

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΝ

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΓΕΝΙΚΟΥ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ

ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΑΠΟΔΕΣΜΕΥΣΗ ΦΩΣΦΟΝΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ
ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΣΕ ΚΑΤΙΟΝΤΙΚΕΣ ΠΟΛΥΜΕΡΙΚΕΣ ΜΗΤΡΕΣ

ΠΑΣΠΑΛΑΚΗ ΜΑΡΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΔΗΜΑΔΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2011

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

1. Δημάδης Κωνσταντίνος (Επιβλέπων Καθηγητής)
Αναπληρωτής Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Κρήτης
2. Μήλιος Κωνσταντίνος
Επίκουρος Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Κρήτης
3. Τρικαλίτης Παντελής
Αναπληρωτής Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

*Στους γονείς μου, την αδελφή μου,
το Μιχάλη και τη Φαίδρα
για την απεριόριστη και
ανιδιοτελή αγάπη που
μου προσφέρουν...*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα Καθηγητή μου κ Κωνσταντίνο Δημάδη για την ανάθεση αυτής της εργασίας, για την ηθική συμπαράσταση και ενθάρρυνση του, την ανεκτικότητα και την επιστημονική καθοδήγησή του. Χωρίς αυτά δε θα μπορούσαν να ξεπεραστούν οι δυσκολίες που παρουσιάστηκαν κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής του μεταπτυχιακού μου διπλώματος.

Ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, τον Επίκουρο καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Μήλιο και τον Αναπληρωτή καθηγητή κ. Παντελή Τρικαλίτη που δέχτηκαν να κρίνουν την παρούσα εργασία.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω το Ίδρυμα Μαρία Μανασάκη για την χορήγηση υποτροφίας. Η βοήθεια αυτή ήταν σημαντική για την εκπόνηση της εργασίας μου.

Ευχαριστώ ιδιαίτερος τον καθηγητή κ. Απόστολο Σπύρο και τη Βίβιαν Μάρα για την πολύτιμη βοήθειά τους και την άψογη συνεργασία σχετικά με τη χρήση του φασματογράφου NMR.

Ακόμη, ευχαριστώ το τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης που με δέχτηκε στο Γενικό Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα, καθώς και για την υλικοτεχνική δομή που μου παρείχε.

Επιπλέον ευχαριστώ τον καθηγητή κ. Κατερινόπουλο και την ομάδα του. Ειδικότερα τον Τσικαλά Γιώργο, τον Στεφανάκη Μιχάλη και τη Ρομπογιαννάκη Μαρία για τη βοήθεια, τις συμβουλές και τις όμορφες στιγμές που μοιραστήκαμε.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω τα τωρινά και παλαιότερα μέλη του εργαστηρίου Εργαστήριο Μηχανικής, Ανάπτυξης και Σχεδιασμού Κρυστάλλων για όλες τις όμορφες στιγμές εντός και εκτός του εργαστηρίου. Ακόμη ευχαριστώ τους μεταπτυχιακούς αλλά και τους προπτυχιακούς φοιτητές του τμήματος Χημείας για τη δημιουργία ευχάριστου κλίματος.

Ευχαριστώ βαθύτατα την οικογένειά μου, που είναι δίπλα μου σε κάθε μου βήμα, με πιστεύουν και με στηρίζουν δίνοντας μου απλόχερα περισσότερα απ' όσα μπορούν.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου: Μιχάλη, Μαρία, Νικόλ, Εύη, Μαίρη για τη στήριξη, τη συμπαράσταση, την υπομονή και την αγάπη τους, για όλα εκείνα που πέρασαν αλλά και για όλα αυτά που έρχονται.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Πασπαλάκη Μαρία

Ημερομηνία γέννησης: 5 Ιουλίου 1984

Διεύθυνση μόνιμης κατοικίας: Βαλέστρα 35, Τ.Κ. 71202, Ηράκλειο

Τηλέφωνο: 2810 283281 , 6972763349

Οικογενειακή κατάσταση: Άγαμη

Email: riapasalaki@yahoo.gr

Εκπαίδευση

1996 – 2002	Πειραματικό Σχολείο Ηρακλείου
2003 – 2008	Πτυχίο Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, βαθμός 7,26 (Λίαν Καλώς) , Πανεπιστήμιο Κρήτης
2008 – Σήμερα	Μεταπτυχιακό Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
2009 – 2010	Σεμινάριο επιμόρφωσης εκπαιδευτικών για άτομα με ειδικές ανάγκες, Πανεπιστήμιο Αιγαίου
2011	Πιστοποίηση γνώσης του συστήματος γραφής και ανάγνωσης Τυφλών Braille

Υποτροφίες

2008 – 2009	Υποτροφία κληροδοτήματος Μανασάκη για εκπόνηση μεταπτυχιακής έρευνας
-------------	---

Ξένες Γλώσσες

Αγγλικά	Certificate of Proficiency in English (University of Michigan)
Γερμανικά	Zertifikat Deutch als Fremdsprache (Goethe Institut)

Γνώσεις Η/Υ

Πιστοποιητικό	Cambridge Skills award in IT Skills (Electronic Communication, Databases, Spreadsheets, Word Processing, Using Computer and Managing files)
---------------	---

Ειδικές Γνώσεις (Σεμινάρια - Προγράμματα)

- Quality Forum Κρήτη 2004 (Ηγεσία, Ανάπτυξη Νέων Τάσεων, Διαχείριση Καινοτομίας και Τεχνολογίας, Ασφάλεια Τροφίμων –HACCP, Αναδόμηση Συστημάτων Διαχείρισης, Εργαλεία Ποιότητας, Ποιότητα και Περιβάλλον)
- Aqua 2006 - 2nd International Conference – Water science and technology - Integrated management of water resources
- 10^ο Συνέδριο Χημείας Ελλάδας – Κύπρου, «Χημική συνείδηση στον 21^ο αιώνα», 2008
- Σεμινάριο «Πειράματα Χημείας σε μικροκλίμακα», 2010

Ερευνητικό Έργο

- Controled release of Bis(phosphonate) Pharmaceuticals from Cationic Biodegradable Polymeric Matrices, Konstantinos D. Demadis, Maria Paspalaki, and Joanna Theodorou, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **2011**, 50, 5873-5876

- Διπλωματική εργασία «Ακινητοποίηση ανιοντικών φωσφονικών σε κατιοντικά πολυμερή – Φάρμακα για οστεοπόρωση», 2008, Τμήμα Χημείας
- Πτυχιακή εργασία «Αντικαταθλιπτικά Φάρμακα», 2010, Πανεπιστήμιο Αιγαίου

Εργασιακή Προϋπηρεσία

2003-2004	ΟΤΕ βλάβες, τηλεφωνικό κέντρο
2008-2011	Φροντιστήριο Αγγλικών FTC
2010-σήμερα	Φροντιστήριο Μέσης εκπαίδευσης Κύκλος
2011-σήμερα	Φροντιστήριο Μέσης εκπαίδευσης Θεμέλιο

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία μελετά την ανάπτυξη ενός συστήματος ελεγχόμενης αποδέσμευσης με βιοϊατρικές εφαρμογές. Πιο συγκεκριμένα γίνεται ακινητοποίηση ανιοντικών φωσφονικών σε κατιοντικά πολυμερή και έπειτα μελετάται ο ρυθμός αποδέσμευσης των πρώτων από το σύστημα. Τα ανιοντικά φωσφονικά HEDP (hydroxyethylidene-diphosphonate) και EDTMP (ethylenediamine-tetrakis(methylenephosphonate)) είναι πιθανά φάρμακα για ασθένειες εναπόθεσης ασβεστίου και τα κατιοντικά πολυμερή PEI (polyethyleneimine) και PDC (poly(diallyldimethylammonium chloride)) είναι οι μήτρες στις οποίες ακινητοποιήθηκαν τα φωσφονικά αυτά.

Όταν αντιδρά το φωσφονικό με το πολυμερές σχηματίζεται ένα σύμπλοκο βασισμένο σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις πολυκατιόντος-φωσφονικού. Αφού παρασκευάστηκε μια σειρά τέτοιων ενώσεων σε διάφορα pH, χρησιμοποιήθηκε φασματοσκοπία FT-IR για να επιβεβαιωθεί ο σχηματισμός του συμπλόκου, έγινε στοιχειακή ανάλυση για τον προσδιορισμό της ποσότητας φωσφόρου σε αυτά και τέλος κατασκευάστηκαν χάπια τα οποία τοποθετήθηκαν σε περιβάλλον που μιμείται το γαστρικό υγρό και μελετήθηκε η αποδέσμευση των φωσφονικών από τη μήτρα ανά ώρα για 8 ώρες. Οι μετρήσεις των φωσφονικών έγιναν μέσω του σχηματισμού μπλε μολυβδαινικού συμπλόκου με τα φωσφορικά με το φασματοφωτόμετρο HACH. Η συγκέντρωση φωσφορικών είναι ανάλογη με την ένταση του μπλε χρώματος.

Σκοπός ήταν η ομαλή και ελεγχόμενη αποδέσμευση των φωσφονικών από την πολυμερική μήτρα. Κάποια υλικά μπόρεσαν να το επιτύχουν και αυτά ήταν τα σύμπλοκα PEI με HEDP. Επίσης, κατεβλήθησαν προσπάθειες για την πιστοποίηση της αποδέσμευσης με φασματοσκοπία ^1H και ^{31}P NMR.

ABSTRACT

The present thesis deals with the development of a controlled release system which could be used in pharmaceutical applications. Specifically, we attempted to immobilize anionic phosphonates onto cationic polymeric matrices and, furthermore, we examined the rate of phosphonate release from these polymeric matrices. The anionic phosphonates HEDP (hydroxyethylidene-diphosphonate) and EDTMP (ethylenediamine-tetrakis (methylenephosphonate)) are prospective drugs for calcium deposition diseases and the cationic polymers PEI (polyethyleneimine) and PDC (poly(diallyldimethylammonium chloride)) represent the polymeric matrices.

When the above phosphonates react with the polymers, a complex salt is produced which is formed due to the electrostatic interactions between the polycation and the phosphonate. After synthesizing such complexes in various pH regions, they were characterized by using FT-IR spectroscopy, the phosphorus content was determined and, finally, tablets containing the synthesized complex were prepared and placed in a solution similar to the stomach environment. Then we studied the release of the phosphonates every one hour for 8 hours. In order to determine the concentration of the phosphonate released we used the HACH method in which a blue complex is produced after the reaction of phosphates with ammonium molybdate. The higher the concentration is the more intense the blue colour is. We tried to succeed controlled and slow release of the phosphonates from the polymeric matrices. Not all the complexes succeeded our purpose but some of them did. Those were the complexes with PEI and HEDP. Finally, efforts were made to establish the controlled release by using ^1H and ^{31}P NMR spectroscopy.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Οστό – Δομή και λειτουργία.....	13
1.1 Εισαγωγή.....	13
1.2 Μικροσκοπική σύσταση οστού.....	13
1.3 Μακροσκοπική σύσταση οστού	15
1.4 Κύτταρα του οστίτη ιστού.....	18
1.4.1 Οστεοκλάστες.....	19
1.4.2 Οστεοβλάστες.....	20
1.4.3 Οστοκύτταρα.....	21
1.5 Κατασκευή και Ανακατασκευή.....	22
1.5.1 Οστική απορρόφηση.....	25
1.5.2 Φάση της αναστροφής.....	27
1.5.3 Οστική Παραγωγή.....	27
1.6 Παράγοντες που επηρεάζουν τον οστικό μεταβολισμό.....	28
1.7 Οστεοπόρωση.....	29
1.7.1 Αίτια.....	32
1.7.2 Θεραπεία.....	33
2. Διφωσφονικά.....	34
2.1 Εισαγωγή.....	34
2.2 Δομικά χαρακτηριστικά.....	36
2.3 Μηχανισμοί δράσης.....	39
2.3.1 Διαφοροποίηση αμινοφωσφονικών και μη αμινοφωσφονικών.....	40
2.4 Επίδραση στον υδροξυαπατίτη και στο ανόργανο μέρος του οστού.....	43
2.5 Φαρμακοκινητική.....	45
2.6 Διφωσφονικά στη θεραπεία της οστεοπόρωσης.....	45
2.7 Παρενέργειες.....	46
3. Φάρμακα και η πορεία τους στον οργανισμό.....	47
3.1 Απορρόφηση, Κατανομή και απέκκριση φαρμάκων.....	47
3.1.1 Χορήγηση από το στόμα.....	48
4. Συστήματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης.....	50
4.1 Εισαγωγή.....	50
4.2 Εφαρμογή της ελεγχόμενης αποδέσμευσης στην φαρμακευτική επιστήμη.....	50
4.3 Μηχανισμοί ελεγχόμενης αποδέσμευσης	54
4.4 Συστήματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης.....	55
4.4.1 Συστήματα προκαθορισμένου ρυθμού αποδέσμευσης	56
4.4.2 Συστήματα ενεργοποιούμενης αποδέσμευσης (activation–modulated systems).....	58
4.4.3 Συστήματα στα οποία η αποδέσμευση ελέγχεται από μηχανισμό ανάδρασης (feed back-regulated systems).....	59
4.4.3α Συστήματα αποδέσμευσης ρυθμιζόμενα μέσω βιοδιάσπασης.....	61
4.4.3β Βιοαποκρινόμενα συστήματα αποδέσμευσης.....	62
4.4.3γ Αυτό-ρυθμιζόμενα συστήματα αποδέσμευσης.....	64
4.4.4 Συστήματα στόχευσης (drug targeting systems).....	64
4.5 Βιολικά για ελεγχόμενη αποδέσμευση.....	66
4.6 Πολυμερή που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.....	70
4.6.1 Κατιοντικά Πολυμερή.....	70

4.6.1α Πολυαιθυλενιμίνη (Polyethyleneimine - PEI).....	70
4.6.1β Πολύ(διαλλυλδιμεθυλαμμώνιο χλωρίδιο) (PDC).....	73
4.7 Ανιοντικά φωσφονικά.....	74
4.7.1 Υδροξυαιθυλένο-διφωσφονικό οξύ (HEDP).....	74
4.7.2 Αιθυλενοδιαμινική τετρα(μεθυλενοφωσφονικό οξύ) (EDTMP).....	76
5. Σκοπός της εργασίας.....	77
6. Πειραματικό μέρος.....	78
6.1 Εισαγωγή	78
6.2 Όργανα.....	79
6.3 Διαλύματα/Αντιδραστήρια.....	80
6.4 Πειραματική διαδικασία.....	82
7. Αποτελέσματα – Συζήτηση.....	85
7.1 Εισαγωγή.....	85
7.2 Σύνθεση υλικών και Χαρακτηρισμός υλικών.....	85
7.3 Μελέτες Αποδέσμευσης.....	91
7.3.1 Μελέτη συστήματος PEI-HEDP.....	92
7.3.2 Μελέτη υπόλοιπων συστημάτων.....	94
7.4 Συζήτηση Αποτελεσμάτων.....	98
7.4.1 Φάσματα IR.....	98
7.4.2 Πειράματα αποδέσμευσης.....	98
7.4.3 Φάσματα NMR.....	98
8. Συμπεράσματα – Προοπτικές.....	100
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	102
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	106

1. Οστό – Δομή και λειτουργία

1.1 Εισαγωγή

Η διατήρηση των βιολογικών και μηχανικών ιδιοτήτων του σκελετού των θηλαστικών επιτυγχάνεται με τη συνέργεια πολλών ρυθμιστικών παραγόντων. Τα οστά χαρακτηρίζονται από μεγάλο βαθμό στερεότητας και αντοχής αλλά και μεγάλο βαθμό ελαστικότητας και έχουν προφανείς εμβιομηχανικές λειτουργίες: Την προστασία και υποστήριξη των μαλακών μορίων και τη μεταφορά φορτίων από ένα σημείο του σώματος στο άλλο. Παράλληλα όμως ο οστίτης ιστός είναι επίσης υπεύθυνος για την ομοιοστασία (homeostasis) του ασβεστίου, του οποίου αποτελεί την σπουδαιότερη αποθήκη καθώς και πηγή προμήθειας για τις ανάγκες του οργανισμού, και άλλων μεταλλικών ιόντων όπως τον φωσφόρο και το μαγνήσιο . [1,2]

Παρά τη μηχανική του σταθερότητα το οστό βρίσκεται σε μια διαρκή δυναμική κατάσταση, μεταβάλλοντας τόσο την εσωτερική του δομή όσο και το σχήμα του, ανταποκρινόμενο στις συνεχείς μεταβολές των φορτίων και των απαιτήσεων του μεταβολισμού των μετάλλων. Όλες αυτές οι ανακατανομές της σύνθεσης και της δομής των οστών γίνονται με τη δράση ειδικών κυττάρων, που υπόκεινται σε ορμονικούς αλλά και τοπικούς μηχανισμούς ρύθμισης. Οι τοπικοί μηχανισμοί με τη σειρά τους ρυθμίζονται από τις μεταβολές των συγκεντρώσεων των ιόντων των μεταλλικών στοιχείων. Στο κεφάλαιο αυτό αναλύονται οι μηχανισμοί αυτοί και τα αποτελέσματα όταν αυτοί δεν λειτουργούν σωστά. [1]

1.2 Μικροσκοπική σύσταση οστού

Τα οστά αποτελούνται κατά το $\frac{1}{3}$ περίπου (35%) από οργανικό τμήμα και κατά τα $\frac{2}{3}$ (65%) από ανόργανα συστατικά. Το οργανικό τμήμα περιλαμβάνει:

- i. Τα κύτταρα του οστίτη ιστού.
- ii. Τα κολλαγόνα ινίδια (πρωτεΐνες με μεγάλη περιεκτικότητα σε γλυκίνη, προλίνη, οξυπρολίνη)
- iii. Τη θεμέλια ουσία (πρωτεΐνες κυρίως βλενοπολυσακχαρίδες). Τα κολλαγόνα ινίδια και η θεμέλια ουσία συνιστούν τη μεσοκυττάρια ουσία του οστίτη ιστού.

Τα κύτταρα του οστίτη ιστού είναι οι οστεοβλάστες, τα οστεοκύτταρα και οι οστεοκλάστες. Οι οστεοβλάστες αποτελούν τα οστεοπαραγωγικά κύτταρα που παράγουν τη μεσοκυττάρια ουσία. Η τελευταία μετά την οστεοποίηση της περικλείει τους οστεοβλάστες που μετατρέπονται στη φάση αυτή σε οστεοκύτταρα. Τα οστεοκύτταρα δημιουργούν αποφυάδες που φέρονται μέσα στα οστικά σωληνάρια και έτσι επικοινωνούν μεταξύ τους. Τα κύτταρα αυτά δεν αποτελούν ανενεργά στοιχεία του οστού, όπως πιστεύονταν παλιότερα, αλλά συμμετέχουν ενεργά στο μεταβολισμό και την ομοιόσταση του ασβεστίου.

Οι οστεοκλάστες είναι πολυπύρρηνα γιγαντοκύτταρα που βρίσκονται σε θέσεις, όπου γίνεται αποδόμηση του οστίτη ιστού και ενεργοποιούνται ύστερα από δράση της παραθορμόνης.

Τα κολλαγόνα ινίδια παράγονται από τους οστεοβλάστες και έχουν διαφορετική σύνθεση από τα ινίδια άλλων ιστών, γεγονός που κάνει δυνατή την εναπόθεση σε αυτά αλάτων ασβεστίου. Επιπλέον βοηθούν την κυτταρική προσκόλληση. Η κύρια δομική πρωτεΐνη είναι το τύπου I κολλαγόνο. Μια άλλη μεγάλη ομάδα πρωτεϊνών είναι οι αυξητικοί παράγοντες, όπως οι μορφογενετικές πρωτεΐνες του οστίτη ιστού και ο μετατρεπτικός παράγοντας β (transforming growth factor β, TGFβ), οι οποίες φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του οστίτη ιστού. Τέλος στη δομή του οστίτη ιστού βρίσκονται και οι πρωτεογλυκάνες (εικόνα 1).



Εικόνα 1: Σχηματικά οι ίνες κολλαγόνου και η θεμέλιος ουσία αποτελούμενη από μόρια πρωτεογλυκανών.[3]

Τα ανόργανα συστατικά των οστών είναι κυρίως το φωσφορικό ασβέστιο (80-90%) που βρίσκεται με τη μορφή υπερμικροσκοπικών κρυστάλλων του υδροξυαπατίτη (εικόνα 2), το ανθρακικό ασβέστιο (8-10%), το φθοριούχο και χλωριούχο ασβέστιο (0,5%), το φωσφορικό μαγνήσιο (1-2%) και τα αλκαλικά άλατα (2%). Τα συστατικά αυτά εμποτίζουν τη θεμέλια ουσία καθώς και τα κολλαγόνα ινίδια και έτσι εξασφαλίζουν την αντοχή του οστίτη ιστού. [2,4]



Εικόνα 2: Κρύσταλλοι υδροξυαπατίτη[3]

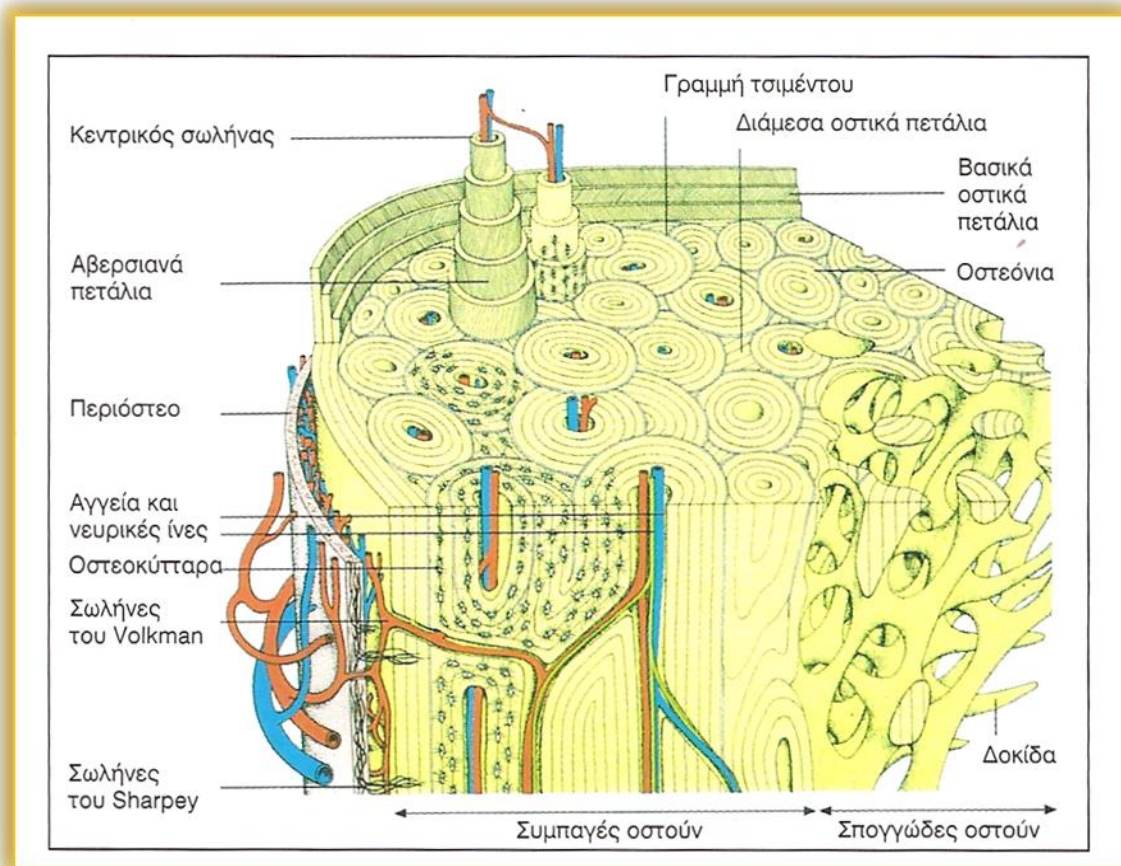
1.3 Μακροσκοπική σύσταση οστού

Τα μακρά οστά αποτελούνται από:

1. Το περίοστεο,
2. Την οστέινη ουσία
3. Το μυελό των οστών και
4. Τα αγγεία και τα νεύρα

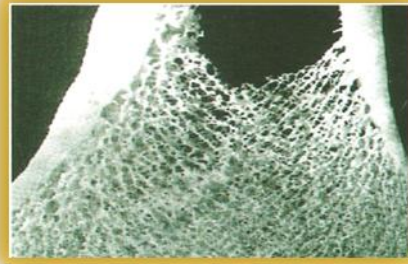
Η οστέινη ουσία αποτελείται διακρίνεται σε: δοκιδώδη ή σπογγώδη ιστός και φλοιώδη ή συμπαγή ιστό. Το 80% περίπου του σκελετού αποτελείται από φλοιώδη ιστό και το υπόλοιπο 20% από δοκιδώδη. Οι σπόνδυλοι και τα πλατέα οστά της λεκάνης αποτελούνται κυρίως από δοκιδώδη ιστό, ο οποίος επιφανειακώς επικαλύπτεται από ένα στρώμα φλοιώδους ιστού. Τα μακρά οστά αποτελούνται κυρίως από φλοιώδη ιστό, ενώ το κεντρικό μέρος των επιφύσεων τους αποτελείται από δοκιδώδη ιστό. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3 το φλοιώδες οστό είναι πυκνής και συμπαγούς σύστασης και βρίσκεται στην περιφερική

μοίρα του οστού. Αντίθετα, το σπογγώδες ή δοκιδώδες οστό είναι λιγότερο πυκνό στη σύσταση και βρίσκεται στην κεντρική μοίρα του οστού. [2,3]



Εικόνα 3: Σχηματική παράσταση οριζόντιας/κάθετης τομής ενός μακρού οστού[3]

Ο σπογγώδης ιστός αποτελείται από πλακίδια ή δοκίδες, οι οποίες είναι διατεταγμένες προς διάφορες κατευθύνσεις ανάλογα με τις μηχανικές ανάγκες κάθε οστού. Ο σχηματισμός αυτός μοιάζει με σπόγγο. (εικόνα 4) Οι κοιλότητες μεταξύ των οστικών δοκίδων περιέχουν μυελό των οστών ή λιπώδη ιστό. Οι οστικές δοκίδες του δοκιδώδους οστίτη ιστού παρουσιάζουν ένα μόνο είδος επιφανείας, η οποία έρχεται σε επαφή με το μυελό των οστών.



Εικόνα 4: Τομή σπογγώδους οστού.

Ο φλοιώδης οστίτης ιστός, είναι ο κανονικός ώριμος ιστός και αποτελείται από τα παρακάτω συστήματα ομόκεντρων πεταλίων, που σχηματίζουν την πεταλιώδη μορφή του οστού(εικόνα 1):

1. Το έξω ή περιφερικό

Η περιστική επιφάνεια η οποία χωρίζει την εξωτερική επιφάνεια του οστού από τα όργανα που το περιβάλλουν και η οποία καλύπτεται από το περίοστεο.

2. Το έσω ή περιμυελικό που καλύπτεται εσωτερικά από το ενδόστεο ή εσωτερικό περίοστεο

Η ενδοστική επιφάνεια χωρίζει τον οστίτη ιστό από το περιεχόμενο του αυλού του μακρού οστού, το οποίο αποτελείται περισσότερο από λίπος και λιγότερο από ερυθρό μυελό.

3. Τα ενδιάμεσα που αποτελούνται από το σύστημα του Havers (ή οστεώνες) και τους σωλήνες του Volkman

Το σύστημα του Havers αποτελείται από έναν επιμήκη σωλήνα (σωλήνας του Havers), συνήθως παράλληλο προς τον επιμήκη άξονα του μακρού οστού, ο οποίος περιέχει ένα αρτηρίδιο και ένα φλεβίδιο. Ο σωλήνας του Havers αποτελεί τον άξονα γύρω από τον οποίο είναι διατεταγμένα κυκλικά πεταλίδια οστίτη ιστού κατά τρόπο συμπαγή. Η κατασκευή αυτή μοιάζει με την υφή του κρεμμυδιού.

Οι σωλήνες του Volkmann είναι και αυτοί αγγειονευροφόροι, αλλά διαφέρουν από τους προηγούμενους στο ότι τα τοιχώματά τους δεν είναι ομόκεντρα, αλλά ακανόνιστα, και είναι τοποθετημένοι λοξά ή εγκάρσια έτσι που αναστομώνουν τους σωλήνες του Havers.

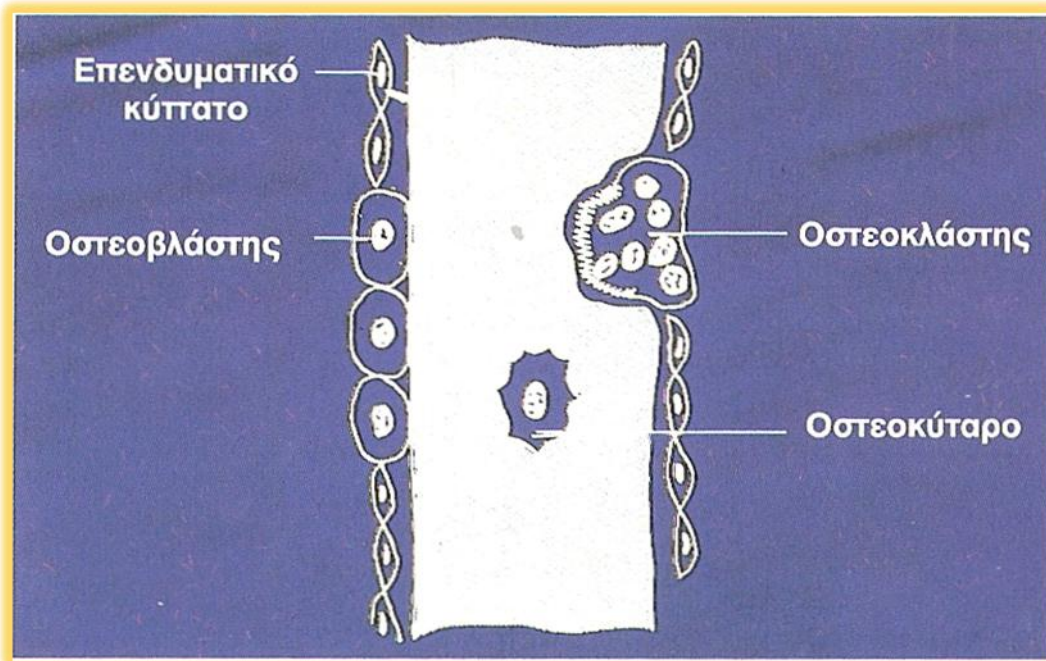
Η σπογγώδης οστέινη ουσία αποτελείται από οστέινα πετάλια και δοκίδες με ακανόνιστο προσανατολισμό. Ανάμεσα στα πετάλια και τις δοκίδες υπάρχουν χώροι που ονομάζονται μυελοκυψέλες.

Τα αγγεία των οστών ξεκινούν από το περίοστεο και τροφοδοτούν κυρίως τις εξωτερικές στιβάδες των οστών, και από την τροφοφόρο αρτηρία που μπαίνει μέσα στη μάζα του οστού από το τροφοφόρο τμήμα και διακλαδίζεται σε ανερχόμενο και κατερχόμενο κλάδο. Η τροφοφόρος αρτηρία τροφοδοτεί το μυελό των οστών, τις κεντρικές στιβάδες της αρτηρία τροφοδοτεί το μυελό των οστών, τις κεντρικές στιβάδες της φλοιώδους ουσίας και καταλήγει σε αγκύλες στην περιοχή της μετάφυσης. Οι φλέβες των οστών δεν συνοδεύουν τις αρτηρίες, εκτός από την τροφοφόρο, ενώ αμφισβητείται η ύπαρξη λεμφικών αγγείων.

Τα νεύρα των οστών βρίσκονται στο περίοστεο και συνοδεύουν την τροφοφόρο αρτηρία στο εσωτερικό του οστού. Είναι κυρίως νεύρα του συμπαθητικού καθώς και της «εν τω βάθει» αισθητικότητας. Αισθητικές ίνες πόνου στα οστά είναι αμφίβολο αν υπάρχουν, ενώ είναι βέβαιη η ύπαρξή τους στο περίοστεο. [2,3]

1.4 Κύτταρα του οστίτη ιστού

Όπως προαναφέρθηκε οι κυριότεροι τύποι κυττάρων που επιτελούν τις λειτουργίες του οστίτη ιστού όπως για παράδειγμα την ανακατασκευή, είναι οι οστεοβλάστες, οι οστεοκλάστες και τα οστεοκύτταρα. Οι οστεοβλάστες παράγουν την οργανική ουσία, η οποία στη συνέχεια επιμεταλλώνεται με την εναπόθεση εντός αυτής κρυστάλλων υδροξυαπατίτη και οι δραστικοί οστεοκλάστες απομακρύνουν την ασβεστοποιημένη οργανική ουσία του οστού (το ώριμο οστό). Πρέπει να σημειωθεί ότι αρχικά, δρουν οι οστεοκλάστες απομακρύνοντας τον παλαιότερο οστίτη ιστό και κατόπιν, δρουν οι οστεοβλάστες για να αποκαταστήσουν την απώλεια με την παραγωγή οργανικής ουσίας, του οστεοειδούς. Η δράση και των δύο κυττάρων του οστίτη ιστού βρίσκεται σε απόλυτη αρμονία (εικόνα 5).



Εικόνα 5: Σχηματική παράσταση όλων των κυττάρων του οστίτη ιστού. [3]

1.4.1 Οστεοκλάστες

Οι οστεοκλάστες (εικόνα 6) είναι μονοπύρρηνα ή πολυπύρρηνα γιγαντοκύτταρα, ειδικευμένα στην απορρόφηση του ώριμου οστίτη ιστού. Ο ώριμος πολυπύρρηνος οστεοκλάστης μπορεί να προσκολληθεί σ' ένα σημείο του οστού το οποίο επιβάλλεται να ανακατασκευασθεί και να αρχίσει να απορροφά μόνο ασβεστοποιημένο ιστό. Η επιφάνεια του οστεοκλάστη, η οποία είναι προσκολλημένη "σαν βεντούζα" στην οστική επιφάνεια, έχει έντονη πτύχωση και προσφύεται στερεά στην οστική επιφάνεια, σχηματίζοντας με αυτό τον τρόπο μια ερμητικά κλειστή κοιλότητα μεταξύ οστικής επιφάνειας και πτυχωτής επιφάνειας του οστεοκλάστη. Στην κοιλότητα αυτή, ο οστεοκλάστης εκκρίνει πρωτεολυτικά ένζυμα και οξέα τα οποία διαλύουν τοπικώς το οστό. Η λειτουργία αυτή γίνεται εξωκυτταρικά. Το κολλαγόνο και ο υδροξυαπατίτης διαλύονται συγχρόνως και τα προϊόντα απορροφώνται και απομακρύνονται από τον οστεοκλάστη. Οι οστεοκλάστες είναι πολύ ευκίνητοι και φαίνεται ότι είναι τα μόνα κύτταρα που είναι ικανά να προκαλέσουν απορρόφηση του οστίτη ιστού *in vivo* (εικόνα 7). [3,4,5]

Τα προγονικά κύτταρα των οστεοκλαστών θεωρούνται ότι είναι μονοπύρρηνα κύτταρα του μυελού των οστών ή μονοπύρρηνα κυκλοφορούντα στο αίμα. Αρχικά, με ένα θετικό χημειοτακτικό ερέθισμα, ορισμένα μονοπύρρηνα προσελκύονται στο συγκεκριμένο σημείο

της οστικής επιφάνειας, το οποίο πρόκειται να απορροφηθεί. Εκεί, αφού πολλαπλασιασθούν, υφίστανται διαφοροποίηση σε προ-οστεοκλάστες, οι οποίοι παραμένουν ακόμη μονοπύρνηνοι. Τελικά, γίνεται σύντηξη ενός αριθμού μονοπύρηνων προ-οστεοκλαστών και προκύπτει ένας ώριμος πολυπύρηνος οστεοκλάστης με ισάριθμους πυρήνες, συνήθως τέσσερις [3].



Εικόνα 6: Οστεοκλάστης, εικόνα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου.



Εικόνα 7: Εικόνα οστεοκλάστη. Κάθε οστεοκλάστης συνοδεύεται από μια κοιλότητα, την οποία δημιούργησε προηγουμένως στην οστική επιφάνεια.[3]

1.4.2 Οστεοβλάστες

Οι οστεοβλάστες (εικόνα 8) είναι μικρά μονοπύρνηνα κυβοειδή οστικά κύτταρα, ειδικευμένα στο σχηματισμό νέου οστίτη ιστού. Πρώτα, παράγουν και εναποθέτουν το κολλαγόνο σε μια οστική κοιλότητα, την οποία έχουν δημιουργήσει προηγουμένως οι οστεοκλάστες. Μετά από μερικές ημέρες, γίνεται η ασβεστοποίηση του κολλαγόνου και του οστεοειδούς, τα οποία οι ίδιοι εναπόθεσαν. Η εναπόθεση των φωσφορικών αλάτων του ασβεστίου γίνεται από τους οστεοβλάστες σε μικρά πακέτα, στα οποία περιλαμβάνονται και πρωτεΐνες (πιθανώς η οστεονεκτίνη, η οστεοκαλσίνη και άλλες). Αργότερα, τα διαλυτά

άλατα ασβεστίου διαχέονται σταδιακά από το μέτωπο ασβεστοποίησης σε όλο το γειτονικό κολλαγόνο και μετατρέπονται με συνεχή και σταθερό ρυθμό σε κρυστάλλους υδροξυαπατίτη ενωμένου με το κολλαγόνο. Καθώς οι οστεοβλάστες σχηματίζουν αλλεπάλληλα στρώματα του οστίτη ιστού από τον πυθμένα της οστικής κοιλότητας ή του οστικού βοθρίου προς την επιφάνεια, μερικοί από αυτούς παραμένουν ενταφιασμένοι σε ειδικές κοιλότητες του νέου ιστού και μετασχηματίζονται σε οστεοκύτταρα. Τα προγονικά κύτταρα των οστεοβλαστών είναι τα κύτταρα του στρώματος του μυελού των οστών (stem cells).



Εικόνα 8: Οστεοβλάστες, εικόνα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου.[3]

1.4.3 Οστοκύτταρα

Τα οστεοκύτταρα είναι κύτταρα πολυγωνικά με μακρές αποφυάδες (εικόνα 9), οι οποίες από την οστεοκυτταρική κοιλότητα, όπου βρίσκεται το σώμα του οστεοκυττάρου, μέσω ειδικών σωληνίσκων φέρουν σε επικοινωνία μεταξύ τους τα γειτονικά οστεοκύτταρα, σχηματίζοντας με αυτό τον τρόπο ένα συγκύτιο. Πέραν της μεταξύ τους επικοινωνίας, τα οστεοκύτταρα επικοινωνούν με οστεοκλάστες και με οστεοβλάστες. Οι οστικές επιφάνειες των κοιλοτήτων καλύπτονται από μια στιβάδα πεπλατυσμένων κυττάρων, τα οποία θεωρούνται ότι είναι και αυτά ένα είδος οστεοβλαστών και γι' αυτό ονομάζονται καλυπτήρια ή επενδυτικά κύτταρα. Οι καθ' εαυτό λοιπόν ώριμοι οστεοβλάστες που σχηματίζουν νέο οστό, τα οστεοκύτταρα και τα αποπεπλατυσμένα κύτταρα που καλύπτουν την οστική επιφάνεια, δηλαδή τα επενδυτικά κύτταρα, θεωρούνται ότι είναι παρόμοια κύτταρα, τα οποία προέρχονται από την ίδια κυτταρική σειρά και η λειτουργία τους είναι κυρίως μεταβολική. Το τοίχωμα της οστεοκυτταρικής κοιλότητας σε βάθος 1-2 μικρά περιέχει διαλυτά άλατα ασβεστίου, τα οποία κινητοποιεί το οστεοκύτταρο και τα διοχετεύει προς την κυκλοφορία όταν διεγερθεί κατάλληλα, π.χ. από την παραθορμόνη. Μια άλλη λειτουργία των οστεοκυττάρων είναι να ανιχνεύουν τα μηχανικά ερεθίσματα του οστίτη ιστού. Έτσι, μόλις ανιχνευθεί από το οστεοκύτταρο μια βλάβη στην περιοχή του,

διαμέσου του συγκυτίου του, "ειδοποιούνται" οι πλησιέστεροι προς το σημείο εκείνο αναπαυόμενοι οστεοβλάστες και οστεοκλάστες επιφανείας και γίνεται η ενεργοποίηση της διαδικασίας ανακατασκευής του ιστού (bone remodeling). Τα επενδυτικά κύτταρα έχουν μια μεταβολική λειτουργία μετακίνησης ασβεστίου από τις οστικές επιφάνειες παρόμοια με εκείνη των οστεοκυττάρων.



Εικόνα 9: Το οστεοκύτταρο με τις αποφυάδες του.[3]

1.5 Κατασκευή και Ανακατασκευή

Κατασκευή των οστών (Bone Modeling) ονομάζουμε το σχηματισμό νέου οστού σε περιοχές όπου δεν υπήρχε προηγουμένως. Η λειτουργία αυτή αρχίζει πολύ νωρίς, κατά την εμβρυϊκή ηλικία που έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη του σκελετού. Επιτρέπει, όχι μόνο την κανονική αρχιτεκτονική ανάπτυξη του σκελετού κατά την περίοδο της αύξησης, αλλά και την προσαρμογή της αρχιτεκτονικής του στον ενήλικα όταν οι μηχανικές συνθήκες αλλάζουν. Κατά τη διάρκεια της ζωής, προκαλεί αύξηση του μεγέθους των σπονδύλων.

