



ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΘΕΟΔΩΡΟΠΟΥΛΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ
ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΥΧΟΣ ΧΗΜΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΚΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ ΜΕ
ΕΓΚΛΩΒΙΣΜΕΝΟ ΠΑΡΑΓΩΓΟ ΒΟΡΙΟΥ ΓΙΑ ΝΕΤΡΟΝΙΚΗ
ΣΥΛΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ**

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2012

Παρασκευή και χαρακτηρισμός λιποσωμάτων με
εγκλωβισμένο παράγωγο βορίου για νετρονική
σύλληψη στην θεραπεία του καρκίνου

The formulation and characterisation of liposomal vehicles
containing boron derivatives for Boron Neutron capture
therapy

ΘΕΟΔΩΡΟΠΟΥΛΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ
ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΥΧΟΣ ΧΗΜΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΚΟΣ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο του τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας της Φαρμακευτικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όσους συντέλεσαν με τον τρόπο τους στην ολοκλήρωσή της.

Συγκεκριμένα, ευχαριστώ θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή Φαρμακευτικής Τεχνολογίας κ. Δημήτριο Φατούρο για την ανάθεση του θέματος, την άψογη συνεργασία και για την συνεχή καθοδήγηση και επίβλεψη που μου παρείχε. Ευχαριστώ επίσης θερμά τα άλλα δυο μέλη της τριμελούς επιτροπής μου, τον διευθυντή Τομέα, Καθηγητή κ. Σταύρο Μαλαματάρη, για την άψογη συνεργασία που είχαμε όλο αυτό το καιρό καθώς και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ιωάννη Νικολακάκη για τις πολύτιμες συμβουλές του. Ακόμα θέλω να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του Τομέα για κάθε βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διεξαγωγή της διατριβής.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συνεργάτες μας: Dr Gianpiero Calabrese (School of Pharmacy and Chemistry, Kingston University, Kingston-upon Thames) για τη σύνθεση του παραγώγου του Βορίου που χρησιμοποιήθηκε και για τον προσδιορισμό του ^{10}B με φασματοφωτομετρία εκπομπής με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (ICP-MS) και τον Dr John Tsibouklis (School of Pharmacy and Biomedical Sciences, University of Portsmouth) για την πρόσβαση που μας παρείχε στο μικροσκόπιο ατομικής δύναμης (AFM).

Δ. ΘΕΟΔΩΡΟΠΟΥΛΟΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η θεραπεία με δέσμευση νετρονίων από βόριο, Boron Neutron Capture Therapy (BNCT), είναι μια χημείο-ακτίνο-θεραπευτική τεχνική δυο βημάτων η οποία πρώτα περιλαμβάνει την επιλεκτική διανομή παραγόντων πλούσιων σε ^{10}B στους όγκους, και μετέπειτα την ακτινοβολήση τους με νετρόνια χαμηλής ενέργειας, με αποτέλεσμα να προκαλείται πυρηνική αντίδραση σχάσης η οποία και επιφέρει την καταστροφή των κυττάρων-στόχων.

Το σημαντικότερο πρόβλημα για την κλινική εφαρμογή της BNCT ήταν η μη διαθεσιμότητα φαρμακομορφών που περιέχουν ^{10}B , με χαμηλή τοξικότητα και οι οποίες θα μπορούσαν να μεταβούν στον ιστό-στόχο σε συγκεντρώσεις που απαιτούνται για την επίτευξη θεραπευτικού αποτελέσματος. Η παρούσα εργασία έχει ως στόχο την αξιολόγηση νέων βοριομένων απεντοπισμένων λιπόφιλων κατιόντων (DLCs) τα οποία και εγκλωβίζονται σε λιποσώματα ώστε να χρησιμοποιηθούν στην θεραπεία με BNCT.

Ενώ υπάρχει αρκετή βιβλιογραφία σχετικά με την παρασκευή λιποσωμικών σκευασμάτων που περιέχουν παράγοντες βορίου, πρέπει να γίνει πιο εκτενής μελέτη στον φυσικοχημικό χαρακτηρισμό τους, ώστε να προχωρήσουν και να δοκιμαστούν σε *in vivo* μελέτες. Για αυτό τον σκοπό λιποσώματα που παρασκευάστηκαν από phosphatidylcholine [PC], dimyristoylphosphatidylcholine [DMPC] και dipalmitoylphosphatidylcholine [DPPC] διαφορφώθηκαν μαζί με $(\text{B}_{18}\text{C}_{34}\text{N}_4\text{H}_{64})\text{nido-carborane salt of Dequalinium}$. Η μορφολογία, το μέγεθος και οι ηλεκτροκινητικές ιδιότητες τόσο των άδειων όσο και των λιποσωμάτων που είχαν εγκλωβίσει το καρβοράνιο ερευνήθηκαν μέσω της μικροσκοπίας ατομικής δύναμης (Atomic force microscopy, AFM), της δυναμικής σκέδασης φωτός (Dynamic light scattering, DLS) και της μέτρησης του ζ-δυναμικού, αντιστοίχως. Η ενσωμάτωση του καρβορανίου εντός των λιποσωμάτων φαίνεται να αυξάνει το μέγεθος τους και να μεταβάλλει τις ηλεκτροκινητικές τους ιδιότητες. Οι μελέτες απεικόνισης των λιποσωμάτων αποκάλυψαν ότι η παρουσία του καρβορανίου μπορεί να προκαλεί παραμορφώσεις στο σχήμα των λιποσωμάτων. Οι μετρήσεις φθορισμού έδειξαν ότι η παρουσία του καρβορανίου επιδρά έντονα στο φάσμα εκπομπής του Nile red λόγω της μεταβολής που προκαλεί στην λιπιδική μεμβράνη. Ο εγκλωβισμός του

καρβορανίου προσδίδει στα λιποσώματα, όπως φάνηκε και από την μελέτη συγκράτησης καλσεΐνης, μεγαλύτερη σταθερότητα. Επιπλέον η ύπαρξη του καρβορανίου στην λιπιδική μεμβράνη δεν επάγει σημαντικά την τάση για συσσωμάτωση των λιποσωμάτων παρουσία ιόντων ασβεστίου. Τέλος έγινε υπολογισμός της ποσότητας του βορίου που εγκλωβίστηκε στα λιποσώματα με την χρήση φασματοφωτομετρίας εκπομπής με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (Inductively coupled plasma mass spectroscopy, ICP-MS) και ο (%) εγκλωβισμός βρέθηκε μεταξύ (42 και 27 %) ανάλογα το λιπίδιο από το οποίο είχαν παρασκευαστεί τα λιποσώματα. Τα λιποσώματα από PC και DMPC δείχνουν να είναι τα πιο ελπιδοφόρα για μελλοντική μελέτη και αξιολόγηση.

Abstract

The Neutron Capture Therapy of Boron (BNCT) is a two-steps chemo-radiotherapeutic technique that involves the selective delivery of ^{10}B -rich agents to tumours and their subsequent irradiation with low-energy neutrons, which induces a nuclear fission reaction that causes the selective destruction of the targeted cells. The major limitation in the early clinical application of BNCT has been the lack of availability of low-toxicity ^{10}B -containing compounds that can be selectively transported to the target tissue at the concentration level necessary to meet the therapeutic objective. Aimed towards the effective delivery of antitumour agents, the current study targets the design and evaluation of new boronated delocalized lipophilic cations (DLCs) for use in the neutron capture therapy of cancer formulated in liposomes.

Whilst there is a significant body of literature on the preparation of liposomal formulations containing boronated agents, considerable work needs to be performed on the physicochemical characterization and the most promising of these can be further considered for *in vivo* evaluation.

For this purpose liposomes comprised of an array of lipids namely; phosphatidylcholine [PC], dimyristoylphosphatidylcholine [DMPC] and dipalmitoylphosphatidylcholine [DPPC] were formulated with nido-carborane salt of Dequalinium($\text{B}_{10}\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_4$).

The morphology, the size and the electrokinetic properties of plain and carborane loaded liposomes were investigated by means of atomic force microscopy (AFM), dynamic light scattering (DLS) and ζ -potential studies, respectively. The incorporation of carborane molecules into the liposomes increases their size and alters their electrokinetic properties. Visualization studies revealed that the presence of carborane in the membranes induced distortion in vesicle morphology. To further elucidate the impact of carborane molecules on lipid bilayers, their miscibility was assessed by fluorescence spectroscopy measurements. Fluorescence measurements showed that the presence of carborane in liposomes causes a pronounced effect on the Nile red (NR) emission spectrum, possible due to alterations to the packing of the lipid membrane. The release of vesicle-encapsulated calcein was used as a measure of the integrity of the liposomes.

Carborane loaded liposomes were found to be more stable compared to plain (empty) liposomes, suggesting that carborane can stabilize the liposome membrane. Further the physical stability of the produced empty and carborane loaded liposomes in absence and presence of Ca^{2+} ions was evaluated by turbidity measurements. The results showed that all formulations are relatively stable to the presence of Ca^{2+} ions. Finally the amount of ^{10}B incorporated into liposomes was measured by Inductive Couple Plasma-Mass Spectroscopy (ICP-MS) with encapsulation varying from 42 to 27 % depending on the lipid used. The PC and DMPC liposomal formulation appear promising for future evaluation.

A. ΘΕΩΡΙΑ	11
1. ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕ ΔΕΣΜΕΥΣΗ ΝΕΤΡΟΝΙΩΝ ΒΟΡΙΟΥ	12
1.1 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΜΕ ΔΕΣΜΕΥΣΗ ΝΕΤΡΟΝΙΩΝ ΑΠΟ ΒΟΡΙΟ	12
1.2 ΠΗΓΕΣ ΝΕΤΡΟΝΙΩΝ ΣΤΗΝ ΒΝCT	13
1.2.1 Πυρηνικοί αντιδραστήρες.....	13
1.2.2 Μετατροπή αντιδραστήρων για χρήση στην ΒΝCT	14
1.2.3 Επιταχυντές.....	14
1.3 ΧΡΗΣΕΙΣ ΤΗΣ ΒΝCT.....	15
1.4 ΜΟΡΙΑΚΗ ΣΧΕΔΙΑΣΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΒΟΡΙΟΥ.....	16
1.5 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΦΑΡΜΑΚΟΜΟΡΦΗΣ.....	17
2. ΕΝΩΣΕΙΣ ΒΟΡΙΟΥ	18
2.1 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΒΟΡΙΟΥ	18
2.1.1 Παράγοντες μεταφοράς βορίου πρώτης και δεύτερης γενιάς	18
2.1.2 Παράγοντες μεταφοράς βορίου τρίτης γενιάς	19
2.2 ΚΑΡΒΟΡΑΝΙΑ	19
3. ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ	21
3.1 ΔΟΜΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ	21
3.2 ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ-ΓΕΝΙΚΑ	22
3.3 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ	24
3.3.1 MLV λιποσώματα.....	25
3.3.2 SUV λιποσώματα.....	26
3.3.3 LUV λιποσώματα.....	28
3.4 ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ ΜΕ ΒΟΡΙΟ	29
3.4.1 Nido-Carborane λιποσώματα	29
3.4.2 Closo-dodecaboratebased liposomes.....	31
3.4.3 Closo-dodecaboratecholesterols.....	31
4. ΜΕΘΟΔΟΙ	32
4.1 ΦΥΣΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ.....	32
4.1.1 Σκέδαση φωτός.....	32
4.1.1.1 Κίνηση Brown	32
4.1.1.2 Μέτρηση μεγέθους λιποσωμάτων-δυναμική σκέδαση (dynamic light scattering)	33
4.1.1.3 Μέτρηση ζ-δυναμικού-ηλεκτροφορητική σκέδαση	35
4.1.2 Θολερότητα (Turbidity).....	37
4.1.2.1 Συγχώνευση (fusion).....	37
4.1.2.2 Μέτρηση θολερότητας	38
4.2 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ ΟΡΑΤΟΥ (uv-vis)	39
4.2.1 Γενικά.....	39
4.2.2 Νόμος BEER.....	39
4.3 ΜΟΡΙΑΚΗ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΑ	40
4.3.1 Φωταύγεια.....	40
4.3.2 Μηχανισμός φθορισμού.....	41
4.3.3 Φάσματα διεγέρσεως και εκπομπής (φθορισμού)	41
4.3.4 Λειτουργία φθορισμόμετρου	42
4.3.5 Φαινόμενο quenching (απόσβεση).....	42
4.3.6 Διαλυτοχρωμισμός (solvatochromism).....	43
4.4 ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ ΕΚΠΟΜΠΗΣ ΜΕ ΕΠΑΓΩΓΙΚΑ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΟ ΠΛΑΣΜΑ (ICP).....	44
4.5 ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ (MS)	45
4.6 ICP-MS.....	46
4.7 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΥ (ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΓΕΛΗΣ)	46

4.8 ΣΑΡΩΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΑΚΙΔΑΣ (SCANNING PROBE MICROSCOPY-SPM).....	47
4.9 ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΑΤΟΜΙΚΩΝ ΔΥΝΑΜΕΩΝ (AFM).....	47
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	49
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	51
1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ	52
1.1 ΟΡΓΑΝΑ	52
1.2 ΥΛΙΚΑ	52
1.3 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	53
1.3.1 Παρασκευή διαλύματος καλσεΐνης 25mM.....	53
1.3.2 Παρασκευή Ρυθμιστικού διαλύματος PBS pH 7.4	53
1.4 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ.....	54
1.5 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ	54
2. ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΚΑΙ ζ-ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΤΩΝ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ	55
3. ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ.....	57
3.1 ΥΛΙΚΑ	57
3.2 ΟΡΓΑΝΑ	57
3.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	57
3.4 ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ	59
4. ΜΕΤΡΗΣΗ ΘΟΛΕΡΟΤΗΤΑΣ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ	59
5. ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΡΟΣΘΗΚΗ NILE-RED	60
6. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΒΟΡΙΟΥ ΤΩΝ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΕΠΑΓΩΓΙΚΑ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ (ICP-MS)	61
7. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΔΥΝΑΜΗΣ (AFM)	62
Γ.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	64
1. ΜΕΛΕΤΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ.....	65
2. ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ	71
3. ΜΕΤΡΗΣΗ ζ- ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ.....	75
4. ΜΕΤΡΗΣΗ ΘΟΛΕΡΟΤΗΤΑΣ.....	77
5. ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΡΟΣΘΗΚΗ NILE RED	80
6. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΒΟΡΙΟΥ ΤΩΝ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΕΠΑΓΩΓΙΚΑ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ (ICP-MS)	82
7. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΑΤΟΜΙΚΩΝ ΔΥΝΑΜΕΩΝ (AFM).....	83
9. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	85
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ.....	87
I. ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ	88
II.ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ	90
III. ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	91
VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	92

A. ΘΕΩΡΙΑ

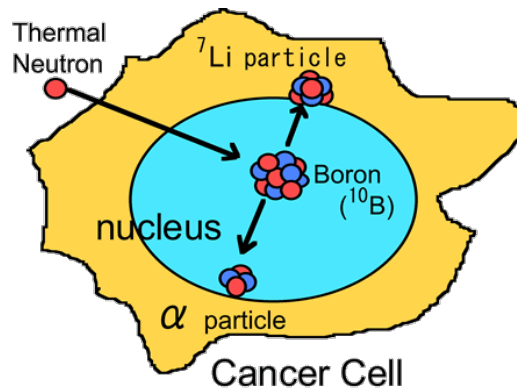
1. ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕ ΔΕΣΜΕΥΣΗ ΝΕΤΡΟΝΙΩΝ ΒΟΡΙΟΥ

1.1 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΜΕ ΔΕΣΜΕΥΣΗ ΝΕΤΡΟΝΙΩΝ ΑΠΟ ΒΟΡΙΟ

Λίγο μετά από την ανακάλυψη του νετρονίου από τον Chadwick [1] και την παρατήρηση από τον Fermi [2] ότι ορισμένα νουκλεΐδια (όπως τα ^{10}B , ^6Li) είναι ικανά να απορροφήσουν θερμικά νετρόνια, ο Locher [3], έθεσε τις βάσεις για την ανάπτυξη της θεραπείας με την μέθοδο της δέσμευσης νετρονίων (Nuclear Capture Therapy, NCT), προτείνοντας την χρήση στοιχείων με μεγάλη ικανότητα απορρόφησης νετρονίων στις περιοχές όπου είναι επιθυμητό να απελευθερώσουν την ενέργεια ιονισμού. Για να μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην NCT ένα νουκλεΐδιο θα πρέπει να προσφέρει υψηλή ενεργό διατομή σκέδασης (σθ), μέγεθος το οποίο αποτελεί μέτρο για την πιθανότητα δέσμευσης ενός νετρονίου από αυτό. Τα ^{157}Gd , ^{113}Cd , ^3He , ^{10}B παρουσιάζουν μεγάλες τιμές σθ [4].

Από τα νουκλεΐδια τα οποία θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στην μέθοδο δέσμευσης νετρονίων, αυτά που προσφέρουν ένα καλό συνδυασμό χαμηλής τοξικότητας και υψηλής σταθερότητας είναι του βορίου, πιο συγκεκριμένα το ισότοπο ^{10}B . Επίσης είναι σημαντικό ότι η χημεία τους είναι ιδιαίτερα ευέλικτη και αρκετά εδραιωμένη ώστε να καθίσταται δυνατή η εύκολη παρασκευή παράγωγων τους.

Η θεραπεία με Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) είναι ουσιαστικά μια χημείο-ακτίνο-θεραπευτική τεχνική δυο βημάτων η οποία πρώτα περιλαμβάνει την επιλεκτική διανομή παραγόντων πλούσιων σε ^{10}B στους όγκους, και μετά την ακτινοβολήση τους με νετρόνια χαμηλής ενέργειας (0.025 eV), ενέργεια η οποία είναι κάτω από το επίπεδο ενέργειας που μπορεί να καταστρέψει ιστούς [5]. Ακολουθώντας με την απορρόφηση νετρονίων μέσα στον κυτταρικό ιστό, οι διεγερμένοι πυρήνες ^{10}B οι οποίοι σχηματίζονται μετά από σχάση παράγουν σωματίδια μεγάλης γραμμικής μεταφοράς ενέργειας (linear energy transfer particles). Τα σωματίδια αυτά ($^4\text{He}^{2+}$, $^7\text{Li}^{3+}$) είναι πολύ τοξικά και κινούνται εντός μικρών αποστάσεων (5 και 9 μm αντίστοιχα), δηλαδή εντός της κυτταρικής μεμβράνης [6] (εικ. 1 και 2).



Εικόνα 1. Σχηματική παρουσίαση της καταστροφή καρκινικού κυττάρου με την χρήση της BNCT.



Εικόνα 2. Αντίδραση σχάσης βορίου

1.2 ΠΗΓΕΣ ΝΕΤΡΟΝΙΩΝ ΣΤΗΝ BNCT

1.2.1 Πυρηνικοί αντιδραστήρες

Αυτή την στιγμή ο τρόπος δημιουργίας νετρονίων για χρήση τους στην BNCT περιορίζεται στην χρήση πυρηνικών αντιδραστήρων. Τα νετρόνια που προέρχονται από τους αντιδραστήρες ταξινομούνται σύμφωνα με την ενέργειά τους σε:

- Θερμικά (thermal) ($E_n < 0.5 \text{ eV}$)
- Επιθερμικά (epithermal) ($0.5 \text{ eV} < E_n < 10 \text{ keV}$)
- Γρήγορα (fast) ($E_n > 10 \text{ keV}$)

Τα θερμικά νετρόνια είναι τα πιο σημαντικά για BNCT γιατί μπορούν και δεσμεύονται από το βόριο και εκκινούν την πυρηνική του σχάση. Ωστόσο επειδή έχουν περιορισμένη ικανότητα διείσδυσης, τελευταία χρησιμοποιούνται τα επιθερμικά νετρόνια, τα οποία χάνουν ενέργεια καθώς διεισδύουν στον ιστό και πέφτουν στην ενεργειακή στάθμη των θερμικών νετρονίων. Αρκετοί αντιδραστήρες

έχουν αναπτυχθεί μέχρι σήμερα και οι οποίοι προσφέρουν πολύ καλής ποιότητας ακτίνα νετρονίων [7]. Κάποιοι από τους πιο γνωστούς είναι οι παρακάτω:

- MITR [8]
- Ο κλινικός αντιδραστήρας στο Studsvik Medical AB στη Σουηδία [9]
- Ο κλινικός αντιδραστήρας FiR1 στο Ελσίνκι, Φινλανδία [10]
- Ο αντιδραστήρας Υψηλής Ροής R2-0 στο Petten στην Ολλανδία [11]
- Ο αντιδραστήρας LVR-15 στο πυρηνικό Ινστιτούτο Έρευνας στην Rez, Τσεχία [12]
- Ο αντιδραστήρας του Πανεπιστημίου του Κιότο [13]
- Ο αντιδραστήρας JRR4 στο Ερευνητικό Κέντρο Ατομικής Ενέργειας στην Ιαπωνία [14]
- Ο αντιδραστήρας RA-6 CNEA στο Bariloche στην Αργεντινή [15]

1.2.2 Μετατροπή αντιδραστήρων για χρήση στην BNCT

Δυο είναι οι τεχνικές που ακολουθούνται για την απαραίτητη μετατροπή που πρέπει να γίνει στον πυρηνικό αντιδραστήρα ώστε να είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί στην BNCT. Η πρώτη ή άμεση προσέγγιση βασίζεται στην συγκέντρωση των παραγόμενων νετρονίων και στο φιλτράρισμα τους. Η δεύτερη προσέγγιση η οποία είναι έμμεση, βασίζεται στην χρήση μιας πλάκας-μετατροπέα σχάσης. Τα νετρόνια που παράγονται από τον αντιδραστήρα δημιουργούν σχάσεις μέσα στην πλάκα από όπου και παράγεται η ακτίνα νετρονίων που οδηγείται στον ασθενή [7].

1.2.3 Επιταχυντές

Για την παραγωγή επιθερμικών νετρονίων μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν επιταχυντές. Η πιο υποσχόμενη αντίδραση η οποία λαμβάνει χώρα με την χρήση αυτών των επιταχυντών περιλαμβάνει βομβαρδισμό ενός στόχου ${}^7\text{Li}$ με πρωτόνια 2.5 MeV. Η μέση τιμή της ενέργειας των νετρονίων που παράγονται είναι 0,4 MeV και η μέγιστη ενέργεια είναι 0,8 MeV. Τα νετρόνια που προέρχονται από πυρηνικό αντιδραστήρα έχουν μεγαλύτερες μέσες και μέγιστες

ενέργειες από ότι αυτά που δημιουργούνται με επιταχυντή με αποτέλεσμα το υλικό που θα πρέπει να μεσολαβεί για να ρίξει την στάθμη ενέργειας των νετρονίων από γρήγορα (fast) σε επιθερμικά είναι μικρότερο στον επιταχυντή από ότι στον πυρηνικό αντιδραστήρα. Αυτή η ιδιότητα είναι πολύ σημαντική γιατί όσο μεγαλύτερο είναι το πάχος του υλικού που πρέπει να διαπεράσουν τα νετρόνια τόσο μικραίνει η πιθανότητα να φτάσουν στη θύρα από την οποία οδηγούνται στον ασθενή [7].

1.3 ΧΡΗΣΕΙΣ ΤΗΣ BNCT

Η θεραπεία με την μέθοδο δέσμευσης νετρονίων από βόριο (BNCT: Boron Neutron Capture Therapy) βασίζεται όπως αναφέρθηκε και παραπάνω στην πυρηνική αντίδραση του βορίου ^{10}B όταν αυτό ακτινοβολείται από χαμηλής ενέργειας θερμικά νετρόνια και την απόδοση σωματιδίων α υψηλής ενέργειας καθώς και πυρήνων λιθίου ^7Li .

Το κλινικό ενδιαφέρον για την BNCT επικεντρώθηκε στην αρχή στην αντιμετώπιση του γλοιώματος καθώς και στην αντιμετώπιση των μεταστάσεων στον εγκέφαλο και το δέρμα, του μελανώματος, ενώ τελευταία αναπτύχθηκε ενδιαφέρον και για την χρησιμοποίηση της στην αντιμετώπιση των καρκίνων του κεφαλιού, του λαιμού και του ήπατος.

Ιδιαίτερου ενδιαφέροντος είναι η εφαρμογή της BNCT στην θεραπεία του γλοιοβλαστώματος. Το γλοιώμα, και συγκεκριμένα το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα, εξακολουθεί να είναι εξαιρετικά ανθεκτικό σε όλες τις σημερινές μορφές θεραπείας, όπως την χειρουργική επέμβαση, την χημειοθεραπεία, την ακτινοθεραπεία την ανοσοθεραπεία, την γονιδιακή θεραπεία, παρ' όλες τις προσπάθειες και την εντατική έρευνα των τελευταίων δεκαετιών [16-20]. Παρά την επιθετική θεραπεία με συνδυασμούς των θεραπευτικών αυτών μεθόδων η πενταετής επιβίωση των ασθενών που έχουν διαγνωστεί με γλοιοβλάστωμα, στις Ηνωμένες Πολιτείες, επιτυγχάνεται σε ένα πολύ μικρό ποσοστό αυτών [21, 22]. Μέχρι να αντιμετωπιστούν χειρουργικά οι όγκοι, τα κακοήθη κύτταρα διεισδύουν πέρα από τα όρια της εκτομής και εξαπλώνονται τόσο στην φαιά ουσία όσο και

στην λευκή [23, 24]. Έτσι το γλοιοβλάστωμα πρέπει να θεωρείται και να αντιμετωπίζεται σαν μια ασθένεια του εγκεφάλου στο σύνολο του [25] και η εφαρμογή της BNCT για την θεραπεία του μπορεί να αποδειχτεί πιο αποτελεσματική από τις κοινές θεραπευτικές τεχνικές.

1.4 ΜΟΡΙΑΚΗ ΣΧΕΔΙΑΣΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΒΟΡΙΟΥ

Αρχικά ο μοριακός σχεδιασμός των παραγόντων βορίου βασίστηκε στο ότι ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός (blood brain barrier BBB) καθίσταται πιο διαπερατός στα σημεία που υπάρχουν καρκινικοί όγκοι, από ότι στους υγιείς ιστούς, αλλά αυτή η προσέγγιση δεν στέφθηκε με επιτυχία εξαιτίας της ύπαρξης απομονωμένων συστάδων καρκινικών κυττάρων, τα οποία προστατεύονταν από τον υγιή αιματοεγκεφαλικό φραγμό και οδηγούσαν σε υποτροπή του όγκου [22].

Ένα θεραπευτικό σκεύασμα για να μπορεί να εφαρμοστεί στην θεραπεία με BNCT θα πρέπει να έχει χαμηλή τοξικότητα (ειδικά στις περιπτώσεις που πρέπει να γίνει συστηματική χορήγηση), θα πρέπει να παρουσιάζει επιλεκτικότητα στα καρκινικά κύτταρα, να διατηρείται σε σταθερές συγκεντρώσεις ενδοκυτταρικά κατά την διάρκεια της ακτινοβολήσης, να παρουσιάζει αριθμούς $>10^9$ ^{10}B ατόμων ανά κύτταρο, και να έχει την ικανότητα να φτάνει στον στόχο με την ροή του αίματος, παρακάμπτοντας τους βιολογικούς φραγμούς, όπως τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό [26].

Η κύρια απαίτηση για τον σχεδιασμό σχετίζεται με την ποσότητα ^{10}B που φτάνει στο σημείο που μας ενδιαφέρει. Έχει υπολογιστεί ότι αν χρειάζεται μια ροή νετρονίων 10^{12} νετρόνια/cm², οι φορείς του βορίου πρέπει να διατηρούνται στην τιμή 30 mg/g όγκου καθ' όλη την διάρκεια της ακτινοβολήσης.

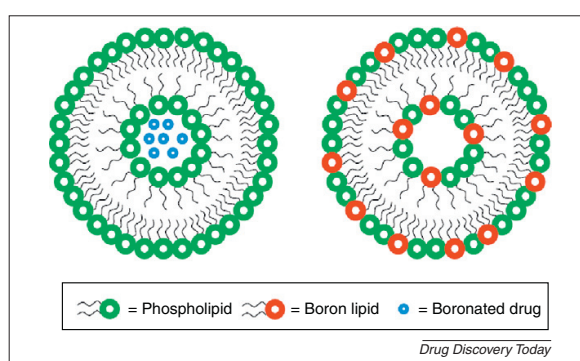
Η στρατηγική που χρησιμοποιείται συνήθως για την επίτευξη αυτών των συγκεντρώσεων αφορά σχεδιασμό θεραπευτικών παραγόντων που ενσωματώνουν πολυεδρικές ενώσεις βορανίου [27]. Μεταξύ αυτών είναι τα καρβοράνια [28] (ουδέτερα λιπόφιλα icosahedralicarbocloso-dodecaboranes, $\text{C}_2\text{B}_{10}\text{H}_{12}$), τα οποία θα παρουσιαστούν στην συνέχεια, που παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον όχι μόνο

εξαιτίας την υψηλής περιεκτικότητας σε ^{10}B , την καλή καταβολική σταθερότητα και την χαμηλή τοξικότητα [29], αλλά και για την χημική τους λειτουργικότητα [30, 31].

