



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΧΗΜΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΒΙΟΕΠΙΧΕΙΡΕΙΝ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΕΣ ΣΥΝΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΚΑΙ
ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΣΕ ΝΑΝΟΦΟΡΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ
ΚΑΡΚΙΝΟΥ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΕΡΕΥΝΗΤΡΙΑ Β', ΒΑΣΙΛΙΚΗ
ΠΑΠΑΔΗΜΗΤΡΙΟΥ

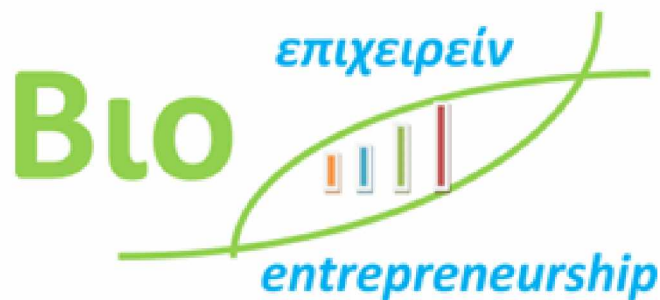


UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY



NATIONAL HELLENIC RESEARCH FOUNDATION
INSTITUTE OF CHEMICAL BIOLOGY

**INTERSTITUTIONAL PROGRAM OF POSTGRADUATE STUDIES
IN
BIOENTREPRENEURSHIP**



ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ ΧΑΧΛΑΚΗ

00078

ΑΘΗΝΑ, 2021

MASTER THESIS

**STRATEGIES FOR COENCAPSULATION OF NUTRACEUTICALS
AND CHEMOTHERAPEUTICS IN NANOCARRIERS FOR CANCER
TREATMENT**

**SUPERVISOR: SENIOR RESEARCHER (RESEARCHER B), VASILIKI
PAPADIMITRIOY**

PANAGIOTA CHACHLAKI

00078

ATHENS, 2021

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο σπουδών για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στο

ΒΙΟΕΠΙΧΕΙΡΕΙΝ

που απονέμει το Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Εγκρίθηκε την από την τριμελή εξεταστική επιτροπή:

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ	ΥΠΟΓΡΑΦΗ
Παπαδημητρίου Βασιλική	Κύρια Ερευνήτρια. Βιομηχανική & Νανοβιοτεχνολογία, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών	Κύρια Ερευνήτρια, Περιβάλλον & Υγεία, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών
Πλέτσα Βασιλική	Επίκουρος Καθηγητής	
Μπαλατσός Νικόλαος	Βιοχημείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας	

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την καθηγήτριά μου κ.Βασιλική Παπαδημητρίου για την ανάθεση του θέματος και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας καθώς και για την συνεχή συμπαράσταση, καθοδήγηση και βοήθεια στην πορεία της εργασίας. Θέλω να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην κ. Βασιλική Πλέτσα, για τη στήριξη, την καθοδήγηση και τη βοήθεια που προσέφερε στη συγκεκριμένη εργασία. Ευχαριστώ τον κ. Νίκο Μπαλατσό που μου έκανε την τιμή να συμμετέχει στην προσπάθειά μου αυτή ως επιβλέπων της εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την καλή μου φίλη και συμφοιτήτρια Αμαλία Φρύδα για τη συνεχή συμπαράσταση και βοήθεια στις κρίσιμες στιγμές καθ' όλο το διάστημα εκπόνησης της συγκεκριμένης εργασίας. Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου που με βοηθά και με στηρίζει για να πραγματοποιώ τα όνειρα μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ:.....	6
ABSTRACT.....	7
ΣΚΟΠΟΣ.....	9
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
2. ΚΥΡΙΟ ΜΕΡΟΣ	11
2.1 Χημειοθεραπευτικοί παράγοντες στη θεραπεία του καρκίνου.....	11
2.1.1 Δοξορουμπκίνη (Doxorubicin).....	11
2.1.2 Δοσεταξέλη (Docetaxel).....	12
2.1.3 Μεθοτρεξάτη (Methotrexate).....	13
2.1.4 Πακλιταξέλη (Paclitaxel).....	14
2.2 Διατροφοφάρμακα στη θεραπεία του καρκίνου	15
2.2.1 Κουρκουμίνη (Curcumin).....	16
2.2.2 Βαϊκαλεΐνη (Baicalein).....	17
2.2.3 Ρεσβερατρόλη (Resveratrol).....	18
2.3 Νανοφορείς για τη συνενθυλάκωση διατροφοφαρμάκων και χημειοθεραπευτικών	19
2.3.1 Πολυμερικά νανοσωματίδια.....	19
2.3.2 Νανογαλακτώματα	33
2.3.3 Νανολιποσώματα.....	37
3. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ.....	42
4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	44

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος είναι μια πολύ συχνή νόσος, η οποία χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Ο καρκίνος είναι ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα υγείας που παρατηρούνται σήμερα στις αναπτυγμένες χώρες. Υπάρχουν διάφοροι τύποι καρκίνου καθώς και πολυάριθμες θεραπευτικές προσεγγίσεις όπως η χειρουργική επέμβαση, η ανοσοθεραπεία, η ραδιοθεραπεία, η ορμονοθεραπεία και η χημειοθεραπεία. Η χημειοθεραπεία είναι η πιο συχνή και αποτελεσματική μέθοδος, εμφανίζει όμως πολλούς περιορισμούς και ανεπιθύμητες ενέργειες. Η συνδυαστική χημειοθεραπεία μαζί με διατροφοφάρμακα αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση, ιδιαίτερα όταν αυτοί οι παράγοντες ενθυλακώνονται σε νανοσωματίδια. Η συνενθυλάκωση περισσότερων του ενός συστατικού είναι μία καθιερωμένη τεχνική στις φαρμακευτικές βιομηχανίες και έχει εφαρμοστεί ευρέως από ορισμένους ερευνητές για την ταυτόχρονη ενθυλάκωση φαρμάκων και βιοδραστικών ουσιών με σκοπό την ανάπτυξη νέας στρατηγικής για τη θεραπεία πολυπαραγοντικών ασθενειών, ιδιαίτερα αυτής του καρκίνου. Οι συνδυαστικές θεραπείες συνενθυλάκωσης διατροφοφαρμάκων και χημειοθεραπευτικών οδηγούν σε ένα καλύτερο θεραπευτικό αποτέλεσμα λόγω της συνεργιστικής δράσης των δύο αυτών παραγόντων. Έτσι λοιπόν, εκτός από την επίτευξη της μέγιστης δράσης μπορούν να αντιμετωπιστούν προβλήματα που αφορούν τη βιοδιαθεσιμότητα, τη βιοαποικοδόμηση και την τοξικότητα των αντικαρκινικών παραγόντων. Τα πιο γνωστά διατροφοφάρμακα που φαίνεται να συμβάλλουν στην αντιμετώπιση του καρκίνου είναι η κουρκουμίνη, η ρεσβερατρόλη και το baicalein ενώ οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι αντικαρκινικοί παράγοντες είναι η μεθοτρεξάτη, η πακλιταξέλη, η δοξορουμπικίνη και η δοσεταξέλη. Έχουν μελετηθεί διάφοροι συνδυασμοί διατροφοφαρμάκων και χημειοθεραπευτικών παραγόντων οι οποίοι συνενθυλακώνονται σε πολυμερικά νανοσωματίδια, νανογαλακτώματα και νανολιποσώματα. Τα αποτελέσματα, δείχνουν πως η συνενθυλάκωση διατροφοφαρμάκων και χημειοθεραπευτικών αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη τεχνική που μπορεί να μειώσει τις ανεπιθύμητες ενέργειες της συμβατικής χημειοθεραπείας και να αντιστρέψει το φαινόμενο της αντίστασης στην πολυφαρμακία. Παρόλα αυτά, είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν περισσότερες προκλινικές μελέτες σε κατάλληλα ζωικά μοντέλα αλλά και κλινικές μελέτες προκειμένου να εξαχθούν πιο ασφαλή συμπεράσματα για τη συγκεκριμένη θεραπευτική προσέγγιση κατά του καρκίνου.

ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ:

Συνενθυλάκωση, διατροφοφάρμακα, χημειοθεραπευτικά, καρκίνος, κουρκουμίνη, νανοφορείς

ABSTRACT

Cancer is a very common disease, which is characterized by an uncontrolled cell proliferation. Cancer is one of the major health problems that appears in developed countries. There are different types of cancer as well as numerous treatment approaches such as surgery, immunotherapy, radiotherapy, hormonotherapy and chemotherapy. Chemotherapy is the most common and effective method, although it has many limitations and side effects. Combination chemotherapy, including nutraceuticals is a promising approach, especially when nutraceuticals are encapsulated in nanoparticles. Coencapsulation of more than one compound is a common technique in pharmaceutical industries and it has been widely used by some researchers for the concomitant encapsulation of drugs and bioactive compounds in order to develop a new strategy for the treatment of multifactorial diseases, especially cancer. Combination therapies with nutraceuticals and chemotherapeutics may lead to a better therapeutic result due to the synergistic effect of these two factors. Thus, except from the achievement of the maximum effect, issues related to bioavailability, biodegradation and toxicity of anti-cancer agents may be solved. The most well-known pharmaceuticals that appear to contribute to cancer's treatment are curcumin, resveratrol and baicalein, while the most widely used anti-cancer agents are methotrexate, paclitaxel, doxorubicin and docetaxel. Various combinations of nutraceuticals and chemotherapeutics that are co-encapsulated into polymeric nanoparticles, nanoemulsions and nanoliposomes have been studied. The results show that co-encapsulation of nutraceuticals and chemotherapeutics is a promising technique which can reduce the side effects of conventional chemotherapy and reverse the phenomenon of multi drug resistance. However, it is necessary to carry out more preclinical studies in suitable animal models as well as clinical studies in order to deduce reliable conclusions about this specific therapeutic approach against cancer.

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η βιβλιογραφική ανασκόπηση των πειραματικών μελετών που αφορούν τη συνενθυλάκωση διατροφοφαρμάκων και χημειοθεραπευτικών σε νανοφορείς για τη θεραπεία του καρκίνου. Πιο συγκεκριμένα αναλύονται εκτενέστερα τα είδη, οι ιδιότητες και τα χαρακτηριστικά των νανοφορέων, των χημειοθεραπευτικών καθώς και των διατροφοφαρμάκων που χρησιμοποιήθηκαν.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο καρκίνος είναι μια πολύ συχνή νόσος, η οποία χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Ο καρκίνος είναι ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα υγείας που παρατηρούνται σήμερα στις αναπτυγμένες χώρες. Το 2012, υπήρξαν περίπου 14 εκατομμύρια περιπτώσεις καρκίνου με περίπου 8,2 εκατομμύρια θανάτους. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) εκτιμά πως σε 20 χρόνια οι περιπτώσεις καρκίνου θα παρουσιάσουν αύξηση κατά 70%. Οι παράγοντες οι οποίοι συμβάλλουν στον καρκίνο είναι ενδογενείς όπως γενετικές μεταλλάξεις, ορμονολογικές και ανοσολογικές καταστάσεις καθώς και εξωγενείς όπως ρύπανση, κάπνισμα, διατροφή, ραδιενέργεια και μολυσματικοί οργανισμοί. Υπάρχουν διάφοροι τύποι καρκίνου (πνεύμονα, παχέος εντέρου, δέρματος, ωθηκών, οστών, προστάτη, ήπατος, μαστού κ.ά). Ωστόσο, οι πιο κοινοί τύποι καρκίνου είναι ο καρκίνος του πνεύμονα, ο καρκίνος του μαστού και ο ορθοκολικός καρκίνος. Οι θεραπευτικές προσεγγίσεις στη θεραπεία του καρκίνου είναι πολυάριθμες και σε αυτές συμπεριλαμβάνονται η χειρουργική επέμβαση, η ανοσοθεραπεία, η ραδιοθεραπεία, η ορμονοθεραπεία και η χημειοθεραπεία. Η χημειοθεραπεία είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος και είναι γνωστή ως μια από τις πιο αποτελεσματικές θεραπείες κατά του καρκίνου στην κλινική πράξη. Παρόλα αυτά, η χρήση χημειοθεραπευτικών παραγόντων παρεμποδίζεται από τρεις βασικούς περιορισμούς όπως χαμηλή υδατική διαλυτότητα, χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα και χαμηλή εξειδίκευση (λόγω ετερογένειας του όγκου) με αποτέλεσμα να επιφέρει ανεπιθύμητες ενέργειες στα υγιή κύτταρα. Η χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα έχει ως αποτέλεσμα τη χαμηλή συγκέντρωση των χημειοθεραπευτικών παραγόντων στον καρκινικό όγκο, το οποίο οδηγεί σε γενικευμένη φαρμακευτική τοξικότητα (drug toxicity). Η στόχευση ενός μονοπατιού με συμβατική θεραπεία δεν αποτελεί αποτελεσματική προσέγγιση για τη θεραπεία του καρκίνου και συχνά οδηγεί στο φαινόμενο της ανθεκτικότητας στην πολυφαρμακία (MDR-Multi-Drug-Resistance). Η συνδυαστική χημειοθεραπεία αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση η οποία ξεπερνά τους περιορισμούς που αναφέρθηκαν παραπάνω (Alven *et. al.* 2020).

Η συνδυαστική χημειοθεραπεία περιλαμβάνει την ταυτόχρονη χορήγηση δύο ή περισσότερων αντικαρκινικών παραγόντων με διαφορετικούς τρόπους δράσης ώστε να ξεπεραστεί το φαινόμενο του MDR (Alven *et. al.* 2020). Για να επιτευχθεί υψηλή αποτελεσματικότητα και χαμηλή τοξικότητα, η επιλογή θεραπευτικών παραγόντων είναι ένα κρίσιμο βήμα στο σχεδιασμό της χημειοθεραπευτικής στρατηγικής. Τα τελευταία χρόνια, ορισμένοι παράγοντες όπως τα διατροφοφάρμακα, απέκτησαν ιδιαίτερη σημασία στη συνδυαστική θεραπεία. Αυτοί οι παράγοντες μπορούν να ασκήσουν τις αντικαρκινικές τους δράσεις μέσω ρύθμισης διαφορετικών κυτταρικών οδών σηματοδότησης. Είναι σημαντικό να

αναφερθεί πως αυτοί οι παράγοντες είναι μη τοξικοί και επομένως οι συνδυαστικές θεραπείες διατροφοφαρμάκων και χημειοθεραπευτικών ενδέχεται να οδηγήσουν σε ένα καλύτερο θεραπευτικό αποτέλεσμα λόγω της συνεργιστικής δράσης των δύο αυτών παραγόντων. Ιδιαίτερα υποσχόμενη φαίνεται να είναι η τεχνική της συνενθυλάκωσης αυτών των ουσιών σε νανοφορείς, ώστε εκτός από την επίτευξη της μέγιστης δράσης να μπορέσουν να αντιμετωπιστούν και τα προβλήματα που αφορούν τη βιοδιαθεσιμότητα, τη βιοαποικοδόμηση και την τοξικότητα των αντικαρκινικών παραγόντων (Ranzato *et. al* 2014).

Με τον όρο νανοενθυλάκωση περιγράφεται ο εγκλωβισμός, η προστασία, η μεταφορά και η ελεγχόμενη αποδέσμευση βιοδραστικών ουσιών (βιταμίνες, αντιοξειδωτικά, πεπτίδια, πρωτεΐνες) με τη χρήση νανοφορέων (π.χ νανογαλακτώματα, νανολιποσώματα) ως συστημάτων μεταφοράς. Κατ' αυτόν τον τρόπο μεταφοράς, αυξάνεται η βιοδιαθεσιμότητα, η διαλυτότητα, η αποτελεσματικότητα, η εξειδίκευση και η ικανότητα στόχευσης των βιοδραστικών ουσιών ενώ προστατεύονται από την υδρόλυση και την οξείδωση (B. Παπαδημητρίου ΔΠΜΣ «Βιοεπιχειρείν», «Εφαρμογή της νανοτεχνολογίας στην επιστήμη των τροφίμων», 2020). Η συνενθυλάκωση περισσότερων του ενός συστατικού είναι μία καθιερωμένη τεχνική στις φαρμακευτικές βιομηχανίες και έχει εφαρμοστεί ευρέως από ορισμένους ερευνητές για την ταυτόχρονη ενθυλάκωση φαρμάκων και βιοδραστικών ουσιών με σκοπό την ανάπτυξη νέας στρατηγικής για τη θεραπεία συγκεκριμένων ασθενειών, ιδιαίτερα αυτής του καρκίνου (Chawda *et. al* 2017). Τα τελευταία στοιχεία σχετικά με την ενθυλάκωση βιοδραστικών ενώσεων, υποδηλώνουν ότι η συνενθυλάκωση μπορεί να βελτιώσει τη βιοδραστικότητα των μεμονωμένων ενώσεων λόγω συνεργιστικών επιδράσεων, ενώ μπορεί να αυξήσει τη δραστηριότητα τους και να περιορίσει την εμφάνιση ανεπιθύμητων ενεργειών (Bamba *et. al.* 2018).

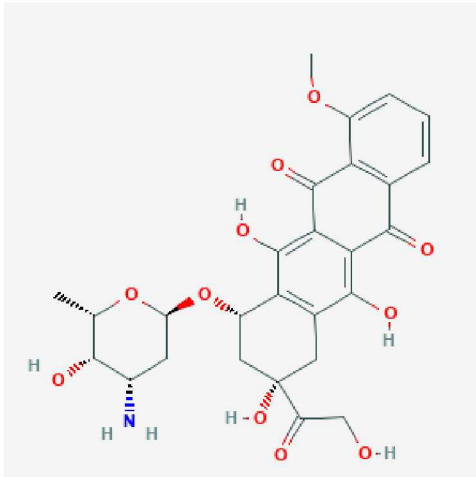
2. ΚΥΡΙΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Χημειοθεραπευτικοί παράγοντες στη θεραπεία του καρκίνου

2.1.1 Δοξορουμπικίνη (Doxorubicin)

Η δοξορουμπικίνη είναι ο καλύτερα μελετημένος αντικαρκινικός παράγοντας. Χρησιμοποιείται σε πολλά είδη καρκίνου όπως για παράδειγμα στον καρκίνου του μαστού, του ήπατος, του παχέος εντέρου καθώς επίσης στο λέμφωμα και τη λευχαιμία (Tacar *et. al.* 2013). Ωστόσο, η δοξορουμπικίνη έχει παρόμοια μειονεκτήματα με αυτά των υπόλοιπων χημειοθεραπευτικών φαρμάκων καθώς τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν αντίσταση στη δοξορουμπικίνη και πολλές ανεπιθύμητες παρενέργειες. (Duan *et. al* 2012). Η χρήση της έχει

βρεθεί να σχετίζεται με γαστρεντερική μυελοκαταστολή, αλωπεκία και βλεννογίνιδα. Οι παραπάνω παρενέργειες φαίνεται να μπορούν να αντιμετωπιστούν με τη συνενθυλάκωση της δοξορουμπικίνης σε νανοφορείς (π.χ λιποσώματα) ώστε να αυξηθεί ο χρόνος παραμονής της στα καρκινικά κύτταρα στόχους και να μειωθεί η τοξικότητα της για τα υγιή κύτταρα (Kumari *et al.* 2014).

