



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΙΙΙ: ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΤΩΝ ΥΛΙΚΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΚΤΙΝΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ

Ελευθερίου Κλεοπάτρα

Φαρμακοποιός

**ΘΕΡΜΟΕΥΑΙΣΘΗΤΑ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ: ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ, ΑΝΑΠΤΥΞΗ
ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ**

Διδακτορική Διατριβή

Αθήνα, 2021



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΙΙΙ: ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΤΩΝ ΥΛΙΚΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΚΤΙΝΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Ι. Αναστασοπούλου, Καθηγήτρια ΕΜΠ, Επιβλέπουσα

Δ. Τσιούρβας, Ερευνητής Α' ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος

Μ. Κουή, Καθηγήτρια ΕΜΠ

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Ι. Αναστασοπούλου, Καθηγήτρια ΕΜΠ, Επιβλέπουσα

Μ. Κουή, Καθηγήτρια ΕΜΠ

Δ. Τσιούρβας, Ερευνητής Α' ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος

Σ. Χαμηλάκης, Καθηγητής ΕΜΠ

Α. Καραντώνης, Αν. Καθηγητής ΕΜΠ

Μ. Ράλλης, Αν. Καθηγητής, ΕΚΠΑ

Φ. Τσόπελας, Επ. Καθηγητής ΕΜΠ

Η διατριβή εγκρίθηκε την 4η Μαΐου 2022

Η έγκριση της Διδακτορικής διατριβής από την Ανώτατη Σχολή Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ. Πολυτεχνείου δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα (Ν.5343/1932, αρ.202).

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ολοκληρώνοντας την παρούσα διδακτορική διατριβή, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κ. Αναστασοπούλου Ιωάννα για την καθοδήγηση, την υποστήριξη, τη βοήθεια και την συμπαράστασή της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας αυτής. Η αμέριστη κατανόηση που έδειξε καθ' όλη την πορεία της παρούσας εργασίας υπήρξε για εμένα πολύτιμη και αποτέλεσε κίνητρο για την ολοκλήρωση της διατριβής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια και μέλος της τριμελούς επιτροπής, κ. Κουή για την τιμή που μου έκανε να είναι μέλος της εξεταστικής επιτροπής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ολόψυχα τον ερευνητή Α' Δρ. Τσιούρβα Δημήτρη για την επίβλεψη, την αστείρευτη κατανόηση, τη βοήθεια και την υπομονή του, καθώς και την ερευνήτρια Α' Δρ Σιδεράτου Ωραιοζήλη για τις πολύτιμες συμβουλές, την υποστήριξη και τη βοήθειά της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής.

Θα ήθελα τελειώνοντας να ευχαριστήσω όλους τους ανθρώπους που στην πορεία αυτή γνώρισα και συνεργάστηκα, καθώς και για την πολύτιμη βοήθειά τους. Τους διδάκτορες Παναγιωτάκη Κατερίνα, Θανάσσουλα Άγγελο, Αρκά Μιχάλη, Νικολέττα Στεργιώτη, Αρχοντία Καμινάρη και ιδιαιτέρως τον Δρ. Παλαιό Κωνσταντίνο, γιατί χωρίς την συμβολή τους δεν θα τα είχα καταφέρει.

Αφιερώνω την παρούσα διδακτορική διατριβή στον πατέρα μου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	19
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	20
SUMMARY	22
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	24
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ	28
1.1 Εισαγωγή στα λιποσώματα	28
1.1.1 Δομή και μορφολογία των λιποσωμάτων	30
1.1.2 Κατηγορίες λιποσωμάτων με βάση τη λιπιδική τους σύσταση	31
1.1.3 Μικτά λιποσώματα	33
1.2 Τεχνικές παρασκευής	34
1.3 Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός λιποσωμάτων	36
1.4 Πλεονεκτήματα λιποσωμάτων	37
1.5 Ιδιότητες και εφαρμογές λιποσωμάτων	37
1.6 Σταθερότητα λιποσωμάτων	38
1.6.1 Φυσική σταθερότητα	39
1.6.2 Χημική σταθερότητα	40
1.6.3 Βιολογική σταθερότητα	40
1.6.4 Προστατευτική κάλυψη λιποσωμάτων	41
1.7 Θερμική συμπεριφορά και μεταπτώσεις των λιποσωμάτων	43
1.8 Λιποσώματα ως συστήματα χορήγησης και ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμακευτικών ουσιών	46

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΘΕΡΜΟΕΥΑΙΣΘΗΤΑ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ	49
2.1 Εισαγωγή	49
2.2 Η επίδραση των λυσολιπιδίων στην διαπερατότητα των διπλοστοιβάδων	52
2.3 Καρκίνος	53
2.3.1 Θεραπείες καρκίνου	54
2.3.2 Λιποσώματα στην θεραπεία του καρκίνου	56
2.3.3 Βιοδραστικά λυσολιπίδια	57
2.3.4 Στοχευμένες θεραπείες, υπερθερμία, λιποσώματα στην θεραπεία του καρκίνου με υπερθερμία	59
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	61
3.1 Αντιδραστήρια και διαλύτες	62
3.2 Όργανα-Συσκευές	63
3.3 Ανάπτυξη θερμοευαίσθητων λιποσωμάτων και εγκλεισμός υδατοδιαλυτών ουσιών	65
3.3.1 Παρασκευή λιποσωμάτων και εγκλεισμός της 5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνης	65
3.3.2 Παρασκευή λιποσωμάτων σύστασης DPPC/DSPE-PEG/λυσολιπίδια (96:4:5)	67
3.3.3 Παρασκευή λιποσωμάτων σύστασης DPPC/DSPE-PEG/λυσολιπίδια (96:4:10)	67
3.3.4 Παρασκευή λιποσωμάτων και εγκλεισμός δοξορουβικίνης	68
3.4 Τεχνικές και μέθοδοι χαρακτηρισμού των λιποσωμάτων με εγκλεισμένες υδατοδιαλυτές ουσίες	70
3.4.1 Μελέτη των μεγεθών των λιποσωμάτων με τη μέθοδο της Δυναμικής Σκέδασης του Φωτός	70
3.4.2 Μελέτη των φορτίων των λιποσωμάτων με προσδιορισμό του ζ-δυναμικού	73

3.4.3 Χαρακτηρισμός των λιποσωμάτων με τη μέθοδο της Διαφορικής Μικροθερμιδομετρίας Σάρωσης	75
3.4.4 Χαρακτηρισμός των λιποσωμάτων με τη μέθοδο της διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης νε διαμόρφωση θερμοκρασίας	76
3.4.5 Προσδιορισμός του ποσοστού εγκλεισμού με τη μέθοδο της φθορισμομετρίας	77
3.4.6 Κυτταροκαλλιέργειες	78
3.4.7 Μελέτες μικροσκοπίας φθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας	79
3.4.8 Κυτταρομετρία ροής	80
3.4.9 Μελέτη <i>in vitro</i> κυτταροτοξικότητας με την μέθοδο MTT	80
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	83
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΜΟΝΟΣΤΟΙΒΑΔΙΚΩΝ ΘΕΡΜΟΕΥΑΙΣΘΗΤΩΝ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ	83
4.1 Μέγεθος και κατανομή μεγέθους μονοστοιβαδικών θερμοευαίσθητων λιποσωμάτων	83
4.2 Μετρήσεις ζ-δυναμικού	84
4.3 Θερμοκρασία κύριας μετάβασης	85
4.3.1 Θερμογραφήματα λιποσωμάτων σύστασης DPPC:DSPE-PEG:λυσολιπιδίων 16 ατόμων άνθρακα	85
4.3.2 Θερμογραφήματα λιποσωμάτων σύστασης DPPC:DSPE-PEG:λυσολιπιδίων 18 ατόμων άνθρακα	88
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΜΕΛΕΤΗ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ 5(6)-ΚΑΡΒΟΞΥΦΛΟΥΟΡΕΣΚΕΙΝΗΣ	91
5.1 Μελέτη θερμικής σταθερότητας λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG:λυσολιπιδίων	91
5.1.1 Λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG που περιέχουν σε ποσοστό 5 mol% λυσολιπίδια με 16 άτομα άνθρακα στην ανθρακική τους αλυσίδα	91
5.1.2 Λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG που περιέχουν σε ποσοστό 10 mol% λυσολιπίδια με 16 άτομα άνθρακα στην ανθρακική τους αλυσίδα	96

5.1.3 Λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG που περιέχουν 5 mol% λυσολιπιδίων με 18 άτομα άνθρακα στην ανθρακική τους αλυσίδα	99
5.2 Συγκριτική μελέτη θερμικής σταθερότητας μεταξύ λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG που περιέχουν μονοάκτυλο λιπίδια διαφορετικής χημικής δομής	103
5.2.1 Συγκριτική μελέτη θερμικής σταθερότητας μεταξύ λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG που περιέχουν σε ποσοστό 5 ή 10 mol% μονοάκτυλο λιπίδια που φέρουν 16 άτομα άνθρακα στη ανθρακική τους αλυσίδα	103
5.2.2 Συγκριτική μελέτη θερμικής σταθερότητας μεταξύ λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG που περιέχουν σε ποσοστό 5 mol% μονοάκτυλο λιπίδια που φέρουν με 18 άτομα άνθρακα στη ανθρακική τους αλυσίδα	109
5.3 Μελέτη του ρυθμού αποδέσμευσης της 6-CF συναρτήσει της θερμοκρασίας	110
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΘΕΡΜΟΕΥΑΙΣΘΗΤΩΝ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ ΜΕ ΕΓΚΛΕΙΣΜΕΝΗ ΔΟΞΟΡΟΥΒΙΚΙΝΗ	114
6.1 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά μονοστοιβαδικών θερμοευαίσθητων λιποσωμάτων με εγκλεισμένη δοξορουβικίνη που φέρουν μονοάκτυλο λιπίδια με 16 άτομα άνθρακα στη ανθρακική τους αλυσίδα	114
6.1.1 Μέγεθος και κατανομή μεγέθους	114
6.1.2 Μετρήσεις ζ-δυναμικού	115
6.1.3 Θερμοδυναμικές παράμετροι	115
6.2 Μελέτη του ρυθμού απελευθέρωσης της δοξορουβικίνης (DOX) από μονοστοιβαδικά θερμοευαίσθητα λιποσώματα που φέρουν μονοάκτυλο λιπίδια με 16 άτομα άνθρακα στη ανθρακική τους αλυσίδα	120
6.3 Συγκριτική μελέτη αποδέσμευσης της DOX μεταξύ λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG που φέρουν διαφορετικά μονοάκτυλο λιπίδια με 16 άτομα άνθρακα στη ανθρακική τους αλυσίδα	125
6.4 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά μονοστοιβαδικών θερμοευαίσθητων λιποσωμάτων με εγκλεισμένη δοξορουβικίνη που φέρουν μονοάκτυλο λιπίδια με 18 άτομα άνθρακα στη ανθρακική τους αλυσίδα	128
6.4.1 Μέγεθος και κατανομή μεγέθους	128
6.4.2 Μετρήσεις επιφανειακού φορτίου	129
6.4.3 Θερμοδυναμικές παράμετροι	130

<i>6.5 Μελέτη του ρυθμού απελευθέρωσης της δοξορουβικίνης (DOX) από μονοστοιβαδικά θερμοευαίσθητα λιποσώματα που φέρουν μονοάλκυλο λιπίδια με 18 άτομα άνθρακα στη ανθρακική τους αλυσίδα</i>	133
<i>6.6 In vitro μελέτη θερμοευαίσθητων λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF στα οποία έχει εγκλεισθεί δοξορουβικίνη</i>	143
6.6.1 <i>Ενδοκυτταρική πρόσληψη</i>	143
6.6.2 <i>Κυτταρομετρία ροής</i>	151
6.6.3 <i>Μελέτη κυτταροτοξικότητας</i>	152
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	156
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	158
ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ	159
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	160
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΩΝ	173

ΕΙΚΟΝΕΣ

- Εικόνα 1.** Τυπική δομή αμφίφιλου μορίου. 28
- Εικόνα 2.** Σχηματική παράσταση μονοστοιβαδικού λιποσώματος. 29
- Εικόνα 3.** Κατάταξη των λιποσωμάτων με βάση το μέγεθος και τον αριθμό των στοιβάδων τους. 30
- Εικόνα 4.** Μη ανιχνεύσιμο (*stealth*) στερεοχημικά σταθεροποιημένο λιπόσωμα. Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται οι ομάδες της πολυαιθυλενογλυκόλης. 32
- Εικόνα 5.** Βασικά στάδια παρασκευής λιποσωμάτων LUV = Μεγάλα μονοστοιβαδικά λιποσώματα SUV = Μικρά μονοστοιβαδικά λιποσώματα 33
- Εικόνα 6.** Μέθοδος ενυδάτωσης λεπτού λιπιδικού υμενίου προς παρασκευή λιποσωμάτων. 34
- Εικόνα 7.** Σχηματική παράσταση των θέσεων εγκλεισμού της δραστηκής ουσίας στα λιποσώματα, ανάλογα με την πολικότητα της. 38
- Εικόνα 8.** Σχηματική παράσταση των φάσεων των διπλοστοιβάδων που αποτελούνται από φωσφατιδυλοχολίνη (PC) σε υδατικό διάλυμα: α. κρυσταλλική (*subgel*, L_C) και κρυσταλλική (*subgel*, L_C') όπου οι αλειφατικές αλυσίδες είναι είτε κάθετες ή υπό γωνία ως προς το επίπεδο της στοιβάδας, αντίστοιχα. β. Γέλη (*gel*, L_B) και γέλη (*gel*, L_B') όπου οι αλειφατικές αλυσίδες είναι είτε κάθετες ή υπό γωνία ως προς το επίπεδο της στοιβάδας αντίστοιχα. γ. Πτυχωτή γέλη (*rippled gel* P_B') και δ. υγρή κρυσταλλική φάση (*liquid crystal*, L_a). 43
- Εικόνα 9.** Σχηματική παράσταση των τρόπων με τους οποίους τα λειτουργικά λιποσώματα αλληλεπιδρούν με τα κύτταρα και απελευθερώνουν την δραστηκή ουσία σε αυτά. Μετά την προσκόλληση των λιποσωμάτων στην επιφάνεια των κυττάρων: Α: διασπώνται οι διπλοστοιβάδες τους και απελευθερώνουν την φαρμακευτική ουσία η οποία με διάχυση περνά στο εσωτερικό των κυττάρων, Β: οι διπλοστοιβάδες των λιποσωμάτων και των κυττάρων συντήκονται και η φαρμακευτική ουσία περνά κατευθείαν στο εσωτερικό των τελευταίων, Γ: τα λιποσώματα υφίστανται ενδοκύτωση μέσω κυστιδίων τα οποία είναι καλυμμένα με κλαθρίνη (i-ii). Ακολούθως απομακρύνεται η κλαθρίνη (iii) και τα κυστίδια συντήκονται με λυσοσώματα (iv) και ακολουθεί διάσπαση των λιποσωματικών διπλοστοιβάδων και απελευθέρωση της δραστηκής ουσίας (v), Δ: Τα λιποσώματα υπόκεινται σε φαγοκύτωση. 48
- Εικόνα 10.** Διάγραμμα ροής του πειραματικού μέρους της διατριβής. 62
- Εικόνα 11.** Χημική δομή των λιπιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. 66
- Εικόνα 12.** Σχηματική αναπαράσταση της στοιβάδας Stern και της ιοντικής διπλοστοιβάδας. 73

ΣΧΗΜΑΤΑ

- Σχήμα 1.** Μέγεθος και κατανομή μεγέθους μονοστοιβαδικών θερμοευαίσθητων λιποσωμάτων που περιέχουν 5 mol% (A) ή 10 mol% (B) λυσολιπίδια με 16 άτομα άνθρακα στη λιπιδική τους διπλοστοιβάδα ή 5 mol% λυσολιπίδια με 18 άτομα άνθρακα στη λιπιδική τους διπλοστοιβάδα (Γ). 84
- Σχήμα 2.** Θερμογραφήματα λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG και θερμοευαίσθητων μονοστοιβαδικών λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG τα οποία περιέχουν επιπλέον μονοάλκυλο φωσφολιπίδια με 16 άτομα άνθρακα σε ποσοστό 5 mol% (A) ή 10 mol% (B). Ο ρυθμός σάρωσης θέρμανσης ήταν 10 K/h. 88
- Σχήμα 3.** Θερμογραφήματα λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG και θερμοευαίσθητων μονοστοιβαδικών λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG τα οποία περιέχουν επιπλέον μονοάλκυλο φωσφολιπίδια με 18 άτομα άνθρακα σε ποσοστό 5 mol%. Ο ρυθμός σάρωσης θέρμανσης ήταν 2 K min⁻¹. 90
- Σχήμα 4.** Ποσοστό απελευθέρωσης 6-CF (%) συναρτήσει του χρόνου από μονοστοιβαδικά λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG (μοριακή αναλογία 91:4) σε θερμοκρασιακό εύρος 37 °C έως 43 °C. Οι μετρήσεις ελήφθησαν κάθε 0,2 s κατά τα πρώτα 5 min της περιόδου επώασης, κάθε 1 min έως 10 min και μετά κάθε 2 min. Για λόγους σαφήνειας, οι γραμμές σφάλματος εμφανίζονται μόνο μετά την πρώτη περίοδο των 5 min. 91
- Σχήμα 5.** Ποσοστό απελευθέρωσης της 6-CF (%) συναρτήσει του χρόνου από μονοστοιβαδικά λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:lyso-PAF16 (μοριακή αναλογία 91:4:5) σε θερμοκρασιακό εύρος από 37 °C έως 43 °C. 92
- Σχήμα 6.** Ποσοστό απελευθέρωσης της 6-CF (%) συναρτήσει του χρόνου από μονοστοιβαδικά λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF16 (μοριακή αναλογία 91:4:5) σε θερμοκρασιακό εύρος από 37 °C έως 43 °C. 93
- Σχήμα 7.** Ποσοστό απελευθέρωσης της 6-CF (%) συναρτήσει του χρόνου από μονοστοιβαδικά λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:PAF16 (μοριακή αναλογία 91:4:5) σε θερμοκρασιακό εύρος από 37 °C έως 43 °C. 94
- Σχήμα 8.** Ποσοστό απελευθέρωσης της 6-CF (%) συναρτήσει του χρόνου από μονοστοιβαδικά λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:lyso-PC16 (μοριακή αναλογία 91:4:5) σε θερμοκρασιακό εύρος από 37 °C έως 43 °C. 95
- Σχήμα 9.** Ποσοστό απελευθέρωσης της 6-CF (%) συναρτήσει του χρόνου από μονοστοιβαδικά λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:lyso-PAF16 (μοριακή αναλογία 91:4:10) σε θερμοκρασιακό εύρος από 37 °C έως 43 °C. 96

- Σχήμα 10.** Ποσοστό απελευθέρωσης της 6-CF (%) συναρτήσει του χρόνου από 97
μονοστοιβαδικά λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF16 (μοριακή
αναλογία 91:4:10) σε θερμοκρασιακό εύρος από 37 °C έως 43 °C.
- Σχήμα 11.** Ποσοστό απελευθέρωσης της 6-CF (%) συναρτήσει του χρόνου από 98
μονοστοιβαδικά λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:PAF16 (μοριακή
αναλογία 91:4:10) σε θερμοκρασιακό εύρος από 37 °C έως 43 °C.
- Σχήμα 12.** Ποσοστό απελευθέρωσης της 6-CF (%) συναρτήσει του χρόνου από 99
μονοστοιβαδικά λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:lyso-PC16 (μοριακή
αναλογία 91:4:10) σε θερμοκρασιακό εύρος από 37 °C έως 43 °C.
- Σχήμα 13.** Ποσοστό απελευθέρωσης της 6-CF (%) συναρτήσει του χρόνου από 100
μονοστοιβαδικά λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:lyso-PAF18 (μοριακή
αναλογία 91:4:5) σε θερμοκρασιακό εύρος από 37 °C έως 43 °C.
- Σχήμα 14.** Ποσοστό απελευθέρωσης της 6-CF (%) συναρτήσει του χρόνου από 101
μονοστοιβαδικά λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF18
(μοριακή αναλογία 91:4:5) σε θερμοκρασιακό εύρος από 37 °C έως 43
°C.
- Σχήμα 15.** Ποσοστό απελευθέρωσης της 6-CF (%) συναρτήσει του χρόνου από 102
μονοστοιβαδικά λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:PAF18 (μοριακή
αναλογία 91:4:5) σε θερμοκρασιακό εύρος από 37 °C έως 43 °C.
- Σχήμα 16.** Ποσοστό απελευθέρωσης της 6-CF (%) συναρτήσει του χρόνου από 103
μονοστοιβαδικά λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:lyso-PC18 (μοριακή
αναλογία 91:4:5) σε θερμοκρασιακό εύρος από 37 °C έως 43 °C.
- Σχήμα 17.** Συγκριτικά διαγράμματα αποδέσμευσης της 6-CF (%) από μονοστοιβαδικά 104
λιποσώματα με ενσωματωμένα λυσολιπίδια 16 ατόμων άνθρακα σε
ποσοστό 5 mol% στη λιπιδική διπλοστοιβάδα, συναρτήσει του χρόνου για
τις θερμοκρασίες 37 °C (A), 41 °C (B) και 42 °C (Γ).
- Σχήμα 18.** Συγκριτικά διαγράμματα αποδέσμευσης της 6-CF (%) από μονοστοιβαδικά 105
λιποσώματα με ενσωματωμένα λυσολιπίδια 16 ατόμων άνθρακα σε
ποσοστό 10 mol% στη λιπιδική διπλοστοιβάδα, συναρτήσει του χρόνου για
τις θερμοκρασίες 37 °C (A), 41 °C (B) και 42 °C (Γ).
- Σχήμα 19.** Συγκριτικά διαγράμματα αποδέσμευσης της 6-CF (%) από μονοστοιβαδικά 110
λιποσώματα με ενσωματωμένα λυσολιπίδια (C18) σε ποσοστό 5 mol%
στη λιπιδική διπλοστοιβάδα, συναρτήσει του χρόνου για τις θερμοκρασίες
37 °C ((A), 41 °C (B) και 42 °C (Γ).)

- Σχήμα 20.** Ρυθμός αποδέσμευσης της 6-CF (%) συναρτήσει της θερμοκρασίας (37-43 °C) από λιποσώματα σύστασης DPPC:DSPE-PEG και λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG με ενσωματωμένα μονοάλκυλο λιπίδια που φέρουν 16 άτομα άνθρακα στη ανθρακική τους αλυσίδα σε ποσοστό 5 mol% (A), σε ποσοστό 10 mol% (B) και με λυσολιπίδια που φέρουν 18 άτομα άνθρακα, σε ποσοστό 5 mol% (Γ). 111
- Σχήμα 21.** Μέγεθος και κατανομή μεγέθους μονοστοιβαδικών θερμοευαίσθητων λιποσωμάτων που περιέχουν λιπίδια με 16 άτομα άνθρακα και με εγκλεισμένη δοξορουβικίνη. 114
- Σχήμα 22.** Θερμογραφήματα λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG και θερμοευαίσθητων μονοστοιβαδικών λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG τα οποία περιέχουν επιπλέον μονοάλκυλο φωσφολιπίδια με 16 άτομα άνθρακα στην ανθρακική τους αλυσίδα σε ποσοστό 5 mol% (αιθερολιπίδια) και 10 mol% (lyso-PC) κατά τη διάρκεια του πρώτου κύκλου θέρμανσης. A: κενοί λιποσωμακοί φορείς, B: λιποσωμακοί φορείς με εγκλεισμένη δοξορουβικίνη. Ο ρυθμός σάρωσης θέρμανσης ήταν 2 K min⁻¹. 116
- Σχήμα 23.** Θερμογραφήματα λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG και θερμοευαίσθητων μονοστοιβαδικών λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG τα οποία περιέχουν επιπλέον μονοάλκυλο φωσφολιπίδια με 16 άτομα άνθρακα στην ανθρακική τους αλυσίδα σε ποσοστό 5 mol% (αιθερολιπίδια) και 10 mol% (lyso-PC) κατά τη διάρκεια του δεύτερου κύκλου θέρμανσης. A: κενοί λιποσωμακοί φορείς, B: λιποσωμακοί φορείς με εγκλεισμένη δοξορουβικίνη. Ο ρυθμός σάρωσης θέρμανσης ήταν 2 K min⁻¹. 117
- Σχήμα 24.** Θερμογραφήματα modulated DSC της αντιστρέψιμης διαδικασίας μετάβασης (A, B) και της μη αντιστρέψιμης διαδικασίας μετάβασης (A', B') λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG και θερμοευαίσθητων λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG με ενσωματωμένα 5 mol% αιθερολιπίδια ή 10 mol% lyso-PC κατά τον πρώτο κύκλο θέρμανσης. A και A': κενοί λιποσωμακοί φορείς, B και B': λιποσωμακοί φορείς με εγκλεισμένη δοξορουβικίνη. Ο ρυθμός σάρωσης ήταν 2 K min⁻¹. 119
- Σχήμα 25.** Ποσοστό απελευθέρωσης της DOX συναρτήσει του χρόνου από μονοστοιβαδικά λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG (μοριακή αναλογία 91:4) σε θερμοκρασιακό εύρος από 37 °C έως 43 °C. 121
- Σχήμα 26.** Ποσοστό απελευθέρωσης της DOX συναρτήσει του χρόνου από μονοστοιβαδικά λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:lyso-PAF16 (μοριακή αναλογία 91:4:5) σε θερμοκρασιακό εύρος από 37 °C έως 43 °C. 122

- Σχήμα 27.** Ποσοστό απελευθέρωσης της DOX συναρτήσει του χρόνου από 123
μονοστοιβαδικά λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF16 (μοριακή
αναλογία 91:4:5) σε θερμοκρασιακό εύρος από 37 °C έως 43 °C.
- Σχήμα 28.** Ποσοστό απελευθέρωσης της DOX συναρτήσει του χρόνου από 124
μονοστοιβαδικά λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:lyso-PC16 (μοριακή
αναλογία 91:4:10) σε θερμοκρασιακό εύρος από 37 °C έως 43 °C.
- Σχήμα 29.** Ποσοστό απελευθέρωσης της DOX συναρτήσει του χρόνου από 125
μονοστοιβαδικά λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:PAF16 (μοριακή
αναλογία 91:4:5) σε θερμοκρασιακό εύρος από 37 °C έως 43 °C.
- Σχήμα 30.** Συγκριτικά διαγράμματα αποδέσμευσης της DOX από μονοστοιβαδικά 126
λιποσώματα με ενσωματωμένα λυσολιπίδια (C16) σε ποσοστό 5 mol%
(αιθερολιπίδια) ή 10 mol% lyso-PC στη λιπιδική διπλοστοιβάδα,
συναρτήσει του χρόνου για τις θερμοκρασίες 37 °C (Α), 41 °C (Β) και 42
°C (Γ).
- Σχήμα 31.** Μέγεθος και κατανομή μεγέθους κενών λιποσωματικών φορέων (Α) και 129
λιποσωματικών φορέων με εγκλεισμένη DOX (Β).
- Σχήμα 32.** Θερμογραφήματα μονοστοιβαδικών θερμοευαίσθητων λιποσωμάτων 131
DPPC:DSPE-PEG και θερμοευαίσθητων μονοστοιβαδικών
λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG τα οποία περιέχουν επιπλέον
μονοάλκυλο λιπίδιο (5 mol%) σε διάλυμα ρυθμιστικού PBS, κατά τη
διάρκεια του 1^{ου} κύκλου θέρμανσης. Ο ρυθμός θέρμανσης ήταν 2 K min⁻¹.
- Σχήμα 33.** Ποσοστό απελευθέρωσης της DOX από μονοστοιβαδικά λιποσώματα 134
στους 37 °C. Οι μετρήσεις ελήφθησαν κάθε 0,2 s για τα πρώτα 5 min της
επώασης, κάθε 0,5 s μέχρι τα 10 min και εν συνεχεία κάθε 1 min.
- Σχήμα 34.** Ποσοστό απελευθέρωσης της DOX από μονοστοιβαδικούς λιποσωματικούς 135
φορείς στους 41 °C (Α) και τους 42 °C (Β). Οι μετρήσεις ελήφθησαν κάθε
0,2 s για τα πρώτα 5 min της επώασης, κάθε 0,5 s μέχρι τα 10 min και εν
συνεχεία κάθε 1 min.
- Σχήμα 35.** Ποσοστό απελευθέρωσης της DOX από μονοστοιβαδικούς λιποσωματικούς 136
φορείς στους 40 °C. Οι μετρήσεις ελήφθησαν κάθε 0,2 s για τα πρώτα 5
min της επώασης, κάθε 0,5 s μέχρι τα 10 min και εν συνεχεία κάθε 1 min.
- Σχήμα 36.** Ποσοστό απελευθέρωσης της 6-CF από μονοστοιβαδικά λιποσώματα που 137
περιέχουν 5 mol% λυσολιπίδια με 18 άτομα άνθρακα στους 41 °C (Α) και
τους 42 °C (Β).

- Σχήμα 37.** Ποσοστό απελευθέρωσης της DOX συναρτήσει της θερμοκρασίας για μονοστοιβαδικά λιποσώματα μετά από 15 min (A) ή 30 min (B) χρόνο επώασης για θερμοκρασίες από 37 °C έως 43 °C. 138
- Σχήμα 38.** Ποσοστό απελευθέρωσης της DOX από μονοστοιβαδικά θερμοευαίσθητα λιποσώματα σύστασης DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF (μοριακή αναλογία 91:4:5), παρουσία τροφικού μέσου (DMEM + 10% FBS), για θερμοκρασίες από 37-43 °C (A) και σε διαφορετικές χρονικές στιγμές (B). 140
- Σχήμα 39.** Ποσοστό απελευθέρωσης της DOX συναρτήσει της θερμοκρασίας σε μέσο κυτταρικής καλλιέργειας (DMEM + 10% FBS) από μη-θερμοευαίσθητο φορέα σύστασης DPPC:DSPE-PEG και από θερμοευαίσθητα μονοστοιβαδικά λιποσώματα που περιέχουν 5 mol% είτε methyl-PAF είτε lyso-PC, μετά από τα πρώτα 5 min (A), 15 min (B) και 30 min (Γ) χρόνου επώασης σε διάφορες θερμοκρασίες από 37 °C έως 43 °C. 142
- Σχήμα 40.** Εικόνες επιφθορισμού και οι αντίστοιχες εικόνες οπτικής μικροσκοπίας αντίθεσης φάσης κυττάρων DU145 που επώαστηκαν στους 37 °C για 2 h (1^η σειρά) και 4 h (2^η σειρά) με λιποσώματα σύστασης DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF18 με εγκλεισμένη DOX. Συγκέντρωση DOX 5 μM, χρόνος έκθεσης εικόνας φθορισμού 10 s. Στη τρίτη στήλη φαίνεται το ακριβές πρωτόκολλο επώασης που χρησιμοποιείται, δηλαδή η θερμοκρασία σε °C και η περίοδος επώασης σε παρένθεση. 144
- Σχήμα 41.** Εικόνες επιφθορισμού και οι αντίστοιχες εικόνες οπτικής μικροσκοπίας αντίθεσης φάσης κυττάρων DU145 που επώαστηκαν με λιποσώματα σύστασης DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF18 με εγκλεισμένη DOX στους 40 °C για 1 h (1^η σειρά) ή στους 40 °C για 1 h και ακολούθως για 3 h στους 37 °C (2^η σειρά). Συγκέντρωση DOX 5 μM, χρόνος έκθεσης εικόνας φθορισμού 2 s. Στη τρίτη στήλη φαίνεται το ακριβές πρωτόκολλο επώασης που χρησιμοποιείται, δηλαδή η θερμοκρασία σε °C και η περίοδος επώασης σε παρένθεση. 145
- Σχήμα 42.** Εικόνες επιφθορισμού και οι αντίστοιχες εικόνες οπτικής μικροσκοπίας αντίθεσης φάσης κυττάρων DU145 που επώαστηκαν με λιποσώματα σύστασης DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF18 με εγκλεισμένη DOX στους 37 °C για 1h και ακολούθως στους 40 °C για 1 h (1^η σειρά) ή μετά από επώαση για 1 h στους 37 °C, ακολούθως για 1 h στους 40 °C και επιπλέον για 2 h στους 37 °C (2^η σειρά), ή μετά από επώαση στους 37 °C για 2 h και ακολούθως στους 40 °C για 1 h (3^η σειρά) ή μετά από επώαση 146

για 2 h στους 37 °C, ακολούθως για 1 h στους 40 °C και επιπλέον για 1 h στους 37 °C (4^η σειρά). Συγκέντρωση DOX 5 μM, χρόνος έκθεσης εικόνας φθορισμού 2 s. Στη τρίτη στήλη φαίνεται το ακριβές πρωτόκολλο επώασης που χρησιμοποιείται, δηλαδή η θερμοκρασία σε °C και η περίοδος επώασης σε παρένθεση.

- Σχήμα 43.** Εικόνες επιφθορισμού και οι αντίστοιχες εικόνες οπτικής μικροσκοπίας αντίθεσης φάσης κυττάρων PC3 που επωάστηκαν με λιποσώματα σύστασης DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF18 με εγκλεισμένη DOX στους 40 °C για 1 h (1^η σειρά) ή μετά από επώαση στους 37 °C για 3 h (2^η σειρά). Συγκέντρωση DOX 5 μM, χρόνος έκθεσης εικόνας φθορισμού 1 s. Στη τρίτη στήλη φαίνεται το ακριβές πρωτόκολλο επώασης που χρησιμοποιείται, δηλαδή η θερμοκρασία σε °C και η περίοδος επώασης σε παρένθεση. 147
- Σχήμα 44.** Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας και η επικάλυψή τους με εικόνες φωτεινού πεδίου κυττάρων DU145 που επωάστηκαν στους 37 °C για 2 h με ελεύθερη DOX (1^η σειρά, ισχύς λέιζερ 2,5%) ή με λιποσώματα σύστασης DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF18 με εγκλεισμένη DOX για 1 h στους 40 °C και ακολούθως για 1 h στους 37 °C (2^η σειρά: ισχύς λέιζερ 2,5%, 3^η σειρά: ισχύς λέιζερ 10%). Στη τρίτη στήλη φαίνεται το ακριβές πρωτόκολλο επώασης που χρησιμοποιείται, δηλαδή η θερμοκρασία σε °C, η περίοδος επώασης σε παρένθεση και η ισχύς του λέιζερ. 148
- Σχήμα 45.** Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας και η επικάλυψή τους με εικόνες φωτεινού πεδίου κυττάρων PC3 που επωάστηκαν στους 37 °C για 2 h με ελεύθερη DOX (1^η σειρά, ισχύς λέιζερ 2,5%) ή με λιποσώματα σύστασης DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF18 με εγκλεισμένη DOX για 1 h στους 40 °C και ακολούθως για 1 h στους 37 °C (2^η σειρά: ισχύς λέιζερ 2,5%, 3^η σειρά: ισχύς λέιζερ 10%). Στη τρίτη στήλη φαίνεται το ακριβές πρωτόκολλο επώασης που χρησιμοποιείται, δηλαδή η θερμοκρασία σε °C, η περίοδος επώασης σε παρένθεση και η ισχύς του λέιζερ. 149
- Σχήμα 46.** Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού και επικάλυψη αυτών με εικόνες φωτεινού πεδίου κυττάρων DU145 που επωάστηκαν στους 40 °C για 1 h είτε με ελεύθερη DOX (1^η σειρά) ή με λιποσώματα σύστασης DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF18 με εγκλεισμένη DOX (2^η σειρά). Τρισδιάστατες ψηφιακά ανακατασκευασμένες εικόνες πυρήνων DU145 κυττάρων (3^η σειρά) που επωάστηκαν με λιποσώματα σύστασης DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF18 με εγκλεισμένη DOX για 1 h στους 37 150

°C (αριστερά) ή στους 40 °C (δεξιά). Συγκέντρωση DOX 5 μM. Στη δεύτερη και τέταρτη στήλη φαίνεται το ακριβές πρωτόκολλο επώασης που χρησιμοποιείται, δηλαδή η θερμοκρασία σε °C, η περίοδος επώασης σε παρένθεση και η ισχύς του λέιζερ.

Σχήμα 47. Ποσοτική ανάλυση της μέσης έντασης φθορισμού της DOX σε πειράματα 151
κυτταρομετρίας ροής με καρκινικά κύτταρα προστάτη DU145 και PC3 που επώαστηκαν με ελεύθερη DOX ή με λιποσωμακή DOX σε λιποσώματα σύστασης DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF18 στους 37 ή 40 °C. Συγκέντρωση DOX: 5 μM, χρόνος επώασης 1 h.

Σχήμα 48. Συγκριτική βιωσιμότητα κυττάρων ελεύθερης (μη εγκλεισμένης) DOX, 154
methyl-PAF18 (mPAF) και του συνδυασμού τους (DOX/methyl-PAF18) καθώς και των αντίστοιχων θερμοευαίσθητων λιποσωμακών σκευασμάτων τους, μετά από επώαση κυττάρων PC3 (A) στους 37 °C για 4 h συνολικά, (B) στους 40 °C για 1 h ακολουθούμενη από μια επιπλέον περίοδο 3 h στους 37 °C, ή (Γ) στους 37 °C για 1, στους 40 °C για 1 h και ακολούθως για 2 h στους 37 °C. Η κυτταρική επιβίωση (%) προσδιορίστηκε με δοκιμασία MTT, 24 h μετά την επώαση. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με Student's t-test, όπου: * $p < 0,05$ και ** $p < 0,01$.

ΠΙΝΑΚΕΣ

- Πίνακας 1.** Θερμοδυναμικές παράμετροι (T_m , $\Delta T_{1/2}$) της κύριας μετάβασης φάσης λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG και των θερμοευαίσθητων μονοστοιβαδικών λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG τα οποία περιέχουν επιπλέον μονοάλκυλο φωσφολιπίδια με 16 άτομα άνθρακα (C16), όπως λαμβάνονται κατά τη διάρκεια της δεύτερης διαδικασίας θέρμανσης. Για σύγκριση, οι παράμετροι που λαμβάνονται κατά τη διάρκεια της πρώτης διαδικασίας θέρμανσης παρουσιάζονται σε παρενθέσεις. 87
- Πίνακας 2.** Θερμοδυναμικές παράμετροι (T_m , $\Delta T_{1/2}$) της κύριας μετάβασης φάσης λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG και των θερμοευαίσθητων μονοστοιβαδικών λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG τα οποία περιέχουν επιπλέον μονοάλκυλο φωσφολιπίδια με 18 άτομα άνθρακα (C18), όπως λαμβάνονται κατά τη διάρκεια της πρώτης και δεύτερης διαδικασίας θέρμανσης. 90
- Πίνακας 3.** Ποσοστιαία απελευθέρωση της 6-CF από τους λιποσωματικούς θερμοευαίσθητους φορείς, μετά από επώαση στους 37 °C για 24 h. 106
- Πίνακας 4.** Σταθερές ρυθμού απελευθέρωσης, k , της 6-CF από θερμοευαίσθητα λιποσώματα που επώαστηκαν στους 41 °C και η συνολική (%) απελευθέρωση της 6-CF στην ίδια θερμοκρασία μέσα στα πρώτα 30 min. Για τον υπολογισμό της k ελήφθησαν υπ' όψη τα πρώτα 2 min των προφίλ απελευθέρωσης. 108
- Πίνακας 5.** Παράμετροι DSC (T_m , $\Delta T_{1/2}$) της κύριας μετάβασης φάσης λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG και των θερμοευαίσθητων μονοστοιβαδικών λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG τα οποία περιέχουν επιπλέον μονοάλκυλο φωσφολιπίδια με 16 άτομα άνθρακα (C16), σε ποσοστό 5 mol% (αιθερολιπίδια) και 10 mol% (lyso-PC) όπως λαμβάνονται κατά τη διάρκεια του πρώτου κύκλου θέρμανσης. 116
- Πίνακας 6.** Παράμετροι DSC (T_m , $\Delta T_{1/2}$) της κύριας μετάβασης φάσης λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG και των θερμοευαίσθητων μονοστοιβαδικών λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG τα οποία περιέχουν επιπλέον μονοάλκυλο φωσφολιπίδια με 16 άτομα άνθρακα, σε ποσοστό 5 mol% (αιθερολιπίδια) και 10 mol% (lyso-PC) όπως λαμβάνονται κατά τη διάρκεια του δεύτερου κύκλου θέρμανσης. 118

Πίνακας 7. Απελευθέρωση (%) της DOX από μονοστοιβαδικά λιποσώματα που φέρουν μονοάλκυλο λιπίδια με 16 άτομα άνθρακα στη ανθρακική τους αλυσίδα, μετά από παραμονή για διάστημα 24 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (θ. π.) ή στους 37 °C.	127
Πίνακας 8. Θερμοδυναμικές παράμετροι (T_m και $\Delta T_{1/2}$) της κύριας μετάβασης φάσης λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG και των θερμοευαίσθητων μονοστοιβαδικών λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG, τα οποία περιέχουν επιπλέον μονοάλκυλο λιπίδιο (5 mol%) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS και σε τροφικό μέσο (DMEM + 10% FBS) κατά τη διάρκεια του 1ου και του 2ου κύκλου θέρμανσης.	130
Πίνακας 9. Θερμοδυναμικές παράμετροι (T_m και $\Delta T_{1/2}$) της κύριας μετάβασης φάσης λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG και των θερμοευαίσθητων μονοστοιβαδικών λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG, τα οποία περιέχουν επιπλέον μονοάλκυλο λιπίδιο (5 mol%) και στα οποία έχει εγκλεισθεί DOX, σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS και σε τροφικό μέσο (DMEM + 10% FBS) κατά τη διάρκεια του 1 ^{ου} και του 2 ^{ου} κύκλου θέρμανσης.	132
Πίνακας 10. Απελευθέρωση (%) της DOX σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μετά από 24 h.	134

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Είναι γνωστό ότι ο καρκίνος απασχολεί την ιατρική και ερευνητική κοινότητα από την αρχαιότητα. Ο Ιπποκράτης αναφέρει μεθόδους αντιμετώπισης, όπως η καυτηρίαση και η χρησιμοποίηση ειδικών φαρμακευτικών φυτικών σκευασμάτων. Παρ' όλα αυτά, αν και παρασκευάστηκαν αρκετά αντικαρκινικά φάρμακα όμως τα περισσότερα είτε επηρεάζουν εξ ίσου και τα υγιή κύτταρα, είτε παρουσιάζουν καρδιοτοξικότητα, νεφροτοξικότητα ή άλλες παρενέργειες. Για τους λόγους αυτούς οι επιστήμονες ανέτρεξαν στην αναζήτηση και ανάπτυξη νέων φαρμάκων τα οποία θα δρουν στοχευμένα μόνο στα ασθενή καρκινικά κύτταρα, ενώ θα αφήνουν ανέπαφα τα υγιή κύτταρα.

Στην παρούσα διατριβή επιχειρείται η ανάπτυξη και ο χαρακτηρισμός νέων θερμοευαίσθητων λιποσωμιακών φορέων. Στόχος είναι ο εγκλεισμός στα λιποσώματα αυτά του αντικαρκινικού φαρμάκου δοξορουβικίνη καθώς και η μελέτη της κυτταροστατικής τους δράσης. Οι νέοι θερμοευαίσθητοι φορείς βασίζονται στην δημιουργία λυσολιπιδίων, που λόγω της κατάλληλης χημική τους δομής να είναι δυνατόν να προσδώσει στα λιποσώματα την ικανότητα ελεγχόμενης αποδέσμευσης της δραστικής ουσίας σε συγκεκριμένο στενό θερμοκρασιακό εύρος, ενώ παράλληλα θα έχουν και αντικαρκινική δράση. Για τον λόγο αυτόν επιλέχθηκε η σειρά των αιθερο-λυσολιπιδίων τα οποία εμφανίζουν αντικαρκινική δράση καθώς και επιλεκτικότητα πρόσληψης από ορισμένους καρκινικούς τύπους κυττάρων.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε η επίδραση της ενσωμάτωσης, σε μικρές συγκεντρώσεις (5 και 10 mol %), βιοδραστικών μονοάκυλο λιπιδίων στη διπλοστοιβάδα λιποσωμάτων σύστασης DPPC:DSPE-PEG, ως προς τον ρυθμό και τον βαθμό απελευθέρωσης αρχικά της εγκλεισμένης υδατοδιαλυτής ουσίας, 5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνης (6-CF), και ακολούθως της αντικαρκινικής ουσίας δοξορουβικίνης (DOX). Τα λιπίδια αυτά ανήκουν στην οικογένεια αναλόγων του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (platelet activating factor, PAF). Χαρακτηριστικό των μελετηθέντων μονοάκυλο λιπιδίων είναι ότι φέρουν αιθερικό δεσμό στη θέση sn-2 της γλυκερόλης, σε αντίθεση με τα ευρέως χρησιμοποιούμενα μονοάκυλο λιπίδια που φέρουν εστερικό δεσμό. Όλα τα μονοάκυλο λιπίδια που μελετήθηκαν προσέδωσαν θερμοευαίσθητες ιδιότητες στους λιποσωματικούς φορείς, παρέμειναν δηλαδή σταθερά σε θερμοκρασία 37 °C, ενώ απελευθέρωσαν ταχύτατα και σε υψηλό ποσοστό την εκάστοτε εγκλεισμένη ουσία, όταν η θερμοκρασία πλησίασε τη θερμοκρασία κύριας μετάβασης των λιποσωμάτων (41-42 °C). Όλοι οι λιποσωμακοί φορείς παρέμειναν σταθεροί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για το χρόνο που μελετήθηκαν, ο οποίος ανήλθε στις 24 h.

Ο χαρακτηρισμός των λιποσωμακών φορέων μελετήθηκε με φυσικοχημικές μεθόδους, όπως η μέση υδροδυναμική ακτίνα, η πολυδιασπορά του μεγέθους των λιποσωμακών εναιωρημάτων με χρήση του DLS και το ζ-δυναμικό για όλα τα λιποσωμακά εναιωρήματα. Διαπιστώθηκε ότι οι παράμετροι αυτοί δεν επηρεάζονται από την παρουσία μονοάκυλο λιπιδίων. Η θερμοκρασία της κύριας μετάβασης των λιποσωμάτων, καθώς και το εύρος της ημίσειας κορυφής μετρήθηκαν με διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης, DSC (Differential Scanning Calorimetry). Η εκτίμηση της αποδέσμευσης των εγκλεισμένων ουσιών πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία φθορισμού στο εύρος θερμοκρασιών μεταξύ 37 °C - 43 °C και για χρονικό διάστημα 30 min. Όλα τα λιποσωμακά σκευάσματα εμφάνισαν ταχύτατη απελευθέρωση της εγκλεισμένης ουσίας σε θερμοκρασίες κοντά στην κύρια μετάβαση των λιπιδίων, ενώ η αποδέσμευση παρέμεινε χαμηλή στους 37 °C. Η ενσωμάτωση των βιοδραστικών μονοάκυλο λιπιδίων, που ανήκουν στην οικογένεια αναλόγων του παράγοντα

ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (platelet activating factor, PAF), προσέδωσε θερμοευαίσθητες ιδιότητες στα λιποσωμιακά σκευάσματα αναφοράς DPPC:DSPE-PEG.

Για τα *in vitro* πειράματα καρκινικών σειρών, επιλέχθηκε ο λιποσωμιακός φορέας που φέρει ενσωματωμένο στη διπλοστοιβάδα του το μονοάλκυλο λιπίδιο 1-*O*-δεκοκτακυλο-2-μεθυλο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (methyl-PAF18, εδελφοσίνη) και έχει εγκλεισμένη στο εσωτερικό του την δοξορουβικίνη (DOX). Η επιλογή αυτή βασίστηκε στο γεγονός ότι η ένωση methyl-PAF18 εμφανίζει αντικαρκινική δράση, η οποία μελετήθηκε τόσο μόνη της όσο και σε συνδυασμό με τη δοξορουβικίνη (DOX). Η πρόσληψη της εγκλεισμένης DOX σε αυτά τα λιποσώματα από κύτταρα αδενοκαρκινώματος προστάτη PC3 και DU145 μελετήθηκε χρησιμοποιώντας μικροσκοπία επιφθορισμού σε θερμοκρασία 37 °C ή 40 °C και συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της πρόσληψης κατά την επώαση των κυτταρικών σειρών πραγματοποιήθηκαν πειράματα κυτταρομετρίας ροής χρησιμοποιώντας τον εγγενή φθορισμό της DOX. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν δοσοεξαρτώμενες μελέτες κυτταροτοξικότητας των ελεύθερων φαρμάκων DOX και methyl-PAF18, καθώς και της λιποσωμιακής τους μορφής στις ίδιες κυτταρικές σειρές, επειδή είναι γνωστό ότι παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στη δοξορουβικίνη. Από τα αποτελέσματα, φάνηκε ότι τα λιποσώματα που περιέχουν methyl-PAF18 προσλαμβάνονται επιτυχώς από τις μελετηθείσες κυτταρικές σειρές καρκίνου του προστάτη, ενισχύοντας τη θεραπευτική δράση της DOX. Τα πειράματα έδειξαν ελπιδοφόρο αποτελέσματα και ότι το σύστημα αυτό μπορεί αποτελέσει φορέα αντικαρκινικών φαρμάκων σε συνδυασμό με τοπική εφαρμογή υπερθερμίας.

SUMMARY

In the present study, the effect of the incorporation at 5 and 10 mol% of monoalkyl lipids belonging to the platelet activating factor (PAF) family in the bilayer of DPPC:DSPE-PEG liposomes, in the rate and degree of release of encapsulated water-soluble substances (carboxyfluorescein, 6-CF, and doxorubicin, DOX) was investigated. The monoalkyl lipids used in this study have an ether bond at the *sn*-2 position of the glycerol group, as opposed to the widely used monoalkyl lipids having an ester bond at this position. All the monoalkyl lipids studied gave thermosensitive properties to the liposomal carriers, releasing the encapsulated substance rapidly and at a high percentage when the temperature approaches the main lipid transition of the bilayers. On the other hand, they remained stable at 37 °C for at least 30 min, and at room temperature for at least 24 hours.

For the physicochemical characterization the mean hydrodynamic radius, the polydispersity, and the ζ -potential of all liposomal formulations was surveyed. The main transition temperature (T_m) of the liposomes as well as the temperature width at half-maximum of the main peak ($\Delta T_{1/2}$), were determined using DSC (Differential Scanning Calorimetry). In order to evaluate the release of encapsulated substances, fluorescence spectroscopy was performed in the temperature range of 37-43 °C for a period of 30 min. All liposomal formulations exhibited rapid release of the encapsulated substance at temperatures close to the main lipid transition, while release remained low at 37 °C. Thus, the incorporation of bioactive monoalkyl lipids of the PAF family imparted thermosensitive properties to the liposomal DPPC: DSPE-PEG formulations.

Of all liposomal formulations studied, the liposomal carrier having the monoalkyl lipid methyl-PAF18 (edelfosine) incorporated at 5 mol% in its bilayer was selected for the *in vitro* cell culture experiments employing the human prostatic carcinoma cell lines DU145 and DU145. This is based on the fact that methyl-PAF18, either alone or in combination with DOX, has a well-established anticancer activity, but its use in practice is prohibited due to severe side effects. To this end, methyl-PAF18 thermosensitive loaded with DOX were prepared

employing the active-loading method. The uptake of liposomal DOX into PC3 and DU145 cells incubated at 37 or 40 °C was based on its native fluorescence and was monitored using epifluorescence microscopy, confocal laser scanning microscopy, as well as flow cytometry which also allowed its quantification. Finally, dose-dependent studies of the cytotoxicity of the free drugs (DOX and methyl-PAF), as well as of their liposomal compositions were performed on DU145 and PC3 cell lines, which are known to be doxorubicin resistant. It was shown that methyl-PAF based thermoresponsive liposomes are effectively internalized in prostate cancer cells, enhancing the therapeutic uptake and efficacy of DOX. In conclusion, this system can prove a promising anti-cancer drug delivery system when used in combination with hyperthermia.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο καρκίνος είναι εκφυλιστική ασθένεια ⁽¹⁾ και αποτελεί μια από τις μεγαλύτερες μάστιγες της εποχής μας. Ο καρκινικός γονότυπος εκφράζεται με τη μορφή έξι χαρακτηριστικών μεταβολών στη φυσιολογία των κυττάρων, οι οποίες συνολικά οδηγούν σε κακοήθη ανάπτυξη και είναι οι εξής ^(2,3): η αυτάρκεια σε σήματα ανάπτυξης, η αναισθησία σε σήματα κατά της ανάπτυξης, η αποφυγή της απόπτωσης, η δυνατότητα αναπαραγωγής χωρίς όρια, η ικανότητα αγγειογένεσης και η εισβολή σε άλλους ιστούς και μετάσταση.

Οι θεραπείες του καρκίνου αναλόγως με τον τρόπο που αντιμετωπίζεται ο κακοήθης όγκος διακρίνονται στη χειρουργική επέμβαση, τη χημειοθεραπεία, την ακτινοθεραπεία (ραδιοθεραπεία), ή συνδυασμός αυτών, καθώς και τις στοχευμένες θεραπείες. Στη χειρουργική επέμβαση, οι μη μικροκυτταρικού τύπου πρωτογενείς όγκοι που δεν έχουν υποστεί εκτεταμένη διασπορά μπορούν να απομακρυνθούν πλήρως με χειρουργική επέμβαση, η οποία ανάλογα με την έκταση του καρκίνου μπορεί είτε να στοχεύει στην απομάκρυνση μόνο του όγκου είτε μέρους ολόκληρου του προσβεβλημένου οργάνου ⁽⁴⁾. Όμως, η μέθοδος αυτή δεν φέρει πάντα το προσδοκώμενο αποτέλεσμα, είτε αισθητικά είτε επειδή ενέχει την πιθανότητα μετάστασης δεδομένου ότι τα υγιή όρια δεν είναι εύκολο να διακριθούν με τις μέχρι σήμερα ισχύουσες μεθόδους. Στην εφαρμογή της χημειοθεραπείας, δηλαδή την αγωγή με χημικά σκευάσματα χρησιμοποιούνται κυτταροστατικά φάρμακα για την θεραπεία του καρκίνου ή συνδυασμό αυτών των φαρμάκων μαζί με κάποια άλλη μορφή θεραπείας. Εν γένει τα περισσότερα χημειοθεραπευτικά σχήματα δρουν ανασταλτικά στην μίτωση των κυττάρων. Άλλος ένας τρόπος δράσης είναι η παρεμπόδιση της σύνθεσης ή λειτουργίας του DNA των καρκινικών κυττάρων ⁽⁵⁾. Τα βασικά μειονεκτήματα των χημειοθεραπειών είναι ότι η δράση των φαρμάκων σε μεγάλο ποσοστό είναι κυτταροστατική και όχι ιαματική. Αυτή η επίδραση σε πολλές περιπτώσεις δεν αυξάνει το επιθυμητό προσδόκιμο επιβίωσης του ασθενούς. Διαπιστώθηκε ότι σε αρκετούς ασθενείς μετά από ένα διάστημα χορήγησής τους, τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσουν μηχανισμούς αντίστασης απέναντι σε αυτά τα σκευάσματα. Το φαινόμενο αυτό στην βιβλιογραφία αναφέρεται ως **πολυφαρμακευτική αντίσταση** (multidrug resistance, MDR) που κάνει πλέον αυτά τα φάρμακα μη αποτελεσματικά. Επίσης, η

χημειοθεραπεία συνήθως συνοδεύεται από παρενέργειες στον οργανισμό των ασθενών οι οποίες ποικίλλουν κατά περίσταση, με πιο συνήθεις την ναυτία και τάση για εμετό, διάρροια, αναιμία, υποσιτισμός, απώλεια μαλλιών, απώλεια μνήμης, καρδιοτοξικότητα, νεφροτοξικότητα, ηπατοτοξικότητα και ωτοτοξικότητα. Στην ακτινοθεραπεία, η οποία βασίζεται στην τοπική χρήση ιονίζουσας ακτινοβολίας, επιδιώκεται η καταστροφή των καρκινικών κυττάρων, ώστε να συρρικνωθούν οι όγκοι στην περιοχή ακτινοβολήσης. Οι ιοντίζουσες ακτινοβολίες είτε προκαλούν άμεση νέκρωση είτε καταστρέφουν το γενετικό υλικό, καθιστώντας τα ανίκανα να διαιρεθούν ⁽³⁾. Σήμερα, οι επιταχυντές μπορούν να μειώσουν την δέσμη της ακτινοβολίας και να μειώσουν την βλάβη στα υγιή κύτταρα τα οποία ακτινοβολούνται κατά την διαδρομή της ιονίζουσας ακτινοβολίας.

Στην προσπάθεια ενίσχυσης της αποτελεσματικότητας των θεραπευτικών σχημάτων για την αποθεραπεία του καρκίνου, όπως η χημειοθεραπεία και η ακτινοθεραπεία, σήμερα άρχισε να εφαρμόζεται η μέθοδος της τοπικής υπερθερμίας ⁽⁶⁾. Η μέθοδος στηρίζεται στην αύξηση της μέσω της θερμοκρασίας της οξυγόνωσης των ιστών λόγω αυξημένης ροής του αίματος με αποτέλεσμα την αύξηση της μικροαγγειακής διαπερατότητας των φαρμάκων, καθώς και με την διαμόρφωση του ανοσοποιητικού συστήματος με την ενεργοποίηση των φυσικών κυττάρων «δολοφόνων» και των φαγοκυττάρων. Λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι η στοχευόμενη αντικαρκινική θεραπεία, η οποία μεταφέρει υψηλή δόση του αντικαρκινικού φαρμάκου κατευθείαν στον όγκο, βελτιώνει την πρόσληψη του φαρμάκου από τα κακοήθη κύτταρα και ελαχιστοποιεί την πρόσληψη από τα φυσιολογικά, είναι ευνόητο ότι με την εφαρμογή τοπικής υπερθερμίας το θεραπευτικό αποτέλεσμα μπορεί να μεγιστοποιηθεί. Το επόμενο βήμα, συνεπώς, για την αντικαρκινική θεραπεία είναι η απελευθέρωση του φαρμάκου αποκλειστικά στην πάσχουσα περιοχή και με ελεγχόμενο ρυθμό ⁽⁷⁾.

Στην προσπάθεια αυτή, η ανάπτυξη των λιποσωμάτων έχει ήδη δώσει ελπιδοφόρα αποτελέσματα για την αντιμετώπιση διαφόρων μορφών καρκίνου. Τα λιποσώματα ως φορείς δραστικών ουσιών, όπως για παράδειγμα αντικαρκινικών φαρμάκων, πλεονεκτούν λόγω της δυνατότητας εγκλεισμού τόσο υδρόφιλων όσο και υδρόφοβων (λιπόφιλων) μορίων και της εκλεκτικής στόχευσης όγκων. Επίσης, είναι ήδη αποδεδειγμένο ότι οι παρενέργειες κυτταροτοξικών φαρμάκων, όπως η δοξορουβικίνη ή η αμφοτερικίνη Β, μειώνονται σημαντικά μετά τον εγκλεισμό τους σε λιποσωματικούς φορείς ⁽⁸⁾.

Τα θερμοευαίσθητα λιποσώματα είναι μία ιδιαίτερη κατηγορία λιποσωμάτων, η οποία μελετήθηκε στην παρούσα διατριβή. Ως θερμοευαίσθητα χαρακτηρίζονται τα λιποσώματα που απελευθερώνουν ποσοτικά το περιεχόμενο τους σε συγκεκριμένη στενή θερμοκρασιακή περιοχή (39-41 °C) του περιβάλλοντος μέσου ⁽⁶⁾. Αυτό επιτυγχάνεται με την ενσωμάτωση κατάλληλων μορίων, κυρίως λυσοφωσφολιπιδίων, σε ποσοστό 5-10 mol% στην διπλοστοιβάδα των λιποσωμάτων. Τα λιποσώματα που εμφανίζουν την ιδιότητα αυτή λίγους βαθμούς πάνω από τη φυσιολογική θερμοκρασία του σώματος θεωρείται ότι μπορούν να φανούν χρήσιμα στην επίτευξη της ελεγχόμενης, αποδέσμευσης φαρμάκων σε επιθυμητή περιοχή του σώματος. Στόχος των λιποσωμάτων αυτών είναι η απελευθέρωση του εγκλεισμένου αντικαρκινικού φαρμάκου στην συγκεκριμένη περιοχή-στόχο, όπου επικρατεί αυξημένη θερμοκρασία (υπερθερμία), η οποία μπορεί να επιτευχθεί με εφαρμογή κατάλληλων μεθόδων. Η ελεγχόμενη χορήγηση φαρμάκου με ταυτόχρονη αύξηση της θερμοκρασίας (υπερθερμία) έχει ήδη εφαρμοστεί στην αντικαρκινική θεραπεία και πολλές μελέτες βασίζονται στη χορήγηση λιποσωματικών φορέων σε συνδυασμό με την υπερθερμία.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η ανάπτυξη ενός νέου θερμοευαίσθητου λιποσωματικού φορέα που φαίνεται ότι πλεονεκτεί έναντι των μέχρι τώρα θερμοευαίσθητων λιποσωματικών φορέων. Για τον σκοπό αυτό, αντί των λυσοφωσφολιπιδίων, διερευνήθηκε η χρήση μιας οικογένειας βιοδραστικών μονοάκυλο λιπιδίων αναλόγων του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (platelet activating factor, PAF). Τα βιοδραστικά αυτά μονοάκυλο λιπίδια έχουν χημικές δομές που ομοιάζουν με αυτή των λυσοφωσφολιπιδίων καθιστώντας τα δυνητικά χρήσιμα για την επαγωγή θερμοευαισθησίας. Επιπλέον, παρουσιάζουν αντινεοπλασματική δράση, με μηχανισμό ωστόσο τελείως διαφορετικό από την αντινεοπλασματική δράση που προκαλούν γνωστά αντικαρκινικά φάρμακα, όπως π.χ. το μόριο της δοξορουβικίνης, η οποία και αλληλεπιδρά άμεσα με το DNA των κυττάρων. Από την οικογένεια αυτή η edelfosine ή methyl-PAF, ένα παράγωγο του PAF, μελετήθηκε αρκετά συστηματικά για την αντικαρκινική του δράση και διαπιστώθηκε ότι προκαλεί απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα. Παρ'όλα αυτά η methyl-PAF προκαλεί σημαντικές παρενέργειες που δεν επιτρέπουν μέχρι σήμερα την κλινική χρήση της ως αντικαρκινικού φαρμάκου. Η καινοτομία της παρούσης εργασίας έγκειται στην ενσωμάτωση μικρής συγκέντρωσης (5 mol%)

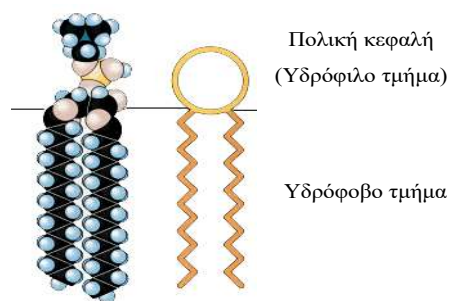
βιοδραστικών παραγώγων του PAF στην διπλοστοιβάδα των λιποσωμάτων που οδηγούν αφ' ενός μεν στην ανάπτυξη νέων θερμοευαίσθητων λιποσωμακών φορέων, αφ' ετέρου δε εμφανίζουν και κυτταροτοξική δράση που συνδυάζεται με την αντίστοιχη δράση της εγκλεισμένης στο εσωτερικό των λιποσωμάτων δοξορουβικίνης. Ο εγκλεισμός των δύο κυτταροστατικών μορίων σε θερμοευαίσθητα λιποσώματα, σε συνδυασμό με την παράλληλη χρήση εξωγενούς τοπικής υπερθερμίας, καθιστά τον λιποσωμακό αυτόν φορέα ένα σύστημα στοχευμένης χορήγησης με επαυξημένη αντικαρκινική δράση, που μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο σύστημα στην θεραπεία διαφόρων μορφών καρκίνου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ

1.1 Εισαγωγή στα λιπосώματα

Τα λιπосώματα ανήκουν στην κατηγορία των κολλοειδών συστημάτων, τα ονομαζόμενα αυτοοργανούμενα συστήματα κολλοειδών (self-associated, or self-assembled colloidal systems) (9). Τα κολλοειδή αυτά συστήματα αποτελούνται από αμφίφιλα χημικά μόρια, τα οποία διαμορφώνονται στον χώρο έτσι ώστε να διευθετούνται χωριστά τα υδρόφιλα από τα υδρόφοβα τμήματα (Εικόνα 1). Τα αμφίφιλα αυτά μόρια σε δεδομένη συγκέντρωση μπορούν αυθόρμητα να σχηματίσουν κολλοειδή συστήματα, η οργάνωση των οποίων εξαρτάται από θερμοδυναμικές παραμέτρους, όπως π.χ. η ενθαλπία. Το υδρόφιλο τμήμα των μορίων προσανατολίζεται προς τα μόρια του ύδατος, ενώ το υδρόφοβο τμήμα λαμβάνει προσανατολισμό και διαμόρφωση στον χώρο έτσι ώστε να ελαττωθούν οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με το υδρόφιλο περιβάλλον.



