



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
Τομέας (I) Χημικών Επιστημών
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Διπλωματική εργασία

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΔΙΕΡΓΑΣΙΑΣ ΕΓΚΛΩΒΙΣΜΟΥ
ΝΕΩΝ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ
ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ
ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΕΣΤΕΡΑΣΗ ΣΕ
ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΣΤΕΡΕΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ**

**Ευφροσύνη
Καραπαναγιώτη**

Επιβλέπουσα: Αναστασία Δέτση, Καθηγήτρια ΕΜΠ

Αθήνα, 2024

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, κατά το ακαδημαϊκό έτος 2022-2023, υπό την επίβλεψη της Δρ. Αναστασίας Δέτση, Καθηγήτριας Ε.Μ.Π..

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Αναστασία Δέτση για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα, που συνδυάζει τα πεδία της Οργανικής Σύνθεσης και της Φαρμακευτικής Χημείας. Η πολύτιμη βοήθειά της, οι συμβουλές, οι διορθώσεις και η καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας υπήρξαν καταλυτικός παράγοντας για την επιτυχή ολοκλήρωσή της.

Ευχαριστώ, ακόμα, τον Δρ. Κυριάκο Προυσή, Ερευνητή Β' στο Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, για την ευγενική παροχή ποσότητας του ενός από τα δύο βιοδραστικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην υποψήφια διδάκτορα στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας Ε.Μ.Π., Βασιλική Κακοκέφαλου, για τη συνεχή στήριξή της, τις συμβουλές της, το χρόνο που αφιέρωσε στο εργαστήριο πάνω στη μελέτη αυτή, καθώς και για την άψογη συνεργασία μας, που συνέβαλαν καθοριστικά στην ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω θερμά τη διδάκτορα στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας Ε.Μ.Π., Αννίτα Κατωπόδη, για τη συνεχή υποστήριξή της, την άψογη συνεργασία μας και τη σημαντική συμβολή της στη μεταλαμπάδευση πρακτικών και θεωρητικών γνώσεων πάνω στο εγχείρημα αυτό.

Ένα ακόμα ευχαριστώ οφείλω στον υποψήφιο διδάκτορα στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας Ε.Μ.Π., Αλέξανδρο Καλοσπύρο, για την ευγενική παροχή ποσότητας του δεύτερου βιοδραστικού μορίου κουμαρίνης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, αλλά και για την πολύτιμη βοήθειά του στο εργαστήριο.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής για το χρόνο που διέθεσαν για την κριτική ανάγνωση της εργασίας μου, αλλά και για τις πολύτιμες υποδείξεις τους.

Δεν θα ήθελα να παραλείψω να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Οργανικής Χημείας Ε.Μ.Π., που υπήρξαν πάντα πρόθυμα να προσφέρουν τη βοήθειά τους και να απαντήσουν σε οποιαδήποτε απορία μου, καθώς και για το ευχάριστο κλίμα που υπήρχε στο εργαστήριο και διευκόλυνε την πραγματοποίηση των πειραμάτων.

Τέλος, είμαι ευγνώμων για τη συνεχή στήριξη και συμπαράσταση της οικογένειας και των φίλων μου κατά την περίοδο εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας, αλλά και καθ' όλη τη διάρκεια της φοίτησής μου στη σχολή.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

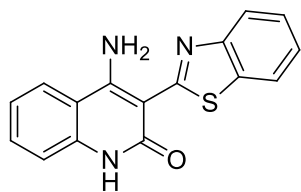
Οι κουμαρίνες αποτελούν ετεροκυκλικές ενώσεις της οικογένειας των βενζοπυρονών και περιέχουν στο μόριό τους τη χαρακτηριστική δομή 1-βενζοπυραν-2-όνη. Απαντώνται στη φύση σε ελεύθερη μορφή σε πολλά είδη φυτών και σε αιθέρια έλαια. Οι κινολινόνες από την άλλη, είναι ετεροκυκλικές αρωματικές ενώσεις αζώτου. Και οι δύο αυτές οικογένειες ενώσεων, λόγω της δομής τους, εμφανίζουν πολλές δράσεις, όπως αντιφλεγμονώδη, αντιμικροβιακή, αντιοξειδωτική, ακόμα και αντικαρκινική, αποτελώντας ιδανικές πύοδρομες ενώσεις για τη σύνθεση νέων βιοδραστικών μορίων με πιθανή φαρμακευτική χρήση.

Στην επίτευξη επιθυμητών φαρμακευτικών ιδιοτήτων, καθώς και στη βελτίωσή τους, μεγάλη εφαρμογή βρίσκει το πεδίο της νανοτεχνολογίας με την ανάπτυξη νέων δομών σε επίπεδο νανοκλίμακας. Τα νανοσωματίδια με το μέγεθος και τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας που διαθέτουν επιδέχονται τροποποίησης, που τα καθιστά ιδανικά για τη στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων. Ειδικότερα, η κατηγορία των στερεών λιπιδικών νανοσωματιδίων (SLNs) έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα ελκυστική για τη στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων, έχοντας τη δυνατότητα να διαπεράσουν ακόμα και τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, βρίσκοντας έτσι εφαρμογή στην αντιμετώπιση των νευροεκφυλιστικών ασθενειών, όπως η νόσος του Alzheimer.

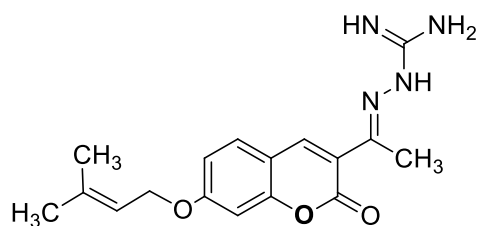
Μία από τις κυριότερες προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση της νόσου του Alzheimer αποτελεί η αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE), ένζυμο της οικογένειας των α/β υδρολασών, που καταλύει την υδρόλυση της ακετυλοχολίνης. Με τη δράση της αυτή τερματίζει τη μετάδοση παλμών στις χολινεργικές συνάψεις, σταματώντας τη νευροδιαβίβαση. Η αναστολή του ενζύμου αυξάνει την ποσότητα της ακετυλοχολίνης και τη δράση του νευροδιαβιβαστή. Για την αποτελεσματική λειτουργία του αναστολέα είναι απαραίτητο αυτός να φτάσει στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα. Έτσι, ο εγκλωβισμός των πιθανών αναστολέων της ακετυλοχολινεστεράσης σε νανοσωματίδια θα μπορούσε να αποτελέσει τη λύση, για να ξεπεραστεί το εμπόδιο του αιματοεγκεφαλικού φραγμού.

Σκοπό της παρούσας εργασίας αποτέλεσε ο εγκλωβισμός ενός κινολινονικού **(1)** και ενός κουμαρινικού αναλόγου **(8)** σε νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων, η δομή των οποίων φαίνεται παρακάτω. Τα νανοσωματίδια παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης με εξάτμιση του οργανικού διαλύτη σε συνδυασμό με υπερήχους, με δοκιμή διαφορετικών αναλογιών των συστατικών. Ακολούθησε χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων ως προς την απόδοση του εγκλωβισμού, το δείκτη πολυδιασποράς και το μέγεθος με τη μέθοδο Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS), καθώς και ως προς το ζ-δυναμικό τους με ηλεκτροφόρηση. Τα νανοσωματίδια της ένωσης **(1)** εμφάνισαν απόδοση εγκλωβισμού 67%, μέση υδροδυναμική διάμετρο 255.6 nm, καλή ομοιομορφία με PDI 0.272 και αρκετά σταθερή διασπορά με ζ-δυναμικό -24.4 mV. Στην

περίπτωση των νανοσωματιδίων της ένωσης **(8)**, επιτεύχθηκαν απόδοση εγκλωβισμού 96%, μέση υδροδυναμική διάμετρος 375.0 nm, μέτρια ομοιομορφία με PDI 0.529 και εξαιρετικά σταθερή διασπορά με ζ-δυναμικό -35.5 mV.



(1)



(8)

Δομές τις κινολινόνης (1) και της κουμαρίνης (8)

Ακόμα, πραγματοποιήθηκε μελέτη αποδέσμευσης της ένωσης **(8)**, τόσο από λυοφιλοποιημένα νανοσωματίδια, όσο και από υδατική διασπορά νανοσωματιδίων, σε διαφορετικές συνθήκες pH και στους 37°C. Η αποδέσμευση ήταν γρηγορότερη στην περίπτωση των λυοφιλοποιημένων νανοσωματιδίων, ενώ δεν φάνηκε να επηρεάστηκε σημαντικά από τις συνθήκες pH (7.4 ή 1.2) και από την παρουσία ενζύμου στο ρυθμιστικό διάλυμα. Σε κάθε περίπτωση, η μαθηματική μοντελοποίηση υπέδειξε ως βέλτιστο το κινητικό μοντέλο Higuchi.

Τέλος, οι δύο ενώσεις μελετήθηκαν ως προς την ικανότητα αναστολής της δράσης της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) και της βουτυρυλοχολινεστεράσης (BuChE) με την τροποποιημένη μέθοδο Ellman, τόσο σε ελεύθερη όσο και εγκλωβισμένη μορφή. Και οι δύο ενώσεις αποτελούν ικανούς αναστολείς και των δύο ενζύμων, με τα SLNs της ένωσης **(1)** να παρουσιάζουν ελαφρώς βελτιωμένη δράση ($IC_{50}=19.9 \mu M$) σε σχέση με την ένωση σε ελεύθερη μορφή ($IC_{50}=23.4 \mu M$) ως προς την αναστολή της BuChE.

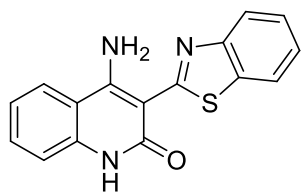
ABSTRACT

Coumarins are heterocyclic compounds, members of the benzopyrone family, containing the 1-benzopyran-2-one unit. They can be found in nature in several plants and essential oils. Quinolinones, on the other hand, are heterocyclic, aromatic compounds that contain nitrogen. Due to their chemical structure, they have been reported to have multiple biological properties, such as anticoagulant, antimicrobial, antioxidant, even anticancer activity, being ideal scaffolds for the design and synthesis of new bioactive compounds with possible pharmaceutical applications.

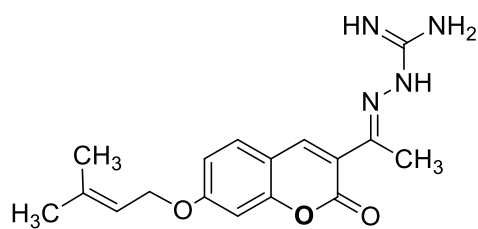
Nanotechnology is the scientific field that takes interest in achieving desirable pharmaceutical properties and improving them, by developing new structures at a nanoscale level. Nanoparticles' size and surface characteristics allows them to be modified so that they can be used in targeted drug delivery. More specifically, the category of solid lipid nanoparticles (SLNs) has proven to be particularly popular targeted drug delivery systems, as they have shown the ability to even penetrate the blood-brain barrier, making it possible to treat neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease.

One of the main approaches for the treatment of Alzheimer's disease is the inhibition of acetylcholinesterase (AChE) an enzyme of the α/β hydrolase family, that catalyzes acetylcholine's hydrolysis. Throughout this action, the pulse transmission in cholinergic synapses is terminated, ending the neurotransmission. Acetylcholinesterase's inhibition increases the amount of acetylcholine and thus the neurotransmitter's action. In order for the inhibitor to be effective, it is necessary to reach the Central and Peripheral Nervous System. Therefore, the encapsulation of acetylcholinesterase's potential inhibitors could be a solution to overcome the blood-brain barrier.

The aim of this diploma thesis was the encapsulation of a coumarin (**8**) and a quinolinone (**1**) compound in solid lipid nanoparticles, the molecular structure of which is shown below. The nanoparticles were prepared by the solvent emulsification-evaporation method combined with ultrasonication, after testing different mass ratios of the components. Then, the nanoparticles were evaluated for their encapsulation efficiency, polydispersity index, size and z-potential using the Dynamic Light Scattering method (DLS). SLNs of compound (**1**) presented a 67% encapsulation efficiency with a size of 255.6 nm, a PDI of 0.272 and a z-potential of -24.4 mV, which indicate a stable aqueous dispersion with good homogeneity. SLNs of compound (**8**) presented a 96% encapsulation efficiency with a size of 375.0 nm, a PDI of 0.529 and a z-potential of -35.5 mV, suggesting a very stable dispersion with moderate homogeneity.



(1)



(8)

Quinolinone compound (1) and coumarin compound (8)

Furthermore, a release study of compound **(8)** from the SLNs was carried out, both from the lyophilized nanoparticles and the aqueous dispersion, in different pH conditions and at 37°C. The release was faster in the case of the lyophilized nanoparticles, while it did not appear to be significantly affected by the different pH conditions (7.4 or 1.2) or by the presence of an enzyme in the buffer. In each case, the kinetic modeling indicated the Higuchi kinetic model as optimal.

Finally, the two compounds were evaluated for their ability to inhibit the activity of acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) using the modified Ellman method, both in free and encapsulated form. Both compounds are good inhibitors of both enzymes, with compound **(1)** SLNs showing slightly improved activity ($IC_{50}=19.9 \mu\text{M}$) in comparison to the free compound ($IC_{50}=23.4 \mu\text{M}$) when it comes to BuChE inhibition.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ABSTRACT	5
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	7
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	10
1. Κουμαρίνες	10
1.1. Δομή και προέλευση	10
1.2. Σύνθεση	13
1.3. Ιδιότητες και βιοδραστικότητα.....	17
1.3.1. Αντιφλεγμονώδης δράση	17
1.3.2. Αντιμικροβιακή-Αντιβακτηριακή-Αντιϊική δράση	18
1.3.3. Αντιοξειδωτική δράση.....	19
1.3.4. Αντικαρκινική δράση.....	20
1.3.5. Αντιπηκτική δράση.....	21
1.4. Εφαρμογές.....	22
2. Κινολινόνες.....	23
2.1. Δομή και προέλευση	23
2.2. Σύνθεση	24
2.3. Ιδιότητες και βιοδραστικότητα.....	26
3. Νανοσυστήματα μεταφοράς φαρμάκων.....	28
3.1. Εισαγωγή.....	28
3.2 Πλεονεκτήματα και εφαρμογές.....	28
3.3. Είδη νανοσυστημάτων	30
3.3.1. Δενδριμερή	30
3.3.2. Στερεά πολυμερικά νανοσωματίδια	30
3.3.3. Ανόργανα νανοσωματίδια	31
3.3.4. Μικύλλια.....	31
3.3.5. Λιποσώματα και κυστίδια επιφανειοδραστικών ουσιών	32
3.3.6. Στερεά λιπιδικά νανοσωματίδια	33
4. Νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων	34
4.1. Εισαγωγή.....	34
4.2. Μέθοδοι παρασκευής	35
4.3. Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων	39

4.4. Εφαρμογές.....	42
5. Ακετυλοχολινεστεράση και Alzheimer	44
5.1. Ακετυλοχολινεστεράση (AChE)	44
5.2. Νόσος Alzheimer.....	47
5.3. Αναστολή ακετυλοχολινεστεράσης.....	49
6. Αποδέσμευση βιοδραστικών ενώσεων από νανοφορείς	53
7. Τεχνικές υψηλής ενέργειας	57
7.1. Υπέρηχοι (Ultrasound)	57
8. Μέθοδοι ταυτοποίησης	60
8.1. Φασματοφωτομετρία ορατού υπεριώδους UV-Vis	60
8.2. Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS).....	62
8.3. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR).....	65
9. Αξιολόγηση ικανότητας αναστολής της AChE	67
ΣΚΟΠΟΣ	68
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	69
1. Όργανα και συσκευές.....	69
2. Συνθετική πορεία ένωσης ((<i>E</i>)-2(1-(7-((3-μεθυλοβουτ-2-εν-1-υλ)οξυ)-2-οξο-2 <i>H</i> - χρωμεν-3-υλ)αιθυλιδεν)-υδραζινοκαρβοξυμιδαμίδιο) (8).....	71
3. Σύνθεση νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων (Solid Lipid Nanoparticles, SLNs) και εγκλωβισμός βιοδραστικής ένωσης	75
3.1. Απομόνωση και καθαρισμός τριμυριστίνης.....	75
3.2. Σύνθεση κενών νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων (Blank SLNs)	75
3.3. Εγκλωβισμός βιοδραστικής ένωσης σε Νανοσωματίδια Στερεών Λιπιδίων (SLNs)	76
4. Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων	77
4.1. Απόδοση διεργασίας.....	77
4.2. Απόδοση εγκλωβισμού	77
4.3. Προσδιορισμός μεγέθους, δείκτη πολυδιασποράς (PDI), ζ-δυναμικού και σταθερότητας	79
4.4. Μελέτη δομής μέσω Υπέρυθρης Φασματοφωτομετρίας (FT-IR).....	79
4.5. Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διερχόμενης Δέσμης (TEM).....	80
5. Μελέτη αποδέσμευσης	80
5.1. Αποδέσμευση από λυοφιλοποιημένη διασπορά SLNs.....	80
5.2. Αποδέσμευση από υδατική διασπορά νανοσωματιδίων	81
6. Μελέτη της ικανότητας των ενώσεων να αναστέλλουν τη δράση της ακετυλοχολινεστεράσης και της βουτυρυλοχολινεστεράσης	81
6.1. Αναστολή AChE.....	82

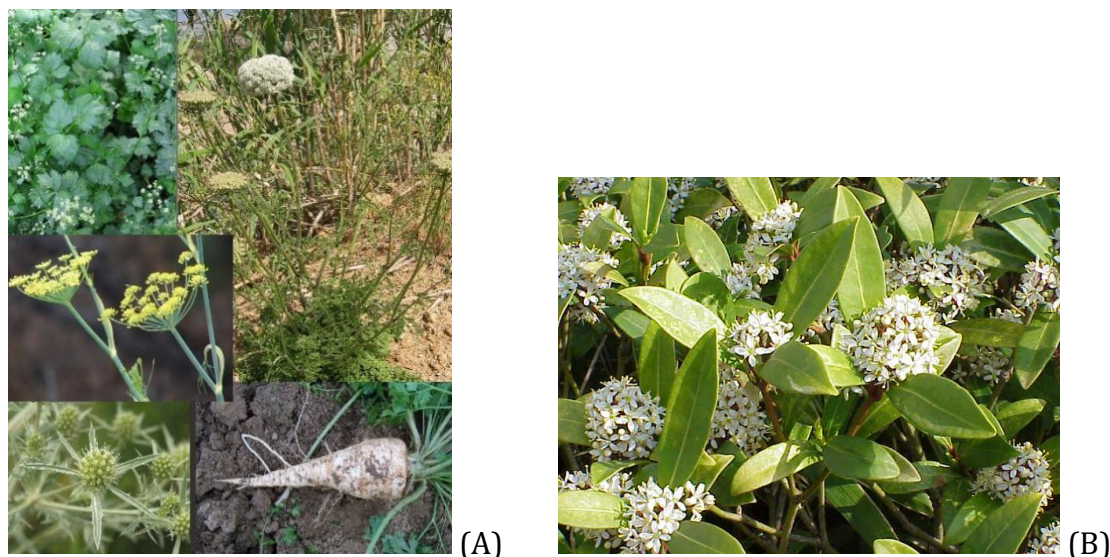
6.2. Αναστολή BuChE.....	83
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	84
1. Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης ((<i>E</i>)-2(1-(7-((3-μεθυλοβουτ-2-εν-1-υλ)οξυ)-2-οξο-2 <i>H</i> -χρωμεν-3-υλ)αιθυλιδεν)-υδραζινοκαρβοξυμιδαμίδιο) (8).....	84
1.1. Ανάλυση φάσματος ¹ H NMR.....	84
2. Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων.....	85
2.1. Απόδοση διεργασίας, απόδοση εγκλωβισμού, μέγεθος, δείκτης πολυδιασποράς (PDI) και ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων.....	85
2.3. Μελέτη σταθερότητας μεγέθους, δείκτη πολυδιασποράς (PDI) και ζ-δυναμικού των νανοσωματιδίων.....	88
2.4. Μελέτη TEM.....	89
2.5. Ανάλυση FT-IR.....	90
3. Μελέτη αποδέσμευσης της ένωσης (8) από τα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων.....	92
3.1. Μελέτη αποδέσμευσης από τα λυοφιλοποιημένα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων.....	93
3.2. Μελέτη αποδέσμευσης από υδατική διασπορά νανοσωματιδίων μέσω μεμβράνης διαπίδυσης.....	95
4. Μελέτη δράσης των βιοδραστικών ενώσεων εγκλωβισμένων σε SLNs ως αναστολείς των ενζύμων AChE και BuChE.....	99
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	101
ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ.....	103
ΠΗΓΕΣ.....	104
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι-ΠΙΝΑΚΕΣ.....	109
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ-ΦΑΣΜΑΤΑ ¹ H NMR.....	110

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

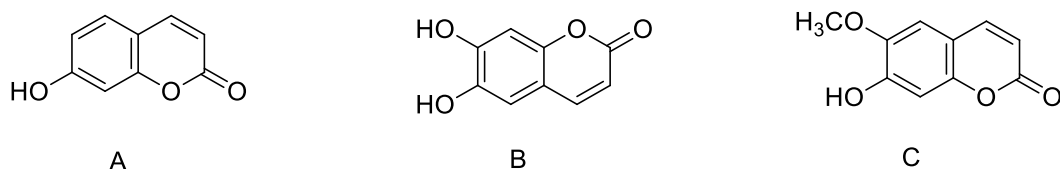
1. Κουμαρίνες

1.1. Δομή και προέλευση

Οι κουμαρίνες είναι ετεροκυκλικές ενώσεις, οι οποίες ανήκουν στην οικογένεια των βενζοπυρονών.^[1] Απομονώθηκαν για πρώτη φορά από τον Vogel το 19^ο αιώνα από σπόρους τόνκα, καθώς και από άνθη γλυκού κίτρινου τριφυλλιού (*melilotus officinalis*). Μάλιστα, το πρώτο μόριο κουμαρίνης πήρε την ονομασία του από τη γαλλική ονομασία *coumarou* των σπόρων τόνκα.^[2] Γενικά, οι κουμαρίνες απαντώνται στη φύση σε πολλά είδη φυτών, όπως στις οικογένειες *Rutaceae* και *Umbelliferae* (εικόνα 1), και σε αιθέρια έλαια, όπως έλαια κανέλας και λεβάντας.^[1,3] Οι πιο διαδεδομένες κουμαρίνες στη φύση είναι η 7-υδροξυ-κουμαρίνη, η 6,7-διυδροξυ-κουμαρίνη και η 7-υδροξυ-6-μεθοξυ-κουμαρίνη, οι οποίες απεικονίζονται στο σχήμα 1.^[1]



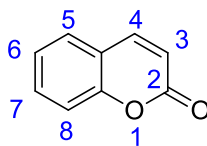
Εικόνα 1. Οικογένεια φυτών *Umbelliferae* (A) και *Rutaceae* (B)



Σχήμα 1. (A) 7-υδροξυ-κουμαρίνη (B) 6,7-διυδροξυ-κουμαρίνη (C) 7-υδροξυ-6-μεθοξυ-κουμαρίνη

Οι κουμαρίνες αποτελούν μια μεγάλη ομάδα χημικών ενώσεων που περιέχουν στο μόριό τους τη χαρακτηριστική δομή 1-βενζοπυραν-2-όνη, γνωστή κατά IUPAC και ως 2H-χρωμεν-2-όνη. Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στο σχήμα 2, η

δομή αυτή προκύπτει από τη συμπύκνωση ενός βενζολικού δακτυλίου με μία α-πυρόνη.^[2,3]



Σχήμα 2. Χαρακτηριστική δομή κουμαρίνης

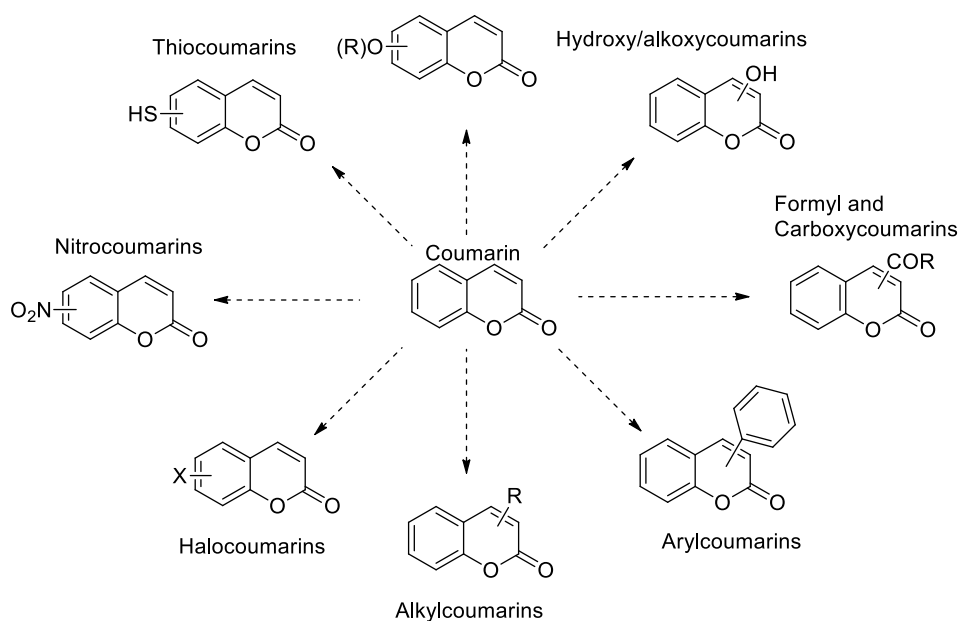
Πιο συγκεκριμένα, η δομή μιας κουμαρίνης περιλαμβάνει ένα σύστημα δύο βενζολικών δακτυλίων, που αποτελείται από μια βενζολική ομάδα συμπυκνωμένη με ένα δακτύλιο πυρόνης, με συνολικά 6 περιφερικές θέσεις δεσμών C-H, έναν διπλό δεσμό C=O και έναν άκαμπτο διπλό δεσμό C=C. Αυτός ο άκαμπτος διπλός δεσμός δίνει στο μόριο τη δυνατότητα να διατηρεί διαμόρφωση *cis* αποφεύγοντας τη μετατροπή του σε *trans*.^[2]

Η χαρακτηριστική δομή της κουμαρίνης είναι κατά κύριο λόγο αδιάλυτη στο νερό. Ωστόσο, η 4-υδροξυ υποκατάστασή της δίνει ασθενείς όξινη ιδιότητες. Συνεπώς, υπό αλκαλικές συνθήκες, το μόριο γίνεται διαλυτό στο νερό.^[1]

Υπάρχουν 4 κύριες υποομάδες στις οποίες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν οι κουμαρίνες:^[3]

- Απλές κουμαρίνες

Οι ενώσεις αυτές είναι τα υδροξυλιωμένα, αλκοξυλιωμένα ή και αλκυλιωμένα παράγωγα της μητρικής ένωσης κουμαρίνης, καθώς και οι γλυκοζίτες τους, όπως φαίνονται στο σχήμα 3.^[3,4]

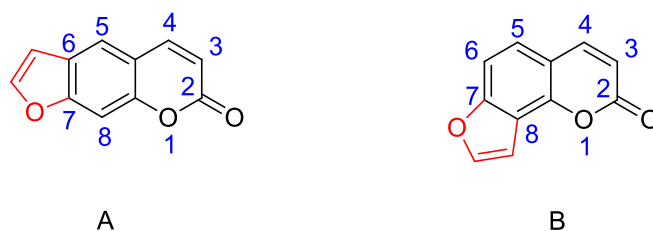


Σχήμα 3. Μητρική ένωση κουμαρίνης προς το σχηματισμό απλών κουμαρινών

Οι απλές κουμαρίνες έχουν προκαλέσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, λόγω των ποικίλων βιολογικών τους ιδιοτήτων, όπως για παράδειγμα η αντικαρκινική, η αντιπηκτική και η αντιφλεγμονώδης δράση τους, καθώς και η δράση τους κατά του ιού HIV.^[4]

- *Φουρανοκουμαρίνες*

Οι κουμαρίνες αυτής της κατηγορίας αποτελούνται από ένα φουρανικό δακτύλιο, ο οποίος είναι συνδεδεμένος με το βενζολικό δακτύλιο της μητρικής ένωσης της κουμαρίνης. Ανάλογα με τη θέση του φουρανικού δακτυλίου, τα παράγωγα αυτά της κουμαρίνης διακρίνονται σε γραμμικού τύπου (ψωραλένιο) και γωνιακού τύπου (αγγελικίνη), όπως φαίνονται στο σχήμα 4.^[5]

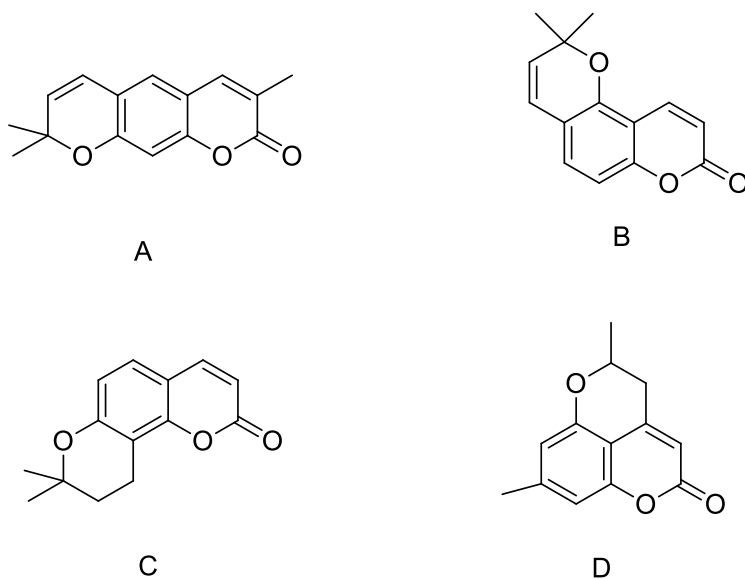


Σχήμα 4. Γενικές δομές γραμμικού (A) και γωνιακού (B) τύπου φουρανοκουμαρινών

Γενικά, στη φύση απαντώνται περισσότερο φουρανοκουμαρίνες γραμμικού τύπου. Ωστόσο, και τα δύο είδη μπορούν να δώσουν πολλά παράγωγα με την υποκατάσταση του υδρογόνου της κουμαρίνης με μία αλκοξυ- ή υδροξυλομάδα. Ανάλογα με τη θέση, το είδος και τον αριθμό των υποκαταστατών, επηρεάζονται και οι φυσικοχημικές ιδιότητες των μορίων.^[5]

- *Πυρανοκουμαρίνες*

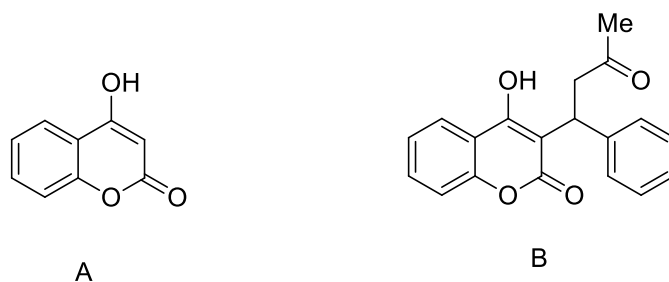
Σε αυτή την κατηγορία εντάσσονται οι κουμαρίνες που περιλαμβάνουν στο μόριό τους έναν εξαμελή δακτύλιο (πυρανικό).^[3] Οι πυρανοκουμαρίνες διακρίνονται σε γραμμικές, γωνιακές ή συμπυκνωμένες, ανάλογα με τον τρόπο που σχηματίζεται ο πυρανικός δακτύλιος. Μερικά παραδείγματα απεικονίζονται στο σχήμα 5.^[6]



Σχήμα 5. Ομάδες πυρανοκουμαρινών: (A) γραμμική, (B) 5,6-γωνιακή, (C) 6,7-γωνιακή, (D) συμπυκνωμένη

- Κουμαρίνες υποκατεστημένες στον πυρανικό δακτύλιο

Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει τις κουμαρίνες, στις οποίες έχει υποκατασταθεί ο πυρανικός δακτύλιος στις θέσεις 3- ή και 4-. Μερικά παραδείγματα τέτοιων κουμαρινών είναι η 4-υδροξυ-κουμαρίνη και η βαρφαρίνη, οι οποίες φαίνονται στο σχήμα 6.^[1]



Σχήμα 6. 4-υδροξυ-κουμαρίνη (A), βαρφαρίνη (B)

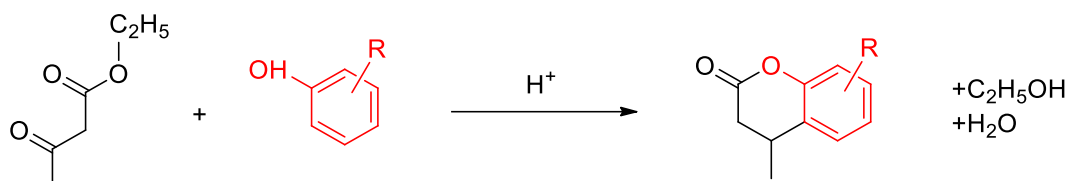
1.2. Σύνθεση

Οι κουμαρίνες, καθώς και τα παράγωγά τους, παρουσιάζουν μεγάλο φαρμακευτικό και ιατρικό ενδιαφέρον, εξαιτίας του μεγάλου εύρους των ιδιοτήτων και των βιολογικών δράσεων που εμφανίζουν. Συμμετέχουν σε μεγάλο βαθμό στην παραγωγή νέων φαρμάκων και θεραπειών. Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι για τη σύνθεσή τους.

1. Μέθοδος Pechmann

Η μέθοδος Pechmann αφορά τη συμπύκνωση φαινολών με β-κετοεστέρες παρουσία ενός όξινου καταλύτη, προς το σχηματισμό κουμαρινών

υποκατεστημένων στη θέση 4.^[7,8,9] Ως παραπροϊόντα παράγονται αιθανόλη και νερό, όπως φαίνεται και στο σχήμα 7.^[10]

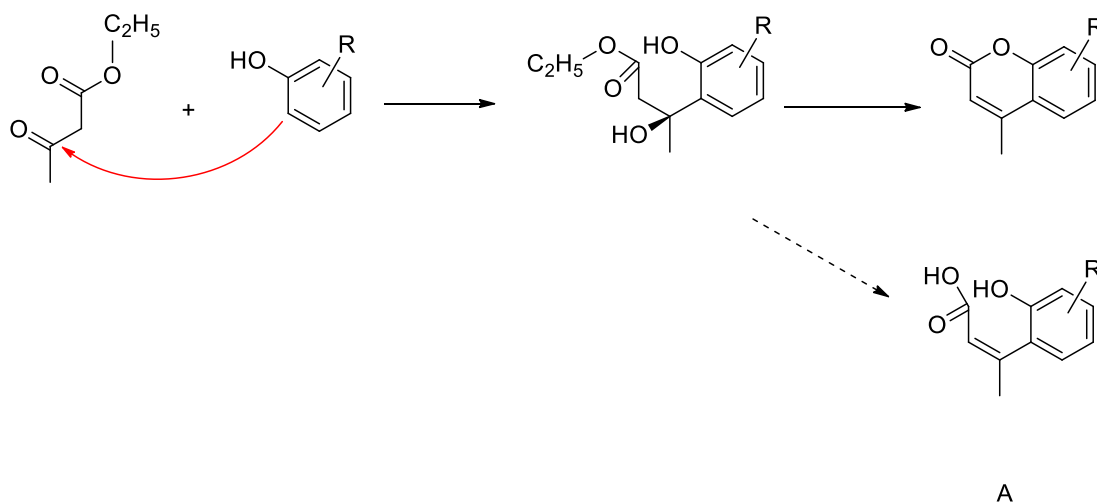


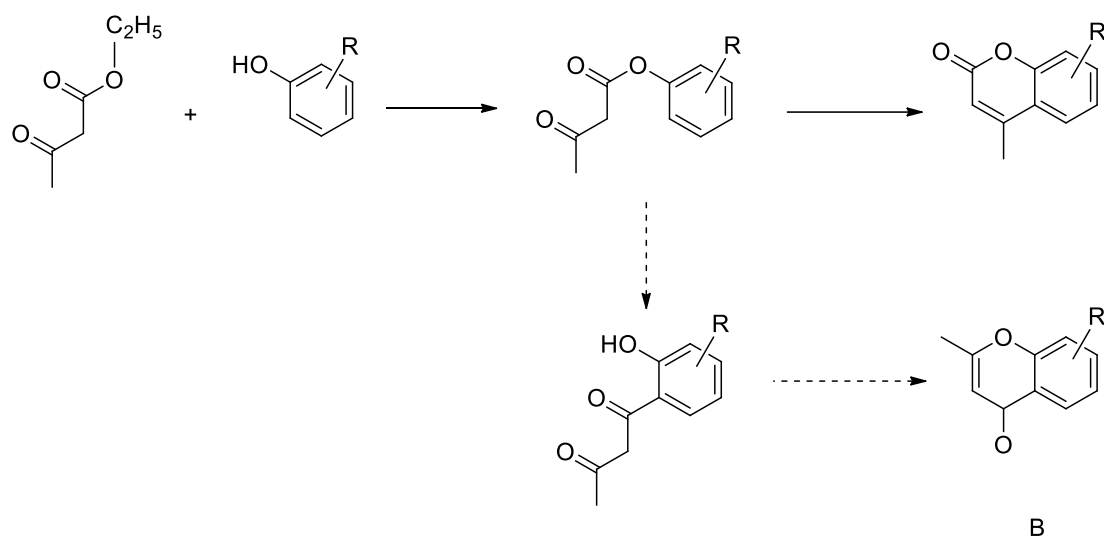
Σχήμα 7. Μέθοδος Pechmann

Οι όξινοι καταλύτες που χρησιμοποιούνται συμβατικά είναι το θειικό οξύ, το πεντοξείδιο του φωσφόρου, το χλωριούχο αργίλιο και το τριφθοροξικό οξύ. Επειδή οι όξινοι καταλύτες (με τη μορφή υδατικών διαλυμάτων) στην αντίδραση αυτή πρέπει να χρησιμοποιούνται σε μεγάλες ποσότητες, οδηγώντας και σε σημαντικές περιβαλλοντικές επιβαρύνσεις, έχουν μελετηθεί εναλλακτικές λύσεις. Πλέον, η σύνθεση των κουμαρινών πραγματοποιείται με τη μέθοδο Pechmann χρησιμοποιώντας στερεούς όξινους καταλύτες, σε συνδυασμό με ακτινοβολία μικροκυμάτων ή με τη χρήση ιοντικών διαλυμάτων.^[9]

Η μέθοδος Pechmann αποτελεί μια αντίδραση τριών σταδίων: ηλεκτρονιόφιλη αρωματική υποκατάσταση, μετεστεροποίηση και αφυδάτωση.^[11] Αν και η σειρά των σταδίων είναι άγνωστη, έχουν προταθεί δύο διαφορετικά είδη μηχανισμών της αντίδρασης.^[10,11]

Ο πρώτος μηχανισμός, πρόταση των *Robertson et al.*, θεωρεί ως πρώτο στάδιο την ηλεκτρονιόφιλη αρωματική υποκατάσταση, που ακολουθείται από τη μετεστεροποίηση και ολοκληρώνεται με την αφυδάτωση. Ο δεύτερος μηχανισμός, πρόταση των *Ahmed και Desai*, θεωρεί ως πρώτο στάδιο τη μετεστεροποίηση, ακολουθούμενη από την ηλεκτρονιόφιλη αρωματική υποκατάσταση και η οποία ολοκληρώνεται με την αφυδάτωση. Οι δύο μηχανισμοί απεικονίζονται στο σχήμα 8.^[10]



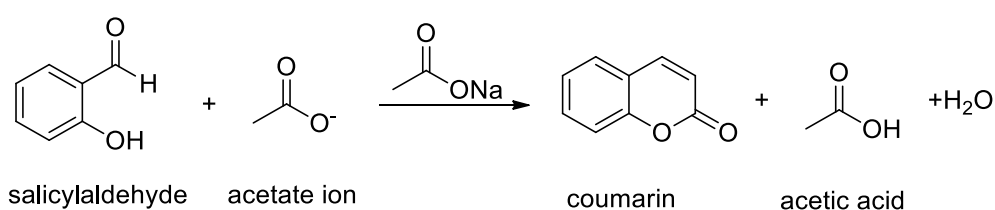


Σχήμα 8. Πιθανοί μηχανισμοί αντίδρασης Pechmann με πρόταση (A) Robertson και (B) Ahmed & Desai

2. Μέθοδος Perkin

Με βάση τη μέθοδο Perkin, η κουμαρίνη συντίθεται από σαλικυλαλδεΐδη και κυανοξικό ή οξικό οξύ (σχήμα 9). Η αντίδραση καταλύεται από προπυλοφωσφονικό ανυδρίτη.^[7] Η πρώτη εφαρμογή της αντίδρασης αυτής πραγματοποιήθηκε από τον Perkin το 1868, ο οποίος συνέθεσε τη μητρική ένωση κουμαρίνης με θέρμανση στους 150-200°C του άλατος νατρίου σαλικυλαλδεΐδης με οξικό ανυδρίτη.^[12,13]

Κατά την αντίδραση αυτή, σχηματίζεται αρχικά ένα ενδιάμεσο παράγωγο υδροξυ-κινναμικού οξέος, το οποίο αυθόρμητα μετατρέπεται σε λακτόνη.^[13]



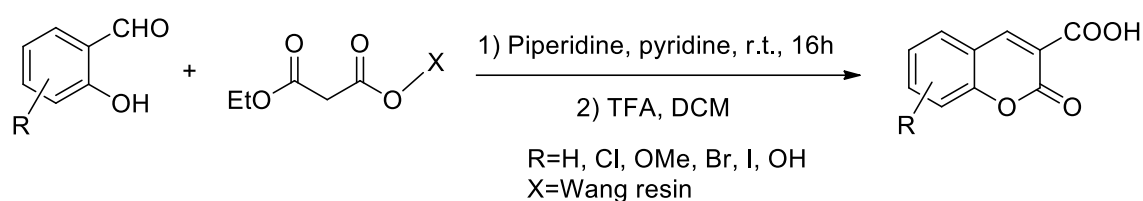
Σχήμα 9. Σύνθεση κουμαρίνης με τη μέθοδο Perkin

Η μέθοδος Perkin θεωρείται η πιο απλή και άμεση μέθοδος για τη σύνθεση κουμαρινών, παρουσιάζει όμως και ορισμένα μειονεκτήματα, όπως το περιορισμένο εύρος υποστρωμάτων στα οποία μπορεί να εφαρμοστεί και τα ισχυρά οξέα που απαιτούνται.^[14]

3. Μέθοδος Knoevenagel

Η αντίδραση σύνθεσης με τη μέθοδο Knoevenagel αποτελεί μια συμπύκνωση αρωματικών αλδεϋδων με ενώσεις που φέρουν ενεργό μεθυλένιο, η οποία καταλύεται από κάποια βάση, συνήθως πιπεριδίνη, πυριδίνη ή κάποιον άλλο οργανικό διαλύτη.^[7,15] Πιο συγκεκριμένα, η σύνθεση υποκατεστημένων κουμαρινικών 3-καρβοξυλικών οξέων, όπως φαίνεται στο σχήμα 10, προκύπτει από τη συμπύκνωση υδροξυ-βενζαλδεϋδών με μηλονικούς εστέρες παρουσία πυριδίνης ή πιπεριδίνης.^[16]

Η αντίδραση Knoevenagel ανήκει στο ευρύτερο πεδίο των καταλυόμενων συμπυκνώσεων τύπου αλδόλης, κατά τις οποίες ένα καρβο-ανιόν προστίθεται σε ένα καρβονύλιο ή ένα ετεροκαρβονύλιο.^[12]



Σχήμα 10. Αντίδραση Knoevenagel

4. Άλλες μέθοδοι

Υπάρχουν πολλές ακόμα συνθετικές οδοί από τις οποίες μπορούν να προκύψουν παράγωγα κουμαρινών, ωστόσο δεν έχουν τόσο συχνή εφαρμογή.

Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ότι μέσω της αντίδρασης Kostanecki-Robinson, σύμφωνα με την οποία πραγματοποιείται η αλκυλίωση μιας ορθο-υδροξυ-αρυλοκετόνης με ανυδρίτες αλειφατικού οξέος, προκύπτουν ως προϊόντα 3- και 4- υποκατεστημένες κουμαρίνες.^[4]

Συχνά χρησιμοποιούνται και οι αντιδράσεις Wittig και Reformatsky. Με την αντίδραση Wittig συντίθεται κουμαρίνη από μια αρωματική αλδεϋδη ή κετόνη και ένα υλίδιο φωσφόρου. Από την άλλη, η σύνθεση κουμαρίνης με βάση την αντίδραση Reformatsky προκύπτει από σαλικυλαλδεϋδη, σε συνδυασμό με βρομοοξικό αιθυλεστέρα, παρουσία ψευδαργύρου και νερού με χρήση όξινου καταλύτη.^[13,17]

1.3. Ιδιότητες και βιοδραστικότητα

Οι κουμαρίνες, εξαιτίας της δομής τους, παρουσιάζουν μια μεγάλη ποικιλία χημικών και βιολογικών ιδιοτήτων.^[3] Ειδικότερα, πολύ σημαντικό ρόλο στην παρουσία των ιδιοτήτων αυτών διαδραματίζουν οι πολλαπλές θέσεις C στις οποίες το μόριο μπορεί να υποστεί τροποποιήσεις.^[1] Μερικές μόνο από αυτές είναι η αντιφλεγμονώδης, η αντιπηκτική, η αντιμικροβιακή, η ηρεμιστική, η αντιοξειδωτική και η αναλγητική δράση.^[3]

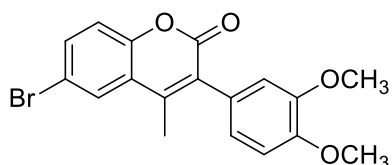
1.3.1. Αντιφλεγμονώδης δράση

Οι φλεγμονές αποτελούν κομμάτι μιας σύνθετης βιολογικής αντίδρασης ενός οργανισμού, όταν έρχεται αντιμέτωπος με επιβλαβή για αυτόν ερεθίσματα, όπως είναι οι τοξίνες ή η βλάβη των κυττάρων και των ιστών του.^[6] Στην ουσία είναι ένας προστατευτικός μηχανισμός, που περιλαμβάνει κύτταρα του ανοσοποιητικού, αιμοφόρα αγγεία, αισθητήρες, καθώς και μοριακούς μεσολαβητές και εμφανίζεται με τα εξής συμπτώματα: πρήξιμο, πόνος, ερυθρότητα, άνοδος της σωματικής θερμοκρασίας και δυσλειτουργία.^[3,6,18] Ο μηχανισμός των φλεγμονών πυροδοτεί τη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος με σκοπό την επαναφορά της ομοιόστασης, γεγονός που τον καθιστά πολύ σημαντικό για την αντιμετώπιση παθογόνων παραγόντων.^[6,18]

Οι κυριότεροι τρόποι ελέγχου μιας φλεγμονής είναι, είτε η παρεμπόδιση των αισθητήρων και των μεσολαβητών, είτε η άμεση δράση στον ιστό που είναι στόχος του ξενιστή. Οι κουμαρίνες και τα παράγωγά τους έχουν παρουσιάσει ανασταλτική δράση σε διάφορα σημεία του μηχανισμού της φλεγμονής, μπορούν, δηλαδή, να ελέγξουν τους αισθητήρες και τους μεσολαβητές.^[18]

Φυσικά και συνθετικά προϊόντα κουμαρινών λειτουργούν ως αντιφλεγμονώδη μέσω διαφόρων μηχανισμών. Πιο συγκεκριμένα, μεταβάλλουν ή παρεμποδίζουν τη λειτουργία των ενζύμων κυκλοοξυγενάση (COX) και λιποξυγενάση (LOX), τα οποία καταλύουν το μηχανισμό σχηματισμού των φλεγμονών, ενώ περιορίζουν ακόμα και το σχηματισμό οιδήματος με την πρόκληση φαγοκυττάρωσης.^[18,19] Ενδεικτικά, το φυσικό προϊόν 7-υδροξυ-κουμαρίνη (σχήμα 1A), που απομονώνεται από το βότανο *Justicia pectoralis*, έδειξε πολύ σημαντική δράση κατά του σχηματισμού οιδήματος από καραγενάνη σε δοκιμή που πραγματοποιήθηκε σε πόδι αρουραίου. ^[19]

Πέρα από τις φυσικά προερχόμενες κουμαρίνες, υπάρχουν και διάφορα παράγωγά τους με αντιφλεγμονώδη δράση, που προκύπτουν συνθετικά. Ήδη από το 1992, πολλές προσπάθειες έχουν πραγματοποιηθεί για τη σύνθεση κουμαρινικών αναλόγων με αντιφλεγμονώδη δράση. Ειδικότερα, έχει αναφερθεί η σύνθεση και μελέτη της αντιφλεγμονώδους δράσης αναλόγων 3-αρυλοκουμαρίνης, απ' όπου προέκυψε ότι το ανάλογο που φέρει δύο μεθοξυομάδες ως υποκαταστάτες σε διαδοχικές θέσεις του αρωματικού δακτυλίου (σχήμα 11) παρουσίασε 86% παρεμπόδιση της λιποξυγενάσης και πρόληψη της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων.^[18]



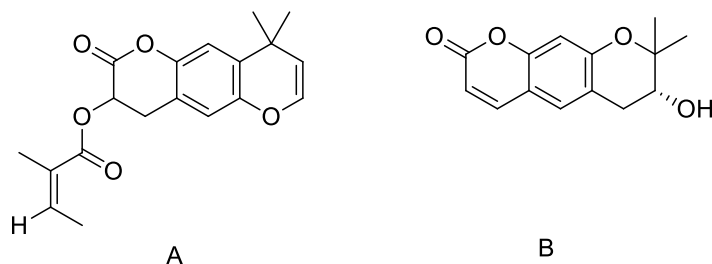
Σχήμα 11. Ανάλογο της 3-αρυλοκουμαρίνης με αντιφλεγμονώδη δράση

Γενικά, έχει παρατηρηθεί πως υπάρχουν πολλοί υποκαταστάτες σε διάφορες θέσεις της κουμαρίνης που μπορούν να της προσδώσουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες ή και να βελτιώσουν την αντιφλεγμονώδη δράση της. Για παράδειγμα, έχει διαπιστωθεί πως ετεροκυκλικοί υποκαταστάτες με άζωτο στη θέση 3 και ετεροκυκλικοί υποκαταστάτες με χλώριο στη θέση 6 του μορίου της κουμαρίνης ενισχύουν την αντιφλεγμονώδη δράση της.^[19] Ακόμα, έχει βρεθεί πως η ύπαρξη μιας πολικής ομάδας στις θέσεις 5, 6 ή 7 είναι αυτή που προκαλεί την αναστολή της λιποξυγενάσης και συνεπώς αυξάνει την αντιφλεγμονώδη δράση. Τα καρβαμικά, αλλά και οι ετεροκυκλικοί υποκαταστάτες με άζωτο στη θέση 7, βελτιώνουν επίσης την αντιφλεγμονώδη δράση, μέσω της αλληλεπίδρασης με δεσμούς υδρογόνου.^[18]

1.3.2. Αντιμικροβιακή-Αντιβακτηριακή-Αντιική δράση

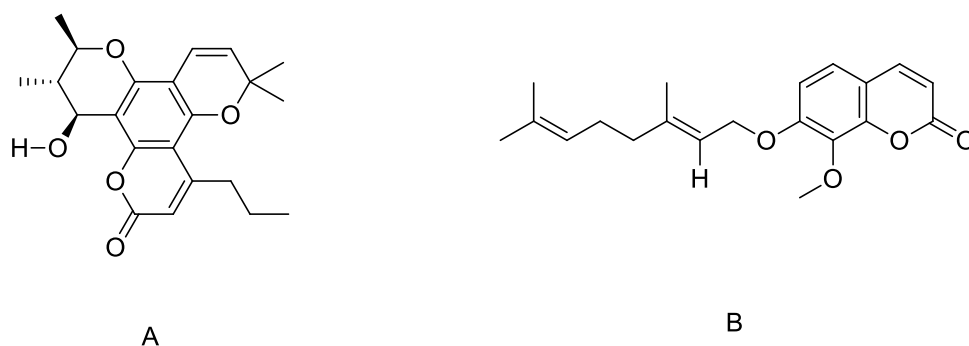
Η καταπολέμηση μολύνσεων από βακτήρια και μύκητες ήταν και παραμένει πολύ κρίσιμη, ειδικά με την πλέον αυξημένη αντίσταση των παθογόνων μικροοργανισμών σε φαρμακευτικούς και αντιμικροβιακούς παράγοντες.^[3,6] Σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τα αντιβιοτικά μπορούν να προκαλέσουν αρνητικές παρενέργειες, έχει κριθεί απαραίτητη η εύρεση νέων αποτελεσματικών και ασφαλών μορίων με αντιβακτηριακή δράση.^[6]

Μελέτες έχουν δείξει, πως οι κουμαρίνες είναι αποτελεσματικές κατά Gram θετικών και Gram αρνητικών βακτηρίων, καθώς και μυκήτων, εξαιτίας των ελεύθερων υδροξυλομάδων στο μόριό τους.^[3] Χαρακτηριστικά αναφέρεται πως οι κουμαρίνες αγασυλίνη και αιγελινόλη (σχήμα 12), που απομονώνονται από το βότανο *Ferulago campestris*, έχουν παρουσιάσει δράση κατά των βακτηρίων *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thypii*, *Enterobacter cloacae* και *Enterobacter Aerogenes*.^[6]



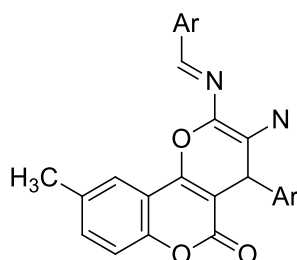
Σχήμα 12. Αγασυλίνη (A) και αιγελινόλη (B)

Ταυτόχρονα, έχει παρατηρηθεί πως κουμαρίνες, όπως η καλανολίδα A (σχήμα 13A) που απομονώνεται από το φυτό *Calopyllum lanigerum*, λειτουργούν ανασταλτικά για το ένζυμο της DNA γυράσης, γεγονός που θα μπορούσε να τους προσδώσει δράση κατά του ιού HIV.^[3] Επιπλέον, ο ιός της ηπατίτιδας B έχει δείξει πως καταστέλλεται από την κουμαρίνη κολινίνη (σχήμα 13B), που προέρχεται από το φυτό *Zanthoxylum schinifolium*.^[3]



Σχήμα 13. Καλανολίδα A (A) και κολινίνη (B)

Εκτός από τις κουμαρίνες φυσικής προέλευσης με αντιμικροβιακή δράση, έχουν συντεθεί και οι 3,4-γωνιακές πυρανοκουμαρίνες, όπως αυτή που απεικονίζεται στο σχήμα 14, οι οποίες έχουν δείξει σημαντική αντιμικροβιακή δράση κατά των Gram θετικών βακτηρίων.



Σχήμα 14. Συνθετική γωνιακή πυρανοκουμαρίνη

1.3.3. Αντιοξειδωτική δράση

Οι οξειδωτικές διεργασίες που βλάπτουν τον οργανισμό προάγονται από ελεύθερες ρίζες σε περίσσεια, οι οποίες είναι άμεσα σχετιζόμενες με την εμφάνιση εκφυλιστικών νόσων. Οι ελεύθερες αυτές ρίζες, θέλοντας να σταθεροποιηθούν, αποσπούν ηλεκτρόνια από άλλα μόρια, μετατρέποντάς τα και αυτά σε ρίζες. Προκαλείται, έτσι, μια αλυσιδωτή αντίδραση, που διαταράσσει τη λειτουργία του οργανισμού και αλλοιώνει κύτταρα και ιστούς. Είναι, λοιπόν, απαραίτητη η σταθεροποίηση των ελευθέρων ριζών με τη χρήση αντιοξειδωτικών μέσων.^[6]

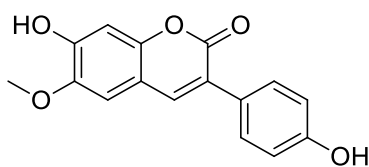
Έχει παρατηρηθεί πως οι κουμαρίνες μπορούν να λειτουργήσουν ως αποτελεσματικά αντιοξειδωτικά μέσα με διάφορους μηχανισμούς. Έχουν τη δυνατότητα, είτε να περιορίζουν το σχηματισμό δραστικών μορφών οξυγόνου

και αζώτου, είτε να αναστέλλουν τη λειτουργία ενζύμων που παράγουν ελεύθερες ρίζες.^[20,21]

Ο αριθμός των υδροξυλομάδων στο βενζοϊκό δακτύλιο της κάθε κουμαρίνης, καθώς και η θέση τους, είναι παράγοντες που καθορίζουν την κατασταλτική τους δράση έναντι των δραστικών μορφών οξυγόνου. Πιο συγκεκριμένα, η θέση ορθο- παρουσιάζει ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση απ' ό,τι η μετα-, εξαιτίας της τάσης της υδροξυλομάδας στη θέση ορθο- να προσδώσει ηλεκτρόνια.^[20]

Ακόμη, σημαντικό ρόλο στην αντιοξειδωτική τους δράση παίζουν και τα είδη των υποκαταστατών στο μόριο της κάθε κουμαρίνης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η 6,7-διυδροξυ-κουμαρίνη (σχήμα 1B), που έχει δύο υδροξυλομάδες στο μόριό της και εμφανίζει πολύ αποτελεσματική δράση δέσμευσης των ελευθέρων ριζών. Αντίθετα, το μόριο που προκύπτει από την υποκατάσταση της μιας υδροξυλομάδας με μία μεθοξυ-ομάδα, παρουσιάζει χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση.^[20]

Ακόμη, έχει βρεθεί πως οι υδροξυλιωμένες 3-φαινυλοκουμαρίνες, εμφανίζουν πολύ αποτελεσματική αντιοξειδωτική δράση. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιας κουμαρίνης παρουσιάζεται στο σχήμα 15.^[20]



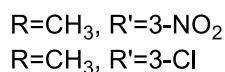
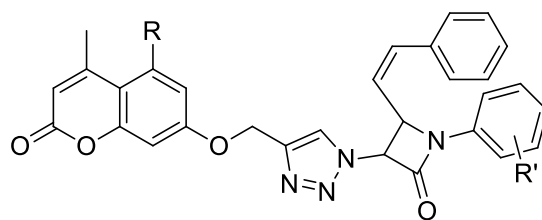
Σχήμα 15. Υδροξυλιωμένη 3-φαινυλοκουμαρίνη

1.3.4. Αντικαρκινική δράση

Η αντικαρκινική δράση των κουμαρινών, και ειδικότερα των πυρανοκουμαρινών, παρατηρήθηκε για πρώτη φορά σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν in vivo σε ποντίκια εμβολιασμένα με καρκινικά κύτταρα σαρκώματος.^[6] Οι κουμαρίνες και τα παράγωγά τους έχουν τη δυνατότητα να διακόψουν τον κυτταρικό κύκλο, την αγγειογένεση, τη λειτουργία της κινάσης και της τελομεράσης στην αναπαραγωγή των καρκινικών κυττάρων, καθώς και να αναστείλουν την καρβονική ανυδράση σε διάφορα καρκινικά κύτταρα. Διαφορετικά είδη υποκαταστατών στο μόριο των κουμαρινών καθορίζουν, τόσο τις φαρμακευτικές τους ιδιότητες, όσο και τις θεραπευτικές τους εφαρμογές.^[22,23]

Ένα από τα παράγωγα κουμαρίνης που έχει μελετηθεί για την αντικαρκινική του δράση είναι το υβρίδιο κουμαρίνης με αζόλες. Οι αζόλες είναι ετεροκυκλικές ενώσεις αζώτου, οι οποίες βρίσκουν ήδη εφαρμογή ως αντικαρκινικά μέσα. Σε συνδυασμό με τις κουμαρίνες, ενισχύεται η φαρμακολογική τους δράση. Συνεπώς τα υβρίδια αυτά έχουν επιλεχθεί για την ανάπτυξη αντικαρκινικών φαρμάκων, με πολλές προσδοκίες. Μάλιστα, οι μελέτες δομής-δράσης τέτοιων μορίων, όπως αυτών που απεικονίζονται στο σχήμα 16, έχουν δείξει πως η

παρουσία υποκαταστατών αζώτου και χλωρίου στη θέση του άνθρακα 3 αυξάνουν την αντικαρκινική δράση.^[22]



Σχήμα 16. Υβριδικά μόρια κουμαρίνης-αζόλης με αντικαρκινική δράση

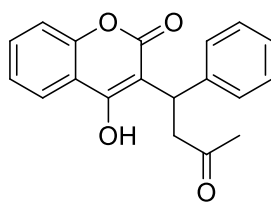
Άλλα παράγωγα κουμαρινών με αντίστοιχη αντικαρκινική δράση είναι τα κουμαρινικά σουλφοναμίδια, τα κουμαρινικά βενζαμίδια, οι διυδροξυκουμαρίνες, καθώς και οι κουμαρίνες που βασίζονται στην πυριδίνη, την πυριμιδίνη και την πιπεριδίνη.^[22]

1.3.5. Αντιπηκτική δράση

Οι αντιπηκτικοί παράγοντες δρουν με σκοπό την αποφυγή της πήξης του αίματος και τελικά το σχηματισμό θρόμβου. Οι κουμαρίνες χρησιμοποιούνται ευρέως ως αντιπηκτικά χορηγούμενα από το στόμα. Χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά το 1920 με τη μορφή ενσιρώματος (φρέσκου χόρτου) από μελίλωτο για την αντιμετώπιση ασθένειας με χαρακτηριστικό τη θανατηφόρα αιμορραγία.^[21]

Οι κουμαρίνες με υδροξυλομάδα στη θέση 4 του μορίου ή κάποιου υποκαταστάτη στη θέση 3, εμφανίζουν αρκετά καλή αντιπηκτική δράση. Σήμερα, τα κουμαρινικά παράγωγα που χρησιμοποιούνται ευρέως για την αντιπηκτική τους δράση είναι η βαρφαρίνη, η ασενοκουμαρόλη και η φενπροκουμόνη (phenprocoumon). Οι ενώσεις αυτές αναστέλλουν την αναγωγή του εποξειδίου της βιταμίνης K, εμποδίζοντας την ενεργοποίηση πολλών παραγόντων πήξης. Ο σχηματισμός των παραγόντων αυτών εξαρτάται από τη βιταμίνη K.^[3,21]

Ειδικότερα, η βαρφαρίνη (σχήμα 17) εμφανίζει ένα χειρόμορφο κέντρο που δίνει τη δυνατότητα σχηματισμού δύο εναντιομερών, τα οποία σε κλινικές περιπτώσεις χορηγούνται ως ρακεμικό μίγμα με αναλογία 50:50.^[21]



Σχήμα 17. Βαρφαρίνη

Τα αντιπηκτικά κουμαρινικής προέλευσης χρησιμοποιούνται πλέον για την αντιμετώπιση και την πρόληψη της αρτηριακής και της φλεβικής θρόμβωσης, αλλά και για την αποφυγή συστηματικού εμβολισμού ή εγκεφαλικού, κυρίως για ασθενείς που έχουν υποστεί κολπική μαρμαρυγή.^[21]

1.4. Εφαρμογές

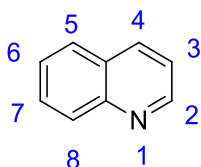
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι κουμαρίνες βρίσκουν μεγάλη εφαρμογή στη φαρμακευτική βιομηχανία για την αντιμετώπιση πολλών ασθενειών. Ωστόσο, εντάσσονται και σε πολλούς άλλους βιομηχανικούς τομείς, εξαιτίας του εκτεταμένου εύρους των ιδιοτήτων που εμφανίζουν.^[3]

Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία αρωμάτων, καθώς έχουν πολύ έντονη μυρωδιά.^[3] Ταυτόχρονα λειτουργούν ως σταθεροποιητές αρωμάτων, γλυκαντικά και ενισχυτικά φυσικών ελαίων, όπως η λεβάντα.^[3,24] Στη βιομηχανία τροφίμων, οι κουμαρίνες βρίσκουν εφαρμογή ως πρόσθετα σε συνδυασμό με τη βανιλίνη, στα προϊόντα καπνού χρησιμοποιούνται ως σταθεροποιητές γεύσης και οσμής, ενώ στα χρώματα και τα ελαστικά επικαλύπτουν τις οσμές.^[3] Ακόμη, οι κουμαρίνες αποτελούν το μεγαλύτερο κομμάτι των φθοριζουσών βαφών.^[24] Λόγω των φθοριζουσών ιδιοτήτων τους χρησιμοποιούνται ευρέως και ως δείκτες για την ιχνηθέτηση προτεϊνών, για το pH, ακόμα και για την ανίχνευση μετάλλων, όπως το νικέλιο.^[3]

2. Κινολινόνες

2.1. Δομή και προέλευση

Οι κινολινόνες είναι ετεροκυκλικές αρωματικές ενώσεις αζώτου. Το μόριό τους χαρακτηρίζεται από μια δομή διπλού δακτυλίου, που περιέχει ένα βενζολικό δακτύλιο συμπυκνωμένο με πυριδίνη σε δύο γειτονικά άτομα άνθρακα, όπως φαίνεται στο σχήμα 18.^[25]



Σχήμα 18. Δομή κινολινονών

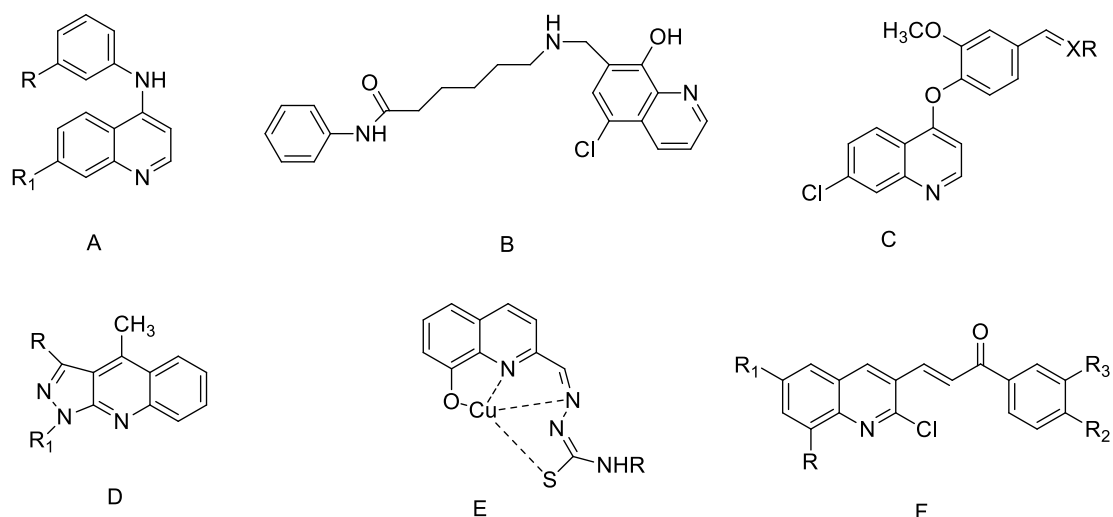
Η κινολινόνη ανακαλύφθηκε το 1842 από τον Gerhardt με τη δραστική αποσύνθεση της κινίνης και της κινchonίνης. Ωστόσο, μόνο μετά το 1879, όταν οι Weidel και Ladenburg μελέτησαν τις βάσεις πυριδίνης με λεπτομέρεια, τέθηκαν τα θεμέλια για τη χημεία της κινολινόνης.^[26]

Οι κινολινόνες είναι μόρια που μπορεί να έχουν φυσική, αλλά και συνθετική προέλευση. Βρίσκονται στη φύση σε μια πληθώρα φυτών, όπως οι οικογένειες *Berberidaceae*, *Fumariaceae*, *Paranaraceae* και *Rutaceae*. Παρόλο που η ετεροκυκλική αυτή ένωση αζώτου δεν είναι ιδιαίτερα χρήσιμη από μόνη της, μπορεί εύκολα να τροποποιηθεί, δίνοντας πολυάριθμα ανάλογα με διαφορετικές ιδιότητες που βρίσκουν μεγάλη εφαρμογή σε ιατρικό αλλά και βιομηχανικό επίπεδο. ^[25,27,28]

Οι κινολινόνες και τα παράγωγά τους κατηγοριοποιούνται ανάλογα με τις δομικές τους τροποποιήσεις, αλλά και τη βιολογική τους δράση στις παρακάτω κατηγορίες:^[27]

- Αμινοκινολινόνες
- Υδροξυκινολινόνες
- Οξυκινολινόνες
- Συμπυκνωμένες κινολινόνες
- Μεταλλικά σύμπλοκα κινολινονών
- Αλκυλο- υποκατεστημένες κινολινόνες

Μερικά παραδείγματα από κάθε κατηγορία απεικονίζονται στο σχήμα 19.



Σχήμα 19. Κατηγορίες κινολινινών: Αμινοκινολινόνες (A), Υδροξυκινολινόνες (B), Οξυκινολινόνες (C), Συμπυκνωμένες κινολινόνες (D), Μεταλλικά σύμπλοκα κινολινινών (E), Αλκυλο-υποκατεστημένες κινολινόνες (F)

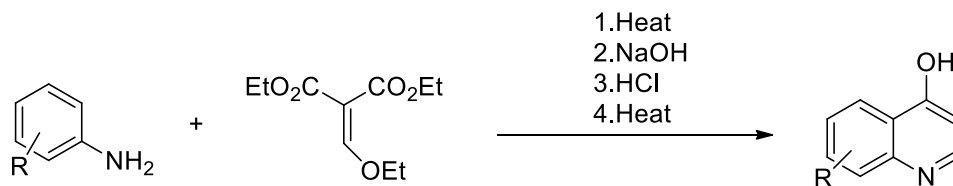
2.2. Σύνθεση

Γενικά, οι κινολινόνες είναι παρούσες σε φαρμακολογικά ενεργά προϊόντα, φυσικής και συνθετικής προέλευσης. Η μητρική ένωση της κινολινόνης (σχήμα 18) χρησιμοποιείται ως πρότυπο για το σχεδιασμό και τη σύνθεση πολλών φαρμάκων.

Τα κινολινονικά ανάλογα είναι ασθενείς τριτοταγείς βάσεις, που μπορούν να σχηματίσουν άλατα αντιδρώντας με οξέα. Παρουσιάζουν παρόμοιες αντιδράσεις με την πυριδίνη και το βενζόλιο και μπορούν να συμμετέχουν, τόσο σε ηλεκτρονιόφιλες, όσο και σε πυρηνόφιλες αντιδράσεις υποκατάστασης. Για τη σύνθεση και λειτουργικότητα των μορίων αυτών έχουν αναφερθεί μέχρι τώρα πολυάριθμες μέθοδοι, μερικές από τις οποίες παρουσιάζονται παρακάτω.^[29]

1. Σύνθεση Gould-Jacob

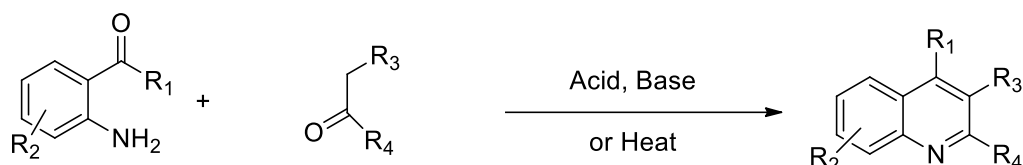
Πολλά κινολινονικά παράγωγα μπορούν να συντεθούν με την προσθήκη υποκαταστατών στον άνθρακα της θέσης 4 μέσω της αντίδρασης κυκλοποίησης Gould-Jacob. Σύμφωνα με τη διαδικασία αυτή, παράγεται 4-υδροξυκινολινόνη με την αντίδραση της ανιλίνης με αιθοξυ-μεθυλεν-μηλνικό οξύ, όπως φαίνεται στο σχήμα 20.^[29]



Σχήμα 20. Κινολινονική σύνθεση Gould-Jacob

2. Σύνθεση Friedländer

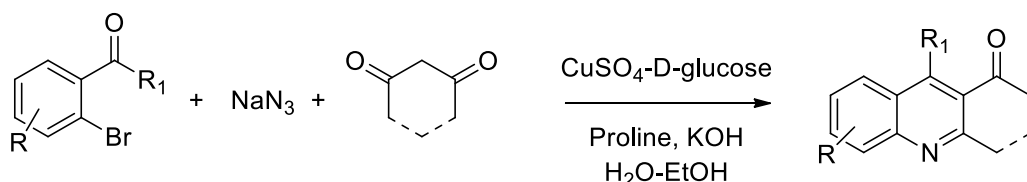
Στη συνθετική αυτή πορεία, η υποκατάσταση ορθο- της ανιλίνης και μιας αλδεΐδης ή κετόνης με ένα δραστικό α -μεθυλένιο μέσω συμπύκνωσης, ακολουθούμενη από κυκλοποίηση, οδηγεί στο σχηματισμό του κινολινονικού μορίου της αντίδρασης του σχήματος 21. Η αντίδραση αυτή καταλύεται με τη χρήση κάποιου οξέος ή βάσης, κάποιου ιονικού διαλύματος, ή ακόμα και με απλή θέρμανση.^[29]



Σχήμα 21. Κινολινονική σύνθεση Friedländer

3. Τροποποιημένη σύνθεση Friedländer

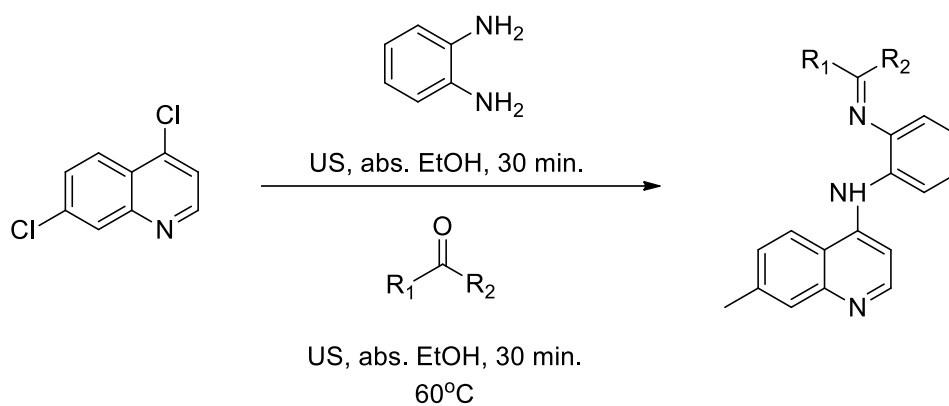
Η διαφοροποίηση της μεθόδου αυτής, σε σχέση με την προηγούμενη, έγκειται στο ότι στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιείται 2-βρομοβενζαλδεΐδη, άκυκλη ή κυκλική 1,3-δικετόνη και αζίδιο του νατρίου προς το σχηματισμό του τελικού μορίου (σχήμα 22). Η αντίδραση αυτή καταλύεται από ένα καταλύτη σταθερό στον αέρα, οικολογικά αποδοτικό και φθηνό, για παράδειγμα τη salt-D-glucose.^[29]



Σχήμα 22. Τροποποιημένη κινολινονική σύνθεση Friedländer

4. Αντιδράσεις ακτινοβολίας με υπερήχους

Αυτό το είδος της σύνθεσης κινολινονών είναι γενικά καλύτερο από τα προηγούμενα σε ό,τι έχει να κάνει με το χρόνο αντίδρασης, την ποιότητα και την ποσότητα του προϊόντος. Με τη χρήση ακτινοβολίας με υπερήχους μπορεί να παραχθεί με καλή απόδοση ένα κινολινονικό παράγωγο μέσω δύο διαδοχικών αντιδράσεων, δηλαδή μιας διμοριακής πυρηνόφιλης υποκατάστασης που ακολουθείται από μια αντίδραση συμπύκνωσης, όπως φαίνεται στο σχήμα 23.^[29]

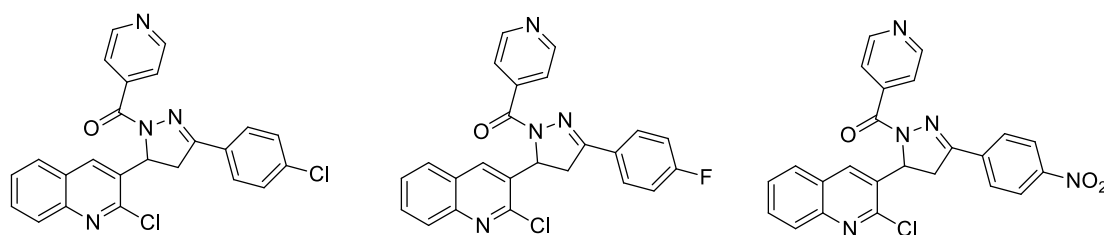


Σχήμα 23. Κινολινονική σύνθεση με ακτινοβολία με υπερήχους

2.3. Ιδιότητες και βιοδραστικότητα

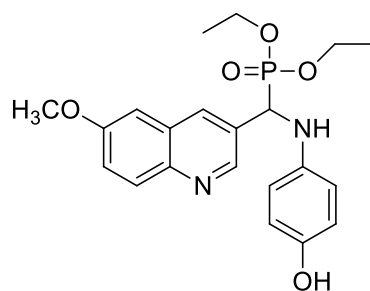
Οι κινολινονές, φυσικής και συνθετικής προέλευσης, επιδεικνύουν σημαντική βιολογική και φαρμακευτική δράση. Μερικές μόνο ιδιότητες που εμφανίζουν είναι ανθελονοσιακές, αντικαρκινικές, αντιβιοτικές, αντιφλεγμονώδεις ακόμα και ιδιότητες αντί του ιού HIV.^[25,29]

Πιο συγκεκριμένα, έχουν συντεθεί κινολινονικά ανάλογα, όπως αυτά του σχήματος 24, τα οποία έχουν δείξει πολύ ισχυρή αντιμικροβιακή δράση με δοκιμές σε βακτήρια, όπως τα *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* και *Pseudomonas aeruginosa*. Η δράση τους αυτή συνδέεται άμεσα με τη θέση των υποκαταστατών στο δακτύλιο.^[29]



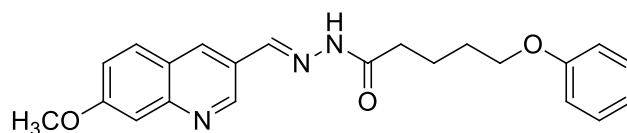
Σχήμα 24. Κινολινονές με αντιβακτηριακή δράση

Παράγωγα της κινολινονής, όπως αυτό του σχήματος 25, έχουν δείξει επίσης αντιοξειδωτική δράση. Το κινολινονικό αυτό μόριο, συνδεδεμένο με ένα α-αμινοφωσφορικό ιόν, έχει επιδείξει σημαντική αντιοξειδωτική δράση με τη μέθοδο του DPPH. Ακόμα, έχει επιβεβαιωθεί πως αυτή η βιολογική δράση μπορεί να βελτιωθεί περαιτέρω με τη χρήση ενός φαινολικού δακτυλίου ως υποκαταστάτη του κινολινονικού μορίου.^[29]



Σχήμα 25. Κινολινόνη με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση

Επίσης, έχουν συντεθεί κινολινονικές ενώσεις, οι οποίες έχουν παρουσιάσει αντικαρκινική δράση κατά κυττάρων νευροβλαστώματος. Το μόριο που απεικονίζεται στο σχήμα 26 έχει δείξει δράση κατά των κυττάρων νευροβλαστώματος Kelly και SH-SY5Y, ενώ ταυτόχρονα έχει μειώσει τη βιωσιμότητα νευροκαρκινικών κυττάρων με εξαιρετική εκλεκτικότητα ως προς τα κανονικά κύτταρα.^[29]



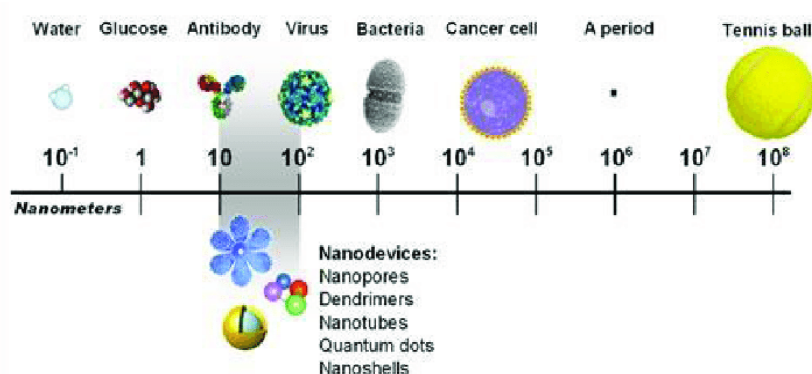
Σχήμα 26. Κινολινόνη με ισχυρή αντικαρκινική δράση

3. Νανοσυστήματα μεταφοράς φαρμάκων

3.1. Εισαγωγή

Η νανοτεχνολογία αποτελεί το επιστημονικό πεδίο που ασχολείται με την ανάπτυξη και τη χρήση υλικών, μέσω των οποίων παράγονται προϊόντα της τάξης του δισεκατομμυριοστού του μέτρου. Μάλιστα, το πρόθεμα «νανο-» που χρησιμοποιείται ακόμα και από το SI (International System of Units), προέρχεται από την ελληνική λέξη «νάνος».[30]

Στο πεδίο της νανοτεχνολογίας, οι δομικές μονάδες της ύλης αναπτύσσονται σε επίπεδο νανοκλίμακας παράγοντας σύνθετα μακρομόρια. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 2, η διάσταση νανο- δεν είναι η μικρότερη.[30]



Εικόνα 2. Σύγκριση των διαστάσεων συνήθων νανοσυστημάτων με τις διαστάσεις μορίων, κυττάρων και αντικειμένων

Η νανοτεχνολογία βρίσκει ευρεία εφαρμογή στον τομέα της φαρμακευτικής. Τα νανοσυστήματα μεταφοράς φαρμάκων ή αλλιώς νανοσωματίδια αποτελούν μικροκολλοειδείς δομές κλίμακας από 10 έως 1000 nm που χρησιμοποιούνται για τη στοχευμένη μεταφορά φαρμακευτικών ουσιών, διαλυμένων ή εγκλωβισμένων σε μια μήτρα/νανοφορέα.[31,32]

Τα νανοσωματίδια έχουν παίξει πολύ σημαντικό ρόλο στον εγκλωβισμό ευαίσθητων χημικών ουσιών και αυτό γιατί τις διαφυλάσσουν από εξωγενείς παράγοντες, διατηρώντας αναλλοίωτα τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους.[26] Με το σχηματισμό νανοσωματιδίων και τη χρήση τους για μεταφορά φαρμακευτικών ουσιών, υδρόφιλων και υδρόφοβων, διευκολύνεται ο έλεγχος του μεγέθους του μορίου, των διεπιφανειακών ιδιοτήτων, καθώς και ο ρυθμός αποδέσμευσης της εγκλωβισμένης ουσίας.[32].

3.2 Πλεονεκτήματα και εφαρμογές

Τα νανοσυστήματα μεταφοράς φαρμάκων παρουσιάζουν πολλά πλεονεκτήματα. Αρχικά, το μέγεθος και τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας των νανοσωματιδίων μπορούν εύκολα να τροποποιηθούν, με σκοπό την επίτευξη της στοχευμένης μεταφοράς ενός φαρμάκου. Ταυτόχρονα, η αποδέσμευση της

δραστικής ουσίας από το νανοφορέα γίνεται ελεγχόμενα, αυξάνοντας, έτσι, την αποτελεσματικότητα και μειώνοντας τις παρενέργειες του φαρμάκου. Επίσης, με την ενσωμάτωση μιας δραστικής ουσίας σε νανοφορέα βελτιώνεται η βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου, δηλαδή αυξάνεται η ποσότητα της δραστικής ουσίας που φτάνει στη συστηματική κυκλοφορία του αίματος. Ακόμη, τα νανοσωματίδια πλεονεκτούν εξαιτίας του μεγέθους τους, το οποίο τους δίνει τη δυνατότητα να προσκολλώνται και να αλληλεπιδρούν με βιολογικές μεμβράνες. Τέλος, οι νανοφορείς δρουν προστατευτικά και σταθεροποιητικά για τη δραστική ουσία ενός φαρμάκου, συγκαλύπτοντας και ορισμένες ανεπιθύμητες ιδιότητές της.^[30,32]

Εξαιτίας των πλεονεκτημάτων αυτών, η χρήση των νανοσωματιδίων πραγματοποιείται κατά κύριο λόγο στον τομέα των ιατρικών εφαρμογών, με σκοπό τη διάγνωση και τη θεραπεία ποικίλων νόσων. Πιο συγκεκριμένα, τα νανοσωματίδια που είναι κατασκευασμένα από βιοαποικοδομήσιμα υλικά έχουν την ίδια τάξη μεγέθους με τις βιολογικές οντότητες και συνεπώς μπορούν να μεταφέρουν βιοδραστικές ουσίες στα κύτταρα του ανθρώπινου οργανισμού. Λόγω του μεγέθους τους και των επιφανειακών τους ιδιοτήτων, μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τα βιολογικά μόρια του οργανισμού θεραπεύοντάς τον από ασθένειες ή καταστρέφοντας παθογόνους παράγοντες.^[30,33]

Στον κλάδο της ενέργειας, η εξοικονόμηση και η αποθήκευσή της αποτελούν θέματα μείζονος σημασίας, ειδικά στην περίπτωση των μη ανανεώσιμων ορυκτών καυσίμων, τα οποία μειώνονται με γοργό ρυθμό. Τα νανοσωματίδια, λοιπόν, έχουν αποδειχτεί πολύ αποτελεσματικά για την παραγωγή νέων ανανεώσιμων ενεργειακών πόρων, λόγω της μεγάλης τους επιφάνειας, της οπτικής τους συμπεριφοράς και του καταλυτικού τους χαρακτήρα. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται σε φωτοκαταλυτικές εφαρμογές παράγοντας ενέργεια από τη φωτοηλεκτροχημική και ηλεκτροχημική διάσπαση του νερού.^[33] Επιπλέον, έχουν τη δυνατότητα να αποθηκεύσουν υδρογόνο ως καύσιμο υλικό και γενικά ενέργεια σε διάφορες μορφές στο επίπεδο της νανοκλίμακας.^[30,33]

Στον τομέα των υλικών, οι νανοδομές έχουν βρει εξαιρετική εφαρμογή. Χρησιμοποιούνται για την επικάλυψη επιφανειών, προσδίδοντάς τους τέτοια χαρακτηριστικά, ώστε να μη χαράσσονται, να είναι αδιάβροχες και να παραμένουν καθαρές και αποστειρωμένες.^[30] Ακόμα, τα νανοσωματίδια παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο και στην παραγωγή ηλεκτρονικών συσκευών, αισθητήρων και φωτονικών υλικών, εξαιτίας των δομικών, οπτικών και ηλεκτρικών τους ιδιοτήτων.^[30,33]

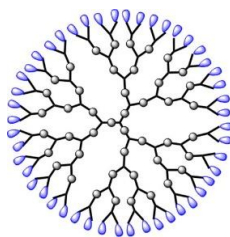
Εξαιρετικά σημαντικές είναι οι εφαρμογές της νανοτεχνολογίας σε ό,τι αφορά τα περιβαλλοντικά ζητήματα. Νανοσωματίδια χρησιμοποιούνται για την παραγωγή περιβαλλοντικά αειφόρων προϊόντων, αλλά και για την αποκατάσταση υλικών που έχουν επιμολυνθεί με επικίνδυνες ουσίες, όπως η αφαίρεση βαρέων μετάλλων από το νερό.^[33]

Από όλες τις εφαρμογές και χρήσεις της νανοτεχνολογίας που προαναφέρθηκαν, προκύπτει πως επηρεάζεται άμεσα και ο τομέας της οικονομίας. Η νανοτεχνολογία δύναται να παρέχει τα μέσα για φθηνή και γρήγορη παραγωγή μέσων και πόρων σε πολλούς τομείς με τελικό αποτέλεσμα το κέρδος.^[30]

3.3. Είδη νανοσυστημάτων

3.3.1. Δενδριμερή

Τα δενδριμερή (εικόνα 3) είναι μακρομόρια σε διασπορά, που προκύπτουν από έναν πυρήνα, ο οποίος διακλαδίζεται όλο και περισσότερο με κάθε επόμενη μονάδα διακλάδωσης.^[34] Αποτελούνται από τρεις περιοχές: τον πυρήνα, τους κλάδους, οι οποίοι ξεκινούν από τον πυρήνα συγκροτώντας το δενδριμερές, και την εξωτερική επιφάνεια, στην οποία βρίσκονται δραστικές ομάδες. Οι επιμέρους δομικές μονάδες από τις οποίες αποτελείται το κάθε δενδριμερές είναι αυτές που καθορίζουν τις φυσικοχημικές ιδιότητές του. Ανάλογα με τις δομικές του μονάδες, το κάθε τελικό μόριο μπορεί να έχει τη δυνατότητα να μεταβάλλει την υδροφιλικότητα ή την υδροφοβικότητά του ή ακόμα και το φορτίο του.^[30]

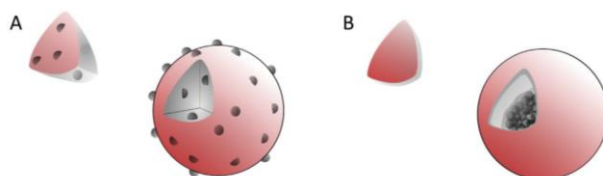


Εικόνα 3. Δομή δενδριμερούς

Δεδομένου ότι υπάρχουν πολλά είδη δενδριμερών με διαφορετικές ιδιότητες, είναι πολυάριθμες και οι εφαρμογές που βρίσκουν. Τα δενδριμερή χρησιμοποιούνται για τη στοχευμένη μεταφορά βιοδραστικών ουσιών, στη διαγνωστική *in vitro*, στη γονιδιακή θεραπεία ως οχήματα μεταφοράς γενετικού υλικού (vectors), καθώς και για τη βελτίωση βιομηχανικών διαδικασιών.^[30]

3.3.2. Στερεά πολυμερικά νανοσωματίδια

Τα πολυμερικά νανοσωματίδια είναι στερεά κολλοειδή σωματίδια της τάξης των 10-1000 nm, που προκύπτουν από το συνδυασμό διαφόρων ειδών πολυμερών, φυσικών, συνθετικών ή και ψευδοσυνθετικών.^[30,35] Μπορούν να έχουν τη δομή νανοσφαίρας ή νανοκάψουλας, όπως φαίνεται στην εικόνα 4.^[35] Δεδομένου ότι προκύπτουν από διαφορετικά είδη πολυμερών, εμφανίζουν τελικά ένα πλήθος νέων ιδιοτήτων. Έχουν τη δυνατότητα να εγκλωβίζουν υδρόφιλα, αλλά και υδρόφοβα μόρια, προστατεύοντάς τα από εξωτερικούς παράγοντες, ενώ διαθέτουν και υψηλή σταθερότητα.^[30]



Εικόνα 4. Τύποι πολυμερικών νανοσωματιδίων: νανοσφαίρα (A), νανοκάψουλα (B)

Οι παραπάνω ιδιότητες καθιστούν τα πολυμερικά νανοσωματίδια κατάλληλα για τη μεταφορά δραστικών ουσιών. Λόγω των μικρών τους διαστάσεων, της ικανότητάς τους να διαπερνούν μεμβράνες και αγγεία και να συσσωρεύονται στο στόχο, τα πολυμερικά νανοσωματίδια πλεονεκτούν ως φορείς στη χορήγηση φαρμάκων. Μάλιστα, με τη χρήση βιοαποικοδομήσιμων υλικών επιτυγχάνεται σταθερός ρυθμός αποδέσμευσης της εγκλωβισμένης δραστικής ένωσης.^[30]

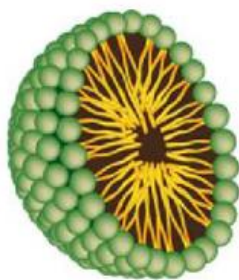
3.3.3. Ανόργανα νανοσωματίδια

Τα ανόργανα νανοσωματίδια παρασκευάζονται από ανόργανα υλικά σε ήπιες συνθήκες, με το επιθυμητό πορώδες, σχήμα και μέγεθος. Τα ανόργανα νανοσυστήματα χαρακτηρίζονται από σταθερότητα και γι' αυτό είναι ιδανικά για τον εγκλωβισμό και την προστασία βιοδραστικών ενώσεων.^[30] Μερικά χαρακτηριστικά ανόργανα νανοσωματίδια είναι οι κβαντικές τελείες, τα νανοσωματίδια χρυσού, τα μαγνητικά νανοσωματίδια, τα νανοσωματίδια πυριτίου και οι νανοσωλήνες άνθρακα. Τα περισσότερα από αυτά χρησιμοποιούνται στην *in vivo* απεικόνιση και στη θεραπεία του καρκίνου.^[36]