Η ανακατασκευή του οστού (bone remodeling) είναι μια λειτουργία του οστίτη ιστού, που αρχίζει ταυτόχρονα με την ανάπτυξη του σκελετού και αποτελεί την κύρια δραστηριότητα κατά την ενήλικη ζωή. Είναι μια συζευγμένη διαδικασία η οποία συνίσταται από την απομάκρυνση του παλαιού οστού και την αντικατάστασή του από νεοσχηματισμένο. Όμως, οι δύο αυτές λειτουργίες συμβαίνουν στην ίδια θέση και έτσι το σχήμα του οστού δεν αλλάζει. Με την ανακατασκευή του οστού εξασφαλίζεται η μορφολογική ακεραιότητα και η μηχανική αντοχή του σκελετού. Η μεγάλη της σημασία αποδεικνύεται στις παθήσεις όπου υπάρχει διαταραχή της ανακατασκευής των οστών, όπως στην οστεοπόρωση, όπου

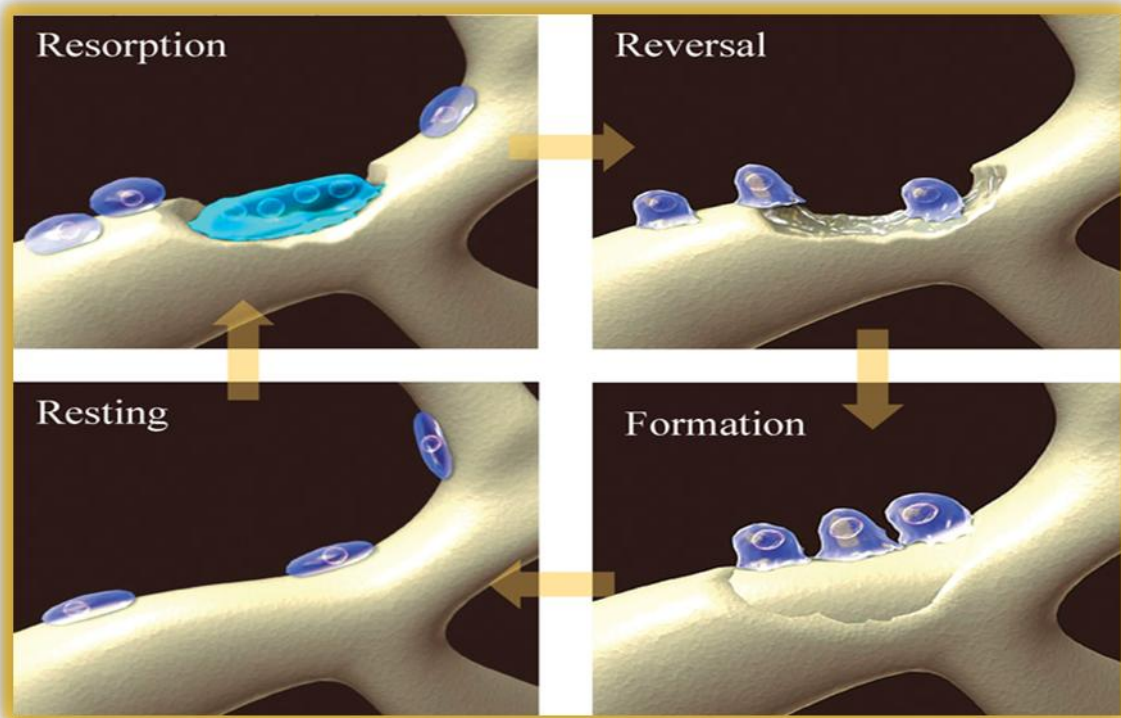
τα οστά γίνονται εύθραυστα και συμβαίνουν πολλά κατάγματα. Αυτό συμβαίνει, διότι η οστική απορρόφηση υπερτερεί της οστεοπαραγωγής με αποτέλεσμα την απώλεια της οστικής μάζας. Η ειδική αυτή λειτουργία δε φέρεται εις πέρας από μεμονωμένους οστεοκλάστες ή οστεοβλάστες, αλλά από προσωρινές ανατομικά κυτταρικές κατασκευαστικές ομάδες που καλούνται βασικές πολυκυτταρικές μονάδες (BMUs - Basic Multicellular Units) ή μονάδα οστικής ανακατασκευής (BRU - Bone Remodeling Unit). Κάθε μονάδα έχει ένα στόχο, να αντικαταστήσει ένα μικρό τμήμα του οστού, το οποίο ή είναι αρκετά παλιό ώστε να μη φέρει ικανοποιητικά εις πέρας τη μηχανική και μεταβολική του λειτουργία ή έχει υποστεί ήδη μικροσκοπικά κατάγματα. Κάθε μονάδα οστικής ανακατασκευής (BRU) δημιουργείται σε ένα ειδικό τόπο και χρόνο και διατρέχει μια ειδική απόσταση μέσα στο οστό. Η λειτουργία της διαρκεί μήνες, κατά τους οποίους μέσω ενός δικτύου μηνυμάτων, υπάρχει αρμονική λειτουργική δράση σε τόπο και χρόνο μεταξύ των κυττάρων που απαρτίζουν τη μονάδα. Αυτά είναι τα επενδυτικά κύτταρα, τα οστεοκύτταρα και βεβαίως οι οστεοκλάστες και οι οστεοβλάστες.

Καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής λοιπόν, τα οστά παρουσιάζουν μια συνεχή ανανέωση μέσω της λειτουργίας της ανακατασκευής των οστών, η οποία γίνεται κατά εστιακό τρόπο. Σκοπός της λειτουργίας αυτής είναι η εξασφάλιση της μέγιστης δυνατής μηχανικής αντοχής των οστών. Η ανανέωση αυτή συνίσταται στην αποδόμηση του παλαιού οστίτη ιστού από τους οστεοκλάστες (οστεοκλαστική λειτουργία) και την αντικατάσταση του από νέο οστίτη ιστό από τους οστεοβλάστες (οστεοβλαστική λειτουργία), όμοιο με εκείνου που απορροφήθηκε.

Ο οστεοβλαστικός σχηματισμός βρίσκεται σε σύζευξη με την οστεοκλαστική απορρόφηση του οστού. Η ισορροπία όμως αυτή δεν είναι σταθερή. Κατά την παιδική και εφηβική ηλικία, ο οστεοβλαστικός σχηματισμός υπερέρχει της οστεοκλαστικής απορρόφησης του οστού (θετικό ισοζύγιο) και έτσι υπάρχει μια βαθμιαία αύξηση της οστικής μάζας, η οποία φθάνει σε μια κορυφαία τιμή (peak bone mass) γύρω στην ηλικία των 20 ετών. Στη συνέχεια, διατηρείται υψηλή (μηδενικό ισοζύγιο) για μερικά χρόνια και κατόπιν, γύρω στο 40ό έτος αρχίζει μια συνεχής απώλεια οστικής μάζας (αρνητικό ισοζύγιο), η οποία επιταχύνεται στις γυναίκες όταν υπάρχει έλλειψη οιστρογόνων, π.χ. μετά την εμμηνόπαυση και μάλιστα κατά τα πρώτα 5-10 χρόνια. Επίσης, παρατηρείται σε όλες τις ηλικίες και στα δύο φύλα και σε διάφορες νόσους, όπως σε υπερπαραθυρεοειδισμό και σε υπερθυρεοειδισμό. Η απώλεια της οστικής μάζας οφείλεται στο ότι η οστεοκλαστική απορρόφηση υπερτερεί της οστεοβλαστικής παραγωγής.

Σε κάθε δεδομένη χρονική στιγμή, περίπου το 80% του σπογγώδους οστού και το 20% του φλοιώδους οστού υπόκειται σε οστική ανακατασκευή. Η οστεοπόρωση, η οποία οφείλεται σε αυξημένο ρυθμό οστικού μεταβολισμού, προσβάλλει κυρίως το σπογγώδες οστό γιατί αυτό είναι κυτταροβριθέστερο. Ας σημειωθεί ότι το 80% του οστικού μεταβολισμού γίνεται στο σπογγώδες οστό, το οποίο αποτελεί μόνο το 20% του σκελετού, ενώ το φλοιώδες οστό που αποτελεί το 80% του σκελετού, αριθμεί μόνο το 20% του οστικού μεταβολισμού του σκελετού. Κάθε μονάδα οστικής ανακατασκευής (BRU) είναι γεωγραφικά και χρονολογικά απομονωμένη από άλλες μονάδες ανακατασκευής, γεγονός το οποίο οδηγεί στην υπόθεση ότι η αλληλουχία των κυτταρικών γεγονότων των υπεύθυνων για την ανακατασκευή ελέγχεται τοπικά, κυρίως από μηχανικούς παράγοντες και δευτερευόντως, πιθανότατα, από αυτοκρινικούς και παρακρινικούς παράγοντες, οι οποίοι δημιουργούνται στο τοπικό μικροπεριβάλλον του οστίτη ιστού που υφίσταται τη διαδικασία της ανακατασκευής. Η επικρατέστερη άποψη υποστηρίζει ότι ενεργοποιημένοι οστεοκλάστες απορροφούν ένα τμήμα του οστού (οστική απορρόφηση) και στη συνέχεια οι οστεοβλάστες σχηματίζουν νέο οστό (οστεοβλαστική λειτουργία). Ο αριθμός των μονάδων ανακατασκευής (συχνότητα ενεργοποίησης), μαζί με την ταχύτητα με την οποία εκτελούνται οι δύο λειτουργίες, αποτελεί το ρυθμό οστικού μεταβολισμού (bone turnover rate).

Στην εικόνα 10 φαίνονται οι τέσσερις κύριες φάσεις της οστικής ανακατασκευής, οι οποίες αναλύονται λεπτομερώς παρακάτω.



Εικόνα 10: Ανακατασκευή φυσιολογικού οστού. **(i)** Οστική απορρόφηση : οι υποκινούμενοι πρόδρομοι οστεοβλάστες απελευθερώνουν παράγοντες που προκαλούν οστεοκλαστική διαφοροποίηση και δραστηριότητα. Οι οστεοκλάστες απομακρύνουν το ανόργανο μέρος του οστού δημιουργώντας ένα βοθρίο. **(ii)** Ανάστροφη φάση : μονοπύρρηνα κύτταρα προετοιμάζουν την οστική επιφάνεια για τους νέους οστεοκλάστες που θα δημιουργήσουν το νέο οστό. **(iii)** Δημιουργία: οι οστεοβλάστες συνθέτουν μια οργανικά μήτρα για να αντικαταστήσουν το απορροφούμενο οστό και να πληρώσουν το βοθρίο με νεοσχηματισμένο οστό. **(iv)** Φάση ηρεμίας ή αναπαύσεως: Το νεοσχηματισμένο οστό καλύπτεται με επίπεδα γραμμικά κύτταρα και μια περίοδος «ξεκούρασης» ξεκινάει για το οστό με χαμηλή κυτταρική λειτουργία μέχρι να ξεκινήσει ο νέος κύκλος ανακατασκευής. [25]

1.5.1 Οστική απορρόφηση

Η οστική απορρόφηση επιτελείται σε διάφορα στάδια, με τελικό αποτέλεσμα την απομάκρυνση των ανόργανων και οργανικών συστατικών του οστού από τους οστεοκλάστες, συνεπικουρούμενων από τους οστεοβλάστες. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει τη στρατολόγηση πρόδρομων οστεοκλαστών στο οστό. Αυτοί προέρχονται, όπως ήδη αναφέρθηκε, από τα μεγάλα μονοπύρρηνα του αιμοποιητικού ιστού και του αίματος. Πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε οστεοκλάστες μέσω "συνομιλίας" (cell-to-cell talk) με τους οστεοβλάστες. Ακολουθεί προετοιμασία της οστικής επιφάνειας με απομάκρυνση του μη ασβεστοποιημένου οστεοειδούς από τους παρακείμενους οστεοβλάστες, οι οποίοι παράγουν πρωτεϊνολυτικά ένζυμα (τις κολλαγενάσες, τις ζελατινάσες και τις μεταλλοπρωτεϊνάσες της θεμέλιας ουσίας). Αυτό διευκολύνει την πρόσβαση των οστεοκλαστών στο μεταλλοποιημένο οστό. Οι οστεοκλάστες

ενεργοποιούνται, αναπτύσσουν την πτυχωτή τους (σαν βούρτσα) επιφάνεια, προσκολλώνται στο οστό και το απορροφούν με τη βοήθεια ιόντων H^+ (λύση της ανόργανης φάσης) και των πρωτεολυτικών ενζύμων (κατακερματισμός της οργανικής φάσης). Τα ιόντα H^+ παράγονται μέσα στο κύτταρο με τη βοήθεια της καρβονικής ανυδράσης II, η οποία βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα κοντά στην πτυχωτή επιφάνεια. Ο κατακερματισμός της οργανικής φάσης γίνεται με τη λυσοσωμική κυστεϊνική πρωτεϊνάση και τις μεταλλοπρωτεϊνάσες. Οι οστεοκλάστες τελικά, υπόκεινται στο μηχανισμό της απόπτωσης, δηλαδή σε προγραμματισμένο θάνατο, σηματοδοτώντας το τέλος της οστικής απορρόφησης η οποία διαρκεί 7-10 ημέρες. Ο μηχανισμός, ο οποίος απενεργοποιεί τους οστεοκλάστες, δεν είναι απόλυτα εξακριβωμένος. Για την ερμηνεία του υπάρχουν διάφορες θεωρίες.

Κατά τη διάρκεια της απορρόφησης, οι οστεοκλάστες απελευθερώνουν τοπικούς παράγοντες από τα οστά, οι οποίοι, ενώ παρέμεναν ανενεργοί εντός της οστικής μάζας, ενεργοποιούνται αμέσως μετά την απελευθέρωσή τους προκαλώντας δύο επιδράσεις: αναστέλλουν τη λειτουργία των οστεοκλαστών και διεγείρουν τη δραστηριότητα των οστεοβλαστών. Επιπροσθέτως οι ίδιοι οι οστεοκλάστες με τις ουσίες που εκκρίνουν εκτός από την αρνητική ρύθμιση στη δραστηριότητά τους προκαλούν και αύξηση της λειτουργίας των οστεοβλαστών. Τελικά οι οστεοκλάστες, όταν επιτελέσουν το απορροφητικό τους έργο, εκκρίνουν πρωτεΐνες, οι οποίες δημιουργούν το υπόστρωμα για την προσκόλληση των οστεοβλαστών.

Οι οστεοκλάστες είναι κύτταρα πλούσια σε μιτοχόνδρια για να παρέχουν τις μεγάλες ποσότητες ATP, οι οποίες είναι απαραίτητες για τις ενδοκυττάρειες και εξωκυττάρειες ανταλλαγές των ιόντων και των άλλων μεταβολικών διεργασιών. Τα πρωτεολυτικά ένζυμα συντίθενται και προσλαμβάνονται από το σύμπλεγμα Golgi για να μεταφερθούν τελικά στην οστική επιφάνεια η οποία πρόκειται να απορροφηθεί. Η ανόργανη φάση του οστού απορροφάται με τη βοήθεια των ιόντων H^+ τα οποία παράγονται από τον οστεοκλάστη, ενώ η οργανική φάση των οστών διασπάται με τη βοήθεια των πρωτεολυτικών ενζύμων τα οποία παράγει το ίδιο κύτταρο.

Η οστική απορρόφηση γενικά, είναι ένας πολύπλοκος μηχανισμός που ρυθμίζεται από τρεις κυρίους παράγοντες:

1. *Ορμόνες.* Η παραθορμόνη (PTH), το σχετικό με την παραθορμόνη πεπτίδιο (PTHrP) και η $1,25(OH)_2D_3$ αυξάνουν την οστική απορρόφηση. Η καλσιτονίνη την ελαττώνει. Στις ορμόνες που επηρεάζουν την οστική απορρόφηση συγκαταλέγονται επίσης τα

οιστρογόνα και η τεστοστερόνη, οι οποίες προκαλούν ελάττωση της οστικής απορρόφησης και η θυροξίνη και τα γλυκοκορτικοειδή, τα οποία προκαλούν αύξηση.

2. *Κυτοκίνες και άλλοι παρακρινικοί παράγοντες.* Οι σπουδαιότεροι από αυτούς, οι οποίοι προκαλούν αύξηση της οστικής απορρόφησης, είναι: IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, TNF α , TNF β , Macrophage colony- stimulating factor (M-CSF), Stem cell factor (SCF), Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), Transforming Growth Factor β (TGF β), IL- 10, IL-13, Oncostatin-M.
3. *Μηχανικοί παράγοντες.* Τα μικροκατάγματα που συμβαίνουν συνεχώς κατά τη διάρκεια της ζωής και τα μηχανικά ερεθίσματα ρυθμίζουν τον οστικό μεταβολισμό. Τα τελευταία λειτουργούν μάλιστα με ένα μηχανισμό αλληλορύθμισης, ο οποίος καλείται "μηχανοστάτης".

1.5.2 Φάση της αναστροφής

Μετά την επίτευξη του μέγιστου βάθους στο σημείο της απορρόφησης από τη δράση των οστεοκλαστών, ακολουθεί η ανάστροφη φάση που διαρκεί περίπου 9 ημέρες. Κατά τη διάρκεια της φάσης αυτής, εξαφανίζονται οι οστεοκλάστες και εμφανίζονται κύτταρα προσομοιάζοντα με τα μακροφάγα (είδος οστεοβλαστών). Τα κύτταρα αυτά πιθανόν εκλύουν παράγοντες που αναστέλλουν τη λειτουργία των οστεοκλαστών και διεγείρουν τους οστεοβλάστες, ενώ παράλληλα απομακρύνουν την υπόλοιπη θεμέλια ουσία, επειδή είναι πλούσια σε κολλαγενάση.

1.5.3 Οστική Παραγωγή

Η αλληλουχία των γεγονότων του οστικού σχηματισμού περιλαμβάνει τον πολλαπλασιασμό των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων, τη διαφοροποίηση αυτών σε προδρόμους οστεοβλάστες (πρώιμο οστεογενετικό κύτταρο, προ-οστεοβλάστης), την ωρίμανση σε ώριμους οστεοβλάστες, το σχηματισμό της οργανικής φάσης και τελικά την ασβεστοποίηση. Οι οστεοβλάστες που συγκλίνουν στη βάση της οστικής κοιλότητας, την οποία δημιούργησαν προηγουμένως οι οστεοκλάστες, παράγουν το οστεοειδές, το οποίο αρχίζει να ασβεστοποιείται μετά από 13 περίπου ημέρες με ένα αρχικό ρυθμό περίπου 1 μm /ημέρα. Οι οστεοβλάστες συνεχίζουν να παράγουν και να ασβεστοποιούν το οστεοειδές μέχρι να γεμίσουν την κοιλότητα. Σε φυσιολογικά άτομα, η λειτουργία αυτή

διαρκεί 124-128 ημέρες. Τα δραστήρια οστεοβλαστικά κύτταρα μετατρέπονται σιγά - σιγά σε επίπεδα, σχεδόν ανενεργά κύτταρα - τα επενδυτικά κύτταρα - και μερικά από αυτά διαφοροποιούνται σε οστεοκύτταρα που παγιδούνται στο νεοσχηματισμένο οστό.

Μετά τον οστικό σχηματισμό ακολουθεί η φάση ηρεμίας ή αναπαύσεως (resting phase), που παρατηρείται στον ώριμο οστίτη ιστό και χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη μόνο των λειτουργικών δράσεων, των επενδυτικών κυττάρων των κυττάρων επιφάνειας και των οστεοκυττάρων. Φυσιολογικά σχηματίζεται τόσο νέο οστό, όσο απορροφήθηκε. [3]

1.6 Παράγοντες που επηρεάζουν τον οστικό μεταβολισμό

Ο μεταβολισμός των οστών εξαρτάται από τροφικούς, ορμονικούς και μηχανικούς παράγοντες.

1. Οι τροφικοί παράγοντες είναι απαραίτητοι για τη σύνθεση του οργανικού υποστρώματος (λευκώματα, βιταμίνες A και C) και την οστεοποίηση του (Ca, P και βιταμίνη D). Η βιταμίνη D θεωρείται σήμερα ουσία που δρα ορμονικά.
2. Στους ορμονικούς παράγοντες περιλαμβάνονται: η αυξητική ορμόνη, η παραθορμόνη, η καλσιτονίνη, οι ορμόνες των γεννητικών αδένων (ανδρογόνα, οιστρογόνα), τα γλυκοκορτικοειδή και η θυροξίνη.

Η αυξητική ορμόνη δρα πάνω στα χονδροκύτταρα του συζευκτικού χόνδρου και συντελεί στην αύξηση σε μήκος των οστών με τη συνεργασία της θυροξίνης, ενώ οι γεννητικές ορμόνες αναστέλλουν την αύξηση και προκαλούν σύγκλιση του συζευκτικού χόνδρου.

Η δράση της παραθορμόνης συνίσταται στη διατήρηση του Ca και P του αίματος σε σταθερά επίπεδα. Αυτό γίνεται κυρίως με απελευθέρωση Ca από τα οστά και κατά δεύτερο λόγο με αύξηση της απορρόφησής του από το έντερο και της επαναπορρόφησης του από τα νεφρικά σωληνάκια. Ερέθισμα για την έκκριση της παραθορμόνης αποτελεί η ελάττωση του Ca του αίματος. Στα οστά η παραθορμόνη ενεργοποιεί τους οστεοκλάστες και τα οστεοκύτταρα, πράγμα που οδηγεί σε οστεόλυση. Η οστεόλυση που γίνεται με τη βοήθεια των οστεοκυττάρων (περιοστεοκυτταρική οστεόλυση), παρουσιάζεται πριν ακόμα ενεργοποιηθούν οι οστεοκλάστες (mini remodeling).

Η καλσιτονίνη είναι ορμόνη που εκκρίνεται από ορισμένα κύτταρα του θυροειδούς (κύτταρα C) σε περίπτωση που αυξάνεται το Ca^{2+} του αίματος και αναστέλλοντας την

οστεόλυση επαναφέρει το Ca^{2+} στα φυσιολογικά επίπεδα. Δρα ανταγωνιστικά προς την παραθορμόνη μαζί με την οποία ρυθμίζει την ομοιόσταση του ασβεστίου.

Τα γλυκοκορτικοειδή αναστέλλουν την αύξηση σε μήκος των οστών σε νεαρά άτομα, ενώ σε ενήλικες προκαλούν οστεοπόρωση (αναστολή σύνθεσης λευκωμάτων, κακή απορρόφηση του Ca από το έντερο εξαιτίας ανταγωνιστικής δράσης προς τη βιταμίνη D).

Η βιταμίνη D διευκολύνει την απορρόφηση του Ca από το έντερο, αναστέλλει την αποβολή του Ca από τα νεφρά και είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική εναπόθεσή του πάνω στο συζευκτικό χόνδρο και το οστεοειδές. Η βιταμίνη D, που παίρνεται με την τροφή, ενεργοποιείται καθώς περνά μέσα από το ήπαρ και τα νεφρά.

Στους παράγοντες που αυξάνουν την οστική ανακατασκευή (αναβολικοί παράγοντες) περιλαμβάνεται και το φθόριο, παράγεται όμως αμφιβόλου ποιότητας οστό, οι μικρές διακεκομμένες δόσεις παραθορμόνης και τα ανάλογά της, οι πεπτιδικοί αυξητικοί παράγοντες (IGF-I, IGF-II, Fibroblast CF, TGF-β), όπως και οι διακεκομμένες δόσεις προσαγλανδινών.

3. Οι μηχανικοί παράγοντες (συνολική κίνηση μυών - βαρύτητα) είναι απαραίτητοι για τη μεταβολή του ανώριμου οστίτη ιστού σε ώριμο, που γίνεται με προσανατολισμό των οστικών πεταλίων και δοκίδων, καθώς και για τη διατήρηση των αλάτων στα οστά (αντίθετα σε περίπτωση ακινητοποίησης έχουμε αφαλάτωση). Επίσης επηρεάζουν το σχήμα των οστών, ιδιαίτερα στη βρεφική ηλικία. [2,3]

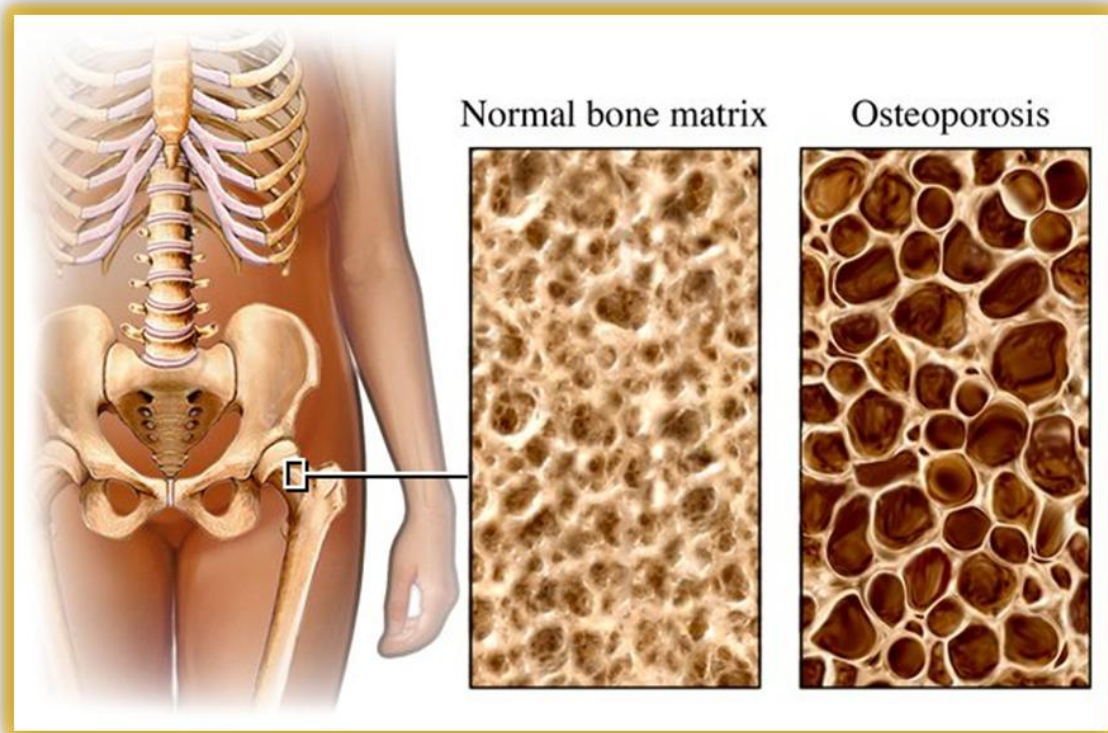
1.7 Οστεοπόρωση

Οι μεταβολικές νόσοι των οστών περιλαμβάνουν μια ομάδα γενικευμένων νόσων, που αφορούν αλλοιώσεις στην σύσταση των οστών. Αυτές διακρίνονται σε δύο κατηγορίες:

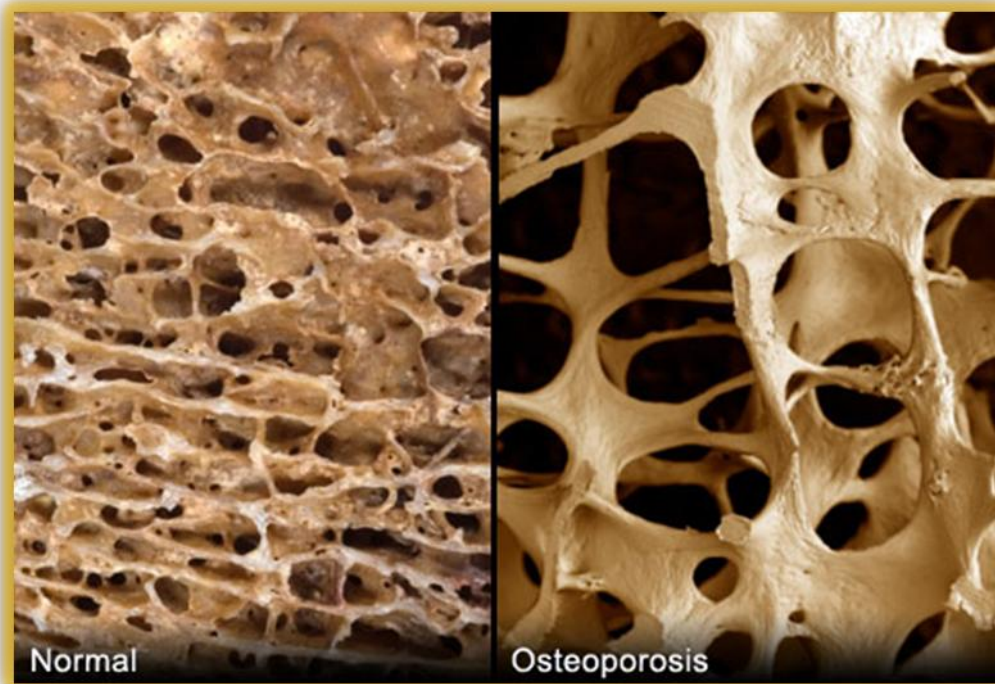
- Σε αυτές που αφορούν διαταραχές της ισορροπίας οστεοβλαστών/οστεοκλαστών.
- Σε αυτές που αφορούν διαταραχές στη σχέση οστεοειδούς/αλάτων ασβεστίου.

Τα κυριότερα παραδείγματα της πρώτης ομάδας είναι η οστεοπόρωση, η κυστική ινώδης οστεΐτιδα και η νόσος του Paget και της δεύτερης η οστεομαλακία και η ραχίτιδα [6].

Η οστεοπόρωση χαρακτηρίζεται από ποσοτική διαταραχή της οστικής μάζας (ελάττωση οστικής μάζας ανά μονάδα όγκου)(εικόνα 26). Η ασβεστοποίηση του οστού είναι φυσιολογική, αλλά η δομή του είναι ανώμαλα πορώδης και η αντοχή του ελαττωμένη. Η οστική απορρόφηση, επειδή δεν εξισορροπείται από οστική αναγέννηση, οδηγεί σε εξασθένηση του οστού και συνεπώς σε αυξημένη συχνότητα εμφάνισης καταγμάτων. Ο σκελετό λιγότερο ανθεκτικό σε μηχανικές καταπονήσεις με αποτέλεσμα την παραμόρφωση των οστών και ιδιαίτερα των σπονδύλων. Έτσι στη θωρακική μοίρα προκαλείται καθίζηση και σφηνοειδής παραμόρφωση των σπονδύλων με συνέπεια την κύφωση, ενώ στην οσφυϊκή αποπλάτυση κι αμφίκουλη διαμόρφωση με αποτέλεσμα την ελάττωση του ύψους του αρρώστου [1,2].



Εικόνα 11: Φυσιολογικό οστό (αριστερά) και οστεοπορωτικό (δεξιά). [26]



Εικόνα 12: Φυσιολογικό οστό (αριστερά) και οστεοπορωτικό (δεξιά). [27]

Η οστεοπόρωση διακρίνεται σε πρωτοπαθή που είναι αποτέλεσμα γήρατος (εικόνα 13) και ελαττωμένης ορμονικής δραστηριότητας (μεταεμμηνοπαυσιακή) και σε δευτεροπαθή, που είναι αποτέλεσμα ενδοκρινολογικών (υπερθυρεοειδισμός), μεταβολικών (αλκοολισμός) ή νεοπλασματικών διαταραχών (πολλαπλούν μυέλωμα και καρκινωμάτωση) [1]. Επιπλέον η οστεοπόρωση μπορεί να είναι τοπική, όπως συμβαίνει ύστερα από ακινησία μέλους (ατροφία), σε κακοήθεις όγκους, στη ρευματοειδή αρθρίτιδα ή και σε διάφορες φλεγμονές ή γενικευμένη [2,6].



Εικόνα 13: Η σπονδυλική στήλη με την πάροδο του χρόνου. [28]

Η ιστολογική ετερογένεια της οστεοπόρωσης, μπορεί να ταξινομηθεί σε τρεις κύριους τύπους:

1. Οστεοπόρωση με αμετάβλητο ρυθμό ανακατασκευής, η οποία παρατηρείται πιο συχνά και αποτελεί το 50% των περιπτώσεων. Δεν υπάρχει διαταραχή στην επιμετάλλωση, όπως αυτό φαίνεται από το φυσιολογικό πάχος του οστεοειδούς. Η οστεοβλαστική δραστηριότητα ή η ταχύτητα σχηματισμού του οστεοειδούς είναι η ίδια με την ταχύτητα της επιμετάλλωσης. Όμως, υπερτερεί και των δύο η ταχύτητα απορρόφησης του οστού, με αποτέλεσμα τελικά να παρατηρείται αυξημένη συχνότητα οστεοπενίας.
2. Οστεοπόρωση με μειωμένη οστεοβλαστική δραστηριότητα, η οποία έχει συχνότητα 20%. Σε αυτούς τους ασθενείς η οστική απορρόφηση είναι φυσιολογική, αλλά η οστεοβλαστική δράση είναι μειωμένη. Το ανά οστική μεταβολική μονάδα έλλειμμα είναι αυξημένο με αποτέλεσμα να έχουμε υψηλού βαθμού οστική απώλεια.
3. Οστεοπόρωση με ταχύ ρυθμό ανακατασκευής, κατά την οποία η αυξημένη οστική απορρόφηση συνδυάζεται με την επέκταση των επιφανειών οστεοσύνθεσης. Η αυξημένη οστική απώλεια, κάτω από αυτές τις συνθήκες, είναι το αποτέλεσμα της αύξησης του αριθμού των οστικών μεταβολικών μονάδων (BMU) οι οποίες δραστηριοποιούνται, με αποτέλεσμα να έχουμε πολλαπλασιασμό των ελλειμμάτων για κάθε BMU.

Στην οστεοπόρωση, δύο μεταβολικές καταστάσεις θεωρούνται ως κύριες σχετικά με το ρυθμό της οστικής ανακατασκευής: Η υψηλού ρυθμού απώλεια και η χαμηλού ρυθμού απώλεια οστικής μάζας. Και οι δύο καταστάσεις οδηγούν σε μια καθαρή απώλεια οστίτη ιστού. Και οι δύο μορφές μπορούν να εμφανιστούν στον ίδιο ασθενή, αντικαθιστώντας η μία την άλλη. Μεταξύ αυτών παρατηρούνται και ενδιάμεσες καταστάσεις.

1.7.1 Αίτια

Η οστεοπόρωση στο μεγαλύτερο ποσοστό είναι άγνωστης αιτιολογίας, οπότε και λέγεται ιδιοπαθής, σ' ένα όμως μικρό ποσοστό προκαλείται από γνωστά αίτια π.χ. μακροχρόνια χορήγηση κορτιζόνης. Γενικά στη δημιουργία οστεοπόρωσης παίζουν ρόλο:

1. Η ηλικία

2. Ορμονικοί παράγοντες: Έλλειψη οιστρογόνων στις γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση και ελάττωση των ανδρογόνων στους άνδρες.
3. Παράγοντες διατροφής: Ελάττωση στην πρόσληψη και απορρόφηση ασβεστίου από το έντερο.
4. Μηχανικοί παράγοντες: Περιορισμός της δραστηριότητας, που συμβαίνει φυσιολογικά με το πέρασμα της ηλικίας, οδηγεί σε ελάττωση των μηχανικών ερεθισμάτων που είναι απαραίτητα για την φυσιολογική ανακατασκευή του οστού (αύξηση του ρυθμού οστεόλυσης σε βάρος της οστεοπαραγωγής).
5. Γενετικοί παράγοντες: Η μαύρη φυλή σπάνια παθαίνει οστεοπόρωση σε αντίθεση με την λευκή [2].
6. Τέλος έλλειψη βιταμίνης D (είτε διαιτολογικό έλλειμμα είτε μειωμένη έκθεση στο ηλιακό φως). Χαρακτηριστική υπόμνηση ότι η βιταμίνη D είναι απαραίτητη είναι η εμφάνιση οστεομαλάκυνσης στις Βεδουίνες της Αραβίας οι οποίες ντύνονται έτσι ώστε μόνο τα μάτια τους να εκτίθενται στο φως του ήλιου [7].

Κλινικά η πάθηση εκδηλώνεται κυρίως σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση με διάχυτους πόνους στα οστά ιδιαίτερα στη οσφυϊκή και θωρακική μοίρα της σπονδυλικής στήλης (οσφυαλγία, ραχιαλγία) μπορεί όμως να είναι και ασυμπτωματική. Οι κινήσεις της σπονδυλικής στήλης είναι περιορισμένες και συχνά επώδυνες. Η διάγνωση της οστεοπόρωσης γίνεται με τον έλεγχο της οστικής μάζας [2,6].

1.7.2 Θεραπεία

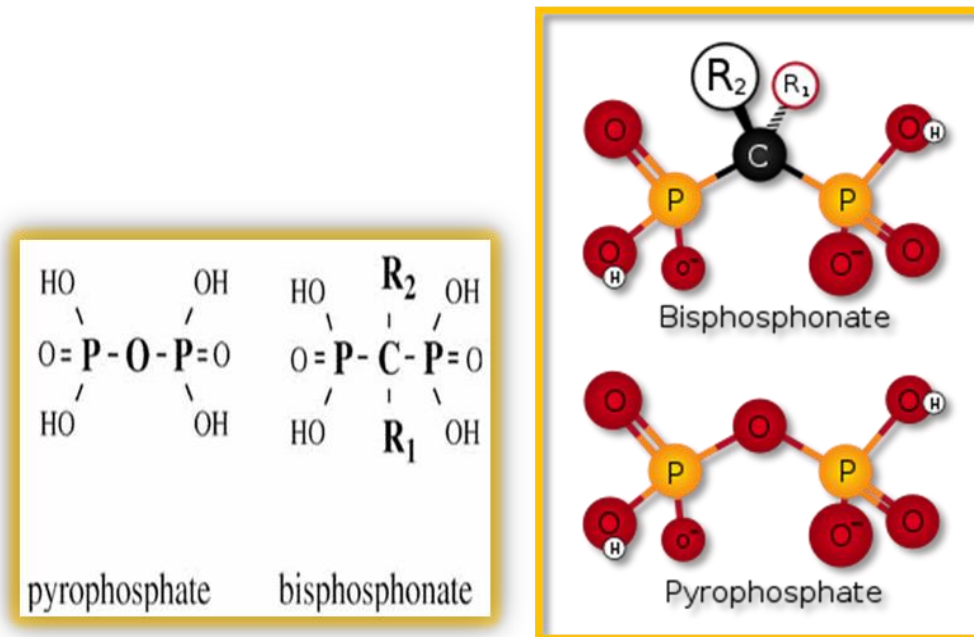
Δεν υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία με την έννοια της επαναποκατάστασης της οστικής μάζας στα αρχικά φυσιολογικά επίπεδα. Η υποχώρηση του πόνου και η αναστολή στην περαιτέρω εξέλιξη της πάθησης αποτελούν τους κύριους στόχους κάθε θεραπευτικού σχήματος. Χορηγούνται οιστρογόνα, αναβολικά, ασβέστιο και βιταμίνη D. Επιπλέον χρησιμοποιείται η καλσιτονίνη (ορμόνη που ρυθμίζει την ομοιόσταση του ασβεστίου) , μόνη της ή σε συνδυασμό με ασβέστιο και βιταμίνη D. Τα πλέον όμως αποτελεσματικά φάρμακα στην πρόληψη των οστεοπορωτικών φαρμάκων είναι τα διφωσφονικά τα οποία αναστέλλουν την οστική απορρόφηση. Υποβοηθητική είναι η φυσικοθεραπεία με τη μορφή τοπικής θερμότητας και ελαφρών ασκήσεων [2,3].

2. Διφωσφονικά οξέα

2.1 Εισαγωγή

Στη δεκαετία του '60 ο Fleisch και οι συνεργάτες του ανακάλυψαν ότι στο πλάσμα αίματος, στο αρθρικό υγρό και στα ούρα περιέχονται συστατικά που εμποδίζουν τη δημιουργία ιζήματος φωσφορικού ασβεστίου και ότι μέρος της δράσης αυτής οφείλεται στο πυροφωσφορικό οξύ (PPi). Το ανόργανο άλας του πυροφωσφορικού οξέος που παρουσιάζει μεγάλη χημική ομοιότητα με τους κρυστάλλους ασβεστίου, εμποδίζει το σχηματισμό και τη διάλυσή τους *in vitro* και καθώς και την ασβεστοποίηση (εφαλάτωση) *in vivo*. Αποτελεί έναν φυσικό αναστολέα της δημιουργίας υδροξυαπατίτη στο εξωκυττάριο υγρό [8].

Τα διφωσφονικά άλατα (Bis-Phosphonates, BPs) είναι συνθετικά ανάλογα του φυσικού πυροφωσφορικού οξέως στα οποία το οξυγόνο στον δεσμό P-O-P έχει αντικατασταθεί από άνθρακα (P-C-P) (εικόνα 14). Αποτελούνται από δύο φωσφονικές ομάδες ενωμένες με φωσφοαιθερικούς δεσμούς σε κεντρικό άνθρακα. Τα πυροφωσφορικά άλατα είναι αδύνατον να χρησιμοποιηθούν διαγνωστικά ή θεραπευτικά γιατί έχουν εξαιρετικά βραχύβια παρουσία στον οργανισμό, εξαιτίας της ταχύτατης ενζυματικής υδρόλυσης στη οποία υπόκεινται από τις πυροφωσφατάσες, παράγοντας φωσφορικά. Η μοριακή μεταβολή των ενώσεων αυτών σε σχέση με το πυροφωσφορικό, η αντικατάσταση δηλαδή του οξυγόνου με άνθρακα, τις καθιστά σταθερές και ανθεκτικές στην ενζυματική υδρόλυση από τις φωσφατάσες, βραδύτατα μεταβολιζόμενες και με μεγάλη ημιπερίοδο ζωής, που αγγίζει τα 10 έτη. Η δομή τους, τους δίνει τη δυνατότητα να ενώνονται χημικά με ιόντα ασβεστίου και συνεπώς τη δυνατότητα να στοχεύουν το ανόργανο μέρος του οστού *in vivo* [3,9].



Εικόνα 14: Τα διφωσφονικά άλατα είναι συνθετικά ανάλογα του φυσικού πυροφωσφορικού οξέως στα οποία το οξυγόνο στον δεσμό P-O-P έχει αντικατασταθεί από άνθρακα (P-C-P). [29]

Ενώσεις διφωσφονικών οξέων είναι γνωστές εδώ και 4 δεκαετίες. Συντέθηκαν από Γερμανούς επιστήμονες το 1965. Τα διφωσφονικά αρχικά χρησιμοποιήθηκαν σε διάφορες βιομηχανικές εφαρμογές, μεταξύ αυτών ως ανασταλτικοί παράγοντες επικάλυψης. Το 1968–1969 αποδείχθηκε ότι οι ενώσεις αυτές έχουν και βιολογική εφαρμογή και ιδιαίτερα στον οστίτη ιστό. Κάθε ένα από τα διφωσφονικά άλατα διαθέτει μοναδικό προφίλ ως προς τα φυσικοχημικά και βιολογικά του χαρακτηριστικά, για παράδειγμα διαφέρουν ως προς την ικανότητα σύνδεσης τους με το ανόργανο μέρος του οστού, και για το λόγο αυτό κάθε ένωση θα πρέπει να θεωρείται μοναδική ως προς τη δράση και τη συμπεριφορά της. [10]

Την αντιαπορροφητική δράση (antiresorption) των διφωσφονικών αξιοποιεί σε μεγάλο βαθμό η φαρμακευτική επιστήμη. Διάφορα διφωσφονικά φάρμακα έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στην θεραπεία διαφορετικών νοσημάτων, όπως είναι η οστεοπόρωση, η νόσος του Paget, η υπερασβεσταιμία, ο πρωτοπαθής υπερπαραθυρεοειδισμός, η ατελής οστεογένεση, οστεοπόρωση από κορτικοστεροειδή αλλά και οι σκελετικές επιπλοκές διάφορων κακοήθων νεοπλασμάτων, με κυριότερα το πολλαπλούν μύελωμα, τον καρκίνο του μαστού και τον καρκίνο του προστάτη (σε οστικές μεταστάσεις) [11].