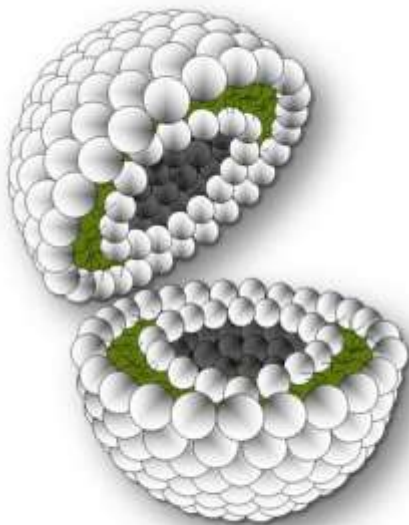
Εικόνα 1. Τυπική δομή αμφίφιλου μορίου.

Η συμπεριφορά αυτή των φωσφολιπιδίων, τα οποία αποτελούν συστατικά των βιολογικών μεμβρανών, είναι καθαρά θερμοδυναμική με στόχο τη σταθερότητα του μορίου. Σε υδατικά διαλύματα τα αμφίφιλα μόρια σχηματίζουν υπερμοριακές κολλοειδείς δομές. Οι κολλοειδείς αυτές δομές χαρακτηρίζονται ως εξαιρετικά πολύπλοκες και δεν είναι εύκολο να μελετηθούν και να κατανοηθεί η συμπεριφορά τους συγκριτικά με άλλες απλούστερες κολλοειδείς δομές. Η δυσκολία απορρέει από το γεγονός ότι η ισορροπία τους εξαρτάται από τους παράγοντες που καθορίζουν την αυτοοργάνωσή τους. Η σημασία και η πολυπλοκότητα αυτών των συστημάτων προσεγγίζει την συμπεριφορά οργάνωσης των λιπιδίων και φωσφολιπιδίων των βιολογικών μεμβρανών.

Η διασπορά των φωσφολιπιδίων σε υδατικό περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα την αυθόρμητη συσσώρευσή τους σε δομές διπλοστοιβάδων. Τα υδρόφοβα άκρα των αλυσίδων που σχηματίζουν τις διπλοστοιβάδες όταν έρχονται σε επαφή με το υδρόφιλο περιβάλλον,

κάμπτονται με τρόπο ώστε οι λιπιδικές αλυσίδες κατά την συνένωσή τους να ελαχιστοποιήσουν την ενέργεια. Η ενέργεια που απαιτείται για την κάμψη των ανθρακικών αλυσίδων των διπλοστοιβάδων λαμβάνεται από την αύξηση της ενέργειας που προκαλεί στο σύστημα η έκθεση υδρόφοβων τμημάτων στο υδατικό περιβάλλον ⁽¹⁰⁾. Το αποτέλεσμα της κάμψης και σύμπλεξης των υδρόφοβων άκρων της διπλοστοιβάδας είναι ο σχηματισμός λιπιδικών κυστιδίων.

Τα λιποσώματα αποτελούν κλειστές σφαιρικές δομές που διαθέτουν μια ή περισσότερες ομόκεντρες λιπιδικές διπλοστοιβάδες (Εικόνα 2).

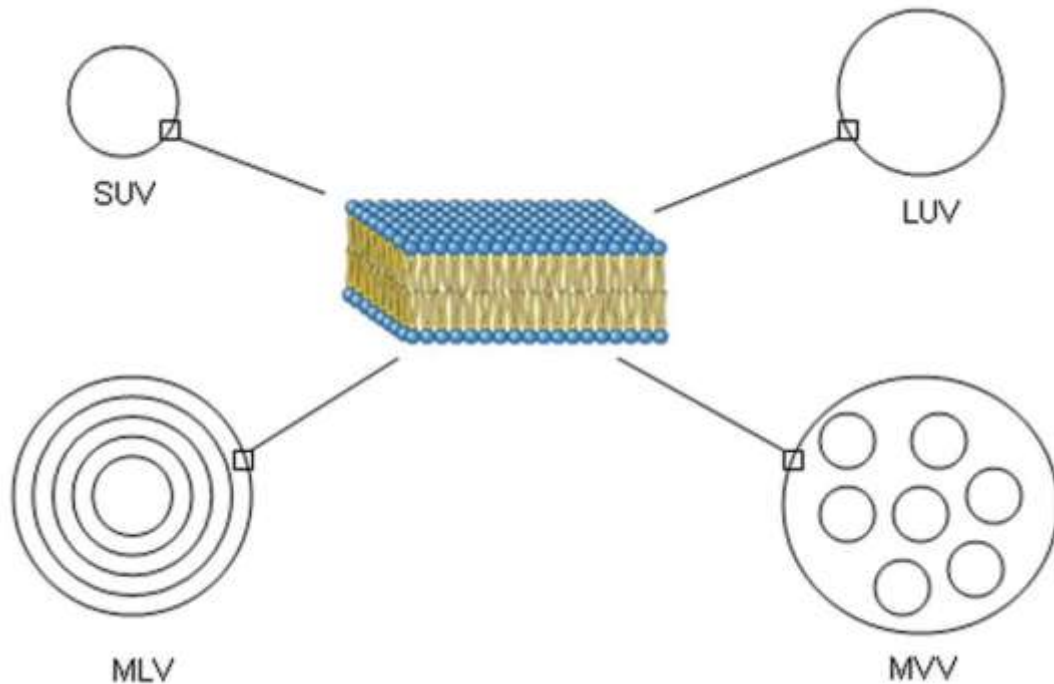


Εικόνα 2. Σχηματική παράσταση μονοστοιβαδικού λιποσώματος.

Όπως προαναφέρθηκε, τα λιποσώματα ανήκουν στα λιπιδικά κολλοειδή συστήματα και σχηματίζονται κατά τη διασπορά αμφίφιλων μορίων, κυρίως φωσφολιπιδίων, σε περίσσεια υδατικού μέσου, το οποίο και εγκλωβίζεται ανάμεσα από τις διπλοστοιβάδες. Ο σχηματισμός αυτός προσδίδει στα λιποσώματα την πολύτιμη ιδιότητα να αποτελούνται τόσο από υδρόφοβο όσο και από υδρόφιλο εσωτερικό περιβάλλον το οποίο καθορίζεται από τις λιπιδικές αλυσίδες των φωσφολιπιδίων και το υδατικό μέσο διασποράς, αντίστοιχα ^(11,12).

1.1.1 Δομή και μορφολογία των λιποσωμάτων

Τα λιποσώματα συνήθως ταξινομούνται με βάση το μέγεθος και τον αριθμό των στοιβάδων που περιέχουν ⁽¹³⁾ (Εικ. 3).



Εικόνα 3. Κατάταξη λιποσωμάτων με βάση το μέγεθος και τον αριθμό των στοιβάδων: SUV = Μικρά μονοστοιβαδικά λιποσώματα, LUV = μεγάλα μονοστοιβαδικά λιποσώματα, MLV = μεγάλα πολυστοιβαδικά λιποσώματα, MVV = Πολυκυστιδικά λιποσώματα (Catala A., *Liposomes*, IntechOpen, London, 2017, pp. 133).

Μεγάλα πολυστοιβαδικά λιποσώματα (Multilamellar Vesicles, MLV), τα οποία αποτελούνται από πέντε έως είκοσι διπλοστοιβάδες και των οποίων το μέγεθος κυμαίνεται μεταξύ 0,1-5,0 μm. Με τον τρόπο αυτόν αυξάνει η υδρόφοβη επιφάνεια των λιποσωμάτων, με αποτέλεσμα να εγκλείουν αποτελεσματικότερα τα υδρόφοβα μόρια. Αν και αποδείχθηκε ότι είναι σχετικά σταθερά, έχει βρεθεί ότι απομακρύνονται από την κυκλοφορία του αίματος γρήγορα, καθώς αναγνωρίζονται από τα φαγοκύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Ειδική υποκατηγορία αποτελούν τα μεγάλα ολιγοστοιβαδικά λιποσώματα (*Large Oligo Vesicles, LOV*), τα οποία φέρουν τα ίδια χαρακτηριστικά με τα μεγάλα πολυστοιβαδικά λιποσώματα αλλά αποτελούνται από δύο έως πέντε λιπιδικές διπλοστοιβάδες.

Μεγάλα μονοστοιβαδικά λιποσώματα (Large Unilamellar Vesicles, LUV), με μέγεθος 100-1000 nm. Η δομή τους αποτελείται από μία και μοναδική διπλοστοιβάδα φωσφολιπιδίων και αυτό τα καθιστά αποτελεσματικότερα στον εγκλεισμό υδρόφιλων μορίων καθώς περιέχουν μεγαλύτερο εσωτερικό υδρόφιλο τμήμα σε σχέση με την υδρόφοβη επιφάνεια της διπλοστοιβάδας τους. Τα λιποσώματα της κατηγορίας αυτής, λόγω του μεγάλου μεγέθους τους, αναγνωρίζονται εύκολα από τα φαγοκύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως και στην περίπτωση των MLV's.

Μικρά μονοστοιβαδικά λιποσώματα (Small Unilamellar Vesicles, SUV), με μέγεθος 20-100 nm. Αποτελούνται από μία διπλοστοιβάδα φωσφολιπιδίων. Τα μικρά μονοστοιβαδικά λιποσώματα εμφανίζουν μεγάλη ομοιογένεια στο μέγεθος, αλλά εμφανίζουν θερμοδυναμική αστάθεια και οδηγούνται γρήγορα σε σύντηξη προς σχηματισμό μεγαλύτερων λιποσωμάτων και/ή σε συσσωμάτωση και καθίζηση.

Πολυκυστιδικά λιποσώματα (MVV). Περιλαμβάνουν αρκετά διακριτά τμήματα στο εσωτερικό τους, τα οποία, σε αντίθεση με τα MLVs, δεν είναι ομόκεντρα.

1.1.2 Κατηγορίες λιποσωμάτων με βάση τη λιπιδική τους σύσταση

Συμβατικά (conventional). Ως συμβατικά χαρακτηρίζονται τα λιποσώματα τα οποία αποτελούνται από φωσφολιπίδια, ουδέτερα ή ανιονικά φορτισμένα. Τα συμβατικά λιποσώματα αναγνωρίζονται γρήγορα από τα μακροφάγα κύτταρα και απομακρύνονται από τον οργανισμό σε σύντομο χρονικό διάστημα (12).

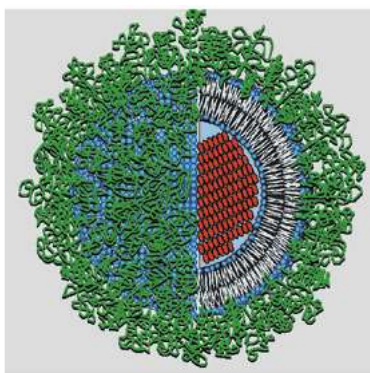
Κατιονικά (cationic). Ως κατιονικά χαρακτηρίζονται τα λιποσώματα τα οποία φέρουν καθαρό θετικό φορτίο. Χρησιμοποιούνται σχεδόν αποκλειστικά για την ενδοκυττάρια μεταφορά αρνητικά φορτισμένων μακρομορίων, όπως DNA, RNA και ολιγονουκλεοτίδια (11·13).

pH-ευαίσθητα (pH-sensitive). Τα λιποσώματα αυτά περιέχουν στη μάζα τους φορτισμένα φωσφολιπίδια (π.χ. DPPG¹) ή ελεύθερα λιπαρά οξέα (π.χ. δεκαεξανοϊκό οξύ). Παρατηρήθηκε ότι η μεταβολή του pH του υδατικού περιβάλλοντος επηρεάζει το ηλεκτρικό φορτίο τους (11·13).

Στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα (Stealth liposomes). Η διπλοστοιβάδα αυτών των λιποσωμάτων (Εικόνα 4) σχηματίζεται από φωσφολιπίδια, όπου τα πολικά τους άκρα

¹ 1,2-διπαλμιτόυλο-sn-γλύκερο-3-φωσφατιδυλογλυκερόλη, C16:0

συνδέονται ομοιοπολικά με την υδρόφιλη πολυ(αιθυλενογλυκόλη) (PEG). Η πολυαιθυλενογλυκόλη προσδίδει ένα είδος στερεικής σταθεροποίησης, δηλαδή έναν φραγμό στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της επιφάνειας των λιποσωμάτων και των συστατικών του βιολογικού περιβάλλοντος. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές οδηγούν συνήθως στην διείσδυση πρωτεϊνών του πλάσματος στη διπλοστοιβάδα, οι οποίες είτε μπορούν να αποσταθεροποιήσουν τη δομή του λιποσώματος ή να προσδώσουν ιδιότητες οψονινών, η παρεμπόδιση των οποίων μειώνει την πιθανότητα αναγνώρισης από τα φαγοκύτταρα. Έτσι τα λιποσώματα αυτά παραμένουν για μεγάλο χρονικό διάστημα στην κυκλοφορία του αίματος χωρίς να απαιτείται να έχουν αναγκαστικά μικρό μέγεθος (13).



Εικόνα 4. Μη ανιχνεύσιμο (stealth) στερεοχημικά σταθεροποιημένο λιπόσωμα. Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται οι ομάδες της πολυαιθυλενογλυκόλης (Lasic, D. D. Angew. Chem. 33, 1685-1698, 1994).

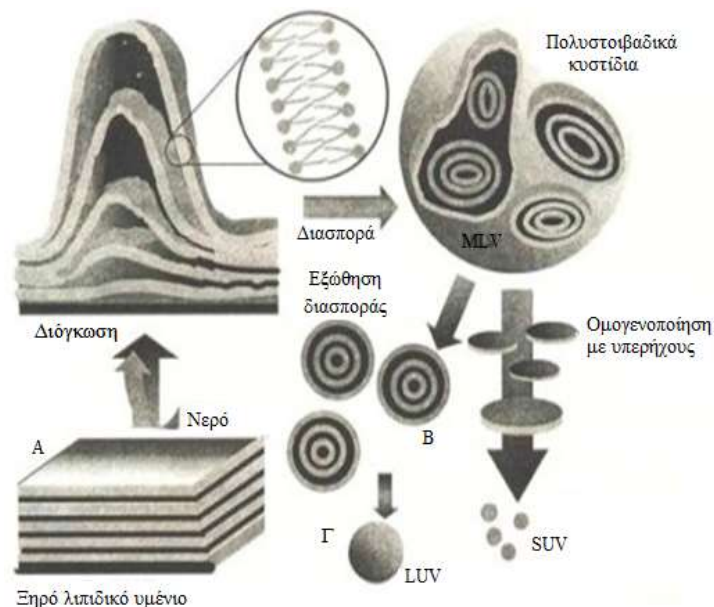
Λιποσώματα που φέρουν στην επιφάνειά τους βιοδραστικά μακρομόρια. Τα λιποσώματα αυτά είναι γνωστά ως λιποσώματα με στοχεύοντα συνδέτη (Ligand Targeted Liposomes, LTLs). Στην τους μπορούν να φέρουν μονοκλωνικά αντισώματα, πεπτίδια, πολυσακχαρίτες, διάφορους υποδοχείς, ορμόνες, βιταμίνες, αυξητικούς παράγοντες, απτένια κ.α. Ανάλογα με τον τύπο του βιοδραστικού μορίου που φέρει το λιπόσωμα στην επιφάνειά του διακρίνονται σε:

- Ανοσολιποσώματα (immunoliposomes or antibody-targeted). Η κατηγορία αυτή αφορά τα λιποσώματα κατευθυνόμενης στόχευσης, τα οποία φέρουν στην επιφάνειά τους ένα αντίσωμα το οποίο λειτουργεί ως κέντρο αναγνώρισης από αντιγόνα επιφανείας των κυττάρων-στόχων (11-13).

- Λιποσώματα που φέρουν στην επιφάνειά τους πεπτίδια. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν λιποσώματα που φέρουν στην επιφάνειά τους πλασμινογόνο, τα οποία στοχεύουν σε θρόμβους ινώδους, καθώς και λιποσώματα με RGD πεπτίδια, που μπλοκάρουν την αγγειογένεση σε ενδοθηλιακά κύτταρα-στόχους.
- Λιποσώματα που φέρουν στην επιφάνειά τους πολυσακχαρίτες. Τα λιποσώματα αυτά μέσω των πολυσακχαριτών που φέρουν στην επιφάνειά τους κατευθύνονται σε συγκεκριμένα κύτταρα-στόχους.

1.1.3 Μικτά λιποσώματα

Τα λιποσώματα σχηματίζονται με αυτοοργάνωση αμφίφιλων μορίων. Αν τα μόρια είναι ίδια καθορίζουν τις ιδιότητες του συστήματος. Αν τα λιποσώματα σχηματίζονται από δύο ή περισσότερα ετερογενή μόρια (μικτά λιποσώματα) τότε αυξάνει ο αριθμός των παραμέτρων, οι οποίες καθορίζουν το σχηματισμό και τις ιδιότητές των. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η περίπτωση των μικτών λιποσωμάτων αποτελούμενα από φωσφατιδυλοχολίνη και λυσολιπίδια. Είναι γνωστό ότι η εισαγωγή των λυσολιπιδίων στη διπλοστοιβάδα επιφέρει πολλαπλές αλλαγές στις ιδιότητες των λιποσωματικών φορέων (¹⁴).



Εικόνα 5. Βασικά στάδια παρασκευής λιποσωμάτων LUV=Μεγάλα μονοστοιβαδικά λιποσώματα SUV=Μικρά μονοστοιβαδικά λιποσώματα (Lasic, D. D., Recherche 20, 904-913, 1989).

1.2 Τεχνικές παρασκευής

Τα λιποσώματα αν και παρασκευάζονται με διάφορες τεχνικές, όμως όλες βασίζονται στην αρχή πρόσδοσης της ενέργειας που απαιτείται, προκειμένου οι διπλοστοιβάδες των φωσφολιπιδίων να αναδιπλωθούν με τρόπο ώστε να σχηματίσουν σφαιρικές κλειστές δομές. Τα βασικά στάδια παρασκευής των λιποσωμάτων είναι τρία (Εικόνα 5):

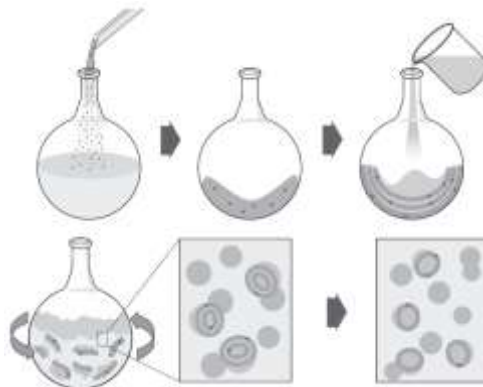
- ❖ Α. Προετοιμασία της λιπιδικής και της υδατικής φάσης
- ❖ Β. Ενυδάτωση της λιπιδικής φάσης
- ❖ Γ. Ρύθμιση του μεγέθους και της κατανομής του μεγέθους των λιποσωμάτων.

A. Προετοιμασία της λιπιδικής και της υδατικής φάσης/Ενυδάτωση της λιπιδικής φάσης

I. Ενυδάτωση λεπτού λιπιδικού υμενίου (thin-film hydration)

Τα κύρια βήματα της μεθόδου είναι τα εξής (Εικόνα 6):

- Διάλυση λιπιδίων, στερολών ή/και άλλων αμφίφιλων μορίων σε οργανικό διαλύτη, συνήθως χλωροφόρμιο, μεθανόλη ή μίγμα αυτών.



Εικόνα 6. Μέθοδος ενυδάτωσης λεπτού λιπιδικού υμενίου προς παρασκευή λιποσωμάτων (Lasic, D. D., *Recherche* 20, 904-913, 1989).

- Απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη με εφαρμογή κενού σε περιστρεφόμενο εξατμιστήρα (rotary evaporator), κατά την οποία σχηματίζεται λεπτό λιπιδικό υμένιο.
- Απομάκρυνση των ιχνών του οργανικού διαλύτη με εφαρμογή υψηλού κενού.

- Ενυδάτωση του λιπιδικού υμενίου (που βρίσκεται στα τοιχώματα σφαιρικής φιάλης κενού) με νερό, ρυθμιστικό διάλυμα ή διάλυμα με υδατοδιαλυτό δείκτη.

II. Έγχυση σε οργανικό διαλύτη (solvent injection). Τα φωσφολιπίδια διαλύονται αρχικά σε μικρό όγκο αιθανόλης ή διαιθυλαιθέρα και στη συνέχεια εγχύονται, είτε με έντονο τρόπο ή εξαιρετικά αργά, σε υδατικό περιβάλλον, το οποίο συνήθως βρίσκεται σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από τη θερμοκρασία της κύριας μετάβασης των λιπιδίων. Ο οργανικός διαλύτης απομακρύνεται με εξάτμιση, διήθηση ή διαπίδυση. Η μέθοδος είναι απλή στην εφαρμογή της με χαρακτηριστικό πλεονέκτημα την απουσία χρήσης επιβλαβών, για τα συστατικά, χημικών ή φυσικών διεργασιών. Μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί το επιπρόσθετο στάδιο απομάκρυνσης του οργανικού διαλύτη και τα αραιά διαλύματα των λιποσωμάτων που παράγονται.

III. Μέθοδος εξάτμισης αντιστρόφου φάσης (reverse-phase evaporation, REV). Παρόμοια με τη μέθοδο έγχυσης οργανικού διαλύτη, τα λιπίδια διασπείρονται σε υδατικό περιβάλλον μέσω οργανικής φάσης. Όμως η οργανική φάση δεν απομακρύνεται άμεσα, αλλά σχηματίζει γαλάκτωμα, όπως συμβαίνει με το H₂O σε λάδι (w/o). Τα μόρια των λιπιδίων διατάσσονται στο σχηματιζόμενο γαλάκτωμα σε μονοστοιβάδες με μορφή αντιστροφών μικκυλίων γύρω από τα σταγονίδια του H₂O. Οι στοιβάδες κατά το στάδιο απομάκρυνσης του οργανικού διαλύτη με εξάτμιση υπό κενό συνενώνονται σχηματίζοντας μίγμα μονοστοιβαδικών και πολυστοιβαδικών λιποσωμάτων. Συνήθως στο διάλυμα του οργανικού διαλύτη των λιπιδίων προστίθεται μέρος του υδατικού μέσου που θα χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή των λιποσωμάτων, ενώ το υπόλοιπο προστίθεται μετά την απομάκρυνση της οργανικής φάσης. Η μέθοδος πλεονεκτεί στο ότι έχει μεγάλη απόδοση στον εγκλεισμό υδατοδιαλυτών μορίων.

IV. Θερμική μέθοδος (Heating Method).

Τα κύρια βήματα της μεθόδου είναι τα εξής:

- Δημιουργία ζώνης συμπλοκοποίησης. Η ζώνη αυτή αποτελείται από ένα υδατικό μέσο που περιέχει το φορέα (συμπολυμερή, φωσφολιπίδια, μη-ιοντικά επιφανειοδραστικά ή/και συνδυασμός των παραπάνω) και έναν μη πτητικό υδατοδιαλυτό οργανικό διαλύτη.

Κατά τη διαδικασία αυτή η δραστική ουσία περιβάλλεται ή συνδέεται δεσμικά ή εγκλείεται στο φορέα.

- Ταυτόχρονη ανάδευση και θέρμανση.
- Προσθήκη της δραστικής ουσίας στο υδατικό μέσο και διατήρηση της ζώνης συμπλοκοποίησης υπό κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας, ώστε να διευκολύνεται η συμπλοκοποίηση του δραστικού συστατικού με το φορέα.

B. Ρύθμιση του μεγέθους των λιποσωμάτων

Οι τεχνικές ρύθμισης μεγέθους των λιποσωμάτων κατατάσσονται σε μηχανικές και ηλεκτροστατικές ανάλογα με το μηχανισμό ρύθμισης του μεγέθους των λιποσωμάτων (¹⁵).

Οι μηχανικές τεχνικές περιλαμβάνουν:

1. Εξώθηση μέσω φίλτρων πολυκαρβονικής μεμβράνης που έχουν συγκεκριμένο μέγεθος πόρων
2. Εξώθηση μέσω γαλλικού φίλτρου (French press)
3. Ομογενοποίηση / μικρορευστοποίηση
4. Υπερήχηση

Στις ηλεκτροστατικές τεχνικές περιλαμβάνονται:

1. Μεταβολή αντισταθμιστικών ιόντων
2. Μεταβολή pH
3. Μεταβολή ιονικής ισχύος

1.3 Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός λιποσωμάτων.

Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των λιποσωμάτων, όπως το μέγεθος, το φορτίο, αλλά και η θερμοδυναμική τους κατάσταση καθορίζονται από τις συνθήκες παρασκευής τους:

Το μέγεθος επηρεάζει τη διαπερατότητα των λιποσωμάτων από φραγμούς, την αλληλεπίδρασή τους με τα κύτταρα, την απομάκρυνσή τους από το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα (ΔΕΣ) (¹⁶) και καθορίζει την απελευθέρωση του φαρμάκου.

Το ζ-δυναμικό είναι ο επιστημονικός όρος, που χρησιμοποιείται για να περιγράψει το ηλεκτροκινητικό δυναμικό των κolloειδών συστημάτων. Το ζ-δυναμικό ορίζει το ηλεκτρικό δυναμικό που επικρατεί στο επίπεδο μετατοπίσεως (slipping plane) των κolloειδών και δεν

πρέπει να συγχέεται με το φορτίο επιφανείας των σωματιδίων. Στην πράξη, το ζ-δυναμικό αποτελεί τη διαφορά δυναμικού μεταξύ του μέσου διασποράς και της στοιβάδας υγρού που παραμένει συγκρατημένη στην επιφάνεια του σωματιδίου, ακόμα και όταν αυτό κινείται υπό την επίδραση ενός ηλεκτρικού φορτίου. Το ζ-δυναμικό είναι ένα ιδιαίτερα σημαντικό φυσικοχημικό χαρακτηριστικό των λιποσωμάτων, το οποίο επηρεάζει τη σταθερότητα των λιποσωμάτων, απέναντι σε φαινόμενα όπως είναι η συσσωμάτωση ή η σύντηξη, η αλληλεπίδραση των λιποσωμάτων με φορτισμένα μόρια π.χ. δραστικές ουσίες και η συμπεριφορά των λιποσωμάτων *in vivo* ⁽¹⁷⁾.

Η θερμοκρασία μετάπτωσης φάσεως εξαρτάται από τον τύπο του φωσφολιπιδίου και ιδιαίτερα από τη φύση της πολικής κεφαλής, το μήκος και το βαθμό ακορεστότητας της αλυσίδας των λιπαρών οξέων. Αύξηση του μήκους και του κορεσμού της αλυσίδας των λιπαρών οξέων καθώς και αύξηση του φορτίου της πολικής κεφαλής οδηγεί σε αύξηση της θερμοκρασίας μεταπτώσεως.

1.4 Πλεονεκτήματα λιποσωμάτων.

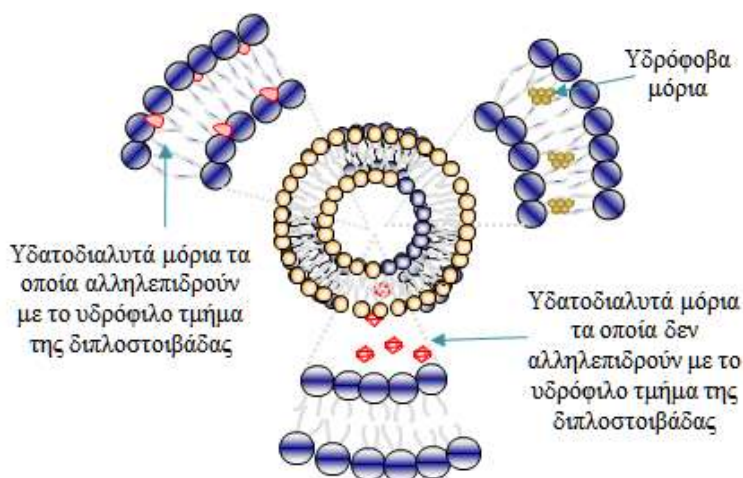
Τα κυριότερα πλεονεκτήματα της χρήσης των λιποσωμάτων στις επιστήμες υγείας είναι η βιοσυμβατότητά τους, η δυνατότητα εγκλεισμού υδρόφιλων και υδρόφοβων βιοδραστικών μορίων, η προστασία ευαίσθητων μορίων, η μείωση της τοξικότητας και των πιθαμών παρενεργειών τους, η δυνατότητα τροποποίησης των ιδιοτήτων τους, μέσω κατάλληλης επιλογής των λιπιδίων και της παρασκευαστικής μεθόδου, και τέλος, η δυνατότητα επίτευξης παρατεταμένης ή/και στοχευμένης αποδέσμευσης του εγκλεισμένου βιοδραστικού μορίου.

1.5 Ιδιότητες και εφαρμογές λιποσωμάτων.

Τα λιποσώματα εμφανίζουν χαρακτηριστικές ιδιότητες, εξ αιτίας των οποίων βρίσκουν εφαρμογή ως φορείς φαρμακευτικών ουσιών ή στην κοσμετολογία (προϊόντα περιποίησης σώματος, σαμπουάν, κ.λπ.). Ακόμα, χρησιμοποιούνται ως διαγνωστικά μέσα σε διάφορες διεργασίες στη βιομηχανία τροφίμων. Ωστόσο, η κυριότερη εφαρμογή στην φαρμακολογία αποδίδεται στην ιδιότητα τους να μπορούν να εγκλωβίζουν και να μεταφέρουν δραστικά μόρια ^(18,19,20).

Η ικανότητα δημιουργίας ανεξάρτητων διαμερισμάτων (compartmentalization), ο εγκλεισμός διάφορων ουσιών, καθώς επίσης και η ελεγχόμενη διαπερατότητα είναι χαρακτηριστικά των λιποσωμάτων που προσομοιάζουν με τα ζωντανά κύτταρα (^{21,22}). Για τον λόγο αυτό τα λιποσώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως απλά μοντέλα μελέτης της συμπεριφοράς των κυττάρων και ως φορείς δραστικών ουσιών, όπως για παράδειγμα τα φάρμακα. Το πλεονέκτημα μεταφοράς ουσιών, ιδιαίτερα φαρμάκων, είναι η δυνατότητα εγκλεισμού τόσο υδρόφιλων, όσο και υδρόφοβων μορίων, η επιλεκτική στόχευση των μη υγιών κυττάρων καθώς και η ελεγχόμενη αποδέσμευση των φαρμάκων από αυτά.

Ο τρόπος και η θέση του εγκλεισμού εξαρτάται κυρίως από το είδος της προς εγκλωβισμό ουσίας. Στην περίπτωση των μονοστοιβαδικών λιποσωμάτων τα υδρόφιλα μόρια εγκλείονται κυρίως στον υδατικό πυρήνα (²³). Στην περίπτωση των πολυστοιβαδικών λιποσωμάτων τα υδρόφιλα μόρια εγκλείονται εντός του πυρήνα και στην υδρόφιλη περιοχή μεταξύ των διπλοστοιβάδων, ιδιαίτερα στην περίπτωση όπου είναι δυνατόν να αναπτυχθούν διαμοριακές αλληλεπιδράσεις (ιοντικές ή δεσμοί υδρογόνου) μεταξύ των μορίων αυτών και των πολικών κεφαλών των αμφιφιλικών μορίων που τις αποτελούν. Αντίθετα, τα υδρόφοβα μόρια εγκλείονται στο υδρόφοβο τμήμα των λιποσωμάτων, δηλαδή στο εσωτερικό των διπλοστοιβάδων (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Σχηματική παράσταση των θέσεων εγκλεισμού της δραστικής ουσίας στα λιποσώματα, ανάλογα με την πολικότητα της.

1.6 Σταθερότητα λιποσωμάτων

Η σταθερότητα των λιποσωμάτων αποτελεί σημαντικό παράγοντα στη διαδικασία παρασκευής και διατήρησής τους, η οποία καθορίζεται από τη σύσταση και τη συγκέντρωσή τους (24,25). Η σταθερότητα των λιποσωμάτων χαρακτηρίζεται από τις συνθήκες εκείνες που διατηρούν συγχρόνως την φυσική, χημική και την βιολογική σταθερότητα.

1.6.1 Φυσική σταθερότητα.

Με τον όρο φυσική σταθερότητα των λιποσωμάτων, εννοούμε την αποφυγή της συσσωμάτωσης και της σύντηξης των λιποσωμάτων. Η συσσωμάτωση είναι δυναμικό και αντιστρεπτό φαινόμενο. Είναι δυνατόν να οδηγήσει στη δημιουργία μεγαλύτερου λιποσωματικού υλικού, το οποίο θα αποτελείται από μικρότερα λιποσώματα. Η σύντηξη αποτελεί μη-αντιστρεπτή διαδικασία συνένωσης μικρότερων λιποσωμάτων προς ένα μεγαλύτερο λιπόσωμα. Η φυσική σταθερότητα των λιποσωμάτων επηρεάζει τις φυσικές ιδιότητες των μορίων των φωσφολιπιδίων όσο και τη μεταξύ των λιποσωμάτων αλληλεπίδραση.

Οι δυνάμεις van der Waals και οι απωστικές ηλεκτροστατικές δυνάμεις που αναπτύσσονται ανάμεσα στις λιπιδικές επιφάνειες των διπλοστοιβάδων είναι βασικός παράγοντας στον καθορισμό των ιδιοτήτων των λιποσωμάτων και της φυσικής σταθερότητάς τους. Εκτός, όμως, από τις ηλεκτροστατικές δυνάμεις, επιπρόσθετες απωστικές δυνάμεις ενυδάτωσης συντηρούν τις δύο επιφάνειες σε απόσταση μεταξύ τους. Έτσι, η ισορροπία μεταξύ των ελκτικών δυνάμεων van der Waals και των απωστικών ηλεκτροστατικών δυνάμεων και ο βαθμός ενυδάτωσης καθορίζουν σημαντικά τη φυσική σταθερότητα των λιποσωμάτων. Οι παράγοντες που μπορούν να μεταβάλλουν τις δυνάμεις αυτές οδηγούν σε σύντηξη ή και συνάθροιση των λιποσωμάτων. Για παράδειγμα, η εμφάνιση ατελειών υδρόφοβης φύσης στη διπλοστοιβάδα λόγω έντονης κάμψης της, ιδιαίτερα σε μικρά λιποσώματα, ενισχύει τις ελκτικές δυνάμεις van der Waals μεταξύ παρακείμενων λιποσωμάτων. Άλλο παράδειγμα αποτελεί η αύξηση του ιξώδους στα λιποσωμακά εναιωρήματα και η μετατροπή τους σε πήκτωμα, που συντελεί επίσης στην αποσταθεροποίηση των λιποσωμάτων. Τέλος, το φαινόμενο του πολυμορφισμού των φωσφολιπιδίων από τα οποία

αποτελούνται τα λιποσώματα αποτελεί επίσης σημαντικό παράγοντα που καθορίζει τη φυσική σταθερότητά τους, ιδιαίτερα σε συνδυασμό με τη θερμοκρασία στην οποία εκτίθενται.

1.6.2 Χημική σταθερότητα

Με τον όρο χημική σταθερότητα των λιποσωμάτων, εννοούμε κυρίως την αποφυγή της υδρόλυσης του εστερικού δεσμού της λιπαρής αλυσίδας με τη γλυκερόλη ή της υπεροξειδωσής των ακόρεστων λιπαρών αλυσίδων. Η χημική σταθερότητα αφορά κυρίως διαδικασίες οι οποίες τροποποιούν τη χημική σύσταση των λιποσωμάτων.

Οι εστερικοί δεσμοί της γλυκερόλης των φωσφολιπιδίων δύνανται να υδρολυθούν, κάτω από ιδιαίτερες συνθήκες. Η υδρόλυση των φωσφολιπιδίων οδηγεί σε σχηματισμό ελεύθερων λιπαρών οξέων, μεταβάλλοντας την οργάνωση των μορίων στη διπλοστοιβάδα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την επιτάχυνση της διαδικασίας συσσωμάτωσης των λιποσωμάτων, ενώ παράλληλα αυξάνεται η διαπερατότητα της διπλοστοιβάδας.

Επίσης, τα φωσφολιπίδια με ακόρεστες λιπιδικές αλυσίδες μπορούν να εύκολα να οξειδωθούν στην θέση των διπλών δεσμών σχηματίζοντας τελικά υπεροξειδία. Συνολικά, τόσο η φυσική όσο και η χημική σταθερότητα των λιποσωμάτων καθορίζουν τον βαθμό εγκλεισμού, την αποδέσμευση, το χρόνο διατήρησης, καθώς και την *in vivo* συμπεριφορά και φαρμακοκινητική των μορίων που φέρουν είτε στη λιπιδική τους διπλοστοιβάδα είτε στο εσωτερικό υδατικό τους περιβάλλον.

1.6.3 Βιολογική σταθερότητα.

Η βιολογική σταθερότητα των λιποσωμάτων σχετίζεται με την παρουσία παραγόντων, όπως οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τα λιποσώματα όταν εισέρχονται σε έναν οργανισμό, και καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από την οδό χορήγησης. Η βιολογική σταθερότητα των λιποσωμάτων εξαρτάται από κυτταρικές και άλλες φυσιολογικές συνθήκες και η απόκρισή τους σχετίζεται άμεσα με τα χαρακτηριστικά που φέρουν τα λιποσώματα και που τελικά καθορίζουν τις ιδιότητές τους *in vivo*. Η φύση αλλά και η πυκνότητα του φορτίου επιφανείας επηρεάζει τη σταθερότητα, την κινητική, την αλληλεπίδραση και την πρόσληψη από τα κύτταρα στόχους, καθώς και την κατανομή των λιποσωμάτων *in vivo*. Καθίσταται λοιπόν

φανερό ότι η ηλεκτροστατική σταθερότητα των λιποσωμάτων, η οποία καθορίζεται από το φορτίο που φέρουν στην επιφάνειά τους, δεν αποτελεί από μόνη της ικανή και αναγκαία συνθήκη σταθερότητας έναντι πρωτεϊνών και ενζύμων που εμπλέκονται στις φυσιολογικές διαδικασίες *in vivo*.

Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας της σταθερότητας των λιποσωμάτων *in vivo* είναι η θερμοδυναμική κατάσταση στην οποία βρίσκεται η λιπιδική τους διπλοστοιβάδα και ιδιαίτερα τη ρευστότητά τους. Οι θερμοτροπικές ιδιότητες της διπλοστοιβάδας των λιποσωμάτων είναι αλληλένδετες με τη διαπερατότητα, συσσωμάτωση, συγχώνευση ή και την πρόσδεση πρωτεϊνών στην επιφάνειά τους. Η ρευστότητα της διπλοστοιβάδας των λιποσωμάτων ευνοεί τη δράση ενζύμων όπως η φωσφολιπάση στην επιφάνεια των κυττάρων, καθώς η πρόσβασή τους στις λιπιδικές αλυσίδες ενισχύεται σε μια διπλοστοιβάδα η οποία βρίσκεται στην υγρή κρυσταλλική φάση. Τέλος, το μέγεθος των λιποσωμάτων επηρεάζει την κατανομή τους στους ιστούς, αλλά και την ταχύτητα αποδόμησής τους από τα μακροφάγα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.

1.6.4 Προστατευτική κάλυψη λιποσωμάτων

Για την επίτευξη της φυσικής σταθερότητας των λιποσωμάτων η προσοχή των επιστημόνων στράφηκε προς τις βασικές ιδιότητες των λιποσωμάτων που επηρεάζουν την εκλεκτικότητα και επομένως τον βαθμό εγκλεισμού δραστικών ενώσεων (²⁶). Στόχος επομένως είναι: πρώτον, το εγκλεισμένο φάρμακο να μη μπορεί να διαρρεύσει από τα κυστίδια προς το εξωτερικό περιβάλλον και δεύτερον, τα λιποσώματα να μη συσσωματώνονται, ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός μεγαλύτερων υπερμοριακών δομών. Και οι δυο προϋποθέσεις επηρεάζουν την βιοκατανομή του φαρμάκου *in vivo* και συνεπώς την θεραπευτική ικανότητά του. Όπως προαναφέρθηκε, η μεταβολή και άλλων φυσικών παραμέτρων, όπως η υδρόλυση, μπορούν να μεταβληθούν κατά την διάρκεια της αποθήκευσης με αποτέλεσμα την μεταβολή των φυσικών ιδιοτήτων της διπλοστοιβάδας.

Ο χρόνος ζωής των λιποσωμάτων παίζει σημαντικό ρόλο στην μεταφορά των φαρμάκων στον οργανισμό, δεδομένου ότι θα πρέπει να καλύπτει το χρονικό διάστημα που απαιτείται για να φτάσουν στα καθορισμένα κύτταρα μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Η

αύξηση της σταθερότητας επιτεύχθηκε μερικώς με τη χρήση μικτών λιποσωμάτων, καθώς τα συστατικά της διπλοστοιβάδας επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την διαπερατότητα της ως προς τα συστατικά που εγκλείονται σε αυτήν. Παρ' όλα αυτά ο χρόνος ζωής δεν αυξήθηκε εξαιτίας του αμυντικού συστήματος του οργανισμού που καταστρέφει τα λιποσώματα με φαγοκύτωση.

Ουσιαστική αύξηση του χρόνου ζωής επιτεύχθηκε όταν η εξωτερική επιφάνεια των λιποσωμάτων καλύφθηκε με αλυσίδες πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG) ⁽²⁴⁾. Τα λιποσώματα αυτά παρέτειναν το χρόνο κυκλοφορίας τους στο αίμα και χαρακτηρίστηκαν ως μη ανιχνεύσιμα λιποσώματα (stealth liposomes) ⁽²⁷⁾. Η εξήγηση του φαινομένου αυτού βασίζεται αποκλειστικά στις ιδιότητες του πολυμερούς. Οι πολυμερικές αλυσίδες καλύπτουν την διπλοστοιβάδα σχηματίζοντας ένα είδος «νέφους». Οι βέλτιστες ιδιότητες για συγκεκριμένο μοριακό βάρος πολυμερούς επιτυγχάνονται σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις του πολυμερούς. Η υδροφιλικότητα και η ευκαμψία του συγκεκριμένου μη ιοντικού πολυμερούς αυξάνει τον όγκο του, με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η προσέγγιση λιποπρωτεϊνών καθώς και των μορίων που αναγνωρίζονται από τα μακροφάγα κύτταρα. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του χρόνου ζωής των λιποσωμάτων στην κυκλοφορία του αίματος. Ωστόσο, θα πρέπει για ιδανικό μήκος του πολυμερούς να υπολογισθεί η ιδανική συγκέντρωση διότι επηρεάζονται οι παρακάτω συνθήκες:

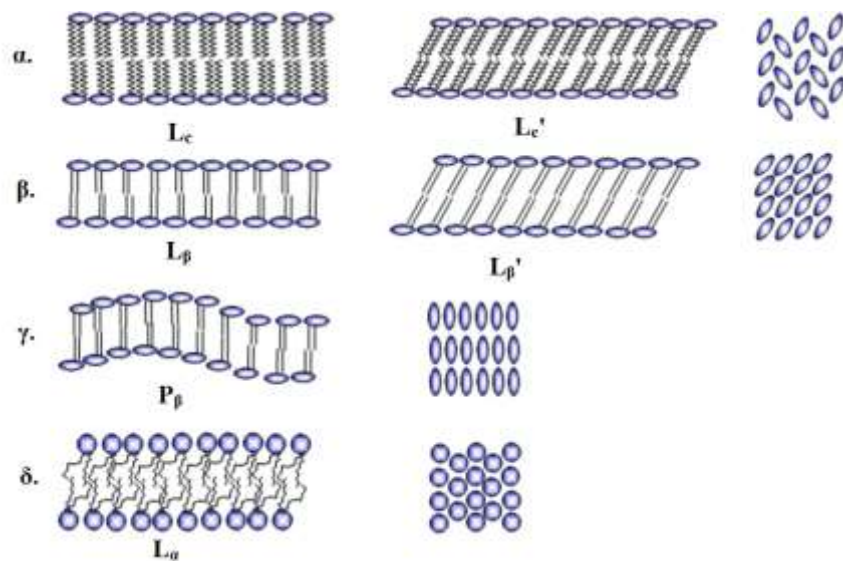
α) ο μεγάλος αριθμός και το μεγάλο μήκος αλυσίδων μπορούν να περιορίσουν τη μοριακή αναγνώριση με άλλα λιποσώματα ή κύτταρα και

β) το υδρόφιλο περιβάλλον που αναπτύσσεται γύρω από το λιπόσωμα μπορεί να εμποδίσει την απελευθέρωση υδρόφοβων δραστικών ουσιών από την διπλοστοιβάδα. Η διαμόρφωση την οποία λαμβάνει το πολυμερές στην επιφάνεια των λιποσωμάτων καθορίζεται από τη μέση απόσταση μεταξύ των μορίων του πολυμερούς (D), η οποία εξαρτάται από το γραμμομοριακό κλάσμα πολυμερούς/λιπιδίων και από το μέγεθος του πολυμερούς (R) το οποίο εξαρτάται από το μοριακό βάρος του ⁽²⁷⁾. Στις περιπτώσεις όπου $D \gg R$, το πολυμερές λαμβάνει πεπλατυσμένη διαμόρφωση (pancake) στην οποία το πάχος του πολυμερούς δεν υπερβαίνει τα 0,15 nm, και είναι ανεξάρτητο από το μοριακό βάρος του. Για $D > R$ οι πολυμερικές αλυσίδες λαμβάνουν την διαμόρφωση μανιταριού, ενώ για $D < R$ οι πολυμερικές

αλυσίδες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και εκτείνονται σε ακτινωτή διεύθυνση λαμβάνοντας την διαμόρφωση «βούρτσας». Η διαμόρφωση επηρεάζει τον βαθμό ενυδάτωσης του πολυμερούς καθώς και τον βαθμό ενυδάτωσης των πολικών τμημάτων των λιπιδίων μέσα στην διπλοστοιβάδα.

1.7 Θερμική συμπεριφορά και μεταπτώσεις των λιποσωμάτων

Η μελέτη της θερμοτροπικής συμπεριφοράς λιποσωμάτων και γενικότερα λιπιδίων σε πρότυπα και βιολογικά συστήματα γίνεται κυρίως με την μέθοδο της διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης, DSC. Οι διπλοστοιβάδες φωσφολιπιδίων υπόκεινται σε θερμικές μεταβολές, οι οποίες περιλαμβάνουν μεταβάσεις από την κατάσταση τάξης στην κατάσταση αταξίας και οι οποίες χαρακτηρίζουν αντίστοιχα τις κρυσταλλικές δομές της διπλοστοιβάδας. Οι θερμοτροπικές ιδιότητες των διπλοστοιβάδων που σχηματίζονται από φωσφολιπίδια χολίνης έχουν μελετηθεί εκτενώς και αποτελούν το συνηθέστερο μοντέλο στη μελέτη αλληλεπίδρασης βιοδραστικών μορίων με μεμβράνες (28).



Εικόνα 8. Σχηματική παράσταση των φάσεων των διπλοστοιβάδων που αποτελούνται από φωσφατιδυλοχολίνη (PC) σε υδατικό διάλυμα: α. κρυσταλλική (subgel, L_c) και κρυσταλλική (subgel, L_c') όπου οι αλειφατικές αλυσίδες είναι είτε κάθετες ή υπό γωνία ως προς το επίπεδο της στοιβάδας, αντίστοιχα. β. Γέλη (gel, L_β) και γέλη (gel, L_β') όπου οι αλειφατικές αλυσίδες είναι είτε κάθετες ή υπό γωνία ως προς το επίπεδο της στοιβάδας αντίστοιχα. γ. Πτυχωτή γέλη (rippled gel P_β) και δ. υγρή κρυσταλλική φάση (liquid crystal, L_a) (Cevc G., Chem. Phys. Lipids, 57, 293, 1991).

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 8 οι φωσφατιδυλοχολίνες χαρακτηρίζονται από πλούσιο πολυμορφισμό και παρουσιάζουν μεταβάσεις μεταξύ των φάσεών τους

Υπομετάπτωση $L_c \rightarrow L_{\beta}$. Η μετάβαση από την κρυσταλλική φάση (Lamellar) στη φάση γέλης ονομάζεται υπομετάπτωση. Για να πραγματοποιηθεί και να γίνει εμφανής απαιτείται θερμική εξισορρόπηση της διπλοστοιβάδας για μεγάλο χρονικό διάστημα, το οποίο μπορεί να υπερβαίνει ακόμα και τις 10 ημέρες σε χαμηλές θερμοκρασίες. Η μετάβαση αυτή χαρακτηρίζεται από πολύ αργή κινητική. Η εμφάνιση της υπομετάπτωσης $L_c \rightarrow L_{\beta}$ εξαρτάται από τη θερμική ιστορία των φωσφολιπιδίων του συστήματος, ενώ τις περισσότερες φορές δεν είναι εμφανής σε ένα τυπικό θερμογράφημα ειδικά αν αυτό προέρχεται από επαναλαμβανόμενους κύκλους ψύξης-θέρμανσης.

Υπομετάπτωση $L_{\beta} \rightarrow SGII$. Κατά την αντίστροφη πορεία, η φάση γέλης L_{β} μεταπίπτει πρώτα στην φάση της υπο-υπογέλης (sub-subgel) SGII στην οποία οι λιπιδικές αλυσίδες είναι πλήρως εκτεταμένες, αλλά με την ίδια επαναλαμβανόμενη περιοδικά απόσταση μεταξύ των διαδοχικών διπλοστοιβάδων όπως ακριβώς στη φάση γέλης L_{β} . Η μετατροπή αυτή είναι αντιστρεπτή και προφανώς συμβαίνει χωρίς σημαντικές αλλαγές στην κατάσταση ενυδάτωσης της διπλοστοιβάδας. Ο χρόνος που απαιτείται για την πλήρη μετατροπή της SGII φάσης στην L_c κατά τη διάρκεια της εξισορρόπησης σε χαμηλές θερμοκρασίες εξαρτάται από το μήκος των λιπιδικών αλυσίδων. Για παράδειγμα, στο DPPC¹ απαιτούνται περισσότερες από 10 ημέρες. Εκτός από τις φωσφατιδυλοχολίνες, η μετασταθής αυτή φάση εμφανίζεται και στο ιονισμένο DPPG². Η SGII εμφανίζεται μόνο κατά τη ψύξη της L_{β} ή L_{β} φάσης γέλης και όχι κατά τη θέρμανση της κρυσταλλικής L_c φάσης (^{29,30}).

Προμετάπτωση $L_{\beta} \rightarrow P_{\beta}$. Στη φάση γέλης L_{β} , το σύστημα χαρακτηρίζεται από πλήρη ανισοτροπία, οι λιπιδικές αλυσίδες απαντώνται σε *all-trans* διαμόρφωση και η κλίση τους ως προς το επίπεδο της διπλοστοιβάδας είναι ομοιογενής (³¹). Ωστόσο, κοντά στη θερμοκρασία της προμετάπτωσης, οι λιπιδικές αλυσίδες αυξάνουν τα *gauche* διαμορφωμερή και η

¹ 1,2-διπαλμιτοϋλο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφατιδυλοχολίνη C16:0

² 1,2-διπαλμιτοϋλο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφατιδυλογλυκερόλη, C16:0

ανισοτροπία μειώνεται αισθητά ⁽²⁸⁾. Το γεγονός αυτό απαιτεί ελεύθερο χώρο στο εσωτερικό της διπλοστοιβάδας προκειμένου να καθίσταται εφικτή η περιστροφή των λιπιδικών αλυσίδων κάτι το οποίο δύναται να συμβεί με την κάθετη εκτόπιση γειτονικών φωσφολιπιδίων στο επίπεδο της διπλοστοιβάδας. Η αύξηση στην ενέργεια, ως αποτέλεσμα της περιστροφής των λιπιδικών αλυσίδων, αντισταθμίζεται από την ενέργεια κατά την εκτόπιση γειτονικών φωσφολιπιδίων. Από την άλλη μεριά η μείωση στην ανισοτροπία των λιπιδικών αλυσίδων δύναται να επιφέρει διακύμανση στη μοριακή κάμψη, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό των χαρακτηριστικών ρικνώσεων (ρυτίδων). Η μεταβολή στη φύση της αλληλεπίδρασης των πολικών άκρων και ο βαθμός ενυδάτωσης στη διεπιφάνεια φαίνεται επίσης να αποτελούν σημαντικό παράγοντα που καθορίζει την εμφάνιση της ρυτιδωμένης φάσης. Η μετάβαση από τη φάση γέλης $L_{\beta'}$ στη ρυτιδωμένη φάση $P_{\beta'}$ χαρακτηρίζεται από αύξηση στην ενυδάτωση της περιοχής διεπιφάνειας καθώς και από αύξηση στην κινητικότητα των πολικών άκρων, με αποτέλεσμα την ενίσχυση των απωστικών δυνάμεων στη διεπιφάνεια και αντίστοιχα την αύξηση στην εγκάρσια επιφάνεια της πολικής περιοχής σε σχέση με αυτήν των δύο λιπιδικών αλυσίδων. Η αύξηση του βαθμού ενυδάτωσης της περιοχής της διεπιφάνειας φέρει τις υδρόφοβες συνεκτικές αλληλεπιδράσεις των λιπιδικών αλυσίδων σε τάση υποβάλλοντας το σύστημα σε διαταραχή. Η διαταραχή αυτή φαίνεται να αντισταθμίζεται με το σχηματισμό της μορφολογίας των ρυτίδων.

Κύρια μετάπτωση $P_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$. Η μετάβαση από τη φάση γέλης στην υγρή κρυσταλλική φάση καλείται κύρια μετάπτωση. Είναι ενδόθερμο φαινόμενο και η απαιτούμενη ενέργεια καταναλώνεται για την εξασθένιση των διαμοριακών δυνάμεων van der Waals μεταξύ των λιπιδικών αλυσίδων ⁽³²⁾. Η κύρια μετάβαση προκαλεί σημαντικές δομικές και αλλαγές διαμόρφωσης της διπλοστοιβάδας των φωσφολιπιδίων. Η μετάπτωση διπλοστοιβάδων φωσφολιπιδίων χολίνης από τη ρυτιδωμένη φάση $P_{\beta'}$ στην υγρή κρυσταλλική φάση L_{α} χαρακτηρίζεται από υψηλή συνεργασιμότητα (cooperativity). Θερμοδυναμικά, η υγρή κρυσταλλική φάση ακολουθείται από σημαντική αύξηση της εντροπία του συστήματος, ως αποτέλεσμα της απότομης αύξησης της ενδομοριακής αταξίας των λιπιδικών αλυσίδων, με επακόλουθο την ταυτόχρονη ελάττωση στις συνεκτικές αλληλεπιδράσεις τους. Το γεγονός αυτό είναι αποτέλεσμα της *trans-gauche* ισομερίωσης των ανθρακικών δεσμών στις λιπιδικές

αλυσίδες, η οποία παρατηρείται κυρίως στα τελικά άκρα των λιπιδικών αλυσίδων στο εσωτερικό υδρόφοβο περιβάλλον της διπλοστοιβάδας καθώς και στην περιοχή κοντά στη διεπιφάνεια. Η ισομερίωση αυτή και η αύξηση του αριθμού των *gauche* διαμορφωμένων είναι οι λόγοι για την αύξηση του όγκου που καταλαμβάνουν τα φωσφολιπίδια στη διπλοστοιβάδα, την αύξηση στην απόσταση μεταξύ των λιπιδικών αλυσίδων ανά μόριο και τη μείωση στο πάχος της διπλοστοιβάδας (^{33,34}).

Υπο-κύρια μετάπτωση. Το 1995, ο Jorgensen περιέγραψε μια μικρή ενθαλπική κορυφή μετάβασης σε φωσφατιδυλοχολίνες με μακριά λιπαρή αλυσίδα (μεγαλύτερη από C16), την οποία και ονόμασε υπο-κύρια μετάπτωση (sub-main transition). Η εμφάνιση της υπο-κύριας μετάπτωσης είναι ίσως το αποτέλεσμα της μετάβασης φάσης της λιπιδικής μήτρας από ένα οργανωμένο πλέγμα με οργανωμένες λιπιδικές αλυσίδες φωσφολιπιδίων σε μια φάση όπου ενώ διατηρείται η οργάνωση των λιπιδικών αλυσίδων δεν υφίσταται πλέον η οργάνωση του φωσφολιπιδικού πλέγματος (³⁵). Η θερμική συμπεριφορά των λιποσωμάτων και η κατανόηση των παραμέτρων που επηρεάζουν τις θερμοτροπικές τους ιδιότητες μελετήθηκαν εκτεταμένα στην προσπάθεια να καθοριστούν με το βέλτιστο τρόπο οι φυσικοχημικές μεταβολές που παρατηρούνται στους φορείς αυτούς. Η μελέτη των λιποσωματικών θερμοτροπικών ιδιοτήτων πραγματοποιείται κυρίως σε θερμοκρασίες κοντά στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης, καθώς στη θερμοκρασία αυτή τα λιποσώματα έχουν πραγματικά πολύ ενδιαφέρουσες ιδιότητες και υποβάλλονται σε ουσιαστικές αλλαγές. Για παράδειγμα, η συνύπαρξη της φάσης γέλης με την υγρή κρυσταλλική φάση κατά τη διαδικασία κύριας μετάβασης των λιπιδικών αλυσίδων μπορεί να επηρεάσει το σχήμα των λιποσωμάτων, αφού προκαλούνται διακυμάνσεις στην ενθαλπία, την επιφάνεια και την καμπυλότητα του λιποσώματος στη διεπιφάνεια της φάσης γέλης και υγρής κρυσταλλικής φάσης (³⁵).

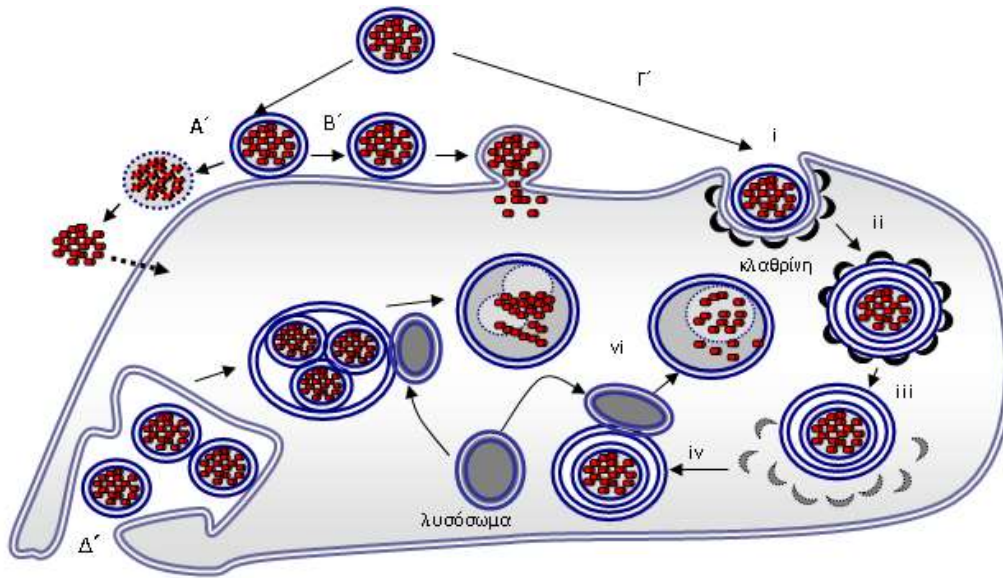
1.8 Λιποσώματα ως συστήματα χορήγησης και ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμακευτικών ουσιών

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, μια από τις ιδιότητες των λιποσωμάτων είναι η δυνατότητα εγκλεισμού μικρών ή μεγάλων μορίων. Ο τρόπος και η θέση του εγκλεισμού εξαρτάται κυρίως από το είδος της υπό έγκλιση ουσίας. Τα υδρόφιλα μόρια, όπως αναμένεται, εγκλείονται

κυρίως στον υδατικό πυρήνα των μονοστοιβαδικών λιποσωμάτων και στους υδάτινους χώρους τους των πολυστοιβαδικών λιποσωμάτων. Στην περίπτωση όπου υπάρχουν διαμοριακές αλληλεπιδράσεις (ιοντικές ή δεσμοί υδρογόνου) μεταξύ των υδρόφιλων μορίων και των πολικών κεφαλών των αμφιφιλικών μορίων που αποτελούν τα υδρόφιλα μόρια επιλέγουν την υδρόφιλη περιοχή των διπλοστοιβάδων ⁽³⁶⁾. Αντίθετα, τα υδρόφοβα μόρια εγκλείονται στο υδρόφοβο τμήμα των λιποσωμάτων, δηλαδή στο εσωτερικό της διπλοστοιβάδας ή των διπλοστοιβάδων, ανάμεσα στις ανθρακικές αλυσίδες των αμφιφιλικών μορίων.

Η δυνατότητα εγκλεισμού είναι πολύ σημαντική καθώς είναι γνωστό ότι η ικανότητα διαχωρισμού με τη δημιουργία ανεξάρτητων χώρων, ο εγκλεισμός διαφόρων ουσιών και η ελεγχόμενη διαπερατότητα, αποτελούν κοινά χαρακτηριστικά των ζωντανών κυττάρων. Με αυτό τον τρόπο, όπως προαναφέρθηκε, τα λιποσώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως απλά μοντέλα μελέτης της συμπεριφοράς των κυττάρων και ως φορείς δραστικών ουσιών όπως για παράδειγμα φαρμάκων, κ.λπ. ⁽³⁷⁾. Τα μεγαλύτερα πλεονέκτημα αυτού του είδους μεταφοράς ουσιών, κυρίως φαρμάκων, είναι η δυνατότητα εγκλεισμού τόσο υδρόφιλων όσο και υδρόφοβων μορίων και της εκλεκτικής στόχευσης των μη υγιών κυττάρων. Η διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται με την κατάλληλη επιλογή μικτών λιποσωμάτων ως φορέων, τα οποία διαθέτουν ειδικά μόρια που φέρουν κατάλληλες αναγνωρίσιμες ομάδες (ligands) ⁽³⁸⁾, ανάλογα με το είδος των κυττάρων στόχων.

