



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΝΑΝΟΔΙΑΤΑΞΕΙΣ»

ΤΙΤΛΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

**Μεικτά νανοσυστήματα αμφιφιλικών συμπολυμερών-
επιφανειοδραστικών ενώσεων για φαρμακευτικές εφαρμογές**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Του

Γιαχαλή Κωνσταντίνου

Επιβλέπων:

Α. Πίσπας

Διευθυντής Ερευνών ΕΙΕ

Αθήνα
2020



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΝΑΝΟΔΙΑΤΑΞΕΙΣ»

ΤΙΤΛΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

**Μεικτά νανοσυστήματα αμφιφιλικών συμπολυμερών-
επιφανειοδραστικών ενώσεων για φαρμακευτικές εφαρμογές**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Του

Γιαχαλή Κωνσταντίνου

Επιβλέπων:

Α. Πίσπας

Διευθυντής Ερευνών ΕΙΕ

Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή την30/10/20.....

Κοντού Ευαγγελία Καθηγήτρια ΕΜΠ	Κυρίτσης Απόστολος Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΜΠ	Πίσπας Αστέριος Διευθυντής Ερευνών ΕΙΕ

Αθήνα
2020

.....
Γιαχαλής Κωνσταντίνος

© (2020) Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο. All rights Reserved. Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς το συγγραφέα. Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σ' αυτό το έγγραφο εκφράζουν το συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευτεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Πρόλογος

Το παρόν σύγγραμμα αποτελεί τη διπλωματική μου εργασία, όπως απαιτείται για την ολοκλήρωση του ΔΠΜΣ: Μικροσυστήματα και Νανοδιατάξεις της σχολής ΣΕΜΦΕ ΕΜΠ. Η διεξαγωγή της έγινε στα εργαστήρια του Ινστιτούτου Θεωρητικής & Φυσικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών υπό την επίβλεψη των Δρ. Α.Πίσπα και Α. Κυρίτση.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Α.Πίσπα για την ανάθεση του θέματος και για την υποστήριξη και καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας, καθώς και τον Α. Κυρίτση για την άψογη συνεργασία και υποστήριξη. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Α. Σκανδάλη για την υποστήριξη του και την βοήθεια του κατά τα αρχικά στάδια της εργασίας, καθώς και τους υποψήφιους διδάκτορες και μεταπτυχιακούς φοιτητές του εργαστηρίου για την συνεισφορά/υποστήριξή τους κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων της εργασίας.

Περίληψη

Σκοπός της διπλωματικής αυτής εργασίας ήταν η προετοιμασία και ο χαρακτηρισμός μικκυλιακών συστημάτων του δισυσταδικού συμπολυμερούς πολυ(ακρυλικός εστέρας της λαυρικής αλκοόλης (δωδεκανόλης))-b-πολυ(ακρυλικός εστέρας της ολιγαιθυλενογλυκόλης) poly(lauryl acrylate)-b-poly(oligoethylene glycol acrylate) (PLA-POEGA). Το PLA-POEGA αποτελεί ένα αμφιφιλικό συμπολυμερές το οποίο αποτελείται από δύο βιοσυμβατά μακρομόρια (συστάδες) τα οποία παρουσιάζουν διαφορετικό βαθμό συγγένειας με πολικούς διαλύτες, όπως το νερό. Ως εκ τούτου όταν το μακρομόριο βρεθεί σε υδατικό περιβάλλον το οποίο είναι εκλεκτικός διαλύτης ως προς τη συστάδα του POEGA τότε το συμπολυμερές αυτοοργανώνεται σε κλειστές δομές μικκυλίων με πυρήνα τη συστάδα του PLA. Στα πλαίσια της μελέτης τα συστήματα του συμπολυμερούς εξετάστηκαν αυτούσια, αλλά και σε συνδυασμό με επιφανειοδραστικές ενώσεις, λιπίδια και άλλα συμπολυμερή με χρήση τεχνικών σκέδασης φωτός και φασματοσκοπίας φθορισμού. Σκοπός ήταν η εξαγωγή συμπερασμάτων για τον μηχανισμό αλληλεπίδρασης των συστατικών και τον τρόπο με τον οποίο διαμορφώνονται οι μεικτές/υβριδικές δομές. Επιπροσθέτως μελετήθηκε η επίδραση των διαφορετικών πρωτοκόλλων ενυδάτωσης στα τελικά συστήματα καθώς και η δυνατότητα εγκλεισμού φαρμακευτικών ενώσεων στα καθαρά και μεικτά μικκύλια.

Τα νανοσυστήματα παρασκευάστηκαν με τρεις διαφορετικούς τρόπους ενυδάτωσης: απευθείας διάλυση, χρήση οργανικού διαλύτη και ενυδάτωση λεπτού φιλμ.

Αρχικά διερευνήθηκε το σημείο της κρίσιμης μικκυλιακής συγκέντρωσης και το μέγεθος των μικκυλίων του PLA-POEGA συναρτήσει της μεθόδου διάλυσης. Η βέλτιστη συμπεριφορά ως προς τα δομικά χαρακτηριστικά καταγράφηκε για την ενυδάτωση λεπτού φιλμ και την άμεση διάλυση, αντίστοιχα. Στα συστήματα αυτά πραγματοποιήθηκε εγκλεισμός των φαρμακευτικών ενώσεων κουρκουμίνης (Curcumin, CUR) και ινδομεθακίνης (Indomethacin, IND). Η ενσωμάτωση των υδρόφοβων φαρμάκων στα πολυμερικά μικκύλια προκάλεσε αναμενόμενη διόγκωση των σωματιδίων, το μέτρο της οποίας εξαρτήθηκε από τα επιμέρους χαρακτηριστικά των δύο φαρμακευτικών ενώσεων.

Ακολούθως εξετάστηκαν τα μεικτά μικκύλια σε συνδυασμό με τις επιφανειοδραστικές ενώσεις (surfactants) Tween και SPAN. Ειδικότερα τα συστήματα του Tween μελετήθηκαν σε δύο συγκεντρώσεις που αντιστοιχούσαν σε τιμές άνω και κάτω της κρίσιμης μικκυλιακής συγκέντρωσης του (critical micelle concentration, CMC). Για την περίπτωση του πρώτου surfactant προσδιορίστηκε και η επίδραση στην συσσωμάτωση του συμπολυμερούς. Συγκεκριμένα η παρουσία του Tween προώθησε την μικκυλοποίηση σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε κάθε περίπτωση ανεξαρτήτως συγκέντρωσης και μεθόδου ανάμειξης. Από τον προσδιορισμό των μεγεθών των μεικτών σωματιδίων συμπολυμερούς και επιφανειοδραστικών ενώσεων

παρατηρήθηκε πως το πιο υδρόφοβο surfactant (SPAN) οδήγησε στον σχηματισμό μικκυλίων μεγαλύτερου μεγέθους. Για τον εγκλεισμό φαρμακευτικών ενώσεων επιλέχθηκε το επιφανειοδραστικό μόριο και η μέθοδος που επέδειξαν τα καλύτερα χαρακτηριστικά. Στις δύο περιπτώσεις ενσωμάτωσης καταγράφηκε αξιοσημείωτη αύξηση των διαστάσεων των μικκυλίων.

Το συμπολυμερές χαρακτηρίστηκε και ως προς την δυνατότητα σχηματισμού μεικτών μικκυλίων με λιπίδια. Το απλό φωσφολιπίδιο DPPC προώθησε την ανεπιθύμητη συσσωμάτωση των σωματιδίων σε δομές μεγάλου μεγέθους σε κάθε εξεταζόμενη συγκέντρωση. Παρόμοια τάση παρουσίασε και το τροποποιημένο λιπίδιο DSPE-PEG, του οποίου τα μεικτά μικκύλια με το συμπολυμερές ήταν σε αποδεκτά όρια μεγέθους. Η ενσωμάτωση των φαρμακευτικών μορίων και ο χαρακτηρισμός πραγματοποιήθηκε στο σύστημα του λιπιδίου DPSE-PEG λόγω των συγκριτικά καλύτερων δομικών ιδιοτήτων που εμφάνισε.

Συμπληρωματικά προετοιμάστηκαν μεικτά μικκύλια του PLA-POEGA- με το συμπολυμερές πολυ(ακρυλικός εστέρας της δωδεκανόλης)-b-πολυ (ακρυλικό οξύ) (PLA-PAA) σε διαφορετικές αναλογίες των δύο συμπολυμερών. Το μέγεθος των σωματιδίων αξιολογήθηκε σε βασικό, ουδέτερο και όξινο περιβάλλον. Η πρωτονίωση και αποπρωτονίωση του PAA ως αποτέλεσμα των μεταβολών του pH προκάλεσε διακυμάνσεις στο μέγεθος των μικκυλίων προσδίδοντας την δυνατότητα απόκρισης του σύνθετου νανοσυστήματος σε εναλλαγές του περιβάλλοντός του.

Λέξεις κλειδιά

Συμπολυμερή, αμφιφιλικά μόρια, μικκύλια, αυτοοργάνωση, επιφανειοδραστικές ενώσεις, λιπίδια, φαρμακευτικές ενώσεις, φαρμακευτική αποδέσμευση, νανοσωματίδια, δυναμική σκέδαση φωτός.

Abstract

The aim of this diploma thesis was the preparation and characterization of micelle systems of poly(lauryl acrylate)-b-poly (oligoethylene glycol acrylate)- (PLA-POEGA) diblock copolymer. PLA-POEGA is an amphiphilic macromolecule that consists of two biocompatible polymeric blocks, that show different affinity towards polar solvents, including water. As a consequence the diblock is capable of self-organization into nanoscopic micelles with PLA cores when dispersed in aqueous media that is selective solvents for the POEGA block. The dispersions that were examined consisted of neat PLA-POEGA and combinations with various surfactants, lipids and other amphiphilic copolymers, aiming to determine the effect of such substances on the structure of mixed/hybrid micelles, utilizing light scattering and fluorescence spectroscopy techniques. Additionally the polymeric micelles, neat and mixed, were evaluated for their drug encapsulation capabilities.

The aqueous nanosystems were prepared with three different methods: direct dissolution in water medium, evaporation of organic solvent and thin film hydration.

Firstly the critical micelle concentration (CMC) and micelle size distribution of PLA-POEGA were determined as a function of the preparation protocol that was used. Results showed that the best behavior was obtained by thin film hydration and direct dissolution, respectively. Afterwards the encapsulation of drug molecules Indomethacin (IND) and Curcumin (CUR) within the micellar dispersions took place. The direct consequence of drug encapsulation was the swelling of polymeric micelles as expected, with the magnitude being directly related to the distinct characteristics of each drug molecule.

As a next step the surfactants Tween and SPAN were introduced to the polymeric micelles. The dispersions that contained Tween were examined at two different surfactant concentrations that corresponded to values above and below its CMC. The aim was to obtain data about the effect of Tween on copolymer micellization when the first is dissolved in molecular and micellar state, respectively. Tween promoted the formation of PLA-POEGA micelles at lower copolymer concentration, regardless of surfactant concentration and hydration method. The swelling of mixed micelles was found to be directly related to surfactant hydrophobicity in the two cases examined. The incorporation of drugs was accomplished according to the hydration method that presented the best results. The presence of drugs led to a notable increase to particles size.

The capability of mixed micelle formation of PLA-POEGA- and lipids was also studied. DPPC caused undesirable aggregation that mainly led to the formation of mixed particles that exceeded by far the micelle dimensions, regardless of the DPPC concentration. DSPE-PEG presented a similar trend, although for the lower

concentrations the average hydrodynamic radius of mixed particles was within acceptable limits. The encapsulation of pharmaceutical substances was carried out only for PLA-POEGA /DSPE mixed micelles due to the better properties that it presented in comparison to PLA-POEGA /DPPC system.

Additionally, PLA-POEGA /PLA-PAA mixed micelles were prepared at different copolymers ratio. The dimensions of mixed micelles were evaluated at acidic, neutral and basic pH. As a result of the displacement in chemical equilibrium, the protonation and deprotonation of PAA caused fluctuation in hydrodynamic radius providing response capability to the mixed nanosystem.

Key words

Copolymers, amphiphilic blocks, micelles, self organization, surfactants, lipids, drugs, advanced drug delivery systems, nanoparticles, dynamic light scattering.

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη	6
Λέξεις κλειδιά	7
Abstract	8
Key words	9
Κατάλογος Σχημάτων	12
Κατάλογος Πινάκων.....	13
1 Κεφαλαίο 1 ^ο : Θεωρητικό μέρος.....	15
1.1 Συμπολυμερή.....	15
1.1.1 Χαρακτηριστικές δομές συμπολυμερών.....	15
1.1.2 Αυτοοργάνωση αμφιφιλικών συμπολυμερών	17
1.1.3 Παρασκευή πολυμερικών μικκυλίων σε υδατικά διαλύματα.....	20
1.1.4 Απόκριση συμπολυμερών σε εξωτερικά ερεθίσματα.	22
1.1.5 Εφαρμογές συμπολυμερών.....	23
1.2 Επιφανειοδραστικές ενώσεις (surfactants)	24
1.2.1 Ρόφηση επιφανειοδραστικών σε διεπιφάνειες και αυτοοργάνωση.	24
1.2.2 Εφαρμογές επιφανειοδραστικών ενώσεων	26
1.3 Λιπίδια	27
1.3.1 Αυτοοργάνωση φωσφολιπιδίων.....	27
1.3.2 Εφαρμογές λιπιδίων	28
1.4 Νανοσυστήματα για εφαρμογές φαρμακευτικής αποδέσμευσης.....	28
1.4.1 Κύριοι τύποι συμπολυμερών για ιατροφαρμακευτικές εφαρμογές.....	29
1.4.2 Σχεδιασμός φαρμακευτικών μικκυλιακών φορέων.	30
1.4.3 Δράση φορέων ελεγχόμενης φαρμακευτικής αποδέσμευσης.	31
1.4.4 Κινητική φαρμακευτικής αποδέσμευσης.....	34
1.4.5 Αποτελεσματικότητα εγκλεισμού φαρμάκων σε πολυμερικά μικκύλια.....	35
1.5 Μεικτά Νανοσυστήματα για βιοϊατρικές εφαρμογές.....	36
1.5.1 Μεικτά μικκύλια συμπολυμερών και επιφανειοδραστικών ενώσεων. .	36
1.5.2 Μεικτά συστήματα συμπολυμερών λιπιδίων.	41
1.5.3 Μεικτά συστήματα συμπολυμερών.....	43
2 Κεφάλαιο 2 ^ο : Πειραματική διαδικασία	44
2.1 Πρώτες ύλες.....	44
2.1.1 PLA-POEGA	44

2.1.2	PLA-PAA.....	45
2.1.3	Tween 80	45
2.1.4	SPAN 80	46
2.1.5	Κουρκουμίνη (Curcumin, CUR).....	46
2.1.6	Ινδομεθακίνη (Indomethacin, IND)	47
2.1.7	DPPC.....	47
2.1.8	DSPE-PEG.....	48
2.2	Παρασκευή συστημάτων.....	48
2.3	Μέθοδοι χαρακτηρισμού	51
2.3.1	Φασματοσκοπία φθορισμού	51
2.3.2	Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS)	54
3	Κεφάλαιο 3 ^ο : Πειραματικά αποτελέσματα	59
3.1	Χαρακτηρισμός του συστήματος συμπολυμερούς PLA-POEGA.....	59
3.2	Χαρακτηρισμός συστήματος PLA-POEGA με εγκλεισμό φαρμακευτικών ενώσεων Cur και Ind.....	62
3.3	Χαρακτηρισμός μεικτού συστήματος PLA-POEGA και της επιφανειοδραστικής ένωσης Tween.....	65
3.4	Χαρακτηρισμός μεικτού συστήματος PLA-POEGA και της επιφανειοδραστικής ένωσης Span.....	70
3.5	Χαρακτηρισμός μεικτών συστημάτων PLA-POEGA και Tween με εγκλεισμό IND και CUR.....	72
3.6	Χαρακτηρισμός μεικτών συστημάτων PLA-POEGA και του φωσφολιπιδίου DPPC.....	73
3.7	Χαρακτηρισμός μεικτού συστήματος συμπολυμερούς PLA-POEGA και του τροποποιημένου φωσφολιπιδίου DSPE-PEG.....	75
3.8	Χαρακτηρισμός μεικτών συστημάτων PLA-POEGA και DPPC με εγκλεισμό IND και CUR.....	77
3.9	Χαρακτηρισμός μεικτών συστημάτων PLA-POEGA και DSPE με εγκλεισμό IND και CUR.....	78
3.10	Χαρακτηρισμός μεικτών συστημάτων συμπολυμερών PLA-POEGA και PLA-PAA. 80	
4	Κεφάλαιο 4 ^ο Συζήτηση αποτελεσμάτων	83
5	Βιβλιογραφία.....	93

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 3-1 Αναλογία εντάσεων κορυφών πυρενίου I_1/I_3 συναρτήσει συγκέντρωσης πολυμερούς για πρωτόκολλο υδατικού διαλύτη.....	60
Σχήμα 3-2 Αναλογία εντάσεων κορυφών πυρενίου I_1/I_3 συναρτήσει συγκέντρωσης πολυμερούς για πρωτόκολλο οργανικού διαλύτη.....	60
Σχήμα 3-3 Αναλογία εντάσεων κορυφών πυρενίου I_1/I_3 συναρτήσει συγκέντρωσης πολυμερούς για πρωτόκολλο λεπτού φιλμ.	61
Σχήμα 3-4 Διάγραμμα κατανομής μεγεθών από ανάλυση CONTIN μετρήσεων DLS για το συμπολυμερές PLA-POEGA σε νερό.....	62
Σχήμα 3-5 Φάσμα απορρόφησης UV-Vis για το νανοσύστημα PLA-POEGA/CUR.....	63
Σχήμα 3-6 Φάσμα απορρόφησης UV-Vis για το νανοσύστημα PLA-POEGA/IND.....	63
Σχήμα 3-7 Διάγραμμα κατανομών μεγέθους από DLS για PLA-POEGA με ενσωμάτωση IND και CUR.....	64
Σχήμα 3-8 Αναλογία κορυφών πυρενίου I_1/I_3 συναρτήσει ολικής συγκέντρωσης για συγκέντρωση Tween κάτω της CMC με χρήση υδατικού διαλύτη.	65
Σχήμα 3-9 Αναλογία κορυφών πυρενίου I_1/I_3 συναρτήσει ολικής συγκέντρωσης για συγκέντρωση Tween άνω της CMC με χρήση υδατικού διαλύτη.....	66
Σχήμα 3-10 Αναλογία κορυφών πυρενίου I_1/I_3 συναρτήσει ολικής συγκέντρωσης για συγκέντρωση Tween κάτω της CMC με χρήση οργανικού διαλύτη.	66
Σχήμα 3-11 Αναλογία κορυφών πυρενίου I_1/I_3 συναρτήσει ολικής συγκέντρωσης για συγκέντρωση Tween άνω της CMC με χρήση οργανικού διαλύτη.....	67
Σχήμα 3-12 Αναλογία κορυφών πυρενίου I_1/I_3 συναρτήσει ολικής συγκέντρωσης για συγκέντρωση Tween κάτω της CMC με σχηματισμό λεπτού φιλμ.....	67
Σχήμα 3-13 Αναλογία κορυφών πυρενίου I_1/I_3 συναρτήσει ολικής συγκέντρωσης για συγκέντρωση Tween άνω της CMC με σχηματισμό λεπτού φιλμ.....	68
Σχήμα 3-14 Διαγράμματα κατανομών μεγέθους από DLS για τα νανοσυστήματα PLA-POEGA/Tween σε συγκέντρωση κάτω της CMC.....	69
Σχήμα 3-15 Διαγράμματα κατανομών μεγέθους από DLS για τα νανοσυστήματα DLS PLA-POEGA/Tween σε συγκέντρωση άνω της CMC.....	69
Σχήμα 3-16 Διαγράμματα κατανομών μεγέθους από DLS του συστήματος PLA-POEGA/Span.....	71
Σχήμα 3-17 Διαγράμματα κατανομών μεγέθους από DLS για τα νανοσυστήματα PLA-POEGA/Tween με εγκλεισμό φαρμακευτικών ενώσεων.....	73
Σχήμα 3-18 Διαγράμματα κατανομών μεγέθους από DLS για τα νανοσυστήματα PLA-POEGA/DPPC για χαμηλές συγκεντρώσεις DPPC.	74
Σχήμα 3-19 Διαγράμματα κατανομών μεγέθους από DLS για τα νανοσυστήματα PLA-POEGA/DPPC για υψηλές συγκεντρώσεις DPPC.	74
Σχήμα 3-20 Διάγραμμα κατανομών μεγέθους από DLS καθαρού DSPE.....	76
Σχήμα 3-21 Διαγράμματα κατανομών μεγέθους από DLS για τα νανοσυστήματα PLA-POEGA/DSPE.	76
Σχήμα 3-22 Διαγράμματα κατανομών μεγέθους από DLS για τα νανοσυστήματα PLA-POEGA/DPPC με εγκλεισμό IND και CUR.	78

Σχήμα 3-23 Διάγραμμα κατανομών μεγέθους από DLS για το νανοσύστημα PLA-POEGA/DSPE με εγκλεισμό CUR.	79
Σχήμα 3-24 Διαγράμματα κατανομών μεγέθους από DLS για τα νανοσυστήματα PLA-POEGA/PLA-PAA σε ουδέτερο pH.	80
Σχήμα 3-25 Διαγράμματα κατανομών μεγέθους από DLS για τα νανοσυστήματα PLA-POEGA/PLA-PAA σε βασικό pH.	81

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 2-1 Συστήματα που εξετάστηκαν.	50
Πίνακας 3-1 Αποτελέσματα CMC PLA-POEGA.	61
Πίνακας 3-2 Αποτελέσματα συστήματος PLA-POEGA.	62
Πίνακας 3-3 Αποτελέσματα για PLA-POEGA με ενσωμάτωση IND και CUR.	64
Πίνακας 3-4 Αποτελέσματα CMC για τα μεικτά νανοσυστήματα PLA-POEGA/Tween.	68
Πίνακας 3-5 Αποτελέσματα συστήματος PLA-POEGA/Tween.	70
Πίνακας 3-6 Αποτελέσματα συστήματος PLA-POEGA/Span.	71
Πίνακας 3-7 Αποτελέσματα DLS PLA-POEGA/Tween με εγκλεισμό φαρμακευτικών ενώσεων.	73
Πίνακας 3-8 Αποτελέσματα συστήματος PLA-POEGA/DPPC.	75
Πίνακας 3-9 Αποτελέσματα DLS καθαρού DSPE και συστήματος PLA-POEGA/DPSE.	77
Πίνακας 3-10 Αποτελέσματα DLS συστήματος PLA-POEGA/DPPC με εγκλεισμό IND και CUR.	78
Πίνακας 3-11 Αποτελέσματα DLS για το νανοσύστημα PLA-POEGA/DPSE με εγκλεισμό CUR.	79
Πίνακας 3-12 Αποτελέσματα DLS συστήματος PLA-POEGA/PLA-PAA.	81

Κεφάλαιο 1^ο: Θεωρητικό μέρος

1.1 Συμπολυμερή

Τα συμπολυμερή αποτελούν μία ειδική κατηγορία χαλαρής ύλης και προκύπτουν από τον σχηματισμό χημικού δεσμού μεταξύ τμημάτων δύο ή περισσότερων ομοπολυμερών. Η εισαγωγή διαφορετικών μονομερών σε κοινή δομή έχει σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη σύνθετων μακρομορίων τα οποία μπορεί να χαρακτηρίζονται από νέες ιδιότητες ή συνδυασμό ιδιοτήτων των επιμέρους μονομερών/ομοπολυμερών. Όπως και τα απλά πολυμερή, τα μόρια των συμπολυμερών υπόκεινται σε αλλαγές φάσης, σχηματίζουν άμορφες και ημικρυσταλλικές δομές, μπορούν να βρίσκονται σε στερεά και υγρή κατάσταση αναλόγως του μοριακού τους βάρους και έχουν την δυνατότητα να διατηρούν επιμέρους χαρακτηριστικά των μονομερών που τα αποτελούν γεγονός που τα καθιστά ευέλικτα μέσα για την ανάπτυξη καινοτόμων νανοϋλικών. Ωστόσο μία από τις πιο ενδιαφέρουσες πτυχές των συμπολυμερών είναι ο συνδυασμός χημικά ασύμβατων ενώσεων που μπορεί να οδηγήσει στην δυνατότητα αυτοοργάνωσης των μακρομορίων σε καθορισμένες νανοδομές όταν βρεθούν σε περιβάλλον που προκαλεί διαχωρισμό φάσεων. Ταυτόχρονα ορισμένες δομές συμπολυμερών κατέχουν την ικανότητα απόκρισης σε ερεθίσματα του περιβάλλοντος τους όπως οι εναλλαγές στην θερμοκρασία, το pH, και η ιοντική ισχύς του διαλύματος διευρύνοντας περαιτέρω το φάσμα πιθανών εφαρμογών τους. Η πρόκληση στον σχεδιασμό και την σύνθεση των συμπολυμερών συνοψίζεται στην διαχείριση των κατάλληλων παραμέτρων που καθορίζουν τόσο την μορφολογία όσο και την συμπεριφορά της αυτοοργανομένης δομής. Όλα τα παραπάνω έχουν αποτελέσει πόλο έλξης του ερευνητικού ενδιαφέροντος σχετικά με τις δυνατότητες χρήσης των συμπολυμερών σε εξειδικευμένους τομείς όπως στην βιομηχανία πλαστικών, στην ηλεκτρονική, την ιατρική και την φαρμακευτική.

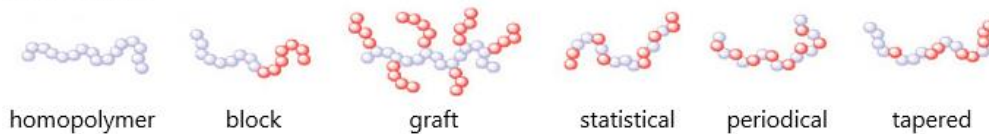
1.1.1 Χαρακτηριστικές δομές συμπολυμερών.

Ένας από τους κυριότερους παράγοντες που καθορίζουν την φυσικοχημική συμπεριφορά των συμπολυμερών αλλά και των αυτοοργανομένων δομών εκτός της φύσης των μονομερών είναι η σύσταση και ο τρόπος με τον οποίον κατανομούνται τα μονομερή εντός του μακρομορίου. Οι βασικότερες κατηγορίες είναι οι εξής:

- Τυχαία συμπολυμερή: Τα μονομερή διατάσσονται με τυχαίο τρόπο κατά μήκος των αλυσίδων και το σύνθετο μόριο δεν διατηρεί τα χαρακτηριστικά των επιμέρους δομικών ομοπολυμερικών μονάδων
- Εναλλασσόμενα συμπολυμερή: Τα μονομερή είναι κατανομημένα κατά μονάδες που εναλλάσσονται μεταξύ τους. Ομοίως με τα τυχαία πολυμερή οι ιδιότητες των ομοπολυμερών δεν διατηρούνται στο τελικό μόριο.

- Συμπολυμερή κατά συστάδες: Το πολυμερές αποτελείται από μονομερή που καταλαμβάνουν διακριτές περιοχές κατά μήκος της αλυσίδας (συστάδες, blocks) και μπορεί τμηματικά να εμφανίζουν κοινές ιδιότητες με τα μητρικά ομοπολυμερή μακρομόρια.
- Ενοφθαλμισμένα συμπολυμερή: Σε αυτή την περίπτωση ένα πολυμερές αποτελεί τον κεντρικό άξονα πάνω στον οποίο γίνεται η πρόσδεση διαφορετικών πολυμερικών αλυσίδων.

composition

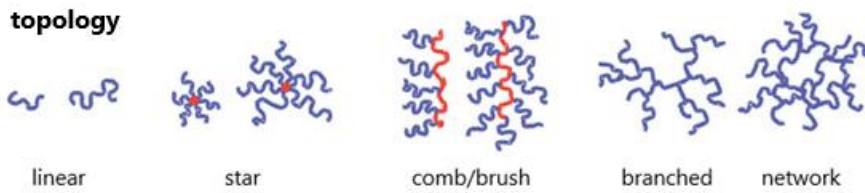


Εικόνα 1-1 Κατηγορίες πολυμερών αναλόγως της σύστασης και της κατανομής μονομερών στο μακρομόριο (τοπολογία/αρχιτεκτονική).

Μία δεύτερη εξίσου σημαντική σχεδιαστική παράμετρος που λαμβάνεται υπόψιν κατά την σύνθεση των συμπολυμερών είναι η αρχιτεκτονική του μορίου. Οι διαφορετικές τεχνικές πολυμερισμού σε συνδυασμό με το ευρύ φάσμα των μονομερών δίνουν την δυνατότητα για την ανάπτυξη νέων πολύπλοκων χημικών δομών διευρύνοντας συνεχώς τις προοπτικές εφαρμογής τους. Ο κατάλληλος συνδυασμός των παραπάνω επιτρέπει την χειραγώγηση των τελικών χαρακτηριστικών του συμπολυμερούς σύμφωνα με την μορφολογία τους. Οι ιδιότητες που μπορούν να καθοριστούν με αυτό τον τρόπο περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων το είδος των αυτοοργανομένων νανοδομών, τις θερμομηχανικές ιδιότητες, την σταθερότητα, και την δυνατότητα χημικών φυσικών και βιολογικών αλληλεπιδράσεων. Τα συμπολυμερή κατατάσσονται ως προς την τοπολογία τους στις εξής κύριες ομάδες.

- Γραμμικά συμπολυμερή (linear copolymers): Η πολυμερική αλυσίδα αποτελείται από τον συνδυασμό μονομερών διαφορετικών ενώσεων σε γραμμική αλυσίδα.
- Αστεροειδή συμπολυμερή (star copolymers): Το συμπολυμερές απαρτίζεται από έναν κεντρικό πυρήνα από τον οποίο εκτείνονται ακτινικά πολυμερικές αλυσίδες
- Ενοφθαλμισμένα συμπολυμερή (Comb/Brush copolymers): Πρόκειται για ενοφθαλμισμένα συμπολυμερή στα οποία η πρόσδεση των πλευρικών πολυμερικών αλυσίδων στην κύρια αλυσίδα (backbone) μπορεί να έχει γίνει μονόπλευρα ή αμφίπλευρα.
- Δενδριτικά/υπερδιακλαδισμένα συμπολυμερή (dendritic/hyperbranched copolymers): Τα συγκεκριμένα συμπολυμερή προκύπτουν από τον συνδυασμό επιμέρους διακλαδισμένων μονομερών ή ολιγομερών παράγοντας ανοιχτές ή

κλειστές δομές και ποικίλουν όσον αφορά το βαθμό διακλάδωσης και την αρχιτεκτονική διακλάδωσης.

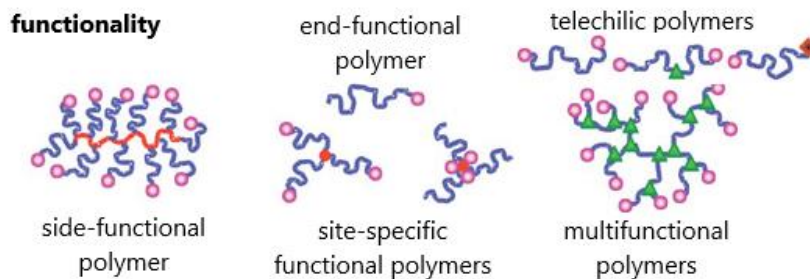


Εικόνα 1-2 Κατηγορίες πολυμερών αναλόγως της τοπολογίας.



Εικόνα 1-3 Εναλλακτικές πολυμερικές αρχιτεκτονικές.

Τέλος τα συμπολυμερή μπορούν να καταταγούν αναλόγως της τροποποίησης της οποίας έχουν υποστεί μέσω της ενσωμάτωσης συγκεκριμένων χαρακτηριστικών ομάδων ή βιολογικών μορίων όταν η χρήση τους προορίζεται για εξειδικευμένες εφαρμογές. Η τροποποίηση των συμπολυμερών μπορεί να επιδράσει ενισχυτικά ως προς την βιοσυμβατότητα και την σταθερότητα των μορίων, ενώ παράλληλα μπορεί να καθορίσει το μέτρο και την εκλεκτικότητα των αλληλεπιδράσεων που παρουσιάζουν τα μόρια με το περιβάλλον τους σε διαφορετικές συνθήκες.

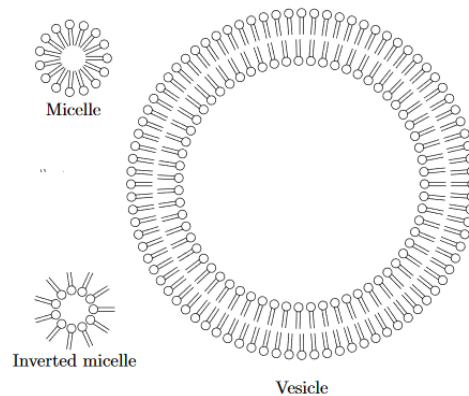


Εικόνα 1-4 Κατηγορίες πολυμερών αναλόγως της τροποποίησης.

1.1.2 Αυτοοργάνωση αμφιφιλικών συμπολυμερών

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω μία από τις πιο ενδιαφέρουσες και χρήσιμες ιδιότητες ορισμένων συμπολυμερών είναι η ικανότητα αυτοοργάνωσης. Τα αμφιφιλικά συμπολυμερή αποτελούν οργανικά μόρια που ενσωματώνουν σε διακριτά τμήματα της δομή τους υδρόφιλα και υδρόφοβα μονομερή. Ως αποτέλεσμα αυτού έχουν την δυνατότητα να δημιουργούν αυτομάτως οργανωμένες νανοδομές όταν έρθουν σε επαφή με διαλύτη που είναι εκλεκτικός ως προς τα μονομερή του συμπολυμερούς. Η εντροπικά μη ευνοϊκή αλληλεπίδραση μέρους του συμπολυμερούς με τα μόρια του διαλύτη έχει σαν συνέπεια τον διαχωρισμό μικροφάσης και την αναδιάταξη των μορίων έτσι ώστε να επιτευχθεί το βέλτιστο

μέτρο επαφής μεταξύ γειτονικών ομάδων που παρουσιάζουν χημική συγγένεια. Συνοπτικά η αυτοδιευθέτηση των μορίων του πολυμερούς καθοδηγείται από τις ελκτικές και απωστικές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ των διαφορετικών τμημάτων του πολυμερούς και τα μόρια του διαλύτη. Η διαδικασία της αυτοοργάνωσης λαμβάνει χώρα σε αραιά διαλύματα όπου το πολυμερές βρίσκεται σε συγκέντρωση μεγαλύτερη μίας κρίσιμης τιμής για την αντίστοιχη θερμοκρασία, συντελώντας στην δημιουργία οργανωμένων νανοδομών. [1] [2].



Εικόνα 1-5 Αναπαράσταση αυτοοργανομένων δομών αμφιφιλικών μορίων.

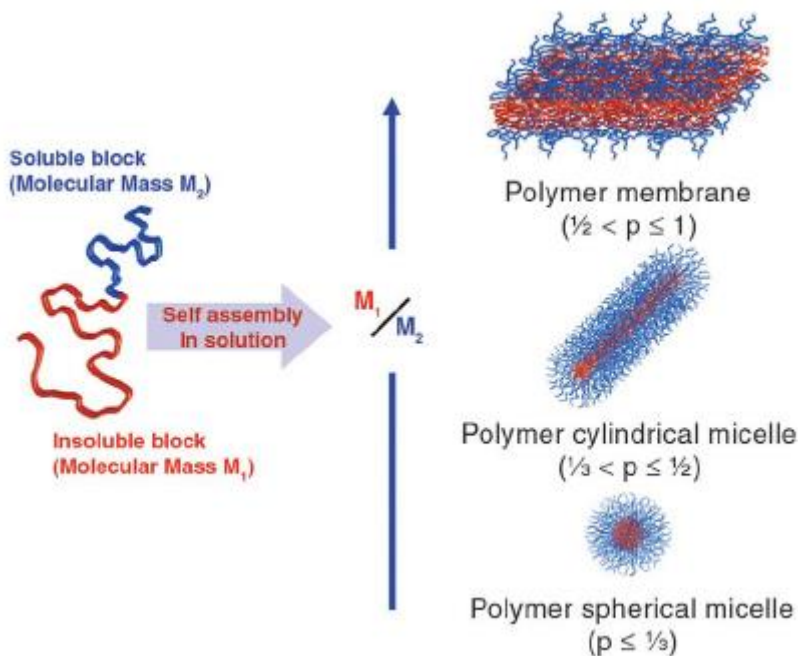
Οι κυρίαρχες δομές που προκύπτουν από την διάλυση συμπολυμερών που αποτελούνται από μη αναμείξιμα μονομερή είναι τα μικκύλια και τα κυστίδια ή πολυμεροσώματα. Τα πολυμερικά κυστίδια αποτελούν κλειστές κενές δομές που σχηματίζονται από μία διπλοστοιβάδα μορίων αμφιφιλικών συμπολυμερών και μιμούνται τα χαρακτηριστικά αυτοοργάνωσης των βιολογικών αμφιφιλικών μορίων όπως τα λιπίδια. Θεωρώντας ότι έχει γίνει χρήση πολικού διαλύτη (νερό) τα μόρια του πολυμερούς διατάσσονται με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε στο εξωτερικό αλλά και εσωτερικό περίβλημα, όπου υπάρχει επαφή με τον διαλύτη, να βρίσκονται αποκλειστικά τα υδρόφιλα τμήματα ενώ τα υδρόφοβα τμήματα καταλαμβάνουν το ενδιάμεσο στρώμα. Τα μεγέθη των πολυμεροσωμάτων ξεκινούν από τις διαστάσεις των νανόμετρων και εκτείνονται έως την κλίμακα των μικρόμετρων, ενώ η κατάταξη τους μπορεί να γίνει αναλόγως του μεγέθους τους, αλλά και τον αριθμό των τοιχωμάτων ή των τομέων που τα απαρτίζει.

