

VILNIAUS UNIVERSITETAS

MARIJA JANKUNEC

LIPIDŲ SKYSTAKRISTALIŲ VAISTŲ NEŠIKLIŲ SAVYBIŲ IR JŲ
SĄVEIKŲ SU LĄSTELIŲ MEMBRANŲ MODELIAIS TYRIMAS

Daktaro disertacija

Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

VILNIUS 2013

Disertacija rengta 2008–2012 metais Vilniaus universiteto Biochemijos institute.

Mokslinis vadovas

dr. Justas Barauskas (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija –
04 P).

*”Gyvenime bijoti nereikia nieko – viską
tereikia tik suprasti.”*

Marie Skłodowska-Curie

PRATARMĖ

Ši disertacija skirta įvertinti lipidų mišinių pritaikymą, kuriant vaistų pernešimo sistemas. Joje nagrinėjami įvairių veiksnių daromi poveikiai nešiklių savybėms. Daug dėmesio skiriama lipidų mišinių praktiniam panaudojimui.

Per ketverius metus mano gyvenime atsirado labai daug žmonių, kurie palaikė ir skatino tobulėti. Be mokslinio vadovo, bendradarbių, šeimos ir draugų nepajėgčiau to padaryti viena. Todėl norėčiau išreikšti padėką visiems, vienaip ar kitaip prisidėjusiems rengiant disertaciją.

Pirmiausia nuoširdžiausiai noriu padėkoti savo darbo vadovui dr. **Justui Barauskui**, kuris supažindino ir įtraukė į mokslo pasaulį, ir visada atsakingai skatindavo tobulėti. Esu dėkinga už jo kantrumą, pastabumą, pasitikėjimą, suteiktą galimybę atlikti įdomius mokslinius tyrimus ir palaikymą bei visapusišką pagalbą ruošiant disertaciją, už geranoriškumą, kantrybę ir supratimą.

Bendradarbiavimas turbūt svarbiausias moksle, džiaugiuosi turėdama galimybę dirbti su žymiausiais savo srities specialistais **Vitaly Kocherbitov** (Malmės universitetas, Švedija) ir **Daniel Topgaard** (Lundo universitetas, Švedija). Už suteiktą pagalbą esu dėkinga projekto partneriams – farmacinei įmonei Camurus AB (Lundas, Švedija): **Markus Johnsson** ir **Fredrik Tiberg**. Už mokslinį bendradarbiavimą nuoširdžiai dėkoju straipsnių bendrautoriams **Camilla Cervin**, **Debby P. Chang** ir **Tommy Nylander**. Esu dėkinga už techninę pagalbą atliekant MKReD matavimus MAX-lab (Lundas, Švedija) komandai: **Yngve Cerenius**, **Tomás Plivelic** ir **Dörthe Haase**. Dėkoju už pagalbą, atliekant kai kuriuos matavimus mūsų laboratorijos studentams: **Marijai Špandyrevai**, **Kristinai Ribokaitei** ir **Egidijui Šimoliūnui**. Dėkoju Malmės ir Lundo universitetų doktorantėms už akimirkas po darbų: **Yanai**, **Vidai**, **Sannai**, **Ninai** ir **Mariannai**. Dėkoju visiems esamiems ir buvusiems Vilniaus universiteto Biochemijos instituto doktorantams: **Editai**, **Rimai**, **Tadui**, **Mariui**, **Mindaugui** už malonias kavos pertraukėles.

Už sudarytas sąlygas (suteiktas laboratorines patalpas ir galimybę naudotis laboratoriniu inventoriumi) dėkoju Vilniaus universiteto Biochemijos instituto Bioelektrochemijos ir biospektroskopijos skyriaus kolektyvui. Taip pat už suteiktą pagalbą dėkoju prof. dr. **Zofijai Babickienei**, staklininkui **Juozui Puzui** ir stiklapūčiui **Kazimierui Vitkauskui**.

Atskiri dėkingumo žodžiai skiriami už finansinę paramą šio darbo vykdymui: Lietuvos valstybiniam mokslo ir studijų fondui (**LVMŠF**); the **Camurus Lipid Research Foundation**; Švedijos instituto **VISBY** programai; Lietuvos Mokslo Tarybai (**LMT**).

Pačius šilčiausius žodžius skiriu savo tėvams už pasitikėjimą, paramą, kantrybę ir supratimą bei už smagius, džiazo įkvėptus pirmadienius savo draugams **Ievai**, **Remigijui**, **Indrei**.

TURINYS

PRATARMĖ	4
SANTRUMPŲ SĄRAŠAS ir ŽYMĖJIMAI	7
ĮVADAS	9
<i>I skyrius. LITERATŪROS APŽVALGA</i>	14
1. Vaistų nešikliai	14
1.1. <i>In situ</i> besiformuojantys nešikliai	16
1.2. Koloidiniai vaistų nešikliai	20
2. Lipidų savitvarka	27
2.1. Fizikocheminės fazių savybės	27
2.2. Lipido ir vandens mišinių skystakristalės fazės	31
2.3. Disperguotų lipidų skystakristalių fazių nanodalelių fizikocheminės savybės	37
3. Lipidų skystųjų kristalų fazės vaistų pernašoje	40
4. Disperguotų lipidų skystakristalių fazių nanodalelių vaistų nešikliai	45
5. Perspektyvos ir įžvalgos	48
<i>II skyrius. MEDŽIAGOS ir METODAI</i>	50
1. Cheminės medžiagos	50
2. Lipidų skystakristalių fazių pirmtakai	52
3. Lipidų skystakristalės fazės	53
4. Disperguotų skystakristalių fazių nanodalelės	53
5. Fosfolipidų liposomų paruošimas	55
6. Lipidų skystakristalių nanodalelių sąveika su eritrocitais	56
7. Fluoresceino <i>in vitro</i> išėjimas	56
8. Mažojo kampo rentgeno spindulių difrakcija	58
9. Dinaminė šviesos sklaida ir ζ potencialas	60
10. Fluorescenciniai metodai	61
11. Elipsometrija	64
12. Kriogeninė transmisinė elektroninė mikroskopija	66

13. Konfokalinė mikroskopija -----	67
<i>III skyrius. REZULTATAI ir jų APTARIMAS</i> -----	68
1. Lipidų sojos fosfatidilcholino ir glicerolio dioleato mišinių fazių elgsena -----	68
1.1. Tirpiklio įtaka-----	69
1.2. Fazių elgsena vandens pertekliuje -----	71
1.3. Temperatūros įtaka-----	80
1.4. Skystakristalio monolito brinkimas-----	85
1.5. Skystakristalio monolito brinkimo eigos tyrimas-----	87
1.6. Modelinės medžiagos įterpimas-----	90
1.7. Funkcija ir fluoresceino <i>in vitro</i> išėjimas-----	93
1.8. Lipidų skystakristalių fazių elgsenos apibendrinimas -----	98
2. Disperguotų SPC/GDO mišinių skystakristalių fazių nanodalelės-----	100
2.1. SPC:GDO/P80 mišinių struktūros tyrimas -----	100
2.2. Dydžio ir krūvio kontrolė -----	105
2.3. Adsorbcija ant hidrofobinio, hidrofilinio ir katijoninio silicio paviršių-----	106
2.4. Susilieėjimas su fosfolipidų liposomomis -----	113
2.5. Sąveikos su eritrocitais -----	118
2.6. Glicerolio monooleato koncentracijos įtaka-----	121
2.7. Sąveikų su skirtingais ląstelių membranų modeliais apibendrinimas -----	127
IŠVADOS -----	128
PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA-----	129
LITERATŪROS SĄRAŠAS-----	131

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS ir ŽYMĖJIMAI

<i>2D-H₂</i>	dvimačio periodiškumo atvirkštinė heksagoninė fazė
<i>3D-H₂</i>	trimačio periodiškumo atvirkštinė heksagoninė fazė
APTES	3-aminopropiltrietskisilanas
BPMP	begaliniai periodiniai minimalūs paviršiai
<i>d</i>	tarpplokštuminis kartotinis atstumas
DAG	diaciliniai gliceroliai
DGMO	diglicerolio monooleatas
DHPE	1,2-diheksadekanoil- <i>sn</i> -glicerolio-3-fosfoetanolamino trietilamonio druska
DMOCS	dimetiloktilchlorsilanas
DOPC	1,2-dioleoil- <i>sn</i> -glicerolio-3-fosfocholinas
DOPE-PEG	dioleoilfosfatidiletanolamino-poli(etileno glikolis)
F127	triblokinis kopolimeras polietileno oksidas-polipropileno oksidas-polietileno oksidas, Pluronic F127, PEO ₉₈ -PPO ₆₇ -PEO ₉₈
<i>Fd3m</i>	centruotų paviršių kubinė fazė
Fluo	fluoresceino dinatrio druska
FREP	Fioresterio rezonansinė energijos pernaša
GDO	glicerolio dioleatas
GMO	glicerolio monooleatas
<i>ghs</i>	glaudus heksagoninis supakavimas
<i>I₂</i>	atvirkštinė kubinė micelių fazė
KF	5-(6) – karboksifluoresceinas
KLN	kietosios lipidų nanodalelės
<i>KPP</i>	kritinis pakavimo parametras
Krio-TEM	kriogeninė transmisinė elektroninė mikroskopija
<i>L₂</i>	atvirkštinių micelių fazė
LSKN	lipidų skystakristalės nanodalelės

L_{α}	skystųjų kristalų lamelinė fazė
MAG	monoaciliniai gliceroliai
MKReD	mažojo kampo rentgeno spindulių difrakcija
NBD-PE	N-(7-nitrobenzo-2-oksa-1,3-diazol-4-il)-1,2-diheksadekanoil- <i>sn</i> -glicerolio-3-fosfoetanolamino trietilamonio druska
NLN	nanosuktūriniai lipidiniai nešikliai
$P6_3/mmc$	3D heksagoninės fazės erdvinė grupė
P80	Polioksitileno (20) sorbitano monooleatas, Polisorbatas 80, stabilizuojantis agentas, emulsiklis
PC	fosfatidilcholinas
PdI	polidispersiškumo indeksas
PEG	polietilenglikolis
PEO	polietileno oksidas
PLA	polipieno rūgštis
PLGA	poli(D,L-laktido-koglikolidas)
q	sklaidos vektorius
SEVPS	save emulsifikuojančios vaistų pernešimo sistemos
SK	skystasis kristalas, skystakristalis
SPC	sojos fosfatidilcholinas
V_2	besitęsianti atvirkštinė kubinė fazė
VitE	vitaminas E, α – tokoferolis
VPS	vaistų pernešimo sistemos

ĮVADAS

Ilgėjanti gyvenimo trukmė, greitas žmogaus gyvenimo tempas skatina ieškoti veiksnių, kurie užtikrintų geresnę gyvenimo kokybę. Mažesnės vaistų dozės, ilgesnis ir efektyvesnis jų veikimas, vaistų šalutinių poveikių sumažėjimas ligoniui – tai vaistų pernešimo sistemų savybės, dėl kurių mažėja ligonio patiriamas diskomfortas ar skausmas ir tokiu būdu gerėja gyvenimo kokybės rodiklis. Lipidų vaistų nešikliai užima tik nežymią vaistų pernešimų sistemų tobulinamų technologijų dalį. Lipidai vandeninėje terpėje susitvarko į funkcines atvirkštines fazes. Jau dešimtmečius žinoma, jog atvirkštinės fosfolipidų fazės stabilios vandeninėje aplinkoje (Luzzati, 1968). Tokios nelamelinės skystųjų kristalų (SK) fazės geba atpalaiduoti biologiškai aktyviąją medžiagą, reaguodamos į supančią aplinką. Lipidų nelamelinių fazių nešikliai pasižymi biologiniu skaidymu, jautrios medžiagos apsauga ir kontroliuojamo išėjimo savybėmis. Taip pat lipidų skystųjų kristalų fazės tinka membraninių baltymų įterpimui ir jų kristalizacijai (Li ir Caffrey, 2011).

Žinoma, jog klampios atvirkštinės SK fazės vandens pertekliuje, pvz., heksagoninė ir besitęsianti kubinė (Shah ir kt., 2001), tinka lėtam aktyviųjų medžiagų išėjimui iš skystakristalio monolito. Glicerolio monooleato mišiniai plačiai tirinėjami būtent dėl jų formuojamos kubinės fazės savybių (Lutton, 1965; Hyde ir kt., 1984; Qiu ir Caffrey, 2000). Tačiau tokių vieno lipido mišinių fazinę elgseną veikia įterpiamos vaistinės medžiagos. Tikėtina, jog dviejų lipidų mišiniai turėtų būti kur kas pranašesni bei patvaresni pokyčiams. Vienas iš tokių yra dviejų nesočiųjų lipidų (pvz., dioleoilo) fosfatidilcholino ir glicerolio dioleato (GDO) mišinys. Vienas fosfatidilcholinas vandenyje formuoja skystąją lamelinę skystųjų kristalų fazę (L_a) (Bergenstahl ir Stenius, 1987), o glicerolio dioleatas atvirkštinę micelių fazę (L_2) (Borné ir kt., 2000). Todėl tikimasi, jog šie lipidų mišiniai formuos nelamelinių fazių įvairovę.

Šiame darbe dviejose atskirose dalyse nagrinėjamos lipidų sojos fosfatidilcholino (SPC)/GDO mišinių skystųjų kristalų fazės (SK monolitas) ir disperguotų fazių nanodalelės (LSKN). Pirmiau aptariami SK monolito pirmtakai, kurie tinka poodiniam suleidimui, todėl svarbu išsiaiškinti kokius fazinius virsmus pereina susiformavęs SK monolitas. Sumodeliuojamos atitinkamos dalinės ir visiškos hidratacijos sąlygos. Kuriant vaistų nešiklius lemiamuoju veiksnium tampa ne tik hidratacijos, temperatūros ar įterptos vaistinės medžiagos veikiami struktūriniai pokyčiai. Pateikiama sąsaja tarp skystųjų kristalų struktūros ir aktyviųjų medžiagų išėjimo iš jų funkcijos.

Skystakristalių fazių panaudojimą oraliniam, intraveniniam ar per nosį vaistų pernešimui riboja jų makroskopinis dydis ir didelis pirmtakų klampumas. Todėl greitai suvokta, jog maži šių fazių fragmentai, t.y. nanodalelės, puikiai tinka tokiai pernašai. Neseniai pristatytas SPC, GDO ir Polisorbato 80 mišinys parenteriniam vaistų pernešimui (Johnsson ir kt., 2006 a), sukonstruotas konkrečiai stabilių nelamelinių LSKN paruošimui (Cervin ir kt., 2009). Tik keliuose tyrimuose nagrinėjamas ryšys tarp lipidinių vaistų nešiklių fizikinių ir cheminių savybių bei jų sąveikos su modelinėmis biologinėmis membranomis (Svensson ir kt., 2008; Vandoolaeghe ir kt., 2006, 2008, 2009 a ir b). Vis dar trūksta nanodalelių adsorbcijos ant skirtingų, nuo silicio iki biologinių membranų modelių, paviršių fundamentalių tyrimų. Todėl šiame darbe nagrinėjamas paviršiaus chemijos, tirpalo savybių ir dalelių dydžio poveikis LSKN elgsenai sąlyčio riboje. Šiuo atveju, atsižvelgiama į nanodalelių stabilumą laikymo, transportavimo ir tikslios adsorbcijos metu. Tokiu būdu bus įmanoma panaudoti šias daleles, atitinkamai, funkcinių paviršių dengimui ir biologiškai aktyviųjų medžiagų pernešimui. Sukuriamos atitinkamų sąveikų su skirtingais paviršiais modelinės sąlygos.

Šie tyrimų rezultatai leis spręsti apie tolimesnę analizuotų lipidų mišinių panaudojimą, kuriant aktyviųjų biologinių medžiagų nešiklius. Atsižvelgus į tai,

suformuluotas pagrindinis šio darbo tikslas bei darbo uždaviniai šiam tikslui įgyvendinti.

DARBO TIKSLAS ir UŽDAVINIAI:

Šio tiriamojo darbo tikslas – lipidų skystakristalių vaistų nešiklių, suformuluotų sojos fosfatidilcholino (SPC), glicerolio dioleato (GDO) ir vandens pagrindu, struktūrinių savybių ir sąveikų su skirtingais paviršiais tyrimas. Tokiam tikslui įgyvendinti suformuluoti šie uždaviniai:

1. Detaliai ištirti lipidų SPC/GDO mišinių fazinius virsmus vandeniniuose tirpaluose.
2. Nustatyti temperatūros poveikį lipidų SPC/GDO skystųjų kristalų fazių virsmams.
3. Įvertinti lipidų SPC/GDO skystųjų kristalų fazių monolito nanostruktūros įtaką uždelstam fluoresceino išėjimui.
4. Ištirti disperguotų lipidų SPC/GDO skystųjų kristalų fazių nanodalelių adsorbcijos pobūdį ant hidrofobinio, hidrofilinio ir katijoninio silicio paviršių.
5. Įvertinti disperguotų lipidų SPC/GDO skystųjų kristalų fazių nanodalelių susilieimo efektyvumą su fosfolipidų liposomomis ir jų hemolizinį poveikį ir palyginti su monogliceridų ir digliceridų mišinių formuojamomis nanodalelėmis.
6. Nustatyti glicerolio monooleato koncentracijos įtaką disperguotų lipidų SPC/GDO skystųjų kristalų fazių nanodalelių susilieimo stipriui su fosfolipidų liposomomis ir hemolizei.

MOKSLINIS NAUJUMAS

Dviejų lipidų sojos fosfatidilcholino ir diacilglicerolio (daugiausiai GDO) mišinių fazinė elgsena pirmąkart aprašyta Orädd ir kt. (1995). Tačiau ši lipidų SPC/GDO mišinių prieštaringa fazinė diagrama sunkiajame vandenyje nėra tiksli, su nenustatytomis dviejų ir trijų fazių sritimis. Šie mišiniai yra patrauklūs ir perspektyvūs dėl formuojamų savitvarkių struktūrų. Tam tikslui, šiame darbe detaliai aprašyta naujai sukonstruota lipidų SPC/GDO mišinių fazinė elgsena

tinkamesnėmis fiziologinėmis sąlygomis. Struktūrinės vaistų nešiklio savybės susietos su aktyviosios medžiagos išėjimo profiliu. Tokiu būdu taps lengviau programuoti ir sukonstruoti norimų savybių vaistų nešiklį.

Lipidų skystakristalės nanodalelės geba pernešti lipofilinius ir vandenyje tirpstančius junginius intraveniniu būdu. Svarbu, jog tokie nešikliai nepasižymėtų hemoliziniu aktyvumu, t.y. būtų saugūs ir organizmo toleruojami. Šiame darbe nustatyta, jog lipidų SPC/GDO mišinių skystakristalės nanodalelės pasižymi žemu hemoliziniu aktyvumu ir labiau nei kiti tirti lipidų mišiniai tinka intraveniniam vaistų pernešimui. Pirmąkart ištirtos šių lipidų skystakristalių nanodalelių adsorbcinės savybės ant skirtingų paviršių.

GINAMIEJI TEIGINIAI:

- Keičiant sojos fosfatidilcholino ir glicerolio dioleato tarpusavio santykį, kontroliuojamas ir keičiamas įterptos medžiagos uždelstas išėjimas.
- Keičiant paviršiaus savybes, galima kontroliuoti disperguotų lipidų SPC/GDO skystakristalių fazių nanodalelių adsorbciją.
- Disperguotų lipidų skystakristalių fazių nanodalelių tyrimai *in vitro* leidžia prognozuoti jų elgesį *in vivo*.

Disertacijos aprobacija

Disertacijos tema išspausdinti 4 moksliniai straipsniai (įtraukti į Thomson ISI sąrašą). Darbo rezultatai pristatyti 6 tarptautinėse ir 2 nacionalinėse mokslinėse konferencijose.

Asmeninis autorės indėlis

Didžioji eksperimentinio darbo dalis buvo atlikta pačios autorės. Autorė savarankiškai paruošė skystųjų kristalų fazių pirmtakų mėginius: fazių elgsenos tyrimams dalinės ir visiškos hidratacijos sąlygomis; skystųjų kristalų monolito brinkimo kinetikos; modelinės medžiagos įterpimo ir lipidų SPC/GDO/P80

mišinių tyrimams. Autorė savarankiškai atliko matavimus mažojo kampo rengenų spindulių difrakcijos metodu MAX-Lab laboratorijoje (Lundo universitetas, Švedija) bei dalyvavo analizuojant šiuos duomenis. Taip pat koordinavo, planavo bei atliko disperguotų lipidų skystakristalių fazių nanodalelių susiliejimo su fosfolipidų liposomomis tyrimus (Fioresterio rezonansinė energijos pernaša) bei dalyvavo analizuojant duomenis.

Fluoresceino išėjimo iš skystakristalio monolito *in vitro* tyrimus 37 °C temperatūroje atliko dr. Justas Barauskas.

Kiti straipsnių bendra autoriai atliko: disperguotų lipidų skystakristalių fazių nanodalelių dydžio ir krūvio (dinaminės šviesos sklaidos metodas) nustatymą; dalelių morfologijos charakterizavimą (konfokalinė mikroskopija ir kriogeninė transmisinė elektroninė mikroskopija), adsorbcijos (elipsometrijos metodas) ir hemolizės tyrimus.

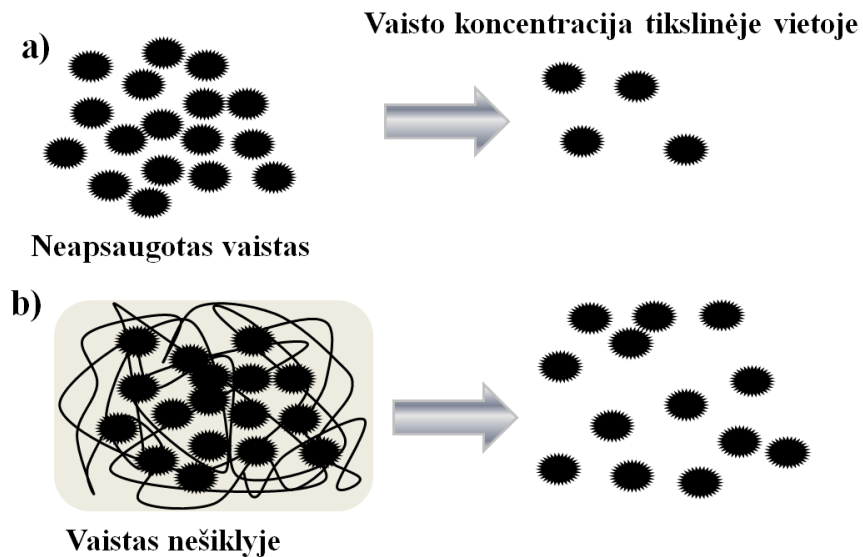
I skyrius. LITERATŪROS APŽVALGA

1. Vaistų nešikliai

Dauguma šiuo metu naudojamų vaistų nesikaupia tiksliniame patologiniame organe, audinyje ar ląstelėje. Dažniausiai, veiklioji farmacinė medžiaga gana tolygiai pasiskirsto po organizmą. Be to, prieš patenkant į veikimo vietą, vaistas turi kirsti daug biologinių kliūčių, tokių kaip kiti organai, ląstelės ir viduląstelinės dalys. Juose aktyvioji medžiaga gali inaktyvuotis arba nepageidaujamai paveikti organus ir audinius, susijusius su patologiniu procesu. Dėl to, siekiant užtikrinti veikliąsias koncentracijas tam tikroje vietoje, reikėtų didinti vaistų kiekius, kurių didžioji dalis yra tiesiog iššvaistoma sveikuose audiniuose. Tokiomis sąlygomis, citotoksiniai ir/arba antigeniniai vaistai gali tapti daugelio neigiamų šalutinių poveikių priežastimi (Barakat ir kt., 2012). Taigi, kaip optimizuoti vaisto farmakologinį poveikį, kartu sumažinant jo toksinį *in vivo* šalutinį poveikį? Lokali vaisto koncentracija ligos pažeistoje vietoje (-ose) turi būti didelė, o kituose netiksliniuose organuose ir audiniuose – mažesnė nei minimalus lygis. Toks tikslas įgyvendinamas, tikslingai pernešant apgaubtus vaistus nešikliuose (Torchilin, 2000; Orive ir kt., 2003). Panašių sistemų privalumus prieš neapsaugotą vaistą vaizduoja schema pateikta **I. 1 paveiksle**.

Vaistų pernešimo sistemų (VPS) tikslas: *pristatyti vaistus „į tinkamą vietą“, „tinkamos koncentracijos“ ir „tinkamu laikotarpiu“*. Jei vaistų pernešimas šių sąlygų neatitinka, pasirenkus tik vartojimo būdą arba toks patekimas sukelia diskomfortą pacientui, taikomos VPS (Ferrari, 2005; Allen ir Cullis, 2004). Vaistų pernešimo sistemos plačiąja prasme – tai mišinys ar įrenginys, užtikrinantis vaisto patekimą į kūną bei pagerinantis jo veiklumą, kontroliuojamas vaisto išėjimą, trukmę ir vietą organizme (Jain, 2008). VPS, pradedant nuo implantuojamų elektroninių prietaisų iki vieno polimero grandinių, privalo būti biologiniu atžvilgiu suderintos su procesais organizme ir pernešamais vaistais. Kliūtys,

atsirandančios dėl mažo vaistų tirpumo, skilimo (aplinkos arba fermentų poveikio), greitų išsivalymo dažnių, nespecifinio toksiškumo, nesugebėjimo prasiskverbti pro biologinius barjerus, taip pat gali būti nustatomos ir šalinamos vaistų pernešimo sistemomis (Allen ir Cullis, 2004).



I. 1 pav. *Vaistų pernešimo sistemų privalumų prieš neapsaugotą vaistą scheminė iliustracija*

Po patekimo į organizmą, laikui bėgant, išlaikoma arba mažėja pirminė vaisto koncentracija: a) akivaizdu, kad neapsaugoto vaisto koncentracija tikslinėje vietoje ženkliai mažesnė nei pradinė; vaistas pasiskirsto po visą kūną; b) nešiklyje apgaubta aktyvioji medžiaga apsaugota nuo išorinių veiksnių (pvz., fermentų)

Vaistų patekimo į organizmą kelias parenkamas priklausomai nuo ligos, pageidaujamo poveikio ir turimo gaminio. Taip pat reikėtų atkreipti dėmesį į vaistų nešikliams keliamus tūrio reikalavimus. Pavyzdžiui, po oda suleidžiamųjų vaistų nešiklių tūris, turėtų būti mažesnis nei 1 ml, – taip mažėja ligoniui sukiamas skausmas ir nepatogumas. Taigi, idealios VPS savybės yra šios: padidina vaisto biologinę tinkamumą; tinkama kontroliuojamam vaistinės medžiagos atpalaidavimui; nepažeidžiant sveikų šeiminių audinių, vaisto pernešimas iki veikimo vietos; užtikrina produkto stabilumą ir įvairių fiziologinių kintamųjų palaikomą pernašą; yra tinkamos plačiai vaistų grupei; lengvai administruojamos ligoniams; saugios ir patikimos; su atitinkamu kaina-veiksmingumas santykiu (Jain, 2008); su geromis tirpinimo savybėmis; idealiai

geba apgaubti vaistus, kurie gali turėti labai skirtingas chemines savybes ir molekulinės mases, taip pat nuo lipofilinių mažų molekulių iki amfifilinių arba hidrofiliinių peptidų bei didesnių baltymų (Tiberg ir kt., 2012). Atkreiptinas dėmesys, kad mažai tirpiųjų vandenyje vaistų pernešimas vis dar tebėra neišspręsta problema.

Vaistų nešikliai skirstomi pagal sudedamųjų dalių cheminę prigimtį, dydį, būvį ir t.t.. Kadangi nėra griežto jų priskyrimo tam tikrai grupei, kartais nešiklis gali atitikti kelias iš jų. Taigi, atsižvelgus į šiame darbe naudojamas nešiklių sistemas, toliau aptariami atitinkami jų analogai:

1. Į poodinį sluoksnį, raumenis ir vidinę kūno ertmę įšvirkščiami implantai, o suleidimo vietoje formuojamas lokalus monolitas.
2. Koloidinės nanostruktūrinės sistemos tinkamos intraveninei vaistų pernašai.

1.1. *In situ* besiformuojantys nešikliai

Vienas iš būdų užtikrinti vaisto nepertraukiamą išėjimą, tai įterpti jį nešiklyje ir implantuoti (suleisti) pacientui. Tokiems veiksams kartais reikalingi chirurginiai metodai ir įleidimo įtaisai. Šių nešiklių medžiagos turi būti biologiškai suderinamos, pvz., naudojami polimerai neturėtų dirginti arba skatinti pūlinio formavimo suleidimo vietoje. Nešiklio patalpinimas po oda vienas iš tinkamesnių nepertraukiamo veikimo pernešimo sistemų administravimo būdų. Tokiu būdu lokalizuojamas vaistų pernešimas paodyje ar raumenyse. Suformuotas monolitas veikia kaip vaistų telkinys, gebantis atpalaiduoti nepertraukiamai. Mišinio savybės nulemia vaisto atpalaidavimo dažnį.

