητα των SK-N-SH κυττάρων ανθρώπινου νευροβλαστώματος. Τα κύτταρα επώαστηκαν με τους αναγραφόμενους όγκους των κενών νανοσωματιδίων για 48ώρες και η βιωσιμότητα τους μετρήθηκε με τη μέθοδο MTT. Η κυτταρική βιωσιμότητα εκφράζεται ως το % ποσοστό της βιωσιμότητας των δειγμάτων αναφοράς. Για κάθε δείγμα πραγματοποιούνται δύο συνολικά πειράματα, τριών μετρήσεων το καθένα και λαμβάνεται ο M.O.± Τυπική Απόκλιση αυτών.

Παρατηρείται ότι για όγκο που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση μεγαλύτερη των 100μM τα κενά PLGA νανοσωματίδια ελαττώνουν την κυτταρική βιωσιμότητα σε ποσοστό περίπου 60%. Επομένως κρίνεται αναγκαίο να αναχθούν τα αποτελέσματα για τα δείγματα NPs που θα ακολουθήσουν προς εξέταση, όχι ως προς τα control δείγματα κυττάρων (untreated cells) αλλά ως προς τα αντίστοιχα δείγματα Κενών NPs της εκάστοτε συγκέντρωσης.

Πιο συγκεκριμένα στα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν για την κυτταρική βιωσιμότητα από την επώαση των κυττάρων με τα εγκλεισμένα και μη κουμαρινικά ανάλογα. Να σημειωθεί ότι τα δείγματα των PLGA νανοσωματιδίων ήταν όλα λυοφιλοποιημένα, χωρίς προσθήκη κρυοπροστατευτικής ένωσης, και αποθηκευμένα για χρονικό διάστημα περίπου 2 μηνών σε συνθήκες κατάψυξης, στους -80°C. Η διεργασία λυοφιλοποίησης προτείνεται βιβλιογραφικά ως μέθοδος που συνεισφέρει στην σταθερότητα των σχηματιζόμενων βιοπολυμερικών νανοσωματιδίων, εφόσον επιτρέπει τη μετατροπή διαλυμάτων ή εναιωρημάτων σε στερεά.

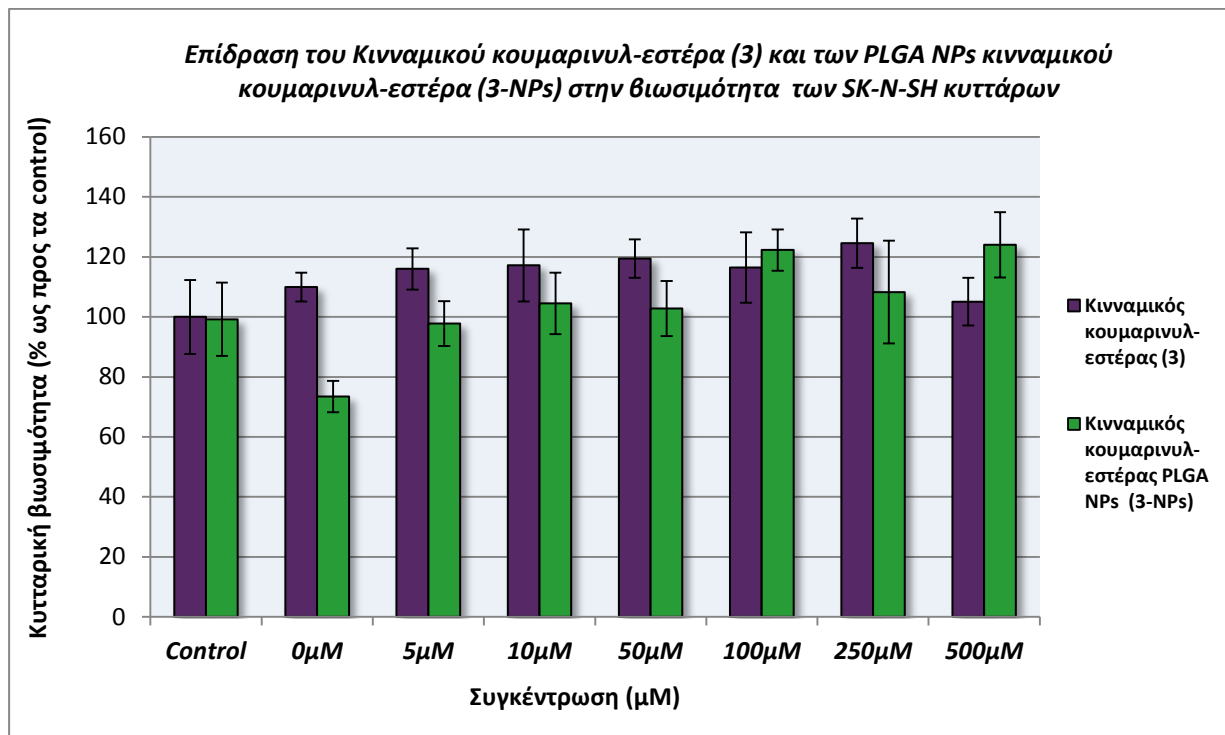


Διάγραμμα 12. Επίδραση της Ουμπελιπρενίνης (2a) και των PLGA NPs Ουμπελιπρενίνης (2a-NPs) στην βιωσιμότητα των SK-N-SH κυττάρων ανθρώπινου νευροβλαστώματος. Τα κύτταρα επώαστηκαν με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις της εγκλεισμένης και μη ένωσης για 48ώρες και η βιωσιμότητα τους μετρήθηκε με τη μέθοδο MTT. Η κυτταρική βιωσιμότητα εκφράζεται ως το (%) ποσοστό της βιωσιμότητας των control δειγμάτων αναφοράς. Για κάθε δείγμα πραγματοποιούνται δύο συνολικά πειράματα, τριών μετρήσεων το καθένα και λαμβάνεται ο M.O. ± Τυπική Απόκλιση αυτών.

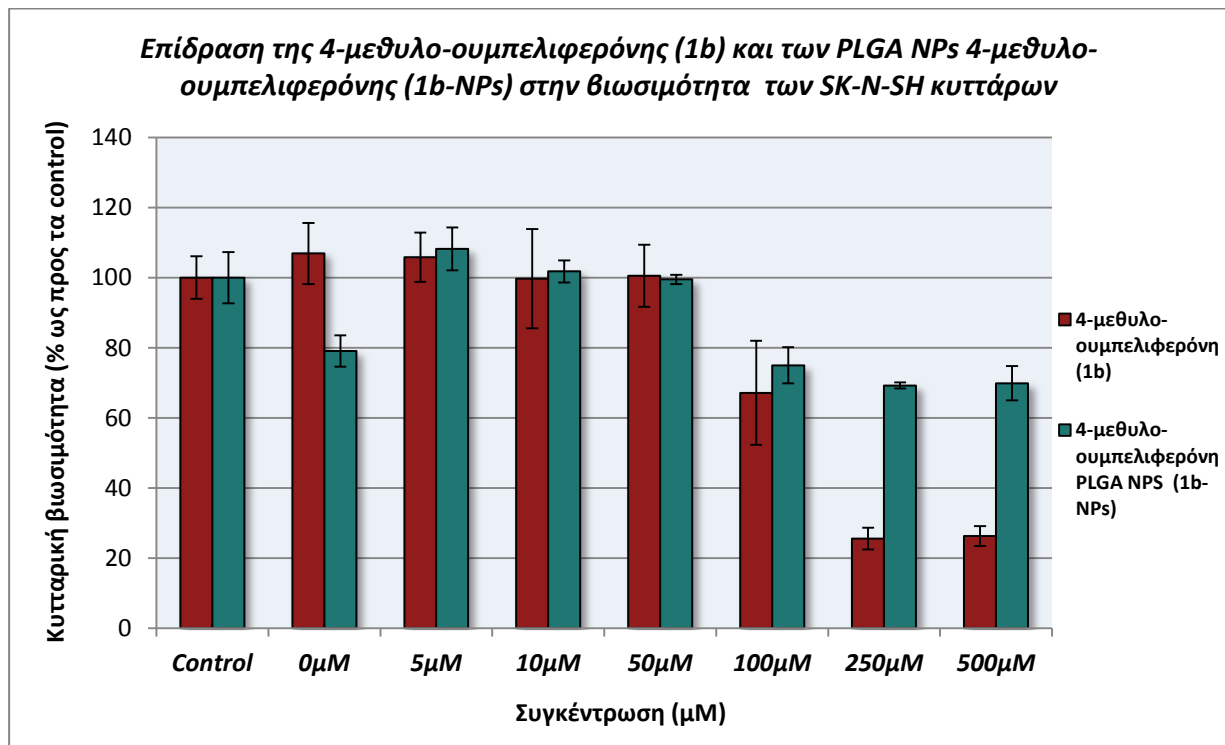


Διάγραμμα 13. Επίδραση της 4-μεθυλο-ουμπελιπρενίνης (2b) και των PLGA NPs 4-μεθυλο-ουμπελιπρενίνης (2b-NPs) στην βιωσιμότητα των SK-N-SH κυττάρων ανθρώπινου νευροβλαστώματος. Τα κύτταρα επώαστηκαν με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις της εγκλεισμένης και μη ένωσης για 48ώρες και η βιωσιμότητα τους μετρήθηκε με τη μέθοδο MTT. Η κυτταρική βιωσιμότητα εκφράζεται ως το (%) ποσοστό της

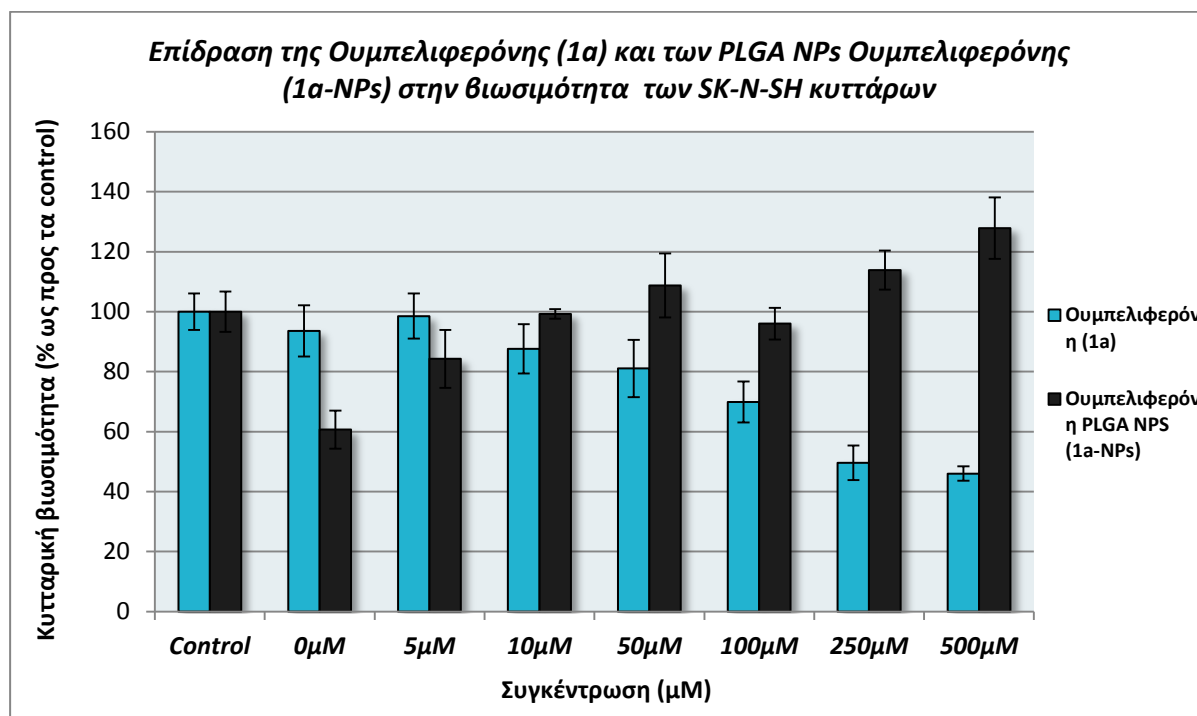
βιωσιμότητας των control δειγμάτων αναφοράς. Για κάθε δείγμα πραγματοποιούνται δύο συνολικά πειράματα, τριών μετρήσεων το καθένα και λαμβάνεται ο Μ.Ο. ± Τυπική Απόκλιση αυτών.



