

Η ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΗ ΚΟΙΛΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΗΡΕΙ ΝΑΝΟΦΟΡΕΙΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΣ ΕΚΤΕΤΑΜΕΝΗ ΤΟΠΙΚΗ ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ**A. Μαραζιώτη^{1,*}, Κ. Παπαδιά², Α. Γιάννου³, Γ.Θ. Σταθόπουλος³, Σ.Γ. Αντιμησιάρη^{1,2}**¹ ΙΤΕ/ΙΕΧΜΗ, Πάτρα, Ελλάδα² Εργαστήριο Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πάτρα, Ελλάδα³ Εργαστήριο Μοριακής Καρκινογένεσης Αναπνευστικού, Τμήμα Ιατρικής, Πάτρα, Ελλάδα(*amarazioti@upatras.gr)**ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Τα λιποσώματα είναι γνωστά για τις πιθανές εφαρμογές τους ως αποτελεσματικοί συνθετικοί νανοφορείς για την χορήγηση φαρμάκων, μέσω της πλέον συνηθισμένης οδού χορήγησης μέχρι τώρα που είναι η ενδοφλέβια χορήγηση. Λίγα είναι γνωστά για τα πιθανά θεραπευτικά πλεονεκτήματα καθώς και για τη παραμονή τοπικά χορηγούμενων νανοφορέων σε περιορισμένες κοιλότητες του σώματος. Στην παρούσα μελέτη παρακολουθήθηκε η παραμονή διαφόρων τύπων λιποσωμάτων στην υπεζωκοτική κοιλότητα μετά από την τοπική χορήγηση τους με απεικόνιση βιοφθορισμού ζωντανών ποντικών. Παρασκευάστηκαν διαφορετικοί τύποι λιποσωμάτων με διάφορες λιπιδικές συνθέσεις, που όλα έχουν ενσωματώσει την χρωστική DiR στη λιπιδική τους μεμβράνη, χαρακτηρίστηκαν φυσικοχημικά και εγχύθηκαν ενδουπεζωκοτικά σε υγιή ποντίκια και σε ποντίκια με κακοήγη υπεζωκοτική συλλογή. Η σωματική κατανομή του DiR απεικονίστηκε με την μέθοδο του βιοφθορισμού. Τα αποτελέσματα αποκαλύπτουν ότι συγκεκριμένες παράμετροι παρασκευής των λιποσωμάτων, όπως το μέγεθος / το πλήθος των στοιβάδων του λιποσώματος και η επικάλυψη με PEG-λιπίδια, επηρεάζουν σημαντικά την τοπική βιοδιαθεσιμότητα των λιποσωμάτων. Ωστόσο, ο σημαντικότερος παράγοντας που παρατείνει την παραμονή των συνθετικών νανοφορέων στην υπεζωκοτική κοιλότητα ήταν η ενέσιμη δόση λιπιδίων. Προχωρώντας ένα βήμα παραπέρα, χορηγήσαμε ενδουπεζωκοτικά μια λιποσωμική μορφή του Deltarasin, ενός νέου αναστολέα του μεταλλαγμένου KRAS, σε ένα πειραματικό μοντέλο κακοήθους υπεζωκοτικής συλλογής (ΚΥΣ) ποντικού. Μία εφάπαξ ένεση ήταν αρκετή για να σταματήσει την ανάπτυξη ΚΥΣ σε ποντικούς, υποδεικνύοντας τη δυνατότητα αυτής της οδού χορήγησης λιποσωμάτων ως μια μέθοδο για να αυξηθεί δραματικά το θεραπευτικό δυναμικό των νανοφαρμάκων για τοπικές ασθένειες.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα λιποσώματα είναι γνωστά για τις πιθανές εφαρμογές τους ως αποτελεσματικοί φορείς για την στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων^[1]. Από τα διαθέσιμα σήμερα λιποσωμικά φάρμακα και αυτά που βρίσκονται κάτω από κλινικές δοκιμές, τα περισσότερα προορίζονται για ενδοφλέβια χορήγηση^[2]. Σήμερα λίγα είναι γνωστά για τα θεραπευτικά πλεονεκτήματα των τοπικά χορηγούμενων λιποσωμάτων και ειδικότερα της παραμονής τους στην επιθυμητή περιοχή μετά τη χορήγηση σε περιορισμένες κοιλότητες του σώματος, περιορίζοντας τις πιθανές εφαρμογές τους. Μία περιοχή για τοπική χορήγηση λιποσωμικών φαρμάκων είναι η υπεζωκοτική κοιλότητα. Η ενδουπεζωκοτική χορήγηση ουσιών είναι μια στοχευμένη στον υπεζωκότα, καινοτόμος θεραπευτική στρατηγική για το μεσοθηλίωμα, η οποία μπορεί να εφαρμοστεί ως οδός χορήγησης φαρμάκου που ελαχιστοποιεί την συστηματική τοξικότητα^[6]. Πράγματι, η άμεση έγχυση στην υπεζωκοτική κοιλότητα (ΥΚ) φαρμάκων μπορεί να έχει αρκετά θεραπευτικά πλεονεκτήματα. Εκτός από την παροχή υψηλών συγκεντρώσεων δραστικών ενώσεων για να στοχεύσουν τις προφλεγμονώδεις δραστηριότητες των υπεζωκοτικών μεσοθηλιακών κυττάρων (PMCs)^[4], μπορεί επίσης να καθυστερήσει ή / και να μειώσει τη συστηματική απορρόφηση, ελαχιστοποιώντας τη συστηματική τοξικότητα και αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου έναντι του μεσοθηλιώματος και άλλων κακοηθειών^[5]. Πράγματι, η ενδουπεζωκοτική χορήγηση έχει αποδειχθεί ότι δίνει υψηλότερες και παρατεταμένες συγκεντρώσεις φαρμάκου σε

