



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΧΗΜΙΚΗΣ
ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΣΥΜΒΑΤΩΝ ΝΑΝΟΔΙΑΣΠΟΡΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ
ΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗ ΥΔΡΟΦΟΒΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ**

**DEVELOPMENT OF BIOCOMPATIBLE NANODISPERSIONS FOR THE
ENCAPTULATION OF HYDROPHOBIC KINASE INHIBITORS**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΑΝΟΥΔΑΚΗΣ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2023

[1]

Η παρούσα διπλωματική εργασία, εκπονήθηκε σε συνεργασία με τις ομάδες Βιομηχανικής & Νανοβιοτεχνολογίας και Περιβάλλοντος & Υγείας του Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας (IXB) του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (ΕΙΕ), σε συνεργασία με το εργαστήριο Δομικής & Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

- **Δρ. Παπαδημητρίου Βασιλική (Επιβλέπουσα)**
Ερευνήτρια Β', Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών
- **Δρ. Σκαμνάκη Βασιλική (Συνεπιβλέπουσα)**
Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας-Μεταβολισμού, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- **Δρ. Πλέτσα Βασιλική (Μέλος)**
Ερευνήτρια Β', Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα επιθυμούσα να ευχαριστήσω από καρδιάς όλα τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής της Διπλωματικής μου εργασίας, την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου Δρ. Βασιλική Παπαδημητρίου, Ερευνήτρια Β', την Δρ. Βασιλική Πλέτσα, Ερευνήτρια Β', και την Δρ. Βασιλική Σκαμνάκη, Επίκουρο Καθηγήτρια Βιοχημείας-Μεταβολισμού, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, πρωτίστως για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν αναθέτοντας μου το παρόν θέμα, τις συμβουλές, την επικοινωνία, την κατανόηση και φυσικά, την εξαιρετική συνεργασία που είχαμε σε όλο το διάστημα εκπόνησης της εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά, τον Δρ. Αριστοτέλη Ξενάκη, Διευθυντή Ερευνών, για την φιλοξενία στους κόλπους του εργαστηρίου Βιομηχανικής και Νανοβιοτεχνολογίας, του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, και όλη την ομάδα που το απαρτίζει, ιδίως την Υποψήφια Διδάκτορα Ελένη Γαλάνη (MSc), και την Υποψήφια Διδάκτορα Κωνσταντίνα Μάτσκου (MSc), για το αμέριστο ενδιαφέρον και την πολύτιμη βοήθεια τους για την συγγραφή της διπλωματικής μου εργασίας, καθώς επίσης και ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ οφείλω στην Δρ. Αθηνά Μπούλακα, Μεταδιδακτορική ερευνήτρια του προγράμματος Περιβάλλον & Υγεία του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, για την καθοριστική βοήθειά της στις κυτταροκαλλιέργειες.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	5
Abstract.....	7
1. Εισαγωγή.....	8
1.1 Μεταβολισμός Γλυκογόνου.....	8
1.1.1 Γλυκογόνο.....	8
1.1.2 Σύνθεση Γλυκογόνου.....	9
1.1.3 Αποικοδόμηση Γλυκογόνου.....	11
1.2 Φωσφορυλάση του Γλυκογόνου (GP).....	14
1.3 Κινάση της Φωσφορυλάσης του Γλυκογόνου (PhK).....	16
1.3.1 Πρωτεϊνικές κινάσες.....	16
1.3.2 Ρύθμιση μέσω Φωσφορυλίωσης.....	18
1.3.3 Κινάση της Φωσφορυλάσης του Γλυκογόνου (PhK).....	19
1.3.4 Υπομονάδες της PhK.....	20
1.3.5 Ρύθμιση της Ενζυμικής Δραστηκότητας.....	22
1.4 Αναστολείς της PhK.....	24
1.5 Νανοδιασπορές.....	29
1.5.1 Εισαγωγικά Στοιχεία.....	29
1.5.2 Μίκρο/Νάνο-Γαλακτώματα – Χαρακτηριστικά & Εφαρμογές.....	32
1.5.3 Ομοιότητες & Διαφορές Μίκρο/Νάνο-Γαλακτωμάτων.....	34
1.5.4 Μέθοδοι Παρασκευής Νανογαλακτωμάτων.....	37
1.5.5 Απορρόφηση Φαρμάκων κατά την χορήγηση από το στόμα.....	40
2. Σκοπός Διπλωματικής Εργασίας.....	41
3. Υλικά και Μέθοδοι.....	42
3.1 Υλικά.....	42
3.2 Κυτταρική σειρά (Caco-2).....	43
3.3 Παρασκευή Νανογαλακτωμάτων και ενθυλάκωση KT5720.....	44
3.4 Δομική Μελέτη Νανογαλακτώματος.....	45
3.4.1 Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS).....	45
3.4.2 Μέτρηση Ιξώδους.....	47
3.5 Προσδιορισμός Κυτταρικής Βιωσιμότητας.....	48
3.5.1 Καλλιέργεια Caco-2 – Μέτρηση Ολικού Αριθμού Κυττάρων.....	48
3.5.2 Δοκιμασία MTT.....	49
4. Αποτελέσματα.....	51
4.1 Δομική Μελέτη Νανογαλακτώματος.....	51
4.1.1 Επισκόπηση Σταθερότητας ο/w νανογαλακτωμάτων.....	51
4.1.2 Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS).....	52
4.1.3 Μέτρηση Ιξώδους.....	54
4.2 Δοκιμασία MTT (MTT assay).....	55
5. Συμπεράσματα-Συζήτηση.....	57
6. Βιβλιογραφία.....	59

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK), συνιστά ένα ζωτικής σημασίας ένζυμο για την ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου, καθώς καταλύει την μετατροπή της ανενεργούς μορφής της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GPb), στην ενεργή της διαμόρφωση (GPa). Ως εκ τούτου, αποτελεί φαρμακευτικό στόχο για την ανάπτυξη μορίων-αναστολέων, στα πλαίσια της ρύθμισης της γλυκογονόλυσης, για την βελτίωση της κλινικής εικόνας ασθενών με διαβήτη τύπου 2, αλλά και για μια ευρεία ποικιλία ευεργετικών δράσεων ως αποτέλεσμα αυτής της αναστολής όπως η αντι-αγγειογόνος δράση που παρατηρείται με μείωση της ενεργότητας της PhK (Camus et al., 2012). Ένας πολλά υποσχόμενος αναστολέας της PhK (PhKi), λόγω της ισχύος ($K_i=18,4$ nM) και της ειδικότητας που τον διέπει, είναι ένα ανάλογο σταυροσπορίνης με ονομασία KT5720 (Begum et al., 2015).

Η νανοβιοτεχνολογία, παρέχει την δυνατότητα ανάπτυξης πληθώρας συστημάτων για την μεταφορά βιοδραστικών ενώσεων, όπως ο αναστολέας KT5720. Ένα oil-in-water (o/w) νανογαλακτώμα (λόγω της υδρόφοβης φύσης του αναστολέα), όπου το έλαιο βρίσκεται σε διασπορά υπό μορφή νανοσταγονιδίων (μεγέθους 50-300 nm) σε μια υδατική συνεχή φάση, σταθεροποιούμενο από την προσθήκη επιφανειοενεργών ουσιών, παρέχει πολλά πλεονεκτήματα, με κυριότερα της αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας του φαρμάκου, και τον περιορισμό των τοξικών παρενεργειών που απορρέουν από την λήψη του.

Τα συστήματα παρασκευάστηκαν με γαλακτωματοποίηση χαμηλής ενέργειας και ειδικότερα με ήπια μηχανική ανάδευση και εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε δομική μελέτη και αξιολόγηση της σταθερότητας τους με την χρήση Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS), παρουσία και απουσία του αναστολέα. Με το πέρας της δομικής μελέτης κατέστη δυνατή η σύγκριση των μέσων διαμέτρων των σταγονιδίων της λιπαρής φάσης καθώς και της ομοιογένειας των συστημάτων, με την εκτίμηση του δείκτη πολυδιασποράς PdI. Ακόμη, διενεργήθηκε και μέτρηση ιξώδους για τις παραπάνω συνθήκες, για την επιβεβαίωση της σταθερότητας των συστημάτων, αλλά και την καταλληλότητά τους για χορήγηση του νανογαλακτώματος από το στόμα.

Τέλος, αποτιμήθηκε *in vitro* η κυτταροτοξικότητα του νανογαλακτώματος σε κύτταρα ορθοκολικού αδενοκαρκινώματος της σειράς Caco-2, μέσω της δοκιμασίας MTT, ενώ προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις του νανογαλακτώματος που δεν επηρεάζουν την

βιωσιμότητα των κυττάρων, και επομένως είναι κατάλληλες για χρήση του συγκεκριμένου νανοσυστήματος ως φορέα μεταφοράς και ενθυλάκωσης του αναστολέα KT5720.

ABSTRACT

Glycogen phosphorylase kinase (PhK), is an enzyme of vital importance involved in the regulation of glycogen metabolism, by catalyzing the conversion of inactive GPb into active GPa. Therefore, it is a therapeutic target for the development of inhibitor molecules, with anti-hyperglycemic and anti-angiogenic properties, due to the reduction of hyperstimulation of PhK (Camus et al., 2012). One very promising PhK inhibitor (PhKi), due to its potency ($K_i=18,4$ nM) and its specificity is a staurosporine analogue, KT5720.(Begum et al., 2015)

Breakthroughs in the field of Nanobiotechnology provide the ability to develop a vast array of delivery systems for bioactive compounds, such as KT5720. An oil-in-water (o/w) nanoemulsion (due to the hydrophobic nature of the inhibitor), which is comprised of a dispersed oil phase in the form of nanodroplets (with a diameter of 50-300 nm) in a continuous aqueous phase, which is stabilized by the addition of surfactants, provides a variety of advantages, with the most prominent being the increase in the bioavailability of a certain drug and the limitation of any side effects caused by its administration

The delivery systems were fabricated with a low energy emulsification method, and to be more precise with the use of a magnetic stirrer, and then for the evaluation of the stability of the nanoemulsions their structural characteristics were studied with the use of Dynamic Light Scattering (DLS), regarding both the empty and the loaded emulsions, by the end of which the comparison of the mean diameters of the droplets dispersed in the aqueous phase was possible, and also the homogeneity of those systems was evaluated, by the estimation of the Pdi value. Furthermore, viscosity measurements were assayed, for the conditions mentioned above, in order to verify the stability measurements with the DLS method, and to evaluate their suitability in order to be orally administered.

Finally, the cytotoxicity of the nanoemulsion that would be fabricated in order to encapsulate the compound KT5720, was assessed *in vitro* with the use of a human colorectal adenocarcinoma cell line, Caco-2, using the MTT assay. The non-cytotoxic concentrations of the nanoemulsion were determined, which are, therefore, suitable for the use of this particular nanosystem as a delivery vehicle and encapsulation of the KT5720 inhibitor.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

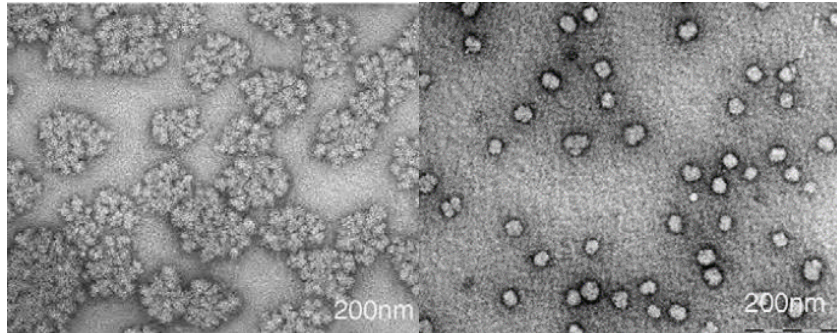
1.1 Μεταβολισμός γλυκογόνου

1.1.1 Γλυκογόνο

Το γλυκογόνο, συνιστά την αποθηκευτική μορφή γλυκόζης στα κύτταρα, και είναι μια ζωτικής σημασίας ένωση για τα αποθέματα ενέργειας και την ομοιόσταση της γλυκόζης. Ανακαλύφθηκε στο ήπαρ το 1857 από τον Claude Bernard. Ο γενικός μηχανισμός της σύνθεσης και αποικοδόμησης του γλυκογόνου, είναι ο ίδιος σε όλους τους ιστούς, σε αντίθεση με την ρύθμιση αυτού, η οποία παρουσιάζει διακριτές διαφορές (Zois & Harris, 2016).

Πρόκειται για ένα διακλαδισμένο πολυμερές καταλοίπων γλυκόζης, το οποίο σχηματίζει κοκκία στα κυτοσόλια διαφορετικών κυττάρων κυρίως ήπατος και σκελετικών μυών και παρέχει γλυκόζη στην κυκλοφορία του αίματος, σε περιόδους νηστείας, και στα μυϊκά κύτταρα, κατά την συστολή των μυών. Ακόμη, το γλυκογόνο έχει ταυτοποιηθεί και σε άλλους ιστούς, όπως στον εγκέφαλο, την καρδιά, τους νεφρούς και τα ερυθροκύτταρα, με άγνωστη, ως επί το πλείστον λειτουργία. (Adeva-Andany et al., 2016; Litwack, 2018)

Ένα μόριο γλυκογόνου αποτελείται μέχρι και 55.000 κατάλοιπα γλυκόζης, με την διάμετρο του στους σκελετικούς μύες να εκτιμάται σε 10-44 nm, ενώ στο ήπαρ 110-290 nm. Μεμονωμένα μόρια γλυκογόνου, έχουν πολύ μικρό μέγεθος ώστε να είναι ορατά με συμβατικό οπτικό μικροσκόπιο. Ωστόσο, είναι αρκετά μεγάλα για να είναι ανιχνεύσιμα με μεθόδους ηλεκτρονιακής μικροσκοπίας, και έχουν περιγραφεί ως β-σωματίδια που ομοιάζουν με ρόδο στους μύες, και μεγαλύτερα α-σωματίδια στο ήπαρ. Τα τελευταία, φαίνεται να αποτελούν προϊόν αθροίσματος πολλών α-σωματιδίων, με άγνωστη μέχρι τώρα χημική βάση για την παραπάνω συσσωμάτωση. (Roach et al., 2012)



Εικόνα 1: Ηλεκτρονική μικροσκοπία γλυκογόνου ήπατος ποντικού (β -σωματίδια ~ 200 nm) και γλυκογόνου σκελετικών μυών ανθρώπου (α -σωματίδια < 50 nm) (Ryu et al., 2009)

Η γλυκόζη μετατρέπεται σε γλυκογόνο, και αντίστροφα με τις διαδικασίες της σύνθεσης και αποικοδόμησης, μέσω πολλών σταδίων στα μονοπάτια μεταβολισμού του γλυκογόνου, ως εκ τούτου αντιλαμβανόμαστε ότι τυχόν μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν ξεχωριστά ένζυμα στα παραπάνω μονοπάτια, οδηγούν σε πληθώρα παθολογικών καταστάσεων για τον οργανισμό. (Kanungo et al., 2018)

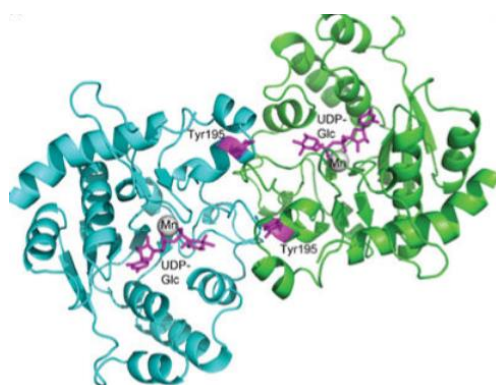
1.1.2 Σύνθεση Γλυκογόνου

Το πρώτο βήμα για την σύνθεση του γλυκογόνου, συνιστά η πρόσληψη της γλυκόζης από την κυκλοφορία του αίματος, στο εσωτερικό των κυττάρων των ιστών με την βοήθεια ειδικών μεταφορέων GLUTs (glucose transporters), μέσω διευκολυνόμενης διάχυσης. Ακολούθως, η ελεύθερη γλυκόζη που έχει μόλις εισέλθει εντός του κυττάρου, υπόκειται σε φωσφορυλίωση προς σχηματισμό 6-φωσφορικής γλυκόζης, από ένζυμα που ανήκουν στην οικογένεια των εξοκινασών, και ουσιαστικά δια αυτού του τρόπου, διασφαλίζουν την παραμονή του προϊόντος, στο εσωτερικό του κυττάρου. (Adeva-Andany et al., 2016; Litwack, 2018)

Ένα από τα πιο κομβικά βήματα, κατά την σύνθεση του γλυκογόνου, αποτελεί ο σχηματισμός της UDP-γλυκόζης, καθώς συνιστά τον άμεσο δότη καταλοίπων γλυκόζης για την εκκίνηση και επιμήκυνση του πολυμερούς του γλυκογόνου. Τα σάκχαρα, που εμπριέχουν διφωσφορικά νουκλεοσίδια, χρησιμοποιούνται ευρέως ως ενδιάμεσα σε αντιδράσεις συμπύκνωσης υδατανθράκων, καθώς ο υψηλής ενέργειας δεσμός μεταξύ του σακχάρου και του διφωσφορικού νουκλεοσιδίου, παρέχει την απαραίτητη ενέργεια για την σύνδεση του νέου σακχάρου σε μη-αναγωγικό άκρο μιας επιμηκνόμενης αλυσίδας πολυσακχαριτών (Bhagavan & Ha, 2015). Προηγείται ωστόσο, ο ισομερισμός της 6-φωσφορικής γλυκόζης σε 1-φωσφορική γλυκόζη, από ένζυμα της οικογένειας των φωσφογλυκομουτασών (PGM), και στην συνέχεια η πυροφωσφορυλάση της UDP-

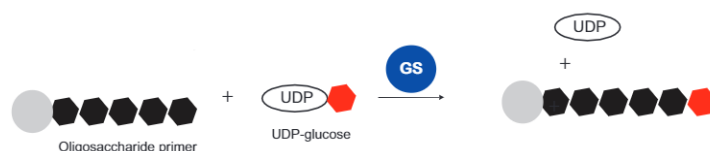
γλυκόζης (UGP), καταλύει τον αντίστροφο ουσιαστικά σχηματισμό της UDP-γλυκόζης και πυροφωσφορικού, από τριφωσφορική ουριδίνη (UTP), και 1-φωσφορική γλυκόζη, παρουσία Mg^{2+} . (Adeva-Andany et al., 2016)

Κατόπιν σχηματισμού της UDP-γλυκόζης, η γλυκογονίνη, μια γλυκοζυλοτρανσφεράση που εντοπίζεται στο κέντρο του γλυκογόνου, εκκινεί ουσιαστικά την διαδικασία σύνθεσης του γλυκογόνου. Ρόλος της γλυκογονίνης, συνιστά ο σχηματισμός ενός αρχικού γραμμικού ολιγομερούς 10-20 καταλοίπων γλυκόζης, που θα αποτελέσει την βάση για την συνέχεια της σύνθεσης του γλυκογόνου από την συνδυαστική δράση της συνθάσης του γλυκογόνου και του ενζύμου σχηματισμού διακλαδώσεων, καταλύοντας τον σχηματισμό α -1,4 γλυκοζιτικών δεσμών.



Εικόνα 2: Ενεργά κέντρα διμερούς γλυκογονίνης. Με μωβ χρώμα, ενδεικτικό για την θέση των ενεργών κέντρων, απεικονίζονται κατάλοιπα τυροσίνης (Tyr^{195}), και UDP-γλυκόζη (Roach et al., 2012)

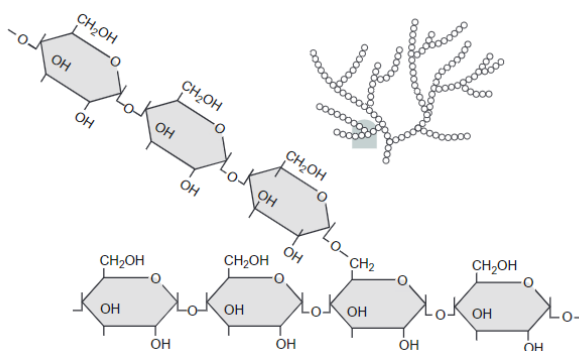
Με την επίτευξη σχηματισμού του ολιγομερούς, η συνθάση του γλυκογόνου, ένζυμο που και αυτό ανήκει στην οικογένεια των γλυκοζυλοτρανσφερασών, ενσωματώνει γλυκοζυλο-μονάδες από την UDP-γλυκόζη, μέσω α -1,4 γλυκοζιτικών δεσμών, που έχουν ως απότοκο την απελευθέρωση UDP. Ειδικότερα, η σύνδεση, πραγματοποιείται μεταξύ του άνθρακα-1 (C-1) της γλυκόζης-δότη, και του άνθρακα-4 (C-4), της επιμηκνόμενης αλυσίδας γλυκογόνου.



Εικόνα 3: Επιμήκυνση αλυσίδας γλυκογόνου από την συνθάση του γλυκογόνου (Ellingwood & Cheng, 2018)

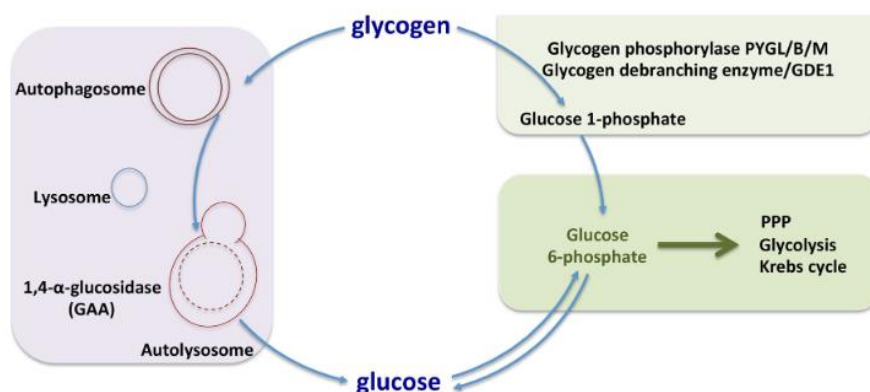
Καθώς, οι λειτουργίες των αποθεμάτων του γλυκογόνου διαφέρουν ανάλογα με τον ιστό στον οποίον αποθηκεύονται, διαφέρουν και οι μηχανισμοί ρύθμισης της συνθάσης

του γλυκογόνου στο ήπαρ και στους μύες. Οι διεργασίες της φωσφορυλίωσης και απο-φωσφορυλίωσης, παίζουν καταλυτικό ρόλο στην ενεργότητα του ενζύμου, με την φωσφορυλίωση, που πραγματοποιείται από κάποια κινάση (π.χ AMPK) να καθιστά ανενεργό το ένζυμο, σε αντίθεση με την δράση πρωτεϊνικής φωσφατάσης-1 (PP1), που ενεργοποιεί την συνθάση του γλυκογόνου από-φωσφορυλιώνοντας την. (Nielsen & Richter, 2003). Τελικό στάδιο της σύνθεσης του γλυκογόνου, αποτελεί η διακλάδωσή του η οποία πραγματοποιείται από το ένζυμο σχηματισμού διακλαδώσεων (GBE), που καταλύει την μεταφορά μικρής αλυσίδας μήκους κατ' ελάχιστον 6 καταλοίπων γλυκόζης, από μια υπό επιμήκυνση εξωτερική αλυσίδα, στην ίδια ή σε γειτνιάζουσα αλυσίδα γλυκογόνου, μέσω σχηματισμού α -1,6 δεσμών. Αυτές οι συνδέσεις, είναι που δημιουργούν νέα μη-αναγωγικά άκρα, και αποτελούν το σημείο εκείνο όπου, εκκινεί η αφαίρεση καταλοίπων γλυκόζης κατά την αποικοδόμηση του γλυκογόνου. (Adeva-Andany et al., 2016; Bhagavan & Ha, 2015)



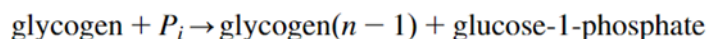
Εικόνα 4: Διακλάδωση γραμμικής αλυσίδας καταλοίπων γλυκόζης. Μεγέθυνση της δομής που απεικονίζεται στο πάνω δεξιά τμήμα της εικόνας (Litwack, 2018)

1.1.3 Αποικοδόμηση Γλυκογόνου



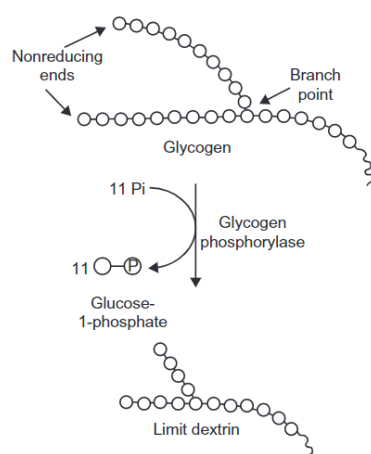
Εικόνα 5: Μονοπάτια αποικοδόμησης γλυκογόνου. Στα δεξιά αποτυπώνεται η κυτταροπλασματική οδός, ενώ στα αριστερά η λυσοσωμική (Zois & Harris, 2016)

Η αποικοδόμηση του γλυκογόνου, πραγματοποιείται μέσω δυο διακριτών μονοπατιών, το ένα στο κυτταρόπλασμα (γλυκογονόλυση), και το δεύτερο στα λυσοσώματα. Η γλυκογονόλυση, συνιστά αποτέλεσμα συνδυαστικής δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GP) και του ενζύμου αποδιακλάδωσης (AGL). Ειδικότερα, η φωσφορυλάση του γλυκογόνου σύμφωνα με την αντίδραση:



απελευθερώνει περίπου 11-12 κατάλοιπα γλυκόζης με την μορφή της 1-φωσφορικής γλυκόζης, από την γραμμική αλυσίδα του γλυκογόνου (φωσφορόλυση), σπάζοντας τις α -1,4 γλυκοζιτικές συνδέσεις (Litwack, 2018).

