

## ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΜΗ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΜΙΚΡΟΣΦΑΙΡΙΔΙΑ ΖΕΛΑΤΙΝΗΣ

**Α. Νάκας<sup>1,2</sup>, Α. Δαλάτση<sup>1</sup>, Κ. Κοντογιαννόπουλος<sup>1,2</sup>, Π. Μπαρμπαλέξης<sup>2,3,#</sup>, Α. Ασημοπούλου<sup>1,2,\*</sup>**

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

<sup>2</sup>Κέντρο Αριστείας Φυσικών Προϊόντων ΑΠΘ (NatPro-AUTH), ΚΕΔΕΚ-ΑΠΘ, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα

<sup>3</sup>Τμήμα Φαρμακευτικής, Σχολή Επιστημών Υγείας ΑΠΘ, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα

(\*[adreana@eng.auth.gr](mailto:adreana@eng.auth.gr)) (#[pbarmp@pharm.auth.gr](mailto:pbarmp@pharm.auth.gr))

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ) είναι μία προοδευτικά εξελισσόμενη νόσος που οδηγεί στην καταστροφή του αρθρικού χόνδρου και τη δημιουργία οστεόφυτων. Τα συμπτώματα της ΟΑ περιλαμβάνουν πόνο, ακαμψία και οίδημα. Συνήθης πρακτική για την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων αυτής, αποτελεί η χορήγηση Μη Στεροειδών Αντιφλεγμονωδών Φαρμάκων (ΜΣΑΦ). Ωστόσο, η συστηματική διά του στόματος χορήγηση ΜΣΑΦ σχετίζεται με παρενέργειες, κυρίως στο γαστρεντερικό σύστημα. Ως πιο ασφαλής και αποτελεσματική μέθοδος χορήγησης, προτείνεται η έγχυση των δραστικών ουσιών ενδοαρθρικά, στοχεύοντας έτσι μόνο στην πάσχουσα άρθρωση. Για το σκοπό αυτό, κρίνεται αναγκαία η ανάπτυξη κατάλληλων φορέων για την ενδοαρθρική έγχυση ΜΣΑΦ.

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η ανάπτυξη μικροσφαιριδίων ζελατίνης για τον εγκλεισμό της νατριούχου δικλοφαινάκης. Ως βιοαποικοδομήσιμο περίβλημα χρησιμοποιήθηκε ζελατίνη τύπου Α (από δέρμα χοίρου) και τύπου Β (από δέρμα βοοειδούς). Τα μικροσφαιρίδια παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης, και συγκεκριμένα του τύπου ύδωρ-σε-έλαιο (water-in-oil).

Ειδικότερα, στην παρούσα εργασία μελετήθηκε με τη χρήση Πειραματικού Σχεδιασμού (Design of Experiments, DoE) η επίδραση επτά (7) παραγόντων που σχετίζονται με τη σύνθεση (τύπος ζελατίνης (X<sub>1</sub>), ποσότητα ζελατίνης (X<sub>2</sub>), αριθμός Bloom ζελατίνης (X<sub>3</sub>), τύπος επιφανειοδραστικού (X<sub>4</sub>), ποσότητα επιφανειοδραστικού (X<sub>5</sub>), τύπος ελαιώδους φάσης (X<sub>6</sub>) και ποσότητα ελαιώδους φάσης (X<sub>7</sub>)), δύο (2) παραγόντων που σχετίζονται με την παραγωγική διαδικασία (ταχύτητα (X<sub>8</sub>) και χρόνος ομογενοποίησης (X<sub>9</sub>)), καθώς και ενός παράγοντα που σχετίζεται με τη σταθεροποίηση των μικροσωματιδίων (περιεκτικότητα σε γλουταραλδεΐδη (GTA) (X<sub>10</sub>)). Ως αποκρίσεις επιλέχθηκαν: 1) το μέσο μέγεθος των σωματιδίων (Y<sub>1</sub>), 2) η ομοιομορφία της κατανομής μεγέθους των σωματιδίων (Y<sub>2</sub>) και 3) η περιεκτικότητα σε δραστική ουσία (Y<sub>3</sub>).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ποσότητα του επιφανειοδραστικού, η ταχύτητα της ομογενοποίησης και η συγκέντρωση του GTA διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο μέσο μέγεθος των σωματιδίων που προκύπτουν, ενώ ο τύπος της ζελατίνης, του επιφανειοδραστικού και της ελαιώδους φάσης επηρεάζουν σημαντικά την κατανομή του μεγέθους των μικροσφαιριδίων. Επίσης, ο πειραματικός σχεδιασμός έδειξε ότι η χρήση του Span 60, αντί του Span 80 ως επιφανειοδραστικού, του ελαιόλαδου αντί του σησαμέλαιου ως ελαιώδη φάση, καθώς επίσης και η αύξηση της ταχύτητας ομογενοποίησης κατά τη διαδικασία της γαλακτωματοποίησης, οδηγούν σε αύξηση της απόδοσης εγκλεισμού της δραστικής ουσίας.