Διάγραμμα 14. Επίδραση του Κινναμικού κουμαρινυλ-εστέρα (3) και των PLGA NPs κινναμικού κουμαρινυλ-εστέρα (3-NPs) στην βιωσιμότητα των SK-N-SH κυττάρων ανθρώπινου νευροβλαστώματος. Τα κύτταρα επώασηκαν με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις της εγκλεισμένης και μη ένωσης για 48ώρες και η βιωσιμότητα τους μετρήθηκε με τη μέθοδο MTT. Η κυτταρική βιωσιμότητα εκφράζεται ως το (%) ποσοστό της βιωσιμότητας των control δειγμάτων αναφοράς. Για κάθε δείγμα πραγματοποιούνται δύο συνολικά πειράματα, τριών μετρήσεων το καθένα και λαμβάνεται ο Μ.Ο. ± Τυπική Απόκλιση αυτών.

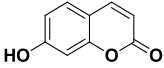
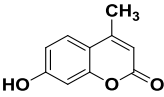
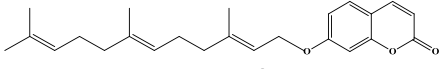
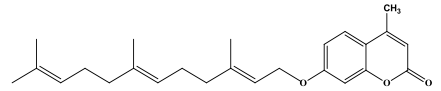
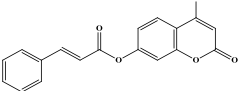


Διάγραμμα 15. Επίδραση της 4-μεθυλο-ουμπελιφερόνης (1b) και των PLGA NPs 4-μεθυλο-ουμπελιφερόνης(1b-NPs) στην βιωσιμότητα των SK-N-SH κυττάρων ανθρώπινου νευροβλαστώματος. Τα κύτταρα επώαστηκαν με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις της εγκλεισμένης και μη ένωσης για 48ώρες και η βιωσιμότητα τους μετρήθηκε με τη μέθοδο MTT. Η κυτταρική βιωσιμότητα εκφράζεται ως το (%) ποσοστό της βιωσιμότητας των control δειγμάτων αναφοράς. Για κάθε δείγμα πραγματοποιούνται δύο συνολικά πειράματα, τριών μετρήσεων το καθένα και λαμβάνεται ο Μ.Ο. ± Τυπική Απόκλιση αυτών.



Διάγραμμα 16. Επίδραση της Ουμπελιφερόνης (1a) και των PLGA NPs Ουμπελιφερόνης (1a-NPs) στην βιωσιμότητα των SK-N-SH κυττάρων ανθρώπινου νευροβλαστώματος. Τα κύτταρα επώαστηκαν με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις της εγκλεισμένης και μη ένωσης για 48ώρες και η βιωσιμότητα τους μετρήθηκε με τη μέθοδο MTT. Η κυτταρική βιωσιμότητα εκφράζεται ως το (%) ποσοστό της βιωσιμότητας των control δειγμάτων αναφοράς. Για κάθε δείγμα πραγματοποιούνται δύο συνολικά πειράματα, τριών μετρήσεων το καθένα και λαμβάνεται ο Μ.Ο. ± Τυπική Απόκλιση αυτών.

Πίνακας 14. Κυτοτοξική δράση των εγκλεισμένων και μη κουμαρινικών αναλόγων έναντι των κυττάρων ανθρώπινου νευροβλαστώματος SK-N-SH (IC₅₀μM).

Δείγμα	IC ₅₀ (μM)
 Ουμπελιφερόνη (1a)	>250
Ουμπελιφερόνη PLGA NPS (1a-NPS)	>250
 4-μεθυλο-Ουμπελιφερόνη (1b)	179.8
4-μεθυλο-Ουμπελιφερόνη PLGA NPS (1b-NPS)	>250
 Ουμπελιπρενίνη (2a)	19.8
Ουμπελιπρενίνη PLGA NPS (2a-NPS)	138.9
 4-μεθυλο-Ουμπελιπρενίνη (2b)	35.3
4-μεθυλο-Ουμπελιπρενίνη PLGA NPS (2b-NPS)	134.4
 Κιναμικός κουμαρινυλ-εστέρας (3)	>250
Κιναμικός κουμαρινυλ-εστέρας PLGA NPS (3-NPS)	>250

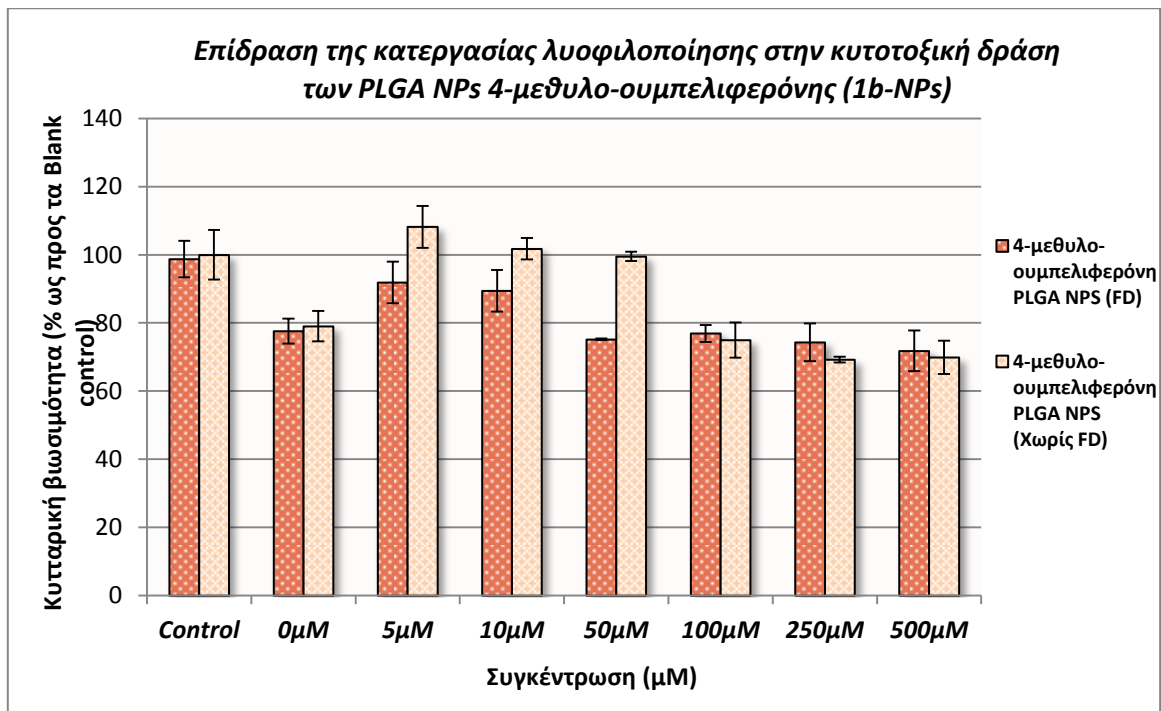
Όπως παρατηρείται τόσο από τα διαγράμματα όσο και από τον Πίνακα 14 η ένωση που εμφανίζει την μεγαλύτερη κυτοτοξικότητα είναι η φαρνεζυλοξυ κουμαρίνη Ουμπελιπρενίνη (**2a**). Ακολουθεί το 4-μεθυλο παράγωγο της **2b** με την αμέσως χαμηλότερη τιμή IC₅₀. Όπως φαίνεται η προσθήκη μιας μεθυλο ομάδας στην θέση C-4 του κουμαρινικού δακτυλίου

αναστέλλει μερικώς την δράση του μορίου. Η 4-μεθυλο-ουμπελιφερόνη (**1b**) εμφανίζει επίσης αξιόλογη δράση για συγκεντρώσεις άνω των 250μΜ, ελαττώνοντας την κυτταρική βιωσιμότητα στο 25% περίπου. Η 7-υδροξυ-κουμαρίνη (**1a**) και πολύ περισσότερο ο κινναμικός κουμαρινυλ-εστέρας (**3**) δεν φαίνεται να επηρεάζουν σημαντικά την βιωσιμότητα των κυττάρων. Συγκεκριμένα κατά την διεξαγωγή των περαμάτων, ο κινναμικός κουμαρινυλ-εστέρας παρουσίαζε δυσκολία ως προς τη διαλυτότητα του στο υδατικό θεραπευτικό μέσο των κυττάρων με τον σχηματισμό ενός λευκού ιζήματος. Μικροσκοπικά το δείγμα φαινόταν σαν να δημιουργεί ένα κρυσταλλικό πλέγμα που επικαλύπτει τον πυθμένα του πηγαδιού. Η υδροφοβικότητα του μορίου πιθανώς να επηρεάζει την κυτταρική του πρόσληψη και επομένως την αποτελεσματικότητα της βιολογικής του δράσης. Ωστόσο, προκαλεί εντύπωση ότι σε διάφορες συγκεντρώσεις παρατηρείται αύξηση της κυτταρικής συγκέντρωσης, πράγμα που δείχνει ότι η εν λόγω ένωση όχι μόνο δεν επιδρά αποπτωτικά στα κύτταρα αλλά αντιθέτως συμβάλλει στον πολλαπλασιασμό τους.

