



ISSN 2241-3081

ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ PHARMAKEFTIKI

ΤΡΙΜΗΝΙΑΙΑ ΕΚΔΟΣΗ ΜΕ ΘΕΜΑΤΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
A QUARTERLY EDITION ON PHARMACEUTICAL SCIENCES' TOPICS

ΤΟΜΟΣ 24 | ΤΕΥΧΟΣ IV
VOLUME 24 | NUMBER IV

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ - ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2012
OCTOBER - DECEMBER 2012



Μη φοβάσαι το γλυκό.

- Φυσική γλυκαντική ουσία από φύλλα STEVIA • Χωρίς Θερμίδες • Εξαιρετική γεύση
- Ιδανικό για ροφήματα και γλυκά • Κατάλληλο για διαβητικούς • Στα φαρμακεία

Φυσικό αναντικατάστατο.

www.sweetestevia.gr



ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ

Τριμηνιαία έκδοση με θέματα
Φαρμακευτικών Επιστημών

Τόμος 24, Τεύχος ΙII, Ιούλιος - Σεπτέμβριος 2012

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΣΥΝΤΑΞΗΣ:

Α. Τσαντίλη

Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Αθηνών
tsantili@pharm.uoa.gr

ΑΡΧΙΣΥΝΤΑΚΤΗΣ:

Γ. Α. Καρίκας

Καθηγητής, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Αθηνών
karikasg@teiath.gr

ΣΥΝΤΑΚΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κ. Δεμέτζος,

Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Β. Δημόπουλος,

Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Ν. Κόλμαν, Galenica SA

Χ. Κοντογιώργης,

PhD, Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Π. Κουρουνάκης,

Ομοτ. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Π. Μαχαίρας,

Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Σ. Νικολαφόπουλος,

Αναπλ. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Γ. Πάιρας,

Επίκ. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Ε. Παντερή,

Αναπλ. Καθηγήτρια Πανεπιστήμιο Αθηνών

Δ. Ρέκκας,

Αναπλ. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Αθηνών

e-mail ΓΙΑ ΥΠΟΒΟΛΗ ΕΡΓΑΣΙΩΝ:

tsantili@pharm.uoa.gr

karikasg@teiath.gr

Για την ηλεκτρονική έκδοση της «Φαρμακευτικής»
και οδηγίες προς συγγραφείς επισκεφτείτε την διεύθυνση
www.hsmc.gr

Τα άρθρα που δημοσιεύονται
στην «Φαρμακευτική» καταχωρούνται
στα Chemical Abstracts, EMBASE και Scopus.

PHARMAKEFTIKI

A quarterly edition
on Pharmaceutical Sciences' topics
Volume 24, Issue III, July - September 2012

EDITOR:

A. Tsantili

Professor, University of Athens
tsantili@pharm.uoa.gr

CO EDITOR:

G.A. Karikas

Professor, Technological Educational Institute of Athens
karikasg@teiath.gr

EDITORIAL BOARD

C. Demetzos,

Professor, University of Athens

V.J. Demopoulos,

Professor, University of Thessaloniki

N. Kolman, Galenica SA

Ch. Kontogiorgis,

PhD, University of Thessaloniki

P. Kourounakis,

Emeritus Professor, University of Thessaloniki

P. Macheras,

Professor, University of Athens

S. Nikolopoulos,

Associate Professor, University of Patras

G. Pairas,

Assistant Professor, University of Patras

I. Panderi,

Associate Professor, University of Athens

D. Rekkas,

Associate Professor, University of Athens

e-mail FOR MANUSCRIPT SUBMISSION:

tsantili@pharm.uoa.gr

karikasg@teiath.gr

For "Pharmakeftiki" electronic edition
and instructions to authors please visit
www.hsmc.gr

Articles published
in "Pharmakeftiki" are indexed
in Chemical Abstracts, EMBASE and Scopus.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ 24, IV, 2012

CONTENTS

PHARMAKEFTIKI 24, IV, 2012

ΑΡΘΡΟ ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗΣ

- Φυσικά και Συνθετικά Προϊόντα
στην Χημειοπρόληψη του Καρκίνου 79-88
Γεώργιος Α. Καρίκας
- Αλληλεπιδράσεις Βιοδραστικών Μορίων με
τις Μεμβράνες και η Συνεισφορά
της Λιπιδομικής στη Φαρμακευτική Έρευνα
Δημήτριος Ντουντανιώτης
Αννα Τσαντίλη-Κακούλιδην
Θωμάς Μαργούμουστακος 89-105

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

- Ο ρόλος του ζ-δυναμικού στη σταθερότητα
των νανοκολλοειδών συστημάτων.
Χαράλαμπος Κουτσούλας
Νατάσσα Πίππα
Κώστας Δεμέτζος
Marian Zabka 106-111
- Ραδιοανοσοθεραπεία σε Ασθενείς με
non-Hodgkin Λέμφωμα - Παρασκευή και
Χορήγηση του [⁹⁰Y] Zevalin - Νοσοκομειακή
Εμπειρία
Μαρία Παπαχρήστου
Αγγελική Γεωργίου
Άννα Κολίντου
Δέσποινα Κυριακή 112-115

ΝΕΑ, ΕΞΕΛΙΞΕΙΣ

- Δελτίο Τύπου της Ελληνικής
Φαρμακευτικής Εταιρείας 116

- 5th BBBB International Conference 118

REVIEW ARTICLES

- Natural and Synthetic Agents
in Cancer Chemoprevention 79-88
George A. Karikas
- Interactions of Bioactive Molecules
with Membranes and the Contribution
of Lipidomics in the Pharmaceutical Research
Dimitrios Ntountaniotis
Anna Tsantili-Kakoulidou
Thomas Mavromoustakos 89-105

RESEARCH ARTICLES

- The role of ζ-potential on the stability
of nanocolloidal systems
Charalampos Koutsoulas
Natassa Pippa
Costas Demetzos
Marian Zabka 106-111
- Radioimmunotherapy in Patients with non-
Hodgkin's Lymphoma (NHL) - Preparation
and Administration of [⁹⁰Y] Zevalin - Hospital
Experience
Maria Papachristou
Aggeliki Georgiou
Anna Kolintou
Despina Kyriaki 112-115

Γραφείο Διοίκησης Ελληνικής Εταιρείας Φαρμακοχημείας
ΖΙΤΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑΚΕΣ
ΚΑΙ ΤΟΥΡΙΣΤΙΚΕΣ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΕΙΣ ΑΕ
1ο χλμ Πατανίας - Μαροκοπούλου
19002, Πατανία, Ελλάδα
Τηλ: +30 211 100 1770-71
E-mail: info@zita-congress.gr

Hellenic Society of Medicinal Chemistry Management Office
ZITA CONGRESS SA
1st klm Peanias-Markopoulou
19002, Peania, Greece
Tel: +30 211 100 1770-71
Email: info@zita-congress.gr

Natural and Synthetic Agents in Cancer Chemoprevention

George A. Karikas*

Department of Medical Laboratories, Faculty of Health and Caring Professions,
Technological and Educational Institute of Athens, Athens, Greece

Abstract

Throughout history, natural products have been the most significant source of drugs in cancer therapy. Cancer represents a multistage and heterogeneous disease that is driven by progressive genetic and epigenetic abnormalities. The majority of chemotherapeutic drugs affect cell division or DNA synthesis and function, in addition to recent targeted therapies (monoclonal antibodies etc). On the other hand, vegetables and fruit are also excellent sources of cancer preventive compounds.

The mechanistic insight into chemoprevention includes induction of cell cycle arrest and apoptosis or inhibition of signal transduction pathways mainly: the mitogen-activated protein kinases (MAPK), protein kinases C (PKC), phosphoinositide 3-kinase (PI3K), glycogen synthase kinase (GSK) which leads to abnormal cyclooxygenase-2 (COX-2), activator protein-1 (AP-1), and nuclear factor kappa-light chain-enhancer of activated B cells (NF-κB). Effectiveness of chemopreventive agents reflects their ability to counteract certain upstream signals that leads to genotoxic damage, redox imbalances and other forms of cellular stress.

Epigenetic therapy is a new area for drug development in cancer prevention. The current generation of epigenetic drugs primarily target to inhibit the activity and expression of methyltransferases (DNMTs) and histone deacetylases (HDACs). In close relation to chemotherapy, chemoprevention enforce by edible phytochemicals or/and epigenetics is now considered to be an inexpensive and promising approach. The present short review present a number of natural and synthetic chemopreventing agents, along with their mode of action, towards cancer control and management.

Key words: *cancer chemoprevention, epigenetic mechanisms, phytochemicals, polyphenols, synthetic agents.*

Introduction

Cancer is a growing health problem around the world, particularly with the steady rise in life expectancy. According to a recent report by the World Health Organization, there are now more than 10 million cases of cancer per year worldwide. Cancer results from a multistage, multi-mechanism carcinogenesis process that involves mutagenic, cell death and epigenetic mechanisms, during the three distinguishable but closely allied stages: initiation, promotion, and progression. Since reducing the initiation phase to a zero level is impossible, the most effective intervention would be at the promotion phase to eliminate premalignant cells before they become malignant¹.

Natural products, in general, have been the most significant source of drugs in science. Throughout history, these products have afforded a rich source of compounds that have found many applications in the fields of medicine, pharmacy and biochemistry².

The fact that about 7 million people die from various types of cancer every year, making this disease responsible for 12.5% of deaths worldwide, raises an overwhelming demand to develop new, more potent and effective anticancer, as well as chemopreventing agents³.

Therefore, the concept of delaying or preventing this transformation remains a viable and attainable goal for the future⁴.

Nutri-epigenetics has lately emerged as a new field in current epigenetic research. During carcinogenesis, major cellular functions and pathways, including drug metabolism, cell cycle regulation, potential to repair DNA damage or to induce apoptosis, response to inflammatory stimuli, cell signaling, and cell growth control and differentiation become deregulated. Recent evidence now indicates that epigenetic alterations contribute to these cellular defects, for example

* Corresponding author: George A. Karikas, e-mail: karikasg@teiath.gr

epigenetic silencing of detoxifying enzymes, tumor suppressor genes, cell cycle regulators, apoptosis-inducing and DNA repair genes, nuclear receptors, signal transducers and transcription factors by promoter methylation, and modifications of histones and non-histone proteins such as p53, NF- κ B, and the chaperone HSP90 by acetylation or methylation⁵.

Vegetables and fruit are excellent sources of cancer-preventive substances. Intervention to slow down, arrest or reverse the process of carcinogenesis by the use of either natural or synthetic substances individually or in combination therapy has emerged as a promising medical approach to reduce cancer risk. Epidemiological and experimental evidence emphasize that specific compounds may positively inhibit carcinogenesis at various sites, including the oral cavity, esophagus, stomach, colon/rectum, lung, breast, and prostate, but at the same time, another compelling body of evidence, together with the data from animal and *in vitro* studies, strongly supports the relationship between dietary constituents and the risk of cancer development⁶. The American National Cancer Institute has identified about 35 plant-based foods containing 1,000 different phytochemicals, that possess cancer-preventive properties. The most exciting findings have been achieved with antioxidant vitamins and their precursors, which are found in dark, leafy green vegetables and yellow/orange fruit and vegetables. Recently, the focus and emphasis have shifted to the non-nutritive phytochemicals².

The present short review present a number of promising natural and synthetic chemopreventing substances along with their mode of action, towards cancer control and management.

Chemopreventing mechanisms

The mechanistic insight into chemoprevention includes induction of cell cycle arrest and apoptosis or inhibition of signal transduction pathways mainly the mitogen-activated protein kinases (MAPK), protein kinases C (PKC), phosphoinositide 3-kinase (PI3K), glycogen synthase kinase (GSK) which leads to abnormal cyclooxygenase-2 (COX-2), activator protein-1 (AP-1), and nuclear factor kappa-light chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B). Effectiveness of chemopreventive agents reflects their ability to counteract certain upstream signals that leads to genotoxic damage, redox imbalances and other forms of cellular stress. Targeting malfunctioning molecules along the disrupted signal transduction pathway in cancer represents a rational strategy in chemoprevention. NF- κ B and AP-1 provide mechanistic links between inflammation

and cancer. Thus, cell signaling cascades and their interacting factors have become important targets of chemoprevention and phenolic phytochemicals and plant extracts seem to be promising in this endeavor⁷.

Epigenetic mechanisms involved also in carcinogenesis. Carcinogenesis is a long-term process and both genetic and epigenetic factors contribute to cancer development. Epigenetic changes, such as DNA methylation, histone modifications and post transcriptional gene regulation by non-coding microRNAs (miRNAs) are easily influenced by dietary and environmental factors. These processes affect transcript stability, DNA folding, nucleosome positioning, chromatin compaction, and complete nuclear organization of the genetic material. Synergistically and cooperatively they determine whether a gene is silenced or expressed, as well as the timing and tissue-specificity of the expression of these genes. Disruption of the epigenome certainly underlies disease development⁸.

DNA methylation is probably the most well researched epigenetic mark that differs between normal cells and tumor cells in humans. In normal cells, CpG islands preceding gene promoters are generally unmethylated, while other individual CpG dinucleotides throughout the genome tend to be methylated. However, in cancer cells, these islands preceding tumor suppressor gene promoters are often hypermethylated, while CpG methylation of oncogene promoter regions and parasitic repeat sequences is often decreased⁹.

In comparison to healthy cells, cancerous cells have been seen to exhibit decreased monoacetylated and trimethylated forms of histone H4. In mouse models, many have noticed that the loss of histone H4 acetylation and trimethylation actually increases as tumor growth continues¹⁰. Loss of histone H4 Lysine 16 acetylation (H4K16ac), that is a mark of aging at the telomeres, specifically loses its acetylation and this histone acetylation loss might be battled with a histone deacetylase (HDAC) inhibitor specific for SIRT1, an HDAC specific for H4K16¹¹.

In mammals, microRNA (miRNA) regulates around 60% of the transcriptional activity of protein-encoding genes. Some miRNAs have also been found to undergo methylation-associated silencing in cancerous cells.^{12,13}

Dietary polyphenols can potentially impact all above mentioned epigenetic modifications, which in turn contribute towards their chemopreventive potential. Although epigenetic changes are heritable in somatic cells, these modifications are also

potentially reversible, which makes them attractive and promising avenues for cancer preventive and therapeutic strategies. Dietary polyphenols from green tea, turmeric, soybeans, broccoli and others have shown to possess multiple cell-regulatory activities within cancer cells¹⁴.

From a clinical point of view, epigenetics seem to offer a very promising and attractive issue, in contrast to genetic changes such mutations, gene deletions, DNA binding¹⁵. Unlike mutations, which exist for the lifetime, epigenetically modified genes can be restored. Methylation silenced genes can be demethylated, and histone complexes can be rendered transcriptionally active by modification of acetylation and methylation of various histones via nutrients, drugs and other dietary interventions¹⁶.

An ideal chemopreventive agent should have: 1) little or no toxicity; 2) high efficacy in multiple sites; 3) capability of oral consumption; 4) known mechanisms of action; 5) low cost, and human acceptance. A variety of grains, cereals, nuts, soy products, olives, beverages confer a protective effect against cancer¹⁷. In particular, natural products consist of a wide variety of biologically active phytochemicals including phenolics, flavonoids, carotenoids, alkaloids and nitrogen containing as well as organosulfur compounds, which have been shown to suppress early and late stages of carcinogenesis¹⁸. Chemopreventing agents and their sources inducing epigenetic mechanisms are given in Table 1.

Table 1. Polyphenols acting as epigenetics via specific mechanisms

POLYPHENOLS	SOURCE	DNMTs inhibition	HDACs inhibition	Tumor suppressors
coffee polyphenols	coffee	✓		
curcumin	turmeric	✓	✓	✓
dihydrocoumarin	sweet Glover		✓	
epigallocatechin-3-gallate	green tea	✓	✓	✓
garcinol	garcinia		✓	
genistein	soya	✓		
lycopene	tomatoes	✓		
quercetin	plant food	✓		
resveratrol	red wine	✓	✓	
rosmarinic acid	oregano	✓		
sanguinarine	blood root		✓	

DNMTs: Methyltransferases, HDACs: Histone deacetylases

The bioactive triterpene lupeol (Fig. 1), commonly found in fruits like fig, mango, etc, has recently attracted interest in the context of chemoprevention attributable in large part to its antioxidant¹⁹, apoptosis-inducing and antiproliferative anti-mutagenic, anti-inflammatory properties as well as its efficacy in inhibition of *in vivo* and *in vitro* cancer growth²⁰.

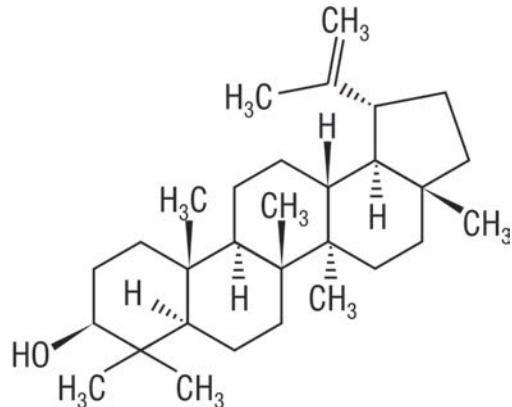


Figure 1. Structure of lupeol.

Triterpenes represent a varied class of natural products, which occur commonly and are found in fruits, vegetables and other parts of several medicinal plants e.g. *Arbutus unedo*, *Tipuana tipu*, etc²¹ have seen tremendous efforts by researchers worldwide to develop this wonderful molecule for its clinical use for the treatment of a variety of disorders. The last 15 years studies also provide insight into the mechanism of

action of lupeol and suggest that it is a multi-target agent with immense anti-inflammatory potential targeting key molecular pathways which involve NF- κ B, cFLIP, Fas, Kras, phosphatidylinositol-3-kinase (PI3 K)/Akt and Wnt/ β -catenin in a variety of cells. It is noteworthy that lupeol at its effective therapeutic doses exhibits no toxicity to normal cells and tissues²². NF- κ B, a transcription factor, is now known to be closely connected to the process of tumor genesis based on a multiplicity of evidence. NF- κ B is activated in response to tobacco, stress, dietary agents, obesity, alcohol, infectious agents, irradiation, and environmental stimuli that account for as much as 95% of all cancers. NF- κ B: a) : regulates the expression of most anti-apoptotic gene products associated with the survival of the tumor; b) : regulates the gene products linked with proliferation of tumors; c) : controls the expression of gene products linked with invasion, angiogenesis, and metastasis of cancer. While most carcinogens activate NF- κ B, most chemopreventive agents suppress its activation. These observations suggest that NF- κ B is intimately intertwined with cancer growth and metastasis. AP1 is another transcription factor that regulates expression of genes that are involved in cellular adaptation, differentiation and proliferation. Functional activation of AP1 is associated with malignant transformation as well as tumor promotion²³.

Other chemopreventing phytochemicals

Curcumin, (Fig.2) a spice widely used in Indian cuisine, has been identified to show considerable anti-tumor effects. It is a yellow pigment that is present in the rhizome of turmeric (*Curcuma longa* L.) and related species and is one of the most extensively investigated phytochemicals, with regard to chemopreventive potential⁶².

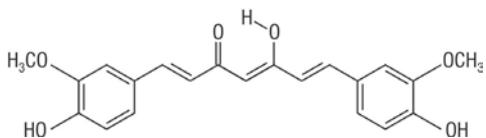


Figure 2. Structure of curcumin

The mechanisms implicated in the inhibition of tumorigenesis by curcumin are diverse and appear to involve a combination of antiinflammatory, antioxidant, immune modulatory, proapoptotic, and antiangiogenic properties via pleiotropic effects on genes and cell-signaling pathways at multiple levels. When curcumin is combined with some cytotoxic drugs or certain other diet-derived polyphenols, synergistic effects have been demonstrated²⁴.

A recent finding is that curcumin binds directly to and activates VDR (the nuclear vitamin D receptor), inducing the VDR target genes CYP3A4, CYP24, p21 and TRPV6²⁵. Despite our increasing knowledge on this substance there still remain many unknown effects that deserve intense investigation²⁶.

Gingerol (Fig.3), a phenolic substance that is responsible for the spicy taste of ginger (*Zingiber officinale*), was reported to inhibit tumor promotion and PMA-induced ornithine decarboxylase (ODC) activity and TNF-production in mouse skin²⁷.

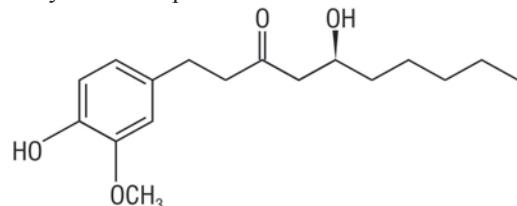


Figure 3. Structure of gingerol

Capsaicin, (Fig.4) a pungent component of hot chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) has been suspected to act as a carcinogen or a co-carcinogen in experimental animals because of its irritant properties, but other studies indicate that this compound has chemopreventive and chemoprotective effects²⁸.

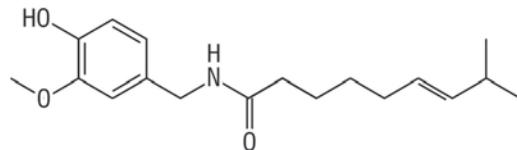


Figure 4. Structure of capsaicin

Epigallocatechin gallate (EGCG, Fig.5) is an antioxidant and chemopreventive polyphenol that is found in green tea. It has been shown to suppress malignant transformation in a PMA-stimulated mouse epidermal JB6 cell line, which seemed to be mediated by blocking activation of Ap1²⁹.

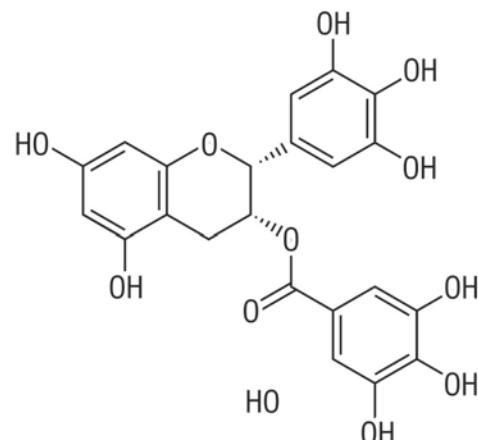


Figure 5. Structure of epigallocatechin

Genistein (Fig.6), a soy-derived isoflavone, is believed to contribute to the putative breast- and prostate cancer preventive activity of soya⁶². Genistein inhibited PMA-induced AP1 activity, expression of c-FOS and ERK activity in certain human mammary **cell lines**. Genistein treatment abrogated NF-**kB** DNA binding in human hepatocarcinoma cells stimulated with hepatocyte growth factor³⁰.

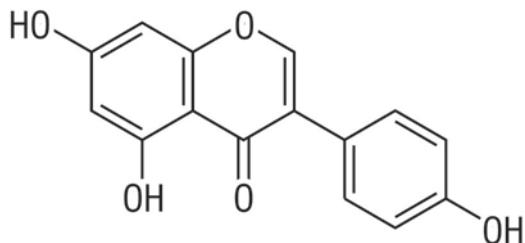


Figure 6. Structure of genistein

Resveratrol (3,4',5-trihydroxy-trans-stilbene, Fig.7) is a phytoalexin that is present in grapes (*Vitis vinifera*) and a key antioxidant ingredient of red wine. It is believed to be responsible for the so-called ‘French paradox’, in which consumption of red wine has been shown to reduce the mortality rates from cardiovascular diseases and certain cancers⁶².

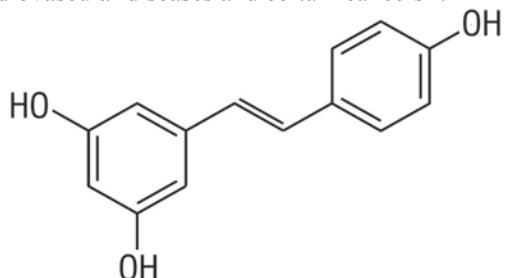


Figure 7. Structure of resveratrol

Resveratrol treatment inhibited PMA-induced COX2 expression and catalytic activity, via the cyclic-AMP response element (CRE) in human mammary epithelial cells³¹. It also inhibited PKC activation, AP1 transcriptional activity and the induction of COX2-promoter activity in PMA-treated cells. Resveratrol induced apoptosis and reduced the constitutive activation of NF-**kB** in both rat and human pancreatic carcinoma cell lines³². Of particular interest is that resveratrol is capable of causing DNA breakage in cells such as human lymphocytes. Such cellular DNA breakage is inhibited by copper specific chelators but not by iron and zinc chelating agents³³.

In addition to the above phytochemicals, quercetin (Fig.8), a well known flavonoid, is ubiquitously distributed in edible plant foods.