1.5 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΦΑΡΜΑΚΟΜΟΡΦΗΣ

Το σημαντικότερο πρόβλημα για την κλινική εφαρμογή της BNCT ήταν η μη διαθεσιμότητα φαρμακομορφών που περιέχουν ^{10}B , με χαμηλή τοξικότητα και οι οποίες θα μπορούσαν να μεταβούν στον ιστό-στόχο σε συγκεντρώσεις που απαιτούνται για την επίτευξη θεραπευτικού αποτελέσματος. Αυτό το πρόβλημα οδηγεί σε ανάπτυξη νέων φαρμακομορφών. Οι πιο διαδεδομένες είναι τα γαλακτώματα, τα λιποσώματα, τα δενδριμερή και, πιο πρόσφατα, οι νανοσωλήνες άνθρακα [26].

Τα λιποσώματα έχουν την ικανότητα να εγκλωβίζουν σχετικά μεγάλες ποσότητες του βορίου [32]. Δύο βασικές στρατηγικές έχουν εξελιχθεί για τη φόρτωση των λιποσωμικών συστημάτων με πολυεδρικά βοράνια: η ενθυλάκωση (encapsulation) και η ενσωμάτωση (incorporation) (εικ. 3).



Εικόνα 3. Ενθυλάκωση και ενσωμάτωση βορανίων σε λιποσώματα [26].

Η ενθυλάκωση αναφέρεται στη συγκράτηση των φαρμάκων με βοράνιο στην εσωτερική κοιλότητα του λιποσωμάτων, ενώ κατά την ενσωμάτωση τα πολυεδρικά βοράνια είναι μέρος της δομής της διπλοστιβάδας. Η ενσωμάτωση επιτρέπει την χημική δέσμευση των βορανίων από τα συστατικά που αποτελούν την διπλοστιβάδα (λιπίδια ή χοληστερόλη). Η στρατηγική που ακολουθείται για την

παρασκευή της απαιτούμενης φαρμακομορφής εξαρτάται από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των λιπιδίων και της δραστικής ουσίας.

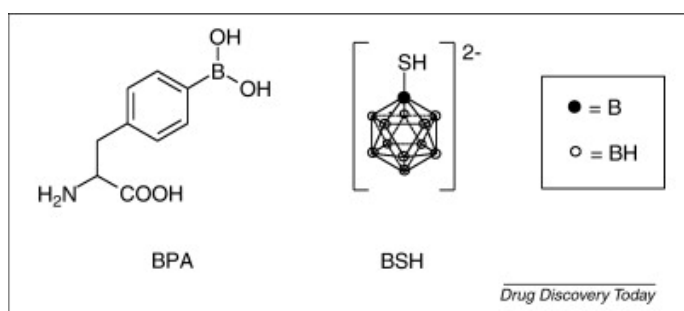
2. ΕΝΩΣΕΙΣ ΒΟΡΙΟΥ

2.1 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΒΟΡΙΟΥ

2.1.1 Παράγοντες μεταφοράς βορίου πρώτης και δεύτερης γενιάς

Το βορικό οξύ και τα παράγωγά του αποτελούν την πρώτη γενιά ενώσεων του βορίου που χρησιμοποιήθηκαν στην BNCT στην δεκαετία του 1950 και στις αρχές της δεκαετίας του 1960. Αυτές οι απλές χημικές ενώσεις δεν είχαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα όσο αναφορά την εκλεκτικότητά τους, την διατήρηση υψηλής συγκέντρωσης στους όγκους και την αναλογία συγκέντρωσης που πετύχαιναν μεταξύ όγκων και υγιών ιστών [33].

Στην δεκαετία του 1960 προέκυψαν μετά από έρευνες εκατοντάδων άλλων ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους, δύο άλλες ενώσεις που περιείχαν βόριο: η [(L)-4-dihydroxy-borylphenylalanine] (BPA) η οποία βασίστηκε στα αρυλ-βορονικά οξέα [34] και η άλλη που βασίστηκε σε ένα πρόσφατα ανακαλυφθέν πολυεδρικό ανιόν βορανίου, sodium mercaptoundeca-hydro-closo -dodecaborate (BSH) [35] (εικ.4). Αυτά τα δεύτερης γενιάς παράγωγα δεν παρουσίαζαν τα μειονεκτήματα των παραγόντων της πρώτης γενιάς.



Εικόνα 4. Δομή των ανιόντων 4-dihydroxyborylphenylalanine (BPA) και mercaptoundeca-hydro-dodecaborate (BSH) [26].

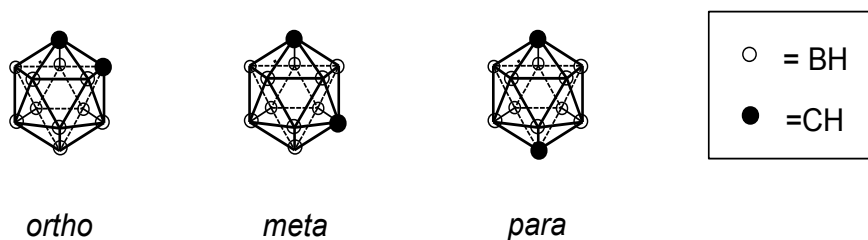
2.1.2 Παράγοντες μεταφοράς βορίου τρίτης γενιάς

Οι λεγόμενοι τρίτης γενιάς παράγοντες αποτελούνται από ενώσεις οι οποίες περιέχουν μια σταθερή ομάδα βορίου ή ένα σύμπλοκο βορίου (καρβοράνια) ενωμένες μέσω ενός σταθερού δεσμού με μια ομάδα με ικανότητα στόχευσης όγκων, όπως χαμηλού μοριακού βάρους βιομόρια ή μονοκλωνικά αντισώματα [7].

Έχει αποδειχθεί ότι τα χαμηλού μοριακού βάρους βιομόρια έχουν ιδιότητες επιλεκτικής στόχευσης και πολλά από αυτά βρίσκονται σε διάφορα στάδια ανάπτυξης για χρήση τους σε χημειοθεραπεία καρκίνου, φωτοδυναμική θεραπεία καθώς και για αντί-ικκή χρήση. Ο πυρήνας και το DNA των καρκινικών κυττάρων αποτελούν τους πιο ελκυστικούς στόχους γιατί απαιτείται πολύ μικρότερη ποσότητα βορίου για να υπάρξει καταστροφικό αποτέλεσμα στο κύτταρο, με την προϋπόθεση πάντα το βόριο να βρίσκεται κοντά ή μέσα στον πυρήνα [36].

2.2 ΚΑΡΒΟΡΑΝΙΑ

Τα καρβοράνια ($C_2B_{10}H_{12}$) είναι οργανομεταλλικές ενώσεις που αποτελούνται από άνθρακα, βόριο και υδρογόνο (Εικ. 5). Αυτά συντίθενται με την αντίδραση του ακετυλενίου ή των παραγώγων του με υδρίδια του βορίου. Η πολυεδρική δομή του καρβορανίου μπορεί να υπάρχει σε μία από τις τρεις ισομερείς μορφές: ορθο, μετα ή παρα [26].



Εικόνα 5. Ορθο (o)-, μετα (m) - και παρα (p) - καρβοράνιο [26].

Τα πλεονεκτήματα αυτών των ενώσεων είναι ότι μπορούν να μεταφέρουν περισσότερο βόριο στους όγκους, χωρίς να αυξάνουν την τοξικότητα, σε σχέση με άλλα παράγωγα του βορίου. Τα πολυεδρικά δι-ανιόντα του βορίου $closo-B_{10}H_{10}^{2-}$ και $closo-B_{12}H_{12}^{2-}$ και τα εικοσαεδρικά καρβοράνια $closo-C_2B_{10}H_{12}$ και $nido-C_2B_9H_{12}^-$

είναι τα πιο κατάλληλα σύμπλοκα για σύνδεση με ομάδες με ικανότητες στόχευσης εξαιτίας της εύκολης ενσωμάτωσης τους σε οργανικά μόρια, της υψηλής περιεκτικότητας σε βόριο, της χημικής και υδρολυτικής σταθερότητας που παρουσιάζουν, τον υδρόφοβο χαρακτήρα τους και του αρνητικού φορτίου που στις περισσότερες των περιπτώσεων διαθέτουν [26]. Το απλό άλας νατρίου του closo-B₁₀H₁₀²⁻ έχει φανεί, από μελέτες που έχουν γίνει σε πειραματόζωα, ότι έχει ικανότητα στόχευσης όγκων και χαμηλή τοξικότητα, και είναι υποψήφιο για μελλοντικές κλινικές μελέτες [37, 38].

Τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από υψηλή μεταβολική δραστηριότητα δίνοντας τη δυνατότητα για στόχευση στα κυτταρικά οργανίδια, όπως τα μιτοχόνδρια. Τα μιτοχόνδρια ευνοούν την εναπόθεση των απεντοπισμένων λιπόφιλων κατιόντων (delocalised lipophilic cations, DLCs) [39, 40]. *In vitro* το δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης έχει μετρηθεί στα 180 mV ενώ *in vivo* είναι περίπου στα 130-150 mV [41]. Επιπλέον έχει αναφερθεί ότι το δυναμικό της μεμβράνης των μιτοχονδρίων στα καρκινικά κύτταρα είναι μεγαλύτερο περίπου 60 mV από αυτό των υγιών επιθηλιακών κυττάρων [42]. Έχοντας υπόψιν το αρνητικό διαμεμβρανικό δυναμικό, τα DLCs μπορούν επιλεκτικά να συσσωρευτούν στα μιτοχόνδρια. Η συσσώρευση αυτή μπορεί να περιγραφεί από την εξίσωση Nernst:

$$\Delta\psi \text{ (mV)} = 61.5 \log_{10}\{[\text{cation}]_{\text{in}}/[\text{cation}]_{\text{out}}\}.$$

Σαν συνέπεια της παραπάνω εξίσωσης μια αύξηση του δυναμικού της μεμβράνης περίπου 61.5 mV έχει ως αποτέλεσμα 10 φορές αύξηση στην συσσώρευση λιπόφιλων κατιόντων μέσα στα μιτοχόνδρια. Επιπλέον η διαδικασία αυτή υποβοηθείται από το δυναμικό των μεμβρανών του πλάσματος (30-60 mV) που επάγει την συσσώρευση των κατιόντων μέσα στα κύτταρα και επιπλέον βοηθά στην μεταφορά τους μέσα στο μιτοχόνδριο [5].

3. ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ

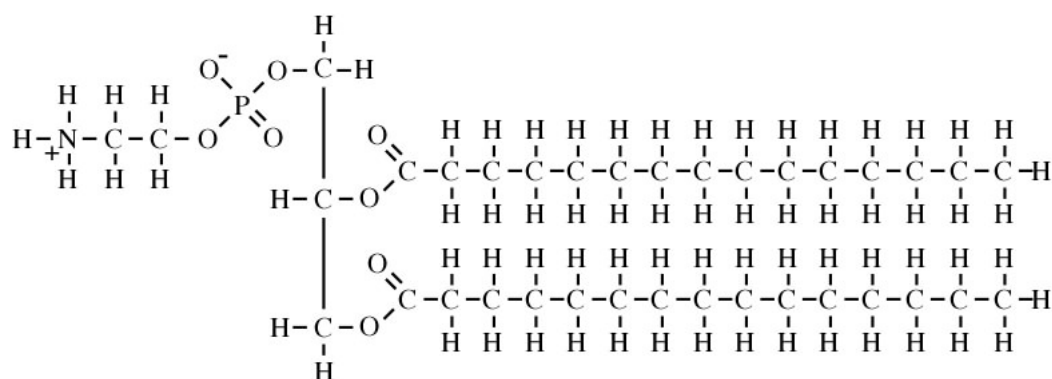
3.1 ΔΟΜΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ

Τα λιπίδια μπορούν να ταξινομηθούν στις παρακάτω οκτώ κατηγορίες:

- Λιπαρά οξέα
- Ανώτερες αλκοόλες
- Υποκατεστημένες γλυκερόλες
- Τερπένια
- Φωσφολιπίδια
- Σφιγγοσίνες
- Προσταγλανδίνες
- Στεροειδή

Τα συχνότερα συναντώμενα λιπίδια στις βιολογικές μεμβράνες είναι τα φωσφολιπίδια [43]. Τα φωσφολιπίδια είναι αμφίφιλα μόρια με διπλή υδρόφοβη (υδρογονανθρακική) αλυσίδα. Αυτή η διπλή αλυσίδα δίνει στα φωσφολιπίδια την τάση να δημιουργούν στις υδατικές τους διασπορές διμοριακά στρώματα ή διπλοστρώματα, τα οποία συχνά διευθετούνται είτε υπό μορφή λιποσωμάτων (ή κυστιδίων) είτε υπό μορφή πολυστρωματικών φυλλιδίων (όταν η διάμετρος των λιποσωμάτων είναι αρκετά μεγάλη τότε συμπεριφέρονται σαν εκτεταμένα διπλοστρώματα).

Υπάρχουν δύο είδη φωσφολιπιδίων, τα φωσφοδιγλυκερίδια και τα σφιγκολιπίδια, μαζί με τα αντίστοιχα προϊόντα υδρόλυσης τους. Στα φωσφοδιγλυκερίδια, ο κύριος κορμός της γλυκερόλης συνδέει δυο υδρόφοβες (υδρογονανθρακικές) αλυσίδες με μια υδρόφιλη κεφαλή. Όταν η κεφαλή αυτή περιέχει χολίνη τότε το φωσφολιπίδιο ονομάζεται λεκιθίνη ή φωσφατιδυλοχολίνη [43] (εικ. 6).



Εικόνα 6. Συντακτικός τύπος φωσφατιδυλοχολίνης.

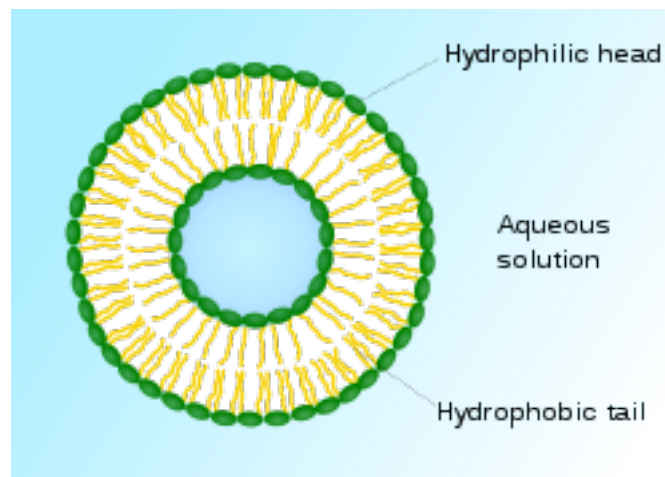
3.2 ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ-ΓΕΝΙΚΑ

Τα λιποσώματα είναι μικροσκοπικά κυστίδια, αποτελούμενα από λιπιδικά μόρια, τα οποία δημιουργούνται αυθόρμητα όταν φωσφολιπίδια ενυδατώνονται και τακτοποιούνται σε φύλλα το ένα δίπλα στο άλλο με παρόμοιο προσανατολισμό [44]. Τα φύλλα αυτά ενώνονται ανά δύο και δημιουργούν μια διπλοστιβάδα, η οποία εγκλωβίζει νερό μέσα σε μια σφαίρα από φωσφολιπίδια [45].

Τα λιποσώματα περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1965 από τον Bangham. Με τον όρο λιποσώματα εννοούμε μικρά σωματίδια με διάμετρο 25 με 1000 nm τα οποία σχηματίζονται από ένα ή πολλά διμοριακά στρώματα φωσφολιπιδίων, όπως η λεκιθίνη, τα οποία διαχωρίζονται από υδατικά στρώματα [46, 47].

Τα χαρακτηριστικά των λιποσωμάτων εξαρτώνται κυρίως από τον τρόπο παρασκευής τους καθώς και από το υλικό από το οποίο είναι φτιαγμένα. Το μέγεθος τους μπορεί να κυμανθεί όπως προείπαμε από 25nm μέχρι 1000 nm. Επίσης μπορούν να είναι είτε μονοστοιβαδικά (unilamellar) (εικ. 7), δηλαδή να αποτελούνται από μια διπλοστοιβάδα που περικλείει έναν υδάτινο πυρήνα, είτε πολυστοιβαδικά (multilamellar) (εικ. 8), περισσότερες της μιας διπλοστοιβάδες οι οποίες διαχωρίζονται μεταξύ τους με υδατικά στρώματα [47], τοποθετημένες ομόκεντρα περικλείοντας πάλι ένα υδάτινο πυρήνα. Εξαιτίας αυτού του εσωτερικού υδάτινου διαμερίσματος, τα λιποσώματα είναι ιδανικά για την μεταφορά υδρόφιλων φαρμάκων. Εξαιτίας της υπόλοιπης δομής τους, έκτος της υδάτινης

φάσης, μπορούν επίσης να μεταφέρουν και φάρμακα τα οποία είναι ελάχιστα διαλυτά στο νερό, ενσωματώνοντάς τα μέσα στην διπλοστοιβάδα [48].



Εικόνα 7. Μονοστοιβαδικό (unilamellar) λιπόσωμα.



Εικόνα 8. Σχηματική απεικόνιση πολυστοιβαδικού (multilamellar) λιποσώματος.

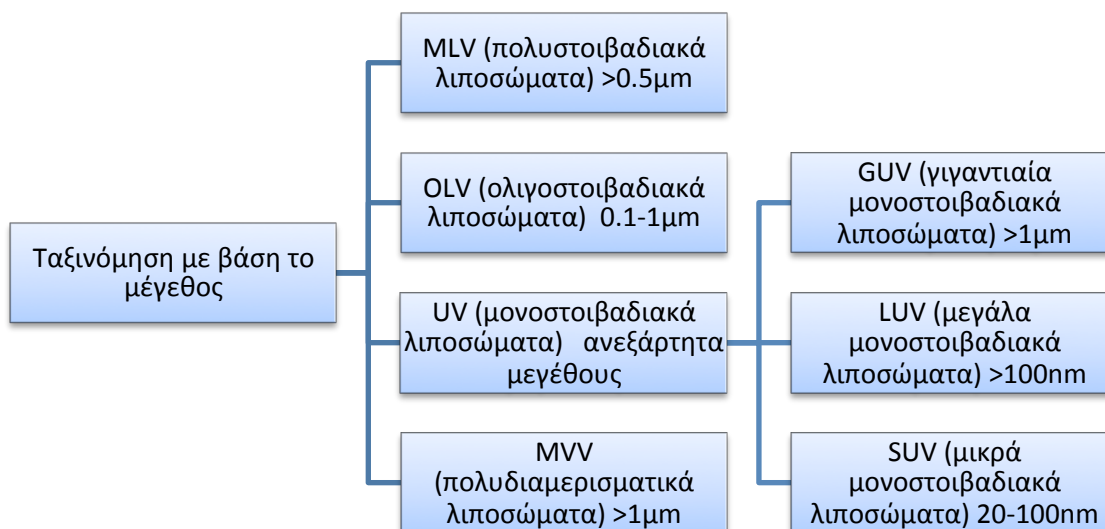
Οι βασικές ιδιότητες των λιποσωμάτων περιλαμβάνουν την ικανότητά τους να μειώνουν τις τοξικές παρενέργειες και να αυξάνουν την βιοδιαθεσιμότητα των περιεχομένων σε αυτά φαρμάκων. Επίσης έχουν την αυξημένη ικανότητα να διαπερνούν τον καρκινικό ιστό και να συγκεντρώνονται σε αυτόν σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με τον φυσιολογικό και υγιή ιστό [49].

Λαμβάνοντας υπόψιν ότι τα λιποσώματα μελετώνται σαν μεταφορείς

φαρμάκων από τις αρχές του 1970, χρειάστηκαν σχεδόν δυο δεκαετίες να αναπτυχθούν τα πρώτα προϊόντα που μπήκαν σε εφαρμογή [50]. Η πρώτη τους χρήση ήταν από την εταιρία DIOR το 1986, όχι όμως για φαρμακευτικό σκοπό. Η πρώτη φαρμακευτική εφαρμογή των λιποσωμάτων ήταν στις αρχές του 1990 (Alveofact® και Ambisome®) [51]. Τελικά τα λιποσώματα χρησιμοποιούνται ποικιλοτρόπως και μελετάται η θεραπευτική τους ικανότητα για πολλές ασθένειες. Έχει μελετηθεί η ικανότητά τους για διαδερμική μεταφορά φαρμάκων όπως, στεροειδών, τοπικών αναισθητικών και αντιμικροβιακών [52]. Επίσης για την θεραπεία μιας σειράς ασθενειών, όπως καρκίνος, μυκητιακές λοιμώξεις, λειψμανίαση κ.α., έχει προταθεί η χρήση λιποσωμάτων σαν σύστημα μεταφοράς του φαρμάκου εξαιτίας του μικρού αριθμού επιπλοκών που μπορούν να προκαλέσουν [53].

3.3 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ

Τα λιποσώματα μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με το μέγεθος τους (σε συνδυασμό με τον αριθμό των διπλοστοιβάδων) και το σχήμα τους, με το μέγεθος να είναι ο πιο συνηθής τρόπος [54]. Μονοστοιβαδικά λιποσώματα (SUV) και πολυστοιβαδικά λιποσώματα (MLV) είναι οι κυριότερες ομάδες λιποσωμάτων. Παρακάτω ακολουθεί διάγραμμα με τα είδη των λιποσωμάτων:



Εικόνα 9. Ταξινόμηση λιποσωμάτων με βάση το μέγεθος και τον αριθμό των στοιβάδων

3.3.1 MLV λιποσώματα

Τα MLV αποτελούνται από λιποσώματα που καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα μεγεθών. Τα λιποσώματα αυτά χαρακτηρίζονται από την παρουσία πολλαπλών διπλοστοιβάδων. Αυτή τους η ιδιότητα τους δίνει το πλεονέκτημα της μείωσης της απώλειας των ουσιών που έχουν ενσωματωμένες, στην παρουσία πλάσματος [55]. Επίσης τα λιποσώματα αυτής της ομάδας είναι εύκολο να παρασκευαστούν και η δομή τους είναι αρκετά αδιαπέραστη [45]. Ωστόσο το μεγάλο φάσμα μεγέθους που τα διακρίνει θεωρείται βασικό μειονέκτημα για ιατρικές εφαρμογές που απαιτούν παρεντερική χορήγηση τους. Με την επίδραση υπερήχων ή με την εξώθηση τους μέσω πολυκαρβονικών φίλτρων είναι δυνατή η μετατροπή τους σε λιποσώματα SUV, πιο ομοιόμορφης κατανομής μεγέθους [56].

MLV λιποσώματα μπορούν να παρασκευαστούν με πολλές τεχνικές. Ενδεικτικά μπορούν να αναφερθούν:

Μηχανική διασπορά

Η τεχνική αυτή βασίζεται στο σχηματισμό λεπτού υμενίου (film) κατά την εξάτμιση οργανικού ή οργανικών διαλυτών, στους οποίους έχει προηγουμένως διαλυθεί το λιπίδιο. Στην συνέχεια το υμένιο ενυδατώνεται με νερό ή ρυθμιστικό διάλυμα ή με διάλυμα της ουσίας που θέλουμε να εγκλωβιστεί [47].

Με μηχανική ανάδευση το υμένιο αποκολλάται από τα τοιχώματα, οπότε λαμβάνεται μία θολερή διασπορά με πολυστοιβαδικά λιποσώματα μεγάλου μεγέθους MLV. Η μείωση του μεγέθους τους μπορεί να επιτευχθεί όπως αναφέρθηκε και παραπάνω με την βοήθεια υπερήχων ή με εξώθηση μέσω φίλτρων.

Μέθοδος σφαιριδίων διαλύτη

Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει την διασκόρπιση στο διάλυμα ύδατος μικρών σφαιριδίων πτητικού υδροφοβικού διαλύτη στον οποίο έχουμε διαλύσει λιπίδιο. Τα MLVs διαμορφώνονται όταν γίνεται ελεγχόμενη εξάτμιση του οργανικού διαλύτη σε ένα υδατόλουτρο. Η μέθοδος αυτή προσφέρει MLV λιποσώματα ομοιογενούς κατανομής μεγέθους [57].

3.3.2 SUV λιποσώματα

Τα SUV λιποσώματα αποτελούνται από μια διπλοστοιβάδα και είναι τα λιποσώματα τα οποία μπορούν να πετύχουν το μικρότερο δυνατό μέγεθος. Το μέγεθός τους βρίσκεται μεταξύ 20-100 nm και εξαρτάται από την ιοντική δύναμη του υδατικού μέσου καθώς και από την σύνθεση της λιπιδικής μεμβράνης. Οι πιο συνηθισμένες τεχνικές παρασκευής τους είναι:

Μέθοδος υπερήχων

Εδώ MLVs εκτίθενται σε υπέρηχους και μετατρέπονται σε SUV. Τα κύρια μειονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι ο πολύ χαμηλός εσωτερικός όγκος/αποδοτικότητα εγκλωβισμού [58] και η πιθανή οξείδωση των λιπιδίων εξαιτίας του μεγάλου ποσού ενέργειας (υπέρηχοι) που δέχονται τα λιποσώματα [59].

Μέθοδος έγχυσης αιθέρα

Σύμφωνα με την τεχνική αυτή διάλυμα λιπιδίου σε διαιθυλαιθέρα ή μίγμα αιθέρα/μεθανόλης εγχέεται αργά σε υδατικό διάλυμα της ουσίας που θέλουμε να εγκλωβίσουμε, σε θερμοκρασία 55-65°C. Στην συνέχεια με εξάτμιση του διαλύτη, η οποία επιτυγχάνεται με εφαρμογή μειωμένης πίεσης, έχουμε τον σχηματισμό των λιποσωμάτων. Το μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι τα λιποσώματα που σχηματίζονται έχουν μεγάλο φάσμα μεγεθών (70-190 nm) και ότι η ουσία που θέλουμε να εγκλωβιστεί εκτίθεται σε υψηλές θερμοκρασίες και σε οργανικούς διαλύτες γεγονός που μπορεί να οδηγήσει στην αλλοίωση της [60, 61].

Μέθοδος έγχυσης αιθανόλης

Διάλυμα λιπιδίων σε αιθανόλη εγχέεται σε περίσσεια ρυθμιστικού. Τα SUV λιποσώματα διαμορφώνονται αμέσως. Τα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι ο πληθυσμός είναι ετερογενής, τα λιποσώματα είναι πολύ αραιά, είναι δύσκολο να αφαιρεθεί όλη η αιθανόλη επειδή διαμορφώνει αζεοτροπικό σύστημα με το νερό, και υπάρχει η πιθανότητα διάφορα βιολογικά ενεργά μακρομόρια να αδρανοποιηθούν παρουσία ακόμη και ελάχιστων συγκεντρώσεων αιθανόλης [62].

Γαλλική μέθοδος πίεσης κυττάρων

Η μέθοδος προβλέπει την εξώθηση MLV λιποσωμάτων, σε 20.000 PSI και σε θερμοκρασία 4°C, μέσω ενός μικρού στομίου. Η μέθοδος είναι απλή, γρήγορη, επαναλήψιμη σε σχέση με την μέθοδο υπερήχων [63], όμως τα λιποσώματα που προκύπτουν είναι κάπως μεγαλύτερα από τα SUV που προκύπτουν με την χρήση υπερήχων. Τα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι η θερμοκρασία είναι δύσκολο να επιτευχθεί και οι όγκοι που εφαρμόζεται είναι σχετικά μικροί (περίπου 50 ml μέγιστο).