Ιδιαίτερα όσον αφορά τους νανοσωλήνες άνθρακα, διαθέτουν εξαιρετικές ηλεκτρικές και μηχανικές ιδιότητες, ενώ μπορούν να αλληλεπιδρούν και με τα κύτταρα ανάλογα με τη διεπιφάνεια, το σχήμα και το μέγεθός τους.^[30]

3.3.4. Μικύλλια

Τα μικύλλια σχηματίζονται από μια μεγάλη σειρά μορίων, τα οποία έχουν τη δυνατότητα αυτοοργάνωσης, όταν βρεθούν σε υδατικό περιβάλλον.^[30] Αποτελούμενα από έναν υδρόφοβο πυρήνα και από υδρόφιλα τμήματα, όπως φαίνεται στην εικόνα 5, σχηματίζουν δομές σε υδατικό περιβάλλον, που χαρακτηρίζονται από μεγάλη σταθερότητα.^[37] Λόγω του υδρόφοβου πυρήνα τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μεταφορά δυσδιάλυτων φαρμάκων.^[30]

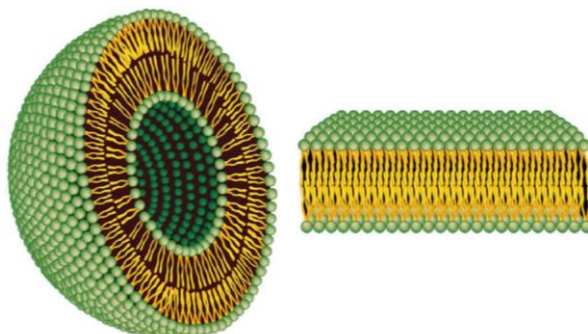


Εικόνα 5. Αναπαράσταση μικυλλίου

Έχουν, συνήθως, σφαιρικό σχήμα και κατηγοριοποιούνται ανάλογα με τις ουσίες από τις οποίες προέρχονται σε δύο είδη: επιφανειοδραστικά και πολυμερικά μικύλλια.^[38] Τα πολυμερικά μικύλλια παρουσιάζουν μεγαλύτερη θερμοδυναμική σταθερότητα σε βιολογικά διαλύματα.^[30]

3.3.5. Λιποσώματα και κυστίδια επιφανειοδραστικών ουσιών

Τα λιποσώματα (εικόνα 6) αποτελούν κλειστά ψευδο-σφαιρικά κυστίδια, που διαθέτουν έναν υδατικό πυρήνα με ένα περίβλημα μίας ή περισσότερων ομόκεντρων λιπιδικών διπλοστιβάδων.^[30,39]



Εικόνα 6. Αναπαράσταση λιποσώματος (αριστερά) και λιπιδικής διπλοστιβάδας (δεξιά)

Μια λιπιδική διπλοστιβάδα μπορεί να προέρχεται από φυσικά ή και συνθετικά λιπίδια. Κατά κύριο λόγο, οι διπλοστιβάδες σχηματίζονται από φωσφολιπίδια και χοληστερόλη, που λειτουργεί ως σταθεροποιητικός παράγοντας, ή από άλλα πολικά λιπίδια. Αυτά, λόγω αμφίφιλου χαρακτήρα, έχουν την τάση να προσανατολίζονται, όταν βρεθούν σε υδατικό περιβάλλον, έτσι ώστε οι υδρόφιλες πολικές κεφαλές τους να είναι στραμμένες προς το υδατικό μέσο, ενώ οι υδρόφοβες υδρογονανθρακικές αλυσίδες τους να προστατεύονται από τα μόρια του υδατικού μέσου. Τελικά, σχηματίζεται η δομή της διπλοστιβάδας, όπως φαίνεται στην εικόνα 6.^[30,39]

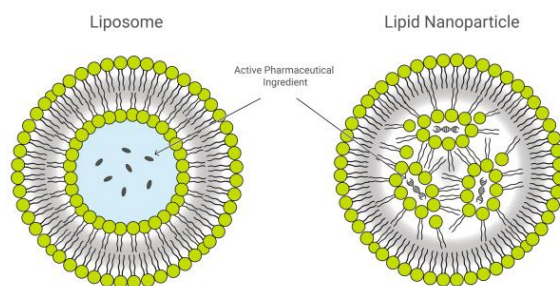
Τα λιποσώματα, εξαιτίας της μορφολογίας τους, που είναι παρόμοια με αυτή των κυτταρικών μεμβρανών, αλλά και της ικανότητάς τους να ενσωματώνουν υδρόφοβες και υδρόφιλες δραστικές ουσίες στη δομή τους, αποτελούν εξαιρετική επιλογή για συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, αλλά και

εμβολίων.^[39] Ταυτόχρονα, έχουν τη δυνατότητα να προστατέψουν τη δραστική ουσία που μεταφέρουν και να την αποδεσμεύσουν ελεγχόμενα στον επιθυμητό στόχο. Στο εμπόριο σήμερα κυκλοφορεί μεγάλος αριθμός λιποσωμικών σκευασμάτων για θεραπευτικούς σκοπούς, όπως την αντιμετώπιση του καρκίνου ή των σοβαρών μυκητιάσεων.^[30]

Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά την αντιμετώπιση του καρκίνου, κυκλοφορούν πολλά αντικαρκινικά λιποσωμικά προϊόντα, όπως είναι το Doxil/Caelyx, που αποτελεί λιποσωμική μορφοποίηση της δοξορουβικίνης, και το Myocet, το οποίο είναι, επίσης, προϊόν λιποσωμικής δοξορουβικίνης, χωρίς όμως υδρόφιλο πολυμερές στην επιφάνειά του. Τα λιποσωμικά αυτά προϊόντα μειώνουν την καρδιοτοξικότητα, αλλά και τις ανεπιθύμητες παρενέργειες της δοξορουβικίνης.^[30]

3.3.6. Στερεά λιπιδικά νανοσωματίδια

Τα λιπιδικά νανοσωματίδια είναι κολλοειδείς φορείς που προέρχονται από στερεά κατιοντικά λιπίδια, σε συνδυασμό με επιφανειοδραστικές και συνεπιφανειοδραστικές ουσίες για την αύξηση της σταθερότητάς τους.^[30,40] Συνήθως παρασκευάζονται με τη μορφή διασποράς με θερμή ή ψυχρή ομογενοποίηση και έχουν τέτοια μορφολογία, ώστε να μπορούν να εγκλωβίσουν φορτισμένα θεραπευτικά ή προστατευτικά μόρια.^[30,40] Η διαφορά τους με τα λιποσώματα, όπως φαίνεται και στην εικόνα 7, έγκειται στο ότι τα λιπιδικά νανοσωματίδια δεν σχηματίζουν λιπιδική διπλοστιβάδα.^[30]



Εικόνα 7. Μορφολογικές διαφορές μεταξύ λιποσωμάτων και λιπιδικών νανοσωματιδίων

Τα λιπιδικά νανοσωματίδια διακρίνονται στις εξής κατηγορίες: νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων (Solid Lipid Nanoparticles, SLNs), νανοδομημένοι λιπιδικοί νανοφορείς (Nanostructured Lipid Carriers), συζεύγματα λιπιδίου-φαρμάκου (Lipid-Drug Conjugates, LDCs) και υβριδικά νανοσωματίδια πολυμερών-λιπιδίων (Polymer-Lipid Hybrid Nanoparticles, PLNs).^[40]

Εμφανίζουν πολλά πλεονεκτήματα, μερικά από τα οποία είναι η άκαμπτη μορφολογία, η απλή σύνθεση, το μικρό μέγεθος και η κινητική σταθερότητα. Αυτά τους τα χαρακτηριστικά τα καθιστούν ιδανικά για τη μεταφορά μικρών μορίων, αλλά και γενετικού υλικού, κυρίως mRNA. Στερεά λιπιδικά νανοσωματίδια χρησιμοποιούνται στη χορήγηση φαρμάκων παρεντερικά, από το στόμα, οφθαλμικά, αλλά και διαδερμικά, ενώ μελέτες έχουν δείξει πως

μπορούν να βρουν εφαρμογή και στη στοχευμένη μεταφορά δραστικών μορίων.^[30,40] Ταυτόχρονα, σε πολύ αρχικά στάδια βρίσκονται μελέτες για τη χρήση λιπιδικών νανοσωματιδίων στον τομέα των τροφίμων.^[41]

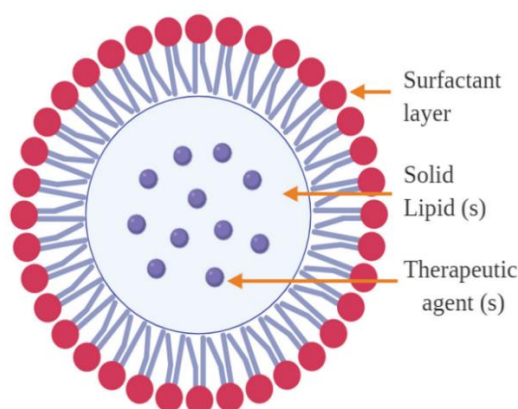
4. Νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων

4.1. Εισαγωγή

Τα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων (SLNs) εμφανίστηκαν για πρώτη φορά το 1991 και έκτοτε βρίσκονται στο επίκεντρο του τομέα της νανοτεχνολογίας, καθώς αποτελούν ένα εναλλακτικό σύστημα μεταφοράς φαρμάκων με πολλά πλεονεκτήματα, σε σχέση με τους κλασικούς κολλοειδείς φορείς.^[42,43]

Τα SLNs αποτελούν κολλοειδή συστήματα φορέων, που παρασκευάζονται από λιπίδια με υψηλό σημείο τήξης, τα οποία συνιστούν το στερεό λιπόφιλο πυρήνα του νανοσωματιδίου και επικαλύπτονται από έναν αμφίφιλο επιφανειοδραστικό παράγοντα, όπως φαίνεται και στην εικόνα 8.^[42,43] Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας λειτουργεί σταθεροποιητικά, καθώς μειώνει την επιφανειακή τάση μεταξύ υδατικής και λιπιδικής φάσης. Τα λιπίδια που χρησιμοποιούνται συχνότερα για την παρασκευή των SLNs είναι τα τριγλυκερίδια, τα λιπαρά οξέα, η χοληστερόλη, καθώς και διάφοροι κηροί, ενώ μεταξύ των επιφανειοδραστικών ουσιών οι πιο διαδεδομένες είναι οι Tween80, Span60 και Poloxamer407.^[30]

Τα SLNs είναι ιδανικά για τον εγκλωβισμό βιοδραστικών μορίων και κατ' επέκταση τη μεταφορά φαρμάκων, καθώς προσδίδουν σταθερότητα και προστατεύουν το μόριο από εξωγενείς παράγοντες.^[42,43]



Εικόνα 8. Δομή ενός νανοσωματιδίου στερεών λιπιδίων

Η χρήση των στερεών λιπιδίων πλεονεκτεί έναντι των υγρών, καθώς επιτρέπει την ελεγχόμενη αποδέσμευση της εγκλωβισμένης βιοδραστικής ένωσης. Ταυτόχρονα, τα SLNs παρουσιάζουν υψηλό ωφέλιμο φορτίο του φαρμάκου που μεταφέρουν, αυξάνοντας τη βιοδιαθεσιμότητά του. Τέλος, έχουν τη δυνατότητα

να εγκλωβίζουν λιπόφιλες, αλλά και υδρόφιλες δραστικές ουσίες, ενώ δεν παρουσιάζουν τοξικότητα.^[42,43]

4.2. Μέθοδοι παρασκευής

4.2.1. Ομογενοποίηση υψηλής πίεσης

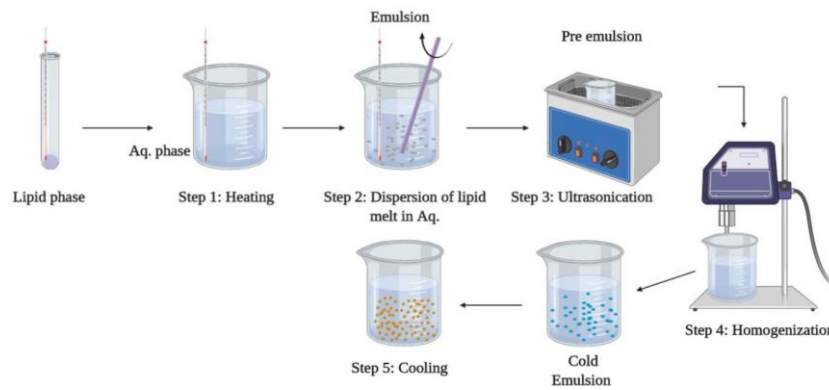
Η ομογενοποίηση υψηλής πίεσης είναι η πιο διαδεδομένη τεχνική παρασκευής SLNs λόγω της αξιοπιστίας της και του χαμηλού της κόστους. Τα λιπίδια που χρησιμοποιούνται είναι κατά κύριο λόγο φυσικής προέλευσης, για να αποφευχθεί πιθανή τοξικότητα.^[44]

Κατά την εφαρμογή της τεχνικής αυτής, ασκείται υψηλή πίεση 100-200 bar, που ωθεί το ρευστό που περιλαμβάνει το λιπίδιο και την επιφανειοδραστική ουσία (και το βιοδραστικό μόριο, αν υπάρχει) μέσα από ένα στενό χώρο του εύρους μερικών μικρών. Το ρευστό επιταχύνεται σε μια πολύ μικρή απόσταση ξεπερνώντας την ταχύτητα των 1000 km/h και τελικά, λόγω πολύ υψηλής διατμητικής τάσης και δυνάμεων σπηλαίωσης, τα σωματίδιά του διαταράσσονται, μέχρι να φτάσουν σε μέγεθος εύρους υπομικρών. Με την εφαρμογή της ομογενοποίησης υψηλής πίεσης, ακόμα και ρευστά με υψηλές συγκεντρώσεις λιπιδίων μπορούν να μετατραπούν σε νανοδιασπορές.^[34,44]

Η ομογενοποίηση υψηλής πίεσης μπορεί να είναι θερμή ή κρύα. Αυτό εξαρτάται από τη θερμοκρασία στην οποία γίνεται η προσθήκη της βιοδραστικής ένωσης στο ρευστό που περιλαμβάνει το λιπίδιο και την επιφανειοδραστική ουσία. Και στις δύο περιπτώσεις προηγείται ένα στάδιο προετοιμασίας.^[42]

Θερμή ομογενοποίηση

Σε αυτό το είδος της ομογενοποίησης, που γενικά θεωρείται ομογενοποίηση γαλακτώματος, επιλέγεται μια θερμοκρασία υψηλότερη από το σημείο τήξης του λιπιδίου. Αρχικά, όπως φαίνεται στην εικόνα 9, στη θερμοκρασία αυτή προετοιμάζεται ένα είδος προ-γαλακτώματος, που συνδυάζει μια υδατική επιφανειοδραστική ουσία, ένα λιπίδιο και μια βιοδραστική ένωση. Με τη χρήση μιας συσκευής ανάμειξης υψηλής διάτμησης το προ-γαλάκτωμα μετατρέπεται σε ένα γαλάκτωμα ελαίου σε νερό, που στη συνέχεια αφήνεται να ψυχθεί. Στο σημείο αυτό, αρχίζουν να σχηματίζονται κρύσταλλοι λιπιδίων και στη συνέχεια SLNs. Το στάδιο αυτό της ομογενοποίησης επαναλαμβάνεται συνήθως 3-5 φορές σε πίεση 500-1500 bar.^[34,44]



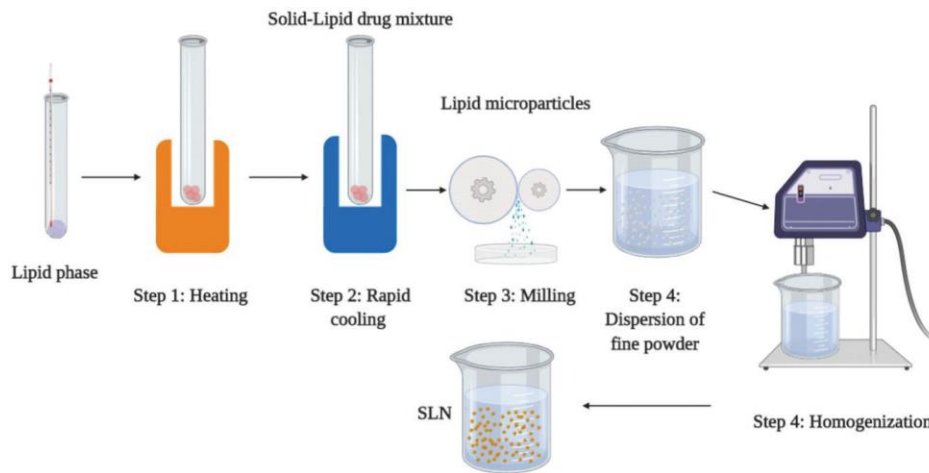
Εικόνα 9. Θερμή ομογενοποίηση

Ο σχηματισμός των στερεών νανοσωματιδίων μπορεί να καθυστερεί, εξαιτίας του μικρού μεγέθους των νανοσωματιδίων, αλλά και της παρουσίας γαλακτωματοποιητών.^[42,44,45]

Στην εφαρμογή της τεχνικής αυτής πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν παράγοντες που επηρεάζουν τα αποτελέσματά της. Αρχικά, η αυξημένη θερμοκρασία οδηγεί στο σχηματισμό νανοσωματιδίων μικρότερου μεγέθους, ωστόσο αυξάνει το ρυθμό με τον οποίο υποβαθμίζεται η βιοδραστική ένωση, αλλά και ο νανοφορέας. Επιπλέον, η αύξηση του αριθμού των κύκλων ομογενοποίησης ή της πίεσης αυξάνει το μέγεθος των παραγόμενων νανοσωματιδίων, εξαιτίας της αύξησης των ελκτικών δυνάμεων μεταξύ των μορίων.^[44]

Κρύα ομογενοποίηση

Στην τεχνική αυτή, όπως φαίνεται στην εικόνα 10, το πρώτο στάδιο, που αφορά τη διαλυτοποίηση ή διασπορά της βιοδραστικής ένωσης στο τηγμένο λιπίδιο, είναι ίδιο με τη θερμή ομογενοποίηση. Η διαφορά έγκειται στο ότι το τήγμα του λιπιδίου που περιέχει τη βιοδραστική ένωση ψύχεται ταχέως με τη βοήθεια στερεού διοξειδίου του άνθρακα ή υγρού αζώτου, ευνοώντας την ομογενή κατανομή της ένωσης στο στερεό φορέα. Το στερεό αυτό, στη συνέχεια, μετατρέπεται σε λεπτή σκόνη με τη χρήση μύλου και διασπείρεται στην υδατική επιφανειοδραστική ουσία. Η διασπορά υφίσταται ομογενοποίηση υψηλής πίεσης σε θερμοκρασία δωματίου, ή και χαμηλότερη, και έτσι σχηματίζονται τα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων.^[42,44]



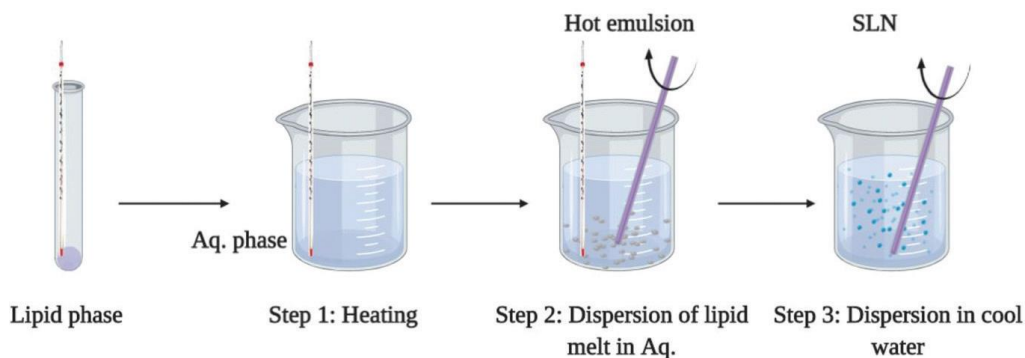
Εικόνα 10. Κρύα ομογενοποίηση

Σε σχέση με τη θερμή ομογενοποίηση, στην κρύα ομογενοποίηση παράγονται νανοσωματίδια μεγαλύτερου μεγέθους και ευρύτερης κατανομής. Ταυτόχρονα, μειώνεται η ευαισθησία, λόγω αύξησης της θερμοκρασίας, χωρίς όμως να αποφεύγεται εντελώς, εξαιτίας της τήξης του λιπιδίου στο πρώτο στάδιο.^[42,44,45]

4.2.2. Μέθοδος μικρογαλακτώματος

Τα μικρογαλακτώματα είναι θερμοδυναμικά σταθερά συστήματα, που αποτελούνται από μια λιπιδική φάση, έναν επιφανειοδραστικό παράγοντα και νερό. Πιο συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στην εικόνα 11, για την παρασκευή ενός μικρογαλακτώματος τήκεται, αρχικά, ένα λιπίδιο σε θερμοκρασία 65-70°C, ενώ στην ίδια θερμοκρασία θερμαίνεται και ένα μίγμα επιφανειοδραστικού παράγοντα με νερό. Το μίγμα αυτό προστίθεται στο λιπίδιο υπό ήπια ανάδευση δημιουργώντας ένα διάφανο, θερμοδυναμικά σταθερό σύστημα.^[46]

Το θερμό αυτό μικρογαλάκτωμα διασπείρεται σε κρύο νερό θερμοκρασίας 2-3°C σε αναλογία όγκων από 1:25 έως 1:50.^[42] Στο στάδιο αυτό σχηματίζονται τα SLNs. Ανάλογα με τη σύνθεση του μικρογαλακτώματος, ακολουθείται η κατάλληλη διαδικασία αραίωσης.^[46]



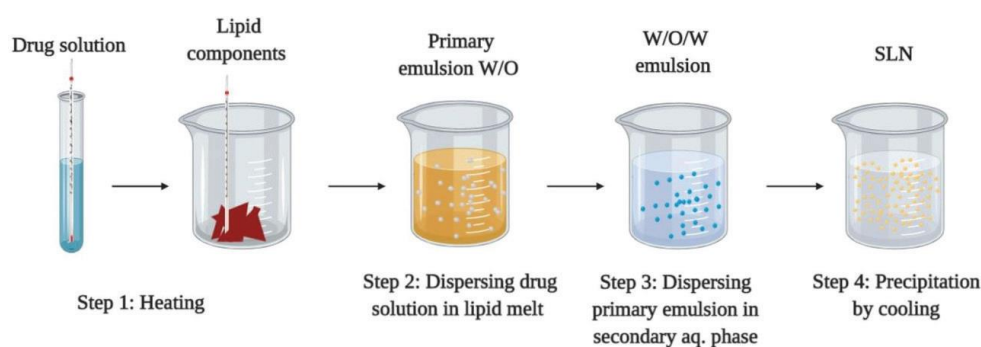
Εικόνα 11. Μέθοδος μικρογαλακτώματος

Η μέθοδος του μικρογαλακτώματος πλεονεκτεί στο ότι δεν χρειάζεται προσφορά ενέργειας για να επιτευχθεί ο σχηματισμός των νανοσωματιδίων. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το μέγεθος των νανοσωματιδίων εξαρτάται από την ταχύτητα της διασποράς του μικρογαλακτώματος σε κατάλληλο διαλύτη.

4.2.3. Μέθοδος διπλού γαλακτώματος

Η μέθοδος του διπλού γαλακτώματος χρησιμοποιείται κυρίως για την παρασκευή στερεών λιπιδικών νανοσωματιδίων φορτωμένων με υδρόφιλα μόρια. Είναι μέθοδος που βασίζεται στη γαλακτωματοποίηση και εξάτμιση διαλύτη.^[44]

Πιο συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στην εικόνα 12, αρχικά προετοιμάζεται ένα μικρογαλάκτωμα νερού σε έλαιο. Το γαλάκτωμα αυτό προκύπτει από την προσθήκη μιας υδατικής φάσης, που περιέχει μια βιοδραστική ένωση, σε ένα μίγμα τηγμένου λιπιδίου και επιφανειοδραστικού παράγοντα. Το αρχικό αυτό γαλάκτωμα παρασκευάζεται σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από το σημείο τήξης του λιπιδίου. Σε δεύτερη φάση, το μικρογαλάκτωμα που σχηματίστηκε προστίθεται σε ένα μίγμα νερού με επιφανειοδραστικό παράγοντα και τελικά σχηματίζεται ένα γαλάκτωμα νερού σε έλαιο σε νερό. Από αυτό το τελικό γαλάκτωμα τα νανοσωματίδια μπορούν να παραληφθούν με ψύξη, έκπλυση και φιλτράρισμα.^[42,44,46]

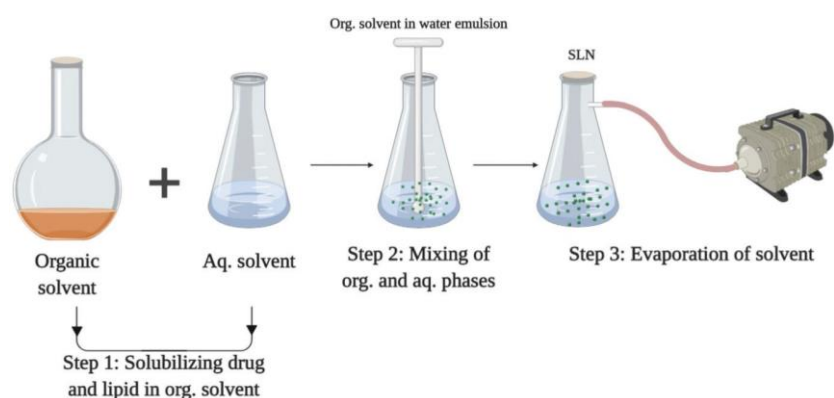


Εικόνα 12. Μέθοδος διπλού γαλακτώματος

Η τεχνική αυτή, όπως και όλες οι τεχνικές που περιλαμβάνουν το σχηματισμό πολλαπλών γαλακτωμάτων, παρουσιάζει το μειονέκτημα πως οδηγεί στο σχηματισμό γαλακτωμάτων με χαμηλή σταθερότητα.^[42] Πολύ σημαντική στην τεχνική αυτή είναι η χρήση του PLGA (poly(lactic-co-glycolic acid)) στο πρώτο στάδιο παρασκευής του αρχικού γαλακτώματος νερού σε έλαιο. Με την προσθήκη PLGA ενισχύεται η ικανότητα των SLNs για εγκλωβισμό βιοδραστικής ένωσης, ενώ βελτιώνεται και η σταθερότητα του γαλακτώματος, χωρίς να επηρεάζεται το μέγεθος των νανοσωματιδίων.^[44]

4.2.4. Μέθοδος γαλακτωματοποίησης-εξάτμισης του διαλύτη

Στη μέθοδο αυτή, όπως φαίνεται και στην εικόνα 13, το λιπίδιο και η υδρόφοβη δραστική ένωση διαλύονται σε έναν οργανικό διαλύτη μη αναμίξιμο με το νερό, όπως κυκλοεξάνιο, χλωροφόρμιο ή τολουόλιο. Στη συνέχεια, οι δύο φάσεις ομογενοποιούνται σε μία υδατική φάση με τη χρήση γαλακτωματοποιητή, μέσω ομογενοποίησης μεγάλης ταχύτητας. Το γαλάκτωμα αυτό αφήνεται να ρέει μέσα από έναν μικρορευστοποιητή. Για την εξάτμιση του διαλύτη χρησιμοποιείται περιστροφικός εξάτμιστήρας με μηχανική ανάδευση.^[42,44,46]



Εικόνα 13. Μέθοδος γαλακτωματοποίησης-εξάτμισης του διαλύτη

Το κύριο μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η πιθανή αλληλεπίδραση του οργανικού διαλύτη με τη βιοδραστική ένωση. Από την άλλη, όμως, το μεγάλο της πλεονέκτημα είναι η αποφυγή της θερμικής καταπόνησης, που επιτρέπει τον εγκλωβισμό θερμοευαίσθητων δραστικών ενώσεων.^[42,46]

4.3. Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων

Ο χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων είναι απαραίτητος, καθώς είναι αυτός που καθορίζει την ποιότητά τους. Για το σωστό χαρακτηρισμό, οι μέθοδοι που εφαρμόζονται θα πρέπει να έχουν υψηλή ευαισθησία σε παραμέτρους που σχετίζονται με τη λειτουργικότητα των νανοσωματιδίων. Με άλλα λόγια, ο χαρακτηρισμός λαμβάνει υπόψη παράγοντες που επηρεάζουν άμεσα τη σταθερότητα των νανοσωματιδίων και την κινητική αποδέσμευσης της εγκλωβισμένης ουσίας από αυτά.^[45]

4.3.1. Μέτρηση μεγέθους και χαρακτηρισμός μορφολογίας

Το μέγεθος των νανοσωματιδίων και η κατανομή των μεγεθών τους είναι από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά που μετριοούνται, καθώς αποτελούν δείκτη της σταθερότητάς τους και παράμετρο του ποιοτικού τους ελέγχου. Για το λόγο αυτό, διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στις μακροσκοπικές ιδιότητες του νανοσυστήματος.^[47]

Πιο συγκεκριμένα, τα καλώς διαμορφωμένα νανοσυστήματα θα πρέπει να παρουσιάζουν στενή κατανομή μεγέθους σωματιδίων και σωματίδια μεγέθους

μικρότερου από 1 μm. Διαφορετικά, το σύστημα χαρακτηρίζεται από αστάθεια. Το μέγεθος των νανοσωματιδίων γενικά επηρεάζεται από παράγοντες, όπως τα συστατικά από τα οποία αποτελούνται, τη μέθοδο παρασκευής και τις συνθήκες στις οποίες αυτή πραγματοποιήθηκε. Μετρώντας τα μεγέθη των νανοσωματιδίων σε βάθος χρόνου κατά την αποθήκευση και παρατηρώντας τις μεταβολές τους, οι προαναφερθείσες παράμετροι τροποποιούνται, με σκοπό την επίτευξη της καλύτερης ποιότητας των παραγόμενων νανοσωματιδίων.^[47]

Γενικά, έχει παρατηρηθεί πως το μέγεθος των νανοσωματιδίων μειώνεται, όταν η αναλογία επιφανειοδραστικού παράγοντα/λιπιδίου αυξάνεται, ενώ η αυξημένη συγκέντρωση επιφανειοδραστικού παράγοντα οδηγεί στην αύξηση του μεγέθους κατά την αποθήκευση. Επιπλέον, οι μεγαλύτερες θερμοκρασίες κατά την παρασκευή ευνοούν το σχηματισμό νανοσωματιδίων μικρότερων μεγεθών, γι' αυτό και η θερμή ομογενοποίηση προτιμάται σε σχέση με την κρύα. Η πίεση παίζει, επίσης, καθοριστικό ρόλο στο τελικό μέγεθος των νανοσωματιδίων. Συγκεκριμένα, η αυξημένη πίεση (1500 bar) αυξάνει την αποτελεσματικότητα της ομογενοποίησης, οδηγώντας στο σχηματισμό νανοσωματιδίων μικρότερου μεγέθους και στενότερης κατανομής μεγέθους.^[47]

Η μέθοδος της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS) ή αλλιώς Φασματοσκοπία Συσχέτισης Φωτονίων (Photon Correlation Spectroscopy, PCS) αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο μέτρησης μεγέθους νανοσωματιδίων, καθώς είναι μη επεμβατική, σύντομη, εύκολη και σχετικά οικονομική. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στον υπολογισμό του συντελεστή διάχυσης D των σωματιδίων μέσω φωτοβόλησης του δείγματος με μονοχρωματική ακτινοβολία και καταγραφής των διακυμάνσεων του σκεδαζόμενου φωτός, που οφείλονται στις τυχαίες κινήσεις Brown των σωματιδίων. Το μέγεθος των νανοσωματιδίων, όπως αυτό εκφράζεται από τη μέση υδροδυναμική διάμετρο, υπολογίζεται από την εξίσωση Stokes-Einstein:

$$D = \frac{K_B T}{6\pi\eta a} \quad (1)$$

όπου D : ο συντελεστής διάχυσης [$\frac{m^2}{s}$], T : η απόλυτη θερμοκρασία [K], K_B : η σταθερά Boltzman [$\frac{m^2 kg}{K s^2}$], η το ιξώδες του διαλύτη [Pa·s] και a : η υδροδυναμική ακτίνα του σωματιδίου [m].^[30]

Η DLS, ωστόσο, είναι μια μέθοδος ευαίσθητη στην παρουσία μεγαλύτερων σωματιδίων, γεγονός που μπορεί να αποτελέσει μειονέκτημα στον ακριβή προσδιορισμό των μεγεθών των σωματιδίων. Αντίθετα, η μέθοδος Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) είναι μια καινοτόμα μέθοδος που μπορεί να υπολογίσει το μέγεθος μορίων από 30 έως 1000 nm, ανάλογα με το δείκτη διάθλασής τους. Η τεχνική αυτή συνδυάζει τη μικροσκοπία σκέδασης φωτός λέιζερ με μια κάμερα συσκευής συζευγμένη με φορτίο, επιτρέποντας την οπτικοποίηση και καταγραφή των νανοσωματιδίων σε ένα διάλυμα. Το λογισμικό της μεθόδου μπορεί στη συνέχεια να ταυτοποιήσει και να παρακολουθήσει μεμονωμένα νανοσωματίδια που κινούνται σύμφωνα με την κίνηση κατά Brown και να

συνδέσει την κίνηση αυτή με το μέγεθός τους μέσω της εξίσωσης Stokes-Einstein (εξίσωση 1).^[48]

Το μέγεθος των νανοσωματιδίων μπορεί, επίσης, να προσδιοριστεί και από άλλες μεθόδους, όπως οι Laser Diffraction (LD), Static Light Scattering (SLS), Nuclear Magnetic Resonance (NMR), Scanning και Transmission Microscopy (SEM και TEM) ακόμα και Atomic Force Microscopy (AFM).^[42,44]

4.3.2. Μέτρηση ζ-δυναμικού και ηλεκτρικού φορτίου

Η μέτρηση του ζ-δυναμικού δίνει τη δυνατότητα πρόβλεψης της σταθερότητας των σωματιδίων μιας κολλοειδούς διασποράς. Είναι γενικά αποδεδειγμένο, ότι τα φορτισμένα σωματίδια, που έχουν υψηλό κατά απόλυτη τιμή ζ-δυναμικό, αποφεύγουν τη συσσωμάτωση, εξαιτίας των ηλεκτρικών απώσεων. Αντίθετα, η χαμηλή τιμή του ζ-δυναμικού κατά απόλυτη τιμή, σημαίνει πως οι έλξεις μεταξύ των σωματιδίων είναι ισχυρότερες από τις απώσεις και για το λόγο αυτό η συσσωμάτωση δεν μπορεί να αποφευχθεί. Γενικά, για να χαρακτηριστεί μια διασπορά σταθερή, θα πρέπει να έχει ζ-δυναμικό, είτε μεγαλύτερο από +30 mV, είτε μικρότερο από -30 mV.^[45,47]

Η αύξηση της ενέργειας είναι ένας παράγοντας που επηρεάζει το ζ-δυναμικό ενός κολλοειδούς συστήματος. Πιο συγκεκριμένα, σε υψηλές θερμοκρασίες και με έκθεση στο φως, η κινητική ενέργεια του συστήματος αυξάνεται προκαλώντας συσσωμάτωση ή και ζελατινοποίηση, που συνοδεύεται από μείωση της απόλυτης τιμής του ζ-δυναμικού.^[47]

Γενικά, η μέτρηση του ζ-δυναμικού πραγματοποιείται μέσω ηλεκτροφόρησης.^[45]

4.3.3. Μέτρηση κρυσταλλικότητας

Για να χαρακτηριστεί πλήρως η ποιότητα των νανοσωματιδίων δεν είναι αρκετή μόνο η μέτρηση του μεγέθους και του ζ-δυναμικού. Είναι απαραίτητο να χαρακτηριστεί η λιπιδική κρυσταλλικότητα, αλλά και η όποια τροποποίηση του λιπιδίου, καθώς τα μεγέθη αυτά συνδέονται άμεσα με τη δυνατότητα ενσωμάτωσης δραστικών ουσιών στα νανοσωματίδια και την απελευθέρωσή τους από αυτά.^[45,47]

Οι ομογενοποιημένες διασπορές ιδανικά πρέπει να ψύχονται σε θερμοκρασία χαμηλότερη από την κρίσιμη θερμοκρασία κρυστάλλωσης, έτσι ώστε τα νανοσωματίδια της διασποράς να υφίστανται κρυστάλλωση και να μετατρέπονται σε στερεά. Η μετατροπή αυτή σε μια πιο σταθερή λιπιδική δομή συνοδεύεται από μια αναδιάταξη των λιπιδικών μορίων, που αυξάνει την πυκνότητα του πλέγματος. Ωστόσο, η μέθοδος σχηματισμού της διασποράς, η παρουσία ή όχι επιφανειοδραστικού παράγοντα, η συγκέντρωση του λιπιδίου και το σημείο τήξης του, αλλά και το μικρό μέγεθος των σχηματιζόμενων νανοσωματιδίων μπορεί να επηρεάσουν το βαθμό κρυστάλλωσης και τις τροποποιήσεις στο κρυσταλλικό πλέγμα των μορίων.^[47]

Σε ό,τι αφορά τον εγκλωβισμό δραστικής ουσίας στα νανοσωματίδια έχει αποδειχτεί, ότι μια πιο ακανόνιστη διάταξη των λιπιδικών κρυστάλλων ευνοεί την ικανότητα φόρτωσης των νανοσωματιδίων. Αυτό συμβαίνει, γιατί ο εγκλωβισμός της δραστικής ουσίας οδηγεί το σύστημα σε μια πιο σταθερή δομή.^[47]

Η κρυσταλλικότητα μετριέται κατά κύριο λόγο με τις μεθόδους Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry, DSC) και Περίθλασης ακτίνων X (X-ray Diffraction). Η DSC εκμεταλλεύεται το γεγονός ότι οι διαφορετικές λιπιδικές δομές παρουσιάζουν διαφορετικό σημείο τήξης και ενθαλπίες τήξης. Η σκέδαση ακτίνων X, από την άλλη, μπορεί να εκτιμήσει το μήκος των διαστημάτων του λιπιδικού πλέγματος.^[42,45]

4.4. Εφαρμογές

Τα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων παρουσιάζουν ένα συνδυασμό πλεονεκτημάτων, γεγονός που τα κάνει να υπερέχουν σε σχέση με τους υπόλοιπους κολλοειδείς φορείς. Μερικά μόνο από αυτά είναι η αυξημένη σταθερότητά τους, η δυνατότητά τους για εγκλωβισμό λιπόφιλων, αλλά και υδρόφιλων ενώσεων, η βελτιωμένη βιοδιαθεσιμότητα των εγκλωβισμένων ενώσεων και η στοχευμένη μεταφορά τους, σε συνδυασμό με την ελεγχόμενη αποδέσμευσή τους.^[42]

Τα πλεονεκτήματα αυτά, καθώς και το γεγονός ότι παρασκευάζονται από λιπίδια φυσικής προέλευσης, καθιστούν τα SLNs ιδανικά για συστήματα μεταφοράς φαρμάκων. Αυτό προϋποθέτει την ενσωμάτωση του φαρμάκου στο λιπιδικό πλέγμα των στερεών νανοσωματιδίων. Οι πιθανές εφαρμογές των SLNs σχετίζονται με την οδό χορήγησης του εκάστοτε φαρμάκου, όπως είναι η παρεντερική, η οφθαλμική, η διαδερμική και η από του στόματος χορήγηση.^[42,45,47]

Στις περισσότερες περιπτώσεις τα SLNs χορηγούνται ενδοφλέβια, ενδομυϊκά ή υποδόρια με ελάχιστο κίνδυνο θρόμβωσης ή εμβολής. Εξαιτίας, όμως, της αστάθειας ορισμένων μορίων στη γαστρεντερική οδό, προτιμάται να χορηγούνται παρεντερικά, δηλαδή κατευθείαν στο έντερο.^[47] Μελέτες φαρμακοκινητικής της δοξορουβικίνης, κατά τις οποίες χορηγήθηκαν ενδοφλέβια SLNs της ένωσης σε αρουραίους, έδειξαν υψηλότερη συγκέντρωση του φαρμάκου στο αίμα, σε σχέση με τη χορήγησή της ενδοφλέβια με τη μορφή ορού. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί πως η χορήγηση καμπτοθεκίνης εγκλωβισμένης σε SLNs σε αρουραίους οδηγεί σε υψηλότερο AUC (περιοχή κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης-χρόνου) ανά δόση και υψηλότερο χρόνο παραμονής, σε σχέση με τη χορήγηση του φαρμάκου με τη μορφή ορού.^[42,45]

Ακόμα, με τη χρήση των SLNs αντιμετωπίζεται το σημαντικότερο από τα μειονεκτήματα που παρουσιάζει η οφθαλμική χορήγηση, δηλαδή η ταχεία αφαίρεση του φαρμάκου από το μάτι. Τα νανοσωματίδια παρατείνουν τη διάρκεια της δράσης του φαρμάκου στο μάτι, εξαιτίας της αυξημένης

ικανότητάς τους για προσκόλληση, χωρίς να παρεμποδίζουν ή να καταστρέφουν την όραση. Μελέτες έχουν δείξει, πως η χρήση των SLNs βελτιώνει την οφθαλμική βιοδιαθεσιμότητα σε φάρμακα, όπως η τιμολόλη, η πιλοκαρπίνη και η τομπραμυκίνη.^[42,47]

Η από του στόματος χορήγηση είναι η πιο εύκολη και ελκυστική οδός για την χορήγηση φαρμάκων, αλλά ταυτόχρονα παραμένει και μια μεγάλη πρόκληση, αφού εμφανίζει τον πλέον περίπλοκο μηχανισμό απορρόφησης, που επηρεάζεται από πολυάριθμες παραμέτρους. Η ενσωμάτωση δραστικών ουσιών σε SLNs δίνει νέες προοπτικές για αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα, αλλά και υψηλά επίπεδα συγκέντρωσης στο πλάσμα του αίματος.^[47] Η χορήγηση SLNs από τη στοματική οδό περιλαμβάνει υδατικές διασπορές ή παραδοσιακές μορφές δοσολογίας που περιέχουν τα νανοσωματίδια, όπως κάψουλες και δισκία. Το μικροκλίμα του στομάχου είναι αυτό που ευνοεί τη συσσωμάτωση των μορίων λόγω της οξύτητας και της ιοντικής ισχύος. Μελέτη που πραγματοποιήθηκε για την καμπτοθεκίνη ενσωματωμένη σε SLNs έδειξε, πως τα νανοσωματίδια αποτελούν ένα πολλά υποσχόμενο σύστημα ελεγχόμενης αποδέσμευσης λιπόφιλων φαρμάκων για χορήγηση από το στόμα.^[42,44] Αυτό βασίζεται στο ότι η αποδέσμευση του φαρμάκου από το πλέγμα των SLNs, που πραγματοποιείται με διάχυση και ενζυμική υποβάθμιση, αλλά και ο ρυθμός της, μπορούν να τροποποιηθούν ανάλογα με τη σύνθεση του λιπιδικού πλέγματος. Ενδεικτικά, η ενσωμάτωση φαρμάκων σε SLNs έχει οδηγήσει σε βελτιωμένη βιοδιαθεσιμότητα σε περιπτώσεις, όπως η κυκλοσπορίνη, η κλοζαπίνη, η ιδαρουβική και η πιριβεδίλη.^[47]

Τα SLNs διαθέτουν ποικίλες ιδιότητες, που τα καθιστούν ένα ιδιαίτερα ελκυστικό κολλοειδές σύστημα φορέα για εφαρμογή στο δέρμα.^[46] Στις περισσότερες περιπτώσεις, η διασπορά των νανοσωματιδίων ενσωματώνεται σε μια αλοιφή ή ένα gel, που βρίσκουν εφαρμογή σε κατεστραμμένο ή ερεθισμένο δέρμα.^[44,46] Τα SLNs, προερχόμενα από μη τοξικά και μη ερεθιστικά λιπίδια, εμφανίζουν την ικανότητα να αποφράζουν το δέρμα αυξάνοντας την ενυδάτωση, εξομαλύνοντας τις ρυτίδες και επιτρέποντας τη μεταφορά ενώσεων σε συγκεκριμένα στρώματα του δέρματος. Ταυτόχρονα, παρέχουν τη δυνατότητα για ελεγχόμενη αποδέσμευση μιας δραστικής ουσίας, επιτρέποντας τη χορήγηση ενός φαρμάκου για παρατεταμένο χρονικό διάστημα και περιορίζοντας τη συστηματική απορρόφηση.^[47]

Οι προαναφερθείσες ιδιότητες που αφορούν τη διαδερμική χορήγηση φαρμάκων, καθιστούν τα SLNs ιδανικά για χρήση στη βιομηχανία των καλλυντικών. Σε συνδυασμό με την ικανότητά τους να μπλοκάρουν την UV ακτινοβολία, βρίσκουν εφαρμογή στη σύνθεση αντηλιακών, αλλά και ενυδατικών σκευασμάτων.^[49]

Τέλος, μια εφαρμογή των SLNs πολλά υποσχόμενη και μεγάλης σημασίας για την αντιμετώπιση των νευροεκφυλιστικών ασθενειών είναι η χρήση τους για τη χορήγηση φαρμάκων, που μπορούν να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να φτάσουν μέχρι τον εγκέφαλο. Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός

αποτελεί έναν ιδιαίτερα αποτελεσματικό φραγμό, που επιτρέπει εκλεκτικά να φτάσουν στον εγκέφαλο μόνο τα μόρια εκείνα που είναι απαραίτητα για τη λειτουργία του. Για να φτάσει ένα φάρμακο στον εγκέφαλο, θα πρέπει να περάσει από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών του ή να μεταφερθεί ενεργητικά. Οι μέχρι τώρα έρευνες έχουν δείξει πως μικρής κλίμακας λιποφιλικά μόρια (μικρότερα από 40 Da) έχουν τη δυνατότητα, μέσω διάχυσης, να διαπεράσουν το ενδοθήλιο του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Δηλαδή, τα SLNs λόγω του σχήματος και των ιδιοτήτων τους μπορούν να μεταφέρουν μια δραστική ουσία περνώντας το εμπόδιο του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, στοχεύοντας στον εγκέφαλο, ώστε να αντιμετωπιστούν ασθένειες του κεντρικού νευρικού συστήματος.^[50]

5. Ακετυλοχολινεστεράση και Alzheimer

5.1. Ακετυλοχολινεστεράση (AChE)

