

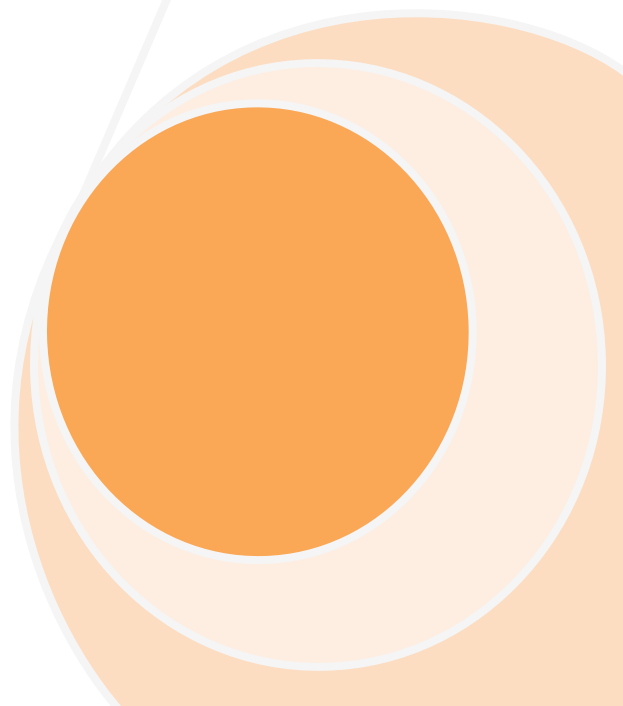
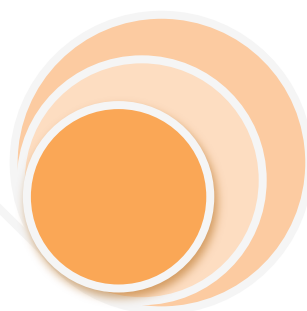
**Ελεγχόμενη
Αποδέσμευση
Φωσφονικών
Φαρμάκων από
Μεταλλοργανικά
Πλαίσια**

**Δάφνη Χανδρινού
(1718)**

**Επιβλέπων Καθηγητής
Δημάδης Κωνσταντίνος**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ ΚΑΙ
ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΝ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2016



Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο καθηγητή μου κ. Κωνσταντίνο Δημάδη για τη συγκεκριμένη εργασία, για την άψογη συνεργασία και τις πολύτιμες συμβουλές που μου έδωσε σε όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας, καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου που μου έδωσαν απλόχερα τη βοήθειά τους. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης που παρείχε όλη την υλικοτεχνική υποδομή για την υλοποίηση της εργασίας μου. Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια και τους φίλους μου που με στήριζαν κατά τη διάρκεια των σπουδών μου και ειδικά στη φίλη μου Χριστίνα Πανοπούλου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	4
1.1 Συστήματα Ελεγχόμενης Αποδέσμευσης Φαρμάκου.....	4
1.2 Μεταλλοργανικά Πλαίσια Ως Συστήματα Ελεγχόμενης Αποδέσμευσης Φαρμάκων.....	5
1.3 Η Αρχή Των Διφωσφονικών Ενώσεων.....	7
1.4 Δομή και Δραστικότητα Διφωσφονικών Ενώσεων.....	8
1.5 HEDP- Etidronic Acid.....	10
1.6 Μηχανισμοί Δράσης Διφωσφονικών Ενώσεων.....	11
1.7 Οστεοπόρωση.....	17
1.8 Φασματοσκοπία NMR (Nuclear Magnetic Resonance)	19
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	23
2.1 Εισαγωγή.....	23
2.2 Όργανα και Αντιδραστήρια.....	24
2.3 Σύνθεση Του $[Ca(HO_3P-C(OH)-(CH_3)-PO_3H)(H_2O)] \cdot 2.5H_2O$	24
2.4 Χαρακτηρισμός Του Μεταλλοργανικού Πλαισίου MOF.....	25
2.5 Πειραματική Διαδικασία Μελέτης Ρυθμού Αποδέσμευσης HEDP.....	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	27
3.1 Υπολογισμοί Ποσοτικοποίησης.....	27
3.2 Αποτελέσματα Φασμάτων NMR.....	28
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	36
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	37
Φάσματα IR.....	37
Φάσματα NMR.....	37
Διάγραμμα XRD.....	62
Διαγράμματα % Αποδέσμευσης.....	63

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

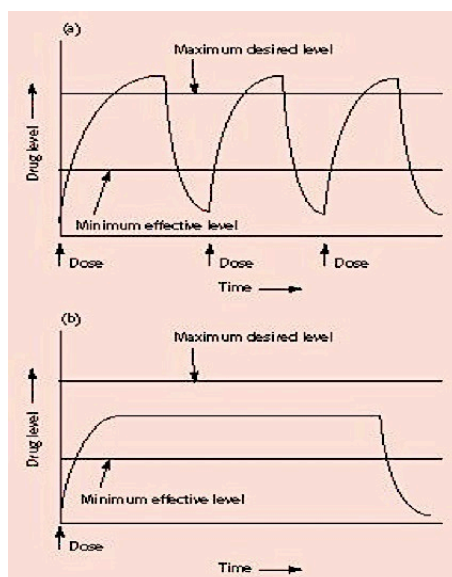
1.1 Συστήματα Ελεγχόμενης Αποδέσμευσης Φαρμάκου ⁽¹⁾

Η χρήση ενός συστήματος ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμάκου καθιστά τη θεραπεία του ασθενούς ασφαλέστερη, όσον αφορά τη δοσολογία και την παρακολούθηση των αποτελεσμάτων. Η επίτευξη αποτελεσματικών θεραπειών προϋποθέτει τη σωστή δοσολογία του φαρμάκου και τη διατήρηση της συγκέντρωσής του στα επιθυμητά επίπεδα. Με αυτόν τον τρόπο, ο ασθενής είναι σε θέση να λάβει τις ελάχιστες λήψεις και ταυτόχρονα να έχει τη βέλτιστη απόκριση στη θεραπεία. Επιπλέον, ένα σύστημα ελεγχόμενης αποδέσμευσης καθιστά δυνατή την στοχευμένη αποδέσμευση του φαρμάκου στους κατάλληλους ιστούς, με αποτέλεσμα την μείωση των παρενεργειών που θα εμφάνιζε ο ασθενής στην περίπτωση μιας συμβατικής θεραπείας.

Τα υλικά που χρησιμοποιούνται ως συστήματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης πρέπει να είναι βιοσυμβατά, μη τοξικά και φυσικά ή αποικοδόμησή τους δεν πρέπει σε καμία περίπτωση να οδηγεί στο σχηματισμό επικίνδυνων παραπροϊόντων για τον ασθενή. Ο σχεδιασμός και η παρασκευή ενός τέτοιου συστήματος έχει συχνά πολύ υψηλότερο κόστος από την παραδοσιακή μέθοδο χορήγησης φαρμάκων. Σε άλλες περιπτώσεις, απαιτείται η χειρουργική επέμβαση για την εισαγωγή ή την εξαγωγή του συστήματος.

Ωστόσο η εκλεκτική αποδέσμευση μέγιστου φορτίου φαρμάκου, ο συνδυασμός χορήγησης δύο ενεργών στοιχείων σε μία θεραπεία και η δυνατότητα παρακολούθησης της αποδέσμευσης του φαρμάκου σε πραγματικό χρόνο αποτελούν τους σημαντικότερους παράγοντες χρήσης τέτοιου είδους συστημάτων. Ο τρόπος λειτουργίας της παραδοσιακής μεθόδου χορήγησης φαρμάκου είναι η διατήρηση της συγκέντρωσής του μεταξύ ενός μέγιστου που μπορεί να εκφράζει και το τοξικό επίπεδο και ενός ελαχίστου κάτω από το οποίο το φάρμακο δεν μπορεί να δράσει. Αμέσως μετά τη χορήγηση του φαρμάκου, είτε μέσω ένεσης είτε μέσω χαπιού, παρατηρείται η απότομη αύξηση της συγκέντρωσης του ενεργού στοιχείου στο αίμα. Κατόπιν τα επίπεδα συγκέντρωσης μειώνονται, μέχρι την επόμενη λήψη.

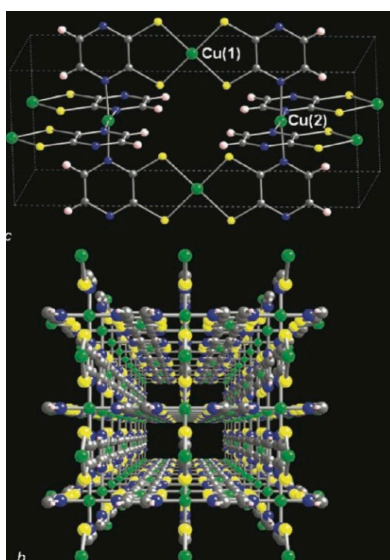
Στόχος των ερευνητών είναι ο σχεδιασμός και η παραγωγή αδρανών και βιοσυμβατών συστημάτων αποδέσμευσης φαρμάκου, τα οποία να χαρακτηρίζονται από μεγάλη μηχανική ισχύ και ευκολία στον τρόπο χορήγησης στον ασθενή. Ένα τέτοιο σύστημα προορίζεται για μακροχρόνια χορήγηση φαρμάκου και δίνει τη δυνατότητα αύξησης και μείωσης της συγκέντρωσης του ενεργού στοιχείου στον οργανισμό παραπάνω από μία φορές για εκτεταμένο χρονικό διάστημα (από 24 ώρες έως και μήνες) στα πλαίσια μίας και μόνο χορήγησης.



Εικόνα 1: Τα επίπεδα της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο αίμα στην περίπτωση (α) συμβατικής δοσολογίας και (β) ελεγχόμενης αποδέσμευσης⁽¹⁾.

1.2 Μεταλλοργανικά Πλαίσια Ως Συστήματα Ελεγχόμενης Αποδέσμευσης Φαρμάκων⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾

Τα μεταλλοργανικά πλαίσια γνωστά ως **Metal Organic Frameworks (MOFs)** θα μπορούσαν να θεωρηθούν ότι αποτελούν προϊόντα ενός είδους ανόργανου πολυμερισμού, στον οποίο συμμετέχουν η ανόργανη μονάδα (ανόργανο κατιόν ή πλειάδα) και ένας (συνήθως) γεφυρωτικός υποκαταστάτης. Πρόκειται για υβριδικά υλικά που σχηματίζουν συντονισμένα δίκτυα χάρη στην αυτοοργάνωση των συστάδων τους. Συνήθως κάτω από ήπιες συνθήκες μεταλλικά ιόντα γεφυρώνονται από πολυσχιδείς υποκαταστάτες και σχηματίζουν σύμπλοκα, τα οποία αυτοοργανώνονται με τέτοιο τρόπο, ώστε να σχηματίζουν πλέγματα, όπως φαίνεται ενδεικτικά στην Εικόνα 2.



Εικόνα 2: Κρυσταλλική δομή του αγωγικού υλικού Cu-Cu-2,3-pyrazinedithiolate. Κωδικός χρωμάτων: πράσινο Cu, S κίτρινο, C μπλε, N ροζ.⁽⁵⁾ Copyright 2009, American Chemical Society.

Χάρη στην εξαιρετικά πορώδη επιφάνεια τους, τα MOFs χρησιμοποιούνται και δοκιμάζονται σε μια πληθώρα εφαρμογών, όπως στην ασφαλή αποθήκευση και μεταφορά αερίων σαν το φυσικό αέριο ή το αέριο υδρογόνο και διοξείδιο του άνθρακα. Τεράστιες ποσότητες αερίων μπορούν να φορτωθούν στους μεγάλους πόρους των MOFs υλικών και να μεταφερθούν με ασφάλεια σε μεγάλες αποστάσεις. Επιπλέον, τέτοιου είδους υλικά χρησιμοποιούνται στους τομείς της κατάλυσης, της οπτικής, της ανάπτυξης αισθητήρων και στο διαχωρισμό ενώσεων.

Ένα σύστημα μεταφοράς φαρμάκου πρέπει να χαρακτηρίζεται από μικρό μέγεθος, βιοσυμβατότητα, εκλεκτικότητα, να μην είναι τοξικό και να δίνει τη δυνατότητα μεταφοράς μεγάλης ποσότητας φαρμάκου με εκλεκτικό και ελεγχόμενο τρόπο. Μεγάλες κατηγορίες τέτοιων συστημάτων είναι τα νανοσωματίδια πολυμερών, τα λιποσώματα, τα οξείδια σιδήρου αλλά και τα οξείδια χρυσού. Τα MOFs έχοντας μεγάλες πορώδεις επιφάνειες και δίνοντας εύκολα την δυνατότητα τροποποίησής τους, μέσω προσθήκης λειτουργικών ομάδων, αποτελούν εξαιρετικά υποψήφια συστήματα ελεγχόμενης, αλλά και εκλεκτικής μεταφοράς φαρμάκων. Επιλέγοντας τα κατάλληλα μεταλλικά κέντρα και τους σωστούς υποκαταστάτες, μπορεί να ρυθμιστούν το μέγεθος των πόρων, το σχήμα και οι χημικές ιδιότητες των συγκεκριμένων υλικών. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται βιοσυμβατότητα και εκλεκτικότητα ως προς την αποθήκευση και την απελευθέρωση συγκεκριμένων φαρμάκων σε συγκεκριμένους ιστούς.

Υπάρχουν τέσσερις γενικές μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί στη σύνθεση των νανοοργανομεταλλικών πλαισίων (NMOFs): η νανοκατακρύμνιση, οι υδροθερμικές αντιδράσεις χρησιμοποιώντας όμως και άλλα είδη διαλυτών εκτός από νερό, τα αντίστροφα μικρογαλακτώματα και η χρήση επιφανειοδραστικών προτύπων σε υδροθερμικές αντιδράσεις. Η πρώτη μέθοδος τείνει να δώσει άμορφα υλικά και στηρίζεται στο γεγονός πως τα σωματίδια είναι αδιάλυτα στο σύστημα του διαλύτη, ενώ τα επιμέρους αντιδρώντα παραμένουν διαλυτά. Οι τρεις τελευταίες μέθοδοι μπορούν να δώσουν κρυσταλλικά υλικά, λόγω της ικανότητας άσκησης καλύτερου ελέγχου επί της πυρήνωσης των νανοσωματιδίων και της ανάπτυξης των κρυστάλλων. Οι δύο πρώτες μέθοδοι δεν προϋποθέτουν την ύπαρξη επιφανειοδραστικών ουσιών, ενώ οι δύο τελευταίες στηρίζονται σε αυτές, όχι μόνο για τον έλεγχο της σύνθεσης των σωματιδίων, αλλά και για τη σταθεροποίηση αυτών των σωματιδίων.

Η χρήση των MOFs σε νανοκλίμακα ως συστήματα φόρτωσης και μεταφοράς φαρμάκων έχει μελετηθεί σε πειραματικό επίπεδο με μία πληθώρα φαρμακόφρων, που απαντώνται σε ποικίλες εφαρμογές. Μέχρι στιγμής, ως συστήματα μεταφοράς φαρμάκων χρησιμοποιούνταν νανοσωματίδια, τα οποία, όμως εμφανίζουν αρκετά προβλήματα στην βιοσυμβατότητα, αλλά και στην εκλεκτική απελευθέρωση του φαρμάκου. Τα MOFs είναι σε θέση να καλύψουν αυτό το κενό, λόγω των μοναδικών τους ιδιοτήτων. Στην Εικόνα 3 παρουσιάζεται μία λίστα MOFs σε νανοκλίμακα και τους φαρμακοφόρους παράγοντες που περιλαμβάνει το καθένα σε κάθε εφαρμογή.

NMOF	Metal	Ligand	Active Agent	Function	Ref	NMOF	Metal	Ligand	Active Agent	Function	Ref
1	Tb ³⁺			Drug Delivery	24	10	Fe ³⁺		Fe ³⁺ Busulfan Cidofovir Doxorubicin Ibuprofen AZT	MRI Contrast Drug Delivery	30
2/2a	Fe ³⁺			Drug Delivery Optical Contrast	25	11	Fe ³⁺		AZT Cidofovir	Drug Delivery	30
3/4	Gd ³⁺		Gd ³⁺	MRI Contrast	28	12	Fe ³⁺		None	None	30
5	Gd ³⁺		Gd ³⁺	MRI Contrast	29	13	Fe ³⁺		Busulfan AZT Ibuprofen Caffeine	Drug Delivery	30
6	Mn ²⁺		Mn ²⁺	MRI Contrast	32	14/15	Zn ²⁺ /Zr ⁴⁺			Optical Imaging	64
7	Mn ²⁺		Mn ²⁺ Rhodamine B	MRI contrast Optical Contrast	32	16	Gd ³⁺			Optical Imaging	39
8	Fe ³⁺		Busulfan Cidofovir	Drug Delivery	30	17/18	Cu ²⁺ /Zn ²⁺		Iodine	CT Contrast	33
9	Fe ³⁺		Fe ³⁺ Busulfan Cidofovir AZT	MRI contrast Drug Delivery	30	19	Zn ²⁺		Doxorubicin SN-38 Camptothecin Daunomycin	Drug Delivery	36

Εικόνα 3: Λίστα βιοϊατρικών παραγόντων ενσωματωμένων σε NMOFs και οι τομείς των εφαρμογών τους.⁽²⁾

1.3 Η Αρχή Των Διφωσφονικών Ενώσεων⁽⁶⁾

Οι διφωσφονικές ενώσεις (BPs) ποτελούν σταθερά ανάλογα του πυροφωσφορικού (PPi), μιας ένωσης που παράγεται φυσικά στον ανθρώπινο οργανισμό και συντελεί σημαντικό ρόλο σε πολλές βιοχημικές διεργασίες. Η πρώτη σύνθεση διφωσφονικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε το 1800, η χρήση τους όμως στην ιατρική ξεκίνησε σταδιακά από το 1960.

Αρχικά, οι διφωσφονικές ενώσεις χρησιμοποιούνταν στη βιομηχανία πετρελαίου, λιπασμάτων, κυρίως όμως ως αναστολείς της διάβρωσης ή ως παράγοντες συμπλοκοποίησης στην κλωστοϋφαντουργία. Η χρήση τους βασίστηκε στην ικανότητά τους να αναστέλλουν την καθίζηση του ανθρακικού ασβεστίου, όπως κάνουν τα πολυφωσφορικά και εφαρμόστηκε ως μέτρο πρόληψης στα οικιακά και βιομηχανικά συστήματα ύδρευσης.

Όπως αναφέρθηκε, οι διφωσφονικές ενώσεις ξεκίνησαν να χρησιμοποιούνται σταδιακά από το 1960, όταν οι William Neuman και Herbert Fleisch παρατήρησαν μέσα από τη μελέτη τους στους μηχανισμούς αβεστοποίησης που προκαλείται από κολλαγόνο, ότι αναστολείς αβεστοποίησης περιέχονταν στα σωματικά υγρά, όπως το πλάσμα και τα ούρα. Δεδομένου ότι ήταν γνωστή από τη δεκαετία του 1930 ότι ιχνοποσότητες πολυφωσφορικών ήταν ικανές να δράσουν ως αποσκληρυντικά νερού αναστέλλοντας την κρυσταλλοποίηση των αλάτων ασβεστίου, όπως το ανθρακικό ασβέστιο, πρότειναν ότι οι ενώσεις αυτού του τύπου θα μπορούσαν να είναι φυσικοί ρυθμιστές της αβεστοποίησης υπό φυσιολογικές συνθήκες.

Στη συνέχεια ο Fleisch και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι το ανόργανο πυροφωσφορικό PPi ήταν παρόν στον ορό και τα ούρα και θα μπορούσε να αποτρέψει την αβεστοποίηση, μέσω δέσμευσης του σε προσφάτως σχηματιζόμενους κρυστάλλους HAP. Έτσι το πυροφωσφορικό θεωρήθηκε το ανθρώπινο "αποσκληρυντικό νερού", που εμποδίζει την αβεστοποίηση των μαλακών ιστών και

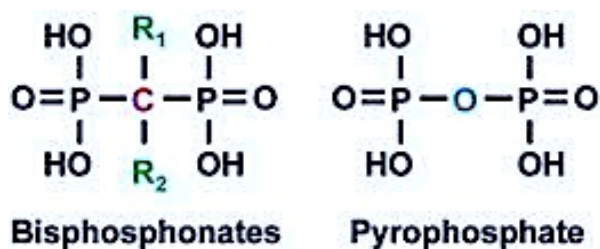
ρυθμίζει την εναπόθεση ασβεστίου στα οστά, ενώ η συγκέντρωσή του στον οργανισμό ελέγχεται από υδρολυτικά ένζυμα.

Τα πρώτα πειράματα αναστολής της τοπικής ασβεστοποίησης αφορούσαν τα αιμοφόρα αγγεία, το δέρμα και τα νεφρά με ενδοφλέβια χορήγηση των πυροφωσφορικών και πολυφωσφονικών ενώσεων. Τα αποτελέσματα ήταν επιτυχή και για αυτό και τα πειράματα προχώρησαν στο στάδιο της χορήγησης από το στόμα. Σε αυτή την περίπτωση, όμως η αντίδραση υδρόλυσης του πυροφωσφορικού σε ορθοφωσφορικό στην περιοχή του γαστρεντερικού σωλήνα, καθιστούσε αυτές τις ενώσεις ανενεργές. Ωστόσο η υψηλή συγγένεια των διφωσφονικών και πυροφωσφορικών ενώσεων για το ασβέστιο που βρίσκεται στα οστά, αποτρέπει την παθολογική ασβεστοποίηση ακόμα και όταν αυτά χορηγούνται από το στόμα. Η μοναδική ιδιότητα των συγκεκριμένων ενώσεων να διαλύουν τον κρύσταλλο του υδροξυαπατίτη ήταν το έναυσμα για να μελετηθεί κατά πόσο μπορούν να αναστείλουν την επαναρρόφηση του οστού.

Σήμερα τα διφωσφονικά αποτελούν μία κατηγορία φαρμάκων για ασθένειες που σχετίζονται με διαταραχές στο μεταβολισμό του ασβεστίου των οστών στον ανθρώπινο οργανισμό. Τα συγκεκριμένα φάρμακα λειτουργούν, μέσω της ισχυρής σύνδεσής τους με οστικές επιφάνειες που οδηγεί στην αναστολή της οστικής επαναρρόφησης και στη διάλυση του κρυστάλλου. Ασθένειες, στις οποίες χορηγούνται τέτοιου είδους φάρμακα είναι η νόσος Paget, η υπερασβεστιαμία, οι οστικές μεταστάσεις και η οστεοπόρωση. Τέλος, διφωσφονικές ενώσεις χρησιμοποιούνται ως σαρωτές οστών, στη διάγνωση οστικών μεταστάσεων και αλλοιώσεων.

1.4 Δομή και Δραστικότητα Διφωσφονικών Ενώσεων⁶⁾

Η διαφορά του πυροφωσφορικού με τις διφωσφονικές ενώσεις βρίσκεται στον τρόπο, με τον οποίο γεφυρώνονται τα δύο φωσφορικά κατάλοιπα, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 4. Πιο συγκεκριμένα, τα διφωσφονικά διαθέτουν ένα άτομο άνθρακα για να γεφυρώνει τις δύο φωσφορικές ομάδες ενώ, το πυροφωσφορικό διαθέτει ένα άτομο οξυγόνου.

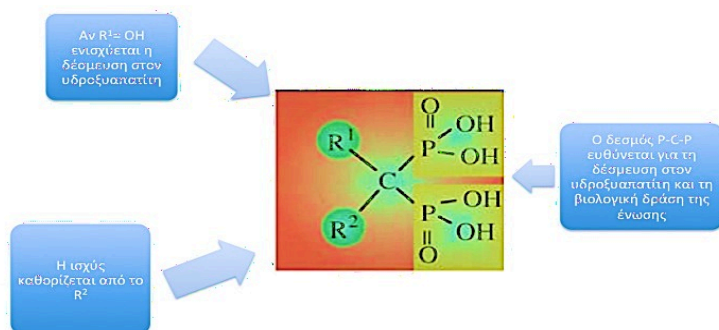


Εικόνα 4: Γενική δομή των διφωσφονικών και του πυροφωσφορικού.⁽⁶⁾

Χάρη στον δεσμό P-C-P, οι διφωσφονικές ενώσεις είναι χημικά σταθερότερες και πιο ανθεκτικές σε όξινο περιβάλλον ή παρουσία υδρολυτικών ενζύμων. Επιπλέον, στον συγκεκριμένο δεσμό ευθύνεται η υψηλή συγγένεια των ενώσεων αυτών με τα οστά. Υπάρχει μία πληθώρα διφωσφονικών ενώσεων, οι οποίες διαφοροποιούνται μεταξύ τους, λόγω των υποκαταστατών R¹ και R². Στην περίπτωση που ο υποκαταστάτης R¹ είναι -OH δεσμεύεται χημικά με τα ιόντα ασβεστίου και έτσι αυξάνεται η ικανότητα δέσμευσης του διφωσφονικού στο οστό και η παρεμπόδιση της διάλυσης του οστού ή


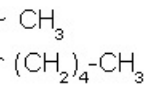
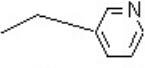
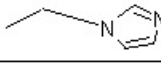
της ανάπτυξης του κρυστάλλου. Μονοφωσφορικές ενώσεις ή ενώσεις με δεσμούς P-C-C-P ή P-N-P δεν μπορούν να αναστείλουν την επαναρρόφηση του οστού σε αντίθεση με τις διφωσφονικές ενώσεις, οι οποίες όταν περιέχουν και ένα άτομο αζώτου σε μια αλκυλική ομάδα αυξάνουν ακόμη περισσότερο την αναστολή της επαναρρόφησης του οστού. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί πως όταν το άτομο του αζώτου είναι τριτοταγές, η ισχύς του αναστολέα είναι από 10 έως 100 φορές μεγαλύτερη, ενώ όταν το άτομο αζώτου αποτελεί μέρος ετεροκυκλικού δακτυλίου, ο αναστολέας επαναρρόφησης του οστού είναι 10.000 φορές ισχυρότερος.

Φυσικά υπάρχουν προϋποθέσεις που πρέπει να τηρούνται προκειμένου να επιτευχθεί η μέγιστη δραστηριότητα των διφωσφονικών ενώσεων. Πιο συγκεκριμένα, οι φωσφονικές ομάδες είναι υπεύθυνες για τη φαρμακολογική δράση των ενώσεων αυτών, ενώ η αλυσίδα R^2 αποτελεί τον βασικό παράγοντα αντιστεκλαστικής δράσης. Όταν ένα άτομο αζώτου περιέχεται στην αλυσίδα R^2 , πρέπει να έχει μια κρίσιμη απόσταση από το δεσμό P-C-P και ταυτόχρονα μια ειδική διάταξη στον χώρο, προκειμένου να έχει τη μέγιστη δραστηριότητα η διφωσφονική ένωση. Στην περίπτωση που κάποια από τις προϋποθέσεις δεν τηρείται, δηλαδή παρατηρείται αλλοίωση των δύο ομάδων, η ένωση χάνει τη συγγένειά της με το οστό και έτσι μειώνεται η αντιαπορροφητική της ισχύς. Για παράδειγμα, η μεθυλίωση των δύο ομάδων καθιστά τις διφωσφονικές ενώσεις ανενεργές.



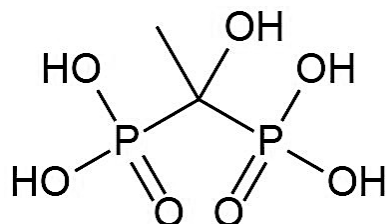
Εικόνα 5: Η βασική δομή του διφωσφονικού οξέος και οι ιδιότητες των λειτουργικών του ομάδων.

Οι φωσφονικές ομάδες και η ομάδα -OH στην αλυσίδα R^1 καθορίζουν τη δράση των διφωσφονικών ενώσεων, μέσω της ταχείας και αποτελεσματικής στόχευσης στην οστική επιφάνεια. Η τρισδιάστατη δομή της αλυσίδας R^2 θα καθορίσει τη βιολογική δραστηριότητα της ένωσης, η οποία έχει προσκολληθεί στο οστό. Ανάλογα με τη δομή και τη διαμόρφωση της αλυσίδας R^2 , δηλαδή το μήκος της και το είδος της υποκατάστασης του αλειφατικού άνθρακα, τα διφωσφονικά φάρμακα μπορούν να αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένους μοριακούς στόχους. Στην Εικόνα 6 παρατίθενται μια πληθώρα διφωσφονικών ενώσεων με ίδια βασική δομή και διαφορετικές αλυσίδες R^1 και R^2 .

Agent	R ₁ side chain	R ₂ side chain
Etidronate	-OH	-CH ₃
Clodronate	-Cl	-Cl
Tiludronate	-H	-S- 
Pamidronate	-OH	-CH ₂ -CH ₂ -NH ₂
Neridronate	-OH	-(CH ₂) ₅ -NH ₂
Olpadronate	-OH	-(CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂
Alendronate	-OH	-(CH ₂) ₃ -NH ₂
Ibandronate	-OH	-CH ₂ -CH ₂ N 
Risedronate	-OH	
Zoledronate	-OH	

Εικόνα 6: Παράγωγα του διφωσφονικού οξέος με διαφορετικές αλυσίδες R¹ και R².

1.5 HEDP- Etidronic Acid



Εικόνα 7: Δομή του διφωσφονικού HEDP (1-hydroxyethane 1,1-diphosphonic acid).

Το HEDP (Etidronic Acid) αποτελεί μία οργανοφωσφονική ένωση, η οποία μπορεί να σχηματίσει σύμπλοκα με μία πληθώρα μετάλλων, όπως ο σίδηρος, ο ψευδάργυρος, ο χαλκός αλλά και οι αλκαλικές γαίες με κυριότερη το ασβέστιο. Καθώς οι δεσμοί που σχηματίζονται μεταξύ του HEDP και των μεταλλικών ιόντων είναι χηλικοί, τα σύμπλοκα αυτά είναι πολύ σταθερά. Έτσι το HEDP μπορεί να δεσμεύσει τέτοιου είδους μεταλλικά ιόντα, τα οποία περιέχονται σε λύματα και μολύνουν τις παροχές υπογείων υδάτων. Φυσικά ως οργανοφωσφονική ένωση, το HEDP δρα ως παρεμποδιστής της διάβρωσης και της κρυστάλλωσης, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιείται στην επιβράδυνση τάγγισης και οξειδωσης λιπαρών οξέων, αλλά και ως αποσκληρυντικό νερού σε απορρυπαντικά και άλλα καθαριστικά. Επιπλέον, το HEDP αναφέρεται ως συστατικό πολλών καλλυντικών σκευασμάτων, όπου χρησιμοποιείται στην καταστολή σχηματισμού ριζών, ως σταθεροποιητής γαλακτώματος και στον έλεγχο του ιξώδους.

Το HEDP είναι χημικά σταθερό σε υψηλές τιμές pH και σε θερμοκρασίες μικρότερες των 250 °C αποτελεί έναν εξαιρετικό παρεμποδιστή διάβρωσης και κρυστάλλωσης. Υπό φυσιολογικές συνθήκες θερμότητας και έκθεσης στο φως υδρολύεται και

αποσυντίθεται δύσκολα, ενώ η υψηλή καθαρότητά του σε μορφή λευκής κρυσταλλικής σκόνης, επιτρέπει την προσθήκη του σε άλλα χημικά σκευάσματα καθημερινής χρήσης (π.χ. σαμπουάν). Επιπλέον, χαρακτηρίζεται από υψηλή αντοχή σε όξινη ή βασική οξειδωση σε σχέση με άλλες οργανοφωσφονικές ενώσεις.

Στην ιατρική το HEDP (Didronel) χρησιμοποιείται στην ενίσχυση των οστών, στη θεραπεία της οστεοπόρωσης και στη θεραπεία της νόσου Paget των οστών. Μειώνοντας την οστεοκλαστική δραστηριότητα, η οποία αποτρέπει την οστική επαναρρόφηση, το HEDP ως διφωσφονικό κινεί την ισορροπία επαναρρόφησης/σχηματισμού οστού προς την πλευρά του σχηματισμού με αποτέλεσμα την ενίσχυση των οστών σε μακροπρόθεσμη κλίμακα. Επιπλέον, αποτρέπει την ασβεστοποίηση των οστών και για αυτό χορηγείται στην πρόληψη επαναρρόφησης των οστών για μικρό χρονικό διάστημα (για δύο εβδομάδες κάθε τρεις μήνες), ώστε να μην επηρεάζεται δραματικά η ασβεστοποίηση. Επίσης χρησιμοποιείται στην καταπολέμηση της έκτοπης οστεοποίησης με καθημερινή χορήγηση, ώστε να αποτρέπει εντελώς την ασβεστοποίηση των οστών. Για την καταπολέμηση της οστεοπόρωσης προτιμώνται διαφορετικά διφωσφονικά φάρμακα, γιατί η συνεχής χρήση του HEDP μπορεί να προκαλέσει οστεομαλάκυνση.

1.6 Μηχανισμοί Δράσης Διφωσφονικών Ενώσεων⁽⁷⁾

Οι διφωσφονικές ενώσεις λειτουργούν μέσω δύο βασικών βιολογικών δράσεων, την αναστολή της ασβεστοποίησης ή της οστικής επαναρρόφησης. Ο τρόπος, με τον οποίο θα δράσουν εξαρτάται τόσο από το είδος της ένωσης όσο και από τη συγκέντρωση στην οποία θα χορηγηθούν. Η αναστολή της ασβεστοποίησης στηρίζεται κυρίως σε φυσικοχημικό μηχανισμό, ενώ η αναστολή της οστικής επαναρρόφησης στηρίζεται σε κυτταρικό μηχανισμό τριών επιπέδων: ιστού, κυτταρικός και μοριακός.

1.6.1 Ασβεστοποίηση

Η αναστολή τόσο της κανονικής όσο και της έκτοπης ασβεστοποίησης στηρίζεται κυρίως σε φυσικοχημικό μηχανισμό. Η ικανότητα αναστολής του φωσφορικού ασβεστίου μιας διφωσφονικής ένωσης *in vitro* σχετίζεται στενά με την αποτελεσματικότητα της δράσης της στην ασβεστοποίηση *in vivo*. Σε αντίθεση με ό,τι συμβαίνει στην επαναρρόφηση οστού, στην ασβεστοποίηση η διφωσφονική ένωση πρέπει να είναι συνεχώς παρούσα για να δράσει τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Οι διφωσφονικές ενώσεις έχουν παρόμοιες φυσικοχημικές δράσεις με το πυροφωσφορικό. Παρουσιάζουν μεγάλη συγγένεια για την επιφάνεια του φωσφορικού ασβεστίου στερεάς φάσης και προσδένονται μέσω χημειορρόφησης στο επιφανειακό ασβέστιο, όπου λειτουργούν παρεμποδιστικά στην ανάπτυξη του κρυστάλλου. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η αναστολή της συσσώρευση κρυστάλλων φωσφορικού ασβεστίου, ο μετασχηματισμός του άμορφου φωσφορικού ασβεστίου σε υδροξυαπατίτη και η συσσωμάτωση κρυστάλλων απατίτη. Επίσης, τα διφωσφονικά καθυστερούν τη διάλυση των κρυστάλλων φωσφορικού ασβεστίου.

Η σύνδεση των διφωσφονικών στην επιφάνεια του ασβεστίου μπορεί να είναι δισχιδής ή τρισχιδής. Στη δισχιδή σύνδεση, ένα άτομο αξυγόνου κάθε φωσφονικής ομάδας προσδένεται σε ένα ασβέστιο του υδροξυαπατίτη. Στις περισσότερες όμως κλινικές περιπτώσεις, η πρόσδεση των διφωσφονικών είναι τρισχιδής και κατ'

επέκταση πιο ισχυρή, όπου το ασβέστιο δεσμεύεται στο άτομο οξυγόνου της υδροξυλομάδας του κεντρικού άνθρακα ή σε ένα άτομο αζώτου κάποιας χημικής ομάδας που έχει αντικαταστήσει την υδροξυλομάδα.

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν ενδείξεις ενσωμάτωσης των διφωσφονικών ενώσεων στο κρυσταλλικό πλέγμα του υδροξυαπατίτη. Ωστόσο, εισέρχονται στο οστό, καθώς οι κρύσταλλοι που περιλαμβάνουν διφωσφονικές ενώσεις στην επιφάνειά τους παγιδεύονται από νέους κρυστάλλους που σχηματίζονται από πάνω τους. Τα αποτελέσματα στην αναστολή της ασβεστοποίησης, δείχνουν πως πρόκειται για ένα φυσικοχημικό μηχανισμό δράσης, ωστόσο δεν μπορεί να αποκλειστεί και το ενδεχόμενο επίδρασης στο στάδιο της πυρήνωσης.