Kaip jau minėta, mažinant paciento diskomfortą, pageidautina, jog suleidžiamo nešiklio pirmtako klampumas būtų kuo mažesnis. Medžiaga turėtų būti skysto būvio, tada įmanoma naudoti plonesnes adatas. Tokie skysti mišiniai, kurie po suleidimo pereina į (pusiau-) kietą monolitinį telkinį (pvz., *in situ* besiformuojantys hidrogeliai (Ruel-Gariépy ir Leroux, 2004)), turi privalumų dar

dėl kelių kitų priežasčių. Pirma, palyginus su kietaisiais implantais, kuriems būtina vietinė nejautra ir chirurginė intervencija, ne tokia skausminga ir mažesnė intervencija į organizmą, patogesnė priežiūra. Antra, įleidimo vietoje vaistų išėjimas iš nešiklių paprastai trunka nuo vienos dienos iki kelių mėnesių. Taip pat ekonominiu požiūriu: ilgėja nešikliuose apgaubtų vaistų gyvavimo trukmė (Packhaeuser ir kt., 2004).

Suleidžiami *in situ* besiformuojantys implantai, iš vaistų apgaubiančio pusiau kieto ar tirpale esančio polimero, po suleidimo patiria cheminius ar fizinius virsmus. Priklausomai nuo monolito formavimo mechanizmo *in vivo*, jie skirstomi į keturias grupes (žr. I.1 lentelę): 1) *in situ* polimero nusėdimas (pvz., poli (D,L-laktido-koglikolidas) (PLGA)); 2) termoplastinės pastos (pvz., poli(orto esteris) (POE), triblokiniai kopolimerai (PLGA-PEG-PLGA)); 3) *in situ* susikryžiausio polimero sistemos (pvz., hidrogelių termogelinė sistema); 4) *in situ* kietėjantys organogeliai (pvz., sorbitano monostearatas, L-alanino turintys organogeliai, skystakristalės fazės) (Hatefi ir Amsden, 2002). Veiksniai, skatinantys šių nešiklių virsmus *in situ* po suleidimo: *i. temperatūra* (kūno temperatūra aukštesnė nei laikymo); *ii. skiedimas* (mišinys dažnai po suleidimo apsuptas vandens pertekliaus); *iii. druskos* (dėl fiziologinės elektrolito koncentracijos įmanoma ekranuoti elektrostazines sąveikas mišinyje); *iv. pH* (fiziologinis pH suleidimo vietoje gali arba sumažinti, arba padidinti elektrostazines sąveikas mišinyje); ir *v. kalcio jonų koncentracija* (stiprus Ca^{2+} surišimas su karboksilo grupėmis, gali pakeisti elektrostatinę sąveiką mišinyje po suleidimo) (Malmsten, 2007).

Polimerinės sistemos naudoja biologiškai suskaidomus poli(pieno rūgštis) (PLA) ar poli(laktido-koglikolido) kopolimerus. Dėl savo savybių: pusiau pralaidūs, biologiškai tinkami ir skaidūs – šie polimerai tinka formuoti suleidžiamus monolitus (Makadia ir Siegel, 2011). Didžiausias PLGA turinčių sistemų trūkumas – tirpiklis (pvz., *N*-metil-2-pirrolidonas) ir sterilumo užtikrinimas. SABER[®] (sacharozės acetato izobutiratas) technologija – viena iš

PLGA mišinių alternatyvų (Okumu ir kt., 2002). Vis dėlto taip pat reikia tirpiklio sudedamųjų dalių išsklaidymui bei stebimas staigus aktyviųjų medžiagų išėjimas, nebent į mišinį pridedami atitinkami PLA kiekiai.

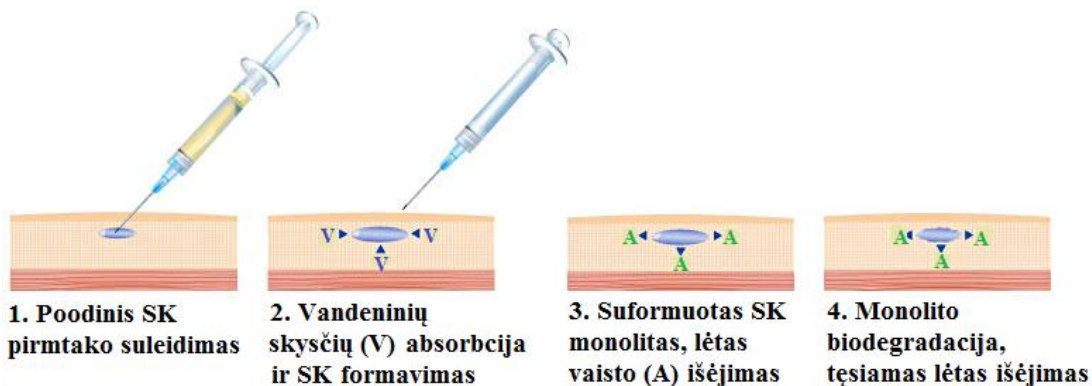
I. 1 lentelė. Biologiškai skaidžios *in situ* kietakūnį formuojančios polimerinės pernešimo sistemos (Hatefi ir Amsden, 2002)

Būdingos problemos	Sudedamosios dalys
<i>Termoplastinės pastos</i>	
aukšta temperatūra įleidimo metu	PLA, PLGA ir PCL; iniciatoriai – alkoholiai
<i>In situ susikryžjavusios sistemos</i>	
reakcijos metu išsiskiria neleistinas šilumos kiekis; medžiagos „perdegimas“ išėjimo metu; toksiški nesureagavę monomerai; dėl didelio susikryžjavimo laipsnio polimeras susitraukia ir tampa trapiu; trumpas apvalkalo gyvavimo laikas; ilgai trunkantis skilimas	katalizatorius – alavo oktoatas; PLA, PDLLA ir PCL oligomerai, pradininkai – polihidroksiliniai alkoholiai ir peroksidai kaip gydomasis veiksnys; alginatas su Ca ²⁺ – gelinimo veiksnys; PGA, PLA, PCL ir PEG, iniciatoriai – eozino dažas, šviesos šaltinis (pvz., UV arba lazeris)
<i>In situ polimero nusėdimas</i>	
medžiagos „perdegimas“ išėjimo metu; naudojami organiniai tirpikliai; aliejų stabilumas ir vašků švarumas	PDLLA, PCL ir PLA. Tirpikliai DMSO ar NMP; NIPAAM, PEG, PLA, PLGA ir chitozanas, Poloksamerai
<i>Organogeliai</i>	
toksinio poveikio duomenų trūkumas; fazių atsiskyrimas	aliejai tokie kaip riešutų aliejus ir vašakai (pvz., Beeswax ir Pericerol)

Pastaba: PLA – polipieno rūgštis, PLGA – poli(D,L-laktido-koglikolidas, PCL – polikaprolaktonas, PDLLA – poli-D,L-pieno rūgštis, PEG – polietilenglikolis, NIPAAM – N-izopropilakrilamidas, DMSO – dimetilsulfoksidas, NMP – N-metil-2-pirrolidonas.

Taigi, tapo aišku, jog reikėtų kitų technologijų platformų, kuriomis galima būtų įveikti bent kelis trūkumus. Viena iš tokių skystakristalės fazės, kuriose įmanoma įterpti didelius skirtingų fizikocheminių savybių turinčių biologiškai aktyviųjų medžiagų kiekius. Dėl jų dažnai didelio klampumo, skystieji kristalai tinka lokalizuotam vaistų pernešimui, pvz., poodiniame sluoksnyje ar raumenyse, kūno ertmėse, ant odos ar skirtingų gleivinių paviršių. Žinoma, jog klampios

atvirkštinės liotropinės SK fazės vandens pertekliuje, pvz., heksagoninė (H_2) ir besitęsianti kubinė (V_2) (Shah ir kt., 2001), tinka lėtam aktyviųjų medžiagų išėjimui iš SK monolito. Tokiose struktūrose, talpinančiose labai didelį paviršių (Ericsson ir kt., 1991), įmanoma papildomai įterpti hidrofilines, lipofilines ir/ar amfifilines molekules, tačiau įterpti junginiai neturėtų veikti liotropinės fazės struktūros. Hidrofilinės molekulės išsidėstys arti lipido polinės galvutės arba gausiame vandens plote. Lipofilinės molekulės pasiskirstys tarp lipido nepolinių uodegų (domenuose) ir amfifilinės lokalizuosis arti sąlyčio ribos (Sagalowicz ir kt., 2006). Pašalinės molekulės įterpimas gali paveikti savitvarkės struktūros savybes. Tinkamai parinkus vandens pertekliuje skystuosius kristalus formuojančias medžiagas, gaunamas stabilus SK monolitas (Boyd ir kt., 2006). Tačiau tokių sistemų dėl jų didelio klampumo paruošimas, laikymas ir administravimas gana sudėtingas. Todėl naudojami mažo klampumo mišiniai, po suleidimo virstantys didelio klampumo nešikliais.



I. 2 pav. Scheminė FluidCrystal® (Camurus AB, Švedija) mišinių virsmų vizualizacija. Pateikti procesai: 1) poodinis suleidimas; 2) supančios aplinkos vandeninių skysčių absorbcija ir lipidų savitvarka; 3) aktyviosios medžiagos išėjimas; ir, veikiant lipazei, monolito suskaidymas ir erozija. SK: skystasis kristalas; V: vanduo; A: aktyvioji medžiaga (adaptuota pagal Tiberg ir Joabsson, 2010).

Vieno iš nešiklių, formuojančių lipidų skystakristales fazes, pavyzdžių – FluidCrystal® (Camurus AB, Švedija) (žr. I. 2 pav.). Tai skystas, mažos klampos tirpalas, kuris transformuojasi į skystojo kristalo monolitą *in situ*, absorbuodamas kūno skysčius suleidimo vietoje. SK monolito formavimosi procesas vyksta iš išorės į vidų, tokiu būdu nešiklio transformacijos metu apgaubta biologiškai

aktyvioji medžiaga išeina į supančią aplinką. FluidCrystal® VPS viso proceso metu – nuo suleidimo iki galutinio suskaidymo įveikia tradicinius šalutinius veiksnius: aukštą pradinį po suleidimo vaistų išėjimą (vaistų „sprogimas“), menką vaistų stabilumą ir apgaubimą monolito nanoporose. Tokiu būdu mišinys tinka peptidų ir baltymų, bei stipriai veikiančių mažų molekulių junginių ilgalaikiam parenteriniam pernešimui. Vienkartinės dozės suleidimas tolygus dienos, savaitės ar net mėnesio vaisto poreikiui užtikrinti. Palyginus su kitomis monolitų technologijomis, tokiomis kaip polimero mikrosferos, šis mišinys pasižymi šiais privalumais: *i)* tinka naudoti iš karto, nereikalauja atkūrimo, *ii)* stabilus, *iii)* lengvai didinami gamybos mastai, naudojant standartinius farmacinius gamybos etapus ir įrangą (Tiberg ir Johnsson, 2011).

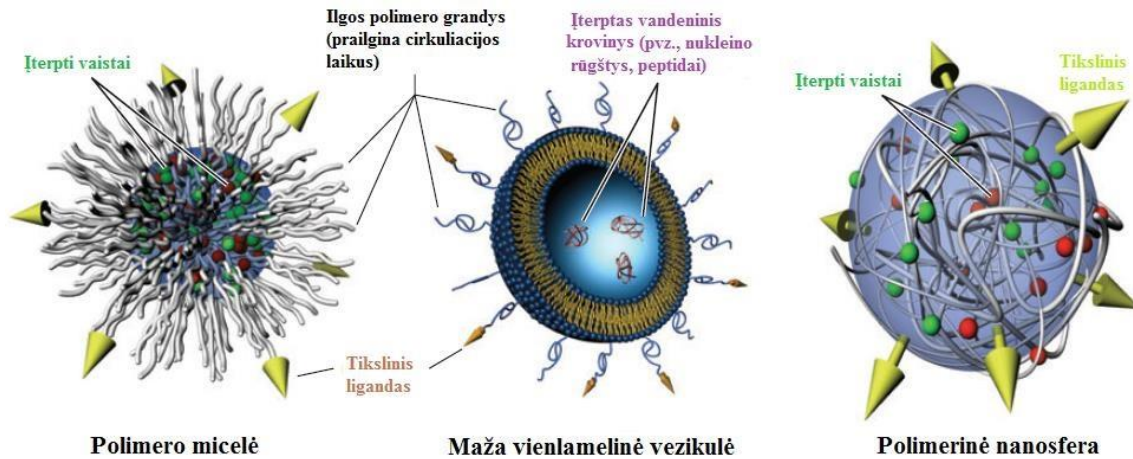
1.2. Koloidiniai vaistų nešikliai

Pastaraisiais dešimtmečiais atsirado nauji farmacijos gaminiai – peptidai ir baltymai, kurie dažniausiai pasižymi dideliais dydžiais, trumpu gyvavimo laiku plazmoje, aukštu pašalinimo dažniu (lengvai fermentų arba kūno skysčių suardomi), ribotu perėjimu per ląstelės membranas ir žemu biologiniu tinkamumu, patenkant per žarnyną. Taip pat dažnai šie vaistiniai junginiai negali pasiekti tikslinės veikimo vietos. Dėl to, gydant šiomis molekulėmis, reikėtų dažnų injekcijų visą gydymo laikotarpį (Hu ir kt., 2004). Įveikti šias problemas galėtų vaistų apgaubimas nešiklyje (žr. I. 3 pav.) (Martins ir kt., 2007).

Intraveninei pernašai skirtos dispersijos su aktyviosiomis sudėtinėmis dalimis turėtų būti koloidinės, kurių dalelių dydis pageidautina būtų mažesnis nei 1 μm. Dispersijų su didesnėmis dalelėmis koloidinis stabilumas mažesnis. Dar, gerai apibūdinamose sistemose lengviau kontroliuoti aktyviųjų medžiagų išėjimą (Johnsson ir Tiberg, 2006).

Vaistai koloidiniais nešikliais pernešami įvairiais patekimo būdais: lokalizuotiems taikymams ant odos ir gleivinės bei sisteminiam naudojimui parenteriniu arba inhaliacijos būdu. Koloidinių nešiklių pavyzdžiai: polimerinės

nanodalelės (De Jong ir Borm, 2008); mikroemulsijos, liposomos, kietosios lipidų nanodalelės (KLN), nanostruktūriniai lipidiniai nešikliai (NLN) ir save emulsifikuojančios vaistų pernešimo sistemos (SEVPS) (Schmidt, 2008); hidrogeliai ir mikrosferos (Almeida ir Souto, 2007); kubinės skystakristalės nanodalelės (Yang ir kt., 2004). Tačiau tik dalis tokių nešiklių rinką pasiekę farmacijos gaminiai.



I. 3 pav. *Nedetalizuotas liposomų, micelių ir polimerinių nanostruktūrinių koloidinių nešiklių vaizdas*

Pateiktos struktūros naudojamos tiksliniam, vietai specifiniam ir kontroliuojamam vaistų pernešimui ir atpalaidavimui (adaptuota pagal Moghimi ir kt., 2012).

Lipidinių nešiklių panaudojimas vaistų pernašoje iš tikrųjų daug žadantis reiškinys medicinoje. Tačiau sistemų, tokių kaip micelės, mikroemulsijos, emulsijos ir liposomos taikymą riboja kelios priežastys. Visų pirma, micelių ir emulsijų sistemų naudojimą riboja mažai vandenyje tirpiųjų medžiagų tirpinimas. Liposomos naudojamos vandenyje tirpiųjų junginių įterpimui, tačiau dažniausiai reikia, pvz., pH gradientų, kurie riboja tokių junginių apgaubimą. Taigi, naujos lipidų superstruktūros – nelamelinės skystųjų kristalų fazės ir disperguotų fazių nanodalelės turėtų būti pranašesnės (Tiberg ir Joabsson, 2008). Toliau, aptariami koloidiniai vaistų nešikliai, kurie tinka intraveniniam vaistų pernešimui, tarp kurių pabrėžiami lipidiniai vaistų nešikliai.

1. Polimerinės nanodalelės (biologiškai skaidūs polimerai PLGA ir PLA) egzistuoja įvairiose formose nuo nanosferų iki dendrimerų, dėl didelės vandens

dalies tinka jautrių baltymų pernešimui. Dėl savo polimerinės prigimties nanodalelės supančioje aplinkoje (pvz., tam tikrose srityse, audiniuose ar ląstelių tipuose) struktūriškai kinta. Šių nešiklių **trūkumai**: maža hidrofobinių vaistų tirpumo talpa; sudėtingas paruošimas ir vaisto įterpimas; reikalingas tirpiklis; probleminis gamybos mastų didinimas (De Jong ir Borm, 2008; Schmidt, 2008; Underwood ir van Eps, 2012).

2. Neorganiniai koloidiniai nešikliai

2.1. Metalų nanodalelės (aukso, sidabro, vario), 1–150 nm dydžio, stabilios, tinka įvairių funkcinių grupių prijungimui, biologiniam vaizdinimui ir vėžio termoterapijai, taip pat tiksliniam vaistų pernešimui. Tačiau toksiškos, sukelia chronines kvėpavimo problemas, slopina natrio kalio ATP-azes, ilgai išlieka organizme (Underwood ir van Eps, 2012).

2.2. Magnetinių nanodalelių (pvz., geležies oksidas) aukštas in vivo skilimas, tačiau toksiškos ir kaupiasi organizme (Jain, 2012).

2.3. Kvantiniai taškai (neorganiniai kristalai), < 10 nm dydžio, tinka tiksliniam pernešimui į organus ir audinius; biologiniam vaizdinimui, bet citotoksiški ir lėtai pasišalina (De Jong ir Borm, 2008; Underwood ir van Eps, 2012).

3. Micelės, mikroemulsijos ir emulsijos – paprasčiausios savitvarkės lipidų ir paviršiaus aktyviųjų medžiagų struktūros su plačiu panaudojimu farmaciniuose gaminiuose. Šiomis sistemomis dažniausiai išsprendžiamas vaistų tirpumas. Mažas tirpumas, o kartu ir jų vangus tirpinimas, labai sumažina daugelio vandenyje netirpiųjų vaistų biologinį prieinamumą. Idealiu atveju, mišinys turėtų būti įsisavintas kartu su ištirpintu vaistu per virškinamąjį traktą. Ypač efektyvios save emulsifikuojančių vaistų pristatymo sistemos. SEVPS mikroemulsijos dažniausiai negalima naudoti parenteriniam vaistų pernešimui dėl didelio pagalbinių medžiagų aktyvumo.

3.1. Micelėse, 5–100 nm dydžio, (natūralios ir sintetinės paviršiaus aktyviosios medžiagos, kopolimerai, lipidai) padidinamas vaistų tirpumas, tinka

kontroliuojamam ir tiksliniam pernešimui; galimas ligando-tarpininko įterpimas; dėl mažo ir pastovaus dydžio kaupiasi naviko audiniuose; stabilios bei lengvai paruošiamos, žema paviršiaus aktyviosios medžiagos koncentracija. Bet jautrios skiedimui, o taip pat po administravimo tikimybė skilti į sudedamąsias dalis (Malmsten, 2006; Schmidt, 2008; Underwood ir van Eps, 2012).

3.2. Emulsijos, > 0,5 μm dydžio, (aliejai, paviršiaus aktyviosios medžiagos, vandeninė fazė) užgožia kartų vaistų skonį, bei pagerina atitinkamų vaistų biologinį tinkamumą, vartojant oraliniu būdu. Taip pat emulsijos plačiai taikomos paviršių paruošimuose. Toksiškos dėl paviršiaus aktyviųjų medžiagų, bei ribotai panaudojamos dėl galimo embolų formavimo (Schmidt, 2008).

3.3. Mikroemulsijos, < 100 nm dydžio, (aliejus, paviršiaus aktyviosios medžiagos, kopaviršiaus aktyviosios medžiagos, kotirpiniai, vandeninė fazė) tinka mažai vandenyje tirpiųjų ir hidrolitiškai imlių junginių tirpinimui; intraveniniu būdu administruojamų vaistų sukeliama sudirginimo, skausmo, ar toksiškumo mažinimui; ilgalaikiam išėjimui; tiksliniam vaistų pernešimui į įvairius organus. Pasižymi ilgalaikiu stabilumu, lengvu paruošimu, mažu klampumu, ilgu apvalkalo gyvavimo laiku. Vis dėlto toksiškos dėl didelių paviršiaus aktyviosios medžiagos koncentracijų ir ribotas jų parenterinis panaudojimas (Malmsten, 2006; Schmidt, 2008, Israelachvili, 1994).

3.4. Save emulsifikuojančios vaistų pernešimo sistemos, 50–300 nm dydžio, apibūdinamos kaip natūralių ir sintetinių aliejų, kietųjų ir skystųjų paviršiaus aktyviųjų medžiagų, arba kitaip vieno ar daugiau hidrofilinių tirpiklių ir kotirpiklių/paviršiaus aktyviosios medžiagos izotropinis mišinys. Jis padidina įterpto vaisto stabilumą ir absorbcijos greitį, tinka mažai vandenyje tirpiųjų vaistų tirpinimui ir pernešimui oraliniu būdu. Šie mišiniai greitai suskaidomi, tačiau yra toksiški dėl didelių paviršiaus aktyviųjų medžiagų koncentracijų (Fanun, 2010). Po lengvo sumaišymo ir vėliau vykstančio praskiedimo vandeninėje terpėje, pvz., virškinimo trakto skysčiuose, šios sistemos suformuos „aliejus vandenyje“ emulsijas arba mikroemulsijas. Palyginus su emulsijomis, jautriomis ir

metastabiliomis disperguotomis formomis, SEVPS lengvai paruošiami ir fiziškai stabilūs mišiniai. Taigi, šios sistemos siūlo lipofiliniams junginiams geresnę greitį ir absorbcijos laipsnį (Gursoy ir Benita, 2004; Pouton ir Porter, 2008)

4. Liposomos – išskaidytos, uždarytos lamelinės fazės vandens pertekliuje. Biologiškai aktyviosios medžiagos priklausomai nuo prigimties lokalizuojamos vidinėje vandeninėje šerdyje arba dvisluoksnyje. Dvisluoksniu mechaninės savybės ir pralaidumas nulemti pasirinktomis sudedamosiomis dalimis. Šiuo metu liposomos naudojamos dėl dviejų priežasčių: siekiant sumažinti „laisvojo vaisto“ proporcijas ir taip išvengti toksinio poveikio, bei modifikuoti vaisto farmakokinetinį ir biologinį pasiskirstymo profilį. Liposomose gaminys neaktyvus, o pats nešiklis kontroliuoja vaisto aktyvumą ir toksiškumą. Liposomų paviršius, dėl ilgesnės gyvavimo trukmės plazmoje, stabilizuojamas polimero grandinėmis, pvz., PEG-lipidais. Tiksliniam pernešimui liposomų struktūros apgaubiamos antikūniais.

4.1. Liposomos, 20 nm–2 μm dydžio, (amfifiliniai fosfolipidai, polimerai, cholesterolis, paviršiaus aktyviosios medžiagos) mažina toksinį vaistų kaupimąsi netiksliniuose audiniuose, biologiškai suderinamos ir tinkamos, tinka genų pernešimui; puikus biologinis suderinamumas. Liposomose galima pernešti lipofilinius ir tirpius vandenyje vaistus. Tinkamos hidrofiliųjų vaistų įterpimui, kanalų baltymai gali būti įterpiami be aktyvumo praradimo. Atkreiptinas dėmesys, kad liposomos nestabilios, sudėtingas jų paruošimas. Fosfolipidų skilimas autooksidacijos metu ir padidėjęs pralaidumas skatina apgaubtos medžiagos išėjimą. Staigus iškritimas iš cirkuliacijos kraujotakoje dėl sunaudojimo retikuloendotelinėje sistemoje, pirmiausiai kepenyse (Malmsten, 2006; Martins ir kt., 2007; Schmidt, 2008; Underwood ir van Eps, 2012).

4.2. Niosomos, < 1 μm dydžio, (nejoninių paviršiaus aktyviųjų medžiagų vezikulės) tinka ilgalaikiam vaistų išėjimui iš nešiklio; vaistų apsaugai nuo skilimo, biologiškai tinkamos ir skaidžios, neimunogeninės, jų mažas toksiškumas, jas panaudojant yra galimybė įterpti hidrofiliinį ir lipofilinį vaistą,

gerina liposomų neigiamas savybes. Dėl fizinio nestabilumo, susiliejimo tikimybės, agregacijos ir pirmalaikio įterpto vaisto ištekėjimo, ribotai tinka pernašai (Schmidt, 2008).

4.3. Ilgos cirkuliacijos – erdviškai stabilizuotos liposomos, 100–200 nm dydžio, (PEG, hidrofiliniai glikolipidai), kurios gali būti modeliuojamos priklausomai nuo poreikių; stabilios, atsparios agregacijai; joms būdingas ilgas cirkuliacijos laikas kraujotakoje; gali būti modifikuotos įvairiais ligandais, tinka tiksliniam vaistų pernešimui. Tačiau šias sistemas sudėtinga paruošti ir didelės jų gamybos sąnaudos, o patekusios intraveniniu būdu gali būti hiperjautrumo priežastimi (Puri ir kt., 2009; Moghimi ir kt., 2012).

5. Kietosios lipidų nanodalelės (KLN) ir nanostruktūriniai lipidų nešikliai (NLN) (kietieji lipidai kambario temperatūroje ir paviršiaus aktyviosios medžiagos). KLN (50 nm – 1 μm) – netoksinė koloidinė sistema, kurioje efektyviai įterpiami lipofiliniai ar hidrofiliniai vaistai. Tokioje lipidų struktūroje hidrofobiniai vaistai lieka stabilūs; tinka jautrių vaistų apsaugai. NLN – antros kartos lipidų nanodalelės (iš kietojo lipido ir skystojo lipido (aliejai) mišinio). Galima įterpti didesnius vaistų kiekius dėl ne tokios tvarkingos, netobulos lipidų struktūros formavimo. Struktūros lankstumas modeliuoja vaisto išėjimą, didina vaisto įterpimą. Trūkumai: mažos vaistų pakrovimo talpos; dėl alternatyvių koloidinių struktūrų stabilumo, esančių vandeninėje dispersijoje, sudėtingas laikymas arba pernešimas; mėginio praskiedimas arba vandens pašalinimas gali daryti įtaką sistemos pusiausvyrai; vaistas ištirpinamas arba disperguojamas lipidų kietojoje struktūroje (Malmsten, 2006; Almeida ir Souto, 2007; Martins ir kt., 2007; Schmidt, 2008; Puri ir kt., 2009; Underwood ir van Eps, 2012).

6. Lipidų skystakristalės nanodalelės (LSKN) (heksosomos, fleksosomos, kubosomos) (poliniai amfifiliniai lipidai). Priešingai nei dauguma liposomų, kurios gali formuoti stabilias koloidines dispersijas, dažnai reikia pridėti stabilizuojančio agento į nelamelinių liotropinių skystųjų kristalų dispersijas, kad

būtų užtikrinama, jog dalelės nesukibs ir liks diskrečios. Skystųjų kristalų fazės, išskaidytos vandenyje, pridėjus stabilizatoriaus/emulsiklio formuoja atitinkamos vidinės struktūros submikrometrines minkštas daleles (100–500 nm dydžio) su atitinkama vidine struktūra. LSKN pasižymi dideliu sąlyčio paviršiaus plotu ir mažu klampumu. Įterptos biologiškai aktyviosios molekulės gali paveikti vidinę dalelių tvarką ir keisti jų struktūrą (Amar-Yuli ir kt., 2009). Dėl LSKN nanostruktūros galima įterpti įvairių hidrofiliųjų, hidrofobinių ir amfifiliųjų molekulių. Visi šie junginiai gali būti įterpti žymiai didesniais kiekiais dėl didesnių lipido kiekių dalelei, lyginant su liposomomis, ir dėl labai didelio vidinio paviršiaus ploto, kuris gali būti palankus amfifiliniams vaistams. Mezofazinė nanostruktūra siejama su junginio atpalaidavimo dažniu (Phan ir kt., 2011). Šios nanostruktūros yra termodinamiškai stabilios, biologiškai suderinamos, atitinkamai pasisavinamos ir adhezinės. LSKN tinka pernešti mažoms molekulėms, peptidams ir baltymams, jos būna stabilios vandens pertekliuje (Zeng ir kt., 2012; Garti, 2012). Nors tokių koloidinių struktūrų spektras teoriniu požiūriu nuodugnus, tačiau praktikoje, atsižvelgus į finansinius, saugumo ir norminius reikalavimus, ribojamas šių mišinių naudojimas. Tik ribota dalis lipidų ir paviršiaus aktyviųjų medžiagų gali būti naudojama farmacinių gaminių pernašai parenteriniu būdu be papildomų toksikologinių tyrimų (Strickley, 2004; Chen, 2008). Taip pat reiktų papildomų tyrimų, kad įvertintume LSKN elgseną skirtingomis sąlygomis. Reiktų atsižvelgti į vaisto poveikį vidinei nanodalelių struktūrai, nešiklio talpumą ir sąryšį su išėjimo profiliu. Taip pat papildomais tyrimais turėtų būti įvertinti tokie veiksniai: nešiklio stabilumas ir tikslinis vaisto pernešimas po patekimo į organizmą bei nanostruktūros pokyčiai, siekiant optimizuoti LSKN sąveiką su skirtingais biologiniais paviršiais.