Η αλληλεπίδραση των λιποσωματικών φορέων και των κυττάρων στόχων έχει σαν τελικό αποτέλεσμα την αποδέσμευση της φαρμακευτικής ουσίας από τα λιποσώματα και την εισαγωγή της στα κύτταρα. Η διαδικασία αυτή είναι δυνατό να επιτευχθεί με πολλούς τρόπους, οι οποίοι εξαρτώνται από το είδος και τα χαρακτηριστικά των λιποσωμάτων, όπως μέγεθος ⁽³⁹⁾, φορτίο, είδη μορίων που φέρουν αναγνωρίσιμες ομάδες ή υποδοχείς κ.λπ.⁽⁴⁰⁾ και των κυττάρων (καρκινικά, μακροφάγα) (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Σχηματική παράσταση των τρόπων με τους οποίους τα λειτουργικά λιποσώματα αλληλεπιδρούν με τα κύτταρα και απελευθερώνουν την δραστική ουσία σε αυτά. Μετά την προσκόλληση των λιποσωμάτων στην επιφάνεια των κυττάρων: *A*: διασπώνται οι διπλοστοιβάδες τους και απελευθερώνουν την φαρμακευτική ουσία η οποία με διάχυση περνά στο εσωτερικό των κυττάρων, *B*: οι διπλοστοιβάδες των λιποσωμάτων και των κυττάρων συντήκονται και η φαρμακευτική ουσία περνά κατευθείαν στο εσωτερικό των τελευταίων, *Γ*: τα λιποσώματα υφίστανται ενδοκύτωση μέσω κυστιδίων τα οποία είναι καλυμμένα με κλαθρίνη (i-ii) (clathrin-mediated endocytosis). Ακολούθως απομακρύνεται η κλαθρίνη (iii) και τα κυστίδια συντήκονται με λυσοσώματα (iv) και ακολουθεί διάσπαση των λιποσωματικών διπλοστοιβάδων και απελευθέρωση της δραστικής ουσίας (v), *Δ*: Τα λιποσώματα υπόκεινται σε φαγοκύτωση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΘΕΡΜΟΕΥΑΙΣΘΗΤΑ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ

2.1 Εισαγωγή

Είναι πλέον γνωστό ότι κατά την εφαρμογή χημειοθεραπείας συμπαγών όγκων, είναι πάρα πολύ δύσκολο να εφαρμοσθούν θεραπευτικά σχήματα, δεδομένου ότι τα φάρμακα συγχρόνως με τα καρκινικά κύτταρα καταστρέφουν και υγιή. Τα λιπосώματα αποτελούν μια πολλά υποσχόμενη λύση, εφόσον το εγκλεισμένο φάρμακο μπορεί να απελευθερωθεί επιλεκτικά μόνο στη πάσχουσα περιοχή (^{41,42}). Για τον λόγο αυτό, οι ερευνητικές προσπάθειες έχουν στραφεί στην προσπάθεια ενεργοποίησης (triggering) της απελευθέρωσης του φαρμάκου από τα λιπосώματα. Αρκετοί από τους μηχανισμούς που έχουν προταθεί στοχεύουν στην μεταβολή του pH, του φωτός, των υπερήχων και της θερμοκρασίας κατά την οποία γίνεται συνδυαστική χρήση της υπερθερμίας με τα θερμοευαίσθητα λιπосώματα. Για τον σχεδιασμό φορέων φαρμάκων και την απόδοση του συστήματος μεταφοράς ισχύουν τέσσερις προϋποθέσεις που περικλείονται σε: Διατήρηση, Αποφυγή, Στόχευση, Απελευθέρωση (⁴³). Τα τελευταία χρόνια, τα συστήματα μεταφοράς φαρμακομορίων με βάση τα λιπίδια έχουν εκτενώς χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία του καρκίνου λόγω της ικανότητάς τους να διατηρούν το αντικαρκινικό φάρμακο στην εσωτερική τους κοιλότητα και να μπορούν να αποφεύγουν την άμυνα του οργανισμού, στοχεύοντας έτσι στον ενδιάμεσο ιστό των όγκων (^{44,45}). Τα συμβατικά λιπосώματα έχουν αξιολογηθεί κλινικά (⁴⁶), ενώ τα μη ανιχνεύσιμα (stealth) λιπосώματα έχουν ήδη εγκριθεί να εφαρμοσθούν κλινικά στο σάρκωμα Kaposi. Το αντικαρκινικό φάρμακο απελευθερώνεται στην περιοχή του ιστού γύρω από τον όγκο, προσφέροντας αρκετά μεγάλο θεραπευτικό όφελος και αποτελεσματικότητα. Ωστόσο, η απελευθέρωση του φαρμάκου αποκλειστικά και μόνο στην πάσχουσα περιοχή θα ήταν εξαιρετικά επωφελής, δεδομένου ότι θα αυξάνονταν τοπικά τα επίπεδα του φαρμάκου στον όγκο. Στην προσπάθεια τοπικής έγχυσης και με ελεγχόμενο ρυθμό του αντικαρκινικού φαρμάκου το 1978 ο Yatvin με τους συνεργάτες του (⁴⁷), πρότειναν τη χρήση θερμοευαίσθητου λιπосωματικού φορέα, ανοίγοντας τον δρόμο σε πρόσθετες μελέτες.

Ως θερμοευαίσθητα χαρακτηρίζονται τα λιποσώματα που απελευθερώνουν το περιεχόμενο τους μόνο σε συγκεκριμένη θερμοκρασία του περιβάλλοντος μέσου. Λιποσώματα που αποκρίνονται σε λίγους βαθμούς πάνω από τη φυσιολογική θερμοκρασία του σώματος θεωρούνται χρήσιμα στην επίτευξη του επιθυμητού αποτελέσματος, δεδομένου ότι θα μπορούν να απελευθερώνουν το εγκλεισμένο αντικαρκινικό φάρμακο ειδικά σε μια περιοχή-στόχο, που με κατάλληλες συνθήκες αποκτά υψηλότερη θερμοκρασία, υπερθερμία, ⁽⁴⁸⁾. Η ιδέα χορήγησης φαρμάκου με αύξηση της θερμοκρασίας έχει ήδη χρησιμοποιηθεί στην αντικαρκινική θεραπεία και πολλές μελέτες βασίζονται στη χρήση λιποσωματικών φορέων που επηρεάζονται από την θερμότητα.

Στην ήπια υπερθερμία οι όγκοι θερμαίνονται σε θερμοκρασίες έως 42-43°C ⁽⁴⁷⁾. Συνήθως συνδυάζεται με χημειοθεραπεία ή ακτινοβολία για την ενίσχυση του αποτελέσματος. Η υπερθερμία είναι γνωστή για την αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας, δημιουργώντας συσσώρευση λιποσωμάτων στον ιστό του όγκου ⁽⁴⁹⁾. Η επίδραση της υπερθερμίας αφορά στην εξαγγείωση των λιποσωμάτων και την εναπόθεση του φαρμάκου στους συμπαγείς όγκους. Τα λιποσώματα λόγω της ικανότητάς τους να έχουν παρατεταμένη κυκλοφορία και το μικρό τους μέγεθος είναι δυνατόν να διαπεράσουν το αγγειακό σύστημα του όγκου, το οποίο είναι περισσότερο διαπερατό από το αντίστοιχο φυσιολογικό αγγειακό σύστημα. Η ήπια υπερθερμία αυξάνει τη αγγειακή διαπερατότητα με αποτέλεσμα να προκαλεί αύξηση στην αιμάτωση του όγκου. Η αιμάτωση του όγκου έχει ως αποτέλεσμα την πιο αποτελεσματική απόκριση στην συνεργιστική επίδραση χημειοθεραπείας και ακτινοθεραπείας ^(33,34). Εκτός αυτού, η υπερθερμία μελετάται πλέον και για την ταχεία απελευθέρωση των φαρμάκων από θερμοευαίσθητα λιποσώματα, τα οποία εντοπίζονται σε στενή γειτνίαση με τα καρκινικά κύτταρα. Στη συνέχεια το φάρμακο απορροφάται κυρίως από τα καρκινικά κύτταρα και μπορεί να φτάσει στη θέση δράσης του, π.χ. στον πυρήνα του κυττάρου. Σύμφωνα με την ενδοαγγειακή απελευθέρωση, τα θερμοευαίσθητα λιποσώματα φτάνουν στην περιοχή του θερμαινόμενου όγκου και αρχίζουν αμέσως να απελευθερώνουν το περιεχόμενο φάρμακό τους ενδοαγγειακά. Το απελευθερωμένο φάρμακο απορροφάται από τον ιστό του όγκου, αλλά και από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αιμοφόρων αγγείων.

Ο σχεδιασμός ενός φαρμακοτεχνικού λιποσωματικού φορέα, ο οποίος να διαθέτει και την ικανότητα διατήρησης του εγκλεισμένου φαρμάκου και συγχρόνως τη δυνατότητα απελευθέρωσης αυτού στην πάσχουσα περιοχή είναι ιδιαίτερα κρίσιμος. Η σπουδαιότητα της ταυτόχρονης συνύπαρξης των δύο αυτών χαρακτηριστικών του λιποσωματικού φορέα οφείλεται στο γεγονός ότι, όπως έχει διαπιστωθεί, η χορήγηση αντικαρκινικών φαρμάκων με λιποσώματα δεν συνεπάγεται απαραίτητα αυξημένη θεραπευτική δράση. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι το εγκλεισμένο φάρμακο δεν απελευθερώνεται πλήρως από τον λιποσωματικό φορέα ώστε να επάγει κυτταροτοξική δράση (⁵⁰).

Η απελευθέρωση του φαρμάκου από τα θερμοευαίσθητα λιποσώματα εξαρτάται από τον τρόπο διαχείρισης της θερμότητας που θα αυξήσει τη θερμοκρασία περιβάλλοντος σε τιμή μεγαλύτερη από τη θερμοκρασία της κύριας μετάπτωσης των λιπιδίων της διπλοστοιβάδας των λιποσωμάτων, πάνω από την οποία η διαπερατότητα της μεμβράνης αυξάνεται ραγδαία. Κατά τον αρχικό σχεδιασμό των θερμοευαίσθητων λιποσωμάτων παρατηρήθηκαν τα εξής δύο προβλήματα: α) το φάσμα θερμοκρασιών της μετάπτωσης των λιπιδίων ήταν σχετικά ευρύ και β) υπήρχε σχετικά αργή και ελλιπής απελευθέρωση των εγκλεισμένων φαρμάκων (^{51,52}). Αυτό διαπιστώθηκε ότι ήταν αποτέλεσμα της εισαγωγής της χοληστερόλης στη λιποσωματική διπλοστοιβάδα, η οποία αν και βελτίωνε την *in vivo* σταθερότητα των λιποσωμάτων, ταυτόχρονα όμως μείωνε τη θερμοευαισθησία τους, αυξάνοντας παράλληλα το θερμοκρασιακό εύρος της κύριας μετάβασης των λιπιδίων της διπλοστοιβάδας. Αν και η εισαγωγή στη διπλοστοιβάδα του μορίου DSPE-PEG5000 αύξησε τη σταθερότητα των λιποσωμάτων, η απελευθέρωση του εγκλεισμένου φαρμάκου δε ξεπερνούσε το 50% τα πρώτα 5 min σε θερμοκρασία 41 °C.

Οι Needham et al (⁶) πρότειναν τη χρήση δύο βασικών λιπιδικών συστατικών για την παρασκευή του λιποσωματικού φορέα που περιέχει 1,2-διπαλμιτοϋλο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (DPPC): α) ένα λυσολιπίδιο, την 1-(μονοστεαρική)-*sn*-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (MSPC) και β) το τροποποιημένο 1,2-(διστεαρική)-*sn*-γλυκερο-3-φωσφοαιθανολαμίνη-N-[μεθοξυ(πολυαιθυλενογλυκόλη)-2000] (DSPE-PEG) σε αναλογία DPPC:MSPC:DSPE-PEG (96:10:4). Το λιπόσωμα με την παραπάνω λιπιδική σύσταση αποτελεί το κατεξοχήν χρησιμοποιούμενο θερμοευαίσθητο λιπόσωμα, λόγω της ικανότητάς του να μεταβαίνει

γρήγορα από τη φάση γέλης στην υγρή κρυσταλλική κατάσταση (κύρια μετάπτωση) με ήπια υπερθερμία (42 °C), απελευθερώνοντας το περιεχόμενό του ραγδαία >90% στα πρώτα 5 min (⁵³).

2.2 Η επίδραση των λυσολιπιδίων στην διαπερατότητα των διπλοστοιβάδων

Πριν από 50 περίπου χρόνια ο Parahadjopoulos παρατήρησε ότι η ιοντική διαπερατότητα μέσω λιπιδικής μεμβράνης εμφανίζει μέγιστο καθώς η μεμβράνη μεταπίπτει από τη φάση γέλης στην υγρή κρυσταλλική φάση (⁵⁴). Κατά τη μετάβαση αυτή, οι δύο φάσεις (γέλης και υγρή κρυσταλλική) συνυπάρχουν δημιουργώντας περιοχές περιφερειακά που αποτελούνται από λιπίδια με μεγάλες ανομοιογένειες στις αναδιπλώσεις (ruckering) των μορίων και στην υδρόφοβη αλληλεπίδραση (⁵⁵). Για την ερμηνεία του φαινομένου της διαπερατότητας αναπτύχθηκαν δύο βασικές θεωρίες. Σύμφωνα με την πρώτη υπόθεση η αύξηση της διαπερατότητας οφείλεται στην πλευρική συμπίεστικότητα της μεμβράνης, η οποία παρατηρείται κατά τη διάρκεια της κύριας μετάβασης (^{56,57}). Οι διακυμάνσεις της συμπίεστικότητας στη διπλοστοιβάδα δημιουργούν κοιλότητες στην περιοχή της πολικής κεφαλής των λιπιδίων και τα ιόντα μπορούν να εισέλθουν και στη συνέχεια να διαπεράσουν τη διπλοστοιβάδα. Κατά τη δεύτερη υπόθεση, η αύξηση αποδίδεται στην ανώμαλη διαπερατότητα που προκαλείται από τη δημιουργία περιοχών, οι οποίες αναπτύσσονται στα όρια των μικροδομών, μεταξύ της γέλης και της υγροκρυσταλλικής περιοχής κατά τη διάρκεια της μετάβασης (^{58,59}).

Ο Mouritsen και οι συνεργάτες του (⁵⁵) στηριζόμενοι στη δεύτερη υπόθεση πρότειναν το μοντέλο της «στοιβαδικής ετερογένειας». Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση η διπλοστοιβάδα κατά τη διάρκεια της κύριας μετάβασης λειτουργεί ως δυναμικό σύστημα, όπου συνυπάρχουν μικροδομές υγροκρυσταλλικής φάσης με φάσης γέλης. Αρχικά, όταν η λιπιδική μεμβράνη ψύχεται (π.χ. κατά τη διαδικασία δημιουργίας των λιποσωμάτων) από την υγρή κρυσταλλική φάση δημιουργείται στο τήγμα ένας πυρήνας στερεού λιπιδίου. Ο πυρήνας αυτός συνεχίζει να αναπτύσσεται, ενώ παράλληλα δημιουργούνται μικροκρύσταλλοι στερεού λιπιδίου στο τήγμα της υγροκρυσταλλικής φάσης. Τελικά, καθώς η μετάβαση πλησιάζει στο τέλος της και μετασχηματίζεται το τελευταίο υγροκρυσταλλικό λιπίδιο, τότε δημιουργούνται κρυσταλλικές

μικροδομές στα όρια των υγροκρυσταλλικών δομών, οι οποίες απαντώνται σε διαφορετικούς προσανατολισμούς, όπως δηλαδή συμβαίνει και στα περισσότερα «παραδοσιακά» 3-D πολυκρυσταλλικά υλικά ⁽⁶⁰⁾. Αυτή η δημιουργία πυρήνα και η ανάπτυξη μικροκρυστάλλων σχηματίζει τελικά μια μικροδομή, η οποία μοιάζει με μπάλα ποδοσφαίρου. Αν και δεν είναι τόσο σύνηθες ως μοτίβο, αυτό αποτελείται από πλάκες (ή σχετικά επίπεδες πλάκες) στερεού λιπιδίου, δηλαδή σε ένα γιγάντιο λιπιδικό κυστίδιο, το οποίο μπορεί να είναι μεγάλου μεγέθους (της τάξης των μικρών) ή μικρότερου μεγέθους, όπως ένα σφαιρικό λιπόσωμα (διαμέτρου 100 nm). Αυτές οι δομές έχουν παρατηρηθεί σε μικροσκοπία φθορισμού καθώς και σε μικρογραφία ηλεκτρονίων (electron micrographs) λιποσωμάτων διαμέτρου 100 nm και σε φάση γέλης, αποτελούμενα από την ίδια σύσταση λιπιδίου:λυσολιπιδίου όπως αυτή που προτάθηκε από τους Needham et al ⁽¹⁴⁾.

2.3 Καρκίνος

Ο καρκίνος είναι μια εκφυλιστική ασθένεια που αποτελεί μια από τις μεγαλύτερες μάστιγες της εποχής μας. Ο καρκινικός γονότυπος χαρακτηρίζεται από μεταβολές στην φυσιολογία των κυττάρων, οι οποίες συνολικά οδηγούν σε κακοήγη ανάπτυξη και είναι οι εξής ^(2,3):

α) Αυτάρκεια σε σήματα ανάπτυξης. Τα υγιή κύτταρα απαιτούν μιτωτικά σήματα ανάπτυξης, για να πραγματοποιήσουν μετάβαση από την κατάσταση ηρεμίας τους σε μια ενεργή κατάσταση πολλαπλασιασμού. Πολλά από τα ογκογόνα στον καρκινικό κατάλογο δρουν με μίμηση των σημάτων φυσιολογικής αύξησης με τον ένα ή τον άλλο τρόπο.

β) Αναισθησία σε σήματα κατά της ανάπτυξης. Στον υγιή ιστό διάφορα αντιπολλαπλασιαστικά σήματα λειτουργούν για να διατηρήσουν την ομοιόσταση των υγιών κυττάρων. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν αναπτύξει μηχανισμούς έτσι ώστε να αποφεύγουν αυτά τα σήματα, επιτυγχάνοντας έτσι ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό.

γ) Αποφυγή της απόπτωσης. Ο προγραμματισμένος θάνατος ή η απόπτωση διασφαλίζει την θανάτωση των κυττάρων, τα οποία δεν λειτουργούν φυσιολογικά. Στα καρκινικά κύτταρα η απόπτωση αποφεύγεται μέσω μιας ποικιλίας στρατηγικών με πιο κοινή την απώλεια των αποπτωτικών ρυθμιστών, μέσω μεταλλάξεων. Η επίκτητη αυτή αντίσταση στην απόπτωση αποτελεί χαρακτηριστικό των περισσότερων, αν όχι όλων, των καρκινικών τύπων.

δ) Δυνατότητα αναπαραγωγής χωρίς όρια. Τα φυσιολογικά κύτταρα έχουν μια πεπερασμένη δυνατότητα αναπαραγωγής, μετά από την οποία μπαίνουν σε μια κατάσταση στασιμότητας που λέγεται γήρανση (senescence) και στην συνέχεια σε μια δεύτερη φάση, η οποία ονομάζεται κρίση και χαρακτηρίζεται από μαζικό κυτταρικό θάνατο και την περιστασιακή εμφάνιση κάποιας παραλλαγής που παρουσιάζει άπειρη δυνατότητα αναπαραγωγής, είναι δηλαδή αθανатоποιημένα. Οι περισσότεροι τύποι των καρκινικών κυττάρων εμφανίζονται να είναι αθανатоποιημένοι, ιδιότητα που έχει να κάνει με την διατήρηση των τελομερών επ' άπειρον.

ε) Ικανότητα αγγειογένεσης. Το οξυγόνο και τα τροφικά που μεταφέρονται από τα αγγεία είναι σημαντικά για την λειτουργία και την επιβίωση των κυττάρων. Στον υγιή ιστό η διαδικασία της αγγειογένεσης είναι ρυθμιζόμενη προσεκτικά μέσω θετικών και αρνητικών σημάτων, τα οποία ενθαρρύνουν ή εμποδίζουν την αγγειογένεση. Οι όγκοι μπορούν να ενεργοποιούν τα σήματα της αγγειογένεσης αλλάζοντας την ισορροπία μεταξύ παραγόντων που προωθούν την αγγειογένεση και αναστολέων της αγγειογένεσης.

στ) Εισβολή σε άλλους ιστούς και μετάσταση. Όσον αφορά την εισβολή σε παρακείμενους ιστούς, αρκετοί τύποι πρωτεϊνών, που ευθύνονται για την προσκόλληση των κυττάρων στο περιβάλλον τους, έχουν υποστεί μεταβολές σε κύτταρα που κατέχουν τέτοιες ικανότητες εισβολής ή μετάστασης, όπως τα καρκινικά. Για παράδειγμα η επιθηλιακή καδερίνη (E-cadherin) είναι γνωστός αναστολέας εισβολής και μετάστασης, της οποίας η μείωση προωθεί και τις δύο αυτές διεργασίες. Ένας δεύτερος παράγοντας που προωθεί την ικανότητα εισβολής και μετάστασης των κυττάρων είναι η αυξημένη συγκέντρωση εξωκυττάρων πρωτεασών.

2.3.1 Θεραπείες καρκίνου

Οι θεραπείες του καρκίνου μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με τον τρόπο με τον οποίο αντιμετωπίζεται ο κακοήθης όγκος, όπως με χειρουργική αφαίρεση, χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία και τελευταία με τη χρήση τις στοχευμένων θεραπειών ή στοχευμένων χημειοθεραπειών.

Χειρουργική επέμβαση

Θεωρητικά οι μη μικροκυτταρικού τύπου πρωτογενείς όγκοι που δεν έχουν υποστεί εκτεταμένη διασπορά μπορούν να απομακρυνθούν πλήρως με χειρουργική επέμβαση⁽⁴⁾,

γεγονός που στην πράξη δεν είναι πάντοτε εφικτό. Ανάλογα με την έκταση του καρκίνου, η χειρουργική επέμβαση είναι δυνατόν να στοχεύει είτε στην αφαίρεση μόνο του όγκου ή ακόμη είτε μέρους ή ολόκληρου του προσβεβλημένου οργάνου. Συνήθεις περιπτώσεις αναφέρονται η μαστεκτομή, προστατεκτομή, ειδικές περιπτώσεις καρκίνου του εγκεφάλου, του δέρματος, κ.ά. Η χειρουργική επέμβαση μερικές φορές δεν είναι επιτυχής είτε επειδή έχει ήδη αρχίσει η μετάσταση είτε επειδή τα υγιή όρια δεν είναι σαφώς διαχωρισμένα από τον κυρίως όγκο. Για τους λόγους αυτούς πολλές φορές επιβάλλεται η χημειοθεραπεία πριν την χειρουργική επέμβαση.

Ακτινοθεραπεία

Η ακτινοθεραπεία (^{61,6}) είναι συνήθη μέθοδος τοπικής θεραπείας του καρκίνου (⁵), ενώ διατυπώθηκε ότι περίπου το 50% των νεοπλασματικών ασθενών πρέπει λάβουν ακτινοθεραπεία κάποια στιγμή κατά την διάρκεια της θεραπείας τους (⁶²). Βασίζεται στην επίδραση ιοντίζουσας ακτινοβολίας, προκειμένου να καταστραφούν τα καρκινικά κύτταρα και να συρρικνωθούν οι όγκοι. Οι μορφές ακτινοθεραπείας διακρίνονται σε: **Παρηγορική**, όταν πρόκειται για ανακούφιση του ασθενή από τα συμπτώματα της νόσου (πόνος από οστικές μεταστάσεις, αιμορραγία, σύνδρομο συμπίεσης του νωτιαίου μυελού, εγκεφαλικές μεταστάσεις). **Ριζική**, εφαρμόζεται ως μοναδική θεραπεία και στόχος της είναι η πλήρης ίασης της νόσου. **Επικουρική**, με σκοπό την επίτευξη του τοπικού-περιοχικού ελέγχου της νόσου και ακολουθεί την χειρουργική επέμβαση ή η χημειοθεραπευτική προσέγγιση του ασθενούς. **Προφυλακτική** με σκοπό την προφύλαξη ανατομικών περιοχών που δεν πάσχουν, αλλά μπορούν να αποτελέσουν δευτεροπαθείς εστίες αυτής σε βάθος χρόνου. **Προεγχειρητική** με σκοπό τη μείωση του μεγέθους ενός ανεγχείρητου όγκου ώστε να γίνει χειρουργήσιμος ή να ελαττωθεί το μεταστατικό δυναμικό των κακοήθων κυττάρων (π.χ. προεγχειρητική ακτινοθεραπεία ορθού) (⁶³).

Χημειοθεραπεία

Είναι η πλέον ευρεία εφαρμοζόμενη μέθοδος θεραπείας πολλών καρκινικών μορφών. Τα περισσότερα χημειοθεραπευτικά σχήματα παρεμποδίζουν την μίτωση των κυττάρων, ενώ υπάρχουν φάρμακα που δρουν στην αναστολή ή λειτουργία του καρκινικού DNA. Στα

νεώτερα αντικαρκινικά φάρμακα χρησιμοποιούνται μονοκλωνικά αντισώματα και αναστολείς κινάσης της τυροσίνης (π.χ. imatinib mesylate), που δρουν απευθείας στις μοριακές ανωμαλίες διαφόρων τύπων καρκίνου. Τα μέχρι σήμερα χρησιμοποιούμενα σχήματα χημειοθεραπείας στοχεύουν σε όλα τα ταχέως διαιρούμενα κύτταρα και όχι αποκλειστικά και μόνον στα καρκινικά κύτταρα. Ο παρατηρούμενος μικρός βαθμός εκλεκτικότητας που παρατηρείται πιθανόν να προέρχεται από την αδυναμία πολλών καρκινικών κυττάρων να επιδιορθώσουν την επιφερόμενη καταστροφή του DNA, ενώ τα φυσιολογικά κύτταρα έχουν εν γένει αυτή τη δυνατότητα περισσότερο ανεπτυγμένη. Έτσι, η χημειοθεραπεία μπορεί να βλάψει παράλληλα και τα υγιή κύτταρα, ειδικά εκείνα που παρουσιάζουν υψηλή ταχύτητα ανάπτυξης. Για την μείωση της τοξικότητας των δραστικών φαρμάκων εφαρμόζονται συνδυαστικά σχήματα χημειοθεραπείας, τα οποία δρουν με συγχορήγηση δύο ή περισσότερων φαρμάκων, τα γνωστά «κοκτέιλ». Τα βασικά μειονεκτήματα των χημειοθεραπειών είναι:

- 1) Η δράση τους είναι σε μεγάλο ποσοστό κυτταροστατική και όχι ιαματική και έτσι δεν δίνουν σημαντικές πιθανότητες επιβίωσης στον ασθενή.
- 2) Μετά από ένα διάστημα χορήγησής τους, τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσουν μηχανισμούς αντίστασης αυτών των σκευασμάτων γνωστό στην βιβλιογραφία ως Multidrug Resistance (MDR) που κάνει πλέον αυτά τα φάρμακα μη αποτελεσματικά.
- 3) Συνήθως συνοδεύονται από παρενέργειες στον οργανισμό των ασθενών οι οποίες ποικίλλουν κατά περίπτωση και μερικές από τις οποίες είναι: ναυτία και τάση για εμετό, διάρροια, αναιμία, υποσιτισμός, απώλεια μαλλιών, απώλεια μνήμης, καρδιοτοξικότητα, νεφροτοξικότητα, ηπατοτοξικότητα και ωτοτοξικότητα.

Στοχευμένες Θεραπείες

Οι στοχευμένες θεραπείες αντιμετώπισης του καρκίνου ξεκίνησαν στα τέλη της δεκαετίας του 1990, αλλά ακόμα και σήμερα γίνονται προσπάθειες για ανάπτυξη βελτιωμένων φαρμάκων⁽⁶⁴⁾. Τα μικρά μόρια φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στις στοχευμένες θεραπείες είναι συνήθως αναστολείς ενζυματικών τμημάτων πρωτεϊνών, οι οποίες είναι μεταλλαγμένες, υπερεκφρασμένες ή για κάποιο άλλο λόγο σημαντικές πρωτεΐνες μέσα στο καρκινικό κύτταρο⁽⁶¹⁾.

Επίσης, ορισμένες μορφές στοχευμένων θεραπειών περιλαμβάνουν μικρά πεπτίδια, τα οποία προσκολλούνται σε εξειδικευμένους υποδοχείς που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων ή κατακρατούνται από το εξωκυττάριο πλέγμα που περιβάλλει τον όγκο (⁴⁶).

2.3.2 Λιποσώματα στην θεραπεία του καρκίνου

Όπως είναι έχει αναφερθεί, τα λιποσώματα αποτελούνται από λιπιδικές διπλοστοιβάδες, οι οποίες εσωκλείουν έναν υδατικό χώρο. Προς αποφυγή της ταχείας αποδόμησης από το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα (reticulo endothelial system), η επιφάνεια των λιποσωμάτων συχνά τροποποιείται με μόρια πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG), όπως π.χ. με 1,2-διστεαροϋλο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφοαιθανολαμίνη-*N*-[μεθοξυ (πολυαιθυλενογλυκόλη)-2000] (DSPE-PEG). Αυτή η τροποποίηση αυξάνει σημαντικά το χρόνο ημίσειας ζωής των λιποσωμάτων, είτε αυτά περιέχουν χοληστερόλη είτε όχι (^{65,66,67,68}).

Επίσης, είναι αποδεδειγμένο ότι οι παρενέργειες κυτταροτοξικών φαρμάκων, όπως η δοξορουβικίνη ή η αμφοτερικίνη Β, μειώνονται σημαντικά μετά τον εγκλεισμό τους σε λιποσωματικούς φορείς. Αυτό διαπιστώθηκε σε διάφορες κλινικές μελέτες όπου χρησιμοποιήθηκε PEGυλιωμένη λιποσωματική δοξορουβικίνη (Caelyx®, Doxil®) και μη-PEGυλιωμένη δοξορουβικίνη (Myocet™) για τον έλεγχο της καρδιοτοξικότητας (^{69,70,71}). Η λιποσωματική μορφή της αμφοτερικίνης-Β (Ambisome) φαίνεται να εμφανίζει μικρότερη τοξικότητα και νεφροτοξικότητα σε σχέση με τη συμβατική (μη λιποσωματική) αμφοτερικίνη-Β. Ωστόσο, σε σύγκριση με το μη λιποσωματικό φάρμακο, δεν έχει αναφερθεί καμία σημαντική βελτίωση στην απόδοση του λιποσωματικού σκευάσματος (^{8,72}).

2.3.3 Βιοδραστικά λυσολιπίδια

Με τον όρο “βιοδραστικά λυσολιπίδια” αναφερόμαστε σε λυσολιπίδια, τα οποία αλληλεπιδρούν με διάφορους κυτταρικούς σχηματισμούς, ή με συστατικά του αίματος (π.χ. πρωτεΐνες, συστατικά του πλάσματος). Όπως θα φανεί παρακάτω, στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε μια σειρά από μονοάλκυλο αιθερολιπίδια, αναλόγων του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (platelet activating factor, PAF). Ο ενεργοποιητής PAF αποτελεί τον πιο ισχυρό αντιφλεγμονώδη λιπιδικό μεσολαβητή που παράγεται από διάφορους

κυτταρικούς τύπους, όπως τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα αιμοπετάλια, τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα (⁷³). Έχει προταθεί ότι ο παράγοντας αυτός συσχετίζεται με διάφορες ασθένειες, όπως το άσθμα, η καρδιακή εμβολή, η εγκεφαλική ισχαιμία και το γαστρικό έλκος (⁷⁴). Επίσης εμπλέκεται σε μια σειρά από φυσιολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της ωορρηξίας, της κινητικότητας του σπέρματος, της ανάπτυξης των εμβρυικών πνευμόνων και της έναρξης και διατήρησης του τοκετού.

Τα βιοδραστικά λυσολιπίδια, ανάλογα του PAF, έχει αποδειχτεί ότι εμφανίζουν αντινεοπλασματική δράση, προκαλώντας θανάτωση των καρκινικών κυττάρων, με μηχανισμό τελείως διαφορετικό από αυτόν που προκαλεί το μόριο της δοξορουβικίνης το οποίο αλληλεπιδρά άμεσα με το DNA των κυττάρων.

Ανάμεσα στην οικογένεια αυτή των λυσοφωσφολιπιδίων το παράγωγο της 1-Ο-δεκαοκτακυλο-2-ακετυλο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφοχολίνης (PAF), γνωστό και ως edelfosine ή methyl-PAF (1-Ο-δεκαοκτακυλο-2-μεθυλο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη), έχει μελετηθεί ευρύτατα ως προς την αντικαρκινική του δράση, δεδομένου ότι φαίνεται να είναι το πιο δραστικό από αυτή την οικογένεια (⁷⁵). Το μόριο αυτό συσσωρεύεται στις λιπιδικές διπλοστοιβάδες των κυττάρων, στο ενδοθηλιακό δίκτυο και στα μιτοχόνδρια προκαλώντας απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα. Είναι πολύ σημαντικό επίσης ότι απορροφάται εκλεκτικά από τα καρκινικά κύτταρα, αλλά όχι από τα φυσιολογικά (⁷⁶). Όμως, λόγω της υψηλής αιμολυτικής δραστηριότητας και αιμοτοξικότητας, η χρήση του είναι περιορισμένη.

Για να ξεπεραστεί αυτό το μειονέκτημα αναπτύχθηκαν και μελετήθηκαν διάφορα σκευάσματα λιπιδίων ή λιποσωμιακών νανοσωματιδίων του methyl-PAF (^{77,78,79}). Διαπιστώθηκε ότι τα λιποσώματα που περιέχουν methyl-PAF μειώνουν κατά 20 περίπου φορές την αιμολυτική δράση, ενώ είναι περίπου δύο φορές λιγότερο αποτελεσματικά σε *in vitro* μελέτες κυττάρων από ότι το ελεύθερο methyl-PAF (⁸⁰). Έχει επίσης προταθεί ότι τα λιποσώματα που περιέχουν methyl-PAF ενισχύουν τη διάχυση του φαρμάκου σε κύτταρα λόγω αύξησης της διαπερατότητας της μεμβράνης (⁸¹). Τα *in vivo* πειράματα όμως σε ποντίκια έδειξαν ότι αυτά τα λιποσωμιακά σκευάσματα αν και δεν παρουσίαζαν τοξικότητα, μόνο εν μέρει ανέστειλαν την ανάπτυξη του όγκου (⁸²).

Σε αρκετές μελέτες χρησιμοποιήθηκε το παράγωγο methyl-PAF σε συνδυασμό με το μόριο της δοξορουβικίνης, είτε ελεύθερο είτε ενσωματωμένο σε νανοσωματίδια λιπιδίων (^{83,84}). Στόχος ήταν η αύξηση του θετικά συνεργιστικού αποτελέσματος κατά των καρκινικών κυττάρων, επειδή προσβάλλει τα καρκινικά κύτταρα κατά τρόπο ουσιαστικά διαφορετικό από τη δοξορουβικίνη (DOX), δηλαδή χωρίς άμεση αλληλεπίδραση με το DNA. Πιθανόν στην δράση αυτή να οφείλεται η μείωση της καρδιοτοξικότητας της DOX. Επιπλέον, προτάθηκε ότι η διαμόρφωση της σύνθεσης της κυτταρικής μεμβράνης, λόγω του εντοπισμού του methyl-PAF στο λιπιδικό σώμα της μεμβράνης, αυξάνει την πρόσληψη των λιποσωματικών φορέων από τα νεοπλασματικά κύτταρα (⁸⁵).

2.3.4 Στοχευμένες θεραπείες, υπερθερμία, λιποσώματα στην θεραπεία του καρκίνου με υπερθερμία

Η εφαρμογή των νανοσωματιδίων, ως προηγμένα συστήματα μεταφοράς μικρών χημειοθεραπευτικών παραγόντων, αποτέλεσε αντικείμενο πολλών προκλινικών και κλινικών μελετών. Τα λιποσώματα αποτελούν κατηγορία κολλοειδών ή νανοσωματιδίων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη προϊόντων αναγκαίων στην κλινική εφαρμογή και ιδιαίτερα της ογκολογίας. Δεδομένων των ενθαρρυντικών προκλινικών αποτελεσμάτων, οι ερευνητές στράφηκαν στην σύνθεση νέων και περισσότερο αποτελεσματικών σκευασμάτων για κλινική εφαρμογή. Στην κατηγορία που έλαβαν εφαρμογής ανήκουν τα λιποσωματικά φαρμακευτικά σκευάσματα, όπως Doxil®, DaunoXome®, DepoCyt®, Myocet®, Lipo-Dox® και Marqibo®. Πρόσφατα, από το FDA εγκρίθηκε η χρήση του MM-398 (Onivyde®, ένα λιποσωματικό σκεύασμα ιρινοτεκάνης) σε συνδυασμό με 5-φθοροουρακίλη και λευκοβορίνη, ως θεραπεία δεύτερης γραμμής για ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του παγκρέατος. Το 1995 το FDA ενέκρινε το Doxil®, πρώτο αντικαρκινικό λιποσωματικό φάρμακο, για την θεραπεία του σαρκώματος Kaposi. Παθολογική ανάλυση του σαρκώματος Kaposi έδειξε κυρίως αυξημένη εξαγγείωση (enhanced extravasation), η οποία οφείλεται στην διαρροή ερυθροκυττάρων στον περιβάλλοντα ιστό, λόγω ατελειών στη μορφολογία του. Η μορφολογία αυτή επιτρέπει στα λιποσώματα που βρίσκονται στη κυκλοφορία να εισέρχονται στους όγκους, που διαφορετικά δεν θα ήταν δυνατόν να επιτευχθεί αν το φάρμακο θα είχε χορηγηθεί ως ελεύθερο. Το φαινόμενο αυτό αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως φαινόμενο αυξημένης

διαπερατότητας και συγκράτησης (Enhanced Permeability and Retention effect, ERP) και έχει σαν αποτέλεσμα την παθητική παροχέτευση του φαρμάκου μέσω των λιποσωματικών σκευασμάτων στους όγκους.

Ωστόσο, παρόλο το φαινόμενο ERP, η συσσώρευση των λιποσωμάτων στην περιοχή του όγκου εμφανίζει μεταβλητότητα, ενώ επιπροσθέτως, η εξωκυτταρική μήτρα του όγκου δημιουργεί ένα φυσικό φράγμα που περιορίζει τη διείσδυση των μεγάλου μεγέθους λιποσωμακών φορέων μακριά από τον περιαγγειακό χώρο του όγκου. Έτσι, παρά την αυξημένη συσσώρευση λιποσωμακών φαρμάκων στην περιοχή του όγκου, η διαθεσιμότητα του φαρμάκου φαίνεται να είναι περιορισμένη, λόγω της περιορισμένης απελευθέρωσής από τους λιποσωματικούς φορείς.

Το 2000, προκειμένου να ξεπεράσουν το πρόβλημα της βιοδιαθεσιμότητας οι Dewhirst και Needham ⁽⁶⁾ ανέπτυξαν μια πρωτοποριακή τεχνολογία στον τομέα της λιποσωματικής στοχευμένης θεραπείας. Παρασκεύασαν έναν λιποσωματικό φορέα της δοξορουβικίνης, ο οποίος περιέχει ένα λυσολιπίδιο και μπορεί να παρέχει ταχεία αποδέσμευση του φαρμάκου, υπό συνθήκες ήπιας υπερθερμίας. Ο φορέας αυτός, με την εμπορική ονομασία ThermoDox® βασίστηκε σε προηγούμενη έρευνα σχετικά με τα παραδοσιακά θερμοευαίσθητα λιποσώματα. Η απελευθέρωση των φαρμάκων από τα παραδοσιακά θερμοευαίσθητα λιποσώματα βασίζεται εξ ολοκλήρου στην αύξηση της διαπερατότητας των λιπιδίων που προκύπτει από θέρμανση σε θερμοκρασίες πάνω από τη θερμοκρασία κύριας μετάβασης των λιπιδίων. Ένα σημαντικό μειονέκτημα αυτών των σκευασμάτων ήταν η σχετικά αργή απελευθέρωση του φαρμάκου, σε θερμοκρασίες πάνω από τη θερμοκρασία κύριας μετάβασης, και απελευθέρωση του φαρμάκου έως 70%. Το βασικό χαρακτηριστικό του ThermoDox® είναι η εισαγωγή στη διπλοστοιβάδα ενός λυσολιπιδίου, της 1-στεαροϋλο-2-υδροξυ-*sn*-γλυκερο-3-φωσφατιδυλοχολίνης (MSPC ή S-lyso-PC) που φαίνεται να οδηγεί στη δημιουργία πόρων στη διπλοστοιβάδα των λιπιδίων κατά τη θέρμανση στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης των λιπιδίων, με αποτέλεσμα την αποτελεσματική απελευθέρωση φαρμάκου (δηλ. 80%) εντός διαστήματος 20 s στους 42 °C ⁽⁷⁾.

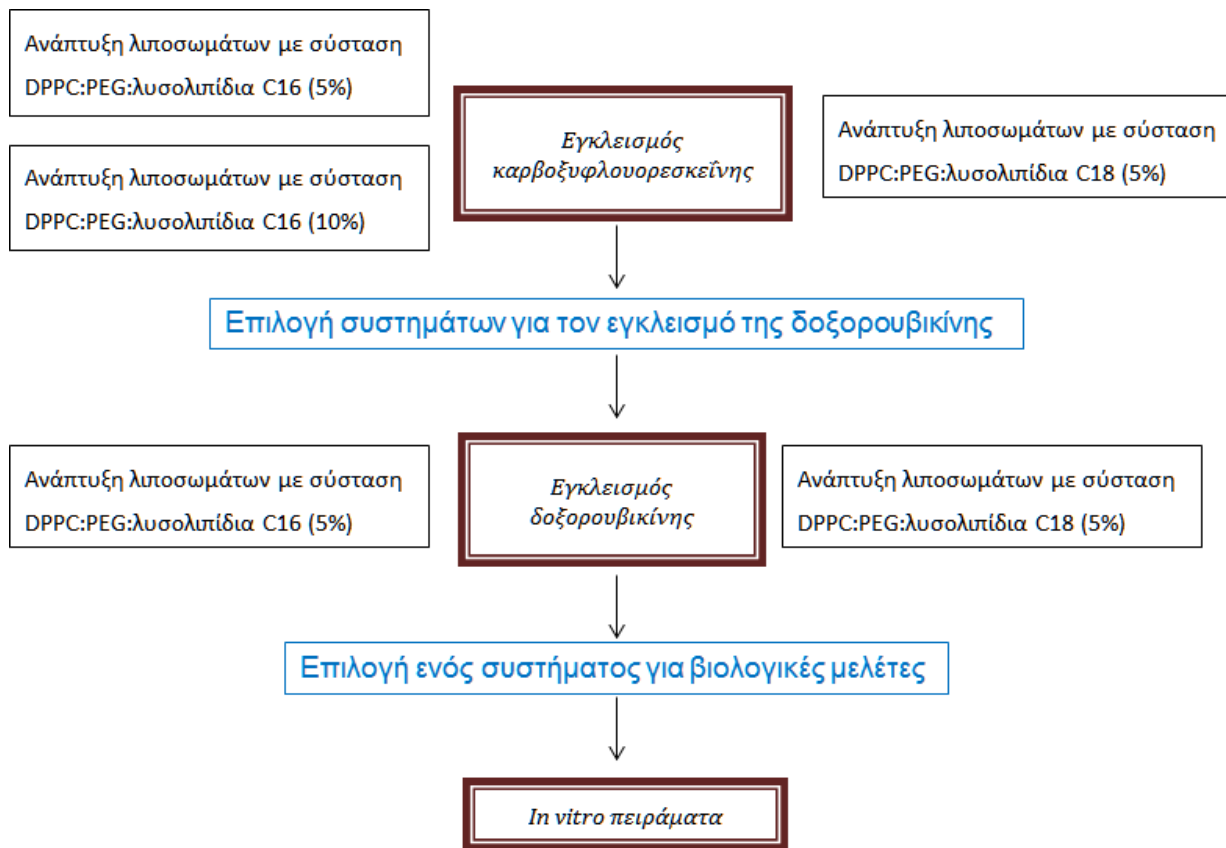
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Όπως προαναφέρθηκε στόχος της διατριβής είναι η ανάπτυξη και ο χαρακτηρισμός νέων θερμοευαίσθητων λιποσωμιακών φορέων, ο εγκλεισμός του αντικαρκινικού φαρμάκου δοξορουβικίνη σε αυτούς καθώς και η μελέτη της κυτταροστατικής τους δράσης. Οι νέοι θερμοευαίσθητοι φορείς σχηματίστηκαν με λυσολιπίδια που εκτός από την χημική τους δομή, η οποία κατά την άποψή μας θεωρήθηκε κατάλληλη να προσδώσει στα λιποσώματα την ιδιότητα ελεγχόμενης αποδέσμευσης της δραστικής ουσίας σε συγκεκριμένο στενό θερμοκρασιακό εύρος, ενώ ταυτόχρονα να εμφανίζουν αντικαρκινική δράση.

Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η ομόλογη σειρά έξι αιθερο-λυσολιπιδίων, τριών με αλυσίδες 16 ατόμων άνθρακα (C16) και τριών με αλυσίδες 18 ατόμων άνθρακα (C18), που εισάγονται σε μοριακή αναλογία 5% και 10% ως προς τα κύρια λιπίδια DPPC και DSPE-PEG τα οποία χρησιμοποιούνται σε αναλογία 96:4. Για την αρχική εκτίμηση των φορέων, διεξήχθησαν πειράματα αποδέσμευσης συναρτήσεως της θερμοκρασίας με χρήση της φθορίζουσας 5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνης και προσδιορίστηκε το βέλτιστο ποσοστό μοριακής αναλογίας (5%). Στη συνέχεια, οι θερμοευαίσθητοι λιποσωμιακοί φορείς χρησιμοποιήθηκαν για τον εγκλεισμό της δοξορουβικίνης και μελετήθηκαν ως προς την αποδέσμευση του αντικαρκινικού φαρμάκου συναρτήσεως της θερμοκρασίας, σε θερμοκρασίες κοντά στην κύρια μετάβαση των λιπιδίων (39-42 °C). Επίσης, μελετήθηκε η σταθερότητά τους, στη θερμοκρασία του σώματος (37 °C).

Όλοι οι λιποσωμιακοί φορείς που φέρουν αιθερολιπίδια, συγκρίθηκαν ανά περίπτωση με τους αντίστοιχους λιποσωμιακούς φορείς που φέρουν εστερολιπίδια, οι οποίοι ήδη χρησιμοποιούνται ευρέως στην ανάπτυξη θερμοευαίσθητων λιποσωμάτων. Τελικώς, από όλους τους αναπτυχθέντες φορείς επιλέχθηκε ο βέλτιστος λιποσωμιακός φορέας και εφαρμόστηκε *in vitro* σε δύο κυτταρικές σειρές καρκινικών κυττάρων του προστάτη που εμφανίζουν ανθεκτικότητα έναντι της δοξορουβικίνης. Στην παρακάτω Εικόνα 10 παρίσταται γραφικά το διάγραμμα ροής των πειραμάτων.



Εικόνα 10. Διάγραμμα ροής του πειραματικού μέρους της διατριβής.

3.1 Αντιδραστήρια και διαλύτες

Τα φωσφολιπίδια 1,2-διπαλμιτική-*sn*-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (DPPC) και το μετά αμμωνίου άλας της 1,2-διστεαρικής-*sn*-γλυκερο-3-φωσφοαιθανολαμίνης-N-[μεθοξυ(πολυαιθελενο-γλυκόλης)-2000] (DSPE-PEG) αγοράστηκαν από την Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany) και την Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, USA), αντίστοιχα. Η 1-παλμιτική-2-υδροξυ-*sn*-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (lyso-PC16), καθώς και η 1-στερική-2-υδροξυ-*sn*-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (lyso-PC18) αγοράστηκαν από την NOFCo. (Tokyo, Japan). Η προμήθεια των λιπιδίων 1-*O*-παλμιτοΐλο -2-ακετυλο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (PAF-16), 1-*O*-παλμιτοΐλο-2-υδροξυ-*sn*-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (lyso-PAF-16), 1-*O*-

παλμιτοϋλο-2-μεθυλο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (methyl-PAF-16), 1-*O*-στεαροϋλο-2-ακετυλο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (PAF-18), 1-*O*-στεαροϋλο-2-υδροξυ-*sn*-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (lyso-PAF-18) και 1-*O*-στεαροϋλο-2-μεθυλο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (methyl-PAF-18, eldefosine) έγινε από την Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MA, USA).

Η 5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνη (6-CF) και η Sephadex G-50 (medium) αγοράστηκαν από την Sigma-Aldrich (St. Louis, MA, USA).

Η δοξορουβικίνη (doxorubicin, DOX) ήταν ευγενική προσφορά της Regulon SA (Athens, Greece).

Οι μεμβράνες εξώθησης με διάμετρο πόρου 100 nm αγοράστηκαν από την Whatman.

Για τις *in vitro* μελέτες με τις καρκινικές κυτταρικές σειρές χρησιμοποιήθηκαν το θρεπτικό μέσο DMEM, ο ορός εμβρύου μόσχου (FBS), το διάλυμα θρυψίνης-EDTA 0,05 %, ο συνδυασμός αντιβιοτικών πενικιλίνης – στρεπτομυκίνης, η L-γλουταμίνη και το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS), τα οποία αγοράστηκαν από την BioChrom AG. Το βρωμίδιο του 3-(4,5-διμεθυλοθιαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλο-τετραζολίου (MTT), η πολυλυσίνη και το ιωδιούχο προπίδιο (PI) είναι προϊόντα της Sigma-Aldrich.

3.2 Όργανα-Συσκευές

- Για την παρασκευή των λιποσωμάτων και την εξώθηση της διασποράς χρησιμοποιήθηκε εργαστηριακός εξωθητής LiposoFast-Pneumatic (Avestin Inc).
- Για τη μέθοδο της δυναμικής σκέδασης του φωτός χρησιμοποιήθηκε το όργανο AXIOS–150/EX, Triton Hellas, με πηγή laser 30mW και με δέκτη φωτοδίοδο (Avalanche) σε γωνία 90°. Για την μαθηματική επεξεργασία των μετρήσεων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα CONTIN.
- Οι μετρήσεις του ζ-δυναμικού επιτεύχθηκαν με το όργανο ZetaPlus της εταιρείας Brookhaven Instruments Corporation.
- Για την διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης χρησιμοποιήθηκε είτε το MCS-DSC calorimeter (MicroCal Inc., Northampton, MA), είτε το MDSC 2920 calorimeter (TA Instruments, USA). Στην δεύτερη περίπτωση δείγματα υποβλήθηκαν σε υπερφυγοκέντρηση με την χρήση της Optima™ Max Ultracentrifuge Beckman Coulter, Inc. (Fullerton, CA, USA) με ρότορα MLA-

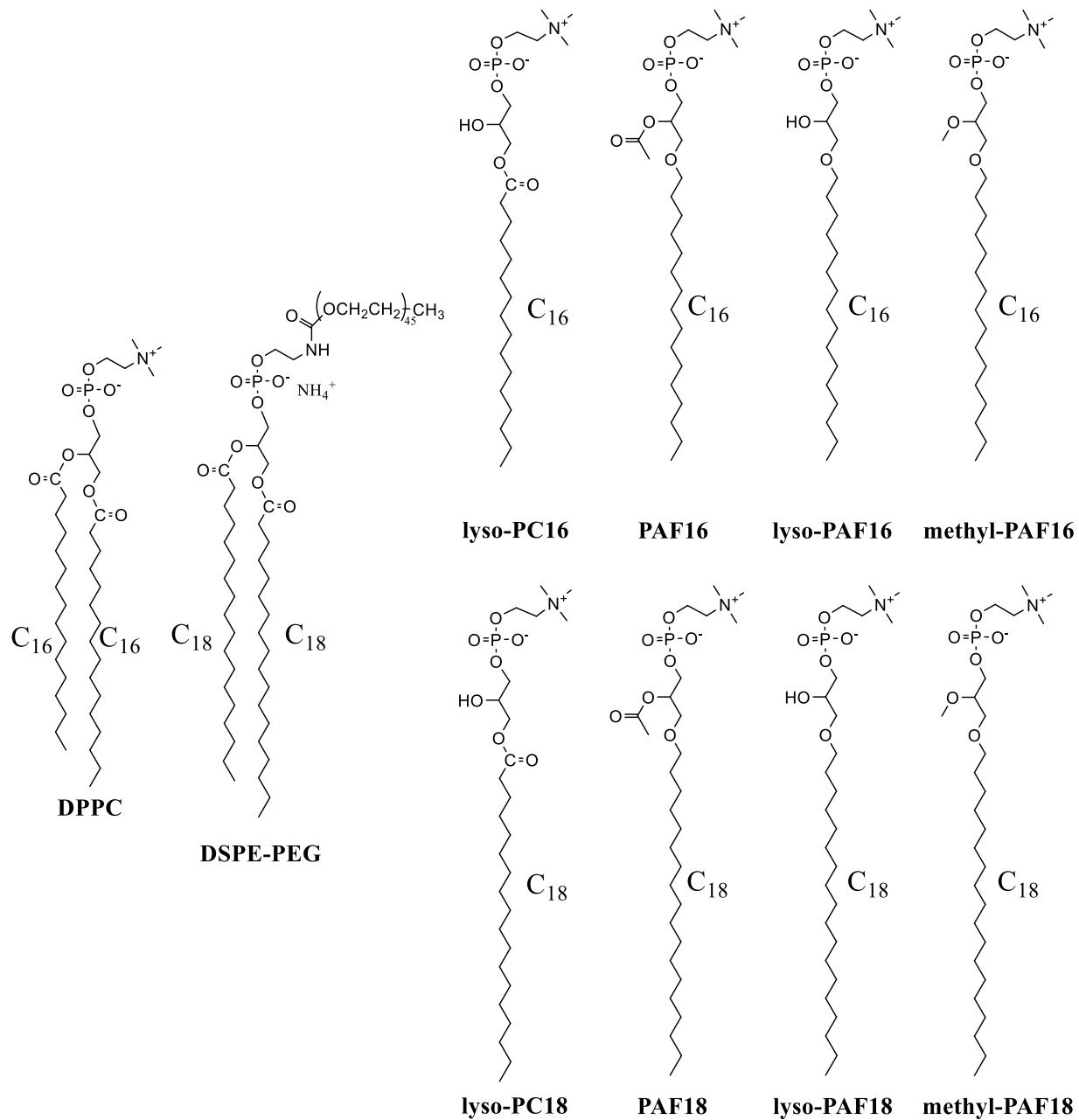
130. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Origin[®]software(MicroCal Inc., Northampton, MA).

- Το φασματοφωτόμετρο φθορισμού ήταν της εταιρείας Carry eclipse, Varian Inc., και οι μετρήσεις έγιναν με ένταση φθορισμού στα 650nm μετά από διέγερση στα 340 nm.
- Η λήψη εικόνων μικροσκοπίας τόσο φωτεινού πεδίου όσο και επιφθορισμού των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με μικροσκόπιο Olympus BX-50 που φέρει ψηφιακή έγχρωμη κάμερα Olympus DP71.
- Η διέγερση φθορισμού πραγματοποιήθηκε με μια λάμπα Mercury USH 102D (Ushio Inc., Τόκιο, Ιαπωνία), ενώ η διέγερση και εκπομπή φθορισμού της DOX επιτεύχθηκε με την χρήση φίλτρου ισοθειοκυανικού ροδαμίνης (RITC, Chroma Technology Corp).
- Για τις μελέτες συνεστιακής μικροσκοπίας χρησιμοποιήθηκε το συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS SP8 MP (Wetzlar, Γερμανία) εξοπλισμένο με λέιζερ Argon (γραμμές διέγερσης στα 458, 476, 488, 496 και 514 nm). Οι εικόνες καταγράφηκαν με τον ανιχνευτή φάσματος του μικροσκοπίου χρησιμοποιώντας κατάλληλες περιοχές μήκους κύματος εκπομπής: Συγκεκριμένα η DOX διεγείρεται στα 496 nm με το λέιζερ Argon και η εκπομπή καταγράφηκε στην περιοχή των 520-620 nm. Οι εικόνες αποκτήθηκαν με το λογισμικό LAS X (Leica Microsystems CMS GmbH) και παρουσιάζονται χωρίς περαιτέρω επεξεργασία.
- Για την κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιήθηκε κυτταρόμετρο ροής FACScalibur (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany).
- Η *in vitro* μελέτη της κυτταροτοξικότητας πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο MTT και χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο Infinite M200 PRO Microplate Reader (Tecan group Ltd., Männedorf, Ελβετία).

3.3 Ανάπτυξη θερμοευαίσθητων λιποσωμάτων και εγκλεισμός υδατοδιαλυτών ουσιών

3.3.1 Παρασκευή λιποσωμάτων και εγκλεισμός της 5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνης

Η παρασκευή των μονοστοιβαδικών λιποσωμάτων έγινε με τη μέθοδο της εξώθησης (extrusion method). Στο στάδιο αυτό τα λιπίδια (Εικόνα 11) διαλύθηκαν σε χλωροφόρμιο, το οποίο απομακρύνθηκε υπό κενό, ώστε να σχηματιστεί ομογενές λεπτό υμένιο. Ακολούθησε η ενυδάτωση του υμενίου για τη διασπορά των λιπιδίων και τέλος η εξώθηση της διασποράς μέσω κατάλληλων μεμβρανών. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή το εναιώρημα των μεγάλων πολυστοιβαδικών λιποσωμάτων, τα οποία σχηματίζονται με απλή διασπορά των λιπιδίων σε νερό, εξωθούνται υπό πίεση μέσω πολυκαρβονικών μεμβρανών με πόρους συγκεκριμένης διαμέτρου (100 nm), σε θερμοκρασία πάνω από το σημείο μετάβασης T_m των λιπιδίων. Το αποτέλεσμα της διαδικασίας αυτής είναι τα αρχικά μεγάλα πολυστοιβαδικά λιποσώματα να διασπώνται και να επανασχηματίζονται πολυστοιβαδικά ή και μονοστοιβαδικά λιποσώματα, ανάλογα με τον αριθμό των κύκλων που εκτελούνται, διαμέτρου περίπου ίσης με αυτήν των πόρων της μεμβράνης.



Εικόνα 11. Χημική δομή των λιπιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

3.3.2 Παρασκευή λιποσωμάτων σύστασης DPPC/DSPE-PEG/λυσολιπίδια (91:4:5)

Σε σφαιρική φιάλη των 100 mL εισάγονται 20 mg DPPC, 3,6 mg DSPE-PEG και 0,8 mg από το εκάστοτε λυσολιπίδιο, με τελική αναλογία mol (91:4:5). Στη συνέχεια προστίθεται CHCl_3 , ώστε να διαλυτοποιηθούν πλήρως οι στερεές ενώσεις. Κατόπιν ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού στους 30-35 °C για την απομάκρυνση του CHCl_3 , οπότε και σχηματίζεται λεπτό υμένιο στα τοιχώματα της φιάλης, το οποίο αφήνεται για ξήρανση υπό κενό επί 24 h. Το προκύπτον λεπτό λιπιδικό υμένιο ενυδατώνεται με 1 mL διαλύματος σύστασης 50 mM 5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνης (6-CF), σε ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM PBS (pH=7,4) και 1μM του εκάστου λυσολιπίδιου. Η ενυδάτωση επιτυγχάνεται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας μεγαλύτερης από την θερμοκρασία μετάβασης των λιπιδίων (55 °C) και περιστροφή της φιάλης επί μία h. Ανά 15 min, η σφαιρική φιάλη υπόκειται σε κυκλική ανάδευση για τη διάσπαση των σχηματιζόμενων πολυστοιβαδικών λιποσωμάτων κατά τη διάρκεια της ενυδάτωσης. Στη συνέχεια, τα πολυστοιβαδικά λιποσώματα που λαμβάνονται υποβάλλονται σε εξώθηση διαμέσου πολυκαρβονικών φίλτρων διαμέτρου 100 nm επί 25 φορές, σε θερμοκρασία 55 °C.

Το διάλυμα της 6-CF παρασκευάζεται διαλύοντας την απαιτούμενη ποσότητα σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 20mM (pH=7,4). Αρχικά το διάλυμα είναι όξινο με αποτέλεσμα να μη διαλύεται όλη η ποσότητα της 6-CF. Για τον λόγο αυτό προστίθεται πυκνό διάλυμα NaOH 10 N και το pH ρυθμίζεται στο 7,4, οπότε όλη η ποσότητα της 6-CF διαλύεται δίνοντας ένα βαθύ κόκκινο διάλυμα. Για την απομάκρυνση της μη εγκλεισμένης 6-CF, 300 μL των λιποσωμάτων υποβάλλονται σε χρωματογραφία στήλης (spin columns) χρησιμοποιώντας ως πληρωτικό υλικό Sephadex G-50 και ως μέσο έκλουσης ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10mM (pH=7,4). Η φυγοκέντρηση πραγματοποιήθηκε στα 1500 rpm και επί 10 min και στο τέλος λήφθηκε λιποσωματικό εναιώρημα όγκου 300 μL.

3.3.3 Παρασκευή λιποσωμάτων σύστασης DPPC/DSPE-PEG/λυσολιπίδια (91:4:10)

Σε σφαιρική φιάλη των 100 mL εισάγονται 20 mg DPPC, 3,6mg DSPE-PEG και 1,6mg από κάθε λυσολιπίδιο ώστε η τελική μοριακή αναλογία να είναι 91:4:10. Στη συνέχεια για την πλήρη διαλυτοποίηση των στερεών ενώσεων προστίθενται 20 mL CHCl_3 . Όπως και

προηγούμενα, ακολούθησε απομάκρυνση του CHCl_3 μέχρι ξηρού στους 30-35 °C, οπότε σχηματίστηκε λεπτό υμένιο στα τοιχώματα της φιάλης. Ακολουθεί ξήρανση υπό κενό για 24 h.

Το λεπτό λιπιδικό υμένιο ενυδατώνεται με 1 mL διαλύματος σύστασης 50 mM 6-CF, 20 mM PBS και 1 μM (pH=7,4) λυσολιπιδίου. Η ενυδάτωση πραγματοποιείται σε υδατόλουτρο πάνω από τη θερμοκρασία μετάβασης των λιπιδίων (55 °C) με περιστροφή της φιάλης για 15 min. Κατά τη διάρκεια της ενυδάτωσης ανά 5 min η σφαιρική φιάλη αναδεύεται κυκλικά, ώστε να διασπασθούν τα σχηματιζόμενα πολυστοιβαδικά λιποσώματα. Στη συνέχεια, τα λαμβανόμενα πολυστοιβαδικά λιποσώματα υποβάλλονται σε εξώθηση διαμέσου πολυκαρβονικών φίλτρων διαμέτρου 100 nm επί 25 φορές, σε θερμοκρασία 55 °C.

Το διάλυμα της 6-CF παρασκευάζεται διαλύοντας την απαιτούμενη ποσότητα σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 20mM (pH=7,4) όπως περιγράφεται παραπάνω. Για την απομάκρυνση της μη εγκλεισμένης 6-CF, 300 μL των λιποσωμάτων υποβάλλονται σε χρωματογραφία στήλης (spin columns) χρησιμοποιώντας ως πληρωτικό υλικό Sephadex G-50 σε σύριγγα των 5 mL και ως μέσο έκλουσης ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10mM (pH=7,4). Η φυγοκέντρωση πραγματοποιήθηκε στα 1500 rpm για 10 min και στο τέλος λαμβάνουμε όγκο λιποσωματικού εναιωρήματος 300 μL .

3.3.4 Παρασκευή λιποσωμάτων και εγκλεισμός δοξορουβικίνης

Η παρασκευή των λιποσωμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της εξώθησης, ενώ ο εγκλεισμός της δοξορουβικίνης επιτεύχθηκε με τη μέθοδο δημιουργίας διαβάθμισης του pH (pH gradient) μεταξύ του εσωτερικού και του εξωτερικού χώρου της λιποσωματικής διπλοστοιβάδας (^{86,87}). Σε σφαιρική φιάλη των 100 mL προστίθενται 40 mg DPPC, 7,2 mg DSPE-PEG και 1,7 mg λυσολιπιδίου, ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή τελική μοριακή αναλογία 96:4:5. Στη συνέχεια προστίθεται CHCl_3 , ώστε να διαλυθούν πλήρως οι στερεές ουσίες. Κατόπιν ακολουθεί απομάκρυνση του διαλύτη μέχρι ξηρού στους 30-35°C, όπου σχηματίζεται λεπτό υμένιο στα τοιχώματα της φιάλης. Ακολουθεί ξήρανση υπό κενό για 24 h. Στη συνέχεια το υμένιο ενυδατώνεται με 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος κινικών 150mM και pH=4 και το μίγμα ανακινείται για 15 min στους 55°C, για τον σχηματισμό αιωρήματος

πολυστοιβαδικών λιποσωμάτων. Ακολουθεί κατεργασία 25 κύκλων του υδατικού εναιωρήματος των πολυστοιβαδικών λιποσωμάτων με ειδικό εκβολέα, χρησιμοποιώντας μεμβράνες με πόρους διαμέτρου 100nm και σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από τη θερμοκρασία μετάβασης των λιπιδίων.

