

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Τομέας (I) Χημικών Επιστημών



**Μελέτη εγκλεισμού του φυσικού προϊόντος
κουρκουμίνη σε βιοσυμβατά νανοσυστήματα και
αξιολόγηση της αλληλεπίδρασής τους με το ctDNA**

Διπλωματική Εργασία

Κωνσταντίνος Πάλλιος

Επιβλέπουσα

Αναστασία Δέτση

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

Εργαστήριο Οργανικής Χημείας

ΑΘΗΝΑ 2021

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Ε.Μ.Π. Δρ. Αναστασίας Δέτση κατά το ακαδημαϊκό έτος 2020–2021.

Η ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας σηματοδοτεί το κλείσιμο του πενταετούς κύκλου σπουδών μου στη Σχολή Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π. Ως εκ τούτου, θα ήθελα να ευχαριστήσω ορισμένους ανθρώπους, των οποίων η βοήθεια υπήρξε σημαντική σε αυτήν την προσπάθειά μου.

Πρωτίστως, οφείλω να ευχαριστήσω βαθύτατα την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Μ.Π. Δρ. Αναστασία Δέτση, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα, αλλά κυρίως για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Οι συμβουλές της και η εμπιστοσύνη που επέδειξε προς το πρόσωπο μου αποτέλεσαν καταλυτικό παράγοντα για την επιτυχή ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στην τριμελή εξεταστική επιτροπή για τον χρόνο που διέθεσε για την κριτική ανάγνωση της εργασίας μου.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω τις ευχαριστίες στην Ιωάννα Πιττερού, υποψήφια διδάκτορα του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας Ε.Μ.Π. για την απεριόριστη στήριξή της, τη βοήθειά της στην επίλυση οποιουδήποτε προβλήματος χρειάστηκε να αντιμετωπιστεί κατά την εκπόνηση της εργασίας μου, τις γνώσεις και την επιστημονική εμπειρία που μοιράστηκε μαζί μου και κυρίως για την άψογη και αρμονική συνεργασία που είχαμε.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Υποψήφια Διδάκτορα Μαρία Μπαϊρακτάρη για την μύηση στη μέθοδο μελέτης του DNA-συμπλόκου, καθώς επίσης και όλους τους συμφοιτητές για το υπέροχο κλίμα στο εργαστήριο.

Επιπλέον, ευχαριστώ τον ομότιμο Καθηγητή Δρ. Μανόλη Κούκιο ο οποίος πρώτος με παρακίνησε να ασχοληθώ με το αντικείμενο του Χημικού Μηχανικού, αποτελώντας πρότυπο επιστήμονα για εμένα.

Ακόμα, ευχαριστώ θερμά την οικογένεια μου για τη συνεχή συμπαράσταση, τις πολύτιμες συμβουλές και για όλα όσα μου έχει προσφέρει όλα αυτά τα χρόνια των σπουδών μου αλλά και της ζωής μου καθώς και το κοντινό φιλικό μου περιβάλλον για τη στήριξή του.

Τέλος θα ήθελα να αφιερώσω την εργασία μου στη μνήμη του πατέρα μου, Βασιλείου Πάλλιου ο οποίος έφυγε από τη ζωή τον Μάρτιο του 2021.

Κωνσταντίνος Πάλλιος

Αθήνα 2021

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κourkouμίνη είναι ένα φυσικό προϊόν που παρουσιάζει πληθώρα βιολογικών δράσεων, μεταξύ αυτών αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντιμικροβιακή και αντικαρκινική δράση. Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα της κourkouμίνης περιορίζεται λόγω της χαμηλής της βιοδιαθεσιμότητας, η οποία οφείλεται στην πολύ μικρή διαλυτότητα στο νερό καθώς και στον γρήγορο μεταβολισμό και αποβολή της από τον οργανισμό.

Οι κυκλοδεξτρίνες είναι μία οικογένεια κυκλικών ολιγοσακχαριτών, αποτελούμενες από επαναλαμβανόμενα μόρια α-D-γλυκοκυρανόζης συνδεδεμένα με α-1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν σύμπλοκα εγκλεισμού με ένα ευρύ φάσμα στερεών, υγρών και αερίων ενώσεων.

Η χιτοζάνη είναι ένα πολλά υποσχόμενο βιοπολυμερές, που παρουσιάζει υψηλή βιοσυμβατότητα, βιοαποικοδομησιμότητα και βλεννοκολλητικές ιδιότητες. Ο συνδυασμός της χιτοζάνης με άλλους φορείς μπορεί να οδηγήσει σε συστήματα τροποποιημένης αποδέσμευσης.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ο σχηματισμός συμπλόκων εγκλεισμού της κourkouμίνης με την β-κυκλοδεξτρίνη (β-CD) και με τις τροποποιημένες 2-υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (HP-β-CD) και μέθυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (Me-β-CD) με στόχο τη βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητάς της. Η σύνθεση των συμπλόκων πραγματοποιείται με δύο μεθόδους: τον σχηματισμό με λειοτρίβηση (kneading) και τον σχηματισμό μέσω εξάτμισης διαλύτη και λυοφιλοποίησης (solvent evaporation & freeze drying). Οι αποδόσεις διεργασίας κυμαίνονται από 73–93% ενώ οι αποδόσεις εγκλεισμού της μεθόδου σύνθεσης των συμπλόκων με λειοτρίβηση (kneading) κυμαίνονται από 65–81%.

Τα σύμπλοκα εγκλεισμού που σχηματίζονται, χαρακτηρίζονται με δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) ως προς το μέγεθος, τον δείκτη πολυδιασποράς (Pdl) και το ζ-δυναμικό. Παράλληλα, μελετώνται δομικά με χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (¹H NMR) και υπέρυθρης φασματομετρίας μετασχηματισμού Fourier (FT-IR) προκειμένου να κατανοηθούν οι πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του φιλοξενούμενου μορίου και του μορίου ξενιστή και να επιβεβαιωθεί ο επιτυχής εγκλεισμός της ένωσης.

Επιπλέον, γίνεται μελέτη απελευθέρωσης της κourkouμίνης από τα σύμπλοκα (σε συνθήκες pH=7.4, T=37°C) και κινητική μοντελοποίηση και προκύπτει ότι τα σύμπλοκα εγκλεισμού Cur-β-CD, Cur-HP-β-CD και Cur-Me-β-CD παρουσιάζουν απότομη απελευθέρωση («burst effect») στις πρώτες 4 h (>50% απελευθέρωση) και σταθεροποίηση της αποδέσμευσης («plateau») μετά από 5 h.

Για την εξασφάλιση παρατεταμένης αποδέσμευσης και ενός πιο ήπιου προφίλ απελευθέρωσης πραγματοποιείται επικάλυψη των παραγόμενων συμπλόκων με χιτοζάνη, μέσω της μεθόδου ιονοτροπικής πηκτωμάτωσης με αποτέλεσμα τη δημιουργία νανοσωματιδίων. Από την αντίστοιχη μελέτη απελευθέρωσης παρατηρείται μετρίαση του burst effect (17-28% στις πρώτες 4 h) ενώ σημειώνεται απελευθέρωση της κourkouμίνης ακόμα και μετά από 288 h (12 μέρες).

Από την κινητική μοντελοποίηση της απελευθέρωσης προκύπτει ότι τα κινητικά μοντέλα Higuchi και Korsmeyer-Perppas περιγράφουν με ικανοποιητική ακρίβεια την απελευθέρωση της κourkouμίνης και ότι στην περίπτωση των συμπλόκων ο μηχανισμός απελευθέρωσης είναι η

διάχυση μέσω ανώμαλης μεταφοράς (non-Fickian) ενώ στα επικαλυμμένα νανοσωματίδια η Fickian διάχυση.

Μελετάται επίσης η αλληλεπίδραση της κουρκουμίνης και των συμπλόκων εγκλεισμού με το DNA θύμου αδένος βοδιού (calf thymus DNA, ctDNA) μέσω πειραματικών και υπολογιστικών μελετών, καθώς η αλληλεπίδραση αυτή μπορεί να οδηγήσει σε αξιοποίηση της κουρκουμίνης για αντικαρκινικές εφαρμογές. Προκύπτει ότι η κουρκουμίνη αλληλεπιδρά με το DNA μέσω δέσμησης στη μικρή αύλακα και αποσταθεροποίησης του δίκλωνου μορίου και ότι η αλληλεπίδραση είναι πολύ πιο ισχυρή στην περίπτωση των συμπλόκων εγκλεισμού, υποδεικνύοντας βελτίωση της δραστηριότητας της κουρκουμίνης χάρη στις κυκλοδεξτρίνες-φορείς.

Επιστημονική περιοχή: Φαρμακευτική Χημεία, Νανοτεχνολογία, Νανοϊατρική

Λέξεις-Κλειδιά: κουρκουμίνη, β-κυκλοδεξτρίνη, χιτοζάνη, σύμπλοκα εγκλεισμού, επικαλυμμένα νανοσωματίδια, μελέτη απελευθέρωσης, κινητική μοντελοποίηση, ctDNA

ABSTRACT

Curcumin is the major biologically active polyphenolic constituent in turmeric, presenting a wide variety of bioactivities such as antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial and anticancer. However, one of the major problems which impedes curcumin use as an oral pharmaceutical agent is its poor bioavailability, which appears to be primarily due to poor absorption, rapid metabolism, and rapid elimination.

Cyclodextrins, naturally occurring or modified, are a family of cyclic oligosaccharides, consisting of a macrocyclic ring of glucose subunits. They are primarily known for their ability to form inclusion complexes (ICs) with a wide variety of solid, liquid or gas substances.

Chitosan is a promising biopolymer, known especially for its biocompatibility, biodegradability and mucoadhesive properties. Moreover, chitosan can be applied as a coating to nanoparticles formed by other biopolymers and drastically modify the release profile of the encapsulated drug.

In the current work, curcumin ICs with β -cyclodextrin (β -CD) and with modified β -CDs such as 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) and methyl- β -cyclodextrin (Me- β -CD) were formed. The goal of the inclusion is to improve curcumin's properties, especially aqueous solubility and bioavailability. The ICs were formed using the kneading method and a combination of solvent evaporation and freeze-drying methods. Process yield for the complexes ranges from 73–93%, while the inclusion efficiency using the kneading method ranges from 65–81%.

The ICs are then characterized using Dynamic Light Scattering (DLS), in order to determine their size, Polydispersity Index (Pdl) and zeta-potential. Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) and Nuclear Magnetic Resonance (^1H NMR) are also used to study the IC structure, to determine the interaction between curcumin (drug) and β -CDs (host) and provide evidence of a successful inclusion process.

Furthermore, a release study is carried out (pH=7.4, T=37 °C), followed by kinetic modeling of the data. The Cur- β -CD, Cur-HP- β -CD and Cur-Me- β -CD complexes show a biphasic release profile which includes a "burst effect" in the first 4 h (with a curcumin release greater than 50%) and a "plateau" after 5 h.

In order to obtain a more sustained release profile of curcumin and to further increase its bioavailability, the Cur- β -CD ICs are coated with chitosan (CS) biopolymer using the ionic gelation method and CS-Cur- β -CD nanoparticles (NPs) are formed. The respective release studies show a moderation of the burst effect (17–28% in the first 4 h), while at the same time the release of curcumin continues even after 288 h (12 days).

The kinetic modelling results indicate that both the Higuchi and the Korsmeyer-Peppas models better describe the release of curcumin. The release of curcumin from the ICs follows a non-Fickian diffusion mechanism while the release from coated NPs is better described as Fickian diffusion.

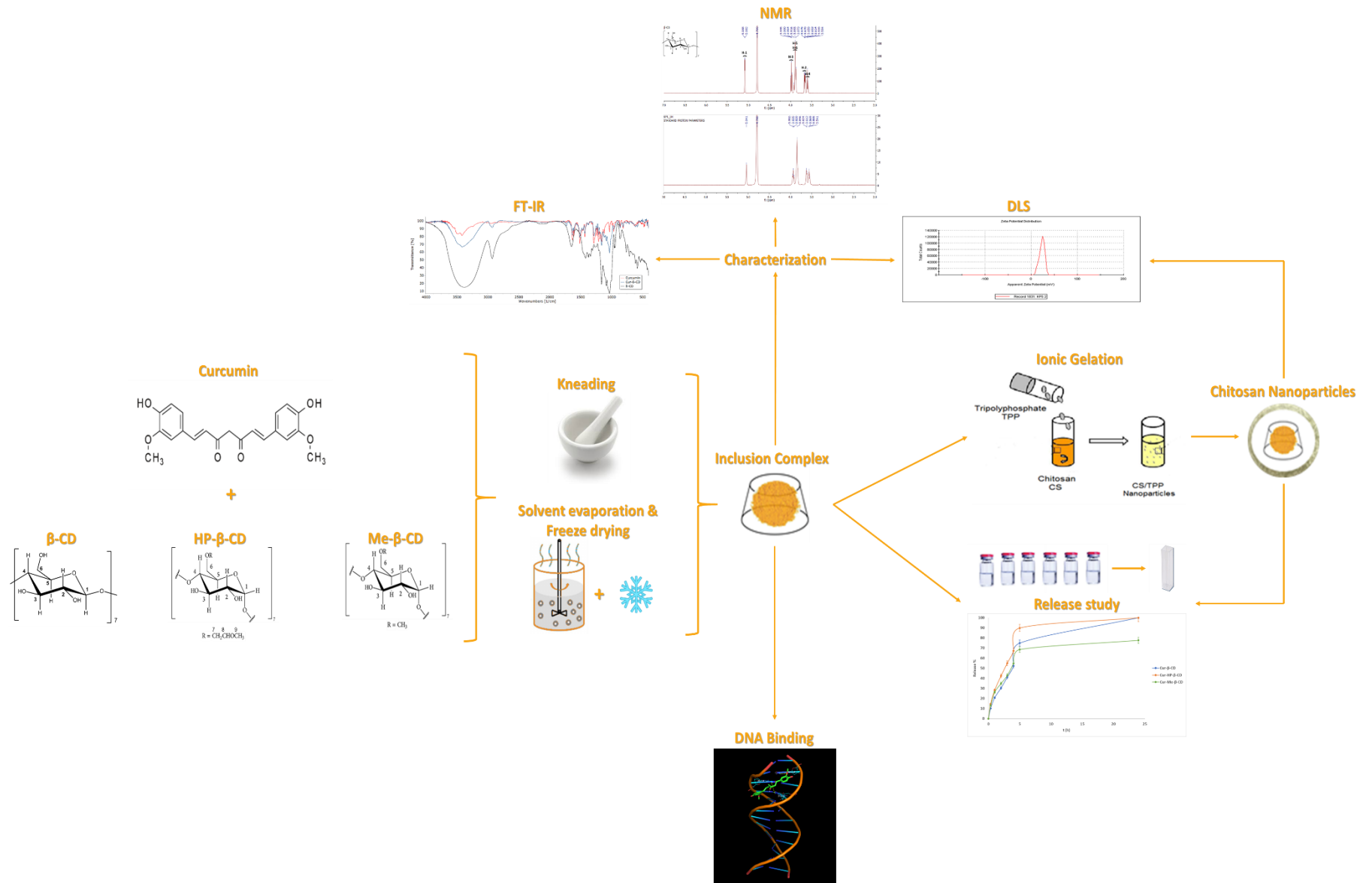
In addition, the interaction of curcumin and of the ICs with calf thymus DNA (ctDNA) is studied using both *in vitro* and *in silico* methods. Curcumin tends to bind with the DNA molecules by attaching itself to its minor groove, thus creating hydrogen bonds. The curcumin-DNA interaction

is significantly stronger in the ICs, which demonstrates the ability of the β -CDs to improve curcumin's efficacy.

Field of study: Pharmaceutical Chemistry, Nanotechnology, Nanomedicine

Keywords: curcumin, β -cyclodextrin, chitosan, inclusion complex, coated nanoparticle, release study, kinetic modeling, ctDNA

GRAPHICAL ABSTRACT



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ABSTRACT	5
GRAPHICAL ABSTRACT.....	7
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	8
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ.....	12
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	13
1.1. Κουρκουμίνη	13
1.1.1. Ιδιότητες κουρκουμίνης	14
1.1.1.1. Αντιοξειδωτική δράση.....	14
1.1.1.2. Αντιφλεγμονώδης δράση	15
1.1.1.3. Αντιμικροβιακή δράση	16
Αντιβακτηριακή δράση	16
Αντική δράση.....	16
1.1.1.4. Αντικαρκινικές ιδιότητες	16
1.1.2. Παρενέργειες κουρκουμίνης στον οργανισμό.....	17
1.2. Κυκλοδεξτρίνες.....	18
1.2.1. Ιστορική αναδρομή	18
1.2.2. Δομή κυκλοδεξτρινών	18
1.2.3. Παραγωγή κυκλοδεξτρινών	20
1.2.4. Κυριότερες κυκλοδεξτρίνες.....	20
1.2.4.1. α, β και γ κυκλοδεξτρίνη	20
1.2.4.2. Τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες και Παράγωγα κυκλοδεξτρινών	21
1.2.5. Παρενέργειες κυκλοδεξτρινών στον οργανισμό.....	22
1.3. Σύμπλοκα Εγκλεισμού.....	23
1.3.1. Τεχνικές σχηματισμού συμπλόκων εγκλεισμού	26
1.3.1.1. Παρασκευή φυσικών μιγμάτων – Ξηρή Ανάμειξη (Physical Mixtures – Dry Mixing Method).....	26
1.3.1.2. Σχηματισμός συμπλόκων με λειοτρίβηση (Kneading Method)	26
1.3.1.3. Συγκαταβύθιση (Co-precipitation Method)	26
1.3.1.4. Εξουδετέρωση και καταβύθιση (Neutralization – Precipitation Method).....	27
1.3.1.5. Εξάτμιση Διαλύτη (Solvent Evaporation Method)	27

1.3.1.6. Ξήρανση με Ψεκασμό (Spray Drying Method).....	27
1.3.1.7. Λυοφιλοποίηση (Freeze Drying Method).....	28
1.3.1.8. Μικροκύματα (Microwave Irradiation Method)	28
1.4. Χιτοζάνη.....	29
1.4.1. Δομή χιτοζάνης.....	29
1.4.2. Παραγωγή χιτοζάνης.....	29
1.5. Επικάλυψη συμπλόκων εγκλεισμού με χιτοζάνη	30
1.5.1. Τεχνικές σχηματισμού νανοσωματιδίων επικαλυμμένων με χιτοζάνη	30
1.5.1.1. Ιονοτροπική Πηκτωμάτωση (Ionic Gelation Method).....	30
1.5.1.2. Γαλακτωματοποίηση – Διάχυση Διαλύτη (Emulsification – Solvent Diffusion Method).....	31
1.5.1.3. Καταβύθιση/Συσσωμάτωση (Precipitation/Coacervation Method).....	32
1.6. Μελέτη και Χαρακτηρισμοί Συμπλόκων Εγκλεισμού και Νανοσωματιδίων	33
1.6.1. Μέγεθος, Δείκτης Πολυδιασποράς και ζ–Δυναμικό μέσω Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (Dynamic Light Scattering – DLS).....	33
1.6.1.1. Μέγεθος (size).....	33
1.6.1.2. Δείκτης Πολυδιασποράς (Pdl)	34
1.6.1.3. ζ–δυναμικό (ζ–potential).....	34
1.6.2. Φασματομετρία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (¹ H NMR)	34
1.6.3. Κινητική Απελευθέρωσης.....	35
1.6.3.1. Απελευθέρωση.....	35
1.6.3.2. Διαλυτοποίηση	36
1.6.3.3. Διάχυση	37
1.6.3.4. Μοντέλα Απελευθέρωσης	38
Μοντέλο απελευθέρωσης μηδενικής τάξης (zero order)	38
Μοντέλο απελευθέρωσης πρώτης τάξης (First order)	39
Μοντέλο Higuchi	40
Μοντέλο Korsmeyer – Peppas	41
1.6.3.5. Προφίλ Απελευθέρωσης	43
1.6.4. Αλληλεπίδραση με το DNA.....	44
1.6.4.1. Ηλεκτροστατικές Αλληλεπιδράσεις	45
1.6.4.2. Παρεμβολή (Intercalation)	45
1.6.4.3. Δέσμευση στη μικρή ή στη μεγάλη αύλακα (minor/major groove binding)	46
2. ΣΚΟΠΟΣ	47

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	48
3.1. Όργανα και Συσκευές	48
3.1.1. Δυναμική Σκέδαση φωτός (DLS)	48
3.1.2. Φασματομετρία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (¹ H NMR)	48
3.1.3. Φασματομετρία Υπερύθρου (FT-IR)	48
3.1.4. Φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis).....	48
3.1.5. Συμπληρωματικές Συσκευές	49
3.2. Αντιδραστήρια.....	50
3.3. Μέθοδοι σχηματισμού συμπλόκων εγκλεισμού	51
3.3.1. Παρασκευή συμπλόκων εγκλεισμού με λειοτρίβηση (Kneading Method)	51
3.3.2. Παρασκευή συμπλόκων εγκλεισμού μέσω συνδυασμού μεθόδων εξάτμισης διαλύτη & λυοφιλοποίησης (solvent evaporation & freeze drying method)	52
3.4. Ιονοτροπική Πηκτωμάτωση (Ionic Gelation Method) για τον σχηματισμό επικαλυμμένων νανοσωματιδίων	53
3.5. Χαρακτηρισμοί συμπλόκων εγκλεισμού – νανοσωματιδίων	53
3.5.1. Απόδοση διεργασίας.....	53
3.5.2. Απόδοση Εγκλεισμού συμπλόκων	54
3.5.3. Προσδιορισμός μεγέθους, δείκτη πολυδιασποράς και ζ-δυναμικού	54
3.5.4. Ανάλυση συμπλόκων εγκλεισμού μέσω υπέρυθρης φασματομετρίας μετασχηματισμού Fourier (FT-IR).....	54
3.5.5. Μελέτη απελευθέρωσης.....	55
3.5.6. Μελέτη αλληλεπίδρασης με το DNA.....	55
3.5.6.1. Μελέτη in vitro	55
3.5.6.2. Μελέτη in silico	56
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	57
4.1. Καμπύλη Αναφοράς	57
4.2. Αποδόσεις Διεργασίας	57
4.2.1. Αποδόσεις διεργασίας συμπλόκων εγκλεισμού	57
4.2.2. Αποδόσεις διεργασίας νανοσωματιδίων	58
4.3. Αποδόσεις Εγκλεισμού	59
4.3.1. Αποδόσεις εγκλεισμού συμπλόκων εγκλεισμού	59
4.3.2. Αποδόσεις εγκλεισμού νανοσωματιδίων	60
4.4. Μέγεθος, Δείκτης Πολυδιασποράς και ζ-Δυναμικό	60
4.4.1. Σύμπλοκα εγκλεισμού	61

4.4.2. Επικαλυμμένα νανοσωματίδια	62
4.5. Μελέτη δομής συμπλόκων	63
4.5.1. Φασματομετρία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR).....	63
4.5.1.1. Φάσματα β-CD και Cur-β-CD	63
4.5.1.2. Φάσματα HP-β-CD και Cur-HP-β-CD	66
4.5.2. Φασματομετρία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier (FT-IR).....	68
4.6. Μελέτη Απελευθέρωσης.....	74
4.6.1. Σύμπλοκα εγκλεισμού	74
4.6.2. Νανοσωματίδια	77
4.7. Αλληλεπίδραση με το ctDNA.....	80
4.7.1. Πειραματική μελέτη αλληλεπίδρασης με το ctDNA	80
4.7.2. Υπολογιστική μελέτη αλληλεπίδρασης με το DNA	84
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	86
6. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ.....	88
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΙΚΟΝΩΝ	89
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ	93
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	94
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	96
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	96
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	97

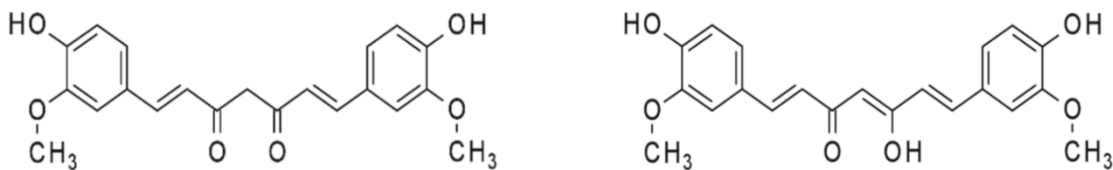
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

<i>Cur</i>	Κουρκουμίνη
<i>β-CD</i>	β-κυκλοδεξτρίνη
<i>HP-β-CD</i>	2-υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη
<i>Me-β-CD</i>	Μέθυλο-β-κυκλοδεξτρίνη
<i>CS</i>	Χιτοζάνη
<i>IC</i>	Σύμπλοκο εγκλεισμού
<i>NPs</i>	Νανοδοσμάτια
<i>TPP</i>	Τριπολυφωσφορικό νάτριο
<i>DLS</i>	Δυναμική σκέδαση φωτός
<i>PDI</i>	Δείκτης πολυδιασποράς
<i>¹H NMR</i>	Φασματομετρία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού
<i>FT-IR</i>	Φασματομετρία υπερώθρου μετασχηματισμού Fourier
<i>UV-VIS</i>	Φασματομετρία υπεριώδους-ορατού

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. Κουρκουμίνη

Η κουρκουμίνη είναι μια πολυφαινόλη η οποία συναντάται στις ρίζες του φυτού *κουρκουμά* (*Curcuma Longa*). Η ονομασία της κατά IUPAC είναι (1E,6E)-1,7-δι-(4-υδροξυ-3-φαινοξυφαινυλο)επτα-1,6-διενο-3,5-διόνη και η δομή της απεικονίζεται στην Εικόνα 1.



Εικόνα 1. Η κουρκουμίνη σε μορφή δικετόνης (αριστερά) και σε μορφή ενόλης (δεξιά). Η δικετο-ομάδα εμφανίζει ταυτομέρεια κετο-ενόλης και αναλόγως του περιβάλλοντος μπορεί να υπάρχει σε πολλές διαμορφώσεις

Αποτελεί το σημαντικότερο βιολογικά ενεργό συστατικό του κουρκουμά, καθώς από τον τελευταίο απομονώνονται σε μικρότερες ποσότητες δύο ακόμη κουρκουμινοειδή τα οποία δεν εμφανίζουν τις ίδιες ιδιότητες με την κουρκουμίνη. Η κουρκουμίνη αλληλεπιδρά με τον οργανισμό σε κυτταρικό επίπεδο και στοχεύει διάφορα μόρια-στόχους, με αποτέλεσμα να παρουσιάζει μεγάλη ποικιλία ευεργετικών ιδιοτήτων όπως αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση, αντιβακτηριακή, αντιμυκητιακή και αντικρκική δράση, προστασία των ιστών, ρύθμιση του μεταβολισμού και του ανοσοποιητικού συστήματος καθώς και αντικαταθλιπτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες.

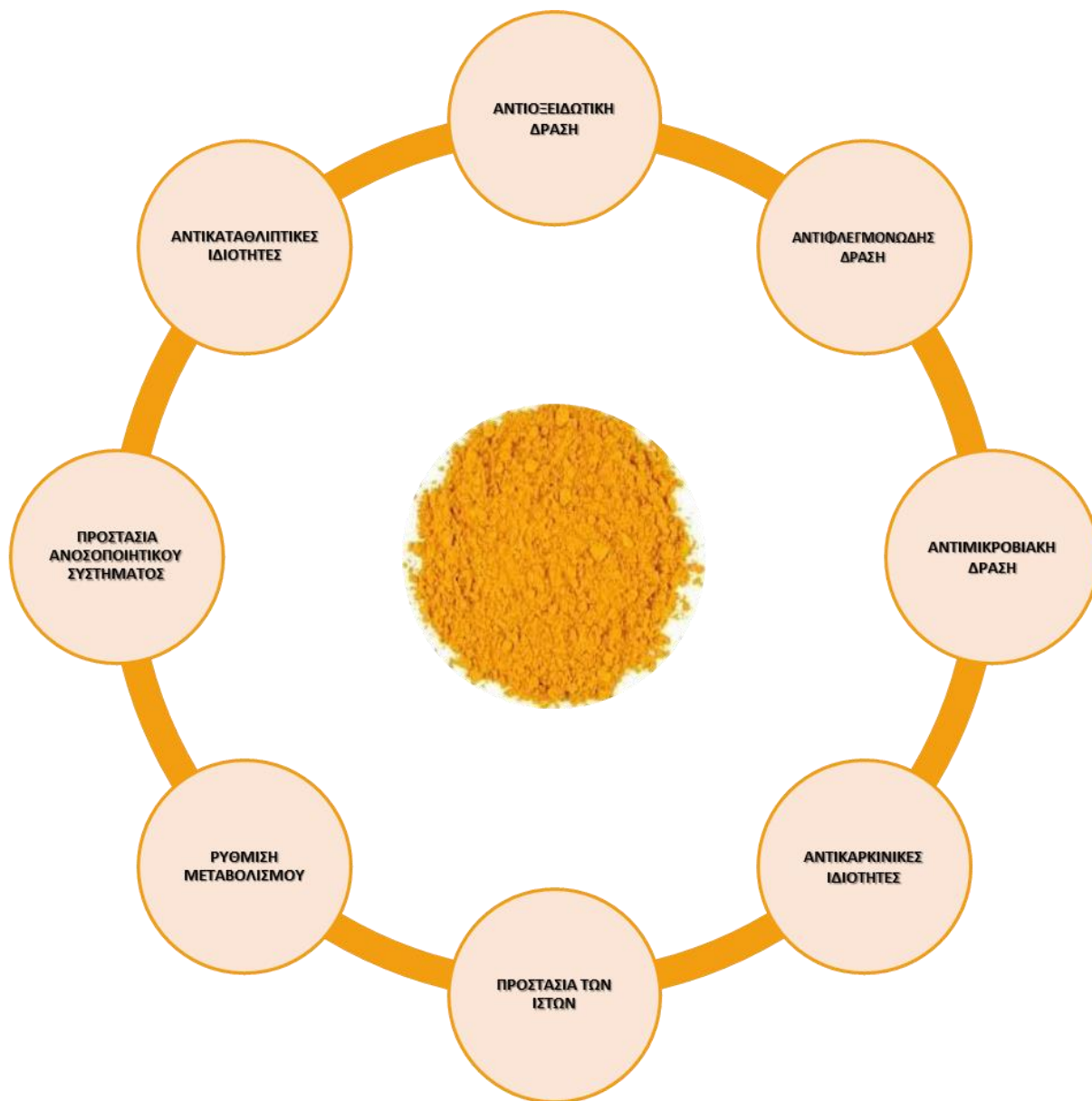
Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα της κουρκουμίνης περιορίζεται λόγω της χαμηλής της βιοδιαθεσιμότητας. Η τελευταία οφείλεται στο γεγονός ότι η κουρκουμίνη είναι πρακτικά αδιάλυτη στο νερό (διαλυτότητα περίπου 11ng/ml) με αποτέλεσμα μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό της να απορροφάται από τον οργανισμό ενώ παράλληλα μεταβολίζεται, μετατρέπεται σε αδρανείς μεταβολίτες και αποβάλλεται ταχύτατα.

Για τη βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας της κουρκουμίνης έχουν εφαρμοσθεί διάφορες προσεγγίσεις σχηματισμού συμπλόκων κουρκουμίνης-φορέα. Μερικές από αυτές είναι:

- Ο συνδυασμός της με άλλα φυσικά συστατικά. Αξιοσημείωτο παράδειγμα αποτελεί η ανάμειξή της με την πιπερίνη (κύριο δραστικό συστατικό του πιπεριού), η οποία οδηγεί σε αύξηση της βιοδιαθεσιμότητάς της κατά 2000%.
- Ο σχηματισμός μικκυλίων, γαλακτωμάτων και γελών (gel) που περιέχουν κουρκουμίνη.
- Ο σχηματισμός συμπλόκων εγκλεισμού της κουρκουμίνης με αξιοποίηση κάποιου νανοφορέα, όπως οι κυκλοδεξτρίνες. ^{[1], [2]}

1.1.1. Ιδιότητες κουρκουμίνης

Μερικά από τα οφέλη που προσφέρει η κουρκουμίνη συνοψίζονται στο ακόλουθο σχήμα:



Σχήμα 1. Ιδιότητες Κουρκουμίνης

1.1.1.1. Αντιοξειδωτική δράση

Πολύ δραστικά μόρια δημιουργούνται σε σταθερή βάση στον οργανισμό. Τα μόρια αυτά ονομάζονται *ελεύθερες ρίζες*. Δημιουργούνται είτε από τον ίδιο τον οργανισμό κατά την εκτέλεση διάφορων βιοχημικών λειτουργιών (π.χ. αναπνοή, μεταβολισμός) είτε από περιβαλλοντικούς παράγοντες (π.χ. ακτινοβολία). Έχουν την ικανότητα να επιτίθενται σε βιολογικά μόρια-στόχους και χρησιμοποιούνται για την άμυνα του οργανισμού. Παράλληλα όμως λόγω της υψηλής δραστικότητάς τους μπορεί να αποδειχθούν επικίνδυνες για τον

οργανισμό. Ως εκ τούτου, ο οργανισμός αναπτύσσει διάφορους μηχανισμούς ελέγχου της συγκέντρωσης των ελευθέρων ριζών, όπως η χρήση αντιοξειδωτικών ουσιών.

Το οξειδωτικό στρες είναι η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ παραγωγής και καταστροφής ελευθέρων ριζών στον οργανισμό. Οδηγεί στην αύξηση της ποσότητας ελευθέρων ριζών με αποτέλεσμα οι τελευταίες να οξειδώνουν χρήσιμες ουσίες για τον οργανισμό και να προκαλούν ακόμα και βλάβες στους ιστούς.^[3]

Έχει αποδειχθεί ότι η κουρκουμίνη βελτιώνει τους δείκτες του οξειδωτικού στρες. Πιο συγκεκριμένα, επιδρά στις ελεύθερες ρίζες με διάφορους μηχανισμούς και οδηγεί στην εξουδετέρωσή τους. Χαρακτηριστικές ρίζες που εξαλείφει είναι ρίζες οξυγόνου και αζώτου. Ταυτόχρονα, αναστέλλει τη λειτουργία ενζύμων που δημιουργούν ελεύθερες ρίζες, δρώντας με αυτόν τον τρόπο όχι μόνο κατασταλτικά αλλά και προληπτικά. Επιπλέον, λόγω της υψηλής λιποφιλίας της, εξουδετερώνει και τις υπεροξυλικές ρίζες (peroxyl radicals) σπάζοντας τις αλυσίδες τους.

Επομένως η κουρκουμίνη προσφέρει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση καθώς συμβάλλει στη διατήρηση της ισορροπίας των συγκεντρώσεων των ελευθέρων ριζών, προστατεύοντας με αυτόν τον τρόπο τον οργανισμό από τις αρνητικές συνέπειές τους.^[2]

1.1.1.2. Αντιφλεγμονώδης δράση

Το οξειδωτικό στρες είναι στενά συνδεδεμένο με τη φλεγμονή, καθώς ευνοεί την εκδήλωση ασθενειών που σχετίζονται με αυτήν, ενισχύοντας την έκφραση γονιδίων που την προκαλούν. Παράλληλα, σε περίπτωση ανάπτυξης φλεγμονής, απελευθερώνονται συχνά χημικές ουσίες που προκαλούν οξειδωτικό στρες. Επομένως παρατηρείται μια αμφίδρομη συσχέτιση μεταξύ οξειδωτικού στρες και φλεγμονής καθώς το ένα μπορεί να αποτελέσει και αιτία πρόκλησης του άλλου.

Η φλεγμονή συναντάται σε διάφορες χρόνιες ασθένειες. Ενδεικτικά αναφέρονται ορισμένες από τις πιο φλέγουσες, οι οποίες είναι: το Αλτσχάιμερ, το Πάρκινσον, ο καρκίνος, το άσθμα, η αρθρίτιδα, ο διαβήτης, το AIDS, διάφορες μορφές σκλήρυνσης, εγκεφαλικά τραύματα, καρδιαγγειακές παθήσεις, σύνδρομο μεταβολισμού και αλλεργίες.

Ο ανθρώπινος οργανισμός διαθέτει τον παράγοντα νέκρωσης όγκων (*Tumor Necrosis Factor-TNFα*) ο οποίος καταπραΰνει την πλειοψηφία των φλεγμονών. Κατά τη δράση του όμως ενεργοποιεί τον πυρηνικό παράγοντα μεταγραφής (*NF-κB*), ο οποίος με τη σειρά του καταστέλλει τη δράση του *TNFα*. Ο τελευταίος ενεργοποιείται επίσης από βακτήρια, ιούς, στρες και άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες που προκαλούν ασθένειες.

Μελέτες έχουν δείξει ότι η κουρκουμίνη εμποδίζει την ενεργοποίηση του *NF-κB* και αναστέλλει την έκφραση γονιδίων που προκαλούν φλεγμονή. Επιπρόσθετα, χρησιμοποιεί πολλούς διαφορετικούς σύνθετους μηχανισμούς για να καταστείλει τη φλεγμονή αφού η τελευταία έχει εκδηλωθεί. Βάσει των παραπάνω, η κουρκουμίνη θεωρείται ένας ευεργετικός αντιφλεγμονώδης παράγοντας.^[2]

1.1.1.3. Αντιμικροβιακή δράση

Έχει πραγματοποιηθεί μεγάλος αριθμός μελετών οι οποίες αναφέρουν ένα ευρύ φάσμα αντιμικροβιακής δράσης της κουρκουμίνης, όπως αντιβακτηριακή, αντική και αντιμυκητιακή δράση.

Αντιβακτηριακή δράση

Οι βακτηριακές λοιμώξεις είναι από τις πιο συνήθεις και μεταδοτικές ασθένειες. Ως εκ τούτου, πραγματοποιούνται εδώ και τουλάχιστον 50 χρόνια εκτεταμένες έρευνες για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων με αντιβακτηριακές ιδιότητες. Σε πολλές από αυτές η κουρκουμίνη χρησιμοποιείται υπό τη μορφή διαφόρων εκχυλισμάτων με τιμές ελάχιστης συγκέντρωσης MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) που κυμαίνονται από 125ppm έως 32g/L και αναστέλλει την ανάπτυξη πληθώρας βακτηρίων. Ενδεικτικά αναφέρονται βακτήρια όπως το *ανθεκτικό στην μεθυκυλλίνη στέλεχος του Σταφυλόκοκκου (MRSA)*, η *Listeria monocytogenes* και το *Helicobacter Pylori* των οποίων η ανάπτυξη περιορίστηκε, σε μελέτες in vivo με αγωγή κουρκουμίνης. Σε αρκετές περιπτώσεις βέβαια, η κουρκουμίνη δεν μπορεί από μόνη της να καταστείλει τελείως τη βακτηριακή ανάπτυξη. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τη συνεχή εμφάνιση νέων ανοχών των μικροβίων στα αντιβιοτικά, καθιστά πιο συνετή της ενσωμάτωση της κουρκουμίνης σε αντιβιοτικά σκευάσματα με στόχο την αποτελεσματικότερη καταπολέμηση των μικροοργανισμών.^[4]

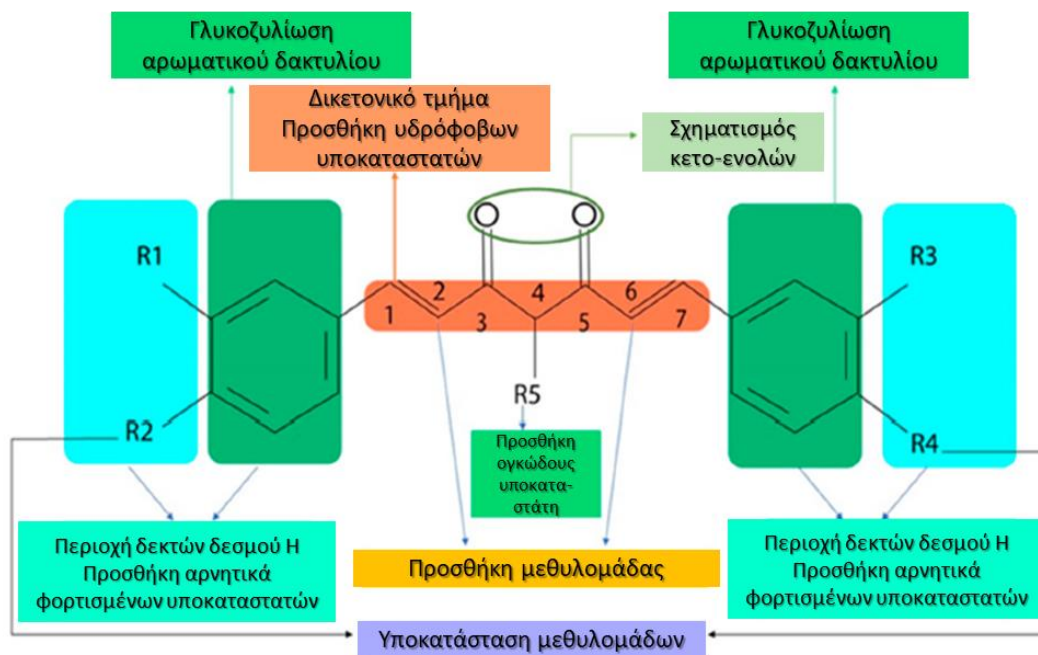
Αντική δράση

Η έλλειψη αποτελεσματικών φαρμακευτικών σκευασμάτων για την αντιμετώπιση ασθενειών που προκαλούνται από ιούς έχει οδηγήσει σε έρευνες για την ανακάλυψη χημικών ουσιών με αντική δράση. Πολλά φυτά, μεταξύ των οποίων και ο κουρκουμάς, έχουν μελετηθεί καθώς αποτελούν πλούσια πηγή τέτοιων χημικών ουσιών. Η κουρκουμίνη έχει αποδειχθεί πως δρα αποτελεσματικά ενάντια σε ποικίλους ιούς όπως διάφορες μορφές γρίπης, ιούς που προσβάλλουν το αναπνευστικό σύστημα, ακόμα και κατά του τύπου-1 του HIV. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η χρήση παραγώγων της κουρκουμίνης αναστέλλει έως και σε διπλάσιο βαθμό την ανάπτυξη ορισμένων ιών, αλλά απαιτείται πιο εκτεταμένη έρευνα.^[4]

1.1.1.4. Αντικαρκινικές ιδιότητες

Καθώς η κουρκουμίνη αποτελεί μια μη τοξική για τον οργανισμό ένωση και λόγω του χαμηλού της μοριακού βάρους, έχει αξιολογηθεί εκτενώς ως προς την ικανότητά της να καταπολεμά καρκινικά κύτταρα.^[5] Οι αντικαρκινικές ιδιότητες που παρουσιάζει οφείλονται κυρίως στη δομή της. Η κουρκουμίνη χρησιμοποιεί ένα συνδυασμό μηχανισμών, καταπολεμώντας έτσι με μοναδικό τρόπο τα καρκινικά κύτταρα. Οι μηχανισμοί αυτοί είναι: η πρόκληση απόπτωσης (κυτταρικός θάνατος) στα καρκινικά κύτταρα μέσω διαταραχής της ισορροπίας των μιτοχονδριακών τους μεμβρανών, η μείωση της συχνότητας πολλαπλασιασμού τους και η διεύθυνση σε αυτά με στόχο την καταστολή της λειτουργίας ποικίλων «οδών μεταφοράς μηνυμάτων». Έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί δείχνουν ότι η κουρκουμίνη είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική ενάντια σε καρκίνους του μαστού, των πνευμόνων, του προστάτη, του εγκεφάλου, του εντέρου και του παγκρέατος.^[6]

Ωστόσο λόγω της χαμηλής της βιοδιαθεσιμότητας, οι αντικαρκινικές της ιδιότητες δεν μπορούν να αξιοποιηθούν στον επιθυμητό βαθμό. Ως εκ τούτου, με τη χρήση διαφόρων τεχνικών έχουν συντεθεί διάφορα συστήματα κουρκουμίνης-νανοφορέων, ενώ παράλληλα έχουν συντεθεί και ποικίλα παράγωγά της με στόχο την αύξηση όχι μόνο της βιοδιαθεσιμότητας, αλλά και της σταθερότητας, της εκλεκτικότητας και της δραστηκότητάς της ενάντια σε διάφορες μορφές καρκίνου. Τόσο τα νανοσυστήματα όσο και μερικά από τα παράγωγα φαίνεται ότι παρουσιάζουν ακόμα πιο αποτελεσματική δράση σε σχέση με την κουρκουμίνη. Τα πιο πολλά υποσχόμενα παράγωγα συνοψίζονται στην ακόλουθη εικόνα. ^{[5], [6]}



Εικόνα 2. Πιθανές υποκαταστάσεις στο μόριο της κουρκουμίνης που δίνουν ουσίες με αντικαρκινικές ιδιότητες ^[6]

1.1.2. Παρενέργειες κουρκουμίνης στον οργανισμό

Ούσα ένα φυσικό προϊόν, η κουρκουμίνη θεωρείται πλήρως ασφαλής για τον ανθρώπινο οργανισμό. Ωστόσο, σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EAAT-EFSA) η μέγιστη επιτρεπόμενη ημερήσια δόση κουρκουμίνης είναι 3mg ανά κιλό σωματικού βάρους. Έχουν πραγματοποιηθεί ποικίλες κλινικές δοκιμές σε υγιείς ανθρώπους, στις οποίες μελετήθηκε η απόκριση του οργανισμού σε μεγάλες δόσεις κουρκουμίνης (500-12000mg). Σε τόσο μεγάλες ποσότητες, παρατηρήθηκαν ορισμένες παρενέργειες όπως διάρροια, πονοκέφαλος, ναυτία και αύξηση των αιματολογικών δεικτών: αλκαλική φωσφατάση και γαλακτική αφυδρογονάση. Οι παραπάνω παρενέργειες όμως δεν θεωρούνται επικίνδυνες για την ανθρώπινη ζωή. ^[2]

1.2. Κυκλοδεξτρίνες

Οι κυκλοδεξτρίνες είναι κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες οι οποίοι αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες μονάδες γλυκόζης. Πιο συγκεκριμένα, αποτελούνται από μια υδρόφιλη εξωτερική επιφάνεια και μία μη πολική, υδρόφοβη εσωτερική κοιλότητα. Ως εκ τούτου μπορούν να διαλύονται στο νερό και παράλληλα να φιλοξενούν στο εσωτερικό τους ποικίλες υδρόφοβες ενώσεις σχηματίζοντας με αυτόν τον τρόπο σύμπλοκα εγκλεισμού. ^[7]

Λόγω της ικανότητας σχηματισμού συμπλόκων εγκλεισμού, οι κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται στην παρασκευή φαρμάκων καθώς βελτιώνουν ορισμένες φυσικοχημικές ιδιότητες όπως τη διαλυτότητα, τη σταθερότητα τη βιοδιαθεσιμότητα αλλά και την απελευθέρωση της εγκλεισμένης ουσίας, ενώ παράλληλα καλύπτουν δυσάρεστες γεύσεις και οσμές που μπορεί να έχει η δραστική ουσία. ^[8]

Παρότι έχουν ανακαλυφθεί εδώ και τουλάχιστον εκατό χρόνια, η πρόσφατη ραγδαία εξέλιξη της Βιοτεχνολογίας έχει βελτιώσει σημαντικά τη διαδικασία παραγωγής τους και έχει μειώσει το κόστος παραγωγής. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τα οφέλη που προσφέρουν, έχει οδηγήσει στη χρήση τους και ως φαρμακευτικά έκδοχα καθώς βελτιώνουν τη διαλυτοποίηση και τη σταθεροποίηση των φαρμάκων. ^[9]

1.2.1. Ιστορική αναδρομή

Οι κυκλοδεξτρίνες ανακαλύφθηκαν το 1891 από τον A.Villiers, ο οποίος εκτελώντας ένα πείραμα βιοαποικοδόμησης του αμύλου, απομόνωσε από το άμυλο μία λευκή κρυσταλλική ουσία που έμοιαζε με την κυτταρίνη, την οποία ονόμασε «cellulosine» (3g/kg αμύλου).