1.6.2 Οστική επαναρρόφηση

Τα αποτελέσματα της ασβεστοποίησης μπορεί να ερμηνεύονται από φυσικοχημικό μηχανισμό, στην περίπτωση όμως της επαναρρόφησης οστού, η αναστολή οφείλεται σε κυτταρικούς μηχανισμούς τριών επιπέδων: ιστού, κυττάρων και μορίων. Τα αποτελέσματα της αναστολής μπορεί να προέρχονται απευθείας από την επίδραση που δέχονται οι οστεοκλάστες ή μέσω άλλων κυττάρων, όπως είναι οι οστεοβλάστες γράμμωσης και τα μακροφάγα κύτταρα. Σύμφωνα με τη θεωρία γύρω από τη δράση των διφωσφονικών ενώσεων στα οστά, η διάλυση των ορυκτών οφείλεται σε φυσικοχημικούς μηχανισμούς. Ενώσεις, όπως το πυροφωσφορικό αναστέλλουν την διάλυση των ορυκτών, ωστόσο οι συγκεντρώσεις των καινούργιων, ισχυρότερων διφωσφονικών ενώσεων που απαιτούνται, για να αναστείλουν την οστική επαναρρόφηση, είναι τόσο μικρές που είναι απίθανο να προκαλούν σημαντικές επιπτώσεις στη διάλυση των ορυκτών. Τέλος, οι μελέτες πάνω στη δομή και τη δραστηριότητα των ενώσεων αυτών δεν έδειξε συσχέτιση μεταξύ της αναστολής της διάλυσης των ορυκτών και της δράσης στην οστική επαναρρόφηση *in vitro* και *in vivo*, οπότε θεωρείται πως οι μηχανισμοί είναι ουσιαστικά κυτταρικοί.

Επίπεδο ιστών

Η δράση των διφωσφονικών ενώσεων στο επίπεδο των ιστών εμφανίζεται με τη μείωση του οστικού μεταβολισμού για όλες τις ενώσεις. Η μείωση της οστικής επαναρρόφησης και του οστικού σχηματισμού αξιολογήθηκε τόσο σε ώα όσο και στον άνθρωπο, μέσω κινητικής μελέτης του ασβεστίου, βιοχημικών δεικτών αλλά και της μορφολογίας του οστού.

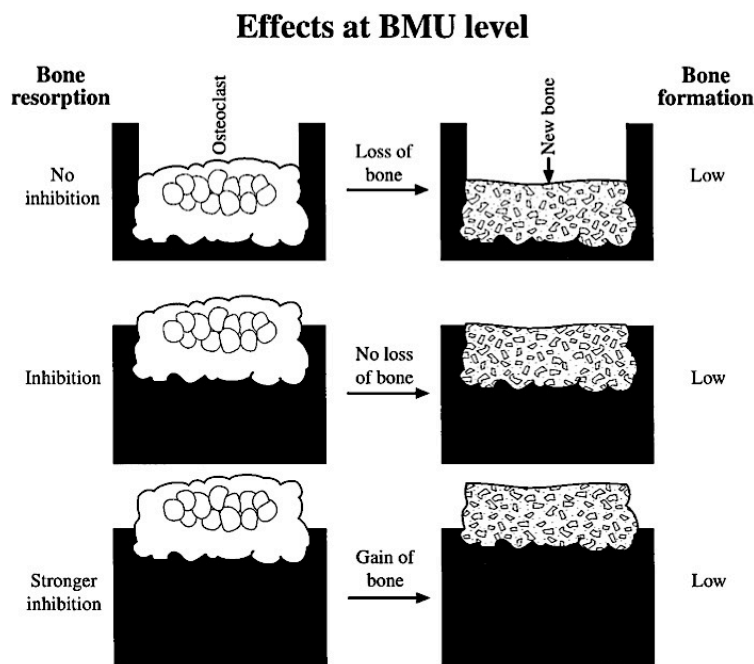
Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η καταστροφή του οστού αποκαθίσταται μέσω αντικατάστασης αυτού αυτού. Ο όρος *turnover* δηλώνει το ποσοστό μονάδων απώλειας για ένα δυναμικό, οι οποίες αντικαθίστανται. Στη συγκεκριμένη περίπτωση το *turnover* εκφράζεται με τη μορφολογική δυναμική μονάδα BMU (*bone morphological unit*). Για έναν ενήλικα οι θέσεις αναδιαμόρφωσης είναι οι περιοχές των δοκίδων και ο φλοιός. Η τελική μορφολογική οντότητα καλείται δομική μονάδα των οστών (*bone structural unit BSU*) και αντιστοιχεί στη λειτουργική μονάδα του πολύ μικρού μεγέθους των οστών (*osteon*) μέσα στον φλοιό, αλλά και στην επιφάνεια του οστού (*hemiostron*).

Το πρώτο βήμα στην αναδιαμόρφωση του οστού είναι η διάβρωση ενός ορισμένου ποσοστού του οστών μέσω οστεοκλαστών στην επιφάνεια των δοκίδων ή του φλοιού,

αλλά και στο εσωτερικό του φλοιού. Η διαδικασία της επαναρρόφησης χαρακτηρίζεται από μια γραμμική ακολουθία, στην οποία σχηματίζεται ένα κανάλι μέσα στον φλοιό και ένα χαράκωμα στην επιφάνειά του. Στη συνέχεια η καταστροφή αποκαθίσταται ταχύτατα από τους οστεοβλάστες, οι οποίοι αναπληρώνουν την ανασκαφή. Για αυτόν τον λόγο, η μείωση της επαναρρόφησης συνεπάγεται μια δευτερεύουσα μείωση στο σχηματισμό των οστών, καθώς υπάρχει η ανάγκη αναπλήρωσης είναι μικρότερη.

Η συνολική επαναρρόφηση και ο σχηματισμός του οστού εξαρτώνται λοιπόν από τον αριθμό των μονάδων BMU που σχηματίζονται ανά πάσα στιγμή, καθώς και από το χρονικό διάστημα που παραμένουν ενεργές. Κανονικά το ποσοστό του οστού που καταστρέφεται ισούται με το ποσοστό που σχηματίζεται σε κάθε κύκλο εργασιών. Στην περίπτωση της οστεοπόρωσης όμως σε κάθε κύκλο εργασιών το ποσοστό καταστροφής είναι μεγαλύτερο από το ποσοστό αναδιαμόρφωσης. Έτσι, ενώ η αλλαγή του κύκλου εργασιών δεν έχει καμία επίδραση στο συνολικό ισοζύγιο του ασβεστίου σε φυσιολογικά άτομα, υπάρχει ένα τοπικό αρνητικό ισοζύγιο των οστών στην οστεοπόρωση, επειδή περισσότερο οστό καταστρέφεται από ότι σχηματίζεται. Η μικρότερη ποσότητα οστού που παράγεται ανά μονάδα χρόνου δεν οφείλεται σε μειωμένη δραστηριότητα των οστεοβλαστών, αντιθέτως το πάχος του οστού που σχηματίζεται αυξάνεται ελάχιστα. Μία λύση στο πρόβλημα θα ήταν η επιβράδυνση της συνολικής απώλειας οστικής μάζας, μέσω του περιορισμού του συνολικού αριθμού κύκλων εργασιών. Το αποτέλεσμα τόσο για το γενικό κύκλο εργασιών και όσο και για την τοπική ισορροπία θα οδηγήσει σε μικρότερη δοκιδωτή αραιώση, μειωμένος αριθμός δοκιδωτών διατρήσεων, μικρότερη μείωση συνδεσιμότητας και μικρότερη διάβρωση του φλοιού, επιβραδύνοντας έτσι τη μείωση της αντοχής των οστών και την εμφάνιση καταγμάτων.

Οι διφωσφονικές ενώσεις είναι σε θέση να δώσουν ένα θετικό ισοζύγιο ασβεστίου και οστών και αυτό ερμηνεύεται, μέσω τεσσάρων πιθανών τρόπων. Πρώτον, η μείωση του turnover οδηγεί στη μείωση της επαναρρόφησης του οστού, ώστε η ισορροπία καταστροφής/ αναδιαμόρφωσης να οδηγηθεί προσωρινά στην πλευρά της αναδιαμόρφωσης. Δεύτερον, η αναδιαμόρφωση της δομικής μονάδας ιστού BSU απαιτεί περισσότερο χρόνο και έτσι η χρονοβόρα διαδικασία εναπόθεσης ασβεστίου που θα οδηγήσει σε υψηλότερη περιεκτικότητα ασβεστίου έχει περισσότερο χρόνο να ολοκληρωθεί. Έτσι αυξάνεται η οστική πυκνότητα και το οστικό περιεχόμενο. Τρίτον και πιθανότερον, στην περίπτωση που η μείωση του βάθους επαναρρόφησης σε μεμονωμένες θέσεις αναδιαμόρφωσης δεν συνεπάγεται και μείωση του σχηματισμού μονάδων BMU, η τελική ισορροπία ευνοεί το οστό. Τέλος, οι διφωσφονικές ενώσεις μπορούν να οδηγήσουν σε αυξημένο επίπεδο σχηματισμού BMU, ενώ υπάρχει ισχυρή αναστολή της επαναρρόφησης του οστού.



Εικόνα 8: Οι επιδράσεις των διφωσφονικών ενώσεων στα επίπεδα των μονάδων BMU.⁽⁷⁾

Επίπεδο κυττάρων

Η δράση των διφωσφονικών ενώσεων εστιάζει κατά γενική ομολογία στους οστεοκλάστες. Υπάρχουν τέσσερις μηχανισμοί, μέσω των οποίων τα διφωσφονικά επηρεάζουν τη λειτουργία και το χρόνο ζωής των οστεοκλαστών. Πιο συγκεκριμένα, μπορούν να αναστείλουν την πρόσληψη των οστεοκλαστών ή την προσκόλληση αυτών, μειώνουν τη διάρκεια ζωής αυτών και τέλος μπορούν να αναστείλουν τη δραστηριότητά τους. Οι πρώτοι τρεις μηχανισμοί έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση του αριθμού των οστεοκλαστών, η οποία παρατηρείται τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ζώα. Η δράση των διφωσφονικών ενώσεων, μέσω των συγκεκριμένων μηχανισμών μπορεί να είναι είτε άμεση επεμβαίνοντας στους ίδιους τους οστεοκλάστες ή σε πρόδρομα μόρια αυτών, είτε έμμεση, επιδρώντας σε κύτταρα υπεύθυνα για τη ρύθμιση των οστεοκλαστών.

1. Αναστολή πρόσληψης οστεοκλαστών

Πολλές διφωσφονικές ενώσεις αναστέλλουν τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών μεταξύ κυττάρων και οστών σε συστήματα καλλιέργειας. Επιπλέον, αποτελούν ισχυρούς αναστολείς του πολλαπλασιασμού των μακροφάγων, τα οποία είναι κύτταρα ίδιου γένους με τους οστεοκλάστες. Όταν αξιολογείται η δραστηριότητα των διφωσφονικών *in vitro*, τα αποτελέσματα σχετίζονται με την *in vivo* κατάσταση μόνο σε συστήματα που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση της πρόσληψης των οστεοκλαστών και όχι για τη δραστηριότητά τους. Όπως αναφέρθηκε, οι διφωσφονικές ενώσεις επιδρούν στη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών μεταξύ κυττάρων και οστών. Ορισμένα πειράματα υποστηρίζουν ότι η επέμβαση γίνεται στο τερματικό βήμα της διαδικασίας της διαφοροποίησης. Υπάρχει λοιπόν μία συσχέτιση μεταξύ του

αριθμού των οστεοκλαστών και του σχηματισμού της οστεοκλαστικής κοιλότητας με την *in vivo* επίδραση των διφωσφονικών ενώσεων που λαμβάνει χώρα μόνο εάν άλλα κύτταρα, πιθανόν οστεοβλάστες και όχι οστεκλάστες εκτίθενται σε αυτά. Όσον αφορά τις δόσεις των διφωσφονικών ενώσεων για την αναστολή της επαναρρόφησης, αυτές είναι χαμηλές μόνο στην περίπτωση των αμινοδιφωσφονικών ενώσεων και όχι σε περιπτώσεις όπως το ετιδρονικό οξύ και η κλοδρονάτη, που αποτελούν λιγότερο ισχυρούς αναστολείς επαναρρόφησης. Με αυτόν τον τρόπο υποδηλώνονται δύο μηχανισμοί λειτουργίας, ένας για την πρόσληψη των οστεοκλαστών και ένας που αφορά την άμεση επίδραση στην δραστηριότητα αυτών.

2. Αναστολή προσκόλλησης οστεοκλαστών

Ένας άλλος μηχανισμός δράσης των διφωσφονικών ενώσεων είναι η μείωση της πρόσφυσης των οστεοκλαστών στην ανοργανοποιημένη μήτρα. Υπάρχουν διαφορούμενα αποτελέσματα πάνω στη συγκεκριμένη θεωρία, ωστόσο πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν πως οι διφωσφονικές ενώσεις μπορούν να αναστείλουν την προσκόλληση ορισμένων κυττάρων, κυρίως καρκινικών *in vitro*. Αντίστοιχη λοιπόν περίπτωση μπορούν να αποτελούν και οι οστεοκλάστες.

3. Μείωση της διάρκειας ζωής των οστεοκλαστών

Οι διφωσφονικές ενώσεις μπορούν και επάγουν τον κυτταρικό θάνατο (απόπτωση) των οστεοκλαστών, γεγονός που έχει αποδειχτεί τόσο σε *in vitro* όσο και *in vivo* πειράματα. Αντίστοιχα αποτελέσματα παρουσιάζονται και σε μακροφάγα κύτταρα που μοιάζουν στους οστεοκλάστες. Υπάρχει και η πρόταση πως η σύντμηση της διάρκειας ζωής των οστεοκλαστών οφείλεται σε κάποιον τοξικό παράγοντα, γεγονός που δεν αποδείχθηκε στα πειράματα που μελετούσαν τον κυτταρικό θάνατο των οστεοκλαστών. Το αποτέλεσμα της μείωσης της διάρκειας ζωής τους μπορεί να είναι είτε μέσω άμεσης επίδρασης στους οστεοκλάστες, είτε με έμμεση επίδραση σε άλλα κύτταρα που επηρεάζουν τον κύκλο ζωής τους.

4. Αναστολή δραστηριότητας οστεοκλαστών

Η τελευταία θεωρία δράσης των διφωσφονικών ενώσεων είναι αναστολή της δραστηριότητας των οστεοκλαστών. Αυτή επιτυγχάνεται κατόπιν λήψης των διφωσφονικών από τους οστεοκλάστες. Αρχικά ο αριθμός των πολυπύρηνων οστεοκλαστών αυξάνεται στην επιφάνεια των οστών, παρά τη μειωμένη οστική επαναρρόφηση. Με αυτόν τον τρόπο αντισταθμίζεται η μειωμένη δραστηριότητα αυτών, οι οποίοι μειώνονται, έπειτα από μακροχρόνια χορήγηση διφωσφονικών ενώσεων. Η άμεση λειτουργία των διφωσφονικών ενώσεων ως αναστολείς της δραστηριότητας των οστεοκλαστών έχει αποδειχτεί μέσα από τις αλλαγές που εμφανίζονται στη μορφολογία των οστεοκλαστών, όταν αυτοί αλληλεπιδρούν με τα διφωσφονικά τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Οι αλλαγές αυτές εντοπίζονται στον κυτταροσκελετό των οστεοκλαστών και πιο συγκεκριμένα στην ακτίνη και τη βινκουλίνη. Μία μελέτη έδειξε ότι οι μορφολογικές αλλαγές εμφανίζονταν μόνο όταν τα κύτταρα απορροφούνταν στην ασβεστοποιημένη μήτρα ή αν οι διφωσφονικές ενώσεις εγχέονταν μέσα στα κύτταρα. Τέλος, οι διφωσφονικές

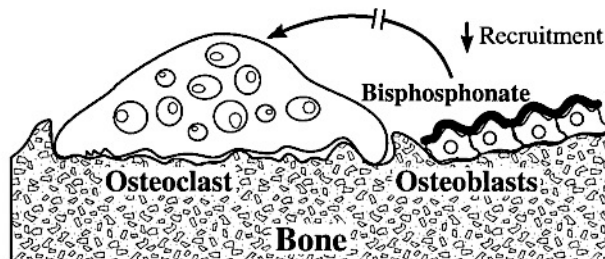
ενώσεις έχουν τη δυνατότητα να εισέλθουν και να συγκεντρωθούν σε υψηλά ποσοστά (πιθανώς 100 mM και παραπάνω) στο εσωτερικό των κυττάρων και απελευθερωθούν όταν το περιβάλλον είναι όξινο.

Επίπεδο μορίων

Τα επίπεδα συγκέντρωσης των διφωσφονικών ενώσεων που είναι φαρμακολογικά ενεργές, είναι συνήθως εξαιρετικά χαμηλά. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η ενεργή δραστηριότητα των ενώσεων αυτών δεν απαιτεί συνεχή χορήγηση, ώστε τα επίπεδα να διατηρούνται σταθερά. Μία μεμονωμένη χορήγηση μπορεί να οδηγήσει σε παρατεταμένη αναστολή της οστικής επαναρρόφησης. Είτε λοιπόν ορισμένα κύτταρα πλήττονται για μεγάλο χρονικό διάστημα, είτε πιθανότερα η απελευθέρωση των διφωσφονικών ενώσεων που λαμβάνονται από το οστό, είναι πολύ μικρή με την πάροδο του χρόνου με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η απορρόφηση σε τοπικό επίπεδο.

Επιπλέον, τα χαμηλά ποσοστά συγκεντρώσεων των διφωσφονικών ενώσεων δηλώνουν πως είτε κάποιο είδος “υποδοχέα” είτε κάποια θέση δέσμευσης στο κύτταρο πλήττεται επάγοντας ένα κυτταρικό μηχανισμό μεταγωγής σήματος. Όταν οι οστεοβλάστες εκτεθούν σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις διφωσφονικών και για πολύ μικρό χρονικό διάστημα (5 λεπτά), αυξάνουν την απελευθέρωση ενός αναστολέα πρόσληψης αυτών, ο οποίος ανταποκρίνεται στην παρουσία τους ως θέση σύνδεσης, όπως εμφανίζεται και στην Εικόνα 9.

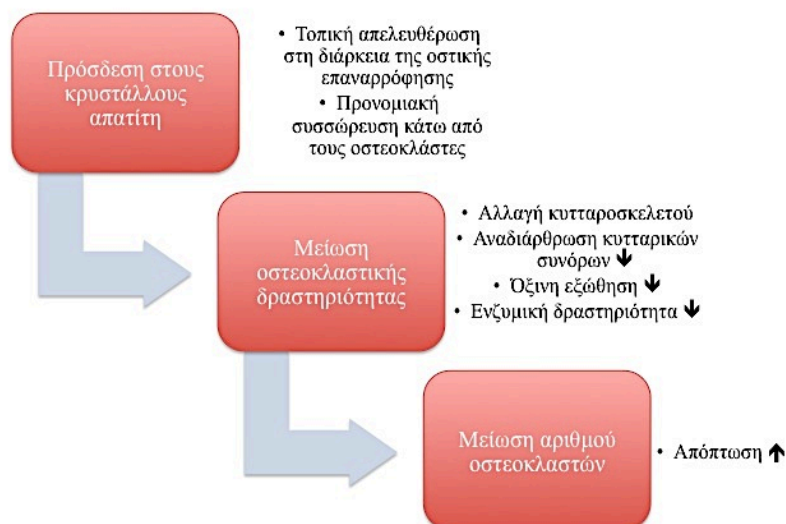
Effect Through Osteoblast



Εικόνα 9: Η έμμεση επίδραση των διφωσφονικών ενώσεων στους οστεοκλάστες, διαμέσου των οστεοβλαστών.⁽⁷⁾

Ανάλογα με τη διφωσφονική ένωση που έχει εξεταστεί, παρουσιάζονται και διαφορετικά αποτελέσματα. Πιο συγκεκριμένα, το clodronate αναστέλλει τα λυσοσωματικά ένζυμα *in vitro* αλλά και *in vivo*. Επιπλέον, τόσο το clodronate όσο και το etidronate αναστέλλουν τη σύνθεση της προσταγλανδίνης στα κύτταρα των οστών, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Οι προσταγλανδίνες παίζουν ρόλο στην επαναρρόφηση του οστού και η αναστολή της σύνθεσής τους μπορεί να επηρεάζει την διαδικασία απορρόφησης. Λόγω της ομοιότητας των διφωσφονικών ενώσεων με το πυροφωσφορικό, πολλά ένζυμα που περιλαμβάνουν στον κύκλο τους πυροφωσφορικό ή ATP έχουν μελετηθεί. Τα ένζυμα φωσφατάση και πυροφωσφατάση επηρεάστηκαν μόνο όταν οι διφωσφονικές ενώσεις βρίσκονταν σε υψηλές συγκεντρώσεις. Αξίζει, ωστόσο να σημειωθεί πως παρουσία alendronate και etidronate αναστέλλονται οι πρωτεΐνες τυροσυλο-φωσφατάση PTPε και η

φωσφατάση της τυροσίνης PTPσ που βρίσκονται στους οστεοκλάστες και στους οστεοβλάστες. Αναφέρεται πως τα αζωτούχα διφωσφονικά δεν μεταβολίζονται και για αυτό ακολουθούν διαφορετικό τρόπο δράσης, αναστέλλοντας τη μεβαλονική οδό που είναι υπεύθυνη για τη σύνθεση της χοληστερόλης και των ισοπρενοειδών λιπιδίων, όπως το διφωσφορικό φαρνεσύλιο (FPP) και το διφωσφορικό γερανυλογερανύλιο (GGPP). Οι ενώσεις αυτές τροποποιούν μεταφραστικά τις GTPάσες, ένζυμα που σηματοδοτούν τη λειτουργία των οστεοκλαστών. Έτσι οι αζωτούχες διφωσφονικές ενώσεις επηρεάζοντας τις GTPάσες, ελαττώνουν τον σχηματισμό των οστεοκλαστών.



Εικόνα 10: Η πιθανή βιοχημική δράση των διφωσφονικών ενώσεων στους οστεοκλάστες.

1.7 Οστεοπόρωση⁽⁸⁾

Η οστεοπόρωση αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα υγείας που απασχολεί εκατομμύρια ανθρώπους καθημερινά. Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει μεγάλες πρόοδοι στην κατανόηση της συγκεκριμένης ασθένειας και στην εύρεση θεραπευτικών προσεγγίσεων για την καταπολέμηση και την πρόσληψη αυτής. Η οστεοπόρωση είναι μια χρόνια πάθηση του μεταβολισμού των οστών, κατά την οποία ο ασθενής πάσχει από χαμηλή οστική μάζα, επιδείνωση της ποιότητας και της αρχιτεκτονικής των οστών του, με αποτέλεσμα αυτά να γίνονται λιγότερο ανθεκτικά και ελαστικά. Έτσι αυξάνεται ο κίνδυνος καταγμάτων και ειδικά στην περιοχή της σπονδυλικής στήλης.

Αυτή η νόσος οφείλεται είτε σε ανεπάρκεια των οιστρογόνων (μετεμμηνοπαυσιακή), είτε προκαλείται από στεροειδή, είτε είναι γεροντική. Στην μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση παρατηρείται σε πρώτο στάδιο η ταχεία απώλεια του 20-30% της οστικής μάζας που υπήρχε πριν από την εμμηνόπαυση και στη συνέχεια η βραδύτερη οστική απώλεια, η οποία μπορεί να σημειωθεί και σε άντρες, όταν διαταράσσεται η ισορροπία του κύκλου εργασιών στα οστά.

Οι θεραπείες της οστεοπόρωσης στοχεύουν στην αναστολή της επαναρρόφησης του οστού, είτε μέσω της χρήσης οιστρογόνων, είτε με τη χρήση διφωσφονικών ενώσεων. Με τη χορήγηση των ενώσεων αυτών επιτυγχάνεται η πρόληψη στην περαιτέρω απώλεια οστικής μάζας, αλλά και ο σχηματισμός οστού σε μεγαλύτερο ποσοστό από

την επαναρρόφηση αυτού για ένα χρονικό διάστημα με αποτέλεσμα μια νέα ισορροπία.

1.7.1 Πώς δρουν οι διφωσφονικές ενώσεις στην οστεοπόρωση;

Στην περίπτωση της οστεοπόρωσης, το ποσοστό καταστροφής ξεπερνά το ποσοστό αναδιαμόρφωσης σε κάθε κύκλο εργασιών και για αυτό τον λόγο παρατηρείται ένα τοπικό αρνητικό ισοζύγιο του ασβεστίου. Ως πιθανή λύση προτίνεται η επιβράδυνση της συνολικής απώλειας οστικής μάζας, περιορίζοντας τους κύκλους εργασιών. Συνολικά το ποσοστό καταστροφής μειώνεται και έτσι επιβραδύνεται η αλλοίωση των οστών και η εμφάνιση καταγμάτων.

Όπως έχει αναφερθεί και στο κεφάλαιο μηχανισμών δράσης των διφωσφονικών ενώσεων στο επίπεδο των ιστών, οι διφωσφονικές ενώσεις μπορούν να φέρουν ένα θετικό ισοζύγιο ασβεστίου με τέσσερις πιθανούς τρόπους. Γενικότερα, η μείωση του turnover οδηγεί στη μείωση της επαναρρόφησης του οστού, ώστε η ισορροπία καταστροφής/αναδιαμόρφωσης να οδηγηθεί προσωρινά στην πλευρά της αναδιαμόρφωσης. Έτσι αυξάνεται η οστική πυκνότητα και η τοπική ισορροπία οδηγεί σε μειωμένη αραίωση των δοκίδων, μειωμένο αριθμό δοκιδωτών διατρήσεων και μειωμένη καταστροφή των συνδέσεων και του φλοιού. Επιπλέον, οι διφωσφονικές ενώσεις έχουν τη δυνατότητα να δράσουν μεμονωμένα και να μειώσουν το βάθος του χώρου οστικής επαναρρόφησης.

Σε ό,τι αφορά το μοριακό επίπεδο, οι διφωσφονικές ενώσεις επάγουν την μείωση των ουρικών διασυνδέσεων, τόσο για τη νόσο του Paget όσο και για την οστεοπόρωση, μειώνοντας την επαναρρόφηση των οστών. Αντίθετα με τα οιστρογόνα, η δράση των διφωσφονικών εστιάζει αποκλειστικά στο επίπεδο των πεπτιδίων που δεσμεύονται από το κολλαγόνο σταυροειδών διασυνδέσεων και όχι σε ελεύθερες διασυνδέσεις, επηρεάζοντας με αυτόν τον τρόπο τη διαδικασία της αποικοδόμησης του κολλαγόνου.

1.7.2 Χορήγηση

Υπάρχουν δύο θεραπευτικές προσεγγίσεις για την εφαρμογή των διφωσφονικών ως φάρμακα ενάντια στην οστεοπόρωση, η διακεκομμένη και η συνεχής χορήγηση χαμηλών δόσεων από το στόμα. Αρχικά πρέπει να αναφερθεί πως η οστική πυκνότητα κατόπιν θεραπείας, αυξάνεται σε υψηλό ποσοστό εντός των πρώτων 6 μηνών χορήγησης και συνεχίζει να αυξάνεται μέχρι και για τα επόμενα δύο χρόνια. Η διακεκομμένη χορήγηση βασίζεται στο γεγονός πως μετά από μια περίοδο μειωμένης επαναρρόφησης οστού στην οποία χορηγείται φάρμακο, ακολουθεί μια περίοδος δίχως φάρμακο, όπου ο σχηματισμός του οστού πραγματοποιείται σε κανονικό ρυθμό. Στην προσέγγιση, όπου η χορήγηση γίνεται συνεχώς και σε χαμηλές δόσεις η θεραπεία βασίζεται στην συνεχή καταστολή της επαναρρόφησης.

Οι διφωσφονικές ενώσεις χρησιμοποιούνται ευρέως για την πρόληψη και την καταπολέμηση της οστεοπόρωσης ως αντιαπορροφητικοί παράγοντες. Αποτελούν φάρμακα που δεν προκαλούν ιδιαίτερα σημαντικές παρενέργειες, καθώς χαρακτηρίζονται από υψηλή εκλεκτικότητα και συγκράτηση στο οστό, ενώ ταυτόχρονα η εντερική απορρόφηση βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα. Τέλος,

αναφέρεται πως οι πιο αποτελεσματικές διφωσφονικές ενώσεις κατά της οστεοπόρωσης μέχρι σήμερα είναι το etidronate και το alendronate.

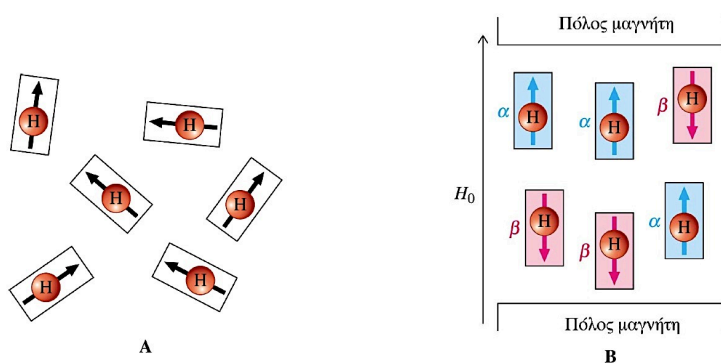
1.8 Φασματοσκοπία NMR (Nuclear Magnetic Resonance)⁽⁹⁾

- Πυρηνικός: Ανίχνευση πυρήνων με σπιν.
- Μαγνητικός: Λήψη φασμάτων εντός μαγνητικού πεδίου.
- Συντονισμός: Οι πυρήνες διεγείρονται με την εκπομπή υψίσυχνων παλμών προς το δείγμα και κατά την αποδιέγερση λαμβάνεται σήμα.

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού στηρίζεται στο φαινόμενο κατά το οποίο οι πυρήνες των ατόμων με αυτοστροφομή (σπιν) υπό την επίδραση ισχυρού στατικού μαγνητικού πεδίου, όταν ακτινοβολούνται, διεγείρονται και κατά την αποδιέγερσή τους δίνουν σήμα. Το σπιν είναι μια θεμελιώδης ιδιότητα, όπως είναι η μάζα και αποτελεί πολλαπλάσιο του $\frac{1}{2}$, ενώ μπορεί να είναι θετικό ή αρνητικό.

Τα πυρηνικά σωματίδια, όπως και τα ηλεκτρόνια κινούνται σε τροχιακά και όταν αυτά συμπληρώνονται, λόγω των σπιν που διαθέτουν συζεύγνυνται. Σχεδόν όλα τα στοιχεία του περιοδικού πίνακα έχουν ένα ισότοπο με μη μηδενικό πυρηνικό σπιν. Η φασματοσκοπία NMR μπορεί να εφαρμοστεί σε ισότοπα των οποίων η φυσική τους αφθονία είναι αρκετά μεγάλη, για να είναι ανιχνεύσιμη. Στον πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό μόνο τα ασύζευκτα πυρηνικά spins παίζουν ρόλο.

Το σπιν ενός πρωτονίου, το κάνει να συμπεριφέρεται σαν ένα μικρός μαγνήτης (δίπολο). Όταν αυτό τοποθετείται σε εξωτερικό ισχυρό μαγνητικό πεδίο, προσανατολίζεται σε σχέση με το εξωτερικό πεδίο. Υπάρχουν δύο τρόποι διεύθετησης, παράλληλα (χαμηλής ενέργειας διεύθετηση N-S-N-S) και αντιπαράλληλα (υψηλής ενέργειας διεύθετηση N-N-S-S), όπως φαίνεται και στην Εικόνα 11.

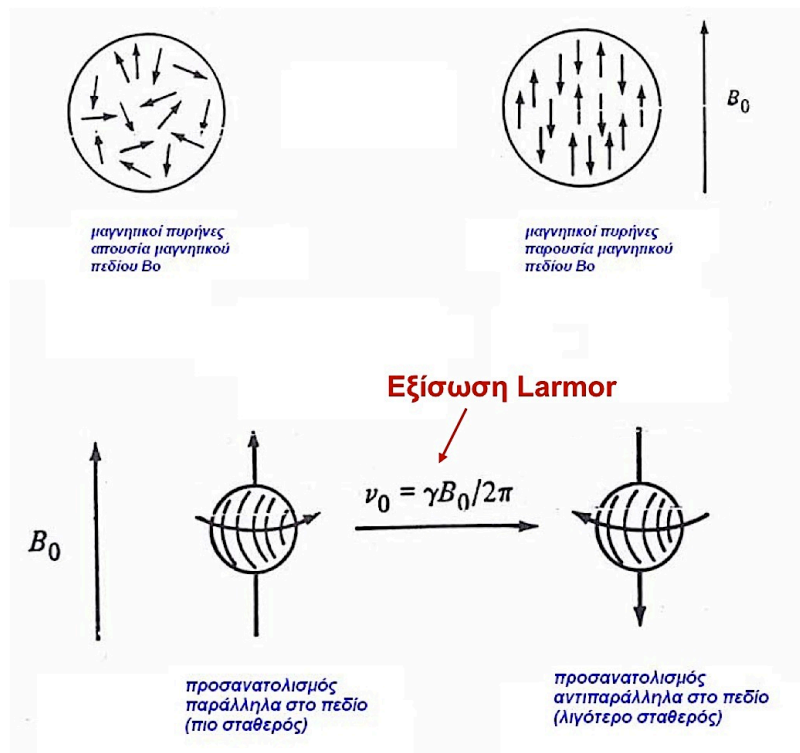


Χωρίς εξωτερικό μαγνητικό πεδίο:
τυχαίος προσανατολισμός

Σε εξωτερικό μαγνητικό πεδίο:
ευθυγράμμιση παράλληλα (α)
ή αντιπαράλληλα (β) στο πεδίο.

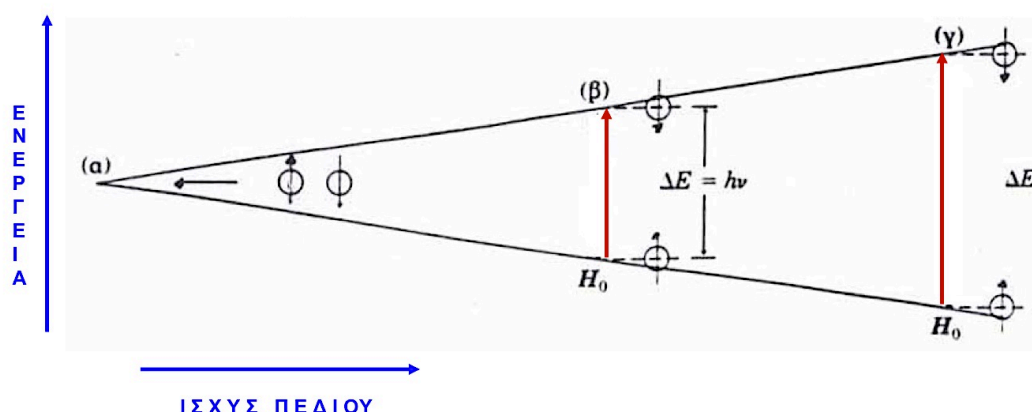
Εικόνα 11: Οι τρόποι διεύθετησης του spin σε σχέση με το εξωτερικό ισχυρό μαγνητικό πεδίο είναι δύο, παράλληλα και αντιπαράλληλα με αυτό.

Εντός μαγνητικού πεδίου έντασης B , ένα σωματίδιο με spin μπορεί να απορροφήσει φωτόνιο με συγκεκριμένη συχνότητα ν . Η συχνότητα αυτή εξαρτάται από τον γυρομαγνητικό λόγο γ , του σωματιδίου.



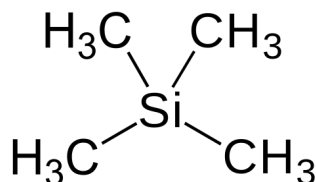
Εικόνα 12: Η εξίσωση Larmor και η σταθερότητα των προσανατολισμών του spin ως προς το πεδίο.

Το σωματίδιο μπορεί να μεταβεί από τη στάθμη της χαμηλότερης ενέργειας σε αυτή της υψηλότερης απορροφώντας ένα φωτόνιο. Η ενέργεια του φωτονίου πρέπει να ταυτίζεται με την ενεργειακή διαφορά μεταξύ των δύο καταστάσεων.



Εικόνα 13: Η ενεργειακή μετάβαση του σωματιδίου σε σχέση με την ισχύ του μαγνητικού πεδίου. Όσο αυξάνεται η ένταση του μαγνητικού πεδίου, αυξάνεται και η συχνότητα συντονισμού.

Η συχνότητα στην οποία συντονίζεται κάθε πυρήνας μετράται αναφορικά με τη συχνότητα συντονισμού μιας ένωσης προτύπου. Η συχνότητα αυτή εκφράζεται σε μονάδες δ ppm (parts per million) σε σχέση με την κορυφή απορρόφησης των πρωτονίων του προτύπου, το οποίο είναι το TMS ($\delta=0$).



Εικόνα 14: Η ένωση τετραμεθυλοσιλάνιο TMS χρησιμοποιείται ως πρότυπη ένωση στη φασματοσκοπία NMR θεωρώντας πως $\delta=0$.