Τα πολυμερικά μικκύλια έχουν συνήθως σχήμα σφαιρικό ή κυλινδρικό και το μέγεθός τους είναι μικρότερο από τα πολυμεροσώματα, σε αντίθεση με τα οποία έχουν εν μέρει συμπαγή πυρήνα. Οι διαστάσεις τους κυμαίνονται από 20 έως 200nm και διακρίνονται από την χαρακτηριστική δομή πυρήνα-κορώνας. Σε περίπτωση που έχει προηγηθεί διάλυση σε πολικό διαλύτη (νερό) η εξωτερική στοιβάδα σχηματίζεται από τις υδρόφιλες αλυσίδες των μονομερών ενώ στον πυρήνα συγκεντρώνονται τα υδρόφοβα τμήματα των αλυσίδων. Στην περίπτωση των ανάστροφων μικκυλίων η διάλυση πραγματοποιείται σε μη πολικό διαλύτη με αποτέλεσμα τα υδρόφοβα τμήματα να καταλαμβάνουν την κορώνα ενώ οι υδρόφοβες αλυσίδες σχηματίζουν το

πυρήνα. Το μέγεθος, το σχήμα και η πυκνότητα της δομής των μικκυλίων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό τόσο από την χημική σύσταση των μονομερών όσο και από το απόλυτο και το σχετικό μέγεθος της αλυσίδας των υδρόφιλων/υδρόφοβων τμημάτων [3]. Ειδικότερα το σχήμα που θα αποκτήσει το σωματίδιο καθορίζεται από την κρίσιμη παράμετρο στοίβαξης που προκύπτει από την παρακάτω σχέση:

$$\rho = \frac{v}{a_0 d}$$

Όπου το v και το d αντιστοιχούν στον όγκο και το μήκος του υδρόφοβου τμήματος και ο παράγοντας a_0 σχετίζεται με το μέγεθος της διεπιφάνειας που αναπτύσσεται μεταξύ υδρόφιλων και υδρόφοβων μορίων[4].



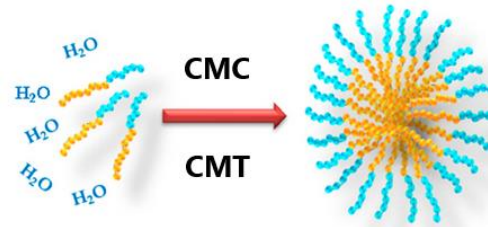
Εικόνα 1-6 Αναπαράσταση μικκυλιακών διαμορφώσεων

Οι τρεις κυριότερες παράμετροι που χαρακτηρίζουν τα αμφιφιλικά συμπολυμερή όσον αφορά την αυτοοργάνωση είναι οι ακόλουθες:

- Κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση (CMC): Εξαρτάται από την θερμοκρασία και αφορά την τιμή της συγκέντρωσης στην οποία τα μακρομόρια των συμπολυμερών συσσωματώνονται και σχηματίζουν μικκύλια. Η τιμή της CMC αποτελεί χαρακτηριστικό ιδιαίτερης σημασίας για τα συμπολυμερή και αντιστοιχεί στην μέγιστη δυνατή συγκέντρωση αλυσίδων στο διάλυμα πάνω

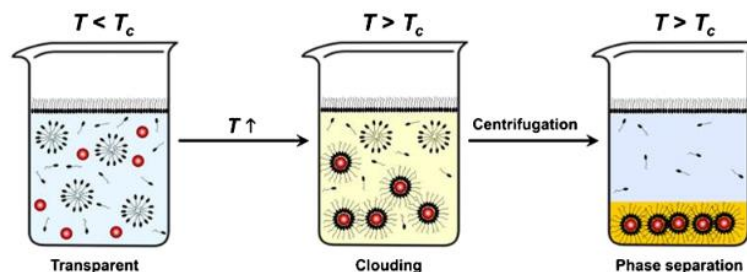
από την οποία τα ελεύθερα μόρια του διαλύματος βρίσκονται σε ισορροπία με τα μικκύλια.

- Κρίσιμη μικκυλιακή θερμοκρασία: Αντίστοιχα με το CMC ορίζεται και η κρίσιμη θερμοκρασία μικκυλιοποίησης (critical micelle temperature, CMT). Η τιμή της αντιστοιχεί στην ελάχιστη θερμοκρασία που τα συμπολυμερή σταθερής συγκέντρωσης βρίσκονται ελεύθερα στο διάλυμα.



Εικόνα 1-7 Επίδραση της θερμοκρασίας και της συγκέντρωσης στον σχηματισμό μικκυλίων.

- Σημείο νέφωσης (Cloud Point Temperature, CPT): Ως CPT ορίζεται η τιμή της θερμοκρασίας πάνω από την οποία το διάλυμα μεταβαίνει από την κατάσταση μικροδιαχωρισμού φάσης σε κανονικό διαχωρισμό φάσης λόγω της συσσωμάτωσης των μικκυλίων.



Εικόνα 1-8 Μεταβολές στις φάσεις μεικτού συστήματος με την αλλαγή θερμοκρασίας.

1.1.3 Παρασκευή πολυμερικών μικκυλίων σε υδατικά διαλύματα

Η προετοιμασία μικκυλιακών συστημάτων μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω διαφορετικών μεθόδων (πρωτοκόλλων διάλυσης). Ωστόσο όλες οι διαδικασίες βασίζονται στην επαφή των αμφιφιλικών συμπολυμερών με διαλύτη που είναι επιλεκτικός μόνο με το ένα τμήμα του μορίου με συνέπεια την έναρξη της συσσωμάτωσης. Ο διαλύτης που θα χρησιμοποιηθεί μπορεί να είναι πολικός ή μη και η συνηθέστερη επιλογή είναι το νερό. Τα διαφορετικά βήματα που απαρτίζουν την κάθε διαδικασία παρασκευής επηρεάζουν το μέγεθος τη μορφολογία και την κατανομή μεγέθους των σωματιδίων που σχηματίζονται στο διάλυμα και η επιλογή τους αποτελεί συνάρτηση της εφαρμογής για την οποία προορίζονται τα συστήματα. Τρεις από τις πιο συνηθείς μεθόδους διάλυσης σε υδατικό μέσο αποτελούν οι εξής:

Απευθείας διάλυση σε υδατικό μέσο.

Σύμφωνα με το συγκεκριμένο πρωτόκολλο το πολυμερές διαλύεται άμεσα στο νερό χωρίς ενδιάμεσα στάδια προετοιμασίας. Η ανάμιξη γίνεται με παράλληλη ανάδευση ενώ το διάλυμα μπορεί να υποστεί ήπια θέρμανση και κατεργασία με υπερήχους προκειμένου να επιταχυνθεί η διαδικασία. Το πρωτόκολλο εφαρμόζεται για συμπολυμερή μικρού μοριακού βάρους που παρουσιάζουν ικανή διαλυτότητα σε πολικούς διαλύτες. Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου συγκαταλέγονται η ταχύτητα και η απλοϊκότητα της διαδικασίας, καθώς και η απουσία πτητικών διαλυτών. Ωστόσο η αποτελεσματικότητα της διαδικασίας εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από της ιδιότητες του συμπολυμερούς αλλά και τις μεθόδους ομογενοποίησης που θα εφαρμοστούν. Λόγω του άμεσου τρόπου που έρχονται σε επαφή τα συστατικά το διάλυμα μπορεί να μην καταφέρει να φτάσει σε θερμοδυναμική ισορροπία με αποτέλεσμα το συμπολυμερές να σχηματίζει συσσωματώσεις οι οποίες θωρακίζονται από τα υδρόφιλα άκρα που παραμένουν διαλυμένα στο νερό. Το παραπάνω φαινόμενο ενισχύεται όταν τα υδρόφοβα τμήματα των αλυσίδων παραμένουν στην υαλώδη φάση κατά την διάλυση παρουσιάζοντας μειωμένη κινητικότητα. Ως αποτέλεσμα η κατανομή μεγεθών εμφανίζεται αρκετά ευρεία και η σταθερότητα των μικκυλίων είναι μειωμένη [5].

Διάλυση σε υδατικό μέσο με χρήση οργανικού διαλύτη.

Η μέθοδος βασίζεται στην πλήρη διάλυση του πολυμερούς αρχικά σε οργανικό διαλύτη. Το σχηματιζόμενο διαλύματα αναμιγνύεται με νερό ενώ ταυτόχρονα γίνεται η αφαίρεση του οργανικού διαλύτη με εξάτμιση. Η μέθοδος εφαρμόζεται σε περιπτώσεις όπου το συμπολυμερές δεν είναι διαλυτό στο νερό ή εάν στο διάλυμα προστίθεται κάποια επιπλέον ένωση που προορίζεται για εγκλεισμό στα μικκύλια και η οποία είναι αδιάλυτη σε πολικό περιβάλλον. Η σταδιακή μετάβαση του συμπολυμερούς στον εκλεκτικό υδατικό διαλύτη περιορίζει θεωρητικά το πλήθος των συσσωματώσεων και επιτρέπει την αυτοοργάνωση μακρομορίων με αρκετά υδρόφοβο χαρακτήρα. Το αποτέλεσμα της διαδικασίας εξαρτάται από την συνάφεια των διαλυτών και του συμπολυμερούς καθώς και από την ταχύτητα της αφαίρεσης του οργανικού διαλύτη. Στα μειονεκτήματα της μεθόδου περιέχονται η χρήση πτητικών ενώσεων και ο εγκλεισμός μικρής ποσότητας αυτών των ενώσεων από τα μικκύλια στο τελικό διάλυμα.

Ενυδάτωση λεπτού φιλμ

Ως εναλλακτική του οργανικού πρωτοκόλλου ο σχηματισμός μικκυλίων μπορεί να προκύψει με τον σχηματισμό φιλμ που αποτελείται από μόρια του συμπολυμερούς και την μετέπειτα ενυδάτωσή του. Το πολυμερές διαλύεται αρχικά σε συμβατό (μη εκλεκτικό) οργανικό διαλύτη ο οποίος ακολουθώς αφαιρείται σε περιστροφικό

εξατμιστή παρουσία κενού και θερμότητας. Ως αποτέλεσμα το πολυμερές σχηματίζει μία λεπτή επιφάνεια στα τοιχώματα του δοχείου. Ακολούθως της προσθήκης νερού το διάλυμα τοποθετείται εκ νέου στον περιστροφικό εξατμιστή όπου το συμπολυμερές μεταβαίνει σταδιακά στην υδατική φάση σχηματίζοντας μικκύλια. Η παρουσία του συμπολυμερούς σε μορφή φιλμ αυξάνει την επιφάνεια επαφής με το υδατικό μέσο ενώ η ομαλή μετανάστευση στο νερό εξασφαλίζει την ισορροπία μεταξύ των μικκυλίων που σχηματίζονται και των πολυμερικών αλυσίδων που υπάρχουν στο διάλυμα. Η μέθοδος χρησιμοποιείται κυρίως για περιπτώσεις εγκλεισμού φαρμακευτικών ενώσεων σε πολυμερικά μικκύλια και τον σχηματισμό λιποσωμάτων λόγω της υψηλής αποτελεσματικότητας της, ωστόσο υστερεί ως προς την πολυπλοκότητά της.

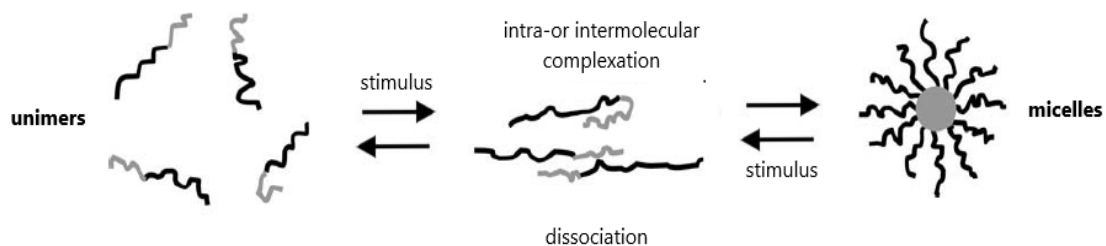
1.1.4 Απόκριση συμπολυμερών σε εξωτερικά ερεθίσματα.

Τα αποκρινόμενα συμπολυμερή αποτελούνται από πολυμερή τα οποία μπορούν να υποστούν απότομες αλλαγές μεγάλης κλίμακας όσον αφορά την φυσικοχημική τους συμπεριφορά ως αποτέλεσμα εξωτερικής διέγερσης. Αντίστοιχα μόρια απαντώνται σε βιολογικά συστήματα και σαν τυπικά παραδείγματα αναφέρονται τα νουκλεϊκά οξέα και οι πρωτεΐνες. Η δράση των αποκρινόμενων συμπολυμερών συνοψίζεται στην αναγνώριση του ερεθίσματος της ισχύος αυτού καθώς και της επακόλουθης αλλαγής στην διαμόρφωση της αλυσίδας ως αντίδραση στην μεταβολή. Τα ερεθίσματα μπορεί να είναι χημικού χαρακτήρα όπως εναλλαγές στο pH, στην ιοντική ισχύ του διαλύματος ή προσθήκη διαφόρων χημικών μέσων, ενώ στα φυσικά ερεθίσματα περιέχονται οι μεταβολές θερμοκρασίας, οι διακυμάνσεις ηλεκτρομαγνητικών πεδίων και η ανάπτυξη μηχανικών τάσεων. Η εκμετάλλευση της συγκεκριμένης ιδιότητας βασίζεται στην δυνατότητα που εμφανίζουν τα συγκεκριμένα πολυμερή να οργανώνονται και να αποδιοργανώνονται όταν επιβάλλεται μία μεταβολή στις συνθήκες του εξωτερικού περιβάλλοντος τους[1]. Όσον αφορά τα χημικά ερεθίσματα τα συμπολυμερή μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως εξής:

- Θερμοαποκρινόμενα συμπολυμερή: Εμπεριέχουν μονομερή των οποίων η διαλυτότητα αποτελεί συνάρτηση της θερμοκρασίας. Πιο συγκεκριμένα η αύξηση και μείωση της θερμοκρασίας προκαλεί χημικές μεταβολές όπως ιοντισμό και αντιδράσεις υδρόλυσης ή συμπύκνωσης που μπορούν να μεταβάλλουν την υδροφιλικότητα/υδροφοβικότητα ενός τμήματος του συμπολυμερούς. Η μετάβαση από πολικό σε άπολο χαρακτήρα και το αντίθετο υποχρεώνει τις αλυσίδες να αλλάξουν την διευθέτησή τους προκαλώντας τον σχηματισμό και την διάσπαση των μικκυλίων κατά περίπτωση.
- pH-αποκρινόμενα συμπολυμερή: Τα συγκεκριμένα πολυμερή περιέχουν όξινες ή βασικές χαρακτηριστικές ομάδες και ιδανικά είναι υδρόφοβα σε ουδέτερη κατάσταση. Η αποπρωτονίωση και πρωτονίωση των όξινων και βασικών

μονάδων αντίστοιχα προκαλεί την εμφάνιση φορτίων στις συγκεκριμένες ομάδες αυξάνοντας την διαλυτότητα των αλυσίδων σε πολικούς διαλύτες. Η αντίστροφη διαδικασία μπορεί να χρησιμοποιηθεί προκειμένου οι αλυσίδες να αναπτύξουν υδροφοβικότητα. Ο χειρισμός του pH και του ιοντισμού των χαρακτηριστικών ομάδων δίνει παράλληλα την δυνατότητα του ελέγχου των αλληλεπιδράσεων και την εμφάνιση ασυμβατότητας μεταξύ των επιμέρους μονομερών επιβάλλοντας την διεύθυνση των μορίων σε οργανωμένες δομές.

- Συμπολυμερή που αποκρίνονται στην ιοντική ισχύ: Για τα μακρομόρια που εμφανίζουν και τα δύο φορτία οι ισχυρές ελκτικές δυνάμεις μεταξύ των αλυσίδων μπορούν να καταστήσουν το συμπολυμερές αδιάλυτο. Οι αντίθετα φορτισμένες αλυσίδες είναι προτιμότερο να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους παρά με τον διαλύτη οδηγώντας το σύστημα σε συσσωμάτωση ή και κατακρήμνιση. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να αναιρεθεί με την προσθήκη αλάτων στο διάλυμα που θωρακίζουν μέρος των φορτίων και ευνοούν την επαφή διαλύτη-πολυμερούς. Στον αντίποδα η προσθήκη άλατος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αποδιοργάνωση των μικκυλίων όταν αυτά έχουν σχηματιστεί λόγω των ηλεκτροστατικών δυνάμεων μεταξύ των αλυσίδων.



Εικόνα 1-9 Αναπαράσταση μηχανισμού αποκρινόμενων συμπολυμερών.

1.1.5 Εφαρμογές συμπολυμερών.

Νανοσύνθετα

Η δυνατότητα αυτοοργάνωσης των συμπολυμερών μπορεί να αξιοποιηθεί κατά τον συνδυασμό τους με άλλα νανοσωματίδια τα οποία δεν σχηματίζουν καθορισμένες δομές όπως silica, μεταλλικά σωματίδια και μόρια πρωτεϊνών. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατή η σύνθεση εξειδικευμένων υλικών που προορίζονται για καταλυτικές, οπτικές και ηλεκτρονικές εφαρμογές. Παράλληλα η ενσωμάτωση δομών συμπολυμερών σε κατάλληλες συγκεντρώσεις εντός θερμοσκληρυνόμενης μήτρας μπορεί να συντελέσει στην ενίσχυση των αντοχών του υλικού.

Μεμβράνες

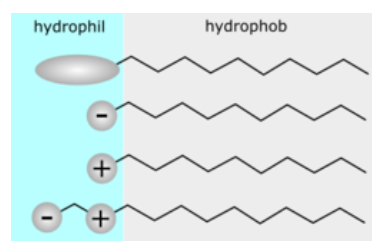
Ο σχεδιασμός και η σύνθεση υλικών τα οποία βασίζονται στα συμπολυμερή χρησιμοποιείται στην ανάπτυξη νέων νανοπορωδών μεμβρανών. Ο συνδυασμός ασύμβατων μεταξύ τους πολυμερών κάνει εφικτό τον ακριβή καθορισμό του πορώδους, αλλά και των επιφανειακών ιδιοτήτων της μεμβράνης επιτρέποντας την δημιουργία υλικών επιλεκτικής διαπερατότητας για εφαρμογές κατάλυσης, διεργασίες διαχωρισμού, απορρύπανσης και παραγωγής ισχύος (κυψελίδες καυσίμων).

Βιοϊατρικές εφαρμογές

Το μέγεθος των συμπολυμερικών μικκυλίων και η ικανότητα μεταφοράς μορίων που παρουσιάζουν τα καθιστά ιδανικούς νανοφορείς υποψήφιους για εφαρμογές εγκλεισμού-αποδέσμευσης φαρμακευτικών ουσιών, ανάπλασης ιστών και ιατρικής απεικόνισης. Η χρήση των συμπολυμερών για την στοχευμένη χορήγηση φαρμακευτικών σκευασμάτων παρουσιάζεται αναλυτικότερα παρακάτω.

1.2 Επιφανειοδραστικές ενώσεις (surfactants)

Τα surfactants αποτελούν αμφιφιλικές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους. Η δομή τους συνήθως απαρτίζεται από μία υδρόφοβη αλειφατική ή διακλαδισμένη αλυσίδα που το τυπικό μήκος της ισούται με 8-18 άνθρακες και μία πολική κεφαλή που μπορεί να ιοντίζεται ή να παραμένει σε ουδέτερη κατάσταση ερχόμενη σε επαφή με πολικό διαλύτη. Τα μη ιοντικά επιφανειοδραστικά μπορούν να ποικίλουν ως προς το μέγεθος του πολικού τμήματος ενώ αντίθετα για τα κατιοντικά και ανιοντικά οι διαστάσεις της πολικής κεφαλής είναι συνήθως συγκεκριμένες. Τόσο ο βαθμός διακλάδωσης και η έκταση της οργανικής αλυσίδας, όσο το είδος και η θέση της πολικής ομάδας αποτελούν καθοριστικούς παράγοντες όσον αφορά την φυσικοχημική συμπεριφορά.



Εικόνα 1-10 Τυπική μορφολογία επιφανειοδραστικών μορίων.

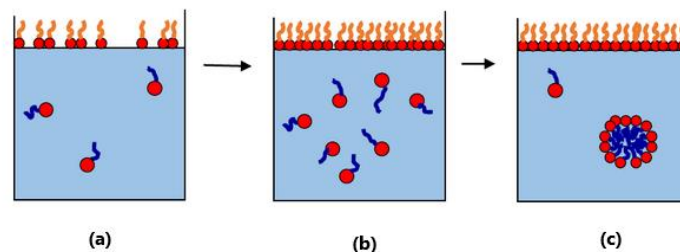
1.2.1 Ρόφηση επιφανειοδραστικών σε διεπιφάνειες και αυτοοργάνωση.

Τα μόρια επιφανειοδραστικών ενώσεων διακρίνονται για την τάση που έχουν να προσροφώνται σε διεπιφάνειες ελαττώνοντας την επιφανειακή τάση μεταξύ των δύο φάσεων. Η μείωση της επιφανειακής ενέργειας είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του επιφανειοδραστικού μορίου και εξαρτάται από παράγοντες όπως η χημεία του

μορίου και η φύση του διφασικού συστήματος. Οι διαφορετικές διεπιφάνειες στις οποίες μπορούν να απορροφηθούν τα τασιενεργά μόρια είναι οι εξής πέντε:

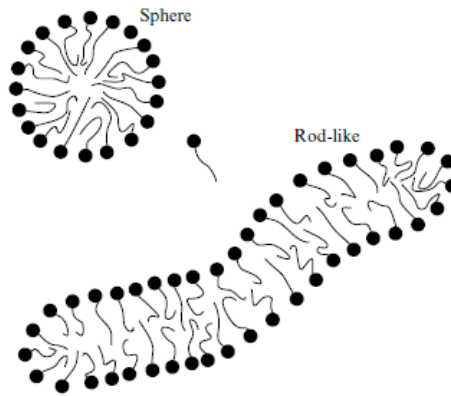
- Στερεού-Υγρού
- Στερεού-Ατμού
- Στερεού-Στερεού
- Υγρού-Ατμού
- Υγρού-Υγρού

Μία δεύτερη ιδιότητα των επιφανειοδραστικών ουσιών που επίσης προκύπτει από την αμφιφιλική φύση τους είναι η δυνατότητά τους να αυτοοργανώνονται σε καθορισμένες δομές μικκυλίων. Η μικκυλοποίηση συμβάλλει στην ελάττωση των μη ευνοϊκών επαφών μεταξύ υδρόφοβων τμημάτων και πολικών διαλυτών (κυρίως νερού). Τα μικκύλια επιφανειοδραστικών συμπεριφέρονται με διαφορετικό τρόπο από τα αντίστοιχα ελεύθερα μόρια που βρίσκονται στο διάλυμα και δεν συμβάλλουν στην μείωση της επιφανειακής ενέργειας. Η συγκέντρωση πάνω από την οποία τα απομονωμένα μόρια συσσωματώνονται και σχηματίζουν μικκύλια, κατά αντιστοιχία με τα συμπολυμερή, ονομάζεται κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση και ομοίως ορίζονται οι κρίσιμες τιμές θερμοκρασιών CMT και CPT.



Εικόνα 1-11 Σχηματισμός μικκυλίων επιφανειοδραστικού σε διάλυμα με αύξηση συγκέντρωσης. (α) Προσρόφηση στην διεπιφάνεια υγρού-αερίου, (β) κορεσμός διεπιφάνειας και διασπορά στον διαλύτη, (γ) υπέρβαση CMC και συσσωμάτωση.

Οι επιφανειοδραστικές ενώσεις μπορούν να οργανωθούν σε σφαιρικές και κυλινδρικές νανοδομές, με την μορφολογία τους να εξαρτάται από την συγκέντρωση και το μέγεθος των σωματιδίων είναι μικρότερο σε σύγκριση με αυτό των συμπολυμερών. Το μέγεθος των μικκυλίων εξαρτάται από παράγοντες που συνδέονται με την δομή του μορίου, αλλά και τις συνθήκες του περιβάλλοντος. Συγκεκριμένα, η τάση αύξησης του μεγέθους τους συνδέεται αναλογικά με το μέγεθος της αλκυλικής αλυσίδας καθώς επιφανειοδραστικά των οποίων το υδρόφοβο μέρος αποτελείται από περισσότερους άνθρακες παρουσιάζουν αυξημένη υδροδυναμική ακτίνα. Το μέγεθος των αυτοοργανούμενων νανοσωματιδίων εξαρτάται και από την θερμοκρασία καθώς σε χαμηλότερες τιμές αυτής τα περισσότερα επιφανειοδραστικά παρουσιάζουν αύξηση του μικκυλιακού μεγέθους. [6].



Εικόνα 1-12 Σφαιρικά και ραβδοειδή μικκύλια επιφανειοδραστικών μορίων.

1.2.2 Εφαρμογές επιφανειοδραστικών ενώσεων

Τα επιφανειοδραστικά μόρια λόγω του αμφιφιλικού χαρακτήρα και του μικρού μοριακού τους βάρους χρησιμοποιούνται κυρίως σε περιπτώσεις όπου είναι απαραίτητος ο συνδυασμός και η αλληλεπίδραση ασύμβατων ουσιών και ενώσεων με τα μόρια του surfactant να επιδρούν σαν ενδιάμεση φάση. Συνοπτικά κάποιες από τις κύριες εφαρμογές επιφανειοδραστικών παρουσιάζονται παρακάτω.

Παράγοντες αύξησης διαβροχής/Γαλακτοματοποιητές/Απορρυπαντικά

Οι επιφανειοδραστικές ενώσεις χρησιμοποιούνται για την ελάττωση της επιφανειακής τάσης μεταξύ υγρών και ελαίων, αυξάνοντας την διαβροχή με αποτέλεσμα να βελτιώνουν την ομογενοποίηση κατά την ανάμειξη μεταξύ ασύμβατων φάσεων. Στην περίπτωση των γαλακτωμάτων τα μικκύλια του επιφανειοδραστικού βοηθούν στην διασπορά της αδιάλυτης φάσης εντός του υδατικού μέσου και στην σταθεροποίηση του κολλοειδούς. Ως απορρυπαντικά τα surfactant επιτρέπουν την διαλυτοποίηση οργανικών ρύπων σε υδατικό μέσο επιτρέποντας την αφαίρεσή τους[7].

Βιοϊατρικές εφαρμογές

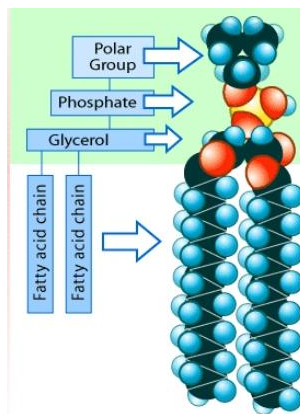
Τα μόρια επιφανειοδραστικών ενώσεων επιστρατεύονται σε μεθόδους γονιδιακής θεραπείας δρώντας ως φορείς του DNA/RNA. Τα surfactants λόγω αντίθετης φόρτισης μπορούν να σχηματίσουν σύμπλοκα με μόρια νουκλεϊκών οξέων διευκολύνοντας την διείσδυση του DNA μέσα από υδρόφοβες μεμβράνες ώστε να προκύψει η αντικατάσταση ελλαττωματικών ή απόντων γονιδίων. Παρόμοια λειτουργία εμφανίζεται και στις εφαρμογές χορήγησης φαρμακευτικών ενώσεων όπου τα surfactant προωθούν την διάλυση των υδρόφωβων φαρμάκων, ενώ παράλληλα αναλαμβάνουν τον ρόλο του φορέα μεταφέροντας τις δραστικές ενώσεις στα σημεία όπου απαιτούνται.

1.3 Λιπίδια

Τα λιπίδια αποτελούν οργανικά αμφιφιλικά μόρια και είναι ένα από τα βασικότερα δομικά στοιχεία κάθε έμβιου οργανισμού. Η δομή τους χαρακτηρίζεται από ένα ή περισσότερα λιπαρά οξέα που συνδέονται σε ένα κοινό άκρο και αντίστοιχο αριθμό γραμμικών αλυσίδων με μήκος από τέσσερις έως είκοσι άνθρακες που μπορεί να είναι κορεσμένες ή ακόρεστες. Τα λιπίδια ως επί το πλείστον είναι διαλυτά σε οργανικούς διαλύτες, ωστόσο κάποια λιπίδια κατέχουν μία πολική κεφαλή που τους προσδίδει αμφιφιλική φύση. Αποτέλεσμα αυτού είναι η δυνατότητα σχηματισμού μικκυλίων όταν τα λιπίδια βρεθούν σε περιβάλλον διαλύτη που είναι εκλεκτικός ως προς το ένα τμήμα του μακρομορίου. Τα μικύλια αυτά ονομάζονται λιποσώματα και απαρτίζονται από μία διπλοστοιβάδα μορίων που εσωκλείει τα υδρόφοβα τμήματα των μορίων στον ενδιάμεσο χώρο. Η στοιβάδα αυτή συγκροτεί το τοίχωμα των κυττάρων διαχωρίζοντας το κυτταρόπλασμα από τον εξωκυτταρικό χώρο ρυθμίζοντας τις ροές συστατικών από και προς το κύτταρο.

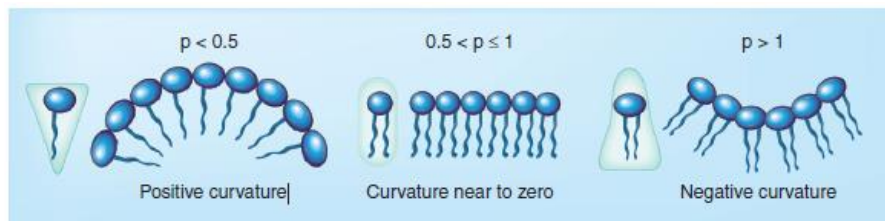
1.3.1 Αυτοοργάνωση φωσφολιπιδίων

Μία κατηγορία λιπιδίων που απαντάται σε κυτταρικές μεμβράνες και παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της απλοϊκής δομής της και των χαρακτηριστικών ιδιοτήτων της είναι τα φωσφολιπίδια. Τα φωσφολιπίδια αποτελούνται από μία πολική κεφαλή φωσφορικού οξέος που συνδέεται με ένα μόριο γλυκερόλης πάνω στο οποίο βρίσκονται προσδεμένα δύο λιπαρά οξέα.



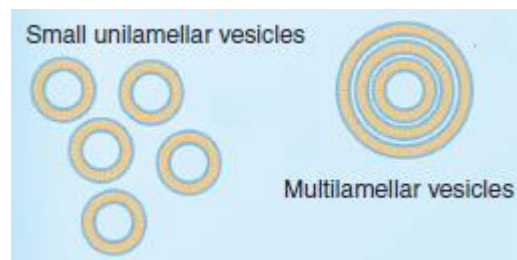
Εικόνα 1-13 Απεικόνιση φωσφολιπιδίου.

Τα φωσφολιπίδια στις κατάλληλες συνθήκες μπορούν αυτοοργανωθούν σε μία πληθώρα διαφορετικών διαμορφώσεων το σχήμα και το μέγεθος των οποίων εξαρτάται από την παράμετρο στοίβαξης [8].



Εικόνα 1-14 Επίδραση της παραμέτρου στοιβάξης στο διαμόρφωση των λιπιδικών δομών.

Η κυριότερη κατηγορία αυτοοργανωμένης δομής των λιπιδίων είναι τα λιποσώματα τα οποία είναι κατά κανόνα σφαιρικά σωματίδια και αποτελούνται από μία η πολλαπλές διπλοστοιβάδες λιπιδίων.



Εικόνα 1-15 Λιποσώματα μονών και πολλαπλών τοιχωμάτων.

1.3.2 Εφαρμογές λιπιδίων

Βιοϊατρικές εφαρμογές λιπιδίων

Τα λιποσώματα αποτελούν αντικείμενο έντονου ερευνητικού ενδιαφέροντος για βιοϊατρικές εφαρμογές στους τομείς της διάγνωσης και της θεραπείας. Ως βιοσυμβατά συστήματα μπορούν να αποτελέσουν φορείς υδρόφιλων και υδρόφοβων ενώσεων που αποσκοπούν στην ιχνηθέτηση και την θεραπεία μέσω της μεταφοράς και της αποδέσμευσης εξειδικευμένων φαρμακευτικών σκευασμάτων. Ταυτόχρονα παρέχουν προστασία από αλληλεπιδράσεις στα ευαίσθητα μόρια που μεταφέρουν επιτρέποντας την στοχευμένη απελευθέρωση τους στα σημεία ενδιαφέροντος με αποτέλεσμα να ελαχιστοποιούνται οι παρενέργειες. Τέλος η δυνατότητα τροποποίησης της επιφάνειας τους σε συνδυασμό με την ικανότητα μίμησης της κυτταρικής μεμβράνης μπορούν να αξιοποιηθούν σε εφαρμογές που σχετίζονται με τον εμβολιασμό και την ελεγχόμενη διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος μέσω της ενεργοποίησης των μακροφάγων κυττάρων[9].

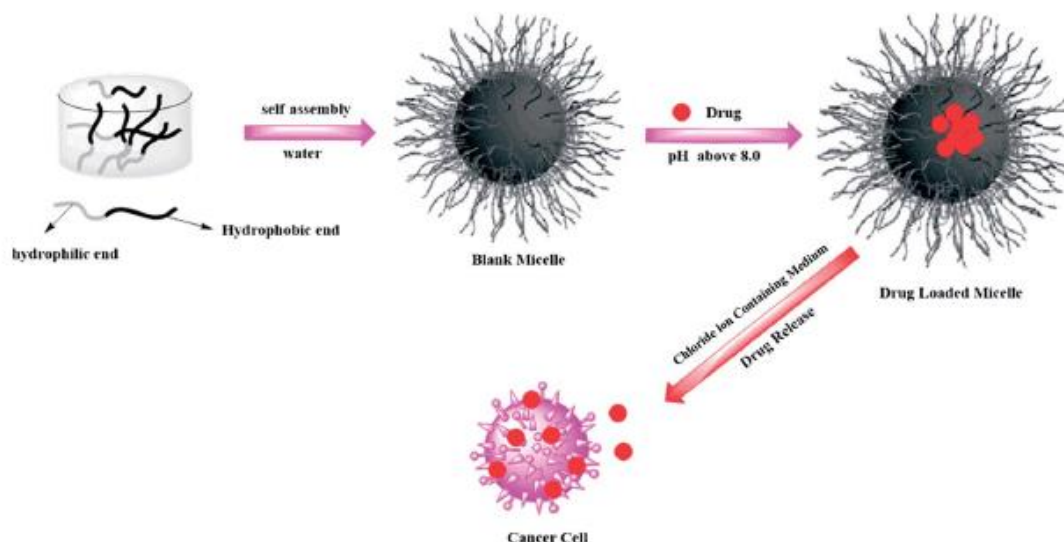
1.4 Νανοσυστήματα για εφαρμογές φαρμακευτικής αποδέσμευσης.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω δύο από τους κυριότερους τομείς στους οποίους υπάγεται η έρευνα και ανάπτυξη νέων αυτοοργανωμένων δομών είναι οι βιοϊατρικές και φαρμακευτικές εφαρμογές. Ανέκαθεν τα φαρμακευτικά σκευάσματα που χρησιμοποιούνται σε μία πληθώρα περιπτώσεων και κυρίως για αντικαρκινική

θεραπεία υστερούν στο γεγονός πως η υδρόφοβη φύση τους αποτελεί ανασχετικό παράγοντα για την διαλυτοποίησή τους σε πολικό περιβάλλον περιορίζοντας την δυνατότητα κυκλοφορίας τους εντός του ανθρώπινου οργανισμού. Παράλληλα η πλειοψηφία των συγκεκριμένων φαρμακευτικών ενώσεων υστερεί ως προς την εκλεκτικότητα που έχει σε σχέση με τα κύτταρα-στόχους γεγονός που αυξάνει την πιθανότητα επιπλοκών λόγω της δράσης του φαρμάκου σε ιστούς για τους οποίους δεν προορίζεται. Το πρόβλημα αυτό εντείνεται σε περιπτώσεις όπου τα κύτταρα των ιστών-στόχων αναπτύσσουν μερική ή ολική αντοχή στην δραστική ουσία των φαρμάκων. Συνέπεια αυτού είναι να απαιτείται μεγαλύτερη δόση ή και ισχυρότερη δραστική ουσία με ότι αυτό συνεπάγεται για τις παρενέργειες που μπορεί να προκληθούν στον οργανισμό λόγω της βιοκτόνου δράσης του φαρμάκου σε παρακείμενους ιστούς [10].

