

## ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΒΙΟΜΟΡΙΩΝ ΣΤΟΝ ΕΓΚΕΦΑΛΟ ΜΕΣΩ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΝ ΣΤΗΝ ΟΣΦΡΗΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ

**Φ.Καραγεώργος<sup>1,2</sup>, Ε. Κικκινίδης<sup>1</sup>, Κ. Κυπαρισσίδης<sup>1,2,\*</sup>**

<sup>1</sup>Τμήμα Χημικών Μηχανικών, ΑΠΘ, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα

<sup>2</sup>Ινστιτούτο Χημικών Διεργασιών και Ενεργειακών Πόρων, ΙΔΕΠ/ΕΚΕΤΑ, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα

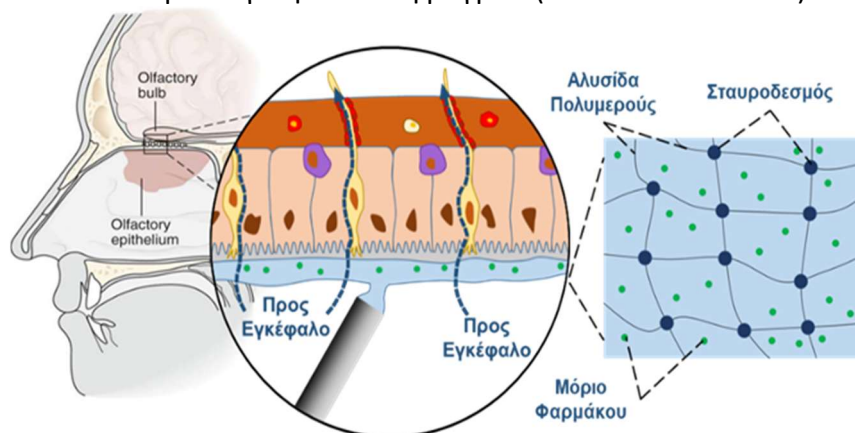
(\*[costas.kiparissides@cpari.certh.gr](mailto:costas.kiparissides@cpari.certh.gr))

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι υδροπηκτές βρίσκουν ευρεία εφαρμογή στη βιοϊατρική μηχανική (π.χ., ελεγχόμενη αποδέσμευση δραστικών ουσιών, μηχανική ιστών, κλπ.). Το υαλουρονικό οξύ αποτελεί έναν φυσικό, βιοσυμβατό, βιοαποικοδομήσιμο, πολυσακχαρίτη. Οι υδροπηκτές με βάση το υαλουρονικό οξύ σχηματίζονται με χημική τροποποίηση του υαλουρονικού οξέος και μετέπειτα δικτύωση των πολυμερικών αλυσίδων για το σχηματισμό ενός τρισδιάστατου πλέγματος. Στην παρούσα εργασία εξετάζεται ο τοπικός σχηματισμός μιας βιοαποικοδομήσιμης υδροπηκτής (π.χ., με βάση το υαλουρονικό οξύ) στην οσφρητική περιοχή της ρινικής κοιλότητας. Στην υδροπηκτική εγκλίνεται η επιλεγμένη φαρμακευτική ουσία ή κατάλληλοι νανοφορείς του δραστικού φαρμακευτικού συστατικού. Το σύστημα υδροπηκτής-νανοφορέων επιτρέπει την ελεγχόμενη χορήγηση φαρμάκου στον εγκέφαλο με χρονικό ορίζοντα 1-2 εβδομάδων για την αντιμετώπιση/θεραπεία νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Συγκεκριμένα αναπτύσσεται ένα μαθηματικό κινητικό μοντέλο προσομοίωσης της δικτύωσης του υαλουρονικού οξέος και σχηματισμού ενός τρισδιάστατου πολυμερικού δικτύου (υδροπηκτής). Το μαθηματικό μοντέλο προβλέπει αποτελεσματικά το σημείο έναρξης σχηματισμού (gelation onset time) της υδροπηκτής σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των μέσων δικτύωσης δηλαδή, του ενζύμου υπεροξειδάση χρένου (Horseradish-Peroxidase) και του υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ).