βρογχοκυψελικά εκπλύματα και σε ενδουπεζωκοτικά υγρά συγκριτικά με τον ορό του αίματος^[6-7], και επίσης να διευρύνει τον αποτελεσματικό θεραπευτικό δείκτη των φαρμάκων βελτιώνοντας την ανοχή του ασθενούς.

Όσον αφορά την πρακτική εφαρμογή των παραπάνω, οι λιγότερο επεμβατικές μέθοδοι πρόσβασης στον υπεζωκοτικό χώρο, όπως οι υπεζωκοτικοί καθετήρες, θα μπορούσαν να καταστήσουν την ενδουπεζωκοτική χορήγηση ως μια βιώσιμη επιλογή για τους ασθενείς^[9]. Ωστόσο, η ενδουπεζωκοτική χορήγηση δεν είναι απόλυτα μη τοξική δεδομένου ότι υψηλές δόσεις φαρμάκων στην υπεζωκοτική κοιλότητα έχουν αναφερθεί προηγουμένως ότι προκαλούν συγκόλληση των υπεζωκοτικών τοιχωμάτων^[5]. Με αυτόν τον τρόπο, μεθοδολογίες που θα μπορούσαν να διατηρήσουν την απελευθέρωση φαρμάκων στην υπεζωκοτική κοιλότητα, αποφεύγοντας την παρουσία υψηλών και δυνητικά τοξικών συγκεντρώσεων φαρμάκου, μπορούν να πραγματοποιήσουν ένα βέλτιστο θεραπευτικό αποτέλεσμα. Ένας πιθανός τρόπος για να επιτευχθεί αυτό θα μπορούσε να είναι η τοπική χορήγηση των λιποσωμικών φαρμάκων.