Labai svarbu užtikrinti koloidinių LSKN dispersijų stabilumą, naudojant nešiklius intraveninei pernašai. Kadangi net nežymi nekoloidinių dalelių dalis, po suleidimo gali būti embolijos ar bent neprognozuojamo aktyviosios medžiagos išėjimo priežastimi. Kai kurių disperguotų lipidų mišinių nanodalelės tirpale

išlieka stabilios tik kelis mėnesius. Taigi, reikėtų naujų lipidų mišinių, kurie formuotų koloidines stabilias nanodalelių dispersijas su siauru dydžio pasiskirstymu ir mažu toksiniu poveikiu. Būtent tokios sistemos pavyzdys nagrinėjamas šiame darbe.

2. Lipidų savitvarka

Lipidai – tai riebalų rūgštys ir jų dariniai, bei medžiagos susietos biologiškai sintetiniu ar funkcinu būdu su šiais junginiais (Christie, 1987). Lipidų hidrofilinė „polinė“ grupė chemiškai surišta su viena, dviem ar trimis riebalų rūgščių angliavandenilių grandinėmis. Šie amfifiliniai junginiai skirstomi į paprastuosius ir kompleksinius, sočiuosius ir nesočiuosius bei polinius ir nepolinius. Nepoliniams lipidams, kurie labai silpnai sąveikauja su vandeniu ir nesudaro skystųjų kristalų fazių bei neformuoja monosluoksnio vandenyje, priskiriami trigliceridai (riebalai/aliejai), digliceridai, parafinas, steroliai ir t.t. Amfifiliniai iš prigimties poliniai lipidai, pvz., monogliceridai ir fosfolipidai, sąveikauja stipriau su vandeniu ir formuoja platų nanostruktūrinių savitvarkių struktūrų spektrą, – taip formuojamas stabilus arba nestabilus monosluoksnis. Pagal elgseną vandenyje poliniai lipidai suskirstomi į tris grupes: 1) netirpieji, nebrinkstantys amfifiliniai junginiai; 2) netirpieji, brinkstantys amfifiliniai junginiai; 3) tirpieji amfifiliniai junginiai (su/be liotropiniu mezomorfizmu) (Small, 1968). Poliniai lipidai dar suskirstomi į tris klases: dipolių jonų (cviterjonai), be krūvio (glikolipidai) ir anijoninių.

2.1. Fizikocheminės fazių savybės

Lipidai, kaip ir kitos paviršiaus aktyviosios medžiagos, geba saviorganizuotis į įvairius agregatinius būvius: skystieji kristalai, micelės, emulsijos ir kietieji kristalai. Skystakristalių fazių arba mezofazių (Friedel, 1922), turinčių abiejų skystųjų ir kietųjų kristalų savybes, perversmas įvyko 1950-aisiais, kai Luzzati su kolegomis pradėjo sistemingai tyrinėti muilo ir vandens mišinius

(Luzzati ir kt., 1957; Husson ir kt., 1960) ir vėliau buvo atliekamas daug skirtingų lipidus turinčių liotropinių fazių klasifikavimas (Luzzati, 1968). Liotropinės SK fazės stebimos daugelyje lipidų ir paviršiaus aktyviųjų medžiagų vandeninių mišinių (Larsson, 1989; Lindblom ir Rilfors, 1989; Seddon, 1990 a ir b; Luzzati ir kt., 1993; Luzzati ir Husson, 1962). Tam tikras lipidai arba lipidų derinys gali, priklausomai nuo chemijos ir tarpmolekulinių sąveikų, formuoti įvairias savitvarkes struktūras (žinomas kaip polimorfizmas) su 1-D (pvz., lamelinė (L_a) fazė), 2-D (pvz., heksagoninė (H_1 ar H_2) fazė) ar 3-D (pvz., besitęsianti kubinė fazė) periodiškumu (Rappolt, 2006). Savitvarkė struktūra gali reaguoti į palyginti mažus molekulių arba aplinkos terpės savybių pokyčius. Lipido ir vandens mišinių turtingas polimorfizmas didžia dalimi kontroliuojamas geometrinių molekulių pakavimo apribojimų, kurie dar labiau veikiami temperatūros ir koncentracijos (Seddon ir kt., 1990 b; Lindblom ir Rilfors, 1989).

Fazės formuojamos hidrofobinio atskyrimo poveikio tarp polinių ir nepolinių sričių, todėl svarbi šių regionų struktūrų sąsaja. Struktūrų savitvarka susieta su lipido molekulių geometrija. Plotas vienai molekulei ir sąlyčio ribos kreivumas – tai svarbiausi struktūriniai parametrai. Kreivumas bet kuriame sąlyčio ribos taške apibūdinamas dviem dydžiais: vidutiniu kreiviu H ir Gauso kreivumu K . Šie parametrai susiję su pagrindiniais kreivumais c_1 ir c_2 ($= 1/r_1$ ir $1/r_2$, kai r_1 ir r_2 – pagrindiniai kreivio spinduliai) (Seddon ir kt., 2000):

$$H = \frac{(c_1 + c_2)}{2} \quad (\text{I.1})$$

$$K = c_1 c_2 \quad (\text{I.2})$$

H ir K parametrai pastovūs arba nepastovūs išilgai sąlyčio ribos, taip pat gali būti teigiami, nuliniai arba neigiami (žr. I. 2 lentelę). Pagal susitarimą teigiamas H apibūdina sąlyčio ribos kreivumą, būdingą hidrofobinei grandinės sričiai, o neigiamas H (atvirkštinis vingiuotumas) atitinka kreivumą, būdingą polinei, vandeninei sričiai. K parametro ženklas nulemia sandūros ribos formą (Seddon ir kt., 2000). Tinkamiausia fazes išdėstyti pagal jų vidutinį kreivumą, H ,

sąlyčio riboje tarp polinių ir nepolinių sričių (paprastai netoli tos vietos, kur lipidų polinės grupės susijungusios su angliavandenilių grandinėmis). **I. 4 paveiksle** pateiktas sisteminis H parametro pokytis, judant per diagramą iš dešinės į kairę. H parametras yra surištas su lipidų molekulinę formą (Hyde, 2001), be to, membranos kreivumas taip pat gali būti paaiškinamas Israelachvili (1991) pasiūlytu kritiniu pakavimo parametru (KPP).

I. 2 lentelė. Skirtingų agregatų Gauso sąlyčio ribos vingiuotumas (Seddon ir kt., 2000)

K ženklas	Sąlyčio ribos forma	Agregato pavidalas	Agregato tipas
teigiamas	elipsinė	sfera/elipsoidas	elipsoidinės micelės
nulinis	parabolinė	plokštuma/cilindras	dvisluoksniai/cilindro micelės
neigiamas	hiperbolinė	balno paviršius	besitęsiančios fazės

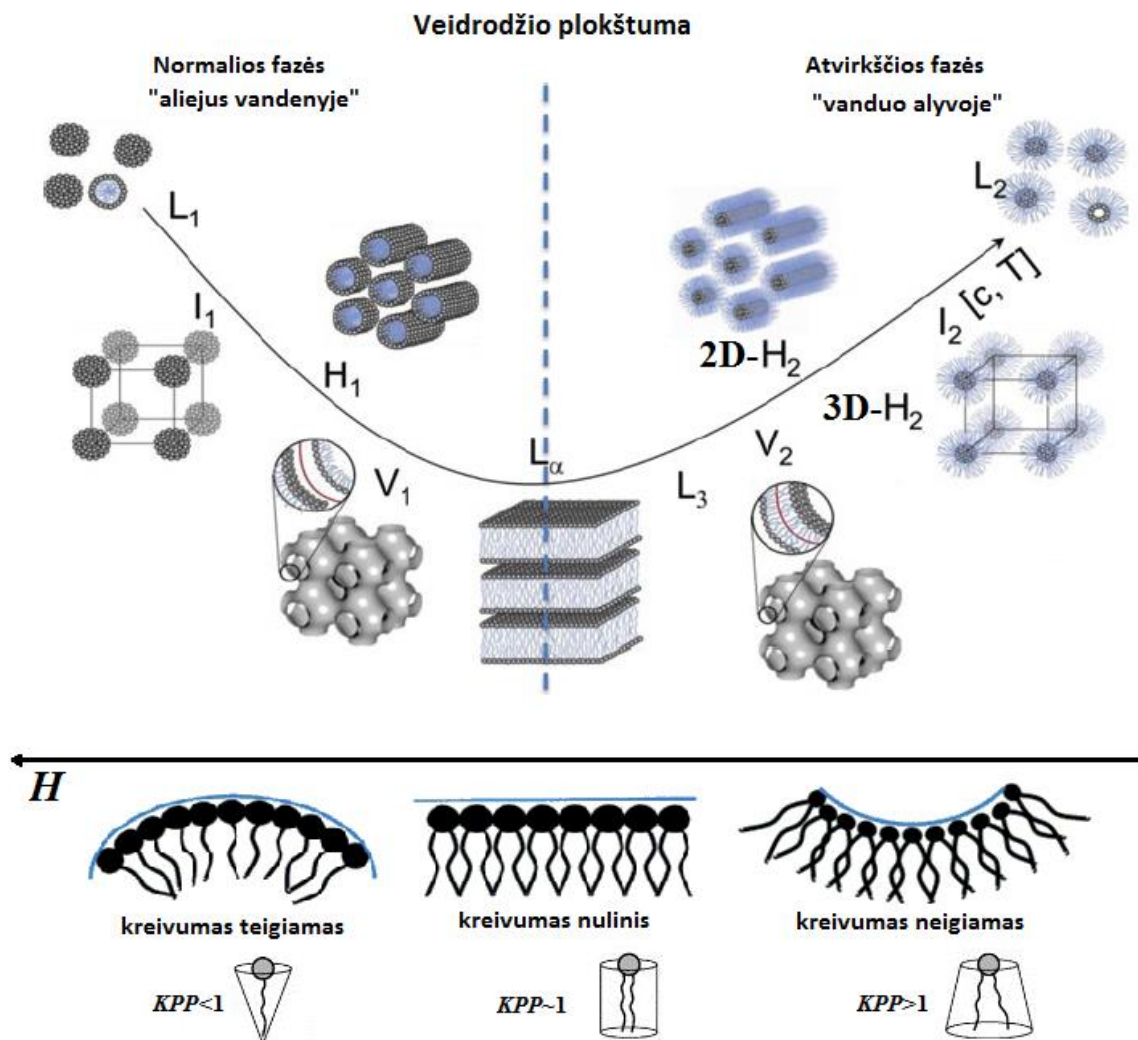
KPP nulemia struktūros morfologiją – tai abstraktus karkasas, susiejantis molekulių parametrus (galvutės plotą, grandinės ilgį ir hidrofobinės uodegos tūrį) ir intensyvius kintamuosius (temperatūrą, joninę jėgą ir t.t.) su amfifilinės medžiagos mikrostruktūromis (Israelachvili, 1991; Israelachvili ir kt., 1976):

$$KPP = \frac{v}{a_0 l_c}, \quad (\text{I.3})$$

kai v ir l_c , atitinkamai, išlydytos hidrofobinės molekulės dalies apimtis ir ilgis, ir a_0 yra efektyvus polinės grupės plotas (Israelachvili ir kt., 1976). KPP naudingas numatant pasirinkto lipido formuojamas fazes, kadangi jis sujungia molekulinę formą ir palankias polinis-nepolinis sąlyčio ribos kreivumo savybes, kritinis pakavimo parametras taip pat sujungia topologiją ir agregato formą. Atvirkščios fazės formuojamos amfifilų su $KPP > 1$ reikšme.

I. 4 paveiksle pavaizduota idealizuota fazių seka, kuri netinka daugeliui lipidų, kai kuriais atvejais galimos papildomos naujų tarpinių fazių struktūros. Akivaizdu, kad perėjimai tarp fazių gali vykti, keičiant tirpiklio (vandens) sudėtį ar pridėjus kitas sudedamąsias dalis, tarp jų, kai kuriais atvejais, ir vaistus.

Idealizuota lipidų fazių seka tinkama priemonė, konstruojant vaistų nešiklius, kai svarbu suprasti, kontroliuoti ir programuoti sistemos fazinius virsmus.



I. 4 pav. Tipinės (idealizuotos) fazių eilės priklausomybė nuo vandens dalies

Taki lamelinė skystakristalė fazė (L_α) gali būti laikoma veidrodžio plokštuma (brūkšninė linija) tarp normalių „aliejus vandenyje“ struktūrų ir atvirkščių „vanduo alyvoje“ struktūrų. Iš abiejų pusių galimas kubinių besitęsiančių (V_1 arba V_2), heksagoninių (H_1 arba H_2), kubinių micelininių (I_1 ar I_2) ir micelininių fazių (L_1 arba L_2), taip pat kitų tarpinių fazių (pvz., „kempinės“, L_3 , fazė) formavimasis. Fazių elgsena gali būti paaiškinta, atsižvelgus į jų kritinį pakavimo parametą (KPP). Liotropinių SK fazių eilė išdėstyta pagal polinės-nepolines dalies sandūros ribos vidutinį paviršinį kreivumą, H (adaptuota pagal Tiberg ir kt., 2012; Seddon ir kt., 2000).

$KPP < 1$ tinka normalioms fazėms (kairėje pusėje, atvirkščio kūgio forma), o $KPP > 1$ tinka atvirkštinėms fazėms (dešinėje pusėje, kūgio forma). Lamelinų fazių KPP yra artimas 1 (cilindro forma). KPP išreiškia agreguoto paviršiaus

kreivumo priklausomybę nuo amfifilinės molekulės formos. Įvairių lipidų formuojamos struktūros yra šios: *atvirkščio kūgio formos lipidai* – detergento molekulės, lizofosfolipidai ir polifosfoinozidai; *cilindrinės formos lipidai* – fosfatidilcholinai ir sfingomielinai; *kūgio formos lipidai* – diacilglicerolis ir fosfatidiletanolaminai (Janmey ir Kinnunen, 2006). Svarbu, kad pakavimo parametras nėra pastovus, o funkcija nuo sistemos kintamųjų, tokių kaip temperatūra, amfifilinio junginio koncentracija ir tirpalo sudėtis. Taigi, pakavimo parametras didėja, didėjant vandens daliai, dėl padidėjusios galvutės hidratacijos, kuri yra viena iš pagrindinių priežasčių fazių eilei (Seddon ir Templer, 1995).

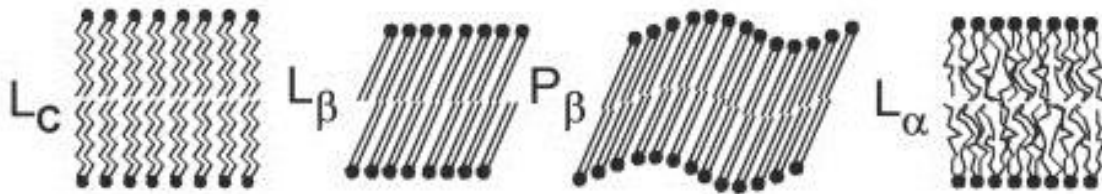
Veiksniai, kurie skatina perėjimus tarp fazių: *lipido cheminės struktūros įtaka*: a) angliavandenilinės grandies ilgėjimas arba grandinių skaičiaus prie polinės galvutės didėjimas skatina hidrofobiškumą ir grandis-grandis sąveikų augimą; vyksta tendencingas atvirkštinių nelamelinių fazių formavimasis; b) lipido galvutei būdingas hidrofiliškumas, efektyvus poliškumas priklauso nuo kelių veiksnių, tokių kaip skirtingų galvučių pusių priėjimas prie vandens, galimybė tiesioginiam galvutė-galvutė ryšiui, sąveikos tarp galvutės ir vandens silpnėjimas; *lipidų mišiniai, tirpiklio įtaka, tirpinio įtaka, fazės metastabilumas, perėjimo kinetika* (temperatūra, pH, joninė jėga) (Seddon, 1996).

Toliau, po veiksnių skatinančių amfifilines molekules sudaryti savitvarkes struktūras apžvalgos, aptarsime jų formuojamas liotropines skystakristales fazes.

2.2. Lipido ir vandens mišinių skystakristalės fazės

Lamelinėje fazėje (ideali mezostruktūra) amfifilinės molekulės susirenka į vandens sluoksniais atskirtas lygiagrečias dvisluoksnes plokštumas, formuojama vienmatė gardelė (Hyde, 2001). **I. 5 paveiksle** pateikti liotropiniuose mišiniuose stebimi skirtingi lamelinės fazės tipai: kristalinė (L_c), gelinė (L_β), skystųjų kristalų, banguota gelinė (P_β). L_β fazė skiriasi nuo L_α fazės anglies grandinių būviu. Iš tikrųjų, L_α fazėje hidrofobinės grandys yra išlydytos, o L_β fazėje jos dalinai kristalinės. L_c fazėje, tvarkingiausioje iš lamelinių, kiekvienos lipidų molekulės

grandys „užšaldytos“. Fosfatidilcholinų lamelinėms fazėms dažnai būdingas priešvirsmas prieš pagrindinį iš L_{β} į L_{α} fazę į taip vadinamą banguotą gelinę fazę (P_{β}) (Cevc, 1993; Lubensky ir MacKintosh, 1993). Lamelinė fazė mažiau klampi negu heksagoninė ar kubinė fazė, bei gali netgi tam tikrose sistemose tekėti (Rappolt, 2006; Luzzati ir Tardieu, 1974).

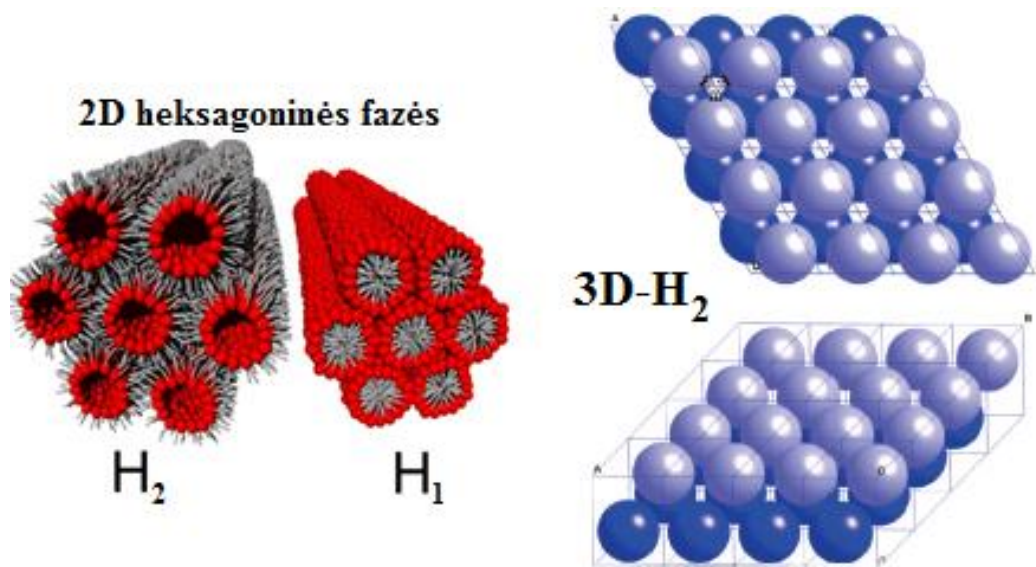


I. 5 pav. Lipidų lamelinės fazės

Pavaizduotos: kristalinė (L_c), gelinė (L_{β}), banguota gelinė (P_{β}) ir skystakristalė (L_{α}) (Winter, 2001).

Paprastos **heksagoninės fazės** (žr. I. 6 pav.) susideda iš tankiai supakuotų cilindrinų micelių, išdėstytų 2D heksagoninėje gardelėje. Palyginti su lamelinėmis mezofazėmis, kurios vienodai išlenktos abiejų hidrofilinių ir hidrofobinių sričių kryptimi, heksagoninės mezofazės demonstruoja du tipus. Normalios topologijos heksagoninės fazės (tipas I, žymėjimas H_1) atveju lipidų cilindrai išdėstyti ištęstinėje vandeninėje matricoje. Atvirkščios heksagoninės fazės (tipas II, žymėjimas H_2) atveju vandeniu užpildyti cilindrai išsidėsto į tęstinę lipidų struktūrą (Amar-Yuli ir kt., 2009). KPP parametras didesnis nei kubinių fazių. Tai anizotropinės, labai klampios, bet ne tokios standžios fazės kaip kubinės (Hyde, 2001). Vienodo dydžio sferos glaudžiai supakuotos (su mažiausiu kiekiu tuščios erdvės) plokštumoje, kai kiekviena sfera liečia kitas šešias bei sudaro taisyklingo heksagono formą. Paprasta heksagoninė gardelė – tai kai šios glaudžiai supakuotos plokštumos (plokštuma eina per sferų „centrus“) išsidėsto tiesiai viena virš kitos. Tačiau tai ne trijų matmenų **glaudus heksagoninis supakavimas** (ghs) (žr. I. 6 pav.). Glaudaus heksagoninio supakavimo struktūros plokštumos privalo būti sudėliotos taip, kad viršutinės plokštumos atomai glaustųsi apatinės plokštumos trikampio „grioveluose“. Pažymėtina, jog yra šeši

tokie „grioveliai“ supantys kiekvieną atomą heksagoninėje plokštumoje, bet tik trys iš jų gali būti uždengiami kitos plokštumos (Hahn, 2005).



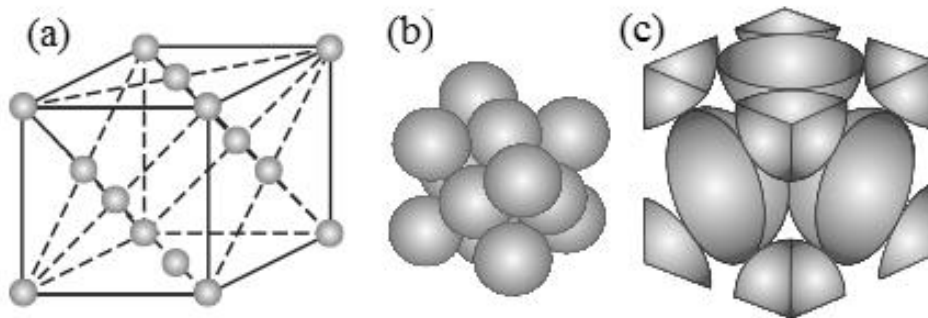
I. 6 pav. Skystakristalių heksagoninių fazių tipai

Kairėje pusėje pateikta lipidų heksagoninių atvirkščios ir normalios topologijos fazių iliustracija. Hidrofilinė galvutė pažymėta raudonai, o angliavandenilių grandinės pilka spalva (Tresset, 2009). Dešinėje pusėje pateiktas nedetalizuotas *ghs* vienodų atvirkštinių micelių ($3D-H_2$) struktūros planas ir perspektyvinis vaizdas. Sferos – tai polinės sritys (vandens centrai ir lipidų galvutės) ir likęs skysčio tūris užpildytas lipido molekulės hidrofobinėmis sritimis. Atspalvių skirtumas tarp sferų sluoksnių parinktas dėl aiškumo (Shearman ir kt., 2009).

Kubinių fazių erdvinė savitvarka sudėtingiausia tarp liotropinių skystųjų kristalų. Trijų matmenų periodiškumą turinčios struktūros skirstomos į micelinės ir besitęsiančios struktūros agregatų tipus. O jų topologija normali (tipas I, „aliejus vandenyje“) ar atvirkštinė (tipas II, „vanduo alyvoje“). *KPP* mažai kinta, judant nuo netvarkingų micelių link tvarkingos kubinės fazės, taigi, fazių perėjimas gali būti apibūdinamas kaip micelių „kristalizacija“. Tai izotropinė, skaidrioji fazė, turinti klampią sandarą, daugeliu atvejų labai standžią. Trys pagrindinės kubinės struktūros: *paprastoji* (po vieną micelę kiekviename kubinės vienetinės gardelės kampe), *centruotų paviršių kubinė* (micelės išsidėsto kampuose ir kiekvienoje vienetinės gardelės pusėje) ir *centruoto tūrio kubinė* (micelės kampuose ir viena micelė vienetinės gardelės centre) (Hyde, 2001; Rummel ir kt., 1998). Dažniausiai kubines fazes galima priskirti net kelioms pagrindinėms struktūroms, tereikia

surasti atitinkančią mažiausią vienetinę gardelę (Laughlin, 1994). Netolydžios **micelių kubinės fazės** (I_1 ar I_2), esančioje tarp micelių ir heksagoninės fazių, pavieniai sferiniai agregatai glaustai supakuoti kubinėje struktūroje.

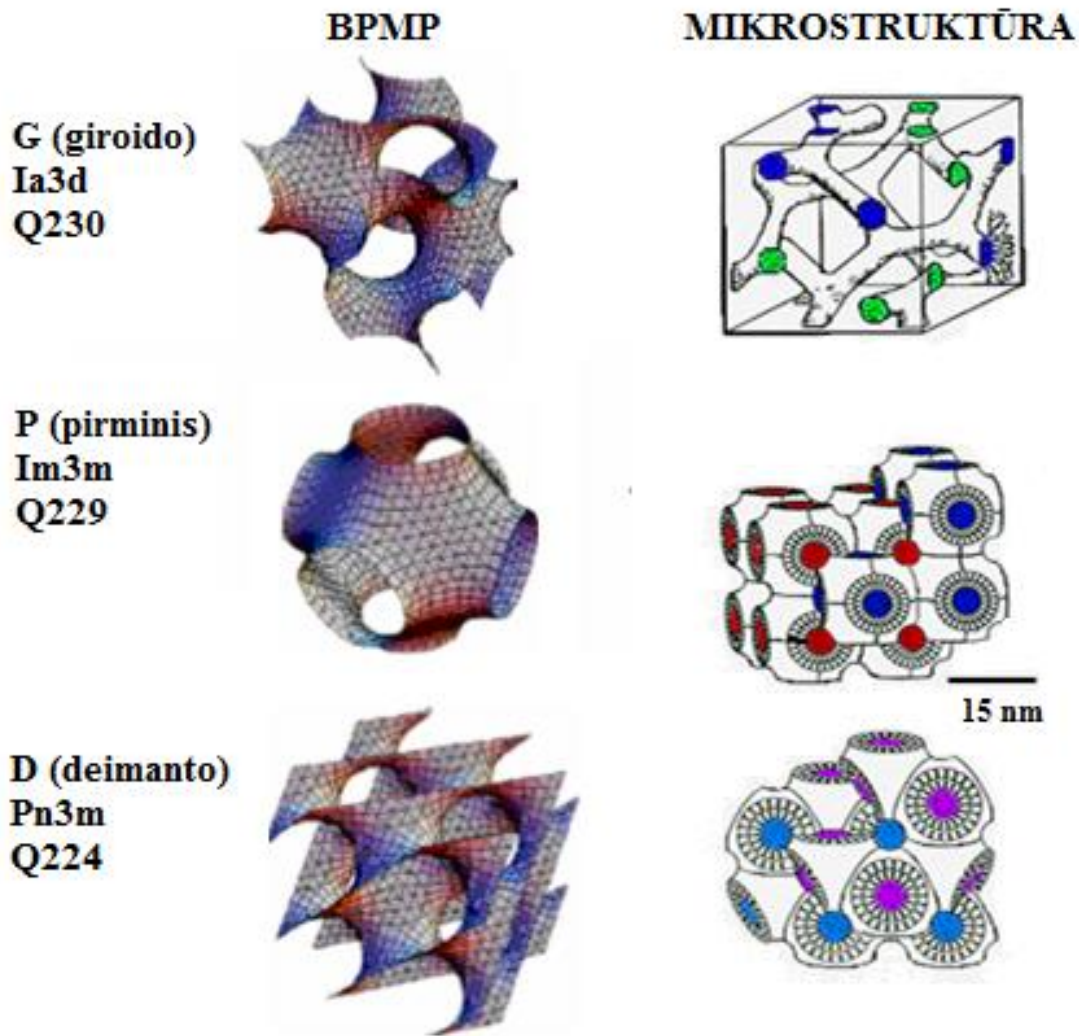
Centruotų paviršių kubinės fazės primityviajame narvelyje atomai išsidėsto visuose kampuose ir visų kubo paviršių centruose. Kiekvienas paviršiaus centro atomas priklauso dviem šalia esančioms vienetinėms gardelėms ir tik $\frac{1}{2}$ kiekvieno atomo priklauso vienetinei gardelei (žr. I. 7 pav.) (Hahn, 2005). Netolydžios centruotų paviršių kubinės gardelės pavyzdys – 24 micelių vienetinėje gardelėje turinti $Fd3m$ erdvinė grupė.