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι ασθένειες του κεντρικού νευρικού συστήματος (νόσος Alzheimer, νόσος Πάρκινσον, σκλήρυνση κατά πλάκας κλπ.) αποτελούν πρωτεύον πρόβλημα για τη δημόσια υγεία λαμβάνοντας υπόψη την αύξηση του προσδόκιμου ζωής και τη γήρανση του πληθυσμού. Η θεραπεία των εν λόγω ασθενειών απαιτεί τη χορήγηση κατάλληλων θεραπευτικών ενώσεων στον εγκέφαλο σε επαρκείς ποσότητες ώστε να επιτευχθεί η απαραίτητη φαρμακολογική απόκριση. Περιοριστική παράμετρο κατά τη μεταφορά φαρμακευτικών ενώσεων στον εγκέφαλο, κατόπιν ενδοφλέβιας χορήγησης, αποτελεί η παρουσία του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (Blood-Brain-Barrier).

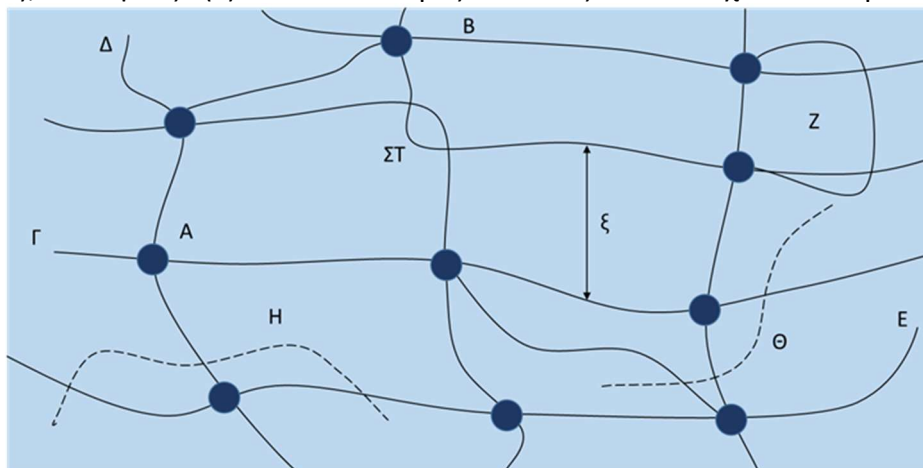


**Σχήμα 1.** Απεικόνιση του τοπικού σχηματισμού υδροπηκτής στην οσφρητική περιοχή της ρινικής κοιλότητας. Η θεραπευτική ουσία εγκλίνεται στην υδροπηκτή. Τα μπλε βέλη αποτελούν τις οδούς δια μέσου των οποίων γίνεται η μεταφορά του φαρμάκου στον εγκέφαλο.

Ως εκ τούτου, η οσφρητική περιοχή της ρινικής κοιλότητας μελετάται ως εναλλακτικό σημείο εισόδου για τη στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων στον εγκέφαλο, ούτως ώστε να παρακαμφθεί ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός (Σχήμα 1) <sup>[1]</sup>. Με την εφαρμογή κατάλληλων υδροπηκτών (τοπικά σχηματιζόμενων στην οσφρητική περιοχή και περιέχοντας τη φαρμακευτική ουσία) είναι δυνατή η ανάπτυξη μιας νέας τεχνολογίας για την επιτυχή χορήγηση φαρμάκων στον εγκέφαλο.