Στις αρχές του 20^{ου} αιώνα ο F. Schardinger, μελετώντας μικροοργανισμούς που προκαλούν αλλοίωση στα τρόφιμα απομόνωσε τον μικροοργανισμό *Bacillus macerans*. Ο μικροοργανισμός αυτός είχε την ιδιότητα να παράγει δύο κρυσταλλικές ουσίες από καλλιέργειες με άμυλο σε μεγάλες ποσότητες (25-30%). Οι ουσίες αυτές είχαν παρόμοιες ιδιότητες με αυτές των ήδη γνωστών δεξτρινών και ονομάστηκαν από τον Schardinger «κρυσταλλική δεξτρίνη α» και «κρυσταλλική δεξτρίνη β».

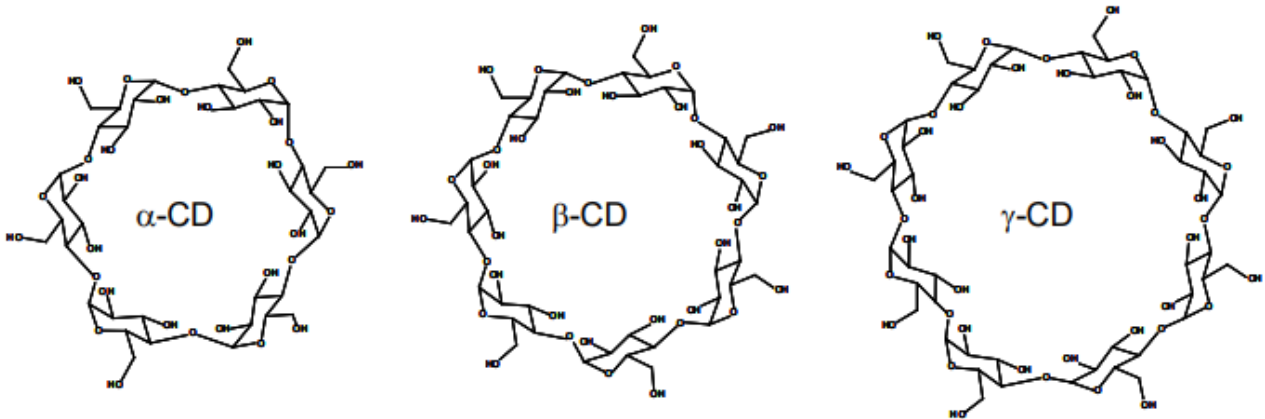
Η χημική δομή των ουσιών αυτών ωστόσο ήταν άγνωστη μέχρι το 1942, όπου με τη χρήση της κρυσταλλογραφίας ακτινών Χ προσδιορίστηκε η κυκλική δομή τους και πήραν και το όνομα κυκλοδεξτρίνες.

Το 1948 ανακαλύφθηκε και η δομή της γ-κυκλοδεξτρίνης και βρέθηκε ότι οι ενώσεις αυτές έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν σύμπλοκα εγκλεισμού. ^{[7], [10]}

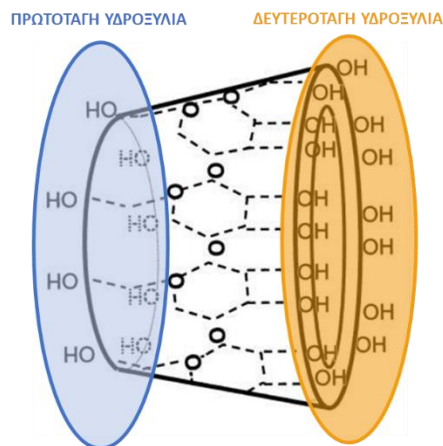
1.2.2. Δομή κυκλοδεξτρινών

Οι κυκλοδεξτρίνες είναι κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες οι οποίοι αποτελούνται από μονάδες γλυκοπυρανόζης συνδεδεμένες μεταξύ τους με 1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Οι πιο γνωστές και συχνά χρησιμοποιούμενες κυκλοδεξτρίνες είναι η α-, β-, και γ- κυκλοδεξτρίνη, αποτελούμενες από έξι, επτά και οχτώ μονάδες γλυκοπυρανόζης αντίστοιχα.

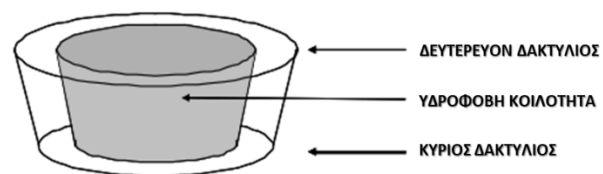
Η τρισδιάστατη δομή των κυκλοδεξτρινών είναι ένας κούλος κώλινος κώνος. Διαθέτουν μια υδρόφιλη εξωτερική επιφάνεια χάρη στις ομάδες των υδροξυλίων που βρίσκονται σε αυτή. Ειδικότερα, τα πρωτοταγή υδροξύλια συναντώνται στην στενή εξωτερική πλευρά του κώνου ενώ τα δευτεροταγή στην ευρύτερη πλευρά. Ως εκ τούτου, οι κυκλοδεξτρίνες είναι υδατοδιαλυτές ενώσεις. Παράλληλα, οι κυκλοδεξτρίνες αποτελούνται και από μια υδρόφοβη εσωτερική κοιλότητα. Χάρη σε αυτή, έχουν την μοναδική ιδιότητα να σχηματίζουν σύμπλοκα εγκλεισμού, φιλοξενώντας υδρόφοβα και λιπόφιλα μόρια στο εσωτερικό τους. [7]



Εικόνα 3. Μοριακοί τύποι α, β και γ κυκλοδεξτρίνης [10]



Εικόνα 4. Απεικόνιση των υδροξυλίων στο μόριο της κυκλοδεξτρίνης

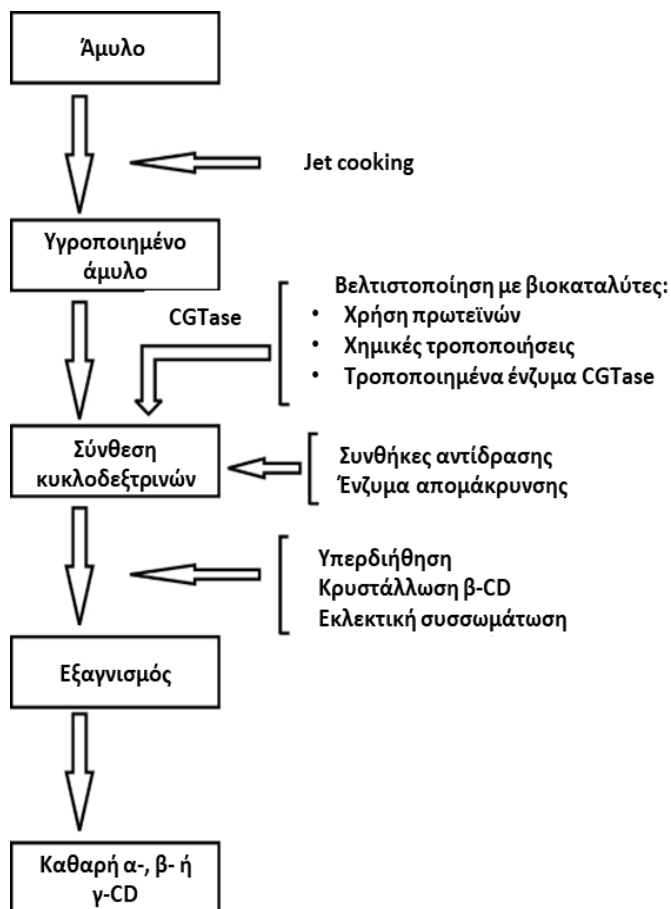


Εικόνα 5. Αναπαράσταση κώλου κώνου κυκλοδεξτρινών (πλάγια όψη) [10]

1.2.3. Παραγωγή κυκλοδεξτρινών

Οι κυκλοδεξτρίνες παράγονται από την υδρόλυση του άμυλου μέσω ενζυμικής τροποποίησής του από το ένζυμο κυκλοδεξτρίνη-γλυκοζυλοτρανσφεράση (Cyclodextrin Glycosyltransferase ή CGTase). Το ένζυμο αυτό παράγεται από πληθώρα μικροοργανισμών όπως ο *Bacillus marenzelleri*, ο *Klebsiella pneumoniae*, ο *Thermoanaerobacter thermosulfurigenes*, ο *Thermococcus* sp. και άλλοι. Για την παραγωγή των κυκλοδεξτρινών μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφοροι τύποι άμυλου, όμως το πιο σύνηθες είναι το άμυλο πατάτας. ^{[11], [12]}

Η διαδικασία παραγωγής των κυκλοδεξτρινών ξεκινά με την ρευστοποίηση του άμυλου σε υψηλή θερμοκρασία. Για την αποφυγή της αύξησης του ιξώδους το άμυλο υδρολύεται στον βέλτιστο βαθμό. Στη συνέχεια προστίθεται το ένζυμο CGTase και σχηματίζονται οι κυκλοδεξτρίνες με απόδοση περίπου 50%. Για τη βελτιστοποίηση της διεργασίας, προστίθενται συχνά και τα ένζυμα ισοαμυλάση ή πουλουλανάση, τα οποία διασπούν τις διακλαδώσεις της αμυλοπηκτίνης, κάτι που από μόνο του το CGTase δε μπορεί να επιτύχει. Επιπρόσθετα, προστίθενται και διάφοροι παράγοντες συμπλοκοποίησης, οι οποίοι απομακρύνουν τις παραγόμενες κυκλοδεξτρίνες από τον αντιδραστήρα, με αποτέλεσμα η συγκέντρωσή τους να παραμένει χαμηλή και να αποφεύγεται η μετατροπή τους σε άκυκλους ολιγοσακχαρίτες από το CGTase. Το είδος του παράγοντα συμπλοκοποίησης καθορίζει και την κυκλοδεξτρίνη που θα παραχθεί στον μεγαλύτερο βαθμό. Καταληκτικά, το παραγόμενο μίγμα κυκλοδεξτρινών υφίσταται εξαγνισμό προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν παραπροϊόντα και να διαχωρισθούν οι κυκλοδεξτρίνες. Τα τελικά προϊόντα είναι α,β και γ κυκλοδεξτρίνες με καθαρότητα συνήθως μεγαλύτερη του 99%. ^{[12], [13]}



Εικόνα 6. Διάγραμμα ροής παραγωγής Κυκλοδεξτρινών και παράγοντες που αυξάνουν την απόδοση της διεργασίας ^[13]

1.2.4. Κυριότερες κυκλοδεξτρίνες

Κυκλοδεξτρίνες οι οποίες παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον συνοψίζονται παρακάτω:

1.2.4.1. α, β και γ κυκλοδεξτρίνη

Οι πιο γνωστές κυκλοδεξτρίνες που έχουν και τις περισσότερες βιομηχανικές εφαρμογές είναι οι α, β και γ κυκλοδεξτρίνη, οι οποίες καλούνται και «κυκλοδεξτρίνες πρώτης γενιάς». Από αυτές, χρησιμοποιείται περισσότερο η β-κυκλοδεξτρίνη καθώς έχει μεγαλύτερη διαθεσιμότητα και χαμηλότερο κόστος παραγωγής. ^[7] Τα βασικότερά τους χαρακτηριστικά συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 1. Βασικά χαρακτηριστικά α, β και γ Κυκλοδεξτρίνης [7], [10]

	α-Κυκλοδεξτρίνη	β-Κυκλοδεξτρίνη	γ-Κυκλοδεξτρίνη
Αριθμός μονάδων γλυκοπυρανόζης	6	7	8
Μοριακό βάρος (g/mol)	972	1135	1297
Διαλυτότητα στο νερό στους 25°C (%w/v)	14.2	1.85	23.2
Όγκος εσωτερικής κοιλότητας (Å ³)	174	262	427
Ύψος εσωτερικής κοιλότητας (Å)	7.9	7.9	7.9
Διάμετρος εσωτερικής κοιλότητας (Å)	4.7-5.3	6.0-6.5	8
Εξωτερική διάμετρος (Å)	14.6	15.4	17.5

Σε σχέση με τις α και γ κυκλοδεξτρίνες, η β-κυκλοδεξτρίνη εμφανίζει σημαντικά μειωμένη διαλυτότητα. Κάτι τέτοιο συμβαίνει επειδή η β-κυκλοδεξτρίνη έχει την τάση να συσσωματώνεται και στη συνέχεια να αλληλεπιδρά με τα μόρια του νερού, με αποτέλεσμα να μη διαλύεται στον ίδιο βαθμό σε αυτό. [14]

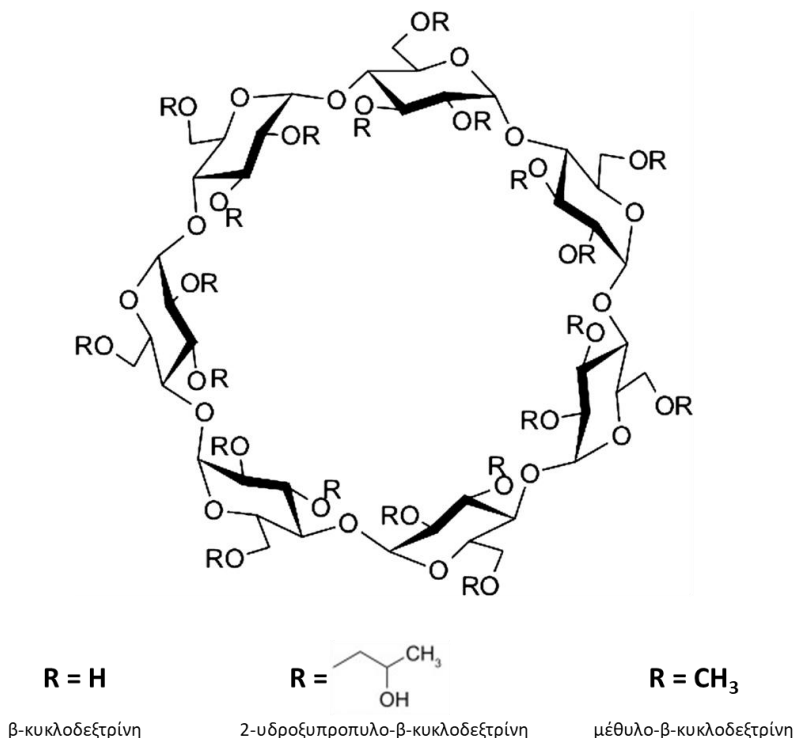
Ιδιαίτερα σημαντική είναι και η διαφορά στους όγκους των κοιλοτήτων των τριών κυκλοδεξτρινών. Πιο συγκεκριμένα η β-κυκλοδεξτρίνη λόγω των ενδιάμεσων διαστάσεων της εσωτερικής της κοιλότητας, είναι συχνά πιο κατάλληλη για τον σχηματισμό συμπλόκων εγκλεισμού με ενώσεις οι οποίες ενδεχομένως να μη χωρούν στην κοιλότητα της α-κυκλοδεξτρίνης. Αντιθέτως για ενώσεις με μικρές διαστάσεις όπως τα λιπίδια, η κοιλότητα της α-κυκλοδεξτρίνης είναι καταλληλότερη. [15], [16]

1.2.4.2. Τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες και Παράγωγα κυκλοδεξτρινών

Εκτός από τις φυσικές κυκλοδεξτρίνες, έχει ανακαλυφθεί και ένας μεγάλος αριθμός παραγώγων κυκλοδεξτρινών, τα οποία προκύπτουν από τις φυσικές μέσω χημικών τροποποιήσεων. Ειδικότερα, οι τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες παράγονται μέσω αντικατάστασης μίας ή περισσότερων ομάδων υδροξυλίου (είτε πρωτοταγών είτε δευτεροταγών) του μορίου της φυσικής κυκλοδεξτρίνης με κάποια άλλη ομάδα. Μέσω της χημικής τροποποίησης προκύπτουν νέες ενώσεις με διαφορετικές ιδιότητες και προοπτικές για ακόμα περισσότερες εφαρμογές. Κατά κανόνα οι τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες εμφανίζουν βελτιωμένη διαλυτότητα και μεγαλύτερη εκλεκτικότητα σε σχέση με τις φυσικές, ενώ μέχρι στιγμής έχουν αξιοποιηθεί σε μια τεράστια ποικιλία διεργασιών, ως συστήματα μεταφοράς φαρμάκων που προσφέρουν

παράλληλα και τροποποιημένη αποδέσμευση, ως βελτιωτικά γεύσεων και οσμών στα τρόφιμα, ακόμα και ως καταλύτες σε χημικές αντιδράσεις. [17]

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν δύο τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες η 2-υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη και η μέθυλο-β-κυκλοδεξτρίνη. Οι διαφορές της δομής τους με την φυσική β-κυκλοδεξτρίνη φαίνονται στην ακόλουθη εικόνα:



Εικόνα 7. β-κυκλοδεξτρίνη και τροποποιημένες β-κυκλοδεξτρίνες

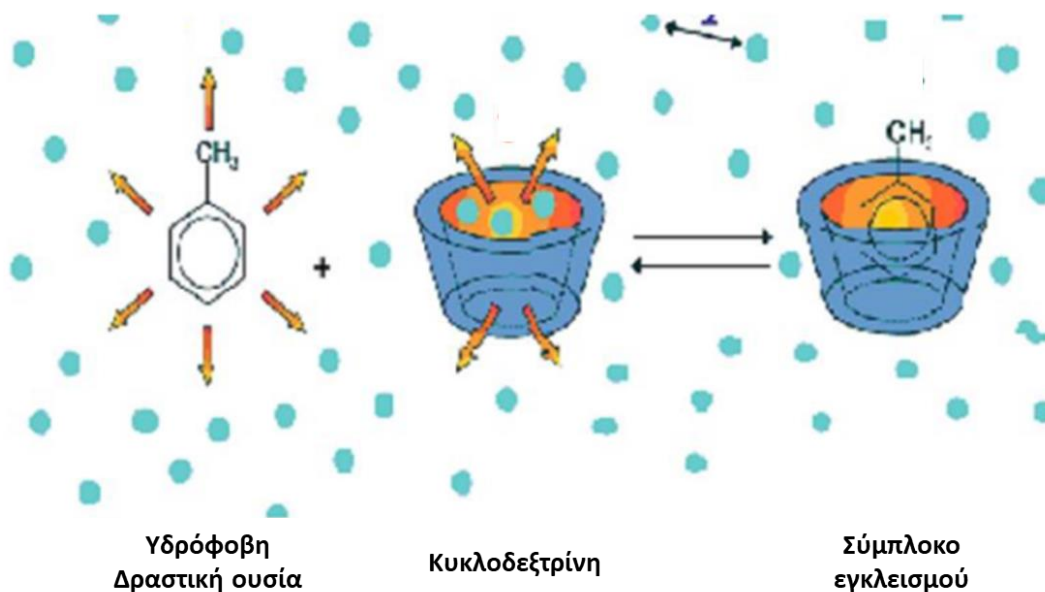
1.2.5. Παρενέργειες κυκλοδεξτρίνων στον οργανισμό

Σύμφωνα με τοξικολογικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, οι κυκλοδεξτρίνες μπορούν να χορηγηθούν από το στόμα καθώς είναι πρακτικά μη τοξικές και δεν απορροφώνται από τον γαστρεντερικό σωλήνα. Ιδιαίτερα η β-κυκλοδεξτρίνη έχει χαρακτηριστεί ως GRAS (Generally Regarded as Safe) από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA)^[18] και έχει βρεθεί ότι προκαλεί λιγότερο ερεθισμό μετά από ενδομυϊκή χορήγηση σε σύγκριση με την α-κυκλοδεξτρίνη. Ωστόσο η χορήγηση μεγάλων δόσεων β-κυκλοδεξτρίνης δε συνιστάται καθώς μπορεί να αποδειχθεί επιβλαβής για τον ανθρώπινο οργανισμό. Ο αντίστοιχος ερεθισμός που προκαλείται από τη γ-κυκλοδεξτρίνη θεωρείται αμελητέος και γενικά η γ-κυκλοδεξτρίνη είναι η λιγότερο τοξική από τις τρεις φυσικές κυκλοδεξτρίνες.

Όσον αφορά τα διάφορα παράγωγα της β-κυκλοδεξτρίνης, μεταξύ των οποίων και η 2-υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη, τα τελευταία θεωρούνται εξίσου ασφαλή ακόμα και για παρεντερική χορήγηση. Ορισμένες όμως μορφές μεθυλομένων β-κυκλοδεξτρίνων κρίνονται ακατάλληλες για παρεντερική χρήση. [7]

1.3. Σύμπλοκα Εγκλεισμού

Το σημαντικότερο γνώρισμα των κυκλοδεξτρινών είναι η ικανότητά τους να σχηματίζουν σύμπλοκα εγκλεισμού με μεγάλη ποικιλία ενώσεων, είτε αυτές βρίσκονται σε στερεή, είτε σε υγρή είτε σε αέρια μορφή. Η ικανότητα αυτή οφείλεται στην λιπόφιλη εσωτερική κοιλότητα των κυκλοδεξτρινών η οποία για μη πολικές ενώσεις κατάλληλων διαστάσεων, αποτελεί ιδανικό περιβάλλον. Κατά τη διαδικασία σχηματισμού του συμπλόκου, δε σπάει ούτε σχηματίζεται κάποιος ομοιοπολικός δεσμός. Η κινητήρια δύναμη για τη δημιουργία του συμπλόκου, είναι η απελευθέρωση μορίων νερού από το εσωτερικό της κοιλότητας της κυκλοδεξτρίνης (όταν αυτή βρίσκεται σε υδατικό διάλυμα) και η αντικατάστασή τους με μη πολικά, υδρόφοβα μόρια. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται ένα σταθερότερο σύστημα καθώς απομακρύνονται τα υψηλής ενθαλπίας μόρια νερού και επιτυγχάνεται ένα ενεργειακά χαμηλότερο αποτέλεσμα.



Εικόνα 8. Σχηματισμός συμπλόκου εγκλεισμού και αλληλεπιδράσεις κυκλοδεξτρίνης-ένωσης-νερού [20]

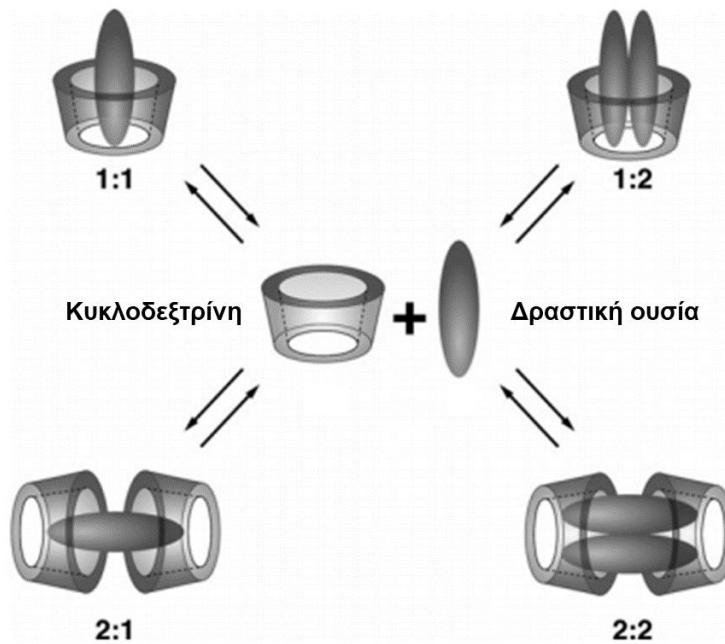
Ιδιαίτερα σημαντικό είναι το γεγονός ότι τα «φιλοξενούμενα μόρια» δεν προσδένονται μόνιμα στην εσωτερική κοιλότητα της εκάστοτε κυκλοδεξτρίνης, επομένως το σύμπλοκο είναι ένα σύστημα που βρίσκεται σε δυναμική ισορροπία. [7],[19]

Η ισορροπία αυτή περιγράφεται από την ακόλουθη εξίσωση:

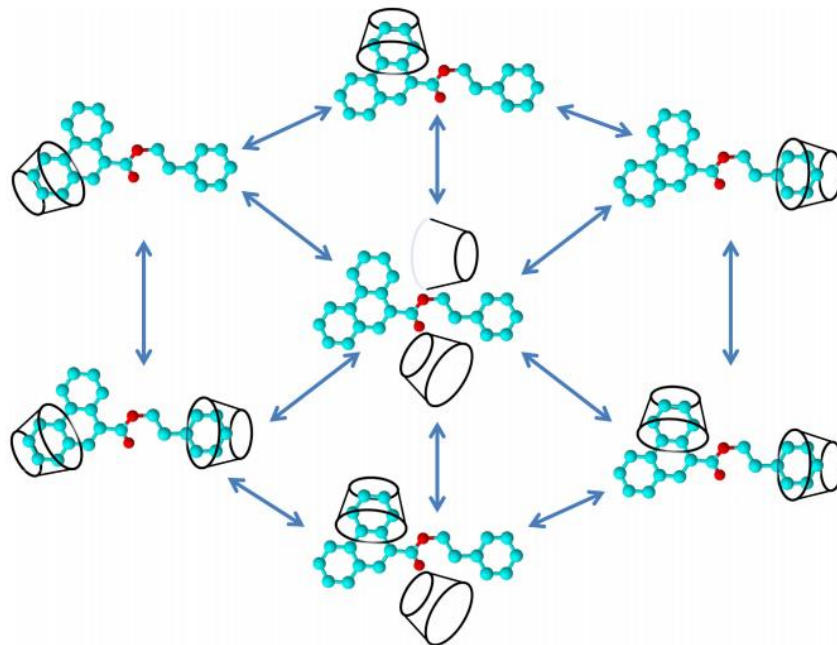


όπου:

- **D:** η δραστική ένωση (Drug)
- **CD:** η κυκλοδεξτρίνη
- **DCD:** το σύμπλοκο εγκλεισμού
- **K_c:** η σταθερά ισορροπίας



Εικόνα 9. Σχηματισμός συμπλόκων εγκλεισμού με διαφορετικές αναλογίες κυκλοδεξτρίνης-δραστικής ένωσης ^[19]



Εικόνα 10. Δυναμική ισορροπία του συμπλόκου εγκλεισμού ^[21]

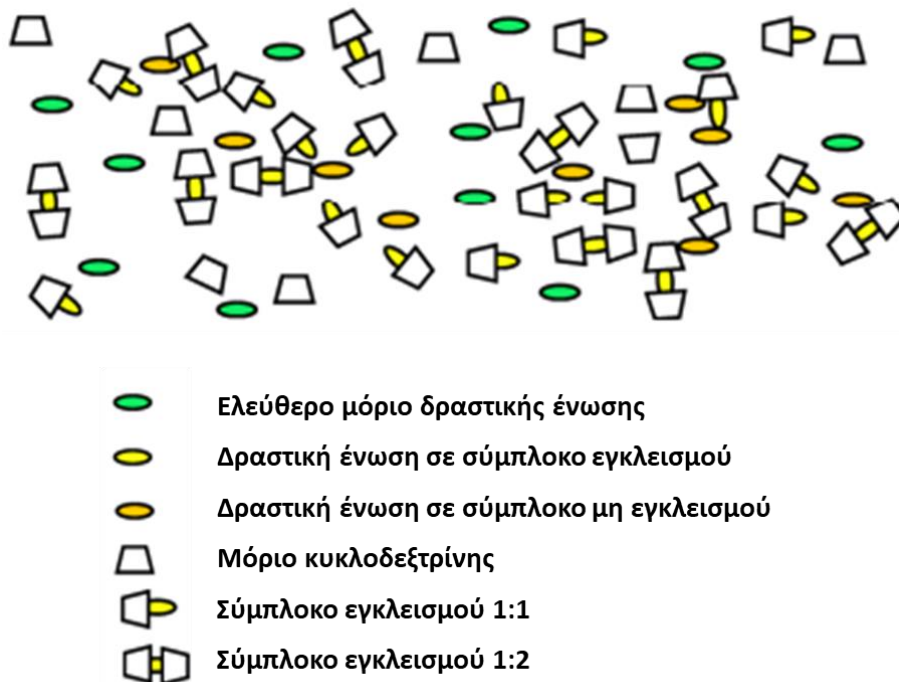
Η ισχύς της πρόσδεσης του μορίου και ο βαθμός σχηματισμού του συμπλόκου εξαρτώνται από τις διαστάσεις τόσο της κυκλοδεξτρίνης όσο και του ίδιου του μορίου, από τη χρήση ενός ή περισσότερων διαλυτών κατά το σχηματισμό του συμπλόκου αλλά και από τις θερμοδυναμικές

αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυκλοδεξτρίνης-ένωσης-διαλύτη, οι οποίες πρέπει να οδηγούν στο σχηματισμό ενός ενεργειακά ευνοϊκότερου συστήματος. ^[7]

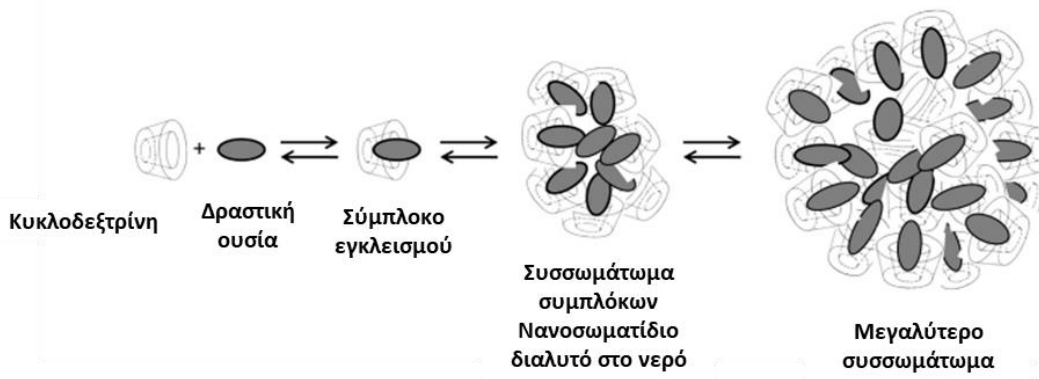
Ορισμένες αλληλεπιδράσεις που συμβάλλουν στη δημιουργία συμπλόκων εγκλεισμού είναι:

- Η απομάκρυνση των πολικών μορίων νερού από την μη πολική κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης
- Η αύξηση των δεσμών υδρογόνου που σχηματίζονται κατά την μετάβαση των μορίων νερού στον κύριο όγκο του διαλύτη
- Η μείωση των απωστικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της υδρόφοβης ένωσης και του υδατικού περιβάλλοντος
- Η αύξηση των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ του υδρόφοβου μορίου και της κοιλότητας της κυκλοδεξτρίνης. ^{[7], [20]}

Παρότι η δημιουργία συμπλόκων εγκλεισμού αποτελεί την πιο συχνή μορφή αλληλεπίδρασης μεταξύ των κυκλοδεξτρινών και των «φιλοξενούμενων μορίων», δεν είναι η μόνη αλληλεπίδραση που παρατηρείται. Έχουν σημειωθεί και περιπτώσεις δημιουργίας συμπλόκων στα οποία η δραστική ένωση προσδένεται στο εξωτερικό της κοιλότητας της κυκλοδεξτρίνης καθώς επίσης και περιπτώσεις στις οποίες αναπτύσσονται διαμοριακές δυνάμεις είτε μεταξύ των μορίων της κυκλοδεξτρίνης, είτε μεταξύ των «φιλοξενούμενων μορίων» είτε μεταξύ της δραστικής ένωσης και κυκλοδεξτρίνης, με αποτέλεσμα τη δημιουργία συσσωματωμάτων. ^{[21], [22]}



Εικόνα 11. Πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ δραστικής ένωσης και κυκλοδεξτρίνης ^[22]



Εικόνα 12. Δημιουργία συσσωματωμάτων ^[21]

1.3.1. Τεχνικές σχηματισμού συμπλόκων εγκλεισμού

Υπάρχει ένα μεγάλο εύρος τεχνικών που χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό συμπλόκων εγκλεισμού. Οι τεχνικές αυτές συνοψίζονται παρακάτω:

1.3.1.1. Παρασκευή φυσικών μιγμάτων – Ξηρή Ανάμειξη (Physical Mixtures – Dry Mixing Method)

Η δραστική ένωση και η κυκλοδεξτρίνη προστίθενται σε ιγδίο στην επιθυμητή αναλογία, κονιορτοποιούνται και αναμειγνύονται για περίπου μια ώρα και στη συνέχεια αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου. Η μέθοδος αυτή δε θεωρείται κύρια μέθοδος παρασκευής συμπλόκων εγκλεισμού, αλλά πραγματοποιείται κυρίως ώστε τα αποτελέσματά της να χρησιμοποιηθούν συγκριτικά, επαληθεύοντας έτσι την αποτελεσματικότητα των άλλων μεθόδων. ^[20]

1.3.1.2. Σχηματισμός συμπλόκων με λειοτριβήση (Kneading Method)

Σε αυτή τη μέθοδο λαμβάνεται μικρή ποσότητα νερού και προστίθεται στην κυκλοδεξτρίνη έτσι ώστε να σχηματίσει με αυτήν μια πάστα. Στη συνέχεια λαμβάνεται κατάλληλη ποσότητα της ένωσης που πρόκειται να εγκλειστεί έτσι ώστε να έχει την εκάστοτε επιθυμητή αναλογία με την κυκλοδεξτρίνη (1:1, 2:1 κλπ.). Η ποσότητα αυτή αναμειγνύεται με την πάστα με χρήση ιγδίου και υπέρου, μέχρι απομάκρυνσης της υγρασίας. Τα παραγόμενα σύμπλοκα εγκλεισμού οδηγούνται για ξήρανση ώστε να απομακρυνθούν υπολείμματα υγρασίας, κονιορτοποιούνται ώστε να αποκτήσουν μορφή πούδρας και αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου και σχετική υγρασία 40-50%. ^[20]

1.3.1.3. Συγκαταβύθιση (Co-precipitation Method)

Η κυκλοδεξτρίνη προστίθεται σε ποσότητα νερού ή οργανικού διαλύτη έτσι ώστε να διαλυθεί. Στη συνέχεια η δραστική ένωση προστίθεται στο διάλυμα υπό ανάδευση και σε θερμοκρασία από 40°C έως 60°C, με αποτέλεσμα να προκύψει ένα κορεσμένο μίγμα. Το μίγμα αφήνεται να κρυσώσει, καθίσταται υπέρκορο και τα παραγόμενα σύμπλοκα εγκλεισμού καταβυθίζονται. Τέλος

απομονώνονται με διήθηση ή φυγοκέντρηση. Η διαδικασία της καταβύθισης διαρκεί από 24 έως 48 ώρες. ^[20]

1.3.1.4. Εξουδετέρωση και καταβύθιση (Neutralization – Precipitation Method)

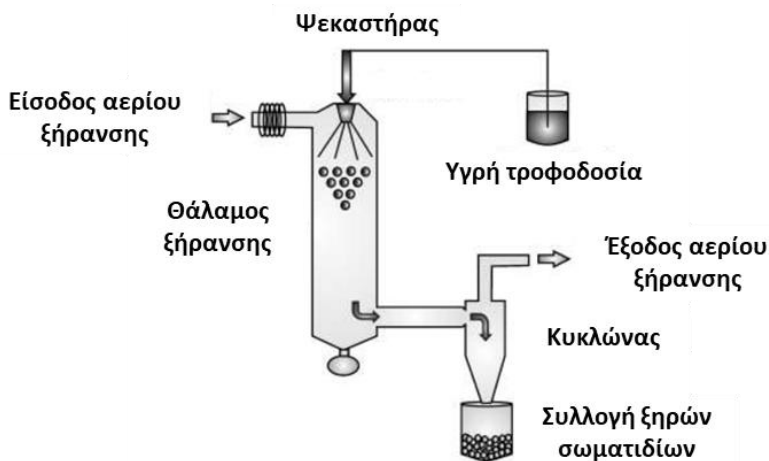
Σε αυτή τη μέθοδο η δραστική ουσία διαλύεται σε αλκαλικό διαλύτη και αναμειγνύεται με υδατικό διάλυμα της κυκλοδεξτρίνης. Το παραγόμενο μίγμα εξουδετερώνεται πλήρως με χρήση υδροχλωρικού οξέος, υπό ανάδευση. Σχηματίζεται ένα λευκό ίζημα, το οποίο επιβεβαιώνει τη δημιουργία των συμπλόκων εγκλεισμού. ^[20]

1.3.1.5. Εξάτμιση Διαλύτη (Solvent Evaporation Method)

Η κυκλοδεξτρίνη και η ένωση που πρόκειται να εγκλειστεί διαλύονται σε δύο διαφορετικούς διαλύτες, οι οποίοι είναι αναμίξιμοι μεταξύ τους. Στη συνέχεια τα δυο διαλύματα αναμειγνύονται με αποτέλεσμα στο τελικό μίγμα να υπάρχει διασπορά των μορίων κυκλοδεξτρίνης και της δραστικής ένωσης. Κατόπιν οι διαλύτες εξατμίζονται υπό κενό και λαμβάνεται μια στερεή πούδρα που αποτελεί τα παραγόμενα σύμπλοκα εγκλεισμού. ^[20]

1.3.1.6. Ξήρανση με Ψεκάσμο (Spray Drying Method)

Για τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιείται ειδικός εξοπλισμός (Spray-Dryer). Η κυκλοδεξτρίνη είτε διαλύεται είτε διασπείρεται σε νερό (σε συνήθη αναλογία 1:10) σε θερμοκρασία δωματίου και υπό έντονη ανάδευση. Η δραστική ουσία προστίθεται αργά στο διάλυμα/αιώρημα, είτε στερεή είτε διαλυμένη σε κάποιον διαλύτη. Το τελικό μίγμα αποτελεί την τροφοδοσία του Spray-Dryer και ψεκάζεται μέσω ακροφυσίου μέσα σε θάλαμο ξήρανσης, με αποτέλεσμα την παραγωγή συμπλόκων εγκλεισμού σε μορφή ξηρής πούδρας. ^[20]



Εικόνα 13. Διάταξη μεθόδου Ξήρανσης με Ψεκάσμο

1.3.1.7. Λυοφιλοποίηση (Freeze Drying Method)

Σε αυτή τη μέθοδο η δραστική ένωση διαλύεται σε νερό παρουσία και κάποιου ακόμα διαλύτη (εάν χρειάζεται). Στη συνέχεια προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα κυκλοδεξτρίνης και το μίγμα αναδεύεται μέχρι να διαλυθούν οι δύο ενώσεις. Έπειτα οδηγείται για λυοφιλοποίηση (διαδικασία αφυδάτωσης ενός κατεψυγμένου υλικού σε συνθήκες κενού μέσω εξάχνωσης), η οποία πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες μεταξύ -20°C και -60°C . Με αυτόν τον τρόπο παράγονται ξηρά σύμπλοκα εγκλεισμού σε μορφή πούδρας. Λόγω των ιδιαίτερα χαμηλών θερμοκρασιών, η λυοφιλοποίηση αποτελεί κατάλληλη μέθοδο δημιουργίας συμπλόκων εγκλεισμού όταν η δραστική ένωση είναι θερμοευαίσθητη.^[20]

1.3.1.8. Μικροκύματα (Microwave Irradiation Method)

Η κυκλοδεξτρίνη και η δραστική ένωση διαλύονται σε μίγμα νερού και οργανικού διαλύτη. Το μίγμα αφήνεται να αντιδράσει για μικρό χρονικό διάστημα (1-2 λεπτών) σε φούρνο μικροκυμάτων με αποτέλεσμα το σχηματισμό συμπλόκων εγκλεισμού υπό μορφή ιζήματος. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης προστίθεται κατάλληλο μίγμα διαλυτών ώστε να απομακρύνει τυχόν υπολείμματα ελεύθερου φαρμάκου και κυκλοδεξτρίνης. Τέλος το μίγμα διηθείται και ξηραίνεται σε κλίβανο κενού.^[20]

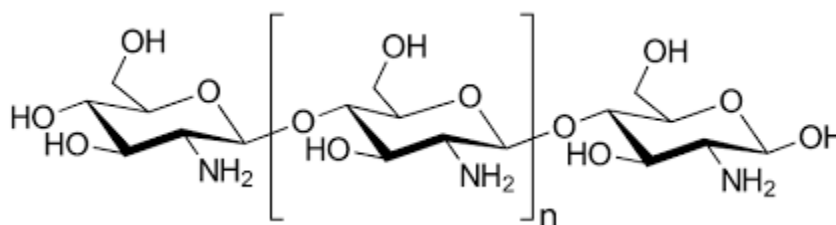
1.4. Χιτοζάνη

Η χιτοζάνη είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης ο οποίος προκύπτει από την απακετυλίωση της χιτίνης, όταν ο βαθμός απακετυλίωσης ξεπερνά το 50%. Διαθέτει ορισμένες ιδιότητες οι οποίες την καθιστούν ιδιαίτερα ελκυστική για χρήση σε φαρμακευτικές εφαρμογές. Πιο συγκεκριμένα η χιτοζάνη, είναι απόλυτα βιοσυμβατή και μη τοξική καθώς δεν προκαλεί κάποια αντίδραση όταν έρχεται σε επαφή με τα ανθρώπινα κύτταρα ενώ παράλληλα βιοαποικοδομείται από πολλά διαφορετικά ένζυμα που συναντώνται στον ανθρώπινο οργανισμό. Ιδιαίτερα σημαντικό είναι και το γεγονός ότι, σε αντίθεση με τη χιτίνη, μπορεί να διαλυθεί σε υδατικό περιβάλλον.