Ακολούθως, 300 μL από το υδατικό εναιώρημα των λιποσωμάτων υποβάλλεται σε χρωματογραφία στήλης (spin columns) χρησιμοποιώντας ως πληρωτικό υλικό Sephadex G-50 σε σύριγγα των 5 mL και ως μέσο έκλουσης ρυθμιστικό διάλυμα PBS 20mM (pH=7,4), με σκοπό την αλλαγή του εξωτερικού ρυθμιστικού διαλύματος των λιποσωμάτων. Η φυγοκέντρηση πραγματοποιήθηκε στα 1500 rpm για 5 min και στο τέλος λαμβάνουμε λιποσωμακό εναιώρημα όγκου 300 μL . Το λιποσωμακό διάλυμα που λαμβάνεται, μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη των 20 mL, η οποία και περιέχει προζυγισμένη ποσότητα δοξορουβικίνης (1 mg/mL λιποσωμακού εναιωρήματος). Η σφαιρική φιάλη μεταφέρεται σε υδατόλουτρο και το περιεχόμενο υπόκειται σε συνεχή ανάδευση για 30 min και σε θερμοκρασία 37 °C, με σκοπό την είσοδο της δοξορουβικίνης στην εσωτερική κοιλότητα των λιποσωμάτων, όπου και σχηματίζει γέλη υπό την πρωτονιωμένη της μορφή μετά την αλληλεπίδραση της με τα ιόντα κιτρικού. Για την απομάκρυνση της μη εγκλεισμένης δοξορουβικίνης, 300 μL των λιποσωμάτων υποβάλλονται σε χρωματογραφία στήλης (spin columns) χρησιμοποιώντας ως πληρωτικό υλικό Sephadex G-50 σε σύριγγα των 5 mL και ως μέσο έκλουσης ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10mM (pH=7,4). Η φυγοκέντρηση πραγματοποιήθηκε στα 1500 rpm για 10 min και στο τέλος λαμβάνουμε όγκο λιποσωμακού εναιωρήματος 300 μL , στο εσωτερικό των οποίων περιέχεται τη δοξορουβικίνη.

3.4 Τεχνικές και μέθοδοι χαρακτηρισμού των λιποσωμάτων με εγκλεισμένες υδατοδιαλυτές ουσίες

3.4.1 Μελέτη των μεγεθών των λιποσωμάτων με τη μέθοδο της Δυναμικής Σκέδασης του Φωτός

Η δυναμική σκέδαση του φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS) είναι μια μέθοδος μέτρησης μεγέθους σωματιδίων μικρότερων του 1 μm , συνήθως από 2nm έως περίπου 1 μm . Η μέθοδος αυτή έχει το πλεονέκτημα ότι απαιτεί ελάχιστη προετοιμασία δείγματος, είναι ταχεία (συνήθως απαιτούνται λιγότερα από περίπου 60s για κάθε μέτρηση) και έχει, επίσης, την ικανότητα να μην καταστρέφει ή να επιφέρει αλλαγές στο υπό εξέταση δείγμα. Αποτελεί πολύ χρήσιμη τεχνική καθώς επιτρέπει τον προσδιορισμό του μεγέθους καθώς και την πολυδιασπορά ή την κατανομή των μεγεθών σωματιδίων, όπως π.χ. μονοστοιβαδικών ή πολυστοιβαδικών λιποσωμάτων, με αρκετά μεγάλη ακρίβεια.

Η μέθοδος βασίζεται στην ακτινοβολία του δείγματος με μονοχρωματική ακτινοβολία (laser) ορισμένου μήκους κύματος και συλλογή της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας, συνήθως υπό γωνία 90°. Η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας παρουσιάζει αυξομείωση συναρτήσει του χρόνου, η οποία οφείλεται στην συνεχή κίνηση των σωματιδίων λόγω συγκρούσεων τους με τα μόρια του διαλύτη (φαινόμενο κίνησης Brown). Τα σκεδαζόμενα σωματίδια σε ένα διάλυμα κινούνται με παρόμοιες ταχύτητες αλλά προς τυχαίες κατευθύνσεις, με αποτέλεσμα η παρατηρούμενη αυξομείωση της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας να εξαρτάται ποσοτικά από την ταχύτητα των σωματιδίων.

Εξαιτίας της ομοιότητας της κίνησής τους η σκεδαζόμενη ακτινοβολία, δηλαδή ο αριθμός των σκεδαζόμενων φωτονίων, εξαρτάται από τον χρόνο περιγράφεται από μια συνάρτηση χρονικής εξάρτησης. Γενικώς, η συνάρτηση χρονικής εξάρτησης μεταξύ δύο σημάτων A και B δίνεται από την σχέση:

$$g(t) = \lim_{T \rightarrow \infty} (1/T) \int_{t_0}^{t_0+T} A(t)B(t-\tau)dt$$

όπου τ ο χρόνος υστέρησης (ή χρόνος δειγματοληψίας, delay time), t_0 ο αρχικός χρόνος και T ο χρόνος διεξαγωγής της μέτρησης. Εάν η B είναι μία αργοποιημένη μορφή της A , τότε η παραπάνω εξίσωση αποτελεί συνάρτηση αυτοσυσχέτισης. Στην απλή περίπτωση ενός συνόλου από σφαιρικά μη αλληλεπιδρώντα μεταξύ τους ομοειδή σωματίδια που κινούνται μέσα σε ένα διάλυμα η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης έχει την μορφή:

$$g(t) = A_0 + A \exp(-\Gamma t)$$

όπου $\Gamma = Dq^2$ είναι η σταθερά απόσβεσης της συνάρτησης, D ο συντελεστής διάχυσης και q το άνωμα σκέδασης.

Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατό να προσδιοριστούν οι συντελεστές διάχυσης των σωματιδίων, D , στο μέσο. Ακολουθως, η ακτίνα των σκεδαζόντων σωματιδίων συνδέεται με την σταθερά απόσβεσης μέσω της εξίσωσης Stokes–Einstein:

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta D}$$

και επομένως

$$R_h = \frac{kTq^2}{6\pi\eta\Gamma}$$

όπου k είναι η σταθερά Boltzmann, T είναι η απόλυτη θερμοκρασία σε $^{\circ}\text{K}$, η το ιξώδες του διαλύματος και R_h η υδροδυναμική ακτίνα των σωματιδίων.

Στην πράξη ο υπολογισμός των υδροδυναμικών ακτίνων (R_h) των λιποσωμάτων απαιτεί την επίλυση της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης για τον προσδιορισμό της Γ , η οποία επιτυγχάνεται με κατάλληλες μαθηματικές μεθόδους ανάλυσης. Στις μεθόδους ανάλυσης χρησιμοποιείται συνήθως είτε η μέθοδος των αθροισμάτων (Cumulants method) είτε η τεχνική κανονικοποίησης αλγορίθμων CONTIN (CONTIN algorithm). Η μέθοδος των αθροισμάτων είναι κατάλληλη για δείγματα με σχετικά στενές κατανομές μεγεθών και μικρούς χρόνους υστέρησης τ . Αντιθέτως η μέθοδος CONTIN είναι κατάλληλη και για συστήματα με μεγάλη πολυδιασπορά, ενώ επιπλέον μας δίνει και την κατανομή μεγέθους σωματιδίων.

Στον αλγόριθμο χρησιμοποιείται μία τροποποιημένη μέθοδος των μη-αρνητικών ελαχίστων τετραγώνων (*non-negative least squares*) που συμπεριλαμβάνει ελαχιστοποίηση κανονικοποιημένων υπολοίπων (*regularized residuals*), ενώ για την βελτιστοποίηση των αποτελεσμάτων προστίθεται ένας επιπλέον όρος στο άθροισμα των τετραγώνων των αποκλίσεων μεταξύ της υπολογιζόμενης καμπύλης και των πειραματικών δεδομένων. Ο όρος αυτός είναι ανάλογος με τη σταθερά αναλογίας α , του ολοκληρώματος της δευτέρας παραγώγου της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης $G(I)$, όπως φαίνεται στην ακόλουθη εξίσωση:

$$\chi^2 = \sum_{j=1}^N (1/\sigma_j^2) \left[g_1(\tau_j) - \int G(I) e^{-I\tau_j} dI \right]^2 + \alpha^2 \|LG(I)\|^2$$

Η σταθερά αναλογίας α , καλείται παράμετρος κανονικοποίησης και μπορεί να μεταβληθεί. Υπολογίζεται το αποτέλεσμα της $G(I)$ με ελαχιστοποίηση του αθροίσματος των τετραγώνων των αποκλίσεων και του α . Τελικά, εξετάζεται μια περιοχή τιμών του α και κατόπιν επιλέγεται μια μικρή περιοχή μέσα από την οποία προκύπτει η τελική λύση.

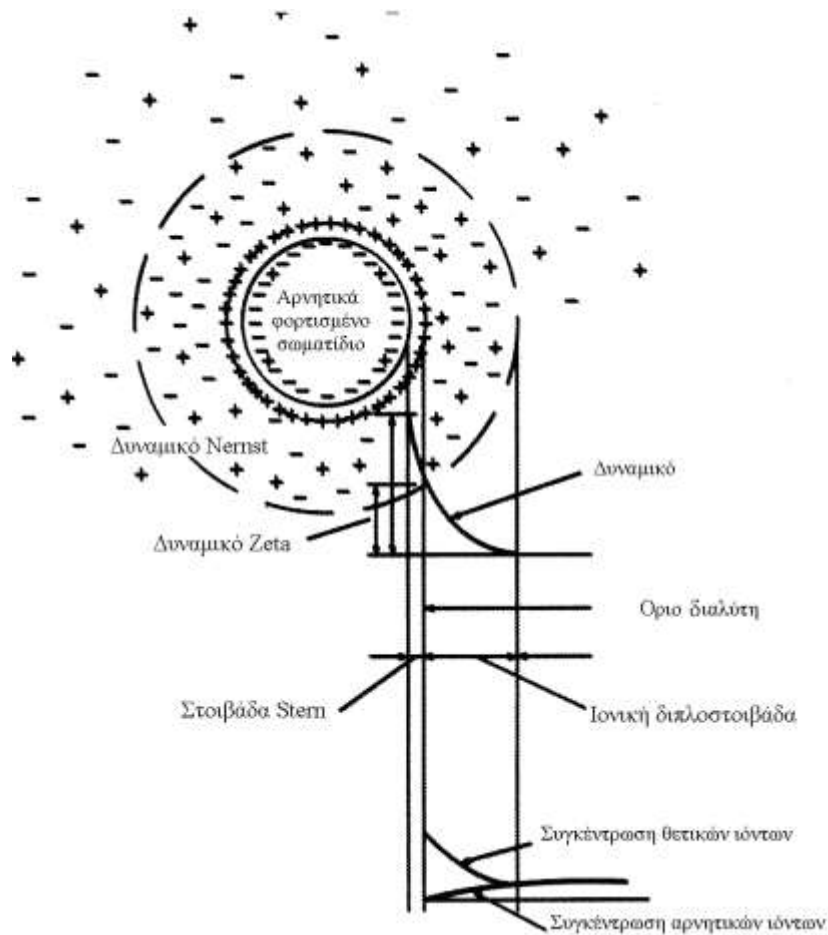
Για την μελέτη των κατανομών των μεγεθών των μονοστοιβαδικών λιποσωμάτων εφαρμόστηκε η μέθοδος της δυναμικής σκέδασης του φωτός. Για παράδειγμα, στην περίπτωση εγκλεισμού της 6-CF σε λιποσώματα, 100 μL από το λιποσωματικό εναιώρημα που παραλάβαμε από τη χρωματογραφία στήλης (spin column) αραιώνεται σε 600 μLPBS 10 mM και το διάλυμα που προκύπτει εισάγεται στην κυψελίδα του οργάνου στους 25 °C και εκτελούνται 10 μετρήσεις που ακολούθως αναλύονται με τη χρήση του μαθηματικού αλγορίθμου CONTIN και λαμβάνεται ο μέσος όρος των μετρήσεων.

Αντίστοιχα για τον εγκλεισμό της DOX, λαμβάνονται 50 μL από το λιποσωματικό εναιώρημα που παραλήφθηκε από την χρωματογραφία στήλης, τα οποία αραιώνονται σε 1 mL PBS 10 mM το δε προκύπτον διάλυμα εισάγεται στην φέρουσα κυψελίδα του οργάνου στους 25°C και εκτελούνται 10 μετρήσεις ως ανωτέρω.

Για τον εγκλεισμό της DOX λαμβάνονται 50 μL από το λιποσωματικό εναιώρημα που παραλήφθηκε από την χρωματογραφία στήλης (spin column), τα οποία αραιώνονται σε 1 mL PBS 10 mM το δε προκύπτον διάλυμα εισάγεται στην φέρουσα κυψελίδα του οργάνου στους 25 °C και εκτελούνται 10 μετρήσεις.

3.4.2 Μελέτη των φορτίων των λιποσωμάτων με προσδιορισμό του ζ-δυναμικού

Ο προσδιορισμός του ζ-δυναμικού επιτρέπει τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των φορτίων στην εξωτερική επιφάνεια των λιποσωμάτων, καθώς και της ευκινησίας τους υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου (electrophoretic mobility). Ένα φορτισμένο σωματίδιο αμέσως με την διάλυσή του στο νερό ενυδατώνεται σχηματίζοντας μία στοιβάδα νερού και μία στοιβάδα από τα διαλυμένα ελεύθερα ιόντα (Εικόνα 12).



Εικόνα 12. Σχηματική αναπαράσταση της στοιβάδας Stern και της ιοντικής διπλοστοιβάδας.

Η πρώτη στοιβάδα (στοιβάδα Stern) αποτελείται από ιόντα τα οποία έχουν αντίθετο φορτίο από τα σωματίδια και είναι δεσμευμένα με ισχυρές ηλεκτροστατικές δυνάμεις πολύ κοντά στην επιφάνεια του σωματιδίου. Η τοπική συγκέντρωση των ιόντων αυτών είναι πολύ

μεγαλύτερη από αυτή του διαλύματος, ενώ η τοπική συγκέντρωση των αντίθετων ιόντων είναι σχεδόν μηδενική. Η δεύτερη στοιβάδα (ιοντική διπλοστοιβάδα) εκτείνεται γύρω από τη στοιβάδα Stern, η οποία αποτελείται κυρίως από ιόντα που φέρουν φορτίο αντίθετο από αυτό του σωματιδίου (με την συγκέντρωση τους όμως να είναι αρκετά μικρότερη από αυτή της στοιβάδας Stern και να μειώνεται σε συνάρτηση με την απόσταση από την επιφάνεια του σωματιδίου προς την τιμή που επικρατεί στο διάλυμα) και από ιόντα τα οποία έχουν ίδιο φορτίο με το σωματίδιο (με την συγκέντρωση τους πλέον να αυξάνεται σε συνάρτηση με την απόσταση από την επιφάνεια του σωματιδίου προς την τιμή που επικρατεί στο διάλυμα).

Η κατανομή των ιόντων επηρεάζεται από τις ηλεκτροστατικές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ του σωματιδίου και των ιόντων, των ιόντων μεταξύ τους και του φαινομένου της διάχυσης των ιόντων, η δε ισχύς αυξάνει όσο αυξάνει η απόσταση από την επιφάνεια του σωματιδίου. Σε δεδομένη απόσταση από το σωματίδιο οι τοπικές συγκεντρώσεις των ιόντων εξισώνονται με αυτές του διαλύματος και αυτή είναι το όριο της ιοντικής διπλοστοιβάδας. Τα παραπάνω έχουν σαν συνέπεια την δημιουργία ηλεκτρικού δυναμικού, η τιμή του οποίου μεταβάλλεται σε συνάρτηση με την απόσταση από την επιφάνεια του σωματιδίου. Η κατανομή του δυναμικού εξαρτάται από το φορτίο του σωματιδίου και από το πάχος των στοιβάδων.

Η επίδραση ενός εξωτερικού δυναμικού θα αναγκάσει το σωματίδιο να κινηθεί με καθορισμένη ταχύτητα, η οποία συνδέεται άμεσα με την τιμή της διαφοράς του ηλεκτρικού δυναμικού που επικρατεί ανάμεσα στα δύο όρια της ιοντικής διπλοστοιβάδας (ζ -δυναμικό), αφού η στοιβάδα αυτή σε αντίθεση με τη στοιβάδα Stern, δεν είναι ακίνητη πάνω στο σωματίδιο. Ο προσδιορισμός της ευκινήσιας των σωματιδίων με την επίδραση εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου επιτρέπει τον προσδιορισμό του ζ -δυναμικού από την εξίσωση Smolukofski:

$$\frac{U}{X} = \frac{\epsilon \zeta}{4\pi\eta}$$

Όπου: U η ταχύτητα του φορτισμένου σωματιδίου υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου, X η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (η ευκινησία του σωματιδίου), ϵ και n η διηλεκτρική σταθερά και το ιξώδες του διαλύματος, αντίστοιχα.

Ο προσδιορισμός των φορτίων των μονοστοιβαδικών λιποσωμάτων επιτυγχάνεται με την μέτρηση του ζ-δυναμικού τους ως εξής:

A) Εγκλεισμός της 6-CF: 200 μL από το λιποσωμιακό εναιώρημα που λήφθηκε από την χρωματογραφία στήλης (spin column) αραιώνονται με 700 μL PBS 10 mM και 700 μL H_2O και το διάλυμα που προκύπτει εισάγεται στην κυψελίδα του οργάνου.

B) Εγκλεισμός της DOX; 50 μL από το λιποσωμιακό εναιώρημα που παραλάβαμε από τη χρωματογραφία στήλης, αραιώνονται με 500 μL PBS 20 mM και 1 mL H_2O και το διάλυμα που προκύπτει εισάγεται στην κυψελίδα του οργάνου.

Και στις δύο περιπτώσεις λαμβάνεται ο μέσος όρος που προκύπτει από δέκα μετρήσεις ζ-δυναμικού.

3.4.3 Χαρακτηρισμός των λιποσωμάτων με τη μέθοδο της Διαφορικής Μικροθερμιδομετρίας Σάρωσης

Με την τεχνική DSC μετράται η μεταβολή του συντελεστή ειδικής θερμότητας ΔC_p σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία. Με την DSC προσδιορίζονται οι κυριότεροι θερμοδυναμικοί παράμετροι που συνοδεύουν την σπουδαιότερη μεταβολή που παρατηρείται στα λιποσώματα και η οποία καλείται κύρια μετάπτωση (main transition). Κατά την κύρια μετάπτωση οι μακριές αλειφατικές αλυσίδες των λιπόφιλων τμημάτων των μορίων, που αποτελούν την διπλοστοιβάδα, περνούν από την στερεή στην υγροκρυσταλλική κατάσταση. Οι παράμετροι αυτοί είναι:

1. Η θερμοκρασία κύριας μετάπτωσης T_m , η οποία εξαρτάται από το είδος των λιποσωμάτων (πολυστοιβαδικά/μονοστοιβαδικά), το είδος των λιπιδίων από τα οποία αποτελείται η

διπλοστοιβάδα, τη μέθοδο με την οποία παρασκευάστηκαν τα λιποσώματα (εξώθηση, χρήση υπερήχων, κλπ.), το ρυθμό αύξησης της θερμοκρασίας, κλπ.

2. Η μεταβολή της ενθαλπίας, ΔH , που απορροφάται κατά την διάρκεια της μετάπτωσης, η οποία φανερώνει τη θερμοδυναμική σταθερότητα των λιποσωμάτων και εξαρτάται από τους παραπάνω παράγοντες, και

3. Ο βαθμός της συνεργιστικότητας των λιπιδίων κατά τη διάρκεια της μετάπτωσης, η οποία προσδιορίζεται ποιοτικά από την μορφή της καμπύλης ΔC_p ως προς T . Επιπλέον είναι δυνατόν να εξαχθούν πληροφορίες για τις μεταβολές στην οργάνωση των αλυσίδων της μεμβράνης που επιφέρει η συνύπαρξη περισσότερο από ένα είδος μορίων, όπως για παράδειγμα η χοληστερόλη ή που μπορούν να προκληθούν από τις αλληλεπιδράσεις με άλλα μόρια μέσω του μηχανισμού της μοριακής αναγνώρισης.

Ο προσδιορισμός της θερμοκρασίας κύριας μετάβασης, της μεταβολής της ενθαλπίας κατά τη κύρια μετάβαση και το ημίσιο εύρος κορυφής της κύριας μετάβασης των μονοστοιβαδικών λιποσωμάτων πραγματοποιείται με τη μέθοδο της Διαφορικής Μικροθερμιδομετρίας Σάρωσης. Συγκεκριμένα, σε ένα τυπικό πείραμα 1 mL από το αιώρημα των υπό μελέτη λιποσωμάτων αραιώνονται σε ένα 1 mL H_2O και εισάγονται στην κυψελίδα του οργάνου. Στη συνέχεια ρυθμίζεται ο ρυθμός μεταβολής της θερμοκρασίας στην τιμή των 10 K/h και εκτελούνται 2 κύκλοι θέρμανσης-ψύξης υπό ροή αζώτου.

3.4.4 Χαρακτηρισμός των λιποσωμάτων με τη μέθοδο της διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης με διαμόρφωση θερμοκρασίας

Η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης με διαμόρφωση θερμοκρασίας (temperature modulated DSC, TMDSC) είναι μια σχετικά νέα τεχνική θερμικής ανάλυσης κατά την οποία η τυπική μεταβολή της θερμοκρασίας που χρησιμοποιείται στο DSC επικαλύπτεται από μια ημιτονοειδή διαμόρφωση με συχνότητα που μπορεί να κυμαίνεται από περίπου 0,001 έως 0,1 Hz. Ένα πολύ σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η, πέραν της γραμμικής αύξησης ή μείωσης της θερμοκρασίας, με της δυνατότητας επιπλέον ημιτονοειδούς μεταβολής της θερμοκρασίας με επιθυμητό εύρος και συχνότητα η οποία κατά συνέπεια επηρεάζει τον

ρυθμού ροής θερμότητας από/προς το δείγμα. Η τεχνική TMDSC περιλαμβάνει την αποσυνέλιξη του ρυθμού ροής θερμότητας σε ένα τμήμα που ακολουθεί την επιθυμητή διαμόρφωση (modulation), το λεγόμενο αντιστρεπτό τμήμα (reversing part) και σε ένα τμήμα που δεν την ακολουθεί (non reversing part). Ο όρος αντιστρεπτό χρησιμοποιείται για την διάκριση των δεδομένων TMDSC από αυτά που έχουν αποδειχθεί θερμοδυναμικά αντιστρεπτά. Ο αντιστρεπτός ρυθμός ροής θερμότητας είναι ανάλογος με τη θερμοχωρητικότητα, ενώ ο μη αντιστρεπτός (συνολικός ρυθμός ροής θερμότητας μείον τον αντιστρεπτό ρυθμό) δείχνει την ύπαρξη υστέρησης, δηλαδή μιας μη αντιστρεπτής θερμικής διαδικασίας.

Συγκεκριμένα, σε ένα τυπικό πείραμα 100 μL από το λιποσωμακό εναιώρημα φυγοκεντρήθηκαν για 45 min, στις 90.000 rpm και σε θερμοκρασία 10 $^{\circ}\text{C}$. Το υγρό σφαιρίδιο που προέκυψε από τη φυγοκέντρηση επαναιωρείται με 10 μL ρυθμιστικού διαλύματος (όμοιου με το εξωτερικό ρυθμιστικό διάλυμα) και ακολούθως μεταφέρεται στην κυψελίδα του οργάνου. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν υπό ροή αζώτου (20 mL/min), ενώ η μεταβολή θερμοκρασίας επιλέχθηκε να είναι 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, με ημιτονοειδή διακύμανση πλάτους 0,31 $^{\circ}\text{C}$ κάθε 60 s, ενώ η κυψελίδα αναφοράς παρέμεινε κενή. Πραγματοποιήθηκαν δύο κύκλοι θέρμανσης/ψύξης από τους 15 $^{\circ}\text{C}$ έως τους 60 $^{\circ}\text{C}$, ενώ το πείραμα για κάθε λιποσωμακό φορέα πραγματοποιήθηκε 3 φορές και σε όλες τις περιπτώσεις η διακύμανση ήταν $\pm 0,2$ $^{\circ}\text{C}$.

3.4.5 Προσδιορισμός του ποσοστού εγκλεισμού με τη μέθοδο της φθορισμομετρίας

A) Για τον προσδιορισμό της εγκλεισμένης 6-CF στα λιποσώματα κατασκευάστηκε αρχικά η καμπύλη αναφοράς φθορισμού για διάφορες συγκεντρώσεις 6-CF (0 έως 2 μM) σε νερό. Για τον σκοπό αυτό, 50 μL από το λιποσωμακό εναιώρημα που παρελήφθησαν από τη στήλη μοριακού αποκλεισμού προστέθηκαν σε 2 mL διαλύματος PBS 20 mM. Από το προκύπτον διάλυμα 40 μL προστέθηκαν στην κυψελίδα του οργάνου, η οποία περιέχει προθερμασμένη ποσότητα (2.700 μL) ρυθμιστικού διαλύματος PBS 20 mM. Οι μετρήσεις έγιναν σε θερμοκρασιακό εύρος από 37 $^{\circ}\text{C}$ έως 43 $^{\circ}\text{C}$ σε ανεξάρτητα πειράματα διάρκειας 30 min. Για κάθε θερμοκρασία μετρήθηκε η μέγιστη ένταση φθορισμού (I_{max}), μετά την προσθήκη 150 μL διαλύματος TritonX-100 10% στην κυψελίδα και ανάδευση για τουλάχιστον

5 min. Το I_0 μετρήθηκε στους 25 °C και η επί τοις εκατό (%) αποδέσμευση της 6-CF προσδιορίζεται με τον τύπο:

$$6\text{-CF (\%)} = (I_t - I_0) / (I_{\max} - I_0) \times 100$$

όπου I_t είναι η ένταση φθορισμού ανά συγκεκριμένη χρονική στιγμή, I_{\max} είναι η μέγιστη ένταση φθορισμού και I_0 είναι η ένταση φθορισμού στην αρχή του πειράματος.

B) Για τον προσδιορισμό της εγκλεισμένης DOX στα λιποσώματα κατασκευάστηκε αρχικά καμπύλη αναφοράς φθορισμού για διάφορες συγκεντρώσεις DOX (0 έως 2 μM) σε νερό, μετρώντας κάθε φορά την ένταση φθορισμού στα 590 nm, μετά από διέγερση στα 490 nm. 5 μL από το λιποσωματικό εναιώρημα που παραλάβαμε από τη στήλη μοριακού αποκλεισμού τοποθετούνται στην κυψελίδα του οργάνου, όπου περιέχονται προθερμασμένα 2700 μL PBS 20 mM. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν για 30 min σε θερμοκρασίες από 37 έως 43 °C. Στο τέλος κάθε μέτρησης, 150 μL διαλύματος TritonX-100 10% προστίθεται στην κυψελίδα του οργάνου ώστε να εκτιμηθεί η μέγιστη ένταση φθορισμού (I_{\max}). Το I_0 μετρήθηκε σε θερμοκρασία 25 °C και η ποσοστιαία αποδέσμευση της DOX υπολογίζεται όπως στην περίπτωση της 6-CF χρησιμοποιώντας τον παραπάνω τύπο.

3.4.6 Κυτταροκαλλιέργειες

Για την *in vitro* βιολογική μελέτη των λιποσωμάτων χρησιμοποιήθηκαν σειρές κυττάρων τύπου DU145 και PC3 από ανθρώπινο καρκίνο του προστάτη. Η καρκινική κυτταρική σειρά DU145 έχει απομονωθεί από καρκίνο του προστάτη, όπου ο ασθενής εμφάνιζε μετάσταση στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Η αρχική διάγνωση ήταν ελαφρώς διαφοροποιημένο αδενοκαρκίνωμα, ενώ η μετάσταση χαρακτηρίστηκε ως μετρίως διαφοροποιημένο αδενοκαρκίνωμα, με εστίες ελαφρώς διαφοροποιημένων κυττάρων. Τα κύτταρα δεν είναι εξαρτημένα από ορμόνες. Τα DU145 παράγουν EGF, TGF- α καθώς και τον υποδοχέα EGFR σε 24 υψηλές συγκεντρώσεις, επάγοντας αυτοκρινώς τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Επιπλέον, διαθέτουν την ικανότητα παραγωγής των παραγόντων bFGF, IGF-1 TGF- β , εκφράζουν τους αντίστοιχους υποδοχείς και διεγείρονται από εξωγενείς παράγοντες bFGF, IGF-1 και TGF- β . Χαρακτηριστικό τους επίσης αποτελεί η έκφραση

υποδοχέων τρανσφερρίνης η οποία, επάγει την ανάπτυξή τους και ενισχύει την ικανότητα μετάστασης (⁸⁸).

Η κυτταρική σειρά PC3 προέρχεται από οστική μετάσταση προστατικού αδενοκαρκινώματος. Τα κύτταρα αυτά έχουν μικρό βαθμό διαφοροποίησης και δεν εκφράζουν το γονίδιο p53. Έχουν πάντα ενεργοποιημένο το μονοπάτι της κινάσης 3-φωσφορικής ινοσιτόλης, το οποίο σχετίζεται με την κυτταρική επιβίωση, το μεταβολισμό και την κυτταρική ανάπτυξη. Διαφοροποιούνται από τα υπόλοιπα προστατικά κύτταρα, καθώς η ανάπτυξή τους δεν εξαρτάται σημαντικά από τον ορό και είναι πλήρως ανεξάρτητα από την επίδραση των ανδρογόνων, γλυκοκορτικοειδών, επιδερμικών αυξητικών παραγόντων και αυξητικών παραγόντων των ινοβλαστών. Επίσης παρουσιάζουν μικρό βαθμό διαφοροποίησης και έχουν μετάλλαξη στο γονίδιο K-ras που είναι απαραίτητο για τη σωστή μετάδοση του σήματος στους φυσιολογικούς ιστούς. Η κυτταρική σειρά PC3 αποτελεί χρήσιμο μοντέλο για τη διερεύνηση των βιοχημικών αλλαγών σε κύτταρα προχωρημένου καρκίνου του προστάτη και στην αξιολόγηση της απόκρισής τους σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες (⁸⁹).

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε φλάσκες με διατροφικό DMEM που περιείχε 10% βοδινό εμβρυϊκό ορό (FBS), 100 U/mL πενικιλίνη, 100 μg/mL στρεπτομυκίνη και 2 mM γλουταμίνη, στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO₂. Τα υποσυρρέοντα κύτταρα αποκολλήθηκαν με 0,05 % θρυψίνη-EDTA. Τα υλικά και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώνονται σε κλίβανο αποστείρωσης πριν τη χρήση τους και τα πειράματα έλαβαν χώρα μέσα σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής με βάση το πρωτόκολλο αποφυγής μόλυνσεων. Στη συνέχεια, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε πλάκες 96 ή 6 φρεατίων καλλιέργειας (96 ή 6 well plate) ή σε τρυβλία 35 mm, ανάλογα με τη μελέτη όπως αναφέρονται στη συνέχεια.

3.4.7 Μελέτες μικροσκοπίας επιφθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας

Ο ενδοκυττάριος εντοπισμός της ελεύθερης και της εγκλεισμένης δοξορουβικίνης (DOX) πραγματοποιήθηκε με μικροσκοπία επιφθορισμού καθώς και με συνεστιακή μικροσκοπία. Έτσι, σε ειδικά τρυβλία (Nunc™ glass bottom dishes, ThermoFisher Scientific, Rochester, NY, USA) ή σε γυάλινες καλυπτρίδες που είχαν επικαλυφτεί με πολυλυσίνη, στρώνουμε περίπου 2×10^5 κύτταρα και τα αφήνουμε να επωαστούν για 24h στους 37 °C σε

ατμόσφαιρα 5% CO₂. Στη συνέχεια, αφού κολλήσουν τα κύτταρα, αφαιρούμε το θρεπτικό μέσο (OPTI-MEM), ξεπλένουμε με PBS και τα επωάζουμε παρουσία επιλεγμένων συγκεντρώσεων methyl-PAF λιποσωμάτων στα οποία είναι εγκλεισμένη η δοξορουβικίνη, καθώς επίσης και methyl-PAF λιποσωμάτων επισημασμένων με τη χρωστική NBD και ελεύθερης δοξορουβικίνης (control) επί 2 h. Στη συνέχεια, απομακρύνουμε τις ουσίες, ξεπλένουμε με PBS δύο φορές, προσθέτουμε ~2 mL θρεπτικού μέσου στα τρυβλία και παρατηρούμε στο συνεστιακό Μικροσκόπιο και στο μικροσκόπιο επιφθορισμού.

3.4.8 Κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής πραγματοποιήθηκε με σκοπό να συγκριθούν τα ποσοστά της ελεύθερης ή της εγκλεισμένης δοξορουβικίνης στα methyl-PAF λιποσώματα, που έχουν εισέλθει μέσα στα καρκινικά κύτταρα. Τα καρκινικά κύτταρα ανθρώπινου προστάτη DU145 ή PC3 τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 6 φρεατίων (25×10⁴ κύτταρα ανά φρεάτιο) και αφήνονται να επωαστούν για 24 h στους 37 °C σε ατμόσφαιρα 5% CO₂. Στη συνέχεια, αφαιρείται το θρεπτικό μέσο, ξεπλένονται με PBS και αφήνονται για επώαση παρουσία ελεύθερης DOX ή methyl-PAF λιποσωμάτων που έχουν εγκλεισμένη DOX, στις επιθυμητές συγκεντρώσεις, για 1 h στους 37 °C ή στους 40 °C σε ατμόσφαιρα 5% CO₂. Τα κύτταρα στη συνέχεια εκπλύθηκαν δύο φορές με PBS, θρυψινοποιήθηκαν και διασπάρθηκαν σε 1 ml θρεπτικού μέσου. Τα προκύπτοντα κυτταρικά εναιωρήματα φυγοκεντρήθηκαν για 5 min στις 1000 rpm και στη συνέχεια τα κύτταρα εκπλύθηκαν δύο φορές με PBS. Τελικά, τα συλλεχθέντα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 0,5 mL PBS και προσδιορίστηκε το ποσοστό πρόσληψης της ελεύθερης και της εγκλεισμένης DOX από τα κύτταρα, με τη βοήθεια κυτταρομέτρου.

3.4.9 Μελέτη *in vitro* κυτταροτοξικότητας με την μέθοδο MTT

Η μέθοδος MTT είναι μια χρωματομετρική διαδικασία που χρησιμοποιείται ευρέως για την εκτίμηση της κυτταροτοξικότητας υποψήφιων ουσιών έναντι κυτταρικών σειρών, δεδομένου ότι σχετίζεται με την κυτταρική αναπνοή. Με την μέθοδο MTT προσδιορίζεται η ικανότητα των ζωντανών κυττάρων να μετατρέπουν το διαλυτό άλας του τετραζολίου (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide-MTT) σε αδιάλυτο ίζημα φορμαζάνης

((E,Z)-5-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan). Αυτό οφείλεται στο ότι το άλας του τετραζολίου ανάγεται καθώς προσλαμβάνει ηλεκτρόνια από οξειδωμένα υποστρώματα ή από τα ένζυμα NADPH και NADH μετατρέπόμενο σε φορμαζάνη. Οι μωβ κρύσταλλοι φορμαζάνης που σχηματίζονται ύστερα από 4 h επώασης στα κύτταρα, διαλύονται σε έναν οργανικό διαλύτη και μετράται η απορρόφηση σε φασματοφωτομέτρο στα 540 nm. Οι τιμές IC₅₀ δηλαδή η συγκέντρωση της υπό εξέτασης ένωσης που απαιτείται για τη μείωση κατά 50% των ζώντων κυττάρων του μάρτυρα (control) υπολογίζονται από τις καμπύλες συγκέντρωσης και χρησιμοποιούνται ως μέτρο της κυτταρικής ευαισθησίας σε μια δεδομένη θεραπεία. Τα πλεονεκτήματα της δοκιμασίας MTT συγκριτικά με άλλες παρόμοιες δοκιμασίες είναι ότι απαιτείται λιγότερος χρόνος, είναι φθηνότερη μέθοδος συγκριτικά με άλλες και λόγω της χρήσης κατάλληλου φασματοφωτομέτρου είναι δυνατή η ταυτόχρονη μέτρηση μεγάλου αριθμού δειγμάτων.

Για την μελέτη τα καρκινικά κύτταρα ανθρώπινου προστάτη DU145 ή PC3 εμβολιάστηκαν (10×10^3) σε πλάκες 96 φρεατίων και αναπτύχθηκαν με 100 μ L DMEM που περιείχε 10% FBS, 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη και 1% L-γλουταμίνη για 24 h στους 37 °C σε ατμόσφαιρα 5% CO₂. Τα κύτταρα στη συνέχεια επώαστηκαν με διάφορες συγκεντρώσεις ελεύθερης DOX, lyso-PC λιποσωμάτων, methyl-PAF λιποσωμάτων, καθώς και methyl-PAF λιποσωμάτων με εγκλεισμένη DOX σε DMEM που περιέχει 10% FBS είτε στους 37 °C για 4 h, είτε στους 40 °C για 1 h και 37 °C για 3 h, ακολουθώντας διαφορετικούς συνδυασμούς επώασης, ώστε να έχουμε πάντα συνολικό χρόνο επώασης 4 h. Έτσι, τα κύτταρα επώαστηκαν: α) στους 40 °C αμέσως μετά την προσθήκη λιποσωμάτων για 1 h και στη συνέχεια στους 37 °C για 3 h, β) στους 37 °C για 1 h, στη συνέχεια στους 40 °C για 1 h, και τέλος στους 37 °C για 2 h και γ) στους 37 °C για 2 h, στη συνέχεια στους 40 °C για 1 h και τέλος στους 37 °C για 1 h. Ακολούθως, το μέσο επώασης αντικαταστάθηκε με 100 μ L πλήρες θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα επώαστηκαν περαιτέρω στους 37 °C για 24 h. Στη συνέχεια, το θρεπτικό υλικό απομακρύνθηκε και αντικαταστάθηκε με 100 μ L MTT διάλυμα (1 mg/mL σε DMEM). Μετά από 4 ώρες επώασης, τα κύτταρα και οι παραγόμενοι κρύσταλλοι φορμαζάνης διαλυτοποιήθηκαν σε 100 μ L 2-προπανόλης ανά φρεάτιο. Οι πλάκες στη συνέχεια ανακινήθηκαν για 10 min στις 100 rpm και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 540 nm, με τη

βοήθεια φασματοφωτομέτρου. Σε όλες τις περιπτώσεις αφαιρέθηκαν οι τιμές αναφοράς που μετρήθηκαν σε φρεάτια με 2-προπανόλη μόνο (χωρίς κύτταρα). Η σχετική κυτταρική βιωσιμότητα προσδιορίστηκε ως ποσοστό επιβίωσης κυττάρων σε σύγκριση με κύτταρα που είχαν επωαστεί μόνο με θρεπτικό μέσο (DMEM που περιείχε 10% FBS), και χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες (control).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

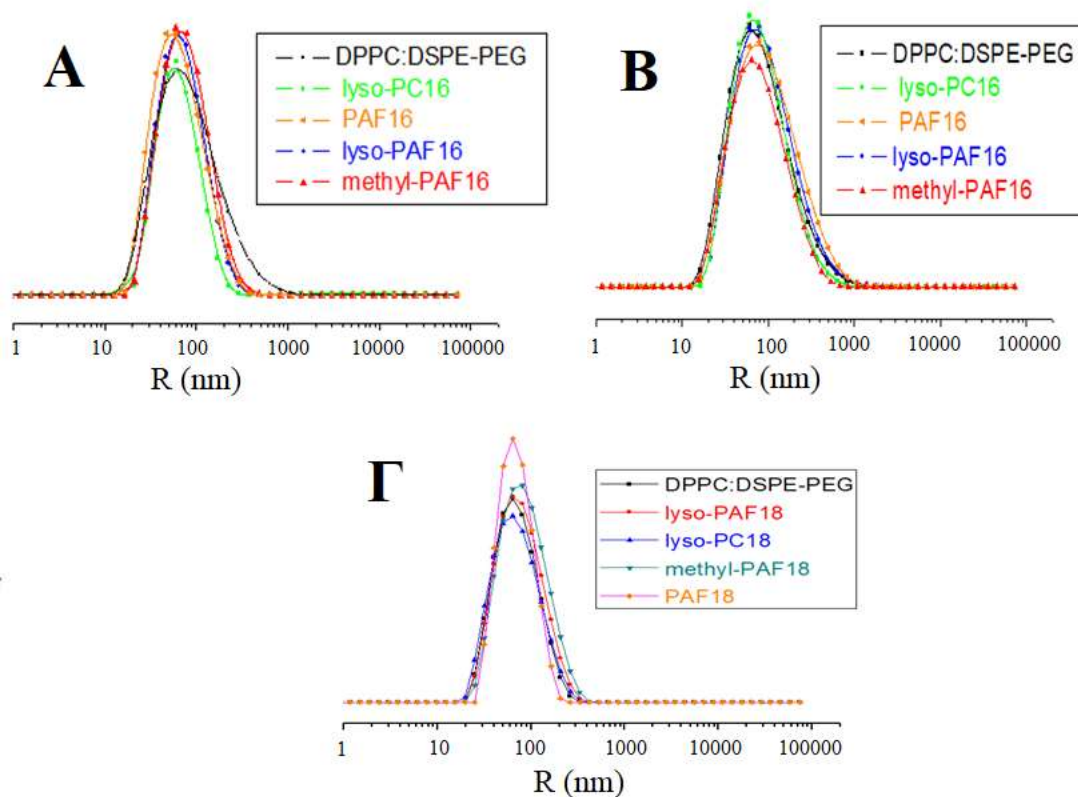
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΜΟΝΟΣΤΟΙΒΑΔΙΚΩΝ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ

4.1 Μέγεθος και κατανομή μεγέθους μονοστοιβαδικών θερμοευαίσθητων λιποσωμάτων

Η μέση ακτίνα όλων των λιποσωματικών φορέων, οι οποίοι φέρουν λιπίδια με 16 άτομα άνθρακα (C16) σε ποσοστά 5 και 10 %, όπως προσδιορίστηκαν από πειράματα DLS βρέθηκαν να είναι, εντός πειραματικού σφάλματος, 45 ± 5 nm, σε συμφωνία με το μέγεθος πόρων της πολυκαρβονικής μεμβράνης που χρησιμοποιήθηκε κατά την εξώθηση των λιποσωμάτων. Ωστόσο, οι αντίστοιχες κατανομές ήταν διαφορετικές για τις διαφορετικές κατηγορίες θερμοευαίσθητων λιποσωμάτων: τα λιποσωματικά σκευάσματα που περιείχαν 5 mol% μονοάκυλο φωσφολιπίδια (Σχήμα 1Α), και συγκεκριμένα τα methyl-PAF16, PAF16, lyso-PAF16 και lyso-PC16, είχαν στενότερη κατανομή μεγέθους σε σύγκριση με εκείνες που μετρήθηκαν για τα σκευάσματα που περιείχαν 10 mol% μονοάκυλο φωσφολιπίδια (Σχήμα 1Β). Λαμβάνοντας υπόψη ότι όλες οι μεταβλητές της διεργασίας κατά την εξώθηση διατηρήθηκαν αυστηρά, η διαφορά αυτή μπορεί να αποδοθεί στην αυξημένη ρευστότητα των λιποσωματικών μεμβρανών για τα λιποσώματα με αυξημένα ποσοστά μονοάκυλο λιπιδίων.

Κατά την παρασκευή λιποσωματικών φορέων με λιπίδια που φέρουν 18 άτομα άνθρακα στην ανθρακική τους αλυσίδα, και συγκεκριμένα τα methyl-PAF18, PAF18, και lyso-PAF18, η παρουσία μονοάκυλο αιθερικών λιπιδίων στη λιποσωματική διπλοστοιβάδα σε συγκέντρωση 5 mol% έχει μικρή αλλά διακριτή επίδραση στο μέγεθος των λιποσωματικών τους συστημάτων σε σύγκριση με τα βασικά DPPC:DSPE-PEG μη θερμοευαίσθητα λιποσώματα ή με τα θερμοευαίσθητα λιποσώματα αναφοράς DPPC:DPPE-PEG:lyso-PC18 (Σχήμα 1Γ). Οι μέσες υδροδυναμικές ακτίνες τους βρέθηκαν να είναι 55 ± 5 nm, σαφώς μεγαλύτερες σε σύγκριση με τα 45 ± 5 nm των λιποσωμάτων αναφοράς. Αυτή η διαφορά είναι σύμφωνη με την ενισχυμένη πλαστικότητα της διπλοστοιβάδας παρουσία μονοάκυλο αιθερικών λιπιδίων, σε σύγκριση με τα απλά λιποσώματα ή με αυτά που περιέχουν lyso-PC18, δεδομένου ότι όλες οι άλλες μεταβλητές κατά τη διάρκεια των σταδίων παρασκευής τους διατηρήθηκαν οι ίδιες.



Σχήμα 1. Μέγεθος και κατανομή μεγέθους μονοστοιβαδικών θερμοευαίσθητων λιποσωμάτων που περιέχουν 5 mol% (A) ή 10 mol% (B) λυσολιπίδια με 16 άτομα άνθρακα στη λιπιδική τους διπλοστοιβάδα ή 5 mol% λυσολιπίδια με 18 άτομα(C18) άνθρακα στη λιπιδική τους διπλοστοιβάδα (Γ).

4.2 Μετρήσεις ζ-δυναμικού

Οι τιμές ζ-δυναμικού όλων των λιποσωματικών φορέων βρέθηκαν σε όλες τις περιπτώσεις να είναι, εντός πειραματικού σφάλματος ίδιες, $-3,0 \pm 1,5$ mV. Αυτό είναι αναμενόμενο λόγω της παρουσίας της ίδιας πολικής ομάδας, δηλαδή της ομάδας φωσφατιδυλοχολίνης, σε όλα τα μελετούμενα λιπίδια. Η μικρή αρνητική τιμή μπορεί να αποδοθεί στην παρουσία DSPE-PEG σε ποσοστό 4% mol, που λόγω της δομής του φέρει αρνητικό καθαρό φορτίο. Συνολικά, σε όλα τα λιποσωματικά σκευάσματα που δοκιμάστηκαν επιτυγχάνεται το ίδιο μέσο μέγεθος και επιφανειακό φορτίο. Αυτό παρέχει το πρόσθετο πλεονέκτημα ότι τυχόν μεταβολές στις ιδιότητές τους, όπως θα παρουσιασθούν ακολούθως, προκύπτουν αποκλειστικά από τα δομικά χαρακτηριστικά των λιπιδίων τους και όχι από το διαφορετικό φορτίο.

4.3 Θερμοκρασία κύριας μετάβασης

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες, τα χαρακτηριστικά και η σταθερότητα των λιπιδικών νανοσωματιδίων μπορούν να μετρηθούν ως συνάρτηση της θερμοκρασίας και του χρόνου χρησιμοποιώντας την τεχνική της θερμικής ανάλυσης. Η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC), όπως προαναφέρθηκε μας επιτρέπει να υπολογίσουμε την ενθαλπία και εντροπία των μεταβάσεων των λιπιδικών αλυσίδων στους λιποσωματικούς φορείς. Η μέθοδος συνέβαλε σημαντικά στον ποιοτικό έλεγχο των λιποσωμάτων, καθώς και για την ορθολογική ανάπτυξη των λιπιδικών νανοφορέων (^{15,90,91}). Τα θερμογραφήματα DSC κατά την δεύτερη διαδικασία θέρμανσης λαμβάνονται μετά από θερμική εξισορρόπηση που επιτυγχάνεται κατά τη διάρκεια της πρώτης διαδικασίας θέρμανσης/ψύξης. Σημειώνεται ότι τα θερμογραφήματα DSC του τρίτου κύκλου θέρμανσης / ψύξης είναι ίδια με εκείνη του δεύτερου σε όλες τις συνθέσεις. Για τα λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG παρατηρείται κορυφή της κύριας μετάβασης (T_m) από τη φάση γέλης στην υγρή κρυσταλλική φάση ($P_\beta \rightarrow L_\alpha$) στους 42 °C όπως αναμένεται με βάση τα βιβλιογραφικά δεδομένα για τα λιποσώματα DPPC (⁹²).

4.3.1 Θερμογραφήματα λιποσωμάτων σύστασης DPPC:DSPE-PEG:λυσολιπιδίων 16 ατόμων άνθρακα

Η θερμική συμπεριφορά των λιποσωμάτων σύστασης DPPC:DSPE-PEG όπως επίσης και των λιποσωμάτων που περιείχαν επιπλέον μονοάκυλο λιπίδια με 16 άτομα άνθρακα στην ανθρακική τους αλυσίδα σε ποσοστό 5 και 10 mol% μελετήθηκε με διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης στην περιοχή θερμοκρασιών από 25 έως 60 °C.

Για την κύρια μετάβαση όλων των λιποσωμάτων καταγράφηκε απλή κορυφή στα θερμογραφήματα DSC που έδειξαν ότι, τουλάχιστον στις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν, τα προκύπτοντα συστήματα είναι ομοιόμορφα μη συνεπαγόμενα ανομοιογένειες εντός της μεμβράνης (⁹³). Όπως φαίνεται στον Πίνακα 1, η θερμοκρασία κύριας μετάβασης (T_m) είναι ίδια για όλες τις λιποσωμακές δομές που περιέχουν είτε 5 mol% ή 10 mol% μονοάκυλο αιθερικά λιπίδια. Κατ' εξαίρεση, αφού ληφθεί υπόψη το σφάλμα στον προσδιορισμό της θερμοκρασίας κύριας μετάβασης (T_m), η μόνη στατιστικά σημαντική διαφορά είναι αυτή των λιποσωμάτων που περιέχουν το λιπίδιο methyl-PAF16 σε 5 mol% αλλά περισσότερο σε 10

mol% ποσοστό ενσωμάτωσης. Συγκεκριμένα, τα λιποσώματα που περιέχουν methyl-PAF16 λιπίδιο σε συγκέντρωση 5 mol% παρουσιάζουν ελαφρά αλλά σαφή μείωση της θερμοκρασίας κύριας μετάβασης (T_m) κατά $\sim 0,3$ °C. Αυτή η μείωση είναι περισσότερο σαφής ($\sim 1,5$ °C) όταν ενσωματώνεται 10 mol% του methyl-PAF16 λιπιδίου στη διπλοστιβάδα. Από το αποτέλεσμα αυτό συνεπάγεται ότι το methyl-PAF αιθερολιπίδιο που ενσωματώνεται στη διπλοστιβάδα των λιποσωματικών φορέων, λόγω της παρουσίας της ογκώδους μεθυλομάδας στο μέσον της γλυκερόλης, διαταράσσει σημαντικά τη συνοχή της διπλοστιβάδας, πιθανώς λόγω μεταβολής των αλληλεπιδράσεων van der Waals μεταξύ γειτονικών μορίων^(94,32,95).

Οι ενθαλπίες της κύριας μετάβασης που καταγράφηκαν (Πίνακας 1) σε σκευάσματα που περιέχουν 5 mol% μονοάκυλο λιπίδια επηρεάζονται ελάχιστα, υποδεικνύοντας μια επιτυχή ενσωμάτωση αυτών των μορίων στη φάση γέλης της διπλοστιβάδας. Η αύξηση του ποσοστού ενσωμάτωσής τους στο 10 mol% οδήγησε σε μικρή αλλά μονοσήμαντη μείωση της ΔH χωρίς, ωστόσο, να επηρεάσει ιδιαίτερα τη μοριακή συνεργασιμότητα (που τυπικά λαμβάνεται ως ανάλογη του $1/\Delta T_{1/2}$, όπου $\Delta T_{1/2}$ είναι το πλάτος θερμοκρασίας στη μέση του μεγίστου της κορυφής DSC) εντός των διπλοστιβάδων. Αν και οι διαφορές είναι μικρές, είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι η ενσωμάτωση του lyso-PAF16 στη διπλή στιβάδα σε συγκέντρωση 5 mol% και 10 mol% έχει ως αποτέλεσμα υψηλότερες τιμές ΔH υποδηλώνοντας ότι αυτό το αιθερικό λιπίδιο που δεν φέρει επιπλέον ομάδα στη θέση 2 της γλυκερόλης διαταράσσει ελάχιστα το πακετάρισμα των φωσφολιπιδίων, όταν η διπλοστιβάδα βρίσκεται σε φάση γέλης. Οι παρατηρούμενες υψηλές τιμές συνεργασιμότητας της μετάβασης παρουσία του lyso-PAF16, είναι σύμφωνη με τα παραπάνω, υποδεικνύοντας μια ευνοϊκή αλληλεπίδραση του lyso-PAF16 με το DPPC οδηγώντας σε μια πιο ομοιογενή κατανομή αυτών των λιπιδίων στη διπλοστιβάδα και, ενδεχομένως, σε αύξηση της οργάνωσης των φωσφολιπιδίων στη φάση γέλης.

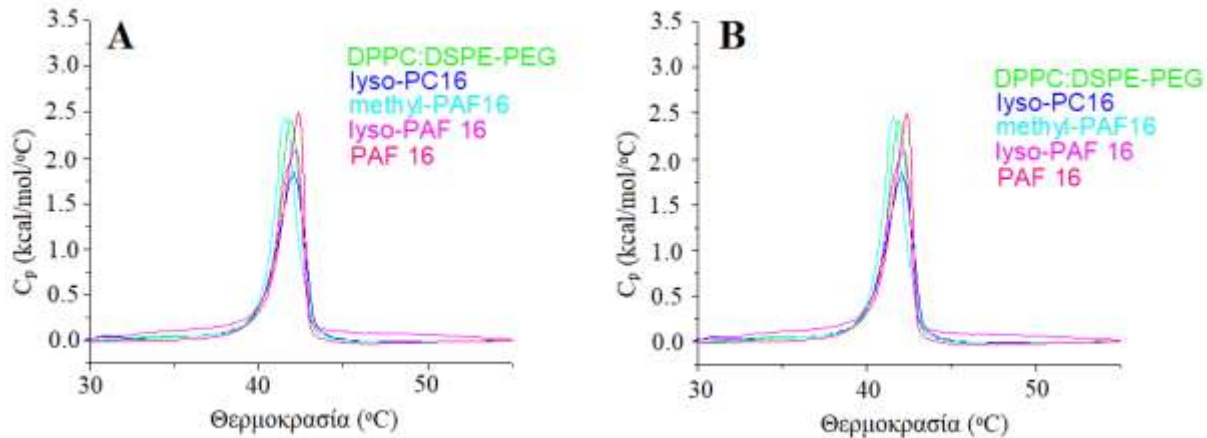
Γενικά, όλα τα αιθερικά λιπίδια σε 5 mol% ενσωμάτωση στις διπλοστιβάδες προσδίδουν μικρές, σχεδόν ασήμαντες μεταβολές στις τιμές ΔH και $\Delta T_{1/2}$ σε αντίθεση με τις μεμβράνες που περιέχουν lyso-PC16, οι οποίες εμφανίζουν τη χαμηλότερη συνεργασιμότητα (ευρύτερες κορυφές DSC) και χαμηλότερες τιμές ΔH . Οι διαφορές στις θερμοδυναμικές παραμέτρους των λιποσωμάτων που περιέχουν lyso-PC16 είναι πιο εμφανείς όταν

συγκρίνονται με λιποσώματα που περιέχουν το αντίστοιχο αιθερολιπίδιο, δηλαδή το lyso-PAF16. Συνολικά, οι θερμοδυναμικές παράμετροι των λιποσωμάτων που περιέχουν μονοάλκυλο αιθερολιπίδια είναι συγκρίσιμες με εκείνες των λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG. Δεν μεταβαίνουν σε υγρή κρυσταλλική φάση ανεξάρτητα από το DPPC, αλλά μάλλον ταυτόχρονα σε ομάδες (μονάδες συνεργασιμότητας) που αποτελούνται, στις περισσότερες περιπτώσεις, από τον ίδιο αριθμό λιπιδικών μορίων. Είναι συνεπώς λογικό να προτείνεται, δεδομένης της ομοιότητας του πολικού μέρους των μορίων και του μήκους της αλειφατικής αλυσίδας, ότι τα μονοάλκυλο λιπίδια αναμιγνύονται τυχαία (ιδανικά) τόσο στη φάση γέλης όσο και στην υγρή κρυσταλλική φάση της DPPC διπλοστοιβάδας (³⁵).

Οι θερμοδυναμικές παράμετροι όλων των λιποσωματικών συστημάτων συνοψίζονται στον Πίνακα 1, ενώ για λόγους σύγκρισης, οι θερμοδυναμικές παράμετροι της πρώτης διαδικασίας θέρμανσης καταγράφονται σε παρενθέσεις. Τα αντίστοιχα θερμογραφήματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 2.

Πίνακας 1. Θερμοδυναμικές παράμετροι (T_m , $\Delta T_{1/2}$) της κύριας μετάβασης φάσης λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG και των θερμοευαίσθητων μονοστοιβαδικών λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG τα οποία περιέχουν επιπλέον μονοάλκυλο φωσφολιπίδια με 16 άτομα άνθρακα (C16), όπως λαμβάνονται κατά τη διάρκεια της δεύτερης διαδικασίας θέρμανσης. Για σύγκριση, οι παράμετροι που λαμβάνονται κατά τη διάρκεια της πρώτης διαδικασίας θέρμανσης παρουσιάζονται σε παρενθέσεις.

Λιποσωματικός Φορέας		T_m (°C)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)
DPPC:DSPE-PEG		41,9±0,2 (41,8)	1,5 (1,4)
DPPC:DSPE-PEG:lyso-PC16	(5%)	42,1±0,2 (42,1)	1,9 (1,7)
DPPC:DSPE-PEG:PAF16	(5%)	42,3±0,2 (42,4)	1,4 (1,3)
DPPC:DSPE-PEG:lyso-PAF16	(5%)	42,2±0,2 (42,1)	1,6 (1,6)
DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF16	(5%)	41,6±0,2 (41,2)	1,5 (2,5)
DPPC:DSPE-PEG:lyso-PC16	(10%)	42,0±0,2 (41,8)	1,8 (1,6)
DPPC:DSPE-PEG:PAF16	(10%)	42,0±0,2 (43,0)	1,4 (1,8)
DPPC:DSPE-PEG:lyso-PAF16	(10%)	41,9±0,2 (41,8)	1,0 (1,0)
DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF16	(10%)	40,4±0,2 (40,1)	1,3 (1,0)



Σχήμα 2. Θερμογραφήματα λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG και θερμοευαίσθητων μονοστοιβαδικών λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG τα οποία περιέχουν επιπλέον μονοάλκυλο φωσφολιπίδια με 16 άτομα άνθρακα σε ποσοστό 5 mol% (A) ή 10 mol% (B). Ο ρυθμός σάρωσης θέρμανσης ήταν 10 K/h.

4.3.2 Θερμογραφήματα λιποσωμάτων σύστασης DPPC:DSPE-PEG:λυσολιπιδίων 18 ατόμων άνθρακα

Όπως και στην περίπτωση των λιποσωματικών φορέων που φέρουν λιπίδια με 16 άτομα άνθρακα στην ανθρακική τους αλυσίδα, έτσι και για τα λιποσώματα που φέρουν λιπίδια με 18 άτομα άνθρακα στη ανθρακική τους αλυσίδα, οι θερμοδυναμικές παράμετροι παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την ποιότητα αυτών των συστημάτων και, ουσιαστικά, την ομοιογένεια της διπλοστοιβάδας, η οποία είναι σημαντική δεδομένης της ενσωμάτωσης μιας ποικιλίας μονοάλκυλο φωσφολιπιδίων στη διπλοστοιβάδα. Διεξήχθησαν μετρήσεις διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης σε θερμοκρασίες από 25 έως 60 °C για τα λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG, που ελήφθησαν ως μάρτυρες, και για λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG που επιπλέον ενσωματώνουν μονοάλκυλο φωσφολιπίδια 18 ατόμων άνθρακα (C18) σε ποσοστό 5 mol%.

Σε όλες τις συνθέσεις καταγράφηκε μόνο μία κορυφή, ένδειξη ότι για τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν τα συστήματα είναι ομοιογενή και ότι η παρουσία των προστιθέμενων φωσφολιπιδίων δεν προκαλεί διαχωρισμό φάσεων ή ανομοιογένειες στη διπλοστοιβάδα των λιποσωματικών φορέων. Από τα δεδομένα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2, είναι προφανές ότι η ενσωμάτωση του lyso-PC18, δηλαδή του συνήθους

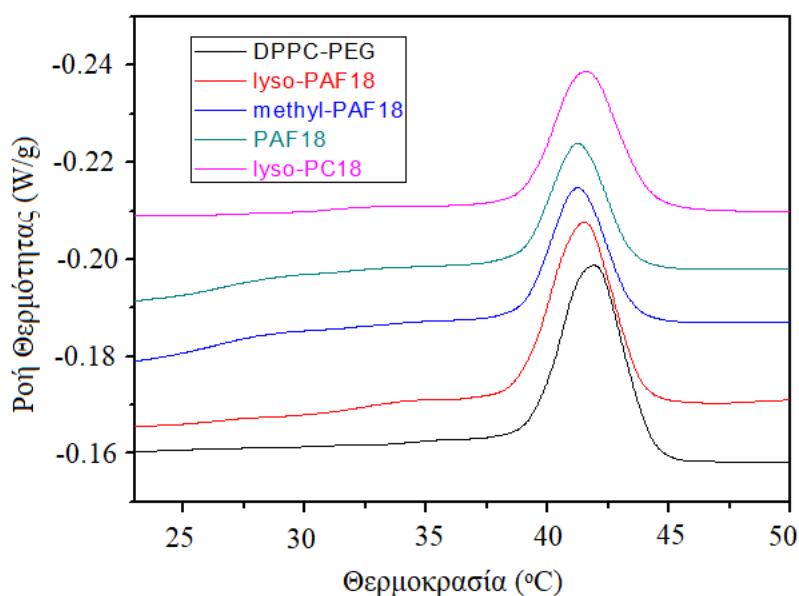
λυσολιπιδίου που χρησιμοποιείται στα πιο γνωστά θερμοευαίσθητα λιποσώματα, δεν οδηγεί σε σημαντική μεταβολή στην θερμοκρασία κύριας μετάβασης T_m σε σύγκριση με τα λιποσώματα αναφοράς DPPC:DSPE-PEG. Επιπλέον, το πλάτος του κορυφής DSC, εκφρασμένο ως πλάτος θερμοκρασίας στο μισό της μέγιστης κορυφής ($\Delta T_{1/2}$) είναι επίσης αμετάβλητο, εντός του πειραματικού σφάλματος, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι οι τιμές συνεργασιμότητας των μεταβάσεων ($\propto 1/\Delta T_{1/2}$) είναι πρακτικά αμετάβλητες και για τα δύο συστήματα. Από την άλλη πλευρά, η παρουσία αιθερικών λυσολιπιδίων έχει σαν αποτέλεσμα μια μικρή αλλά σαφή μείωση των τιμών της θερμοκρασίας κύριας μετάβασης T_m , ενώ δεν υπάρχει σημαντική μεταβολή στη συνεργασιμότητα της μετάβασης, δηλ. στο πλάτος κορυφής του DSC.

Και οι δύο παράμετροι που ελήφθησαν υπόψη, δείχνουν μια μικρή διαταραχή της οργάνωσης στη λιπιδική διπλοστοιβάδα των λιποσωματικών φορέων, χωρίς όμως να έχουν οποιαδήποτε εμφανή επίδραση στις περιοχές που επεκτείνεται η τοπική οργάνωση της διπλοστοιβάδας. Με βάση τη μικρή επίδραση των αιθερικών λυσολιπιδίων στις θερμοδυναμικές παραμέτρους των διπλοστοιβάδων, το γεγονός ότι αυτές οι παράμετροι είναι ουσιαστικά αμετάβλητες κατά τη διάρκεια της δεύτερης διαδικασίας θέρμανσης και δεδομένης της όμοιας με το DPPC χημικής τους δομής, είναι λογικό να συμπεράνουμε ότι αυτά τα λιπίδια ενσωματώνονται πλήρως στη διπλοστοιβάδα σχηματίζοντας ομοιογενή και θερμικά σταθερά συστήματα με το DPPC που είναι το κύριο συστατικό των στοιβάδων.