Οι υδροπηκτές είναι τρισδιάστατα πλέγματα υδρόφιλων πολυμερών που έχουν την ιδιότητα να απορροφούν μεγάλες ποσότητες νερού και συνεπώς να διογκώνονται, ενώ παραμένουν αδιάλυτες στο υδατικό μέσο λόγω της ύπαρξης σταυροδεσμών <sup>[2]</sup>. Οι σταυροδεσμοί (crosslinks) αποτελούν σημεία διασύνδεσης των πολυμερικών αλυσίδων του πλέγματος και διακρίνονται σε ομοιοπολικούς, ιονικούς, δεσμούς υδρογόνου, κρυσταλλίτες ή φυσικές περιελίξεις (entanglements) του πολυμερούς. Χαρακτηριστικό μέγεθος κατά τη διογκωση μιας υδροπηκτής αποτελεί ο βαθμός διογκώσής της. Το κλάσμα όγκου του πολυμερούς στη διογκωμένη κατάσταση ισορροπίας,  $v_{2,s}$ , το μέσο μοριακό βάρος μεταξύ δυο διαδοχικών σταυροδεσμών,  $M_c$ , καθώς και το μέσο μέγεθος βρόγχου που αντιστοιχεί στο χώρο μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων του δικτύου και ορίζεται ίσο με την απόσταση,  $\xi$ , αποτελούν κρίσιμες παραμέτρους για τη μοριακή δομή μιας υδροπηκτής <sup>[2]</sup>. Η φύση του πολυμερούς, οι συνθήκες και η μέθοδος παρασκευής της υδροπηκτής καθορίζουν τις τιμές των ανωτέρω μοριακών παραμέτρων, τις μηχανικές ιδιότητές της, το ρυθμό αποδέσμευσης δραστικών ουσιών από την υδροπηκτή καθώς και το ρυθμό διάσπασής της <sup>[3]</sup>. Οι υδροπηκτές είναι ημιπερατά και βιοσυμβατά υλικά χωρίς ανεπιθύμητες ιστολογικές συνέπειες, κατά την εφαρμογή τους. Οι συγκεκριμένες ιδιότητες τις καθιστούν κατάλληλες σε πληθώρα εφαρμογών όπως τα υπεραπορροφητικά υλικά, οι διεργασίες διαχωρισμού με μεμβράνες, οι φακοί επαφής, η μηχανική ιστών και η ελεγχόμενη αποδέσμευση δραστικών ουσιών. Οι υδροπηκτές μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως φορείς δραστικών ουσιών για την ελεγχόμενη μεταφορά των φαρμάκων στον εγκέφαλο μέσω της ρινικής κοιλότητας <sup>[3]</sup>.

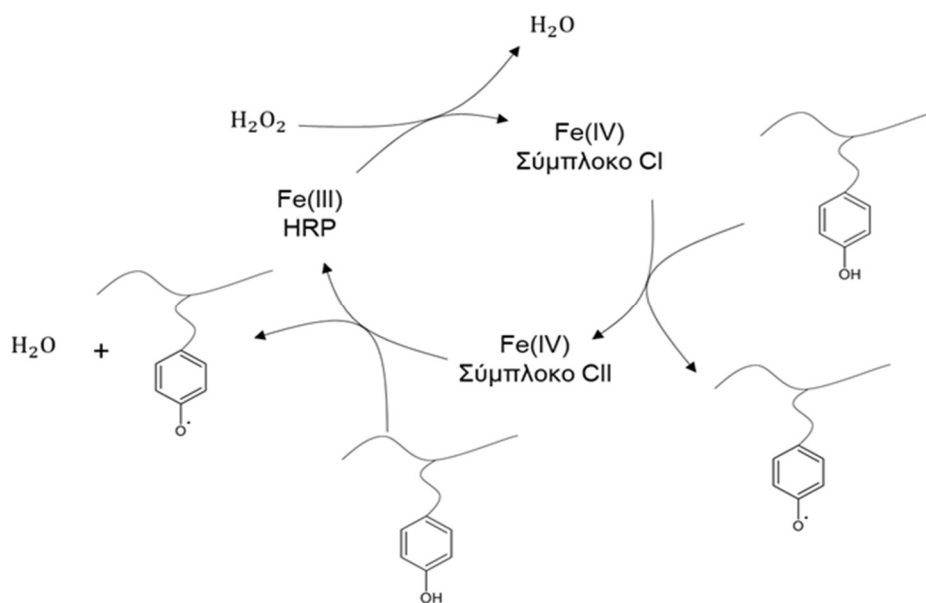
Στο Σχήμα 2 απεικονίζεται σχηματικά η δομή μιας υδροπηκτής, δηλαδή τα σημεία σύνδεσης τεσσάρων (A) ή και περισσότερων (B) αλυσίδων, τα άκρα των πολυμερικών αλυσίδων (Γ, Δ, E), οι περιελίξεις (ΣΤ), οι «θηλιές» (Z) και οι ελεύθερες αλυσίδες που δεν έχουν αντιδράσει (H, Θ).