Η ακετυλοχολινεστεράση (AChE) ή αλλιώς ακετυλοϋδρολάση ακετυλοχολίνης ανήκει στις α/β υδρολάσες, μια οικογένεια πρωτεϊνών, που περιλαμβάνει τις χολινεστεράσες, τις καρβοξυλεστεράσες και τις λιπάσες. Συναντάται σε όλα τα σπονδυλωτά και μη θηλαστικά, σε πολλά είδη των αγγύγιμων ιστών τους, όπως νεύρα, μύες, κεντρικούς και περιφερικούς ιστούς, χολινεργικές και μη ίνες. Ωστόσο, μελέτες αναφέρουν πως πρωτεΐνες παρόμοιες με την ακετυλοχολινεστεράση συναντώνται και σε φύκη, όπως το *Paramecium*.^[51,52]

Η ακετυλοχολινεστεράση συμμετέχει στη λειτουργία του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος, μαζί με τον υποδοχέα της ακετυλοχολίνης.^[53] Ο φυσιολογικός ρόλος της ακετυλοχολινεστεράσης είναι ο τερματισμός της μετάδοσης παλμών στις χολινεργικές συνάψεις μέσω της ταχείας υδρόλυσης του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη.^[54] Δηλαδή, το ένζυμο καταλύει την υδρόλυση της ακετυλοχολίνης, που αποτελεί κατιονικό νευροδιαβιβαστή, σταματώντας τη μετάδοση παλμών και τη νευροδιαβίβαση.^[53]

Το ένζυμο της ακετυλοχολινεστεράσης παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με αυτό της βουτυρυλοχολινεστεράσης (BuChE), καθώς και με άλλες μη ενζυμικές πρωτεΐνες, όπως η νευρολιγνίνη και η θυρογλοβουλίνη. Η βουτυρυλοχολινεστεράση, ή αλλιώς ψευδοχολινεστεράση, βρίσκεται κυρίως στο ανθρώπινο συκώτι και υδρολύει τη βουτυρυλοχολίνη, ταχύτερα απ' ό,τι η ακετυλοχολινεστεράση την ακετυλοχολίνη.^[51,52] Είναι γενικότερα υπεύθυνη για την υδρόλυση διάφορων εστέρων και γι' αυτό έχει μελετηθεί με σκοπό την κατανόηση μεταβολικών μονοπατιών.^[55]

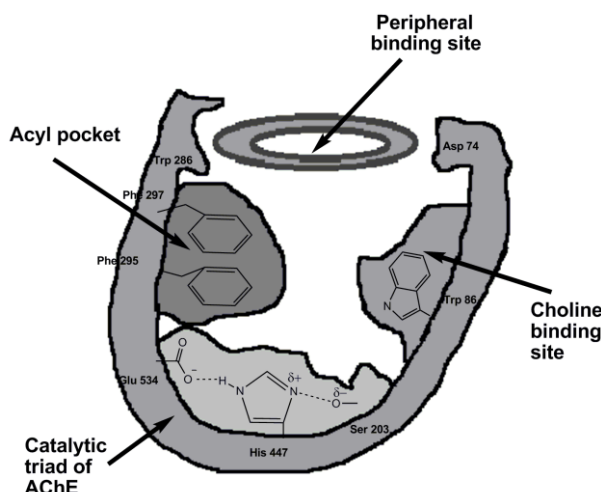
Η μελέτη του ενζύμου έχει οδηγήσει στο συμπέρασμα πως υπάρχουν δύο τάξεις ακετυλοχολινεστεράσης: η σφαιρική και η ασύμμετρη μορφή. Οι ασύμμετρες μορφές παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς διαθέτουν μια ασυνήθιστη

δομή, στην οποία οι καταλυτικές υπομονάδες είναι προσκολλημένες σε μία ουρά κολλαγόνου τριπλής έλικας.^[54]

5.1.1. Δομή ακετυλοχολινεστεράσης

Η ακετυλοχολινεστεράση είναι μια υδρολάση σερίνης με εξαιρετικά υψηλή καταλυτική ικανότητα. Κάθε μόριό της αποικοδομεί περίπου 25000 μόρια χολίνης το δευτερόλεπτο.^[52]

Το μόριό της ακετυλοχολινεστεράσης έχει ελλειψοειδές σχήμα με διαστάσεις 45×60×65 Å. Το μονομερές που αποτελεί τη δομική μονάδα του ενζύμου είναι μια α/β πρωτεΐνη, που αποτελείται από 12 κλώνους β-πτυχωτών φύλλων, τα οποία περιβάλλονται από 14 α-έλικες. Το πιο αξιοσημείωτο κομμάτι της δομής είναι ένα βαθύ και στενό «φαράγγι» με βάθος περίπου 20 Å, το οποίο φτάνει έως τη μέση του ενζύμου και πλαταίνει στη βάση του, όπως φαίνεται στην εικόνα 14. Το ενεργό κέντρο του ενζύμου βρίσκεται 4 Å από τον πυθμένα του και αποτελείται από τέσσερις υπομονάδες.^[52]



Εικόνα 14. Σχηματική αναπαράσταση της δομής της ακετυλοχολινεστεράσης

Η εστερατική υπομονάδα (esteratic subsite), που αποτελεί το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου, βρίσκεται στον πυθμένα του και απαρτίζεται από τα εξής τρία καταλυτικά αμινοξέα: ιστιδίνη 447, σερίνη 203 και γλουταμινικό οξύ 534. Στην υπομονάδα αυτή, πραγματοποιείται η υδρόλυση της ακετυλοχολίνης σε χολίνη και οξικό άλας.^[51,52,56]

Η ανιονική υπομονάδα (anionic subsite), αποτελείται από τα αμινοξέα τρυπτοφάνη 86, τυροσίνη 133, τυροσίνη 337 και φαινυλαλανίνη 338, είναι λιπόφιλη και ουδέτερα φορτισμένη. Γι' αυτό το λόγο, επιτρέπει την πρόσδεση με αλληλεπιδράσεις κατιόντος-π, της θετικά φορτισμένης τεταρτοταγούς αμίνης της χολίνης, αλλά και των υπόλοιπων τεταρτοταγών μορίων που λειτουργούν ως ανταγωνιστικοί αναστολείς. Τα κατιοντικά υποστρώματα δεν προσδένονται στα αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα της ανιονικής υπομονάδας, αλλά αλληλεπιδρούν με 14 αρωματικά αμινοξέα που αποτελούν το «φαράγγι» που

οδηγεί στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Από τα 14 αυτά αμινοξέα, η τρυπτοφάνη 86 είναι υψίστης σημασίας, καθώς η αντικατάστασή της, για παράδειγμα με αλανίνη, μπορεί να μειώσει την ενζυμική δραστηριότητα έως και 3000 φορές.^[51,52,56]

Η υπομονάδα «acyl rocket» αποτελείται από τα αμινοξέα φαινυλαλανίνη 295 και φαινυλαλανίνη 297. Αυτή είναι υπεύθυνη για την εκλεκτικότητα των υποστρωμάτων, εμποδίζοντας την πρόσβαση σε μεγαλύτερα μόρια της ομάδας των εστέρων χολίνης.^[51]

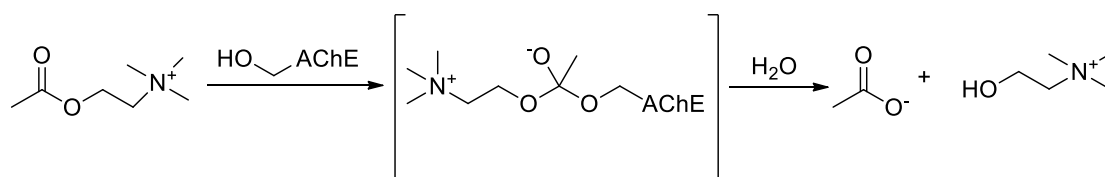
Τέλος, η υπομονάδα «oxyanion hole» αποτελείται από γλυκίνη 121, γλυκίνη 122 και αλανίνη 204. Ο ρόλος της περιλαμβάνει την παροχή δοτών δεσμών υδρογόνου που σταθεροποιούν την τετραεδρική μεταβατική δομή του υποστρώματος κατά την κατάλυσή του.^[53] Συγκεκριμένα, όσον αφορά την υδρόλυση της ακετυλοχολίνης, η υπομονάδα αυτή αλληλεπιδρά με το καρβονυλικό οξυγόνο και το οξυγόνο της εστερομάδας της ακετυλοχολίνης.^[56]

Εκτός από το ενεργό της κέντρο, η ακετυλοχολινεστεράση απαρτίζεται και από ένα ή περισσότερα περιφερειακά ανιονικά κέντρα, διαφορετικά από αυτό στο οποίο προσδένεται η χολίνη. Τα κέντρα αυτά προορίζονται για την πρόσδεση άλλων τεταρτοταγών μορίων που δρουν ως μη συναγωνιστικοί αναστολείς.^[52]

Η γνώση της δομής της ακετυλοχολινεστεράσης είναι απαραίτητη για την κατανόηση της υψηλής καταλυτικής της αποτελεσματικότητας, καθώς και της δράσης της, φαρμακολογικής και τοξικολογικής, με σκοπό τη χρήση της στο σχεδιασμό φαρμάκων.^[52]

5.1.2. Δράση ακετυλοχολινεστεράσης

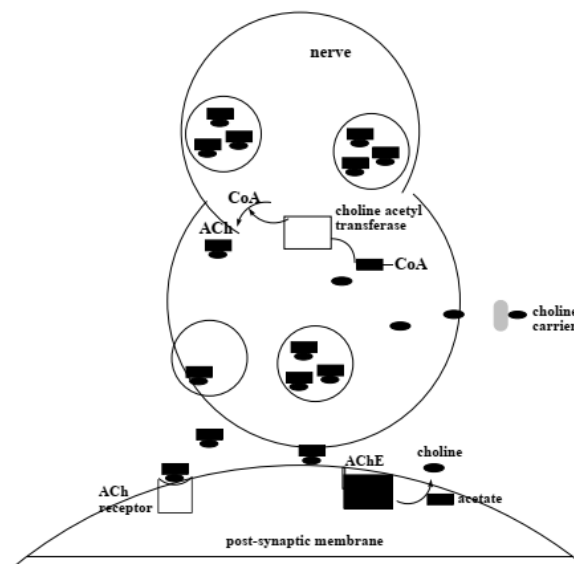
Ο κύριος ρόλος της ακετυλοχολινεστεράσης, όπως προαναφέρθηκε, είναι η ταχεία υδρόλυση της ακετυλοχολίνης στη σύναψη και το νευρομυϊκό σύνδεσμο (σχήμα 27). Αποτέλεσμα της αντίδρασης αυτής είναι ο τερματισμός του νευρικού παλμού.^[51,55]



Σχήμα 27. Υδρόλυση ακετυλοχολίνης με ακετυλοχολινεστεράση

Πιο συγκεκριμένα, η ακετυλοχολίνη αποτελεί το νευροδιαβιβαστή σε όλα τα αυτόνομα γάγγλια και στα περισσότερα αυτόνομα νευρωμένα όργανα. Η πλειονότητά της στις νευρικές απολήξεις περιέχεται σε κυστίδια μεγέθους 100 nm, αλλά βρίσκεται και σε ελεύθερη μορφή στο κυτταρόπλασμα. Κατά τη διάρκεια της νευροδιαβίβασης, η ακετυλοχολίνη απελευθερώνεται από το νεύρο στη συναπτική σχισμή και προσδένεται στους υποδοχείς (νικοτινικός και

μουσκαρινικός υποδοχέας), που βρίσκονται στο μετασυναπτικό άκρο, αναμεταδίδοντας το σήμα από το νεύρο. Η ακετυλοχολινεστεράση, που βρίσκεται κι αυτή στο μετασυναπτικό άκρο, τερματίζει τη μετάδοση του σήματος με την υδρόλυση της ακετυλοχολίνης. Η χολίνη που παράγεται από την υδρόλυση συλλέγεται από το προσυναπτικό άκρο και ο νευροδιαβιβαστής συντίθεται ξανά. Ο μηχανισμός δράσης της ακετυλοχολινεστεράσης στη νευροδιαβίβαση παρουσιάζεται στο σχήμα 28.^[52]



Σχήμα 28. Μηχανισμός δράσης της ακετυλοχολινεστεράσης

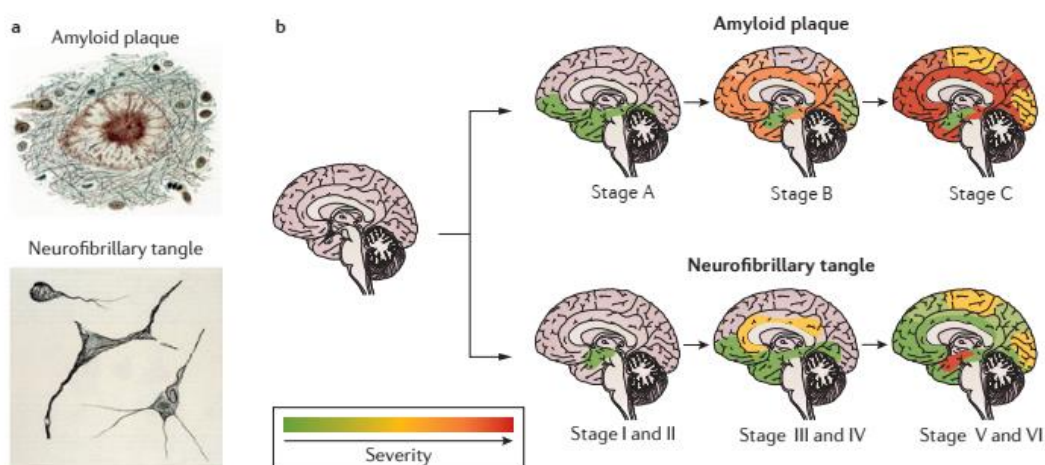
5.2. Νόσος Alzheimer

Η νόσος του Alzheimer (Alzheimer's disease, AD) αποτελεί την κύρια αιτία άνοιας. Πήρε την ονομασία της από το Γερμανό ψυχίατρο Alois Alzheimer, ο οποίος περιέγραψε τα πρώτα περιστατικά της νόσου τον 20^ο αιώνα, αναφέροντας συμπτώματα όπως διαταραχή της μνήμης και νευροπαθολογική εικόνα με πυκνές δέσμες ινιδίων, συμπτώματα που σήμερα αποτελούν χαρακτηριστικά της νόσου.^[57]

Η νόσος Alzheimer είναι μια νευροεκφυλιστική διαταραχή, προοδευτική και αδιάκοπη, που επηρεάζει περιοχές του εγκεφάλου, όπως ο εγκεφαλικός φλοιός και ο ιππόκαμπος. Οι ανωμαλίες της νόσου που σχετίζονται με τον εγκεφαλικό ιστό, αρχικά εντοπίζονται στο μετωπιαίο και τον κροταφικό λοβό και σταδιακά επεκτείνονται και στον υπόλοιπο εγκεφαλικό φλοιό με ρυθμό που διαφέρει από άτομο σε άτομο.^[58]

Από γενετικής άποψης, η νόσος του Alzheimer είναι μια ετερογενής διαταραχή, η οποία σε ορισμένες περιπτώσεις είναι κληρονομική, ενώ σε άλλες όχι. Κατά μέσο όρο διαρκεί 8-10 χρόνια, συνήθως όμως εμφανίζει προκλινικά στάδια που μπορεί να φτάνουν και τις δύο δεκαετίες. Δύο είναι οι πιο διαδεδομένες υποθέσεις που εξηγούν την παθολογία της νόσου, η χολινεργική και η αμυλοειδής. Η χολινεργική υπόθεση θεωρεί πως η νόσος προκύπτει από

ανεπάρκεια του εγκεφαλικού νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη, της οποίας η υδρόλυση καταλύεται από το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση. Η αμυλοειδής υπόθεση, από την άλλη, υποστηρίζει πως το Alzheimer αποδίδεται κυρίως στη συσσώρευση αδιάλυτης μορφής του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου (Aβ) σε εξωκυτταρικούς χώρους, τις λεγόμενες πλάκες (plaques), σε πυκνές δέσμες ινιδίων (tangles), αλλά και στα τοιχώματα των αιμοφόρων αγγείων, όπως φαίνεται στην εικόνα 15. Το β-αμυλοειδές πεπτίδιο προκύπτει από την πρωτεολυτική διάσπαση της πρωτεΐνης APP (amyloid precursor protein) από μια σύνθετη ομάδα ενζύμων, τις γ- και β- σεκρετάσες. Η νόσος οφείλεται, επίσης, στη συσσώρευση της πρωτεΐνης TAU στους νευρώνες.^[57,58,59]



Εικόνα 15. (α) Συσσωρευμένο β-αμυλοειδές πεπτίδιο σε πλάκες και δέσμες ινιδίων, (β) Παθολογική εξέλιξη της νόσου Alzheimer

Η επιδημιολογία της νόσου αποτελεί το αντικείμενο πολλών ερευνών, ειδικά τα τελευταία 30 χρόνια. Ωστόσο, τα αποτελέσματα των περισσότερων δεν είναι ξεκάθαρα, καθώς συγχέονται οι μεταβλητές συννοσηρότητας. Παρόλα αυτά, έχουν προκύψει ορισμένα συμπεράσματα, με σημαντικότερο το γεγονός πως η γήρανση αποτελεί τον πρωταρχικό παράγοντα κινδύνου της νόσου. Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει πως το μειωμένο μέγεθος του εγκεφάλου, το χαμηλό μορφωτικό επίπεδο, η χαμηλή νοητική ικανότητα στην πρώιμη ηλικία, αλλά και η μειωμένη πνευματική και σωματική δραστηριότητα στη μετέπειτα ζωή, είναι παράγοντες που μπορούν να συσχετιστούν με την εμφάνιση της νόσου. Τα εγκεφαλικά τραύματα, αλλά και ορισμένες αγγειακές ασθένειες, αυξάνουν επίσης τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου.^[57,58]

Η νόσος του Alzheimer είναι μια διαταραχή που εμφανίζεται απρόοπτα, εξελίσσεται με αργό ρυθμό και εξασθενεί την επεισοδιακή μνήμη προοδευτικά. Παράλληλα, οι ενδείξεις που προμηνύουν την εμφάνισή της είναι η απραξία, η αγνωσία, η εξασθενημένη κρίση στη λήψη αποφάσεων και η έλλειψη προσανατολισμού. Ο νευροεκφυλισμός της νόσου ξεκινά πριν από την κλινική έναρξή της. Στην προκλινική αυτή φάση, που χαρακτηρίζεται ως ήπια γνωστική εξασθένηση (Mild Cognitive Impairment, MCI), παρατηρείται απώλεια μνήμης

που επαληθεύεται από πρόσωπα του στενού οικείου περιβάλλοντος, αλλά και από αντικειμενικές μετρήσεις προσαρμοσμένες στην ηλικία και το μορφωτικό επίπεδο. Η MCI μπορεί να αποτελεί πρόδρομο της νόσου Alzheimer, ένδειξη κάποιας άλλης διαταραχής, όπως η αγγειακή άνοια, αλλά μπορεί και να είναι καλοήθης ως φυσιολογικό κομμάτι της γήρανσης.^[57]

Η γνώση της διατάραξης των νευροδιαβιβαστών που προκαλεί η νόσος του Alzheimer έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη φαρμάκων που επιδρούν αποτελεσματικά στα συμπτώματα της νόσου. Σύμφωνα με τη χολινεργική υπόθεση, ο εκφυλισμός των χολινεργικών νευρώνων, όπως είναι η ακετυλοχολίνη, είναι αυτός που διαταράσσει τα προσυναπτικά χολινεργικά άκρα. Επομένως, μια προσέγγιση για την αντιμετώπιση της νόσου είναι η ενίσχυση της ακετυλοχολίνης με την παρεμπόδιση της δράσης της ακετυλοχολινεστεράσης, που την υδρολύει. Μελέτες έχουν δείξει, πως οι κουμαρίνες έχουν την ικανότητα να παρεμποδίζουν τη λειτουργία της ακετυλοχολινεστεράσης και αποτελούν απαραίτητο στοιχείο στη σύνθεση νέων υβριδικών μορίων, ικανών να αναστέλλουν το ένζυμο, αλλά και τη συσσώρευση του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου.^[57,59]

Πιο συγκεκριμένα, η δονεπεζίλη, η γαλανταμίνη και η ριβαστιγμίνη είναι ενώσεις που έχουν εγκριθεί για κλινική χορήγηση, με σκοπό την αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης. Η γαλανταμίνη και η δονεπεζίλη μεταβολίζονται στο συκώτι, ενώ η ριβαστιγμίνη όχι. Οι κλινικές δοκιμές έχουν δείξει πως η δράση των μορίων αυτών είναι αποτελεσματική σε ό,τι αφορά τα χαρακτηριστικά συμπτώματα της νόσου. Ωστόσο, μέχρι τώρα οι αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης έχουν δείξει να μετριάζουν προσωρινά τα συμπτώματα, χωρίς να μπορούν να αναστείλουν τη φυσική πορεία του Alzheimer.^[57]

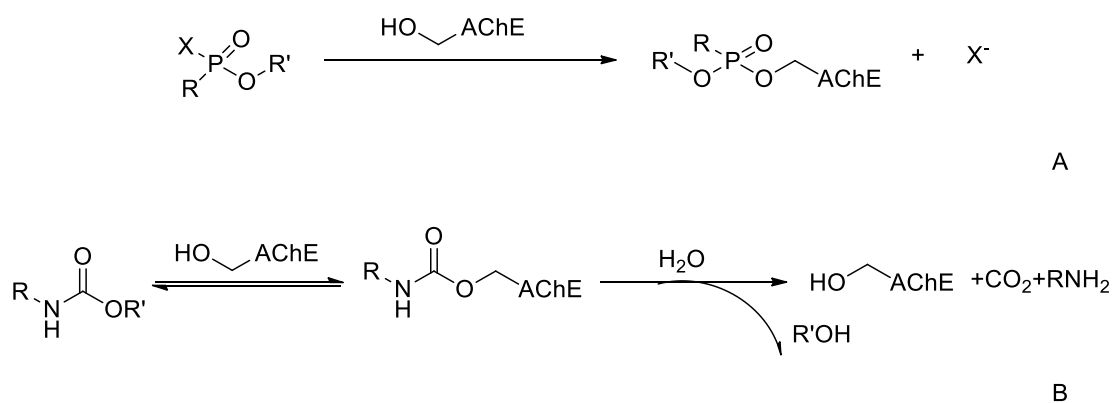
Πέρα από τη στόχευση της ακετυλοχολινεστεράσης για την αντιμετώπιση του Alzheimer, υπάρχουν κι άλλες πιθανές προσεγγίσεις. Μία από αυτές είναι η χρήση μεμαντίνης, η οποία προστατεύει τους νευρώνες από τη διεγερτική τοξικότητα που προκαλεί η αυξημένη δραστηριότητα του νευροδιαβιβαστή γλουταμικού οξέος υπό τις μη φυσιολογικές συνθήκες που προκαλεί το Alzheimer στον εγκέφαλο. Άλλη προσέγγιση αφορά τη θεραπεία των συμπεριφορικών χαρακτηριστικών της νόσου. Η επιθετικότητα, η ψύχωση και η ψυχοκινητική διέγερση, συμπεριφορές συχνές σε άτομα που πάσχουν από Alzheimer, αντιμετωπίζονται με άτυπα αντιψυχωσικά φάρμακα. Τέλος, πολύ σημαντική για τη θεραπεία της νόσου είναι η αναστολή της παραγωγής και της συσσώρευσης του β-αμυλοειδούς στον εγκέφαλο. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με ρυθμιστές της σεκρετάσης, Αβ ανοσοθεραπεία, αλλά και φάρμακα κατά της πρωτεΐνης TAU.^[57]

5.3. Αναστολή ακετυλοχολινεστεράσης

Όπως προαναφέρθηκε, η αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης αποτελεί μία από τις κύριες προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση της νόσου του Alzheimer. Οι αναστολείς του ενζύμου παρεμποδίζουν την υδρόλυση της ακετυλοχολίνης, με

αποτελεσμα την αύξηση της ποσότητας αλλά και της δράσης του νευροδιαβιβαστή. Οι αναστολείς της AChE διακρίνονται σε αναστρέψιμους και μη. Οι θεραπευτικές ιδιότητες αποδίδονται στους αναστρέψιμους αναστολείς, ανταγωνιστικούς και μη, οι οποίοι δρουν στο κεντρικό νευρικό σύστημα με αξιοσημείωτη απόκριση. Οι μη αναστρέψιμοι, από την άλλη, χαρακτηρίζονται από τοξικά φαινόμενα, καθώς μπορεί να προκαλέσουν μη αναστρέψιμη αναστολή σε νευρομυϊκές συνάψεις, απειλητική για τη ζωή.^[52,55]

Γενικά, η αντίδραση μεταξύ της ακετυλοχολινεστεράσης και των αναστολέων της πραγματοποιείται μεταξύ μιας ηλεκτρονιόφιλης ομάδας του αναστολέα και του πυρηνόφιλου υδροξειδίου της AChE. Στην περίπτωση της μη αναστρέψιμης αναστολής, η ομάδα που απομακρύνεται από τον αναστολέα είναι, είτε κάποιο αλογόνο, είτε κάποια άλλη κατάλληλη χημική ομάδα. Στην περίπτωση της αναστρέψιμης αναστολής, αυτό που απομακρύνεται είναι ένα μόριο αλκοόλης, όπως φαίνεται και στο σχήμα 29.^[55]



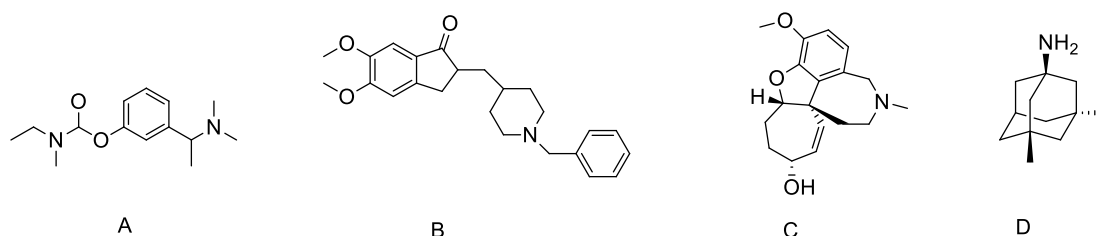
Σχήμα 29. Αντιδράσεις αναστολής ακετυλοχολινεστεράσης

5.3.1. Αναστρέψιμη αναστολή ακετυλοχολινεστεράσης

Οι αναστρέψιμοι αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην αξιοποίηση της δράσης του ενζύμου για την παρασκευή φαρμακευτικών σκευασμάτων. Πιο συγκεκριμένα, ο νευροδιαβιβαστής της ακετυλοχολίνης θεωρείται πως συμμετέχει σε μεγάλο βαθμό στις γνωστικές λειτουργίες του εγκεφάλου. Συνεπώς, η αυξημένη παρουσία της μπορεί να οδηγήσει στη βελτίωση της μνήμης. Σύμφωνα με αυτή τη θεώρηση, η επιλεκτική αναστολή του ενζύμου της ακετυλοχολινεστεράσης στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα μπορεί να βρει εφαρμογή στη θεραπεία ασθενειών, όπως το Alzheimer, η γεροντική άνοια και το Parkinson, που προκαλούν εξασθένηση της μνήμης και νευροεκφυλισμό.^[52,55,60]

Προς το παρόν, τέσσερα είναι τα φαρμακευτικά σκευάσματα που κυκλοφορούν στην αγορά, τα οποία αναστέλλουν αναστρέψιμα τη δράση της AChE και συνεπώς ενδείκνυνται για τη βελτίωση της μνήμης και την αντιμετώπιση των λοιπών συμπτωμάτων της νόσου Alzheimer. Δυστυχώς, μέχρι τώρα είναι δυνατή μόνο η αντιμετώπιση των συμπτωμάτων και όχι η παύση της εξέλιξης

της ασθένειας. Οι χημικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται εγκεκριμένα για την αναστρέψιμη αναστολή της AChE είναι η ριβαστιγμίνη, η doneπεζίλη, η γαλανταμίνη και η μεμαντίνη, η δομή των οποίων παρουσιάζεται στο σχήμα 30.^[52,55]



Σχήμα 30. Εγκεκριμένοι αναστολείς της AChE: ριβαστιγμίνη (A), doneπεζίλη (B), γαλανταμίνη (C) και μεμαντίνη (D)

Η ριβαστιγμίνη (A) αποτελεί έναν ισχυρό καρβαμικό αναστολέα που συνδέεται στην εστερατική υπομονάδα του ενεργού κέντρου εμποδίζοντας τη δραστηριότητα της χολινεστεράσης. Ως αποτέλεσμα, τα επίπεδα της ακετυλοχολίνης αυξάνονται και η απόκριση στη γνωστική διαδικασία βελτιώνεται. Γενικά, η χρήση καρβαμικών βασίζεται στη σύγκριση των ρυθμών υδρόλυσης μεταξύ AChE και ακετυλοχολίνης (που αποτελεί το φυσικό υπόστρωμα του ενζύμου) και AChE και καρβαμικού, που συνήθως εμφανίζει χαμηλότερους ρυθμούς. Τα φαρμακευτικά σκευάσματα της ριβαστιγμίνης χορηγούνται από το στόμα με τη μορφή κάψουλας και παρουσιάζουν βιοδιαθεσιμότητα 40% σε δόση 3 mg. Απομακρύνονται από τον οργανισμό με τα ούρα και δεν αλληλεπιδρούν με άλλα φάρμακα.^[52,55]

Η doneπεζίλη (B) δρα με σκοπό τη μείωση της σύνθεσης του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου, του οποίου η συσσώρευση οδηγεί στα νευροεκφυλιστικά συμπτώματα ασθενειών, όπως το Alzheimer. Θεωρείται πως είναι πιο αποδεκτή από τον ανθρώπινο οργανισμό, καθώς προκαλεί πολύ λιγότερες γαστρεντερικές παρενέργειες σε σχέση με τη ριβαστιγμίνη και τη γαλανταμίνη.^[52,55]

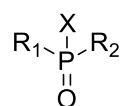
Η γαλανταμίνη (C) είναι ένα αλκαλοϊδές που δρα ως επιλεκτικός, ανταγωνιστικός και γρήγορα αναστρέψιμος αναστολέας της AChE. Αυτό το επιτυγχάνει αλληλεπιδρώντας με την ανιονική υπομονάδα της AChE, αλλά και με το αρωματικό κομμάτι του ενζύμου. Το φαρμακευτικό σκεύασμα απορροφάται άμεσα από τον οργανισμό από το στόμα με βιοδιαθεσιμότητα από 80 έως και 100%. Επιπλέον, η γαλανταμίνη, ενισχύει αλλοστερικά τους νικοτινικούς υποδοχείς επηρεάζοντας τη χολινεργική διαβίβαση, καθώς και άλλα συστήματα νευροδιαβιβαστών όπως το γλουταμικό και το αμινοβουτυρικό οξύ. Η επίδραση αυτή μπορεί να βελτιώσει γνωστικές δυσλειτουργίες και να θεραπεύσει ψυχιατρικές ασθένειες.^[52,55]

Ακόμα, μια μεγάλη ποικιλία φυτών έχει δείξει πως διαθέτει την ικανότητα να αναστέλλει τη λειτουργία της AChE και συνεπώς μπορεί να αποτελέσει πιθανή

θεραπεία για νευροεκφυλιστικές διαταραχές. Ειδικότερα, οι κουμαρίνες αποτελούν μόρια φυτικής προέλευσης, που διαθέτουν ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων και μπορούν να παρεμποδίσουν τη δραστηριότητα της AChE αλληλεπιδρώντας με την περιφερική ανιονική της υπομονάδα. Επιπλέον, με τροποποίηση του αρωματικού τους κέντρου μπορούν να δώσουν κουμαρινικά ανάλογα ικανά να αποτρέψουν τη συσσώρευση του β-αμυλοειδούς μέσω παρεμπόδισης της λειτουργίας της β-σεκρετάσης.^[60,61]

5.3.2. Μη αναστρέψιμη αναστολή ακετυλοχολινεστεράσης

Η μη αναστρέψιμη αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης οφείλεται κυρίως στη δράση οργανοφωσφορικών ενώσεων. Σε αυτή την ομάδα ενώσεων ανήκουν κυρίως εστέρες ή θειόλες, που προέρχονται από φωσφορικό, φωσφορούχο ή και υποφωσφορικό οξύ. Η γενική δομή μιας οργανοφωσφορικής ένωσης παρουσιάζεται στο σχήμα 31.



Σχήμα 31. Γενική δομή μορίου οργανοφωσφορικής ένωσης

Οι υποκαταστάτες R₁ και R₂ μπορεί να είναι αρύλια ή αλκύλια συνδεδεμένα με το άτομο του φωσφόρου άμεσα ή μέσω ενός ατόμου οξυγόνου ή θείου. Ο υποκαταστάτης X μπορεί να είναι κάποιο αλογόνο, αλειφατική, αρωματική ή ετεροκυκλική ένωση. Ο υποκαταστάτης αυτός είναι που απομακρύνεται από το άτομο του φωσφόρου κατά την υδρόλυση μέσω φωσφοτριεστεράσης ή κατά την αλληλεπίδραση με πρωτεϊνικούς στόχους.

Στον τομέα της ιατρικής, οι οργανοφωσφορικές ενώσεις βρίσκουν εφαρμογή στην αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης, εμφανίζοντας όμως τοξικά φαινόμενα.^[53] Η τοξικότητα αυτή οφείλεται στην υψηλή συγγένεια φωσφόρου και οξυγόνου, των οποίων τα άτομα σχηματίζουν απλούς και διπλούς δεσμούς υψηλής ενέργειας. Τα τοξικά φαινόμενα εμφανίζονται κατά τη μη αναστρέψιμη φωσφορυλίωση μιας εστεράσης στο κεντρικό νευρικό σύστημα, άρα και κατά τη μη αναστρέψιμη αδρανοποίηση της ακετυλοχολινεστεράσης.^[52,55]

Πιο συγκεκριμένα, οι οργανοφωσφορικές ενώσεις μπορούν να συνδεθούν με το ενεργό κέντρο του ενζύμου με παρόμοιο τρόπο με το φυσικό υπόστρωμα (ακετυλοχολίνη), μέσω δημιουργίας δεσμού με την υδροξυλομάδα. Έτσι το ένζυμο φωσφορυλιώνεται, αφού η οργανοφωσφορική ένωση λυθεί. Η αποφωσφορυλίωση του ενζύμου, όντας αργή, εμποδίζει τον επανασηματισμό της ελεύθερης μορφής του, με αποτέλεσμα να συσσωρεύεται η ακετυλοχολίνη. Τελικά, προκαλείται υπερδιέγερση των υποδοχέων της ακετυλοχολίνης και παρεμποδίζεται η νευροδιαβίβαση. Αυτού του τύπου η «δηλητηρίαση» προκαλεί μυϊκή αδυναμία, μυϊκές συστολές, εφίδρωση, υπερσιελόρροια και σε ακραίο

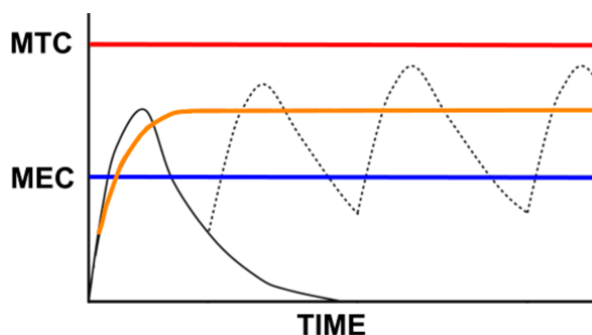
βαθμό αναπνευστική ανεπάρκεια, απώλεια αισθήσεων, σύγχυση έως και θάνατο.^[52]

6. Αποδέσμευση βιοδραστικών ενώσεων από νανοφορείς

Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 2, τα νανοσωματίδια αποτελούν, λόγω των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους, εξαιρετικούς φορείς για στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων. Πέραν αυτού, όμως, η μεταφορά αυτή είναι επιθυμητό να ακολουθείται και από ελεγχόμενη αποδέσμευση της ουσίας στο στόχο της. Η τροποποίηση του ρυθμού αποδέσμευσης συνεπάγεται μια ελεγχόμενη φαρμακοκινητική, που έχει ως απώτερο σκοπό τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας του τελικού θεραπευτικού σκευάσματος και την ελαχιστοποίηση των ανεπιθύμητων ενεργειών.^[30]

Σε όλες τις περιπτώσεις των συστημάτων αποδέσμευσης, συμπεριλαμβανομένων και των νανοφορέων, ο μηχανισμός της αποδέσμευσης περιλαμβάνει κάποιο φαινόμενο διάχυσης. Η διάχυση αυτή της εγκλωβισμένης ένωσης οφείλεται στη βαθμίδωση της συγκέντρωσής της, μέσω διάγκωσης του πολυμερικού δικτύου ή μέσω αποικοδόμησης. Η αποδέσμευση μπορεί, μεταξύ άλλων, να είναι παρατεταμένη ή ελεγχόμενη. Κατά την παρατεταμένη αποδέσμευση επιβραδύνεται η αποδέσμευση της εγκλωβισμένης ένωσης, η οποία εισέρχεται σταδιακά στην κυκλοφορία του αίματος και έτσι παρατείνεται η θεραπευτική της δράση. Η ελεγχόμενη αποδέσμευση από την άλλη, οδηγεί σε προβλέψιμη και σταθερή συγκέντρωση της δραστικής ουσίας στον οργανισμό. Η μέθοδος της ελεγχόμενης αποδέσμευσης παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με την παρατεταμένη, γι' αυτό και προτιμάται στην φαρμακευτική έρευνα.^[30]

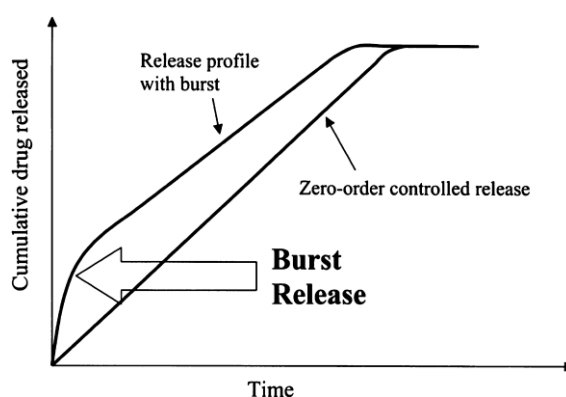
Όσον αφορά την κινητική αποδέσμευσης της δραστικής ουσίας από το νανοφορέα, επιδιώκεται να σχεδιαστεί μια κινητική μηδενικής τάξης, καθώς αυτή εξασφαλίζει σταθερή συγκέντρωση του φαρμάκου στο πλάσμα του αίματος, σε ποσότητα τέτοια εντός του θεραπευτικού εύρους. Το θεραπευτικό εύρος βρίσκεται μεταξύ της ελάχιστης αποτελεσματικής συγκέντρωσης (Minimum Effective Concentration, MEC) και της μέγιστης τοξικής συγκέντρωσης (Maximum Toxic Concentration, MTC), όπως φαίνεται στο διάγραμμα της εικόνας 16.^[62]



Εικόνα 16. Διάγραμμα θεραπευτικού εύρους δραστικής ουσίας φαρμάκου

Το προφίλ αποδέσμευσης της δραστικής ουσίας από τον εκάστοτε φορέα διαφέρει, καθώς σχετίζεται με διάφορους παράγοντες. Αρχικά, σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν η βαθμίδωση της συγκέντρωσης της ουσίας, αλλά και το σχήμα και η μορφή του φορέα. Τα χαρακτηριστικά του φορέα είναι αυτά που επηρεάζουν και το ρυθμό με τον οποίο αυτός αποικοδομείται. Ένας ακόμα παράγοντας, καθοριστικός για την αποδέσμευση, είναι το κατά πόσο η εγκλωβισμένη στο φορέα δραστική ουσία είναι υδρόφοβη ή υδρόφιλη. Πιο συγκεκριμένα, τα υδρόφοβα μόρια απελευθερώνονται με μηδενικής τάξης κινητική, ενώ τα υδρόφιλα παρουσιάζουν τριφασικό προφίλ αποδέσμευσης. Τέλος, το προφίλ της αποδέσμευσης εξαρτάται και από τη μέθοδο παρασκευής του νανοφορέα, καθώς αυτή καθορίζει αν η δραστική ουσία θα βρίσκεται στον πυρήνα, στο κέλυφος ή διεσπαρμένη στο μόριο.^[46,62]

Στις περισσότερες περιπτώσεις αποδέσμευσης βιοδραστικών μορίων από νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων παρατηρείται μια σύντομη και ραγδαία αποδέσμευση, το λεγόμενο «burst effect». Το φαινόμενο αυτό εμφανίζεται, όταν το σύστημα μεταφοράς τοποθετείται στο μέσο αποδέσμευσης. Η ραγδαία αποδέσμευση ακολουθείται από ένα προφίλ σταθερής αποδέσμευσης (plateau), όπως φαίνεται στο διάγραμμα της εικόνας 17.^[45,62]



Εικόνα 17. Προφίλ αποδέσμευσης «burst effect»

Οι πιθανές αιτίες που μπορεί να προκαλέσουν το «burst effect» είναι πολυάριθμες. Αρχικά, σημαντικό ρόλο παίζουν οι συνθήκες αποθήκευσης του συστήματος στις οποίες η ένωση διαχέεται στην επιφάνεια του φορέα και

τελικά απελευθερώνεται απότομα. Καθοριστικός, επίσης, είναι ο αργός σχηματισμός της πολυμερικής γέλης, ειδικά στην περίπτωση των ενέσιμων υδρογελών, ο οποίος οδηγεί στη διαφυγή μέρους της ουσίας. Ακόμη, οι ετερογενείς πολυμερικές μήτρες, αλλά και τα κατασκευαστικά σφάλματα, επηρεάζουν το προφίλ της αποδέσμευσης. Επιπλέον, η διάχυση των μορίων της ένωσης κατά την παρασκευή του νανοσυστήματος μπορεί να ευθύνεται για τη ραγδαία αποδέσμευση. Τέλος, οι διεργασίες της ξήρανσης μπορεί να οδηγήσουν στην απότομη αποδέσμευση, αφού τα μόρια του νερού, κινούμενα προς την επιφάνεια της γέλης, μεταφέρουν μέσω μεταγωγής τα μόρια της ένωσης οδηγώντας σε αύξηση της συγκέντρωσής της στην επιφάνεια του φορέα.^[62]

Είναι γεγονός, πως σε κάποιες περιπτώσεις είναι επιθυμητή η αρχική ταχεία αποδέσμευση της δραστικής ουσίας. Ωστόσο, είναι ένα φαινόμενο απρόβλεπτο με συχνά ανεξέλεγκτη διάρκεια και δοσολογία, του οποίου ο μηχανισμός είναι δυσνόητος. Γενικά, αυτού του είδους η αποδέσμευση αποφεύγεται, με σκοπό να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος μιας αρχικής τοξικότητας, σχετιζόμενης με μεγάλη δόση της θεραπευτικής ουσίας.^[62]

Για να γίνει πιο εύκολα κατανοητό το φαινόμενο της αποδέσμευσης, αλλά και να μπορεί να προβλεφθεί ο ρυθμός της αποδέσμευσης και διάχυσης μιας δραστικής ουσίας, έχει γίνει προσπάθεια για μαθηματική μοντελοποίηση. Τα μαθηματικά μοντέλα μπορούν να βοηθήσουν στη βελτιστοποίηση της κινητικής αποδέσμευσης και να επιβεβαιώσουν τους φυσικούς μηχανισμούς που διέπουν τη μεταφορά του φαρμάκου. Δίνουν ακόμα τη δυνατότητα πρόβλεψης της επίδρασης που έχουν ορισμένες παράμετροι στην αποδέσμευση, όπως το σχήμα, το μέγεθος και η σύσταση του νανοσυστήματος. Τελικά, η χρήση των μαθηματικών μοντέλων που προβλέπουν ρυθμούς και μηχανισμούς αποδέσμευσης μπορεί να ελαττώσει το απαιτούμενο κόστος και το χρόνο των πειραμάτων, δίνοντας πιο αποτελεσματικά φαρμακευτικά σκευάσματα.^[62,63]

Ένας μεγάλος αριθμός μαθηματικών μοντέλων έχει προταθεί για να περιγράψει και να εξηγήσει την αποδέσμευση δραστικής ουσίας από πολυμερικά συστήματα μεταφοράς φαρμάκων. Κάποια από αυτά είναι εμπειρικά/ημί-εμπειρικά, ενώ κάποια άλλα είναι μηχανιστικά. Τα μηχανιστικά μοντέλα λαμβάνουν υπόψη τις βιοφυσικοχημικές ιδιότητες των συστημάτων και μπορούν να δώσουν πληροφορίες αναφορικά με τη διάχυση, την υποβάθμιση και τη διάβρωσή τους. Τα μοντέλα αυτά, λαμβάνοντας υπόψη τη διάχυση, βασίζονται στο νόμο του Fick, σύμφωνα με τον οποίο η ροή κινείται από περιοχές με υψηλή σε περιοχές με χαμηλή συγκέντρωση. Γενικά, τα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων κατηγοριοποιούνται με βάση το αν η αποδέσμευση της εγκλωβισμένης ένωσης διέπεται ή όχι από το νόμο του Fick. Ο νόμος του Fick ισχύει, κατά κύριο λόγο, στις περιπτώσεις που ο χρόνος χαλάρωσης του πολυμερούς είναι μεγαλύτερος από το χρόνο διάχυσης του διαλύτη.^[62]

Ένας άλλος τρόπος κατηγοριοποίησης των συστημάτων ελεγχόμενης αποδέσμευσης βασίζεται στο μηχανισμό της αποδέσμευσης. Έτσι, υπάρχουν διαφορετικά κινητικά μοντέλα για συστήματα που ελέγχονται από τη διάχυση,

από χημικές αντιδράσεις, από την ώσμωση ή τη διάλυση. Τα κινητικά μοντέλα, που χρησιμοποιούνται συχνότερα για την πρόβλεψη του φαινομένου της αποδέσμευσης των δραστικών μορίων από το νανοφορέα ως συνάρτηση του χρόνου είναι οι κινητικές μηδενικής και πρώτης τάξης, το μοντέλο Higuchi και το μοντέλο Korsmeyer-Peppas. Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται πιο αναλυτικά τα κινητικά αυτά μοντέλα αποδέσμευσης.^[63]

Πίνακας 1. Κινητικά μοντέλα αποδέσμευσης

Μοντέλο	Εξίσωση	Περιπτώσεις εφαρμογής
Μηδενικής τάξης	$C_t = C_0 + k_0 t$	Σε συστήματα που η αποδέσμευση πραγματοποιείται με ώσμωση
Πρώτης τάξης	$\log Q_t = \log Q_0 + \frac{kt}{2.303}$	Σε συστήματα με υδατοδιαλυτές βιοδραστικές ενώσεις και πορώδη μήτρα
Higuchi	$Q = k_H t^{1/2}$ ή $\frac{M_t}{M_0} = kt^{1/2}$	Σε συστήματα που ελέγχονται από διάχυση με βάση τον 1 ^ο νόμο του Fick
Korsmeyer-Peppas	$F = \frac{M_t}{M} = k_m t^n$	Ημι-εμπειρικό μοντέλο που συνδέει την αποδέσμευση και το χρόνο με εκθετική σχέση