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η οστεοαρθρίτιδα είναι μία εκφυλιστική νόσος των αρθρώσεων, η οποία προκαλεί τη σταδιακή φθορά του αρθρικού χόνδρου, με αποτέλεσμα τη μειωμένη κινητικότητά της. Μεταξύ των διαθέσιμων επιλογών, τα Μη Στεροειδή Αντιφλεγμονώδη Φάρμακα (ΜΣΑΦ) αποτελούν μία ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο συντηρητικής θεραπείας. Τα ΜΣΑΦ είναι αποτελεσματικά αντιφλεγμονώδη και αναλγητικά φάρμακα, λόγω της ικανότητάς τους να αναστέλλουν τη

βιοσύνθεση των προσταγλανδινών, απενεργοποιώντας τη δράση του ενζύμου κυκλοοξυγενάση [1]. Ωστόσο, η συστηματική διά του στόματος χορήγηση ΜΣΑΦ συνοδεύεται συχνά από παρενέργειες στο γαστρεντερικό σύστημα [2].

Η ενδοαρθρική χορήγηση ΜΣΑΦ αποτελεί μία νέα προοπτική για την αποτελεσματική ανακούφιση των ασθενών από τα συμπτώματα της οστεοαρθρίτιδας. Καινοτόμοι φορείς φαρμάκων, όπως υδρογέλες, λιποσώματα, νανο- και μικροσφαιρίδια, έχουν προταθεί ως πιθανές λύσεις για τον περιορισμό των παρενεργειών των ΜΣΑΦ. Ταυτόχρονα, τέτοιου είδους φαρμακομορφές δίνουν τη δυνατότητα και για ελεγχόμενη αποδέσμευση της δραστικής ουσίας, εντός της αρθρικής κοιλότητας [3].

Μεταξύ των φορέων αυτών, τα μικροσφαιρίδια φαίνεται να αποτελούν μία πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για τη μεταφορά και αποδέσμευση των ΜΣΑΦ ενδοαρθρικά [4, 5]. Για την παρασκευή κατάλληλων βιοαποικοδομησιμων μικροσφαιριδίων, έχουν προταθεί διάφορα πολυμερή, είτε φυσικής προέλευσης (ζελατίνες, αλγινικά, χιτοζάνες), είτε συνθετικά [6]. Οι ζελατίνες - οι οποίες είναι μετουσιωμένες πρωτεΐνες προερχόμενες από φυσικές πηγές (μέσω όξινης ή αλκαλικής υδρόλυσης του ζωικού κολλαγόνου) - παρουσιάζουν ορισμένα σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως η βιοσυμβατότητα, η βιοαποικοδομησιμότητα και το χαμηλό κόστος [7]. Οι διαθέσιμες ζελατίνες κατηγοριοποιούνται ανάλογα με την πηγή προέλευσης του κολλαγόνου (χοίροι, βοοειδή), τον αριθμό Bloom, που αποτελεί δείκτη ισχύος της πηκτής, το ισοηλεκτρικό σημείο κ.α., ενώ η διασύνδεση (crosslinking) με ουσίες όπως η γλουταραλδεΐδη ή η γενιπίνη κρίνεται απαραίτητη, έτσι ώστε να αυξηθεί η μηχανική και θερμική σταθερότητα [8].