Κατά την αντίδραση αυτή, ένα μόριο ανόργανου φωσφόρου προσβάλλει την πλευρά του C1 του α -1,4 γλυκοζιτικού δεσμού, αφήνοντας την υδροξυλ-ομάδα του C4 που παραμένει ακόμη προσδεμένος στο γλυκογόνο. Η ενέργεια που υπάρχει αποθηκευμένη στον α -1,4 γλυκοζιτικό δεσμό, κατά την διάρκεια της αντίδρασης συμπύκνωσης στην σύνθεση του γλυκογόνου, επαρκεί για τον σχηματισμό του δεσμού γλυκόζης-φωσφορικού, χωρίς την χρήση ATP (Adeva-Andany et al., 2016; Bhagavan & Ha, 2015; Ellingwood & Cheng, 2018).



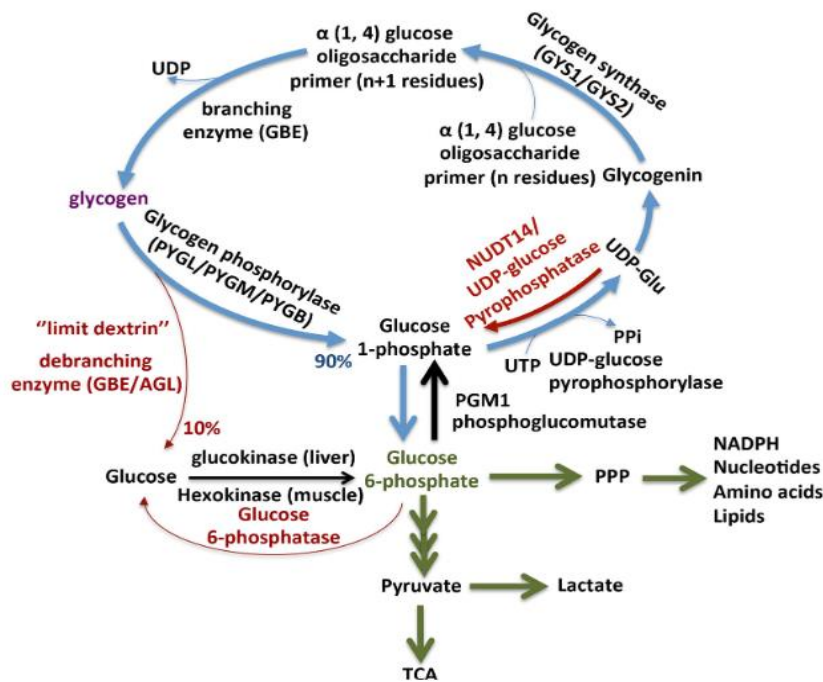
Εικόνα 6: Επισκόπηση δράσης φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (Litwack, 2018)

Με το πέρας, της απελευθέρωσης των εξωτερικών καταλοίπων 1-φωσφορικής γλυκόζης, το ένζυμο αποδιακλάδωσης, σε απόσταση 4 γλυκοζυλο-μονάδων, από τα σημεία διακλάδωσης, υδρολύει τους α -1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς, επιτρέποντας την πρόσβαση στην φωσφορυλάση του γλυκογόνου να δράσει, απελευθερώνοντας γλυκόζη, σύμφωνα με τον μηχανισμό που περιγράφεται παραπάνω.

Στην συνέχεια, η 1-φωσφορική γλυκόζη που έχει απελευθερωθεί, υπόκειται σε ισομερισμό από φωσφογλυκομουτάσες, προϊόν του οποίου αποτελεί η 6-φωσφορική γλυκόζη, η οποία παρουσία της 6-φωσφατάσης της γλυκόζης μπορεί να μετατραπεί σε ελεύθερη γλυκόζη, ή να ακολουθήσει μια πληθώρα μεταβολικών μονοπατιών, όπως η γλυκόλυση, στο τέλος της οποίας θα έχει μετατραπεί σε πυροσταφυλικό οξύ, ενδιαμέση ένωση καίρια για μονοπάτια όπως ο κύκλος του Krebs και η σύνθεση λιπαρών οξέων. Υπό ορισμένες συνθήκες, οι μύες μπορούν να μετατρέψουν το πυροσταφυλικό σε γαλακτικό (κατά την αναερόβια γλυκόλυση) ή σε αλανίνη (κατά την αποικοδόμηση των σκελετικών μυών), αυτές οι ενώσεις με την σειρά τους, μεταφέρονται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος στο ήπαρ, όπου μετατρέπονται ξανά σε πυροσταφυλικό μέσω των κύκλων Cori και αλανίνης αντίστοιχα, ενώ μέσω της γλυκονεογένεσης το πυροσταφυλικό μπορεί ξανά να μετατραπεί σε γλυκόζη. Για την έξοδο, της ελεύθερης πλέον γλυκόζης, από το ήπαρ στην κυκλοφορία του αίματος προκειμένου να αξιοποιηθεί από άλλους ιστούς, είναι απαραίτητη η δράση του μεταφορέα GLUT2. Το φαινόμενο αυτό, συμβαίνει κατά τις περιόδους, όπου ο οργανισμός βρίσκεται σε νηστεία, ή μεταγευματικά, όπου η συγκέντρωση της γλυκόζης, είναι υψηλότερη στο ήπαρ από ό,τι στο αίμα. (Ellingwood & Cheng, 2018; Litwack, 2018)

Αναφορικά με το δεύτερο μεταβολικό μονοπάτι αποικοδόμησης του γλυκογόνου, στα λυσοσώματα, είναι απαραίτητη η παρουσία της όξινης α-γλυκοσιδάσης (GAA), η οποία συγκροτείται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και μεταφέρεται στα λυσοσώματα μέσω του συμπλέγματος Golgi, για να καταλύσει την αποικοδόμηση του λυσοσωμικού γλυκογόνου, με αυτοφαγία. Αξίζει να σημειωθεί ότι ενώ έχει δειχθεί και τα δυο μονοπάτια είναι απαραίτητα για την μέγιστη αποικοδόμηση του γλυκογόνου (Zirin et al., 2013), δεν έχει πλήρως αποκρυσταλλωθεί η σημασία ταυτόχρονης ύπαρξής τους. Κλείνοντας, ενώ η μελέτη της αποικοδόμησης του λυσοσωμικού γλυκογόνου, δεν βρίσκεται ακόμη σε προχωρημένα επίπεδα, με την ρύθμιση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, να συγκεντρώνει το μεγαλύτερο ερευνητικό ενδιαφέρον, έχει υποστηριχθεί ότι η αυτοφαγία, παίζει καταλυτικό ρόλο στην επιβίωση κατά την νεογνική ηλικία. (Ellingwood & Cheng, 2018)

Επισκόπηση Μεταβολισμού Γλυκογόνου

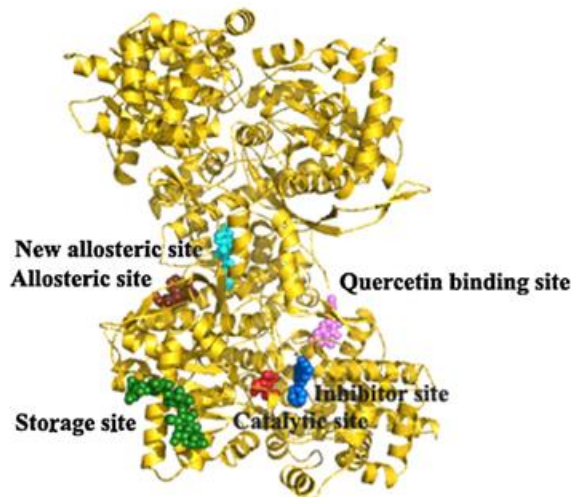


Εικόνα 7: Βασικά μονοπάτια σύνθεσης και αποικοδόμησης γλυκογόνου, με τα μεταβολικά μονοπάτια τα οποία επηρεάζουν (Zois & Harris, 2016)

1.2 Φωσφορυλάση του Γλυκογόνου (GP)

Η Φωσφορυλάση του Γλυκογόνου, διαθέτει μορφή διμερούς, με την φωσφορική πυριδοξάλη (PLP) να εντοπίζεται στο κέντρο κάθε μονομερούς, ομοιοπολικά συνδεδεμένη με ένα κατάλοιπο λυσίνης. Ρυθμίζεται αλλοστερικά από πληθώρα τελεστών, και από αντιστρεπτή ομοιοπολική τροποποίηση μέσω φωσφορυλίωσης της σερίνης-14 (ser-14) που καταλύεται από την PhK, με την φωσφορυλιωμένη και την από-φωσφορυλιωμένη μορφή του ενζύμου να ταξινομείται ως GP_a και GP_b αντίστοιχα.

Η φωσφορυλάση, βρίσκεται σε καθεστώς ισορροπίας μεταξύ της «χαλαρής» ενεργής μορφής, R (Relaxed) και της «τεταμένης» ανενεργής μορφής T (Tense). Στην μορφή R, παρατηρείται μεγαλύτερη συγγένεια για υποστρώματα και αλλοστερικούς τροποποιητές, ενώ στην μορφή T, μικρή συγγένεια για υποστρώματα, γλυκογόνο και φωσφορικά. (Agius, 2015)



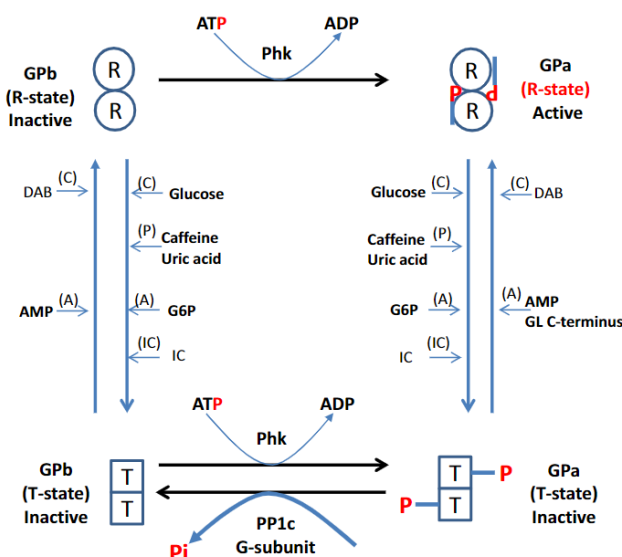
Εικόνα 8: Διμερές φωσφορυλάσης γλυκογόνου με τα αντίστοιχα κέντρα πρόσδεσης. (Hayes et al., 2014)

Η φωσφορυλίωση της σερίνης-14 και η πρόσδεση του AMP στο αλλοστερικό κέντρο ενεργοποίησης μετατοπίζει την ισορροπία προς την R μορφή, ενώ στο κέντρο αυτό, που εντοπίζεται παρακείμενα του κέντρου φωσφορυλίωσης, προσδένονται και διάφοροι φωσφορολυτικοί προσδέτες, όπως η 6-φωσφορική γλυκόζη και το ATP, οι οποίοι ευνοούν την T μορφή. Στο καταλυτικό κέντρο, προσδέεται 1-φωσφορική γλυκόζη και φωσφορικά, που ευνοούν την R διαμόρφωση του ενζύμου, σε αντίθεση με την πρόσδεση της γλυκόζης στο κέντρο αυτό, η οποία σταθεροποιεί την T διαμόρφωση. Η πρόσδεση του γλυκογόνου, είτε στο αλλοστερικό είτε στο κέντρο αποθήκευσης γλυκογόνου ευνοεί την R κατάσταση. Στο αλλοστερικό κέντρο αναστολέων πουρίνης προσδέεται η *καφεΐνη*, καθώς και άλλα ανάλογα πουρινών, συμπεριλαμβανομένου και του AMP, που σε συνδυασμό με την προαναφερθείσα πρόσδεση της γλυκόζης στο καταλυτικό κέντρο σταθεροποιούν την T μορφή. (Agius, 2015)

Επιπρόσθετα, ορμόνες μπορούν να ρυθμίζουν την μετατροπή του ενζύμου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από την ανενεργή στην ενεργή της μορφή. Ειδικότερα, ορμόνες οι οποίες αυξάνουν τις τιμές cAMP, όπως η γλυκαγόνη ή τιμές του ασβεστίου, όπως η βασοπρεσίνη, προκαλούν ταχύτατη μετατροπή της GPb σε GPa. Αξιοσημείωτο δε είναι το γεγονός πως η επίδραση της γλυκαγόνης, αλλά όχι των εξαρτώμενων από ασβέστιο ορμονών, έχει συσχετισθεί με ενεργοποίηση της Phk. (Adeva-Andany et al., 2016; Agius, 2015)

Αντίστροφα, η απενεργοποίηση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου μέσω αποφωσφορυλίωσης της από την GPa προς GPb, καταλύεται από την πρωτεϊνική

φωσφατάση (PP1), σε συνεργασία με μια πρωτεΐνη στόχευσης γλυκογόνου (G-υπομονάδα). Τόσο η GP_a, όσο και η φωσφορυλιωμένη συνθάση του γλυκογόνου (GS), αποτελούν υποστρώματα για την PP1, σε συνδυασμό με τη υπομονάδα G, με την διαφορά ότι η από-φωσφορυλίωση της συνθάσης την καθιστά ενεργή, έτοιμη να καταλύσει τον σχηματισμό α-1,4 γλυκοζιτικών δεσμών.



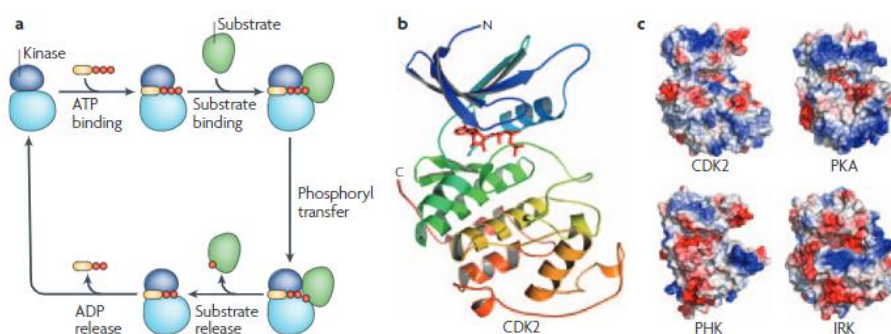
Εικόνα 9: Επισκόπηση ρύθμισης της φωσφορυλάσης μέσω φωσφορυλίωσης και αλλοστερικών αλληλεπιδράσεων. Η Phk καταλύει την μετατροπή της GP_b σε GP_a φωσφορυλιώνοντας ένα κατάλοιπο σερίνης στο αμινοτελικό άκρο κάθε υπομονάδας του διμερούς. Αλλοστερικοί προσδέτες και αναστολείς σταθεροποιούν είτε την χαλαρή (R) ,είτε την τεταμένη (T) διαμόρφωση του ενζύμου. Στην T διαμόρφωση, το φωσφορυλιωμένο πλέον κατάλοιπο σερίνης είναι προσβάσιμο, στην PP1, η οποία σε συνδυασμό με την δράση της G-υπομονάδας, αποφωσφορυλιώνουν το αμινοξύ, απενεργοποιώντας τελικά το ένζυμο. (Agius, 2015)

1.3 Κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK)

1.3.1 Πρωτεϊνικές κινάσες

Μια μεγάλη ποικιλία φυσιολογικών κυτταρικών διεργασιών, ρυθμίζονται μέσω αντιστρεπτής φωσφορυλίωσης, πρωτεϊνών-στόχων, μέσω της δράσης κινασών και φωσφατασών, ενζύμων που καταλύουν την μεταφορά φωσφορικών ομάδων μεταξύ των υποστρωμάτων τους. Τυχόν δυσλειτουργία στην δράση των παραπάνω ενζύμων, επηρεάζει την μεταγωγή σήματος και ως εκ τούτου, οδηγεί σε πληθώρα παθολογικών καταστάσεων, όπως ο καρκίνος, διάφορες νευροεκφυλιστικές νόσοι, και ο διαβήτης. (Begum et al., 2015; Cheng et al., 2011)

Μια πρωτεϊνική κινάση δρα καταλύοντας την μεταφορά μιας γ-φωσφορικής ομάδας από ένα τριφωσφορικό νουκλεοσίδιο – δότη (ATP ή GTP), στην υδροξύλοομάδα της πλευρικής αλυσίδας κάποιας σερίνης, θρεονίνης ή τυροσίνης της πρωτεΐνης-υποστρώματος, σε αντίθεση με μια φωσφατάση η οποία μεταφέρει μια φωσφορική ομάδα, από μια φωσφο-πρωτεΐνη σε ένα μόριο νερού. Παρότι, και οι δυο ομάδες ενζύμων, υπάγονται στις φωσφοτρανσφεράσες, καταλύουν αντιδράσεις με αντίθετα αποτελέσματα, τόσο στην δομή όσο και στην λειτουργία πολλών πρωτεϊνών σε προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά κύτταρα. Από όλες τις διαφορετικές κατηγορίες μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων η φωσφορυλίωση και η από-φωσφορυλίωση, αποτελούν τους επικρατέστερους ρυθμίζοντας κυτταρικές διεργασίες που εκτείνονται από τον κυτταρικό θάνατο μέχρι την ρύθμιση του μεταβολισμού. Η αξία μάλιστα της φωσφορυλίωσης, αναδεικνύεται από το γεγονός ότι παρόλο που μόλις το 2% του γονιδιώματος αντιστοιχεί σε γονίδια κινασών, φωσφορυλιώνουν περισσότερο από το 30% των συνολικών πρωτεϊνών του κυττάρου.(Cheng et al., 2011; Ubersax & Ferrell, 2007)



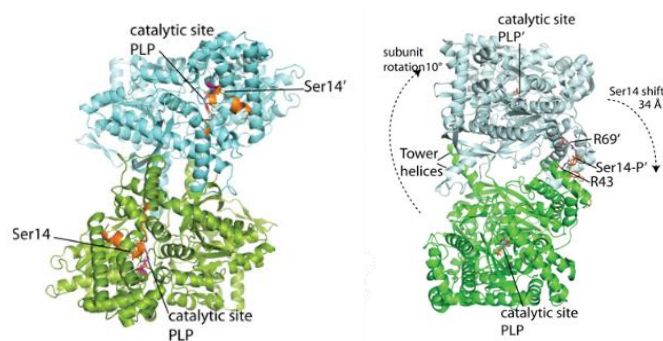
Εικόνα 10: Μηχανισμός δράσης & αναδίπλωση κινασών. α) Ο βασικός μηχανισμός φωσφορυλίωσης υποστρωμάτων παραμένει ίδιος, με την πρόσδεση του ATP και την επακόλουθη πρόσδεση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο της. Με την επίτευξη αυτών των δυο βημάτων, η γ-φωσφορική ομάδα μεταφέρεται σε ένα κατάλοιπο σερίνης, θρεονίνης ή τυροσίνης, και έτσι σηματοδοτείται η απελευθέρωση του υποστρώματος, και το πέρας της αντίδρασης με την απελευθέρωση του ADP από το ενεργό κέντρο της κινάσης. Η σειρά των βημάτων του παραπάνω μηχανισμού είναι διαφορετική από κινάση σε κινάση. β) Ενδεικτική δομή κινασών. Η εικονιζόμενη κινάση (CDK2), όπως και οι περισσότερες παρουσιάζουν παρόμοια αναδίπλωση, που απαρτίζεται από δυο λοβούς, με τον πρώτο να αποτελείται από ένα β-πτυχωτό φύλλο (μπλε), και τον δεύτερο να αποτελείται από α-έλικες (πράσινο, πορτοκαλί, κίτρινο), στον οποίον εντοπίζεται η περιοχή πρόσδεσης του ATP. γ) Ηλεκτροστατικές επιφανειακές απεικονίσεις, με τις διαφορές στην υδροφοβικότητα και το φορτίο τεσσάρων διαφορετικών κινασών, που συνιστούν και αιτία πρόσδεσης σε διαφορετικά πρωτεϊνικά υποστρώματα, παρά τις ομοιότητες στην αναδίπλωση.(Ubersax & Ferrell, 2007)

1.3.2 Ρύθμιση μέσω φωσφορυλίωσης

Η φωσφορυλίωση, ρυθμίζει τις λειτουργίες των πρωτεϊνών με δυο βασικούς τρόπους:

- i. Με αλλαγές στην διαμόρφωση των πρωτεϊνών
- ii. Με παρεμπόδιση ή δημιουργία επιφανειών για πρόσδεση τροποποιητών

Αναφορικά με τις αλλαγές στην διαμόρφωση που επάγονται κατόπιν φωσφορυλίωσης, αυτές εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό, από την δομή της φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης. Η ρύθμιση της ενεργότητας της πρωτεΐνης, γίνεται από την φωσφορική ομάδα, μέσω δημιουργίας ενός πλέγματος δεσμών υδρογόνου, μεταξύ συγκεκριμένων καταλοίπων αμινοξέων. Ως εκ τούτου, το συγκεκριμένο πλέγμα, λόγω της διαφορετικής τρισδιάστατης δομής της φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης, είναι ξεχωριστό για κάθε πρωτεΐνη, με πλέον χαρακτηριστικό παράδειγμα τις αλλαγές στην διαμόρφωση που επάγονται στην φωσφορυλίωση του γλυκογόνου. (Cheng et al., 2011)



Εικόνα 11: GPb & GPa.. Με την φωσφορυλίωση, το κατάλοιπο σερίνης-14 στο αμινοτελικό άκρο της GPb (αριστερά), μετατοπίζεται, στην ενεργή πλέον GPa (δεξιά), κατά περίπου 34 Å, όπου είναι σε θέση να έρθει σε επαφή με δυο κομβικά κατάλοιπα στην διεπιφάνεια των δύο υπομονάδων, της Arg₆₉ στην μια υπομονάδα και της Arg₄₃ στην άλλη. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές οδηγούν σε περαιτέρω σταθερότητα όλων των αλληλεπιδράσεων στην διεπιφάνεια αυτή, και αποτελεί σημαντικό βήμα σε συνδυασμό με αλλοστερικούς μηχανισμούς ρύθμισης για την επίτευξη της πιο ενεργούς μορφής του ενζύμου.. (Johnson, 2009)

Σε ό,τι αφορά στην ρύθμιση της λειτουργίας των πρωτεϊνών με φωσφορυλίωση, χωρίς αλλαγές στην διαμόρφωση τους, χαρακτηριστική είναι η περίπτωση της βακτηριακής ισοκιτρικής αφυδρογονάσης, όπου η φωσφορυλίωση ενός καταλοίπου σερίνης έχει ως απόρροια την παρεμπόδιση πρόσδεσης του υποστρώματος, απενεργοποιώντας το ένζυμο πλήρως. Ομοίως, ως αποτέλεσμα της φωσφορυλίωσης, δύναται να προκύψει κάποια νέα επιφάνεια πρόσδεσης, χωρίς περαιτέρω αλλαγές στην διαμόρφωση της πρωτεΐνης, όπως συμβαίνει με την φωσφορυλίωση τυροσινών αρκετών κυτταρικών

πρωτεϊνών, δημιουργώντας κέντρα πρόσδεσης για διάφορες SH2 και PTB επικράτειες. (Cheng et al., 2011)

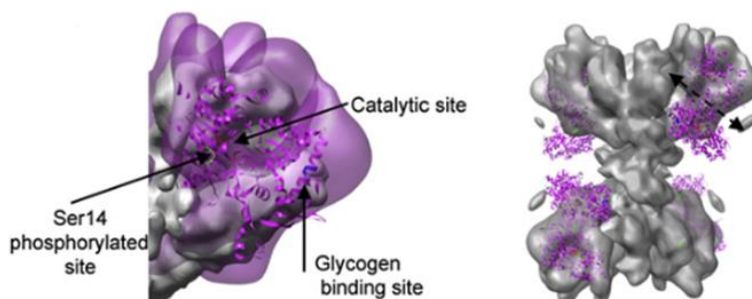
1.3.3 Κινάση της Φωσφορυλάσης του Γλυκογόνου

Η PhK, είναι μια εκ των μεγαλύτερων και πλέον πολύπλοκων πρωτεϊνικών κινασών με μέγεθος 1.3 MDa και δεκαεξαμερική στοιχειομετρία, αποτελούμενη από 4 υπομονάδες ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$)₄, με την γ να αποτελεί την καταλυτική υπομονάδα του ενζύμου, ενώ τις α, β και δ να διαδραματίζουν ρυθμιστικό ρόλο, ενώ έχει δειχθεί πως μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν την PhK, επάγουν πληθώρα παθήσεων όπως διαταραχές αποθήκευσης του γλυκογόνου, ενώ υπερενεργοποίηση του ενζύμου, έχει συσχετισθεί με περιστατικά ψωρίασης, αγγειογένεσης και φυσικά δυσχέρεια στην κλινική εικόνα ασθενών διαβήτη τύπου 2 (T2D). (Begum et al., 2015; Camus et al., 2012)