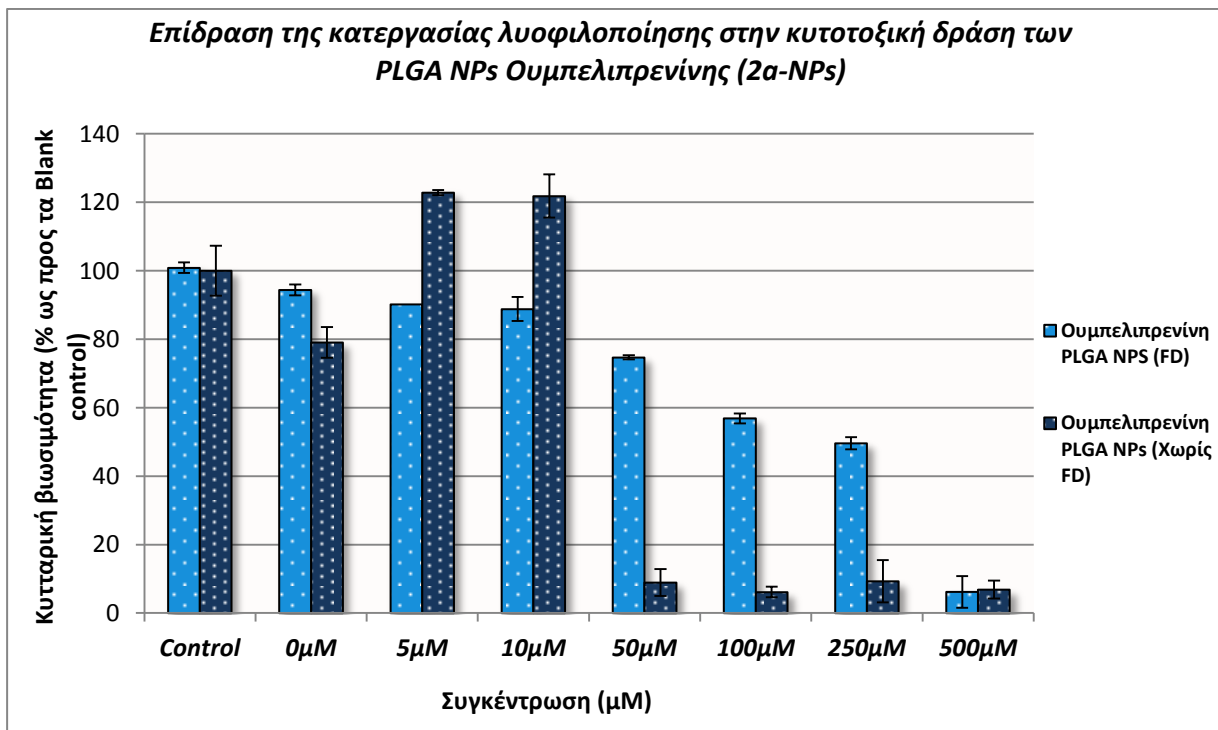
Όσον αφορά τα νανοσωματίδια που περιέχουν τις εγκλεισμένες ενώσεις παρατηρείται ότι την καλύτερη ανταπόκριση είχαν τα νανοσωματίδια της 4-μεθυλο-Ουμπελιπρενίνης (**2b-NPS**) και μετέπειτα της Ουμπελιπρενίνης (**2a-NPS**), χωρίς ωστόσο να παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Τα νανοσωματίδια των υπόλοιπων ενώσεων φαίνεται να επιδρούν ελάχιστα έως καθόλου στην λειτουργία των κυττάρων. Αυτό που προκαλεί εντύπωση είναι ότι τα νανοσωματίδια της Ουμπελιφερόνης (**1a-NPS**) με την αύξηση της συγκέντρωσης αντί να ακολουθούν πτωτική τάση ως προς την κυτταρική βιωσιμότητα, όπως το αντίστοιχο μη εγκλεισμένο δείγμα, αντιθέτως ενισχύουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Γενικά η ανεπαρκής κυτοτοξική δράση των παραγόμενων νανοσωματιδίων πιθανώς να οφείλεται στις συνθήκες συντήρησης πριν την χρήση τους. Η κατεργασία λυοφιλοποίησης μπορεί να εξασφαλίζει γενική σταθερότητα στο δείγμα αλλά συνάμα προκαλεί αρκετές καταπονήσεις σε αυτό, κυρίως δομικής φύσεως. Ομοίως και οι έντονες συνθήκες κατάψυξης (-80°C) στις οποίες διατηρούνταν τα δείγματα.

Θεωρήθηκε επομένως αναγκαίο να συγκριθεί η απόδοση της δράσης των νανοσωματιδίων για δείγματα που δεν υπέστησαν κατεργασία λυοφιλοποίησης και γενικά έντονης ψύξης. Στα ακόλουθα διαγράμματα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν για την κυτταρική βιωσιμότητα από την επώαση των κυττάρων με τις εγκλεισμένες ενώσεις Ουμπελιπρενίνη (**2a**), 4-μεθυλο-Ουμπελιπρενίνη (**2b**) και 4-μεθυλο-Ουμπελιφερόνη (**1b**) χωρίς αυτές να υποστούν κατεργασία λυοφιλοποίησης (Freeze Drying). Ομοίως και τα Κενά PLGA NPs που χρησιμοποιήθηκαν ως control δείγματα. Εδώ τα δείγματα των PLGA νανοσωματιδίων ήταν αποθηκευμένα σε συνθήκες ήπιας ψύξης, στους 4°C, για διάστημα μικρότερο των 5 ημερών πριν την χρήση τους στα κύτταρα. Τα διαγράμματα δίνουν μια εικόνα σύγκρισης όσον αφορά την αποτελεσματικότητα της δράσης των νανοσωματιδίων αναφορικά με την κατεργασία που έχουν υποστεί.

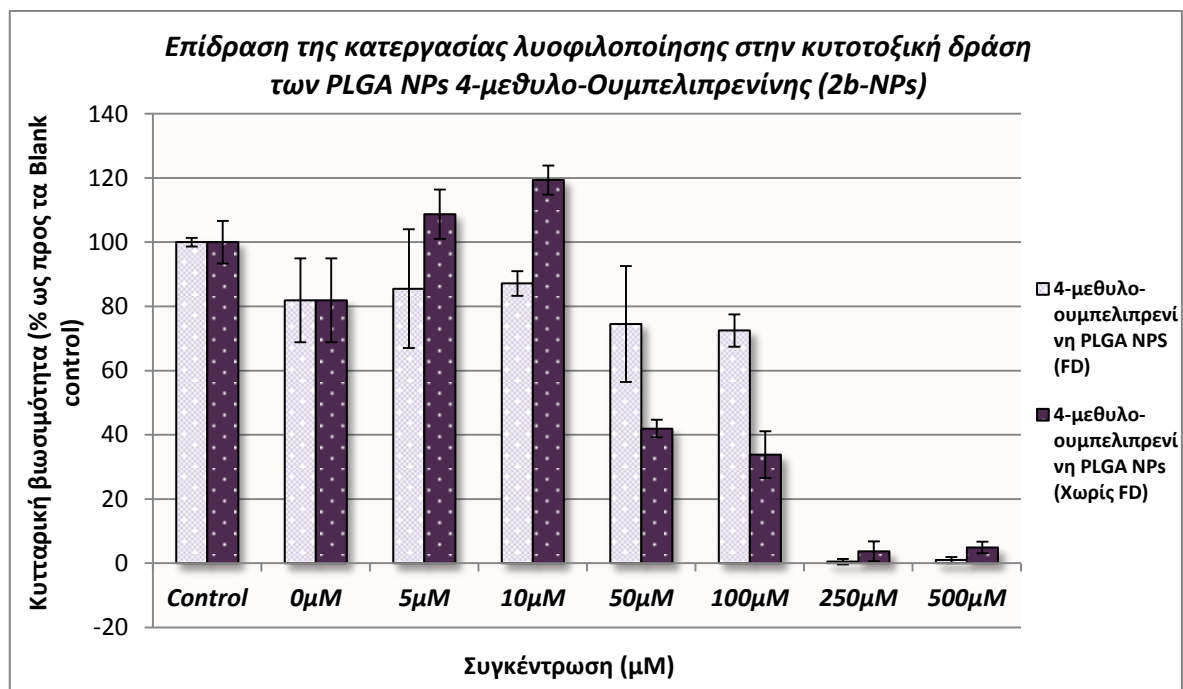


Διάγραμμα 17. Επίδραση της κατεργασίας λυοφιλοποίησης (FD) στην κυττοτοξική δράση των PLGA NPs 4-μεθυλο-Ουμπελιφερόνης (1b-NPs). Τα κύτταρα επώαστηκαν με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις της εγκλεισμένης ένωσης για 48ώρες και η βιωσιμότητα τους μετρήθηκε με τη μέθοδο MTT. Η κυτταρική βιωσιμότητα εκφράζεται ως το (%) ποσοστό της βιωσιμότητας των control δειγμάτων αναφοράς. Για κάθε δείγμα πραγματοποιούνται δύο συνολικά πειράματα, τριών μετρήσεων το καθένα και λαμβάνεται ο Μ.Ο. ± Τυπική Απόκλιση αυτών.



Διάγραμμα 18. Επίδραση της κατεργασίας λυοφιλοποίησης (FD) στην κυττοτοξική δράση των PLGA NPs Ουμπελιπρενίνης (2a-NPs). Τα κύτταρα επώαστηκαν με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις της εγκλεισμένης ένωσης για 48ώρες και η βιωσιμότητα τους μετρήθηκε με τη μέθοδο MTT. Η κυτταρική βιωσιμότητα εκφράζεται ως το (%) ποσοστό της βιωσιμότητας των control δειγμάτων αναφοράς. Για κάθε δείγμα

πραγματοποιούνται δύο συνολικά πειράματα, τριών μετρήσεων το καθένα και λαμβάνεται ο Μ.Ο. ± Τυπική Απόκλιση αυτών.



Διάγραμμα 19. Επίδραση της κατεργασίας λυοφιλοποίησης (FD) στην κυττοτοξική δράση των PLGA NPs 4-μεθυλο-Ουμπελιπρενίνης (2b-NPs). Τα κύτταρα επώαστηκαν με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις της εγκλεισμένης ένωσης για 48ώρες και η βιωσιμότητα τους μετρήθηκε με τη μέθοδο MTT. Η κυτταρική βιωσιμότητα εκφράζεται ως το (%) ποσοστό της βιωσιμότητας των control δειγμάτων αναφοράς. Για κάθε δείγμα πραγματοποιούνται δύο συνολικά πειράματα, τριών μετρήσεων το καθένα και λαμβάνεται ο Μ.Ο. ± Τυπική Απόκλιση αυτών.

Αν και στα δείγματα νανοσωματιδίων της 4-μεθυλο-Ουμπελιφερόνης (1b-NPs) δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές ως προς την δράση τους κατά των κυττάρων SK-N-SH, στα δείγματα της Ουμπελιπρενίνης (2a-NPs) και του παραγώγου της 4-μεθυλο-Ουμπελιπρενίνης (2b-NPs) τα αποτελέσματα είναι διαφορετικά. Τα δείγματα PLGA NPs που δεν υπέστησαν κατεργασία λυοφιλοποίησης εμφανίζουν μεγαλύτερη δραστηριότητα σε σχέση με τα αντίστοιχα λυοφιλοποιημένα, γεγονός που εξακριβώνεται και από την τιμή IC50 στον Πίνακα 15 που ακολουθεί. Η τιμή IC50 σχεδόν υποτετραπλασιάζεται για τα σωματίδια (2a-NPs) ενώ παρουσιάζεται 2,5 περίπου φορές χαμηλότερα για τα αντίστοιχα σωματίδια (2b-NPs).

Πίνακας 15. Επίδραση της λυοφιλοποίησης στην κυτοτοξική δράση των εγκλεισμένων κουμαρινικών αναλόγων έναντι των καρκινικών κυττάρων SK-N-SH (IC50 μ M).