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η ανάπτυξη μικροσφαιριδίων ζελατίνης για τον εγκλεισμό της νατριούχου δικλοφαινάκης (DCF, [(2,6-διχλωροφαινυλ)αμινο]-βενζυλο οξικό άλας του μονονατρίου), μελετώντας την επίδραση δέκα (10) συνολικά παραγόντων, με στόχο την παρασκευή φορέων με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά.

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### Υλικά

Χρησιμοποιήθηκε ζελατίνη Τύπου Α (από δέρμα χοίρου) και ζελατίνη Τύπου Β (από δέρμα βοοειδών) σε κοκκώδη μορφή, με αριθμό Bloom 150 και 225, καθώς και νατριούχος δικλοφαινάκη (DCF) καθαρότητας 99,8% με  $d_{90}$  στα 33,2  $\mu\text{m}$  (μετρημένη σε Mastersizer 3000, Malvern, UK), τα οποία ήταν μια ευγενική χορηγία της εταιρίας Rontis Hellas S.A. (Athens, Greece). Η γλουταραλδεΐδη (GTA 50 wt. % σε  $\text{H}_2\text{O}$ ), το ελαιόλαδο, το μεταδιθειώδες νάτριο, η ακετόνη, η τρυψίνη και οι παστίλιες για την παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος (Phosphate Buffered Saline, PBS) προμηθεύτηκαν από την εταιρία Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Τα επιφανειοδραστικά Span 60 και Span 80 ήταν της εταιρίας Merck (Darmstadt, Germany), το τολουόλιο, ο διαιθυλαιθέρας και η ισοπροπανόλη της εταιρίας Carlo Erba Reagents (Barcelona, Spain), ενώ το σησαμέλαιο της εταιρίας Henry Lamotte OILS GmbH (Bremen, Germany).

### Πειραματικός σχεδιασμός

Χρησιμοποιήθηκε πειραματικός σχεδιασμός (Design of Experiments, DoE) τύπου Plackett-Burman για τη μελέτη της επίδρασης δέκα (10) συνολικά παραγόντων στην παρασκευή μικροσφαιριδίων νατριούχου δικλοφαινάκης. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκαν: (i) επτά (7) παράγοντες που σχετίζονται με τη σύνθεση: ο τύπος ( $X_1$ ) και η ποσότητα ( $X_2$ ) της ζελατίνης, ο αριθμός Bloom της ζελατίνης ( $X_3$ ), ο τύπος ( $X_4$ ) και η ποσότητα ( $X_5$ ) του επιφανειοδραστικού, ο τύπος ( $X_6$ ) και η ποσότητα ( $X_7$ ) της ελαιώδους φάσης, (ii) δύο (2) παράγοντες που σχετίζονται με την παραγωγική διαδικασία: η ταχύτητα ( $X_8$ ) και ο χρόνος ομογενοποίησης ( $X_9$ ), και (iii) η επίδραση ενός παράγοντα που σχετίζεται με τη σταθεροποίηση των μικροσωματιδίων: η περιεκτικότητα σε GTA ( $X_{10}$ ). Τέλος, ως αποκρίσεις επιλέχθηκαν το μέσο μέγεθος των σωματιδίων ( $Y_1$ ), η ομοιομορφία (uniformity) της κατανομής μεγέθους των σωματιδίων ( $Y_2$ ) και η περιεκτικότητα σε δραστική ουσία ( $Y_3$ ).