Η χημική μετατόπιση εκφράζεται μέσω της σχέσης:

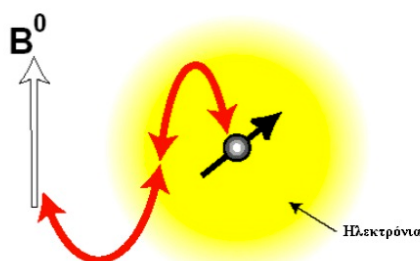
$$\delta = \nu_i / \nu_0$$

όπου δ η χημική μετατόπιση

ν_i η συχνότητα συντονισμού του πυρήνα

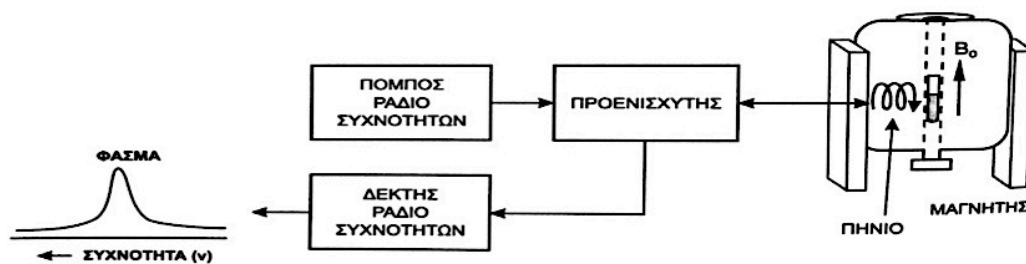
ν_0 η συχνότητα του οργάνου

Όλοι οι ενεργοί πυρήνες ενός δείγματος δεν συντονίζονται στην ίδια συχνότητα. Η ένταση του μαγνητικού πεδίου φτάνει διαφοροποιημένη σε κάθε πυρήνα. Τα ηλεκτρόνια σθένους κάποιων ατόμων περιστρέφονται με τη φορά του εφαρμοζόμενου πεδίου. Στους πυρήνες των ατόμων που διευθετούνται αντίθετα με το εφαρμοζόμενο πεδίο η περιστροφή τους προκαλεί ένα μικρότερης έντασης μαγνητικό πεδίο. Το μαγνητικό πεδίο που 'αισθάνεται' ο κάθε πυρήνας είναι τελικώς μικρότερο από το εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο.



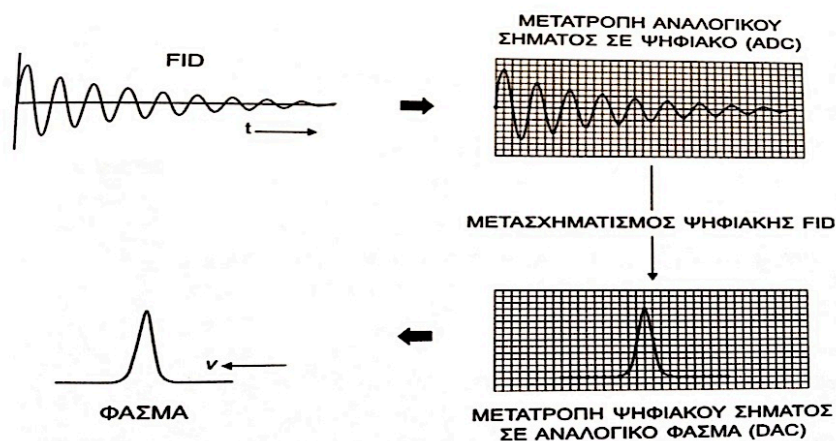
Εικόνα 15: Η ένταση του μαγνητικού πεδίου που δέχεται κάθε πυρήνας είναι διαφορετική από το εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο, λόγω της προάσπισης/θωράκισης των ηλεκτρονίων που το περιβάλλουν.

Ο φασματογράφος που χρησιμοποιείται προκειμένου να ληφθεί ένα φάσμα αποτελείται από ένα μαγνήτη σωληνοειδούς μορφής, ο οποίος περιέχει υπεραγωγικό υλικό. Η διακριτική ικανότητα του οργάνου αυξάνεται με την αύξηση της συχνότητας. Στο κέντρο του οργάνου υπάρχει ένας αισθητήρας (probe), που εκπέμπει παλμούς προς το δείγμα, ώστε οι παρατηρούμενοι πυρήνες του να διεγερθούν και να δώσουν σήμα κυματομορφής κατά την αποδιέγερσή τους. Όταν οι πυρήνες αποδιεγείρονται ρεύμα επάγεται στο πηνίο παρατήρησης και στη συνέχεια αυτό ενισχύεται, φτάνει στο δέκτη και αποδιαμορφώνεται.



Εικόνα 16: Σχηματικό διάγραμμα περιγραφής λήψης φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού.⁽⁹⁾

Το σήμα που λαμβάνει το όργανο μετατρέπεται από αναλογικό σε ψηφιακό και το φάσμα υπόκειται σε μετασχηματισμό Fourier πριν την επεξεργασία του προς ανάγνωση. Ο μετασχηματισμός Fourier στην απλοποιημένη του μορφή μετατρέπει μία μορφή συνημιτόνου/ημιτόνου σε νούμερο. Η εξίσωση Fourier ουσιαστικά ολοκληρώνει μία περιοχή από το 0 έως το άπειρο, δηλαδή την περιοχή που εμφανίζεται το φάσμα. Μέσω του μετασχηματισμού Fourier υπολογίζονται όλα τα ημίτονα και συνημίτονα που χρειάζονται στις εξισώσεις κύματος, ώστε να προκύψει η μορφή του φάσματος και συγκεντρώνονται όλα τα ημίτονα και συνημίτονα που αντιστοιχούν στην ίδια φάση, δηλαδή στο ίδιο μήκος κύματος. Με αυτόν τον τρόπο το φάσμα έχει τη μορφή κορυφών, των οποίων το ύψος καθορίζεται από το πόσο υψηλή ένταση αντιστοιχεί στην κάθε κορυφή. Το τελευταίο βήμα, για να ληφθούν όλες οι απαραίτητες πληροφορίες από το φάσμα είναι η προσαρμογή της φάση στα επιθυμητά επίπεδα, η διόρθωση της βασικής γραμμής του φάσματος και η ολοκλήρωση των κορυφών.



Εικόνα 17: Επεξεργασία FID από τον ηλεκτρονικό υπολογιστή.⁽⁹⁾

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Εισαγωγή

Όλα τα πειράματα που αναφέρονται στη συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Σχεδιασμού και Ανάπτυξης Κρυστάλλων, στον Τομέα Ανόργανης Χημείας στις εγκαταστάσεις των κτηρίων του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Όπως έχει αναφερθεί στο εισαγωγικό μέρος, τα μεταλλοργανικά πλαίσια έχουν δοκιμαστεί ως πιθανά συστήματα απελευθέρωσης φαρμάκων. Μέχρι στιγμής, ένα μεταλλοργανικό πλαίσιο εξετάζεται ως μεταφορέα ενός φαρμάκου. Χάρη στην πορώδη επιφάνειά τους, μεγάλες ποσότητες φαρμάκων μπορούν να φορτωθούν στο εσωτερικό των συστημάτων αυτών και να μεταφερθούν με ακρίβεια και εκλεκτικότητα στο κατάλληλο σημείο απελευθέρωσης. Το μεταλλοργανικό πλαίσιο (MOF) αποσυντίθεται και με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατή η αποδέσμευση του φαρμάκου.

Στόχος της συγκεκριμένης εργασίας είναι η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός ενός μεταλλοργανικού πλαισίου, το οποίο όμως θα είναι το ίδιο το φάρμακο και όχι απλώς ο μεταφορέας του. Επιπλέον, μελετάται ο ρυθμός αποδέσμευσης του φαρμάκου σε συνθήκες διαφορετικού pH. Πιο αναλυτικά, στο μεταλλικό κέντρο του μεταλλοργανικού πλαισίου προσδένονται υποκαταστάτες, οι οποίοι αποτελούν το φάρμακο. Ως μεταλλικό κέντρο χρησιμοποιείται κατιόν ασβεστίου, το οποίο εμφανίζει μεγάλη συγγένεια για το HEDP και ως υποκαταστάτης το συγκεκριμένο διφωσφονικό οξύ. Το HEDP είναι ένα από τα πιο γνωστά φάρμακα στην κατηγορία των διφωσφονικών οξέων που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση της οστεοπόρωσης. Έχοντας ένα μεταλλοργανικό πλαίσιο που αποτελείται από το ίδιο το φάρμακο που σε άλλη περίπτωση απλώς θα μετέφερε, μπορεί να εξεταστεί ο ρυθμός αποδέσμευσης του φαρμάκου παρακολουθώντας τον ρυθμό, με τον οποίο το MOF αποσυντίθεται.

Το πρώτο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας ήταν η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός του μεταλλοργανικού πλαισίου. Το MOF που συντέθηκε έχει μοριακό τύπο $[Ca(HO_3PC(OH)(CH_3)PO_3H)(H_2O)] \cdot 2.5H_2O$ και ταυτοποιήθηκε ως η ένωση που έχει δημοσιευτεί από τον Stock και συνεργάτες.⁽¹⁰⁾ Για τη σύνθεσή του χρησιμοποιήθηκαν το διφωσφονικό οξύ (HEDP, 1-hydroxyethylidene-1,1-diphosphonic acid), w/w 60 %, με εμπορική ονομασία Dequest 2010 της εταιρίας Dequest (<http://www.dequest.com>) και χημικό τύπο $C_6H_8O_7P_2$ και χλωριούχο ασβέστιο ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$, Calcium chloride dihydrate) της εταιρείας Sigma Aldrich (<http://www.sigmaaldrich.com>). Ο χαρακτηρισμός και η ταυτοποίηση του MOF πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία υπερύθρου IR και περιθλασιμετρία ακτίνων X σκόνης (powder XRD). Το επόμενο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας ήταν η μελέτη του ρυθμού αποδέσμευσης HEDP σε υδατικά διαλύματα διαφορετικού pH. Παρασκευάστηκαν χάπια από την ένωση του Stock και στη συνέχεια διεξήχθησαν πειράματα, στα οποία παρακολουθούνταν το ποσοστό αποδέσμευσης του υποκαταστάτη HEDP, μέσω φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού για πρωτόνια σε σχέση με τον χρόνο.

2.2 Όργανα και Αντιδραστήρια

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω όργανα:

- Φασματοφωτόμετρο FT-IR Perkin Elmer 1760X
- Φασματομέτρο XRD
- Φασματομέτρο NMR Bruker AMX- 300MHz
- Πεχάμετρο WTW
- Αναδευτήρας Wids
- Πιπέτα Gilson (1000 μ l) Witeg Germany
- Ζυγός ακριβείας
- Πρέσσα για την παρασκευή χαπιών

Πίνακας 1: Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν και τα χαρακτηριστικά τους.

Αντιδραστήρια	Χαρακτηριστικά
$C_2H_8O_7P_2$ (DEQUEST 2010) HEDP (1-Hydroxyethylidene-1,1-diphosphonic acid)	Διάλυμα 1-υδροξυαιθυλιδενό-1,1-διφωσφορικού οξέος 60% w/w Mr = 206.02 g/mol, d = 1.4 g/ml
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$, (Sigma Aldrich) (Calcium chloride dihydrate)	Στερεό διένυδρο χλωριούχο ασβέστιο Mr = 147.01 g/mol
NaOH (Sigma Aldrich)	Στερεό υδροξείδιο του νατρίου Mr = 40.0 g/mol
HCl (Sigma Aldrich)	Υγρό. Υδροχλωρικό οξύ $\geq 37\%$ Mr = 36.46 g/mol
$(CH_3)_3SiCD_2CD_2CO_2Na$ (Sigma Aldrich) TMSP (3-(Trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3-d ₄ acid sodium salt)	Υγρό. 3-(Τριμεθυλσιλυλ)προπιονικού-2,2,3,3-d ₄ οξέος άλας νατρίου Mr = 172.27 g/mol

2.3 Σύνθεση Του $[Ca(HO_3P-C(OH)-(CH_3)-PO_3H)(H_2O)] \cdot 2.5H_2O$

Πίνακας 2: Αντιδραστήρια και ποσότητες για τη σύνθεση του MOF $[Ca(HO_3P-C(OH)-(CH_3)-PO_3H)(H_2O)] \cdot 2.5H_2O$.

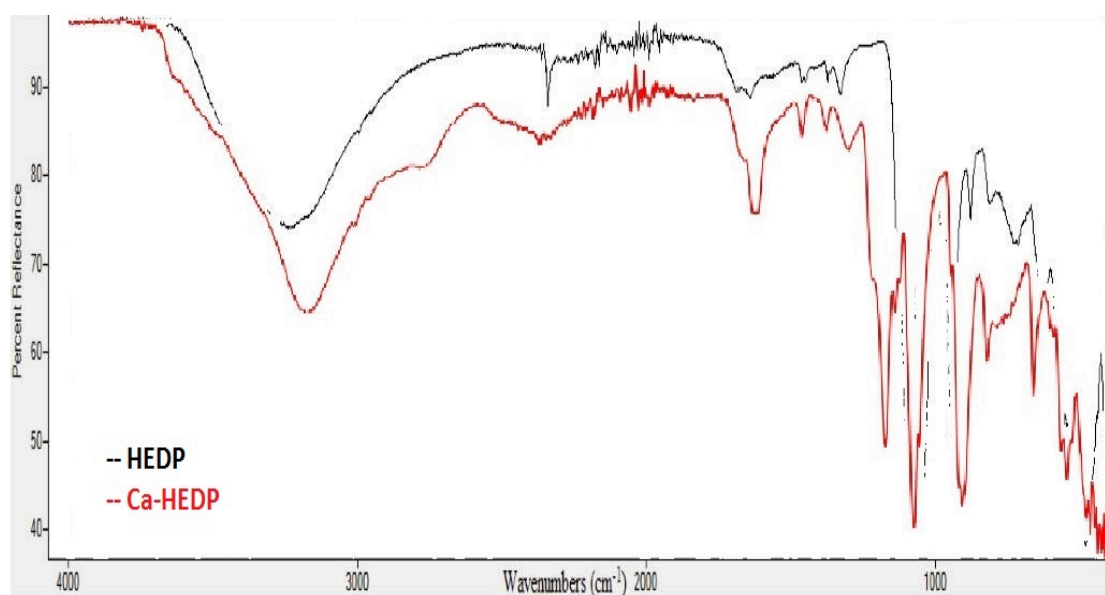
Αντιδραστήρια	HEDP	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$
mmol	1	1
Mr (g/mol)	206.02	147.01
m (g)	0.343	0.147
V (ml)	0.245	-
d (g/ml)	1.4	-
% w/w	60	-

Σε ένα ποτήρι των 100 ml ογκομετρώνται 30 mL απιονισμένου νερού H_2O και προστίθεται ο υποκαταστάτης HEDP και το χλωριούχο ασβέστιο $CaCl_2 \cdot 2H_2O$. Το σύστημα αναδεύεται και η τιμή του pH είναι περίπου 1.5. Με σταδιακή προσθήκη διαλύματος NaOH, το διάλυμα γίνεται θωλό (pH~ 4.7) καθώς το σύμπλοκο καταβυθίζεται. Στη συνέχεια προστίθεται σταδιακά διάλυμα HCl μέχρι το διάλυμα να

γίνει διαυγές (pH~ 3.5). Το ποτήρι καλύπτεται για την αποφυγή εξάτμισης όλης της ποσότητας του διαλύτη και έπειτα από 48 ώρες έχουν σχηματιστεί βελονοειδείς λευκοί κρύσταλλοι. Πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό και ξήρανση του λευκού στερεού συμπλόκου σε θερμοκρασία δωματίου.

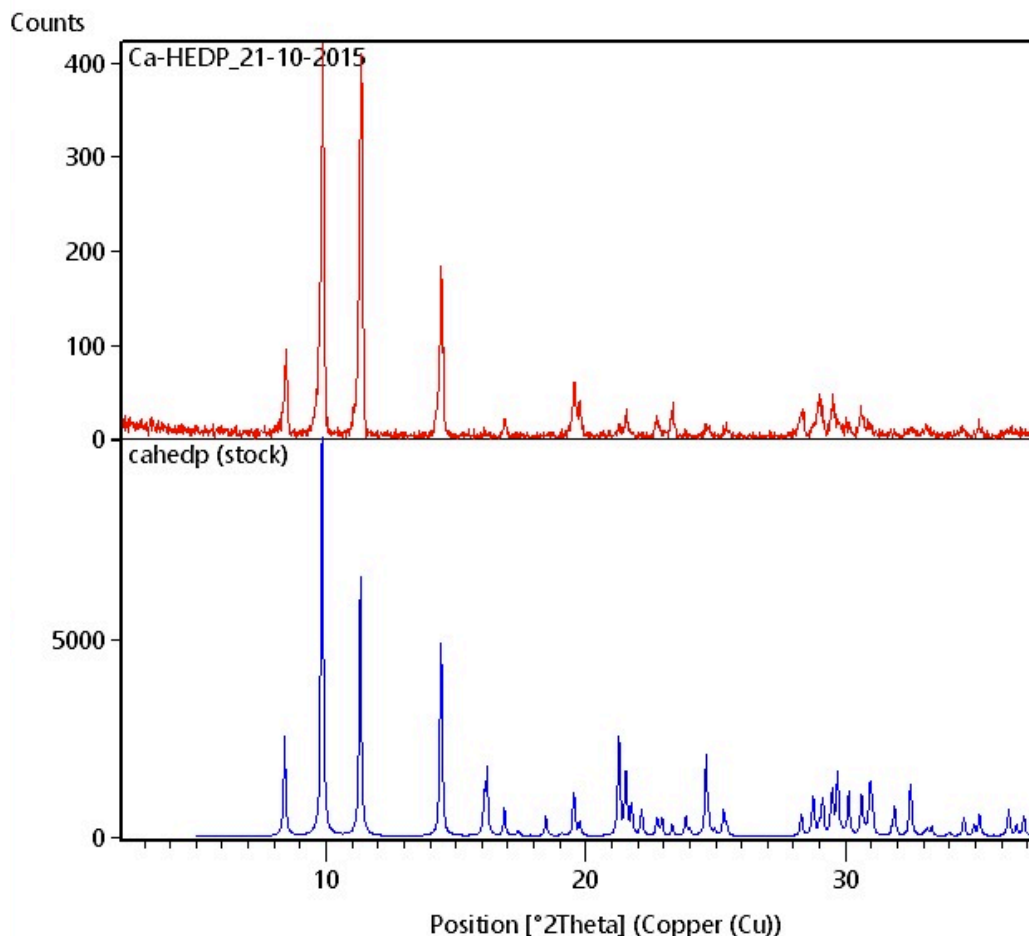
2.4 Χαρακτηρισμός Του Μεταλλοργανικού Πλαισίου MOF

Προκειμένου να ταυτοποιηθεί η ένωση που παράχθηκε χρησιμοποιήθηκαν δύο είδη φασματοσκοπίας, υπερύθρου και περίθλασης ακτίνων X. Μέσα από τη σύγκριση των φασμάτων IR του ελεύθερου υποκαταστάτη HEDP και του συμπλόκου, προκύπτει το συμπέρασμα πως οι χαρακτηριστικές κορυφές για τη διφωσφονική ένωση έχουν μετακινηθεί γεγονός που δηλώνει τη συναρμογή του HEDP στο μεταλλικό κέντρο του ασβεστίου.



Φάσμα IR: Με κόκκινο συμβολίζεται το φάσμα IR του συμπλόκου Ca-HEDP, ενώ με μαύρο του ελεύθερου υποκαταστάτη HEDP. Η πρόσδεση του υποκαταστάτη στο μεταλλικό κέντρο συμπεραίνεται από τη μετακίνηση των κορυφών στην περιοχή των 900-1100 cm^{-1} .

Ωστόσο για την ταυτοποίηση της ένωσης το φάσμα υπερύθρου δεν μπορούσε να δώσει όλες τις απαραίτητες πληροφορίες και για αυτό το MOF Ca-HEDP υποβλήθηκε σε φασματοσκοπία περίθλασης ακτίνων X. Το διάγραμμα του συγκρίθηκε με αντίστοιχο της βιβλιογραφίας και η ένωση ταυτοποιήθηκε ως η ένωση του Stock $[\text{Ca}(\text{HO}_3\text{P}-\text{C}(\text{OH})-(\text{CH}_3)-\text{PO}_3\text{H})(\text{H}_2\text{O})]\cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ από τη δημοσίευση 'Discovery of New Calcium Etidronates Employing Ultrasound Adapted High-Throughput Methods', Cryst. Growth Des., Vol.14, 599–606 (2014)



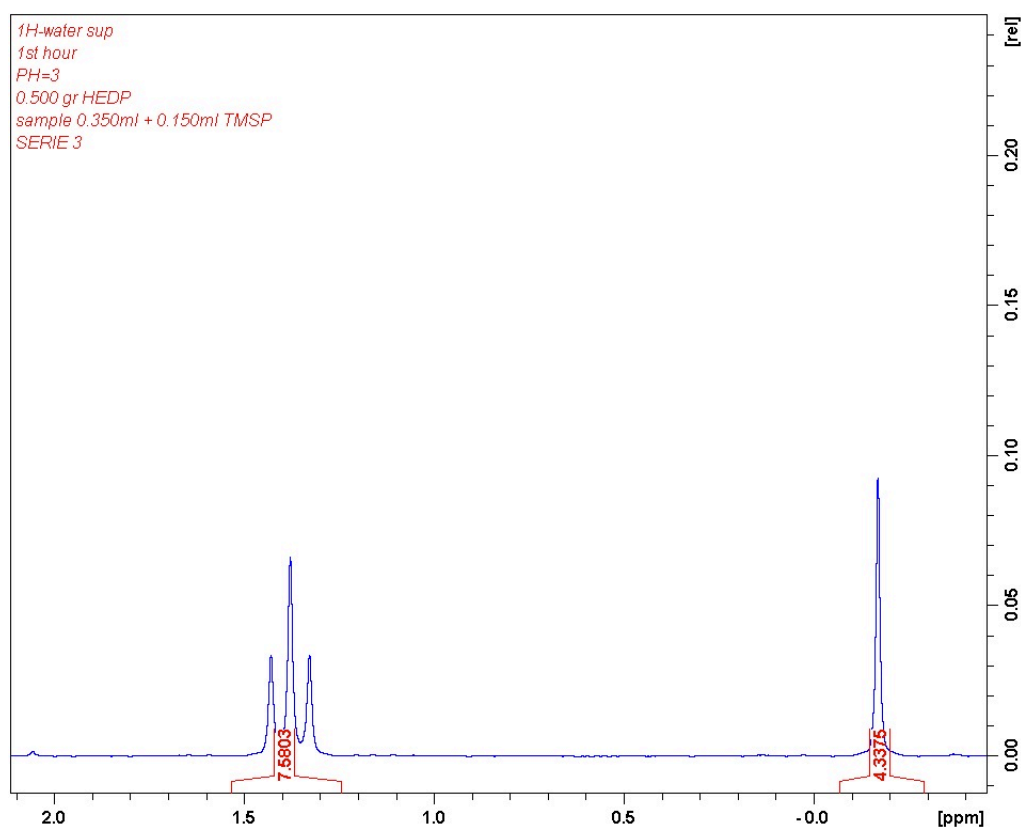
Διάγραμμα 1: Σύγκριση των διαγραμμάτων XRD της ένωσης Ca-HEDP και της ένωσης του Stock.⁽¹⁰⁾ Όπως φαίνεται, οι κορυφές των δύο διαγραμμάτων ταυτίζονται, γεγονός που σημαίνει ότι και στις δύο περιπτώσεις η ένωση Ca-HEDP είναι η ίδια.

2.5 Πειραματική Διαδικασία Μελέτης Ρυθμού Αποδέσμευσης HEDP

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν οκτώ πειράματα μελέτης αποδέσμευσης HEDP, τέσσερα σε τιμή pH=3, τέσσερα σε τιμή pH=1.2 και παρασκευάστηκαν οκτώ χάπια ίδου βάρους και ίδιας σύστασης. Για κάθε χάπι ζυγίστηκαν 0.500 g από την ένωση Ca-HEDP και κονιοποιήθηκαν. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στην πρέσσα για την παρασκευή χαπιών, όπου εφαρμόστηκε πίεση 10 τόνων. Σε κάθε πείραμα ένα ποτήρι ζέσεως των 600 ml τοποθετήθηκαν 100 ml H₂O και το pH ρυθμίστηκε στην τιμή 3 και στην τιμή 1.2 αντίστοιχα με τη βοήθεια διαλύματος HCl. Για κάθε πείραμα ένα χάπι Ca-HEDP τοποθετήθηκε σε ένα δίχτυ ίδιου τύπου τσαγιού και τοποθετήθηκε στο ποτήρι ζέσεως με ταυτόχρονη ανάδευση. Τέλος πραγματοποιούνταν δειγματοληψίες 0.350 ml διαλύματος με πιπέτα Gilson κάθε μία ώρα για έξι ώρες συνολικά σε κάθε πείραμα. Το δείγμα τοποθετούνταν σε σωλήνα NMR όπου προστίθενταν 0.150 ml πρότυπου διαλύματος TMSP πριν από τη λήψη του φάσματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Έχοντας παρασκευάσει χάπια από Ca-HEDP ήταν δυνατή η μελέτη της αποδέσμευσης του διφωσφονικού φαρμάκου HEDP σε διαφορετικές συνθήκες pH. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση του αποδεσμευμένου HEDP σε υδατικά διαλύματα με pH=3.0 και pH=1.2 χρησιμοποιώντας τη φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR). Οι τιμές του pH ορίστηκαν σύμφωνα με τις αντίστοιχες συνθήκες που επικρατούν στο στομάχι του ανθρώπινου οργανισμού (pH=1.2). Η λήψη φασμάτων ^1H έγινε με φασματογράφο συχνότητας 300MHz και χρήση προτύπου διαλύματος TMS, ώστε να είναι εφικτή η ποσοτικοποίηση. Το πρότυπο διάλυμα TMS εμφανίζει στο φάσμα ^1H μια μονή κορυφή ($\delta < 0$ ppm), λόγω των τριών μεθυλομάδων, ενώ το δείγμα μια τριπλή κορυφή ($\delta = 1.4$ ppm), λόγω των φωσφονικών ομάδων που ενώνονται με τον άνθρακα που διαθέτει μια μεθυλομάδα. Ολοκληρώνοντας τις δύο κορυφές και συγκρίνοντας τις τιμές τους είναι εφικτός ο υπολογισμός του ποσοστού αποδέσμευσης HEDP στο διάλυμα. Έχοντας το ποσοστό αποδέσμευσης για κάθε ώρα και επαναλαμβάνοντας τα πειράματα τέσσερις φορές, κατασκευάστηκαν διαγράμματα % αποδέσμευσης σε σχέση με τον χρόνο, ενώ υπολογίστηκαν και τα πειραματικά σφάλματα των μετρήσεων. Για τα διαγράμματα χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Origin, καθώς και το πρόγραμμα Excel για τους αντίστοιχους υπολογισμούς.



Φάσμα 1: Φάσμα ^1H για το πείραμα 1 αποδέσμευσης HEDP σε pH=3.0 (1^η ώρα).

3.1 Υπολογισμοί Ποσοτικοποίησης

Για κάθε τιμή pH πραγματοποιήθηκαν τέσσερα πειράματα, ώστε τα αποτελέσματα να είναι επαναλήψιμα. Κάθε χάπι αποτελούνταν από 0.500 g $[\text{Ca}(\text{HO}_2\text{P}-\text{C}(\text{OH})-(\text{CH}_3)-\text{PO}_3\text{H})(\text{H}_2\text{O})] \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$, ένωση με μοριακό βάρος FW= 309.135 g/mol.

Το μοριακό βάρος του HEDP είναι $FW = 206.02 \text{ g/mol}$.

Σε κάθε χάπι περιέχονται $n_{\text{Ca-HEDP}} = m / FW = 0.500 \text{ g} / (309.135 \text{ g/mol}) = 1.62 \text{ mmol}$.

Στα 309.315 g Ca-HEDP περιέχονται 206.02 g HEDP

Στα 0.500 g Ca-HEDP περιέχονται x

Όπου $x = 0.333 \text{ g}$ HEDP

Άρα η μέγιστη ποσότητα HEDP που μπορεί να αποδεσμευτεί είναι $n_{\text{HEDP}} = m / FW = 0.333 \text{ g} / (206.02 \text{ g/mol}) = 1617 \text{ } \mu\text{mol}$.

Καθώς το σήμα ^1H NMR που λαμβάνεται για το δείγμα αντιστοιχεί στα τρία πρωτόνια της μεθυλομάδας του HEDP πρέπει να διαιρεθεί με το τρία. Σε κάθε δειγματοληψία η ποσότητα αντιστοιχούσε σε 0.350 ml , ενώ ο όγκος του διαλύματος στο οποίο πραγματοποιούνταν το πείραμα ήταν 100 ml .

Άρα η ποσότητα HEDP που έχει αποδεσμευτεί κάθε ώρα στα 100 ml υπολογίζεται από τη σχέση:

$$\mu\text{mol HEDP} = [(\text{Σήμα } ^1\text{H NMR} / 3) * 100] / 0.350$$

Άρα το % ποσοστό αποδέσμευσης HEDP για κάθε ώρα υπολογίζεται διαιρώντας με τη μέγιστη ποσότητα HEDP που μπορεί να υπάρχει στο διάλυμα των 100 ml :

$$\% \text{ ποσοστό αποδέσμευσης HEDP} = (\mu\text{mol HEDP} / 1617 \mu\text{mol}) * 100$$

Στα διαγράμματα που ακολουθούν έγινε κανονικοποίηση της καμπύλης και η εξίσωση της κανονικοποίησης είναι της μορφής:

$$y = A * e^{-Bx} + C \quad (A, B, C > 0)$$

Τα ποσοστά αποδέσμευσης HEDP για κάθε ώρα βρέθηκαν από τον μέσο όρο των τεσσάρων πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν για $\text{pH}=3.0$ και $\text{pH}=1.2$, ενώ παράλληλα βρέθηκαν και τα σφάλματα αυτών, τα οποία είναι εντός των ορίων του σφάλματος του φασματογράφου ($<10\%$).

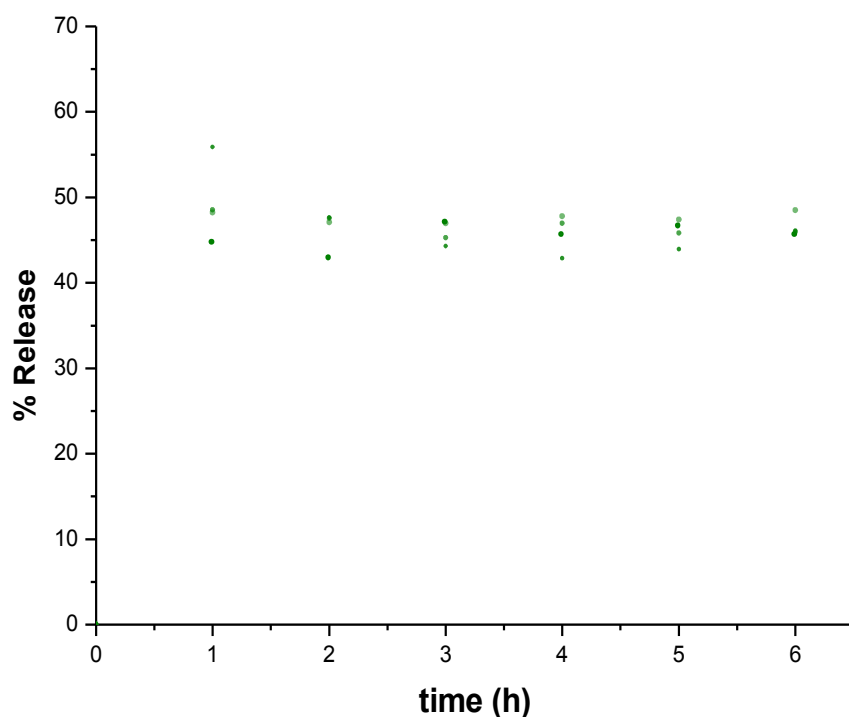
3.2 Αποτελέσματα Φασμάτων NMR

Από τα φάσματα ^1H NMR προέκυψαν τα δεδομένα των παρακάτω πινάκων, στους οποίους βασίστηκαν τα επόμενα διαγράμματα % αποδέσμευσης σε σχέση με τον χρόνο.

3.2.1 Πειραματικά αποτελέσματα για τα διαλύματα με τιμή pH=3.0

Πίνακας 3: Η ποσότητα HEDP σε μmol για κάθε ώρα σε κάθε ένα από τα τέσσερα πειράματα για τιμή pH=3.0 και τα % ποσοστά αποδέσμευσης HEDP στο διάλυμα.

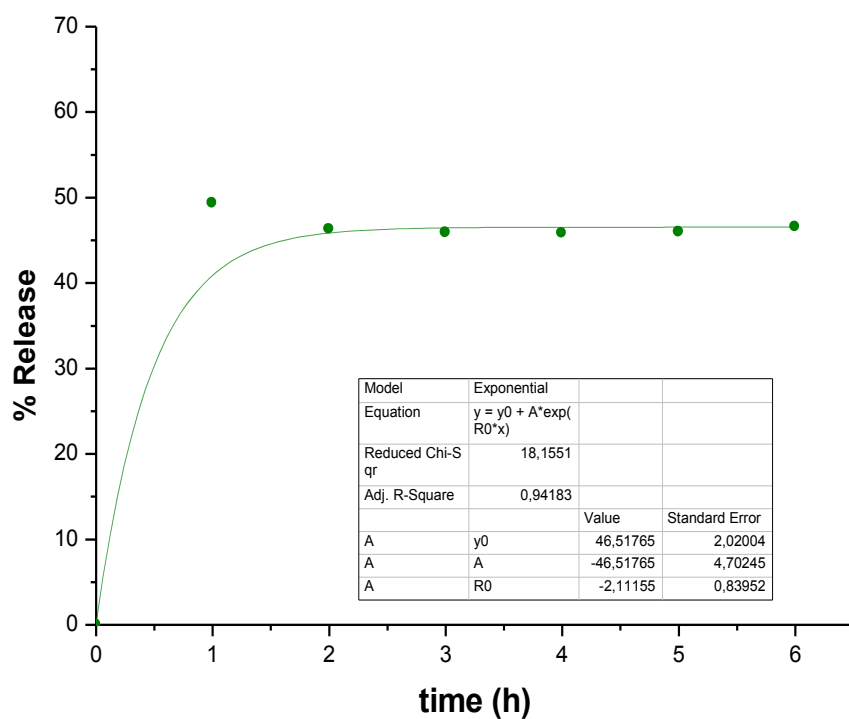
Ωρα	Πείραμα 1		Πείραμα 2		Πείραμα 3		Πείραμα 4	
	Ποσότητα HEDP (μmol)	Αποδέσμευση (%)	Ποσότητα HEDP (μmol)	Αποδέσμευση (%)	Ποσότητα HEDP (μmol)	Αποδέσμευση (%)	Ποσότητα HEDP (μmol)	Αποδέσμευση (%)
1	721.93	44.65	784.91	48.54	903.95	55.90	779.88	48.23
2	693.12	42.86	768.91	47.55	770.01	47.62	761.37	47.09
3	759.91	46.99	732.05	45.27	716.39	44.30	759.69	46.98
4	736.35	45.54	759.76	46.98	693.27	42.87	772.89	47.80
5	753.31	46.59	741.09	45.83	710.80	43.96	766.51	47.40
6	736.67	45.56	742.76	45.93	745.33	46.09	784.03	48.49



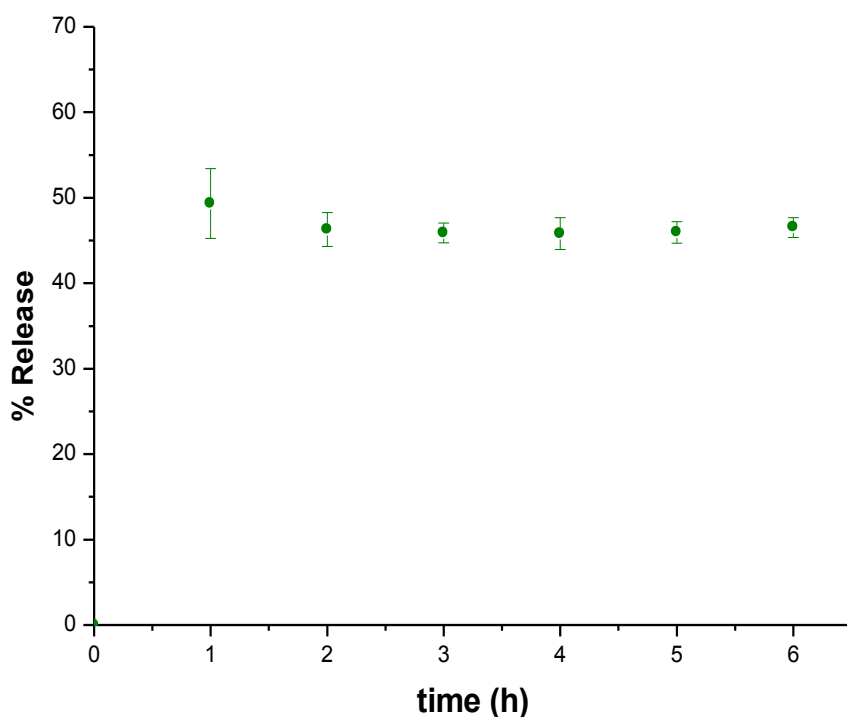
Διάγραμμα 2: Διάγραμμα σημείων με την % αποδέσμευση HEDP σε υδατικό διάλυμα με τιμή pH=3.0 σε σχέση με τον χρόνο. Σε κάθε μία ώρα αντιστοιχούν τέσσερις τιμές % αποδέσμευσης, μία για κάθε ένα από τα τέσσερα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν.

Πίνακας 4: Ο μέσος όρος της ποσότητας HEDP στο διάλυμα για κάθε ώρα και ο μέσος όρος της % αποδέσμευσης HEDP με τα σφάλματα των μετρήσεων για τιμή pH=3.0.