Στους ασθενείς με οστεοπόρωση, τα διφωσφονικά αναστέλλουν την οστική απώλεια και αυξάνουν την οστική πυκνότητα, με αποτέλεσμα την ελάττωση των παθολογικών

καταγμάτων. Λόγω της ομοιότητας τους με το πυροφωσφορικό οξύ, δεσμεύονται εύκολα από τους κρυστάλλους του υδροξυαπατίτη, δημιουργώντας τοπικά κατάλληλο όξινο περιβάλλον (*in vitro*) και έχουν ισχυρή αντιοστεοκλαστική και αντι-οστεοαπορροφητική δράση μέσω καταστολής των οστεοκλαστών (*in vivo*). Στους ασθενείς με κακοήθη νεοπλασμάτα, τα διφωσφονικά εκτός από την ανασταλτική επίδρασή τους στους οστεοκλάστες η οποία είναι ευεργετική στην οστεόλυση και στον περιορισμό της υπερασβεστιαμίας επιπλέον έχουν άμεσο αποτελέσματα στα καρκινικά κύτταρα. Κατά την θεραπεία με διφωσφονικά παρατηρείται επαγωγή της απόπτωσης κατά την οποία ο οργανισμός «απαλλάσσεται» από τα καρκινικά κύτταρα, παρεμπόδιση της αγγειογένειας, μείωση της προσκόλλησης καρκινικών στις οστικές μήτρες, υποκίνηση των g- και d-T-κυττάρων και παρεμπόδιση των μεταλλοπρωτεΐναισών (υπεύθυνες για την αντιγραφή μίας μεγάλης ποικιλίας ογκογονιδίων). Γενικά τα φάρμακα αυτά βοηθούν στον έλεγχο της οστικής απώλειας που προκαλούν οι οστικές μεταστάσεις και οδηγούν στη μείωση των σκελετικών τους επιπλοκών όπως ο πόνος, τα κατάγματα και η υπερασβεστιαμία, αλλά και στον περιορισμό των ίδιων των οστικών μεταστάσεων [12,13].

2.2 Δομικά χαρακτηριστικά

Ο άνθρακας της ομάδας P-C-P έχει εκτός από τις δύο φωσφονικές ομάδες και δύο πλάγιες αλυσίδες R_1 και R_2 . Οι δύο φωσφονικές ομάδες είναι απαραίτητες τόσο για τη σύνδεση με το ανόργανο μέρος του οστίτη ιστού ιδιαίτερα στα σημεία ενεργού οστικής ανακατασκευής, όσο και για την αντιαπορροφητική δράση με κυτταρική διαμεσολάβηση. Μετατροπές σε μία από τις δύο ομάδες μπορεί να μειώσουν δραματικά την ικανότητα σύνδεσης των διφωσφονικών αλάτων με τον οστικό υδροξυαπατίτη και τη βιοδιαθεσιμότητα τους. Οι άλλες δύο θέσεις του ατόμου του άνθρακα είναι δυνατό να συνδεθούν ομοιοπολικά με άλλο άτομο άνθρακα ή οξυγόνου ή αλογόνου ή θείου ή αζώτου, οδηγώντας σε έναν τεράστιο αριθμό πιθανών ενώσεων. Η δομή P-C-P επιτρέπει μεγάλη ποικιλομορφία δομών στις ενώσεις αυτές, απλά και μόνο αλλάζοντας τις πλευρικές αλυσίδες των ατόμων άνθρακα. Οι αλυσίδες αυτές, R_1 και R_2 , είναι υπεύθυνες για το μεγάλο φάσμα δράσεων ανάμεσα στα διάφορα διφωσφονικά. Μικρές αλλαγές στη δομή των πλάγιων αλυσίδων οδηγούν σε σημαντικές φυσικοχημικές, βιολογικές και θεραπευτικές διαφορές και κάθε φωσφονικό θα πρέπει να εξετάζεται μεμονωμένα [14,15].

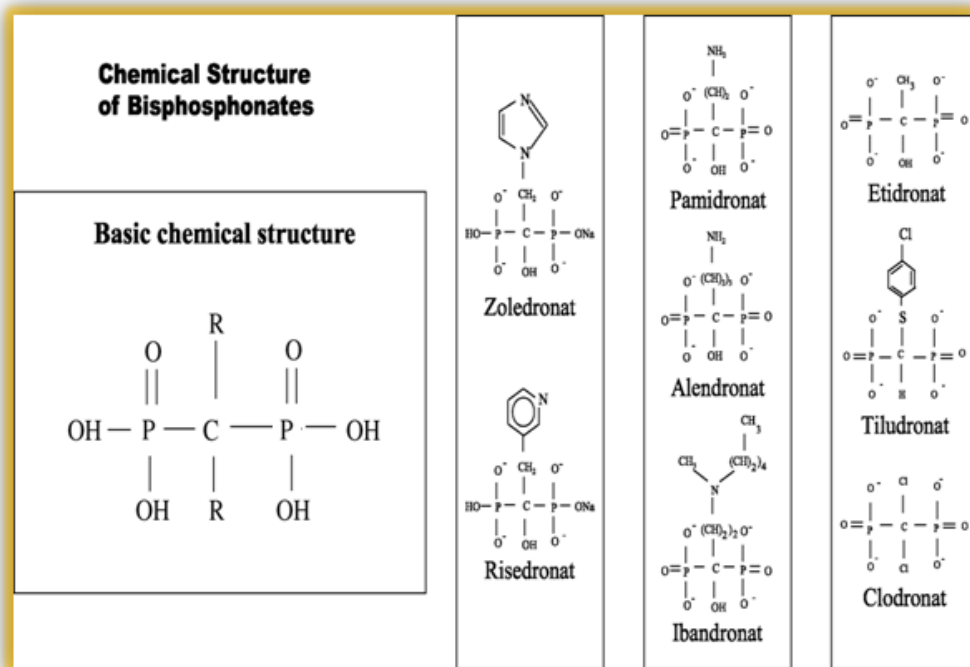
Η R_1 είναι συνήθως μια υδροξυλομάδα, καθώς ενισχύει τη συγγένεια των ενώσεων αυτών με τα μεταλλικά στοιχεία του οστού αλλά έχει μικρή επιρροή στην αντιαπορροφητική δυνατότητα τους [9].

Η R_2 πλευρική αλυσίδα είναι το κύριο στοιχείο που καθορίζει τις διαφορετικές τάξεις διφωσφονικών φαρμάκων. Ανάλογα με τη χημική τροποποίηση του μορίου, το χρόνο συνθέσεως και την αντι-οστεοαπορροφητική ισχύ των διαφόρων διφωσφονικών διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες

- α) τα μη αμινοδιφωσφονικά πρώτης γενιάς (Ετιδρονάτη, Κλοροδρονάτη, Τιλουδρονάτη),
- β) τα αμινοδιφωσφονικά δεύτερης γενιάς (Αλεδρονάτη, Παμιδρονάτη, Ριζεδρονάτη, Ιμπαδρονάτη, Olpadronate) και
- γ) τα αμινοδιφωσφονικά τρίτης γενιάς (Ζολεδρονάτη)

Η πρώτη γενιά διφωσφονικών φαρμάκων έχουν μικρή R_2 πλευρική αλυσίδα, όπως για παράδειγμα μια ομάδα $-CH_3$ στο ετιδρονικό οξύ ή ένα $-Cl$ στο κλοροδρονικό. Αυτά τα διφωσφονικά, μαζί με το τιλουδρονικό το οποίο έχει για R_2 μία ομάδα χλωροφενυλθειομεθυλενίου, είναι 10 έως 1000 φορές λιγότερο δραστικά από αυτά της δεύτερης γενιάς τα οποία έχουν μια R_2 πλευρική αλυσίδα που περιέχει μια πρωτοταγή αμινομάδα όπως το παμιδρονικό και το αλεδρονικό. Η Τρίτη γενιά διφωσφονικών είναι ανάλογα του παμιδρονικού το οποίο περιέχει μια τεταρτοταγή αμινομάδα και είναι 10.000 φορές πιο δραστικά από τα φάρμακα πρώτης γενιάς. Το γεγονός αυτό επιτρέπει τη χρήση μικρότερων θεραπευτικών κλινικών δόσεων που ίσως οδηγεί σε αραιότερη εμφάνιση παρενεργειών [9].

Η προσθήκη του αζώτου στην πλευρική αλυσίδα των διφωσφονικών αυξάνει τη δραστηριότητα τους, αφού έχει παρατηρηθεί ότι τα αμινοδιφωσφονικά είναι πολύ πιο ισχυροί αναστολείς της οστικής απορρόφησης *in vivo* σε σχέση με τα μη-αμινοδιφωσφονικά [16].



Εικόνα 15: Χημικές δομές διφωσφονικών.[16]

Agent	R ₁ side chain	R ₂ side chain
Etidronate	-OH	-CH ₃
Clodronate	-Cl	-Cl
Tiludronate	-H	-S- -Cl
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 16: Γνωστά διφωσφονικά και οι πλευρικές τους ομάδες. [30]

2.3 Μηχανισμοί δράσης

Υπάρχουν πολλοί μηχανισμοί με τους οποίους τα διφωσφονικά ασκούν ανασταλτική δράση στην οστική απορρόφηση αλλά οι μηχανισμοί αυτοί δεν έχουν απόλυτα διευκρινισθεί. Η κύρια δράση των διφωσφονικών είναι η μείωση της απορρόφησης του οστού μέσω των οστεοκλαστών, οι οποίοι όπως έχει προαναφερθεί είναι υπεύθυνοι για την οστική απορρόφηση, με διάφορους μηχανισμούς στους οποίους περιλαμβάνονται:

1. αναστολή της αντλίας πρωτονίων των οστεοκλαστών, η λειτουργία της οποίας είναι απαραίτητη για τη διάλυση του υδροξυαπατίτη,
2. μείωση του σχηματισμού και της ενεργοποίησης των οστεοκλαστών και
3. αύξηση του ρυθμού απόπτωσης των οστεοκλαστών.

Η σχετική σημασία των μηχανισμών αυτών μπορεί να διαφέρει μεταξύ των διφωσφονικών και δεν είναι γνωστό εάν τα τρία αυτά αποτελέσματα επιτυγχάνονται μέσω κοινής μοριακής οδού.

Ο κύριος μηχανισμός δράσης των διφωσφονικών είναι η αύξηση της απόπτωσης ενός από τα τέσσερα βασικά είδη κυττάρων του οστίτη ιστού, των οστεοκλαστών, οι οποίοι ως γνωστόν είναι υπεύθυνοι για την οστική απορρόφηση. Τα διφωσφονικά απορροφώνται στις επιφάνειες των οστών και ιδιαίτερα στις περιοχές που υπόκεινται σε οστική ανακατασκευή. Οι οστεοκλάστες συρρέουν στην υπό ανακατασκευή περιοχή και απομονώνουν το υποκείμενο οστό. Μετά την αγκίστρωση του οστεοκλάστη στο οστό, τα διφωσφονικά απελευθερώνονται στο τοπικό όξινο περιβάλλον που δημιουργείται με αποτέλεσμα την καταστροφή του οστεοκλάστη.

Στους δευτερεύοντες μηχανισμούς δράσης περιλαμβάνεται:

Πρώτον, η παρεμβολή διφωσφονικών μεταξύ κρυσταλλικών επιφανειών και οστικών κυττάρων και η παρεμπόδιση, με τον τρόπο αυτό, της προσφύσεως πρόδρομων μορφών οστεοκλαστών στην ασβεστωμένη θεμέλια ουσία και της διαφοροποίησης των κυττάρων αυτών σε ώριμες μορφές με οστεοαπορροφητική δράση.

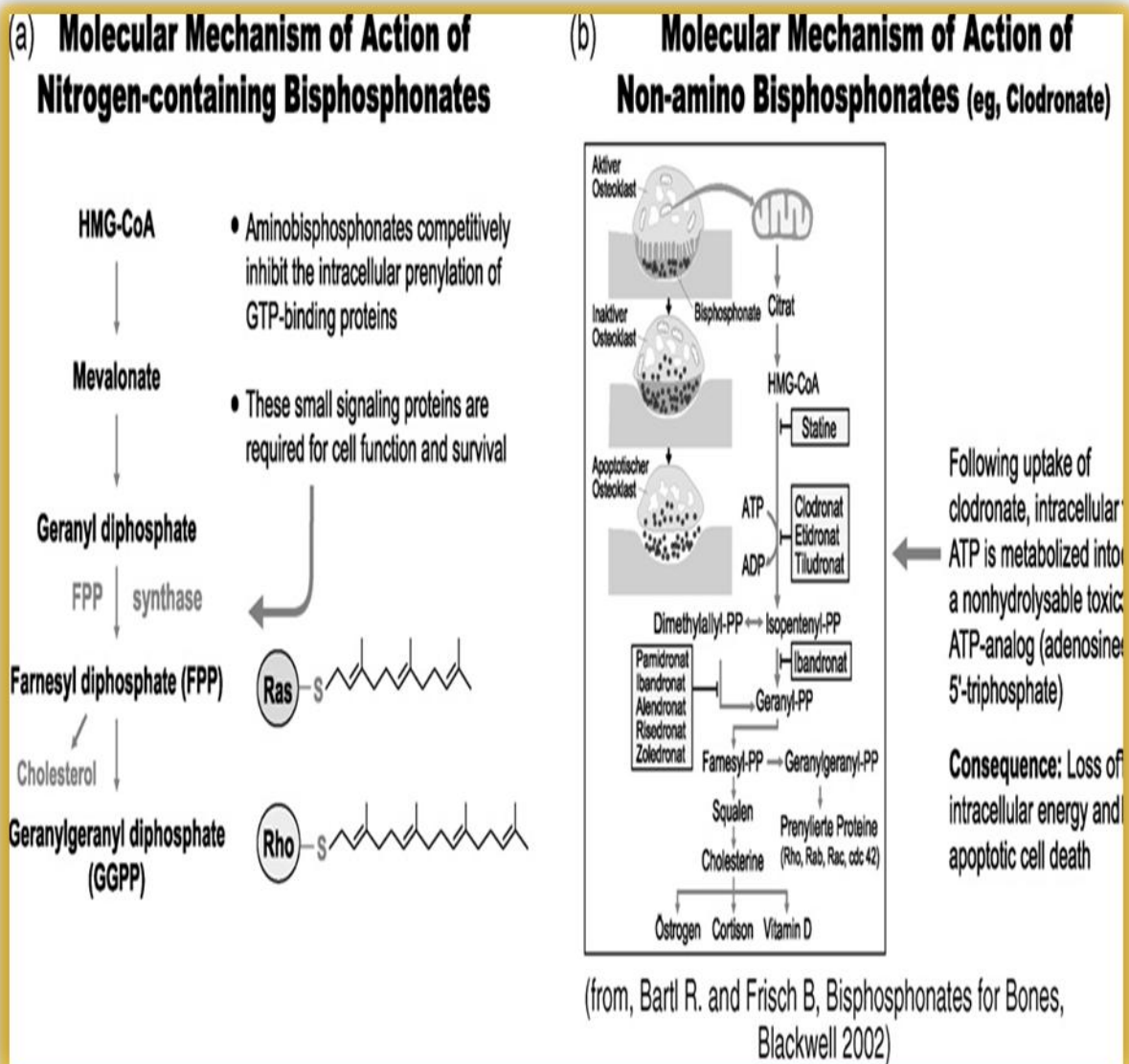
Άλλος μηχανισμός, είναι η άμεση ανασταλτική επίδραση στη δημιουργία και τη διαλυτότητα των κρυστάλλων υδροξυαπατίτη.

Τέλος έχει διαπιστωθεί διαφοροποίηση στο μηχανισμό δράσης μεταξύ των άμινο και μη-άμινο φωσφονικών [3,16,17].

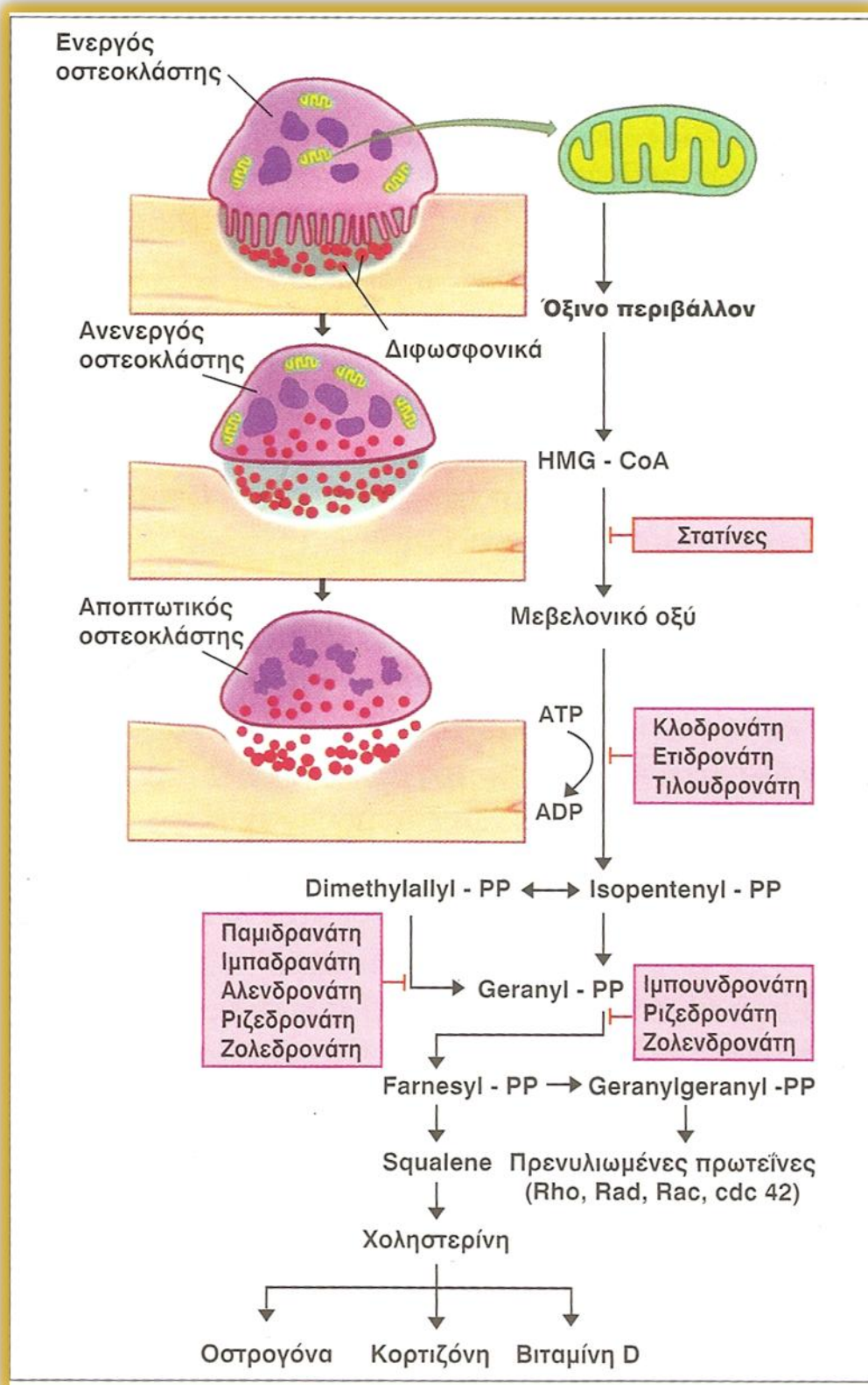
2.3.1 Διαφοροποίηση αμινοφωσφονικών και μη αμινοφωσφονικών

Τα αμινοφωσφονικά παρεμβαίνουν στη μεταβολική οδό του μεβαλονικού το οποίο είναι γνωστό για το ρόλο του στη βιοσύνθεση της χοληστερόλης και άλλων στερολών. Το μεβαλονικό υφίσταται μια σειρά βιοχημικών μετατροπών με το σχηματισμό, μεταξύ άλλων, δύο ενδιάμεσων προϊόντων: του πυροφωσφορικού γερανυλίου (geranyl pyrophosphate), το οποίο κατόπιν μετατρέπεται σε πυροφωσφορικό φαρνεσύλιο (farnesyl pyrophosphate). Η βιοσυνθετική οδός συνεχίζεται με αναγωγική συμπύκνωση δύο μορίων πυροφωσφορικού φαρνεσυλίου προς σχηματισμό του σκουαλενίου, το οποίο μετατρέπεται μετά από κυκλοποίηση σε λανοστερόλη και τελικώς σε χοληστερόλη. Μέρος του φαρνεσυλίου μετατρέπεται σε πυροφωσφορικό geranylgeranyl. Τα δύο αυτά λιποειδή πρενύλια (δηλαδή το farnesyl και το geranylgeranyl) διατίθενται για ένα είδος χημικής τροποποίησης διαφόρων πρωτεϊνών, η οποία ονομάζεται πρενυλίωση (prenylation). Η πρενυλίωση μιας πρωτεΐνης περιλαμβάνει την προσθήκη ενός μορίου farnesyl ή geranylgeranyl isoprenoid σε ένα μόριο κυστεΐνης που βρίσκεται κοντά ή είναι το C-τελικό άκρο του μορίου της πρωτεΐνης. Τα αμινοφωσφονικά δρουν αναστέλλοντας την πρενυλίωση των GTPασών πρωτεϊνών Ras, Rho, Rac και Rab. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι σηματοδοτικά μόρια σημαντικά για την επιβίωση, τη μορφολογία και λειτουργία των οστεοκλαστών και κατά κύριο λόγο ρυθμίζουν την απόπτωση (εικόνα 17a) [16].

Σε αντίθεση, τα μη-αμινοφωσφονικά που μοιάζουν περισσότερο με το πυροφωσφορικό οξύ δεν φαίνεται να δρουν στη μεταβολική οδό του μεβαλονικού. Αντί γι' αυτό φαίνεται ότι το κλωροδρονικό και άλλα διφωσφονικά της ομάδας αυτής μεταβολίζονται ενδοκυτταρικά σε μεθυλενικά ανάλογα της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) στα οποία η ομάδα P-C-P των διφωσφονικών αντικαθιστά την ομάδα P-O-P στην τριφωσφορική αδενοσίνη. Τα ανάλογα αυτά συσσωρεύονται μέσα στο κυτταρόπλασμα των οστεοκλαστών και όντας ανίκανα να υδρολυθούν παρεμποδίζουν και αναστέλουν τη δράση διαφόρων ενδοκυτταρικών μεταβολικών ενζύμων που χρησιμοποιούν την ATP, οδηγώντας έτσι σε κυτταρική τοξικότητα και άρα σε απόπτωση. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι οι μη υδρολυόμενοι μεταβολίτες αναστέλουν την μιτοχονδριακή ADP/ATP μεταφοράση και με αυτόν τον τρόπο μειώνουν τη μιτοχονδριακή κατανάλωση οξυγόνου(εικόνα 17b και 18) [16,18].



Εικόνα 17: Σχηματική απεικόνιση πιθανών μηχανισμών δράσης α)αμινοφωσφονικών και β) μη αμινοφωσφονικών.[16]



Εικόνα 18: Σχηματικός μηχανισμός τρόπου δράσης των μη αμινο-διφωσφονικών. [3]

2.4 Επίδραση στον υδροξυαπατίτη και στο ανόργανο μέρος του οστού

Είναι γνωστό ότι τα διφωσφονικά επιδρούν πολλαπλά στον υδροξυαπατίτη (HAP) με τους παρακάτω τρόπους:

1. εμποδίζουν την εκ νέου καθίζηση φωσφορικού ασβεστίου του διαλύματος,
2. καθυστερούν τον μετασχηματισμό του άμορφου υδροξυαπατίτη σε κρυσταλλικό,
3. εμποδίζουν τη συσσωμάτωση και τη διάλυση των κρυστάλλων [19].

Η ικανότητα σύνδεσης οποιουδήποτε διφωσφονικού με τον υδροξυαπατίτη καθορίζει σε σημαντικό βαθμό το πως και το που αυτό θα συνδεθεί με το οστό καθώς και τη διάρκεια της σύνδεσής του. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται η παρακάτω σειρά, η οποία δείχνει την διαφορά της ικανότητας σύνδεσης των διφωσφονικών από την άποψη της κινητικής: κλωροδρονάτη <ετιδρονάτη < ρισενδρονάτη < ιμπανδρονάτη < αλενδρονάτη < παμιδρονάτη < ζολενδρονάτη [31].

Γενικά μερικές από τις πιο σημαντικές σχέσεις δομής-δράσης που σχετίζονται με την αλληλεπίδραση διφωσφονικών και είναι οι παρακάτω:

1. Η δομή O-P-C-P-O είναι σημαντική για την πρόσδεση.
2. Η ύπαρξη υδροξυλομάδας αντί υδρογονομάδας στη θέση της πλευρικής ομάδας R1 ενισχύει τη σύνδεση του διφωσφονικού με τον υδροξυαπατίτη.
3. Ένα άτομο αζώτου και η τοποθέτησή του σε αλκυλομάδα ή σε ετεροκυκλικό δακτύλιο στην πλευρική ομάδα R2 μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική αύξηση της σύνδεσης του διφωσφονικού με τον υδροξυαπατίτη.
4. Η σύνδεση ενισχύεται και από την αμινομάδα ανάμεσα στη δομή P-C-P και την πλευρική ομάδα R2.
5. Οι μικρές αλλαγές στη χημική δομή των διφωσφονικών φαίνεται πως οδηγούν σε σημαντικές αλλαγές της τρισδιάστατης μορφής και του ατομικού προσανατολισμού. Γι'αυτό θεωρήθηκε ότι η τρισδιάστατη μορφή των αμινοδιφωσφονικών (N-BPs) και ο προσανατολισμός των ατόμων αζώτου (των πλευρικών ομάδων R2), τα οποία καθιστούν δυνατό το σχηματισμό των N-H-O δεσμών στις επιφάνειες των κρυστάλλων, επηρεάζουν σημαντικά τη σύνδεση με το ανόργανο οστό. Οι διαφορές υποστηρίζονται και από μελέτες διερεύνησης των

γωνιών και αποστάσεων ανάμεσα στους N-H-O δεσμούς. Για την καλή σύνδεση με την επιφάνεια του υδροξυαπατίτη θα πρέπει η γωνία N-H-O να είναι μεγαλύτερη ή ίση των 125° και η απόσταση N-O περίπου 3 Å.

6. Αυξάνοντας την ποσότητα των BPs σε ένα διάλυμα κρυστάλλων HAP, η ποσότητα εκείνη που συνδέεται με τους κρυστάλλους εξαρτάται από τη χημική συγγένεια που έχει κάθε διφωσφονικό με την επιφάνεια του υδροξυαπατίτη. Υπάρχουν διαφορές μεταξύ των BPs ως προς τα ποσά που μπορούν να συνδεθούν στο σημείο κορεσμού, ωστόσο, ανεξαρτήτως της χημικής συγγένειας, όλο και μεγαλύτερο μέρος των διφωσφονικών του διαλύματος συνδέεται με τον υδροξυαπατίτη έως ένα σημείο κορεσμού, που αντανακλά την ικανότητα των κρυστάλλων να προσροφούν το δεδομένο διφωσφονικό στην επιφάνειά τους. Σύμφωνα με μελέτες η ικανότητα σύνδεσης σε pH 7.4 ακολουθεί την παρακάτω σειρά: ρισεδρονάτη < ζολεδρονάτη < ιμπανδρονάτη < ετιδρονάτη < αλεδρονάτη.
7. Τα διφωσφονικά παρουσιάζουν διαφορές στα ηλεκτρικά φορτία στο άτομο του αζώτου της R2 πλευρικής ομάδας σε pH 7.4, που οδηγεί σε διαφορές του μοριακού φορτίου (zeta potential) όταν συνδέονται με τον υδροξυαπατίτη. Αυτό μπορεί να επηρεάσει πολλαπλές διεργασίες, όπως: την επιπλέον σύνδεση φορτισμένων μορίων, το συνολικό ποσό των διφωσφονικών που μπορούν να συνδεθούν στην επιφάνεια του οστίτη ιστού (loading capacity), την κυτταρική και σκελετική διανομή τους, καθώς και τις αλληλεπιδράσεις με φορτισμένα ιόντα και συστατικά της θεμέλιας ουσίας, όπως η οστεοκαλσίνη, οστεονεκτίνη, σιελοπρωτεΐνες του οστού και πρωτεογλυκάνες.
8. Το μοριακό φορτίο ενδεχομένως να επηρεάζει την ποσότητα του διφωσφονικού που συνδέεται στον υδροξυαπατίτη, όπως αποκαλύπτεται από τη μελέτη ισοθερμικών καμπυλών. Μία εξήγηση είναι ότι τα περισσότερο θετικά φορτισμένα διφωσφονικά (αλεδρονάτη, ιμπανδρονάτη, ζολεδρονάτη) δημιουργούν μια θετικότερα φορτισμένη οστική επιφάνεια που μπορεί να έλκει επιπλέον διφωσφονικά μέσω των αρνητικά φορτισμένων φωσφονικών ομάδων τους. Αυτό αυξάνει και τη συσσώρευση των διφωσφονικών και βελτιώνει την ικανότητα μέγιστης σύνδεσης στους κρυστάλλους υδροξυαπατίτη. Τα διφωσφονικά που είναι λιγότερο φορτισμένα θετικά (π.χ. ρισεδρονάτη) οδηγούν στα ακριβώς αντίθετα αποτελέσματα. Το μοριακό φορτίο επομένως αποτελεί όπως φαίνεται μία

ανεξάρτητη ιδιότητα που δεν συνδέεται άμεσα με τη χημική συγγένεια, αλλά επηρεάζει την ικανότητα σύνδεσης των διφωσφονικών [19].

2.5 Φαρμακοκινητική

Η φαρμακοκινητική των φωσφονικών είναι ιδιαίτερη. Η από του στόματος απορρόφηση των περισσότερων διφωσφονικών είναι 1-10% για μια δεδομένη δόση. Επιπλέον, η απορρόφηση μειώνεται σημαντικά όταν το φάρμακο λαμβάνεται με τροφή, ιδιαίτερα τροφές που περιέχουν ασβέστιο ή φώσφορο ή με ταυτόχρονη λήψη συμπληρωμάτων Ca^{2+} , για αυτό πρέπει να χορηγείται με κενό στομάχι και μισή έως 2 ώρες πριν από το γεύμα, μόνο με νερό. Η παμιδρονάτη, επειδή προκαλεί γαστρικό ερεθισμό χορηγείται ενδοφλεβίως. Η βιοδιαθεσιμότητα παραμένει χαμηλή μέχρι και 2 ώρες μετά τη χορήγηση. Τα διφωσφονικά απομακρύνονται γρήγορα από την κυκλοφορία, κυρίως γιατί δεσμεύονται από τον υδροξυαπατίτη των οστών. Αφού δεσμευθούν στα οστά απομακρύνονται τελικά από αυτά μέσα σε διάστημα μηνών ή ετών. Σχεδόν το μισό του απορροφούμενου φαρμάκου συσσωρεύεται στα οστά και το υπόλοιπο απεκκρίνεται αμετάβλητο μέσω νεφρικής κάθαρσης από τα ούρα. Γι' αυτό δεν θα πρέπει να χορηγούνται σε ασθενείς με σοβαρή διαταραχή της νεφρικής λειτουργίας. Η κατανομή των φαρμάκων ολοκληρώνεται σε 12-24 ώρες, στα οστά σε ποσοστό 20-50% και λιγότερο σε άλλα όργανα, όπως ήπαρ, σπλήνα και χόνδρους [3,15,19,20].

2.6 Διφωσφονικά στη θεραπεία της οστεοπόρωσης

Τα τρία διφωσφονικά που έχουν μελετηθεί αρκετά για τη θεραπεία της οστεοπόρωσης είναι η ετιδρονάτη, η αλενδρονάτη και η ριζενδρονάτη.

Η ετιδρονάτη χορηγείται σε διακοπτόμενο κυκλικό σχήμα στη δόση των 400 mg/ημέρα επί 2 εβδομάδες και διακοπή για 10-11 εβδομάδες με επαναχορήγηση κατά το ίδιο τρόπο. Σε γυναίκες με οστεοπορωτικά σπονδυλικά κατάγματα, οι μελέτες έδειξαν ότι αυτό το θεραπευτικό σχήμα είναι αποτελεσματικό στην πρόληψη νέων σπονδυλικών καταγμάτων. Αναφέρεται επίσης και μείωση της επιπτώσεως μη σπονδυλικών καταγμάτων, συμπεριλαμβανομένων αυτών του ισχίου. Αντίθετα με την ετιδρονάτη, η αλενδρονάτη χορηγείται συνεχώς σε δόση 10 mg/ημέρα. Η αγωγή αυτή μετά από δύο χρόνια συνεχούς χορήγησης, αναφέρεται ότι μείωσε την εμφάνιση καταγμάτων, καθώς και τα κατάγματα

του καρπού και του ισχίου. Τα τελευταία χρόνια, κυκλοφορεί και στην Ελλάδα η εβδομαδιαία χορήγηση του φαρμάκου σε δόση 70 mg, με σκοπό να βελτιώσει τη συμμόρφωση των ασθενών [3,15,19,20].

2.7 Παρενέργειες

Τα διφωσφονικά με χορήγηση από το στόμα μπορεί να προκαλέσουν στομαχικές διαταραχές, όπως ναυτία, διάρροια και κοιλιακά άλγη, όπως επίσης φλεγμονές και διαβρώσεις του οισοφάγου. Πρόσθετα προβλήματα που έχουν παρατηρηθεί σε ενήλικους και έχουν περιγραφεί στην ιατρική βιβλιογραφία περιλαμβάνουν πόνο των μυών, ενόχληση των ματιών και πονοκέφαλος, "σύνδρομο γρίπης", αναιμία και νεφροτοξικότητα. Η πιο σοβαρή παρενέργεια από τα διφωσφονικά είναι η οστεονέκρωση στην κάτω γνάθο. Ανάλογα με το στάδιο εξέλιξης μπορεί να συνοδεύεται από πόνο και φλεγμονή ή να οδηγεί σε κατάγματα και εκτεταμένη οστεόλυση [16,21,22].

3. Φάρμακα και η πορεία τους στον οργανισμό

3.1 Απορρόφηση, Κατανομή και απέκκριση φαρμάκων.

Ο σκοπός της θεραπείας με φάρμακα είναι να προλαμβάνει, να θεραπεύει ή να ελέγχει διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Για την επίτευξη αυτού του σκοπού, πρέπει να μεταφέρονται στους ιστούς-στόχους επαρκείς δόσεις φαρμάκου, ώστε να εξασφαλίζονται θεραπευτικά αλλά όχι τοξικά επίπεδα. Η ταχύτητα έναρξης της δράσης ενός φαρμάκου, η ένταση του φαρμακευτικού αποτελέσματος και η διάρκεια δράσης ενός φαρμάκου ρυθμίζονται από τις τέσσερις βασικές οδούς διακίνησης και τροποποίησης του φαρμάκου στον οργανισμό. Πρώτον, η απορρόφηση του φαρμάκου από τη θέση χορήγησής του επιτρέπει την είσοδο του θεραπευτικού παράγοντα (είτε απευθείας, είτε έμμεσα) στο πλάσμα (Είσοδος). Δεύτερον, το φάρμακο μπορεί στη συνέχεια να αφήσει την κυκλοφορία του αίματος και να κατανεμηθεί στο διάμεσο και στο ενδοκυττάριο υγρό (Κατανομή). Τρίτον, το φάρμακο μπορεί να μεταβολιστεί από το ήπαρ, τους νεφρούς ή άλλους ιστούς. Τελικά, το φάρμακο και οι μεταβολίτες του απεκκρίνονται από τον οργανισμό (Εξοδος) με τα ούρα, τη χολή ή τα κόπρανα.

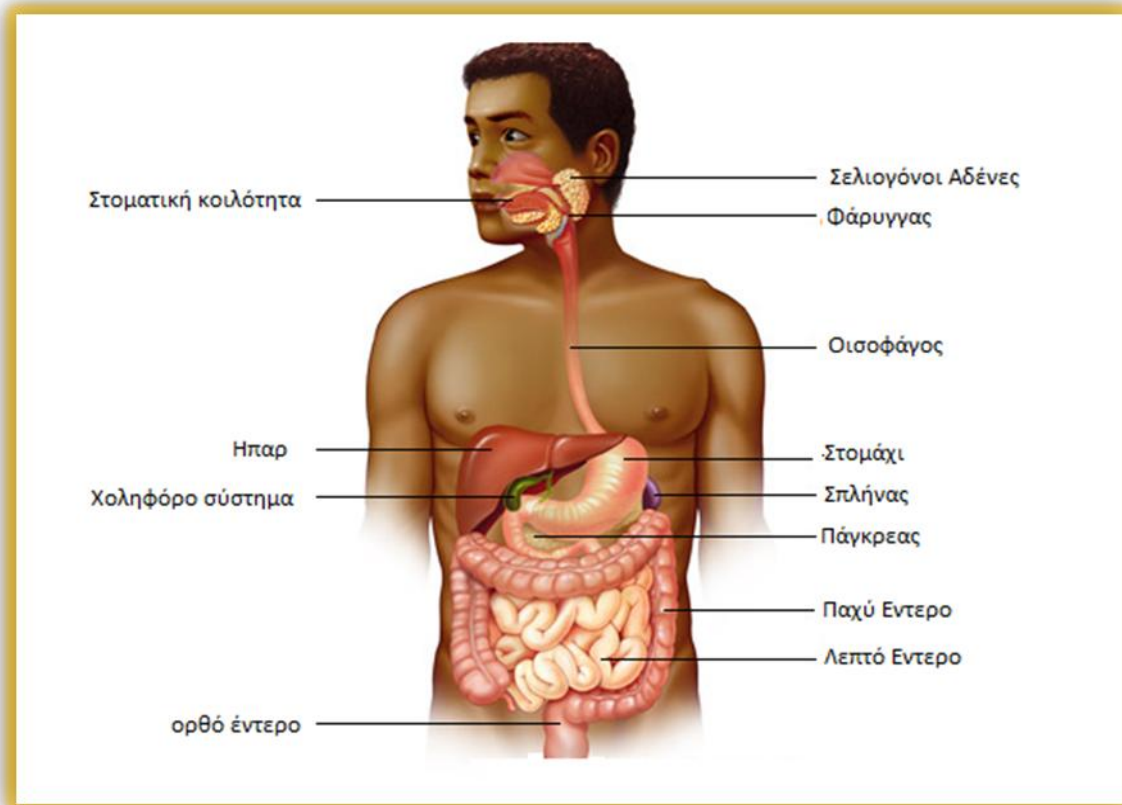
Η σωστή γνώση των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων ενός φαρμάκου επιτρέπει την ορθολογική και αποτελεσματική αξιοποίηση των φαρμακοδυναμικών του ιδιοτήτων και κατ' επέκταση τη σωστή του χρήση. Φυσικά σημαντικό ρόλο σε αυτό παίζει ο τρόπος χορήγησης ενός φαρμάκου. Με την επιλογή του κατάλληλου τρόπου χορήγησης επιτυγχάνεται η αποδέσμευση της δραστικής ουσίας και η όσο το δυνατόν καλύτερη απορρόφηση και κατανομή της. Με βάση την οδό χορήγησής τους οι διάφορες φαρμακευτικές μορφές διακρίνονται σε χορηγούμενες από το στόμα, παρεντερικά, τοπικά και μέσω της αναπνευστικής οδού. Η τυποποίηση ενός φαρμάκου εξαρτάται από:

- Τους φραγμούς που ένα φάρμακο είναι ικανό να διαπεράσει.
- Οι συνθήκες υπό τις οποίες θα χρησιμοποιηθεί ένα φάρμακο.
- Το επείγον της ιατρικής κατάστασης.
- Τη σταθερότητα του φαρμάκου.
- Δράση πρώτης διέλευσης [32]

3.1.1 Χορήγηση από το στόμα

Σήμερα υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός στερεών και υγρών φαρμακευτικών μορφών οι οποίες χορηγούνται από το στόμα. Οι σημαντικότερες απ' αυτές είναι τα δισκία, οι κάψουλες, οι βώλοι, οι σκόνες, οι κόκκοι, τα σιρόπια, τα διαλύματα, τα εναιωρήματα, οι πάστες. Παρότι οι επιστήμονες ερευνούν εναλλακτικές οδούς και μεθόδους χορήγησης, η χορήγηση από το στόμα παραμένει η πιο δημοφιλής, με ποσοστό περίπου 70% από όλες τις μορφές θεραπείας. Οι λόγοι είναι προφανείς. Η χορήγηση από το στόμα είναι η πιο αποδεκτή οδός χορήγησης για τον ασθενή, η καταλληλότερη για τα φάρμακα που λαμβάνει μόνος του και τέλος οι μορφές όπως τα δισκία και οι κάψουλες είναι οι πιο συμφέρουσες οικονομικά μορφές. Η χορήγηση ενός φαρμάκου από το στόμα μπορεί να αποτελεί τη συνηθέστερη οδό χορήγησης, αλλά και την πιο ασταθή, καθώς ακολουθεί τον πιο πολύπλοκο δρόμο μέχρι τους ιστούς [17,33,37].

Η δόση που θα χορηγηθεί από το στόμα θα υποστεί τις ίδιες φυσιολογικές διαδικασίες με την τροφή. Μετά την κατάποση το σκεύασμα θα περάσει από τον οισοφάγο στο στομάχι, όπου εκεί θα αποσυντεθεί σε λίγα λεπτά. Η απελευθερωμένη πλέον δραστική ουσία θα διαλυθεί στα γαστρικά υγρά και έπειτα το διάλυμα με το φάρμακο θα περάσει στο λεπτό έντερο και από εκεί θα περάσει στο εσωτερικό των αγγείων του κυκλοφορικού συστήματος και ιδιαίτερα στο φλεβικό σύστημα. Όλες οι φλέβες του εντέρου καταλήγουν στην πυλαία φλέβα, η οποία καταλήγει στο ήπαρ. Έτσι, ένα ποσοστό του φαρμάκου θα καταλήξει στα κύτταρα του ήπατος όπου θα μεταβολιστεί και θα εξουδετερωθεί. Με την είσοδο του φαρμάκου στη γενική κυκλοφορία του αίματος αρχίζει η κατανομή του σ' ολόκληρο τον οργανισμό (εικόνα 19). Το σημείο συνάντησης του φαρμάκου με τον υποδοχέα για την εκδήλωση δράσης δε βρίσκεται μέσα στην κυκλοφορία του αίματος, αλλά στους ιστούς. Συνεπώς το φάρμακο πρέπει να βγει από τη γενική κυκλοφορία και, αφού διαχυθεί στο περικυτταρικό υγρό, να περάσει τις κυτταρικές μεμβράνες και να διεισδύσει στους ιστούς. Αυτό σημαίνει ότι είναι υποχρεωμένο να περάσει δια μέσου πολλών βιολογικών φραγμών μέχρι τη σύνδεσή του με τον υποδοχέα και την εκδήλωση της φαρμακολογικής ενέργειάς του. Η ποσότητα λοιπόν του φαρμάκου, που φτάνει στους ιστούς και τα όργανα, προσδιορίζεται, μεταξύ άλλων, από το βαθμό αιμάτωσης των ιστών και την ικανότητα του φαρμάκου να διαπερνά τις βιολογικές μεμβράνες που συναντά στην πορεία του [32].