Λόγω των παραπάνω ιδιοτήτων της, η χιτοζάνη χρησιμοποιείται για την επικάλυψη δραστικών ουσιών και τη δημιουργία νανοσωματιδίων καθώς λειτουργεί ως φορέας φαρμάκων, ενισχύει τη διαλυτότητα, τη σταθερότητα και τη βιοδιαθεσιμότητά τους και προσφέρει τροποποιημένη αποδέσμευση των δραστικών ουσιών. [23], [24], [25]

1.4.1. Δομή χιτοζάνης

Η χιτοζάνη αποτελείται από τυχαία κατανεμημένες μονάδες D-γλυκοζαμίνης (απακετυλιωμένες μονάδες) και N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνης (ακετυλιωμένες μονάδες). Οι μονάδες συνδέονται μεταξύ τους με 1,4-β-γλυκοζιτικό δεσμό. Η χημική της δομή φαίνεται και στο ακόλουθο σχήμα: [26]



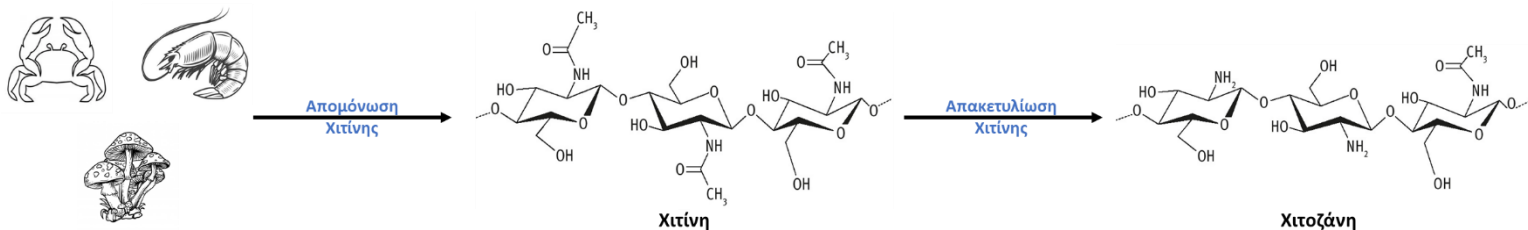
Εικόνα 14. Χημική δομή Χιτοζάνης

1.4.2. Παραγωγή χιτοζάνης

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η χιτοζάνη προκύπτει από την απακετυλίωση της χιτίνης, όταν ο βαθμός απακετυλίωσης ξεπερνά το 50%. Η χιτίνη είναι ένας πολυσακχαρίτης που συναντάται στη φύση, καθώς αποτελεί δομικό συστατικό των εξωσκελετών των αρθροπόδων (κυρίως καβουριών και γαρίδων) και των κυτταρικών τοιχωμάτων των μυκήτων.

Η απομάκρυνση της ομάδας του ακετυλίου δεν είναι εύκολη διαδικασία. Συνήθως πραγματοποιείται με πυκνό αλκαλικό διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου, είτε υδατικό είτε αλκοολικό. Για την αποφυγή της οξειδωσης χρησιμοποιείται άζωτο το οποίο εξασφαλίζει ένα αδρανές περιβάλλον, ή εναλλακτικά προστίθεται βοροϋδρίδιο του νατρίου στο διάλυμα του NaOH.

Για το χαρακτηρισμό της χιτοζάνης θα πρέπει να αναφέρεται και ο τελικός βαθμός ακετυλίωσης, ο οποίος κυμαίνεται μεταξύ 50% και 99% και επηρεάζει τις ιδιότητες της χιτοζάνης. [23], [25]



Σχήμα 2. Διαδικασία παραγωγής χιτοζάνης

1.5. Επικάλυψη συμπλόκων εγκλεισμού με χιτοζάνη

Τις τελευταίες δεκαετίες, έχει πραγματοποιηθεί μεγάλος αριθμός ερευνών αναφορικά με την εύρεση συστημάτων φαρμάκων τροποποιημένης αποδέσμευσης. Ο σχηματισμός συμπλόκων εγκλεισμού, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, αποτελεί μια τεχνική που μπορεί να δώσει συστήματα με βελτιωμένη διαλυτότητα, σταθερότητα και βιοδιαθεσιμότητα καθώς και τροποποιημένη αποδέσμευση. Έχει επίσης ανακαλυφθεί ότι για την περαιτέρω βελτίωση τέτοιων συστημάτων, συνίσταται η τροποποίηση της επιφάνειας του εκάστοτε συμπλόκου εγκλεισμού μέσω επικάλυψης με διάφορα βιοπολυμερή, ένα εκ των οποίων είναι και η χιτοζάνη.

Η χιτοζάνη φαίνεται πως έχει ιδιαίτερη προοπτική για την επικάλυψη συμπλόκων εγκλεισμού καθώς με τη χρήση της παρατηρείται ο σχηματισμός ενός τελικού συστήματος - νανοσωματιδίου το οποίο εμφανίζει σημαντικά πιο βραδεία αποδέσμευση από το εκάστοτε αρχικό σύμπλοκο εγκλεισμού. Παράλληλα δεν υπάρχει κάποιος κίνδυνος τοξικότητας αφού είναι πλήρως βιοσυμβατή με τον ανθρώπινο οργανισμό, ούτε η πιθανότητα εμφάνισης χημικών παραπροϊόντων ή υπολειμμάτων κατά τη σύζευξή της με το σύμπλοκο εγκλεισμού. Καταληκτικά η χιτοζάνη έχει την ιδιότητα να προσκολλάται σε βλενώδεις περιοχές του οργανισμού με αποτέλεσμα να μπορεί να χρησιμοποιηθεί και πιο εξειδικευμένα, στοχεύοντας συγκεκριμένες περιοχές του σώματος στις οποίες θα παραμένει για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα. ^[27]

1.5.1. Τεχνικές σχηματισμού νανοσωματιδίων επικαλυμμένων με χιτοζάνη

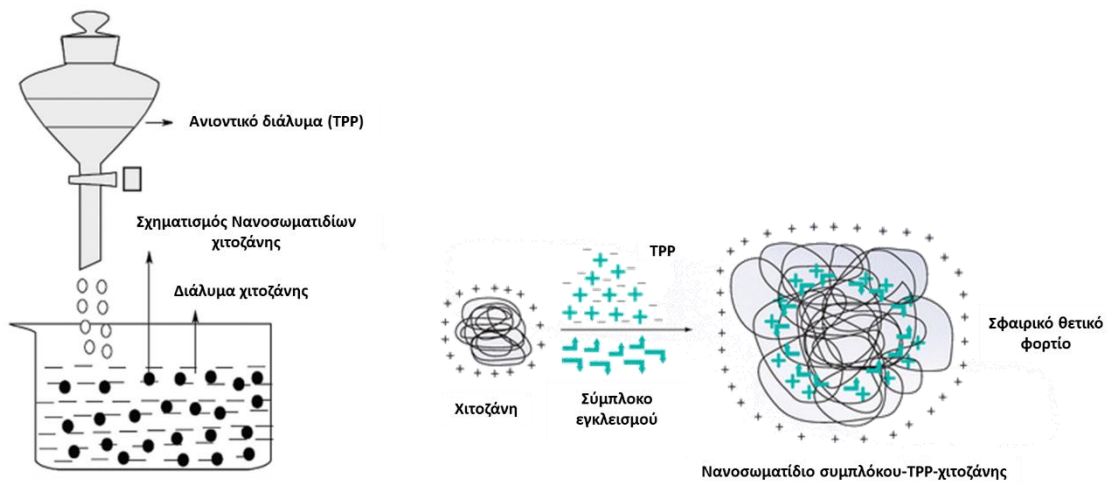
Η επικάλυψη των συμπλόκων εγκλεισμού με τη χιτοζάνη μπορεί να επιτευχθεί με διάφορες τεχνικές. Ορισμένες από αυτές παρουσιάζονται συνοπτικά παρακάτω:

1.5.1.1. Ιονοτροπική Πηκτωμάτωση (Ionic Gelation Method)

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στις ιοντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των θετικά φορτισμένων πρωτοταγών αμινομάδων της χιτοζάνης και των εκάστοτε αρνητικά φορτισμένων ανιονικών ομάδων, όπως για παράδειγμα του τριπολυφωσφορικού νατρίου (sodium triphosphate-TPP) το οποίο αποτελεί και τον πιο συχνά χρησιμοποιούμενο παράγοντα διασύνδεσης ιόντων. Πιο συγκεκριμένα η χιτοζάνη διαλύεται σε όξινο υδατικό διάλυμα ώστε να απελευθερωθούν τα κατιόντα της, προστίθεται διασπορά των συμπλόκων εγκλεισμού και στη συνέχεια προστίθεται με αργό ρυθμό και υπό συνεχή ανάδευση το ανιοντικό διάλυμα του TPP για τον σχηματισμό των επικαλυμμένων νανοσωματιδίων.

Τόσο το μέγεθος όσο και το επιφανειακό φορτίο των νανοσωματιδίων μπορεί να αλλάξει με αλλαγή της αναλογίας χιτοζάνης–TRP. Η απόδοση της τεχνικής αυτής είναι ιδιαίτερα υψηλή, η βιοδιαθεσιμότητα του τελικού φαρμάκου είναι βελτιωμένη ενώ έχει βρεθεί ότι το τελικό φάρμακο αποδεσμεύεται και απορροφάται από τον οργανισμό ακόμα και 15 μέρες μετά τη χορήγηση.

Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιείται συχνά καθώς έχει αρκετά πλεονεκτήματα. Πιο συγκεκριμένα δεν είναι τοξική (καθώς το όξινο υδατικό διάλυμα στο οποίο διαλύεται η χιτοζάνη ξεπλένεται και δεν μένει στα νανοσωματίδια) και είναι ιδιαίτερα βολική καθώς είναι εύκολα ελεγχόμενη. Παράλληλα, με τη χρήση της ιονοτροπικής πηκτωμάτωσης δεν υπάρχει ο κίνδυνος να υποστεί κάποια ζημία το σύμπλοκο εγκλεισμού. Ωστόσο το μέγεθος του τελικού νανοσωματιδίου σε σύγκριση με το μέγεθος του απλού συμπλόκου εγκλεισμού είναι σημαντικά μεγαλύτερο. [28], [29], [30]



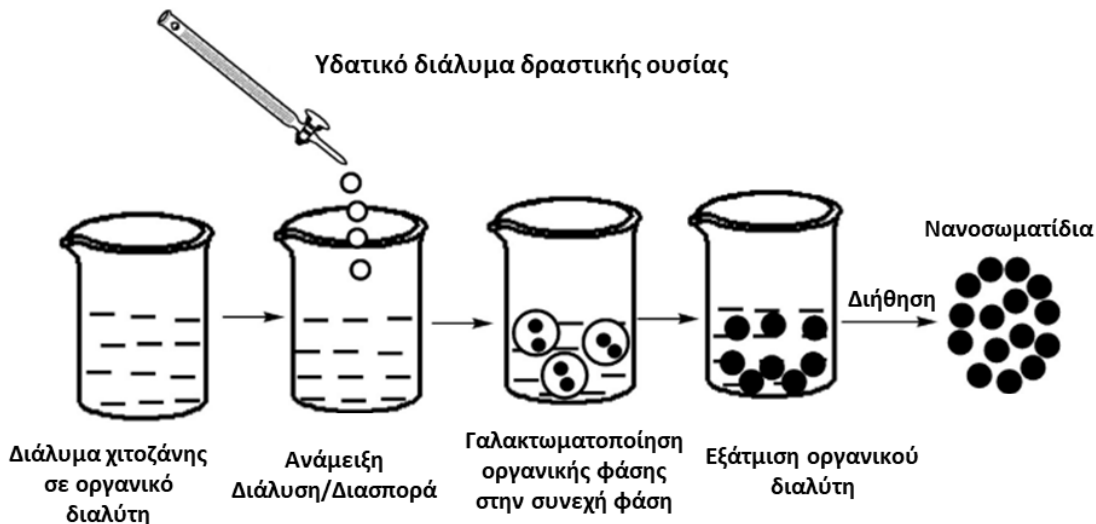
Εικόνα 15. Σχηματισμός νανοσωματιδίων χιτοζάνης με την μέθοδο ιονοτροπικής πηκτωμάτωσης [29], [30]

1.5.1.2. Γαλακτωματοποίηση – Διάχυση Διαλύτη (Emulsification – Solvent Diffusion Method)

Η συγκεκριμένη τεχνική βασίζεται στην εξάτμιση της εσωτερικής φάσης ενός γαλακτώματος μέσω ανάδευσης. Πιο συγκεκριμένα παρασκευάζονται δύο διαλύματα: η χιτοζάνη διαλύεται σε οργανικό διαλύτη και το φάρμακο–σύμπλοκο εγκλεισμού διαλύεται σε υδατικό διάλυμα. Το διάλυμα του συμπλόκου αναμειγνύεται με το διάλυμα της χιτοζάνης ώστε να διαλυθεί ή να διασπαρεί σε αυτό και στη συνέχεια το μίγμα μετατρέπεται σε γαλάκτωμα μέσω σταθεροποιητικού παράγοντα υπό μηχανική ανάδευση και υψηλή πίεση. Έπειτα το γαλάκτωμα αραιώνεται με προσθήκη μεγάλης ποσότητας νερού κατά την οποία λαμβάνει χώρα καταβύθιση της χιτοζάνης ως αποτέλεσμα της διάχυσης του οργανικού διαλύτη στο νερό και δημιουργούνται τα νανοσωματίδια τα οποία απομονώνονται με διήθηση.

Η μέθοδος αυτή δεν απαιτεί ούτε αυξημένες θερμοκρασίες ούτε κάποιον παράγοντα διαχωρισμού φάσεων και είναι κατάλληλη για υδρόφοβες δραστικές ουσίες. Τα κύρια

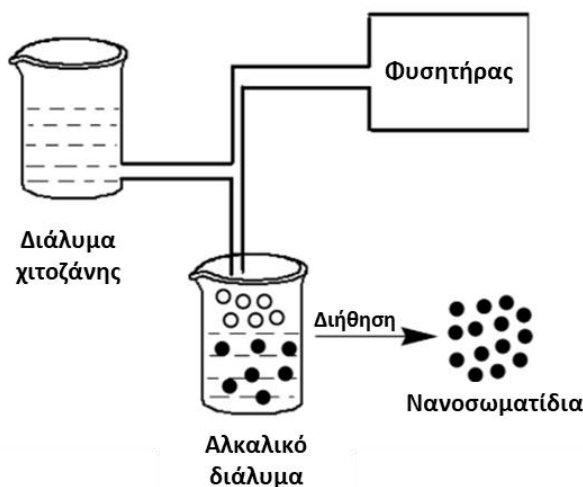
μειονεκτήματά της είναι ότι για την παρασκευή των νανοσωματιδίων χρησιμοποιούνται οργανικοί διαλύτες και αναπτύσσονται υψηλές δυνάμεις διάτμησης.^[29]



Εικόνα 16. Σχηματισμός νανοσωματιδίων χιτοζάνης με Γαλακτωματοποίηση-Διάχυση Διαλύτη^[29]

1.5.1.3. Καταβύθιση/Συσσωμάτωση (Precipitation/Coacervation Method)

Η συγκεκριμένη μέθοδος περιλαμβάνει υδατικούς διαλύτες και ήπιες συνθήκες επεξεργασίας. Εκμεταλλεύεται το γεγονός ότι η χιτοζάνη είναι αδιάλυτη σε αλκαλικό pH και επομένως καθιζάνει όταν έρχεται σε επαφή με αλκαλικό διάλυμα. Πιο συγκεκριμένα τα νανοσωματίδια παράγονται μέσω εμφύσησης διαλύματος χιτοζάνης σε αλκαλικό διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου χρησιμοποιώντας ακροφύσιο πεπιεσμένου αέρα για το σχηματισμό σταγονιδίων. Στη συνέχεια τα νανοσωματίδια διαχωρίζονται και καθαρίζονται μέσω διήθησης, φυγοκέντρησης και διαδοχικών πλύσεων με ζεστό και κρύο νερό. Η χιτοζάνη διαλύεται σε οξικό οξύ που περιέχει Tween 80 και η ανάπτυξη των σωματιδίων επιτυγχάνεται μέσω της προσθήκης διαλύματος θειικού νατρίου υπό ήπια ανάδευση και χρήση υπερήχων.



Εικόνα 17. Σχηματισμός νανοσωματιδίων χιτοζάνης με Καταβύθιση/Συσσωμάτωση

1.6. Μελέτη και Χαρακτηρισμοί Συμπλόκων Εγκλεισμού και Νανοσωματιδίων

1.6.1. Μέγεθος, Δείκτης Πολυδιασποράς και ζ-Δυναμικό μέσω Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (Dynamic Light Scattering – DLS)

Η δυναμική σκέδαση φωτός είναι μία μη επεμβατική, σύντομης διάρκειας, σχετικά οικονομική και εύκολη στην πραγματοποίηση μέθοδος προσδιορισμού του μεγέθους σωματιδίων, του δείκτη πολυδιασποράς Pdl και του ζ-δυναμικού.

Για τον προσδιορισμό των επιθυμητών μεγεθών η μέθοδος βασίζεται στον υπολογισμό του συντελεστή διάχυσης. Ακτίνα λέιζερ περνά από μονοχρωμάτορα και φωτοβολεί το δείγμα και λόγω των υπαρχόντων σωματιδίων, τμήμα της ακτινοβολίας σκεδάζεται. Τα διεσπαρμένα σωματίδια μέσα στο διαλύτη ακολουθούν κίνηση Brown και η ταχύτητα τους εξαρτάται από το μέγεθος τους. Λόγω της κίνησης αυτής υπάρχει διακύμανση στην ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας σε συνάρτηση με το χρόνο.

Από τη συνάρτηση αυτή και με κατάλληλες συσχετίσεις ανάλογα με το δείγμα υπολογίζεται ο συντελεστής διάχυσης. Για να υπολογιστεί η υδροδυναμική διάμετρος χρησιμοποιείται η εξίσωση Stokes-Einstein:

$$d_H = \frac{k_B \cdot T}{3\pi \cdot \eta \cdot D_T} \quad (2)$$

όπου:

- d_H η υδροδυναμική διάμετρος
- k_B η σταθερά Boltzmann
- T η θερμοκρασία
- η το ιξώδες
- D_T ο συντελεστής διάχυσης ^[31]

1.6.1.1. Μέγεθος (size)

Το μέγεθος των νανοσωματιδίων αποτελεί το βασικότερο χαρακτηριστικό τους και μπορεί να ποικίλει καθώς επηρεάζεται από πολλές παραμέτρους. Η μέθοδος σχηματισμού, ο φορέας εγκλεισμού, η δραστική ουσία που εγκλείεται αλλά και η αναλογία μεταξύ φορέα και «φιλοξενούμενου μορίου» είναι παράγοντες που καθορίζουν το τελικό μέγεθος των παραγόμενων σωματιδίων.

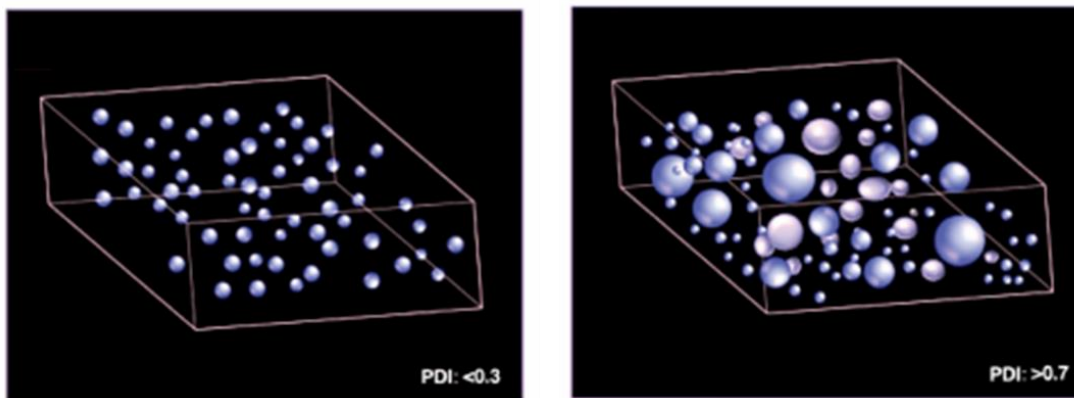
Τόσο τα σύμπλοκα εγκλεισμού όσο και τα επικαλυμένα με χιτοζάνη νανοσωματίδια που μελετώνται θεωρούνται σφαιρικά σωματίδια, επομένως η κλίμακα των σωματιδίων καθορίζεται από το μέγεθος της διαμέτρου τους. Ως νανοσωματίδια ορίζονται τα στερεά ή διεσπαρμένα σωματίδια με μέγεθος μεταξύ 10nm και 1000nm.

Το μέγεθος των νανοσωματιδίων καθορίζει σε μεγάλο βαθμό και τις ιδιότητές τους. Πιο συγκεκριμένα επηρεάζει την σταθερότητα των σωματιδίων, την ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν στοχευμένα με μόρια-στόχους αλλά και το βαθμό δραστηκότητάς τους, την

απελευθέρωση της εγκλεισμένης ουσίας και την *in vivo* συμπεριφορά τους. Επίσης, όσο μικρότερο είναι το μέγεθος των σωματιδίων, αλληλεπιδρούν με τα κύτταρα σε μεγαλύτερο βαθμό και διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό με μεγαλύτερη ευκολία. Ωστόσο τα πιο μικρά νανοσωματίδια έχουν την τάση να συσσωματώνονται περισσότερο. ^{[32], [33]}

1.6.1.2. Δείκτης Πολυδιασποράς (PDI)

Ο δείκτης πολυδιασποράς είναι μία παράμετρος που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ομοιομορφίας του μεγέθους των νανοσωματιδίων. Είναι αδιάστατο μέγεθος και χαμηλές τιμές του (μικρότερες του 0.05) συνεπάγονται μικρό εύρος μεγεθών σωματιδίων και επομένως μονοδιασπορά ενώ τιμές υψηλότερες του 0.7 συνεπάγονται μεγάλες διακυμάνσεις στο μέγεθος των νανοσωματιδίων και επομένως πολυδιασπορά. Στη φαρμακευτική χημεία, συστήματα με τιμές PDI έως 0.3 θεωρούνται ομογενή και μονοδιασπορά. Βασικό πλεονέκτημα ενός συστήματος μονοδιασποράς είναι η ιδιότητά του να παρέχει πιο σταθερές ποσότητες της δραστικής ένωσης. ^[34]



Εικόνα 18. Σχηματική Αναπαράσταση μονοδιασποράς και πολυδιασποράς συστήματος ^[34]

1.6.1.3. ζ-δυναμικό (ζ-potential)

Το ζ-δυναμικό ορίζεται ως η διαφορά δυναμικού μεταξύ της σταθερά δεσμευμένης στιβάδας ιόντων στην επιφάνεια των σωματιδίων και της ηλεκτρικά ουδέτερης περιοχής του διαλύματος. Είναι μία παράμετρος που υποδεικνύει την σταθερότητα των νανοσωματιδίων και την τάση τους να απωθούν το ένα το άλλο και να μη συσσωματώνονται. Η τιμή του ζ-δυναμικού καθορίζεται όχι μόνο από τα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων (π.χ. είδος ιόντων και ιοντική ισχύς, μορφολογία), αλλά και από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως το pH και η θερμοκρασία. Δείγματα με απόλυτη τιμή ζ-δυναμικού μεγαλύτερη των 30mV θεωρούνται σταθερά. ^{[35], [36]}

1.6.2. Φασματομετρία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (¹H NMR)

Η συγκεκριμένη μέθοδος στηρίζεται στο γεγονός ότι οι πυρήνες της εκάστοτε ένωσης προς εξέταση εκπέμπουν ακτινοβολία σε χαρακτηριστικές συχνότητες, υπό κατάλληλες συνθήκες και με τη χρήση μαγνητικού πεδίου. Ειδικότερα, όταν στο δείγμα επιβληθεί ισχυρό μαγνητικό πεδίο

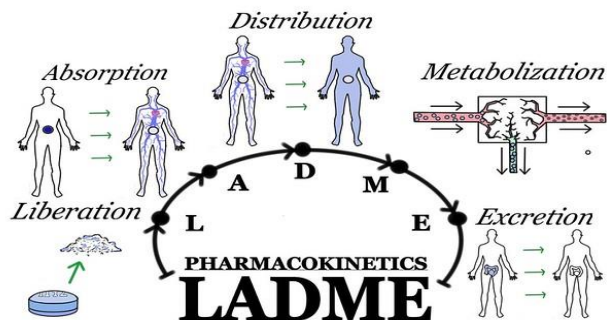
αυτό θα απορροφά ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία στην περιοχή των ραδιοκυμάτων. Λόγω της απορρόφησης της ακτινοβολίας οι πυρήνες των ατόμων μεταβαίνουν από μία κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας σε μία υψηλότερης. Η μεταβολή αυτή γίνεται με αναστροφή του spin. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται συντονισμός. Ένα φάσμα ^1H NMR είναι, όπως όλες οι φασματομετρικές τεχνικές, μια γραφική παράσταση της έντασης της απορρόφησης σε συνάρτηση με τη συχνότητα. Το συνηθισμένο εύρος συχνοτήτων στο ^1H NMR είναι 10-800 MHz. Μέσω του φάσματος ^1H NMR υπολογίζονται οι χημικές μετατοπίσεις, που δείχνουν τη διαφορά συχνοτήτων συντονισμού του προς εξέταση πυρήνα με τη συχνότητα συντονισμού αναφοράς. Στις οργανικές ενώσεις οι χαρακτηριστικές ομάδες (πυρήνες) εκπέμπουν σε συγκεκριμένες συχνότητες, συνεπώς το φάσμα ^1H NMR είναι κατάλληλο για την ταυτοποίηση ενώσεων. ^[37]

1.6.3. Κινητική Απελευθέρωσης

1.6.3.1. Απελευθέρωση

Η απελευθέρωση ενός φαρμάκου είναι η διαδικασία κατά την οποία η δραστική ουσία διαχωρίζεται από το φαρμακευτικό σκεύασμα και στη συνέχεια υπόκειται σε Απορρόφηση, Κατανομή, Μεταβολισμό και Απέκκριση (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion – ADME). Υπάρχουν πολλοί τρόποι με τους οποίους τα φαρμακευτικά σκευάσματα απελευθερώνονται στον οργανισμό. Οι μέθοδοι απελευθέρωσης είναι:

- Άμεση απελευθέρωση (Immediate release) κατά την οποία τα φάρμακα διαλύονται χωρίς καμία καθυστέρηση ή εν συνεχεία παρατεταμένη απορρόφηση της δραστικής ουσίας.
- Τροποποιημένη απελευθέρωση (Modified release) κατά την οποία υπάρχει είτε καθυστέρηση είτε εκτεταμένη αποδέσμευση της δραστικής ουσίας. Τα συστήματα τροποποιημένης αποδέσμευσης μπορούν με τη σειρά τους να ταξινομηθούν σε:
 - Επιβραδυνόμενης απελευθέρωσης (Delayed release) κατά την οποία η δραστική ουσία δεν απελευθερώνεται αμέσως μετά τη λήψη του φαρμάκου αλλά μετά από κάποιο χρονικό διάστημα.
 - Εκτεταμένης απελευθέρωσης (Extended release) κατά την οποία η δραστική ουσία είναι διαθέσιμη και απελευθερώνεται στον οργανισμό για μεγάλη περίοδο μετά την χορήγηση.
 - Στοχευμένης απελευθέρωσης (Targeted release) κατά την οποία η δραστική ουσία απελευθερώνεται σε συγκεκριμένο σημείο μετά τη χορήγηση. ^[38]

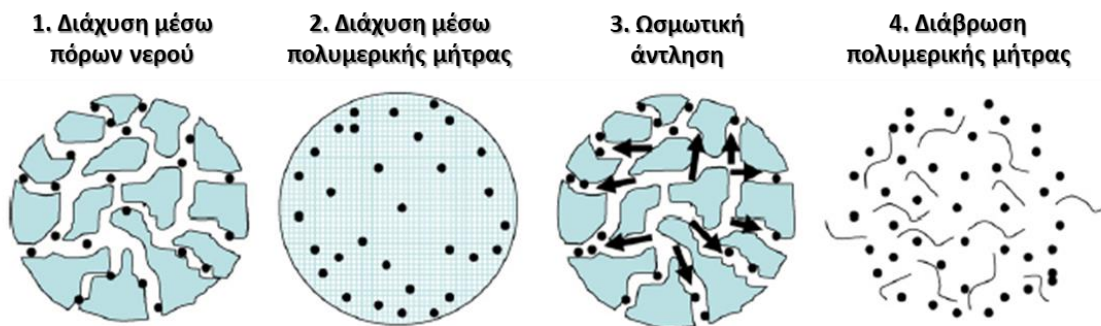


Εικόνα 19. Φαρμακοκινητική: Πρώτο στάδιο η απελευθέρωση της δραστικής ουσίας

Στα πολυμερικά συστήματα η απελευθέρωση του φαρμάκου περιγράφεται από τον τρόπο με τον οποίο η δραστική ουσία μεταφέρεται στην εξωτερική επιφάνεια της πολυμερικής μήτρας και στη συνέχεια στο περιβάλλον. Οι βασικοί μηχανισμοί απελευθέρωσης σε πολυμερικά συστήματα είναι:

1. Η διάχυση της δραστικής ουσίας μέσω πόρων που έχουν πληρωθεί με νερό
2. Η διάχυση της δραστικής ουσίας διαμέσου της πολυμερικής μήτρας
3. Η ωσμωτική άντληση της δραστικής ουσίας
4. Η διάβρωση της πολυμερικής μήτρας ^[39]

Οι παραπάνω μηχανισμοί συνοψίζονται στην ακόλουθη εικόνα:



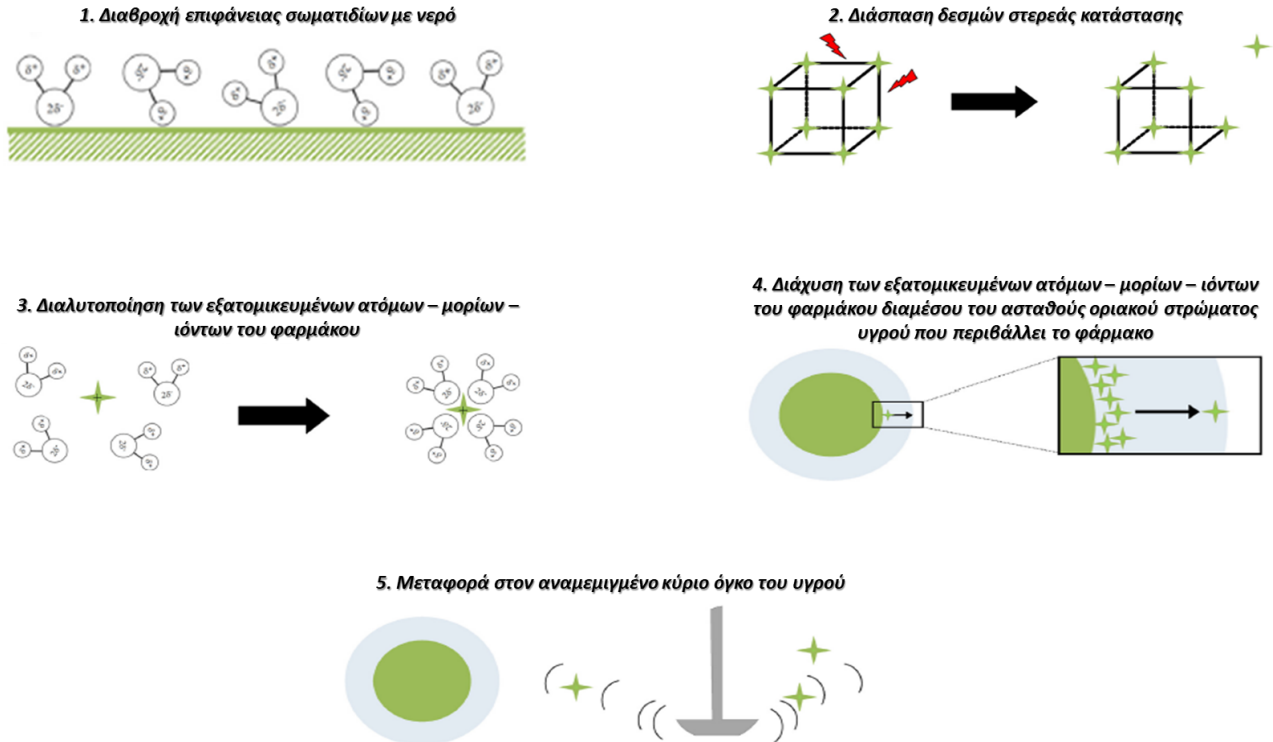
Εικόνα 20. Μηχανισμοί απελευθέρωσης φαρμάκων από πολυμερικά συστήματα (νανοσωματίδια) ^[39]

1.6.3.2. Διαλυτοποίηση

Η διαλυτοποίηση ενός φαρμάκου ορίζεται ως ο ρυθμός μεταφοράς μάζας από μια στερεή επιφάνεια (φαρμακευτικό σκεύασμα) στο μέσο διαλυτοποίησης υπό τυποποιημένες συνθήκες. Η διαλυτοποίηση και η απελευθέρωση μιας δραστικής ουσίας δεν είναι συνώνυμες έννοιες. Η διαλυτοποίηση ενός στερεού φαρμάκου είναι μια διαδικασία που περιλαμβάνει πέντε στάδια, ενώ η απελευθέρωση είναι ένα πολύ πιο σύνθετο φαινόμενο τμήμα του οποίου είναι και η διαλυτοποίηση. Τα πέντε στάδια της διαλυτοποίησης του φαρμάκου είναι:

1. Η διαβροχή της επιφάνειας των σωματιδίων με νερό
2. Η διάσπαση των δεσμών στερεάς κατάστασης (π.χ. δεσμοί σε έναν κρύσταλλο)
3. Η διαλυτοποίηση των εξατομικευμένων ατόμων – μορίων – ιόντων του φαρμάκου
4. Η διάχυση των εξατομικευμένων ατόμων – μορίων – ιόντων του φαρμάκου διαμέσου του ασταθούς οριακού στρώματος υγρού που περιβάλλει το φάρμακο
5. Η μεταφορά στον αναμεμιγμένο κύριο όγκο του υγρού ^{[38], [40]}

Τα στάδια αυτά συνοψίζονται στην ακόλουθη εικόνα:



Εικόνα 21. Τα 5 στάδια της διαλυτοποίησης ενός φαρμάκου

1.6.3.3. Διάχυση

Διάχυση είναι η τάση των μορίων μιας ουσίας να διασπείρονται από περιοχές υψηλότερης συγκέντρωσης προς τις περιοχές χαμηλότερης συγκέντρωσης. Ο πρώτος νόμος του Fick περιγράφει την διάχυση της μάζας σε μια φραγμένη περιοχή με τη σχέση:

$$J = -D \cdot \frac{dC}{dx} \quad (3)$$

όπου:

- J η ροή διάχυσης (μονάδες: $\frac{\text{ποσότητα ουσίας}}{\text{επιφάνεια} \cdot \text{χρόνος}}$). Μετρά την ποσότητα ουσίας που διέρχεται από μια μονάδα επιφάνειας σε συγκεκριμένο χρόνο.
- D ο συντελεστής διάχυσης
- C η συγκέντρωση
- x η θέση ^[41]

1.6.3.4. Μοντέλα Απελευθέρωσης

Η κινητική απελευθέρωσης είναι η εφαρμογή μαθηματικών μοντέλων προκειμένου να μελετηθεί η απελευθέρωση της δραστικής ουσίας. Μερικά από τα κινητικά μοντέλα που περιγράφουν με μεγαλύτερη ακρίβεια τα φαινόμενα που πραγματοποιούνται κατά την απελευθέρωση της δραστικής ένωσης είναι:

- Μοντέλο απελευθέρωσης μηδενικής τάξης (zero order)
- Μοντέλο απελευθέρωσης πρώτης τάξης (first order)
- Μοντέλο Higuchi
- Μοντέλο Korsmeyer – Peppas
- Μοντέλο Hixson – Crowell
- Μοντέλο Baker – Lonsdale
- Μοντέλο Weibull

Μοντέλο απελευθέρωσης μηδενικής τάξης (zero order)

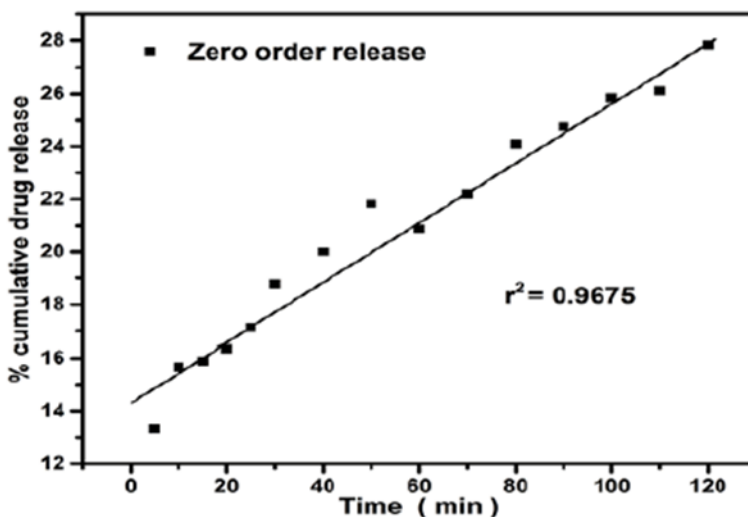
Σύμφωνα με το μοντέλο απελευθέρωσης μηδενικής τάξης, η διάλυση φαρμάκων που δεν αποσυντίθεται απευθείας αλλά απελευθερώνουν με αργό ρυθμό τη δραστική ουσία μπορεί να αναπαρασταθεί από την εξίσωση:

$$Q_t = Q_o + K_o \cdot t \quad (4)$$

όπου:

- Q_o η αρχική ποσότητα του φαρμάκου στο διάλυμα (συνήθως λαμβάνεται ίση με 0)
- Q_t η ποσότητα του φαρμάκου που διαλύεται σε χρόνο t
- K_o η σταθερά απελευθέρωσης μηδενικής τάξης
- t ο χρόνος

Κατά τη γραφική αναπαράσταση των δεδομένων που λαμβάνονται από μελέτες in vitro χρησιμοποιείται η αθροιστική ποσότητα % της ουσίας που απελευθερώνεται ως προς το χρόνο.



Εικόνα 22. Παράδειγμα γραφικής παράστασης μοντέλου Zero Order

Το συγκεκριμένο μοντέλο είναι κατάλληλο για συστήματα στα οποία ο ρυθμός απελευθέρωσης είναι ανεξάρτητος της συγκέντρωσης της διαλυμένης ουσίας· μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ορισμένα διαδερμικά σκευάσματα, για επικαλυμμένα δισκία με χαμηλή διαλυτότητα καθώς και για οσμωτικά συστήματα. ^[42]

Μοντέλο απελευθέρωσης πρώτης τάξης (First order)

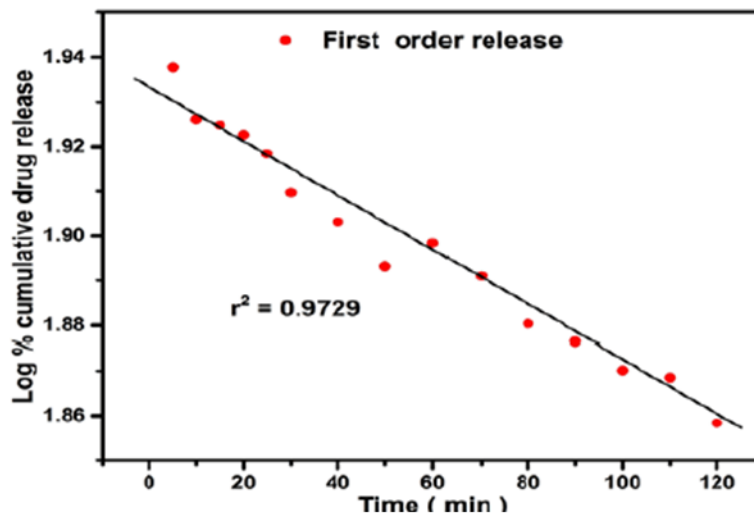
Η απελευθέρωση ενός φαρμάκου που ακολουθεί κινητική πρώτης τάξης εκφράζεται από την εξίσωση:

$$\log Q_t = \log Q_o + \frac{K \cdot t}{2.303} \quad (5)$$

όπου:

- Q_o η αρχική ποσότητα του φαρμάκου στο διάλυμα
- Q_t η ποσότητα του φαρμάκου που διαλύεται σε χρόνο t
- K η σταθερά απελευθέρωσης πρώτης τάξης
- t ο χρόνος

Κατά τη γραφική αναπαράσταση των δεδομένων που λαμβάνονται από μελέτες *in vitro* χρησιμοποιείται ο λογάριθμος της αθροιστικής ποσότητας % της ουσίας που απελευθερώνεται ως προς το χρόνο.