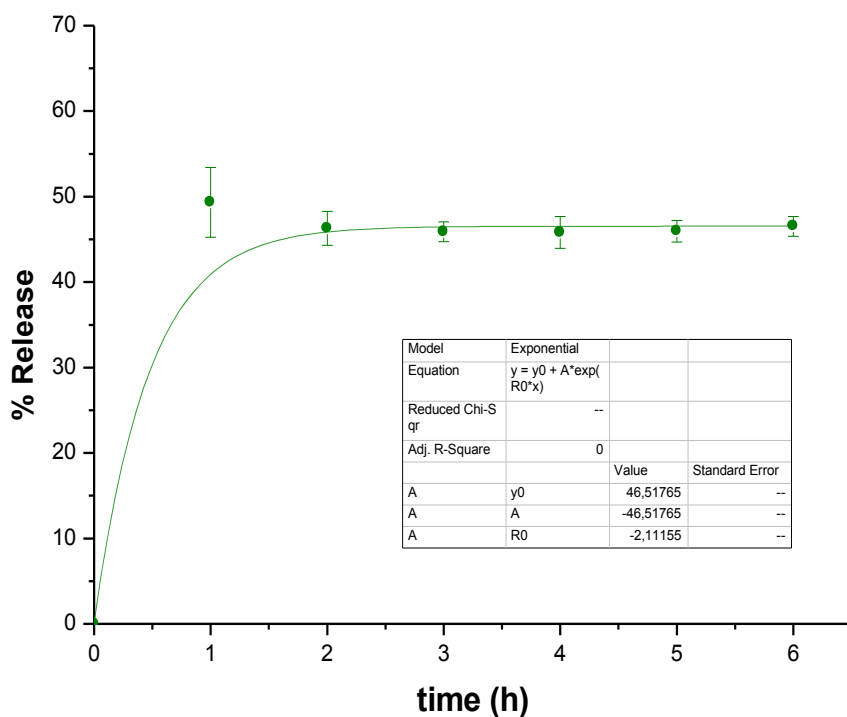
Ωρα	Μέσος όρος Ποσότητας HEDP (μmol)	% Αποδέσμευση	% Σφάλμα
1	797.67	49.33	4.09
2	748.35	46.28	1.99
3	742.01	45.89	1.15
4	740.57	45.8	1.87
5	742.93	45.95	1.27
6	752.20	46.52	1.15



Διάγραμμα 3: Διάγραμμα μέσης τιμής της % αποδέσμευσης HEDP για τα χάπια σε διαλύματα με pH=3.0 σε σχέση με τον χρόνο.



Διάγραμμα 4: Διάγραμμα σημείων μέσης τιμής της % αποδέσμευσης HEDP για τα χάπια σε διαλύματα με pH=3.0 σε σχέση με τον χρόνο με το εύρος των σφαλμάτων των μετρήσεων.



Διάγραμμα 5: Διάγραμμα μέσης τιμής της % αποδέσμευσης HEDP για τα χάπια σε διαλύματα με pH=3.0 σε σχέση με τον χρόνο με το εύρος των σφαλμάτων των μετρήσεων.

Τα σφάλματα των μετρήσεων είναι εντός των ορίων σφάλματος του οργάνου, δηλαδή δεν ξεπερνούν το 10% και μάλιστα στις περισσότερες περιπτώσεις είναι μικρότερα του 2%. Η κανονικοποίηση χαρακτηρίζεται από την εξίσωση της μορφής:

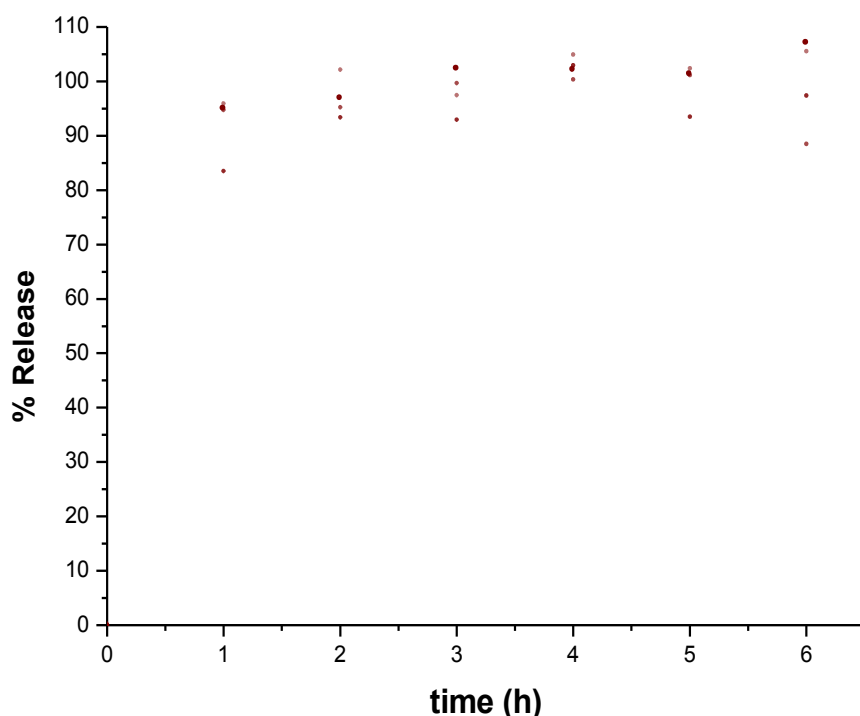
$$y = A * e^{-Bx} + C$$

Για τα διαλύματα με τιμή pH=3.0, το pH δεν μεταβλήθηκε κατά τη διάρκεια της αποδέσμευσης HEDP, η οποία φτάνει κατά μέσο όρο το 50% ως μέγιστη τιμή.

3.2.2 Πειραματικά αποτελέσματα για τα διαλύματα με τιμή pH=1.2

Πίνακας 5: Η ποσότητα HEDP σε μmol για κάθε ώρα σε κάθε ένα από τα τέσσερα πειράματα για τιμή pH=1.2 και τα % ποσοστά αποδέσμευσης HEDP στο διάλυμα.

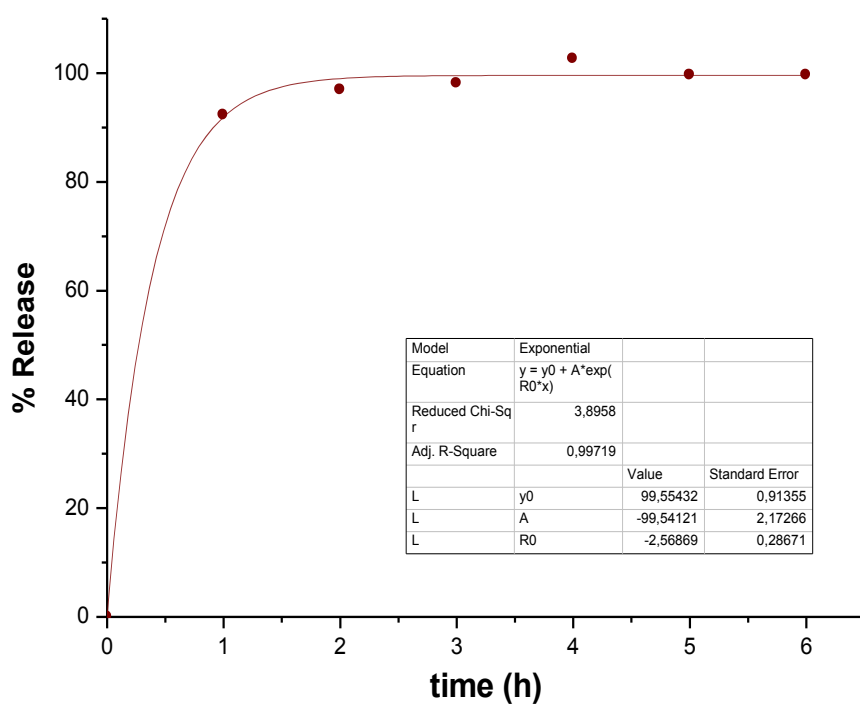
Ωρα	Πείραμα 1		Πείραμα 2		Πείραμα 3		Πείραμα 4	
	Ποσότητα HEDP (μmol)	Αποδέσμευση (%)	Ποσότητα HEDP (μmol)	Αποδέσμευση (%)	Ποσότητα HEDP (μmol)	Αποδέσμευση (%)	Ποσότητα HEDP (μmol)	Αποδέσμευση (%)
1	1534.73	94.91	1350.36	83.51	1531.84	94.73	1550.73	95.90
2	1565.92	96.84	1509.73	93.37	1539.84	95.23	1651.91	102.16
3	1654.14	102.30	1503.06	92.95	1611.79	99.67	1576.29	97.48
4	1650.8	102.09	1665.04	102.97	1622.78	100.36	1696.4	104.91
5	1637.67	101.28	1512.39	93.53	1635.97	101.17	1655.82	102.40
6	1730.69	107.03	1575.48	97.43	1431.15	88.51	1707.18	105.58



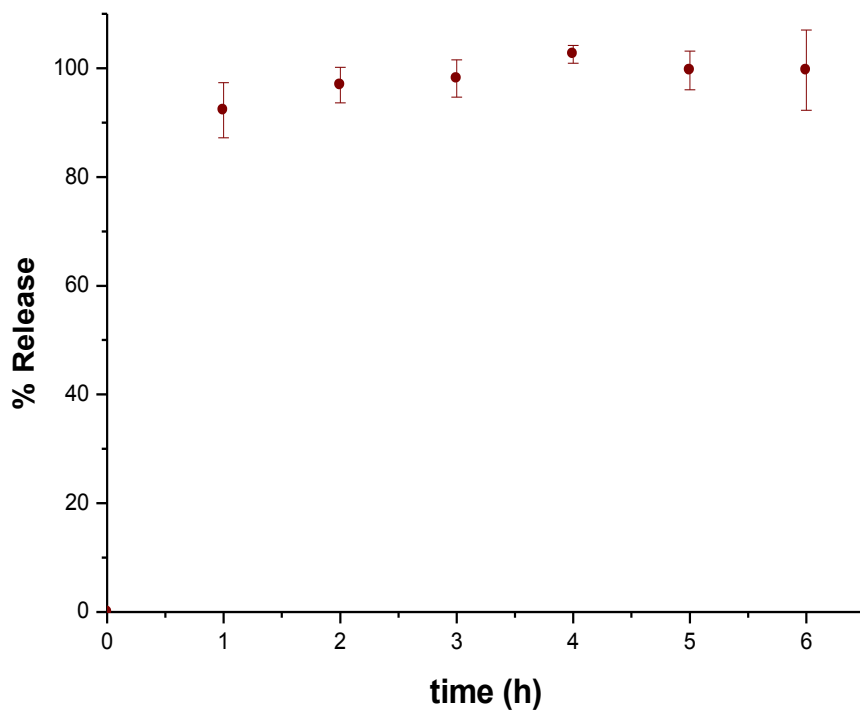
Διάγραμμα 6: Διάγραμμα σημείων με την % αποδέσμευση HEDP σε υδατικό διάλυμα με τιμή pH=1.2 σε σχέση με τον χρόνο. Σε κάθε μία ώρα αντιστοιχούν τέσσερις τιμές % αποδέσμευσης, μία για κάθε ένα από τα τέσσερα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν.

Πίνακας 6: Ο μέσος όρος της ποσότητας HEDP στο διάλυμα για κάθε ώρα και ο μέσος όρος της % αποδέσμευσης HEDP με τα σφάλματα των μετρήσεων για τιμή pH=1.2.

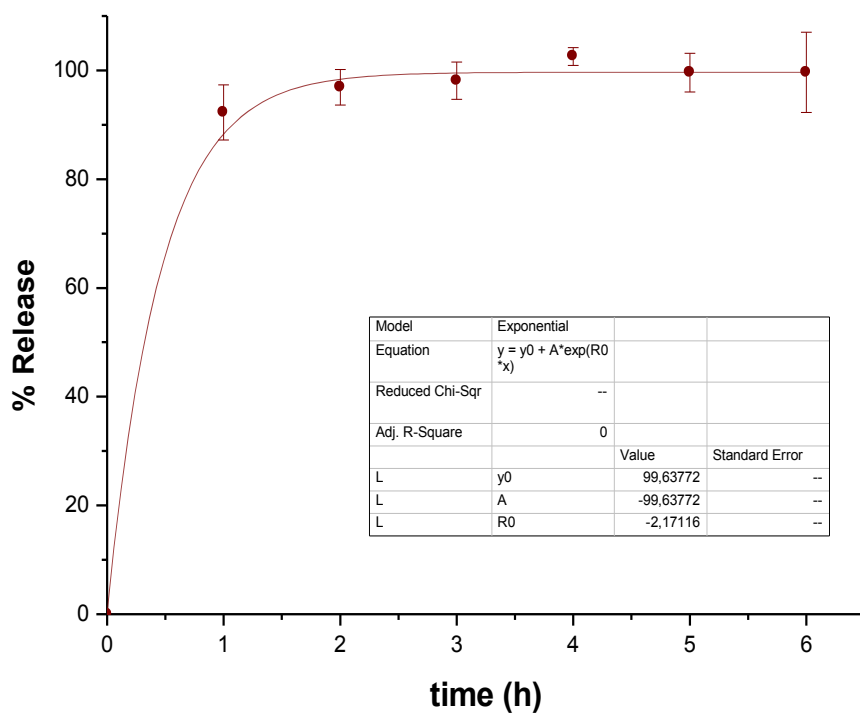
Ωρα	Μέσος όρος Ποσότητας HEDP (μmol)	% Αποδέσμευση	% Σφάλμα
1	1491.92	92.26	5.07
2	1566.85	96.90	3.28
3	1586.32	98.10	3.43
4	1658.76	102.58	1.64
5	1610.46	99.60	3.53
6	1611.13	99.64	7.39



Διάγραμμα 7: Διάγραμμα μέσης τιμής της % αποδέσμευσης HEDP για τα χάπια σε διαλύματα με pH=1.2 σε σχέση με τον χρόνο.



Διάγραμμα 8: Διάγραμμα σημείων μέσης τιμής της % αποδέσμευσης HEDP για τα χάπια σε διαλύματα με pH=1.2 σε σχέση με τον χρόνο με το εύρος των σφαλμάτων των μετρήσεων.



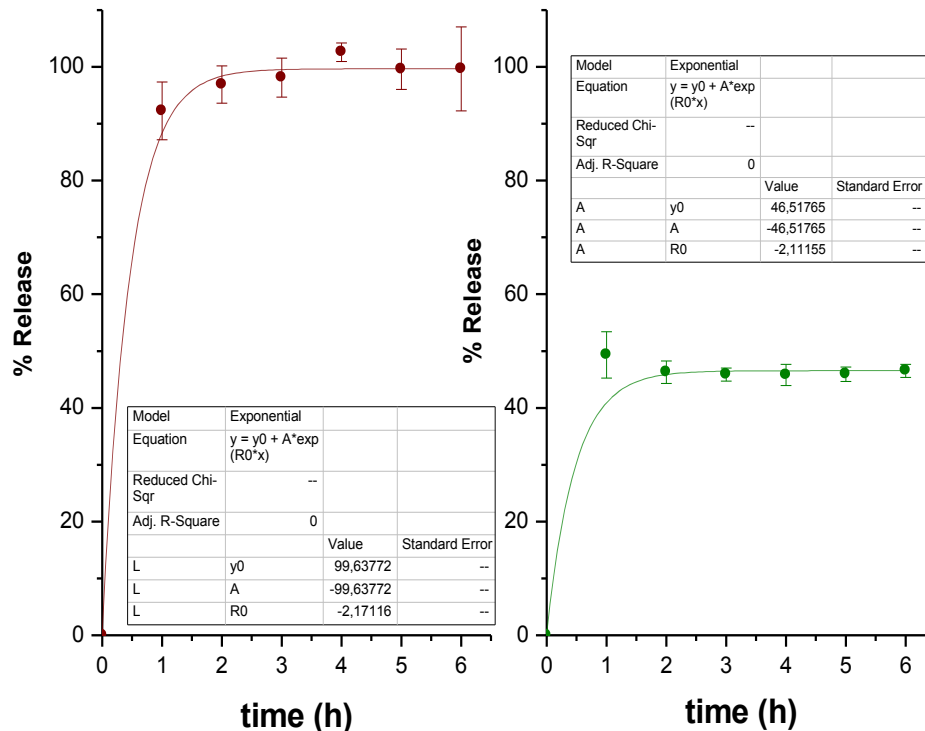
Διάγραμμα 9: Διάγραμμα μέσης τιμής της % αποδέσμευσης HEDP για τα χάπια σε διαλύματα με pH=1.2 σε σχέση με τον χρόνο με το εύρος των σφαλμάτων των μετρήσεων.

Τα σφάλματα των μετρήσεων είναι εντός των ορίων σφάλματος του οργάνου, δηλαδή δεν ξεπερνούν το 10% και μάλιστα στις περισσότερες περιπτώσεις είναι μικρότερα του 5%. Η κανονικοποίηση χαρακτηρίζεται από την εξίσωση της μορφής:

$$y = A * e^{-Bx} + C$$

Για τα διαλύματα με τιμή pH=1.2, το pH δεν μεταβλήθηκε κατά τη διάρκεια της αποδέσμευσης HEDP, η οποία στην συγκεκριμένη περίπτωση αγγίζει το 100%.

3.2.3 Σύγκριση Αποτελεσμάτων



Διάγραμμα 10: Σύγκριση της % αποδέσμευσης HEDP για τα χάπια σε διαλύματα με pH=1.2 και pH=3.0 σε σχέση με τον χρόνο με το εύρος των σφαλμάτων των μετρήσεων.

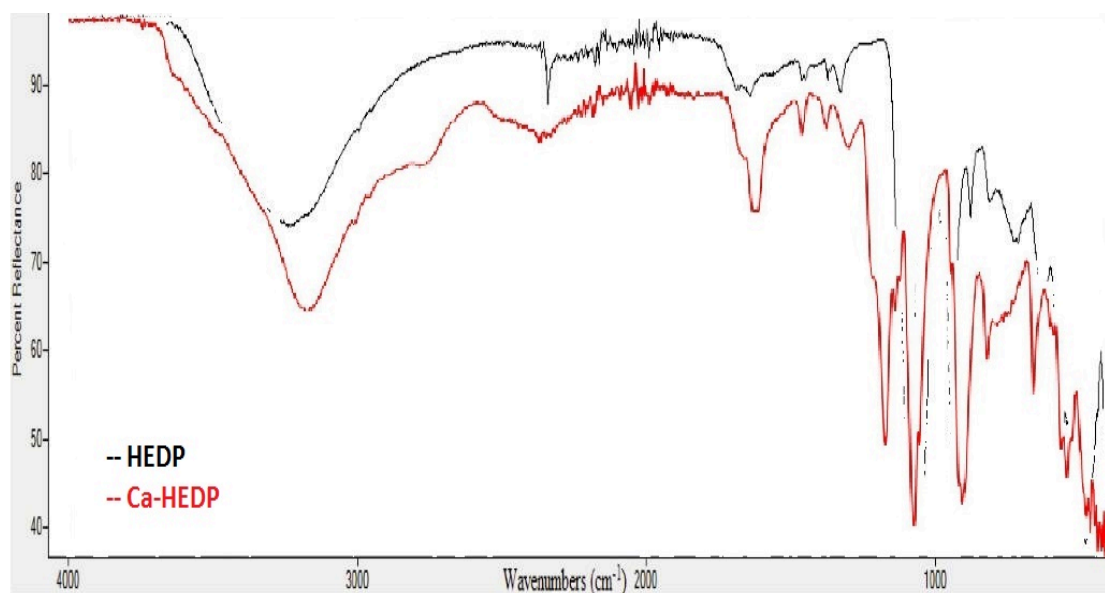
Παρατηρείται πως ανεξάρτητα από τις συνθήκες pH, η % αποδέσμευση αυξάνεται κατακόρυφα από την πρώτη ώρα και στη συνέχεια κυμαίνεται σε σταθερά επίπεδα στο διάστημα των έξι ωρών. Στην περίπτωση της τιμής pH=3.0 η % αποδέσμευση φτάνει στο 50%, ενώ στην περίπτωση της τιμής pH=1.2 η % αποδέσμευση αγγίζει το 100%. Επιπλέον, για τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε συνθήκες pH=3.0 αναφέρεται πως οι μετρήσεις χαρακτηρίζονται από μικρότερα σφάλματα σε σχέση με τα αντίστοιχα για συνθήκες pH=1.2. Εφόσον, όμως όλα τα σφάλματα είναι στο εύρος σφάλματος του οργάνου οι μετρήσεις είναι αποδεκτές και τα πειράματα επαναλήψιμα. Ως τελικό συμπέρασμα προκύπτει το γεγονός πως η μείωση του pH επιφέρει μεγαλύτερο ποσοστό % αποδέσμευσης HEDP στο υδατικό διάλυμα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Lisa Brannon, Peppas, "Polymers in Controlled Drug Delivery", Biomaterials (1997)
- (2) Della Rocca J., Liu D., Lin W., "Nanoscale Metal Organic Frameworks for Biomedical Imaging and Drug Delivery", Accounts Of Chemical Research, Vol. 44, No.10, 957-968 (2011)
- (3) Keskin S., Kızılel S., "Biomedical Applications of Metal Organic Frameworks", Industrial and Engineering Chemical Research, Vol. 50, 1799–1812 (2011)
- (4) Huxford R., Della Rocca J., Lin W., "Metal–organic frameworks as potential drug carriers", Chemical Biology, Vol. 14, 262–268 (2010)
- (5) S. Takaishi, M. Hosoda, T. Kajiwara, H. Miyasaka, M. Yamashita, Y. Nakanishi, Y. Kitagawa, K. Yamaguchi, A. Kobayashi, H. Kitagawa, Inorg. Chem., Vol. 48, 9048 (2009)
- (6) R. Graham, G. Russel "Bisphosphonates From Bench to Bedside" Ann. N.Y. Acad. Sci., Vol. 1068, 367–401 (2006)
- (7) Hebert Fleisch, "Bisphosphonates: Mechanisms of Action", Department of Pathophysiology, Switzerland Endocrine Reviews 19(1) 80-100 (1998)
- (8) Rolf W. Sparidans, Irene M. Twiss and Stephanie Talbot, "Bisphosphonates in bone diseases", Pharm World Sci, Vol. 20, No. 5, 206-213 (1998)
- (9) Θ.Μαυρομούστακος-Ι.Ματσούκας, "NMR, Αρχές και εφαρμογές φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού στην Ιατρική, Φαρμακευτική Χημεία, Βιοχημεία, Χημεία τροφίμων και ποτών", Εκδόσεις Γιάννης Β. Παρισιάνος (2006)
- (10) Niekel F., Stock N., 'Discovery of New Calcium Etidronates Employing Ultrasound Adapted High-Throughput Methods', Cryst. Growth Des., Vol.14, 599–606 (2014)

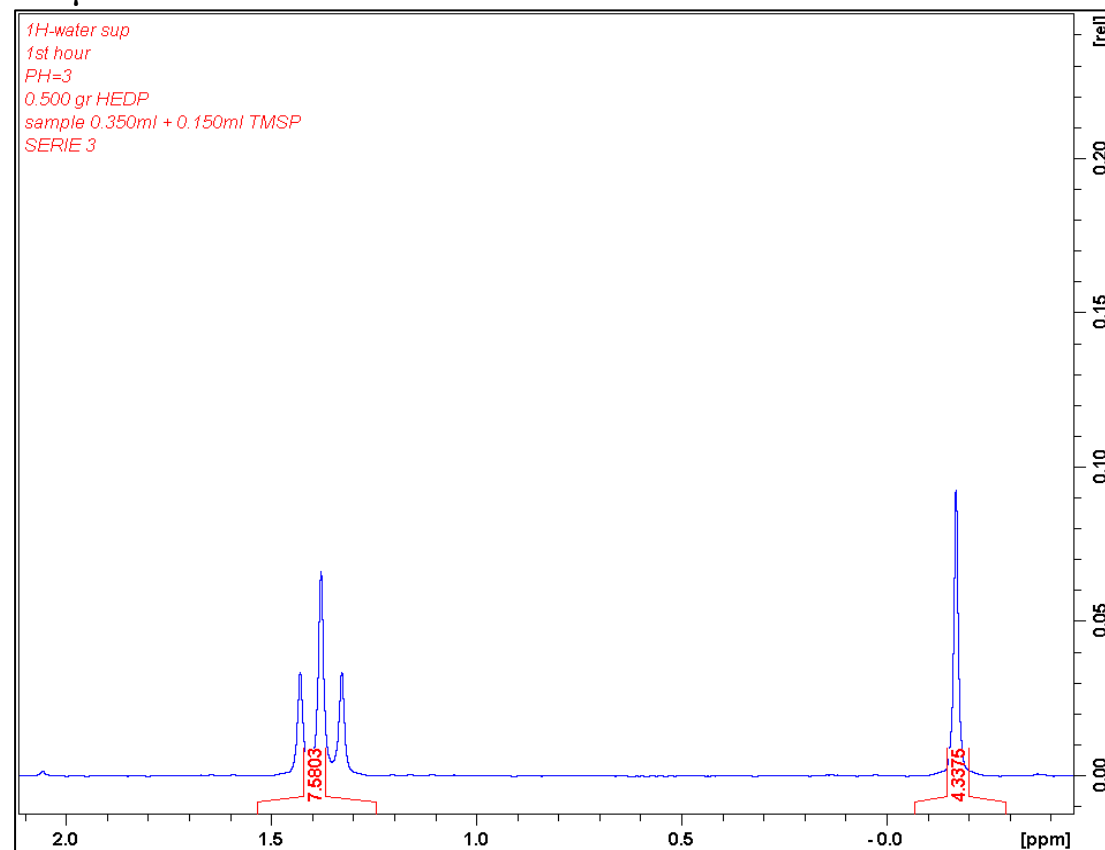
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Φάσματα IR

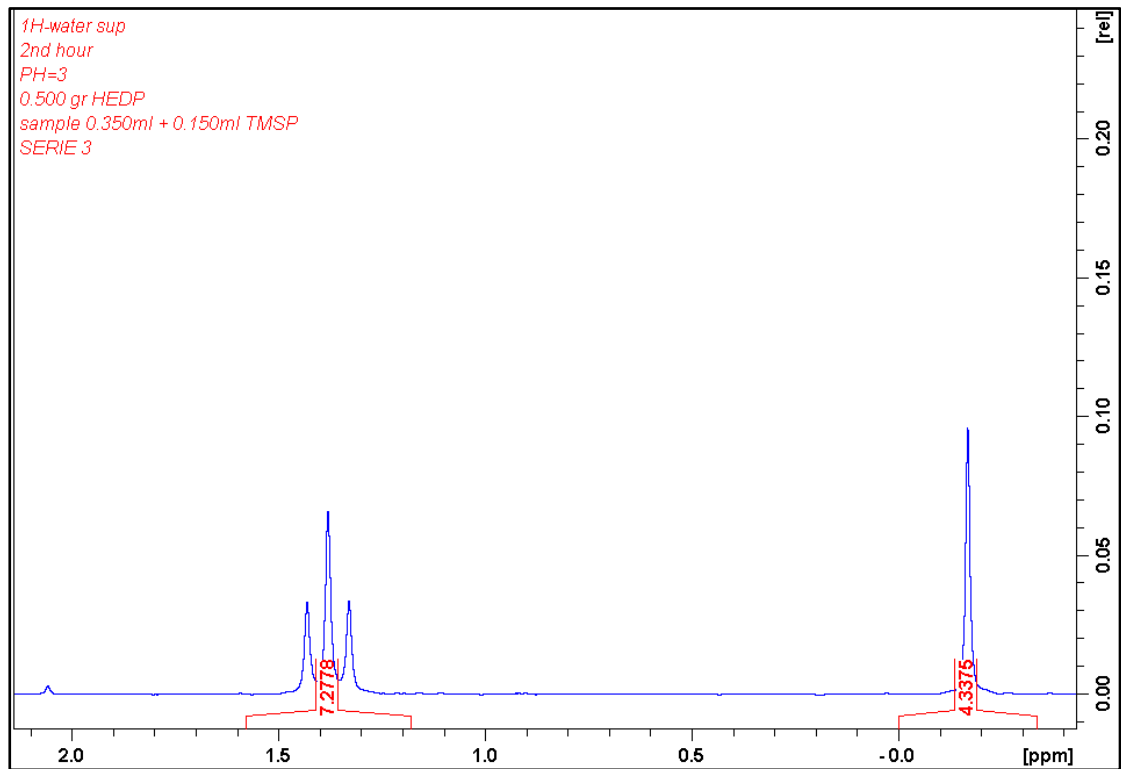


Φάσμα IR: Με κόκκινο συμβολίζεται το φάσμα IR του συμπλόκου Ca-HEDP, ενώ με μαύρο του ελεύθερου υποκαταστάτη HEDP. Η πρόσδεση του υποκαταστάτη στο μεταλλικό κέντρο συμπεραίνεται από τη μετακίνηση των κορυφών στην περιοχή των 900-1100 cm⁻¹.

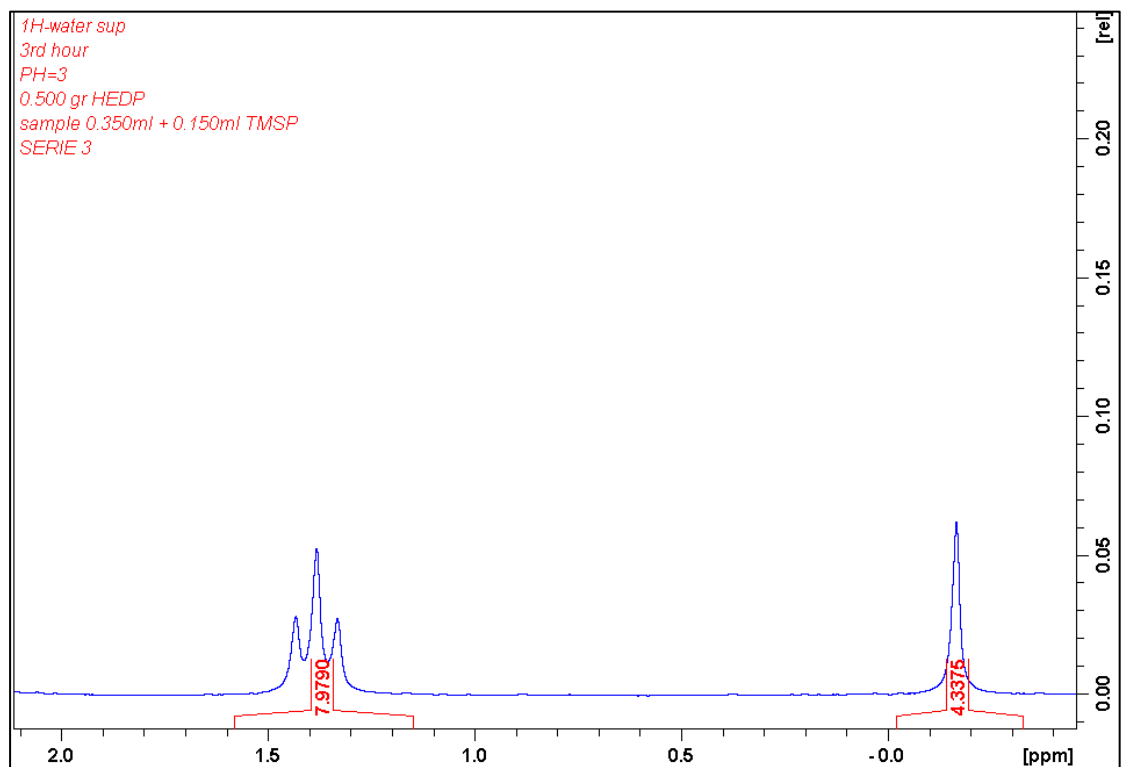
Φάσματα NMR



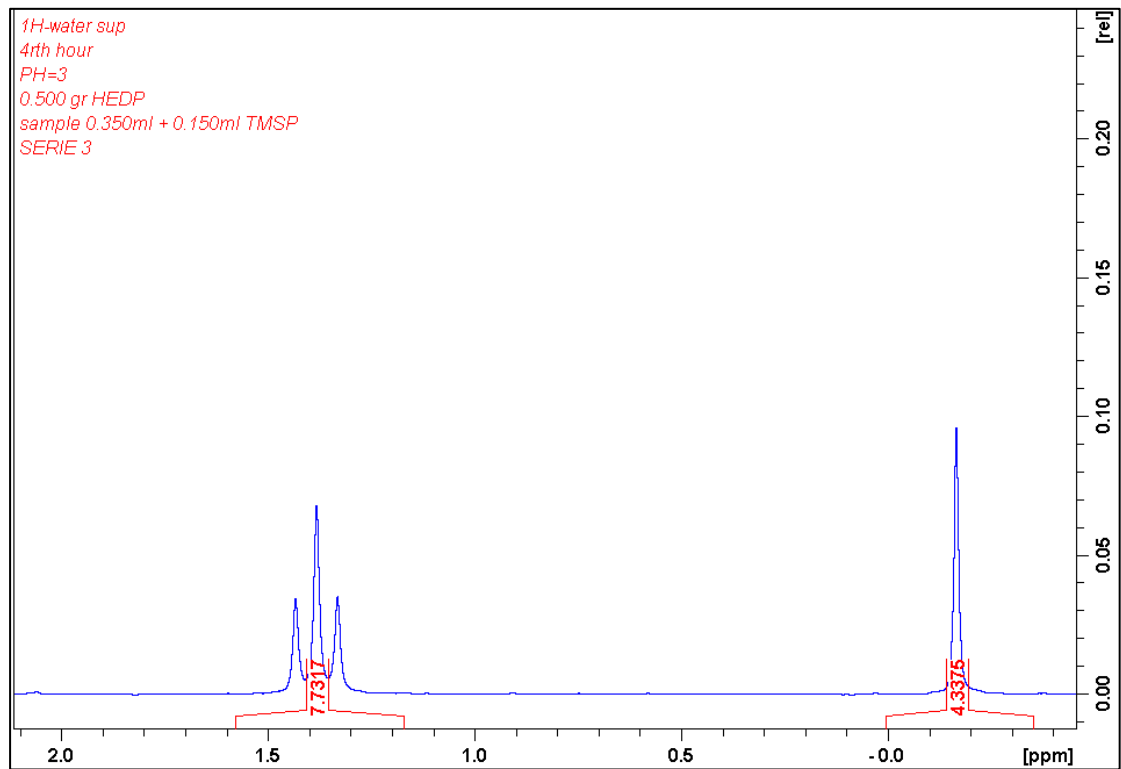
Φάσμα 1: Φάσμα ¹H για το πείραμα 1 αποδέσμευσης HEDP σε pH=3.0 (1^η ώρα).



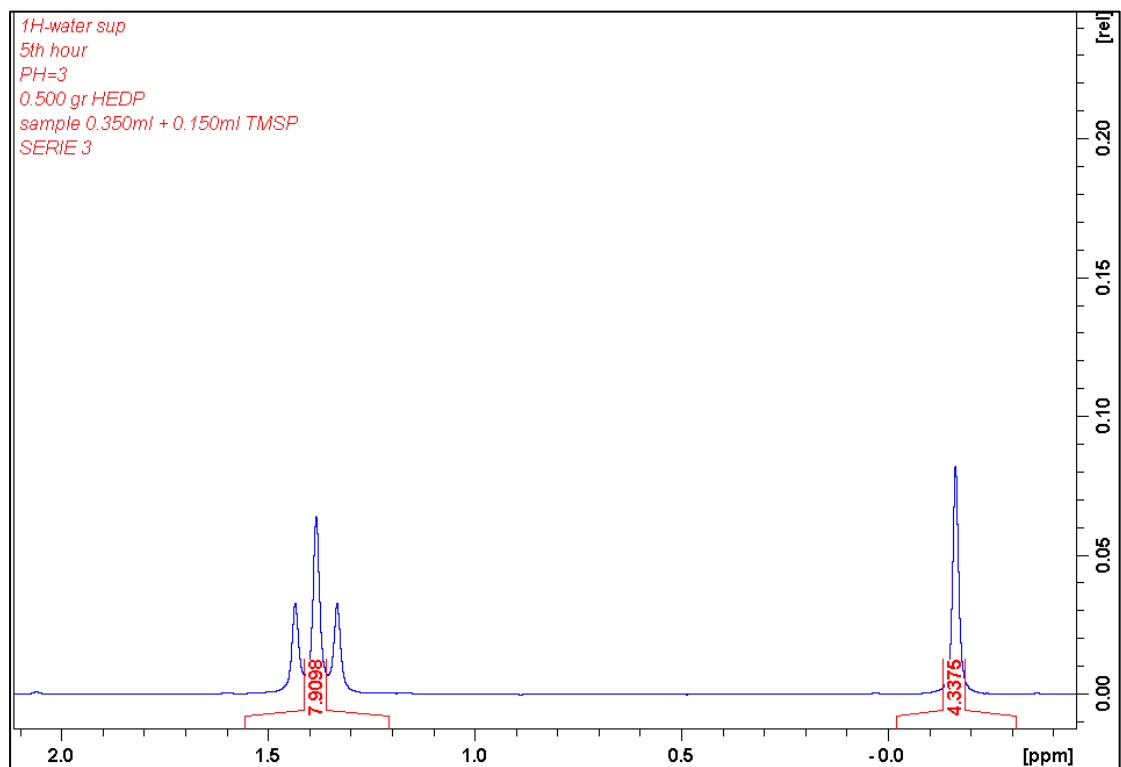
Φάσμα 2: Φάσμα ^1H για το πείραμα 1 αποδέσμευσης HEDP σε pH=3.0 (2^η ώρα).