Μοντέλο μηδενικής τάξης

C_t : η ποσότητα της ένωσης που διαλύεται σε χρόνο t [$\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$]

C_0 : η αρχική ποσότητα της ένωσης στο διάλυμα [$\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$]

k_0 : η σταθερά αποδέσμευσης μηδενικής τάξης [$\frac{\text{mg}}{\text{mL}\cdot\text{h}}$]

Μοντέλο πρώτης τάξης

Q_0 : η αρχική ποσότητα της ένωσης στο διάλυμα [$\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$]

Q_t : η ποσότητα της ένωσης που διαλύεται σε χρόνο t [$\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$]

k : η σταθερά αποδέσμευσης πρώτης τάξης [$\frac{\text{mg}}{\text{mL}\cdot\text{h}}$]

Μοντέλο Higuchi

Q : η ποσότητα της ένωσης που διαλύεται σε χρόνο t [$\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$]

k_H : η σταθερά Higuchi [$\frac{\text{mg}}{\text{mL}\cdot\text{h}^2}$]

Μοντέλο Korsmeyer-Peppas

F : το κλάσμα της ένωσης που δεσμεύεται τη χρονική στιγμή t

M_t : η ποσότητα της ένωσης που αποδεσμεύεται τη χρονική στιγμή t [$\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$]

M : η συνολική ποσότητα της ένωσης σε δοσολογική μορφή ή στην ισορροπία [$\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$]

k_m : η κινητική σταθερά που ενσωματώνει τα δομικά και γεωμετρικά χαρακτηριστικά του συστήματος [$\frac{\text{mg}}{\text{mL} \cdot \text{h}^n}$]

n : ο εκθέτης διάχυσης (λαμβάνει διαφορετικές τιμές, ανάλογα με το είδος του μηχανισμού αποδέσμευσης)

t : ο χρόνος [h]

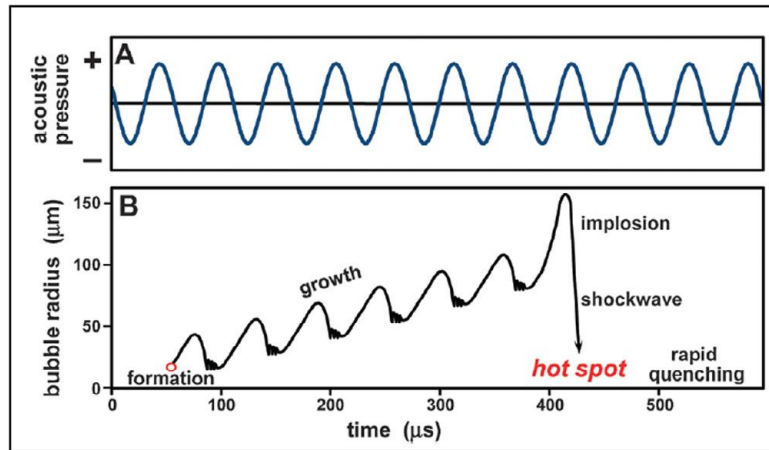
7. Τεχνικές υψηλής ενέργειας

7.1. Υπέρηχοι (Ultrasound)

Η χρήση των υπερήχων έχει αποδειχθεί ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για τη βελτίωση των ρυθμών των αντιδράσεων σε μεγάλο αριθμό αντιδρώντων συστημάτων, κυρίως υγρών. Πιο συγκεκριμένα, οι υπέρηχοι έχουν τη δυνατότητα να αυξήσουν τη μετατροπή και την απόδοση, να αλλάξουν το μηχανισμό της αντίδρασης, αλλά και να εκκινήσουν μια βιολογική, χημική ή ηλεκτροχημική αντίδραση. Αυτή η ενίσχυση των χημικών αντιδράσεων με χρήση υπερήχων ορίζεται ως ηχοχημεία.^[64]

Οι υπέρηχοι χρησιμοποιήθηκαν πρώτη φορά για την ενίσχυση χημικών αντιδράσεων το 1927 από τους Loomis και Richards. Μία δεκαετία αργότερα ανακαλύφθηκε από τον Brohult πως οι υπέρηχοι μπορούν να υποβαθμίσουν βιολογικά πολυμερή.^[64]

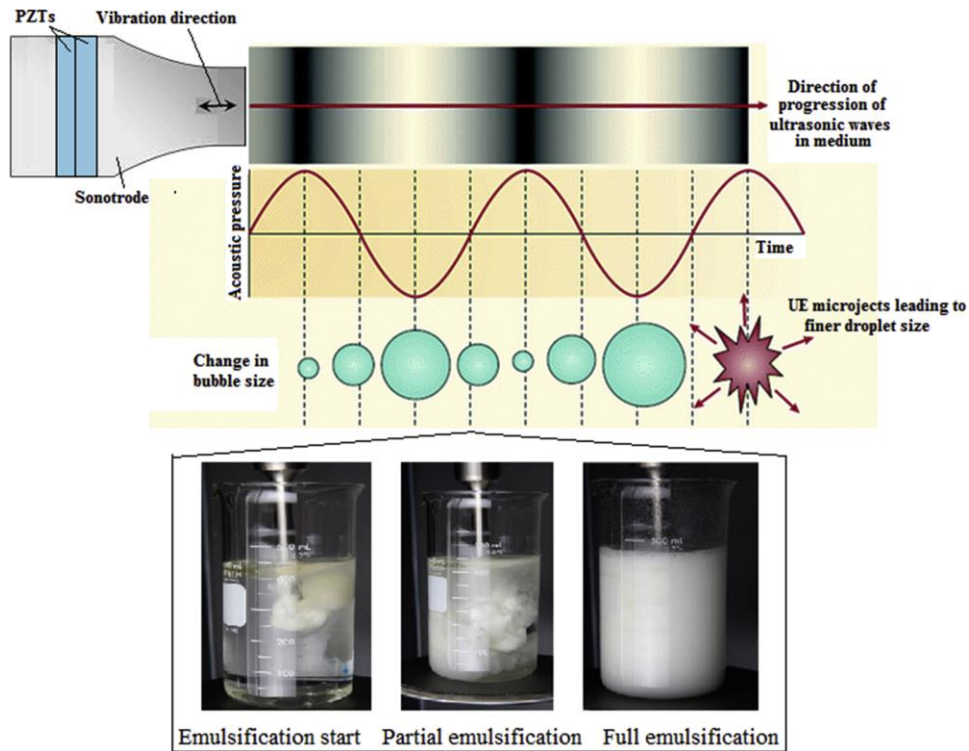
Ως υπέρηχος ορίζεται ένα ηχητικό κύμα, το οποίο έχει συχνότητα από 20 kHz έως 5 MHz, συχνότητα εκτός του εύρους που μπορεί να ακούσει το ανθρώπινο αυτί. Η διάδοσή του σε ρευστό μέσο βασίζεται σε εναλλασσόμενους κύκλους συμπίεσης και αποσυμπίεσης οδηγώντας στα διαφορετικά στάδια της σπηλαίωσης. Ως σπηλαίωση ορίζεται ο σχηματισμός μικροφουσαλίδων ή κοιλοτήτων που ταλαντώνονται και συσσωρεύουν ενέργεια. Οι φουσαλίδες αυτές αναπτύσσονται μέχρι το μέγιστο μέγεθος και τελικά εκρήγνυνται οδηγώντας σε σημαντική αποδέσμευση ενέργειας, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα της εικόνας 18. Τα φαινόμενα της σπηλαίωσης συνοδεύονται από πολύ υψηλές τιμές πίεσης, περίπου 500 bar, και θερμοκρασίας, περίπου 5000 K.^[65,66]



Εικόνα 18. Σχηματική αναπαράσταση των φάσεων της ακουστικής σπηλαιώσης

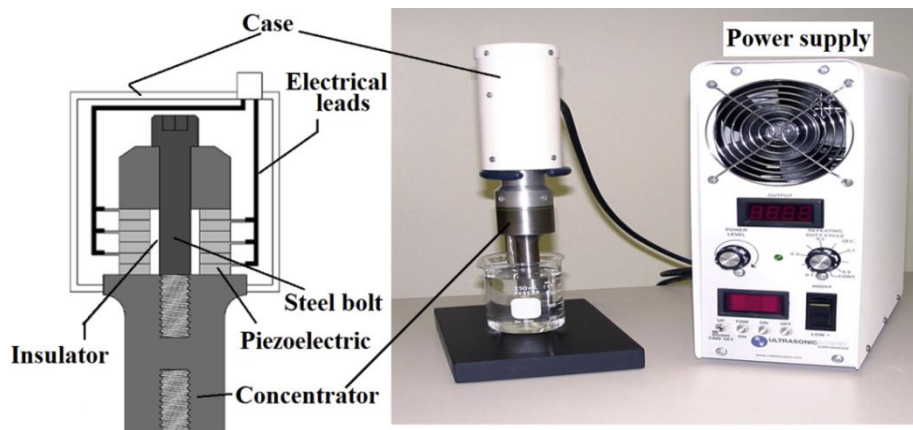
Η έκρηξη που προκύπτει από τη σπηλαιώση είναι παροδική και εντοπισμένη. Η μεταφορά ενέργειας που πραγματοποιείται στο ρευστό μέσο προκαλεί τυρβώδη ροή βελτιώνοντας το ρυθμό μεταφοράς μάζας, αλλά και την αποτελεσματικότητα των χρησιμοποιούμενων καταλυτών. Γενικά, η χρήση των υπερήχων δημιουργεί ένα μοναδικό περιβάλλον, το οποίο ευνοεί την ανάπτυξη νέων δομών. Η χρήση ακτινοβολίας επιφέρει πολλά πλεονεκτήματα, όπως ο αυξημένος ρυθμός των αντιδράσεων, αλλά και η ικανότητα για σχηματισμό υλικών υψηλής καθαρότητας, ομοιόμορφου σχήματος και στενής κατανομής μεγεθών. Για παράδειγμα, η χρήση υπερήχων έχει θεωρηθεί αποτελεσματική μέθοδος για τη σύνθεση νανοσωματιδίων από οξειδία μετάλλων.^[65,66,67]

Πιο συγκεκριμένα, η χρήση υπερήχων βρίσκει εφαρμογή στη σύνθεση νανοσωματιδίων, στο στάδιο της ομογενοποίησης των γαλακτωμάτων που περιέχουν τις πρώτες ύλες. Οι συσκευές που χρησιμοποιούνται για το σκοπό αυτό παράγουν έντονη ηχητική πίεση που διαπερνά το γαλάκτωμα, σχηματίζοντας μικροφουσαλίδες, μέσω των οποίων προκαλείται στη συνέχεια το φαινόμενο της σπηλαιώσης. Με την έκρηξη των φυσαλίδων διαχέεται ενέργεια, τέτοια, ώστε να διαρρηχθούν οι ομοιοπολικοί δεσμοί, μετατρέποντας τελικά το γαλάκτωμα σε νανογαλάκτωμα, όπως φαίνεται στο σχήμα της εικόνας 19.^[68,69]



Εικόνα 19. Διάρρηξη των φυσαλίδων κατά την ομογενοποίηση με τη χρήση υπερήχων

Στο εργαστήριο, συνήθως χρησιμοποιείται ένα πιεζοηλεκτρικό σύστημα υπερήχων (εικόνα 20). Το όργανο αυτό παράγει υπερηχητικές δονήσεις, οι οποίες με τη σειρά τους δημιουργούν ένα πεδίο ακουστικής σπηλαιώσης. Έτσι, διαρρηγνύονται διεπιφάνειες μεταξύ δύο ρευστών, διευκολύνοντας το σχηματισμό νανογαλακτώματος με πολύ μικρή διάμετρο νανοσωματιδίων και μεγαλύτερης σταθερότητας.^[69]



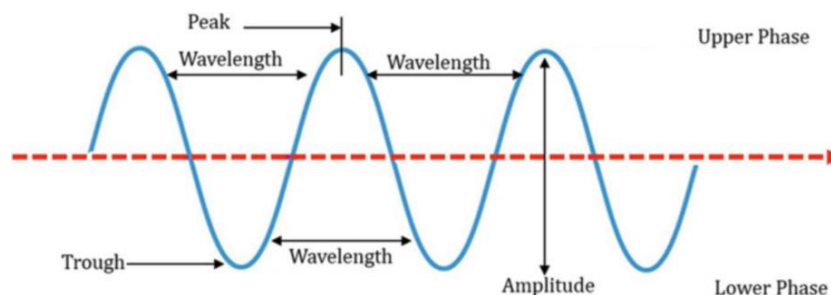
Εικόνα 20. Πιεζοηλεκτρικό σύστημα υπερήχων

8. Μέθοδοι ταυτοποίησης

8.1. Φασματοφωτομετρία ορατού υπεριώδους UV-Vis

Η φασματοφωτομετρία UV-Vis μετράει την ένταση του φωτός στα φάσματα του υπεριώδους (10-400 nm) και ορατού (400-800 nm) ως συνάρτηση του μήκους κύματος. Όταν η ακτινοβολία διαπεράσει ένα διάλυμα με την προς ανάλυση ουσία (αναλύτης), η ουσία απορροφά την ακτινοβολία σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος και έτσι υπολογίζεται η ποσότητα της ακτινοβολίας που απορροφήθηκε. Το φάσμα που προκύπτει μετά την απορρόφηση της ακτινοβολίας είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην περιοχή του υπεριώδους-ορατού με το προς ανάλυση μόριο.^[70,71,72]

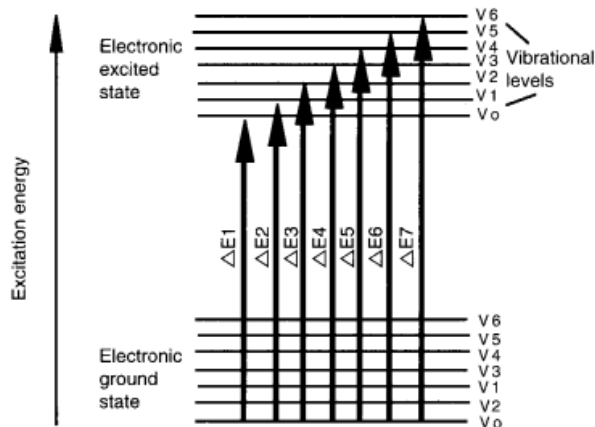
Τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα, όπως απεικονίζονται στην εικόνα 21, περιγράφονται από τρία μεγέθη, τη συχνότητα (ν), το μήκος κύματος (λ) και την απόσταση ανάμεσα σε δύο κορυφές. Το μήκος κύματος ορίζεται ως η απόσταση μεταξύ δύο διαδοχικών κορυφών ή κοιλάδων του κύματος που βρίσκονται στην ίδια φάση. Η συχνότητα ορίζεται ως ο αριθμός των ταλαντώσεων της ακτινοβολίας του ηλεκτρικού πεδίου σε 1 s.^[71]



Εικόνα 21. Σχηματική αναπαράσταση ενός κυματικού φαινομένου

Σύμφωνα με την αρχή της μεθόδου, η φασματοφωτομετρία UV-Vis βασίζεται στα φαινόμενα απορρόφησης του φωτός και πιο συγκεκριμένα συσχετίζει την ποσότητα του απορροφούμενου φωτός με την ποσότητα του αναλύτη στο δείγμα. Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του αναλύτη, αναλόγως μεγαλύτερη είναι και η απορρόφηση του φωτός. Η απορρόφηση στην περιοχή του υπεριώδους-ορατού εξαρτάται από την ηλεκτρονιακή δομή των ατόμων, μορίων ή ιόντων που απορροφούν.^[71]

Ειδικότερα, η απορρόφηση της ακτινοβολίας πραγματοποιείται εξαιτίας των διεγέρσεων των ηλεκτρονίων εντός της δομής του αναλύτη σε υψηλότερες ενεργειακές στάθμες. Οι διεγέρσεις που μπορούν να πραγματοποιηθούν παρουσιάζονται στην εικόνα 22. Διενεργούνται από τη χαμηλότερη δονητική στάθμη της βασικής ενεργειακής στάθμης του μορίου προς ένα άλλο από τα επίπεδα δόνησης της διεγερμένης ηλεκτρονιακής στάθμης.^[70]



Εικόνα 22. Σχηματική αναπαράσταση της διέγερσης του ηλεκτρονίου από βασική σε διεγερμένη κατάσταση

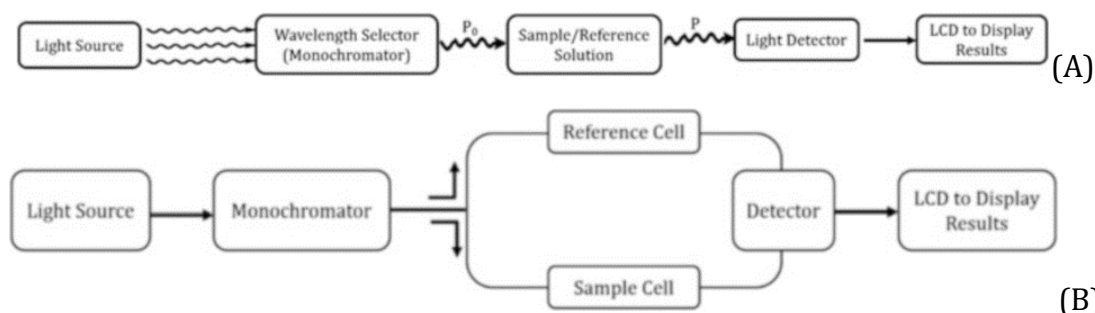
Η μέτρηση της απορρόφησης της ακτινοβολίας από δείγμα που περιέχει τον αναλύτη διέπεται από το νόμο των Beer-Lambert, ο οποίος περιγράφεται από την εξίσωση (2).

$$\log \frac{I_0}{I_t} = A \quad (2)$$

όπου I_0 η ισχύς της προσπίπτουσας ακτινοβολίας [A], I_t η ισχύς της διερχόμενης ακτινοβολίας [A] και A η απορρόφηση.^[70]

Σε ό,τι αφορά την οργανολογία, ένα φασματοφωτόμετρο UV-Vis, ανάλογα με τον αριθμό των κυψελίδων που χρησιμοποιούνται, αλλά και τον αριθμό των δεσμών φωτός, μπορεί να είναι απλής ή διπλής δέσμης. Σε κάθε περίπτωση, ένα φασματοφωτόμετρο UV-Vis αποτελείται από ορισμένα κύρια τμήματα, όπως φαίνεται στην εικόνα 23. Πρώτο και σημαντικότερο τμήμα είναι οι πηγές φωτός, συγκεκριμένα μία λυχνία δευτερίου για την περιοχή του υπεριώδους από τα 190 nm έως τα 350 nm και μία λυχνία αλογόνου/χαλαζία ή βολφραμίου για την περιοχή του ορατού από τα 350 nm έως τα 900 nm. Το όργανο περιλαμβάνει και ένα μονοχρωμάτορα, η χρήση του οποίου αποσκοπεί στο διαχωρισμό του φωτός στα συνιστώσα μήκη κύματος. Αυτά διαχωρίζονται περαιτέρω από τη σχισμή εξόδου. Καθώς το όργανο σαρώνει το φάσμα, ο μονοχρωμάτορας περιστρέφεται, ώστε να διέρχεται από το δείγμα ένα εύρος μηκών κύματος. Επιπλέον, το φασματοφωτόμετρο διαθέτει έναν ανιχνευτή, ο οποίος μετράει την ακτινοβολία που διέρχεται από το δείγμα και μετατρέπει τα σήματα του φωτός σε ηλεκτρικά σήματα. Τέλος, ο ανιχνευτής είναι συνδεδεμένος με ηλεκτρονικό υπολογιστή για την παρουσίαση των αποτελεσμάτων. Η διαφορά των οργάνων απλής και διπλής δέσμης έγκειται στο εξής: το όργανο διπλής δέσμης διαθέτει κάτοπτρα, τα οποία διαχωρίζουν τη δέσμη φωτός, ώστε να διέρχεται από δύο υποδοχείς δείγματος, σε έναν από τους οποίους τοποθετείται το λεγόμενο «λευκό» δείγμα (blank), συνήθως ο διαλύτης του δείγματος. Το «λευκό» δείγμα χρησιμοποιείται για τη διόρθωση της μέτρησης ή του φάσματος του δείγματος.

Αντίθετα, τα φασματοφωτόμετρα απλής δέσμης διαθέτουν έναν υποδοχέα, στον οποίο μετριούνται διαδοχικά το «λευκό» δείγμα και το δείγμα που περιέχει τον αναλύτη.^[70,71]



Εικόνα 23. Σχηματικό διάγραμμα ενός UV-Vis φασματοφωτομέτρου (A) απλής και (B) διπλής δέσμης

Τα δείγματα εισέρχονται στους υποδοχείς του φασματοφωτομέτρου τοποθετημένα σε κυβέττες ή αλλιώς κυψελίδες, που είναι ειδικά σχεδιασμένες για το σκοπό αυτό. Το υλικό κατασκευής τους μπορεί να είναι πλαστικό, γυαλί ή χαλαζίας με οπτική ποιότητα, που δεν απορροφά στο εύρος ενδιαφέροντος του μήκους κύματος. Για να χρησιμοποιηθεί η κυψελίδα, πριν την ανάλυση θα πρέπει να καθαρίζεται διεξοδικά, ώστε να μη διαθέτει την οποιαδήποτε ακαθαρσία που μπορεί να μεταβάλλει το αποτέλεσμα της ανάλυσης.^[71]

Όσον αφορά τις δραστικές ενώσεις, ορισμένα από τα μόρια αυτά είναι έγχρωμα και απορροφούν ακτινοβολία στο φάσμα του ορατού, ενώ άλλα απορροφούν στην υπεριώδη ή στην υπέρυθη περιοχή του φάσματος. Η απορρόφηση της ακτινοβολίας στην περιοχή του υπεριώδους-ορατού (UltraViolet-Visible, UV-Vis) βρίσκει εφαρμογή στις τεχνικές χημικής ανάλυσης, όντας από τις πιο παλιές, αν όχι η πιο παλιά, φασματοφωτομετρική μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση χημικών ενώσεων.^[70,71]

8.2. Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS)

Η ανίχνευση της σκέδασης του φωτός (light scattering) από την ύλη είναι μια τεχνική που βρίσκει εφαρμογή σε πολλούς επιστημονικούς κλάδους μελετώντας τις ιδιότητες των μορίων. Συγκεκριμένα, η μέθοδος αυτή αξιολογεί παραμέτρους των σωματιδίων, όπως το μέγεθός τους, ο συντελεστής διάχυσής τους, ακόμα και το μοριακό τους βάρος.^[30,73]

Η αξιολόγηση των μορίων με βάση την τεχνική αυτή στηρίζεται στις φυσικές αρχές της περίθλασης του φωτός (light diffraction) και της απλής σκέδασης σωματιδίου (single particle scattering). Η περίθλαση του φωτός βασίζεται στη συσχέτιση της έντασης της περιθλώμενης ακτινοβολίας με τη γωνία περίθλασης, τις οπτικές ιδιότητες και το μέγεθος των σωματιδίων. Η απλή σκέδαση σωματιδίου στηρίζεται στην αρχή ότι το μέγεθος των σωματιδίων αξιολογείται κυρίως από την ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας και λιγότερο από τη

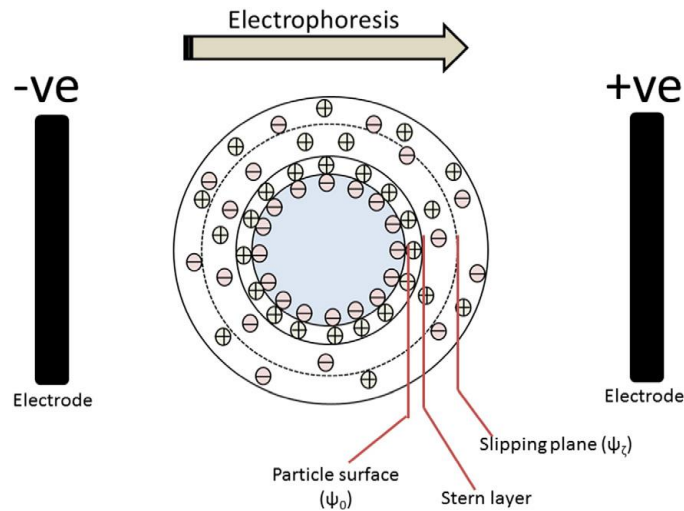
γωνία σκέδασης, η οποία στα όργανα που χρησιμοποιούνται παραμένει σταθερή.^[30]

Η αρχή της μεθόδου Δυναμικής Σκέδασης του Φωτός, όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 3.3.2, στηρίζεται στην κίνηση Brown των σωματιδίων ενός εναιωρήματος, το οποίο φωτοβολείται με μονοχρωματική ακτινοβολία. Οι διακυμάνσεις στην ένταση του σκεδαζόμενου φωτός, εξαιτίας των τυχαίων κινήσεων Brown των σωματιδίων, αναλύονται και υπολογίζεται ο συντελεστής διάχυσης D . Γνωρίζοντας την τιμή του συντελεστή διάχυσης, μπορεί να υπολογιστεί η υδροδυναμική διάμετρος α των σωματιδίων μέσω της εξίσωσης (1) Stokes-Einstein, όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 3. Η υδροδυναμική διάμετρος είναι η διάμετρος μιας ισοδύναμης σφαίρας που έχει τον ίδιο συντελεστή διάχυσης με τα σωματίδια του δείγματος. Ωστόσο, η τιμή της είναι λίγο μεγαλύτερη από την πραγματική διάμετρο των σωματιδίων, εξαιτίας του φαινομένου της επιδιαλύτωσης/ενυδάτωσης και της ύπαρξης αλληλεπιδράσεων μεταξύ των σωματιδίων.^[30,73,74,75]

Η μέθοδος DLS χρησιμοποιείται συνήθως για τη μέτρηση του μεγέθους νανοσωματιδίων εύρους 1-500 nm, ενώ πολλά όργανα λειτουργούν και σε εύρος 0.3 nm -10 μ m.^[74]

Με το ίδιο όργανο, αλλά με εφαρμογή ηλεκτροφόρησης, μπορεί να μετρηθεί και το ζ-δυναμικό, το οποίο αποτελεί μέτρο της σταθερότητας των σωματιδίων και η μέτρησή του δίνει στοιχεία για το φυσικοχημικό χαρακτηρισμό τους.^[30]

Όλα τα στερεά σωματίδια που βρίσκονται διασπαρμένα σε υγρό μέσο, αποκτούν θετικό ή αρνητικό φορτίο, ανάλογα με το πρόσημο του φορτίου των επιμέρους συστατικών που αποτελούν το σωματίδιο. Ως άμεση συνέπεια, στην επιφάνεια του κάθε σωματιδίου σχηματίζεται μια διπλοστιβάδα από το μέσο διασποράς, αποτελούμενη από την εσωτερική ή στιβάδα Stern και από την εξωτερική ή στιβάδα διάχυσης. Ανάλογα με το φορτίο των σωματιδίων, η εσωτερική στιβάδα αποτελείται από ιόντα αντίθετα φορτισμένα, τα οποία είναι ισχυρά δεσμευμένα πάνω στην επιφάνεια του κάθε σωματιδίου. Η εξωτερική στιβάδα αποτελείται από ανιόντα και κατιόντα τα οποία έλκονται ή απωθούνται από το επιφανειακό φορτίο των σωματιδίων, όπως φαίνεται στην εικόνα 24.^[76]



Εικόνα 24. Σχηματική αναπαράσταση της ηλεκτρικής διπλοστιβάδας που περιβάλλει σωματίδιο σε διασπορά

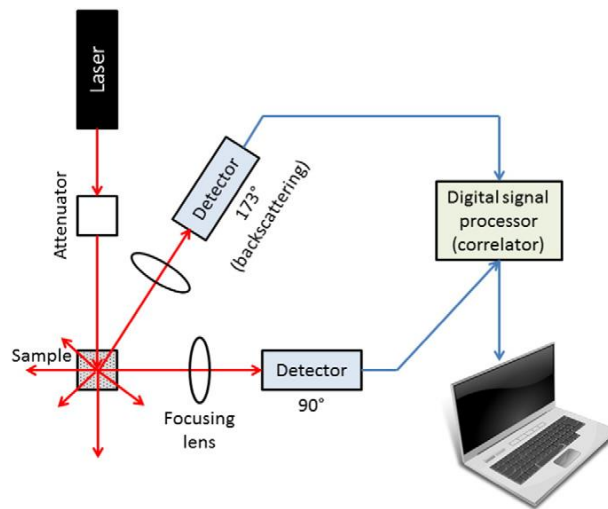
Το ζ-δυναμικό είναι το μέγεθος που αντανακλά τη διαφορά δυναμικού μεταξύ της ηλεκτρικής διπλοστιβάδας των σωματιδίων σε διασπορά και της υπόλοιπης διασποράς γύρω τους. Σαν μέγεθος δεν μπορεί να μετρηθεί άμεσα και γι' αυτό υπολογίζεται έμμεσα με τη χρήση της εξίσωσης Henry (3), σχετιζόμενο με την ηλεκτροφορητική κινητικότητα:

$$\zeta = \frac{4\pi n u_E}{\epsilon f(k\alpha)} \quad (3)$$

όπου u_E η ηλεκτροφορητική κινητικότητα [$\frac{m^2V}{s}$], ζ το ζ-δυναμικό [V], ϵ η διηλεκτρική σταθερά [$\frac{F}{m}$], n το ιξώδες [$\frac{kg}{m \cdot s}$], $f(k\alpha)$ η συνάρτηση Henry και $k\alpha$ ο λόγος της ακτίνας του σωματιδίου προς το πάχος της διπλοστιβάδας. Για πολικούς διαλύτες, η μέγιστη τιμή της $f(k\alpha)$ είναι 1.5 (προσέγγιση Smoluchowski), ενώ για μη πολικούς διαλύτες η ελάχιστη τιμή της $f(k\alpha)$ είναι 1 (προσέγγιση Hückel).^[30,75]

Η μέτρηση του ζ-δυναμικού σχετίζεται άμεσα με τη σταθερότητα μιας διασποράς. Συγκεκριμένα, οι τιμές μεγαλύτερες από ± 30 mV υποδεικνύουν υψηλή σταθερότητα της διασποράς μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων. Στην πράξη, ωστόσο, η τιμή του ζ-δυναμικού δεν είναι αρκετή για τον προσδιορισμό της σταθερότητας, καθώς δεν λαμβάνει υπόψη τις ελκτικές δυνάμεις van der Waals.^[76]

Ως προς την οργανολογία, όλα τα όργανα δυναμικής σκέδασης φωτός αποτελούνται από τρία κύρια τμήματα: την πηγή της μονοχρωματικής ακτινοβολίας, την υποδοχή για την τοποθέτηση του δείγματος και τον ανιχνευτή φωτός, όπως φαίνεται στην εικόνα 25. Το όργανο είναι πάντα συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή με κατάλληλο λογισμικό για τη λήψη των αποτελεσμάτων.^[74,76]



Εικόνα 25. Σχηματική αναπαράσταση οργάνου DLS

Μερικά από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα όργανα Δυναμικής Σκέδασης φωτός είναι η σειρά Zetasizer της Malvern, η σειρά NanoDLS της Brookhaven και η σειρά Wave II της Microtrac.^[76]

8.3. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Η φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR Spectroscopy) είναι μια ισχυρή, μη καταστρεπτική μέθοδος ικανή για πλήρη ανάλυση της δομής και της διαμόρφωσης πολύπλοκων μορίων, αλλά και μη επεμβατική μέτρηση ρυθμών χημικών αντιδράσεων.^[77]

Η φασματοσκοπική αυτή μέθοδος βασίζεται στην αλληλεπίδραση της ύλης με την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Πιο συγκεκριμένα, η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στο ότι γύρω από ορισμένους ατομικούς πυρήνες σχηματίζονται τοπικά μαγνητικά πεδία, ενώ οι πυρήνες αυτοί μεταβαίνουν από μια κατάσταση spin σε μια άλλη, όταν εφαρμόζεται σε αυτούς εξωτερικό μαγνητικό πεδίο. Η διέγερση αυτή των πυρήνων, που προκαλείται από την εφαρμογή ακτινοβολιών ραδιοσυχνότητας (10-1000 MHz), δίνει σήμα το οποίο διαφέρει ανάλογα με το είδος του πυρήνα και τελικά παρέχει πληροφορίες για την ηλεκτρονιακή δομή του εκάστοτε μορίου και το χημικό του περιβάλλον. Ωστόσο, οι πυρήνες που εμφανίζουν την παραπάνω ιδιότητα και μπορούν να αναλυθούν με φασματοσκοπία NMR είναι συγκεκριμένα αυτοί που διαθέτουν κβαντικό αριθμό spin και περιττό ατομικό ή μαζικό αριθμό. Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι είναι οι πυρήνες ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{29}Si και ^{31}P . Η φασματοσκοπία NMR πρωτονίου (^1H) είναι ο συνηθέστερα χρησιμοποιούμενος τύπος NMR, ενώ ακολουθεί η χρήση του ισότοπου ^{13}C .^[70,77,78,79]

Παράλληλα με τον προσδιορισμό της συχνότητας, στην οποία οι πυρήνες του προς ανάλυση μορίου απορροφούν και καταγράφεται ως χημική μετατόπιση σε

ppm, καταγράφεται και το εμβαδό του κάθε σήματος, που είναι ανάλογο με τον αριθμό των πυρήνων που απορροφούν ακτινοβολία.^[70]

Τα προς ανάλυση μόρια υφίστανται μία ακόμα επίδραση μετατόπισης, η οποία οφείλεται στο spin των πυρήνων σε άτομα γειτονικά σε ένα συγκεκριμένο πυρήνα. Πιο συγκεκριμένα, ένας πυρήνας με ένα spin επηρεάζει έναν κοντινό του με διαφορετικό spin μέσω αλληλεπίδρασης των χημικών δεσμών του μορίου, οδηγώντας στη σύζευξή τους. Ως αποτέλεσμα, το φάσμα NMR που προκύπτει διαχωρίζει τις κορυφές, δίνοντας πληροφορίες για τον τρόπο σύνδεσης των ατόμων. Κάθε σήμα πυρήνα χωρίζεται σε συνιστώσες κορυφές, ανάλογα με την παρουσία των γειτονικών πυρήνων, που ακολουθούν τον κανόνα $n+1$, όπου n ο αριθμός των γειτονικών πυρήνων με τους οποίους πραγματοποιείται η σύζευξη. Παρόλα αυτά, αν υπάρχει πρόσδεση σε ισχυρά ηλεκτραρνητική ομάδα, η σύζευξη των spin παρεμποδίζεται, ενώ πυρήνες με ίδια χημική μετατόπιση δεν μπορούν να εμφανίσουν στο φάσμα NMR διαφορετικές κορυφές.^[70,80]

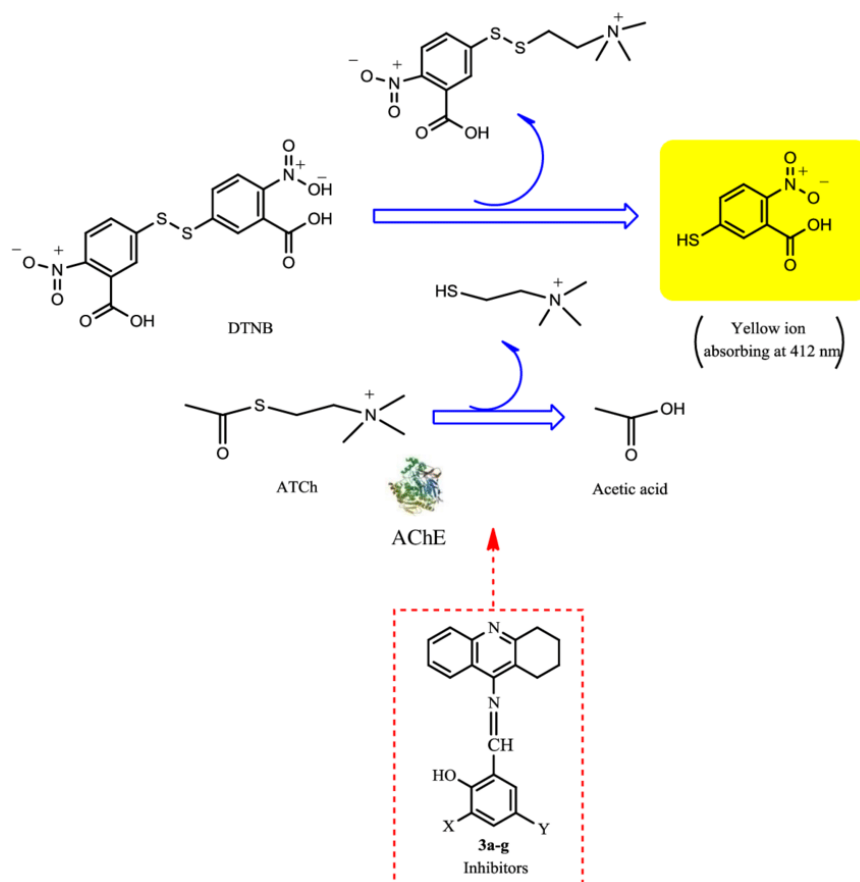
Η διαφορά (σε Hz) μεταξύ των κορυφών που προκύπτουν από το διαχωρισμό λέγεται σταθερά σύζευξης (coupling constant, J) και είναι ανεξάρτητη από την ισχύ του πεδίου που εφαρμόζεται στη συσκευή NMR. Ταυτόχρονα, το ύψος κάθε κορυφής σχετίζεται με τον αριθμό των πυρήνων. Αυτό αφορά κυρίως την περίπτωση της φασματοσκοπίας NMR πρωτονίου. Συγκεκριμένα, με την ολοκλήρωση και τον υπολογισμό του εμβαδού κάτω από την κορυφή προκύπτει ένας αριθμός, ανάλογος με τον αριθμό των πυρήνων που απορροφούν ακτινοβολία στη συγκεκριμένη συχνότητα. Για παράδειγμα, τρία πρωτόνια δίνουν εμβαδό τριπλάσιο του σήματος που προκύπτει από ένα πρωτόνιο στο ίδιο μόριο.^[70,80]

Η φασματοσκοπία NMR αποτελεί μια μέθοδο ανάλυσης με πολλά πλεονεκτήματα. Παρέχει πολύ περισσότερες πληροφορίες για τη δομή ενός μορίου σε σχέση με κάθε άλλη τεχνική. Επιπλέον, τα αποτελέσματα που δίνει είναι επαναλήψιμα και το σύστημα είναι πολύ σταθερό, χωρίς ιδιαίτερη συντήρηση οργανολογίας. Ωστόσο, είναι μια τεχνική σχετικά μικρής ευαισθησίας, που απαιτεί <1 mg δείγματος για NMR πρωτονίου και <5 mg για NMR άνθρακα.^[70]

9. Αξιολόγηση ικανότητας αναστολής της AChE

Η ικανότητα αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης από διάφορες ενώσεις αξιολογείται *in vitro* κατά κύριο λόγο με τη μέθοδο Ellman. Η μέθοδος αυτή είναι μια φωτομετρική μέθοδος, σύμφωνα με την οποία συσχετίζονται η ενζυμική δραστηριότητα της AChE με την εμφάνιση κίτρινου χρώματος κατά την αντίδραση της θειοχολίνης με το 5,5'-διθειο-νιτροβενζοϊκό ιόν (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoate) που προέρχεται από το 5,5'-διθειο-νιτροβενζοϊκό οξύ (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid, DTNB). Το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται στην αντίδραση είναι η ακετυλοθειοχολίνη (acetylthiocholine, ATCI) η οποία υδρολύεται ενζυμικά από την AChE προς την παραγωγή θειοχολίνης και οξικού οξέος.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη μέτρηση του ρυθμού με τον οποίο παράγεται η θειοχολίνη κατά την υδρόλυση της ATCI. Η μέτρηση αυτή γίνεται εφικτή με τη συνεχή αντίδραση της θειοχολίνης με το DTNB που παράγει ως προϊόν το 5-θειο-2-νιτροβενζοϊκό ιόν (5-thio-2-nitrobenzoate, TNB), το οποίο εμφανίζει έντονο κίτρινο χρώμα. Με τη χρήση φωτομέτρου πραγματοποιείται μέτρηση στα 412 nm του ρυθμού με τον οποίο παράγεται το κίτρινο χρώμα και με τον τρόπο αυτό μπορεί να ποσοτικοποιηθεί τελικά η ενζυμική αναστολή.^[81]

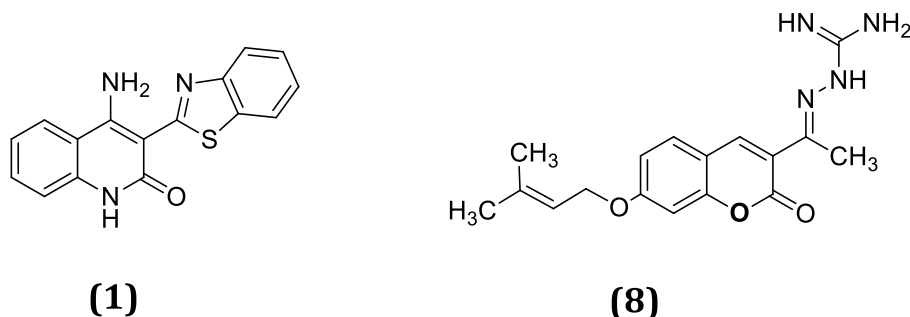


Εικόνα 26. Χημική αναπαράσταση της μεθόδου Ellman

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπό της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η ανάπτυξη της διεργασίας εγκλωβισμού ενός κουμαρινικού αναλόγου και ενός αναλόγου κινολινόνης σε νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων, καθώς και η αξιολόγηση της δράσης τους ως αναστολείς των ενζύμων ακετυλοχολινεστεράση και βουτυρυλοχολινεστεράση.

Η σύνθεση της κινολινόνης **(1)** πραγματοποιήθηκε από την ομάδα του Δρ Κ. Προυσή, στο Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών και της κουμαρίνης **(8)** στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου (Σχήμα 32). Οι βιοδραστικές αυτές ενώσεις επιλέχθηκαν, καθώς είχαν εμφανίσει αξιόλογη αναστολή της δράσης της ακετυλοχολινεστεράσης ($IC_{50,(1)}=92.5 \mu M$, $IC_{50,(8)}=6.4 \mu M$).



Σχήμα 32. Η δομή της κινολινόνης **(1)** και της κουμαρίνης **(8)**

Οι παραπάνω ενώσεις εγκλωβίστηκαν σε νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων και χαρακτηρίστηκαν ως προς το μέγεθος και το δείκτη πολυδιασποράς με τη μέθοδο της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS) και το ζ-δυναμικό τους μέσω ηλεκτροφόρησης. Η απόδοση εγκλωβισμού υπολογίστηκε μέσω φασματοφωτομετρίας UV-Vis, ο δομικός χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων πραγματοποιήθηκε με Υπέρυθρη Φασματοσκοπία (FT-IR), ενώ η μορφολογία τους μελετήθηκε με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διερχόμενης Δέσμης (TEM).

Ακόμη, μελετήθηκε το προφίλ αποδέσμευσης των βιοδραστικών ενώσεων από τα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων, σε διαφορετικές συνθήκες pH (1.2 και 7.4) στους 37°C και ακολούθησε μαθηματική μοντελοποίηση του προφίλ αποδέσμευσης.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε *in vitro* μελέτη της ικανότητας αναστολής της δράσης των ενζύμων ακετυλοχολινεστεράση και βουτυρυλοχολινεστεράση από τα νανοσωματίδια, μέσω της τροποποιημένης μεθόδου Ellman.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Όργανα και συσκευές

Στην παρούσα ενότητα, παρουσιάζονται τα όργανα και ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση των νανοσωματιδίων, την παρακολούθηση της αποδέσμευσης της εγκλωβισμένης δραστικής ουσίας από το φορέα, καθώς και τη μελέτη της δράσης των SLNs ως αναστολείς των ενζύμων AChE και BuChE.

Χρησιμοποιήθηκαν δύο φασματοφωτόμετρα UV-Vis. Το “V-770” της Jasco χρησιμοποιήθηκε για τη λήψη φασμάτων, με σκοπό τον έμμεσο προσδιορισμό των αποδόσεων των εγκλωβισμών. Με το “Epoch 2 microplate reader” λήφθηκαν τιμές απορρόφησης για τον προσδιορισμό των τιμών IC₅₀ των δύο αναστολέων των ενζύμων που μελετήθηκαν.

Για τη ζύγιση χρησιμοποιήθηκαν ένας αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων, μοντέλο “KERN ADJ” της εταιρίας Technolab, καθώς και ένας ζυγός ακριβείας (mg) με ακρίβεια έξι δεκαδικών ψηφίων, μοντέλο “PRO” της εταιρίας Sartorius.

Η μέτρηση των τιμών του pH στα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν πραγματοποιήθηκε με χρήση του οργάνου “744 pH Meter” της Metrohm.

Για την εξάτμιση των διαλυτών χρησιμοποιήθηκε περιστροφικός εξατμιστήρας της εταιρίας BÜCHI SWITZERLAND, αποτελούμενος από περιστροφικό ψυκτήρα “Rotavapor R-114”, υδατόλουτρο “Waterbath B-4810”, αντλία και σύστημα ελέγχου “Vacuum Pump V-710”.

Ακόμη, για την ομογενοποίηση των μιγμάτων χρησιμοποιήθηκε η συσκευή υπερήχων probe, άμεσης ακτινοβολήσης, μοντέλο “Vibra-Cell VCX 750” της Sonics and Materials Inc. Για τη διάλυση στερεών σε διαλύτες, αλλά και την ανάμειξη διαλυτών, χρησιμοποιήθηκε η συσκευή vortex “V05 series” της εταιρίας Ibx instruments.

Για τη λυοφιλοποίηση των διασπορών και την παραλαβή των νανοσωματιδίων σε στερεή μορφή χρησιμοποιήθηκε η συσκευή λυοφιλοποίησης “Lablyo Mini” της εταιρείας Frozen In Time.

Η παραλαβή της υδατικής διασποράς των SLNs πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την υπερφυγόκεντρο “SORVALL LYNX 6000 Centrifuge” της Thermo SCIENTIFIC.

Η επώαση των γαλακτωμάτων για την εξάτμιση του χρησιμοποιούμενου διαλύτη πραγματοποιήθηκε στον επωαστήρα “Gallenkamp Environmental Shaker Model 10X400”.