### Παρασκευή μικροσφαιριδίων ζελατίνης

Τα μικροσφαιρίδια ζελατίνης για τον εγκλεισμό της δραστικής ουσίας παρασκευάστηκαν με μια διαδικασία γαλακτώματος-διασύνδεσης (crosslinking) βασισμένη σε ένα απλό γαλάκτωμα νερού σε έλαιο (water-in-oil, W/O). Εν συντομία, 190 mg DCF και κατάλληλη ποσότητα ζελατίνης (Τύπου Α ή Τύπου Β) διαλυτοποιήθηκαν σε 1,5 mL φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (PBS, pH=7,4) το καθένα σε θερμοκρασία 60°C, και κατόπιν αναμίχθηκαν προκειμένου να προκύψει η "υδατική φάση". Παράλληλα, κατάλληλη ποσότητα επιφανειοδραστικού (Span 60 ή Span 80) διαλυτοποιήθηκε σε σησαμέλαιο ή ελαιόλαδο στους 60°C, έτσι ώστε να σχηματισθεί η "ελαιώδης φάση". Οι δύο φάσεις γαλακτωματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας αναδευτήρα Eurostar 200 (IKA, Staufen, Germany). Το γαλάκτωμα αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, και στη συνέχεια προστέθηκε στάγδην, και υπό μηχανική ανάδευση, διάλυμα τολουολίου κορεσμένο σε γλουταραλδεΐδη. Το αιώρημα αφέθηκε για 24 ώρες υπό ανάδευση, έτσι ώστε να ολοκληρωθεί η διαδικασία διασύνδεσης της ζελατίνης. Τα μικροσφαιρίδια συλλέχθηκαν έπειτα από κοσκίνιση και πλύθηκαν κατά σειρά με διαιθυλαιθέρα, μεταδιθειώδες νάτριο 2% w/v σε νερό, απιονισμένο νερό και ακετόνη. Το τελικό προϊόν ξηράνθηκε στους 40°C, οπότε και προέκυψαν κόκκοι πορτοκαλοκίτρινης απόχρωσης, οι οποίοι αποθηκεύτηκαν σε κατάλληλους περιέκτες.

### Χαρακτηρισμός μικροσφαιριδίων ζελατίνης

#### A) Απόδοση εγκλεισμού, περιεκτικότητα σε δραστική ουσία και απόδοση διαδικασίας

Η περιεκτικότητα σε δραστική ουσία αξιολογήθηκε μετά από χώνεψη/διάρρηση (digestion) του περιβλήματος 5 mg μικροσφαιριδίων μέσα σε 5 mL PBS (pH=7,4), το οποίο περιείχε 2,5 mg τρυψίνης (υπό ανάδευση για 48 ώρες, 25±2°C). Μετά από φιλτράρισμα (0,22 μm nylon φίλτρα) και κατάλληλη αραιώση, προσδιορίστηκε η περιεκτικότητα σε DCF, χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο Υπεριώδους-ορατού (Hitachi, Tokyo, Japan) στα 275 nm. Η απόδοση εγκλεισμού (Entrapment Efficiency, EE), η περιεκτικότητα σε δραστική ουσία (Actual Drug Loading, ADL) και η απόδοση της διαδικασίας (Yield) υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τις ακόλουθες σχέσεις:

$$- EE (\%) = \frac{[\text{μάζα DCF στα μικροσφαιρίδια}]}{[\text{αρχική μάζα DCF}]} \times 100 \quad (1)$$

$$- ADL (\%) = \frac{[\text{μάζα DCF στα μικροσφαιρίδια}]}{[\text{μάζα μικροσφαιριδίων}]} \times 100 \quad (2)$$

$$- Yield (\%) = \frac{[\text{μάζα μικροσφαιριδίων}]}{[\text{αρχική μάζα συστατικών}]} \times 100 \quad (3)$$

Όλες οι παραπάνω μετρήσεις διεξήχθησαν εις τριπλούν και για τους περαιτέρω υπολογισμούς χρησιμοποιήθηκαν οι μέσες τιμές αυτών.