I. 7 pav. Centruotų paviršių kubinės vienetinės gardelės

Pavaizduotos: (a) atvira struktūra; (b) užpildyta struktūra ir (c) vienetinei gardelei priklausantys „tikrieji“ atomai (Sharma, 2012).

Besitęsiančią kubinę fazę galima rasti kai kuriose sistemose tarp heksagoninės ir lamelinės fazių (Fontell, 1990). Tai kubinė gardelė su dviejų vandens kanalų sistemomis, atskirtomis dvisluoksnėmis membranomis. Dėl membranos įgaubto ir išgaubto kreivumo pusiausvyros membranų vidutinis kreivumas lygus nuliui. Šie paviršiai vadinami begaliniais periodiniais minimaliais paviršiais (BPMP) (žr. I. 8 pav.). Minimalūs paviršiai dažniausiai išsidėsto lipidų dvisluoksnio vidurio plokštumoje (atvirkščios fazės) ar vandens sluoksnio viduryje (normalios fazės). Liotropiniuose mišiniuose nustatyti trys besitęsiančių kubinių mezofazių tipai: pirminė ($Im3m$), deimanto ($Pn3m$) ir giroido ($Ia3d$) (žr. I. 8 pav.) (Seddon, 1996; Fogden ir Hyde, 1999). $Ia3d$ simetrija yra pirmoji nustatyta bendra lipidų mišiniam (Lindblom ir Rilfors, 1989).

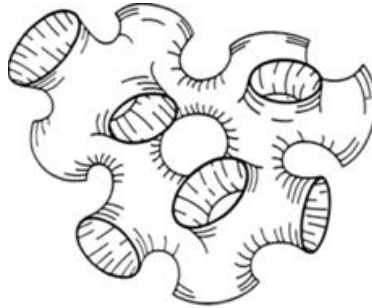


I. 8 pav. *Trijų besitęsiančių lipidų kubinių fazių skirtingų erdvių grupių (Ia3d, Im3m ir Pn3m) animaciniai paveikslai*

Dešinėje pusėje skirtingomis spalvomis pažymėti du nesusisiekiančių vandens kanalų tinklai (Landau ir Rosenbusch, 1996).

Išlydytos ir tarpinės fazės: mikroemulsijos (L_1 ir L_2) ir „kempinės“ fazės (L_3). Mikroemulsijos – laisvai tekantys izotropiniai liotropai. Mikroemulsijose galimi įvairių struktūrų, pradedant nuo 1 ir 2 tipo micelių (sferinių, elipsoidės, kolonos pavidalo, ir t.t.), išdėstytų atsitiktiniu būdu, iki besitęsiančių mikroemulsijų, gerai sumodeliuotų besitęsiančių monosluoksnių (Hyde, 2001). Tokios unikalios tarpinės struktūros kaip „kempinės“ (L_3) ar „kaspino“ (R_I) fazės kartais apibūdinamos kaip neapibrėžti skystieji kristalai

(Bhansali ir kt., 2006). Tai skysčių analogai, turintys lokalią struktūrą, bet dėl per mažo tvarkingumo netinka gardelės apibūdinimui. Nors šios mezofazės ir netvarkingos, vis dėlto, išryškina daug tvarkingoms struktūroms būdingų skiriamųjų bruožų. Dažnai modeliuojamos kaip kelių skystųjų kristalų fazių lydalai. „Kempinės“ tipo fazės (žr. I. 9 pav.) pasižymi klampumu, nors ir mažesniu nei besitęsiančios kubinės fazės. Jų struktūros artimai susietos su besitęsiančiomis kubinėmis gardelėmis. Dažnai formuojamos hidratuotuose tarpiniuose tarp lamelinės ir besitęsiančios kubinės fazių regionuose. Taip pat gali būti pateiktos kaip lamelinės fazės suirimas, kai kanalai jungia tik vietomis tvarkingus dvisluoksnius.



I. 9 pav. L_3 („kempinės“ tipo) fazės nedetalizuotas vaizdas (Hyde, 2001)

„Kilpinės“ fazės dar kelios tarpinės struktūros tarp lamelinės ir besitęsiančios fazių. Tai „pradurtų“ dvisluoksnių tvarkingas kūgis kartu su tvarkingu skylių išsidėstymu kiekviename dvisluoksnyje. Kaip diskrečių micelių ir besitęsiančių fazių atveju organizuota trijų matmenų struktūra. Žinomos dvi struktūrų formos „R“ (romboedrinė) „kilpinė“ fazė (erdvinė grupė $R3m$), kurioje skylių masyvas glaustai supakuotas šešiakampyje ir centruoto tūrio keturkampė „T“ fazė (erdvinė grupė $I422$) su kvadratinio skylių masyvu (Hyde, 2001).

Lipidų skystakristalių struktūrų nustatymas ir jų elgsenos analizė vykdoma metodais, tokiais kaip: mažojo kampo rentgeno spindulių difrakcija (MKReD), polarizuojamos šviesos mikroskopija ir/ar kriogenine transmisine elektronine mikroskopija (krio-TEM).

2.3. Disperguotų lipidų skystakristalių fazių nanodalelių fizikocheminės savybės

Nelamelinės atvirkštinės lipido ir vandens fazės kartu su tam tikrais dispersiniais agentais vandenyje gali formuoti termodinamiškai stabilias nanodalelių koloidines dispersijas (Larsson, 2000). Pagrindinis reikalavimas nelamelinių lipidų skystakristalių nanodalelių paruošimui yra tas, kad SK fazės egzistuotų vandens pertekliuje. Taigi, kol kas tik gana nedaug žinoma lipidų mišinių, teoriškai tinkančių nelamelinių kinetiškai stabilių nanodalelių paruošimui.

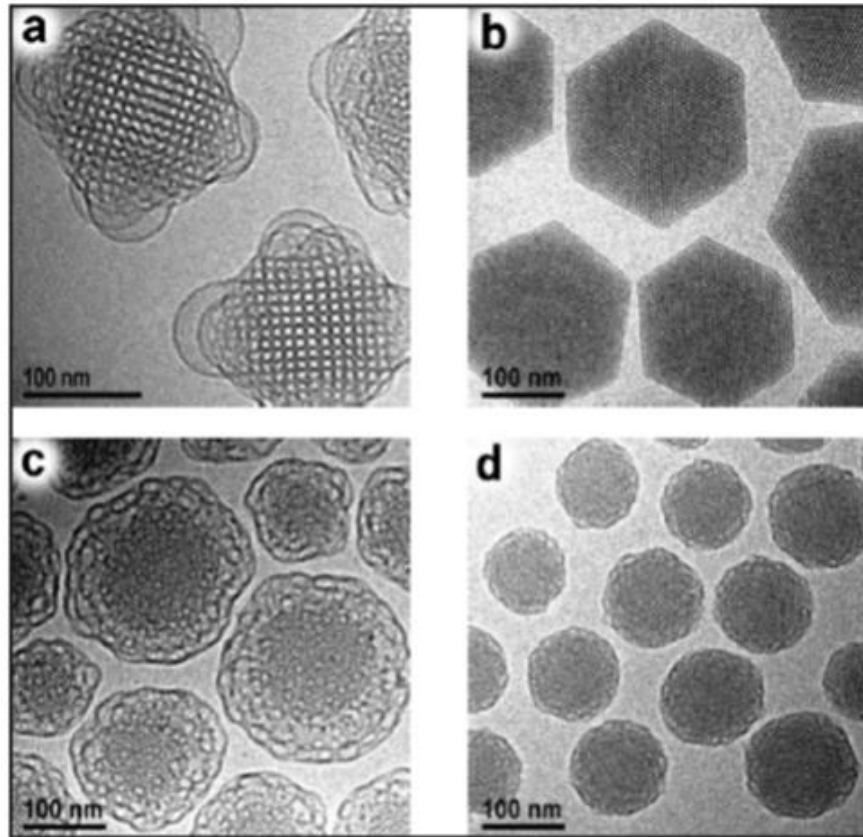
Liposomos – labiausiai žinomos koloidinės lipidų struktūros, atrastos Bangham kartu su bendradarbiais 1960-aisiais (Bangham ir kt., 1965). Liposomos (pavyzdžiui, turinčios fosfatidilcholiną (PC)) – tai disperguotos lamelinės skystųjų kristalų fazės, nors dažnai ruošiamos iš, pvz., PC gelio fazių (Lasic, 1993). Liposomos kitaip nei nelamelinių fazių nanodalelės gali būti disperguotos vandens pertekliuje be dispersijos stabilizatoriaus poreikio, bet ilgalaikiam stabilumui daugeliui liposomų mišinių reikia kurios nors stabilizatoriaus formos, pvz., polimerinės prigimties (Winterhalter ir kt., 1997). Landh ir Larsson užpatentavo nelamelinių liotropinių SK fazių koloidinių dispersijų paruošimą (Landh ir Larsson, 1996). Gustafsson pasiūlė vandeninių koloidinių atvirkštinės heksagoninės fazės dispersijų gamybą ir struktūrą (Gustafsson ir kt., 1997). Dalelės paruošiamos iš glicerolio monooleato (GMO, monooleinas)/saulėgrąžų aliejaus arba GMO/retinilio palmitato lipidų mišinių ir erdviškai stabilizuojamos nejoniniu triblokiniu polimeru vandenyje. Atvirkščios heksagoninės fazės koloidinės dalelės pavadintos heksosomomis. Analogiškai besitęsiančios kubinės fazės – kubosomomis, diskretinės kubinės fazės – micelosomomis, o „kempinės“ fazės nanodalelės – fleksosomomis. Skirtingos studijos aprašė micelinių kubosomų (Nakano ir kt., 2002; Yaghmur ir kt., 2006), „kempinės“ tipo dalelių (Barauskas ir kt., 2005 b, 2006), emulsuotų atvirkštinių micelių (de Campo ir kt.,

2004) ir išbrinkusių micelių (Yaghmur ir kt., 2005; Yaghmur ir Glatter, 2009) (žr. I. 10 pav.) formavimą.

Dispersijos stabilizatorius užtikrina aukštą nelamelinių LSKN kinetinį stabilumą. Per pastaruosius du dešimtmečius kinetinio LSKN dispersijų stabilumo problema sėkmingai išspręsta, taip pat pasiūlyti nauji lipidų mišiniai (Barauskas ir kt., 2005 a ir b; Johnsson ir kt., 2005, 2006 a; Gustafsson ir kt., 1997; Boyd ir kt., 2009; Yaghmur ir Glatter, 2009). Geram kinetiniam stabilumui dažnai reikia santykinai didelių stabilizatoriaus koncentracijų (pvz., 10–30 % nuo bendros lipidų ar amfifilinių junginių koncentracijos). Jis gali suardyti norimos fazės nanostruktūrą, tokiu būdu, jog dažniausiai nelamelinės atvirkščios SK fazės pereina į lamelines arba net micelines struktūras (Barauskas ir kt., 2006; Johnsson ir Edwards, 2001; Johnsson ir Bergstrand, 2004). Dispersijos stabilizatoriai pirmenybę teikiantys nulinio arba teigiamo kreivumo struktūroms, daro įtaką tokiam faziniam virsmui. Todėl spontaniškas visų lipidų/paviršiaus aktyvumo medžiagų mišinių vingiuotumas keičiasi teigiama kryptimi, didėjant stabilizatoriaus koncentracijai. Stabilizatoriai naudojami įvairioms LSKN sistemoms: triblokiniai kopolimerai, pavyzdžiui, Pluronics (Tiberg ir Johnsson, 2011); baltymai, tokie kaip kazeinas (Larsson, 1989); polisorbatai, kaip Polisorbatas 80 (arba Tween 80); PEG-turintys monogliceridai ir tokoferoliai (Barauskas ir kt., 2008), ir hidrofobiškai pakeisti PEG-turintys polimerai (Rangelov ir Almgren, 2005).

Mažojo kampo rengeno spindulių difrakcija ir kriogeninė transmisinė elektroninė mikroskopija – tai metodai, kurie apibūdina disperguotų nanodalelių morfologiją ir jų vidinę nanostruktūrą (Gustafsson ir kt., 1997; Larsson, 2000; Johnsson ir kt., 2006 a). Disperguotų dalelių dydis ir dydžio pasiskirstymai gali būti tikrinami lazerio šviesos sklaidos prietaisais. Nelamelinių, pvz., atvirkštinių besitęsiančios kubinės ar heksagoninės fazių, LSKN pasižymi dideliais paviršiaus plotais dėl kartu esamų hidrofilinių ir hidrofobinių nanodomėnų. Iš **I. 10**

paveiksle pateiktų krio-TEM vaizdų aiškiai matomi lipidų ir vandeniniai domenai, atitinkamai, tamsios ir šviesios sritys.



I. 10 pav. Įvairių nelamelinių lipidų fazių nanodalelių krio-TEM vaizdai
Pavaizduotos: V_2 (a), H_2 (b) L_3 (c) ir L_2 (d), skalė 100 nm (Johnsson ir kt., 2006 a).

Didinant gamybos mastus, labai svarbus LSKN dispersijų paruošimas. Apskritai, panašios procedūros, kurios yra taikomos didelių kiekių emulsijoms ir liposomoms, pavyzdžiui, aukšto slėgio homogenizavimas arba membranos ekstruzija, gali būti taikomos ir LSKN sistemoms. Taigi, turimoms LSKN/vaistas sistemoms dažniausiai nereikia naujų gamybos procesų. Nepaisant to, reikėtų atkreipti dėmesį į tam tikrus paruošimo procedūros aspektus. Visų pirma, nustatyta, kad klasikinėje kubinės fazės nanodaleles formuojančioje glicerolio monooleatas (GMO)/Pluronic F127 LSKN sistemoje (Gustafsson ir kt., 1997), priklausomai nuo gamybos proceso dispersijoje gali būti didelė dalis metastabilių pūslelinių teršalų (Spicer ir kt., 2001). Šių teršalų nestabilumas susijęs su kubinės fazės dalelėmis, susiformavusiomis iš pusiausvyrinės besitęsiančios kubinės SK

fazės. Tokie pūslelių teršalai laikui bėgant susijungs į didesnes netvarkingas daleles dažnai nekontroliuojamu būdu, to pasekmė yra prastas dispersijos koloidinis (arba kinetinis) stabilumas, dažnai pastebimas kaip mišinių būvio kitimas, panašus į grietinės būvio masę. Veikimas karščiu (arba autoklavavimas) mažina arba pašalina šiuos pūslelių „teršalus“. Tuo pat metu, paruošiamos vienalytės LSKN dispersijos su mažu polidispersiškumu (Barauskas ir kt., 2005 a ir b). Literatūroje aprašyti mišiniai, kuriuos naudojant galima ruošti LSKN dispersijas minimaliomis energijos sąnaudomis ("savarankiškai pasklindantys mišiniai") (Barauskas ir kt., 2006). Taigi, gerai apibūdinamos LSKN dispersijos paruošiamos paprastu mechaninio sukratymo būdu.

Jeigu nekreipsime dėmesio į lipidų ar pagalbinės medžiagos saugumo ir suderinamumo aspektus, apibendrintos lipidus-turinčių vaistų nešiklių svarbiausios fizikinės, cheminės savybės bei techniniai reikalavimai yra tokie:

- 1) lipidai ar lipidų mišiniai formuoja nelamelinę SK fazę vandens pertekliuje;
- 2) dispersijos stabilizatorius suderinamas su lipidų struktūra: kinetiškai stabilizuoja dalelių dispersiją ir išsaugo nelamelinę nanostruktūrą;
- 3) lanksčios nelamelinių LSKN sistemos strategija: priklausomai nuo lipidų mišinių, geba įterpti kuo įvairesnes vaistų rūšis be žalingų poveikių dalelių struktūrai, stabilumui ar funkcionalumui;
- 4) paruošta dalelių dispersija su vienalyčiu dydžio pasiskirstymu bei mažu polidispersiškumu optimaliu ilgalaikiam kinetiniam stabilumui.

3. Lipidų skystųjų kristalų fazės vaistų pernašoje

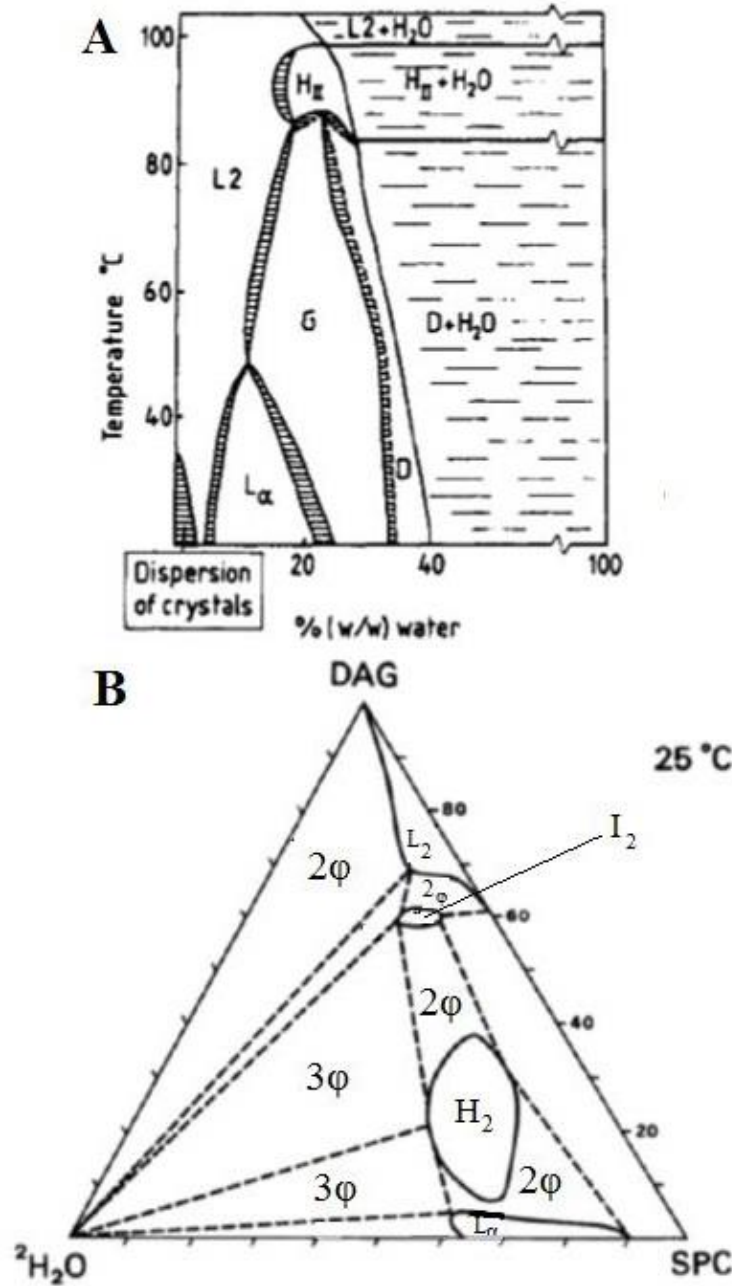
Pirmasis nelamelinių SK fazių vaistų nešiklis patentuotas 1980-ųjų pradžioje (Engstrom ir kt., 1983). Pirmas vaistinis produktas Elyzol dantų gelis pradėtas pardavinėti 1990-ųjų pradžioje. Norling su bendradarbiais aprašė stabilaus, antimikrobinio agento metronidazolo formulotės plėtrą periodonto ligai gydyti. Gaminys – tai monogliceridų ir trigliceridų mišinio bevandenė suspensija, pereina į atvirkštinę heksagoninę fazę apydančių kišenėje (Norling ir kt., 1992).

Taip pat tyrinėtą ir kubinės fazės panaudojimas, bet atvirkštinė heksagoninė fazė pasirodė palankesnė tokiam dantų gydymui (Stelzer ir kt., 1996).

SK fazės formuojamos tik dalinai arba visiškai hidratuotose lipidų mišiniuose. Hidratuotas SK monolitas, arba gana klampus jo lipidų pirmtakas, netinka būti nešikliu dėl per mažo skystumo. Todėl pageidautina, kad nešiklio pirmtakas *in situ* virstų į skystojo kristalo monolitą. Vis dėlto, SK fazes formuojančios sistemos netinka suleidimui į veną, bet funkcionalios kaip vaistų monolitas poodiniame sluoksnyje arba raumenyno audiniuose, arba kūno vidaus ertmėse. Taip pat dėl santykinai didelio klampumo ir hidratuotų SK fazių biologinės adhezijos, tokios sistemos netinka gleiviniam, nosies, vaginaliniam pernešimui, ar patekimui per akį. Todėl išėjimui tampa mažiau klampūs bevandeniai SK fazių monolito pirmtakai su maža atitinkamo tirpiklio dalimi.

Glicerolio monooleatas – tai lipidai formuojantis nelamelines SK fazes, plačiai naudojamas tyrimuose susijusiuose su vaistų pernaša. Sąlytyje su vandeniu, GMO saviorganizuojamas į lamelinę, heksagoninę ir kubinę fazes, priklausomai nuo vandens kiekio ir temperatūros (žr. I. 11 A pav.). Fiziologinėmis sąlygomis vandens pertekliuje, GMO sudaro besitęsiančią kubinę fazę (Larsson ir kt., 1980; Hyde ir kt., 1984). Santykinai vandenyje tirpaus lidokaino hidroklorido pridėjimas į GMO ir vandens mišinį skatina perėjimą nuo V_2 į L_α ar „kempinės“ fazę, pridėjus daugiau lidokaino lipofilinės laisvosios bazės pakeičia tą pačią V_2 fazę į H_2 fazę (Engstrom ir Engstrom, 1992). Monogliceridų turinčių SK fazių atpalaidavimo savybės dažnai priklauso nuo difuzijos (Chang ir Bodmeier, 1997). Greitis priklauso nuo vaisto ar modelinio junginio molekulos dydžio ir kubinės fazės vandeninio kanalo dydžio (Clogston ir Caffrey, 2005). Kaip jau minėta aukščiau vienkomentės GMO sistemos taikymą riboja fazių pokyčiai, atsiradę dėl ištirpintų sistemoje vaistų, sutrikdoma sistemos fazių pusiausvyra. Tokiu atveju, dvikomponentinių lipidų mišinių naudojimas, vis dėlto išspręstų šią problemą ir leistų kompensuoti fazės elgseną, tiesiog koreguojant dviejų lipidų santykį. Be to, gali būti užtikrinamas geresnis apgaubimas dėl perėjimo nuo

difuzijos iki biologinio skaidymo valdomos ribotos pernašos (Tiberg ir Johnsson, 2011).



I. 11 pav. A – dvikomponentė glicerolio monooleato ir vandens fazinė diagrama, B – trikomponentė sojos fosfatidilcholino, diacilglicerolio ir sunkiojo vandens fazinė diagrama

Vandens pertekliuje esančių fazių žymėjimas: besitęsianti kubinė (D ar V_2) ir atvirkštinė heksagoninė (H_{II} ar H_2) fazės. A atvejis – GMO/vanduo (Hyde ir kt., 1984); B atvejis – lipidų SPC ir DAG (diacilglicerolis; daugiausia glicerolio dioleatas) bei vandens (deuteruotas) fazinės diagramos. Pateikiamos dviejų ir trijų fazių sritys, atitinkamai per 2ϕ ir 3ϕ žymėjimą (Orädd ir kt., 1995).

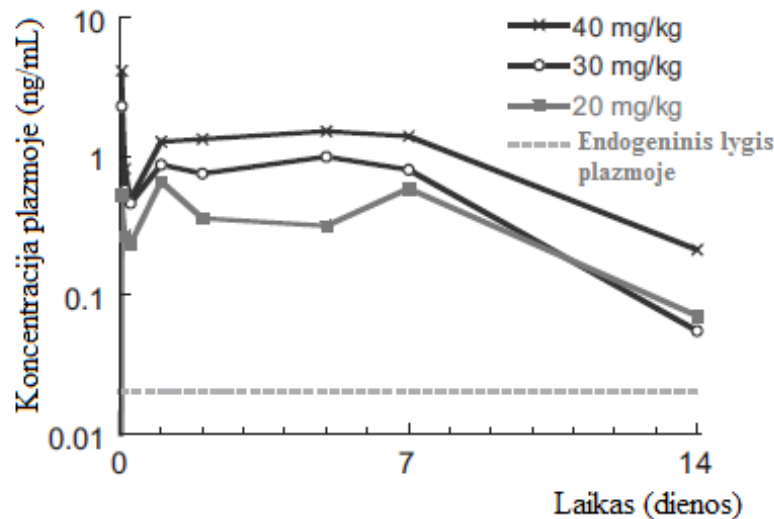
Dviejų lipidų atvirkštines fazes formuojanti sistema – ilgos grandinės fosfatidilcholino ir diglicerido lipidų mišinys, pvz. SPC arba sintetinio dioleoil-PC ir glicerolio dioleatas (GDO) (žr. I. 11 B pav.). Didėjant GDO daliai, šiame mišinyje vyksta tokie faziniai virsmai: lamelinė, atvirkštinė heksagoninė, tvarkingų atvirkštinių kubinių micelių (I_2) ir atvirkštinių micelių (L_2) fazė; su tarpinių fazių galimybe (Orädd ir kt., 1995). H_2 ir I_2 fazės ir jų mišiniai tinka vaistų pernešimui dėl įterpimo ir apgaubimo savybių. Šios fazės geba koegzistuoti vandens pertekliuje ir priešintis fazių pokyčiams dėl žemo diacilo lipidų tirpumo. Tokiu būdu šios fazių struktūros yra tinkamos stabiliai *in vivo* vaistams pernešti.

Norint sumažinti PC/GDO – SK fazių pirmtako klampumą, patogiau bei lengviau paruošti ir tvarkyti, galima pridėti nedidelius pasirinktų tirpiklių kiekius, pvz., etanolio ir/arba propilenglikolio (Thuresson ir kt., 2005). Svarbu, jog selektyviai pasirinkto tirpiklio rūšis ir koncentracija nepaveiktų neigiamai SK fazių išėjimo savybių. PC/GDO lipidų mišinių SK fazės labai tinka ilgo veikimo pernešimui, o dalis medicininių gaminių, naudojančių šią pernešimo sistemą, turi FluidCrystal® prekės ženklą (Camurus AB, Švedija). **I. 3 lentelėje** pateikti keli, įterptų į FluidCrystal® biologiškai aktyviųjų junginių pavyzdžiai.

I. 3 lentelė. Keli biologiškai aktyviųjų junginių, įterptų FluidCrystal® VPS, pavyzdžiai. Pateikiami vaistų tiksliniai įterpimo kiekiai, 25 °C (Tiberg ir kt., 2012)

Medžiaga	Klasė	Įterpto vaisto kiekis, mg/ml	Molekulinė masė, g/mol
<i>Mažos molekulės</i>			
Lidokainas	Vietinis anestetikas	300	234,3
Granisetronas	Prieš vėmimą	90	312,4
Buprenorfinas	Skausmą mažinantis	100	467,6
<i>Peptidai ir baltymai</i>			
Oktreotidas	Peptidinis hormonas Somatostatino analogas	100	1,019
Lizocimas	Hidrolizuojantis fermentas	20	14,300
Krienuų peroksidazė	Fermentas	10	40,000

I. 12 paveiksle pateiktas endogeninio peptidinio hormono somatostatino 1-14, įterpto PC/GDO (FluidCrystal®) mišinyje, farmakokinetinio profilio pavyzdys. Nors somatostatino 1-14 pusinis biologinio poveikio laikas minutės trukmės, iš SK monolito stabilus išėjimas trunka daugiau nei vieną savaitę, o jo koncentracija kraujo plazmoje proporcinga suleistai dozei (Cervin ir kt., 2009).



I. 12 pav. Vidutinės hormono somatostatino 1-14 koncentracijos plazmoje priklausomybė nuo laiko pusiau logaritminėje skalėje

Pateikiami apibendrinti tyrimo rezultatai. Atliekant tyrimą į žiurkių poodį buvo suleisti vienkartiniai skirtingi peptido tūriai ($n = 8$) PC/GDO mišinyje (adatuota pagal Tiberg ir kt., 2012).