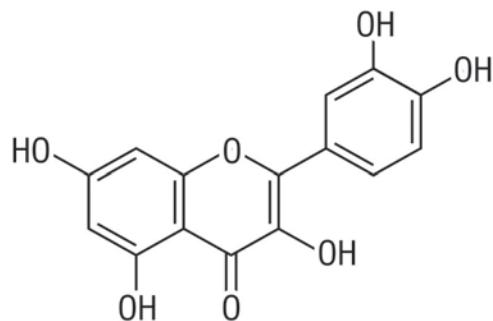


Figure 8. Structure of quercetin

Caffeic acid phenethyl ester, sulphoraphane, silymarin, apigenin, emodin and anethole have also been reported to suppress the activation of NF-**kB** and AP1, which might contribute to their chemopreventive and/or cytostatic effects³⁴.

Several dietary phytochemicals have been shown to downregulate the β -catenin-mediated signaling pathway as part of their molecular mechanism of chemoprevention. Curcumin and caffeic acid phenethyl ester inhibited tumorigenesis and decreased β -catenin expression in the multiple intestinal neoplasia (Min $+$) mouse model³⁵. Moreover, curcumin reduced the cellular levels of β -catenin through caspase-mediated cleavage of the protein³⁶. Downregulation of β -catenin expression by resveratrol was observed in a human colon cancer cell line³⁷.

Expression of a β -catenin–TCF4-binding reporter construct was reduced in HEK293 cells by epigallocatechin-3-gallate³⁸. Indole-3-carbinol altered the pattern of β -catenin mutation in chemically-induced rat colon tumors³⁹, inhibited adhesion, migration and invasion of cultured human breast carcinoma cells, and upregulated E-cadherin and β -catenin⁴⁰. A similar effect was observed with tangeretin from citrus⁴¹. COX inhibitors have also been found to suppress β -catenin signalling and β -catenin–TCF/LEF transcriptional activity⁴².

Epigenetic synthetic agents

Epigenetic therapy, the use of drugs to correct epigenetic defects, is currently a new and promising area for drug development in the field of cancer prevention. Besides their promise as therapeutic agents, epigenetic drugs may also be used for prevention of various diseases, including cancer chemoprevention. Epigenetic therapy is a potentially novel form of therapy since epigenetic defects, in contrast to genetic defects, are quite reversible⁴³⁻⁴⁴.

Additionally, there is growing trend that epigenetic drugs alone or in combination with conventional anticancer drugs may prove to be a significant

advance over the conventional anticancer drugs, which inherently tend to be very toxic⁴⁵.

The current generation of epigenetic drugs primarily target to inhibit the activity and expression of DNMTs and HDACs. Among the DNMT inhibitors, nucleic acid inhibitors, such as 5-azacytidine and 5-aza-2-deoxycytidine (Fig.9), are the most important and widely studied epigenetic drugs⁶³.

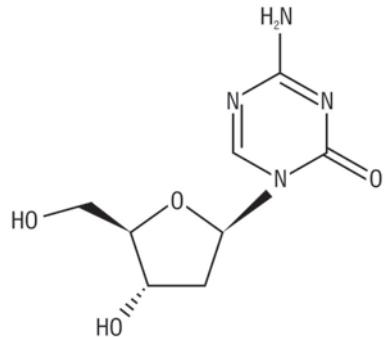


Figure 9. Structure of 5-aza-2-deoxycytidine

This hypomethylating agent has been used to treat myelodysplastic syndrome, a blood cancer produced by abnormal bone marrow stem cells⁴⁶. An inhibitor for all three types of active DNA methyltransferases, 5-azaC, previously thought to be highly toxic for human trials, proves to be an effective therapeutics in clinical trials when apply in low dosage, reducing progression of myelodysplastic syndrome to leukaemia, and increasing survival rate of patients with cancer⁴⁷.

In addition, certain non-nucleoside inhibitors such as procainamide, procaine and EGCG have also shown potent inhibitors of DNMT activity in various experimental and clinical studies⁴⁸⁻⁵¹. Concerning HDAC inhibitors, trichostatin A, suberoylanilide hydroxamic acid, valproic acid and phenyl butyrate, have been widely used with some success in various studies. Vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, Fig.10,) a highly potent histone deacetylase inhibitor, was recently approved by the FDA for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma⁵²⁻⁵⁴.

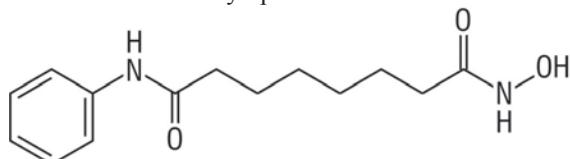


Figure 10. Structure of vorinostat

Vorinostat in treatment of advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC) showed improved response rates and increased median progression free survival and overall survival, although the survival improvements were not significant at the P=0.05 level.⁵⁵ Binding of Vorinostat to histone deacetylase is depicted in Figure 11.

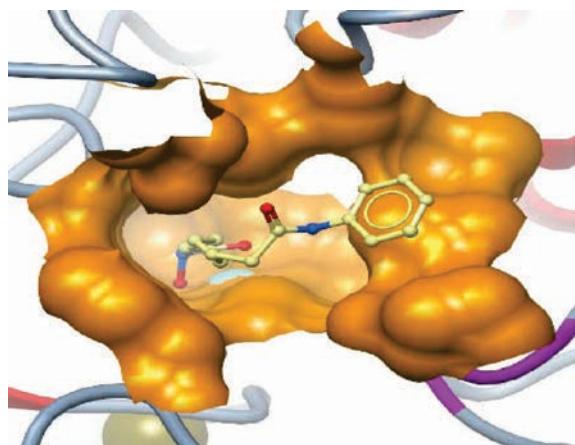


Figure 11. Vorinostat incorporation into HDAC enzymatic system (<http://pharmaceuticalintelligence.com/author/sjwilliams/>)

HDAC inhibitors generally consist of three parts in the chemical structure:

1. a zinc-chelating group
2. a spacer group, which is generally hydrophobic
3. "enzyme binding" group that confers specificity and is generally aromatic in character⁵⁶⁻⁵⁷.

As for the common antiepileptic agent, valproic acid it was suggested that impairs the liver function resulting in free radicals production. The latter seems to produce DNA oxidative damage in liver cells, not excluding neuronal cells, as evidenced by the measured remarkably increased 8-OHdG serum levels⁵⁸. Interestingly, only recently, researchers have taken advantage of the high level of reactive oxygen species (ROS) in cancer cells, developing new therapeutic strategies to preferentially kill these cells. Strategies involving ROS activation may be used for development of new ROS-targeting prodrugs, which could lead to new approaches or technology for more effective cancer treatment⁶¹.

Several of these potentially useful epigenetic drugs are still undergoing preclinical and clinical drug trials. Although the current generation of epigenetic drugs have provided the proof of principle in its favor, epigenetic therapy has its limitations. Some of these shortcomings include that both DNMT and HDAC inhibitors may activate oncogenes due to lack of specificity, resulting in accelerated tumor progression⁵⁹.

Furthermore, benefits and targets of phytochemicals, mainly rely so far on cell and animal models. To safely apply phytochemicals as personalized cancer preventive agents, the effects of

phytochemicals in humans will need to be assessed. Thus, personalized prevention methods using nutri-epigenetics could have a crucial role in cancer prevention, especially in high-risk populations. Extensive research in identifying molecular targets and conducting human studies with chemopreventing agents would provide a more orientated approach to personalized cancer prevention for the near future⁶⁰.

Conclusions

The hallmarks of cancer comprise six biological capabilities acquired during the multistep development of human tumors. The hallmarks constitute an organizing principle for rationalizing the complexities of neoplastic disease. They include: sustaining proliferative signaling, evading growth suppressors, resisting cell death, enabling replicative immortality, inducing angiogenesis, and activating invasion and metastasis. Underlying these hallmarks are genome instability, which generates the genetic diversity that expedites their acquisition, and inflammation, which fosters multiple hallmark functions. Conceptual progress in the last decade has added two emerging hallmarks of potential generality to this list-reprogramming of energy metabolism and evading immune destruction⁶¹.

As it was already stated, natural products consist of a wide variety of biologically active phytochemicals, including phenolics, flavonoids, carotenoids, alkaloids and nitrogen containing as well as organosulfur compounds, which have been shown to suppress early and late stages of carcinogenesis. Effectiveness of natural chemopreventive agents reflects their ability to counteract certain upstream signals. Dietary polyphenols can also potentially impact epigenetic modifications, such as DNA methylation, histone modifications and post transcriptional gene regulation by non-coding microRNAs (miRNAs). All these mechanisms seem to be closely related to their well known antioxidant effect. In addition, epigenetic drugs acting via similar mechanisms, alone or in combination with conventional anticancer drugs may prove to be a significant advance over the conventional anticancer drugs. It has become obvious, that chemoprevention in close relation to chemotherapy, enforced by edible phytochemicals is now considered to be an inexpensive and promising approach to cancer control and management^{62,63}.

Concluding, with healthcare costs being an international key issue today, it would be especially cost-effective to promote the awareness and consumption of phytochemicals as a cancer-preventive and therapeutic strategy, within the health system.

Φυσικά και Συνθετικά Προϊόντα στην Χημειοπρόληψη του Καρκίνου

Γεώργιος Α. Καρήκας

Τμήμα Ιατρικών Εργαστηρίων, Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Αθηνών, Αγ. Σπυρίδωνος και Δημητσάνας, Αθήνα, 12 210

Περίληψη

Τα φυσικά προϊόντα υπήρξαν ανέκαθεν η πιο σημαντική πηγή αντικαρκινικών φαρμάκων. Ο καρκίνος αντιπροσωπεύει μια ομάδα ετερογενών και πολλών σταδίων ασθένεια, που καθορίζεται από προοδευτικές γενετικές και επιγενετικές διαταραχές. Πέραν των στοχευμένων θεραπευτικών μέσων (μονοκλωνικά αντισώματα κλπ), η πλειοψηφία των αντικαρκινικών φαρμάκων επηρεάζει τη κυτταρική διέγερση ή τη σύνθεση και λειτουργικότητα του DNA. Από την άλλη μεριά, πολλοί φυτικοί οργανισμοί και φρούτα συνιστούν πλούσιες πηγές ενώσεων, με χημειοπροστατευτική δράση έναντι του καρκίνου.

Ο μηχανισμός της χημειοπρόληψης περιλαμβάνει αφενός την ενεργοποίηση της παύσης του κυτταρικού κύκλου, την απόπτωση ή την αναστολή των διόδων σημάτων-μεταγωγής, που σχετίζονται με τις πρωτεΐνικές κινάσες (MAPK, PKC) την φωσφο-ινοσιδική -3- κινάση (PI3K), την κινάση συνθετάση του γλυκογόνου (GSK), που οδηγούν στον σχηματισμό μη φυσιολογικής κυκλοοξυγονάσης-2 (COX-2), πρωτεΐνης-1 (AP-1) και του παράγοντα NF-κB, ενεργοποιημένων κυττάρων B. Η αποτελεσματικότητα των χημειοπροληπτικών ενώσεων αντανακλά στην ικανότητά τους να ανταγωνίζονται συγκεκριμένα σήματα-μεταγωγής, που οδηγούν σε γενοτοξικές βλάβες, διαταραχή του οξειδωτικού status και άλλων μορφών κυτταρικού stress.

Η επιγενετική θεραπεία, συνιστά ένα σχετικό νέο τομέα ανάπτυξης φαρμάκων στη χημειοπρόληψη του καρκίνου. Η πρόσφατη γενιά επιγενετικών φαρμάκων στοχεύουν στην αναστολή της δραστικότητας και έκφρασης των μεθυλτρανσερασών (DNMTs) και της ιστόνης αποακετυλάσης. Η χημειοπρόληψη-χημειοπροστασία βρώσιμων φυτοχημικών ή/και συνθετικών επιγενετικών φαρμάκων, σε συνδυασμό με τη κλασική χημειοθεραπεία, θεωρείται μια οικονομική και ελπιδοφόρα θεραπευτική προσέγγιση. Το παρόν άρθρο επισκόπησης καταγράφει έναν αριθμό φυσικών και συνθετικών προϊόντων και τους μηχανισμούς δράσης τους, για τον έλεγχο και διαχείριση του καρκίνου.

References

1. Trosko J.E. The role of stem cells and gap junctions as targets for cancer chemoprevention and chemotherapy. *Biomed. Pharmacother.* 59, 326-331, 2005
2. Karikas G.A. Anticancer and chemopreventing natural products: some biochemical and therapeutic aspects. *J. B.U.ON.* 15, 627-638, 2010
3. Coseri S. Natural products and their analogues as efficient anticancer drugs. *Mini Rev. Med. Chem.* 9, 560-571, 2009
4. Brenner D.E., Gescher A.J. Cancer chemoprevention: lessons learned and future directions. *Br. J. Cancer* 93, 735-739, 2005
5. Gerhauser C. Cancer chemoprevention and nutria-epigenetics: state of art and future challenges. *Top. Curr. Chem.* 2012 Sep 6 [Epub ahead of print]
6. Chaturvedi P., Bhui K., Shukla Y. Lupeol: Connotations for chemoprevention. *Cancer Letters* 263, 1-13, 2008
7. Neergheen V.S., Bahorun T., Taylor E.W., Jen L.S., Aruoma O.I. Targeting specific cell signaling transduction pathways by dietary and medicinal phytochemicals in cancer chemoprevention. *Toxicology* 278, 229-41, 2010
8. Ellis L., Atadja P.W., Johnstone R.W. Epigenetics in cancer: targeting chromatin modifications. *Mol. Cancer Ther.* 8, 1409-1420, 2009
9. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat. Rev. Genet.* 8, 286-98, 2007
10. Fraga M.F., Ballestar E., Villar-Garea A., Boix-Chornet M., Espada J., Schotta G., Bonaldi T., Haydon C., Ropero S., Petrie K., Iyer N.G., Pérez-Rosado A., Calvo E., Lopez J.A., Cano A., Calasanz M.J., Colomer D., Piris M.A., Ahn N., Imhof A., Caldas C., Jenuwein T., Esteller M. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet* 37, (391-400, 2005.
11. Dang W., Steffen K.K., Perry R., Dorsey J.A., Johnson F.B., Shilatifard A., Kaeberlein M., Kennedy B.K., Berger S.L. Histone H4 lysine16 acetylation regulates cellular lifespan. *Nature* 459, 802-807, 2009.
12. Saito Y., Liang G., Egger G., Friedman J.M., Chuang J.C., Coetzee G.A., Jones P.A. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* 9, 435-43, 2006.
13. Lujambio A., Ropero S., Ballestar E., Fraga M.F., Cerrato C., Setién F., Casado S., Suarez-Gauthier A., Sanchez-Cespedes M., Git A., Spiteri I., Das P.P., Caldas C., Miska E., Esteller M. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res.* 67, 1424-9, 2007.
14. Linka A., Balaguera F.A. Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: Promising role for epigenetics. *Biochem. Pharmacol.* 12, 1791-1792, 2010
15. Karikas G.A., Constantinou-Kokotou V., Kokotos G. An HPLC method for the measurement of polyamines and lipidic amines binding to DNA. *J. Liqu. Chromatogr. Relat. Tech.* 20, 1789-1796, 1997
16. Dolinoy D.C., Huang D., Jirtle R.T. Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 13056-13061, 2007
17. Williams M.T., Hord N.G. The role of dietary factors in cancer prevention: beyond fruits and vegetables. *Nutr. Clin. Pract.* 20, 451-459, 2005
18. Nishino H., Satomi Y., Tokuda H., Masuda M. Cancer control by phytochemicals. *Curr. Pharm. Des.* 13, 3394-3399, 2007
19. Nagaraj S., Sunitha S., Varalakshmi P. Effect of lupeol on the lipid peroxidation and antioxidant status in rat kidney after chronic cadmium exposure. *J. Appl. Toxicol.* 20, 413-417, 2000
20. Saleem M., Afaq F., Adhami V.M., Mukhtar H. Lupeol modulates NF-KappaB and P13K/Akt pathway and inhibits skin cancer in CD-1 mice. *Oncogene* 23, 5203-5214, 2004
21. Karikas G.A., Euerby M.R., Waigh R.D. Constituents of the Stems of *Arbutus unedo*. *Planta Medica* 2, 223-224, 1987
22. Saleem M. Lupeol, novel anti-inflammatory and anticancer dietary triterpene. *Cancer Lett.* 285, 109-115, 2009
23. Prasad S., Ravindran J., Aggarwal B.B. NF-kappa B and cancer: how intimate is this relationship. *Mol. Cell Biochem.* 336, 25-37, 2010
24. Strimpakos A., Sharma R.A. Curcumin: Preventive and Therapeutic Properties in Laboratory Studies and Clinical Trials, *ARS* 10, 511-546, 2008
25. Bartik L.G., Whitfield K., Kaczmarcka M., Lowmiller C.L., Moffet E.W., Furwick J.K., Hernandez Z., Haussler C.A., Haussler M.R., Jurutka P.W. Curcumin: a novel nutritionally derived ligand of the vitamin D receptor with

- implications for colon cancer chemoprevention. *J. Nutr. Biochem.* 21, 1153–1161, 2010
26. Bachmeier B.E., Kilian P., Pfeffer U., Nerlich A.G. Novel aspects for the application of Curcumin in chemoprevention of various cancers. *Front Biosci (Schol Ed)* 2, 697–717, 2010
 27. Park K., Chun K.S., Lee J.M., Lee S.S., Surh Y.J. Inhibitory effects of [6]-gingerol, a major pungent principle of ginger, on phorbol ester-induced inflammation, epidermal ornithin decarboxylase activity and skin tumor promotion in ICR mice. *Cancer Lett.* 129, 139–144, 1998
 28. Surh Y.J., Lee SS. Capsaicin, a double-edged sword: toxicity, metabolism, and chemopreventive potential. *Life Sci* 56: 1845–1855, 1995
 29. Nomura M., Ma W., Chen N., Bode A.M., Dong Z. Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced NF-κB activation by tea polyphenols, (–)-epigallocatechin gallate and theaflavins. *Carcinogenesis* 21, 1885–1890, 2000
 30. Tacchini L., Dansi P., Matteucci E., Desiderio M.A. Hepatocyte growth factor signal coupling to various transcription factors depends on triggering of Met receptor and protein kinase transducers in human hepatoma cells HepG2. *Exp. Cell Res.* 256, 272–281, 2000
 31. Subbaramaiah K. Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription in human mammary epithelial cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 889, 214–223, 1999
 32. Mouria M. Food-derived polyphenols inhibit pancreatic cancer growth through mitochondrial cytochrome C release and apoptosis. *Int. J. Cancer* 98, 761–769, 2002
 33. Hadi S.M., Ullah M.F., Azmi A.S. Resveratrol Mobilizes Endogenous Copper in Human Peripheral Lymphocytes Leading to Oxidative DNA Breakage: A Putative Mechanism for Chemoprevention of Cancer. *Pharm. Res.* 27, 979–88 2010
 34. Bharti A.C., Aggarwal B.B. Nuclear factor-κB and cancer: its role in prevention and therapy. *Biochem. Pharmacol.* 64, 883–888, 2002
 35. Mahmoud N.N. Plant phenolics decrease intestinal tumors in an animal model of familial adenomatous polyposis. *Carcinogenesis* 21, 921–927, 2000
 36. Jaiswal A.S., Marlow B.P., Gupta N., Narayan S. β-catenin-mediated transactivation and cell–cell adhesion pathways are important in curcumin (diferuylmethane)- induced growth arrest and apoptosis in colon cancer cells. *Oncogene* 21, 8414–8427, 2002
 37. Joe AK. Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines. *Clin. Cancer Res.* 8, 893–903, 2002
 38. Orner G.A. Response of *Apcmin* and *A33ΔNβ*-cat mutant mice to treatment with tea, sulindac, and 2-amino-1-methyl- 6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). *Mutat. Res.* 506–507, 121–127, 2002.
 39. Blum C.A. β-Catenin mutation in rat colon tumors initiated by 1,2-dimethylhydrazine and 2-amino-3- methylimidazo[4,5-f]quinoline, and the effect of post initiation treatment with chlorophyllin and indole-3-carbinol. *Carcinogenesis* 22, 315–320, 2001.
 40. Meng Q. Suppression of breast cancer invasion and migration by indole-3-carbinol: associated with upregulation of BRCA1 and E-cadherin/ catenin complexes. *J. Mol. Med.* 78, 155–165, 2000.
 41. Brack M.E. The citrus methoxyflavone tangeretin affects human cell–cell interactions. *Adv. Exp. Med. Biol.* 505, 135–139, 2002.
 42. Mori H. Chemoprevention of large bowel carcinogenesis; the role of control of cell proliferation and significance of β-catenin-accumulated crypts as a new biomarker. *Eur. J. Cancer Prev.* 11 (Suppl 2): S71–S75, 2002
 43. Miyamoto K., Ushijima T. Diagnostic and therapeutic applications of epigenetics, *Jpn. J. Clin. Oncol.* 35, 293–301, 2005.
 44. Gilbert J., Gore S.D., Herman J.G., Carducci MA. The clinical application of targeting cancer through histone acetylation and hypomethylation. *Clin. Cancer Res.* 10: 4589–4596, 2004.
 45. Horrobin D.F. Are large clinical trials in rapidly lethal diseases usually unethical?, *Lancet* 361, 695–697, 2003.
 46. Jones P.A., Baylin S.B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet.* 3, 415–28, 2002
 47. Fenaux P., Mufti G.J., Hellstrom-Lindberg E., Santini V., Finelli C., Giagounidis A. Schoch R., Gattermann N., Sanz G., List A., Gore S.D., Seymour J.F., Bennett J.M., Byrd J., Backstrom J., Zimmerman L., McKenzie D., Beach C., Silverman L.R. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher risk myelodysplastic syndromes: a randomized open-label, phase III study. *Lancet Oncol.* 10, 223–32, 2009.
 48. Lee B.H., Yegnasubramanian S., Lin X., Nelson W.G. Procainamide is a specific inhibitor of

- DNA methyltransferase 1. *J. Biol. Chem.* 280, 40749–40756, 2005.
49. Tada M., Imazeki F., Fukai K., Sakamoto A., Arai M., Mikata R., Tokuhisa T., Yokosuka O. Procaine inhibits the proliferation and DNA methylation in human hepatoma cells. *Hepatol. Int.* 1, 355–364, 2007.
50. Gao Z., Xu Z., Hung MS., Lin YC., Wang T., Gong M., Zhi X., Jablon D.M., You L. Promoter demethylation of WIF-1 by epigallocatechin-3-gallate in lung cancer cells. *Anticancer Res.* 29, 2025–2030, 2009.
51. Gu B., Ding Q., Xia G., Fang Z. EGCG inhibits growth and induces apoptosis in renal cell carcinoma through TFPI-2 overexpression. *Oncol. Rep.* 21, 635–640, 2009.
52. Jones K., Nourse J., G. Corbett G., Gandhi M.K. Sodium valproate in combination with ganciclovir induces lysis of EBV-infected lymphoma cells without impairing EBV-specific T-cell immunity. *Int. J. Lab. Hematol.* 32, e169–74, 2010.
53. Hurtubise A., Bernstein M.L., Momparle R.L. Preclinical evaluation of the antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine and different histone deacetylase inhibitors on human Ewing's sarcoma cells. *Cancer Cell Int.* 8, 16, 2008.
54. Duvic M, Talpur R, Ni X., Zhang C., Hazarika P., Kelly C., Chiao J.H., Reilly J.F., Ricker J.L., Richon V.M., Frankel S.R. Phase II trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Blood* 109, 31–9, 2007.
55. Esteller M. Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 629–56, 2005.
56. Finnin M.S., Donigian J.R., Cohen A., Richon V.M., Rifkind R.A., Marks P.A., Breslow R., Pavletich N.P. Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* 401, 188–193, 1999.
57. Cang S., Ma Y., Liu D. New clinical developments in histone deacetylase inhibitors for epigenetic therapy of cancer. *J. Hemat. Oncol.* 2, 22, 2009.
58. Schulpis K.H., Lazaropoulou C., Regoutas S., Karikas G.A., Margeli A., Tsakiris S., Papassotiriou I. Valproic acid monotherapy induces DNA oxidative damage. *Toxicology* 217, 228–32, 2006.
59. Sato N., Maitra A., Fukushima N., van Heek N.T., Matsubayashi H., Iacobuzio-Donahue C.A., Rosty C., Goggins M. Frequent hypomethylation of multiple genes overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res.* 63, 4158–4166, 2003.
60. Lee K.W., Bode A.M., Dong Z. Molecular targets of phytochemicals for cancer prevention. *Nat. Rev.* 11, 211–217, 2011.
61. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674, 2011.
62. Surh Y.-J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat. Rev.* 3, 768–780, 2003.
63. Karikas G.A. Chemoprevention molecular and biochemical mechanisms involved in cancer control and management. *Health Sci. J.* 5, 149–156, 2011