Εικόνα 19: Ανατομία του ανθρώπου-Γαστροεντερικό σύστημα.[32]

Μία μέθοδος για την παράταση της δράσης των φαρμάκων εκείνων τα οποία αποβάλλονται ταχύτατα από τον οργανισμό, είναι η χρησιμοποίηση κάποιας φαρμακοτεχνικής μορφής που αποδεσμεύει το φάρμακο αργά καθώς αυτό διέρχεται από το γαστρεντερικό σωλήνα. Δισκία επικαλυπτόμενα με ημιπερατή μεμβράνη αποτελούν ένα πρόσφατο παράδειγμα του συστήματος ελεγχόμενης αποδέσμευσης. Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν αρκετές ακόμα μέθοδοι μορφοποίησης, οι οποίες θα καθορίζουν τη συγκέντρωση του φαρμάκου στο πλάσμα, σε δεδομένη χρονική στιγμή [15].

4. Συστήματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης

4.1 Εισαγωγή

Με τα φαρμακευτικά σκευάσματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης (controlled release) το δραστικό συστατικό χορηγείται για ορισμένο χρονικό διάστημα με σταθερή ταχύτητα σε αντίθεση με τα συμβατικά φαρμακευτικά σκευάσματα όπου η δραστική ουσία διαχέεται σε όλο το σώμα φθάνοντας και σε άρρωστες αλλά και σε υγιείς περιοχές. Σήμερα με τη χρήση της τεχνολογίας της ελεγχόμενης αποδέσμευσης υπάρχει η δυνατότητα να περιοριστεί η δράση της δραστικής ουσίας στον ιστό όπου είναι απαραίτητη. Η χρήση των πολυμερών ως μεταφορείς φαρμάκων (drug delivery systems) για το σκοπό αυτό είναι καθοριστική. Στο κεφάλαιο αυτό αναλύεται η τεχνολογία ελεγχόμενης αποδέσμευσης και οι πολυμερικές μήτρες.

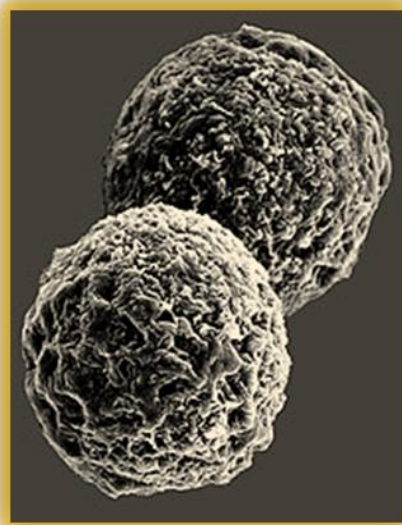
4.2 Εφαρμογή της ελεγχόμενης αποδέσμευσης στην φαρμακευτική επιστήμη

Η τεχνολογία της ελεγχόμενης αποδέσμευσης (controlled release) είναι δημιούργημα σύμπτυξης της φαρμακευτικής επιστήμης, της ιατρικής, της νανοτεχνολογίας και της χημείας πολυμερών. Ελεγχόμενη αποδέσμευση μπορεί να επιτευχθεί συνδυάζοντας μια δραστική ουσία, για παράδειγμα ένα φάρμακο, με ένα κατάλληλο φορέα, για παράδειγμα ένα πολυμερές, είτε φυσικό είτε συνθετικό, με τέτοιο τρόπο ώστε η δραστική ουσία να αποδεσμεύεται από τον φορέα με ένα προκαθορισμένο ρυθμό. Η αποδέσμευση της δραστικής ουσίας μπορεί να γίνεται με σταθερό ρυθμό για μεγάλο χρονικό διάστημα, είτε κυκλικά, είτε μετά από απόκριση σε εξωτερικά ερεθίσματα. Σε κάθε περίπτωση σκοπός είναι να βελτιωθεί και να μεγιστοποιηθεί η δράση της ουσίας τόσο σε ένταση αλλά και σε διάρκεια χρόνου επιτυγχάνοντας έτσι πιο αποτελεσματικές θεραπείες [33].

Το ενδιαφέρον των επιστημόνων πλέον έχει μετατοπιστεί σε πιο πολύπλοκες φόρμουλες χορήγησης φαρμάκων αφού οι παραδοσιακές μέθοδοι χορήγησης δεν μπορούν να ανταπεξέλθουν σε πολλές περιπτώσεις. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι καταστάσεις που απαιτούν την αργή αποδέσμευση υδατοδιαλυτών φαρμάκων ή τη γρήγορη αποδέσμευση χαμηλής διαλυτότητας φαρμάκων, τη συγκεκριμένη στόχευση και μεταφορά φαρμάκων, τη μεταφορά φαρμάκων με τη χρήση νανοσωματιδιακών συστημάτων, τη μεταφορά δύο ή περισσότερων δραστικών ουσιών με παρόμοια δομή και συστήματα βασιζόμενα σε μεταφορείς που μπορούν να διαλυθούν ή να αποβληθούν εύκολα από τον

οργανισμό. Επιπλέον έχει εφαρμογή στη χορήγηση μακρομορίων όπως οι πρωτεΐνες που είναι δύσκολο να χορηγηθούν μέσω κατάποσης και συνήθως χορηγούνται μέσω μιας επώδυνης ένεσης. Εκτός όμως από αυτό γίνεται προσπάθεια να βελτιωθεί η ποιότητα πολλών φαρμάκων με το να γίνουν πιο ασφαλή, φιλικότερα προς τον ασθενή και να μειωθούν οι απαιτούμενες ημερήσιες δόσεις. Για την υλοποίηση όλων των παραπάνω, οι εταιρίες έχουν στρέψει τις έρευνες τους σε νέες πολλά υποσχόμενες τεχνολογίες όπως είναι η ελεγχόμενη χορήγηση φαρμάκων (controlled drug delivery) [33,39].

Το σύστημα αποδέσμευσης όσον αφορά την σύστασή του μπορεί να αποτελείται από βιοδιασπώμενα, μη-βιοδιασπώμενα, διαλυτοποιήσιμα, βιοσυμβατά ή ανόργανα υλικά ενώ η μορφή του ποικίλλει από μικρο- και νανο-σφαιρίδια, μέχρι ογκώδη εμφυτεύματα ή μεμβράνες. Τα τελευταία χρόνια η τεχνολογία ελεγχόμενης αποδέσμευσης έχει εφαρμοστεί ευρέως σε διάφορους τομείς όπως η φαρμακευτική, η κοσμητική, η γεωργία η βιομηχανία ενώ συναντάται επίσης σε αρκετά καταναλωτικά προϊόντα όπως είδη υγιεινής, συσκευασίες τροφίμων και είδη οικιακής χρήσης.



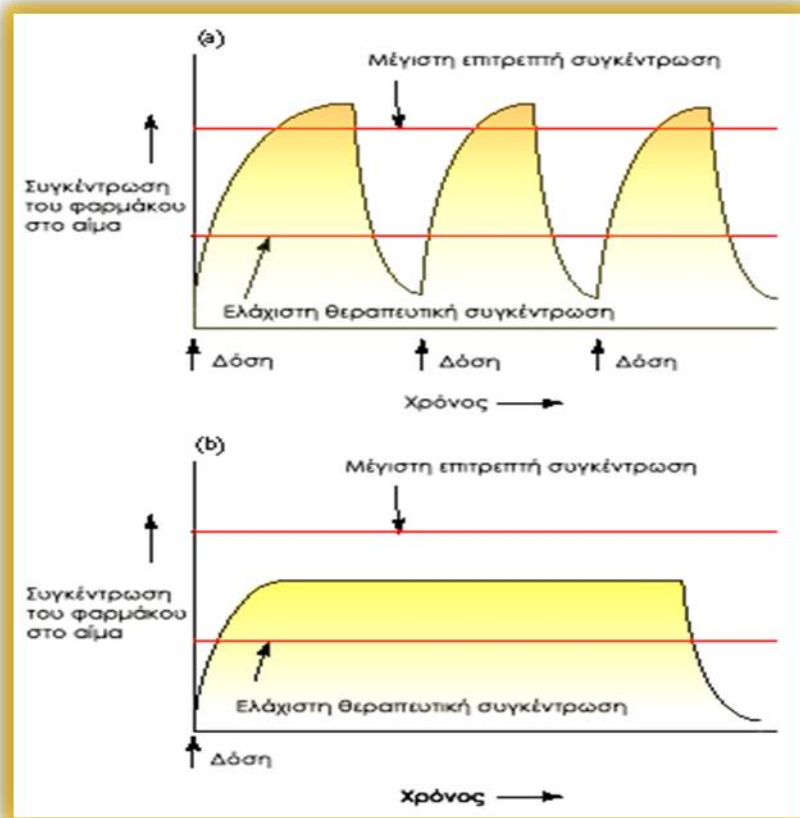
Εικόνα 20: Μικρογραφία σωματιδίων- μεταφορείς φαρμάκων με στόχο τους πνεύμονες.

Ένα ιδανικό σύστημα απελευθέρωσης φαρμάκου θα πρέπει να έχει τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

1. να είναι βιοχημικά αδρανές
2. να είναι βιοσυμβατό

3. να είναι μηχανικά ανθεκτικό
4. να μην προκαλεί οποιαδήποτε ενόχληση στον ασθενή
5. να είναι ικανό να επιτύχει τη μέγιστη απορροφούμενη δόση του φαρμάκου
6. να είναι ασφαλές ως προς κάποια τυχαία απελευθέρωση
7. να είναι απλό στη χορήγηση και στην απομάκρυνση του
8. να είναι εύκολο στη κατασκευή και στην αποστείρωση

Ο στόχος για πολλά από τα αρχικά συστήματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης ήταν να επιτευχθεί ένας ρυθμός διανομής που θα παρείχε ένα υψηλό επίπεδο φαρμάκου στο αίμα κατά τη διάρκεια μιας μεγάλης χρονικής περιόδου. Με τα κοινά χάπια ή τις ενέσεις, το επίπεδο του φαρμάκου στο αίμα αυξάνεται απότομα αμέσως μετά από τη χορήγηση και στη συνέχεια μειώνεται μέχρι την χορήγηση της επόμενης δόσης (εικόνα 21.α). Το κύριο σημείο στις χορηγήσεις των κοινών φαρμάκων είναι ότι το επίπεδο της δραστικής ουσίας στο αίμα θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ μιας μέγιστης τιμής, η οποία μπορεί να συμπίπτει με το επίπεδο τοξικότητας του φαρμάκου, και μια ελάχιστη τιμή κάτω από την οποία το φάρμακο παύει να είναι αποτελεσματικό. Στα συστήματα ελεγχόμενης απελευθέρωσης του φαρμάκου που σχεδιάζονται για μακροπρόθεσμη χορήγηση, το επίπεδο του φαρμάκου στο αίμα παραμένει σταθερό μεταξύ της επιθυμητής μέγιστης και ελάχιστης τιμής, για μια παρατεταμένη χρονική περίοδο (εικόνα 21.β). Το διάστημα αυτό μπορεί να κυμαίνεται από 24 ώρες (Procardia XL- για ανακούφιση της στηθάγχης με τη μείωση της αρτηριακής πίεσης), 1 μήνα (Lupron Depot- για τον καρκίνο του προστάτη) μέχρι και 5 χρόνια (Norplant- αντισυλληπτικό μακρόχρονης δράσης).



Εικόνα 21: Γραφικές παραστάσεις της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο αίμα σε συνάρτηση με τον χρόνο για τις περιπτώσεις: (a) συμβατικής μεθόδου χορήγησης φαρμάκων, (b) Ελεγχόμενης χορήγησης φαρμάκων. [33]

Τα τελευταία χρόνια, τα συστήματα ελεγχόμενης απελευθέρωσης του φαρμάκου και τα πολυμερή που χρησιμοποιούνται σε αυτά, εξελίσσονται και έχουν γίνει πιο εξειδικευμένα και ικανά να κάνουν πολλά περισσότερα από την απλή παράταση της περιόδου απελευθέρωσης ενός συγκεκριμένου φαρμάκου. Παραδείγματος χάριν, τα σημερινά συστήματα ελεγχόμενης απελευθέρωσης μπορούν να ανταποκριθούν σε αλλαγές του βιολογικού περιβάλλοντος και να διανείμουν ή να σταματήσουν να διανέμουν φάρμακα, σύμφωνα με αυτές τις αλλαγές. Επιπλέον, τα υλικά έχουν βελτιωθεί και έτσι οδηγήθηκαν στα προσανατολισμένα συστήματα διανομής, στα οποία ένα σύστημα μπορεί να «στοχεύσει» ένα συγκεκριμένο τύπο κυττάρων ή ιστών και να αποδεσμεύσει εκεί όπου είναι απαραίτητη, τη δραστική ουσία.

Η μέθοδος ελεγχόμενης αποδέσμευσης κατά την εφαρμογή της στην φαρμακευτική παρουσιάζει αρκετά σημαντικά πλεονεκτήματα αλλά και κάποια μη παραβλέψιμα μειονεκτήματα. Τα πλεονεκτήματά της είναι:

- Σταθεροποίηση της συγκέντρωσης της δραστικής ουσίας πάνω από τα θεραπευτικά επίπεδα για όσο χρόνο διαρκεί η θεραπεία και μικρότερες διακυμάνσεις της συγκέντρωσης.
- Ελάττωση των παρενεργειών.
- Ενίσχυση της βιοδιαθεσιμότητας του φαρμάκου και άρα ελάττωση της ποσότητας που απαιτείται για τη θεραπεία.
- Ελάττωση της συχνότητας χορήγησης των δόσεων.
- Αποτελεσματική χορήγηση βιοδραστικών ουσιών με μικρή βιολογική ημιπερίοδο ζωής.

Ενώ αντίστοιχα τα μειονεκτήματά της είναι:

- Υψηλό κόστος παρασκευής.
- Πιθανή τοξικότητα λόγω των υλικών που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή τους ή των προϊόντων διάσπασης αυτών.
- Κίνδυνος υπέρβασης των τοξικών επιπέδων του φαρμάκου από την μη αναμενόμενη απελευθέρωση του εγκλεισμένου φαρμάκου.
- Πιθανή ενόχληση του ασθενούς από τη φαρμακομορφή αλλά και από τον τρόπο χορήγησης [23,24,32,33].

4.3 Μηχανισμοί ελεγχόμενης αποδέσμευσης

Η μελέτη της κινητικής της αποδέσμευσης μπορεί να γίνει *in vitro* και *in vivo*. Υπάρχουν προϊόντα ελεγχόμενης (controlled), παρατεταμένης (prolonged action) και αργής αποδέσμευσης (slow release). Προϊόντα παρατεταμένης αποδέσμευσης θεωρούνται εκείνα στα οποία το φάρμακο διατίθεται στον οργανισμό σε ποσότητα ίση με την ποσότητα που απαιτείται για να προκληθεί η επιθυμητή θεραπευτική δράση. Η ελεγχόμενη αποδέσμευση διαφέρει από την αργή και την παρατεταμένη στο βαθμό του ελέγχου του βέλτιστου επιπέδου όσο και του βέλτιστου χρόνου διαθεσιμότητας της δραστικής ουσίας.

Υπάρχουν τρεις πρωταρχικοί μηχανισμοί με τους οποίους μπορεί μια δραστική ουσία να απελευθερωθεί από ένα σύστημα μεταφοράς και αυτοί είναι:

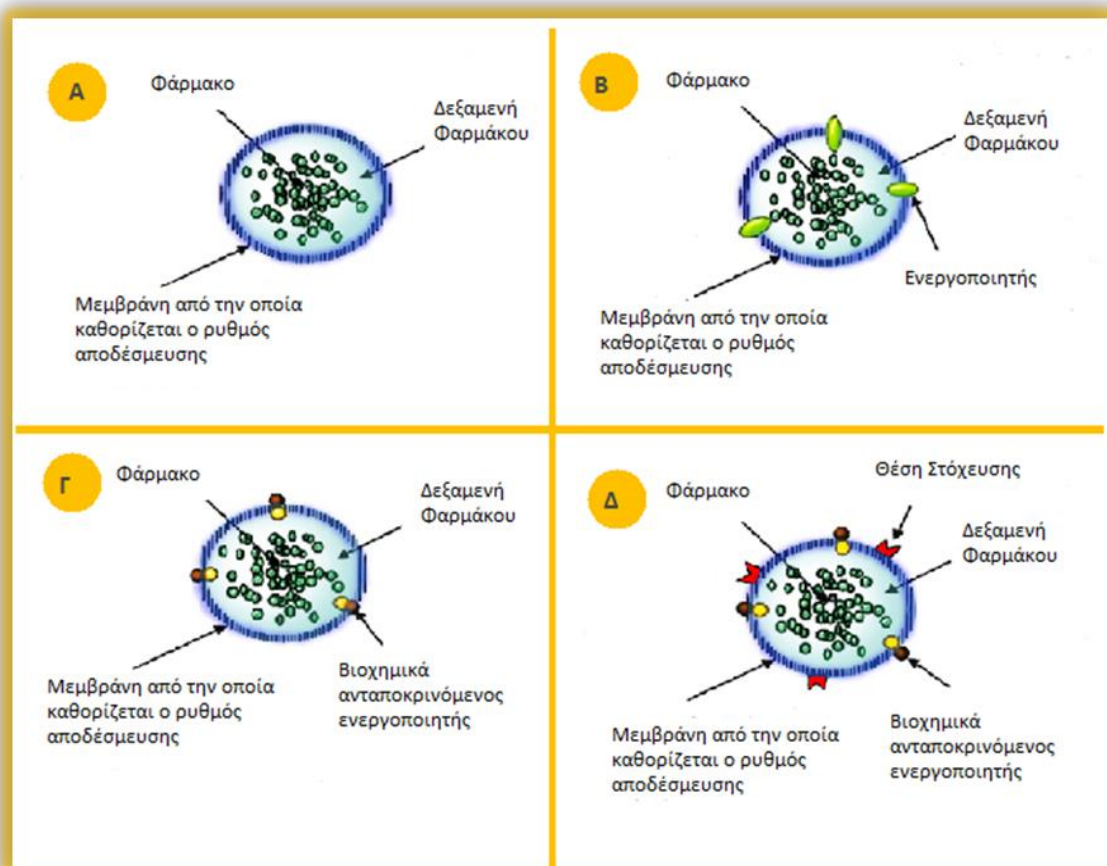
- Διάλυση

- Διάχυση
- Ώσμωση [32]

4.4 Συστήματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης

Τα συστήματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης μπορούν να καταταγούν σε τέσσερις κύριες κατηγορίες, ανάλογα με το μηχανισμό και την πολυπλοκότητα που εμφανίζει η λειτουργία τους:

1. Συστήματα προκαθορισμένου ρυθμού αποδέσμευσης
2. Συστήματα ενεργοποιούμενης αποδέσμευσης.
3. Συστήματα στα οποία η αποδέσμευση ελέγχεται από μηχανισμό ανάδρασης.
4. Συστήματα στόχευσης (εικόνα 22) [34]

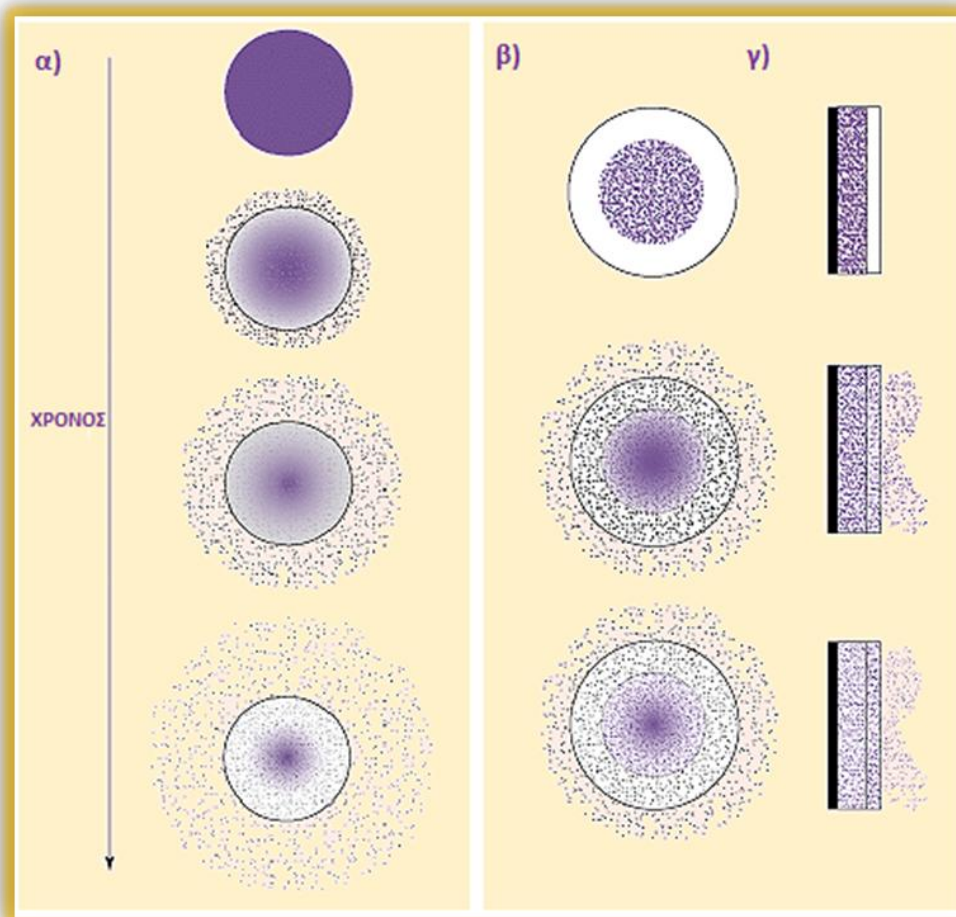


Εικόνα 22 : Οι τέσσερις κατηγορίες συστημάτων ελεγχόμενης αποδέσμευσης .

4.4.1 Συστήματα προκαθορισμένου ρυθμού αποδέσμευσης

Πρόκειται για συστήματα στα οποία η απελευθέρωση των μορίων της εγκλωβισμένης δραστικής ουσίας έχει προκαθοριστεί ώστε να γίνεται με συγκεκριμένο ρυθμό και αυτός καθορίζεται από την κατασκευή του συστήματος και ελέγχεται από την διάχυση της δραστικής ουσίας ή την διείσδυση του διαλύτη. Η έλεγχος στην αποδέσμευση του φαρμάκου επιτυγχάνεται με την εισαγωγή ενός φραγμού στο σύστημα ο οποίος περιλαμβάνει δύο τύπους : Τα συστήματα δεξαμενής (reservoir systems)(εικόνα 23β) και τα συστήματα τύπου μήτρας ή πλέγματος (matrix systems)(εικόνα 23α).

Στον πρώτο τύπο ο φραγμός είναι μια πολυμερική μεμβράνη και διαχωρίζει τον πυρήνα που περιέχει την δραστική ουσία από το εξωτερικό βιολογικό του περιβάλλον. Ο πυρήνας που περιέχει το ενεργό συστατικό μπορεί να είναι στη στερεή ή υγρή μορφή και η μεμβράνη να διαθέτει από καθόλου έως και υψηλό πορώδες. Τα περισσότερα συστήματα έχουν γεωμετρία επίπεδη, κυλινδρική (μικροσωλήνες, πολυμερικές ίνες διάτρητες εσωτερικά) ή σφαιρική (μικροχάνδρες, σωματίδια ή σταγόνες επικαλυμμένες με λεπτό πολυμερικό φιλμ).



Εικόνα 23: Σχηματική αναπαράσταση αποδέσμευσης της δραστικής ουσίας από συστήματα: α) πλέγματος και β),γ) Δεξαμένης (β) σφαιρικού σχήματος, γ) μεμβράνης με μία ελεύθερη επιφάνεια- διαδερμικό σύστημα αποδέσμευσης στο οποίο μόνο η μία πλευρά της συσκευής μπορεί να απελευθερώσει το φάρμακο.) [33]

Τα συστήματα τύπου μήτρας ή πλέγματος είναι τα απλούστερα και πιο διαδεδομένα συστήματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης. Εδώ το φάρμακο βρίσκεται διαλυμένο ή διεσπαρμένο εντός μιας πολυμερικής ή κηρώδους μήτρας.

Ένα από τα χαρακτηριστικά των παραπάνω δύο συστημάτων είναι πως με την πάροδο του χρόνου ο ρυθμός αποδέσμευσης μειώνεται αφού αυξάνεται η απόσταση διάχυσης που απαιτείται να διασχίσουν τα μόρια της δραστικής ουσίας από τον πυρήνα προς την επιφάνεια του πλέγματος. Εκτός από την διάχυση από το πολυμερικό δίκτυο, τα μόρια της εγκλωβισμένης δραστικής ουσίας μπορούν να βρουν διέξοδο μέσω των καναλιών που σχηματίζονται από την διαλυτοποίηση και απομάκρυνση της ποσότητας της δραστικής ουσίας που έχει ήδη αποδεσμευτεί. Στην περίπτωση των μακρομορίων που λόγω του όγκου τους έχουν περιορισμένη διαπερατότητα από το πολυμερές πλέγμα, η αποδέσμευσή τους

επιτυγχάνεται σχεδόν αποκλειστικά μέσω αυτών των πόρων. Επειδή η έκταση των παραπάνω πόρων και καναλιών καθορίζεται από την συγκέντρωση του εγκλωβισμένου φαρμάκου τότε προφανώς το ποσοστό φόρτωσης φαρμάκου στο σύστημα καθώς και το μέγεθος των σωματιδίων του θα έχουν και σημαντική επίδραση στην κινητική αποδέσμευσης. Κάτω από ένα κρίσιμο επίπεδο φόρτωσης φαρμάκου κάποια από τα απομονωμένα σωματίδια της δραστικής ουσίας ίσως να παραμείνουν παγιδευμένα στο πολυμερικό πλέγμα. Η κινητική αποδέσμευσης των παραπάνω ελεγχόμενων μέσω διάχυσης συστημάτων εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από τις φυσικές ιδιότητες του δραστικού συστατικού που μεταφέρουν. Επιπλέον εκτός από τον βαθμό πλήρωσης του συστήματος σε δραστικό συστατικό και το μέγεθος των σωματιδίων του τελευταίου, η διαλυτότητα του συστατικού αυτού στην πολυμερική μήτρα και η ικανότητα διάχυσής του σε αυτή αποτελούν επίσης σημαντικούς παράγοντες. Τέλος το σχήμα του πολυμερικού συστήματος φαίνεται πως έχει μεγάλο αντίκτυπο στην ταχύτητα απελευθέρωσης της δραστικής ουσίας καθώς καθορίζει το μέγεθος της ελεύθερης επιφάνειας που προσφέρεται για διάχυση και το μήκος της διαδρομής που ακολουθεί η διάχυση των μορίων προς της επιφάνεια [32,34,35,38].

4.4.2 Συστήματα ενεργοποιούμενης αποδέσμευσης (activation – modulated systems)

Σε αυτήν την κατηγορία συστημάτων επιτυγχάνεται η ενεργοποίηση της αποδέσμευσης του φαρμάκου με κάποιες φυσικές, χημικές ή βιολογικές διαδικασίες ή υποβοηθείται από εξωτερικά παρεχόμενη ενέργεια. Ο ρυθμός της αποδέσμευσης της εγκλωβισμένης ουσίας ελέγχεται έμμεσα, ρυθμίζοντας κατάλληλα την διαδικασία ενεργοποίησης ή την παρεχόμενη στο σύστημα ενέργεια. Στον πίνακα που ακολουθεί φαίνονται οι κατηγορίες συστημάτων ενεργοποιούμενης αποδέσμευσης.

Πίνακας 1: Κατηγορίες συστημάτων ενεργοποιούμενης αποδέσμευσης

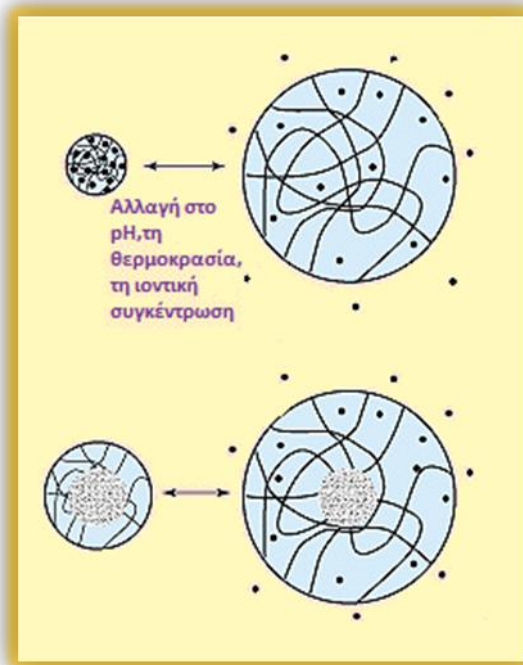
Συστήματα ενεργοποιούμενα μέσω:	
Φυσικές Μέθοδοι	α. Οσμωτικής Πίεσης
	β. Υδροδυναμικής πίεσης
	γ. Τάσης ατμών
	δ. Μηχανικής ενέργειας
	ε. Μαγνητικής ενέργειας
	στ. Υπερήχων
	ζ. Ιοντοφόρησης
	η. Ενυδάτωσης
Χημικές Μέθοδοι	α. Μεταβολής του pH
	β. Μεταβολής της συγκέντρωσης ιόντων
	γ. Υδρόλυσης
Βιοχημικές Μέθοδοι	α. Ενζύμων
	β. Βιοχημικών αντιδράσεων

4.4.3 Συστήματα στα οποία η αποδέσμευση ελέγχεται από μηχανισμό ανάδρασης (feed back-regulated systems)

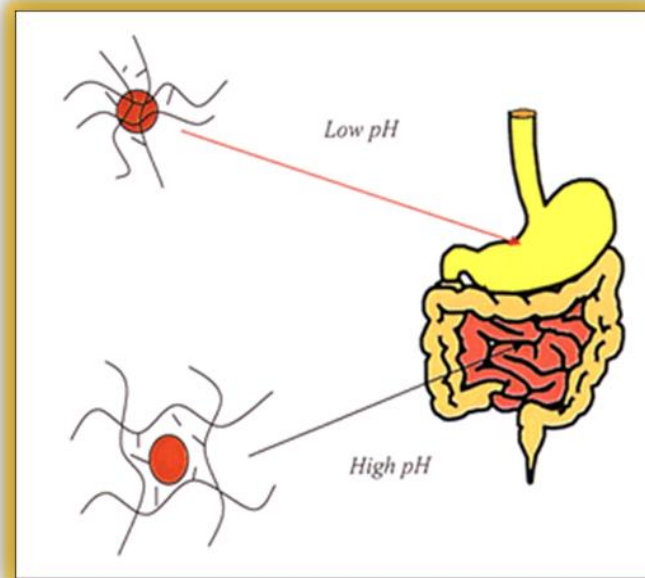
Στην κατηγορία αυτή η απελευθέρωση των μορίων της δραστηκής ουσίας ρυθμίζεται από ένα βιοχημικά ανταποκρινόμενο αισθητήρα. Ο αισθητήρας αυτός συνήθως ανιχνεύει μια βιοχημική ουσία μέσα στο σώμα, η οποία δρα ως ενεργοποιητής για το σύστημα. Ανάλογα με την συγκέντρωση αυτής της ουσίας, ο μηχανισμός ανάδρασης του συστήματος ρυθμίζει κατάλληλα και τον ρυθμό αποδέσμευσης του εγκλωβισμένου συστατικού. Για παράδειγμα, μπορεί ένα σύστημα ελεγχόμενης αποδέσμευσης να σχεδιαστεί με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να είναι ανίκανο να αποδεσμεύσει τη δραστηκή ουσία μέχρι να τοποθετηθεί σε ένα κατάλληλο βιολογικό περιβάλλον.

Στην εικόνα 24 περιγράφεται ένα σύστημα ελεγχόμενης αποδέσμευσης που βασίζεται στην διόγκωση πολυμερών. Το σύστημα είναι αρχικά στεγνό και όταν τοποθετηθεί στο σώμα

απορροφάει νερό ή άλλα σωματικά υγρά και διογκώνεται. Η διογκωση αυτή αυξάνει την συγκέντρωση του υδατικού διαλύτη στο εσωτερικό του συστήματος όπως επίσης και του μεγέθους των πόρων του δικτύου του πολυμερούς επιτρέποντας έτσι την διέλευση και διάχυση του πολυμερούς στο εξωτερικό περιβάλλον. Τα υλικά που χρησιμοποιούνται συνήθως σε αυτά τα συστήματα είναι οι υδρογέλες. Αξίζει να αναφερθεί ότι τα «έξυπνα» πολυμερή και οι υδρογέλες υπόκεινται σε, οι δομικές αλλαγές που είναι αντιστρέψιμες και επαναλαμβανόμενες ανάλογα με τις αλλαγές του pH, της θερμοκρασίας όπως φαίνεται στην εικόνα που ακολουθεί (εικόνα 24). Επιπλέον στην εικόνα 25 παρατηρούμε τη διογκωση του συστήματος της υδρογέλης εξαιτίας της αλλαγής του pH του περιβάλλοντος κατά την πορεία του συστήματος αυτού διαμέσου του γαστρεντερικού συστήματος .



Εικόνα 24: Σύστημα με μηχανισμό ανάδρασης [33]

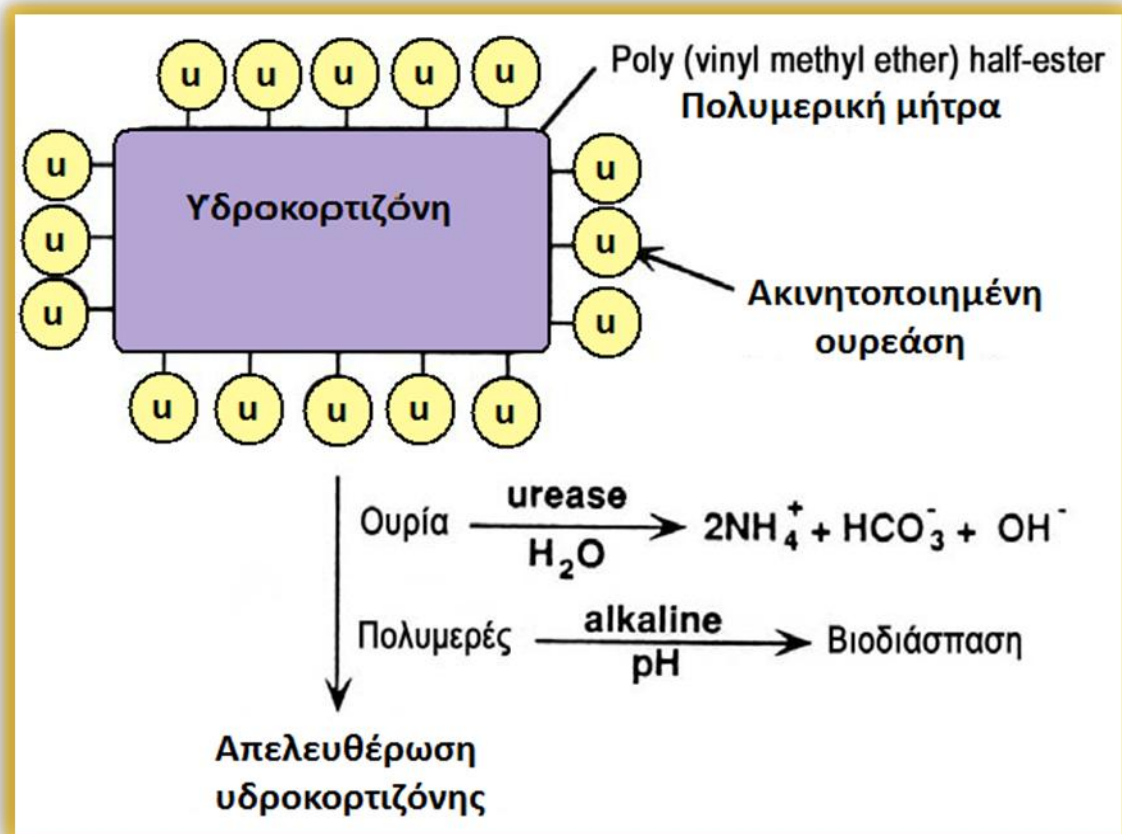


Εικόνα 25: Διόγκωση της υδρογέλης του πολυμερούς *poly(methacrylic acid -g -ethylene glycol) P(MAA-g-EG)* ως της διαφοράς pH στα μέρη του γαστρεντερικού συστήματος. [41]

Τα συστήματα αυτά μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες: Τα ρυθμιζόμενα συστήματα μέσω βιοδιάσπασης (bioerosion-regulated), τα βιο-αποκρινόμενα (bioresponsive) συστήματα και τέλος τα αυτό-ρυθμιζόμενα (self-regulated) συστήματα. [33,34]

4.4.3α Συστήματα αποδέσμευσης ρυθμιζόμενα μέσω βιοδιάσπασης

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της κατηγορίας αποτελεί το σύστημα μεταφοράς υδροκορτιζόνης (hydrocortisone). Το σύστημα αυτό αποτελείται από ένα βιοδιασπώμενο πολυμερές πλέγμα από *poly(vinyl methylether)half-ester* μέσα στο οποίο βρίσκεται διασπαρμένο το προς μεταφορά φάρμακο, ενώ εξωτερικά περιβάλλεται από ένα στρώμα ακινητοποιημένης ουρεάσης. Σε διάλυμα ουδέτερου pH το πολυμερές πλέγμα διασπάται πολύ αργά. Παρουσία όμως ουρίας, η ουρεάση στο περίβλημα της φαρμακομορφής μεταβολίζει την ουρία προς σχηματισμό αμμωνίας. Με αυτό τον τρόπο το pH αυξάνεται και αυτό συνεπάγεται μια ραγδαία αποικοδόμηση του πολυμερούς με ταυτόχρονη απελευθέρωση του φαρμάκου (εικόνα 26). [34,39]

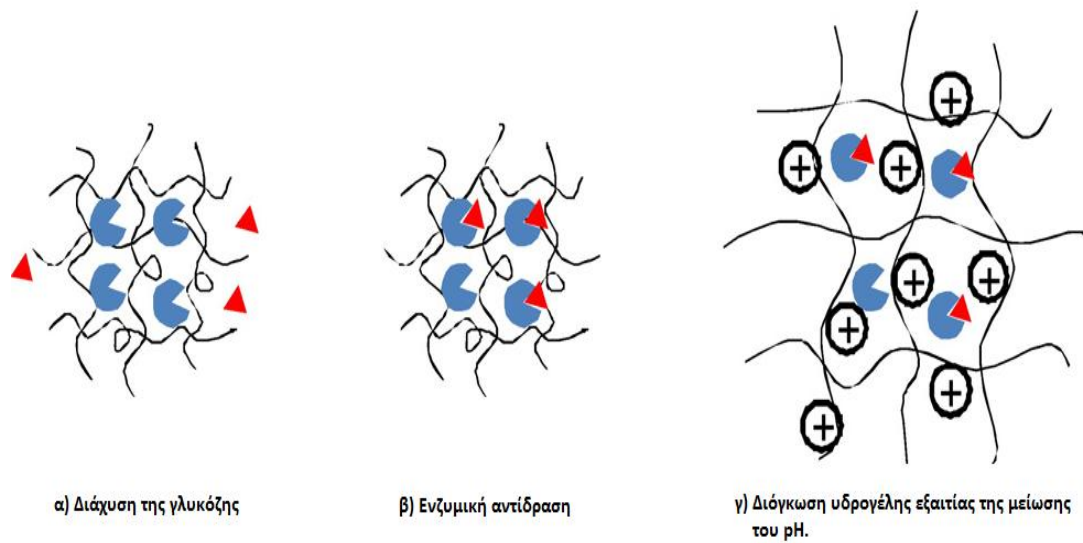


Εικόνα 26: Το βιοδιασπώμενο σύστημα μεταφοράς υδροκορτιζόνης.

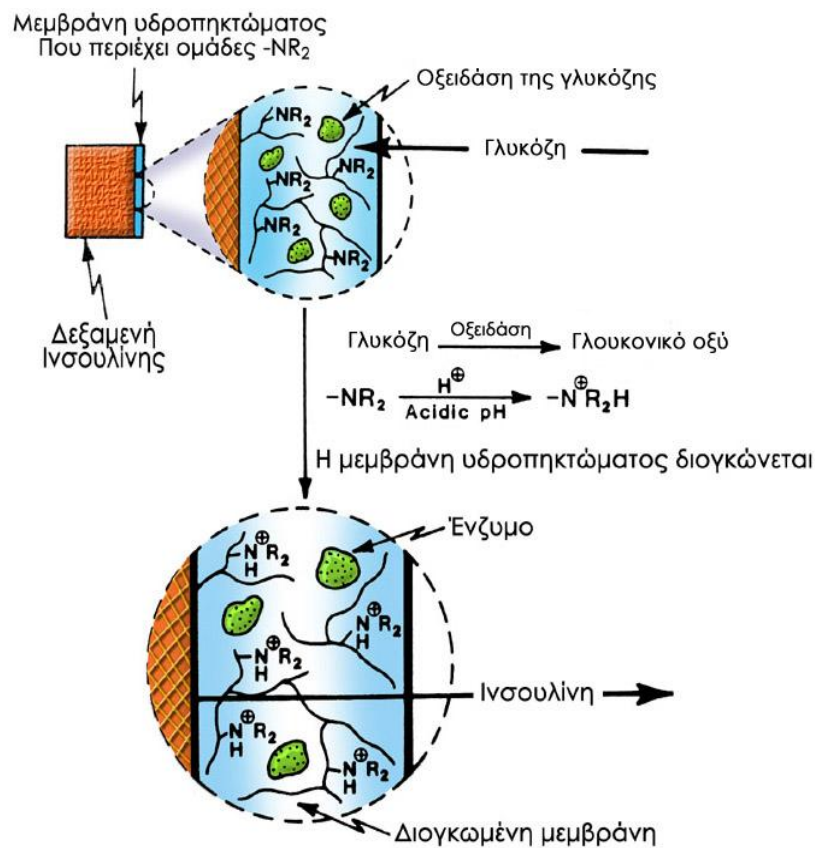
4.4.3β Βιοαποκρινόμενα συστήματα αποδέσμευσης

Σε αυτό το είδος συστημάτων η δραστική ουσία μεταφέρεται σε μία συσκευή η οποία περιβάλλεται από μία βιοαποκρινόμενη πολυμερική μεμβράνη. Η διαπερατότητα της μεμβράνης στην δραστική ουσία ελέγχεται από την συγκέντρωση μιας βιοχημικής ουσίας, στον ιστό όπου έχει τοποθετηθεί το σύστημα. Τυπικό παράδειγμα βιοαποκρινόμενου συστήματος είναι το ενεργοποιούμενο από γλυκόζη (glucose-triggered) σύστημα μεταφοράς ινσουλίνης. Εδώ η δεξαμενή ινσουλίνης περιέχεται μέσα σε μία μεμβράνη υδρογέλης που φέρει ομάδες $-\text{NR}_2$. Σε αλκαλικό διάλυμα οι ομάδες $-\text{NR}_2$ είναι ουδέτερες και η μεμβράνη παραμένει μη διογκωμένη και αδιαπέραστη από την ινσουλίνη. Καθώς η γλυκόζη, ο ενεργοποιητής του συστήματος, διαπερνά την μεμβράνη, τότε οξειδώνεται από το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης το οποίο βρίσκεται στην μεμβράνη και σχηματίζεται γλουκονικό οξύ. Τότε οι ομάδες $-\text{NR}_2$ δέχονται πρωτόνια σχηματίζοντας $-\text{NR}_2\text{H}^+$ και η

μεμβράνη υδρογέλης διογκώνεται και καθίσταται διαπερατή στα μόρια της (εικόνα 27, εικόνα 28) [34,40].