SK fazių pirmtakai tinka ir paviršinei, gleivinei vaistų pernašai ir patekimui per odą. Ant biologinio paviršiaus, pvz., burnos gleivinės, lipido tirpalas gali pasklisti plonu sluoksniu. Virsmas į stipriai biologiškai adhezinių SK fazių paviršių vyksta hidratacijos metu. Vandens molekulės, dujų arba skystojoje (pvz., seilės) fazėje, patenka iš supančios aplinkos. Tokie SK fazių pirmtakai tampa patrauklūs biologiškai adheziniam vaistų pernešimui. Lipidų mišinių biologinę adheziją sąlygoja fazių elgsena ir biologinio paviršiaus prigimtis. Taip pat, pridėjus biologiškai aktyviųjų junginių, padidėja daugiakomponenčių sistemų privalumas, kadangi jų fazių elgsena atsparesnė vaistų poveikiui. Kaip jau minėta, Elyzol danties gelis – vienas iš pirmųjų, SK fazes formuojančių, rinkoje pasirodžiusių medicininių gaminių (Norling ir kt., 1992). GMO ir trigliceridų mišinyje apgaubta

metronidazolo suspensija suleidžiama į danteną su švirškštu. Dantų kišenėje Elyzol pereina *in situ* iš skystosios L_2 (vaisto dispersija) fazės į biologiškai adhezinę H_2 fazę, kuri savo ruožtu biologiškai suskaidoma ir metronidazolas yra atpalaiduojamas. 25 % metronidazolo gelio išėjimas suleidimo vietoje trunka ilgiau negu 24 val. PC/GDO mišinys taip pat pasižymi stipria biologine adhezija L_2 ir H_2 fazių formavimo srityje, kai tirpiklio kiekiai yra riboti. Episil, PC/GDO mišinio medicininis gaminys, numalšina po chemoterapijos atsiradusius pažeistos burnos gleivinės skausmus. Sąlytyje su burnos gleivine po 5 min. spontaniškai formuojamas adhezinis ir apsauginis sluoksnis, skausmas sumažėja iki 8 val. (Tiberg ir kt., 2009).

Lipidų SK fazes formuojantys pirmtakai dėl savo unikalių tirpinimo, užlaikymo išėjimo ir/arba jautrių vaistų apsauginių savybių nuo skilimo, pvz., proteazėmis, tinka ir oraliniam pernešimui. Šios sistemos apgaubtos žarniniais apvalkalais (pvz., kapsulės) pereina per virškinamąjį traktą ir išvengia suskaidymo skrandyje. Viename iš paskutiniųjų tyrimų dviejų lipidų jautrumas lipazės suskaidymui ištirtas sąryšyje su mažai tirpaus vaisto cinarizino (CIN) išėjimu (Boyd ir kt., 2007). CIN išėjimas ženkliai uždeliamas iš oleilo glicerato sistemos formuojamos H_2 fazės, lyginant su GMO sistemos formuojama V_2 faze.

4. Disperguotų lipidų skystakristalių fazių nanodalelių vaistų nešikliai

Nelamelinės LSKN, tinkamos ir alternatyvios, gali būti naudojamos daugeliui skirtingų vaistinių medžiagų, tarp kurių netirpios arba amfifilinės mažos molekulės, taip pat baltymų ir peptidų, pernašai. Lyginant su liposomomis, kurios netgi mažo skersmens pripildytos vandens ir dažniausiai tinka vandenyje tirpiųjų vaistų pernašai, lipidų dalis nelamelinėse LSKN didesnė (paprastai svyruoja nuo 50–70%). Dėl šios nanodalelių savybės įmanomas didesnis lipofilinių vaistų įterpimas negu liposomų sistemose. Kita vertus, dėl didelio vidaus lipidų/vanduo paviršiaus ploto, LSKN tinka amfifilinių ar paviršiaus aktyviųjų vaistų įterpimui. Taigi, nelamelinių LSKN sistemos geriau pritaikytos tam tikrų rūšių vaistams nei

liposomos, emulsijos ir micelės. Deja, nedaug liotropinių skystakristalių sistemų plėtojama kaip vaistų nešikliai. Daugelis mokslinių tyrimų skirti dalelių charakterizavimui be jų daugiafunkcinės analizės, – nepaisant nanostruktūrinių dalelių privalumų, palyginus su liposomomis, įterpiant hidrofobinius ar amfifilinius junginius, taip pat ir peptidus ar baltymus (Mulet ir kt., 2009; Conn ir kt., 2010). Camurus AB (Švedija) ir Phosphagenics (Australija) – farmacijos įmonės, kurios specializuojasi skystųjų kristalų fazių plėtroje, pernešant biologiškai aktyvias medžiagas, ir sėkmingai patvirtino komercinius gaminius tokių junginių pernašai.

Literatūroje aprašytos lipidų skystakristalės dispersijos su įterptais įvairiais vaistais: sojų pupelių aliejaus ir Polisorbato 80 emulsija su estradioliu (Novavax); fosfatidilcholino/cholesterolio liposomos su doksorubicinu (Zeneus ir Ortho Biotech); fitantriolio arba glicerolio monooleato ir F127 kubosomos su cinarizinu (Nguyen ir kt., 2011); GMO/F127 su indometacinu (Esposito ir kt., 2005) ir su flurbiprofenu (Han ir kt., 2010); glicerolio monooleato/oleino rūgštis/F127 heksosomos su ciklosporinu A ir vitaminu K (Lopes ir kt., 2006; 2007), bei su progesteronu (Swarnakar ir kt., 2007); sojos fosfatidilcholino/glicerolio dioleato/P80 micelosomos su propofolu (Johnsson ir kt., 2006). Akivaizdu, jog skirtingų struktūrų sistemos pasižymi skirtingais vaisto įterpimo slenksčiais, virš kurių vyksta fazių virsmas. Dažnai stebimi gardelės nanostruktūros parametru pokyčiai žemesnėse nei fazių virsmo slenksčio koncentracijose. Jeigu vaistas paveikia sąlyčio ribą link padidėjusio kreivumo, dažnai gardelės parametras sumažėja ir priešingai. Norint suprasti vaisto sąveiką su nanodalelių struktūromis, svarbu apibūdinti fazių struktūrą ir gardelės parametru, didėjant vaisto koncentracijai (Mulet ir kt., 2013).

Lipidai, tarp kurių kubinės fazės nanodaleles formuojantis nesotus monogliceridas, nelabai tiko vaistų pernašai parenteriniu būdu (Gustafsson ir kt., 1997). Tačiau naujos įvairių fizikocheminių savybių lipidų sistemos kartu su patikimais gamybos procesais sumažino galutines kliūtis taikyti nelamelines

LSKN parenteriniame pernešime (Barauskas ir kt., 2005 b; Johnsson ir kt., 2006 a). Nelamelinės sojos fosfatidilcholino ir glicerolio dioleato mišinių LSKN, kurių vidutinis dydis apie 100 nm, paruošiamos iš lipidų mišinio, pridėjus atitinkamas dispersijos stabilizatoriaus (P80) koncentracijas (Johnsson ir kt., 2006, a). Įrodyta, jog tokia sistema tinka saugiai vaistų pernašai į veną *in vivo* (Cervin ir kt., 2009). Paskutiniuoju metu aprašyta naujoji H_2 fazę formuojančių glicerato paviršiaus aktyviųjų medžiagų klasė (Boyd ir kt., 2006). Šie lipidai struktūriškai panašūs į GMO ir tinka pvz., suformulavimui ir sisteminiam irinotekano, priešvėžinio vaisto, pernešimui.

Kaip jau minėta, daugiausia duomenų yra apie kubosomas. Dažniausiai apie nesočiųjų mono ir digliceridų, ypač glicerolio monooleato, jo mišinių su kitais lipidais ar GMO struktūrinius darinius. Nors šie lipidai nebrangūs ir biologiškai skaidūs, esterio dalis paverčia juos jautriais hidrolizei. Fitantriolis kaip pagalbinė medžiaga dažnai naudojamas kosmetikos pramonėje, taip pat formuoja besitęsiančią kubinę fazę vandens pertekliuje fiziologinėje temperatūroje (Barauskas ir Landh, 2003). Fitantriolio kubosomos paruoštos iš skystųjų pirmtakų optimali GMO alternatyva (Rizwan ir kt., 2011). Kitas pavyzdys, kai modelinė medžiaga ištirpinta – vitamino E (VitE), fitantriolio (FIT) ir vandens mišinyje. Šis tūrinis lipidų mišinys toliau išskaidomas vandeniniame tirpale kartu su stabilizuojančiu agentu F127, – taip formuojamos kubosomos ir heksosomos. Šių mišinių (VitE ir FIT) dispersijos panašios į gryno fitantriolio dispersijas. Pasirodo, jog F127 gali dalinai būti atsakingas dėl terminės elgsenos skirtumų (Amar-Yuli ir kt., 2009). Lee kartu su kitais tyrėjais (Lee ir kt., 2009) paruošė dvi skirtingas glicerolio monooleato ir fitantriolio besitęsiančias kubines fazes ir atvirkščią heksagoninę fazę, pridėjus vitamino E į fitantriolį, atitinkamai, V_2 GMO, V_2 FIT ir H_2 FIT+VitE. Išėjimo kinetikos *in vitro* duomenys surinkti įterpus modelinius hidrofilinius vaistus su skirtingomis molekulinėmis masėmis. Nustatyta, jog kiekvieno iš vaistų išėjimo dažniai mažėja, kintant stuktūrai iš V_2 GMO į V_2 FIT į H_2 FIT+VitE.

Nelamelinės nanodalelės galimos kandidatės paviršiniam pernešimui, pvz., per žando, nosies ir odos paviršių. Be to, dėl biologinio sukibimo savybių LSKN lengvai paruošiamos įvairiems taikiniams. Dar, LSKN gali būti paruoštos iš lipidų, tokių kaip monogliceridai, digliceridai ir fosfolipidai, ilgai naudojamų kaip maisto, kosmetikos farmacinės priemonės. Diglicerolio monooleato (DGMO) ir glicerolio dioleato mišinys priešklinikinuose tyrimuose tirtas vaistų pernašai per odą. „Kempinės“ fazės (L_3) LSKN formuojamos vandeninės fazės pertekliuje mechaninio suplakimo metu, pridėjus Polisorbato 80 dispersijos stabilizatoriaus (Barauskas ir kt., 2006). Šios dalelės lengvai deformuojamos minkštais ir lanksčiais lipidų dvisluoksniais sujungtais tarpusavyje netvarkingu būdu. Ši ypatybė savo ruožtu gali būti privalumu prasiskverbimui/pernašai per odą. Vandeniniai purkštuvai, kremai, geliai ar pusiau kieti mišiniai yra galimi dėl tokių mišinių fizikinių formų, o gaunamo gaminio savybės gali būti priderintos prie pageidaujamų naudojamų (Johnsson ir kt., 2006 b).

5. Perspektyvos ir išvalgos

Nelamelinės skystakristalės fazės ir jų nanodalelės jau virš dvidešimt metų skinasi kelią į vaistų nešiklių rinką. Iš pradžių daugelis tyrimų buvo skirti atvirkščiosioms SK fazėms, o ypač besitęsiančiosioms kubinėms fazėms, kurios formuojamos glicerolio monooleato. Tačiau norimi rezultatai galutinio vaistinio gaminio pavidalu nebuvo pasiekti. Situacija pradėjo keistis, kai atsirado nauji inovatyvūs lipidų mišiniai, kurie formuoja nelamelines skystųjų kristalų fazes ir jų nanodaleles. Spartus šių busimųjų vaistų nešiklių vystymas ir tobulėjimas aprėpė ir tyrimus su ligojais. Stiprėjant tokių sistemų saugumo savybėms ir terapiniams poveikiams, tikėtina, jog SK technologijų panaudojimo galimybės plėsis. Tikėtina, kad ateityje, bus plėtojama asmeninė medicina ir, mažinant finansinius išteklius, reikėtų priemonių, gebančių pernešti naujas medžiagas į tikslias vietas. Pavyzdžiui, si-RNR pernešimas vis dar kūrimo stadijoje, o sukonstruotos

daugiafunkcės LSKN struktūros ateityje išspręs pernešimo problemas. Tokiu būdu si-RNR bus taikomi ligoms gydyti.

Kokios kitos novatoriškos vaistų nešiklių pernešimo sistemos turėtų atsirasti? Tikėtina, kad SK formuojančios sistemos galės būti naudojamos iš dalies lokaliai, peroralinei pernašai. Atsižvelgiant į esamas žinias, naujų lipidų mišiniai galėtų ateityje atverti naujas nelamelinių skystakristalių fazių taikymo sritis.

II skyrius. MEDŽIAGOS ir METODAI

1. Cheminės medžiagos

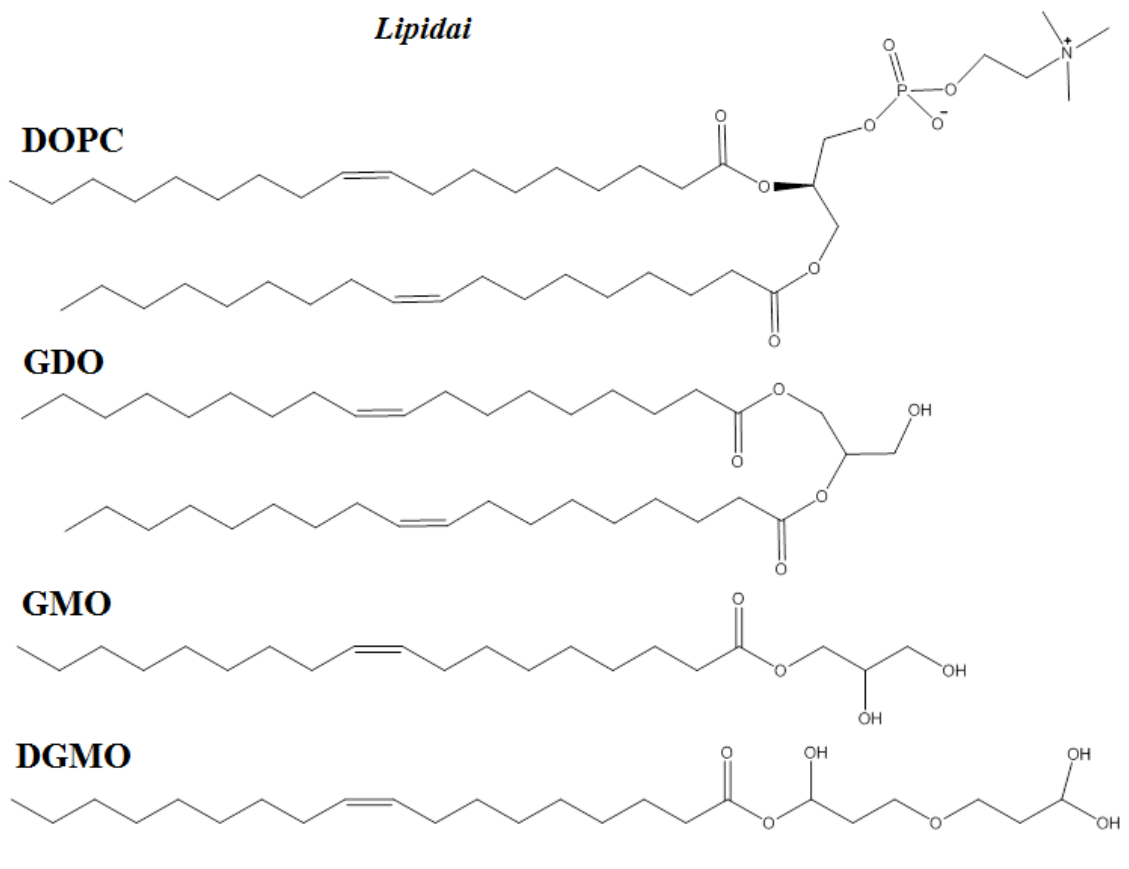
Lipidai: sojos fosfatidilcholinas (Lipoid S100), kurį sudaro fosfatidilcholinas (> 94 %), lizofosfatidilcholinas (< 1,0 %), trigliceridai (< 1,0 %) ir laisvosios riebalų rūgštys (< 0,05 %), vidutinė molekulinė masė 770 g/mol (Lipoid GmbH, Vokietija). Glicerolio dioleatas, kurį sudaro digliceridai (96 %), monogliceridai (0,2 %), ir trigliceridai (3,8 %); glicerolio monooleatas, kurį sudaro monogliceridai (95 %) ir digliceridai (4,1 %); diglicerolio monooleatas: diglicerolio monoesteris (87 %), glicerolio monoesteris (2 %) ir laisvas glicerolis ir poliesteriai (5,2 %) (Danisco, Danija). 1,2-Dioleoil-*sn*-glicerolio-3-fosfocholinas (DOPC, > 99 %) ir dioleoilfosfatidiletanolamino–poli(etileno glikolis) 2000 (DOPE–PEG (2000) ar PEG-lipidas) (Avanti Polar Lipids Inc., JAV). α – tokoferolis (Vitaminas E), $\geq 95,5$ % (Sigma Aldrich, Vokietija).

Amfifiliniai polimeriniai junginiai: hidrofilinis nejoninis trijų bloką kopolimeras polietileno oksidas–polipropileno oksidas–polietileno oksidas (PEO₉₈–PPO₆₇–PEO₉₈) (Pluronic F127, F127), vidutinė molekulinė masė 12600 g/mol (BASF Svenska AB, Švedija). Polioksitileno (20) sorbitano monooleatas (Polisorbatas 80, P80, Tween 80) (Apoteksbolaget AB, Švedija). Polietileno glikolio p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenilo eteris (Tritonas X-100) (Loba Chemie PVT. LTD., Indija).

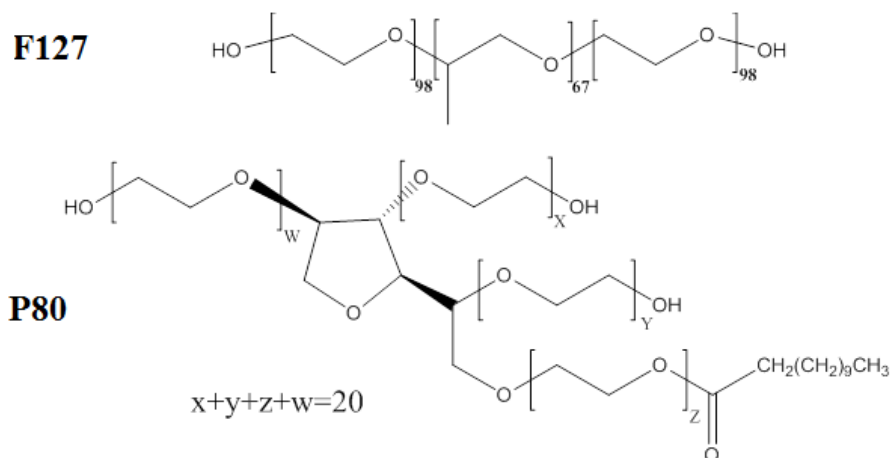
Fluoroforai: metakriloksietilo tiokarbamoil rodaminas B (PolyFluor[®] 570, Polysciences, Inc., JAV). Fluoresceino dinatrio druska (Fluo) (Fluka, Šveicarija). 5-(6) – karboksifluoresceinas (mišrūs izomerai) – nesurišamas polinis žymuo (KF) ir žymėti lipidai: N-(7-nitrobenzo-2-oksa-1,3-diazol-4-il)-1,2-diheksadekanoil-*sn*-glicerolio-3-fosfoetanolamino trietilamonio druska (NBD-PE, donoras, N360) ir 1,2-diheksadekanoil-*sn*-glicerolio-3-fosfoetanolamino trietilamonio druska (Lissamine[™]/Rodaminas B, rodaminas DHPE, akceptorius, L1392) (Invitrogen,

JAV). **II. 1 paveiksle** pateikiamos šiame darbe naudotų lipidų ir polimerų struktūrinės formulės.

Lipidai



Polimerai



II. 1 pav. Šiame darbe naudotų įvairių lipidų ir polimerų molekulinės struktūros

Fermentai ir cukrūs: vištos kiaušinio baltymo lizocimas (14,6 kDa, Fluka, Belgija), pepsinas (35 kDa), krienų peroksidazė (~ 44 kDa) ir D(+)-trehalozė (iš *Saccharomyces cerevisiae*) (Sigma Aldrich, Vokietija); sacharozė ir D-manitolis (dovana iš Camurus AB, Švedija).

Kitos medžiagos: NaCl, chitozanas, dimetiloktilchlorsilanas (DMOCS), 2% 3-aminopropiltrioksisilanas (APTES) ir chloroformas iš Fluka (Šveicarija); NaOH, toluenas, tetrahidrofuranas, natrio-fosfatinio buferio tabletės (pH 7,4) ir Sephadex[®] G-50 (granulių dydis 20–80 μm) iš Sigma-Aldrich (Vokietija); 36 % HCl, 2-amino-2-hidroksimetil-propano-diolis (TRIS), NH₄OH ir H₂O₂ iš Merck (Vokietija); Etilo alkoholis 96,3 % (Vilniaus degtinė, Lietuva), absolutus etanolis (99,5 %) (Kemetyl AB, Švedija arba Solveco AB, Švedija), acto rūgštis (Eurochemicals, Lietuva); deuterio oksidas 99,8 atom% D (Dr. Glaser AG, Šveicarija). Milli-Q (Merck Millipore, JAV) išvalytas vanduo (18,2 MΩ*cm) arba Chromasolv[™] Plus vanduo (Sigma-Aldrich, Vokietija) naudotas visų tirpalų gamybai. Visos medžiagos, jeigu nenurodyta kitaip, naudotos be papildomo valymo ar kitokio paruošimo.

2. Lipidų skystakristalių fazių pirmtakai

Lipidų skystųjų kristalų (SK) fazių pirmtakų mišiniai paruošti atsvėrus atitinkamus lipidų kiekius (0,2–0,4 g), vėliau mišiniai ištirpinti etanolyje santykiu 9/1. Visiškai homogenizacijai mėginiai dedami ant sukamojo stalo 1 val. Paruošti mišiniai gali būti laikomi –18 °C iki panaudojimo. Kai kuriais atvejais etanolis yra nugarinamas ant sukamojo rotorius su vandens pompa (IKA, Vokietija). Likutinė etanolio koncentracija mažesnė nei 1 %, apskaičiuota sveriant mėginius prieš ir po nugarinimo. Taip pat paruošti atitinkami SK fazių pirmtakai su įterpta modeline medžiaga. Liofilizuojamas fermento (10 mg/ml) ir trehalozės (10 mg/ml) (1:1) vandeninis tirpalas, gauti purūs kristalai sumaišomi su SK fazių pirmtakais, o vėliau bandiniai atitinkamai hidratuojami.

3. Lipidų skystakristalės fazės

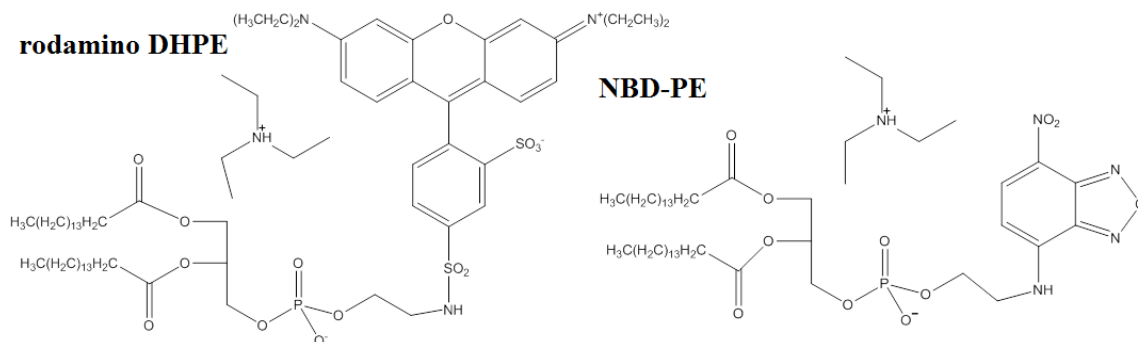
Lipidų skystakristalės fazės paruoštos iš SK pirmtakų mišinių pagal tokius protokolus: *i*) visiškai hidratuoti mėginiai toliau ruošiami pridėjus 90 % vandens (kai kuriais atvejais pridėta H₂O/D₂O (8/2) mišinio) arba 0,9 % NaCl tirpalo. Visiškai hidratuoti mėginiai paruošti taip, jog galutinė etanolio koncentracija siekė 1 %; *ii*) į mėginius su daline hidratacija, iš kurių iš pradžių pašalinamas etanolis, pridedami atitinkami vandens arba druskos tirpalo kiekiai. Galutinė vandeninio tirpalo koncentracija sudarė 5–50 % nuo bendros mėginio masės. Intensyviai išmaišoma, užsandarinama ir paliekama pusiausvyrintis mažiausiai trims savaitėms. Gerinant fazių išsimašymą, jeigu prireikia mėginiai papildomai centrifuguojami, buteliukus apverčiant keletą kartų (2–3 min., 1500 g) (Eppendorf AG, Vokietija); *iii*) kinetiniams SK fazių formavimo ypatumams tirti, sumodeliuotos atitinkamos monolito apvalkalo brinkimo sąlygos (nepusiausvyrinės sąlygos). Tyrimams panaudoti apie 8 cm ilgio stiklo kapiliarai, kurių vidinis skersmuo iki 1,6–1,8 mm (HR6-124, Hampton Research, JAV). Lipidų SPC/GDO SK fazių pirmtakai, paruošti kaip aprašyta aukščiau (su ar be etanolio), įlašinami į kapiliaro apačią (apie 30 mm), kad užimtų apie pusę jo tūrio. Papildomai leidžiama nusistovėti vertikaloje padėtyje, kad susidarytų lygi riba tarp lipido ir oro. Vėliau atsargiai iš viršaus įlašinamas 0,9 % NaCl tirpalas (apie 30 mm), mėginių laisvi galai yra greitai užgaminami, ir paliekami vertikaloje padėtyje nuo 5 iki 21 dienos.

4. Disperguotų skystakristalių fazių nanodalelės

Lipidų skystakristalių fazių nanodalelės ruošiamos disperguojant jų SK fazių pirmtakus vandenyje, pridėjus dalelių stabilizatoriaus. Išlaikomas bendras mišinio lipidas ir polimeras:EtOH/vanduo svorio santykis 90:10/95. Hemolizės tyrimams SK fazių pirmtakai disperguojami ne vandenyje, o 5 % gliukozės vandeniniame tirpale. Mėginiai iš karto sukrotomi ir paliekami maišytis 48–72 val.

termostatuojamoje purtyklėje (30 °C, 180–400 aps./min.). Kad susidarytų didesnės dalelės, disperguotų fazių nanodalelės po supurtymo veikiamos karščiu, taip mažinamas metastabilių vezikulinių agregatų kiekis, gerėja dispersijos savybės. Paveikus karščiu susiaurinamas dalelių dydžių pasiskirstymo diapozonas, nepasižymintis ryškiu lipidų skilimu (Barauskas ir kt., 2005 a). Paruoštos nanodalelių dispersijos atvėsinaimos ir laikomos kambario temperatūroje iki panaudojimo. Prieš tolimesnius darbus paruoštos 5 % lipidų skystakristalių nanodalelių dispersijos praskiedžiamos iki atitinkamų koncentracijų druskos tirpale.

Paruoštos lipidų skystakristalių nanodalelių dispersijos su fluorescencine žyme turinčiais fosfatidiletanolamino lipidais (žr. II. 2 pav.). 0,4 mg NBD-PE (donoras) arba 0,5 mg rodamino DHPE (akceptorius) ištirpinami 1,250 ml chloroformas/etanolis (santykiu 1:4 pagal tūrį); galutinė bazinio tirpalo koncentracija, atitinkamai, 0,335 mM ir 0,3 mM. 8 μM fluorescuojančių NBD-PE/DHPE lipidų (1:1) tirpalas paruošiamas atskiedus bazinius 0,24 ml NBD-PE ir 0,27 ml DHPE tirpalus 19,49 ml etanolyje. Norint fluorescuojančiais fosfolipidais pažymėti LSKN, sumaišomi atitinkami 8 μM fluorescuojančių lipidų (1:1) tirpalo kiekiai (80–150 μl) su 6 ml 0,003 % LSKN dispersijos, kad fluorescuojančios žymės sudarytų 1 mol% lipidų bendros koncentracijos. Prieš kiekvieną panaudojimą dispersijos maišomos ant magnetinės maišyklės 48 val.



II. 2 pav. Fluorescuojančias žymes turinčių lipidų struktūrinės formulės

5. Fosfolipidų liposomų paruošimas

Daugialamelinių liposomų dispersijos paruoštos pridėjus 2,25 g SPC į 47,75 ml 0,9 % druskos tirpalą (150 mM NaCl). Paruošto mišinio galutinė koncentracija ~ 4,5 %. Mėginys sukratomas stipriai ir pastatomas į termostatuojamą purtyklę (~ 29 °C, 180 aps./min) 48–72 val. Susidariusios daugialamelinių liposomų dispersijos apibūdintos monodomeniniu dydžio pasiskirstymu ir vidutiniu dalelių dydžiu 1,3 μm (dinamine šviesos sklaida išmatuoto polidispersiškumo indekso (PdI) skaitinė reikšmė lygi 0,23) (Malvern Instruments Ltd., JK).