Εικόνα 23. Παράδειγμα γραφικής παράστασης μοντέλου First Order

Το συγκεκριμένο μοντέλο είναι κατάλληλο για συστήματα στα οποία ο ρυθμός απελευθέρωσης εξαρτάται από τη συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας· μπορεί να χρησιμοποιηθεί για σκευάσματα που περιέχουν υδατοδιαλυτές δραστικές ουσίες και πορώδεις φορείς. ^[42]

Μοντέλο Higuchi

Το συγκεκριμένο μοντέλο είναι το πρώτο μοντέλο που ανακαλύφθηκε, με σκοπό να περιγράψει την απελευθέρωση μιας δραστικής ουσίας από έναν φορέα. Βασίζεται στις ακόλουθες παραδοχές:

- η αρχική συγκέντρωση της δραστικής ουσίας εντός του φορέα είναι κατά πολύ μεγαλύτερη από τη διαλυτότητά της
- η διάχυση του φαρμάκου είναι σταθερή και μονοδιάστατη
- τα σωματίδια του φαρμάκου είναι πολύ μικρότερα από το πάχος του συστήματος
- η διόγκωση και διάλυση του φορέα είναι αμελητέες

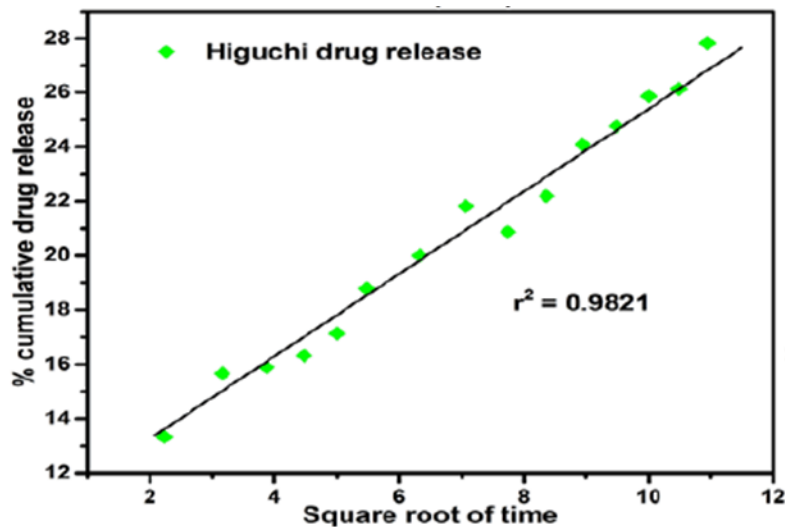
Σύμφωνα με το μοντέλο Higuchi η απελευθέρωση μιας δραστικής ουσίας εκφράζεται από την εξίσωση:

$$Q = K_H \cdot \sqrt{t} \quad (6)$$

όπου:

- Q η ποσότητα του φαρμάκου που διαλύεται σε χρόνο t
- K_H η σταθερά Higuchi
- t ο χρόνος σε ώρες

Κατά τη γραφική αναπαράσταση των δεδομένων που λαμβάνονται από μελέτες in vitro χρησιμοποιείται η αθροιστική ποσότητα % της ουσίας που απελευθερώνεται ως προς την τετραγωνική ρίζα του χρόνου.



Εικόνα 24. Παράδειγμα γραφικής παράστασης μοντέλου Higuchi

Το συγκεκριμένο μοντέλο είναι κατάλληλο για συστήματα στα οποία η απελευθέρωση του φαρμάκου πραγματοποιείται με διάχυση.^[42]

Μοντέλο Korsmeyer – Peppas

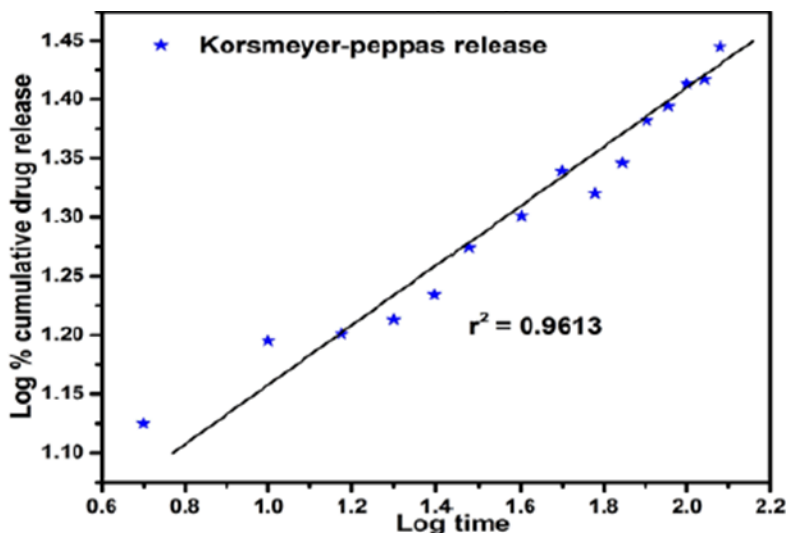
Το συγκεκριμένο μοντέλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση του πρώτου 60% των δεδομένων απελευθέρωσης της δραστικής ένωσης. Η απελευθέρωση της δραστικής ουσίας σύμφωνα με το μοντέλο Korsmeyer – Peppas, εκφράζεται από την εξίσωση:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K t^n \quad (7)$$

όπου:

- M_t η ποσότητα της δραστικής ουσίας που απελευθερώνεται σε χρόνο t
- M_∞ η συνολική ποσότητα της ουσίας
- M_t/M_∞ το κλάσμα του φαρμάκου που απελευθερώνεται σε χρόνο t
- K η σταθερά ρυθμού απελευθέρωσης
- t ο χρόνος σε ώρες
- n ο εκθέτης απελευθέρωσης/διάχυσης

Κατά τη γραφική αναπαράσταση των δεδομένων που λαμβάνονται από μελέτες *in vitro* χρησιμοποιείται ο λογάριθμος του αθροιστικού κλάσματος του φαρμάκου % που απελευθερώνεται ως προς τον λογάριθμο του χρόνου.



Εικόνα 25. Παράδειγμα γραφικής παράστασης μοντέλου Korsmeyer - Peppas

Ανάλογα με την τιμή του εκθέτη απελευθέρωσης/διάχυσης (n) του μοντέλου Korsmeyer – Peppas μπορεί να εξαχθεί συμπέρασμα για το είδος του μηχανισμού απελευθέρωσης. Οι τιμές του εκθέτη και οι αντίστοιχοι μηχανισμοί απελευθέρωσης συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα: ^[42]

Πίνακας 2. Μηχανισμοί Απελευθέρωσης βάσει του εκθέτη n στο μοντέλο Korsmeyer – Peppas [42]

Μηχανισμός απελευθέρωσης	Γεωμετρία	Τιμή Εκθέτη n
Fickian Διάχυση	Φιλμ	$n \leq 0.5$
	Κύλινδρος	$n \leq 0.45$
	Σφαίρα	$n \leq 0.43$
Μη Fickian Διάχυση	Φιλμ	$0.5 < n < 1$
	Κύλινδρος	$0.45 < n < 0.89$
	Σφαίρα	$0.43 < n < 0.85$
Case II	Φιλμ	$n = 1$
	Κύλινδρος	$n = 0.89$
	Σφαίρα	$n = 0.85$
Super Case II	Φιλμ	$n > 1$
	Κύλινδρος	$n > 0.89$
	Σφαίρα	$n > 0.85$

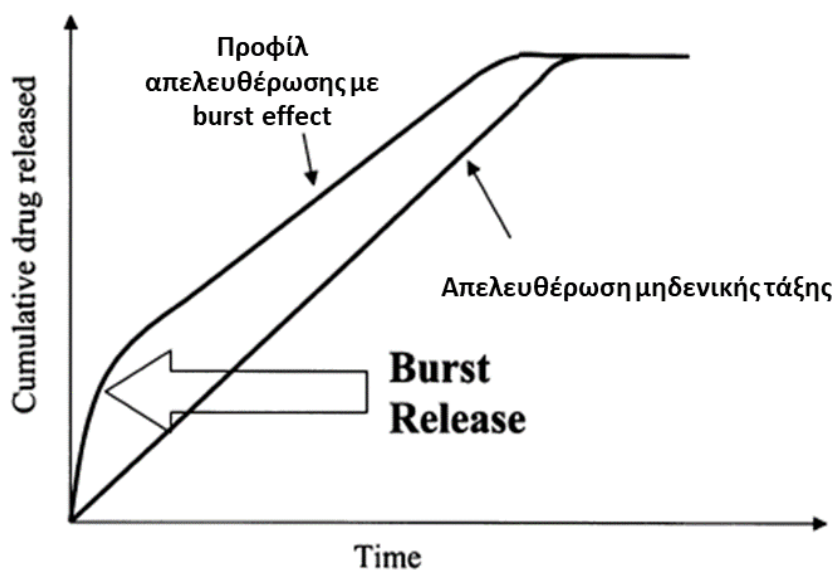
Τα παραπάνω μοντέλα απελευθέρωσης συνοψίζονται στον Πίνακα 3:

Πίνακας 3. Σύνοψη μαθηματικών μοντέλων

Μαθηματικό Μοντέλο	Εξίσωση	Γραφική Παράσταση
Zero Order	$Q_t = Q_o + K_o \cdot t$	Αθροιστική ποσότητα % της ουσίας που απελευθερώνεται συναρτήσει του χρόνου
First Order	$\log Q_t = \log Q_o + \frac{K \cdot t}{2.303}$	Λογάριθμος της αθροιστικής ποσότητας % της ουσίας που απελευθερώνεται συναρτήσει του χρόνου
Higuchi	$Q = K_H \cdot \sqrt{t}$	Αθροιστική ποσότητα % της ουσίας που απελευθερώνεται συναρτήσει της τετραγωνικής ρίζας του χρόνου
Korsmeyer – Peppas	$\frac{M_t}{M_\infty} = K t^n$	Λογάριθμος του αθροιστικού κλάσματος του φαρμάκου % που απελευθερώνεται συναρτήσει του λογαρίθμου του χρόνου

1.6.3.5. Προφίλ Απελευθέρωσης

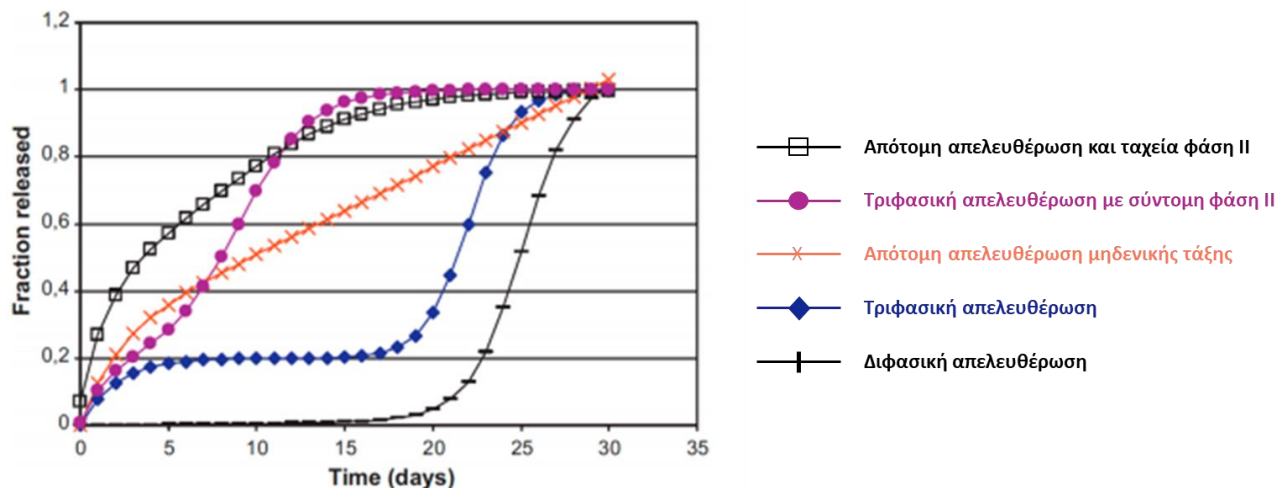
Σε συστήματα ελεγχόμενης απελευθέρωσης της δραστικής ουσίας, κατά την έναρξη της διαδικασίας απελευθέρωσης παρατηρείται ταχεία απελευθέρωση της δραστικής ουσίας για σύντομο χρονικό διάστημα, ακολουθούμενη από ένα σταθερό προφίλ απελευθέρωσης. Το φαινόμενο της αρχικής ταχείας απελευθέρωσης ονομάζεται «burst effect» ενώ το εν συνεχεία σταθερό προφίλ καλείται «plateau». Η ένταση του burst effect εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως: το μοριακό βάρος της δραστικής ουσίας, τη μέθοδο εγκλεισμού, την ποσότητα δραστικής ουσίας που είναι ασθενώς δεσμευμένη στον φορέα αλλά και το περιβάλλον. Αν και υπό ορισμένες συνθήκες μια αρχική απότομη απελευθέρωση της δραστικής ουσίας μπορεί να είναι επιθυμητή, το burst effect είναι μια απρόβλεπτη διαδικασία με ανεξέλεγκτη διάρκεια. Ως εκ τούτου είναι επιθυμητή η μείωση του burst effect, ώστε να αποφεύγονται πιθανές παρενέργειες λόγω μεγάλης δόσης δραστικής ουσίας.^[43]



Εικόνα 26. Γραφική αναπαράσταση του Burst Effect^[43]

Το προφίλ απελευθέρωσης ενός φαρμάκου μπορεί να αποτυπωθεί και πιο σύνθετα με μια σιγμοειδή καμπύλη η οποία διακρίνεται σε τρεις φάσεις: τη φάση πρώτης απελευθέρωσης (early release), τη φάση υστέρησης (lag phase) και τη φάση κύριας απελευθέρωσης (main release). Ειδικότερα, κατά την πρόωρη απελευθέρωση η ουσία που βρίσκεται στην εξωτερική επιφάνεια απελευθερώνεται, ενώ κατά την φάση υστέρησης παρατηρείται η διαλυτοποίηση της δραστικής ουσίας. Τέλος, στην φάση της κύριας απελευθέρωσης η εγκλεισμένη δραστική ουσία απελευθερώνεται σταδιακά.

Οι πιθανές καμπύλες για την αποτύπωση του προφίλ απελευθέρωσης ενός φαρμάκου συνοψίζονται στο ακόλουθο διάγραμμα:^[43]



Εικόνα 27. Προφίλ απελευθέρωσης φαρμάκων ^[43]

1.6.4. Αλληλεπίδραση με το DNA

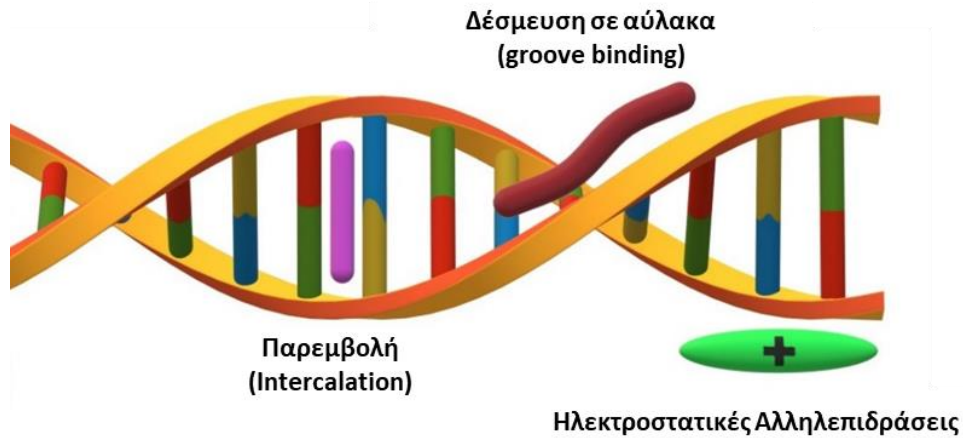
Πολλά φάρμακα που βρίσκονται υπό ανάπτυξη ή έχουν ήδη περάσει στο στάδιο των κλινικών δοκιμών, έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με το DNA με αποτέλεσμα τη ρύθμιση κυτταρικών λειτουργιών, την τροποποίηση της μεταγραφής (γονιδιακή έκφραση και πρωτεϊνοσύνθεση) ή ακόμα και την παρέμβαση στην αντιγραφή του DNA. Οι δραστικές ουσίες που έχουν αυτή τη δυνατότητα καλούνται «προσδέματα» (ligand molecules) και μπορούν να τροποποιήσουν τεχνητά ή να αναστείλουν τη λειτουργία του DNA, γεγονός ιδιαίτερα χρήσιμο όταν απαιτείται η θεραπεία ή ο έλεγχος μιας ασθένειας (π.χ. καρκίνος). Ωστόσο, δεν υπάρχουν ακόμα πολλά δεδομένα για τους μηχανισμούς με τους οποίους οι φαρμακευτικές αυτές ουσίες αλληλεπιδρούν με το DNA.

Με βάση έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί, υπάρχουν τρεις διαφορετικοί τρόποι με τους οποίους οι δραστικές ουσίες αλληλεπιδρούν με το DNA:

- Αλληλεπίδραση μέσω ελέγχου μεταγραφικών παραγόντων και πολυμερασών
- Αλληλεπίδραση μέσω πρόσδεσης RNA στη διπλή έλικα του DNA με αποτέλεσμα το σχηματισμό υβριδίων DNA-RNA τριπλής έλικας
- Αλληλεπίδραση μέσω απευθείας δέσμευσης μορίων – προσδεμάτων στη διπλή έλικα του DNA

Ειδικότερα για την τρίτη περίπτωση αλληλεπίδρασης, υπάρχουν τρεις γνωστοί μηχανισμοί με τους οποίους οι δραστικές ενώσεις προσδέονται στο DNA. Οι μηχανισμοί αυτοί είναι:

- Ανάπτυξη ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ μορίου και DNA (δεσμοί υδρογόνου, δυνάμεις Van der Waals)
- Παρεμβολή (intercalation) του μορίου μεταξύ ζευγών αζωτούχων βάσεων του DNA
- Δέσμευση του μορίου στη μικρή ή στη μεγάλη αύλακα του DNA (minor/major groove binding) ^[44]



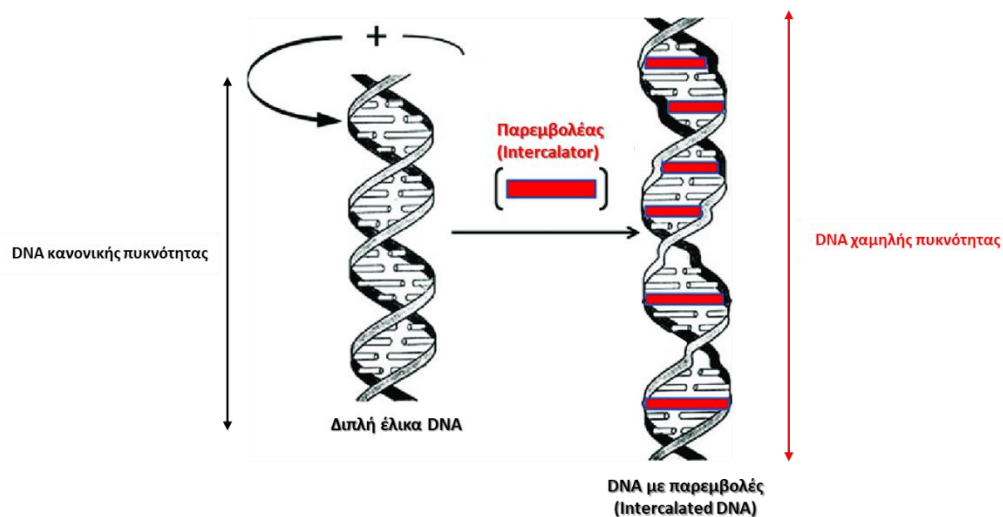
Εικόνα 28. Είδη αλληλεπιδράσεων μορίων - DNA

1.6.4.1. Ηλεκτροστατικές Αλληλεπιδράσεις

Ορισμένα προσδέματα έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις «στοίβαξης» (stacking interactions) με τις φωσφορικές ομάδες στο άκρο του DNA. Σε αυτό το σημείο η έλικα του DNA έχει αρνητικό φορτίο, ενώ τα προσδέματα είναι συνήθως σύμπλοκα μετάλλων και θετικά φορτισμένων ιόντων. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία συσσωματωμάτων, καθώς μέσω της πρόσδεσης στο DNA μειώνονται οι απωστικές δυνάμεις μεταξύ των ιόντων του συμπλόκου.^[44]

1.6.4.2. Παρεμβολή (Intercalation)

Ορισμένα μόρια έχουν την ικανότητα να συσσωρεύονται κάθετα στο σκελετό του DNA χωρίς να σχηματίζουν ομοιοπολικούς δεσμούς και χωρίς να διασπών τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των βάσεων του DNA. Οι ενώσεις αυτές είναι κυρίως επίπεδες ενώσεις, συνδέονται με το DNA μέσω επικάλυψης των π-ηλεκτρονίων και δημιουργούν ένα σταθερό σύμπλοκο σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου και αναπτύσσοντας δυνάμεις Van der Waals.



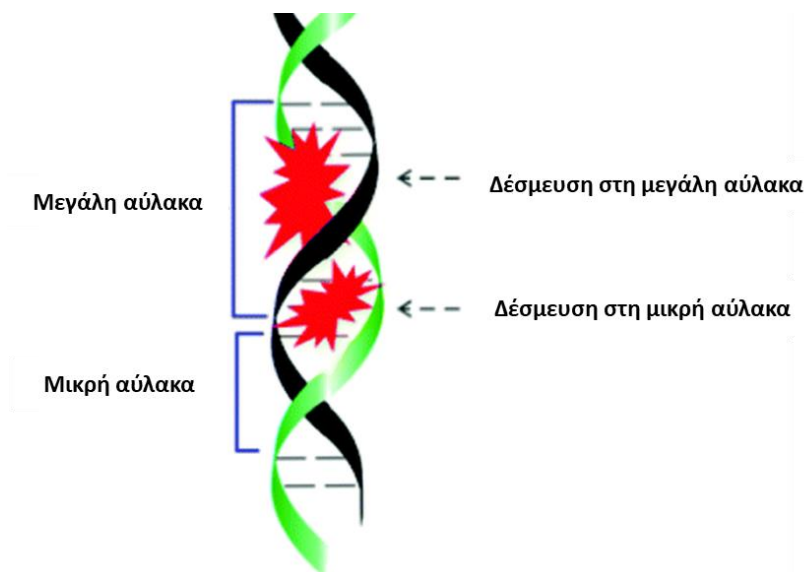
Σχήμα 3. Παρεμβολή (intercalation) στο DNA

Οι ενώσεις – παρεμβολείς DNA (DNA intercalators) προκαλούν δομικές αλλαγές στο DNA. Πιο συγκεκριμένα, σταθεροποιούν, επιμηκύνουν και ενισχύουν τη διπλή έλικα του DNA και συγχρόνως την ξετυλίγουν ούτως ώστε να διευκολυνθεί η παρεμβολή ανάμεσα στα ζεύγη των βάσεων του DNA. Οι παρεμβολείς χρησιμοποιούνται στη χημειοθεραπεία καθώς συμβάλλουν στην αναστολή της αντιγραφής του DNA των ταχέως αναπτυσσόμενων καρκινικών κυττάρων. Άλλες συνέπειες που προκαλούν είναι η αναστολή της μεταγραφής και της παραγωγής πρωτεϊνών. ^[44]

1.6.4.3. Δέσμευση στη μικρή ή στη μεγάλη αύλακα (minor/major groove binding)

Ορισμένες ενώσεις έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με την μικρή ή τη μεγάλη αύλακα του DNA μέσω αλληλεπιδράσεων Van der Waals και δεσμών υδρογόνου. Η αύλακα με την οποία θα αλληλεπιδράσει ένα μόριο εξαρτάται κυρίως από το μέγεθός του. Οι δραστικές ενώσεις που προσδένονται στη μικρή αύλακα είναι συνήθως μικρές ενώσεις καμπύλου σχήματος, ενώ με τη μεγάλη αύλακα αλληλεπιδρούν ενώσεις μεγαλύτερου μοριακού βάρους. Η πρόσδεση στη μικρή αύλακα εκ πρώτης όψεως θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως μη ελκυστική καθώς σε αυτές τις θέσεις το DNA περιέχει λιγότερες πληροφορίες, όμως οι ενώσεις με αυτή την ιδιότητά παρουσιάζουν αρκετά πλεονεκτήματα, όπως αντικαρκινικές και αντιικές ιδιότητες.

Τα μόρια που δεσμεύονται στις αύλακες του DNA συχνά περιλαμβάνουν αρωματικούς δακτυλίους που επιτρέπουν την ελεύθερη κίνηση και στρέψη, και δεσμεύονται κυρίως σε περιοχές πλούσιες σε αδενίνη–θυμίνη. Το γεγονός αυτό οφείλεται πιθανώς στις καλύτερες αλληλεπιδράσεις van der Waals μεταξύ του προσδέματος και της αύλακας σε αυτές τις περιοχές, δεδομένου ότι οι περιοχές A–T είναι στενότερες από τις περιοχές G–C καθώς επίσης και λόγω της καλής υδρόφοβης αλληλεπίδρασης μεταξύ του αρωματικού δακτυλίου της ένωσης και του δεύτερου ατόμου άνθρακα της αδενίνης. ^[44]



Εικόνα 29. Δέσμευση μορίων στη μικρή ή στη μεγάλη αύλακα του DNA

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η παρασκευή και η μελέτη συμπλόκων εγκλεισμού κουρκουμίνης (Cur) σε β-κυκλοδεξτρίνη (β-CD) και στις τροποποιημένες 2-υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (HP-β-CD) και μέθυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (Me-β-CD) και η επικάλυψη των παραγόμενων συμπλόκων (Cur-β-CD) με χιτοζάνη (CS) με στόχο τον σχηματισμό καινοτόμων νανοσωματιδίων (CS-Cur-β-CD) παρατεταμένης αποδέσμευσης.

Τα νανοσυστήματα αυτά παράγονται με σκοπό τη βελτίωση των ιδιοτήτων της κουρκουμίνης, συγκεκριμένα την αύξηση της υδατοδιαλυτότητας, της βιοδιαθεσιμότητας και της σταθερότητάς της. Η κουρκουμίνη επιλέγεται ως δραστική ένωση λόγω της πληθώρας των ευεργετικών ιδιοτήτων που προσφέρει, όπως αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντιμικροβιακή και αντικαρκινική δράση.

Για την παρασκευή των συμπλόκων εγκλεισμού χρησιμοποιούνται δύο μέθοδοι: η μέθοδος λειοτρίβησης (kneading method) και ο συνδυασμός των μεθόδων εξάτμισης διαλύτη και λυοφιλοποίησης (solvent evaporation & freeze drying method). Για την παρασκευή των επικαλυμμένων συμπλόκων με χιτοζάνη χρησιμοποιείται η μέθοδος της ιονοτροπικής πηκτωμάτωσης (ionic gelation).

Πραγματοποιείται πλήρης χαρακτηρισμός των παραγόμενων συμπλόκων και νανοσωματιδίων. Για κάθε σύμπλοκο προσδιορίζεται η απόδοση εγκλεισμού και η απόδοση διεργασίας μέσω φασματοφωτομετρίας υπεριώδους-ορατού (UV-Vis). Το μέγεθος των σωματιδίων, ο δείκτης πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό προσδιορίζονται με χρήση της μεθόδου Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS). Ο δομικός χαρακτηρισμός πραγματοποιείται με τις μεθόδους Φασματομετρίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (¹H NMR) και Φασματομετρίας Υπερύθρου (FT-IR).

Επιπλέον, τόσο για τα σύμπλοκα εγκλεισμού όσο και για τα νανοσωματίδια πραγματοποιείται μελέτη του προφίλ απελευθέρωσης σε συνθήκες pH=7.4 και θερμοκρασίας 37°C. Στη συνέχεια γίνεται κινητική μοντελοποίηση ώστε να διαπιστωθεί σε ποιο μοντέλο από τα: Zero Order, First Order, Higuchi ή Korsmeyer – Peppas προσαρμόζονται καλύτερα τα δεδομένα.

Καταληκτικά, μελετάται η αλληλεπίδραση των συμπλόκων εγκλεισμού με το DNA *in silico* αλλά και πειραματικά.

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1. Όργανα και Συσκευές

3.1.1. Δυναμική Σκέδαση φωτός (DLS)

Το όργανο Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS) ονομάζεται Zetasizer Nano ZS. Τα δείγματα εισέρχονται σε ειδική κυψελίδα με προσοχή ώστε να μην υπάρχουν φυσαλίδες και να ακουμπούν σωστά τα ηλεκτρόδια. Ως έξοδο δίνει μέτρηση για το μέγεθος, τον δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό τα οποία μετράει περισσότερες από μία φορές για λόγους επαλήθευσης.

3.1.2. Φασματομετρία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (^1H NMR)

Για το χαρακτηρισμό των ενώσεων, τον έλεγχο της καθαρότητάς τους και τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ φιλοξενούμενου μορίου (κουρκουμίνη) και του μορίου ξενιστή (κυκλοδεξτρίνες) στα σύμπλοκα εγκλεισμού, χρησιμοποιείται η μέθοδος Φασματομετρίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (^1H NMR). Τα φάσματα ^1H NMR καταγράφονται με τα όργανα Varian V300MHz και V600MHz του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών. Ως διαλύτης χρησιμοποιείται δευτεριωμένο νερό (D_2O), το φάσμα αποδίδει τις χημικές μετατοπίσεις σε ppm, τις σταθερές σύζευξης (J) σε Hz, ενώ η πολλαπλότητα των σημάτων στα φάσματα ^1H NMR αναφέρεται ως: s (singlet, απλό), d (doublet, διπλό), t (triplet, τριπλό), q (quartet, τετραπλό), m (multiplet, πολλαπλό), br (broad, ευρύ), dd (doublet of doublets, διπλή διπλών), tt (triplet of triplets, τριπλή τριπλών) και td (triplet of doublets, τριπλή διπλών).

3.1.3. Φασματομετρία Υπερύθρου (FT-IR)

Η διάταξη που χρησιμοποιείται είναι η FT-IR 4200 Jasco του Εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας. Η υπό μελέτη ένωση αναμειγνύεται με βρωμιούχο κάλιο (KBr) σε αναλογία περίπου 1:100 για την παρασκευή δείγματος με την μορφή δισκίου (παλέτας). Στη συνέχεια λαμβάνεται φάσμα κυματαριθμών (cm^{-1}) μεταξύ 4000 cm^{-1} και 400 cm^{-1} συναρτήσει της αλληλεπίδρασης της ένωσης με την υπέρυθη ακτινοβολία, το οποίο χρησιμοποιείται για το χαρακτηρισμό των ενώσεων, τον έλεγχο της καθαρότητάς τους και τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ φιλοξενούμενου μορίου (κουρκουμίνη) και του μορίου ξενιστή (κυκλοδεξτρίνες) στα σύμπλοκα εγκλεισμού.

3.1.4. Φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis)

Η διάταξη που χρησιμοποιείται είναι η UV-Vis V770 Jasco του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται εκτενώς στη συγκεκριμένη εργασία για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων των δειγμάτων. Στο UV-Vis η ακτινοβολία απορροφάται μεταξύ 190-800nm, από τα μόρια της διαλυμένης ουσίας που έχουν υποστεί ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις. Δεν απορροφούν όλα τα μόρια στα συγκεκριμένα μήκη κύματος, παρά μόνο αυτά που έχουν χρωμοφόρες ομάδες, δηλαδή ακόρεστες ομάδες και μη δεσμικά ζεύγη ηλεκτρονίων. Για τη συσχέτιση απορρόφησης και συγκέντρωσης κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς. Η καμπύλη αναφοράς είναι απαραίτητη για κάθε ουσία που μελετάται.

3.1.5. Συμπληρωματικές Συσκευές

Επιπλέον συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 4. Όργανα και Συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν

Όργανο/Συσκευή	Μοντέλο	Κατασκευαστής
Ζυγός ακριβείας (μέχρι 210g)	ADB 200-4	Kern
Ζυγός ακριβείας (μέχρι 2g)	M2P	Satorius
Συσκευή Υπερήχων	Vibra-Cell VCX 750	Sonics and Materials Inc
Λουτρό υπερήχων	WUC-A02H	Wisd
Πεχάμετρο	744	Metrohm
Αναδευτήρας Vortex	V05	lbx instruments
Επωαστήρας (Incubator)	IOX400 XX2 C	Gallenkamp
Λυοφιλοποιητής	46/1	Lablyo Mini
Φυγόκεντρος	LYNX 6000	Sorvall
Μαγνητικός Αναδευτήρας	HO1	lbx instruments

3.2. Αντιδραστήρια

Για την παραγωγή και τη μελέτη των συμπλόκων εγκλεισμού και των επικαλυμμένων νανοσωματιδίων χρησιμοποιήθηκαν:

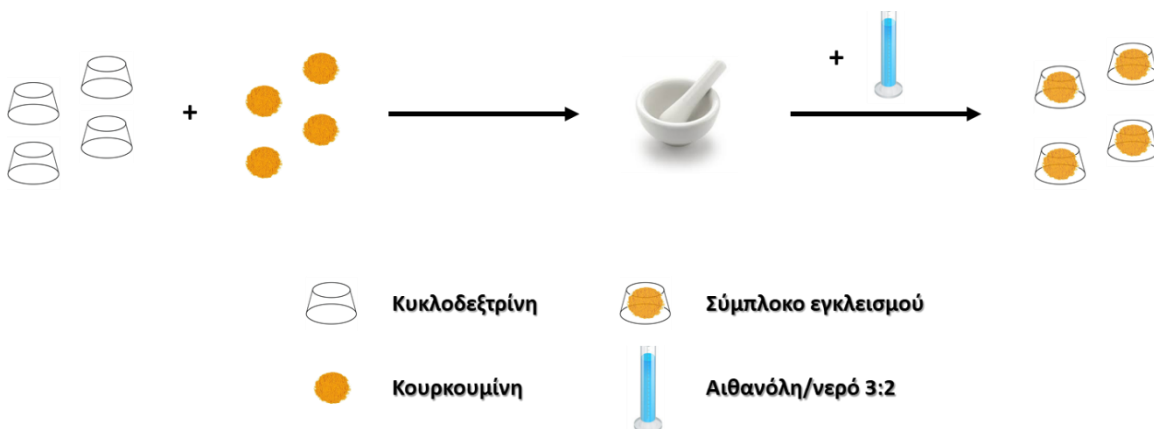
Πίνακας 5. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν

Αντιδραστήριο	Προμηθευτής
Κουρκουμίνη <i>[1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione]</i>	Fluorochem
β-κυκλοδεξτρίνη <i>(β-CD)</i>	Glentham Life Sciences
2-υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη <i>(HP-β-CD)</i>	Acros Organics
Μέθυλο-β-κυκλοδεξτρίνη <i>(Me-β-CD)</i>	Glentham Life Sciences
Χιτοζάνη <i>(ultra-low molecular weight chitosan)</i>	Glentham Life Sciences
DNA <i>(deoxyribonucleic acid sodium salt)</i>	Alfa Aesar
Τρομεθαμίνη <i>(Tris – C₄H₁₁NO₃)</i>	Fisher Bioreagents
Αιθανόλη	Acros Organics
Αιθανικό οξύ <i>(Acetic acid)</i>	Carlo Erba Reagents
Διμεθυλοσουλφοξείδιο <i>(DMSO)</i>	Fischer Chemical
Όξινο φωσφορικό κάλιο <i>(K₂HPO₄)</i>	Penta
Δισόξινο φωσφορικό κάλιο <i>(KH₂PO₄)</i>	Penta
Τριπολυφωσφορικό νάτριο <i>(TPP)</i>	Acros Organics

3.3. Μέθοδοι σχηματισμού συμπλόκων εγκλεισμού

3.3.1. Παρασκευή συμπλόκων εγκλεισμού με λειοτρίβηση (Kneading Method)

Για τη συγκεκριμένη μέθοδο, τοποθετούνται σε ιγδίο η κουρκουμίνη και η εκάστοτε κυκλοδεξτρίνη σε αναλογία 1:1. Προστίθενται μερικές σταγόνες μίγματος αιθανόλης/νερού αναλογίας 3:2 ώστε να δημιουργηθεί μια πάστα της κουρκουμίνης με την κυκλοδεξτρίνη. Πραγματοποιείται λειοτρίβηση μέχρι να απομακρυνθεί η περισσότερη υγρασία από το μίγμα και στη συνέχεια τα παραγόμενα σύμπλοκα εγκλεισμού μεταφέρονται σε αντλία κενού. Τα δείγματα ζυγίζονται ανά τακτά χρονικά διαστήματα μέχρι να μην παρατηρείται διαφορά μάζας μεταξύ διαδοχικών ζυγίσεων, γεγονός που συνεπάγεται την πλήρη απομάκρυνση της υγρασίας. Τα τελικά δείγματα φυλάσσονται σε ξηραντήρα.



Σχήμα 4. Πειραματική διαδικασία παραγωγής συμπλόκων εγκλεισμού με τη μέθοδο Kneading

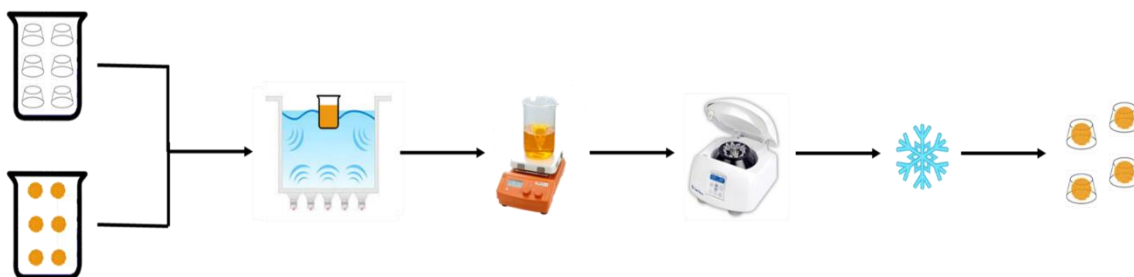
Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται η αναλογία και οι ποσότητες των ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή των συμπλόκων εγκλεισμού με τη μέθοδο kneading:

Πίνακας 6. Αναλογίες και ποσότητες κουρκουμίνης και κυκλοδεξτρινών που χρησιμοποιήθηκαν για παραγωγή συμπλόκων εγκλεισμού με τη μέθοδο Kneading

Σύμπλοκο εγκλεισμού	Αναλογία κυκλοδεξτρίνης: ένωσης (mol)	Ποσότητα κυκλοδεξτρίνης (mg)	Ποσότητα ένωσης (mg)
Cur-β-CD	1:1	500	162.9
Cur-HP-β-CD	1:1	500	156.9
Cur-Me-β-CD	1:1	500	141.3

3.3.2. Παρασκευή συμπλόκων εγκλεισμού μέσω συνδυασμού μεθόδων εξάτμισης διαλύτη & λυοφιλοποίησης (solvent evaporation & freeze drying method)

Στη συγκεκριμένη μέθοδο, παρασκευάζονται δύο διαλύματα: το πρώτο περιέχει κατάλληλη ποσότητα κυκλοδεξτρίνης, διαλυμένη σε 20ml νερού και το δεύτερο περιέχει κατάλληλη ποσότητα κουρκουμίνης διαλυμένη σε 1ml αιθανόλης. Οι ποσότητες επιλέγονται έτσι ώστε να επιτυγχάνεται αναλογία mol 1:1. Το διάλυμα της κουρκουμίνης προστίθεται στο διάλυμα της κυκλοδεξτρίνης και το μίγμα τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων για πέντε λεπτά. Στη συνέχεια αφήνεται για ανάδευση τέσσερις ώρες και έπειτα φυγοκεντρείται στις 4000rpm για 15 λεπτά στους 4°C. Καταληκτικά, το δείγμα τοποθετείται στον λυοφιλοποιητή. Τα σύμπλοκα εγκλεισμού λαμβάνονται υπό μορφή πούδρας.



Σχήμα 5. Πειραματική διαδικασία παραγωγής συμπλόκων εγκλεισμού μέσω εξάτμισης διαλύτη & λυοφιλοποίησης

Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται η αναλογία και οι ποσότητες των ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή των συμπλόκων εγκλεισμού με την παραπάνω μέθοδο:

Πίνακας 7. Αναλογίες και ποσότητες κουρκουμίνης και κυκλοδεξτρινών που χρησιμοποιήθηκαν για παραγωγή συμπλόκων εγκλεισμού με το συνδυασμό μεθόδων Solvent evaporation & Freeze drying

Σύμπλοκο εγκλεισμού	Αναλογία κυκλοδεξτρίνης: ένωσης (mol)	Ποσότητα κυκλοδεξτρίνης (mg)	Ποσότητα ένωσης (mg)
Cur-β-CD	1:1	200	64.9
Cur-HP-β-CD	1:1	200	62.4
Cur-Me-β-CD	1:1	200	56.5

3.4. Ιονοτροπική Πηκτωμάτωση (Ionic Gelation Method) για τον σχηματισμό επικαλυμμένων νανοσωματιδίων

Για την επικάλυψη των συμπλόκων εγκλεισμού με χιτοζάνη, χρησιμοποιείται η μέθοδος της ιονοτροπικής πηκτωμάτωσης. Πιο συγκεκριμένα παρασκευάζονται 3 διαλύματα:

- Ένα διάλυμα 100ml (εκ των οποίων 98ml υπερκάρθαρo νερό και 2ml αιθανικό οξύ) στο οποίο διαλύονται 300mg χιτοζάνη
- Ένα διάλυμα 75ml υπερκάρθαρo νερού στο οποίο διαλύονται 75mg Τριπολυφωσφορικού νατρίου (TPP)
- Ένα διάλυμα μικρής ποσότητας νερού στο οποίο διασπείρονται 150mg του εκάστοτε συμπλόκου εγκλεισμού

Το διάλυμα του συμπλόκου προστίθεται στο διάλυμα χιτοζάνης και στη συνέχεια το διάλυμα TPP προστίθεται με αργό ρυθμό στο μίγμα. Το τελικό μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση για μία ώρα και κατόπιν οδηγείται στον λυοφιλοποιητή. Το προϊόν που παραλαμβάνεται φυγοκεντρείται στις 28000rpm για 40 λεπτά στους 4°C προκειμένου να απομακρυνθεί το αιθανικό οξύ. Η διαδικασία φυγοκέντρησης επαναλαμβάνεται συνολικά 3 φορές. Τα υπερκείμενα υγρά συλλέγονται προκειμένου να προσδιορισθεί έμμεσα η νέα απόδοση εγκλεισμού. Τέλος, το δείγμα τοποθετείται και πάλι στον λυοφιλοποιητή. Τα επικαλυμμένα νανοσωματίδια παραλαμβάνονται υπό μορφή σκόνης.