	Λυοφιλοποιημένα Δείγματα	Μη Λυοφιλοποιημένα Δείγματα
IC50 (μM)	4-μεθυλο-Ουμπελιφερόνη (1b-NPS)	4-μεθυλο-Ουμπελιφερόνη (1b-NPS)
	>250	>250
	Ουμπελιπρενίνη (2a-NPs)	Ουμπελιπρενίνη (2a-NPs)
	138.9	36.5
	4-μεθυλο-Ουμπελιπρενίνη (2b-NPs)	4-μεθυλο-Ουμπελιπρενίνη (2b-NPs)
	134.4	53.5

Είναι προφανώς προτιμότερο να γίνεται χρήση των παραγόμενων νανοσωματιδίων εντός μικρού χρονικού διαστήματος, χωρίς αυτά να λυοφιλοποιούνται και να καταψύχονται. Στην αντίθετη περίπτωση η κατάλληλη προσθήκη μιας κρυοπροστατευτικής ένωσης, όπως η σουκρόζη για παράδειγμα, θα ήταν επιθυμητή ώστε να διασφαλιστεί συνοχή των νανοσωματιδιακών δομών και να αποφευχθεί τυχόν συσσωμάτωση τους.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σημαντική πρόοδος έχει σημειωθεί τα τελευταία χρόνια στην ελεγχόμενη αποδέσμευση θεραπευτικών φαρμάκων και βιομορίων μέσω της ανάπτυξης συνθετικών νανο-συστημάτων. Τα στοχευμένα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων συμβάλλουν στην ελεγχόμενη αποδέσμευση των φαρμάκων με σκοπό την μεγιστοποίηση της βιοδιαθεσιμότητας και της αποτελεσματικότητας των θεραπευτικών ουσιών, στον έλεγχο της φαρμακοκινητικής και φαρμακοδυναμικής που εμφανίζουν, στον έλεγχο και την καταστολή της ανεπιθύμητης τοξικότητας και της ανοσογένειας που προκαλούν καθώς και στην αποτελεσματική αντιμετώπιση περιορισμών χρήσης τους λόγω περιορισμένης υδατοδιαλυτότητας, γρήγορης αποικοδόμησης από τον οργανισμό, φωτοευαισθησίας κ.α.

Στην παρουσία διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε επιτυχώς η σύνθεση νέων κουμαρινικών αναλόγων, που εμφανίζουν αξιόλογη βιολογική δράση, και μετέπειτα ο εγκλεισμός τους σε βιοδιασπώμενα νανοσωματίδια πολυ(γαλακτικού-γλυκολικού) οξέος.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της 7-υδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνης (**1b**), ενώ η 7-υδροξυ-κουμαρίνη (**1a**) λήφθηκε εμπορικά. Μέσα από την αντίδραση αιθεροποίησης κατά Williamson σχηματίστηκαν οι φαρνεσυλοξυ κουμαρίνες (**2a & 2b**), από τα αντίστοιχα μόρια-οδηγούς. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ακυλίωση της 7-υδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνης με το κινναμούλο-χλωρίδιο για τον σχηματισμό του αντίστοιχου εστέρα **3**. Οι ενώσεις εξετάστηκαν σε *in vitro* δοκιμασίες για την διερεύνηση της αντιοξειδωτικής (ικανότητα δέσμευσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH, αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης του λινολεϊκού οξέος) και αντιφλεγμονώδους δράσης τους (ικανότητα αναστολής της δράσης του ενζύμου λιποξυγονάση από σόγια). Την καλύτερη απόδοση στην μέθοδο DPPH παρουσίασε η ένωση **2a**, ενώ στην μέθοδο AAPH, παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη δραστηριότητα της ουμπελιφερόνης (**1a**), της 4-μεθυλο-ουμπελιφερόνης (**1b**) και της ουμπελιπρενίνης (**2a**). Αναφορικά με την αντιφλεγμονώδη δράση των ενώσεων τη μέγιστη παρεμποδιστική ικανότητα παρουσιάζει η ουμπελιφερόνη (**1a**) που φαίνεται να αναστέλλει πλήρως την δράση του ενζύμου καθώς και ο κινναμικός κουμαρινυλ-εστέρας **3** (ποσοστό 100%).

Ο νανοεγκλεισμός των κουμαρινικών αναλόγων πραγματοποιήθηκε μέσω της τεχνικής γαλακτωματοποίησης με ταυτόχρονη εξάτμιση του οργανικού διαλύτη, η οποία είχε εφαρμοστεί σε προηγούμενη μελέτη εγκλεισμού στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας ΕΜΠ. Τα νανοσωματίδια που παρήχθησαν ήταν της τάξης των 100-200 nm, ενώ οι υψηλές τιμές του ζ-δυναμικού που μετρήθηκαν, υποδηλώνουν σταθερές νανο-σωματιδιακές δομές. Προκειμένου να διερευνηθεί κατά πόσο επηρεάζει το είδος του οργανικού διαλύτη στον σχηματισμό των νανοσωματιδίων, έγινε χρήση δύο διαφορετικών διαλυτών, της πλήρως υδατικά αναμίξιμης ακετόνης και του μερικώς υδατοδιαλυτού οξικού αιθυλεστέρα. Παρατηρήθηκε ότι το μέγεθος των νανοσωματιδίων εμφάνιζε ελαφρώς χαμηλότερη τιμή για τα δείγματα που παρασκευάστηκαν με τον οξικό αιθυλεστέρα, πράγμα που είναι και το ζητούμενο. Τέλος, η απόδοση εγκλεισμού των παραγόμενων ενώσεων με την επιλογή του

οξικού αιθυλεστέρα ως διαλύτη της οργανικής φάσης, σημειώθηκε για την πλειοψηφία των ενώσεων αρκετά υψηλή με την ουμπελιφερόνη (**1a**) μόνο να παρουσιάζει το χαμηλότερο ποσοστό (21,49%).

Τέλος, αξιολογήθηκε η κυτοτοξικότητα των εγκλεισμένων και μη ενώσεων μέσω της μέτρησης κυτταρικής βιωσιμότητας με τη δοκιμασία MTT σε κυτταρικές σειρές ανθρώπινου νευροβλαστώματος SK-N-SH. Η ένωση που εμφάνισε την μεγαλύτερη κυτοτοξικότητα είναι η ισοπρενυλοξυ κουμαρίνη Ουμπελιπρενίνη (**2a**), ενώ ακολουθεί το 4-μεθυλο παράγωγο της. Όσον αφορά τα νανοσωματίδια των ενώσεων παρατηρείται ότι την καλύτερη ανταπόκριση είχαν τα νανοσωματίδια της 4-μεθυλο-Ουμπελιπρενίνης (**2b-NPS**) και μετέπειτα της Ουμπελιπρενίνης (**2a-NPS**), χωρίς ωστόσο να παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Επίσης εξετάστηκαν οι νανοσωματιδιακές μορφές των ενώσεων αυτών για δείγματα λυοφιλοποιημένα και μη, όπου παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην δράση τους, γεγονός που καθιστά προτιμητέα τη χρήση των παραγόμενων νανοσωματιδίων εντός μικρού χρονικού διαστήματος, χωρίς αυτά να λυοφιλοποιούνται είτε να καταψύχονται.

ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Οι κουμαρίνες αποτελούν μια ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών με πολυάριθμες βιολογικές δράσεις, η φύση των οποίων έχει πολλάκις μελετηθεί σε διαφορετικά κυτταρικά συστήματα. Μέσω της τεχνικής του νανοεγκλεισμού επιτυγχάνεται αφενός η βελτίωση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των εγκλεισμένων ενώσεων αφετέρου η ελεγχόμενη και συνάμα αποτελεσματική τους αποδέσμευση στα κυτταρικά συστήματα που εφαρμόζονται. Με άξονα τόσο τα πειράματα που διεξήχθησαν όσο και τα αποτελέσματα που προέκυψαν σχετικά με την αξιολόγηση των παραγόμενων εγκλεισμένων και μη ενώσεων θεωρείται χρήσιμο να διευρυνθεί το φάσμα που ερευνήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία. Ως εκ τούτου παρουσιάζονται οι εξής προτάσεις για μελλοντική έρευνα:

1. Η εισαγωγή της φαρνεζυλοξυ- ομάδας και αντίστοιχα η εστεροποίηση με φαινολικά οξέα σε περισσότερες θέσεις του κουμαρινικού δακτυλίου θα μπορούσε να οδηγήσει στην σύνθεση νέων αναλόγων με διαφορετική βιολογική δραστικότητα.
2. Η μελέτη των παραμέτρων της διεργασίας εγκλεισμού σε νανοσωματίδια Συγκεκριμένα, θα μπορούσε να μεταβληθεί το μοριακό βάρος του πολυμερούς, το ποσοστό φόρτωσης (drug loading), η αναλογία υδατικής προς την οργανική φάση του γαλακτώματος, αλλά και η θερμοκρασία και ο ρυθμός ανάδευσης κατά το σχηματισμό του γαλακτώματος.
3. Η μελέτη αποδέσμευσης των εγκλεισμένων ενώσεων από τα πολυμερικά νανοσωματίδια. Επίδραση του pH και των συνθηκών αποθήκευσης στην μορφολογία και τα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων.
4. Δυνατότητα επιφανειακής τροποποίησης των PLGA νανωσωματιδίων με επικάλυψη στρωμάτων άλλων βιοπολυμερών όπως PEG, Vitamin E TPGS, χιτοζάνη κ.α. και μελέτη της βιολογικής τους δράσης.
5. Χρήση εναλλακτικού βιο-πολυμερούς ή γαλακτωματοποιητή στην διεργασία νανοεγκλεισμού.
6. Εφαρμογή των παραγόμενων κουμαρινικών αναλόγων και των νανοσωματιδίων τους σε διαφορετικές καρκινικές αλλά και υγιείς κυτταρικές σειρές με στόχο την σύγκριση της κυτοτοξικής τους δράσης.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] S. Sasidharan et al., "Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plant's extracts", *Afr J Tradit Complement Altern Med.* (2011) 8(1):1-10
- [2] Aksel Bernhoft, "A brief review on bioactive compounds in plants", *The Norwegian Academy of Science and Letters*, Oslo, Norway 2010
- [3] F. Borges et al., "Simple Coumarins and Analogues in Medicinal Chemistry: Occurrence, Synthesis and Biological Activity", *Current Medicinal Chemistry*, 2005, 12, 887-916. n.d.
- [4] Richard O'Kennedy, R. Douglas Thornes, "Coumarins: Biology, Applications and Mode of Action", John Wiley & Sons Ltd, New York 1997, pp. 1-2, 24-26
- [5] P.K. Jain and Himanshu Joshi, "Coumarin: Chemical and Pharmacological Profile", *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 02 (06); 2012: 236-240
- [6] Park SJ et al., "Spectrofluorimetric assay for rapid detection of total and fecal coliforms from surface water", *Appl Environ Microbiol* 1995; 61; 2027-9
- [7] Irena Kostova, "Synthetic and Natural Coumarins as Cytotoxic Agents", *Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents*, 2005, 5, 29-46 29
- [8] Xin-Mei Peng et al., "Current Developments of Coumarin Compounds in Medicinal Chemistry", *Current Pharmaceutical Design*, 2013, 19, 3884-3930
- [9] Sonali Sandhu et al., "Coumarin hybrids as novel therapeutic agents", *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 22 (2014) 3806–3814
- [10] Chen ZY, Mao RQ, Liu Y. "Fullerenes for cancer diagnosis and therapy: preparation, biological and clinical perspectives", *Curr Drug Metab* 2012; 13: 1035-45.
- [11] Carter SK, Bakowski MT, Hellman K. *Chemotherapy of Cancer*, Third Edition, New York, Wiley & Sons, 1989.
- [12] Grotz KA, Wustenberg P. et al., "Prophylaxis Of Radiogenic Sialadenitis and Mucositis by Coumarin/Troxerutine in Patients with Head and Neck Cancer-A Prospective, Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Study", *Br J Oral Maxillofac Surg* 2001; 39: 34-39.
- [13] G. Kanimozhi et al., "Umbelliferone protects whole-body irradiated Swiss albino mice: Study on animal survival, tissue antioxidant status and DNA damage", *Biomedicine & Preventive Nutrition* 2 (2012) 186–192
- [14] D.Yang, T. Gu, T.Wang, Q. Tang, and C. Ma, "Effects of osthole on migration and invasion in breast cancer cells," *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, vol. 74, no. 7, pp. 1430–1434, 2010.