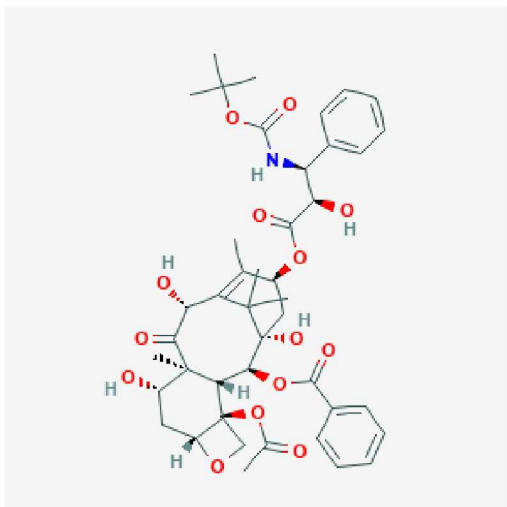


Εικόνα 1: Χημική δομή δοξορουμπικίνης (Pubchem.Doxorubicin).

2.1.2 Δοσεταξέλη (Docetaxel)

Η δοσεταξέλη (DTX or DXL), είναι ένα χημειοθεραπευτικό φάρμακο που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία διαφόρων τύπων καρκίνων. Σε αυτούς συγκαταλέγονται ο καρκίνος του μαστού, του στομάχου, του προστάτη και του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνη της ή σε συνδυασμό με άλλο χημειοθεραπευτικό σχήμα και δίνεται με αργή ενδοφλέβια ένεση. Όπως όλα τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα παρουσιάζει κι αυτό παρενέργειες όπως απώλεια μαλλιών, κυτοπενία, δυσκολία στην αναπνοή, μυϊκούς πόνους, εμετούς κ.ά. Ανήκει στην οικογένεια των ταξανών (taxane) και δρα παρεμποδίζοντας τη φυσιολογική λειτουργία των μικροσωληνίσκων, διακόπτοντας έτσι την κυτταρική διαίρεση (Yan *et al.* 2016). Πιο συγκεκριμένα, η δράση της δοσεταξέλης βασίζεται στην αναστολή των μικροσωληνίσκων οδηγώντας σε μιτωτική παύση της G2/M φάσης και κατ' επέκταση σε κυτταρικό θάνατο. Η δοσεταξέλη κυκλοφορεί στην αγορά με το εμπορικό όνομα Taxotere®. Παρόλα αυτά, το συγκεκριμένο φάρμακο διαθέτει περιορισμένη κλινική εφαρμογή λόγω του MDR που παρουσιάζει. Επιπλέον, ένα ακόμη μειονέκτημα του συγκεκριμένου φαρμάκου είναι η υψηλή λιποφιλικότητα, άρα η πολύ χαμηλή υδατοδιαλυτότητα και οι σοβαρές παρενέργειες της δραστικής ουσίας (δοσεταξέλη) και των εκδόχων του. Προκειμένου να

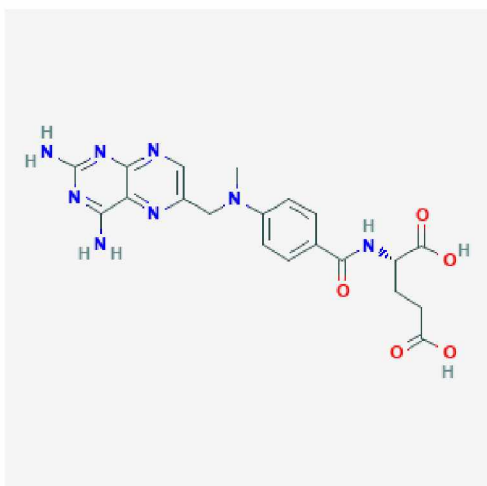
αντιμετωπιστούν τα παραπάνω εμπόδια, έχουν αναπτυχθεί καινοτόμες συνδυαστικές θεραπείες καθώς και συστήματα μεταφοράς βασισμένα σε νανοφορείς (Yan *et. al* 2016).



Εικόνα 2: Χημική δομή δοσεταξέλης (Pubchem.Docetaxel).

2.1.3 Μεθοτρεξάτη (Methotrexate)

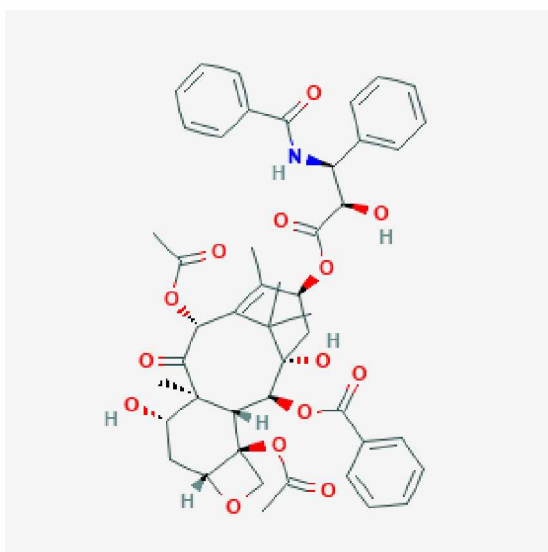
Η μεθοτρεξάτη (MTX), επίσημα γνωστή ως αμεθοπτερίνη (amethopterin), είναι ένας χημειοθεραπευτικός και ανοσοκατασταλτικός παράγοντας. Χρησιμοποιείται κυρίως στη θεραπεία του καρκίνου και των αυτοάνοσων νοσημάτων. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται περισσότερο στον καρκίνο του μαστού, στη λευχαιμία, στο λέμφωμα, στον καρκίνο του πνεύμονα και στο οστεοσάρκωμα. Οι πιο κοινές παρενέργειες είναι η ναυτία, το αίσθημα κόπωσης, ο πυρετός, κυτοπενία και αυξημένος κίνδυνος μόλυνσης. Ενδέχεται να εμφανιστούν και σοβαρότερες παρενέργειες όπως παθήσεις του ήπατος και των πνευμόνων. Η μεθοτρεξάτη παρήχθει το 1947 και αρχικά χρησιμοποιούνταν για τη θεραπεία του καρκίνου καθώς ήταν λιγότερο τοξική από τις μέχρι τότε θεραπείες. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας είναι ένα από τα πιο αποτελεσματικά και ασφαλή φάρμακα για τον καρκίνο (Gaies *et. al*. 2012).



Εικόνα 3: Χημική δομή μεθοτρεξάτης (Pubchem.Methotrexate).

2.1.4 Πακλιταξέλη (Paclitaxel)

Η πακλιταξέλη είναι μια ουσία η οποία χρησιμοποιείται ως φάρμακο για τη θεραπεία πολλών μορφών καρκίνου, όπως καρκίνο των ωοθηκών, καρκίνο του μαστού, καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, σάρκωμα Καπόσι, καρκίνο του πνεύμονα και καρκίνο του παγκρέατος. Προκαλεί συχνές παρενέργειες όπως απώλεια των μαλλιών, αλλεργικές αντιδράσεις, μούδιασμα, μυϊκούς πόνους, και διάρροια. Σοβαρές παρενέργειες αποτελούν τα καρδιακά προβλήματα, ο αυξημένος κίνδυνος λοίμωξης και η πνευμονική φλεγμονή, ενώ η χρήση της πακλιταξέλης μπορεί να οδηγήσει σε εμφάνιση MDR. Η πακλιταξέλη είναι ένας παράγοντας που προάγει τη συνάθροιση μικροσωληνίσκων από διμερή τουμπουλίνης και σταθεροποιεί τους μικροσωληνίσκους μέσω αποτροπής του αποπολυμερισμού. Αυτή η σταθεροποίηση έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της φυσιολογικής δυναμικής αναδιοργάνωσης του δικτύου μικροσωληνίσκων, που είναι απαραίτητη για τη ζωτικής σημασίας ενδιάμεση φάση και τις μιτωτικές κυτταρικές λειτουργίες («Γαληνός - Φάρμακο - TAXOL». www.galinos.gr, 2020).



Εικόνα 4: Χημική δομή πακλιταξέλης (Pubchem.Paclitaxel).

2.2 Διατροφοφάρμακα στη θεραπεία του καρκίνου

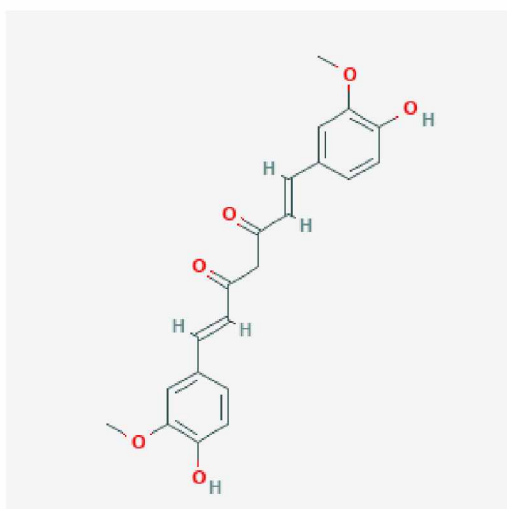
Ο όρος «nutraceutical» είναι υβριδικός της «διατροφής» και της «φαρμακευτικής» που προτάθηκαν από την Stephen L. DeFelice το 1989 (DeFelice *et. al.* 1995). Αρχικά, ο όρος «nutraceutical» αναφέρθηκε σε «Ένα τρόφιμο (ή συστατικό ενός τροφίμου) που παρέχει οφέλη στην υγεία, συμπεριλαμβανομένης της πρόληψης και / της θεραπείας μιας ασθένειας» (DeFelice *et. al.* 1995). Ο ορισμός του «nutraceutical», στα ελληνικά διατροφοφάρμακο, άλλαξε πρόσφατα ως: «προϊόν που απομονώθηκε από τρόφιμα που πωλούνται γενικά σε φαρμακευτικές μορφές που συνήθως δεν σχετίζονται με τρόφιμα». Με βάση τη βιβλιογραφία, υπάρχουν 25 ορισμοί για τον όρο «nutraceutical» και οι περισσότεροι από τους ορισμούς αναφέρονται στα διατροφοφάρμακα σε «τρόφιμα, συστατικά τροφίμων ή θρεπτικά συστατικά που παρέχουν οφέλη για την υγεία πέραν τη διατροφικής τους αξίας». Παρά το ότι δεν υπάρχει ικανοποιητικός ορισμός που να καλύπτει όλες τις πτυχές των διαφορετικών υπάρχοντων ορισμών για το διατροφοφάρμακο, είναι γενικά αναγνωρισμένο ότι τα διατροφοφάρμακα αποτελούν μια σημαντική κατηγορία ενώσεων προαγωγής της υγείας και πρόληψης ασθενειών πέραν της σπουδαίας διατροφικής τους αξίας (Liu *et. al.* 2019).

Με βάση τις λειτουργίες τους, προκύπτουν οι παρακάτω κατηγορίες διατροφοφαρμάκων: (1) για καρδιαγγειακά νοσήματα (2) για γενικότερη βελτίωση της υγείας, (3) για την ενίσχυση του ανοσοποιητικού, (4) για την πρόληψη του διαβήτη και (5) για την υγεία του εγκεφάλου (Liu *et. al.* 2019). Σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν και στην αντιμετώπιση του καρκίνου καθώς φαίνεται να συμβάλλουν στη θεραπεία και την πρόληψη του καρκίνου (Salami *et. al.* 2013). Οι βιοδραστικές ουσίες, ακόμη και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, μπορεί να έχουν πολύ μεγαλύτερο αντίκτυπο από ό, τι είχε προηγουμένως εκτιμηθεί στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Πολυάριθμες μελέτες έχουν δημοσιευθεί σχετικά με τις φαρμακολογικές ιδιότητες και την κλινική αποτελεσματικότητα ορισμένων διατροφοφαρμάκων στον έλεγχο του καρκίνου (Tripathi *et. al.* 2005). Πιο συγκεκριμένα, τα διατροφοφάρμακα μπορούν να συμβάλλουν στη μείωση της τοξικότητας, που σχετίζεται με τη χημειοθεραπεία και την ακτινοθεραπεία, και μπορεί να οδηγήσουν σε καλύτερες συνθήκες ζωής μειώνοντας την καχεξία του καρκίνου. Τα διατροφοφάρμακα έχουν δείξει διαφορετικό μηχανισμό δράσης σε διαφορετικά κυτταρικά επίπεδα. Τα περισσότερα από αυτά έχουν αναδειχθεί ως πηγή αντιοξειδωτικών που επηρεάζουν το μονοπάτι σηματοδότησης που σχετίζεται με παράγοντες μεταγραφής που προκαλούνται από την οξειδοαναγωγή. Εκτός αυτού, ρυθμίζουν άμεσα το ενδοκρινικό σύστημα, τον ανοσολογικό καταρράκτη και τα ένζυμα που σχετίζονται με τη φλεγμονή. Μερικά από αυτά έχουν δείξει άμεση επίδραση στη διαδικασία επισκευής και διάσπασης (cleavage) του DNA. Τα πιο ευρέως μελετημένα διατροφοφάρμακα που φαίνεται να συμβάλλουν στην αντιμετώπιση του καρκίνου είναι η

κερσετίνη, η ρεσβερατρόλη και η κουρκουμίνη και ορισμένα από αυτά θα αναλυθούν παρακάτω (Ranzato *et. al* 2014).

2.2.1 Κουρκουμίνη (Curcumin)

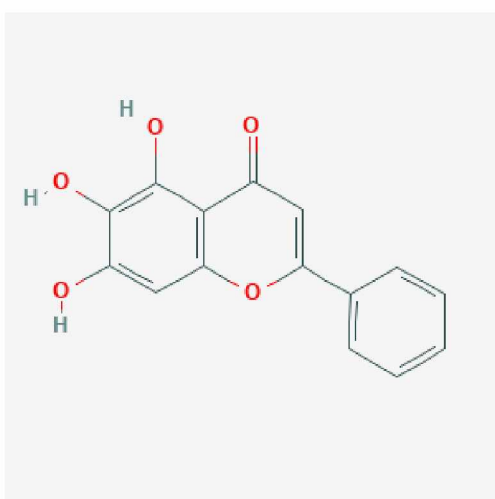
Η κουρκουμίνη, είναι μια πολυφαινόλη που έχει αποδειχθεί ότι στοχεύει πολλαπλά μόρια σηματοδότησης ενώ επίσης επιδεικνύει σημαντική δραστικότητα σε κυτταρικό επίπεδο και γενικότερα επιφέρει πολλαπλά οφέλη για την υγεία. Προέρχεται από το ρίζωμα του φυτού *Curcuma longa* και επιφέρει σημαντικά οφέλη στις φλεγμονώδεις καταστάσεις, στο μεταβολικό σύνδρομο, στον πόνο, ενώ διαθέτει και αντικαρκινικές – αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Hewlings *et. al* 2017). Η αντικαρκινική ιδιότητα της κουρκουμίνης βασίζεται στο ότι στοχεύει διαφορετικές οδούς σηματοδότησης κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων παραγόντων ανάπτυξης, κυτοκινών, παραγόντων μεταγραφής και γονιδίων που ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση. Παρά τα αναφερόμενα οφέλη, η δράση της δεν είναι απαλλαγμένη από παρενέργειες (π.χ ναυτία, διάρροια, κεφαλαλγία) ενώ ένα από τα μεγάλα μειονεκτήματα της είναι η χαμηλή βιοδιαθεσιμότητά της, η οποία οφείλεται κυρίως στη χαμηλή απορρόφηση, στον γρήγορο μεταβολισμό και στην ταχεία αποβολή (Giordano *et. al* 2019). Αρκετοί παράγοντες έχουν μελετηθεί για τη βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας της κουρκουμίνης, οι περισσότεροι από αυτούς έχουν αναπτυχθεί για να εμποδίζουν τη μεταβολική οδό της κουρκουμίνης προκειμένου να αυξηθεί η βιοδιαθεσιμότητα της. Ωστόσο, αρκετά αποτελεσματική για την επίλυση των προβλημάτων βιοδιαθεσιμότητας της κουρκουμίνης φαίνεται να είναι η ενθυλάκωση της σε νανοφορείς προκειμένου να μειωθεί η ταχεία αποβολή και βιοαποικοδόμησή της (Hewlings *et. al* 2017).



Εικόνα 5: Χημική δομή κουρκουμίνης (Pubchem.Curcumin).

2.2.2 Βαϊκαλεΐνη (Baicalein)

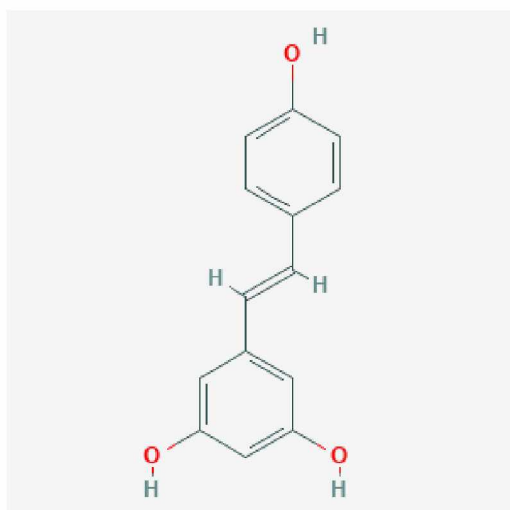
Η βαϊκαλεΐνη είναι μια φλαβόνη και δραστικό συστατικό του παραδοσιακού βοτάνου *Scutellariae radix* (επίσης γνωστό ως Chinese Huang Qin). Υπάρχουν μια πληθώρα ενδείξεων που καταδεικνύουν το ρόλο του baicalein στη θεραπεία και πρόληψη διαφόρων τύπων καρκίνου. Το εξέχον, δομικό χαρακτηριστικό του baicalein είναι η λειτουργική ομάδα του δι-ορθοϋδροξυλίου, η οποία βρίσκεται στον δακτύλιο-A στη μοριακή του δομή. Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι το baicalein διαθέτει αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές και αντιϊικές ιδιότητες, ενώ προστατεύει από καρδιαγγειακές παθήσεις. Κατά την τελευταία δεκαετία, έχει σημειωθεί μεγάλη πρόοδος στη διερεύνηση των μηχανισμών στόχων και της σηματοδοτικής πορείας του αντικαρκινικού δυναμικού του baicalein. Οι κύριοι μοριακοί μηχανισμοί των αντικαρκινικών δράσεων του baicalein περιλαμβάνουν την αναστολή αρκετών κυκλίνων ή εξαρτώμενων από κυκλίνες κινασών (CDKs) για τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, την απομάκρυνση των οξειδωτικών ριζών, την εξασθένιση των σηματοδοτήσεων MAPK, Akt ή mTOR, προκαλώντας απόπτωση μέσω της ενεργοποίησης των κασπασών -9 / -3 και της αναστολής της μετάστασης του όγκου με τη μείωση της έκφρασης της MMP (Matrix MetalloProteinase)-2 / -9 (Liu *et. al* 2016). Ωστόσο, παρά τα αντικαρκινικά του οφέλη φαίνεται να απαιτείται περαιτέρω έρευνα προκειμένου να αντιμετωπιστούν ορισμένα εμπόδια που αφορούν τη βιοδιαθεσιμότητα και την τοξικότητα του σε ορισμένες συγκεντρώσεις. Η βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας της βαϊκαλεΐνης και η συνδυαστική θεραπεία με άλλους αντικαρκινικούς παράγοντες θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε ευρύτερη χρήση αυτού του φλαβονοειδούς ως υποψήφιου αντικαρκινικού παράγοντα. (Gao *et. al* 2016).