Σχήμα 6. Πειραματική διαδικασία παραγωγής επικαλυμμένων νανοσωματιδίων μέσω ιονοτροπικής πηκτωμάτωσης

3.5. Χαρακτηρισμοί συμπλόκων εγκλεισμού – νανοσωματιδίων

3.5.1. Απόδοση διεργασίας

Η απόδοση διεργασίας μπορεί να υπολογισθεί από την ποσότητα των συμπλόκων που συλλέγονται στο πέρας κάθε μεθόδου σύνθεσης και την αρχική ποσότητα των συστατικών που χρησιμοποιούνται, σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\text{Απόδοση Διεργασίας} = \frac{\text{Ποσότητα συμπλόκων που συλλέγονται}}{\text{Αρχική ποσότητα συστατικών}} \cdot 100\% \quad (8)$$

3.5.2. Απόδοση Εγκλεισμού συμπλόκων

Για τον προσδιορισμό της απόδοσης εγκλεισμού χρησιμοποιείται η φασματομετρία υπεριώδους-ορατού. Αρχικά κατάλληλη ποσότητα του συμπλόκου εγκλεισμού διαλύεται σε αντίστοιχη ποσότητα αιθανόλης έτσι ώστε να προκύπτει διάλυμα συγκέντρωσης 1mg/ml (διαλύονται είτε 10mg σε 10ml είτε 20mg σε 20ml). Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση για τουλάχιστον 48 ώρες. Κατά τη διάρκεια της ανάδευσης το μίγμα βρίσκεται σε σκιερό μέρος, σκεπασμένο όσο καλύτερα γίνεται, καθώς η κουρκουμίνη είναι πολύ ευαίσθητη σε οξείδωση από το φως του ήλιου. Στη συνέχεια για να υπολογισθεί η ποσότητα της ένωσης που εγκλείστηκε στο σύμπλοκο, απομονώνεται μικρή ποσότητα από το μίγμα, αραιώνεται με αιθανόλη σε τελικό όγκο 3ml και το δείγμα μετρείται στο όργανο UV-Vis. Η αραιώση πραγματοποιείται έτσι ώστε να λαμβάνονται τιμές απορρόφησης μεταξύ 0.1-1.

Από την τιμή της απορρόφησης που προκύπτει και μέσω πρότυπης καμπύλης αναφοράς που έχει κατασκευασθεί, προσδιορίζεται η ποσότητα της ένωσης στο δείγμα και μέσω κατάλληλης αναγωγής, υπολογίζεται και η συνολική ποσότητα εγκλεισμένης κουρκουμίνης στο εκάστοτε σύμπλοκο. Η απόδοση εγκλεισμού προκύπτει από την εξίσωση:

$$\text{Απόδοση Εγκλεισμού} = \frac{\text{Ποσότητα κουρκουμίνης που εγκλείστηκε}}{\text{Αρχική ποσότητα κουρκουμίνης}} \cdot 100\% \quad (9)$$

3.5.3. Προσδιορισμός μεγέθους, δείκτη πολυδιασποράς και ζ-δυναμικού

Ο χαρακτηρισμός των συμπλόκων και των νανοσωματιδίων ως προς το μέγεθος, τον δείκτη πολυδιασποράς (PDI) και το ζ-δυναμικό πραγματοποιείται μέσω της μεθόδου Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS). Αρχικά σε ένα γυάλινο φιαλίδιο προστίθεται 1mg του εκάστοτε δείγματος (συμπλόκου ή νανοσωματιδίου) και 20ml υπερκάρου νερού και αφήνονται υπό μαγνητική ανάδευση για 48 ώρες. Για την επίτευξη καλύτερης και ομοιόμορφης διασποράς, πριν την εισαγωγή του δείγματος στο όργανο, το τελευταίο τοποθετείται σε συσκευή υπερήχων για 2 λεπτά ή σε αναδευτήρα τύπου Vortex. Ακολουθεί προσθήκη του δείγματος με χρήση σύριγγας σε κυψελίδα τύπου U μέχρι την πλήρη διαβροχή των ηλεκτροδίων της και χωρίς να δημιουργηθούν φυσαλίδες και έπειτα λαμβάνονται οι μετρήσεις. Για καθένα από τα μετρούμενα μεγέθη πραγματοποιούνται τρεις μετρήσεις και λαμβάνεται ο μέσος όρος αυτών ενώ πριν την έναρξη των μετρήσεων λαμβάνεται ένα αρχείο «τυποποιημένης διαδικασίας λειτουργίας» που περιέχει πληροφορίες για το δείγμα, την κυψελίδα και το πρωτόκολλο μέτρησης.

3.5.4. Ανάλυση συμπλόκων εγκλεισμού μέσω υπέρυθρης φασματομετρίας μετασχηματισμού Fourier (FT-IR)

Μέσω της χρήσης της φασματομετρίας υπέρυθρου είναι η δυνατή η επιβεβαίωση του σχηματισμού των συμπλόκων εγκλεισμού. Ειδικότερα, αρχικά λαμβάνονται τα φάσματα απορρόφησης FT-IR της β-κυκλοδεξτρίνης, της 2-υδροξυπρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνης και της μέθυλο-β-κυκλοδεξτρίνης καθώς επίσης και της κουρκουμίνης και έπειτα λαμβάνονται τα φάσματα των συμπλόκων εγκλεισμού. Στην συνέχεια αξιολογώντας τις διαφορές που υπάρχουν ανάμεσα στα φάσματα των πρότυπων ενώσεων και των συμπλόκων, λαμβάνονται πληροφορίες για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της κουρκουμίνης και της εκάστοτε κυκλοδεξτρίνης,

επιβεβαιώνοντας την επιτυχία του εγκλεισμού. Για την λήψη των φασμάτων πραγματοποιείται ανάμειξη των ουσιών με βρωμιούχο κάλιο (KBr) σε αναλογία περίπου 1:100 για την παρασκευή δείγματος με την μορφή δισκίου (παλέτας).

3.5.5. Μελέτη απελευθέρωσης

Προκειμένου να μελετηθεί το προφίλ απελευθέρωσης της κουρκουμίνης, αρχικά παρασκευάζεται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων ($K_2HPO_4 - KH_2PO_4$) με τιμή pH=7.4.

Σε φιαλίδια των 3ml προστίθενται 5mg συμπλόκου και 2ml ρυθμιστικού διαλύματος. Τα φιαλίδια τοποθετούνται σε επωαστήρα (incubator) απουσία φωτός με ανάδευση στις 100rpm και σταθερή θερμοκρασία 37°C που προσομοιάζει τη θερμοκρασία του ανθρώπινου σώματος. Η δειγματοληψία πραγματοποιείται σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα. Λόγω του γεγονότος ότι η κουρκουμίνη είναι ελάχιστα διαλυτή σε υδατικό περιβάλλον, πριν τη μέτρηση κάθε δείγματος προστίθεται στο φιαλίδιο 1ml DMSO στο οποίο η κουρκουμίνη είναι διαλυτή και πραγματοποιείται αμέσως δειγματοληψία μικρού όγκου, ώστε στο DMSO να διαλυθεί μόνο η κουρκουμίνη που έχει απελευθερωθεί από το εκάστοτε σύμπλοκο ή νανοσωματίδιο. Το δείγμα τοποθετείται στην κυψελίδα και αραιώνεται με μίγμα ρυθμιστικού διαλύματος:DMSO αναλογίας 2:1 σε τελικό όγκο 3ml.

Στη συνέχεια γίνεται προσδιορισμός της συγκέντρωσης της κουρκουμίνης στο δείγμα με φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) και με κατάλληλη αναγωγή υπολογίζεται η συνολική ποσότητα κουρκουμίνης που έχει απελευθερωθεί από κάθε φιαλίδιο για το κάθε χρονικό διάστημα. Με αυτά τα δεδομένα σχεδιάζονται τα διαγράμματα ποσοστιαίου ρυθμού απελευθέρωσης καθώς και τα διαγράμματα για τα κυριότερα κινητικά μοντέλα απελευθέρωσης και λαμβάνονται οι αντίστοιχες εξισώσεις.

3.5.6. Μελέτη αλληλεπίδρασης με το DNA

3.5.6.1. Μελέτη *in vitro*

Προκειμένου να μελετηθεί η αλληλεπίδραση με το DNA, αρχικά παρασκευάζονται τα εξής διαλύματα:

- Ρυθμιστικό διάλυμα τρομεθαμίνης (Tris-Buffer), για το οποίο ζυγίζονται 605.7mg Tris και διαλύονται σε 500ml υπερκάθαρου νερού. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στην τιμή 7.4 με τη χρήση σταγόνων HCl (10% v/v).
- Διάλυμα DNA (deoxyribonucleic acid sodium salt) συγκέντρωσης 0.01M, το οποίο παρασκευάζεται με διάλυση ινών φυσικού DNA από θύμο αδένος βοοειδούς (CT-DNA), 1mg/ml σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (10mM), το οποίο αναδεύεται για 24 ώρες υπό ψύξη (4°C).

Η συγκέντρωση του διαλύματος DNA ανά νουκλεοτίδιο υπολογίζεται με φασματομετρία απορρόφησης, από το πηλίκο της απορρόφησης του διαλύματος στα 260nm προς τον συντελεστή μοριακής απορρόφησης της κορυφής στα 260nm, που είναι $6600 M^{-1}cm^{-1}$. Ο λόγος της UV απορρόφησης στα 260:280nm είναι 1.8-1.9:1, γεγονός που υποδηλώνει ότι το DNA είναι ελεύθερο από πρωτεΐνες. Το διάλυμά μπορεί να παραμείνει στο ψυγείο το πολύ για 4 ημέρες και πριν την επαναχρησιμοποίησή του ελέγχεται με φάσμα ηλεκτρονικής απορρόφησης).

Στη συνέχεια παρασκευάζονται αραιά διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων DNA (από 0 έως 500μΜ) λαμβάνοντας κατάλληλες ποσότητες από το αρχικό διάλυμα DNA και αραιώνοντάς τες με ρυθμιστικό διάλυμα Tris σε τελικό όγκο 10ml.

Πριν από τη δοκιμή των συμπλόκων, ετοιμάζονται «blank» διαλύματα κουρκουμίνης και κυκλοδεξτρινών συγκέντρωσης 1mg/ml, προκειμένου να διερευνηθεί εάν οι πρότυπες ενώσεις αλληλεπιδρούν με το DNA. Για τα διαλύματα κυκλοδεξτρινών χρησιμοποιείται ως διαλύτης το Tris–buffer ενώ για την δυσδιάλυτη σε υδατικό περιβάλλον κουρκουμίνη, χρησιμοποιείται αιθανόλη. Κατάλληλη ποσότητα από τα διαλύματα αραιώνεται κάθε φορά με διάλυμα DNA σε τελικό όγκο 1ml, αφήνεται να επωαστεί για 5 λεπτά απουσία φωτός, με ανάδευση στις 100rpm και σταθερή θερμοκρασία 37°C και στη συνέχεια το δείγμα τοποθετείται στο όργανο UV–Vis.

Διατηρώντας σταθερή τη συγκέντρωση της εξεταζόμενης ένωσης και μεταβάλλοντας τη συγκέντρωση του CT-DNA, μελετώνται οι μεταβολές που λαμβάνουν χώρα στα φάσματά UV (200-400nm) διαλύματος της κάθε ένωσης με την προσθήκη αυξανόμενων ποσοτήτων του CT-DNA και καταγράφονται οι μεταβολές τόσο της απορρόφησης όσο και της τιμής του λ_{max} .

Οι παρατηρούμενες μεταβολές μπορούν να οδηγήσουν σε αξιόπιστα συμπεράσματα σχετικά με το είδος της αλληλεπίδρασης. Η σταθερά σύνδεσης K_b , της ένωσης με το CT-DNA προσδιορίζεται από το λόγο της τεταγμένης επί της αρχής προς την κλίση της ευθείας ελαχίστων τετραγώνων που προσδιορίζεται σε διαγράμματα του λόγου σε συνάρτηση με τη [DNA] με βάση την εξίσωση Benesi–Hildebrand:

$$\frac{1}{A_f - A_{obs}} = \frac{1}{A_f - A_{fc}} + \frac{K_b}{(A_f - A_{fc}) \cdot [DNA]} \quad (10)$$

όπου:

- K_b η σταθερά ισχύος σύνδεσης της ένωσης με το DNA
- A_f η απορρόφηση της ελεύθερης ένωσης
- A_{obs} η παρατηρούμενη απορρόφηση της δεσμευμένης ένωσης
- A_{fc} η απορρόφηση κορεσμού

Η ίδια διαδικασία με τα διαλύματα «blank» ακολουθείται και για τα σύμπλοκα εγκλεισμού, για τα οποία επίσης χρησιμοποιείται η αιθανόλη ως διαλύτης.

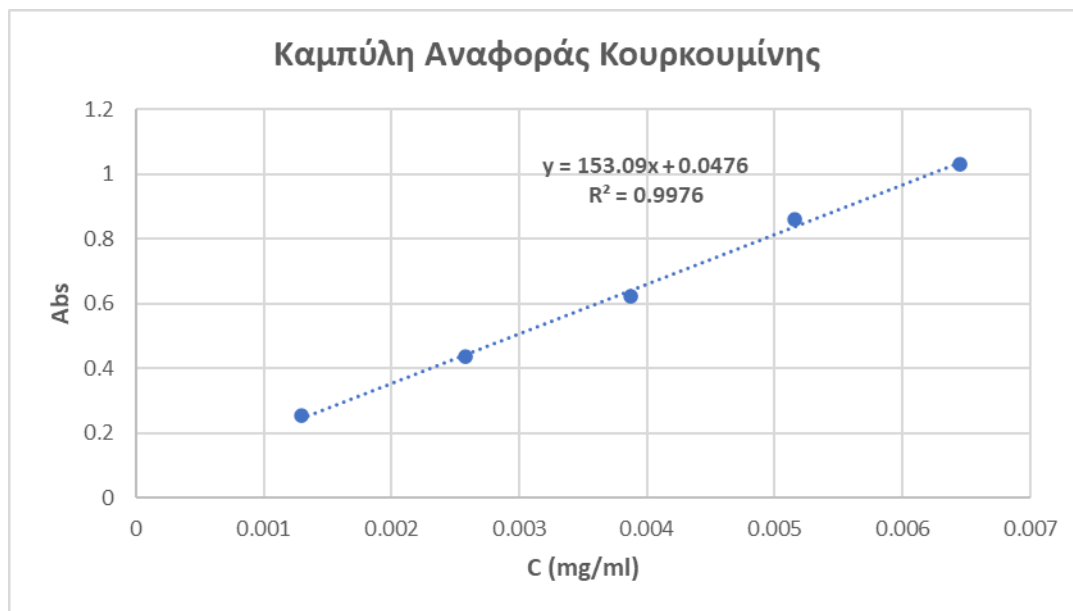
3.5.6.2. Μελέτη *in silico*

Για την υπολογιστική μελέτη αλληλεπίδρασης της κουρκουμίνης με το DNA, χρησιμοποιείται η κρυσταλλική δομή του DNA (PDB ID: 1bna) η οποία παραλαμβάνεται από το RSCB Protein Data Bank (PDB). Οι ενώσεις σχεδιάζονται με χρήση του προγράμματος HyperChem 7.0 software (version 7.0, Hypercube, Inc, Gainesville, FL, USA). Η βελτιστοποίηση των παραμέτρων σύνδεσης πραγματοποιείται μέσω του AutoDock Vina software (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA), εφαρμόζοντας εμπειρική λειτουργία ελεύθερης ενέργειας. Σημειώνεται ότι μέσω του AutoDock Tools προστίθενται μόνο πολικά υδρογόνα στο DNA. Τέλος, για την απεικόνιση των παραπάνω χρησιμοποιείται το λογισμικό PyMol. Το όνομα και ο αριθμός των νουκλεοτιδίων σχεδιάζονται σύμφωνα με το λογισμικό αυτό.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Καμπύλη Αναφοράς

Όλες οι αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν με φασματομετρία υπεριώδους-ορατού βασίζονται στην μέτρηση της απορρόφησης του εκάστοτε δείγματος και στη μετατροπή της σε συγκέντρωση. Ως εκ τούτου για την κourkouμίνη, ο οποία αποτέλεσε την υπό μελέτη ένωση, κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς. Πιο συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν διαλύματα κourkouμίνης γνωστών συγκεντρώσεων σε αιθανόλη και μετρήθηκε η απορρόφησή τους στα 423.8nm. Η καμπύλη αναφοράς που προέκυψε φαίνεται στο ακόλουθο διάγραμμα:



Διάγραμμα 1. Καμπύλη αναφοράς κourkouμίνης ($\lambda_{max}=423.8nm$)

Με βάση το παραπάνω διάγραμμα, η συγκέντρωση της κourkouμίνης μπορεί να υπολογισθεί από την απορρόφηση, σύμφωνα με την εξίσωση:

$$Abs = 153.09 \cdot C + 0.0476 \quad (11)$$

όπου:

- Abs η απορρόφηση στα 423.8nm
- C η συγκέντρωση της κourkouμίνης σε mg/ml

4.2. Αποδόσεις Διεργασίας

4.2.1. Αποδόσεις διεργασίας συμπλόκων εγκλεισμού

Οι αποδόσεις διεργασίας όπως υπολογίσθηκαν για τα σύμπλοκα εγκλεισμού, συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα. Η απόδοση υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση (8):

$$\text{Απόδοση Διεργασίας} = \frac{\text{Ποσότητα συμπλόκων που συλλέγονται}}{\text{Αρχική ποσότητα συστατικών}} \cdot 100\%$$

Πίνακας 8. Αποδόσεις διεργασίας συμπλόκων εγκλεισμού

Σύμπλοκο εγκλεισμού	Αναλογία κουρκουμίνης : CD	Μέθοδος σύνθεσης συμπλόκων	Απόδοση διεργασίας (%)
<i>Cur-β-CD</i>	1:1	Λειοτρίβηση (Kneading)	93
<i>Cur-HP-β-CD</i>	1:1	Λειοτρίβηση (Kneading)	88
<i>Cur-Me-β-CD</i>	1:1	Λειοτρίβηση (Kneading)	88
<i>Cur-β-CD</i>	1:1	Εξάτμιση διαλύτη & λυοφιλοποίηση	73
<i>Cur-HP-β-CD</i>	1:1	Εξάτμιση διαλύτη & λυοφιλοποίηση	75
<i>Cur-Me-β-CD</i>	1:1	Εξάτμιση διαλύτη & λυοφιλοποίηση	77

Είναι εμφανές ότι κύριο ρόλο στις αποδόσεις διεργασίας έχει η μέθοδος σχηματισμού των συμπλόκων που χρησιμοποιείται. Και για τις τρεις κυκλοδεξτρίνες που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή των συμπλόκων εγκλεισμού, η απόδοση διεργασίας είναι σημαντικά μεγαλύτερη με τη μέθοδο λειοτρίβησης (Kneading method) σε σύγκριση με το συνδυασμό των μεθόδων εξάτμισης διαλύτη και λυοφιλοποίησης (Solvent Evaporation & Freeze Drying method).

Επίσης συγκρίνοντας τις αποδόσεις των συμπλόκων που παρασκευάστηκαν με την ίδια μέθοδο αλλά με διαφορετικό φορέα, παρατηρείται ότι:

- Με τη μέθοδο Kneading, η β-CD παρουσιάζει μεγαλύτερη απόδοση σε σύγκριση με τις HP-β-CD και Me-β-CD.
- Με το συνδυασμό μεθόδων Solvent Evaporation & Freeze Drying δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στις αποδόσεις των παραγόμενων συμπλόκων.

Το γεγονός αυτό ενδεχομένως οφείλεται στην ευκολότερη μεταφορά των συμπλόκων Cur-β-CD μετά τη λειοτρίβηση, από το ιγδίο. Τα σύμπλοκα τις HP-β-CD είχαν την τάση να προσκολλώνται στο ιγδίο και να δυσχεραίνουν τη μεταφορά ολόκληρης της ποσότητας της, ενώ και η Me-β-CD παρουσίασε αντίστοιχη συμπεριφορά. Το πρόβλημα αυτό δεν παρουσιάστηκε με το συνδυασμό μεθόδων Solvent Evaporation & Freeze Drying, γεγονός που εξηγεί και τις μικρότερες αποκλίσεις στις αποδόσεις αυτής της μεθόδου.

4.2.2. Αποδόσεις διεργασίας νανοσωματιδίων

Οι αποδόσεις διεργασίας όπως υπολογίστηκαν για τα επικαλυμμένα νανοσωματίδια, συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 9. Αποδόσεις διεργασίας παραγωγής νανοσωματιδίων

Νανοσωματίδιο	Μέθοδος σύνθεσης	Απόδοση διεργασίας (%)
<i>CS-Cur-β-CD</i>	Ιονοτροπική Πηκτωμάτωση	25
<i>CS-Cur-HP-β-CD</i>	Ιονοτροπική Πηκτωμάτωση	36
<i>CS-Cur-Me-β-CD</i>	Ιονοτροπική Πηκτωμάτωση	26

Οι αποδόσεις διεργασίας των νανοσωματιδίων χιτοζάνης κρίνονται ικανοποιητικές, καθώς υπάρχει αναμενόμενη δυσκολία στη συλλογή των νανοσωματιδίων ακόμα και στις υψηλές στροφές φυγοκέντρησης λόγω του μικρού μεγέθους τους. Σημειώνεται ότι και στις τρεις περιπτώσεις, η φυγοκέντρηση πραγματοποιήθηκε μετά τη λυοφιλοποίηση, γεγονός που συνέβαλε σημαντικά στην απομάκρυνση του οξικού οξέος και οδήγησε σε ικανοποιητικές αποδόσεις διεργασίας.

4.3. Αποδόσεις Εγκλεισμού

4.3.1. Αποδόσεις εγκλεισμού συμπλόκων εγκλεισμού

Οι αποδόσεις εγκλεισμού, όπως υπολογίσθηκαν για τα σύμπλοκα εγκλεισμού, συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα. Η απόδοση εγκλεισμού υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση (9):

$$\text{Απόδοση Εγκλεισμού} = \frac{\text{Ποσότητα κουρκουμίνης που εγκλείσθηκε}}{\text{Αρχική ποσότητα κουρκουμίνης}} \cdot 100\%$$

Πίνακας 10. Αποδόσεις εγκλεισμού παραγόμενων συμπλόκων

Σύμπλοκο εγκλεισμού	Αναλογία κουρκουμίνης : CD	Μέθοδος σύνθεσης συμπλόκων	Απόδοση εγκλεισμού (%)
<i>Cur-β-CD</i>	1:1	Λειοτρίβηση (Kneading)	81
<i>Cur-HP-β-CD</i>	1:1	Λειοτρίβηση (Kneading)	73
<i>Cur-Me-β-CD</i>	1:1	Λειοτρίβηση (Kneading)	65
<i>Cur-β-CD</i>	1:1	Εξάτμιση διαλύτη & λυοφιλοποίηση	17

Cur-HP-β-CD	1:1	Εξάτμιση διαλύτη & λυοφιλοποίηση	6
Cur-Me-β-CD	1:1	Εξάτμιση διαλύτη & λυοφιλοποίηση	6

Όπως και στις αποδόσεις διεργασίας, έτσι και στις αποδόσεις εγκλεισμού είναι εμφανές ότι κύριο ρόλο έχει η μέθοδος σχηματισμού. Και για τις τρεις κυκλοδεξτρίνες που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή των συμπλόκων εγκλεισμού, η απόδοση εγκλεισμού είναι σημαντικά μεγαλύτερη με τη μέθοδο λειοτρίβησης (Kneading method) σε σύγκριση με το συνδυασμό των μεθόδων εξάτμισης διαλύτη και λυοφιλοποίησης (Solvent Evaporation & Freeze Drying method). Ειδικότερα στη δεύτερη μέθοδο, οι αποδόσεις εγκλεισμού είναι τόσο χαμηλές, που επιλέγεται να μην αναλυθούν περαιτέρω τα παραγόμενα σύμπλοκα εγκλεισμού.

Όσον αφορά τις αποδόσεις εγκλεισμού των συμπλόκων που παρασκευάστηκαν με την ίδια μέθοδο αλλά με διαφορετικό φορέα, παρατηρείται ότι και για τις δύο μεθόδους, η β-CD παρουσιάζει υψηλότερες αποδόσεις εγκλεισμού από τις τροποποιημένες HP-β-CD και Me-β-CD.

4.3.2. Αποδόσεις εγκλεισμού νανοσωματιδίων

Προκειμένου να προσδιορισθούν οι αποδόσεις εγκλεισμού στα επικαλυμμένα νανοσωματίδια, κατά την σύνθεση των νανοσωματιδίων με τη μέθοδο ιονοτροπικής πηκτωμάτωσης, μετά την πραγματοποίηση των φυγοκεντρήσεων τα υπερκείμενα υγρά συλλέχθηκαν ώστε να αναλυθούν με φασματομετρία UV-Vis και να ποσοτικοποιηθεί η κουρκουμίνη. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να προσδιορισθεί έμμεσα η απόδοση εγκλεισμού των νανοσωματιδίων. Σημειώνεται ότι στα υπερκείμενα υγρά προστέθηκε και αιθανόλη ώστε η κουρκουμίνη να είναι διαλυμένη και όχι διεσπαρμένη πριν από τη μέτρηση.

Στα υπερκείμενα υγρά που συλλέχθηκαν, δεν ανιχνεύτηκε ποσότητα κουρκουμίνης και ως εκ τούτου επιβεβαιώθηκε ότι δεν υπάρχει απώλεια της εγκλεισμένης κουρκουμίνης.

4.4. Μέγεθος, Δείκτης Πολυδιασποράς και ζ-Δυναμικό

Προκειμένου να επιτευχθεί ο πλήρης χαρακτηρισμός των συμπλόκων και των νανοσωματιδίων που σχηματίστηκαν, μετρήθηκε το μέγεθος, ο δείκτης πολυδιασποράς (PDI), καθώς και το ζ-δυναμικό μέσω της μεθόδου δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS). Για κάθε ένα από τα παραπάνω μεγέθη λαμβάνονται τρεις μετρήσεις για κάθε δείγμα.

4.4.1. Σύμπλοκα εγκλεισμού

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των μετρήσεων της ανάλυσης DLS για τα σύμπλοκα εγκλεισμού που παράχθηκαν με τη μέθοδο Kneading, καθώς και οι αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις:

Πίνακας 11. Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου, δείκτη πολυδιασποράς και ζ-δυναμικού συμπλόκων εγκλεισμού με τη μέθοδο Kneading

Σύμπλοκο εγκλεισμού	Μέση υδροδυναμική διάμετρος (nm)	Δείκτης Πολυδιασποράς (Pdl)	ζ-δυναμικό (mV)
Cur-β-CD	168.5 ± 10.7	0.334 ± 0.087	-8.2 ± 1.4
Cur-HP-β-CD	215.5 ± 6.2	0.317 ± 0.067	-19.7 ± 6.0
Cur-Me-β-CD	181.0 ± 10.5	0.313 ± 0.028	-9.5 ± 2.0

Όπως φαίνεται και από τα δεδομένα του Πίνακα 11, τα σύμπλοκα της κουρκουμίνης με τις κυκλοδεξτρίνες, δεν παρουσιάζουν σημαντικές αποκλίσεις όσον αφορά τα μεγέθη τους, καθώς τα τελευταία κυμαίνονται από 168.5nm έως 215.5nm. Τα διαγράμματα κατανομής μεγέθους των συμπλόκων παρουσιάζονται στις Εικόνες: **Εικόνα 49**, **Εικόνα 50** και **Εικόνα 51** στο Παράρτημα Εικόνων, στα οποία δεν παρατηρούνται διακυμάνσεις στα μεγέθη των συμπλόκων, με εξαίρεση ένα μικρό ποσοστό συμπλόκων με μέγεθος που ξεπερνά το 1μm στα διαγράμματα των Cur-β-CD και Cur-HP-β-CD. Ως εκ τούτου το μέγεθος των συμπλόκων θεωρείται ικανοποιητικό. Η ομοιόμορφη κατανομή μεγέθους επιβεβαιώνεται και από τον δείκτη πολυδιασποράς, οι τιμές του οποίου κυμαίνονται από 0.313 έως 0.334.

Το ζ-δυναμικό των συμπλόκων κυκλοδεξτρίνης παρουσιάζει αρνητική τιμή η οποία είναι αναμενόμενη και οφείλεται στην παρουσία υδροξυλίων στην επιφάνεια της β-κυκλοδεξτρίνης. Πιο συγκεκριμένα, οι τιμές του ζ-δυναμικού των συμπλόκων κυμαίνονται από -19.7mV έως -8.2mV. Γενικά όταν το ζ-δυναμικό είναι σχετικά χαμηλό, η έλξη μεταξύ των σωματιδίων υπερβαίνει την άπωση και ως εκ τούτου, τα σωματίδια τείνουν να δημιουργήσουν συσσωματώματα. Αντίθετα, οι διασπορές με ένα υψηλό ζ-δυναμικό είναι ηλεκτρικά σταθερές. Ειδικότερα τιμές του ζ-δυναμικού κοντά στο ±30mV υποδεικνύουν σταθερή διασπορά σωματιδίων χωρίς τάση προς συσσωμάτωση.

Με βάση τα παραπάνω, τα παραγόμενα σύμπλοκα Cur-HP-β-CD παρουσιάζουν υψηλότερες τιμές ζ-δυναμικού από τα σύμπλοκα Cur-β-CD και Cur-Me-β-CD και ως εκ τούτου υποδεικνύουν σταθερότερη διασπορά.

Τα διαγράμματα του ζ-δυναμικού των τριών συμπλόκων παρατίθενται στο Παράρτημα Εικόνων (**Εικόνα 52**, **Εικόνα 53** και **Εικόνα 54**).

4.4.2. Επικαλυμμένα νανοσωματίδια

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των μετρήσεων της ανάλυσης DLS για τα νανοσωματίδια χιτοζάνης που παράχθηκαν, καθώς και οι αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις:

Πίνακας 12. Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου, δείκτη πολυδιασποράς και ζ-δυναμικού νανοσωματιδίων

Νανοσωματίδιο	Μέση υδροδυναμική διάμετρος (nm)	Δείκτης Πολυδιασποράς (Pdl)	ζ-δυναμικό (mV)
CS-Cur-β-CD	824.1 ± 191.2	0.661 ± 0.098	24.0 ± 1.5
CS-Cur-HP-β-CD	550.9 ± 270.6	0.636 ± 0.102	28.4 ± 1.5
CS-Cur-Me-β-CD	858.8 ± 431.0	0.668 ± 0.129	36.5 ± 2.0

Από τον Πίνακα 12, φαίνεται ότι τα νανοσωματίδια παρουσιάζουν μια ευρεία κατανομή μεγέθους, καθώς το μέγεθός τους κυμαίνεται κατά μέσο όρο από 550.9nm έως 858.8nm. Ωστόσο, στα διαγράμματα κατανομής μεγέθους του κάθε είδους νανοσωματιδίων που παρουσιάζονται στις Εικόνες: **Εικόνα 55**, **Εικόνα 56** και **Εικόνα 57** στο Παράρτημα Εικόνων, δεν παρατηρούνται διακυμάνσεις στα μεγέθη των νανοσωματιδίων, με εξαίρεση ένα μικρό ποσοστό νανοσωματιδίων CS-Cur-HP-β-CD με μέγεθος περίπου 100nm.

Το αυξημένο μέγεθος των νανοσωματιδίων σε σύγκριση με τα σύμπλοκα εγκλεισμού είναι αναμενόμενο καθώς τα αρχικά σύμπλοκα εγκλεισμού επικαλύπτονται με χιτοζάνη, αποκτούν δηλαδή μια εξωτερική στοιβάδα χιτοζάνης που αυξάνει τη συνολική διάμετρο.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ως νανοσωματίδια ορίζονται τα σωματίδια που έχουν τουλάχιστον μία διάσταση που παίρνει τιμές από 1nm έως 100nm. Ο ορισμός αυτός θεωρείται «αυστηρός» καθώς υπάρχουν σωματίδια με διαστάσεις έως 1000nm που εμφανίζουν ιδιότητες νανοσωματιδίων. Επομένως, είναι σίγουρο ότι ένα μικρότερο μέγεθος των τελικών νανοσωματιδίων που παράχθηκαν θα ήταν προτιμητέο, ωστόσο το μέγεθος των νανοσωματιδίων και ιδιαίτερα των CS-Cur-HP-β-CD θεωρείται ικανοποιητικό.

Οι τιμές του δείκτη πολυδιασποράς κυμαίνονται από 0.636 έως 0.668. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, στη φαρμακευτική χημεία Συστήματα με τιμές Pdl υψηλότερες του 0.7 παρουσιάζουν μεγάλες διακυμάνσεις στο μέγεθος των νανοσωματιδίων και επομένως πολυδιασπορά. Τα συγκεκριμένα σύμπλοκα παρουσιάζουν τιμές Pdl κατά λίγο χαμηλότερες από το όριο πολυδιασποράς. Το γεγονός αυτό αποτελεί ταυτόχρονη εξήγηση και για την ομοιογένεια του μεγέθους των νανοσωματιδίων CS-Cur-β-CD και CS-Cur-Me-β-CD αλλά και για την ύπαρξη του μικρού ποσοστού νανοσωματιδίων με μέγεθος διαφορετικό από την πλειοψηφία των νανοσωματιδίων στο σύστημα CS-Cur-HP-β-CD. Παρότι οι τιμές του δείκτη πολυδιασποράς δεν είναι ιδανικές, λαμβάνοντας υπόψιν και την κατά κανόνα ομοιογένεια στο μέγεθος των νανοσωματιδίων, θεωρούνται ικανοποιητικές.

Το ζ-δυναμικό των επικαλυμμένων με χιτοζάνη νανοσωματιδίων, παρουσιάζει θετική τιμή η οποία είναι αναμενόμενη και οφείλεται στην περίσσεια θετικού φορτίου της χιτοζάνης μετά την αλληλεπίδραση με το TPP, το οποίο προέρχεται από τις θετικά φορτισμένες πρωτοταγείς αμινομάδες της. Τα αποτελέσματα του ζ-δυναμικού είναι αξιοσημείωτα. Πιο συγκεκριμένα οι τιμές του ζ-δυναμικού κυμαίνονται από +24.0mV έως +36.5mV. Η θετικές του τιμές αρχικά επιβεβαιώνουν ότι η επικάλυψη με χιτοζάνη και ο σχηματισμός των νανοσωματιδίων έχουν πραγματοποιηθεί με επιτυχία. Παράλληλα, οι υψηλές του τιμές υποδεικνύουν ότι τα παραγόμενα νανοσωματίδια και ιδιαίτερα τα CS-Cur-Me-β-CD, είναι σταθερά και δεν έχουν τη τάση να συσσωματωθούν κατά το χρονικό διάστημα της αποθήκευσής τους και κατά την μετέπειτα εφαρμογή τους σε προϊόντα.

Τα διαγράμματα του ζ-δυναμικού των τριών συμπλόκων παρατίθενται στο Παράρτημα Εικόνων (**Εικόνα 58**, **Εικόνα 59**, και **Εικόνα 60**).

4.5. Μελέτη δομής συμπλόκων

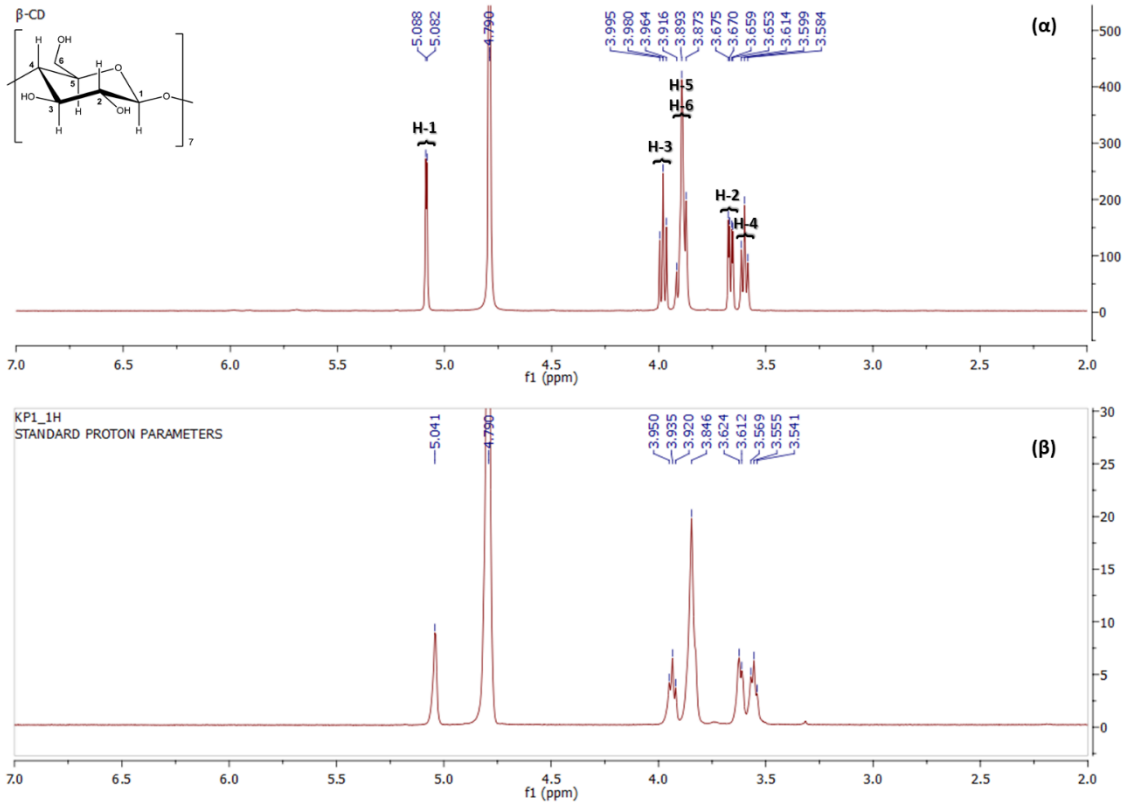
Η μελέτη της δομής των συμπλόκων εγκλεισμού πραγματοποιήθηκε με Φασματομετρία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού και Φασματομετρία Υπεριώδους Μετασχηματισμού Fourier.

4.5.1. Φασματομετρία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Για κάθε κυκλοδεξτρίνη που χρησιμοποιήθηκε, λήφθηκε ένα φάσμα στο οποίο εμφανίζονται ορισμένες κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια (H) της. Στη συνέχεια λήφθηκαν τα φάσματα των συμπλόκων εγκλεισμού κουρκουμίνης-κυκλοδεξτρίνης και αφού εντοπίστηκαν οι αντίστοιχες κορυφές, συγκρίθηκαν οι κορυφές των καθαρών κυκλοδεξτρινών και των συμπλόκων και μελετήθηκαν οι χημικές μετατοπίσεις των κορυφών των πρωτονίων. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατό να κατανοηθούν οι πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ φιλοξενούμενου μορίου (κουρκουμίνη) και του μορίου ξενιστή (κυκλοδεξτρίνες).

4.5.1.1. Φάσματα β-CD και Cur-β-CD

Τα συγκριτικά φάσματα ^1H NMR της β-CD και του συμπλόκου Cur-β-CD παρουσιάζονται στην ακόλουθη εικόνα:



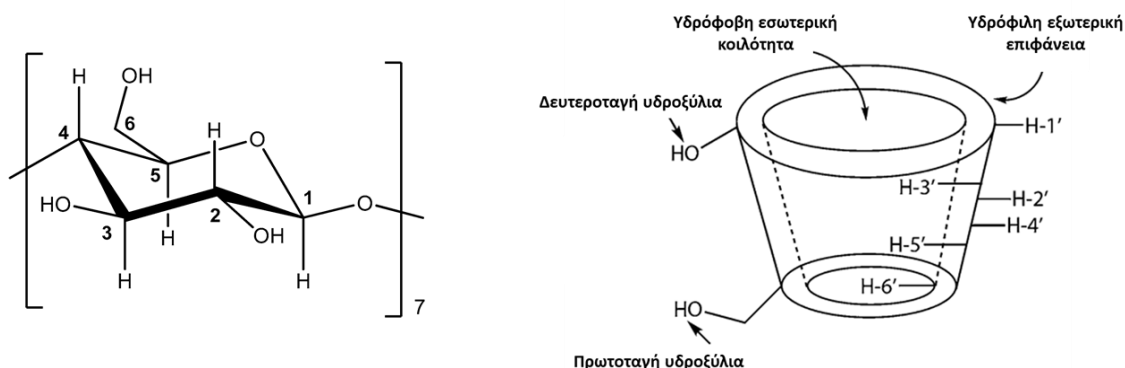
Εικόνα 30. Φάσματα ¹H NMR (600MHz, D₂O) της β-CD (α) και του συμπλόκου Cur-β-CD (β)

Με βάση τα φάσματα υπολογίζονται οι χημικές μετατοπίσεις της καθαρής β-CD και του συμπλόκου Cur-β-CD και στη συνέχεια πραγματοποιείται σύγκριση.

Πίνακας 13. Χημικές μετατοπίσεις στα φάσματα ¹H NMR (600MHz, D₂O) της β-CD και του συμπλόκου Cur-β-CD

Πρωτόνιο	Χημικές μετατοπίσεις (δ ₁) των πρωτονίων της β-CD (ppm)	Χημικές μετατοπίσεις (δ ₂) των πρωτονίων του Cur-β-CD (ppm)	Δδ = δ ₂ - δ ₁ (ppm)
H-1	5.085	5.041	-0.044
H-2	3.664	3.618	-0.046
H-3	3.980	3.935	-0.045
H-4	3.599	3.555	-0.044
H-5	3.893	3.846	-0.047
H-6	3.893	3.846	-0.047

Από τη συγκριτική μελέτη των μετατοπίσεων της καθαρής β -CD και του συμπλόκου CuI- β -CD, παρατηρούνται μεγάλες και παρόμοιες διαφορές μετατοπίσεων σε όλα τα πρωτόνια.