Αλληλεπιδράσεις Βιοδραστικών Μορίων με τις Μεμβράνες και η Συνεισφορά της Λιπιδομικής στη Φαρμακευτική Έρευνα

Δημήτριος Ντουντανιώτης^{1,3} Αννα Τσαντίλη-Κακουλίδου², Θωμάς Μαυρομούστακος³

¹ Πανεπιστήμιο Πατρών, Τμήμα Χημείας

² Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Φαρμακευτικής, Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας

³ Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Χημείας, Εργαστήριο Οργανικής Χημείας

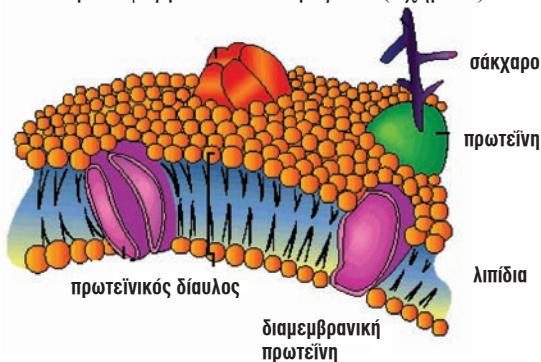
Περίληψη

Στο παρελθόν οι μεμβράνες θεωρούνταν ως αδρανή λιπόφιλα φράγματα που παρεμποδίζουν την είσοδο των τοξικών ουσιών στο κύτταρο και επομένως την εξάσκηση των βιολογικών τους δράσεων αλλά επιτρέπουν σε ευεργετικά μόρια να ενσωματωθούν στο λιπόφιλο πυρήνα και να εξασκήσουν την φυσιολογική τους δράση. Σήμερα, γνωρίζουμε ότι οι μεμβράνες είναι πολύπλοκες οντότητες που ελέγχουν θεμελειώδεις βιολογικές λειτουργίες της ζωής και τη φαρμακευτική δράση. Μεταξύ των τριών βιομορίων συστατικών της (λιπίδια, πρωτεΐνες και σάκχαρα) οι πρωτεΐνες ιστορικά ήταν οι πρώτες που ερευνήθηκαν εντατικά. Την τελευταία δεκαετία, λόγω της πρόδου της βιοχημείας, βιολογίας και μοριακής βιολογίας έχει κατανοηθεί ο σημαντικότατος ρόλος του λιπιδικού τμήματος των βιολογικών μεμβρανών. Είναι γνωστό ότι τα λιπίδια αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες και ότι αυτές οι αλληλεπιδράσεις συχνά ευθύνονται για την επαγωγή του βιολογικού αποτελέσματος. Η ανάπτυξη διαφόρων φυσικοχημικών μεθόδων και της μοριακής μοντελοποίησης που προσομοιώνουν τις ιδιότητες των λιπιδικών διπλοστιβάδων βοήθησε σημαντικά στην ανάπτυξη του πεδίου και στην κατανόηση των αλληλεπιδράσεων φαρμακευτικών μορίων με τις βιολογικές μεμβράνες. Το κάθε φαρμακευτικό μόριο αποτυπώνει κατά την αλληλεπιδρασή του με τις βιολογικές μεμβράνες το «δακτυλικό του αποτύπωμα», το οποίο ορίζεται από τον εντοπισμό, προσανατολισμό και διαταραχή που προκαλεί σ' αυτές. Αυτό το «δακτυλικό του αποτύπωμα» σχετίζεται με το φαρμακολογικό του προφίλ. Οι αλληλεπιδράσεις φαρμάκων με τις βιολογικές μεμβράνες είναι σημαντικές για να κατανοηθεί η διάχυση και οι μεταβολικές ιδιότητές τους οι οποίες προσδιορίζουν τις επιθυμητές ή ανεπιθύμητες βιολογικές τους δράσεις. Παράλληλα, σημαντικός είναι ο ρόλος της χοληστερόλης η οποία ανάλογα με τη συγκέντρωσή της επηρεάζει την ομαλή λειτουργία της μεμβράνης. Επιπλέον αλλαγές στο λιπιδικό προφίλ στην περίπτωση παθοφυσιολογικών καταστάσεων

έχουν οδηγήσει πρόσφατα στην ανάπτυξη του πεδίου της «λιπιδομικής», που αποτελεί τμήμα της μεταβονομικής (μεταβολομικής), ως διαγνωστικό εργαλείο στην ταυτοποίηση βιο-δεικτών.

1. Εισαγωγή

Οι βιολογικές μεμβράνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ζωής. Επιπρόσθετα, αποτελούν βιολογικούς φραγμούς προστασίας του κυττάρου και συμμετέχουν σε ζωτικές λειτουργίες των ζώντων οργανισμών. Για το λόγο αυτό οι βιολόγοι, βιοχημικοί, βιοφυσικοί όπως και οι φαρμακοχημικοί, φαρμακολόγοι και γιατροί διεξάγουν βασική έρευνα για να κατανοήσουν τα φαινόμενα στα οποία εμπλέκονται οι βιολογικές μεμβράνες. Οι φαρμακοχημικοί μελετούν τις βιολογικές μεμβράνες ως στόχο για την ανάπτυξη καινοτόμων φαρμακευτικών μορίων (Σχήμα 1).



Σχήμα 1: Βιολογική μεμβράνη

Δομικά οι μεμβράνες αποτελούν πολύπλοκα υγρά κρυσταλλικά συστήματα με στερεές περιοχές (domains) που περιέχουν κυρίως φωσφολιπίδια. Τα φωσφολιπίδια αυτά σχηματίζουν λιπιδικές διπλοστιβάδες στις οποίες είναι ενσωματωμένα άλλα βιομόρια όπως πρωτεΐνες, σάκχαρα και χοληστερόλη.

Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες επιτελούν σημαντικές λειτουργίες στους ζωντες οργανισμούς όπως είναι η επαγωγή βιοχημικών αντιδράσεων και πολλές βιοφυ-

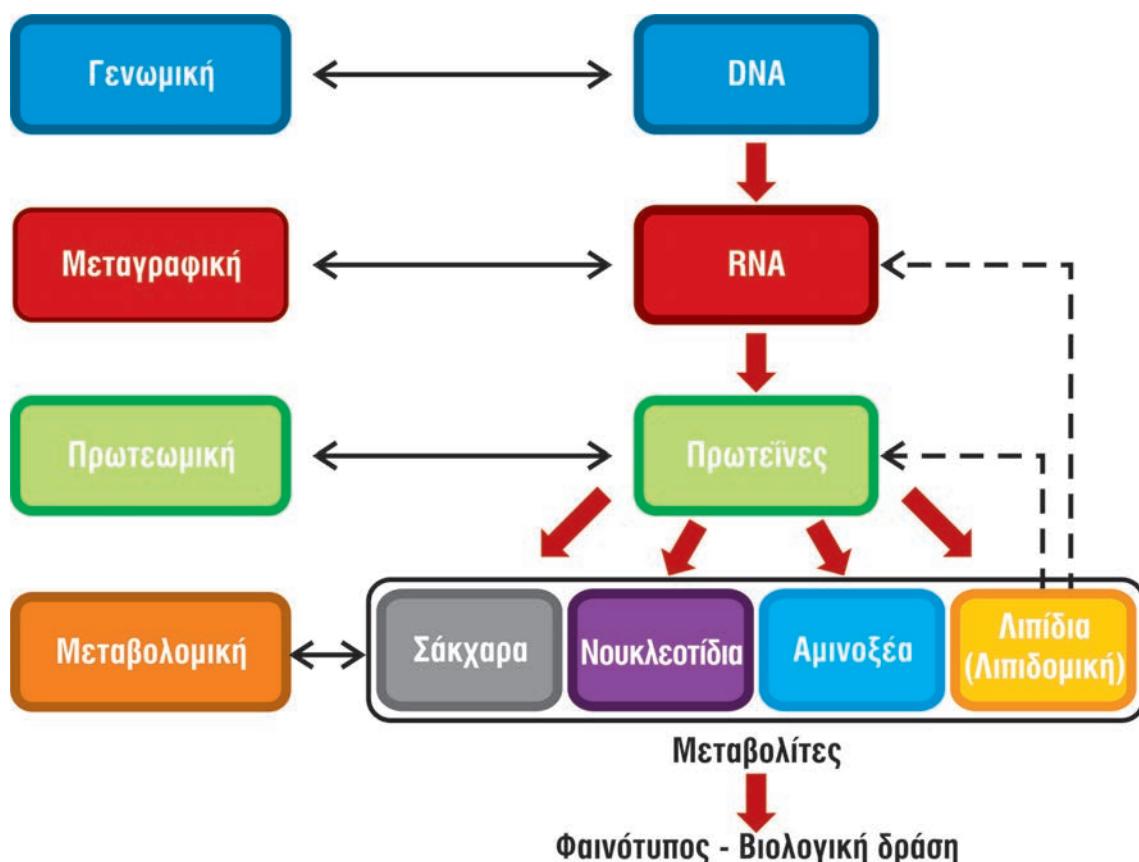
* Συγγραφέας για αλληλογραφία: Thomas Mavromoustakos e-mail: tmavrom@chem.uoa.gr

σικές διεργασίες. Με την υπόθεση ότι οι πρωτεΐνες παίζουν πρωτεύοντα ρόλο στον έλεγχο των κυτταρικών διεργασιών, το ενδιαφέρον των ερευνητών για την ανακάλυψη και ανάπτυξη νέων φαρμακομορίων εστιάστηκε στο παρελθόν κυρίως στην αλληλεπίδραση του προσδέτη (φαρμάκου) με το μοριακό στόχο (πρωτεΐνικός υποδοχέας). Το αποτέλεσμα αυτής της υπερτιμησης του ρόλου των πρωτεΐνων στις βιολογικές διεργασίες, ήταν να υποτιμηθεί η σημασία του λιπιδικού τμήματος των μεμβρανών. Το λιπιδικό τμήμα θεωρήθηκε ως ένα αδρανές δομικό στρώμα το οποίο περιβάλλει το πρωτεϊνικό και δρα με παθητικό τρόπο^{1,2}.

Τα σύγχρονα δεδομένα ωστόσο ολοένα και προσδιδουν ένα δυναμικό ρόλο στα μεμβρανικά λιπίδια. Είναι πλέον γνωστό ότι τα μεμβρανικά λιπίδια εμπλέκονται σε χρήσιμες κυτταρικές λειτουργίες, οι οποίες δικαιολογούν την παρουσία διαφόρων τύπων φωσφολιπδίων. Αυξανόμενα ερευνητικά αποτελέσματα συνηγορούν για το κεντρικό ρόλο του λιπιδικού στρώματος σε μυριάδες κυτταρικές διεργασίες αποδεικνύοντας ότι τα λιπίδια δεν είναι μόνο δομικά στοιχεία και πηγές μεταβολικής ενέργειας. Αντιθέτως, τα λιπίδια είναι ουσιώδη κυτταρικά συστατικά τα οποία έχουν πολλαπλούς και

διακριτούς ρόλους στις κυτταρικές και μεταβολικές λειτουργίες. Κατά συνέπεια τα λιπίδια δεν αποτελούν μόνο το φυσικό υπόστρωμα των μεμβρανικών πρωτεΐνων και το φραγμό που απομονώνει και προσδιορίζει τα κύτταρα και οργανίδια, αλλά συμμετέχουν στην ίδια την αλληλεπίδραση των πρωτεΐνων με τον κυτταρικό φραγμό και ελέγχουν την κατανομή και τοπογραφική θέση των περιφερικών πρωτεΐνων στις μεμβρανικές περιοχές, όπου μπορούν να αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες που λειτουργούν ως σηματοδότες. Έχει διαπιστωθεί ότι, μεταβολές της λιπιδικής σύνθεσης στις μεμβράνες σχετίζεται με την ανάπτυξη διαφόρων παθολογικών καταστάσεων, όπως η παχυσαρκία, αθηροσκλήρωση, καρδιακή προσβολή, υπέρταση και διαβήτης.^{3,4} Εξ άλλου η φωσφολιπδώση, μια κατάσταση που επάγεται από φαρμακευτικές ουσίες οδηγεί σε σοβαρά τοξικά φαινόμενα και αποτελεί συχνά πρόβλημα για την ασφάλεια των φαρμάκων⁵.

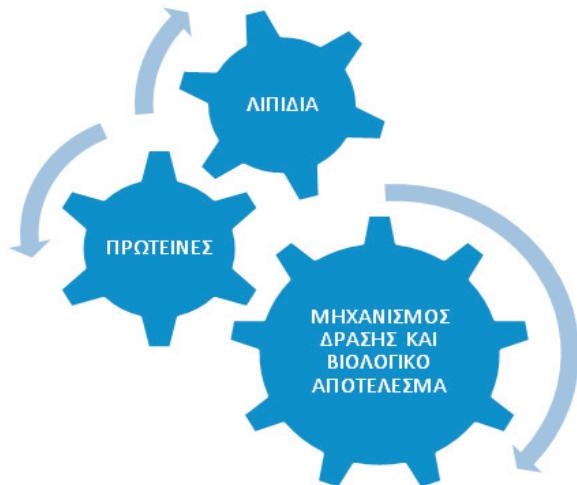
Η συνεχής αναγνώριση του σημαντικού ρόλου των λιπιδίων οδήγησε τα τελευταία χρόνια στην ανάπτυξη της λιπιδομικής που μελετά το κυτταρικό λιπιδικό προφίλ στα βιολογικά συστήματα, διευρύνοντας το πεδίο της μεταβολομικής^{6,7} (Σχήμα 2).



Σχήμα 2: Γενικό σχήμα στο οποίο εμφαίνονται οι σχέσεις της λιπιδομικής, γενομικής, μεταγραφικής, πρωτεομικής και μεταβολομικής. Τα λιπίδια ρυθμίζουν επίσης την πρωτεϊνική λειτουργία και τη γενετική μεταγραφή στα πλαίσια της δυναμικής «αλληλεπιδρομικής (interactomics)» μέσα στο κύτταρο.

Παράλληλα τα λιπίδια είναι δυνατόν να αποτελέσουν στόχους για φαρμακευτικά μόρια των οποίων η φαρμακολογική δράση σχετίζεται με την τροποποίηση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των μεμβρανών. Εφόσον η δράση των μεμβρανικών πρωτεΐνων ελέγχεται από τα λιπίδια, είναι αντιληπτό ότι φάρμακα τα οποία είναι ικανά να επηρεάζουν τη λιπιδική οργάνωση θα μπορούσαν να τροποποιήσουν τις δράσεις των μεμβρανικών πρωτεΐνων και το μηχανισμό σηματοδότησης.

Επομένως, οι αλληλεπιδράσεις φαρμακευτικών μορίων με μεμβράνες αποτελούν ένα ευρύ και πολύπλοκο πεδίο της Φαρμακευτικής Χημείας που περιλαμβάνει μελέτες φαρμάκων τα οποία έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν την πρωτεϊνική λειτουργία άμεσα ή έμμεσα με τροποποίηση του λιπιδικού υποστρώματος. Ο πρωτεϊνικός έλεγχος ο οποίος επιτυγχάνεται λόγω των αλληλεπιδράσεων των φαρμακευτικών μορίων με τις μεμβράνες μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στην κυτταρική σηματοδότηση και έκφραση γονιδίων τα οποία θα μπορούσαν να αναστρέψουν μια παθολογική κατάσταση (Σχήμα 3).¹⁻³

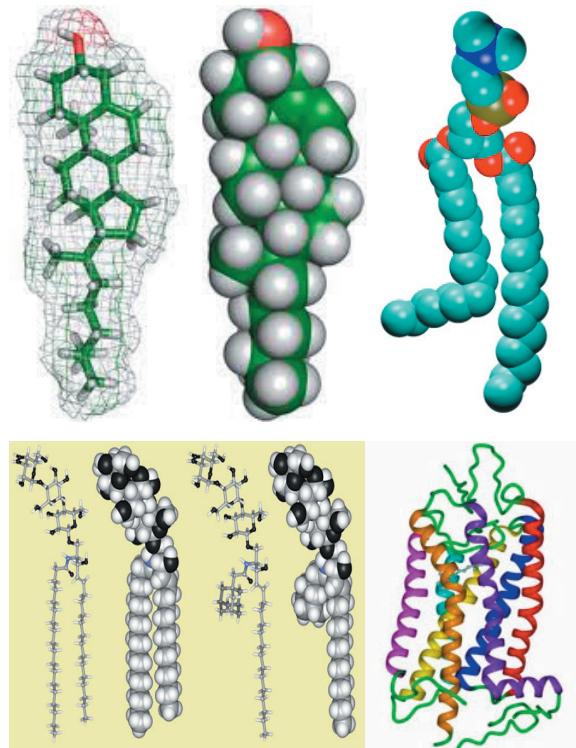


Σχήμα 3: Η δράση των λιπιδίων συμπλέκεται με αυτή των πρωτεΐνων για να παραχθεί ένα βιολογικό αποτέλεσμα.

2. Λομή μεμβρανών και μοντέλα που χρησιμοποιούνται για τις μελέτες αλληλεπιδράσεων με φαρμακευτικά μόρια

Δομή μεμβρανών: Τα κύρια συστατικά των μεμβρανών είναι: α. Τα τρία είδη των λιπιδίων: φωσφολιπίδια, γλυκολιπίδια, και στερόλες. β. Πρωτεΐνες γ. Σάκχαρα που εντοπίζονται στην εξωτερική επιφάνεια και είναι ενωμένα με λιπίδια (γλυκολιπίδια) ή πρωτεΐνες (γλυκοπρωτεΐνες) (Σχήμα 4).

Από τις στερόλες, η χοληστερόλη είναι το κύριο συστατικό των ευκαρυωτικών μεμβρανών και



Σχήμα 4: (άνω) Αριστερά παριστάνεται η χοληστερόλη σε χωροπληρωτικό μοντέλο και πλέγμα ηλεκτρονικής πυκνότητας. Δεξιά παριστάνεται μία φωσφατιδυλοχολίνη. (κάτω) Αριστερά παριστάνεται ένα γλυκολιπίδιο και δεξιά ένα συζευγμένος με G-πρωτεΐνη υποδοχέας.

επηρεάζει ισχυρά τη μοριακή οργάνωσή τους αλληλεπιδρώντας με τα φωσφολιπίδια όπως επίσης τη λειτουργία πολλών μεμβρανών συνολικά. Τα πρωτεϊνικά τμήματα ποικίλουν ανάλογα με τη λειτουργία που εκτελούν.

Τα ποσοστά γλυκολιπίδων, φωσφολιπίδων και χοληστερόλης σε διαφορετικούς τύπους μεμβράνης παρουσιάζονται στον πίνακα 1.⁸

Η οργάνωση των βιομεμβρανών έχει τα τελευταία χρόνια αναθεωρηθεί και το ρευστό μωσαϊκό μοντέλο των Singer και Nicholson που ανέπτυξαν το 1972 έχει τροποποιηθεί⁹. Στις σύγχρονες απόψεις η βιομεμβράνη θεωρείται ότι αποτελείται από στερεές περιοχές με καθορισμένη δομή και λειτουργία και ρευστά μεμβρανικά λιπίδια¹⁰. Αυτές οι περιοχές έχουν διακριτά φυσικά χαρακτηριστικά και σύνθεση η οποία εξαρτάται από τις αλληλεπιδράσεις λιπιδίων/λιπιδίων και λιπιδίων/πρωτεΐνων ή μπορεί να είναι εμπλουτισμένες με χοληστερόλη στις οποίες να συσσωρεύονται πρωτεΐνες (rafts). Οι απόψεις αυτές καταδεικνύουν τη δομική πολυπλοκότητα των μεμβρανών¹¹⁻¹³. Αν επιπλέον ληφθεί υπ' όψη η ύπαρξη διαφόρων τύπων μεμβρανών στον οργανισμό, των οποίων η σύσταση

Πίνακας 1. Ποσοστά γλυκολιπιδίων, φωσφολιπιδίων και χοληστερόλης σε διαφορετικούς τύπους μεμβρανών.

Τύπος Μεμβράνης	Ποσοστό % λιπιδίων (κατά βάρος)		
	Γλυκολιπίδια	Φωσφολιπίδια	Χοληστερόλη
Ανθρ.Ερυθροκύτταρα	11	61	22
Μυελίνη	28	41	22
Μιτοχόνδρια ήπατος (ποντίκι)	< 5	80	4
Ενδοπλασματικό δίκτυο	< 5	75	8
Πρωτοπλάστες βακτηρίων	Ιχνη	80 – 90	0
Φυτικοί χλωροπλάστες	80	12	0

ποικίλει, η πολυπλοκότητα τους αυξάνεται περαιτέρω. Όπως ήδη αναφέρθηκε η κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των συστατικών της βιολογικής μεμβράνης μόλις πρόσφατα άρχισε να κατανοείται. Προς απλοποίηση της δομής της μεμβράνης, αυτή μπορεί να θεωρηθεί ως μία λιπιδική διπλοστιβάδα στην οποία είναι ενσωματωμένες πρωτεΐνες.

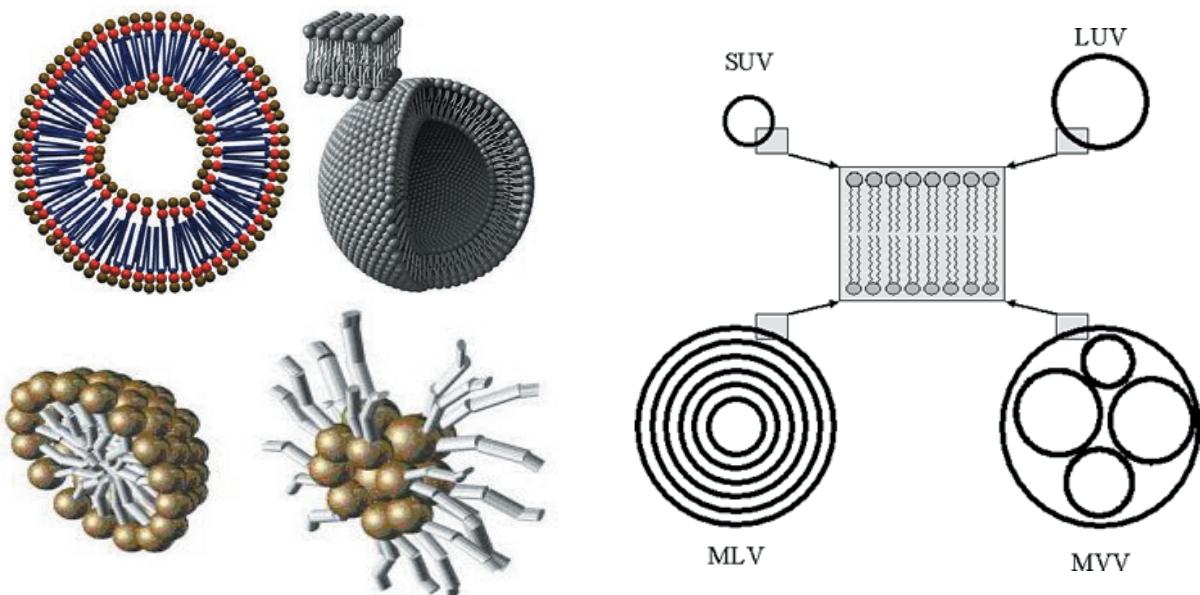
Μοντέλα μεμβρανών: Για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων φαρμακευτικών μορίων με τις βιομεμβράνες είναι ανάγκη να χρησιμοποιηθούν απλούστερα συστήματα τα οποία επιτρέπουν τη δυνατότητα εμβάθυνσης στην κατανόηση των ιδιοτήτων πολύπλοκων βιολογικών μεμβρανών. Τα μοντέλα αυτά είναι: μικυλλιακά, λιποσωμιακά, επιστρωμένες λιπιδικές διπλοστιβάδες ή μονοστιβάδες (Σχήμα 5).

Τα λιποσώματα αποτελούν σφαιρικά συστήματα λιπιδικών διπλοστιβάδων τα οποία εσωκλείουν υδα-

τικό διαμέρισμα¹⁴⁻¹⁶. Οι διπλοστιβάδες αυτές μπορεί να είναι πολυκυστιδικές με ανομοιογενές σχήμα (multilamellar vesicles-MLVs), μονοκυστιδικές διπλοστιβάδες (unilamellar vesicles-ULVs), οι οποίες δημιουργούνται με χρήση υπερήχων (sonication) ή με εξώθηση σε πολυκαρβονικές μεμβράνες ή μικυλλιακές μονοστιβάδες (micelles).