Εικόνα 6: Χημική δομή baicalein (Pubchem.Baicalein).

2.2.3 Ρεσβερατρόλη (Resveratrol)

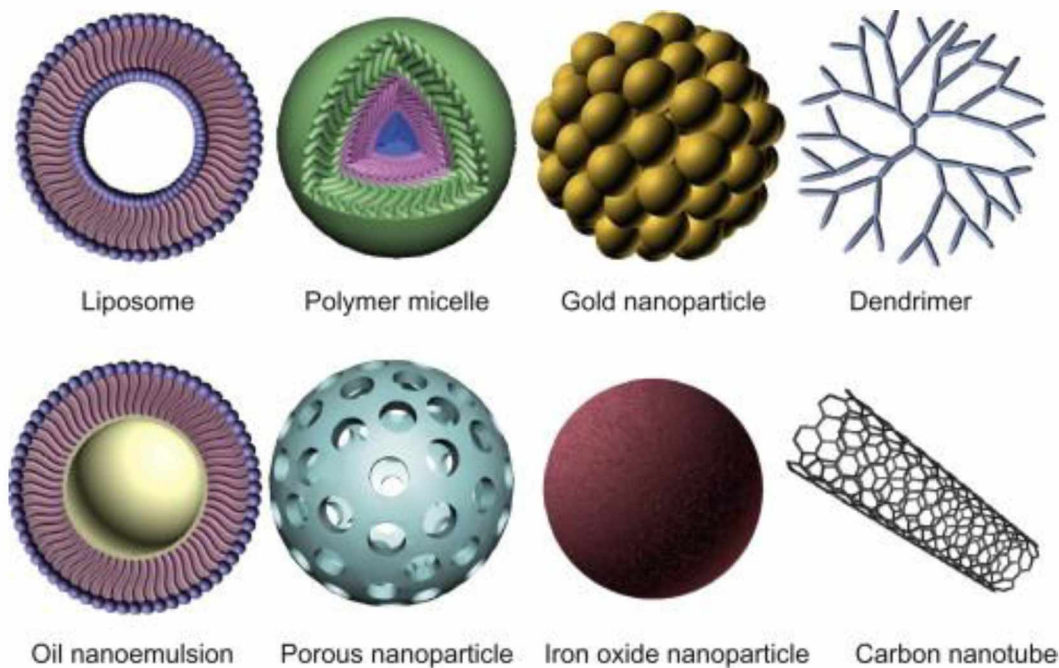
Η ρεσβερατρόλη (3,5,4'-τριυδροξυσιλβένιο), είναι μια φυσική πολυφαινολική ένωση, ένα σιλβένιο που βρίσκεται σε σημαντικές ποσότητες στα σταφύλια, τα μούρα, τα φιστίκια και άλλες φυτικές πηγές καθώς και στο κόκκινο κρασί. Αυτή η ένωση έχει γίνει πολύ δημοφιλής λόγω της αντικαρκινικής δράσης της, που αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1997 (Jang *et al.*, 1997). Έκτοτε, οι ερευνητές έχουν εστιάσει σε αυτήν την ένωση καθώς διαθέτει αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές, αντιοξειδωτικές και καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες (Rauf *et. al* 2018). Προηγούμενες μελέτες *in vitro* και σε ζώα έδειξαν ότι η ρεσβερατρόλη έχει αντιπολλαπλασιαστική και προ-αποπτωτική δράση ενάντια σε διάφορους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του μελανώματος, του καρκίνου του πνεύμονα, του νευροβλαστώματος και του καρκίνου του προστάτη. (Meng *et. al* 2016). Η ρεσβερατρόλη μειώνει επίσης τη σταθερά Michaelis του SIRT1 (Sirtuin 1, μια πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το *sirt1*) τόσο για το ακετυλιωμένο υπόστρωμα όσο και για το NAD (+) και αυξάνει την κυτταρική επιβίωση διεγείροντας την εξαρτώμενη από SIRT1 αποακετυλίωση του p53. Γενικότερα, οι μηχανισμοί με τους οποίους δρα η ρεσβερατρόλη αφορούν μηχανισμούς σηματοδότησης που σχετίζονται με αυξητικούς παράγοντες και υποδοχείς κίνησης τυροσίνης, με μεταγωγή σήματος από τον αυξητικό παράγοντα β και με απόπτωση και φλεγμονή (Rauf *et. al* 2018). Παρόλα αυτά, όπως και τα προαναφερθέντα διατροφικά φάρμακα εμφανίζει και αυτή χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα και απορρόφηση κάτι το οποίο φαίνεται να μπορεί να ξεπεραστεί με τη χρήση νανοφορέων (De Vries *et. al* 2018).



Εικόνα 7: Χημική δομή ρεσβερατρόλης (Pubchem.Resveratrol).

2.3 Νανοφορείς για τη συνενθυλάκωση διατροφοφαρμάκων και χημειοθεραπευτικών

Τα νανοσωματίδια είναι στερεά σωματίδια διαμέτρου 1-100 nm, τα οποία αποτελούνται από άνθρακα, μέταλλα, λιπίδια, πολυσακχαρίτες κ.ά. Τα περισσότερα είναι εσωτερικά κενά διαθέτοντας κεντρικό αποθηκευτικό χώρο για τη φιλοξενία βιοδραστικών ουσιών ή άλλων ενώσεων. Τα νανοσωματίδια έχουν μεγάλη επιφάνεια επαφής, γεγονός που επηρεάζει τη φυσική, χημική και βιολογική συμπεριφορά τους. Χρησιμοποιούνται για τη μεταφορά δραστικών / λειτουργικών συστατικών (delivery systems), ως αισθητήρες για ανίχνευση ή μέτρηση μιας φυσικοχημικής μεταβολής (sensors). Ακόμη συναντώνται ευρέως στην τεχνολογία τροφίμων ως υλικά συσκευασίας (food packaging) π.χ νανοσωματίδια Fe, χιτοζάνης, TiO₂ προσφέροντας αντιμικροβιακή προστασία και ως ζελατινοποιητές-ρυθμιστές ιξώδους (B. Παπαδημητρίου ΔΠΜΣ «Βιοεπιχειρείν», «Εφαρμογή της νανοτεχνολογίας στην επιστήμη των τροφίμων», 2020).



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση διαφόρων ειδών νανοσωματιδίων (Heo *et. al.* 2014).

2.3.1 Πολυμερικά νανοσωματίδια

2.3.1.1 Υβριδικά πολυμερικά-λιπιδικά νανοσωματίδια

Τα τελευταία χρόνια, τα βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή-λιπιδικά νανοσωματίδια, ιδιαίτερα

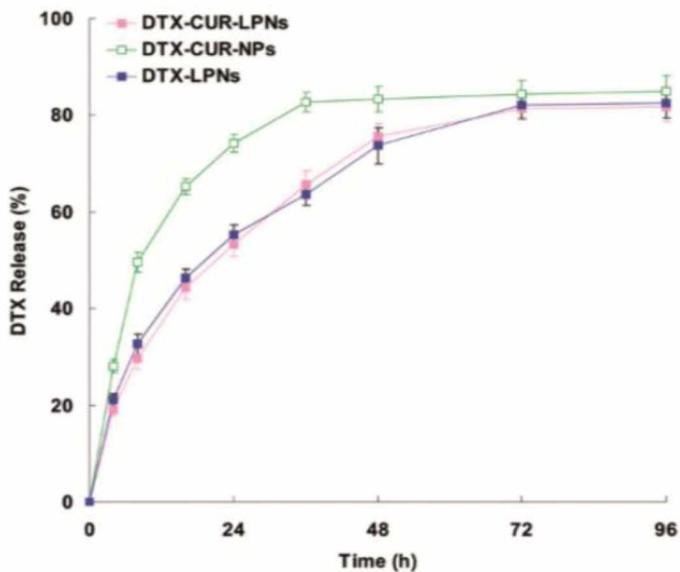
εκείνα που είναι επικαλυμμένα με υδρόφιλο πολυμερές όπως η πολυ αιθυλενογλυκόλη (PEG) γνωστά ως σωματίδια μακράς κυκλοφορίας, έχουν χρησιμοποιηθεί ως πιθανοί φορείς για παροχή φαρμάκου λόγω της ικανότητάς τους να κυκλοφορούν για παρατεταμένο χρονικό διάστημα στοχεύοντας ένα συγκεκριμένο όργανο δίχως να αναγνωρίζονται από το ανοσοποιητικό σύστημα. Ακόμη, έχουν χρησιμοποιηθεί ως φορείς DNA στη γονιδιακή θεραπεία ενώ ιδιαίτερα σημαντική είναι και η ικανότητά τους να απελευθερώνουν πρωτεΐνες, πεπτιδία και γονίδια (Mohanraj *et. al* 2006).

Ο H. Wang και οι συνεργάτες του (Yan *et. al* 2016), μελέτησαν τη συνενθυλάκωση κουρκουμίνης και δοσεταξέλης σε υβριδικά πολυμερή-λιπιδικά νανοσωματίδια (lipid-polymer hybrid nanoparticles LPNs) αξιολογώντας στη συνέχεια την *in vitro* κυτταροτοξικότητα σε καρκινικά κύτταρα προσάτη PC-3 και την *in vivo* αποτελεσματικότητα κατά του όγκου. Ειδικότερα, τα LPNs που χρησιμοποιήθηκαν αποτελούνται από τρία συστατικά α) έναν πυρήνα πολυμερούς στον οποίο ενθυλακώνονται οι θεραπευτικοί παράγοντες, β) ένα εσωτερικό λιπιδικό στρώμα που περικλύει τον πυρήνα εξασφαλίζοντας στο νανοσωματίδιο βιοσυμβατότητα και γ) ένα εξωτερικό στρώμα αποτελούμενο από λιπίδια και PEG το οποίο προστατεύει την υπόλοιπη δομή και επιμηκύνει τον *in vivo* χρόνο κυκλοφορίας. Η μέθοδος προσθήκης PEG στην επιφάνεια νανοσωματιδίων ονομάζεται "πεγκυλίωση" και δημιουργεί μια ασπίδα προστασίας έναντι της άμυνας του οργανισμού μέσω στερικής παρεμπόδισης στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων, προβάλλοντας προς τα έξω το υδρόφιλο μέρος του PEG. Τα νανοσωματίδια με δοσεταξέλη και κουρκουμίνη (DTX-CUR-LPNs) συγκρίθηκαν με νανοσωματίδια δοσεταξέλης (DTX-LPNs) και κουρκουμίνης (CUR-LPNs). Ακόμη, μελετήθηκαν και νανοσωματίδια χωρίς λιπιδική στοιβάδα με κουρκουμίνη και δοσεταξέλη (DTX-CUR-NPs) καθώς και με κουρκουμίνη (CUR-NPs) και δοσεταξέλη (DTX-LPNs) ξεχωριστά. Επιπλέον, στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν LPNs ως «control» δείγμα. Το μέσο μέγεθος των νανοσωματιδίων LPNs (είτε ελεύθερα είτε με φάρμακο) κυμάνθηκε από 160 – 170 nm ενώ τα νανοσωματίδια DTX-CUR-NPs είχαν μέγεθος 116 nm. Τα LPNs παρουσίασαν υψηλή δομική ακεραιότητα, σταθερότητα κατά την αποθήκευση, ελεγχόμενη αποδέσμευση καθώς και υψηλή βιοσυμβατότητα και βιοδιαθεσιμότητα. Το zeta δυναμικό των DTX-CUR-LPNs ήταν σημαντικά μικρότερο από αυτό των ελεύθερων LPNs υποδεικνύοντας πως τα LPNs είναι πιο σταθερά από τα NPs. Επίσης, τα ποσοστά αποτελεσματικής ενθυλάκωσης (drug encapsulation efficiency – EE) και της ικανότητας «φόρτωσης» (drug loading capacity-DL) για την κουρκουμίνη (82%) και τη δοσεταξέλη (89%) ήταν υψηλότερα στα νανοσωματίδια DTX-CUR-LPNs σε σχέση με αυτά στα υπόλοιπα είδη νανοσωματιδίων. Κάτι τέτοιο υποδεικνύει και την αποτελεσματικότητα της λιπιδικής στοιβάδας ως προς την καλύτερη ενθυλάκωση του φαρμάκου. Η παρουσία της λιπιδικής στοιβάδας ήταν σημαντική καθώς φάνηκε να εμποδίζει τα μικρά μόρια των ενθυλακωμένων ουσιών να εξέλθουν από

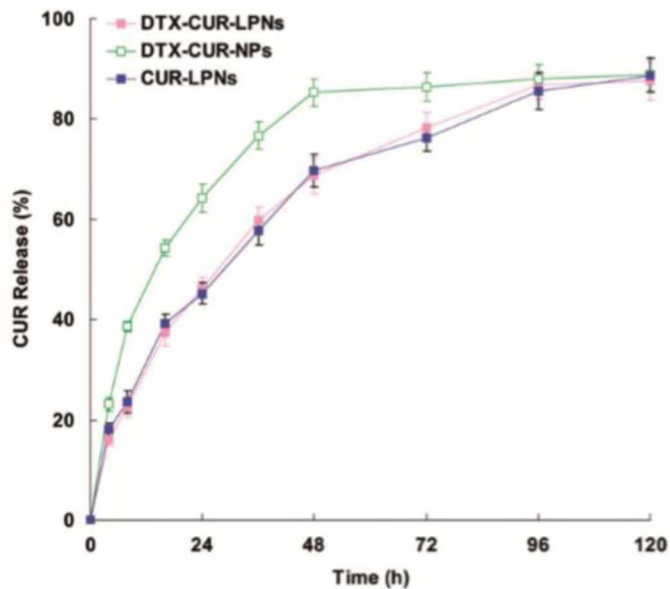
τον νανοφορέα βελτιώνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα της ενθυλάκωσης τους. Επίσης, η λιπιδική στοιβάδα εμποδίζει την είσοδο του νερού στον πυρήνα του νανοφορέα και κατ' επέκταση την υδρόλυση του νανοφορέα, κάτι που οδηγεί σε πιο αργή απελευθέρωση του φαρμάκου. Όπως παρουσιάζεται και στην Εικόνα 9, η δοσεταξέλη εμφάνισε τον πιο μικρό βαθμό απελευθέρωσης *in vitro* όταν βρισκόταν συνενθυλακωμένη με κουρκουμίνη σε LPN. Το ίδιο ισχύει και για την κουρκουμίνη όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 10. Γενικότερα, τα προφίλ απελευθέρωσης έδειξαν ότι τα LPNs έχουν πιο σταθερή «συμπεριφορά» από τα NPs, κάτι τέτοιο ενδέχεται να οφείλεται στην λιπιδική στοιβάδα που εμπόδισε την απελευθέρωση των φαρμάκων από τον πυρήνα του νανοσωματιδίου. Παρόλα αυτά, η απελευθέρωση του φαρμάκου από τα DTX-LPNs και CUR-LPNs ήταν παρόμοια με αυτή από τα DTX-CUR-LPNs. Η *in vitro* κυτταροτοξικότητα αξιολογήθηκε μέσω MTT δοκιμής αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε κύτταρα PC-3 ενώ πραγματοποιήθηκαν και μελέτες για την *in vivo* αξιολόγηση της αντικαρκινικής δράσης των νανοσωματιδίων σε μοντέλα ποντικών. Αναφορικά με τη μελέτη κυτταροτοξικότητας, η συνενθυλάκωση της κουρκουμίνης και της δοσεταξέλης κατέδειξε τη μέγιστη κυτταροτοξικότητα σε σχέση με τα άλλα είδη νανοσωματιδίων και τα ελεύθερα φάρμακα. Η συνεργιστική δράση των CUR και DTX στα LPNs οδήγησε τα καρκινικά κύτταρα στην πιο χαμηλή βιωσιμότητα συγκριτικά με τη δράση των υπόλοιπων ειδών νανοφορέων. Οι *in vivo* μελέτες έδειξαν πως η πιο αποτελεσματική μείωση του όγκου επιτεύχθη με τη συνενθυλάκωση της κουρκουμίνης και της δοσεταξέλης σε LPNs. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 12, η κουρκουμίνη με τη δοσεταξέλη σε LPNs εμφάνισαν τη μεγαλύτερη αντικαρκινική δράση (82,5%) έναντι του όγκου, ακολούθησαν οι DTX-CUR-NPs (62,1 %) και DTX-LPNs (45,2%). Τα παραπάνω αποτελέσματα μπορούν να εξηγηθούν με δύο τρόπους: α) η δομή των LPNs καθυστερεί την απελευθέρωση του φαρμάκου και αυξάνει τη συσσώρευση του στους καρκινικούς όγκους, β) η λιπιδική στοιβάδα έχει υψηλή συγγένεια με την επιφάνεια των κυττάρων, προωθώντας έτσι τη σύντηξη των νανοφορέων με την κυτταρική μεμβράνη και μεταφέροντας μεγαλύτερη ποσότητα φαρμάκου στα κύτταρα του όγκου (Yan *et. al* 2016).

Πίνακας 1: Γενικά χαρακτηριστικά των διάφορων ειδών νανοσωματιδίων (Yan *et. al* 2016).