Η PhK των σκελετικών μυών του κουνελιού, ήταν η πρώτη που ταυτοποιήθηκε από τους από τους Fischer και Krebs, το 1956. Συνιστά κομβικό ένζυμο για τον έλεγχο της γλυκογενόλυσης, καθώς ενσωματώνει σήματα μονοπάτια, όπως :

- Ορμονικά (Αδρεναλίνη)
- Απόκριση παρουσία Ca^{2+}
- Λοιπά μεταβολικά (π.χ επίπεδα ADP)

προκειμένου, να ξεκινήσει η ραγδαία κινητοποίηση και αποικοδόμηση των αποθεμάτων γλυκογόνου, φωσφορυλιώνοντας ένα κατάλοιπο σερίνης-14 της ανενεργούς φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GPb), μετατρέποντάς την έτσι στην ενεργή μορφή της (GPa). (Graves et al., 1999; Vénien-Bryan et al., 2009)



Εικόνα 12: 3D cryo-EM απεικόνιση (αριστερά) σε ανάλυση 9.9 Å της PhK (γκρι), με την διεπιφάνεια αλληλεπίδρασης PhK/GPb (μωβ), την θέση φωσφρυλιώσεως της Ser14 (πράσινο), την θέση πρόσδεσης του γλυκογόνου (μπλε) και το καταλυτικό κέντρο (κόκκινο). Πιθανά σημεία πρόσδεσης (δεξιά) διμερών GPb (μωβ) στην PhK. (Vénien-Bryan et al., 2009)

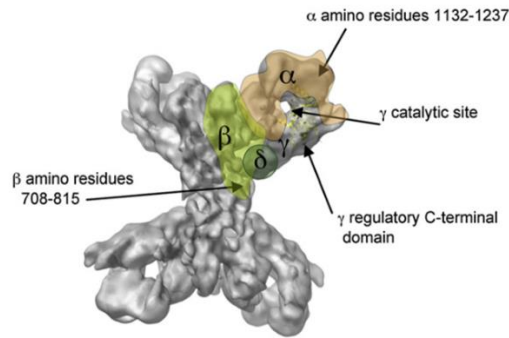
1.3.4 Υπομονάδες της PhK

Οι ρυθμιστικές **υπομονάδες α και β** είναι ομόλογες μεγάλου μοριακού βάρους πρωτεΐνες, που αθροιστικά συνιστούν το 81% της μάζας του ολοενζύμου της PhK, και μαζί δρουν ανασταλτικά ως προς την ενεργότητα της υπομονάδας γ. Η α έχει μοριακό βάρος 138 kDa και αποτελείται από 1237 κατάλοιπα αμινοξέων, ενώ η β έχει μετρηθεί στα 125 kDa, με 1093 κατάλοιπα. Η α υπομονάδα (PHKA) της PhK, έχει 2 ισομορφές, την μυϊκή PHKA1 και την ηπατική PHKA2, που κωδικοποιούνται από τα αντίστοιχα γονίδια, ενώ η β υπομονάδα (PHKB) κωδικοποιείται από ένα γονίδιο, με τα ιστοειδικά μετάγραφα για τους μύες, το ήπαρ, και τον εγκέφαλο να προκύπτουν κατόπιν εναλλακτικού ματίσματος. Στην α υπομονάδα εντοπίζονται τουλάχιστον 7 θέσεις φωσφορυλίωσης, που αποτελούνται αποκλειστικά από κατάλοιπα σερίνης, σε μια μικρή περιοχή της επικράτειας (από το κατάλοιπο 972-1030), που καλείται και επικράτεια πολύ-φωσφορυλίωσης. Αξίζει να σημειωθεί, ότι εντός της επικράτειας αυτής, ιδιαίτερο ρόλο στη ρύθμιση της PhK, φαίνεται να διαδραματίζει ένα κατάλοιπο σερίνης-1018 (Ser1018), που *in vivo* φωσφορυλιώνεται από την PKA, ένζυμο που όπως θα δειχθεί στην συνέχεια παίζει καταλυτικό ρόλο στην ρύθμιση της PhK, ενώ *in vitro*, το εν λόγω κατάλοιπο δύναται να αυτό-φωσφορυλιωθεί. Ομοίως και η β υπομονάδα της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, περικλείει εντός της επικράτειας της πολυάριθμες θέσεις φωσφορυλίωσης, εκ των οποίων τρία κατάλοιπα σερίνης (Ser11, Ser26, και Ser700), *in vitro* αυτό-φωσφορυλιώνονται, ενώ η Ser26 φωσφορυλιώνεται από την PKA. Αυτή η εξαρτώμενη από την PKA φωσφορυλίωση που παρατηρείται στις υπομονάδες α και β, οδηγεί στην αναστολή της παρεμπόδισης της δραστηριότητας φωσφοτρανσφεράσης της γ υπομονάδας, και ως εκ τούτου σε αυξημένη ενεργότητα της καταλυτικής δράσης του ενζύμου. (Adeva-Andany et al., 2016; Agius, 2015; Brushia & Walsh, 1999; Vénien-Bryan et al., 2009)

Η **γ υπομονάδα** (44.7 kDa, 386 κατάλοιπα), αποτελείται από την αμινοτελική (N-τελική) καταλυτική περιοχή (δράση κινάσης) και την καρβοξυτελική (C-τελική) περιοχή πρόσδεσης της καλμοδουλίνης, ενώ όπως και α διαθέτει δυο ισομορφές για μύες (PHKG1) και ήπαρ (PHKG2), Η περιοχή με δράση κινάσης (κατάλοιπα 1-298) που εντοπίζεται στο αμινοτελικό τμήμα της υπομονάδας, είναι διαρκώς ενεργή χωρίς να απαιτεί ενεργοποίηση μέσω φωσφορυλίωσης ή μέσω δράσης τροποποιητών. Έτσι μπορούμε να πούμε πως ο ρολος των ρυθμιστικών υπομονάδων α,β, και δ, είναι να περιορίζουν την ενεργότητα της περιοχής της κινάσης, μέχρι να δράσουν σήματα που

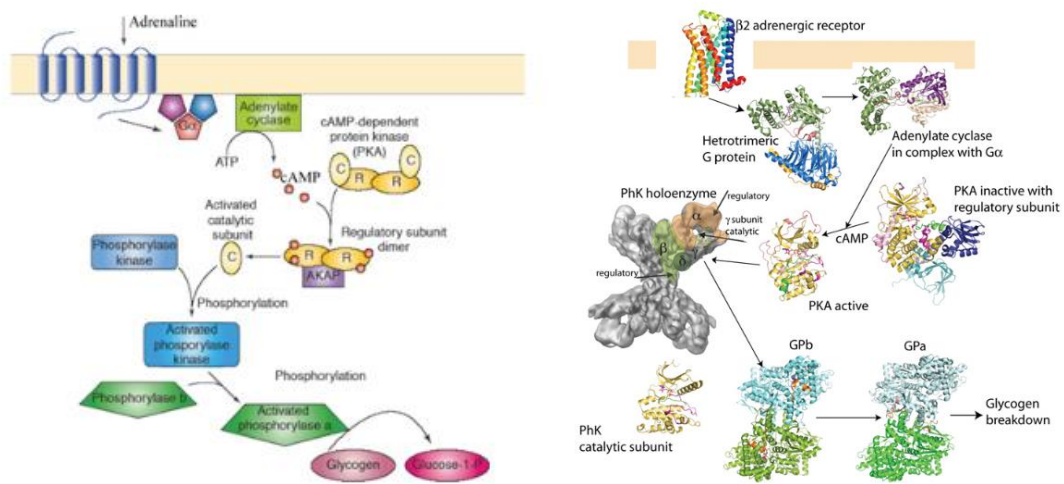
αναστέλλουν την παρεμπόδιση των παραπάνω υπομονάδων. Αυτή η περιοχή παρουσιάζει εκτεταμένη αμινοξική ομολογία με καταλυτικές υπομονάδες άλλων πρωτεϊνικών κινασών, σε αντίθεση με την καρβοξυτελική περιοχή της υπομονάδας, που συνιστά και το 1/3 του μεγέθους της, (κατάλοιπα 299-386), που δεν εμφανίζει ιδιαίτερη ομολογία με την αλληλουχία αμινοξέων άλλων κινασών, υποδηλώνοντας έτσι μια εξειδικευμένη λειτουργία του τμήματος αυτού για την PhK. Η C-τελική περιοχή, περιέχει δυο περιοχές πρόσδεσης της καλμοδουλίνης (κατάλοιπα 301-327 και 332-371) οι οποίες αλληλεπιδρούν με την δ υπομονάδα της PhK, και πιθανώς εξαιτίας αυτής της αλληλεπίδρασης η καρβοξυτελική περιοχή της υπομονάδας παρουσιάζει αυτό-ανασταλτική δράση. Οι περιοχές πρόσδεσης με την δ υπομονάδα, έχουν την ιδιαιτερότητα να αποτελούνται από εφαιπτόμενα ζεύγη που απαρτίζονται από περίπου 70 κατάλοιπα αμινοξέων, με την δυνατότητα ταυτόχρονης αλληλεπίδρασης με μια δ υπομονάδα, σε αντίθεση με τα περισσότερα ένζυμα στόχευσης καλμοδουλίνης στα οποία, συνήθως υπάρχει μια μόνο περιοχή αλληλεπίδρασης με την καλμοδουλίνη, και έχουν μέγεθος μικρότερο των 30 αμινοξέων. Ως εκ τούτου, η παρουσία των δυο αυτών μεγάλων υπομονάδων, ωθεί την γ υπομονάδα σε αλληλεπίδραση με την δ, ακόμη και όταν η συγκέντρωση Ca^{2+} είναι σε πολύ χαμηλά επίπεδα. (Adeva-Andany et al., 2016; Agius, 2015; Brushia & Walsh, 1999; Skamnaki et al., 1999; Vénien-Bryan et al., 2009)

Η δ υπομονάδα, (16.5 kDa, 148 κατάλοιπα) εκφράζεται καθολικά, και κωδικοποιείται από τρία ανεξάρτητα γονίδια τα CALM1, CALM2, και CALM3, και σε αντίθεση με τις τρεις παραπάνω υπομονάδες (α,β,γ), έχει δειχθεί πως μεταλλάξεις στο γονίδιο της υπομονάδας καλμοδουλίνης, δεν σχετίζονται με ανεπάρκεια της PhK. Έχει δομή παρόμοια με την καλμοδουλίνη, μια εξαρτώμενη από τις συγκεντρώσεις Ca^{2+} ρυθμιστική πρωτεΐνη, με σχήμα χαρακτηριστικό σχήμα αλτήρα, και μια κεντρική α-έλικα που συνδέει δυο περιοχές πρόσδεσης Ca^{2+} . Η δ υπομονάδα σχετίζεται με την Ca^{2+} -εξαρτώμενη ενεργότητα της PhK, και σε αντίθεση με την καλμοδουλίνη η οποία συνήθως συνδέεται με πρωτεΐνες-στόχους με Ca^{2+} -εξαρτώμενο τρόπο, και εν συνεχεία διαχωρίζεται με την πτώση της συγκέντρωσης Ca^{2+} , παραμένει ακέραια στο ολοένζυμο της PhK, ακόμη σε ακραία πτώση της συγκέντρωσης των Ca^{2+} σε nM επίπεδα. (Adeva-Andany et al., 2016; Agius, 2015; Brushia & Walsh, 1999)



Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση 3DCryo-EM της PhK με τις υπομονάδες (Vénien-Bryan et al., 2009)

1.3.5 Ρύθμιση ενζυμικής δραστηριότητας



Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση (αριστερά), με τις τρισδιάστατες δομές (δεξιά) για κάθε βήμα της PKA-εξαρτώμενης ενεργοποίησης της PhK. Η αδρεναλίνη ενεργοποιεί με την διαμεσολάβηση μιας διαμεμβρανικής GPCR πρωτεΐνης, την G-πρωτεΐνη $G_{\alpha\beta\gamma}$, η οποία ακολούθως επάγει την ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης προς παραγωγή cAMP. Εν συνεχεία, προσδένεται στην ανενεργή PKA, διαχωρίζοντας την από τις ρυθμιστικές ανασταλτικές υπομονάδες της, και αυτή με την σειρά της φωσφορυλιώνει την β υπομονάδα της PhK, καθιστώντας την ενεργή προς μετατροπή της ανενεργούς GPb σε GPa, που συνιστά εκκίνηση για το μονοπάτι αποικοδόμησης του γλυκογόνου. (Johnson, 2009)

Η γ υπομονάδα της PhK, απουσία των υπόλοιπων υπομονάδων που συγκροτούν το ολοένζυμο της κινάσης, παρουσιάζει μεγαλύτερη ενεργότητα φωσφοτρανσφεράσης, ακόμη και όταν το ολοένζυμο βρίσκεται στην μέγιστη ενεργή μορφή του, απόρροια διαφόρων διεργασιών. Έτσι πρέπει να λαμβάνουμε υπόψιν, όταν αναλύουμε την ρύθμιση της ενζυμικής δραστηριότητας της κινάσης, ότι οι ρυθμιστικές υπομονάδες (α, β, δ) δρουν ως αναστολέας την καταλυτικής δράσης της γ , και η ενεργοποίησή της συνιστά συνέπεια της αναστολής της παρεμπόδισης των υπομονάδων αυτών. (Brushia & Walsh, 1999)

Μεταξύ των μηχανισμών ρύθμισης της δραστηριότητας της κινάσης συγκαταλέγονται οι:

- i. Φωσφορυλίωση
- ii. Μεταβολές στο pH
- iii. Μεταβολές στα επίπεδα Ca^{2+}
- iv. ADP-αλλοστερική τροποποίηση

i. Φωσφορυλίωση

Η φωσφορυλίωση που καταλύεται σύμφωνα με το μονοπάτι της εικόνας 14, από την PKA παίζει καθοριστικό ρόλο στην ενεργοποίηση του ενζύμου. Ειδικότερα, έχει δειχθεί ότι *in vivo* η φωσφορυλίωση της β-υπομονάδας, σε αντίθεση με την φωσφορυλίωση της α-υπομονάδας, η οποία έχει επικουρικό ρόλο στην ενεργοποίηση της PhK, οδηγεί άμεσα στην ενεργή κατάσταση της κινάσης. Επίσης, *in vitro* έχουν παρατηρηθεί και περιπτώσεις αυτό-φωσφορυλίωσης, που οδηγούν σε αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας της PhK. Κλείνοντας, αξίζει να σημειωθεί ότι, εφόσον τόσο η α όσο και η β υπομονάδα φωσφορυλιώνονται από την PKA, και από την στιγμή που στο ολοένζυμο, απατώνται 4 υπομονάδες από την κάθε μια, είναι εύκολο να αντιληφθούμε πως υπάρχουν αρκετά φωσφορυλιωμένα ενδιάμεσα, στην cAMP-εξαρτώμενη ενεργοποίηση της PhK, που εμφανίζουν διαφορετικό βαθμό δραστηριότητας. (Brushia & Walsh, 1999; Johnson, 2009)

ii. pH

Η δραστηριότητα φωσφοτρανσφεράσης της PhK, παρουσιάζει μεγάλη εξάρτηση με το pH *in vitro*. Πιο συγκεκριμένα, παρουσία Ca^{2+} , η αύξηση του pH από την τιμή 6.8 στην τιμή 8.2, φαίνεται να οδηγεί σε αύξηση της καταλυτικής δραστηριότητας της PhK, επάγοντας στις υπομονάδες α και β 10-20 αναδιπλώσεις, αναστέλλοντας ως εκ τούτου την παρεμποδιστική τους δράση. Αυτή η επίδραση του pH, οφείλεται στην αποπρωτονίωση καταλοίπων στις μεγάλες αυτές ρυθμιστικές υπομονάδες, που φαίνεται να αντανakλά σε κάποιο βαθμό την διαμόρφωση τους κατόπιν φωσφορυλίωσης από την PKA, καθώς η καταλυτική ενεργότητα τόσο της απομονωμένης γ υπομονάδας όσο και του γ-δ διμερούς φαίνεται να μην επηρεάζεται σε όψιμο βαθμό από τρόπο εξαρτώμενο από το pH. (Brushia & Walsh, 1999; W. Liu et al., 2013; Vénien-Bryan et al., 2009)

iii. Επίδραση ασβεστίου

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως η επίδραση των ιόντων ασβεστίου στην δραστηριότητα της κινάσης, σχετίζεται με την δ υπομονάδα. Στο C-τελικό άκρο της, υπάρχει ένας Ca^{2+} -εξαρτώμενος μοριακός διακόπτης, ο οποίος απουσία Ca^{2+} , ωθεί την επικράτεια να λαμβάνει διαμόρφωση τέτοια, η οποία αποτρέπει στην φωσφορυλάση του γλυκογόνου την πρόσβαση στην καταλυτική θηλιά. Αντίθετα παρουσία Ca^{2+} , η δ υπομονάδα, προσδέεται στο C-τελικό άκρο της γ υπομονάδας και επάγει αλλαγές στην διαμόρφωση της περιοχής δέσμευσης της φωσφορυλάσης, καθιστώντας εφικτή πλέον την πρόσβαση του υποστρώματος στην κινάση, αντιστρέφοντας έτσι το φαινόμενο αυτό-αναστολής. (Brushia & Walsh, 1999)

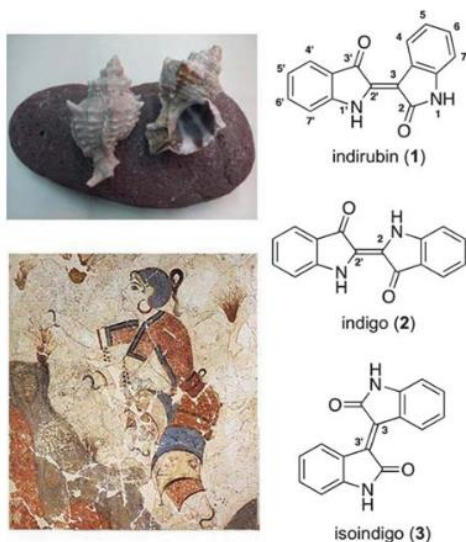
iv. ADP-αλλοστερικός τροποποιητής

Η διφωσφορική αδενοσίνη (ADP), ενεργοποιεί την PhK, μέσω πρόσδεσης σε μια από τις περίπου 8 θέσεις πρόσδεσης ADP σε όλο το ολοένζυμο, που εντοπίζονται στην β υπομονάδα. Όταν η PhK, έχει υποστεί φωσφορυλίωση κατά PKA-εξαρτώμενο τρόπο, αυξάνεται η συγγένεια της κινάσης με την ADP, ωστόσο δεν έχει καμία επίδραση στην δραστηριότητα του ενζύμου. Ακόμη, η πρόσδεση του ADP, εξαρτάται και από την τιμή pH, με την συγγένεια ως προς την PhK να είναι μεγαλύτερη σε τιμή 6.8, αλλά σε τιμή 8.2 που αποτελεί και την βέλτιστη για την ενεργότητα της PhK, δεν εμφανίζει τόσο μεγάλη συγγένεια. Η ADP, διεγείρει τόσο την αυτοφωσφορυλίωση όσο και την φωσφορυλίωση της GP, σε τιμή pH 6.8, αλλά καμία διέγερση δεν παρατηρείται σε pH 8.2. Ως εκ τούτου, συμπεραίνουμε πως η δράση της ADP, αφορά την μη ενεργοποιημένη PhK, ενώ δεν έχει καμία επίδραση στο ήδη ενεργό ένζυμο. (Brushia & Walsh, 1999)

1.4 Αναστολείς PhK

Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, απορρύθμιση στην ενεργότητα των πρωτεϊνικών κινασών, έχει συσχετισθεί με πολλές ασθένειες όπως ο καρκίνος, διάφορες νευρολογικές διαταραχές και ο σακχαρώδης διαβήτης. Ουσίες από τις οποίες προέρχονται ποικίλοι σημερινοί αναστολείς κινασών, χρησιμοποιούνταν από αρχαιοτάτων χρόνων, όταν ακόμη δεν ήταν γνωστή η χημική δομή τους, με χαρακτηριστικότερο παράδειγμα τα ανάλογα ινδιουβίνης, που αξιοποιούνταν ως χρωστική ουσία στο «πορφυρό της Τύρου», στην οποία προσδίδουν το χαρακτηριστικό πορφυρό χρώμα, με προέλευση κυρίως από μαλάκια (π.χ από το γαστερόποδο,

Hexaplex trunculus), αλλά και ως ζωτικής σημασίας συστατικό στο μείγμα βοτάνων «Danggui Longhui Wan» με αντιλευχαιμική δράση, στην αρχαία Κίνα.(Vougianniopoulou & Skaltsounis, 2012).



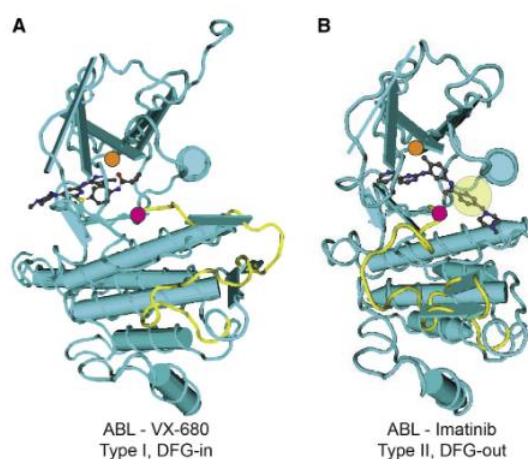
Εικόνα 15: Δομές ινδιρουβίνης και των αναλόγων της, ιντιγκο και ισο-ιντιγκο, με το μαλάκιο Hexaplex trunculus, που αποτελεί πηγή του «πορφυρού της Τύρου», χρωστική η οποία έχει αποδειχθεί ότι για πρώτη φορά χρησιμοποιήθηκε στις περίφημες τοιχογραφίες (όπως στις «Κροκοσυλλέκτριες», που απεικονίζονται παραπάνω) στο Ακρωτήρι της Θήρας κατά την εποχή του Χαλκού. (Vougianniopoulou & Skaltsounis, 2012)

Σήμερα, το 20–33% των ερευνητικών προσπαθειών που στοχεύει στην ανακάλυψη φαρμάκων, στηρίζεται στην υπερ-οικογένεια των κινασών, με την παρεμπόδιση της πρωτεϊνικής φωσφορυλίωσης να αποτελεί την κυρίαρχη προσέγγιση. Επομένως, ο σχεδιασμός εξειδικευμένων αναστολέων κινασών, ως θεραπευτικοί παράγοντες αποτελεί αδήριτη αναγκαιότητα, με τον FDA (U.S. Food and Drug Administration) να έχει εγκρίνει ως το 2022, 72 αναστολείς και 180 συνολικά να βρίσκονται σε στάδιο κλινικών δοκιμών διεθνώς. (Chen et al., 2022; Roskoski, 2023)

Οι διαθέσιμοι αναστολείς κινασών, μπορούν εν γένει να κατηγοριοποιηθούν σε πέντε μεγάλες κλάσεις: τους τύπους I, II, III που στοχεύουν την περιοχή πρόσδεσης του υποστρώματος ή περίξ αυτής, τον τύπο IV, που περιλαμβάνει αλλοστερικούς αναστολείς, και τον τύπο V των δισθενών αναστολέων, που περικλείουν χαρακτηριστικά από τους 4 προαναφερθέντες τύπους αναστολέων (Lamba & Ghosh, 2012).

Ειδικότερα, οι αναστολείς **τύπου I**, προσδένονται στην περιοχή σύνδεσης του ATP και αποτελούν ανταγωνιστές του. Αναγνωρίζουν την καταλυτικά ενεργή διαμόρφωση του

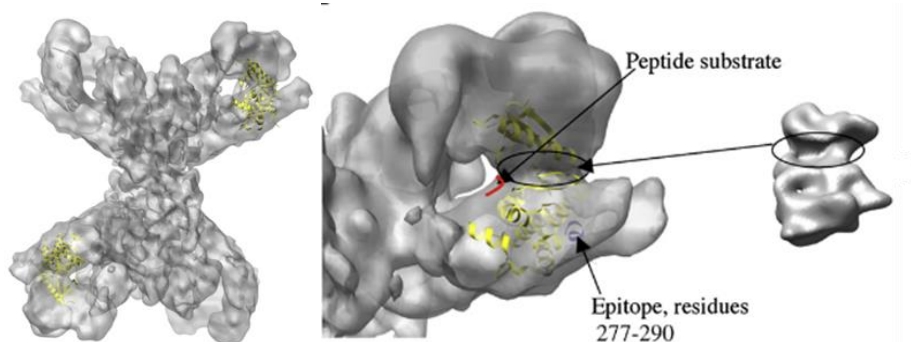
ενζύμου, που καλείται “DFG in”, λόγω της ύπαρξης 3 συντηρημένων καταλοίπων ασπαρτικού (D), φαινυλαλανίνης (F) και γλυκίνης (G), όπου η πλευρική αλυσίδα του ασπαρτικού, είναι προσανατολισμένη προς το ενεργό κέντρο του ενζύμου, διευκολύνοντας την κατάλυση, και μιμούνται πρακτικά την αλληλεπίδραση της αδενοσίνης με την περιοχή αυτή (Hari et al., 2013). Αντίθετα, τα μόρια-αναστολείς **τύπου II**, προσδένονται στην κινάση και την σταθεροποιούν όταν αυτή βρίσκεται στην ανενεργή “DFG out” διαμόρφωση, όπου το ασπαρτικό βρίσκεται εκτός της περιοχής του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Αυτή η μετατόπιση, έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία μιας αλλοστερικής περιοχής παρακαείμενα του ενεργού κέντρου, με την οποία αλληλεπιδρούν αυτού του τύπου οι αναστολείς, ενώ προσδένονται και στο ενεργό κέντρο της κινάσης (Zuccotto et al., 2010).