1.4.1 Κύριοι τύποι συμπολυμερών για ιατροφαρμακευτικές εφαρμογές

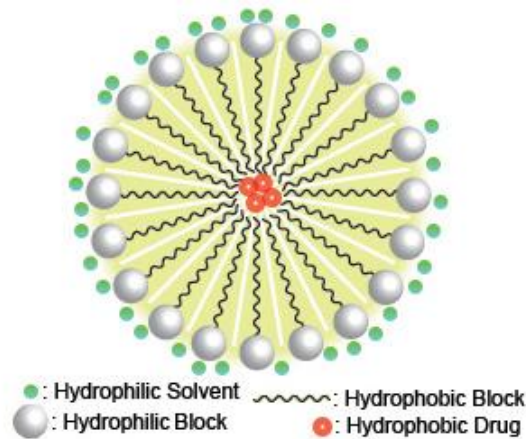
Τα συμπολυμερή που επιστρατεύονται για την δημιουργία βιοσυμβατών φορέων αποτελούνται ως επί το πλείστον από αμφιφιλικά συμπολυμερή ενώ σε κάποιες περιπτώσεις ενδείκνυται η χρήση συμπολυμερών τριών συστάδων, δηλαδή πολυμερών που αποτελούνται από τρία μονομερή, αλλά και ενοφθαλμισμένα συμπολυμερή, προκειμένου να επιτευχθεί το κατάλληλο προφίλ χαρακτηριστικών για τα δεδομένα της εφαρμογής. Η υδρόφιλη κορώνα απαρτίζεται κυρίως από πολυαιθέρες, όπως PEG και PEO, από τον συνδυασμό τους ή και από παραλλαγές των συγκεκριμένων δύο μορίων. Για τον υδρόφοβο πυρήνα επιλέγονται πολυεστέρες όπως το PLA και το PGA, καθώς και πολυαμινοξέα όπως τα PAS. Σημαντικό κριτήριο για την επιλογή του συνδυασμού των κατάλληλων μορίων είναι και η δυνατότητα εισαγωγής δραστικών χαρακτηριστικών ομάδων στην διάταξη της αλυσίδας τους με σκοπό την τροποποίηση των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ των τμημάτων του ίδιου του συμπολυμερούς, του συμπολυμερούς και της εγκλεισμένης δραστικής ένωσης και τελικώς μεταξύ του σωματιδίου και του περιβάλλοντός του. Στην τροποποίηση της δομής των μικκυλίων συμπεριλαμβάνεται και η δημιουργία χημικών δεσμών μεταξύ των αλυσίδων των συμπολυμερών στον πυρήνα ή στην υδρόφιλη κορώνα με σκοπό την αύξηση της σταθερότητας της δομής σε συνθήκες μεγάλης αραιώσης, αλλά και την ρύθμιση του ρυθμού αποδέσμευσης [10][11].



Εικόνα 1-16 Σχηματική απεικόνιση προετοιμασίας και δράσης πολυμερικών νανοφορέων.

1.4.2 Σχεδιασμός φαρμακευτικών μικκυλιακών φορέων.

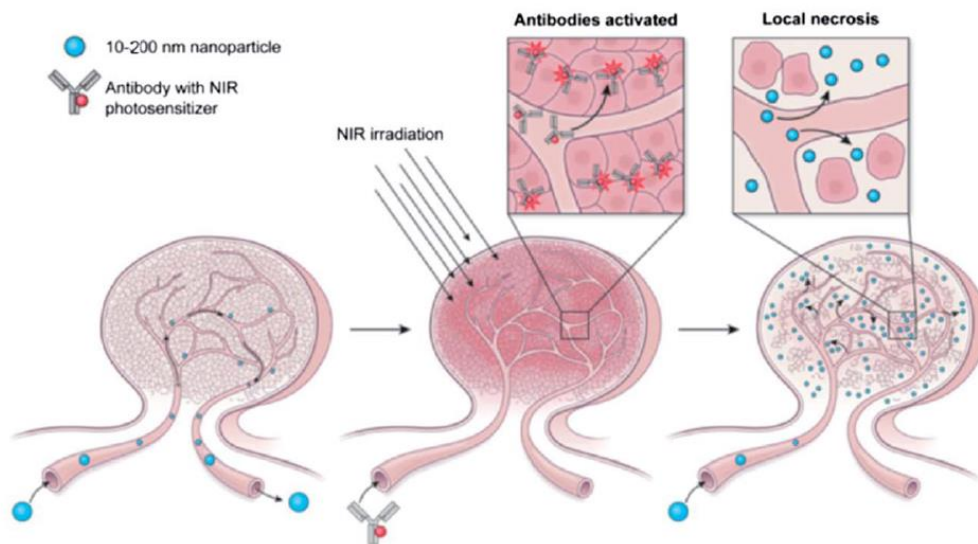
Ο σχεδιασμός νανοσυστημάτων-φορέων φαρμάκων συνίσταται στον τρόπο με τον οποίο θα πραγματοποιηθεί ο εγκλεισμός της δραστικής ουσίας στα νανοσωματίδια, τον μηχανισμό προσέγγισης των φορέων στα σημεία στόχους και την διαδικασία αποδέσμευσης της δραστικής ένωσης στους πάσχοντες ιστούς αποσκοπώντας στην επιτυχή και στοχευμένη χορήγηση. Συνεπώς υπάρχει απαίτηση για ένα σύστημα που εμφανίζει φαινομενικά αντιθετικά χαρακτηριστικά, όπως σταθερότητα εντός βιολογικού περιβάλλοντος, αλλά ταυτόχρονα πρέπει να είναι βιοσυμβατό ή και βιοαποικοδομήσιμο, και η χρήση του προϋποθέτει την δυνατότητα συγκράτησης του περιεχομένου του χωρίς διαρροές σε συνδυασμό με την ελεγχόμενη απελευθέρωση. Τα νανοσωματίδια εισήχθησαν ως πρωτοποριακοί φορείς φαρμάκων την δεκαετία του '90 με σκοπό να παρακάμψουν τα εμπόδια που αναφέρθηκαν παραπάνω και αρχικά αφορούσαν αποκλειστικά λιποσώματα ή εναλλακτικές δομές που βασίζονταν στα λιπίδια. Οι συγκεκριμένες δομές δεν κατάφεραν να καλύψουν πλήρως τις προϋποθέσεις εκλεκτικότητας και σταθερότητας που απαιτούνταν με αποτέλεσμα να προκύψει η ανάγκη για νέα μόρια που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δομικά στοιχεία εξειδικευμένων φαρμακευτικών νανοφορέων. Τα συμπολυμερή αποτέλεσαν τον ιδανικό υποψήφιο για την ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών νανοφορέων καθώς μπορούν να συνδυάσουν τις δυνατότητες αυτοοργάνωσης, το πολύ μικρό μέγεθος σωματιδίων, την σταθερότητα, την δυνατότητα τροποποίησης, αλλά και την βιοσυμβατότητα επιτρέποντας την σύνθεση νανοσωματιδίων που ανταποκρίνονται πλήρως στις απαιτήσεις της κάθε εφαρμογής.



Εικόνα 1-17 Αναπαράσταση εγκλεισμένης φαρμακευτικής ένωσης σε μικκυλιακό φορέα.

1.4.3 Δράση φορέων ελεγχόμενης φαρμακευτικής αποδέσμευσης.

Η χαρακτηριστική δομή τύπου πυρήνα-κορώνας που εμφανίζουν τα μικκύλια συμπολυμερών προσφέρεται για την διαλυτοποίηση υδρόφοβων φαρμάκων σε υδατικό περιβάλλον καθώς τα μόρια της φαρμακευτικής ένωσης παραμένουν στον πυρήνα που σχηματίζεται από τα υδρόφοβα τμήματα των αλυσίδων. Η στενή κατανομή μεγεθών που χαρακτηρίζει τα μικκύλια συμπολυμερών σε συνδυασμό με την βιοσυμβατή εξωτερική κορώνα αυξάνουν την διαπερατότητα των σωματιδίων μέσα από την μεμβράνη των κυττάρων ενώ παράλληλα μειώνουν τα ποσοστά της δραστικής ένωσης που αποβάλλονται από τον οργανισμό μέσω εκκρίσεων. Η απομόνωση της δραστικής ένωσης από το περιβάλλον συμβάλλει στην προστασία της από ανεπιθύμητες αλληλεπιδράσεις που μπορούν να επηρεάσουν την λειτουργία της, όπως σε περιπτώσεις όπου η εγκλωβισμένη ουσία είναι κάποιο ευαίσθητο μόριο πρωτεΐνης ή νουκλεϊκού οξέος. Τα νανοσωματίδια συμπολυμερών διακρίνονται επίσης για την στοχευμένη αποδέσμευση του περιεχομένου στις απαιτούμενες περιοχές με ελεγχόμενο ρυθμό που μπορεί να επιτευχθεί παθητικά ή ενεργητικά μέσω ερεθισμάτων στην περίπτωση αποκρινόμενων συμπολυμερών, αλλά και μέσω κατάλληλης επιφανειακής τροποποίησης [12]. Ειδικότερα για τις περιπτώσεις αντικαρκινικής θεραπείας τα πολυμερικά νανοσωματίδια εμφανίζουν ένα επιπλέον πλεονέκτημα όσον αφορά την στοχευμένη αποδέσμευση λόγω του φαινομένου της ενισχυμένης διαπερατότητας και παραμονής (EPR) που εμφανίζεται στα καρκινικά κύτταρα. Το συγκεκριμένο φαινόμενο αποδίδεται στο ελαττωματικό και πορώδες αγγειακό σύστημα που αναπτύσσουν τα καρκινικά κύτταρα που έχει ως αποτέλεσμα την παγίδευση και συσσώρευση σωματιδίων συγκεκριμένου μεγέθους όπως τα πολυμερικά μικκύλια λειτουργώντας ως ένας μηχανισμός παθητικής εκλεκτικότητας.[13].

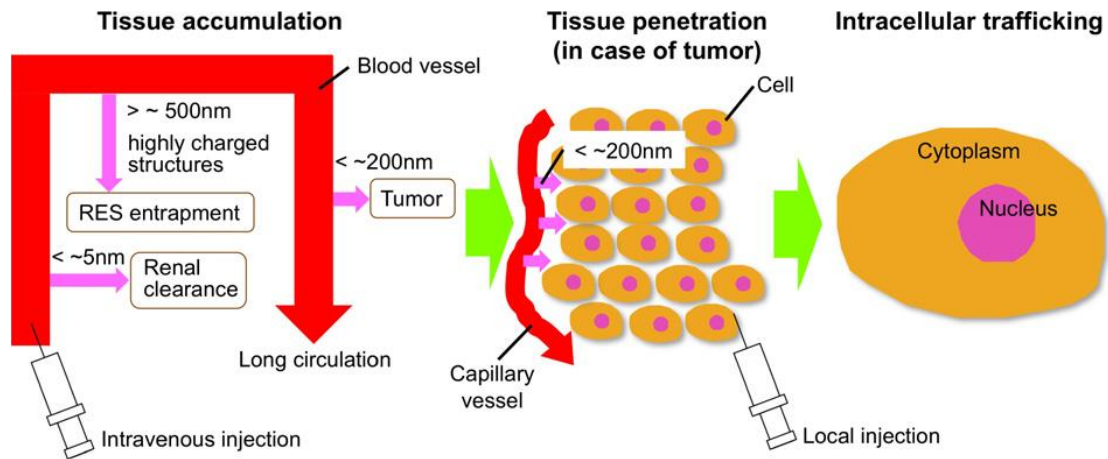


Εικόνα 1-18 Απεικόνιση του φαινομένου EPR.

Η δράση του φορέα φαρμακευτικής αποδέσμευσης (drug delivery system, DDS) συντελείται σε τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο αντιστοιχεί στην συσσώρευση των φορέων στην περιοχή των ιστών. Η διαδικασία αυτή προϋποθέτει την μη αποβολή των νανοσωματιδίων από τα νεφρά, αλλά και την αποφυγή της παγίδευσης από το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα. Η παραμονή του συστήματος στην κυκλοφορία επιτυγχάνεται όταν το μέγεθος το σωματιδίων είναι μεγαλύτερο από 9nm ώστε να μην μπορεί να απεκκριθεί από τα νεφρά, αλλά και μικρότερο από 100nm ώστε να μην υπάρχουν αλληλεπιδράσεις με φαγοκύτταρα. Η υδρόφιλη εξωτερική επιφάνεια η οποία μπορεί να έχει υποστεί κατάλληλη τροποποίηση συμβάλλει στην απόκρυψή του από τα φαγοκύτταρα αυξάνοντας τον χρόνο παραμονής και κυκλοφορίας, ενώ η παρουσία κατάλληλων μορίων σε αυτήν μπορεί να λειτουργήσει προς όφελος της αναγνώρισης των κυττάρων-στόχων συμβάλλοντας στην εκλεκτικότητα του φορέα. Τα παραπάνω είναι απαραίτητα να ληφθούν υπόψιν όταν τα DDS προορίζονται για χορήγηση σε περιοχές που δεν είναι άμεσα προσβάσιμες. Αντίθετα για περιπτώσεις όπου η χορήγηση μπορεί να γίνει τοπικά, με αποτέλεσμα την ελαχιστοποίηση της δυνατότητας μετανάστευσης της δραστικής ουσίας σε υγιείς ιστούς, ορισμένες από τις παραπάνω προϋποθέσεις μπορούν να αγνοηθούν [13].

Το δεύτερο στάδιο αφορά την διείσδυση των φορέων στους πάσχοντες ιστούς. Ο βαθμός διείσδυσης εξαρτάται άμεσα από το μέγεθος και την σταθερότητα των σωματιδίων με τα αποτελέσματα κλινικών μελετών να δείχνουν πως τα σωματίδια μικρότερων μεγεθών συνήθως έχουν υψηλότερη αποτελεσματικότητα.

Στο τρίτο στάδιο λαμβάνει χώρα η εισχώρηση δραστικής ουσίας στο εσωτερικό του κυττάρου. Το μικρό συνήθως μοριακό βάρος που εμφανίζουν οι φαρμακευτικές ενώσεις επαρκεί ώστε να προσπελαστεί η κυτταρική μεμβράνη και η ένωση να μεταφερθεί στο κυτταρόπλασμα αφού πρώτα έχει αποδεσμευτεί από τα μικκύλια. Ωστόσο σε περιπτώσεις καρκινικών κυττάρων η ανάπτυξη αντοχών αποτρέπει την είσοδο του φαρμάκου μέσω της μεμβράνης.

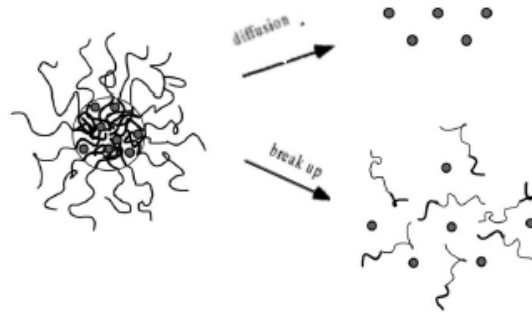


Εικόνα 1-19 Στάδια δράσης συστήματος φαρμακευτικής αποδέσμευσης.

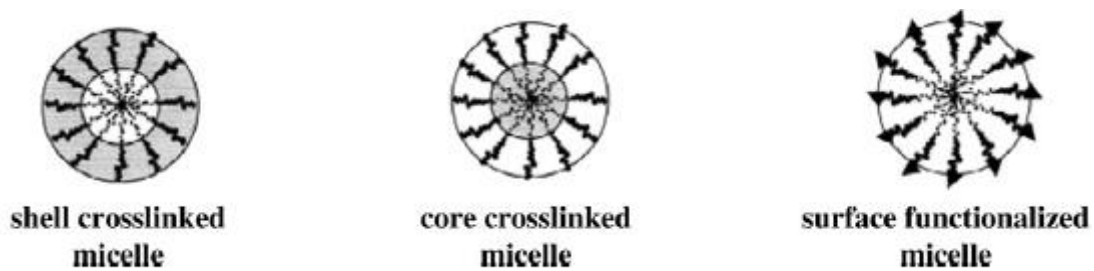
Ο πολυμερικός φορέας συγκαλύπτει την παρουσία της δραστικής ουσίας ενώ παράλληλα μπορεί να εισέλθει στο κυτταρόπλασμα αυτούσιος και να απελευθερώσει την δραστική στο κυτταρόπλασμα. Η εισχώρηση των νανοσωματιδίων πραγματοποιείται μέσω της ενδοκυττάρωσης, όπου η μεμβράνη υπόκειται σε διαταραχές λόγω ωσμωτικής πίεσης παρουσία κάποιων ιόντων με αποτέλεσμα να επιτρέπεται η εισροή συστατικών[13]. Η απελευθέρωση του φαρμάκου από την μάζα του μικκυλίου μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάχυση ή λόγω κατάρρευσης της δομής. Ο πρώτος τρόπος συνεπάγεται με αργό ρυθμό που ελέγχεται από το δυναμικό συγκέντρωσης του φαρμάκου μεταξύ του πυρήνα και του εξωτερικού περιβάλλοντος ενώ κατά τον δεύτερο συντελείται άμεση απελευθέρωση και προϋποθέτει την δυνατότητα ελέγχου της συμπεριφοράς του μικκυλίου μέσω της μεταβολής συνθηκών, όπως η θερμοκρασία, η παρουσία ιόντων η ακτινοβολία κα.

1.4.4 Κινητική φαρμακευτικής αποδέσμευσης.

Ο ρυθμός με τον οποίο λαμβάνει χώρα η απελευθέρωση μίας δραστικής ένωσης αποτελεί καθοριστική παράμετρο για τον σχεδιασμό των κατάλληλων φορέων. Η αποδέσμευση της φαρμακευτικής ένωσης πραγματοποιείται κυρίως λόγω της διάχυσης και επηρεάζεται από μία πληθώρα παραγόντων που σχετίζονται με τις φυσικοχημικές ιδιότητες του συμπολυμερούς και της δραστικής, καθώς και τις αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ αυτών των δύο. Αρχικά δύο από τα κυριότερα χαρακτηριστικά που ρυθμίζουν την ταχύτητα αποδέσμευσης είναι η σταθερότητα του πολυμερικού μικκυλίου, αλλά και η αντοχή του συμπολυμερούς στην βιοδιάσπαση, με τα σταθερότερα σωματίδια να εμφανίζουν μικρότερους ρυθμούς απελευθέρωσης με μεγαλύτερη διάρκεια στο χρόνο. Οι ισχυρές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της φαρμακευτικής ένωσης ενισχύουν την δυνατότητα αποθήκευσης και συγκράτησης ενός φαρμάκου στον υδρόφοβο πυρήνα, δρουν ανασχετικά όμως ως προς την διάχυση της δραστικής εκτός του σωματιδίου. Ωστόσο με κατάλληλες μεταβολές των συνθηκών όπως πχ. του pH είναι δυνατό να αξιοποιηθεί η μεταβλητή χημική φύση του συμπολυμερούς. Η ρύθμιση του μέτρου των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των δύο ενώσεων δίνει τη δυνατότητα της ελεγχόμενης αυξομείωσης του ρυθμού αποδέσμευσης. Η διαχείριση του ρυθμού μπορεί να γίνει και μέσω του μέτρου υδροφοβικότητας της δραστικής καθώς αναλόγως της διαλυτότητας που παρουσιάζει σε πολικούς διαλύτες η φαρμακευτική ένωση μπορεί να βρίσκεται εν μέρει στην κορώνα, αλλά και στην διεπιφάνεια κορώνας και πυρήνα. Η παρουσία του φαρμάκου στις συγκεκριμένες θέσεις συντελεί στην ευκολότερη αποδέσμευση και σε υψηλότερους ρυθμούς απελευθέρωσης. Αναφορικά με το ιξώδες του συμπολυμερούς έχει καταγραφεί πως όταν η θερμοκρασία εφαρμογής είναι κατώτερη του T_g , η μειωμένη κινητικότητα των μορίων εμποδίζει την απελευθέρωση των φαρμακευτικών σκευασμάτων καθώς τα δεύτερα αντιμετωπίζουν μεγαλύτερες αντιστάσεις κατά την διάχυση. Παρόμοια επίδραση στην διάχυση της δραστικής έχει και το μέγεθος της αλυσίδας του συμπολυμερούς καθώς τα δύο μεγέθη είναι αντιστρόφως ανάλογα. Τέλος σε ορισμένες περιπτώσεις το είδος των αλληλεπιδράσεων μεταξύ φαρμάκου-συμπολυμερούς μπορεί να έχει έμμεση επιρροή στον ρυθμό αποδέσμευσης μέσω των μεταβολών που μπορεί να προκαλέσει η δραστική στην φάση του συμπολυμερούς. Ειδικότερα η φαρμακευτική ένωση μπορεί να δράσει μερικώς ως πλαστικοποιητής ή ενισχυτικό μέσο μεταβάλλοντας την θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης με τις ανάλογες επιπτώσεις στο ιξώδες των νανοσωματιδίων[3].



Εικόνα 1-20 Αποδέσμευση δραστικής ουσίας από πολυμερικό μικκύλιο



Εικόνα 1-21 Τροποποιημένα χημικά μικκύλια.

1.4.5 Αποτελεσματικότητα εγκλεισμού φαρμάκων σε πολυμερικά μικκύλια.

Ένα ακόμη χαρακτηριστικό που προσδιορίζει την αποτελεσματικότητα ενός νανοφορέα φαρμάκου είναι η μέγιστη ποσότητα δραστικής ουσίας που μπορεί να διαλυτοποιήσει. Η ιδιότητα αυτή που αποτελεί συνάρτηση του μέγιστου αριθμού σωματιδίων που μπορεί να υπάρξει εντός διαλύματος χωρίς να επέλθει κορεσμός, αλλά και την επιμέρους ικανότητα διαλυτοποίησης του κάθε μικκυλίου. Η δυνατότητα του υδρόφοβου πυρήνα να συγκρατεί την δραστική ουσία εξαρτάται από παραμέτρους όπως η συμβατότητα και η συγκέντρωση των δύο συστατικών στο διάλυμα, αλλά και η δομή των μορίων. Καθοριστικός παράγοντας για το μέτρο διαλυτότητας μίας ένωσης εντός ενός μικκυλίου συγκεκριμένων χαρακτηριστικών είναι το μέγεθος της προς διάλυσης ένωσης. Κατά κανόνα οι ενώσεις μικρού μοριακού βάρους μπορούν να εισχωρήσουν σε μεγαλύτερο βαθμό εντός των σωματιδίων, λόγω αυξημένης κινητικότητας και μικρότερων αντιστάσεων, με αποτέλεσμα να εμφανίζουν υψηλότερη διαλυτότητα σε σχέση με μόρια μεγαλύτερου μεγέθους. Αύξηση στην διαλυτότητα προκαλείται και από το μέτρο υδροφοβικότητας του προς ενσωμάτωση μορίου. Τα αρωματικά μόρια επιβάλλουν μεγαλύτερες μειώσεις επιφανειακής τάσης στην διεπιφάνεια τους με το νερό σε σύγκριση με τα αλειφατικά μόρια, συμπεριφορά που έχει ως αποτέλεσμα την δυνατότητα εγκλεισμού μεγαλύτερου αριθμού μορίων σε σχέση με τις γραμμικές ενώσεις. Το απόλυτο και σχετικό μέγεθος των δύο τμημάτων της αλυσίδας του συμπολυμερούς διαμορφώνει με άμεσο και έμμεσο τρόπο την ικανότητα διάλυσης που χαρακτηρίζει

τα σωματίδια. Το μήκος του υδρόφοβου τμήματος καθορίζει το μέγεθος του πυρήνα και άρα επηρεάζει άμεσα την χωρητικότητα της δομής καθώς ρυθμίζει τον όγκο που είναι διαθέσιμος για να πραγματοποιηθεί η ενσωμάτωση. Με αντίστροφο τρόπο επιδρά το μέγεθος του υδρόφοβου τμήματος. Ειδικότερα όταν το μέγεθος της υδρόφιλης αλυσίδας αυξάνει τότε παρατηρείται αύξηση του CMC και μικρότερος αριθμός μικκυλίων μεγαλύτερου μεγέθους τα οποία διαθέτουν περιορισμένες περιοχές στις οποίες μπορεί να βρεθεί μία υδρόφοβη δραστική ένωση. Η υψηλή συγγένεια μίας υδρόφοβης ένωσης με την υδρόφιλη κορώνα μπορεί να δράσει ανασταλτικά στον εγκλεισμό της πρώτης καθώς τα μόρια της μπορεί να παραμείνουν στην διεπιφάνεια μεταξύ κορώνα-πυρήνα ή και εντός του υδρόφιλου τμήματος. Όσον αφορά την συγκέντρωση του συμπολυμερούς, η αύξηση της φαίνεται να επηρεάζει αισθητά μόνο στις περιπτώσεις όπου τα μικκύλια εμφανίζουν μικρό μέγεθος πυρήνα. Ταυτόχρονα η αύξηση της συγκέντρωσης της δραστικής ένωσης φαίνεται να βελτιώνει την διαλυτότητά της εντός των σωματιδίων, καθώς σε αρκετές περιπτώσεις έχει καταγραφεί πρώιμος σχηματισμός μικκυλίων σε συγκεντρώσεις κάτω του CMC. Η συμπεριφορά αυτή συνεπάγεται αυξημένο αριθμό μικκυλίων και υψηλότερη διαλυτότητα και προέρχεται από την δράση του φαρμάκου ως παράγοντα συσσωμάτωσης [3].

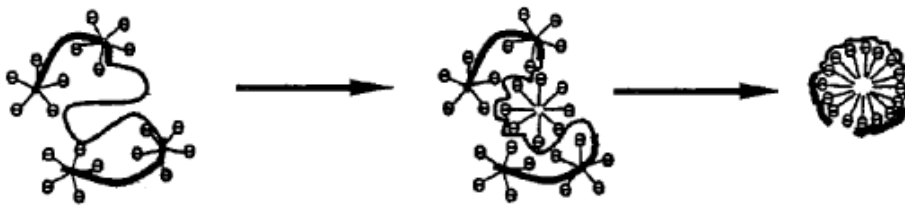
1.5 Μεικτά Νανοσυστήματα για βιοϊατρικές εφαρμογές.

Μέχρι στιγμής η συζήτηση έχει περιστραφεί γύρω από τον σχεδιασμό νανοσωματιδίων τα οποία προκύπτουν μέσω της αυτοοργάνωσης αυτούσιων μορίων επιφανειοδραστικών λιπιδίων και κυρίων συμπολυμερών. Ωστόσο στα πλαίσια διεύρυνσης των δυνατοτήτων εφαρμογής των αυτοοργανομένων νανοσωματιδίων το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί στην ανάπτυξη νέων δομών που απαρτίζονται από τον συνδυασμό των παραπάνω μορίων. Στο νέο αυτό αναπτυσσόμενο πεδίο η έρευνα καταπιάνεται με την ανάπτυξη και τον χαρακτηρισμό νέων υλικών τα χαρακτηριστικά των οποίων προκύπτουν από τον συνδυασμό των κατάλληλων μορίων και των αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα μεταξύ τους. Παρά τις εγγενείς δυσκολίες που παρουσιάζονται λόγω της πολυπλοκότητας των συστημάτων και την σχετική έλλειψη δεδομένων οι προοπτικές για την ανάδειξη νέων καινοτόμων υλικών φαίνονται ιδιαίτερα αξιόλογες.

1.5.1 Μεικτά μικκύλια συμπολυμερών και επιφανειοδραστικών ενώσεων.

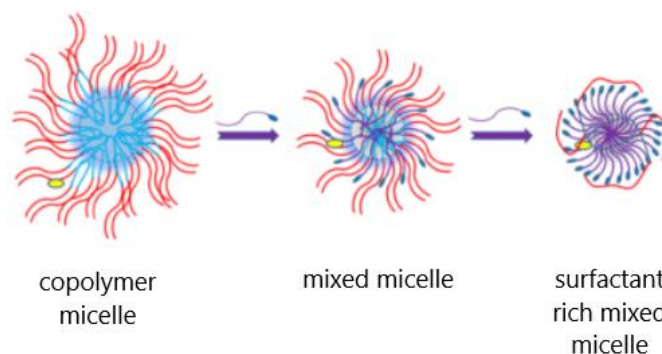
Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ επιφανειοδραστικών ενώσεων και αμφιφιλικών πολυμερών είναι σχετικά γνωστές και επιστρατεύονται στον σχεδιασμό πληθώρας συστημάτων. Στην πλειοψηφία αυτών η παρουσία του αμφιφιλικού συμπολυμερούς οδηγεί στην δραστική μείωση της συγκέντρωσης των ελεύθερων μορίων του surfactant στο διάλυμα καθώς για συγκεντρώσεις μεγαλύτερης μίας κρίσιμης τιμής ευνοείται ο σχηματισμός μεικτών δομών. Η διαδικασία πραγματοποιείται σε τρία

στάδια τα οποία προκύπτουν από τις μεταβολές στις μετρήσεις στην επιφανειακή τάση και εξαρτώνται από την συγκέντρωση και των δύο μορίων.



Εικόνα 1-22 Σχηματική απεικόνιση πρόσδεσης επιφανειοδραστικής ένωσης σε μόριο συμπολυμερούς.

Αρχικά λαμβάνει χώρα η μικρής έκτασης πρόσδεση των επιφανειοδραστικών μορίων στην αλυσίδα του συμπολυμερούς. Κατά το δεύτερο στάδιο το οποίο ρυθμίζεται από την στοιχειομετρία του διαλύματος τα μόρια συμπολυμερούς και surfactant σχηματίζουν συσσωματώσεις που αποτελούν πρόδρομο στάδιο των μικκυλίων. Η προαναφερόμενη τιμή συγκέντρωσης ορίζεται ως κρίσιμη συγκέντρωση συσσωμάτωσης (critical aggregation concentration, CAC) και αποτελεί το κατώτατο όριο περιεκτικότητας επιφανειοδραστικού για το οποίο παρατηρείται αλληλεπίδραση μεταξύ αυτού και του συμπολυμερούς [14]. Η δομή που έχει προταθεί για τις πρόδρομες δομές του συγκεκριμένου σταδίου προσομοιάζεται από μία αλυσίδα πολυμερούς πάνω στην οποία προσαρτώνται τα μόρια του επιφανειοδραστικού μέχρι να επέλθει κορεσμός [15]. Τέλος κατά το τρίτο στάδιο συντελείται η μετάβαση από τις ολιγομοριακές συσσωματώσεις στα μεικτά μικκυλιακά συστήματα. Ο παραπάνω μηχανισμός αποτελεί γενικό κανόνα και δεν έχει καθολική ισχύ στα χημικά συστήματα δεδομένου ότι πέρα από την συγκέντρωση των δύο μορίων, καθοριστικό ρόλο για την διαδικασία ανάπτυξης της κοινής δομής διαδραματίζουν η συνάφεια μεταξύ των δύο ουσιών, το μέτρο αλλά και το είδος των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ του συμπολυμερούς και του surfactant.



Εικόνα 1-23 Διαμόρφωση μικκυλίων με αύξηση συγκέντρωσης επιφανειοδραστικού.

Όσον αφορά την επίδραση της παρουσίας surfactant σε διάλυμα συμπολυμερούς έχουν καταγραφεί αποτελέσματα τα οποία σε ορισμένες περιπτώσεις είναι αντιφατικά μεταξύ τους. Το γεγονός αυτό απορρέει από το ευρύ φάσμα διαφορετικών αμφιφιλικών συμπολυμερών και επιφανειοδραστικών ο συνδυασμός των οποίων μπορεί να οδηγήσει σε συστήματα τα οποία διακρίνονται από τελείως διαφορετικά χαρακτηριστικά. Ωστόσο αποτελεί σημείο κοινής αποδοχής πως οι μεικτές δομές συμπολυμερών και επιφανειοδραστικών αποτελούνται από την χαρακτηριστική διαμόρφωση πυρήνα-κορώνας με τα μόρια των επιφανειοδραστικών να εντοπίζονται στην διεπιφάνεια των δύο περιοχών έχοντας το υδρόφοβο άκρο εντός του πυρήνα και με το αντίστοιχο υδρόφιλο άκρο να βρίσκεται στο υδρόφιλο κέλυφος.

1.5.1.1 Βιβλιογραφική ανασκόπηση επίδρασης επιφανειοδραστικών ενώσεων σε μικκύλια συμπολυμερών

Οι Jadoon et al.[16] μελέτησαν με την μέθοδο DLS την επίδραση ανιονικών και κατιονικών επιφανειοδραστικών ενώσεων σε διάλυμα συμπολυμερούς όπου κατέγραψαν μείωση του μεγέθους των πολυμερικών μικκυλίων. Το γεγονός αυτό αποδόθηκε στην πρόσδεση των μορίων του surfactant στην επιφάνεια των μικκυλίων. Η συμπεριφορά αυτή αποδόθηκε εν μέρει στο μικρότερο μέγεθος των μορίων του επιφανειοδραστικού που εισχώρησε στον πυρήνα, αλλά και την ανάπτυξη απωστικών δυνάμεων μεταξύ των αλυσίδων λόγω εμφάνισης φορτίων, γεγονός που επέτρεψε την εισχώρηση του υδατικού διαλύτη σε μεγαλύτερο βάθος έχοντας σαν αποτέλεσμα την μικρότερη τιμή υδροδυναμικής ακτίνας.

Η ομάδα των Sastry et al.[17] χαρακτήρισε μεικτά συστήματα συμπολυμερούς PB-PEO παρουσία επιφανειοδραστικών και κατέγραψε μείωση της υδροδυναμικής ακτίνας των μεικτών μικκυλίων σε σύγκριση με τα καθαρά μικκύλια του συμπολυμερούς. Στην συγκεκριμένη περίπτωση η ενσωμάτωση των επιφανειοδραστικών στα πολυμερικά μικκύλια ευνόησε, λόγω μικρού μοριακού βάρους την κινητικότητα των πολυμερικών μορίων με αποτέλεσμα να αποκτηθεί η ευνοϊκότερη διαμόρφωση που είχε σαν αποτέλεσμα την μείωση της ακτίνας. Παράλληλα καταγράφηκε αυξημένη σταθερότητα των χιμαιρικών μικκυλίων ενώ εντυπωσιακή ήταν και η μετάβαση από κυλινδρικό σχήμα σε σφαιρικό με την ενσωμάτωση των επιφανειοδραστικών.

Στην περίπτωση των Koutalas et al. [18] μελετήθηκε η επίδραση επιφανειοδραστικών μορίων κατιονικής και ανιονικής φύσης στην διαμόρφωση μικκυλίων τριπολυμερούς PI-P2VP-PEO. Η παρουσία της κατιοντικής ένωσης DTMAB οδήγησε στην μείωση των διαστάσεων των πολυμερικών μικκυλίων η οποία ήταν ανάλογη της συγκέντρωσης του surfactant μέχρι μίας κρίσιμης τιμής. Παρόμοια συμπεριφορά καταγράφηκε και για το ανιοντικό επιφανειοδραστικό SDS η οποία αποδόθηκε επίσης στο μικρό

μοριακό βάρος της ένωσης. Το σύστημα συμπολυμερούς-SDS εμφανίζει διαφορετική συμπεριφορά σε όξινο pH. Ειδικότερα σε πρώτο στάδιο καταγράφηκε αύξηση του μεγέθους με ανάλογη μείωση του pH καθώς τα φορτισμένα μόρια του επιφανειοδραστικού προσδένονται στα μικκύλια προκειμένου να εξουδετερώσουν τα φορτία των ιοντισμένων αλυσίδων του κελύφους. Με αύξηση της συγκέντρωσης του SDS καταγράφεται μείωση του βαθμού συσσωμάτωσης καθώς οι απωστικές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ των φορτισμένων μορίων της επιφανειοδραστικής ένωσης καθορίζουν πλέον την διαμόρφωση των κορεσμένων μεικτών δομών και συνεισφέρουν στην μείωση των διαστάσεων.

Μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης του SDS και DTMAB σε πολυμερικά μικκύλια PB-PEO διαφορετικού μοριακού βάρους πραγματοποιήθηκε και από τους Pispas et al. [19]. Όσον αφορά το SDS συγκεντρώσεις οι οποίες εξετάστηκαν ήταν κάτω και άνω του CMC. Για τις χαμηλές συγκεντρώσεις του επιφανειοδραστικού η επίδραση στην πλειοψηφία των συστημάτων ήταν η αναμενόμενη καθώς παρουσιάστηκε μείωση του μεγέθους των μικκυλίων. Στον αντίποδα για τα αντίστοιχα συστήματα και για συγκεντρώσεις ανώτερες του CMC το SDS επέφερε μικρή αύξηση της μέσης ακτίνας των σωματιδίων ή οποία αποδόθηκε στον σχηματισμό συσσωματώσεων μεταξύ μεικτών μικκυλίων και αυτούσιων μικκυλίων του επιφανειοδραστικού. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η περίπτωση των δύο συμπολυμερών με το χαμηλότερο μοριακό βάρος. Ειδικότερα παρατηρήθηκε πως η αύξηση της συγκέντρωσης του επιφανειοδραστικού SDS συντέλεσε σε ανάλογη αύξηση του μεγέθους των σωματιδίων. Το φαινόμενο αυτό αποδόθηκε στην μειωμένη ικανότητα που διακρίνει τις πολυμερικές αλυσίδες μικρού μεγέθους να προσαρμόζονται σε έντονες μεταβολές που προκαλούνται στην δομή των μικκυλίων τους. Ειδικότερα λόγω του μικρού μεγέθους τους οι αλυσίδες δεν έχουν την δυνατότητα μεγάλης έκτασης προκειμένου να καλύψουν την αυξημένη απαίτηση του διογκωμένου από τα surfactant πυρήνα για θωράκιση. Συνέπεια αυτού είναι τα επιμέρους μεικτά μικκύλια να απαρτίζονται πλέον από μεγαλύτερο αριθμό μορίων του συμπολυμερούς εμφανίζοντας μεγαλύτερη ακτίνα. Παράλληλα σύμφωνα με τους συγγραφείς δεν αποκλείεται η μετάβαση των σωματιδίων από μικκυλιακή μορφή σε κυστίδια των οποίων ο σχηματισμός πιθανώς ευνοείται στις συγκεκριμένες συνθήκες. Η επίδραση του DTMAB σε όλα τα εξεταζόμενα συστήματα ήταν αντίστοιχη με αυτή που είχε το SDS στα συστήματα συμπολυμερών μεγαλύτερου μοριακού βάρους.

Οι Pal et al.[20] μελέτησαν με την τεχνική του φθορισμού την συμπεριφορά μικκυλίων PEO-PPO-PEO συναρτήσει των μεταβολών στην συγκέντρωση του ιοντικού επιφανειοδραστικού CTAB. Από τα αποτελέσματα προέκυψε πως η μείωση του μεγέθους των μεικτών μικκυλίων συντελείται σε δύο στάδια. Σε πρώτο βαθμό η εισχώρηση της επιφανειοδραστικής ένωσης στην διεπιφάνεια των μικκυλίων προκαλεί μία πρώτη πτώση στο μέτρο της υδροδυναμικής ακτίνας των σωματιδίων ως αποτέλεσμα του μικρότερου μεγέθους των μορίων του surfactant. Στο δεύτερο στάδιο κατά το οποίο η συγκέντρωση του surfactant αυξάνεται καταγράφεται μία

δραστικότερη μείωση των διαστάσεων. Ο μηχανισμός ο οποίος προτάθηκε είναι η μετάβαση από το αρχικό σύστημα στο οποίο επικρατούν τα πολυμερικά μικκύλια με ενσωματωμένα τα μόρια του DTAB σε μία δεύτερη κατάσταση στην οποία τα surfactant επιβάλλουν την δική τους μικκυλιακή διαμόρφωση προκαλώντας αναδιάταξη των αλυσίδων. Το τελικό σύστημα πλέον αποτελείται από μικκύλια της επιφανειοδραστικής ένωσης στα οποία συμμετέχουν μόρια του συμπολυμερούς με άμεση συνέπεια την καταγραφή μικρότερης υδροδυναμικής ακτίνας σωματιδίων.

Οι Bharatya et al. [21] εξέτασαν την επιρροή της συγκέντρωσης ιοντικών surfactants όπως το SDS σε συμπολυμερή PEO-PPO-PEO διαφορετικών μοριακών βαρών. Από τα αποτελέσματα προέκυψε πως το SDS επιδρά με διττό τρόπο στην διαμόρφωση του μεγέθους των μεικτών μικκυλίων. Ειδικότερα σε χαμηλές συγκεντρώσεις το SDS προκαλεί αφυδάτωση της υδρόφιλης κορώνας προκαλώντας μείωση του μεγέθους των μικκυλίων καθώς οι πολυμερικές αλυσίδες έχουν τον απαραίτητο χώρο να διαταχθούν σε πιο συμπαγείς δομές. Η αύξηση της συγκέντρωσης του surfactant πέραν μίας ορισμένης τιμής έχει σαν αποτέλεσμα την αντίστοιχη αύξηση της υδροδυναμικής ακτίνας των μικκυλίων. Η συμπεριφορά αυτή πιθανώς είναι αποτέλεσμα του κορεσμού των μικκυλίων από τα μόρια της επιφανειοδραστικής ένωσης. Η ανάπτυξη σημαντικής ποσότητας φορτίων φαίνεται να εμποδίζει την περαιτέρω εισχώρηση του SDS στα μεικτά μικκύλια και οδήγησε τα απομονωμένα μόρια στον σχηματισμό αυτούσιων μικκυλίων που προκάλεσαν μερική συσσωμάτωση. Παράλληλα για πολύ υψηλές συγκεντρώσεις SDS παρατηρήθηκε καταστολή του σχηματισμού συμπολυμερικών μικκυλίων με αποτέλεσμα να επικρατούν δομές που αποτελούνται από μόρια surfactant και περιβάλλονται από τις συμπολυμερικές αλυσίδες.

Η ομάδα των Bibi et al.[22] ανέλυσε τις αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται σε μεικτά συστήματα μεταξύ επιφανειοδραστικών ενώσεων και αμφιφιλικών συμπολυμερών. Ειδικότερα μελετήθηκε η επίδραση των surfactant SDS και CTAB στα μικκύλια συμπολυμερούς E₆₂B₂₂. Η συμπεριφορά και των δύο επιφανειοδραστικών ήταν παρόμοια καθώς αύξηση της συγκέντρωσης τους στα διαλύματα του συμπολυμερούς οδήγησε στην ελάττωση της υδροδυναμικής ακτίνας των σωματιδίων. Οι Bibi et al. πρότειναν πως η επίδραση αυτή προκύπτει κυρίως από την διάλυση των επιφανειοδραστικών στον υδρόφοβο πυρήνα, αλλά και στις απωστικές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ των εγκλεισμένων μορίων του surfactant. Τα συγκεντρωμένα φορτία των επιφανειοδραστικών μορίων που εντοπίζονται στην περιοχή της κορώνας είναι ικανά να διαμορφώσουν μία λιγότερο συμπαγή δομή, επιτρέποντας στον διαλύτη να εισχωρήσει σε μεγαλύτερο βάθος, με αποτέλεσμα την μείωση της ακτίνας των σωματιδίων. Συμπληρωματικά μελετήθηκε και το συμπολυμερές PB-PS σε διαλύτη DMF παρουσία CTAB. Η αρχική αύξηση της συγκέντρωσης του CTAB είχε παρόμοια επίδραση με το πρώτο εξεταζόμενο σύστημα. Ωστόσο για συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από μία κρίσιμη τιμή το μέγεθος των σωματιδίων παρουσιάζει αυξητική τάση έως ότου σταθεροποιηθεί. Το φαινόμενο

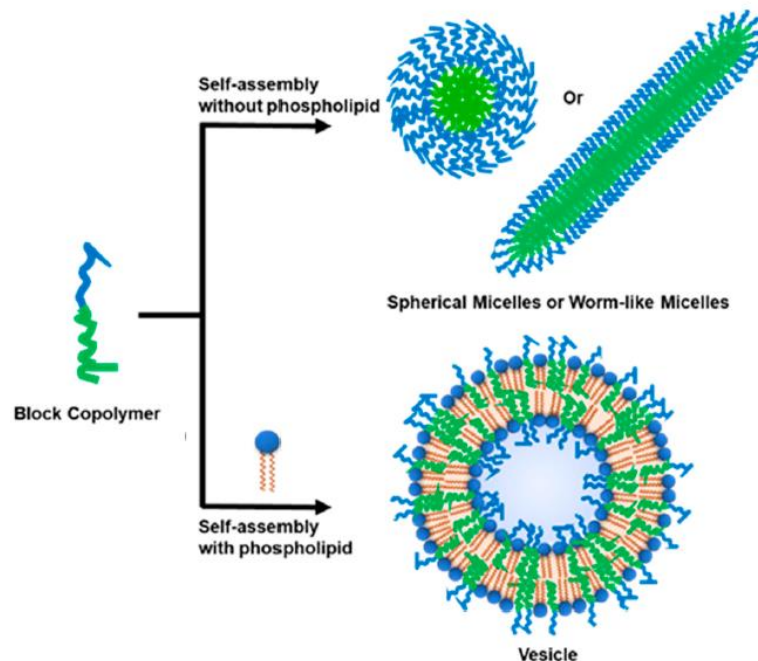
αυτό σύμφωνα με τους συγγραφείς προκύπτει ως συνέπεια της αύξησης του βαθμού συσσωμάτωσης των μικκυλίων λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε CTAB. Κατά το δεύτερο στάδιο τα μόρια του surfactant προκαλούν την εξαγωγή μορίων του συμπολυμερούς από τα μικκύλια και συσσωματώνονται γύρω από αυτά αναστέλλοντας την περαιτέρω αύξηση του μεγέθους των σωματιδίων.

Οι Zheng et al. χαρακτήρισαν συστήματα μικκυλίων τρισυσταδικών (triblock) συμπολυμερών $EO_{21}-EE_{35}-EO_{21}$ και δισυσταδικών (diblock) $EO_{126}B_{45}$ παρουσία του επιφανειοδραστικού $C_{12}E_5$ με την μέθοδο TEM. Με την εισαγωγή του επιφανειοδραστικού στο κολλοειδές του triblock παρατηρήθηκε μετάβαση στο σχήμα των μικκυλίων από κυλινδρικό σε σφαιρικό. Η εισχώρηση του surfactant, που τα μόριά του έχουν σημαντικά μικρότερο μέγεθος, στη μάζα των μικκυλίων επέτρεψε στις αλυσίδες να αποκτήσουν την ενεργειακά ευνοϊκότερη διαμόρφωση που είναι η σφαιρική. Από την μελέτη του συστήματος του απλού συμπολυμερούς οι Zheng et al. κατέληξαν πως η παρουσία του $C_{12}E_5$ προώθησε την μείωση των διαστάσεων των μικκυλίων μέσω της ανάπτυξης μεικτών μικκυλίων που χαρακτηρίζονται από σημαντικά μικρότερη ακτίνα. Περαιτέρω αύξηση περιεκτικότητας του surfactant είχε σαν αποτέλεσμα μεγαλύτερη μείωση της μέσης ακτίνας των σωματιδίων με παράλληλη αύξηση του μέτρου πολυδιασποράς.

1.5.2 Μεικτά συστήματα συμπολυμερών λιπιδίων.

Οι κυτταρικές λιπιδικές μεμβράνες αποτελούν την πιο χαρακτηριστική περίπτωση αυτοοργανομένης δομής που απαντάται στην φύση. Η λιπιδική διπλοστοιβάδα αποτελεί τον φραγμό μεταξύ εξωκυτταρικού και εσωκυτταρικού περιβάλλοντος ο οποίος διαχειρίζεται την επιλεκτική εισροή και εκροή συστατικών από και προς το κύτταρο. Οι ιδιότητες των λιποσωμάτων και ιδιαίτερα η βιοσυμβατότητά τους έχουν οδηγήσει σε μία εκτενή έρευνα προκειμένου να αναδειχθούν οι δυνατότητες χρήσης του σε προηγμένα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων (advanced drug delivery systems, ADDS). Ωστόσο τα λιποσώματα υστερούν όσον αφορά συγκεκριμένες προϋποθέσεις που πρέπει να πληρούν τα υλικά που προορίζονται για φαρμακευτικούς φορείς. Τα σωματίδια συμπολυμερών αποτελούν την ιδανική εναλλακτική για τα λιπίδια βιολογικής προέλευσης καθώς λόγω της μορφολογίας τους, της χημικής συμπεριφοράς τους, σε συνδυασμό με την δυνατότητα αυτοοργάνωσης, καταφέρνουν να μιμηθούν τις βασικές λειτουργίες της λιπιδικής μεμβράνης σε πολύ ικανοποιητικό επίπεδο. Ωστόσο η πλειονότητα των συμπολυμερών υστερεί στο γεγονός ότι εμφανίζει περιορισμένη βιοσυμβατότητα. Προκύπτει η ανάγκη έτσι για την ανάπτυξη νέων υβριδικών υλικών που στα χαρακτηριστικά τους θα συνοψίζουν τα επιμέρους πλεονεκτήματα των δομικών μορίων.

Τα χημικά νανοσυστήματα σωματιδίων λιπιδίων-συμπολυμερών αποτελούν πολύπλοκα συστήματα με πολλαπλές δυνατότητες παραμετροποίησης και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ιατροφαρμακευτικές εφαρμογές με υψηλό βαθμό επιτυχίας.



Εικόνα 1-24 Αυτοοργάνωση συμπολυμερούς απουσία και παρουσία λιπιδίων.

Οι δομή και η συμπεριφορά των μεικτών σωματιδίων συμπολυμερούς-λιπιδίων εξαρτάται από μία πληθώρα παραγόντων. Η αναλογία ανάμειξης των μορίων σε συνδυασμό με το μέτρο διαφοράς του υδρόφοβου χαρακτήρα, αλλά και τις χαρακτηριστικές θερμοκρασίες αλλαγής φάσης των επιμέρους ουσιών μπορούν να συντελέσουν στην εμφάνιση μίας μεγάλης πληθώρας μορφολογικά και λειτουργικά διαφορετικών σωματιδίων [23]. Υπάρχουν περιπτώσεις όπου τα μεικτά σωματίδια διακρίνονται από ομοιογένεια χαρακτηριστικών τόσο μεταξύ τους αλλά και εντός του όγκου τους με την κατανομή των επιφανειακών μορίων να παρουσιάζει ελάχιστες διαφοροποιήσεις από περιοχή σε περιοχή. Αντίστοιχα είναι δυνατή η εμφάνιση συστημάτων τα οποία παρουσιάζουν διαχωρισμό φάσης ακόμη και εντός της σωματιδίων οδηγώντας σε επιφανειακές περιοχές που μπορεί να απαρτίζονται αποκλειστικά μόνο από ενός εκ των δύο ειδών μορίων με αποτέλεσμα να χαρακτηρίζονται από τελείως διαφορετική συμπεριφορά. Ακόμα η παρουσία λιπιδίων μπορεί να επηρεάσει τον τρόπο αυτοσυγκρότησης των μορίων του συμπολυμερούς και με αποτέλεσμα την μετάβαση από μικκυλιακές δομές σε διαμορφώσεις κυστιδίων που προσομοιάζουν σε μεγαλύτερο βαθμό με τα λιποσώματα [24]. Το μεγαλύτερο τμήμα της υφιστάμενης έρευνας που αφορά τα χημικά σωματίδια περιστρέφεται γύρω από την επίδραση μικρών συγκεντρώσεων αμφιφιλικών συμπολυμερών στην μορφολογία και συμπεριφορά σωματιδίων που απαρτίζονται ως επί το πλείστον από λιπίδια. Στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής πραγματοποιήθηκε μελέτη για την επίδραση λιπιδίων σε πολυμερικά μικκύλια, θεματική για την οποία τα βιβλιογραφικά στοιχεία είναι αρκετά περιορισμένα.

1.5.3 Μεικτά συστήματα συμπολυμερών.

Η ανάπτυξη συμπολυμερικών σωματιδίων για DDS περιλαμβάνει και την μελέτη μεικτών πολυμερικών συστημάτων. Συγκεκριμένα τα σωματίδια απαρτίζονται από διαφορετικά μόρια αμφιφιλικών συμπολυμερών τα οποία συγκροτούν πολύπλοκες δομές με ιδιότητες που προκύπτουν από τα επιμέρους είδη μορίων. Τα μεικτά μικκύλια χρησιμοποιούνται σε εξειδικευμένες περιπτώσεις όπου τα συμβατικά συμπολυμερικά συστήματα του ενός συστατικού υστερούν ως προς τις απαιτήσεις της εφαρμογής. Η παρουσία ενός δευτερεύοντος συμπολυμερούς στα μικκύλια είναι ικανή να διαμορφώσει την συμπεριφορά του μεικτού σωματιδίου που προκύπτει βελτιώνοντας ένα μεγάλο φάσμα των ιδιοτήτων του. Ο συνδυασμός συμπολυμερών και πεπτιδίων-πολυμερών που επιτρέπουν την διείσδυση στο εσωτερικό του κυττάρου αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα όπου η δευτερεύουσα μονάδα μεταβάλλει τις ιδιότητες του σωματιδίου φορέα. Στην συγκεκριμένη περίπτωση το μεμονωμένο συμπολυμερές αδυνατεί να εισχωρήσει εντός του κυττάρου προκειμένου να αποδεσμεύσει το φορτίο του, ενώ όσον αφορά τα μόρια του πεπτιδίου συμπολυμερούς παρά την ικανότητα διάτρησης της κυτταρικής μεμβράνης είναι ασταθή και δεν παρουσιάζουν καμία εκλεκτικότητα ως προς το είδος των κυττάρων. Η συνεργιστική δράση των δύο ενώσεων εξασφαλίζει την σταθερότητα και την επιτυχημένη αποδέσμευση της φαρμακευτικής ένωσης, ενώ η χρήση του κατάλληλου συμπολυμερούς μπορεί να συμβάλλει και στην αύξηση της εκλεκτικότητας του σωματιδίου βελτιώνοντας περαιτέρω τη δράση του [25]. Οι διαφορετικές θερμοκρασίες μεταπτώσεων των ουσιών που αποτελούν τα μεικτά μικκύλια μπορούν επίσης να αξιοποιηθούν με τέτοιο τρόπο ώστε να μεταβληθεί η φάση του υδρόφοβου πυρήνα από υαλώδη σε κρυσταλλική και το αντίστροφο. Η παραπάνω μεταβολή επιτρέπει τον χειρισμό της δυνατότητας συγκράτησης φαρμακευτικού φορτίου, αλλά και της ταχύτητας αποδέσμευσης του εντός των ιστών [26]. Τέλος την πιο χαρακτηριστική περίπτωση συνδυασμού συμπολυμερών αποτελούν τα αποκρινόμενα νανοσωματίδια. Το συγκεκριμένο είδος μικκυλίων χαρακτηρίζεται από την σταθερότητα και βιοσυμβατότητα των απλών αμφιφιλικών συμπολυμερών και την δυνατότητα της στοχευμένης απελευθέρωσης της φαρμακευτικής ένωσης όταν παρουσιαστεί το κατάλληλο ερέθισμα. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται τόσο η υψηλή εκλεκτικότητα του συστήματος όσο και ο ακριβής προσδιορισμός της ταχύτητας αποδέσμευσης.

Κεφάλαιο 2^ο: Πειραματική διαδικασία

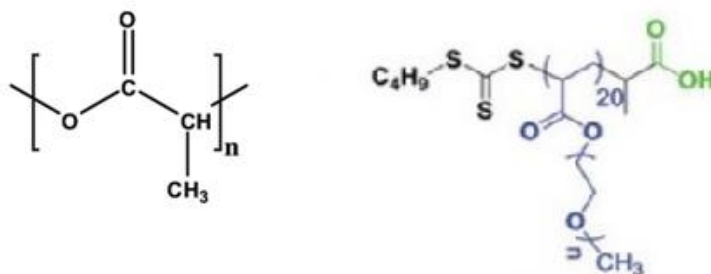
Στα πλαίσια αυτής της εργασίας πραγματοποιήθηκε η παρασκευή και η μελέτη συστημάτων του αμφιφιλικού συμπολυμερούς poly(lauryl acrylate)-b-poly (oligoethylene glycol acrylate) (PLA-POEGA). Ειδικότερα μελετήθηκε η συμπεριφορά αυτοοργάνωσης του συμπολυμερούς σε μικκύλια εντός υδατικών διαλυμάτων σε καθαρή μορφή καθώς και η επίδραση της παρουσίας επιφανειοδραστικών ενώσεων και λιπιδίων στην διαμόρφωση των σωματιδίων. Ταυτόχρονα τα απλά και τα μεικτά μικκύλια αξιολογήθηκαν ως προς τη δυνατότητα εγκλεισμού φαρμακευτικών ενώσεων και τις μεταβολές που προκαλούν τα φαρμακευτικά μόρια στην αυτοοργάνωση των μικκυλίων. Συμπληρωματικά παρασκευάστηκε μεικτό σύστημα συμπολυμερών αποτελούμενο από PLA-POEGA- και PLA-PAA το οποίο εξετάστηκε ως προς την δυνατότητα απόκρισης σε μεταβολές του pH. Τα συστήματα παρασκευάστηκαν με την χρήση διαφορετικών πρωτοκόλλων ενυδάτωσης προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της διαδικασίας προετοιμασίας τους στο μέγεθος και την διαμόρφωση των μικκυλίων στα τελικά διαλύματα.

2.1 Πρώτες ύλες

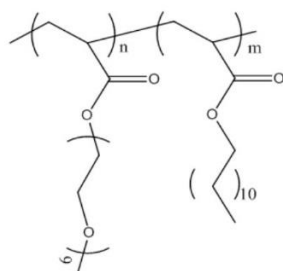
Παρακάτω καταγράφονται τα κύρια χαρακτηριστικά των πρώτων υλών με τις οποίες έγινε η προετοιμασία των συστημάτων πολυμερικών μικκυλίων.

2.1.1 PLA-POEGA

Το πολυμερές που αποτέλεσε την βάση των συστημάτων του μελετήθηκαν ήταν το PLAPOEGA το οποίο προέρχεται από συμπολυμερισμό. Το poly (oligoethylene glycol acrylate) (POEGA) αποτελεί το υδρόφιλο τμήμα ενώ το poly(lauryl acrylate) (PLA) αντιστοιχεί στο υδρόφοβο μέρος. Η αναλογία μάζας των επιμέρους πολυμερών στο τελικό μόριο ήταν 30:70 (PLA:POEGA)



Εικόνα 2-1 Τα μόρια των πολυμερών PLA και POEGA.



Εικόνα 2-2 Το μόριο του συμπολυμερούς PLA-POEGA.

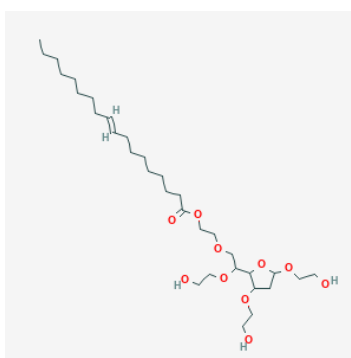
Το μοριακό βάρος του συμπολυμερούς ήταν 10.200g/ml με δείκτη πολυδιασποράς ίσο με 1,4, ενώ σε θερμοκρασία δωματίου το συμπολυμερές βρίσκεται σε κατάσταση ιξώδους ρευστού. Το μόριο επιλέχθηκε μεταξύ άλλων προς μελέτη λόγω της βιοσυμβατότητας που εμφανίζουν και τα δύο τμήματα που το αποτελούν. Η σύνθεση του μορίου έγινε εργαστηριακά με την μέθοδο RAFT εκτός των πλαισίων της παρούσας εργασίας.

2.1.2 PLA-PAA

Το μοριακό βάρος του συμπολυμερούς ήταν 9.800 g/ml με 59% κατά βάρος PLA, ενώ σε θερμοκρασία δωματίου το συμπολυμερές βρίσκεται σε κατάσταση ιξώδους ρευστού. Το μόριο επιλέχθηκε μεταξύ άλλων προς μελέτη λόγω της βιοσυμβατότητας που εμφανίζουν και τα δύο τμήματα που το αποτελούν, αλλά και λόγω της αποκρισιμότητας του PAA σε αλλαγές του pH του διαλύματος. Η σύνθεση του μορίου έγινε εργαστηριακά με την μέθοδο RAFT εκτός των πλαισίων της παρούσας εργασίας.

2.1.3 Tween 80

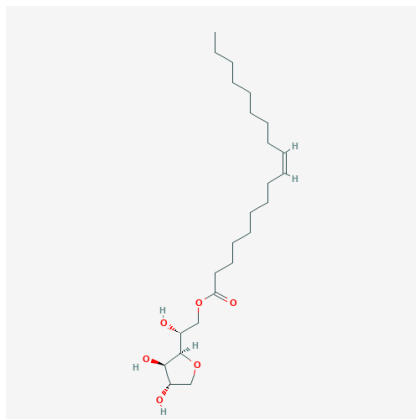
Το Πολυoxyethylene (20) sorbitan monooleate (Tween 80) αποτελεί μη ιοντική αμφιφιλική ένωση μικρού μοριακού βάρους. Το Tween 80 χρησιμοποιείται ως επιφανειοδραστικό και γαλακτοματοποιητής για τρόφιμα και καλλυντικά. Το μοριακό του βάρος αντιστοιχεί σε 1030g/mol και είναι ελαιώδες ρευστό. Η διαλυτότητα του στο νερό είναι ίση με 100ml/L.



Εικόνα 2-3 Η χημική δομή του Tween 80.

2.1.4 SPAN 80

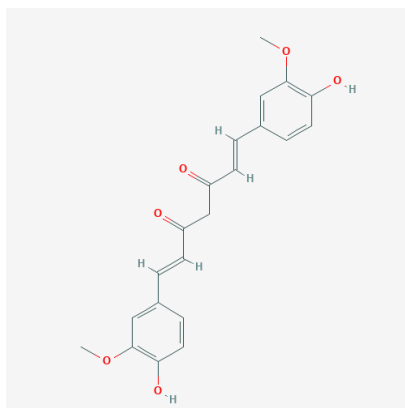
Το Sorbitan monooleate (SPAN 80) αποτελεί επιφανειοδραστική ένωση χαμηλού μοριακού βάρους ίσου με 428,6 g/mol. Είναι βιοσυμβατό καθώς προέρχεται από λιπαρά οξέα. Το SPAN 80 χρησιμοποιείται κυρίως ως γαλακτοματοποιητής σε εφαρμογές τροφίμων, ωστόσο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εσωτερικό λιπαντικό και συνδετικό μέσο σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών που απαιτείται καταλληλότητα για τρόφιμα.



Εικόνα 2-4 Η χημική δομή του SPAN 80.

2.1.5 Κουρκουμίνη (Curcumin, CUR)

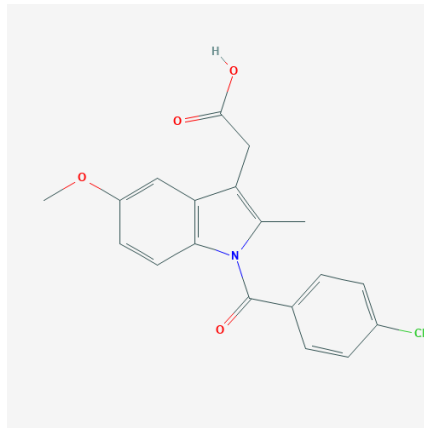
Η κουρκουμίνη συγκαταλέγεται στις φαινόλες και αποτελεί φυσικό συστατικό που προέρχεται από το φυτό της Κιτρινόριζας (*Curcuma longa*) και χρησιμοποιείται κυρίως ως συστατικό συμπληρωμάτων διατροφής. Η κουρκουμίνη παρουσιάζει αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση, ενώ παράλληλα αξιολογείται για την πιθανή αντικαρκινική της δράση. Είναι μερικώς υδρόφοβο μόριο με μοριακό βάρος ίσο με 368 g/mol.



Εικόνα 2-5 Η χημική δομή της κουρκουμίνης.

2.1.6 Ινδομεθακίνη (Indomethacin, IND)

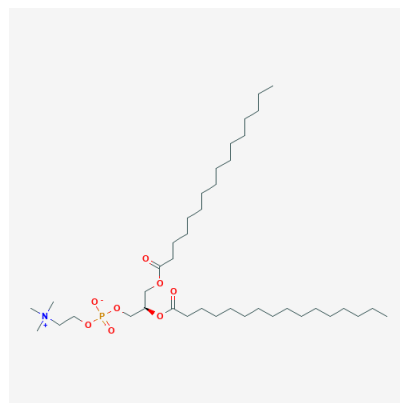
Η ινδομεθακίνη αποτελεί μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη ένωση η οποία κατέχει αναλγητική και αντιπυρετική δράση. Αποτελεί κύρια δραστική ουσία εμπορικών φαρμακευτικών σκευασμάτων. Το μοριακό βάρος της ένωσης είναι 357 g/mol και είναι πρακτικά αδιάλυτη στο νερό.



Εικόνα 2-6 Η χημική δομή της ινδομεθακίνης.

2.1.7 DPPC

Ένα από τα πιο χαρακτηριστικά λιπίδια που χρησιμοποιούνται σε φαρμακευτικές εφαρμογές ως δραστική ένωση αλλά και σε μελέτες φαρμακευτικής αποδέσμευσης είναι το Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) με χημικό τύπο C₄₀H₈₀NO₈P.



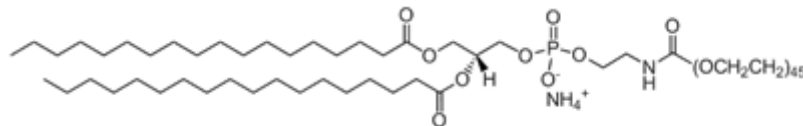
Εικόνα 2-7 Η δομή του DPPC.

Το μόριο του DPPC απαρτίζεται από μία υδρόφιλη κεφαλή η οποία μέσω μίας φωσφορικής ομάδας συνδέεται με δύο αλειφατικούς εστέρες που αποτελούν τα υδρόφοβα άκρα του. Λόγω της χημικής δομής του το λιπίδιο είναι ικανό να οργανώνεται σε διπλοστοιβάδα σχηματίζοντας λιποσώματα. Το DPPC αποτελεί

βιολογικό επιφανειοδραστικό και παράγεται από όλους τους αερόβιους οργανισμούς με σκοπό την μείωση της επιφανειακής τάσης στην επιφάνεια συγκεκριμένων ιστών. Το μοριακό βάρος της ένωσης ισούται με 734g/mol και η κρίσιμη συγκέντρωση συσσωμάτωσης είναι $4,6 \times 10^{-10}$ mol/L

2.1.8 DSPE-PEG

Το Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DPSE) με χημικό τύπο $C_{41}H_{82}NO_8P$ είναι επίσης φωσφολιπίδιο και αποτελεί βασικό δομικό υλικό της μεμβράνης των βακτηριδίων καθώς και των κυττάρων του ανθρώπινου νευρικού συστήματος. Στα πλαίσια αυτής της εργασίας χρησιμοποιήθηκε το εν λόγω φωσφολιπίδιο πάνω στο οποίο είναι προσδεμένη μία αλυσίδα πολυαιθυλενογλυκόλης PEG. Η PEG αποτελεί βιοσυμβατό και βιοδιασπώμενο πολυαιθέρα που χρησιμοποιείται ως έκδοχο σε φαρμακευτικά σκευάσματα. Ο συγκεκριμένος συνδυασμός λιπιδίου-πολυμερούς οδηγεί στην αύξηση της υδροφιλικότητας του DSPE προσδίδοντας βελτιωμένες ιδιότητες φορέα στα σχηματιζόμενα λιποσώματα. Το μοριακό βάρος της ένωσης είναι 2.748g/mol με τα 2.000g/mol να αντιστοιχούν στο Mw του πολυμερούς.



Εικόνα 2-8 Δομή του DSPE-PEG.

2.2 Παρασκευή συστημάτων

Αρχικά παρασκευάστηκαν τα συστήματα αυτούσιου συμπολυμερούς PLA-POEGA προς αξιολόγηση των ιδιοτήτων του. Παρασκευάστηκαν τρία όμοια υδατικά διαλύματα ίδιας συγκέντρωσης συμπολυμερούς με τρία διαφορετικά πρωτόκολλα ενυδάτωσης.

- Απευθείας διάλυση σε νερό: Έπειτα από την ζύγιση της απαιτούμενης ποσότητας πολυμερούς προστέθηκε ο απαιτούμενος όγκος απεσταγμένου νερού με χρήση φίλτρου προκειμένου να γίνει συγκράτηση σωματιδίων της κλίμακας των μm, και το διάλυμα αφέθηκε προκειμένου να έρθει σε ισορροπία για 24 ώρες.
- Διάλυση σε νερό με οργανικό διαλύτη: Η ποσότητα συμπολυμερούς διαλύθηκε πλήρως σε κατάλληλη ποσότητα THF και αφέθηκε να έρθει σε ισορροπία. Το διάλυμα μεταφέρθηκε με χρήση σύριγγας σε υδατικό μέσο. Η προσθήκη του διαλύματος THF στο νερό γίνεται με ακαριαίο τρόπο υπό ισχυρή ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα. Για το απεσταγμένο νερό έχει προηγηθεί φιλτράρισμα. Το νέο διάλυμα μεταφέρθηκε σε περιστροφικό εξατμιστή όπου με χρήση κενού και ήπιας θέρμανσης ολοκληρώθηκε η αφαίρεση του οργανικού διαλύτη.

- Ενυδάτωση φιλμ: Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με την μέθοδο οργανικού διαλύτη χωρίς όμως την διάλυση σε νερό. Το διάλυμα PLA-POEGA σε THF τοποθετήθηκε στον εξατμιστή απουσία νερού όπου και αφαιρέθηκε ο διαλύτης. Το πολυμερικό φιλμ που σχηματίστηκε στα τοιχώματα ενυδατώθηκε με απεσταγμένο νερό υπό ήπια θέρμανση και το διάλυμα που προέκυψε μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο.

Ακολούθησε η προετοιμασία διαλυμάτων PLA-POEGA/Tween. Παρασκευάστηκαν έξι συστήματα εκ των τα τρία περιείχαν συγκέντρωση Tween μεγαλύτερη της CMC και στα υπόλοιπα τρία η περιεκτικότητα του Tween ήταν σε τιμή χαμηλότερη της CMC. Για τις δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις Tween παρασκευάστηκαν τρία διαλύματα που αντιστοιχούν στα προαναφερόμενα πρωτόκολλα ενυδάτωσης.

- Απευθείας διάλυση σε νερό: Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν πανομοιότυπη με αυτή που χρησιμοποιήθηκε για το PLA-POEGA.
- Διάλυση σε νερό με χρήση οργανικού διαλύτη: Αρχικά έγινε διάλυση κατάλληλων ποσοτήτων των ουσιών σε δύο φιαλίδια με χρήση THF τα οποία αφέθηκαν αρχικά να έρθουν σε ισορροπία και μετέπειτα αναμείχθηκαν μεταξύ τους ώστε να προστεθούν στο υδατικό διάλυμα. Για την ολοκλήρωση της διαδικασίας έγινε επανάληψη των σταδίων της προετοιμασίας του PLA-POEGA.
- Ενυδάτωση φιλμ: Τα αρχικά στάδια της παρασκευής ήταν παρόμοια με του οργανικού προτύπου ενώ ο σχηματισμός φιλμ και η ενυδάτωση του πραγματοποιήθηκε όπως και στην περίπτωση του καθαρού PLA-POEGA.

Τα συστήματα συμπολυμερούς επιφανειοδραστικού PLA-POEGA/SPAN προέκυψαν με χρήση οργανικού διαλύτη και ενυδάτωση φιλμ με τρόπο πανομοιότυπο με αυτόν των συστημάτων PLA-POEGA/Tween σε αντίστοιχες συγκεντρώσεις. Ωστόσο λόγω της μειωμένης διαλυτότητας του SPAN στο νερό, η χρήση του πρωτόκολλου της απευθείας διάλυσης σε υδατικό μέσο αποκλείστηκε.

Ακολούθως έγινε η προετοιμασία μεικτών συστημάτων συμπολυμερούς PLA-POEGA και λιπιδίου DPPC. Προετοιμάστηκαν τέσσερα διαλύματα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις λιπιδίου. Δεδομένου ότι το DPPC δεν είναι διαλυτό σε THF επιλέχθηκε ως διαλύτης το χλωροφόρμιο. Ωστόσο καθώς το χλωροφόρμιο σχηματίζει γαλάκτωμα με το νερό και τα λιπίδια δεν είναι διαλυτά σε υδατικό μέσο τα διαλύματα παρασκευάστηκαν αποκλειστικά με ενυδάτωση λεπτού φιλμ.

- Ενυδάτωση λεπτού φιλμ: Τα στάδια προετοιμασίας ήταν πανομοιότυπα με αυτά που περιεγράφηκαν για τα προηγούμενα συστήματα. Επιπροσθέτως τα παραχθέντα διαλύματα τοποθετήθηκαν σε λουτρό υπερήχων ώστε να επιτευχθεί μείωση μεγέθους των σχηματιζόμενων σωματιδίων.

