

ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΔΙΑΣΥΝΔΕΔΕΜΕΝΩΝ ΜΕ PEG-ΔΙΘΕΙΟΛΗ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ

**Σταύρος Κρεμεζής¹, Γιώργος Κουρμουλάκης¹, Σπυρίδων Μουρτάς^{1,2}, Σοφία Γ.
Αντιμησιάρη^{1,2}**

¹ Εργαστήριο Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο
Πατρών, Ρίο Πάτρας, Ελλάδα

² Ινστιτούτο Επιστημών Χημικής Μηχανικής, FORTH/ICE-HT, Πλατάνι Πάτρας, Ελλάδα
e-mail: stauros_chemeng@yahoo.com

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα λιποσώματα είναι μικροσκοπικά σφαιρικά σωματίδια που αποτελούνται κυρίως από φωσφολιπίδια και χοληστερόλη και χρησιμοποιούνται ως φορείς για τη χορήγηση φαρμάκων.

Για την τοπική χορήγηση λιποσωμικών φαρμάκων απαιτείται η ρύθμιση των ρεολογικών ιδιοτήτων τους, η οποία μπορεί να επιτευχθεί με την ενσωμάτωσή τους σε γέλες (λιποσωμικές γέλες). Για την επιτυχή παρασκευή σταθερών λιποσωμικών γελών είναι απαραίτητη η μελέτη της χημικής διασύνδεσης λιποσωμάτων με κατάλληλα πολυμερή τα οποία μπορεί να σχηματίσουν γέλες.

Σε προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριό μας συντέθηκαν παράγωγα PEG-διθειόλης τα οποία στη συνέχεια αντέδρασαν επιτυχώς μέσω Michael προσθήκης με ομάδες μαλεϊμιδίου ενσωματωμένες σε λιποσώματα ως λιπίδιο-peg-μαλεϊμίδιο. Από την αντίδραση αυτή προέκυψαν νέες διασυνδεδεμένες μέσω θειοαιθερικού δεσμού λιποσωμικές δομές, στις οποίες οι θειολ-ομάδες της PEG-διθειόλης είχαν αντιδράσει με τις ομάδες μαλεϊμιδίου των λιποσωμάτων.

Στην παρούσα εργασία παρασκευάσθηκαν λιποσώματα στα οποία ενσωματώθηκαν μόρια λιπιδίου-μαλεϊμιδίου, τα οποία στη συνέχεια αντέδρασαν ως ανωτέρω με μόρια PEG-διθειόλης και μελετήθηκαν: (α) τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των νέων μορφών (μέγεθος, δείκτης πολυδιασποράς (PDI) και ζ-δυναμικό) και (β) η ακεραιότητά τους σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) και βόειο ορό (FBS). Για τη συγκριτική μελέτη ακεραιότητας των νέων λιποσωμικών μορφών έγινε παρασκευή λιποσωμάτων (με και χωρίς [control] λιπίδιο-peg-μαλεϊμίδιο) στα οποία είχε εγκλωβιστεί καλσεΐνη, ακολούθησε αντίδραση των λιποσωμάτων με την peg-διθειόλη και στη συνέχεια έγινε η μελέτη ακεραιότητας των διασυνδεδεμένων λιποσωμικών δομών, με μέτρηση της συγκράτησης της καλσεΐνης σε αυτά, κατά την επώασή τους στους 37°C (σε PBS και ορό) για διάστημα 72 ωρών. Ελήφθησαν δείγματα σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα και μέτρηση του φθορισμού της ακόμα εγκλωβισμένης καλσεΐνης (latency).

Από τα αποτελέσματα των ανωτέρω μελετών προκύπτει ότι η αντίδραση της PEG-διθειόλης με τις ομάδες μαλεϊμιδίου των λιποσωμάτων οδηγεί στο σχηματισμό λιποσωμικών δομών στις οποίες παρατηρείται μικρή αύξηση του μεγέθους των λιποσωμάτων (στην περιοχή των νανοσωματιδίων), ενώ ως προς την λιποσωμική ακεραιότητά οι νέες δομές εμφανίζονται σημαντικά πιο σταθερές.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα λιποσώματα είναι σφαιρικά νανοσωματίδια που αποτελούνται από μία ή περισσότερες λιπιδικές διπλοστοιβάδες οι οποίες περικλείουν έναν υδάτινο πυρήνα. Διαθέτουν αρκετά πλεονεκτήματα ως νανοφορείς βιοδραστικών ουσιών λόγω της βιοσυμβατότητάς τους, της ικανότητάς τους για στοχευμένη χορήγηση, προστασία και ελεγχόμενη αποδέσμευση των εγκλωβισμένων ουσιών. Ωστόσο, εξακολουθούν να υπάρχουν κάποια μειονεκτήματα όσον αφορά την εκτεταμένη χρήση τους λόγω του σχετικά μικρού χρόνου ημιζωής τους που έχει ως αποτέλεσμα την ανεπαρκή συγκράτηση της δραστικής ουσίας στο σημείο εφαρμογής^[4].