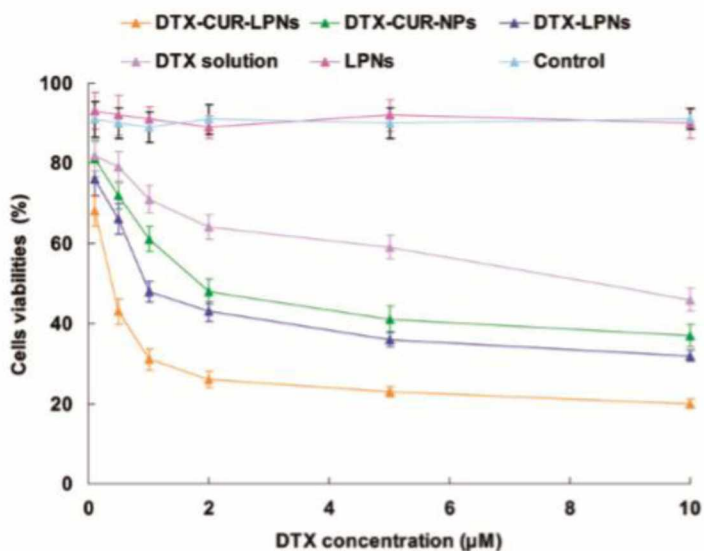
LPNs	Mean diameter (nm)	PDI	Zeta potential (mV)	DTX EE (%)	CUR EE (%)	DTX DL (%)	CUR DL (%)
DTX-CUR-LPNs	169.6 ± 4.6	0.16 ± 0.06	-35.7 ± 1.9	89.8 ± 3.1	81.9 ± 5.6	5.5 ± 0.8	5.8 ± 0.6
DTX-CUR-NPs	116.4 ± 2.2	0.08 ± 0.02	-31.1 ± 2.9	80.2 ± 4.3	72.5 ± 3.6	8.3 ± 1.2	9.6 ± 1.7
DTX-LPNs	167.2 ± 3.9	0.13 ± 0.04	-26.4 ± 2.7	88.3 ± 2.9	NA	9.1 ± 1.4	NA
CUR-LPNs	168.1 ± 4.2	0.14 ± 0.05	-23.2 ± 2.3	NA	82.6 ± 3.9	NA	10.4 ± 1.9
LPNs	163.3 ± 3.8	0.11 ± 0.03	-18.5 ± 1.6	NA	NA	NA	NA



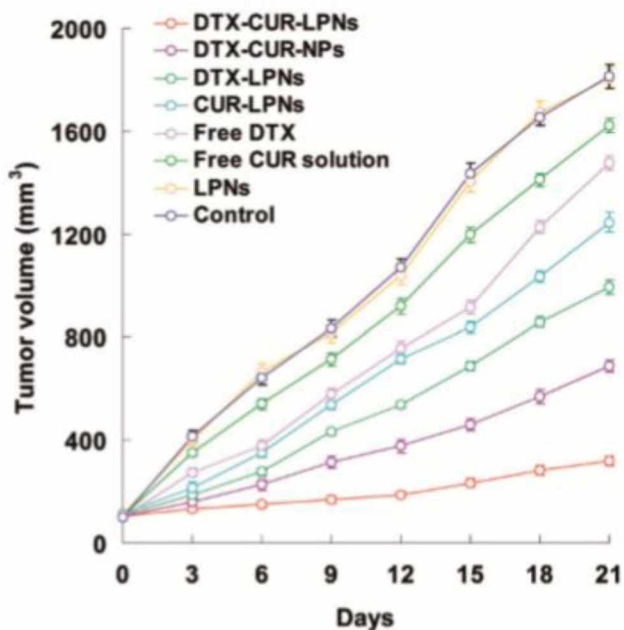
Εικόνα 9: *In vitro* απελευθέρωση της DTX από διαφορετικούς νανοφορείς (Yan *et. al* 2016).



Εικόνα 10: *In vitro* απελευθέρωση της CUR από διαφορετικούς νανοφορείς (Yan *et. al* 2016).

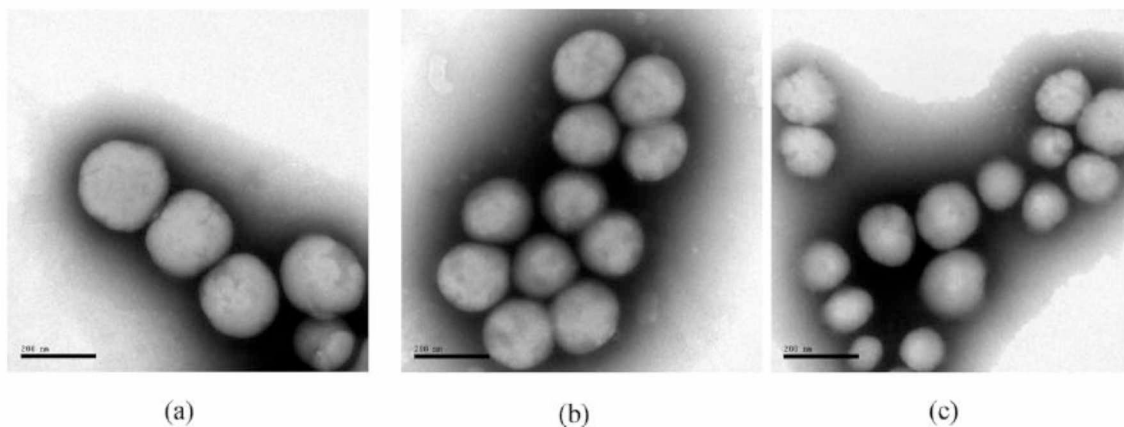


Εικόνα 11: *In vitro* δοκιμές κυτταροτοξικότητας των LPNs, NPs και ελεύθερων φαρμάκων (Yan *et. al* 2016).



Εικόνα 12: *In vivo* αντικαρκινική αποτελεσματικότητα των LPNs, NPs και ελεύθερων φαρμάκων (Yan *et. al* 2016)

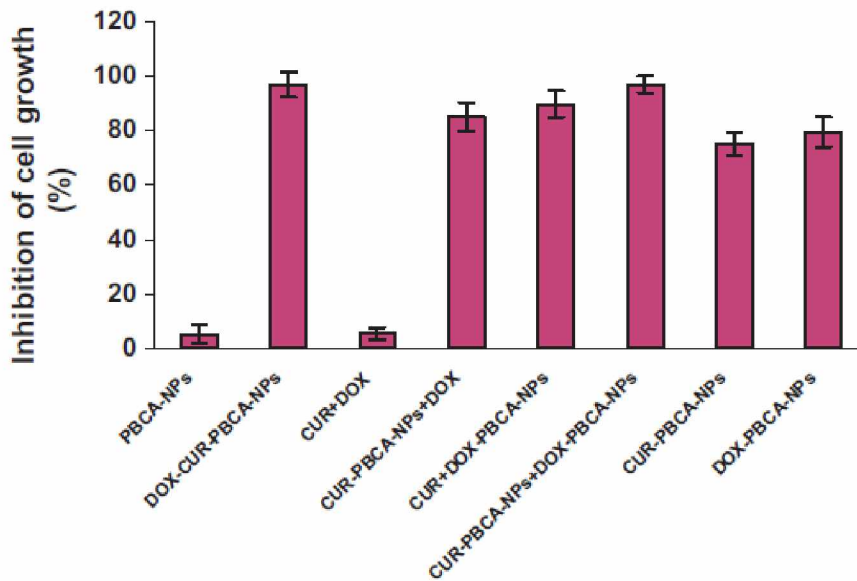
Στη μελέτη του J. Zhao και των συνεργατών του (Duan *et. al* 2012), διερευνήθηκε η συμμεταφορά κουρκουμίνης και δοξορουμπικίνης ενθυλακωμένες σε PBCA [chitosan/poly(butyl cyanoacrylate)] νανοσωματίδια. Τα CUR-DOX-PBCA νανοσωματίδια που δημιουργήθηκαν διέθεταν ισχυρή ικανότητα ενθυλάκωσης και φόρτωσης φαρμάκου. Ακόμη, τα νανοσωματίδια παρατηρήθηκαν μέσω μικροσκοπίας με εκπομπή ηλεκτρονίων (Transmission electron microscopy-TEM) και εμφάνισαν σφαιρικό σχήμα και λεία επιφάνεια (Εικόνα 13) ενώ το μέγεθος των CUR-DOX PBCA νανοσωματιδίων ήταν μικρότερο από αυτό των CUR-PBCA και DOX-PBCA νανοσωματιδίων. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην αλληλεπίδραση της δοσεταξέλης με το μονομερές butylcyanoacrylate, καθώς έχει αποδειχθεί ότι η δοσεταξέλη αυξάνει τον ρυθμό αντίδρασης πολυμερισμού κατά τη δημιουργία των νανοσωματιδίων οδηγώντας σε μικρότερο μέγεθος νανοσωματιδίων.



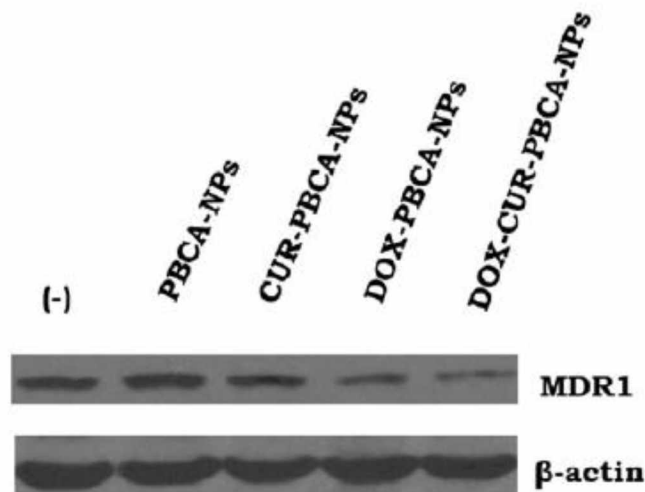
Εικόνα 13: TEM a) CUR-PBCA νανοσωματίδια, b) DOX-PBCA νανοσωματίδια και c) CUR-DOX PBCA νανοσωματίδια (Duan *et. al* 2012).

Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 14, τα ποσοστά αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης τεσσάρων θεραπειών σε MCF-7/ADR ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού με τα εξής νανοσωματίδια: CUR – DOX – PBCA-NPs, CUR + DOX – PBCA-NPs, DOX + CUR – PBCA-NPs, CUR – PBCA-NPs + DOX – PBCA-NPs ήταν υψηλότερα από τα ελεύθερα νανοσωματίδια DOX / CUR – PBCA NPs και από τον συνδυασμό φαρμάκων δοσεταξέλης και κουρκουμίνης (CUR + DOX). Ενώ τα κενά νανοσωματίδια PBCA στην ίδια συγκέντρωση σπάνια προκάλεσαν κυτταρικό θάνατο, πράγμα που επιδεικνύει πως η κυτταροτοξικότητα των φορέων PBCA-NPs προήλθε από τα ενθυλακωμένα συστατικά και όχι από τα υλικά του φορέα PBCA. Τα νανοσωματίδια CUR-DOX-PBCA-NPs είχαν παρόμοια κυτταροτοξικότητα (96,94%) με τη συγχορήγηση δύο PBCA-NPs (DOX-PBCA-NPs + CUR-PBCA NPs, 96,78%). Τέλος, όπως φαίνεται στην Εικόνα 15, η συνενθυλάκωση κουρκουμίνης και

δοσεταξέλης σε PBCA νανοσωματίδια έδειξε την υψηλότερη αποτελεσματικότητα αναστροφής του φαινομένου MDR, ύστερα από ανοσοτύπωση (Western-blot ανάλυση) της MDR1 πρωτεΐνης σε MCF-7/ADR ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού (Duan *et. al* 2012).



Εικόνα 14: Η ανασταλτική δράση της κυτταρικής ανάπτυξης διαφορετικών σκευασμάτων που περιέχουν δοξορουμπικίνη και / ή κουρκουμίνη σε MCF-7 / ADR κύτταρα (Duan *et. al* 2012).



Εικόνα 15: Western-blot ανάλυση της πρωτεΐνης MDR1 σε MCF-7/ADR κύτταρα (Duan *et. al* 2012).

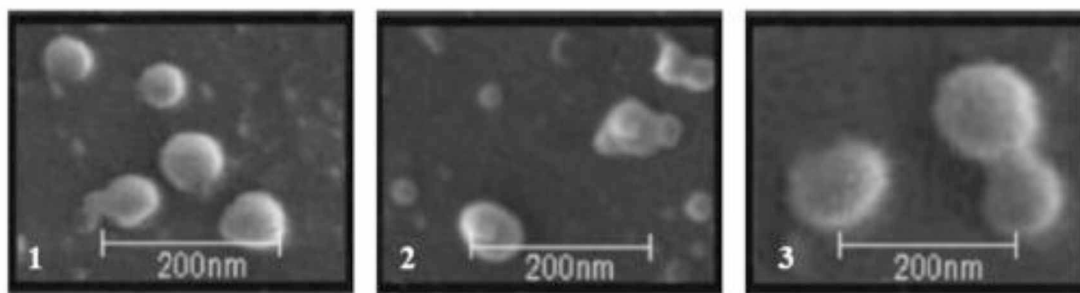
Στη μελέτη του S. Alipour και των συνεργατών του (Vakilinezhad *et. al.* 2019), διερευνήθηκε η στρατηγική συνενθυλάκωσης της μεθοτρεξάτης και της κουρκουμίνης σε PLGA (Poly-Lactic-co-Glycolic Acid) νανοσωματίδια για την αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού. Αναφορικά με το μέγεθος των νανοσωματιδίων, οι μελέτες έδειξαν πως όσο πιο υψηλή ήταν η συγκέντρωση της κουρκουμίνης και της μεθοτρεξάτης στο νανοσωματίδιο τόσο μεγαλύτερο ήταν και το μέγεθος του. Το πιο μικρό μέγεθος νανοσωματιδίου που παρατηρήθηκε ήταν 97.2 ± 4.75 nm, το οποίο παρουσίασε και τη λιγότερο αποτελεσματική ενθυλάκωση για την κουρκουμίνη και τη μεθοτρεξάτη. Η πιο αποτελεσματική ενθυλάκωση επιτεύχθηκε στα MTX-CUR-NPs-8 νανοσωματίδια όπου η μεθοτρεξάτη και η κουρκουμίνη υπήρχαν σε ποσοστό 30 % και 20 % αντίστοιχα. Το μέγεθος των νανοσωματιδίων μεθοτρεξάτης-κουρκουμίνης (MTX-CUR-NPs) ήταν μεταξύ 10-200 nm, μέγεθος ικανό να οδηγήσει σε αποτελεσματική κατανομή τους στον όγκο. Ακόμη, μετρήθηκε το ζ δυναμικό το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης σταθερότητας των νανοσωματιδίων. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η παρουσία δύο φαρμάκων στο νανοσωματίδιο οδήγησε σε χαμηλότερο ζ δυναμικό και κατά συνέπεια αυξημένη σταθερότητα νανοσωματιδίου. Τα νανοσωματίδια MTX-CUR-NPs-8 εμφάνισαν την πιο αποτελεσματική ενθυλάκωση για τη μεθοτρεξάτη και την κουρκουμίνη με ποσοστό $71,32 \pm 7,8$ % και $85,64 \pm 6,3$ % αντίστοιχα. Με τη χρήση μικροσκοπίου SEM (Scanning Electron Microscope), όπως παρουσιάζεται και στην Εικόνα 16, τα νανοσωματίδια MTX-NPs, CUR-NPs και MTX-CUR-NPs-8 είχαν σφαιρικό σχήμα και παρουσίαζαν μία μικρή συσσωμάτωση μεταξύ τους (ιδιαίτερα τα CUR-NPs)

Πίνακας 2: Γενικά χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων (Vakilinezhad *et. al.* 2019).

Formulation	MTX%	CUR%	Particle Size (nm)	PDI	Zeta potential (mV)	MTX EE%	MTX loading%	CUR EE%	CUR loading%
MTX-CUR-NPs-1	10	10	97.2±4.75	0.13	-6.32±1.2	50.24±9.2	9.53±3.1	59.20±8.4	15.6±2.6
MTX-CUR-NPs-2	10	20	104.6±6.21	0.27	-5.71±0.9	54.47±6.8	11.02±2.5	68.31±9.3	18.77±0.74
MTX-CUR-NPs-3	10	30	129.1±3.87	0.45	-8.45±1.7	47.30±5.9	10.4±1.6	63.94±7.3	17.22±1.03
MTX-CUR-NPs-4	20	10	100.5±5.96	0.21	-4.73±0.6	59.35±9.3	11.87±2.2	62.85±6.8	16.45±0.68
MTX-CUR-NPs-5	20	20	138.9±7.20	0.19	-10.22±1.1	61.54±5.1	10.33±0.9	71.04±5.9	19.42±1.53
MTX-CUR-NPs-6	20	30	145.0±4.33	0.22	-7.83±1.5	55.29±10.4	9.89±1.4	65.15±11.6	18.06±2.71
MTX-CUR-NPs-7	30	10	114.7±6.86	0.16	-8.55±1.9	64.23±7.5	14.11±3.5	61.27±7.1	16.03±1.9
MTX-CUR-NPs-8	30	20	148.3±4.07	0.17	-3.41±0.8	71.32±7.8	15.9±4.7	85.64±6.3	22.1±2.85
MTX-CUR-NPs-9	30	30	169.4±5.92	0.39	-9.53±2.2	60.48±6.9	13.7±2.8	74.19±9.2	20.52±2.05
Blank-NPs	-	-	70.8±3.10	0.13	-3.06±0.5	-	-	-	-
MTX-NPs	30	-	78.1±7.36	0.18	-3.85±1.4	46.27±3.2	11.08±5.1	-	-
CUR-NPs	-	20	92.4±5.22	0.15	-5.12±1.7	-	-	89.44±5.9	23.8±3.14

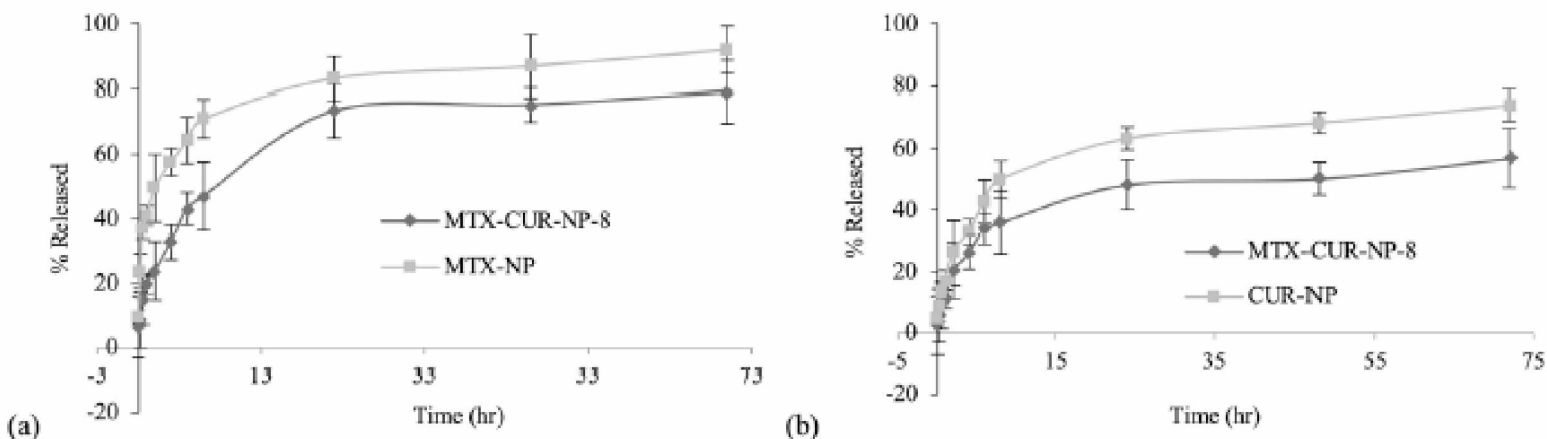
Data reported as mean ±SD.