**Σχήμα 2.** Σχηματική απεικόνιση δικτυωτής δομής υδροπηκτής. Σημείο σύνδεσης τεσσάρων αλυσίδων (A), σημείο σύνδεσης περισσότερων των τεσσάρων αλυσίδων (B), άκρα πολυμερικών αλυσίδων (Γ, Δ, E), περιελίξεις (ΣΤ), «θηλιές» (Z) και αλυσίδες που δεν έχουν αντιδράσει (H, Θ). Απεικονίζεται επίσης το μέσο μέγεθος των βρόγχων του δικτύου ( $\xi$ ).

Πολυμερικές αλυσίδες (π.χ. υαλουρονικού οξέος) που φέρουν πλευρικές φαινολικές δραστικές ομάδες μπορούν να σχηματίσουν τρισδιάστατα δίκτυα (υδροπηκτές) μετά από κατάλληλη ενεργοποίηση και αντίδραση των φαινολικών δακτυλίων μέσω ενός οξειδο-αναγωγικού μηχανισμού ελευθέρων ριζών παρουσία του ενζύμου υπεροξειδάση χρένου Horseradish-

Peroxidase (HRP) και του υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) [4,5]. Η συγκεκριμένη μέθοδος έχει εφαρμοστεί για τη σύνθεση υδροπηκτών με βάση το υαλουρονικό οξύ [6,7], το αλγινικό οξύ [8], τη ζελατίνη [9,10], τη χιτοζάνη [11] κ.ά. Στον καταλυτικό μηχανισμό της υπεροξειδάσης χρένου (HRP) συμμετέχουν τα σύμπλοκα CI και CII του ενζύμου που αποτελούν οξειδωμένες μορφές του ενζύμου. Τα στάδια του καταλυτικού μηχανισμού παρουσιάζονται στο Σχήμα 3. Εκτός των συμπλόκων CI και CII του ενζύμου παράγονται επίσης τα σύμπλοκα CIII και CIV που αποτελούν αντίστοιχα μια αντιστρεπτή μη ενεργή μορφή του ενζύμου και μια μη αντιστρεπτή μη ενεργή μορφή του [12]. Σημειώνεται ότι το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), σε υψηλές συγκεντρώσεις, μπορεί να αναστέλλει τον ενζυμικό μηχανισμό, ενώ παράλληλα αυξάνει τον ρυθμό οξείδωσης του ενζύμου. Ο μηχανισμός της απενεργοποίησης του ενζύμου δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί [12]. Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται ένα μαθηματικό κινητικό μοντέλο δικτύωσης του υαλουρονικού οξέος μέσω των HRP/ $H_2O_2$ .



**Σχήμα 3.** Καταλυτικός κύκλος του ενζύμου *Horseradish-Peroxidase* παρουσία  $H_2O_2$  και αλυσίδων υαλουρονικού οξέος με πλευρικούς φαινολικούς δακτυλίους.

### ΚΙΝΗΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΥΔΡΟΠΗΚΤΩΝ

Ο προτεινόμενος απλοποιημένος μηχανισμός δικτύωσης των αλυσίδων υαλουρονικού οξέος περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια: i) την ενεργοποίηση του ενζύμου (εξίσωση 1) και τη δημιουργία ενεργών πολυμερικών αλυσίδων μέσω του σχηματισμού ελευθέρων ριζών στους φαινολικούς δακτυλίους (εξισώσεις 2 και 3), ii) την αντίδραση δικτύωσης και απενεργοποίησης των αλυσίδων (εξίσωση 4) και iii) την αντίδραση απενεργοποίησης του ενζύμου (εξίσωση 5). Στο μαθηματικό μοντέλο γίνεται η παραδοχή ότι κάθε αλυσίδα έχει μόνο μια ελεύθερη ρίζα. Επιπλέον, η απενεργοποίηση του ενζύμου θεωρείται πως λαμβάνει χώρα μόνο για το σύμπλοκο CII.

Εκκίνηση/ Ενεργοποίηση



Τερματισμός με συνδυασμό



Απενεργοποίηση



Όπου E είναι το ενζύμο HRP και CI, CII και CIV τα σύμπλοκα του. R<sub>n</sub> είναι οι "ενεργές" αλυσίδες του πολυμερούς με "n" αριθμό δομικών μονάδων, D<sub>n</sub> οι "ανεργές" αλυσίδες πολυμερούς με "n" αριθμό δομικών μονάδων και k<sub>1</sub>, k<sub>2</sub>, k<sub>3</sub>, k<sub>4</sub> και k<sub>5</sub> οι κινητικές σταθερές των αντιδράσεων (1-5).