Εικόνα 16: Διαμορφώσεις “DFG in” (A) και “DFG out” (B) της κινάσης ABL με διαφορετικού τύπου αναστολείς (Treiber & Shah, 2013).

Οι αναστολείς **τύπου III**, δεν έχουν ανταγωνιστική ως προς το ATP δράση σε αντίθεση με τους δυο παραπάνω τύπους, και προσδένονται σε μια αλλοστερική περιοχή δίπλα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, επιτρέποντας την ταυτόχρονη πρόσδεση του ATP στην κινάση, ενώ οι ουσίες που υπάγονται στον **τύπο IV**, προσδένονται σε αλλοστερικές θέσεις, οι οποίες είναι απομακρυσμένες από το ενεργό κέντρο του ενζύμου, και έτσι δεν επηρεάζονται από την πρόσδεση του ATP στο ενεργό κέντρο (Roskoski, 2016). Κλείνοντας, η τελευταία κατηγορία αναστολέων κινασών (**τύπος V**), απαρτίζεται από μόρια τα οποία δυνητικά στοχεύουν οποιοσδήποτε δύο περιοχές στην επιφάνεια της κινάσης, συμπεριλαμβανομένων ρυθμιστικών και καταλυτικών επικρατειών (Lamba & Ghosh, 2012).

Η πολύ εξειδικευμένη δραστηριότητα της γ υπομονάδας του ολοενζύμου της PhK, την καθιστά φαρμακευτικό στόχο, ιδίως μέσω παρεμπόδισης της περιοχής πρόσδεσης ATP, για τον έλεγχο του μεταβολισμού της γλυκόζης, μια προοπτική που παρουσιάζει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον. (Begum et al., 2015)



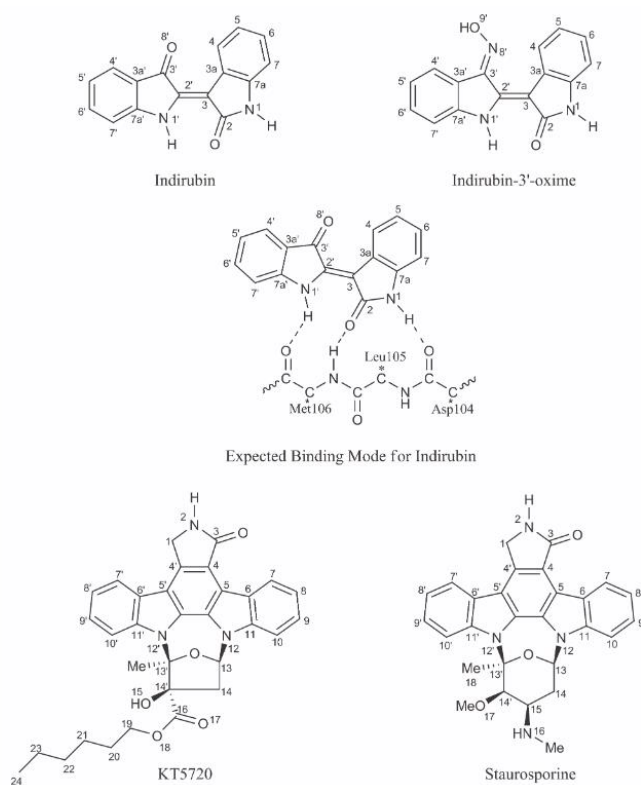
Εικόνα 17: cryo-EM απεικόνιση των 2 απομονωμένων γ υπομονάδων, με κίτρινο χρώμα (αριστερά), με τις εναπομείναντες δυο γ υπομονάδες του ολοενζύμου της PhK, να βρίσκονται στο πίσω μέρος της δομής καλυμμένες. Μεγέθυνση (δεξιά) της πλαϊνής όψης της PhK, με την καταλυτική θηλιά κυκλωμένη. Με κυανό χρώμα διακρίνεται η περιοχή δέσμευσης αντι- γ αντισωμάτων που απαντάται στα κατάλοιπα 277-290, και με κόκκινο χρώμα η επικράτεια του πεπτιδικού υποστρώματος, συμπλοκοποιημένη με την γ υπομονάδα. (Vénien-Bryan et al., 2009)

Έχει παρατηρηθεί ότι η μεγάλη δυσκολία στις ουσίες που στοχεύουν περιοχές με δραστηριότητα κίνησης, έγκειται στην εξειδίκευσή τους ως προς το υπόστρωμα, την δράση του οποίου παρεμποδίζουν, εξαιτίας της μεγάλης ομολογίας που απαντάται μεταξύ των περιοχών πρόσδεσης ATP. Τέσσερις αξιοσημείωτοι αναστολείς της PhK, που ερευνήθηκαν στα πλαίσια ελέγχου της γλυκογονόλυσης, στον σακχαρώδη διαβήτη τύπου-2, αποτελούν οι:

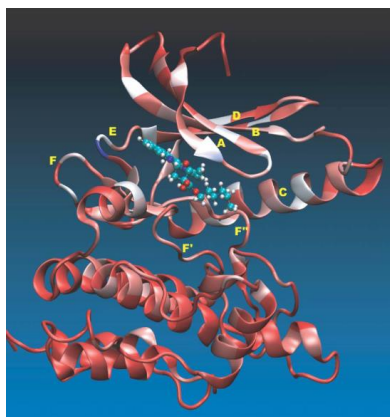
- Ινδιρουβίνη
- Indiru-bin-30-oxime (ανάλογο της ινδιρουβίνης)
- Σταυροσπορίνη
- KT5720 (ανάλογο της σταυροσπορίνης)

Ουσίες οι οποίες αποτελούν παρεμποδιστές της θέσης πρόσδεσης του ATP στην γ υπομονάδα της PhK, με την σταυροσπορίνη και το ανάλογό της να ξεχωρίζουν εξαιτίας της ανασταλτικής τους δράσης σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Η σταυροσπορίνη, αποτελεί ένα φυσικό προϊόν, που απομονώνεται από το βακτήριο *Streptomyces staurosporeus*, και έχει την ικανότητα να αναστέλλει την περιοχή δραστηριότητας τουλάχιστον 45 πρωτεϊνικών κινάσων μεταξύ αυτών και της PhK. Αν και τοξική σε μη

αποδεκτά επίπεδα για κλινική χρήση, συνιστά έναν ισχυρό αναστολέα της PhK με $K_i = 0.37 \text{ nM}$, που εντούτοις δεν εμφανίζει τόσο μεγάλη εξειδίκευση ως προς την περιοχή με δραστικότητα κινάσης της PhK. Αντιθέτως, το ανάλογο της, KT5720, που στα πλαίσια αυτής της εργασίας αποτελεί την υπό μελέτη ουσία, συνιστά έναν αρκετά ισχυρό αναστολέα με $K_i = 18.4 \text{ nM}$ και μεγάλη εξειδίκευση ως προς την PhK. (Begum et al., 2015; Hayes et al., 2011)



Εικόνα 18: Δομές ινδρουβίνης, σταυροσπορίνης και των αναλόγων τους μαζί με την αναμενόμενη δομή πρόσδεσης της ινδρουβίνης στην γ υπομονάδα της PhK, με τα κατάλοιπα Asp104 και Met106, να έχουν κομβικό ρόλο στον σχηματισμό δεσμών υδρογόνων με την καταλυτική υπομονάδα της κινάσης. Με παρόμοιο τρόπο προσδέονται και οι παραπάνω αναστολείς. (Hayes et al., 2011)



Εικόνα 19: Σύμπλοκο KT5720-PhK, με τις χαρακτηριστικές επικράτειες A-F, όπου επάγονται οι κυριότερες αλλαγές στην διαμόρφωση τους από την δράση του αναστολέα (Hayes et al., 2011)

1.5 Νανοδιασπορές

1.5.1 Εισαγωγικά στοιχεία

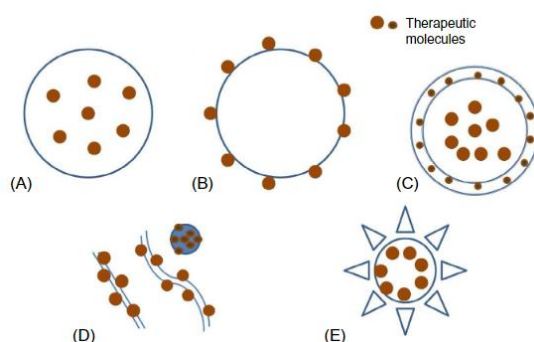
Η νανοτεχνολογία, συνιστά έναν καινοτόμο κλάδο της επιστήμης, που μας παρέχει τα εφόδια, για την εργασία σε ατομικό, μοριακό και υπερ-μοριακό επίπεδο, προς δημιουργία συσκευών και συστημάτων μεταφοράς, με νέες λειτουργίες και ιδιότητες, καθώς και σημαντικά ανταγωνιστικά πλεονεκτήματα που τα καθιστούν, ένα ιδιαίτερα ελκυστικό αντικείμενο έρευνας. Ειδικότερα ως προς τα νανοσυστήματα για την αποτελεσματική μεταφορά βιοδραστικών ουσιών, ο υψηλός λόγος της επιφάνειας μιας επικράτειας ως προς τον όγκο που αυτή καταλαμβάνει, αλλά και οι ιδιαίτερες φυσικοχημικές ιδιότητές τους, αποτελούν κάποιιο από τους λόγους περαιτέρω μελέτης του συγκεκριμένου τομέα. Μερικές, από τις πιο αξιόλογες εφαρμογές αξιοποίησης νανοβιοτεχνολογίας, συνιστούν οι κατασκευές νανοφορέων ενθυλάκωσης λιπόφιλων φαρμάκων όπως η ιβουπροφαίνη, γνωστή για την αντι-φλεγμονώδη δράση της, αλλά και διαφόρων νανοσυστημάτων μεταφοράς χημικών ουσιών, γεωπονικού ενδιαφέροντος όπως τα εντομοκτόνα, με σκοπό τον έλεγχο της ανάπτυξης των φυτών αλλά και τον περιορισμό των τοξικών επιπτώσεων από την χρήση τους στο οικοσύστημα. (Rawat et al., 2006; Theochari et al., 2019; Vega-Vásquez et al., 2020)

Το μικρό μέγεθος των σωματιδίων εντός των διασπορών αυτών, επιτρέπει στα νανοσυστήματα να χαρακτηρίζονται από υψηλή οπτική καθαρότητα, και ενισχυμένη μακροχρόνια σταθερότητα και βιοδιαθεσιμότητα. Ταυτόχρονα, καθιστούν εφικτή την διείσδυση υδρόφοβων ενώσεων, όπως οι αναστολείς κινασών που αποτελούν αντικείμενο μελέτης αυτής της διπλωματικής εργασίας, εντός βιολογικών φραγμών (π.χ επιθηλιακοί ιστοί) προς τους ενδοκυτταρικούς τους στόχους, ελαττώνοντας συγχρόνως την συχνότητα δόσολογίας του φαρμάκου που ενθυλακώνεται εντός μιας νανοδιασποράς, οδηγώντας ως εκ τούτου σε ελαχιστοποίηση τυχόν ανεπιθύμητων παρενεργειών. (D. J. McClements, 2012; Theochari et al., 2019)

Εντούτοις, ο σχεδιασμός κατάλληλων συστημάτων ενθυλάκωσης αποτελεί μια αληθινή πρόκληση. Ειδικότερα, παρατηρούνται δυσκολίες στην αποθήκευση, χορήγηση και γενικότερη διαχείριση των νανοφορέων, κυρίως λόγω της τάσης τους να συσσωματώνονται, ενώ το μικρό μέγεθος σωματιδίων παρά τις προαναφερθείσες ευεργετικές τους ιδιότητες, καθιστά εύκολη την πρόσβαση σε ανεπιθύμητες περιοχές

εντός του κυττάρου, όπως την περιοχή εντός του πυρηνικού του φακέλου, προκαλώντας ανεπιθύμητες βλάβες στο γονιδίωμα και μεταλλάξεις. Ακόμη, παράγοντες όπως η μεθοδολογία που ακολουθείται για την ενθυλάκωση μιας βιοδραστικής ουσίας και η διαλυτότητα της τελευταίας στην λιπαρή φάση μιας νανοδιασποράς, επηρεάζουν άμεσα την ικανότητα «φόρτωσης» ενός φαρμάκου, δηλαδή την ποσότητα του που δύναται να διαλυθεί ανά μονάδα μάζας των λιπαρών συστατικών ενός συστήματος, και επομένως καθιστούν ακόμη πιο απαιτητικό τον σχεδιασμό μιας κολλοειδούς διασποράς. Τέλος, πολλές φορές τα νανοσυστήματα αυτά κρίνονται ακατάλληλα, για την ενθυλάκωση ουσιών που απαιτούν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις για την θεραπευτική τους δράση, λόγω της ανεπαρκούς – από βιολογικής άποψης – τελικής τους συγκέντρωσης στα κύτταρα που αποτελούν φαρμακευτικό στόχο. (Rawat et al., 2006; Zagalo et al., 2022)

Αναφορικά με τους θεραπευτικούς παράγοντες, αυτοί μπορούν να συγκροτήσουν διάφορες δομές νανοσωματιδίων εντός του φορέα τους. Ειδικότερα, διακρίνονται σε σφαιρικά κολλοειδή νανοσωματίδια στα οποία το φάρμακο δύναται να βρίσκεται ενθυλακωμένο εντός (Εικ. 22Α), ή προσκολλημένο στην επιφάνεια του σωματιδίου (Εικ. 22Β) ή ακόμη και να απαντάται τόσο εντός όσο και να είναι ενσωματωμένο στο ίδιο το περίβλημα της νανο-κάψουλας (Εικ. 22C). Επιπλέον, οι προς ενθυλάκωση ουσίες, μπορεί να βρίσκονται προσκολλημένες στην επιφάνεια ανόργανων, μη-σφαιρικών σωματιδίων (Εικ. 22D), ενώ με την χρήση πολυμερών η σύσταση των οποίων χαρακτηρίζεται από έναν υδρόφοβο φραγμό, χημικά συζευγμένο με έναν αντίστοιχο υδρόφιλο, που σε ένα υδατικό διάλυμα αποκτά χαρακτηριστική δομή μικκυλίου (Εικ. 22E). (Adams et al., 2003; Dhanasekaran et al., 2018)



Εικόνα 20: Διαφορετικές μορφές νανοσωματιδίων-θεραπευτικών παραγόντων. (Dhanasekaran et al., 2018)

Τα συστήματα μεταφοράς νανοσωματιδίων, πρέπει να διαθέτουν ορισμένα χαρακτηριστικά, προκειμένου να καθίστανται αξιοποιήσιμα από τις διάφορες βιομηχανίες, όπως οι βιομηχανίες τροφίμων και φαρμάκων. Επιγραμματικά, ορισμένα εξ αυτών είναι:

- **Καταλληλότητα Συστατικών**

Τα νανοσυστήματα μεταφοράς, θα πρέπει να σχηματίζονται από συστατικά που υπάγονται στην κατηγορία GRAS (generally recognized as safe excipients)

- **Οικονομική παραγωγή**

Η παρασκευή νανοδιασπορών με όσο το δυνατόν φθηνότερα συστατικά αλλά και μεθόδους παραγωγής, αποτελεί ένα ανταγωνιστικό πλεονέκτημα για την κάθε βιομηχανία, που της επιτρέπει να υπερκεράζει τα όποια επιπρόσθετα κόστη σχετίζονται με την παραγωγή, την μεταφορά και την αποθήκευση ενός συστήματος.

- **Βιοδιαθεσιμότητα**

Μια νανοδιασπορά, κρίνεται ως ιδανική στην περίπτωση που βελτιστοποιεί την βιοδιαθεσιμότητα της υπό ενθυλάκωση ουσίας, ή σε κάθε περίπτωση δεν την επηρεάζει αρνητικά

- **Προστασία έναντι χημικής αποικοδόμησης**

Ένα σύστημα ενθυλάκωσης, ενδέχεται να απαιτείται να παρέχει προστασία έναντι οξειδωτικών ή υδρολυτικών παραγόντων, για την λιπόφιλη ουσία που ενσωματώνει.

- **Ικανότητα φόρτωσης**

Μια κολλοειδής διασπορά, ιδανικά καθίσταται ικανή να ενθυλακώνει μεγάλες ποσότητες της υδρόφοβης βιοδραστικής ουσίας, ανά μονάδα μάζας του νανοφορέα, και να διατηρεί τα δομικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της, μέχρι την χορήγησή της. (D. J. McClements et al., 2007)

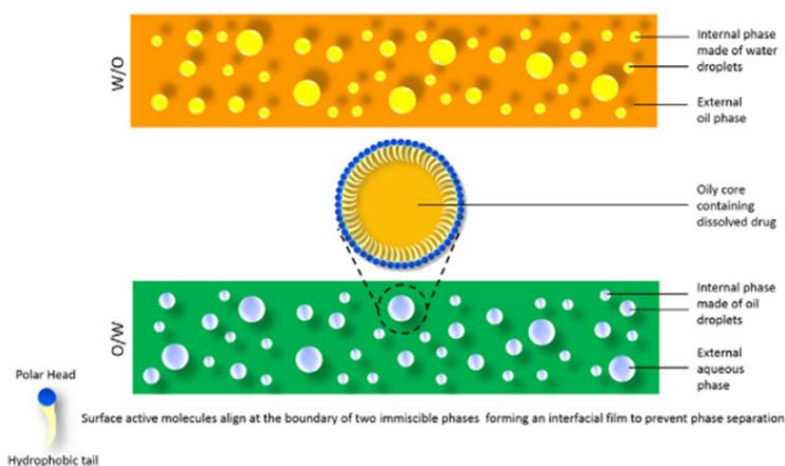
1.5.2 Μίκρο/Νάνο-Γαλακτώματα – Χαρακτηριστικά & Εφαρμογές

Οι κολλοειδείς διασπορές, μπορούν να έχουν πολλές συστάσεις, με μια από τις πλέον χρησιμοποιούμενες από πληθώρα βιομηχανιών, να αφορά στην χρήση νερού, κάποιου ελαίου (ορολογία που χρησιμοποιείται για την περιγραφή κάθε υγρού που είναι αδιάλυτο στο νερό) και την αξιοποίηση ενός ή περισσότερων επιφανειοδραστικών ουσιών, ποιοτική σύσταση η οποία αποτελεί και αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας. Αξίζει να σημειωθεί ότι, αρκετές φορές κρίνεται απαραίτητη η χρήση συντηρητικών και αντιοξειδωτικών ουσιών. Αυτό συμβαίνει καθώς, τόσο στην υδατική όσο και στην λιπαρή φάση, δύνανται να αναπτυχθούν μικροοργανισμοί, και επομένως επιλέγονται κατάλληλες συντηρητικές ουσίες για τον περιορισμό αυτών των φαινομένων, όπως παράγωγα βενζοϊκού οξέος που αξιοποιούνται ως αντιμυκητιακοί παράγοντες. Αντίστοιχα, αναφορικά με τις αντιοξειδωτικές ουσίες, η χρήση τους είναι συχνή, καθώς αποτρέπει την εγγενή τάση που έχουν έλαια, και λιπίδια να αυτό-οξειδώνονται κατόπιν έκθεσης τους στον ατμοσφαιρικό αέρα. Οι δύο συχνότερες κατηγορίες γαλακτωμάτων που μπορούν να δημιουργηθούν από τα παραπάνω συστατικά είναι τα Νάνο- & Μίκρο-γαλακτώματα. Μεταξύ αυτών, απαντώνται σημαντικές δομικές ομοιότητες αλλά και διαφορές. (D. J. McClements, 2012; Singh et al., 2017; Theochari et al., 2019)

Ως **μικρογαλακτώματα** (microemulsions), ορίζονται οι διασπορές εκείνες που χαρακτηρίζονται για την οπτική τους διαύγεια και την θερμοδυναμική τους σταθερότητα, που αποτελούνται από διεσπαρμένα νανο-σταγονίδια, μεγέθους από 5-50 nm. Τα μικρογαλακτώματα, ταξινομούνται στις εξής τρεις κατηγορίες: έλαιο σε νερό (o/w), όπου η λιπαρή φάση είναι διεσπαρμένη στην υδάτινη, νερό σε έλαιο (w/o), όπου η υδάτινη φάση είναι διεσπαρμένη σε λιπαρή και τα δισυνεχή, τα οποία ουσιαστικά συνιστούν ενδιάμεσες φάσεις των παραπάνω δυο, που δύνανται να αλληλομετατρέπονται αντιστρέπτα. Πρόκειται ουσιαστικά για μια κατάσταση ισορροπίας των δύο φάσεων, με περίσσεια ελαίου ή νερού, όπου η μετάβαση από την μια φάση στην άλλη, μπορεί να πραγματοποιηθεί κατόπιν, προσθήκης ενός νέου συστατικού, αλλαγών στην σύσταση υπαρχόντων συστατικών του μικρογαλακτώματος, ή ακόμη ως αποτέλεσμα θερμοκρασιακών διακυμάνσεων.