#### B) Κατανομή μεγέθους σωματιδίων

Η κατανομή μεγέθους σωματιδίων (Particle Size Distribution, PSD) προσδιορίστηκε με φασματοσκοπία συσχέτισης φωτονίων (Photon Correlation Spectroscopy, PCS) στον αναλυτή κατανομής μεγέθους σωματιδίων Malvern Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Malvern, UK). Τα σημαντικότερα δεδομένα που εξάγονται είναι η μέση διάμετρος των σωματιδίων ( $d_{50}$ ), καθώς και η ομοιομορφία (uniformity) της κατανομής, η οποία αποτελεί το μέτρο της απόλυτης απόκλισης από τη διάμεσο της κατανομής. Όλες οι μετρήσεις διεξήχθησαν στους 25°C και με γωνία οπισθοσκέδασης (back scattering angle) 90°. Τα δείγματα αναλύθηκαν υπό μορφή εναιωρήματος αμέσως μετά την παρασκευή τους, χρησιμοποιώντας νερό υψηλής καθαρότητας.

#### Γ) Στατιστική ανάλυση

Όσον αφορά τον πειραματικό σχεδιασμό κατά Plackett-Burman, έγινε έλεγχος υποθέσεων με ANOVA, ορίζοντας ως επίπεδο σημαντικότητας μία  $p$ -τιμή  $< 0,1$  προκειμένου να συμπεριληφθούν όλοι οι παράγοντες που έχουν σημαντική επίδραση σε αυτή την προκαταρκτική φάση διαχωρισμού παραγόντων (screening).

**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Στον **Πίνακα 1** παρουσιάζεται ο πειραματικός χώρος του σχεδιασμού κατά Plackett-Burman, όπου όλοι οι παράγοντες εξετάστηκαν σε δύο επίπεδα. Πιο συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν δύο τύποι ζελατίνης (τύπου Α και Β) με αριθμό Bloom 150 ή 225 για το καθένα, σε δύο επίπεδα συγκέντρωσης (750 και 500 mg ανά παρτίδα), καθώς και δύο είδη επιφανειοδραστικών ουσιών (Span 80 ή Span 60) σε δύο επίπεδα συγκέντρωσης (250 ή 500 mg ανά παρτίδα). Επιπρόσθετα, δοκιμάστηκαν δύο τύποι ελαίου (σησαμέλαιο και ελαιόλαδο) σε δύο επίπεδα συγκέντρωσης (25 και 50 mL ανά παρτίδα), σε δύο ταχύτητες (9.000 και 18.000 rpm) και χρόνους γαλακτωματοποίησης (5 και 10 λεπτά). Τέλος, η συγκέντρωση του κορεσμένου διαλύματος GTA-τολουολίου (το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τη διασύνδεση/σκλήρυνση των σχηματιζόμενων σφαιριδίων ζελατίνης) ελέγχθηκε σε δύο επίπεδα (2,5 και 5,0 mL ανά παρτίδα).

**Πίνακας 1.** Πειραματικός χώρος όπως προκύπτει κατά τη διαδικασία διαχωρισμού παραγόντων (screening) χρησιμοποιώντας πειραματικό σχεδιασμό κατά Plackett-Burman.