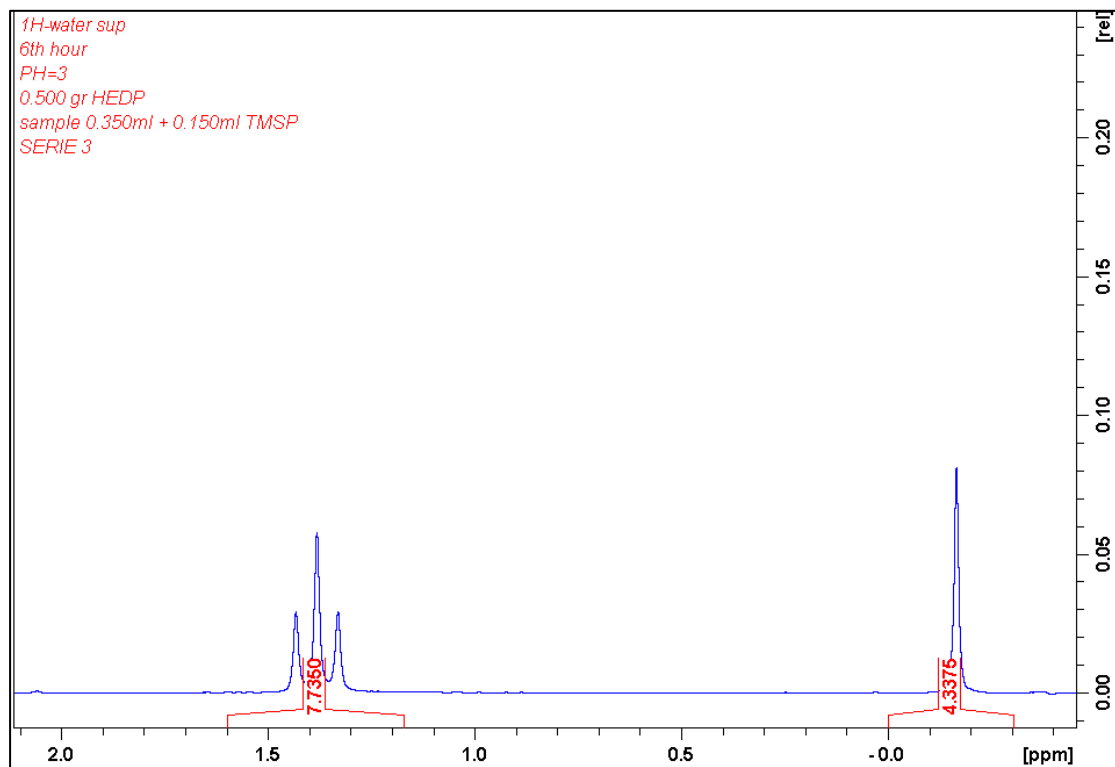
Φάσμα 3: Φάσμα ^1H για το πείραμα 1 αποδέσμευσης HEDP σε pH=3.0 (1^η ώρα).



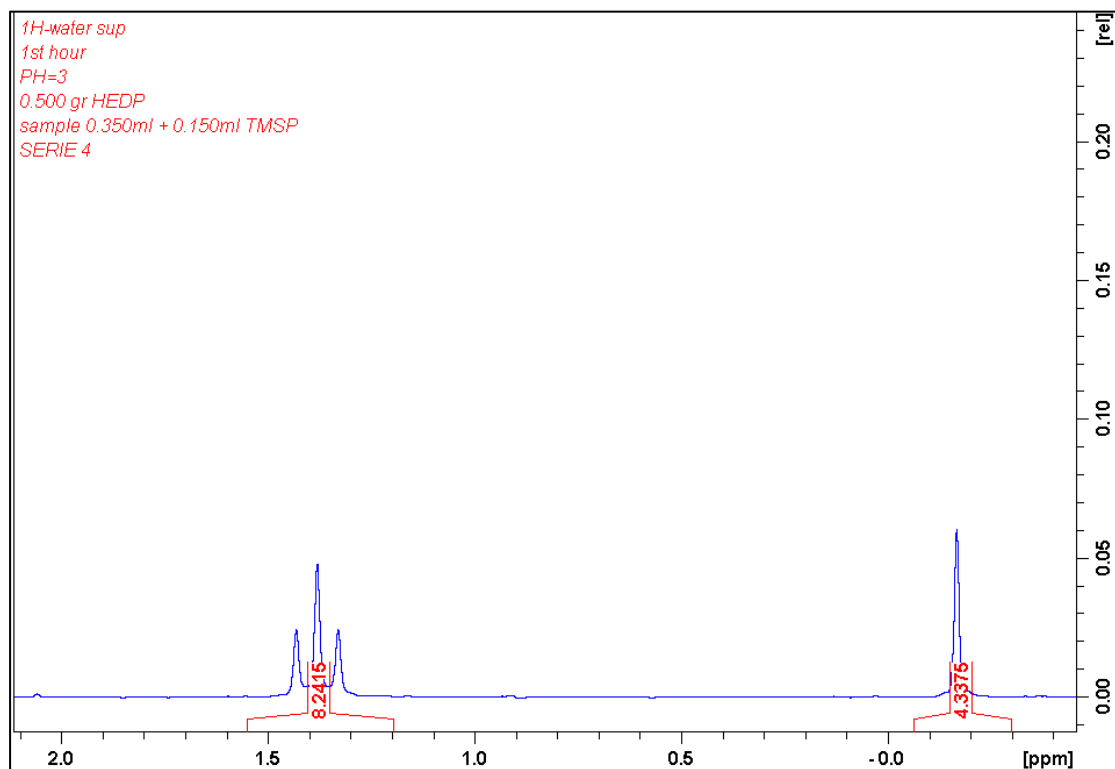
Φάσμα 4: Φάσμα ^1H για το πείραμα 1 αποδέσμευσης HEDP σε $\text{pH}=3.0$ (4^η ώρα).



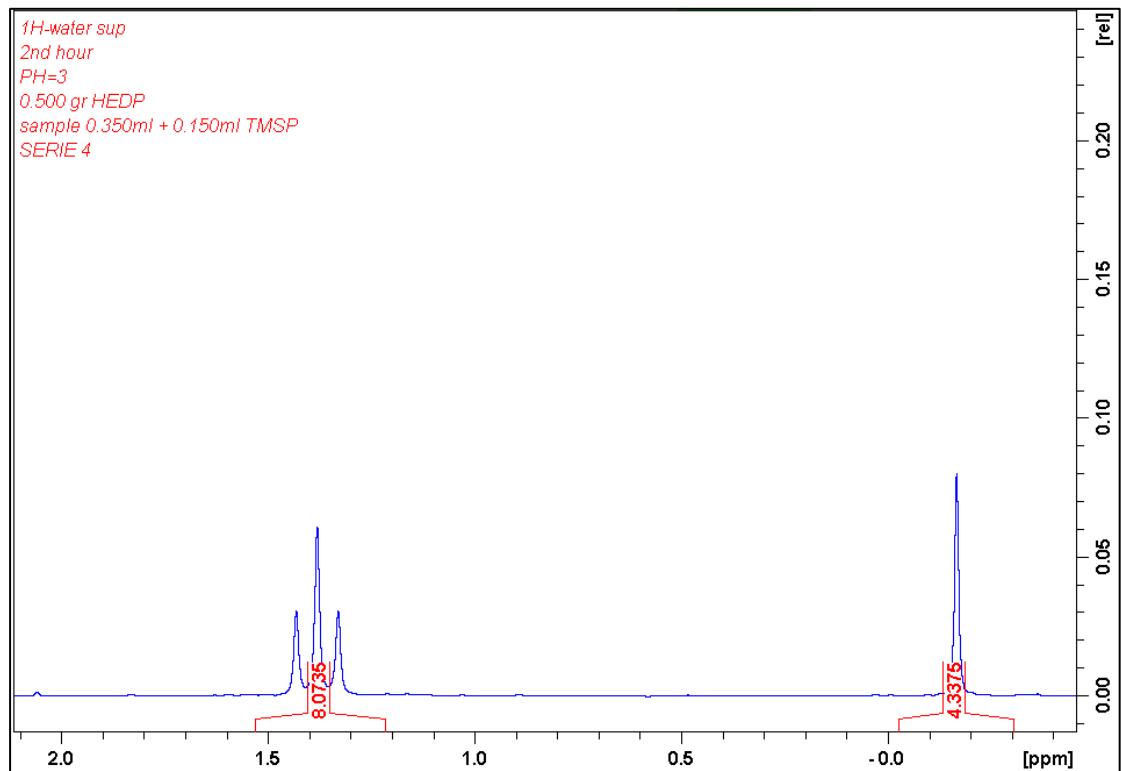
Φάσμα 5: Φάσμα ^1H για το πείραμα 1 αποδέσμευσης HEDP σε $\text{pH}=3.0$ (5^η ώρα).



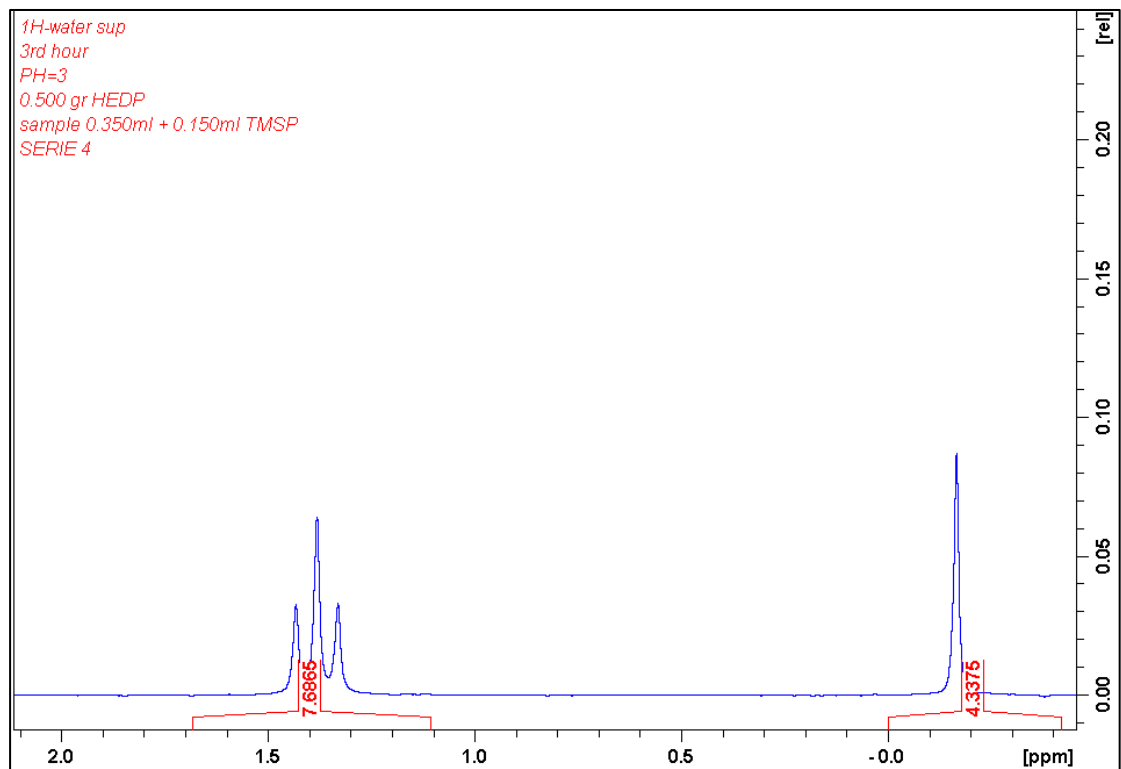
Φάσμα 6: Φάσμα ^1H για το πείραμα 1 αποδέσμευσης HEDP σε $\text{pH}=3.0$ (6^η ώρα).



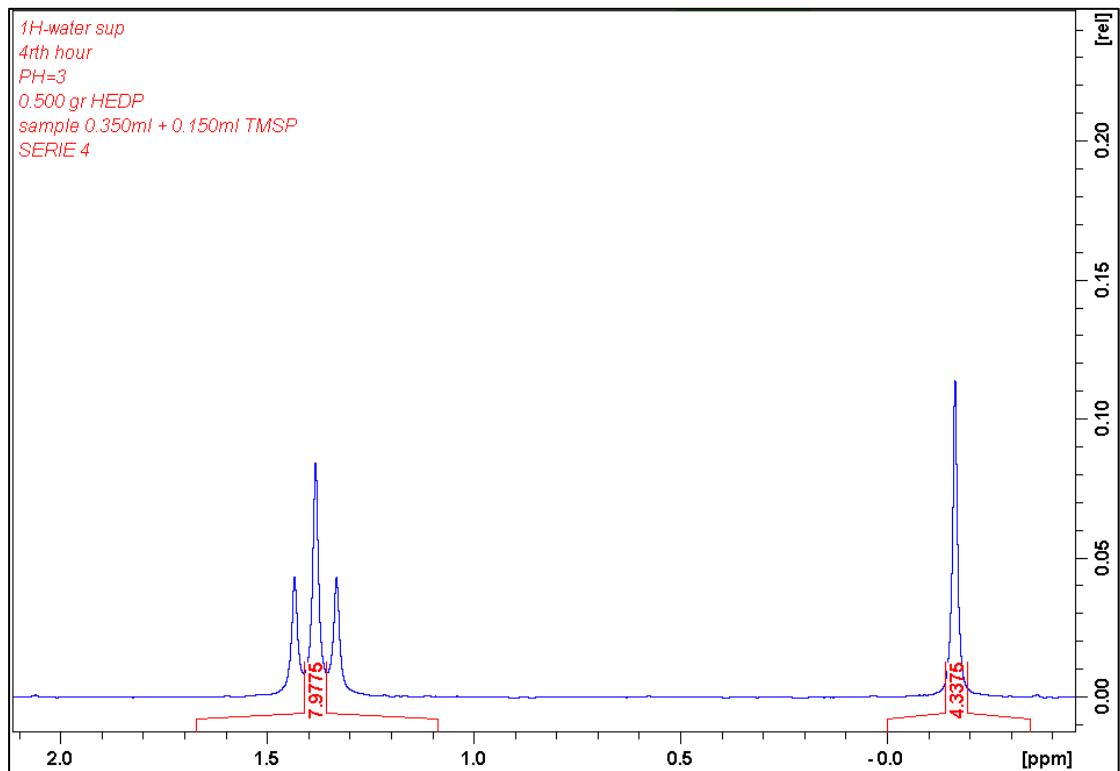
Φάσμα 7: Φάσμα ^1H για το πείραμα 2 αποδέσμευσης HEDP σε $\text{pH}=3.0$ (1^η ώρα).



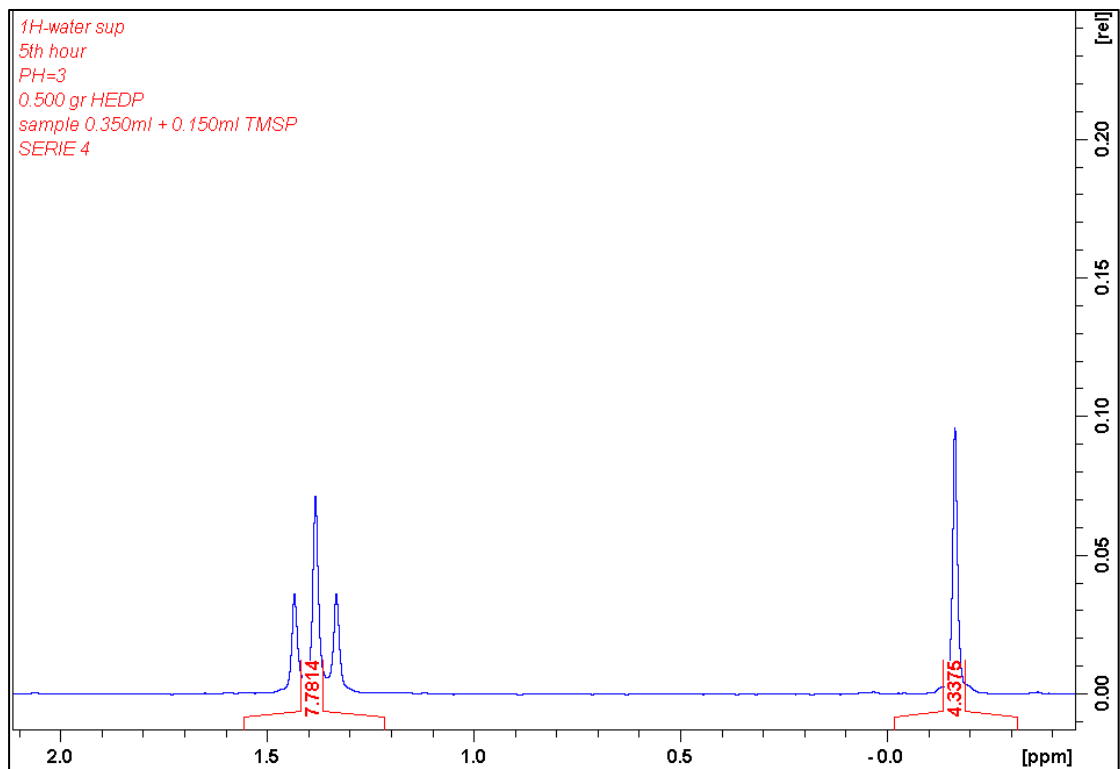
Φάσμα 8: Φάσμα ^1H για το πείραμα 2 αποδέσμευσης HEDP σε $\text{pH}=3.0$ (2^η ώρα).



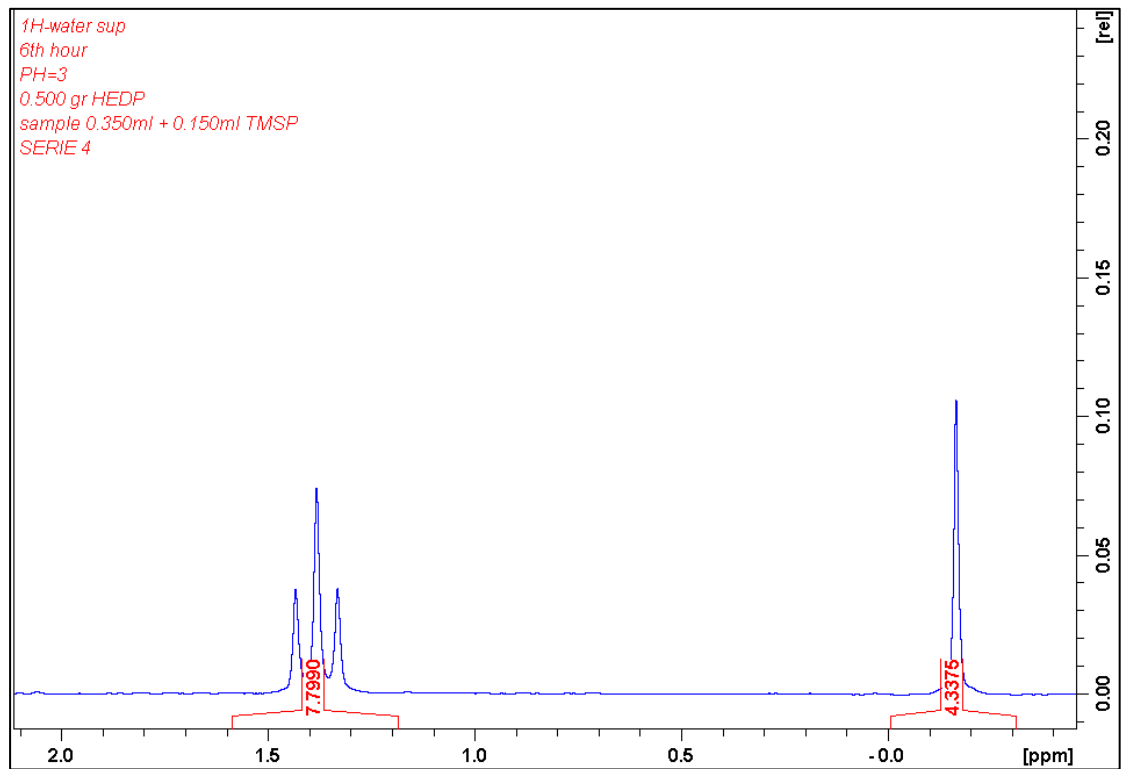
Φάσμα 9: Φάσμα ^1H για το πείραμα 2 αποδέσμευσης HEDP σε $\text{pH}=3.0$ (3^η ώρα).



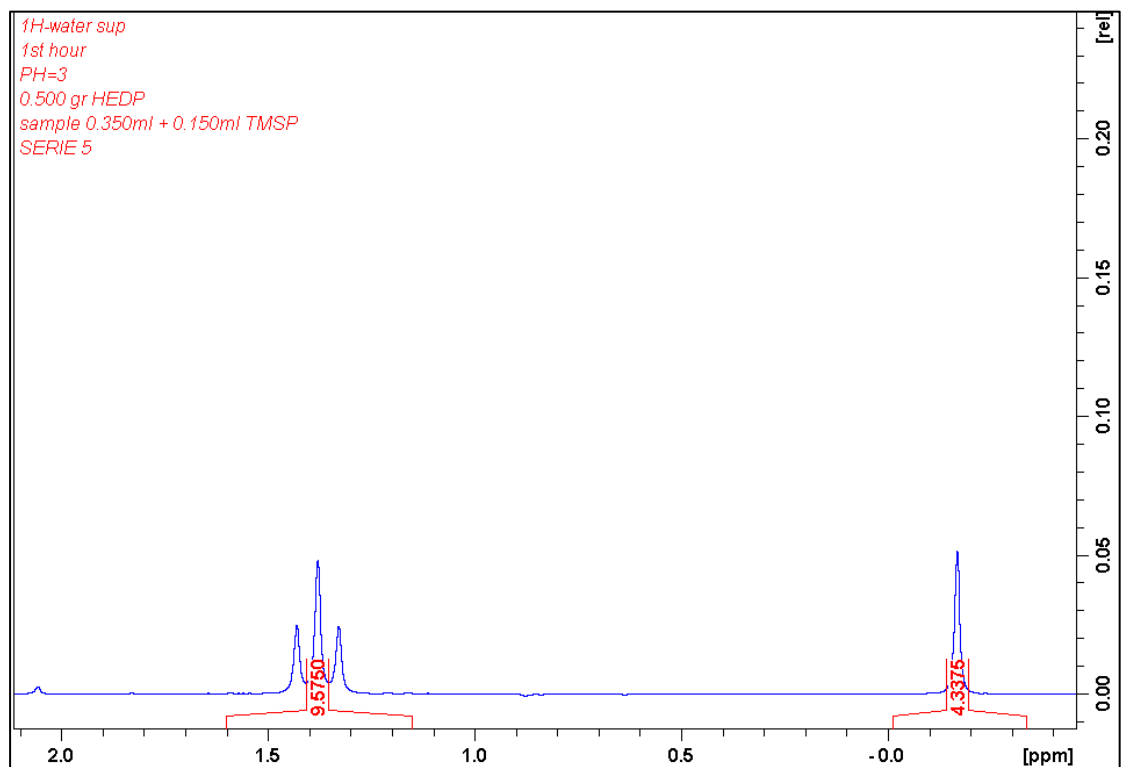
Φάσμα 10: Φάσμα ^1H για το πείραμα 2 αποδέσμευσης HEDP σε pH=3.0 (4^η ώρα).



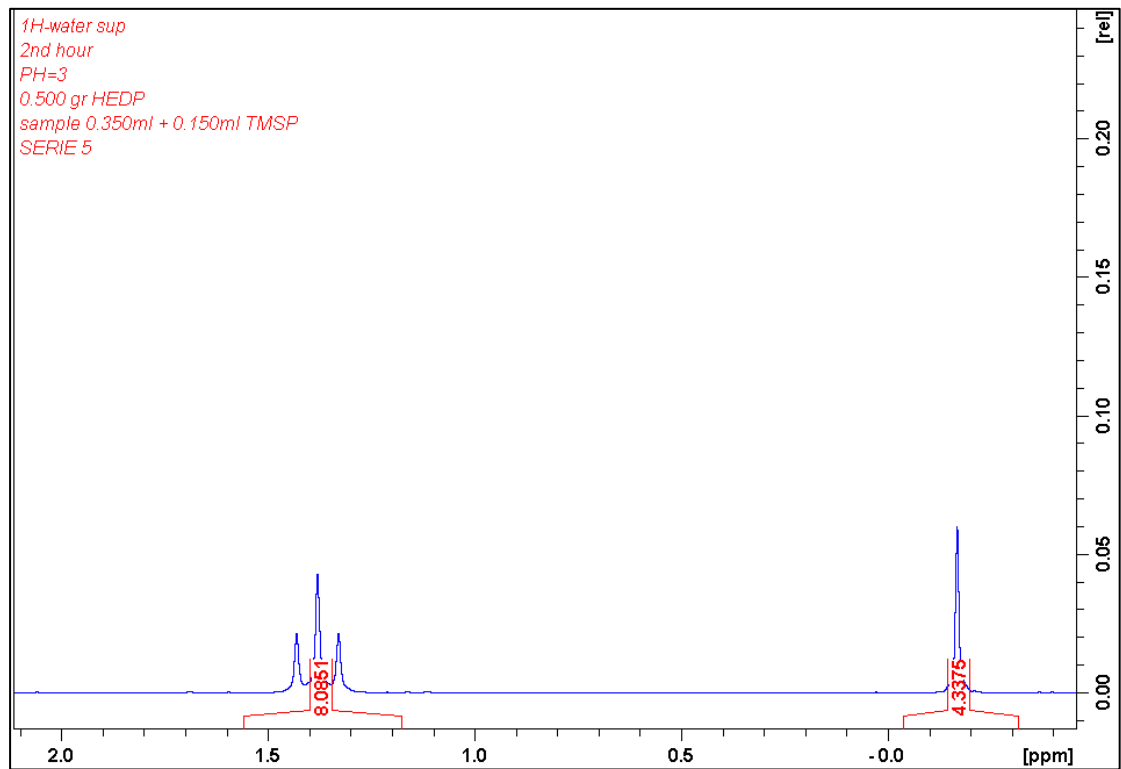
Φάσμα 11: Φάσμα ^1H για το πείραμα 2 αποδέσμευσης HEDP σε pH=3.0 (5^η ώρα).



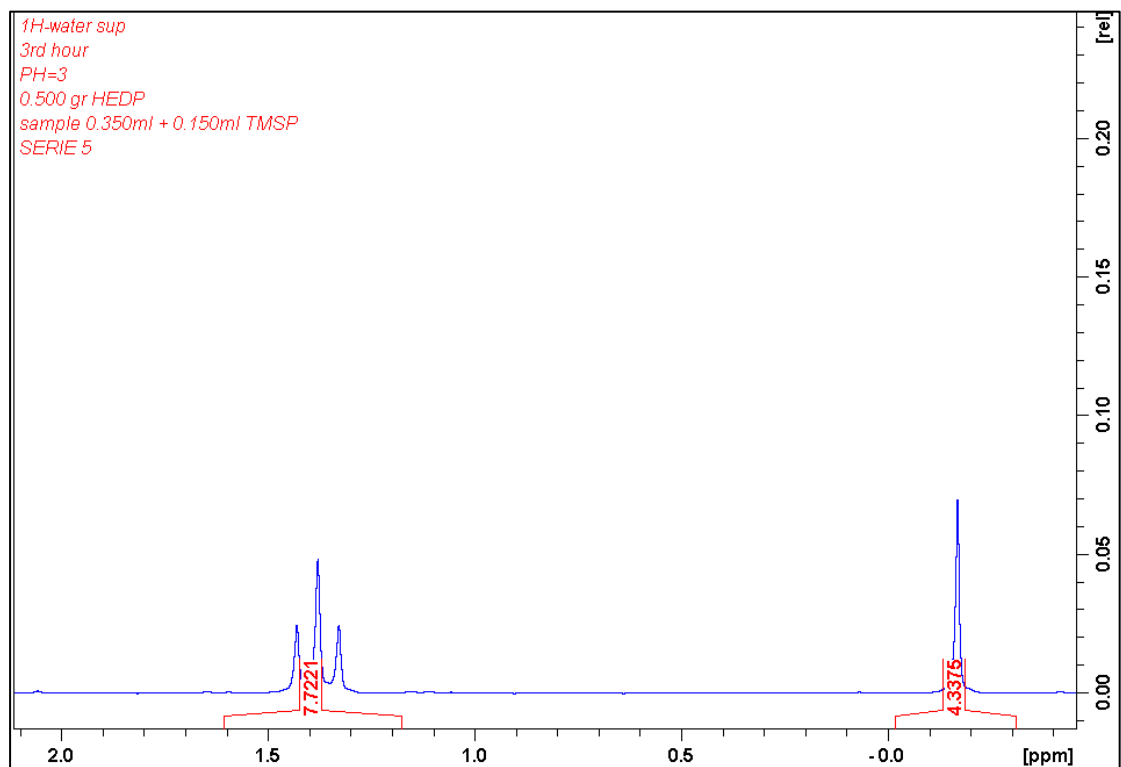
Φάσμα 12: Φάσμα ^1H για το πείραμα 2 αποδέσμευσης HEDP σε $\text{pH}=3.0$ (6^η ώρα).



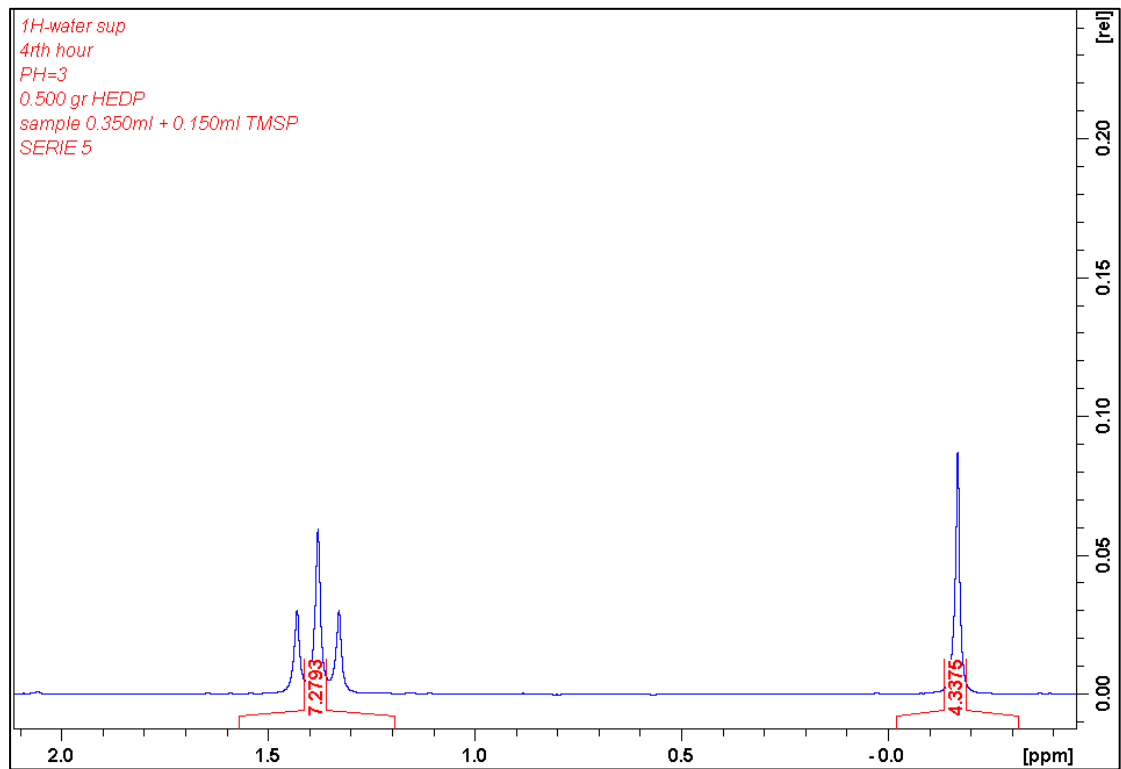
Φάσμα 13: Φάσμα ^1H για το πείραμα 3 αποδέσμευσης HEDP σε $\text{pH}=3.0$ (1^η ώρα).



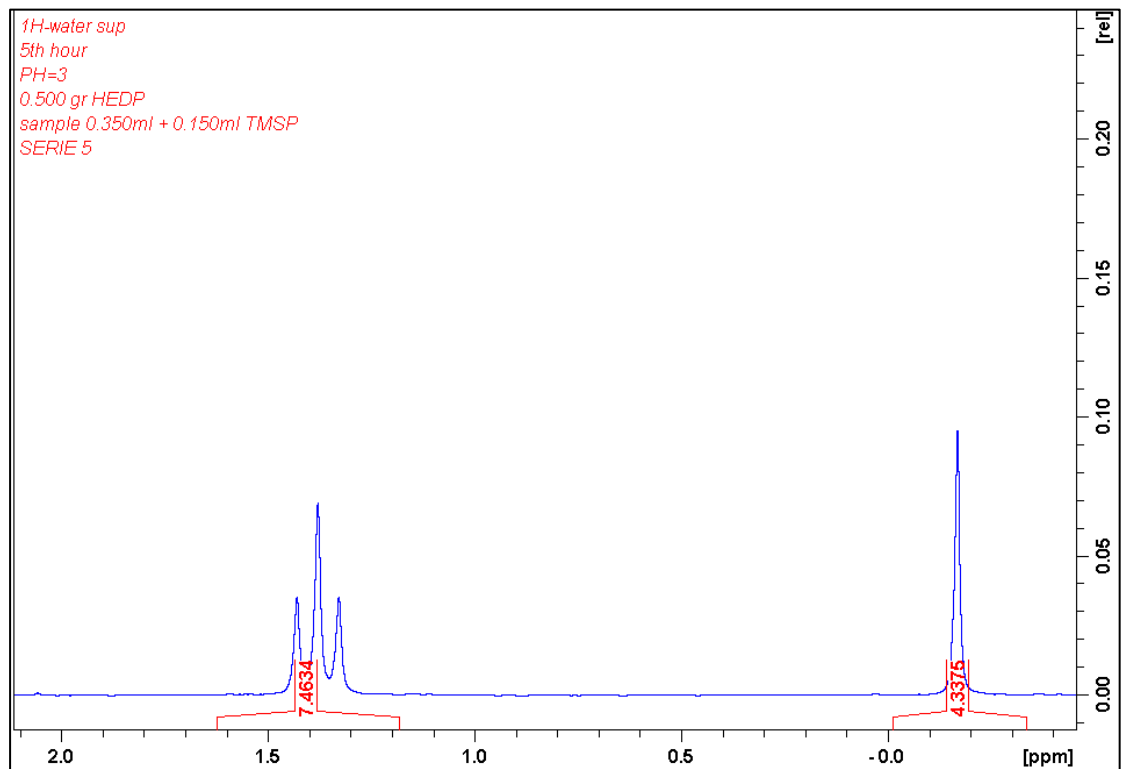
Φάσμα 14: Φάσμα ^1H για το πείραμα 3 αποδέσμευσης HEDP σε $\text{pH}=3.0$ (2^η ώρα).



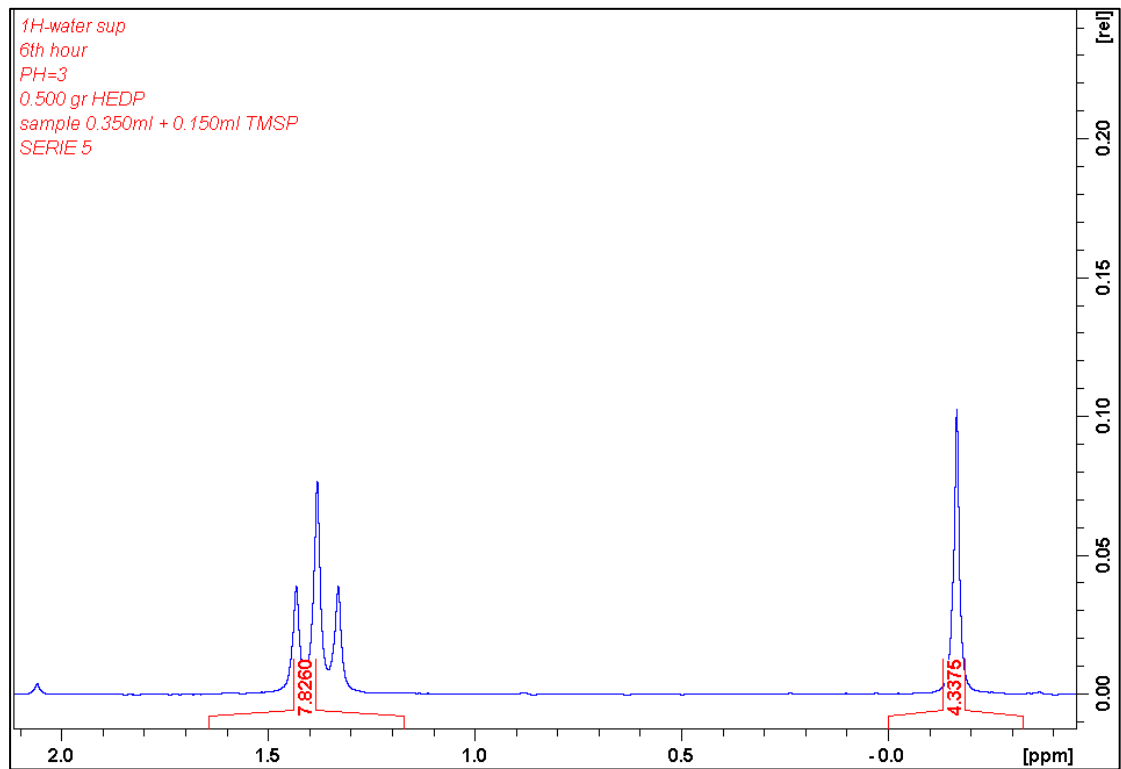
Φάσμα 15: Φάσμα ^1H για το πείραμα 3 αποδέσμευσης HEDP σε $\text{pH}=3.0$ (3^η ώρα).