MTX: Methotrexate, CUR: Curcumin, NPs: PLGA nanoparticles



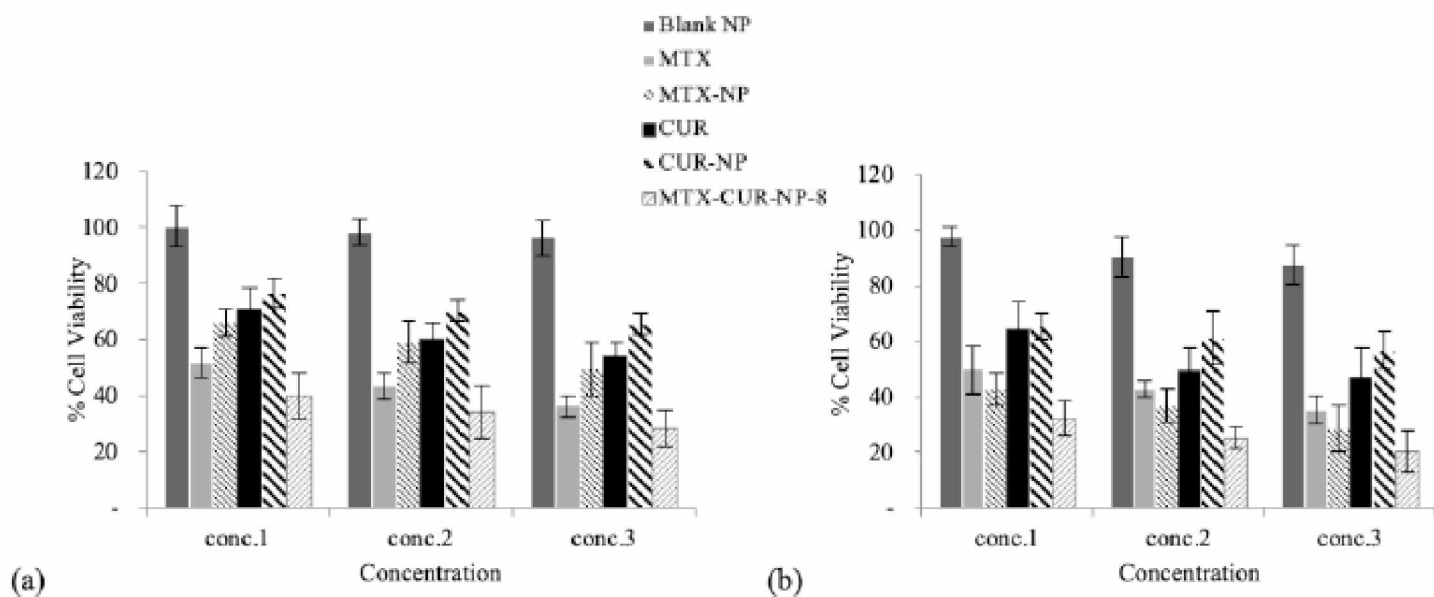
Εικόνα 16: Εικόνες μικροσκοπίου SEM, 1) νανοσωματίδια μεθοτρεξάτης (MTX-NP), 2) νανοσωματίδια κουρκουμίνης (CUR-NP) και 3) νανοσωματίδια μεθοτρεξάτης (30 %)-κουρκουμίνης (20%) (MTX-CUR-NP-8) (Vakilinezhad *et. al.* 2019).

Η Εικόνα 17 συγκρίνει το *in vitro* προφίλ απελευθέρωσης της μεθοτρεξάτης από τα MTX-CUR-NPs-8 και MTX-NPs. Το στάδιο υψηλής απελευθέρωσης που παρατηρείται αρχικά (*burst release*), πιθανώς οφείλεται στην αρχική διασπορά του φαρμάκου στα επιφανειακά στρώματα των σωματιδίων. Ωστόσο, η αρχική αυτή «έκρηξη» μειώθηκε σε μεγαλύτερο βαθμό στα MTX-CUR-NPs-8 απ' ό,τι στα MTX-NPs. Τα MTX-NPs απελευθέρωσαν το 50% της μεθοτρεξάτης σε περίπου 2 ώρες. Τα MTX-CUR-NPs-8 χρειάστηκαν περισσότερο από 8 ώρες προκειμένου να απελευθερώσουν το 50% της μεθοτρεξάτης. Μέχρι το τέλος του πειράματος, δηλαδή στις 72 ώρες, τα MTX-CUR-NPs-8 απελευθέρωσαν σχεδόν το 80% της μεθοτρεξάτης, ενώ τα MTX-NPs απελευθέρωσαν περισσότερο από το 90%, καταδεικνύοντας ότι η κουρκουμίνη μπορεί να διατηρήσει αργή και σταθερή την απελευθέρωσή της μεθοτρεξάτης από τα νανοσωματίδια. Αυτό πιθανώς οφείλεται, είτε στη μεταξύ τους αλληλεπίδραση είτε στη σταθεροποίηση της υδατικής φάσης. Το προφίλ απελευθέρωσης της κουρκουμίνης από τα MTX-CUR-NPs-8 και CUR-NPs ήταν σχεδόν ίδιο τις πρώτες 2 ώρες, ωστόσο, ο ρυθμός απελευθέρωσης της κουρκουμίνης από τα MTX-CUR-NPs-8 μειώθηκε σημαντικά στο υπόλοιπο του πειράματος. Περίπου το 50% της κουρκουμίνης απελευθερώθηκε σε 8 και 24 ώρες από τα CUR-NPs και MTX-CUR-NPs-8, αντίστοιχα. Μέχρι το τέλος του πειράματος, περίπου το 60% της κουρκουμίνης απελευθερώθηκε από τα MTX-CUR-NPs-8, ενώ περισσότερο από το 70% απελευθερώθηκε από τα CUR-NPs. Φαίνεται πως η απελευθέρωσή της κουρκουμίνης από τα MTX-CUR-NPs-8 νανοσωματίδια μειώθηκε λόγω της πιθανής αλληλεπίδρασης της με τη μεθοτρεξάτη.



Εικόνα 17: *In vitro* προφίλ απελευθέρωσης σε συνάρτηση με τον χρόνο. α) απελευθέρωση μεθοτρεξάτης (MTX) από MTX-CUR-NPs-8 και MTX-NPs, β) απελευθέρωση κουρκουμίνης (CUR) από MTX-CUR-NPs-8 και CUR-NPs (Vakilinezhad *et. al.* 2019).

Οι μελέτες *in vitro* κυτταροτοξικότητας, μέσω MTT δοκιμής αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε SK-Br-3 κύτταρα παρουσιάζονται στην Εικόνα 18. Τα κενά νανοσωματίδια δεν παρουσίασαν τοξικότητα, ενώ η τοξικότητα της μη ενθυλακωμένης μεθοτρεξάτης ήταν υψηλότερη από αυτή της ενθυλακωμένης, στις 24 ώρες. Αυτό πιθανώς συμβαίνει λόγω της μη ολοκληρωμένης απελευθέρωσης (περίπου 83 %) της μεθοτρεξάτης από τα MTX-NPs. Ωστόσο, τα νανοσωματίδια MTX-NPs εμφάνισαν μεγαλύτερη τοξικότητα από τη μη ενθυλακωμένη μεθοτρεξάτη στις 48 ώρες. Η κυτταροτοξικότητα των CUR-NPs ήταν χαμηλότερη από τη μη ενθυλακωμένη κουρκουμίνη, στις 24 και στις 48 ώρες. Τη μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα απ' όλα τα παραπάνω είδη νανοσωματιδίων και ελεύθερων φαρμάκων εμφάνισαν τα νανοσωματίδια MTX-CUR-NPs-8 οδηγώντας τα καρκινικά κύτταρα στην πιο χαμηλή βιωσιμότητα.



Εικόνα 18: *In vitro* κυτταροτοξικότητα των κενών νανοσωματιδίων, των ενθυλακωμένων και μη ενθυλακωμένων μεθοτρεξάτης/κουρκουμίνης και των σύνθετων νανοσωματιδίων MTX-CUR-NPs-8 σε a) 24 ώρες και b) 48 ώρες (Vakilnezhad *et. al.* 2019).

Η χορήγηση του MNU (N-Methyl-N-nitrosourea), ενός καρκινογόνου μοντέλου, άμεσης δράσης, είναι μια απλή μέθοδος επαγωγής όγκων του μαστού σε τρωκτικά. Στη συγκεκριμένη πειραματική μελέτη, οι ψηλαφητοί όγκοι του μαστού ήταν εμφανείς σε περίπου 80% των αρουραίων τέσσερις μήνες μετά την έκθεση στο καρκινογόνο MNU. Ο Πίνακας 3 δείχνει την *in vivo* αποτελεσματικότητα των νανοσωματιδίων μεθοτρεξάτης ή/και κουρκουμίνης στον επαγόμενο από MNU καρκίνο του μαστού. Πριν από τη θεραπεία, δηλ. την δέκατη έκτη εβδομάδα, οι διαφορές επίπτωσης και μεγέθους των όγκων μεταξύ όλων των ομάδων αρουραίων (έξι ομάδες που έλαβαν έξι διαφορετικές θεραπείες) δεν ήταν στατιστικά σημαντικές ($p > 0,05$). Μέχρι το τέλος της έρευνας, τα ζωικά μοντέλα που έλαβαν οποιοδήποτε είδος θεραπείας με μεθοτρεξάτη ή κουρκουμίνη παρουσίασαν σημαντικά χαμηλότερο μέγεθος όγκου σε σύγκριση με την «control» ομάδα. Οι αρουραίοι που έλαβαν θεραπεία με νανοσωματίδια μεθοτρεξάτης παρουσίασαν σημαντικά χαμηλότερο μέγεθος όγκου σε σύγκριση με την ομάδα που έλαβε ελεύθερη μεθοτρεξάτη. Η διαφορά της εξέλιξης του μεγέθους του όγκου δεν ήταν σημαντική εντός των ομάδων που έλαβαν μη ενθυλακωμένη και ενθυλακωμένη κουρκουμίνη. Ωστόσο, η μόνη θεραπεία που ήταν ικανή να μειώσει το μέγεθος του όγκου ήταν τα νανοσωματίδια MTX-CUR-NPs-8, υποδεικνύοντας την καταλληλότητα του συγκεκριμένου σκευάσματος για τον έλεγχο της εξέλιξης του καρκίνου του μαστού.

Πίνακας 3: *In vivo* αποτελεσματικότητα των διάφορων ειδών νανοσωματιδίων στον καρκίνο του μαστού σε ποντίκια (Vakilinezhad *et. al.* 2019).

Weeks after MNU injection	Week 16		Week 17		Week 18		Week 19		Week 20	
Animal groups	Tumor incidence	Tumor size(cm ³)	Tumor incidence	Tumor size(cm ³)	Tumor incidence	Tumor size(cm ³)	Tumor incidence	Tumor size(cm ³)	Tumor incidence	Tumor size(cm ³)
No treatment	2.8	0.7±0.3	3.1	1.0±0.2	3.6	1.5±0.4	3.9	1.7±0.5	4.4	2.5 ±0.6
MTX solution	2.7	0.9±0.5	2.6	1.0±0.4	2.8	1.2±0.6	2.7	1.5±0.3	2.9	1.7±0.3
MTX-NPs	2.6	1.0±0.2	2.4	0.9±0.2	2.1	0.9±0.4	2.2	1.1±0.2	2.2	1.3±0.5
CUR solution	2.8	0.7±0.2	2.8	0.8±0.1	3.1	1.2 ±0.6	3.0	1.6±0.6	3.1	2.1±0.2
CUR-NPs	2.5	0.9±0.1	2.7	1.3±0.3	3.0	1.4±0.4	3.3	1.7±0.4	2.9	2.0±0.7
MTX-CUR-NPs-8	2.6	0.8±0.3	2.4	1.1±0.2	2.3	0.8±0.4	1.9	0.6±0.1	1.9	0.6±0.2

* Tumor incidence presented as the Mean number of palpable tumors per rat (n=6)

Ο S. Zanin και οι συνεργάτες του (Rudnik *et. al.* 2020), μελέτησαν την ενθυσία της κουρκουμίνης και της μεθοτρεξάτης σε νανοκάψουλες με PCL (poly-caprolactone) και PEG (polyethylenoglycol) για την αντιμετώπιση του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα. Δημιουργήθηκαν νανοκάψουλες με ή χωρίς κουρκουμίνη και/ή μεθοτρεξάτη (CUR-NCs, MTX-NCs, CUR-MTX-NCs, blank NCs), των οποίων το μέσο μέγεθος κυμάνθηκε μεταξύ 200 και 300 nm. Το μεγαλύτερο μέγεθος ορισμένων νανοκαψουλών πιθανώς οφείλεται στην παρουσία του PEG στη σύνθεσή τους. Το PEG δημιουργεί μια πιο ιξώδη οργανική φάση, η οποία επηρεάζει τη διασπορά της στην υδατική φάση κατά την ανάδευση, οδηγώντας σε υψηλότερα μεγέθη νανοσωματιδίων με ευρύτερη πολυδιασπορά. Άλλες παράμετροι που μπορούν να επηρεάσουν άμεσα τη διάμετρο των σωματιδίων στα νανοσυστήματα είναι το έλαιο που χρησιμοποιείται για την παρασκευή νανοκαψουλών που επηρεάζει ορισμένες από τις ιδιότητές τους, όπως το ιξώδες, την υδροφοβικότητα και την επιφανειακή τάση. Όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 4, παρατηρήθηκαν αρνητικές τιμές ζ δυναμικού για όλα τα είδη των νανοκαψουλών (Πίνακας 1), κάτι που πιθανώς οφείλεται στην ανιονική φύση του PCL λόγω της παρουσίας ομάδων καρβοξυλικού οξέος. Η ανάλυση του ζ δυναμικού επιτρέπει τον εντοπισμό των ηλεκτρικών φορτίων που εμφανίζονται στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων. Γενικότερα, τα νανοσωματίδια θεωρούνται σταθερά όταν οι τιμές δυναμικού τους είναι υψηλότερες από ± 30 mV, κάτι το οποίο ισχύει στο συγκεκριμένο πείραμα. Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι οι τιμές της μέσης διαμέτρου και του ζ δυναμικού ήταν παρόμοιες για τις νανοκάψουλες με ή χωρίς κουρκουμίνη και / ή μεθοτρεξάτη. Το μεγαλύτερο ποσοστό αποτελεσματικής ενθυσίας, παρουσίασαν τα νανοσωματίδια που περιείχαν μόνο κουρκουμίνη (98,7%) ή κουρκουμίνη και μεθοτρεξάτη. Αυτές οι υψηλές τιμές αποδίδονται

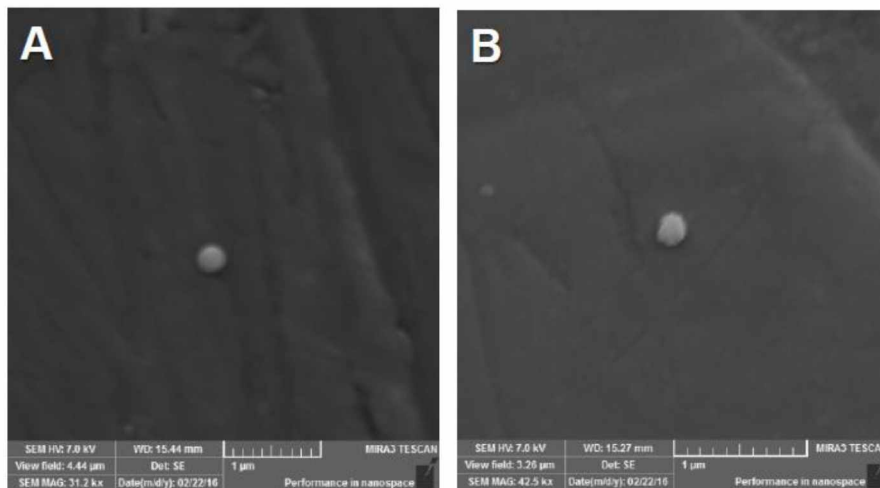
στη μικρή διαλυτότητα της κουρκουμίνης στην υδατική φάση. Για τις νανοκάψουλες που περιείχαν μεθοτρεξάτη, οι μέσες τιμές αποτελεσματικότητας ενθυλάκωσης κυμάνθηκαν από 82,4% (NCUR / MTX-2) έως 88,9% (NMTX-1). Τα παραπάνω αποτελέσματα που αφορούν το μέγεθος, το ζ δυναμικό και την αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης των νανοσωματιδίων παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Μέση διάμετρος, ζ δυναμικό και αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης των διάφορων ειδών νανοσωματιδίων (Rudnik *et.al.* 2020).

Formulation	Mean Particle Size* (nm)	PDI*	Zeta Potential* (mV)	EE* (%)
NCUR/MTX-0	313.30 ± 48.20	0.351 ± 0.15	-39.83 ± 2.46	-
NCUR-1	307.26 ± 29.40	0.323 ± 0.07	-38.80 ± 7.45	99.4 ± 0.51
NCUR-2	315.96 ± 10.30	0.351 ± 0.02	-41.20 ± 7.20	98.7 ± 0.66
NMTX-1	287.83 ± 28.00	0.290 ± 0.11	-40.60 ± 5.80	88.9 ± 0.47
NMTX-2	298.60 ± 25.00	0.292 ± 0.01	-38.96 ± 1.60	83.3 ± 0.42
NCUR/MTX-1	312.03 ± 23.60	0.344 ± 0.05	-39.43 ± 6.26	99.1 ± 0.63 (CUR) 84.4 ± 0.57 (MTX)
NCUR/MTX-2	325.16 ± 28.90	0.351 ± 0.03	-33.40 ± 3.29	99.3 ± 0.54 (CUR) 82.4 ± 0.44 (MTX)

* Values are depicted as mean ± standard deviation (SD).

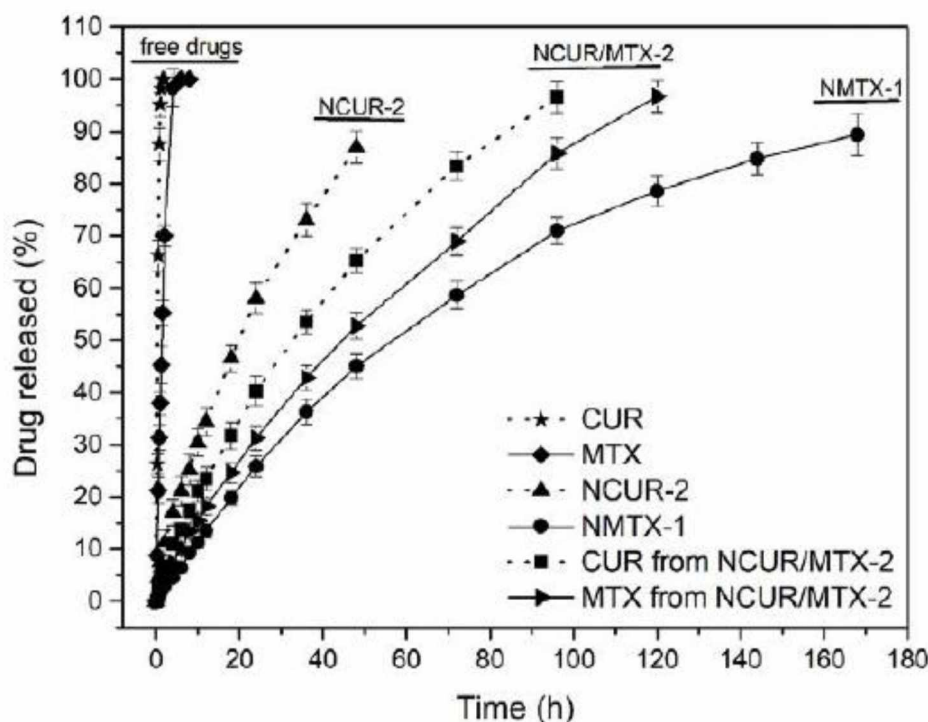
Στην Εικόνα 19, παρουσιάζεται η μορφολογία των κενών νανοσωματιδίων και των νανοσωματιδίων με μεθοτρεξάτη και κουρκουμίνη που καταγράφηκε μέσω μικροσκοπίου SEM (Scanning Electron Microscope). Τα νανοσωματίδια είχαν σφαιρικό σχήμα και λεία επιφάνεια, ενώ ακόμη και μετά την αλλαγή των συγκεντρώσεων της κουρκουμίνης και/ή της μεθοτρεξάτης οι μορφολογίες τους ήταν παρόμοιες και δεν παρατηρήθηκαν κρύσταλλοι φαρμάκων.