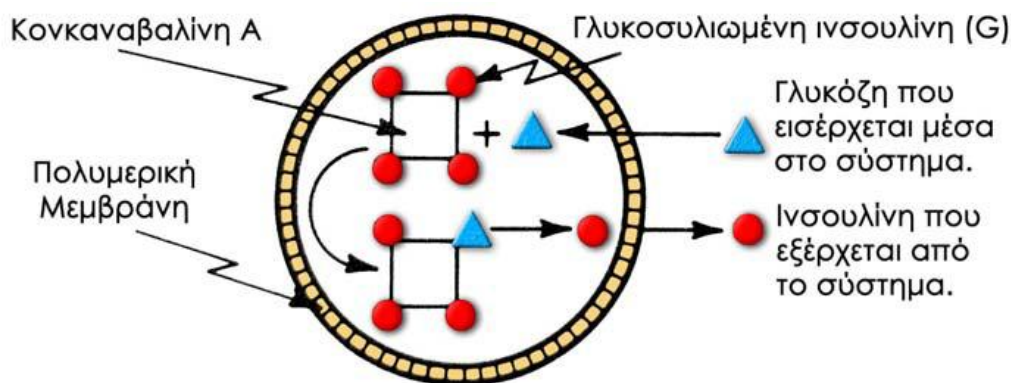
Εικόνα 27: Σχηματική απεικόνιση της Ph-αποκρινόμενης υδρογέλης με την παγιδευμένη οξειδάση. [40]



Εικόνα 28: Το βιοαποκρινόμενο σύστημα μεταφοράς ινσουλίνης, που ελέγχεται από την συγκέντρωση της γλυκόζης.[34]

4.4.3γ Αυτό-ρυθμιζόμενα συστήματα αποδέσμευσης

Αυτό το είδος συστημάτων βασίζεται σε έναν αναστρέψιμο μηχανισμό ανταγωνιστικής σύνδεσης (competitive binding) ο οποίος ενεργοποιεί και ρυθμίζει την αποδέσμευση του φαρμάκου στον οργανισμό. Εδώ η δραστική ουσία βρίσκεται αποθηκευμένη σε ένα πλέγμα που περιβάλλεται από μια ημιπερατή μεμβράνη και η αποδέσμευσή του ενεργοποιείται όταν μία βιοχημική ουσία από τον περιβάλλοντα ιστό διαπεράσει την μεμβράνη. Ένα από τα πρώτα παραδείγματα αυτό-ρυθμιζόμενου συστήματος χρησιμοποιούσε τον μηχανισμό αναστρέψιμης σύνδεσης μορίων σακχάρου με λεκτίνη (lectin). Ένα σύμπλοκο ινσουλίνης-σακχάρου-λεκτίνης τοποθετείται μέσα σε μια ημιπερατή μεμβράνη. Καθώς η γλυκόζη του αίματος διαχέεται μέσα στην συσκευή ανταγωνιστικά (competitively) συνδέεται στις θέσεις σύνδεσης σακχάρου πάνω στα μόρια λεκτίνης (κονκαναβαλίνης A) και ταυτόχρονα ενεργοποιείται η απελευθέρωση των μορίων ινσουλίνης-σακχάρου. Τα απελευθερωμένα τότε σύμπλοκα διαχέονται έξω από την συσκευή, προς το αίμα. Έχουμε έτσι ένα αυτορυθμιζόμενο σύστημα μεταφοράς στο οποίο η δοσολογία του δραστικού συστατικού, της ινσουλίνης στην περίπτωση μας, ρυθμίζεται ανάλογα με την συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα (εικόνα29). [34]



Εικόνα 29: Αναπαράσταση ενός αυτορυθμιζόμενου συστήματος χορήγησης ινσουλίνης. [34]

4.4.4 Συστήματα στόχευσης (drug targeting systems)

Τα συστήματα στόχευσης επιχειρούν την εκλεκτική αποστολή της δραστικής ουσίας στην θέση δράση αυτής. Η εκλεκτική αποστολή στα κύτταρα στόχο έχει ως αποτέλεσμα την βελτίωση του θεραπευτικού δείκτη του φαρμάκου και είναι ιδιαίτερα σημαντική σε ισχυρά φάρμακα με αυξημένη τοξικότητα, όπως είναι τα αντικαρκινικά φάρμακα.

Ένα σύστημα στόχευσης θα πρέπει να περιλαμβάνει τα εξής:

- μια μη-ανοσογονική βιοδιασπώμενη πολυμερική αλυσίδα στην οποία έχει προσδεθεί μία κατευθυντήρια ομάδα (targeting moiety), η οποία θα οδηγήσει το σύστημα στον στόχο
- ένας διαλυτοποιητής (solubiliser) αν χρειάζεται, για την διάλυση του συστήματος στα βιολογικά υγρά (π.χ. αίμα).
- Τα μόρια της δραστικής ουσίας συνδέονται στο σύστημα μέσω ενός βραχίονα (spacer) ο οποίος φέρει χημικούς δεσμούς που μπορούν να διασπασθούν μόνο από ένζυμο που βρίσκονται στην περιοχή του κυττάρου στόχου, ελευθερώνοντας το φάρμακο.

Η εκλεκτική συσσώρευση του συστήματος στον στόχο μπορεί να συμβεί παθητικά (passive targeting) ή ενεργητικά (active targeting). Δραστικές ουσίες μικρού μοριακού βάρους, όπως είναι τα αντικαρκινικά φάρμακα, μπορούν να διαπεράσουν εύκολα τις κυτταρικές μεμβράνες των περισσότερων ιστών, οπότε το φάρμακο κατανέμεται ταχέως σε όλο το σώμα και όχι εκλεκτικά στον πάσχοντα ιστό. Εάν λοιπόν το φάρμακο προσδεθεί με κάποιο τρόπο σε μεγαλομοριακή ουσία όπως για παράδειγμα ένα βιοσυμβατό πολυμερές και οι δεσμοί αυτοί είναι αρκετά σταθεροί ώστε να επιτρέπουν την παρατεταμένη κυκλοφορία του φαρμάκου στο αίμα, η είσοδος του συμπλέγματος στα κύτταρα λόγω του μεγάλου μοριακού βάρους μπορεί να γίνει μόνο με ενδοκύττωση. Οι καρκινικοί όγκοι εμφανίζουν περισσότερο διαπερατά τριχοειδή αγγεία σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς οπότε το σύμπλεγμα φορέα-φαρμάκου, το οποίο εμφανίζει ιδιότητες μακράς παραμονής στην γενική κυκλοφορία, μπορεί να εξέλθει από τα αγγεία μόνο στην περιοχή του όγκου και συσσωρεύεται σε αυτούς. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η παθητική στόχευση.

Η ενεργητική στόχευση μπορεί να γίνει με τη σύνδεση του συμπλέγματος φορέα-φαρμάκου με μια "κατευθυντήρια ομάδα" (targeting moiety) και αναγνωρίζεται από συγκεκριμένους υποδοχείς των κυττάρων στόχων. Η ομάδα αυτή μπορεί να είναι κάποιο αντίσωμα, υδατάνθρακας, πεπτίδιο ή ολιγονουκλεοτίδιο. Την μεγαλύτερη δυσκολία αυτής της προσέγγισης για την χορήγηση φαρμάκων αποτελεί η εύρεση μη ανοσογονικών και εξαιρετικά εξειδικευμένων "κατευθυντήριων" ομάδων.

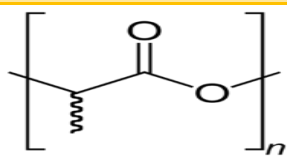
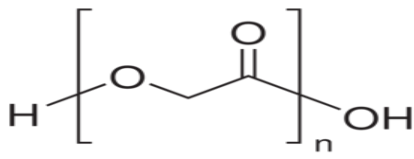
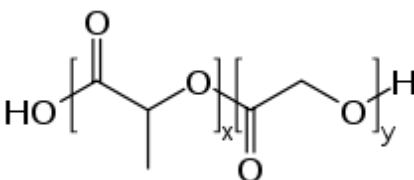
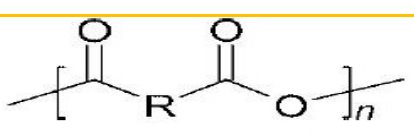
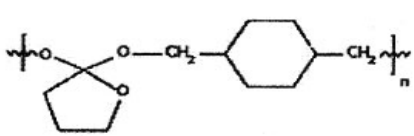
Σύγχρονα παραδείγματα συστημάτων που χρησιμοποιούνται για στοχευόμενη χορήγηση φαρμάκων αποτελούν τα λιποσώματα και τα νανοσωματίδια.

ΠΟΛΥΜΕΡΕΣ	ΔΟΜΗ
Πολυ-2-υδροξυ-αιθυλ-μεθακρυλικό (pHEMA)	
Πολυμεθυλ-μεθακρυλικό (PMMA)	
Πολυβινυλαλκοόλη(PVA)	
Πολυακρυλικό οξύ (PAA)	
Πολυακρυλαμίδιο (PAAM)	
Πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG)	

Πίνακας 3: Πολυμερή για ελεγχόμενη αποδέσμευση.

Τα τελευταία χρόνια έχουν σχεδιαστεί πολυμερή αποκλειστικά για βιοιατρικές και μόνο εφαρμογές και για ελεγχόμενη αποδέσμευση. Τα περισσότερα από αυτά είναι σχεδιασμένα έτσι ώστε να είναι αποικοδομήσιμα μέσα στο σώμα. Κάποια παρουσιάζονται στον πίνακα 3.

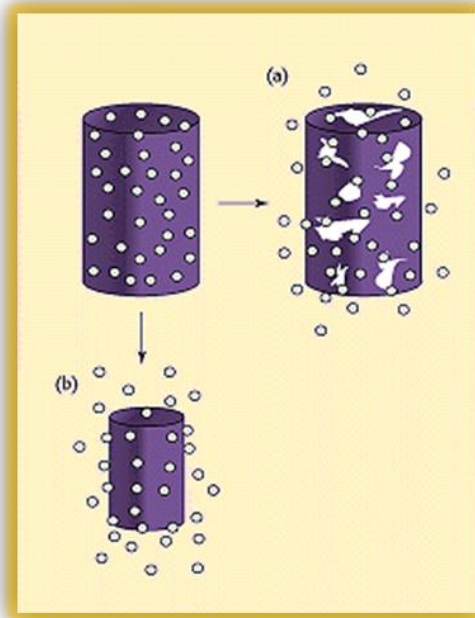
[33]

ΠΟΛΥΜΕΡΕΣ	ΔΟΜΗ
Πολυλακτίδιο (PLA)	
Πολυγλυκολίδιο (PGA).	
Πολυγαλακτικό-co-γλυκολίδιο (PLGA).	
Πολυανυδρίδες	
Πολυορθοεστέρες	

Πίνακας 4: Βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή.

Όλα τα συστήματα που περιγράφηκαν ως τώρα είναι βασισμένα σε πολυμερή τα οποία δεν αλλάζουν τη χημική τους δομή παρά μόνο όταν λαμβάνει χώρα διάγκωση. Ωστόσο, μεγάλη προσοχή και έρευνα συγκεντρώνεται στα βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα με τα πολυμερή αυτά είναι ότι αποικοδομούνται και διασπώνται σε βιολογικά αποδεκτά μόρια τα οποία μεταβολίζονται και απεκκρίνονται από τον οργανισμό μέσω φυσιολογικών μεταβολικών μονοπατιών. Έτσι, αφού απομακρύνονται ως αποτέλεσμα μιας φυσιολογικής βιολογικής διαδικασίας, απαλείφουν την ανάγκη απομάκρυνσης του συστήματος μεταφοράς του φαρμάκου όταν η απελευθέρωση του τελευταίου έχει ολοκληρωθεί. Τα περισσότερα βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή σχεδιάζονται έτσι ώστε να διασπώνται ως αποτέλεσμα υδρόλυσης των πολυμερικών αλυσίδων σε βιολογικά αποδεκτές και προοδευτικά μικρότερες ενώσεις. Σε μερικές περιπτώσεις (π.χ. πολυλακτίδια, πολυγλυκολίδια και τα συμπολυμερή τους) τα πολυμερή θα διασπαστούν τελικά σε γαλακτικό οξύ και σε γλυκολικό οξύ και θα εισαχθούν στο κύκλο του Krebs, ώστε να διασπαστούν περαιτέρω σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό και να απεκκριθούν διαμέσου της κανονικής διαδικασίας. Η αποικοδόμηση μπορεί να λάβει χώρα διαμέσου

μιας υδρόλυσης σε όλο τον όγκο, κατά την οποία το πολυμερές διασπάται με τρόπο αρκετά ομοιόμορφο σε όλη την μήτρα, όπως γίνεται εμφανές στην εικόνα 30.



Εικόνα 30: Αποδέσμευση φαρμάκου από α) μαζικά και β) επιφανειακά βιοαποικοδομήσιμα συστήματα

Σε κάποια αποικοδομήσιμα πολυμερή, κυρίως πολυανυδρίτες και πολυ(όρθο εστέρες), η αποικοδόμηση πραγματοποιείται μόνο στην επιφάνεια του πολυμερούς, έχοντας ως αποτέλεσμα έναν βαθμό απελευθέρωσης ανάλογο με την επιφάνεια του συστήματος απελευθέρωσης. Εντούτοις, τα βιοαποικοδομήσιμα αυτά υλικά μπορεί να παράγουν παραπροϊόντα, επιθυμητά και μη, τα οποία θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν καθώς υπάρχει ένα πλήθος παραγόντων τα οποία μπορούν να επηρεάσουν την αποικοδόμηση. Στον Πίνακα 5 αναφέρονται κάποιοι απ' αυτούς τους παράγοντες.[33]

ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ
<ul style="list-style-type: none"> • Χημική δομή
<ul style="list-style-type: none"> • Χημική σύνθεση
<ul style="list-style-type: none"> • Παρουσία ιοντικών ομάδων
<ul style="list-style-type: none"> • Μοριακό βάρος
<ul style="list-style-type: none"> • Συνθήκες αποστείρωσής και αποθήκευσης
<ul style="list-style-type: none"> • Σχήμα
<ul style="list-style-type: none"> • Μορφολογία (άμορφο/κρυσταλλικό)
<ul style="list-style-type: none"> • Προσοφώντα ιόντα ή λιπίδια ή νερό και απορροφητικότητα

Πίνακας 5: Ανασταλτικοί παράγοντες βιοαποικοδόμησης.

4.6 Πολυμερή που μελετήθηκαν στην παρούσα έρευνα

Στην παρούσα εργασία συντέθηκαν υλικά με αρχή την ακινητοποίηση ανιοντικών φωσφονικών σε κατιοντικά πολυμερή μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Στις επόμενες δύο ενότητες παρουσιάζονται τα πολυμερή και τα φωσφονικά που χρησιμοποιήθηκαν.

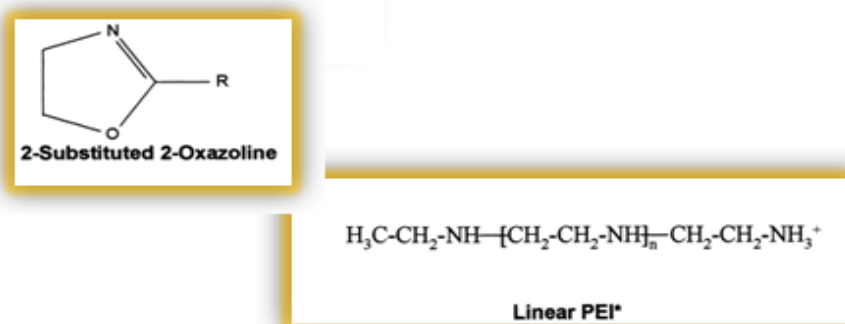
4.6.1 Κατιοντικά Πολυμερή

Τα κατιοντικά πολυμερή που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι η πολυαιθυλενιμίνη (PEI) και το πολυδιαλλυλδιμεθυλαμμωνίουχο χλωρίδιο (PDC) μεσαίου και πολύ χαμηλού μοριακού βάρους.

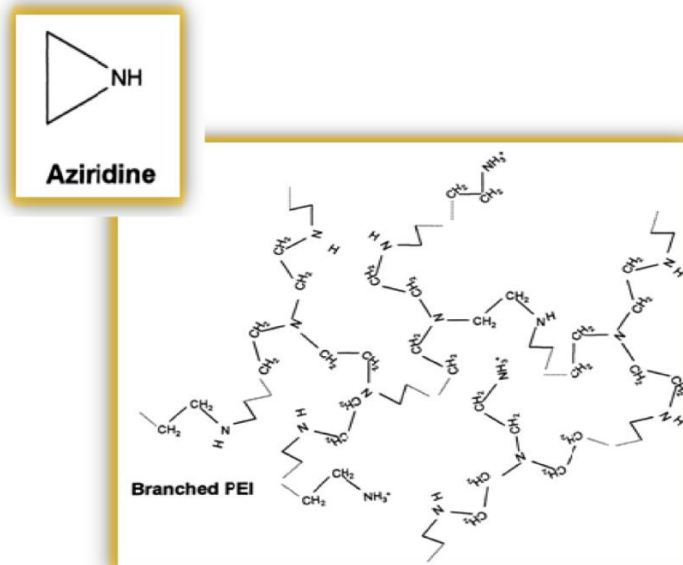
4.6.1α Πολυαιθυλενιμίνη (PEI)

Η πολυαιθυλενιμίνη είναι ένα γνωστό πολυμερές το οποίο έχει ευρέως χρησιμοποιηθεί σε διεργασίες όπως η παραγωγή χαρτιού, ο καθαρισμός του νερού και η παρασκευή

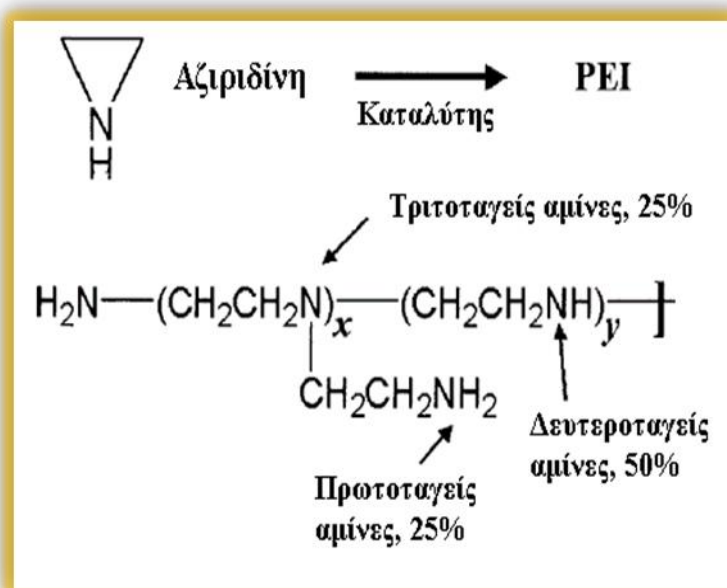
καλλυντικών. Διατίθεται σε δύο κυρίως μορφές, σε γραμμική και διακλαδισμένη δομή. Η διακλαδισμένη μορφή παράγεται με πολυμερισμό μονομερών αζιριδίνης με όξινη κατάλυση. Η γραμμική μορφή παράγεται με την ίδια διαδικασία που παράγεται το διακλαδισμένο πολυμερές αλλά σε πολύ χαμηλή θερμοκρασία ή με μονομερή διυποκατεστημένης οξαζολιδίνης (εικόνα 31, εικόνα 32). Η βασική μονάδα του PEI έχει ένα σκελετό δύο ανθράκων που ακολουθούνται από ένα άτομο Αζώτου. Αποτελεί μια υψηλής ενεργότητας αλειφατική πολυαμίνη και η επαναλαμβανόμενη μονάδα της αιθυλαμίνης διασφαλίζει υψηλή διαλυτότητα αυτών των πολυμερών στο νερό. Διαθέτει ~25 % πρωτοταγείς αμίνες, ~50 % δευτεροταγείς αμίνες και ~25 % τεταρτοταγείς και κάθε μια έχει τη δυνατότητα να πρωτονιωθεί (εικόνα 33). Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των δυο δομών του PEI είναι η μεγάλη πυκνότητα θετικού φορτίου, καθώς κάθε τρίτο άτομο στην αλυσίδα είναι ένα άζωτο το οποίο μπορεί να πρωτονιωθεί. Εξαιτίας αυτού του χαρακτηριστικού το PEI μπορεί να δημιουργήσει σύμπλοκα με το DNA και να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω σε γενετικές αντιδράσεις με ευκαρυωτικά κύτταρα. Η πολυαιθυλενιμίνη αλληλεπιδρά με το DNA μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων μεταξύ του πολυκατιόντος και των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων του DNA. Με τον ίδιο τρόπο συνδέεται και με τα φωσφονικά στην παρούσα εργασία.



Εικόνα 31: Η γραμμική μορφή του PEI παράγεται με μονομερή αζιριδίνης σε πολύ χαμηλή θερμοκρασία ή με μονομερή διυποκατεστημένης οξαζολιδίνης.



Εικόνα 32: Η διακλαδισμένη μορφή του PEI παράγεται με πολυμερισμό μονομερών αζιριδίνης με όξινη κατάλυση.



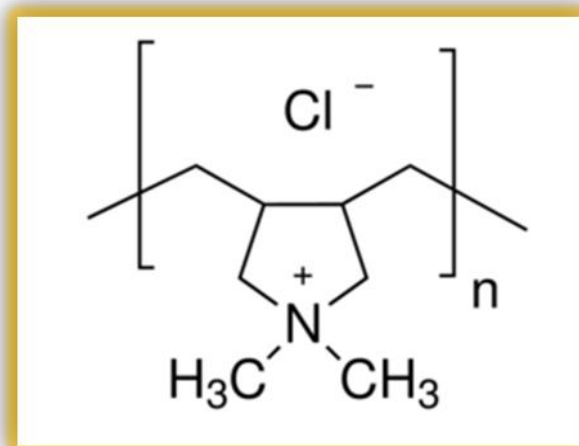
Εικόνα 33: Παρασκευή πολυαιθυλενιμίνης με αντίδραση πολυμερισμού

Η δομή που εμείς χρησιμοποιήσαμε είναι η διακλαδισμένη από την εταιρία Polyscience Inc. Το μοριακό βάρος της βάρους είναι 70 kDa και είναι ένα διαφανές, άχρωμο, ημίρρεστο υγρό με πυκνότητα $\sim 1,038 \text{ g/cm}^3$ και με χαμηλό εσωτερικό ιξώδες σε διάλυμα. [42]

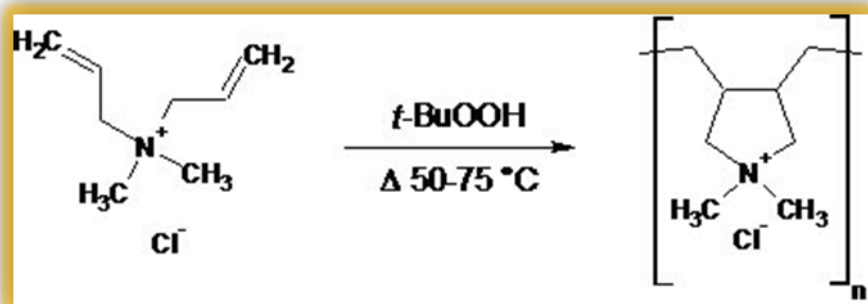
4.6.1β Πολύ(διαλλυλδιμεθουλαμμώνιο χλωρίδιο) (PDC)

Το PDC είναι ένα υψηλά κατιοντικό πολυμερές με μοριακά βάρη εκατοντάδων χιλιάδων Dalton, μπορεί και ένα εκατομμύριο για κάποια παράγωγα. Περιέχει ένα τεταρτοταγές άζωτο το οποίο του δίνει τη δυνατότητα να δεσμεύει τα φωσφονικά στην παρούσα μελέτη δια μέσου ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Το κατιοντικό του φορτίο το καθιστά ικανό κροκιδωτικό μέσο (flocculant). Το PDC είναι συνήθως σε μορφή υδατικού διαλύματος από 10 έως 50 % βάρος κατά βάρος. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν δύο παράγωγα του πολυμερούς αυτού: PDC πολύ χαμηλού μοριακού βάρους μικρότερο από 100 KDa σε υδατικό διάλυμα 35 % wt και μεσαίου μοριακού βάρους 200-350 KDa σε υδατικό διάλυμα 20 % wt.

Η δομική μονάδα του PDC (εικόνα 34) σχηματίζεται με την αντίδραση δύο αλλυλοχλωριδίων με μια διμεθουλαμίνη και μετά πολυμερίζεται μέσω ριζών με οργανικό υπεροξείδιο σαν καταλύτη (εικόνα 35).



Εικόνα 34: Το μονομερές του PDC.



Εικόνα 35: Σύνθεση μονομερούς PDC.

Το PDC χρησιμοποιείται στην επεξεργασία υδατικών αποβλήτων ως οργανικό πηκτικό που εξουδετερώνει τα αρνητικά φορτισμένα κολλοειδή και μειώνει τον όγκο λάσπης (sludge) σε σύγκριση με τα ανόργανα πηκτικά. Χρησιμοποιείται επιπλέον στη βιομηχανία χαρτιού. [45]

4.7 Ανιοντικά φωσφονικά

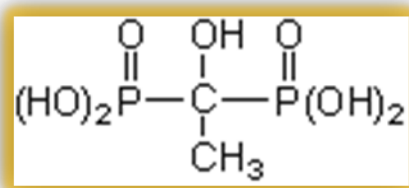
Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν το 1-υδροξύ αιθυλοδιεν-1,1-διφωσφονικό οξύ (1-Hydroxy Ethylidene-1,1-Diphosphonic Acid, HEDP) και το Αιθυλενοδιάμινο τετρα(μεθυλενοφωσφονικό οξύ (Ethylenediamine-tetra(methylenephosphonic acid) (EDTMP)).

4.7.1 Υδροξυαιθυλένο-διφωσφονικό οξύ (HEDP)

Το HEDP είναι ένας οργανοφωσφονικός παρεμποδιστής διάβρωσης και κρυστάλλωσης (scale inhibitor). Μπορεί να σχηματίσει σταθερές σύνθετες χηλικές ενώσεις με ιόντα Fe, Cu και Zn και κυρίως με αλκαλικές γαίες. Μπορεί επίσης να διαλύσει τα οξειδωμένα υλικά από τις επιφάνειες των μετάλλων αυτών. Το HEDP παρουσιάζει εξαιρετικές παρεμποδιστικές ιδιότητες σε θερμοκρασίες μικρότερες των 250 °C. Επιπλέον παρουσιάζει σταθερότητα κάτω από υψηλές τιμές του pH, υδρολύεται δύσκολα, και δύσκολα αποσυντίθεται υπό φυσιολογικές συνθήκες φωτός και θερμότητας. Η αντοχή του στις οξειδώσεις από οξέα, βάσεις και χλωρίνη είναι καλύτερη από άλλων οργανοφωσφορικών οξέων. Το HEDP μπορεί να αντιδράσει με μεταλλικά ιόντα σε υδατικά συστήματα και να σχηματίσει χηλικά σύμπλοκα, ειδικότερα με το ασβέστιο. Έτσι, το HEDP έχει καλές αντιδιαβρωτικές ιδιότητες και παρεμποδίζει τον σχηματισμό δυσδιάλυτων αλάτων σε συστήματα βιομηχανικού ψυκτικού νερού. Όταν προστεθεί σε άλλα παρασκευάσματα χημικών παρεμποδιστών

αλάτων στο βιομηχανικό νερό, παρουσιάζει πολύ καλή συνέργεια με αυτά. Η στερεά κατάσταση του HEDP έχει την μορφή άσπρης κρυσταλλικής σκόνης, κατάλληλη για χρήση σε ψυχρές και παγωμένες περιοχές. Μάλιστα, λόγω της υψηλής του καθαρότητας, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως καθαριστικός παράγοντας σε ηλεκτρονικά αντικείμενα, και ως πρόσθετο σε καθημερινά χημικά. Τέλος, χρησιμοποιείται σε βραστήρες χαμηλής πίεσης, στη χημική βιομηχανία, στη μεταλλουργία στη λίπανση κ.α. Στην υφαντική βιομηχανία το HEDP χρησιμοποιείται ως σταθεροποιητής του βαψίματος και βελτιωτικός παράγοντας. [46]

Το HEDP χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ως διφωσφονικό αντιοστεοπορωτικό φάρμακο αφού είναι ταυτόσημο με το ετιδρονικό οξύ, γνωστό για τη χρήση του στη θεραπεία της οστεοπόρωσης. Έχει γενικό μοριακό τύπο $C_2H_8O_7P_2$ και μοριακό βάρος 206,02. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε με τη μορφή υδατικού διαλύματος 60 % wt Dequest 2010 της εταιρίας ThermPhos. Στην εικόνα 36 φαίνεται η δομή του ενώ στον πίνακα 6 φαίνονται ορισμένα χαρακτηριστικά του.



Εικόνα 36: Μοριακή δομή HEDP.

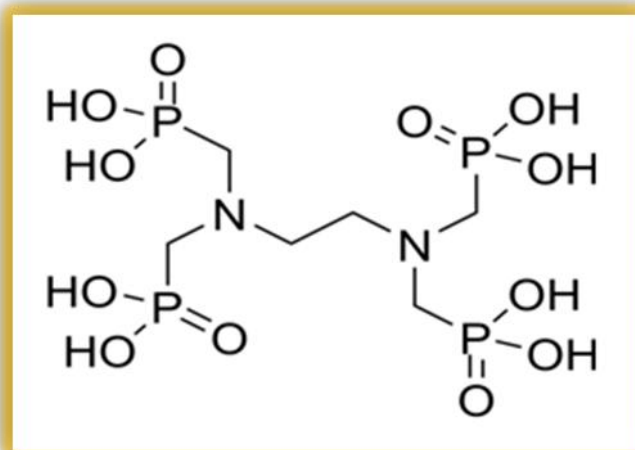
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ
Εμφάνιση	Άχρωμο ή ελαφρά κίτρινο διαυγές υγρό
Ενεργή περιεκτικότητα (HEDP)%	58.0 - 62.0
Φωσφορώδες οξύ (σαν PO_3^{3-})%	2.0 max
Φωσφορικό οξύ (σαν PO_4^{3-})%	0.8 max
Χλωρίδιο (σαν Cl^-)%	0.01 max
pH (1% διάλυμα)	2 max
Πυκνότητα (20°C)g/cm ³	1.40
Περιεκτικότητα σε Σίδηρο σε ppm	10 max

Πίνακας 6: Χαρακτηριστικά γνωρίσματα HEDP.

4.7.2 Αιθυλενοδιαμινη τετρα(μεθυλενοφωσφονικό οξύ) (EDTMP)

Το EDTMP είναι ένα τετραφωσφονικό οξύ με χηλικές και αντιδιαβρωτικές ιδιότητες. Συνήθως χρησιμοποιείται το άλας του όμως στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα του (25% wt Dequest 2046 της εταιρίας ThermPhos) καθώς το στερεό έχει μικρή διαλυτότητα στο νερό. Ανήκει στα αζωτούχα οργανικά πολυφωσφονικά οξέα αφού στο μόριο του έχει τέσσερα φωσφονικές ομάδες οι οποίες συνδέονται με μεθυλικές ομάδες και αυτές καταλήγουν σε τέσσερα άτομα αζώτου (εικόνα 37). Έχει μοριακό βάρος 436 g/mol και η πυκνότητα του διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε είναι 1,26% g/ml.

Ως διαβρωτικός αναστολέας είναι 3-5 φορές καλύτερος απ' ό τι τα ανόργανα πολυφωσφορικά, έχει μεγάλη χημική σταθερότητα και θερμική ανθεκτικότητα. Μπορεί να αποπρωτονιωθεί πλήρως μέχρι αρνητικού φορτίου «-8» (σε pH > 10) και γι' αυτό το λόγο μπορεί να προσδεθεί χηλικά με μεταλλικά ιόντα και να καταστρέψει την φυσική κρυσταλοποίηση αλάτων ασβεστίου (π.χ. ανθρακικό ασβέστιο, θειικό ασβέστιο, κτλ). Το EDTMP σε συνδυασμό με το ^{153}Sm έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία οστεοσαρκώματος, μελανωμάτων και στις οστικές μεταστάσεις. [43, 47]



Εικόνα 37: Δομή EDTMP.

5. Σκοπός της εργασίας

Η ανάγκη για την ελεγχόμενη απελευθέρωση διαφόρων βιοδραστικών ουσιών αυξάνει ολοένα και περισσότερο το ενδιαφέρον για την χρήση της τεχνολογίας ελεγχόμενης αποδέσμευσης και τις εφαρμογές της. Ο σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι η αναζήτηση και η ανάπτυξη ενός συστήματος ελεγχόμενης αποδέσμευσης που θα επιτρέπει την σταδιακή και ελεγχόμενη απελευθέρωση διφωσφονικών από μια πολυμερική μήτρα με εφαρμογή στην ιατρική και συγκεκριμένα στην θεραπεία της οστεοπόρωσης.

Πιο συγκεκριμένα έγιναν συνθέσεις υλικών ώστε να ακινητοποιηθούν ανιοντικά φωσφονικά σε κατιοντικά πολυμερή και έπειτα μελετήθηκε ο ρυθμός αποδέσμευσης των φωσφονικών αυτών σε συνθήκες που προσομοιάζουν το γαστρικό περιβάλλον. Τα συστήματα αυτά είναι τύπου μήτρας και η αποδέσμευση της δραστικής ουσίας ελέγχεται από την εισχώρηση του νερού και επομένως την καταστροφή των ηλεκτροστατικών έλξεων πολυμερούς-διφωσφονικού.

6. Πειραματικό μέρος

6.1 Εισαγωγή

Η έρευνα επικεντρώθηκε σε πολυμερή μικρού έως μεγάλου μοριακού βάρους, κατιοντικά σε $\text{pH} = 7$, βιοδιασπώμενα και φιλικά προς το περιβάλλον με διαφορετικές λειτουργικές μονάδες. Επιλέξαμε κατιοντικά πολυμερή για να μπορέσουμε να εγκλωβίσουμε στο εσωτερικό τους ανιοντικά φωσφονικά και βιοδιασπώμενα για να είναι φιλικά με τον ανθρώπινο οργανισμό και να μπορούν πιθανόν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή φαρμάκων. Χρησιμοποιήθηκαν τα πολυμερή Πολυαιθυλενιμίνη (PEI), Πολύ(διαλλυλδιμεθύλαμμώνιο χλωρίδιο) PDC μεσαίου και πολύ χαμηλού μοριακού βάρους. Το πολυμερές PEI είναι γνωστό για τη χρήση του ως μεταφορέας γονιδίων δημιουργώντας σύμπλοκα με το DNA με σκοπό τη θεραπεία του γονιδιώματος. [42]

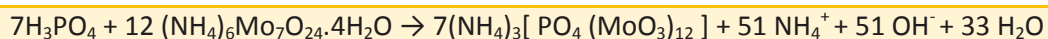
Ως δραστικές ουσίες χρησιμοποιήθηκαν τα ανιοντικά φωσφονικά οξέα υδροξυαιθυλενοδιφωσφονικό οξύ (HEDP) και αιθυλενοδιαμινική τετρα(μεθυλενοφωσφονικό οξύ) (EDTMP) (τετραφωσφονικό). Προτιμήσαμε τα δύο αυτά φωσφονικά γιατί είναι γνωστά για τις ιατρικές τους εφαρμογές. Το HEDP είναι το ετιδρονικό οξύ, γνωστό για τη χρήση του στη θεραπεία της οστεοπόρωσης. Προγενέστερες έρευνες στο εργαστήριο μας έδειξαν ότι το HEDP σε συνδυασμό με κατιοντικά πολυμερή της σειράς CATIN αποδεσμεύτηκε σταδιακά σε διάλυμα που προσομοιάζει το γαστρικό περιβάλλον. [44] Το EDTMP σε συνδυασμό με το ^{153}Sm αναφέρεται στη βιβλιογραφία ότι έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία οστεοσαρκώματος, μελανωμάτων και στις οστικές μεταστάσεις. [43]

Η πορεία γενικά που ακολουθήθηκε σ' αυτήν την εργασία είναι:

- Σύνθεση των συστημάτων προς μελέτη με συνδυασμό των πολυμερών και φωσφονικών που περιγράφονται παραπάνω σε pH από 1 έως 7.
- Χαρακτηρισμός των υλικών με την φασματοσκοπία IR.
- Στοιχειακή ανάλυση των υλικών για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε φώσφορο (P).
- Μελέτη της αποδέσμευσης φωσφονικών μετά από την τοποθέτηση χαπιού που περιέχει το υλικό και άμυλο (ως έκδοχο) σε φιάλη με διάλυμα σε περιβάλλον που προσομοιάζει το γαστρικό, με τη χρήση φασματοφωτομετρικής μεθόδου.

6.2 Όργανα

- Οι μετρήσεις των συγκεντρώσεων των φωσφορικών πραγματοποιήθηκαν με φασματοφωτόμετρο *HACH DR/890* (πρόγραμμα 79). Η μέθοδος στηρίζεται στο σχηματισμό ενός συμπλόκου του φωσφορικού ιόντος με μια ένωση του μολυβδαινίου σε διάλυμα οξέος σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Το άχρωμο φωσφομολυβδαινικό σύμπλοκο (Mo IV) με προσθήκη αναγωγικού διαλύματος παρουσία θεικού οξέως μετατρέπεται σε μπλε ανηγμένη μορφή (Mo V). Η ένταση του μπλε χρώματος είναι ανάλογη με την ποσότητα φωσφορικών που υπάρχει στο δείγμα και ποσοτικοποιείται φασματοφωτομετρικά στα 830 nm.

- Μετρήσεις των συγκεντρώσεων φωσφορικών στα δείγματα έγιναν και με φασματοσκοπία NMR με τη χρήση του Φασματομέτρου *Bruker AMX-500*.

- Τα φάσματα για το χαρακτηρισμό των υλικών που παρασκευάστηκαν καταγράφηκαν με το φασματοφωτόμετρο *FT-IR Perkin-Elmer FT 1760*.

- Για τη ρύθμιση του pH των διαλυμάτων που συντέθηκαν χρησιμοποιήθηκε το πεχάμετρο της εταιρίας WTW pH 315i pH/mV Pocket Meter.

- Τέλος χρησιμοποιήθηκε λάμπα UV Laborgerate, VETTER GMBH, με μήκη κύματος 254 nm και 366 nm.

6.3 Διαλύματα/Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν προβάλλονται αναλυτικά στον πίνακα 7.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΕΤΑΙΡΙΑ
Πολυαιθυλενιμίνη (PEI) (διακλαδισμένο, MB 70,000)	Polyscience
Πολύ(διαλλυλδιμέθυλαμμώνιο χλωρίδιο) σε διάλυμα, μεσαίου μοριακού βάρους (MB 200,000- 350,000), (PDC M) 20 wt. % σε H ₂ O	Sigma- Aldrich
Πολύ(διαλλυλδιμέθυλαμμώνιο χλωρίδιο) σε διάλυμα, πολύ χαμηλού μοριακού βάρους (MB<100,000), (PDC VI) 35 wt. % σε H ₂ O	Sigma- Aldrich
Υδροξυαιθυλένο-διφωσφονικό οξύ (HEDP) 60% (<i>Dequest</i> 2010)	ThermPhos
Αιθυλενοδιαμινική τετρα(μεθυλενοφωσφονικό οξύ) (EDTMP) 25% wt (<i>Dequest</i> 2046)	ThermPhos
Τετραϋδρίτης Μολυβδαινικού αμμωνίου (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	Riedel-de Haën
L-Ασκορβικό οξύ C ₆ H ₈ O ₆	Sigma- Aldrich
Θειικό οξύ	Sigma-Aldrich
Διάλυμα υποχλωριώδους Νατρίου 5%	Sigma-Aldrich
Χλωριούχο Νάτριο NaCl	Riedel-de Haën
Υδροχλώριο HCl 37%	Sigma-Aldrich
Υδροξείδιο του Νατρίου NaOH	Riedel-de Haën
Άμυλο (C ₆ H ₁₀ O ₅) _n	Merck
Δισόξινο φωσφορικό Κάλιο (KH ₂ PO ₄)	Riedel-de Haën
Όξινο υπερθειικό Κάλιο K ₂ SO ₄ ·KHSO ₄ ·2KHSO ₅	Merck

Πίνακας 7 :Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της ερευνητικής εργασίας

Αναγωγικό διάλυμα

Διαλύονται:

α) 1,00 g Μολυβδαινικού αμμωνίου ((NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O) σε 50 ml απιονισμένου H₂O.

β) 1,76 g Ασκορβικού οξέος (C₆H₈O₆) σε 100 ml απιονισμένου H₂O.

γ) Αραιώνονται 17 ml πυκνού Θεικού οξέος (H₂SO₄) σε 200 ml απιονισμένου H₂O.

Λαμβάνονται 39 ml από α), 60 ml από β) και 125 ml από γ) και συμπληρώνονται με απιονισμένο νερό σε μια ογκομετρική φιάλη 250 ml.

Διάλυμα τοποθέτησης χαπιού

Σε κωνική φιάλη τοποθετούμε 1 lt H₂O, προστίθενται 5,8 g NaCl ώστε η αλατότητα του διαλύματος να γίνει 0,1 M και ρυθμίζουμε το pH στο 3 με την προσθήκη αραιού διαλύματος HCl.

Χάπι

Το χάπι αποτελείται από το σύμπλεγμα φωσφονικού-πολυμερούς και άμυλο ώστε ο τελική του μάζα να είναι 2 g. Η ποσότητα του υλικού είναι τόση, ώστε όταν αποδεσμευτεί όλο το φωσφονικό έχουμε συγκέντρωση 5 ppm P.