Στην περίπτωση του τροποποιημένου λιπιδίου παρασκευάστηκαν τρία διαλύματα εκ των οποίων το ένα περιείχε καθαρό DSPE-PEG ενώ τα υπόλοιπα δύο ήταν μεικτά συστήματα PLA-POEGA/DSPE-PEG με το λιπίδιο να βρίσκεται σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις. Για λόγους σύγκρισης με τα διαλύματα που περιέχουν DPPC τα μεικτά συστήματα του DSPE παρασκευάστηκαν με τον ίδιο ακριβώς τρόπο.

Η προετοιμασία των διαλυμάτων με ενσωματωμένες φαρμακευτικές ενώσεις έγινε έπειτα από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των αρχικών συστημάτων. Ως συνέπεια αυτού επιλέχθηκαν τα κατάλληλα πρωτόκολλα και συγκεντρώσεις τα οποία έδωσαν τα βέλτιστα αποτελέσματα. Τα συστήματα που περιείχαν SPAN δεν μελετήθηκαν σε αυτό το στάδιο καθώς κρίθηκε πως δεν παρουσίασαν τα επιθυμητά χαρακτηριστικά ως προς το μέγεθος των σωματιδίων. Τα διαλύματα προέκυψαν σύμφωνα τα στάδια που έχουν περιγραφεί παραπάνω κατά περίπτωση.

Τέλος προετοιμάστηκαν τρία διαλύματα που περιείχαν τα συμπολυμερή PLA-POEGA/PLA-PAA με την μέθοδο του οργανικού πρωτοκόλλου σε τρεις διαφορετικές αναλογίες με την διαδικασία να είναι πανομοιότυπη με τα παραπάνω συστήματα.

Για τις μετρήσεις με την μέθοδο της δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) τα διαλύματα φιλτραρίστηκαν ώστε να περιοριστεί το πλήθος των σωματιδίων με μέγεθος μεγαλύτερο από το επιθυμητό. Επιπροσθέτως στις περιπτώσεις όπου ήταν εμφανής η παρουσία συσσωματώσεων λόγω μειωμένης διαύγειας των διαλυμάτων πραγματοποιήθηκε κατάλληλη αραιώση με απεσταγμένο νερό.

Πίνακας 2-1 Συστήματα που εξετάστηκαν.

Διαλύματα	Αναλογίες	Μέθοδος διάλυσης
PLA-POEGA	-	Water/THF/Thin film
PLA-POEGA/CUR	1:0.1	THF
PLA-POEGA/IND	1:0.1	THF
PLA-POEGA/Tween	1:0.5/1:3	Water/THF/Thin film
PLA-POEGA/SPAN	1:0.5/1:3	THF/Thin film
PLA-POEGA/Tween/CUR	1:0.5:0.1	THF
PLA-POEGA/Tween/IND	1:0.5:0.1	THF
PLA-POEGA/DPPC	1:0.01/1:0.05/1:0.1/1:0.3	Thin film
DSPE	-	Thin film
PLA-POEGA/DSPE	1:0.1/1:0.3	Thin film
PLA-POEGA/DPPC/CUR	1:0.01:0.1	Thin film
PLA-POEGA/DPPC/IND	1:0.01:0.1	Thin film
PLA-POEGA/DSPE/CURCUR	1:0.1:0.1	Thin film
PLA-POEGA/DSPE/IND	1:0.1:0.1	Thin film
PLA-POEGA/PLA-PAA	1:2/1:1/2:1	THF

Στον προηγούμενο πίνακα παρουσιάζονται συνοπτικά τα συστήματα τα οποία μελετήθηκαν με τις αντίστοιχες μεθόδους προετοιμασίας και τις αναλογίες των ουσιών στα διαλύματα. Η συγκέντρωση του PLA-POEGA ήταν 10^{-3} g/ml σε κάθε διάλυμα.

Για τις μετρήσεις φθορισμού έγινε κατάλληλη επεξεργασία στα τρία διαλύματα του καθαρού PLA-POEGA και τα έξι διαλύματα PLA-POEGA/Tween. Συγκεκριμένα μία αρχική ποσότητα από ένα διάλυμα υπέστη συνεχείς αραιώσεις με την συγκέντρωση των ουσιών να μειώνεται κατά το ήμισυ ώστε να προκύψουν δέκα νέα υδατικά διαλύματα μεταξύ συγκεντρώσεων πολυμερούς από 5×10^{-4} g/ml έως 10^{-8} g/ml. Στο σύνολο προέκυψαν ενενήντα διαλύματα. Με το πέρας της διαδικασίας έγινε προσθήκη κατάλληλης ποσότητας ιχνηθέτη πυρενίου σε κάθε αραιωμένο διάλυμα.

2.3 Μέθοδοι χαρακτηρισμού

Ο χαρακτηρισμός των συστημάτων απλού συμπολυμερούς και των υβριδικών συστημάτων πραγματοποιήθηκε με την χρήση των μεθόδων φασματοσκοπίας φθορισμού, φασματοσκοπίας εγγύς υπεριώδους ακτινοβολίας και δυναμικής σκέδασης φωτός.

2.3.1 Φασματοσκοπία φθορισμού

Η φασματοσκοπία φθορισμού χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της κρίσιμης μικκυλιακής συγκέντρωσης των εξεταζόμενων συστημάτων. Ο προσδιορισμός του CMC έγινε βάση των μετατοπίσεων που καταγράφηκαν στις χαρακτηριστικές κορυφές του φάσματος φθορισμού του πυρενίου ως αποτέλεσμα των μεταβολών στο περιβάλλον του.

Αρχή λειτουργίας

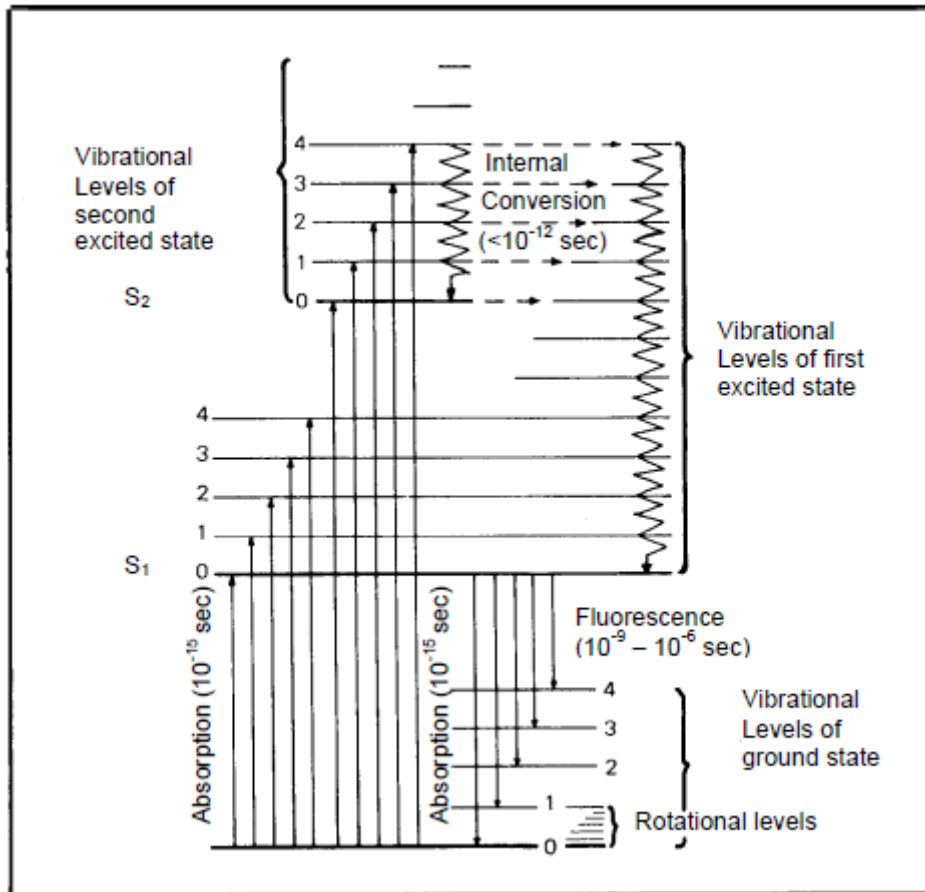
Η αποβολή ενέργειας με εκπομπή ακτινοβολίας από ένα σώμα αποτελεί άμεση συνέπεια της αποδιέγερσης των ηλεκτρονίων του. Η ενέργεια των φωτονίων που εκπέμπονται είναι ανάλογη της συχνότητας της ακτινοβολίας και το μέτρο της εξαρτάται από το φαινόμενο που προκαλεί την εκπομπή. Παρακάτω παρουσιάζονται συνοπτικά κάποια χαρακτηριστικά είδη ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας.

Radiation	Approximate sizes of Quanta				
	$\nu(\text{cm})$ (typical values)	Wave-number (μm^{-1})	Size of quantum (electron volts)	Size of einstein (kilogram calories)	Absorption or emission of radiation involves
Gamma rays	10^{-10}	10^6	1.2×10^6	2.9×10^7	Nuclear reactions
X-rays	10^{-8}	10^4	1.2×10^4	2.9×10^5	Transitions of inner atomic electrons
Ultraviolet	10^{-5}	10^1	1.2×10^1	2.9×10^2	Transitions of outer atomic electrons
Visible	4×10^{-5} 8×10^{-5}	2.5 1.25	3.1 1.6	7.1×10^1 3.6×10^1	
Infrared	10^{-3}	10^{-1}	1.2×10^{-1}	2.9	Molecular vibrations
Far infrared	10^{-3}	10^{-2}	1.2×10^{-2}	2.9×10^{-1}	Molecular rotations
Radar	10^1	10^{-5}	1.2×10^{-5}	2.9×10^{-4}	Oscillation of mobile or free electrons
Long radio waves	10^5	10^{-9}	1.2×10^{-9}	2.9×10^{-8}	

Εικόνα 2-9 Μεγέθη χαρακτηριστικών ακτινοβολιών.

Το εύρος ακτινοβολιών που μελετά η φθορισμομετρία και οι τεχνικές απορρόφησης κυμαίνεται μεταξύ του ορατού και του υπεριώδους φωτός. Μεταξύ αυτών των ορίων λαμβάνει χώρα η διέγερση των ηλεκτρονίων της εξωτερικής στοιβάδας των ατόμων και των μορίων.

Η απορρόφηση ενέργειας από τα ηλεκτρόνια προκαλεί την μετάβασή τους από την στάθμη σθένους στις ενεργειακά υψηλότερες διεγερμένες στάθμες. Το μόριο αντίστοιχα με την απορρόφηση ακτινοβολίας συγκεκριμένης συχνότητας μπορεί να μεταβεί στις διεγερμένες καταστάσεις που του επιτρέπει η κβαντισμένη ποσότητα ενέργειας που δέχθηκε.

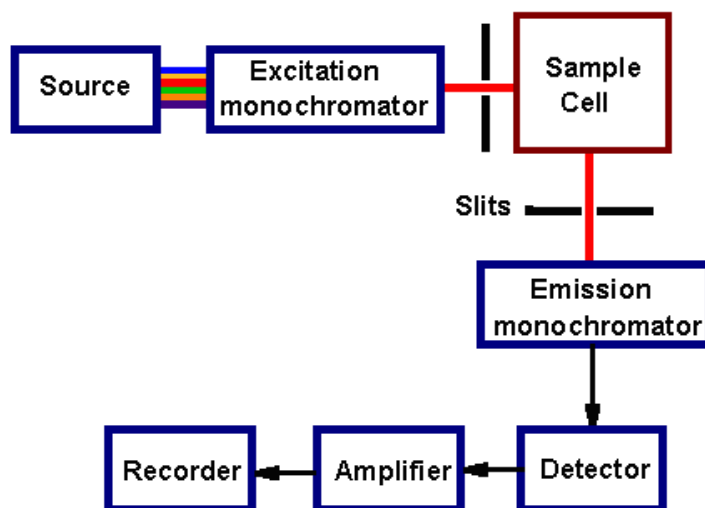


Εικόνα 2-10 Απλοποιημένο διάγραμμα ενεργειακών καταστάσεων.

Το διεγερμένο μόριο μπορεί αποβάλλει άμεσα το σύνολο ή μέρος της ενέργειας που έχει προσλάβει μέσω συγκρούσεων και να μεταπέσει σε οποιαδήποτε χαμηλότερη ενεργειακή στάθμη. Κάθε ένωση απορροφά και εκπέμπει ακτινοβολία σε συγκεκριμένα τμήματα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος με συνέπεια να είναι δυνατή τόσο η ταυτοποίηση της ίδιας της ένωσης όσο και των αλληλεπιδράσεων που παρουσιάζει με το περιβάλλον της.

Οργανολογία

Τα συστήματα φασματοσκοπίας φθορισμού αποτελούνται από τέσσερα βασικά στοιχεία: μία φωτεινή πηγή που εκπέμπει στο επιθυμητό μήκος κύματος, έναν υποδοχέα δείγματος, έναν αισθητήρα και μία μονάδα που επεξεργάζεται το σήμα του αισθητήρα. Συμπληρωματικά μεταξύ της πηγής και του δείγματος καθώς και μεταξύ του δείγματος και του αισθητήρα υπάρχουν κατάλληλα φίλτρα που επιτρέπουν την διέλευση ακτινοβολίας συγκεκριμένης συχνότητας.



Εικόνα 2-11 Διάγραμμα φασματοσκοπικής διάταξης φθορισμού.

Οι φωτεινές πηγές που χρησιμοποιούνται συνήθως μπορούν να εκπέμπουν σε συνεχές ή διακοπτόμενο φάσμα και ο τύπος επιλέγεται αναλόγως του προς εξέταση δείγματος. Τα υλικά που χαρακτηρίζονται είναι κατά κόρον σε μορφή διαλύματος. Ο φορέας του δείγματος θα πρέπει να είναι από υλικό το οποίο δεν απορροφά τμήμα της προσπίπτουσας και της ανακλώμενης ακτινοβολίας προκειμένου να μην υπάρχει απώλεια δεδομένων [27].

2.3.2 Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS)

Η εκτίμηση του μεγέθους των μικκυλίων που σχηματίστηκαν στα διαλύματα έγινε με την μέθοδο DLS.

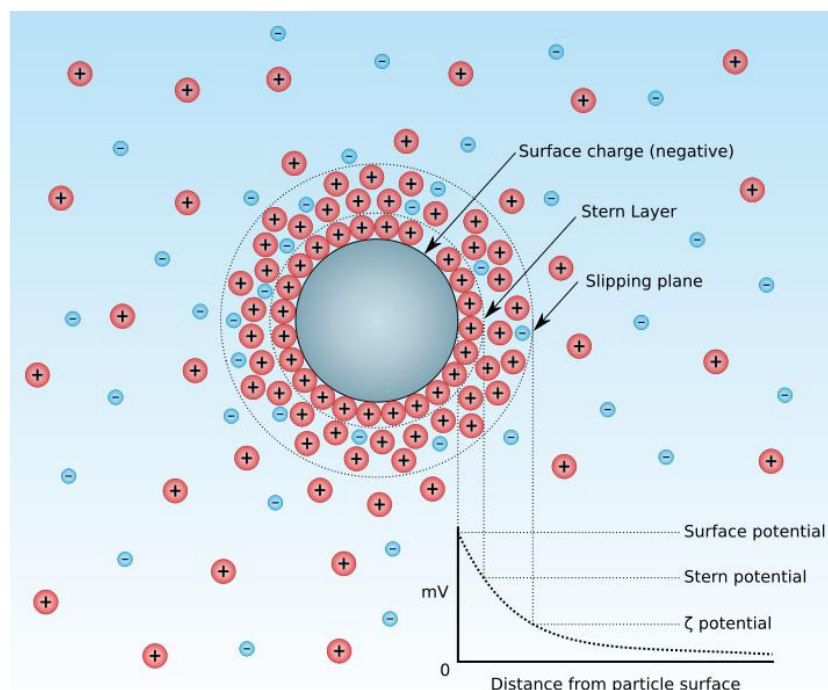
Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στην ποσοτικοποίηση της τυχαίας κίνησης Brown των σωματιδίων εντός διαλύματος και την συσχέτισή της με το μέγεθός τους. Πιο συγκεκριμένα η μέθοδος υπολογίζει την υδροδυναμική ακτίνα (R_h) του εξεταζόμενου σωματιδίου που αντιστοιχεί με την ακτίνα ενός σφαιρικού σωματιδίου που χαρακτηρίζεται από τον ίδιο συντελεστή διάχυσης. Το μέτρο της υδροδυναμικής ακτίνας προκύπτει από την εξίσωση Stokes-Einstein.

$$R(h) = \frac{kT}{6\pi\eta D}$$

Βάση της παραπάνω σχέσης η ακτίνα είναι ανάλογη της θερμοκρασίας T και της σταθεράς Boltzman, ενώ είναι αντιστρόφως ανάλογη του ιξώδους και του συντελεστή διάχυσης .

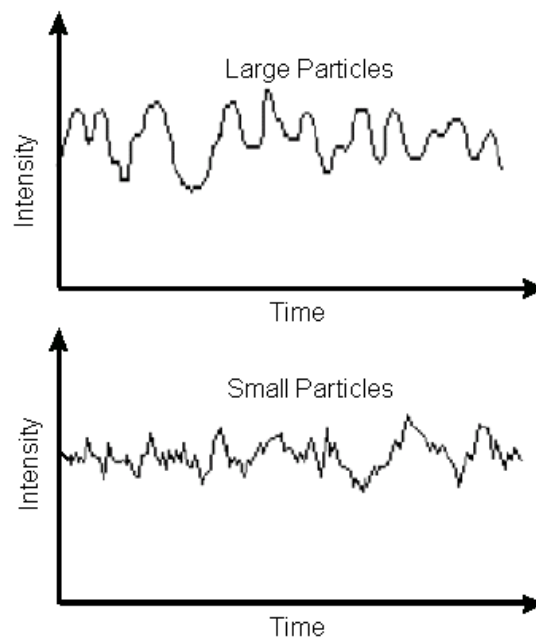
Η υδροδυναμική ακτίνα εξαρτάται πέραν του μεγέθους του σωματιδίου, την ιοντική ισχύ του διαλύματος, την δομή και το σχήμα του νανοσωματιδίου. Η ιοντική ισχύς μεταβάλλει το πάχος της στοιβάδας διάχυσης του σωματιδίου γεγονός το οποίο μεταφράζεται σε διαφορετικές τιμές υδροδυναμικής ακτίνας. Η παρουσία υψηλής συγκέντρωσης ιόντων προκαλεί μεγαλύτερη θωράκιση των επιφανειακών φορτίων αυξάνοντας τον συντελεστή διάχυσης και μειώνοντας την ακτίνα R_h . Αντίθετα η χαλαρή πρόσδεση των ιόντων σε διάλυμα χαμηλής ιοντικής ισχύος αυξάνει το μέγεθος της στοιβάδας ενυδάτωσης με συνέπεια να εμφανίζεται μείωση του συντελεστή διάχυσης και αύξηση της υδροδυναμικής ακτίνας. Το μέγεθος και το σχήμα του σωματιδίου επηρεάζουν την R_h λόγω των δυνατών διαμορφώσεων και αλληλεπιδράσεων που μπορεί να εμφανίσει το σωματίδιο, γεγονός που οδηγεί σε μεταβολές της ταχύτητας διάχυσης.



Εικόνα 2-12 Αναπαράσταση ηλεκτροστατικής θωράκισης φορτισμένου σωματιδίου.

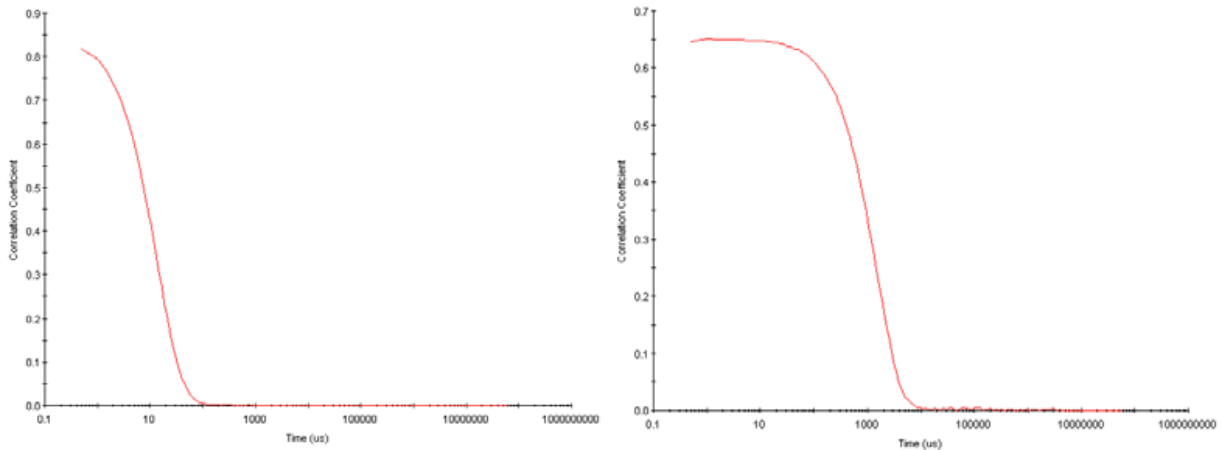
Όταν οι διαστάσεις ενός σωματιδίου είναι συγκρίσιμες με το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας τότε θεωρείται πως η σκέδασή της είναι ισοτροπική. Σύμφωνα με την προσέγγιση Rayleigh η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας είναι ανάλογη κατά ένα παράγοντα που ισούται με την διαμέτρου του σωματιδίου στην έκτη δύναμη και αντιστρόφως ανάλογη του μήκους κύματος της ακτινοβολίας στην τέταρτη δύναμη. Η πρώτη προσέγγιση οδηγεί στο συμπέρασμα πως η συνεισφορά των μικρότερων σωματιδίων στην σκεδαζόμενη ακτινοβολία είναι αμελητέα και η ανίχνευσή τους είναι δυσχερής όταν συνυπάρχουν με μεγαλύτερα σωματίδια. Η δεύτερη συνθήκη δηλώνει πως η ποσότητα της σκεδαζόμενης έντασης για υψηλότερες συχνότητες προσπίπτουσας ακτινοβολίας είναι μεγαλύτερη.

Η μέθοδος DLS καταγράφει τις μεταβολές στην ένταση της ακτινοβολίας που σκεδάζεται από το δείγμα σε σχέση με τον χρόνο και τις συσχετίζει με το μέγεθος των σωματιδίων. Τα κύματα ακτινοβολίας που φτάνουν στον αισθητήρα/ανιχνευτή της διάταξης μπορεί να συμβάλλουν ή να αναιρούνται μεταξύ τους. Ο ρυθμός με τον οποίο μεταβάλλεται η ένταση λόγω συμβολής και αναίρεσης εξαρτάται από την κινητικότητα των σωματιδίων μέσα στο διάλυμα. Στην περίπτωση που το μέγεθος των σωματιδίων είναι επαρκώς μεγάλο, τότε η κινητικότητα των σωματιδίων θα είναι μικρή. Ως συνέπεια αυτού η διακύμανση της έντασης είναι σχετικά μικρή στην μονάδα του χρόνου. Σε αντίθετη περίπτωση η μεγάλη κινητικότητα λόγω μικρού μεγέθους σωματιδίων, προκαλεί μεγάλες διακυμάνσεις έντασης.



Εικόνα 2-13 Διακύμανση εντάσεως σκεδαζόμενης ακτινοβολίας για μεγάλα και μικρά σωματίδια.

Ο προσδιορισμός του μεγέθους γίνεται μέσω της διαδικασίας αυτοσυσχέτισης. Το σύστημα συγκρίνει κάθε στιγμή το σήμα που έλαβε με τα προγενέστερα αποδίδοντας κάθε φορά μία τιμή συσχέτισης. Προφανώς όσο περισσότερο περνάει ο χρόνος η τυχαία κίνηση των σωματιδίων προκαλεί μείωση της συσχέτισης του σήματος με τα αντίστοιχα προηγούμενα έως ότου η συσχέτιση μηδενιστεί. Η διάρκεια του χρόνου που απαιτείται για πλήρη αποσυσχέτιση είναι της τάξης των nano-millisecond και ανάλογη της κινητικότητας των σωματιδίων. Συνεπώς συμπεραίνεται ότι μεγάλα σωματίδια θα παρουσιάζουν υψηλούς χρόνους αποσυσχέτισης ενώ το ακριβώς αντίθετο ισχύει για σωματίδια μικρότερου μεγέθους.



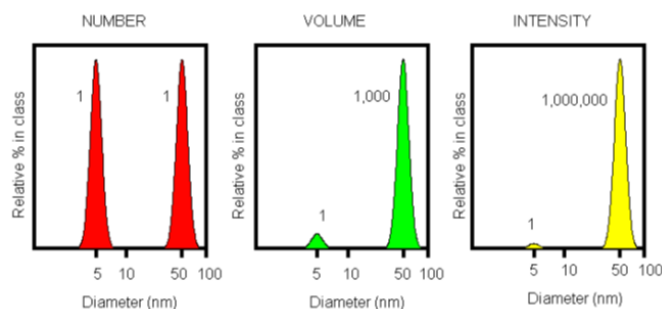
Εικόνα 2-14 Καμπύλη συσχέτισης για μικρά και μεγάλα σωματίδια.

Οι λογαριθμικές καμπύλες συσχέτισης προκύπτουν μέσω της αντίστοιχης συνάρτησης. Η συνάρτηση συσχέτισης έχει την εξής μορφή:

$$G(\tau) = A \left(1 + B \exp \left(-2D\tau \left(\frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin \frac{\theta}{2} \right) \right) \right)$$

Όπου:

- A το baseline
- B η τετμημένη της συνάρτησης στον άξονα γ
- D ο συντελεστής διάχυσης
- T ο χρόνος υστέρησης
- n ο συντελεστής διάθλασης του διαλύματος
- λ_0 το μήκος κύματος της ακτινοβολίας
- θ η γωνία του αισθητήρα.



Εικόνα 2-15 Παράδειγμα αποτελεσμάτων για διασπορά με δύο πληθυσμούς σωματιδίων.

Ο προσδιορισμός του μεγέθους και του πλήθους των σωματιδίων γίνεται με την χρήση αλγορίθμων που προσαρμόζουν ένα ή πολλαπλά πολυώνυμα στην καμπύλη συσχέτισης. Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως προς το πλήθος των σωματιδίων τον όγκο και την απόλυτη ένταση ακτινοβολίας όπως φαίνεται στην παραπάνω εικόνα.

Για τις μετρήσεις είναι απαραίτητη η εισαγωγή δεδομένων όπως η θερμοκρασία και ο δείκτης διάθλασης. Το λέιζερ που αποτελεί την φωτεινή πηγή ρυθμίζεται αυτόματα να εκπέμπει σε ένταση που επιτρέπει την συλλογή δεδομένων από το διάλυμα. Ο ανιχνευτής δύναται να λάβει σήμα βρισκόμενος σε διαφορετικές γωνίες σε σχέση με την εισερχόμενη ακτίνα εκπομπής. Συνεπώς οι μετρήσεις πραγματοποιούνται συνήθως σε τρεις γωνίες (135° , 90° και 45°) προκειμένου να υφίσταται μία συνολική εικόνα για τους πληθυσμούς εντός του διαλύματος.

Κεφάλαιο 3^ο: Πειραματικά αποτελέσματα

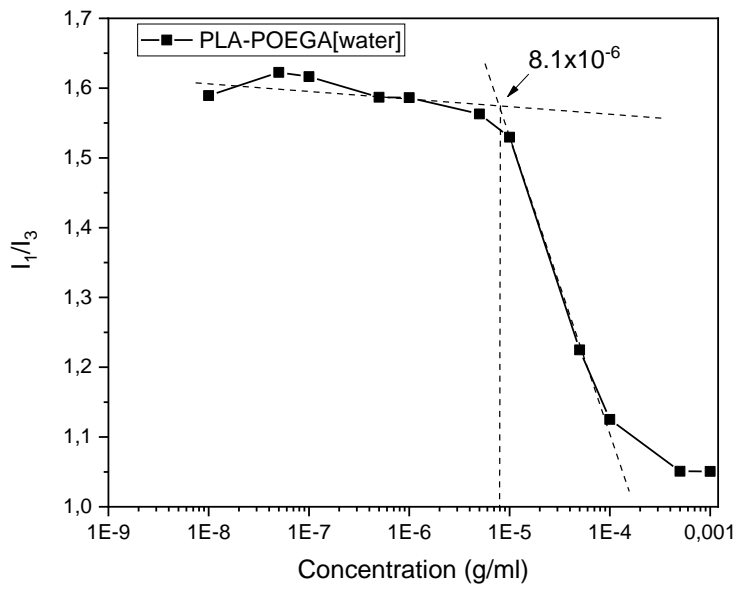
Στο παρόν κεφάλαιο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν για τα συστήματα του καθαρού συμπολυμερούς, και των μεικτών συστημάτων του. Ο χαρακτηρισμός των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο δυναμικής σκέδασης φωτός DLS. Έπειτα από την απαραίτητη επεξεργασία, τα δεδομένα που προκύπτουν από την συγκεκριμένη μέθοδο μπορούν να δώσουν πληροφορίες για την υδροδυναμική ακτίνα των σωματιδίων το σχετικό πλήθος των ομαδοποιήσεων συγκεκριμένων διαστάσεων, την πολυδιασπορά του συστήματος και το μοριακό βάρος των σχηματιζόμενων δομών. Από τα παραπάνω μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για τον τρόπο με τον οποίο η παρουσία διαφορετικών ενώσεων οδηγεί στην εμφάνιση νέων χαρακτηριστικών στα μικκύλια καθώς και το μέγεθος της εν λόγω επίδρασης. Στα πλαίσια μίας πιο ολοκληρωμένης μελέτης επιστρατεύτηκαν οι μέθοδοι φασματοσκοπίας φθορισμού και εγγύς υπεριώδους ακτινοβολίας σε συγκεκριμένα δείγματα. Η μέθοδος του φθορισμού χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση των παραγόντων που επηρεάζουν την κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση σε απλά και μεικτά συστήματα. Πιο συγκεκριμένα ως ιχνηθέτης χρησιμοποιήθηκε το πυρένιο σε συγκέντρωση $6,3 \times 10^{-3}$ M και αρχικά υπολογίστηκε η ένταση των κορυφών εντός των διαλυμάτων διαφορετικής συγκέντρωσης που σχετίζονται με το υδρόφιλο ή υδρόφοβο περιβάλλον του. Η τιμή της CMC υπολογίστηκε από το σημείο στο οποίο η αναλογία των παραπάνω κορυφών παρουσιάζει τον μέγιστο ρυθμό μεταβολής ως αποτέλεσμα της έναρξης σχηματισμού μικκυλίων του συμπολυμερούς και της εισχώρησης του υδρόφοβου πυρενίου στους πυρήνες. Τέλος η φασματοσκοπία UV-Vis επιστρατεύτηκε για την επιβεβαίωση του εγκλεισμού των φαρμάκων στο σύστημα καθαρού συμπολυμερούς μέσω ταυτοποίησης των χαρακτηριστικών κορυφών των φαρμάκων.

3.1 Χαρακτηρισμός του συστήματος συμπολυμερούς PLA-POEGA.

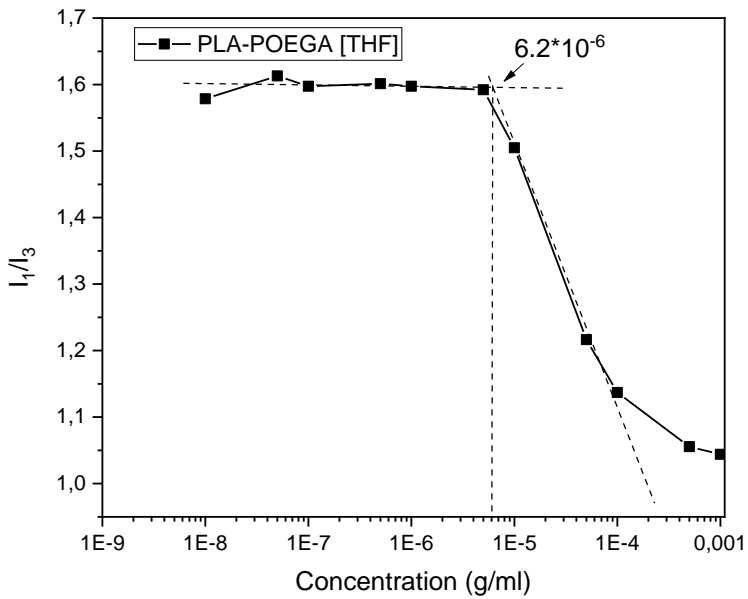
Αρχικά μελετήθηκαν τα χαρακτηριστικά αυτοοργάνωσης του καθαρού συμπολυμερούς PLA-POEGA. Ειδικότερα εξετάστηκαν οι διαφορές που προκύπτουν τόσο στη CMC όσο και στις διαστάσεις των νανοσωματιδίων από την ενυδάτωση του πολυμερούς με την χρήση τριών διαφορετικών πρωτοκόλλων.

Αποτελέσματα φθορισμού PLA-POEGA.

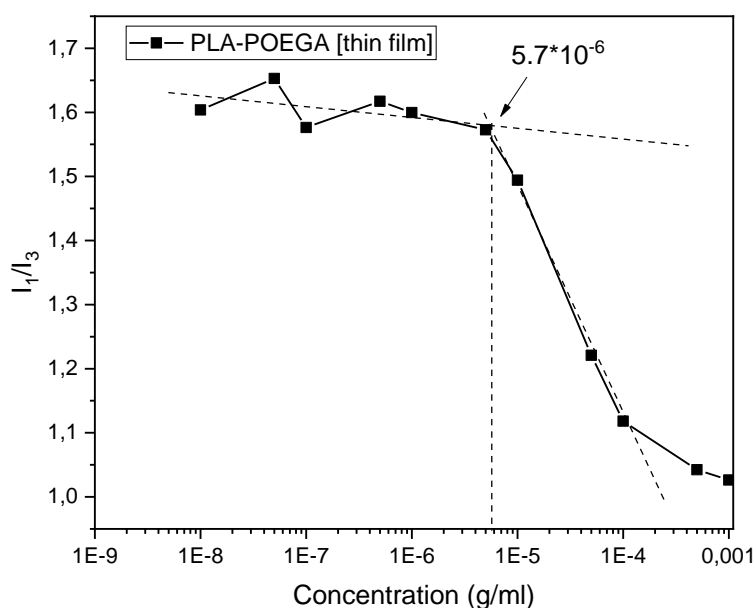
Ακολουθούν τα γραφήματα αναλογίας εντάσεων πυρενίου και συγκέντρωσης πολυμερούς από τα οποία προσδιορίστηκε η CMC του καθαρού συμπολυμερούς.



Σχήμα 3-1 Αναλογία εντάσεων κορυφών πυρενίου I_1/I_3 συναρτήσει συγκέντρωσης πολυμερούς για πρωτόκολλο υδατικού διαλύτη.



Σχήμα 3-2 Αναλογία εντάσεων κορυφών πυρενίου I_1/I_3 συναρτήσει συγκέντρωσης πολυμερούς για πρωτόκολλο οργανικού διαλύτη.



Σχήμα 3-3 Αναλογία εντάσεων κορυφών πυρενίου I₁/I₃ συναρτήσει συγκέντρωσης πολυμερούς για πρωτόκολλο λεπτού φιλμ.

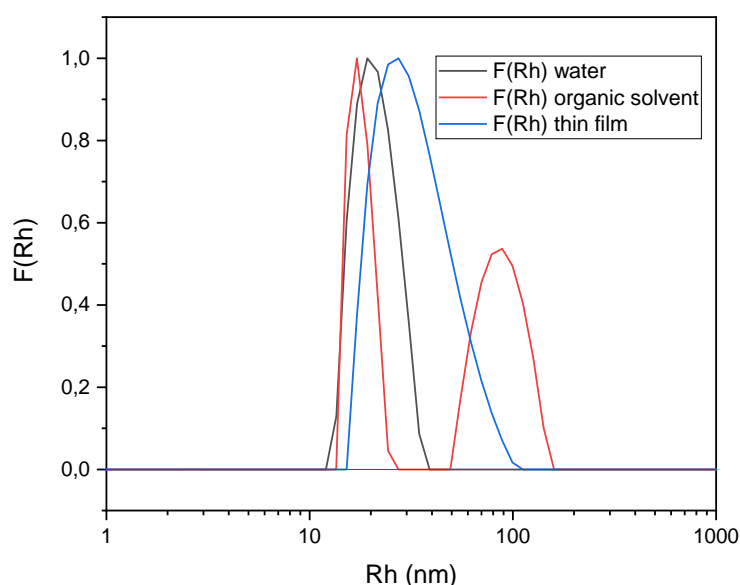
Πίνακας 3-1 Αποτελέσματα CMC PLA-POEGA.