Μέθοδος αφαίρεσης τασιενεργής ουσίας

Σύμφωνα με την τεχνική αυτή στην αρχή έχουμε διασπορά μιας τασιενεργής ουσίας και ενός φωσφολιπιδίου σε ένα υδατικό διάλυμα το οποίο εμπεριέχει την ουσία-φάρμακο που θέλουμε να εγκλωβιστεί. Στην συνέχεια ακολουθεί διήθηση

των παραγόμενων μικκυλίων ώστε να απομακρυνθεί η τασιενεργός ουσία και να παραληφθεί μια ομογενής διασπορά από μικρά μονοστοιβαδικά λιποσώματα. Το μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι η ικανότητα ενσωμάτωσης της ουσίας-φαρμάκου είναι μικρή εξαιτίας της συγκράτησης της από τον ηθμό κατά την διήθηση [47].

Μέθοδος αντίστροφων μικκυλίων

Η μέθοδος αυτή ξεκινά με την διασπορά ενός υδατικού διαλύματος της ουσίας που πρόκειται να εγκλωβιστεί σε ένα διάλυμα, οργανικού διαλύτη, του λιπιδίου. Στην συνέχεια έχουμε επαναδιασπορά σε ένα υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα και τον σχηματισμό ενός πολλαπλού γαλακτώματος. Τέλος αν εξατμιστεί ο διαλύτης έχουμε τον σχηματισμό μικρών μονοστρωματικών λιποσωμάτων [47].

3.3.3 LUV λιποσώματα

Τα LUV λιποσώματα χαρακτηρίζονται από μεγέθη μεγαλύτερα των 100 nm και η δομή τους αποτελείται από μια διπλοστοιβάδα. Ως συνέπεια για μια δεδομένη συγκέντρωση λιπιδίου τα MLV εγκλείουν μεγαλύτερο υδατικό όγκο σε σχέση με τα SUV [54]. Ωστόσο η απουσία πολλαπλών διπλοστοιβάδων καθιστά τα λιποσώματα περισσότερο εύθραυστα σε σχέση με τα SUV [45]. Οι πιο κοινές τεχνικές παρασκευής LUV λιποσωμάτων είναι οι ακόλουθες:

Μέθοδος εξάτμισης αντίστροφης φάσης

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην μετατροπή ενός γαλακτώματος σε διασπορά λιποσωμάτων. Στην αρχή παρασκευάζεται ένα Υ/Ε γαλάκτωμα του υδατικού διαλύματος της ουσίας που πρόκειται να ενσωματωθεί σε οργανικό διαλύτη που περιέχει το λιπίδιο. Ο διαλύτης στην συνέχεια απομακρύνεται με την χρήση περιστροφικού εξατμιστήρα και έτσι έχουμε τον σχηματισμό των λιποσωμάτων. Ανάλογα με τις συνθήκες παρασκευής μπορούν να σχηματιστούν SUV, LUV ή MLV [47].

Μέθοδος μικρορευστοποίησης

Η τεχνική αυτή βασίζεται στην πρόσκρουση δυο υγρών ροών μεγάλης ταχύτητας. Η μείωση του μεγέθους των παραγόμενων λιποσωμάτων μπορεί να επιτευχθεί με την ανακύκλωση του δείγματος. Με την μέθοδο αυτή παρασκευάζονται λιποσώματα μεγάλης ομοιομορφίας και μεγάλης ικανότητας εγκλωβισμού [47].

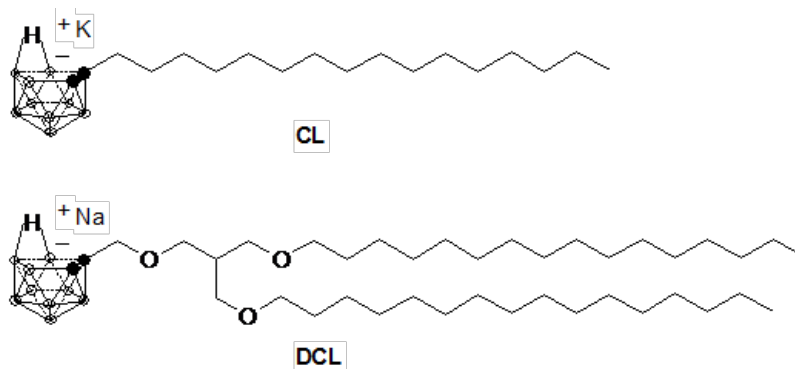
Εξώθηση μέσω φίλτρων

LUVs μπορούν να παρασκευασθούν διαπερνώντας MLV υπό συνθήκες αζώτου μέσω φίλτρων πολυκαρβονικών μεμβρανών. Τα λιποσώματα που παρασκευάζονται μ' αυτό τον τρόπο έχουν στενή κατανομή μεγέθους. Η εξώθηση γίνεται σε μέτριες πιέσεις (100-250 PSI) [64].

3.4 ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ ΜΕ ΒΟΡΙΟ

3.4.1 Nido-Carborane λιποσώματα

Η έννοια της ενσωμάτωσης λιπόφιλων ενώσεων βορίου εντός της λιπιδικής διτλοστιβάδας εισήχθη από τον Feakes και τους συνεργάτες του [65] που ήταν ο πρώτος που συνέθεσε αμφίφιλα nido-καρβοράνια από τα οποία η ιονική κεφαλή παρέχει το υδρόφιλο τμήμα της λιπιδικής αλυσίδας (εικ. 10).



Εικόνα 10. Nido-Carborane Lipids μονής και διπλής αλυσίδας [60, 61].

Τα αμφίφιλα nido καρβοράνια έχουν χρησιμοποιηθεί ως φορείς βορίου που προστίθενται στην διπλοστοιβάδα των λιποσωμάτων [65]. Σε Μικρά μονοστοιβαδικά λιποσώματα (διαμέτρου 40 έως 110 nm) ενσωματώθηκαν $K[nido-7-CH_3(CH_2)_{15}-7,8-C_2B_9H_{11}]$ και ακολούθησε έγχυση τους σε BALB / c ποντίκια που έφεραν EMT6 μαστικά αδενοκαρκινώματα. Ακόμη και μετά από έγχυση μικρών δόσεων (περίπου 5-10 mg βορίου ανά kg βάρους σώματος), η μέγιστη συγκέντρωση βορίου στους όγκους (περίπου 35 μ g βορίου ανά g ιστού) και η αναλογία συγκέντρωσής του στους όγκους σε σχέση με το αίμα (περίπου 8:1) υπερέβησαν τα επίπεδα που απαιτούνται για να υπάρχει θεραπευτικό αποτέλεσμα με την χρήση της BNCT.

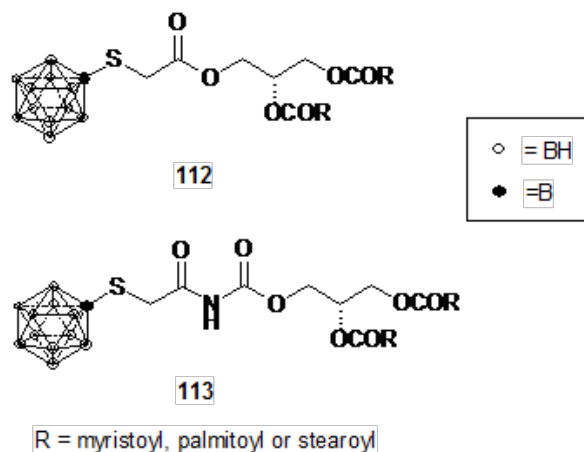
Οι ίδιοι ερευνητές [66] μελέτησαν επίσης μικρά μονοστοιβαδικά λιποσώματα (περίπου 65 nm), παρασκευασμένα από ένα 1:1 μίγμα distearoylphosphatidylcholine και cholesterol, ενσωματώνοντας δυο ενώσεις βορίου: την λιπόφιλη $K[nido-7-CH_3(CH_2)_{15}-7,8-C_2B_9H_{11}]$, σαν πρόσθετο στην λιπιδική διπλοστοιβάδα, και την υδρόφιλη $Na_3[a2-B_{20}H_{17}NH_2CH_2CH_2NH_2]$, εντός του υδατικού πυρήνα του λιποσώματος. Μετά από ενέσεις 13-18 mg του βορίου ανά kg βάρους σώματος σε αρουραίους Lounain, η μέγιστη συγκέντρωση βορίου που παρατηρήθηκε στο αρθρικό υγρό ήταν 29 μ g βορίου ανά g ιστού.

Θεραπευτικές συγκεντρώσεις βορίου επιτεύχθηκαν μετά από ενδοφλέβια χορήγηση (σε ινδικά χοιρίδια με καρκίνο του στόματος, 6 mg ανά kg βάρους σώματος) λιποσωμάτων που ενσωμάτωναν $K[nido-7-CH_3(CH_2)_{15}-7,8-C_2B_9H_{11}]$ στην διπλοστοιβάδα και περιείχαν στον υδατικό πυρήνα ένα πυκνό υδατικό διάλυμα του υδρόφιλου $Na_3[ae-B_{20}H_{17}NH_3]$ [67].

Ένα nido-carborane λιπίδιο με διπλή λιπαρή αλυσίδα ενσωματώθηκε σε λιποσώματα από distearoylphosphatidylcholine (DSPC) τα οποία σταθεροποιήθηκαν με την προσθήκη χοληστερόλης σε αναλογία 25% με το DSPC [68]. Στα ίδια λιποσώματα εισήχθη τρανσφερίνη στην επιφάνεια τους, δημιουργώντας δεσμό με ομάδες PEG-CO₂H [69]. Μετά από ενέσιμη χορήγηση των λιποσωμάτων αυτών σε συγκεντρώσεις 7.2 mg/kg σωματικού βάρους (ποντικίων με όγκους) επιτεύχθηκε μια συγκέντρωση 22 μ g ανά mL όγκου. Μετά από ακτινοβολία νετρονίων, το μέσο χρονικό διάστημα επιβίωσης των ποντικών στους οποίους εφαρμόστηκε η αγωγή ήταν 31 ημέρες, ενώ στα ποντίκια ελέγχου (control) 21 ημέρες.

3.4.2 *Closo*-dodecaborate based liposomes

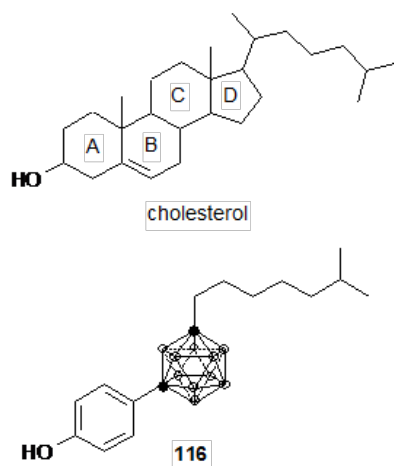
Η χημική σύνθεση των *closo*-dodecaborate (εικ. 11) λιπιδίων καθιερώθηκε εξαιτίας της χαμηλής τοξικότητας των $B_{12}H_{11}SH$ (BSH). Η δυνατότητα σχηματισμού ενός βοριομένου λιπιδίου με διπλή ουρά, στο οποίο η ομάδα $B_{12}H_{11}SH$ (BSH) παρέχει την υδρόφιλη λειτουργία, έχει αποδειχθεί από την συνδιαμόρφωση *S*-alkylated BSH, dimyristoylphosphatidylcholine, PEG-distearoylphosphatidylethanolamine και cholesterol [70]. Σε μια άλλη μελέτη, δύο παράγωγα βορανίου, τα *S*-(*N,N*-(2-dimyristoyloxyethyl)acetamido)thioundecahydro-*closo*-dodeca-borate και *S*-(*N,N*-(2-dipalmitoyloxyethyl)acetamido)thioundecahydro-*closo*-dodecaborate αναμίχθηκαν με ισομοριακές ποσότητες (DSPC) και cholesterol και τα λιποσώματα που σχηματίστηκαν δοκιμάστηκαν σε κυτταρικές σειρές V79 από ποντίκια [71]. Η μελέτες της τοξικότητας έκριναν αυτό το σκεύασμα σαν κατάλληλο για περαιτέρω αξιολόγηση, δεδομένου ότι δεν επιδεικνύει καμία ανιχνεύσιμη τοξικότητα σε συγκεντρώσεις <30 mM.



Εικόνα 11. *Closo*-dodecaborate λιπίδια [26].

3.4.3 *Closo*-dodecaborate cholesterolols

Για να συνδυαστούν οι σταθεροποιητικές ιδιότητες της χοληστερόλης με την πλούσια σε βόριο φύση των καρβορανίων, αναπτύχθηκαν σαν δομικά συστατικά της λιπιδικής διπλοσποϊβάδας, μιμητικά χοληστερόλης με παράγωγα βορίου [72] (εικ. 12).



Εικόνα 12. Cholesterol και cholesterol-mimicking carborane [26].

4. ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 ΦΥΣΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ

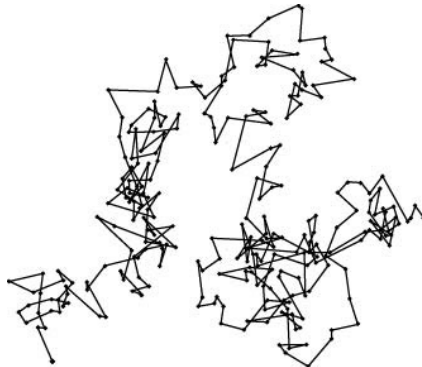
4.1.1 Σκέδαση φωτός

4.1.1.1 Κίνηση Brown

Το 1827 ο Brown ανακάλυψε τη παλμική κίνηση των σωματιδίων μέσα σε υγρό, που αποκαλείται έκτοτε κίνηση Brown.

Σύμφωνα με τη μοριακή κινητική θεωρία, η κίνηση Brown οφείλεται στις τυχαίες συγκρούσεις των μορίων του μέσου διασποράς με τα σωματίδια. Οι κατευθύνσεις των κινήσεων των μορίων του μέσου περί το σωματίδιο είναι τυχαία προσανατολισμένες, ενώ οι ταχύτητες τους κατανέμονται σύμφωνα με τον νόμο Maxwell- Boltzman. Η δύναμη που ασκείται πάνω στα σωματίδια είναι ανάλογη τόσο της συχνότητας των συγκρούσεων όσο και της ταχύτητας των συγκρούσεων των μορίων του μέσου. Η συχνότητα των συγκρούσεων είναι ανάλογη της πυκνότητας του μέσου σε μια περιοχή περί το σωματίδιο πάχους ίσου με τη μέση ελεύθερη διαδρομή των μορίων του μέσου. Επειδή η τοπική πυκνότητα ενός υγρού μεταβάλλεται, όπως άλλωστε και η μοριακή ταχύτητα, η ασκούμενη δύναμη ανά μονάδα επιφάνειας του σωματιδίου θα μεταβάλλεται επίσης διαρκώς. Την κάθε χρονική στιγμή θα ασκείται μια συγκεκριμένη συνισταμένη δύναμη στο σωματίδιο της οποίας το μέτρο και η κατεύθυνση θα αλλάζει συνεχώς με αποτέλεσμα το

σωματίδιο να κάνει την χαρακτηριστική αυτή κίνηση zig-zag που ονομάζουμε κίνηση Brown [43] (εικ. 13).



Εικόνα 13. Κίνηση Brown.

4.1.1.2 Μέτρηση μεγέθους λιποσωμάτων-δυναμική σκέδαση φωτός (*dynamic light scattering*)

Η σκέδαση του φωτός (*light scattering*) χρησιμοποιείται εδώ και δεκαετίες για τον υπολογισμό του μοριακού βάρους, την μέτρηση του μεγέθους, τον υπολογισμό του συντελεστή διάχυσης ή άλλων παραμέτρων μεγάλων μορίων. Τα τελευταία χρόνια μάλιστα η εφαρμογή της αρχής της σκέδασης του φωτός στον υπολογισμό του μεγέθους σωματιδίων μερικών νανομέτρων (nm), παρουσιάζει αλματώδη ανάπτυξη. Αυτό οφείλεται κυρίως στην χρήση των laser, καθώς και στην χρήση των ηλεκτρονικών υπολογιστών [47].

Η Δυναμική σκέδαση φωτός (επίσης γνωστή ως φασματοσκοπία συσχέτισης φωτονίων) είναι μια τεχνική στη φυσική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της κατανομής μεγέθους μικρών σωματιδίων σε εναιώρημα ή πολυμερών σε διάλυμα. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για να εξεταστεί η συμπεριφορά σύνθετων ρευστών, όπως συμπυκνωμένα διαλύματα πολυμερούς.

Αυτή η τεχνική είναι μία από τις πιο δημοφιλείς μεθόδους που χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό του μεγέθους των σωματιδίων. Η σκέδαση της μονοχρωματικής ακτινοβολίας από ένα εναιώρημα, οφείλεται κυρίως σε διακυμάνσεις της συγκέντρωσης, οι οποίες συνδέονται με την κίνηση Brown την οποία και εκτελούν τα σωματίδια μέσα στο υγρό μέσο. Όταν το φως σκεδάζεται από κινούμενο σωματίδιο, λόγω του φαινομένου Doppler, υφίσταται μια

μετατόπιση προς ελαφρώς χαμηλότερη ή υψηλότερη συχνότητα ανάλογα με το αν το σωματίδιο κινείται από ή προς τον παρατηρητή. Αυτή η αλλαγή σχετίζεται με το μέγεθος του σωματιδίου. Είναι δυνατόν να υπολογίσουμε την κατανομή μεγέθους των σωματιδίων και να δοθεί μια περιγραφή της κίνησης του σωματιδίου στο μέσο, μετρώντας τον συντελεστή διάχυσης των σωματιδίων και χρησιμοποιώντας τη συνάρτηση αυτοσυσχέτισης.

Η συνήθης μορφή της πειραματικής συνάρτησης αυτοσυσχέτισης περιγράφεται από την εξίσωση:

$$G(t) = A + |g^2(t)| = A + \exp(-2Dq^2t) = A + \exp\left(\frac{-2t}{t^*}\right) \quad (1)$$

όπου D είναι ο συντελεστής μεταφορικής διάχυσης του σωματιδίου και q είναι το διάνυσμα σκέδασης ή άνυσμα κύματος.

Ο χρόνος χαλάρωσης t^* , είναι ο χρόνος που απαιτείται για να μετατοπισθεί το σωματίδιο με διάχυση κατά μια απόσταση ίση με q^{-1} .

Από τον συντελεστή διάχυσης

$$D = \frac{1}{t^*q^2} \quad (2)$$

μπορούμε να υπολογίσουμε το συντελεστή τριβής,

$$f = \frac{kT}{D} \quad (3)$$

του σωματιδίου και από το f ,

$$f = 6\pi\eta R \quad (4)$$

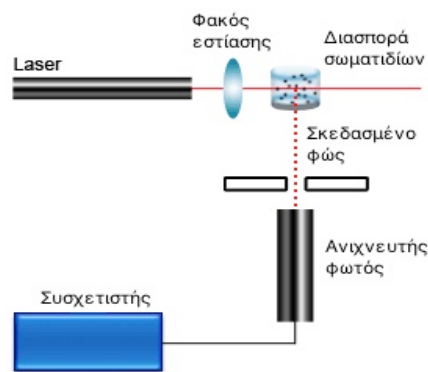
μπορούμε να υπολογίσουμε την ακτίνα μιας υδροδυναμικά ισοδύναμης με το σωματίδιο σφαίρας:

$$(3),(4) \quad D = \frac{kT}{6\pi\eta R} \quad (5)$$

όπου k η σταθερά Boltzman, T η απόλυτη θερμοκρασία, n το ιξώδες και R η ακτίνα της υδροδυναμικά ισοδύναμης, με το σωματίδιο, σφαίρας. [43].

Για τον υπολογισμό της υδροδυναμικής ακτίνας από την συνάρτηση αυτοσυσχέτισης, πρέπει να προηγηθεί κατάλληλη μαθηματική ανάλυση. Υπάρχουν δύο μέθοδοι μαθηματικής ανάλυσης που χρησιμοποιούνται ευρέως: η μέθοδος των αθροισμάτων (cumulant method) και οι τεχνικές κανονικοποίησης (regularization methods) μέσω του προγράμματος CONTIN.

Η μέθοδος της δυναμικής σκέδασης του φωτός έχει πολλά πλεονεκτήματα: πρώτα από όλα η διάρκεια του πειράματος είναι μικρή και είναι σχεδόν όλα αυτοματοποιημένα έτσι ώστε να μην απαιτείται εμπειρία για μετρήσεις ρουτίνας. Τυπική διάταξη για την μέτρηση σωματιδίων με δυναμική σκέδαση φωτός παρουσιάζεται στην εικ. 14.



Εικόνα 14. Σχηματικό διάγραμμα συσκευής δυναμικής σκέδασης φωτός.

4.1.1.3 Μέτρηση ζ-δυναμικού-ηλεκτροφορητική σκέδαση

Τα σωματίδια τα οποία βρίσκονται διασπαρμένα σε ένα διάλυμα έχουν την τάση να παρουσιάζουν επιφανειακό φορτίο. Εάν ασκηθεί ηλεκτρικό πεδίο σε αυτό το διάλυμα, τότε τα φορτισμένα σωματίδια θα κινηθούν ανάλογα με το φορτίο τους, είτε προς την άνοδο (αναφόρηση), είτε προς την κάθοδο (καταφόρηση) όπου και θα αποτεθούν. Το ηλεκτροκινητικό αυτό φαινόμενο ονομάζεται ηλεκτροφόρηση και έχει εκτενέστατα μελετηθεί και χρησιμοποιηθεί σε πολλές εφαρμογές.

Η ταχύτητα με την οποία θα κινηθούν είναι ανάλογη του μεγέθους του

φορτίου τους. Συνεπώς πρέπει να καταγράφεται η κατεύθυνση και η ταχύτητα κίνησης των σωματιδίων υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου ώστε να είναι δυνατός ο υπολογισμός της ιοντικής ευκινησίας και του ζ-δυναμικού.

Ισχύει για την ηλεκτροφόρηση η παρακάτω εξίσωση:

$$-V_e\psi = \eta v + c' \quad (1)$$

Αν v_E είναι η ταχύτητα ηλεκτροφόρησης (ταχύτητα της φορτισμένης επιφάνειας των σωματιδίων ως προς το ακίνητο μέσο διασποράς), οι οριακές συνθήκες για τον υπολογισμό της σταθεράς c' είναι:

$$-\psi = 0 \text{ και } v = 0 \text{ για } x = y$$

$$-\psi = \zeta \text{ και } v = -v_E \text{ στη διατμητική επιφάνεια}$$

Με βάση αυτές τις οριακές συνθήκες η εξίσωση (1) γίνεται για ηλεκτροφόρηση:

$$V_e\zeta = \eta v_E \quad (2)$$

ή

$$-V_e\psi = \eta v + c' \quad (\kappa a > 100) \quad (3)$$

όπου κa : αδιάστατο μέγεθος ($1/\kappa$: πάχος ηλεκτρικής διπλοστιβάδας,

a : ακτίνα καμπυλότητας φορτισμένης επιφάνειας)

Η εξίσωση (3) (εξίσωση Helmholtz-Smoluchowski) δείχνει ότι η ηλεκτροφορητική κινητικότητα ενός μη αγωγίμου σωματιδίου, για το οποίο το κa είναι μεγάλο σε όλα τα σημεία της επιφάνειάς του, πρέπει να είναι ανεξάρτητη του μεγέθους και του σχήματος του σωματιδίου για σταθερό δυναμικό ζ . Η εξίσωση (3) μπορεί εναλλακτικά να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του ζ .

Εάν το ηλεκτρικό πεδίο είναι χαμηλής έντασης, τότε η ταχύτητα με την οποία κινούνται τα σωματίδια προς το αντίθετα φορτισμένο ηλεκτρόδιο είναι ανάλογη του πεδίου που ασκείται και μπορεί να εκφραστεί από την σχέση [43]:

$$v_s = \mu_e E \quad (4)$$

όπου μ_e είναι η ηλεκτροφορητική κινητικότητα.

Το ζ-δυναμικό υπολογίζεται στο όριο Smoluchowski από την εξίσωση:

$$\mu_e = e\zeta/\eta \quad (5)$$

4.1.2 Θολερότητα (Turbidity)

4.1.2.1 Συγχώνευση (fusion)

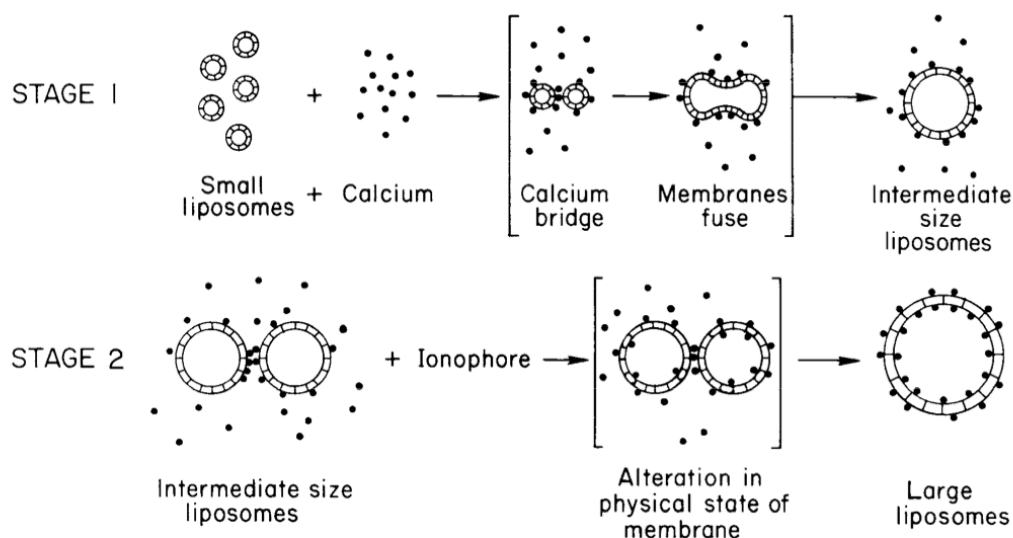
Η συγχώνευση (fusion) των μεμβρανών εμφανίζεται φυσικά σε ένα αριθμό βιολογικών διεργασιών, όπως στην ενδοκυτταρική διανομή των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και των μεταβολιτών από κυστίδια μεταφοράς, στην ενδοκυττάρωση, στην εξωκυττάρωση, στην κυτταρική διαίρεση, στη συγχώνευση κυττάρων, στην γονιμοποίηση κ.α. [73-75]. Επίσης έχει αποδειχθεί ότι φαινόμενα συγχώνευσης παρουσιάζονται και ανάμεσα σε λιποσώματα ή συνδυασμούς λιποσωμάτων με κύτταρα [76].

Έχει βρεθεί ότι ένας μεγάλος αριθμός παραγόντων μπορούν να επιταχύνουν το φαινόμενο της συγχώνευσης, οι οποίοι μπορεί να είναι από φορτισμένες οργανικές ενώσεις, όπως λεκιθίνες, μέχρι ιόντα μετάλλου [76, 77]. Ένα από τα πιο ενδιαφέροντα ιόντα είναι το ιόν του ασβεστίου. Μελέτες για τον μηχανισμό συγχώνευσης παρουσία ασβεστίου έχουν γίνει από τον Parahadjjorouλος και τους συνεργάτες του ενώ έχει καταστεί δυνατό να διακριθούν δυο στάδια του φαινομένου [76].

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΝΤΗΞΗΣ

Σύμφωνα με τους Thomas D. Ingolia και Daniel E. Koshland, Jr. [78] το φαινόμενο της συγχώνευσης των λιποσωμάτων διακρίνεται σε δυο στάδια (εικ. 15). Στο πρώτο στάδιο της συγχώνευσης, τα ιόντα ασβεστίου συνδέονται σχεδόν αποκλειστικά στο εξωτερικό τμήμα των λιποσωμάτων. Το δεύτερο στάδιο της συγχώνευσης ενεργοποιείται με την δέσμευση του ασβεστίου από την εσωτερική επιφάνεια της μεμβράνης του λιποσώματος. Σύμφωνα με τον μηχανισμό που προτείνουν τα ιόντα ασβεστίου εισέρχονται μέσα στην διπλοστοιβάδα εξαιτίας της

παρουσίας ενός ιονοφόρου, αλλάζοντας έτσι την σταθερότητα και τις ιδιότητες της μεμβράνης με αποτέλεσμα να οδηγείται το φαινόμενο στην δημιουργία ακόμα μεγαλύτερων λιποσωμάτων. Ο Miller και οι συνεργάτες του [79] αποδίδουν την είσοδο των ιόντων ασβεστίου στο εσωτερικό των λιποσωμάτων, σε αυξημένη ωσμωτική πίεση στο εσωτερικό της μεμβράνης.