SPC ar SPC/DOPE-PEG (2000) (PEG-lipidas) vienlamelinės liposomos paruoštos, ištirpinus lipidą arba lipidų mišinį chloroforme, vėliau vakuume tirpiklis išgarinimas bei susiformuoja sauso lipido plėvelė. Lipidai hidratuojami 0,9 % NaCl tirpale kartojant šaldymo – šildymo etapus (šaldymas skystajame azote ir šildymas vandens vonelėje, 50 °C) su tarpiniu maišymu. Dispersijos po to 15 kartų perleidžiamos pro 2 sustatytus polikarbonatinius filtrus, kurių porų dydis 400 nm, naudojant LIPEX ekstruderį (Avanti Lipids Inc., Kanada), suformuojamos vienlamelinės liposomos. Panašiai, vienlamelinės liposomos su įterptu karboksifluoresceinu paruoštos standartinės sauso lipido sluoksnio hidratacijos metodu su 100 mM 5-(6) – karboksifluoresceino tirpalu (Senior ir Gregoriadis, 1984), TBS buferyje (20 mM TRIS ir 150 mM NaCl, pH 7,4). KF nuo pH priklausomas dažas, todėl jo milteliai pirmiau yra ištirpinami mažame NaOH kiekyje, paskiau pridedamas TBS buferis. SPC brinkintas paruoštame tirpale (1 %), kratytas ant maišyklės ir paliktas 48–72 val. termostatuojamoje purtyklėje (180 aps./min, 30 °C). Vėliau turi būti dešimt pasikartojančių šaldymo (–20 °C) – šildymo (50 °C) etapų. Veikiama ultragarso vonelėje apie 1 val., dispersijos po to 21 kartą perleidžiamos ekstruderyje pro polikarbonatinį filtrą (Whatman, JAV), porų dydis 200 nm (Avanti Polar Lipids Inc., JAV), suformuojamos vienlamelinės liposomos. O liposomose įterptas KF atskiriamas

nuo laisvojo dažo gelfiltracijos metu per chromatografinę kolonelę (12,5x1,5 cm), užpildytą Sephadex® G-50, eliucija vyksta su TBS buferiu.

6. Lipidų skystakristalių nanodalelių sąveika su eritrocitais

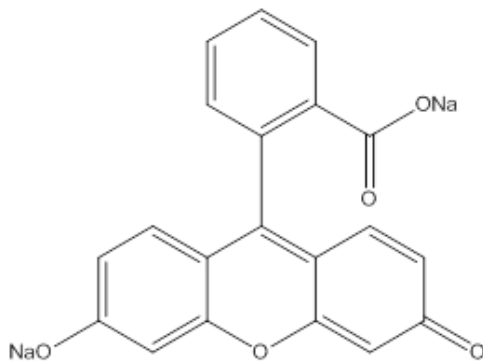
Šviežias žiurkių kraujas (heparinizuotas) sumaišomas su lipidų nanodalelių dispersijomis 5 % gliukozės tirpale (santykiu 1:19), arba su kontrolėmis santykiu 1:1 (pagal tūrį) (bendras tūris 1 ml). 5 % gliukozės ir 2 % Triton X-100 (paviršiaus aktyviosios medžiagos) tirpalų injekcijos vandenyje, atitinkamai, kaip neigiama ir teigiama kontrolė. Mėginiai inkubuojami 37 °C, maišant 200 aps./min. purtyklėje 1 val., vėliau nucentrifuguojami 10 min. 2000 g. Supernatantai paveikiami vandeniniu 10 % Triton X-100 tirpalu santykiu 1:4 (pagal tūrį) (bendras tūris 200 µL), taip anuliuojami klaidingai pozityvūs rezultatai, kurie atsiranda iš lipidų dispersijų drumstumo. Supernatanto, paveikto Triton X-100, adsorbcija nustatoma spektrofotometriškai 96-šulinėlių mikrotitro plokštelėje 540 nm bangos ilgyje. Hemolizė pateikiama kaip pozityvi kontrolė (100 % hemolizės) % pagal absorbcijų skirtumus:

$$\frac{Abs_{m\acute{e}ginio} - Abs_{neigiama}}{Abs_{teigiama} - Abs_{neigiama}} \times 100 \quad (II.1)$$

7. Fluoresceino *in vitro* išėjimas

Lipidų skystakristalių fazių pirmtakai su įterptu fluoresceinu (Fluo, žr. II. 3 pav.) paruošti 6 ml talpos buteliukuose, atsvėrus 10 mg Fluo ir 1,99 g SPC/GDO mišinio, turinčio 10 % etanolio. Bandiniai sumaišomi ant maišyklės, iki homogeninio mišinio. *In vitro* tyrimai atlikti 8 ml buteliukuose, 100 mg SK fazių pirmtako mišinio įšvirkščiaama į 5 ml natrio-fosfatinį buferinį tirpalą (pH 7,4). Naudojami sterilūs BD Plastipak (KA, JAV) 1 ml švirkštai ir 18G adatos. Kiekvienam mišiniui paruošta po tris mėginus. Buteliukai užplombuojami ir laikomi termostatuojamoje purtyklėje (150 aps./min., 37 °C). Po 2, 4 ir 7 dienų 0,1 ml vandeninės mėginio fazės praskiedžiama 15 kartų su natrio-fosfatinu buferiu.

Fluo koncentracija nustatyta spektrofotometriškai Lambda 40 spektrofotometru (Perkin Elmer, JAV), įrengtu su EL808IU mikroplokštelių skaitytuvu (BioTek, JAV) ir 96 šulinėlių plokšte. 0,3 mL mėginio tenka kiekvienam šulinėliui. Absorbicija matuojama 490 nm bangos ilgyje.



II. 3 pav. Dinatrio fluoresceino druskos struktūrinė formulė

Koncentracija ir išėjusi Fluo (%) dalis apskaičiuojama iš kiekvienos plokštelės kalibravimo kreivės. Kalibravimo kreivės gautos, matuojant Fluo tirpalų absorbiciją natrio-fosfatiniame buferyje, kai koncentracijos ribos 0,00016–0,0134 mg/ml. Visų plokštelių kalibravimo kreivių tiesių $r^2 = 0,995$.

Vaisto išėjimas iš skystakristalių nanostruktūrų valdomas difuzijos, bet skiriasi priklausomai nuo nanostruktūros (Phan ir kt., 2011). Kai atpalaidavimo matavimas atliekamas kontroliuojamomis sąlygomis, vaisto išėjimo kinetika sėkmingai modeliuojama Higuchi modeliu (Higuchi, 1961):

$$Q = K_H t^{1/2}, \quad (\text{II.2})$$

kai Q – išėjusios iš nešiklio medžiagos kiekis per t laiką, K_H – Higuchi konstanta, t – laikas. Modelis aprašo difuzinį vaisto išėjimą priklausomai nuo laiko kvadratinės šaknies.

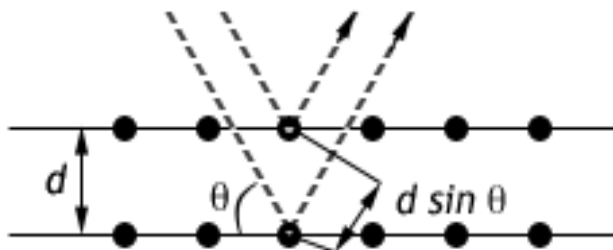
Fluo išėjimo iš pasirinktų mišinių matavimai atlikti ir kambario temperatūroje (25 °C). SK fazių pirmtakai su 0,5 % dinatrio fluoresceino sulašinami į vandenį 1:10 santykiu, tokiu būdu likutinė etanolio dalis mažesnė nei 1 proc. Mišiniai fotografuoti laiko atžvilgiu ir, norint palyginti, paruošti atitinkamų mišinių mėginiai fiziologiniame tirpale (37 °C).

8. Mažoji kampo rentgeno spindulių difrakcija

Iš mažoji kampo rentgeno spindulių difrakcijos gaunami duomenys apie struktūros makrodomenus 1–100 nm lygmenyje. Metodas pagrįstas atsitiktinės bangos difrakcija nuo tiriamos medžiagos ir jos interferencija ant detektoriaus (Hahn, 2005). Duomenų interpretacijai naudojamas Brego dėsnis, aprašomas nesudėtinga lygtimi, kuri teigia, jog difrakcijos smailė atsirandanti iš tvarkingos struktūros su kartotiniu atstumu d bus stebima tik tada, kai atitiks šio dėsnio sąlygas:

$$2d \sin \theta = n\lambda, \quad (\text{II.3})$$

čia: n – daugiklis (sveikasis skaičius), λ – krentančios Rentgeno spinduliuotės bangos ilgis, ir θ – kampas ties kuriuo stebima difrakcija, kintamas dydis d – atstumas tarp atominių plokštumų kristale (žr. II. 4 pav.) (Guinier, 1994; Warren, 1990). Taigi, d atvirkščiai proporcingas $\sin\theta$, todėl kuo didesni kartotiniai atstumai d , tuo mažesni kampai ties kuriais stebima difrakcija. Todėl, MKReD metodas idealus tvarkingų struktūrų su dideliais kartotiniais atstumais, pavyzdžiui, tokių kaip skystųjų kristalų mezofazių, kompleksinių skysčių ir nuo nanoporinių iki mezoporinių medžiagų tyrimui.



II. 4 pav. Brego dėsnio aiškinamasis principas

Brūkšninė linija – krentantis Rentgeno spindulys, θ – difrakcijos kampas, taškai – kristalinės gardelės plokštumų atomai (Guinier, 1994).

Difraktogramose pateikiami atspindėjimo intensyvumai ir q – sklaidos vektorius, apskaičiuojamas pagal Brego dėsnio išvestinę lygtį:

$$|\vec{q}| = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda} = \frac{2\pi}{d} \quad (\text{II.4})$$

II. 1 lentelė. Dažniausiai darbe indeksuojamų kristalų šeimų tarplokštuminio atstumo (d_{hkl}) skaičiavimo formulės

Sistema	d_{hkl}
Kubinė	$\left(\frac{1}{a^2}(h^2 + k^2 + l^2)\right)^{-1/2}$
Heksagoninė	$\left(\frac{4}{3a^2}(h^2 + hk + k^2) + \frac{l^2}{c^2}\right)^{-1/2}$ <i>heksagoninis indeksavimas</i>

Erdvinės grupės suskirstomos į šešias kristalų šeimas: kubinė, heksagoninė (žr. **II. 1 lentelę**), tetragoninė, ortorombinė, monoklininė ir triklininė (Hahn, 2005). Milerio indeksai (h, k, l) kristalografijoje naudojami kristalinės gardelės plokštumoms ir kryptims apibūdinti. Jeigu naudojama trijų matmenų difrakcinė gardelė kaip matematinis modelis, tai trys indeksai h, k, l tampa gardelės kraštinių a, b, c ilgių atitikmenimis.

II. 2 lentelė. Atspindžio dėsniai: lamelinės, kai kurių kubinių ir heksagoninės fazių

L_a	$\left(\frac{a}{d}\right) = 1,2,3,4,5,6 \dots$ kai $d = \frac{2\pi}{q}$, $a \dots$ gardelės parametras
$Pn3m (C_D)$	$\left(\frac{a}{d_{hkl}}\right)^2 = 2,3,4,6,8,9,10,11 \dots$
$Ia3d (C_G)$	$\left(\frac{a}{d_{hkl}}\right)^2 = 6,8,14,16,20,22,24 \dots$
$Im3m (C_P)$	$\left(\frac{a}{d_{hkl}}\right)^2 = 2,4,6,8,10,12,14 \dots$
$Fd3m$	$\left(\frac{a}{d_{hkl}}\right)^2 = 2,4,5,6,8, \dots$
H_2	$\left(\frac{\sqrt{3} \cdot a}{2 \cdot d_{hk}}\right)^2 = 1,3,4,7$

Kristalografinės erdvinės (Fedorovo) grupės atvaizduoja kristalo simetrijos tipą, iš viso tokių yra 230 grupių su 3 dimensijų matmenimis. Kai kurioms iš jų **II. 2 lentelėje** pateikti atspindžio dėsniai: lamelinei, kubinėms (su deimanto ($Pn3m (C_D)$)), giroido ($Ia3d (C_G)$), ir primitiviu ($Im3m (C_P)$) minimaliu

paviršiumi ir glaudaus supakavimo ($Fd3m$) bei atvirkštinei heksagoninei fazei (Hahn, 2005).

Šiame darbe mažojo kampo rentgenostruktūriniai matavimai atlikti Nacionalinėje sinchrotroninėje laboratorijoje MAX-lab (Lundo universitetas, Švedija) I711 spindulio stotyje. Naudotas Marresearch 165 CCD detektorius uždėtas ant Marresearch Desktop Beamline pagrindinės plokštės (Cerenius ir kt., 2000; Knaapila ir kt., 2009). Kelių miligramų lipidų SPC/GDO skystakristalių fazių pavyzdžiai dedami tarp poliimidinių langelių (Kapton[®]) plieno mėginių laikiklyje arba kapiliarų atveju, kurie išmatuoti horizontalioje padėtyje, ribą tarp lipido ir druskos tirpalo žymint brinkimo pradžios tašku. Atstumas tarp mėginio ir detektoriaus 1250–1683 mm ribose. Difraktogramos užrašytos vakuume, kai bangos ilgis 0,1066–0,1201 nm ir spindulio dydis 0,25×0,25 mm (visas plotis maksimumo viduryje) einančiu per mėginį. Dažniausiai difraktogramų užrašymo temperatūra 25 °C, tačiau kai kuriais atvejais ir 5–75 °C temperatūrų diapozone, pusiausvyrinimo laikas kiekvienoje iš temperatūrų 10 min. Ekspozicijos laikas 3–5 min. Sidabro behenatas ($\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{20}\text{-COOAg}$, kurio d (tarpplokštuminis kartotinis atstumas) lygus 5,838 nm) naudojamas kaip išmatuoto kampų mastelio intensyvumo kalibracijos standartas. Difraktogramos gautos integruojant duomenis su Fit2D programiniu paketu (dr. A. Hammersley (<http://www.esrf.fr/computing/scientific/FIT2D>)), ir panaudojus kalibracines reikšmes bangos ilgiui ir detektoriaus padėčiai.

9. Dinaminė šviesos sklaida ir ζ potencialas

Dalelių dydžių pasiskirstymai išmatuoti dinamine šviesos sklaida, o dalelių paviršiaus krūvis stebėtas, matuojant ζ (zeta) potencialą su Doppler lazeriu elektroforezės metodu (Malvern Instruments Ltd., JK), naudojant atitinkamai vienkartinės kiuvetes arba ζ elementus, užpildytus 1 ml 0,5 % LSKN dispersijos, 25 °C temperatūroje. Dalelių dydžio pasiskirstymo duomenys surenkami po 2 min. pusiausvyrinimosi laiko ir apskaičiuoti vidurkiai iš daugiau nei 12 matavimų.

Atitinkami lūžio rodikliai 1,48 ir 1,33 panaudoti lipidų nanodalelėms ir vandeniui. Tikrasis hidrodinaminis spindulys apskaičiuojamas panaudojus Stokes-Einšteino ryšį sferinėms dalelėms:

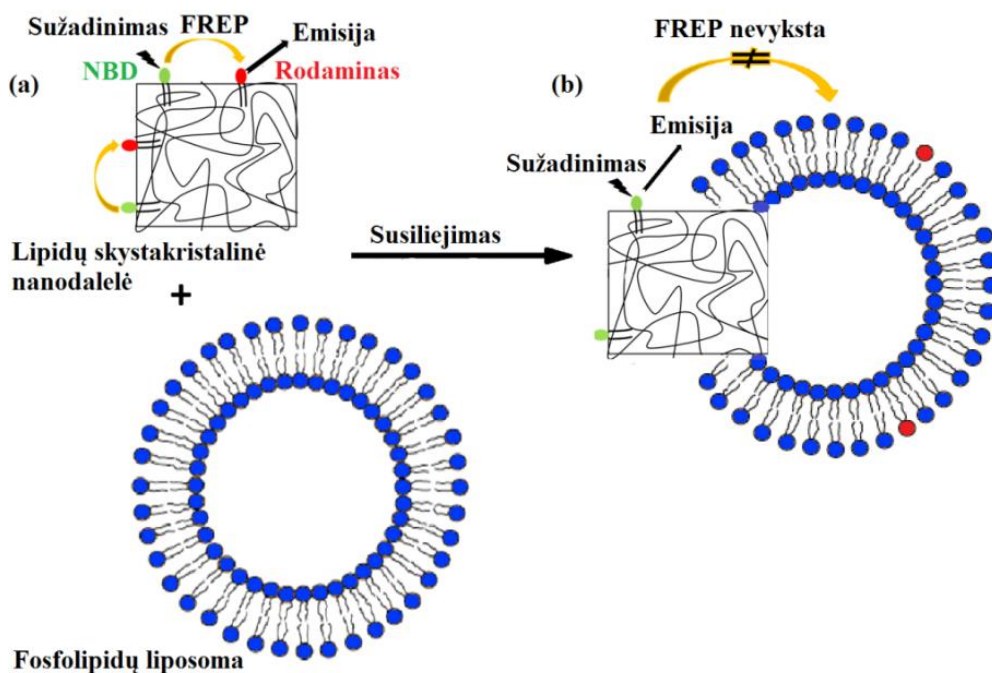
$$D = \frac{k_B T}{6\pi \eta r}, \quad (\text{II.5})$$

čia: D – difuzijos konstanta, k_B – Boltzmano konstanta, T – absoliuti temperatūra, η – aplinkos klampumas, r – sferinių dalelių spindulys. Dalelių dydžio pasiskirstymai apibūdinami iš apskaičiuotų intensyvumų vidurkio ir polidispersiškumo indekso. O ζ potencialas apskaičiuotas panaudojus Smoluchovskio aproksimaciją dispersijai vandenyje su dinamiu klampumu 0,8872 mPa·s, refrakcijos indeksu 1,33 ir dielektrine konstanta 78,5.

10. Fluorescenciniai metodai

Lipidų skystakristalių nanodalelių ir liposomų susiliejimo arba pažaidos tyrimai matuoti su liuminescenciniu spektrometru LS-55 (Perkin Elmer, JAV). Fioosterio rezonansinė energijos pernaša (FREP) – tai fluorescencinis metodas, kai donoro molekulės sužadavimo energija pernešama akceptorius molekulei nespinduliniu būdu per dipolis-dipolis sąveiką. FREP – tai nuo atstumo priklausoma sąveika tarp dviejų dažo molekulių elektroninių sužadintų būvių, kurioje sužadinimas nuo donoro molekulės pereina iki akceptorius molekulės *be fotonų emisijos*. (Stryer ir Haugland, 1967). FREP sąlygas tenkina atstumas tarp donoro ir akceptorius 1–10 nm ribose (Struck ir kt., 1981).

II. 5 paveiksle pateikta principinė eksperimento schema: a) į įvairias nanodaleles įterpiami fluorescuojančias žymes turintys lipidai (NBD-PE ir DHPE), kai donoras ir akceptorius yra per R_0 (Fioosterio atstumas), sužadinus donorą stebima akceptorius emisija – vyksta FREP; b) į žymėtų LSKN dispersiją pridėjus fosfolipidų liposomas, vykstant susiliejimui R_0 didėja ir FREP nebevyksta. Energijos pernaša registruojama sužadinus donorą NBD-PE 463 nm bangos ilgyje ir detektuojama akceptorius DHPE emisija 580 nm bangos ilgyje.



II. 5 pav. Principinė LSKN sąveikų su fosfolipidų liposomomis schema

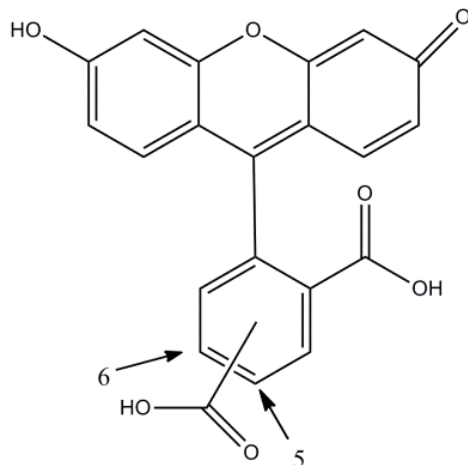
Fluorescuojantys lipidai įterpiami į LSKN dvisluoksnį, donoras (NBD-PE, žalias) sužadinamas bangos ilgiu 463 nm; akceptorius (rodaminas DHPE, raudonas) emisija detektuojama 580 nm bangos ilgyje. Donoras ir akceptoriai išsidėstę šalia vienas kito membranoje, FREP sąlyga išpildoma (a). Vykstant susiliejimui su fosfolipidų liposomomis, atstumas tarp donoro ir akceptoriaus fluoroforų didėja, akceptoriaus emisija nyksta, kol FREP jau nebevyksta (b). Realūs dydžiai: fosfolipidų liposoma – 1,3 μm , LSKN – apie 300 nm.

NBD-PE svarbios optinės savybės: fotopastovumas, nuo koncentracijos priklausomas savigesinimas ir fluorescencijos rezonansinės energijos pernaša rodaminio akceptoriams (įprastai rodaminas DHPE). Rodaminas DHPE nenoriai pereina tarp atskirtų lipidų dvisluoksnių. Fluorescencijos energijos pernaša tarp NBD ir rodaminio tinka membranos susiliejinimo tyrimams. NBD-PE atsparus pernašai tarp vezikulių (Invitrogen).

2 ml paruoštų LSKN (0,003 % palyginus su lipidais), pažymėtų su 1 mol% fluorescuojančių fosfolipidų (0,5 mol% DHPE ir 0,5 mol% NBD-PE), pridėtos į 1 cm kvarcines kiuvetes ir sumaišytos su 13 μl 4,5 % daugialamelių SPC liposomų, užtikrinant galutinį LSKN ir liposomų svorio santykį 1/10. Fluorescencijos emisijos gesinimas registruotas kambario temperatūroje 30 min., kai bangos ilgis

580 nm. Gautos fluorescencijos gesinimo kreivės koreguotos atsižvelgus į foninį signalą (atėmus intensyvumo duomenis iš SPC liposomų maišymosi su LSKN dispersijomis be fluorescencinių žymenų), ir normalizuotos (pradinis intensyvumas prilygintas 100 %). Papildomai visos LSKN dispersijos tikrintos, ar įterptų fluorescencinių žymenų fluorescencijos intensyvumas nemažėja spontaniškai, pvz., dėl fotoblukinimo maišymosi eksperimento metu. Imituojant kuo tiksliau *in vivo* sąlygas, visi FREP maišymosi eksperimentai tikslingai vykdomi, kai LSKN/SPC liposomų masės santykis lygus 1/10, pvz., imituojamas įšvirkštų LSKN sisteminis praskiedimas su ląstelių membranų pertekliumi. Visi FREP matavimai atlikti su naujai paruoštomis, pažymėtomis fluorescuojančiais lipidais, LSKN dispersijomis.

Kitas fluorescencinis metodas – savigesinančios fluorescencijos metodas gali būti efektyviai taikomas lipidinės membranos pralaidumo pokyčių tyrimams. Metodas taikomas tyrimuose, kuriuose yra naudingas fluorescencijos intensyvumo praradimas dėl fluorescuojančio dažo molekulių tarpmolekulinių sąveikų. Šio darbo metu į paruoštų vienlamelinių lipidinių struktūrų vidų įterpiamas fluoroforas 5-(6) – karboksifluoresceinas (žr. II. 6 pav.). Kai fluoroforas dimerinės formos, vyksta fluorescencijos gesinimas. Matavimo metu, keičiantis vienlamelinių liposomų membranų pralaidumui, karboksifluoresceinas išeina iš liposomų į supančią aplinką (tirpalą), jo dimerinei formai virstant monomerine. Nutolus KF monomerams, fluorescencija detektuojama spektrofotometru. Vykstant membranos pokyčiams ir ištekant fluorescuojančiam dažui, stebimas fluorescencijos didėjimas. KF pasirinktas dėl to, kad: (a) nesiriša su liposomų membranomis; (b) inertiškas; (c) lengvai kiekybiškai nustatomas analitiniais metodais (fluorimetrija) (Senior, 1987). Matavimai, kurių trukmė 30 min, atlikti $\lambda_{\text{sužadavimo}} - 492 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisijos}} - 520 \text{ nm}$ bangos ilgiuose.



II. 6 pav. Karboksifluoresceino struktūrinė formulė

Maksimalus (100 %) KF išėjimas pasiektas, sumaišius SPC liposomas su 10 μ l 5 % Triton X-100 tirpalo. O išėjusio KF dažo procentinė koncentracija apskaičiuota pagal šią formulę:

$$X_{\text{išėjęs KF, \%}} = \frac{I_d - I_0}{I_T - I_0} \times 100 \%, \quad (\text{III.6})$$

kai I_d ir I_T – galutinės fluorescencijos intensyvumo reikšmės po 30 min liposomų sąveikos, atitinkamai, su nanodalelių dispersijomis ir Triton X-100 tirpalu. I_0 – pradinis SPC liposomų fluorescencijos intensyvumas.

11. Elipsometrija

Oksiduoti silicio paviršiai paruošti iš poliruotų silicio vaflių (p-tipo, boro dopinguoti, savitoji varža 1–20 $\Omega \cdot \text{cm}$) (Linčopingo universitetas, Švedija ir Semiconductor Wafer Inc., Taivanas). 10 mm pločio plokštelės nuvalomos, pirmiausia baziniame mišinyje: NH_4OH 25 %, 30 % H_2O_2 ir H_2O (1:1:5 pagal tūrį) (5 min, 80 $^\circ\text{C}$); tada nuplaunamos su vandeniu, toliau laikomos rūgštiniame mišinyje: 32 % HCl , 30 % H_2O_2 ir H_2O (1:1:5 pagal tūrį) (5 min, 80 $^\circ\text{C}$). Elipsometrijos padėklai kruopščiai nuplaunami vandeniu, etanoliumi ir laikomi etanolyje (> 99 %) iki panaudojimo. Prieš matavimus padėklai nuplaunami su etanoliumi ir vandeniu, išdžiovinami su azoto dujomis ir nuvalomi 5 min plazmoje (Harrick Scientific Corp., JAV).

Katijoniniai silicio paviršiai paruošti skystosios-fazės silanizacijos metu. Plazmoje išvalyti padėklai išdžiovinami krosnyje, kad pasišalintų likutinė vandens drėgmė. Plokštelės inkubuotos apie 2 val. bevandeniame toluene su 2 % 3-aminopropiltrioksisilano azoto atmosferoje. Silanizuoti padėklai veikiami ultragarsu toluene, toluenas/etanolis (1:1), ir etanolyje tam, kad pasišalintų nesureagavusios medžiagos. Katijoniniai padėklai išdžiovinami (120 °C) ir laikomi etanolyje iki panaudojimo.

Hidrofobiniai silicio paviršiai paruošti dujinės-fazės silanizacijos metu. Iš karto prieš silanizaciją, silicio plokštelės valomos plazmoje (5 min ore, 0,04 mbar) bet kokiems organiniams teršalams pašalinti, ir dedamos į desikatorių su maždaug 1 ml dimetiloktilchlorsilano. Paliekama pernakt desikatoriuje (apie 0,01 mbar) kambario temperatūroje. Kitą dieną, nesureagavusioms medžiagoms pašalinti, silanizuoti padėklai veikiami ultragarsu tetrahidrofurane ir etanolyje 20 min. Padėklai laikomi etanolyje iki panaudojimo. Šios procedūros metu paruoštų hidrofobinių paviršių vandens kontaktinis kampas $> 90^\circ$ (duomenys nepateikiami).

Chitozanu dengti paviršiai paruošti adsorbuojant jį vandenyje ant silicio paviršiaus. Chitozanas tirpinamas 1 % acto rūgštyje (10 mg/ml) 24 val., nuolat maišant, iki visiško ištirpinimo. Tirpalas toliau skiedžiamas vandeniu iki 1 mg/ml koncentracijos. 500 μ l 1 mg/ml chitozono tirpalo suleidžiama į elipsometrinę kiuvetę, kurioje galutinė chitozono koncentracija lygi 0,1 mg/ml. Silicio padengimas, stebėtas realiu laiku, baigiamas, pasiekus adsorbavusio chitozono storio ir kiekio pusiausvyrą. Padėklai panaudojami iškart.