Με βάση το ανωτέρω σύστημα των χημικών αντιδράσεων μπορούν να διατυπωθούν τα ακόλουθα δυναμικά γραμμομοριακά ισοζύγια για τα αντιδρώντα-προϊόντα του συστήματος.

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_1[E][H_2O_2] + k_3[CII] \sum_{x=1}^{\infty} x(DS)D_x \quad (6)$$

$$\frac{d[H_2O_2]}{dt} = -k_1[E][H_2O_2] - k_5[H_2O_2][CII] \quad (7)$$

$$\frac{d[CI]}{dt} = k_1[E][H_2O_2] - k_2[CI] \sum_{x=1}^{\infty} x(DS)D_x \quad (8)$$

$$\frac{d[CII]}{dt} = k_2[CI] \sum_{x=1}^{\infty} x(DS)D_x - k_3[CII] \sum_{x=1}^{\infty} x(DS)D_x - k_5[H_2O_2][CII] \quad (9)$$

$$\frac{d[CIV]}{dt} = k_5[H_2O_2][CII] \quad (10)$$

$$\frac{dD_n}{dt} = -k_2[CI]n(DS)D_n - k_3[CII]n(DS)D_n + \frac{1}{2}k_4 \sum_{x=1}^{n-1} R_{n-x}R_x \quad (11)$$

$$\frac{dR_n}{dt} = k_2[CI]n(DS)D_n + k_3[CII]n(DS)D_n - k_4R_n \sum_{x=1}^{\infty} R_x \quad (12)$$

όπου DS είναι ο βαθμός χημικής τροποποίησης του πολυμερούς.

Για την επίλυση του παραπάνω δυναμικού συστήματος μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορες αριθμητικές τεχνικές. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των ροπών η οποία βασίζεται στη στατιστική αναπαράσταση των μέσων μοριακών ιδιοτήτων του πολυμερούς (μέσο μοριακό βάρος κατά αριθμό και κατά βάρος) συναρτήσεων των πρώτων ροπών της διαφορικής κατανομής του βαθμού πολυμερισμού των ενεργών και ανεργών μακρομοριακών αλυσίδων<sup>[13,14]</sup>. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι πολλές από τις τελικές ιδιότητες (π.χ., μηχανικές, ρεολογικές, κλπ.) ενός πολυμερούς σχετίζονται άμεσα με τις μέσες τιμές της κατανομής μήκους των αλυσίδων που μπορούν να εκφραστούν συναρτήσεων των πρώτων ροπών της κατανομής. Οι ροπές αυτές ορίζονται αντίστοιχα για τις ενεργές και ανεργές αλυσίδες σύμφωνα με τις εξισώσεις (13-14):

$$\lambda_n = \sum_{x=1}^{\infty} x^n R(x) \quad (13)$$

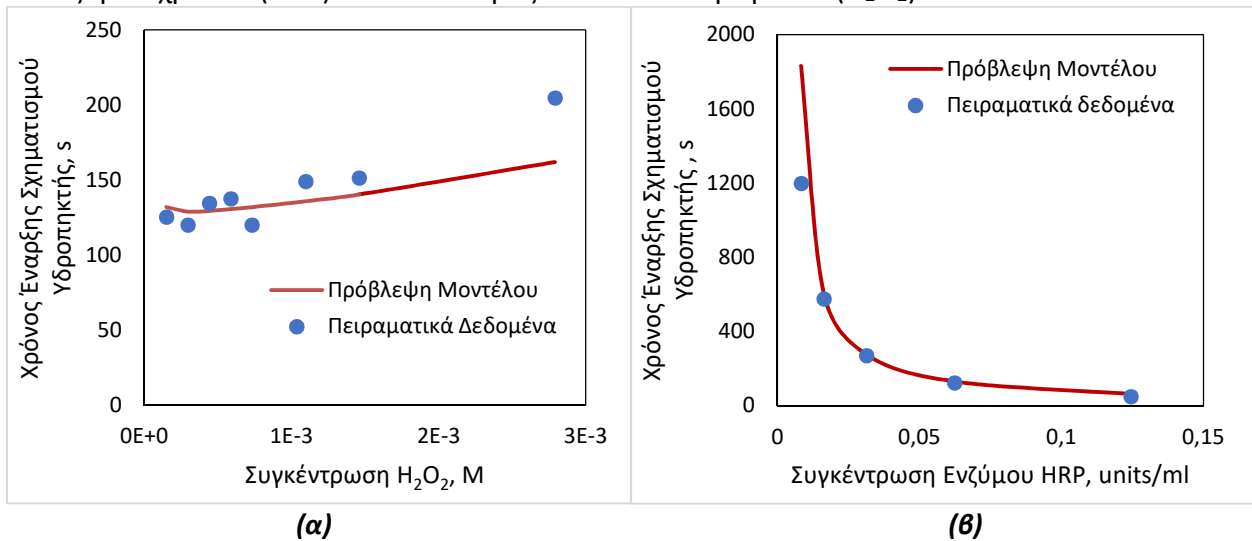
$$\mu_n = \sum_{x=1}^{\infty} x^n D(x) \quad (14)$$