Οι θερμοδυναμικές παράμετροι των λιποσωματικών φορέων που φέρουν μονοάκυλο φωσφολιπίδια με 18 άτομα άνθρακα στην ανθρακική τους αλυσίδα παρουσιάζονται στον Πίνακα 2. Οι μετρήσεις διεξήχθησαν σε θερμοκρασιακό εύρος 25-60 °C και για λόγους σύγκρισης παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που ελήφθησαν κατά τη διάρκεια της πρώτης και της δεύτερης διαδικασίας θέρμανσης. Τα αντίστοιχα θερμογραφήματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.

Πίνακας 2. Θερμοδυναμικές παράμετροι (T_m , $\Delta T_{1/2}$) της κύριας μετάβασης φάσης λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG και των θερμοευαίσθητων μονοστοιβαδικών λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG τα οποία περιέχουν επιπλέον μονοάλκυλο φωσφολιπίδια με 18 άτομα άνθρακα (C18), όπως λαμβάνονται κατά τη διάρκεια της πρώτης και δεύτερης διαδικασίας θέρμανσης.

Λιποσωματικός Φορέας	T_m (°C)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)
	1 ^{ος} / 2 ^{ος} κύκλος θέρμανσης	1 ^{ος} / 2 ^{ος} κύκλος θέρμανσης
DPPC:DSPE-PEG	41,9 / 41,9	2,4 / 2,4
DPPC:DSPE-PEG:lyso-PC18 (5 %)	41,5 / 41,7	2,5 / 2,6
DPPC:DSPE-PEG:PAF18 (5 %)	41,2/ 41,4	2,5 / 2,9
DPPC:DSPE-PEG:lyso-PAF18 (5 %)	41,4 / 41,6	2,4 / 2,3
DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF18 (5 %)	41,2 / 41,3	2,4/2,9



Σχήμα 3. Θερμογραφήματα λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG και θερμοευαίσθητων μονοστοιβαδικών λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG τα οποία περιέχουν επιπλέον μονοάλκυλο φωσφολιπίδια με 18 άτομα άνθρακα σε ποσοστό 5 mol%. Ο ρυθμός σάρωσης θέρμανσης ήταν 2 K min⁻¹.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΜΕΛΕΤΗ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ

5(6)-ΚΑΡΒΟΞΥΦΛΟΥΟΡΕΣΚΕΙΝΗΣ (6-CF)

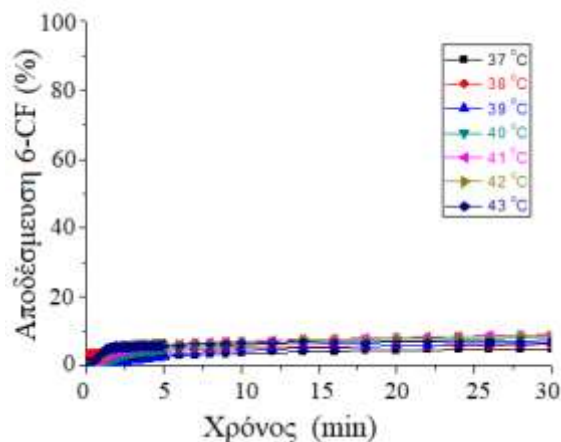
5.1 Μελέτη θερμικής σταθερότητας λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG:λυσολιπιδίων

5.1.1 Λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG που περιέχουν σε ποσοστό 5 mol% λυσολιπίδια με 16 άτομα άνθρακα στην ανθρακική τους αλυσίδα

Η θερμική σταθερότητα των λιποσωματικών φορέων με ενσωματωμένα τα εξεταζόμενα λυσολιπίδια μελετήθηκε αρχικά με τη μέθοδο προσδιορισμού του ρυθμού αποδέσμευσης της 6-CF συναρτήσει της θερμοκρασίας (⁹⁶).

Λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG

Στο Σχήμα 4 παρουσιάζεται η αποδέσμευση της 6-CF από τα λιποσώματα αναφοράς, με σύσταση DPPC:DSPE-PEG (μοριακή αναλογία DPPC:DSPE-PEG = 91:4) σε συνάρτηση με το χρόνο (0-30 min) και για θερμοκρασίες από 37 °C έως 43 °C.

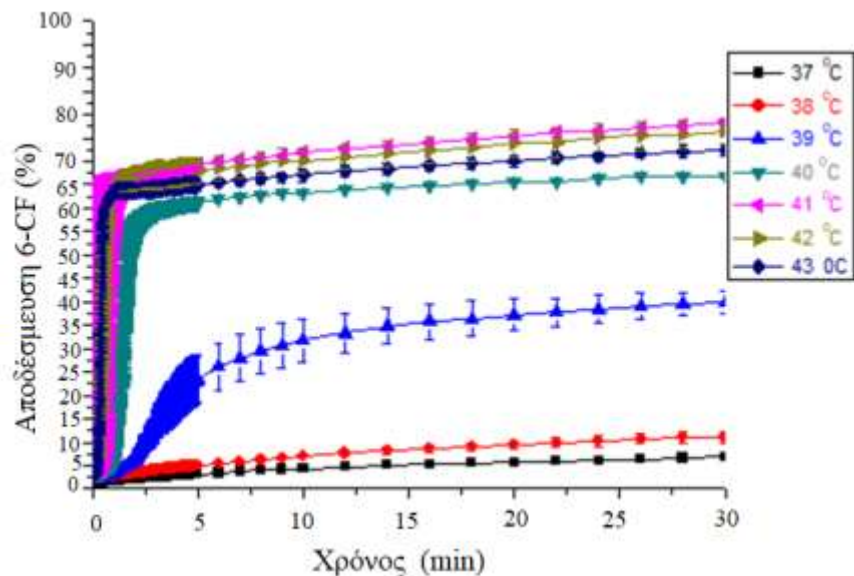


Σχήμα 4. Ποσοστό απελευθέρωσης 6-CF (%) συναρτήσει του χρόνου από μονοστοιβαδικά λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG (μοριακή αναλογία 91:4) σε θερμοκρασιακό εύρος 37 °C έως 43 °C. Οι μετρήσεις ελήφθησαν κάθε 0,2 s κατά τα πρώτα 5 min της περιόδου επώασης, κάθε 1 min έως 10 min και μετά κάθε 2 min. Για λόγους σαφήνειας, οι γραμμές σφάλματος εμφανίζονται μόνο μετά την πρώτη περίοδο των 5 min.

Όπως φαίνεται από τις καμπύλες αποδέσμευσης, η εξεταζόμενη ουσία 6-CF δεν εμφανίζει ιδιαίτερη αποδέσμευση από τον λιποσωμιακό φορέα. Διαπιστώνεται ότι μόλις το 10% της αρχικής ουσίας απελευθερώνεται μετά από 30 min, σε όλες τις εφαρμοζόμενες θερμοκρασίες.

Λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:lyso-PAF16 σε μοριακή αναλογία 91:4:5

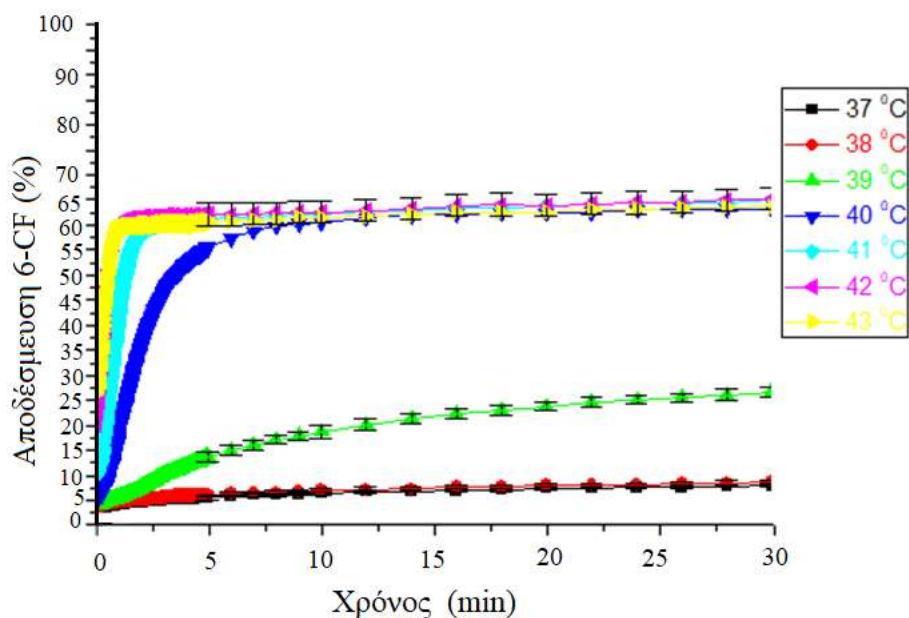
Η ενσωμάτωση του λυσολιπιδίου lyso-PAF16 στη διπλοστοιβάδα του λιποσωμιακού φορέα σύστασης DPPC:DSPE-PEG σε ποσοστό 5 mol% προήγαγε την απελευθέρωση της 6-CF, ειδικά σε θερμοκρασίες κοντά στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης του λιποσώματος. Στο Σχήμα 5 παρουσιάζεται η απελευθέρωση της 6-CF από τον λιποσωμιακό φορέα σύστασης DPPC:DSPE-PEG:lyso-PAF16 (91:4:5) σε συνάρτηση με το χρόνο και για θερμοκρασίες από 37 °C έως 43 °C. Όπως δείχνουν οι καμπύλες αποδέσμευσης η απελευθέρωση της 6-CF ξεπερνά το 70%, όταν οι θερμοκρασίες προσεγγίζουν την θερμοκρασία κύριας μετάβασης του λιποσωμιακού φορέα, ενώ παραμένει αρκετά χαμηλή στους 37 °C και 38 °C.



Σχήμα 5. Ποσοστό απελευθέρωσης της 6-CF (%) συναρτήσεως του χρόνου από μονοστοιβαδικά λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:lyso-PAF16 (μοριακή αναλογία 91:4:5) σε θερμοκρασιακό εύρος 37 °C έως 43 °C.

Λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF16 σε μοριακή αναλογία 91:4:5

Στο Σχήμα 6 παρουσιάζεται η απελευθέρωση της 6-CF από τον λιποσωματικό φορέα σύστασης DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF16 (91:4:5) σε συνάρτηση με το χρόνο και για θερμοκρασίες από 37 °C έως 43 °C.

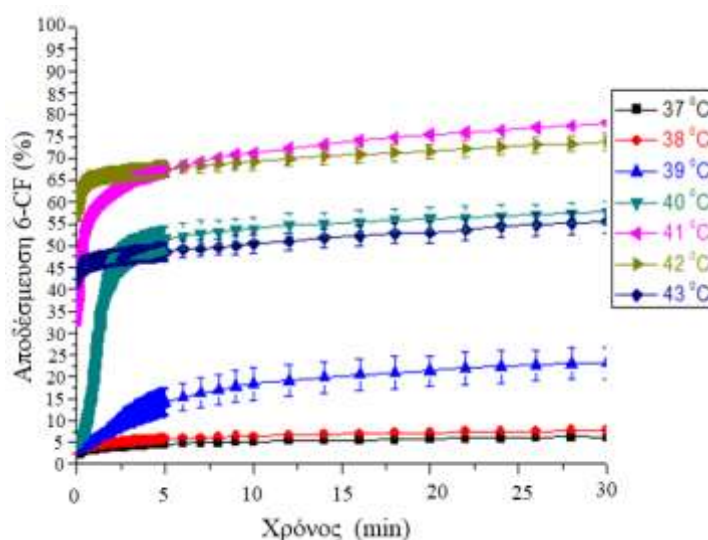


Σχήμα 6. Ποσοστό απελευθέρωσης της 6-CF (%) συναρτήσει του χρόνου από μονοστοιβαδικά λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF16 (μοριακή αναλογία 91:4:5) σε θερμοκρασιακό εύρος από 37 °C έως 43 °C.

Όπως φαίνεται από τις καμπύλες απελευθέρωσης η ενσωμάτωση του λυσολιπιδίου methyl-PAF16 στη διπλοστοιβάδα του λιποσωματικού φορέα σύστασης DPPC:DSPE-PEG σε ποσοστό 5 mol% προάγει μερικώς την απελευθέρωση της 6-CF, ιδιαίτερα σε θερμοκρασίες κοντά στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης του λιποσώματος. Η απελευθέρωση της 6-CF πλησιάζει το 60%, ειδικά σε θερμοκρασίες κοντά στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης του λιποσωματικού φορέα, ενώ παραμένει χαμηλή στους 37 °C και 38 °C.

Λιπασώματα DPPC:DSPE-PEG:PAF16 σε μοριακή αναλογία 91:4:5

Στο Σχήμα 7 παρουσιάζεται η απελευθέρωση της 6-CF από τον λιπασωματικό φορέα σύστασης DPPC:DSPE-PEG:PAF16 (91:4:5) σε συνάρτηση με το χρόνο και για θερμοκρασίες από 37 °C έως 43 °C. Παρατηρείται πάλι ότι η ενσωμάτωση του λυσολιπιδίου PAF16 στη διπλοστοιβάδα του λιπασωματικού φορέα σύστασης DPPC:DSPE-PEG σε ποσοστό 5 mol% προάγει την απελευθέρωση της 6-CF, ειδικά σε θερμοκρασίες κοντά στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης του λιπασώματος.



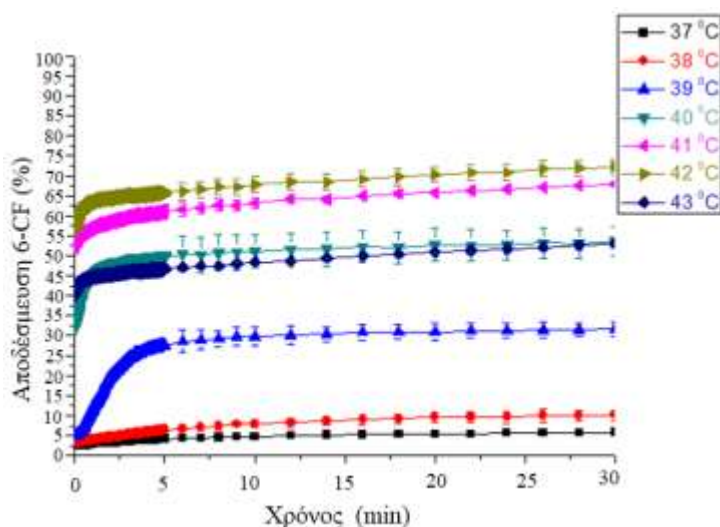
Σχήμα 7. Ποσοστό απελευθέρωσης της 6-CF (%) συναρτήσει του χρόνου από μονοστοιβαδικά λιπασώματα DPPC:DSPE-PEG:PAF16 (μοριακή αναλογία 91:4:5) σε θερμοκρασιακό εύρος από 37 °C έως 43 °C.

Η απελευθέρωση της 6-CF υπερβαίνει το 70%, ειδικά σε θερμοκρασίες κοντά στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης του λιπασωματικού φορέα (41 °C και 42 °C), ενώ παραμένει χαμηλή στους 37 °C και 38 °C. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζει η απελευθέρωση της 6-CF από τον λιπασωματικό φορέα στη θερμοκρασία των 43 °C. Στην περίπτωση αυτή παρατηρείται ότι η μέγιστη απελευθέρωση αγγίζει μόλις το 50% και είναι αρκετά χαμηλότερη εκείνης, η οποία παρατηρείται κοντά στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης (70%).

Λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:lyso-PC16 σε μοριακή αναλογία 91:4:5

Η ενσωμάτωση του λυσολιπιδίου lyso-PC16 στη διπλοστοιβάδα του λιποσωματικού φορέα σύστασης DPPC:DSPE-PEG σε ποσοστό 5 mol% προήγαγε την απελευθέρωση της 6-CF, ειδικά σε θερμοκρασίες κοντά στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης του λιποσώματος. Η απελευθέρωση της 6-CF φτάνει το 70%, ειδικά σε θερμοκρασίες κοντά στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης του λιποσωματικού φορέα (41 °C και 42 °C), ενώ παραμένει χαμηλή στους 37 °C και 38 °C. Όπως και στην περίπτωση του PAF16, η απελευθέρωση της 6-CF από τον λιποσωματικό φορέα στη θερμοκρασία 43 °C εμφανίζεται χαμηλότερη από τη μέγιστη απελευθέρωση, η οποία παρατηρείται κοντά στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης, και φτάνει μόλις το 50%.

Στο Σχήμα 8 παρουσιάζεται η απελευθέρωση της 6-CF από τον λιποσωματικό φορέα σύστασης DPPC:DSPE-PEG:lyso-PC16 (91:4:5) σε συνάρτηση με το χρόνο και για θερμοκρασίες από 37 °C έως 43 °C. Η ενσωμάτωση του λυσολιπιδίου lyso-PC16 στη διπλοστοιβάδα του λιποσωματικού φορέα σύστασης DPPC:DSPE-PEG σε ποσοστό 5 mol% προήγαγε την απελευθέρωση της 6-CF, ειδικά σε θερμοκρασίες κοντά στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης του λιποσώματος.



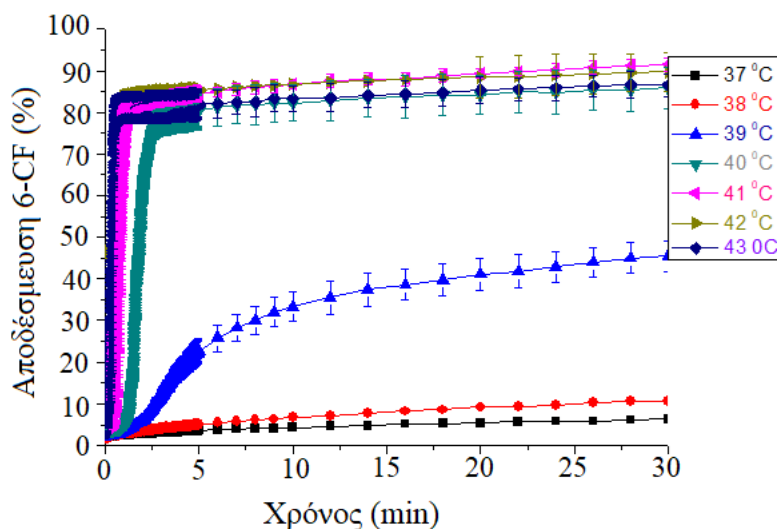
Σχήμα 8. Ποσοστό απελευθέρωσης της 6-CF (%) συναρτήσεως του χρόνου από μονοστοιβαδικά λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:lyso-PC16 (μοριακή αναλογία 91:4:5) σε θερμοκρασιακό εύρος από 37 °C έως 43 °C.

Η απελευθέρωση της 6-CF προσεγγίζει το 70%, ειδικά σε θερμοκρασίες κοντά στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης του λιποσωματικού φορέα (41 °C και 42 °C), ενώ παραμένει χαμηλή στους 37 °C και 38 °C. Όπως και στην περίπτωση του PAF16, η απελευθέρωση της 6-CF από τον λιποσωματικό φορέα στη θερμοκρασία 43 °C εμφανίζεται χαμηλότερη από τη μέγιστη απελευθέρωση, η οποία παρατηρείται κοντά στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης, και φτάνει μόλις το 50%.

5.1.2 Λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG που περιέχουν σε ποσοστό 10 mol% λυσολιπίδια με 16 άτομα άνθρακα στην ανθρακική τους αλυσίδα

Λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:lyso-PAF16 σε μοριακή αναλογία 91:4:10

Η ενσωμάτωση του λυσολιπιδίου lyso-PAF16 στη διπλοστοιβάδα του λιποσωματικού φορέα σύστασης DPPC:DSPE-PEG σε ποσοστό 10 mol% προήγαγε την απελευθέρωση της 6-CF, όπως αναμέναμε σε θερμοκρασίες κοντά στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης του λιποσώματος. Στο Σχήμα 9 παρουσιάζεται η απελευθέρωση της 6-CF από τον λιποσωματικό φορέα σύστασης DPPC:DSPE-PEG:lyso-PAF16 (91:4:10) σε συνάρτηση με το χρόνο και για θερμοκρασίες από 37 °C έως 43 °C.



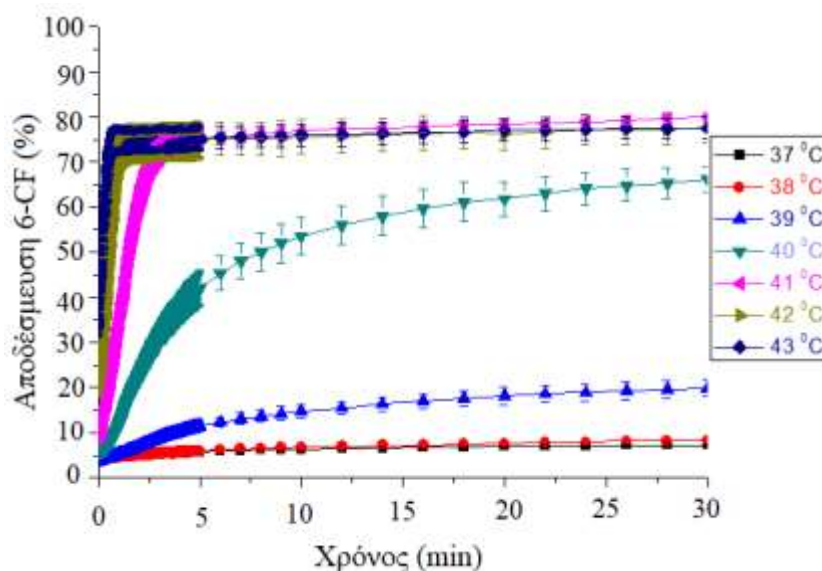
Σχήμα 9. Ποσοστό απελευθέρωσης της 6-CF (%) συναρτήσεως του χρόνου από μονοστοιβαδικά λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:lyso-PAF16 (μοριακή αναλογία 91:4:10) σε θερμοκρασιακό εύρος 37 °C έως 43 °C.

Όπως φαίνεται από τις καμπύλες η απελευθέρωση της 6-CF ανήλθε στο 85%, ειδικά για θερμοκρασίες κοντά στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης του λιποσωματικού φορέα (41 °C και 42 °C), ενώ παρέμεινε χαμηλή στους 37 °C και 38 °C.

Λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF16 σε μοριακή αναλογία 91:4:10

Η ενσωμάτωση του λυσολιπιδίου methyl-PAF16 στη διπλοστοιβάδα του λιποσωματικού φορέα σύστασης DPPC:DSPE-PEG σε ποσοστό 10 mol% προήγαγε την απελευθέρωση της 6-CF, ειδικά σε θερμοκρασίες κοντά στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης του λιποσώματος.

Στο Σχήμα 10 παρουσιάζεται η απελευθέρωση της 6-CF από τον λιποσωματικό φορέα σύστασης DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF16 (91:4:10) σε συνάρτηση με το χρόνο και για θερμοκρασίες από 37 °C έως 43 °C.

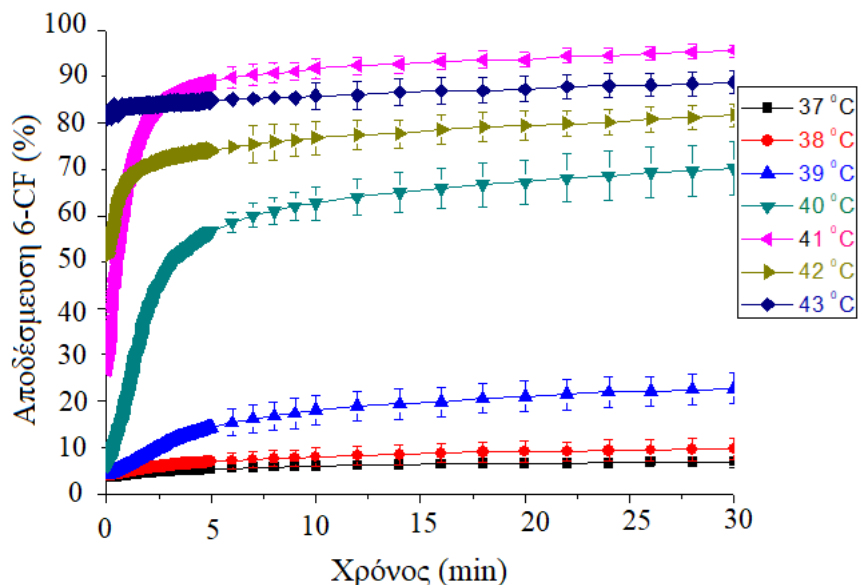


Σχήμα 10. Ποσοστό απελευθέρωσης της 6-CF (%) συναρτήσει του χρόνου από μονοστοιβαδικά λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF16 (μοριακή αναλογία 91:4:10) σε θερμοκρασιακό εύρος από 37 °C έως 43 °C.

Η απελευθέρωση της 6-CF προσεγγίζει το 80%, ειδικά σε θερμοκρασίες κοντά στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης του λιποσωματικού φορέα (41 °C και 42 °C), ενώ παραμένει χαμηλή στους 37 °C και 38 °C.

Λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:PAF16 σε μοριακή αναλογία 91:4:10

Στο Σχήμα 11 παρουσιάζεται η απελευθέρωση της 6-CF από τον λιποσωματικό φορέα σύστασης DPPC:DSPE-PEG:PAF16 (91:4:10) σε συνάρτηση με το χρόνο και για θερμοκρασίες από 37 °C έως 43 °C.

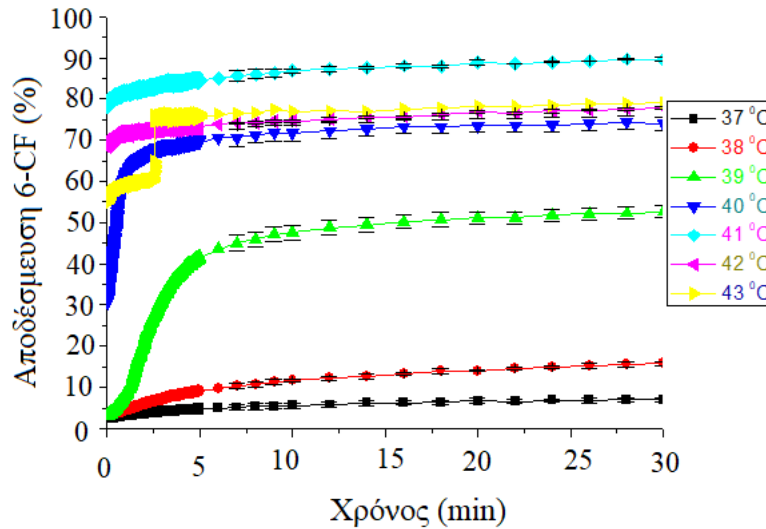


Σχήμα 11. Ποσοστό απελευθέρωσης της 6-CF (%) συναρτήσει του χρόνου από μονοστοιβαδικά λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:PAF16 (μοριακή αναλογία 91:4:10) σε θερμοκρασιακό εύρος από 37 °C έως 43 °C.

Η ενσωμάτωση του λυσολιπιδίου PAF16 στη διπλοστοιβάδα του λιποσωματικού φορέα σύστασης DPPC:DSPE-PEG σε ποσοστό 10 mol% προήγαγε την απελευθέρωση της 6-CF, ειδικά σε θερμοκρασίες κοντά στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης του λιποσώματος. Η απελευθέρωση της 6-CF φτάνει το 90%, ειδικά σε θερμοκρασίες κοντά στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης του λιποσωματικού φορέα (41 °C και 42 °C), ενώ παραμένει χαμηλή στους 37 °C και 38 °C

Λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:lyso-PC16 σε μοριακή αναλογία 91:4:10

Στο Σχήμα 12 παρουσιάζεται η απελευθέρωση της 6-CF από τον λιποσωματικό φορέα σύστασης DPPC:DSPE-PEG:lyso-PC16 (91:4:10) σε συνάρτηση με το χρόνο και για θερμοκρασίες από 37 °C έως 43 °C.



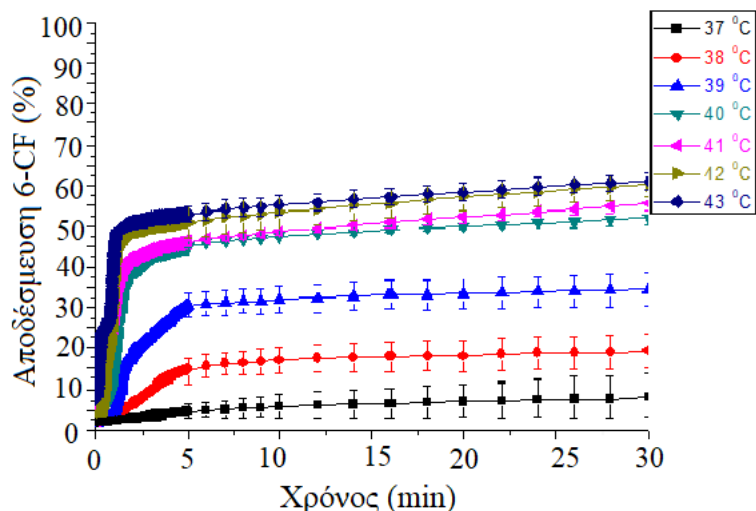
Σχήμα 12. Ποσοστό απελευθέρωσης της 6-CF (%) συναρτήσει του χρόνου από μονοστοιβαδικά λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:lyso-PC16 (μοριακή αναλογία 91:4:10) σε θερμοκρασιακό εύρος από 37 °C έως 43 °C.

Η ενσωμάτωση του λυσολιπιδίου lyso-PC16 στη διπλοστοιβάδα του λιποσωμιακού φορέα σύστασης DPPC:DSPE-PEG σε ποσοστό 10 mol% προήγαγε την απελευθέρωση της 6-CF, ειδικά σε θερμοκρασίες κοντά στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης του λιποσώματος. Η απελευθέρωση της 6-CF φτάνει το 90%, ειδικά σε θερμοκρασίες κοντά στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης του λιποσωμιακού φορέα (41 °C και 42 °C), ενώ παραμένει χαμηλή στους 37 °C και 38 °C.

5.1.3 Λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG που περιέχουν 5 mol% λυσολιπιδίων με 18 άτομα άνθρακα στην ανθρακική τους αλυσίδα

Λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:lyso-PAF18 σε μοριακή αναλογία 91:4:5

Στο Σχήμα 13 παρουσιάζεται η απελευθέρωση της 6-CF από τον λιποσωμιακό φορέα σύστασης DPPC:DSPE-PEG:lyso-PAF18 (91:4:5) σε συνάρτηση με το χρόνο και για θερμοκρασίες από 37 °C έως 43 °C.

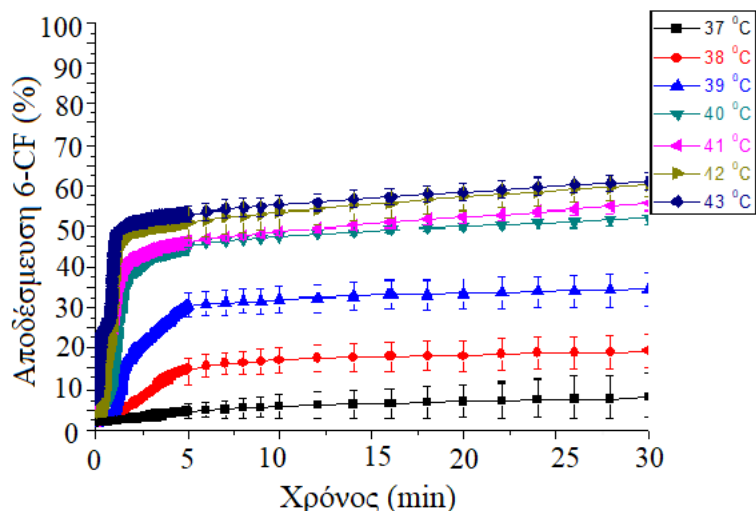


Σχήμα 13. Ποσοστό απελευθέρωσης της 6-CF (%) συναρτήσει του χρόνου από μονοστοιβαδικά λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:lyso-PAF18 (μοριακή αναλογία 91:4:5) σε θερμοκρασιακό εύρος από 37 °C έως 43 °C.

Η ενσωμάτωση του λυσολιπιδίου lyso-PC18 στη διπλοστοιβάδα του λιποσωματικού φορέα σύστασης DPPC:DSPE-PEG σε ποσοστό 5 mol% δεν προήγαγε επαρκώς την απελευθέρωση της 6-CF, ούτε στις θερμοκρασίες κοντά στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης του λιποσώματος. Η απελευθέρωση της 6-CF φτάνει μόλις το 50%, ακόμα και στις θερμοκρασίες κοντά στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης του λιποσωματικού φορέα (41 °C και 42 °C), ενώ εμφανίζει μεγαλύτερη απελευθέρωση στους 38 °C, σε σχέση με τους λιποσωματικούς φορείς που έφεραν λυσολιπίδια με 16 άτομα άνθρακα ενσωματωμένα στη ανθρακική τους αλυσίδα.

Λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF18 σε μοριακή αναλογία 91:4:5

Στο Σχήμα 14 παρουσιάζεται η απελευθέρωση της 6-CF από τον λιποσωματικό φορέα σύστασης DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF18 (91:4:5) σε συνάρτηση με το χρόνο και για θερμοκρασίες από 37 °C έως 43 °C.

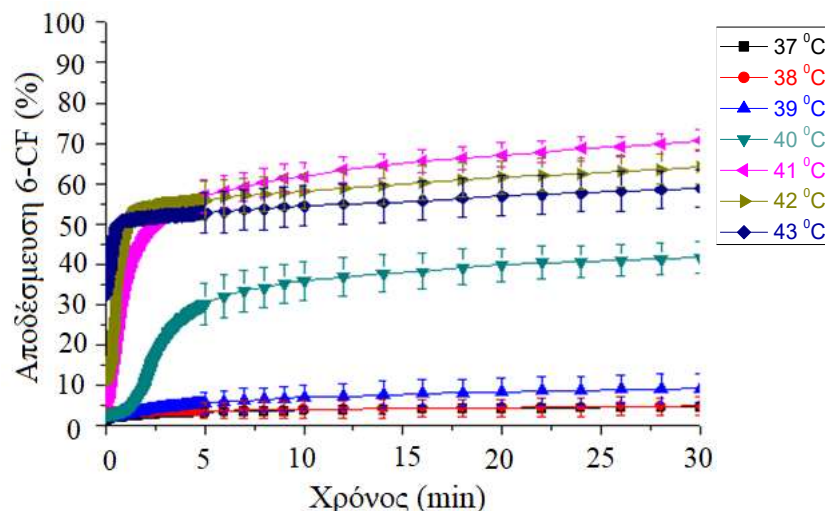


Σχήμα 14. Ποσοστό απελευθέρωσης της 6-CF (%) συναρτήσει του χρόνου από μονοστοιβαδικά λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF18 (μοριακή αναλογία 91:4:5) σε θερμοκρασιακό εύρος από 37 °C έως 43 °C.

Η ενσωμάτωση του λυσολιπιδίου methyl-PAF18 στη διπλοστοιβάδα του λιποσωματικού φορέα σύστασης DPPC:DSPE-PEG σε ποσοστό 5 mol% προήγαγε επαρκώς την απελευθέρωση της 6-CF, ειδικά σε θερμοκρασίες κοντά στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης του λιποσώματος. Η απελευθέρωση της 6-CF φτάνει το 80%, στις θερμοκρασίες κοντά στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης του λιποσωματικού φορέα (41 °C και 42 °C), ενώ εμφανίζεται μειωμένη στις χαμηλές θερμοκρασίες 37 °C και 38 °C.

Λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:PAF18 σε μοριακή αναλογία 91:4:5

Στο Σχήμα 15 παρουσιάζεται η απελευθέρωση της 6-CF από τον λιποσωματικό φορέα σύστασης DPPC:DSPE-PEG:PAF18 (91:4:5) σε συνάρτηση με το χρόνο (30 min) και για θερμοκρασίες από 37 °C έως 43 °C.

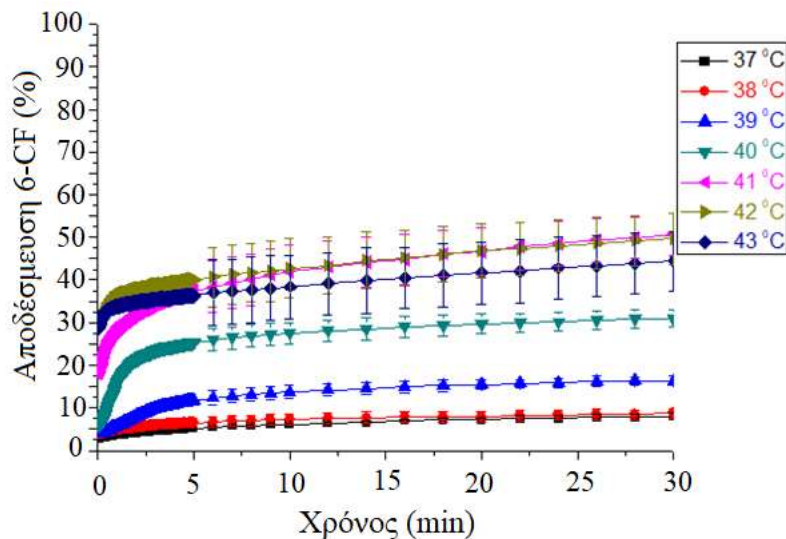


Σχήμα 15. Ποσοστό απελευθέρωσης της 6-CF (%) συναρτήσει του χρόνου από μονοστοιβαδικά λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:PAF18 (μοριακή αναλογία 91:4:5) σε θερμοκρασιακό εύρος 37 °C έως 43 °C.

Η ενσωμάτωση του λυσολιπιδίου PAF18 στη διπλοστοιβάδα του λιποσωματικού φορέα σύστασης DPPC:DSPE-PEG σε ποσοστό 5 mol% προήγαγε επαρκώς την απελευθέρωση της 6-CF, ειδικά σε θερμοκρασίες κοντά στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης του λιποσώματος. Η απελευθέρωση της 6-CF φτάνει το 70%, στις θερμοκρασίες κοντά στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης του λιποσωματικού φορέα (41 °C και 42 °C), ενώ εμφανίζεται μειωμένη στις χαμηλές θερμοκρασίες 37 °C και 38 °C.

Λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:lyso-PC18 σε μοριακή αναλογία 91:4:5

Στο Σχήμα 16 παρουσιάζεται η απελευθέρωση της 6-CF από τον λιποσωματικό φορέα σύστασης DPPC:DSPE-PEG:lyso-PC18 (91:4:5) σε συνάρτηση με το χρόνο (30 min) και για θερμοκρασίες από 37 °C έως 43 °C.



Σχήμα 16. Ποσοστό απελευθέρωσης της 6-CF (%) συναρτήσει του χρόνου από μονοστοιβαδικά λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:lyso-PC18 (μοριακή αναλογία 91:4:5) σε θερμοκρασιακό εύρος από 37 °C έως 43 °C.

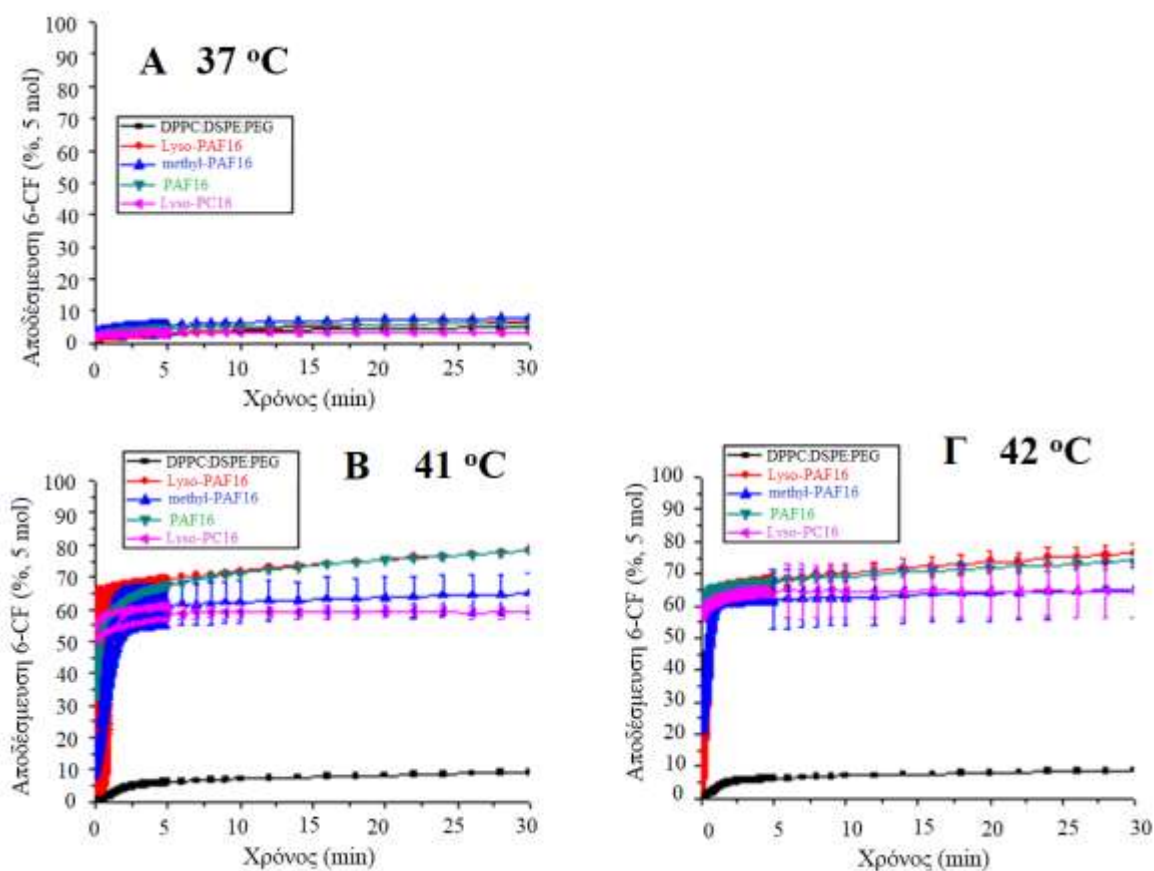
Η ενσωμάτωση του λυσολιπιδίου lyso-PC18 στη διπλοστοιβάδα του λιποσωματικού φορέα σύστασης DPPC:DSPE-PEG σε ποσοστό 5 mol% δεν προήγαγε επαρκώς την απελευθέρωση της 6-CF, ούτε και στις θερμοκρασίες κοντά στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης του λιποσώματος. Η απελευθέρωση της 6-CF φτάνει μόλις το 45%, στις θερμοκρασίες κοντά στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης του λιποσωματικού φορέα (41 °C και 42 °C), ενώ εμφανίζεται μειωμένη στις χαμηλές θερμοκρασίες 37 °C και 38 °C.

5.2 Συγκριτική μελέτη θερμικής σταθερότητας μεταξύ λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG που περιέχουν μονοάλκυλο λιπίδια διαφορετικής χημικής δομής

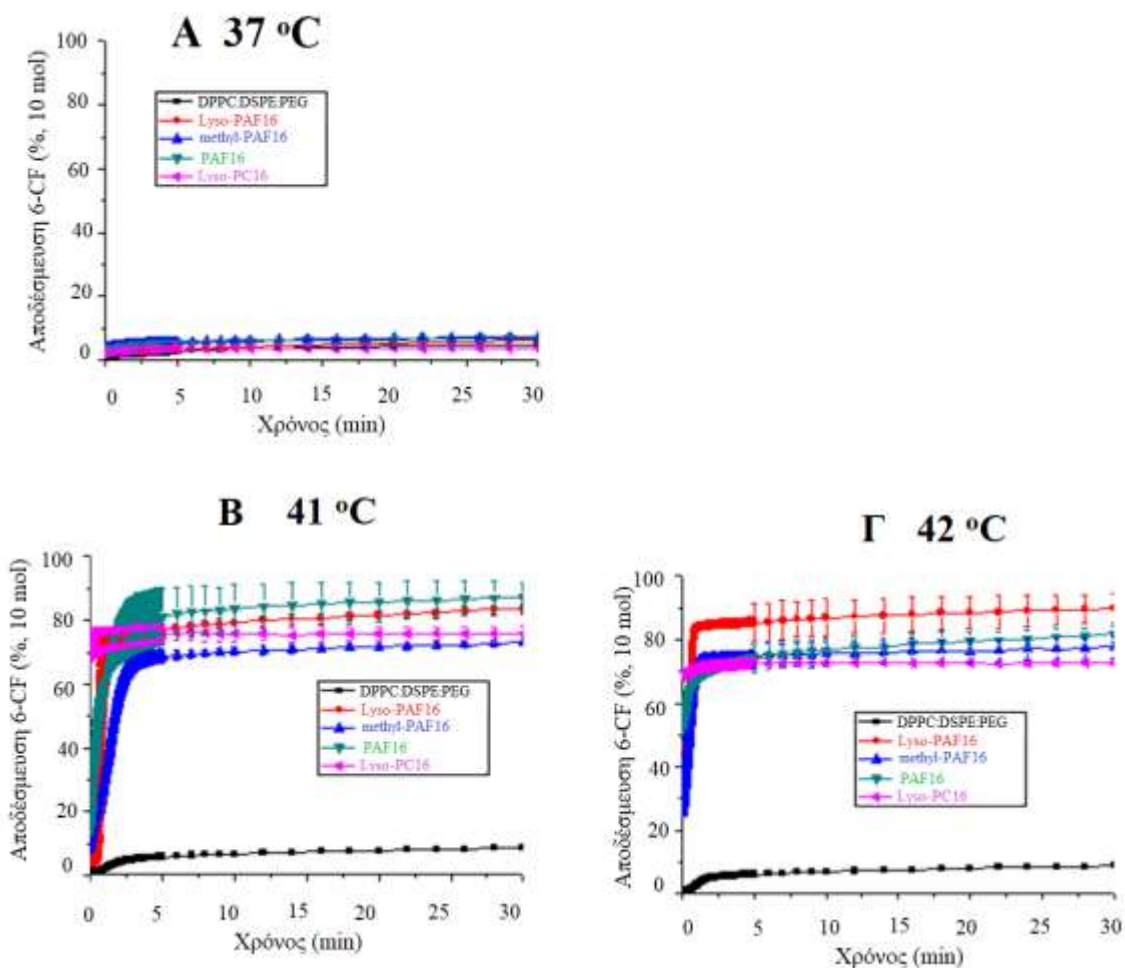
5.2.1 Συγκριτική μελέτη θερμικής σταθερότητας μεταξύ λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG που περιέχουν σε ποσοστό 5 ή 10 mol% μονοάλκυλο λιπίδια που φέρουν 16 άτομα άνθρακα στη ανθρακική τους αλυσίδα

Η εξαρτώμενη από το χρόνο απελευθέρωση της 6-CF από λιποσώματα που περιέχουν 5 ή 10 mol% λυσολιπίδια πραγματοποιήθηκε με απευθείας μετρήσεις για 30 min. Αυτό το

χρονικό πλαίσιο δικαιολογείται δεδομένου ότι, στην πράξη, οι θεραπείες υπερθερμίας ασκούνται για περίπου 30 min μετά τη χορήγηση φαρμάκων ή λιποσωμάτων με ενσωματωμένες φαρμακευτικές ουσίες (^{97,98}). Όλα τα δείγματα φαίνεται να είναι σταθερά στους 37 °C με μέγιστη αποδέσμευση της 6-CF περίπου 7% μετά από επώαση 30 min (Σχήματα 17 και 18), ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό της αποδεσμευόμενης 6-CF παρατηρείται μέσα στα πρώτα 10 min. Το προφίλ αποδέσμευσης της 6-CF από λιποσώματα με lyso-PC16 είναι σύμφωνα με τα αντίστοιχα προφίλ παρόμοιων λιποσωματικών φορέων που αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Για παράδειγμα, απελευθέρωση 6-CF κατά ~10% αναφέρθηκε για λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:lyso-PC16 (84:4:10) εντός 30 min με το μεγαλύτερο μέρος της απελευθέρωσης να παρατηρείται εντός των πρώτων 10-15 min (¹⁴).



Σχήμα 17. Συγκριτικά διαγράμματα αποδέσμευσης της 6-CF (%) από μονοστοιβαδικά λιποσώματα με ενσωματωμένα λυσολιπίδια 16 ατόμων άνθρακα σε ποσοστό 5 mol% στη λιπιδική διπλοστοιβάδα, συναρτήσει του χρόνου για τις θερμοκρασίες 37 °C (A), 41 °C (B) και 42 °C (Γ).



Σχήμα 18. Συγκριτικά διαγράμματα αποδέσμευσης της 6-CF από μονοστοιβαδικά λιποσώματα με ενσωματωμένα λυσολιπίδια 16 ατόμων άνθρακα σε ποσοστό 10 mol% στη λιπιδική διπλοστοιβάδα, συναρτήσει του χρόνου για τις θερμοκρασίες 37 °C (A), 41 °C (B) και 42 °C (Γ).

Τα προφίλ αποδέσμευσης της 6-CF για τους διαφορετικούς λιποσωματικούς φορείς που μελετήθηκαν δεν διαφοροποιούνται ουσιαστικά αν και είναι σαφές ότι τα λιποσώματα αναφοράς DPPC:DSPE-PEG έχουν την βραδύτερη απελευθέρωση, η οποία αναμένεται επειδή δεν φέρουν ενσωματωμένα λυσολιπίδια στη λιπιδική τους διπλοστοιβάδα. Για τα θερμοευαίσθητα λιποσώματα, η παρατηρούμενη απελευθέρωση της 6-CF είναι υψηλότερη για τα λιποσώματα που περιέχουν είτε 5 ή 10 mol% methyl-PAF16, αν και η διαφορά με τα τυπικά

θερμοευαίσθητα λιποσώματα που περιέχουν lyso-PC16 δεν είναι στατιστικά σημαντική, ιδιαίτερα όταν χρησιμοποιείται μοριακή αναλογία 10 mol% αυτών των λιπιδίων.

Η ποσοστιαία απελευθέρωση της 6-CF από τα θερμοευαίσθητα λιποσώματα μελετήθηκε επίσης μετά από 24 h επώασης στους 37 °C και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Ποσοστιαία απελευθέρωση της 6-CF από τους λιποσωμακούς θερμοευαίσθητους φορείς, μετά από επώαση στους 37 °C για 24 h.

Λιποσωμακός Φορέας	Απελευθέρωση	
	της 6-CF (%)	SE (±)
DPPC:DSPE-PEG	15,9	2,1
DPPC:DSPE-PEG:lyso-PC16 (5%)	27,3	3,8
DPPC:DSPE-PEG:PAF16 (5%)	30,9	4,3
DPPC:DSPE-PEG:lyso-PAF16 (5%)	34,0	5,1
DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF16 (5%)	31,4	5,7
DPPC:DSPE-PEG:lyso-PC16 (10%)	30,4	4,0
DPPC:DSPE-PEG:PAF16 (10%)	31,7	5,4
DPPC:DSPE-PEG:lyso-PAF16 (10%)	34,7	4,2
DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF16 (10%)	32,8	3,8

Όπως προκύπτει από τον Πίνακα 3, στους 37 °C δεν παρατηρείται σημαντική διαφοροποίηση στο ποσοστό απελευθέρωσης 6-CF για όλους τους φορείς που μελετήθηκαν. Ενώ τα λιποσώματα ελέγχου εμφανίζονται σίγουρα πιο σταθερά, η επίδραση διαφόρων μονοάλκυλο λιπιδίων στην σταθερότητα των λιποσωμάτων είναι οριακά υπέρ των λιποσωμάτων lyso-PC16 σε σύγκριση με τα αιθερικά λιπίδια που μελετήθηκαν.

Από την άλλη πλευρά, στους 41 °C, δηλαδή κοντά στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης (T_m), η οποία επιλέχθηκε επειδή εφαρμόζεται στην πράξη κατά τη διάρκεια μιας ήπιας θεραπείας με υπερθερμία, τα αντίστοιχα προφίλ αποδέσμευσης (Σχήματα 17 και 18) δείχνουν ταχεία απελευθέρωση της 6-CF, η οποία σχεδόν φτάνει στο μέγιστο σε κάθε δείγμα μέσα στα πρώτα 5 min και στις περισσότερες περιπτώσεις ακόμη πιο γρήγορα (περίπου μέσα σε 2 min). Τα αποτελέσματα απελευθέρωσης της 6-CF από τα δείγματα ελέγχου (λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG και DPPC:DSPE-PEG:lyso-PC16) είναι σύμφωνα με ήδη δημοσιευμένα δεδομένα, αν και μικρές αποκλίσεις στα προφίλ απελευθέρωσης είναι αναμενόμενες λόγω διαφορών στο πρωτόκολλο προετοιμασίας ή του μεγέθους των λιποσωματικών φορέων. Έτσι, έχει αναφερθεί ότι τα λιποσώματα που αποτελούνται από DPPC:DSPE-PEG (90:4) έχουν απελευθέρωση 6-CF ~10% μετά από 5 min επώασης στους 41 °C, ενώ τα "πρότυπα" θερμοευαίσθητα λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:lyso-PC16 (91:4:10) έχουν απελευθέρωση 85 ±8% στους 40,9 °C (⁹⁹). Σύμφωνα με τα παραπάνω, στη δημοσίευση των Sandström et. al., η αποδέσμευση της 6-CF από λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:lyso-PC16 (90:4:10) ήταν 50,9% και 84,5% μετά από θέρμανση στους 41,5 °C για 1 και 30 min, αντίστοιχα (¹⁰⁰).

Συγκρίνοντας τις χρονικά εξαρτώμενες μετρήσεις απελευθέρωσης της 6-CF από τα λιποσώματα που περιέχουν αιθερο-μονοάλκυλο λιπίδια σε σχέση με εκείνη του αντίστοιχου lyso-PC που έχει εστερική ομάδα αντί της αιθερικής, είναι σαφές ότι σε ποσοστό ενσωμάτωσης 10 mol% (το οποίο χρησιμοποιείται στα πρότυπα θερμοευαίσθητα λιποσώματα) όλες οι συνθέσεις συμπεριφέρονται ταυτόσημα απελευθερώνοντας το μεγαλύτερο μέρος του περιεχόμενου τους εντός των πρώτων 5 min και φθάνοντας σε σχεδόν σταθερή τιμή ~90% μετά από 30 min (Πίνακας 4). Διαφορετικό προφίλ παρουσιάζουν τα λιποσώματα που περιέχουν ενσωματωμένο το λυσολιπίδιο methyl-PAF16 και εμφανίζουν βραδύτερο ρυθμό απελευθέρωσης και χαμηλότερο ποσοστό τελικής απελευθέρωσης της 6-CF μετά από 30 min (80%).

Πίνακας 4. Σταθερές ρυθμού απελευθέρωσης, k , της 6-CF από θερμοευαίσθητα λιποσώματα που επωάστηκαν στους 41 °C και η συνολική (%) απελευθέρωση της 6-CF στην ίδια θερμοκρασία μέσα στα πρώτα 30 min. Για τον υπολογισμό της k ελήφθησαν υπ' όψη τα πρώτα 2 min των προφίλ απελευθέρωσης.

Λιποσωμιακός Φορέας	Σταθερά ρυθμού απελευθέρωσης k (s^{-1})	Απελευθέρωση της 6-CF (%)
DPPC:DSPE-PEG	0,72 \pm 0,03	9,1 \pm 0,1
DPPC:DSPE-PEG:lyso-PC16 (5%)	2,75 \pm 0,15	68,0 \pm 0,5
DPPC:DSPE-PEG:PAF16 (5%)	(2,40 \pm 0,10)	78,1 \pm 0,9
DPPC:DSPE-PEG:lyso-PAF16 (5%)	(3,75 \pm 0,25)	75,5 \pm 1,0
DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF16 (5%)	0,82 \pm 0,03	58,8 \pm 0,5
DPPC:DSPE-PEG:lyso-PC16 (10%)	(2,50 \pm 0,15)	89,6 \pm 1,0
DPPC:DSPE-PEG:PAF16 (10%)	1,25 \pm 0,12	92,0 \pm 1,0
DPPC:DSPE-PEG:lyso-PAF16 (10%)	5,80 \pm 0,20	91,6 \pm 1,6
DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF16 (10%)	0,90 \pm 0,03	80,0 \pm 0,9

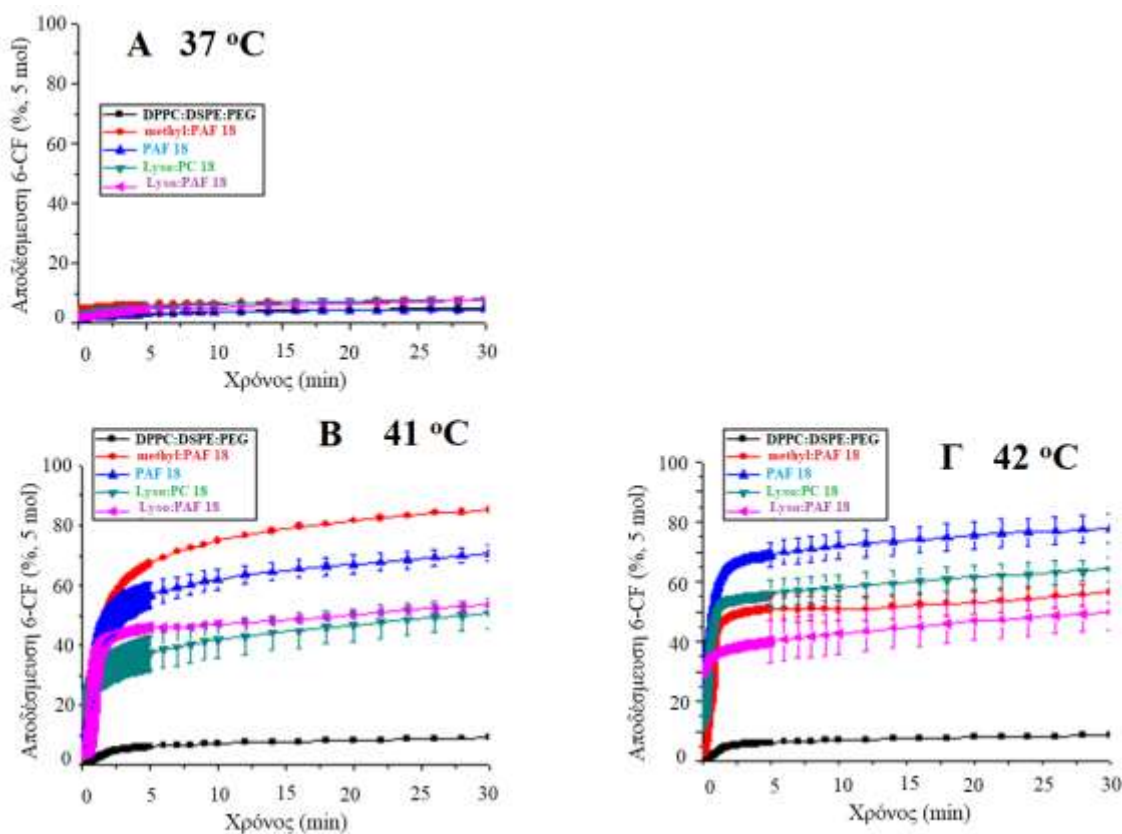
Από την άλλη πλευρά, τα λιποσώματα που περιέχουν μόνο 5 mol% μονοάλκυλο-λιπίδια παρουσιάζουν διαφορετικά προφίλ απελευθέρωσης και στην περίπτωση αυτή μπορεί να προταθεί με επιφύλαξη μια σχέση δομής-ιδιότητας. Όπως και παραπάνω, το λυσολιπίδιο methyl-PAF16 έχει τις χαμηλότερες ιδιότητες απελευθέρωσης, γεγονός που θεωρείται ως αποτέλεσμα της παρουσίας της μεθυλικής ομάδας στη θέση 2 του τμήματος της γλυκερίνης. Ωστόσο, τόσο τα PAF16 όσο και τα αιθερικά παράγωγα lyso-PAF16 επάγουν υψηλότερη απελευθέρωση 6-CF από το lyso-PC16, υποδηλώνοντας τον σημαντικό ρόλο της παρουσίας αιθερικού δεσμού στη θέση 1 της γλυκερίνης. Για αυτά τα θερμοευαίσθητα λιποσώματα η συνολική απελευθέρωση που καταγράφηκε είναι 75-78%, η οποία είναι 10% υψηλότερη από εκείνη του lyso-PC16 και μόλις 10% μικρότερη από την απελευθέρωση που λαμβάνεται από λιποσώματα που περιέχουν διπλάσια ποσότητα μονοάλκυλο λιπιδίων.

Οι παρατηρούμενες διαφορές αντικατοπτρίζονται επίσης στις σταθερές του ρυθμού απελευθέρωσης, k , οι οποίες υπολογίζονται από τα πειραματικά δεδομένα και περιλαμβάνονται στον Πίνακα 4. Θα πρέπει να τονιστεί ότι δεν ήταν δυνατόν να ταιριάζει με ακρίβεια ολόκληρη η καμπύλη απελευθέρωσης δεδομένου ότι καθώς ο χρόνος εξελίσσεται, η απελευθέρωση γίνεται σημαντικά πιο αργή φθάνοντας σε τιμές πλατώ, γεγονός που πρακτικά ελαχιστοποιεί τις σταθερές ρυθμού απελευθέρωσης. Για το λόγο αυτό, μόνο τα πρώτα 2 min των προφίλ απελευθέρωσης, χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των k . Επίσης, δεδομένου ότι για ορισμένες συνθέσεις ακόμη και η πρώτη καταχωρημένη τιμή (που λαμβάνεται μέσα σε λιγότερο από 10 s μετά την προσθήκη των λιποσωμάτων στους 41 °C) είναι πολύ υψηλή (κοντά σε 60 έως και 80%), η αρχική σταθερά ρυθμού είναι πρακτικά αδύνατο να προσδιοριστεί με ακρίβεια.