Εικόνα 15. Στάδια μηχανισμού συγχώνευσης λιποσωμάτων παρουσία ιόντων ασβεστίου [78].

4.1.2.2 Μέτρηση θολερότητας

Η μέτρηση της θολερότητας είναι μια φασματοσκοπική τεχνική για τον προσδιορισμό της οπτικής πυκνότητας των κολλοειδών σωματιδίων. Συνήθως οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε μήκος κύματος μεταξύ 350 και 500 nm [81]. Η μέτρηση της θολερότητας μπορεί να προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για την κινητική των αντιδράσεων της μεμβράνης και του επιφανειοδραστικού, δεδομένου ότι οι αλλαγές στην διαλυτότητα της μεμβράνης αντανακλώνται στις αλλαγές στην οπτική πυκνότητα της διασποράς [82-85].

Η μέτρηση της θολερότητας χρησιμοποιείται επίσης ευρέως ως μία τεχνική για τη διερεύνηση του φαινομένου της συσσωμάτωσης και συγχώνευσης των λιποσωμάτων [86]. Η συσσωμάτωση μπορεί να αξιολογηθεί προσθέτοντας διάλυμα

CaCl₂ στα λιποσώματα και στην συνέχεια μετρώντας την θολερότητα που δημιουργείται στις λιποσωμικές διασπορές συναρτήσει του χρόνου. Οι μελέτες αυτές γίνονται για να μελετηθεί η συμπεριφορά των λιποσωμάτων παρουσία ιόντων Ca⁺⁺, δηλαδή σε συνθήκες που επικρατούν στο πλάσμα.

4.2 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ ΟΡΑΤΟΥ (uv-vis)

4.2.1 Γενικά

Η φασματοφωτομετρία απορροφήσεως αποτελεί μια από τις χρησιμότερες αναλυτικές τεχνικές στην ανάλυση. Πάρα πολλά φάρμακα απορροφούν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, ιδιαίτερα στην υπεριώδη περιοχή του φάσματος, και με τη χρησιμοποίηση του κατάλληλου οργάνου και τεχνικής είναι δυνατή η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός ενός φαρμάκου σε ένα σκεύασμα, σε ένα αντιδρών μείγμα ή σε ένα βιολογικό σύστημα.

Το τμήμα του μορίου που είναι υπεύθυνο για την απορρόφηση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, καλείται χρωμοφόρο και η εμφάνιση των χαρακτηριστικών ταινιών απορροφήσεως των διαφόρων χρωμοφόρων ομάδων σε ένα φάσμα απορροφήσεως είναι ενδεικτική για την ύπαρξη των ομάδων αυτών στο μόριο. Η φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού (200-800 nm) χρησιμοποιείται κυρίως για τον ποσοτικό προσδιορισμό ουσιών, με συσχέτιση του ποσοστού απορροφήσεως ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας προς τη συγκέντρωση της ουσίας που είναι υπεύθυνη για την απορρόφηση.

4.2.2 Νόμος BEER

Όταν μονοχρωματική ακτινοβολία διέρχεται από διάλυμα, που περιέχει την ουσία X, η οποία απορροφά, η ισχύς της ακτινοβολίας ελαττώνεται προοδευτικά κατά μήκος της διαδρομής, λόγω απορροφήσεως της από την ουσία X. Η ελάττωση της ισχύος ($P < P_0$), εξαρτάται από τη συγκέντρωση της ουσίας X και από την απόσταση που διάνυσε η δέσμη μέσα στο διάλυμα [87].

Οι σχέσεις αυτές εκφράζονται από τον νόμο των Lambert-Beer, που συνήθως αναφέρεται ως νόμος του Beer και διατυπώνεται με την μορφή:

$$A = \log \frac{P_0}{P} = -\log T = \log \left(\frac{100}{\%T} \right) = abc_{g/L} = \epsilon bc_{mol/L} \quad (1)$$

Όπου

A απορρόφηση

P_0 ισχύς προσπίπτουσας ακτινοβολίας

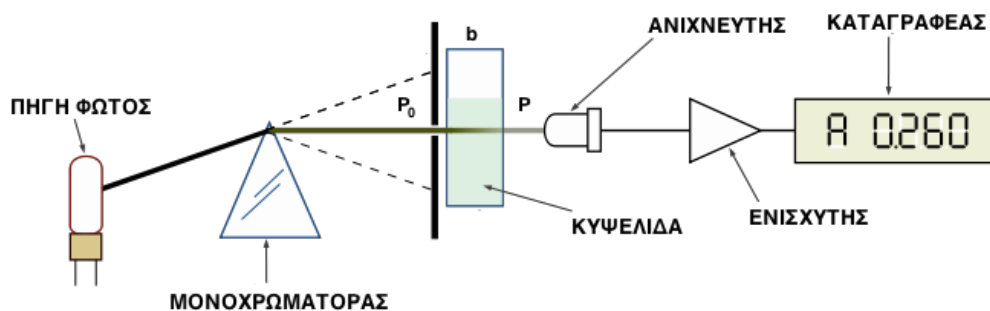
P ισχύς της εξερχόμενης ακτινοβολίας, μετά την διέλευση από το διάλυμα

T διαπερατότητα, ίση με P/P_0 που εκφράζεται και στα (%T)

a σταθερά αναλογίας, όταν η c εκφράζεται σε g/L, που καλείται απορροφητικότητα, με μονάδες $\text{g}^{-1}\text{Lcm}^{-1}$

b μήκος διαδρομής που διανύθηκε μέσα στο διάλυμα και εκφράζεται συνήθως σε cm (πάχος κυψελίδας)

ε σταθερά αναλογίας, όταν η c εκφράζεται σε mol/L, που καλείται μοριακή απορροφητικότητα, με μονάδες $\text{mol}^{-1}\text{Lcm}^{-1}$



Εικόνα 16. Σχηματικό διάγραμμα φασματοφωτομετρίας.

Για την μέτρηση της απορρόφησης χρησιμοποιούνται φωτόμετρα και φασματοφωτόμετρα [87] (εικ. 16).

4.3 ΜΟΡΙΑΚΗ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΑ

4.3.1 Φωταύγεια

Η ενέργεια που προσλαμβάνεται κατά την φωτοδιέγερση ενός μορίου με απορρόφηση ενός φωτονίου δε διατηρείται στο διεγερμένο μόριο, αλλά αποβάλλεται από το μόριο με διάφορους τρόπους, κυρίως υπό μορφή θερμότητας, αλλά και με εκπομπή δευτερεύουσας ακτινοβολίας, η οποία χαρακτηρίζεται με το γενικό όρο φωταύγεια. Ειδικότερα η φωταύγεια χαρακτηρίζεται ως φθορισμός, εάν η εκπομπή γίνει σε χρόνο 10^{-9} - 10^{-10} s μετά την διέγερση, και ως φωσφορισμός όταν

μεσολαβεί καθυστέρηση 10^{-4} - 10 s (ή και μεγαλύτερη) μέχρι την εκπομπή. Εξαιτίας της μικρής διάρκειας του φθορισμού, η μέτρηση της εντάσεως του γίνεται κατά την διάρκεια της διεγέρσεως και όχι μετά τον τερματισμό της [87].

4.3.2 Μηχανισμός φθορισμού

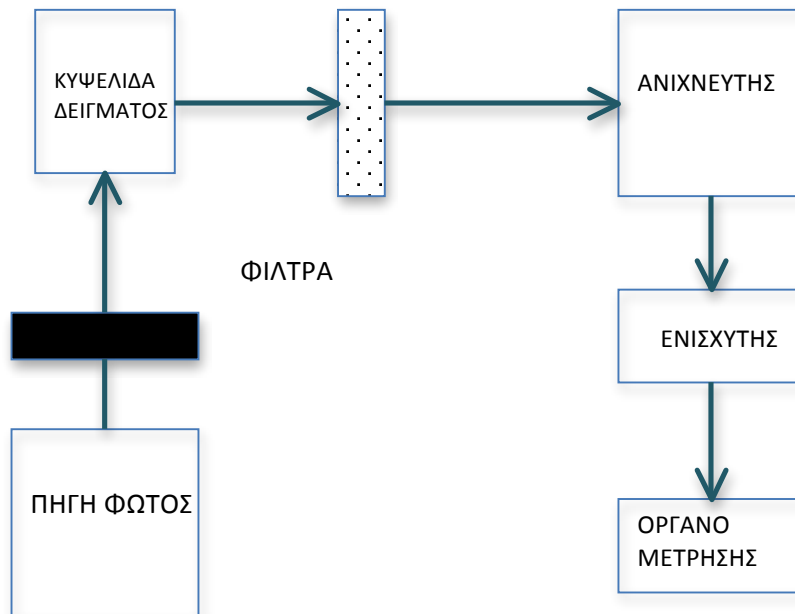
Μια ηλεκτρονική στάθμη ενέργειας ενός μορίου χαρακτηρίζεται ως απλή (singlet) και συμβολίζεται με το S, όταν η συνολική στροφορμή (spin) είναι μηδέν, ενώ όταν είναι διάφορο του μηδενός, χαρακτηρίζεται ως τριπλή (triplet) και συμβολίζεται με το T.

Η απορρόφηση της υπεριώδους και ορατής ακτινοβολίας από τα μόρια οφείλεται στις ηλεκτρονιακές μεταβάσεις από τη βασική (S_0) στις διεγερμένες καταστάσεις (S_1 , S_2 , T_1 , T_2). Η αποδιέγερση του μορίου γίνεται μέσω μιας διεργασίας που ονομάζεται θερμική επαναφορά, με την οποία πετυχαίνετε σταδιακά και ταχύτατα μεταφορά θερμότητας στα μόρια του διαλύτη με τα οποία συγκρούεται το διεγερμένο μόριο. Το αποτέλεσμα είναι η κατάληξη όλων των απλών διεγερμένων καταστάσεων στη χαμηλότερη στάθμη δονήσεως της διεγερμένης κατάστασης S_1 με έκλυση θερμότητας [87].

4.3.3 Φάσματα διεγέρσεως και εκπομπής (φθορισμού)

Κατά την μελέτη μιας ουσίας με την τεχνική της φθορισμομετρίας, λαμβάνονται δυο ειδών φάσματα, τα διεγέρσεως και τα εκπομπής. Το φάσμα διεγέρσεως είναι η γραφική απεικόνιση της εντάσεως της ακτινοβολίας φθορισμού F συναρτήσει του μήκους κύματος της ακτινοβολίας διεγέρσεως (excitation spectrum), ενώ η γραφική απεικόνιση της εντάσεως F συναρτήσει του μήκους κύματος της ακτινοβολίας φθορισμού αποτελεί το φάσμα εκπομπής (emission ή fluorescence spectrum) [87].

4.3.4 Λειτουργία φθορισμόμετρου



Εικόνα 17. Σχηματικό διάγραμμα φθορισμόμετρου.

Η ακτινοβολία που εκπέμπεται από την πηγή φωτός διέρχεται από ένα πρωτογενές φίλτρο (φίλτρο διεγέρσεως), ο οποίο επιτρέπει την διόδο μόνον εκείνου του τμήματος της δέσμης φωτός, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για την διεγερση των μορίων. Η ακτινοβολία φθορισμού εκπέμπεται από το δείγμα προς όλες τις κατευθύνσεις, συνήθως όμως μετράται υπό γωνία 90° ως προς τη διεγείρουσα ακτινοβολία, για ελαχιστοποίηση της ανιχνεύσεως της δέσμης διεγέρσεως και της παράσιτης ακτινοβολίας. Η ακτινοβολία φθορισμού διέρχεται από ένα δευτερογενές φίλτρο, το οποίο επιτρέπει τη διόδο μικρού τμήματος της και προσπίπτει στον ανιχνευτή. Το σήμα εξόδου του ανιχνευτή ενισχύεται και παρουσιάζεται σε ένα όργανο μετρήσεως [87] (εικ. 17).

4.3.5 Φαινόμενο quenching (απόσβεση)

Ένας από τους παράγοντες που επηρεάζουν την ακρίβεια του ποσοτικού προσδιορισμού, όταν χρησιμοποιείται φθορισμομετρικός ανιχνευτής, είναι η ελάττωση της έντασης φθορισμού (*Quenching* ή *απόσβεση*). Η απόσβεση μπορεί να οφείλεται σε πολλούς παράγοντες, όπως π.χ.

- στην αποδιέγερση των διεγερμένων μορίων της προσδιοριζόμενης ουσίας λόγω συγκρούσεων μεταξύ τους ή με μόρια άλλων ουσιών
- στον σχηματισμό συμπλόκων διαφορετικών φασματικών χαρακτηριστικών,
- σε φωτοδιάσπαση
- σε αυτοαπορρόφηση της ακτινοβολίας φθορισμού από μόρια της ουσίας.

Η αυτοαπορρόφηση συνεπάγεται καμπύλωση της καμπύλης αναφοράς προς τον άξονα των συγκεντρώσεων, μπορεί δε να διαπιστωθεί με μέτρηση της εντάσεως φθορισμού του δείγματος και στην συνέχεια δείγματος που έχει αραιωθεί [87].

Για την μέτρηση της σταθερότητας των λιποσωμάτων μπορεί να χρησιμοποιηθεί καλσεΐνη η οποία παρουσιάζει την ιδιότητα της αυτοαπόσβεσης σε μεγάλες συγκεντρώσεις, οπότε και μειωμένη η ένταση φθορισμού. Οι λιποσωμικές διασπορές παρασκευάζονται σε υδατικό διάλυμα καλσεΐνης μεγάλης συγκέντρωσης. Η καλσεΐνη σαν υδρόφιλο μόριο που είναι εγκλωβίζεται μέσα στα λιποσώματα. Μετρώντας την μεταβολή της έντασης φθορισμού σε συνάρτηση με τον χρόνο, που οφείλεται στην αραιώση της καλσεΐνης καθώς απελευθερώνεται, μπορεί να υπολογιστεί ο ρυθμός αποδέσμευσης της καλσεΐνης από τα λιποσώματα [80].

4.3.6 Διαλυτοχρωμισμός (solvatochromism)

Διαλυτοχρωμισμός είναι η ικανότητα μιας ουσίας να αλλάζει χρώμα όταν αλλάζει η πολικότητα του διαλύτη. Ο αρνητικός διαλυτοχρωμισμός αντιστοιχεί σε υψοχρωμική μετατόπιση (ή μπλε μετατόπιση) και πραγματοποιείται με την αύξηση της πολικότητας του διαλύτη. Η αντίστοιχη βαθυχρωμική (ή ερυθρά) μετατόπιση ονομάζεται θετικός διαλυτοχρωμισμός. Το πρόσημο του διαλυτοχρωμισμού εξαρτάται από την διαφορά στην διπολική ροπή της βασικής από τις διεγερμένες καταστάσεις της χρωμοφόρου [88].

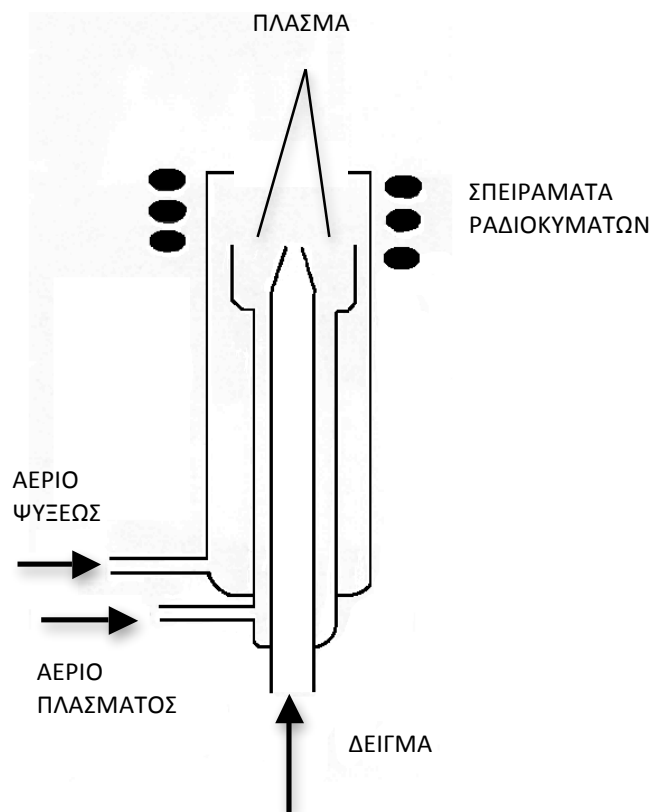
Το φαινόμενο του διαλυτοχρωμισμού οδηγεί σε μια ισχυρή εξάρτηση των φασμάτων εκπομπής και απορρόφησης με την πολικότητα του διαλύτη. Δεδομένου ότι ο πολικότητες της βασικής και μιας διεγερμένης κατάστασης μιας χρωμοφόρου

ουσίας είναι διαφορετικές, μια αλλαγή στην πολικότητα του διαλύτη θα οδηγήσει σε αλλαγή του ενεργειακού χάσματος των δυο αυτών ενεργειακών καταστάσεων. Συνεπώς μεταβολές στη θέση, στο σχήμα και στην ένταση των φασμάτων απορρόφησης μπορούν να παρατηρηθούν εξαιτίας των ειδικών αλληλεπιδράσεων της διαλυμένης ουσίας με τα μόρια του διαλύτη. Κατά κανόνα το φάσμα διατηρεί το σχήμα του, απλώς μετατοπίζεται σε μεγαλύτερα ή μικρότερα μήκη κύματος, εάν η ποσοτική σχέση σε ένα μίγμα διαλυτών αλλάξει [89]. Αλλαγές στα φάσματα μπορούν να παρουσιαστούν και σε κolloειδή συστήματα λιπιδίων, όπως λιποσώματα και μικρογαλακτώματα [90].

4.4 ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ ΕΚΠΟΜΠΗΣ ΜΕ ΕΠΑΓΩΓΙΚΑ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΟ ΠΛΑΣΜΑ (INDUCTIVELY COUPLED PLASMA, ICP)

Η φασματοφωτομετρία εκπομπής με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (ICP) είναι μια τεχνική η οποία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό μέχρι και 60 στοιχείων, με υψηλή ευαισθησία και μεγάλη γραμμική αναλυτική περιοχή. Σαν μέσο διεγέρσεως του δείγματος χρησιμοποιείται πλάσμα αργού, το οποίο παρουσιάζει μεγάλη σταθερότητα, σε αντίθεση με τις φασματοσκοπικές τεχνικές τόξου και εκκενώσεως.

Το σύστημα του πυρσού (εικ. 18) αποτελείται από τρεις ομόκεντρους σωλήνες από χαλαζία. Στον μεσαίο σωλήνα εισέρχεται υψηλής καθαρότητας αργό το οποίο χρησιμεύει για τον σχηματισμό του πλάσματος. Το αέριο διέρχεται από ένα ισχυρό μαγνητικό Πεδίο, που δημιουργείται από ένα επαγωγικό πηνίο ραδιοκυμάτων (27 MHz). Το δημιουργούμενο πλάσμα έχει θερμοκρασία 6000-10000⁰K. Στον εξωτερικό σωλήνα εισέρχεται ένα άλλο ρεύμα αργού το οποίο χρησιμεύει για την ψύξη του μεσαίου σωλήνα και την προστασίας του από το πλάσμα υψηλής θερμοκρασίας που περιέχει. Το διάλυμα του δείγματος εισάγεται από τον κεντρικό σωλήνα με ένα συμβατικό πνευματικό εκνεφωτή και την βοήθεια ρεύματος αργού. Η υψηλή θερμοκρασία του πλάσματος προκαλεί ποσοτική εξαέρωση και ατομοποίηση του δείγματος [87].



Εικόνα 18. Σχηματικό διάγραμμα πυρσού φασματοφωτομέτρου εκπομπής με επαγωγικό συζευγμένο πλάσμα.

4.5 ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ (MASS SPECTROSCOPY, MS)

Η φασματομετρία μάζας είναι μία ευαίσθητη τεχνική για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό χημικών ενώσεων. Βασίζεται στον διαχωρισμό των μαζών φορτισμένων σωματιδίων (κυρίως κατιόντων) με την βοήθεια κατάλληλης διάταξης και την εύρεση της αντιστοιχίας των μαζών των λαμβανομένων ιόντων με την δομή της πρόδρομης ένωσης.

Όταν ηλεκτρόνια, υψηλής ενεργειακής στάθμης, προσκρούουν σε μόρια μιας ένωσης, που βρίσκεται σε αέρια φάση και σε συνθήκες κενού, τα μόρια της ένωσης μετατρέπονται σε ιόντα τα οποία συνήθως έχουν θετικό φορτίο. Τα ιόντα αυτά ευθυγραμμίζονται σε λεπτή δέσμη με την βοήθεια ηλεκτρικών πεδίων. Στην

συνέχεια η δέσμη περνάει από μαγνητικό ή ηλεκτρικό πεδίο και τα ιόντα ανάλογα με το λόγο μάζα/ηλεκτρικό φορτίο (m/z) αποκλίνει από την αρχική κατεύθυνση.

Το διάγραμμα που λαμβάνεται παρουσιάζει την ένταση του μετρούμενου ρεύματος σε συνάρτηση με τον λόγο m/z και ονομάζεται φάσμα μαζών [87].

4.6 INDUCTIVELY COUPLED PLASMA MASS SPECTROSCOPY, ICP-MS

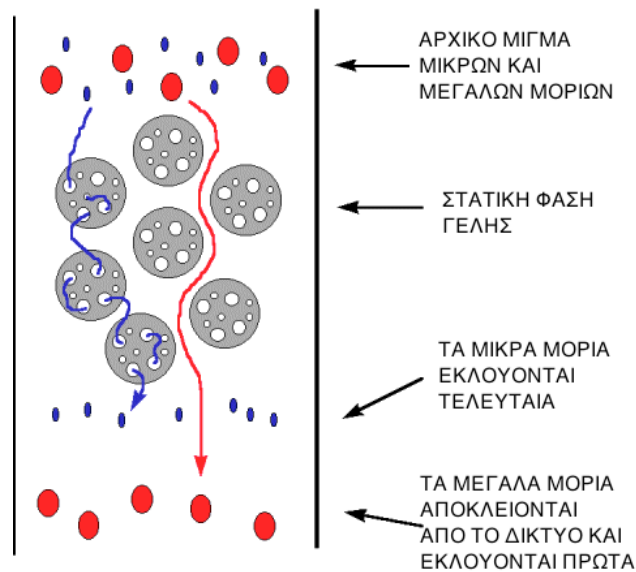
Η τεχνική ICP-MS συνδυάζει την φασματοφωτομετρία εκπομπής με επαγωγικό συζευγμένο πλάσμα με την φασματομετρία μάζας. Στον πυρσό της ICP τα άτομα των στοιχείων του δείγματος μετατρέπονται σε ιόντα και κατόπιν αυτά διαχωρίζονται και ανιχνεύονται από τον φασματογράφο μαζών.

4.7 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΥ (ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΓΕΛΗΣ)

Οι χρωματογραφικές τεχνικές χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό και τον προσδιορισμό των συστατικών μειγμάτων ανόργανων ή οργανικών ουσιών. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με κατανομή των συστατικών μεταξύ δυο φάσεων, μιας στατικής και μιας κινητής που βρίσκονται στην χρωματογραφική στήλη. Ο διαχωρισμός βασίζεται στις διάφορες που υπάρχουν σε ορισμένες ιδιότητες των συστατικών, όπως είναι το σημείο ζέσεως, η πολικότητα, τα ηλεκτρικά φορτία, το μέγεθος των μορίων κ.α.

Στην υγρή χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (εικ. 19), ή πιο γνωστή σαν χρωματογραφία γέλης, τα μόρια των συστατικών ενός μίγματος, μετακινούνται με τη βοήθεια μιας υγρής κινητής φάσης μέσα στο πορώδες δίκτυο στατικής φάσης και διαχωρίζονται με βάση το μέγεθος τους. Έτσι, τα μόρια μεγάλου μεγέθους διέρχονται ταχέως χωρίς να εισέρχονται στο δίκτυο, ενώ τα μόρια μικρού μεγέθους μπαίνουν στο δίκτυο της στατικής φάσης αργούν να εξέλθουν από την στήλη, αφού χρειάζονται μεγαλύτερο όγκο κινητής φάσης για να τα παρασύρει.

Ως στατικές φάσεις χρησιμοποιούνται κυρίως υδρόφιλες πηκτές από διακλαδούμενα πολυμερή δεξτράνης (Sephadex G), αγαρόζης (Sephacrose B) ή πολυακρυλαμιδίου (Bio-Gel-P) [87].



Εικόνα 19. Μηχανισμός χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού.

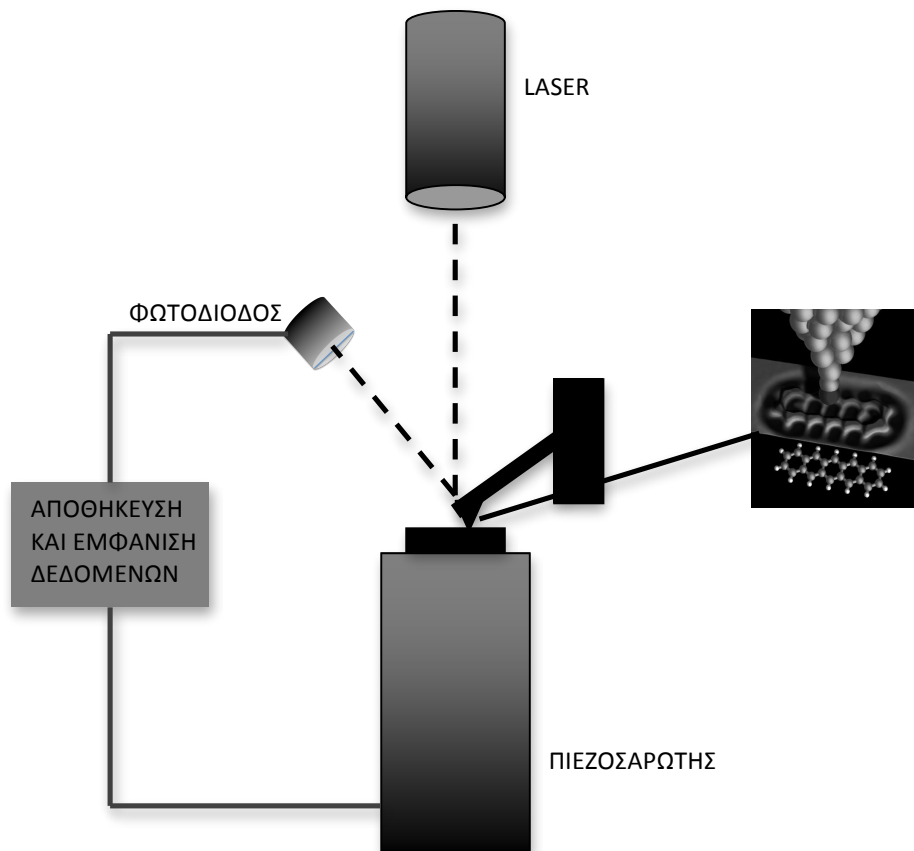
4.8 ΣΑΡΩΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΑΚΙΔΑΣ (SCANNING PROBE MICROSCOPY-SPM)

Με τον όρο σαρωτική μικροσκοπία ακίδας περιγράφεται ένα σύνολο τεχνικών οι οποίες βασίζονται στην αλληλεπίδραση μιας λεπτής ακίδας με την επιφάνεια που θέλουμε να μελετήσουμε. Οι τεχνικές αυτές διαφέρουν μεταξύ τους στο είδος της αλληλεπίδρασης της ακίδας με το δείγμα, ενώ είναι ίδιος ο τρόπος σάρωσης της επιφάνειας και η επεξεργασία και παρουσίαση των αποτελεσμάτων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε μορφή εικόνας, συνήθως ατομικής διακριτικής ικανότητας.

Οι δυο κυριότερες τεχνικές είναι η Σαρωτική Μικροσκοπία Σήραγγας (Scanning Tunnelling Microscopy-STM) και η Σαρωτική Μικροσκοπία Ατομικών Δυνάμεων (Scanning Force Microscopy-SFM ή Atomic Force Microscopy-AFM) [87].

4.9 ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΑΤΟΜΙΚΩΝ ΔΥΝΑΜΕΩΝ (AFM)

Η λειτουργία της τεχνικής AFM παρουσιάζεται σχηματικά στην εικόνα 20:



Εικόνα 20. Η αρχή λειτουργίας της μικροσκοπίας ατομικής δύναμης AFM.