Διάλυμα τοποθέτησης χαπιού για τη λήψη φασμάτων NMR

Το χάπι φτιάχτηκε με τον ίδιο τρόπο με τη διαφορά ότι υπολογίστηκαν 500 μmol φωσφόρου στο υλικό (στην παρασκευή που περιγράφηκε προηγουμένως το κάθε χάπι περιέχει 50 μmol P) και το χάπι τοποθετήθηκε σε 20 ml διαλύματος (ενώ στα πειράματα αποδέσμευσης το διάλυμα τοποθέτησης του χαπιού είναι 1000 ml) συνθηκών ίδιων με τα πειράματα αποδέσμευσης. Το πρότυπο διάλυμα περιέχει 0,6 g [Cr(acac)₃] (βοηθητικό στην αποδιέγερση του πυρήνα P, έτσι ώστε να διαρκεί λιγότερο η λήψη ³¹P φάσματος NMR) και 400 μmol KH₂PO₄ (πρότυπο) σε 10ml D₂O.

6.4 Πειραματική διαδικασία

Σύνθεση υλικών

Παρασκευάστηκαν τα εξής υλικά:

- PEI – HEDP
- PEI – EDTMP
- PDCvI – HEDP
- PDCvI – EDTMP
- PDCm – HEDP
- PDCm – EDTMP

Όλα τα υλικά παρασκευάστηκαν με αναλογία moles πολυμερούς – φωσφονικού 1:1, εκτός από το ζευγάρι PEI – HEDP που ήταν 1:0,5, σε νερό μέχρι τελικού όγκου 25 ml. Το pH ρυθμίζεται από 1 έως 7, οπότε λαμβάνονται 7 υλικά για κάθε συνδυασμό. Έπειτα τα συντεθέντα υλικά εισάγονται στο φούρνο (~ 40 °C) μέχρι να αποβάλουν όλο το νερό και να μείνουν επί ξηρού.

Χαρακτηρισμός υλικών

Μετά τη σύνθεση των υλικών λήφθηκαν φάσματα IR και έπειτα έγινε στοιχειακή ανάλυση φωσφόρου με βιβλιογραφική μέθοδο [48].

Μετρήσεις με το φασματοφωτόμετρο HACH DR/890

Οξειδωση με υποχλωριώδες Νάτριο (NaOCl)

Αρχικά τοποθετούμε το χάπι στην κωνική φιάλη, με προσοχή έτσι ώστε να είναι στο κέντρο του πυθμένα της φιάλης. Το σύστημα αφήνεται σε ηρεμία, χωρίς ανάδευση. Κάθε μία ώρα για οκτώ ώρες λαμβάνουμε 10 ml δείγμα από την επιφάνεια του διαλύματος ώστε οι συνθήκες λήψης κάθε φορά να είναι η ίδιες και το τοποθετούμε σε κυψελίδα του φασματοφωτόμετρου. Προσθέτουμε ποσότητα διαλύματος υποχλωριώδους νατρίου 5 % (NaOCl) ανάλογα με το φωσφονικό που μελετάμε (για 1mol φωσφονικού υπολογίζω 6mol υποχλωριώδους Νατρίου) και τοποθετούμε την κυψελίδα σε υδατόλουτρο 60 °C για 1h. Η αναλογία 1mol φωσφονικό προς 6mol υποχλωριώδους Νατρίου προτάθηκε γιατί το HEDP έχει δύο ισχυρούς ομοιοπολικούς δεσμούς (P-C-P) που πρέπει να αποικοδομηθούν και το EDTMP τέσσερεις και επομένως το υποχλωριώδες νάτριο προστίθεται σε περίσσεια. Αφού

τα φωσφωρικά μετατραπούν σε φωσφορικά με τη βοήθεια του οξειδωτικού, προστίθεται αναγωγικό (για 1η υποχλωριώδους Νατρίου υπολογίζω την διπλάσια ποσότητα ασκορβικού) και τοποθετείται ξανά στο υδατόλουτρο για 40'. Με το ίδιο σκεπτικό, ελέγχεται αν η ποσότητα του αναγωγικού μέσου βρίσκεται και αυτή σε περίσσεια έτσι ώστε να μπορεί να εξουδετερώσει και την επιπλέον ποσότητα του οξειδωτικού μέσου αλλά και να μετατρέψει το φωσφορικό οξύ στο πεντασθενές σύμπλοκο. Τέλος, λαμβάνουμε τις μετρήσεις με τη βοήθεια του φασματοφωτόμετρου HACH που περιγράφεται παραπάνω. Το σύμπλοκο του μολυβδαινίου που μετράμε φαίνεται όπως στην εικόνα 38.



Εικόνα 38: Φωτογραφία κυψελίδας οργάνου HACH που περιέχει το σύμπλοκο φωσφορικού με το μολυβδαίνιο.

Οξείδωση με άλλα μέσα

Αρχικά προτάθηκε το Υπερθεικό αμμώνιο ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$) ως οξειδωτικό μέσο, στην ποσότητα του 1 mg και ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω. Από τις μετρήσεις που λάβαμε συμπεραίνεται πως παρόλο που το Υπερθεικό αμμώνιο οξειδώνει το διφωσφονικό μόνο του δεν είναι αρκετά ισχυρό για να οξειδώσει το διφωσφονικό πλήρως όταν έχει ακινητοποιηθεί στο πολυμερές οπότε απορρίφθηκε και προτιμήθηκε το υποχλωριώδες Νάτριο.

Επιπλέον δοκιμάσαμε την οξείδωση των διφωσφονικών με όξινο υπερθειικό κάλιο ($\text{K}_2\text{SO}_4 \cdot \text{KHSO}_4 \cdot 2\text{KHSO}_5$) και τη χρήση λάμπας UV και η πορεία συνεχίστηκε όπως περιγράφεται με σκοπό το σχηματισμό του μπλε συμπλόκου του μολυβδαινίου. Απ' ότι φάνηκε τα χλωρίδια που προϋπάρχουν στο διάλυμα παρεμποδίζουν την δημιουργία του μπλε συμπλόκου φωσφομολυβδαινικού γεγονός που επιβεβαιώνεται από τη βιβλιογραφία. [49] Οπότε απορρίφθηκε και αυτή η μέθοδος.

Φάσματα NMR

Από το διάλυμα που περιγράφεται παραπάνω λαμβάνονται 600 μl κάθε μία ώρα. Σ' αυτά προστίθενται 100 μl διαλύματος προτύπου (Δισόξινο φωσφορικό Κάλιο, KH_2PO_4) και λαμβάνονται τα φάσματα ^1H ή ^{31}P NMR.

7. Αποτελέσματα – Συζήτηση

7.1 Εισαγωγή

Στο παρόν κεφάλαιο παρουσιάζονται και σχολιάζονται τα πειράματα χαρακτηρισμού και οι μελέτες της αποδέσμευσης που διεξήχθησαν για τα συστήματα διφωσφονικού – πολυμερούς.

7.2 Σύνθεση υλικών και Χαρακτηρισμός υλικών

Κάθε ένα από τα τρία πολυμερή που αναλύσαμε σε προηγούμενη ενότητα συνδυάστηκε με τα δύο φωσφονικά. Αφού λοιπόν υπολογίστηκαν οι ποσότητες των αντιδραστηρίων με αναλογία φωσφονικού πολυμερούς 1:1, εκτός το ζευγάρι PEI – HEDP που ήταν 1: 0,5, ακολουθήθηκε η σύνθεση των υλικών σε pH 1 έως 7. Η πειραματική διαδικασία διεξήχθη σε θερμοκρασία δωματίου (23°C - 25°C) και ήταν η ίδια σε όλους τους συνδυασμούς. Για να ρυθμίσουμε το pH χρησιμοποιήσαμε αραιά διαλύματα HCl και NaOH.

Για τον συνδυασμό PEI-HEDP, ρυθμίζονται ξεχωριστά τα pH των δύο αντιδραστηρίων γιατί γιατί σε pH από 2 έως 5 παρατηρείται σχηματισμός κολλώδους ιζήματος με αποτέλεσμα η ανάδευση να γίνεται δύσκολα και να μην είναι εφικτή η ακριβής ρύθμιση του pH. Το ίδιο συμβαίνει και με το συνδυασμό PEI-EDTMP στα pH 1 και 2. Σε όλους τους άλλους συνδυασμούς δεν συναντήσαμε κάποιο εμπόδιο στη σύνθεση. Μετά τη σύνθεση τα υλικά τοποθετήθηκαν στο φούρνο έως να αποξηρανθούν πλήρως για να είναι δυνατή η περαιτέρω επεξεργασία τους. Κατόπιν έγινε στοιχειακή ανάλυση με τη μέθοδο Kjeldahl. Κάποια από τα υλικά ήταν επεξεργάσιμα. Κάποια όμως απορρίφθηκαν καθώς ήταν πολύ κολλώδη και δεν μπορούσαν να αναλυθούν περαιτέρω. Στους πίνακες που ακολουθούν φαίνονται ποια υλικά χρησιμοποιήθηκαν τελικά καθώς και το περιεχόμενό τους σε Φώσφορο (πίνακες 8 έως 13).

PEI-HEDP / pH σύνθεσης	Περιεχόμενο σε Φώσφορο
pH 2	4.99%
pH 3	5.02 %
pH 4	4.79 %
pH 5	4.59 %

Πίνακας 8: Υλικά σύνθεσης PEI-HEDP στα pH που επιλέξαμε και το περιεχόμενό τους σε Φώσφορο.

PEI - EDTMP / pH σύνθεσης	Περιεχόμενο σε Φώσφορο
pH 3	4.03 %
pH 4	3.02 %
pH 7	2.76 %

Πίνακας 9: Υλικά σύνθεσης PEI-EDTMP στα pH που επιλέξαμε και το περιεχόμενό τους σε Φώσφορο.

PDCv1 - EDTMP / pH σύνθεσης	Περιεχόμενο σε Φώσφορο
pH 1	4.09 %
pH 2	3.21 %
pH 3	5.09 %
pH 4	3.73 %
pH 5	3.33 %
pH 6	4.56 %
pH 7	2.29 %

Πίνακας 10: Υλικά σύνθεσης PDC very low -EDTMP σε pH1 έως 7 και το περιεχόμενό τους σε Φώσφορο.

PDCvl - HEDP / pH σύνθεσης	Περιεχόμενο σε Φώσφορο
pH 3	10.51 %
pH 4	9.79 %
pH 5	10.70 %
pH 6	14.73 %
pH 7	14.18 %

Πίνακας 11: Υλικά σύνθεσης PDC very low -HEDP σε pH 3 έως 7 και το περιεχόμενό τους σε Φώσφορο

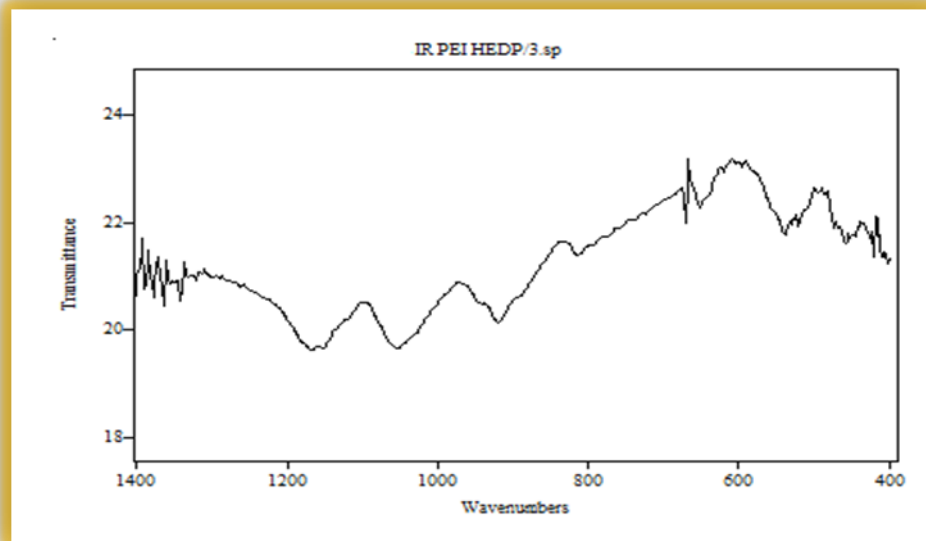
PDCm - EDTMP / pH σύνθεσης	Περιεχόμενο σε Φώσφορο
pH 1	2.73 %
pH 2	3.88 %
pH 3	2.38 %
pH 4	2.31 %
pH 5	3.67 %

Πίνακας 12: Υλικά σύνθεσης PDC medium -EDTMP στα pH που επιλέχθηκαν και το περιεχόμενό τους σε Φώσφορο.

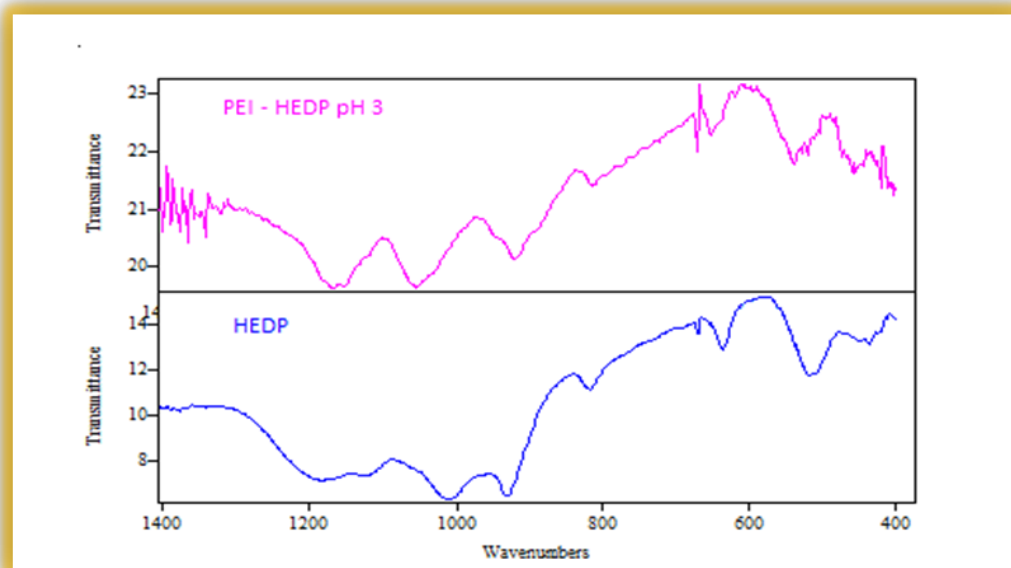
PDCm - HEDP / pH σύνθεσης	Περιεχόμενο σε Φώσφορο
pH 3	9.73 %
pH 4	10.88 %
pH 5	11.05 %
pH 6	12.40 %
pH 7	12.84 %

Πίνακας 13: Υλικά σύνθεσης PDC medium -HEDP στα pH που επιλέχθηκαν και το περιεχόμενό τους σε Φώσφορο.

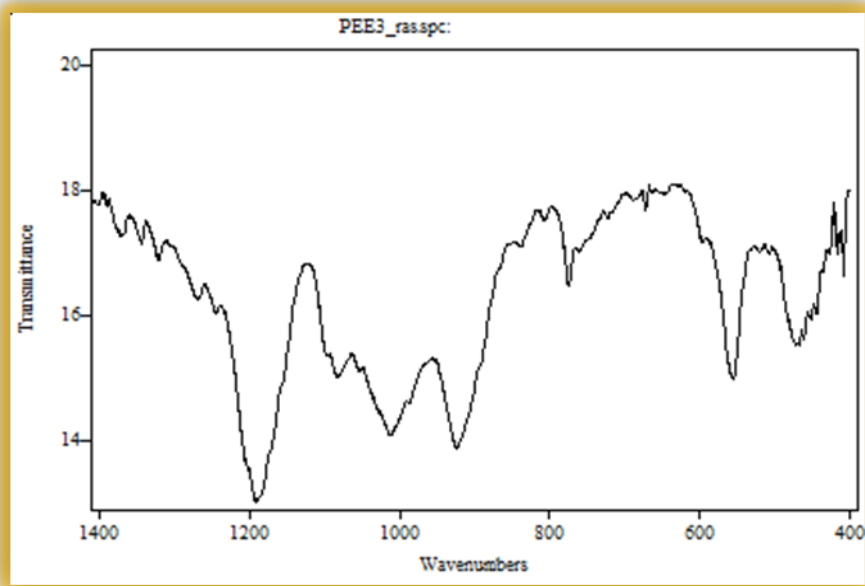
Για κάθε υλικό που περιγράφεται παραπάνω λήφθηκε φάσμα IR όπου αποδεικνύεται η ύπαρξη φωσφονικών. Παρακάτω παρουσιάζονται ενδεικτικά ένα φάσμα για κάθε συνδυασμό τα υπόλοιπα περιλαμβάνονται στο παράρτημα. (εικόνα 39 έως 43)



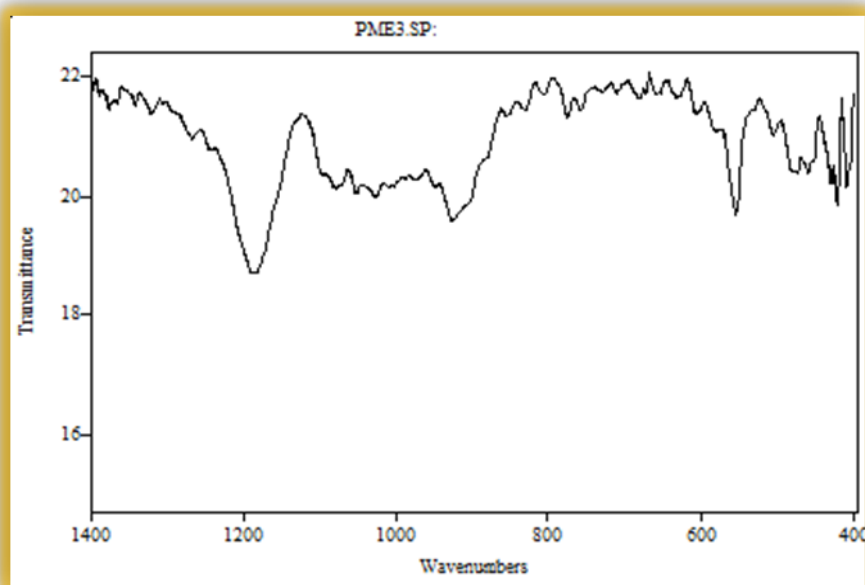
Εικόνα 39: Φάσμα PEI – HEDP σε pH3



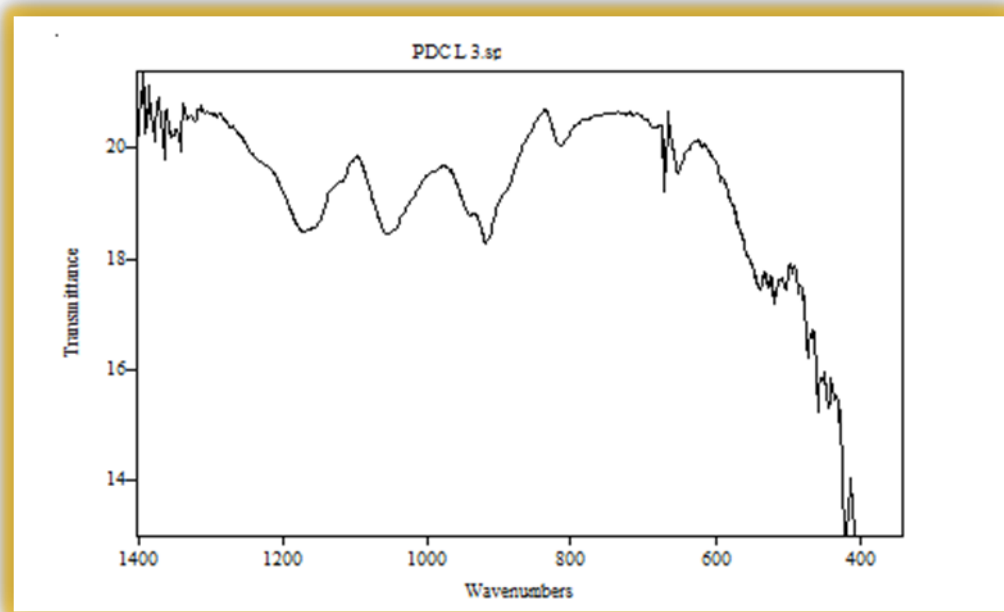
Εικόνα 40: Σύγκριση φάσματος PEI – HEDP σε pH3 με το φάσμα καθαρού HEDP.



Εικόνα 41: Φάσμα IR PEI – EDTMP pH 3



Εικόνα 42: Φάσμα IR PDC Medium - EDTMP pH 3



Εικόνα 43: Φάσμα IR PDC very low - HEDP

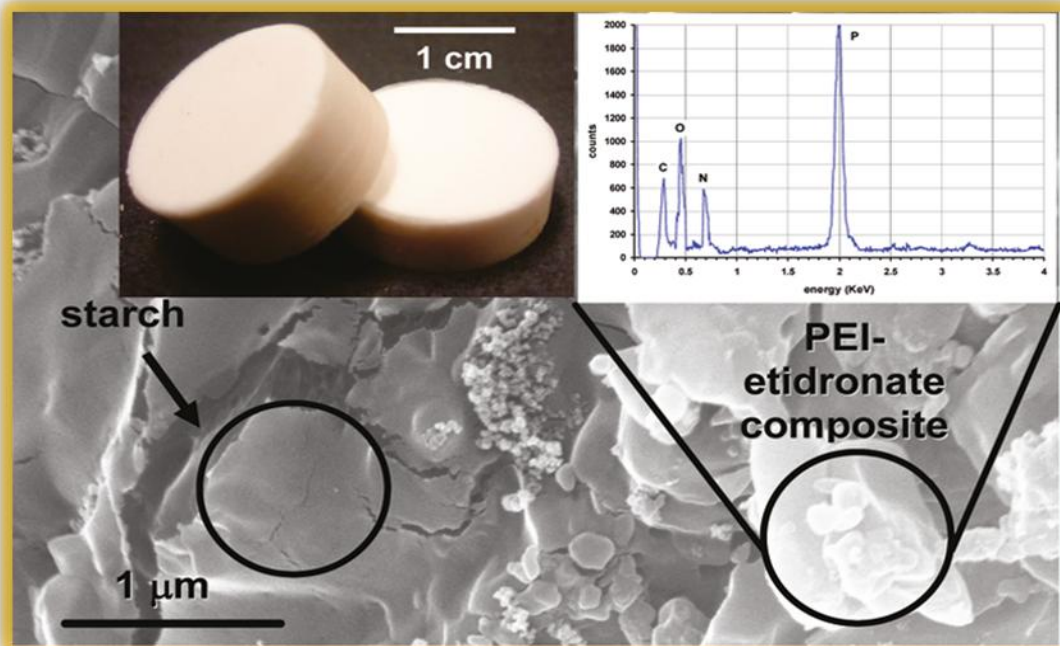
Σε όλα τα παραπάνω φάσματα καθώς και σε αυτά του παραρτήματος παρατηρούνται όλες οι χαρακτηριστικές κορυφές της λειτουργικής ομάδας του Φωσφονικού ($-\text{PO}_3\text{H}^-$) από τα 900 cm^{-1} έως τα 1200 cm^{-1} περίπου. Χαρακτηριστική η μεγάλη και οξεία κορυφή των φωσφονικών γύρω στα 1200 cm^{-1} . Παρακάτω παρουσιάζεται πίνακας 14 με τις απορροφήσεις των λειτουργικών ομάδων που περιέχουν φώσφορο.

Λειτουργικές Ομάδες	Απορροφήσεις σε cm^{-1}
P-H phosphine	2280-2440 cm^{-1} (med & shp) 950-1250 (wk) P-H bending
(O=)PO-H phosphonic acid	2550-2700 (med)
P-OR esters	900-1050 (str)
P=O phosphine oxide phosphonate phosphate phosphoramidate	1100-1200 (str)
	1230-1260 (str)
	1100-1200 (str)
	1200-1275 (str)

Πίνακας 14: Οι απορροφήσεις των λειτουργικών ομάδων που περιέχουν φώσφορο στα φάσματα IR.

7.3 Μελέτες Αποδέσμευσης

Όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 6 κατασκευάσαμε ένα χάπι (εικόνα 44) που αποτελείται από συγκεκριμένη ποσότητα υλικού και άμυλο και το τοποθετήσαμε σε διάλυμα που προσομοιάζει το γαστρικό περιβάλλον. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που πήραμε από τις μελέτες αποδέσμευσης των ήδη αναφερθέντων υλικών.



Εικόνα 44: Χάπι για πειράματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης, εικόνα της ταμπλέτας από μικροσκόπιο SEM, φάσμα EDS της ταμπλέτας που δείχνει την παρουσία φωσφόρου από το HEDP και άνθρακα C, αζώτου N, και οξυγόνου O από το πολυμερές.

7.3.1 Μελέτη συστήματος PEI-HEDP

Αρχικά δοκιμάσαμε σαν οξειδωτικό μέσο το Ammonium persulfate ($H_6N_2O_8S_2$) με τη διαδικασία που αναφέρεται στο κεφάλαιο 6 αλλά δεν ήταν αρκετά δραστικό οπότε χρησιμοποιήθηκε το υποχλωριώδες Νάτριο.

Δείγμα	Ώρα λήψης	Μετρήσεις HACH σε ppm P_2O_5
1	30'	0.168
2	1h	0.21
3	2h	0.364
4	3h	0.21
5	4h	0.462
6	5h	0.798
7	6h	1.036
8	7h	1.148
9	8h	1.176

Πίνακας 15: PEI – HEDP σε pH 2

Δείγμα	Ώρα λήψης	Μετρήσεις HACH σε ppm P_2O_5
1	30'	0.196
2	1h	0.308
3	2h	0.280
4	3h	0.308
5	4h	0.378
6	5h	0.420
7	6h	0.434
8	7h	0.672
9	8h	0.896

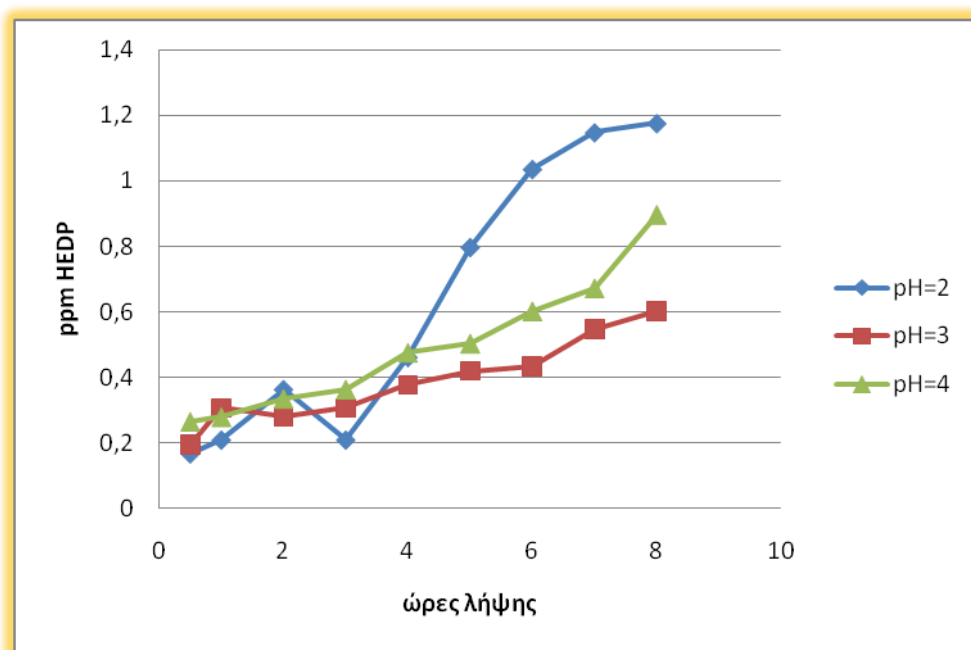
Πίνακας 16: PEI – HEDP σε pH 3

Δείγμα	Ώρα λήψης	Μετρήσεις HACH σε ppm P ₂ O ₅
1	30'	0.266
2	1h	0.280
3	2h	0.336
4	3h	0.364
5	4h	0.476
6	5h	0.504
7	6h	0.602
8	7h	0.546
9	8h	0.602

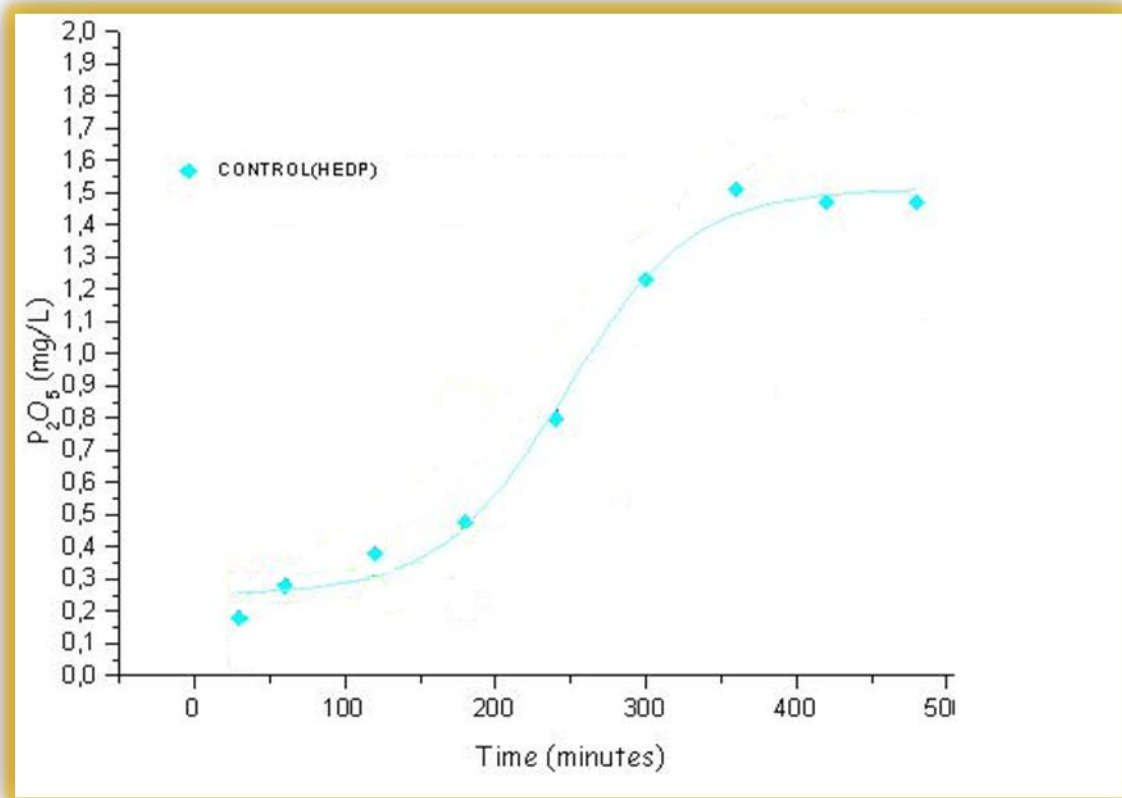
Πίνακας 17: PEI – HEDP σε pH 4

Στο υλικό με pH 5 όλος Φώσφορος απελευθερώθηκε από το πρώτο μισάωρο.

Συνολικά οι καμπύλες αποδέσμευσης παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα:



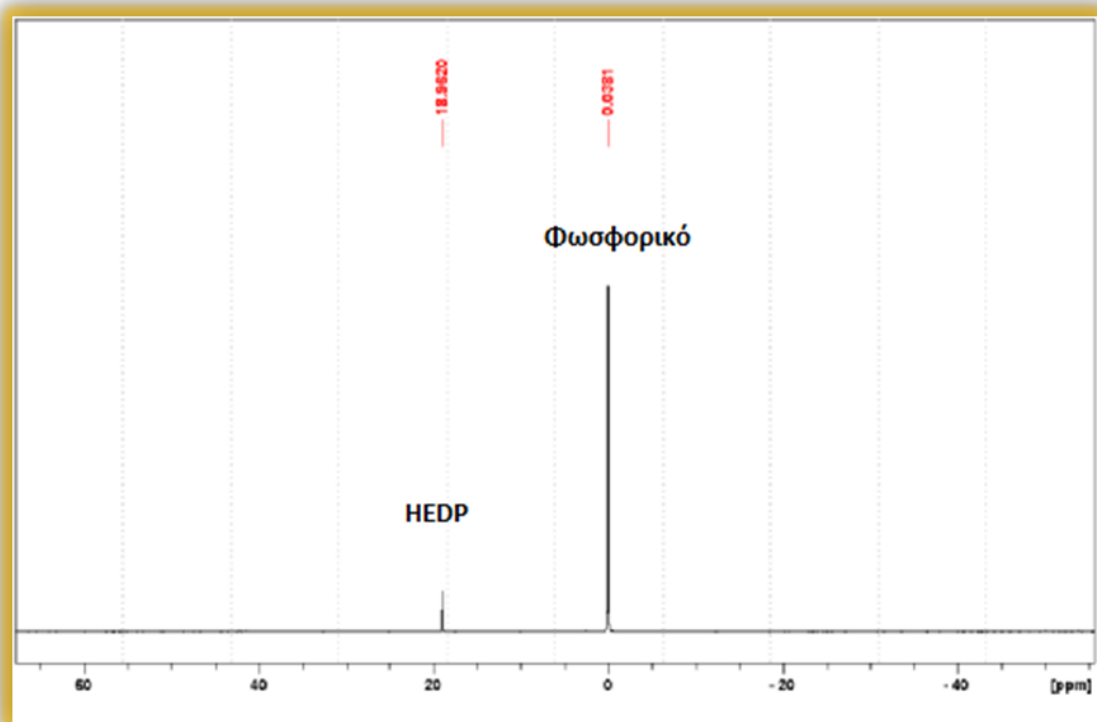
Εικόνα 45: Καμπύλες αποδέσμευσης HEDP από την πολυμερική μήτρα PEI σε pH σύνθεσης 2, 3, 4.



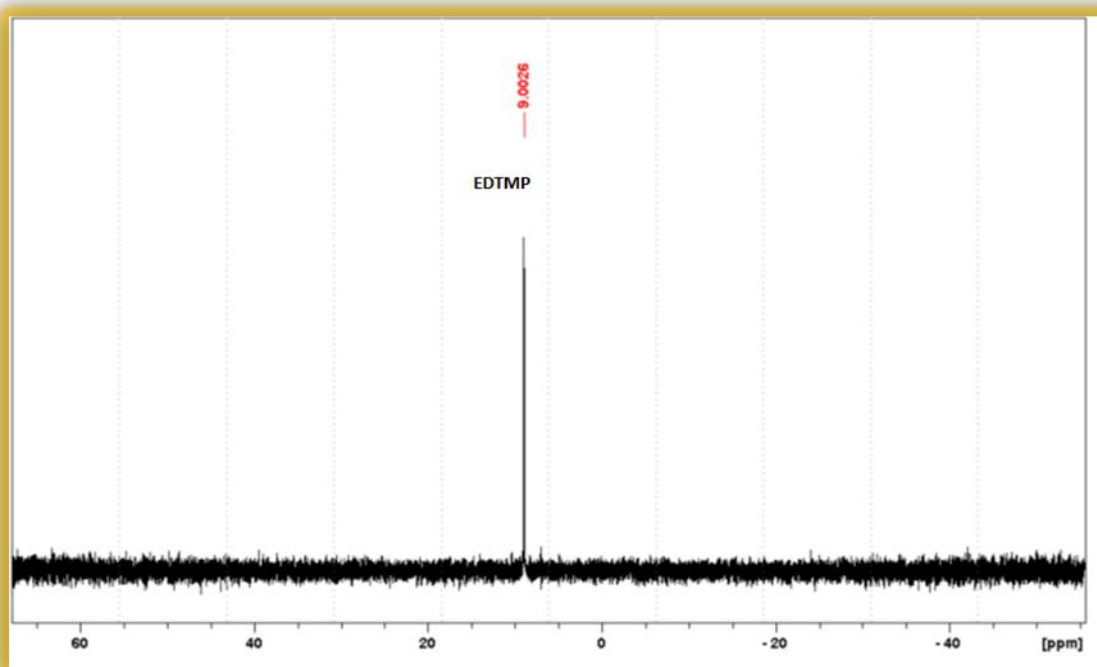
Εικόνα 46: Πρότυπη καμπύλη αποδέσμευσης φωσφονικού HEDP από σκέτο άμυλο, χωρίς πολυμερική μήτρα.

7.3.2 Μελέτη υπόλοιπων συστημάτων

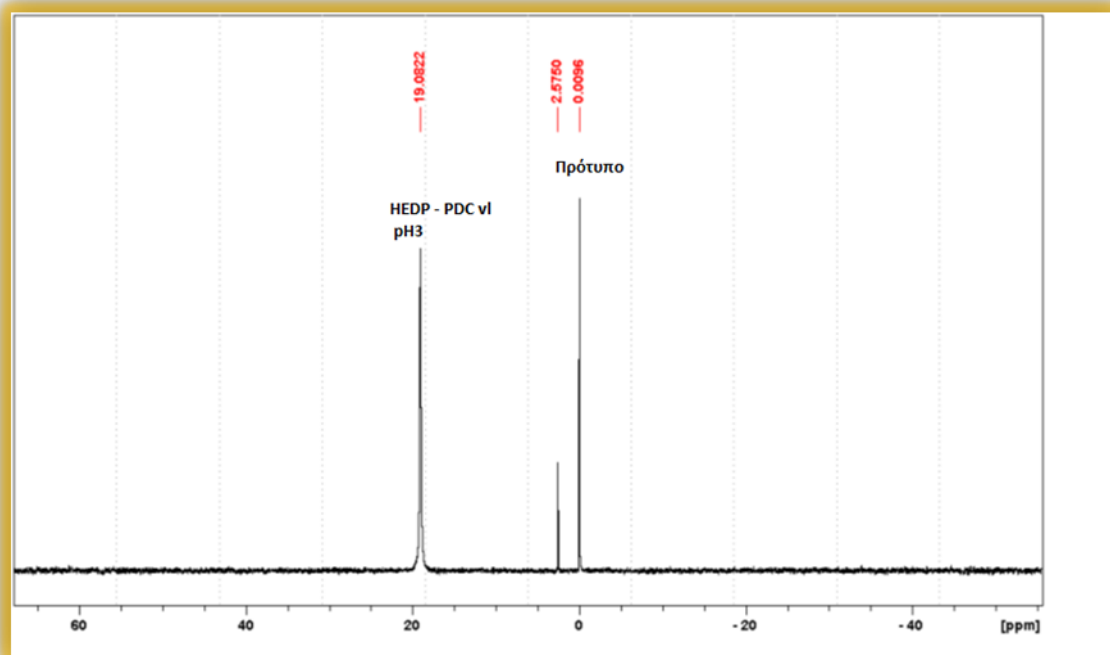
Στην μελέτη των υπολοίπων υλικών δεν είχαμε τα ίδια αποτελέσματα. Δοκιμάσαμε για οξειδωτικό μέσο Υπερθειικό αμμώνιο ((NH₄)₂S₂O₈) και Υπερθειικό Κάλιο σε συνδυασμό με ακτινοβολία UV όπως επίσης υποχλωριώδες Νάτριο σε διάφορες περιεκτικότητες. Μετά από αρκετές προσπάθειες δοκιμάσαμε και την φασματοσκοπία NMR όπου δεν χρειάζεται κάποιο οξειδωτικό μέσο για την αποικοδόμηση του δεσμού P-C, αλλά είναι δυνατό να μετρηθεί απευθείας η ποσότητα φωσφόρου που απελευθερώνεται σε μορφή φωσφονικού. Εδώ τα πειράματα όπως προαναφέραμε έγιναν όχι σε κωνική φιάλη αλλά σε μια κυψελίδα όγκου 20 ml διαλύματος και ποσότητα υλικού στο χάπι 500 μmol P. Παρακάτω παρουσιάζονται μόνο τα φάσματα που μας πρόσφεραν κάποιες χρήσιμες πληροφορίες. (εικόνα 47 έως 51)



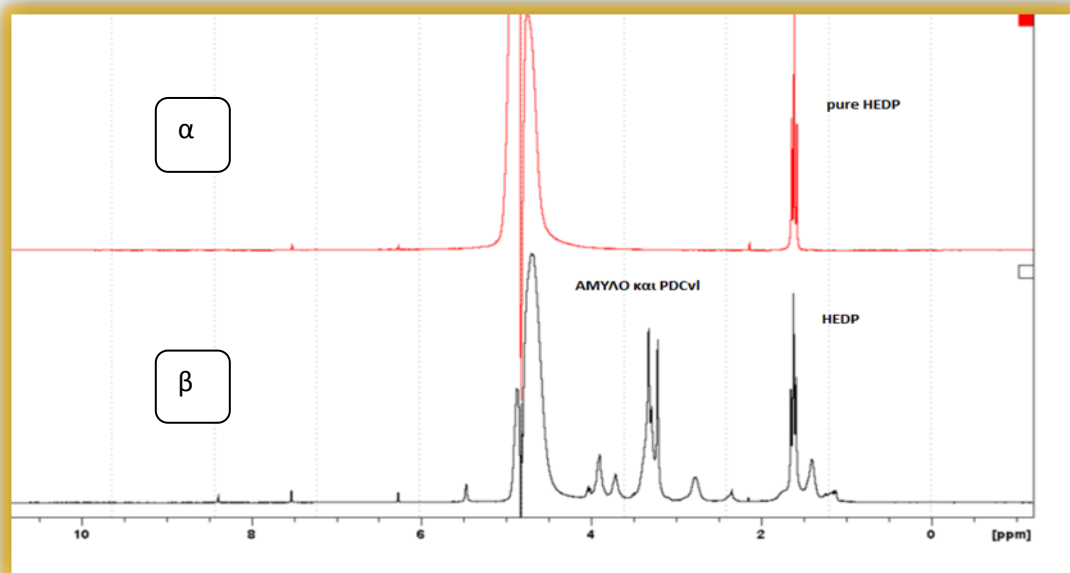
Εικόνα 47: Φάσμα ^{31}P NMR όπου φαίνονται οι κορυφές καθαρού HEDP και του φωσφορικού από το πρότυπο KH_2PO_4 .