Για τη μελέτη της σταθερότητας των νανοσωματιδίων, τον προσδιορισμό του μεγέθους τους και του δείκτη πολυδιασποράς μέσω της μεθόδου Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (Dynamic Light Scattering), καθώς και του ζ-δυναμικού μέσω ηλεκτροφόρησης, χρησιμοποιήθηκε η συσκευή “ZETASIZER Nano-ZS” της εταιρίας Malvern.

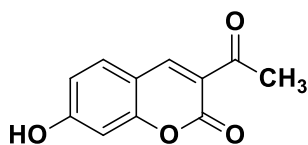
Η πορεία των αντιδράσεων σύνθεσης και η καθαρότητα των προϊόντων ελέγχθηκαν με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC). Χρησιμοποιήθηκαν πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με Silica gel F254 της εταιρίας Merck, σε συνδυασμό με συστήματα διαλυτών σε διαφορετικές αναλογίες, όπως PE/EtOAc (πετρελαϊκός αιθέρας/οξικός αιθυλεστέρας) και DCM/MeOH (διχλωρομεθάνιο/μεθανόλη). Οι θέσεις των κηλίδων των έγχρωμων ενώσεων παρατηρήθηκαν στο ορατό φως, ενώ χρησιμοποιήθηκε και λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας UV στα 254 nm. Ακόμη, πραγματοποιήθηκε εμποτισμός της πλάκας σε διάλυμα φωσφομολυβδικού οξέος (PMA) αναλογίας 1:2 (αιθανολικό διάλυμα PMA 7%:EtOH).

Οι ενώσεις που συντέθηκαν χαρακτηρίστηκαν και ελέγχθηκαν ως προς την καθαρότητά τους με φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ^1H NMR. Η λήψη των φασμάτων πραγματοποιήθηκε με το όργανο Varian NMR 300 MHz του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3 , d_1) και το δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO, d_6). Οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων δίνονται σε ppm, ενώ των σταθερών συζεύξεων (J) σε Hz. Οι πολλαπλότητες των σημάτων στα φάσματα ^1H NMR περιγράφονται ως εξής:

• s (singlet, απλό)	• brs (broad singlet, ευρύ απλό)
• d (doublet, διπλό)	• dd (doublet of doublets, διπλό διπλών)
• t (triplet, τριπλό)	

παραλήφθηκε παρέμεινε στην αντλία κενού για ξήρανση. Προέκυψε στερεό πράσινου χρώματος, η καθαρότητα του οποίου ελέγχθηκε μέσω $^1\text{H NMR}$ (εικόνα 46 – Παράρτημα II).

(4) 3-ακετυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνη



Μοριακός τύπος: $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{O}_4$

Μοριακό Βάρος: 204.04 g/mol

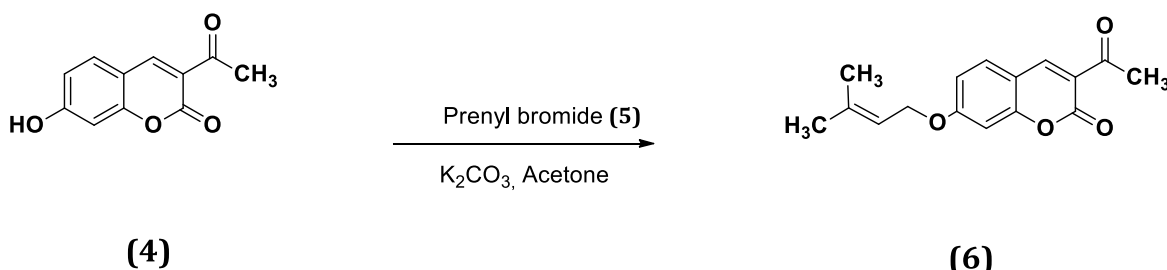
Σημείο τήξεως: 235-236°C

Απόδοση αντίδρασης: 68%

$^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3): δ (ppm) 8.37 (s, 1H, **H-4**), 7.38 (d, $J = 9$ Hz, 1H, **H-5**), 6.75 (dd, $J = 9$ Hz, $J = 2.4$ Hz, 1H, **H-6**), 6.74 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, **H-8**), 2.57 (s, 3H, **3-OCH₃**)

2^ο Στάδιο

Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης του δεύτερου σταδίου, χρησιμοποιήθηκε το προϊόν που παραλήφθηκε από το πρώτο στάδιο. Με βάση τη στοιχειομετρία της αντίδρασης του σχήματος 34, υπολογίστηκαν, όπως φαίνονται στον πίνακα 3, οι ποσότητες των αντιδρώντων που χρησιμοποιήθηκαν.



Σχήμα 34. Αντίδραση σύνθεσης 3-ακετυλο-7-πρενυλοξυ-κουμαρίνης (ένωση (6))

Πίνακας 3. Απαιτούμενες ποσότητες αντιδρώντων για το δεύτερο στάδιο της σύνθεσης 3-ακετυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνη Πρενυλοβρομίδιο

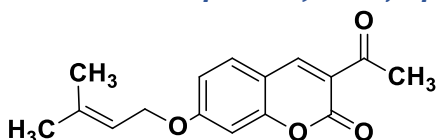
Γραμμομοριακή αναλογία	1 eq	1.2 eq
MW [g/mol]	204.18	149.04
m [mg]	300	262.7
d [g/mL]	1.410	1.281
n [mmol]	1.47	1.76

Το στερεό προϊόν του πρώτου σταδίου μεταφέρθηκε σε σφαιρική φιάλη, όπου προστέθηκαν 37 mL ακετόνης υπό ανάδευση στους 56°C μέχρι διάλυσης του

στερεού. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 203.1 mg K₂CO₃ (στοιχειομετρική αναλογία 1:1 με το προϊόν του πρώτου σταδίου). Τέλος, προστέθηκε το βρομίδιο (prenyl bromide) και το σύστημα παρέμεινε υπό συνεχή ανάδευση στους 56°C για 24 h, παρουσία κάθετου ψυκτήρα και σε αδρανείς συνθήκες. Η πορεία της αντίδρασης και η καθαρότητα του τελικού προϊόντος παρακολούθηθηκαν με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 70:30 και 30:70 PE:EtOAc. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το μίγμα διηθήθηκε υπό κενό με ακετόνη για απομάκρυνση της βάσης. Το διήθημα εξατμίστηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα και παρέμεινε στην αντλία κενού για ξήρανση.

Για τον καθαρισμό του στερεού πραγματοποιήθηκε ανακρυστάλλωση με DCM/MeOH στους 65°C, όπως ακριβώς στο πρώτο στάδιο. Παραλήφθηκε στερεό υποκίτρινου χρώματος, η καθαρότητα του οποίου ελέγχθηκε μέσω ¹H NMR (εικόνα 47 – Παράρτημα II).

(6) 3-ακετυλο-7-πρενυλοξυ-κουμαρίνη

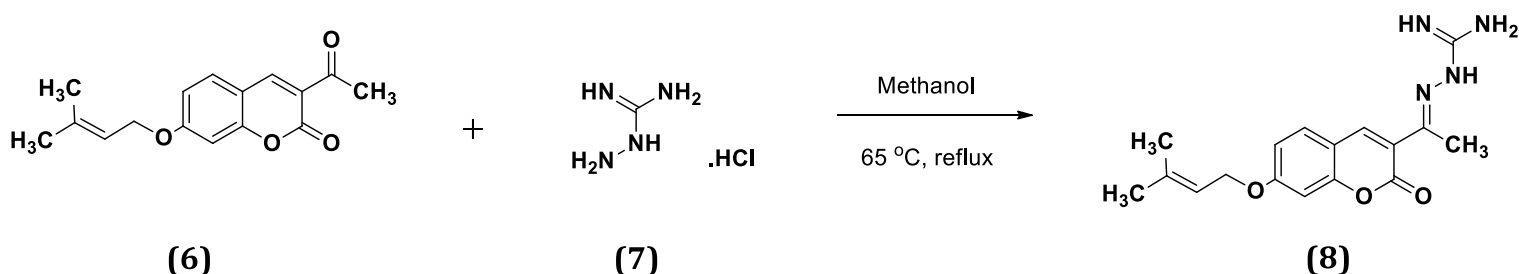


Μοριακός τύπος: C₁₆H₁₆O₄
 Μοριακό Βάρος: 272.30 g/mol
 Σημείο τήξεως: 107°C
 Απόδοση αντίδρασης: 45%

¹H NMR (300MHz, DMSO): δ (ppm) 8.62 (s, 1H, **H-4**), 7.85 (d, J=8.7 Hz, 1H, **H-5**), 7.04 (d, J=2.1 Hz, 1H, **H-8**), 6.99 (dd, J₁=8.7 Hz, J₂=2.4 Hz, 1H, **H-6**), 5.46 (t, J=6.6 Hz, 1H, **H-2'**), 4.67 (d, J=6.6 Hz, 2H, **H-1'**), 2.55 (s, 3H, **3-OCH₃**), 1.74 (d, J=8.1 Hz, 6H, **H-4', H-5'**)

3^ο Στάδιο

Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης του τρίτου σταδίου, χρησιμοποιήθηκε το προϊόν που προέκυψε από το δεύτερο στάδιο. Με βάση τη στοιχειομετρία της αντίδρασης του σχήματος 35, υπολογίστηκαν οι απαιτούμενες ποσότητες των αντιδρώντων, όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 4.



Σχήμα 35. Αντίδραση σύνθεσης ένωσης (8)

Πίνακας 4. Απαιτούμενες ποσότητες αντιδρώντων για το τρίτο στάδιο της σύνθεσης

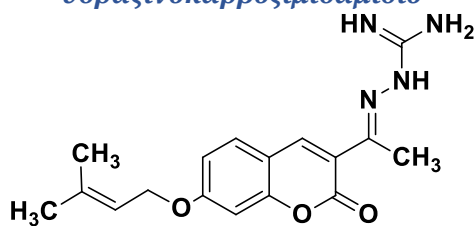
3-ακετυλο-7-πρενυλοξυ-κουμαρίνη Αμινογουανιδίνη

Γραμμομοριακή αναλογία	1.1 eq	1 eq
MW [g/mol]	272.3	110.55
m [mg]	179.5	66.3
n [mmol]	0.659	0.599

Αρχικά, ζυγίστηκε η υδροχλωρική αμινογουανιδίνη και μεταφέρθηκε σε σφαιρική φιάλη μαζί με 6 mL μεθανόλης. Το μίγμα παρέμεινε υπό ανάδευση στους 65°C μέχρι το στερεό να διαλυθεί πλήρως. Στη συνέχεια, προστέθηκε το προϊόν του δεύτερου σταδίου και το σύστημα παρέμεινε αρχικά υπό ανάδευση στους 65°C για 3 h και ύστερα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος χωρίς θέρμανση για 24 h, παρουσία κάθετου ψυκτήρα και σε αδρανείς συνθήκες. Ακολούθησε ψύξη του μίγματος για 2 h. Η πορεία της αντίδρασης και η καθαρότητα του τελικού προϊόντος παρακολουθήθηκαν με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 70:30, 30:70 PE:EtOAc και 95:5 DCM:MeOH. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το μίγμα διηθήθηκε υπό κενό με κρύα μεθανόλη και το στερεό που παραλήφθηκε παρέμεινε στην αντλία κενού για ξήρανση.

Ο καθαρισμός του προϊόντος πραγματοποιήθηκε με στήλη χρωματογραφίας σε σύστημα διαλυτών 95:5 DCM:MeOH αρχικά και 80:20 DCM:MeOH στη συνέχεια. Τελικά, προέκυψε στερεό κίτρινου χρώματος, η καθαρότητα του οποίου επιβεβαιώθηκε με φασματοσκοπία ^1H NMR (Εικόνα 31).

(8) ((E)-2(1-(7-((3-μεθυλοβουτ-2-εν-1-υλ)οξυ)-2-οξο-2H-χρωμεν-3-υλ)αιθυλιδεν)-υδραζινοκαρβοξυμιδαμίδιο



Μοριακός τύπος: $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_3$

Μοριακό Βάρος: 328.37 g/mol

Σημείο τήξεως: 202°C

Απόδοση αντίδρασης: 34%

^1H NMR (300MHz, DMSO): δ (ppm) 8.42 (s, 1H, **H-4**), 7.90-7.78 (brs, 4H, **-NH**, **-NH**, **-NH₂**), 7.67 (d, $J=9$ Hz, 1H, **H-5**), 7.05 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, **H-8**), 6.99 (dd, $J_1=8.7$ Hz, $J_2=2.4$ Hz, 1H, **H-6**), 5.46 (t, $J=6.9$ Hz, 1H, **H-2'**), 4.65 (d, $J=6.9$ Hz, 2H, **H-1'**), 2.28 (s, 3H, **3-OCH₃**), 1.74 (d, $J=8.4$ Hz, 6H, **H-4'**, **H-5'**)

3. Σύνθεση νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων (Solid Lipid Nanoparticles, SLNs) και εγκλωβισμός βιοδραστικής ένωσης

3.1. Απομόνωση και καθαρισμός τριμυριστίνης

Η τριμυριστίνη που χρησιμοποιήθηκε ως λιπιδική φάση στη σύνθεση των νανοσωματιδίων απομονώθηκε από μοσχοκάρυδο. Αρχικά, ζυγίστηκαν 20 g κονιοποιημένου μοσχοκάρυδου, τα οποία στη συνέχεια διαλύθηκαν σε 50 mL διαιθυλαιθέρα μέσα σε σφαιρική φιάλη. Το διάλυμα παρέμεινε για 1 h σε υδατόλουτρο με ήπια θέρμανση υπό ανάδευση.

Έπειτα, το περιεχόμενο της σφαιρικής φιάλης ψύχθηκε και διηθήθηκε. Το διήθημα οδηγήθηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα προς απομάκρυνση του διαλύτη και τέλος στην αντλία κενού για ξήρανση.

Για τον καθαρισμό της τριμυριστίνης που απομονώθηκε, πραγματοποιήθηκε ανακρουσάλλωση. Πιο συγκεκριμένα, η στερεή ακάθαρτη τριμυριστίνη που λήφθηκε διαλύθηκε σε σφαιρική φιάλη με ακετόνη (με αναλογία 1 mL ακετόνης για κάθε 50 mg ακάθαρτης τριμυριστίνης) και παρέμεινε σε υδατόλουτρο για 20 min στους 56°C υπό ανάδευση. Έπειτα, η σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκε στην κατάψυξη. Το στερεό, δηλαδή η καθαρή τριμυριστίνη, παραλήφθηκε μέσω διήθησης υπό κενό και παρέμεινε στην αντλία κενού, ώστε να ξηρανθεί πλήρως.

3.2. Σύνθεση κενών νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων (Blank SLNs)

Για τη σύνθεση των κενών νανοσωματιδίων ακολουθήθηκε η μέθοδος της γαλακτωματοποίησης με εξάτμιση του οργανικού διαλύτη. Για την παρασκευή της λιπιδικής φάσης ζυγίστηκε ποσότητα στερεής τριμυριστίνης (Πίνακας 5) και μεταφέρθηκε σε σφαιρική φιάλη, η οποία τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο υπό ανάδευση και θέρμανση στους 70°C (σημείο τήξης της τριμυριστίνης), μέχρι να τηχθεί πλήρως. Στη συνέχεια, ζυγίστηκε και προστέθηκε στη σφαιρική φιάλη ποσότητα φωσφατιδυλοχολίνης (Πίνακας 5), η οποία λειτούργησε ως σταθεροποιητής, ενώ συμπληρώθηκαν και 2 mL αιθανόλης για να βοηθήσουν στη διάλυση. Αφού το μίγμα έγινε διαυγές, προστέθηκε ως υδατική φάση ο επιφανειοδραστικός παράγοντας Polysorbate 80 (Tween 80) με τη μορφή υδατικού διαλύματος περιεκτικότητας 0.5% w/v (Πίνακας 5). Μέρος του διαλύματος προστέθηκε αρχικά στάγδην και αφού αποχύθηκε και το υπόλοιπο στη σφαιρική φιάλη, το μίγμα αφέθηκε υπό ανάδευση στους 70°C για 1 h. Στη συνέχεια, το σύστημα μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη, ενώ πραγματοποιήθηκε και έκπλυση της σφαιρικής φιάλης με ελάχιστη ποσότητα υπερκίθου νερού. Προκειμένου να γίνει πιο ομοιογενής η διασπορά, η κωνική φιάλη μεταφέρθηκε σε συσκευή υπερήχων για 6 λεπτά και ισχύ 30% watt. Το γαλάκτωμα που προέκυψε επώαστηκε για 24 h στους 37°C με ταυτόχρονη ανάδευση, προκειμένου να εξατμιστεί ο διαλύτης.

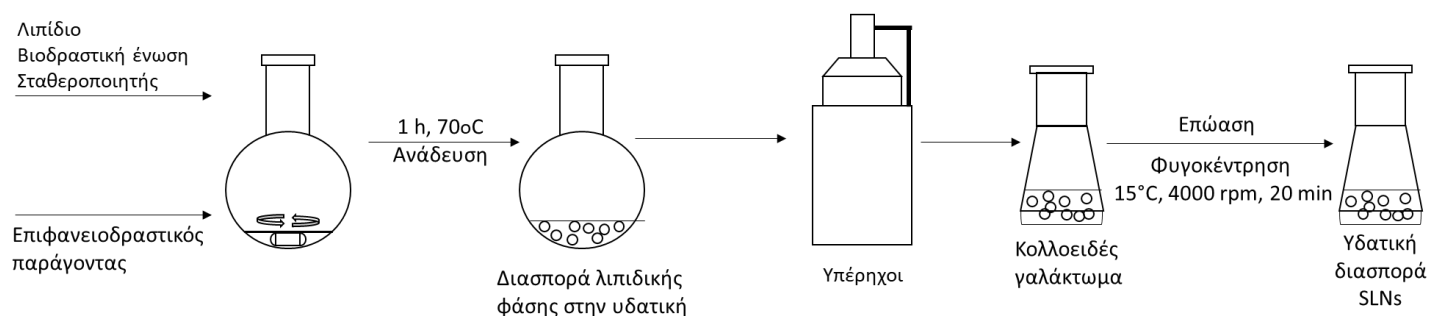
Για την παραλαβή των νανοσωματιδίων, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση σε συνθήκες 15°C και 4000 rpm για 20 min. Το υπερκείμενο υγρό που προέκυψε

από τη φυγοκέντρηση ήταν η υδατική διασπορά των νανοσωματιδίων, η οποία μεταφέρθηκε σε κρυσταλλωτήριο και παρέμεινε στην κατάψυξη για 24 h. Στη συνέχεια, μεταφέρθηκε στη συσκευή λυοφιλοποίησης, με σκοπό την παραλαβή των SLNs σε στερεή μορφή.

3.3. Εγκλωβισμός βιοδραστικής ένωσης σε Νανοσωματίδια Στερεών Λιπιδίων (SLNs)

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον εγκλωβισμό των βιοδραστικών ενώσεων, όπως φαίνεται στην εικόνα 27, ήταν παρόμοια με τη σύνθεση των κενών νανοσωματιδίων. Τα σημεία στα οποία διαφοροποιήθηκαν οι δύο διεργασίες είναι τα εξής:

- Στη διαδικασία του εγκλωβισμού προστέθηκε συγκεκριμένη ποσότητα βιοδραστικής ένωσης (Πίνακας 5). Η προς εγκλωβισμό ένωση διαλύθηκε σε 4 mL αιθανόλης με χρήση συσκευής Vortex. Το διάλυμα της ένωσης προστέθηκε στο μίγμα της σφαιρικής φιάλης μαζί με τη φωσφατιδυλοχολίνη μετά την τήξη της τριμυριστίνης.
- Επιπλέον, μετά τη φυγοκέντρηση, το ίζημα που καταβυθίστηκε στον πυθμένα του φιαλιδίου, χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της απόδοσης του εγκλωβισμού.



Εικόνα 27. Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διαδικασίας σύνθεσης SLNs

Ο εγκλωβισμός σε SLNs πραγματοποιήθηκε για δύο βιοδραστικές ενώσεις, την 4-αμινο-3-(βενζο[*d*]θιαζολ-2-υλ)κινολιν-2(1*H*)-όνη (**1**), η σύνθεση της οποίας έγινε στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών και το (*E*)-2(1-(7-((3-μεθυλοβουτ-2-εν-1-υλ)οξύ)-2-οξο-2*H*-χρωμεν-3-υλ)αιθυλιδεν)-υδραζινοκαρβοξυμιδαμίδιο (**8**). Οι δομές τους παρουσιάζονται στο σχήμα 32.

Για τους εγκλωβισμούς των δύο ενώσεων δοκιμάστηκαν διαφορετικές αναλογίες συστατικών, οι οποίες παρουσιάζονται στον πίνακα 5.

Πίνακας 5. Αναλογίες συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν για τους εγκλωβισμούς

Τριμυριστίνη (mg)	Φωσφατιδυλοχολίνη (mg)	Tween 80 (mg)	Ένωση (1) (mg)
200	50	100	20
100	25	50	10

Τριμυριστίνη (mg)	Φωσφατιδυλοχολίνη (mg)	Tween 80 (mg)	Ένωση (8) (mg)
100	25	50	10
100	25	70	10
100	25	30	10
200	25	50	10
75	18.75	37.5	7.5

4. Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων

4.1. Απόδοση διεργασίας

Η απόδοση της διεργασίας υπολογίζεται ως το πηλίκο της μάζας των ξηρών νανοσωματιδίων που παραλήφθηκαν προς τη συνολική μάζα των αρχικών συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν, δηλαδή της τριμυριστίνης, της φωσφατιδυλοχολίνης, του Tween 80 και της ένωσης προς εγκλωβισμό:

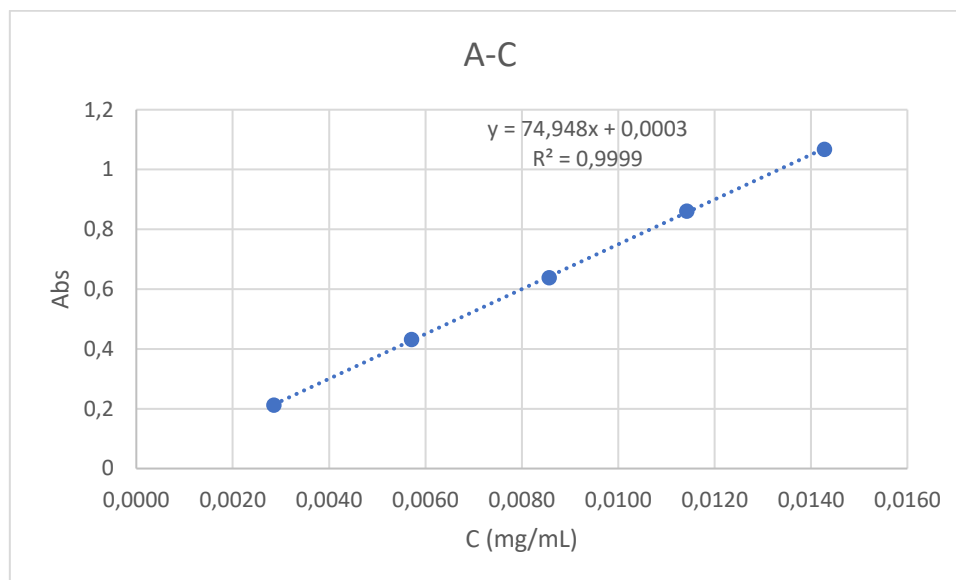
$$\% \text{απόδοση διεργασίας} = \frac{\text{ποσότητα ξηρών νανοσωματιδίων (mg)}}{\text{συνολική ποσότητα αρχικών συστατικών (mg)}} * 100 \quad (4)$$

4.2. Απόδοση εγκλωβισμού

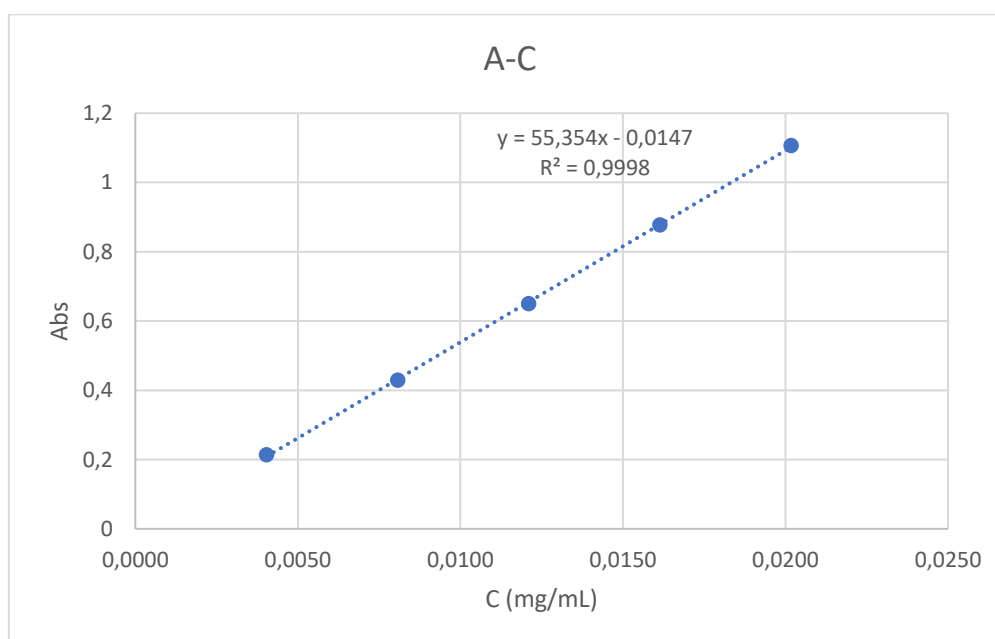
Η απόδοση του εγκλωβισμού προσδιορίστηκε έμμεσα, δηλαδή με τη μέτρηση της ποσότητας της ουσίας που δεν εγκλωβίστηκε, μέσω φασματοσκοπίας υπεριώδους-ορατού (UV-Vis).

Πιο συγκεκριμένα, το ίζημα που καταβυθίστηκε μετά τη φυγοκέντρηση της υδατικής διασποράς συλλέχθηκε από το φιαλίδιο με τη βοήθεια αιθανόλης και μεταφέρθηκε σε σφαιρική φιάλη. Η αιθανόλη εξατμίστηκε και το στερεό υπόλειμμα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 20 mL συστήματος DCM/MeOH σε αναλογία 1:1. Μέρος του διαλύματος λήφθηκε και πέρασε από φίλτρο με πορώδες 0.22 μm. Ποσότητα του φιλτραρισμένου διαλύματος ίση με 50 μL αραιώθηκε σε κυψελίδα με 1300 μL διαλύματος DCM/MeOH αναλογίας 1:1 και μετρήθηκε στο φασματοφωτόμετρο UV-Vis. Μέσω της απορρόφησης του κάθε δείγματος, στα 360 nm για την ένωση (1) και στα 352 nm για την ένωση (8), πραγματοποιήθηκε η ποσοτικοποίηση της μη εγκλωβισμένης ένωσης.

Ειδικότερα, για την ποσοτικοποίηση της μη εγκλωβισμένης ένωσης με τη χρήση φασματοσκοπίας, χρησιμοποιήθηκαν οι καμπύλες βαθμονόμησης που κατασκευάστηκαν για τις δύο βιοδραστικές ενώσεις.



Εικόνα 28. Καμπύλη βαθμονόμησης ένωσης (1)



Εικόνα 29. Καμπύλη βαθμονόμησης ένωσης (8)

Ο υπολογισμός των αποδόσεων των εγκλωβισμών των δύο ενώσεων παρουσίασε την εξής διαφορά: κατά τη σύνθεση των νανοσωματιδίων της (1) παρατηρήθηκε να μένει υπόλειμμα της ένωσης στη σφαιρική φιάλη, όπου παρασκευάστηκαν τα νανοσωματίδια. Για να ληφθεί υπόψη και αυτή η

ποσότητα ως μη εγκλωβισμένη ένωση, το υπόλειμμα διαλύθηκε σε ethyl acetate, προστέθηκε ξηραντικό και διηθήθηκε. Το διήθημα ογκομετρήθηκε, πέρασε από φίλτρο με πορώδες 0.22 μm και ποσότητα ίση με 50 μL αραιώθηκε σε κυψελίδα με 1200 μL διαλύματος DCM/MeOH αναλογίας 1:1. Το δείγμα μετρήθηκε στο φασματοφωτόμετρο και υπολογίστηκε η ποσότητα της ένωσης που έμεινε ως υπόλειμμα στη σφαιρική φιάλη. Αντίθετα, στη σύνθεση νανοσωματιδίων για τον εγκλωβισμό της **(8)** δεν παρατηρήθηκε να μένει υπόλειμμα στη σφαιρική φιάλη.

Τελικά, η απόδοση εγκλωβισμού για κάθε βιοδραστική ένωση υπολογίστηκε με χρήση της εξίσωσης (5).

απόδοση εγκλωβισμού

$$= 1 - \frac{\text{ποσότητα μη εγκλωβισμένης ένωσης (mg)}}{\text{αρχική ποσότητα ένωσης προς εγκλωβισμό (mg)}} \quad (5)$$

4.3. Προσδιορισμός μεγέθους, δείκτη πολυδιασποράς (PDI), ζ-δυναμικού και σταθερότητας

Τα νανοσωματίδια που παρασκευάστηκαν, τόσο τα blank, όσο και αυτά που περιείχαν εγκλωβισμένη ένωση, χαρακτηρίστηκαν ως προς το μέγεθός τους (size) και το δείκτη πολυδιασποράς (PolyDispersity Index, PDI) με τη μέθοδο της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS), καθώς και το ζ-δυναμικό (z-potential) μέσω ηλεκτροφόρησης.

Η προετοιμασία των δειγμάτων έγινε ως εξής: 20 μL υδατικής διασποράς νανοσωματιδίων διασπάρθηκαν σε 20 mL υπερκάθαρου νερού. Το κάθε δείγμα αναδεύτηκε με συσκευή Vortex και ορισμένη ποσότητα μεταφέρθηκε με χρήση σύριγγας σε κυψελίδα τύπου U (DTS 1070, Malvern, UK) του οργάνου DLS.

Πραγματοποιήθηκαν δύο είδη μετρήσεων, η πρώτη για το μέγεθος και το PDI και η δεύτερη για το ζ-δυναμικό. Η κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε από μία φορά και για καθένα από τα μεγέθη λήφθηκαν από τρεις τιμές.

Για τη μελέτη της σταθερότητας των νανοσωματιδίων πραγματοποιήθηκαν ξανά οι παραπάνω μετρήσεις στα ίδια δείγματα υδατικών διασπορών μετά από 1 μήνα αποθήκευσης σε συνθήκες περιβάλλοντος, αλλά και ψυγείου.

4.4. Μελέτη δομής μέσω Υπέρυθρης Φασματοφωτομετρίας (FT-IR)

Τα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων, η τριμυριστίνη, αλλά και οι βιοδραστικές ενώσεις εξετάστηκαν δομικά και με τη μέθοδο φασματοφωτομετρίας υπερύθρου (FT-IR). Τα φάσματα FT-IR καταγράφηκαν σε φασματόμετρο Bruker Tensor 27 σε λειτουργία αποσβένουσας ολικής ανάκλασης (ATR), στην περιοχή από 4000 έως 400 cm⁻¹.

4.5. Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διερχόμενης Δέσμης (TEM)

Για τη μελέτη TEM χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διερχόμενης δέσμης JEOL JEM-2100 LaB6 υψηλής ανάλυσης (HRTEM), που λειτουργεί στα 200 kV. Η υδατική διασπορά των blank SLNs υποβλήθηκε σε υπερήχους, ώστε να διασπαστούν τυχόν συσσωματωμένα σωματίδια. Στη συνέχεια, μία σταγόνα διασποράς τοποθετήθηκε σε πλέγμα χαλκού επικαλυμμένο με άνθρακα 300 mesh και ξηράνθηκε σε αέρα όλη τη νύχτα.

5. Μελέτη αποδέσμευσης

Το προφίλ αποδέσμευσης της ένωσης **(8)** μελετήθηκε, τόσο στην περίπτωση υδατικής διασποράς νανοσωματιδίων, όσο και σε λυοφιλοποιημένη διασπορά SLNs.

5.1. Αποδέσμευση από λυοφιλοποιημένη διασπορά SLNs

Για τη μελέτη αποδέσμευσης της εγκλωβισμένης ένωσης από τη λυοφιλοποιημένη διασπορά των SLNs παρασκευάστηκε αρχικά ρυθμιστικό διάλυμα με pH=7.4 ως εξής: 1.74 g K_2HPO_4 διαλύθηκαν σε 100 mL υπερκάθαρου νερού και 0.55 g KH_2PO_4 διαλύθηκαν σε 40 mL υπερκάθαρου νερού. Το διάλυμα του KH_2PO_4 προστέθηκε στάγδην στο διάλυμα του K_2HPO_4 μέχρι το pH να φτάσει την τιμή 7.4. Στη συνέχεια, προστέθηκε στο ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλη ποσότητα Tween 80, ώστε το διάλυμα να αποκτήσει 5% w/v περιεκτικότητα.

Σε vials προστέθηκε ποσότητα λυοφιλοποιημένης διασποράς SLNs τέτοια, ώστε να περιέχονται 0.5 mg εγκλωβισμένης ένωσης. Ο υπολογισμός αυτός έγινε με βάση την απόδοση και τη συνολική μάζα των νανοσωματιδίων που παραλήφθηκαν, ενώ χρησιμοποιήθηκαν τόσα vials, όσες ήταν και οι χρονικές στιγμές στις οποίες ήταν επιθυμητή η λήψη δείγματος, δηλαδή 30 min, 1, 2, 3, 4, 5 και 24 h. Τα SLNs στο κάθε vial διαλύθηκαν σε 1.5 mL ρυθμιστικού διαλύματος περιεκτικότητας 5% w/v Tween 80. Για αποτελεσματικότερη διάλυση χρησιμοποιήθηκε και συσκευή Vortex. Τα vials τοποθετήθηκαν στον επωαστήρα υπό ανάδευση στους 37°C. Στις χρονικές στιγμές που ήταν επιθυμητή η λήψη του δείγματος, το αντίστοιχο vial απομακρυνόταν από τον επωαστήρα και το περιεχόμενό του περνούσε από φίλτρο πορώδους 0.22 μ m. Στο τέλος, 200 μ L του φιλτραρισμένου δείγματος κάθε χρονικής στιγμής αραιώθηκαν με 800 μ L ρυθμιστικού διαλύματος με Tween 80 και φωτομετρήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο UV-Vis. Έτσι, από την απορρόφηση κάθε δείγματος και μέσω της καμπύλης βαθμονόμησης της ένωσης, ποσοτικοποιήθηκε η ένωση που είχε αποδεσμευτεί σε κάθε χρονική στιγμή.

5.2. Αποδέσμευση από υδατική διασπορά νανοσωματιδίων

Η αποδέσμευση της εγκλωβισμένης ένωσης από υδατική διασπορά μελετήθηκε σε δύο διαφορετικές τιμές pH, σε pH=7.4 και pH=1.2. Το ρυθμιστικό διάλυμα για τη μελέτη σε pH=7.4 παρασκευάστηκε όπως αναφέρεται στην παράγραφο 5.1. Το ρυθμιστικό διάλυμα για τη μελέτη σε pH=1.2 παρασκευάστηκε ως εξής: 0.5 g NaCl διαλύθηκαν σε 200 mL υπερκάθαρου νερού. Στο διάλυμα προστέθηκαν 1.85 mL διαλύματος HCl 85% w/w και συμπληρώθηκε υπερκάθαρο νερό, μέχρι ο όγκος του διαλύματος να φτάσει τα 250 mL.

Και στις δύο περιπτώσεις pH, κατάλληλος όγκος ρυθμιστικού διαλύματος, ανάλογα με τον όγκο της υδατικής διασποράς, θερμάνθηκε στους 37°C υπό ανάδευση σε ποτήρι ζέσεως. Ακόμη, προστέθηκε ποσότητα Tween 80 τέτοια, ώστε το διάλυμα να αποκτήσει περιεκτικότητα 5% w/v. Η υδατική διασπορά των νανοσωματιδίων τοποθετήθηκε σε μεμβράνη διαπίδυσης, η οποία εμβαπτίστηκε στο ρυθμιστικό διάλυμα με το Tween 80 και παρέμεινε υπό ανάδευση στους 37°C. Για τη μέτρηση της ποσότητας της ένωσης που αποδεσμεύτηκε, λήφθηκαν δείγματα στα εξής χρονικά διαστήματα: 30 min, 1, 2, 3, 4, 5 και 24 και 48 h. Πιο συγκεκριμένα, σε καθεμία από αυτές τις χρονικές στιγμές λήφθηκαν 1.5 mL από το ρυθμιστικό διάλυμα με το Tween 80, τα οποία πέρασαν από φίλτρο πορώδους 0.22 μm και μετρήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο χωρίς αραίωση, εκτός από τις περιπτώσεις πυκνού δείγματος, που η απορρόφηση ξεπέρασε το 1. Σε κάθε λήψη δείγματος, συμπληρώνονταν στο ποτήρι ζέσεως 1.5 mL ρυθμιστικού διαλύματος με Tween 80, ώστε ο τελικός του όγκος στο ποτήρι ζέσεως να παραμένει σταθερός.

Μετρώντας το δείγμα κάθε χρονικής στιγμής σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis υπολογίστηκε μέσω της καμπύλης βαθμονόμησης της ένωσης η ποσότητα αυτής που αποδεσμεύτηκε από τα SLNs.

Πραγματοποιήθηκε, επίσης, μελέτη αποδέσμευσης από υδατική διασπορά SLNs με χρήση του ενζύμου πεψίνη, για την προσομοίωση των συνθηκών του ανθρώπινου στομάχου. Συγκεκριμένα, η μόνη διαφοροποίηση στη διαδικασία αυτή ήταν πως στο ρυθμιστικό διάλυμα με το Tween 80 προστέθηκε και συγκεκριμένη ποσότητα πεψίνης (σύμφωνα με την αναλογία 0.8 g πεψίνης ανά 250 mL ρυθμιστικού διαλύματος).

6. Μελέτη της ικανότητας των ενώσεων να αναστέλλουν τη δράση της ακετυλοχολινεστεράσης και της βουτυρυλοχολινεστεράσης

Οι ενώσεις **(1)** και **(8)** έχουν παρουσιάσει ανασταλτική δράση στη λειτουργία των ενζύμων ακετυλοχολινεστεράση (AChE) και βουτυρυλοχολινεστεράση (BuChE). Για το λόγο αυτό, μελετήθηκε και το κατά πόσο ο εγκλωβισμός τους σε SLNs μπορεί να επηρεάσει τη δράση τους ως αναστολείς των παραπάνω ενζύμων.

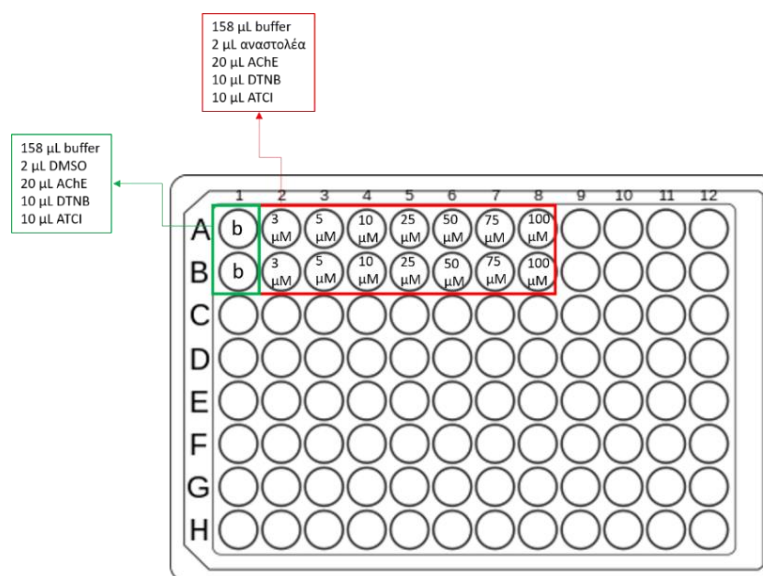
6.1. Αναστολή AChE

Για τη μελέτη της αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης, που προήλθε από τον οργανισμό *Electrophorus Electricus*, χρησιμοποιήθηκαν ως αναστολείς, τόσο οι καθαρές βιοδραστικές ενώσεις, όσο και οι εγκλωβισμένες σε SLNs. Η ακετυλοχολινεστεράση που προέρχεται από τον οργανισμό *Electrophorus Electricus* προσομοιάζει κατά πολύ την AChE του ανθρώπινου οργανισμού, με 60% ομοιότητα του ενεργού κέντρου.

Αρχικά, παρασκευάστηκε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl συγκέντρωσης 50 mM με τελικό pH=8. Το ένζυμο AChE, όντας σε μορφή διαλύματος, αραιώθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl προς τελική συγκέντρωση $C=0.1$ units/mL.

Όσον αφορά τους αναστολείς, παρασκευάστηκαν διαλύματα αρχικής συγκέντρωσης $C=10$ mM χρησιμοποιώντας διαλύτη DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο). Στη συνέχεια, παρασκευάστηκαν με διαδοχικές αραιώσεις διαλύματα αναστολέων συγκεντρώσεων 7.5 mM, 5 mM, 2.5 mM, 1 mM, 0.5 mM και 0.3 mM. Οι αναστολείς αραιώθηκαν στις συγκεκριμένες τιμές συγκεντρώσεων με σκοπό να προστεθούν στο αντίστοιχο τρυβλίο με τελική συγκέντρωση $C_{\text{τελ}}=C_{\text{αρχ}}/100$.

Έπειτα, πληρώθηκαν τα πηγαδάκια (wells) του τρυβλίου, όπως φαίνεται στην εικόνα 30: προστέθηκαν 158 μL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl, 2 μL αναστολέα (ή DMSO για τη μέτρηση blank) και 20 μL διαλύματος ενζύμου AChE. Για κάθε συγκέντρωση αναστολέα πληρώθηκαν δύο πηγαδάκια του τρυβλίου. Ακολούθησε επώαση του ενζύμου για τουλάχιστον 15 min. Αφού προστέθηκαν 10 μL DTNB σε όλα τα πηγαδάκια, προστέθηκαν και 10 μL από το διάλυμα του υποστρώματος ATCI και πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο plate reader για χρόνους $t=0$ και $t=10$ min.



Εικόνα 30. Πλήρωση των τρυβλίων ειδικής πλάκας

Η ποσοστιαία αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης υπολογίστηκε ως εξής:

$$\%Inhibition = \left(1 - \frac{\Delta A_{sample}}{\Delta A_{control}}\right) \cdot 100 \quad (6)$$

όπου

$$\Delta A_{sample} = A_{sample,10 \text{ min}} - A_{sample,0 \text{ min}}$$

$$\Delta A_{control} = A_{control,10 \text{ min}} - A_{control,0 \text{ min}}$$

Τα δείγματα εκείνα που απέκτησαν ωχρό κίτρινο χρώμα υπέδειξαν ισχυρή αναστολή της AChE, ενώ εκείνα με έντονο κίτρινο χρώμα δεν εμφάνισαν ανασταλτική δράση.

6.2. Αναστολή BuChE

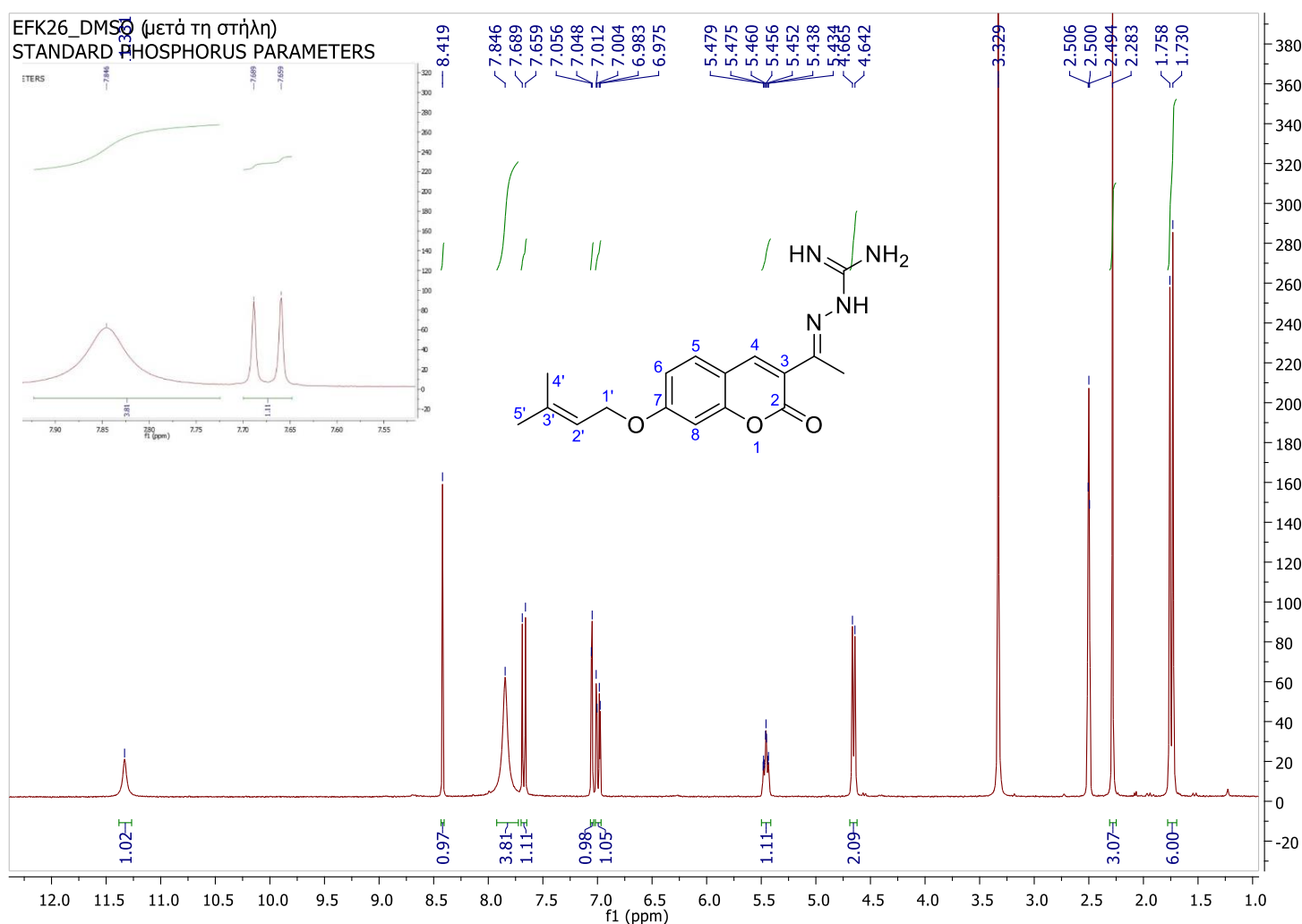
Η μελέτη αναστολής του ενζύμου BuChE πραγματοποιήθηκε, όπως αναφέρθηκε και στην περίπτωση του ενζύμου AChE (Παράγραφος 6.1). Η διαφοροποίηση έγκειται στη χρήση του ενζύμου βουτυρυλοχολινεστεράση BuChE (0.4 Units/mL), το οποίο προέρχεται από ορό αλόγου, και του υποστρώματός του, της βουτυρυλοχολίνης (BTCI).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης ((*E*)-2(1-(7-((3-μεθυλοβουτ-2-εν-1-υλ)οξυ)-2-οξο-2*H*-χρωμεν-3-υλ)αιθυλιδεν)-υδραζινοκαρβοξυμιδαμίδιο) (**8**)

Όπως παρουσιάστηκε στην παράγραφο 4 του πειραματικού μέρους, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της βιοδραστικής ένωσης (**8**), η οποία ταυτοποιήθηκε μέσω φασματοσκοπίας ^1H NMR.