- [15] Devji T. et al., "Pancreatic anticancer activity of a novel geranylgeranylated coumarin Derivative", *Bioorg Med Chem Lett* 2011; 21: 5770-3.
- [16] Harada K, Kubo H, Tomigahara Y, et al., "Coumarins as novel 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 3 inhibitors for potential treatment of prostate cancer", *Bioorg Med Chem Lett* 2010; 20: 272-5.
- [17] Marshall, M. et al., "Phase I evaluation of coumarin (1, 2-benzopyrone) and cimetidine in patients with advanced malignancies", *Mol. Biotherm.*, 1991, 3, 170.
- [18] Olga N. Uchakina, Hao Ban, Robert J. McKallip, "Targeting hyaluronic acid production for the treatment of leukemia: Treatment with 4-methylumbelliferone leads to induction of MAPK-mediated apoptosis in K562 leukemia", *Leukemia Research* 37 (2013) 1294– 1301
- [19] Oliveira de Lima F, Nonato FR, Couto RD, et al. "Mechanisms involved in the antinociceptive effects of 7-hydroxycoumarin", *J Nat Prod* 2011; 74: 596-602.
- [20] G. J. Huang, J. S. Deng, J. C. Liao et al., "Inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 participate in anti-inflammatory activity of imperatorin from *Glehnia littoralis*", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 60, no. 7, pp. 1673–1681, 2012.
- [21] A. Witaicenis, L. N. Seito, and L. C. Di Stasi, "Intestinal anti-inflammatory activity of esculetin and 4-methylesculetin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis", *Chemico-Biological Interactions*, vol. 186, no. 2, pp. 211–218, 2010.
- [22] K. C. Fylaktakidou, D. J. Hadjipavlou-Litina, K. E. Litinas, and D. N. Nicolaidis, "Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/antioxidant activities", *Current Pharmaceutical Design*, vol. 10, no. 30, pp. 3813–3833, 2004.
- [23] Ingale N, Maddi V, Palkar M, et al., "Synthesis and evaluation of anti-inflammatory and analgesic activity of 3-[(5-substituted-1,3,4-oxadiazol-2-yl-thio)acetyl]-2H-chromen-2-ones", *Med Chem Res* 2012; 21: 16-26.
- [24] Goodman & Gilman's, "The Pharmacological basis of therapeutics: Blood coagulation and Anti-coagulant, thrombolytic and Anti-platelet drugs", 11th ed. (2006) 1325-1328.
- [25] Bhatia MS, et al., "Application quantum and physico chemical molecular descriptors utilizing principal components to study mode of anticoagulant activity of pyridyl chromen-2-one derivatives", *Bioorg Med Chem* 2009; 17: 1654-62.
- [26] Du LP, Zhang GL, Mei D., "Clinical evaluation and rational use of coumarin anticoagulants", *Eval Anal Drug-use Hosp China* 2008; 8: 576-9.
- [27] Wang H, et al., "Research progress on application of coumarin and its derivatives", *Chem Ind Times* 2009; 23: 40-3.

- [28] Kathuria A, Priya N, Chand K, et al., "Substrate specificity of acetoxy derivatives of coumarins and quinolones towards calreticulin mediated transacetylation: investigations on antiplatelet function", *Bioorg Med Chem* 2012; 20: 1624-38.
- [29] Jalal S, Chand K, Kathuria A, et al., "Calreticulin transacetylase: a novel enzyme-mediated protein acetylation by acetoxy derivatives of 3-alkyl-4-methylcoumarins", *Bioorg Chem* 2012; 40: 131-6.
- [30] Inoue, M. et al., "Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life", *Curr Med Chem* 2003, 10(23), 2495-2505.
- [31] Li, C.; Jackson, R.M., "Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation in injury", *Am J Physiol Cell Physiol* 2002, 282(2), 227-241.
- [32] Valko, M. et al., "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer", *Chem Biol Interact* 2006, 160(1), 1-40.
- [33] Wek-Rodriguez, K. et al., "Effect of reactive oxygen intermediaries on the viability and infectivity of *Mycobacterium lepraemurium*", *Int J Exp Pathol* 2007, 88(3), 137-145.
- [34] Valko, M. et al., "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease", *Int J Biochem Cell Biol* 2007, 39(1), 44-84.
- [35] Miri, R. et al., "Alterations in oxidative stress biomarkers associated with mild hyperlipidemia and smoking", *Food Chem Toxicol* 2011, 50(3-4), 920-926.
- [36] Ames, B.N.; Shigenaga, M.K.; Hagen, T.M., "Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging", *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90(17), 7915-7922.
- [37] Borges, F. et al., "Simple coumarins: privileged scaffolds in medicinal chemistry", *Front Med Chem* 2009; 4: 23-85.
- [38] Beillerot, A. et al., "Synthesis and protective effects of coumarin derivatives against oxidative stress induced by doxorubicin", *Bioorg Med Chem Lett* 2008; 18: 1102-5.
- [39] Balabani, A. et al., "A. Synthesis and biological evaluation of (2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-2H-chromen-2-ones as free radical scavengers", *Eur J Med Chem* 2011, 46(12), 5894-5901.
- [40] Lin, H.C., et al., "Structure-activity relationship of coumarin derivatives on xanthine oxidase-inhibiting and free radical scavenging activities", *Biochem Pharmacol* 2008, 75(6), 1416-1425.
- [41] Zhang, H.Y., Wang, L.F., "Theoretical elucidation of structure activity relationship for coumarins to scavenge peroxy radical", *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* 2004, 673(1-3), 199-202.

- [42] Paya, M.; Halliwell, B.; Hoult, J.R., "Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species. Scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals", *Biochem Pharmacol* 1992, 44(2), 205-214.
- [43] Natella, F. et al., "4-methylcoumarins as antioxidants: scavenging of peroxy radicals and inhibition of human low-density lipoprotein oxidation", *Biochimie* 2010, 92(9), 1147-1152.
- [44] Rodriguez, S.A., et al., "Effect of different C3-aryl substituents on the antioxidant activity of 4-hydroxycoumarin derivatives", *Bioorg Med Chem* 2011, 19(21), 6233-6238.
- [45] Melagraki, G., et al., "Synthesis and evaluation of the antioxidant and anti-inflammatory activity of novel coumarin-3-aminoamides and their alpha-lipoic acid adducts", *Eur J Med Chem* 2009, 44(7), 3020-3026.
- [46] W. K. Whang, H. S. Park, I. Ham et al., "Natural compounds, fraxin and chemicals structurally related to fraxin protect cells from oxidative stress," *Experimental and Molecular Medicine* 2005, 37(5), 436-446.
- [47] Guilherme Borges Bubols et al., "The Antioxidant Activity of Coumarins and Flavonoids", *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2013, Vol. 13, No.3, p.p. 8.
- [48] Ma K, Thomason LAM, McLaurin J., "Scyllo-inositol, preclinical, and clinical data for Alzheimer's disease", *Adv Pharmacol* 2012; 64:177-212.
- [49] Hargreaves, R.J., "It ain't over 'til it's over "a-the search for treatments and cures for Alzheimer's disease", *ACS Med Chem Lett* 2012; 3:862-6.
- [50] Wong, KY et al., "QSAR applications during last decade on inhibitors of acetylcholinesterase in Alzheimer's disease", *Mini-Rev Med Chem* 2012; 12: 936-46.
- [51] Zhou, X. et al., "Design, synthesis, and acetylcholinesterase inhibitory activity of novel coumarin analogs", *Bioorg Med Chem* 2008; 16: 8011-21.
- [52] Joyce Izidoro da Silva et al., "Acetylcholinesterase capillary enzyme reactor for screening and characterization of selective inhibitors", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 73 (2013) 44-52
- [53] Torok, B. et al., "Chemistry of small molecule inhibitors in self-assembly of Alzheimer's disease related amyloid beta peptide", *Curr Bioact Comp* 2008; 4: 159-74.
- [54] Soto-Ortega, DD. et al., "Inhibition of amyloid- β aggregation by coumarin analogs can be manipulated by functionalization of the aromatic center", *Bioorg Med Chem* 2011; 19: 2596-602.
- [55] Edmondson, DE. et al., "Molecular and mechanistic properties of the membrane-bound mitochondrial monoamine oxidases", *Biochemistry* 2009; 48: 4220-30.

- [56] Bortolato M, Chen K, Shih JC., "Monoamine oxidase inactivation: from pathophysiology to therapeutics", *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60: 1527-33.
- [57] Zhang, Y. et al., "Synthesis and antioxidant activities of novel 4-Schiff base-7-benzyloxy-coumarin derivatives", *Bioorg Med Chem Lett.* 2011, 21(22), 6811-6815.
- [58] X. Chen, R. Pi, Y. Zou et al., "Attenuation of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57 BL/6 mice by osthole, a natural coumarin," *European Journal of Pharmacology*, vol. 629, no. 1-3, pp. 40-46, 2010.
- [59] Mehrdad Iranshahi, et al., "Cancer Chemopreventive Activity of Terpenoid Coumarins from *Ferula* Species", *Planta Med* 2008; 74: 147-150
- [60] Shahverdi AR, et al., "Two matrix metalloproteinases inhibitors from *Ferula persica* var. *persica*", *Phytomedicine* 2006, 13:712-717.
- [61] Soltani F, et al., "Evaluation of antigenotoxicity effects of umbelliprenin on human peripheral lymphocytes exposed to oxidative stress", *Cell Biol Toxicol* 2009, 25:291-296.
- [62] Iranshahi M, et al., "Umbelliprenin from *Ferula persica* roots inhibits the red pigment production in *Serratia marcescens*" , *Z. Naturforsch. C* (2004) 59: 506-508.
- [63] Iranshahi M, et al., "C. Sesquiterpene coumarins from *Ferula szowitsiana* and in-vitro antileishmanial activity of 7-prenyloxycoumarins against promastigotes", *Phytochem* (2007) 68: 554-561.
- [64] Barthomeuf C, et al., " Umbelliprenin from *Ferula szowitsiana* inhibits the growth of human M4Beu metastatic pigmented malignant melanoma cells through cell-cycle arrest in G1 and induction of caspase-dependent apoptosis", *Phytomedicine* (2008) 15: 103-111
- [65] Maria Jun et al., "Synthesis and biological evaluation of isoprenylated coumarins as potential anti-pancreatic cancer agents", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 24 (2014) 4654-4658
- [66] Joung Hyuck Joo, Anton M. Jetten, "Molecular mechanisms involved in farnesol-induced apoptosis", *Cancer Letters* 287 (2010) 123-135
- [67] Iranshahi, M. et al., "Evaluation of antioxidant, anti-inflammatory and lipoxygenase inhibitory activities of the prenylated coumarin umbelliprenin", *DARU* 2009 17 (2) 99-103
- [68] Mehrdad Iranshahi et al., "Cancer chemopreventive activity of the prenylated coumarin, umbelliprenin, in vivo", *European Journal of Cancer Prevention* 2009, 18:412-415