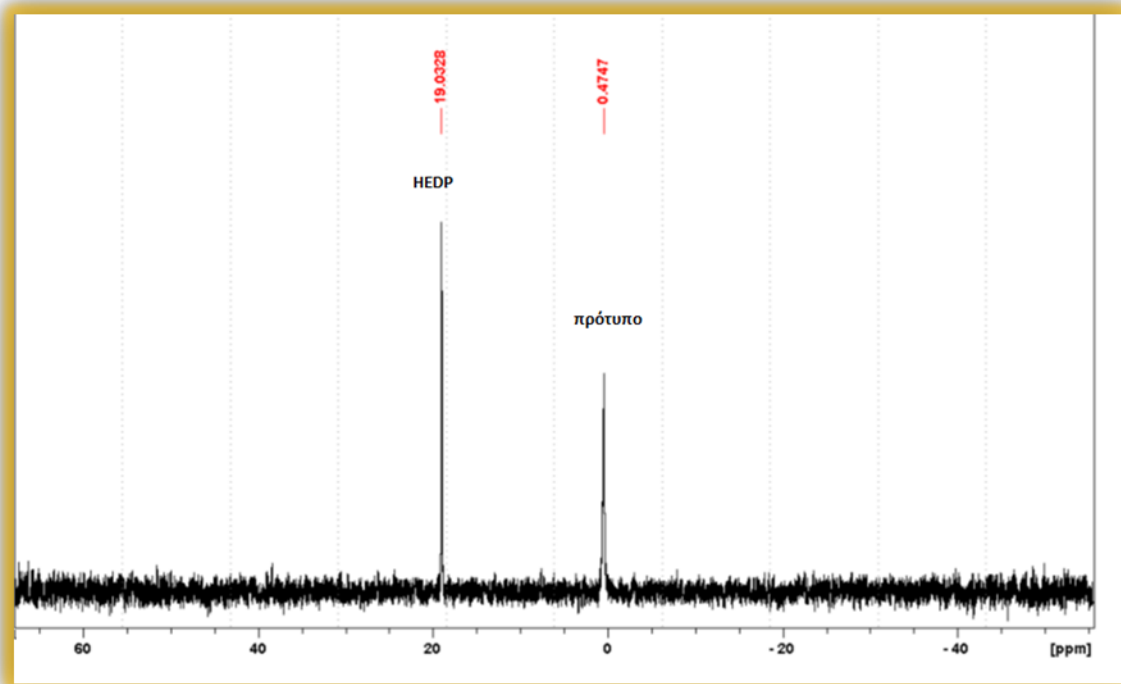
Εικόνα 48: Φάσμα ^{31}P NMR όπου φαίνεται η κορυφή καθαρού EDTMP.



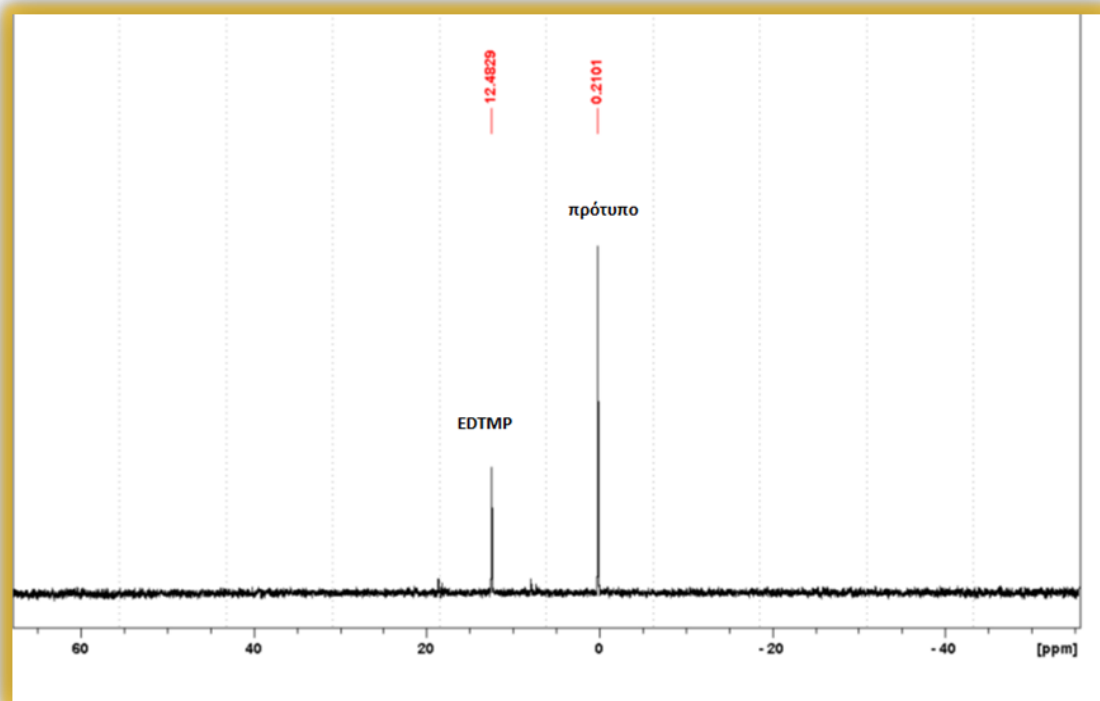
Εικόνα 49: Φάσμα ^{31}P NMR όπου φαίνονται οι κορυφές του φωσφορικού σε δείγμα από πείραμα ελεγχόμενης αποδέσμευσης υλικού PDC vI – HEDP σε pH3 και του προτύπου. (Το δείγμα λήφθηκε από τον πάτο της κυψελίδας οπότε ήταν αυτούσιο υλικό και όχι αποδεσμευμένο)



Εικόνα 50: Φάσμα ^{31}P NMR όπου φαίνονται οι κορυφές των υδρογόνων του αμύλου και της πολυμερικής μήτρας στο β σε δείγμα από πείραμα ελεγχόμενης αποδέσμευσης υλικού PDC vI – HEDP σε pH3 καθώς και των υδρογόνων του μεθυλίου του HEDP που σχάζονται λόγω του P του γειτονικού φωσφορικού. Στο φάσμα α φαίνεται ξανά η κορυφή των υδρογόνων του μεθυλίου του HEDP (Το δείγμα λήφθηκε από τον πάτο της κυψελίδας οπότε ήταν αυτούσιο υλικό και όχι αποδεσμευμένο)



Εικόνα 51: Φάσμα ^{31}P NMR από χάπι με άμυλο και καθαρό HEDP ύστερα από τοποθέτηση του σε υδατόλουτρο 37°C .



Εικόνα 52: Φάσμα ^{31}P NMR από χάπι με άμυλο και καθαρό EDTMP ύστερα από τοποθέτηση του σε υδατόλουτρο 37°C .

7.4 Συζήτηση Αποτελεσμάτων

7.4.1 Φάσματα IR

Συγκρίνοντας τα φάσματα του HEDP και των πολυμερών με τα φάσματα των σύνθετων υλικών, παρατηρούμε ότι όντως οι κατιοντικές πολυμερικές αλυσίδες έχουν ακινητοποιήσει το διφωσφονικό γιατί οι κορυφές των υπαρχόντων χαρακτηριστικών ομάδων ($P=O$ για το διφωσφονικό που απορροφά στα $900-1100\text{ cm}^{-1}$ και RN^+ για τα πολυμερή που απορροφούν στα $1000-1200\text{ cm}^{-1}$) της κάθε ουσίας συνυπάρχουν και είναι ελαφρά μετατοπισμένες.

7.4.2 Πειράματα αποδέσμευσης

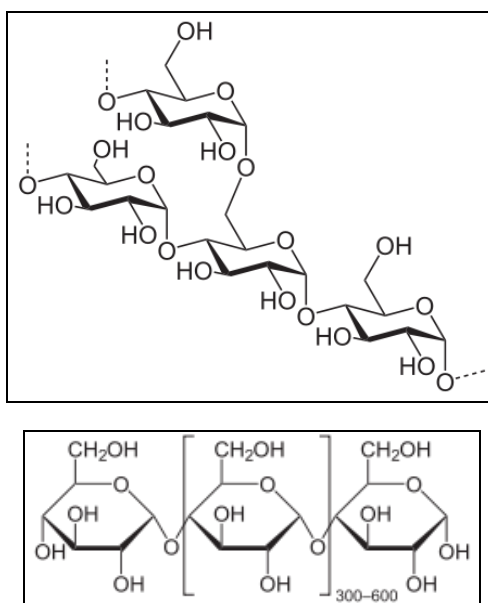
Από τα υλικά που συντέθηκαν μόνο τρία παρουσίασαν ελεγχόμενη αποδέσμευση και μάλιστα πιο αργή από το control (χάπι με μόνο HEDP και άμυλο, χωρίς πολυμερική μήτρα). Οι συνθέσεις PEI-HEDP σε pH 2, 3, 4 απελευθέρωσαν το HEDP σε χαμηλότερο ρυθμό τις 4 πρώτες ώρες απ' ότι το control. Και τα τρία αυτά υλικά απελευθερώνουν όλη την ποσότητα φωσφόρου σε δύο μέρες. Μεταξύ των τριών υλικών που αποδέσμευσαν ομαλά το υλικό με pH 2 φαίνεται ότι αποδεσμεύει το φωσφονικό πιο γρήγορα από τα υπόλοιπα. Αυτό ίσως συμβαίνει γιατί στο pH αυτό το HEDP είναι στη αποπρωτονιομένη του μορφή και έτσι σχηματίζει ισχυρότερες αλληλεπιδράσεις με την κατιοντική μήτρα PEI. Επίσης το υλικό που συντέθηκε σε pH 3 φαίνεται να αποδεσμεύει το φωσφονικό σε αργότερο ρυθμό απ' ότι αυτό σε pH 4. Τέλος σε pH 5 οι πλειοψηφία των πρωτοταγών αμινών δεν είναι πρωτονιωμένες και αυτό έχει ως αποτέλεσμα να δημιουργούνται ασθενέστερες αλληλεπιδράσεις και άρα να απελευθερώνεται το φωσφονικό πολύ ευκολότερα.

7.4.3 Φάσματα NMR

Την πειραματική αυτή διαδικασία την εκτελέσαμε για την πλειοψηφία των υλικών. Η φασματοσκοπία NMR (1H και ^{31}P σε συνδιασμό) μπορεί να προσφέρει χρήσιμες πληροφορίες για την ύπαρξη φωσφονικών σε υδατικά διαλύματα. Το φωσφονικό HEDP αναμένεται να παρουσιάζει μια απλή κορυφή στο φάσμα ^{31}P NMR, αφού και οι δύο φωσφονικές ομάδες είναι χημικά ισοδύναμες. Αυτό επιβεβαιώθηκε, βλ. εικόνα 47, όπου φαίνεται το ^{31}P NMR φάσμα μίγματος HEDP και φωσφορικού. Το HEDP δίνει κορυφή στα $\sim 18\text{ ppm}$ και το φωσφορικό στα $\sim 0\text{ ppm}$ (πρότυπο). Το φωσφονικό EDTMP αναμένεται και αυτό να παρουσιάζει μια απλή κορυφή στο φάσμα ^{31}P NMR, αφού και οι τέσσερις φωσφονικές ομάδες είναι χημικά ισοδύναμες. Αυτό επιβεβαιώθηκε, βλ. εικόνα 48, όπου φαίνεται το ^{31}P NMR φάσμα καθαρού EDTMP. Το EDTMP δίνει κορυφή στα $\sim 9\text{ ppm}$. Οι

παραπάνω χημικές μετατοπίσεις ενδέχεται να αλλάζουν και παρουσιάζουν μικρές διαφοροποιήσεις με μικρές αλλαγές του pH του διαλύματος.

Κανένα όμως από τα υλικά που εξετάστηκαν δεν έδειξε ελεγχόμενη αποδέσμευση του αντίστοιχου φωσφονικού, και δυστυχώς η αποδέσμευση που παρατηρήθηκε ήταν περιορισμένη, και λιγότερη από την αναμενόμενη. Εξετάσαμε διάφορους παράγοντες που θα μπορούσαν να επηρεάζουν την αποδέσμευση όπως την οξύτητα, την αλατότητα, την ποσότητα φωσφόρου στο χάπι ή τον όγκο του διαλύματος αλλά δεν υπήρξε βελτίωση. Όταν όμως αλλάξαμε τη θερμοκρασία τοποθετώντας το σύστημα σε υδατόλουτρο 37 °C, όση και η θερμοκρασία σώματος, τότε παρατηρήθηκαν κάποια ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Είδαμε ότι το φωσφονικό, είτε στο EDTMP είτε στο HEDP σε χάπι που περιείχε άμυλο και φωσφονικό χωρίς μήτρα όταν τοποθετηθεί στο υδατόλουτρο αποδεσμεύει κάποια ποσότητα φωσφονικού μετά από 1-2 ώρες. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ίσως το άμυλο (εικόνα 53) δημιουργεί αλληλεπιδράσεις είτε με την πολυμερική μήτρα (PEI, PDC), είτε με το φωσφονικό, είτε συνδιασμό των δύο, και δεν επιτρέπει την αποδέσμευση του τελευταίου.



Εικόνα 53: Σχηματική δομή του αμύλου (πάνω:αμυλοπηκτίνη, κάτω: αμυλόζη)

8. Συμπεράσματα – Προοπτικές

Η παρούσα ερευνητική προσπάθεια είχε σαν αντικείμενο την μελέτη σύνθετων συστημάτων πολυμερικής μήτρας-φωσφονικού ως υποψήφιων υλικών για ελεγχόμενη αποδέσμευση φωσφονικών φαρμάκων σε παρασκευάσματα που λαμβάνονται δια της πεπτικής οδού (χάπια, ταμπλέτες). Με βάση τα πειράματα που διεξήχθησαν και τα ληφθέντα αποτελέσματα, μπορούμε να εξάγουμε τα παρακάτω συμπεράσματα:

- (1) Συντέθηκαν υλικά πολυμερούς-φωσφονικού (όπου πολυμερές = PEI, PDCm, PDC nI; φωσφονικό = HEDP), τα οποία χαρακτηρίστηκαν με στοιχειακή ανάλυση P και φασματοσκοπία FT-IR. Η αναλύσεις P και τα δεδομένα FT-IR πιστοποίησαν την παρουσία φωσφονικού στα τελικά προϊόντα. Για τα υλικά PEI-HEDP το ποσοστό P κυμάνθηκε από 4.59 % έως 5.02 % (ανάλογα με το pH σύνθεσης) ενώ για τα υλικά PEI-EDTMP το ποσοστό P κυμάνθηκε από 2.76 % έως 4.03 %. Για τα προϊόντα PDC (m ή nI) σε συνδιασμό με το HEDP το ποσοστό P κυμάνθηκε από 9.73% έως 14.73% ενώ για προϊόντα PDC (m ή nI) σε συνδιασμό με το EDTMP το ποσοστό P κυμάνθηκε από 2.29% έως 5.09%. Περαιτέρω, η παρουσία HEDP και EDTMP στα τελικά προϊόντα επιβεβαιώθηκε και με ^{31}P NMR (εικόνες 47 έως 51)
- (2) Το υποχλωριώδες νάτριο (NaOCl) αποδείχτηκε το πιο αποτελεσματικό οξειδωτικό. Το υπερθειικό αμμώνιο $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (σε συνδιασμό με ακτινοβολία UV) δεν έδωσε τα επιθυμητά αποτελέσματα, λόγω παρεμπόδισης από τα υψηλά ποσοστά χλωριούχων.[49] Από τα προς μελέτη προϊόντα αυτά που παρουσίασαν βραδύτερη αποδέσμευση φωσφονικού σε σύγκριση με το «control» (δηλαδή χάπι που περιείχε μόνο άμυλο και φωσφονικό), ήταν τα PEI-HEDP (που συντέθηκαν σε pH 2, 3, και 4).
- (3) Η μελέτη της αποδέσμευσης με φασματοσκοπία ^1H και ^{31}P NMR (σε συγκεντρώσεις φωσφονικού 500 φορές υψηλότερες από αυτές στα πειράματα που μελετήθηκαν φασματοφωτομετρικά) μας επέτρεψε την αποφυγή χρήσης οξειδωτικών-αναγωγικών και αποδεικνύει ότι το φωσφονικό παραμένει εγκλωβισμένο στη μήτρα πολυμερούς-αμύλου. Όμως, σίγουρα η χρήση τόσο υψηλών συγκεντρώσεων φωσφονικού επηρεάζει τα χαρακτηριστικά διαλυτότητας του φωσφονικού, καθιστώντας το πιο δυσδιάλυτο.

- (4) Η θερμοκρασία προφανώς διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αποδέσμευση. Συγκεκριμένα, θέρμανση του διαλύματος αποδέσμευσης στη θερμοκρασία 37 ° C (θερμοκρασία σώματος) επιταχύνει την αποδέσμευση (Εικόνα 46, σε χάπι “control”).
- (5) Με βάση τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην εικόνα 50 (η δειγματοληψία σε αυτό το πείραμα έγινε από τον πυθμένα της φιάλης), με τη φασματοσκοπία ^1H NMR κατέστη δυνατό να ταυτοποιηθεί το φωσφονικό HEDP (τριπλή κορυφή λόγω των $-\text{CH}_3$), αλλά ταυτόχρονα αποκαλύφθηκε και παρουσία αμύλου και μήτρας PDC. Αυτό είναι μια ισχυρή ένδειξη ότι αφού το χάπι αμύλου «αποικοδομηθεί» (κάτι που φαίνεται και οπτικά) τα συστατικά του (άμυλο-πολυμερές-φωσφονικό) παραμένουν στον πυθμένα του φιαλιδίου.

Με βάση τα δεδομένα που περιγράφηκαν σε αυτή τη διατριβή, προτείνονται τα παρακάτω μελλοντικά πειράματα:

- (1) Χρήση διαφορετικού, μη πολυμερικού έκδοχου, π.χ. χλωριούχο νάτριο, βορικό οξύ.
- (2) Χρήση θερμοκρασίας σώματος (37 ° C).
- (3) Χρήση χαμηλότερων συγκεντρώσεων (στις μελέτες με φασματοσκοπία NMR).
- (4) Χρήση υδρολυτικών ενζύμων (σε περίπτωση χρήσης αμύλου ως έκδοχο).
- (5) Διερεύνηση διαφορετικής πολυμερικής μήτρας.
- (6) Διερεύνηση διαφορετικών φωσφονικών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Λαμπίρης, Η.; Ορθοπεδική και Τραυματολογία. Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης: Αθήνα: **2003**; Κεφάλαιο 6, 91-96.
- (2) Συμεωνίδης, Π.; Ορθοπεδική – Παθήσεις και κακώσεις του μυοσκελετικού συστήματος. UNIVERSITY STUDIO PRESS: Θεσσαλονίκη: **1986**; Κεφάλαιο 28, 19-22, 247-248.
- (3) Δρ. Καλδρυμίδης, Φ.; Δρ. Τρόβας, Γ.; Δρ Γώγου, Λ.; Δρ. Σκαραντάβος, Γ.; Οστεοπόρωση, NOVARTIS: Αθήνα: **2004**; Κεφάλαιο 5,10, 77-113, 229-255.
- (4) Underwood, J.; C.; E. Γενική και Συστηματική Παθολογική Ανατομική. Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε.: Αθήνα: **2007**; Κεφάλαιο 25, 790-795.
- (5) O' Rahilly, R.; Müller, F. Εμβρυολογία και Τερατολογία του Ανθρώπου. Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης: Αθήνα: **2000**; Κεφάλαιο 10, 150-151.
- (6) Δελίδης, Γ. Σύνοψη Παθολογικής Ανατομικής. Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε.: Αθήνα: **2001**; Κεφάλαιο 10, 450-455.
- (7) Berg, J.; M.; Tymoczko, J.; L.; Stryer, L.; Βιοχημεία II. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης: Ηράκλειο: **2005**, 831-832.
- (8) Russell, G. G. R.; Mühlbauer, R. C.; Bisaz, S.; Williams, D. A.; Fleisch H. The Influence of Pyrophosphate, Condensed Phosphates, Phosphonates and other Phosphate Compounds on the Dissolution of Hydroxyapatite in vitro and on Bone Resorption Induced by Parathyroid Hormone in Tissue Culture and in Thyroparathyroideetomised Rats. *Calcified Tissue International*. **1970**, 6, 183-196.
- (9) Benford, <http://molpharm.aspetjournals.org/content/56/1/131.short-target-1> H. L.; Frith, J. C.; Seppo, Auriola; Jukka, Mönkkönen; Rogers, M. J. Farnesol and Geranylgeraniol Prevent Activation of Caspases by Aminobisphosphonates: Biochemical Evidence for Two Distinct Pharmacological Classes of Bisphosphonate Drugs. *Molecular Pharmacology*. **1999**, 56,131–140.
- (10) Fleisch, H. The Aging Spine, **2005**, Part 2, 60-64.
- (11) Reginster, J. -Y. The role of bisphosphonates in the prevention and treatment of osteoporosis, *Clinical Rheumatology*. **1995**, 14, 22-25.
- (12) Helmer Sørensen, O.; Storm, T.; Thamsborg, G.; Ancher Sørensen, H.; Kollerup, G.; Steiniche, T.; Melsen, F. Genant, H. K. Bisphosphonates and osteoporosis. *Osteoporosis International*. **1993**, 1, 223-225.

- (13) Milner, R. J.; Farese J.; Henry, C. J.; Selting, K.; Fan, T. M.; de Lorimier, L. P. Bisphosphonates and cancer. *J. Vet. Intern. Med.* **2004**, *18*, 597-604.
- (14) Luckman, S. P.; Coxon, F. P.; Ebetino, F. H.; Russell, R. G.; Rogers, M.J.; Heterocycle-containing bisphosphonates cause apoptosis and inhibit bone resorption by preventing protein prenylation: evidence from structure-activity relationships in J774 macrophages. *J Bone Miner Res.* **1998**, *13*, 1668-1678.
- (15) Page, Curtis, Sutter, Walker, Hoffman, Φαρμακολογία, Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης: Αθήνα: **2000**; 341-342.
- (16) Diel I. J.; Fogelman I.; Al-Nawas B.; Hoffmeister B.; Migliorati C.; Gligorov J.; Väänänen K.; Pylkkänen L.; Pecherstorfer M.; Aapro M. S. Pathophysiology, risk factors and management of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: Is there a diverse relationship of amino- and non-aminobisphosphonates?, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **2007**, *64*, 198-207.
- (17) Harvey, R.; Champe, P.; Mycek, M.; Φαρμακολογία, Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε.: Αθήνα: **2000**; Κεφάλαιο 43, 533-534.
- (18) Frith J. C.; Monkkonen J.; Blackburn G.M.; Russell R. G.; Rogers M. J.; Clodronate and liposome-encapsulated clodronate are metabolized to a toxic ATP analog, adenosine 5'-(beta, gamma-dichloromethylene) triphosphate, by mammalian cells in vitro. *J. Bone Miner. Res.* **1997**, *12*, 1358–1367.
- (19) Russell R.; G.; G.; Xia, Z.; Dunford, J.; E.; Oppermann, U.; Kwaasi, A.; et al. Bisphosphonates: an update on mechanisms of action and how these relate to clinical efficacy, *Ann.N.Y.Acad. Sci.* **2007**, *1117*, 209-257.
- (20) Katzung, B.; Βασική και Κλινική Φαρμακολογία, Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης: Αθήνα: **2009**; Τόμος Β; Κεφάλαιο 42, 917-919.
- (21) Murray, J.; F. Bisphosphonates for Osteoporosis, *N Engl J Med*, **2010**, *363*, 2027-2035.
- (22) Bamias, A.; Kastritis, E.; Bamia, C.; Mouloupoulos, L.; A.; Melakopoulos, I.; Bozas, G.; Koutsoukou, V.; Gika, D.; Anagnostopoulos, A.; Papadimitriou, C.; Terpos, E.; Dimopoulos, M.; A. Osteonecrosis of the jaw in cancer after treatment with bisphosphonates: incidence and risk factors, *J Clin Oncol.* **2005 Dec**, *23*, 8580-8587.
- (23) Uhrich, E.; K.; Cannizzaro, S.; M.; Langer, S.; R.; Shakesheff, M.; K. Polymeric Systems for Controlled Drug Release. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 3181-3198.

- (24) Dey, N.; S.; Majumdar, S.; Rao, M.; E.; B. Multiparticulate Drug Delivery Systems for Controlled Release. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. **2008**, *7*, 1067-1075.
- (25) http://www.nature.com/pcan/journal/v7/n2/fig_tab/4500705f1.html
- (26) <http://catalog.nucleusinc.com/generateexhibit.php?ID=38121>
- (27) <http://www.osteoporosis101.com/page/241>
- (28) <http://www.healblog.net/category/osteoporosis/>
- (29) <http://www.healthype.com/bisphosphonates-in-osteoporosis.html>
- (30) <http://en.wikipedia.org/wiki/Bisphosphonate>
- (31) Nancollas, G.; H.; Tang, R.; Phipps, R.; J.; Henneman, Z.; Gulde, S.; Wu, W.; Mangood, A.; Russell, R.;G.;G.; Ebetino, F.;H. Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: Differences in interactions with hydroxyapatite. *Bone*, **2006**, *38*, 617–627.
- (32) Uchegbu, I.; F.; Schätzlein, A.; G. *Polymers in Drug Delivery*. CRC Press:**2006**.
- (33) Brannon-Peppas,L. *Polymers in Controlled Drug Delivery, Medical Plastics and Biomaterials Magazine*, **1997**.
<http://www.devicelink.com/mpb/archive/97/11/003.html>
- (34) Chien, Y.; W.; *Concepts and System Design for Rate-Controlled Drug Delivery, Novel Drug Delivery Systems*, Second edition **1992**,.1-38
- (35) Leong, K.; W.; Langer, R. *Polymeric Controlled Drug Delivery, Adv. Drug Deliver. Rev.* **1987**, *1*, 199-233.
- (36) Olson, J. *Clinical Pharmacology Made Ridiculously Simple. Med. Master Series* **1998**.
- (37) Zhu, G.; Mallery, S. R.; Schwendeman, S. P. Stabilization of proteins encapsulated in injectable poly (lactide- co-glycolide). *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 52 – 57.
- (38) Καραγιαννίδου, Ε.; Γ.; Σιδερίδου, Ε.; Δ. Εφαρμογή των πολυμερών στην παραγωγή φαρμακευτικών σκευασμάτων με ελεγχόμενη απελευθέρωση της δραστικής ουσίας. *Χημικά Χρονικά*, **2010**, *2*, 21-26.
- (39) Joseph, K.; Langer, R. Responsive polymeric delivery system. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2001**, *46* ,125–148.
- (40) Ravaine, V.; Ancla, C.; Catargi, B.; Chemically controlled closed-loop insulin delivery. *Journal of Controlled Release*. **2008**, *132*, 2-11.
- (41) Langer, R.; Peppas, N. Advances in Biomaterials, Drug Delivery, and Bionanotechnology. *AIChE Journal*. **2003**, *49*, 2990–3006.

- (42) Godbey, W.; T.; Wu, K.; K.; Mikos, A.; G. Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery. *Journal of Controlled Release*. **1999**, 60, 149–160.
- (43) Harvey J.; T.; Martindale, A.; A.; Sorby, P.; 3, Hetherington, E.; L.; Fleay, R.; F.; Hoffman R.; F.; Claringhold, P.; G.; 2 Samarium- 153 EDTMP therapy of disseminated skeletal metastasis, *Eur .J. Nucl. Med*. **1989**, 15, 784-795.
- (44) Demadis, K.; D.; Paspalaki, M.; Theodorou, J. Controlled Release of Bis(phosphonate) Pharmaceuticals from Cationic Biodegradable Polymeric Matrices. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. **2011**, 50, 5873-5876.
- (45) <http://en.wikipedia.org/wiki/PolyDADMAC>
- (46) <http://www.thwater.net/01-hedp.htm>
- (47) <http://en.wikipedia.org/wiki/EDTMP>
- (48) Popa, A.; Parvulescu, V.; Iliescu, S.; Plesu, N.; Ilia, G.; Macarie, L.; Pascariu, A. *Plast. Rubber Comp*. **2008**, 37, 193.
- (49) Kan, A.T., Rice U.; Varughese, K., Al-Qahtani Pipe Coating Terminal; Tomson, M.B., Rice U. Determination of Low Concentrations of Phosphonate in Brines. *Society of Petroleum Engineers*.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Σε αυτό το Παράρτημα παρουσιάζονται μια σειρά από πειράματα τα οποία είτε ήταν βοηθητικά στη βασική πειραματική πορεία είτε δεν οδήγησαν σε κάποιο επιθυμητό αποτέλεσμα. Επιπλέον συμπεριλαμβάνονται τα φάσματα IR που δεν παρουσιάστηκαν μέσα στην εργασία.

Παραλληλισμός πρότυπης καμπύλης με την πρότυπη καμπύλη του HACH.**Προετοιμασία και μέτρηση των δειγμάτων.**

Ο όγκος κάθε δείγματος διανέμεται στις κυψελίδες του HACH όπως υποδεικνύεται στον παρακάτω πίνακα.

	1	2	3	4	5	6
Σταθερό διάλυμα εργασίας 4ppm (ml)	0	1	2	3	4	5
Αναγωγικό μέσο (ml)	4	4	4	4	4	4
Απιονισμένο νερό (ml)	6	5	4	3	2	1
Τελικός όγκος (ml)	10	10	10	10	10	10
Τελική συγκέντρωση ppm P₂O₅	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0

Πίνακας 18

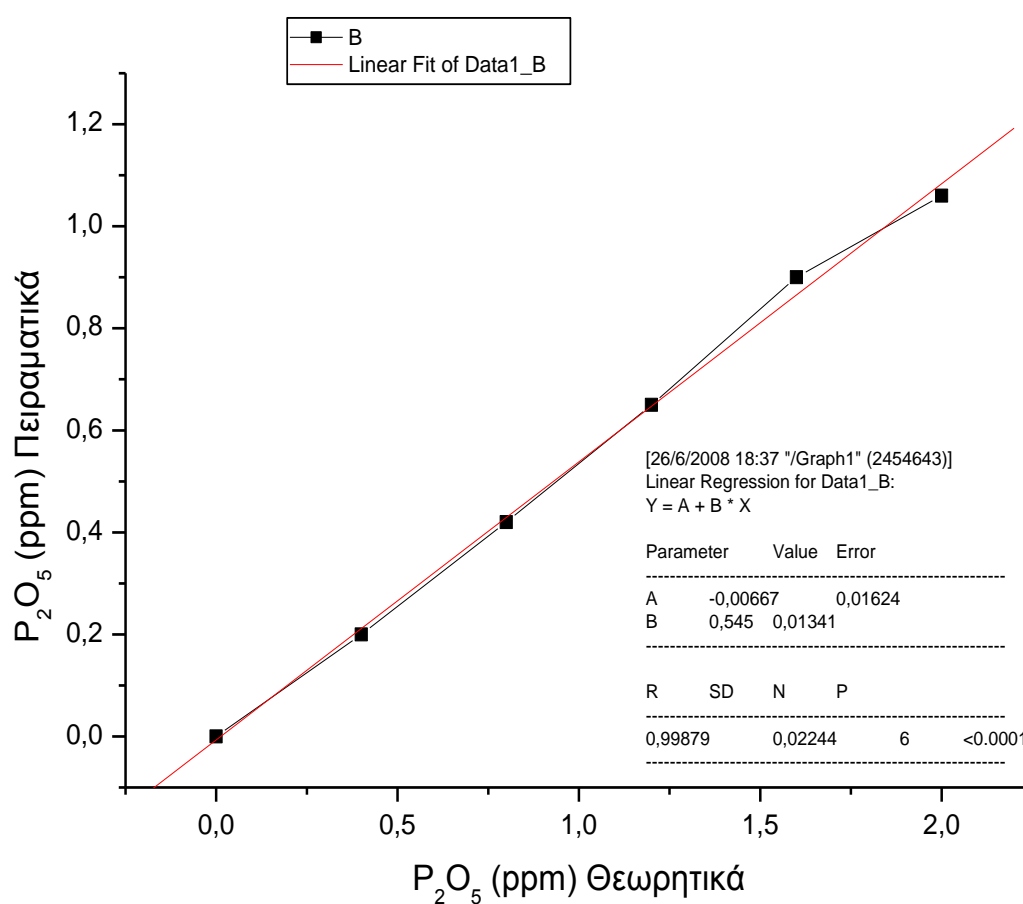
Σταθερό διάλυμα εργασίας: Ζυγίζονται 0,1941 gr ξηρό KH₂PO₄ και διαλύονται σε απιονισμένο νερό σε μια ογκομετρική φιάλη 1 lt . Η περιεκτικότητα σε φώσφορο αυτού του διαλύματος που εκφράζεται ως P₂O₅ είναι 100 ppm. Το διάλυμα αυτό αραιώνεται σε μια ογκομετρική φιάλη των 50 ml ώστε η τελική προκύπτουσα συγκέντρωση να είναι 4ppm P₂O₅.

Ακολουθεί βρασμός σε υδατόλουτρο 60⁰ C για 40' και έπειτα λαμβάνονται οι μετρήσεις με το HACH. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε τρεις φορές. Τα τελικά αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω.

	1	2	3	4	5	6
Τελική συγκέντρωση $\rho\rho\text{m}$ P_2O_5 (πρότυπη)	0	0,4	0,8	1,2	1,6	2,0
Τελική συγκέντρωση $\rho\rho\text{m}$ P_2O_5 (HACH)	0.00	0.20	0.42	0.65	0.90	1.06

Πίνακας 19

Παρακάτω δίδεται η καμπύλη στην οποία φαίνεται η αντιστοιχία των θεωρητικών τιμών με αυτές που λήφθηκαν κατά τη μέτρηση των δειγμάτων με το HACH.

Εικόνα 54: Συσχετισμός θεωρητικής και πειραματικής ποσότητας P_2O_5 .

Η εξίσωση που προκύπτει από την πρότυπη αυτή καμπύλη είναι:

$$y = - 0,00667 + 0,545 x$$

Έτσι σύμφωνα με την εξίσωση αυτή αν για παράδειγμα μετρώντας στο HACH ένα διάλυμα, ληφθεί απορρόφηση 0,3 τότε το διάλυμα αυτό πραγματικά περιέχει 0,562 ppm P_2O_5 .

Παρασκευή πρότυπου διαλύματος HEDP

Κάθε μονάδα HEDP με οξείδωση δίνει δύο μόρια φωσφορικού. Σύμφωνα με αυτό τα moles του HEDP θα είναι ίσα με τα μισά moles του KH_2PO_4 , δηλαδή 0,000713 moles. Το Μοριακό Βάρος του HEDP είναι 206, επομένως :

$$m_{HEDP} = 0,00713 \text{ moles} \times 206 = 0,147 \text{ gr HEDP}$$

Τόσα gr καθαρό HEDP ζυγίζονται και διαλύονται σε 1lt ώστε να έχω stock 100ppm. Αν πρόκειται για διάλυμα HEDP 60% w/w τότε με τη βοήθεια της πυκνότητας του ,που είναι 1,45 g/ml, ο απαιτούμενος όγκος υπολογίζεται 0,170ml. Απ' το stock λαμβάνονται 2ml και αραιώνονται με απιονισμένο νερό ως τελικό όγκο 50ml ώστε να έχω stock των 4 ppm.

Οξείδωση με Persulfate

Ο όγκος κάθε δείγματος διανέμεται στις κυψελίδες του HACH όπως υποδεικνύεται στον παρακάτω πίνακα.

	1	2	3	4	5	6
Σταθερό διάλυμα εργασίας HEDP 4ppm (ml)	0	1	2	3	4	5
Αναγωγικό μέσο (ml)	4	4	4	4	4	4
Persulfate (mg)	1	1	1	1	1	1
Απιονισμένο νερό (ml)	6	5	4	3	2	1
Τελικός όγκος (ml)	10	10	10	10	10	10
Τελική συγκέντρωση ppm P₂O₅	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0

Πίνακας 20

Αρχικά προστίθενται το σταθερό διάλυμα εργασίας, το απιονισμένο νερό και το οξειδωτικό Persulfate. Ακολουθεί βρασμός σε υδατόλουτρο 60⁰ C για 30' ώστε να ελευθερωθούν τα δύο μόρια φωσφονικού και να μετατραπούν σε φωσφορικά. Κατόπιν προστίθεται το αναγωγικό και τα διαλύματα θερμαίνονται σε υδατόλουτρο 60⁰ C για 40'. Έπειτα λαμβάνονται οι μετρήσεις με το HACH. Τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω.

	1	2	3	4	5	6
Τελική συγκέντρωση ppm P₂O₅ (πρότυπη)	0.00	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0
Τελική συγκέντρωση ppm P₂O₅ (HACH)	0.00	0.23	0.53	0.82	1.08	1.34

Πίνακας 21

Το Persulfate παρόλο που οξειδώνει το HEDP όπως αποδείχτηκε δεν είναι αρκετά ισχυρό οξειδωτικό για τα υλικά που συντέθηκαν. Για το λόγο αυτόν δοκιμάζεται σαν οξειδωτικό το υποχλωριώδες νάτριο (NaOCl, χλωρίνη).

Οξείδωση διαλυμάτων HEDP διαφόρων συγκεντρώσεων με Υποχλωριώδες Νάτριο.

Αρχικά παρασκευάζεται ένα stock του HEDP σε συγκέντρωση 500ppm σε PO₄ αραιώνοντας 0,627 ml διαλύματος HEDP 60% w/w σε 1000ml απιονισμένο νερό. Κατόπιν με τις κατάλληλες αραιώσεις παρασκευάζονται οι εξής συγκεντρώσεις: **0,5 1 1,5 2 2,5 3 3,5 4 4,5** και **5** ppm . Προστέθηκε οξειδωτικό HEDP : NaClO 1 : 6 σε κάθε διάλυμα.

Ο όγκος κάθε δείγματος διανέμεται στις κυψελίδες του HACH όπως υποδεικνύεται στον παρακάτω πίνακα.

Συγκέντρωση P₂O₅ (ppm)	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5
Stock HEDP 500ppm (ml)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Αναγωγικό (ml)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Χλωρίνη (μl)	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200
H₂O (ml)	5	4	3	2	1	-	-	-	-	-
Τελικός όγκος (ml)	10	10	10	10	10	10	11	12	13	14

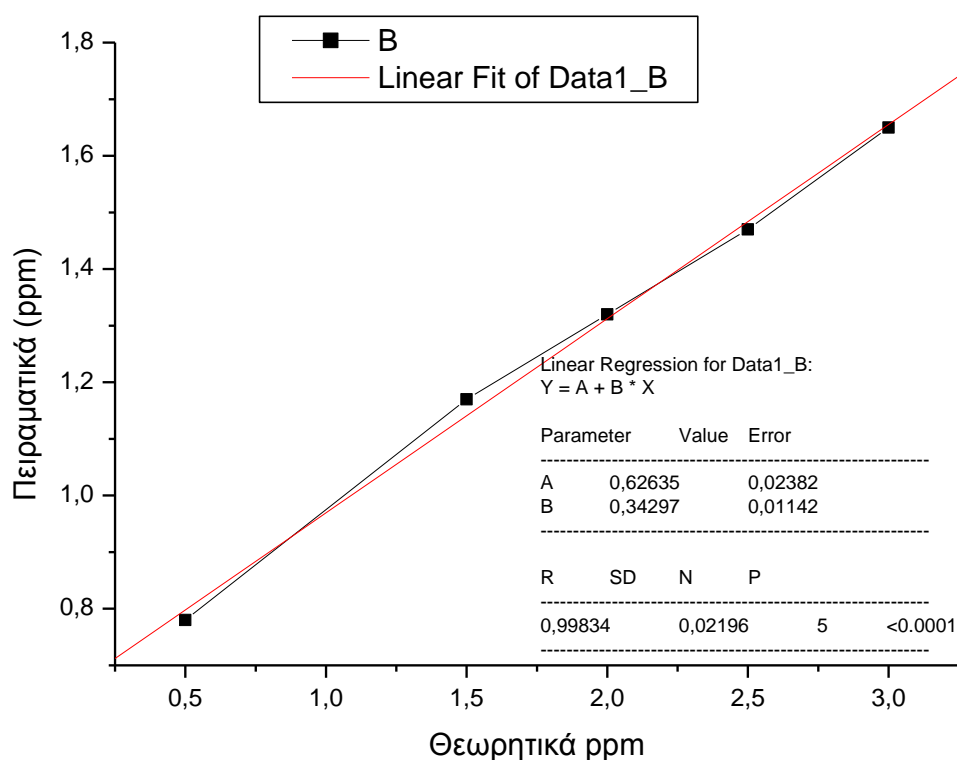
Πίνακας 22

Αρχικά προστίθενται το stock , το νερό και η χλωρίνη και θερμαίνονται σε υδατόλουτρο στους 60⁰ C για 1h. Έπειτα προστίθεται το αναγωγικό και τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 60⁰ C για 40'. Τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω.

Συγκέντρωση P₂O₅ (ppm)	0,5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5
Τελική συγκέντρωση ppm P₂O₅ (HACH)	0.78	1.58	1.17	1.32	1.47	1.65	1.72	1.68	1.77	1.76

Πίνακας 23

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα κατασκευάζεται η ακόλουθη καμπύλη:



Εικόνα 55

Και η εξίσωση που προκύπτει είναι :

$$y = 0,62635 + 0,34297x$$

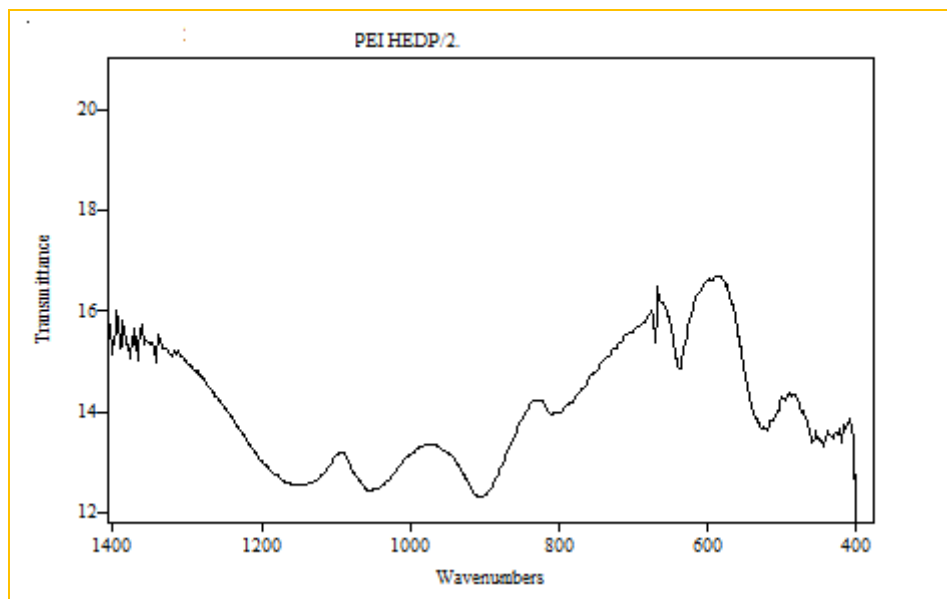
Τεστ Παρεμπόδισης

Κατά τη διάρκεια της ερευνητικής αυτής εργασίας δοκιμάσαμε πολλά πειράματα για να βρούμε την αιτία που τα περισσότερα συνθετικά υλικά δεν αποδέσμευσαν καν το φωσφονικό. Μέσα στα πειράματα αυτά ήταν και το τεστ παρεμπόδισης (interference test) στο οποίο θέλαμε να αποκλείσουμε την πιθανότητα να παρεμποδίζει το πολυμερές τη δημιουργία του μπλε συμπλόκου με τα φωσφορικά. Υπολογίσαμε την ποσότητα πολυμερούς σε ένα από τα υλικά μας και προσθέσαμε τόσο καθαρό πολυμερές. Κατόπιν υπολογίσαμε την ποσότητα του φωσφονικού και προσθέσαμε την αντίστοιχη ποσότητα

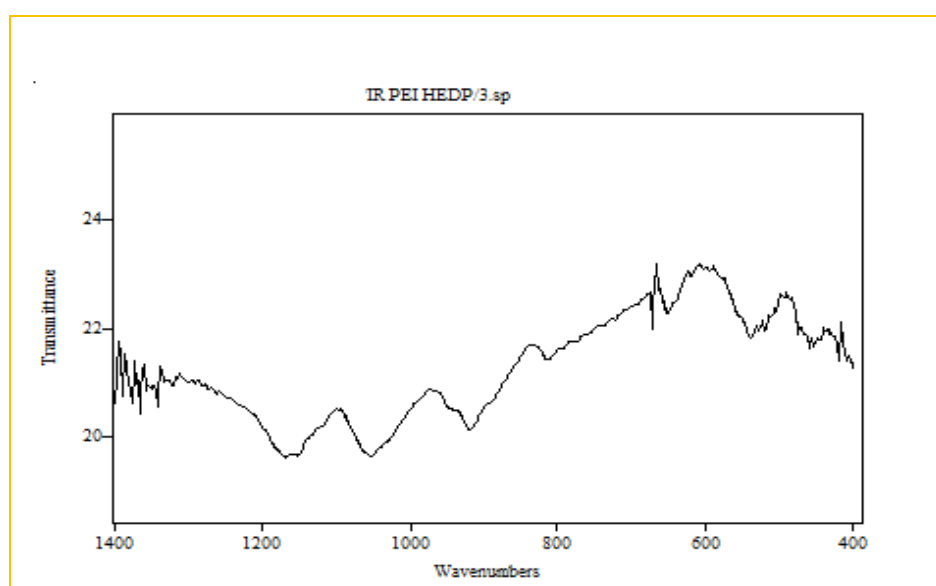
φωσφορικών. Το μπλε σύμπλοκο δημιουργήθηκε κανονικά επομένως δεν παρεμποδίζει το σχηματισμό του το πολυμερές.