Η προσθήκη παραγόντων σχηματισμού γέλης, δηλαδή υδρόφιλων πολυμερών στις λιποσωμικές διασπορές οδηγεί στην παρασκευή σταθερών λιποσωμικών γελών, υβριδικών συστημάτων που ευνοούν την τοπική χορήγηση φαρμάκων καθώς έτσι ρυθμίζονται και οι ρεολογικές ιδιότητες τους^[2]. Η επιπρόσθετη χημική διασύνδεση των λιποσωμάτων και η παρασκευή συστημάτων λιποσωμικών υδρογελών στις οποίες οι λιποσωμικοί φορείς είναι χημικά διασυνδεδεμένοι μπορεί να έχει επιπρόσθετα πλεονεκτήματα ως προς τη σταθερότητα των συστημάτων και την παρατεταμένη αποδέσμευση των εγκλωβισμένων/ενσωματωμένων στους λιποσωμικούς φορείς βιοδραστικών ουσιών^[1,3].

Έχοντας υπόψη τα ανωτέρω, σε προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριό μας συντέθηκαν παράγωγα PEG-διθειόλης τα οποία στη συνέχεια αντέδρασαν επιτυχώς μέσω Michael προσθήκης με ομάδες μαλεϊμιδίου ενσωματωμένες σε λιποσώματα ως λιπίδιο-peg-μαλεϊμίδιο. Από την αντίδραση αυτή προέκυψαν λιποσωμικές δομές όπου διαπιστώθηκε η διασύνδεση των λιποσωμάτων μέσω της PEG-διθειόλης.

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη: (α) των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των δομών που προέρχονται από την αντίδραση της PEG-διθειόλης με τις ομάδες μαλεϊμιδίου στις επιφάνειες των λιποσωμάτων, ώστε να παρατηρηθούν τυχόν μεταβολές στο μέγεθος τους ή/και στο ζ-δυναμικό και (β) της ακεραιότητας των διασυνδεδεμένων λιποσωμικών δομών με την PEG-διθειόλη, στις οποίες έχει εγκλωβιστεί καλσεΐνη (φθορίζουσα η οποία επιτρέπει τον προσδιορισμό διάσπασης λιποσωμικών φορέων).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Έγινε παρασκευή λιποσωμάτων (με λιπίδιο-peg-μαλεϊμίδιο και χωρίς (control)), με τη χρήση της thin film μεθόδου, στα οποία εγκλωβίσθηκε η φθορίζουσα ουσία καλσεΐνη. Παρασκευάστηκαν οι εξής λιποσωμικές συστάσεις: HPC/Chol/DSPE-PEG2000-OMe (2:1:0.03) (control) και HPC/Chol/DSPE-PEG2000-Mal (2:1:0.03), οι οποίες χαρακτηρίστηκαν ως προς τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες (μέγεθος, πολυδιασπορά και ζ-δυναμικό). Ακολούθησε αντίδραση των λιποσωμάτων (control και λιποσώματα-Mal) με την PEG-διθειόλη και ο εκ νέου φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των λιποσωμικών δομών. Οι ανωτέρω λιποσωμικές δομές υποβλήθηκαν σε μελέτη ως προς την ακεραιότητά τους με μέτρηση συγκράτησης της καλσεΐνης κατά την επώασή τους στους 37°C (σε PBS και FBS) για διάστημα 72 ωρών. Η ακεραιότητα των λιποσωμάτων

προσδιορίστηκε από το ποσοστό συγκράτησης της εγκλωβισμένης χρωστικής (% Latency), με βάση την εξίσωση:

$$\text{Latency (\%)} = 100 \times \left(\frac{[1.1 \times \text{Fat}] - [1.1 \times \text{Fbt}]}{[1.1 \times \text{Fat}]} \right) \quad (1)$$

όπου: *Fbt* και *Fat* είναι οι τιμές φθορισμού πριν και μετά την προσθήκη του Triton X-100.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

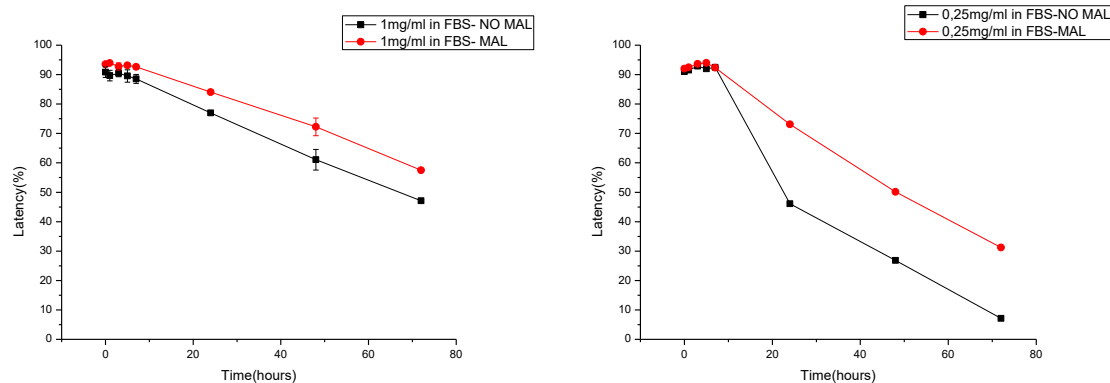
Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται οι λιπιδικές συστάσεις (control και λιποσώματα-Mal) καθώς και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των λιποσωμικών δομών πριν και μετά την αντίδρασή τους με την PEG-διθειόλη.