ΣΤΟΧΟΙ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Η χορήγηση λιποσωμάτων ή οποιουδήποτε άλλου τύπου νανοσωματιδίων με ενδουπεζωκοτική έγχυση δεν είναι μια κοινή πρακτική στην θεραπευτική και επομένως λίγα είναι γνωστά για τη παραμονή τους στην υπεζωκοτική κοιλότητα καθώς και τη βιοκατανομή τους. Βασιζόμενοι σε προηγούμενες δημοσιευμένες μελέτες που υποδεικνύουν υψηλά θεραπευτικά πλεονεκτήματα της άμεσης υπεζωκοτικής χορήγησης λιποσωμικών φαρμάκων και στο κενό που υπάρχει στη βιβλιογραφία σχετικά με τη παραμονή των λιποσωμάτων στην περιοχή αυτή και πώς αυτό μπορεί να επηρεαστεί από τις διάφορες ιδιότητες των λιποσωμάτων καθώς και από την εξέλιξη της ασθένειας, σχεδιάσαμε και πραγματοποιήσαμε την παρούσα μελέτη. Χρησιμοποιήσαμε σημασμένα με DiR λιποσώματα και το σύστημα βιοφωταύγειας σε ζωντανά ποντίκια (live animal imaging) προκειμένου να παρακολουθηθεί η παραμονή διαφορετικών τύπων λιποσωμάτων στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Χρησιμοποιήθηκαν υγιείς ποντικοί και ποντικοί με εγκατεστημένους υπεζωκοτικούς όγκους και συνοδευόμενο σχηματισμό κακοήθους υπεζωκοτικού υγρού, προκειμένου να εξεταστεί η πιθανή επίδραση της φλεγμονώδους νόσου στη παραμονή των λιποσωμάτων.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Παρασκευή λιποσωμάτων. Πολυστοιβαδικά (MLV) και μικρά μονοστοιβαδικά λιποσωμικά κυστίδια (SUV) παρασκευάστηκαν με την μέθοδο ενυδάτωσης λεπτού λιπιδικού υμενίου^[10-11]. Η ενυδάτωση του λιπιδίου έγινε με διάλυμα PBS. Η ενσωμάτωση του DiR στο λιπόσωμα έγινε με την προσθήκη αυτού στο αρχικό μείγμα λιπιδίων. Η προετοιμασία των SUV έγινε με υπερήχηση των MLV λιποσωμάτων (ακίδα υπερήχων). Τα DRV (dehydration-rehydration) λιποσώματα παρασκευάστηκαν από τα άδεια σημασμένα με DiR SUVs. Η μείωση του μεγέθους των λιποσωμάτων έγινε με την διαδικασία της εξώθησης περνώντας τα μέσα από πολυκαρβονικά φίλτρα με διάμετρο πόρων 400 και 100nm. Η ποσότητα του μη ενσωματωμένου DiR απομακρύνθηκε με υπερφυγοκέντρηση (2x60 min at 60.000rpm, Sorvall WX90 Ultra).

Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός λιποσωμάτων. Η λιπιδική συγκέντρωση των λιποσωμάτων μετρήθηκε με την χρωματογραφική μέθοδο Stewart, και η δόση προσαρμόστηκε ανάλογα με το πείραμα. Όλα τα λιποσώματα χαρακτηρίστηκαν για το μέγεθος και το ζ δυναμικό τους, όπως έχει προηγουμένως αναφερθεί^[10-11]. Συγκεκριμένα, υπολογίστηκε η μέση υδροδυναμική διάμετρος και ο δείκτης πολυδιασποράς στα εναιωρήματα των λιποσωμάτων με την τεχνική DLS (dynamic light scattering). Στα ίδια δείγματα μετρήθηκε και το ζ δυναμικό με τη χρήση ροομετρίας laser Doppler.