- [69] Tanaka, T. et al., "Immunomodulatory action of citrus auraptene on macrophage functions and cytokine production of lymphocytes in female BALB/c mice", *Carcinogenesis*, 1999, 20, 1471.
- [70] Murakami, A. et al., "Suppression by citrus auraptene of phorbol ester- and endotoxin-induced inflammatory responses: role of attenuation of leukocyte activation", *Carcinogenesis*, 2000, 21, 1843
- [71] Du L, Mahdi F, Jakobsons MB, Nagle DG, Zhou YD, "Mammea E/BB, an isoprenylated dihydroxycoumarin protonophore that potently uncouples mitochondrial electron transport, disrupts hypoxic signaling in tumor cells", *J Nat Prod* 2010; 73: 1868-72
- [72] Robbins, R.J., "Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology", *J Agric Food Chem* 2003, 51(10), 2866-2887.
- [73] Olthof, M. et al., "Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans", *Hum. Nutr. Metabol.* 2001, 131, 66-71.
- [74] Koshihara, Y. et al., "Caffeic acid is a selective inhibitor for leukotriene biosynthesis" *Biochim Biophys Acta* 1984, 792, 92-97.
- [75] Rao, C. V. et al., "Inhibitory effect of caffeic acid esters on azoxymethane-induced biochemical changes and aberrant crypt foci formation in rat colon", *Cancer Res* 1993, 53, 4182-4188.
- [76] King, P. J. et al., "Structure-activity relationships: analogues of the dicaffeoylquinic and dicaffeoyltartaric acids as potent inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 integrase and replication", *J Med Chem* 1999, 42, 497-509.
- [77] Maggi-Capeyron, M. et al., "Wine phenolic antioxidants inhibit ap-1 transcriptional activity", *J Agric Food Chem* 2001, 49, 5646-5652
- [78] Evandro Luís de Oliveira Niero and Gláucia Maria Machado-Santelli, "Cinnamic acid induces apoptotic cell death and cytoskeleton disruption in human melanoma cells", *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2013, 32:31
- [79] Jian Zhang et al., "Effect and mechanism of action of cinnamic acid on the proliferation and apoptosis of leukaemia cells", *Biomedical Research* 2014; 25 (3): 405-408
- [80] Rafiq Lone, Razia shuab and K.K. Koul, "Role of Cinnamate and Cinnamate Derivatives in Pharmacology", *Global Journal of Pharmacology* 8 (3): 328-335, 2014
- [81] Nilufer Cinkilic et al., "Radio-protective effect of cinnamic acid, a phenolic phytochemical, on genomic instability induced by X-rays in human blood lymphocytes in vitro", *Mutation Research* 770 (2014) 72-79
- [82] Murray, R.D.H., "Coumarins", *Nat. Prod. Rep.*, 1995, 12, 477.

- [83] Majid M. Heravi, et al., "Pechmann Reaction in the Synthesis of Coumarin Derivatives", *Advances in Heterocyclic Chemistry*, Volume 112, Chapter 1, p.p. 8-9
- [84] S. Sethna, R. Phadke, *Organic Reactions*, John Wiley & Sons, New York 1953: 7,4
- [85] Naser Montazeri, Samad Khaksar et al., "Pentafluorophenylammonium triflate (PFPA): An efficient, metal-free and reusable catalyst for the von Pechmann reaction" *Journal of Fluorine Chemistry* 132 (2011) 450–452
- [86] Yvette A. Jackson, "Improved Synthesis of Esculetin", Department of Chemistry, University of the West Indies, Vol 41, No. 9, 1995, pp.1979-1986
- [87] M.C. Laufer, H. Hausmann, and W.F. Hölderich, "Synthesis of 7-hydroxycoumarins by Pechmann reaction using Nafion resin/silica nanocomposites as catalysts", *Journal of Catalysis* 218 (2003) 315–320
- [88] Stephane Frere, Valerie Thiery and Thierry Besson, "Microwave acceleration of the Pechmann reaction on graphite/montmorillonite K10: application to the preparation of 4-substituted 7-aminocoumarins", *Tetrahedron Letters* 42 (2001) 2791–2794
- [89] Louis Wayne Whaley, "Synthesis of cyclic and acyclic lipophilic complexing agents for metal ions", Chemistry Thesis (1990), Chapter II, Texas Tech University, p.p. 24-26
- [90] John McMurry, *Οργανική Χημεία*, Τόμος II, Κεφ. 18: Αιθέρες, εποξειδία και σουλφίδια—Κεφ21: Παράγωγα καρβοξυλικών οξέων και αντιδράσεις πυρηνόφιλης ακυλο υποκατάστασης, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης (2010), σελ. 829-830, 983-986
- [91] Panyam J, Labhasetwar V, "Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue", *Adv Drug Deliv Rev* 2003; 55(3):329-347.
- [92] Singh Davinder, Harikumar S L, Nirmala, "Nanoparticles: An Overview", *Journal of Drug Delivery & Therapeutics* 2013, 3(2), 169-175
- [93] Stephanie D. Steichen, Mary Caldorera-Moore, Nicholas A. Peppas, "A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics", *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 48 (2013) 416–427
- [94] Duncan, R., "The dawning era of polymer therapeutics", *Nat. Rev. Drug Discov.* 2003,2, 347–360.
- [95] Dan Peer et al., "Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy", *Nature Nanotechnology* 2, 751 - 760 (2007)
- [96] Cristina Buzea, Ivan I. Pacheco, and Kevin Robbie, "Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity", *Biointerphases*, Vol. 2, No. 4, December 2007

- [97] D.E. Owens III, N.A. Peppas, "Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles", *Int. J. Pharm.* 307 (2006) 93–102.
- [98] B. Říhová, "Biocompatibility and immunocompatibility of water- soluble polymers based on HPMA", *Composites Part B* 38 (2007) 386–397.
- [99] A. Mahapatro, D.K. Singh, "Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines", *J. Nanobiotechnol.* 9 (2011) 55.
- [100] M.A. Dobrovolskaia, D.R. Germolec, J.L. Weaver, "Evaluation of nanoparticle immunotoxicity", *Nat. Nanotechnol.* 4 (2009) 411–414.
- [101] Sheva Naahidi et al., "Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery", *Journal of Controlled Release* 166 (2013) 182–194
- [102] Lasic, D.D., "Novel applications of liposomes", *Trends Biotechnol* 1998, 16, 307–321.
- [103] Haley, B., Frenkel, E., "Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment", *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* 26 (2008) 57–64
- [104] M.Z. Ahmad, et al., "Metallic nanoparticles: Technology overview & drug delivery applications in oncology", *Expert Opin. Drug Deliv.* 7 (2010) 927–942.
- [105] W.H. De Jong, P.J. Borm, Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards, *Int. J. Nanomed.* 3 (2008) 133–149
- [106] Ranjita Misra, Sarbari Acharya and Sanjeeb K. Sahoo, "Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy", *Drug Discovery Today*, Volume 15, Numbers 19/20, 2010
- [107] Re F, Gregori M, Masserini M., "Nanotechnology for neurodegenerative disorders", *Nanomedicine: NBMedicine* 2012;8:51–S58
- [108] Ren Zhong Xiao, et al., "Recent advances in PEG–PLA block copolymer nanoparticles", Dove Medical Press Ltd, *International Journal of Nanomedicine*:5 1057–1065, 2010
- [109] Desai M.P., Labhasetwar V., Amidon G.L., Levy R.J., "Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size", *Pharm Res* 1996, 13 1838–1845.
- [110] Hunter R.J., "Zeta Potential in Colloid Science: principles and applications", Academic Press, London, 1981
- [111] Hanaor D.A.H. et al., "The effects of carboxylic acids on the aqueous dispersion and electrophoretic deposition of ZrO₂", *Journal of the European Ceramic Society* 2012, 32 (1): 235-244
- [112] Greenwood R., Kendall K., *Journal of the European Ceramic Society* 1991, 19 (4): 479-488.

- [113] Chacon M., Molpeceres J., Berges L., Guzman M., Aberturas M.R., "Stability and freeze-drying of cyclosporine loaded poly(D,L lactide-glycolide) carriers", *Eur. J. Pharm. Sci.* 1999, 8 ,99–107.
- [114] Franks F., "Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice", *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1998, 45 221–229.
- [115] Abdelwahed W., Degobert G., Stainmesse S., Fessi H., "Freeze drying of nanoparticles: Formulation, process and storage consideration", *Advanced Drug Delivery Reviews* 2006, 58, 1688–1713
- [116] Melisande Holzer et al., "Physico-chemical characterisation of PLGA nanoparticles after freeze-drying and storage", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 72 (2009) 428–437
- [117] Di Bei, Jianing Meng, Bi-Botti C Youan, "Engineering Nanomedicines for Improved Melanoma Therapy: Progress and Promises", *Nanomedicine.* 2010; 5(9):1385-1399.
- [118] Ming Li, Olivier Rouaud, Denis Poncelet, "Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches", *International Journal of Pharmaceutics* 363 (2008) 26–39
- [119] Hideki Murakami et al., "Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method", *International Journal of Pharmaceutics* 187 (1999) 143–152
- [120] Catarina Pinto Reis et al., "Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles", *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2 (2006) 8-21
- [121] Christian Wischke, Steven P. Schwendeman, "Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles", *International Journal of Pharmaceutics* 364 (2008) 298–327
- [122] Ki Chang Song et al., "The effect of type of organic phase solvents on the particle size of poly(d,l lactide-co-glycolide) nanoparticles", *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 276 (2006) 162–167
- [123] Hirenkumar K. Makadia, Steven J. Siegel, "Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier", *Polymers (Basel).* 2011 September 1; 3(3): 1377–1397.
- [124] Fabienne Danhier et al., "PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications", *Journal of Controlled Release* 161 (2012) 505–522
- [125] Natarajan Jawahar, SN Meyyanathan, "Polymeric nanoparticles for drug delivery and targeting: A comprehensive review", *International Journal of Health & Allied Sciences* 2012,

- [126] <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4444190.html>
- [127] <http://www.herboreal.com/Umbelliprenin.html>
- [128] Tim Mosmann, "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays", *Journal of Immunological Methods*, 65 (1983) 55-63
- [129] Detsi, A. et al., "Natural and synthetic 2'-hydroxy-chalcones and aurones: synthesis characterization and evaluation of the antioxidant and soybean lipoxygenase inhibitory activity", *Bioorg Med Chem* 2009, 17, 8073-8085.
- [130] Gallwitz WE et al., "5-Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid stimulate isolated osteoclasts to resorb calcified matrices", *J Biol Chem* 1993; 268:10087-94.
- [131] Ghosh J, Myers CE., "Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells", *Pros Natl Acad Sci USA* 1998; 95:13182-7.
- [132] Theodoros Symeonidis, Konstantina C. Fylaktakidou, Dimitra J. Hadjipavlou-Litina, Konstantinos E. Litinas, " Synthesis and anti-inflammatory evaluation of novel angularly or linearly fused coumarins", *Europ. Journal of Med. Chem.* 44,. (2009) 5012-5017.
- [133] Khaghanzadeh et al., "Umbelliprenin is cytotoxic against QU-DB large cell lung cancer cell line but anti proliferative against A549 adenocarcinoma cells", *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* 2012, 20:69