Εικόνα 19: Μικροσκόπιο SEM. α) Κενά νανοσωματίδια και β) νανοσωματίδια κουρκουμίνης και μεθοτρεξάτης (Rudnik *et al.* 2020).

Στην Εικόνα 20 παρουσιάζεται το προφίλ απελευθέρωσης των μη ενθυλακωμένων φαρμάκων καθώς και των ενθυλακωμένων σε διάφορα είδη νανοσωματιδίων. Η μη ενθυλακωμένη κουρκουμίνη και μεθοτρεξάτη παρουσίασαν έναν γρήγορο προφίλ απελευθέρωσης (CUR: 80 % σε 41 λεπτά, MTX: 80 % 195 λεπτά). Το νανοσωματίδιο NCUR-2 απελευθέρωσε το 80% της κουρκουμίνης σε 44 ώρες, ενώ το NMTX-1 απελευθέρωσε το 80% της μεθοτρεξάτης σε 136 ώρες. Το σύνθετο νανοσωματίδιο (NCUR / MTX-2) είχε μέση απελευθέρωση 80% σε 69 ώρες και σε 90 ώρες, για την κουρκουμίνη και τη μεθοτρεξάτη αντίστοιχα. Επομένως, οι νανοκάψουλες παρουσίασαν ένα προφίλ παρατεταμένης απελευθέρωσης χωρίς να παρατηρείται στάδιο υψηλής αποδέσμευσης (burst release) σε σύγκριση με τα μη ενθυλακωμένα φάρμακα. Δεν παρουσιάστηκε αυτο το φαινόμενο «έκρηξης» καθώς στην παρούσα μελέτη, σχεδιάστηκε στρατηγικά μια τυπική δομή πυρήνα-κελύφους για να επιτευχθεί μια αργή και παρατεταμένη απελευθέρωση φαρμάκου ώστε να παρακαμφθεί η χορήγηση πολλαπλών δόσεων χημειοθεραπείας ημερησίως. Λαμβάνοντας υπόψη τα προφίλ απελευθέρωσης της μεθοτρεξάτης και της κουρκουμίνης στα διάφορα είδη νανοσωματιδίων, η διαφορά στον ρυθμό απελευθέρωσης θα μπορούσε να εξηγηθεί μέσω της διαβάθμισης συγκέντρωσης του κάθε νανοσωματιδίου σε σχέση με το μέσο διάλυσης. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις φαρμάκων, ο ρυθμός απελευθέρωσης ήταν ταχύτερος δεδομένου ότι αυτή η διαβάθμιση συγκέντρωσης ήταν η κινητήρια δύναμη για την απελευθέρωση του φαρμάκου. Έτσι λοιπόν, σε υψηλότερη συγκέντρωση η κουρκουμίνη και / ή η μεθοτρεξάτη μπόρεσαν να κατανεμηθούν κοντά στην επιφάνεια των νανοκαψουλών παρέχοντας μια ταχύτερη *in vitro* απελευθέρωση. Υπό αυτήν την έννοια, το NCUR-2, που παρασκευάστηκε με την υψηλότερη θεωρητική συγκέντρωση φαρμάκου, παρουσίασε ταχεία απελευθέρωση σχεδόν σε 2 ημέρες. Από την άλλη πλευρά, το NMTX-1, που παρασκευάστηκε με τη χαμηλότερη θεωρητική συγκέντρωση φαρμάκου,

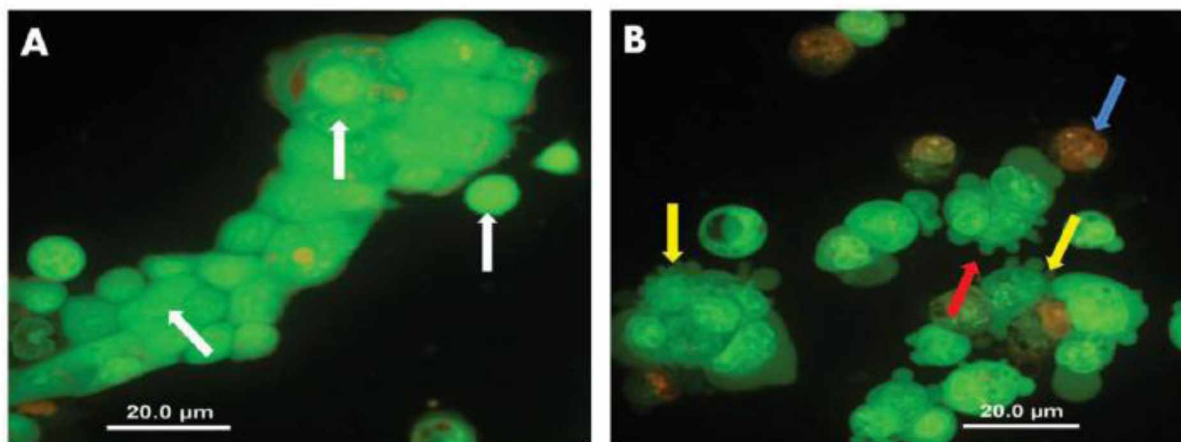
παρουσίασε πολύ αργό ρυθμό απελευθέρωσης σε περίπου 7 ημέρες. Τα σύνθετα νανοσωματίδια κουρκουμίνης και μεθοτρεξάτης (NCUR / MTX-2) πέτυχαν έναν κατάλληλο ρυθμό απελευθέρωσης περίπου σε 3 ημέρες. Σε αυτό το σύνθετο νανοσωματίδιο, το προφίλ απελευθέρωσης των φαρμάκων, όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 20, ήταν το επιθυμητό καθώς θα μπορούσε να εξασφαλίσει την κατάλληλη χημειοθεραπευτική δράση και αναστολή της ρ -γλυκοπρωτεΐνης *in vivo*.



Εικόνα 20: *In vitro* προφίλ απελευθέρωσης μη ενθυλακωμένων και ενθυλακωμένων κουρκουμίνης και μεθοτρεξάτης καθώς και των σύνθετων νανοσωματιδίων (Rudnik *et.al.* 2020).

Από τις μελέτες βιωσιμότητας των κύτταρων που δέχτηκαν θεραπεία με τα διάφορα είδη νανοσωματιδίων, το NCUR / MTX-2 παρείχε στατιστικά σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των Calu-3 κυττάρων ύστερα από MTT και SRB δοκιμές αποδεικνύοντας τη σημασία της συνεργιστικής δράσης των δύο αυτών φαρμάκων. Το μοτίβο κυτταρικού θανάτου του συγκεκριμένου νανοσωματιδίου μετά την 24ωρη θεραπεία, επαληθεύτηκε με χρώση AO / EB (Acridine Orange / Ethidium Bromide). Το κυτταροτοξικό αποτέλεσμα των σκευασμάτων NCUR / MTX-2 παρουσιάζεται στην Εικόνα 21. Στην Εικόνα 21A (αρνητικό control) εμφανίζονται ζωντανά κύτταρα με φυσιολογικούς και φωτεινούς πράσινους πυρήνες (λευκά βέλη). Αντίθετα, στην 21B, παρουσιάζονται με κίτρινα και μπλέ βέλη αποπτωτικά κύτταρα πρώιμου και τελευταίου σταδίου, αντίστοιχα, ενώ με κόκκινο βέλος παρουσιάζεται η

αποπτωτική μεμβράνη. Δεν παρατηρήθηκε νεκρωτικό κύτταρο μετά τη θεραπεία των Calu-3 κυττάρων με το NCUR / MTX-2 νανοσωματίδιο.

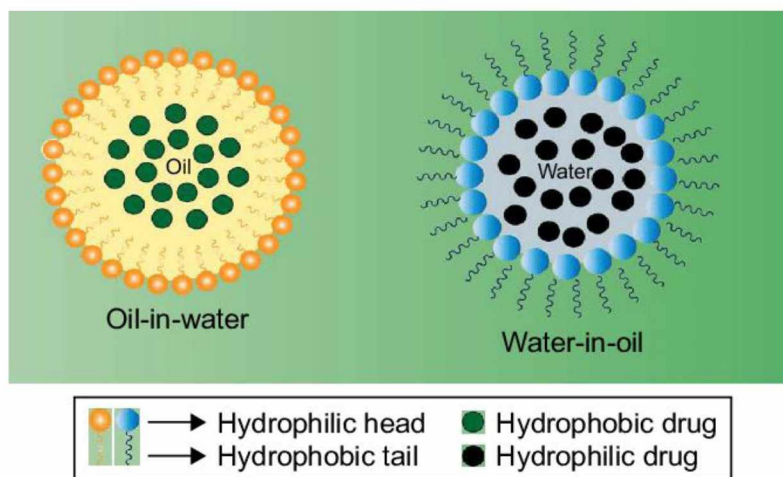


Εικόνα 21: Επίδραση του NCUR / MTX-2 στη μορφολογία των Calu-3 κυττάρων που χρωματίστηκαν με χρώση AO / BE. Εικόνες από μικροσκόπιο φθορισμού (μεγέθυνση 400X). A) Αρνητικό control: ζωντανά κύτταρα με κανονική χρώση πυρήνων (λευκά βέλη). (B) Θεραπεία με NCUR / MTX-2 νανοσωματίδιο: αποπτωτικά κύτταρα πρώιμου σταδίου (κίτρινα βέλη), αποπτωτικά κύτταρα τελευταίου σταδίου (μπλε βέλη) και αποπτωτική μεμβράνη (κόκκινο βέλος). Οι εικόνες είναι αντιπροσωπευτικές των αποτελεσμάτων που ελήφθησαν από τρεις ανεξάρτητες επαναλήψεις του πειράματος (Rudnik *et.al.* 2020).

2.3.2 Νανογαλακτώματα

Τα νανογαλακτώματα είναι υγρά συστήματα και συγκεκριμένα αποτελούν κολλοειδείς διασπορές αποτελούμενες από δύο μη αναμίξιμα υγρά (π.χ νερό, λάδι) και επιφανειοενεργές ουσίες. Είναι σταθερά, διαυγή, ελαφρώς θολά ή γαλακτώδη, χαμηλού ιξώδους και χρησιμοποιούνται για νανοενθυλάκωση ουσιών και νανοδόμηση τροφίμων. Χαρακτηριστικό τους πλεονέκτημα είναι η αύξηση βιοδιαθεσιμότητας και διαλυτότητας των δραστικών ουσιών που μεταφέρουν, ενώ λειτουργούν προστατευτικά στο λειτουργικό συστατικό έναντι της χημικής ή βιολογικής αποδόμησης του ώστε να διατηρείται ο λειτουργικός χαρακτήρας του (B. Παπαδημητρίου ΔΠΜΣ «Βιοεπιχειρείν», «Εφαρμογή της νανοτεχνολογίας στην επιστήμη των τροφίμων», 2020). Τα νανογαλακτώματα διακρίνονται σε: α) ελαίου σε νερό (O / W) (το έλαιο διασπείρεται σε υδατική φάση) και β) νερού σε έλαιο (W / O) (το νερό διασπείρεται σε έλαιο). Τα νανογαλακτώματα προσφέρουν διάφορα πλεονεκτήματα έναντι άλλων νανοφορέων και αυτά είναι τα ακόλουθα: (1) αυξημένος ρυθμός απορρόφησης, (2) μειωμένη μεταβλητότητα στην απορρόφηση, (3) προστασία από οξείδωση και υδρόλυση σε

νανογαλακτώματα O / W, (4) μεταφορά λιπόφιλων φαρμάκων μετά τη διαλυτοποίηση, (5) χορήγηση λιπόφιλων δραστικών ουσιών μέσω O / W νανογαλακτωμάτων, (6) ενισχυμένη βιοδιαθεσιμότητα για πολλά φάρμακα, (7) ικανότητα ενσωμάτωσης τόσο λιπόφιλων όσο και υδρόφιλων φαρμάκων, (8) μεταφορά για την ενίσχυση της αποτελεσματικότητας και παράλληλη μείωση της συνολικής δόσης και των παρενεργειών (9) βιοσυμβατοί, μη τοξικοί και μη ερεθιστικοί (non-irritant) μεταφορείς και (10) ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκου μέσω υγρής στιβάδας, της οποίας η υδροφιλία ή η λιποφιλία καθώς και το πάχος μπορούν να ελεγχθούν επακριβώς (Gurpreet *et.al* 2018).



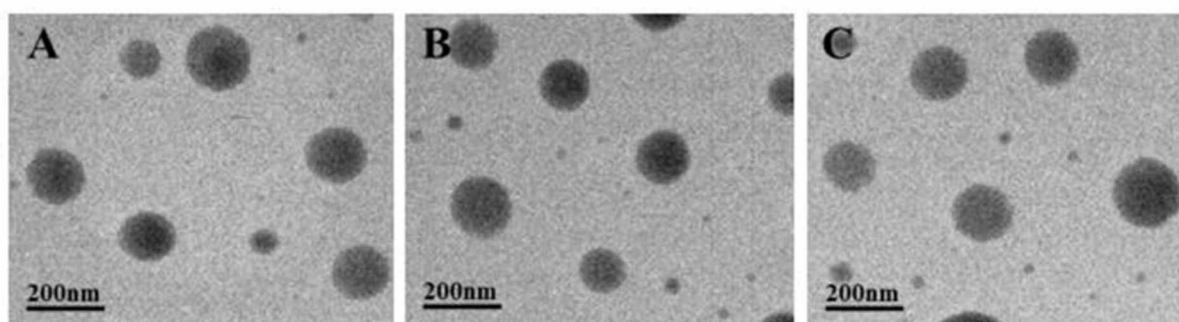
Εικόνα 22: Σχηματική απεικόνιση νανογαλακτώματος (αριστερά: έλαιο σε νερό, δεξιά: νερό σε έλαιο) (Bauab *et. al* 2018).

Στη μελέτη του Y. Liu και των συνεργατών του (Meng *et. al.* 2016), η πακλιταξέλη και το baicalein συνενθυλακώθηκαν με τη μορφή συμπλέγματος πακλιταξέλης και χοληστερόλης (PCC) και με τη μορφή baicalein-φωσφολιπιδίου (BPC), αντίστοιχα. Μελετήθηκε η κυτταροτοξικότητα διάφορων συνδυασμών βάρους πακλιταξέλης και baicalein, ώστε να βρεθεί η ιδανική αναλογία των δύο ουσιών καθώς αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για τη θεραπευτική επίδραση του συστήματος μεταφοράς. Ο συνδυασμός baicalein και πακλιταξέλης σε αναλογία βάρους 1/1 είχε την πιο υψηλή συνεργιστική δράση σε σχέση με τις άλλες αναλογίες που μελετήθηκαν (PTX/BA αναλογία βάρους = 10/1, 5/1, 2/1, 1/1, 1/2, 1/5 και 1/10). Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των νανογαλακτωμάτων παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα 5. Ειδικότερα, το μέγεθος όλων των νανογαλακτωμάτων ήταν μικρότερο από 200 nm ενώ στο PTX/BA νανογαλάκτωμα το ποσοστό ΕΕ της πακλιταξέλης και του baicalein ήταν αρκετά υψηλό. Τα φυσικοχημικά αυτά χαρακτηριστικά παρέμειναν σχετικά σταθερά μετά από αποθήκευση στους 4 °C για έξι μήνες, κάτι που αποδεικνύει τη σταθερότητα τους.

Πίνακας 5: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και σταθερότητα (4°C για 6 μήνες) των νανογαλακτωμάτων πακλιταξέλης, baicalein και PTX/BA νανογαλακτωμάτων (Meng *et. al.* 2016).

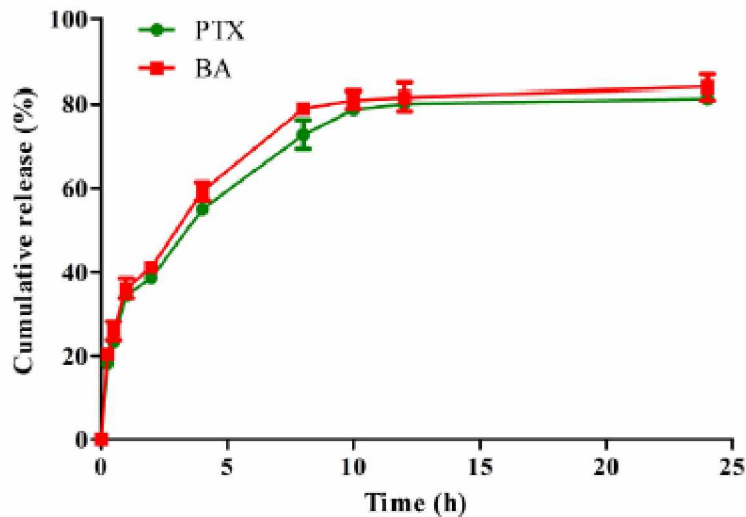
Time (month)	Formulation	Size (nm)	PDI	Zeta potential (mV)	EE (%)	
					PTX	BA
0	PTX NE	165.3 ± 8.2	0.094 ± 0.006	-38.3 ± 2.7	97.3	-
	BA NE	161.5 ± 5.5	0.107 ± 0.011	-22.4 ± 3.1	-	98.2
	PTX/BA NE	170.5 ± 6.5	0.113 ± 0.005	-42.4 ± 3.7	97.1	97.9
6	PTX NE	167.5 ± 7.1	0.091 ± 0.005	-38.9 ± 2.1	96.7	-
	BA NE	164.6 ± 6.8	0.104 ± 0.009	-24.1 ± 2.9	-	97.1
	PTX/BA NE	169.5 ± 6.0	0.115 ± 0.001	-41.4 ± 3.2	96.7	96.9

Τα νανοσταγονίδια της διεσπαρμένης φάσης ήταν σφαιρικά και όμοια στο μέγεθος όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 23, η οποία ελήφθη με Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης (Transmission Electron Microscope –TEM).