5.2.2 Συγκριτική μελέτη θερμικής σταθερότητας μεταξύ λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG που περιέχουν σε ποσοστό 5 mol% μονοάλκυλο λιπίδια που φέρουν με 18 άτομα άνθρακα στη ανθρακική τους αλυσίδα

Η εξαρτώμενη από το χρόνο απελευθέρωση της 6-CF από λιποσώματα που περιέχουν 5 mol% λυσολιπίδια με 18 άτομα άνθρακα πραγματοποιήθηκε με απευθείας μετρήσεις για 30 min. Όλα τα δείγματα φαίνεται να είναι σταθερά στους 37 °C με μέγιστη αποδέσμευση της 6-CF περίπου 7% μετά από επώαση 30 min (Σχήμα 19) ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό της αποδεσμευόμενης 6-CF παρατηρείται μέσα στα πρώτα 10 min. Όπως ήταν αναμενόμενο, η απελευθέρωση της 6-CF παραμένει χαμηλή για τα λιποσώματα αναφοράς DPPC:DSPE-PEG, ακόμα και κοντά στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης, ενώ οι υπόλοιποι φορείς που φέρουν λυσολιπίδια εμφανίζουν αυξημένη απελευθέρωση. Στο Σχήμα 19 φαίνεται σαφώς ότι η απελευθέρωση της 6-CF από τους λιποσωματικούς φορείς που φέρουν το lyso-PC18 είναι η χαμηλότερη τόσο στους 41 °C, όσο και στους 42 °C και φτάνει μόλις το 45% μετά από 30 min. Αντιθέτως οι λιποσωματικοί φορείς που ενσωματώνουν αιθερολιπίδια στη λιπιδική τους διπλοστοιβάδα εμφανίζουν αυξημένη απελευθέρωση της 6-CF και πιο συγκεκριμένα το methyl-PAF18 λιποσωματικό παράγωγο, το οποίο εμφανίζει 80% απελευθέρωση στους 41 °C και 70% στους 42 °C. Η μειωμένη απελευθέρωση η οποία καταγράφεται στους 42 °C είναι σε πλήρη συμφωνία με τα δεδομένα του DSC, όπου η θερμοκρασία κύρια μετάβασης μετρήθηκε

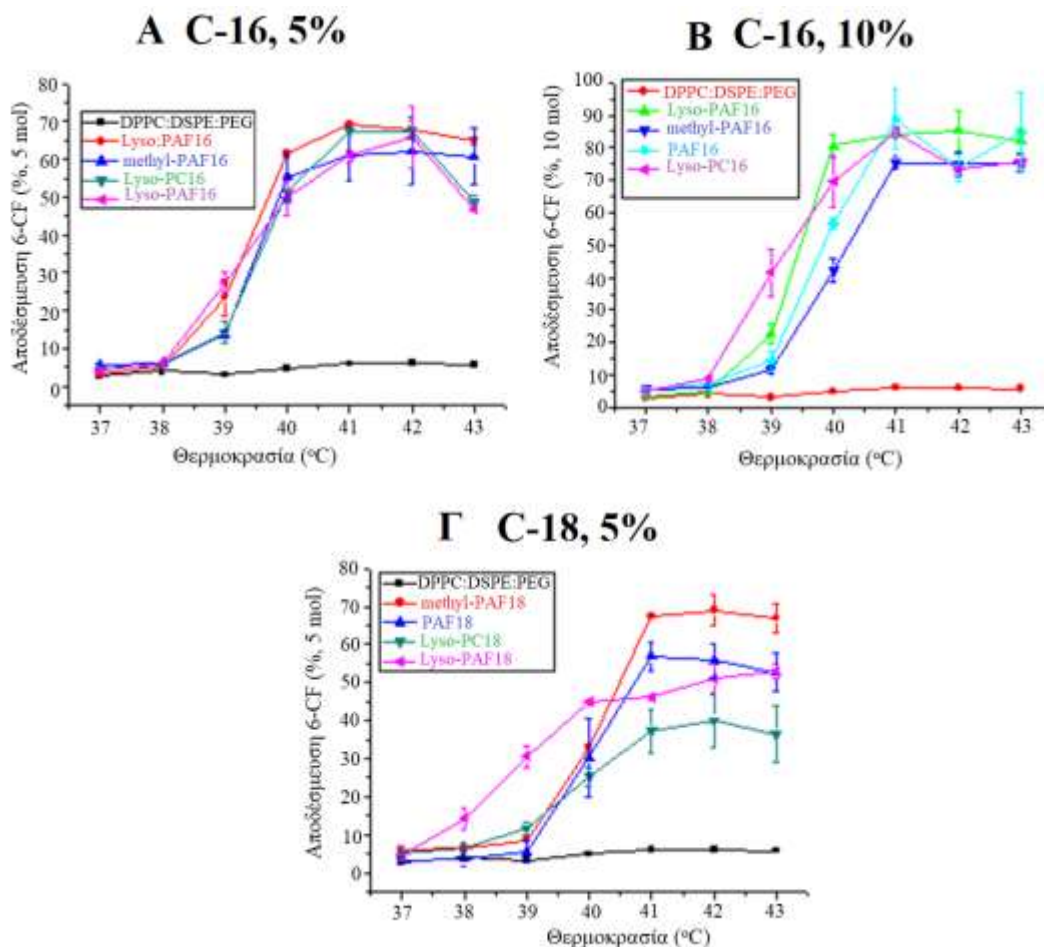
στους $41,4 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ για όλους τους λιποσωμιακούς φορείς που φέρουν ενσωματωμένα αιθερολιπίδια στη λιπιδική τους διπλοστοιβάδα.



Σχήμα 19. Συγκριτικά διαγράμματα αποδέσμευσης της 6-CF (%) από μονοστοιβαδικά λιποσώματα με ενσωματωμένα λυσολιπίδια (C18) σε ποσοστό 5 mol% στη λιπιδική διπλοστοιβάδα, συναρτήσει του χρόνου για τις θερμοκρασίες $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (A), $41 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (B) και $42 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (Γ).

5.3 Μελέτη του ρυθμού αποδέσμευσης της 6-CF συναρτήσει της θερμοκρασίας

Προκειμένου να μελετηθεί η εξαρτώμενη από την θερμοκρασία αποδέσμευση της 6-CF, προσδιορίστηκαν πειραματικά τα αντίστοιχα προφίλ όλων των λιποσωμιακών σκευασμάτων σε θερμοκρασίες $37\text{-}43 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Για να διευκολυνθεί η σύγκριση, παρουσιάζονται στο Σχήμα 20 οι τιμές απελευθέρωσης της 6-CF μετά από χρόνο επώασης 5 min σε κάθε θερμοκρασία και για κάθε λιποσωμιακό φορέα. Είναι σαφές ότι όλα τα δείγματα είναι αρκετά σταθερά σε θερμοκρασίες έως $38 \text{ }^{\circ}\text{C}$ και γίνονται προοδευτικά διαπερατά σε θερμοκρασίες κοντά στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης (T_m).



Σχήμα 20. Ρυθμός αποδέσμευσης της 6-CF (%) συναρτήσει της θερμοκρασίας (37-43 °C) από λιποσώματα σύστασης DPPC:DSPE-PEG και λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG με ενσωματωμένα μονοάλκυλο λιπίδια που φέρουν 16 άτομα άνθρακα στη ανθρακική τους αλυσίδα σε ποσοστό 5 mol% (A), σε ποσοστό 10 mol% (B) και με λυσολιπίδια που φέρουν 18 άτομα άνθρακα, σε ποσοστό 5 mol% (Γ).

Για τα λιποσώματα που περιέχουν 5 mol% μονοάλκυλο λιπίδια με 16 άτομα άνθρακα στην ανθρακική τους αλυσίδα, παρατηρείται ουσιαστική απελευθέρωση της 6-CF στους 40 °C η οποία μεγιστοποιείται στους 41-42 °C, δηλαδή στη θερμοκρασία μετάπτωσης από τη φάση γέλης στην υγρή κρυσταλλική φάση των λιποσωμάτων. Με περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας παρατηρήθηκε μια αξιοσημείωτη πτώση της απελευθερωμένης 6-CF, η οποία είναι χαρακτηριστική και σε άλλες θερμοευαίσθητες λιποσωματικές μορφές^(64,65,73,74). Τα λιποσώματα που φέρουν ενσωματωμένα τα methyl-PAF16 λυσολιπίδια εμφανίζουν μικρότερο

βαθμό απελευθέρωσης της 6-CF, ενώ τα λιποσώματα που φέρουν ενσωματωμένα τα lyso-PAF16 και PAF16 λυσολιπίδια εμφανίζουν υψηλότερο βαθμό απελευθέρωσης της υπό εξέτασης ουσίας. Τα λιποσώματα που περιέχουν 10 mol% των μονοάκυλο λυσολιπιδίων με 16 άτομα άνθρακα στην ανθρακική τους αλυσίδα εμφανίζουν υψηλότερες τιμές απελευθέρωσης της 6-CF, παράλληλα όμως η απελευθέρωση της 6-CF στους 38 και 39 °C είναι σημαντική, ειδικά για τη σύνθεση που φέρει ενσωματωμένο το lyso-PC16. Η τιμή που ελήφθη (~40%) συμφωνεί άριστα με εκείνη που αναφέρθηκε στη βιβλιογραφία για τον λιποσωμιακό φορέα DPPC:DSPE-PEG: lyso-PC (86: 4: 10) ⁽⁷³⁾. Αντίθετα, οι λιποσωμιακές συνθέσεις που περιέχουν σε αιθερολιπίδια αποδείχθηκαν πιο σταθερές σε αυτή τη θερμοκρασία (~25% απελευθέρωση για lyso-PAF16, ~15% για PAF16) οι οποίες υποδηλώνουν ότι αυτές οι συνθέσεις είναι πιο σταθερές σε χαμηλότερες θερμοκρασίες από την κοινώς χρησιμοποιούμενη σύνθεση βασισμένη σε lyso-PC.

Κατά την ενσωμάτωση λυσολιπιδίων με 18 άτομα άνθρακα στη ανθρακική τους αλυσίδα και σε ποσοστό 5 mol%, παρατηρείται μικρότερος βαθμός απελευθέρωσης της 6-CF στους 39 °C. Εξάιρεση αποτελεί ο λιποσωμιακός φορέας που φέρει ενσωματωμένο το lyso-PAF18, του οποίου το προφίλ αποδέσμευσης αυξήθηκε σε αυτή τη θερμοκρασία (~ 30%). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι οι λιποσωμιακοί φορείς εμφανίζουν μεγαλύτερη σταθερότητα σε θερμοκρασία προμετάπτωσης γεγονός το οποίο είναι αναμενόμενο δεδομένου ότι τα λιποσώματα αυτά φέρουν λιπίδια με μεγαλύτερο αριθμό ατόμων άνθρακα. Ωστόσο, πλησιάζοντας στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης των λιποσωμιακών φορέων, παρατηρείται αύξηση της διαπερατότητας της διπλοστοιβάδας των λιποσωμάτων, η οποία και μεγιστοποιείται στους 41 °C. Σε αντίθεση όμως με τους λιποσωμιακούς φορείς που φέρουν λιπίδια με 16 άτομα άνθρακα, ο βαθμός αποδέσμευσης της 6-CF στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης διαφέρει σημαντικά. Παρατηρήθηκε δηλαδή, ότι όλες οι υπό εξέταση ουσίες (lyso-PAF18 και PAF18),εμφανίζουν υψηλότερο βαθμό απελευθέρωσης της 6-CF στους 41 °C, με το λιποσωμιακό φορέα σύνθεσης DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF18 (96:4:5) να παρουσιάζει το βέλτιστο αποτέλεσμα. Ο φορέας αυτός παρουσιάζει ποσοστό απελευθέρωσης της 6-CF ίσο με 70%, που είναι σημαντικά βελτιωμένος σε σύγκριση με το συχνά χρησιμοποιούμενο lyso-PC18 λιποσωμιακό φορέα που παρουσιάζει ποσοστό απελευθέρωσης 50%.

Συνολικά, όλες οι συνθέσεις έχουν τις μέγιστες τιμές απελευθέρωσης σε θερμοκρασίες κοντά στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης (T_m) και οι ιδιότητες απελευθέρωσής τους είναι συγκρίσιμες σε ενσωμάτωση 10 mol%. Οι διαπερατότητες των μεμβρανών στο T_m διαφέρουν υπέρ των αιθερικών λιπιδίων και του lyso-PAF18 μόνο όταν βρίσκονται στην διπλοστοιβάδα σε μικρότερο ποσοστό (5 mol%) ή όταν συγκρίνονται σε θερμοκρασίες μικρότερες από 39 °C που παρουσιάζουν περισσότερο ενδιαφέρον σε περιπτώσεις ήπιας υπερθερμίας.

Όπως έγινε σαφές από τα πειράματα αποδέσμευσης της 6-CF σε μονοάλκυλο λιπίδια που φέρουν 16 άτομα άνθρακα στη ανθρακική τους αλυσίδα, η αύξηση του ποσοστού αιθερολιπιδίων από 5 mol% σε 10 mol% δε συνεισφέρει σημαντικά στο ποσοστό απελευθέρωσης, ενώ αντιθέτως αυξάνει σημαντικά το κόστος του εκάστου σκευάσματος. Βασιζόμενοι στην παραπάνω παρατήρηση, για την ανάπτυξη των λιποσωμιακών φορέων που φέρουν εγκλεισμένη την αντικαρκινική ουσία δοξορουβικίνη (βλ. Κεφάλαιο 6), επιλέχθηκε να παραμείνει σε χαμηλό ποσοστό (5 mol%) η ενσωμάτωση των αιθερολιπιδίων με ανθρακική αλυσίδα 16 ή 18 ατόμων άνθρακα, σε σύγκριση πάντα με τον φορέα αναφοράς DPPC:DSPE-PEG:lyso-PC16 (10%).

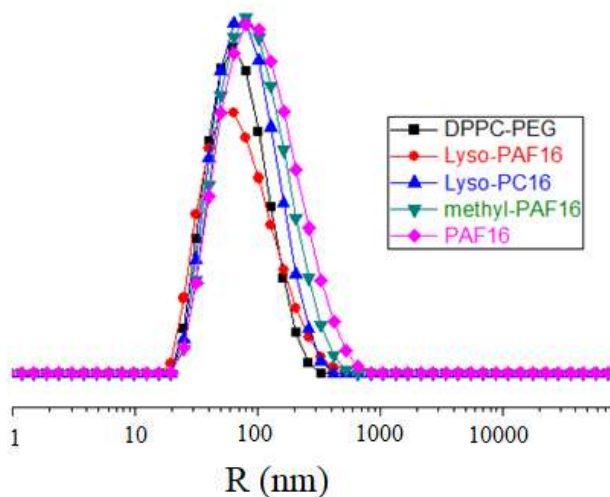
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΘΕΡΜΟΕΥΑΙΣΘΗΤΩΝ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ ΜΕ ΕΓΚΛΕΙΣΜΕΝΗ ΔΟΞΟΡΟΥΒΙΚΙΝΗ

6.1 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά μονοστοιβαδικών θερμοευαίσθητων λιποσωμάτων με εγκλεισμένη δοξορουβικίνη που φέρουν μονοάλκυλο λιπίδια με 16 άτομα άνθρακα στη ανθρακική τους αλυσίδα

6.1.1 Μέγεθος και κατανομή μεγέθους

Η μέση ακτίνα όλων των λιποσωματικών φορέων, οι οποίοι φέρουν λιπίδια με 16 άτομα άνθρακα και με εγκλεισμένη δοξορουβικίνη, όπως προσδιορίστηκαν από πειράματα δυναμικής σκέδασης φωτός βρέθηκε να είναι, εντός πειραματικού σφάλματος, 45 ± 5 nm, σε συμφωνία με το μέγεθος πόρων της πολυκαρβονικής μεμβράνης που χρησιμοποιήθηκε κατά την εξώθηση των λιποσωμάτων. Οι κατανομές των λιποσωματικών φορέων ήταν ίδιες μεταξύ όλων των λιποσωματικών σκευασμάτων που περιείχαν 5 mol% αιθερολιπίδια ή 10 mol% (lyso-PC16) και εμφάνισαν μικρή πολυδιασπορά, όπως και στην περίπτωση του εγκλεισμού της 6-CF (Σχήμα 21).



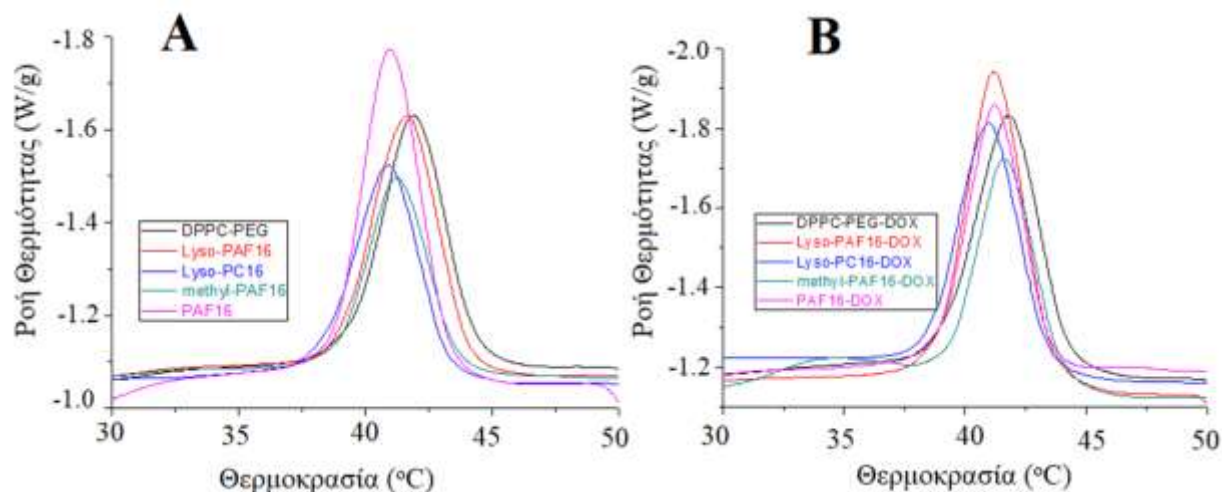
Σχήμα 21. Μέγεθος και κατανομή μεγέθους μονοστοιβαδικών θερμοευαίσθητων λιποσωμάτων που περιέχουν λιπίδια με 16 άτομα άνθρακα και με εγκλεισμένη δοξορουβικίνη.

6.1.2 Μετρήσεις ζ-δυναμικού

Οι τιμές ζ-δυναμικού όλων των λιποσωμακών φορέων βρέθηκαν σε όλες τις περιπτώσεις να είναι, εντός πειραματικού σφάλματος ίδιες, $-4,0 \pm 1,5$ mV. Αυτό είναι αναμενόμενο λόγω της παρουσίας της ίδιας πολικής ομάδας, δηλαδή της ομάδας φωσφατιδυλοχολίνης, σε όλα τα μελετώμενα λιπίδια. Η μικρή αρνητική τιμή μπορεί να αποδοθεί στην παρουσία DSPE-PEG σε ποσοστό 4 mol% που φέρει αρνητικό καθαρό φορτίο. Συνολικά, σε όλα τα λιποσωμακά σκευάσματα που δοκιμάστηκαν επιτυγχάνεται το ίδιο μέσο μέγεθος και επιφανειακό φορτίο. Αυτό δίνει το πρόσθετο πλεονέκτημα ότι τυχόν μεταβολές στις ιδιότητές τους, όπως θα παρουσιασθούν ακολούθως, προκύπτουν αποκλειστικά από τα δομικά χαρακτηριστικά των λιπιδίων τους και όχι από το τυχόν διαφορετικό φορτίο.

6.1.3 Θερμοδυναμικές παράμετροι

Η θερμική συμπεριφορά των λιποσωμάτων σύστασης DPPC:DSPE-PEG όπως επίσης και των ίδιων λιποσωμάτων που περιείχαν μονοάλκυλο λιπίδια με 16 άτομα άνθρακα (C16) στην ανθρακική τους αλυσίδα σε ποσοστό 5 mol% αιθερολιπίδια και 10 mol% (lyso-PC16) μελετήθηκε με DSC στην περιοχή θερμοκρασιών από 25 έως 60 °C, τόσο για τους κενούς λιποσωμακούς φορείς, όσο και για τους φορείς που έφεραν εγκλεισμένη δοξορουβικίνη. Στο Σχήμα 22 παρουσιάζεται ο πρώτος κύκλος θέρμανσης των λιποσωμακών φορέων, ενώ οι θερμοδυναμικές παράμετροι παρουσιάζονται στον Πίνακα 5. Με σκοπό την εκτίμηση της επίδρασης της δοξορουβικίνης στις λιποσωμακές διπλοστοιβάδες, μελετήθηκαν κενοί λιποσωμακοί φορείς, καθώς και φορείς με εγκλεισμένη δοξορουβικίνη κατά τον πρώτο κύκλο θέρμανσης, δεδομένου ότι η δοξορουβικίνη απελευθερώνεται ταχύτατα από τον λιποσωμακό φορέα στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης (T_m) και συνεπώς κατά τον δεύτερο κύκλο θέρμανσης η κατάσταση του συστήματος είναι διαφορετική αποτελούμενη πλέον από σχεδόν κενά λιποσώματα εφόσον η DOX έχει αποδεσμευθεί.

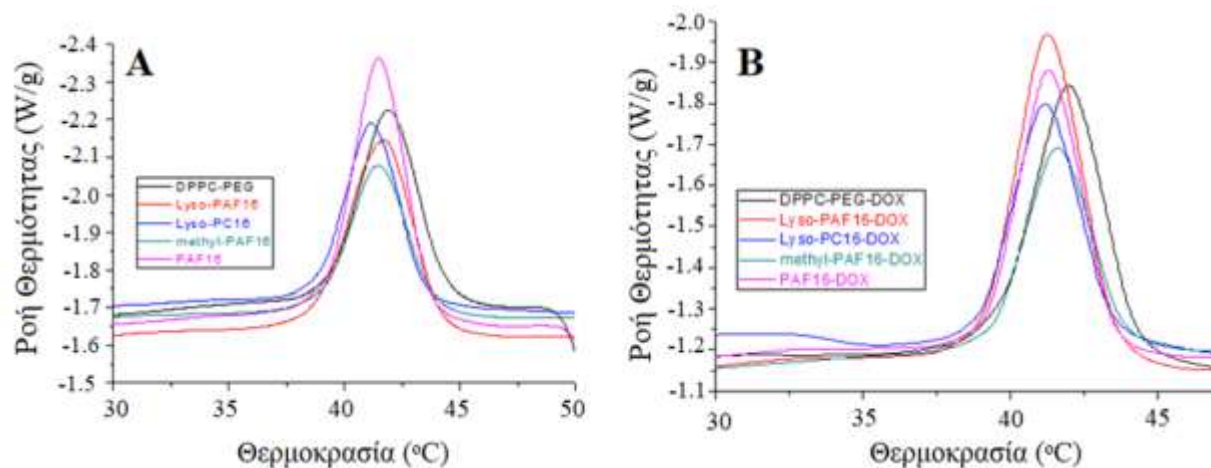


Σχήμα 22. Θερμογραφήματα λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG και θερμοευαίσθητων μονοστοιβαδικών λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG τα οποία περιέχουν επιπλέον μονοάλκυλο φωσφολιπίδια με 16 άτομα άνθρακα στην ανθρακική τους αλυσίδα σε ποσοστό 5 mol% (αιθερολιπίδια) και 10 mol% (lyso-PC) κατά τη διάρκεια του πρώτου κύκλου θέρμανσης. A: κενοί λιποσωμακοί φορείς, B: λιποσωμακοί φορείς με εγκλεισμένη δοξορουβικίνη. Ο ρυθμός σάρωσης θέρμανσης ήταν 2 K min^{-1} .

Πίνακας 5. Παράμετροι DSC (T_m , $\Delta T_{1/2}$) της κύριας μετάβασης φάσης λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG και των θερμοευαίσθητων μονοστοιβαδικών λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG τα οποία περιέχουν επιπλέον μονοάλκυλο φωσφολιπίδια με 16 άτομα άνθρακα (C16), σε ποσοστό 5 mol% (αιθερολιπίδια) και 10 mol% (lyso-PC) όπως λαμβάνονται κατά τη διάρκεια του πρώτου κύκλου θέρμανσης.

Λιποσωματικός φορέας		T_m (°C)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)
DPPC:DSPE-PEG		41,9	2,4
DPPC:DSPE-PEG:lyso-PC16	(10%)	40,9	2,4
DPPC:DSPE-PEG:PAF16	(5%)	41,0	2,4
DPPC:DSPE-PEG:lyso-PAF16	(5%)	41,2	2,4
DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF16	(5%)	41,4	2,4
DPPC:DSPE-PEG + DOX		41,8	2,5
DPPC:DSPE-PEG:lyso-PC16 + DOX	(10%)	41,0	2,4
DPPC:DSPE-PEG:PAF 16+ DOX	(5%)	41,2	2,3
DPPC:DSPE-PEG:lyso-PAF16-DOX	(5%)	41,2	2,4
DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF 16-DOX	(5%)	41,6	2,4

Για λόγους σύγκρισης, στο Σχήμα 23 παρουσιάζεται ο δεύτερος κύκλος θέρμανσης των λιποσωμακών φορέων ενώ οι αντίστοιχες θερμοδυναμικές παράμετροι παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.



Σχήμα 23. Θερμογραφήματα λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG και θερμοευαίσθητων μονοστοιβαδικών λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG τα οποία περιέχουν επιπλέον μονοάκυλο φωσφολιπίδια με 16 άτομα άνθρακα στην ανθρακική τους αλυσίδα σε ποσοστό 5 mol% (αιθερολιπίδια) και 10 mol% (Lyso-PC) κατά τη διάρκεια του δεύτερου κύκλου θέρμανσης. A: κενοί λιποσωμακοί φορείς, B: λιποσωμακοί φορείς με εγκλεισμένη δοξορουβικίνη. Ο ρυθμός σάρωσης θέρμανσης ήταν 2 K min^{-1} .

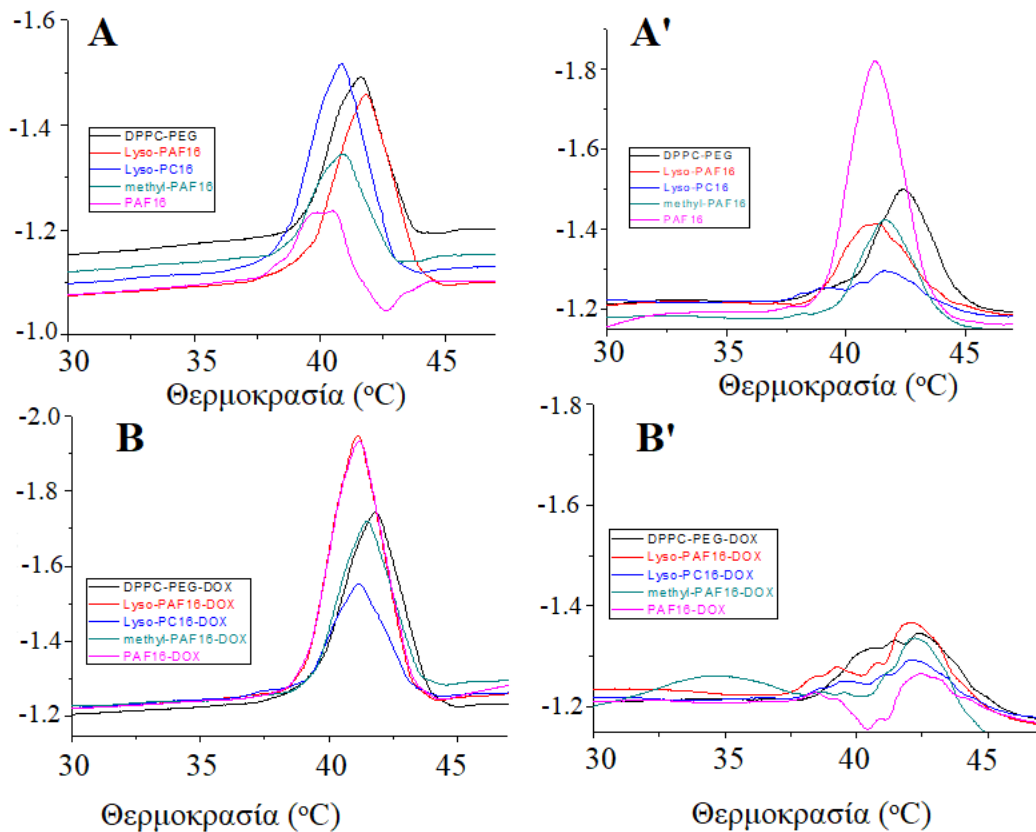
Πίνακας 6. Παράμετροι DSC (T_m , $\Delta T_{1/2}$) της κύριας μετάβασης φάσης λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG και των θερμοευαίσθητων μονοστοιβαδικών λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG τα οποία περιέχουν επιπλέον μονοάλκυλο φωσφολιπίδια με 16 άτομα άνθρακα, σε ποσοστό 5 mol% (αιθερολιπίδια) και 10 mol% (lyso-PC) όπως λαμβάνονται κατά τη διάρκεια του δεύτερου κύκλου θέρμανσης.

Λιποσωματικός φορέας		T_m (°C)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)
DPPC:DSPE-PEG		41,9	2,4
DPPC:DSPE-PEG:lyso-PC16	(10%)	41,2	2,4
DPPC:DSPE-PEG:PAF16	(5%)	41,4	2,4
DPPC:DSPE-PEG:lyso-PAF16	(5%)	41,5	2,4
DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF16	(5%)	41,5	2,4
DPPC:DSPE-PEG + DOX		42,0	2,5
DPPC:DSPE-PEG:lyso-PC16 + DOX	(10%)	41,2	2,4
DPPC:DSPE-PEG:PAF16 + DOX	(5%)	41,3	2,3
DPPC:DSPE-PEG:lyso-PAF16 + DOX	(5%)	41,3	2,4
DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF16 + DOX	(5%)	41,6	2,4

Σε όλους τους λιποσωματικούς φορείς, τόσο τους κενούς όσο και αυτούς με εγκλεισμένη δοξορουβικίνη, η εισαγωγή του λυσολιπιδίου lyso-PC16 (10%) στη λιποσωματική διπλοστοιβάδα προκάλεσε μείωση της θερμοκρασίας κύριας μετάβασης T_m , τόσο κατά τον πρώτο, όσο και κατά τον δεύτερο κύκλο θέρμανσης, σε αντίθεση με τους φορείς που στη διπλοστοιβάδα τους ενσωματώθηκε αιθερολιπίδιο, στους οποίους η θερμοκρασία κύριας μετάβασης T_m επηρεάστηκε ελάχιστα. Αυτό μπορεί να είναι αποτέλεσμα της διαφορετικής συγκέντρωσης (10 mol%) που χρησιμοποιήθηκε στους φορείς με ενσωματωμένο το lyso-PC, ενώ για τους αιθερολιπιδικούς φορείς η συγκέντρωση ήταν μικρότερη (5 mol%). Η παρατήρηση αυτή είναι σε συμφωνία και με τα δεδομένα του Bratton et al., όπου μελετήθηκε η επίδραση του PAF και ομοειδών λιπιδίων στις θερμοτροπικές παραμέτρους λιποσωματικών φορέων (¹⁰¹). Επιπλέον, το $\Delta T_{1/2}$ δεν επηρεάστηκε καθόλου από την εισαγωγή του lyso-PC16 ή των αιθερολιπιδίων στη λιποσωματική διπλοστοιβάδα, γεγονός που υποδηλώνει την

ομοιόμορφη ενσωμάτωση των λυσολιπιδίων όπως έχει ήδη αναπτυχθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο.

Χρησιμοποιώντας την τεχνική του modulated DSC (mDSC), η διαδικασία μετάβασης των λιποσωμιακών φορέων από τη φάση γέλης στην υγρή κρυσταλλική φάση μπορεί να διαχωριστεί σε αντιστρέψιμη (reversing) και μη αντιστρέψιμη (non-reversing). Για την εκτίμηση της επίδρασης του εγκλεισμού και της ενσωμάτωσης της δοξορουβικίνης στη λιποσωμιακή διπλοστοιβάδα, παρουσιάζονται στο Σχήμα 24 η αντιστρέψιμη και η μη αντιστρέψιμη καμπύλη όπως λαμβάνεται κατά την μετάβαση φάσης είτε των κενών λιποσωμιακών φορέων είτε των φορέων με εγκλεισμένη δοξορουβικίνη.



Σχήμα 24. Θερμογραφήματα modulated DSC της αντιστρέψιμης διαδικασίας μετάβασης (A, B) και της μη αντιστρέψιμης διαδικασίας μετάβασης (A', B') λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG και θερμοεναίσθητων λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG με ενσωματωμένα 5 mol% αιθερολιπίδια ή 10 mol% lyso-PC κατά τον πρώτο κύκλο θέρμανσης. A και A': κενοί λιποσωμιακοί φορείς, B και B': λιποσωμιακοί φορείς με εγκλεισμένη δοξορουβικίνη. Ο ρυθμός σάρωσης 2 K min⁻¹.

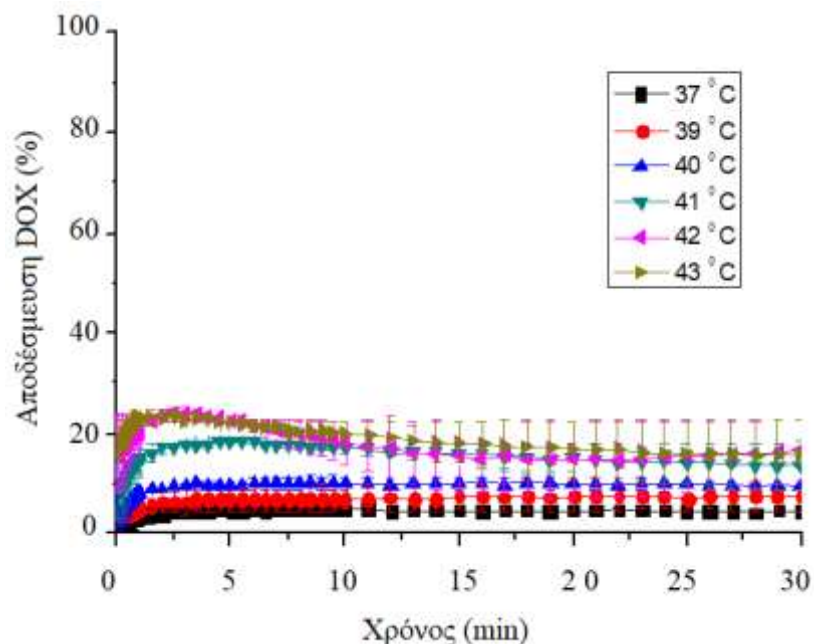
Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 24, όταν η διαδικασία κύριας μετάβασης διαχωριστεί σε αντιστρέψιμη και μη αντιστρέψιμη παρατηρούνται διαφοροποιήσεις για τους κενούς λιποσωματικούς φορείς και για τους φορείς με εγκλεισμένη δοξορουβικίνη. Πιο συγκεκριμένα, στους κενούς λιποσωματικούς φορείς, στην κύρια μετάβαση συμβάλλουν εξίσου και η αντιστρέψιμη και η μη αντιστρέψιμη διαδικασία. Αντιθέτως στους λιποσωματικούς φορείς με εγκλεισμένη δοξορουβικίνη, η μη αντιστρέψιμη διαδικασία συμβάλλει ελάχιστα στην διαδικασία κύριας μετάβασης και πρωταρχικό ρόλο διαδραματίζει η αντιστρέψιμη διαδικασία. Αυτό πιθανώς να είναι αποτέλεσμα της ενσωμάτωσης της δοξορουβικίνης στη διεπιφάνεια της πολικής κεφαλής και της ανθρακικής αλυσίδας των λιποσωματικών φορέων, λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι η δοξορουβικίνη απελευθερώνεται από τους φορείς ταχύτατα κοντά στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης.

6.2 Μελέτη του ρυθμού απελευθέρωσης της δοξορουβικίνης (DOX) από μονοστοιβαδικά θερμοευαίσθητα λιποσώματα που φέρουν μονοάκτυλο λιπίδια με 16 άτομα άνθρακα στη ανθρακική τους αλυσίδα

Η αποδέσμευση της DOX συναρτήσκει του χρόνου για τους λιποσωματικούς φορείς με ενσωματωμένα αιθερολιπίδια (5 mol%) ή lyso-PC16 (10 mol%) πραγματοποιήθηκε για 30 min και για θερμοκρασίες από 37 °C έως 43 °C, με σκοπό την εκτίμηση του ποσοστού αποδέσμευσης.

Λιποσώματα σύστασης DPPC:DSPE-PEG

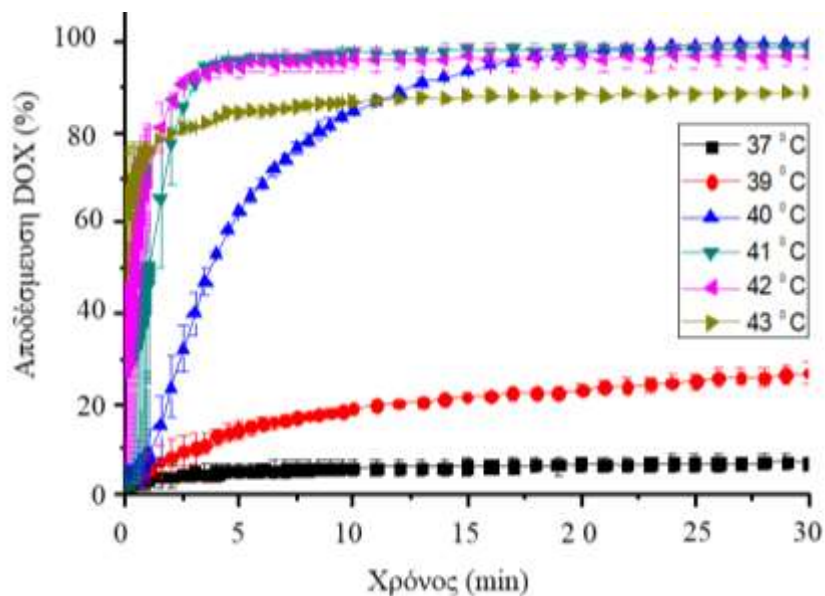
Στο Σχήμα 25 παρουσιάζεται η απελευθέρωση της DOX από λιποσωματικό φορέα σύστασης DPPC:DSPE-PEG συναρτήσκει του χρόνου. Σε καμία από τις παρατηρούμενες θερμοκρασίες, η απελευθέρωση της DOX δεν εμφάνισε σημαντικό ποσοστό αποδέσμευσης, η οποία παρέμεινε στο ~20%, στο εξεταζόμενο χρονικό διάστημα των 30 min.



Σχήμα 25. Ποσοστό απελευθέρωσης της DOX συναρτήσει του χρόνου από μονοστοιβαδικά λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG (μοριακή αναλογία 91:4) σε θερμοκρασιακό εύρος 37 °C έως 43 °C.

Λιποσώματα σύστασης DPPC:DSPE-PEG:lyso-PAF16 (μοριακή αναλογία 91:4:5)

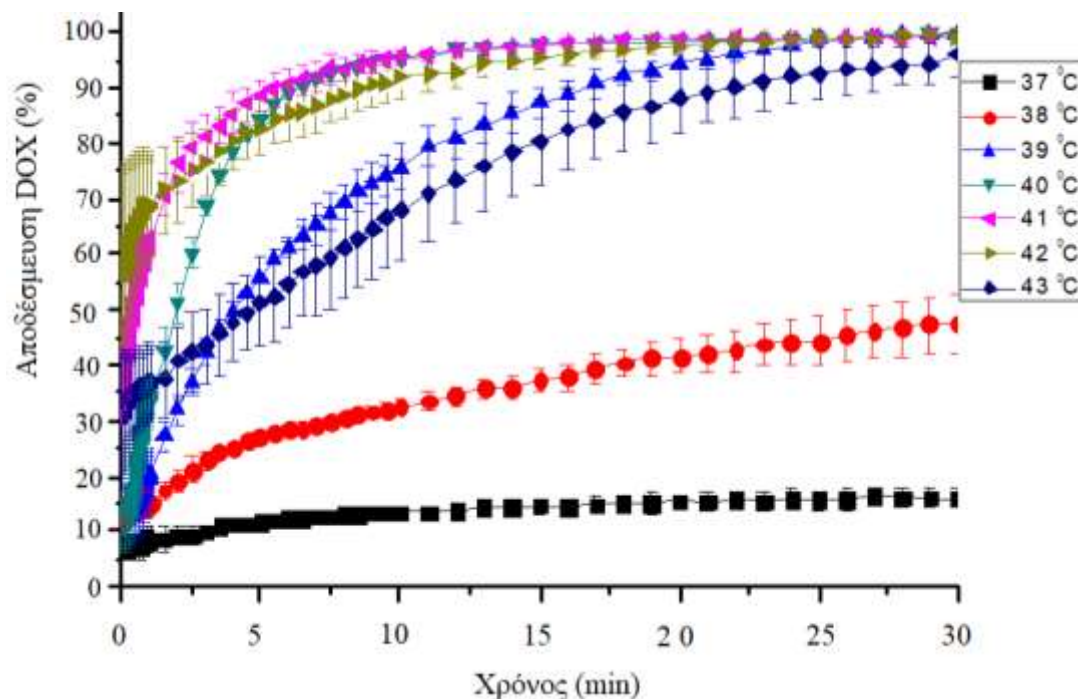
Η ενσωμάτωση του αιθερολιπιδίου lyso-PAF16 στη διπλοστοιβάδα των λιποσωμάτων αναφοράς DPPC:DSPE-PEG σε μοριακή αναλογία 91:4:5 προκάλεσε αύξηση της απελευθέρωσης της εγκλεισμένης DOX σε θερμοκρασίες κοντά στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης, ενώ σε χαμηλότερες θερμοκρασίες η απελευθέρωση της DOX παραμένει σε χαμηλό ποσοστό. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 26, στους 37 °C η απελευθέρωση της DOX φτάνει στο 8% ακόμα και μετά από 30 min, ενώ και στους 39 °C είναι ακόμα χαμηλή με μέγιστο 25%. Όταν οι θερμοκρασίες πλησιάζουν τη θερμοκρασία κύριας μετάβασης, η απελευθέρωση της DOX μεγιστοποιείται και προσεγγίζει το 95% ήδη εντός διαστήματος 3 min. Αξίζει να σημειωθεί ότι μετά τη θερμοκρασία κύριας μετάβασης, η απελευθέρωση της DOX εμφανίζεται μειωμένη, όπως είναι αναμενόμενο για τους θερμοευαίσθητους λιποσωματικούς φορείς.



Σχήμα 26. Ποσοστό απελευθέρωσης της DOX συναρτήσει του χρόνου από μονοστοιβαδικά λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:lyso-PAF16 (μοριακή αναλογία 91:4:5) σε θερμοκρασιακό εύρος 37 °C έως 43 °C.

Λιποσώματα σύστασης DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF16 (μοριακή αναλογία 91:4:5)

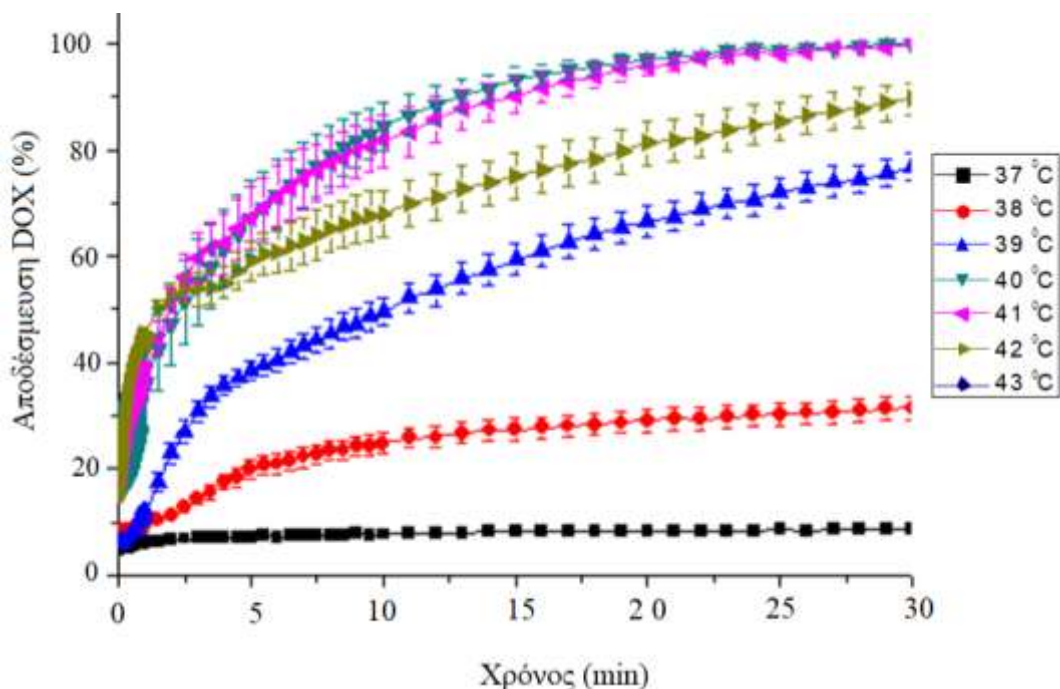
Η ενσωμάτωση του αιθερολιπιδίου methyl-PAF16 στη διπλοστοιβάδα των λιποσωμάτων αναφοράς DPPC:DSPE-PEG σε μοριακή αναλογία 91:4:5 προκάλεσε αύξηση της απελευθέρωσης της εγκλεισμένης DOX σε θερμοκρασίες κοντά στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης, ενώ σε χαμηλότερες θερμοκρασίες η απελευθέρωση της DOX παραμένει σε χαμηλό ποσοστό. Όπως και με τους λιποσωμιακούς φορείς που έφεραν ενσωματωμένο το lyso-PAF16 στη λιπιδική τους διπλοστοιβάδα, έτσι και σε αυτούς τους λιποσωμιακούς φορείς, η απελευθέρωση της DOX στους 37 °C παραμένει χαμηλή, σε ποσοστό 10% μετά από 30 min (Σχήμα 27). Αντιθέτως όμως, ήδη από τους 39 °C, η απελευθέρωση αυξάνεται πολύ γρήγορα (εντός 5 min) και φτάνει το μέγιστο (98%) στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης του λιποσώματος μετά από 30 min. Αυτό υποδηλώνει πως ο συγκεκριμένος λιποσωμιακός φορέας είναι πιο ρευστός σε σχέση με τον λιποσωμιακό φορέα με ενσωματωμένο lyso-PAF16 και ως εκ τούτου απελευθερώνει σε χαμηλότερες θερμοκρασίες την εγκλεισμένη DOX. Και σε αυτόν τον λιποσωμιακό φορέα, όταν η θερμοκρασία ξεπερνά τη θερμοκρασία της κύριας μετάβασης, το ποσοστό της DOX που απελευθερώνεται παρουσιάζει μείωση.



Σχήμα 27. Ποσοστό απελευθέρωσης της DOX συναρτήσει του χρόνου από μονοστοιβαδικά λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF16 (μοριακή αναλογία 91:4:5) σε θερμοκρασιακό εύρος 37 °C έως 43 °C.

Λιποσώματα σύστασης DPPC:DSPE-PEG:lyso-PC16 (μοριακή αναλογία 91:4:10)

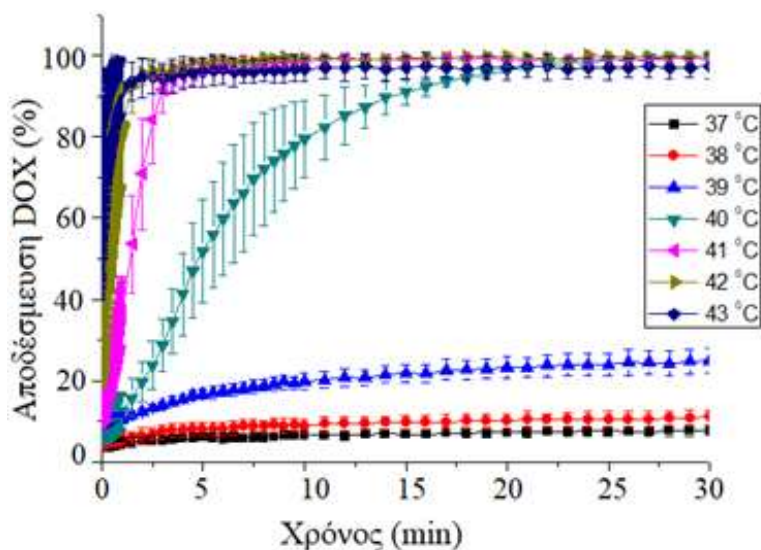
Η ενσωμάτωση του λυσολιπιδίου lyso-PC16 στα λιποσώματα αναφοράς με σύσταση DPPC:DSPE-PEG σε μοριακή αναλογία 91:4:10, προκάλεσε αύξηση της απελευθέρωσης της DOX, η οποία όπως και στους προηγούμενους λιποσωμιακούς φορείς παραμένει χαμηλή στη θερμοκρασία του σώματος (37 °C) και αυξάνεται σταδιακά για να μεγιστοποιηθεί στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης (Σχήμα 28). Και σε αυτόν τον λιποσωμιακό φορέα, η απελευθέρωση της DOX εμφανίζει μείωση όταν η θερμοκρασία αυξηθεί περισσότερο από τη θερμοκρασία κύριας μετάβασης.



Σχήμα 28. Ποσοστό απελευθέρωσης της DOX συναρτήσει του χρόνου από μονοστοιβαδικά λιπосώματα DPPC:DSPE-PEG:lyso-PC16 (μοριακή αναλογία 91:4:10) σε θερμοκρασιακό εύρος 37 °C έως 43 °C.

Λιπосώματα σύστασης DPPC:DSPE-PEG:PAF16 σε μοριακή αναλογία 91:4:5

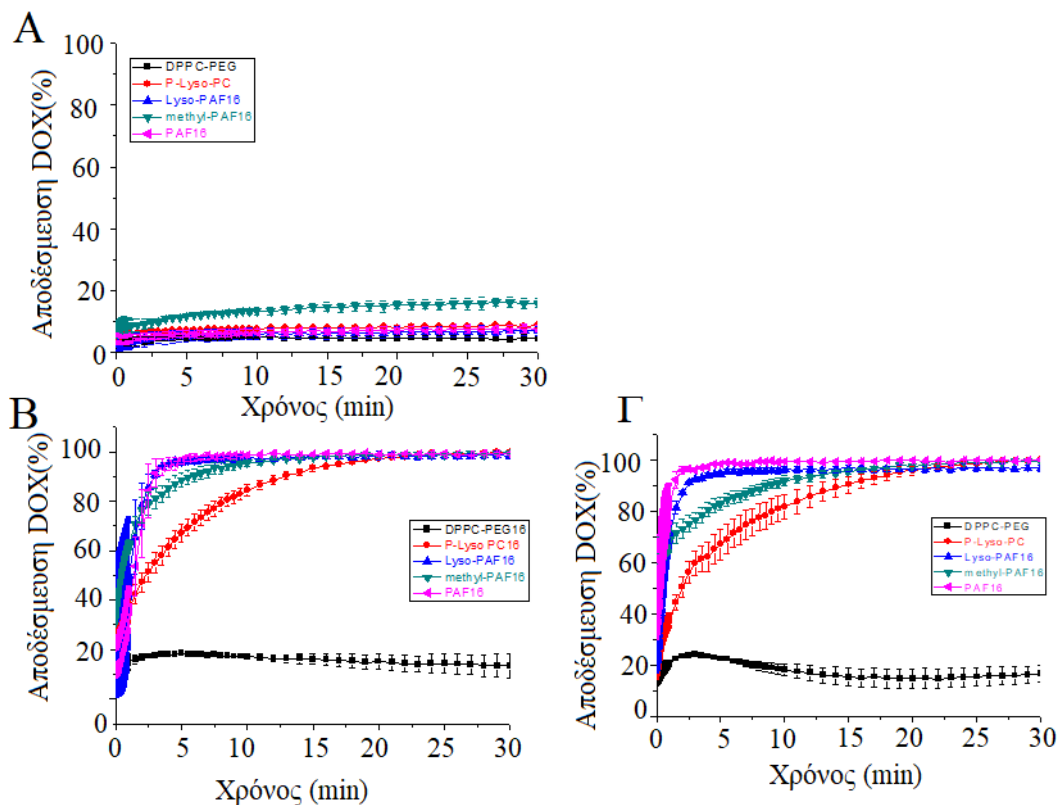
Η ενσωμάτωση του αιθερολιπιδίου PAF16 στη διπλοστοιβάδα των λιπосωμάτων αναφοράς DPPC:DSPE-PEG σε μοριακή αναλογία 91:4:5, προκάλεσε αύξηση της απελευθέρωσης της εγκλεισμένης DOX σε θερμοκρασίες κοντά στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης, ενώ σε χαμηλότερες θερμοκρασίες η απελευθέρωση της DOX παραμένει σε χαμηλό ποσοστό. Όπως και με τους λιπосωμιακούς φορείς που έφεραν ενσωματωμένο το lyso-PAF16 στη λιπιδική τους διπλοστοιβάδα, έτσι και σε αυτούς τους λιπосωμιακούς φορείς, η απελευθέρωση της DOX στους 37 °C παραμένει χαμηλή, σε ποσοστό 10% μετά από 30 min (Σχήμα 29). Καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται, η απελευθέρωση αυξάνεται πολύ γρήγορα (εντός 2 min) και φτάνει το μέγιστο (98%) στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης του λιπосώματος. Σε αντίθεση με τους υπόλοιπους λιπосωμιακούς φορείς, η απελευθέρωση της DOX παρουσιάζει μικρή μείωση με αύξηση της θερμοκρασίας περαιτέρω της θερμοκρασίας κύριας μετάβασης και παραμένει σε ποσοστό 98% για 30 min.



Σχήμα 29. Ποσοστό απελευθέρωσης της DOX συναρτήσει του χρόνου από μονοστοιβαδικά λιποσώματα DPPC:DSPE-PEG:PAF16 (μοριακή αναλογία 91:4:5) σε θερμοκρασιακό εύρος 37 °C έως 43 °C.

6.3 Συγκριτική μελέτη αποδέσμευσης της DOX μεταξύ λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG που φέρουν διαφορετικά μονοάλκυλο λιπίδια με 16 άτομα άνθρακα στη ανθρακική τους αλυσίδα

Η εξαρτώμενη από το χρόνο απελευθέρωση της DOX από λιποσώματα που περιέχουν 5 mol% αιθερολιπίδια ή 10 mol% lyso-PC16 πραγματοποιήθηκε με απευθείας μετρήσεις για 30 min. Αυτό το χρονικό πλαίσιο δικαιολογείται δεδομένου ότι, στην πράξη, οι θεραπείες υπερθερμίας ασκούνται για περίπου 30 min μετά τη χορήγηση φαρμάκων ή λιποσωμάτων με ενσωματωμένες φαρμακευτικές ουσίες (^{97,102}). Τα δείγματα είναι σταθερά στους 37 °C με μέγιστη αποδέσμευση της DOX περίπου 8% στα πρώτα 30 min (Σχήμα 30) με εξαίρεση τους λιποσωματικούς φορείς που περιέχουν 5 mol% methyl-PAF16 που εμφανίζουν τη μεγαλύτερη απελευθέρωση της DOX (~15%), σε συμφωνία με τα αποτελέσματα απελευθέρωσης της 6-CF που παρουσιάστηκαν στο Σχήμα 17.



Σχήμα 30. Συγκριτικά διαγράμματα αποδέσμευσης της DOX από μονοστοιβαδικά λιποσώματα με ενσωματωμένα λυσολιπίδια (C16) σε ποσοστό 5 mol% (αιθερολιπίδια) ή 10 mol% lyso-PC στη λιπιδική διπλοστοιβάδα, συναρτήσει του χρόνου για τις θερμοκρασίες 37 °C (A), 41 °C (B) και 42 °C (Γ).

Κοντά στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης, δηλαδή στους 41 °C, όλοι οι λιποσωμακοί φορείς εμφανίζουν ταχεία απελευθέρωση της DOX στα πρώτα 5 min. Εξαιρέση αποτελεί ο λιποσωμακός φορέας που φέρει ενσωματωμένο στη διπλοστοιβάδα του το lyso-PC16, το οποίο και αποτελεί το μοναδικό παράγωγο εστέρα, σε αντίθεση με τους υπόλοιπους φορείς με ενσωματωμένα αιθερολιπίδια. Ο λιποσωμακός φορέας με lyso-PC16 εμφανίζει το μέγιστο της αποδέσμευσης στα 20 min, παρόλο που ενσωματώθηκε σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στη λιποσωμακή διπλοστοιβάδα (10 mol% έναντι 5 mol%). Όπως είναι αναμενόμενο, οι λιποσωμακοί φορείς αναφοράς με σύσταση DPPC:DSPE-PEG (96:4) εμφανίζουν μικρό ποσοστό απελευθέρωσης της DOX.

Όπως αναφέρθηκε στη μελέτη απελευθέρωσης της 6-CF σε προηγούμενη ενότητα, οι λιποσωμιακοί φορείς που ενσωματώνουν μόνο 5 mol% αιθερολιπιδίου στη διπλοστοιβάδα τους εμφανίζουν και διαφορετικό προφίλ απελευθέρωσης της 6-CF, που αποδίδεται στην δομή τους. Έτσι και στη μελέτη απελευθέρωσης της DOX, οι λιποσωμιακοί φορείς που ενσωματώνουν τα αιθερολιπίδια PAF16 και lyso-PAF16 στη λιπιδική τους διπλοστοιβάδα εμφανίζουν υψηλότερο ποσοστό απελευθέρωσης συγκριτικά με τους φορείς που ενσωματώνουν lyso-PC16, προβάλλοντας τον ρόλο του αιθερικού δεσμού στη θέση-1 της γλυκερόλης. Ωστόσο, σε αντίθεση με τα δεδομένα από την απελευθέρωση της 6-CF, οι λιποσωμιακοί φορείς που φέρουν lyso-PC16 εμφανίζουν πιο αργή απελευθέρωση της DOX, ενώ οι φορείς που φέρουν το αιθερολιπίδιο methyl-PAF16 εμφανίζουν διαφορετική συμπεριφορά όταν εγκλείεται η DOX, σε σχέση με τη 6-CF.

Με στόχο τον έλεγχο της σταθερότητας των λιποσωμιακών φορέων που φέρουν αιθερολιπίδια ή lyso-PC16, όλα τα λιποσωμιακά εναιωρήματα μελετήθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 24 h και μετά από επώαση στους 37 °C για το ίδιο χρονικό διάστημα (Πίνακας 7).

Πίνακας 7. Απελευθέρωση (%) της DOX από μονοστοιβαδικά λιποσώματα που φέρουν μονοάλκυλο λιπίδια με 16 άτομα άνθρακα στη ανθρακική τους αλυσίδα, μετά από παραμονή για διάστημα 24 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (θ. π.) ή στους 37 °C.

Λιποσωμιακός φορέας	Απελευθέρωση (%) της DOX σε θ. π.	Απελευθέρωση (%) της DOX στους 37 °C
DPPC:DSPE-PEG	0,5	3,3
DPPC:DSPE-PEG:lyso-PC16 (10%)	0,0	11,0
DPPC:DSPE-PEG:PAF16 (5%)	6,9	16,2
DPPC:DSPE-PEG:lyso-PAF16 (5%)	0,8	21,5
DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF16 (5%)	2,2	13,6

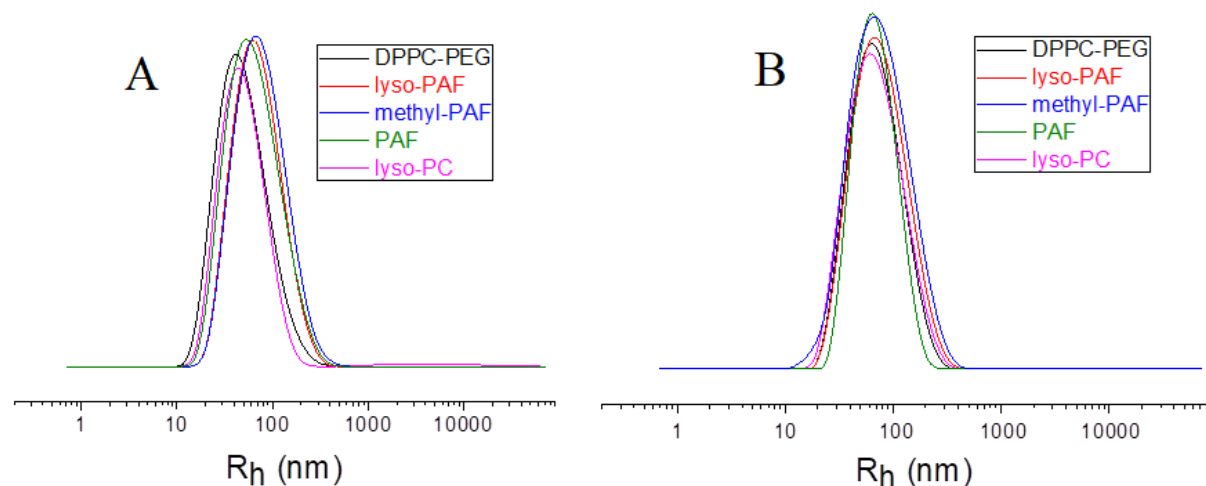
Όλοι οι λιποσωμιακοί φορείς εμφανίζονται σταθεροί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με το μέγιστο ποσοστό απελευθέρωσης της DOX να φτάνει το 7% για το PAF16. Στους 37 °C, τα λιποσώματα αναφοράς με σύσταση DPPC:DSPE-PEG εμφανίζουν ελάχιστη απελευθέρωση της DOX, ενώ και οι υπόλοιποι λιποσωμιακοί φορείς εμφανίζουν χαμηλό ποσοστό απελευθέρωσης (10%-20%), σε αντίθεση με τα ποσοστά απελευθέρωσης της 6-CF μετά από επώαση στους 37 °C για 24 h (Πίνακας 3). Αυτό οφείλεται στην διαφορετική μέθοδο παρασκευής των λιποσωμιακών φορέων, αφού ο εγκλεισμός της DOX πραγματοποιείται με τη μέθοδο διαβάθμισης pH, ενώ στα λιποσωμιακά εναιωρήματα της 6-CF το εσωτερικό και το εξωτερικό διάλυμα είναι το ίδιο (ρυθμιστικό PBS pH=7,4). Στο κιτρικό ρυθμιστικό διάλυμα (pH=4), η DOX βρίσκεται στην πρωτονιωμένη της μορφή (DOX⁺) και δεσμευμένη με τα αντίστοιχα ιόντα κιτρικού οξέως, με αποτέλεσμα να εγκλείεται στο εσωτερικό του λιποσώματος και να μην μπορεί να διαχυθεί από τη λιποσωμιακή μεμβράνη. Ως εκ τούτου η DOX αποδεσμεύεται από το λιπόσωμα με πιο αργό ρυθμό σε σύγκριση με την 6-CF.

6.4 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά μονοστοιβαδικών θερμοευαίσθητων λιποσωμάτων με εγκλεισμένη δοξορουβικίνη που φέρουν μονοάλκυλο λιπίδια με 18 άτομα άνθρακα στη ανθρακική τους αλυσίδα

6.4.1 Μέγεθος και κατανομή μεγέθους

Η εισαγωγή των λυσολιπιδίων με 18 άτομα άνθρακα στη ανθρακική τους αλυσίδα σε ποσοστό 5 mol% στους λιποσωμιακούς φορείς προκάλεσε μια μικρή, αλλά διακριτή επίδραση στο μέγεθος των θερμοευαίσθητων φορέων, σε σχέση με τους μη θερμοευαίσθητους φορείς DPPC:DSPE-PEG, αλλά και με τον ήδη χρησιμοποιούμενο θερμοευαίσθητο φορέα σύστασης DPPC:DSPE-PEG:lyso-PC18. Η υδροδυναμική ακτίνα μετρήθηκε 55 ± 5 nm, σαφώς μεγαλύτερη από την υδροδυναμική ακτίνα των λιποσωμάτων αναφοράς (45 ± 5 nm) (Σχήμα 31). Η διαφοροποίηση αυτή είναι συνέπεια της αυξημένης πλαστικότητας της διπλοστοιβάδας παρουσία του αιθερολιπιδίου, σε σχέση με τα απλά λιποσώματα και τα lyso-PC18 λιποσώματα. Οι λιποσωμιακοί φορείς με εγκλεισμένη DOX εμφανίζουν ίδια συμπεριφορά όσον αφορά στην μέση υδροδυναμική ακτίνα, αν και όχι τόσο έντονη, σε σχέση με τους κενούς λιποσωμιακούς

φορείς. Το μέγεθος των λιποσωμακών φορέων κυμαίνεται στα 60 ± 5 nm, ενώ οι κατανομές μεγέθους είναι συγκρίσιμες. Η αύξηση του μεγέθους των λιποσωμακών φορέων είναι σαφώς αποτέλεσμα του εγκλεισμού της DOX στα λιποσώματα και μπορεί να είναι είτε αποτέλεσμα του σχηματισμού κρυστάλλων της DOX με το ρυθμιστικό διάλυμα (κιτρικό) στο εσωτερικό του λιποσώματος (¹⁰³), είτε λόγω εντοπισμού μορίων DOX κοντά ή ακόμα και μέσα στη διπλοστοιβάδα (¹⁰⁴).



Σχήμα 31. Μέγεθος και κατανομή μεγέθους κενών λιποσωμακών φορέων (A) και λιποσωμακών φορέων με εγκλεισμένη DOX (B).