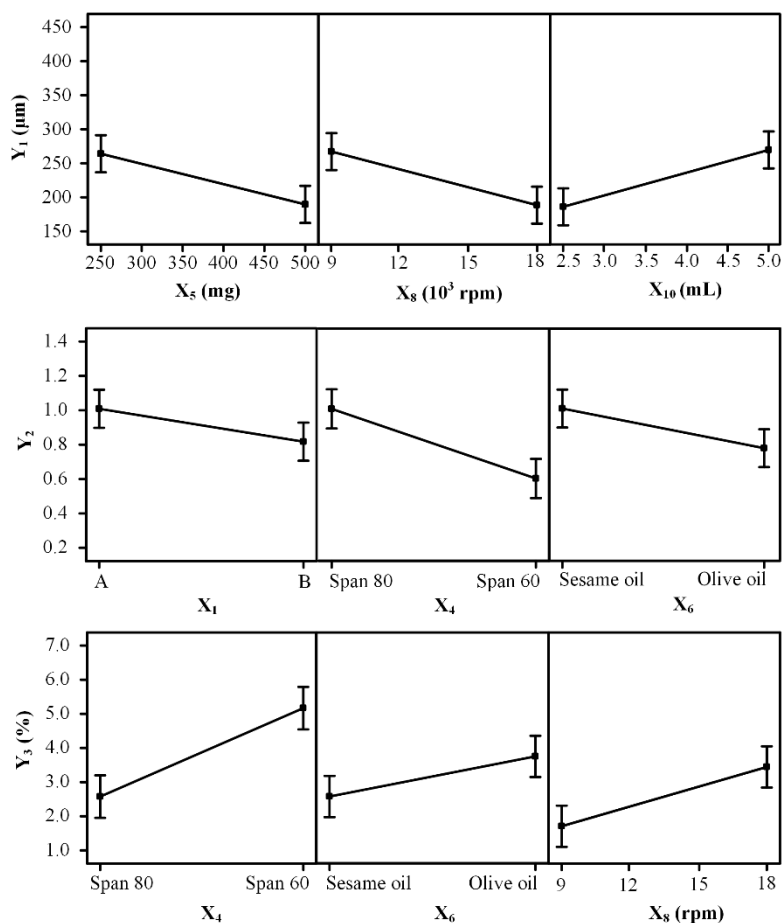
Κωδικός	Ανεξάρτητες μεταβλητές									
	Ζελατίνη			Επιφανειο-δραστικό		Ελαιώδης φάση		Γαλακτωματοποίηση		Κορεσμ. δ/μα GTA-τολουολίου (mL) (X <sub>10</sub> )
	Τύπος (X <sub>1</sub> )	Ποσότητα (mg) (X <sub>2</sub> )	Bloom (X <sub>3</sub> )	Τύπος (X <sub>4</sub> )	Ποσότητα (mg) (X <sub>5</sub> )	Τύπος (X <sub>6</sub> )	Ποσότητα (mL) (X <sub>7</sub> )	Ταχύτητα (rpm) (X <sub>8</sub> )	Χρόνος (min) (X <sub>9</sub> )	
F1	A	750	150	Span 80	500	Σησαμέλαιο	50	18.000	10	2,5
F2	B	500	150	Span 60	500	Σησαμέλαιο	50	18.000	5	5,0
F3	B	750	150	Span 60	250	Ελαιόλαδο	25	18.000	10	2,5
F4	B	750	150	Span 80	500	Ελαιόλαδο	25	9.000	5	5,0
F5	A	500	150	Span 60	250	Σησαμέλαιο	25	9.000	5	2,5
F6	B	500	225	Span 80	500	Σησαμέλαιο	25	9.000	10	2,5
F7	B	750	225	Span 60	250	Σησαμέλαιο	50	9.000	10	5,0
F8	B	500	225	Span 80	250	Ελαιόλαδο	50	18.000	5	2,5
F9	A	750	225	Span 80	250	Σησαμέλαιο	25	18.000	5	5,0
F10	A	750	225	Span 60	500	Ελαιόλαδο	50	18.000	5	2,5
F11	A	500	225	Span 60	500	Ελαιόλαδο	25	18.000	10	5,0
F12	A	500	150	Span 80	250	Ελαιόλαδο	50	9.000	10	5,0

Ο **Πίνακας 2** συνοψίζει τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τη μελέτη διαχωρισμού των σημαντικών από τους μη σημαντικούς παράγοντες (screening design). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μέση διάμετρος των σωματιδίων (Y<sub>1</sub>) κυμάνθηκε από 151,30 μm (Πείραμα F6) έως 400,86 μm (Πείραμα F7), ενώ το μέτρο της ομοιομορφίας του μεγέθους των σωματιδίων (Y<sub>2</sub>) κυμάνθηκε από 0,391 (Πείραμα F10) έως 1,250 (Πείραμα F9), και η περιεκτικότητα σε δραστική ουσία (Y<sub>3</sub>) παρουσίασε διακύμανση από 2,31% (Πείραμα F1) έως 6,70% (Πείραμα F11).

**Πίνακας 2.** Μέση διάμετρος σωματιδίων (d<sub>50</sub>), ομοιομορφία (uniformity) και περιεκτικότητα σε δραστική ουσία (ADL) των συνθέσεων από τον σχεδιασμό Plackett-Burman.