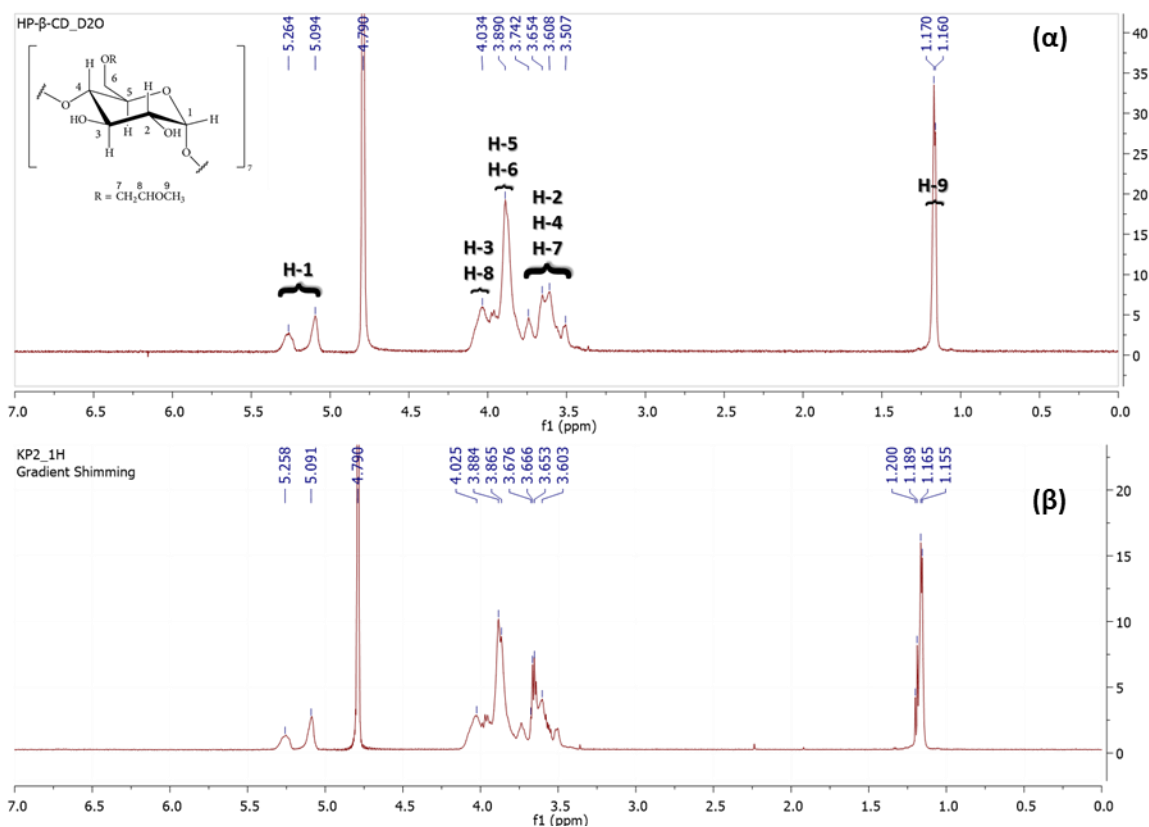
Εικόνα 31. Χημική δομή β -CD και αναπαράσταση της τρισδιάστατης δομής της β -CD

Όπως φαίνεται και στην παραπάνω εικόνα, τα πρωτόνια H-3 και H-5 βρίσκονται στο εσωτερικό της υδρόφοβης κοιλότητας της β -CD ενώ το H-6 βρίσκεται κοντά σε αυτή. Οι διαφορές στις χημικές μετατοπίσεις που παρατηρούνται στα συγκεκριμένα πρωτόνια είναι και οι πιο σημαντικές καθώς υποδεικνύουν την αλληλεπίδραση της κουρκουμίνης με την εσωτερική υδρόφοβη κοιλότητα της β -CD και επομένως τον επιτυχή σχηματισμό συμπλόκων εγκλεισμού.

Παράλληλα, όμοιες διαφορές μετατοπίσεων σημειώνονται και στα πρωτόνια H-1, H-2 και H-4 τα οποία βρίσκονται στο εξωτερικό της υδρόφιλης επιφάνειας της κυκλοδεξτρίνης. Κάτι τέτοιο ενδεχομένως συνεπάγεται ότι στα παραγόμενα σύμπλοκα εγκλεισμού, μόρια κουρκουμίνης έχουν προσκολληθεί και στην εξωτερική επιφάνεια της β -CD, γεγονός που αποτελεί και μία πολύ πιθανή εξήγηση για το χαρακτηριστικό πορτοκαλί χρώμα των συμπλόκων το οποίο προσδίδει η κουρκουμίνη.

4.5.1.2. Φάσματα HP-β-CD και Cur-HP-β-CD

Τα συγκριτικά φάσματα ^1H NMR της HP-β-CD και του συμπλόκου Cur-HP-β-CD παρουσιάζονται στην ακόλουθη εικόνα:



Εικόνα 32. Φάσματα ^1H NMR (600MHz, D₂O) της HP-β-CD (α) και του συμπλόκου Cur-HP-β-CD (β)

Με βάση τα φάσματα υπολογίζονται οι χημικές μετατοπίσεις της καθαρής HP-β-CD και του συμπλόκου Cur-HP-β-CD και στη συνέχεια πραγματοποιείται σύγκριση.

Πίνακας 14. Χημικές μετατοπίσεις στα φάσματα ^1H NMR (600MHz, D₂O) της HP-β-CD και του συμπλόκου Cur-HP-β-CD

Πρωτόνιο	Χημικές μετατοπίσεις (δ_1) των πρωτονίων της HP-β-CD (ppm)	Χημικές μετατοπίσεις (δ_2) των πρωτονίων του Cur-HP-β-CD (ppm)	$\Delta\delta = \delta_2 - \delta_1$ (ppm)
H-1	5.179	5.175	-0.005
H-2	3.628	3.650	0.022
H-3	4.034	4.025	-0.009

H-4	3.628	3.650	0.022
H-5	3.890	3.875	-0.015
H-6	3.890	3.875	-0.015
H-7	3.628	3.650	0.022
H-8	4.034	4.025	-0.009
H-9	1.165	1.177	0.012

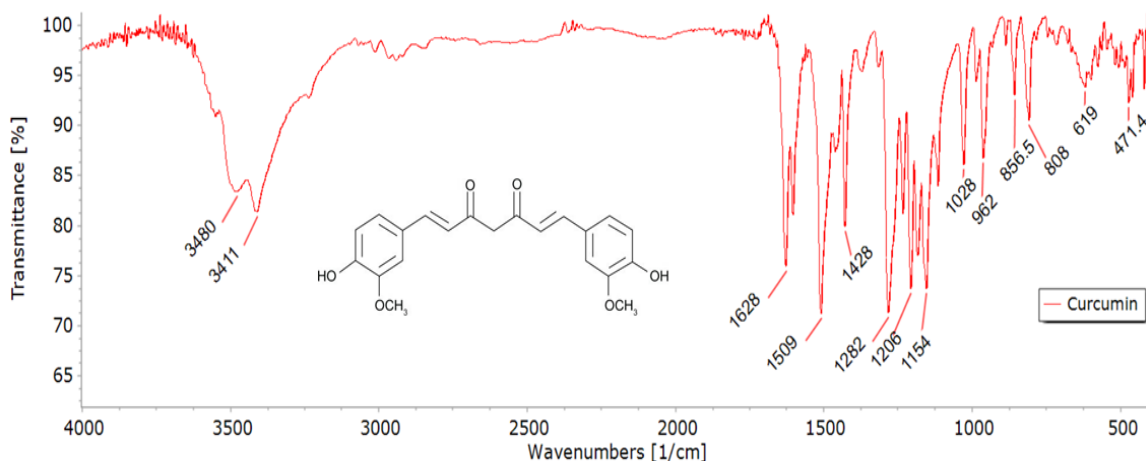
Από τη συγκριτική μελέτη των μετατοπίσεων της ελεύθερης HP-β-CD και του συμπλόκου Cur-HP-β-CD, παρατηρούνται σημαντικές διαφορές μετατοπίσεων στα πρωτόνια H-2, H-4 και H-7 καθώς επίσης και στα H-5 και H-6.

Όσον αφορά τα τελευταία, η τοποθεσία τους στην κυκλοδεξτρίνη είναι παρόμοια με τη β-CD, δηλαδή το ένα βρίσκεται στο εσωτερικό της υδρόφοβης κοιλότητας της κυκλοδεξτρίνης ενώ το άλλο βρίσκεται κοντά σε αυτή, στο στενό άνοιγμα του κόλουρου κώνου. Ως εκ τούτου η διαφορά στις τιμές των χημικών μετατοπίσεων υποδεικνύει την πιθανή εισαγωγή του μορίου της κουρκουμίνης από το στενό άνοιγμα της HP-β-CD με αποτέλεσμα το σχηματισμό συμπλόκου εγκλεισμού.

Όσον αφορά τα πρωτόνια H-2, H-4 και H-7, βρίσκονται στο εξωτερικό της υδρόφιλης επιφάνειας της HP-β-CD. Σε αυτά τα πρωτόνια παρατηρείται και η μεγαλύτερη διαφορά στις τιμές των χημικών μετατοπίσεων, γεγονός που ενδεχομένως συνεπάγεται ότι στα παραγόμενα σύμπλοκα εγκλεισμού η κουρκουμίνη έχει προσκολληθεί έντονα στην εξωτερική επιφάνεια της HP-β-CD. Η αλληλεπίδραση αυτή, όπως και με τα σύμπλοκα της β-CD, πιθανώς είναι και αυτή που προκαλεί το χαρακτηριστικό πορτοκαλί χρώμα των συμπλόκων το οποίο προσδίδει η κουρκουμίνη.

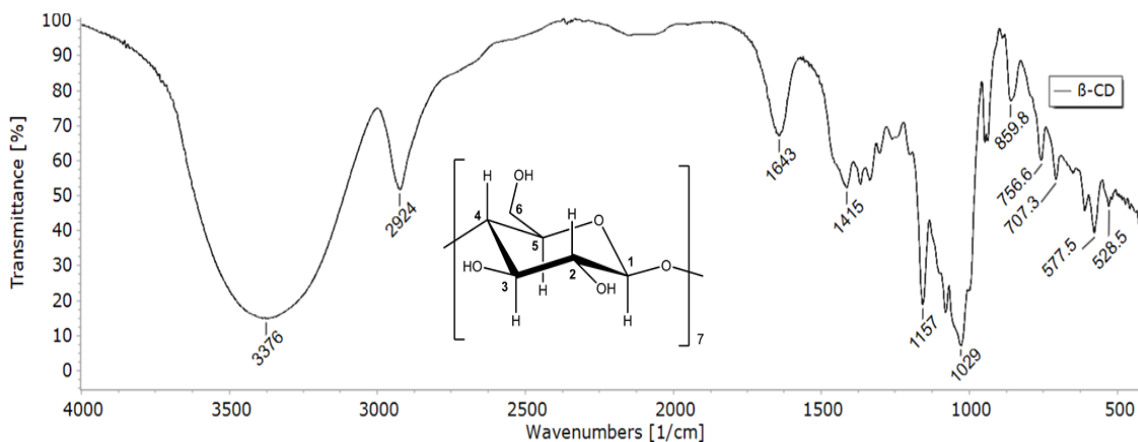
4.5.2. Φασματομετρία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier (FT-IR)

Για την ανίχνευση πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της κουρκουμίνης και των κυκλοδεξτρινών, χρησιμοποιήθηκε επίσης η φασματοσκοπία FT-IR. Πιο συγκεκριμένα λήφθηκαν φάσματα για τις καθαρές κυκλοδεξτρίνες, την κουρκουμίνη και τα σύμπλοκα εγκλεισμού, για τα οποία θα πραγματοποιηθούν συγκριτικές μελέτες.



Εικόνα 33. Φάσμα FT-IR της κουρκουμίνης

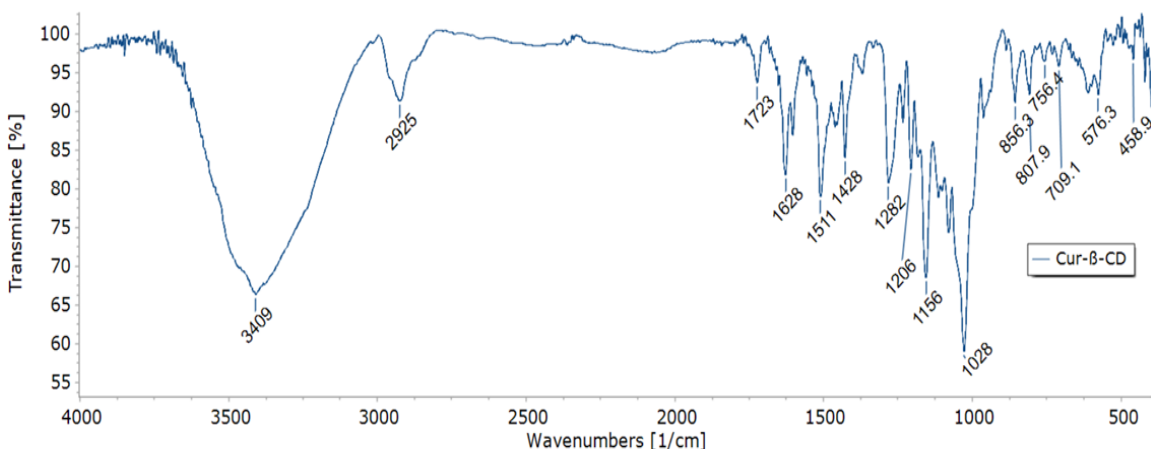
Στο φάσμα FT-IR της κουρκουμίνης, χαρακτηριστικές κορυφές εμφανίζονται στα 3480 cm^{-1} και 3411 cm^{-1} λόγω δονήσεων τάσης O-H, στα 1628 cm^{-1} που αποδίδονται σε δονήσεις τάσης των διπλών δεσμών C=C και C=O, στα 1512 cm^{-1} λόγω συνδυασμού δονήσεων τάσης C=O και δονήσεων κάμψης των αλειφατικών τμημάτων της κουρκουμίνης, στα 1428 cm^{-1} λόγω ασύμμετρης δόνησης τάσης του -CH₂ και μεταξύ 1282 cm^{-1} και 1154 cm^{-1} λόγω δονήσεων κάμψης των δεσμών C-O στους δύο δακτυλίους.



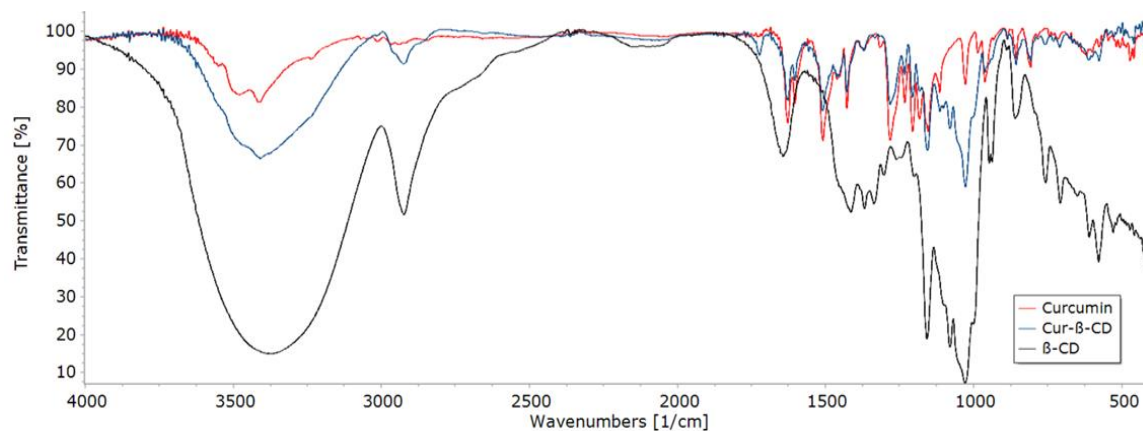
Εικόνα 34. Φάσμα FT-IR της β-CD

Στο φάσμα FT-IR της β-CD, οι πιο χαρακτηριστικές κορυφές εμφανίζονται στα 3376 cm^{-1} λόγω των δονήσεων τάσης O-H, στα 2924 cm^{-1} που αποδίδονται στη δόνηση τάσης των C-H, στα 1643 cm^{-1} λόγω της ασύμμετρης δόνησης τάσης των -CH_2 , καθώς και στα 1415 cm^{-1} λόγω της δόνησης τάσης των O-H. Τέλος, η χαρακτηριστική κορυφή στα 1029 cm^{-1} αποδίδεται στη C-O δόνηση τάσης των ομάδων των δευτεροταγών αλκοολών που υπάρχουν στο μόριο της β-CD.

Στη συνέχεια εξετάζεται το φάσμα του συμπλόκου Cur-β-CD και συγκρίνεται με τα φάσματα των καθαρών ενώσεων:



Εικόνα 36. Φάσμα FT-IR του συμπλόκου Cur-β-CD

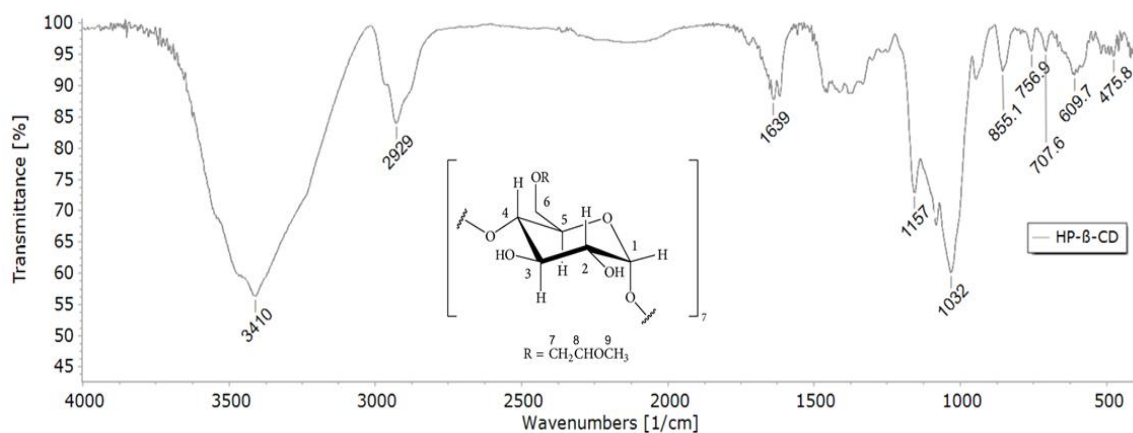


Εικόνα 35. Συγκριτικά φάσματα FT-IR των καθαρών Cur και β-CD και του συμπλόκου Cur-β-CD

Συγκρίνοντας τα τρία φάσματα παρατηρείται ότι το φάσμα του συμπλόκου εμφανίζει διαφορές σε σχέση με τα φάσματα των καθαρών ενώσεων. Πιο συγκεκριμένα, στο φάσμα του συμπλόκου παρατηρείται κορυφή στα 3409 cm^{-1} η οποία προκύπτει τόσο από τη μετατόπιση της κορυφής στα 3411 cm^{-1} της καθαρής κουρκουμίνης, όσο και από την μετατόπιση της κορυφής στα 3376 cm^{-1} της β-CD. Η κορυφή στα 2925 cm^{-1} προκύπτει από τη μετατόπιση της χαρακτηριστικής κορυφής που εμφανίζεται στα 2924 cm^{-1} στο φάσμα IR της β-CD. Σημαντική μετατόπιση παρατηρείται στην κορυφή των 1643 cm^{-1} της β-CD η οποία στο φάσμα του συμπλόκου σημειώνεται στα 1723 cm^{-1} . Κορυφές παρατηρούνται επίσης στα 1628 cm^{-1} , 1428 cm^{-1} , 1282

cm^{-1} , 1206 cm^{-1} και 1028 cm^{-1} οι οποίες οφείλονται στην κουρκουμίνη και δεν εμφανίζουν κάποια μετατόπιση σε σύγκριση με το φάσμα της κουρκουμίνης. Τέλος η κορυφή στα 1511 cm^{-1} προκύπτει από μετατόπιση της κορυφής των 1509 cm^{-1} της κουρκουμίνης ενώ η κορυφή στα 1156 cm^{-1} προκύπτει από μετατόπιση τόσο της κορυφής των 1157 cm^{-1} της β -CD όσο και της κορυφής των 1154 cm^{-1} της κουρκουμίνης. Σημειώνεται επίσης ότι στο φάσμα το συμπλόκου, αρκετές κορυφές πέρα από μετατόπιση στον κυματαριθμό εμφανίζουν και διαφορετική ένταση απορρόφησης.

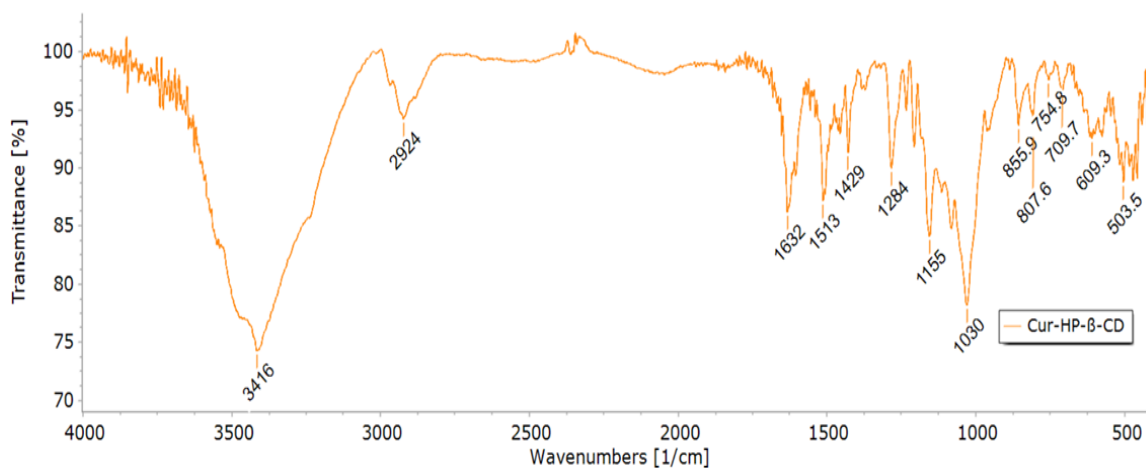
Το φάσμα FT-IR της HP- β -CD παρουσιάζεται στην ακόλουθη εικόνα:



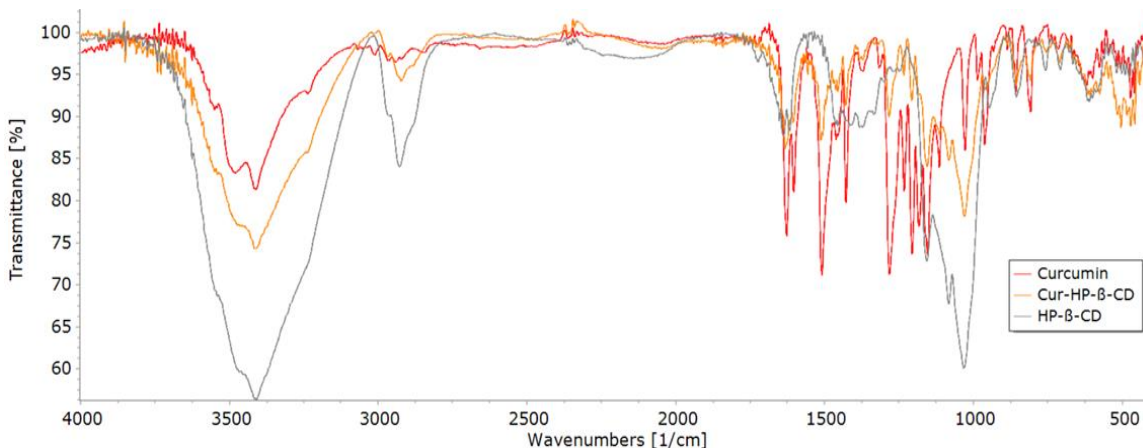
Εικόνα 37. Φάσμα FT-IR της HP- β -CD

Στο φάσμα FT-IR της HP- β -CD, οι πιο χαρακτηριστικές κορυφές εμφανίζονται στα 3410 cm^{-1} λόγω των δονήσεων τάσης O-H, στα 2929 cm^{-1} και στα 1629 cm^{-1} που αποδίδονται σε δονήσεις τάσης των C-H και των $-\text{CH}_2$, στα 1157 cm^{-1} λόγω των δονήσεων τάσης C-O και στα 1032 cm^{-1} που αποδίδονται στη δόνηση τάσης του C-O-C.

Στη συνέχεια εξετάζεται το φάσμα του συμπλόκου Cur-HP- β -CD και συγκρίνεται με τα φάσματα των καθαρών ενώσεων:

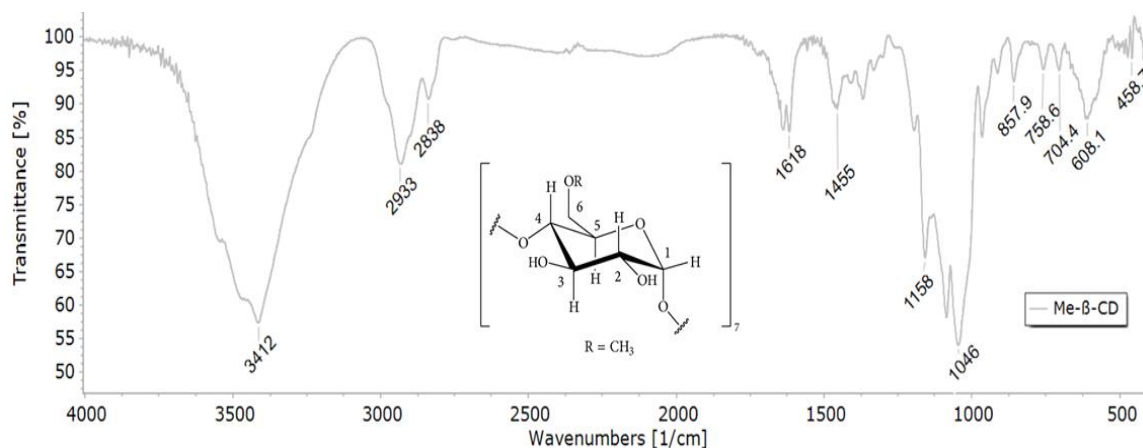


Εικόνα 38. Φάσμα FT-IR του συμπλόκου Cur-HP- β -CD



Εικόνα 39. Συγκριτικά φάσματα FT-IR των καθαρών Cur και HP-β-CD και του συμπλόκου Cur-HP-β-CD

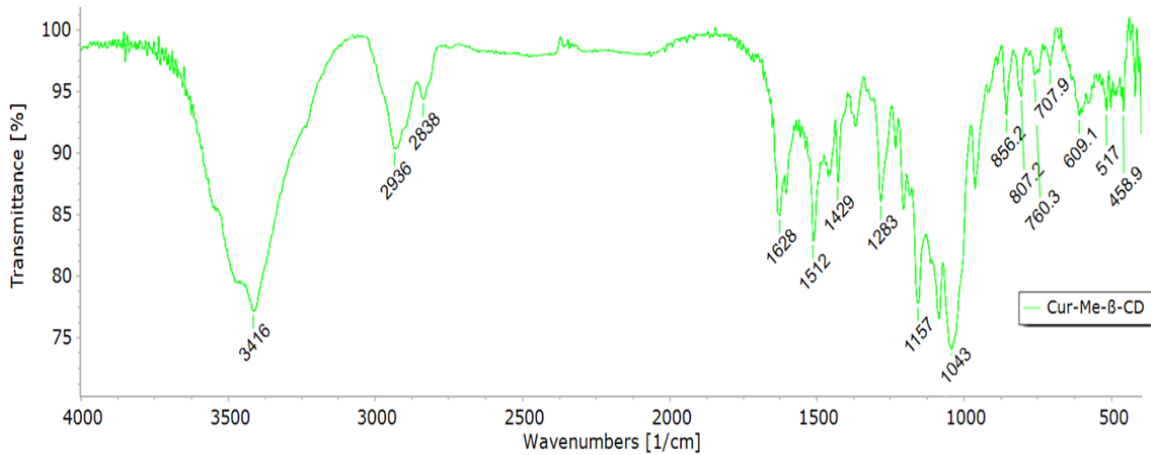
Στο φάσμα του συμπλόκου Cur-HP-β-CD παρατηρείται χαρακτηριστική κορυφή στα 3416 cm^{-1} η οποία προκύπτει τόσο από τη μετατόπιση της κορυφής στα 3411 cm^{-1} της καθαρής κουρκουμίνης, όσο και από την μετατόπιση της κορυφής στα 3410 cm^{-1} της β-CD και παράλληλα έχει τιμή απορρόφησης ενδιάμεση των αντίστοιχων τιμών των φασμάτων των καθαρών ενώσεων. Επιπλέον, η κορυφή στα 2924 cm^{-1} προκύπτει από μετατόπιση της κορυφής που εμφανίζεται στα 2929 cm^{-1} στο φάσμα IR της HP-β-CD. Χαρακτηριστικές κορυφές σημειώνονται επίσης στα 1513 cm^{-1} , στα 1429 cm^{-1} και στα 1284 cm^{-1} οι οποίες προκύπτουν από μετατοπίσεις των κορυφών της κουρκουμίνης στα 1509 cm^{-1} , 1428 cm^{-1} και 1282 cm^{-1} αντίστοιχα. Τέλος οι κορυφές στα 1632 cm^{-1} , στα 1155 cm^{-1} και στα 1030 cm^{-1} προκύπτουν από μετατοπίσεις στα 1628 cm^{-1} , στα 1154 cm^{-1} και στα 1028 cm^{-1} της κουρκουμίνης και συγχρόνως από μετατοπίσεις στα 1639 cm^{-1} , στα 1157 cm^{-1} και στα 1032 cm^{-1} της HP-β-CD.



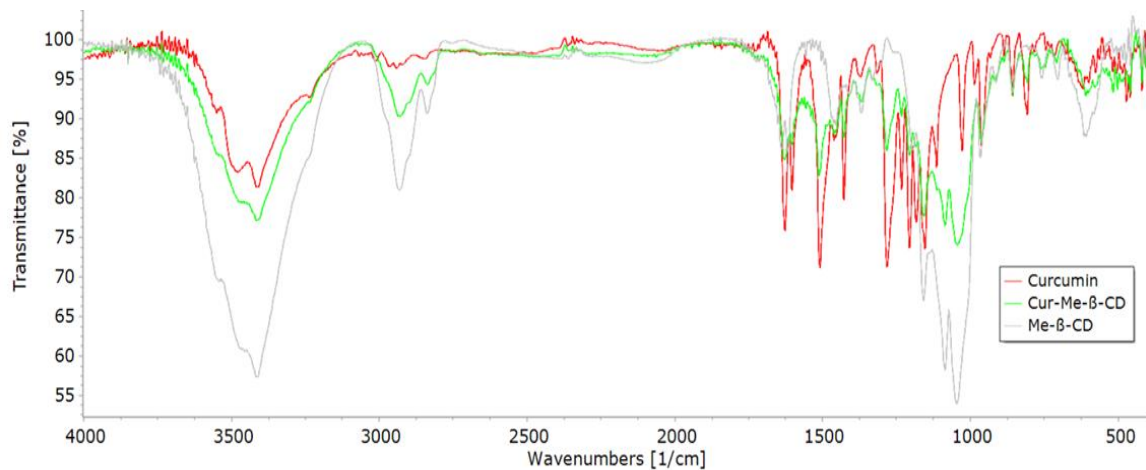
Εικόνα 40. Φάσμα FT-IR της Me-β-CD

Στο φάσμα FT-IR της Me-β-CD, οι πιο χαρακτηριστικές κορυφές εμφανίζονται στα 3412 cm^{-1} λόγω των δονήσεων τάσης O-H, στα 2933 cm^{-1} και 2838 cm^{-1} που αποδίδονται στη δόνηση τάσης των C-H, στα 1618 cm^{-1} λόγω της ασύμμετρης δόνησης τάσης των -CH_2 , καθώς και στα 1455 cm^{-1} λόγω της δόνησης τάσης των O-H. Τέλος, οι χαρακτηριστικές κορυφές στα 1158 cm^{-1} και στα 1046 cm^{-1} αποδίδονται στην C-O δόνηση τάσης των ομάδων των δευτεροταγών αλκοολών που υπάρχουν στο μόριο της Me-β-CD.

Στη συνέχεια εξετάζεται το φάσμα του συμπλόκου Cur-Me-β-CD και συγκρίνεται με τα φάσματα των καθαρών ενώσεων:



Εικόνα 41. Φάσμα FT-IR του συμπλόκου Cur-Me-β-CD



Εικόνα 42. Συγκριτικά φάσματα FT-IR των καθαρών Cur και Me-β-CD και του συμπλόκου Cur-Me-β-CD

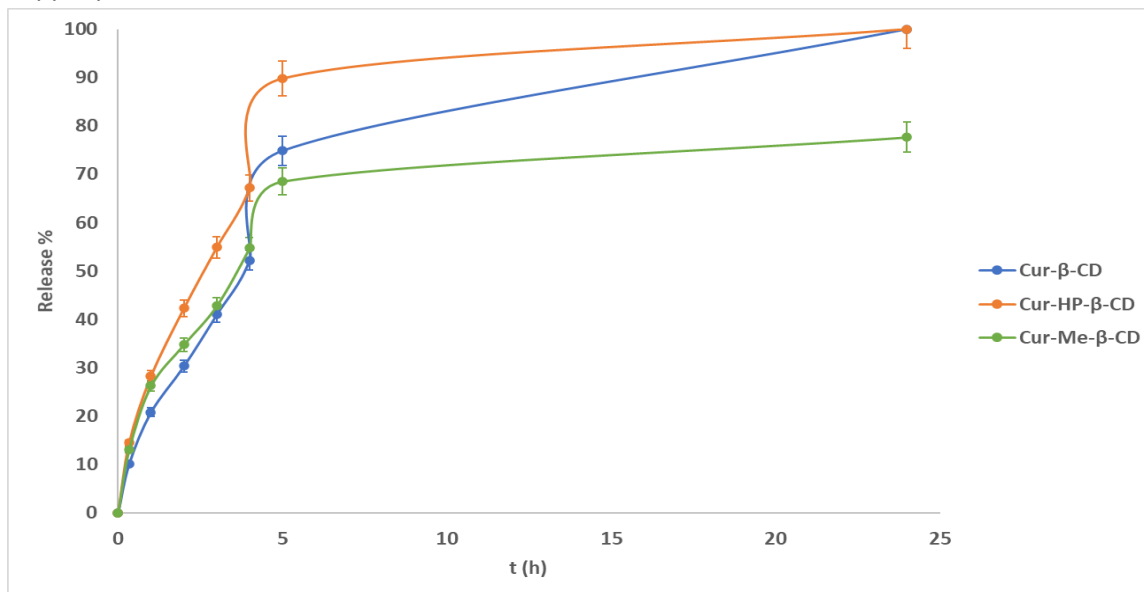
Συγκρίνοντας τα τρία φάσματα παρατηρείται ότι το φάσμα του συμπλόκου εμφανίζει χαρακτηριστική κορυφή στα 3416 cm^{-1} η οποία προκύπτει τόσο από τη μετατόπιση της κορυφής στα 3411 cm^{-1} της καθαρής κουρκουμίνης, όσο και από την μετατόπιση της κορυφής στα 3412 cm^{-1} της Me-β-CD και παράλληλα έχει τιμή απορρόφησης ενδιάμεση των αντίστοιχων τιμών των φασμάτων των καθαρών ενώσεων. Η κορυφή στα 2936 cm^{-1} προκύπτει από τη μετατόπιση της χαρακτηριστικής κορυφής που εμφανίζεται στα 2933 cm^{-1} στο φάσμα IR της Me-β-CD, ενώ η κορυφή στα 2838 cm^{-1} δεν εμφανίζει κάποια μετατόπιση συγκριτικά με την καθαρή Me-β-CD. Χαρακτηριστικές κορυφές σημειώνονται επίσης στα 1512 cm^{-1} , στα 1429 cm^{-1} και στα 1283 cm^{-1} οι οποίες προκύπτουν από μετατοπίσεις των κορυφών της κουρκουμίνης στα 1509 cm^{-1} , 1428 cm^{-1} και 1282 cm^{-1} αντίστοιχα. Επιπλέον, η κορυφή στα 1157 cm^{-1} προκύπτει από μετατόπιση της κορυφής στα 1158 cm^{-1} της Me-β-CD και της κορυφής στα 1154 cm^{-1} της κουρκουμίνης. Τέλος η κορυφή στα 1043 cm^{-1} στο φάσμα του συμπλόκου, προκύπτει από μετατόπιση της κορυφής στα 1046 cm^{-1} της Me-β-CD.

Συμπερασματικά, οι παραπάνω μετατοπίσεις των χαρακτηριστικών κορυφών των μορίων είναι ενδεικτικές των πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της κουρκουμίνης και της εκάστοτε κυκλοδεξτρίνης-«ξενιστή», γεγονός που συνεπάγεται το σχηματισμό συμπλόκων εγκλεισμού με επιτυχία. Ακόμη, η παρουσία ορισμένων κορυφών της κουρκουμίνης στα φάσματα των συμπλόκων σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού $^1\text{H NMR}$ υποδεικνύουν τον σχηματισμό όχι μόνο συμπλόκων εγκλεισμού, αλλά και συμπλόκων μη εγκλεισμού.

4.6. Μελέτη Απελευθέρωσης

4.6.1. Σύμπλοκα εγκλεισμού

Στο ακόλουθο διάγραμμα παρουσιάζεται το προφίλ απελευθέρωσης των συμπλόκων εγκλεισμού Cur-β-CD, Cur-HP-β-CD και Cur-Me-β-CD. Η απελευθέρωση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ως διαλυτικό μέσο ρυθμιστικό διάλυμα K_2HPO_4 - KH_2PO_4 pH=7.4 και θερμοκρασία 37°C.



Διάγραμμα 2. Καμπύλες απελευθέρωσης κουρκουμίνης από τα σύμπλοκα εγκλεισμού

Το προφίλ απελευθέρωσης των συμπλόκων εγκλεισμού όπως παρουσιάζεται στο παραπάνω διάγραμμα χαρακτηρίζεται από μια ταχεία απελευθέρωση που παρατηρείται στις πρώτες 4 h («burst effect»), η οποία στη συνέχεια σταδιακά περιορίζεται φθάνοντας στις 5 h και έπειτα αρχίζει να σταθεροποιείται («plateau»).

Κατά το burst effect, η μεγαλύτερη ποσοστιαία απελευθέρωση σημειώνεται στα σύμπλοκα Cur-HP-β-CD, όπου απελευθερώνεται περίπου το 67% της εγκλεισμένης κουρκουμίνης. Ακολουθούν με μικρή διαφορά μεταξύ τους τα σύμπλοκα Cur-Me-β-CD από τα οποία απελευθερώνεται περίπου το 55% της εγκλεισμένης κουρκουμίνης και τα σύμπλοκα Cur-β-CD από τα οποία απελευθερώνεται περίπου το 52% της εγκλεισμένης κουρκουμίνης.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μοντελοποίηση των δεδομένων απελευθέρωσης ώστε να διαπιστωθεί η κινητική απελευθέρωσης της κουρκουμίνης από τα σύμπλοκα. Τα κινητικά μοντέλα απελευθέρωσης με την μεγαλύτερη εφαρμογή και την καλύτερη περιγραφή των φαινομένων κατά την απελευθέρωση της δραστικής ουσίας είναι:

- Μοντέλο απελευθέρωσης μηδενικής τάξης (zero order)
- Μοντέλο απελευθέρωσης πρώτης τάξης (first order)
- Μοντέλο Higuchi
- Μοντέλο Korsmeyer – Peppas

Η επιλογή του βέλτιστου κινητικού μοντέλου για την περιγραφή του προφίλ απελευθέρωσης της δραστικής ένωσης έγινε με βάση τον συντελεστή R^2 .

Πίνακας 15. Συντελεστές R^2 για κάθε κινητικό μοντέλο για τα σύμπλοκα εγκλεισμού ($pH=7.4$, $T=37^\circ C$)

Σύμπλοκο εγκλεισμού	R^2			
	Zero Order	First Order	Higuchi	Korsmeyer–Peppas
Cur-β-CD	0.7134	0.3060	0.9080	0.9754
Cur-HP-β-CD	0.5513	0.2354	0.8123	0.9468
Cur-Me-β-CD	0.5441	0.2293	0.8137	0.9421

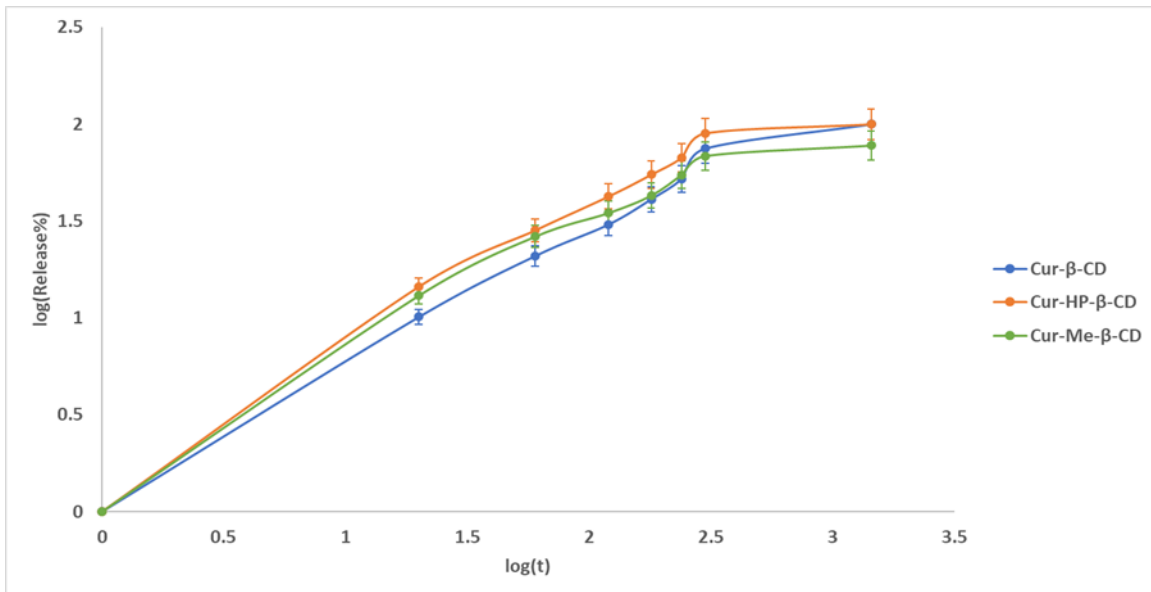
Όπως φαίνεται και από τον παραπάνω πίνακα, την καλύτερη γραμμικότητα (τον υψηλότερο συντελεστή R^2) και για τα τρία σύμπλοκα εγκλεισμού παρουσιάζει το κινητικό μοντέλο Korsmeyer-Peppas.