Οι μονοκυστιδικές μεμβράνες χωρίζονται σε μικρές, με διάμετρο μικρότερο των 100 nm (small unilamellar vesicles SUVs), μεγάλες (large unilamellar vesicles-LUVs) και γιγάντιες (giant unilamellar vesicles-GUVs)¹⁷⁻¹⁹ Οι μεγάλες μονοκυστιδικές μεμβράνες μιμούνται την κυτταρική αρχιτεκτονική.

Η λιπιδική διπλοστιβάδα όπως είναι γνωστό αποτελεί κλειστό σύστημα το οποίο διαχωρίζεται από το εξωτερικό διάλυμα. Οι μονοκυστιδικές όπως και οι πολυκυστιδικές μεμβράνες είναι κατάλληλες για τη



Σχήμα 5:(άνω αριστερά) Τρισδιάστατη απεικόνιση λιπιδικής διπλοστιβάδας και μονοκυστιδικών λιποσωμάτων. Τα μονοκυστιδικά λιποσώματα εμφανίζονται και σε δισδιάστατη απεικόνιση. (κάτω αριστερά) Μικύλια σε κανονική και ανεστραμμένη μορφή. (δεξιά) Είδη λιποσωμάτων.

μελέτη της διαπερατότητας των φαρμάκων και των συστημάτων αποδέσμευσης φαρμάκων, ενώ σε συνδυασμό με διάφορες φασματοσκοπικές τεχνικές όπως φθορισμομετρία και φασματοσκοπία Raman επιτρέπουν τη διερεύνηση βιοφυσικών αλληλεπιδράσεων και τις συσχετίσεις με βιολογικές δράσεις^{20,21}.

Οι λιπιδικές μονοστιβάδες μιμούνται μόνο τη μία στιβάδα της μεμβράνης. Επίτεδα συστήματα μεμβρανών (planar membranes) χρησιμοποιούνται για να μιμούνται την πλευρική οργάνωση των κυτταρι-

κών επιφανειών²². Σχηματίζονται στην επιφάνεια νερού (ή ρυθμιστικού διαλύματος) με εξισορρόπηση υμενίων Langmuir.

3. Παραδείγματα χρήσεων φυσικοχημικών μεθόδων σε μελέτες φαρμακευτικών μορίων με μεμβράνες

Στους πίνακες 2-4 συνοψίζονται οι διαφορετικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με τα διαφορετικά μοντέλα μεμβρανών, καθώς και οι πληροφορίες που παρέχουν.

Πίνακας 2: Φυσικοχημικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την άντληση πληροφοριών που αφορούν αλληλεπιδράσεις φαρμακευτικών μορίων με πολυκυστιδικές διπλοστιβάδες.

Μέθοδος	Πληροφορίες
NMR στερεής και υγρής κατάστασης (το δείγμα μπορεί να είναι στατικό ή περιστρεφόμενο στο μαγνητικό πεδίο (π.χ. ^1H, ^2H, ^{13}C, ^{14}N κλπ))	Δομή, δυναμική και προσανατολισμός φαρμάκων καθώς και τοπογραφικός εντοπισμός. Επεξήγηση δράσης ή δραστικότητας.
Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης	Θερμικές μεταβολές και αλλαγές στη συνεργατικότητα των μεμβρανών. Δυναμική, οργάνωση και μεταβολές στις φάσεις μετασχηματισμών των λιπιδίων των μεμβρανών.
Φασματοσκοπία Raman και IR	Αλλαγές στις φάσεις και μέτρηση ποσοτικών μεταβολών <i>gauche:trans</i> . Αλληλοεπιχώρηση των αλκυλικών αλυσίδων (interdigitation).

Πίνακας 3: Φυσικοχημικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την άντληση πληροφοριών που αφορούν αλληλεπιδράσεις φαρμακευτικών μορίων με μονοκυστιδικές διπλοστιβάδες.

Μέθοδος	Πληροφορίες
Κυκλοϊκός διχρωϊσμός (circular dichroism-CD)	Δευτερογείς δομές ενζύμων και μελέτες των μεταβολών στις διαμορφώσεις των πρωτεΐνων που επάγονται από φάρμακα.
Συντονισμός ηλεκτρονικής ιδιοπεριστροφής (electron spin resonance-ESR)	Χρήση επισημασμένων αισθητήρων που προσδένονται ομοιοπολικά σε διάφορα τμήματα των λιπιδικών αλκυλικών αλυσίδων και σε διάφορες θέσεις. Βοηθούν στη μελέτη του τοπογραφικού εντοπισμού των φαρμάκων και της τροποποίησης που προκαλούν στη ρευστότητα των λιπιδίων και λιπιδικής κίνησης.
Τεχνικές φθορισμού (fluorescence leakage techniques)	Γίνεται χρήση φθορισμομετρικών δεικτών (<i>dyes</i>) φυσικών ή τεχνητών, προσδεμένων στα λιπίδια. Μελετάται ο σχηματισμός πόρων και η ολική καταστροφή της μεμβράνης. Τέτοιες μεταβολές έχουν ως συνέπεια την αλλαγή της φθορισμομετρικής εκπομπής. Μελέτη βάθους εισαγωγής πεπτιδίων.
Εκπομπή των τμημάτων τρυποφάνης σε ενζυμικές ακολουθίες (φυσικά ή τεχνητά ενσωματωμένες) Φθορισμομετρικός συντονισμός με μεταφορά ενέργειας (Fluorescence Resonance Energy Transfer-FRET)	Μεταφορά ενέργειας από ένα δότη φθορισμομετρικό σε ένα δέκτη μέσω ενός μη ακτινοβολούμενου μηχανισμού. Αυτό συμβαίνει όταν είναι σε μικρή απόσταση μεταξύ τους και μπορούν να μετρηθούν ποσοτικά.

Πίνακας 4: Φυσικοχημικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την άντληση πληροφοριών που αφορούν αλληλεπιδράσεις φαρμακευτικών μορίων με μονοστιβαδικές μεμβράνες

Μέθοδος	Πληροφορίες
Φίλμς Langmuir	Πλευρική οργάνωση των κυτταρικών επιφανειών Ισόθερμες πίεσης-εμβαδού επιτρέπουν τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων φαρμάκων με λιπίδια (π.χ. φάσεις μετασχηματισμού μονοστιβάδων και ρευστότητά τους).
Μικροσκοπία ατομικής Φθορισμομετρίας (Atomic fluorescence microscopy-AFM) Κρυογενική ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης και μετάδοσης (Cryogenic scanning and transmission electron microscopy-cryo-SEM and cryo-TEM).	Μεταβολές στη μορφολογία των λιπιδίων στη μεσεπιφάνεια αέρα-νερού.
Περίθλαση νετρονίων (neutron scattering) και περίθλαση ακτίνων-X με αμυχές στην προσπίπτουσα (grazing incidence x-ray scattering –GIXD)	Χαρακτηρισμός της μοριακής δομής της μεμβράνης και αλληλεπιδράσεις φαρμάκων με τη μεμβράνη. Μελέτη βιοφυσικών πτυχών μεμβράνης όπως επαγωγή τάξεως (order) ή κλίσης στις αλκυλικές αλυσίδες.
Μονοστιβάδες με στερεά υποστηρίγματα (solid supports) Langmuir-Blodgett (LB) φίλμς. Langmuir-Shaefer φίλμς. Διπλοστιβάδες με στερεά υποστηρίγματα όπως είναι οι μαύρες λιπιδικές μεμβράνες-BLM (black lipid membranes). Αποδυναμωμένη ανάκλαση φασματοσκοπίας υπερύθρου όπου γίνεται χρήση μετασχηματισμού Fourier (Attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy-ATR-FTIR). Υποστηριγμένες λιπιδικές διπλοστιβάδες με μικροχάντρες (microbeads) και νανοϋλικά. Καμπύλες λιπιδικές μεμβράνες με υψηλού βαθμού δομική ολοκλήρωση.	Δημοφιλή βιομηχανικά μεμβρανικά συστήματα τα οποία επιτρέπουν την εξέταση πεπτιδικών αλληλεπιδράσεων στη διεπιφάνεια λιπιδίου/νερού και την περιορισμένη κίνηση των λιπιδίων λόγω της ακινητοποίησης της επιφάνειας. Μέτρηση δευτεροταγών δομών και προσανατολισμών πεπτιδίων και φαρμάκων σε λιπιδικά περιβάλλοντα. Μελέτη ιδιοτήτων μεμβρανών και βιολογικών λειτουργιών όπως η ρευστότητα και οι αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες.

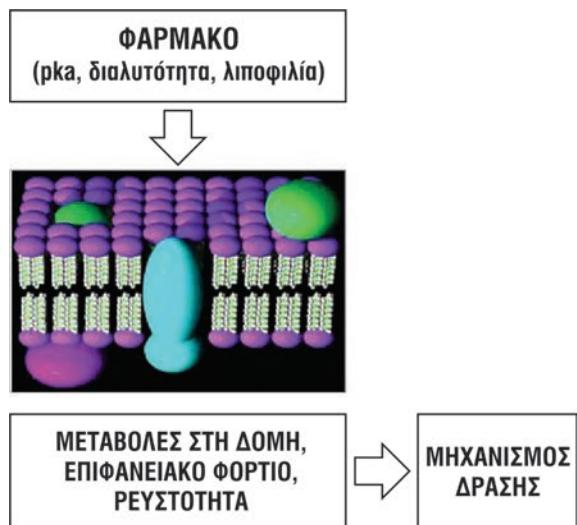
4. Οι μεμβράνες ως βιολογικοί φραγμοί

Η φαρμακευτική βιομηχανία βρίσκεται σε μία διαρκώς αυξανόμενη ανταγωνιστική οικονομική πίεση να επιτύχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην ανακάλυψη καινοτόμων φαρμάκων. Για να αποφευχθούν υψηλότερες επενδύσεις και αποτυχίες στις φάσεις των κλινικών δοκιμών, απαιτείται ο έγκαιρος εντοπισμός των προβλημάτων που σχετίζονται με τη βιοδιαθεσιμότητα των υποψηφίων ενώσεων και τη δυνατότητά τους να διέρχονται τους βιολογικούς φραγμούς. Για το σκοπό αυτό έχουν αναπτυχθεί γρήγορες δοκιμές που προσομοιώνουν τη συμπεριφορά των φαρμάκου εναντί των φραγμών αυτών. Εκτός από τη διαπερατότητα μέσω των βιολογικών φραγμών που καθορίζονται από μεμβράνες και η οποία σε μεγάλο βαθμό εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες, κυρίως τη λιποφιλία και το βαθμό ιονισμού, βι-

οχημικές διεργασίες (βιομετατροπές, μεταβολισμός), επηρεάζουν επίσης τη βιοδιαθεσιμότητα μειώνοντας την ποσότητα της ουσίας η οποία τελικά φθάνει στο θεραπευτικό στόχο^{23,24}.

Ο ορθολογικός σχεδιασμός φαρμάκων πρέπει να λαμβάνει υπόψη τις αιμοιβαίς αλληλεπιδράσεις μεταξύ φαρμάκων και μεμβρανικών φραγμών εντός του οργανισμού, αναγνωρίζοντας ότι τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των φαρμάκων επηρεάζουν το βαθμό διείσδυσης και τον εντοπισμό τους στις μεμβράνες. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές συσχετίζονται με περαιτέρω διαφοροποιήσεις, όπως η μεταβολή στη διαπερατότητα της μεμβράνης σε παθολογικές καταστάσεις²⁵, ή αλλαγές στο κυτταρικό σχήμα κατά τη φάση της μεμβρανικής τήξης²⁶, που τελικά είναι υπεύθυνες για σοβαρές μεταβολές στην εκτέλεση των λειτουργιών του κυττάρου. Επίσης, επηρεάζουν

τη λειτουργία των διαμεμβρανικών πρωτεΐνων υπεύθυνων για τη μετάδοση σήματος οι οποίες τελικά σχετίζονται με το μηχανισμό σε μοριακό επίπεδο της δράσης ή των ανεπιθύμητων ενεργειών του φαρμάκου (Σχήμα 6).



Σχήμα 6: Δράση φαρμακευτικών μορίων στις λιπιδικές διπλοστιβάδες.

Διαπερατότητα μέσω μεμβρανών

Οι φαρμακευτικές ενώσεις διαπερνούν με παθητική διάχυση τις μεμβράνες ή μέσω διευκολυνόμενης ή ενεργού μεταφοράς με σύνδεση σε μία μεμβρανική πρωτεΐνη-μεταφορέα²⁷⁻²⁹. Εξ άλλου μεμβρανικές πρωτεΐνες –μεταφορείς είναι δυνατόν να οδηγούν σε ‘εκροή’ ενός φαρμάκου από το κύτταρο και να μειώνουν την διαπερατότητά του³⁰.

Ο μηχανισμός της παθητικής διάχυσης βασίζεται στη γνωστή υπόθεση pH/ μερισμού και εξαρτάται κυρίως από τη σταθερά ιοντισμού (pKa) και το συντελεστή μερισμού στο σύστημα οκτανόλης –νερού (logP), ως καθιερωμένο μέτρο της λιποφιλίας των μορίων^{31, 32}.

Για την προσομοίωση της διαπερατότητας έχουν αναπτυχθεί μοντέλα *in vitro* που βασίζονται σε κυτταρικές σειρές, όπως κυτταρικές σειρές (Caco-2) που αποτελούνται από ανθρώπινα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα ή οι σειρές, Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) που αποτελούνται από κύτταρα νεφρών σκύλων³³⁻³⁵.

Άλλες τεχνικές που αναπτύχθηκαν για τον ίδιο σκοπό είναι:

- Τεχνητές Μεμβράνες για ταχύ ύλεγχο (High ThroughPut) της διαπερατότητας (parallel artificial membrane permeation assay-PAMPA)³⁶.
- Διατάξεις συντονισμού επιφανείας πλάσματος

(surface plasmon resonance-SPR)³⁷

- Αντιστρόφου Φάσεως Υγρή Χρωματογραφία Υγηλής Απόδοσης (RP-HPLC)³⁸⁻⁴¹
- Χρωματογραφία Ακινητοποιημένων Τεχνητών Μεμβρανών- Βιοχρωματογραφία (Immobilized Artificial Membrane, IAM Chromatography-biochromatography)⁴²⁻⁴⁵

Η αντιστρόφου φάσεως HPLC προσομοιώνει υπό κατάλληλες συνθήκες την κατανομή στο σύστημα οκτανόλης νερού και υπό αυτή την έννοια την παθητική διάχυση^{40,41}. Τόσο το σύστημα οκτανόλης-νερού όσο και η αντιστρόφου φάσεως HPLC δεν επιτρέπουν την έκφραση ιοντικών αλληλεπιδράσεων, που ενδεχομένως λαμβάνουν χώρα με τα φορτισμένα κέντρα των λιπιδίων. Τα λιποσώματα ωστόσο θεωρούνται άμεσα μοντέλα βιομεμβρανών και δεν προσφέρονται για γρήγορες μετρήσεις του συντελεστή κατανομής. Ως εκ τούτου, η χρωματογραφία IAM αρχίζει να συγκεντρώνει αυξανόμενο ενδιαφέρον, δεδομένου ότι συνδυάζει την κατανομή σε μεμβράνες με την ταχύτητα και επαναληγμότητα των μετρήσεων, παρακάμπτοντας τις δυσκολίες που σχετίζονται με την παρασκευή λιποσωμάτων ή κυτταρικών σειρών. Από την άλλη δεν απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό – μια συνήθης συσκευή υγρής χρωματογραφίας είναι αρκετή. Οι στατικές φάσεις IAM περιέχουν ενσωματωμένα φωσφολιπίδια (κυρίως φωσφατιδυλοχολίνη) σε σκελετό προπυλαμινο-πυριτίας. Πρόκειται για μονοστιβάδες λιπιδίων ακινητοποιημένες σε στερεό υπόστρωμα. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται συσχετίσεις χρωματογραφικών δεικτών που προσδιορίζονται σε στήλες IAM με τους συντελεστές κατανομής σε λιποσώματα φωσφατιδυλοχολίνης καθώς και με μεγέθη διαπερατότητας και φαρμακοκινητικές παραμέτρους⁴⁶⁻⁴⁹. Η χρωματογραφία IAM είναι δυνατόν να παρέχει πληροφορίες για την αλληλεπίδραση των φαρμάκων με τα λιπίδια των βιολογικών μεμβρανών. Π.χ. οι φθοροκινολόνες, οι οποίες, παρά τη σχετικά χαμηλή λιποφιλία τους, συγκρατούνται ισχυρά στην στατική φάση IAM⁵⁰, έχει διαπιστωθεί ότι αλληλεπιδρούν ισχυρά με τα φωσφολιπίδια⁵¹. Ισχυρή συγκράτηση εξ άλλου σε στατικές φάσεις IAM, πιθανόν να σχετίζεται με το φαινόμενο της φωσφολιπίδωσης, σύμφωνα με σχετικές αναφορές στη βιβλιογραφία⁵².

5. Σχεδιασμός φαρμάκων-προσδεμάτων σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς-πέρα από τις απαιτήσεις του ενεργού κέντρου

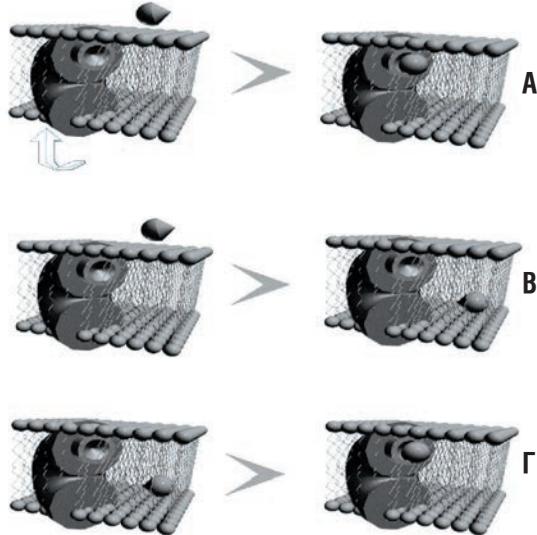
Τα φαρμακομόρια δεσμεύονται στο ενεργό κέντρο των διαμεμβρανικών υποδοχέων είτε μέσω του εξωκυττάριου προθαλάμου, είτε εισερχόμενα στη λιπιδική διπλοστιβάδα με ακόλουθη πλευρική μετατόπιση. Υπάρχουν τρεις βασικοί λόγοι που στηρίζουν την άποψη ότι ένα φαρμακομόριο μπορεί να προσεγγίσει το

ενεργό κέντρο αφού πρώτα εισέλθει στις λιποειδείς διπλοστιβάδες. Ο πρώτος λόγος είναι ότι τα φαρμακευτικά μόρια είναι συχνά λιπόφιλες ή αμφίφιλες ενώσεις, οπότε προτιμούν να κατανέμονται στο λιπόφιλο τμήμα ή ενδιάμεσης πολικότητας τμήμα της λιποειδούς διπλοστιβάδας. Ο δεύτερος λόγος είναι ότι η διάχυση ενός φαρμάκου στη μεμβράνη περιορίζεται σε δύο διαστάσεις. Η παρατηρηση αυτή μπορεί να είναι σημαίνουσας βιολογικής σημασίας. Ένας μηχανισμός διάχυσης που επιτελείται σε δύο διαστάσεις αυξάνει την πιθανότητα προσέγγισης στην πρωτεΐνη υποδοχέα ή διαυλο-στόχο περίπου 1000 φορές.^{53, 54} Ο τρίτος λόγος είναι ότι το εμβαδόν της μεμβράνης είναι πολύ μεγαλύτερο από αυτό μίας εξειδικευμένης πρωτεΐνης. Επομένως, μία μη ειδική δέσμευση του φαρμακευτικού μορίου στη μεμβράνη φέρνει το μόριο σε χωρική εγγύτητα με την πρωτεΐνη στόχο.

Οι διάφοροι μηχανισμοί αλληλεπίδρασης ενός φαρμάκου με τις μεμβράνες παριστάνονται στο σχήμα 7.

Οι αλληλεπιδράσεις φαρμάκων με μεμβρανικούς

Φαρμακευτικό μόριο

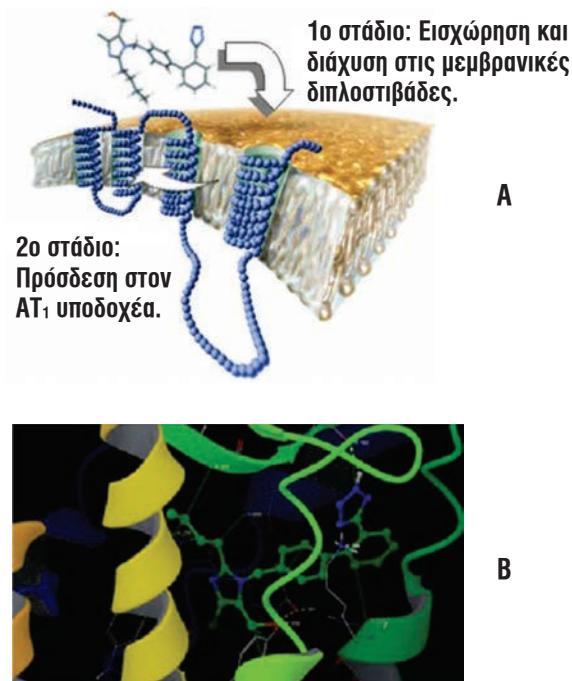


Σχήμα 7: Στο σχήμα παριστάνονται οι διάφορες περιπτώσεις αλληλεπίδρασης φαρμακευτικών μορίων στο επίπεδο των μεμβρανών. A: το φαρμακευτικό μόριο αλληλεπιδρά κατευθείαν με τον υποδοχέα. Η περίπτωση αυτή μπορεί να παρατηρηθεί κυρίως όταν το φαρμακευτικό μόριο αλληλεπιδρά πρώτα με το εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα όπως είναι στην περίπτωση του AT_1 υποδοχέα (βλέπε κείμενο). B: το φάρμακο αλληλεπιδρά με το λιπιδικό τμήμα της διπλοστιβάδας. Γ: παρουσιάζεται ο μηχανισμός δύο σταδίων. Το φαρμακευτικό μόριο εισέρχεται στο εσωτερικό της λιπιδικής διπλοστιβάδας και με πλευρική διάχυση προσεγγίζει και προσδένεται στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα. (Την εικόνα επιμελήθηκε ο Δρ. K. Παπακωνσταντίνου).

υποδοχέις είναι δυνατόν να μελετηθούν με Μοριακή Μηχανική. Πρόσφατα μελετήθηκε ο μηχανισμός πρόσδεσης φαρμακευτικών μορίων στον αδρενεργικό υποδοχέα- περίπτωση απ' ευθείας πρόσδεσης (Α στο σχήμα 7). Η μελέτη αφορούσε σε β -αναστολείς και ένα β -αγωνιστή. Τα μόρια αυτά συνάντησαν δύο εμπόδια στην πορεία τους για να φθάσουν στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα. Το ένα εμπόδιο ήταν η απώλεια της στιβάδας ενδιάμεσης η οποία συνέβαινε αρκετά μακριά από το ενεργό κέντρο του υποδοχέα στον εξω-κυττάριο προθάλαμο και το δεύτερο εμπόδιο οφειλόταν στη γεωμετρία του υποδοχέα πλησίον του ενεργού κέντρου.⁵⁵

Αντίθετα οι Hurst και οι συνεργάτες του πρότειναν μηχανισμό δύο βημάτων (Γ στο Σχήμα 6) για την πρόσδεση των κανναβιδοειδών μοριών στον υποδοχέα κανναβινοειδών CB2. Τα μόρια αυτά ως αμφίφιλα προτιμούν να εισέρχονται στις λιπιδικές διπλοστιβάδες και με πλευρική διάχυση προσεγγίζουν το ενεργό κέντρο⁵⁶.

Ο Ζουμπουλάκης και οι συνεργάτες του πρότειναν τον ίδιο μηχανισμό για αμφίφιλα μόρια, ανταγωνιστές της αγγειοτασίνης II (AT_1) (σχήμα 8).⁵⁷



Σχήμα 8: A: Τρόπος δράσης AT_1 ανταγωνιστών στον AT_1 υποδοχέα. Αναφέρονται τα δύο βήματα τα οποία θα πρέπει να ακολουθήσουν οι AT_1 ανταγωνιστές ώστε να προσδέθούν στο ενεργό κέντρο. Το πρώτο βήμα περιλαμβάνει την εισχώρηση τους στις λιπιδικές διπλοστιβάδες.⁵⁷⁻⁵⁹ Εκεί διαχέονται πλευρικά προς το ενεργό κέντρο⁶⁰ όπου μέσω αμφοτερικών αλληλεπιδράσεων ενεργοποιούν τον υποδοχέα και τελικά αναστέλλουν τη δράση της αγγειοδιασταλτικής ορμόνης αγγειοτασίνης II (Β).