Μοντέλα ποντικών και ενδουπεζωκοτική χορήγηση των λιποσωμάτων. Όλες οι διαδικασίες που χρησιμοποιήθηκαν για τη φροντίδα των ζώων και το πειραματισμό τους εγκρίθηκαν από το Γραφείο Κτηνιατρικής Διοίκησης της Νομαρχίας Αχαΐας και από την επιτροπή βιοηθικής του Πανεπιστημίου Πατρών και διεξήχθησαν σύμφωνα με την Οδηγία 86/609 / ΕΟΚ της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τα πειραματόζωα. Στους FVB ποντικούς διεξήχθησαν δύο ομάδες πειραμάτων προκειμένου να καθοριστεί η μέγιστη διάρκεια της ακριβούς παρακολούθησης της παραμονής του λιποσωμικού-DiR στην υπεζωκοτική κοιλότητα μετά από ενδουπεζωκοτική έγχυση σε δύο διαφορετικές δόσεις λιπιδίου. Οι ενδουπεζωκοτικές ενέσεις έγιναν υπό άμεση στερεοσκοπική μικροσκοπία μέσω μίας μικρής τομής στο αριστερό προσθιοπλευρικό δέρμα και περιτονίας του θώρακα. Για το σκοπό αυτό, μία σύριγγα προωθήθηκε στον υπεζωκοτικό χώρο υπό γωνία 45 ° υπό άμεση επαφή με την ανώτερη πλευρά και τα καρκινικά κύτταρα καθώς και τα λιποσωμικά σκευάσματα εγχύθηκαν υπό άμεση οπτική επιθεώρηση, όπως περιγράφηκε προηγουμένως^[12]. Στην πρώτη πειραματική ομάδα χορηγήθηκαν ενδουπεζωκοτικά 150μg/ζώο MLV και SUV λιποσώματα διαφορετικών λιπιδικών συνθέσεων προκειμένου να εκτιμηθεί η επίδραση του μεγέθους των λιποσωμάτων, του αρνητικού φορτίου και της επιφανειακής επικάλυψης με PEG, στη διάρκεια παραμονής τους στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Τα ζώα απεικονίστηκαν (IVIS Lumina II imager; Perkin Elmer, Santa Clara, CA) πριν και αμέσως μετά την ένεση, καθώς και στις 0.5, 2.5 και 4.5 μέρες μετά την ένεση. Στο δεύτερο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 2 mg (λιποσωματικό λιπίδιο) ανά ζώο και χρησιμοποιήθηκαν δύο λιπιδικές συνθέσεις για να αξιολογηθεί η επίδραση της προσθήκης αρνητικού φορτίου στη λιποσωματική μεμβράνη, στη παραμονή του λιποσωματικού-DiR στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Τα ζώα απεικονίστηκαν πριν και αμέσως μετά την έγχυση, καθώς και 7 ημέρες, 12 ημέρες και 24 ημέρες μετά την ένεση. Για την ανάπτυξη κακοήθους υπεζωκοτικής συλλογής χρησιμοποιήθηκαν C57BL/6 ποντίκια στα οποία εγχύθηκαν ενδουπεζωκοτικά καρκινικά κύτταρα MC38 (colon adenocarcinoma), και αφέθηκαν για 4 μέρες ώστε να αρχίσουν να σχηματίζονται οι υπεζωκοτικοί όγκοι. Στη συνέχεια στα ποντίκια έγινε ενδουπεζωκοτική έγχυση λιποσωμικού-DiR (2mg/ζώο). Τα ζώα απεικονίστηκαν πριν και αμέσως μετά την έγχυση, καθώς και 1, 3, 6 και 8 ημέρες μετά την λιποσωμική ένεση. Τα ποντίκια θανατώθηκαν στις 14 μέρες για ex vivo απεικόνιση των οργάνων και για ανάλυση των όγκων και του υπεζωκοτικού υγρού. Οι εικόνες αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το Living Image v4.2 software (Perkin Elmer, Santa Clara, CA). Συγκεκριμένα, δημιουργήθηκαν καθορισμένες περιοχές ενδιαφέροντος (ROI), που αντιστοιχούν στην περιοχή του χώρου της ένεσης και τοποθετήθηκαν σε όλες τις εικόνες που αποκτήθηκαν με ομοιόμορφο τρόπο. Στη συνέχεια μετρήθηκε η ροή φωτονίων σε αυτές τις περιοχές και συγκρίθηκε μεταξύ ποντικών που έλαβαν διαφορετικές θεραπείες. Σε όλες τις περιπτώσεις, το ROI του υποβάθρου (background) που μετρήθηκε για το συγκεκριμένο ζώο πριν την ένεση αφαιρέθηκε από το σήμα κάθε χρονικού σημείου που αποκτήθηκε.