Δείγμα	CMC (g/ml)
PLA-POEGA [water]	8,1x10 ⁻⁶
PLA-POEGA [THF]	6,2x10 ⁻⁶
PLA-POEGA [thin film]	5,7x10 ⁻⁶

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται πως η κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση του πολυμερούς κυμαίνεται από τα 5,7x10⁻⁶ έως τα 8,1x10⁻⁶ g/ml. Η επίδραση του κάθε πρωτοκόλλου στην συγκέντρωση συμπολυμερούς που αρχίζει ο σχηματισμός των μικκυλίων αν και μικρή δεν είναι ανεπαίσθητη. Πιο συγκεκριμένα φαίνεται ότι η συγκρότηση των μορίων σε μικκύλια διευκολύνεται περισσότερο από το πρωτόκολλο του λεπτού φιλμ, και σε μικρότερο βαθμό από την χρήση οργανικού διαλύτη.

Αποτελέσματα DLS συστήματος PLA-POEGA.

Παρακάτω παρουσιάζονται οι κορυφές που ελήφθησαν για τρία υδατικά διαλύματα PLA-POEGA τα οποία παρασκευάστηκαν με τρία διαφορετικά πρωτόκολλα διάλυσης. Η συγκέντρωση σε όλες τις περιπτώσεις διατηρήθηκε σταθερή και ίση με 10⁻³ g/ml. Ακολουθεί ο πίνακας με τις μετρήσεις που προέκυψαν.



Σχήμα 3-4 Διάγραμμα κατανομής μεγεθών από ανάλυση CONTIN μετρήσεων DLS για το συμπολυμερές PLA-POEGA σε νερό

Πίνακας 3-2 Αποτελέσματα συστήματος PLA-POEGA

Δείγμα	Ένταση σκεδάσεως	PDI	$R_h(W_p)$
PLA-POEGA [water]	476	0.10	20.8 (98%)
PLA-POEGA [THF]	588	0.39	17.9 (48%), 87.7 (51%)
PLA-POEGA [thin film]	526	0.21	32.2 (99%)

Όσον αφορά την σκεδαζόμενη ακτινοβολία η ένταση της δεν παρουσιάζει ιδιαίτερη διακύμανση για τα τρία διαφορετικά πρωτόκολλα. Σχετικά με τον δείκτη πολυδιασποράς το πρωτόκολλο διάλυσης σε νερό φαίνεται να έχει την καλύτερη συμπεριφορά όπως φαίνεται και από την πιο στενή κατανομή μεγεθών που παρουσιάζει. Αντίθετα το πρωτόκολλο διάλυσης με σχηματισμό λεπτού φιλμ δίνει σωματίδια με ελαφρώς μεγαλύτερο εύρος μεγεθών. Σε ότι αφορά το μέγεθος των μικυλλίων οι μικρότερες τιμές ελήφθησαν με τα πρωτόκολλα υδατικού διαλύτη και thin film. Στην περίπτωση χρήσης οργανικού διαλύτη προκύπτουν δύο διαφορετικές ομάδες σωματιδίων σε ισόποσα ποσοστά. Η πρώτη ομάδα με μέγεθος 18nm αντιστοιχεί σε μικκύλια του συμπολυμερούς ενώ η δεύτερη με μέγεθος 88nm πιθανώς να πρόκειται για συσσωματώματα.

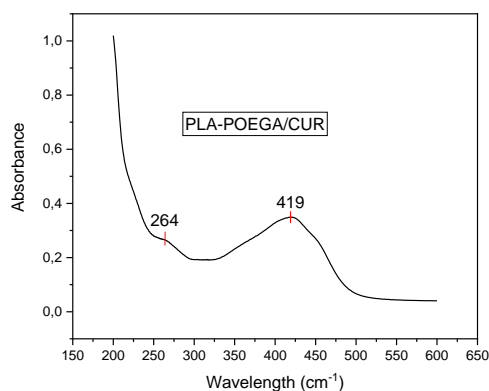
3.2 Χαρακτηρισμός συστήματος PLA-POEGA με εγκλεισμό φαρμακευτικών ενώσεων Cur και Ind.

Ακολούθως πραγματοποιήθηκε μελέτη της δυνατότητας εγκλεισμού των φαρμακευτικών ενώσεων Cur και Ind στα νανοσωματίδια του πολυμερούς. Για τα

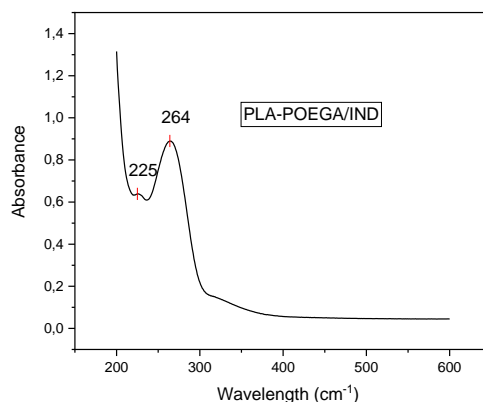
συγκεκριμένα συστήματα προτιμήθηκε αποκλειστικά η παρασκευή με το πρωτόκολλο του οργανικού διαλύτη. Η συγκέντρωση του πολυμερούς ήταν 10^{-3} g/ml ενώ των φαρμάκων 10^{-4} g/ml. Ο εγκλεισμός επιβεβαιώθηκε με τη μέθοδο της φασματοσκοπίας υπεριώδους-ορατού ενώ τα αποτελέσματα του εγκλεισμού στο μέγεθος και την δομή των σωματιδίων εξετάστηκαν με την μέθοδο DLS.

Αποτελέσματα φασματοσκοπίας UV-Vis του συστήματος PLA-POEGA με εγκλεισμό IND και CUR.

Για την ταυτοποίηση των ενώσεων που εγκλείστηκαν στο προς μελέτη σύστημα χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία UV-Vis. Στα ακόλουθα σχήματα παρουσιάζονται τα φάσματα απορρόφησης των διαλυμάτων PLA-POEGA/CUR και PLA-POEGA/IND που παρασκευάστηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο οργανικού διαλύτη.



Σχήμα 3-5 Φάσμα απορρόφησης UV-Vis για το νανοσύστημα PLA-POEGA/CUR.

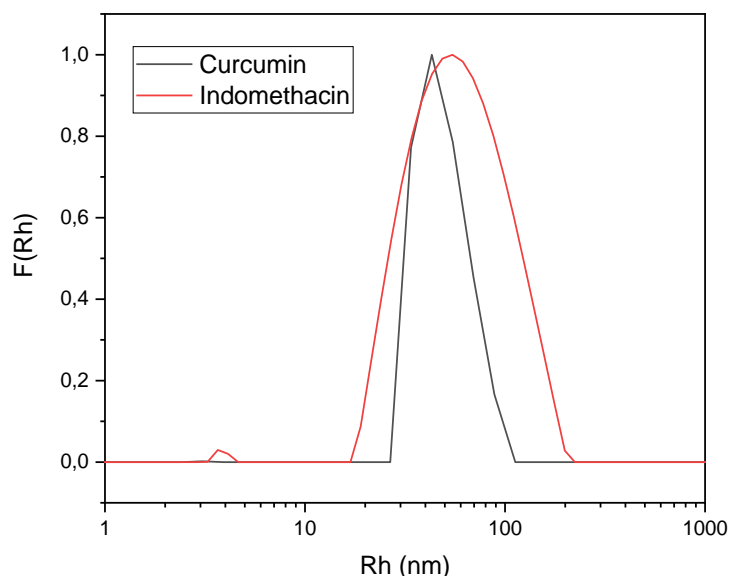


Σχήμα 3-6 Φάσμα απορρόφησης UV-Vis για το νανοσύστημα PLA-POEGA/IND.

Από το πρώτο σχήμα καταγράφονται δύο κορυφές στα 264 και 419 nm που συμπίπτουν με τις κορυφές απορρόφησης της κουρκουμίνης, ενώ στο δεύτερο σχήμα οι κορυφές στα 225 και 264 nm αντιστοιχούν στην απορρόφηση της ινδομεθακίνης. Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνουν τον εγκλεισμό των φαρμακευτικών ουσιών στο εσωτερικό υδρόφοβο περιβάλλον των μικκυλίων.

Αποτελέσματα DLS συστήματος PLA-POEGA με εγκλεισμό IND και CUR.

Παρακάτω καταγράφονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν με την μέθοδο DLS για τα συστήματα PLA-POEGA στα οποία ενσωματώθηκαν οι φαρμακευτικές ουσίες IND και CUR.



Σχήμα 3-7 Διάγραμμα κατανομών μεγέθους από DLS για PLA-POEGA με ενσωμάτωση IND και CUR

Πίνακας 3-3 Αποτελέσματα για PLA-POEGA με ενσωμάτωση IND και CUR

Δείγμα	Ενταση σκεδάσεως	PDI	R _h (W _p) (nm)
PLA-POEGA/CUR 1:0.1 [THF]	1019	0.19	47.9 (99%)
PLA-POEGA/IND 1:0.1 [THF]	602	0.23	57.4 (99%)

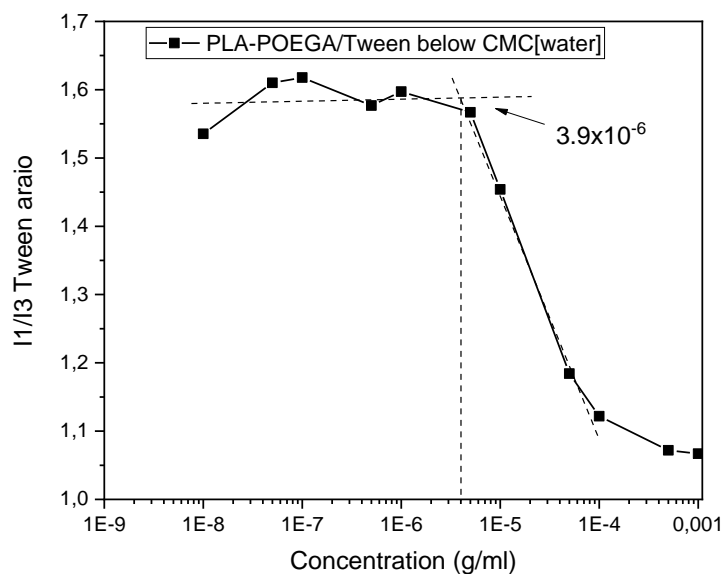
Η ενσωμάτωση των IND και CUR στα μικκύλια του πολυμερούς οδήγησε στην εμφάνιση μονών κορυφών και στις δύο περιπτώσεις. Τα δύο συστήματα εμφανίζουν μικρούς δείκτες πολυδιασποράς μεγέθους με το πολυμερές που περιέχει την ινδομεθακίνη να είναι ελάχιστα μεγαλύτερο. Το μέγεθος των σωματιδίων στα οποία έχει εγκλειστεί η ινδομεθακίνη είναι μεγαλύτερο κατά 10nm από τα αντίστοιχα που περιέχουν κουρκουμίνη. Παράλληλα και στις δύο περιπτώσεις το μέγεθος είναι αρκετά μεγαλύτερο σε σύγκριση με το καθαρό PLA-POEGA ως αποτέλεσμα της εισχώρησης των φαρμάκων στον υδρόφοβο πυρήνα.

3.3 Χαρακτηρισμός μεικτού συστήματος PLA-POEGA και της επιφανειοδραστικής ένωσης Tween.

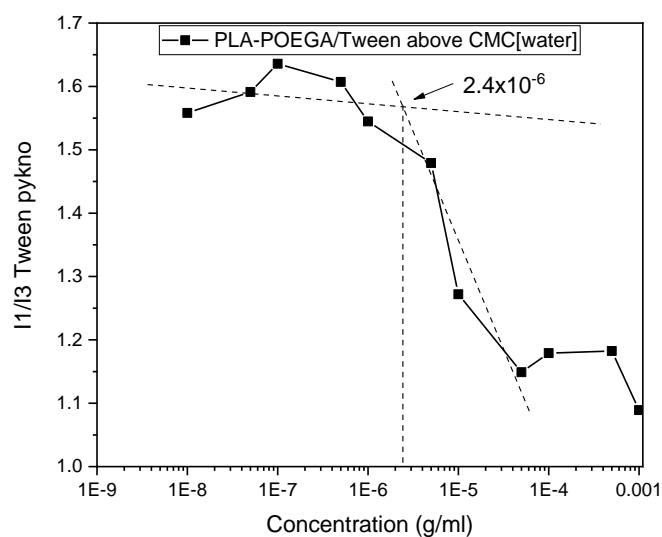
Η συμπεριφορά αυτοοργάνωσης του PLA-POEGA μελετήθηκε παρουσία της επιφανειοδραστικής ένωσης Tween 80. Στα πλαίσια των πειραμάτων εξετάστηκαν δύο διαφορετικές αναλογίες συγκέντρωσης πολυμερούς προς την αντίστοιχη συγκέντρωση επιφανειοδραστικού, 2:1 και 1:3 (w/w) με την συγκέντρωση του πολυμερούς να παραμένει σταθερή και ίση με 10^{-3} g/ml. Αρχικά αξιολογήθηκε η επίδραση του Tween με την χρήση και των τριών πρωτοκόλλων στη CMC του πολυμερούς με χρήση φασματοσκοπίας φθορισμού. Μετέπειτα τα παραπάνω δείγματα μελετήθηκαν ως προς την συνδυαστική επίδραση του Tween αλλά και των μεθόδων ενυδάτωσης στο μέγεθος και την διαμόρφωση των σωματιδίων.

Αποτελέσματα φασματοσκοπίας φθορισμού μεικτού συστήματος PLA-POEGA/Tween

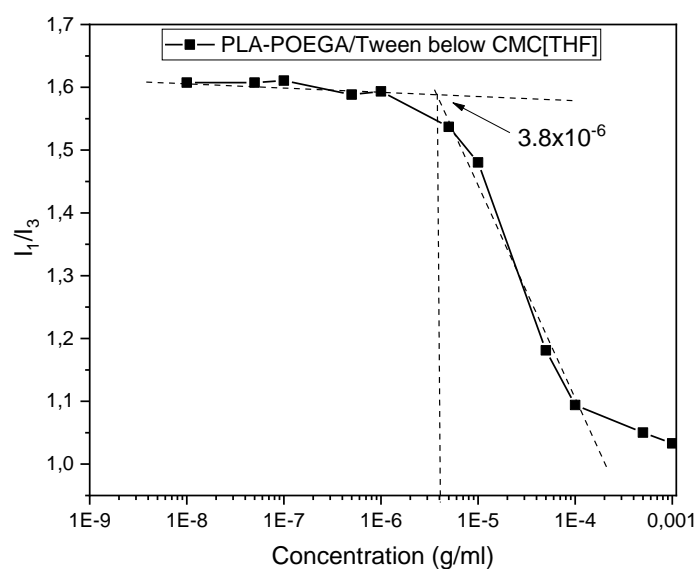
Ακολουθούν τα γραφήματα αναλογίας εντάσεων των κορυφών του πυρενίου σε σχέση με την συγκέντρωση του PLA-POEGA, από τα οποία προσδιορίστηκε η κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση των μεικτών συστημάτων για τις δύο διαφορετικές αναλογίες.



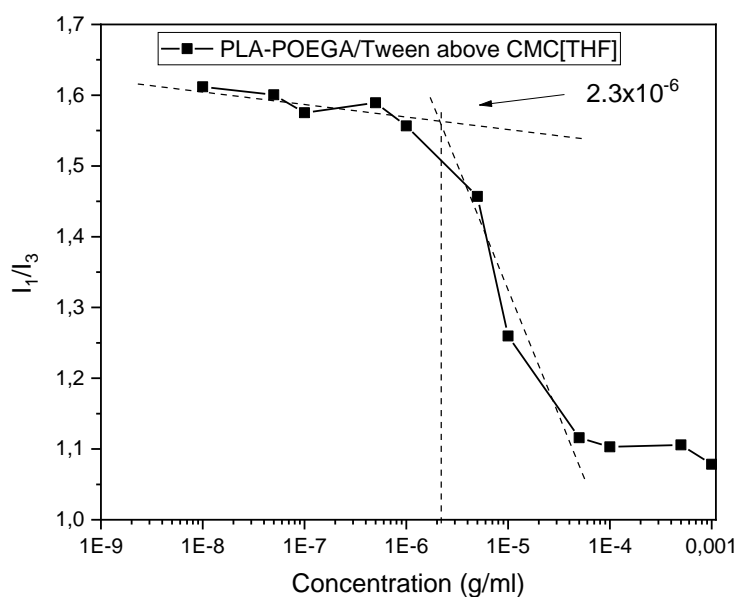
Σχήμα 3-8 Αναλογία κορυφών πυρενίου I_1/I_3 συναρτήσεως ολικής συγκέντρωσης για συγκέντρωση Tween κάτω της CMC με χρήση υδατικού διαλύτη.



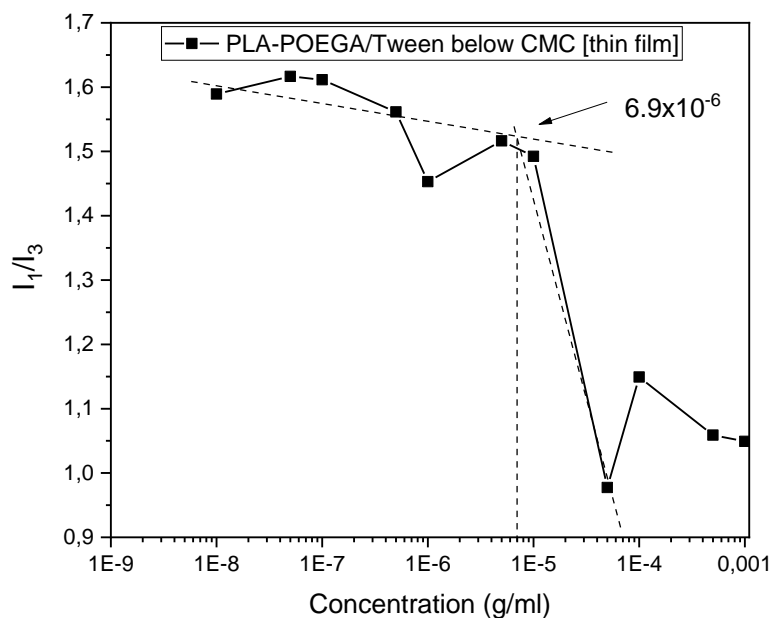
Σχήμα 3-9 Αναλογία κορυφών πυρενίου I_1/I_3 συναρτήσεως ολικής συγκέντρωσης για συγκέντρωση Tween άνω της CMC με χρήση υδατικού διαλύτη.



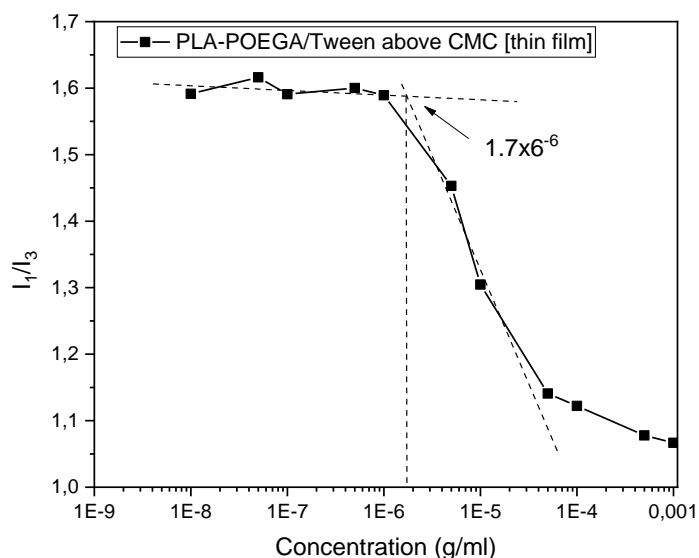
Σχήμα 3-10 Αναλογία κορυφών πυρενίου I_1/I_3 συναρτήσεως ολικής συγκέντρωσης για συγκέντρωση Tween κάτω της CMC με χρήση οργανικού διαλύτη.



Σχήμα 3-11 Αναλογία κορυφών πυρενίου I_1/I_3 συναρτήσει ολικής συγκέντρωσης για συγκέντρωση Tween άνω της CMC με χρήση οργανικού διαλύτη.



Σχήμα 3-12 Αναλογία κορυφών πυρενίου I_1/I_3 συναρτήσει ολικής συγκέντρωσης για συγκέντρωση Tween κάτω της CMC με σχηματισμό λεπτού φιλμ.



Σχήμα 3-13 Αναλογία κορυφών πυρενίου I_1/I_3 συναρτήσει ολικής συγκέντρωσης για συγκέντρωση Tween άνω της CMC με σχηματισμό λεπτού φιλμ

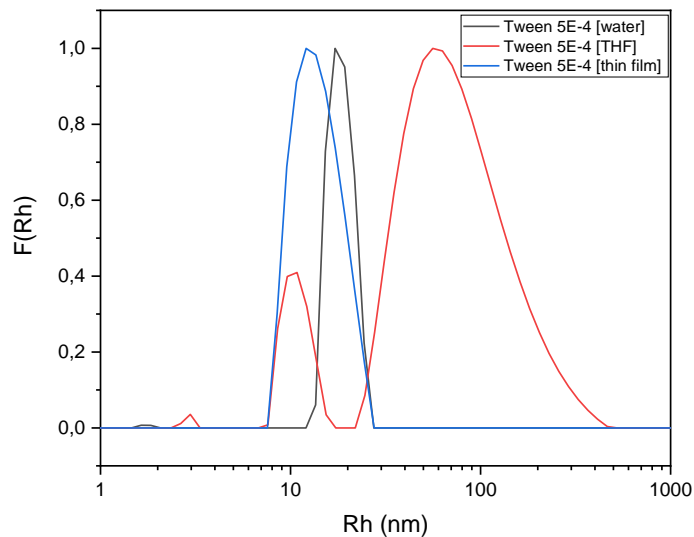
Πίνακας 3-4 Αποτελέσματα CMC για τα μεικτά νανοσυστήματα PLA-POEGA/Tween.

Δείγμα	CMC (g/ml)
PLA-POEGA/Tween 2:1 [water]	3.9×10^{-6}
PLA-POEGA/Tween 1:3 [water]	2.4×10^{-6}
PLA-POEGA/Tween 2:1 [THF]	3.8×10^{-6}
PLA-POEGA/Tween 1:3 [THF]	2.3×10^{-6}
PLA-POEGA/Tween 2:1 [thin film]	6.9×10^{-6}
PLA-POEGA/Tween 1:3 [thin film]	1.7×10^{-6}

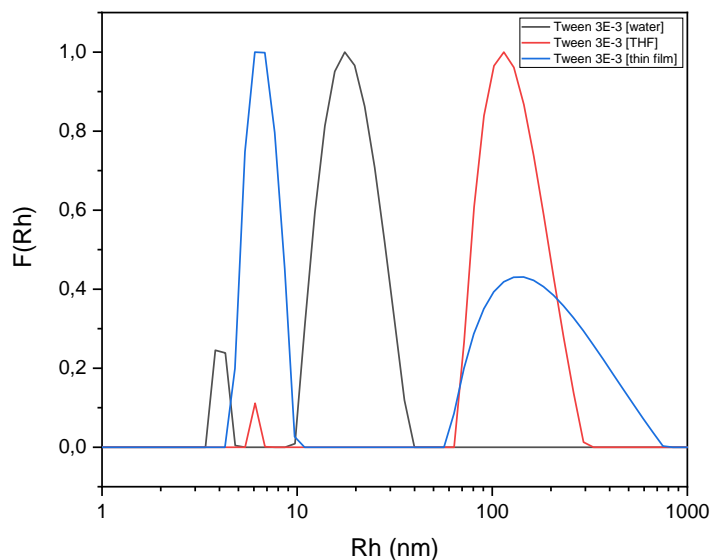
Συγκρίνοντας την επίδραση των δύο συγκεντρώσεων του Tween είναι ξεκάθαρο πως όταν η αναλογία είναι υπέρ του επιφανειοδραστικού τότε ο σχηματισμός μικκυλίων του συμπολυμερούς πραγματοποιείται ευκολότερα. Παράλληλα για την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε Tween παρατηρείται πως το πρωτόκολλο του thin film όπως και στην περίπτωση του καθαρού πολυμερούς, παρουσιάζει την χαμηλότερη τιμή κρίσιμης συγκέντρωσης. Αντίθετη συμπεριφορά σημειώνεται στην περίπτωση του λεπτού φιλμ όταν το Tween βρίσκεται σε μικρότερη συγκέντρωση. Πιο συγκεκριμένα σε αυτήν την περίπτωση καταγράφεται η υψηλότερη κρίσιμη συγκέντρωση για το σύστημα PLA-POEGA/Tween. Ταυτόχρονα σε σύγκριση με τα αποτελέσματα του καθαρού πολυμερούς η προαναφερθείσα περίπτωση είναι και η μόνη στην οποία το Tween εμφανίζεται να οδηγεί σε άνοδο της τιμής του CMC του PLA-POEGA.

Αποτελέσματα DLS μεικτού συστήματος PLA-POEGA/Tween.

Στα ακόλουθα σχήματα και πίνακες παρατίθενται οι κορυφές και τα αποτελέσματα των νανοσυστημάτων PLA-POEGA/Tween. Το πρώτο σχήμα αντιστοιχεί σε δείγματα στα οποία η συγκέντρωση του Tween διατηρήθηκε μικρότερη από την κρίσιμη μικυλλιακή συγκέντρωση της επιφανειοδραστικής, ενώ στο δεύτερο η συγκέντρωση του Tween είναι μεγαλύτερη.



Σχήμα 3-14 Διαγράμματα κατανομών μεγέθους από DLS για τα νανοσυστήματα PLA-POEGA/Tween σε συγκέντρωση κάτω της CMC



Σχήμα 3-15 Διαγράμματα κατανομών μεγέθους από DLS για τα νανοσυστήματα DLS PLA-POEGA/Tween σε συγκέντρωση άνω της CMC

Πίνακας 3-5 Αποτελέσματα συστήματος PLA-POEGA/Tween

Δείγμα	Ένταση σκεδάσεως	PDI	R _h (W _p) (nm)
PLA-POEGA/Tween 1:0.5 [water]	739	0.10	18.4(99%)
PLA-POEGA/Tween 1:3 [water]	748	0.26	4.0(6%), 18.6(93%)
PLA-POEGA/Tween 1:0.5 [THF]	560	0.42	10.7(11%), 73.7(88%)
PLA-POEGA/Tween 1:3 [THF]	494	0.20	6.1(1%), 126.9(98%)
PLA-POEGA/Tween 1:0. [thin film]	596	0.17	13.6(99%)
PLA-POEGA/Tween 1:3 [thin film]	479	0.48	6.6(42%), 175.3(57%)

Για την χαμηλότερη περιεκτικότητα σε Tween παρατηρούνται τα εξής. Από το παραπάνω Σχήμα διακρίνεται πως τα πρωτόκολλα του υδατικού διαλύτη και του λεπτού φιλμ οδηγούν στον σχηματισμό ενός μόνο πληθυσμού σωματιδίων. Οι διαστάσεις των μικυλλίων κυμαίνονται από 13 έως 18nm για τις δύο περιπτώσεις με την μέθοδο του thin film να οδηγεί σε μικρότερα σωματίδια. Στον αντίποδα η χρήση οργανικού διαλύτη έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση δύο κορυφών στα 11 και 127nm. Η πρώτη κορυφή αντιστοιχεί σε μικκύλια PLA-POEGA με ενσωματωμένο Tween ενώ η δεύτερη που συμπεριλαμβάνει συγκριτικά μεγαλύτερο αριθμό σωματιδίων προέρχεται από την συσσωμάτωση των μορίων πολυμερούς και της επιφανειοδραστικής ένωσης.

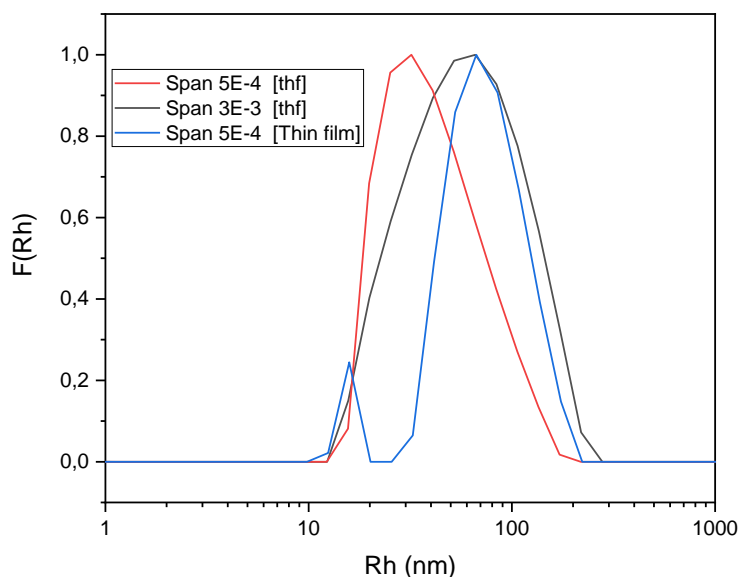
Στην περίπτωση που η συγκέντρωση του Tween είναι ανώτερη του CMC παρατηρούνται διπλές κορυφές και για τα τρία πρωτόκολλα διάλυσης. Οι κορυφές μικρότερης έντασης εμφανίζονται σε μεγέθη από 4 έως 7nm και οφείλονται στον σχηματισμό μικυλλίων του Tween. Η χρήση υδατικού διαλύτη είχε σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση μικυλλίων του μικρότερου δυνατού μεγέθους με ακτίνα ίση με 18nm. Ο σχηματισμός λεπτού φιλμ και ιδίως η διάλυση σε THF οδήγησαν στην συσσωμάτωση των μορίων PLA-POEGA και Tween.

3.4 Χαρακτηρισμός μεικτού συστήματος PLA-POEGA και της επιφανειοδραστικής ένωσης Span.

Στα πλαίσια διεύρυνσης της μελέτης που σχετίζεται με την αυτοοργάνωση των αμφιφιλικών συμπολυμερών παρουσία επιφανειοδραστικών ενώσεων, πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός των συστημάτων PLA-POEGA με την προσθήκη Span. Τα συστήματα παρασκευάστηκαν με ενυδάτωση-εξάτμιση του οργανικού διαλύτη και ενυδάτωση λεπτού φιλμ σε δύο αναλογίες πολυμερούς προς surfactant 2:1 και 1:3 w/w. Οι δυο διαφορετικές αναλογίες αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις άνω και κάτω της CMC του επιφανειοδραστικού και η συγκέντρωση του PLA-POEGA ήταν ίση με 10⁻³g/ml σε κάθε περίπτωση.

Αποτελέσματα DLS μεικτού συστήματος PLA-POEGA/Span.

Ακολουθούν το γράφημα DLS και ο πίνακας αποτελεσμάτων για το σύστημα PLA-POEGA/Span. Θα πρέπει να σημειωθεί πως στα δείγματα PLA-POEGA/Span (1:3) που προέκυψε με εξάτμιση οργανικού διαλύτη και PLA-POEGA/Span (2:1) που προέκυψε με σχηματισμό λεπτού φιλμ ήταν απαραίτητη η αραιώση στο 1/4 της αρχικής συγκέντρωσης προκειμένου να γίνει δυνατή η μέτρηση των διαστάσεων των σωματιδίων.



Σχήμα 3-16 Διαγράμματα κατανομών μεγέθους από DLS του συστήματος PLA-POEGA/Span

Πίνακας 3-6 Αποτελέσματα συστήματος PLA-POEGA/Span

Δείγμα	Ένταση σκεδάσεως	PDI	R _h (W _p)
PLA-POEGA/SPAN 2:1 [THF]	437	0,21	40.4(99%)
PLA-POEGA/SPAN 1:3 [THF]	922	0,29	57.2(99%)
PLA-POEGA/SPAN 2:1 [Thin film]	527	0,34	15.9(6%), 74.4(93%)

Το πρωτόκολλο οργανικού διαλύτη οδήγησε στην εμφάνιση μονών κορυφών με σχετικά μεγάλο εύρος. Ειδικότερα το σύστημα με την συγκέντρωση του Span κάτω του CMC παρουσιάζει μικρότερες διαστάσεις σε σύγκριση με αυτό που έχει μεγαλύτερη συγκέντρωση. Το αποτέλεσμα αυτό πιθανώς προκύπτει από την ενσωμάτωση μεγαλύτερης ποσότητας Span στην διεπιφάνεια του υδρόφιλου και υδρόφοβου τμήματος όταν η συγκέντρωση του Span είναι υψηλή. Το γεγονός ότι οι κορυφές που αντιστοιχούν στο οργανικό πρωτόκολλο εκτείνονται σε μία κλίμακα από τα 10 έως τα 300nm καθιστά δύσκολη την διάκριση των μικκυλίων. Συνεπώς οι συγκεκριμένες κορυφές μάλλον προκύπτουν από την συνύπαρξη μεικτών μικκυλίων

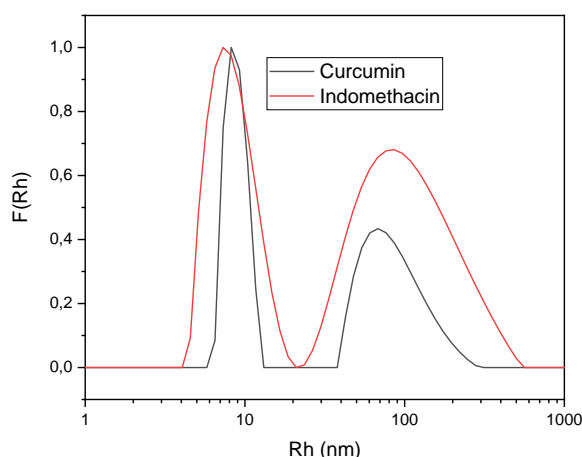
και μικκυλίων του πολυμερούς, ενώ για την υψηλή συγκέντρωση του SPAN αναμένεται και η ύπαρξη μικκυλίων του καθαρού τασιενεργού. Όσον αφορά το πρωτόκολλο σχηματισμού λεπτού φιλμ παρατηρούνται δύο κορυφές στα 16 και 74nm. Η κορυφή στα 74nm προκύπτει από σωματίδια PLA-POEGA με ενσωματωμένο Span. Αντίθετα η προέλευση της κορυφής στα 16nm δεν μπορεί να προσδιοριστεί με βεβαιότητα καθώς μπορεί να ανήκει σε μεικτά μικκύλια ή μικκύλια μεμονωμένων μορίων των δύο ενώσεων. Τα αποτελέσματα της αναλογίας PLA-POEGA/Span 1:3 που παρασκευάστηκαν με σχηματισμό λεπτού φιλμ δεν παρουσιάζονται καθώς δεν επιτεύχθηκε ο σχηματισμός μικκυλίων. Το μέγεθος των σωματιδίων που προέκυψαν ξεπερνούσε κατά πολύ την κλίμακα των νανόμετρων και η μέτρηση των διαστάσεων τους δεν ήταν δυνατή με την χρησιμοποιούμενη διάταξη DLS.

3.5 Χαρακτηρισμός μεικτών συστημάτων PLA-POEGA και Tween με εγκλεισμό IND και CUR.

Η δυνατότητα εγκλεισμού και η επίδραση των φαρμακευτικών ενώσεων στα σχηματιζόμενα μικκύλια μελετήθηκε με την μέθοδο DLS και στην περίπτωση του μεικτού συστήματος PLA-POEGA/Tween όταν το Tween βρίσκεται σε συγκέντρωση χαμηλότερη του CMC. Η παρασκευή των συστημάτων έγινε βάσει του πρωτοκόλλου οργανικού διαλύτη, με χρήση THF, για δύο κυρίως λόγους. Όπως προαναφέρθηκε η ινδομεθακίνη και η κουρκουμίνη είναι αρκετά υδρόφοβες ενώσεις και η χρήση οργανικού διαλύτη εξασφαλίζει την ικανοποιητική διασπορά τους στα τελικά διαλύματα. Παράλληλα το Tween φάνηκε να επηρεάζει σε μεγαλύτερο βαθμό τη δομή των σωματιδίων όταν στο προηγούμενο πείραμα ακολουθήθηκε το συγκεκριμένο πρωτόκολλο. Η συγκέντρωση του PLA-POEGA ήταν 10^{-3} g/ml ενώ των υπολοίπων ενώσεων 10^{-4} g/ml.

Αποτελέσματα DLS συστημάτων PLA-POEGA/Tween/CUR και PLA-POEGA/Tween/IND.

Ακολουθεί το γράφημα DLS που λήφθηκε για τον εγκλεισμό μορίων ινδομεθακίνης και κουρκουμίνης στο σύστημα των μεικτών μικκυλίων του συμπολυμερούς και του Tween.



Σχήμα 3-17 Διαγράμματα κατανομών μεγέθους από DLS για τα νανοσυστήματα PLA-POEGA/Tween με εγκλεισμό φαρμακευτικών ενώσεων.

Πίνακας 3-7 Αποτελέσματα DLS PLA-POEGA/Tween με εγκλεισμό φαρμακευτικών ενώσεων.