Πειράματα Μοριακής Δυναμικής έδειξαν ότι τα μόρια αυτά μπορούν να εισδύουν στις λιπιδικές διπλοστιβάδες. Απομένει να διεξαχθούν κατάλληλα πειράματα για να διευκρινιστεί ποιος από τους δύο πιθανούς μηχανισμούς αντιστοιχεί στην πραγματικότητα στη δράση φαρμακευτικών μορίων που αλληλεπιδρούν στους συζευγμένους υποδοχείς με G-πρωτεΐνη. Δε θα πρέπει να αποκλειστεί και η περίπτωση ότι μπορεί να λειτουργούν και οι δύο μηχανισμοί.

6 . Αλληλεπίδραση φαρμάκων με μεμβράνες

Όπως αναφέρθηκε μελέτες σε κυτταροκαλλιέργειες, σε μοντέλα μεμβρανών και *in vivo* έχουν δείξει ότι οι αλληλεπιδράσεις φαρμάκου-λιπιδίου παίζουν σημαντικό ρόλο στις φαρμακοκινητικές ιδιότητες και επηρεάζουν τη μεταφορά και κατανομή στα διαμερίσματα του οργανισμού αλλά και τη συσσώρευση (accumulation) εντός του κυττάρου, διαδικασίες οι οποίες επηρεάζουν την τελική αποτελεσματικότητα. Ο ρόλος των λιπιδίων ως σηματοδοτικών μορίων έχει επίσης αναγνωριστεί^{61,62}.

Οι μεταβολές που συμβαίνουν κατά την αλληλεπίδραση ενός φαρμακευτικού μορίου με τις μεμβράνες, μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες:

A) Μεταβολές στη δομή της μεμβράνης

- Αλλαγή στην διαμόρφωση των ακυλικών ομάδων (trans-gauche ισομερειώσεις)
- Αύξηση της μεμβρανικής επιφάνειας
- Αλλαγή στο πάχος της μεμβράνης
- Αλλαγή στη ρευστότητα και τη συνεργατικότητα (cooperativity)
- Αλλαγή στην ενυδάτωση της πολικών κεφαλών

B) Μεταβολές στη διαμόρφωση των ενσωματωμένων πρωτεινών-στόχων⁶³

Η βιολογική δράση του φαρμάκου εξαρτάται από τη διάχυση του στη μεμβράνη. Κατά την είσοδο του μορίου στη λιπιδική διπλοστιβάδα της μεμβράνης υπάρχει πιθανότητα να επέλθουν αλλαγές στη διαμόρφωση των ενσωματωμένων πρωτεϊνών με άμεσο αποτέλεσμα την επιτάχυνση ή επιβράδυνση της διάχυσης του φαρμακομορίου και κατά συνέπεια της εκδήλωσης της φαρμακολογικής δράσης. Από τα παραπάνω καθίσταται σαφές ότι τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες πρέπει να θεωρούνται ως συζευγμένες οντότητες (partners).

Παρατίθενται μερικά παραδείγματα για να καταστήσουν σαφή τα προλεγόμενα:

(α) Η διαταραχή της λιπιδικής φάσης των κυτταρικών μεμβρανών από τροποποιητές (modulators) ρ-γλυκοπρωτεΐνης τρίτης γενεάς εμφανίζεται ιδιαίτερα σημαντική στην ενίσχυση (potentiating) της αντικαρ-

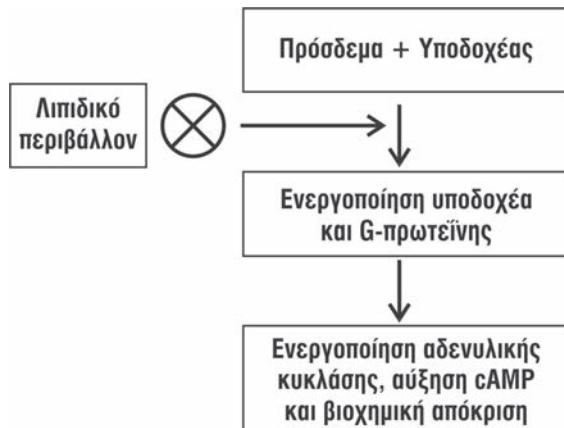
κινικής θεραπείας, η αποτελεσματικότητα της οποίας επηρεάζεται από μηχανισμούς «διασταυρούμενης αντοχής, multi drug resistance». Η ρ-γλυκοπρωτεΐνη ανήκει στους μεταφορείς της οικογένειας ABC (ATP-Binding Cassete) και είναι η κύρια πρωτεΐνη που εμπλέκεται στο μηχανισμό «διασταυρούμενης αντοχής». Ως εκ τούτου αναστολή ή τροποποίηση της διαμόρφωσης της ρ-γλυκοπρωτεΐνης μειώνουν την αντίσταση στην αντικαρκινική θεραπεία. Οι τροποποιητές τρίτης γενεάς με χαρακτηριστικό εκπρόσωπο τη ταρικιντάρη (tariquidar) προσδένονται ισχυρά στην ρ-γλυκοπρωτεΐνη, επάγοντας αλλαγή στη διαμόρφωσή της και εμποδίζοντας την υδρόλυση του ATP και κατά συνέπεια την εκροή του κυτταροστατικού παράγοντα έξω από το κύτταρο^{64,65}.

(β) Η πρόσδεση των μεμβρανικών λιπιδίων μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στη λειτουργία πρωτεϊνών όπως της φωσφολιπάσης A₂, 5-λιποξυγονάσης, οξειδάσης κυτοχρώματος c, λυσοσωμιακές φωσφολιπάσες, φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη ειδική φωσφολιπάση c, σφιγγομενινάση και πρωτεΐνική κινάση C²⁰.

(γ) Ένας από τους σημαντικότερους φυσιολογικούς ρόλους της μεμβρανικής λιπιδικής σύνθεσης και δομής είναι η συμμετοχή στη κυτταρική σηματοδότηση. Τα μεμβρανικά λιπίδια συνεισφέρουν με διάφορους τρόπους στη μεταγωγή σήματος⁶¹. Αποτελούν ένα εκλεκτικό φραγμό στις υδρόφοβες ορμόνες και υδρόφιλα σηματοδοτικά μόρια. Είναι ικανά να ελέγχουν τη δράση των μεμβρανικών σηματοδοτικών πρωτεϊνών διατηρώντας καθορισμένη σύνθεση και ρευστότητα. Επηρεάζουν την αλληλεπίδραση των σηματοδοτών πρωτεϊνών διατηρώντας καθαρό αρνητικό επιφανειακό φορτίο στο εσωτερικό τμήμα της μεμβράνης. Αυτό επιτυγχάνεται κύρια από τη φωσφατιδυλοσερίνη και παρέχουν πολλούς από τους σπουδαίους μοριακούς κυτταρικούς σηματοδότες μέσω των φωσφολιπασών και λιπιδικών κινασών.

(δ) Οι G πρωτεΐνες αποτελούν τους μοριακούς διακόπτες του οργανισμού. Αυτές μεταβιβάζουν το σήμα όταν έχουν δεσμεύσει τη GTP και σιγούν όταν δεσμεύσουν τη GDP. Οι GPCRs αποτελούν το 80% των γνωστών υποδοχέων για νευροδιαβιβαστές ορμόνες και νευροτροποποιητές και γύρω στο 5% των γονιδίων των ευκάρυωτικών οργανισμών. Η δυνατότητα να ελεγχθεί η δραστικότητα των G-πρωτεϊνών μέσω τροποποίησης του λιπιδικού περιβάλλοντος έχει τελευταία χρησιμοποιηθεί για να αναπτυχθούν φάρμακα για τη θεραπεία του καρκίνου, παχυσαρκίας, υπέρτασης κλπ. Όπως είναι γνωστό η ενδοκυτταρική G-πρωτεΐνη δρα ως μεταδότης και ελέγχει τη δράση των επενεργουσών (effector) πρωτεϊνών όπως π.χ. αδενυλικής κυκλάσης, γουανυλικής κυκλάσης,

φωσφολιπάσης c, ιοντικών καναλιών κλπ. Για να δημιουργθεί ένα απόθεμα G πρωτεΐνών γύρω από τους συζευγμένους G πρωτεΐνικους υποδοχείς (GPCRs) είναι ανάγκη η συσσώρευση λιπιδίων που δε σχηματίζουν ελασματώδη (lamellar) φάση. Τέτοια λιπίδια είναι π.χ. η φωσφατιδυλοαιθυλαμίνη (PE), που οργανώνονται σε Ha (εξαγωνικές-Hexagonal) φάσεις. Αυτές οι μη ελασματώδεις φάσεις βρέθηκε να αυξάνουν τη δέσμευση των ετεροτριμερών G πρωτεΐνών. Η διεργασία δέσμευσης των G πρωτεΐνών στους GPCRs τερματίζεται όταν οι ελασματώδεις περιοχές (π.χ. λιπιδικά τμήματα-lipid rafts) προκαλούν μία ταχεία έξodo των G πρωτεΐνών από το περιβάλλον του υποδοχέα (Σχήμα 9)^{1,63}.



Σχήμα 9: Το λιπιδικό περιβάλλον στη μεμβράνη ελέγχει τη βιοχημική απόκριση.

6. Ανάπτυξη συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων

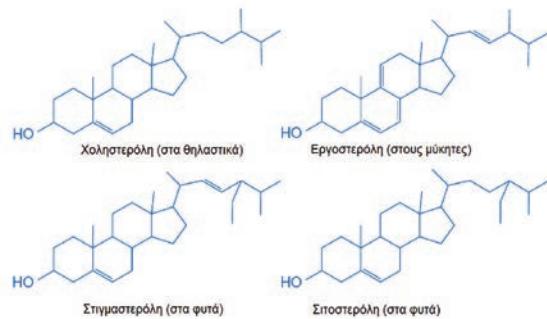
Η μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ φαρμάκων με μεμβράνες είναι σημαντική και από μία άλλη άποψη. Τα λιποσώματα χρησιμοποιούνται και ως συστήματα μεταφοράς φαρμάκων. Η μεταφορά του φαρμάκου και η υψηλή εκλεκτικότητα εξαρτώνται από τη διάχυση του ενσωματωμένου φαρμάκου δια μέσου των λιποσωμιακών τοιχωμάτων. Η έρευνα εστιάζεται στη βελτιστοποίηση της λιπιδικής σύνθεσης, του λιποσωμιακού μεγέθους, της ρευστότητας της μεμβράνης, του επιφανειακού φορτίου, της σταθερότητας ώστε να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα των λιποσωμάτων ως μεταφορείς σε σύγκριση με τα συμβατικά σκευάσματα (formulations)⁶⁶⁻⁶⁹. Στην πραγματικότητα, η αποτελεσματικότητα της βιοδιαθεσιμότητας κατά τη μεταφορά του φαρμάκου με τη χρήση λιποσωμάτων και η υψηλή εκλεκτικότητα εξαρτώνται από τη διάχυση του ενσωματωμένου φαρμάκου δια μέσου των λιποσωμιακών τοιχωμάτων.

Με το σκεπτικό αυτό η αλληλεπίδραση του συστήματος μεταφοράς του φαρμάκου με τη μεμβράνη

πρέπει να είναι το πρώτο βήμα μελέτης για να κατανοθούν οι βιοφυσικές αλληλεπιδράσεις των νανομεταφορέων με τις κυτταρικές μεμβράνες ώστε να αναπτυχθεί ένα αποτελεσματικό σύστημα μεταφοράς φαρμάκων (ή πρωτεΐνης ή γονιδίου). Επίσης είναι σημαντικό να είναι γνωστά οποιαδήποτε χαρακτηριστικά νανοϋλικών που μπορούν να προκαλέσουν τοξικά αποτελέσματα⁷⁰.

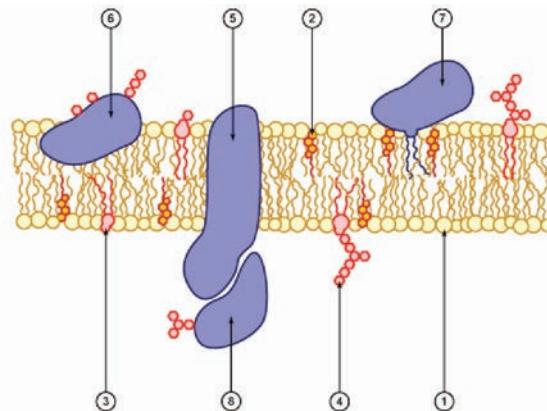
5.8. Ο σημαίνων ρόλος της χοληστερόλης

Η χοληστερόλη, η εργοστερόλη, η στιγμαστερόλη και η σιτοστερόλη είναι στερόλες που απαντώνται σε διαφόρους τύπους μεμβρανών σε όλους τους ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς (σχήμα 10)^{15, 71,72}. Το γεγονός ότι αυτά τα τέσσερα μόρια έχουν παρεμφερή



Σχήμα 10: Οι στερόλες που απαντώνται στις μεμβράνες ζωικών και φυτικών οργανισμών.

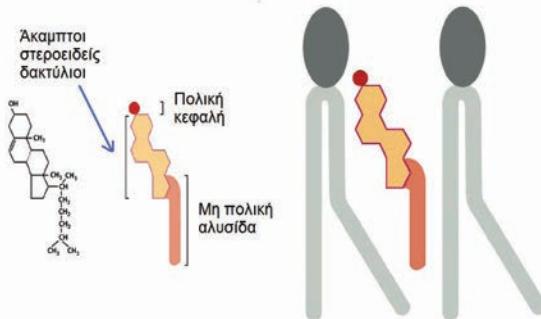
δομή και απαντώνται τόσο συχνά σε μεμβράνες, υποδεικνύει ότι οι στερόλες παίζουν σημαίνοντα ρόλο στη λειτουργία αυτών των μεμβρανών. Η χοληστερόλη για παράδειγμα η οποία βρίσκεται ανάμεσα στα μόρια των φωσφολιπιδών των πλασματικών μεμβρανών των ζωικών οργανισμών (σχήμα 11), θεωρείται ότι σταθεροποιεί τη μεμβράνη, μειώνοντας τη κινητικότητα των μεμβρανικών φωσφολιπιδών.⁷²



Σχήμα 11: Απεικόνιση κυτταρικής μεμβράνης: 1) φωσφολιπίδια 2) χοληστερόλη 3) γλυκολιπίδια 4) σάκχαρα και 5, 6, 7, 8) πρωτεΐνες

Οι διαμοριακές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ των μορίων της χοληστερόλης και του νερού που βρίσκεται εντός και εκτός κυττάρου συμβάλλει στη ρευστή αλλά συνεκτική δομή της μεμβράνης, και της προσδίδει λειτουργικότητα. Επιπλέον, έχει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη νευρικών συνδέσμων του εγκεφάλου και βοηθάει τον οργανισμό στο σχηματισμό και την προστασία των νευρώνων και στη δημιουργία των ιστών των κυττάρων. Σε πολλές βιοχημικές διαδικασίες χρησιμεύει ως πρώτη ύλη, όπως π.χ. στην παρασκευή της προβιταμίνης D.⁷³

Η χοληστερόλη με την πολική ομάδα υδροξυλίου, μπορεί να αλληλεπιδρά με ομάδες επάνω ή κοντά στην μεμβρανική επιφάνεια (Σχήμα 12). Στη ρευστή φάση της μεμβράνης η χοληστερόλη ελαττώνει την περιστροφική ελευθερία των γειτονικών υδρογονανθρακικών αλυσίδων και έτσι ελαχιστοποιεί τη ρευστότητα ή αλλιώς δημιουργεί ακαμψία στην μεμβράνη. Στη φάση πηκτής η χοληστερόλη δρα ως πρόδημης που ελαττώνει την τάξη μεταξύ των καλά πακεταρισμένων λιπιδικών αλυσίδων.⁸



Σχήμα 12: Η χοληστερόλη διατάσσεται παράλληλα με τις αλυσίδες λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων, με την υδροξυλομάδα να αλληλεπιδρά με τις πολικές κεφαλές.

Οι επιδράσεις της χοληστερόλης με μεμβράνες - μοντέλα έχουν μελετηθεί εκτενώς από διάφορες τεχνικές, όπως π.χ. με προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής, φασματοσκοπία NMR, περίθλαση ακτίνων X, διαφορικής θερμιδομέτριας σάρωσης κ.α.⁷⁴⁻⁸² Από τα πειράματα αυτά πιστεύεται ότι η χοληστερόλη δρα ως ρυθμιστής των κυτταρικών μεμβρανών ρυθμίζοντας τη ρευστότητα τους. Η χοληστερόλη μπορεί επίσης να αυξήσει την μηχανική αντοχή της μεμβράνης^{82,83}. Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής σε διπλοστιβάδες φωσφολιπιδίων ως συνάρτηση της συγκέντρωσης χοληστερόλης δείχνουν μια σημαντική αύξηση στην τάξη των φωσφολιπιδικών αλύσιδων και μειωμένο ποσοστό της *gauche* διαμορφώσης καθώς και μείωση της πλευρικής διάχυσης των φωσφολιπιδών^{84,85}. Μελέτες ²H NMR σε φωσφολιπιδικές διπλοστιβάδες που περιέχουν χοληστερόλη, δείχνουν ότι αξονικές περιστροφές των φωσφολιπιδών εμφανίζονται σε

υψηλότερο ποσοστό συγκριτικά με διπλοστιβάδες φωσφολιπιδών χωρίς χοληστερόλη. Επιπλέον, το άκαμπτο μόριο της χοληστερόλης φαίνεται να υποβάλλεται σε αξονική περιστροφή πιο αργά από ότι τα αντίστοιχα μόρια φωσφολιπιδών⁸⁶.

Υγρή εύτακτη φάση (liquid-ordered phase) και χοληστερόλη: Πειράματα με συνδυασμό των παραπάνω μεθοδολογιών έδειξαν ότι η χοληστερόλη δημιουργεί μία νέα φάση μετασχηματισμού η οποία καλείται εύτακτη υγρή φάση. Η υγρή εύτακτη φάση είναι υγρή με την έννοια ότι υπάρχει μεταφορική αταξία (translational disorder) και ταχεία διάχυση (rapid diffusion) στο επίπεδο της διπλοστιβάδας αλλά εύτακτη γιατί συγχρόνως υπάρχει και μεγάλη διαμορφωτική τάξη στις λιπιδικές αλυσίδες. Όπως θα εξηγηθεί παρακάτω αυτή η υψηλή τάξη στην υγρή εύτακτη φάση οδηγεί σε επιθυμητές μηχανικές ιδιότητες μίας στερεής μεμβράνης χωρίς στην πραγματικότητα να είναι κρυσταλλική. Η υγρή αυτή εύτακτη φάση είναι μοναδική για τη χοληστερόλη και άλλες στερολέες⁸⁷.

Σημαντικά χαρακτηριστικά που επηρεάζονται ανάλογα με τη συγκέντρωση της χοληστερόλης στις λιπιδικές διπλοστιβάδες (και τα οποία απαιτούν πειράματα με πολλές τεχνικές και διάφορες ουσίες για διεξαγωγή τελικών συμπεράσματων) είναι τα εξής:

- Παθητική διαπερατότητα
- Πρόσδεση ουσιών
- Θερμομηχανική της λιπιδικής διπλοστιβάδας
- Πλευρική διάχυση
- Λειτουργία πρωτεΐνων

Διαπερατότητα: Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον ότι η διαπερατότητα της μεμβράνης παρουσιάζει διακυμάνσεις ανάλογα με τη συγκέντρωση της χοληστερόλης. Απουσία χοληστερόλης, η διπλοστιβάδα παρουσιάζει σημαντική διαπερατότητα. Σε μικρό ποσοστό μοριακής αναλογίας στη διπλοστιβάδα (π.χ. 5%), η χοληστερόλη προκαλεί μικρή αύξηση της διαπερατότητας. Οι μεγάλες συγκεντρώσεις χοληστερόλης (π.χ. 40%) προσδίδουν ευταξία στις λιπιδικές διπλοστιβάδες, λόγω δε της μεγάλης επιφάνειας που καλύπτουν, μειώνουν τη διαπερατότητα τους^{88,89}.

Πρόσδεση ουσιών: Η χοληστερόλη δρα ως ανταγωνιστής σε άλλες ουσίες που μπορούν να δεσμευτούν στις μεμβράνες σε μεγάλες συγκεντρώσεις. Σε μικρές όμως συγκεντρώσεις, όπως συμβαίνει και με την παθητική διαπερατότητα, οδηγεί σε ισχυρότερη δέσμευση λόγω των διακυμάνσεων πυκνότητας (density fluctuations) και κατά συνέπεια πλευρικής ετερογένειας της μεμβράνης^{88,90}.

Θερμομηχανική της λιπιδικής διπλοστιβάδας: Οι διακυμάνσεις της πυκνότητας κατά τη φάση μετασχηματισμού μίας λιπιδικής διπλοστιβάδας έχει συνέπειες

στις θερμομηχανικές ιδιότητές της. Η λιπιδική διπλοστιβάδα κατά τη φάση μετασχηματισμού γίνεται πιο μαλακή (softens) και το πάχος της διπλοστιβάδας αυξάνει ανώμαλα. Η παρουσία χοληστερόλης σε πλήρως δευτεριωμένες διπλοστιβάδες διμυριστικής φωσφατιδυλοχολίνης σε αναλογία >4 mol% έχει ως συνέπεια την εξαφάνιση αυτής της ανώμαλης αύξησης του πάχους. Αντίθετα σε μικρές συγκεντρώσεις έχει το αντίθετο αποτέλεσμα και η εξήγηση που δίνεται είναι ότι αυξάνει τις διακυμάνσεις πυκνότητας.

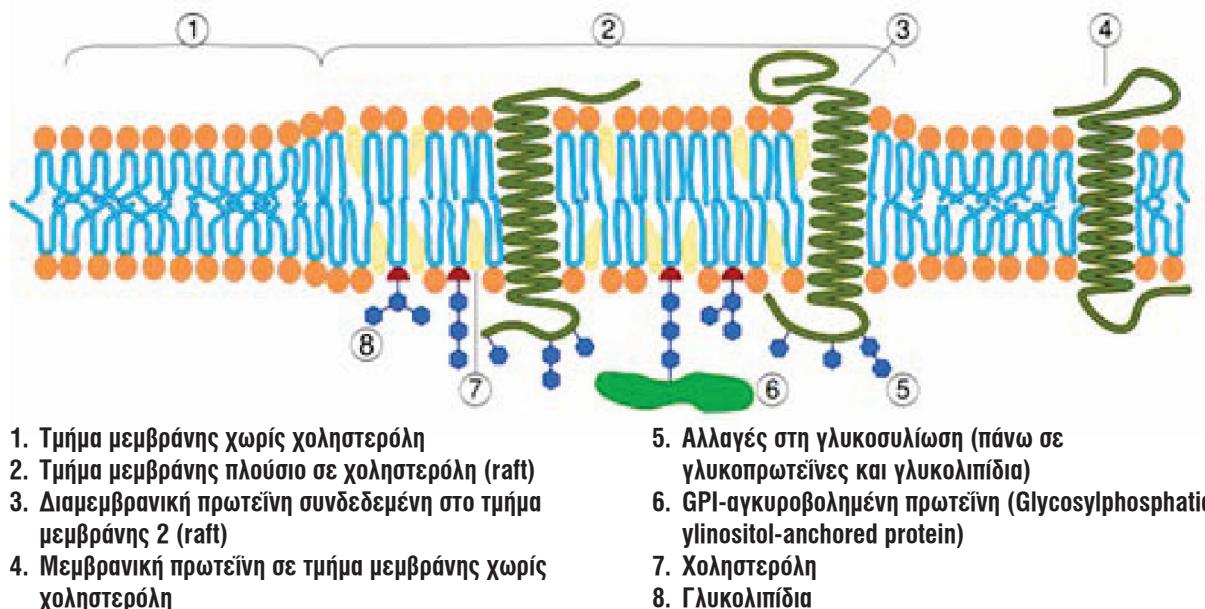
Πλευρική διάχυση: Η χοληστερόλη έχει τη μοναδική ιδιότητα να αυξάνει τη λιπιδική ευταξία, να βελτιώνει τις μηχανικές ιδιότητες και τη διαπερατότητα και συγχρόνως να προσδίδει χαρακτηριστικά υγρού στη διπλοστιβάδα. Σε υψηλές θερμοκρασίες (μεγαλύτερες του T_m των λιπιδικών διπλοστιβάδων) η διάχυση (D) ελαττώνεται με αύξηση της συγκέντρωσης της χοληστερόλης και σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (μικρότερες του T_m των λιπιδικών διπλοστιβάδων) η διάχυση αυξάνεται μονοτονικά με την αύξηση της χοληστερόλης⁹⁰.