Κωδικός	Y <sub>1</sub> : d <sub>50</sub> (μm)	Y <sub>2</sub> : Uniformity	Y <sub>3</sub> : ADL (%)	Κωδικός	Y <sub>1</sub> : d <sub>50</sub> (μm)	Y <sub>2</sub> : Uniformity	Y <sub>3</sub> : ADL (%)
F1	178,46	0,772	2,31	F7	400,86	0,357	5,10
F2	202,38	0,524	6,25	F8	180,18	0,630	6,28
F3	161,06	0,552	3,77	F9	216,44	1,250	4,06
F4	257,37	0,409	2,55	F10	162,86	0,391	5,33
F5	275,41	0,434	3,94	F11	185,27	0,463	6,70
F6	151,30	0,925	1,57	F12	350,12	0,829	3,06

Αξιολογήθηκε επίσης το είδος της επίδρασης κάθε παράγοντα στην εκάστοτε απόκριση (συνεργιστική ή ανταγωνιστική) με τη βοήθεια των διαγραμμάτων κύριων επιδράσεων (main effect plots, **Σχήμα 1**). Όσον αφορά την τιμή  $Y_1$  (μέγεθος σωματιδίων), η αυξημένη συγκέντρωση επιφανειοδραστικού ( $X_5$ ) φαίνεται να οδηγεί σε μείωση του μεγέθους των σφαιριδίων, πράγμα αναμενόμενο, αφού και τα δύο επιφανειοδραστικά δρουν ως παράγοντες γαλακτωματοποίησης, η συγκέντρωση των οποίων - μέχρι μία κρίσιμη τιμή - μειώνει το μέγεθος των σταγονιδίων (αύξηση της συγκέντρωσης του επιφανειοδραστικού πέρα από αυτό το κρίσιμο σημείο έχει ως αποτέλεσμα αύξηση του ιξώδους, το οποίο οδηγεί σε μεγαλύτερα σταγονίδια). Παρόμοια συνεργιστική δράση παρατηρήθηκε και κατά την εξέταση επίδρασης της ταχύτητας γαλακτωματοποίησης ( $X_8$ ), όπου αυξημένη ταχύτητα οδήγησε σε μικρότερο μέγεθος σωματιδίων. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στην υψηλή διάτμηση (προϊόν της έντονης ανάδευσης). Εν αντιθέσει με τους παράγοντες  $X_5$  και  $X_8$ , η αύξηση της ποσότητας κορεσμένου διαλύματος GTA-τολουολίου ( $X_{10}$ ), οδήγησε σε αύξηση του μεγέθους των μικροσφαιριδίων, πιθανόν λόγω της αύξησης του ιξώδους που οδηγεί σε σύμπτυξη σταγονιδίων. Από το **Σχήμα 1** φαίνεται ότι η ομοιομορφία ( $Y_2$ ) ευνοείται όταν κατά την παραγωγή των μικροσφαιριδίων χρησιμοποιείται ζελατίνη τύπου Β, Span 60 και ελαιόλαδο. Η χρήση Span 60, καθώς και η έντονη γαλακτωματοποίηση (αυξημένη ταχύτητα ομογενοποίησης) έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του ADL ( $Y_3$ ). Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να αποδοθεί εν μέρει στις τιμές Υδροφιλής-Λιπόφιλης Ισορροπίας (Hydrophilic-Lipophilic Balance, HLB) των συστατικών της ελαιώδους φάσης (δηλαδή των ελαίων και επιφανειοδραστικών), οδηγώντας σε πιο σταθερά σταγονίδια στην περίπτωση του Span 60 (οι τιμές HLB του Span 60, του Span 80, του ελαιόλαδου και του σησαμέλαιου είναι 4,7, 4,3, 7,0 και 7,0 αντίστοιχα), ενώ στη δεύτερη περίπτωση η αυξημένη διάτμηση βελτιώνει την αιώρηση των σταγονιδίων, εμποδίζοντας τη διαφυγή της δραστικής ουσίας από αυτά, έως ότου ολοκληρωθεί η διαδικασία σκλήρυνσης/διασταύρωσης.