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

NMR: Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

DLS: Δυναμική Σκέδαση Φωτός

UV-Vis: Φασματοσκοπίας απορρόφησης υπεριώδους-ορατού

MTT: 3-(4,5-διμεθυλθειαζολ-2-υλ-)-2,5-διφαινυλτετραζόλιο βρωμίδιο

NPs: Νανοσωματίδια

PLGA: πολυ(γαλακτικό-γλυκολικό) οξύ

PLA: πολυ(γαλακτικό) οξύ

PGA: πολυ(γλυκολικό) οξύ

PEG: πολυ(αιθυλενογλυκόλη)

PCL: πολυ(ε-καπρολακτόνη)

PVA: πολυ(βινυλική αλκοόλη)

QDs: Κβαντικές τελείες

Tg: Θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης

ECM: Εξωκυττάρια μήτρα

4MU: 4-μεθυλουμπελιφερόνη

ROS: Δραστικές μορφές οξυγόνου

RNS: Δραστικές μορφές αζώτου

LO: Λιποξυγονάση

AChE: Ακετυλοχολινεστεράση

RES: Δικτυοενδοθηλιακό σύστημα

MAO: Μονοαμινοξειδάση

TPA: 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate

NDGA: Nordihydroguaiaretic acid

AAPH: 2,2 αζοδισ-(2-αμιδινοπροπανο)υδροχλωρίδιο

DPPH: 2,2- διφαινυλ-1-πικρυλυδραζίλη

PBS: Φυσιολογικός ορός ρυθμισμένος με φωσφορικά

DMSO: Διμέθυλο σουλφοξείδιο

FD: Freeze drying (λυοφιλοποίηση)

Παράρτημα Εικόνων

Εικόνα 1: Φυτικά είδη πλούσια σε κουμαρινικά παράγωγα	7
Εικόνα 2: Χημική δομή μιας τυπικής α-πυρόνης.....	8
Εικόνα 3: Χημική δομή Κουμαρίνης.....	8
Εικόνα 4: Χημική δομή της 7-υδροξυ-κουμαρίνης (<i>Umbelliferone</i>) και της σκοπολετίνης, αντίστοιχα.....	8
Εικόνα 5: Η κουμαρίνη ως βασικός πυρήνας για την σύνθεση νέων απλών κουμαρινικών αναλόγων.....	9
Εικόνα 6: Τυπική δομή φουρανοκουμαρινών και πυρανοκουμαρινών, αντίστοιχα.....	9
Εικόνα 7: Χημικός τύπος της 4-υδροξυ-κουμαρίνης (a) και της βαρφαρίνης (b), αντίστοιχα.....	10
Εικόνα 8: Χημική δομή των φυσικών αντικαρκινικών κουμαρινών οσθόλη (a), γερανυλογερανυλόξυ κουμαρίνη (b), ουμπελιφερόνη (c), 4-μεθυλομπελιφερόνη (d) και του χημικά σύνθετου 4-υποκατεστημένου θειοαιθερικού κουμαρινικού αναλόγου (e), αντίστοιχα.....	13
Εικόνα 9: Χημική δομή ιμπερατορίνης (a) και εσκουλετίνης (b), αντίστοιχα.....	14
Εικόνα 10: Αντιφλεγμονώδες οξαδιαζολικό παράγωγο κουμαρίνη.....	14
Εικόνα 11: Χημική δομή των αντιπηκτικών κουμαρινών βαρφαρίνη (a), ακενοκουμαρόλη (b), δικουμαρόλη (c) και κυκλοκουμαρόλη (d), αντίστοιχα.....	15
Εικόνα 12: Χημικός τύπος της ακεταμιδο-υποκατεστημένης (a) και ακετοξυ-υποκατεστημένης (b) κουμαρίνης.....	16
Εικόνα 13: Μοριακή δομή της εσκουλετίνης (a), της 4-μεθυλο εσκουλετίνης (b) και της σκοπελετίνης (c), αντίστοιχα.....	17
Εικόνα 14: Κουμαρινικά παράγωγα του λιποϊκού οξέος.....	18
Εικόνα 15: Χημική δομή της φραξίνης.....	18
Εικόνα 16: Συνοπτική απεικόνιση της αντιοξειδωτικής δράσης των κουμαρινών συναρτήσει των δομικών τους χαρακτηριστικών.....	19
Εικόνα 17: Η ενσακουλίνη (a) και το καινοτόμο πιπεριδυλο κουμαρινικό ανάλογο (b), ως αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης, αντίστοιχα.....	20
Εικόνα 18: Δομή του anti-Alzheimer τετραζολο κουμαρινικού αναλόγου.....	20
Εικόνα 19: Χημική δομή της αντιοξειδωτικής 7-βενζυλοξυ κουμαρίνης.....	21
Εικόνα 20: Δομή ουμπελιπρενίνης.....	22
Εικόνα 21: Δομή των ισοπρενυλοξυ κουμαρινών ωραπτένη (a) και Mammaea E/BB (b), αντίστοιχα.....	24

Εικόνα 22: Χημική δομή κινναμικού οξέος.....	26
Εικόνα 23: Σχηματική απεικόνιση της δράσης των νανοσωματιδίων ως μεταφορείς φαρμάκων σε καρκινικούς ιστούς, μέσω του EPR φαινομένου.....	32
Εικόνα 24: Πολλαπλασιαστική τάση καρκινικών κυττάρων για τον σχηματισμό καρκινικού όγκου.....	32
Εικόνα 25: Σύγκριση μεγέθους μεταξύ νανοσωματιδιακών μορφών και μακροφάγου κύτταρου ποντικού. Το ανθρώπινο μακροφάγο κύτταρο είναι δυο φορές μεγαλύτερο από το απεικονιζόμενο.....	32
Εικόνα 26: Διάφορα είδη νανοσωματιδίων για βιοϊατρική χρήση.....	37
Εικόνα 27: Οι ιδιότητες των νανοσωματιδίων καθορίζουν την δράση τους στον ανθρώπινο οργανισμό.....	37
Εικόνα 28: Οι δύο βασικές μορφές των πολυμερικών νανοσωματιδίων. Νανόσφαιρες (αριστερά) και νανοκάψουλες (δεξιά) αντίστοιχα.....	40
Εικόνα 29: Σχηματική απεικόνιση των μοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της PVA και των επιφανειακών μορίων του πολυμερούς PLGA.....	41
Εικόνα 30: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου εκτόπισης οργανικού διαλύτη για τον σχηματισμό πολυμερικών νανοσωματιδίων.....	43
Εικόνα 31: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου γαλακτωματοποίησης με διάχυση διαλύτη.....	44
Εικόνα 32: Επίδραση της οργανική φάσης και την συγκέντρωσης πολυμερούς στην κατανομή μεγέθους και την μικροδομή των σχηματιζόμενων σωματιδίων, από την (o/w) μέθοδο γαλακτωματοποίησης υπό εξάτμιση διαλύτη. Η συγκέντρωση του PLGA πολυμερούς (Resomer® RG 503H) είναι 100mg/ml για τις εικόνες (b–d) και 200 mg/ml για τις εικόνες (f–h), αντίστοιχα. Επίσης, ο οργανικός διαλύτης για τις εικόνες είναι (b και f), το μεθυλενοχλωρίδιο, για τις (c και g) ο οξικός αιθυλεστέρας και για τις (d και h) ο οξικός αιθυλεστέρας οργανικά κορεσμένης υδατική φάσης.....	45
Εικόνα 33: Χημική δομή πολυ(γαλακτικού-γλυκολικού) οξέος (PLGA) και των μονομερών του PLA και PGA.....	49
Εικόνα 34: Μηχανισμός κυτταρικής πρόσληψης νανοσωματιδίων.....	51
Εικόνα 35: Μηχανισμοί αποδέσμευσης φαρμάκου από πολυμερικά νανοσωματίδια.....	52
Εικόνα 36: Φάσμα πρωτονίου ¹ H NMR (300MHz, DMSO-d ₆) της κουμαρίνης 1b	56
Εικόνα 37: Φάσμα πρωτονίου ¹ H NMR (300MHz, DMSO-d ₆) της κουμαρίνης 2a	58
Εικόνα 38: Φάσμα πρωτονίου ¹ H NMR (300MHz, DMSO-d ₆) της κουμαρίνης 2b	59
Εικόνα 39: Φάσμα πρωτονίου ¹ H NMR (300MHz, DMSO-d ₆) του εστέρα 3	60
Εικόνα 40: Shaker Gallenkamp.....	62

Εικόνα 41: Συσκευή Malvern Zetasizer Nano ZSP, για τις μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS).....	64
Εικόνα 42: Όργανο φασματοσκοπίας απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-Vis).....	64
Εικόνα 43: Αναγωγή του άλατος τετραζολίου σε φορμαζάνη μέσω της δράσης των μιτοχονδριακών αναγωγάσων.....	67
Εικόνα 44: Δομή NDGA.....	69
Εικόνα 45: Δομή AAPH και Trolox αντίστοιχα.....	69
Εικόνα 46: Τυπικό δείγμα MTT.....	84

Παράρτημα Σχημάτων

Σχήμα 1: Σύνθεση κουμαρινών μέσω της αντίδρασης Pechmann	26
Σχήμα 2: Στάδια της αντίδρασης Pechmann κατά τον σχηματισμό της 7-υδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνης.....	27
Σχήμα 3: Μηχανισμός σύνθεσης κουμαρινικών αιθέρων κατά Williamson.....	29
Σχήμα 4: Μηχανισμός αντίδρασης πυρηνόφιλης ακυλο υποκατάστασης του κινναμικού χλωριδίου από την 7-υδροξυ-κουμαρίνη.....	30
Σχήμα 5: Επίδραση του οργανικού διαλύτη στον σχηματισμό PLGA νανοσωματιδίων παρουσία σταθεροποιητή DMAB συγκέντρωσης 1% (w/v)	48
Σχήμα 6: Επίδραση του οργανικού διαλύτη στον σχηματισμό PLGA νανοσωματιδίων παρουσία σταθεροποιητή PVA συγκέντρωσης 1% (w/v)	48
Σχήμα 7: Επίδραση του οργανικού διαλύτη στον σχηματισμό PLGA νανοσωματιδίων παρουσία σταθεροποιητή Pluronic F68 συγκέντρωσης 1% (w/v)	48
Σχήμα 8: Κουμαρινικά ανάλογα με αξιόλογη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση.....	54
Σχήμα 9: Χημική δομή της ρίζας DPPH πριν και μετά την αντίδραση της με τον αντιοξειδωτικό παράγοντα (AH).....	68