Λειτουργία των πρωτεϊνών: Υπάρχουν πολλά παραδείγματα για την επίδραση της χοληστερόλης στη βιοχημική λειτουργία των διαφόρων κυτταρικών διεργασιών. Η χοληστερόλη τείνει να μετατοπίσει την ισορροπία των πλευρικών πιέσεων προς το εσωτερικό της διπλοστιβάδας. Ορισμένες πρωτεΐνες φαίνεται να προτιμούν τη συσσώρευση σε τμήματα πλούσια σε χοληστερόλη (σχήμα 12). Συχνά αυτές οι πρωτεΐνες φέρουν μια υδρογονανθράκη αλυσίδα ως «άγκυρα» που ταιριάζει άνετα στο σφιχτό πακετάρισμα της σχεδίας. Πρόσληψη πρωτεϊνών ή απόσπαση στα τμήματα αυτά (rafts) μπορούν εύκολα να διευκολυνθούν

με ενζυματική διάσπαση ή προσκόλληση των κατάλληλων υδρογονανθρακικών αλυσίδων⁹¹.

Συμπεράσματα

Ο ρόλος των λιπιδίων των μεμβρανών δεν περιορίζεται σε αυτόν του βιολογικού φραγμού που στοχεύει στην προστασία του κυττάρου. Αντίθετα έχει διαπιστωθεί ότι επιτελούν πολλαπλές και πολύπλοκες λειτουργίες, συμμετέχοντας σε αντιδράσεις μεταγωγής σήματος και σε αλληλεπιδράσεις με φάρμακευτικά μόρια κατά τη διαδικασία προσέγγισης στο ενεργό κέντρο διαμεμβρανικών υποδοχέων. Επι πλέον μεταβολή του λιπιδικού προφίλ σε παθολογικές καταστάσεις έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη της 'λιπιδομικής' που επεκτείνει το πεδίο της μεταβονομικής. Η ανάπτυξη τεχνητών μοντέλων μεμβρανών επιτρεπει τη γρήγορη εκτίμηση της διαπερατότητας των φαρμάκων, ενώ η παρασκευή λιποσωμάτων βρίσκει εφαρμογή στην ανάπτυξη συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων. Οι βιοφυσικές αλληλεπιδράσεις που παρατηρούνται χρησιμοποιώντας μοντέλα λιπιδίων παίζουν σημαντικό ρόλο στη διερεύνηση των ανωτέρω λειτουργιών των μεμβρανικών λιπιδίων. Σημαντικός είναι ο ρόλος της χοληστερόλης, ο οποίος διαφοροποιείται ανάλογα με τη συγκέντρωσή της επηρεάζοντας τη διαπερατότητα και την πρόσδεση άλλων ουσιών, καθώς και τη θερμοδυναμική της λιπιδικής διπλοστιβάδας, την πλευρική διάχυση και τη λειτουργία των πρωτεϊνών. Ως εκ τούτου απαιτείται μια ολιστική προσέγγιση της λειτουργίας των κυτταρικών μεμβρανών θεωρώντας τα συστατικά της, λιπίδια, πρωτεΐνες, στερόλες ως μια συζευγμένη οντότητα.



Σχήμα 12: Λιπιδική διπλοστιβάδα μέρος της οποίας είναι πλούσιο σε χοληστερόλη (raft)

Interactions of Bioactive Molecules with Membranes and the Contribution of Lipidomics in the Pharmaceutical Research

Dimitrios Ntountaniotis^{1,3}

Anna Tsantili-Kakoulidou²

Thomas Mavromoustakos³

¹ University of Patras, Department of Chemistry,
Patras 26500, Greece

² University of Athens, School of Pharmacy,
Department of Pharmaceutical Chemistry,
Panepistimiopolis, Zografou 15771, Athens, Greece

³ University of Athens, Chemistry Department,
Organic Chemistry Section, Panepistimiopolis,
Zographou 15771, Athens, Greece

Abstract

In the past, membranes were considered as inert lipophilic barriers that block toxic substances to enter the cells and exert their detrimental effects but allow beneficial molecules to stay inside the bilayer core and promote physiological responses. Today, we know that membranes are complex entities that govern fundamental biological aspects of life and also control drug action. Among the three biomolecule constituents: lipids, proteins and sugars, historically proteins received first recognition for their important role in vital biological processes. In our days, an increasing recognition of the paramount importance in the biological action of the lipidic part is experienced. Thanks, mainly to the advances of biology, biochemistry and molecular biology which contributed to understand the vital role of the lipid part of the membrane bilayers. Lipids are in a harmonic interactions with proteins and because of this, the promotion of the

biological response is triggered. In addition, lipids can control drug action. Pharmaceutical research has been developed for studying drug:membrane interactions using several models that simulate lipid bilayer functions. The advance of physical chemical techniques aided tremendously in the explosion of this field. The “fingerprint” of drug defined as its localisation, orientation and perturbing effects in membrane bilayers is assumed to be related with the pharmacological action as well. Drug-membrane interactions are also important to understand the diffusion and metabolic properties of the drugs and in many cases they may be responsible for their desirable or undesirable effects. The importance of membrane lipids in signal transduction, in most cases through complicated processes, is also well established. Moreover, changes in the lipid profile in pathophysiological conditions have triggered the development of ‘lipidomics’, an emerging field to complement with ‘metabolomics’ in the disease diagnosis and in identifying and validating novel biomarkers. Among the sterols a special role is assigned to cholesterol. The importance of membrane lipids in the drug discovery process has led to the development of biophysical models and biophysical techniques in order to investigate and understand drug permeability and drug action in the early phase. The application of liposomes in drug delivery systems is another important aspect of the role of lipids in drug efficacy and may solve formulation and drug targeting problems. After providing a short overview of the recent aspects on membrane structure, the above functions of membrane lipids and the impact of biophysical interactions with lipid models and artificial membranes are reviewed in the present article.

Βιβλιογραφία

1. Lucio M., Lima J.L.F.C., Reis S. Drug-Membrane Interactions: Significance for Medicinal Chemistry. *Curr. Med. Chem.* 17, 1795-1809, 2010.
2. Berg J.B., Tymoczko J.L., Stryer L. (2011) Βιοχημεία. Τόμος Ι. Απόδοση στα ελληνικά: Αλεξτράς Α., Βαλκανά Θ., Δραΐνας Δ., Δραΐνας Κ., Φράγκου-Λαζαρίδη Μ. *Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης*, Ηράκλειο.
3. Sewell G.W., Hannun Y.A., Han X., Koster G., Bielawski J., Goss V., Smith P.J., Rahman F.Z., Vega R., Bloom S.L., Walker A.P., Postle A.D., Segal A.W. Lipidomic profiling in Crohn's disease: Abnormalities in phosphatidylinositols, with preservation of ceramide, phosphatidylcholine and phosphatidylserine composition. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 1839-1846, 2012.
4. Morishita K., Aiboshi J., Kobayashi T., Mikami S., Yokoyama Y., Ogawa K., Yokota H., Otomo Y. Lipidomics analysis of mesenteric lymph after trauma and hemorrhagic shock. *J. Trauma Acute Care Surg.* 72, 1541-7, 2012.
5. Hanumegowda U.M., Wenke G., Regueiro-Ren A., Yordanova R., Corradi S., Adams P. Phospholipidosis as a function of basicity, lipophilicity, and volume of distribution of compounds. *Chem. Res. Toxicol.* 23, 749-55, 2010.

6. Wenk M.R. The emerging field of lipidomics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 594–610, 2005.
7. Postle A.D. Lipidomics. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 15,127-33, 2012.
8. van Meer G., Voelker D.R., Feigenson G.W. Membrane lipids: Where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 112-124, 2008
9. Singer S.J., Nicolson G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175,720–731, 1972.
10. Vereb G., Szollosi J. Matko J., Nagy P, Farkas T, Vigh L, Matyus L, Waldmann TA, Damjanovich S. Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 100, 8053–8058, 2003.
11. Simons K., Vaz W.L. Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 33, 269-95, 2004.
12. Cevc G. How membrane chain-melting phase-transition temperature is affected by the lipid chain asymmetry and degree of unsaturation: an effective chain-length model. *Biochemistry*, 30, 7186- 7193, 1991.
13. Sebastião A.M., Colino-Oliveira M., Assaife-Lopes N., Dias R.B., Ribeiro J.A. Lipid rafts, synaptic transmission and plasticity: Impact in age-related neurodegenerative diseases. *Neuropharmacology* 64, 97-107, 2013.
14. Lasic D.D. (1993) Liposomes: From physics to applications. Elsevier, Amsterdam.
15. Cevc G. (1993) Phospholipid Handbook. First edition, Marcel Dekker, Inc, New York.
16. Eytan G.D. Use of liposomes for reconstitution of biological functions. *Biochim. Biophys. Acta*, 694,185–202, 1982.
17. Marsch D. (1990) Handbook of Lipid Bilayers CRC, Press, Boston.
18. Walde P., Cosentino K., Engel H., Stano P. Giant vesicles: preparations and applications. *Chembiochem.* 11,848-65, 2010.
19. Hope M.J., Bally M.B., Webb G., Cullis P.R. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochim. Biophys. Acta* 812, 55-65, 1985.
20. Peetla C., Stine A., Labhasetwar V. Biophysical interactions with model lipid membranes: applications in drug discovery and drug delivery *Mol Pharm.* 6, 1264–1276, 2009.
21. Corvis Y., Barzyk W., Brezesinski G., Mrabet N., Badis M., Hecht S., Rogalska E. Interactions of a fungistatic antibiotic, griseofulvin, with phospholipid monolayers used as models of biological membranes. *Langmuir* 22, 7701–7711, 2006.
22. Brezesinski G., Mohwald H. Langmuir monolayers to study interactions at model membrane surfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* 100–102. 563–584, 2003.
23. van de Waterbeemd H., Smith D.A., Beaumont K., Walker D.K. Property-Based Design: Optimization of Drug Absorption and Pharmacokinetics. *J. Med. Chem.* 44 1-21, 2001.
24. Rogge M.C., Taft D.R. (2010) Preclinical Drug Development in J. Swarbrick (ed.) “Drugs and the Pharmaceutical Sciences” Vol 187, Informa Healthcare Publications, 2nd edition, USA,
25. Dumont E.A., Reutelingsperger C.P.M., Smits J.F.M, Daemen, M.J.A.P. Doevedans P.A.F., Wellens H.J.J., Hofstra L. Real-time imaging of apoptotic cell-membrane changes at the single-cell level in the beating murine heart, *Nature Medicine* 7, 1352 – 1355, 2001.
26. Gallaher J., Wodzińska K., Heimburg T., Bier M. Ion-channel-like behavior in lipid bilayer membranes at the melting transition, *Phys. Rev. E* 81, 061925, 2010.
27. Hosoya K, Tachikawa M. Roles of organic anion/cation transporters at the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers involving uremic toxins. *Clin. Exp. Nephrol.* 15, 478-85, 2011.
28. Wu C.Y., Benet L.Z. Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption / elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. *Pharm. Res.* 22, 11-23, 2005.
29. Di L., Artursson P., Avdeef A., Ecker G.F., Faller B., Fischer H., Houston J.B., Kansy M., Kerns E.H., Krämer S.D., Lennernäs H., Sugano K. Evidence-based approach to assess passive diffusion and carrier-mediated drug transport. *Drug Discov. Today* 17, 905-12, 2012.
30. Chiba P., Mihalek I., Ecker G.F., Kopp S., Lichtarge O. Role of transmembrane domain / transmembrane domain interfaces of P-glycoprotein (ABCB1) in solute transport. Convergent information from photoaffinity labeling, site directed mutagenesis and in silico importance prediction. *Curr. Med. Chem.* 13, 793-805, 2006.
31. Gaviraghi G., Barnaby R.J., Pellegatti M. (2001), Pharmacokinetic challenges in lead optimization” In: B. Testa, H. van de Waterbeemd, G. Folkers,

- R. Guy (Eds.). "Pharmacokinetic Optimization in Drug Research, Verlag Helvetica Chimica Acta: Zürich and Wiley - VCH: Weinheim, pp. 3-14.
32. Liu X., Testa B., Fahr A. Lipophilicity and its Relationship with Passive Drug Permeation, *Pharm. Res.* 28, 962–977, 2011.
 33. Yee S. In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man—fact or myth, *Pharm. Res.* 14, 763–766, 1997.
 34. Usansky H.H., Sinko P.J. Estimating Human Drug Oral Absorption Kinetics from Caco-2 Permeability using an Absorption-Disposition Model: Model Development and Evaluation and Derivation of Analytical Solutions for k_a and F_a . *J. Pharm. Exp. Ther.* 314, 391–399, 2005.
 35. Volpe, D.A. Variability in Caco-2 and MDCK cell-based intestinal permeability assays. *J. Pharm. Sci.* 97, 712–725, 2008.
 36. Faller B. Artificial membrane assays to assess permeability. *Curr. Drug Metab.* 9, 886–892, 2008.
 37. Baird C.L., Courtenay E.S., Myszka D.G. Surface plasmon resonance characterization of drug/liposome interactions, *Anal. Biochem.* 310, 93–99, 2002.
 38. Van de Waterbeemd H., Kansy M., Wagner B., Fischer H. (1996) Lipophilicity Measurement by High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC). In Pilska V, Testa B, van de Waterbeemd H, editors. Lipophilicity in Drug Action and Toxicology VCH Publishers: Weinheim, Germany, p 73-87
 39. Giaginis C., Tsantili-Kakoulidou A., Alternative measures of lipophilicity. From octanol-water partitioning to IAM retention. *J. Pharm. Sci.* 97, 2984–3004, 2008.
 40. Lombardo F., Shalaeva M.Y., Tupper K.A., Gao F. ElogDoct: A tool for Lipophilicity Determination in Drug Discovery.2. Basic and neutral compounds. *J. Med. Chem.* 44, 2490–7 2001.
 41. Giaginis C., Theocharis S., Tsantili-Kakoulidou A., Octanol/water partitioning simulation by reversed phase HPLC for structurally diverse acidic drugs: Effect of octanol as mobile phase additive, *J. Chromatogr. A*, 116, 116-125, 2007.
 42. Taillardat-Bertschinger A., Galland A., Carrupt P.A., Testa B. Immobilized artificial membrane (IAM)-HPLC: proposed guidelines for technical optimization of retention measurements. *J. Chromatogr A* 953, 39-53, 2002.
 43. Valko K., Du C.M., Bevan C.D., Reynolds D.P., Abraham M.H. Rapid-gradient HPLC method for measuring drug interactions with immobilized artificial membrane: Comparison with other lipophilicity measures. *J. Pharm. Sci.* 89, 1085–1096, 2000.
 44. Vrakas D., Tsantili-Kakoulidou A. Χρωματογραφία Ακινητοποιημένων Τεχνητών Μεμβρανών (IAM). Εναλλακτική Προσέγγιση για την Αποτίμηση της (Φωσφο)λιποφιλίας και την Προσομοίωση των βιολογικών Διεργασιών' *Pharmakeftiki*, 20, 83-97, 2007
 45. Ottiger C., Wunderli-Allenspach H. Immobilized artificial membrane (IAM)-HPLC for partition studies of neutral and ionized acids and bases in comparison with the liposomal partition system. *Pharm. Res.* 16:643–650, 1999.
 46. Vrakas D., Hadjipavlou-Litina D., Tsantili-Kakoulidou A. Retention of substituted coumarins using Immobilized Artificial Membrane (IAM) Chromatography: A comparative study with n-Octanol Partitioning and Reversed-Phase HPLC and TLC. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39, 908–913, 2005.
 47. Vrakas D., Giaginis C., Tsantili-Kakoulidou A. Different retention behaviour of Structurally Diverse Basic and Neutral Drugs in Immobilized Artificial Membrane (IAM) and Reversed-Phase HPLC. Comparison with octanol- water partitioning. *J. Chromatogr. A* 1116, 158–164, 2006.
 48. Reichel A., Begley D.J. Potential of immobilized artificial membranes for predicting drug penetration across the blood-brain barrier. *Pharm. Res.* 15, 1270–1274, 1998.
 49. Genty M., Gonzalez G., Clere C., Desangle-Gouty V., Legendre J.Y. Determination of passive absorption through the rat intestine using chromatographic indices and molar volume. *Eur. J. Pharm. Sci.* 12, 223–229, 2001.
 50. Vrakas D., Giaginis C., Tsantili-Kakoulidou A. Electrostatic interactions and ionization effect in IAM retention. A comparative study with octanol- water partitioning, *J. Chromatogr. A* 1187, 67–78, 2008.
 51. Bensikaddour H., Fa N., Burton I., Deleu M. Lins L., Schanck A. Characterization of the Interactions between Fluoroquinolone Antibiotics and Lipids: a Multitechnique Approach. *Biophys. J.* 94, 3035–3046, 2008.
 52. Casartelli A., Bonato M., Cristofori P., Crivellente F., Dal Negro G., Masotto I., Mutinelli C., Valko K., Bonfante V. *Cell Biol. Toxicol.* 19, 161–76, 2003.

53. Almeida P.F.F., Vaz W.L.C. (1995) Lateral Diffusion in Membranes, Elsevier Science B.V. Handbook of Biological Physics, Vol. 1 (R. Lipowsky and E. Sackmann eds) pp 307-350.
54. Murray D., Ben Tal N., Honig B., McLaughlin S. Electrostatic interaction of myristoylated proteins with membranes: simple physics, complicated biology. *Structure* 5, 985-9, 1997.
55. Dror R.O., Pan A.C., Arlow D.H., Borhani D.W., Maragakis P., Sahn Y., Xu H., Shaw D.E. Pathway and mechanism of drug binding to G-protein-coupled receptor. *PNAS* 108, 13117-123, 2011.
56. Hurst D.P. A lipid pathway for ligand binding is necessary of a cannabinoid G-protein coupled receptor. *J. Biol. Chem.* 285, 17954-964, 2010.
57. Zoumpoulakis P., Daliani I., Zervou M., Kyrikou I., Siapi E., Lambrinidis G., Mikros E., Mavromoustakos T. Losartan's molecular basis of interaction with membranes and AT1 receptor. *Chem. Phys. Lipids* 125, 13-25, 2003.
58. Potamitis C., Chatzigeorgiou P., Siapi E., Mavromoustakos T., Hodzic A., Cacho-Nerin F., Laggner P., Rappolt M. Interactions of the AT1 antagonist valsartan with dipalmitoyl-phosphatidylcholine bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1808, 1753-63, 2011.
59. Ntountaniotis D., Mali G., Grdadolnik S.G., Halabalaki M, Skaltsounis, A.-L., Potamitis C., Siapi E., Chatzigeorgiou P., Rappolt M., Mavromoustakos T. Thermal, dynamic and structural properties of drug AT₁ antagonist olmesartan in lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1808, 2995-3006, 2011.
60. Aggelis G., Roumelioti P., Resvani A., Durdagi S., Androutsou M.E., Kelaidonis K., Vlahakos D., Mavromoustakos T., Matsoukas J. An efficient synthesis of a rationally design 1,5 disubstituted imidazole AT1 Angiotensin Receptor Antagonist. Reorientation of imidazole pharmacophore groups in losartan reserves high receptor affinity and confirms docking studies. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 24, 749-758, 2010.
61. Fernandis A.Z., Wenk M.R. Membrane lipids as signaling molecules. *Curr. Opin. Lipidol.* 18,121-8, 2007.
62. Eyster K.M. The membrane and lipids as integral participants in signal transduction: lipid signal transduction for the non-lipid biochemist. *Adv. Physiol. Educ.* 31, 5-16, 2007.
63. Mondal S., Khelashvili G., Shan J., Andersen O.S., Weinstein H. Quantitative modeling of membrane deformations by multihelical membrane proteins: application to G-protein coupled receptors. *Biophys. J.* 101, 2092-101, 2011.
64. Thomas H., Coley H.M. Overcoming Multidrug Resistance in Cancer: An Update on the Clinical Strategy of Inhibiting p-Glycoprotein, *Cancer Control*, 10, 159-165, 2003.
65. Dantzig A. H., Shepard R. L., Law K. L., Tabas L., Pratt S. Gillespie J. S. Binkley S. N., Kuhfeld M. T. Selectivity of the Multidrug Resistance Modulator, LY335979, for p-Glycoprotein and Effect on Cytochrome P-450 Activities. *J.Pharm.Exp.Ther.* 290,854-862, 1999.
66. Vemuri S., Rhodes C.T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: A review. *Pharm. Acta Helv.* 70, 95-111, 1995.
67. Thomas P.G., Seelig J. Binding of the calcium antagonist flunarizine to phosphatidylcholine bilayers: charge effects and thermodynamics. *Biochem. J.* 291,397-402, 1993.
68. Bäuerle H.D., Seelig J. Interaction of charged and uncharged calcium channel antagonists with phospholipid membranes. Binding equilibrium, binding enthalpy, and membrane location. *Biochemistry* 30, 7203-7211, 1991.
69. Wenk M.R., Fahr A., Reszka R., Seelig J. Paclitaxel partitioning into lipid bilayers. *J. Pharm. Sci.* 85, 228-231, 1996.
70. Sharifi S., Behzadi S., Laurent S., Forrest M.L., Stroeve P., Mahmoudi M. Toxicity of nanomaterials *Chem. Soc. Rev.* 41, 2323-2343, 2012.
71. Gurr M.I., Harwood J.L., Frayn K.N. (2002) Lipid Biochemistry: An Introduction (5th Edition), Blackwell publishing, Oxford.
72. Chen S. Solid state NMR study of drug interaction with phospholipid bilayers. PhD Thesis, Department of Chemistry, the Faculty of Mathematics and Natural Sciences. University of Bergen. Norway, 2007.
73. <http://en.wikipedia.org/wiki/Cholesterol>
74. Lu J.-X. PhD Thesis. Solid-state NMR studies of phospholipid model membranes and membrane-associated macromolecules. Faculty of Miami University, 2007.
75. Chiu S. W., Jakobsson E., Mashl, J., Scott. H. L. Cholesterol-induced modifications in lipid bilayers: a simulation study. *Biophys. J.* 83, 1842-1853, 2002.
76. Kessel A., Ben-Tal N., May S. Interactions of cholesterol with lipid bilayers: the preferred configuration and fluctuations. *Biophys. J.* 81, 643-658, 2001.