6.4.2 Μετρήσεις επιφανειακού φορτίου

Οι τιμές ζ-δυναμικού όλων των λιποσωμακών φορέων βρέθηκαν σε όλες τις περιπτώσεις να είναι, εντός πειραματικού σφάλματος ίδιες, $-3,5\pm 1,5$ mV. Αυτό είναι αναμενόμενο λόγω της παρουσίας της ίδιας πολικής ομάδας, δηλαδή της ομάδας φωσφατιδυλοχολίνης, σε όλα τα μελετώμενα λιπίδια. Η μικρή αρνητική τιμή μπορεί να αποδοθεί στην παρουσία DSPE-PEG σε ποσοστό 4% mol που φέρει αρνητικό καθαρό φορτίο. Η σχετικά χαμηλή τιμή αντανάκλα τη μειωμένη ηλεκτροφορητική κινητικότητα των νανοσωματιδίων λόγω της παρουσίας μακρών αλειφατικών αλυσίδων PEG που αυξάνουν την υδροδυναμική αντίσταση και μετακινούν τη θέση του ολισθαίνοντος επιπέδου πιο μακριά από την επιφάνεια των σωματιδίων (^{105,106,107}).

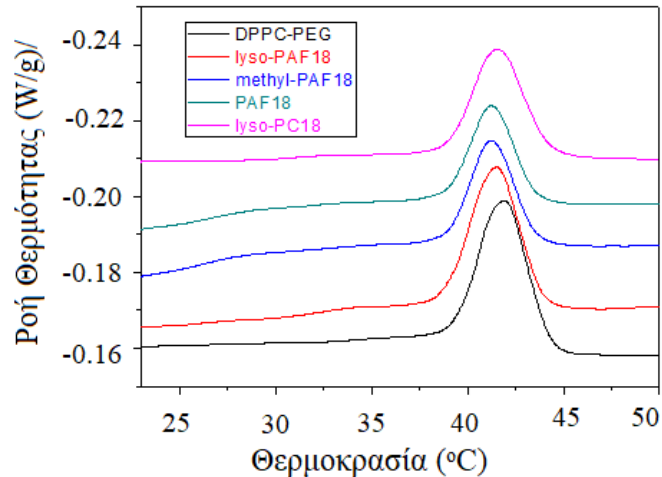
6.4.3 Θερμοδυναμικές παράμετροι

Η θερμική συμπεριφορά των λιποσωμάτων σύστασης DPPC:DSPE-PEG όπως επίσης και των ίδιων λιποσωμάτων που περιείχαν μονοάλκυλο λιπίδια με 18 άτομα άνθρακα στην ανθρακική τους αλυσίδα σε ποσοστό 5 mol% μελετήθηκε με modulated DSC στην περιοχή θερμοκρασιών από 25 έως 55 °C. Η μέτρηση έγινε τόσο στους κενούς λιποσωματικούς φορείς, όσο και στους φορείς που έφεραν εγκλεισμένη δοξορουβικίνη. Οι θερμοδυναμικές παράμετροι συνοψίζονται στον Πίνακα 8, ενώ τα θερμογραφήματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 32.

Πίνακας 8. Θερμοδυναμικές παράμετροι (T_m και $\Delta T_{1/2}$) της κύριας μετάβασης φάσης λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG και των θερμοευαίσθητων μονοστοιβαδικών λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG τα οποία περιέχουν επιπλέον μονοάλκυλο λιπίδιο (5 mol%) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS και σε τροφικό μέσο (DMEM + 10% FBS) κατά τη διάρκεια του 1^{ου} και του 2^{ου} κύκλου θέρμανσης.

Λιποσωματικός φορέας	T_m (°C)		$\Delta T_{1/2}$ (°C)	
	1 ^{ος} /2 ^{ος} κύκλος θέρμανσης		1 ^{ος} /2 ^{ος} κύκλος θέρμανσης	
DPPC:DSPE-PEG	41,9 / 41,9		2,4 / 2,4	
Σε τροφικό μέσο	41,6 / 41,5		2,5 / 2,5	
DPPC:DSPE-PEG:lyso-PC18	(5 %)	41,5 / 41,7	2,5 / 2,6	
DPPC:DSPE-PEG:PAF18	(5 %)	41,2 / 41,4	2,5 / 2,9	
DPPC:DSPE-PEG:lyso-PAF18	(5 %)	41,4 / 41,6	2,4 / 2,3	
DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF18	(5 %)	41,2 / 41,3	2,4/2,9	
Σε τροφικό μέσο	41,2 / 41,2		2,6 / 2,7	

Η θερμοκρασία κύριας μετάβασης των λιποσωμάτων αναφοράς σύστασης DPPC:DSPE-PEG μετρήθηκε 41,9±0,2 °C, όπως ήταν αναμενόμενο. Για όλους τους λιποσωματικούς φορείς, παρατηρήθηκε μόνο μία κορυφή κατά τη διαδικασία κύριας μετάβασης, γεγονός που δηλώνει ότι η ενσωμάτωση των λιπιδίων στη λιποσωματική μεμβράνη ήταν ομοιογενείς και δεν παρατηρείται καμία ανομοιογένεια στη λιποσωματική διπλοστοιβάδα. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 8, η ενσωμάτωση του lyso-PC18 στη λιποσωματική διπλοστοιβάδα δεν μείωσε τη θερμοκρασία κύριας μετάβασης, σε σύγκριση με τα λιποσώματα αναφοράς σύστασης DPPC:DSPE-PEG.



Σχήμα 32. Θερμογραφήματα μονοστοιβαδικών θερμοευαίσθητων λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG και των θερμοευαίσθητων μονοστοιβαδικών λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG τα οποία περιέχουν επιπλέον μονοάλκυλο λιπίδιο (5 mol%) σε διάλυμα ρυθμιστικού PBS, κατά τη διάρκεια του 1^{ου} κύκλου θέρμανσης. Ο ρυθμός θέρμανσης ήταν 2K min⁻¹.

Επιπροσθέτως, το ημίσιο εύρος της κορυφής ($\Delta T_{1/2}$) εμφανίζεται, εντός πειραματικού σφάλματος, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι οι τιμές της συνεργασιμότητας κατά τη μετάβαση ($\propto 1/\Delta T_{1/2}$) παραμένουν ανεπηρέαστες για τα δύο λιποσωμιακά συστήματα. Όταν όμως στη λιποσωμιακή διπλοστοιβάδα ενσωματώθηκαν αιθερολιπίδια, παρατηρήθηκε μια μικρή, αλλά αξιοπρόσεκτη μείωση της θερμοκρασίας κύριας μετάβασης T_m , όχι όμως και της συνεργασιμότητας της μετάβασης, όπως αυτή εκφράζεται από το ημίσιο εύρος της κορυφής, $\Delta T_{1/2}$. Και οι δύο παράμετροι υποδηλώνουν μια μικρή διαταραχή της διπλοστοιβάδας, χωρίς ωστόσο να εμφανίζεται ουσιαστική διαταραχή σε τοπικό επίπεδο. Λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι οι θερμοδυναμικές παράμετροι των λιποσωμιακών φορέων δεν παρουσίασαν σημαντικές αλλαγές κατά την ενσωμάτωση των αιθερολιπιδίων, εξάγεται το συμπέρασμα ότι τα λιπίδια αυτά ενσωματώνονται πλήρως και ομοιογενώς στη διπλοστοιβάδα, δίνοντας θερμοδυναμικά σταθερούς φορείς μαζί με το DPPC.

Κατά τη μελέτη των λιποσωμιακών φορέων με εγκλεισμένη DOX, κατά τον 1^ο κύκλο θέρμανσης παρατηρείται αύξηση της θερμοκρασίας κύριας μετάβασης (0,4-0,5 °C), σε σχέση

με τους αντίστοιχους κενούς λιποσωμιακούς φορείς (Πίνακας 9), ενώ το ημίσιο εύρος της κορυφής παραμένει ανεπηρέαστο.

Πίνακας 9. Θερμοδυναμικές παράμετροι (T_m και $\Delta T_{1/2}$) της κύριας μετάβασης φάσης λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG και των θερμοευαίσθητων μονοστοιβαδικών λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG τα οποία περιέχουν επιπλέον μονοάλκυλο λιπίδιο (5 mol%) στα οποία έχει εγκλεισθεί DOX, σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS και σε τροφικό μέσο (DMEM + 10% FBS) κατά τη διάρκεια του 1^{ου} και του 2^{ου} κύκλου θέρμανσης.

Φορέας Λιποσωμιακής DOX (% μοριακή αναλογία μονοάλκυλο λιπιδίου)	T_m (°C) 1 ^{ος} /2 ^{ος} κύκλος θέρμανσης	$\Delta T_{1/2}$ (°C) 1 ^{ος} /2 ^{ος} κύκλος θέρμανσης
DPPC:DSPE-PEG	41,8 / 41,9	2,5 / 2,5
Σε τροφικό μέσο	41,8 / 41,8	2,7 / 2,5
DPPC:DSPE-PEG:lyso-PC18 (5 %)	41,7 / 41,4	2,3 / 2,4
DPPC:DSPE-PEG:PAF18 (5 %)	41,7 / 41,5	2,4 / 2,4
DPPC:DSPE-PEG:lyso-PAF18 (5 %)	41,7 / 41,4	2,4 / 2,4
DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF18 (5 %)	41,6 / 41,4	2,4 / 2,4
Σε τροφικό μέσο	41,3 / 41,1	2,6 / 2,6

Παρατηρούμε ότι μετά τον πρώτο κύκλο θέρμανσης/ψύξης, η θερμοκρασία κύριας μετάβασης επανέρχεται σε χαμηλότερες τιμές και ομοιάζει με αυτήν των κενών λιποσωμιακών φορέων. Η DOX, κατά τον πρώτο κύκλο θέρμανσης απελευθερώνεται ταχύτατα από τον λιποσωμιακό φορέα στο εξωτερικό διάλυμα, αφήνοντας τους φορείς με τις ίδιες θερμοδυναμικές παραμέτρους που έφεραν και οι αντίστοιχοι κενοί λιποσωμιακοί φορείς. Σε αντίθεση με τους θερμοευαίσθητους λιποσωμιακούς φορείς, και οι δύο μελετώμενες παράμετροι (T_m και $\Delta T_{1/2}$) δεν εμφανίζουν καμία αλλαγή στα λιποσώματα αναφοράς με σύσταση DPPC:DSPE-PEG και εγκλεισμένη DOX, ούτε κατά τον 1^ο, ούτε και κατά τον 2^ο κύκλο θέρμανσης, παραμένοντας ίδιες με τις παραμέτρους στα κενά λιποσώματα αναφοράς. Ως εκ τούτου, οι παρατηρούμενες αλλαγές στα λιποσώματα με εγκλεισμένη DOX, είναι

συνέπεια της ύπαρξης της δοξορουβικίνης. Δεδομένου ότι η δοξορουβικίνη είναι μια ασθενής βάση, είναι σαφές ότι ένα μέρος αυτής θα υπάρχει στη μη πρωτονιωμένη της μορφή και μπορούμε να υποθέσουμε ότι προκαλεί ενδοεισχώριση στη διπλοστοιβάδα, μόνο όταν σε αυτή έχουν ενσωματωθεί μονοάλκυλο λιπίδια. Αυτό εξηγεί τις διαφορές που παρατηρούνται στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης των φορέων με εγκλεισμένη DOX, ενώ οι μονάδες συνεργασιμότητας παραμένουν ανεπηρέαστες για τους κενούς λιποσωμιακούς φορείς, όσο και για τους μη θερμοευαίσθητους φορείς.

Επίσης, μετρήσεις διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης πραγματοποιήθηκαν και παρουσία τροφικού μέσου (DMEM+10% FBS), για τους φορείς που εν συνεχεία μελετήθηκαν *in vitro*. Όπως φαίνεται στους Πίνακες 8 και 9, η παρουσία του τροφικού μέσου στο εξωτερικό των κενών λιποσωμιακών φορέων, επιφέρει μια επίδραση της τάξης του 0,3 °C για τη θερμοκρασία κύριας μετάβασης T_m και της τάξης του 0,2 °C για το ημίσιο εύρος της κορυφής $\Delta T_{1/2}$. Αν και επίδραση αυτή είναι πολύ μικρή, και εντός πειραματικού σφάλματος, πάντα παρατηρείται πτωτική τάση για την T_m , ενώ αυξητική για το $\Delta T_{1/2}$, ισχυροποιώντας την άποψη ότι η υπάρχουσα αλληλεπίδραση συστατικών του τροφικού μέσου με τα λιποσώματα επηρεάζει και τη διαδικασία κύριας μετάβασης των λιποσωμιακών φορέων.

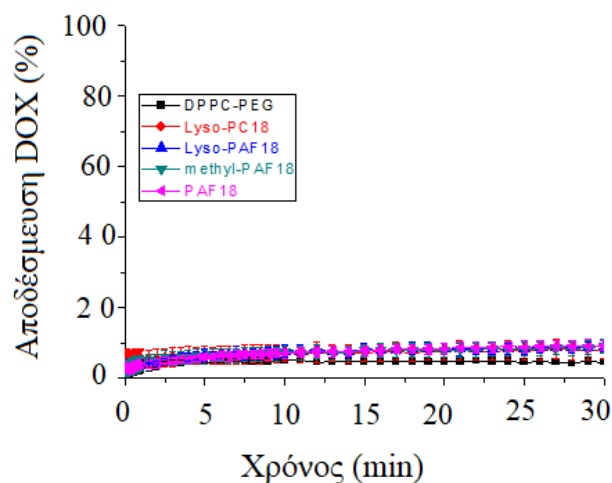
6.5 Μελέτη του ρυθμού απελευθέρωσης της δοξορουβικίνης (DOX) από μονοστοιβαδικά θερμοευαίσθητα λιποσώματα που φέρουν μονοάλκυλο λιπίδια με 18 άτομα άνθρακα στη ανθρακική τους αλυσίδα

Η απελευθέρωση της DOX από τους λιποσωμιακούς φορείς πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, αλλά και σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες. Σε θερμοκρασία δωματίου, η απελευθέρωση της DOX μετά από 24 h, παραμένει λιγότερη από 1% για όλους τους λιποσωμιακούς φορείς (Πίνακας 10).

Πίνακας 10. Απελευθέρωση (%) της DOX σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μετά από 24 h.

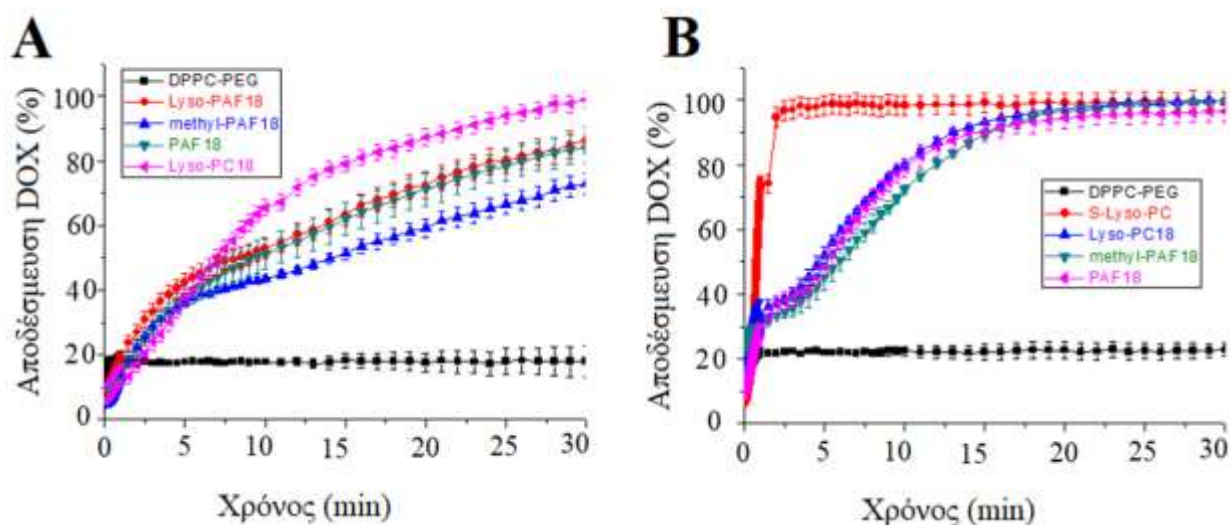
Λιποσωματικός φορέας	Αποδέσμευση DOX (%)
DPPC:DSPE-PEG:lyso-PC18 (5%)	0,2
DPPC:DSPE-PEG:PAF18 (5%)	0,8
DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF18 (5%)	0,2
DPPC:DSPE-PEG:lyso-PAF18 (5%)	0,5

Για τις μεγαλύτερες θερμοκρασίες, ο ρυθμός απελευθέρωσης της DOX παρατηρήθηκε για χρονικό διάστημα 30 min, χρονικό διάστημα το οποίο εφαρμόζεται υπερθερμία σε αντικαρκινικές θεραπείες (¹⁰⁸). Όλα τα θερμοευαίσθητα λιποσωμακά συστήματα παρέμειναν σταθερά στους 37 °C, με ποσοστό της απελευθερούμενης DOX να φτάνει το 10%, μετά από 30 min (Σχήμα 31).



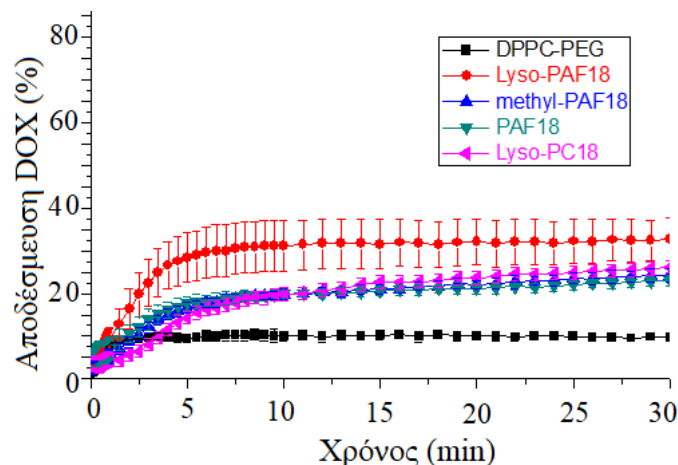
Σχήμα 33. Ποσοστό απελευθέρωσης της DOX από μονοστοιβαδικά λιποσώματα στους 37 °C. Οι μετρήσεις ελήφθησαν κάθε 0,2 s για τα πρώτα 5 min της επώασης, κάθε 0,5 s μέχρι τα 10 min και εν συνεχεία κάθε 1 min.

Καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται, η απελευθέρωση της DOX κλιμακώνεται προοδευτικά για όλες τις λιποσωματικές παρασκευές. Συγκρίνοντας την απελευθέρωση της DOX από τους λιποσωματικούς φορείς που φέρουν ενσωματωμένο αιθερολιπίδιο στη λιπιδική τους διπλοστοιβάδα, σε σχέση με αυτούς που φέρουν εστερολιπίδιο Lyso-PC18, όλα σε μοριακή αναλογία 5%, είναι σαφές ότι οι αιθερολιπιδικές παρασκευές συμπεριφέρονται πανομοιότυπα μεταξύ τους, όμως εμφανίζουν μικρότερο ρυθμό αποδέσμευσης σε σχέση με το lyso-PC18 (Σχήμα 34.)



Σχήμα 34. Ποσοστό απελευθέρωσης της DOX από μονοστοιβαδικούς λιποσωματικούς φορείς στους 41 °C (A) και τους 42 °C (B). Οι μετρήσεις ελήφθησαν κάθε 0,2 s για τα πρώτα 5 min της επόασης, κάθε 0,5 s μέχρι τα 10 min και εν συνεχεία κάθε 1 min.

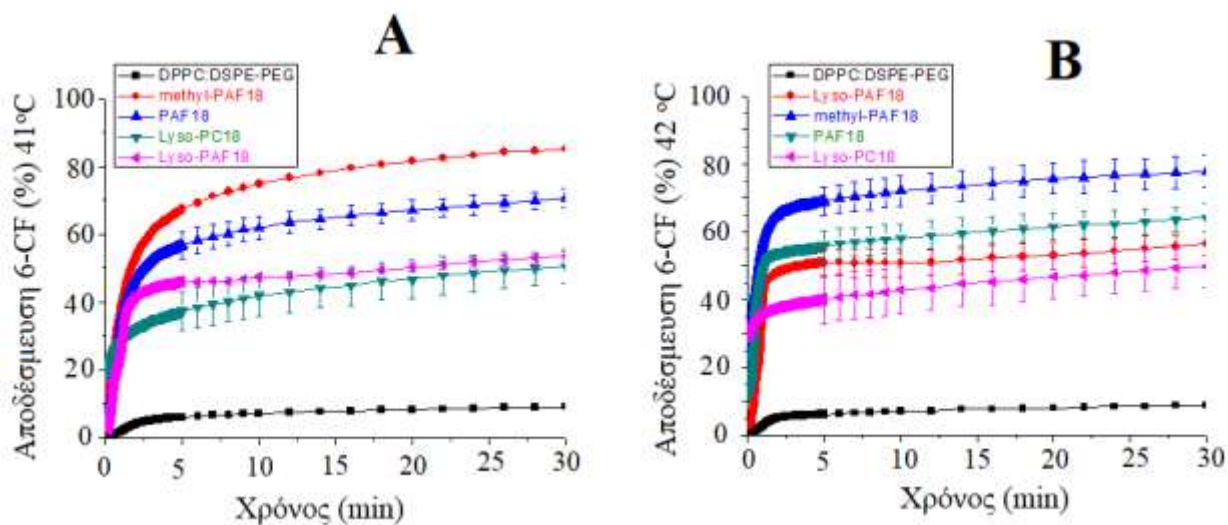
Αν και η μέγιστη επιτευχθείσα απελευθέρωση στους 40 °C είναι σχετικά χαμηλή σε όλες τις περιπτώσεις (Σχήμα 35), στους 41 °C και 42 °C, δηλαδή στο εύρος θερμοκρασιών όπου τα θερμογραφήματα DSC εμφανίζουν τις μέγιστες τιμές τους, η απελευθέρωση της DOX είναι ποσοτική.



Σχήμα 35. Ποσοστό απελευθέρωσης της DOX από μονοστοιβαδικούς λιποσωματικούς φορείς στους 40 °C. Οι μετρήσεις ελήφθησαν κάθε 0,2 s για τα πρώτα 5 min της επώασης, κάθε 0,5 s μέχρι τα 10 min και εν συνεχεία κάθε 1 min.

Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 34, στους 41 °C η απελευθέρωση δεν έχει ακόμη επιτύχει την υψηλότερη τιμή της, η οποία παρατηρείται στους 42 °C. Αυτό είναι σύμφωνο με τα αποτελέσματα DSC, τα οποία υποδεικνύουν ότι το T_m για τους θερμοευαίσθητους λιποσωματικούς φορείς με εγκλεισμένη DOX είναι 41,7-41,8 °C. Είναι επίσης σαφές ότι ο τυπικός θερμοευαίσθητος φορέας σύστασης DPPC:DSPE-PEG:lyso-PC18 παρουσιάζει γρήγορη απελευθέρωση η οποία, ειδικά στους 42 °C, οδηγεί σε ποσοτική απελευθέρωση μέσα σε μόλις 1-2 min, ενώ όλα τα σκευάσματα που περιέχουν μονοαλκυλαιθέρα παρουσιάζουν πολύ βραδύτερο ρυθμό απελευθέρωσης.

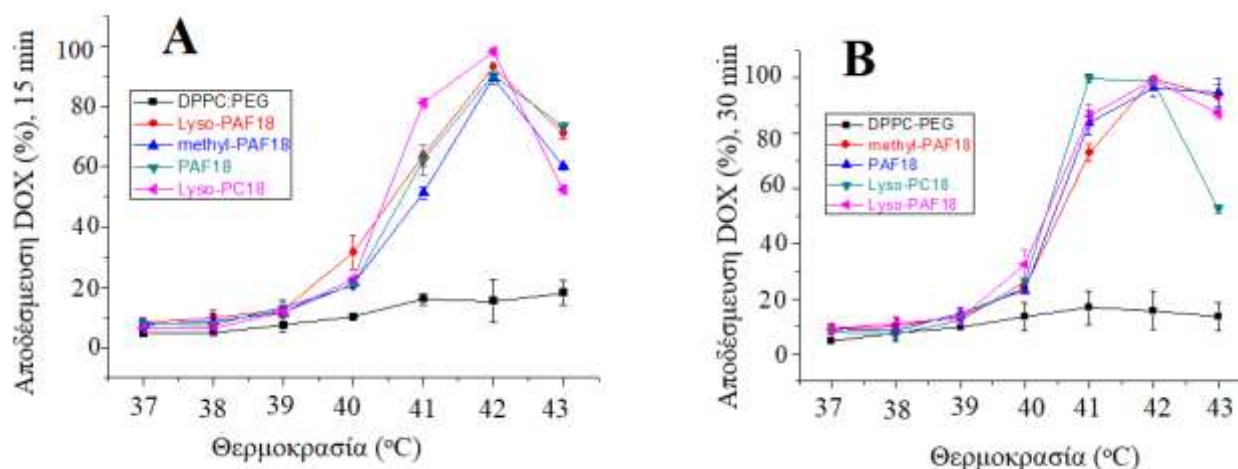
Τα προφίλ απελευθέρωσής παρέχουν ενδείξεις για μια διαδικασία απελευθέρωσης δύο φάσεων, μια αρχική ταχεία απελευθέρωση ακολουθούμενη από μια δευτερεύουσα πιο αργή. Παρόμοια προφίλ απελευθέρωσης της DOX μπορούν επίσης να βρεθούν στη βιβλιογραφία (^{109,110}) και είναι εμφανή μόνο σε περιπτώσεις όπου τα συστήματα δεν απελευθερώνουν όλο το εγκλεισμένο φορτίο τους σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα. Πρέπει να σημειωθεί ότι η παρατηρούμενη συμπεριφορά δύο βημάτων καταγράφεται αποκλειστικά στην περίπτωση ενεργών λιποσωμάτων φορτωμένων με DOX. Συγκριτικά, η απελευθέρωση της 6-CF από τους λιποσωματικούς φορείς, εμφανίζει διαφορετικό προφίλ (Σχήμα 36).



Σχήμα 36. Ποσοστό απελευθέρωσης της 6-CF από μονοστοιβαδικά λιποσώματα που περιέχουν 5 mol% λυσολιπίδια με 18 άτομα άνθρακα στους 41 °C (A) και τους 42 °C (B).

Η απελευθέρωση της 6-CF στους 41 °C και τους 42 °C δεν εμφανίζει πολυπλοκότητα στο προφίλ αποδέσμευσής της, δίνοντας μια απότομη και γρήγορη απελευθέρωση εντός του πρώτου min και εν συνεχεία ακολουθώντας κινητική πρώτης τάξης. Η αρχική αυτή γρήγορη φάση, που έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση ~20-30% της συνολικής DOX, μπορεί να αποδοθεί σε εκείνα τα μόρια της DOX που εντοπίζονται εντός ή κοντά στη μεμβράνη. Όπως αναφέρθηκε, η θερμική ανάλυση των συστημάτων έδειξε ότι ένας αριθμός μορίων DOX βρίσκεται στη διπλοστοιβάδα, σε αντίθεση με τη 6-CF, η οποία για αυτόν τον λόγο δεν ακολουθεί το ίδιο προφίλ αποδέσμευσης. Αυτός ο ισχυρισμός επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι τα μη θερμοευαίσθητα λιποσώματα απελευθερώνουν επίσης μέσα στην ίδια περίοδο περίπου την ίδια ποσότητα DOX (~20%), ενώ στη συνέχεια δεν παρατηρείται επιπλέον αποδέσμευση. Η δεύτερη φάση απελευθέρωσης καθορίζεται από την αυξημένη διαπερατότητα της διπλοστοιβάδας λόγω της παρουσίας του μονοάλκυλο λιπιδίου και είναι υπεύθυνη για την σταδιακή απελευθέρωση του φαρμάκου. Είναι προφανές ότι η πλήρης απελευθέρωση της DOX από τα λιποσωμιακά συστήματα που φέρουν PAF ή παράγωγα αυτού, μπορεί να επιτευχθεί μετά από περίπου 15 min εάν η θερμοκρασία είναι κοντά στο T_m (42 °C), ενώ σε 1 βαθμό χαμηλότερη ο ρυθμός μειώνεται και απαιτείται περίπου 1 h για πλήρη απελευθέρωση.

Τα διαγράμματα απελευθέρωσης της DOX συναρτήσει της θερμοκρασίας (Σχήμα 37) υποδηλώνουν ότι όλα τα λιποσωμιακά σκευάσματα να είναι σταθερά μέχρι τους 39 °C, απελευθερώνοντας λιγότερο από 15% στα πρώτα 30 min. Στους 40 °C, η απελευθέρωση της DOX αυξάνεται, πλησιάζοντας το 20-30%. Στους 41 °C, ο λιποσωμιακός φορέας με Lyso-PC εμφανίζει μεγαλύτερη απελευθέρωση σε σύγκριση με τους λιποσωμιακούς φορείς που φέρουν αιθερολιπίδια, αλλά στους 42 °C η διαφορά αυτή καταργείται, υποδηλώνοντας ότι είναι συνέπεια της διαφοροποίησης του ρυθμού απελευθέρωσης και όχι των τιμών ισορροπίας. Μετά από 30 min στους 41 °C, οι λιποσωμιακοί φορείς που φέρουν PAF ή παράγωγα αυτού παρουσιάζουν ποσοστό απελευθέρωσης 70-80% της εγκλεισμένης DOX, σε αντίθεση με τον λιποσωμιακό Lyso-PC18 φορέα που φτάνει το 95%. Επιπροσθέτως, εμφανίζουν το ίδιο ποσοστό απελευθέρωσης με τον λιποσωμιακό Lyso-PC18 φορέα στους 42 °C και μετά από 15 min.



Σχήμα 37. Ποσοστό απελευθέρωσης της DOX συναρτήσει της θερμοκρασίας για μονοστοιβαδικά λιποσώματα μετά από 15 min (A) ή 30 min (B) χρόνο επώασης για θερμοκρασίες από 37 °C έως 43 °C.

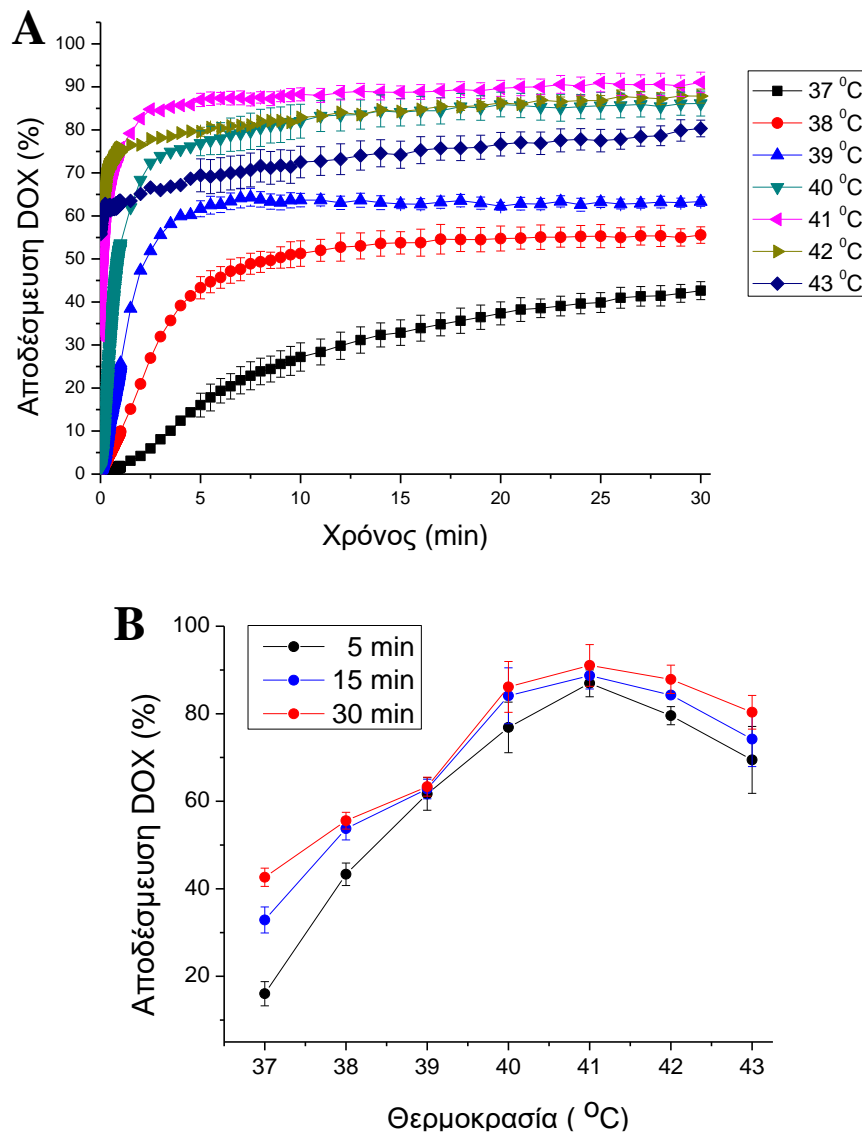
Οι λιποσωμιακοί φορείς που φέρουν αιθερολιπίδια παρουσιάζουν μια μικρή διακύμανση στο προφίλ αποδέσμευσης της DOX. Ο λιποσωμιακός φορέας με methyl-PAF18 εμφανίζει το χαμηλότερο ποσοστό απελευθέρωσης σε όλες τις θερμοκρασίες που μελετήθηκαν, γεγονός που μπορεί να σχετίζεται με τη διευθέτηση του μορίου στη λιπιδική διπλοστοιβάδα λόγω της μεθυλομάδας στη θέση 2, αν και όλοι οι φορείς απελευθερώνουν

σχεδόν κατά 100% τη δοξορουβικίνη όταν βρίσκονται στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης. Γενικά, ο methyl-PAF18 λιποσωμιακός φορέας δείχνει να είναι πιο σταθερός σε χαμηλές θερμοκρασίες, ενώ στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης απελευθερώνει εξολοκλήρου την DOX, αλλά με έναν πιο αργό, γραμμικό τρόπο.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα και με πρόσθετο γεγονός ότι το methyl-PAF18 χρησιμοποιείται ως αντικαρκινικό φάρμακο μόνο του ή σε συνδυασμό με DOX, επιλέχθηκαν θερμοευαίσθητα λιποσωμιακά σκευάσματα που περιέχουν DOX για να μελετηθούν περαιτέρω σε *in vitro* κυτταρικά πειράματα. Ωστόσο, είναι αποδεδειγμένο ότι η παρουσία ορού ή συστατικών ορού μπορεί να επηρεάσει το προφίλ απελευθέρωσης ενός λιποσωμιακού φαρμάκου. Το αποτέλεσμα αποδίδεται σε πρωτεΐνες όπως η αλβουμίνη, η οποία είναι γνωστό ότι συνδέεται ισχυρά με τα λυσοφωσφολιπίδια (^{111,112}), ιδιαίτερα σε θερμοκρασίες κοντά στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης της διπλοστοιβάδας (¹¹³). Αυτή η ενίσχυση της διαπερατότητας παρουσία ορού αποδίδεται είτε στο γεγονός ότι σε αυτές τις θερμοκρασίες διευκολύνεται η διείσδυση πρωτεϊνών στη διπλοστοιβάδα της μεμβράνης, είτε στην αλληλεπίδραση άκαμπτων (δηλαδή σε θερμοκρασίες κάτω από το T_m) διπλοστοιβάδων με συστατικά του συμπληρώματος (complement), το οποίο αποτελεί μέρος του ανοσοποιητικού συστήματος και έχει την ικανότητα, μεταξύ άλλων, να προσβάλλει την κυτταρική μεμβράνη των παθογόνων.

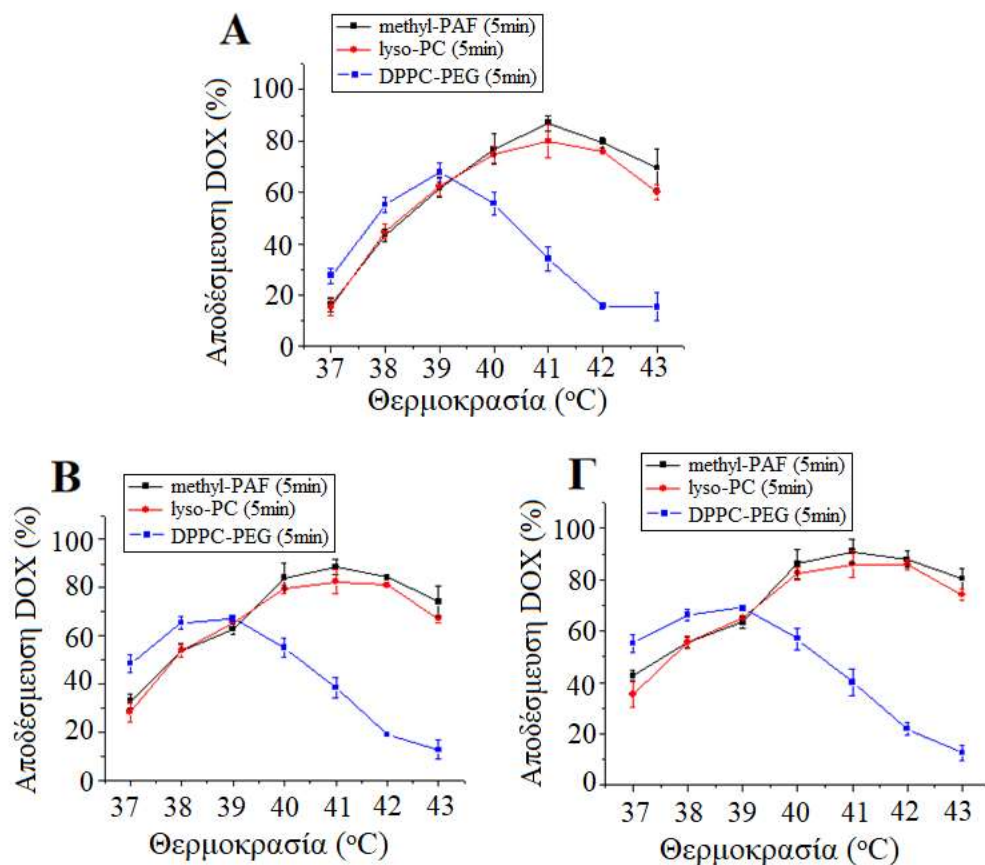
Δεδομένου ότι το τροφικό μέσο καλλιέργειας που χρησιμοποιείται (DMEM + 10% FBS) είναι γνωστό ότι μεταβάλλει σημαντικά τις ιδιότητες απελευθέρωσης φαρμάκων που έχουν εγκλεισθεί σε λιπόσωμα, πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω πειράματα απελευθέρωσης για την παρακολούθηση της απελευθέρωσης DOX στο τροφικό μέσο καλλιέργειας αντί του ρυθμιστικού διαλύματος PBS. Τα προφίλ απελευθέρωσης της DOX από λιποσώματα που περιέχουν methyl-PAF18 αποδείχθηκαν αρκετά διαφορετικά από τα παραπάνω σε πολλά σημεία. Πιο συγκεκριμένα, η DOX δεν εμφανίζει την αρχική απότομη απελευθέρωση και εν συνεχεία το δεύτερο στάδιο της πιο αργής απελευθέρωσης που εμφανίζει στο PBS, αντιθέτως εμφανίζει μια ταχεία απελευθέρωση, η οποία φτάνει στο μέγιστο στα πρώτα 10-15 min, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 38. Η μέγιστη απελευθέρωση (κοντά στο 90%) παρατηρείται στους 41 °C, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του DSC, σύμφωνα με τα οποία η T_m των λιποσωμάτων

στα μέσα καλλιέργειας βρίσκεται στους 41,2-41,3 °C. Το πιο σημαντικό, ωστόσο, είναι η σημαντική απελευθέρωση DOX στους 37 °C (~40%) και η παρουσία ενός σημείου καμπής στα προφίλ απελευθέρωσης που εξαρτώνται από τη θερμοκρασία στους 39 °C.



Σχήμα 38. Ποσοστό απελευθέρωσης της DOX από μονοστοιβαδικά θερμοευαίσθητα λιποσώματα σύστασης DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF (μοριακή αναλογία 91:4:5), παρουσία τροφικού μέσου (DMEM + 10% FBS), για θερμοκρασίες από 37-43 °C (A) και σε διαφορετικές χρονικές στιγμές (B).

Για την περαιτέρω επεξεργασία των αποτελεσμάτων, το ίδιο πείραμα επαναλήφθηκε χρησιμοποιώντας το μη-θερμοευαίσθητο λιπόσωμα αναφοράς με σύσταση DPPC:DSPE-PEG και το καλά μελετημένο θερμοευαίσθητο λιποσωματικό σύστημα, σύστασης DPPC:DSPE-PEG:lyso-PC18. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 39, ο μη-θερμοευαίσθητος λιποσωματικός φορέας σύστασης DPPC:DSPE-PEG, ακόμη και σε φυσιολογικές θερμοκρασίες, δείχνει αυξημένη απελευθέρωση της DOX, υψηλότερη από αυτή των θερμοευαίσθητων αναλόγων. Η μέγιστη απελευθέρωση παρατηρείται στους 39 °C, η οποία συμπίπτει με τη θερμοκρασία έναρξης της κύριας μετάβασης της ανθρακικής αλυσίδας. Η περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας μειώνει την παρατηρούμενη απελευθέρωση της DOX. Αυτό το προφίλ απελευθέρωσης, όπου η μέγιστη απελευθέρωση στο πλάσμα του ανθρώπου ή του ποντικού καταγράφηκε σε θερμοκρασίες κάτω από το T_m και κοντά στη θερμοκρασία έναρξης της κύριας μετάβασης έχει αναφερθεί επίσης στη βιβλιογραφία (¹¹⁴). Επίσης, ο θερμοευαίσθητος lyso-PC φορέας συμπεριφέρεται όπως και ο methyl-PAF18 φορέας, εμφανίζοντας επίσης ένα σημείο καμπής σε αυτή τη συγκεκριμένη θερμοκρασία. Σε υψηλότερες θερμοκρασίες, πάνω από 39 °C, η απελευθέρωση και από τους δύο θερμοευαίσθητους φορείς αυξάνεται περαιτέρω όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 30, φτάνοντας το μέγιστο σε θερμοκρασία που είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του DSC. Το μεγαλύτερο μέρος της απελευθέρωσης πραγματοποιείται εντός των πρώτων 15 min, αφού μετά από 30 min η απελευθέρωση παρουσιάζει μόνο μικρή αύξηση (Σχήμα 39). Οι φορείς που περιέχουν methyl-PAF18 φαίνονται πιο αποτελεσματικοί στην απελευθέρωση DOX αν και η διαφορά είναι μικρή. Γίνεται έτσι προφανές ότι σε *in vitro* πειράματα ακόμη και τα απλά λιποσώματα αναφοράς, σύστασης DPPC:DSPE-PEG εμφανίζουν θερμοευαισθησία, απελευθερώνοντας σχεδόν το 70% της εγκλεισμένης DOX στους 39 °C στο τροφικό μέσο. Ωστόσο, στους 41 °C η απελευθέρωση της DOX είναι χαμηλότερη, περίπου 40%, και αυτό πρέπει να ελήφθη υπόψη στον ορθολογικό σχεδιασμό των *in vitro* πειραμάτων. Είναι αξιοσημείωτο ότι αυτή η συμπεριφορά παρατηρείται μόνο για συστήματα στα οποία πραγματοποιήθηκε ενεργή φόρτωση της DOX και συνδέεται με την παρουσία του FBS, αφού η απελευθέρωση της DOX παρουσία PBS+10% FBS εμφανίζει παρόμοια συμπεριφορά. Παρουσία DMEM χωρίς FBS η απελευθέρωση της DOX εμφανίζει αντίστοιχη συμπεριφορά, αλλά όχι τόσο σημαντική (^{115,116}).



Σχήμα 39. Ποσοστό απελευθέρωσης της DOX συναρτήσει της θερμοκρασίας σε μέσο κυτταρικής καλλιέργειας (DMEM + 10% FBS) από μη-θερμοευαίσθητο φορέα σύστασης DPPC:DSPE-PEG και από θερμοευαίσθητα μονοστοιβαδικά λιποσώματα που περιέχουν 5 mol% είτε methyl-PAF είτε lyso-PC, μετά από τα πρώτα 5 min (A), 15 min (B) και 30 min (Γ) χρόνου επώασης σε διάφορες θερμοκρασίες από 37 °C έως 43 °C.

Τα ανωτέρω αποτελέσματα υποδηλώνουν την εμφάνιση ετερογένειας στη μεμβράνη κατά την κύρια μετάβαση από τη φάση γέλης στην υγρή κρυσταλλική φάση, η οποία είναι ιδιαίτερα εμφανής παρουσία του FBS. Η αυξημένη διαπερατότητα εξηγείται σήμερα με το ευρέως αποδεκτό μοντέλο της «ετερογένειας των λιπιδίων της διπλοστοιβάδας» που υποδηλώνει την ύπαρξη στερεών «κρυσταλλικών» φάσεων και ρευστών περιοχών στα λιπίδια της διπλοστοιβάδας. Σε χαμηλότερες θερμοκρασίες η παρατηρούμενη απελευθέρωση είναι μια εγγενής ιδιότητα των διπλοστοιβάδων του DPPC (μετά την αλληλεπίδρασή τους με τα συστατικά του FBS όπως σημειώθηκε παραπάνω) αφού η απελευθέρωση ακολουθεί


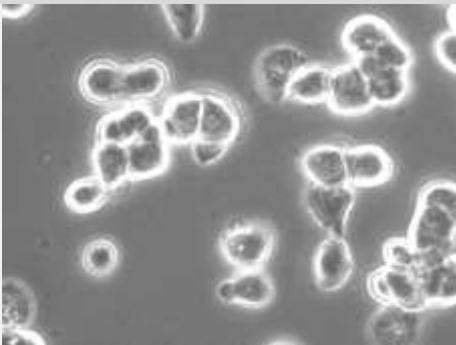
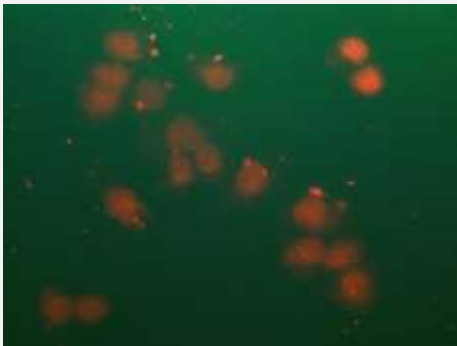
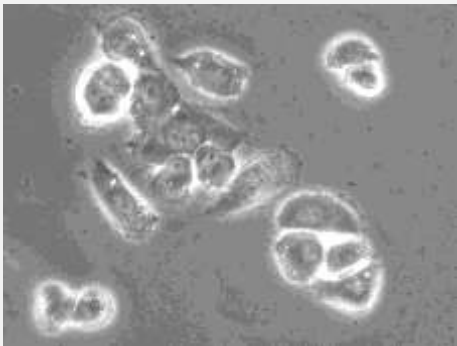
διαφορετικές τιμές κινητικής και ισορροπίας. Σε υψηλότερες θερμοκρασίες, η απελευθέρωση οφείλεται κυρίως στην παρουσία μονοάλκυλο λιπιδίων που οδηγούν σε αυξημένη διαπερατότητα της διπλοστοιβάδας. Και τα δύο μοτίβα απελευθέρωσης λειτουργούν σε υψηλές θερμοκρασίες (40-41 °C) και αυτό έχει ως αποτέλεσμα αυξημένους ρυθμούς απελευθέρωσης σε σύγκριση με τους ρυθμούς απελευθέρωσης απουσία FBS. Ωστόσο, εκτός από τα παραπάνω, δεν είναι δυνατό να αποκλειστεί η επίδραση των κιτρικών στη συνολική συμπεριφορά του συστήματος. Κατά τη θέρμανση κοντά στο T_m , η αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης επιτρέπει στα κιτρικά ιόντα να διασχίσουν τη μεμβράνη και να αλληλεπιδράσουν με συστατικά του εξωτερικού μέσου, όπως ανόργανα ιόντα. Σε σχέση με αυτό έχει αποδειχθεί ότι το Mg^{2+} σε χηλική μορφή ενισχύει τη διαπερατότητα της μεμβράνης οδηγώντας σε σημαντική διαρροή ακόμη και μικρών μορίων RNA σε θερμοκρασίες δωματίου και επίσης ότι ο πιο αποτελεσματικός χηλικός παράγοντας για Mg^{2+} ήταν το κιτρικό (^{117,118}). Είναι ενδιαφέρον να επισημανθεί το έργο του Παπαχατζόπουλου, ο οποίος πρώτος ανέφερε ότι παρουσία EDTA (το οποίο δεσμεύει τα ιόντα Mg^{2+}) αναστέλλεται η απελευθέρωση της DOX. Παρόμοια σύμπλοκα του κιτρικού είναι δυνατόν να σχηματιστούν όχι μόνο με τα ιόντα Mg^{2+} αλλά και με άλλα παρόμοια ιόντα που υπάρχουν στο μέσο κυτταρικής καλλιέργειας και οδηγούν στην πολύπλοκη συμπεριφορά που παρατηρείται. Αυτή η παρατήρηση μπορεί επίσης να εξηγήσει την αυξημένη διαπερατότητα της DOX όταν υπάρχει μόνο DMEM στο μέσο, και επίσης μπορεί να συμβάλει στη συνολική ενίσχυση της διαπερατότητας παρουσία DMEM+FBS.

6.6 *In vitro* μελέτη θερμοευαίσθητων λιποσωμάτων DPPC:DSPE-PEG: methyl-PAF18 στα οποία έχει εγκλεισθεί δοξορουβικίνη

6.6.1 *Ενδοκυτταρική πρόσληψη*

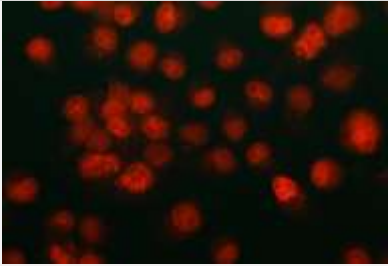
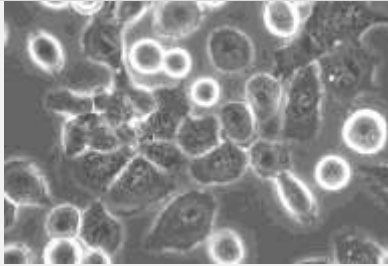
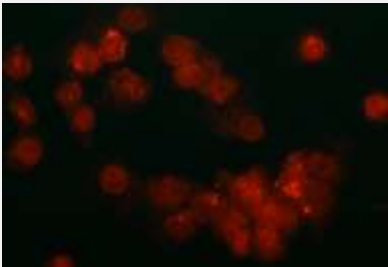
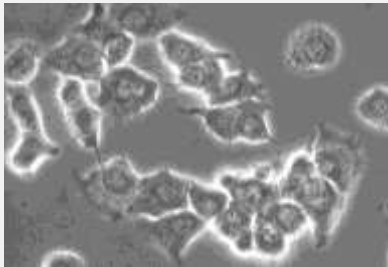
Η πρόσληψη της λιποσωματικής DOX σε κύτταρα PC3 και DU145 ακολουθήθηκε χρησιμοποιώντας μικροσκοπία επιφθορισμού σε θερμοκρασία 37 ή 40 °C. Τα κύτταρα επώαστηκαν με λιποσώματα σύστασης DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF18 και εγκλεισμένη DOX στους 37 °C για 1, 2 και 4 h και στους 40 °C πάντα για 1 h, καθώς αυτή είναι η συνήθως χρησιμοποιούμενη συνολική διάρκεια της περιφερειακής υπερθερμίας στους ασθενείς. Μετά

την προσθήκη της λιποσωματικής DOX η επώαση στους 40 °C λαμβάνει χώρα είτε αμέσως, είτε τα κύτταρα πρώτα αφήνονται στους 37 °C για 1 ή 2 h και μετά τοποθετούνται στους 40 °C. Με αυτόν τον τρόπο δοκιμάστηκαν διαφορετικά συστήματα θέρμανσης, προσομοιώνοντας διαφορετικά πρωτόκολλα επεξεργασίας, προκειμένου να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες που οδηγούν στη μέγιστη πρόσληψη της DOX από τα κύτταρα DOX. Τα κύτταρα που επώαστηκαν μόνο στους 37 °C δείχνουν μικρή πρόσληψη της DOX, που εξαρτάται από το χρόνο (Σχήμα 40), εμφανίζοντας μέγιστη ένταση φθορισμού μετά από 4 h.

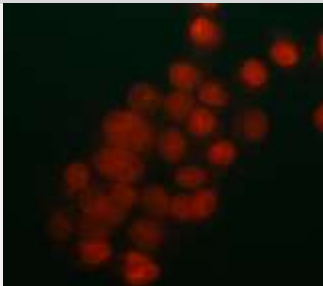

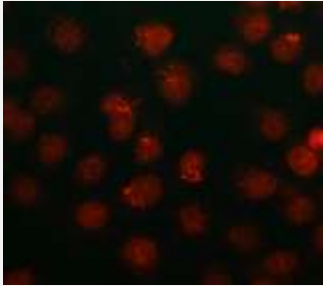
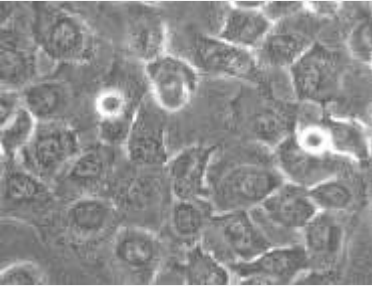
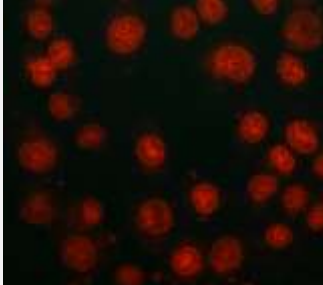
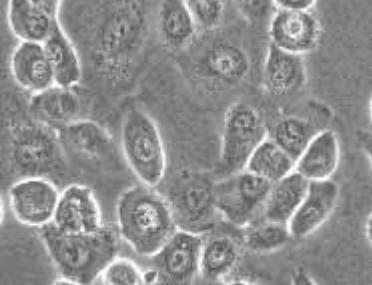
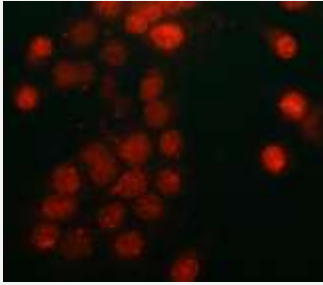
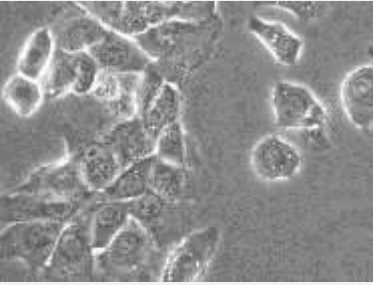
Σειρά	Επιφθορισμός	Οπτική μικροσκοπία	Πρωτόκολλο επώασης
1			37 °C (2h)
2			37 °C (4h)

Σχήμα 40. Εικόνες επιφθορισμού και οι αντίστοιχες εικόνες οπτικής μικροσκοπίας αντίθεσης φάσης κυττάρων DU145 που επώαστηκαν στους 37 °C για 2 h (1η σειρά) και 4 h (2η σειρά) με λιποσώματα σύστασης DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF18 με εγκλεισμένη DOX. Συγκέντρωση DOX 5 μ M, χρόνος έκθεσης εικόνας φθορισμού 10 s. Στη τρίτη στήλη φαίνεται το ακριβές πρωτόκολλο επώασης που χρησιμοποιείται, δηλαδή η θερμοκρασία σε °C και η περίοδος επώασης σε παρένθεση.



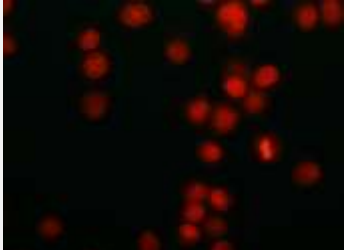
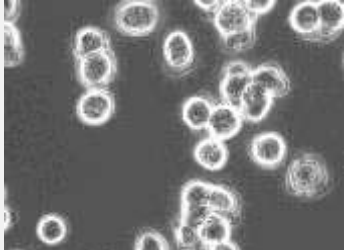
Αντίθετα, η επώαση στους 40 °C για 1 h αυξάνει σημαντικά την ένταση του φθορισμού και δείχνει σαφώς ότι η DOX βρίσκεται στη μεμβράνη των πυρήνων των κυττάρων και στο εσωτερικό του (Σχήματα 41, 42, 43).

Σειρά	Επιφθορισμός	Οπτική μικροσκοπία	Πρωτόκολλο επώασης
1			40 °C (1h)
2			40 °C (1h) 37 °C (3h)

Σχήμα 41. Εικόνες επιφθορισμού και οι αντίστοιχες εικόνες οπτικής μικροσκοπίας αντίθεσης φάσης κυττάρων DU145 που επώαστηκαν με λιποσώματα σύστασης DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF18 με εγκλεισμένη DOX στους 40 °C για 1 h (1η σειρά) ή στους 40 °C για 1 h και ακολούθως για 3 h στους 37 °C (2η σειρά). Συγκέντρωση DOX 5 μ M, χρόνος έκθεσης εικόνας φθορισμού 2 s. Στη τρίτη στήλη φαίνεται το ακριβές πρωτόκολλο επώασης που χρησιμοποιείται, δηλαδή η θερμοκρασία σε °C και η περίοδος επώασης σε παρένθεση.

Σειρά	Επιφθορισμός	Οπτική μικροσκοπία	Πρωτόκολλο
1			37 °C (1h) 40 °C (1h)
2			37 °C (1h) 40 °C (1h) 37 °C (2h)
3			37 °C (2h) 40 °C (1h)
4			37 °C (2h) 40 °C (1h) 37 °C (1h)

Σχήμα 42. Εικόνες επιφθορισμού και οι αντίστοιχες εικόνες οπτικής μικροσκοπίας αντίθεσης φάσης κυττάρων DU145 που επώαστηκαν με λιποσώματα σύστασης DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF18 με εγκλεισμένη DOX στους 37 °C για 1 h και ακολούθως στους 40 °C για 1 h (1^η σειρά) ή μετά από επώαση για 1 h στους 37 °C, ακολούθως για 1 h στους 40 °C και επιπλέον για 2 h στους 37 °C (2^η σειρά), ή μετά από επώαση στους 37 °C για 2 h και ακολούθως στους 40 °C για 1 h (3^η σειρά) ή μετά από επώαση για 2 h στους 37 °C, ακολούθως για 1 h στους 40 °C και επιπλέον για 1 h στους 37 °C (4^η σειρά). Συγκέντρωση DOX 5 μM, χρόνος έκθεσης εικόνας φθορισμού 2 s. Στη τρίτη στήλη φαίνεται το ακριβές πρωτόκολλο επώασης που χρησιμοποιείται, δηλαδή η θερμοκρασία σε °C και η περίοδος επώασης σε παρένθεση.


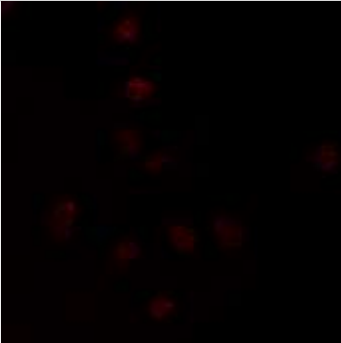



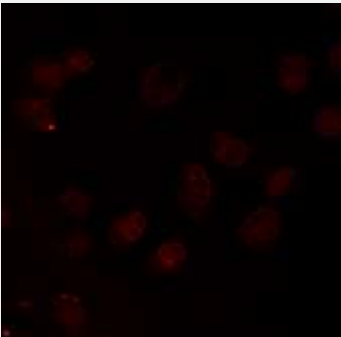
Σειρά	Επιφθορισμός	Οπτική μικροσκοπία	Πρωτόκολλο
1			40 °C (1h)
2			37 °C (3h) 40 °C (1h)

Σχήμα 43. Εικόνες επιφθορισμού και οι αντίστοιχες εικόνες οπτικής μικροσκοπίας αντίθεσης φάσης κυττάρων PC3 που επώαστηκαν με λιποσώματα σύστασης DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF18 με εγκλεισμένη DOX στους 40 °C για 1 h (1^η σειρά) ή μετά από επώαση στους 37 °C για 3 h (2^η σειρά). Συγκέντρωση DOX 5 μ M, χρόνος έκθεσης εικόνας φθορισμού 1 s. Στη τρίτη στήλη φαίνεται το ακριβές πρωτόκολλο επώασης που χρησιμοποιείται, δηλαδή η θερμοκρασία σε °C και η περίοδος επώασης σε παρένθεση.


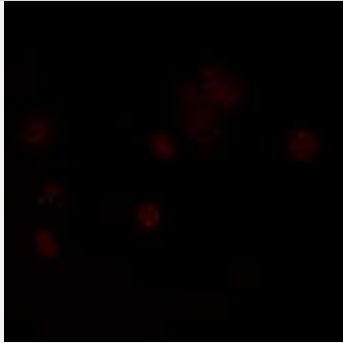

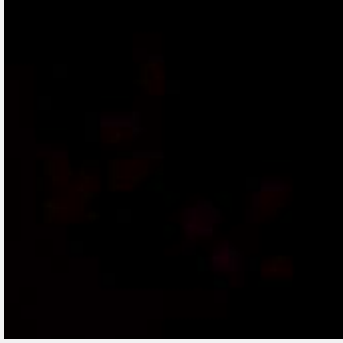

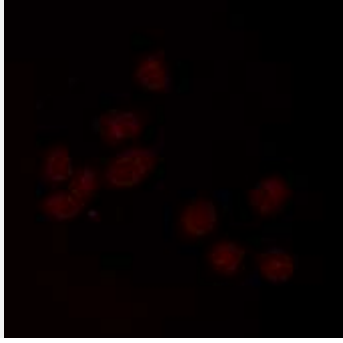
Οι διαφορετικές συνθήκες επώασης που χρησιμοποιούνται οδηγούν σε αξιοσημείωτες αλλαγές στην ένταση των σημάτων φθορισμού της DOX. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα που παρακολουθούνται αμέσως μετά την επώαση στους 40 °C δείχνουν μέγιστη ένταση της DOX, ενώ τα κύτταρα που αφήνονται στους 37 °C για διάφορα χρονικά διαστήματα (έως 3 h) μετά από 1 h επώαση στους 40 °C δείχνουν μειωμένα σήματα φθορισμού στους πυρήνες καθώς την παρουσία της DOX στο κυτταρόπλασμα, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο μηχανισμός εκροής της DOX από τα κύτταρα (πολυφαρμακευτική αντοχή, multi drug resistance, MDR) είναι ενεργός και παρατηρείται σε ζωντανά κύτταρα μετά από 2 ή 3 h στους 37 °C.

Με βάση τα παραπάνω, πραγματοποιήθηκαν πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας μετά την επώαση και των δύο κυτταρικών σειρών με ελεύθερη DOX ή με DOX σε λιποσώματα σύστασης DPPC:DSPE-PEG: methyl-PAF18 στους 37 °C και 40 °C. Είναι προφανές ότι στους 37 °C η ένταση φθορισμού είναι χαμηλή για την ελεύθερη DOX και

ελάχιστη όταν χορηγήθηκαν λιποσώματα methyl-PAF18 με εγκλεισμένη DOX (Σχήματα 44, 45).