Στατιστική Ανάλυση. Όλα τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσες τιμές \pm την τυπική απόκλιση από τουλάχιστον 3 διαφορετικά πειράματα. Η στατιστική ανάλυση έγινε με two-way-ANOVA ακολουθούμενη από Bonferroni post hoc tests.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήσαμε το δυναμικό των λιποσωμάτων να παραμένουν στην υπεζωκοτική κοιλότητα, μετά από τοπική χορήγησή τους. Τα τρέχοντα πειραματικά αποτελέσματα αποκαλύπτουν ότι ορισμένες παρασκευαστικές παράμετροι του λιποσώματος, όπως το μέγεθος λιποσώματος και η επικάλυψη λιποσωμάτων με PEG, επηρεάζουν σημαντικά τη παραμονή των λιποσωμάτων στην υπεζωκοτική κοιλότητα, αφού τα SUV και τα επικαλυμμένα με PEG λιποσώματα SUV παραμένουν στη θέση έγχυσης σε σημαντικά υψηλότερα ποσοότητες σε σύγκριση με τα MLV και τα μη επικαλυμμένα με PEG λιποσώματα SUV, αντίστοιχα. Η υψηλότερη παραμονή των επικαλυμμένων με PEG λιποσωμάτων πιθανότατα σχετίζεται με την καλά

τεκμηριωμένη υψηλότερη ακεραιότητα που προσδίδεται στα λιποσώματα όταν αυτά είναι επικαλυμμένα με υδρόφιλα πολυμερή, όπως το PEG^[13].

Η χαμηλότερη παραμονή των συγκριτικά μεγάλων λιποσωμάτων MLV μπορεί να αποδοθεί στην ευκολότερη και ταχύτερη αλληλεπίδρασή τους με τα μακροφάγα που υπάρχουν στην περιοχή, λόγω της χαμηλότερης καμπυλότητας των MLV (σε σύγκριση με τα μικρότερα λιποσώματα SUV και DRV). Αντίθετα με την επίδραση του PEG και του μεγέθους, η προσθήκη ενός αρνητικά φορτισμένου λιπιδίου στη μεμβράνη των DiR-λιποσωμάτων δεν είχε καμία επίδραση στη παραμονή του λιποσωμικού-DiR στο σημείο της ένεσης. Τα ουδέτερα και αρνητικά φορτισμένα λιποσώματα έδειξαν παρόμοια κινητική. Επιπρόσθετα, όταν η μεγαλύτερη δόση των 2 mg λιποσωματικού λιπιδίου εγχύθηκε στα ποντίκια, περισσότερο από το 20% του εγχυόμενου λιποσωμικού-DiR ήταν ακόμα στη θέση της έγχυσης μετά από 24 μέρες.

Τα αποτελέσματά μας επιβεβαιώνουν ότι το λιποσωμικό-DiR διατηρείται στην υπεζωκοτική κοιλότητα για παρατεταμένες χρονικές περιόδους. Με αυτόν τον τρόπο εάν τα λιποσωμικά σκευάσματα φαρμάκων είναι σταθερά (και το φάρμακο δεν απελευθερώνεται ταχέως από τα λιποσώματα) η παραμονή τους στην κοιλότητα θα πρέπει επίσης να διατηρείται. Παρόλα αυτά, η σταθερότητα των λιποσωμάτων στο φυσιολογικό υπεζωκοτικό υγρό των ποντικών είναι πιθανώς πολύ διαφορετική από αυτή στην κακοήθη υπεζωκοτική συλλογή, λόγω των γνωστών διαφορών τόσο στον όγκο τους όσο και στις συνθέσεις τους^[14]. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι, όπως σαφώς καταδεικνύεται από τα αποτελέσματά μας το χρονικό πλαίσιο της παραμονής του λιποσωμικού-DiR ήταν παρόμοιο σε ποντίκια με κακοήθη υπεζωκοτική συλλογή και σε υγιή ποντίκια, αποδεικνύοντας ότι τουλάχιστον στην περίπτωση των λιποσωμάτων SUV επικαλυμμένων με PEG (και σημασμένων με τον λιπόφιλο ιχνηλάτη DiR), η παρουσία της υπεζωκοτικής συλλογής δεν επηρεάζει τη παραμονή τους στην υπεζωκοτική κοιλότητα.