LSKN adsorbcija ant skirtingų paviršių išmatuota *in situ* nulinės elipsometrijos metodu (Tiberg ir Landgren, 1993; Vandoolaeghe ir kt., 2006) automatiniu plonųjų sluoksnių elipsometru (Rudolph Research, JAV) su ksenonine lankine lempa. Nufiltruoto šviesos šaltinio bangos ilgis 401,5 nm. Padėklas dedamas į 5 ml trapecijos formos kiuvetę. Mėginio gardelė maišyta ant magnetinės maišyklės (25 °C). Matavimai atlikti, kai šviesos kritimo kampas ~

67,85°. Prieš kiekvieną matavimą, silicio paviršiaus savybės apibūdinamos, panaudojus 3 sluoksnių modelį, darant prielaidą, jog pirminis izotropinis silicis supančioje terpėje yra su plonu oksido sluoksniu. Pirminio silicio padėklo kompleksinis lūžio rodiklis ($N_2 = n_2 - jk_2$), oksido sluoksniu storis bei lūžio rodiklis nustatomi išmatavus elipsometrinius kampus (ψ ir Δ) ore ir vandeninėje aplinkoje. Apskaičiuojami išmatuotų dydžių iš daugiau nei keturių skirtingų zonų vidurkiai, kad kompensuotų prietaiso komponentų optinius trūkumus. Adsorbuoto sluoksniu optinis storis (d) ir lūžio rodiklis (n) modeliuojami pagal optinį keturių sluoksnių modelį. Adsorbuotas kiekis, Γ , apskaičiuojamas panaudojus de Feijterio aproksimaciją (De Feijter ir kt., 1978):

$$\Gamma = \frac{(n-n_0)d}{dn/dc} \quad , \quad (\text{II.7})$$

čia: n_0 – tirpiklio lūžio rodiklis ir dn/dc – adsorbuotų medžiagų lūžio rodiklio padidėjimo priklausomybė nuo jo pirminės koncentracijos. Skirtingų koncentracijų LSKN vandeniniams tirpalams lūžio rodiklio augimo reikšmė ($dn/dc = 0,15 \text{ ml/g}$) išmatuota refraktometru (Multiscale Automatic, RFM-81, $\lambda = 589,3 \text{ nm}$, BS, Anglija). Po paviršių apibūdinimo, į kiuvetę suleidžiama 10 μl LSKN dispersijos (5 % arba 50 mg/ml) iki galutinės 0,1 mg/ml koncentracijos.

12. Kriogeninė transmisinė elektroninė mikroskopija

Mėginiai paruošti kontroliuojamos (25–28 °C ribose) temperatūros ir drėgmės (santykinė drėgmė arti įsotinimo) aplinkoje, tokiu būdu užtikrinama stabili temperatūra ir išvengiama vandens praradimo mėginio ruošimo metu. Užnešama 5 μL 5 % LSKN dispersijos ant anglimi dengtų vario grotelių ir švelniai nusausinama su filtravimo popieriumi. Mėginys gaunamas su plona skysčių plėvele (20–400 nm). Grotelės greitai panardinamos skystame etane (–180 °C), vanduo esantis mėginiuose paverčiamas amorfiniu ledu. Siekiama išvengti ledo kristalų susidarymo ir išsaugoti nepažeistą mėginį. Paruošti bandiniai iki matavimų laikomi skystame azote (–196 °C). Mėginių pernešimui į elektroninį

mikroskopą (EMBL Heidelberg, Vokietija) su įrengtu po kolonėlės energijos filtru (Gatan Inc., JAV), panaudotas kriogeninis laikiklis (Cryospares, JK). Matavimo sąlygos: įtampos pagreitis 120 kV ir darbinė temperatūra palaikoma mažesne nei –180 °C. Vaizdai įrašyti skaitmeniškai su CCD kamera žemų elektronų dozių sąlygomis.

13. Konfokalinė mikroskopija

Ant paviršiaus adsorbuotos nanodalelės nufotografuotos su fluorescenciniu lazeriniu skenuojančiu mikroskopu (Leica, TCS, SPS Italija). 30 µL vandeninio 0,1 mg/ml rodamino (PolyFluor 570) tirpalo pridedama į 1 ml 5 % LSKN dispersijos. Fluorescuojančių dažų įterpimas trunka ilgiau nei 2 val. Silicio padėklai paruošti kaip aprašyta aukščiau. Žymėtos LSKN dispersijos adsorbuojamos ant silicio paviršiaus 1 val. 1 mg/ml, ir tada nuplaunamos pH 4 vandeniui. Adsorbuoti padėklai nufotografuojami po vandeniui su 0,15 mm vaizdavimo tarpikliu (*Secure-Seal Spacer*) tarp dengiamojo stiklelio, kad išvengtume suspaudimo. Sužadintų fluorescencinių dalelių 543 nm He-Ne lazeriu emisija stebėta 572 nm bangos ilgyje.

III skyrius. REZULTATAI ir jų APTARIMAS

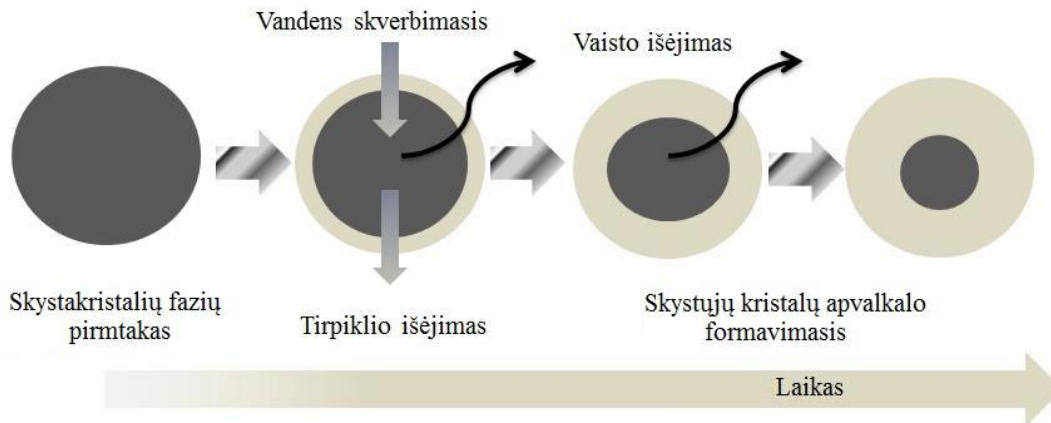
I skyriuje. Literatūros apžvalgoje aptarti keli skystuosius kristalus formuojantys lipidų mišiniai, kurie tiktų kurti vaistų nešiklius. Šio darbo pagrindą sudaro sojos fosfatidilcholino ir glicerolio dioleato lipidų mišiniai. Tokie mišiniai pasižymi įdomiomis ir naudingomis biologiškai adhezinėmis savybėmis. SPC natūralus, plačiai naudojamas maisto pramonėje ir nebrangus lipidas. Kaip parodyta ankstesniuose tyrimuose, SPC ir GDO mišinių nelamelinių SK fazių savybės įdomios ir dėl to tinka uždelstam bei lėtam vandenyje tirpiųjų modelių ir vaistinių junginių išėjimui (Rosenbaun ir kt., 2010; Cervin ir kt., 2009, 2010). Todėl tikslinga susieti tokių mišinių struktūrinės savybės su biologiškai aktyviųjų junginių atpalaidavimo geba.

Skystojo kristalo pirmtako mišinys tinka aktyviųjų medžiagų pernašai paodyje, o disperguotų SK fazių nanodalelės – intraveniniam vaistų pernešimui. Taigi, toliau šios sistemos nagrinėjamos atskirai. Pirmame poskyryje apibūdinama lipidų SPC/GDO mišinių fazinė elgsena ir SK fazių formavimasis. O antrame poskyryje aptariamos nanodalelių savybės ir jų susilieėjimas su ląstelių membranų modeliais ir įvairiais kietaisiais paviršiais.

1. Lipidų sojos fosfatidilcholino ir glicerolio dioleato mišinių fazių elgsena

Lipidų skystųjų kristalų formavimas: vaistų nešikliai sušvirkščiami į paodį ar kūno ertmę sąlyginai skysto būvio SK pirmtako pavidalu; laikui bėgant ir bevandeniam SK pirmtakui palengva absorbuojant kūno skysčius, formuojamas skystakristalių fazių apvalkalas; tuo pačiu metu išeina biologiškai aktyvioji medžiaga (žr. III. 1 pav.); laikui bėgant nešiklis suskaidomas suleidimo vietoje. Visi šie sudėtingi procesai įvyksta lygiagrečiai vienu metu. Taigi, svarbu išsiaiškinti kokias savitvarkes struktūras formuos lipido ir vandens mišinys, keičiant mišinio sudėtį. Be to, formuojamos skystakristalės struktūros gali būti siejamos su vaisto išėjimo profiliu. Vadinasi, detalus supratimas apie

formuojamas SK fazes, t.y. fazių elgseną, padės kontroliuoti ir programuoti atitinkamas busimųjų vaistų nešiklių savybes. Todėl itin svarbu nustatyti lipidų SPC/GDO mišinio fazių elgseną dalinės ir visiškos hidratacijos sąlygomis. Orädd jau aprašė lipidų SPC ir GDO bei sunkiojo vandens mišinio fazinę elgseną (Orädd ir kt., 1995), tačiau ji kontraversiška bei paliktos nenustatytos dviejų ir trijų fazių sritys (žr. I. 11 B pav.). Todėl šio darbo tikslas buvo detaliau iširti lipidų SPC/GDO mišinių fazių virsmus tinkamesnėmis fiziologinėmis sąlygomis.



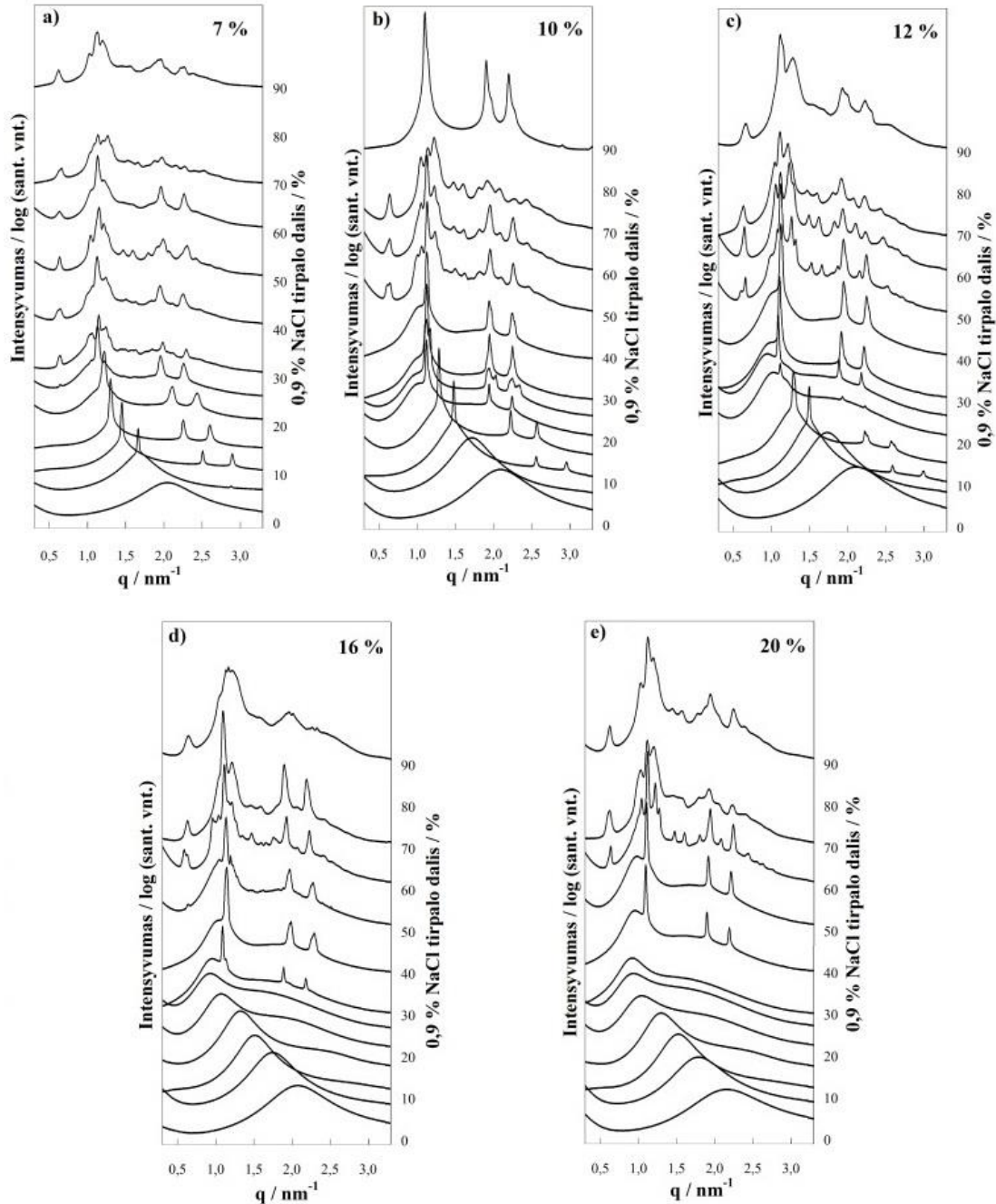
III. 1 pav. *Nedetali skystojo kristalo monolito formavimo iliustracija*

Lipidų fazių elgsenos (polimorfizmai) pateikiamos dažnai fazinėse diagramose, iš kurių paprasčiausiose kinta vandens dalis ir temperatūra. Norima lipidų mišinio fazė gaunama, parinkus atitinkamą hidratacijos laipsnį ir temperatūrą. Šiame darbe lipidų SPC/GDO mišinių fazių elgsena apibūdinta klasikiniu metodu – mažojo kampo rentgeno spindulių difrakcija. Matavimai atlikti sinchrotroninėje laboratorijoje (Lundas, Švedija), kadangi laboratorinio rentgeno spindulių šaltinio srauto skiriamosios gebos nepakanka nelamelinių struktūrų analizei. O su sinchrotroniniu rentgeno spindulių aukšto srauto šaltiniu gautos aukštos kokybės difraktogramos.

1.1. Tirpiklio įtaka

Etanolis (EtOH) lipidų SPC/GDO mišinių paruošimo metu naudojamas kaip tirpiklis mišinio homogenizacijai. Taip pat per didelę EtOH koncentracija nešiklyje po suleidimo į paodį gali būti vietinio sudirginimo priežastimi. Įvertinta

reikalinga etanolio koncentracijos riba, kai vyksta virsmas iš atvirkštinių micelių (L_2) į nelamelines skystakristales fazes. Duomenys surinkti iš lipidų SPC/GDO mišinių (svorio santykis 50/50) su skirtingomis etanolio koncentracijomis.



III. 2 pav. Hidratuotų SPC/GDO/EtOH mišinių MKReD profilių priklausomybė nuo fiziologinio tirpalo koncentracijos

Pateiktuose MKReD profiluose SPC/GDO/EtOH mišinių svorio santykiai: a) 46,5/46,5/7; b) 45/45/10; c) 44/44/12; d) 42/42/16 ir e) 40/40/20. Fiziologinio tirpalo koncentracijos kinta tarp 0 ir 90 % nuo bendros mišinio masės. Matavimai atlikti 25 °C temperatūroje.

III. 2 paveiksle pateikiamos SPC/GDO/EtOH mišinių MKReD difraktogramos fiziologinio tirpalo nuo 0 iki 30 % (didėja kas 5 svorio %) ir nuo 40 iki 90 % (didėja kas 10 svorio %) koncentracijų ribose. Pageidautina, jog suleidžiamas pusiau skysto būvio nešiklis pasižymėtų mažu klampumu. **III. 2 a paveiksle** parodyta, kai etanolio koncentracija 7 % nuo bendros mišinio masės, jog jau 5 % fiziologinio tirpalo koncentracijos pakanka nelamelinės SK fazės suformavimui. SK fazė (šiuo atveju, atvirkštinė heksagoninė H_2) atsiranda greitai po kontakto su vandenine terpe. Formuojama dvimačio periodiškumo H_2 fazė charakterizuojama gerai išreikštais trimis atspindžiais, kurių santykinės pozicijos sudaro šią eilę: $1:\sqrt{3}:2$.

Kitų dviejų mišinių, kai etanolio koncentracija, atitinkamai, 10 ir 12 %, fazinė elgsena labai panaši tarpusavyje. Tačiau visiškos hidratacijos sąlygomis (90 % fiziologinio tirpalo) tik vienu atveju, kai etanolio dalis siekia 10 % nuo bendros mišinio masės, formuojasi tvarkinga atvirkštinė heksagoninė fazė. O, kai etanolio koncentracija 16 ir 20 %, prireikia, atitinkamai, 30 ir 40 % fiziologinio tirpalo nuo bendros mišinio masės nelamelinės skystųjų kristalų fazės suformavimui. Etanolio koncentracijai didėjant, plečiasi membrana, kartu mažėja jos storis (Gurtovenko ir Anwar, 2009). Toliau SK fazių pirmtakai ruošiami su 10 % etanolio, kuris nugarinamas, jeigu ruošiami mėginiai dalinės hidratacijos sąlygomis. Likutinė EtOH dalis mišinyje siekė apie 1 % nuo bendros mišinio masės. Vandeninės fazės pertekliuje (90 %) etanolio dėl prasiskiedimo mišinyje lieka neženkli dalis (apie 1 %). Taip pat tirpiklis nugarinamas iš mėginių skirtų biologiškai aktyviųjų medžiagų išėjimo modeliavimo tyrimams.

1.2. Fazių elgsena vandens pertekliuje

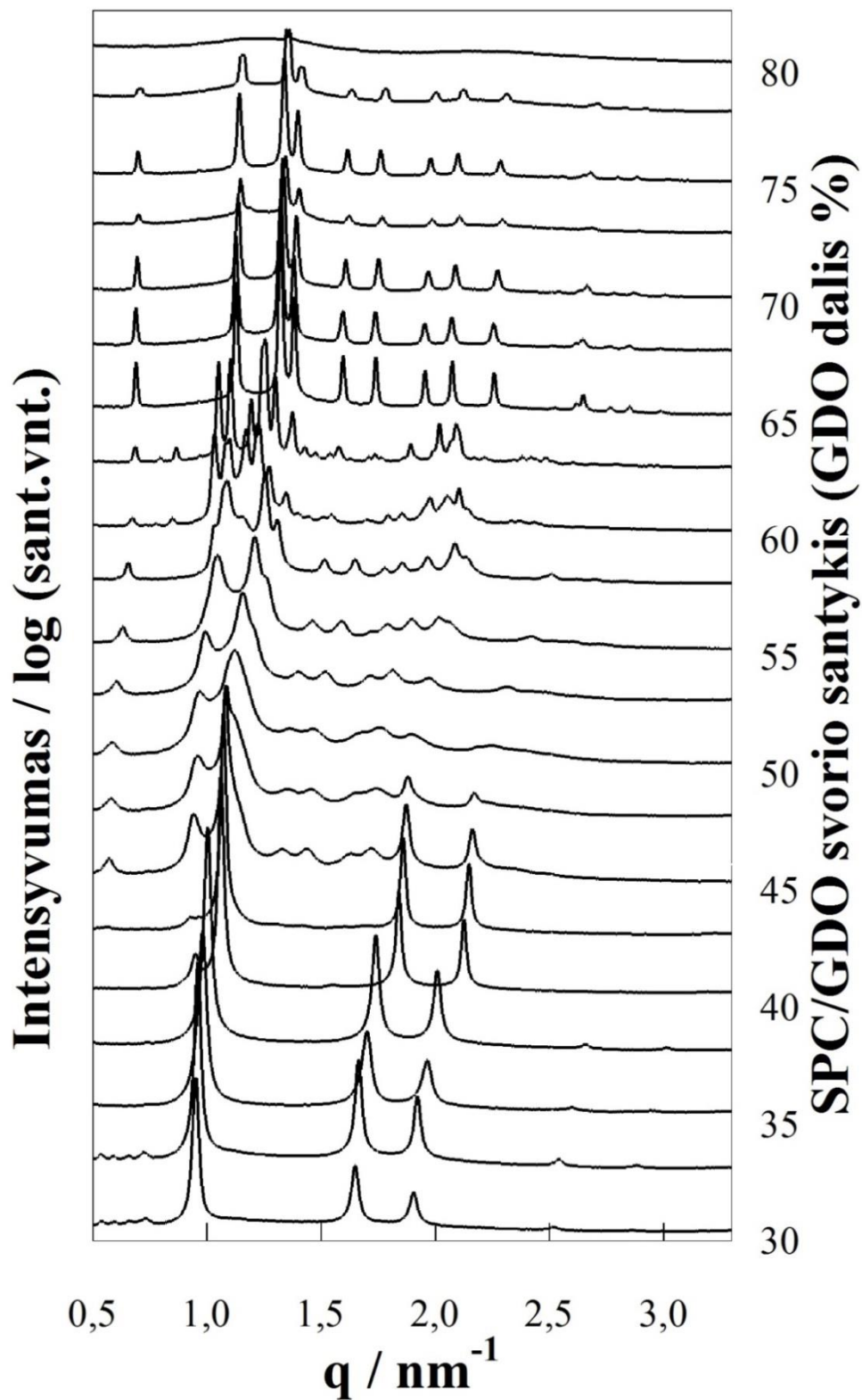
Dviejų lipidų SPC ir GDO mišinių pusiausvyrinė fazių elgsena detaliam tirta: vandens pertekliuje ir dalinės hidratacijos sąlygomis, taip pat, pakeičiant vieną iš sudedamųjų dalių. Sojos fosfatidilcholinai – tai kelių lipidų mišinys

išskirtas iš sojų pupelių, iš kurių didžiausią dalį sudaro fosfatidilcholoinai, dažniausiai su nuo C_{16} iki C_{18} ilgio grandinėmis su nei viena arba dviem dvigubom jungtim. Kadangi tyrime naudojamas SPC gamtinės kilmės, todėl jį sudaro ir ne-PC „priemaišos“.

III. 3 paveiksle pateikiami gauti visiškai hidratuotų (90 % vandens) lipidų SPC/GDO mišinių MKReD profiliai. Lipidų SPC ir GDO tarpusavio svorio santykiai kinta kas 2,5 % tarp 70/30 ir 20/80. Taip pat palyginimui **III. 4 paveiksle** pateikti lipidų dioleoilfosfatidilcholino (DOPC)/GDO mišinių MKReD profiliai visiškos hidratacijos sąlygomis (90 % vandens), kai lipidų svorio santykis kinta kas 2,5 % tarp 60/40 ir 25/75. DOPC – sintetinis fosfatidilcholinas, dviejų C_{18} ilgio grandžių su vienu dvigubu ryšiu kiekvienoje grandyje. DOPC pagal struktūrą labai panašus į PC, kurie sudaro didžiausią (> 94 %) SPC mišinio dalį. Kaip matome iš MKReD duomenų lipidų SPC/GDO mišinių fazinė elgsena iš tiesų įvairesnė, gausesnė ir kompleksinė negu pateikti lipidų DOPC/GDO mišinio faziniai virsmai. Ypač reikėtų atkreipti dėmesį į PC/GDO svorio santykių atkarpą tarp 60/40 ir 40/60.

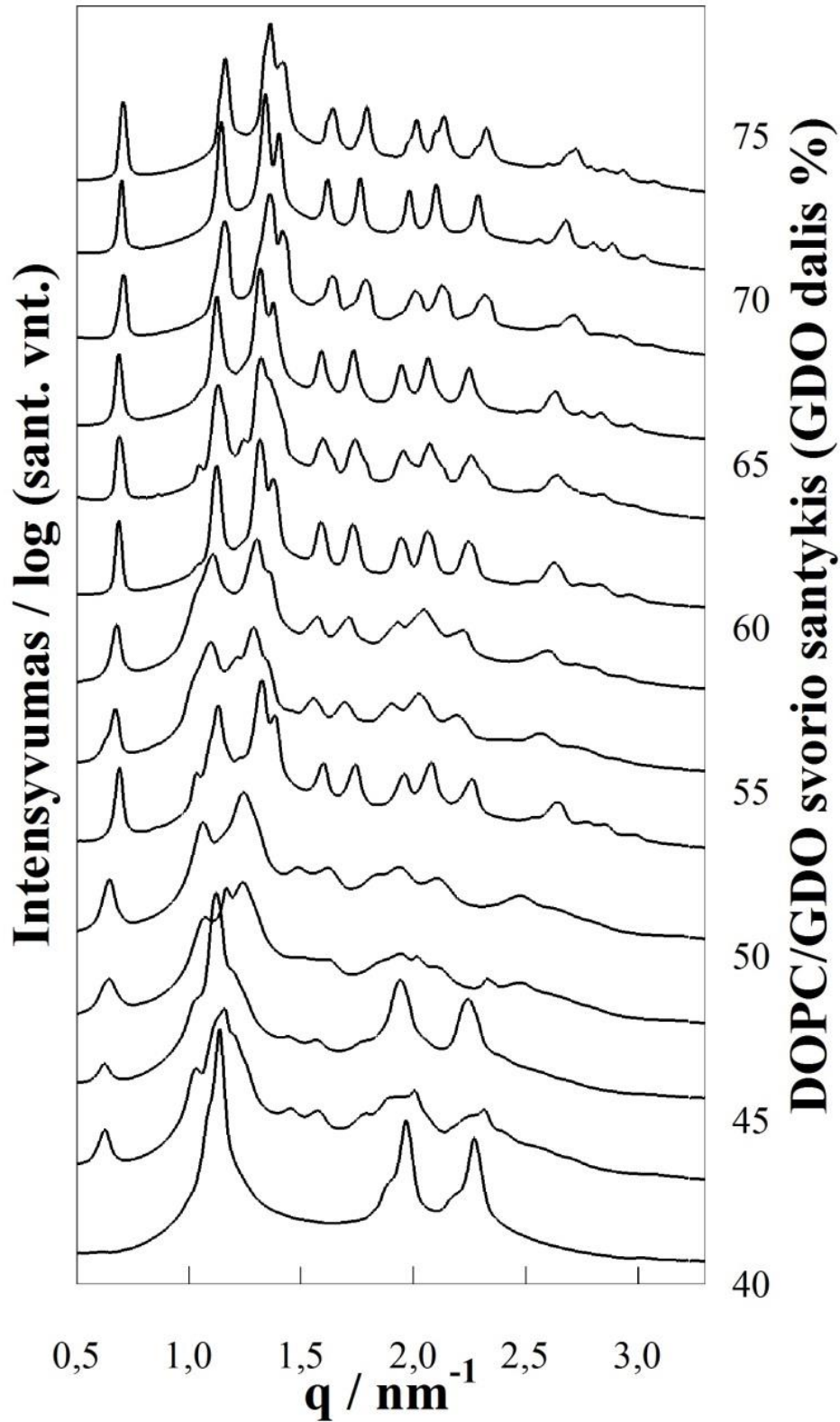
Mišiniuose su mažesne GDO dalimi ir jai augant iki SPC/GDO svorio santykių 62,5/37,5 formuojama dvimačio periodiškumo (2D) H_2 fazė, charakterizuojama penkiais savitais atspindžiais, kurių santykinių pozicijų eilė yra $1:\sqrt{3}:2:\sqrt{7}:3$ (atitinkamas Milerio indeksavimas 100, 110, 200, 210, 300 ir t.t.). Suskaičiuotas gardelės parametras (a) $2D-H_2$ (erdvinė grupė $P6mm$) fazei mažėja nuo 7,66 iki 7,25 nm tarp lipidų SPC/GDO mišinių svorio santykių 70/30 ir 62,5/37,5.

Didėjant GDO daliai mišinyje, pradeda atsirasti atvirkštinė diskretinė kubinė fazė, kurios vienfazinis regionas yra tarp SPC/GDO 50/50 ir 45/55 svorio santykių. Tai aiškiai nurodo pirmų 9 Brego smailių santykinės padėtys, esančios $\sqrt{3}:\sqrt{8}:\sqrt{11}:\sqrt{12}:\sqrt{16}:\sqrt{19}:\sqrt{24}:\sqrt{27}:\sqrt{32}$, kurios gali būti indeksuojamos kaip kubinės fazės $Fd3m$ erdvinės grupės atspindžiai (žr. III. 5 a pav.).



III. 3 pav. Visiškai hidratuotų lipidų SPC/GDO mišinių MKReD profilių priklausomybė nuo lipidų mišinio sudėties

Svorio santykiai kinta kas 2,5 % tarp 70/30 ir 20/80, matavimai atlikti 25 °C temperatūroje.



III. 4 pav. *Visiškai hidratuotų lipidų DOPC/GDO mišinių MKReD profilių priklausomybė nuo mišinio sudėties*
Svorio santykiai kinta kas 2,5 % tarp 60/40 ir 25/75, matavimai atlikti 25 °C temperatūroje.