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι εξισώσεις Korsmeyer-Peppas που προέκυψαν από τα δεδομένα απελευθέρωσης κάθε συμπλόκου:

Πίνακας 16. Εξισώσεις κινητικού μοντέλου Korsmeyer–Peppas για τα σύμπλοκα εγκλεισμού

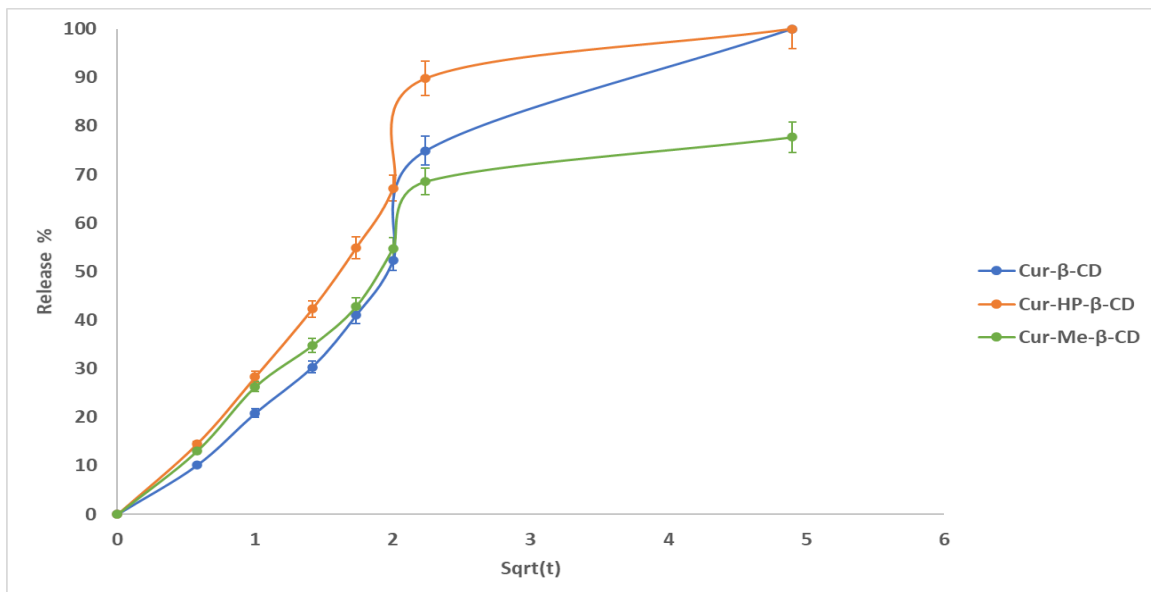
Σύμπλοκο εγκλεισμού	R^2	Εξίσωση	Τιμή Εκθέτη n	Μηχανισμός Απελευθέρωσης
Cur-β-CD	0.9754	$y = 0.6659x + 0.0921$	0.6659	Μη Fickian Διάχυση
Cur-HP-β-CD	0.9468	$y = 0.6719x + 0.1740$	0.6719	Μη Fickian Διάχυση
Cur-Me-β-CD	0.9421	$y = 0.6316x + 0.1783$	0.6316	Μη Fickian Διάχυση

Στο ακόλουθο διάγραμμα απεικονίζεται γραφικά το μοντέλο Korsmeyer–Peppas για τα τρία σύμπλοκα εγκλεισμού:



Διάγραμμα 3. Γραφική παράσταση του κινητικού μοντέλου *Korsmeyer-Peppas* για την απελευθέρωση της κουρκουμίνης από τα σύμπλοκα

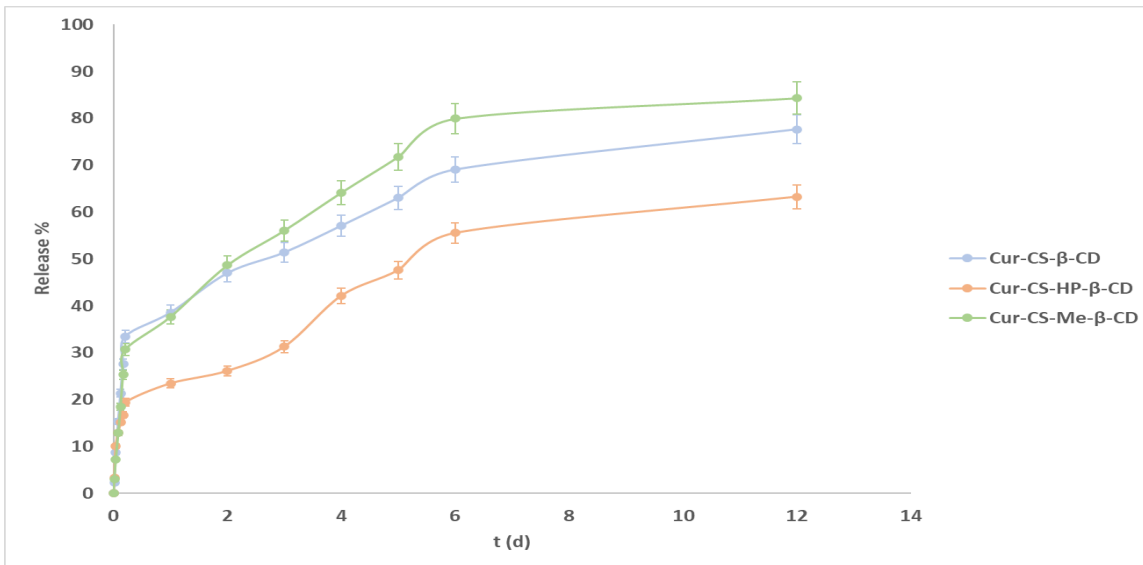
Ωστόσο το μοντέλο *Korsmeyer-Peppas* είναι ημιεμπειρικό και θεωρητικά χρησιμοποιείται για την ανάλυση μόνο του πρώτου 60% των δεδομένων απελευθέρωσης της δραστικής ένωσης. Ως εκ τούτου, λαμβάνεται το κινητικό μοντέλο που εμφανίζει την αμέσως επόμενη καλύτερη γραμμικότητα, δηλαδή το μοντέλο *Higuchi*, το οποίο απεικονίζεται γραφικά στο ακόλουθο διάγραμμα.



Διάγραμμα 4. Γραφική παράσταση του κινητικού μοντέλου *Higuchi* για την απελευθέρωση της κουρκουμίνης από τα των σύμπλοκα

4.6.2. Νανοσωματίδια

Στο διάγραμμα που ακολουθεί παρουσιάζεται η απελευθέρωση των νανοσωματιδίων CS–Cur–β-CD, CS–Cur–HP-β-CD και CS–Cur–Me-β-CD. Η απελευθέρωση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ως διαλυτικό μέσο ρυθμιστικό διάλυμα K_2HPO_4 – KH_2PO_4 pH=7.4 και θερμοκρασία 37°C.



Διάγραμμα 5. Καμπύλες απελευθέρωσης της κουρκουμίνης από τα επικαλυμμένα νανοσωματίδια

Από το παραπάνω διάγραμμα προκύπτει ότι το προφίλ απελευθέρωσης των νανοσωματιδίων είναι παρόμοιο με αυτό των συμπλόκων εγκλεισμού, δηλαδή χαρακτηρίζεται από μια ταχεία απελευθέρωση («burst effect»), η οποία στη συνέχεια σταδιακά περιορίζεται και αρχίζει να σταθεροποιείται («plateau»).

Αξιοσημείωτα είναι τα συγκριτικά αποτελέσματα απελευθέρωσης μεταξύ νανοσωματιδίων και συμπλόκων. Στις 4 h το ποσοστό απελευθέρωσης των νανοσωματιδίων CS–Cur–β-CD είναι περίπου 28% ενώ των συμπλόκων Cur–β-CD 52%. Ομοίως τα νανοσωματίδια της HP-β-CD εμφανίζουν ποσοστό απελευθέρωσης 17% σε σύγκριση με 67% των αντίστοιχων συμπλόκων και τα νανοσωματίδια της Me-β-CD εμφανίζουν ποσοστό απελευθέρωσης 25% σε σύγκριση με 55% των αντίστοιχων συμπλόκων. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται και στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 17. Σύγκριση αποτελεσμάτων απελευθέρωσης συμπλόκων και νανοσωματιδίων

Κυκλοδεξτρίνη–Φορέας	Ποσοστό απελευθέρωσης συμπλόκων (4h)	Ποσοστό απελευθέρωσης νανοσωματιδίων (4h)	Ποσοστιαία Μείωση απελευθέρωσης ¹
β-CD	52%	28%	46%

¹ Η % μείωση του burst effect (4 h) στα επικαλυμμένα νανοσωματίδια, σε σύγκριση με τα σύμπλοκα εγκλεισμού

HP-β-CD	67%	17%	75%
Me-β-CD	55%	25%	55%

Μέσω της επικάλυψης των συμπλόκων με χιτοζάνη, στο ίδιο χρονικό διάστημα επιτυγχάνεται μείωση της απελευθέρωσης της κουρκουμίνης κατά περίπου 50% για τα συστήματα της β-CD και της Me-β-CD ενώ αξιοσημείωτη είναι η μείωση της απελευθέρωσης της κουρκουμίνης από το σύστημα της HP-β-CD, κατά 75%.

Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι μέσω της επικάλυψης δεν παρατηρείται μόνο ένα πιο ήπιο «burst effect», αλλά η κουρκουμίνη απελευθερώνεται γενικά με βραδύτερο ρυθμό. Ως αποτέλεσμα, στα επικαλυμμένα νανοσωματίδια μετά την πάροδο 12 ημερών υπάρχει ακόμα ποσότητα κουρκουμίνης που απελευθερώνεται, ενώ στα σύμπλοκα εγκλεισμού όλη σχεδόν η κουρκουμίνη έχει απελευθερωθεί μετά από μια ημέρα.

Ως εκ τούτου ο σχηματισμός των νανοσωματιδίων κρίνεται απόλυτα επιτυχής, καθώς η εξασφάλιση εκτεταμένης απελευθέρωσης (extended release) είναι και ο κύριος λόγος για τον οποίο πραγματοποιήθηκε η επικάλυψη.

Τα αποτελέσματα της μοντελοποίησης των δεδομένων απελευθέρωσης προκειμένου να διαπιστωθεί η κινητική απελευθέρωσης της κουρκουμίνης από τα νανοσωματίδια συνοψίζονται στον πίνακα που ακολουθεί:

Πίνακας 18. Συντελεστές R² για κάθε κινητικό μοντέλο για τα επικαλυμμένα νανοσωματίδια (pH=7.4, T=37°C)

Νανοσωματίδια	R²			
	Zero Order	First Order	Higuchi	Korsmeyer-Peppas
CS-Cur-β-CD	0.7249	0.3432	0.9236	0.9155
CS-Cur-HP-β-CD	0.8429	0.4302	0.9544	0.9478
CS-Cur-Me-β-CD	0.7477	0.3906	0.9389	0.9541

Σύμφωνα με τα δεδομένα του παραπάνω πίνακα, την καλύτερη γραμμικότητα (τον υψηλότερο συντελεστή R²) για τα νανοσωματίδια CS-Cur-β-CD και CS-Cur-HP-β-CD παρουσιάζει το κινητικό μοντέλο Higuchi ενώ για τα νανοσωματίδια CS-Cur-Me-β-CD το μοντέλο Korsmeyer-Peppas. Σημειώνεται ότι οι διαφορές του συντελεστή R² είναι μικρές, επομένως μελετώνται και τα δύο μοντέλα.

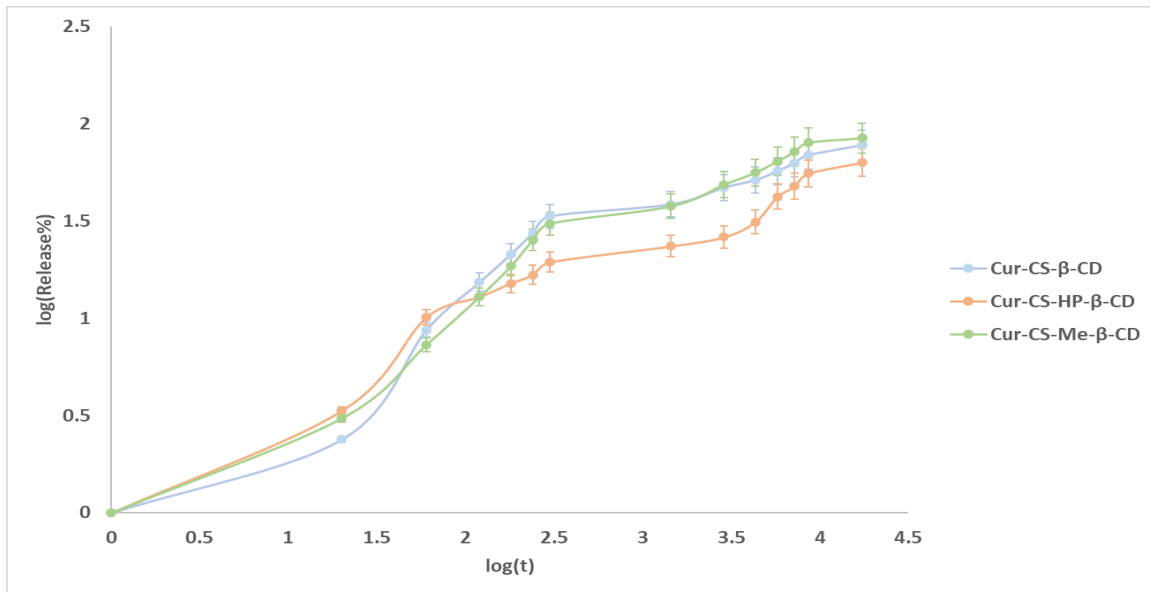
Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται οι εξισώσεις Korsmeyer–Peppas που προέκυψαν από τα δεδομένα απελευθέρωσης κάθε νανοσωματιδίου:

Πίνακας 19. Εξισώσεις κινητικού μοντέλου Korsmeyer–Peppas για τα επικαλυμμένα νανοσωματίδια

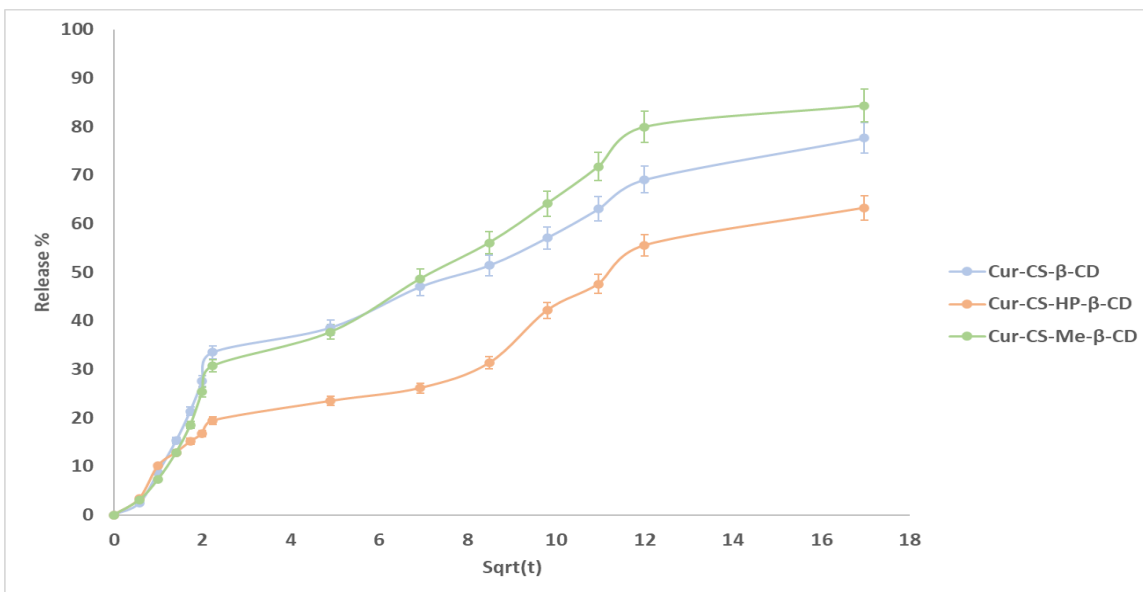
Νανοσωματίδια	R^2	Εξίσωση	Τιμή Εκθέτη n	Μηχανισμός Απελευθέρωσης
CS–Cur–β-CD	0.9155	$y = 0.4514x + 0.1254$	0.4514	Fickian Διάχυση
CS–Cur–HP-β-CD	0.9478	$y = 0.3981x + 0.1579$	0.3981	Fickian Διάχυση
CS–Cur–Me-β-CD	0.9541	$y = 0.4674x + 0.0868$	0.4674	Fickian Διάχυση

Όπως παρατηρείται από τα αποτελέσματα του μοντέλου Korsmeyer–Peppas, αλλάζει και ο μηχανισμός απελευθέρωσης καθώς στα νανοσωματίδια πραγματοποιείται μέσω διάχυσης, ενώ για τα σύμπλοκα εγκλεισμού η απελευθέρωση πραγματοποιείται με Μη Fickian διάχυση.

Στα ακόλουθα διάγραμμα απεικονίζονται γραφικά τα μοντέλα Korsmeyer–Peppas και Higuchi για τα νανοσωματίδια:



Διάγραμμα 6. Γραφική παράσταση του κινητικού μοντέλου Korsmeyer–Peppas για την απελευθέρωση της κουρκουμίνης από τα νανοσωματίδια



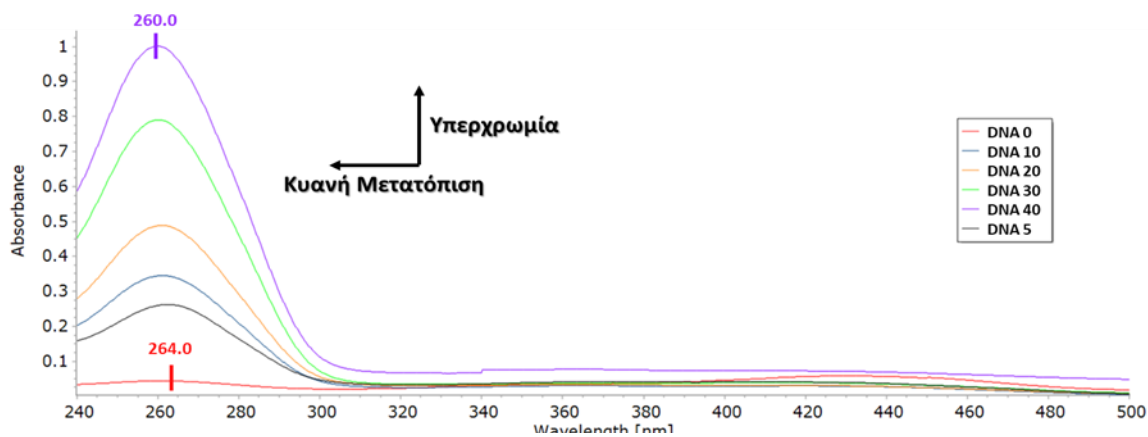
Διάγραμμα 7. Γραφική παράσταση του κινητικού μοντέλου Higuchi για την απελευθέρωση της κουρκουμίνης από τα νανοσωματίδια

4.7. Αλληλεπίδραση με το ctDNA

4.7.1. Πειραματική μελέτη αλληλεπίδρασης με το ctDNA

Προκειμένου να διαπιστωθεί η πιθανή αλληλεπίδραση με το DNA, πραγματοποιήθηκαν τιτλοδοτήσεις υπεριώδους-ορατού για διαφορετικές συγκεντρώσεις ctDNA. Τα φάσματα που προέκυψαν μελετώνται τόσο ως προς τη μεταβολή της απορρόφησης όσο και ως προς τη μεταβολή του μήκους κύματος στο οποίο σημειώνεται η μέγιστη απορρόφηση, λ_{max} . Με αυτόν τον τρόπο συμπεραίνεται το είδος της αλληλεπίδρασης και ταυτόχρονα μπορεί να διαπιστωθεί εάν το DNA σταθεροποιείται ή αποσταθεροποιείται. Επιπλέον, υπολογίζεται η σταθερά σύνδεσης με το ctDNA K_b , με βάση την εξίσωση Benesi-Hildebrand:

Αρχικά μελετήθηκε η καθαρή κουρκουμίνη και τα φάσματα που προέκυψαν συνοψίζονται στην εικόνα που ακολουθεί:



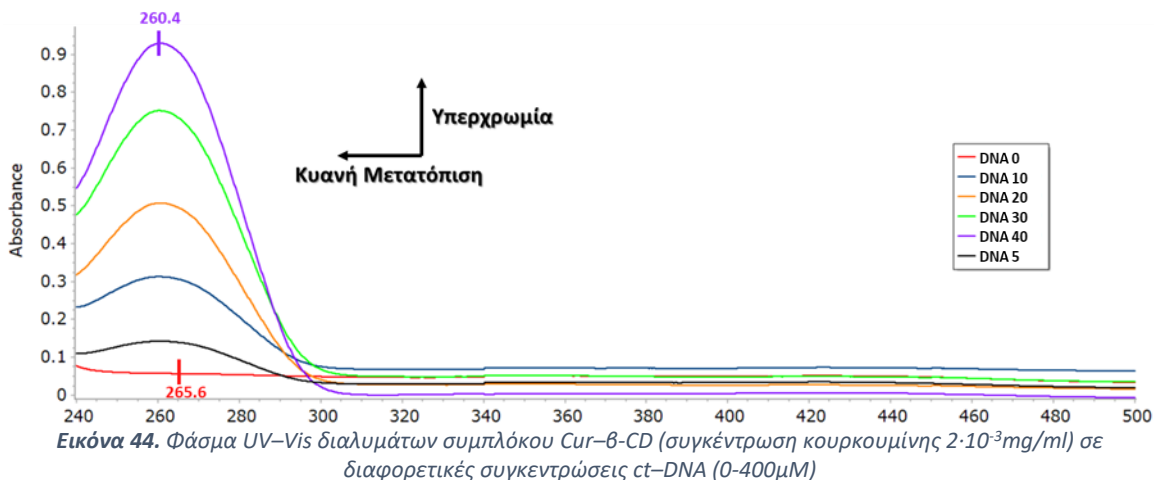
Εικόνα 43. Φάσμα UV-Vis διαλυμάτων καθαρής κουρκουμίνης συγκέντρωσης $2 \cdot 10^{-3} \text{mg/ml}$ σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ct-DNA (0-400 μM)

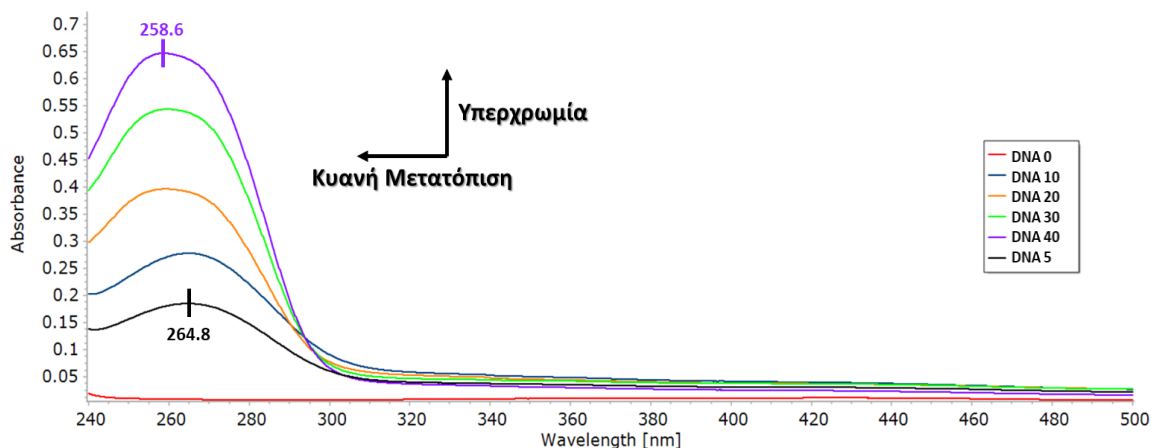
Από την παραπάνω εικόνα παρατηρείται αύξηση της απορρόφησης για αύξηση της συγκέντρωσης του DNA και παράλληλα μετατόπιση του λ_{\max} προς μικρότερα μήκη κύματος. Η αύξηση της έντασης απορρόφησης ονομάζεται υπερχρωμία και δηλώνει πιθανή συναρμογή της κourκουμίνης στην εξωτερική επιφάνεια DNA, ενώ η κυανή μετατόπιση ή υποχρωμία δείχνει αποσταθεροποίηση της ελικοειδούς δομής του DNA μέσω της αλληλεπίδρασης με την κourκουμίνη. Η τιμή της σταθεράς K_b όπως προέκυψε από την εξίσωση Benesi– Hildebrand βρέθηκε ίση με: $K_b=2.45 \cdot 10^4 M^{-1}$.

Για να διαπιστωθεί η ισχύς της σύνδεσης με το DNA, πραγματοποιήθηκε σύγκριση της τιμής της K_b της κourκουμίνης με την K_b της πρότυπης ένωσης Methyl-green, η οποία σύμφωνα με τη βιβλιογραφία εμφανίζει σύνδεση με το DNA. Για την Methyl-green ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία και προέκυψε τιμή $K_b=7.33 \cdot 10^4 M^{-1}$. Από τη σύγκριση των δύο τιμών K_b προκύπτει ότι η κourκουμίνη εμφανίζει ασθενέστερη σύνδεση με το DNA από ότι η Methyl-green αλλά συγκρίσιμη.

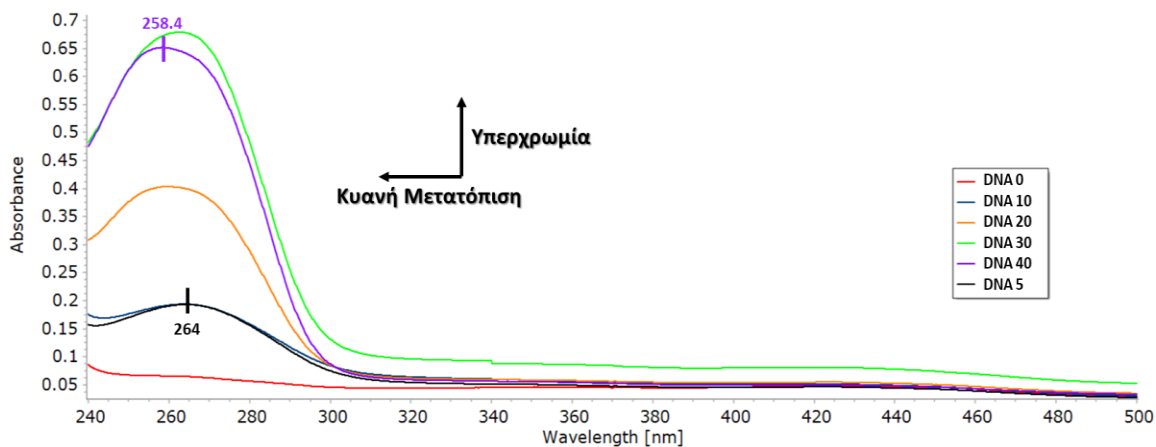
Στη συνέχεια μελετήθηκε η αλληλεπίδραση των τριών κυκλοδεξτρινών–φορέων με το DNA. Οι κυκλοδεξτρίνες αναμενόταν να εμφανίσουν ασθενή σύνδεση με το DNA. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε και πειραματικά, καθώς από τις τιτλοδοτήσεις UV–Vis παρατηρήθηκαν χαμηλότερες μεταβολές της απορρόφησης και του λ_{\max} με μεταβολή των συγκεντρώσεων του DNA, καθώς επίσης και χαμηλότερες τιμές K_b .

Καταληκτικά, μελετήθηκε η αλληλεπίδραση των συμπλόκων εγκλεισμού με το DNA. Επειδή όμως η ένωση που είναι επιθυμητό να αλληλεπιδρά με το DNA είναι η κourκουμίνη, πριν την επώαση με το DNA τα διαλύματα των συμπλόκων αφέθηκαν να επωασθούν για επιπλέον χρόνο ώστε να απελευθερωθεί η κατάλληλη ποσότητα κourκουμίνης. Πιο συγκεκριμένα, με βάση τα αποτελέσματα των κινητικών απελευθέρωσης επιλέχθηκαν οι 4 ώρες ως χρόνος επώασης, στις οποίες ολοκληρώνεται το burst effect και έχει ήδη απελευθερωθεί ικανοποιητική ποσότητα κourκουμίνης. Η επώαση πραγματοποιήθηκε στις ίδιες συνθήκες με τη μελέτη της απελευθέρωσης της κourκουμίνης (pH=7.4, T=37°C). Στη συνέχεια έγιναν κατάλληλες αναμειξεις με τα διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων DNA έτσι ώστε στα τελικά διαλύματα, η συγκέντρωση της κourκουμίνης να είναι κάθε φορά ίδια με αυτή των διαλυμάτων καθαρής κourκουμίνης ($2 \cdot 10^{-3} \text{mg/ml}$) και να μπορούν τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα.





Εικόνα 45. Φάσμα UV-Vis διαλυμάτων συμπλόκου Cur-HP-β-CD (συγκέντρωση κουρκουμίνης $2 \cdot 10^{-3} \text{mg/ml}$) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ct-DNA (0-400μM)

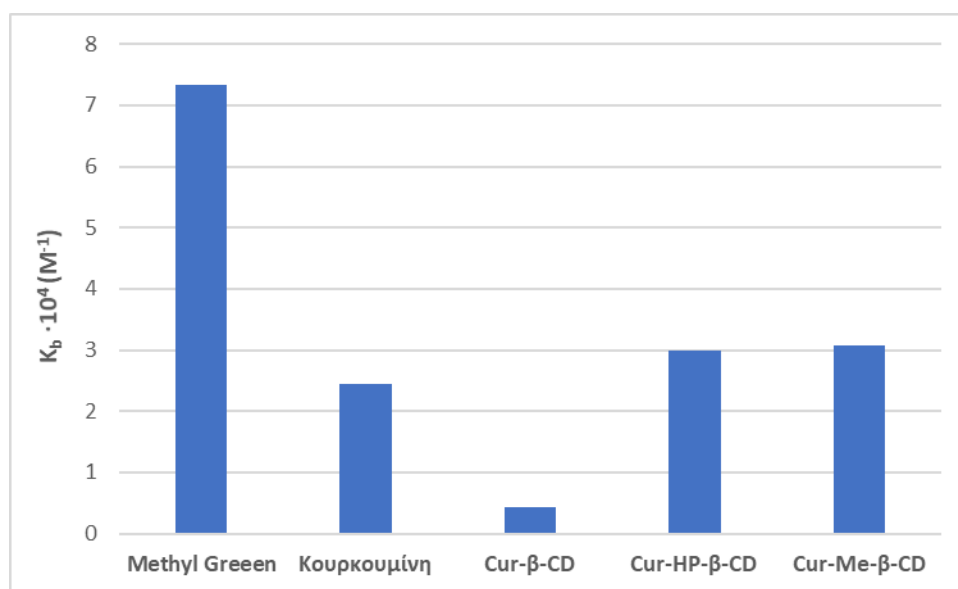


Εικόνα 46. Φάσμα UV-Vis διαλυμάτων συμπλόκου Cur-Me-β-CD (συγκέντρωση κουρκουμίνης $2 \cdot 10^{-3} \text{mg/ml}$) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ct-DNA (0-400μM)

Από τις παραπάνω εικόνες παρατηρείται αύξηση της απορρόφησης για αύξηση της συγκέντρωσης του DNA και παράλληλα μετατόπιση του λ_{max} προς μικρότερα μήκη κύματος, όπως ακριβώς και στην περίπτωση της καθαρής κουρκουμίνης. Η υπερχρωμία δηλώνει πιθανή συναρμογή της κουρκουμίνης στην εξωτερική επιφάνεια DNA, ενώ η κυανή μετατόπιση ή υποχρωμία δείχνει αποσταθεροποίηση της ελικοειδούς δομής του DNA μέσω της αλληλεπίδρασης με την κουρκουμίνη. Οι τιμές της σταθεράς K_b όπως προέκυψαν από την εξίσωση Benesi-Hildebrand συνοψίζονται παρακάτω.

Πίνακας 20. Τιμές σταθεράς σύνδεσης με το DNA

Ένωση/Σύμπλοκο	$K_b \cdot 10^4 (M^{-1})$
<i>Methyl green</i>	7.33
<i>Κουρκουμίνη</i>	2.45
<i>Cur-β-CD</i>	0.42
<i>Cur-HP-β-CD</i>	3.00
<i>Cur-Me-β-CD</i>	3.08



Διάγραμμα 8. Τιμές σταθεράς σύνδεσης με το DNA

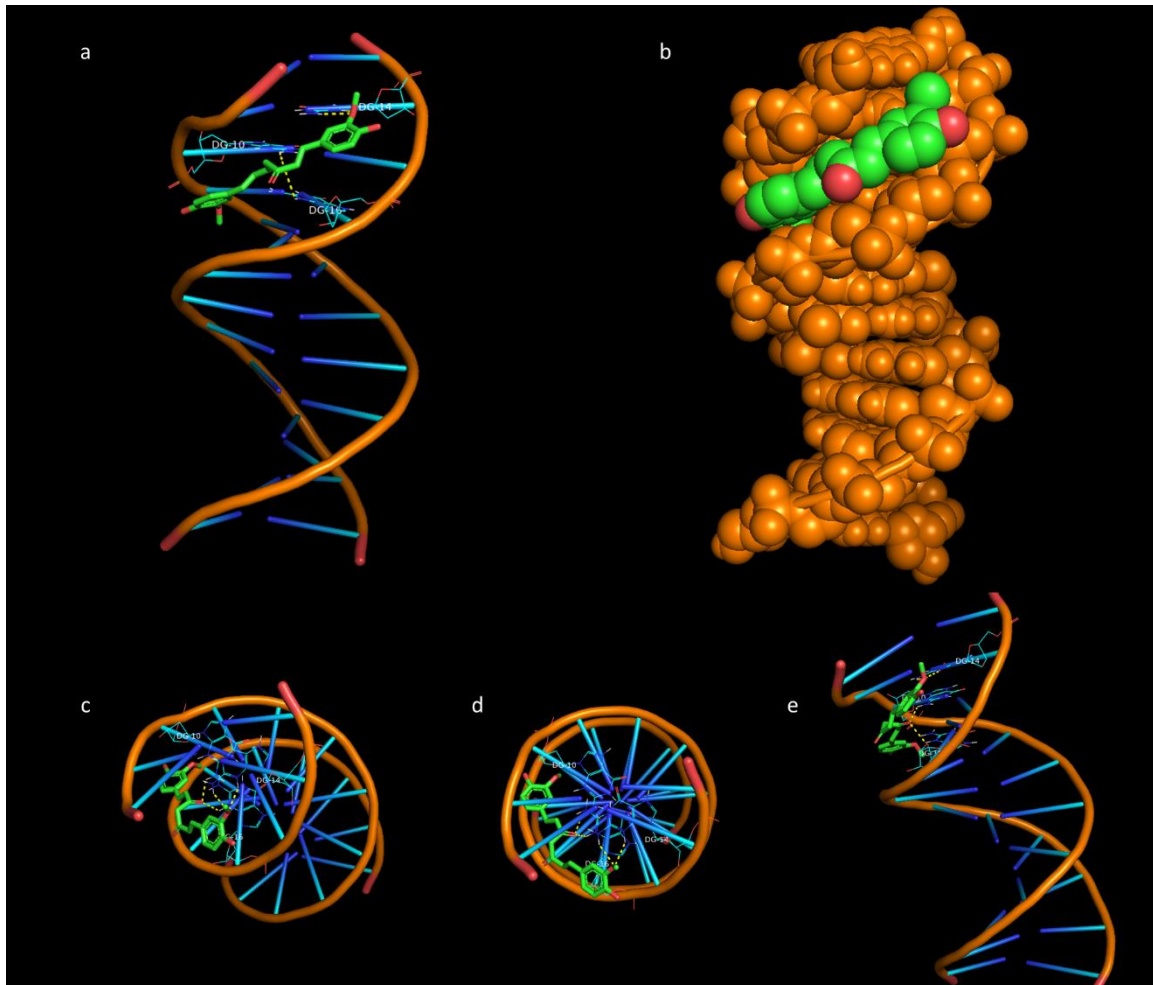
Συγκρίνοντας τα παραγόμενα σύμπλοκα εγκλεισμού με την καθαρή κουρκουμίνη, παρατηρείται ότι τα σύμπλοκα Cur-HP-β-CD και Cur-Me-β-CD εμφανίζουν μεγαλύτερη τιμή σταθεράς σύνδεσης με το DNA. Η διαφορά αυτή είναι σημαντική και πιθανότατα οφείλεται στην παρουσία των κυκλοδεξτρινών-φορέων, καθώς οι τελευταίες κατά τον εγκλεισμό προσφέρουν στην κουρκουμίνη βελτιωμένη διαλυτότητα, σταθερότητα και βιοδιαθεσιμότητα και ως εκ τούτου βελτιώνουν και τη δραστηριότητά της. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μετέπειτα μεγαλύτερη αλληλεπίδρασή της με το DNA.

Τα σύμπλοκα Cur-β-CD δεν εμφάνισαν παρόμοια συμπεριφορά, ωστόσο κάτι τέτοιο ενδεχομένως οφείλεται στην μειωμένη επαναληψιμότητα της μεθόδου.

Η βελτιωμένη αλληλεπίδραση των συμπλόκων εγκλεισμού της κουρκουμίνης με το ctDNA δε φαίνεται μόνο από τις τιμές της σταθεράς σύνδεσης, αλλά και από την υψοχρωμία. Πιο συγκεκριμένα και στα τρία σύμπλοκα παρατηρείται μεγαλύτερη κυανή μετατόπιση από ότι στην καθαρή κουρκουμίνη. Αυτό ενδεχομένως συνεπάγεται ισχυρότερη αποσταθεροποίηση της ελικοειδούς δομής του ctDNA.

4.7.2. Υπολογιστική μελέτη αλληλεπίδρασης με το DNA

Στη συγκεκριμένη ενότητα η αλληλεπίδραση της κουρκουμίνης με το DNA εξετάζεται θεωρητικά, με τη χρήση υπολογιστικών εργαλείων (molecular docking). Στην εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζεται η δέσμευση της κουρκουμίνης στην κρυσταλλική δομή του DNA και συγκεκριμένα απεικονίζεται η σταθεροποίησή της στην μικρή αύλακα του DNA, με ενέργεια αλληλεπίδρασης (binding energy) -7.7kcal/mol .



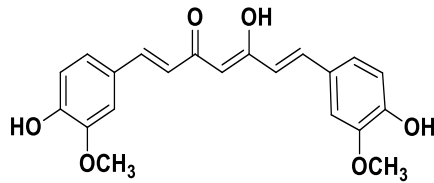
Εικόνα 47. Σχηματική απεικόνιση της δέσμευσης της κουρκουμίνης στην κρυσταλλική δομή του DNA, μέσω σταθεροποίησης στη μικρή αύλακα.

(α) Απεικόνιση της δομής του DNA και της κουρκουμίνης ως κινούμενα σχέδια.

(β) Απεικόνιση της δομής του DNA και της κουρκουμίνης ως σφαίρες.

(c-e) απεικόνιση των δεσμών υδρογόνου -με κίτρινες διακεκομμένες γραμμές- και των νουκλεοτιδίων από διαφορετικές οπτικές γωνίες

Η σταθεροποίηση αυτή επιτυγχάνεται με το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου, πολικών και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Συνολικά σχηματίζονται 4 δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των νουκλεοτιδίων DG-10, DG-14 και DG-16. Οι δύο δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται μεταξύ του οξυγόνου της καρβonyλομάδας της κουρκουμίνης και των πουρινών των αζωτούχων ζευγών βάσεων των νουκλεοτιδίων DG-10 και DG-16, ενώ δύο ακόμη δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται μεταξύ του οξυγόνου της μέθοξυ-ομάδας της κουρκουμίνης και της πουρίνης της αζωτούχου βάσης του νουκλεοτιδίου DG-14.



Εικόνα 48. Χημική δομή κουρκουμίνης

Τα αποτελέσματα της υπολογιστικής μελέτης επαληθεύονται από τα πειραματικά αποτελέσματα, γεγονός που ενισχύει την εγκυρότητα της υπόθεσης ότι η κουρκουμίνη αλληλεπιδρά με το DNA μέσω δέσμησης στη μικρή αύλακα.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας εξάγονται τα εξής συμπεράσματα:

- ✓ Για τα σύμπλοκα Cur-β-CD, Cur-HP-β-CD και Cur-Me-β-CD, η μέθοδος Kneading (με αναλογία κουρκουμίνης:CD 1:1) αποτέλεσε τη βέλτιστη μέθοδο παρασκευής συμπλόκων εγκλεισμού, καθώς είχε αρκετά υψηλές αποδόσεις εγκλεισμού σε σύγκριση με τη μέθοδο εξάτμισης διαλύτη & λυοφιλοποίησης.
- ✓ Οι αποδόσεις διεργασίας των συμπλόκων που αναπτύχθηκαν και έπειτα μελετήθηκαν παρουσίασαν υψηλά ποσοστά (88%–93%). Οι αντίστοιχες αποδόσεις εγκλεισμού κρίνονται ως ιδιαίτερα ικανοποιητικές (65%–80%).
- ✓ Από τις τεχνικές χαρακτηρισμού που χρησιμοποιήθηκαν (DLS, ¹H NMR, FT-IR) προέκυψε ότι σχηματίστηκαν τόσο σύμπλοκα εγκλεισμού όσο και σύμπλοκα μη εγκλεισμού καθώς και συσσωματώματα λόγω των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων. Ειδικότερα, κουρκουμίνη που βρίσκεται εξωτερικά της εκάστοτε κυκλοδεξτρίνης αναπτύσσει διαμοριακές δυνάμεις με τα σύμπλοκα εγκλεισμού σχηματίζοντας συσσωματώματα.
- ✓ Το προφίλ απελευθέρωσης της κουρκουμίνης από τα σύμπλοκα εγκλεισμού είναι διφασικό. Χαρακτηρίζεται από μια ταχεία απελευθέρωση που παρατηρείται στις πρώτες 4 ώρες («burst effect»), η οποία στη συνέχεια σταδιακά περιορίζεται φθάνοντας στις 5 ώρες και έπειτα αρχίζει να σταθεροποιείται («plateau»).
- ✓ Από την κινητική μοντελοποίηση της απελευθέρωσης της κουρκουμίνης από τα σύμπλοκα εγκλεισμού προέκυψε ότι το κινητικό μοντέλο το οποίο περιγράφει το προφίλ απελευθέρωσης είναι το μοντέλο Korsmeyer-Perppas. Ειδικότερα ο εκθέτης διάχυσης *n* είχε τιμές μεταξύ 0.63–0.67, συνεπώς μηχανισμό απελευθέρωσης αποτελεί η διάχυση μέσω ανώμαλης μεταφοράς (non Fickian). Ωστόσο επειδή το συγκεκριμένο μοντέλο είναι ημι-εμπειρικό, θεωρήθηκε ότι τα δεδομένα της απελευθέρωσης προσαρμόζονται καλύτερα στο μοντέλο Higuchi.
- ✓ Η επικάλυψη των συμπλόκων εγκλεισμού με χιτοζάνη με στόχο τον σχηματισμό των νανοσωματιδίων CS-Cur-β-CD, CS-Cur-HP-β-CD και CS-Cur-Me-β-CD κρίνεται απόλυτα επιτυχής. Πιο συγκεκριμένα:
 - Η απόδοση εγκλεισμού της διαδικασίας επικάλυψης αγγίζει το 100%, δηλαδή τα σύμπλοκα εγκλεισμού εγκλείστηκαν πλήρως στη χιτοζάνη.
 - Από το χαρακτηρισμό δυναμικής σκέδασης φωτός παρατηρήθηκε μεταβολή του ζ-δυναμικού από «χαμηλές» αρνητικές τιμές σε «υψηλές» θετικές τιμές. Η μεταβολή του πρόσημου οφείλεται στην περίσσεια θετικού φορτίου της χιτοζάνης και υποδεικνύει ότι το επιφανειακό στρώμα των συστημάτων είναι πλέον επικαλυμμένο με χιτοζάνη, ενώ οι υψηλές τιμές του ζ-δυναμικού υποδεικνύουν ότι τα παραγόμενα νανοσωματίδια είναι σταθερά και δεν έχουν τη τάση να συσσωματωθούν κατά το

χρονικό διάστημα της αποθήκευσής τους και κατά την μετέπειτα εφαρμογή τους σε προϊόντα, κάτι που δεν ίσχυε για τα σύμπλοκα εγκλεισμού.