Η ακίδα στην τεχνική της μικροσκοπίας ατομικής δύναμης (AFM) είναι κατασκευασμένη από διαμάντι ή νιτρίδιο του πυριτίου, Si_3N_4 και είναι προσαρμοσμένη στο άκρο ενός προ-εντεταμένου ελάσματος. Στο πάνω μέρος του ελάσματος υπάρχει καθρέφτης στον οποίο αντανακλάται η ακτίνα laser. Καθώς η ακίδα σαρώνει την υπό μελέτη επιφάνεια, 'ανεβοκατεβαίνει' διερχόμενη από 'λόφους' και 'κοιλιάδες'. Αυτή η κατακόρυφη κίνηση της ακίδας παρακολουθείται οδηγώντας την ακτίνα που αντανακλάται σε ειδικό φωτοαισθητήρα θέσης. Το σήμα που λαμβάνει ο αισθητήρας καταγράφεται και επεξεργάζεται κατάλληλα και η μελετώμενη επιφάνεια ανεβαίνει ή κατεβαίνει ανάλογα, ώστε στο έλασμα να ασκείται σταθερή δύναμη [87].

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η θεραπεία με δέσμευση νετρονίων από βόριο (BNCT) αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη θεραπευτική τεχνική, η οποία πρώτα περιλαμβάνει την επιλεκτική διανομή παραγόντων πλούσιων σε ^{10}B στους όγκους και μετά, την ακτινοβόληση τους με νετρόνια χαμηλής ενέργειας. Ο βομβαρδισμός αυτός με νετρόνια έχει σαν αποτέλεσμα την πυρηνική σχάση του βορίου, και την απόδοση σωματιδίων α υψηλής ενέργειας καθώς και πυρήνων λιθίου ^7Li , η οποία τελικά προκαλεί την επιλεκτική καταστροφή των καρκινικών κυττάρων.

Για την μεταφορά των παραγόντων βορίου στα καρκινικά κύτταρα έχουν προταθεί διάφορες φαρμακομορφές όπως τα γαλακτώματα, τα λιποσώματα, τα δενδριμερή και πιο πρόσφατα, οι νανοσωλήνες άνθρακα.

Στην παρούσα εργασία παρασκευάστηκαν λιποσώματα με την τεχνική έγχυσης αιθανόλης (ethanol injection) από τρία είδη λιπιδίων (Phosphatidylcholine [PC], Dimyristoylphosphatidylcholine [DMPC], Dipalmytoylphosphatidylcholine [DPPC]) και πραγματοποιήθηκε φυσικοχημική μελέτη τόσο αυτών όσο και των αντίστοιχων λιποσωμάτων που είχαν εγκλωβίσει ένα παράγωγο βορίου, το καρβοράνιο ($\text{B}_{18}\text{C}_{34}\text{N}_4\text{H}_{64}$) nido-carborane salt of Dequalinium. Τα παράγωγα αυτά καρβορανίου παρουσιάζουν επιλεκτική συγγένεια με τα μιτοχόνδρια των κυττάρων (Delocalized Lipophilic Cations). Επιπλέον το Dequalinium έχει δείξει αντικαρκινική δράση σε καρκίνο ουροδόχου κύστεως.

Ενώ υπάρχουν αρκετές *in vivo* μελέτες λιποσωμικών διασπορών με Βόριο ή παράγωγα του Βορίου, η φυσικοχημική σταθερότητα τους δεν έχει μελετηθεί σε τόση έκταση. Η σταθερότητα μιας διασποράς είναι απαραίτητη προϋπόθεση προκειμένου η μορφή αυτή να έχει το επιθυμητό θεραπευτικό αποτέλεσμα κατά τη χορήγηση.

Για το σκοπό αυτό μετρήθηκε η *in vitro* σταθερότητα των λιποσωμάτων παρουσία και απουσία πρωτεϊνών πλάσματος, η κατανομή μεγέθους τους και το επιφανειακό τους φορτίο και έγινε μελέτη του φαινομένου της συσσωμάτωσης των λιποσωμάτων μετρώντας την μεταβολή της θολερότητας συναρτήσει του χρόνου, παρουσία ιόντων ασβεστίου Ca^{2+} . Επίσης αποτυπώθηκε η τοπογραφία των λιποσωμάτων με μικροσκοπία ατομικής δύναμης (Atomic force microscopy [AFM])

και υπολογίστηκε το ποσοστό εγκλωβισμού του βορίου στα λιποσώματα με την χρήση φασματοσκοπίας με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα [Inductive couple plasma-mass spectroscopy ICP-MS]).

Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

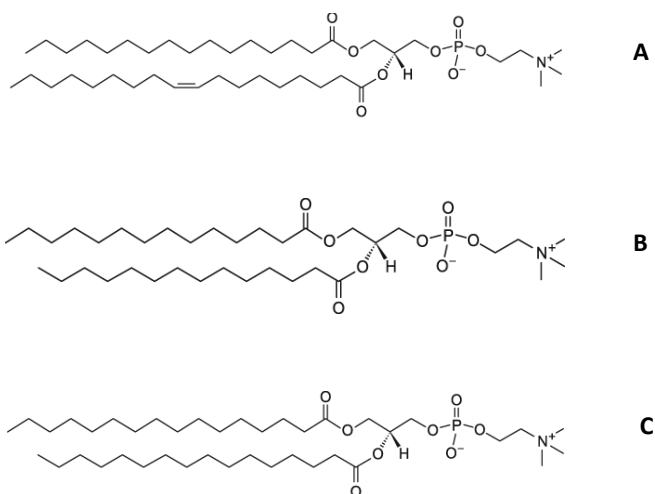
1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ

1.1 ΟΡΓΑΝΑ

- Μαγνητικός αναδευτήρας της εταιρίας FALC
- Περιστροφικός εξατμιστήρας της εταιρίας BUCHI
- Αναλυτικός ζυγός Mettler
- Λουτρό υπερήχων ELMA transsonic 780
- Στήλη χρωματογραφίας (1x35 cm) πληρωμένη με SEPHADEX-G 50 της εταιρίας SIGMA

1.2 ΥΛΙΚΑ

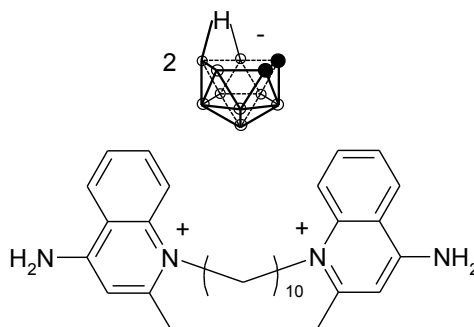
- ΛΙΠΙΔΙΑ ΣΕ ΜΟΡΦΗ ΣΚΟΝΗΣ
 - PC (L-α-Phosphatidylcholine 95%) από την εταιρεία Avanti Polar Lipids Inc. (εικ. 21A)
 - DMPC (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) από την εταιρεία Avanti Polar Lipids Inc. (εικ. 21B)
 - DPPC(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) από την εταιρεία Avanti Polar Lipids Inc. (εικ. 21C)



Εικόνα 21. Συντακτικοί τύποι (A) PC, (B) DMPC, (C) DPPC.

➤ ΚΑΡΒΟΡΑΝΙΟ

- $(B_{18}C_{34}N_4H_{64})$ nido-carborane salt of Dequalinium (εικ. 22)



Εικόνα 22. Συντακτικός τύπος $(B_{18}C_{34}N_4H_{64})$ nido-carborane salt of Dequalinium.

➤ ΑΙΘΑΝΟΛΗ από την εταιρία MERCK

1.3 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

1.3.1 Παρασκευή διαλύματος καλσεΐνης 25mM

Ζυγίζονται 0.311g στερεής καλσεΐνης (Calcein Sigma-Aldrich) και προστίθενται σε 20 mL PBS (PH=7.4). Το διάλυμα τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων μέχρι να διαλυθεί τελείως η στερεή καλσεΐνη. Μετά τη διάλυση των στερεών συστατικών και το σχηματισμό ομοιογενούς μίγματος ακολουθεί η ρύθμιση του pH μέχρι την τιμή του pH =7.4 με προσθήκη διαλύματος ΝΑΟΗ. Το διάλυμα καλσεΐνης διατηρείται στους 4°C.

1.3.2 Παρασκευή Ρυθμιστικού διαλύματος PBS pH 7.4

Ζυγίζουμε 8 g NaCl, 0.19 g KCl, 0.2 g KH₂PO και 1.46 g Na₂HPO₄·12H₂O (από την εταιρία MERCK) τα οποία μεταφέρουμε σε μια κωνική φιάλη. Προσθέτουμε 1000 mL απιονισμένου νερού και τοποθετούμε την κωνική φιάλη σε μαγνητικό

αναδευτήρα για περίπου 15 λεπτά μέχρι τα στερεά υλικά διαλυθούν τελείως. Στην συνέχεια μετράτε το pH του διαλύματος και ρυθμίζεται μέχρι την επιθυμητή τιμή 7.4 προσθέτοντας σταγόνες από διαλύματα NaOH και HCl ανάλογα με το αν χρειάζεται να αυξηθεί ή να μειωθεί.

1.4 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ

Τα λιποσώματα παρασκευάστηκαν με την μέθοδο της έγχυσης αιθανόλης (ethanol injection method).

Σε φιαλίδιο τοποθετούμε την ποσότητα που λιπιδίου (5 mg) σε 1 mL αιθανόλης. Σε κάποιες περιπτώσεις στο αιθανολικό διάλυμα προστίθεται και το παράγωγο του καρβορανίου σε αναλογία (1:1 βάρος κατά βάρος, w/w) με το λιπίδιο. Το φιαλίδιο τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων για μισή ώρα, έως ότου διαλυθεί πλήρως το λιπίδιο και το καρβοράνιο.

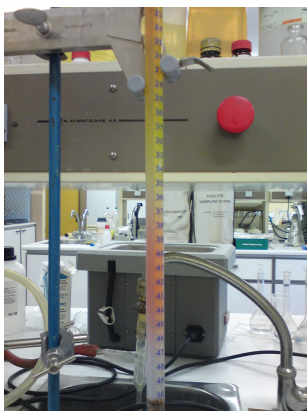
Στην συνέχεια σε ένα άλλο φιαλίδιο εισάγουμε 3 mL διαλύματος PBS-καλσεΐνης (τελικής συγκέντρωσης 25 mM) και το τοποθετούμε πάνω σε μαγνητικό αναδευτήρα. Με την χρήση πιπέτας εγχέουμε με αργό ρυθμό (~1mL/min) το διάλυμα του λιπιδίου πάντα με ταυτόχρονη ανάδευση (~700rpm/min). Μόλις ολοκληρωθεί η έγχυση του διαλύματος του λιπιδίου συνεχίζουμε την ανάδευση για περίπου 15 λεπτά ακόμα.

Ακολουθεί η απομάκρυνση της αιθανόλης. Το διάλυμα εισάγεται στην σφαιρική φιάλη του περιστροφικού εξατμιστήρα ο οποίος ρυθμίζεται περίπου στους 40°C. Η διαδικασία της εξάτμισης κρατάει περίπου 10 λεπτά. Στην συνέχεια τα λιποσώματα αφήνονται σε θερμοκρασία 37°C για 45 λεπτά ώστε να σταθεροποιηθεί θερμοδυναμικά η λιπιδική διπλοστοιβάδα.

1.5 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ

Από το καθαρό από αιθανόλη πλέον διάλυμα των λιποσωμάτων περνούμε 1 mL με μια πιπέτα και το περνάμε από τη στήλη της χρωματογραφίας γέλης (Sephadex-G50) για να απομακρύνουμε την ελεύθερη καλσεΐνη η οποία δεν έχει εγκλωβιστεί από τα λιποσώματα. Κατά τον διαχωρισμό βλέπουμε να σχηματίζονται δυο ζώνες (εικ. 23). Η στενή πορτοκαλί ζώνη που εμπεριέχει τα λιποσώματα και τα

οποία εκλούονται πρώτα από την στήλη και μια διευρυμένη κίτρινου χρώματος η οποία είναι η ελεύθερη καλσεΐνη.



Εικόνα 23. Στήλη χρωματογραφίας γέλης και διαχωρισμός των λιποσωμάτων από την εξωτερική καλσεΐνη

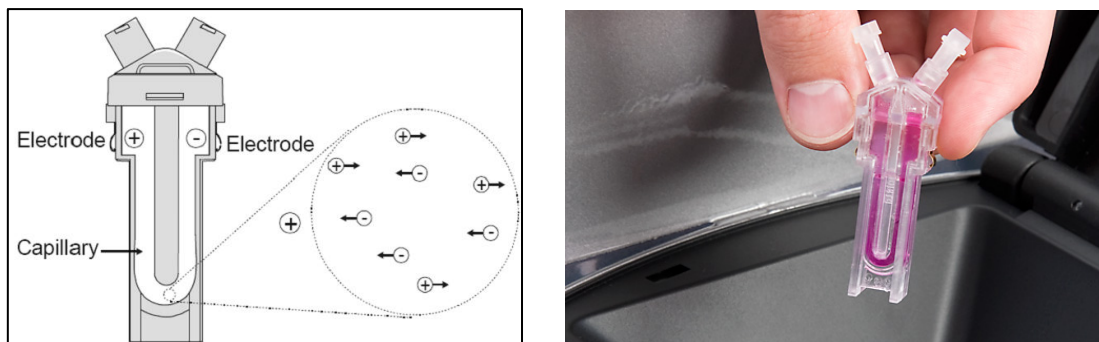
Σαν κινητή φάση χρησιμοποιείται PBS pH 7.4 ενώ σαν ακίνητη Sephadex G-50. Αφού ολοκληρωθεί ο καθαρισμός των λιποσωμάτων αφήνουμε την στήλη να τρέχει για περίπου 15 λεπτά μέχρι να απομακρυνθεί όλη η ελεύθερη καλσεΐνη και γενικότερα να καθαριστεί ώστε να είναι έτοιμη για να χρησιμοποιηθεί εκ νέου.

Η στήλη προηγουμένως είχε κορεσθεί με λιπίδιο και παράγωγο του καρβορανίου. Η απόδοση της στήλης υπολογίσθηκε σε 90%.

2. ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΚΑΙ Ζ-ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΤΩΝ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ

Η μέτρηση του μεγέθους και του ζ-δυναμικού των λιποσωμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση συσκευής Zetasizer NanoZS της Malvern η οποία είναι εφοδιασμένη με πηγή ακτινοβολίας laser He/Ne 25 mW.

Κατά τη διαδικασία αυτή, μικρή ποσότητα από τα λιποσώματα που λαμβάνονται μετά τον καθαρισμό τους στην στήλη, τοποθετούνται σε ειδική κυψελίδα με ηλεκτρόδια (εικ. 24) για την μέτρηση του ζ-δυναμικού.



Εικόνα 24. Κυψελίδα με ηλεκτρόδια για την μέτρηση του ζ-δυναμικού.

Στις ρυθμίσεις του οργάνου ως δείκτης διαθλάσεως (Refractive Index R.I.), λαμβάνεται ο δείκτης διαθλάσεως του νερού $R.I.=1.330$. Το μήκος της προσπίπτουσας δέσμης φωτός ρυθμίζεται στα 14.30 mm υπό σταθερή γωνία 178° , ενώ οι μετρήσεις λαμβάνουν χώρα στους $25^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Πρώτα λαμβάνει χώρα η μέτρηση του μεγέθους και ακολουθεί η μέτρηση του ζ-δυναμικού με την χρήση της συσκευής που φαίνεται στην εικόνα 25.



Εικόνα 25. Zetasizer Nano ZS της Malvern.

3. ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ

3.1 ΥΛΙΚΑ

- Calcein (Sigma-Aldrich)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich)
- ΒΟΕΙΟΣ ΟΡΟΣ FBS (GIBCO INVITROGEN)
- Nile Red (Sigma-Aldrich)

3.2 ΟΡΓΑΝΑ

- RF 5301 SHIMADZU (εικ. 26)



Εικόνα 26. Φθορισμόμετρο RF 5301 SHIMADZU.

3.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Στο στάδιο αυτό προσδιορίζεται η σταθερότητα των λιποσωμάτων μετρώντας τη συγκράτηση της καλσεΐνης στα λιποσώματα (latency). Ο προσδιορισμός της συγκράτηση έγινε μετρώντας το φθορισμό των αντίστοιχων δειγμάτων πριν και μετά από την προσθήκη διαλύματος απορρυπαντικού Triton X-100 περιεκτικότητας 10%.

Από 0 έως 24 ώρες ανά τακτά χρονικά διαστήματα (0, 1, 2, 3, 24) λαμβάνονται δείγματα για μέτρηση της έντασης φθορισμού. Μια μικρή ποσότητα

δείγματος (10μL) μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα και ακολουθεί προσθήκη 4mL ρυθμιστικού διαλύματος PBS pH 7.4. Μετράται η ένταση του φθορισμού. Στη συνέχεια προστίθενται 0,4 mL διαλύματος Triton X-100 και ακολουθεί καλή ανάδευση και μέτρηση εκ νέου της έντασης του φθορισμού. Η προσθήκη του απορρυπαντικού επιφέρει τη λύση των λιποσωμάτων, με αποτέλεσμα να απελευθερώνεται η εγκλωβισμένη μέσα στα λιποσώματα καλσεΐνη, και λόγω της αραιώσης που υφίσταται εξαλείφεται το φαινόμενο της απόσβεσης. Καθ' όλη τη διάρκεια των μετρήσεων τα λιποσώματα τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 37°C.

Οι μετρήσεις της έντασης φθορισμού (fluorescence intensity, FI) πραγματοποιούνται σε $\lambda_{EX}=495\text{nm}$, $\lambda_{EM}=515\text{nm}$ υπό σταθερή θερμοκρασία (25°C). Από τις μετρήσεις αυτές υπολογίζεται η συγκράτηση της καλσεΐνης, (% Latency) και το συγκριτικό ποσοστό συγκράτησης της καλσεΐνης, % retention. Το % Latency δίνεται από τον παρακάτω τύπο:

$$\%LATENCY = \frac{1.1 * A.T. - B.T.}{1.1 * A.T.} * 100$$

Όπου B.T. (before Triton X-100) είναι η μέτρηση πριν την προσθήκη του απορρυπαντικού και A.T (after Triton X-100) είναι η μέτρηση μετά την προσθήκη του απορρυπαντικού (λύση λιποσωμάτων). Οι τιμές της εντάσεως (B.T.) αυξάνονται σταδιακά επειδή κάποια λιποσώματα σπάνε στην πορεία και απελευθερώνεται καλσεΐνη. Ο συντελεστής 1,1 με τον οποίο πολλαπλασιάζεται η τιμή A.T. είναι διόρθωση λόγω αραιώσης.

3.4 ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ

Θέλοντας να προσομοιάσουμε τις βιολογικές συνθήκες μετράται η σταθερότητα των διαφόρων ειδών των λιποσωμάτων παρουσία πλάσματος. Η διαδικασία που ακολουθείται και η μέθοδος υπολογισμού της σταθερότητας είναι ίδιες με αυτές των μετρήσεων της σταθερότητας των λιποσωμάτων, χωρίς την παρουσία πλάσματος, και οι οποίες έχουν περιγραφεί παραπάνω.

Σε 800 μL λιποσωμικής διασποράς προσθέτουμε 200 μL πλάσματος. Κατόπιν λαμβάνονται οι μετρήσεις στις 0, 1, 2, 3, 24 ώρες. Τα αποτελέσματα που διεξάγονται συγκρίνονται με αυτά που προκύπτουν για τα δείγματα χωρίς την παρουσία πλάσματος.

4. ΜΕΤΡΗΣΗ ΘΟΛΕΡΟΤΗΤΑΣ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ

Η φυσική σταθερότητα των λιποσωμάτων μπορεί να μετρηθεί αν μελετηθεί το φαινόμενο της συσσωμάτωσης των λιποσωμάτων παρουσία ιόντων Ca^{++} . Η συσσωμάτωση μπορεί να αξιολογηθεί προσθέτοντας διάλυμα $CaCl_2$ στα λιποσώματα και στην συνέχεια μετρώντας την θολερότητα που δημιουργείται στις λιποσωμικές διασπορές.

Παρασκευάζεται στην αρχή διάλυμα $CaCl_2$ συγκέντρωσης 20 mM. Σε 1.2 mL από τα λιποσώματα που παρασκευάστηκαν προστίθενται 0.120 mL από το διάλυμα του $CaCl_2$ ώστε να επιτευχθεί μια τελική συγκέντρωση 1.8. mM. Οι μετρήσεις έγιναν με φασματοφωτόμετρο UV mini 1240 της Shimadzu (εικ. 27) στα 500 nm. Η δειγματοληψία και οι μετρήσεις διενεργήθηκαν στις 0, 1, 2, 3, 24 ώρες σε δείγματα λιποσωμάτων όλων των ειδών των λιπιδίων, άδειων καθώς και λιποσωμάτων που περιείχαν καρβοράνιο, ώστε να μελετηθεί η έκταση της συσσωμάτωσης που υφίσταται το καθένα από τα δείγματα και η διαφορετική συμπεριφορά που παρουσιάζουν μεταξύ τους.



Εικόνα 27. Φασματοφωτόμετρο UV mini 1240 της Shimadzu.

5. ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΡΟΣΘΗΚΗ NILE-RED

Προκειμένου να εξετάσουμε την ικανότητα ανάμιξης μεταξύ του καρβορανίου και των λιποσωμάτων χρησιμοποιήσαμε μια πρότυπη ουσία (model compound) το Ερυθρό του Νείλου (Nile Red). Το Nile red είναι μια λιπόφιλη φθορίζουσα ουσία η οποία έχει μεγάλη συγγένεια για λιπιδικής φύσης μεμβράνες. Έτσι όσο περισσότερη ποσότητα Nile Red δεσμεύεται από τα λιποσώματα τόσο ισχυρότερο σήμα εμφανίζεται στο φάσμα. Καταγράφοντας το φάσμα των άδειων από καρβοράνιο λιποσωμάτων και των αντίστοιχων που περιέχουν καρβοράνιο, βλέπουμε ότι υπάρχει διαφορά στην ένταση του σήματος και μάλιστα τα άδεια λιποσώματα παρουσιάζουν ισχυρότερο σήμα, αφού διαθέτουν περισσότερες κενές θέσεις, οι οποίες δεν έχουν καταληφθεί από το καρβοράνιο, για να δεσμευτεί το Nile Red. Έτσι έχουμε μια ποιοτική ένδειξη για το αν τα λιποσώματα τα οποία παρασκευάστηκαν έχουν δεσμεύσει ικανή ποσότητα καρβορανίου.

Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε φθορισμόμετρο RF-5301 Shimadzu. Η τελική συγκέντρωση σε Nile Red ήταν 3μM το οποίο προστέθηκε στα λιποσώματα αφού είχε διαλυθεί σε αιθανόλη. Το μήκος κύματος διέγερσης ορίστηκε στα 549 nm και το φάσμα εκπομπής καταγράφηκε μεταξύ 550 και 700 nm. Τα πλάτη της σχισμής (slit width) της πηγής της ακτινοβολίας ορίστηκαν στα 3 nm ενώ η ταχύτητα σάρωσης ήταν αργή.

6. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΒΟΡΙΟΥ ΤΩΝ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΕΠΑΓΩΓΙΚΑ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ (ICP-MS)

Με την χρήση της ICP-MS προσδιορίσαμε την ακριβή ποσότητα βορίου που εμπεριέχονταν στα λιποσώματα που παρασκευάσαμε.

Στην αρχή προστέθηκε πυκνό θειικό οξύ (300μL) στα δείγματα για να προκαλέσουμε την χώνευσή τους και στην συνέχεια κάθε δείγμα θερμάνθηκε στους 100°C για μια ώρα, ενώ ανά τακτά χρονικά διαστήματα τα δείγματα αναδεύονταν. Μετά το πέρας της θέρμανσης τα δείγματα αφέθηκαν να ψυχθούν σε θερμοκρασίας δωματίου και στην συνέχεια αποχρωματίστηκαν με προσθήκη διαλύματος H₂O₂ (500 μL, 35%). Όλα τα δείγματα πληρώθηκαν με απεσταγμένο νερό μέχρι τον όγκο των 10 mL και στην συνέχεια διενεργήθηκε η μέτρηση της περιεκτικότητας σε βόριο με τη χρήση ενός φασματογράφου μαζών με φασματοφωτόμετρο εκπομπής με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (ICP-MS) της εταιρίας AGILENT TECHNOLOGIES τύπου 7700 (εικ. 28), που λειτουργεί στα 1500 W.



Εικόνα 28. Agilent 7700 ICP-MS.

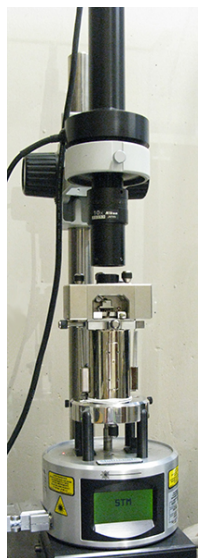
Η ροή του φέροντος αερίου ρυθμίστηκε σε 0.91 mL min^{-1} και του αερίου 0.24 mL min^{-1} , η ταχύτητα της αντλίας του εκνεφωτή σε 0.1 rps .

Η βαθμονόμηση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ενός πρότυπου διαλύματος βηρυλλίου και ενός βορίου (1000 ppm) (Spex Certi Prep από την Fisher Scientific, Loughborough, UK).

7. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΔΥΝΑΜΗΣ (AFM)

Η μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM) έγινε με ένα MultiMode/NanoScope IV Scanning Probe Microscope (εικ. 29) (Digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA) υπό ήπιες συνθήκες ($T=23^\circ\text{C}$, $RH=21\%$) και χρησιμοποιώντας πιεζοσαρωτή (j-scanner) με $\text{max. } xy = 200 \text{ }\mu\text{m}$. Η σάρωση πραγματοποιήθηκε σε λειτουργία 'Tapping mode' με χρήση βραχίονα πυριτίου Si στον οποίο ήταν ενσωματωμένη ακίδα τύπου RTESP της Veeco Instruments, με τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

($t = 3.5 - 4.5 \text{ }\mu\text{m}$, $l = 115 - 135 \text{ }\mu\text{m}$, $w = 30 - 40 \text{ }\mu\text{m}$, $\nu_0 = 200 - 400 \text{ kHz}$, $k = 20 - 80 \text{ Nm}^{-1}$, $R < 10 \text{ nm}$)



Εικόνα 29. Μικροσκόπιο ατομικής σάρωσης MultiMode/NanoScope IV.

Η λειτουργία 'Tapping mode' είναι μια κατοχυρωμένη με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας τεχνική (Veeco Instruments) όπου ο τοπογραφικός χάρτης της υπό

εξέταση επιφάνειας γίνεται καθώς το άκρο της ακίδας το οποίο ταλαντώνεται χτυπάει ελαφρά την επιφάνεια. Η ταλάντωση του βραχίονα αλλάζει ανάλογα με την τοπογραφία της επιφάνειας [91].

Στην συνέχεια οι εικόνες επεξεργάστηκαν με την χρήση του λογισμικού NanoScope software (V 7.10, Digital Instruments, SantaBarbara, CA, USA).

Τα προς απεικόνιση δείγματα παρασκευάστηκαν με τοποθέτηση μιας διασποράς (10 μ L) του κάθε δείγματος, πάνω στην επιφάνεια υποστρώματος muscovite mica (Agar Scientific, Stansted, Essex, UK) που ήταν τοποθετημένο σε ένα δίσκο νικελίου. Το υπόστρωμα με την διασπορά αφέθηκε για δυο λεπτά και στην συνέχεια τοποθετήθηκε σε ένα ρεύμα αζώτου για να ξηραθεί.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. ΜΕΛΕΤΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ

Στο παρόν τμήμα της εργασίας μελετάται η σταθερότητα των λιποσωμάτων συναρτήσει του χρόνου. Γίνεται σύγκριση των αποτελεσμάτων για να δούμε την διαφορετική συμπεριφορά που παρουσιάζουν τα διαφορετικά είδη λιποσωμάτων καθώς και το πως επηρεάζει την σταθερότητα η παρουσία ή μη του καρβορανίου. Η σταθερότητα μετρήθηκε σε PBS και σε πλάσμα. Απώτερος σκοπός είναι να εξαχθούν συμπεράσματα ώστε να προσδιοριστεί το είδος των λιποσωμάτων τα οποία έχουν τις βέλτιστες ιδιότητες για την χρησιμοποίησή τους στην θεραπεία με την μέθοδο της BNCT.