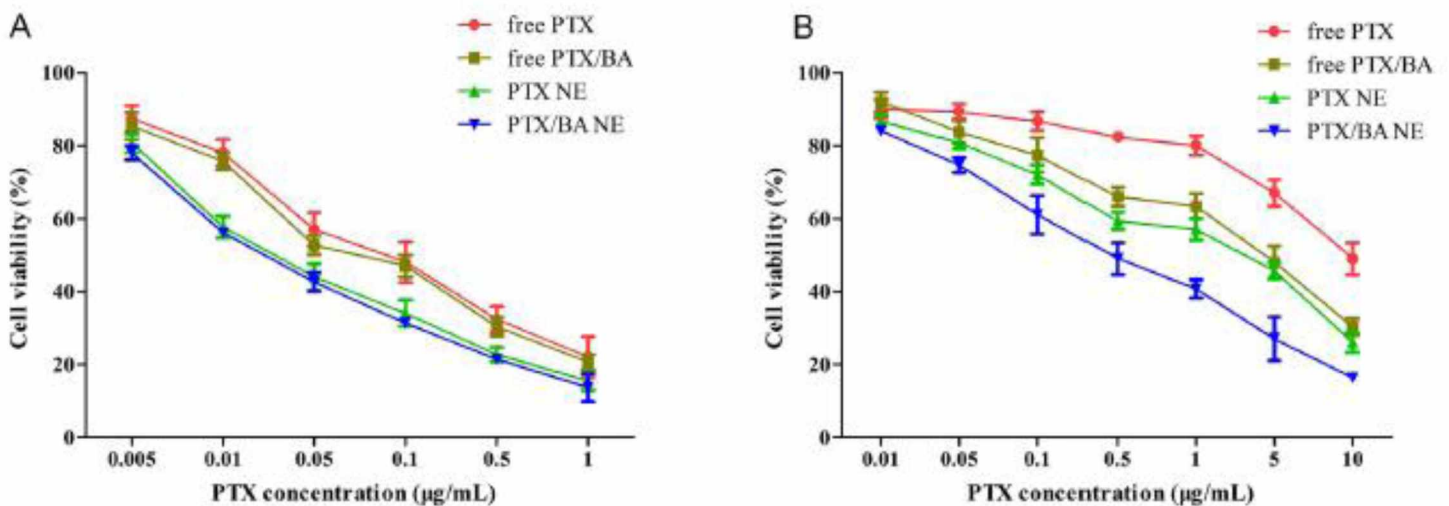
Εικόνα 23: Εικόνες TEM PTX νανογαλακτωμάτων (A), baicalein νανογαλακτωμάτων (B) και PTX/BA νανογαλακτωμάτων (C) (Meng *et. al.* 2016).

Στο νανογαλάκτωμα PTX/BA, τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα *in vitro* προφίλ απελευθέρωσης της πακλιταξέλης και του baicalein ήταν όμοια και αρκετά ικανοποιητικά προκειμένου να επιφέρουν την κατάλληλη συνεργιστική δράση. Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 24, το 40% της πακλιταξέλης και του baicalein απελευθερώθηκαν από το PTX / BA νανογαλάκτωμα σε 2 ώρες. Το αθροιστικό ποσό των PTX και BA που απελευθερώθηκαν από το νανογαλάκτωμα ήταν 81,2% και 83,8% σε 24 ώρες, αντίστοιχα. Το PTX / BA NE εμφάνισε ένα προφίλ παρατεταμένης απελευθέρωσης και των δύο φαρμάκων με μια αρχική έκρηξη απελευθέρωσης την πρώτη ώρα.



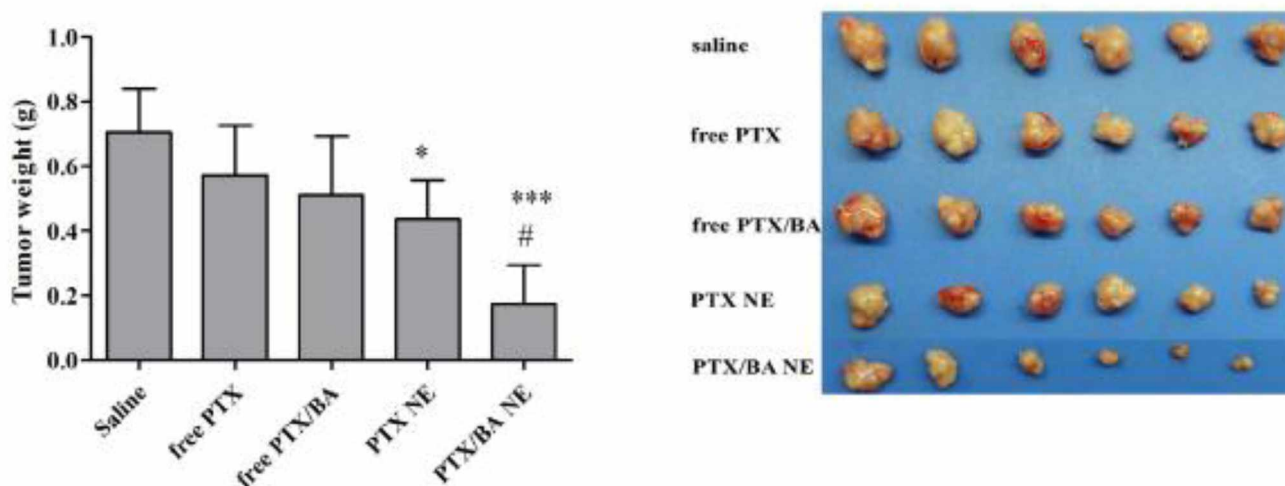
Εικόνα 24: *In vitro* προφίλ απελευθέρωσης της πακλιταξέλης και του baicalein από τα PTX/BA νανογαλακτώματα (Meng *et. al.* 2016).

Το νανογαλάκτωμα PTX/BA NE, όπως φαίνεται στην Εικόνα 25 εμφάνισε αυξημένη *in vitro* κυτταροτοξικότητα σε σχέση με τους άλλους συνδυασμούς νανογαλακτωμάτων και τα ελεύθερα φάρμακα στα MCF-7 κύτταρα.



Εικόνα 25: *In vitro* κυτταροτοξικότητα μη ενθυλακωμένων πακλιταξέλης (PTX), πακλιταξέλης/baicalein (PTX/BA) και αντίστοιχα ενθυλακωμένων σε νανογαλάκτωμα (NE) πακλιταξέλης (PTX NE) και πακλιταξέλης/baicalein (PTX/BA NE) σε MCF-7 κύτταρα (A) και MCF-7/Tax (Taxol-resistant) κύτταρα (B) μετά από 48 ώρες χορήγησης (mean \pm SD, n = 3), (Meng *et. al.* 2016).

Ακόμη αυξήθηκαν τα κυτταρικά ROS τα οποία πυροδότησαν την απόπτωση των κυττάρων μέσω κασπάσης-3, ενώ μειώθηκε η γλουταθειόνη στα MCF-7 κύτταρα. Τέλος, αναφορικά με την *in vivo* αξιολόγηση, τη μεγαλύτερη αντικαρκινική δραστηριότητα εμφάνισε το PTX/BA νανογαλάκτωμα (NE) όπως φαίνεται στην Εικόνα 26 μετά από 30 ημέρες. Πιο συγκεκριμένα, ο όγκος με το μικρότερο βάρος ήταν αυτός όπου είχε χορηγηθεί το PTX/BA νανογαλάκτωμα, κάτι το οποίο επιβεβαιώνεται και από την όψη του όγκου ύστερα από τη χειρουργική αφαίρεση του μετά την θανάτωση των ποντικών.

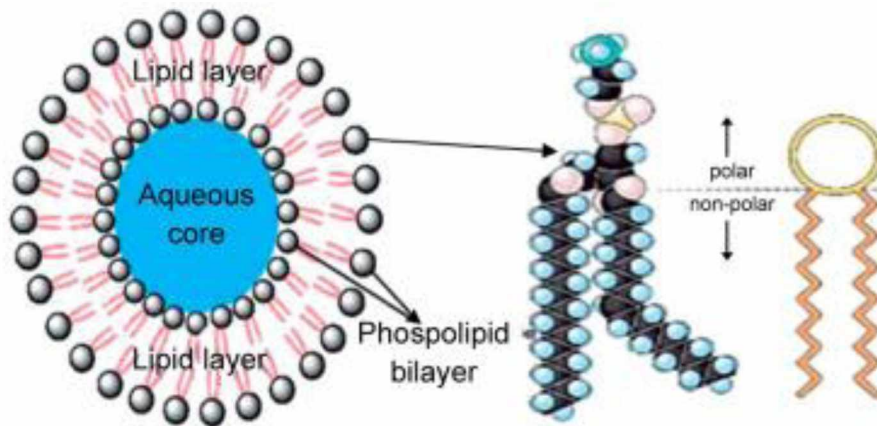


Εικόνα 26: *In vivo* αντικαρκινική δράση σε ποντίκια με ξενομοσχεύματα (xenografts) με MCF-7 κύτταρα. Αριστερά: Βάρη καρκινικών όγκων από διαφορετικές χορηγήσεις μετά από θανάτωση των ποντικών στις 30 ημέρες. Δεξιά: Καρκινικοί όγκοι από διαφορετικές χορηγήσεις μετά από 30 ημέρες (Meng *et. al.* 2016).

2.3.3 Νανολιποσώματα

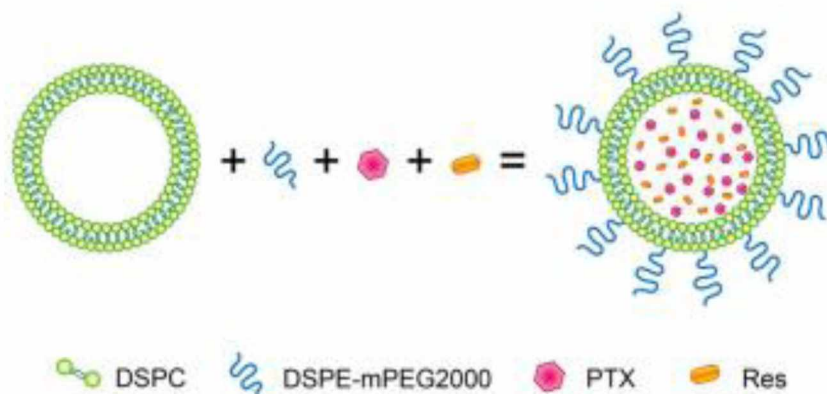
Τα νανολιποσώματα θεωρούνται ιδανικά συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, λόγω των βιολογικών και τεχνολογικών πλεονεκτημάτων τους τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Κατά συνέπεια, τα νανολιποσώματα έχουν διερευνηθεί εκτενώς τα τελευταία 60 χρόνια. Μέχρι σήμερα, 15 λιποσωματικά φάρμακα έχουν εγκριθεί για κλινικές χρήσεις (Ambisome, Abelcet, Amphotec, DaunoXome, Doxil, Lipo-dox, Myocet, Duomeisu, Libaoduo, Visudyne, Depocyt, DepoDur, Eraxal, Inflexal V και Lipusu) (Su *et. al.* 2018). Είναι υγρά συστήματα, πιο συγκεκριμένα, κυστίδια που περιβάλλονται από λιπιδική διπλοστιβάδα. Έχουν υδάτινο πυρήνα, ρυθμιζόμενου pH ενώ είναι βιοσυμβατά και βιοαποικοδομήσιμα. Χρησιμοποιούνται για τον εγκλωβισμό, την προστασία και τη μεταφορά βιοδραστικών ουσιών, υδρόφιλων και μη, όπως φάρμακα, βιταμίνες, πεπτιδία, αντιοξειδωτικά κ.ά. Μερικά από τα βασικά τους

πλεονεκτήματα είναι η ελεγχόμενη αποδέσμευση καθώς και η αύξηση της διαλυτότητας και βιοδιαθεσιμότητας του συστατικού που μεταφέρουν (B. Παπαδημητρίου ΔΠΜΣ «Βιοεπιχειρείν», «Εφαρμογή της νανοτεχνολογίας στην επιστήμη των τροφίμων», 2020). Το μέγεθος των σφαιρικών κυστιδίων λιπιδίων μπορεί να κυμαίνεται από μερικά νανόμετρα έως αρκετά μικρόμετρα και τα νανολιποσώματα που εφαρμόζονται στην ιατρική χρήση γενικά κυμαίνονται μεταξύ 50 και 450 nm. Τα νανολιποσώματα είναι ασταθή συστήματα (Su *et. al* 2018)



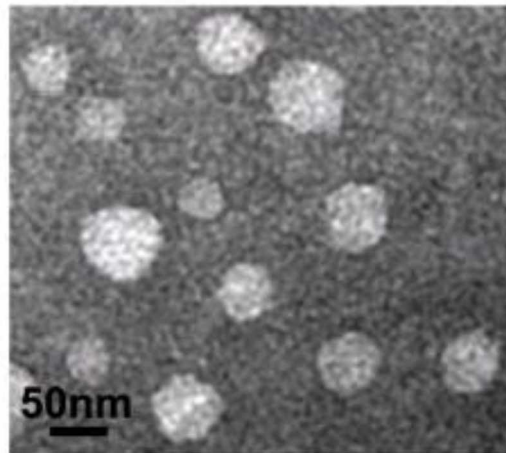
Εικόνα 27: Σχηματική απεικόνιση των λιποσωμάτων (Papachristos *et al.*2015).

Ο Χ. Yang και η ερευνητική του ομάδα (Meng *et. al.* 2016), χρησιμοποίησαν PEG-νανολιποσώματα (εγκεκριμένα από τον FDA) στα οποία ενθυλάκωσαν πακλιταξέλη και ρεσβερατρόλη με σκοπό την αναστροφή του φαινομένου του MDR σε καρκινικά κύτταρα μαστού *in vitro* και *in vivo*. Στην Εικόνα 28, απεικονίζεται το λιπόσωμα που χρησιμοποιήθηκε όπου ενσωματώθηκε το DSPE-mPEG2000 στην εξωτερική μεμβράνη για τη βελτίωση της σταθερότητας του λιποσώματος.



Εικόνα 28: Σχηματική απεικόνιση του νανολιποσώματος με τα συστατικά του (Meng *et. al.* 2016).

Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των νανολιποσωμάτων αξιολογήθηκαν με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο TEM (Εικόνα 29), είχαν σφαιρικό και ομοιόμορφο σχήμα. Το μέσο μέγεθος τους ήταν 50 nm, χωρίς κανένα να υπερβαίνει τα 200 nm, κάτι το οποίο θα οδηγούσε σε δέσμευση τους από τα μακροφάγα του ήπατος και του σπλήνα.

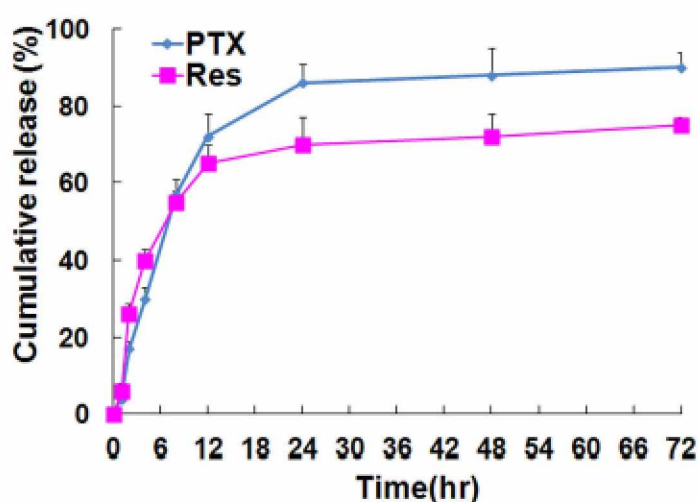


Εικόνα 29: Λιποσώματα: λήψη από TEM μικροσκόπιο (Meng *et. al.* 2016).

Όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 6, τα λιποσώματα ενός συστατικού εμφάνισαν αποτελεσματική ικανότητα ενθυλάκωσης είτε για πακλιταξέλη είτε για ρεσβερατρόλη, με το ποσοστό EE (encapsulation efficiency) να φτάνει τα επίπεδα $90,3\% \pm 2,4\%$ και $92\% \pm 3,0\%$, αντίστοιχα. Για τα σύνθετα λιποσώματα με πακλιταξέλη και ρεσβερατρόλη, το EE ήταν $52\% \pm 3,7\%$ για PTX και $56\% \pm 3,3\%$ για Res. Αυτά τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα PTX και Res θα μπορούσαν να φορτωθούν μαζί σε ένα σύνθετο λιπόσωμα, επιτυγχάνοντας έτσι ένα EE μεγαλύτερο από 50%. Επιπλέον, μετρήθηκαν τα προφίλ απελευθέρωσης της ρεσβερατρόλης και της πακλιταξέλης από το σύνθετο λιπόσωμα στους 37°C σε PBS (pH 7,4). Οι καμπύλες απελευθέρωσης της ρεσβερατρόλης και της πακλιταξέλης από το σύνθετο λιπόσωμα παρουσιάζονται στην Εικόνα 30. Η ρεσβερατρόλη και η πακλιταξέλη παρουσίασαν παρόμοιο προφίλ απελευθέρωσης. Σχετικά ταχύτερη απελευθέρωση πακλιταξέλης και ρεσβερατρόλης παρατηρήθηκε από το σύνθετο λιπόσωμα τις πρώτες 24 ώρες (PTX, $86,4\% \pm 3,6\%$, Res, $71,8\% \pm 4,5\%$). Στις 48 ώρες, η αθροιστική απελευθέρωση έφτασε το $89,3\% \pm 2,9\%$ για το PTX και το $76,7\% \pm 4,9\%$ για το Res. Το σύνθετο λιπόσωμα αποδείχθηκε ότι έχει ένα προφίλ παρατεταμένης και ικανοποιητικής απελευθέρωσης, αποτέλεσμα που ήταν σύμφωνο με αντίστοιχες μελέτες στους περισσότερους φορείς λιποσωμάτων για φάρμακα.

Πίνακας 6: Αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης των διάφορων λιποσωμάτων για την πακλιταξέλη και τη ρεσβερατρόλη (Meng *et. al.* 2016).