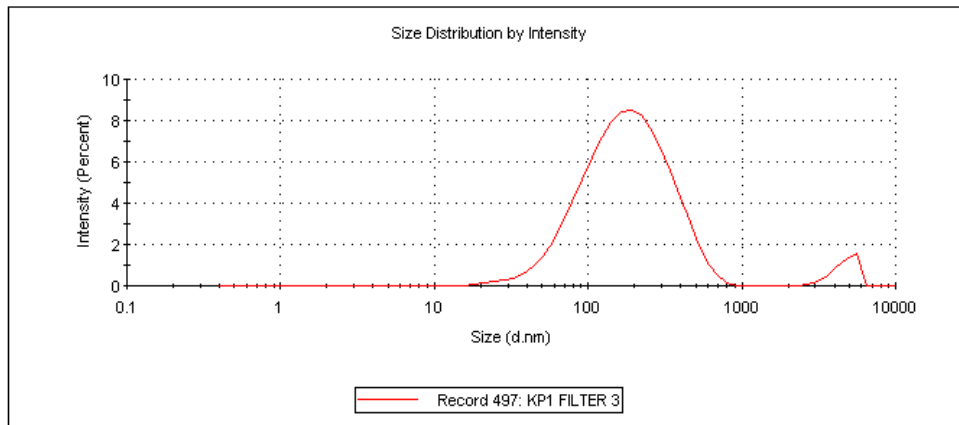
- Το προφίλ απελευθέρωσης της κουρκουμίνης από τα νανοσωματίδια είναι και πάλι διφασικό δηλαδή χαρακτηρίζεται από μια ταχεία απελευθέρωση («burst effect») και έπειτα μία σταδιακή σταθεροποίηση («plateau»). Όμως σε σύγκριση με τα σύμπλοκα εγκλεισμού, το burst effect είναι μετριασμένο καθώς έχει τιμές 17%–28% ενώ στα σύμπλοκα οι τιμές κυμαίνονται μεταξύ 52%–67%. Ο βραδύτερος ρυθμός απελευθέρωσης που εξασφαλίζεται χάρη στην επικάλυψη με χιτοζάνη, δεν παρατηρείται μόνο κατά το burst effect αλλά καθ' όλη τη διάρκεια της απελευθέρωσης. Ως εκ τούτου, μέσω της επικάλυψης εξασφαλίζεται παρατεταμένη απελευθέρωση της κουρκουμίνης (extended release).
- ✓ Από την κινητική μοντελοποίηση της απελευθέρωσης της κουρκουμίνης από τα νανοσωματίδια προέκυψαν χαμηλότερες τιμές του εκθέτη διάχυσης n (0.40–0.47). Επομένως στα νανοσωματίδια ο μηχανισμός απελευθέρωσης είναι η Fickian διάχυση. Τα δεδομένα της απελευθέρωσης προσαρμόζονται καλύτερα στο μοντέλο Higuchi.
- ✓ Από τις μελέτες αλληλεπίδρασης με το ctDNA, προκύπτει τόσο *in vitro* όσο και *in silico* πως η κουρκουμίνη και τα σύμπλοκα εγκλεισμού της σε β-κυκλοδεξτρίνες εμφανίζουν εξωτερική αλληλεπίδραση με τη δευτερεύουσα αύλακα του DNA και συγχρόνως αποσταθεροποιούν τη δομή της διπλής έλικας.

6. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

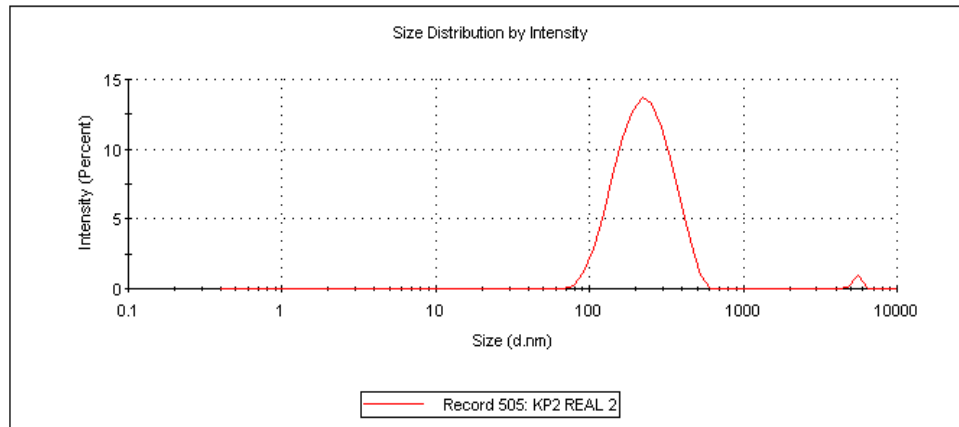
Μελλοντικοί στόχοι της παρούσας εργασίας αποτελούν:

- Η πραγματοποίηση μελέτης Job's Plot για την εύρεση της βέλτιστης αναλογίας κourκουμίνης και κυκλοδεξτρινών κατά τον σχηματισμό των συμπλόκων εγκλεισμού.
- Η πραγματοποίηση μελέτης Phase Solubility ώστε να διερευνηθεί η επίδραση της παρουσίας της εκάστοτε κυκλοδεξτρίνης στην υδατοδιαλυτότητα της κourκουμίνης.
- Ο χαρακτηρισμός των συμπλόκων Cur–Me-β-CD και των επικαλυμμένων νανοσωματιδίων με Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού και ο χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων με Φασματομετρία Υπέρυθρου Μετασχηματισμού Fourier, προκειμένου να μελετηθούν περαιτέρω δομικά.
- Η μελέτη των συμπλόκων και των νανοσωματιδίων με τις μεθόδους Θερμοσταθμικής Ανάλυσης (TGA) και Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC) για τη μελέτη των θερμικών ιδιοτήτων τους.
- Η μελέτη του προφίλ απελευθέρωσης των συμπλόκων και των νανοσωματιδίων σε διαφορετικές συνθήκες, όπως στο pH που προσομοιάζει του στομάχου ή του εντέρου.
- Η δισκιοποίηση των συμπλόκων εγκλεισμού και των επικαλυμμένων νανοσωματιδίων, μελέτη και κινητική μοντελοποίηση της απελευθέρωσής τους από τα φαρμακευτικά σκευάσματα.
- Η εξέταση του σύνθετου φαινομένου της αλληλεπίδρασης της κourκουμίνης με την εκάστοτε β-κυκλοδεξτρίνη και πώς αυτό επιδρά στην απελευθέρωσή της.

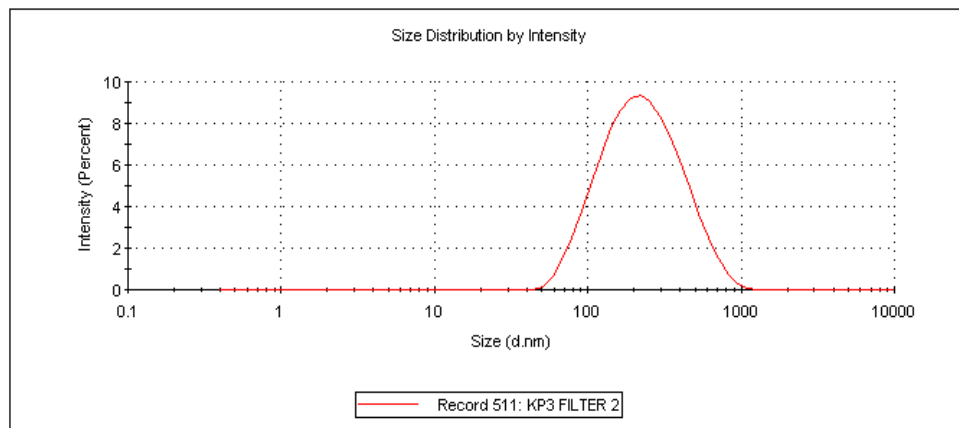
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΙΚΟΝΩΝ



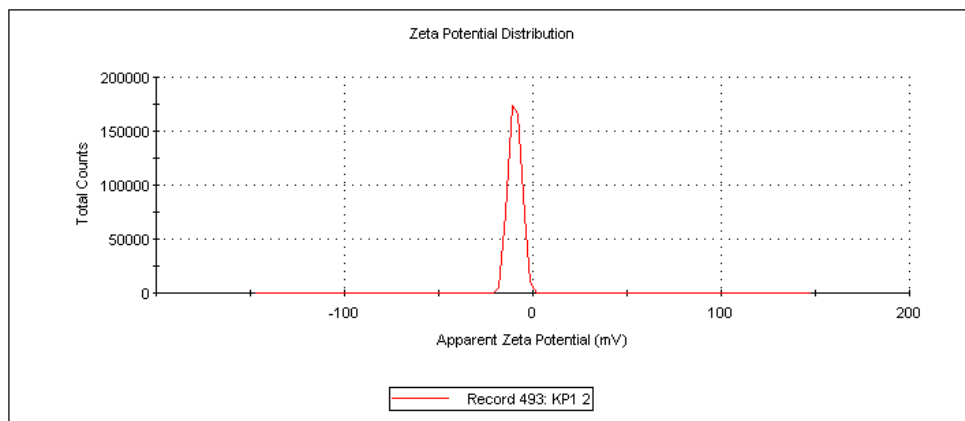
Εικόνα 49. Κατανομή μεγέθους συμπλόκων Cur-β-CD με τη μέθοδο Kneading



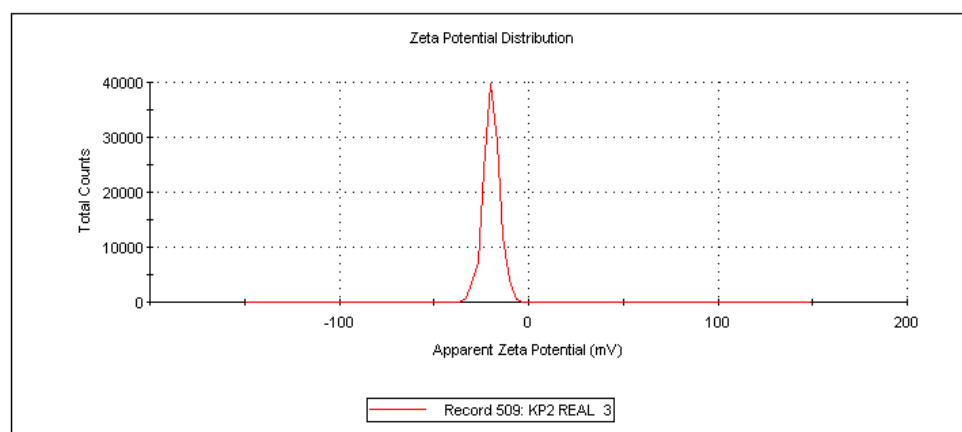
Εικόνα 50. Κατανομή μεγέθους συμπλόκων Cur-HP-β-CD με τη μέθοδο Kneading



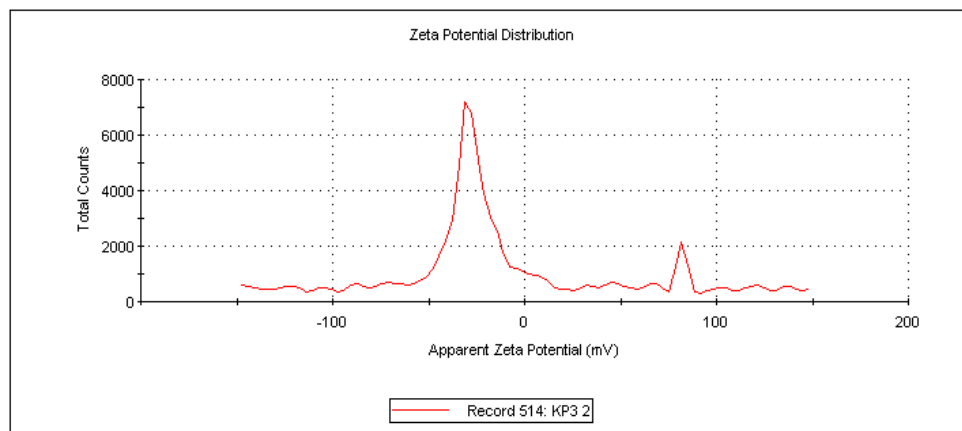
Εικόνα 51. Κατανομή μεγέθους συμπλόκων Cur-Me-β-CD με τη μέθοδο Kneading



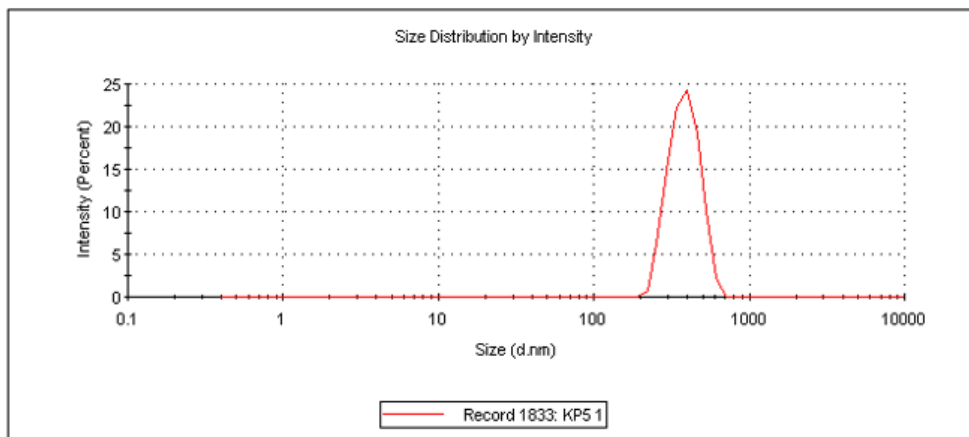
Εικόνα 52. ζ-δυναμικό συμπλόκων Cur-β-CD με τη μέθοδο Kneading



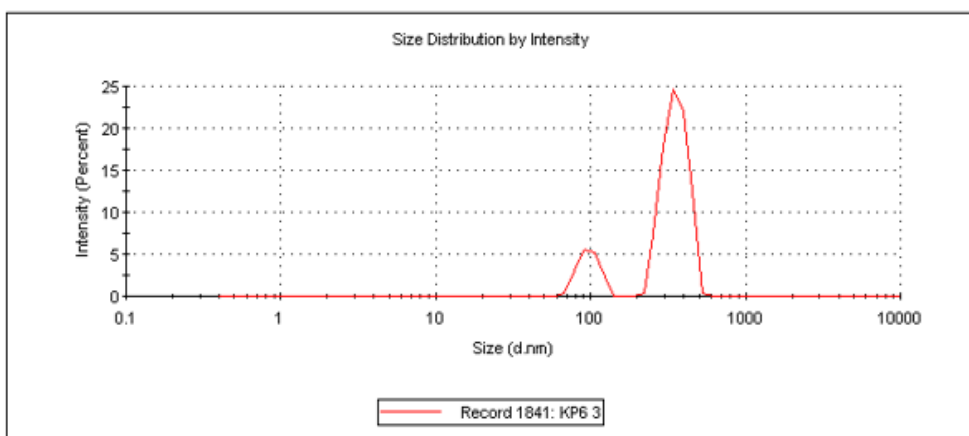
Εικόνα 53. ζ-δυναμικό συμπλόκων Cur-HP-β-CD με τη μέθοδο Kneading



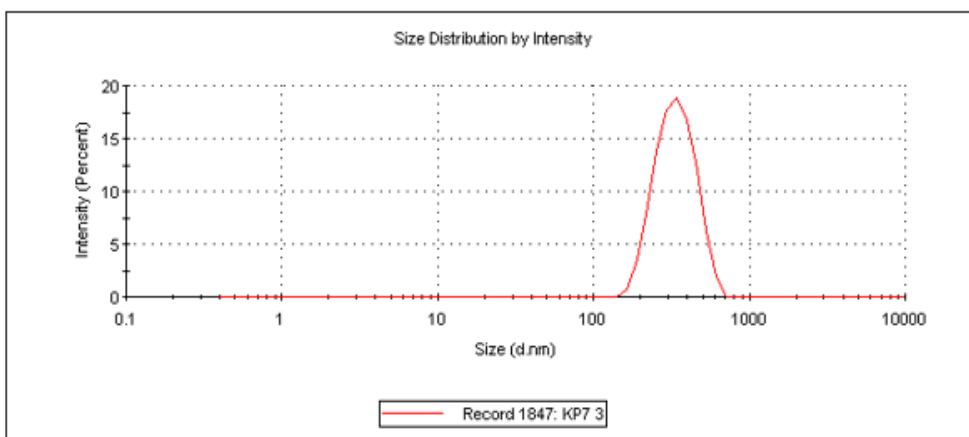
Εικόνα 54. ζ-δυναμικό συμπλόκων Cur-Me-β-CD με τη μέθοδο Kneading



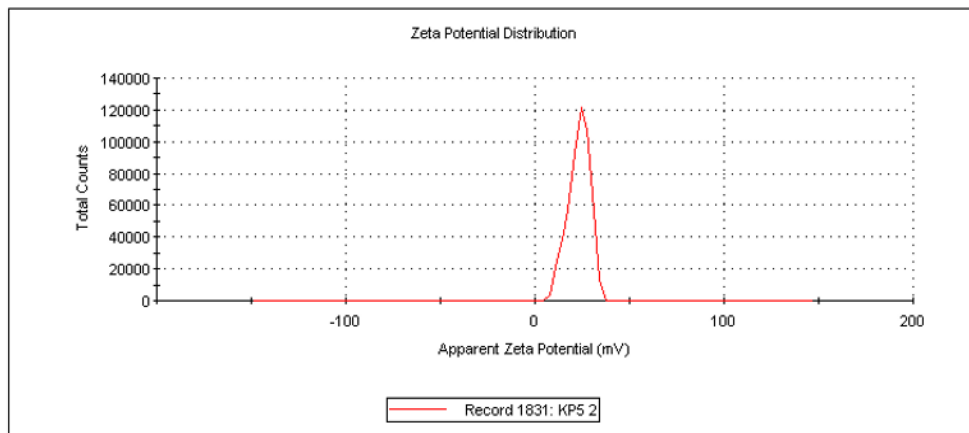
Εικόνα 55. Κατανομή μεγέθους νανοσωματιδίων CS-Cur-β-CD



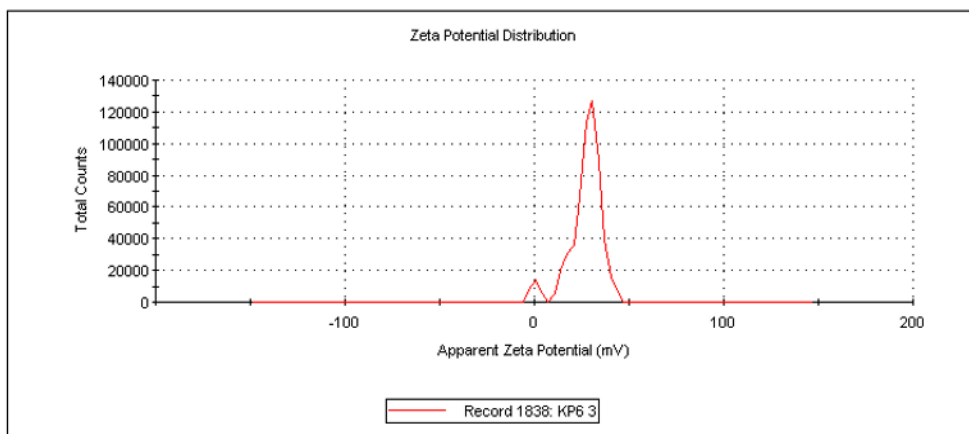
Εικόνα 56. Κατανομή μεγέθους νανοσωματιδίων CS-Cur-HP-β-CD



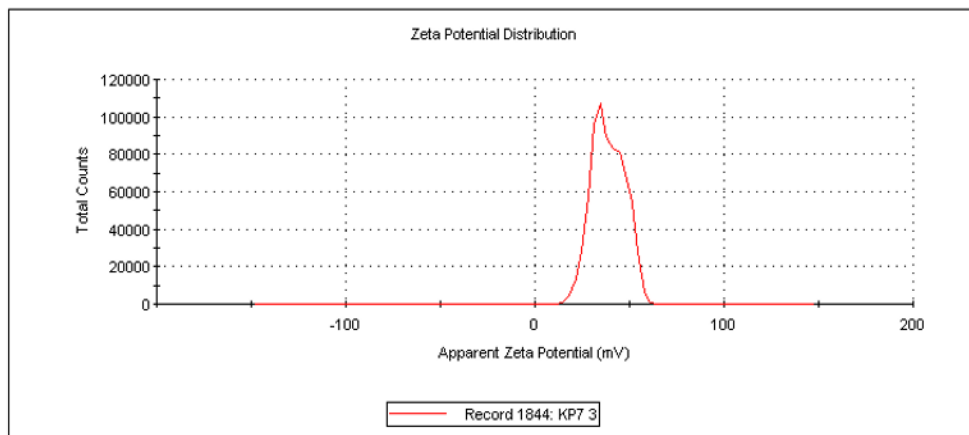
Εικόνα 57. Κατανομή μεγέθους νανοσωματιδίων CS-Cur-Me-β-CD



Εικόνα 58. ζ-δυναμικό νανοσωματιδίων CS-Cur-β-CD



Εικόνα 59. ζ-δυναμικό νανοσωματιδίων CS-Cur-HP-β-CD



Εικόνα 60. ζ-δυναμικό νανοσωματιδίων CS-Cur-Me-β-CD

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Βασικά χαρακτηριστικά α , β και γ Κυκλοδεξτρίνης ^{[7], [10]}	21
Πίνακας 2. Μηχανισμοί Απελευθέρωσης βάσει του εκθέτη n στο μοντέλο Korsmeyer – Peppas ^[42]	42
Πίνακας 3. Σύνοψη μαθηματικών μοντέλων.....	42
Πίνακας 4. Όργανα και Συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν.....	49
Πίνακας 5. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν.....	50
Πίνακας 6. Αναλογίες και ποσότητες κουρκουμίνης και κυκλοδεξτρινών που χρησιμοποιήθηκαν για παραγωγή συμπλόκων εγκλεισμού με τη μέθοδο Kneading.....	51
Πίνακας 7. Αναλογίες και ποσότητες κουρκουμίνης και κυκλοδεξτρινών που χρησιμοποιήθηκαν για παραγωγή συμπλόκων εγκλεισμού με το συνδυασμό μεθόδων Solvent evaporation & Freeze drying.....	52
Πίνακας 8. Αποδόσεις διεργασίας συμπλόκων εγκλεισμού.....	58
Πίνακας 9. Αποδόσεις διεργασίας παραγωγής νανοσωματιδίων.....	59
Πίνακας 10. Αποδόσεις εγκλεισμού παραγόμενων συμπλόκων.....	59
Πίνακας 11. Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου, δείκτη πολυδιασποράς και ζ -δυναμικού συμπλόκων εγκλεισμού με τη μέθοδο Kneading.....	61
Πίνακας 12. Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου, δείκτη πολυδιασποράς και ζ -δυναμικού νανοσωματιδίων.....	62
Πίνακας 13. Χημικές μετατοπίσεις στα φάσματα ^1H NMR (600MHz, D_2O) της β -CD και του συμπλόκου Cur- β -CD.....	64
Πίνακας 14. Χημικές μετατοπίσεις στα φάσματα ^1H NMR (600MHz, D_2O) της HP- β -CD και του συμπλόκου Cur-HP- β -CD.....	66
Πίνακας 15. Συντελεστές R^2 για κάθε κινητικό μοντέλο για τα σύμπλοκα εγκλεισμού ($\text{pH}=7.4$, $T=37^\circ\text{C}$).....	75
Πίνακας 16. Εξισώσεις κινητικού μοντέλου Korsmeyer–Peppas για τα σύμπλοκα εγκλεισμού.....	75
Πίνακας 17. Σύγκριση αποτελεσμάτων απελευθέρωσης συμπλόκων και νανοσωματιδίων.....	77
Πίνακας 18. Συντελεστές R^2 για κάθε κινητικό μοντέλο για τα επικαλυμμένα νανοσωματίδια ($\text{pH}=7.4$, $T=37^\circ\text{C}$).....	78
Πίνακας 19. Εξισώσεις κινητικού μοντέλου Korsmeyer–Peppas για τα επικαλυμμένα νανοσωματίδια.....	79
Πίνακας 20. Τιμές σταθεράς σύνδεσης με το DNA.....	83

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Η κουρκουμίνη σε μορφή δικετόνης (αριστερά) και σε μορφή ενόλης (δεξιά). Η δικετο-ομάδα εμφανίζει ταυτομέρεια κετο-ενόλης και αναλόγως του περιβάλλοντος μπορεί να υπάρχει σε πολλές διαμορφώσεις.....	13
Εικόνα 2. Πιθανές υποκαταστάσεις στο μόριο της κουρκουμίνης που δίνουν ουσίες με αντικαρκινικές ιδιότητες ^[6]	17
Εικόνα 3. Μοριακοί τύποι α, β και γ κυκλοδεξτρίνης ^[10]	19
Εικόνα 4. Απεικόνιση των υδροξυλίων στο μόριο της κυκλοδεξτρίνης	19
Εικόνα 5. Αναπαράσταση κόλουρου κώνου κυκλοδεξτρινών (πλάγια όψη) ^[10]	19
Εικόνα 6. Διάγραμμα ροής παραγωγής Κυκλοδεξτρινών και παράγοντες που αυξάνουν την απόδοση της διεργασίας ^[13]	20
Εικόνα 7. β-κυκλοδεξτρίνη και τροποποιημένες β-κυκλοδεξτρίνες.....	22
Εικόνα 8. Σχηματισμός συμπλόκου εγκλεισμού και αλληλεπιδράσεις κυκλοδεξτρίνης-ένωσης-νερού ^[20]	23
Εικόνα 9. Σχηματισμός συμπλόκων εγκλεισμού με διαφορετικές αναλογίες κυκλοδεξτρίνης-δραστικής ένωσης ^[19]	24
Εικόνα 10. Δυναμική ισορροπία του συμπλόκου εγκλεισμού ^[21]	24
Εικόνα 11. Πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ δραστικής ένωσης και κυκλοδεξτρίνης ^[22]	25
Εικόνα 12. Δημιουργία συσσωματωμάτων ^[21]	26
Εικόνα 13. Διάταξη μεθόδου Ξήρανσης με Ψεκασμό	27
Εικόνα 14. Χημική δομή Χιτοζάνης.....	29
Εικόνα 15. Σχηματισμός νανοσωματιδίων χιτοζάνης με την μέθοδο ιονοτροπικής ηλεκτροπηγής ^{[29], [30]}	31
Εικόνα 16. Σχηματισμός νανοσωματιδίων χιτοζάνης με Γαλακτωματοποίηση-Διάχυση Διαλύτη ^[29]	32
Εικόνα 17. Σχηματισμός νανοσωματιδίων χιτοζάνης με Καταβύθιση/Συσσωμάτωση	32
Εικόνα 18. Σχηματική Αναπαράσταση μονοδιεσπαρμένου και πολυδιεσπαρμένου συστήματος ^[34]	34
Εικόνα 19. Φαρμακοκινητική: Πρώτο στάδιο η απελευθέρωση της δραστικής ουσίας	35
Εικόνα 20. Μηχανισμοί απελευθέρωσης φαρμάκων από πολυμερικά συστήματα (νανοσωματίδια) ^[39]	36
Εικόνα 21. Τα 5 στάδια της διαλυτοποίησης ενός φαρμάκου	37
Εικόνα 22. Παράδειγμα γραφικής παράστασης μοντέλου Zero Order.....	38
Εικόνα 23. Παράδειγμα γραφικής παράστασης μοντέλου First Order	39
Εικόνα 24. Παράδειγμα γραφικής παράστασης μοντέλου Higuchi	40
Εικόνα 25. Παράδειγμα γραφικής παράστασης μοντέλου Korsmeyer - Peppas	41
Εικόνα 26. Γραφική αναπαράσταση του Burst Effect ^[43]	43
Εικόνα 27. Προφίλ απελευθέρωσης φαρμάκων ^[43]	44
Εικόνα 28. Είδη αλληλεπιδράσεων μορίων - DNA	45
Εικόνα 29. Δέσμευση μορίων στη μικρή ή στη μεγάλη αύλακα του DNA	46
Εικόνα 30. Φάσματα ¹ H NMR (600MHz, D ₂ O) της β-CD (α) και του συμπλόκου Cur-β-CD (β) ..	64
Εικόνα 31. Χημική δομή β-CD και αναπαράσταση της τρισδιάστατης δομής της β-CD	65
Εικόνα 32. Φάσματα ¹ H NMR (600MHz, D ₂ O) της HP-β-CD (α) και του συμπλόκου Cur-HP-β-CD (β)	66

Εικόνα 33. Φάσμα FT-IR της κουρκουμίνης.....	68
Εικόνα 34. Φάσμα FT-IR της β-CD.....	68
Εικόνα 35. Συγκριτικά φάσματα FT-IR των καθαρών Cur και β-CD και του συμπλόκου Cur-β-CD	69
Εικόνα 36. Φάσμα FT-IR του συμπλόκου Cur-β-CD	69
Εικόνα 37. Φάσμα FT-IR της HP-β-CD	70
Εικόνα 38. Φάσμα FT-IR του συμπλόκου Cur-HP-β-CD	70
Εικόνα 39. Συγκριτικά φάσματα FT-IR των καθαρών Cur και HP-β-CD και του συμπλόκου Cur-HP-β-CD	71
Εικόνα 40. Φάσμα FT-IR της Me-β-CD	71
Εικόνα 41. Φάσμα FT-IR του συμπλόκου Cur-Me-β-CD.....	72
Εικόνα 42. Συγκριτικά φάσματα FT-IR των καθαρών Cur και Me-β-CD και του συμπλόκου Cur-Me-β-CD	72
Εικόνα 43. Φάσμα UV-Vis διαλυμάτων καθαρής κουρκουμίνης συγκέντρωσης $2 \cdot 10^{-3}$ mg/ml σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ct-DNA (0-400 μM)	80
Εικόνα 44. Φάσμα UV-Vis διαλυμάτων συμπλόκου Cur-β-CD (συγκέντρωση κουρκουμίνης $2 \cdot 10^{-3}$ mg/ml) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ct-DNA (0-400 μM)	81
Εικόνα 45. Φάσμα UV-Vis διαλυμάτων συμπλόκου Cur-HP-β-CD (συγκέντρωση κουρκουμίνης $2 \cdot 10^{-3}$ mg/ml) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ct-DNA (0-400 μM)	82
Εικόνα 46. Φάσμα UV-Vis διαλυμάτων συμπλόκου Cur-Me-β-CD (συγκέντρωση κουρκουμίνης $2 \cdot 10^{-3}$ mg/ml) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ct-DNA (0-400 μM)	82
Εικόνα 47. Σχηματική απεικόνιση της δέσμευσης της κουρκουμίνης στην κρυσταλλική δομή του DNA, μέσω σταθεροποίησης στη μικρή αύλακα.	84
Εικόνα 48. Χημική δομή κουρκουμίνης.....	85
Εικόνα 49. Κατανομή μεγέθους συμπλόκων Cur-β-CD με τη μέθοδο Kneading.....	89
Εικόνα 50. Κατανομή μεγέθους συμπλόκων Cur-HP-β-CD με τη μέθοδο Kneading	89
Εικόνα 51. Κατανομή μεγέθους συμπλόκων Cur-Me-β-CD με τη μέθοδο Kneading	89
Εικόνα 52. ζ-δυναμικό συμπλόκων Cur-β-CD με τη μέθοδο Kneading.....	90
Εικόνα 53. ζ-δυναμικό συμπλόκων Cur-HP-β-CD με τη μέθοδο Kneading.....	90
Εικόνα 54. ζ-δυναμικό συμπλόκων Cur-Me-β-CD με τη μέθοδο Kneading	90
Εικόνα 55. Κατανομή μεγέθους νανοσωματιδίων CS-Cur-β-CD	91
Εικόνα 56. Κατανομή μεγέθους νανοσωματιδίων CS-Cur-HP-β-CD	91
Εικόνα 57. Κατανομή μεγέθους νανοσωματιδίων CS-Cur-Me-β-CD	91
Εικόνα 58. ζ-δυναμικό νανοσωματιδίων CS-Cur-β-CD.....	92
Εικόνα 59. ζ-δυναμικό νανοσωματιδίων CS-Cur-HP-β-CD	92
Εικόνα 60. ζ-δυναμικό νανοσωματιδίων CS-Cur-Me-β-CD	92

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1. Ιδιότητες Κουρκουμίνης.....	14
Σχήμα 2. Διαδικασία παραγωγής Χιτοζάνης.....	30
Σχήμα 3. Παρεμβολή (intercalation) στο DNA.....	45
Σχήμα 4. Πειραματική διαδικασία παραγωγής συμπλόκων εγκλεισμού με τη μέθοδο Kneading	51
Σχήμα 5. Πειραματική διαδικασία παραγωγής συμπλόκων εγκλεισμού μέσω εξάτμισης διαλύτη & λυοφιλοποίησης	52
Σχήμα 6. Πειραματική διαδικασία παραγωγής επικαλυμμένων νανοσωματιδίων μέσω ιονοτροπικής ηηκτωμάτωσης	53

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1. Καμπύλη αναφοράς κουρκουμίνης ($\lambda_{\max}=423.8\text{nm}$).....	57
Διάγραμμα 2. Καμπύλες απελευθέρωσης κουρκουμίνης από τα σύμπλοκα εγκλεισμού	74
Διάγραμμα 3. Γραφική παράσταση του κινητικού μοντέλου Korsmeyer–Peppas για την απελευθέρωση της κουρκουμίνης από τα σύμπλοκα	76
Διάγραμμα 4. Γραφική παράσταση του κινητικού μοντέλου Higuchi για την απελευθέρωση της κουρκουμίνης από τα των σύμπλοκα	76
Διάγραμμα 5. Καμπύλες απελευθέρωσης της κουρκουμίνης από τα επικαλυμμένα νανοσωματίδια.....	77
Διάγραμμα 6. Γραφική παράσταση του κινητικού μοντέλου Korsmeyer–Peppas για την απελευθέρωση της κουρκουμίνης από τα νανοσωματίδια	79
Διάγραμμα 7. Γραφική παράσταση του κινητικού μοντέλου Higuchi για την απελευθέρωση της κουρκουμίνης από τα νανοσωματίδια.....	80
Διάγραμμα 8. Τιμές σταθεράς σύνδεσης με το DNA	83

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] S. J. Stohs, O. Chen, S. D. Ray, J. Ji and L. R. Bucci, "Highly Bioavailable Forms of Curcumin and Promising Avenues for Curcumin-Based Research and Application: A Review," *Molecules*, March 2020.
- [2] S. J. Hewlings and D. S. Kalman, "Curcumin: A Review of Its' Effects on Human Health," *Foods*, pp. 1-7, October 2017.
- [3] J. D. Betteridge, "What Is Oxidative Stress?," *W.B. Saunders Company*, pp. 1-6, February 2000.
- [4] S. Z. Moghadamtousi, H. A. Kadir, P. Hassandarvish, H. Tajik, S. Abubakar and K. Zandi, "A Review on Antibacterial, Antiviral, and Antifungal Activity of Curcumin," *Hindawi Publishing Corporation*, pp. 1-12, April 2014.
- [5] X. Wei, Z. Du, X. Zheng, X. Cui, A. H. Conney and K. Zhang, "Synthesis and evaluation of curcumin-related compounds for anticancer activity," *European Journal of Medicinal Chemistry*, April 2012.
- [6] M. Tomeh, R. Hadianamrei and X. Zhao, "A Review of Curcumin and Its Derivatives as Anticancer Agents," *International Journal of Molecular Sciences*, pp. 1-11, February 2019.
- [7] M. E. Del Valle, "Cyclodextrins and their uses: a review," *Elsevier*, pp. 1033-1046, 2004.
- [8] Y. Vikas, K. Sandeep, D. Braham, C. Manjusha and V. Budhwar, "Cyclodextrin Complexes: An Approach to Improve the Physicochemical Properties of Drugs and Applications of Cyclodextrin Complexes," *Asian Journal of Pharmaceutics*, pp. 394-409, April-June 2018.
- [9] T. Loftsson and M. E. Brewster, "Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. Drug Solubilization and Stabilization," *Journal of Pharmaceutical Sciences* , pp. 1017-1025, October 1996.
- [10] P. Shahgaldian and U. Piele, "Cyclodextrin Derivatives as Chiral Supramolecular Receptors for Enantioselective Sensing," *Sensors*, vol. 6, pp. 593-615, June 2006.
- [11] N. Szerman, I. Schroh, A. L. Rossi, A. M. Rosso, N. Krymkiewicz and S. A. Ferrarotti, "Cyclodextrin production by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* DF 9R," *Bioresource Technology*, pp. 2886-2991, December 2006.
- [12] J. Szejtli, "Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry," *Chem. Rev.*, vol. 98, no. 5, pp. 1743-1753, June 1998.

- [13] H. Leemhuis, L. Dikhuizen and R. Kelly, "Engineering of cyclodextrin glucanotransferases and the impact for biotechnological applications," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 85, pp. 823-835, September 2009.
- [14] A. Coleman, I. Nicolis, N. Keller and J. P. Dabliez, "Aggregation of Cyclodextrins: An Explanation of the Abnormal Solubility of β -Cyclodextrin," *Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry*, vol. 13, pp. 139-143, 1992.
- [15] L. Szente and E. Fenyvesi, "Cyclodextrin-Lipid Complexes: Cavity Size Matters," *Structural Chemistry*, vol. 28, pp. 479-492, November 2016.
- [16] P. Mura, E. Adragna, A. M. Rabasco, J. R. Moyano, J. I. Pérez-Martínez, M. J. Arias and J. M. Ginés, "Effects of the Host Cavity Size and the Preparation Method on the Physicochemical Properties of Ibuprofen-Cyclodextrin Systems," *Drug Development and Industrial Pharmacy*, vol. 25, no. 3, pp. 279-287, February 1999.
- [17] S. D. Eastburn and B. Y. Tao, "Applications of Modified Cyclodextrins," *Biotechnology Advances*, vol. 12, pp. 325-339, 1994.
- [18] L. E. Hill, C. Gomes and T. M. Taylor, "Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications," *LWT - Food Science and Technology*, vol. 51, pp. 86-93, 2013.
- [19] A. Giani, A. Linde, N. Laverde, G. A. Barros Colauto and G. Linde, "Changes to Taste Perception in the Food Industry: Use of Cyclodextrins," *Handbook of Behavior, Food and Nutrition*, pp. 99-117, July 2014.
- [20] N. A. Khan and M. Durakshan, "Cyclodextrin: An Overview," *International Journal of Bioassays*, pp. 858-865, May 2013.
- [21] A. Ryzhakov, T. D. Thi, J. Stappaerts, L. Bertoletti, K. Kimpe, A. Rodrigues, S. Couto, P. Saokham, G. Van den Mooter, P. Augustijns, G. W. Somsen, S. Kurkov, S. Inghelbrecht, A. Arien, M. I. Jimidar, K. Schrijnemakers and T. Loftsson, "Self-Assembly of Cyclodextrins and Their Complexes in Aqueous Solutions," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 105, pp. 2556-2569, March 2016.
- [22] N. N. S. Mai, R. Nakai, Y. Kawano and T. Hanawa, "Enhancing the Solubility of Curcumin Using a Solid Dispersion System with Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Prepared by Grinding, Freeze-Drying, and Common Solvent Evaporation Methods," *Pharmacy*, November 2020.
- [23] M. N. V. Ravi Kumar, R. A. A. Muzzarelli, C. Muzzarelli, H. Sashiwa and A. J. Domb, "Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives," *Chemical Reviews*, vol. 104, pp. 6017-6084, 2004.

- [24] L. Qi, Z. Xu, X. Jiang, C. Hu and X. Zou, "Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles," *Carbohydrate Research*, vol. 339, pp. 2693-2700, October 2004.
- [25] M. Rinaudo, "Chitin and chitosan: Properties and applications," *Progress In Polymer Science*, vol. 31, pp. 603-632, June 2006.
- [26] S. Islam, M. A. Rahman Bhuiyan and M. N. Islam, "Chitin and chitosan: Properties and applications in Biomedical Engineering," *Journal of Polymers and the Environment*, vol. 25, pp. 854-866, 2017.
- [27] Y. Luo, Z. Teng, Y. Li and Q. Wang, "Solid lipid nanoparticles for oral drug delivery: Chitosan coating improves stability, controlled delivery, mucoadhesion and cellular uptake," *Carbohydrate Polymers*, vol. 122, pp. 221-229, 2015.
- [28] W. Fan, W. Yan, Z. Xu and H. Ni, "Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 90, pp. 21-27, 2012.
- [29] A. M. Holban and A. M. Grumezescu, *Nanoarchitectonics for Smart Delivery and Drug Targeting*, 2016.
- [30] D. Shah and V. Londhe, "Optimization and characterization of levamisole-loaded chitosan nanoparticles by ionic gelation method using 2³ factorial design by Minitab," *Therapeutic Delivery*, vol. 2, no. 2, 2011.
- [31] J. Stetefeld, S. A. McKenna and T. R. Patel, "Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences," *Biophysical Reviews*, vol. 84, pp. 409-427, October 2016.
- [32] V. J. Mohanraj and Y. Chen, "Nanoparticles – A Review," *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 5, no. 1, pp. 561-573, June 2006.
- [33] A. Albanese, P. S. Tang and W. C. W. Chan, "The Effect of Nanoparticle Size, Shape and Surface Chemistry on Biological Systems," *Annual Review of Biomedical Engineering*, vol. 14, pp. 1-16, 2012.
- [34] M. Danaei, M. Dehghankhold, S. Ataei, F. Hasanzadeh Davarani, R. Javanmard, A. Dokhani, S. Khorasani and M. R. Mozafari, "Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems," *Pharmaceutics*, vol. 10, no. 57, May 2018.
- [35] B. Salopek, D. Krasic and S. Filipovic, "Measurement and application of zeta-potential," *Rudarsko-geoloiko-naftni zbornik*, vol. 4, pp. 147-151, 1992.
- [36] R. Xu, "Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement," *Particuology*, vol. 6, pp. 112-115, 2008.

- [37] J. Keeler, *Understanding NMR Spectroscopy*, May 2010.
- [38] G. Singhvi and M. Singh, "Review: In-Vitro Drug Release Characterization Models," *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research*, vol. 2, no. 1, pp. 77-84, 2011.
- [39] S. Fredenberg, M. Wahlgren, M. Reslow and A. Axelsson, "The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems—A review," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 415, pp. 34-52, 2011.
- [40] J. Siepmann and F. Siepmann, "Mathematical modeling of drug dissolution," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 453, no. 1, pp. 12-24, August 2013.
- [41] Z. Erdelyi and D. L. Beke, "On the "rationalisation" of Fick's first law," *Scripta Materialia*, vol. 49, pp. 613-617, 2003.
- [42] S. Dash, P. Narasimha Murthy, L. Nath and P. Chowdhury, "kinetic Modeling on Drug Release from Controlled Drug Delivery Systems," *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, vol. 67, no. 3, pp. 217-223, 2010.
- [43] N. Kamaly, B. Yameen, J. Wu and O. C. Farokhzad, "Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release," *Chemical Reviews*, vol. 116, pp. 2602-2663, 2016.
- [44] M. Sirajuddin, S. Ali and A. Badshah, "Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry," *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 124, pp. 1-19, 2013.