Σε ό,τι αφορά στα o/w μικρογαλακτώματα, αυτά χρησιμοποιούνται για την ενθυλάκωση και μεταφορά λιπόφιλων ουσιών, σε αντίθεση με τα w/o που αποτελούν

μεταφορείς υδρόφιλων. Ο σχηματισμός των μικρογαλακτωμάτων, εξαιτίας αυτής της θερμοδυναμικής ισορροπίας που τα διέπει, είναι αυθόρμητος, χωρίς να απαιτεί ενεργειακή κατανάλωση, και εξαρτάται από μεταβλητές, όπως η μοριακή σύσταση του συστήματος και η θερμοκρασία. (Anton & Vandamme, 2011; Flanagan & Singh, 2006; Theochari et al., 2019)



Εικόνα 21: Δομή ενός o/w ή w/o αντίστοιχα νανογαλακτώματος. Συντίθενται συστήματα δύο φάσεων, στα οποία ένας βέλτιστος όγκος ελαίου βρίσκεται διεσπαρμένος σε έναν μεγαλύτερο όγκο νερού, ή αντίστροφα, με την συνεισφορά μιας επιφανειοενεργής ουσίας. (Singh et al., 2017)

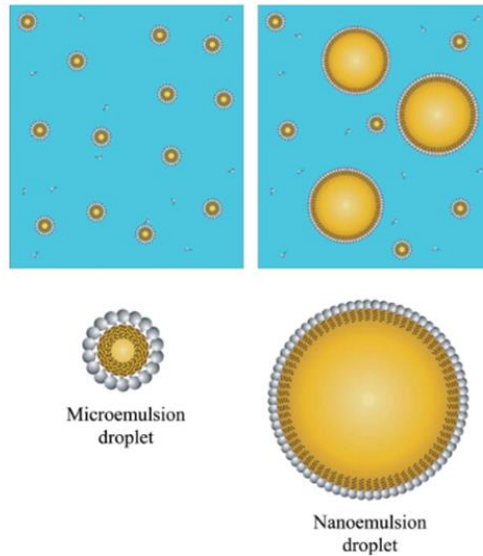
Τα **νανογαλακτώματα** (nanoemulsions), απαρτίζονται από σταγονίδια μεγέθους συμβατικά 50-300 nm, και από θερμοδυναμικής άποψης κρίνονται ασταθή, ωστόσο η κινητική αποσταθεροποίηση που παρατηρείται, είναι τόσο αργή, ώστε να θεωρούνται κινητικά σταθερά. Οπτικά, μπορεί να είναι διαυγή, ελαφρώς θολερά, ή γαλακτερά. Σε αντίθεση με τα μικρογαλακτώματα, σχηματίζονται κατόπιν παροχής ενέργειας, με μεθόδους υψηλής ή χαμηλής ενέργειας, ενώ σε καθεστώς αποθήκευσης παρατηρείται κινητική σταθερότητα, αλλά θερμοδυναμική ανισορροπία, τόσο λόγω της μικρής συγκέντρωσης επιφανειοενεργών ουσιών, όσο και λόγω της μεθόδου σχηματισμού τους. Τα νανογαλακτώματα, κατηγοριοποιούνται σε: έλαιο σε νερό (o/w), και νερό σε έλαιο (w/o), ανάλογα με την υπό διασπορά φάση. Τα γαλακτώματα αυτά, κατόπιν παρασκευής τους μπορούν να λάβουν ποικίλες μορφές, όπως κρέμες, υγρά, γέλες και αερολύματα, και μπορούν να χορηγηθούν μέσω διαφόρων οδών, όπως τοπικά, ενδοφλέβια, ενδορινικά, παρεντερικά, και από το στόμα. (Anton & Vandamme, 2011; Singh et al., 2017; Theochari et al., 2019)

Τα έλαια ουσίες που χρησιμοποιούνται στον σχηματισμό ενός νανογαλακτώματος συνήθως έχουν περιεκτικότητα 5-20% στα o/w νανογαλακτώματα, και όπως

αναφέρθηκε και προηγουμένως τόσο αυτά όσο και τα επιφανειοενεργά, ανήκουν στην κατηγορία GRAS. Ειδικότερα, έχει μελετηθεί η χρήση τόσο βρώσιμων φυτικών ελαίων, όπως το ελαιόλαδο, το ηλιέλαιο και το σησαμέλαιο, όσο και συνθετικών εστέρων, όπως ο μυριστικός ισοπροπυλεστέρας (IPM). Αναφορικά με τις επιφανειοενεργές ουσίες, πρόκειται για αμφίφιλα μόρια, των οποίων η δράση εντός ενός νανογαλακτώματος, σχετίζεται με την αποτροπή συσσωμάτωσης των σταγονιδίων μεταξύ τους και την μείωση της διεπιφανειακής τάσης μεταξύ των δύο φάσεων. Διακρίνονται δυο κατηγορίες επιφανειοενεργών ουσιών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη φορτίου στην πολική κεφαλή, τα ιοντικά και τα μη ιοντικά. Τα ιοντικά, που έχουν φορτίο, χωρίζονται με την σειρά τους σε ανιοντικά (αρνητικό φορτίο κεφαλής), κατιοντικά (θετικό φορτίο κεφαλής) και επαμφοτερίζοντα (με αρνητικό και θετικό φορτίο κεφαλής). Μερικά από τα πλέον μελετημένα επιφανειοενεργά συνιστούν η λεκιθίνη, καθώς επίσης και διάφοροι εστέρες όπως οι μονολαυρικές πολυοξυαιθυλενοσορβιτάνες, (Tween 20, 40, 60, και 80) και οι μονολαυρικές σορβιτάνες (Span 20, 40, 60, 80, και 85). Για την επιλογή των κατάλληλων συστατικών σε ένα νανογαλάκτωμα, πρέπει να έχουμε υπόψιν, ότι οι τύποι ελαίων και επιφανειοενεργών που χρησιμοποιούνται, επηρεάζουν κρίσιμες παραμέτρους των συστημάτων, όπως την σταθερότητα, την τοξικότητα, και τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες τους, το μέγεθος των νανοσταγονιδίων και φυσικά ως εκ τούτου την βιοδιαθεσιμότητα της ουσίας που ενθυλακώνεται. (Singh et al., 2017; Theochari et al., 2019)

1.5.3 Ομοιότητες & Διαφορές Μικρο/Νανο-Γαλακτωμάτων

Συχνά, παρατηρείται σύγχυση ως προς την διάκριση των νάνο- από τα μικρο-γαλακτώματα, και αντίστροφα, τόσο με γνώμονα την κατηγοριοποίησή τους, όσο και ως προς τις πιθανές εφαρμογές τους. Τούτο, συνιστά απόρροια, συγκεκριμένων πειραματικών συνθηκών, όπου υπό συγκεκριμένη θερμοκρασία και σύσταση, τα μικρογαλακτώματα, μπορούν να ομοιάζουν αρκετά με τα νανογαλακτώματα, παρουσιάζοντας παρόμοια μορφολογία νανοσταγονιδίων, διεσπαρμένων σε μια συνεχή φάση (Anton & Vandamme, 2011)

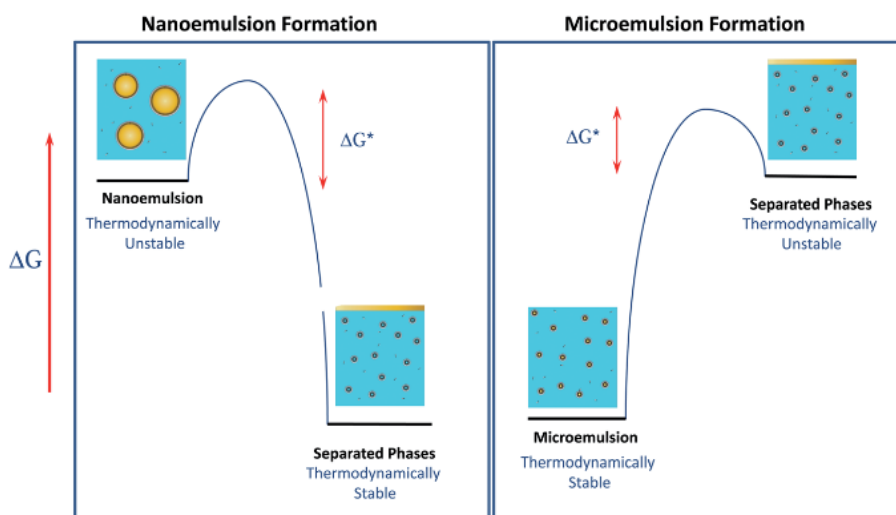


Εικόνα 22: Σχηματική απεικόνιση ο/ω μικρο- και νάνο-γαλακτωμάτων, αποτελούμενα από νερό, κάποιο έλαιο και επιφανειοενεργή ουσία, με την δομή των σωματιδίων να ομοιάζει και στους δύο τύπους γαλακτωμάτων, με το υδρόφιλο περίβλημα και τις υδρόφοβες ουρές των επιφανειοενεργών να περικλείουν το έλαιο στην διασπορά. (D. J. McClements, 2012)

Ωστόσο, είναι ζωτικής σημασίας να υπάρχει σωστή ταξινόμηση για την εκάστοτε διασπορά, καθώς βάσει αυτής θα επιλεγθούν οι κατάλληλες μέθοδοι παρασκευής της, και ως εκ τούτου θα αποκτηθούν και οι αντίστοιχες λειτουργικές και φυσικοχημικές ιδιότητες, από τις οποίες, θα καθοριστεί και η ίδια η σταθερότητα του συστήματος. (D. J. McClements, 2012)

Ξεκινώντας με κάποιες εκ των θεμελιωδών διαφορών μεταξύ των δυο γαλακτωμάτων, θα πρέπει να αναφέρουμε την απόκλιση που παρατηρείται στις μέσες διαμέτρους των σταγονιδίων, με αυτή των νανογαλακτωμάτων να είναι σημαντικά μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των μικρογαλακτωμάτων, ενώ σχετικά με την δομή των νανοσταγονιδίων, έχει παρατηρηθεί πως, εξαιτίας της μεγαλύτερης διεπιφανειακής τάσης που υπάρχει στα νανογαλακτώματα, και της επακόλουθης τάσης τους να ελαττώνουν την περιοχή επαφής τους, σχηματίζονται σφαιρικά σταγονίδια. Αντίθετα στα μικρογαλακτώματα, δεν υπάρχει αυστηρός περιορισμός ως προς την σφαιρικότητα ή μη των σταγονιδίων, λόγω της μικρής, σχετικά, διεπιφανειακής τάσης, που επιτρέπει στα επιφανειοενεργά να υιοθετούν τις βέλτιστες δομές τους (π.χ σκωληκοειδής δομή βλ. εικ 22). Ακόμη, τα νανογαλακτώματα θεωρούνται θερμοδυναμικά ασταθή, σε αντίθεση με τα μικρογαλακτώματα που χαρακτηρίζονται ως σταθερά. Ως εκ τούτου παρατηρείται αξιόλογη διαφορά στον τρόπο συμπεριφοράς των δομικών στοιχείων των δυο συστημάτων, σε χημικές μεταβολές ή σε αλλαγή των περιβαλλοντικών συνθηκών με

τα μικρογαλακτώματα να επηρεάζονται εμφανώς στις διακυμάνσεις αυτές, ενώ τα νανογαλακτώματα παραμένουν ανθεκτικά. Αυτό αποτελεί φυσικό επακόλουθο της υψηλότερης τιμής ελεύθερης ενέργειας στην διεσπαρμένη κατάσταση του νανογαλακτώματος σε σχέση με την ελεύθερη ενέργεια όταν υπάρχει διαχωρισμός των δύο φάσεων (βλ. εικ. 23). Το γεγονός αυτό, έχει τον αντίστοιχο αντίκτυπο σε ό,τι αφορά στις συνθήκες μακροχρόνιας αποθήκευσης και κλινικής τους χρήσης, για την στόχευσή σε επίπεδο οργάνων και ιστών, αλλά και την οδό χορήγησης που θα ακολουθηθεί, με τα νανογαλακτώματα να εμφανίζουν ανταγωνιστικά πλεονεκτήματα, ως προς την καταλληλότητα τους σε περιβάλλοντα με ευμετάβλητη θερμοκρασία, pH και πίεση. Σε ό,τι αφορά στην σύσταση των δύο τύπων κολλοειδών διασπορών, παρότι αυτές, μπορούν να σχηματιστούν από τα ίδια ακριβώς συστατικά, συνήθως απαιτείται, μεγαλύτερη αναλογία επιφανειοενεργών/ελαίου στα μικρογαλακτώματα από ό,τι στα νανογαλακτώματα, με τις ανάλογες επιπτώσεις στα επίπεδα τοξικότητας του σχηματισθέντος συστήματος. Τέλος δεν θα πρέπει να λησμονούμε τις διαφορές που χαρακτηρίζουν τα δυο αυτά είδη, ως προς τον σχηματισμό τους, με τα μικρογαλακτώματα να σχηματίζονται αυθόρμητα με μηδενική παροχή εξωτερικής ενέργειας, σε αντίθεση με τα νανογαλακτώματα για την παρασκευή των οποίων είναι απαραίτητη η παροχή ενέργειας. (Anton & Vandamme, 2011; D. J. McClements, 2012; Theochari et al., 2019)



Εικόνα 23: Σχηματική απεικόνιση της ελεύθερης ενέργειας (ΔG) των νανογαλακτωμάτων και μικρογαλακτωμάτων σε σχέση με τις διαχωρισμένες φάσεις τους. Τα μικρογαλακτώματα έχουν χαμηλότερη ελεύθερη ενέργεια σε σχέση με την διαχωρισμένη τους φάση, σε αντίθεση με τα νανογαλακτώματα που έχουν υψηλότερη τιμή. (D. J. McClements, 2012)

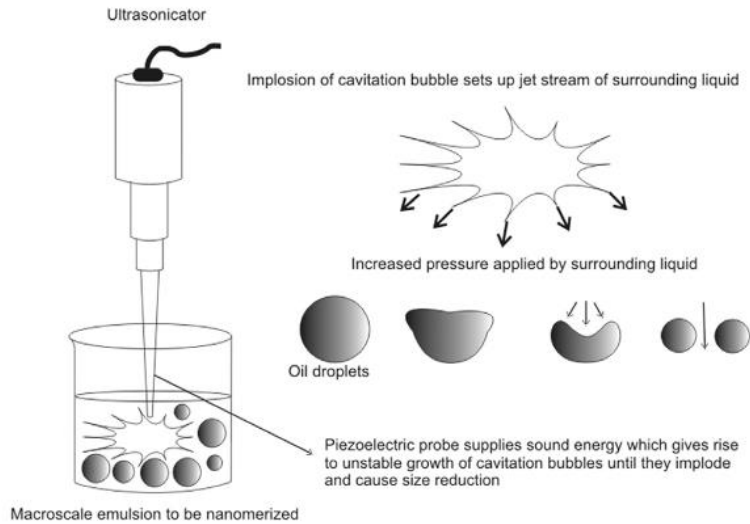
1.5.4 Μέθοδοι παρασκευής νανογαλακτωμάτων

- **Μέθοδοι υψηλής ενέργειας**

Κατά την γαλακτωματοποίηση υψηλής ενέργειας, τα νανο-σταγονίδια σχηματίζονται από τον διαχωρισμό προϋπαρχόντων σταγονιδίων (προγαλάκτωμα) σε μικρότερα, με την χρήση υπερήχων, ή μέσω ομογενοποίησης υψηλής πίεσης.

Στην **ομογενοποίηση υψηλής πίεσης (HPH)**, αξιοποιούνται συσκευές όπως οι μικρορευστοποιητές (microfluidizer), που χρησιμοποιούν ταυτοχρόνως πίεση, τριβή, τυρβώδεις ροές, εξωθώντας τα σταγονίδια, σε μεταξύ τους σύγκρουση, προκειμένου να αποκτήσουν το επιθυμητό μέγεθος και διασπορά. Η ενέργεια που παράγεται κατά την πρόσκρουση των σταγονιδίων μεταξύ τους, απευλευθερώνεται υπό μορφή θερμότητας, επομένως απαιτείται ψύξη της συσκευής. Ως εκ τούτου αντιλαμβανόμαστε ότι η παρασκευή ενός νανογαλακτώματος με την χρήση μικρορευστοποιητή, δεν είναι ο πλέον ενδεδειγμένος για θερμοευαίσθητες βιοδραστικές ουσίες και εν γένει συστατικά που το **απαρτίζουν**, εντούτοις οι μέθοδοι υψηλής ενέργειας απαιτούν μικρότερη ποσότητα επιφανειοενεργών ουσιών για τον σχηματισμό μικρών σταγονιδίων, ενώ ελαχιστοποιείται η πιθανότητα επιμολύνσεων. (Komaiko & McClements, 2016; Singh et al., 2017)

Με συσκευές **υπερήχων**, η μείωση του μεγέθους των νανοσταγονιδίων, εξαρτάται από υψηλής συχνότητας (άνω των 20 kHz) ηχητικών κυμάτων. Κατόπιν εμβάπτισης της συσκευής εντός της διασποράς, παράγονται φυσαλίδες εξαιτίας της σπηλαιώσης που υπόκειται το υγρό, οι οποίες αυξάνονται σε μέγεθος μέχρι να καταρρεύσουν. Το επακόλουθο ωστικό κύμα, προξενεί ένα αέριο ρεύμα το οποίο με την σειρά του, συμπιέζει τα διασκορπισμένα σταγονίδια, μειώνοντας το μέγεθός τους. Συγκριτικά με την ομογενοποίηση υψηλής πίεσης, το βασικότερο πλεονέκτημα των υπερήχων, αποτελεί το χαμηλό ενεργειακό κόστος, ενώ εξίσου αξιοσημείωτο αρνητικό στοιχείο που απορρέει από την χρήση τους συνιστά η αυξημένη πιθανότητα επιμολύνσεων, λόγω της χρήσης καθετήρα (βλ. εικ 24). (Singh et al., 2017)



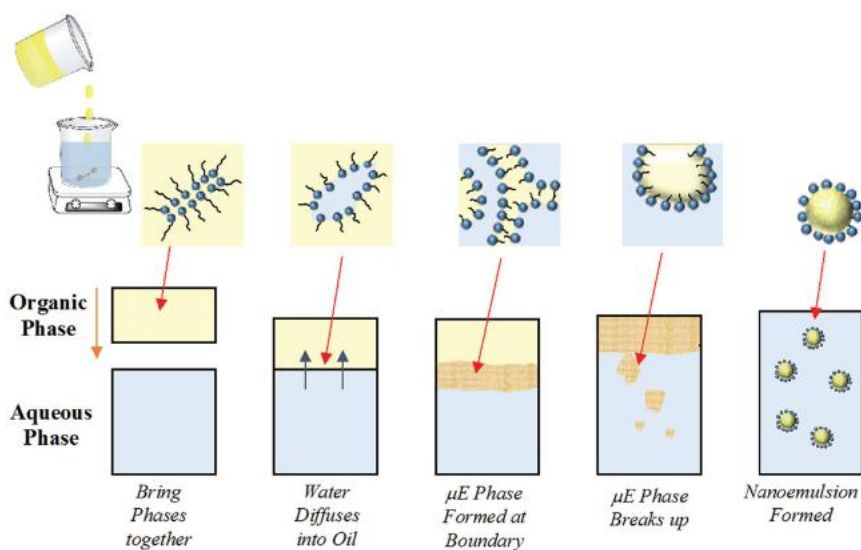
Εικόνα 24: Γαλακτωματοποίηση με χρήση συσκευής υπερήχων και επακόλουθη μείωση μεγέθους σταγονιδίων. (Singh et al., 2017)

- **Μέθοδοι χαμηλής ενέργειας**

Οι μέθοδοι χαμηλής ενέργειας, εκμεταλλεύονται την ενέργεια που είναι αποθηκευμένη εντός των συστημάτων, για την παραγωγή νανοσταγονιδίων, είτε με αυθόρμητη γαλακτωματοποίηση είτε με μεταβολές στην σύσταση ή εξωτερικούς παράγοντες, όπως με την μέθοδο της αναστροφής φάσης με μεταβολή της θερμοκρασίας (PIT).

Η **αυθόρμητη γαλακτωματοποίηση**, υλοποιείται στην πραγματικότητα, όταν δυο μη αναμίξιμα υγρά, έρχονται σε επαφή και γαλακτωματοποιούνται, χωρίς την δράση εξωγενών παραγόντων, όπως η εφαρμογή θερμότητας. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, αυτού του τύπου γαλακτωματοποίησης, συνιστά το «φαινόμενο του ούζου», όπως αναγράφεται στη διεθνή βιβλιογραφία, όπου δύο μη αναμίξιμοι διαλύτες π.χ έλαιο και νερό και ένας τρίτος διαλύτης ο οποίος είναι διαλυτός στον ένα διαλύτη και μερικώς διαλυτός στον άλλο (π.χ αλκοόλη), χωρίς την δράση κάποιας επιφανειοενεργής ουσίας, δημιουργούν κατά αυθόρμητο τρόπο ένα γαλάκτωμα (Ganachaud & Katz, 2005). Ωστόσο, τυπικά για την παρασκευή ενός ο/w νανογαλακτώματος, κατά αυθόρμητο τρόπο απαιτείται η προσθήκη μιας οργανικής φάσης (αποτελούμενη, από έλαιο και επιφανειοενεργά, και την λιπόφιλη ουσία προς ενθυλάκωση), στην υπό ανάδευση, υδατική φάση σε πολύ μικρές ποσότητες, για τον σχηματισμό σταγονιδίων σε νανοκλίμακα. Παρά τις ευκολίες στην χρήση, και την οικονομία στην ανάπτυξη νανοδιασκορών, ο αυθόρμητος σχηματισμός νανογαλακτωμάτων, έχει δειχθεί ότι προϋποθέτει μεγαλύτερες συγκεντρώσεις επιφανειοενεργών, σε σύγκριση με μεθόδους

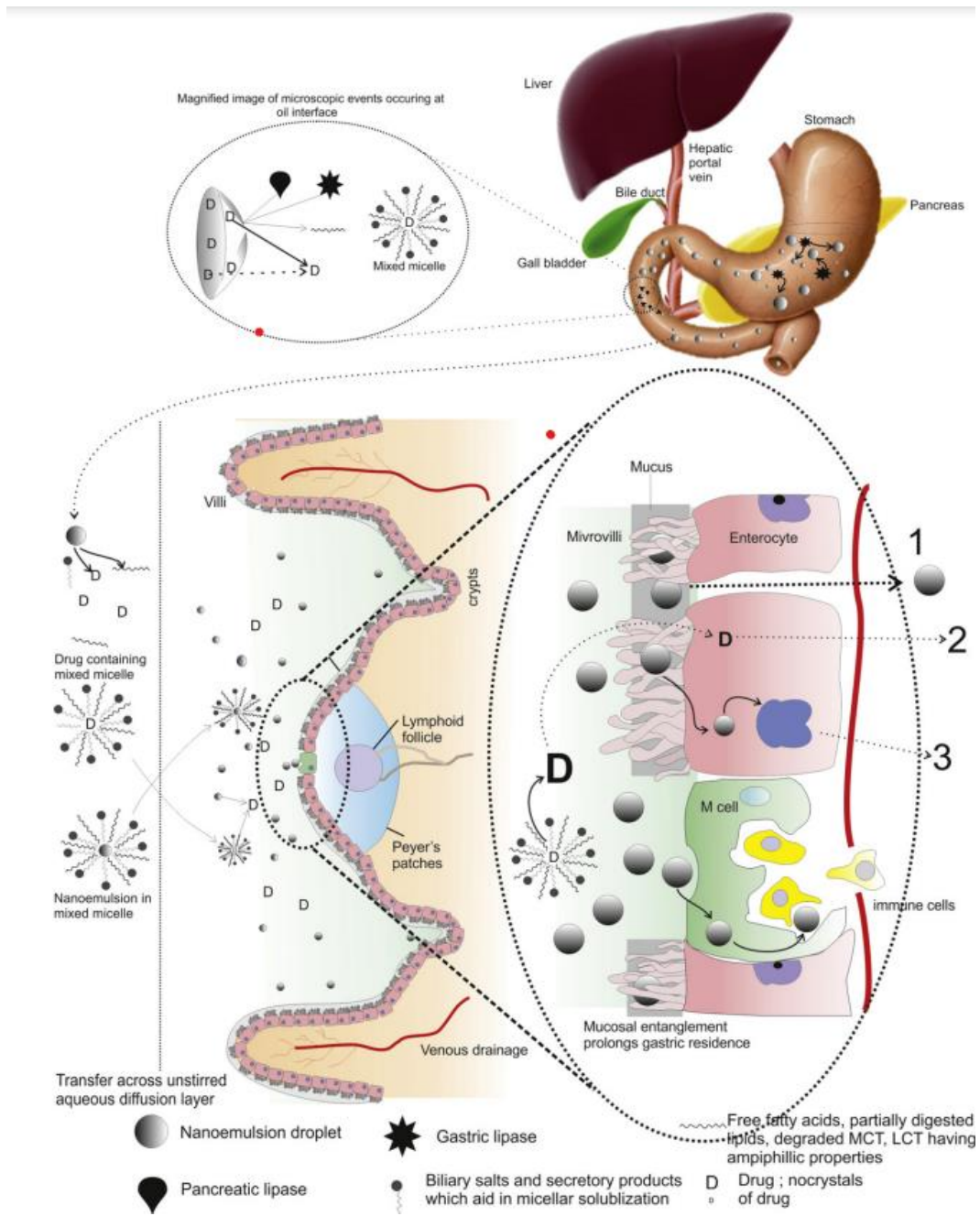
υψηλής ενέργειας, γεγονός που ενδέχεται να έχει αντίκτυπο, στην τοξικότητα του συστήματος για τα κύτταρα που αποτελούν στόχο του φαρμάκου, που ενθυλακώνεται εντός αυτού. (Komaiko & McClements, 2016; Singh et al., 2017)



Εικόνα 25: Σχηματική απεικόνιση αυθόρμητης γαλακτοματοποίησης με τα επιμέρους στάδια (Komaiko & McClements, 2016)

Η **αναστροφή φάσης με μεταβολή της θερμοκρασίας**, αξιοποιεί τις υδατοδιαλυτές ή λιποδιαλυτές ιδιότητες των επιφανειοενεργών ουσιών, προκειμένου σε συνδυασμό με αυξομειώσεις στην θερμοκρασία να συντελείται μετατροπή ενός o/w σε w/o γαλάκτωμα και αντιστρόφως μέσω μιας ενδιάμεσης δισυνεχούς φάσης. Πιο συγκεκριμένα, ένα μίγμα νερού, ελαίου και επιφανειοενεργών θερμαίνεται πέρα από μια προκαθορισμένη θερμοκρασία – ειδική για το κάθε μίγμα, και ακολούθως ψύχεται. Όταν φτάσει την προκαθορισμένη θερμοκρασία, το επιφανειοενεργό διαλύεται εξίσου σε υδατική και λιπαρή φάση, ενώ σε υψηλότερες θερμοκρασίες, διαχωρίζεται πλήρως από την υδατική φάση, οδηγώντας σε αναστροφή φάσης. Στη συνέχεια, με την πτώση της θερμοκρασίας, αναδομείται η διεπιφάνεια μεταξύ των δύο φάσεων, προς σχηματισμό μικρότερων νανοσταγονιδίων. Στο σημείο αυτό, θα πρέπει να αναφερθεί ότι, η χρήση θερμότητας καθιστά αδύνατη την χρήση θερμοευαίσθητων φαρμάκων προς ενθυλάκωση, ενώ είναι απαραίτητη η επιλογή συστατικών με ικανές αμοιβαίες διαλυτότητες, για την ομαλή μετάβαση φάσης, δεσμεύοντας την επιλογή αρκετών ελαίων, βιοδραστικών και επιφανειοενεργών ουσιών. (Singh et al., 2017)

1.5.5 Απορρόφηση Φαρμάκου κατά την χορήγηση από το στόμα



Εικόνα 26: Πορεία φαρμάκου εντός της γαστρεντερικής οδού. Κατόπιν χορήγησης από στόματος, ένα νανογαλάκτωμα, δύναται να πυροδοτήσει μια σειρά μηχανισμών που οδηγούν στην έκκριση γαστρικών ή παγκρεατικών λιπασών και χολικών αλάτων. Οι λιπάσες, συνεισφέρουν στην πέψη των λιπαρών συστατικών του συστήματος, επιταχύνοντας την απελευθέρωση του φαρμάκου. Όταν το φάρμακο απελευθερωθεί στην γαστρεντερική κοιλότητα, μπορεί να έχει την γνωστή νανομερική μορφή του ή να είναι ενσωματωμένο εντός μεικτής μικκυλιακής δομής, που συγκροτείται από ελεύθερα θραύσματα ελαίου ή διαθέσιμα χολικά άλατα, με αποτέλεσμα την βελτιστοποίηση της εγγενούς διαλυτότητας της βιοδραστικής ουσίας. Στο σημείο αυτό, το φάρμακο μπορεί να ακολουθήσει τις εξής πορείες: (1) Να απορροφηθεί, και να γίνει συστηματικά διαθέσιμο είτε μέσω λεμφικής, είτε φλεβικής κυκλοφορίας. (2) Να προσληφθεί μέσω διακυτταρικών μονοπατιών ή λοιπών απορροφητικού κυττάρων. (3) Εντός απορροφητικού κυττάρου, το νανοσταγονίδιο, μπορεί να υπόκειται σε κατεργασία από απολιποπρωτεΐνες, και να διοχετευθεί στην λεμφική κυκλοφορίας (Singh et al., 2017)

2. ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Έρευνες έχουν καταδείξει πως η υπερ-ενεργοποίηση της PhK, οδηγεί σε πληθώρα παθολογικών καταστάσεων για τον οργανισμό, με την εμφάνιση του διαβήτη τύπου 2, και την ογκογένεση κατόπιν, ανεξέλεγκτης αγγειογένεσης να αποτελούν τα πλέον χαρακτηριστικά παραδείγματα. Κατά συνέπεια, η καταλυτική υπομονάδα της PhK, αποτελεί φαρμακευτικό στόχο και πεδίο έρευνας για την ανάπτυξη πολλών θεραπευτικών παραγόντων, μέσω της αναστολής της καταλυτικής δράσης του ενζύμου. Ένας εξ αυτών, ένα ανάλογο σταυροσπορίνης, ο αναστολέας KT5720, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, τόσο εξαιτίας της ισχύος του ($K_i=18,4$ nM) όσο και της ιδιαίτερα εξειδικευμένης δράσης του ως προς την Phk.