Σειρά	Επιφθορισμός	Οπτική μικροσκοπία	Πρωτόκολλο
1			37 °C (2h) ισχύς λέιζερ 2,5%
2			40 °C (1h) 37 °C (1h) ισχύς λέιζερ 2,5%
3			40 °C (1h) 37 °C (1h) ισχύς λέιζερ 10%

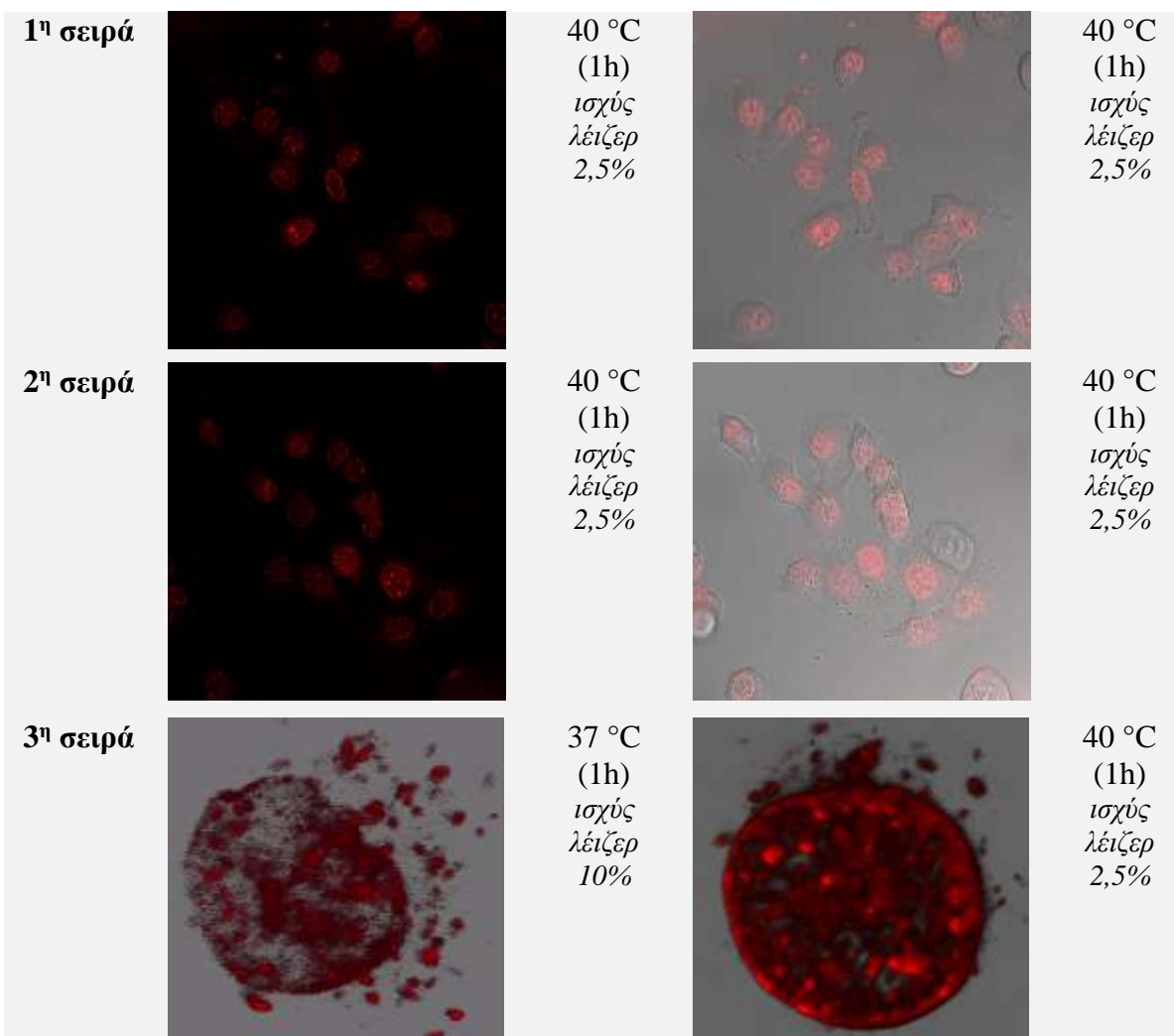
Σχήμα 44. Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας και η επικάλυψή τους με εικόνες φωτεινού πεδίου κυττάρων DU145 που επωάστηκαν στους 37 °C για 2 h με ελεύθερη DOX (1^η σειρά, ισχύς λέιζερ 2,5%) ή με λιποσώματα σύστασης DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF18 με εγκλεισμένη DOX για 1 h στους 40 °C και ακολούθως για 1 h στους 37 °C (2^η σειρά: ισχύς λέιζερ 2,5%, 3^η σειρά: ισχύς λέιζερ 10%). Στη τρίτη στήλη φαίνεται το ακριβές πρωτόκολλο επώασης που χρησιμοποιείται, δηλαδή η θερμοκρασία σε °C, η περίοδος επώασης σε παρένθεση και η ισχύς του λέιζερ.

Σειρά	Επιφθορισμός	Οπτική μικροσκοπία	Πρωτόκολλο
1			37 °C (2h) ισχύς λέιζερ 2,5%
2			40 °C (1h) 37 °C (1h) ισχύς λέιζερ 2,5%
3			40 °C (1h) 37 °C (1h) ισχύς λέιζερ 10%

Σχήμα 45. Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας και η επικάλυψή τους με εικόνες φωτεινού πεδίου κυττάρων PC3 που επώασηκαν στους 37 °C για 2 h με ελεύθερη DOX (1^η σειρά, ισχύς λέιζερ 2,5%) ή με λιποσώματα σύστασης DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF18 με εγκλεισμένη DOX για 1 h στους 40 °C και ακολούθως για 1 h στους 37 °C (2^η σειρά: ισχύς λέιζερ 2,5%, 3^η σειρά: ισχύς λέιζερ 10%). Στη τρίτη στήλη φαίνεται το ακριβές πρωτόκολλο επώασης που χρησιμοποιείται, δηλαδή η θερμοκρασία σε °C, η περίοδος επώασης σε παρένθεση και η ισχύς του λέιζερ.

Η επώαση στους 40 °C (Σχήμα 46) αποκάλυψε ένα σαφές και διακριτό σήμα φθορισμού κυρίως στους πυρήνες των κυττάρων. Σε αυτή τη θερμοκρασία, τα κύτταρα στα οποία χορηγείται ελεύθερη DOX εμφανίζουν αυξημένο σήμα φθορισμού σε σύγκριση με τη λιποσωμική DOX, όπως συμβαίνει επίσης όταν η επώαση πραγματοποιείται στους 37 °C.

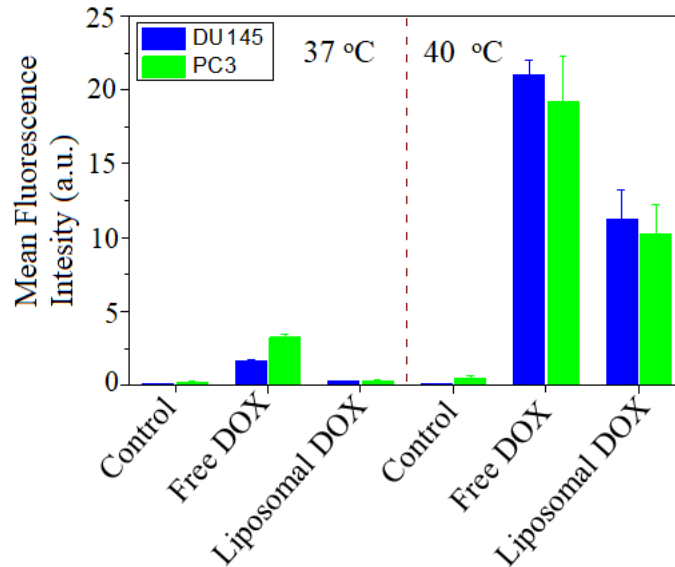
Περαιτέρω ανάλυση υποδεικνύει ότι η DOX βρίσκεται κοντά στο πυρηνικό περίβλημα και στον πυρήνα και για τις δύο κυτταρικές σειρές, πιθανώς στις δομές χρωματίνης (119). Συγκριτικά, η επώαση στους 37 °C δείχνει επίσης ότι η DOX εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα επίσης, αλλά σαφώς σε σημαντικά μικρότερη ποσότητα.



Σχήμα 46. Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού και επίθεση αυτών με εικόνες φωτεινού πεδίου κυττάρων DU145 που επωάστηκαν στους 40 °C για 1 h είτε με ελεύθερη DOX (1^η σειρά) ή με λιποσώματα σύστασης DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF18 με εγκλεισμένη DOX (2^η σειρά). Τρισδιάστατες ψηφιακά ανακατασκευασμένες εικόνες πυρήνων DU145 κυττάρων (3^η σειρά) που επωάστηκαν με λιποσώματα σύστασης DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF18 με εγκλεισμένη DOX για 1 h στους 37 °C (αριστερά) ή στους 40 °C (δεξιά). Συγκέντρωση DOX 5 μM. Στη δεύτερη και τέταρτη στήλη φαίνεται το ακριβές πρωτόκολλο επώασης που χρησιμοποιείται, δηλαδή η θερμοκρασία σε °C, η περίοδος επώασης σε παρένθεση και η ισχύς του λέιζερ.

6.6.2 Κυτταρομετρία ροής

Με σκοπό την ποσοτικοποίηση της πρόσληψης της DOX κατά την επώαση των κυτταρικών σειρών PC3 και DU145 με 5μM DOX, είτε ελεύθερη είτε λιποσωμακή, στους 37 ή 40 °C για 1h πραγματοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής βασισμένη στον εγγενή φθορισμό της DOX (Σχήμα 47).



Σχήμα 47. Ποσοτική ανάλυση της μέσης έντασης φθορισμού της DOX σε πειράματα κυτταρομετρίας ροής με καρκινικά κύτταρα προστάτη DU145 και PC3 που επώαστηκαν με ελεύθερη DOX ή με λιποσωμακή DOX σε λιποσώματα σύστασης DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF18 στους 37 ή 40 °C. Συγκέντρωση DOX: 5 μM, χρόνος επώασης 1 h.

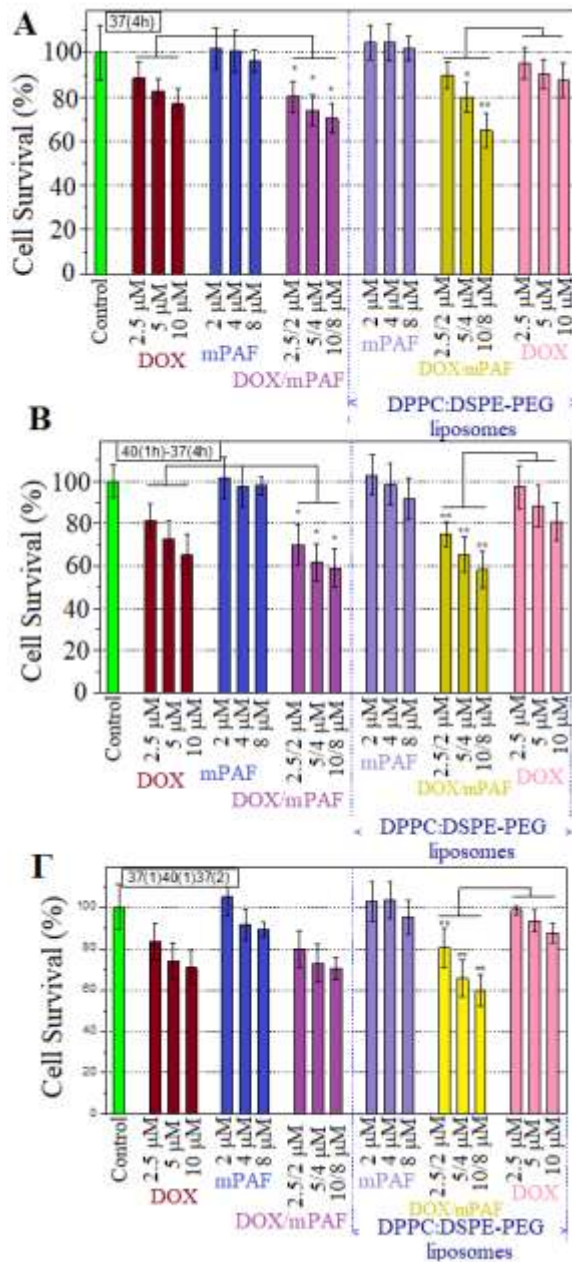
Στους 37 °C η ένταση φθορισμού της DOX που εντοπίζεται στο εσωτερικό των κύτταρων είναι σχετικά χαμηλή όπως παρατηρήθηκε επίσης στα πειράματα CLSM. Είναι, ωστόσο, σαφές ότι η λιποσωμακή DOX εισέρχεται ελάχιστα καθώς η καταγεγραμμένη ένταση φθορισμού είναι κοντά στην ένταση του μάρτυρα, ενώ η ελεύθερη DOX δείχνει στατιστικά σημαντική εισροή. Η επώαση στους 40 °C αυξάνει σημαντικά την εισροή τόσο για την ελεύθερη όσο και για τη λιποσωμακή DOX, αν και η ελεύθερη DOX εισέρχεται και πάλι πιο αποτελεσματικά επιβεβαιώνοντας τα ευρήματα οπτικής και συνεστιακής μικροσκοπίας.

6.6.3 Μελέτη κυτταροτοξικότητας

Δοσοεξαρτώμενες μελέτες κυτταροτοξικότητας ελεύθερων φαρμάκων, δηλαδή DOX και methyl-PAF18, καθώς και των λιποσωμακών συνθέσεών τους πραγματοποιήθηκαν σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές αδενοκαρκινώματος προστάτη DU145 και PC3, που είναι γνωστό ότι είναι ανθεκτικές στη δοξορουβικίνη (^{120,121}). Η τοξικότητα της DOX, είτε ελεύθερη είτε ενσωματωμένη στα θερμοευαίσθητα λιποσώματα, δοκιμάστηκε στο εύρος συγκεντρώσεων 2,5-10 μΜ. Παράλληλα μελετήθηκε η τοξικότητα του φορέα που είναι κενός από φάρμακα (λιποσώματα σύστασης DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF18) στις ίδιες συγκεντρώσεις με αυτές που χρησιμοποιούνται στη λιποσωμακή DOX. Αξιολογήθηκαν επίσης οι τοξικότητες του ελεύθερου methyl-PAF και του ελεύθερου methyl-PAF18 που συγκορηγείται με DOX. Σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις methyl-PAF18 στο εύρος συγκέντρωσης 2-8 μΜ καθώς αυτές οι συγκεντρώσεις αντιστοιχούν στις ποσότητες του που υπάρχουν στα λιποσώματα σύστασης DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF18 με εγκλεισμένη DOX. Μετά την προσθήκη των λιποσωμακών φορέων τα κύτταρα επώαστηκαν για συνολικά 4 h είτε στους 37 °C, είτε στους 40 °C για 1 h, ακολουθούμενη από επώαση για άλλες 3 h στους 37 °C. Σε ένα άλλο πρωτόκολλο, τα κύτταρα επώαστηκαν, στους 37 °C για 1 h, στη συνέχεια στους 40 °C για 1 h και τέλος για 2 h στους 37 °C, προκειμένου να διερευνηθεί εάν απαιτείται επώαση στους 37 °C αρχικά για τον αποτελεσματικό λιποσωμακό εγκλεισμό πριν από θέρμανση σε θερμοκρασίες που προκαλούν απελευθέρωση φαρμάκου. Στη συνέχεια, οι φορείς που περιέχουν φάρμακα αντικαταστάθηκαν με πλήρες μέσο, επώαστηκαν περαιτέρω στους 37 °C για 24 h, και τελικά η βιωσιμότητα των κυττάρων εκτιμήθηκε με τη μέθοδο της *in vitro* κυτταροτοξικότητας, MTT.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 48, η ελεύθερη DOX στις σχετικές συγκεντρώσεις 2,5 έως 10 μΜ, εμφανίζει στους 37 °C μικρή επίδραση στη βιωσιμότητα των κυττάρων (~80%), ενώ το methyl-PAF18 στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δεν είναι καθόλου κυτταροτοξικό. Η παρατηρούμενη χαμηλή τοξικότητα της DOX αναμένεται λόγω του χημειοανθεκτικού χαρακτήρα των επιλεγμένων κυτταρικών σειρών.

Η ασήμαντη επίδραση του methyl-PAF18 στη βιωσιμότητα των κυττάρων αποδίδεται στη χαμηλή συγκέντρωση που χρησιμοποιείται, η οποία ανέρχεται έως 8 μM . Η τιμή αυτή είναι πολύ μικρότερη από την αντίστοιχη συγκέντρωση των 14 μM για επιβίωση IC_{50} των κυττάρων DU145 μετά από επώαση 72 h (¹²²). Ωστόσο, ο συνδυασμός και των δύο φαρμάκων αυξάνει την αποτελεσματικότητά τους, οδηγώντας σε αυξημένη τοξικότητα (70% βιωσιμότητα των κυττάρων, $p < 0,05$, Σχήμα 48) σύμφωνα με την αναφερόμενη συνέργεια των δύο φαρμάκων. Επώαση σε αυξημένη θερμοκρασία (40 °C) αυξάνει περαιτέρω την τοξικότητα τόσο για την DOX όσο και για τον συνδυασμό DOX/methyl-PAF18 (~60% βιωσιμότητα των κυττάρων και στις δύο περιπτώσεις). Από την άλλη πλευρά, τα λιποσωμιακά σκευάσματα δείχνουν μια πραγματική συνέργεια όταν οι δύο ενώσεις συν-υπάρχουν στο ίδιο λιπόσωμα. Όπως ήταν αναμενόμενο, τα κενά λιποσώματα σύστασης DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF18 έχουν μη στατιστικά σημαντική επίδραση στα κύτταρα PC3 ή DU145 ακόμη και μετά από επώαση στους 40 °C (Σχήμα 48).



Σχήμα 48. Συγκριτική βιωσιμότητα κυττάρων ελεύθερης (μη εγκλεισμένης) DOX, methyl-PAF18 (mPAF) και του συνδυασμού τους (DOX/methyl-PAF18) καθώς και των αντίστοιχων θερμοευαίσθητων λιποσωματικών σκευασμάτων τους, μετά από επώαση κυττάρων PC3 (A) στους 37 °C για 4 h συνολικά, (B) στους 40 °C για 1 h ακολουθούμενη από μια επιπλέον περίοδο 3 h στους 37 °C, ή (Γ) στους 37 °C για 1, στους 40 °C για 1 h και ακολούθως για 2 h στους 37 °C. Η κυτταρική επιβίωση (%) προσδιορίστηκε με δοκιμασία MTT, 24 h μετά την επώαση. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με Student's t-test, όπου: * $p < 0,05$ και ** $p < 0,01$.

Από αυτή την άποψη, αυτό το σύστημα έχει την ίδια συμπεριφορά με τα κενά λιποσώματα σύστασης DPPC:DSPE-PEG. Τα λιποσώματα σύστασης DPPC:DSPE-PEG με εγκλεισμένη DOX προκαλούν μικρή κυτταροτοξικότητα στους 37 °C, η οποία αυξάνεται μετά την επώαση στους 40 °C (κυτταρική βιωσιμότητα 80%). Πρέπει να σημειωθεί ότι αυτό το σύστημα (λιποσωμακή DOX) είναι λιγότερο αποτελεσματικό από την ελεύθερη DOX και στις δύο θερμοκρασίες. Αυτό το αποτέλεσμα είναι σύμφωνο με το γνωστό γεγονός ότι η λιποσωμακή DOX είναι ουσιαστικά λιγότερο κυτταροτοξική από την ελεύθερη DOX λόγω της περιορισμένης βιοδιαθεσιμότητας που οφείλεται κυρίως στην ύπαρξη εγκλεισμένων μορίων DOX. Πράγματι το όφελος των απλών λιποσωμακών σκευασμάτων DOX βρίσκεται στην παθητική και επιλεκτική διάχυση των λιποσωμάτων στην περιοχή του όγκου, λόγω του φαινομένου αυξημένης διαπερατότητας και συγκράτησης (enhanced permeation and retention effect, EPR) ⁽¹²³⁾. Από την άλλη πλευρά, τα λιποσώματα σύστασης DPPC:DSPE-PEG:methyl-PAF18 με εγκλεισμένη DOX είναι πιο αποτελεσματικά από τα λιποσώματα με DOX τόσο στους 37 °C (βιωσιμότητα κυττάρων 65%) όσο και στους 40 °C (βιωσιμότητα κυττάρων 60%) ($p < 0,01$, Σχήμα 48). Το πιο σημαντικό είναι ότι είναι εξίσου ισχυρά με τον μη λιποσωμακό συνδυασμό DOX/methyl-PAF18, αν και όπως αναφέρθηκε παραπάνω, θα ήταν αναμενόμενο τα λιποσωμακά σκευάσματα να είναι λιγότερο αποτελεσματικά σε *in vitro* κυτταρικές μελέτες.

Στην πραγματικότητα, όπως φαίνεται και παραπάνω από τα πειράματα ενδοκυτταρικής πρόσληψης, λιγότερη DOX εισέρχεται στα κύτταρα όταν χρησιμοποιούνται λιποσωμακές παρασκευές. Αυτό είναι, συνεπώς, μια σαφής ένδειξη ότι η παρουσία του methyl-PAF18 στη λιποσωμακή διπλοστοιβάδα η οποία από μόνη της δεν συνεπάγεται καμία τοξικότητα, αυξάνει την λιποσωμακή κυτταροτοξικότητα της DOX στους 40 °C αλλά και στους 37 °C. Το τελευταίο μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι, ακόμη και στους 37 °C και κάτω από τις πειραματικές συνθήκες που χρησιμοποιούνται, αυτά τα λιποσώματα απελευθερώνουν επίσης ένα σημαντικό ποσό του φορτίου τους.

Είναι επίσης αξιοσημείωτο ότι η επώαση αρχικά στους 37 °C για 1 h και στη συνέχεια στους 40 °C για άλλη 1 h (Σχήμα 48) δείχνει μια μικρή, αλλά σταθερή, σε όλες τις περιπτώσεις, αύξηση της βιωσιμότητας των κυττάρων. Αυτό αποδίδεται στην ικανότητα αυτών των κυτταρικών σειρών να αποκτούν χημειοανθεκτικότητα έναντι της DOX. Η επώαση των κυττάρων με μέτριες συγκεντρώσεις DOX στους 37 °C, έστω και για 1 h, επιτρέπει στα κύτταρα να ενεργοποιήσουν την απόκριση τους σε αυτό το φάρμακο ⁽¹²⁴⁾.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Συγκρίνοντας τις χρονικά εξαρτώμενες μετρήσεις απελευθέρωσης της 6-CF από τα λιποσώματα που περιέχουν αιθερο-μονοάλκυλο λιπίδια σε σχέση με εκείνη του αντίστοιχου lyso-PC που φέρει εστερική ομάδα αντί της αιθερικής, έγινε σαφές ότι σε ποσοστό ενσωμάτωσης 10 mol% όλες οι συνθέσεις συμπεριφέρονται ταυτόσημα. Πέραν αυτών, τα λιποσώματα που περιέχουν μόνο 5 mol% μονοάλκυλο λιπίδια παρουσιάζουν διαφορετική κατατομή απελευθέρωσης. Έτσι, το λυσολιπίδιο methyl-PAF16 έχει τις χαμηλότερες ιδιότητες απελευθέρωσης, γεγονός που θεωρείται ως αποτέλεσμα της παρουσίας της μεθυλικής ομάδας στη θέση 2 του τμήματος της γλυκερίνης. Εν τούτοις, τόσο τα PAF16 όσο και το αιθερικό παράγωγο lyso-PAF16 επάγουν υψηλότερη απελευθέρωση 6-CF από το lyso-PC16, υποδηλώνοντας τον σημαντικό ρόλο της παρουσίας αιθερικού δεσμού στη θέση 1 της γλυκερίνης. Για τα θερμοευαίσθητα αυτά λιποσώματα η συνολική απελευθέρωση που καταγράφηκε ανήλθε σε 75-78%. Η απόδοση αυτή είναι 10% υψηλότερη από εκείνη του lyso-PC16 και μόλις 10% μικρότερη από την απελευθέρωση που λαμβάνεται από λιποσώματα που περιέχουν διπλάσια ποσότητα μονοάλκυλο λιπιδίων. Από την άλλη μεριά, η απελευθέρωση της 6-CF από τους λιποσωμιακούς φορείς που φέρουν το lyso-PC18 είναι η χαμηλότερη τόσο στους 41 °C, όσο και στους 42 °C και φτάνει μόλις το 45% μετά από 30 min. Αντιθέτως, οι λιποσωμιακοί φορείς που ενσωματώνουν αιθερο-λιπίδια στη λιπιδική τους διπλοστοιβάδα εμφανίζουν αυξημένη απελευθέρωση της 6-CF και πιο συγκεκριμένα το methyl-PAF18 λιποσωμιακό παράγωγο, το οποίο εμφανίζει 80% απελευθέρωση στους 41 °C και 70% στους 42 °C.

Από την άλλη μεριά, κατά τη μελέτη απελευθέρωσης της DOX από λιποσώματα, κοντά στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης, όλοι οι λιποσωμιακοί φορείς εμφανίζουν ταχεία απελευθέρωση της DOX. Πιο συγκεκριμένα, ο λιποσωμιακός φορέας με methyl-PAF18 εμφανίζει το χαμηλότερο ποσοστό απελευθέρωσης σε όλες τις θερμοκρασίες που μελετήθηκαν, γεγονός που μπορεί να σχετίζεται με τη διευθέτηση του μορίου στη λιπιδική διπλοστοιβάδα λόγω της μεθυλομάδας στη θέση 2, αν και όλοι οι φορείς απελευθερώνουν σχεδόν κατά 100% τη δοξορουβικίνη όταν βρίσκονται στη θερμοκρασία κύριας μετάβασης. Γενικά, ο methyl-PAF18 λιποσωμιακός φορέας δείχνει να είναι πιο σταθερός σε χαμηλές θερμοκρασίες, ενώ στη

θερμοκρασία κύριας μετάβασης απελευθερώνει εξολοκλήρου την DOX, αλλά με έναν πιο αργό, γραμμικό τρόπο.

Για το λόγο αυτό, καθώς και το γεγονός ότι το methyl-PAF18 χρησιμοποιείται ως αντικαρκινικό φάρμακο μόνο του ή σε συνδυασμό με DOX, επιλέχθηκαν θερμοευαίσθητα λιποσωμιακά σκευάσματα που περιέχουν DOX για να μελετηθούν περαιτέρω σε *in vitro* κυτταρικά πειράματα. Κατά τη μελέτη της ενδοκυτταρικής πρόσληψης της DOX, η λιποσωμιακή μορφή αυτής μελετήθηκε σε κύτταρα PC3 και DU145 χρησιμοποιώντας μικροσκοπία επιφθορισμού σε θερμοκρασία 37 ή 40 °C. Με την μέθοδο παρατηρήθηκε ότι στους 37 °C, η λιποσωμιακή DOX εισέρχεται ελάχιστα, ενώ η ελεύθερη DOX δείχνει στατιστικά σημαντική εισροή. Η επώαση στους 40 °C αυξάνει σημαντικά την εισροή τόσο για την ελεύθερη όσο και για τη λιποσωμιακή DOX, αν και η ελεύθερη DOX εισέρχεται και πάλι πιο αποτελεσματικά. Στην τελική φάση, πραγματοποιήθηκαν δοσοεξαρτώμενες μελέτες κυτταροτοξικότητας ελεύθερων φαρμάκων, δηλαδή DOX και methyl-PAF18, καθώς και των λιποσωμιακών συνθέσεών τους. Έτσι, η ελεύθερη DOX, έχει στους 37 °C μια μικρή επίδραση στη βιωσιμότητα των κυττάρων, ενώ το methyl-PAF18 στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δεν έχει καθόλου κυτταροτοξικότητα. Ωστόσο, ο συνδυασμός και των δύο φαρμάκων αυξάνει την αποτελεσματικότητά τους, οδηγώντας σε αυξημένη τοξικότητα. Τα λιποσωμιακά σκευάσματα από την άλλη δείχνουν μια πραγματική συνέργεια όταν οι δύο ενώσεις συν-υπάρχουν στο ίδιο λιπόσωμα. Τα λιποσώματα σύστασης DPPC:DSPE-PEG: methyl-PAF18 με εγκλεισμένη DOX είναι πιο αποτελεσματικά από τα λιποσώματα με DOX τόσο στους 37 °C όσο και στους 40 °C. Το πιο σημαντικό είναι ότι είναι εξίσου ισχυρά με τον μη λιποσωμιακό συνδυασμό DOX/methyl-PAF18. Στην πραγματικότητα, όπως φαίνεται και από τα πειράματα ενδοκυτταρικής πρόσληψης, λιγότερη DOX εισέρχεται στα κύτταρα όταν χρησιμοποιούνται λιποσωμιακές παρασκευές. Αυτό είναι, συνεπώς, μια σαφής ένδειξη ότι η παρουσία του methyl-PAF18 στη λιποσωμιακή διπλοστοιβάδα η οποία από μόνη της δεν συνεπάγεται καμία τοξικότητα, αυξάνει την λιποσωμιακή κυτταροτοξικότητα της DOX στους 40 °C αλλά και στους 37 °C.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή σχεδιάσθηκαν, αναπτύχθηκαν και μελετήθηκαν νέοι καινοτόμοι θερμοευαίσθητοι λιποσωμιακοί φορείς. Για τον σκοπό αυτό εξετάστηκε μια σειρά παραγώγων του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (platelet activating factor), PAF, και ιδιαίτερα τα λιπίδια PAF16, lyso-PAF16, methyl-PAF16, PAF18, lyso-PAF18 και methyl-PAF18, τα οποία ενσωματώθηκαν στη λιπιδική διπλοστοιβάδα σε ποσοστό 5 mol% και 10 mol%. Για τις τιμές αυτές λήφθηκαν υπόψη και υπολογίσθηκαν πάντα σε σύγκριση με τα ευρέως μελετηθέντα και αποδεκτά πλέον ως συστήματα αναφοράς που χρησιμοποιούν τα λυσολιπίδια lyso-PC16 και lyso-PC18. Οι χημικές δομές αυτών των βιοδραστικών μονοάλκυλο λιπιδίων ομοιάζουν σημαντικά με την δομή των λυσοφωσφολιπιδίων καθιστώντας τα δυνητικά χρήσιμα για την επαγωγή θερμοευαισθησίας, ενώ παρουσιάζουν και αντινεοπλασματική δράση.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται υποστηρίζουν τη γενική αντίληψη ότι η παρουσία φωσφατιδυλοχολινών μονοαλκυλικής αλυσίδας προσδίδει θερμοευαίσθητες ιδιότητες στα λιποσώματα και παρέχει περαιτέρω στοιχεία ότι η προσκόλληση της μακράς αλειφατικής αλυσίδας στην πολική ομάδα γλυκεροφωσφατιδυλοχολίνης μέσω ενός αιθερικού δεσμού μπορεί να είναι ευεργετική. Η ενσωμάτωση των μονοάλκυλο λιπιδίων στη διπλοστοιβάδα του DPPC οδηγεί σε πιο εύκαμπτες και λιγότερο οργανωμένες διπλοστοιβάδες, ενδεικτικές μιας πιο διαπερατής μεμβράνης. Πιο συγκεκριμένα, η ενσωμάτωση μονοάλκυλο λιπιδίων φωσφατιδυλοχολίνης, συμπεριλαμβανομένου του PAF και των αναλόγων του, προκαλεί θερμοευαισθησία σε DPPC λιποσώματα με εγκλεισμένη DOX και εμφανίζουν προφίλ ελεγχόμενης απελευθέρωσης σε θερμοκρασίες κοντά στους 40-41 ° C. Μεταξύ αυτών, τα λιποσώματα που περιέχουν methyl-PAF (εδελφοσίνη) διαπιστώνεται ότι προσλαμβάνονται αποτελεσματικά από κυτταρικές σειρές καρκίνου του προστάτη και ενισχύουν τη θεραπευτική αποτελεσματικότητα της DOX. Λαμβάνοντας υπόψη την δυνατότητα παθητικής στόχευσης, την ικανότητα πρόσληψης από καρκινικά κύτταρα, και την συνεργιστική αντικαρκινική δράση δύο αντινεοπλασματικών φαρμακευτικών ενώσεων, αυτό το λιποσωμιακό σύστημα μπορεί να αποδειχθεί ελπιδοφόρο στην αντικαρκινική θεραπεία όταν συνδυαστεί με τοπική υπερθερμίας.

ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Η εφαρμογή υπερθερμίας, καθώς και η χρήση των θερμοευαίσθητων λιποσωμάτων έχει αποδειχθεί πολλά υποσχόμενη στην προσπάθεια αντιμετώπισης διαφόρων μορφών καρκίνου. Όπως παρουσιάστηκε στην παρούσα διατριβή, η ενσωμάτωση του μονοάλκυλο λιπιδίου methyl-PAF18, το οποίο και ως ελεύθερο δρα ενάντια σε καρκινικά κύτταρα, θα άξιζε να μελετηθεί σε συνδυασμό με τον εγκλεισμό της αντικαρκινικής ουσίας δοξορουβικίνη. Ίσως αυτό μπορεί να οδηγήσει σε ένα προηγμένο θερμοευαίσθητο λιποσωματικό φορέα για την αντικαρκινική θεραπεία.

Περαιτέρω πειράματα, για να αναδειχθεί η καινοτόμος συμπεριφορά του μελετηθέντος λιποσωματικού φορέα, προτείνεται η μελέτη να επεκταθεί σε *in vivo* πειράματα για να εκτιμηθεί η πραγματική αντικαρκινική του δράση.

Ενδιαφέρον επίσης θα είχε η περαιτέρω ανάπτυξη του λιποσωματικού αυτού φορέα σε λυοφιλιωποιημένη μορφή, καθώς η μορφή αυτή εμφανίζει μεγαλύτερη χρονική σταθερότητα, αλλά και φαίνεται να είναι πιο εύκολα διαχειρίσιμη σε ένα δύσκολο νοσοκομειακό περιβάλλον.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1 David, A. (1998) Cancer - A degenerative disorder? *European Journal of Surgical Oncology*, **24**; 362-366.
- 2 Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2000) The hallmarks of cancer, *Cell*, **100**; 57-70.
- 3 Tubiana, M. (1992) The role of local treatment in the cure of cancer. *European Journal of Cancer*, **28**; 2061-2069.
- 4 Cancer, Wikipedia, the free Encyclopedia (<http://en.wikipedia.org/wiki/Cancer>).
- 5 Theophanides T. (1981) Fourier Transform Infrared Spectra of Calf Thymus DNA and its Reactions with Anticancer Drug *cis-platin*, *Applied Spectroscopy.*, **35**; 461-465.
- 6 Needham, D., Anyarambhatla, G., Kong, G., Dewhirst, MW. (2000) A new temperature-sensitive liposome for use with mild hyperthermia: characterization and testing in a human tumor xenograft model, *Cancer Research*, **60**; 1197-201.
- 7 Dou, Y., Hynynen, K., Allen, C. (2017) To heat or not to heat: Challenges with clinical translation of thermosensitive liposomes, *Journal of Controlled Release*, **249**; 63–73.
- 8 Walsh, T. J., Finberg, R. W., Arndt, C., Hiemenz, J., Schwartz, C., Bodensteiner, D., Pappas, P., Seibel, N., Greenberg, R. N., Dummer, S., Schuster, M., Holcenberg, J. C. (1999) Liposomal amphotericin B for empirical therapy in patients with persistent fever and neutropenia, *The New England Journal of Medicine*, **340**; 764–771.
- 9 Solier, J. D., Galera-Cortés, E., Sabati, R., Estelrich, J. (2005) Translational diffusion in charged phospholipid bilayer membranes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **270**; 88-92.
- 10 Saveyn, P., Van Der Meeren, P., Cocquyt, J., Drakenberg, T., Olofsson, G., Olsson, U. (2007) Incomplete lipid chain freezing of sonicated vesicular dispersions of double-tailed ionic surfactants, *Langmuir*, **23**; 10455-10462.
- 11 Tianshun, L., Rodney, J. Y. H. (2001) Trends and developments in liposome drug delivery systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **90**; 667-680.

-
- 12 Lasic, D. D. (1998) Novel applications of liposomes. *Trends in Biotechnology*, **16**; 307-321.
 - 13 Sharma, A., Sharma, U. S. (1997) Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics*, **154**; 123-140.
 - 14 Mills K. J., and Needham, D. (2004) The materials engineering of temperature-sensitive liposomes, *Methods in Enzymology*, **387**; 82-113.
 - 15 Taylor, K. M. G., Morris, R. M. (1995) Thermal analysis of phase transition behaviour in liposomes, *Thermochimica Acta*, **248**; 289-301.
 - 16 Paleos, C., Tsiourvas, D., Sideratou, Z. (2011) Interaction of vesicles: adhesion, fusion and multicompartments systems formation, *ChemBioChem*, **12**; 510-521.
 - 17 Carrion, F. J., De La Maza, A., Parra, J. L. (1994) The Influence of Ionic Strength and Lipid Bilayer Charge on the Stability of Liposomes, *Journal of Colloid and Interface Science*, **164**; 78-87.
 - 18 Pantos, A., Tsiourvas, D., Nounesis, G., Paleos, C. M. (2005) Interaction of functional dendrimers with multi-lamellar liposomes: design of a model system for studying drug delivery, *Langmuir*, **21**; 7483-7490.
 - 19 Paleos, C. M., Tsiourvas, D., Sideratou, Z. (2007) Developing and applying a drug delivery model for liposomal and dendritic multifunctional nanoparticles, *Gene Therapy and Molecular Biology*, **11**; 117-131.
 - 20 Paleos, C. M., Tsiourvas, D., Sideratou, Z. (2016) Triphenylphosphonium Decorated Liposomes and Dendritic Polymers: Prospective Second Generation Drug Delivery Systems for Targeting Mitochondria, *Molecular Pharmaceutics*, **13**; 2233–2241.
 - 21 Paleos C. M. and D. Tsiourvas. (2006) Interaction between complementary liposomes: a process leading to multicompartments systems formation, *Journal of Molecular Recognition*, **19**; 60-67.
 - 22 Sideratou, Z., Sterioti, N., Tsiourvas, D., Paleos, C. M. (2009) Structural features of interacting complementary liposomes promoting the formation of multicompartments structures, *Physical Chemistry Chemical Physics*, **10**; 3083-3089.

-
- 23 Gawrisch, K., Soubias, O. (2008) Structure and dynamics of polyunsaturated hydrocarbon chains in lipid bilayers--significance for GPCR function. *Chemistry and Physics of Lipids*, **153**; 64-75.
 - 24 Feitosa, E., Jansson, J., Lindman, B. (2006) The effect of chain length on the melting temperature and size of dialkyldimethylammonium bromide vesicles, *Chemistry and Physics of Lipids*, **142**; 128-132.
 - 25 Hildebrand, A., Beyer, K., Neubert, R., Garidel, P., Blume, A. (2004) Solubilization of negatively charged DPPC/DPPG liposomes by bile salts, *Journal of Colloid and Interface Science*, **279**; 559-571.
 - 26 Pantos, A., Sideratou, Z., Paleos, C. M. (2002) Complementary liposomes based on phosphatidyl choline: interaction effectiveness vs protective coating, *Journal of Colloid and Interface Science*, **253**; 435-442.
 - 27 Ceh, B., Winterhalter, M., Frederik, P. M., Vallner, J. J., Lasic, D. D. (1997) Stealth liposomes: from theory to product., *Advanced Drug Delivery Reviews*, **24**; 165–177.
 - 28 Hicks, A., Dinda, M., Singer, M. A. (1987) The ripple phase of phosphatidylcholines: effect of chain length and cholesterol, *Biochimica et Biophysica Acta*, **903**; 177-185.
 - 29 Tenchov, B., Koynova, R., Rapp, G. (2001) New ordered metastable phases between the gel and subgel phases in hydrated phospholipids, *Biophysical Journal*, **80**; 1873-1890.
 - 30 Koynova, R., Tenchov, B. G., Todinova, S., Quinn, P. J. (1995) Rapid reversible formation of a metastable subgel phase in saturated diacylphosphatidylcholines, *Biophysical Journal*, **68**; 2370-2375.
 - 31 Huang, C., Li, S. (1999) Calorimetric and molecular mechanics studies of the thermotropic phase behavior of membrane phospholipids, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1422**; 273-307.
 - 32 Ceckler, T. L., Cunningham, B. A. (1997) Transition state thermodynamics of lipid bilayers characterized by differential scanning calorimetry, *The Chemical Educator*, **2**; 1-17.
 - 33 Riske, K., Barroso, R. P., Vequi-Suplicy, C. C., Germano, R., Henriques, V. B., Lamy, M. T. (2009) Lipid bilayer pre-transition as the beginning of the melting process: a periodic melting, *Biophysical Journal*, **96**; 954-963.

-
- 34 Mcelhanev, R. N. (1982) The use of differential scanning calorimetry and differential thermal analysis in studies of model and biological membranes, *Chemistry and Physics of Lipids*, **30**; 229-259.
- 35 Heimburg, T. (2007) *Thermal Biophysics of Membranes*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- 36 Paleos, C., Tsiourvas, D., Sideratou, Z. (2012) Preparation of multicompartiment lipid-based systems based on vesicle interactions, *Langmuir*, **28**; 2337-2346.
- 37 Gregoriadis, G. (1995) Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems, *Trends in Biotechnology*, **12**; 527-537.
- 38 Forssen, E., Willis, M. (1998) Ligand-targeted liposomes, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **29**; 249-271.
- 22 Gabisov, A., Price, D. C., Huberty, J., Bresalier, R. S., Papahadjopoulos, D. (1990) *Cancer Research*, **50**; 6371-6378.
- 40 Lee, K. D., Hong, K., Papahadjopoulos, D. (1992) Recognition of liposomes by cells: in vitro binding and endocytosis mediated by specific lipid headgroups and surface charge density, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1103**; 185-197.
- 41 Jain, R. K. (1994) Barriers to drug delivery in solid tumors. *Scientific American*, **271**; 58–65.
- 42 Working, P. K., Dayan, A. D. (1996) Pharmacological toxicological expert report Caelyx(TM) – (Stealth(R) liposomal doxorubicin HCl), *Human & Experimental Toxicology*, **15**; 751–785.
- 43 Needham, D. (1999) Materials engineering of lipid bilayers for drug carrier function, *MRS Bull.*, **24**; 32–40.
- 44 Allen, T. M. (1997) Liposomes: opportunities in drug delivery, *Drugs*, **54**; 8–14.
- 45 Gabizon, A., and Barenholz, Y (1999) Liposomal anthracyclines. From basics to clinical approval of PEGylated liposomal doxorubicin, *Journal of Controlled Release*, **53**; 275-279.

-
- 46 Campos, S., and Shapiro, C (1999) Clinical evaluation of liposomal anthracyclines. In: A. Janoff (ed.), *Liposomes: Rational Design*, pp. 363–377.
- 47 Yatvin, M. B., Weinstein, J. N., Dennis, W. H., Blumenthal, R. (1978) Design of liposomes for enhanced local release of drugs by hyperthermia, *Science*, **202**; 1290-1293.
- 48 Mayhew, E. G., Lasic, D., Babbar, S., Martin, F. J. (1992) Pharmacokinetics and antitumoractivity of epirubicin encapsulated in long-circulating liposomes incorporating a polyethylene glycol-derivatized phospholipid, *The International Journal of Cancer*, **51**; 302–309.
- 49 Gaber, M. H., Wu, N. Z., Hong, K. L., Huang, S. K., Dewhirst, M. W., Papahadjopoulos, D. (1996) Thermosensitive liposomes: extravasation and release of contents in tumor microvascular networks, *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, **36**; 1177–1187.
- 50 Park, J. W., Benz, C. C., Martin, F. J. (2004) Future directions of liposome- and immunoliposome-based cancer therapeutics, *Seminars in Oncology*, **31**; 196–205.
- 51 Maruyama, K., Unezaki, S., Takahashi, N., Iwatsuru, M. (1993) Enhanced delivery of doxorubicin to tumor by long-circulating thermosensitive liposomes and local hyperthermia, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1149**; 209–216.
- 52 Unezaki, S., Maruyama, K., Takahashi, N., Koyama, M., Yuda, T., Suginaka, A., Iwatsuru, M. (1994) Enhanced delivery and antitumor activity of doxorubicin using long-circulating thermosensitive liposomes containing amphipathic polyethylene glycol in combination with local hyperthermia, *Pharmaceutical Research*, **11**; 1180–1185.
- 53 Mills, J. K., Needham, D. (2005) Lysolipid incorporation in dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes enhances the ion permeability and drug release rates at the membrane phase transition, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1716**; 77–96.
- 54 Paphadjopoulos, D., Jacobsen, K., Nir, S., Isac, T. (1973) Phase transitions in phospholipid vesicles. Fluorescence polarization and permeability measurements concerning the effects of temperature and cholesterol, *Biochimica et Biophysica Acta*, **311**; 330–348.

-
- 55 Mouritsen, O. G., Jorgensen, K., Honger, T. (1995) Permeability of lipid bilayers near the phase transition, in: E. A. Disalvo, S. A. Simon (Eds.), *Permeability and Stability of Lipid Bilayers*, CRC Press, Boca Raton, pp. 137– 160.
- 56 Nagle, J. F., Scott, H. L. (1978) Lateral compressibility of lipid mono- and bilayers theory of membrane permeability, *Biochimica et Biophysica Acta*, **513**; 236– 243.
- 57 Doniach, S. (1978) Thermodynamic fluctuations in phospholipid bilayers, *The Journal of Chemical Physics*, **68**; 4912– 4916.
- 58 Marsh, D., Watts, A. (1976) Evidence for phase boundary lipid. Permeability of tempocholine into dimyristoylphosphatidylcholine vesicles at the phase transition, *Biochemistry*, **15**; 3570–3578.
- 59 Corvera, E., Mouritsen, O. G., Singer, M. A., Zuckerman, M. J. (1991) The permeability and the effect of acyl-chain length for phospholipid bilayers containing cholesterol: theory and experiment, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1107**; 261– 270.
- 60 Shackelford, J. F. (1988) *Introduction to Materials Science for Engineers*, Macmillan Publishing Company, New York.
- 61 Radiation Therapy for cancer: Q & A- National Cancer Institute (www.cancer.gov).
- 62 Jaffray, D., Knaul, F., Atun, R., Adams, C., Barton, M., Baumann, M., Lievens, Y., Lui, M., Rodin, D., Rosenblatt, E. (2015) Global task force on radiotherapy for cancer control, *Lancet Oncology*, **16**; 1144-1146.
- 63 Πλατανιώτης ΓΑ (2009) *Αρχές Ακτινοθεραπευτικής Ογκολογίας*. Ελληνική Εταιρία Ακτινοθεραπευτικής Ογκολογίας. Αθήνα.
- 64 Paleos, C., Tsiourvas, D., Sideratou, Z., Tziveleka, L. (2010) Drug delivery using multifunctional dendrimers and hyperbranched polymers, *Expert Opinion on Drug Delivery*, **7**; 1387-1398.
- 65 Allen, T. M., Hansen, C., Martin, F., Redemann, C., Yau-Young, A. (1991) Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1066**; 29–36.

-
- 66 Klibanov, A. L., Maruyama, K., Torchilin, V. P., Huang, L. (1990) Amphipatic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes, *FEBS Letters*, **268**; 235–238.
- 67 Blume, G., Cevc, G. (1993) Molecular mechanism of the lipid vesicle longevity in vivo, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1146**; 157–168.
- 68 Allen, C., Dos Santos, N., Gallagher, R., Chiu, G. N., Shu, Y., Li, W. M., Johnstone, S. A., Janoff, A. S., Mayer, L. D., Webb, M. S., Bally, M. B. (2002) Controlling the physical behavior and biological performance of liposome formulations through use of surface grafted poly(ethylene glycol), *Bioscience Reports*, **22**; 225–250.
- 69 O'Brien, M. E., Wigler, N., Inbar, M., Rosso, R., Grischke, E., Santoro, A., Catane, R., Kieback, D. G., Tomczak, P., Ackland, S. P., Orlandi, F., Mellars, L., Alland, L., Tendler, C. (2004) Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX/Doxil) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer, *Annals of Oncology*, **15**; 440–449.
- 70 Batist, G., Barton, J., Chaikin, P., Swenson, C., Welles, L. (2002) Myocet (liposomeencapsulated doxorubicin citrate): a new approach in breast cancer therapy, *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, **3**; 1739–1751.
- 71 Theodossiou, T., Sideratou, Z., Katsarou, M., Tsiourvas, D. (2019) Mitochondrial delivery of doxorubicin by triphenylphosphonium-functionalized hyperbranched nanocarriers results in rapid and severe cytotoxicity, *Pharmaceutical Research*, **30**; 2832–2842.
- 72 Judson, I., Radford, J. A., Harris, M., Blay, J. Y., van Hoesel, Q., le Cesne, A., van Oosterom, A. T., Clemons, M. J., Kamby, C., Hermans, C., Whittaker, J., Donato di Paola, E., Verweij, J., Nielsen, S. (2001) Randomised phase II trial of PEGylated liposomal doxorubicin (DOXIL/CAELYX) versus doxorubicin in the treatment of advanced or metastatic soft tissue sarcoma: a study by the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group, *European Journal of Cancer*, **37**; 870–877.
- 73 Prescott, S. M., Zimmerman, G. A., Stafforini, D. M., McIntyre, T. M. (2000) Platelet activating factor and related lipid mediators, *Annual Review of Biochemistry*, **69**; 419–445.

-
- 74 Imaizumi, T. A., Stafforini, D. M., Yamada, Y., McIntyre, T. M., Prescott, S. M., Zimmerman, GA. (1995) Platelet-activating factor: a mediator for clinicians, *Journal of Internal Medicine*, **238**; 5–20.
- 75 Houlihan, W. J., Lohmeyer, M., Workman, P., Cheon, S. H. (1995) Phospholipid antitumor agents, *Medicinal Research Reviews*, **15**; 157-223.
- 76 Gajate, C., Mollinedo, F. (2014) Lipid rafts, endoplasmic reticulum and mitochondria in the antitumor action of the alkylphospholipid analog edelfosine, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, **14**; 509-527.
- 77 Busto, V., del Canto-Jañez, E., Goñi, F. M., Mollinedo, F., Alonso, A. (2008) Combination of the Anti-tumor Cell Ether Lipid Edelfosine with Sterols Abolishes Haemolytic Side Effects of the Drug, *Journal of Chemical Biology*, **1**; 89–94.
- 78 González-Fernández, Y., Zalacain, M., Imbuluzqueta, E., Sierrasesumaga, L., Patiño-García, A., Blanco-Prieto, M. J. (2015) Lipid nanoparticles enhance the efficacy of chemotherapy in primary and metastatic human osteosarcoma cells, *Journal of Drug Delivery Science Technology*, **30**; 435-442.
- 79 Mayhew, E., Ahmad, I., Bhatia, S., Dause, R., Filep, J., Janoff, A. S., . Kaisheva, E., Perkins, W. R., Zha, Y., Craig Franklin J. (1997) Stability of Association of 1-O-Octadecyl-2-O-Methyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine with Liposomes is Composition Dependent, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1329**; 139–148.
- 80 Peters, J. A. C., Ahmad, I., Janoff, A. S., Pushkareva, M. Y., Mayhew, E. (1997) Growth Inhibitory Effects of Liposome-Associated 1-O-Octadecyl-2-O-methyl-sn-glycero-3-phosphocholine, *Lipids*, **32**; 1045–1054.
- 81 Andresen, T. L., Davidsen, J., Begtrup, M., Mouritsen, O. G., Jørgensen, K. (2004) Enzymatic Release of Antitumor Ether Lipids by Specific Phospholipase A2 Activation of Liposome-Forming Prodrugs, *Journal of Medicinal Chemistry*, **47**; 1694–1703.
- 82 Ahmad, I., Filep, J. J., Craig Franklin, J., Janoff, A. S., Masters, G. R., Pattassery, J., Peters, A., Schupsky, J. J., Zha, Y., Mayhew, E. (1997) Enhanced Therapeutic Effects of Liposome-associated 1-O-Octadecyl-2-O-methyl-sn-glycero-3-phosphocholine, *Cancer Research*, **57**; 1915–1921.

-
- 83 González-Fernández, Y., Imbuluzqueta, E., Zalacain, M., Mollinedo, F., Patiño-García, A., Blanco-Prieto, M. J. (2017) Doxorubicin and Edelfosine Lipid Nanoparticles are Effective Acting Synergistically against Drug-resistant Osteosarcoma Cancer Cells, *Cancer Letters*, **388**; 262–268.
- 84 Principe, P., Coulomb, H., Broquet, C., Braquet, P. (1992) Evaluation of Combinations of Antineoplastic Ether Phospholipids and Chemotherapeutic Drugs, *Anticancer Drugs*, **3**; 577–587.
- 85 Chen, Q., Tong, S., Dewhirst, M. W., Yuan, F. (2004) Targeting tumor microvessels using doxorubicin encapsulated in a novel thermosensitive liposome, *Molecular Cancer Therapeutics*, **3**; 1311–1317.
- 86 Mayer, L. D., Bally, M. B., Hope, M. J., Cullis, P. R. (1985) Uptake of antineoplastic agents into large unilamellar vesicles in response to a membrane potential, *Biochimica et Biophysica Acta*, **816**; 294-302.
- 87 Mayer, L. D., Tai, L. C. L., Ko, D. S. C., Masin, D., Ginsberg, R. S., Cullis P. R., Bally, M. B. (1989) Influence of vesicle size, lipid composition, and drug-to-lipid ratio on the biological activity of liposomal doxorubicin in mice, *Cancer Research*, **49**; 5922-5930.
- 88 Webber, M. M., Bello, D., Kleinman, H. K., Hoffman, M. P. (1997) Acinar differentiation by non-malignant immortalized human prostatic epithelial cells and its loss by malignant cells, *Carcinogenesis*, **18**; 1225-1231.
- 89 Kaighn, M. E., Narayan, K. S., Ohnuki, Y., Lechner, JF., Jones, L. W. (1979) Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3), *Investigative urology*, **17**; 16-23.
- 90 Biltonen, R. L., Lichtenberg, D. (1993) The use of differential scanning calorimetry as a tool to characterize liposome preparations, *Chemistry and Physics of Lipids*, **64**; 129-142.
- 91 Suurkuusk, J., Lentz, B. R., Barenholz, Y., Biltonen, R. L., Thompson, T. E. (1976) A calorimetric and fluorescent probe study of the gel-liquid crystalline phase transition in small, single-lamellar dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles, *Biochemistry*, **15**; 1393-1401.

-
- 92 Koynova, R., Caffrey, M. (1998) Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1376**; 91-145.
- 93 Mouritsen, O. G., Jørgensen, K. (1994) Dynamical order and disorder in lipid bilayers, *Chemistry and Physics of Lipids*, **73**; 3-25.
- 94 Ortiz, A., Gómez-Fernández, J. C. (1987) A differential scanning calorimetry study of the interaction of free fatty acids with phospholipid membranes, *Chemistry and Physics of Lipids*, **45**; 75-91.
- 95 Ambrosini, A., Bossi, G., Dante, S., Dubini, B., Gobbi, L., Leone, L., Bossi, M. G. P., Zolse, G. (1998) Lipid-drug interaction: thermodynamic and structural effects of antimicrobial fluconazole on DPPC liposomes, *Chemistry and Physics of Lipids*, **95**; 37-47.
- 96 Eleftheriou, K., Sideratou, Z., Thanassoulas, A., Papakyriakou, A., Tsiourvas, D. (2016) Comparative Experimental and Computational Study of Monoalkyl Chain Phosphatidylcholine-Containing Thermoresponsive Liposomes, *The Journal of Physical Chemistry B*, **120(24)**; 5417-5428.
- 97 Needham, D., Anyarambhatla, G., Kong, G., Dewhirst, M. W. (2000) A new temperature-sensitive liposome for use with mild hyperthermia: characterization and testing in a human tumor xenograft model, *Cancer Research*, **60**; 1197-1201.
- 98 Tagami, T., Ernsting, M. J, Li, S.-D. (2011) Efficient tumor regression by a single and low dose treatment with a novel and enhanced formulation of thermosensitive liposomal doxorubicin, *Journal of Controlled Release*, **152**; 303-309.
- 99 Hossann, M., Wiggenhorn, M., Schwerdt, A., Wachholz, K., Teichert, N., Eibl, H., Issels, R. D., Lindner, L. H. (2007) In vitro stability and content release properties of phosphatidylglycerol containing thermosensitive liposomes, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1768**; 2491-2499.
- 100 Sandström, M. C., Ickenstein, L. M., Mayer, L. D., Edwards, K. (2005) Effects of lipid segregation and lysolipid dissociation on drug release from thermosensitive liposomes, *Journal of Controlled Release*, **107**; 131-142.
- 101 Bratton, D. L., Harris, R. A., Clay, K., Henson, P. M. (1988) Effects of platelet activating factor and related lipids on phase transition of dipalmitoylphosphatidylcholine, *Biochimica et Biophysica Acta*, **941**; 76-82.

-
- 102 Tagami, T., Ernsting, M. J., Li, S.-D. (2011) Efficient tumor regression by a single and low dose treatment with a novel and enhanced formulation of thermosensitive liposomal doxorubicin, *Journal of Controlled Release*, **152**; 303-309.
- 103 Li, X., Hirsh, D. J., Cabral-Lilly, D., Zirkel, A., Gruner, S. M., Janoff, A., Perkins, S. (1998) Doxorubicin physical state in solution and inside liposomes loaded via a pH gradient, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1415**; 23-40.
- 104 Gaber, M. H., Ghannam, M. M., Ali, S. A., Khalil, W. A. (1998) Interaction of Doxorubicin with phospholipid monolayer and liposomes, *Biophysical Chemistry*, **70**; 223–229.
- 105 Silvander, M., Hansson, P., Edwards, K. (2000) Liposomal Surface Potential and Bilayer Packing As Affected by PEG-Lipid Inclusion, *Langmuir*, **16**; 3696-3702.
- 106 Woodle, M. C., Collins, L. R., Sponsler, E., Kossovsky, N., Papahadjopoulos, D., Martin, F. J. (1992) Sterically stabilized liposomes. Reduction in electrophoretic mobility but not electrostatic surface potential, *Biophysical Journal*, **61**; 902-910.
- 107 McDaniel, R. V., McLaughlin, A., Winiski, A. P., Eisenberg, M., McLaughlin, S. (1984) Bilayer membranes containing the ganglioside GM1: models for electrostatic potentials adjacent to biological membranes, *Biochemistry*, **23**; 4618-4624.
- 108 Dou, Y., Hynynen, K., Allen, C. (2017) To heat or not to heat: Challenges with clinical translation of thermosensitive liposomes, *Journal of Controlled Release*, **249**; 63–73.
- 109 Needham, D., Dewhirst, M. W. (2001) The development and testing of a new temperature-sensitive drug delivery system for the treatment of solid tumors, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **53**; 285-305.
- 110 Tagami, T. M., Ernsting, M. J., Li, S.-D. (2011) Efficient tumor regression by a single and low dose treatment with a novel and enhanced formulation of thermosensitive liposomal doxorubicin, *Journal of Controlled Release*, **152**; 303-309.
- 111 Lindner, L. H., Hossann, M., Vogeser, M., Teichert, N., Wachholz, K., Eibl, H., Hiddemann, W. Issels, R. D. (2008) Dual role of hexadecylphosphocholinemiltefosinein thermosensitive liposomes: Active ingredient and mediator of drug release, *Journal of Controlled Release*, **125**; 112-120.

-
- 112 Kotting, J., Marschner, N. W., Neumuller, W., Unger, C., Eibl, H. (1992) Hexadecylphosphocholine and octadecyl-methyl-glycero-3-phosphocholine: A comparison of hemolytic activity, serum binding and tissue distribution, *Tumor Research*, **34**; 131–142.
- 113 Hosokawa, T., Sami, M., Kato, Y., Hayakawa, E. (2003) Alteration in the temperature-dependent content release property of thermosensitive liposomes in plasma, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **51**; 1227–1232.
- 114 Chen C., He, C.-Q., Lin, A.-H., Gu, W., Chen, Z.-P., Li, W., Cai, B.-C. (2014) Thermosensitive liposomes with higher phase transition temperature for targeted drug delivery to tumor, *International Journal of Pharmaceutics*, **475**; 408–415.
- 115 Tejera-Garcia, R., Parkkila, P., Zamotin, V., Kinnunen, P. K. J. (2014) Principles of rational design of thermally targeted liposomes for local drug delivery, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, **10**; 1243-1252.
- 116 de Smet, M., Langereis, S., van den Bosch, S., Grüll, H. (2010) Temperature-sensitive liposomes for doxorubicin delivery under MRI guidance, *Journal of Controlled Release*, **143**; 120–127.
- 117 O’Flaherty, D. K., Kamat, N. P., Mirza, F. N., Li, L., Prywes, N., Szostak, J. W. (2018) Copying of mixed-sequence rna templates inside model protocells, *Journal of the American Chemical Society*, **140**; 5171–5178.
- 118 Adamala, K., Szostak, J. W. (2013) Nonenzymatic template-directed RNA synthesis inside model protocells, *Science*, vol. **342**; 1089-1900.
- 119 Ou, H. D., Phan, S., Deerinck, T. J., Thor, A., Ellisman, M. HO’Shea., C. C. (2017) ChromEMT: Visualizing 3D chromatin structure and compaction in interphase and mitotic, *Science* **1173**, 357-370.
- 120 David-Beabes, G. L., Overman, M. J., Petrofski, J. A., Campbell, P. A., De Marzo, A. M., Nelson, W. G. (2000) Doxorubicin-resistant variants of human prostate cancer cell lines DU 145, PC-3, PPC-1, and TSU-PR1: Characterization of biochemical determinants of antineoplastic drug sensitivity, *Journal of Oncology*, **17**; 1077–1086.

-
- 121 Fale, P. L., Altharawi, A., Chan, K. L. A. (2015) In situ Fourier transform infrared analysis of live cells' response to doxorubicin, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, **1853**; 2640–2648.
- 122 Peters, J. A. C., Ahmad, I., Janoff, A. S., Pushkareva, M. Y., Mayhew, E. (1997) Growth inhibitory effects of liposome-associated 1-O-octadecyl-2-O-methyl-sn-glycero-3-phosphocholine, *Lipids*, **32(10)**; 1045-1054.
- 123 Laginha, K. M., Verwoert, S., Charrois, G. J. R., Allen, T. M. (2005) Determination of doxorubicin levels in whole tumor and tumor nuclei in murine breast cancer tumors, *Clinical Cancer Research*, **11**; 6944-6949.
- 124 Eleftheriou K., Kaminari A., Panagiotaki K. N., Sideratou Z., Zachariadis M., Anastassopoulou J., Tsiourvas D. (2020) A combination drug delivery system employing thermosensitive liposomes for enhanced cell penetration and improved in vitro efficacy, *International Journal of Pharmacy*, **574**; 118912.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΩΝ

Δημοσιεύσεις σε διεθνή περιοδικά με κριτές:

1. Eleftheriou K., Sideratou Z., Thanassoulas A., Papakyriakou A., Tsiourvas D. (2016). Comparative experimental and computational study of monoalkyl chain phosphatidylcholine-containing thermoresponsive liposomes, *J. Phys. Chem. B*, **120**; 5417-5428.
2. Eleftheriou K., Kaminari A., Panagiotaki K. N., Sideratou Z., Zachariadis M., Anastassopoulou J., Tsiourvas D. (2020). A combination drug delivery system employing thermosensitive liposomes for enhanced cell penetration and improved in vitro efficacy, *Int. J. Pharmaceutics*, **574**; 118912.

Ανακοινώσεις σε διεθνή συνέδρια:

1. Eleftheriou K., Panagiotaki K. N., Sideratou Z., Tsiourvas D. Novel thermosensitive doxorubicin-loaded phosphatidylcholine-based long-circulating thermosensitive liposomes with improved in vitro efficacy. 28th Annual Conference of the European Society for Biomaterials (ESB 2017), 4-8 September 2017, Athens, Greece.
2. Eleftheriou K., Hatziantoniou S., Demetzos C., Interaction of the flavonoid quercetin with model lipid membranes assessed by DSC. 8th Mediterranean Conference on Calorimetry and Thermal Analysis (MEDICTA2007), September 25th-29th, 2007, Palermo, Italy.

Ανακοινώσεις σε ελληνικά συνέδρια:

Κ. Ελευθερίου, Ζ. Σιδεράτου, Δ. Τσιούρβας, Σχεδιασμός, ανάπτυξη και μελέτη νέων θερμοευαίσθητων λιποσωμάτων, 8η Δημερίδα Ελληνικής Εταιρείας Βιοϋλικών (ΕΕΒ), 15-16 Νοεμβρίου 2013, Αθήνα.

Βραβεία

1^ο βραβείο αναρτημένης ανακοίνωσης (poster):Κ. Ελευθερίου, Σχεδιασμός, ανάπτυξη και μελέτη νέων θερμοευαίσθητων λιποσωμάτων, 8η Δημερίδα Ελληνικής Εταιρείας Βιοϋλικών (ΕΕΒ), 15-16 Νοεμβρίου 2013, Αθήνα.