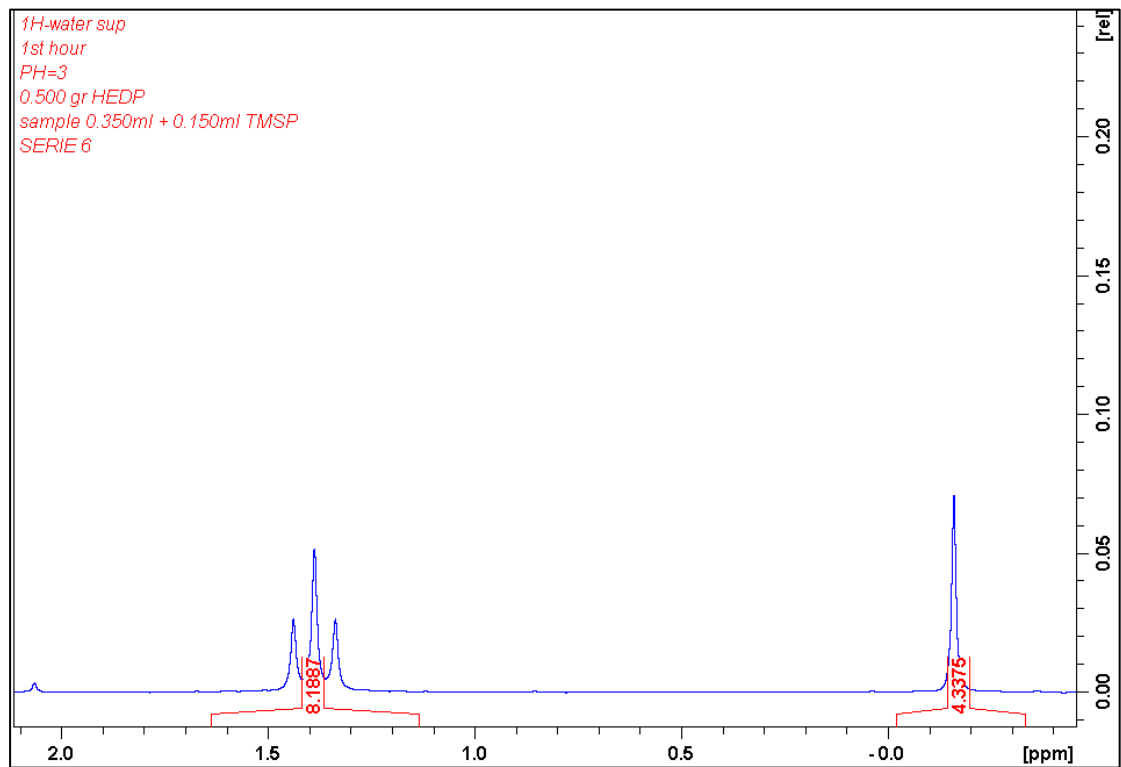
Φάσμα 16: Φάσμα ^1H για το πείραμα 3 αποδέσμευσης HEDP σε pH=3.0 (4^η ώρα).



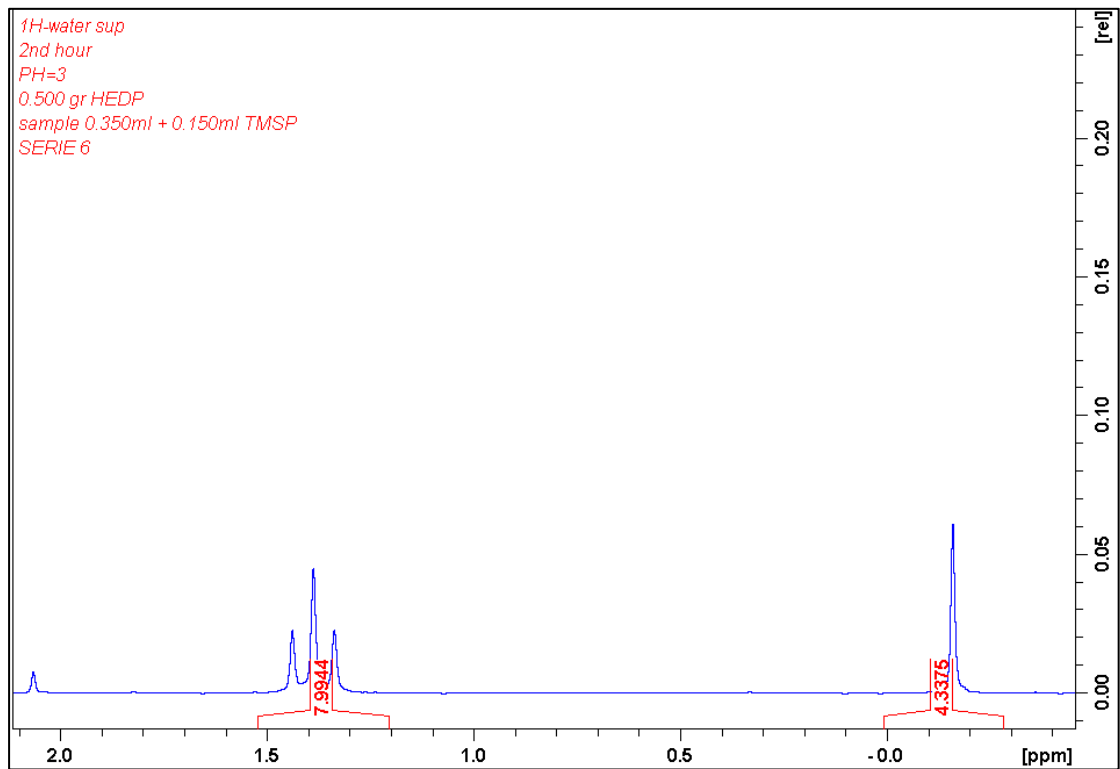
Φάσμα 17: Φάσμα ^1H για το πείραμα 3 αποδέσμευσης HEDP σε pH=3.0 (5^η ώρα).



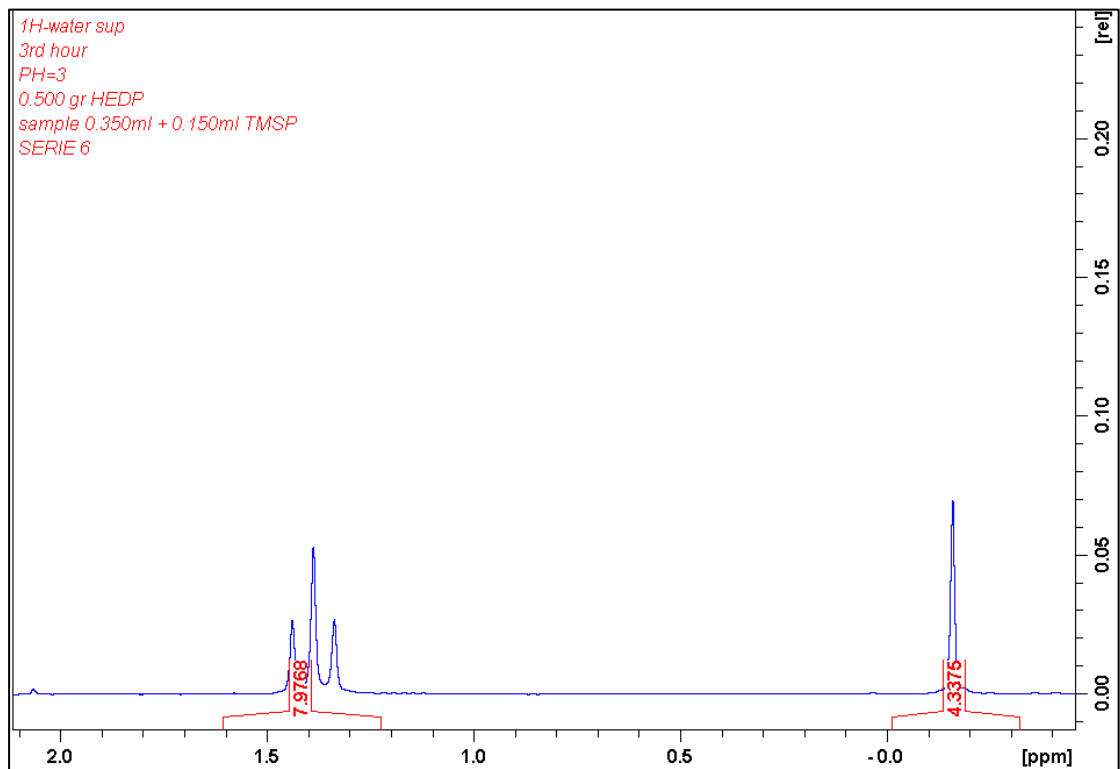
Φάσμα 18: Φάσμα ^1H για το πείραμα 3 αποδέσμευσης HEDP σε $\text{pH}=3.0$ (6^η ώρα).



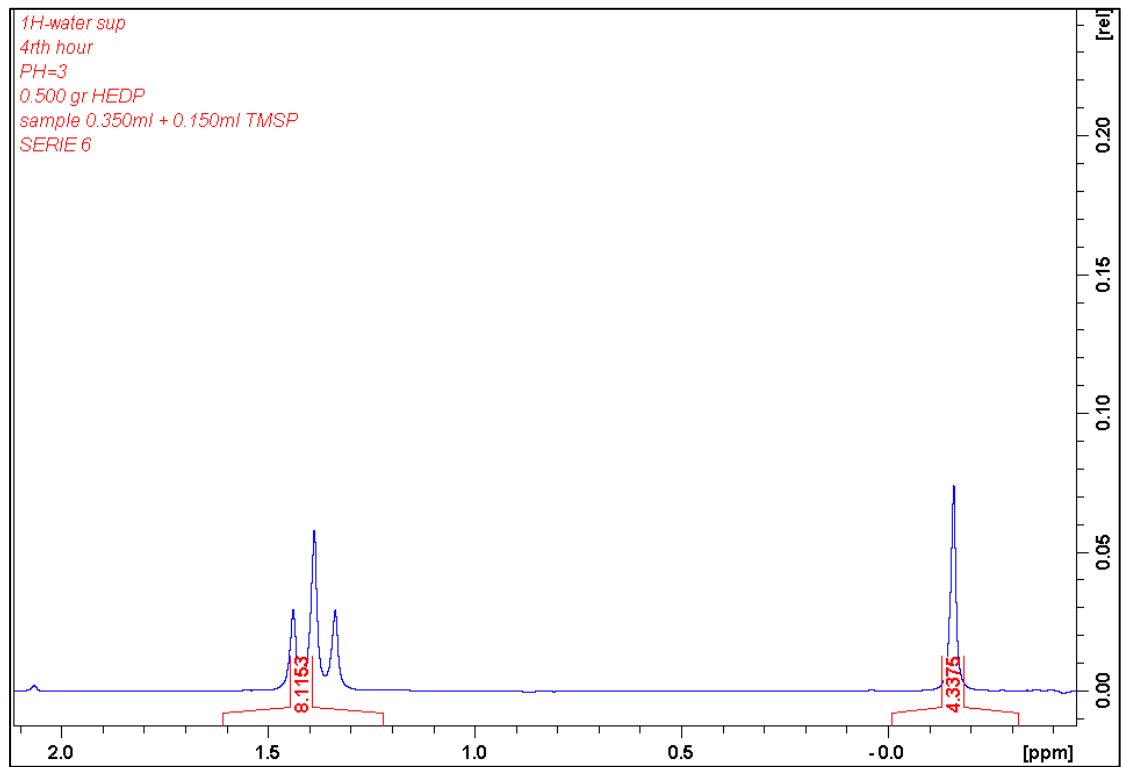
Φάσμα 19: Φάσμα ^1H για το πείραμα 4 αποδέσμευσης HEDP σε $\text{pH}=3.0$ (1^η ώρα).



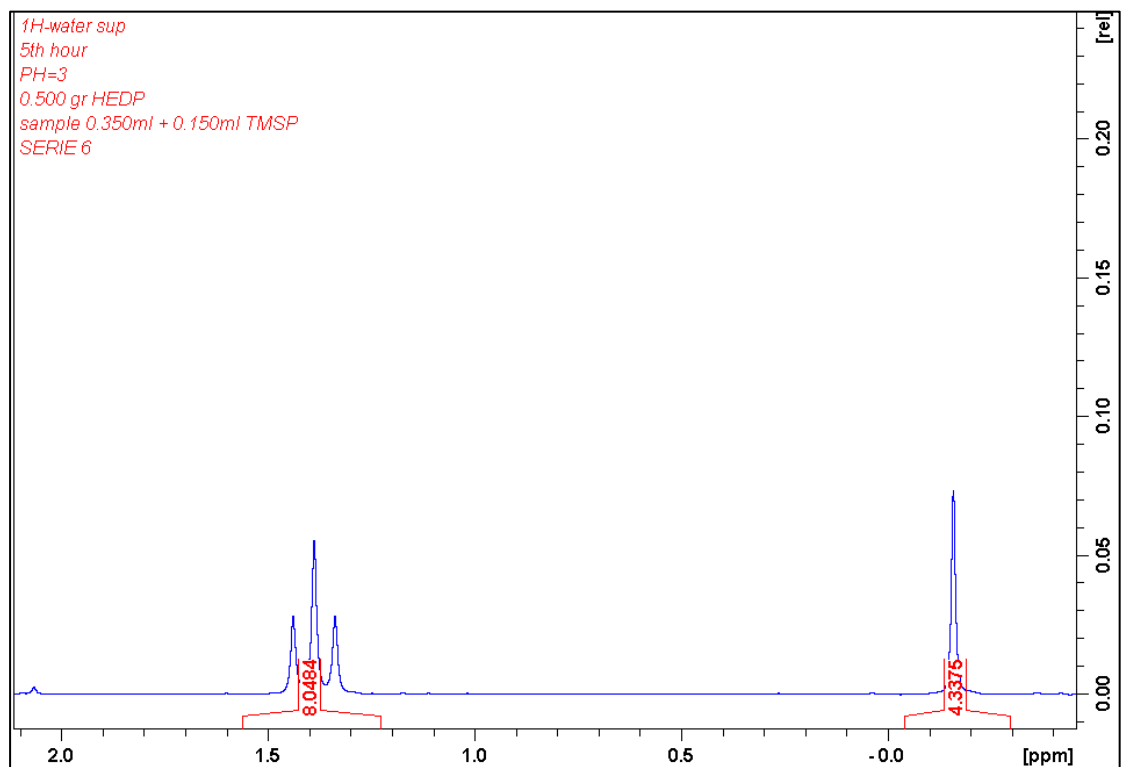
Φάσμα 20: Φάσμα ^1H για το πείραμα 4 αποδέσμευσης HEDP σε pH=3.0 (2^η ώρα).



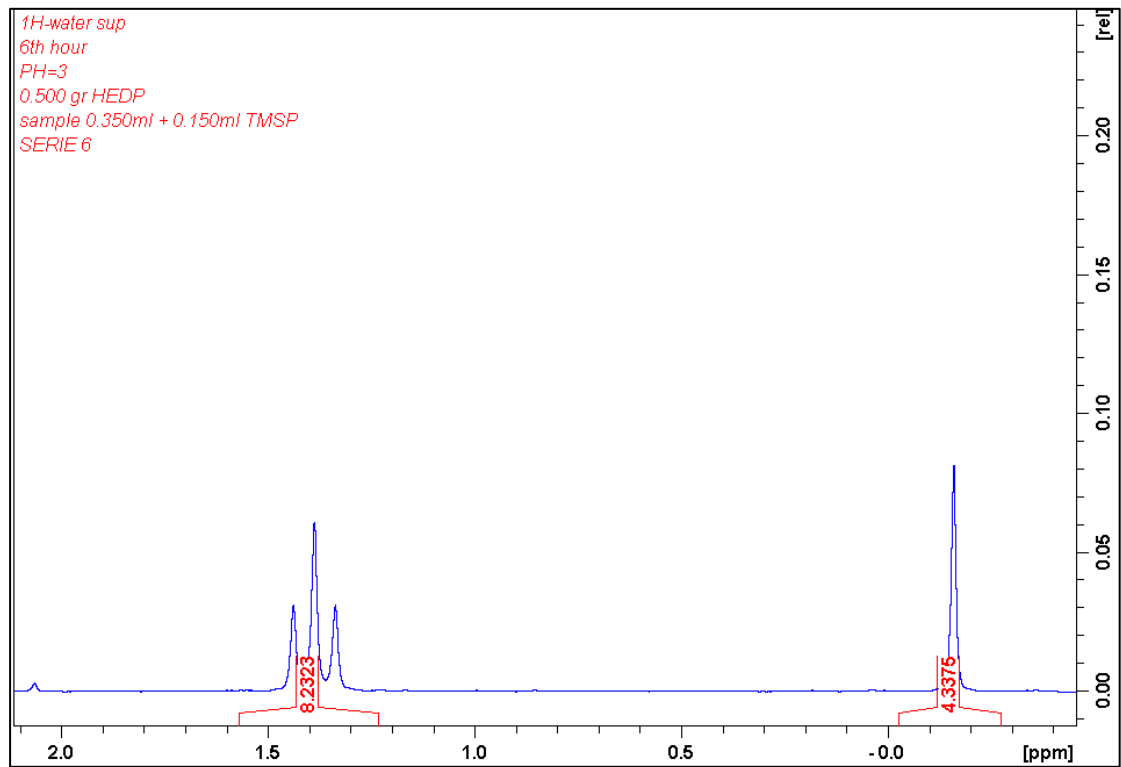
Φάσμα 21: Φάσμα ^1H για το πείραμα 4 αποδέσμευσης HEDP σε pH=3.0 (3^η ώρα).



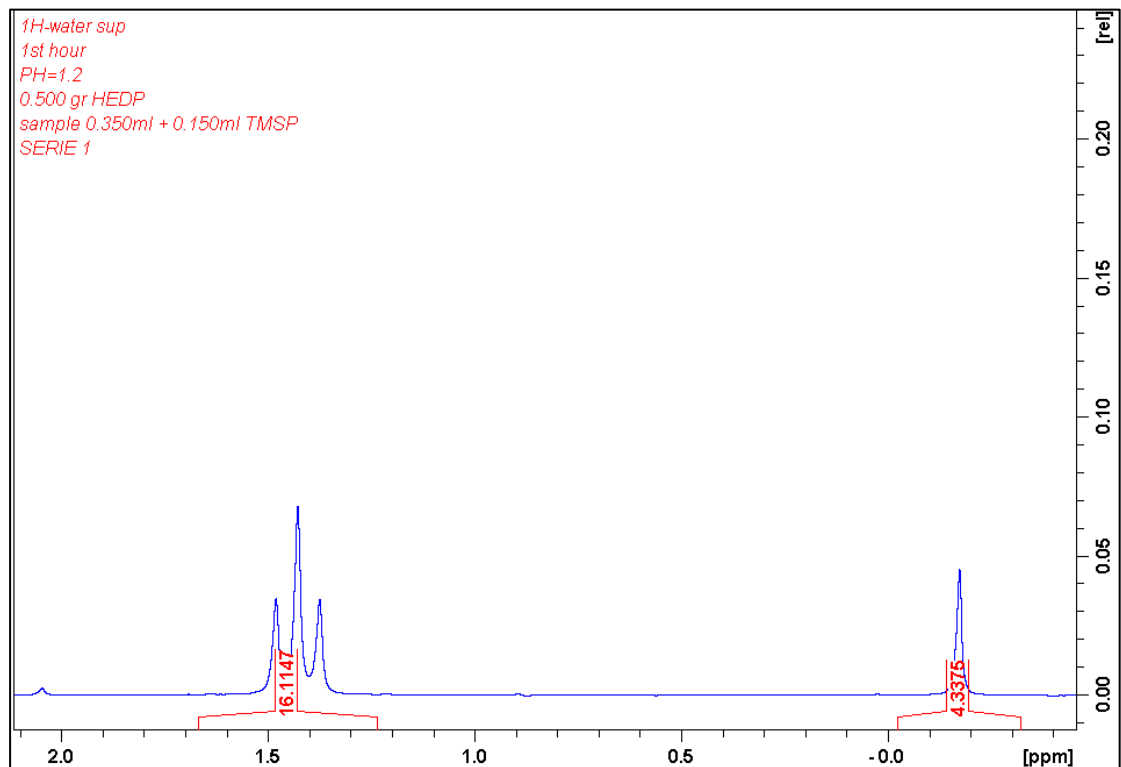
Φάσμα 22: Φάσμα ^1H για το πείραμα 4 αποδέσμευσης HEDP σε $\text{pH}=3.0$ (4^η ώρα).



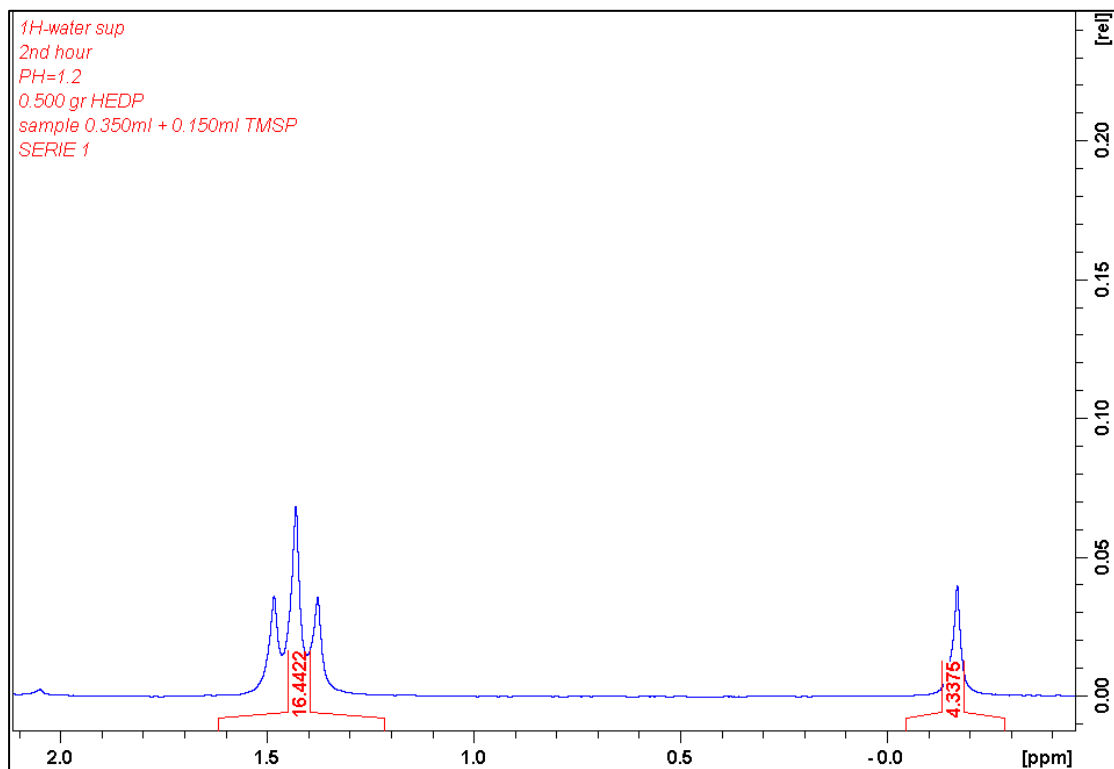
Φάσμα 23: Φάσμα ^1H για το πείραμα 4 αποδέσμευσης HEDP σε $\text{pH}=3.0$ (5^η ώρα).



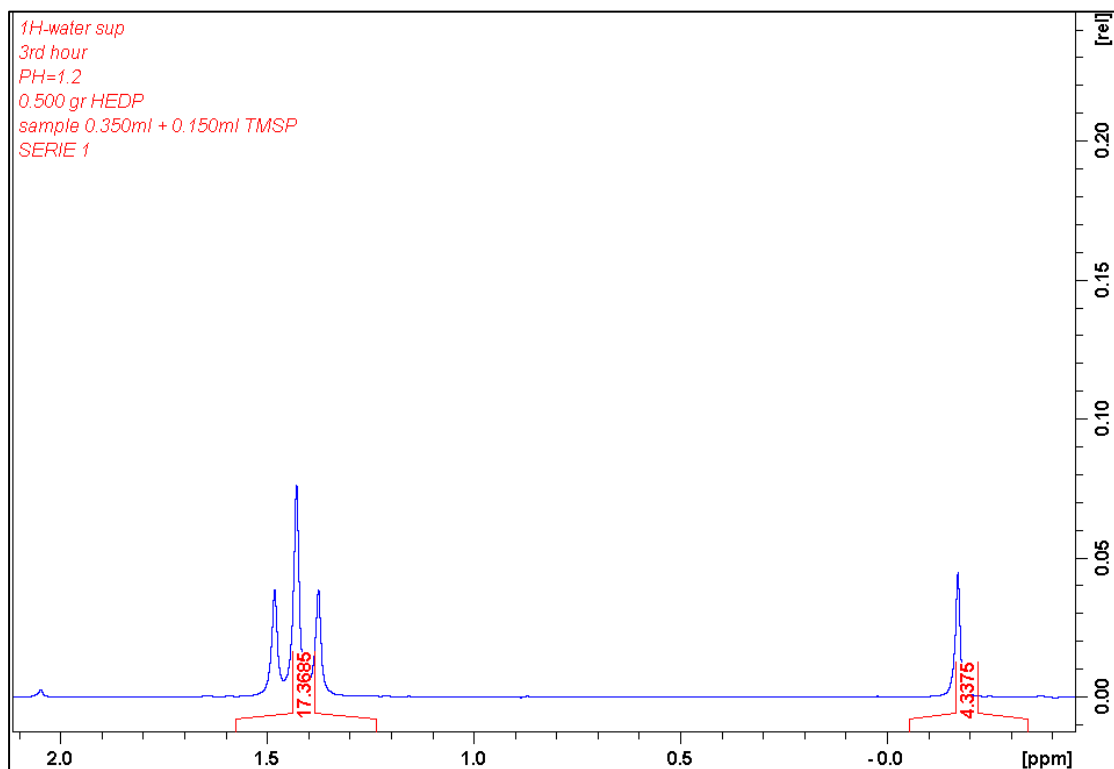
Φάσμα 24: Φάσμα ^1H για το πείραμα 4 αποδέσμευσης HEDP σε $\text{pH}=3.0$ (6^η ώρα).



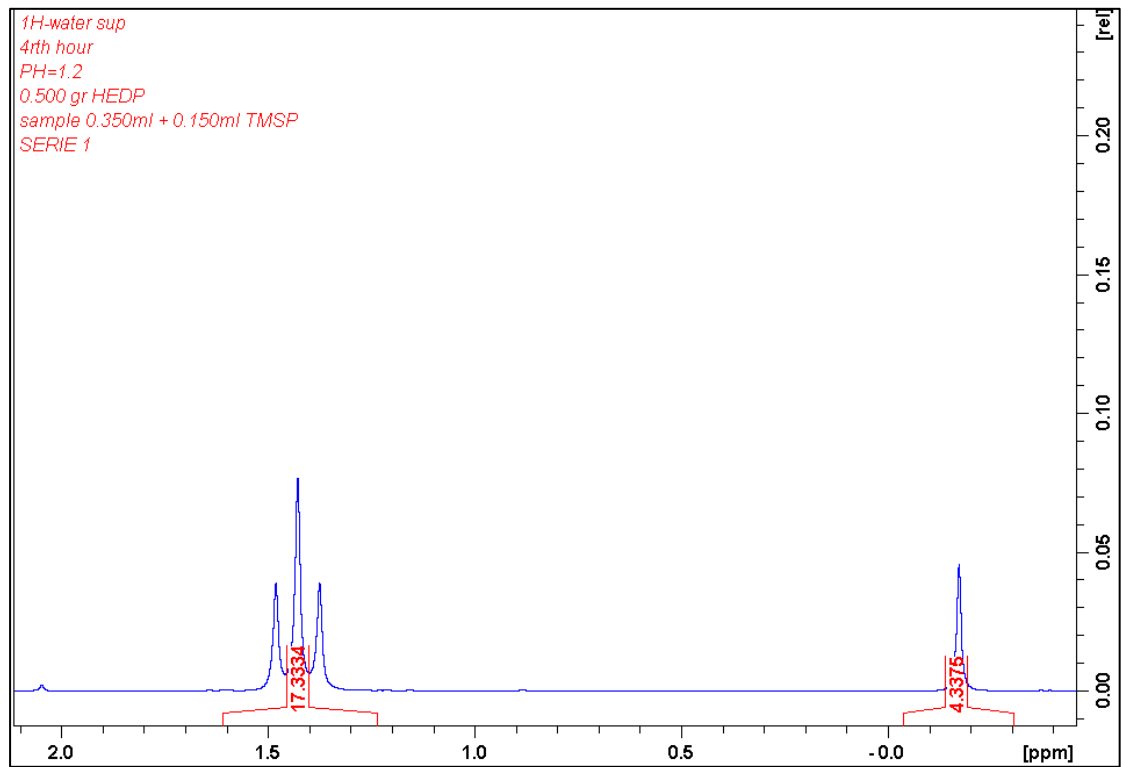
Φάσμα 25: Φάσμα ^1H για το πείραμα 1 αποδέσμευσης HEDP σε $\text{pH}=1.2$ (1^η ώρα).



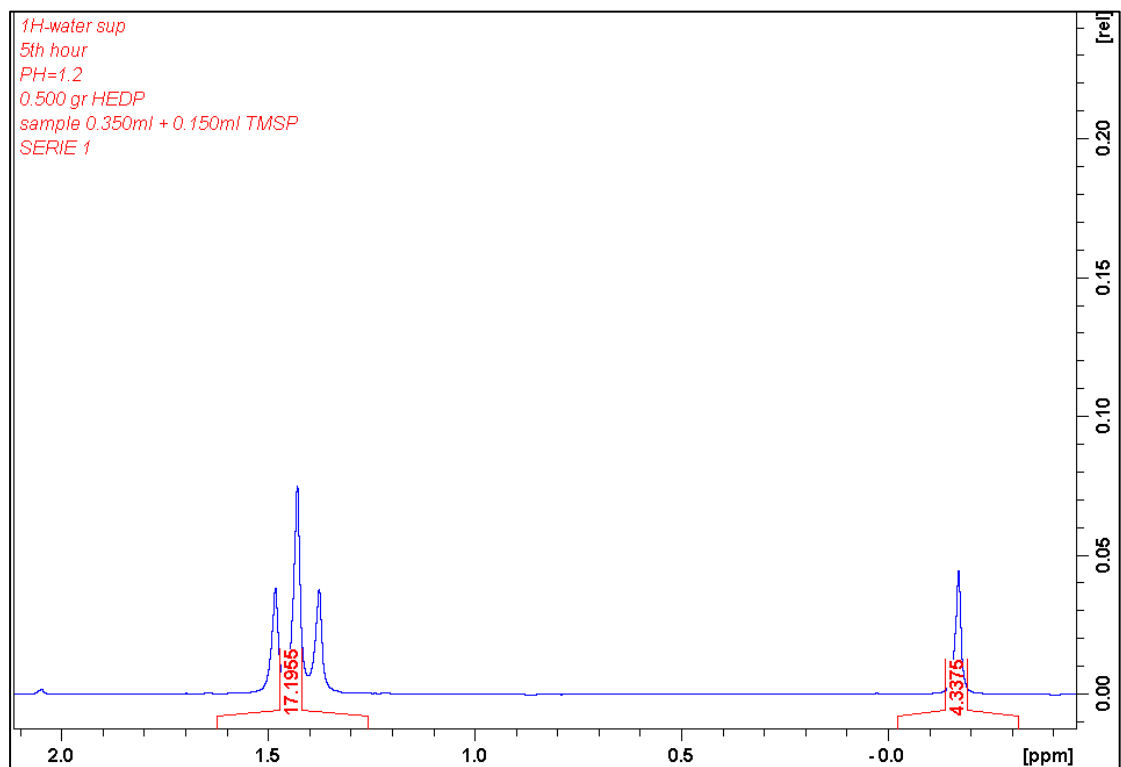
Φάσμα 26: Φάσμα ^1H για το πείραμα 1 αποδέσμευσης HEDP σε $\text{pH}=1.2$ (2^η ώρα).



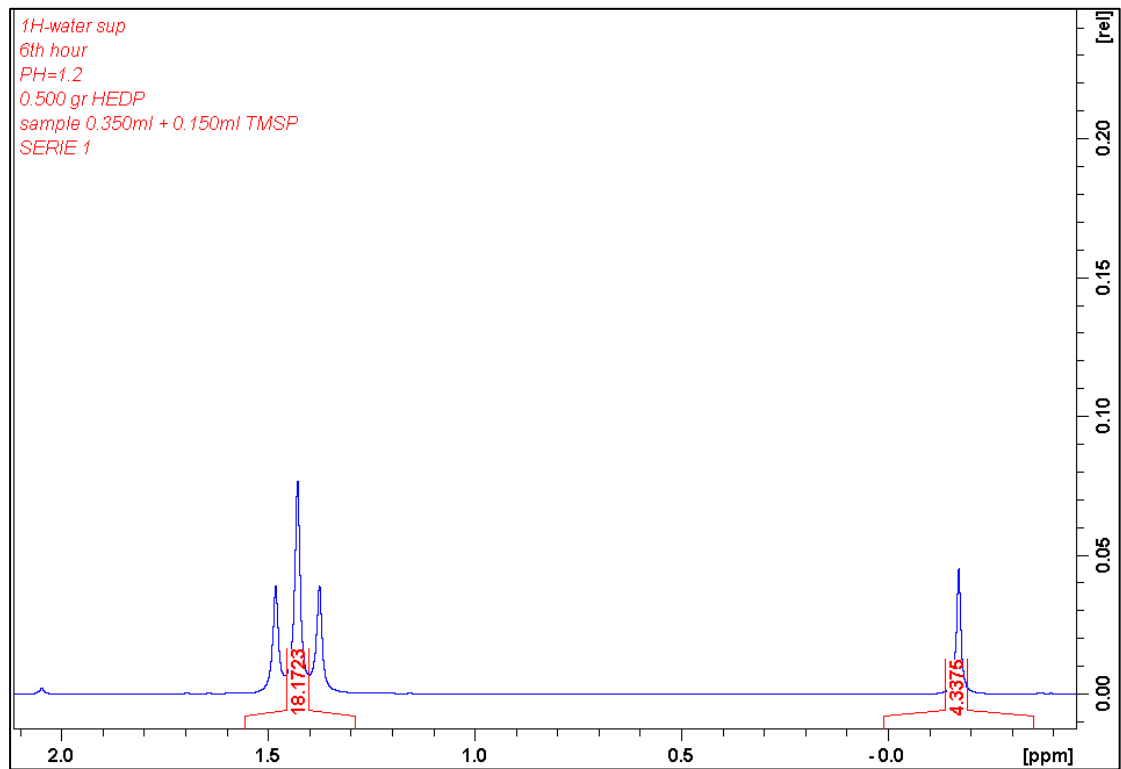
Φάσμα 27: Φάσμα ^1H για το πείραμα 1 αποδέσμευσης HEDP σε $\text{pH}=1.2$ (3^η ώρα).



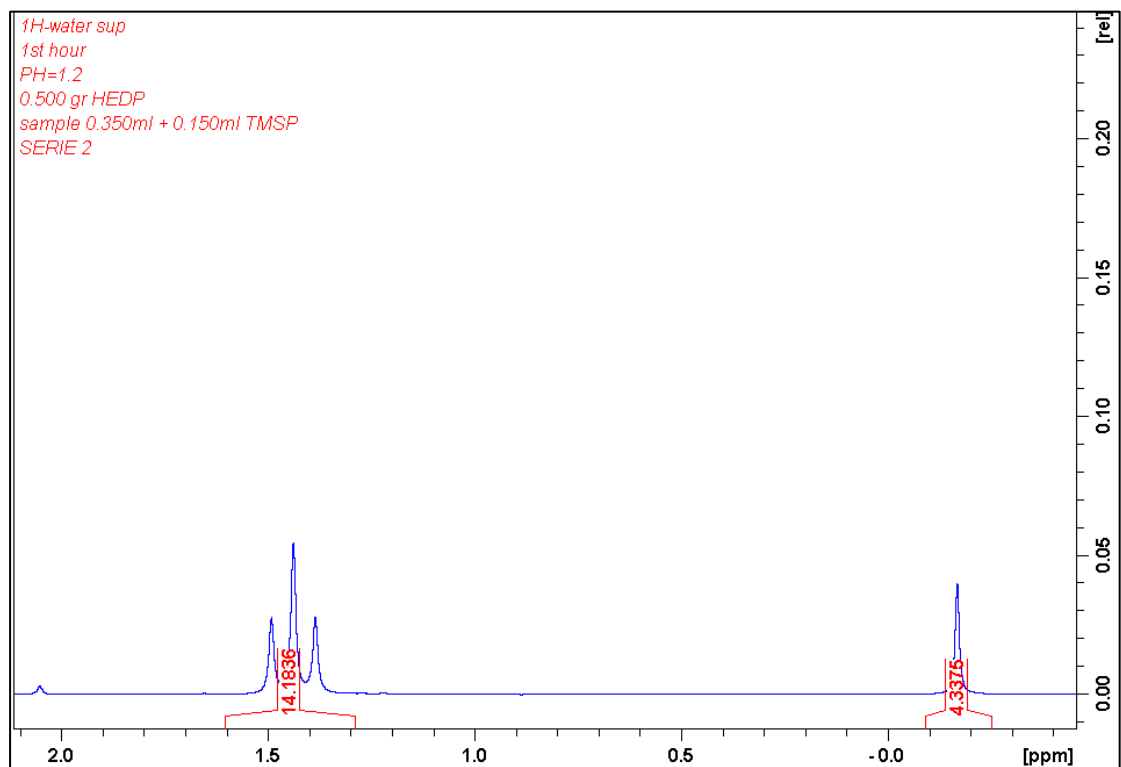
Φάσμα 28: Φάσμα ^1H για το πείραμα 1 αποδέσμευσης HEDP σε $\text{pH}=1.2$ (4^η ώρα).