Λαμβάνοντας τα παραπάνω υπόψιν, και έχοντας πάντα κατά νου τα ανταγωνιστικά πλεονεκτήματα που παρουσιάζουν τα κολλοειδή συστήματα μεταφοράς βιοδραστικών ουσιών (π.χ αύξηση βιοδιαθεσιμότητας, περιορισμός τοξικών παρενεργειών, οικονομία κλίμακας από την μείωση κόστους παραγωγής), σκοπό της παρούσας εργασίας, αποτέλεσε ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη βιοσυμβατών νανογαλακτωμάτων για την επιτυχή ενθυλάκωση του αναστολέα KT5720, με προοπτική την από στόματος χορήγηση του φαρμάκου.

3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

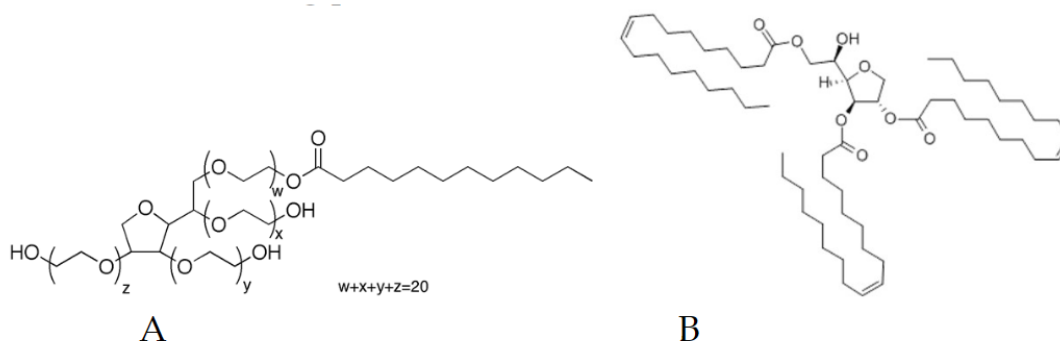
3.1 Υλικά

Για την παρασκευή των νανογαλακτωμάτων, χρησιμοποιήθηκε ως έλαιο για την λιπαρή φάση, αποκλειστικά το IPM (Isopropyl tetradecanoate 98%), της εταιρίας Alfa Aesar (Καντελ, Γερμανία). Πρόκειται για έναν συνθετικό εστέρα, που σχηματίζεται κατόπιν εστεροποίησης της ισοπροπυλικής αλκοόλης με το μυριστικό οξύ, και χαρακτηρίζεται από την μικρή διαλυτότητα του στο νερό, η οποία ωστόσο βελτιστοποιείται εντός μιας νανοδιασποράς, ενώ εξαιτίας των χαμηλών επιπέδων τοξικότητας, αξιοποιείται ως βιοσυμβατό συστατικό σε φορείς ενθυλάκωσης βιοδραστικών ουσιών για φαρμακευτική και καλλυντική χρήση (Pushkala & Panda, 2023; Y. Zhang et al., 2017). Για τις ανάγκες της παρούσας διπλωματικής, επιχειρήθηκε ο σχηματισμός πολλών ο/w νανογαλακτωμάτων με διαφορετικές επιφανειοδραστικές ουσίες, και αναλογίες αυτών, προκειμένου να γίνει η επιλογή του συστήματος εκείνου με τις κατάλληλες μορφολογικές ιδιότητες, για την ενθυλάκωση του αναστολέα της PhK, KT5720 (InSolution™ KT5720, 2mM, Merck KGaA, Γερμανία). Ειδικότερα, μελετήθηκε η συμπεριφορά των παρακάτω επιφανειοδραστικών ουσιών:

- Labrasol ALF (Gattefossé, Saint-Priest, France) (υδρόφιλο)
- Plurol Oleique MB (Gattefossé, Saint-Priest, France) (λιπόφιλο)
- Labrafac lipophile WL 139 (Gattefossé, Saint-Priest, France) (λιπόφιλο)
- Plurol isostearique (Gattefossé, Saint-Priest, France) (λιπόφιλο)
- Labrafil M 1944 CS CG (Gattefossé, Saint-Priest, France) (λιπόφιλο)
- Plurol Diisostearique CG (Gattefossé, Saint-Priest, France) (λιπόφιλο)
- PGPH, μη ιοντικό επιφανειοενεργό (λιπόφιλο)

Ενώ, επιλέχθηκε τελικά για την ενθυλάκωση της βιοδραστικής μας ουσίας, για λόγους που θα αναφερθούν στην συνέχεια, μίγμα των μονολαυρικών σορβιτανών Tween 80 (BIOΡΥΛ Α.Ε) και Span 85 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), ως επιφανειοενεργές ουσίες, οι οποίες ανήκουν στην κατηγορία των μη ιοντικών επιφανειοενεργών, με την πρώτη λόγω της αλυσίδας πολυοξυαιθυλενίου που απαντάται στην δομή της να είναι εξόχως υδατοδιαλυτή, ενώ η δεύτερη είναι ιδιαίτερα λιπόφιλη. Και οι δυο ουσίες, είναι βρώσιμες, χαμηλής τοξικότητας και προσδίδουν λόγω των αλληλεπιδράσεων τους υψηλή σταθερότητα στα συστήματα, στα οποία,

αποτελούν συστατικά τους, για αυτό και χρησιμοποιούνται εκτενώς από τις βιομηχανίες φαρμάκων και τροφίμων (Y. Liu et al., 2005). Για την υδατική φάση των νανογαλακτωμάτων, χρησιμοποιήθηκε δις απεσταγμένο νερό.



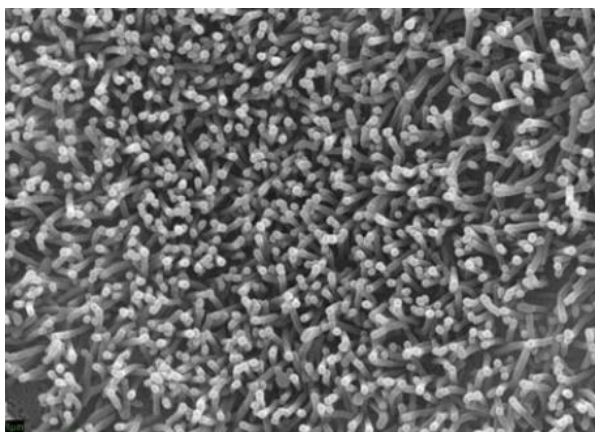
Εικόνα 27: Χημικές δομές Tween 80 (A) και Span 85 (B). (Faÿ et al., 2019)

Σε ό,τι αφορά στην καλλιέργεια των κυττάρων, χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), στο οποίο χορηγήθηκε 20% FBS (fetal bovine serum), 1% μίγμα αντιβιοτικών πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης, ενώ επίσης για τις διάφορες ανακαλλιέργειες χορηγήθηκε στα κύτταρα τρυψίνη (0,25% σε EDTA) και ρυθμιστικό διάλυμα PBS (phosphate-buffered saline) από την εταιρεία Gibco-LifeTechnologies (NY, USA). Κλείνοντας για την διαδικασία παγώματος των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε DMSO (Διμεθυλοσουλφοξείδιο), και το τετραζόλιο άλας MTT, για την δοκιμασία κυτταρικής βιωσιμότητας από την εταιρεία Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany).

3.2 Κυτταρική Σειρά (Caco-2)

Για τις ανάγκες των πειραμάτων κυτταρικής βιωσιμότητας, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα της σειράς Caco-2 (Caco-2 [Caco2] - HTB-37 – ATCC). Πρόκειται για κύτταρα ορθοκολικού καρκίνου, που αναπτύχθηκαν για πρώτη φορά από τον Jorgen Fogh, στο ινστιτούτο καρκινικής έρευνας Sloan-Kettering, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως ως μοντέλο προσομοίωσης του εντερικού επιθηλίου, καθώς διαθέτουν την ικανότητα αυθόρμητης διαφοροποίησης προς μονοστιβάδα κυττάρων που ομοιάζει με τα απορροφητικά κύτταρα του λεπτού εντέρου, ως προς τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους. Εξαιτίας αυτών των χαρακτηριστικών, παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες στην διαπερατότητα διαφόρων φαρμάκων, με τα κύτταρα του

εντερικού βλεννογόνου, και ως εκ τούτο χρησιμοποιούνται πολύ συχνά για *in vitro* μελέτες που μπορεί να αφορούν στην εντερική απορρόφηση, μεταφορά και μεταβολισμό μιας βιοδραστικής ουσίας καθώς και τα επίπεδα τοξικότητάς της (Lea, 2015; Yang et al., 2017).



Εικόνα 28: Απεικόνιση πολωμένων Caco-2 κυττάρων κατόπιν καλλιέργειας για 21 ημέρες. (Lea, 2015)

3.3 Παρασκευή Νανογαλακτώματων και Ενθυλάκωση KT5720

Όλα τα νανογαλακτώματα στην παρούσα εργασία, παρασκευάστηκαν με μεθόδους χαμηλής ενέργειας, και ειδικότερα με ισόθερμη αυθόρμητη γαλακτωματοποίηση. Πιο συγκεκριμένα, τα προαναφερθέντα επιφανειοενεργά για κάθε σύστημα που σχηματίστηκε, διαλύθηκαν στο έλαιο IPM με τη χρήση μαγνητικού αναδευτήρα, για χρονικό διάστημα 2-3 λεπτών, μέχρις ότου να επιτευχθεί ομογενοποίηση των συστατικών, που πλέον θα αποτελούσαν την λιπαρή φάση. Στην συνέχεια, για να επιτευχθεί ο σχηματισμός του νανογαλακτώματος, η λιπαρή φάση, διαλύθηκε στην συνεχή υδατική φάση, με την σταδιακή προσθήκη του μίγματος ελαίου και επιφανειοενεργών, ανά 100 μl κάθε 1 λεπτό, σταγόνα-σταγόνα με την χρήση πιπέτας, υπό συνεχή ήπια μαγνητική ανάδευση, η οποία και ακολούθησε για 1 ώρα, μέχρι τον σχηματισμό του νανογαλακτώματος. Για όσα συστήματα δεν παρατηρήθηκε διαχωρισμός φάσης, θολερότητα ή κροκίδωση, ακολούθησε δομική μελέτη, για την επιλογή εκείνου στο οποίο θα πραγματοποιούταν η ενθυλάκωση της βιοδραστικής ουσίας της εργασίας. Σε ό,τι στην ενθυλάκωση του λιπόφιλου αναστολέα KT5720, διενεργήθηκαν δοκιμασίες διαλυτοποίησης του στο IPM, προκειμένου να εξακριβωθεί η μέγιστη δυνατή συγκέντρωση ενθυλάκωσης του αναστολέα στην λιπαρή φάση του

συστήματος. Έτσι, λάβαμε 2, 4 και 6 μl της ουσίας KT5720, που στο σχηματισμένο νανογαλάκτωμα θα αντιστοιχούσε σε περιεκτικότητα 0,02, 0,04 και 0,06 %v/v και την προσθέσαμε σε 1,2 g IPM και ακολούθησε ήπια μαγνητική ανάδευση για λίγα λεπτά. Παρατηρήθηκε, ότι τόσο σε ποσότητα τεσσάρων όσο και σε ποσότητα έξι μl, σχηματίζονταν ανεπιθύμητες φυσαλίδες στο έλαιο, οι οποίες το καθιστούσαν μη διαυγές και θολερό, γεγονός το οποίο θα είχε και τον ανάλογο αντίκτυπο στις ρεολογικές και μορφολογικές ιδιότητες του νανογαλακτώματος. Ως εκ τούτου, επιλέχθηκε μια ποσότητα των 2 μl (0,02 % v/v), ως μέγιστη για ενθυλάκωση, στον φορέα μας, μιας και είχε ανεπαίστες επιπτώσεις στην δομή της λιπαρής φάση του συστήματος. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την ενθυλάκωση του αναστολέα, είναι ακριβώς η ίδια με αυτήν που διενεργήθηκε για τις δοκιμασίες διαλυτοποίησης του στο IPM, με την μόνη διαφορά ότι προστέθηκαν και τα επιφανειοενεργά συστατικά, που μαζί με το έλαιο συγκροτούν την λιπαρή φάση του γαλακτώματος, τα οποία εν συνεχεία κατόπιν ανάδευσης τους για 2-3 λεπτά μεταφέρθηκαν στην υδατική φάση για τον σχηματισμό του νανογαλακτώματος. Με το πέρας μιας ώρας συνεχούς ήπιας ανάδευσης όλα τα διαφορετικά νανογαλακτώματα που παρασκευάστηκαν, μεταφέρθηκαν σε γυάλινα φιαλίδια και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, με εξαίρεση το νανογαλάκτωμα που ήταν «φορτωμένο» με την βιοδραστική ουσία, για το οποίο και μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας αποθήκευσης στην δομή του, και έτσι αποθηκεύτηκε και σε ψυγείο θερμοκρασίας, 2-4°C.

3.4 Δομική Μελέτη Νανογαλακτώματος

3.4.1 Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS)

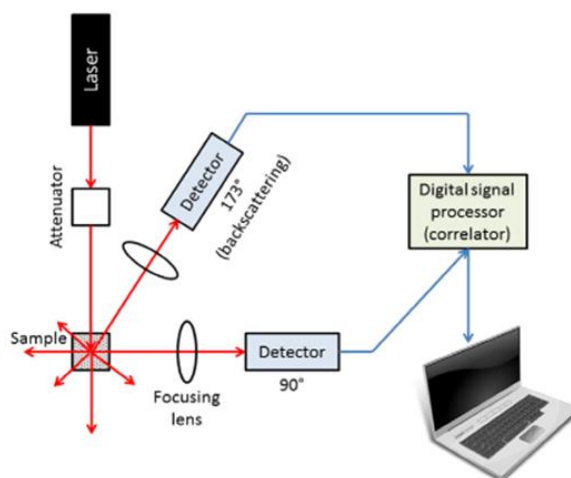
Ο χαρακτηρισμός των φυσικοχημικών και διεπιφανειακών ιδιοτήτων ενός νανογαλακτώματος (π.χ ιζώδες, μέγεθος νανοσταγονιδίων), παρέχει καλύτερη κατανόηση της συμπεριφοράς του καθώς επίσης και των πιθανών αλληλεπιδράσεων σε κλινική εφαρμογή. Η Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS) αποτελεί την πλέον κατάλληλη και ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνολογία χαρακτηρισμού διαστάσεων των σταγονιδίων. Σε αυτήν την μέθοδο, τα κινούμενα σταγονίδια της λιπαρής φάσης εκτίθενται σε δέσμη φωτός, η οποία σκεδάζεται με διαφορετική ένταση ανάλογα με το μέγεθος των σωματιδίων. Η συχνότητα των διακυμάνσεων του σκεδασμένου κύματος ενός δείγματος, αναλύεται υπό καθορισμένη γωνία σκέδασης και με την χρήση κατάλληλου μαθηματικού μοντέλου, με σκοπό την μετατροπή της σε κατανομή

μεγέθους των νανοσταγονιδίων. Η μέση διάμετρος των νανοσταγονιδίων και ο δείκτης πολυδιασποράς (Polydispersity Index: PDI), συνιστούν κομβικές παραμέτρους για την εκτίμηση των δομικών ιδιοτήτων και της κατανομής ενός νανογαλακτώματος. Επομένως, όταν οι τιμές αυτές παραμένουν αμετάβλητες σε βάθος χρόνου, τα νανosuστήματα θεωρούνται σταθερά. (J. McClements & McClements, 2016; Tayeb et al., 2021)

Τα όργανα που επιτελούν μετρήσεις DLS, είναι ευαίσθητα σε διαμέτρους σταγονιδίων που ποικίλουν από 1 έως 3000 nm. Για αυτόν τον λόγο και η μέθοδος αυτή αποτελεί ένα από τα πλέον κατάλληλα εργαλεία για τον χαρακτηρισμό των νανοσταγονιδίων, και χρησιμοποιείται από πολλά ερευνητικά εργαστήρια. Άλλα υψίστης σημασίας πλεονεκτήματα που παρουσιάζει η συγκεκριμένη μεθοδολογία, αναφέρονται παρακάτω (Bourbon et al., 2018; J. McClements & McClements, 2016):

- i. Μικρός χρόνος μέτρησης των αποτελεσμάτων
- ii. Δεν απαιτείται βαθμονόμηση πριν το πείραμα
- iii. Απλή και αυτοματοποιημένη μέθοδος
- iv. Μη επεμβατική τεχνολογία

Για τις μετρήσεις αυτές, έγινε χρήση του μηχανήματος Zetasizer NanoZS ZEN3600 (Malvern Instruments, Malvern, UK), το οποίο είναι εξοπλισμένο με στερεάς κατάστασης λέιζερ He-Ne ($\lambda=633$) και την πατενταρισμένη τεχνολογία μη επεμβατικής οπισθοσκέδασης. Τα δείγματα τόσο απουσία όσο και παρουσία του αναστολέα KT5720, τοποθετήθηκαν σε γυάλινη κυψελίδα, πλάτους 1 cm και οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τριπλέτες στους 25°C, υπό γωνία οπισθοσκέδασης 173°.



Εικόνα 29: Οργανολογία DLS (Bhattacharjee, 2016)

Η υδροδυναμική ακτίνα (R_h) των διεσπαρμένων σταγονιδίων της λιπαρούς φάσης εκτιμήθηκε με χρήση της εξίσωσης Stokes-Einstein:

$$R_h = k_B T / 6\pi\eta D$$

Όπου:

- k_B , η σταθερά του Boltzmann
- T , η απόλυτη θερμοκρασία
- η , το ιξώδες της συνεχούς φάσης σε δεδομένη θερμοκρασία
- D , η σταθερά διάχυσης

Ο δείκτης πολυδιασποράς, αποτυπώνει την ένταση του φωτός που σκεδάζεται, από τα διαφορετικά σε μέγεθος νανοσταγονίδια και συνιστά μέτρο ομογένειας μεταξύ τους. Λαμβάνει τιμές από 0 έως 1, με τις τιμές που προσεγγίζουν το 0, να αποτελούν δείκτη μεγαλύτερης ομοιογένειας του συστήματός μας, και τις τιμές από 0,1 έως 0,4 να είναι ενδεικτικές ενός μετρίως έως υψηλά πολύ-διεσπαρμένου συστήματος. Ακόμη, το μέγεθος των σωματιδίων, διαδραματίζει ζωτικής σημασίας ρόλο στην κατανομή κάποιου θεραπευτικού παράγοντα στο ανθρώπινο σώμα, επομένως η ξεχωριστή μελέτη του κρίνεται απαραίτητη. Με την μείωση του μεγέθους των σταγονιδίων ενός συστήματος μεταφοράς, βελτιστοποιείται τόσο η σταθερότητα του ίδιου του συστήματος, όσο και η εντερική διαπερατότητα του φαρμάκου που ενθυλακώνεται εντός αυτού. (Bhattacharjee, 2016; Theochari et al., 2017)

3.4.2 Μέτρηση Ιξώδους

Για την διερεύνηση της καταλληλότητας του νανογαλακτώματος ως φαρμακευτικό σκεύασμα, διενεργήθηκαν μετρήσεις ιξώδους. Το ιξώδες, αποτελεί σημαντική παράμετρο που καθορίζει την ρεολογική συμπεριφορά ενός νανογαλακτώματος, και βάσει της τιμής του, μπορεί να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα, η ασφάλεια και η σταθερότητα μιας νανοδιασποράς, και ως εκ τούτου να προσδιοριστεί σωστά, η οδός χορήγησης για κάποιο σύστημα μεταφοράς. Οι μετρήσεις, διενεργήθηκαν με την χρήση του ιξωδόμετρου DV-I Prime Digital Viscometer, της εταιρείας Brookfield Engineering Laboratories (USA), το οποίο ήταν εξοπλισμένο με την άτρακτο CPA-40Z. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε σταθερή θερμοκρασία 25°C, με την βοήθεια υδατόλουτρου, και για κάθε δείγμα οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τριπλέτες.

3.5 Προσδιορισμός Κυτταρικής Βιωσιμότητας

3.5.1 Καλλιέργεια Caco-2 - Μέτρηση Ολικού Αριθμού Κυττάρων

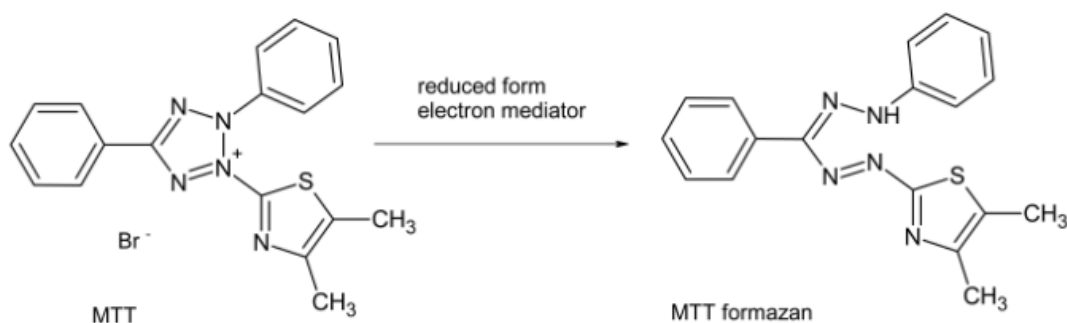
Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM, το οποίο περιέχει L-γλυκόζη, L-γλουταμίνη και πυροσταφυλικό, συστατικά απαραίτητα για την ανάπτυξη και επιβίωση των κυττάρων, στο οποίο προστέθηκε 20 % FBS και μίγμα αντιβιοτικών 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη, και ακολούθως επώασθησαν σε υγροποιημένο θάλαμο επώασης στους 37°C με 5% CO₂. Τα κύτταρα διατηρήθηκαν σε καλλιέργεια μονοστοιβάδας, και όταν πλέον είχε επιτευχθεί ικανοποιητική κάλυψη των προσκολλημένων κυττάρων στην επιφάνεια του δοχείου καλλιέργειας (φλάσκες T25/T75), διενεργήθηκε η διαδικασία της τρυψινοποίησης. Η τρυψίνη, είναι μια παγκρεατικής προέλευσης πρωτεάση σερίνης που σχηματίζεται από το ανενεργό τρυψινογόνο, διαθέτει 3 ενεργά καταλυτικά κέντρα (His-57, Asp-102 και Ser-195), και αποτελεί την πλέον άφθονη πρωτεάση στην φύση. Η χορήγηση της τρυψίνης στα κύτταρα πραγματοποιείται με σκοπό την πέψη των πρωτεϊνών της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων, που είναι υπεύθυνες για την προσκόλλησή τους στην επιφάνεια ενός δοχείου καλλιέργειας, με σκοπό την αποκόλλησή τους από αυτήν προς μεταφορά σε κάποιο άλλο δοχείο, πιθανότατα για κάποιο επόμενο πείραμα. (Jung et al., 2009; J. Zhang et al., 2024).