Δείγμα	Ένταση σκεδάσεως	PDI	R _h (W _p)
PLA-POEGA/Tween/IND [THF]	1:0.5:0.1	349	0.51
PLA-POEGA/Tween/CUR [THF]	1:0.5:0.1	515	0.48

Στο παραπάνω σχήμα καταγράφονται δύο διαφορετικές κορυφές για κάθε σύστημα. Τα σωματίδια που εμφανίζονται στα 8nm προκύπτουν από τον σχηματισμό μικυλλίων του Tween που πιθανώς να περιέχουν φαρμακευτικές ενώσεις ενώ στις μεγαλύτερες διαστάσεις αντιστοιχούν τα σωματίδια POEGA/PLA-Tween με εγκλεισμένες τις φαρμακευτικές ενώσεις. Οι δομές που εμπεριέχουν ινδομεθακίνη χαρακτηρίζονται από ελάχιστα μεγαλύτερη ακτίνα σε σύγκριση με αυτές που περιέχουν κουρκουμίνη και από μεγαλύτερες κατανομές μεγέθους (ευρύτερες κορυφές στο διάγραμμα).

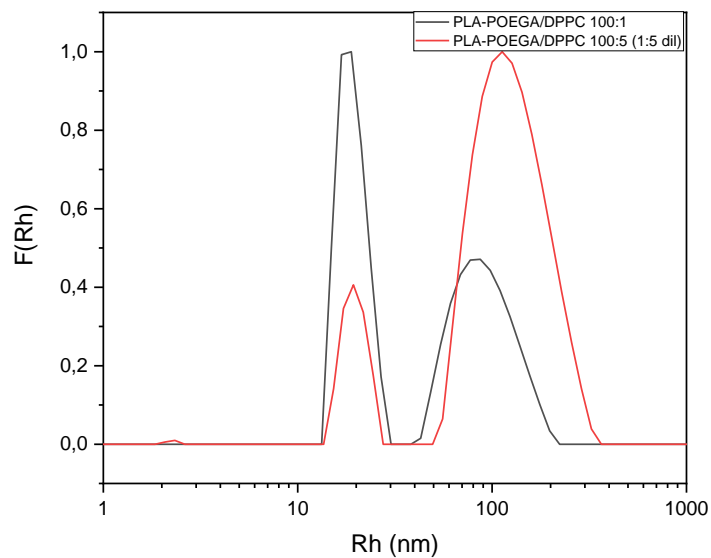
3.6 Χαρακτηρισμός μεικτών συστημάτων PLA-POEGA και του φωσφολιπιδίου DPPC.

Το συμπολυμερές PLA-POEGA εξετάστηκε και ως προς την δυνατότητά του να σχηματίζει μεικτά μικύλια με το φωσφολιπίδιο DPPC. Ειδικότερα αξιολογήθηκε η δυνατότητα δράσης του λιπιδίου ως εναλλακτικός επιφανειοδραστικός παράγοντας όσον αφορά την επιρροή στο μέγεθος και την διαμόρφωση των μεικτών μικκυλίων. Τα διαλύματα παρασκευάστηκαν με ενυδάτωση λεπτού φιλμ και τα ποσοστά μάζας

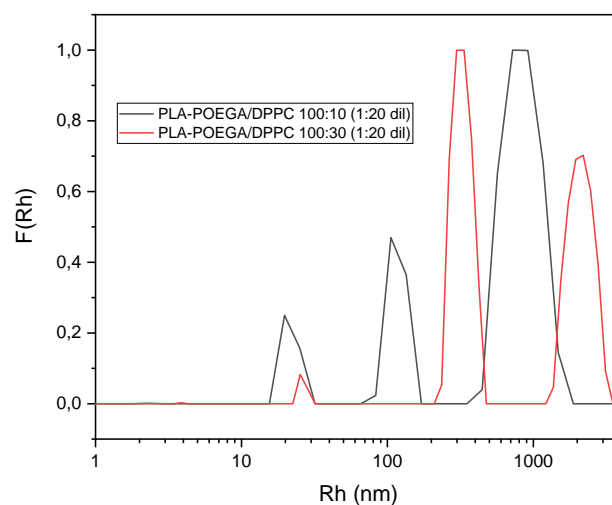
του λιπιδίου σε σχέση με το πολυμερές που εξετάστηκαν ήταν: 1%, 5%, 10%, 30%. Η συγκέντρωση του πολυμερούς ήταν 10^{-3} g/ml σε όλα τα διαλύματα.

Αποτελέσματα DLS μεικτών συστημάτων PLA-POEGA/DPPC

Στα δύο παρακάτω σχήματα παρουσιάζονται οι κορυφές του PLA-POEGA παρουσία του φωσφολιπιδίου DPPC. Τα διαλύματα παρασκευάστηκαν με το πρωτόκολλο του thin film και εξετάστηκαν τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις DPPC. Ακολουθεί ο πίνακας αποτελεσμάτων.



Σχήμα 3-18 Διαγράμματα κατανομών μεγέθους από DLS για τα νανοσυστήματα PLA-POEGA/DPPC για χαμηλές συγκεντρώσεις DPPC.



Σχήμα 3-19 Διαγράμματα κατανομών μεγέθους από DLS για τα νανοσυστήματα PLA-POEGA/DPPC για υψηλές συγκεντρώσεις DPPC.

Πίνακας 3-8 Αποτελέσματα συστήματος PLA-POEGA/DPPC.

Δείγμα	Ένταση σκεδάσεως	PDI	R _h (W _p)
PLA-POEGA/DPPC 1:0.01 [Thin film]	671	0.40	19.0 (50%) 89.0 (49%)
PLA-POEGA/DPPC 1:0.05 [Thin film]	373	0.41	19.4 (13%) 123.0 (86%)
PLA-POEGA/DPPC 1:0.1 [Thin film]	708	0.50	21.6 (8%) 117 (18%)
PLA-POEGA/DPPC 1:0.3 [Thin film]	452	0.44	26.1 (1%) 323 (51%)

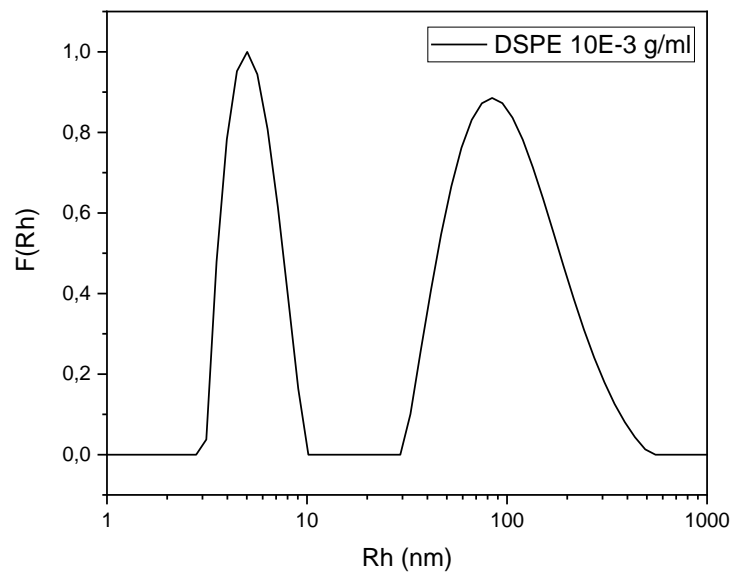
Από τα παραπάνω σχήματα παρατηρείται πως και στις τέσσερις περιπτώσεις εμφανίζεται μία κορυφή στην περιοχή των 19-26 nm. Ειδικότερα η συγκεκριμένη κορυφή φαίνεται να μετατοπίζεται προς μεγαλύτερες τιμές διαστάσεων με την αύξηση της περιεκτικότητας του λιπιδίου. Αντίθετη τάση καταγράφεται για το ποσοστό των σωματιδίων που ανήκουν στο συγκεκριμένο μέγεθος, καθώς καταγράφεται μείωση για παράλληλη αύξηση της συγκέντρωσης DPPC. Οι μεγαλύτερες κορυφές με εξαίρεση ίσως αυτής στα 89nm προέρχονται από συσσωματώσεις του πολυμερούς και του λιπιδίου ενώ για τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις λιπιδίου η προέλευση πιθανώς οφείλεται στην δημιουργία λιποσωμάτων. Τόσο οι διαστάσεις τους όσο και τα αντίστοιχα ποσοστά τους αυξάνονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις DPPC.

3.7 Χαρακτηρισμός μεικτού συστήματος συμπολυμερούς PLA-POEGA και του τροποποιημένου φωσφολιπιδίου DSPE-PEG.

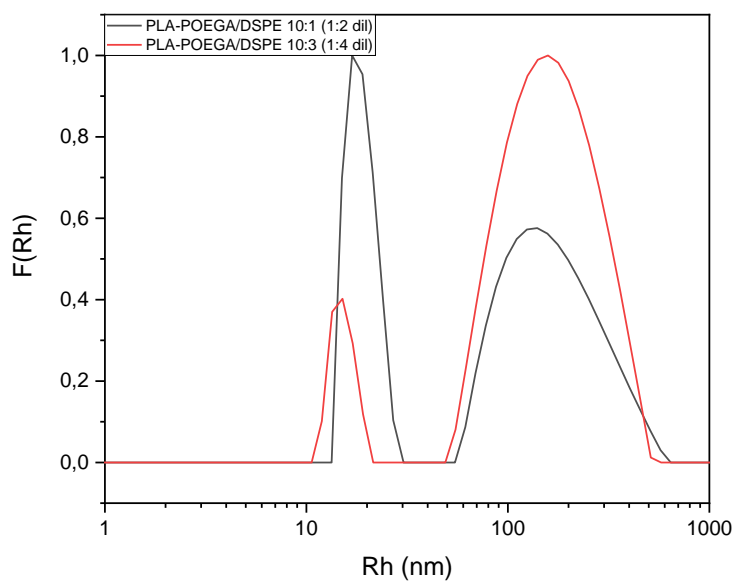
Παράλληλα με το DPPC, για την μελέτη αλληλεπίδρασης συμπολυμερούς λιπιδίου επιστρατεύτηκε και το τροποποιημένο λιπίδιο DSPE-PEG. Σκοπός ήταν να αναδειχθούν οι διαφορές που προκύπτουν στα σχηματιζόμενα μεικτά σωματίδια όταν αυξηθεί ο υδρόφιλος χαρακτήρας του λιπιδίου μέσω της προσάρτησης μίας αλυσίδας PEG στην κεφαλή του λιπιδίου. Η παρασκευή των διαλυμάτων πραγματοποιήθηκε με σχηματισμό thin film και οι εξεταζόμενες αναλογίες πολυμερούς προς λιπίδιο ήταν 1:0.1 και 1:0.3 με την περιεκτικότητα του πολυμερούς να είναι 10⁻³g/ml. Ταυτόχρονα εξετάστηκε και το καθαρό λιπίδιο DSPE ώστε να εξακριβωθεί το είδος των σχηματιζόμενων δομών.

Αποτελέσματα DLS μεικτών συστημάτων PLA-POEGA/DSPE

Ακολούθως παρατίθενται τα γραφήματα DLS αρχικά για το καθαρό λιπίδιο DSPE και μετέπειτα για το μεικτό σύστημα συμπολυμερούς λιπιδίου.



Σχήμα 3-20 Διάγραμμα κατανομών μεγέθους από DLS καθαρού DSPE.



Σχήμα 3-21 Διαγράμματα κατανομών μεγέθους από DLS για τα νανοσυστήματα PLA-POEGA/DSPE.

Πίνακας 3-9 Αποτελέσματα DLS καθαρού DSPE και συστήματος PLA-POEGA/DPSE

Δείγμα	Ένταση σκεδάσεως	PDI	R _h (W _p)
DSPE 10 ⁻³ g/ml [Thin film]	142	0.57	5.3 (34%) 100 (64%)
PLA-POEGA/DSPE 1:0.1 [Thin film]	923	0.49	18.7 (35%) 162 (64%)
PLA-POEGA/DSPE 1:0.3 [Thin film]	727	0.43	15 (9%) 160 (90%)

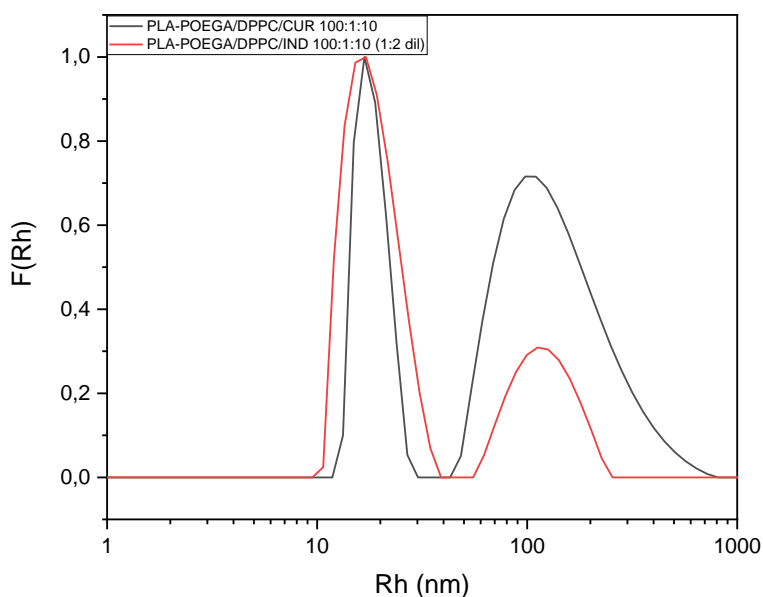
Το καθαρό λιπίδιο DSPE χαρακτηρίζεται από δύο κορυφές. Η πρώτη με το μικρότερο ποσοστό που βρίσκεται στα 5.3nm είναι αποτέλεσμα εμφάνισης μικκυλίων του λιπιδίου ενώ η κορυφή στα 100nm αντιστοιχεί σε συσσωματώσεις ή λιποσώματα του DSPE. Για την αναλογία 10% σε DSPE το σύστημα PLA-POEGA/DSPE παρουσιάζει ένα πληθυσμό μικκυλίων με μέγεθος 18.7nm ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό των μορίων πολυμερούς και λιπιδίου φαίνεται να έχει υποστεί συσσωμάτωση. Με αύξηση της συγκέντρωσης του φωσφολιπιδίου παρατηρείται μία μείωση στο μέγεθος των μικκυλίων κατά 3.7nm ενώ ταυτόχρονα καταγράφεται μία μεγάλη μείωση έντασης της κορυφής που οφείλεται στον πληθυσμό των μικρότερων σωματιδίων.

3.8 Χαρακτηρισμός μεικτών συστημάτων PLA-POEGA και DPPC με εγκλεισμό IND και CUR.

Η δυνατότητα ενσωμάτωσης φαρμακευτικών ενώσεων και η επίδραση στην αυτοοργάνωση των μικκυλίων εξετάστηκε και στην περίπτωση μεικτών μικκυλίων του PLA-POEGA/DPPC. Τα συστήματα παρασκευάστηκαν με το πρωτόκολλο του λεπτού φιλμ και η αναλογία των ενώσεων ήταν 1:0.01 πολυμερές προς λιπίδιο, καθώς η συγκεκριμένη σύσταση έδωσε τα βέλτιστα αποτελέσματα σε προηγούμενο πείραμα. Η συγκέντρωση του POEGA-PLA και των φαρμάκων ήταν 10⁻³ g/ml και 10⁻⁴ g/ml αντίστοιχα.

Αποτελέσματα DLS συστήματος PLA-POEGA/ DPPC/CUR και PLA-POEGA/ DPPC/IND.

Παρακάτω παρουσιάζονται οι κορυφές και ο πίνακας αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την μέθοδο DLS για το σύστημα PLA-POEGA/DPPC στα μικκύλια των οποίων έγινε εγκλεισμός των φαρμακευτικών ενώσεων IND και CUR.



Σχήμα 3-22 Διαγράμματα κατανομών μεγέθους από DLS για τα νανοσυστήματα PLA-POEGA/DPPC με εγκλεισμό IND και CUR.

Πίνακας 3-10 Αποτελέσματα DLS συστήματος PLA-POEGA/DPPC με εγκλεισμό IND και CUR

Δείγμα	Ένταση σκεδάσεως	PDI	R _h (W _p)
PLA-POEGA/DPPC/CUR 100:1:10 [Thin film]	401	0.49	19.1 (31%) 131 (68%)
PLA-POEGA/DPPC/IND 100:1:10 [Thin film]	101	0.37	17.9 (71%) 176 (27%)

Από τα παραπάνω δεδομένα είναι εμφανές πως και από τα δύο συστήματα προκύπτει μία κορυφή στην περιοχή των 18-19nm. Οι συγκεκριμένες διαστάσεις αντιστοιχούν σε μικύλια πολυμερούς-λιπιδίου στα οποία πιθανώς έχει ενσωματωθεί ποσότητα Indomethacin και CUR. Οι κορυφές στα 131 και 176nm αποδίδονται σε συσσωματώσεις. Παρά το γεγονός ότι η εξαγωγή αποτελεσμάτων ήταν δυνατή για την περίπτωση του εγκλεισμού της ινδομεθακίνης, η ένταση ακτινοβολίας που καταγράφηκε ήταν σημαντικά μικρή. Το γεγονός αυτό καθιστά τις παραπάνω τιμές μη αντιπροσωπευτικές καθώς αντιστοιχούν σε ένα πολύ μικρό αριθμό σωματιδίων.

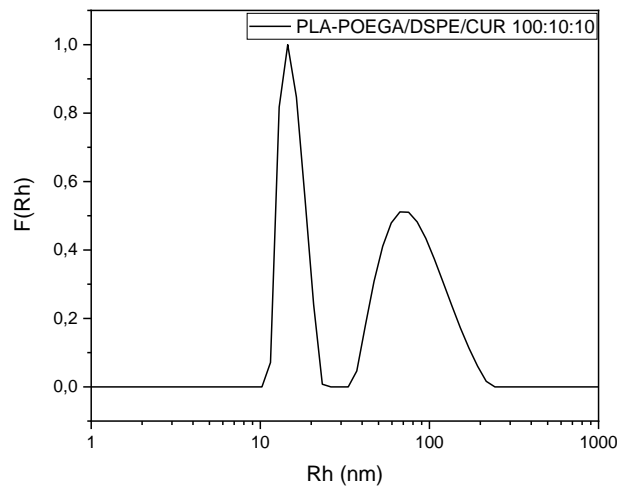
3.9 Χαρακτηρισμός μεικτών συστημάτων PLA-POEGA και DSPE με εγκλεισμό IND και CUR.

Κατά αντιστοιχία με το DPPC πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός και των μεικτών συστημάτων PLA-POEGA/DSPE όταν σε αυτά γίνει εγκλεισμός IND και CUR. Τα

διαλύματα προέκυψαν με ενυδάτωση λεπτού φιλμ. Η συγκέντρωση του DSPE που επιλέχθηκε ήταν 10^{-4} g/ml καθώς κρίθηκε ότι αυτή ήταν η βέλτιστη συγκέντρωση από προηγούμενο πείραμα. Η συγκέντρωση του πολυμερούς ήταν και σε αυτήν την περίπτωση 10^{-3} g/ml ενώ των φαρμακευτικών ενώσεων 10^{-4} g/ml.

Αποτελέσματα DLS συστήματος PLA-POEGA/DSPE/CUR και PLA-POEGA/DSPE/IND .

Παρακάτω εξετάζονται το γράφημα για το σύστημα PLA-POEGA/DSPE/CUR και στον πίνακα παρουσιάζονται τα αντίστοιχα αποτελέσματα. Το σύστημα με την ινδομεθακίνη δεν ήταν δυνατό να μετρηθεί καθώς εμφάνισε συσσωματώσεις μεγάλου μεγέθους ορατές με γυμνό οφθαλμό.



Σχήμα 3-23 Διάγραμμα κατανομών μεγέθους από DLS για το νανοσύστημα PLA-POEGA/DSPE με εγκλεισμό CUR.

Πίνακας 3-11 Αποτελέσματα DLS για το νανοσύστημα PLA-POEGA/DPSE με εγκλεισμό CUR.

Δείγμα	Ένταση σκεδάσεως	PDI	R _h (W _p)
PLA-POEGA/DSPE/Cur [Thin film]	900	0.44	15.4 (43%) 79.6 (56%)

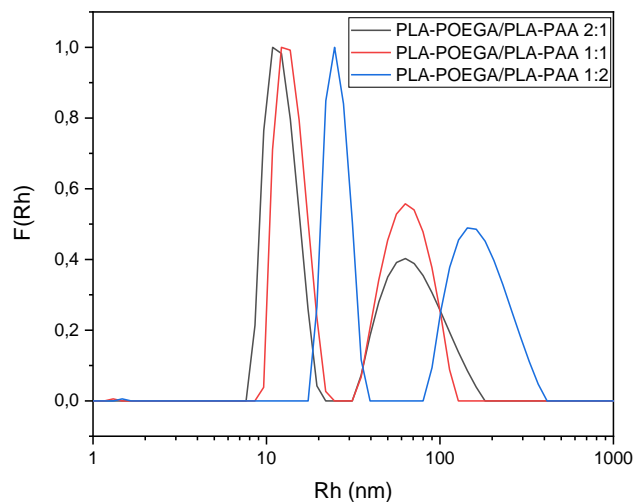
Το σύστημα πολυμερούς-λιπιδίου παρουσία της φαρμακευτικής ένωσης εμφανίζει δύο κορυφές. Η πρώτη εντοπίζεται στα 15nm που αντιστοιχεί πιθανότατα σε μικτά μικκύλια πολυμερούς-λιπιδίου. Η δεύτερη κορυφή στα 79.6nm που συμπεριλαμβάνει τα περισσότερα σωματίδια μάλλον προέρχεται από συσσωματώματα των τριών μορίων.

3.10 Χαρακτηρισμός μεικτών συστημάτων συμπολυμερών PLA-POEGA και PLA-PAA.

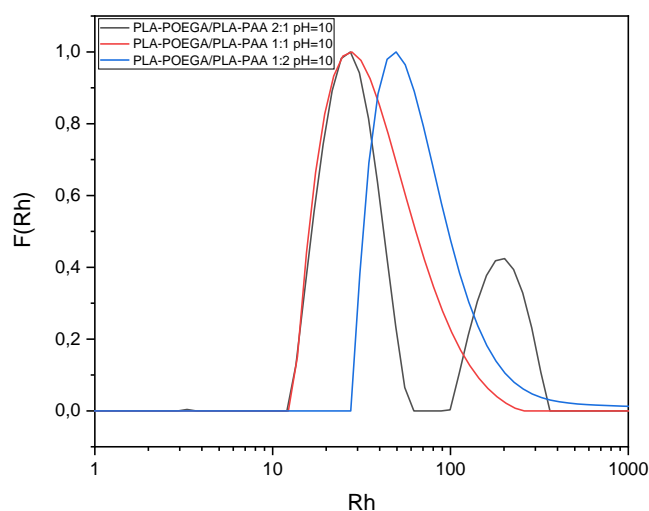
Τέλος ελέγχθηκε η δυνατότητα του PLA-POEGA να σχηματίζει μεικτά μικκύλια με το pH-αποκρινόμενο συμπολυμερές PLA-PAA. Εξετάστηκαν τρεις αναλογίες πολυμερών PLA-POEGA:PLA-PAA οι οποίες ήταν 2:1, 1:1 και 1:2. Η συγκέντρωση του PLA-POEGA διατηρήθηκε ίση και σταθερή με 10^{-3} g/ml και όλα τα διαλύματα παρασκευάστηκαν με εξάτμιση του οργανικού διαλύτη. Η συμπεριφορά των νανοσωματιδίων εξετάστηκε σε συνθήκες βασικού, ουδέτερου και όξινου pH. Τα αποτελέσματα του όξινου pH δεν παρατίθενται καθώς η πρωτονίωση του PAA οδήγησε στον σχηματισμό συσσωματώσεων, προφανώς λόγω μικρότερης διαλυτότητας και σχηματισμού δεσμών υδρογόνου στην μεικτή κορώνα.

Αποτελέσματα DLS συστήματος PLA-POEGA/PLA-PAA

Στα παρακάτω σχήματα παρουσιάζονται οι κορυφές που ελήφθησαν με την μέθοδο DLS για τα μεικτά μικκύλια των PLA-POEGA και PLA-PAA στις αναγραφόμενες αναλογίες σε ουδέτερο και βασικό pH αντίστοιχα.



Σχήμα 3-24 Διαγράμματα κατανομών μεγέθους από DLS για τα νανosuστήματα PLA-POEGA/PLA-PAA σε ουδέτερο pH.



Σχήμα 3-25 Διαγράμματα κατανομών μεγέθους από DLS για τα νανοσυστήματα PLA-POEGA/PLA-PAA σε βασικό pH.

Πίνακας 3-12 Αποτελέσματα DLS συστήματος PLA-POEGA/PLA-PAA.

Δείγμα	Ένταση σκεδάσεως	PDI	R _h (W _p)
PLA-POEGA/PLA-PAA 2:1 [THF]	667	0.43	12.9 (57%), 69.3 (42%)
PLA-POEGA/PLA-PAA 2:1 [THF] pH=10	520	0.36	26.6 (72%), 191.2 (27%)
PLA-POEGA/PLA-PAA 1:1 [THF]	755	0.36	13.8 (52%), 64.0 (47%)
PLA-POEGA/PLA-PAA 1:1 [THF] pH=10	508	0.29	36.1 (99%)
PLA-POEGA/PLA-PAA 1:2 [THF]	268	0.46	25.4 (47%), 167.4 (52%)
PLA-POEGA/PLA-PAA 1:2 [THF] pH=10	543	0.32	70.0 (99%)

Τα τρία διαλύματα ουδέτερου pH παρουσιάζουν κοινή συμπεριφορά καθώς και στις τρεις περιπτώσεις καταγράφονται διπλές κορυφές. Ειδικότερα οι αναλογίες PLA-POEGA/PLA-PAA 2:1 και 1:1 δεν εμφανίζουν ιδιαίτερες διαφορές. Οι διαστάσεις που παρατηρήθηκαν για τις συγκεκριμένες αναλογίες, αλλά και τα ποσοστά των σωματιδίων που αντιστοιχούν σε αυτές είναι παρόμοια όπως φαίνεται και από τον πίνακα. Στην αναλογία 1:2 υπάρχει μία μετατόπιση και των δύο κορυφών σε μεγαλύτερα μεγέθη. Η πρώτη αντιστοιχεί πιθανώς σε μικτά μικκύλια και η δεύτερη είναι αποτέλεσμα συσσωμάτωσης των μικκυλίων.

Για την αναλογία PLA-POEGA/PLA-PAA 2:1 και 1:2 η αύξηση του pH είχε σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση δύο κορυφών στα 27 και 191nm. Οι αναλογίες 1:1 και 1:2 εμφανίζουν απλές κορυφές στα 36 και 70nm. Η ύπαρξη μονών κορυφών στις

αυξημένες συγκεντρώσεις PLA-PAA σχετίζεται με τον αυξημένο ιοντισμό του PAA σε συνθήκες βασικού pH.

Κεφάλαιο 4^ο Συζήτηση αποτελεσμάτων

Στο παρόν κεφάλαιο πραγματοποιείται συζήτηση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τον χαρακτηρισμό των συστημάτων και γίνεται προσπάθεια εξαγωγής συμπερασμάτων μέσω της αντιπαραβολής των αποτελεσμάτων και των παρατηρήσεων με την υφιστάμενη βιβλιογραφία.

Επίδραση της επιφανειοδραστικής ένωσης Tween στην κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση του συμπολυμερούς.

Όπως προέκυψε από τα πειράματα φθορισμού, η CMC του PLA-POEGA προσδιορίστηκε προσεγγιστικά μεταξύ 5×10^{-6} και 8×10^{-6} g/ml με την μέθοδο του thin film να παρουσιάζει την χαμηλότερη τιμή. Η επιφανειοδραστική ένωση Tween προώθησε την συγκρότηση των μορίων σε μεικτά μικκύλια. Από τις τιμές που ελήφθησαν φαίνεται πως σε όλες τις περιπτώσεις οι τιμές της CMC που καταγράφηκαν ήταν μικρότερες από τις αντίστοιχες του καθαρού συμπολυμερούς με εξαίρεση το δείγμα υψηλής συγκέντρωσης Tween που παρασκευάστηκε με ενυδάτωση φιλμ. Το Tween λόγω μικρότερου μοριακού βάρους και υψηλότερης ευκινησίας μπορεί να αλληλεπιδράσει ασθενώς με τις υδρόφοβες αλυσίδες του PLA και να προσδεθεί σε αυτές επιταχύνοντας την διαδικασία σχηματισμού μεικτών μικκυλίων μετατοπίζοντας τη CMC σε χαμηλότερες τιμές. Η παραπάνω υπόθεση ισχυροποιείται από το γεγονός ότι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του Tween φαίνεται να επηρεάζουν σε μεγαλύτερο βαθμό την κρίσιμη συγκέντρωση των μεικτών δομών. Όσον αφορά τα πρωτόκολλα ενυδάτωσης δεν παρατηρείται σαφής τάση σχετικά με την επίδραση τους στη CMC του καθαρού πολυμερούς και του μεικτού συστήματος. Η κορυφή στα 460 nm που αντιστοιχεί στο excimer του πυρενίου ήταν απύσασα από τα φάσματα εκπομπής όλων των δειγμάτων. Το excimer του πυρενίου εμφανίζεται σε περιπτώσεις όπου δύο διεγερμένα μόρια πυρενίου προσεγγίσουν μεταξύ τους στο χώρο και ως αποτέλεσμα ο χρόνος ζωής της διεγερμένης κατάστασης αντιστοιχεί σε nanoseconds. Η παρατήρηση αυτή πιθανώς υποδηλώνει την συμπαγή δομή του πυρήνα των καθαρών μικκυλίων, αλλά και των μεικτών μικκυλίων συμπολυμερούς και επιφανειοδραστικού, που μπορεί να οδήγησε στην περιορισμένη εισχώρηση και διάχυση του ιχνηθέτη εντός του υδρόφοβου τμήματος των σωματιδίων, δίνοντας μια μη ομοιογενή κατανομή του ιχνηθέτη στη νανοδομή καθώς και τη δημιουργία συσσωματωμάτων πυρενίου σε αυτή.

Επίδραση πρωτοκόλλων διάλυσης και ενσωμάτωση επιφανειοδραστικών ενώσεων στη δομή απλών και μεικτών μικκυλίων του συμπολυμερούς.

Αναφορικά με τα διαλύματα του καθαρού συμπολυμερούς προκύπτουν τα παρακάτω. Η ταχεία διαφυγή του THF από το υδατικό διάλυμα φαίνεται να ευνοεί το σχηματισμό συσσωματωμάτων μεγαλύτερου μεγέθους σε σχέση με τα άλλα δύο πρωτόκολλα. Είναι πιθανό η συγκεκριμένη συμπεριφορά να σχετίζεται και με το

μέτρο διαμοριακών αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ του πολυμερούς και του THF, επηρεάζοντας την διαδικασία της αυτοοργάνωσης του πολυμερούς. Το είδος του διαλύτη καθώς και η αναλογία διαλυτών που χρησιμοποιείται κατά τα αρχικά στάδια παρασκευής των δειγμάτων έχει βρεθεί να επηρεάζει ποικιλοτρόπως το μέγεθος των πολυμερικών μικκυλίων[28]. Κατά την ενυδάτωση του λεπτού φιλμ, η σταδιακή μετάβαση του συμπολυμερούς από την στερεή στην υγρή φάση (διάλυμα) οδηγεί σε ελαφρώς μεγαλύτερου μεγέθους σωματίδια, σε σύγκριση με το υδατικό πρωτόκολλο, πιθανώς γιατί τα μόρια PLA-POEGA που διαλύονται σταδιακά προσαρτώνται σε ήδη σχηματισμένα μικκύλια ή καθώς τους δίνεται μεγαλύτερος χρόνος αλληλεπίδρασης σχηματίζουν ελαφρώς μεγαλύτερες δομές.

Η παρουσία του Tween σε συγκέντρωση υψηλότερη από την CMC δεν οδήγησε στα επιθυμητά αποτελέσματα. Όπως ήταν αναμενόμενο υπήρξε σχηματισμός δύο διακριτών πληθυσμών σωματιδίων εκ των οποίων ο πρώτος προκύπτει από τα μικκύλια του Tween ενώ ο δεύτερος είναι αποτέλεσμα μεικτών μικκυλίων. Για τις περιπτώσεις όπου ο σχηματισμός των μικκυλίων πραγματοποιήθηκε με αφαίρεση του οργανικού διαλύτη και ενυδάτωση λεπτού φιλμ φαίνεται πως το Tween λειτούργησε ως παράγοντας συσσωμάτωσης μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων ομαδοποιώντας τα ελεύθερα μεικτά μικκύλια. Η συγκεκριμένη συμπεριφορά μπορεί να έχει προκύψει από τα μεμονωμένα μόρια του Tween που δεν ενσωματώθηκαν σε μεικτά μικκύλια λόγω κορεσμού και έχουν απλώς προσαρτηθεί στην επιφάνεια των σωματιδίων του συμπολυμερούς ή στα ίδια τα μικκύλια του Tween [19]. Σε αντιδιαστολή με τα παραπάνω το Tween σε συγκέντρωση μικρότερη της CMC είχε σαν αποτέλεσμα την μείωση της R_h των σωματιδίων PLA-POEGA στα πρωτόκολλα υδατικού διαλύτη και λεπτού φιλμ. Στην περίπτωση του THF ο μοναδικός πληθυσμός που καταγράφηκε έχει μικρότερο μέγεθος από τον αντίστοιχο πληθυσμό των μεγαλύτερων σωματιδίων που εμφανίστηκαν στο καθαρό πολυμερές χωρίς όμως να παρατηρείται η αρχική κορυφή στα 18nm. Το Tween λόγω του μικρότερου μοριακού βάρους σε σχέση με το συμπολυμερές δύναται, με την προσρόφηση του στην διεπιφάνεια κορώνας-πυρήνα, να οδηγήσει σε πιο πυκνή διαμόρφωση αλυσίδων πολυμερούς [19][18]. Η υδρόφιλη κεφαλή του Tween, που καταλαμβάνει **αρκετό** χώρο λόγω του μεγέθους της, επιδρά παραχωρώντας τον απαραίτητο χώρο στις αλυσίδες του POEGA ώστε να αποκτήσουν την ευνοϊκότερη θερμοδυναμικά διαμόρφωση οδηγώντας σε μείωση του μεγέθους[19][17]. Παράλληλα είναι δυνατό η νέα αυτή δομή να είναι πιο διαπερατή από το νερό. Δεδομένου ότι η κορώνα είναι λιγότερο συμπαγής και περιέχει τις αρκετά υδρόφιλες ουρές του Tween, η υδροδυναμική ακτίνα εμφανίζεται μικρότερη [17]. Παρόμοια επίπτωση στο μέγεθος των μικκυλίων έχει καταγραφεί σε περιπτώσεις ενσωμάτωσης ιοντικών surfactants σε μικκύλια συμπολυμερών με την διαφορά πως η λιγότερο συμπαγής δομή οφείλεται κατά κύριο λόγο στις απωστικές δυνάμεις των ιόντων εντός της κορώνας [29][22]. Αναφορικά με την ένταση του σκεδαζόμενου φωτός παρατηρείται αξιοσημείωτη αύξηση μόνο στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε υδατικός διαλύτης και για τις δύο συγκεντρώσεις του Tween. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει πως

στα πλαίσια του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου το Tween ενσωματώθηκε στα μικκύλια του πολυμερούς σε μεγάλο βαθμό οδηγώντας σε δομές μικρότερου μεγέθους και μεγαλύτερης μάζας/πυκνότητας[30] χωρίς την τάση αλληλεπίδρασης με παρακείμενα σωματίδια. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώνεται από το γεγονός πως με την άμεση διάλυση των μορίων του πολυμερούς και του Tween στο νερό δεν καταγράφεται συσσωμάτωση για καμία από τις δύο συγκεντρώσεις του επιφανειοδραστικού.

Αναφορικά με το SPAN και ειδικότερα όταν η συγκέντρωση του είναι κάτω από την CMC η αφαίρεση του οργανικού διαλύτη κατέληξε στον σχηματισμό σωματιδίων μεγέθους που βρίσκεται στο ενδιάμεσο μεταξύ των δύο αρχικών πληθυσμών που καταγράφηκαν για το καθαρό PLA-POEGA. Όταν η διάλυση πραγματοποιήθηκε με ενυδάτωση λεπτού φιλμ τα μικκύλια που προέκυψαν είχαν μεγαλύτερο μέγεθος συγκριτικά με τα αντίστοιχα του καθαρού πολυμερούς. Η αύξηση των διαστάσεων στο πρωτόκολλο thin film πιθανώς οφείλεται στον αρκετά πιο υδρόφοβο χαρακτήρα του SPAN. Προκειμένου να γίνει δυνατή η θωράκιση της υδρόφοβης απόληξης του επιφανειοδραστικού, το μεγαλύτερο μέρος του μορίου θα πρέπει να εισχωρήσει στο υδρόφοβο τμήμα της μικκυλιακής δομής αυξάνοντας το μέγεθος του πυρήνα. Παράλληλα οι υδρόφιλες αλυσίδες θα πρέπει να αναδιαταχθούν ή να προστεθούν νέα μόρια πολυμερούς προκειμένου να καταληφθεί ο ελεύθερος χώρος που προέκυψε έχοντας σαν συνέπεια την συνολική αύξηση του όγκου [18], [19]. Σημαντική αύξηση έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας καταγράφεται μόνο για το οργανικό πρωτόκολλο, όταν η συγκέντρωση του Span είναι μεγαλύτερη της CMC. Ο ιδιαίτερα υδρόφοβος χαρακτήρας του Span σε συνδυασμό με την υψηλή συγκέντρωση του στο διάλυμα είχαν σαν αποτέλεσμα τον μεγάλο βαθμό ενσωμάτωσης του και την δημιουργία συμπαγών μεικτών δομών με τα μόρια του PLA-POEGA.