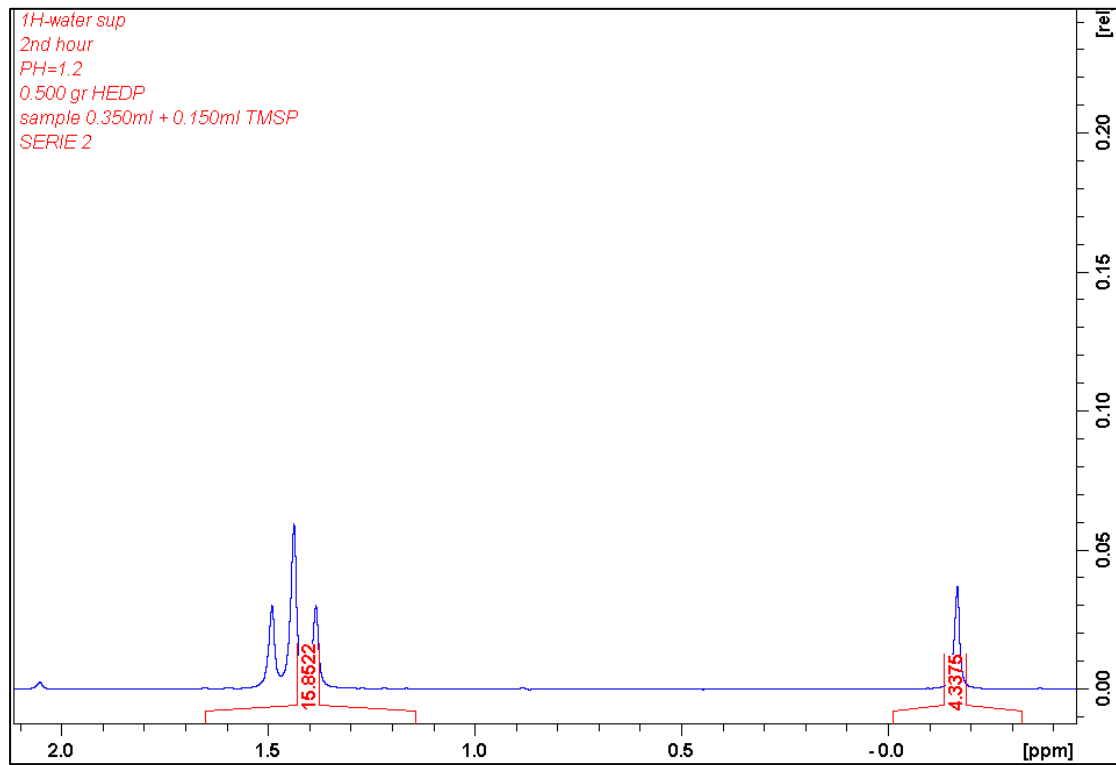
Φάσμα 29: Φάσμα ^1H για το πείραμα 1 αποδέσμευσης HEDP σε $\text{pH}=1.2$ (5^η ώρα).



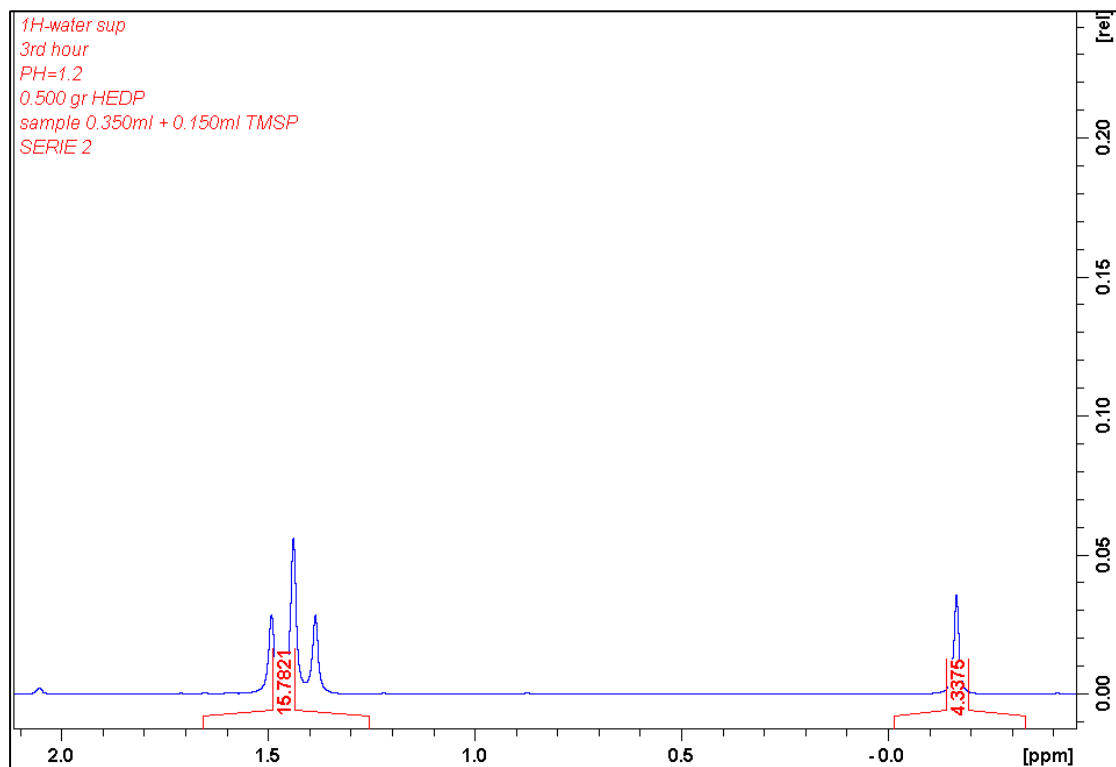
Φάσμα 30: Φάσμα ^1H για το πείραμα 1 αποδέσμευσης HEDP σε $\text{pH}=1.2$ (6^η ώρα).



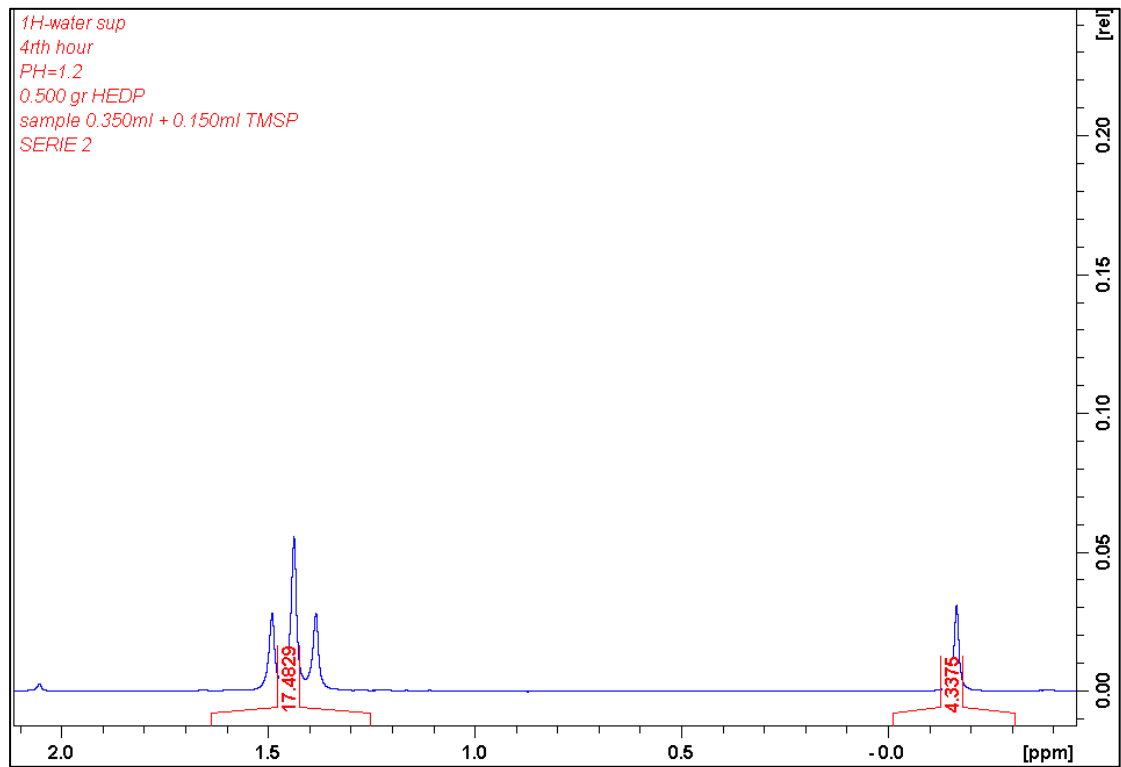
Φάσμα 31: Φάσμα ^1H για το πείραμα 2 αποδέσμευσης HEDP σε $\text{pH}=1.2$ (1^η ώρα).



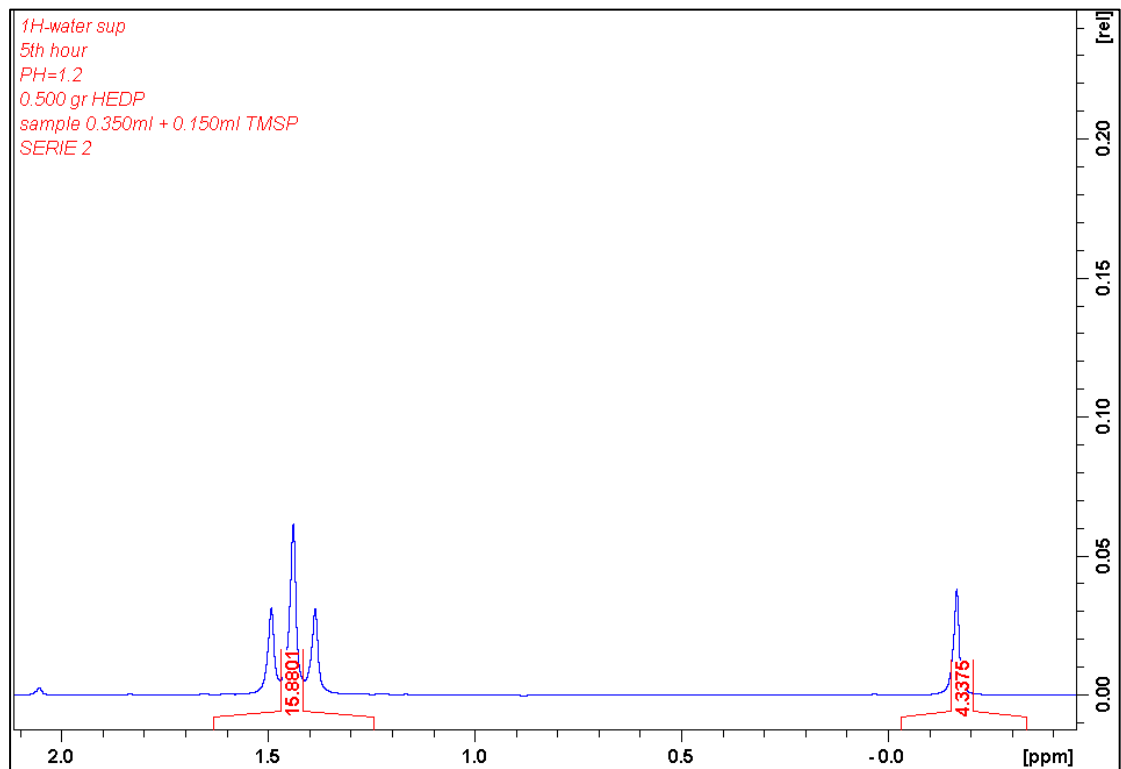
Φάσμα 32: Φάσμα ^1H για το πείραμα 2 αποδέσμευσης HEDP σε pH=1.2 (2^η ώρα).



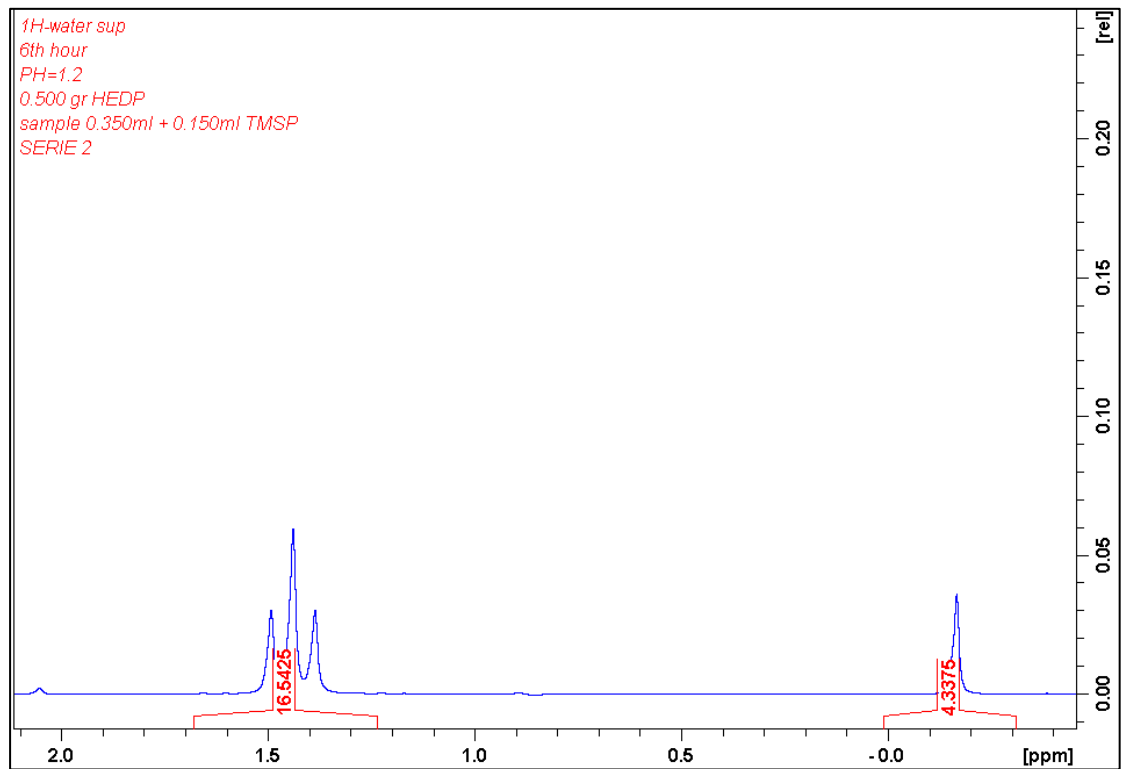
Φάσμα 33: Φάσμα ^1H για το πείραμα 2 αποδέσμευσης HEDP σε pH=1.2 (3^η ώρα).



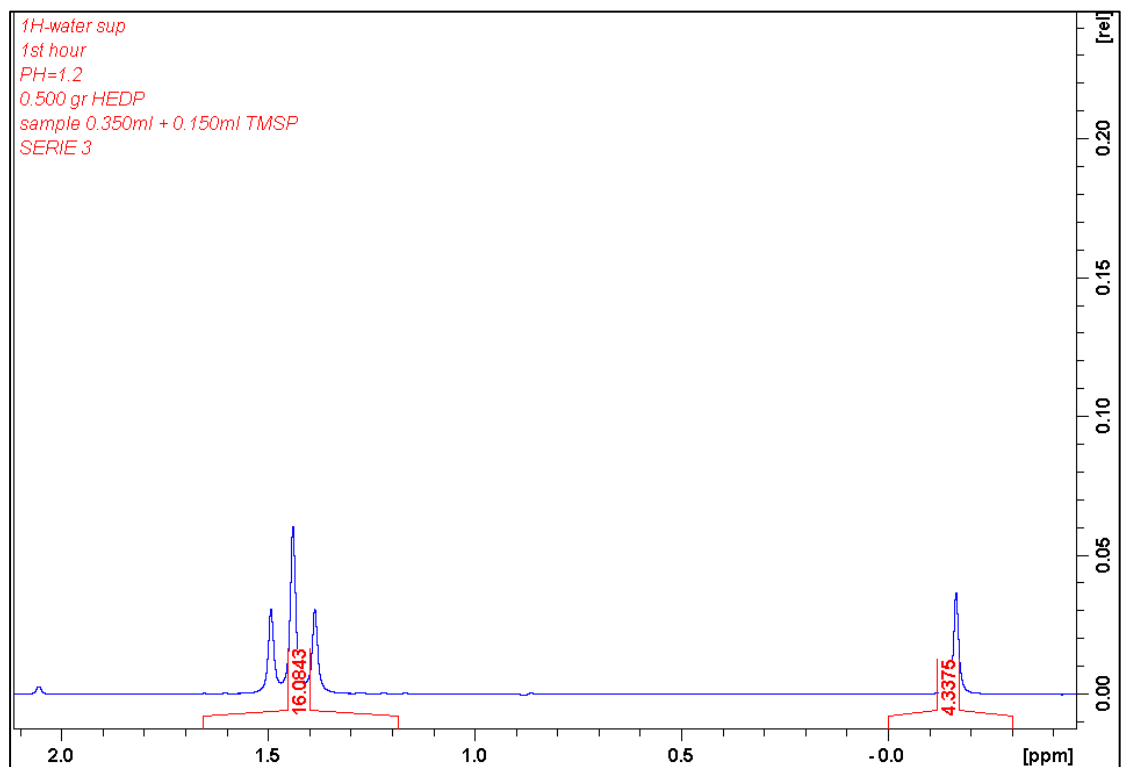
Φάσμα 34: Φάσμα ^1H για το πείραμα 2 αποδέσμευσης HEDP σε $\text{pH}=1.2$ (4^η ώρα).



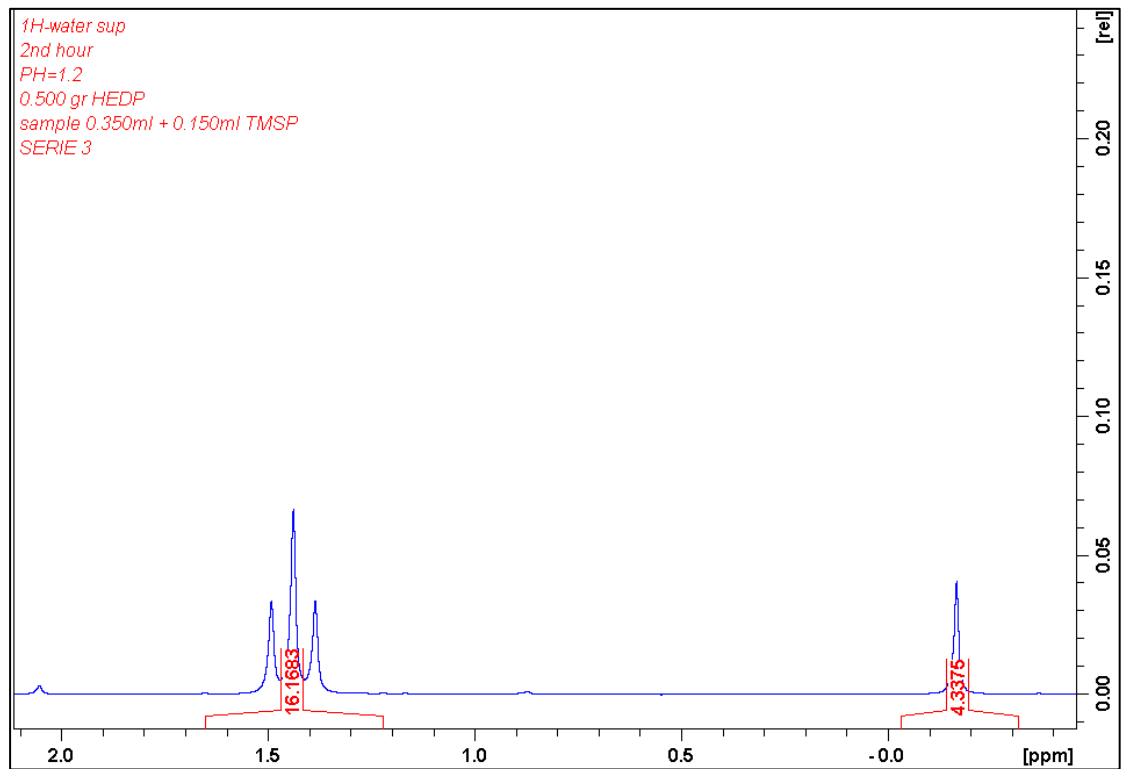
Φάσμα 35: Φάσμα ^1H για το πείραμα 2 αποδέσμευσης HEDP σε $\text{pH}=1.2$ (5^η ώρα).



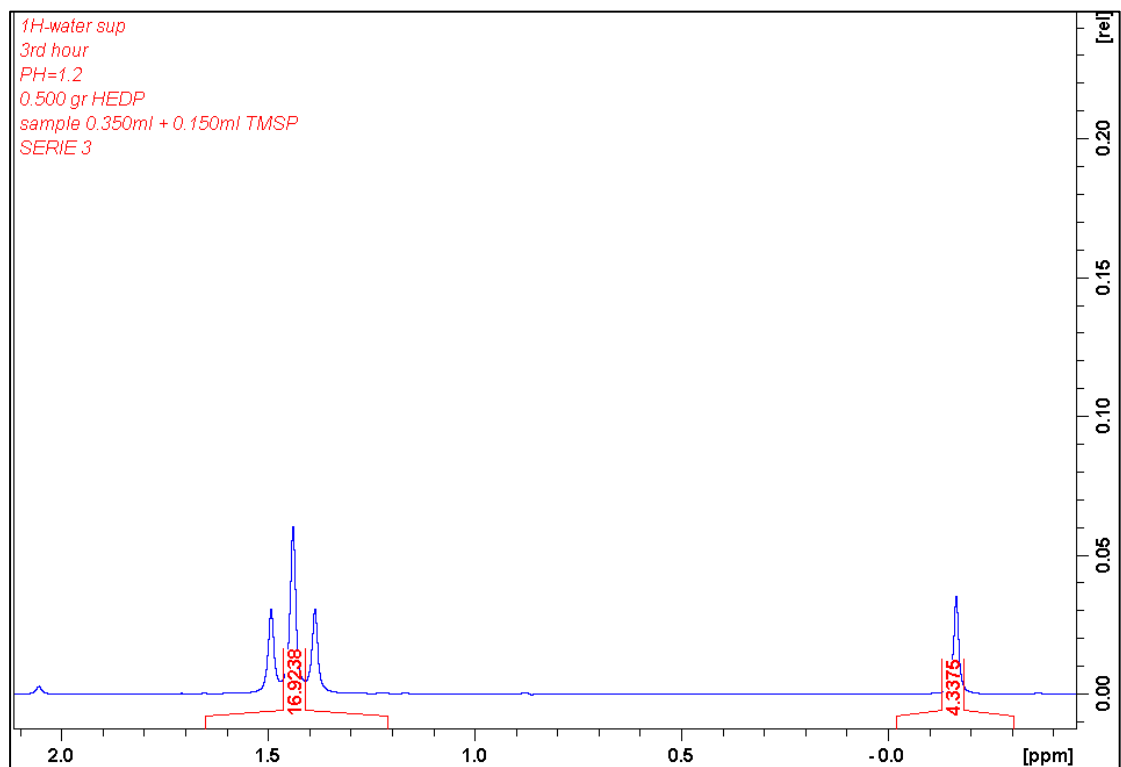
Φάσμα 36: Φάσμα ^1H για το πείραμα 2 αποδέσμευσης HEDP σε $\text{pH}=1.2$ (6^η ώρα).



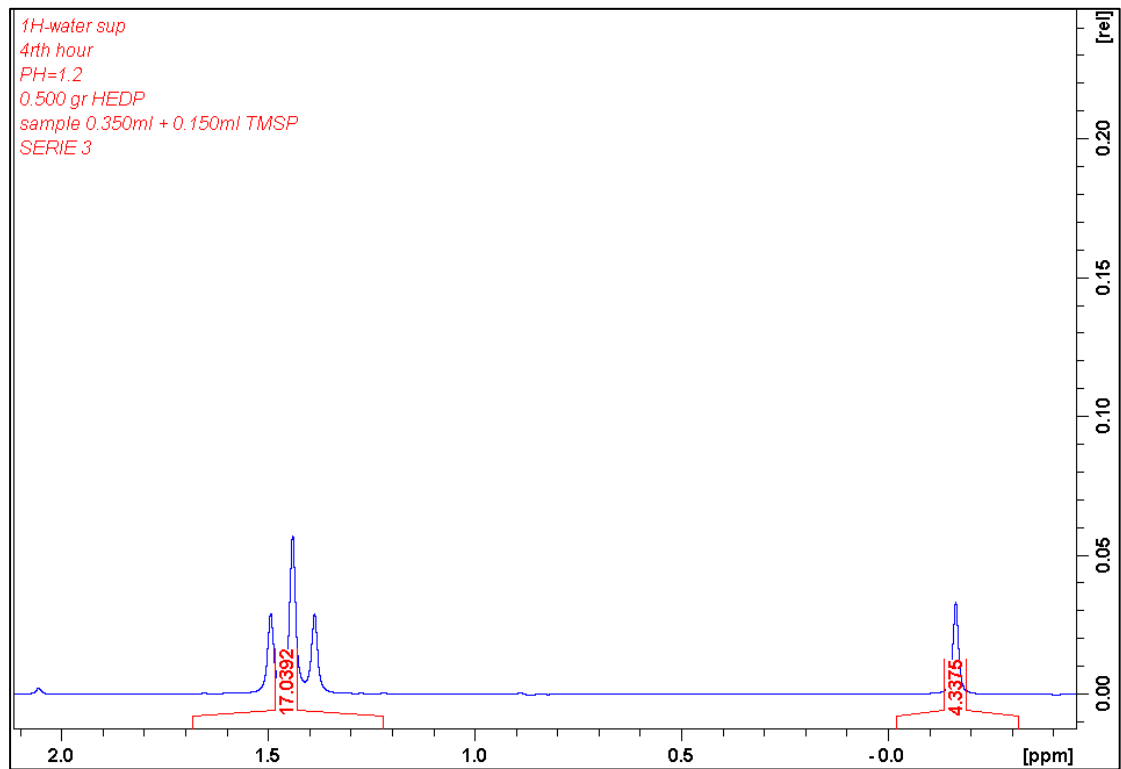
Φάσμα 37: Φάσμα ^1H για το πείραμα 3 αποδέσμευσης HEDP σε $\text{pH}=1.2$ (1^η ώρα).



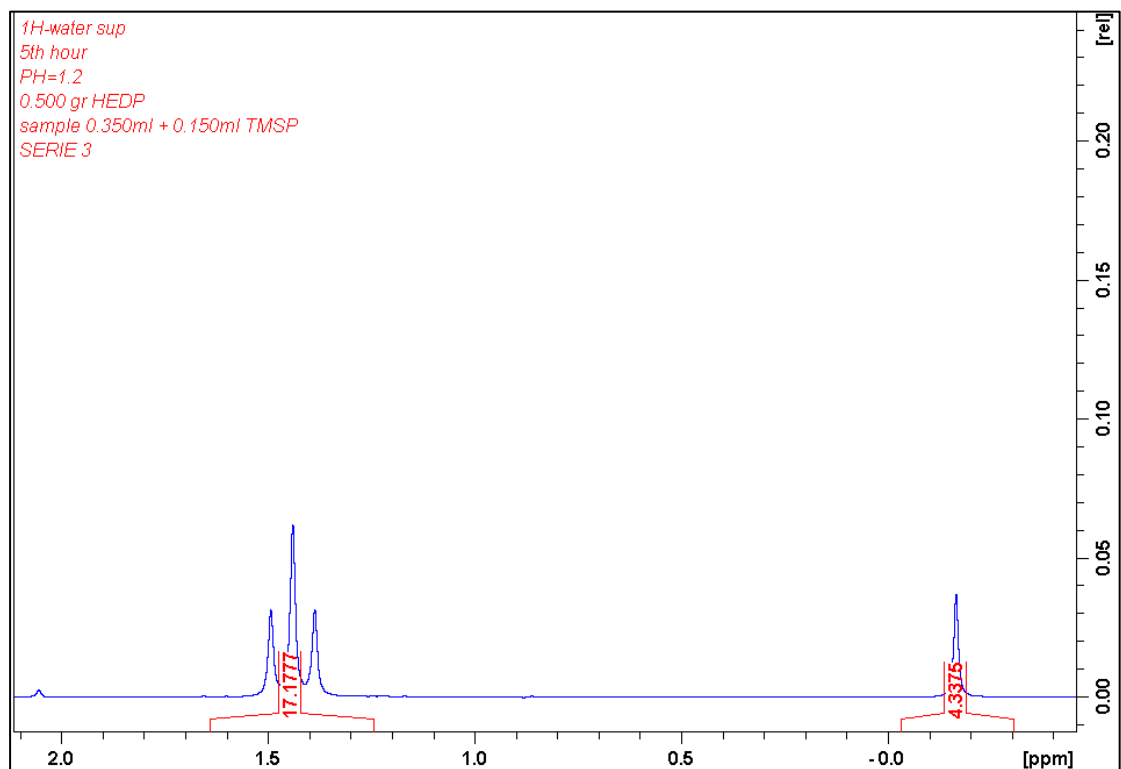
Φάσμα 38: Φάσμα ^1H για το πείραμα 3 αποδέσμευσης HEDP σε pH=1.2 (2^η ώρα).



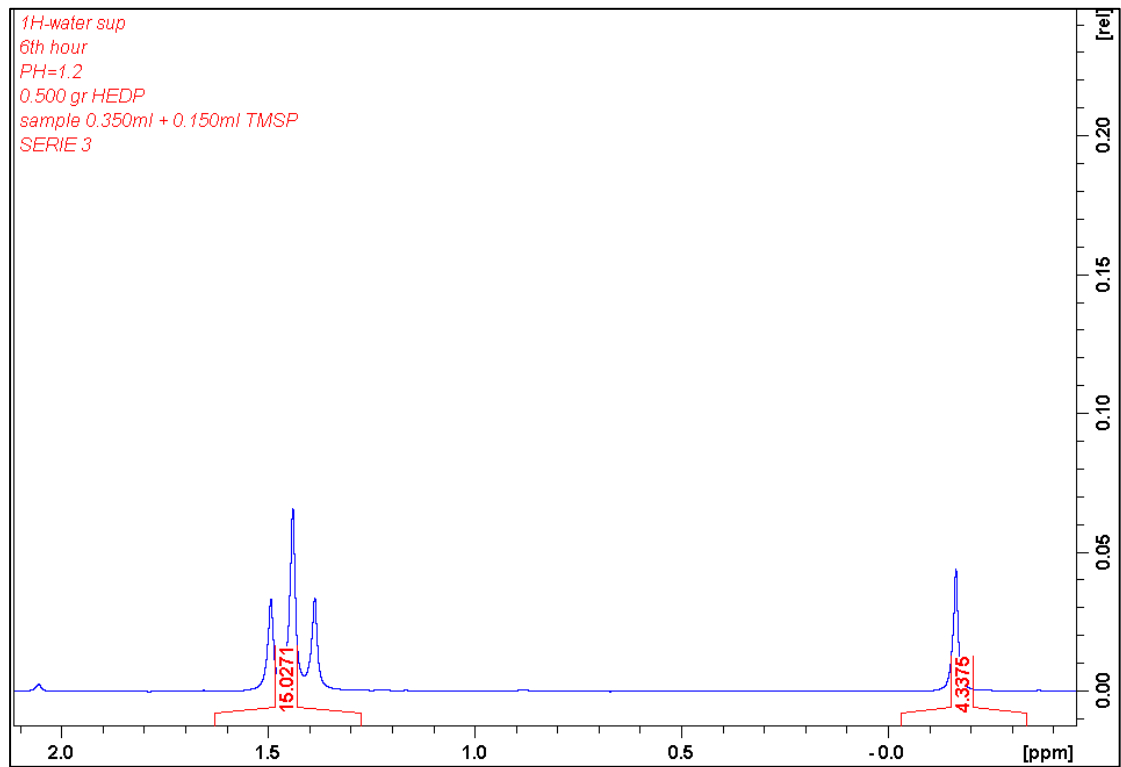
Φάσμα 39: Φάσμα ^1H για το πείραμα 3 αποδέσμευσης HEDP σε pH=1.2 (3^η ώρα).



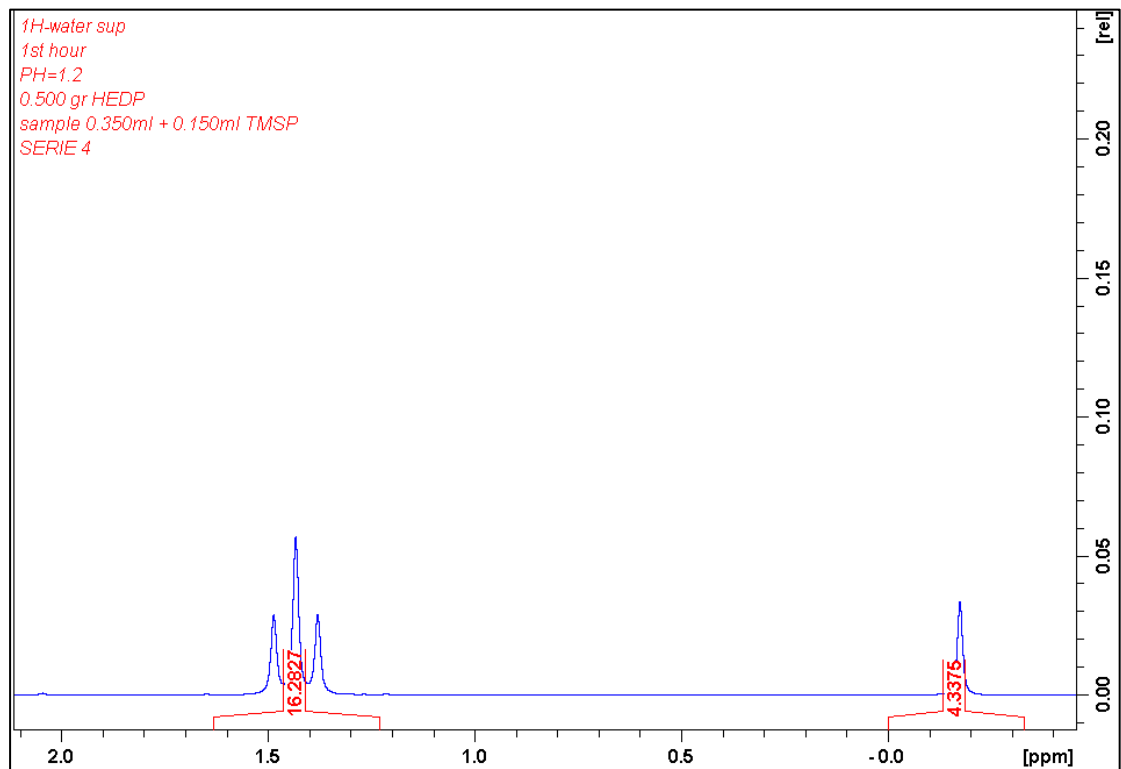
Φάσμα 40: Φάσμα ^1H για το πείραμα 3 αποδέσμευσης HEDP σε pH=1.2 (4^η ώρα).