Τέλος, η πολύ υψηλή συσσώρευση του λιποσωμικού-DiR στους όγκους που αναπτύσσονται στα ποντίκια με κακοήθη υπεζωκοτική συλλογή είναι ιδιαίτερα σημαντική για την παροχή και την αποτελεσματικότητα ενός χημειοθεραπευτικού φαρμάκου. Πράγματι, η υψηλή συσσώρευση των λιποσωμάτων SUV στους εντοπισμένους όγκους εξηγεί και το υψηλό θεραπευτικό αποτέλεσμα που παρατηρήσαμε μετά την ενδουπεζωκοτική χορήγηση μίας δόσης λιποσωμικού Deltarasin και υπογραμμίζει το μεγάλο δυναμικό τέτοιων τοπικά εγχυμένων λιποσωμικών φαρμάκων στην θεραπεία τοπικών κακοηθειών, όπως το μεσοθηλίωμα.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματά μας αποδεικνύουν την παρατεταμένη παραμονή των λιποσωμάτων στην υπεζωκοτική κοιλότητα μετά από ενδουπεζωκοτική χορήγηση, ακόμη και στην περίπτωση της κακοήθους υπεζωκοτικής συλλογής, καθώς και την υψηλή αποτελεσματικότητα στόχευσης των υπεζωκοτικών όγκων από τα εγχυόμενα λιποσώματα. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν υψηλό δυναμικό για παρατεταμένη παραμονή στην υπεζωκοτική κοιλότητα των λιποσωμικών φαρμάκων που χορηγούνται ενδουπεζωκοτικά καθώς και υψηλό θεραπευτικό δυναμικό για τη θεραπεία τοπικών ασθενειών, αποδεικνύοντας ότι η απελευθέρωση του φαρμάκου από τα λιποσώματα είναι ελεγχόμενη.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Μέρος αυτής της εργασίας χρηματοδοτήθηκε από το Ίδρυμα Σταύρος Νιάρχος στο πλαίσιο του έργου ARCHERS ("Πρώθηση του Ανθρώπινου Κεφαλαίου των Νέων Ερευνητών σε τεχνολογίες αιχμής για τη διατήρηση της πολιτιστικής κληρονομιάς και την αντιμετώπιση των κοινωνικών προκλήσεων").



ΙΔΡΥΜΑ ΣΤΑΥΡΟΣ ΝΙΑΡΧΟΣ
STAVROS NIARCHOS FOUNDATION

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] S. Antimisiaris, S. Mourtas, K. Papadia. International Journal of Pharmaceutics (2017) 293-31.
- [2] U. Bulbake, S. Doppalapudi, N. Kommineni, W. Khan. Pharmaceutics (2017) 12.
- [3] MA. Jantz, VB. Antony. Pleural fibrosis. Clin. Chest Med. (2006) 181–191.
- [4] DA. Haber, AJ. Buckler, T. Glaser et al. Cell (1990) 1257–1269.
- [5] Y. Tada, K. Hiroshima, H. Shimada et al. SpringerPlus (2016)195.
- [6] KK. Mubarak, A. Montes-Worboys, D. Regev et al. Eur Respir J (2012) 133–140.
- [7] Y.Tohda, T. Iwanaga, M. Takada et al. Chemotherapy (1999) 197-204.
- [8] L. Greillier, S. Monjanel-Mouterde, A. Fraticelli et al. Journal of Thoracic Oncology (2009) 3.
- [9] T. Jomgeow, Y. Oji, N. Tsuji et al. Cancer Sci (2006) 259–270.
- [10] E. Markoutsas, K. Papadia, AD. Giannou. et al. Pharm Res (2014) 1275-1289.
- [11] K. Papadia, AD. Giannou, E. Markoutsas et al. Eur J Pharm Sciences (2017) 180-187.
- [12] A. Marazioti, I. Lilis, M. Vreka, H. Apostolopoulou et al. Nat Comms (2018) 672.
- [13] AH.Matloob, S. Mourtas, P. Klepetsanis, SG. Antimisiaris. Inter J Pharmaceutics (2014) 108-115.
- [14] A. Marazioti, CA. Kairi, M. Spella et al. PLoS One (2013) e71207.