Παράρτημα Πινάκων

Πίνακας 1: In vitro κυτοτοξική αξιολόγηση (LC50/μM) των χημικά σύνθετων ισοπρενυλο κουμαρινών 1-9 στις παγκρεατικές κυτταρικές σειρές PANC-1, υπό συνθήκες πλούσιες (ND) και μη (NR) σε θρεπτικά συστατικά.....	22
Πίνακας 2: Παράγωγα των φαινολικών οξέων βάσει της υδροξυκιναμικής και υδροξυβενζοϊκής δομής αντίστοιχα.....	24
Πίνακας 3: Λίστα ορισμένων οργανικών διαλυτών που χρησιμοποιούνται συχνότερα στην μέθοδο γαλακτοματοποίησης υπό εξάτμιση διαλύτη.....	42
Πίνακας 4: Υδατική αναμιξιμότητα οργανικών διαλυτών που χρησιμοποιούνται στις τεχνικές νανοεγκλεισμού PLGA νανοσωματιδίων.....	47
Πίνακας 5: Αποτελέσματα της in vitro αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής δράσης των παραγόμενων κουμαρινικών αναλόγων.....	70
Πίνακας 6: Αξιολόγηση της αντιφλεγμονώδους δράσης των παραγόμενων κουμαρινικών αναλόγων.....	72
Πίνακας 7: Συνθήκες παραγωγής κενών PLGA νανοσωματιδίων.....	74
Πίνακας 8: Αποτελέσματα μετρήσεων DLS για το μέγεθος, την πολυδιασπορά και το ζ-δυναμικό παραγόμενων κενών PLGA νανοσωματιδίων.....	74
Πίνακας 9: Επίδραση του οργανικού διαλύτη στο μέγεθος, το δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό των PLGA νανοσωματιδίων.....	76
Πίνακας 10: Αποτελέσματα μετρήσεων πρότυπων διαλυμάτων για κατασκευή της καμπύλης αναφοράς της 7-υδροξυ-κουμαρίνης (1a).....	80
Πίνακας 11: Αποτελέσματα μετρήσεων UV-Vis των υπερκειμένων δ/των της ένωσης 1a	81
Πίνακας 12: Μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης των κουμαρινικών αναλόγων 1a-3a	82
Πίνακας 13: Απόδοση εγκλεισμού των κουμαρινικών αναλόγων 1a-3a	82
Πίνακας 14: Κυτοτοξική δράση των εγκλεισμένων και μη κουμαρινικών αναλόγων έναντι των κυττάρων ανθρώπινου νευροβλαστώματος SK-N-SH (IC50μM).....	89
Πίνακας 15: Επίδραση της λυοφιλοποίησης στην κυτοτοξική δράση των εγκλεισμένων κουμαρινικών αναλόγων έναντι των καρκινικών κυττάρων SK-N-SH (IC50μM).	93

Παράρτημα Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Κατανομή μεγέθους του δείγματος Blank_EtOAc.....	75
Διάγραμμα 2: Κατανομή δυναμικού επιφάνειας του δείγματος Blank_EtOAc.....	75
Διάγραμμα 3: Κατανομή μεγέθους του δείγματος Ουμπελιπρενίνη (2a-NPs)_EtOAc.....	77
Διάγραμμα 4: Κατανομή μεγέθους του δείγματος 4-μεθυλο-ουμπελιπρενίνη (2b-NPs)_EtOAc.....	78
Διάγραμμα 5: Κατανομή μεγέθους του δείγματος Κιναμικός κουμαρινοϋλ-εστέρας (3-NPs)_EtOAc.....	78
Διάγραμμα 6: Κατανομή δυναμικού επιφάνειας του δείγματος Ουμπελιπρενίνη (2a-NPs)_EtOAc.....	78
Διάγραμμα 7: Κατανομή δυναμικού επιφάνειας του δείγματος 4-μεθυλο-ουμπελιπρενίνη (2b-NPs)_EtOAc.....	79
Διάγραμμα 8: Κατανομή δυναμικού επιφάνειας του δείγματος Κιναμικός κουμαρινοϋλ-εστέρας (3-NPs)_EtOAc.....	79
Διάγραμμα 9: Φάσμα απορρόφησης της 7-υδροξικουμαρίνης (1a).....	80
Διάγραμμα 10: Καμπύλη αναφοράς της 7-υδροξικουμαρίνης (1a) στα 352nm.....	81
Διάγραμμα 11: Επίδραση των Κενών PLGA NPs στην βιωσιμότητα των SK-N-SH κυττάρων ανθρώπινου νευροβλαστώματος. Τα κύτταρα επώαστηκαν με τους αναγραφόμενους όγκους των κενών νανοσωματιδίων για 48ώρες και η βιωσιμότητα τους μετρήθηκε με τη μέθοδο MTT. Η κυτταρική βιωσιμότητα εκφράζεται ως το % ποσοστό της βιωσιμότητας των δειγμάτων αναφοράς. Για κάθε δείγμα πραγματοποιούνται δύο συνολικά πειράματα, τριών μετρήσεων το καθένα και λαμβάνεται ο Μ.Ο.± Τυπική Απόκλιση αυτών.....	85
Διάγραμμα 12: Επίδραση της Ουμπελιπρενίνης (2a) και των PLGA NPs Ουμπελιπρενίνης (2a-NPs) στην βιωσιμότητα των SK-N-SH κυττάρων ανθρώπινου νευροβλαστώματος. Τα κύτταρα επώαστηκαν με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις της εγκλεισμένης και μη ένωσης για 48ώρες και η βιωσιμότητα τους μετρήθηκε με τη μέθοδο MTT. Η κυτταρική βιωσιμότητα εκφράζεται ως το (%) ποσοστό της βιωσιμότητας των control δειγμάτων αναφοράς. Για κάθε δείγμα πραγματοποιούνται δύο συνολικά πειράματα, τριών μετρήσεων το καθένα και λαμβάνεται ο Μ.Ο. ± Τυπική Απόκλιση αυτών.....	86
Διάγραμμα 13: Επίδραση της 4-μεθυλο-ουμπελιπρενίνης (2b) και των PLGA NPs 4-μεθυλο-ουμπελιπρενίνης (2b-NPs) στην βιωσιμότητα των SK-N-SH κυττάρων ανθρώπινου νευροβλαστώματος. Τα κύτταρα επώαστηκαν με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις της εγκλεισμένης και μη ένωσης για 48ώρες και η βιωσιμότητα τους μετρήθηκε με τη μέθοδο MTT. Η κυτταρική βιωσιμότητα εκφράζεται ως το (%) ποσοστό της βιωσιμότητας των control δειγμάτων αναφοράς. Για κάθε δείγμα πραγματοποιούνται δύο συνολικά πειράματα, τριών μετρήσεων το καθένα και λαμβάνεται ο Μ.Ο. ± Τυπική Απόκλιση αυτών.....	86
Διάγραμμα 14: Επίδραση του Κιναμικού κουμαρινοϋλ-εστέρα (3) και των PLGA NPs κινναμικού κουμαρινοϋλ-εστέρα (3-NPs) στην βιωσιμότητα των SK-N-SH κυττάρων ανθρώπινου νευροβλαστώματος. Τα κύτταρα επώαστηκαν με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις της εγκλεισμένης και μη ένωσης για 48ώρες και η βιωσιμότητα τους μετρήθηκε με τη μέθοδο MTT. Η κυτταρική βιωσιμότητα εκφράζεται ως το (%) ποσοστό της βιωσιμότητας των control δειγμάτων	

αναφοράς. Για κάθε δείγμα πραγματοποιούνται δύο συνολικά πειράματα, τριών μετρήσεων το καθένα και λαμβάνεται ο Μ.Ο. \pm Τυπική Απόκλιση αυτών.....87

Διάγραμμα 15: Επίδραση της 4-μεθυλο-ουμπελιφερόνης (**1b**) και των PLGA NPs 4-μεθυλο-ουμπελιφερόνης (**1b-NPs**) στην βιωσιμότητα των SK-N-SH κυττάρων ανθρώπινου νευροβλαστώματος. Τα κύτταρα επώαστηκαν με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις της εγκλεισμένης και μη ένωσης για 48ώρες και η βιωσιμότητα τους μετρήθηκε με τη μέθοδο MTT. Η κυτταρική βιωσιμότητα εκφράζεται ως το (%) ποσοστό της βιωσιμότητας των control δειγμάτων αναφοράς. Για κάθε δείγμα πραγματοποιούνται δύο συνολικά πειράματα, τριών μετρήσεων το καθένα και λαμβάνεται ο Μ.Ο. \pm Τυπική Απόκλιση αυτών.....87

Διάγραμμα 16: Επίδραση της Ουμπελιφερόνης (**1a**) και των PLGA NPs Ουμπελιφερόνης (**1a-NPs**) στην βιωσιμότητα των SK-N-SH κυττάρων ανθρώπινου νευροβλαστώματος. Τα κύτταρα επώαστηκαν με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις της εγκλεισμένης και μη ένωσης για 48ώρες και η βιωσιμότητα τους μετρήθηκε με τη μέθοδο MTT. Η κυτταρική βιωσιμότητα εκφράζεται ως το (%) ποσοστό της βιωσιμότητας των control δειγμάτων αναφοράς. Για κάθε δείγμα πραγματοποιούνται δύο συνολικά πειράματα, τριών μετρήσεων το καθένα και λαμβάνεται ο Μ.Ο. \pm Τυπική Απόκλιση αυτών.....88

Διάγραμμα 17: Επίδραση της κατεργασίας λυοφιλοποίησης (**FD**) στην κυτοτοξική δράση των PLGA NPs 4-μεθυλο-Ουμπελιφερόνης (**1b-NPs**). Τα κύτταρα επώαστηκαν με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις της εγκλεισμένης ένωσης για 48ώρες και η βιωσιμότητα τους μετρήθηκε με τη μέθοδο MTT. Η κυτταρική βιωσιμότητα εκφράζεται ως το (%) ποσοστό της βιωσιμότητας των control δειγμάτων αναφοράς. Για κάθε δείγμα πραγματοποιούνται δύο συνολικά πειράματα, τριών μετρήσεων το καθένα και λαμβάνεται ο Μ.Ο. \pm Τυπική Απόκλιση αυτών.....91

Διάγραμμα 18: Επίδραση της κατεργασίας λυοφιλοποίησης (**FD**) στην κυτοτοξική δράση των PLGA NPs Ουμπελιπρενίνης (**2a-NPs**). Τα κύτταρα επώαστηκαν με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις της εγκλεισμένης ένωσης για 48ώρες και η βιωσιμότητα τους μετρήθηκε με τη μέθοδο MTT. Η κυτταρική βιωσιμότητα εκφράζεται ως το (%) ποσοστό της βιωσιμότητας των control δειγμάτων αναφοράς. Για κάθε δείγμα πραγματοποιούνται δύο συνολικά πειράματα, τριών μετρήσεων το καθένα και λαμβάνεται ο Μ.Ο. \pm Τυπική Απόκλιση αυτών.....91

Διάγραμμα 19: Επίδραση της κατεργασίας λυοφιλοποίησης (**FD**) στην κυτοτοξική δράση των PLGA NPs 4-μεθυλο-Ουμπελιπρενίνης (**2b-NPs**). Τα κύτταρα επώαστηκαν με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις της εγκλεισμένης ένωσης για 48ώρες και η βιωσιμότητα τους μετρήθηκε με τη μέθοδο MTT. Η κυτταρική βιωσιμότητα εκφράζεται ως το (%) ποσοστό της βιωσιμότητας των control δειγμάτων αναφοράς. Για κάθε δείγμα πραγματοποιούνται δύο συνολικά πειράματα, τριών μετρήσεων το καθένα και λαμβάνεται ο Μ.Ο. \pm Τυπική Απόκλιση αυτών.....92