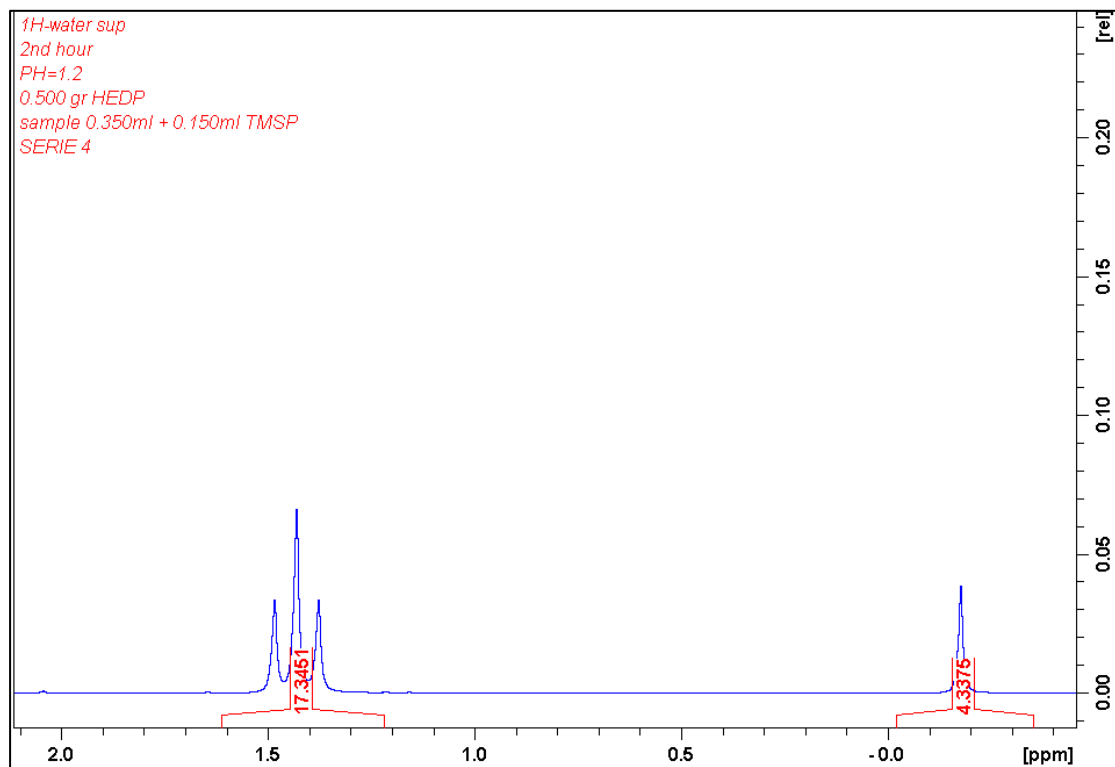
Φάσμα 41: Φάσμα ^1H για το πείραμα 3 αποδέσμευσης HEDP σε pH=1.2 (5^η ώρα).



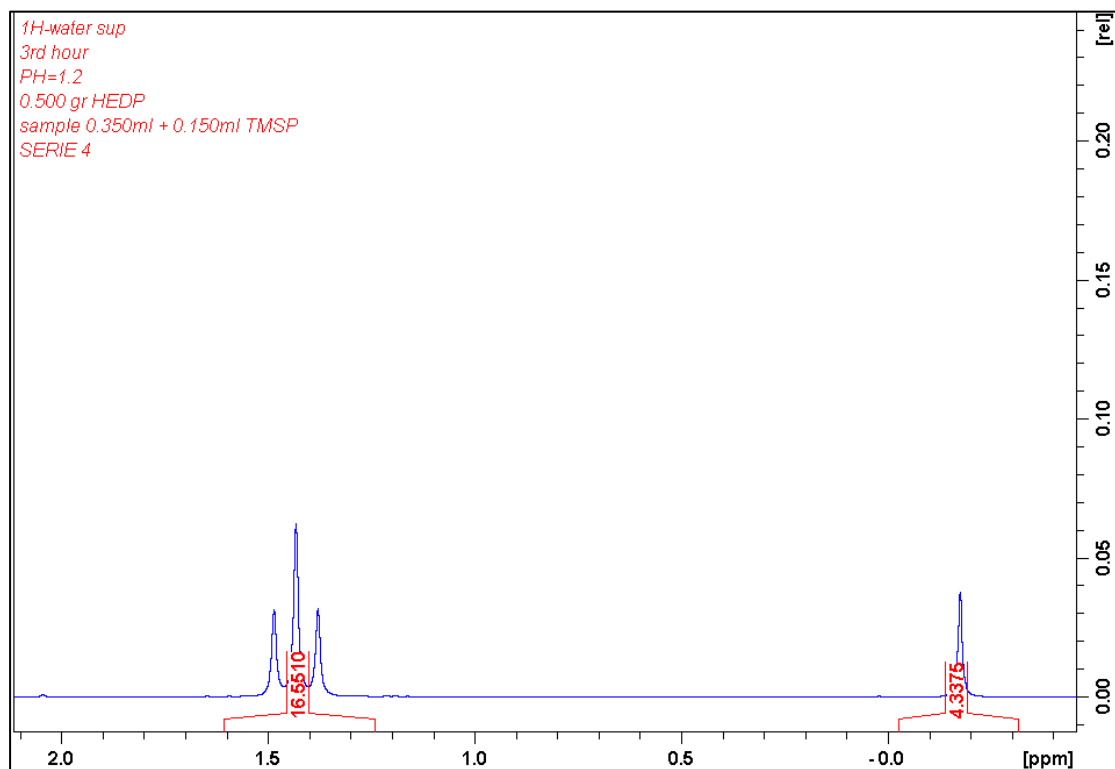
Φάσμα 42: Φάσμα ^1H για το πείραμα 3 αποδέσμευσης HEDP σε pH=1.2 (6^η ώρα).



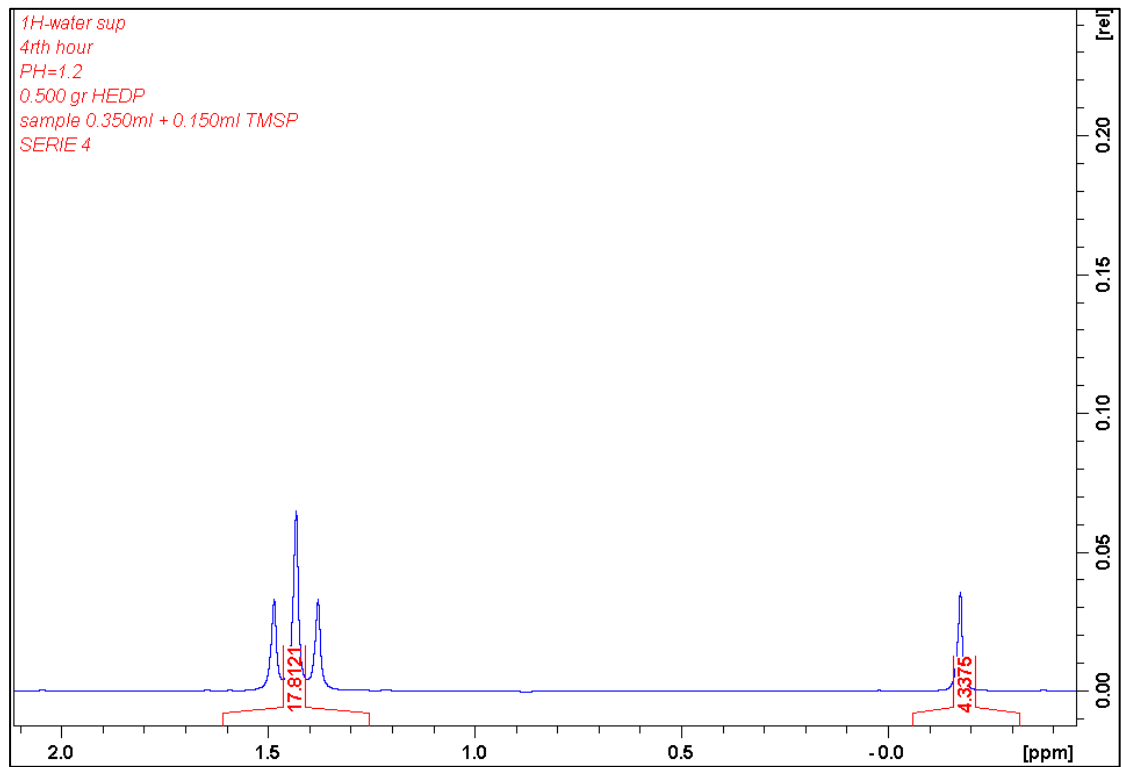
Φάσμα 43: Φάσμα ^1H για το πείραμα 4 αποδέσμευσης HEDP σε pH=1.2 (1^η ώρα).



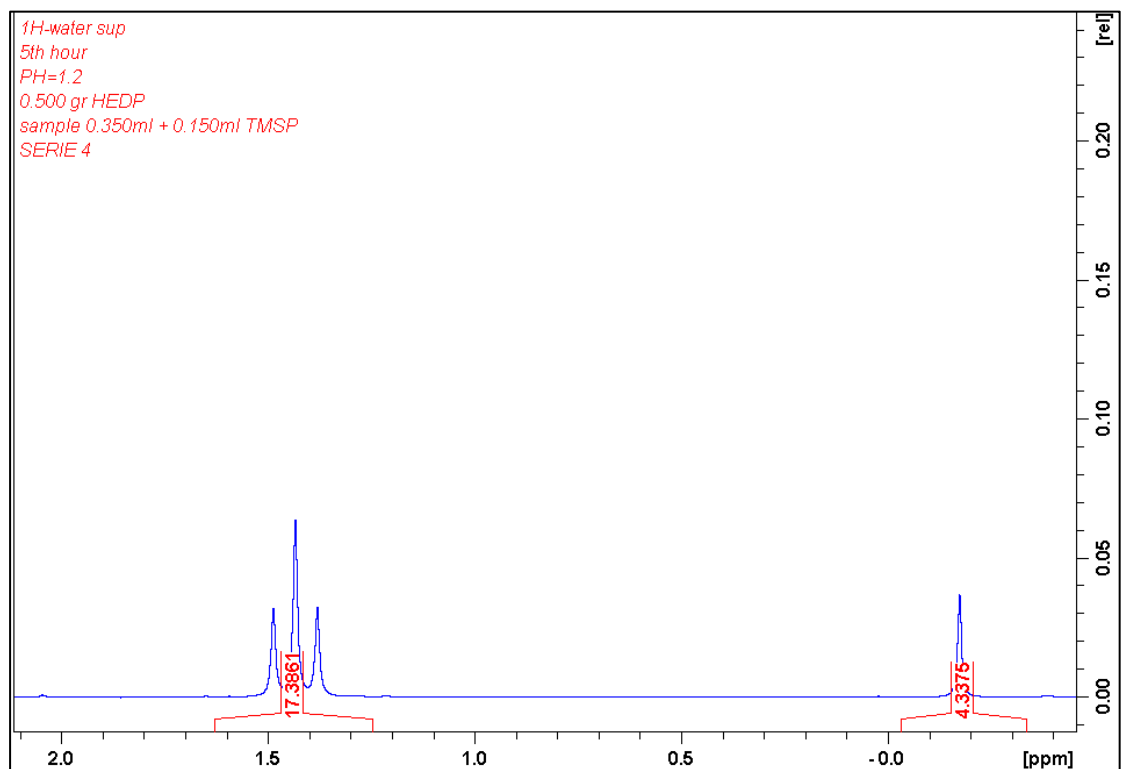
Φάσμα 44: Φάσμα ^1H για το πείραμα 4 αποδέσμευσης HEDP σε pH=1.2 (2^η ώρα).



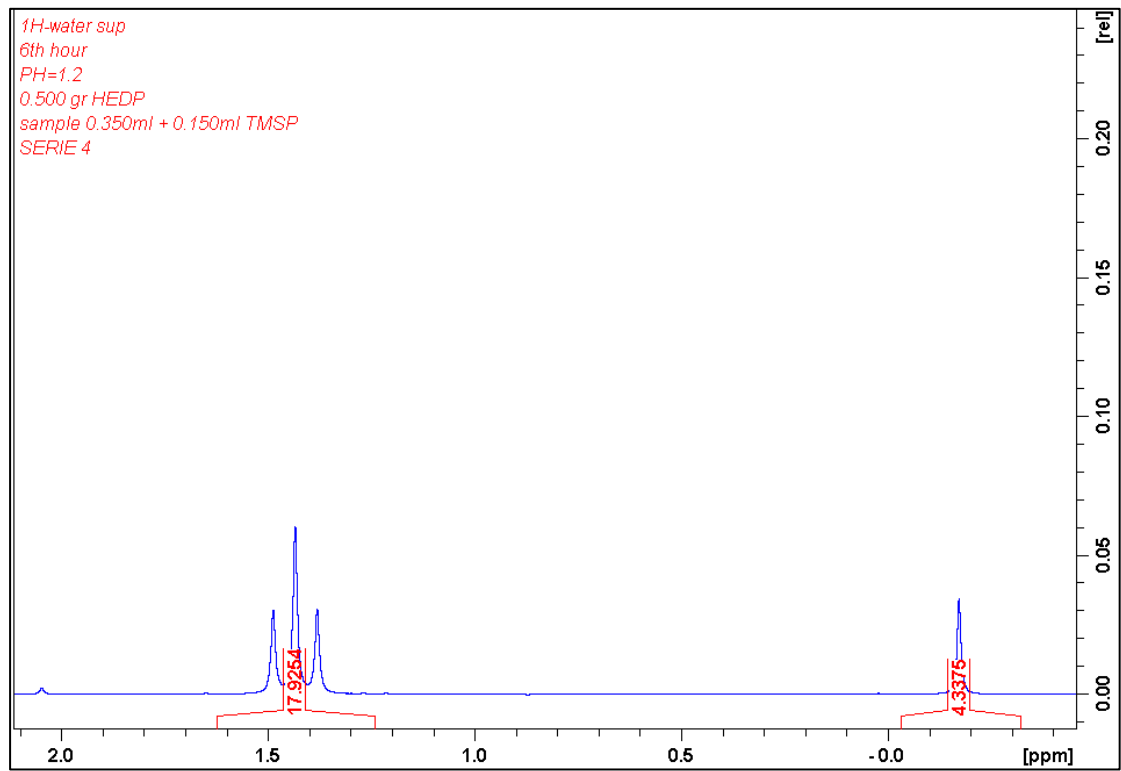
Φάσμα 45: Φάσμα ^1H για το πείραμα 4 αποδέσμευσης HEDP σε pH=1.2 (3^η ώρα).



Φάσμα 46: Φάσμα ¹H για το πείραμα 4 αποδέσμευσης HEDP σε pH=1.2 (4^η ώρα).

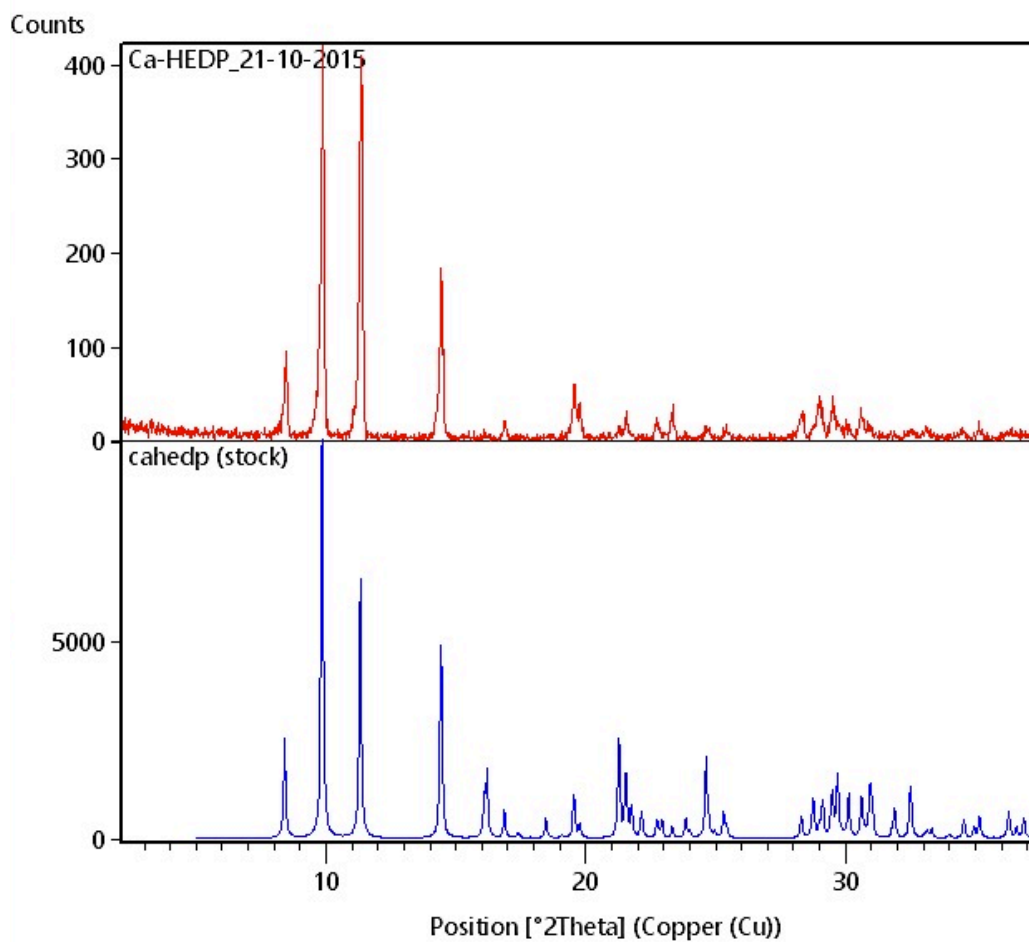


Φάσμα 47: Φάσμα ¹H για το πείραμα 4 αποδέσμευσης HEDP σε pH=1.2 (5^η ώρα).



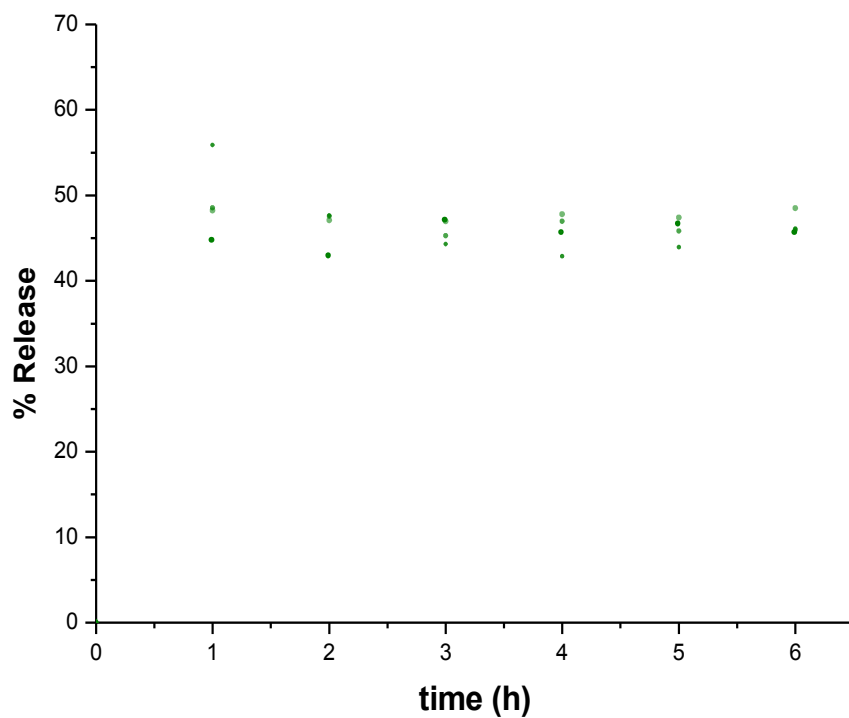
Φάσμα 48: Φάσμα ^1H για το πείραμα 4 αποδέσμευσης HEDP σε pH=1.2 (6^η ώρα).

Διάγραμμα XRD

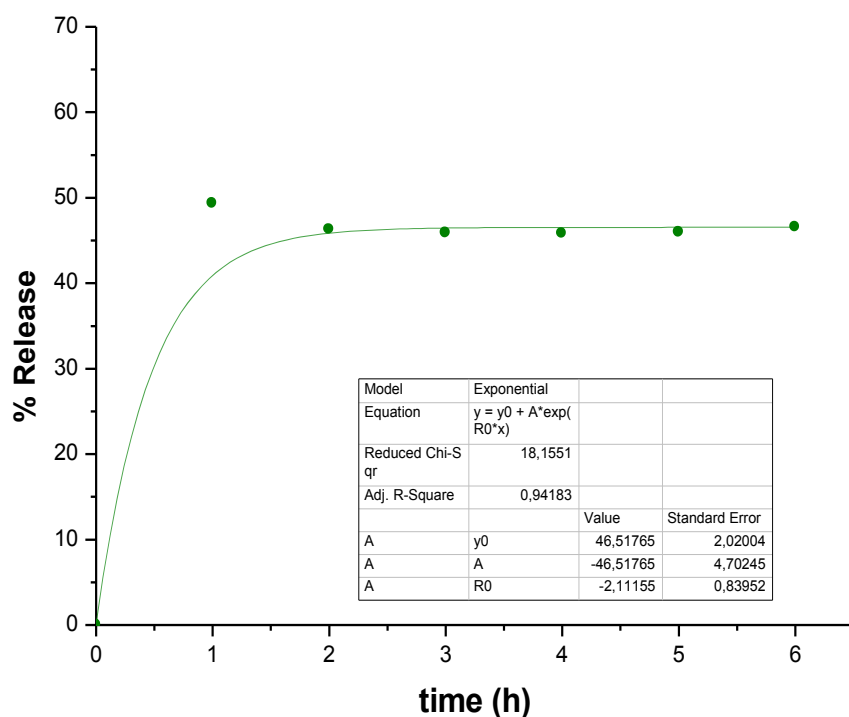


Διάγραμμα 1: Σύγκριση των διαγραμμάτων XRD της ένωσης Ca-HEDP και της ένωσης του Stock.⁽¹⁰⁾ Όπως φαίνεται, οι κορυφές των δύο διαγραμμάτων ταυτίζονται, γεγονός που σημαίνει ότι και στις δύο περιπτώσεις η ένωση Ca-HEDP είναι η ίδια.

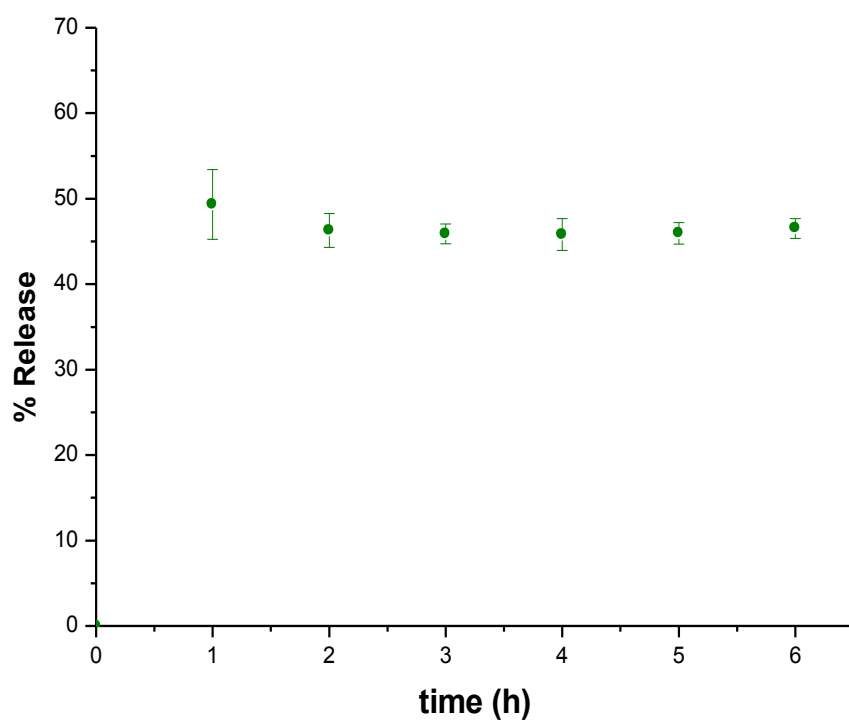
Διαγράμματα % Αποδέσμευσης



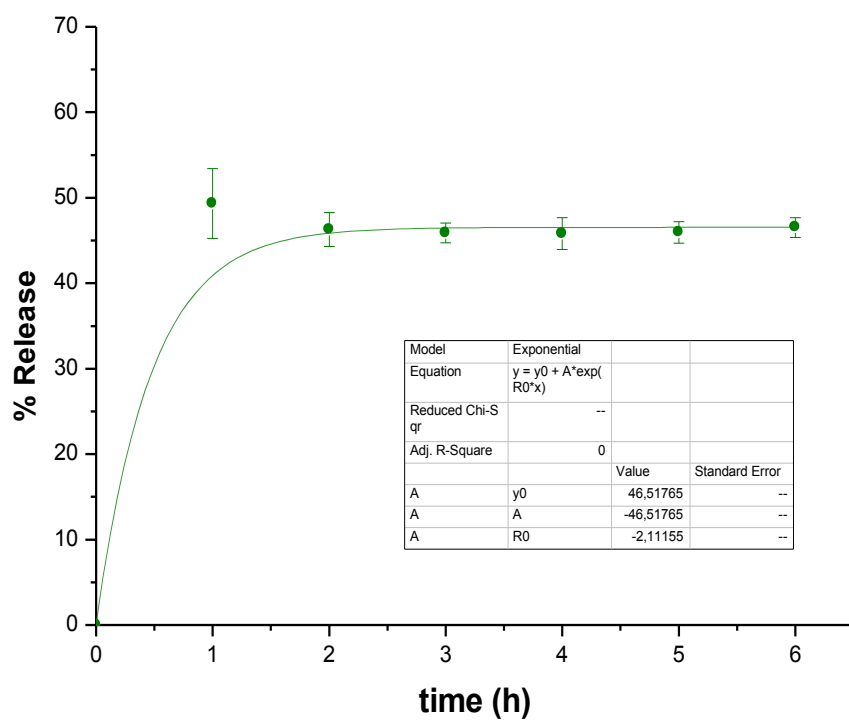
Διάγραμμα 2: Διάγραμμα σημείων με την % αποδέσμευση HEDP σε υδατικό διάλυμα με τιμή pH=3.0 σε σχέση με τον χρόνο. Σε κάθε μία ώρα αντιστοιχούν τέσσερις τιμές % αποδέσμευσης, μία για κάθε ένα από τα τέσσερα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν.



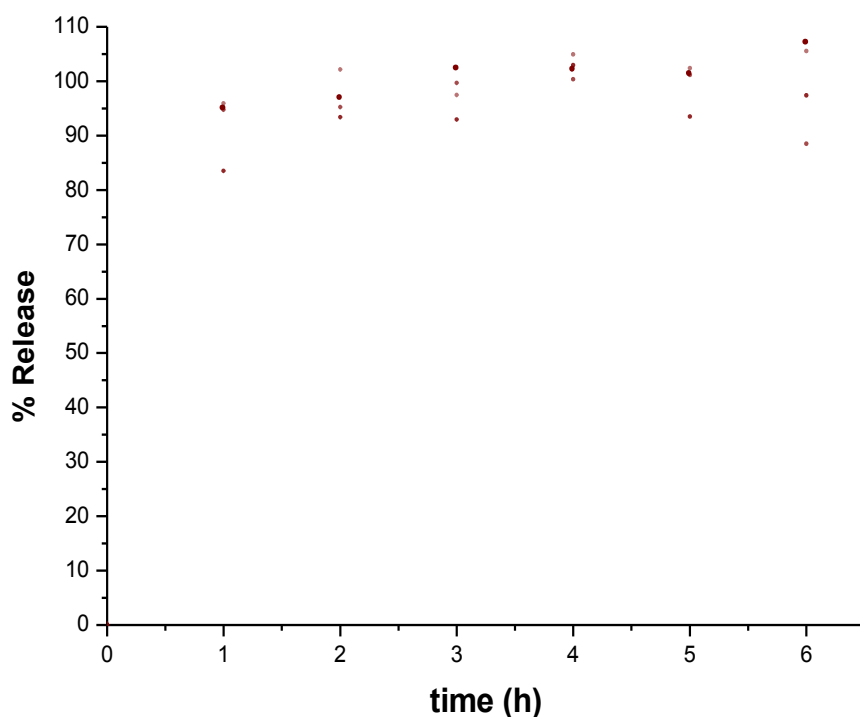
Διάγραμμα 3: Διάγραμμα μέσης τιμής της % αποδέσμευσης HEDP για τα χάπια σε διαλύματα με pH=3.0 σε σχέση με τον χρόνο.



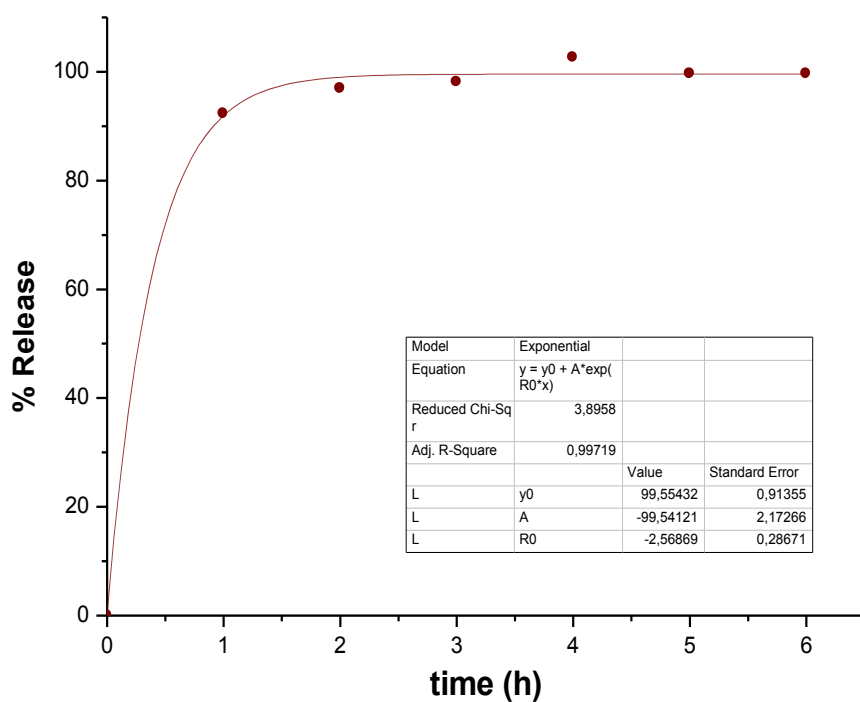
Διάγραμμα 4: Διάγραμμα σημείων μέσης τιμής της % αποδέσμευσης HEDP για τα χάπια σε διαλύματα με pH=3.0 σε σχέση με τον χρόνο με το εύρος των σφαλμάτων των μετρήσεων.



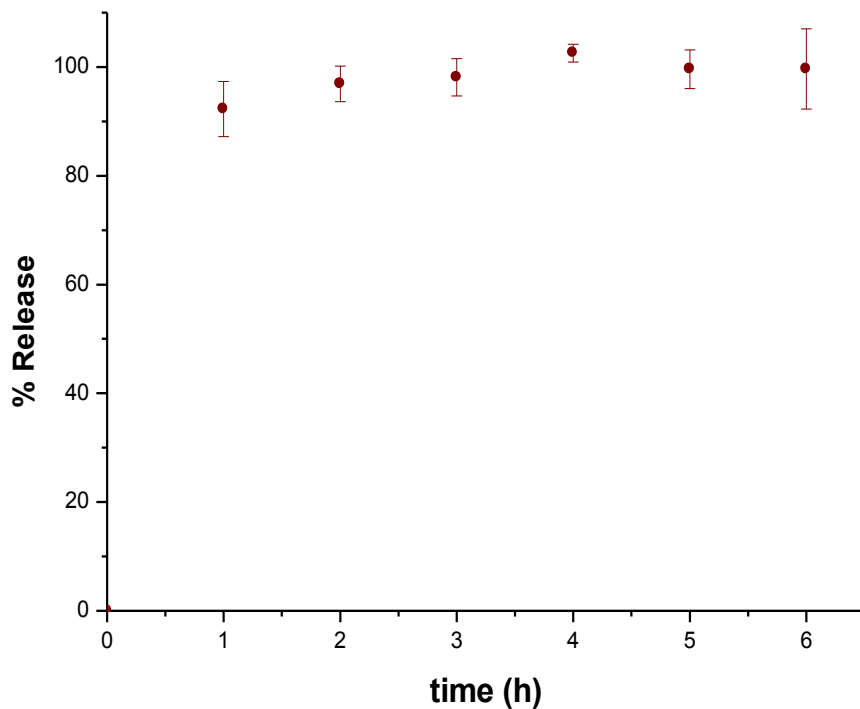
Διάγραμμα 5: Διάγραμμα μέσης τιμής της % αποδέσμευσης HEDP για τα χάπια σε διαλύματα με pH=3.0 σε σχέση με τον χρόνο με το εύρος των σφαλμάτων των μετρήσεων.



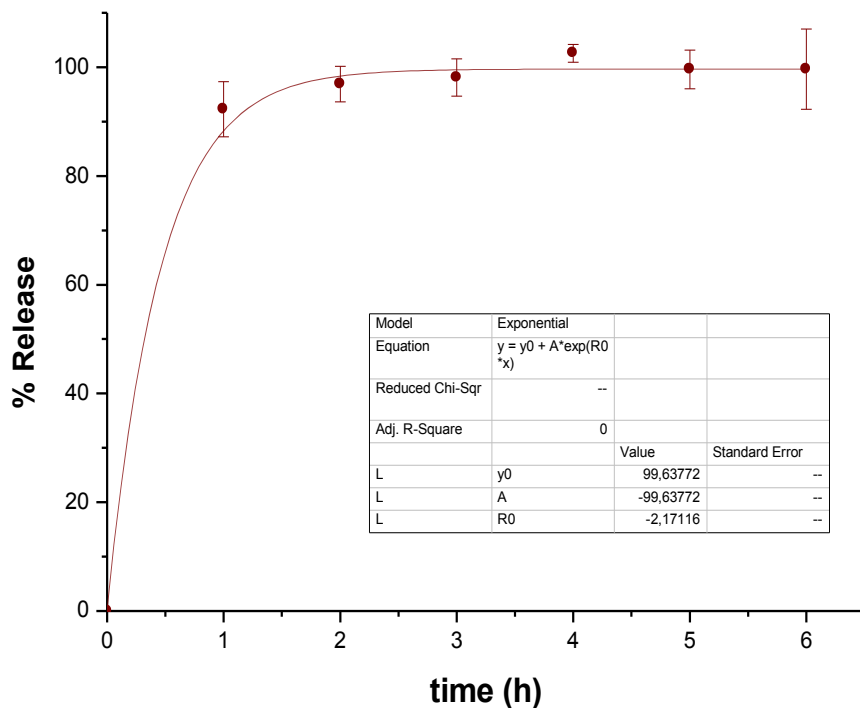
Διάγραμμα 6: Διάγραμμα σημείων με την % αποδέσμευση HEDP σε υδατικό διάλυμα με τιμή pH=1.2 σε σχέση με τον χρόνο. Σε κάθε μία ώρα αντιστοιχούν τέσσερις τιμές % αποδέσμευσης, μία για κάθε ένα από τα τέσσερα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν.



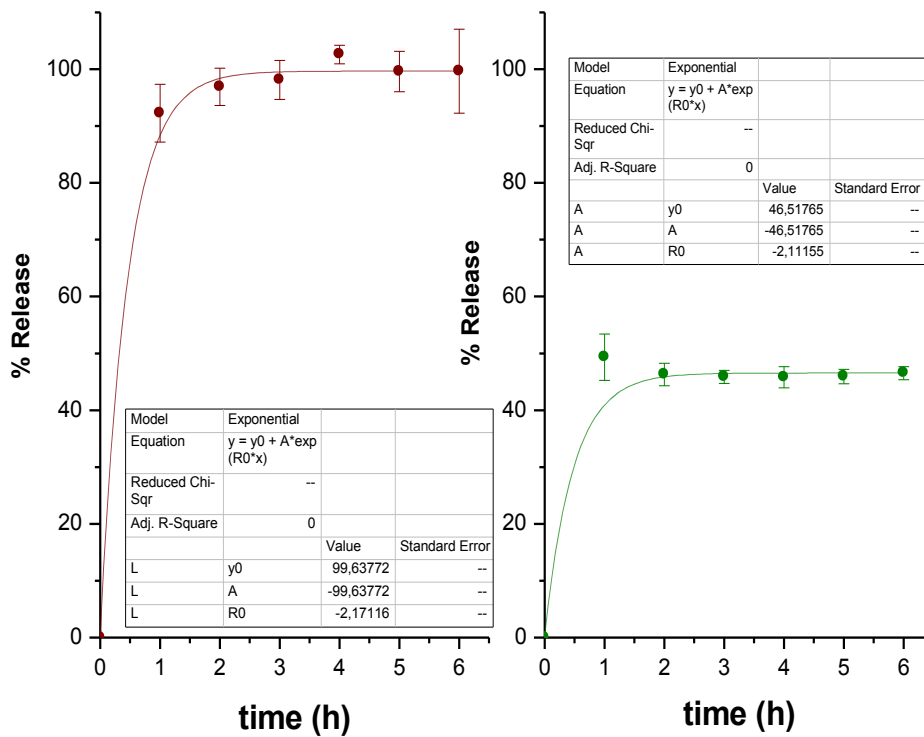
Διάγραμμα 7: Διάγραμμα μέσης τιμής της % αποδέσμευσης HEDP για τα χάπια σε διαλύματα με pH=1.2 σε σχέση με τον χρόνο.



Διάγραμμα 8: Διάγραμμα σημείων μέσης τιμής της % αποδέσμευσης HEDP για τα χάπια σε διαλύματα με pH=1.2 σε σχέση με τον χρόνο με το εύρος των σφαλμάτων των μετρήσεων.



Διάγραμμα 9: Διάγραμμα μέσης τιμής της % αποδέσμευσης HEDP για τα χάπια σε διαλύματα με pH=1.2 σε σχέση με τον χρόνο με το εύρος των σφαλμάτων των μετρήσεων.



Διάγραμμα 10: Σύγκριση της % αποδέσμευσης HEDP για τα χάπια σε διαλύματα με pH=1.2 και pH=3.0 σε σχέση με τον χρόνο με το εύρος των σφαλμάτων των μετρήσεων.