Πίνακας 1. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των λιποσωμικών δομών πριν και μετά την αντίδραση με PEG-διθειόλη.

Λιπιδική σύσταση	Μέση υδροδυναμική διάμετρος (nm)		PDI	
	Πριν την αντίδραση	Μετά την αντίδραση	Πριν την αντίδραση	Μετά την αντίδραση
HPC/Chol/DSPE-PEG2000-OMe[control]	99.4±0.543	100.8±0.757	0.180	0.192
HPC/Chol/DSPE-PEG2000-Mal	100.3±0.621	145.7±2.875	0.199	0.317

Όπως προκύπτει, η αντίδραση των λιποσωμάτων-Mal με την PEG-διθειόλη έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του μεγέθους των λιποσωμάτων (από 100.3 nm σε 145.7 nm) και αντίστοιχη αύξηση του δείκτη πολυδιασποράς (PDI) (από 0.199 σε 0.317). Σημειώνεται ότι η προσθήκη PEG-διθειόλης στα control λιποσώματα (που δεν φέρουν ομάδες ικανές να αντιδράσουν με την PEG-διθειόλη), δεν οδήγησε, όπως άλλωστε αναμενόταν, σε αύξηση του μεγέθους και της πολυδιασποράς των control λιποσωμάτων, λόγω της μη δυνατότητας αντίδρασης.

Ακολούθησε το πείραμα συγκράτησης της καλσεΐνης (σχήμα 1 & 2), σε δύο διαφορετικές λιπιδικές συγκεντρώσεις: 1mg/ml (σχήμα 1) και 0.25mg/ml (σχήμα 2), παρουσία ορού. Οι μετρήσεις του ποσοστού συγκράτησης της καλσεΐνης έδειξαν ότι οι διασυνδεδεμένες με PEG-διθειόλη λιποσωμικές δομές είναι περισσότερες σταθερές, σε αντίθεση με τα λιποσώματα που δεν φέρουν ομάδες μαλεϊμιδίου στα οποία το ποσοστό συγκράτησης της καλσεΐνης μειώνεται σημαντικά και στις δύο συγκεντρώσεις. Τέλος, όλες οι λιποσωμικές διασπορές ήταν σταθερές, σε υψηλό ποσοστό, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών(PBS) για το ελεγχόμενο διάστημα των 72h.



Σχήμα 1 & 2. Ποσοστό συγκράτησης καλσεΐνης σε συνάρτηση με το χρόνο σε ορό (συγκέντρωση λιπιδίου 1mg/ml και 0.25mg/ml).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η αντίδραση της PEG-διθειόλης με τις ομάδες μαλεϊμιδίου των λιποσωμάτων οδηγεί στο σχηματισμό λιποσωμικών δομών στις οποίες παρατηρείται αύξηση του μεγέθους των λιποσωμάτων (στην περιοχή των νανοσωματιδίων), σε ποσοστό περίπου 45%, ενώ ως προς την λιποσωμική ακεραιότητά των νέων λιποσωμικών δομών παρουσία ορού (σε συγκεντρώσεις 0.25mg/ml και 1mg/ml), οι νέες λιποσωμικές δομές εμφανίζονται σημαντικά πιο σταθερές, αφενός επιβεβαιώνοντας την αντίδραση της PEG-διθειόλης με τις ομάδες μαλεϊμιδίου των λιποσωμάτων, και αφετέρου, αποδεικνύοντας ότι η διασύνδεση των λιποσωμάτων μέσω της PEG-διθειόλης επηρεάζει τη σταθερότητα των νέων δομών. Αποδείχθηκε επιπρόσθετα ότι η συγκέντρωση του λιπιδίου παίζει ρόλο ως προς τη σταθερότητα των νέων λιποσωμικών δομών, καθώς τα λιποσώματα με λιπιδική συγκέντρωση 0.25mg/ml εμφανίζονται πιο ασταθή παρουσία ορού, σε σύγκριση με λιποσώματα λιπιδικής συγκέντρωσης 1mg/ml, ενώ οι διαπιστωμένες διαφορές μεταξύ λιποσωμάτων-Mal και control-λιποσωμάτων, είναι μεγαλύτερες στην περίπτωση των 0.25mg/ml λιποσωμάτων (σε σχέση με τα 1mg/ml).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] M Pitorre, H Gondé, C Hauray, et al. Journal of Control Release 266 (2017) 140-145.
- [2] S Grijalvo, J Mayr, R Eritja, et al. Biomaterial Science 4 (2016) 555-574.
- [3] Y SR Elnaggar, W M El-Refaie, M A El-Massik, et al. Journal of Control Release 180 (2014) 10-24.
- [4] A Akbarzadeh, R Rezaei-Sadabady, S Davaran, et al. Nanoscale Research Letters 1 (2013) 102.