Από την αριθμητική επίλυση του τελικού συστήματος των διαφορικών εξισώσεων υπολογίζονται η αύξηση του μέσου μοριακού βάρους των αλυσίδων λόγω των αντιδράσεων δικτύωσης, η

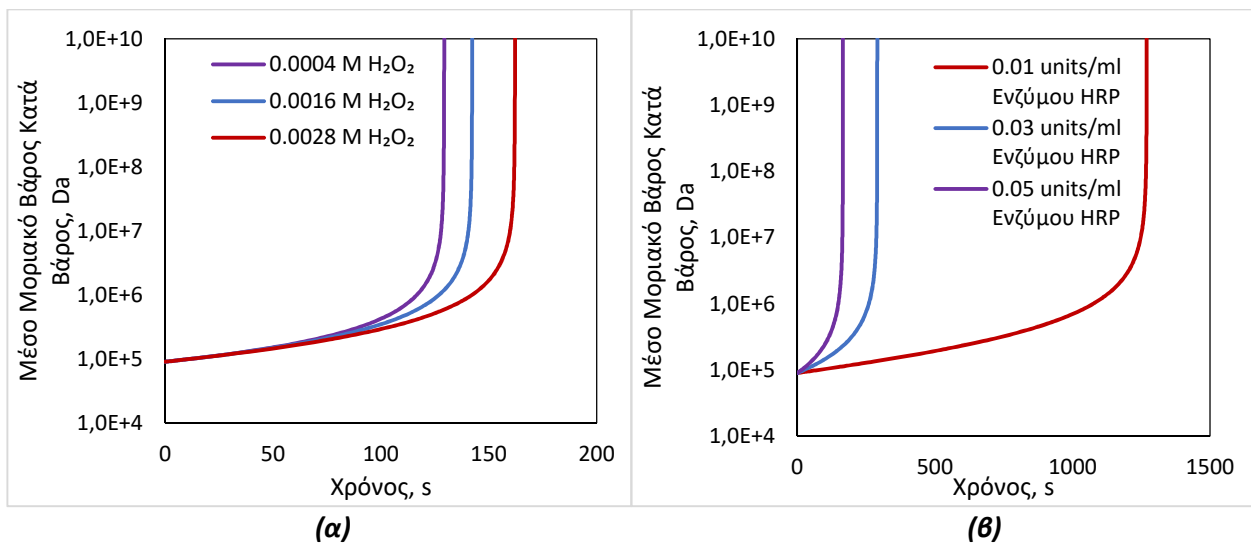
συγκέντρωση των σταυροδεσμών, η μεταβολή του βαθμού χημικής τροποποίησης, το μοριακό βάρος μεταξύ των σταυροδεσμών,  $M_c$ , και ο χρόνος σχηματισμού του τρισδιάστατου πολυμερικού πλέγματος (υδροπηκτή).