1.1. Ανάλυση φάσματος ^1H NMR



Εικόνα 31. Φάσμα ^1H NMR της ένωσης (**8**)

Το φάσμα αυτό χαρακτηρίζεται από την παρουσία μιας διπλής κορυφής στα 1.744 ppm, που ολοκληρώνεται για 6 πρωτόνια, τα οποία αντιστοιχούν στις θέσεις 4' και 5', αντίστοιχα, δηλαδή τις μεθυλομάδες της πρενυλο-αλυσίδας. Στη συνέχεια, η απλή κορυφή στα 2.283 ppm αποδίδεται στα τρία ισοδύναμα

πρωτόνια της μεθυλομάδας της θέσης **3**. Στη συνέχεια, παρατηρείται μια διπλή κορυφή στα 4.654 ppm, η οποία αποδίδεται στα δύο πρωτόνια της θέσης **1'**, ενώ η τριπλή κορυφή στα 5.456 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης **2'**. Έπειτα, στα 6.994 ppm εμφανίζεται μια διπλή διπλών κορυφή, που αποδίδεται στο **H-6** με $J=8.7$ Hz και $J=2.4$ Hz, λόγω της σύζευξης του με τα **H-5** και **H-8**, αντίστοιχα. Ακολουθεί μία διπλή κορυφή στα 7.052 ppm που αποδίδεται στο **H-8**, ως αποτέλεσμα της σύζευξης του με το αρωματικό πρωτόνιο της θέσης **6**, με $J=2.4$ Hz, ενώ η διπλή κορυφή στα 7.674 ppm αποδίδεται στο **H-5** καθώς διαθέτει ένα μη ισοδύναμο γειτονικό πρωτόνιο. Η ύπαρξη μιας απλής κορυφής στα 8.419 ppm αποδίδεται στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης **4**. Τέλος, η ευρεία κορυφή από τα 7.90 έως τα 7.78 ppm αποδίδεται στα τέσσερα πρωτόνια που είναι συνδεδεμένα με άζωτο.

2. Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων

Τα νανοσωματίδια που παρασκευάστηκαν χαρακτηρίστηκαν ως προς το μέγεθος, το δείκτη πολυδιασποράς (PDI) και το ζ-δυναμικό. Επιπλέον, υπολογίστηκαν οι αποδόσεις εγκλωβισμού και διεργασίας για το κάθε πείραμα. Ακόμη, μελετήθηκε η σταθερότητα του μεγέθους, του δείκτη πολυδιασποράς και του ζ-δυναμικού των νανοσωματιδίων μετά από 1 μήνα αποθήκευσης της υδατικής διασποράς των νανοσωματιδίων εντός και εκτός ψυγείου.

2.1. Απόδοση διεργασίας, απόδοση εγκλωβισμού, μέγεθος, δείκτης πολυδιασποράς (PDI) και ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων

Η παρασκευή των SLNs και ο εγκλωβισμός βιοδραστικών ενώσεων σε αυτά πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης-εξάτμισης του διαλύτη. Η μέθοδος αυτή επιλέχθηκε, εξαιτίας της χρήσης της αιθανόλης, η οποία ενισχύει τη διαλυτοποίηση των κουμαρινικών αναλόγων. Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 2.3 του πειραματικού μέρους, πραγματοποιήθηκαν διάφορες δοκιμές με διαφορετικές ποσότητες των επιμέρους συστατικών, με σκοπό να βρεθεί η βέλτιστη αναλογία για τη σύνθεση των νανοσωματιδίων και τον εγκλωβισμό των βιοδραστικών ενώσεων (**1**) και (**8**). Οι αναλογίες των συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν στο κάθε πείραμα, οι αποδόσεις εγκλωβισμού και διεργασίας, καθώς και τα αποτελέσματα της μεθόδου DLS, παρουσιάζονται στους πίνακες 6 και 7.

Πίνακας 6. Αποτελέσματα μεθόδου DLS, απόδοσης διεργασίας και εγκλωβισμού της ένωσης (8)

Πείραμα	Αναλογία συστατικών τριμυριστίνη/φωσφατιδυλοχολίνη /tween 80/ ένωση (8)	Απόδοση εγκλωβισμού	Απόδοση διεργασίας	Μέγεθος (nm)	PDI	z- potential (mV)
1	100:25:50:10	96%	45%	374.9±13.5	0.529±0.010	-35.5±2.6
2	100:25:70:10	91%	-	350.6±15.2	0.581±0.062	-17.2±1.5
3	100:25:30:10	96%	-	328.5±39.3	0.637±0.133	-16.1±1.2
4	200:25:50:10	95%	-	345.7±25.1	0.577±0.300	-15.2±4.6

Οι αρχικές δοκιμές πραγματοποιήθηκαν για τον εγκλωβισμό της ένωσης (8) και αφορούσαν την αναλογία μάζας των συστατικών για τη σύνθεση των SLNs. Δοκιμάστηκαν διαφορετικές ποσότητες τριμυριστίνης και επιφανειοδραστικού παράγοντα Tween 80 (πειράματα 1 έως 4).

Παρατηρήθηκε, πως οι διαφορετικές αναλογίες μάζας των συστατικών που εξετάστηκαν δεν φάνηκε να επηρεάζουν την απόδοση εγκλωβισμού, η οποία σε κάθε περίπτωση παρέμεινε υψηλή (91-96%).

Όλα τα νανοσωματίδια που παρασκευάστηκαν παρουσίασαν μέγεθος από 328.5 nm έως 374.9 nm, το μέγεθός τους δηλαδή ανήκει στη νανοκλίμακα. Επιπλέον, από τις τιμές PDI που μετρήθηκαν (0.529-0.637) φαίνεται ότι προέκυψαν διασπορές με μέτρια ομοιομορφία. Το μικρότερο μέγεθος είχαν τα νανοσωματίδια με τη χαμηλότερη ποσότητα επιφανειοδραστικού παράγοντα (πείραμα 3), ωστόσο παρουσίασαν την υψηλότερη τιμή PDI (0.637), μεταξύ όλων των πειραμάτων, ενώ και η τιμή του ζ-δυναμικού (-16.1 mV) υποδεικνύει διασπορά με μεγάλη αστάθεια.

Ακόμη, από τα πειράματα 2 και 4 προέκυψαν διασπορές νανοσωματιδίων με παραπλήσιες τιμές μεγέθους, PDI και ζ-δυναμικού, καθώς και απόδοση εγκλωβισμού. Όσον αφορά το πείραμα 1, παρόλο που τα νανοσωματίδια εμφάνισαν μεγαλύτερο μέγεθος (374.9 nm), παρουσίασαν τη χαμηλότερη τιμή PDI (0.529) και το υψηλότερο κατ' απόλυτη τιμή ζ-δυναμικό (-35.5 mV), υποδεικνύοντας εξαιρετικά σταθερή διασπορά.

Συνεπώς, ως βέλτιστες ποσότητες παρασκευής των SLNs κρίθηκαν τα 100 mg τριμυριστίνης, 25 mg φωσφατιδυλοχολίνης, 50 mg Tween 80 και 10 mg ένωσης προς εγκλωβισμό.

Μετά την εύρεση της βέλτιστης αναλογίας μάζας των επιμέρους συστατικών, που απαιτούνται για τη σύνθεση των SLNs με χρήση της ένωσης (8), επιλέχθηκε η ίδια αναλογία και για τον εγκλωβισμό της ένωσης (1), καθώς και για το σχηματισμό Blank SLNs. Τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων παρουσιάζονται στον πίνακα 7.

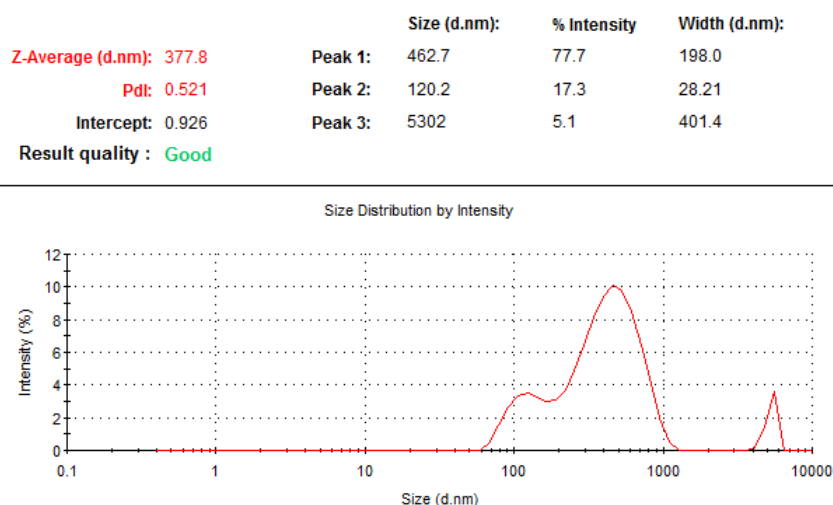
Πίνακας 7. Αποτελέσματα μεθόδου DLS, απόδοσης διεργασίας και εγκλωβισμού της ένωσης **(1)** και των Blank SLNs

Πείραμα	Αναλογία συστατικών τριμυριστίνη/φωσφατιδυλοχολίνη /tween 80/ ένωση (1)	Απόδοση εγκλωβισμού	Απόδοση διεργασίας	Μέγεθος (nm)	PDI	z- potential (mV)
5	100:25:50:10	64%	67%	255.6±7.1	0.272±0.021	-24.4±1.2
6	100:25:50:–	–	43%	276.3±4.5	0.320±0.018	-37.7±0.3

Τα νανοσωματίδια της ένωσης **(1)** (πείραμα 5) εμφάνισαν μικρότερο μέγεθος (255.6 nm), σε σχέση με αυτά της ένωσης **(8)**, ενώ παρουσίασαν και εξαιρετική ομοιομορφία διασποράς (PDI 0.272). Ακόμη, η τιμή του ζ-δυναμικού (-24.4 mV) υποδηλώνει σταθερή διασπορά νανοσωματιδίων, ενώ οι τιμές των αποδόσεων εγκλωβισμού και διεργασίας κρίθηκαν αρκετά ικανοποιητικές.

Τέλος, όσον αφορά τα Blank SLNs (πείραμα 6), αυτά εμφάνισαν εξίσου μικρό μέγεθος (276.3 nm) και πολύ καλή ομοιομορφία διασποράς (PDI 0.320), καθώς και εξαιρετικά σταθερή διασπορά νανοσωματιδίων (ζ-δυναμικό -37.7 mV).

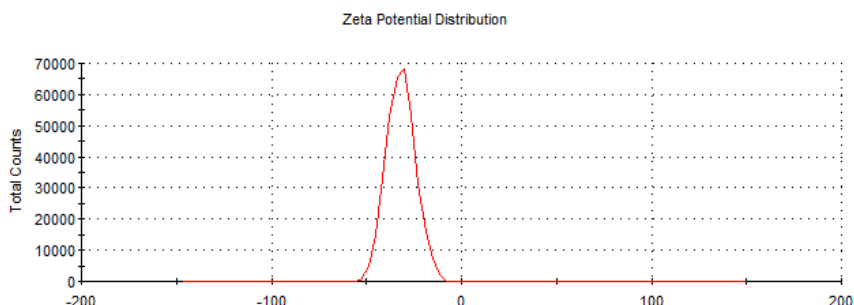
Ενδεικτικά, στις εικόνες 32 και 33 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μεθόδου DLS για τα νανοσωματίδια του πειράματος 1.



Εικόνα 32. Κατανομή μεγέθους των SLNs της ένωσης **(8)**

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): -31.8	Peak 1: -31.8	100.0	7.42
Zeta Deviation (mV): 7.42	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 0.00620	Peak 3: 0.00	0.0	0.00

Result quality : **Good**



Εικόνα 33. Z-δυναμικό των SLNs της ένωσης (8)

2.3. Μελέτη σταθερότητας μεγέθους, δείκτη πολυδιασποράς (PDI) και ζ-δυναμικού των νανοσωματιδίων

Τα νανοσωματίδια των δύο ενώσεων, που παρασκευάστηκαν με τη βέλτιστη αναλογία συστατικών, αξιολογήθηκαν ως προς τη σταθερότητά τους μετά από διάστημα ενός μήνα. Η αποθήκευσή τους έγινε σε δύο διαφορετικά περιβάλλοντα, ένα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ένα σε θερμοκρασία εντός ψυγείου. Στους πίνακες 8 και 9 παρατίθενται τα αποτελέσματα της μεθόδου DLS για τα SLNs των ενώσεων (1) και (8): (i) αμέσως μετά τη σύνθεσή τους, (ii) ένα 1 μήνα μετά τη σύνθεσή τους και αποθήκευση εντός ψυγείου και (iii) 1 μήνα μετά τη σύνθεσή τους και αποθήκευση εκτός ψυγείου σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Πίνακας 8. Μελέτη σταθερότητας της υδατικής διασποράς της ένωσης (1) ως προς το μέγεθος, το PDI και το ζ-δυναμικό

Πείραμα	Αναλογία συστατικών τριμυριστίνη/φωσφατιδυλοχολίνη /tween 80/ ένωση (1)	Μέγεθος (nm)	PDI	z- potential (mV)
5i	100:25:50:10	255.6±7.1	0.272±0.021	-24.4±1.2
5ii		281.5±8.7	0.318±0.014	-25.1±0.2
5iii		354.8±17.1	0.434±0.028	-20.3±2.0

Τα νανοσωματίδια της ένωσης (1) του πειράματος 5 παρουσίασαν αύξηση μεγέθους και στις δύο συνθήκες αποθήκευσης, όπως και αύξηση του δείκτη πολυδιασποράς. Η δε αποθήκευση σε συνθήκες περιβάλλοντος έδειξε μεγαλύτερη αύξηση του PDI και του μεγέθους, σε σύγκριση με την αποθήκευση της διασποράς σε συνθήκες ψύξης. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει πως η μείωση της θερμοκρασίας καθυστερεί την υποβάθμιση της διασποράς των νανοσωματιδίων με την πάροδο του χρόνου. Το ζ-δυναμικό μειώθηκε κατά

απόλυτη τιμή σε συνθήκες αποθήκευσης εκτός ψυγείου, γεγονός που αποδεικνύει τη συσσωμάτωση των νανοσωματιδίων. Ωστόσο, όλα τα μεγέθη που μετρήθηκαν μετά από 1 μήνα αποθήκευσης υπό ψύξη δεν παρουσίασαν πολύ σημαντική απόκλιση από τις αρχικές τους τιμές. Συνεπώς, τα SLNs της ένωσης **(1)** που παρασκευάστηκαν παρέμειναν αρκετά σταθερά υπό αυτές τις συνθήκες.

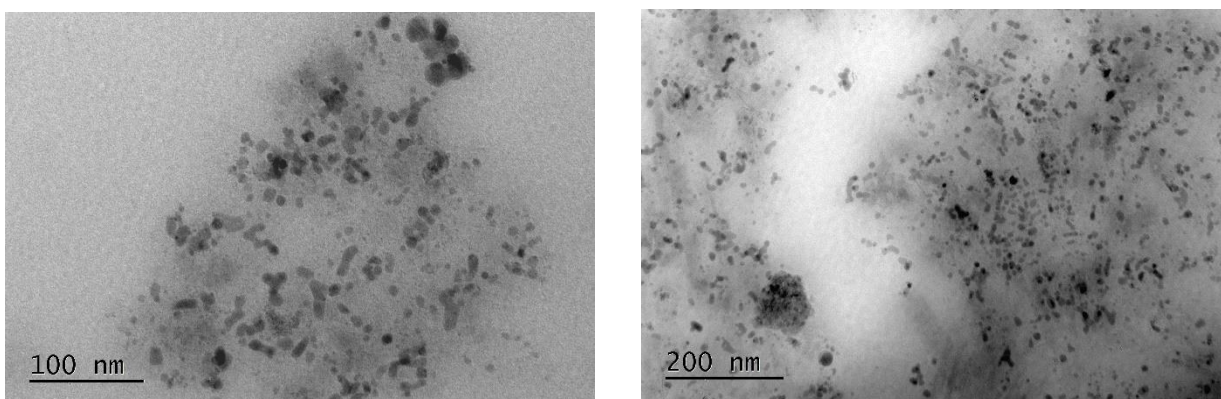
*Πίνακας 9. Μελέτη σταθερότητας της υδατικής διασποράς της ένωσης **(8)** ως προς το μέγεθος, το PDI και το ζ-δυναμικό*

Πείραμα	Αναλογία συστατικών τριμυριστίνη/φωσφατιδυλοχολίνη /tween 80/ένωση (8)	Μέγεθος (nm)	PDI	z- potential (mV)
1i	100:25:50:10	374.9±13.5	0.529±0.010	-35.5±2.6
1ii		396.3±74.2	0.556±0.074	-26.7±0.7
1iii		336.2±10.7	0.570±0.050	-29.4±1.3

Όσον αφορά τα νανοσωματίδια της ένωσης **(8)** του πειράματος 1, τόσο το μέγεθος, όσο και ο δείκτης πολυδιασποράς παρουσίασαν μικρή αύξηση στην αποθήκευση εντός ψυγείου, χωρίς σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Οι τιμές αυτές ίσως να υποδεικνύουν πιθανή συσσωμάτωση των SLNs με την πάροδο του χρόνου. Το ζ-δυναμικό, από την άλλη, παρουσίασε μια μικρή μείωση κατά απόλυτη τιμή και στις δύο συνθήκες αποθήκευσης. Οι μικρές μεταβολές των μεγεθών που μετρήθηκαν μετά τον 1 μήνα υποδηλώνουν πως και σε αυτή την περίπτωση τα SLNs της ένωσης **(8)** παρέμειναν ιδιαίτερα σταθερά.

2.4. Μελέτη TEM

Τα SLNs που παρασκευάστηκαν χωρίς εγκλωβισμό κουμαρινικής ένωσης (blank SLNs) εξετάστηκαν ως προς τη μορφολογία τους μέσω Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Διερχόμενης Δέσμης (Transmission Electron Microscopy, TEM) (Εικόνα 34).

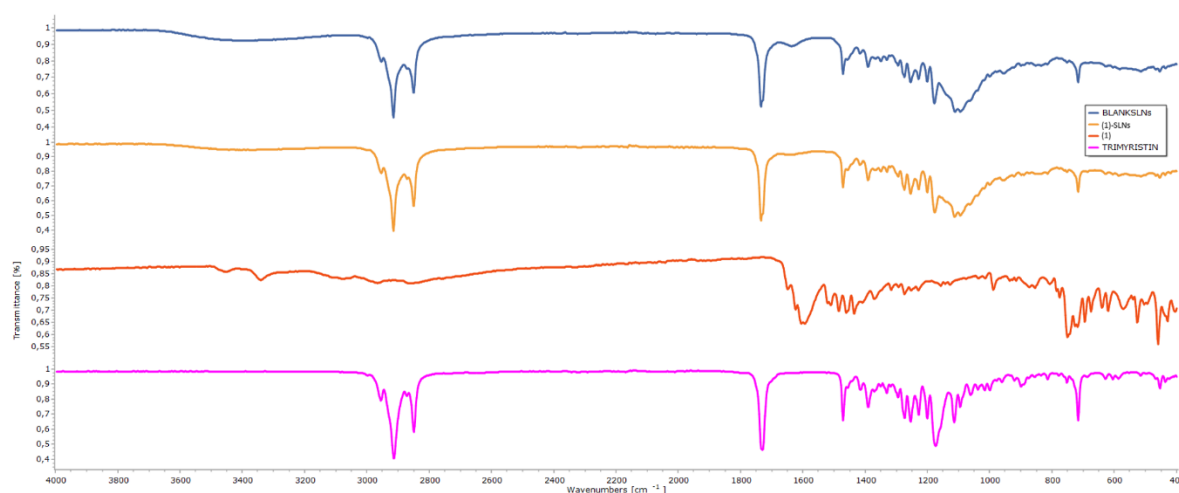


Εικόνα 34. Εικόνες TEM των blank-SLNs

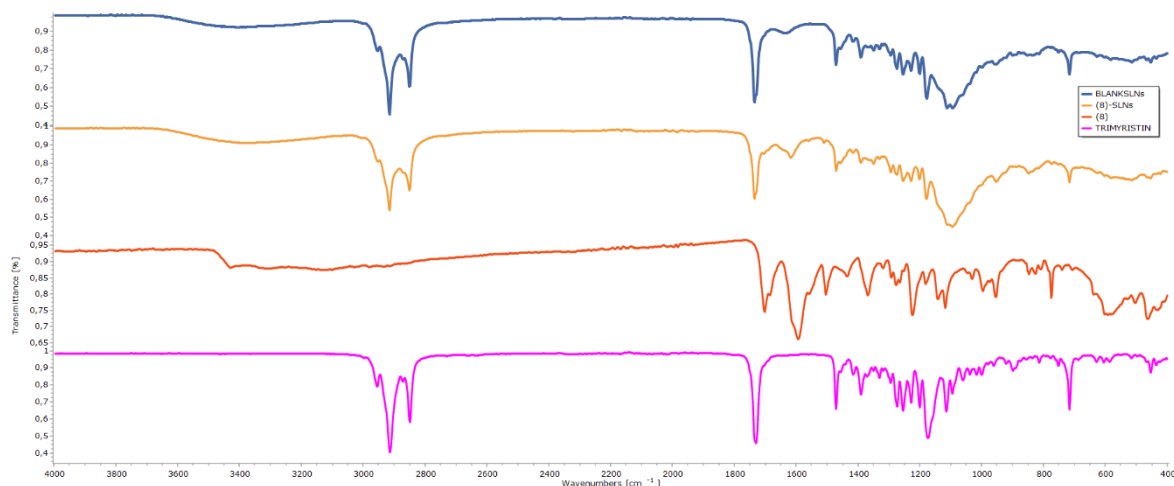
Από τις εικόνες TEM παρατηρείται ότι τα νανσωματίδια παρουσιάζουν αρκετά ομοιόμορφη σφαιρική μορφολογία με μέγεθος 20 – 50 nm και ελάχιστες συσσωματώσεις. Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφερθεί, ότι η Δυναμική Σκέδαση Φωτός και η Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διερχόμενης Δέσμης αποτελούν δύο διαφορετικές μεθόδους. Η μέθοδος DLS χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της υδροδυναμικής διαμέτρου των σωματιδίων, στηριζόμενη στη μέτρηση της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας σε σχέση με το χρόνο, ενώ φέρει αρκετές παραδοχές και επηρεάζεται σημαντικά από την παρουσία συσσωμάτων. Ακόμη, κατά τη μέθοδο TEM, είναι δυνατόν λόγω της απουσίας διαλύτη (H₂O) και των συνθηκών κενού που επικρατούν κατά τη μέτρηση, να προκαλείται μείωση του μεγέθους των σωματιδίων και ενδεχομένως και συσσωμάτωση.

2.5. Ανάλυση FT-IR

Στις εικόνες 35 και 36 παρουσιάζονται τα φάσματα που προέκυψαν από την ανάλυση με FT-IR για την τριμυριστίνη, τα blank SLNs, τις ενώσεις **(1)** και **(8)** και τα SLNs τους, καθώς και οι χαρακτηριστικές κορυφές των φασμάτων και τα είδη των δονήσεων στα οποία αυτές αποδίδονται.



Εικόνα 35. Φάσμα FT-IR των blank SLNs, των SLNs της **(1)**, της καθαρής ένωσης **(1)** και της τριμυριστίνης στο εύρος 400-4000 cm⁻¹



Εικόνα 36. Φάσμα FT-IR των blank SLNs, των SLNs της **(8)**, της καθαρής ένωσης **(8)** και της τριμυριστίνης στο εύρος 400-4000 cm^{-1}

Στον πίνακα 10 παρουσιάζονται οι χαρακτηριστικές ζώνες απορρόφησης της τριμυριστίνης, των blank SLNs, των ενώσεων **(1)** και **(8)** και των SLNs τους.

Πίνακας 10. Χαρακτηριστικές ζώνες απορρόφησης (cm^{-1}) τριμυριστίνης, blank SLNs, ενώσεων **(1)** και **(8)** και των SLNs τους

Δείγμα	Χαρακτηριστικές ζώνες απορρόφησης (cm^{-1})					
	Δόνηση τάσης O-H	Δόνηση τάσης N-H	Δόνηση τάσης C-H	Δόνηση τάσης C=O	Δόνηση τάσης C=N	Δόνηση κάμψης C-H
Τριμυριστίνη	-	-	2956 2911 2849	1733	-	1472
Ένωση (1)	-	3462 3343	3083 2966 2866	1595		1486
Blank SLNs	3412	-	2912 2849	1734	-	1472
(1) -SLNs	3406		2916 2848	1734	-	1472
Ένωση (8)	-	3430	-	1703	1594	-
(8) -SLNs	3416		2915 2850	1733	1617	1470

Οι κύριες χαρακτηριστικές ζώνες απορρόφησης στο φάσμα FT-IR των blank SLNs παρουσιάζονται αρχικά στα 3412 cm^{-1} εξαιτίας της δόνησης τάσης O-H, καθώς και στα 2912 cm^{-1} και 2849 cm^{-1} , που αποδίδονται στη δόνηση τάσης C-H των μακρών υδρόφοβων αλυσίδων της τριμυριστίνης και του Tween 80. Επιπλέον, η ζώνη απορρόφησης στα 1734 cm^{-1} οφείλεται στη δόνηση τάσης C=O, ενώ η ζώνη στα 1472 cm^{-1} οφείλεται στη δόνηση κάμψης C-H.

Στο φάσμα FT-IR της ένωσης **(1)**, οι κορυφές που παρουσιάζονται στα 3462 cm^{-1} και 3343 cm^{-1} αποδίδονται στη δόνηση τάσης N-H. Ακολουθούνται από τρεις κορυφές στα 3083 cm^{-1} , 2966 cm^{-1} και 2866 cm^{-1} , που οφείλονται στη δόνηση τάσης C-H. Στα 1595 cm^{-1} παρατηρείται μια ευρεία κορυφή, που θα μπορούσε να οφείλεται στις δονήσεις τάσης C=O και C=N. Τέλος, η ζώνη απορρόφησης στα 1472 cm^{-1} αποδίδεται στη δόνηση κάμψης C-H.

Το φάσμα FT-IR των SLNs της **(1)** έχει παρόμοια μορφή με αυτή των blank SLNs και της καθαρής τριμυριστίνης. Οι κύριες χαρακτηριστικές ζώνες απορρόφησης του κινολινονικού αναλόγου επικαλύπτονται από τις χαρακτηριστικές ζώνες της τριμυριστίνης, λόγω της περίσσειας της τριμυριστίνης που περιέχεται στο νανοφορέα. Επιπλέον, η μετατόπιση της ζώνης απορρόφησης που αποδίδεται στη δόνηση τάσης O-H από τα 3412 cm^{-1} στα 3406 cm^{-1} αποδεικνύει την παρουσία ομάδων N-H στα SLNs της ένωσης **(1)**. Αυτό, σε συνδυασμό με την απουσία χαρακτηριστικών κορυφών για την ένωση **(1)**, επιβεβαιώνει τον επιτυχή εγκλωβισμό της ένωσης στα SLNs.

Στο φάσμα FT-IR της ένωσης **(8)** η κορυφή που παρουσιάζεται στα 3430 cm^{-1} αποδίδεται στη δόνηση τάσης N-H. Ακολουθούν μία κορυφή στα 1703 cm^{-1} που οφείλεται στη δόνηση τάσης C=O και μια στα 1594 cm^{-1} που οφείλεται στη δόνηση τάσης C=N.

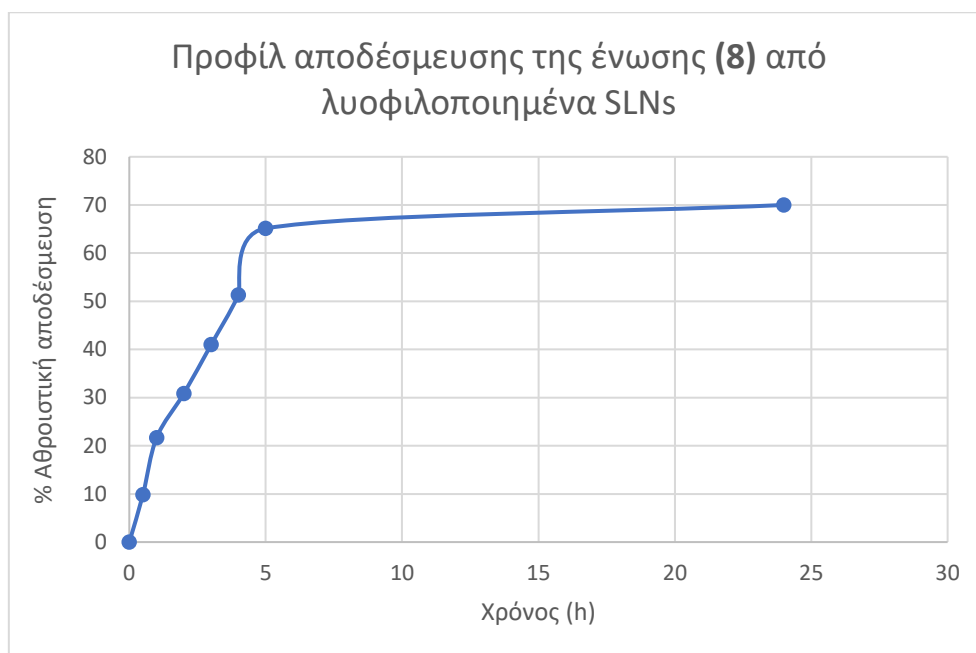
Όσον αφορά τα SLNs της ένωσης **(8)**, το φάσμα FT-IR είναι παρόμοιο με αυτό των blank SLNs, αλλά και της καθαρής τριμυριστίνης. Οι κύριες χαρακτηριστικές ζώνες απορρόφησης του κουμαρινικού αναλόγου επικαλύπτονται και σε αυτή την περίπτωση από της τριμυριστίνης που περιέχεται στο νανοφορέα. Η μετατόπιση της ζώνης απορρόφησης που αποδίδεται στη δόνηση τάσης O-H από τα 3412 cm^{-1} στα 3416 cm^{-1} αποδεικνύει και σε αυτή την περίπτωση την ύπαρξη ομάδων N-H στα νανοσωματίδια της ένωσης **(8)**.

3. Μελέτη αποδέσμευσης της ένωσης **(8)** από τα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων

Η μελέτη της αποδέσμευσης του κουμαρινικού αναλόγου **(8)** πραγματοποιήθηκε με δύο μεθόδους, μέσω της διασποράς των λυοφιλοποιημένων SLNs στο ρυθμιστικό διάλυμα (παράγραφος 3.1), αλλά και με τη χρήση της υδατικής διασποράς και μεμβράνης διαπίδυσης (παράγραφος 3.2). Όσον αφορά τις συνθήκες, η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε pH 7.4 και θερμοκρασία 37°C , ώστε να προσομοιάζει τις φυσιολογικές συνθήκες του ανθρώπινου οργανισμού, καθώς και σε pH 1.2 και θερμοκρασία 37°C , παρουσία πεψίνης, ώστε να προσομοιάζει τις συνθήκες του στομάχου.

3.1. Μελέτη αποδέσμευσης από τα λυοφιλοποιημένα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων

Το διάγραμμα της εικόνας 37 περιγράφει το προφίλ αποδέσμευσης της ένωσης **(8)** από λυοφιλοποιημένα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων. Σύμφωνα με αυτό, η ένωση παρουσίασε απότομη αποδέσμευση τις πρώτες 5 h, κατά τις οποίες αποδεσμεύτηκε το 65% της ένωσης. Μετά τις πρώτες 5 h, φαίνεται να ακολούθησε μια σταδιακή αποδέσμευση, μέχρι τις 24 h. Τελικά, στο χρονικό διάστημα αυτό αποδεσμεύτηκε το 70% της εγκλωβισμένης ένωσης.



Εικόνα 37. Προφίλ αποδέσμευσης της ένωσης **(8)** από λυοφιλοποιημένα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων

Τα κινητικά μοντέλα που περιγράφουν το προφίλ αποδέσμευσης της ένωσης **(8)** από τα SLNs προσδιορίστηκαν με κατάλληλη προσαρμογή των δεδομένων σε γραμμικά συστήματα, επιλέγοντας αυτό με το μεγαλύτερο συντελεστή προσδιορισμού R^2 . Τα αποτελέσματα για το R^2 παρουσιάζονται στον πίνακα 11.

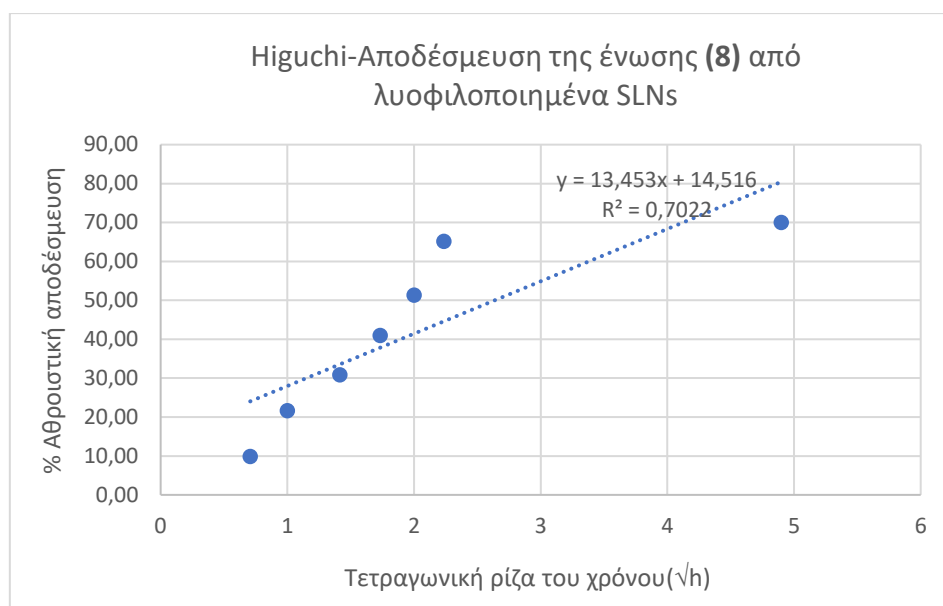
Πίνακας 11. Συντελεστής R^2 για το κάθε κινητικό μοντέλο αποδέσμευσης από SLNs της ένωσης **(8)**

Μοντέλο	Zero order	First order	Higuchi	Korsmeyer-Peppas
R^2	0.5095	0.3555	0.7022	0.8345

Όπως φαίνεται στον πίνακα 11, το καλύτερο R^2 παρουσιάζει το μοντέλο Korsmeyer-Peppas, το οποίο όμως αποτελεί ημι-εμπειρικό μοντέλο που

εκφράζει μόνο το 60% των δεδομένων της αποδέσμευσης μιας δραστικής ένωσης. Για το λόγο αυτό, δεν επιλέγεται για τον ακριβή προσδιορισμό της αθροιστικής αποδέσμευσης. Επομένως, επιλέγεται το μοντέλο με την αμέσως επόμενη καλύτερη τιμή του R^2 , δηλαδή το μοντέλο Higuchi. Η εξίσωση που προκύπτει από το μοντέλο Higuchi είναι η εξίσωση 7, ενώ στο διάγραμμα της εικόνας 38 απεικονίζεται η γραφική παράσταση του κινητικού αυτού μοντέλου.

$$y = 13.453x + 14.516 \quad (7)$$

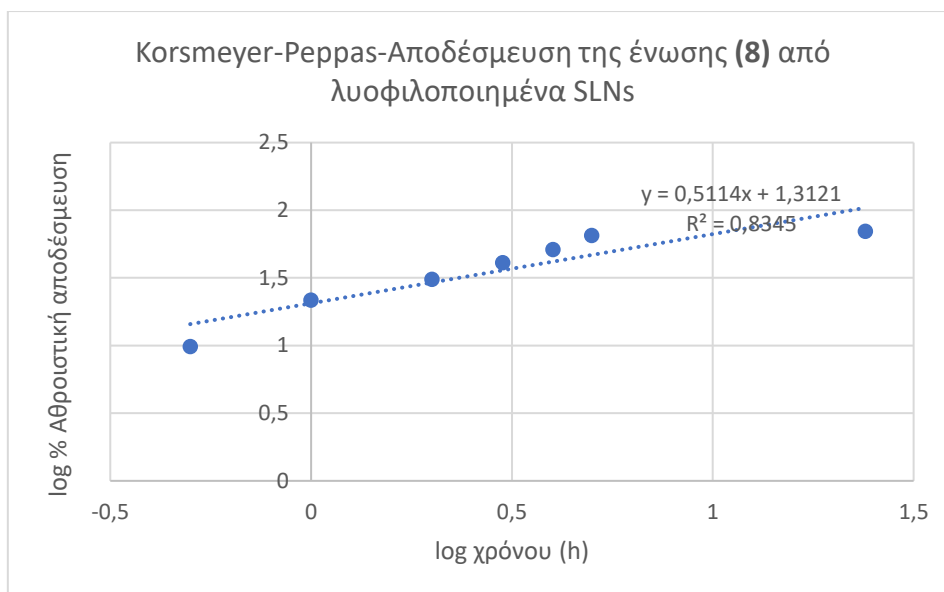


Εικόνα 38. Γραφική παράσταση του κινητικού μοντέλου Higuchi για την αποδέσμευση της ένωσης (8) από λυοφιλοποιημένα SLNs

Παρόλα αυτά, το μοντέλο Korsmeyer-Peppas, του οποίου η γραφική παράσταση απεικονίζεται στο διάγραμμα της εικόνας 39, μπορεί να δώσει πληροφορίες για το μηχανισμό του προφίλ αποδέσμευσης. Από το διάγραμμα της εικόνας 39 προκύπτει πως η εξίσωση του κινητικού μοντέλου Korsmeyer-Peppas είναι η εξίσωση 8.

$$y = 0.5114x + 1.3121 \quad (8)$$

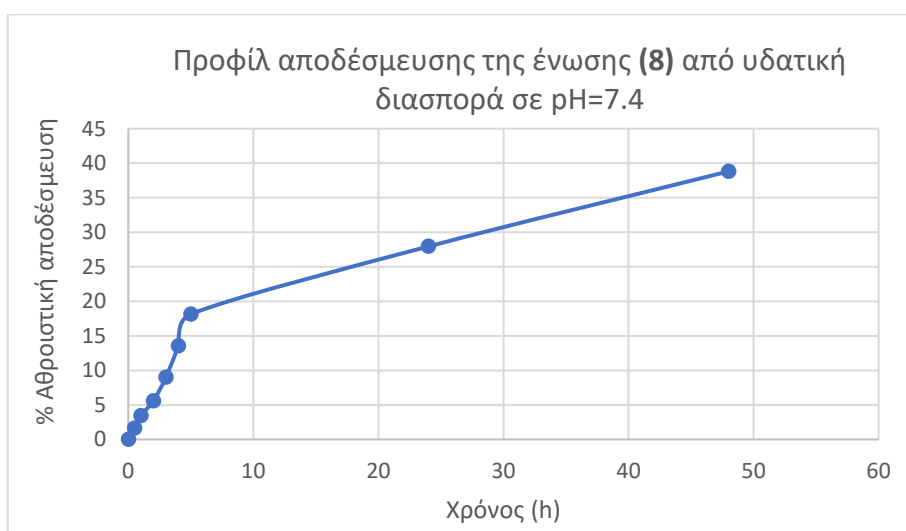
Από την εξίσωση 8 προκύπτει πως η τιμή του εκθέτη διάχυσης n είναι 0.5114 (>0.5) και συνεπώς ο μηχανισμός αποδέσμευσης είναι η μη ομαλή διάχυση.



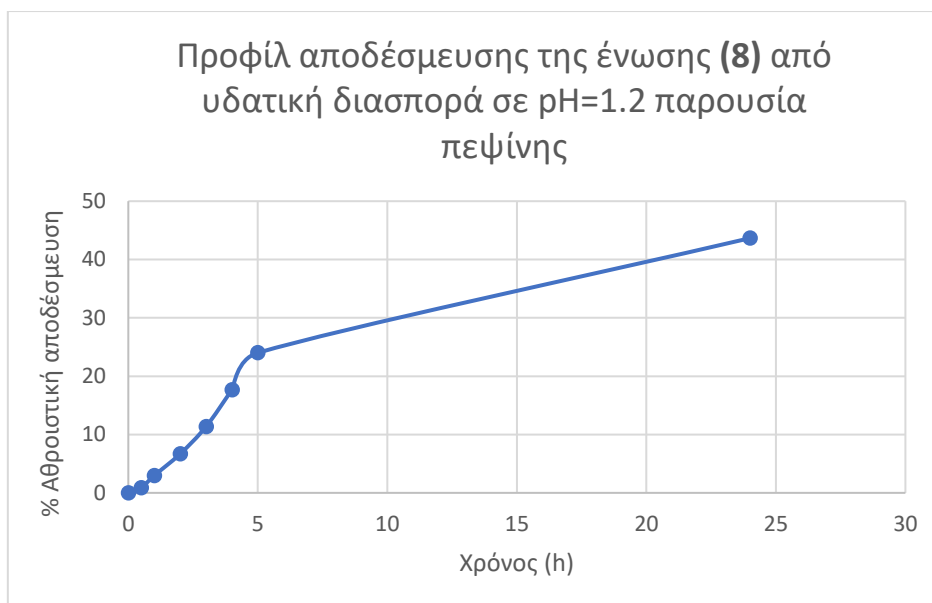
Εικόνα 39. Γραφική παράσταση του κινητικού μοντέλου Korsmeyer-Peppas για την αποδέσμευση της ένωσης **(8)** από λυοφιλοποιημένα SLNs

3.2. Μελέτη αποδέσμευσης από υδατική διασπορά νανοσωματιδίων μέσω μεμβράνης διαπίδυσης

Στα διαγράμματα που ακολουθούν (εικόνες 40 και 41) παρουσιάζεται το προφίλ αποδέσμευσης της ένωσης **(8)** από υδατική διασπορά νανοσωματιδίων. Συγκεκριμένα, παρουσιάζεται το προφίλ αποδέσμευσης της ένωσης σε pH=7.4 και θερμοκρασία 37°C, στο διάγραμμα της εικόνας 40, αλλά και σε pH=1.2 και θερμοκρασία 37°C παρουσία του ενζύμου πεψίνη, στην εικόνα 41.



Εικόνα 40. Προφίλ αποδέσμευσης της ένωσης **(8)** από διασπορά νανοσωματιδίων σε pH=7.4



*Εικόνα 41. Προφίλ αποδέσμευσης της ένωσης **(8)** από διασπορά νανοσωματιδίων σε pH=1.2 παρουσία πεψίνης*

Η ένωση **(8)**, όπως φαίνεται στα διαγράμματα των εικόνων 40 και 41, παρουσίασε παρόμοιο προφίλ αποδέσμευσης στις δύο διαφορετικές εξεταζόμενες συνθήκες. Σε αυτή τη μέθοδο, για pH=7.4 (εικόνα 40) η ένωση παρουσίασε αρχικά μια απότομη αποδέσμευση τις πρώτες 5 h, κατά τις οποίες αποδεσμεύτηκε το 18% της ένωσης. Ακολούθησε μια σταδιακή αποδέσμευση κατά την οποία αποδεσμεύτηκε σε 24 h το 28% της ένωσης, ενώ στις 48 h το 39% της ένωσης.

Η διαφορά της αποδέσμευσης από υδατική διασπορά σε σχέση με την αποδέσμευση από τα λυοφιλοποιημένα SLNs έγκειται στο ότι τα ξηρά SLNs διασπείρονται απευθείας στο ρυθμιστικό διάλυμα και η ένωση γίνεται πιο γρήγορα διαθέσιμη σε αυτό, άρα και τα ποσοστά αποδέσμευσης είναι υψηλότερα.

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα της εικόνας 41, για pH=1.2 παρουσία πεψίνης, η ένωση παρουσίασε μια απότομη αποδέσμευση στις πρώτες 5 h, με το 24% της ένωσης να αποδεσμεύεται. Στη συνέχεια, η αποδέσμευση πραγματοποιήθηκε σταδιακά μέχρι τις 24 h. Στο διάστημα αυτό, τελικά αποδεσμεύτηκε το 44% της ένωσης **(8)**. Συνεπώς, το χαμηλότερο pH και η παρουσία πεψίνης δεν ενισχύουν την αποδέσμευση της δραστικής αυτής ένωσης από υδατική διασπορά.

Τα κινητικά μοντέλα που περιγράφουν τα προφίλ αποδέσμευσης από υδατική διασπορά στις δύο συνθήκες προσδιορίστηκαν με κατάλληλη προσαρμογή των δεδομένων σε γραμμικά συστήματα, επιλέγοντας αυτό με το μεγαλύτερο R². Τα αποτελέσματα για το R² στις διαφορετικές συνθήκες παρουσιάζονται στον πίνακα 12.