Ακολουθούν πίνακες και διαγράμματα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις μετρήσεις. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τουλάχιστον τριών (3) επαναλήψεων. Έγινε μελέτη της σταθερότητας των άδειων λιποσωμάτων καθώς και λιποσωμάτων που περιείχαν καρβοράνιο σε PBS και πλάσμα.

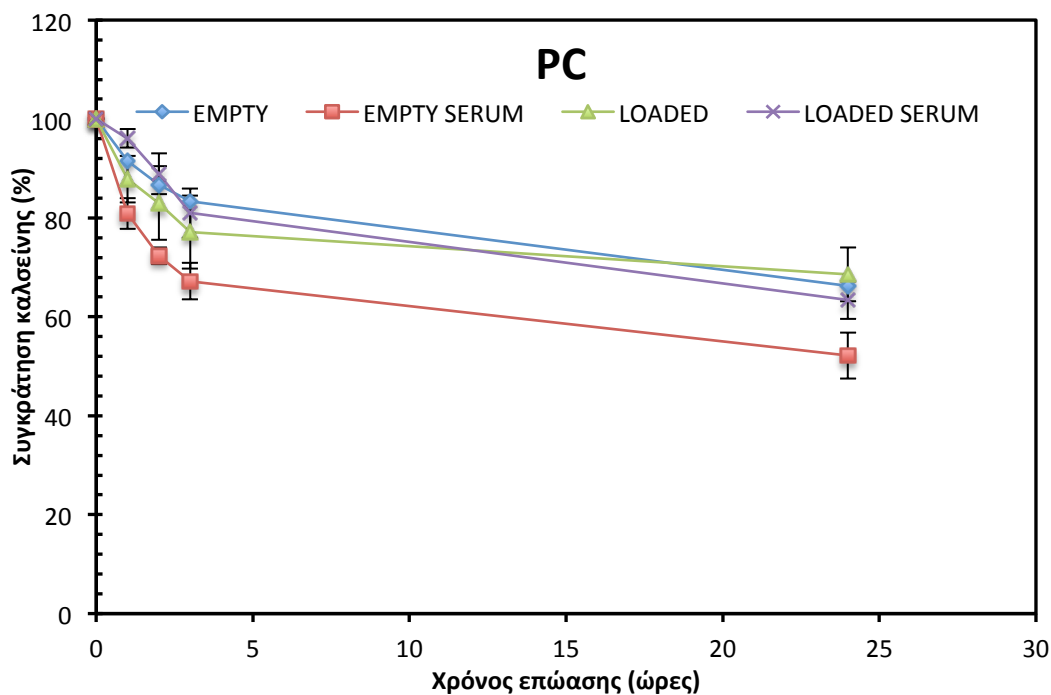
Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε t-test και η τιμή της p-value ως δείκτης αξιοπιστίας του αποτελέσματος.

Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της (%) συγκράτησης της καλσεΐνης σε PC-λιποσώματα συναρτήσει του χρόνου σε ρυθμιστικό διάλυμα και σε βόειο ορό.

Πίνακας 1. Συγκράτηση καλσεΐνης (%) των λιποσωμάτων (PC) σε σχέση με το χρόνο επώασης τους στους 37° C.

Συγκράτηση καλσεΐνης (%) (\pm SD)								
Είδος λιποσωμάτων	PC EMPTY				PC LOADED			
	PBS		SERUM		PBS		SERUM	
Χρόνος επώασης (ώρες)		(\pm SD)		(\pm SD)		(\pm SD)		(\pm SD)
0	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00
1	91.49	6.99	80.90	3.11	87.86	4.73	96.09	1.86
2	86.68	6.32	72.32	1.68	83.01	7.47	88.92	4.11
3	83.28	4.47	67.19	3.68	77.10	7.37	80.97	5.02
24	66.24	3.70	52.18	4.66	68.55	5.45	63.40	3.81

Στο διάγραμμα 1 απεικονίζεται η (%) συγκράτηση της καλσεΐνης συναρτήσει του χρόνου και ακολουθούν οι τιμές p value για τις 24 ώρες.



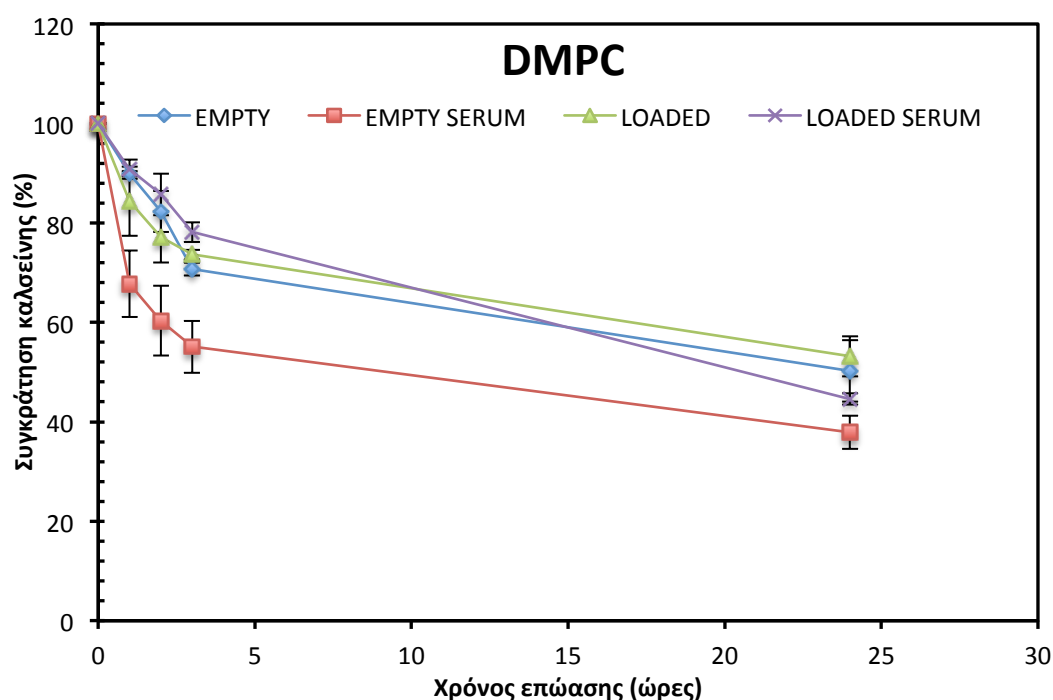
Διάγραμμα 1. Διάγραμμα μεταβολής συγκράτησης καλσεΐνης (%) σε συναρτήσεϊ του χρόνου επώασης.

PC EMPTY-LOADED	PBS	SERUM
P values	0.5764	0.0320
	Δεν είναι στατιστικά σημαντική η διαφορά	Είναι στατιστικά σημαντική η διαφορά

Αντίστοιχα στον πίνακα 2 και στο διάγραμμα 2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα συγκράτησης καλσεΐνης και ακολούθως η στατιστική ανάλυση για τα DMPC λιποσώματα.

Πίνακας 2. Συγκράτηση καλσεΐνης(%) των λιποσωμάτων (DMPC) σε σχέση με το χρόνο επώασης τους στους 37° C.

Συγκράτηση καλσεΐνης (%) (\pm SD)									
Είδος λιποσωμάτων	DMPC EMPTY				DMPC LOADED				
	PBS		SERUM		PBS		SERUM		
Μέσο επώασης		(\pm SD)		(\pm SD)		(\pm SD)		(\pm SD)	
Χρόνος επώασης (ώρες)									
0	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	
1	89.88	0.52	67.76	6.68	84.32	6.97	90.80	1.93	
2	82.28	4.13	60.32	7.01	77.18	5.14	85.74	4.20	
3	70.69	1.31	55.07	5.28	73.62	0.98	78.14	1.98	
24	50.22	6.21	37.89	3.33	53.14	4.00	44.57	1.11	



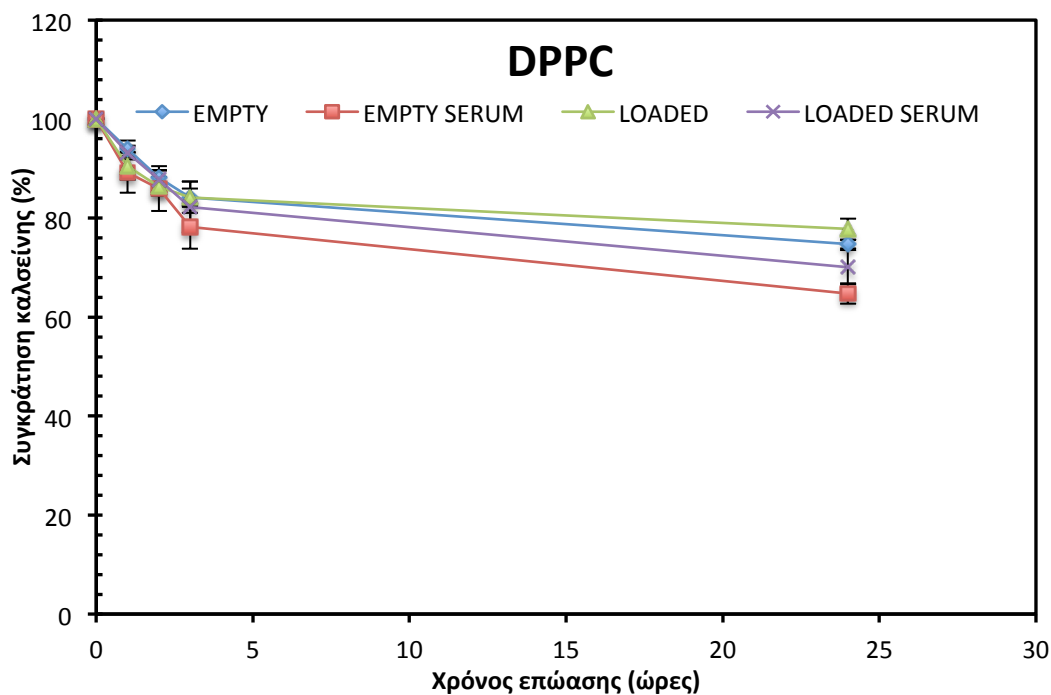
Διάγραμμα 2. Διάγραμμα μεταβολής συγκράτησης καλσεΐνης (%) σε συναρτήσε του χρόνου επώασης.

DMPC EMPTY-LOADED	PBS	SERUM
P values	0.5312	0.0300
	Δεν είναι στατιστικά σημαντική η διαφορά	Είναι στατιστικά σημαντική η διαφορά

Τέλος τα αντίστοιχα αποτελέσματα συγκράτησης καλσεΐνης για τα DPPC λιποσώματα παρουσιάζονται στον πίνακα 3 και στο διάγραμμα 3.

Πίνακας 3. Συγκράτηση καλσεΐνης(%) των λιποσωμάτων (DPPC) σε σχέση με το χρόνο επώασης τους στους 37° C.

Συγκράτηση καλσεΐνης (%) (\pm SD)								
Είδος λιποσωμάτων	DPPC EMPTY				DPPC LOADED			
	PBS		SERUM		PBS		SERUM	
Χρόνος επώασης (ώρες)		(\pm SD)		(\pm SD)		(\pm SD)		(\pm SD)
0	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00
1	94.03	1.58	89.21	4.09	90.49	2.72	93.27	1.42
2	88.16	1.47	85.95	4.56	86.39	1.88	87.76	2.01
3	84.19	3.20	78.16	4.35	84.14	1.88	82.26	5.11
24	74.75	0.90	64.74	2.03	77.75	2.15	70.07	3.46



Διάγραμμα 3. Διάγραμμα μεταβολής συγκράτησης καλσεΐνης (%) σε συναρτήσεϊ του χρόνου επώασης.

Εφαρμόζοντας την δοκιμασία t-test για τις μετρήσεις στις 24 ώρες προκύπτουν οι παρακάτω τιμές p values.

DMPC EMPTY-LOADED	PBS	SERUM
P values	0.0897	0.0828
	Δεν είναι στατιστικά αρκετά σημαντική η διαφορά	Δεν είναι στατιστικά αρκετά σημαντική η διαφορά

Από τις τιμές που αναγράφονται στους παραπάνω πίνακες και από τα διαγράμματα που προέκυψαν από αυτές παρατηρούμε κάποια χαρακτηριστικά στην συμπεριφορά και στα τρία είδη λιποσωμάτων.

Καταρχήν βλέπουμε ότι με την προσθήκη του καρβορανίου αυξάνεται η σταθερότητα των λιποσωμάτων με όλους τους τύπους των λιπιδίων που χρησιμοποιήθηκαν. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι το καρβοράνιο σαν λιπόφιλη ουσία, ενσωματώνεται εντός της λιπιδικής διπλοστοιβάδας και έτσι αυξάνει την σταθερότητα της. Η επίδραση στην σταθερότητα των λιποσωμάτων γίνεται πιο

εμφανής στον ορό (μικρότερες τιμές p και άρα στατιστικά σημαντική διαφορά) το οποίο και έχει πιο επιθετική δράση σε σχέση με το PBS στην λιπιδική διπλοστοιβάδα εξαιτίας των πρωτεϊνών που περιέχει.

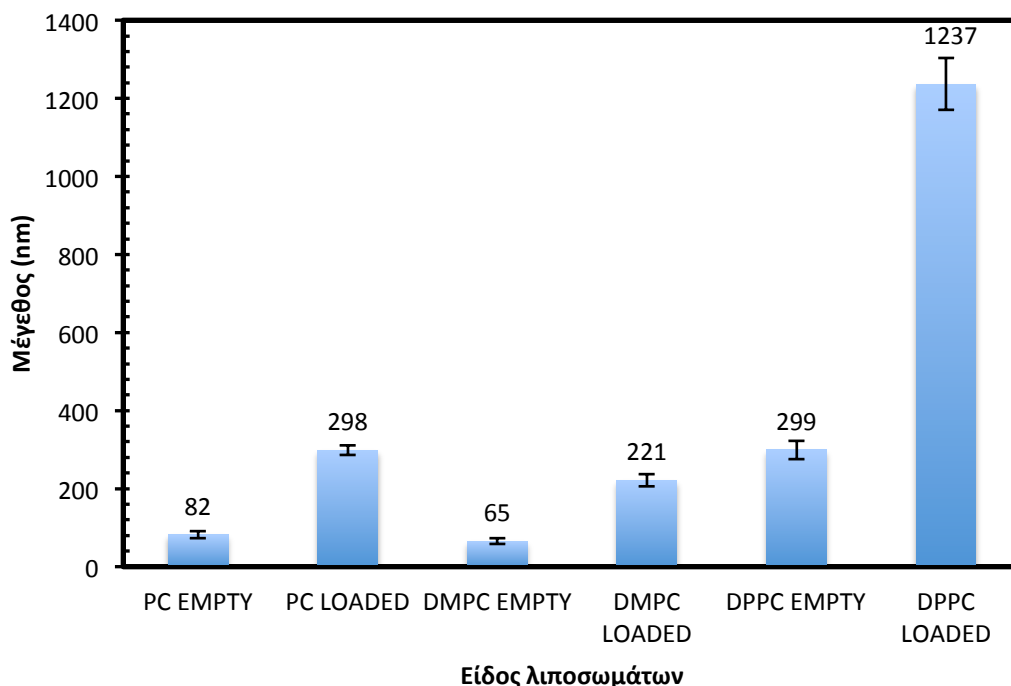
Επίσης βλέπουμε ότι η συγκράτηση της καλσεΐνης είναι μεγαλύτερη στα λιποσώματα από DPPC μετά στα λιποσώματα από PC και τέλος την μικρότερη συγκράτηση παρουσιάζουν τα λιποσώματα τα οποία σαν δομικό συστατικό έχουν το DMPC γεγονός το οποίο είναι σύμφωνο και με την βιβλιογραφία [83]. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι τα λιπίδια DPPC έχουν πολύ υψηλή θερμοκρασίας μεταπτώσεως (42°C) σε σχέση με το DMPC (22.5 °C) και το PC (-9°C). Συνεπακόλουθα η λιπιδική διπλοστοιβάδα είναι πιο ανθεκτική και η απομάκρυνση της δραστικής ουσίας γίνεται πιο αργά.

2. ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις μετρήσεις μεγέθους των λιποσωμάτων παρουσιάζονται στον πίνακα 4 και στο διάγραμμα 4. Κάθε τιμή αποτελεί τον μέσο όρο τριών τουλάχιστον μετρήσεων από διαφορετικά δείγματα. Επίσης δίνονται οι τιμές του δείκτη πολυδιασποράς [Polydispersity Index (PDI)]. Ο δείκτης αυτός παίρνει τιμές από 0 (εντελώς ομογενείς διασπορές) μέχρι 1 (εντελώς ανομοιογενείς διασπορές).

Πίνακας 4. Μετρήσεις μεγέθους λιποσωμάτων.

ΕΙΔΟΣ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ	ΜΕΓΕΘΟΣ (nm)	± SD	PDI	± SD
PC EMPTY	81.7	8.7672	0.23	0.035
PC LOADED	298.3	12.0968	0.21	0.006
DMPC EMPTY	65.4	7.7797	0.2	0.012
DMPC LOADED	221	15.3948	0.13	0.018
DPPC EMPTY	299.3	23.7557	0.32	0.046
DPPC LOADED	1236.7	66.5833	0.44	0.119

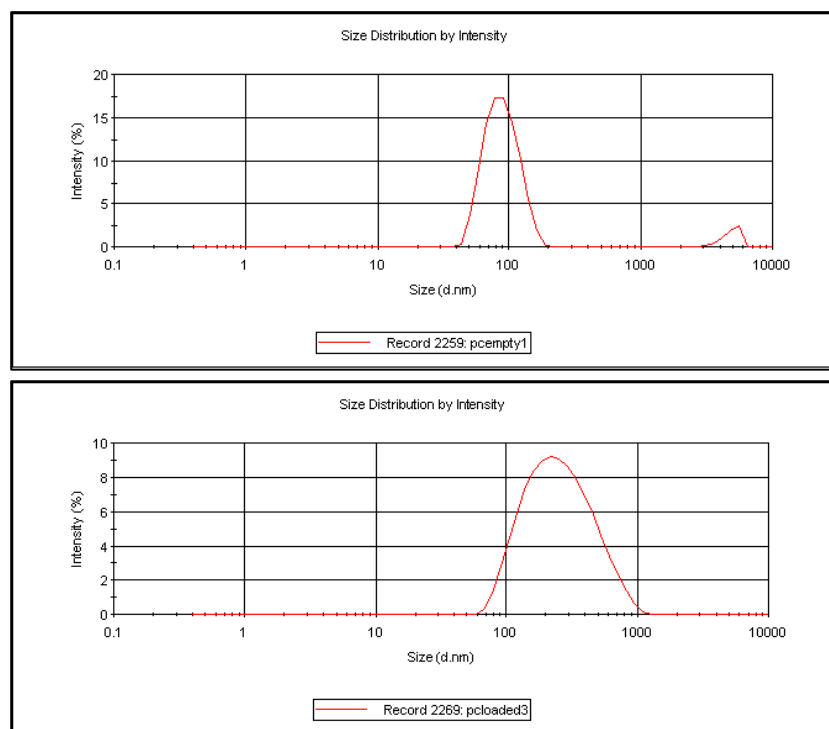


Διάγραμμα 4. Μέγεθος λιποσωμάτων.

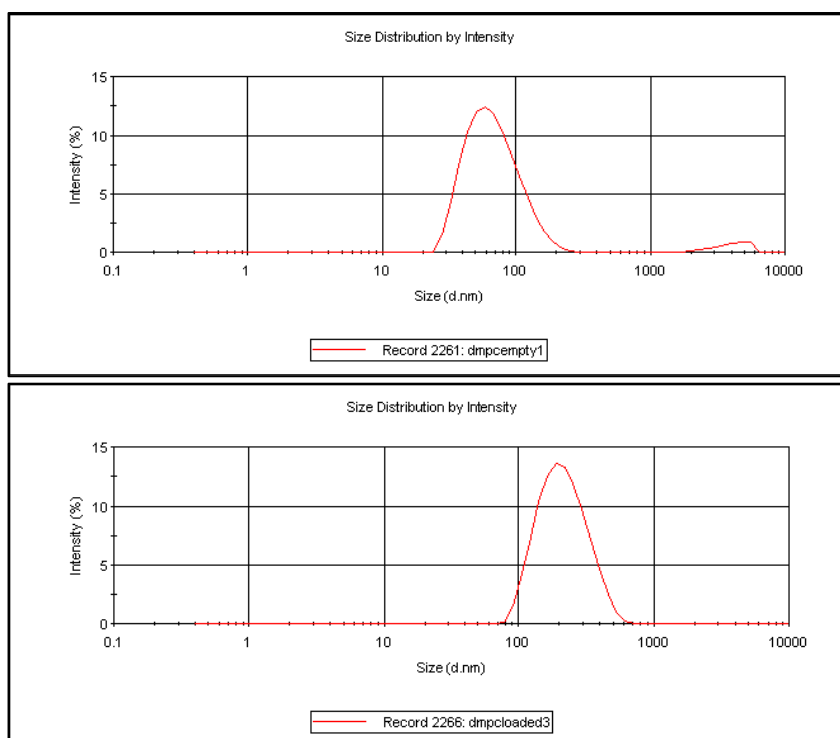
Από την δοκιμασία t-test και τις τιμές των p-values που προέκυψαν όπως φαίνεται και παρακάτω προκύπτει ότι οι διαφορές στο μέγεθος των λιποσωμάτων πριν και μετά την προσθήκη του καρβορανίου είναι στατιστικά σημαντικές.

	PC EMPTY-LOADED	DMPC EMPTY-LOADED	DPPC EMPTY-LOADED
P VALUES	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	Είναι στατιστικά πολύ σημαντική η διαφορά	Είναι στατιστικά πολύ σημαντική η διαφορά	Είναι στατιστικά πολύ σημαντική η διαφορά

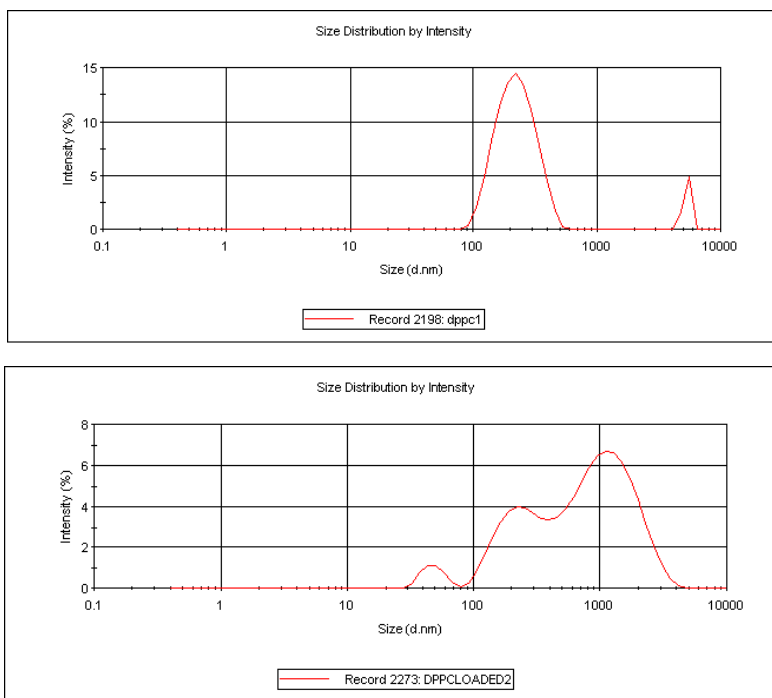
Ενδεικτικά ακολουθούν αντιπροσωπευτικά διαγράμματα (διαγράμματα 5-7) από τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν.



Διάγραμμα 5. Κατανομή εντάσεως έναντι υδροδυναμικής διαμέτρου PC-λιποσωμάτων με ή χωρίς καρβοράνιο.



Διάγραμμα 6. Κατανομή εντάσεως έναντι υδροδυναμικής διαμέτρου DMPC-λιποσωμάτων με ή χωρίς καρβοράνιο.



Διάγραμμα 7. Κατανομή εντάσεως έναντι υδροδυναμικής διαμέτρου DPPC-λιποσωμάτων με ή χωρίς καρβοράνιο.

Η αύξηση του μεγέθους των λιποσωμάτων παρουσία του καρβορανίου αποτελεί ένδειξη της παρουσίας του καρβορανίου στην λιπιδική διπλοστοιβάδα.

Όσον αφορά τα λιποσώματα που παρασκευάστηκαν από PC και DMPC, τα μεγέθη τους πριν την προσθήκη του καρβορανίου συμφωνούν με την βιβλιογραφία, στην οποία αναφέρεται ότι με την ethanol injection μέθοδο παρασκευάζονται λιποσώματα μεγέθους 60-80 nm.

Επιπλέον οι κατανομές μεγέθους δίνουν μία μόνο κορυφή (διαγράμματα 5, 6) και οι δείκτες πολυδιασποράς εμφανίζουν αντίστοιχα μικρές τιμές ($PDI < 0.25$). Το μέγεθος των λιποσωμάτων, τόσο των άδειων όσο και αυτών που περιέχουν το καρβοράνιο, που παρασκευάστηκαν από DPPC, είναι μεγαλύτερο από το αναμενόμενο ενώ και ο δείκτης πολυδιασποράς PDI εμφανίζει μεγαλύτερες τιμές. Επιπλέον παρατηρείται περισσότερες από μία κορυφές (διάγραμμα 7) οι οποίες αποτελούν ένδειξη ετερογενούς σε μέγεθος πληθυσμού σωματιδίων.

Μια πιθανή εξήγηση για το μέγεθος των λιποσωμάτων από DPPC καθώς και για την κατανομή μεγέθους τους είναι ότι η παρασκευή τους έγινε σε θερμοκρασία μικρότερη από την θερμοκρασία μεταπτώσεως του λιπιδίου (42.5°C) και έτσι η διάταξη των λιπιδίων μέσα στην διασπορά δεν ήταν ομαλή ώστε να ευνοηθεί η

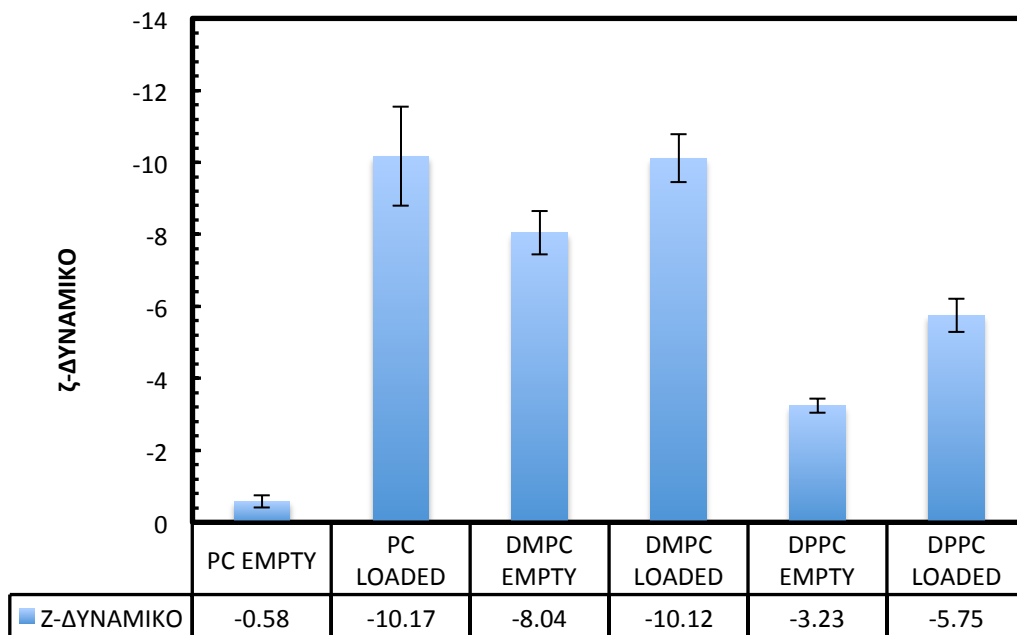
δημιουργία λιποσωμάτων του επιθυμητού μεγέθους επάγοντας ταυτόχρονα την δημιουργία άλλων λιπιδικών υπερδομών.

3. ΜΕΤΡΗΣΗ ζ- ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ

Στο παρακάτω πίνακα και στο διάγραμμα που προέκυψε από τις τιμές του, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις μετρήσεις μεγέθους των λιποσωμάτων. Κάθε τιμή αποτελεί τον μέσο όρο τριών τουλάχιστον μετρήσεων από διαφορετικές λιποσωμικές διασπορές.