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Προκειμένου να εξεταστεί η ικανότητα του μαθηματικού μοντέλου να προβλέπει το σημείο έναρξης σχηματισμού της υδροπηκτής, συναρτήσει των συγκεντρώσεων του πολυμερούς, του ενζύμου υπεροξειδάση χρένου και του υπεροξειδίου του υδρογόνου, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των προβλέψεων του μοντέλου με πειραματικά δεδομένα από τη βιβλιογραφία για υαλουρονικό οξύ τροποποιημένο με τυραμίνη<sup>[7]</sup>. Τα αποτελέσματα της σύγκρισης παρουσιάζονται στο Σχήμα 4. Στο Σχήμα 5 παρουσιάζεται η εξέλιξη του μέσου μοριακού βάρους κατά βάρος για την επίδραση του ενζύμου χρένου (HRP) και του υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ).



**Σχήμα 4.** Σύγκριση των αριθμητικών προβλέψεων του χρόνου έναρξης σχηματισμού της υδροπηκτής με πειραματικά δεδομένα για διαφορετικές συγκεντρώσεις (α) του υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και (β) του ενζύμου υπεροξειδάση χρένου (HRP).



**Σχήμα 5.** Αριθμητικές προβλέψεις της εξέλιξης του μέσου μοριακού βάρους κατά βάρος για διαφορετικές συγκεντρώσεις (α) του υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και (β) του ενζύμου υπεροξειδάση χρένου (HRP). Οι συγκεντρώσεις του ενζύμου υπεροξειδάση χρένου (HRP) και του υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) καθορίστηκαν  $0,06 \text{ units/ml}$  για το (α) και  $7,28 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  για το (β), αντίστοιχα.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το μαθηματικό κινητικό μοντέλο δικτύωσης υαλουρονικού οξέος μέσω του συστήματος HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> που αναπτύχθηκε, προβλέπει επιτυχώς την έναρξη σχηματισμού της υδροπηκτής λαμβάνοντας υπόψη τις μεταβολές των συγκεντρώσεων των HRP και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Το μοντέλο θα μπορούσε να εφαρμοστεί και σε αντιδράσεις δικτύωσης άλλων πολυμερικών αλυσίδων κατάλληλα τροποποιημένων με πλευρικές φαινολικές ομάδες.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του ερευνητικού έργου “Nose to Brain Delivery of NG-101 via the Olfactory Region for the Regenerative Treatment of Multiple Sclerosis Using Novel Multifunctional Biomaterials Combined with a Medical Device, N2B-patch” (Horizon 2020, Grant No. 721098).

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] V. Bourganis, O. Kammona, A. Alexopoulos, C. Kiparissides. *Eur J Pharm Biopharm* 128 (2018) 337-362.
- [2] C. C. Lin, A. T. Metters. *Adv Drug Deliv Rev* 58(12-13) (2006) 1379-1408
- [3] B. A. Aderibigbe. *Pharmaceutics* 10(2) (2018) 40
- [4] J. W. Bae, J. H. Choi, Y. Lee, K. D. Park. *J Tissue Eng Regen Med*. 9(11) (2015) 1225-1232
- [5] F. Lee, K. H. Bae, M. Kurisawa. *Biomed Mater*. 11(1) (2015) 014101
- [6] M. Kurisawa, J. E. Chung, Y. Y. Yang, S. J. Gao, H. Uyama. *Chem Commun (Camb)*. 14(34) (2005) 4312-4314
- [7] F. Lee, J. E. Chung, M. Kurisawa. *Soft Matter*. 4 (2008) 880-887
- [8] S. Sakai, K. Kawakami. *Acta Biomater*. 3(4) (2007) 495-501
- [9] S. Sakai, K. Hirose, K. Taguchi, Y. Ogushi, K. Kawakami. *Biomaterials* 30(20) (2009) 3371-3377
- [10] L. Wang, J. E. Chung, P. P. Chan, M. Kurisawa. *Biomaterials*. 31(6) (2010) 1148-1157
- [11] S. Sakai, Y. Yamada, T. Zenke, K. Kawakami. *Journal of materials Chemistry* 19 (2009) 230-235
- [12] A. Schmidt, J. T. Schumacher, J. Reichelt, H. Hecht, U. Bilitewski. *Anal Chem* 74(13) (2002) 3037-3045
- [13] P. Pladis, C. Kiparissides. *Chem Eng Sci* 53(18) (1998) 3315-3333
- [14] D. S. Achillias, C. Kiparissides. *Macromolecules* 25(14) (1992) 3739-3750