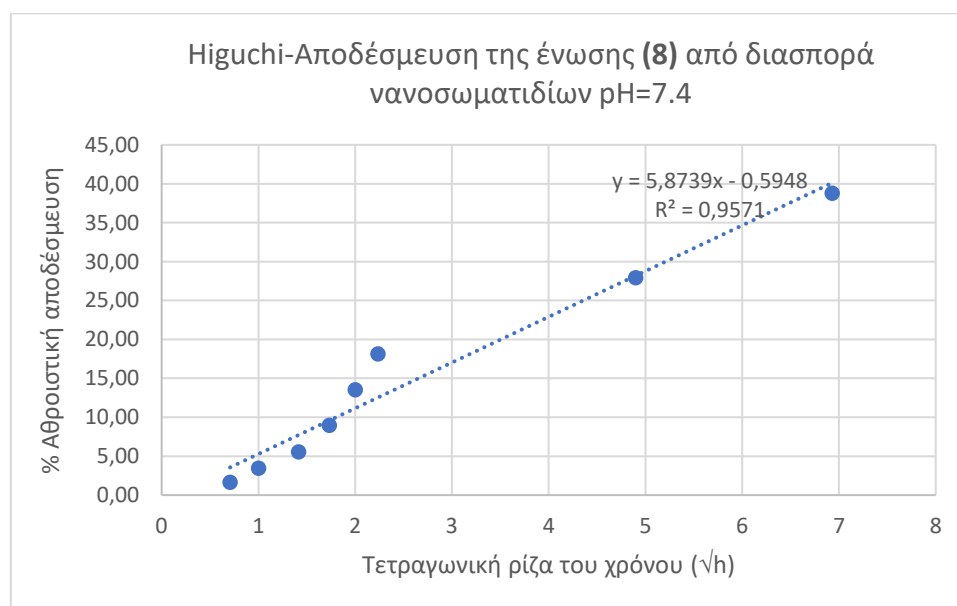
Πίνακας 12. Συντελεστής R^2 για το κάθε κινητικό μοντέλο αποδέσμευσης από υδατική διασπορά της ένωσης (8)

Μοντέλο	Zero order	First order	Higuchi	Korsmeyer-Peppas
R^2 (pH=7.4)	0.8729	0.5478	0.9571	0.9242
R^2 (pH=1.2, πεψίνη)	0.8588	0.4628	0.9549	0.9113

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα του πίνακα 12, το μοντέλο που περιγράφει καλύτερα την αποδέσμευση της ένωσης (8) σε όλες τις συνθήκες που δοκιμάστηκαν είναι το μοντέλο Higuchi.

Για την αποδέσμευση της ένωσης (8) σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH=7.4, το κινητικό μοντέλο Higuchi είναι αυτό με το καλύτερο R^2 . Η εξίσωση που περιγράφει το μοντέλο είναι η εξίσωση 9 και η γραφική του παράσταση απεικονίζεται στο διάγραμμα της εικόνας 42.

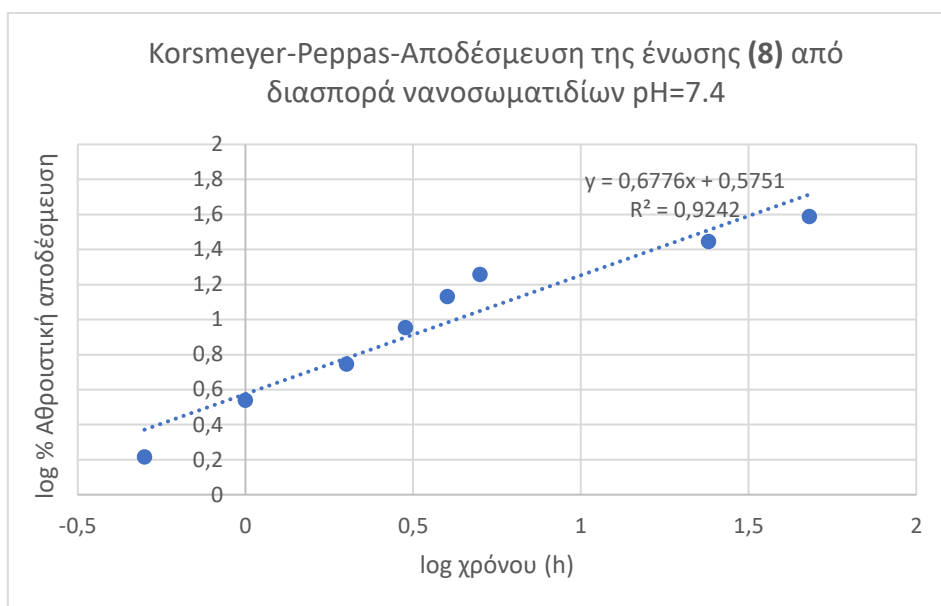
$$y = 5.8739x - 0.5948 \quad (9)$$



Εικόνα 42. Γραφική παράσταση του κινητικού μοντέλου Higuchi για την αποδέσμευση της ένωσης (8) από διασπορά νανοσωματιδίων σε pH=7.4

Από το μοντέλο Korsmeyer-Peppas, του οποίου η γραφική παράσταση απεικονίζεται στο διάγραμμα της εικόνας 43 και η εξίσωσή του είναι η εξίσωση 10, προκύπτει πως η τιμή του εκθέτη διάχυσης n είναι 0.6776 ($0.5 < n < 1$), που σημαίνει πως ο μηχανισμός αποδέσμευσης δεν ακολουθεί το νόμο του Fick, δηλαδή τα φαινόμενα διάχυσης και διόγκωσης είναι ισοδύναμα.

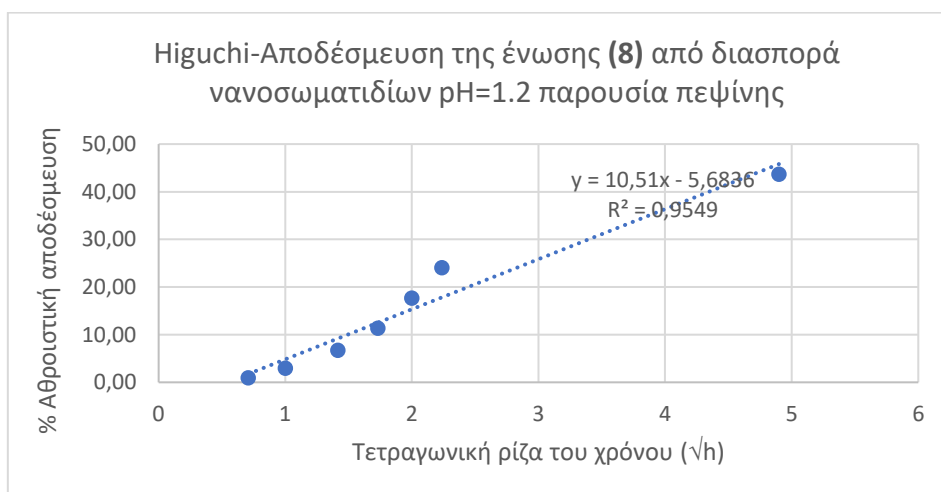
$$y = 0.6776x + 0.5751 \quad (10)$$



Εικόνα 43. Γραφική παράσταση του κινητικού μοντέλου *Korsmeyer-Perras* για την αποδέσμευση της ένωσης (8) από διασπορά νανοσωματιδίων σε pH=7.4

Τέλος, η αποδέσμευση της ένωσης (8) σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH=1.2 παρουσία πεψίνης προσαρμόζεται κι αυτή καλύτερα στο μοντέλο Higuchi και περιγράφεται με την εξίσωση 11. Το μοντέλο απεικονίζεται γραφικά στο διάγραμμα της εικόνας 44.

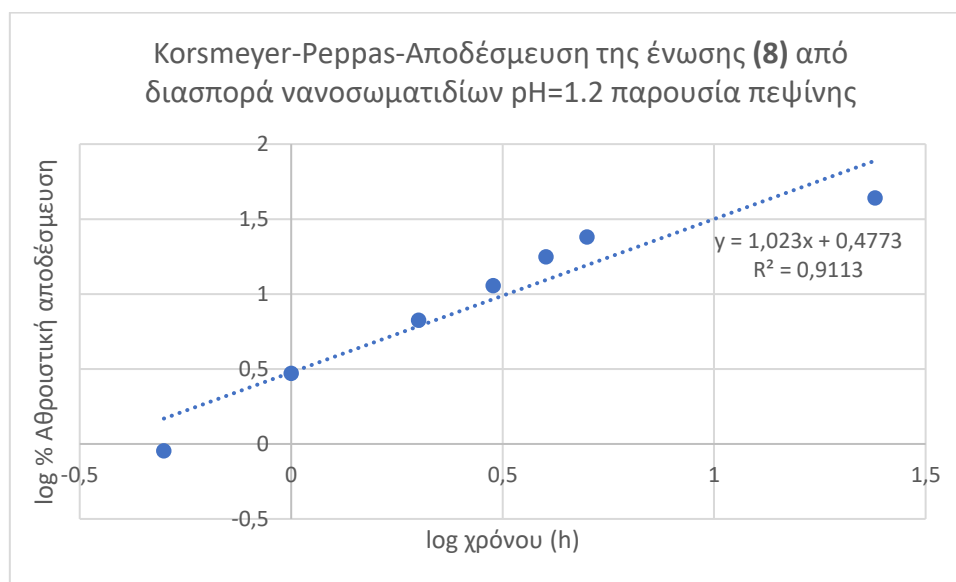
$$y = 10.51x - 5.6836 \quad (11)$$



Εικόνα 44. Γραφική παράσταση του κινητικού μοντέλου *Higuchi* για την αποδέσμευση της ένωσης (8) από διασπορά νανοσωματιδίων σε pH=1.2 παρουσία πεψίνης

Ο εκθέτης διάχυσης n , όπως αυτός προκύπτει από το μοντέλο Korsmeyer-Peppas με εξίσου καλή προσαρμογή, έχει τιμή 1.023 ενώ το μοντέλο περιγράφεται από την εξίσωση 12. Η τιμή του n αυτή είναι κοντά στο 1, που σημαίνει ότι ο μηχανισμός της αποδέσμευσης είναι η μη ομαλή διάχυση. Το μοντέλο παριστάνεται γραφικά στο διάγραμμα της εικόνας 45.

$$y = 1.023x + 0.4773 \quad (12)$$



Εικόνα 45. Γραφική παράσταση του κινητικού μοντέλου Korsmeyer-Peppas για την αποδέσμευση της ένωσης **(8)** από διασπορά νανοσωματιδίων σε pH=1.2 παρουσία πεψίνης

4. Μελέτη δράσης των βιοδραστικών ενώσεων εγκλωβισμένων σε SLNs ως αναστολείς των ενζύμων AChE και BuChE

Οι ενώσεις **(1)** και **(8)** μελετήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση των ενζύμων της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) και της βουτυρυλοχολινεστεράσης (BuChE) in vitro. Οι δύο ενώσεις σε ελεύθερη μορφή, αλλά και εγκλωβισμένες σε SLNs, εξετάστηκαν σε συγκεντρώσεις εύρους 100 μM – 5 μM , ώστε να υπολογιστεί η συγκέντρωση IC_{50} για κάθε ένα από τα δύο ένζυμα. Τα αποτελέσματα της μελέτης της ανασταλτικής δράσης των ενώσεων παρουσιάζονται στον πίνακα 13.

Πίνακας 13. Ικανότητα %αναστολής AChE και BuChE 100 μM και IC_{50} των ενώσεων και των SLNs τους

Δείγμα	%Αναστολή AChE 100 μM	AChE IC_{50} (μM)	%Αναστολή BuChE 100 μM	BuChE IC_{50} (μM)
Tacrine	n.t.	0.033 \pm 0.001	n.t.	0.005 \pm 0.001
(1)	54 \pm 4	92.5 \pm 2.5	86 \pm 1	23.4 \pm 0.2
(1)-SLNs	43 \pm 4	-	71 \pm 1	19.9 \pm 0.5
(8)	100 \pm 2	6.4 \pm 0.3	97 \pm 4	5.0 \pm 0.3
(8)-SLNs	89 \pm 3	10.0 \pm 0.6	87 \pm 4	20.3 \pm 2.0
Blank-SLNs	-	-	-	-

n.t.=not tested

Αρχικά, από τα αποτελέσματα του πίνακα 13 προκύπτει πως η κουμαρινική ένωση **(8)** παρουσιάζει την καλύτερη αναστολή της AChE με τιμή IC_{50} =6.4 μM σε ελεύθερη μορφή, ενώ τα SLNs με εγκλωβισμένη την ένωση **(8)** παρουσιάζουν εξίσου σημαντική ανασταλτική δράση (IC_{50} =10 μM). Η εμφάνιση χαμηλών τιμών IC_{50} είναι απαραίτητη, ώστε να επιτυγχάνεται με όσο το δυνατόν μικρότερη δόση φαρμάκου, το επιθυμητό θεραπευτικό αποτέλεσμα.

Όσον αφορά την ικανότητα αναστολής της BuChE, η ελεύθερη ένωση **(8)** εμφανίζει πολύ χαμηλή τιμή IC_{50} =5.0 μM , ενώ σε εγκλωβισμένη μορφή παρουσιάζει τιμή IC_{50} =20.3 μM , το οποίο πιθανώς υποδηλώνει ότι δεν έχει ολοκληρωθεί η αποδέσμευση ικανής συγκέντρωσης της ένωσης από το φορέα τη χρονική στιγμή της μέτρησης.

Η κινολινονη **(1)** παρουσιάζει πολύ καλή αναστολή της BuChE με τιμή IC_{50} =23.4 μM σε ελεύθερη μορφή, ενώ όσον αφορά την αναστολή της AChE από την ίδια ένωση, είναι πιο χαμηλή, (54% στη συγκέντρωση των 100 μM) με τιμή IC_{50} =92.5 μM .

Τα SLNs της ένωσης **(1)**, φαίνεται να εμφανίζουν αντίστοιχη αναστολή των AChE και BuChE με την ένωση σε ελεύθερη μορφή. Συγκεκριμένα, τα SLNs της **(1)** αναστέλλουν την AChE κατά 43% σε συγκέντρωση 100 μM της ένωσης. Τα SLNs της **(1)** εμφανίζουν ελαφρώς βελτιωμένη δράση έναντι της BuChE με τιμή IC_{50} =19.9 μM , σε σχέση με την ένωση σε ελεύθερη μορφή (IC_{50} =23.4 μM), πιθανώς λόγω συνεργιστικής δράσης μεταξύ των λιπιδίων και του κινολινονικού αναλόγου.^[43,82]

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Κατά την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, συντέθηκε το νέο κουμαρινικό ανάλογο ((*E*)-2(1-(7-((3-μεθυλοβουτ-2-εν-1-υλ)οξυ)-2-οξο-2*H*-χρωμεν-3-υλ)αιθυλιδεν)-υδραζινοκαρβοξυμιδαμίδιο) (**8**) με απόδοση 34%, ενώ ταυτοποιήθηκε και η δομή του με φασματοσκοπία ¹H NMR. Η ένωση αυτή, καθώς και το κινολινονικό παράγωγο (**1**), έχοντας παρουσιάσει σημαντική ικανότητα αναστολής της δράσης των ενζύμων AChE και BuChE, εγκλωβίστηκαν σε νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων με τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης με εξάτμιση του οργανικού διαλύτη σε συνδυασμό με υπερήχους.

Για τη σύνθεση των νανοσωματιδίων της ένωσης (**8**) πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση της αναλογίας μάζας των συστατικών (τριμυριστίνη:φωσφατιδυλοχολίνη:Tween 80:Βιοδραστική ένωση). Ως βέλτιστη κρίθηκε η αναλογία μάζας 100:25:50:10. Η ίδια αναλογία και ποσότητες συστατικών χρησιμοποιήθηκαν και για την παρασκευή των νανοσωματιδίων της ένωσης (**1**). Τα SLNs της ένωσης (**1**) που παράχθηκαν με αυτή τη μέθοδο και αναλογία παρουσίασαν απόδοση διεργασίας 67% και απόδοση εγκλωβισμού 64%, ενώ τα SLNs της ένωσης (**8**) παρουσίασαν απόδοση διεργασίας 45% και απόδοση εγκλωβισμού 96%.

Τα νανοσωματίδια που παρασκευάστηκαν χαρακτηρίστηκαν με τη μέθοδο της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS) ως προς το μέγεθος και το δείκτη πολυδιασποράς τους (PDI), καθώς και μέσω ηλεκτροφόρησης ως προς το ζ-δυναμικό. Τα SLNs και των δύο ενώσεων, καθώς και τα Blank SLNs, παρουσίασαν υδροδυναμική διάμετρο από 200 έως 400 nm. Οι διασπορές που σχηματίστηκαν κρίθηκαν αρκετά σταθερές με τιμές ζ-δυναμικού κοντά στα -30 mV και με καλή έως μέτρια ομοιομορφία με τιμές PDI από 0.2 έως 0.6.

Οι υδατικές διασπορές αξιολογήθηκαν ως προς τη σταθερότητά τους σε διάστημα ενός μήνα με αποθήκευση σε συνθήκες ψύξης και περιβάλλοντος. Τα μεγέθη που μετρήθηκαν μετά το πέρασμα του ενός μήνα υπό ψύξη δεν παρουσίασαν σημαντική μεταβολή στην περίπτωση της ένωσης (**1**). Όσον αφορά την ένωση (**8**), τα νανοσωματίδια παρουσίασαν μεγαλύτερη συσσωμάτωση εντός ψυγείου, χωρίς ωστόσο να παρατηρείται σημαντική αύξηση του μεγέθους.

Ακόμη, μελετήθηκε η αποδέσμευση της ένωσης (**8**) από τα SLNs, τόσο σε μορφή υδατικής διασποράς, όσο και υπό τη μορφή λυοφιλοποιημένων νανοσωματιδίων, σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH=7.4 στους 37°C. Τα λυοφιλοποιημένα νανοσωματίδια της ένωσης (**8**) παρουσίασαν "Burst effect" τις πρώτες 5 h της αποδέσμευσης, αποδεσμεύοντας το 65% της ένωσης. Τελικά, στις 24 h αποδεσμεύτηκε το 70% της εγκλωβισμένης ένωσης (**8**). Η αποδέσμευση από τα λυοφιλοποιημένα νανοσωματίδια βρέθηκε πως περιγράφεται καλύτερα από το μοντέλο κινητικής Higuchi. Ο εκθέτης διάχυσης *n*, όπως προέκυψε από το μοντέλο Korsmeyer-Peppas, υπέδειξε ως μηχανισμό τη

μη ομαλή διάχυση. Η αποδέσμευση της ένωσης **(8)** από την υδατική διασπορά των νανοσωματιδίων χρησιμοποιώντας τη μεμβράνη διαπίδυσης, στις ίδιες συνθήκες, παρουσίασε αισθητά πιο αργό προφίλ αποδέσμευσης. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε αρχικά αποδέσμευση τις πρώτες 5 h μέχρι το ποσοστό 18%, ενώ ακολούθησε μια σταδιακή αποδέσμευση, που στις 48 h κατέληξε στο 39% της εγκλωβισμένης ένωσης. Το προφίλ αυτό περιγράφηκε καλύτερα από το μοντέλο Higuchi, ενώ ο εκθέτης διάχυσης n υπέδειξε ως μηχανισμό τη μη ομαλή διάχυση.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα προέκυψε, πως η αποδέσμευση πραγματοποιείται πιο γρήγορα από τα λυοφιλοποιημένα νανοσωματίδια σε σχέση με την υδατική διασπορά, πιθανότατα εξαιτίας της άμεσης επαφής τους με το ρυθμιστικό διάλυμα.

Η τελευταία μελέτη αποδέσμευσης της ένωσης **(8)** από υδατική διασπορά νανοσωματιδίων μέσω της μεμβράνης διαπίδυσης, πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα $pH=1.2$, στους $37^{\circ}C$ παρουσία του ενζύμου πεψίνη, με σκοπό την προσομοίωση των συνθηκών του ανθρώπινου στομάχου. Αυτό το προφίλ παρουσίασε αποδέσμευση τις πρώτες 5 h της τάξης του 24%, ενώ ακολούθησε μια σταδιακή αποδέσμευση μέχρι τις 24 h, όπου τελικά αποδεσμεύτηκε το 44% της ένωσης. Το προφίλ αποδέσμευσης προσαρμόστηκε κι αυτό καλύτερα στο μοντέλο Higuchi. Η αποδέσμευση της ένωσης **(8)** από την υδατική διασπορά νανοσωματιδίων φάνηκε πως δεν ενισχύθηκε από το χαμηλότερο pH και την παρουσία πεψίνης.

Τέλος, οι δύο ενώσεις αλλά και τα νανοσωματίδια τους μελετήθηκαν ως προς τη δράση τους ως αναστολείς των AChE και BuChE. Η κουμαρινική ένωση **(8)** παρουσίασε την καλύτερη αναστολή της AChE σε ελεύθερη μορφή με $IC_{50}=6.4 \mu M$, αλλά και τα SLNs της παρουσίασαν εξίσου ικανοποιητική ανασταλτική δράση με $IC_{50}=10 \mu M$. Όσον αφορά τη BuChE, η ένωση **(8)** σε ελεύθερη μορφή παρουσίασε καλή αναστολή με $IC_{50}=5.0 \mu M$, ωστόσο τα SLNs της έδωσαν αρκετά υψηλότερο $IC_{50}=20.3 \mu M$, υποδεικνύοντας πιθανότατα τη μη ολοκληρωμένη αποδέσμευση της ένωσης από τα SLNs.

Η ένωση **(1)**, από την άλλη, εμφάνισε σε ελεύθερη μορφή καλύτερη αναστολή της BuChE ($IC_{50}=23.4 \mu M$) σε σχέση με την AChE ($IC_{50}=92.5 \mu M$). Τα SLNs της κινολινονης εμφάνισαν αντίστοιχη αναστολή της δράσης της AChE με την ένωση σε ελεύθερη μορφή, ενώ για τη BuChE, τα νανοσωματίδια της **(1)** έδειξαν ελαφρώς βελτιωμένη δράση ($IC_{50}=19.9 \mu M$), πιθανότατα εξαιτίας συνεργιστικής δράσης μεταξύ των λιπιδίων και του κινολινονικού αναλόγου.

ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελούν βάση για περαιτέρω έρευνα στον τομέα της Φαρμακευτικής Χημείας.

Αρχικά προτείνεται ο χαρακτηρισμός των SLNs και με άλλες μεθόδους, π.χ. Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC) και Θερμοσταθμική Ανάλυση (TGA) για αξιολόγηση των θερμικών ιδιοτήτων τους ή χρήση Μικροσκοπίας Ατομικών Δυνάμεων (AFM) και Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης ψυκτοτεμαχισμού (cryo-SEM) για εκτενέστερη μελέτη της μορφολογίας τους.

Κρίνεται επίσης σκόπιμος ο σχηματισμός των SLNs και με άλλες μεθόδους, όπως η θερμή ή ψυχρή ομογενοποίηση και η μέθοδος μικρογαλακτώματος, με σκοπό τη σύγκριση των αποτελεσμάτων.

Ακόμη, προτείνεται η μελέτη της αποδέσμευσης της ένωσης **(1)** από τα SLNs με τις μεθόδους της μεμβράνης διαπίδυσης και των λυοφιλοποιημένων νανοσωματιδίων, χρησιμοποιώντας ωστόσο ως μέθοδο ανίχνευσης της ένωσης Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC) και όχι τη φασματομετρία UV-Vis, λόγω της χαμηλής υδατοδιαλυτότητάς της. Στο πεδίο αυτό, έχουν ήδη πραγματοποιηθεί προκαταρκτικά πειράματα.

Θα μπορούσε επιπλέον να αξιολογηθεί η σταθερότητα των νανοσωματιδίων σε βάθος χρόνου, μεγαλύτερο του ενός μήνα, προκειμένου να εξασφαλιστεί η απουσία αλλοίωσής τους κατά τη μεταφορά και την αποθήκευση.

Μελλοντικό στόχο αποτελεί και η μελέτη κυτταροτοξικότητας των νέων ενώσεων, καθώς και των SLNs τους, σε κυτταρικές σειρές υγιών νευρικών κυττάρων, καθώς και μελέτη της ικανότητάς τους να διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.

Εκτός από τα λιπιδικά συστήματα, προτείνεται και ο εγκλωβισμός των ενώσεων σε διαφορετικούς φορείς, όπως οι κυκλοδεξτρίνες, η χιτοζάνη, το αλγινικό κ.α., που θα προσφέρουν διαφορετικές ιδιότητες στο τελικό σύστημα.

ΠΗΓΕΣ

1. Jain, P. K., & Joshi, H. (2012). Coumarin: chemical and pharmacological profile. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, (Issue), 236-240.
2. Cao, D., Liu, Z., Verwilst, P., Koo, S., Jangjili, P., Kim, J. S., & Lin, W. (2019). Coumarin-based small-molecule fluorescent chemosensors. *Chemical reviews*, 119(18), 10403-10519.
3. Ojala, T. (2001). Biological screening of plant coumarins.
4. Borges, F., Roleira, F., Milhazes, N., Santana, L., & Uriarte, E. (2005). Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: occurrence, synthesis and biological activity. *Current medicinal chemistry*, 12(8), 887-916.
5. Sumorek-Wiadro, J., Zając, A., Maciejczyk, A., & Jakubowicz-Gil, J. (2020). Furanocoumarins in anticancer therapy—For and against. *Fitoterapia*, 142, 104492.
6. Khandy, M. T., Sofronova, A. K., Gorpenchenko, T. Y., & Chirikova, N. K. (2022). Plant pyranocoumarins: Description, biosynthesis, application. *Plants*, 11(22), 3135.
7. Bouhaoui, A., Eddahmi, M., Dib, M., Khouili, M., Aires, A., Catto, M., & Bouissane, L. (2021). Synthesis and biological properties of coumarin derivatives. A review. *ChemistrySelect*, 6(24), 5848-5870.
8. Stefanachi, A., Leonetti, F., Pisani, L., Catto, M., & Carotti, A. (2018). Coumarin: A natural, privileged and versatile scaffold for bioactive compounds. *Molecules*, 23(2), 250.
9. Potdar, M. K., Mohile, S. S., & Salunkhe, M. M. (2001). Coumarin syntheses via Pechmann condensation in Lewis acidic chloroaluminate ionic liquid. *Tetrahedron Letters*, 42(52), 9285-9287.
10. Daru, J., & Stirling, A. (2011). Mechanism of the Pechmann reaction: a theoretical study. *The Journal of organic chemistry*, 76(21), 8749-8755.
11. Tyndall, S., Wong, K. F., & VanAlstine-Parris, M. A. (2015). Insight into the mechanism of the Pechmann condensation reaction using NMR. *The Journal of organic chemistry*, 80(18), 8951-8953.
12. Rosen, T. E. R. R. Y. (1992). The perkin reaction. *Comprehensive Organic Synthesis; Trost, BM, Fleming, I., Eds*, 395-408.
13. PATIL, K. V. SYNTHESIS OF DERIVATIVES OF COUMARIN AND ITS APPLICATION.
14. Jumal, J., & Sakinah, N. (2021). Synthesis, characterization, and applications of coumarin derivatives: a short review. *Malaysian Journal of Science Health & Technology*, 7(1), 62-68.
15. Kumar, B. V., Naik, H. S. B., Girija, D., & Kumar, B. V. (2011). ZnO nanoparticle as catalyst for efficient green one-pot synthesis of coumarins through Knoevenagel condensation. *Journal of Chemical Sciences*, 123, 615-621.
16. Vekariya, R. H., & Patel, H. D. (2014). Recent advances in the synthesis of coumarin derivatives via Knoevenagel condensation: A review. *Synthetic Communications*, 44(19), 2756-2788.
17. Mustafa, Y. F., Bashir, M. K., & Oglah, M. K. (2020). Original and innovative advances in the synthetic schemes of coumarin-based derivatives: A review. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11(6), 598-612.
18. Bansal, Y., Sethi, P., & Bansal, G. (2013). Coumarin: a potential nucleus for anti-inflammatory molecules. *Medicinal Chemistry Research*, 22, 3049-3060.
19. Grover, J., & Jachak, S. M. (2015). Coumarins as privileged scaffold for anti-inflammatory drug development. *RSC Advances*, 5(49), 38892-38905.
20. Borges Bubols, G., da Rocha Vianna, D., Medina-Reimon, A., von Poser, G., Maria Lamuela-Raventos, R., Lucia Eifler-Lima, V., & Cristina Garcia, S. (2013). The antioxidant activity of coumarins and flavonoids. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 13(3), 318-334.

21. Najmanova, I., Dosedel, M., Hrdina, R., Anzenbacher, P., Filipisky, T., Riha, M., & Mladenka, P. (2015). Cardiovascular effects of coumarins besides their antioxidant activity. *Current topics in medicinal chemistry*, 15(9), 830-849.
22. Rawat, A., & Reddy, A. V. B. (2022). Recent advances on anticancer activity of coumarin derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*, 5, 100038.
23. Zhang, L., & Xu, Z. (2019). Coumarin-containing hybrids and their anticancer activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 181, 111587.
24. Costa, T. M., Tavares, L. B. B., & de Oliveira, D. (2016). Fungi as a source of natural coumarins production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 6571-6584.
25. Keri, R. S., & Patil, S. A. (2014). Quinoline: A promising antitubercular target. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 68(8), 1161-1175.
26. Manske, R. H. (1942). The Chemistry of Quinolines. *Chemical Reviews*, 30(1), 113-144.
27. Yadav, P., & Shah, K. (2021). Quinolines, a perpetual, multipurpose scaffold in medicinal chemistry. *Bioorganic Chemistry*, 109, 104639.
28. Ramann, G. A., & Cowen, B. J. (2016). Recent advances in metal-free quinoline synthesis. *Molecules*, 21(8), 986.
29. Weyesa, A., & Mulugeta, E. (2020). Recent advances in the synthesis of biologically and pharmaceutically active quinoline and its analogues: a review. *RSC advances*, 10(35), 20784-20793.
30. Δεμέτζος, Κ. Ν. (2014). Φαρμακευτική Νανοτεχνολογία: Βασικές Αρχές και Πρακτικές Εφαρμογές. *Βασικές αρχές και πρακτικές εφαρμογές". Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου ΑΕ.*
31. Paroha, S., Chandel, A. K. S., & Dubey, R. D. (2018). Nanosystems for drug delivery of coenzyme Q10. *Environmental chemistry letters*, 16, 71-77.
32. Mohanraj, V. J., & Chen, Y. J. T. J. O. P. R. (2006). Nanoparticles-a review. *Tropical journal of pharmaceutical research*, 5(1), 561-573.
33. Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian journal of chemistry*, 12(7), 908-931.
34. Fischer, M., & Vögtle, F. (1999). Dendrimers: from design to application—a progress report. *Angewandte Chemie International Edition*, 38(7), 884-905.
35. Khalid, M., & El-Sawy, H. S. (2017). Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery. *International journal of pharmaceutics*, 528(1-2), 675-691.
36. Huang, H. C., Barua, S., Sharma, G., Dey, S. K., & Rege, K. (2011). Inorganic nanoparticles for cancer imaging and therapy. *Journal of controlled Release*, 155(3), 344-357.
37. McLntire, G. L., & Dorsey, J. G. (1990). Micelles in analytical chemistry. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 21(4), 257-278.
38. Qi, M., & Zhou, Y. (2019). Multimicelle aggregate mechanism for spherical multimolecular micelles: from theories, characteristics and properties to applications. *Materials Chemistry Frontiers*, 3(10), 1994-2009.
39. Bozzuto, G., & Molinari, A. (2015). Liposomes as nanomedical devices. *International journal of nanomedicine*, 975-999.
40. Shah, R., Eldridge, D., Palombo, E., & Harding, I. (2015). *Lipid nanoparticles: Production, characterization and stability* (Vol. 1, pp. 23-43). New York, NY, USA:: Springer International Publishing.
41. da Silva Santos, V., Ribeiro, A. P. B., & Santana, M. H. A. (2019). Solid lipid nanoparticles as carriers for lipophilic compounds for applications in foods. *Food Research International*, 122, 610-626.
42. Yadav, N., Khatak, S., & Sara, U. S. (2013). Solid lipid nanoparticles-a review. *Int. J. Appl. Pharm*, 5(2), 8-18.

43. Katopodi, A., & Detsi, A. (2021). Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers of natural products as promising systems for their bioactivity enhancement: The case of essential oils and flavonoids. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 630, 127529.
44. Sastri, K. T., Radha, G. V., Pidikiti, S., & Vajjhala, P. (2020). Solid lipid nanoparticles: Preparation techniques, their characterization, and an update on recent studies. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 10(6), 126-141.
45. Mehnert, W., & Mäder, K. (2012). Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Advanced drug delivery reviews*, 64, 83-101.
46. Parhi, R., & Suresh, P. (2010). Production of solid lipid nanoparticles-drug loading and release mechanism. *J Chem Pharm Res*, 2(1), 211-27.
47. Üner, M. (2006). Preparation, characterization and physico-chemical properties of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): their benefits as colloidal drug carrier systems. *Die pharmazie-an international journal of pharmaceutical sciences*, 61(5), 375-386.
48. Filipe, V., Hawe, A., & Jiskoot, W. (2010). Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharmaceutical research*, 27, 796-810.
49. Wissing, S. A., & Müller, R. H. (2003). Cosmetic applications for solid lipid nanoparticles (SLN). *International journal of pharmaceutics*, 254(1), 65-68.
50. Satapathy, M. K., Yen, T. L., Jan, J. S., Tang, R. D., Wang, J. Y., Taliyan, R., & Yang, C. H. Solid lipid nanoparticles (SLNs): an advanced drug delivery system targeting brain through BBB. *Pharmaceutics* 2021, 13, 1183.
51. Johnson, G., & Moore, S. W. (2006). The peripheral anionic site of acetylcholinesterase: structure, functions and potential role in rational drug design. *Current pharmaceutical design*, 12(2), 217-225.
52. Colovic, M. B., Krstic, D. Z., Lazarevic-Pasti, T. D., Bondzic, A. M., & Vasic, V. M. (2013). Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Current neuropharmacology*, 11(3), 315-335.
53. Quinn, D. M. (1987). Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chemical reviews*, 87(5), 955-979.
54. Aldunate, R., Casar, J. C., Brandan, E., & Inestrosa, N. C. (2004). Structural and functional organization of synaptic acetylcholinesterase. *Brain research reviews*, 47(1-3), 96-104.
55. Cavalcante, S. F. D. A., Simas, A. B., Barcellos, M. C., de Oliveira, V. G., Sousa, R. B., Cabral, P. A. D. M., ... & França, T. C. (2020). Acetylcholinesterase: the "Hub" for neurodegenerative diseases and chemical weapons convention. *Biomolecules*, 10(3), 414.
56. Dvir, H., Silman, I., Harel, M., Rosenberry, T. L., & Sussman, J. L. (2010). Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. *Chemico-biological interactions*, 187(1-3), 10-22.
57. Blennow, K., de Leon, M. J., & Zetterberg, H. (2006). Alzheimer's disease. *The Lancet*, 368(9533), 387-403.
58. Masters, C. L., Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C. C., Sperling, R. A., & Cummings, J. L. (2015). Alzheimer's disease. *Nature reviews disease primers*, 1(1), 1-18.
59. Ali, M. Y., Jannat, S., Jung, H. A., Choi, R. J., Roy, A., & Choi, J. S. (2016). Anti-Alzheimer's disease potential of coumarins from *Angelica decursiva* and *Artemisia capillaris* and structure-activity analysis. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 9(2), 103-111.
60. Mukherjee, P. K., Kumar, V., Mal, M., & Houghton, P. J. (2007). Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*, 14(4), 289-300.

61. Anand, P., Singh, B., & Singh, N. (2012). A review on coumarins as acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 20(3), 1175-1180.
62. Kamaly, N., Yameen, B., Wu, J., & Farokhzad, O. C. (2016). Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: mechanisms of controlling drug release. *Chemical reviews*, 116(4), 2602-2663.
63. Peppas, N. A., & Narasimhan, B. (2014). Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 190, 75-81.
64. Thompson, L. H., & Doraiswamy, L. K. (1999). Sonochemistry: science and engineering. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 38(4), 1215-1249.
65. Sancheti, S. V., & Gogate, P. R. (2017). A review of engineering aspects of intensification of chemical synthesis using ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 36, 527-543.
66. Takano, Y., Hayashi, Y., Fukushima, J., & Takizawa, H. (2021). Room-temperature synthesis of γ -Ga₂O₃ nanoparticles from gallium metal via ultrasound irradiation. *Advanced Powder Technology*, 32(3), 860-865.
67. Zhu, L., Liu, Y., Fan, X., Yang, D., & Cao, X. (2011). Rapid synthesis of single-crystalline TbF₃ with novel nanostructure via ultrasound irradiation. *Materials Research Bulletin*, 46(2), 252-257.
68. Dhankhar, P. (2014). Homogenization fundamentals. *IOSR Journal of Engineering*, 4(5), 8.
69. Modarres-Gheisari, S. M. M., Gavagsaz-Ghoachani, R., Malaki, M., Safarpour, P., & Zandi, M. (2019). Ultrasonic nano-emulsification—A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 52, 88-105.
70. Watson, D. G. (2020). *Pharmaceutical analysis E-book: a textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists*. Elsevier Health Sciences.
71. Akash, M. S. H., Rehman, K., Akash, M. S. H., & Rehman, K. (2020). Ultraviolet-visible (UV-VIS) spectroscopy. *Essentials of pharmaceutical analysis*, 29-56.
72. Picollo, M., Aceto, M., & Vitorino, T. (2018). UV-Vis spectroscopy. *Physical sciences reviews*, 4(4), 20180008.
73. Stetefeld, J., McKenna, S. A., & Patel, T. R. (2016). Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical reviews*, 8, 409-427.
74. Jain, A. K., & Thareja, S. (2019). In vitro and in vivo characterization of pharmaceutical nanocarriers used for drug delivery. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 47(1), 524-539.
75. Kaszuba, M., McKnight, D., Connah, M. T., McNeil-Watson, F. K., & Nobbmann, U. (2008). Measuring sub nanometre sizes using dynamic light scattering. *Journal of nanoparticle research*, 10, 823-829.
76. Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential—what they are and what they are not?. *Journal of controlled release*, 235, 337-351.
77. Smith, I. C., & Blandford, D. E. (1995). Nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Analytical chemistry*, 67(12), 509-518.
78. Chatham, J. C., & Blackband, S. J. (2001). Nuclear magnetic resonance spectroscopy and imaging in animal research. *IAR Journal*, 42(3), 189-208.
79. Bothwell, J. H., & Griffin, J. L. (2011). An introduction to biological nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biological Reviews*, 86(2), 493-510.
80. Raja P. M. V., Barron A. R., *Physical Methods in Chemistry and Nanoscience*, LibreTexts, 2021, Volume 4, Issue 7

81. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres Jr V., Featherstone R.M. (1961), "A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity", *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95.
82. Lacatusu, I., Badea, N., Murariu, A., Oprea, O., Bojin, D., & Meghea, A. (2013). Antioxidant activity of solid lipid nanoparticles loaded with umbelliferone. *Soft Materials*, 11(1), 75-84.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι-ΠΙΝΑΚΕΣ

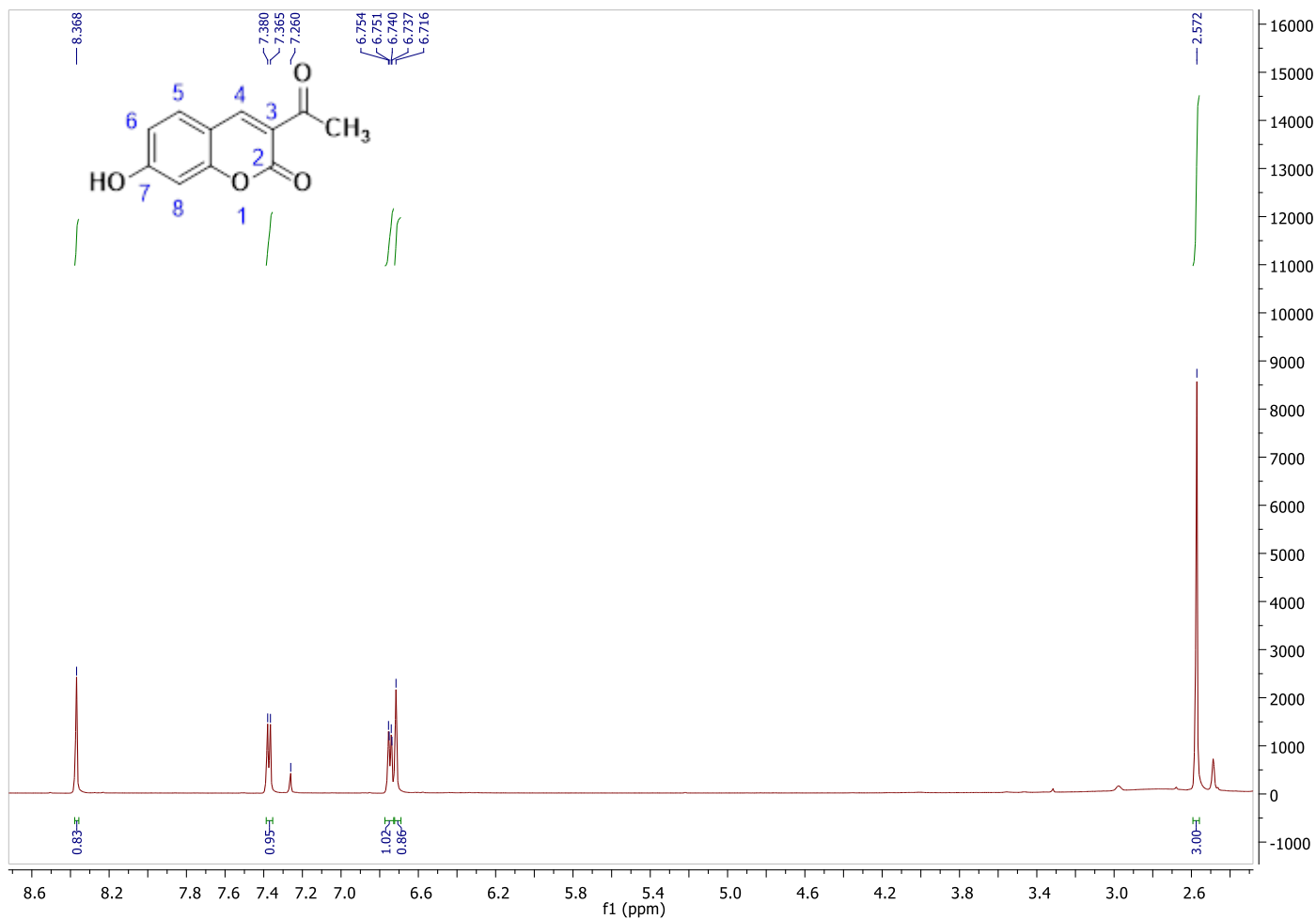
Πίνακας 14. Τιμές απορρόφησης διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης της ένωσης (1) σε αιθανόλη

Συγκέντρωση (mg/mL)	Συγκέντρωση (10^{-5} mol/L)	Abs
0,0143	4,87	1,06812
0,0114	3,89	0,861143
0,0086	2,92	0,638706
0,0057	1,95	0,431924
0,0029	0,974	0,212479

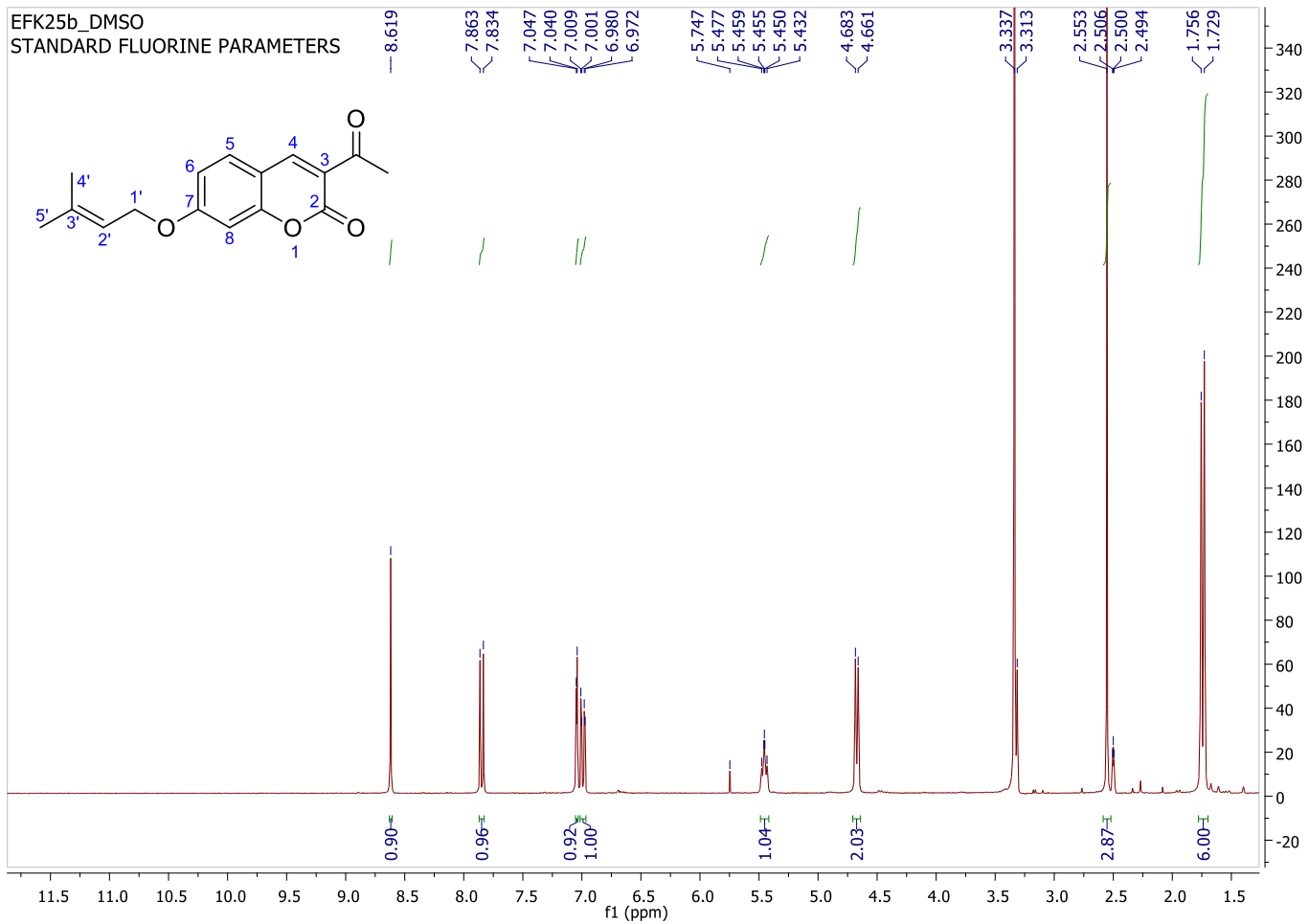
Πίνακας 15. Τιμές απορρόφησης διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης της ένωσης (8) σε αιθανόλη

Συγκέντρωση (mg/mL)	Συγκέντρωση (10^{-5} mol/L)	Abs
0,0202	6,14559	1,10676
0,0161	4,91647	0,877331
0,0121	3,68735	0,650371
0,0081	2,45823	0,429617
0,0040	1,22912	0,213573

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ-ΦΑΣΜΑΤΑ ^1H NMR



Εικόνα 46. Φάσμα ^1H NMR της ένωσης (4)



Εικόνα 47. Φάσμα ^1H NMR της ένωσης (6)