**Σχήμα 1.** Διαγράμματα κύριων παραγόντων κατά τη φάση διαχωρισμού παραγόντων (screening).

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στόχος της μελέτης ήταν η δημιουργία φορέων εγκλεισμού ΜΣΑΦ κατάλληλων για ενδοαρθρική χορήγηση. Για την αξιολόγηση της καταλληλότητας ενός τέτοιου φορέα λήφθηκαν υπ' όψιν τρεις καθοριστικοί παράγοντες: (1) το μέγεθος των σωματιδίων, (2) η ομοιομορφία της κατανομής του μεγέθους των σωματιδίων και (3) η περιεκτικότητα σε δραστική ουσία.

Ιδανικά, τα προοριζόμενα για ενδοαρθρική χορήγηση σωματίδια πρέπει να είναι της τάξεως μερικών μικρομέτρων, και αυτό γιατί ενώ πολύ μικρά σωματίδια εγχέονται ευκολότερα, εντούτοις απομακρύνονται εξίσου εύκολα από την αρθρική κοιλότητα. Στον αντίποδα, πολύ μεγαλύτερα σωματίδια θα φαγοκυτταρώνονταν από τα μακροφάγα του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι υψηλή συγκέντρωση ζελατίνης ( $X_5$ ), υψηλή ταχύτητα γαλακτωματοποίησης ( $X_8$ ), καθώς και χαμηλή συγκέντρωση GTA ( $X_{10}$ ) οδηγούν προς τη σωστή κατεύθυνση. Επιπρόσθετα, φαίνεται ότι ο τύπος της ζελατίνης ( $X_1$ ), του επιφανειοδραστικού ( $X_4$ ) και της ελαιώδους φάσης ( $X_6$ ) επηρεάζουν σημαντικά την κατανομή του μεγέθους των μικροσφαιριδίων. Τέλος, όσον αφορά την αύξηση της απόδοσης εγκλεισμού της δραστικής ουσίας, αυτή επιτεύχθηκε με χρήση Span 60, αντί Span 80 ως επιφανειοδραστικού ( $X_4$ ), ελαιόλαδου αντί σησαμέλαιου ως ελαιώδη φάση ( $X_6$ ), καθώς και με την εφαρμογή υψηλής ταχύτητας γαλακτωματοποίησης ( $X_8$ ).

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Οι συγγραφείς εκφράζουν θερμές ευχαριστίες προς τον Επίκ. Καθ. κ. Χ. Χατζηδούκα του Εργαστηρίου Β' Χημικής Μηχανικής του Τμήματος Χημικών Μηχανικών Α.Π.Θ. για την πρόσβαση στον αναλυτή κατανομής μεγέθους σωματιδίων Mastersizer 2000 (Malvern Instruments).

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] L.J. Crofford. Arthritis Res Ther. 15(3) (2013) S2.
- [2] M.R. Griffin. Am J Med. 104(3) (1998) 23-29.
- [3] C. Larsen, J. Ostergaard, S.W. Larsen, H. Jensen, S. Jacobsen, C. Lindegaard, P.H. Andersen. J Pharm Sci. 97(11) (2008) 4622-4654.
- [4] A. Fernandez-Carballido, R. Herrero-Vanrell, I.T. Molina-Martinez, P. Pastoriza. Int J Pharm. 279 (2004) 33-41.
- [5] M. Saravanan, K. Bhaskar, G. Maharajan, K.S. Pillai. J Drug Target. 19 (2011) 96-103.
- [6] D.A. El-Setouhy, N.S. Abdelmalak, S.E. Anis, D. Louis. Int J Pharm. 495 (2015) 664-670.
- [7] A.O. Elzoghby. J Control Release. 172 (2013) 1075-1091.
- [8] A. Bigi, G. Cojazzi, S. Panzavolta, N. Roveri, K. Rubini. Biomaterials. 23 (2002) 4827-4832.