Πίνακας 5. Μετρήσεις ζ-δυναμικού λιποσωμάτων

ΕΙΔΟΣ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ	Μ.Ο. ζ- ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ	± SD
PC EMTRY	-0.58	0.17
PC LOADED	-10.17	1.37
DMPC EMPTY	-8.04	0.60
DMPC LOADED	-10.12	0.67
DPPC EMPTY	-3.23	0.20
DPPC LOADED	-5.75	0.46



Διάγραμμα 8. ζ-δυναμικό λιποσωμάτων.

Από την δοκιμασία t-test όπως φαίνεται και παρακάτω προκύπτει ότι οι διαφορές στο δυναμικό των λιποσωμάτων πριν και μετά την προσθήκη του καρβορανίου είναι στατιστικά πολύ σημαντικές .

	PC EMPTY-LOADED	DMPC EMPTY-LOADED	DPPC EMPTY-LOADED
p values	<0.0001	0.0036	<0.0001
	Είναι στατιστικά πολύ σημαντική η διαφορά	Είναι στατιστικά πολύ σημαντική η διαφορά	Είναι στατιστικά πολύ σημαντική η διαφορά

Συγκρίνοντας τις τιμές του ζ-δυναμικού πριν και μετά την προσθήκη του καρβορανίου στα λιποσώματα συμπεραίνουμε, όπως και με τις μετρήσεις του μεγέθους την ύπαρξη καρβορανίου στην λιπιδική διπλοστοιβάδα.

Τα λιπίδια που χρησιμοποιήθηκαν είναι ουδέτερα και συμπεριφέρονται ως αμφολύτες. Η μετατόπιση τους σε αρνητικές τιμές δυναμικού με την προσθήκη του καρβορανίου (αρνητικά φορτισμένο μόριο) αποτελεί ένδειξη της παρουσίας του

στην επιφάνεια των λιποσωμάτων. Μεγαλύτερες αλλαγές στο ζ-δυναμικό παρατηρήθηκαν στην περίπτωση των λιποσωμάτων που παρασκευάστηκαν από PC και DPPC.

4. ΜΕΤΡΗΣΗ ΘΟΛΕΡΟΤΗΤΑΣ

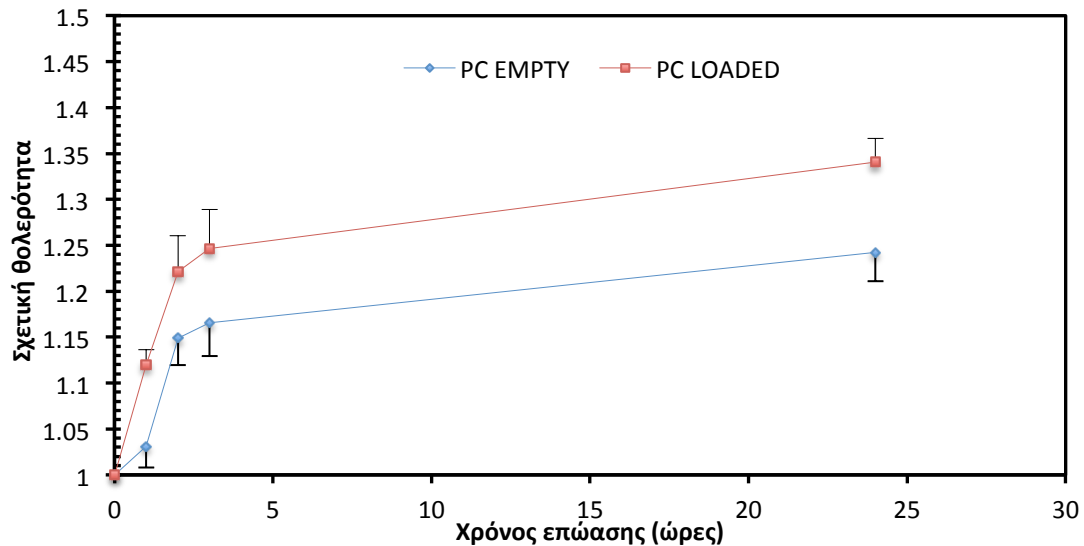
Όπως περιγράφηκε και στο πειραματικό μέρος μετρήθηκε η θολερότητα των λιποσωμάτων μετά από προσθήκη CaCl_2 , για να εξαχθούν συμπεράσματα για την συσσωμάτωση των λιποσωμάτων και επομένως για την φυσική σταθερότητά τους.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα αυτών των μετρήσεων. Η αρχική θολερότητα το χρονικό σημείο 0 (πρώτη μέτρηση) λαμβάνεται ως σημείο εκκίνησης. Στα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζεται πως μεταβάλλεται σε σχέση με το χρόνο η σχετική θολερότητα.

Πίνακας 6. Σχετική θολερότητα λιποσωμάτων.

ΧΡΟΝΟΣ ΕΠΩΑΣΗΣ (ΩΡΕΣ)	ΣΧΕΤΙΚΗ ΘΟΛΕΡΟΤΗΤΑ (\pm SD)			
	PC EMPTY	\pm SD	PC LOADED	\pm SD
0	1	0	1	0
1	1.031352941	0.023542496	1.119711042	0.016783752
2	1.148558824	0.029074567	1.221549278	0.038848914
3	1.165588235	0.036187229	1.246787926	0.041977624
24	1.242352941	0.031611833	1.340595975	0.025777654
	DMPC EMPTY	SD	DMPC LOADED	SD
0	1	0	1	0
1	1.068502582	0.056471178	1.067797857	0.033153435
2	1.102633391	0.000316433	1.127428185	0.026243868
3	1.173683305	0.035513556	1.236416883	0.032112837
24	1.311376936	0.028211248	1.318798564	0.022456093
	DPPC EMPTY	SD	DPPC LOADED	SD
0	1	0	1	0
1	1.060351413	0.039433762	1.085170214	0.018980634
2	1.108256939	0.021382463	1.12892903	0.030130826
3	1.141774892	0.035202286	1.15881387	0.034343783
24	1.264737713	0.034617081	1.283921767	0.029713997

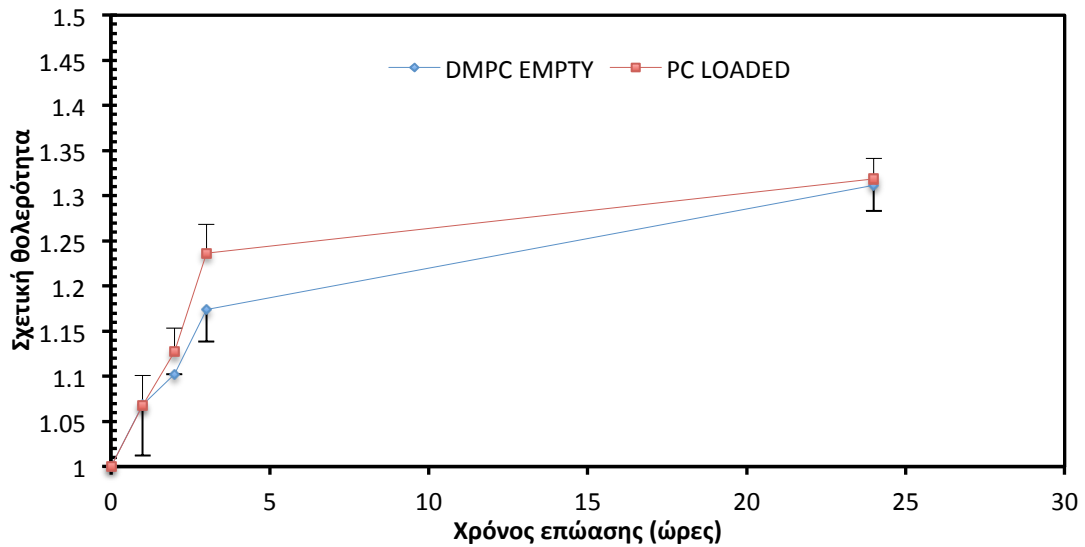
Ακολουθούν τα διαγράμματα της σχετικής θολερότητας συναρτήσει του χρόνου για όλα τα είδη των λιποσωμάτων. Στις 24 ώρες εφαρμόζεται δοκιμασία t-test για να διακριβωθεί αν η προσθήκη του καρβορανίου παίζει σημαντικό ρόλο στο φαινόμενο της συσσωμάτωσης των λιποσωμάτων.



Διάγραμμα 9. Διαγράμματα σχετικής θολερότητας PC λιποσωμάτων συναρτήσει του χρόνου.

Εφαρμόζοντας την δοκιμασία t για τις μετρήσεις στις 24 ώρες βλέπουμε ότι η διαφορά είναι στατιστικώς σημαντική.

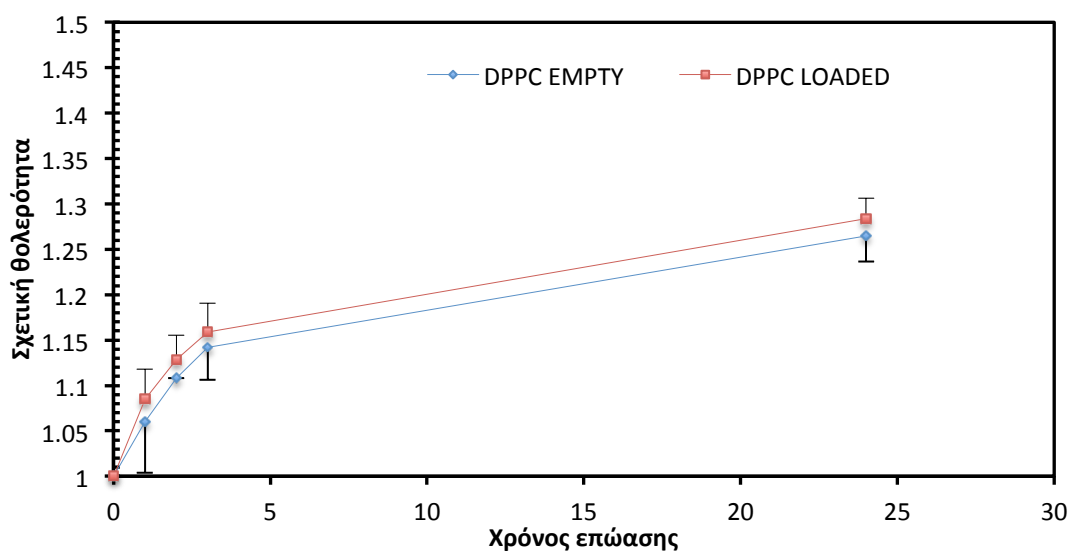
PC EMPTY-LOADED	
P values	0.0140
	Η διαφορά είναι στατιστικώς σημαντική



Διάγραμμα 10. Διαγράμματα σχετικής θωλερότητας DMPC λιποσωμάτων συναρτήσει του χρόνου.

Εφαρμόζοντας την δοκιμασία t-test για τις μετρήσεις στις 24 ώρες βλέπουμε ότι η διαφορά δεν είναι στατιστικώς σημαντική.

DMPC EMPTY-LOADED	
P values	0.7395
	Η διαφορά δεν είναι στατιστικώς σημαντική



Διάγραμμα 11. Διαγράμματα σχετικής θωλερότητας DPPC λιποσωμάτων συναρτήσει του χρόνου.

Εφαρμόζοντας την δοκιμασία t-test για τις μετρήσεις στις 24 ώρες βλέπουμε ότι η διαφορά δεν είναι στατιστικώς σημαντική.

DPPC EMPTY-LOADED	
P values	0.5068
	Η διαφορά δεν είναι στατιστικώς σημαντική

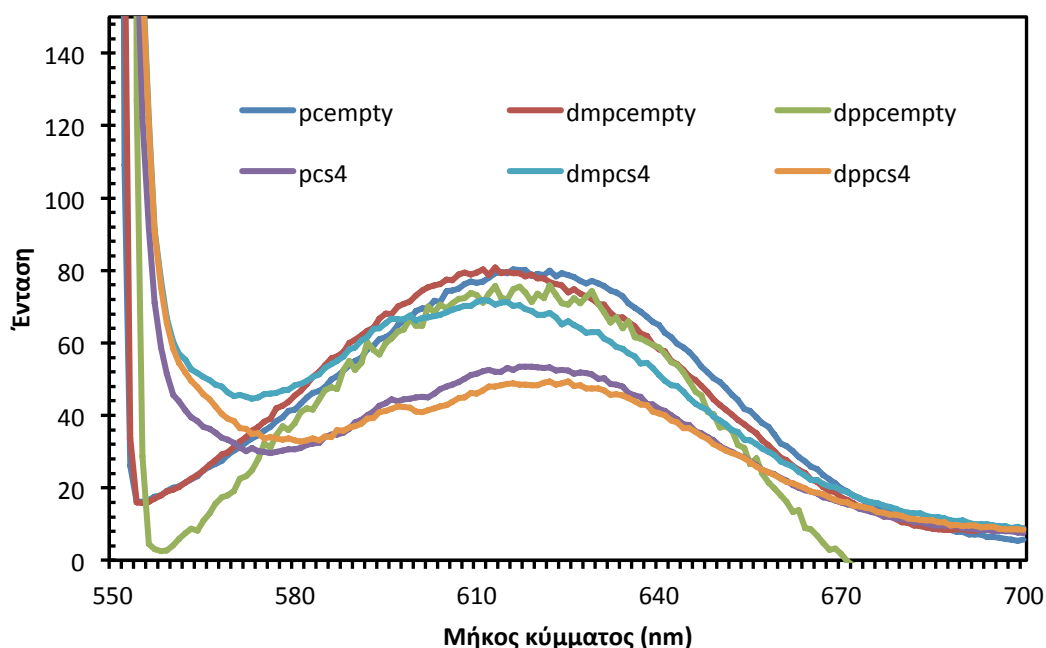
Από τις μετρήσεις τις θολερότητας και τα αντίστοιχα διαγράμματα παρατηρούμε ότι σημαντική διαφορά στην συσσωμάτωση των λιποσωμάτων πριν και μετά την προσθήκη του καρβορανίου παρατηρείται μόνο στην περίπτωση των λιποσωμάτων που παρασκευάστηκαν από PC. Το γεγονός αυτό μπορεί να ερμηνευτεί εν μέρει και από τις μετρήσεις του ζ-δυναμικού για τις αντίστοιχες λιποσωμικές διασπορές. Πιο συγκεκριμένα στην περίπτωση των PC λιποσωμάτων η διαφορά του ζ-δυναμικού των άδειων λιποσωμάτων από αυτά που περιείχαν καρβοράνιο ήταν πολύ μεγάλη (-0.58, -10.17), σε σχέση με τα DMPC λιποσώματα (-8.04, -10.12) και τα DPPC (-3.23, -5.75), οπότε μπορεί να θεωρηθεί ότι στην επιφάνεια της λιπιδικής διπλοστοιβάδας υπάρχει περισσότερο καρβοράνιο, το οποίο είναι αρνητικά φορτισμένο, και το οποίο με τα ιόντα ασβεστίου Ca^{2+} συμπλέκεται και έτσι δημιουργούνται μεγάλα συσσωματώματα με αποτέλεσμα να είναι εμφανής η διαφορά της θολερότητας πριν και μετά την προσθήκη του καρβορανίου.

5. ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΡΟΣΘΗΚΗ NILE RED

Ακολουθούν οι μετρήσεις και τα διαγράμματα φθορισμού των λιποσωμάτων μετά από προσθήκη σε αυτά Nile Red. Οι συγκεκριμένες μετρήσεις αποτελούν έναν έμμεσο τρόπο για να εξαχθούν συμπεράσματα για την ικανότητα ανάμειξης (miscibility) μεταξύ του λιπιδίου και του καρβορανίου.

Πίνακας 7. Μέγιστες εντάσεις φθορισμού των λιποσωμάτων, μετά από προσθήκη Nile-red.

ΕΙΔΟΣ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ	λ_{\max}	max intensity (A.U.)
PC EMPTY	616	80.285
PC LOADED	619	53.514
DMPC EMPTY	613	80.838
DMPC LOADED	611	71.782
DPPC EMPTY	617	75.471
DPPC LOADED	622	49.421



Διάγραμμα 12. Διαγράμματα φθορισμού λιποσωμάτων μετά από προσθήκη Nile Red.

Στο παραπάνω διάγραμμα παρατηρούμε ότι η ένταση φθορισμού μειώνεται για τα δείγματα των λιποσωμάτων που περιέχουν το καρβοράνιο, σε σχέση με τα αντίστοιχα άδεια λιποσώματα. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι τα λιποσώματα έχουν εγκλωβίσει μέσα στην λιπιδική διπλοστιβάδα το καρβοράνιο με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η δέσμευση του Nile Red στην επιφάνεια των λιποσωμάτων οπότε και η ένταση φθορισμού μειώνεται. Επιπλέον στην περίπτωση των PC λιποσωμάτων η διαφορά στην ένταση είναι μεγάλη πριν

και μετά την προσθήκη του καρβορανίου σε σχέση με την αντίστοιχη διαφορά εντάσεως στα DMPC λιποσώματα. Οι μετρήσεις αυτές θα μπορούσαν να εξηγηθούν λαμβάνοντας υπόψιν και τις αντίστοιχες μετρήσεις του ζ-δυναμικού. Πιο συγκεκριμένα οι αυξημένες τιμές ζ-δυναμικού στα PC λιποσώματα με καρβοράνιο παρέχουν ένδειξη παρουσίας μεγαλύτερης ποσότητας καρβορανίου σε σχέση με τα DMPC λιποσώματα. Για την περίπτωση του DPPC δεν μπορούμε να βγάλουμε ασφαλή συμπεράσματα. Παρά το γεγονός ότι η ένταση στον φθορισμό μεταβάλλεται σημαντικά πριν και μετά την προσθήκη του καρβορανίου, οι αντίστοιχες τιμές που ελήφθησαν από το ζ-δυναμικό δεν συνηγορούν στην ύπαρξη μεγάλης ποσότητας καρβορανίου στην επιφάνεια. Πιθανόν εξαιτίας της μη ομαλής δημιουργίας των λιποσωμάτων από το DPPC (εξαιτίας του ότι η παρασκευή τους έγινε κάτω από την θερμοκρασία μετάπτωσης) και της ύπαρξης συσσωματωμάτων η κατανομή του Nile Red στα DPPC λιποσώματα να ακολουθεί διαφορετικό μηχανισμό.

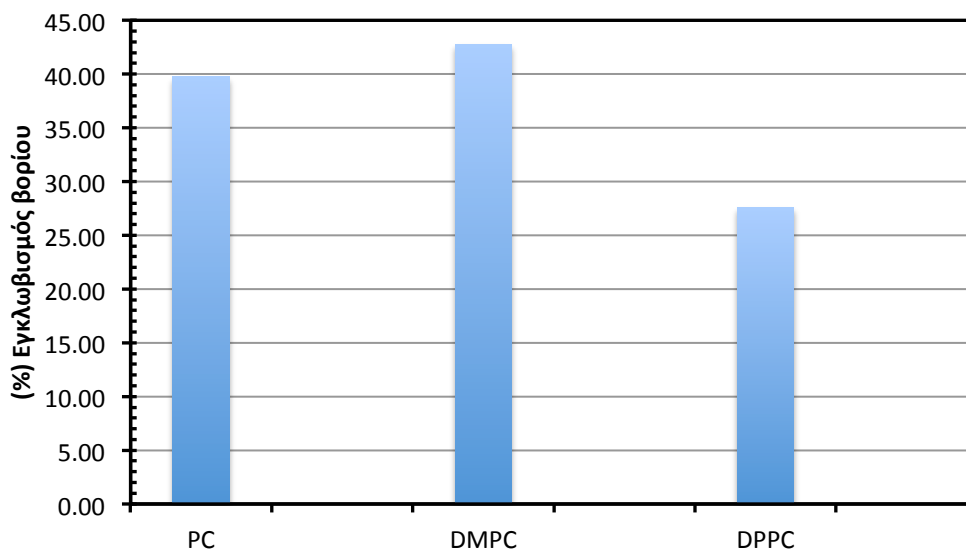
Επιπλέον δεν παρατηρούνται αλλαγές (shifts) στο λ_{\max} μεταξύ των άδειων και γεμάτων με καρβοράνιο λιποσωμάτων. Αυτό σημαίνει ότι η παρουσία του καρβορανίου δεν μεταβάλλει σημαντικά το λιπόφιλο χαρακτήρα του φορέα.

6. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΒΟΡΙΟΥ ΤΩΝ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΕΠΑΓΩΓΙΚΑ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ (ICP-MS)

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις του ^{10}B (ppb) που μετρήθηκαν από τον ICP-MS και στην συνέχεια ο (%) εγκλωβισμός του βορίου που προέκυψε μετά από υπολογισμούς.

Πίνακας 8. Μετρήσεις ICP-MS και (%) Εγκλωβισμός βορίου ^{10}B

Δείγμα	ConcB (ppb)	%ΕΓΚΛΩΒΙΣΜΟΣ ^{10}B	M.O.
PC1	5275.67	37.40	39.75
PC2	5512.75	42.09	
DMPC1	8627.1	47.05	42.77
DMPC2	6417.62	38.50	
DPPC1	4168.14	29.55	27.57
DPPC2	3449.65	25.59	

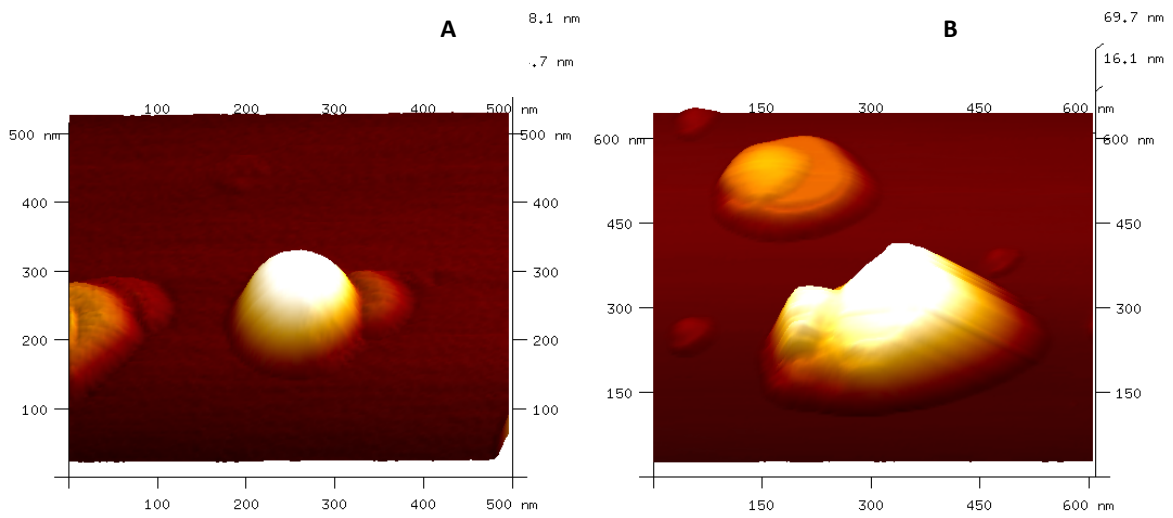


Διάγραμμα 13. (%) Εγκλωβισμός βορίου ^{10}B

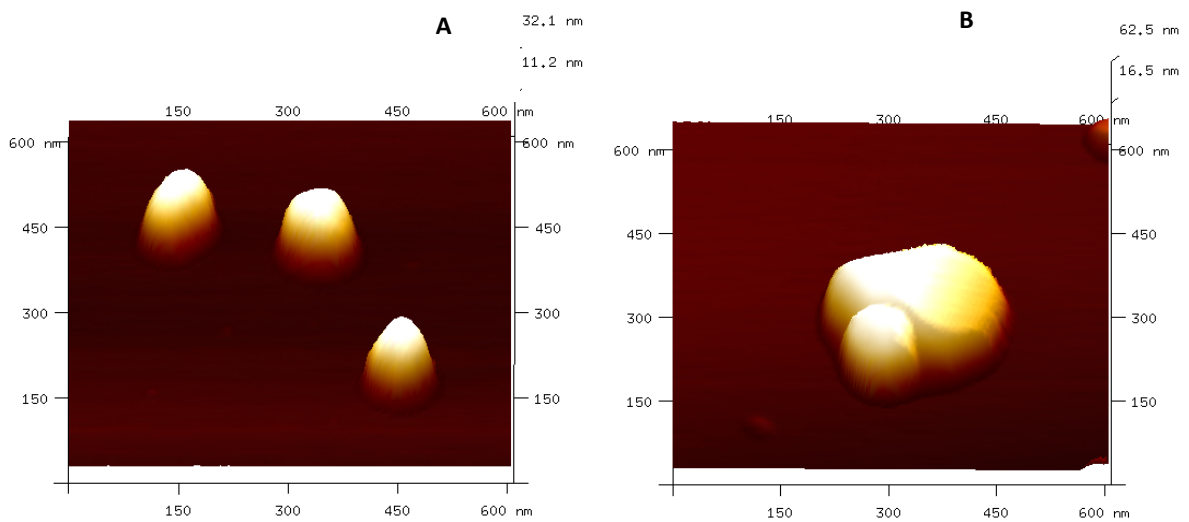
Τα αποτελέσματα εγκλωβισμού του ^{10}B έδειξαν ότι σε απόλυτες τιμές η ποσότητα εγκλωβισμού στα λιποσώματα από PC και DMPC είναι παρόμοιες. Στη περίπτωση του DPPC οι ποσότητες ήταν μικρότερες. Η μικρότερη ποσότητα στα λιποσώματα που έχουν παρασκευασθεί από DPPC θα μπορούσε να αποδοθεί στο γεγονός ότι η διαδικασία παρασκευής έγινε κάτω από τη θερμοκρασία μετάπτωσης με αποτέλεσμα να μην ευνοείται ο σχηματισμός λιποσωμάτων.

7. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΔΥΝΑΜΗΣ (AFM)

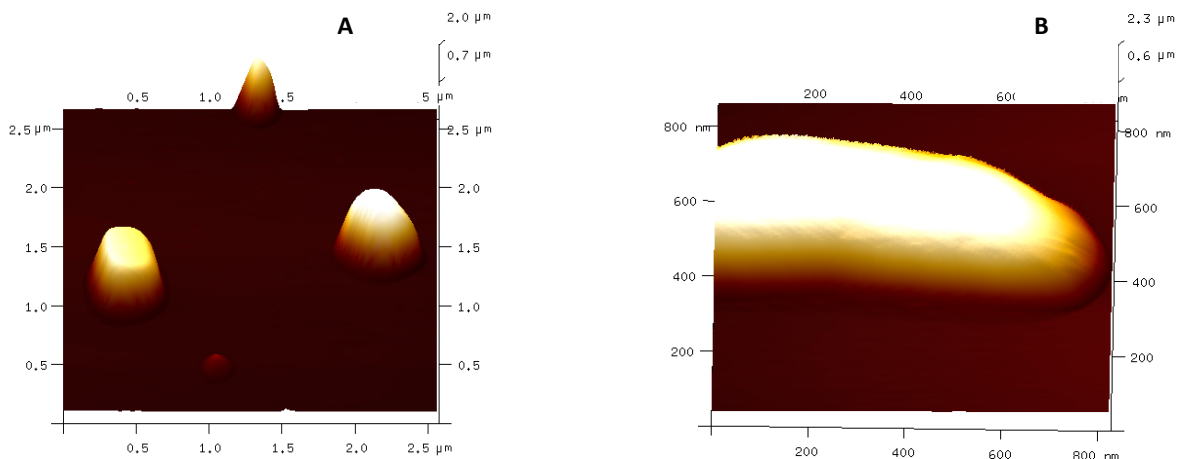
Η τοπογραφία της επιφάνειας των λιποσωμάτων μελετήθηκε με την χρήση της μικροσκοπίας ατομικής δύναμης (AFM). Παρακάτω ακολουθούν χαρακτηριστικές φωτογραφίες από τα λιποσώματα που παρασκευάστηκαν από όλα τα είδη των λιπιδίων, πριν και μετά την προσθήκη του καρβορανίου.



Εικόνα 30. Άδεια PC-λιποσώματα (A) και PC-λιποσώματα που έχουν εγκλωβίσει καρβονάνιο (B).



Εικόνα 31. Άδεια DMPC-λιποσώματα (A) και DMPC-λιποσώματα που έχουν εγκλωβίσει καρβονάνιο (B).



Εικόνα 32. Άδεια DPPC-λιποσώματα (A) και DPPC-λιποσώματα που έχουν εγκλωβίσει καρβοράνιο (B).

Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν με μικροσκοπία ατομικής δύναμης βρίσκονται σε καλή συμφωνία με τα αποτελέσματα σκέδασης. Εκείνο το οποίο μπορεί να παρατηρηθεί για τα λιποσώματα PC και DMPC που περιέχουν το καρβοράνιο, είναι ένα είδος παραμόρφωσης (distortion) (Εικόνα 30B και 31B αντίστοιχα) το οποίο ίσως να οφείλεται στη παρουσία του καρβορανίου στη λιπιδική διπλοστοιβάδα. Οι παραμορφώσεις αυτές είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες όπου λιποσώματα επώαστηκαν με παράγωγα βορίου τα οποία προκάλεσαν αλλαγές στο σχήμα των λιποσωμάτων κατόπιν μελετών με ηλεκτρονική μικροσκοπία[92, 93]. Στη περίπτωση των λιποσωμάτων με DPPC αυτό το φαινόμενο φαίνεται ότι ισχύει τόσο στα άδεια όσο και στα γεμάτα λιποσώματα (εικόνα 32A και 32B).

9. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την επεξεργασία των μετρήσεων και την ανάλυση των αποτελεσμάτων καταλήγουμε σε κάποια γενικά συμπεράσματα.

Οι μετρήσεις του μεγέθους των λιποσωμάτων, του ζ-δυναμικού, τα φάσματα φθορισμού μετά την προσθήκη του Nile-red αλλά και ο υπολογισμός του

εγκλωβισμένου βορίου με τον ICP-MS αποδεικνύουν την παρουσία καρβορανίου σε όλους τους τύπους λιποσωμάτων που παρασκευάστηκαν.

Ο εγκλωβισμός του καρβορανίου προσδίδει στα λιποσώματα, όπως φάνηκε και από την μελέτη συγκράτησης καλσεΐνης, μεγαλύτερη σταθερότητα. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στον εξαιρετικά λιπόφιλο χαρακτήρα του καρβορανίου το οποίο εγκλωβίζεται στην λιπιδική διπλοστοιβάδα. Επιπλέον η ύπαρξη του καρβορανίου στην λιπιδική μεμβράνη δεν επάγει σημαντικά την τάση για συσσωμάτωση των λιποσωμάτων παρουσία ιόντων ασβεστίου, ενώ και στα λιποσώματα από PC που παρατηρείται μια αύξηση στην συσσωμάτωση δεν είναι ιδιαίτερα μεγάλη.

Μελλοντικά προτείνεται η δοκιμή και άλλων τεχνικών παρασκευής καθώς και η δοκιμή διαφορετικών αναλογιών λιπιδίου/καρβορανίου ώστε να επιτευχθεί μεγαλύτερος εγκλωβισμός του βορίου στα λιποσώματα. Επίσης η τροποποίηση της λιπιδικής μεμβράνης τοποθετώντας πάνω της κάποιες πρωτεΐνες, όπως τρανσφεράσες (transferrin), θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην παρασκευή λιποσωμάτων με μεγαλύτερη ικανότητα προσπέλασης του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, γεγονός το οποίο είναι πολύ σημαντικό για την θεραπευτική τεχνική της BNCT στην οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί το καρβοράνιο το οποίο εγκλωβίσαμε στα λιποσώματα.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

I. ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Σχηματική παρουσίαση της καταστροφή καρκινικού κυττάρου με την χρήση της BNCT.	13
Εικόνα 2. Αντίδραση σχάσης βορίου	13
Εικόνα 3. Ενθυλάκωση και ενσωμάτωση βορανίων σε λιποσώματα [26].	17
Εικόνα 4. Δομή των ανιόντων 4-dihydroxyborylphenylalanine (BPA) και mercaptoun decahydrododecaborate (BSH) [26].	18
Εικόνα 5. Ορθο (o)-, μετα (m) - και παρα (p) - καρβοράνιο [26].	19
Εικόνα 6. Συντακτικός τύπος φωσφατιδυλοχολίνης.....	22
Εικόνα 7. Μονοστοιβαδικό (unilamellar) λιπόσωμα.	23
Εικόνα 8. Σχηματική απεικόνιση πολυστοιβαδικού (multilamellar) λιποσώματος.	23
Εικόνα 9. Ταξινόμηση λιποσωμάτων με βάση το μέγεθος και τον αριθμό των στοιβάδων	25
Εικόνα 10. Nido-Carborane Lipids μονής και διπλής αλυσίδας [60, 61].....	29
Εικόνα 11. <i>Closo</i> -dodecaborate λιπίδια [26].	31
Εικόνα 12. Cholesterol και cholesterol-mimicking carborane [26].	32
Εικόνα 13. Κίνηση Brown.....	33
Εικόνα 14. Σχηματικό διάγραμμα συσκευής δυναμικής σκέδασης φωτός.	35
Εικόνα 15. Στάδια μηχανισμού συγχώνευσης λιποσωμάτων παρουσία ιόντων ασβεστίου [78].	38
Εικόνα 16. Σχηματικό διάγραμμα φασματοφωτομετρίας.....	40
Εικόνα 17. Σχηματικό διάγραμμα φθορισμόμετρου.	42
Εικόνα 18. Σχηματικό διάγραμμα πυρσού φασματοφωτομέτρου εκπομπής με επαγωγικό συζευγμένο πλάσμα.....	45
Εικόνα 19. Μηχανισμός χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού.	47
Εικόνα 20. Η αρχή λειτουργίας της μικροσκοπίας ατομικής δύναμης AFM.....	48
Εικόνα 21. Συντακτικοί τύποι (A) PC, (B) DMPC, (C) DPPC.....	52
Εικόνα 22. Συντακτικός τύπος (B ₁₈ C ₃₄ N ₄ H ₆₄) nido-carborane salt of Dequalinium. ..	53
Εικόνα 23. Στήλη χρωματογραφίας γέλης και διαχωρισμός των λιποσωμάτων από την εξωτερική καλσεΐνη	55
Εικόνα 24. Κυψελίδα με ηλεκτρόδια για την μέτρηση του ζ-δυναμικού.	56

Εικόνα 25. Zetasizer Nano ZS της Malvern.....	56
Εικόνα 26. Φθορισμόμετρο RF 5301 SHIMADZU.....	57
Εικόνα 27. Φασματοφωτόμετρο UV mini 1240 της Shimadzu.	60
Εικόνα 28. Agilent 7700 ICP-MS.....	61
Εικόνα 29. Μικροσκόπιο ατομικής σάρωσης MultiMode/NanoScope IV.	62
Εικόνα 30. Άδεια PC-λιποσώματα (A) και PC-λιποσώματα που έχουν εγκλωβίσει καρβοράνιο (B).....	84
Εικόνα 31. Άδεια DMPC-λιποσώματα (A) και DMPC-λιποσώματα που έχουν εγκλωβίσει καρβοράνιο (B).....	84
Εικόνα 32. Άδεια DPPC-λιποσώματα (A) και DPPC-λιποσώματα που έχουν εγκλωβίσει καρβοράνιο (B).....	85

II. ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Συγκράτηση καλσεΐνης (%) των λιποσωμάτων (PC) σε σχέση με το χρόνο επώασης τους στους 37° C.	66
Πίνακας 2. Συγκράτηση καλσεΐνης(%) των λιποσωμάτων (DMPC) σε σχέση με το χρόνο επώασης τους στους 37° C.....	68
Πίνακας 3. Συγκράτηση καλσεΐνης(%) των λιποσωμάτων (DPPC) σε σχέση με το χρόνο επώασης τους στους 37° C.....	69
Πίνακας 4. Μετρήσεις μεγέθους λιποσωμάτων.....	71
Πίνακας 5. Μετρήσεις ζ-δυναμικού λιποσωμάτων.....	75
Πίνακας 6. Σχετική θολερότητα λιποσωμάτων.....	77
Πίνακας 7. Μέγιστες εντάσεις φθορισμού των λιποσωμάτων, μετά από προσθήκη Nile-red.	81
Πίνακας 8. Μετρήσεις ICP-MS και (%) Εγκλωβισμός βορίου ¹⁰ B.....	82

III. ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1. Διάγραμμα μεταβολής συγκράτησης καλσεΐνης (%) σε συναρτήσσει του χρόνου επώασης.....	67
Διάγραμμα 2. Διάγραμμα μεταβολής συγκράτησης καλσεΐνης (%) σε συναρτήσσει του χρόνου επώασης.....	68
Διάγραμμα 3. Διάγραμμα μεταβολής συγκράτησης καλσεΐνης (%) σε συναρτήσσει του χρόνου επώασης.....	70
Διάγραμμα 4. Μέγεθος λιποσωμάτων.....	72
Διάγραμμα 5. Κατανομή εντάσεως έναντι υδροδυναμικής διαμέτρου PC-λιποσωμάτων με ή χωρίς καρβοράνιο.....	73
Διάγραμμα 6. Κατανομή εντάσεως έναντι υδροδυναμικής διαμέτρου DMPC-λιποσωμάτων με ή χωρίς καρβοράνιο.....	73
Διάγραμμα 7. Κατανομή εντάσεως έναντι υδροδυναμικής διαμέτρου DPPC-λιποσωμάτων με ή χωρίς καρβοράνιο.....	74
Διάγραμμα 8. ζ-δυναμικό λιποσωμάτων.....	76
Διάγραμμα 9. Διαγράμματα σχετικής θολερότητας PC λιποσωμάτων συναρτήσσει του χρόνου.....	78
Διάγραμμα 10. Διαγράμματα σχετικής θολερότητας DMPC λιποσωμάτων συναρτήσσει του χρόνου.....	79
Διάγραμμα 11. Διαγράμματα σχετικής θολερότητας DPPC λιποσωμάτων συναρτήσσει του χρόνου.....	79
Διάγραμμα 12. Διαγράμματα φθορισμού λιποσωμάτων μετά από προσθήκη Nile Red.....	81
Διάγραμμα 13. (%) Εγκλωβισμός βορίου ¹⁰ B.....	83

VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Chadwick J., The existence of a neutron, Proc. R. Soc. Lond., 1938, A 136: 692–708.
2. Fermi E. et al., Artificial radioactivity produced by neutron bombardment, 1934, Proc. R. Soc. Lond. A 146:483–500.
3. Locher G.L., Biological effects and therapeutic possibilities of neutrons, Am. J. Roent. Rad. Ther., 1936, 36:1–13.
4. Sauerwein W., Principles and history of neutron capture therapy, Strahlenther. Onkol., 1993, 169:1–6.
5. G. Calabrese, Ana C. N. M. Gomes, E. Barbu, T. G. Nevell and J. Tsibouklis, Carborane-based derivatives of delocalised lipophilic cations for boron neutron capture therapy: synthesis and preliminary in vitro evaluation, J. Mater. Chem., 2008, 18:4864–4871.
6. M. F. Hawthorne, Mol. Med. Today, 1998, 4(4):174.
7. R. F. Barth, J. A. Coderre, M. Graca, H. Vicente, and Thomas E., Blue Boron Neutron Capture Therapy of Cancer: Current Status and Future Prospects, Clin. Cancer Res., 2005, 11(11).
8. Harling O., Riley K., Newton T., et al., The fission converter-based epithermal neutron irradiation facility at the Massachusetts Institute of Technology reactor, Nucl. Sci. Eng. ,2002, 140:223-40.
9. Capala J., B.H. Stenstam , Skold K., et al., Boron neutron capture therapy for glioblastoma multiforme: clinical studies in Sweden, J. Neurooncol., 2003, 62:135-44.
10. Joensuu H., Kankaanranta L., Seppa T., et al., Boron neutron capture therapy of brain tumors: clinical trials at the Finnish Facility using boronophenylalanine, J. Neurooncol, 2003, 62:123 – 34.
11. Moss R.L., Stecher-Rasmussen F., Ravensberg K., Constantine G., Watkins P., Design, construction and installation of an epithermal neutron beam for BNCT at the High Flux Reactor Petten. In: Allen BJ, Moore DE, Harrinston BV editors. Progress in neutron capture therapy for cancer. New York: Plenum Press, 1992, p. 63-6.

12. Marek M., Viererbl M., Burian J., Jansky B., Determination of the geometric and spectral characteristics of BNCT beam (neutron and g-ray). In: Hawthorne MF, Shelly K, Wiersema RJ, editors. Neutron capture therapy. Vol. I. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2001, p. 381-9.
13. Kobayashi T., Sakurai Y., Kanda K., Fujita Y., Ono K., The remodeling and basic characteristics of the heavy water neutron irradiation facility of the Kyoto University Research Reactor, mainly for neutron capture therapy. Nucl. Technol., 2000, 131:354-78.
14. Yamamoto K., Kumada H., Torii Y., et al., Characteristics of neutron beams for BNCT. Proceedings of the 9th Symposium on Neutron Capture Therapy, 2000, Osaka, Japan. p. 243-44.
15. Blaumann H.R., Larrieu O.C., Longhino J.M., Albornoz A.F., NCT facility development and beam characterisation at the RA-6 Reactor. In: Hawthorne MF, Shelly K, Wiersema RJ, editors. Frontiers in neutron capture therapy. Vol. I. New York : Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2001, p.313-7.
16. Berger M.S., Malignant astrocytomas: surgical aspects, Semin. Oncol., 1994, 21:172-85.
17. Gutin P.H., Posner J.B., Neuro-oncology: diagnosis and management of cerebral gliomas-past, present, and future, Neurosurgery, 2000, 47:1-8.
18. Parney I.F., Chang S.M., Current chemotherapy for glioblastoma. In: Market J., DeVita V.T., Rosenberg S.A., Hellman S., editors. Glioblastoma multiforme, 1st ed. Sudbury: Jonesand Bartlett Publishers, 2005, p. 161-77.
19. Paul D.B., Kruse C.A., Immunologic approaches to therapy for brain tumors, Curr. Neurol. Neurosci., 2001, 1:238-44.
20. Rainov N.G., Gene therapy for human malignant brain tumors. In: Market J., De Vita V.T., Rosenberg S.A., Hellman S., editors. Glioblastoma multiforme, 1st ed. Sud- bury: Jones and Bartlett Publishers, 2005, p.249-65.
21. Curran W.J., Scott C.B., Horton J., et al., Recursive partitioning analysis of prognostic factors in three radiation oncology group malignant glioma trials, J. Natl. Cancer. Inst., 1993, 85:704-10.
22. Lacroix M., Abi-Said D., Fourny D.R., et al., A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multi- forme: prognosis, extent of resection, and

- survival, *J. Neurosurg.*, 2001, 95:190-8.
23. Hentschel S.J., Lang F.F., Current surgical management of glioblastoma, In: Market J., DeVita V.T., Rosenberg S.A., Hellman S, editors. *Glioblastoma multiforme*, 1st ed. Sudbury: Jones and Bartlett Publishers, 2005, p.108-30.
 24. Laws E.R., Shaffrey M.E., The inherent invasiveness of cerebral gliomas: implications for clinical management, *Int. J. Dev. Neurosci.*, 1999, 17:413-20.
 25. Halperin E.C., Burger P.C., Bullard D.E., The fallacy of the localized supratentorial malignant glioma, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1988, 15:505-9.
 26. G. Calabrese, J.J. Nesnas, E. Barbu, D.Fatouros and J. Tsibouklis The formulation of polyhedral boranes for the boron neutron capture therapy of cancer, *Dr. Discov. Today*, 2012, 17(3-4):153.
 27. Sivaev, I.B. and Bregadze, V.V., Polyhedral boranes for medical applications: current status and perspectives. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 1999, 11:1433–1450.
 28. Grimes, R.N., ed. (2011) *Carboranes*, Academic Press.
 29. Valliant, J.F. et al., The medicinal chemistry of carboranes. *Coord. Chem. Rev.*, 2002, 232:173–230.
 30. Anderson, B.D., Prodrugs for improved CNS delivery. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 1996, 19:171–202.
 31. Hoste, K. et al., Polymeric prodrugs. *Int. J. Pharm.*, 2004, 277:119–131.
 32. Nakamura H., Liposomal boron delivery for neutron capture therapy. *Methods Enzymol.*, 2009, 465:179–208.
 33. Godwin J.T., Farr L.E., Sweet W.H., Robertson J.S., Pathological study of eight patients with glioblastoma multiforme treated by neutron-capture therapy using boron 10., *Cancer*, 1955, 8:601-15.
 34. Snyder H.R., Reedy A.J., Lennarz W.J., Synthesis of aromatic boronic acids, aldehydo boronic acids and a boronic acid analog of tyrosine, *J. Am. Chem. Soc.*, 1958, 80:835-838.
 35. Soloway A.H., Hatanaka H., Davis M.A., Penetration of brain and brain tumor. VII. Tumor-binding sulfhydryl boron compounds., *J. Med. Chem.*, 1967, 10:714.
 36. Gabel D., Foster S., Fairchild R.G., The Monte Carlo simulation of the

- biological effect of the $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{L}$ reaction in cells and tissue and its implication for boron neutron capture therapy. *Radiat. Res.*, 1987, 111:14-25.
37. Hawthorne M.F., Lee M.W., Acritical assessment of boron target compounds for boron neutron capture therapy, *J. Neurooncol*, 2003, 62:33-45.
38. Diaz A., Stelzer K., Laramore G., Wiersema R., Pharmacology studies of $\text{Na}_2^{10}\text{B}_{10}\text{H}_{10}$ (GB-10) in human tumor patients. In: M.W. Sauerwein, R.Mossand A. Wittig, editors. *Research and Development in Neutron Capture Therapy*, Bologna: Monduzzi Editore, International Proceedings Division, 2002, p.993-9.
39. A. S. Don and P. J. Hogg, *Trends Mol. Med.*, 2004, 10(8):372.
40. E. A. Liberman, V. P. Topali, L. M. Tsofina, A. A. Jasaitis and V. P. Skulachev, *Nature*, 1969, 222:1076.
41. G. F. Azione, D. Pietrobon and M. Zoratti, *Curr. Top. Bioenerg.*, 1984, 13:1.
42. J. S. Modica-Napolitano and J. R. Aprille, *Cancer Res.*, 1987, 47:4361.
43. Κ. Παναγιώτου. *Διεπιφανειακά Φαινόμενα και Κολλοειδή Συστήματα*. Εκδόσεις Ζήτη, 1998, Θεσσαλονίκη.
44. Talsma H., Gooris, G., v. Steenberg M.J., Salomons M.A., Bouwstra J., Crommelin D.J.A., The influence of the molar ratio of cholesteryl hemisuccinate/dipalmitoylphosphatidylcholine on 'liposome' formation after lipid film hydration. *Chemistry and Physics of Lipids*, 1992, 62(2):105-112.
45. Kirby C.J. and Gregoriadis G., 1999, 'Liposomes' in Mathiowitz E. (ed.), *Encyclopaedia of Controlled drug delivery*, John Willey & sons Inc., New York, USA, 461-492.
46. A.D. Bangham, M.M. Standish, J.C. Watkins, Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, *J. of Mol. Biol.* 1965, 13(1):238–252.
47. Γεώργιου Χ. Κτίστη, *Μαθήματα Φυσικής Φαρμακευτικής*, Εκδόσεις ΖΗΤΗ, 2007, Θεσσαλονίκη.
48. Meng-Feng Shieh, I-Ming Chu, Chau-Jen Lee, Pei Kan, Dou-Mong Hau, Jiunn-Jay Shieh, Liposomal delivery system for taxol, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1997, 83(1):87–90.

49. S.G. Antimisiaris, P. Kallinteri and D.G. Fatouros: LIPOSOMES AND DRUG DELIVERY, Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Production and Processes, 2008 John Wiley & Sons, Inc..
50. Tiberg F., Improving drug delivery by use of lipid self-assembly particle structures- beyond liposomes and emulsions. Business Briefing: Pharma Outsourcing, 2003, 62-65.
51. Muller R.H., Keck C.M., Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs-a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles, J. Biotechnol., 2004 , 113(1-3):151-70.
52. S.S. Biju, Sushama Talegaonkar, P.R. Mishra, R.K. Khar. Vesicular systems: An overview. Ind. J. of Pharm., 2006, 68(2):141-153.
53. Parampal Deol, G.K Khuller, Lung specific stealth liposomes: stability, biodistribution and toxicity of liposomal antitubercular drugs in mice. Bioch. et Bioph. Acta (BBA), 1997, 1334(2-3): 161–172.
54. Liu X.Y., Yang Q., Kamo N., Miyake J., Effect of liposome type and membrane fluidity on drug-membrane partitioning analyzed by immobilized liposome chromatography, J. Chromatogr., 2001, 913(1-2):123-31.
55. Kirby C. & Gregoriadis G., Dehydration-rehydration vesicles: a simple method for high yield drug entrapment in liposomes. Biotechnology, 1984, 2: 979-984.
56. Amarnath Sharma , Uma S. Sharma, Liposomes in drug delivery: progress and limitations, Int. J. of Pharm. 154 (1997):123-140.
57. Sinil Kim., Russell E. Jacobs, Stephen H. White, Preparation of multilamellar vesicles of defined size-distribution by solvent-spherule evaporation, Biochim. Biophys. Acta., 1985, 812(3):793-801.
58. C. Kirby, G. Gregoriadis, The effect of lipid composition of small unilamellar liposomes containing melphalan and vincristine on drug clearance after injection into mice. Bioch. Pharm., 1983, 32(4):609–615.
59. M. Müller, S. Mackeben, C. Müller-Goymann, Physicochemical characterisation of liposomes with encapsulated local anaesthetics. Int. J. of Pharm., 2004, 274(1-2):139–148.
60. Deamer D. and Bangham A.D. Biochim. Biophys. Acta., 1976, 443: 629.

61. Schieren H., Rudolph S., Findelstein M., Coleman P. and Weissmann G., *Biochim. Biophys. Acta.*, 1978, 542:137.
62. Batzri S., Korn E.D., Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1973, 298(4):1015–1019.
63. Hamilton R.L. and Guo L.S.S., In: *Liposome Technology*, Gregoriadis G. editor, CRC Press, Florida, 1984, Vol.1, Chapter 4, p.37.
64. Jousma H., Talsma H., Spies F., Joosten J.G.H., Junginger H.E., and Crommelin, D.J.A., Characterization of liposomes. The influence of extrusion on multilamellar vesicles through polycarbonate membranes on particle size, particles size distribution and number of bilayers. *Int. J. Pharm.*, 35(1987): 263-274.
65. Feakes D. A., Shelly K., Hawthorne M. F., Selective boron delivery to murine tumors by lipophilic species incorporated in the membranes of unilamellar liposomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92:1367-1370.
66. Watson-Clark R.A., Banquerigo M.L., Shelly K., Hawthorn M.F., Brahn E., Model studies directed toward the application of boron neutron capture therapy to rheumatoid arthritis: Boron delivery by liposomes in rat collagen-induced arthritis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*,1998, 95:2531-2534.
67. Heber E.M., Kueffer P.J., Lee M.W. Jr., Hawthorne M.F., Garabalino M.A., Molinari A.J., Nigg D.W., Bauer W., Hughes A.M., Pozzi E.C., Trivillin V.A., Schwint A.E., Boron delivery with liposomes for boron neutron capture therapy (BNCT): biodistribution studies in an experimental model of oral cancer demonstrating therapeutic potential. *Radiat. Environ. Biophys.*, 2012, Epub ahead.
68. Nakamura H., Miyajima Y., Takei T., Kasaoka T., Maruyama K., Synthesis and vesicle formation of a nido-carborane cluster lipid for boron neutron capture therapy, *Chem. Commun.*, 2004, 17:1910-1911.
69. Miyajima Y., Nakamura H., Kuwata Y., Lee J.-D., Masunaga S., Ono K., Maruyama K., Transferrin-loaded nido-carborane liposome: Synthesis and

- intracellular targeting to solid tumors for boron neutron capture therapy. *Bioconjug. Chem.*, 2006, 17:1314-1320.
70. Lee, J.-D., Ueno, M., Miyajima, Y., Nakamura, H. (2007). Synthesis of boron cluster lipids: closo-Dodecaborate as an alternative hydrophilic function of boronated liposomes for neutron capture therapy. *Org. Lett.*, 9:323-326.
71. Justus, E., Awad, D., Hohnholt, M., Schaffran, T., Edwards, K., Karlsson, G., Damian, L., Gabel, D. (2007). Synthesis, liposomal preparation, and in vitro toxicity of two novel dodecaborate cluster lipids for boron neutron capture therapy. *Bioconjug. Chem.*, 18 : 1287-1293.
72. Feakes D.A, Spinier J.K., Harris F.R., Synthesis of boron-containing cholesterol derivatives for incorporation into unilamellar liposomes and evaluation as potential agents for BNCT. *Tetrahedron*, 1999, 55:11177-11186.
73. Jay Tepperman. *Metabolic and endocrine physiology*. Year Book Medical Publishers, 1980, Chicago.
74. Douglas W.W., *Biochem. Sot. Symp.*, 1974, 39:1-28.
75. Katz B. and Miledi, R., *J. Physiol.*. 1970, 207:789-801.
76. Miller C., Racker E., Ca^{++} -induced fusion of fragmented sarcoplasmic reticulum with artificial planar bilayers, *J. Membr. Biol.*, 1976, 30 (3):283–300.
77. Papahadjopoulos D., Poste G., Schaeffer B. E., and Vail W., *Biochim. Biophys. Acta*, 1974, 352:10-28.
78. Thomas D. Ingolia and Daniel E. Koshland Jr., The role of calcium in fusion in artificial vesicles, *J. of Bio. Chem.*, 1978, 253(11):3821-9.
79. Miller C., Arvan P., Telford J. N., and Racke, E., *J. Membr. Biol.*, 1976, 30:271-282.
80. L.M. Were, B.D. Bruce, P. M. Davidson and J. Weiss, Size, Stability, and Entrapment Efficiency of Phospholipid Nanocapsules Containing Polypeptide Antimicrobials, *J. of Agr. And Food Chem.*, 2003, 56(18):8231-8247.

81. Goni F.M., and Alonso A., Spectroscopic techniques in the study of membrane solubilization, reconstitution and permeabilization by detergents, *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, 1508:51–68.
82. Alonso A., Villena A. and Goñi F.M., Lysis and reassembly of sonicated lecithin vesicles in the presence of Triton X-100, *FEBS Lett.*, 1981, 123:200–204.
83. Kokona M., Kallinteri P., Fatouros D., and Antimisiaris S.G., Stability of SUV liposomes in the presence of cholate salts and pancreatic lipases: Effect of lipid composition, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2000, 9:245–252.
84. Almog S., Litman B.J., Wimley W., Cohen J., Wachtel E. J., Barenholz Y., Ben-Saul A., and Lichtenberg D., States of aggregation and phase transformations in mixtures of phosphatidylcholine and octyl glucoside, *Biochemistry*, 1990, 29:4582–4592.
85. Lopez O. de la Maza, A. Coderch, L. Lopez-Iglesias, C. Wehrli E. and Parra J.L., Direct formation of mixed micelles in the solubilization of phospholipid liposomes by Triton X-100, *FEBS Lett.*, 1998, 426:314–318.
86. Fatouros D.G., Piperoudi S., Gortzi O., Ioannou P.V., and Antimisiaris S.G., Physical stability of sonicated arsonoliposomes: Effect of calcium ions, *J. Pharm. Sci. US*, 2005, 94:46–55.
87. Θ.Π. Χατζηιωάννου, Μ.Α. Κουππάρη, ΕΝΟΡΓΑΝΗ ΑΝΑΛΥΣΗ, Πανεπιστήμιο Αθηνών, 1997, Αθήνα.
88. Reichardt C., Welton T., *Solvents and solvent effects in organic chemistry*. (4th, updated and enl. ed. ed.), Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2010, p. 360.
89. M.M. Davis and H.B. Hetzer, Titrimetric and equilibrium studies using indicators related to nile blue, *A. Anal. Chem.*, 1966, 38:451-461.
90. P. Greenspan and S.D. Fowler., Spectrofluorometric studies of the lipid probe nile red, *J. Lipid Res.*, 1985, 26:781-789.

91. A Practical Guide to SPM Scanning Probe Microscopy, 2005 Veeco Instruments Inc.
92. T. Schaffran, Jingyu Li, G. Karlsson, K. Edwards, M., D. Gabel, Interaction of N,N,N- trialkylammoniumundecahydro-closo-dodecaborates with dipalmitoyl phosphatidylcholine liposomes, Chem. and Ph. of Lip., 2010, 163:64–73.
93. D. Awad, L. Damian, M. Winterhalter, G. Karlsson, K. Edwards, D. Gabel, Interaction of $\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$ with dimyristoyl phosphatidylcholine liposomes, Chem. and Ph. of Lip., 2009, 157:78–85.