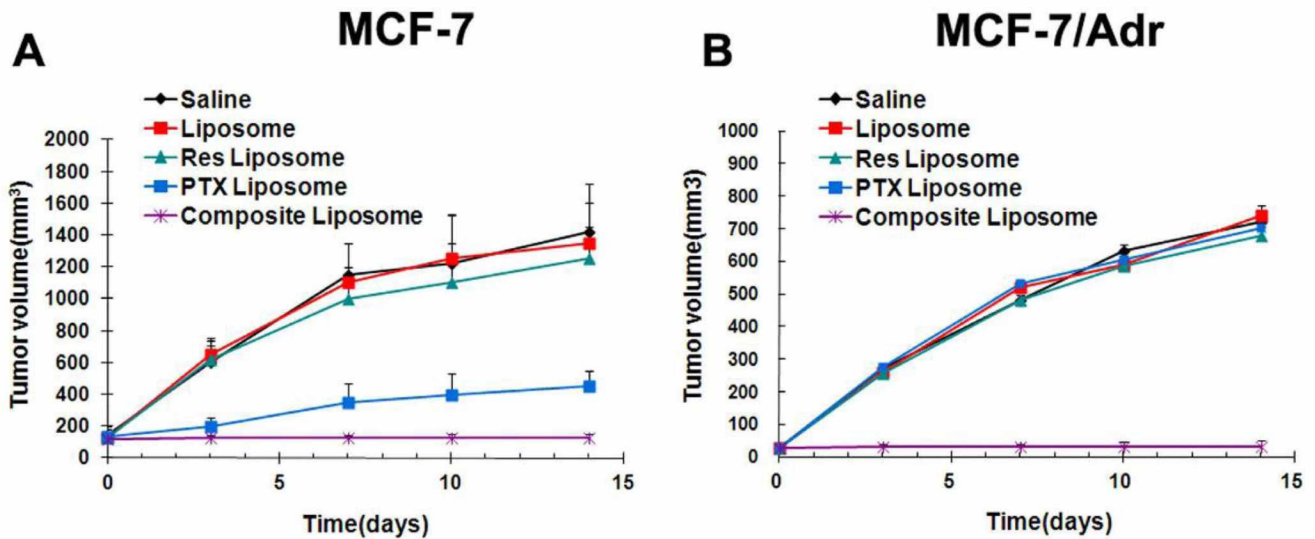
Agent	PTX liposome	Res liposome	Composite liposome
PTX	90.3% ± 2.4%	NA	52% ± 3.7%
Res	NA	92% ± 3.0%	56% ± 3.3%



Εικόνα 30: Αθροιστική απελευθέρωση πακλιταξέλης και ρεσβερατρόλης από το σύνθετο λιπόσωμα (Meng *et. al.* 2016).

Οι μελέτες *in vitro* κυτταροτοξικότητας πραγματοποιήθηκαν μόνο σε λιποσώματα ρεσβερατρόλης ή πακλιταξέλης καθώς και σύνθετα λιποσώματα. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα MCF-7 και MCF-7/Adr (multidrug resistant MCF-7 cells) εκτέθηκαν σε λιπόσωμα με πακλιταξέλη (1,5μg / mL) και / ή ρεσβερατρόλη διάφορων συγκεντρώσεων (1, 3, 5 και 10μg / mL) για 24, 48 και 72 ώρες. Η χορήγηση αλατούχου διαλύματος ή κενού λιποσώματος (control) δεν είχε σημαντικές επιδράσεις στην κυτταρική βιωσιμότητα. Τα σύνθετα λιποσώματα έδειξαν σημαντική κυτταροτοξικότητα και στα δύο είδη κυττάρων (ανθεκτικά και μη) ενώ η συνεργιστική δράση και των δύο παραγόντων ήταν απαραίτητη για την εξάλειψη των ανθεκτικών στο φάρμακο καρκινικών κυττάρων. Τα *in vivo* πειράματα αντικαρκινικής δράσης πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια με ξενομοσχεύματα MCF-7 κυτάρων, ανθεκτικών

και ευαίσθητων στα φάρμακα. Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 31, η ισχυρότερη αντικαρκινική δράση παρατηρήθηκε ύστερα από τη χορήγηση του σύνθετου λιποσώματος και στις δύο κυτταρικές σειρές. Επομένως, το σύνθετο λιπόσωμα έχει τη δυνατότητα να αντιστρέψει αποτελεσματικά την ανθεκτικότητα στα φάρμακα *in vivo*.



Εικόνα 31: *In vivo* αντικαρκινική δράση των διάφορων ειδών λιποσωμάτων σε α) MCF-7 και β) MCF-7/Adr κύτταρα σε ποντίκια (Meng *et. al.* 2016).

3. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Στην παρούσα εργασία αναλύθηκαν εκτενώς τα είδη, οι ιδιότητες και τα χαρακτηριστικά των νανοφορέων, των χημειοθεραπευτικών παραγόντων και των διατροφοφαρμάκων που χρησιμοποιήθηκαν σε πειραματικές μελέτες συνενθυλάκωσης. Στη μελέτη του H. Wang (Yan *et. al.* 2016), και των συνεργατών του, παρασκευάστηκαν υβριδικά πολυμερικά-λιπιδικά νανοσωματίδια (LPNs) για τη συνενθυλάκωση της δοσεταξέλης και της κουρκουμίνης. Τα νανοσωματίδια με δοσεταξέλη και κουρκουμίνη (DTX-CUR-LPNs) εμφάνισαν τη μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα σε PC-3 κύτταρα σε σχέση με τα LPNs με δοσεταξέλη/κουρκουμίνη καθώς και με τα μη ενθυλακωμένα φάρμακα. Οι *in vivo* μελέτες έδειξαν πως η πιο αποτελεσματική μείωση του όγκου επετεύχθη με τη συνενθυλάκωση της κουρκουμίνης και της δοσεταξέλης σε LPNs σε ποντίκια με καρκίνο του προστάτη. Ο J. Zhao και οι συνεργάτες του (Duan *et. al.* 2012), μελέτησαν τη συνενθυλάκωση κουρκουμίνης και δοξορουμπικίνης σε PBCA νανοσωματίδια. Τα νανοσωματίδια αυτά εμφάνισαν αποτελεσματική ενθυλάκωση των φαρμάκων, μικρό μέγεθος καθώς και υψηλή κυτταροτοξικότητα *in vitro* έναντι των καρκινικών κυττάρων. Σε μία ακόμη μελέτη του S. Alipour και των συνεργατών του (Vakilinezhad *et. al.* 2019), διερευνήθηκε η συνενθυλάκωση της μεθοτρεξάτης και της κουρκουμίνης σε PLGA (Poly-Lactic-co-Glycolic Acid) νανοσωματίδια για την αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού. Η μελέτη κατέληξε σε νανοσωματίδια με κατάλληλα *in vitro* χαρακτηριστικά, τα οποία εμφάνισαν υψηλότερη *in vitro* κυτταροτοξικότητα από τη μη ενθυλακωμένη μεθοτρεξάτη (MTX) / κουρκουμίνη (CUR) στα SK-Br-3 κύτταρα. Επίσης, το σύνθετο νανοσωματίδιο κουρκουμίνης-μεθοτρεξάτης φάνηκε να επιβραδύνει την εξέλιξη των όγκων σε ποντίκια καθώς μερικοί από τους όγκους δεν ήταν ψηλαφητοί στο τέλος της μελέτης, καταδεικνύοντας την ικανότητα του σύνθετου νανοσωματιδίου να εξαλείφει ή να μειώνει τους καρκινικούς όγκους. Ο S. Zanin και οι συνεργάτες του (Rudnik *et. al.* 2020), μελέτησαν την ενθυλάκωση της κουρκουμίνης και της μεθοτρεξάτης σε νανοκάψουλες με PCL (polycaprolactone) και PEG (polyethylenoglycol) για την αντιμετώπιση του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα. Οι νανοκάψουλες κουρκουμίνης-μεθοτρεξάτης παρασκευάστηκαν επιτυχώς και παρουσίασαν αποτελεσματική ενθυλάκωση των συστατικών αυτών. Πιο συγκεκριμένα, το NCUR / MTX-2 νανοσωματίδιο μείωσε σημαντικά τη βιωσιμότητα των Calu 3 κυττάρων οδηγώντας σε αποπτωτικά κύτταρα πρώιμου και όψιμου σταδίου. Επιπλέον, η πακλιταξέλη και η βαϊκαλεΐνη συνενθυλακώθηκαν επιτυχώς σε νανογαλακτώματα από τον Y. Liu και τους συνεργάτες του (Meng *et. al.* 2016). Τα νανογαλακτώματα πακλιταξέλης και βαϊκαλεΐνης εμφάνισαν αυξημένη *in vitro* κυτταροτοξικότητα στα MCF 7 / Tax κύτταρα σε σύγκριση με τα ενθυλακωμένα και ελεύθερα φάρμακα. Ακόμη, κατά τη θεραπεία με τα νανογαλακτώματα πακλιταξέλης-βαϊκαλεΐνης τα επίπεδα των ROS αυξήθηκαν, η συγκέντρωση γλουταθειόνης (GSH) μειώθηκε, ενώ ταυτόχρονα αυξήθηκε η δραστηριότητα της

κασπάσης-3 στα κύτταρα. Η *in vivo* αξιολόγηση έδειξε ότι το νανογαλάκτωμα πακλιταξέλης-βαϊκαλεΐνης παρουσίασε την υψηλότερη αντικαρκινική δραστηριότητα σε σύγκριση με τα άλλα είδη νανογαλακτωμάτων που εξετάστηκαν. Τέλος, ο X. Yang και η ερευνητική του ομάδα (Meng *et. al.* 2016), χρησιμοποίησαν PEG-νανολιποσώματα (εγκεκριμένα από τον FDA) στα οποία ενθυλάκωσαν πακλιταξέλη και ρεσβερατρόλη και τα οποία παρουσίασαν αυξημένη *in vivo* αντικαρκινική δράση έναντι ευαίσθητων και ανθεκτικών στα φάρμακα όγκων.

Γενικά, όλες οι προαναφερθείσες μελέτες, αποδεικνύουν πως η συνενθυλάκωση διατροφολογικών και αντικαρκινικών παραγόντων σε διάφορα είδη νανοφορέων μπορεί να αποτελέσει μια πολλά υποσχόμενη θεραπευτική προσέγγιση σε διάφορα είδη καρκίνων όπως του προστάτη, του μαστού κ.ά. Ειδικότερα, η συγκεκριμένη θεραπευτική στρατηγική είναι ικανή να μειώσει τις παρενέργειες που προκαλούν τα αντικαρκινικά φάρμακα στα φυσιολογικά κύτταρα επιτυγχάνοντας τη βέλτιστη αποτελεσματικότητα τους στα καρκινικά κύτταρα. Επιπροσθέτως, ένα ακόμη σημαντικό πλεονέκτημα της συγκεκριμένης θεραπείας έγκειται στην ικανότητα των σύνθετων νανοσωματιδίων να αντιστρέφουν το φαινόμενο της ανθεκτικότητας στην πολυφαρμακία (MDR), ένα φαινόμενο το οποίο αποτελεί εμπόδιο στην αποτελεσματική θεραπεία του καρκίνου.

Ωστόσο, παρά τις πολλά υποσχόμενες δυνατότητες που μπορεί να προσφέρει η συγκεκριμένη στρατηγική συνενθυλάκωσης, υπάρχουν και ορισμένες προκλήσεις που δυσκολεύουν την εφαρμογή της συγκεκριμένης θεραπευτικής προσέγγισης. Οι προκλήσεις αυτές σχετίζονται με το μέγεθος των νανοσωματιδίων, αν είναι μεγάλο ενδέχεται να αναγνωριστούν από το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού και να καταστραφούν. Επίσης, σημαντικό φαίνεται να είναι και το προφίλ απελευθέρωσης που παρουσιάζουν, καθώς η υπερβολικά αυξημένη απελευθέρωση φαρμάκων από τους νανοφορείς ενδέχεται να είναι τοξική για τον οργανισμό που δέχεται τη θεραπεία. Επιπλέον, άλλη μια σημαντική πρόκληση που πρέπει να αντιμετωπιστεί, αφορά τη διαδικασία παρασκευής των νανοσωματιδίων καθώς σε πολλές περιπτώσεις δημιουργούνται συσσωματώματα και θραύσματα νανοσωματιδίων, γεγονός που οδηγεί σε μη λειτουργικά νανοσωματίδια. Συνοψίζοντας, εκτός από τις παραπάνω δυσκολίες που πρέπει να διευρευνηθούν εκτενέστερα, προκειμένου να μπορέσει η συγκεκριμένη θεραπευτική προσέγγιση να εφαρμοστεί κλινικά, είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν περαιτέρω έρευνες, κυρίως *in vivo*, ώστε να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για τη συγκεκριμένη τεχνική που πιθανά θα οδηγήσουν στη διεξαγωγή αντίστοιχων, στοχευμένων κλινικών δοκιμών.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Alven, S., & Aderibigbe, B. A. (2020). Efficacy of Polymer-Based Nanocarriers for Co-Delivery of Curcumin and Selected Anticancer Drugs. *Nanomaterials*, 10(8), 1556.
2. Bamba, B. S. B., Shi, J., Tranchant, C. C., Xue, S. J., Forney, C. F., Lim, L. T., ... & Xu, G. (2018). Coencapsulation of polyphenols and anthocyanins from blueberry pomace by double emulsion stabilized by whey proteins: effect of homogenization parameters. *Molecules*, 23(10), 2525.
3. Ramos, M. A. D. S., Da Silva, P. B., Spósito, L., De Toledo, L. G., Bonifacio, B. V., Rodero, C. F., ... & Bauab, T. M. (2018). Nanotechnology-based drug delivery systems for control of microbial biofilms: a review. *International journal of nanomedicine*, 13, 1179.
4. Chawda, P. J., Shi, J., Xue, S., & Young Quek, S. (2017). Co-encapsulation of bioactives for food applications. *Food Quality and Safety*, 1(4), 302-309.
5. DeFelice, S. L. (1995). The nutraceutical revolution: its impact on food industry R&D. *Trends in Food Science & Technology*, 6(2), 59-61.
6. De Vries, K., Strydom, M., & Steenkamp, V. (2018). Bioavailability of resveratrol: Possibilities for enhancement. *Journal of Herbal Medicine*, 11, 71-77.
7. Duan, J., Mansour, H. M., Zhang, Y., Deng, X., Chen, Y., Wang, J., ... & Zhao, J. (2012). Reversion of multidrug resistance by co-encapsulation of doxorubicin and curcumin in chitosan/poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*, 426(1-2), 193-201.
8. Gaies, E., Jebabli, N., Trabelsi, S., Salouage, I., Charfi, R., Lakhal, M., & Klouz, A. (2012). Methotrexate side effects: review article. *J Drug Metab Toxicol*, 3(4), 1-5.
9. Gao, Y., Snyder, S. A., Smith, J. N., & Chen, Y. C. (2016). Anticancer properties of baicalein: a review. *Medicinal chemistry research*, 25(8), 1515-1523.
10. Giordano, A., & Tommonaro, G. (2019). Curcumin and cancer. *Nutrients*, 11(10), 2376.
11. Gurpreet, K., & Singh, S. K. (2018). Review of nanoemulsion formulation and characterization techniques. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 80(5), 781-789.
12. Heo, D. N., Min, K. H., Choi, G. H., Kwon, I. K., Park, K., & Lee, S. C. (2014). Chapter 24-Scale-up production of theranostic nanoparticles. *Cancer Theranostics*.
13. Hewlings, S. J., & Kalman, D. S. (2017). Curcumin: a review of its' effects on human health. *Foods*, 6(10), 92
14. Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher, C. W., ... & Pezzuto, J. M. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product

- derived from grapes. *Science*, 275(5297), 218-220.
15. Kumari, A., Singla, R., Guliani, A., & Yadav, S. K. (2014). Nanoencapsulation for drug delivery. *EXCLI journal*, 13, 265.
 16. Liu, H., Dong, Y., Gao, Y., Du, Z., Wang, Y., Cheng, P., ... & Huang, H. (2016). The fascinating effects of baicalein on cancer: a review. *International journal of molecular sciences*, 17(10), 1681.
 17. Liu, L., Liu, L., & Zhu. (2019). *Systems and Synthetic Biotechnology for Production of Nutraceuticals*. Springer Singapore.
 18. Meng, J., Guo, F., Xu, H., Liang, W., Wang, C., & Yang, X. D. (2016). Combination therapy using co-encapsulated resveratrol and paclitaxel in liposomes for drug resistance reversal in breast cancer cells in vivo. *Scientific reports*, 6, 22390.
 19. Meng, L., Xia, X., Yang, Y., Ye, J., Dong, W., Ma, P., ... & Liu, Y. (2016). Co-encapsulation of paclitaxel and baicalein in nanoemulsions to overcome multidrug resistance via oxidative stress augmentation and P-glycoprotein inhibition. *International Journal of Pharmaceutics*, 513(1-2), 8-16.
 20. Mohanraj, V. J., & Chen, Y. (2006). Nanoparticles-a review. *Tropical journal of pharmaceutical research*, 5(1), 561-573.
 21. Papachristos, A., Pippa, N., Ioannidis, K., Sivolapenko, G., & Demetzos, C. (2015). Liposomal forms of anticancer agents beyond anthracyclines: present and future perspectives. *Journal of liposome research*, 25(2), 166-173.
 22. Ranzato, E., Martinotti, S., Calabrese, C. M., & Calabrese, G. (2014). Role of nutraceuticals in cancer therapy. *Journal of Food Research*, 3(4), 18.
 23. Rauf, A., Imran, M., Butt, M. S., Nadeem, M., Peters, D. G., & Mubarak, M. S. (2018). Resveratrol as an anti-cancer agent: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(9), 1428-1447.
 24. Rudnik, L. A. C., Farago, P. V., Manfron Budel, J., Lyra, A., Barboza, F. M., Klein, T., ... & Zanin, S. M. W. (2020). Co-Loaded Curcumin and Methotrexate Nanocapsules Enhance Cytotoxicity against Non-Small-Cell Lung Cancer Cells. *Molecules*, 25(8), 1913.
 25. Salami, A., Seydi, E., & Pourahmad, J. (2013). Use of nutraceuticals for prevention and treatment of cancer. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 12(3), 219.
 26. Saleh, T. A. (2020). Nanomaterials: Classification, properties, and environmental toxicities. *Environmental Technology & Innovation*, 101067.
 27. Su, C., Liu, Y., He, Y., & Gu, J. (2018). Analytical methods for investigating in vivo fate of nanoliposomes: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 8(4), 219-225.
 28. Suganya, V., & Anuradha, V. (2017). Microencapsulation and nanoencapsulation: a review. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9(3), 233-239.
 29. Tacar, O., Sriamornsak, P., & Dass, C. R. (2013). Doxorubicin: an update on anticancer

- molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 65(2), 157-170.
30. Tripathi, Y. B., Tripathi, P., & Arjmandi, B. H. (2005). Nutraceuticals and cancer management. *Front Biosci*, 10(2), 1607-1618.
 31. Vakilinezhad, M. A., Amini, A., Dara, T., & Alipour, S. (2019). Methotrexate and curcumin co-encapsulated PLGA nanoparticles as a potential breast cancer therapeutic system: In vitro and in vivo evaluation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 184, 110515.
 32. Van de Voorde, M., Tulinski, M., & Jurczyk, M. (2017). Engineered nanomaterials: a discussion of the major categories of nanomaterials. *Metrology and Standardization of Nanotechnology: Protocols and Industrial Innovations*, 49-74.
 33. Yan, J., Wang, Y., Zhang, X., Liu, S., Tian, C., & Wang, H. (2016). Targeted nanomedicine for prostate cancer therapy: docetaxel and curcumin co-encapsulated lipid-polymer hybrid nanoparticles for the enhanced anti-tumor activity in vitro and in vivo. *Drug delivery*, 23(5), 1757-1762.
 34. Β. Παπαδημητρίου ΔΠΜΣ «Βιοεπιχειρείν», «Εφαρμογή της νανοτεχνολογίας στην επιστήμη των τροφίμων», 2020
 35. «Γαληνός - Φάρμακο - TAXOL». www.galinos.gr. Ανακτήθηκε στις 18 Αυγούστου 2020.