Φάσματα IR

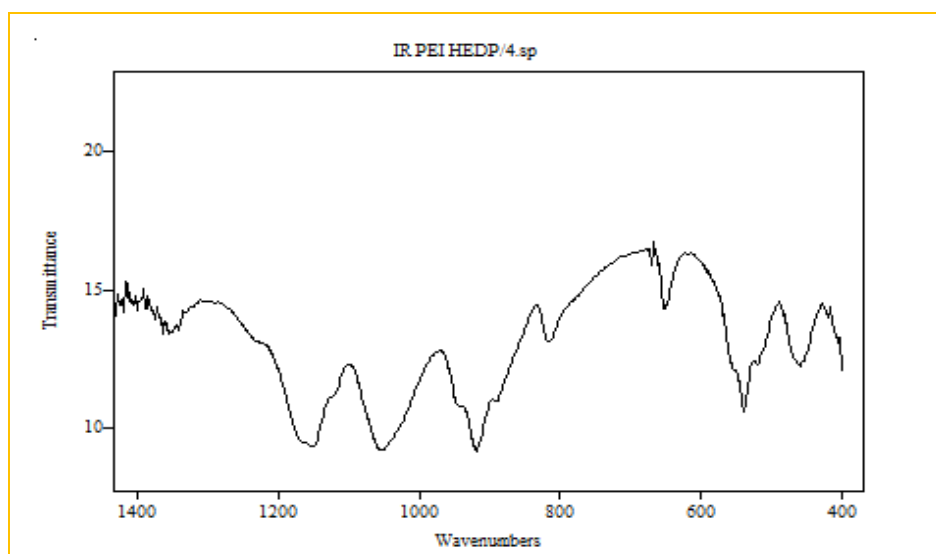
PEI-HEDP



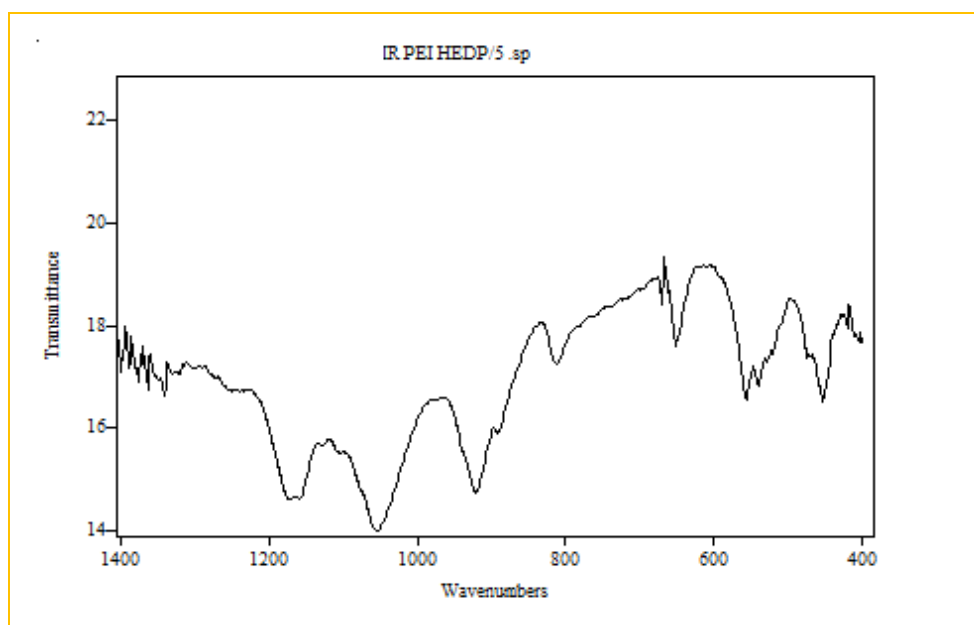
Φάσμα 1: PEI-HEDP σε pH 2



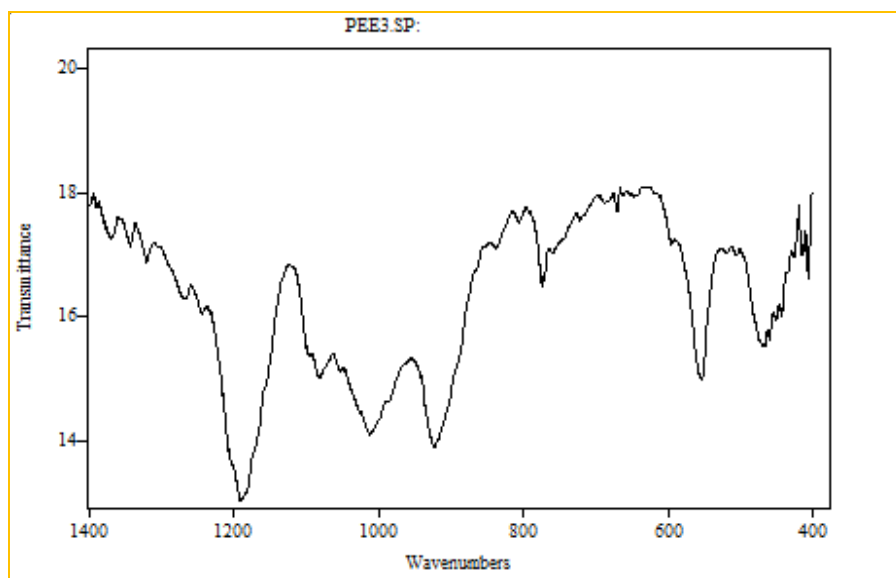
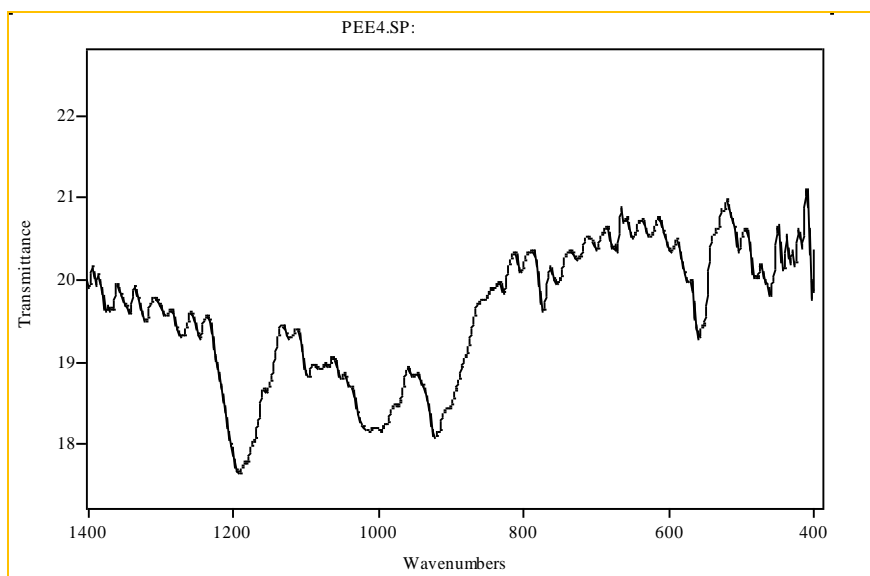
Φάσμα 2 : PEI-HEDP σε pH 3

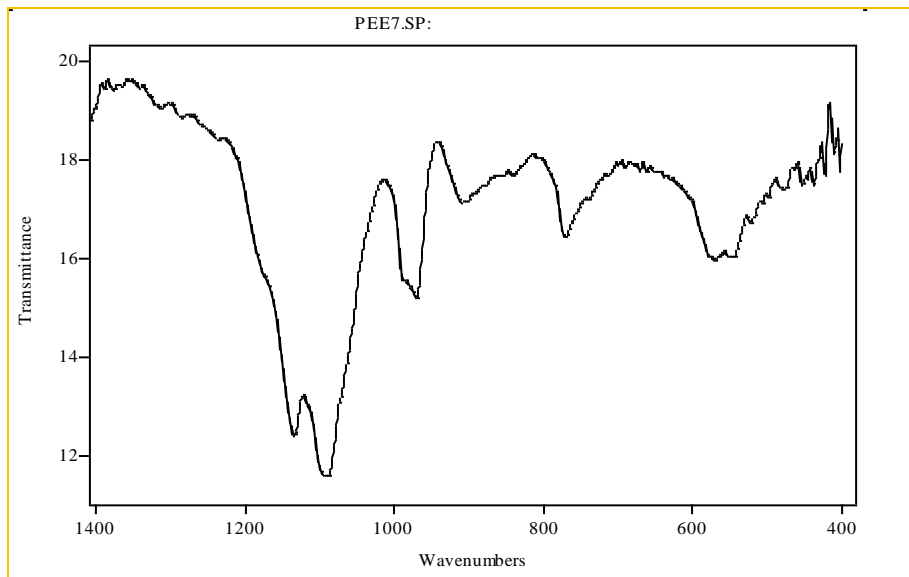


Φάσμα 3: PEI-HEDP σε pH 4



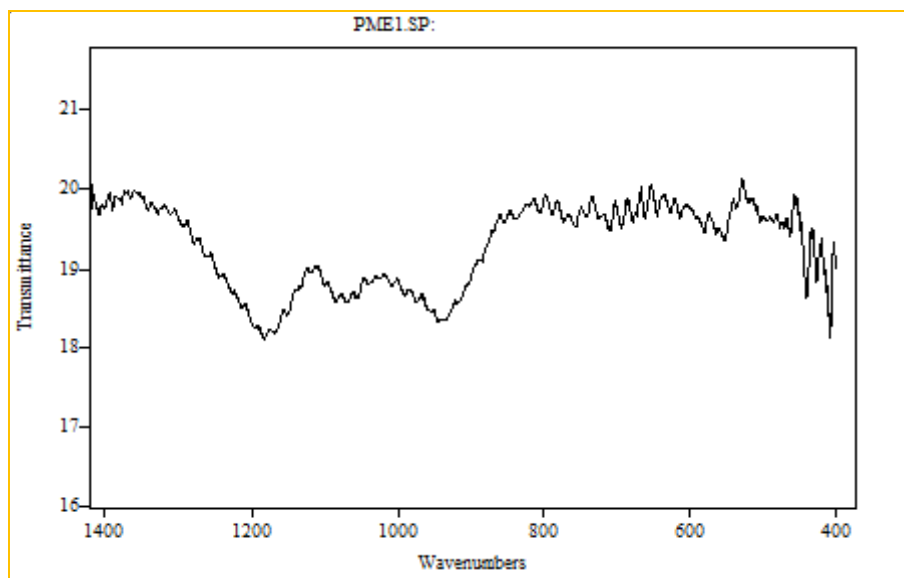
Φάσμα 4: PEI-HEDP σε pH 5

PEI – EDTMP**Φάσμα 5: PEI – EDTMP σε pH 3****Φάσμα 6: PEI – EDTMP σε pH 4**

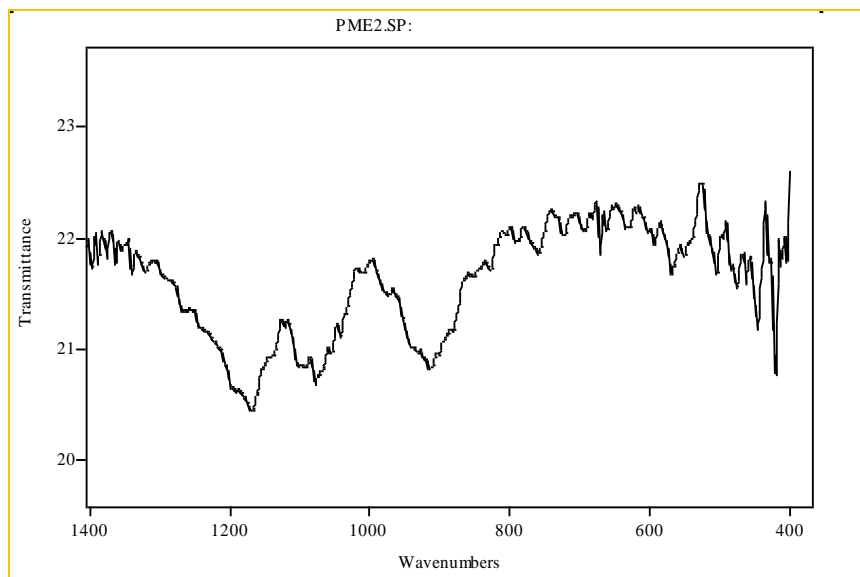


Φάσμα 7: PEI – EDTMP σε pH 7

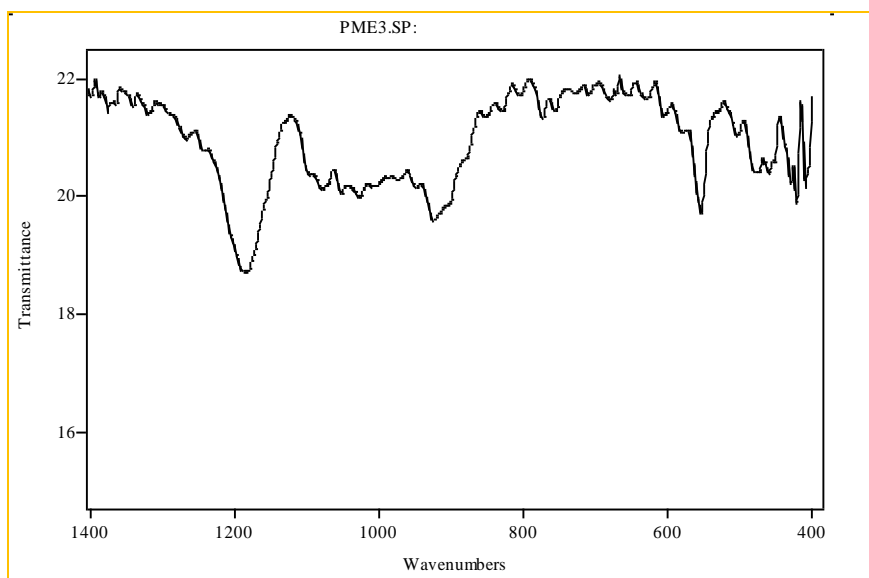
PDC Medium - EDTMP



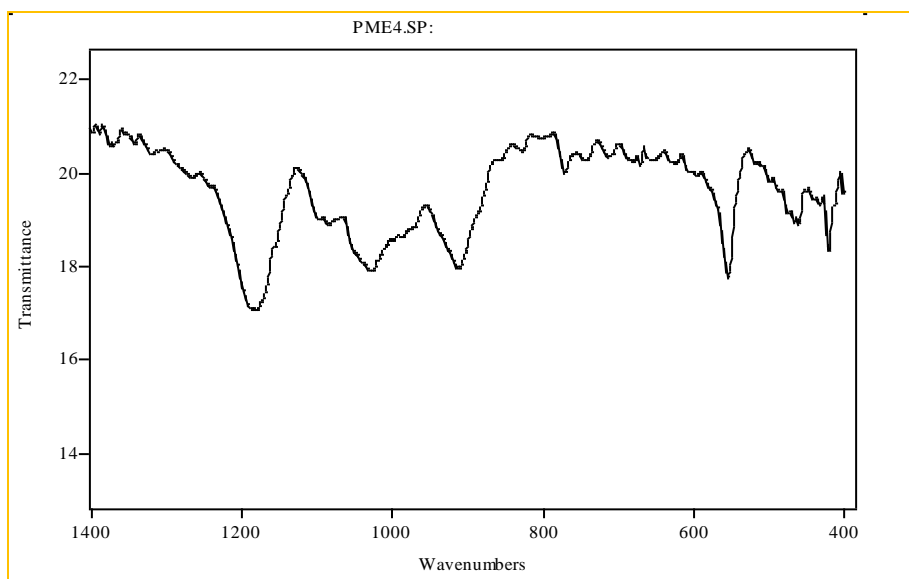
Φάσμα 8: PDC medium – EDTMP σε pH 1



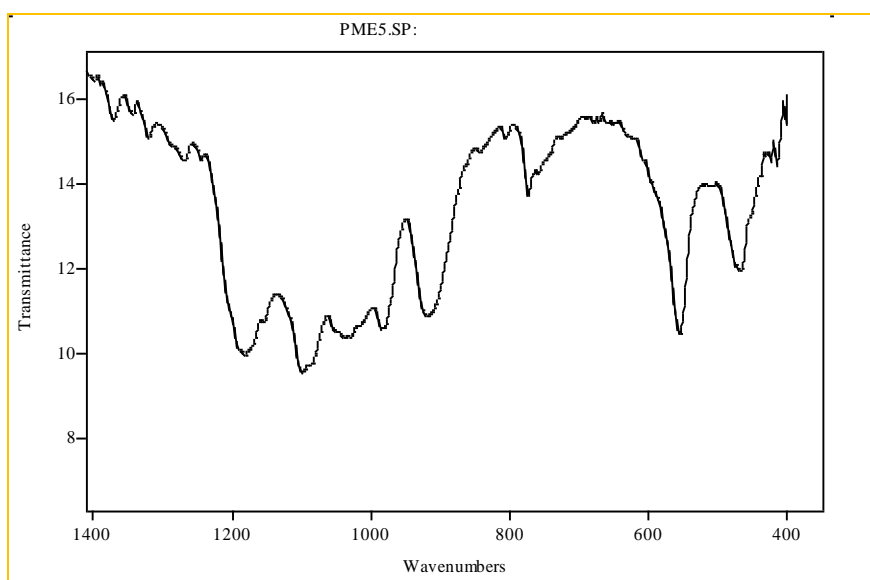
Φάσμα 9: PDC medium – EDTMP σε pH 2



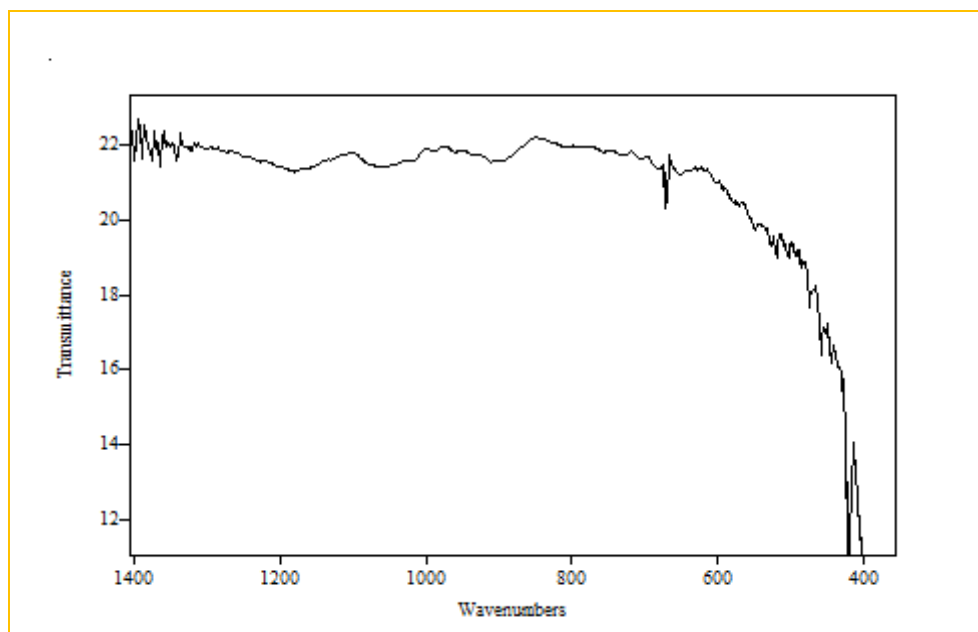
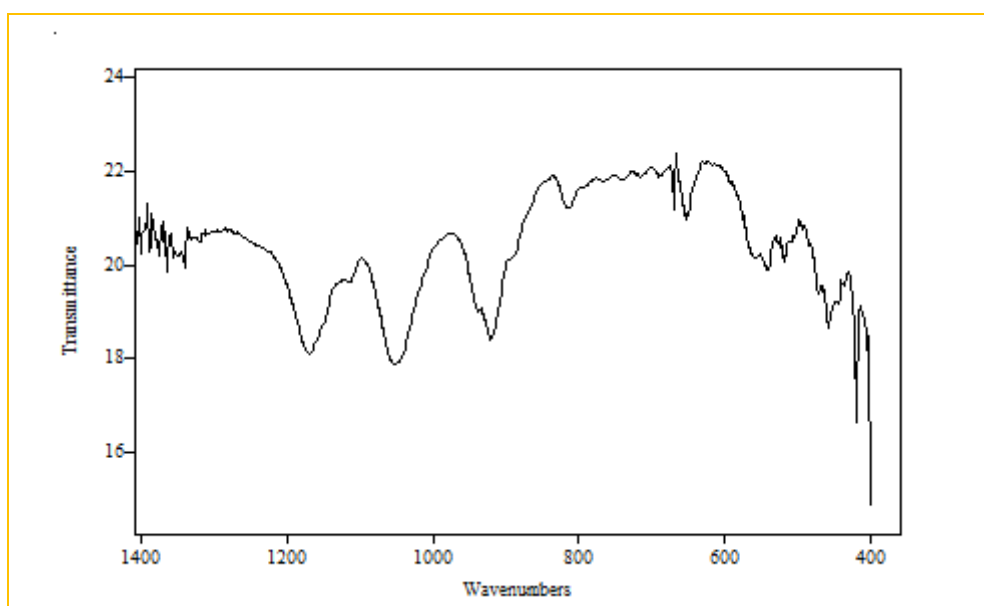
Φάσμα 10: PDC medium – EDTMP σε pH 3

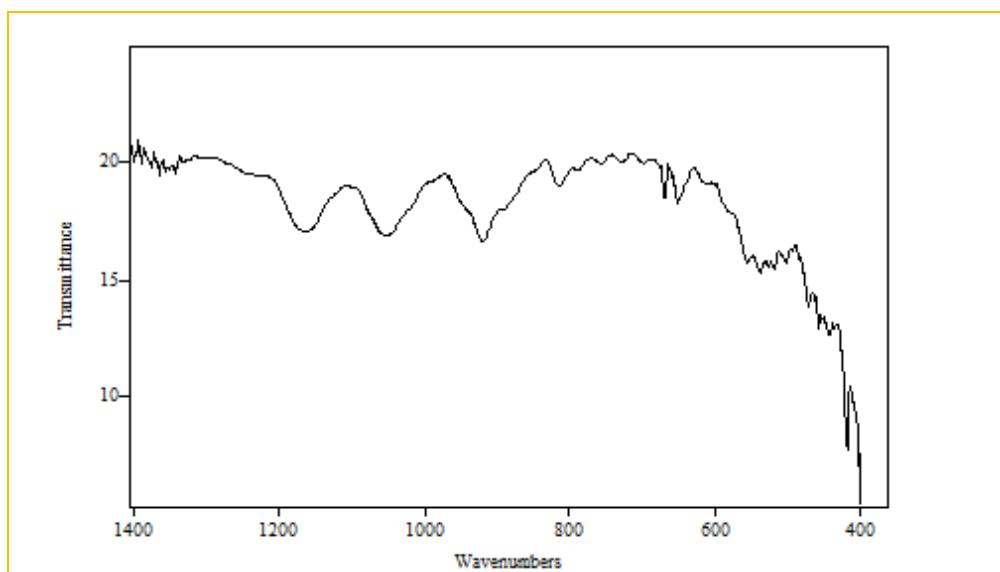


Φάσμα 11: PDC medium – EDTMP σε pH 4

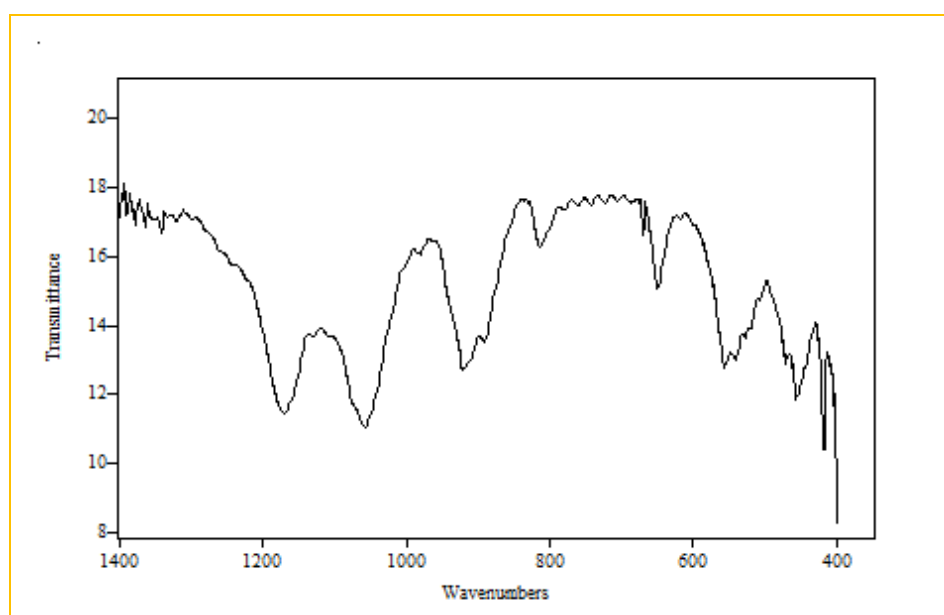


Φάσμα 12: PDC medium – EDTMP σε pH 5

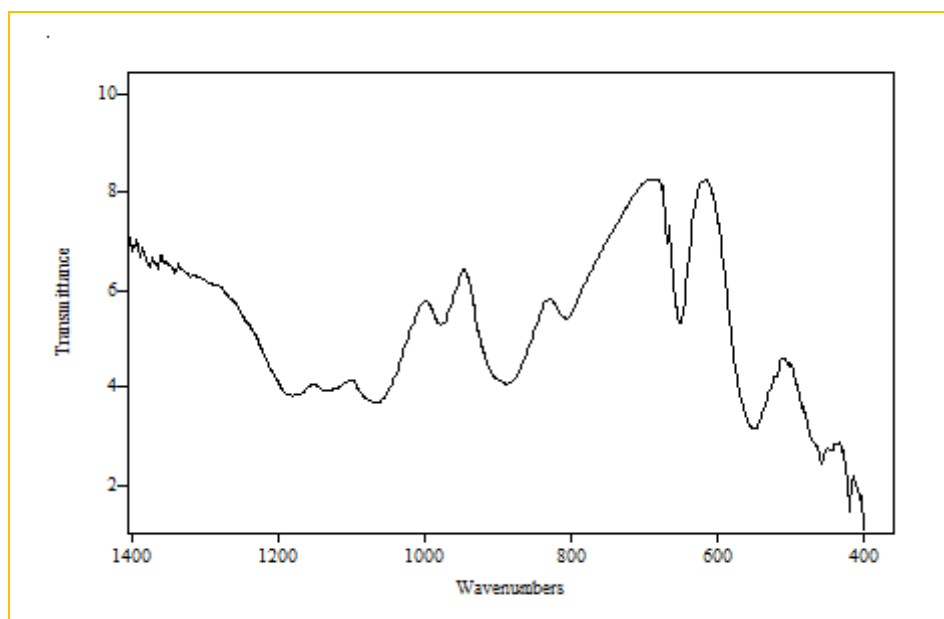
PDC m – HEDP**Φάσμα 13:** PDC m – HEDP σε pH 3**Φάσμα 14:** PDC m – HEDP σε pH 4



Φάσμα 15: PDC m – HEDP σε pH 5

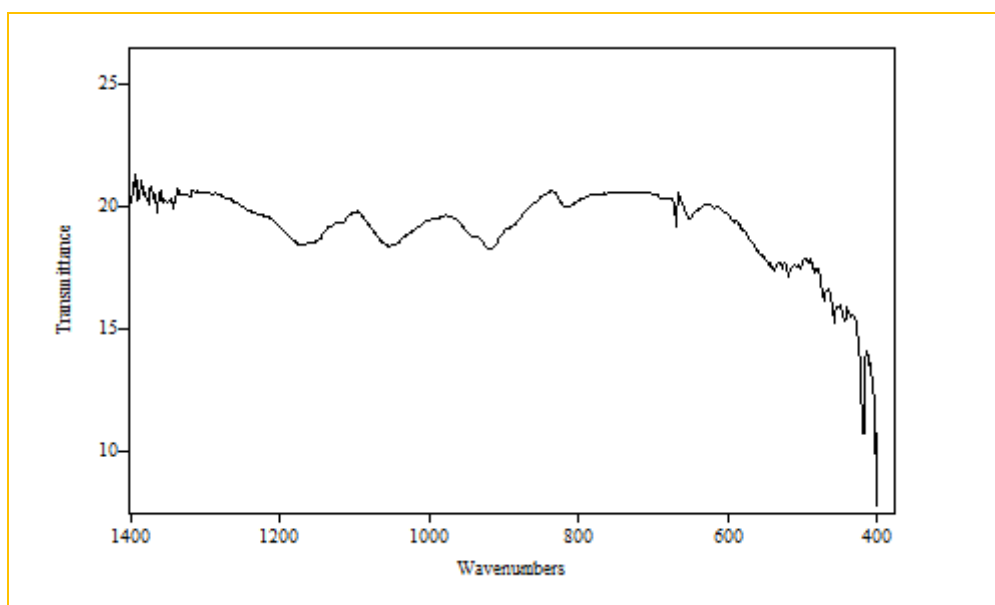


Φάσμα 16: PDC m – HEDP σε pH 6

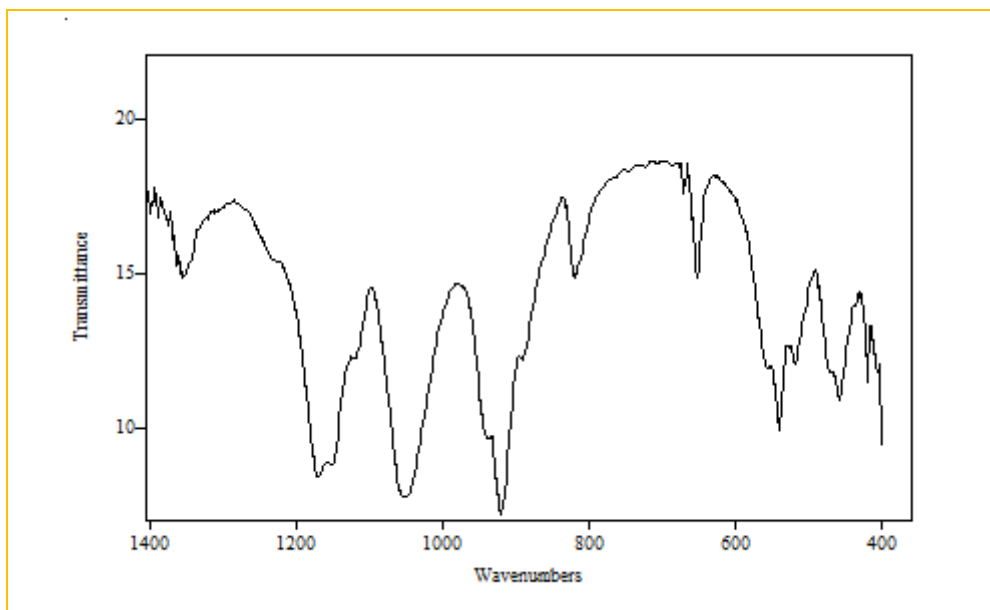


Φάσμα 17: PDC m – HEDP σε pH 7

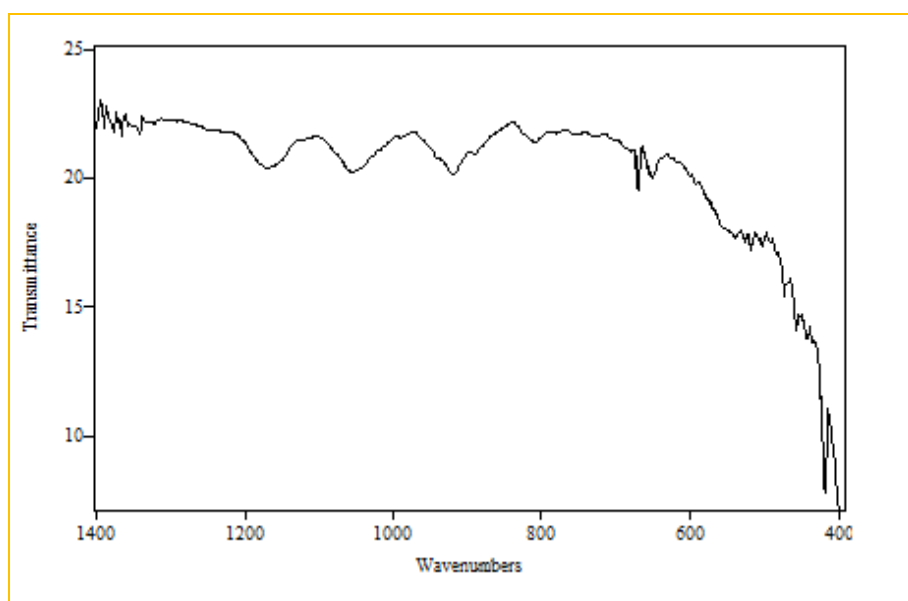
PDC vi – HEDP



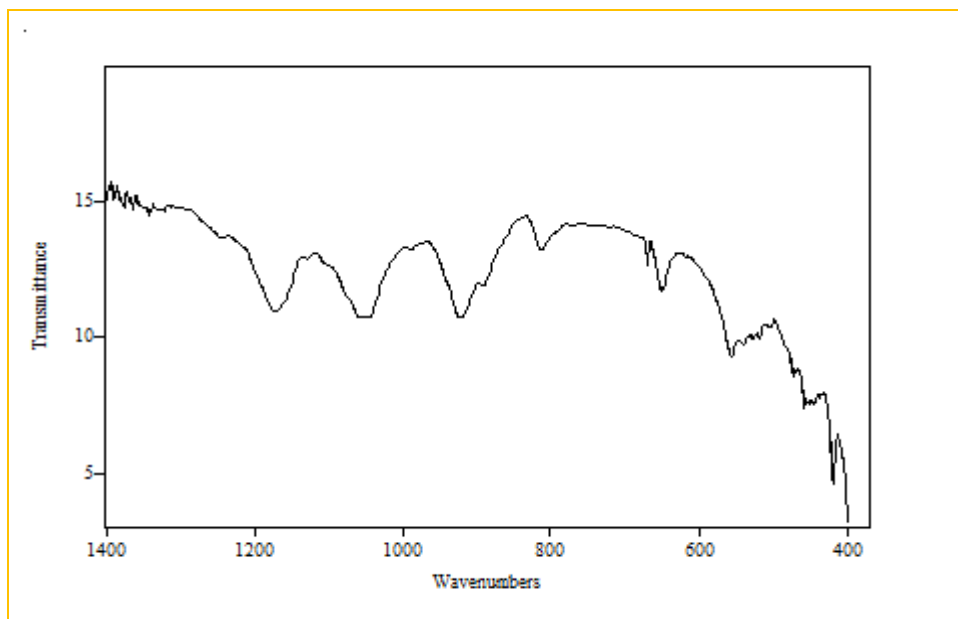
Φάσμα 18: PDC vi – HEDP σε pH 3



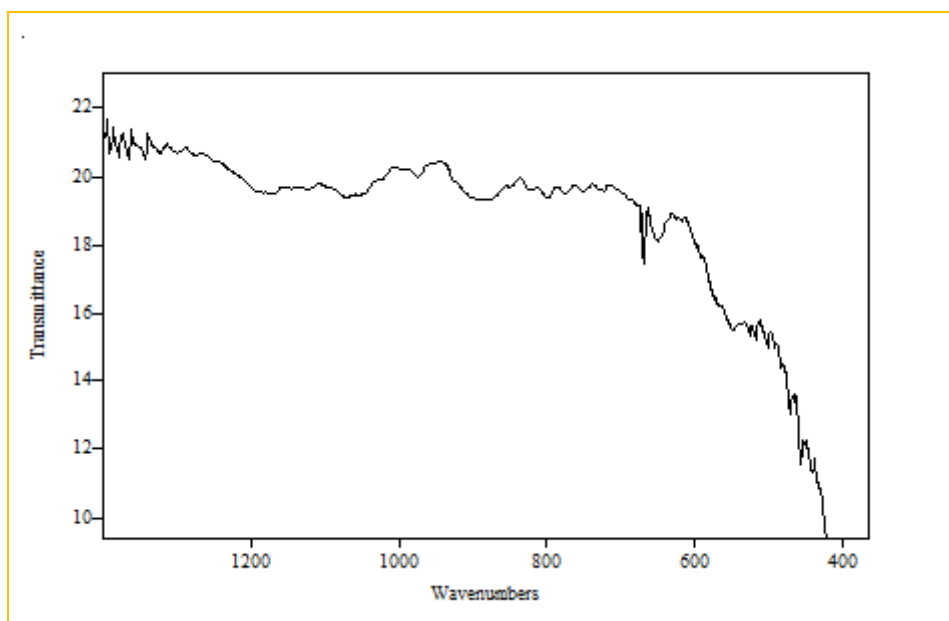
Φάσμα 19: PDC VI – HEDP σε pH 4



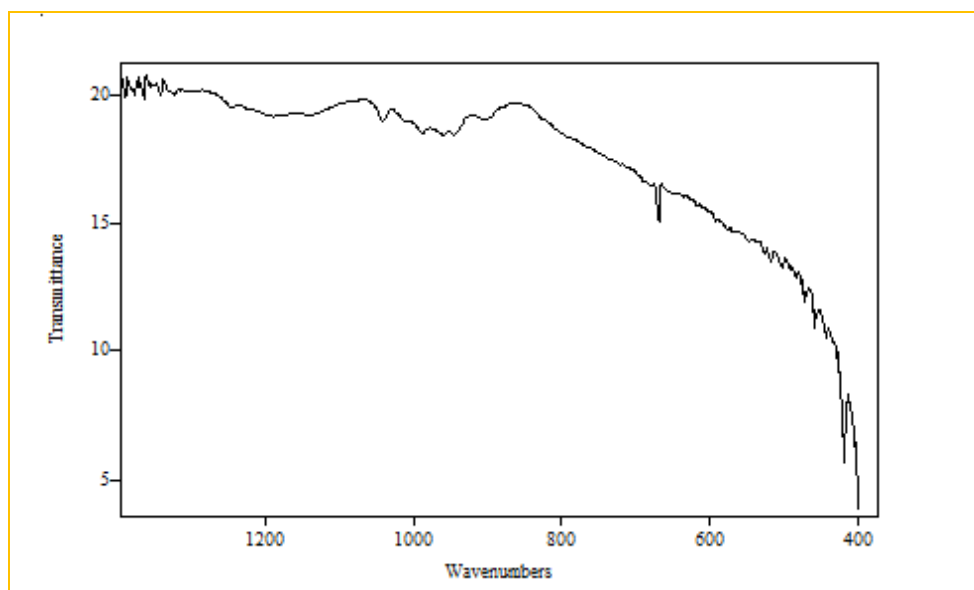
Φάσμα 20: PDC VI – HEDP σε pH 5



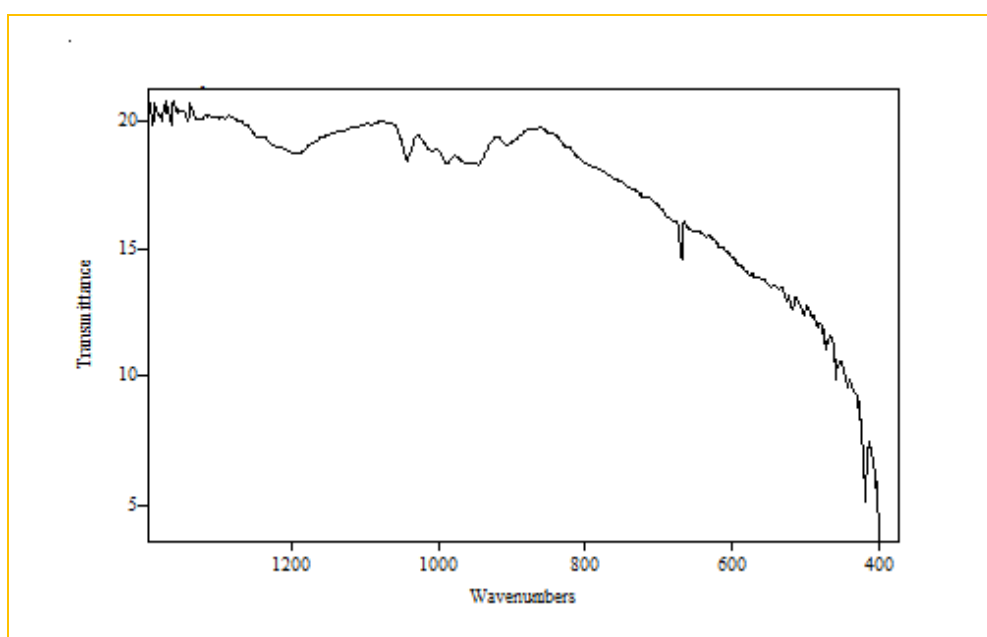
Φάσμα 21: PDC VI – HEDP σε pH 6



Φάσμα 22: PDC VI – HEDP σε pH 7



Φάσμα 23: PDC m



Φάσμα 24: PDC vi