Από τα δεδομένα που προέκυψαν για τις τρεις μεθόδους διαλυτοποίησης, όπου αυτές εφαρμόστηκαν, στα συστήματα καθαρού συμπολυμερούς και συμπολυμερούς-επιφανειοδραστικών δεν προκύπτει κάποια καθολική τάση ως προς την επίδραση του κάθε πρωτοκόλλου στο τελικό μέγεθος των σωματιδίων, καθώς η χημική δομή, το μέγεθος και η στερεοδιάταξη του κάθε συστατικού διαφέρει. Ωστόσο μπορούν να γίνουν κάποιες γενικές παρατηρήσεις όσον αφορά μεμονωμένα αποτελέσματα που προέκυψαν από κάθε πρωτόκολλο.

Ακολουθεί η σύγκριση των αποτελεσμάτων των μεικτών νανοσυστημάτων όταν η συγκέντρωση των δεύτερων είναι κατώτερη της CMC, όπου τα δεδομένα είναι πιο πλήρη. Αρχικά τα πρωτόκολλα οργανικού διαλύτη και λεπτού φιλμ επηρεάζουν με διαφορετικό τρόπο το μέγεθος των τελικών σωματιδίων. Ειδικότερα στην περίπτωση του Tween η χρήση οργανικού διαλύτη οδήγησε στον σχηματισμό μεγαλύτερων σωματιδίων από την ενυδάτωση του thin film, ενώ ακριβώς το αντίθετο καταγράφηκε όταν το SPAN ενσωματώθηκε στα μικκύλια του πολυμερούς με την ίδια διαδικασία.

Όσον αφορά την χρήση του οργανικού διαλύτη το μέτρο αλληλεπίδρασης των δύο surfactant με το THF είναι δυνατόν να επέδρασε διαφορετικά τον σχηματισμό των μικκυλίων επηρεάζοντας την διαλυτοποίησή τους στο υδατικό μέσο οδηγώντας σε διαφορετική συμπεριφορά κατά την διαδικασία της αυτοοργάνωσης. Αντίστοιχα κατά την ενυδάτωση του φιλμ η διαφορά στον υδρόφοβο/υδρόφιλο χαρακτήρα μεταξύ Tween και Span μπορεί να έχει σημαντικό αντίκτυπο στους ρυθμούς μετάβασης των μορίων από την στερεά στην υγρή φάση του διαλύματος επηρεάζοντας το τελικό μέγεθος των σωματιδίων των δύο συστημάτων. Παρόλα αυτά από τα δεδομένα που προέκυψαν δεν είναι δυνατόν να προσδιοριστεί ο μηχανισμός που λαμβάνει χώρα σε κάθε περίπτωση ώστε να εξαχθούν πιο λεπτομερή συμπεράσματα.

Επίδραση φαρμακευτικών ενώσεων στη δομή μικκυλίων του καθαρού συμπολυμερούς και μεικτών μικκυλίων συμπολυμερούς- επιφανειοδραστικού Tween.

Όπως ήταν αναμενόμενο η παρουσία των φαρμάκων υδρόφοβου χαρακτήρα στο διάλυμα καθαρού συμπολυμερούς οδήγησε αυτόματα στην εισχώρηση τόσο της CUR όσο και της IND στον υδρόφοβο πυρήνα των νανοσωματιδίων. Το παραπάνω αποδεικνύεται πρωτίστως από την επιτυχή διάλυση των παραπάνω αδιάλυτων ενώσεων στο υδατικό μέσο. Ειδικότερα τα όρια διαλυτότητας σε νερό αντιστοιχούν σε $3.1 \times 10^{-6} \text{g/ml}$ για την CUR και $0.9 \times 10^{-6} \text{g/ml}$ για την IND και με τον εγκλεισμό επιτεύχθηκε συγκέντρωση 10^{-4}g/ml και για τις δύο ενώσεις δηλ. αύξηση της διαλυτότητάς τους κατά δύο τάξεις μεγέθους. Παράλληλα η εμφάνιση ενός μόνο πληθυσμού μικκυλίων του οποίου το μέγεθος των 45 και 57nm είναι αισθητά μεγαλύτερο σε σύγκριση με το καθαρό πολυμερές επιβεβαιώνει την ενσωμάτωση των φαρμάκων εντός των πολυμερικών σωματιδίων. Η απουσία της κορυφής των συσσωματώσεων του καθαρού πολυμερούς στα 87nm υποδηλώνει πως η απαίτηση για απομόνωση των φαρμακευτικών ενώσεων από το υδατικό περιβάλλον πιθανώς επέβαλλε συγκεκριμένη διαμόρφωση/αλλαγή δομής στα μικκύλια προκειμένου να επιτευχθεί ο βέλτιστος βαθμός θωράκισης/εγκλωβισμού καθώς πλέον καταγράφεται μόνο ένας πληθυσμός σε κάθε νανοσύστημα. Τέλος, ιδιαίτερα στην περίπτωση της CUR η μεγάλη ένταση σκεδαζόμενης ακτινοβολίας που καταγράφεται σχετίζεται άμεσα με την υψηλή μάζα των σχηματιζόμενων μικκυλίων ενισχύοντας την υπόθεση του ικανοποιητικού ποσοστού εγκλεισμού.

Παρόμοια συμπεριφορά καταγράφεται και στην περίπτωση των μεικτών μικκυλίων συμπολυμερούς και Tween. Πιο συγκεκριμένα παράλληλα με την επιτυχή διάλυση των υδρόφοβων φαρμακευτικών ενώσεων στο υδατικό μέσο καταγράφεται μία αύξηση στο μέγεθος των πληθυσμών μεγαλύτερου μεγέθους από τα 74nm στα 87 και 100nm με την προσθήκη CUR και IND αντίστοιχα, επιβεβαιώνοντας την εισχώρηση των υδρόφοβων μορίων στις μεικτές δομές. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον επιδεικνύει η μετατόπιση της κορυφής από τα 11nm στα 8nm για τα συστήματα που περιέχουν τα

μόρια των φαρμακευτικών ενώσεων. Δεδομένης της πολυπλοκότητας του συστήματος είναι δύσκολο να διαπιστωθεί η ακριβής σύσταση των συγκεκριμένων σωματιδίων, καθώς απαιτούνται συμπληρωματικές μέθοδοι χαρακτηρισμού. Ωστόσο γνωρίζοντας ότι το μέγεθος των 8nm είναι αρκετά μικρό ώστε να αντιστοιχεί σε ομαδοποίηση/συσσωμάτωση μορίων του συμπολυμερούς, και λίγο μεγαλύτερο από τα μικύλια του καθαρού Tween, είναι πιθανό η συγκεκριμένη κορυφή να προκύπτει από μόρια του Tween που περιβάλλουν τα μόρια των φαρμάκων. Η ανεπιβεβαίωτη υπόθεση αυτή βασίζεται σε δύο άξονες. Πρώτον στο γεγονός ότι η συγκέντρωση του surfactant είναι κατώτερη του CMC οπότε αποκλείεται ο κορεσμός και ο σχηματισμός μικκυλίων Tween. Δεύτερον στην δυνατότητα που έχουν τα μόρια των επιφανειοδραστικών ενώσεων να σχηματίζουν σύμπλοκα χαλαρής δομής με μόρια που εμφανίζουν χημική συγγένεια, όταν η συγκέντρωση των πρώτων είναι χαμηλότερη της CMC και ανώτερη της CAC[14]. Αξίζει να σημειωθεί πως για κάθε εξεταζόμενη περίπτωση τα συστήματα που εμπεριείχαν την ινδομεθακίνη παρουσίασαν μεγαλύτερη αύξηση μεγέθους από τα αντίστοιχα στα οποία είχε εγκλειστεί η κουρκουμίνη. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να προκύπτει από τις διαφορές στην χημική δομή και την υδροφοβικότητα των δύο μορίων. Οι τρεις δακτύλιοι που απαρτίζουν το μόριο την ινδομεθακίνης προσδίδουν μεγαλύτερη ακαμψία στο μόριο περιορίζοντας τις πιθανές διαμορφώσεις που μπορεί να λάβει στο εσωτερικό του πυρήνα ενώ ταυτόχρονα ενισχύουν τον υδρόφοβο χαρακτήρα του. Από την άλλη πλευρά η υδροφοβικότητα της κουρκουμίνης είναι μεγαλύτερη εκείνης της ινδομεθακίνης οδηγώντας σε πιο συμπαγείς μεικτές νανοδομές με μικρότερο μέγεθος.

Επίδραση των λιπιδίων στον σχηματισμό μεικτών νανοσωματιδίων με το συμπολυμερές PLA-POEGA.

Όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα του μεικτού συστήματος PLA-POEGA και DPPC, τα μικύλια που εμφανίζονται είναι μικρότερων διαστάσεων από τα αντίστοιχα του καθαρού συμπολυμερούς. Η εισχώρηση των αρκετά μικρότερου μοριακού βάρους λιπιδίων στην διεπιφάνεια πυρήνα-κορώνας οδηγεί σε μειωμένη υδροδυναμική ακτίνα. Με αύξηση της συγκέντρωσης του λιπιδίου εμφανίστηκαν νέοι πληθυσμοί μεγαλύτερων διαστάσεων και το ποσοστό των μικρότερων σωματιδίων στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις έγινε πρακτικά αμελητέο. Η κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση του DPPC αντιστοιχεί σε 4.6×10^{-10} M ή σε 3.4×10^{-10} g/ml από όπου συμπεραίνεται πως ακόμα και στο σύστημα της χαμηλότερης συγκέντρωσης λιπιδίου, που ήταν 10^{-5} g/ml, το DPPC διατηρεί την δυνατότητα σχηματισμού μικκυλίων ή λιποσωμάτων. Τα λιποσώματα του DPPC διακρίνονται από μέγεθος που κυμαίνεται από 50nm έως την κλίμακα των μικρομέτρων και εξαρτάται από τις παραμέτρους παρασκευής. Οι εξεταζόμενες περιεκτικότητες DPPC κατά βάρος πολυμερούς 1%, 5%, 10% και 30% αντιστοιχούν σε μοριακές αναλογίες 7:1, 1.4:1, 0.7:1 και 0.2:1 πολυμερούς προς λιπίδιο. Σε περιπτώσεις όπου η μοριακή αναλογία είναι υπέρ του λιπιδίου, τα μόρια αμφιφιλικών συμπολυμερών μπορούν να ενσωματωθούν στην

στοιβάδα των λιπιδίων του DPPC σχηματίζοντας χημαιρικά λιποσώματα με μικρότερο μέγεθος και αυξημένη σταθερότητα, χαρακτηριστικά που εμφανίζουν εξάρτηση ανάλογη της συγκέντρωσης του πολυμερούς [31]. Παράλληλα έχει παρατηρηθεί πως η εισαγωγή λιπιδίων σε διάλυμα συμπολυμερούς σε ισομοριακή αναλογία μπορεί να επιβάλλει την ανάπτυξη χημαιρικών κυστιδίων ακόμα και αν πρόκειται για πολυμερές που έχει την τάση να σχηματίζει μικκύλια σε καθαρή μορφή, με προϋπόθεση ότι το μοριακό βάρος του πολυμερούς είναι αρκούντως μικρό [24]. Όλα τα παραπάνω σε συνδυασμό με τους υψηλούς δείκτες πολυδιασποράς και την συσχέτιση που εμφανίζουν τα αποτελέσματα με την συγκέντρωση του λιπιδίου οδηγούν στο συμπέρασμα πως στο διάλυμα και ιδιαίτερα στις υψηλότερες αναλογίες λιπιδίου συνυπάρχουν σωματίδια διαφορετικών ειδών/μορφολογιών. Ειδικότερα οι δομές μικρότερου μεγέθους αποτελούνται από μεικτά μικκύλια πολυμερούς παρουσία DPPC, τα σωματίδια ενδιάμεσου μεγέθους προκύπτουν από χημαιρικά μικκύλια και κυστίδια ενώ στις μεγαλύτερες διαστάσεις απαντώνται τα λιποσώματα του DPPC τα οποία μπορεί να έχουν προσαρτηθεί και πολυμερικές αλυσίδες. Η τελική δομή/μορφολογία των μεικτών συστημάτων συμπολυμερών και μικκυλίων εξαρτάται πέραν της χημικής δομής των ενώσεων και από ιδιότητες όπως η διαφορά θερμοκρασιών αλλαγής φάσεων, η συνάφεια του μεγέθους και της διάταξης των μορίων καθώς και οι διαφορές στο μέτρο υδροφοβικότητας. Μεγάλες διαφοροποιήσεις μεταξύ των δύο ενώσεων όσον αφορά τα παραπάνω χαρακτηριστικά μπορούν να οδηγήσουν σε περίπλοκες δομές που χαρακτηρίζονται από ανομοιογένεια και τοπικές διακυμάνσεις συγκέντρωσης στην επιφάνεια των σωματιδίων έως και διαχωρισμό φάσης [23]. Είναι αναμενόμενο λοιπόν να είναι δυσχερής η εξαγωγή συμπαγών συμπερασμάτων αποκλειστικά με την μέθοδο του DLS για το συγκεκριμένο σύστημα.

Το τροποποιημένο λιπίδιο DSPE σε αντίθεση με τα απλά λιπίδια σχηματίζει αποκλειστικά μικκύλια κατά την διάλυσή του στο νερό ως αποτέλεσμα πρόσδεσης της γραμμικής αλυσίδας πολυαιθυλενογλυκόλης στην υδρόφιλη κεφαλή του λιπιδίου [32] (θα μπορούσε κάποιος να πει ότο συγκεκριμένο λιπίδιο είναι ένα μικρού μοριακού βάρους συμπολυμερές). Η παραπάνω συμπεριφορά αυτοοργάνωσης είναι συνεπής με τα αποτελέσματα της μεθόδου DLS και ειδικότερα όσον αφορά την κορυφή στα 5.2nm. Η CMC του DSPE-PEG υπολογισμένη με την μέθοδο του φθορισμού αντιστοιχεί σε 7×10^{-6} g/ml βάση βιβλιογραφίας [33], τιμή η οποία συνεπάγεται δυνατότητα σχηματισμού καθαρών μικκυλίων ακόμα και στην περίπτωση μεικτών συστημάτων με το PLA-POEGA. Ωστόσο κάτι τέτοιο δεν παρατηρείται στα εξεταζόμενα συστήματα πολυμερούς-λιπιδίου καθώς από τα γραφήματα απουσιάζει οποιαδήποτε διακριτή κορυφή που θα μπορούσε να αποδοθεί σε καθαρά μικκύλια του DSPE-PEG, επιβεβαιώνοντας τον σχηματισμό χημαιρικών μικκυλίων. Από την σύγκριση μεγέθους των σωματιδίων καθαρού PLA-POEGA και του μεικτού συστήματος που παρασκευάστηκαν με την ίδια μέθοδο φαίνεται πως και σε αυτή την περίπτωση η εισχώρηση μορίων μικρότερου μεγέθους από αυτά του συμπολυμερούς οδηγεί σε μειωμένες διαστάσεις. Η μεγαλύτερη κορυφή στα 100nm του καθαρού λιπιδίου αυξάνει σε μέγεθος κατά 60nm όταν το

DSPE-PEG σχηματίζει μεικτά μικκύλια και το μέγεθος φαίνεται να είναι ανεξάρτητο της συγκέντρωσης του λιπιδίου. Τα συγκεκριμένα σωματίδια προέρχονται πιθανώς από την εισχώρηση μορίων του PLA-POEGA σε συσσωματώσεις του λιπιδίου και στην υπόθεση αυτή συνηγορεί και το γεγονός πως το σχετικός πλήθος τους είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του λιπιδίου στο διάλυμα.

Ως προς την σύγκριση της επίδρασης των δύο λιπιδίων ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η εξάρτηση του μεγέθους των πληθυσμών μικρότερων διαστάσεων από την συγκέντρωση του εκάστοτε λιπιδίου. Όπως προαναφέρθηκε και στις δύο περιπτώσεις τα χιμαιρικά μικκύλια είναι μικρότερα από τα αντίστοιχα του καθαρού πολυμερούς. Στην περίπτωση του DSPE-PEG η υψηλότερη αναλογία υδρόφιλου προς υδρόφοβου χαρακτήρα λόγω παρουσίας της PEG προσομοιάζει σε ικανοποιητικό βαθμό την δομή του αμφιφιλικού πολυμερούς μικρού μοριακού βάρους. Αποτέλεσμα αυτού είναι η αντικατάσταση ενός μορίου PLA-POEGA από ένα μόριο τροποποιημένου λιπιδίου DSPE-PEG να οδηγεί σε μείωση της ακτίνας, ενώ το φαινόμενο εντείνεται όταν αυξάνεται η περιεκτικότητα των λιπιδίων στα μικκύλια. Στον αντίποδα το DPPC αν και έχει μάζα τέσσερις φορές μικρότερη από το DSPE-PEG παρουσιάζει μεγαλύτερα σωματίδια από αυτά του συστήματος PLA-POEGA/DSPE-PEG και τάση αύξησης της ακτίνας για παράλληλη αύξηση της συγκέντρωσης. Οι αλκυλικές αλυσίδες που αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος του μορίου, θεωρητικά εισέρχονται στον πυρήνα προκαλώντας την διόγκωσή του. Άμεση συνέπεια αυτού είναι η προσθήκη περισσότερων μορίων συμπολυμερούς στα μικκύλια προκειμένου να επιτευχθεί ικανοποιητικός βαθμός θωράκισης του υδρόφοβου τμήματος, διαδικασία που συντελεί στην αύξηση του τελικού μεγέθους του μεικτού συσσωματώματος.

Επίδραση εγκλεισμού φαρμακευτικών ενώσεων στην διαμόρφωση χιμαιρικών μικκυλίων του συμπολυμερούς με τα λιπίδια DPPC και DSPE-PEG

Για τον εγκλεισμό των φαρμακευτικών μορίων επιλέχθηκαν τα μεικτά συστήματα PLA-POEGA/DPPC (1:0.01) και PLA-POEGA/DSPE-PEG (1:0.1) τα οποία παρουσίασαν το χαμηλότερο ποσοστό συσσωματώσεων. Αναφορικά με την ινδομεθακίνη ο εγκλεισμός της στα μεικτά μικκύλια PLA-POEGA/DPSE ήταν ανεπιτυχής καθώς στο διάλυμα εμφανίστηκαν συσσωματώσεις. Για το σύστημα PLA-POEGA/DPPC/IND κρίθηκε απαραίτητη η αραιώση στο 1/10 της αρχικής συγκέντρωσης ώστε η μέτρηση με την μέθοδο DLS να είναι εφικτή ενώ η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας που καταγράφηκε ήταν πολύ μικρή ως αποτέλεσμα της αραιώσης. Το μέγεθος, αλλά και η ικανότητα εγκλεισμού των σχηματιζόμενων σωματιδίων κατά την ενυδάτωση του thin film έχει βρεθεί να εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως την ομοιογένεια του σχηματιζόμενου φιλμ, τον χρόνο επαφής με την υδατική φάση, την θερμοκρασία και την ταχύτητα ανάδευσης [34][35]. Ο υδρόφοβος χαρακτήρας της ινδομεθακίνης σε συνδυασμό με την χρήση του πρωτοκόλλου ενυδάτωσης του λεπτού φιλμ πιθανώς συνέβαλλαν σε μη ικανοποιητική διασπορά του φαρμάκου εντός του κολλοειδούς. Ταυτόχρονα ο πιο συμπαγής πυρήνας των χιμαιρικών μικκυλίων μπορεί να έδρασε

ανασχετικά στην ενσωμάτωση της ινδομεθακίνης με αποτέλεσμα την εμφάνιση συσσωματώσεων. Από τα αποτελέσματα των δειγμάτων PLA-POEGA/DPPC δεν καταγράφεται επίσης κάποια διαφοροποίηση που να ξεφεύγει από τα όρια του σφάλματος, στο μέγεθος των μικρότερων μικκυλίων.

Σχετικά με τα χιμαιρικά μικκύλια του τροποποιημένου λιπιδίου η παρουσία της κουρκουμίνης παραδόξως προκάλεσε μείωση στο μέγεθος και των δύο πληθυσμών. Ειδικότερα οι διαστάσεις των υδροδυναμικών ακτινών μετατοπίστηκαν από 18nm σε 15nm και από τα 164nm στα 79nm ενώ ταυτόχρονα αυξήθηκε το σχετικό πλήθος του μικρότερου πληθυσμού κατά 8%. Η παραπάνω μη αναμενόμενη συμπεριφορά, έχει καταγραφεί στην βιβλιογραφία για περιπτώσεις που αφορούν συστήματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης αντιφλεγμονωδών ενώσεων τα οποία τα υδρόφοβα τμήματα του συμπολυμερούς και του φαρμάκου παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια [36]. Ειδικότερα όταν πρόκειται για μικκύλια DSPE-PEG το συγκεκριμένο φαινόμενο έχει αποδοθεί στις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αλκυλικών αλυσίδων του λιπιδίου και των φαινυλομάδων των υδρόφοβων φαρμάκων[36]. Στα συστήματα χιμαιρικών μικκυλίων που χαρακτηρίστηκαν οι ενώσεις κουρκουμίνη και ινδομεθακίνη έχουν την δυνατότητα να αναπτύξουν τις παραπάνω αλληλεπιδράσεις καθώς περιέχουν στην χημική δομή τους δύο φαινύλια και δύο φαινόλες αντίστοιχα. Συνοψίζοντας λοιπόν είναι δυνατόν η παρουσία της κουρκουμίνης να ευνόησε τον σχηματισμό πυρήνων πιο συμπαγούς δομής και παράλληλα να επέφερε μείωση στον βαθμό συσσωμάτωσης (aggregation number) με αποτέλεσμα να μειωθούν οι διαστάσεις των χιμαιρικών μικκυλίων.

Επίδραση συμπολυμερούς PLA-PAA και της αναλογίας του στον σχηματισμό μεικτών μικκυλίων με το PLA-POEGA.

Από την σύγκριση των μεγεθών του καθαρού συμπολυμερούς με τα μεικτά συστήματα PLA-POEGA/PLA-PAA για τις αναλογίες 2:1 και 1:1 παρατηρείται από κοινού μία μείωση διαστάσεων στους δύο πληθυσμούς. Η μειωμένη υδροδυναμική ακτίνα των μεικτών μικκυλίων εμφανίζεται ως αποτέλεσμα της δυνατότητας των αλυσίδων του PAA που δεν έχουν ιοντιστεί πλήρως να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των καρβοξυλίων τους, αλλά και με τα αιθερικά οξυγόνα των αλυσίδων POEGA [37]. Οι διαμοριακές αυτές αλληλεπιδράσεις οδηγούν σε πιο συνεκτική δομή των σωματιδίων καθώς οι υδρόφιλες αλυσίδες του PAA, που απαρτίζουν εν μέρη την περιοχή της κορώνας, πλησιάζουν μεταξύ τους. Αντίθετη συμπεριφορά καταγράφεται όταν η συγκέντρωση του PLA-PAA είναι διπλάσια του PLA-POEGA. Η συγκεκριμένη συμπεριφορά πιθανώς οφείλεται τόσο στις προαναφερθείσες αλληλεπιδράσεις όσο και στην υψηλή συνολική συγκέντρωση του PAA. Οι δύο αυτοί παράγοντες μπορούν να αυξήσουν τον αριθμό των μακρομορίων που απαρτίζει κάθε μικκύλιο με άμεση συνέπεια την μεγέθυνση των διαστάσεων του. Με την αύξηση του pH όπως ήταν αναμενόμενο για την αναλογία 2:1 υπήρξε σημαντική αύξηση του μεγέθους και των δύο πληθυσμών. Ο σχεδόν πλήρης ιοντισμός των καρβοξυλίων του PAA και η αρνητική φόρτιση των συγκεκριμένων ομάδων έχει

σαν αποτέλεσμα την διαστολή των αλυσίδων του PAA πολυμερούς λόγω απωθήσεων ηλεκτροστατικής φύσεως, αλλά και την πιθανή εισχώρηση μορίων του νερού σε περιοχές του κελύφους. Για τις περιπτώσεις των αναλογιών 1:1 και 1:2 η εμφάνιση μονών κορυφών υψηλού PDI είναι ίσως αποτέλεσμα του ίδιου μηχανισμού σε συνδυασμό με την υψηλή συγκέντρωση του PAA. Πιο συγκεκριμένα τα μεγαλύτερα μεικτά μικκύλια και οι συσσωματώσεις είναι πιθανό λόγω υψηλής περιεκτικότητας σε PAA να καθίστανται ασταθή σε συνθήκες πλήρους ιοντισμού των καρβοξυλίων. Το μεγάλο μέτρο απωστικών δυνάμεων που αναπτύσσεται μπορεί να διευκολύνει την διάσπαση των μεγαλύτερων σωματιδίων και την αναδιάταξη τους σε μικρότερου μεγέθους δομές. Για τα μικκύλια μικρότερου μεγέθους ισχύει ότι και στις προηγούμενες αναλογίες, όπου το αλκαλικό περιβάλλον οδηγεί σε αύξηση του μεγέθους.

Συμπεράσματα

Το αμφιφιλικό συμπολυμερές PLA-POEGA παρουσίασε αρκετά ικανοποιητικά χαρακτηριστικά ως προς τις δυνατότητες αυτοοργάνωσης. Συγκεκριμένα η στενή κατανομή μεγεθών που παρουσίασε, αλλά και το μέσο μέγεθος των νανοσωματιδίων σε συνδυασμό με την βιοσυμβατότητα του το καθιστούν ιδανικό υποψήφιο για εφαρμογές φαρμακευτικών φορέων. Η παρουσία επιφανειοδραστικών ενώσεων επέδρασε ποικιλοτρόπως στην διαμόρφωση των μεικτών μικκυλίων. Η χημική δομή και η συγκέντρωση των surfactant σε συνδυασμό με την διαδικασία ενσωμάτωσης καθόρισαν σε μεγάλο βαθμό τις διαστάσεις των μεικτών νανοσωματιδίων, παρέχοντας έναν επιπλέον τρόπο χειραγώγησης των ιδιοτήτων του συστήματος. Τα βέλτιστα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν για το πιο υδρόφιλο επιφανειοδραστικό σε συγκεντρώσεις μικρότερες της κρίσιμης μικκυλιακής συγκέντρωσης. Οι διαφορετικές μέθοδοι ενυδάτωσης οδήγησαν στην ανάπτυξη συστημάτων νανοσωματιδίων με διαφορετικές κατανομές μεγεθών ως αποτέλεσμα των διαφορετικών ρυθμών μετάβασης στην διαλυμένη φάση, αλλά και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών. Ο εγκλεισμός των φαρμακευτικών ουσιών ήταν επιτυχής στην πλειοψηφία των περιπτώσεων. Το μέτρο του εγκλεισμού φάνηκε να εξαρτάται από παραμέτρους που έχουν να κάνουν με την δομή της δραστικής ένωσης, αλλά και την τροποποίηση που έχει υποστεί ο μικκυλιακός πυρήνας λόγω παρουσίας άλλων ενώσεων που καθορίζουν την πυκνότητά του. Ο συνδυασμός συμπολυμερούς με λιπίδια ανέδειξε την δυνατότητα διατήρησης των μικκυλιακών χαρακτηριστικών όταν η συγκέντρωση του λιπιδίου είναι αρκούντως μικρή. Τα βέλτιστα αποτελέσματα καταγράφηκαν στην περίπτωση του DSPE-PEG λόγω της τροποποίησης που είχε υποστεί ώστε να αυξηθεί η υδροφιλικότητά του. Ως συνέπεια αυτού επιβεβαιώθηκε η υπόθεση πως τα λιπίδια υπό τις κατάλληλες προϋποθέσεις μπορούν να διαδραματίσουν εν μέρει τον ρόλο των επιφανειοδραστικών ενώσεων στις μεικτές δομές αποτελώντας μία επιπλέον παράμετρο σχεδιασμού. Τέλος επιτυχής ήταν και ο σχηματισμός αποκρινόμενων στο pH συστημάτων καθώς υπήρξε ικανοποιητική ανταπόκριση των σωματιδίων στις μεταβολές του περιβάλλοντός τους. Ωστόσο το

συγκεκριμένο σύστημα απαιτεί περαιτέρω μελέτη για την βελτιστοποίησή του καθώς και για τις δυνατότητες εγκλεισμού που έχει.

Βιβλιογραφία

- [1] M. Lazzari and G. Liu, "Block Copolymers in Nanoscience", Wiley-VCH, Weinheim, 2006.
- [2] I.A. Hamley, "The Physics of Block Copolymers", Oxford University Press, 1998, New York.
- [3] A. Solmaz, "Amphiphilic Block Copolymer Micelles for Drug Delivery Vehicles", University of Groningen, 2010, Groningen.
- [4] T. Smart, H. Lomas, M. Massignani, M. V Flores-merino, L. R. Perez, and G. Battaglia, "Block copolymer nanostructures", *Nanotoday*, 2008, vol. 3, pp. 38–46.
- [5] J. Gohy, Block Copolymer Micelles, *Adv Polymer Science*, 2005, 190, pp 65–136.
- [6] K. Holmberg, J. Bo, and B. Kronberg, "Surfactants and Polymers in Aqueous Solution", John Wiley and Sons, 2002, Sussex.
- [7] S. Kumar, A. Bhattarai, and S. Chatterjee, "Applications of Surfactants in modern Science and Technology", *Modern Science and Technology*, 2013 pp147-158.
- [8] T. Delivery, "Nanostructured self assembled lipid materials for drug delivery and tissue engineering", *Therapeutic Delivery*, 2011, 2(11), pp. 1485–1516.
- [9] P. Vishvakrama and S. Sharma, "Review Article Liposomes: An Overview," *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 2014,1, pp. 47–55.
- [10] U. Kedar, P. Phutane, S. Shidhaye, and V. Kadam, "Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 2010,6, no. 6, pp. 714–729.
- [11] Y. Zhang et al., "Strategies for improving the payload of small molecular drugs in polymeric micelles," *Control. Release*, 2017, vol. 261, pp. 352–366.
- [12] V. P. Sant, N. Kang, D. Maysinger, and J. Leroux, "Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery," *Journal of Controlled Release*, 2005, vol. 109, pp. 169–188.
- [13] K. Miyata, R. J. Christie, and K. Kataoka, "Reactive & Functional Polymers Polymeric micelles for nano-scale drug delivery," *Reactive and Functional Polymers*, 2011, vol. 71, no. 3, pp. 227–234.
- [14] N. Rehman, H. Ullah, S. Alam, A. K. Jan, S. W. Khan, and M. Tariq, "Surface and thermodynamic study of micellization of non ionic surfactant / diblock copolymer system as revealed by surface tension and conductivity," *JMES*, 2017, vol. 8, no. 4, pp. 1161–1167.
- [15] Y. Zheng and H. T. Davis, "Mixed Micelles of Nonionic Surfactants and Uncharged Block Copolymers in Aqueous Solutions: Microstructure Seen by Cryo-TEM," *Langmuir*, 2000, no. 6, pp. 6453–6459.
- [16] Q. Jadoon et al., "Interaction of surfactants with block-copolymer systems in the presence of Hofmeister anions.," *Materials Research Express*, 2017, vol 4.
- [17] N. V Sastry and H. Hoffmann, "Interaction of amphiphilic block copolymer micelles with surfactants," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical. Engineering Aspects*, 2004, vol. 250, pp. 247–261.

- [18] G. Koutalas, S. Pispas, and N. Hadjichristidis, "Micelles of poly (isoprene-*b*-2-vinylpyridine-*b*-ethylene oxide) terpolymers in aqueous media and their interaction with surfactants," *The European Physical Journal E*, 2004 vol. 464, pp. 457–464.
- [19] S. Pispas and N. Hadjichristidis, "Aggregation Behavior of Poly (butadiene- *b* -ethylene oxide) Block Copolymers in Dilute Aqueous Solutions: Effect of Concentration, Temperature, Ionic Strength, and Type of Surfactant," *Langmuir*, 2003 no.19, pp. 48–54.
- [20] T. Pal and K. Sahu, "Anomalous Variation of Excited State Proton Transfer Dynamics Inside a Triblock Copolymer-Cationic Surfactant Mixed Micelle," *Journal of Physical Chemistry*, 2019, vol 123, pp. 8559-8568.
- [21] P. Taylor et al., "The Effects of Salts and Ionic Surfactants on the Micellar Structure of Tri - Block Copolymer PEO - PPO - PEO in Aqueous Solution" *Journal of Dispersion Science and Technology*, 2018, vol 29, pp. 37–41.
- [22] P. Taylor et al., "Characterization of Surfactant-Diblock Copolymer Interactions and Its Thermodynamic Studies" *Journal of Dispersion Science and Technology*, 2012, vol 33, pp. 792-798.
- [23] J. Kowal, D. Wu, V. Mikhalevich, C. G. Palivan, and W. Meier, "Hybrid Polymer – Lipid Films as Platforms for Directed Membrane Protein Insertion," *Langmuir*, 2015.
- [24] A. K. Khan, J. C. S. Ho, S. Roy, B. Liedberg, and M. Nallani, "Facile Mixing of Phospholipids Promotes Biodegradable Block Co-Polymers into Functional Vesicular Architectures," *Polymers*, 2020, vol 12(979), pp.1-18.
- [25] Q. Wang, Z. Gao, S. Liu, B. Fan, L. Kang, and W. Huang, "Biomaterials Hybrid polymeric micelles based on bioactive polypeptides as pH-responsive delivery systems against melanoma," *Biomaterials*, 2014, vol. 35(25), pp. 7008–7021.
- [26] N. Ko, "Soft Matter Structure and thermodynamics of mixed polymeric micelles with crystalline cores: tuning properties via co-assembly," *The Royal Society of Chemistry*, 2019,
- [27] "An Introduction to Fluorescence Spectroscopy." Pekin Elmer, Buckinghamshire, 2000
- [28] Y. Baimark and M. Srisa-ard, "Preparation of nanoparticle colloids of methoxy poly (ethylene glycol) - *b* -poly (D, L -lactide): effects of surfactant and organic solvent," *Colloid Polymer Science*, 2007, vol 285 pp. 1521–1525.
- [29] Q. Jadoon et al., "Interaction of surfactants with block-copolymer systems in the presence of Hofmeister anions.," *Materials Research Express*, 2017, vol 4.
- [30] N. Pippa, D Stellas, A Skandalis, S Pispas, C Demetzos, M Libera, A Marcinkowski, B Trzebicka, "Chimeric lipid/block copolymer nanovesicles: physico-chemical and biocompatibility evaluation" *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2016.
- [31] N. Pippa, E. Kaditi, S. Pispas, and C. Demetzos, "PEO-*b*-PCL–DPPC chimeric nanocarriers: self-assembly aspects in aqueous and biological media and drug incorporation," *The Royal Society of Chemistry*, 2013.

- [32] L.Xu, "Application of poly(ethylene-glycol)-distearoylphosphatidylethanolamine (PEG-DSPE) block copolymers and their derivatives as nanomaterials in drug delivery," *International Journal of Nanomedicine*, 2012, vol 7, pp. 4185–4198.
- [33] M. Lujan and L. Alamos, "In Vitro Characterization of PEGylated Phospholipid Micelles for Improved Drug Solubilization: Effects of PEG Chain Length and PC Incorporation," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2004, vol. 93, no. 10, pp. 2476–2487.
- [34] R. Jangde and D. Singh, "Preparation and optimization of quercetin-loaded liposomes for wound healing, using response surface methodology," *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, pp. 1–7, 2014.
- [35] H. Zhang, "Chapter 2 Thin-Film Hydration Followed by Extrusion Method for Liposome Preparation," *Liposomes: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, 2017, vol. 1522, pp. 17–22.
- [36] Z. Ahmad, A. Shah, K. Pakhtunkhwa, and H. B. Kraatz, "RSC Advances," no. April, 2014.
- [37] Y. Niu, H. Ma, M. Wang, S. Hu, and H. Li, "Thin-film hydration preparation method and stability test of DOX-loaded disulfide-linked polyethylene glycol 5000-lysine-di-tocopherol succinate nano micelles" *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014, pp. 1-7