Πρώτο βήμα για την διαδικασία αυτή αποτελεί η αναρρόφηση του υπερκείμενου θρεπτικού υλικού, κατά τέτοιον τρόπο ώστε να μην τραυματιστεί η στιβάδα των Caco-2, στον πυθμένα του δοχείου, και ακολουθεί πλύση των κυττάρων με ρυθμιστικό διάλυμα PBS (~5 ml), προκειμένου να γίνει η χορήγηση 0,5 με 2 ml διαλύματος τρυψίνης 0,25% σε EDTA, με σκοπό να καλυφθεί όλη η επιφάνεια των κυττάρων στο δοχείο καλλιέργειας. Στο σημείο αυτό, με ήπια πλευρικά χτυπήματα στο δοχείο καλλιέργειας αλλά και με ολιγόλεπτη επώαση στους 37°C, τα κύτταρα έχουν πλέον ξεκολλήσει από την επιφάνεια που βρίσκονταν προσκολλημένα, και το επόμενο βήμα για να διακοπεί η πρωτεολυτική δράση του ενζύμου της τρυψίνης, αποτελεί η προσθήκη DMEM, όγκου περίπου 4 με 5 φορές μεγαλύτερου από αυτόν της τρυψίνης. Στο σημείο αυτό, πρέπει να αναφέρουμε ότι οι όγκοι που χρησιμοποιούνται κάθε φορά, εξαρτώνται από την καλυπτόμενη επιφάνεια των υπό καλλιέργεια κυττάρων.

Με το πέρας της τρυψινοποίησης, ακολουθεί φυγοκέντρηση προκειμένου να είμαστε σε θέση να ποσοτικοποιήσουμε τα κύτταρα που παρατηρούμε δια γυμνού οφθαλμού με την βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου. Ειδικότερα, μετά και την προσθήκη του DMEM, γίνεται συλλογή του μίγματος DMEM-Caco2-τρυψίνης, και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση σε 1800 rpm για 5 λεπτά. Κατόπιν αναρρόφησης του υπερκειμένου, τα κύτταρα που έχουν πλέον καταβυθιστεί σε μορφή ιζήματος στον πυθμένα του σωλήνα φυγοκέντρησης, αναδιαλύονται με θρεπτικό υλικό. Τέλος, συλλέγεται μικρή ποσότητα του διαλύματος (12 µl) και γίνεται η καταμέτρηση σε ειδική καλυπτρίδα Neubauer.

3.5.2 Δοκιμασία MTT

Πρόκειται για μια γρήγορη χρωματομετρική μέθοδο ποσοτικοποίησης της αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και επακόλουθα της κυτταροτοξικότητας που αναπτύχθηκε την δεκαετία του '80 από τον Dr. Tim R. Mosmann, η οποία στηρίζεται στην μετατροπή ενός κίτρινου τετραζόλιου άλατος (MTT) σε ένα ιώδες υδατοδιαλυτό φορμαζάνιο, όταν αυτό βρεθεί σε κάποιο υλικό καλλιέργειας. Αυτή η μετατροπή (αναγωγή) του άλατος MTT, καταλύεται κυρίως από μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες και επομένως είναι ενδεικτική για την ύπαρξη μεταβολικά ενεργών κυττάρων σε ένα δείγμα. Έτσι, εάν κάποια κύτταρα έχουν υποστεί βλάβες ή καταστραφεί εξαιτίας της παρουσίας τοξινών, το οπτικό αποτέλεσμα της αντίδρασης για τα κύτταρα αυτά θα είναι λιγότερο έντονο χρωματικά, και αυτή η χρωματική διαβάθμιση, επομένως και η κυτταροτοξικότητα κάποιας βιοδραστικής ουσίας, μπορεί να προσδιοριστεί φωτομετρικά, ως κλάσμα της οπτικής πυκνότητας των κυττάρων στα οποία έχει χορηγηθεί κάποιο σύστημα μεταφοράς (π.χ νανογαλάκτωμα) με ή χωρίς τον θεραπευτικό παράγοντα, προς την οπτική πυκνότητα των κυττάρων-μαρτύρων. Τέλος, θα πρέπει να λαμβάνουμε υπόψιν ότι με την παρούσα μέθοδο, δεν μας δίνεται πληροφορία για τον τύπο των βλαπτικών, για τα κύτταρα, παραγόντων, παρά μόνο προσδιορίζονται οι επιπτώσεις τους σε αυτά. (Patravale et al., 2012; Twarużek et al., 2018; Winikoff et al., 2005)



Εικόνα 30: Αναγωγή MTT (Twarużek et al., 2018)

Σε ό,τι αφορά στο πείραμά της παρούσας διπλωματικής, στα κύτταρα της σειράς Caco-2, χορηγήθηκαν DMSO (0,1%v/v) ως θετικός μάρτυρας και διάφορες συγκεντρώσεις του άδειου νανογαλακτώματος που επρόκειτο να χρησιμοποιηθεί προς ενθυλάκωση του αναστολέα KT5720, για να εξακριβωθεί η βέλτιστη ως προς την βιωσιμότητα των κυττάρων, προκειμένου να μελετηθεί σε δεύτερο χρόνο η επίδρασή του φορτωμένου πλέον με τον αναστολέα, συστήματος, σε συγκέντρωση που ως προς τα συστατικά τουλάχιστον του νανογαλακτώματος δεν θα είναι βλαπτική για τα κύτταρα.

Η κυτταροτοξικότητα λοιπόν των νανοφορέων, εκτιμήθηκε 72 ώρες μετά τη χορήγηση με το διάλυμα MTT, σύμφωνα με τα πρωτόκολλα του κατασκευαστή, και η επίδρασή τους μετρήθηκε με την χρήση του μηχανήματος Safire II της εταιρείας TECAN. Τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε πλακίδιο καλλιέργειας 96-πηγαδιών σε πυκνότητα 10^4 ανά πηγάδι και ακολούθησε επώαση για 24 ώρες σε θάλαμο επώασης στους 37°C . Την ημέρα της χορήγησης, πραγματοποιήθηκε αναρρόφηση του υπερκείμενου από κάθε πηγάδι, και αναπληρώθηκε με φρέσκο θρεπτικό υλικό DMEM, στο οποίο, αραιώθηκε το νανογαλάκτωμα που επιλέχθηκε για την ενθυλάκωση του φαρμάκου, σε διαφορετικές % v/v περιεκτικότητες (από 0,01 % v/v έως 0,2 % v/v). Στην συνέχεια, το διάλυμα MTT χορηγήθηκε σε κάθε πηγάδι και ακολούθησε επώαση για χρονικό διάστημα 3 ωρών, με το πέρας της οποίας το θρεπτικό μέσο αναρροφήθηκε, και το αδιάλυτο ιώδες άλας φορμαζανίου, διαλύθηκε με την προσθήκη ισοπροπανόλης. Κλείνοντας, η απορρόφηση από την μετατροπή του MTT, μετρήθηκε σε μήκος κύματος $\lambda=570\text{ nm}$.

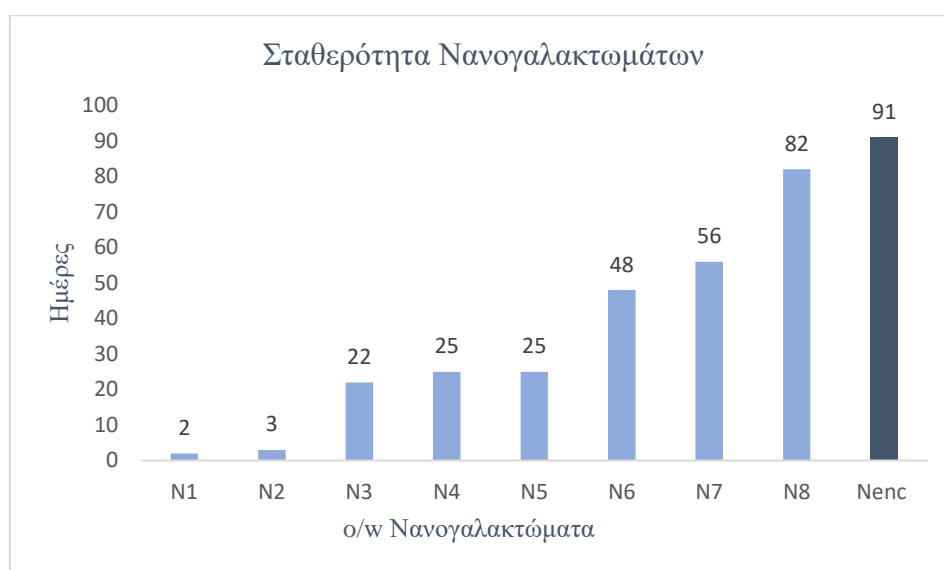
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Δομική Μελέτη Νανογαλακτώματος

4.1.1 Επισκόπηση Σταθερότητας ο/w Νανογαλακτωμάτων

Για την εξεύρεση του ο/w νανογαλακτώματος εκείνου, που παρουσίαζε τις βέλτιστες μορφολογικές, και φυσικοχημικές ιδιότητες, παρασκευάστηκαν πολλοί νανοφορείς με διαφορετικές συστάσεις, και ως εκ τούτου διαφορετική χρονική περίοδο για την οποία παρέμεναν σταθερά.

Κατόπιν παρασκευής των διαφορετικών ο/w νανογαλακτωμάτων, το πρώτο βήμα για το προσδιορισμό της σταθερότητας του αποτελεί η οπτική παρατήρηση. Συστήματα, όπου παρατηρούνταν φαινόμενα όπως ο διαχωρισμός φάσεων, η κροκίδωση και η θολερότητα, κρίνονταν ακατάλληλα για την ενθυλάκωση της βιοδραστικής μας ουσίας, και επομένως δεν υποβλήθηκαν σε αναλυτικά πειράματα εκτίμησης των δομικών χαρακτηριστικών τους. Αντίθετα, τα νανογαλακτώματα εκείνα που παρουσίασαν οπτική διαύγεια και σταθερότητα φάσεων, μελετήθηκαν ως προς την κατανομή και το μέγεθος των νανοσταγονιδίων τους, με την μεθοδολογία της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός. Ενδεικτικά, στο παρακάτω διάγραμμα αποτυπώνονται ορισμένα συστήματα με τις μέρες που διατηρήθηκε σταθερή η δομή τους, με την αξιοποίηση της παραπάνω τεχνικής.



Διάγραμμα 1: Σταθερότητα νανογαλακτωμάτων

Όπου τα παραπάνω συστήματα είχαν τις ακόλουθες συστάσεις (% w/w):

N1: 90 % H₂O, 5 % IPM, 2% Labrasol, 1% Labrafil, 1% Labrafac, 1% PGPH

N2: 87 % H₂O, 8% IPM, 2% Labrasol, 1% Labrafac, 1% Plurol Ol., 1% PGPH

N3: 90 % H₂O, 5 % IPM, 2% Labrasol 1% Plurol Diis., 1% Plurol Is., 1% PGPH

N4: 90 % H₂O, 5 % IPM, 2% Tween 80, 1% Labrafac, 1% Plurol Ol., 1% PGPH

N5: 90 % H₂O, 5 % IPM, 1,5% Labrasol, 1% Labrafac, 1,5% Plurol Ol, 1% PGPH

N6: 83 % H₂O, 12 % IPM, 4% Tween 80, 1% Plurol Ol.

N7: 84 % H₂O, 12 % IPM, 3% Tween 80, 1 % Span 85

N8: 85 % H₂O, 10 % IPM, 4% Tween 80, 1 % Span 85

N_{enc}: 82 % H₂O, 12 % IPM, 4% Tween 80, 2 % Span 85

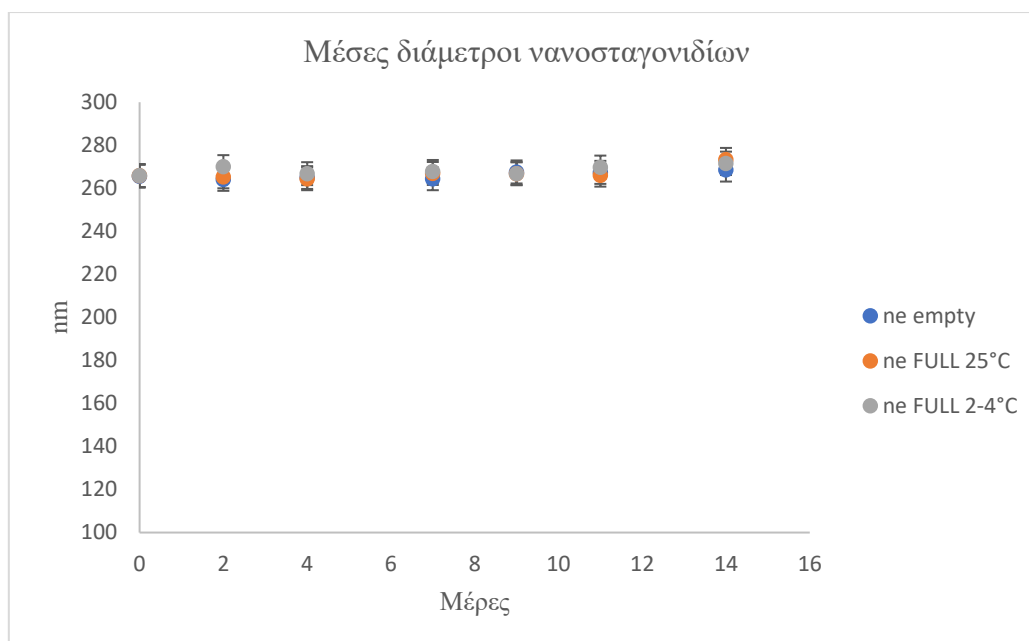
Έτσι, εξαιτίας της δομικής σταθερότητας για χρονικό διάστημα άνω των 3 μηνών, επιλέχθηκε το σύστημα N_{enc}, με την σύσταση που αναγράφεται παραπάνω για την ενθυλάκωση του αναστολέα της PhK, με τις δομικές αναλύσεις για το σύστημα αυτό με ή χωρίς τον θεραπευτικό αυτό παράγοντα να ακολουθούν παρακάτω.

4.1.2 Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS)

Αφού πραγματοποιήθηκε η επιλογή του νανογαλακτώματος εκείνου στο οποίο έγινε η ενθυλάκωση του λιπόφιλου αναστολέα KT5720 (0,02 % v/v), διενεργήθηκαν μετρήσεις μεγέθους και ομογένειας των νανοσταγονιδίων που βρίσκονται σε διασπορά στο σύστημά μας, παράμετροι κρίσιμοι για την εκτίμηση της σταθερότητας ενός νανογαλακτώματος, τόσο με όσο και χωρίς το φάρμακο, ενώ για το σύστημα που εμπειριείχε τον θεραπευτικό παράγοντα, εξετάστηκε και η επίδραση της θερμοκρασίας αποθήκευσης του συστήματος μεταφοράς στην δομή του, για χρονικό διάστημα 15 ημερών.

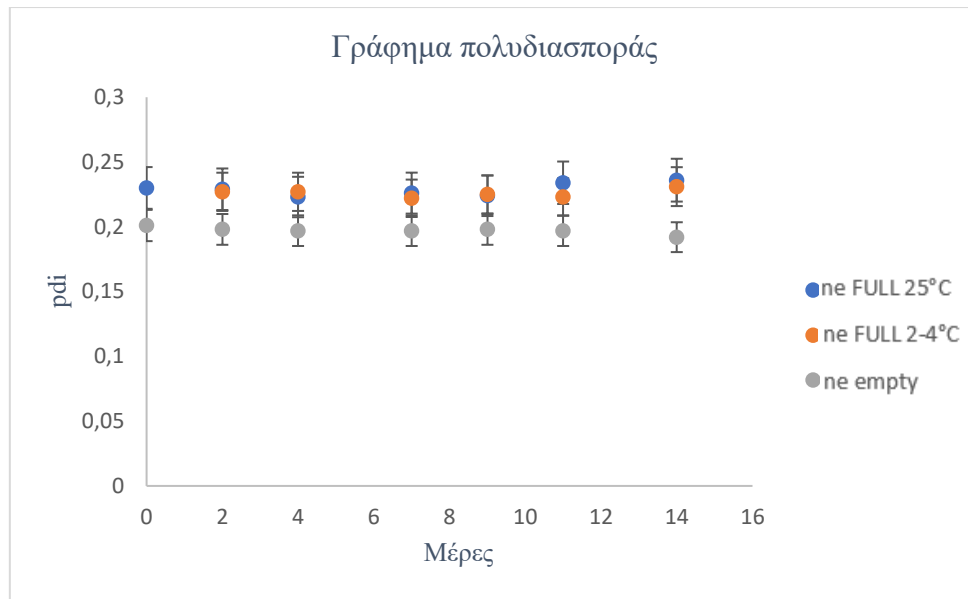
Από τα παρακάτω διαγράμματα καθίσταται σαφές, ότι τα νανογαλακτώματα παραμένουν σταθερά, χωρίς αξιοσημείωτες μεταβολές τόσο στο μέγεθος των νανοσταγονιδίων τους όσο και στην τιμή pd_i , που είναι ενδεικτική για την κατανομή των διαφορετικών πληθυσμών των σωματιδίων, ως προς τον όγκο τους στο νανογαλάκτωμα. Ειδικότερα, σε ό,τι αφορά στις μέσες διαμέτρους των σταγονιδίων παρατηρούμε από αρχική τιμή $265,6 \pm 2,9$ nm, με το πέρας 15 ημερών αυξάνονται ελαφρώς κατόπιν ενθυλάκωσης του KT5720, σε $273,3 \pm 1,8$ και $271,6 \pm 2$ nm, για θερμοκρασία αποθήκευσης 25°C και 2-4°C αντίστοιχα. Επομένως, μπορούμε να πούμε

πως η θερμοκρασία δεν φαίνεται να επηρεάζει τις δομικές ιδιότητες του νανογαλακτώματος σε βαθμό που να καθιστά απαραίτητη την αποθήκευση του σε ψυγείο.



Διάγραμμα 2: Μεταβολή μέσων διαμέτρων σταγονιδίων λιπαρής φάσης σε συνάρτηση με τον χρόνο

Κατά αντίστοιχο τρόπο μπορούμε να πούμε πως οι δείκτες πολυδιασποράς PdI παρουσίασαν ανεπαίσθητες μεταβολές, στο διάστημα των 15 ημερών, με ενδεχομένως την μόνη αξιόλογη ποιοτική διαφορά να εντοπίζεται μεταξύ του άδειου και του γεμάτου νανογαλακτώματος, ανεξάρτητα από θερμοκρασία αποθήκευσης. Πιο συγκεκριμένα βλέπουμε πως το άδειο νανογαλάκτωμα, λαμβάνουμε μια αρχική τιμή PdI $0,2\pm 0,016$, ενώ στο γεμάτο $0,23\pm 0,015$, με την διαφορά αυτή να παρατηρείται με μικρές μεταβολές για όλο αυτό το διάστημα των 15 ημερών. Ως εκ τούτου, συμπεραίνουμε πως με την ενθυλάκωση του αναστολέα, του γαλάκτωμα παραμένει σταθερό, αλλά υστερεί ελαφρώς σε ομοιογένεια συγκριτικά, με το άδειο.



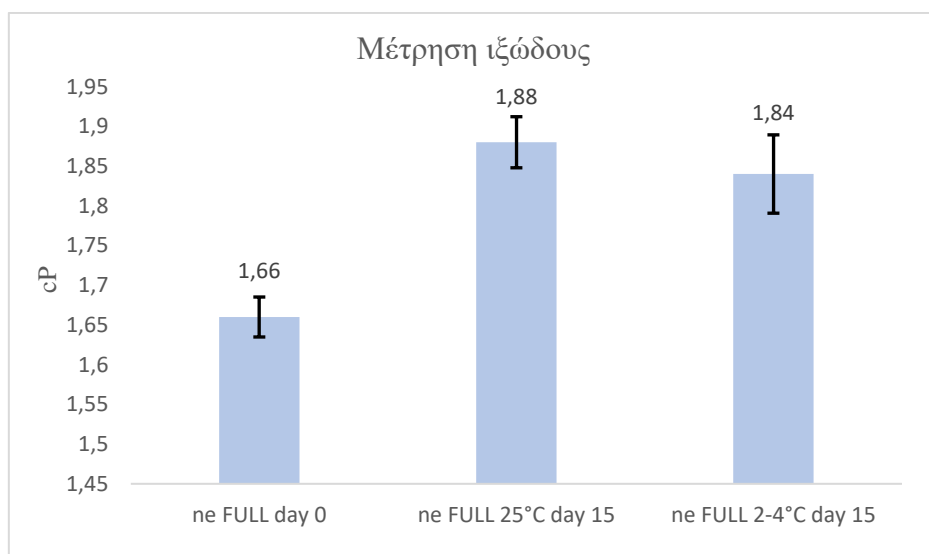
Διάγραμμα 3: Μεταβολή της τιμής PdI σε συνάρτηση με τον χρόνο

4.1.3 Μέτρηση Ιξώδους

Παράγοντες που χαρακτηρίζουν την ρεολογική συμπεριφορά ενός νανογαλακτώματος, όπως το ιξώδες, καθορίζουν τον χρόνο παραμονής του στην στοματική κοιλότητα, καθώς επίσης και την ικανότητά του να παραμένει σταθερό και ομοιογενές κατόπιν χορήγησης, στοιχεία υψίστης σημασίας για την στοχευμένη μεταφορά κάποιου φαρμάκου. Επιπλέον, ο προσδιορισμός του ιξώδους, ουσιαστικά βεβαιώνει εάν το σύστημα που έχει παρασκευαστεί πρόκειται για o/w ή w/o νανογαλάκτωμα, με τις χαμηλότερες τιμές να είναι ενδεικτικές για τύπο o/w (εξαιτίας της μεγάλης περιεκτικότητας της υδατικής φάσης) και τις υψηλότερες για w/o νανογαλάκτωμα. Αξίζει να σημειωθεί ότι για ένα νανογαλάκτωμα που χρησιμοποιείται για την ενθυλάκωση μιας λιπόφιλης βιοδραστικής ουσίας, όπως ο αναστολέας της PhK, KT5720 που μελετάται στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, το ιξώδες δεν πρέπει να αυξάνεται αισθητά στο τελικό σκεύασμα. (Kumar & Singh, 2018; D. J. McClements, 2013; Samiraninezhad et al., 2023)

Έτσι, διενεργήθηκαν μετρήσεις ιξώδους για τα γεμάτα νανογαλακτώματα που διέφεραν ως προς την θερμοκρασία αποθήκευσης τους για 15 ημέρες, για να μελετηθούν οι ρεολογικές ιδιότητες του φορέα, και να υποστηριχθεί έτι περαιτέρω ο ισχυρισμός που θέλει το παραπάνω νανογαλάκτωμα να θεωρείται ως κατάλληλο σύστημα μεταφοράς κάποιου θεραπευτικού παράγοντα να αποτελεί κατάλληλο φορέα για χορήγηση από το στόμα.

Διαπιστώθηκε ότι συγκριτικά με την ημέρα παρασκευής τους που είχαν τιμή ιζώδους $1,66 \pm 0,02$ cP, τόσο το σύστημα που αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου ($1,88 \pm 0,03$ cP), όσο και αυτό που παρέμεινε εντός ψυγείου ($1,89 \pm 0,04$ cP), παρουσίασαν μικρές αυξήσεις στις τιμές τους, οι οποίες δεν ήταν απαγορευτικές και βρίσκονται εντός ενός φάσματος αποδεκτών τιμών ιζώδους σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία (Khani et al., 2016; Laxmi et al., 2015), ώστε να αποτελεί κατάλληλο φορέα για χορήγηση από το στόμα.