77. Jedlovszky P., Mezei M. Effect of cholesterol on the properties of phospholipid membranes. 1. Structural features. *J. Phys. Chem. B.* 107, 5311-5321, 2003.
78. Epand R.M., Bain, A. D., Sayer B. G., Bach, D., Wachtel E. Properties of mixtures of cholesterol with phosphatidylcholine or with phosphatidylserine studied by ¹³C magic angle spinning nuclear magnetic resonance. *Biophys. J.* 83, 2053-2063, 2002.
79. Taylor M.G., Smith I.C.P., Reliability of nitroxide spin probes in reporting membrane properties: a comparison of nitroxide- and deuterium-labeled steroids. *Biochemistry* 20, 5252-55, 1981.
80. Dufourc E.J., Parish, E.J., Chitrakorn S., Smith I.C.P. Structural and dynamical details of cholesterol-lipid interaction as revealed by deuterium NMR. *Biochemistry* 23, 6062-6071, 1984.
81. Lemmich, J., Mortensen, K., Ipsen, J. H., Honger, T., Bauer, R., Mouritsen O. G. The effect of cholesterol in small amounts on lipid-bilayer softness in the region of the main phase transition. *Eur. Biophys. J.* 25, 293-304, 1997.
82. Rappolt M., Vidal M.F., Kriechbaum M., Steinhart M., Amenitsch H., Bernstorff S., Laggner P. Structural, dynamic and mechanical properties of POPC at low cholesterol concentration studied in pressure/temperature space. *Eur. Biophys. J. Biophys. Lett.* 31, 575-585, 2003.
83. McMullan R.K., McElhaney R.N. Physical studies of cholesterol-phospholipid interactions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 1, 83-90, 1996.
84. Hofsäß C., Lindahl E., Edholm O. Molecular dynamics simulations of phospholipid bilayer with cholesterol. *Biophys. J.* 84, 2192-2206, 2003.
85. Smondyre A.M., Berkowits M.L. Structure of dipalmitoylphosphatidyl-choline/cholesterol bilayer at low and high cholesterol concentrations: molecular dynamics simulation. *Biophys. J.* 77, 2075-2089, 1999.
86. Trouard T. P., Nevzorov A. A., Alam T. M., Job C., Zajicek J., Brown M.F. Influence of cholesterol on dynamics of dimyristoylphosphatidylcholine bilayers as studied by deuterium NMR relaxation. *J. Chem. Phys.* 110, 8802-8818, 1999.
87. Vist M.R., Davis J.H. Phase-Equilibria of Cholesterol Dipalmitoyl-phosphatidylcholine Mixtures - H-2 Nuclear Magnetic-Resonance and Differential Scanning Calorimetry. *Biochemistry* 29, 451-464, 1990.
88. Mouritsen O.G., Zuckermann M.J. What's so special about Cholesterol? *Lipids.* 3, 1101-13, 2004.
89. Corvera E., Mouritsen O.G., Singer M.A., Zuckermann M.J. The permeability and the effect of acyl-chain length for phospholipid bilayers containing cholesterol: Theory and experiments. *Biochim. Biophys. Acta.* 1107, 261-270, 1992.
90. Trandum C., Westh P., Jørgensen K., Mouritsen O.G. A thermodynamic study of the effects of cholesterol on the interaction between liposomes and ethanol. *Biophys. J.* 78, 2486-2492, 2000.
91. R. E. Brown Sphingolipid organization in biomembranes: what physical studies of model membranes reveal. *J. Cell Sci.* 111, 1-9, 1998

The role of ζ -potential on the stability of nanocolloidal systems

Charalampos Koutsoulas¹, Natassa Pippa², Costas Demetzos², Marian Zabka¹

¹ Faculty of Pharmacy, Department of Galenic Pharmacy,
Comenius University in Bratislava. Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, Slovakia

² Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy,
University of Athens, University Campus Zografou, 15784 Athens, Greece

Abstract

The DLVO theory is a tool to explain the phenomenology of the physicochemical behavior of nanocolloidal dispersion qualitatively. The ζ -potential measurements can be considered as a method for quantitative characterization of the surface properties of these systems. Particle charge determines the stability of colloidal suspension. The magnitude of the ζ -potential gives an indication of the potential stability of the nanocolloidal systems. For electrostatically stabilized suspensions and dispersions, minimum ζ -potential should be ± 30 mV, and for combined steric and electrostatic stabilization, it should be a minimum of ± 20 mV. The goal of this study is to investigate the role of ζ -potential as a key parameter for detecting changes of structural components of liposomes, the most common nanocolloidal particles of Pharmaceutical Nanotechnology. For this purpose, physicochemical characteristics were evaluated by measuring the size distribution and ζ -potential of two liposomal dispersions, which were prepared by the same phospholipid with different purity grade. The hydrodynamic diameter of two liposomal dispersions did not change significantly, while ζ -potential presented significantly change. These results indicate that the ζ -potential could be used as an indicator of nanocolloidal stability, which should be taken into consideration identifying the quality of raw materials in Pharmaceutical Industry and understanding the nanocolloidal behavior of vectors for designing drug containers.

Keywords: ζ -potential, nanocolloidal stability, liposomes, DLVO theory

Introduction

Nanocolloidal nanocarriers like liposomes, polymeric nanoparticles, etc., can be classified in a more general category of “soft matter”, which includes a wide range of materials, that cannot be classified as solid or liquid and that can deform easily because their molecules simply rearrange.¹ These materials are characterized by softness (can be considered synonymous with deformability) because for these bionanomaterials, the entropy changes related to the bond energy variations are dominated by the modification due to molecules or biomolecules configuration and structural and/or surface changes.¹ Another important feature is the particle shape, which is related to the specific surface and determines the presence of attractive or repulsive forces within dispersed and dispersive phases, which are present in a nanocolloidal dispersion. The interactions which play a key role in particle shape related to ionic interactions, dipole-dipole interactions, steric interactions and hydrogen bonding. In life sciences, knowledge of the interaction mechanism at short distances between the biomolecules immersed in an electrolyte solution is very important to elucidate the essential biological processes involved in many cellular phenomena like membrane fusion.^{2,3}

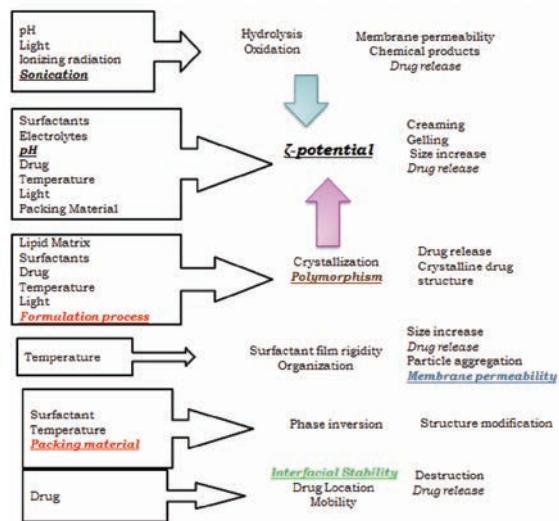
The colloidal properties of micro- and/or nanoparticles are of paramount importance for their applications. The Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) is the central theory for colloidal stability.^{4,5} According to the recent literature, the hydration interaction energy can play an important role in the colloid particle aggregation, though the

* Corresponding author: demetzos@pharm.uoa.gr

classical DLVO theory considers only the Coulomb and van der Waals interactions. This phenomenology is predicted by extended DLVO theory and by fractal formalism.⁶⁻¹⁰ The concept of fractal geometry can be applied to describe the complexity of the heterogeneous nature of drug processes due to aggregation phenomena in the human body and the dissolution of bioactive compounds.^{11,12}

The ζ -potential

The ζ -potential values play an important role in the nanocolloidal stability (Scheme 1). Almost all particles in contact with a liquid acquire an electric charge on their surface (Figure 1). The electric potential at the shear plane is called the ζ -potential (using the Greek letter ζ) (Figures 2 and 3). The shear plane is an imaginary surface separating (Figure 2) the thin layer of liquid (liquid layer constituted of counter-ions) bound to the solid surface in motion. Z-potential (Figure 3) is an important and useful



Scheme 1. Destabilization mechanism and consequences on colloidal vectors of drugs. The central role of ζ -potential. Adapted from¹³.

indicator of particle surface charge, which can be used to predict and control the stability of nanocolloidal suspensions or emulsions, as mentioned above.¹³ In other words, ζ -potential is the potential at the slipping plane (Figure 3). It is not the surface potential may or may not be related. The measurement of ζ -potential is often the key to understanding dispersion's stability or aggregation processes in applications. The magnitude of the ζ -potential gives an indication of the potential stability of the nanocolloidal systems (Table 1). If all

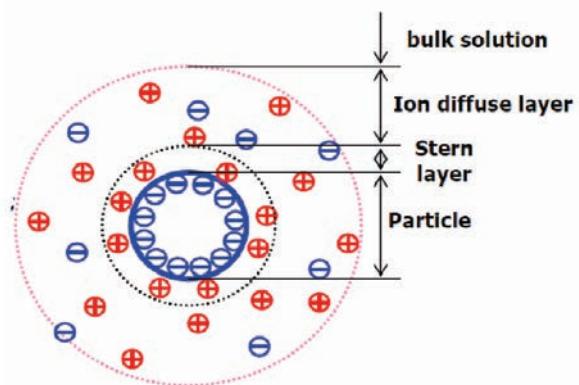


Figure 1. Nanoparticles in dispersion. When nanoparticles are dispersed in medium, most of them will carry surface charge. The surface charge will attract ions of opposite charge to form a Stern layer, where the ions are strongly bound and a diffuse region where they are less firmly associated.

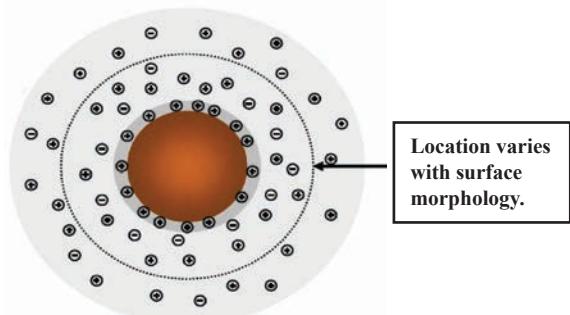


Figure 2. The slipping plane (shear plane). It is an imaginary location, somewhere in the diffuse layer.

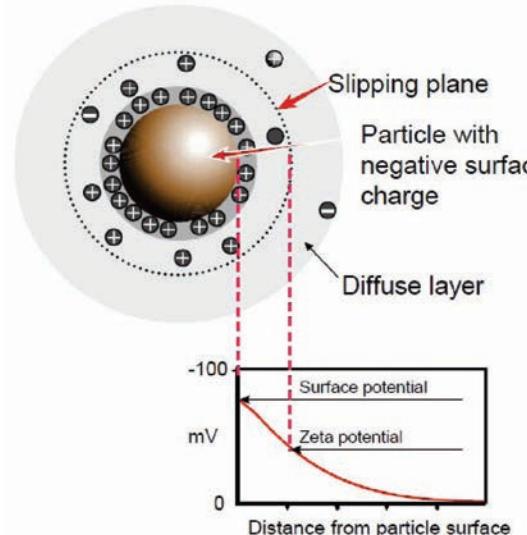


Figure 3. Z-potential is the potential at the slipping plane. It is not the surface potential may or may not be related.

Table 1: Stability characteristics of colloidal systems.

Stability characteristics	ζ - potential*
Maximum agglomeration & precipitation	0 to 3mV
Strong agglomeration & precipitation	$\sim 5\text{mV}$
Threshold of agglomeration	10 to 15mV
Threshold of delicate dispersion/suspension	15 to 30mV
Moderate stability	30 to 40mV
Fairly good stability	40 to 60mV
Very good stability	60 to 80mV
Extremely good stability	80 to 100mV

* The measurements of ζ -potential correspond to the absolute values

the particles in suspension have a large negative or positive ζ - potential then they will tend to repel each other and there is no tendency to flocculate.^{14,15}

However, if the colloidal particles have low ζ - potential values then there is no force to prevent the particles coming together and flocculating or aggregating. The general dividing line between stable and unstable suspensions is generally taken at either +30mV or -30mV (Table 1). On the other hand, nanocolloidal particles with ζ - potential values more positive than +30mV or more negative than -30mV are normally considered stable (Table 1).

Z -potential depends not only upon the particle surface but also on its environment (dispersion medium). It can be affected by small changes in the pH values or ionic strength of the medium (Figure 4).^{14,15} It also depends on the surface morphology of non-smooth particles. In this study, ζ - potential can be readily measured by the technique of microelectrophoresis.¹⁶ The main applications of ζ - potential determination are:

- 1) The relative comparison of various systems with regard to their surface properties, to predict or monitor stability of nanocolloidal dispersions in micro- or nano- scale
- 2) The identification of the isoelectric point (or point of zero ζ - potential) of nanocolloids and microcolloids
- 3) The particle surface absorption and
- 4) The morphology identification.

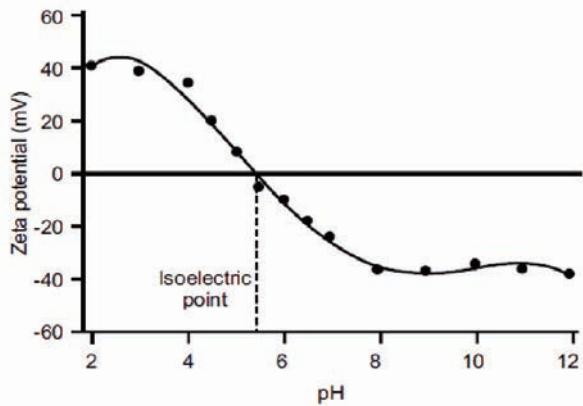


Figure 4. A typical plot of ζ - potential versus pH. Isoelectric point: the point where the plot passes through zero ζ - potential and is very important from a practical consideration. It is normally the point where the colloidal system is least stable.

Furthermore, surface charge and ζ -potential determination are critical for understanding the cellular uptake of colloidal particles, especially those which are used as containers of bioactive agents.¹⁷

Electrophoresis

When an electromagnetic field is applied across an electrolyte, charged particles suspended in the electrolyte are attracted towards the electrode of opposite charge. Viscous forces acting on the particles tend to oppose this movement. When equilibrium is reached between these two opposing forces, the particles move with constant **velocity**.

The **velocity** of the particle is dependent on:

- 1) Strength of electric field or voltage gradient.
- 2) The Dielectric constant of the medium.
- 3) The Viscosity of the medium.
- 4) The ζ -potential.

The **velocity** of a particle in an electric field is commonly referred to as its **electrophoretic mobility**. The **Henry equation** is:

$$U_E = \frac{2 \epsilon \zeta f(Ka)}{3 n} \quad (1)$$

Where:

ζ is the ζ - potential, U_E the electrophoretic mobility, ϵ the dielectric constant, n the viscosity and $f(Ka)$ is the **Henry's function**.

Two values are generally used as approximations for the $f(Ka)$ determination either 1.5 or 1.0.

Electrophoretic determinations of ζ -potential are most commonly made in aqueous media and moderate electrolyte concentration. $f(Ka)$ in this case is 1.5, and is referred to as the **Smoluchowski** approximation. The ζ -potentials were calculated from electrophoretic mobilities, μ_E , by using the Henry correction of the Smoluchowski equation:

$$\zeta = \frac{3\mu_E n}{2\epsilon_0 \epsilon_r f(Ka)} \quad (2)$$

where ϵ_0 is the permittivity of the vacuum, ϵ_r is the relative permittivity, a is the particle radius, K is the Debye length, and n is the viscosity of water. The function $f(Ka)$ depends on particle shape. Therefore calculation of ζ - potential from the mobility is straightforward for systems that fit the **Smoluchowski** model, i.e. particles larger than about 0.2 microns dispersed in electrolytes containing more than 10^{-3} molar salt. The **Smoluchowski** approximation is used for the folded capillary cell and the universal dip cell when used with aqueous samples.

For small particles in low dielectric constant media $f(Ka)$ becomes 1.0 and allows an equally simple calculation. This is referred to as the **Hückel** approximation. It should be noted that **Non aqueous dispersions'** measurements generally use the **Hückel** approximation. While if $Ka > 1$:

$$f(Ka) = 1.5 + \frac{9}{2(Ka)} + \frac{75}{2(Ka)^2} \quad (3)$$

The role of ζ - potential in liposomal technology

Liposomes are colloidal nanoparticles and have been considered as suitable carriers in drug delivery. The structural units of liposomes are amphiphile molecules, mainly phospholipids. The most abundant lipids in liposomes are phosphatidylcholines (PCs). In addition, parameters that influence the behavior of liposomes in biological environments are membrane fluidity, surface charge and ζ - potential, degree of hydration, liposome size and the method

of preparation. The physicochemical properties of liposomes such as lipid composition, surface charge and size, can modulate their *in vivo* behavior, resulting in an improvement of the pharmacokinetic properties as well as the pharmacological response of the incorporated drugs. High net ζ -potential values indicate increased stability of the liposomal suspension, due to decreased aggregation and fusion of liposomes.¹³ The liposomal stability indicates that electrostatic repulsion should be responsible for keeping the liposomes far enough to avoid van der Waals attraction, which was predicted from classical DLVO theory.³⁻⁷

The goal of this study is to investigate the role of ζ -potential as a key parameter for detecting changes of structural components of liposomes, the most common colloid particles of Pharmaceutical Nanotechnology.

Materials and Methods

Materials

The phospholipid used for the preparation of liposomes was 1,2-Diacyl-sn-glycero-3-phosphocholine (EggPC) of 60% and 99% purity and was used without further purification. It were purchased from Sigma Aldrich and Avanti Polar Lipids Inc., (Albaster, AL, USA), respectively. All reagents used were of analytical grade.

Liposome preparation

Liposomes were prepared by thin-film hydration method. The lipid film was prepared by dissolving EggPC in chloroform, and slowly evaporating the solvent in a flash evaporator. The film was left under vacuum for at least 24h. The lipid film was hydrated either in tris-buffered saline (TBS) of pH 7.4 by slowly stirring for 1h, in a water bath above the phase transition of lipids (23° C). The resultant multilamellar vesicles (MLVs) were subjected to size reduction in an extruder through a polycarbonate filter of 200 um pore size resulting to the formation of large unilamellar vesicles (LUVs).

Table 2. Physicochemical characteristics of liposomal formulations.

Liposomal Composition	z-average mean^a (nm)	PI^b	ζ-potential (mV)
EggPC (60%)	209.03 ± 0.95	0.133 ± 0.002	-26.2 ± 0.9
EggPC (99%)	191.60 ± 2.70	0.120 ± 0.024	0.8 ± 0.7

^a z-average mean: mean size of particles, ^b PI: Polydispersity index

Mean particle size and ζ -potential measurements

Physicochemical characteristics were evaluated by measuring the size distribution (z -average mean), polydispersity index (PI) and ζ - potential of liposomes. The mean hydrodynamic diameter (z -average mean), polydispersity index (P.I.) and ζ -potential of the particles were used for the characterization of the liposomal dispersion immediately after preparation. 100 μ l aliquots were 30-fold diluted in HPLC grade water. Measurements are performed at a detection angle of 90° and at 25°C in a photon correlation spectrometer (Z-sizer 3000 HAS)

Results and Discussion

Physicochemical characteristics of EggPC liposomes are presented in Table 2.

The hydrodynamic diameter of two liposomal dispersions did not change significantly and the P.D.I. values indicate quite monodisperse liposomal formulations (Table 2). The ζ -potential of EggPC 99% purity liposomes in TBS water was found near zero, because of the absence of net charges on liposome surface (Table 2). On the other hand, the preparation of liposomes with EggPC 60% purity caused a shift of ζ -potential to more negative values (Table 2). Furthermore, ζ - potential plays an important role for the elucidation of structural characteristics of liposome, while hydrodynamic diameter did not alter by the change of the purity of EggPC. These results indicate that the ζ -potential is a key parameter, which could be used as a road map for choosing raw materials with optimal properties for designing and developing drug nanocolloidal containers. According to the requirements of Pharmaceutical Industry, the Good Manufacturing Practices (GMPs) shall adopt ζ -potential measurements of raw materials to produce nanocolloidal systems incorporating drugs with therapeutic value.

Conclusions

Electrokinetic characterization of colloidal particles surfaces is important to a number of fields in Pharmaceutical Nanotechnology. The **DLVO**, classical and extended, is the central theory, which describes the stability of colloidal nanoparticles, while the ζ - potential values indicate and predict the stability of a colloid dispersion or suspension. Additionally, it is well established in the recent literature, that the regulatory considerations are of great importance aiming at providing proofs concerning not only the design, biomaterials and preparation of liposomal delivery systems but also the final formulation's physicochemical and structural characteristics.¹⁸ Z -potential determination is significant for understanding

the biophysical behavior of colloidal particles, especially those which are used as containers of drugs. Finally, we could conclude that the determination of ζ - potential is very important for colloidal systems, especially for liposomes, as it was indicated of the ζ - potential values of liposomal dispersion consisted of the same phospholipid with different purity grade.

Ο ρόλος του ζ -δυναμικού στη σταθερότητα των νανοκολλοειδών συστημάτων.

Χαράλαμπος Κουτσούλας¹, Νατάσσα Πίππα²,
Κώστας Δεμέτος², Marian Zabka¹

¹Τμήμα Γαλλινικής Φαρμακευτικής, Φαρμακευτική Σχολή, Comenius Πανεπιστήμιο
Μπρατισλάβα, Odbojarov 10,
832 32 Μπρατισλάβα, Σλοβακία

²Τομέας Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστημιούπολη Ζωγράφου, 15784, Αθήνα

Περίληψη

Η θεωρία DLVO αποτελεί ένα εργαλείο για την εξήγηση της φαινομενολογίας της φυσικοχημικής συμπεριφοράς των νανο-κολλοειδών διασπορών ποιοτικά. Οι μετρήσεις του ζ -δυναμικού μπορούν να θεωρηθούν ως μία μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ιδιοτήτων επιφανείας αυτών των συστημάτων. Το φορτίο του σωματιδίου προσδιορίζει τη σταθερότητα του κολλοειδούς εναιωρήματος. Το μέγεθος του ζ -δυναμικού προσδίδει μία ένδειξη της πιθανής σταθερότητας του νανο-κολλοειδούς συστήματος. Για ηλεκτροστατικώς σταθεροποιημένα εναιωρήματα και διασπορές, η ελάχιστη του ζ -δυναμικού θα πρέπει να είναι ± 30 mV, και για συνδυασμό στερικής και ηλεκτροστατικής σταθεροποίησης, θα πρέπει να λαμβάνει ελάχιστη τιμή ± 30 mV. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να διερευνηθεί ο ρόλος του ζ -δυναμικού ως μίας παραμέτρου-κλειδιού για την ανίχνευση των αλλαγών στα δομικά συστατικά των λιποσωμάτων, τα πιο κοινά κολλοειδή σωματίδια της Φαρμακευτικής Νανοτεχνολογίας. Για το σκοπό αυτό, τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά αξιολογήθηκαν προσδιορίζοντας την κατανομή μεγέθους και το ζ -δυναμικό δύο λιποσωματικών εναιωρημάτων, τα οποία παρασκευάστηκαν από φωσφολιπίδια ίδιας χημικής δομής, αλλά διαφορετικού βαθμού καθαρότητας. Η υδροδυναμική διάμετρος των δύο λιποσωματικών εναιωρημάτων δεν άλλαξε, ενώ το ζ -δυναμικό παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση. Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το ζ -δυναμικό θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως μία ένδειξη της νανο-κολλοειδούς σταθερότητας, και το οποίο θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη για την ταυτοποίηση της ποιότητας των πρώτων υλών στη Φαρμακευτική Βιομηχανία και για την κατανόηση της νανο-κολλοειδούς συμπεριφοράς των φορέων για το σχεδιασμό συστημάτων μεταφοράς φαρμακομορίων.

References

1. Bonacucina G., Cepsi M., Misici-Falsi M., Palmieri G.F. Colloidal Soft Matter as Drug Delivery System. *J. Pharm. Sci.* 98,1-42, 2009.
2. Sabín J., Prieto G., Russo J.M., Hidalgo-Álvarez R., Sarmiento F. Size and stability of liposomes: a possible role of hydration and osmotic forces. *Eur. Phys. J.E.* 20, 401-408, 2006.
3. Sabín J., Prieto G., Messina P.V., Russo J.M., Hidalgo-Álvarez R., Sarmiento F. On the effect of Ca^{2+} and La^{3+} on the colloidal stability of liposomes. *Langmuir* 21, 10968-10975, 2005.
4. Derjaguin B.V., Landau L.D. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of adhesion of strongly charged particles in solution of electrolytes. *Acta Physicochim. URSS* 14, 633-62, 1941.
5. Verwey E.J.B., Overbeek J.Th.G. *Theory of the stability of lyophobic Colloids*. Elsevier, Amsterdam, 1948.
6. Ohki S., Ohshima H. Interaction and aggregation of lipid vesicles (DLVO theory versus modified DLVO theory). *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 14, 27-45, 1999.
7. Ohki S., Arnold K. A mechanism for ion-induced lipid fusion. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 18, 83-97, 2000.
8. Pippa N., Pispas S., Demetzos C. The fractal hologram and elucidation of the structure of liposomal carriers in aqueous and biological media. *Int. J. Pharm.* 430, 65-73, 2012.
9. Pippa N., Pispas S., Demetzos C. The delineation of the morphology of charged liposomal vectors via a fractal analysis in aqueous and biological media: physicochemical and self-assembly studies. *Int. J. Pharm.* 437, 65-73, 2012.
10. Demetzos C. Differential Scanning Calorimetry (DSC): a tool to study the thermal behavior and of lipid bilayer and liposomal stability. *J. Liposome Res.* 18,159-173, 2008.
11. Dokoumetzidis A., Karalis V., Iliadis A., Macheras P. The heterogeneous course of drug transit through the body. *Trends Pharmacol. Sci.* 25,140-6, 2004.
12. Dokoumetzidis A., Macheras P. The changing face of the rate concept in biopharmaceutical sciences: from classical to fractal and finally to fractional. *Pharm. Res.* 28,1229-1232, 2011.
13. Heutault B., Saulnier P., Pech B., Proust J.E., Benoit J.P. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials* 24, 4283-4300, 2003.
14. Alargova R.G., Vakarelsky I.Y., Paunov V.N., Stoyanov S.D., Kralchevsky P.A., Mehreteab A., Brozw G. Properties of amphoteric surfactants studied by ζ -potential measurements with latex particles. *Langmuir* 14, 1996-2003, 1998.
15. Erickson D., Li D., Werner C. An improved method of determining the ζ -potential and surface conductance. *J. Colloid Interface Sci.* 232,,186-197, 2000.
16. Delgado A.V., González-Caballero F., Hunter R.J., Koopal L.K., Lyklema J. Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena. *J. Colloid Interface Sci.* 309, 194-224, 2007
17. Kapoor M., Burgess D.J., Patil S.D. Physicochemical characterization techniques for lipid based delivery systems for siRNA. *Int. J. Pharm.* 427,35-57, 2012.
18. Chen M.L. Lipid excipients and delivery systems for pharmaceutical development: A regulatory perspective. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 768-777, 2008.

Radioimmunotherapy in Patients with non-Hodgkin's Lymphoma (NHL) - Preparation and Administration of [⁹⁰Y] Zevalin - Hospital Experience

Maria Papachristou^{1*}, Aggeliki Georgiou², Anna Kolintou², Despina Kyriaki²,

¹ Department of Nuclear Medicine, General Hospital "Evangelismos",

² Department of Nuclear Medicine, General Hospital "Laiko"

Abstract

Zevalin therapy is a new treatment for NHL which demands a different preparation procedure and administration. The Nuclear Medicine Department of General Hospital "Laiko" had a series of therapies, 10 of those were "multiple" labeling preparation procedures. The preparation of the radiopharmaceutical was based on the labeling of rituximab with [⁹⁰Y]Cl₃ (Kit) and for the quality control, ITL-Chromatography was used. The radiolabelings were 1 to 3 per day. The process is reproducible and provides a consistent quality product for patient administration. "Slow-push" injection (i.v) is the way to administer the drug. The whole procedure is considered to be complexed for the Nuclear Medicine Departments of Hellenic Hospitals.

Introduction

Zevalin (ibritumomab tiuxetan) therapeutic regimen is indicated for the treatment of patients with relapsed or refractory low grade follicular or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma (NHL), including patients with Rituximab refractory follicular NHL¹⁻³. Zevalin is a radioimmunotherapeutic compound and was approved in 2002 in the USA and later in Europe⁴.

Zevalin is distributed as a kit containing all non-radioactive ingredients necessary to produce a single dose of [⁹⁰Y]Zevalin when labeled with the radioactive isotope yttrium-90 [⁹⁰Y], supplied separately as [⁹⁰Y] chloride. The final product contains 2.08 mg ibritumomab tiuxetan in 10 ml⁵⁻⁸.

Ibritumomab is a murine IgG1 kappa monoclonal antibody directed against the CD20 antigen, which is expressed on the surface of normal and malignant B-lymphocytes. Ibritumomab, like Rituximab induces apoptosis in CD20+ B-cell lines in vitro⁹. The chelate tiuxetan which tightly binds [⁹⁰Y] is covalently linked to the amino groups of exposed lysines and arginines contained within the antibody. The beta emission from yttrium induces cellular damage and formation of free radicals in the target and neighboring cells¹⁰. Yttrium-90-ibritumomab tiuxetan produces high rates of clinical response (up to 80%) and durable remissions in patients with NHL, and can be given at standard doses in older patients. The favorable safety profile of the regimen makes it an effective treatment for older patients, who may not otherwise tolerate the adverse events associated with chemotherapy¹¹.

Handling and administrating [⁹⁰Y]Zevalin should be done by professionals and physicians qualified by training and experienced in the safe use of radionuclides¹². This report represents the experience of the experience of the Nuclear Medicine Department of "Laiko" Hospital in preparing, handling and administrating 10 doses of [⁹⁰Y]Ibritumomab tiuxetan (Zevalin) in multi-labeling procedures.

Experimental methods

The Zevalin therapeutic regimen is administered in two steps. Step 1 includes one rituximab ("cold") infusion (i.v 250 mg/m²). Step 2 follows 8 days after and consists a second infusion of rituximab (i.v 250 mg/m²) followed within 4 hours by a [⁹⁰Y]Zevalin

* Corresponding author: Papachristou Maria, e-mail: papacmaria@yahoo.gr

dose (maximum dose 32 mCi, 1200 MBq). Proper aseptic technique and precautions for handling radioactive materials were employed. Appropriate shielding is used during radiolabeling, and use of syringe shield is recommended during administration to the patient.

The radiolabeling of [⁹⁰Y]Zevalin is to be done according to the following directions: i) before labeling allow the contents of the refrigerated carton to reach RT and clean the rubber stoppers of all the vials with a suitable alcohol swab and allow to air dry, ii) prior to initiating the radiolabeling reaction, determine the amount of each component needed, iii) with a 1 ml syringe transfer the sodium acetate volume to the empty reaction vial coating the inner surface by gentle rolling, iv) with a 1 ml syringe transfer the ⁹⁰Y-chloride volume mixing the two solutions as stated above, v) with a 2.5 ml syringe transfer the volume of ibritumomab tiuxetan to the reaction vial mixing carefully not to cause foaming, vi) incubate the mixture for 5 min, vii) with a 10 ml syringe immediately transfer the formulation buffer to the reaction vial.

The procedure to determine the radiochemical purity (RCP) – quality control of the radiopharmaceutical is ITL-Chromatography. Three strips of ITLC-SG paper are used. A small drop of the product is placed at the origin of the strip. The strips are placed into a chromatography chamber with the origin at the bottom and the solvent front at the top. The solvent (0.9 % NaCl) migrates from the bottom of the strip

and the strip is removed from the chamber and the cut in half. The two parts are counted in a g-counter for one minute (CPM). The RC Pos calculated as follows:

$$\% RCP = [cpm \text{ bottom half} / cpm \text{ bottom half} + cpm \text{ top half}] * 100$$

$$\text{average \% rcp} = cpm 1 + cpm 2 + cpm 3 \geq 95 \%$$

The radiochemical purity should be $\geq 95 \%$, if the purity is less than 95% the ITLC should be repeated. If repeat testing confirms that radiochemical purity is $< 95 \%$, the preparation should not be administered. The labeling procedure and the quality control take approximately 50 – 60 min.

Results – Discussion

The labeling of simple dose (1 patient \rightarrow 1 administration) does not present handling problems. For multiple labelings double and triple doses, special programming is needed. The cooperation of the Hematological Clinic is essential because of the administration of rituximab.

The group of three labelings needed great effort. The procedure was 1st labeling – 1st quality control – 1st administration. After the conclusion of the 1st procedure followed the 2nd labeling – 2nd quality control – 2nd administration and then the 3rd labeling – 3rd quality control – 3rd administration. This protocol was followed instead of a “parallel” one because the department owns one set appropriate shielding.

Table 1. Information about the administrated drugs

Patient	% RCP	Labelings (group)	Dose
1	95.6	1	28 mCi (0.4 mCi/Kg)
2	98.13	3	24 mCi (0.3 mCi/Kg)
3	95.06	3	29 mCi (0.4 mCi/Kg)
4	95.5	3	32 mCi (0.4 mCi/Kg)
5	96.2	2	32 mCi (0.4 mCi/Kg)
6	97.31	2	21.2 mCi (0.4 mCi/Kg)
7	95.08	2	32 mCi (0.4 mCi/Kg)
8	98.5	2	30 mCi (0.4 mCi/Kg)
9	95.7	1	32 mCi (0.4 mCi/Kg)
10	98.4	1	32 mCi (0.4 mCi/Kg)

For multiple parallel radiolabelings at least 2 sets of appropriate shielding is needed. Additionally, after the administrations sometimes there are radiospills in the syringe shielding, so to manage multiple administrations, time for disinfecting is needed.

Other problems that might arise are the multiple radio-infections of the clubs and seizers used in the quality control which led in two cases to the repetition of the ITL-Chromatography in order to verify the radiochemical purity of the pharmaceutical.

Information about the administrated drugs, radiolabeled percentage, group of radiolabelings (how many labeling were performed in the same day) and the patient dose is given in Table 1.

The radiochemical purity (average) was about 97%. The dosage of Zevalin for a) patients with platelets > 150000 cell/mm³ is 15 MBq/Kg or 0.4 mCi/Kg up to 100000 and 150000 cells/mm³ the dose is reduced to 11 MBq/Kg or to 0.3 mCi/Kg. Depending on their peripheral blood status, 9 patients were given a 0.4 mCi/Kg and in 1 patient 0.3 mCi/Kg dose of [⁹⁰Y]Zevalin.

[⁹⁰Y]Zevalin is injected intravenously (i.v) over a period of 10 min (“slow-push” injection) using a 10 ml syringe with shielding. After the administrations, no adverse reactions were noted. Generally the most common adverse events reported with Zevalin therapeutic regimen are hematological 6 to 8 weeks after the treatment and are reversible.

Conclusions

[⁹⁰Y]Zevalin provides an alternative treatment for patients with rituximab relapsed or refractory CD20+ follicular B-cell NHL. The cooperation of the Hematological Clinic is important because the first and the second administration of the “cold” rituximab is in the Clinic’s responsibility. The [⁹⁰Y]Zevalin must be infused within four hours after the administration of the “cold” pharmaceutical.

The radiolabeling procedure is complicated for the Nuclear Medicine departments of Greek Hospitals because of the lack of radiopharmacists. The ITL-Chromatography secures quality control for the administrative radiopharmaceuticals. The labelings are reproducible and with good yields. Using the supplied labels, protocols of labelings and dose administrations are kept for further references (follow-ups etc). Worksheets with the date and the time of preparation, the total activity and volumes added, are very important for the procedure especially in cases of multiple administrations.

Ραδιοανοσοθεραπεία σε Ασθενείς με non-Hodgkin Λέμφωμα - Παρασκευή και Χορήγηση του [⁹⁰Y] Zevalin - Νοσοκομειακή Εμπειρία

Μαρία Παπαχρίστου^{1*}, Αγγελική Γεωργίου², Άννα Κολίντου², Δέσποινα Κυριάκη²

¹ Εργαστήριο Παρασκευής Ραδιοφαρμάκων, Τμήμα Πυρηνικής Ιατρικής ΓΝΑ «Εναγγελισμός»,
² Τμήμα Πυρηνικής Ιατρικής ΓΝΑ «Λαϊκό»

Περίληψη

Η θεραπεία με Zevalin είναι μια νέα θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών με NHL η οποία έχει ιδιαίτερητα ως προς την διαδικασία και την χορήγηση. Στο Τμήμα Πυρηνικής Ιατρικής του ΓΝΑ «Λαϊκό» πραγματοποιήθηκε μια σειρά από θεραπείες, οι 10 από τις οποίες έγιναν ως «πολλαπλές» ραδιοεπισημάνσεις. Η παρασκευή του ραδιοσκευάσματος βασίζεται στην επισήμανση του μονοκλωνικού αντισώματος rituximab με χλωριούχο [90Y] (Kit) και ο ποιοτικός έλεγχος γίνεται με χρωματογραφία ITLC. Οι πολλαπλές επισημάνσεις έγιναν σε ομάδες δύο έως τριών την ημέρα. Η διαδικασία είναι επαναλήψιμη, παρέχοντας συστηματικά ποιοτικό προϊόν για χορήγηση στον ασθενή. Ο τρόπος χορήγησης είναι ενδοφλεβίως με «Slow-push» ένεση περί τα 10 λεπτά. Η όλη διαδικασία θεωρείται ιδιαίτερα πολύπλοκη για τα δεδομένα των Τμημάτων της Πυρηνικής Ιατρικής των Ελληνικών Νοσοκομείων.

References

1. Chamarty M.R., Williams S.C., Moadel R.M.. Radioimmunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma: from the 'magic bullets' to 'radioactive magic bullets'. *Yale J. Biol. Med.* 84,391-407, 2011.
2. Krasner C., Joyce R.M. Zevalin: ⁹⁰Yttrium labeled anti-CD20 (ibritumomab tiuxetan) a new treatment for non-Hodgkin's lymphoma. *Curr. Pharmaceut. Biotechnol.* 2, 341-349, 2001
3. Hou Y., Wang H.-Q. Ba Y. Rituximab, gemcitabine, cisplatin, and dexamethasone in patients with refractory or relapsed aggressive B-cell lymphoma, *Med Oncol.* 29, 2409-2416 2012.
4. Emmanouilides C. Radioimmunotherapy for Non-Hodgkin Lymphoma: Historical Perspective and Current Status, *J. Clin. Exp. Hematopathol.* 47, 43-60 2007.

5. Zevalin® (Ibritumomab Tiuxetan) for the treatment of non – Hodgkin's lymphoma. US Monograph 2002.
6. Zevalin, Cell Therapeutics Inc, Seattle, WA, and Schering AG, Berlin, Germany; 2002
7. Zevalin® product information, Schering AG, 14432 Berlin, Germany 2002.
8. Rituxan (Rituximab). Full prescribing information. San Diego, CA, USA: IDEC Pharmaceuticals Corporation, 2011.
9. Fanale MA, Younes A, Monoclonal antibodies in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma, *Drugs*. 67, 333-50, 2007.
10. Wiseman G.A., Kornmehl E., Leigh B., Erwin W.D., Podoloff D.A., Spies S., Sparks R.B., Stabin M.G., Witzig T., White C.A. Radiation dosimetry results and safety correlations from 90Y Ibritumomab Tiuxetan radioimmunotherapy for relapsed or refractory non – Hodgkin's lymphoma: combined data from 4 trials. *J. Nucl. Med.* 44, 465-474, 2003.
11. Emmanouilides C., Witzig T.E., Wiseman G.A., Gordon L.I., Wang H., Schilder R., Saville M.W., Flinn I., Molina A. Safety and efficacy of yttrium-90 ibritumomab tiuxetan in older patients with non-Hodgkin's lymphoma *Cancer Biother. Radiopharm.* 22, 684-91, 2007
12. Wagner H.N., Wiseman G.A., Marcus C.S., Nabi H.A, Nagle C.E., Fink-Bennet D.M., Lamonica D.M. , Peter S. Conti P.S. Lymphoma with 90Y-Labeled Anti-CD20 Monoclonal Antibody *J.Nucl. Med.* 43, 267-272 2002

Δελτίο Τύπου της Ελληνικής Φαρμακευτικής Εταιρείας

Με μεγάλη επιτυχία πραγματοποιήθηκε η επετειακή εκδήλωση «80 χρόνια της Ελληνικής Φαρμακευτικής Εταιρείας», στις 3 Δεκεμβρίου 2012, στη Μεγάλη Αίθουσα Τελετών ΕΚΠΑ.

Την εκδήλωση τίμησαν με την παρουσία τους εκπρόσωποι από την Πανεπιστημιακή Κοινότητα, τον Εθνικό Οργανισμό Φαρμάκων, τον Πανελλήνιο Φαρμακευτικό Σύλλογο, καθώς και τη φαρμακοβιομηχανία.

Την εναρκτήρια ομιλία έκανε ο Καθηγητής του Τμήματος Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ και πρόεδρος της Ελληνικής Φαρμακευτικής Εταιρείας (Ε.Φ.Ε) κ. **Κωνσταντίνος Δεμέτζος**, ο οποίος παρουσίασε το όραμα και τις δραστηριότητες της Ε.Φ.Ε, κάνοντας και μια σύντομη ιστορική αναδρομή.

Στην ψηφιοποίηση των αρχείων της Ε.Φ.Ε και στους νέους στόχους αναφέρθηκε η κα **Τζούλια Αττά-Πολίτον**, Αναπλ. Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας ΕΚΠΑ και Β' αντιπρόεδρος της Ελληνικής Φαρμακευτικής Εταιρείας.

Στη συνέχεια, η Καθηγήτρια και Α' Αντιπρόεδρος της Ελληνικής Φαρμακευτικής Εταιρείας, και **Άννα Τσαντίλη-Κακούλιδον** αναφέρθηκε στις δραστηριότητες της Ευρωπαϊκής Ομοσπονδίας των Φαρμακευτικών Επιστημών (EUFEPS) και την ελληνική συμμετοχή σε αυτές και κάλεσε στο βήμα τον **Professor Lennart Denker**, πρόεδρο της EUFEPS. Ο Professor **Lennart Denker** ανέπτυξε στην ομιλία του το επίκαιρο θέμα **«Embryo, Fetus, Child: are they at risk upon drug treatment?»**. Παρατίθεται η περίληψη της ομιλίας στο τέλος του δελτίου. Μετά το τέλος της ομιλίας, ο πρόεδρος της Ε.Φ.Ε Καθηγητής κ. **Κωνσταντίνος Δεμέτζος** πρόσφερε στον Professor **Lennart Denker** ένα δώρο-ενθύμιο της παρουσίας του στην εκδήλωση.

Χαιρετισμό απηγόρωναν οι κ.κ.: **Μαρία Σκουρόλακον**, Επίκ. Καθηγήτρια Τμήματος Διαιτολογίας Χαροκόπειου Πανεπιστημίου και Α' Αντιπρόεδρος ΕΟΦ, **Παναγιώτης Μαράκος**, Καθηγητής και Αναπλ. Πρόεδρος Τμήματος Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ, **Ενρένιος Κοκκάλον**, Καθηγητής και Πρόεδρος Τμήματος Φαρμακευτικής Α.Π.Θ, και **Σωτήριος Νικολαρόπουλος**, Αναπλ. Καθηγητής και Πρόεδρος Τμήματος Φαρμακευτικής Πανεπιστημίου Πατρών.

Ιδιαίτερα όμορφη ήταν η στιγμή που τον «λόγο» πήρε η μεικτή χορωδία Πανεπιστημίου Αθηνών, ερμηνεύοντας έργα του Μάνου Χατζιδάκι υπό τη διεύθυνση του κ. Σάββα Ρακιντζάκη.

Embryo, Fetus, Child: are they at risk upon drug treatment?

Lennart Dencker,
Professor of Toxicology, Uppsala University,
Uppsala, Sweden
President EUFEPS

Abstract of the lecture presented at the Day Meeting for the celebration of 80 years from the foundation of the Hellenic Pharmaceutical Society.

Ever since the Thalidomide catastrophe in the early 1960ies, there has been concern that new drugs would have the potential of harming the developing individual in utero. Therefore test of potential drugs are performed in pregnant animals, to reveal possible teratogenic effects before introduction in the market.

Embryonic development is characterized by the expression of a multitude of developmentally important genes at a given strength, in the right cells and right in time. A comparison from every-day life may be the performance of a symphony, where speed and the order of the different instruments to appear, the strength of their expression, and not playing false is most important for the full enjoyment. Exposure to several chemicals during pregnancy may disturb this delicate orchestration, such as anticancer drugs, anti-epileptics, antihypertensive drugs, retinoids and in alcoholism.

Chemicals may exert hormonal (disturbing) effects, changing development of e.g. sexual organs and behavior. These and other findings have focused attention to epigenetic mechanisms, meaning disturbance of the complicated machinery regulating the expression of genes (the orchestration). If this is disturbed early in life, it may affect disease patterns of the individual for the rest of its life. One additional example of such disturbances is that in animal models, exposure of newborn rats to anesthetics, regularly used in surgery of babies, can affect behavior of the rats later in life.

The practical implications of our knowledge in this field is that one should avoid unnecessary use of drug during pregnancy, adhere to lowest possible therapeutic doses if treatment is necessary (such as in epilepsy), and practice anti-conception when applicable.

May 19-23, 2013 Camerino, Italy**31st Camerino-Cyprus-Noordwijkerhout Symposium**<http://www.unicam.it/farmacia/symposium/index.html>**Organized by:**

School of Pharmacy - University of Camerino
Divisione di Chimica Farmaceutica Società Chimica Italiana

Contact persons:**Prof. Mario Giannella**:

Tel: +39 0737 402 237
Fax: +39 0737 637 345

Email: secretariat.camerino@unicam.it

Prof. Dr H. Timmerman

Tel: +31 71 576 27 91
Fax: +31 71 364 65 56
Email: henktim@planet.nl

* * *

June 12-15, 2013, Athens, Greece**MEDICTA 2013, 11th Mediterranean Conference on Calorimetry and Thermal Analysis**<http://www.hsta.gr/medicta2013/>**organized by:** Hellenic Society of Thermal Analysis**Contact person:**

Vicky Delidimitriou
tel: (+30) 210 2715032
fax: (+30) 210 27114437
Email: vicky@kprovoli.gr,

* * *

June 23-26, 2013 San Francisco, US**Frontiers in Medicinal Chemistry**<http://wizard.musc.edu/frontiers2013.html>

Co-organised by the European Federation for Medicinal Chemistry and the Division of Medicinal Chemistry of ACS.

Organizing Committee:**Jeff Zablocki, Ph.D. (USA)****Patrick M. Woster, Ph.D. (USA)****Koen Augustyns, Ph.D. (Belgium)****Anders Karlen (Sweden)****Ulrich Stilz (Germany)****June 30 - July 3, 2013 Bologna, Italy****24th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis (PBA 2013)**<http://www.pba2013.org>**Contact person:****Carlo Bertucci** (Chairman)

Tel: +39 051 209 97 31

Fax: +39 051 209 97 34

Email: carlo.bertucci@unibo.it**Organized by:**

Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie,
Università di Bologna

Organised by:

Division of Medicinal Chemistry of the Italian Chemical Society (Società Chimica Italiana) (Italy)

* * *

June 30 - July 4, 2013 Lublin, Poland**VIIIth Joint Meeting on Medicinal Chemistry****Organized by:**

The Polish Society of Medicinal Chemistry and Prof. Dariusz Matosiuk Chairman of the Organizing Committee

Contact person:

Prof. Dariusz Matosiuk
Tel: +48 81 535 73 55
Fax: +48 81 535 73 55
Email: darek.matosiuk@am.lublin.pl

Organised by:

Polish Society of Medicinal Chemistry (Poland)

* * *

September 26-28 2013, Athens, Greece**5th BBBB International Conference**www.bbbb-eufeps.org**Organized by:**

EUFEPS, Hellenic Society of Medicinal Chemistry, Hellenic Pharmaceutical Society

Contact person:**Prof. Panos Macheras,**

Tel: +30 210 7274026

Fax: +30 210 7274027

e-mail: macheras@pharm.uoa.gr

5th

BBBB International Conference

From Drug Discovery and Formulation Strategies

(design-synthesis and preclinical testing, delivery systems, nanotechnology, biopharmaceuticals, biosimilars, generics-bioequivalence)

To Pharmacokinetics-Pharmacodynamics

(metabolism, transporters, pharmacogenomics, biomarkers, drug therapy, individualized therapy, biotherapeutics, PK/PD modeling)

2 congresses
in 1

➤ **26-28 September 2013**
Athens-Greece

➤ Metropolitan Hotel



NATIONAL AND KAPODISTRIAN
UNIVERSITY OF ATHENS



Hellenic
Pharmaceutical Society
H.P.S.



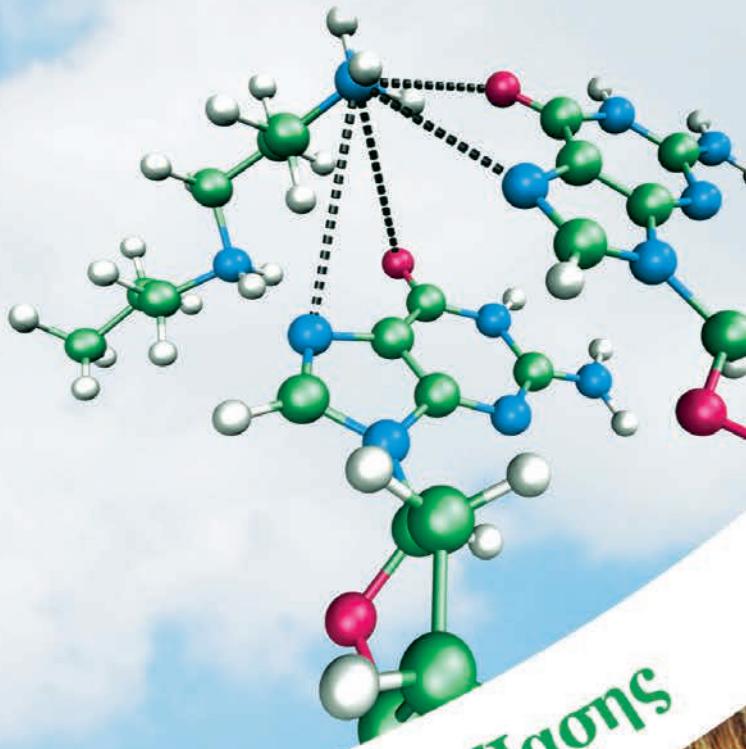
Congress website:
www.bbbb-eufeps.org



1st Announcement



Galenica



Αδιάκοπη Αναζήτηση της Ιασίσ

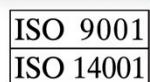


 Galenica a.e.

ΑΘΗΝΑ: Ελευθερίας 4, 145 64 Κηφισιά • Τηλ.: 210 5281700, Fax: 210 5245939 • ΘΕΣ/ΚΗ: Κουντουριώτου & Φασιανού 2 • Τηλ.: 2310 542685 • <http://www.galenica.gr>



30 years of excellence, inspiration, efficiency
Congresses & Events / Travels / Associations



We inspire results

1st klm Peanias-Markopoulou Avenue, 19002, Peania, T: +30 211 1001 777, F: +30 210 6642 116

info@zita-congress.gr, www.zita-congress.gr