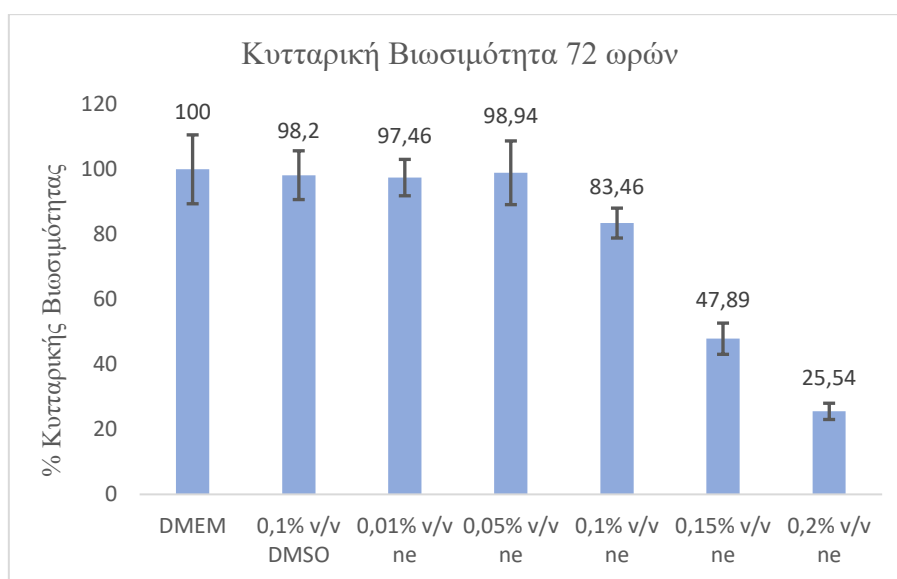
Διάγραμμα 4: Μεταβολή ιζώδους γεμάτων νανογαλακτωμάτων σε διάστημα 15 ημερών

4.2 Δοκιμασία MTT (MTT Assay)

Ο προσδιορισμός της κυτταρικής βιωσιμότητας στα πλαίσια της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκε με την χρήση της δοκιμασίας MTT σε κύτταρα ορθοκολικού καρκίνου της σειράς Caco-2, κατόπιν επώασης 72 ωρών στις εξής πειραματικές συνθήκες:

- Για κύτταρα τα οποία επώασθηκαν αποκλειστικά με DMEM και με 0,1 % v/v DMSO, τα οποία και αποτέλεσαν θετικούς μάρτυρες
- Για κύτταρα τα οποία επώασθηκαν με DMEM, στα οποία είχε προστεθεί το νανογαλάκτωμα που επιλέχθηκε για την ενθυλάκωση του αναστολέα KT5720, σε διαφορετικές % v/v περιεκτικότητες (από 0,01 % v/v έως 0,2 % v/v), με σκοπό τον καθορισμό της συγκέντρωσης εκείνης που μας επιτρέπει ασφαλή χορήγηση

Βρέθηκε ότι το νανογαλάκτωμα, για περιεκτικότητες από 0,01-0,05% v/v δεν παρουσίασε κυτταροτοξικότητα, ενώ για περιεκτικότητες υψηλότερες του 0,1% v/v, παρατηρήθηκε απότομη μείωση της βιωσιμότητας των Caco-2. Τέλος, θα πρέπει να αναφέρουμε πως ο μέσος όρος των απορροφήσεων που λάβαμε για τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν αποκλειστικά σε DMEM, αποτέλεσε το 100% της βιωσιμότητας, και βάσει αυτού εκτιμήθηκε η βιωσιμότητα των υπόλοιπων συνθηκών του πειράματός μας, ενώ ο μέσος όρος των απορροφήσεων για κάθε περίπτωση, από τον οποίο απορρέει το ποσοστό της κυτταρικής βιωσιμότητας, προκύπτει κατόπιν πέντε επαναλήψεων.



Διάγραμμα 5: Κυτταρική βιωσιμότητα κυτταρικής σειράς Caco-2 κατόπιν επώασης 72 ωρών

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι πρωτεϊνικές κινάσες, και οι αναστολείς αυτών αποτελούν ένα αντικείμενο έρευνας με ολοένα και αυξανόμενο ενδιαφέρον, καθώς η ρύθμιση της ενζυμικής του δραστηριότητας, μπορεί να αποτελέσει εφελτήριο για την αντιμετώπιση πολλών διαταραχών. Ειδικότερα, σε ό,τι αφορά στην PhK, αποτελεί ένζυμο-κλειδί για το μονοπάτι της αποικοδόμησης του γλυκογόνου, μέσω της φωσφορυλίωσης ενός καταλοίπου σερίνης, που έχει ως αποτέλεσμα την μετατροπή της ανενεργής GPb στην ενεργή GPa.

Ως εκ τούτου, αυτός ο καταλυτικός μηχανισμός ενεργοποίησης αποτελεί στόχο για την ανάπτυξη φαρμάκων, κυρίως με αντι-γλυκαιμικές προεκτάσεις, με τις μελέτες αναφορικά με την αναστολή της δράσης της καταλυτικής υπομονάδας (γ) της PhK να έχουν ενταθεί εμφανώς τις τελευταίες δεκαετίες, με τις μελέτες μεταξύ άλλων αναλόγων ινδουβίνης και σταυροσπορίνης να πρωταγωνιστούν. Το ανάλογο σταυροσπορίνης KT5720, αποτελεί μια περίπτωση με μεγάλη προοπτική λόγω της ισχύος αλλά και της εξειδικευμένης του δράσης.

Επομένως υπάρχει πρόσφορο έδαφος για την ανάπτυξη νέων συστημάτων μεταφοράς για το εν λόγω φάρμακο, με την αξιοποίηση των εργαλείων της νανοτεχνολογίας και των καινοτομιών που προσφέρει εν γένει ο εγκλωβισμός φαρμάκων, αντιοξειδωτικών και πεπτιδίων σε ένα oil-in-water νανογαλάκτωμα, μιας και μελετούμε έναν υδρόφοβο αναστολέα.

Για την βιοσυμβατότητα του συστήματος που παρασκευάστηκε, κρίθηκε απαραίτητο να γίνει η εκτίμηση ορισμένων χαρακτηριστικών των μορφολογικών χαρακτηριστικών και της δομής των νανογαλακτωμάτων σε συνδυασμό με τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικότητας του σε κύτταρα ορθοκολικού αδενοκαρκινώματος της σειράς Caco-2, για να εξασφαλισθεί η καταλληλότητα του φορέα για χορήγηση από το στόμα.

Το σύστημα που παρασκευάστηκε για την ενθυλάκωση της βιοδραστικής μας ουσίας, αποτελούταν από ένα συνθετικό έλαιο (IPM), μίγμα επιφανειοενεργών αποτελούμενο από ένα λιπόφιλο (Span 85) και ένα υδρόφιλο (Tween 80) επιφανειοενεργό και δις απεσταγμένο νερό για την συνεχή υδατική του φάση. Ο αναστολέας KT5720, ενθυλακώθηκε με επιτυχία σε 0,02% v/v (που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 0,4 μ M) στο νανογαλάκτωμά μας, με χρήση μεθόδου χαμηλής ενέργειας και πιο συγκεκριμένα,

ήπια μηχανική ανάδευση. Στην συνέχεια, ακολούθησε δομική αξιολόγηση τόσο του άδειου, όσο και του γεμάτου συστήματος με ενσωματωμένο τον αναστολέα με δυο διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης για το γεμάτο νανογαλάκτωμα, σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) και εντός ψυγείου (2-4°C) για χρονικό διάστημα 15 ημερών. Καταρχάς με την χρήση δυναμικής σκέδασης φωτός, υπολογίστηκε πώς οι μέσες διαμέτροι των νανοσταγονιδίων τόσο για το άδειο όσο και για τα γεμάτα νανογαλακτώματα εκτείνονταν από 265,6 nm την ημέρα παρασκευής τους μέχρι και 273,3 nm την 15^η μέρα αποθήκευσής τους ενδεικτικό της σταθερότητάς τους, ενώ κατά παρόμοιο τρόπο κυμάνθηκε και η ομοιογενής κατανομή τους με τον δείκτη πολυδιασποράς να παρουσιάζει μικρές διακυμάνσεις. Στην συνέχεια, με τις μετρήσεις ιξώδους που ακολούθησαν διαπιστώθηκαν ομοίως μικρές μεταβολές μεταξύ των άδειων και γεμάτων συστημάτων, ανεξάρτητα από θερμοκρασία αποθήκευσης με διάστημα τιμών από 1,66 cP την ημέρα σχηματισμού της διασποράς έως 1,88 cP, με το πέρας 15 ημερών.

Για την εκτίμηση της τοξικότητας των συστατικών του φορέα διενεργήθηκε δοκιμασία MTT από την οποία προσδιορίστηκε η κυτταρική βιωσιμότητα σε κύτταρα της σειράς Caco-2, κατόπιν χορήγησης διαφορετικών περιεκτικοτήτων του άδειου νανογαλακτώματος από 0,01 έως 0,2 % v/v. Όπως κατέδειξε το διάγραμμα 5, ένα εύρος συγκεντρώσεων από 0,01 έως 0,05 % v/v κρίνεται ως βέλτιστο, με κάθε τιμή μεγαλύτερη του 0,1 % v/v να θεωρείται τοξική, καθώς είχε σοβαρές επιπτώσεις στον μεταβολισμό και ως εκ τούτου, στην επιβίωση των κυττάρων.

Εν κατακλείδι, στο πλαίσιο της εργασίας αυτής, αναδείχθηκε η αξία των ο/w νανογαλακτωμάτων ως βιοσυμβατών φορέων ενθυλάκωσης υδρόφοβων αναστολέων κινασών, ένα πεδίο με αρκετά περιορισμένη βιβλιογραφία διεθνώς, και μολονότι δεν κατέστη εφικτή η μελέτη της τοξικότητας στα κύτταρα του συστήματος με ενσωματωμένο τον αναστολέα, λόγω της εξαιρετικά μικρής μέγιστης συγκέντρωσης που θα είχε στα κύτταρα (0,2 nM για 0,5 mg/ml νανογαλακτώματος), λαμβάνοντας υπόψιν την τιμή $K_i=18,4$ nM της ουσίας KT5720 (Begum et al., 2015; Hayes et al., 2011), είναι σαφές πως η μελέτη για την εξεύρεση νανοφορέων λόγω των ανταγωνιστικών πλεονεκτημάτων των κολλοειδών διασπορών έναντι των συμβατικών μορφών χορήγησης βιοδραστικών ουσιών, κρίνεται επιβεβλημένη τόσο σε αμιγώς ερευνητικό επίπεδο όσο και σε εμπορικό.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams, M. L., Lavasanifar, A., & Kwon, G. S. (2003). MINIREVIEW Amphiphilic Block Copolymers for Drug Delivery. In *Pharmacists Association J Pharm Sci* (Vol. 92).
- Adeva-Andany, M. M., González-Lucán, M., Donapetry-García, C., Fernández-Fernández, C., & Ameneiros-Rodríguez, E. (2016). Glycogen metabolism in humans. *BBA Clinical*, 5, 85. <https://doi.org/10.1016/J.BBACLI.2016.02.001>
- Agius, L. (2015). Role of glycogen phosphorylase in liver glycogen metabolism. *Molecular Aspects of Medicine*, 46, 34–45. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2015.09.002>
- Anton, N., & Vandamme, T. F. (2011). Nano-emulsions and micro-emulsions: Clarifications of the critical differences. In *Pharmaceutical Research* (Vol. 28, Issue 5, pp. 978–985). <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0309-1>
- Begum, J., Skamnaki, V. T., Moffatt, C., Bischler, N., Sarrou, J., Skaltsounis, A. L., Leonidas, D. D., Oikonomakos, N. G., & Hayes, J. M. (2015). An evaluation of indirubin analogues as phosphorylase kinase inhibitors. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, 61, 231–242. <https://doi.org/10.1016/J.JMGM.2015.07.010>
- Bhagavan, N. V., & Ha, C.-E. (2015). Carbohydrate Metabolism II. In *Essentials of Medical Biochemistry* (pp. 205–225). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416687-5.00014-2>
- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential - What they are and what they are not? In *Journal of Controlled Release* (Vol. 235, pp. 337–351). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- Bourbon, A. I., Gonçalves, R. F. S., Vicente, A. A., & Pinheiro, A. C. (2018). Characterization of Particle Properties in Nanoemulsions. In *Nanoemulsions: Formulation, Applications, and Characterization* (pp. 519–546). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811838-2.00016-3>
- Brushia, R. J., & Walsh, D. A. (1999). 618 PHOSPHORYLASE KINASE: THE COMPLEXITY OF ITS REGULATION IS REFLECTED IN THE COMPLEXITY OF ITS STRUCTURE. In *Frontiers in Bioscience* (Vol. 4).
- Camus, S., Quevedo, C., Menéndez, S., Paramonov, I., Stouten, P. F. W., Janssen, R. A. J., Rueb, S., He, S., Snaar-Jagalska, B. E., Laricchia-Robbio, L., & Izpisua Belmonte, J. C. (2012). Identification of phosphorylase kinase as a novel therapeutic target through high-throughput screening for anti-angiogenesis compounds in zebrafish. *Oncogene*, 31(39), 4333–4342. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.594>
- Chen, Y., Wang, Z. Z., Hao, G. F., & Song, B. A. (2022). Web support for the more efficient discovery of kinase inhibitors. In *Drug Discovery Today* (Vol. 27, Issue 8, pp. 2216–2225). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.04.002>
- Cheng, H. C., Qi, R. Z., Paudel, H., & Zhu, H. J. (2011). Regulation and Function of Protein Kinases and Phosphatases. *Enzyme Research*, 2011(1). <https://doi.org/10.4061/2011/794089>
- Dhanasekaran, H. R., Sharma, C. P., & Haridoss, P. (2018). Drug delivery nanosystems-an introduction. In *Drug Delivery Nanosystems for Biomedical Applications* (pp. 1–12). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-50922-0.00001-8>
- Ellingwood, S. S., & Cheng, A. (2018). Biochemical and Clinical Aspects of Glycogen Storage Diseases. *The Journal of Endocrinology*, 238(3), R131. <https://doi.org/10.1530/JOE-18-0120>

- Fay, F., Gouessan, M., Linossier, I., & Réhel, K. (2019). Additives for efficient biodegradable antifouling paints. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2).
<https://doi.org/10.3390/ijms20020361>
- Flanagan, J., & Singh, H. (2006). Microemulsions: A potential delivery system for bioactives in food. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 46, Issue 3, pp. 221–237).
<https://doi.org/10.1080/10408690590956710>
- Ganachaud, F., & Katz, J. L. (2005). Nanoparticles and nanocapsules created using the ouzo effect: Spontaneous emulsification as an alternative to ultrasonic and high-shear devices. In *ChemPhysChem* (Vol. 6, Issue 2, pp. 209–216). Wiley-VCH Verlag.
<https://doi.org/10.1002/cphc.200400527>
- Graves, D., Bartleson, C., Biorn, A., & Pete, M. (1999). Substrate and inhibitor recognition of protein kinases: what is known about the catalytic subunit of phosphorylase kinase? *Pharmacology & Therapeutics*, 82(2–3), 143–155. [https://doi.org/10.1016/s0163-7258\(98\)00049-7](https://doi.org/10.1016/s0163-7258(98)00049-7)
- Hari, S. B., Merritt, E. A., & Maly, D. J. (2013). Sequence determinants of a specific inactive protein kinase conformation. *Chemistry and Biology*, 20(6), 806–815.
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.05.005>
- Hayes, J. M., Kantsadi, A. L., & Leonidas, D. D. (2014). Natural products and their derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase: Potential treatment for type 2 diabetes. In *Phytochemistry Reviews* (Vol. 13, Issue 2, pp. 471–498). Kluwer Academic Publishers.
<https://doi.org/10.1007/s11101-014-9360-6>
- Hayes, J. M., Skamnaki, V. T., Archontis, G., Lamprakis, C., Sarrou, J., Bischler, N., Skaltsounis, A. L., Zographos, S. E., & Oikonomakos, N. G. (2011). Kinetics, in silico docking, molecular dynamics, and MM-GBSA binding studies on prototype indirubins, KT5720, and staurosporine as phosphorylase kinase ATP-binding site inhibitors: The role of water molecules examined. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 79(3), 703–719.
<https://doi.org/10.1002/prot.22890>
- Johnson, L. N. (2009). The regulation of protein phosphorylation. *Biochemical Society Transactions*, 37(4), 627–641. <https://doi.org/10.1042/BST0370627>
- Jung, K. H., Paik, J. Y., Lee, Y. La, Lee, Y. J., Lee, J., & Lee, K. H. (2009). Trypsinization severely perturbs radioiodide transport via membrane Na/I symporter proteolysis: implications for reporter gene imaging. *Nuclear Medicine and Biology*, 36(8), 967–974.
<https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2009.06.010>
- Kanungo, S., Wells, K., Tribett, T., & El-Gharbawy, A. (2018). Glycogen metabolism and glycogen storage disorders. *Annals of Translational Medicine*, 6(24), 474.
<https://doi.org/10.21037/atm.2018.10.59>
- Khani, S., Keyhanfar, F., & Amani, A. (2016). Design and evaluation of oral nanoemulsion drug delivery system of mebudipine. *Drug Delivery*, 23(6), 2035–2043.
<https://doi.org/10.3109/10717544.2015.1088597>
- Komaiko, J. S., & McClements, D. J. (2016). Formation of Food-Grade Nanoemulsions Using Low-Energy Preparation Methods: A Review of Available Methods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(2), 331–352. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12189>
- Kumar, S. S., & Singh, S. K. (2018). *Review of Nanoemulsion Formulation and Characterization Techniques*. [https://doi.org/DOI: 10.4172/pharmaceutical-sciences.1000422](https://doi.org/DOI:10.4172/pharmaceutical-sciences.1000422)

- Lamba, V., & Ghosh, I. (2012). New Directions in Targeting Protein Kinases: Focusing Upon True Allosteric and Bivalent Inhibitors. In *Current Pharmaceutical Design* (Vol. 18).
- Laxmi, M., Bhardwaj, A., Mehta, S., & Mehta, A. (2015). Development and characterization of nanoemulsion as carrier for the enhancement of bioavailability of artemether. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 43(5), 334–344. <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.887018>
- Lea, T. (2015). Caco-2 Cell Line. *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*, 103–111. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_10
- Litwack, G. (2018). Glycogen and Glycogenolysis. In *Human Biochemistry* (pp. 161–181). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-383864-3.00007-7>
- Liu, W., Nadeau, O. W., Sage, J., & Carlson, G. M. (2013). Physicochemical changes in phosphorylase kinase induced by its cationic activator Mg²⁺. *Protein Science*, 22(4), 444–454. <https://doi.org/10.1002/pro.2226>
- Liu, Y., Dong, X. Y., & Sun, Y. (2005). Characterization of reversed micelles of Cibacron Blue F-3GA modified Span 85 for protein solubilization. *Journal of Colloid and Interface Science*, 290(1), 259–266. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2005.04.017>
- McClements, D. J. (2012). Nanoemulsions versus microemulsions: Terminology, differences, and similarities. In *Soft Matter* (Vol. 8, Issue 6, pp. 1719–1729). <https://doi.org/10.1039/c2sm06903b>
- McClements, D. J. (2013). Nanoemulsion-based oral delivery systems for lipophilic bioactive components: Nutraceuticals and pharmaceuticals. In *Therapeutic Delivery* (Vol. 4, Issue 7, pp. 841–857). Newlands Press Ltd. <https://doi.org/10.4155/tde.13.46>
- McClements, D. J., Decker, E. A., & Weiss, J. (2007). Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *Journal of Food Science*, 72(8). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00507.x>
- McClements, J., & McClements, D. J. (2016). Standardization of Nanoparticle Characterization: Methods for Testing Properties, Stability, and Functionality of Edible Nanoparticles. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(8), 1334–1362. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.970267>
- Nielsen, J. N., & Richter, E. A. (2003). *Regulation of glycogen synthase in skeletal muscle during exercise*.
- Patravale, V., Dandekar, P., & Jain, R. (2012). Nanotoxicology: evaluating toxicity potential of drug-nanoparticles. In *Nanoparticulate Drug Delivery* (pp. 123–155). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9781908818195.123>
- Pushkala, S. P., & Panda, R. C. (2023). Design and analysis of reactive distillation for the production of isopropyl myristate. *Cleaner Chemical Engineering*, 5, 100090. <https://doi.org/10.1016/j.clce.2022.100090>
- Rawat, M., Singh, D., & Saraf, S. (2006). Nanocarriers: Promising Vehicle for Bioactive Drugs. *Biol. Pharm. Bull*, 29(9), 1790–1798.
- Roach, P. J., Depaoli-Roach, A. A., Hurley, T. D., & Tagliabracci, V. S. (2012). Glycogen and its metabolism: Some new developments and old themes. In *Biochemical Journal* (Vol. 441, Issue 3, pp. 763–787). <https://doi.org/10.1042/BJ20111416>

- Roskoski, R. (2016). Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes. In *Pharmacological Research* (Vol. 103, pp. 26–48). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.10.021>
- Roskoski, R. (2023). Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2023 update. In *Pharmacological Research* (Vol. 187). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106552>
- Ryu, J. H., Drain, J., Kim, J. H., McGee, S., Gray-Weale, A., Waddington, L., Parker, G. J., Hargreaves, M., Yoo, S. H., & Stapleton, D. (2009). Comparative structural analyses of purified glycogen particles from rat liver, human skeletal muscle and commercial preparations. *International Journal of Biological Macromolecules*, 45(5), 478–482. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.08.006>
- Samiraninezhad, N., Asadi, K., Rezazadeh, H., & Gholami, A. (2023). Using chitosan, hyaluronic acid, alginate, and gelatin-based smart biological hydrogels for drug delivery in oral mucosal lesions: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 252, 126573. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126573>
- Singh, Y., Meher, J. G., Raval, K., Khan, F. A., Chaurasia, M., Jain, N. K., & Chourasia, M. K. (2017). Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. In *Journal of Controlled Release* (Vol. 252, pp. 28–49). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.008>
- Skamnaki, V. T., Owen, D. J., Noble, M. E. M., Lowe, E. D., Lowe, G., Oikonomakos, N. G., & Johnson, L. N. (1999). Catalytic mechanism of phosphorylase kinase probed by mutational studies. *Biochemistry*, 38(44), 14718–14730. <https://doi.org/10.1021/bi991454f>
- Tayeb, H. H., Felimban, R., Almaghrabi, S., & Hasaballah, N. (2021). Nanoemulsions: Formulation, characterization, biological fate, and potential role against COVID-19 and other viral outbreaks. In *Colloids and Interface Science Communications* (Vol. 45). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.colcom.2021.100533>
- Theochari, I., Goulielmaki, M., Danino, D., Papadimitriou, V., Pintzas, A., & Xenakis, A. (2017). Drug nanocarriers for cancer chemotherapy based on microemulsions: The case of Vemurafenib analog PLX4720. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 154, 350–356. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.03.032>
- Theochari, I., Xenakis, A., & Papadimitriou, V. (2019). Nanocarriers for effective drug delivery. In *Smart Nanocontainers: Micro and Nano Technologies* (pp. 315–341). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816770-0.00019-8>
- Treiber, D. K., & Shah, N. P. (2013). Ins and outs of kinase DFG motifs. In *Chemistry and Biology* (Vol. 20, Issue 6, pp. 745–746). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.06.001>
- Twarużek, M., Zastempowska, E., Soszycyńska, E., & Altyn, I. (2018). The use of in vitro assays for the assessment of cytotoxicity on the example of MTT test. *Acta Universitatis Lodziensis. Folia Biologica et Oecologica*, 14, 23–32. <https://doi.org/10.1515/FOBIO-2017-0006>
- Ubersax, J. A., & Ferrell, J. E. (2007). Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 8, Issue 7, pp. 530–541). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm2203>
- Vega-Vásquez, P., Mosier, N. S., & Irudayaraj, J. (2020). Nanoscale Drug Delivery Systems: From Medicine to Agriculture. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00079>

- Vénien-Bryan, C., Jonic, S., Skamnaki, V., Brown, N., Bischler, N., Oikonomakos, N. G., Boisset, N., & Johnson, L. N. (2009). The Structure of Phosphorylase Kinase Holoenzyme at 9.9 Å Resolution and Location of the Catalytic Subunit and the Substrate Glycogen Phosphorylase. *Structure(London, England:1993)*, 17(1), 117. <https://doi.org/10.1016/J.STR.2008.10.013>
- Vougogiannopoulou, K., & Skaltsounis, A. L. (2012). From tyrian purple to kinase modulators: Naturally halogenated indirubins and synthetic analogues. *Planta Medica*, 78(14), 1515–1528. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1315261>
- Winikoff, S. E., Zeh, H. J., DeMarco, R., & Lotze, M. T. (2005). *Cytolytic Assays*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-455900-4.50291-9>
- Yang, Y., Zhao, Y., Yu, A., Sun, D., & Yu, L. X. (2017). Oral drug absorption: Evaluation and prediction. In *Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice: Second Edition* (pp. 331–354). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802447-8.00012-1>
- Zagalo, D. M., Silva, B. M. A., Silva, C., Simões, S., & Sousa, J. J. (2022). A quality by design (QbD) approach in pharmaceutical development of lipid-based nanosystems: A systematic review. In *Journal of Drug Delivery Science and Technology* (Vol. 70). Editions de Sante. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103207>
- Zhang, J., Tang, L., Hu, X., Zeng, Z., Wu, W., Geng, F., Li, H., & Wu, D. (2024). Evaluation of the binding affinity and antioxidant activity of phlorizin to pepsin and trypsin. *Food Science and Human Wellness*, 13(1), 392–400. <https://doi.org/10.26599/FSHW.2022.9250033>
- Zhang, Y., Zhang, X. Y., Chai, J. L., Cui, X. C., Pan, J., Song, J. W., Sun, B., & Lu, J. J. (2017). The phase behavior and solubilization of isopropyl myristate in microemulsions containing hexadecyl trimethyl ammonium bromide and sodium dodecyl sulfate. *Journal of Molecular Liquids*, 244, 262–268. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.08.074>
- Zirin, J., Nieuwenhuis, J., & Perrimon, N. (2013). Role of Autophagy in Glycogen Breakdown and Its Relevance to Chloroquine Myopathy. *PLoS Biology*, 11(11), 1001708. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.1001708>
- Zois, C. E., & Harris, A. L. (2016). Glycogen metabolism has a key role in the cancer microenvironment and provides new targets for cancer therapy. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 94(2), 137. <https://doi.org/10.1007/S00109-015-1377-9>
- Zuccotto, F., Ardini, E., Casale, E., & Angiolini, M. (2010). Through the “gatekeeper door”: Exploiting the active kinase conformation. In *Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 53, Issue 7, pp. 2681–2694). <https://doi.org/10.1021/jm901443h>