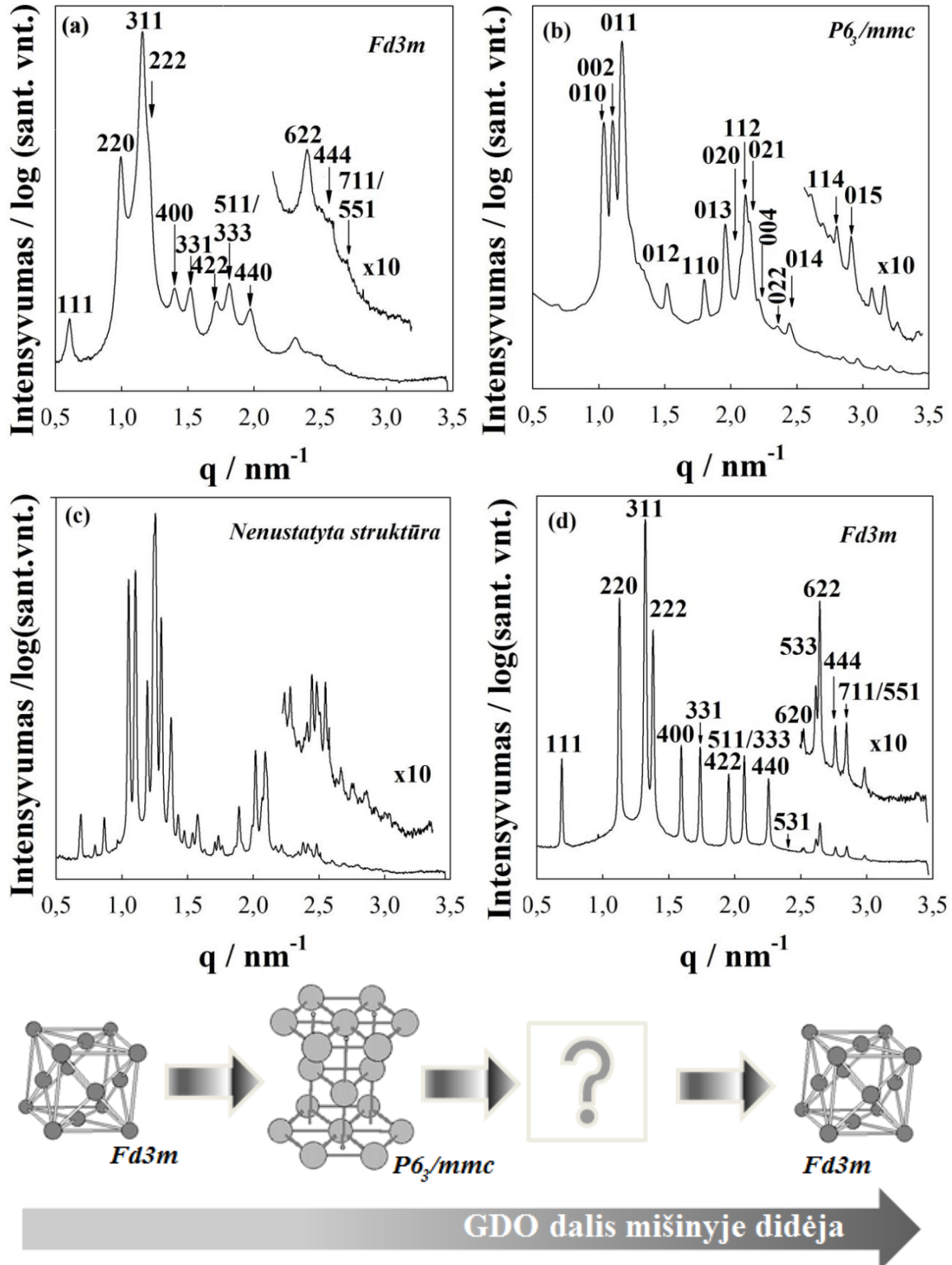
Vis didėjant GDO daliai mišinyje, kubinės fazės gaunama Gardelės kraštinės (a) skaitinė reikšmė varijuoja nuo 18,7 iki 17,3 nm. Gardelės kraštinės mažėjimas siejamas su neigiamo išlinkimo augimu ir/arba kubinės fazės brinkimo gebėjimo sumažėjimu. Judama link neigiamesnio vidutinio paviršiaus kreivumo (H , žr. I.4 pav.).

Mišiniuose su didesnėmis GDO koncentracijomis atsiranda ypač siauras kitos SK fazės regionas, išsidėstęs maždaug tarp 42/58 ir beveik 40/60 SPC/GDO svorio santykių (žr. III. 5 b pav.). Identifikuoti 20 Brego pikų pateikiami **III. 1 lentelėje**. MKReD duomenys indeksuoti, darant prielaidą, jog ši trimačio periodiškumo fazė yra glaudaus heksagoninio supakavimo (ghs) struktūra.

III. 1 lentelė. 3D heksagoninės fazės indeksavimas su $P6_3/mmc$ simetrijos formavimu visiškai hidratuotose SPC/GDO (40/60) mišiniuose, naudojant gardelės parametrus $a = 69,85$; $c = 113,5$.

Nr.	hkl	Apskaičiuotas 2Θ	Stebėtas 2Θ	Nr.	hkl	Apskaičiuotas 2Θ	Stebėtas 2Θ
1	0 1 0	0,862	0,862	11	0 2 2	1,953	1,952
2	0 0 2	0,919	0,919	12	0 1 4	2,030	2,028
3	0 1 1	0,977	0,978	13	0 2 3	2,207	2,205
4	0 1 2	1,260	1,260	14	1 2 0	2,281	2,278
5	1 1 0	1,493	1,494	15	1 2 1	2,326	2,325
6	0 1 3	1,626	1,628	16	1 1 4	2,368	2,365
7	0 2 0	1,724	1,727	17	0 1 5	2,453	2,455
8	1 1 2	1,753	1,752	18	0 3 0	2,586	2,584
9	0 2 1	1,784	1,779	19	1 2 3	2,665	2,662
10	0 0 4	1,838	1,832	20	0 3 2	2,744	2,745

Analizė parodo, jog fazė suderinama su ghs gardele, vienodų sferinių atvirkštinių micelių turinčia $P6_3/mmc$ simetrija. Panaudojome sąryšį (III.1), kur d_{hkl} surištas su dviem gardelės kraštinių parametrais, a ir c , ir kai $R=c/a$:



III. 5 pav. Visiškai hidratuotų (90 % vandens) SPC/GDO mišinių SK fazių MKReD profilių priklausomybė nuo lipidų mišinio sudėties
 Lipidų SPC/GDO svorio santykiai: 47,5/52,5 (a), 40/60 (b), 37,5/62,5 (c) ir 35/65 (d). Struktūros atitinkamai indeksuotos Milerio indeksais, matavimai atlikti 25 °C temperatūroje.

$$\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{1}{a_{hkl}^2} \left(\frac{4}{3} (h^2 + k^2 + hk) + \frac{l^2}{R^2} \right) \quad (\text{III.1})$$

Apskaičiuoti 3D heksagoninės gardelės parametrai $a = 6,99$ ir $c = 11,35$ nm, su c/a santykiu lygiu 1,624, kuris labai artimas idealios ghs vienodų sferų gardelės reikšmei $R_{ideali} = \sqrt{8/3} = 1,633$. Be to, gautų MKReD atspindžių intensyvumai panašūs gautiems 3D heksagoninei $P6_3/mmc$ fazei DOPC/GDO/cholesterolis (Shearman ir kt., 2009) ir paviršiaus aktyviųjų medžiagų (Zeng ir kt., 2007) mišiniams vandenyje.

Tarp lipidų SPC/GDO svorio santykių apie 39/61 ir 37/63 egzistuoja labai siauras dar nenustatytos SK fazės regionas (žr. III. 5 c pav.). Pateikiami mažiausiai 30 Brego atspindžių, kurie nėra suderinami nei su kubinės ar 3D heksagoninės struktūrų gardelėmis. Kol kas šios struktūros nepajėgėme nustatyti. Galime tik spėlioti, kadangi ji yra tarp $P6_3/mmc$ ir $Fd3m$, tai jos struktūra turėtų būti „tarpinė“: tarp vienodų micelių glaudaus heksagoninio supakavimo struktūros ir atvirkštinių micelių $Fd3m$ kubinės gardelės. Dėl to **III. 5 c paveiksle** ši fazė priešingai nei kitos nėra indeksuojama Milerio indeksais. Taip pat šios fazės profilyje pateikti siauri atspindžiai nurodo labai tvarkingą nanostruktūrą.

Pradedant nuo lipidų SPC/GDO tarpusavio svorio santykio 35/65 vėl atsiranda atvirkštinė kubinė $Fd3m$ fazė. MKReD profilyje identifikuota mažiausiai 15 Brego pikų (žr. III. 5 d pav.). Didėjant GDO daliai, apskaičiuotas gardelės kraštinės parametras a šiai struktūrai mažėja maždaug nuo 15,81 iki 15,42 nm prieš virsmą į atvirkštinių micelių fazę, kai lipidų SPC ir GDO tarpusavio svorio santykis 20/80.

Visiškai hidratuoti lipidų SPC/GDO mišiniai su didėjančia GDO dalimi formuoja šių fazinių virsmų eilę: lamelinė (L_a) → 2D atvirkštinė heksagoninė (H_2 , iki SPC/GDO svorio santykio 62,5/37,5) → kubinė atvirkštinių micelių, $Fd3m$ erdvinė grupė (SPC/GDO svorio santykiai 50/50–45/55) → 3D atvirkštinė heksagoninė, erdvinė grupė $P6_3/mmc$ (SPC/GDO svorio santykiai 42/58–40/60) → nenustatytos struktūros (SPC/GDO svorio santykiai 39/61–37/63) → $Fd3m$

(SPC/GDO svorio santykiai 35/65–22,5/77,5) $\rightarrow L_2$ (nuo SPC/GDO svorio santykio 20/80). Pažymėtina, kad $Fd3m$ fazės grįžtamasis atsiradimas skirtinguose GDO dalyse nestebina ir neprieštarauja Gibso fazių taisyklei. Aptarta tokia sudėtinga fazinė elgsena anksčiau nebuvo stebima. Dauguma tyrimų, atliktų su DOPC/GDO mišiniais, pasižymėjo ne tokia gausia fazinių virsmų įvairove (Das ir kt., 1986; Seddon, 1990 a; Luzzati ir kt., 1992).

III. 4 paveiksle pateikti mūsų gauti MKReD rezultatai patvirtina, kad DOPC/GDO mišiniai vandens pertekliuje formuoja tiktai H_2 ir $Fd3m$ fazes. Atvirkštinių micelių $Fd3m$ kubinė fazė pradeda formotis nuo 52,5/47,5 DOPC/GDO tarpusavio svorio santykių. $P6_3/mmc$ struktūra nenustatyta grynam lipidų DOPC/GDO (40/60) mišiniui dalinės hidratacijos sąlygomis (Seddon ir kt., 2000). 3D heksagoninė fazė formuojasi tik trijų sudėtinių dalių lipidų DOPC/GDO/cholesterolis mišinyje (Shearman ir kt., 2009).

Taip pat reikėtų pažymėti, kad priešingai nei mūsų radiniai, anksčiau aprašyta visiškai hidratuotų lipidų SPC/GDO mišinių fazinė elgsena, taip pat neparodė $P6_3/mmc$ ir „tarpinės“ nenustatytos fazės formavimo (Orädd ir kt., 1995). Šio skirtumo priežastimi yra autorių tyrime naudotas deuteruotas, o ne grynas vanduo. Be to, visiškai hidratuoti mėginiai apibūdinti kaip dviejų ar trijų fazių sritys.

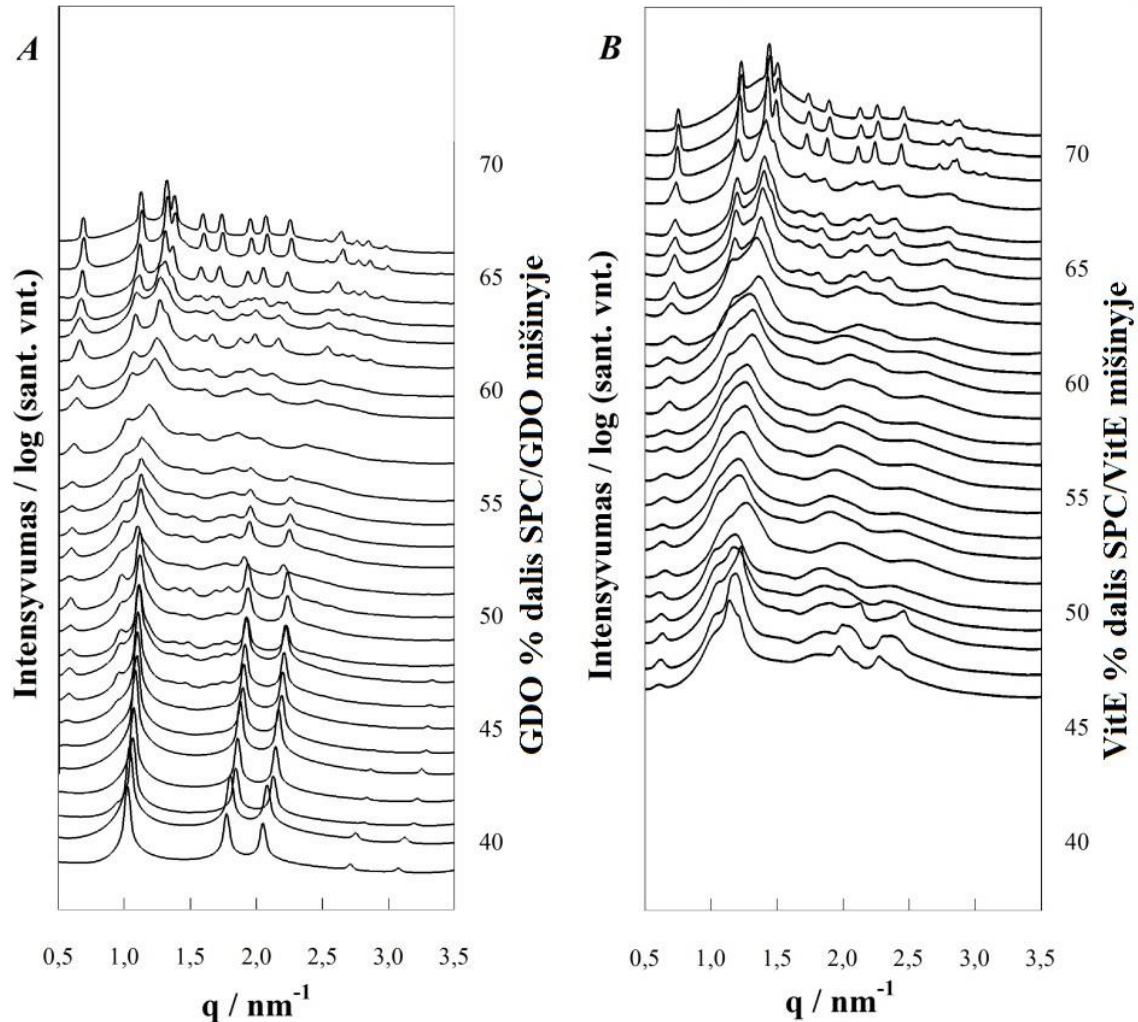
Kaip pateikta **III. 6 A paveiksle**, SPC/GDO fazinė elgsena, net pridėjus nedaug deuteruoto vandens, H_2O/D_2O (8/2) pertekliuje drastiškai kitokia negu gryname vandenyje, formuojamos tik H_2 ir $Fd3m$ fazės pateiktame lipidų mišinių sudėčių intervale. Atvirkštinių micelių $Fd3m$ kubinė fazė pradeda formotis, didėjant GDO daliai, nuo 56/44 lipidų SPC/GDO (90 % H_2O/D_2O mišinio) tarpusavio svorio santykių. Tvaringa atvirkštinė kubinė fazė atsiranda, didėjant GDO daliai mišinyje, nuo lipidų SPC ir GDO tarpusavio santykio 60/40.

Deuteruoto vandens poveikis fosfatidilcholinų mišinių fazių elgsenai yra aptartas ir literatūroje. D_2O poveikis lamelinių fazių fosfolipidų dvisluoksnių fazinių virsmų perėjimams tirtas kalorimetriškai (Matsuki ir kt., 2005). Šie tyrimai

parodė, jog D_2O mažina fosfolipidų užimtą molekulinį plotą dvisluoksnio sandūroje. Taip pat įrodyta, jog D_2O nepaveikė fosfatidilcholino dvisluoksnio storio, bet nulėmė tarplamelinio atstumo sumažėjimą, palyginus su H_2O (Kobayashi ir Fukada, 1998). Šis poveikis – tai bangavimo jėgų pokytis tarp dvisluoksnių (Israelachvili, 1991). Ploto mažėjimas, paveikus D_2O , gali būti susijęs su pokyčiais vidiniuose molekulinuose ir/arba tarpmolekuliniuose vandeniliniuose ryšiuose. Daromos šios prielaidos: D_2O poveikį galima paaiškinti per dideliu kubinės fazės jautrių; o H_2 fazės supakavimas turbūt per glaudus, kad reaguotų į pasikeitusį tirpiklį (Takahashi ir Jojiki, 2012).

Atkreiptinas dėmesys, jog pakeitus GDO į α -tokoferolį (Vitaminas E, VitE) vandeninės fazės pertekliuje (H_2O/D_2O (80/20)) (žr. III. 6 B pav.) stebima tokia pat fazinė elgsena kaip ir gryname vandenyje (Barauskas ir kt., 2008). Atvirkštinių micelių $Fd3m$ kubinė fazė pradeda formotis iš H_2 , didėjant VitE daliai, nuo 63/37 lipidų SPC/VitE (90 % H_2O/D_2O mišinio) tarpusavio santykių. SPC/VitE mišinys formuoja atvirkštinę $Fd3m$ kubinę fazę ir, dėl to patrauklus, konstruojant parenterinius kontroliuojamo įterptų medžiagų atpalaidavimo nešiklius, pvz., tinkamus poodiniam suleidimui (Thuresson ir kt., 2005). Didėjant VitE daliai, mišinys pereina iš netvarkingos H_2 (SPC/VitE svorio santykis 60/40) į tvarkingą atvirkštinių micelių $Fd3m$ fazę (SPC/VitE svorio santykis 35/65). Palyginus SPC/GDO ir SPC/VitE mišinius, pastebime, jog atvirkštinių micelių kubinė fazė GDO atveju atsiranda, kai GDO dalis didesnė nei 55 % nuo bendros lipidų mišinio masės. SPC/VitE mišinyje perėjimas vyksta, kai VitE dalis sudaro apie 40 % nuo bendros lipidų masės.

Pakeitus vieną iš sudedamųjų dalių lipidų SPC ir GDO mišiniuose (SPC pakeičiamas DOPC ir GDO pakeičiamas VitE mišinyje), sudaroma fazių seka: $H_2 \rightarrow Fd3m$, didėjant, atitinkamai, DOPC ir VitE daliai mišiniuose. Kadangi šie mišiniai formuojama nelamelines struktūras, – tai puikūs kandidatai kaip uždelsto atpalaidavimo vaistų nešikliai.



III. 6 pav. Visiškai hidratuotų (90 % pagal svorį, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (80/20)) lipidų mišinių MKReD profilių priklausomybė nuo lipidų mišinio sudėties

Kaip matome A) atveju SPC/GDO svorio santykiai tarp 62/38 ir 35/65, o B) atveju SPC/VitE svorio santykiai tarp 54/46 ir 30/70. Lipidų tarpusavio svorio santykių skalė dėl patogumo suvienodinta.

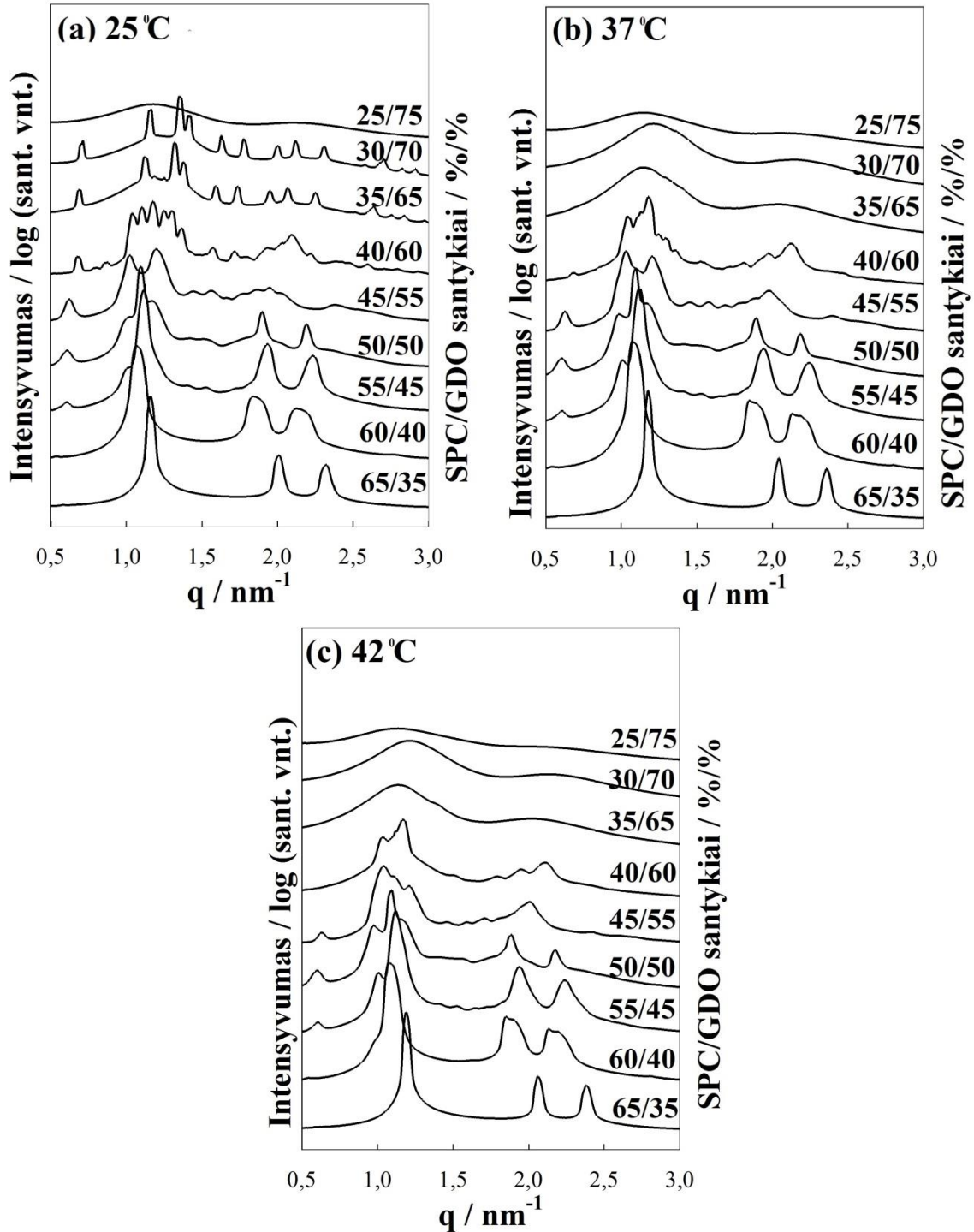
1.3. Temperatūros įtaka

Lipidų SPC/GDO mišinių fazių virsmai fiziologinio tirpalo (0,9 % NaCl) pertekliuje (žr. III. 7 a pav.) panašūs į vykstančius vandens pertekliuje (žr. III. 3 pav.) 25 °C temperatūroje. Vienintelis skirtumas, jog lipidų mišinių fiziologiniame tirpale fazių virsmų ribos šiek tiek pasislinkusios mažesnių GDO dalių kryptimi negu vandens pertekliuje. Svarbu, jog tinkamesnės fiziologinės temperatūros (37–42 °C) veikia atvirkštinių micelių $P6_3/mmc$ heksagoninės (SPC/GDO svorio

santykis 40/60) ir $Fd3m$ kubinės fazių stabilumą (žr. III. 7 b ir c pav.). Taigi, SPC/GDO/fiziologinis tirpalas mišinys 42 °C temperatūroje pasižymi tik 3 iš 6 skirtingų regionų: $2D-H_2$ fazė transformuojasi į netvarkingą, panašią į atvirkštinių micelių $Fd3m$ kubinę struktūrą (kai SPC/GDO svorio santykis 45/55), savo ruožtu, atvirkštinė kubinė fazė tiesiogiai virsta į L_2 fazę (kai SPC/GDO svorio santykis 25/75). Atvirkštinė kubinė fazė mažiau stabili, didėjant temperatūrai, tiesiogiai virsta į L_2 fazę, kai SPC/GDO svorio santykiai 35/65 ir 30/70. Atvirkštinė 2D heksagoninė fazė (SPC/GDO svorio santykiai nuo 65/35 iki 50/50) išlieka, keliant temperatūrą iki 42 °C.

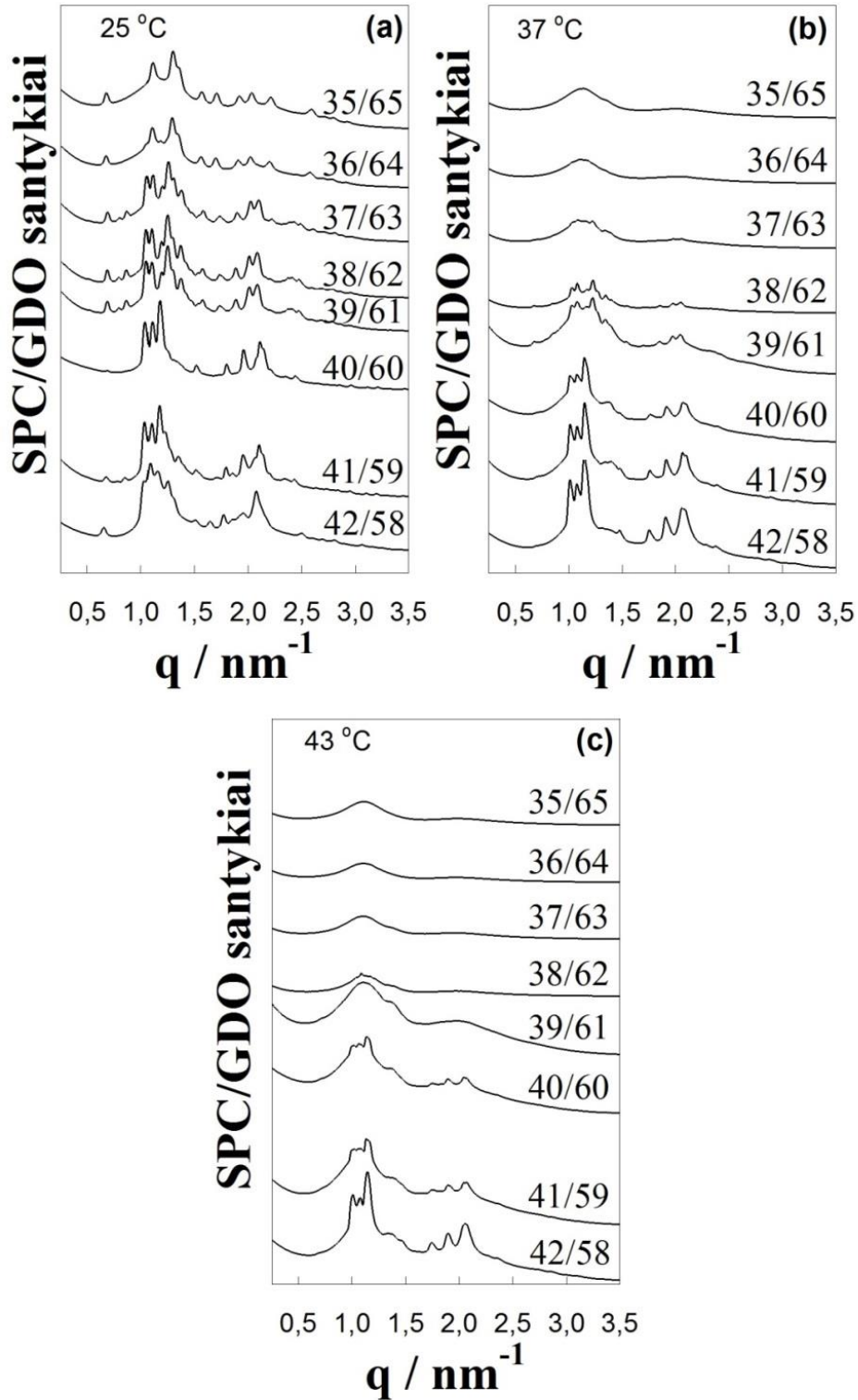
Atvirkštinės kubinės fazės ($Fd3m$ erdvinė grupė) nepatvarumas, keliant temperatūrą, taip pat stebėtas SPC/VitE mišinyje visiškos hidratacijos sąlygomis (Barauskas ir kt., 2008). Tiesa, šiuo atveju, stebėti fazių pokyčiai ne tokie dramatiški kaip lipidų SPC/GDO mišinyje. Taip pat ištirta detalesnė fazių elgsena, kai tarpusavio SPC/GDO svorio santykis kito kas 1 % tarp 42/58 ir 35/65 (žr. III. 8 pav.) ir 10–43 °C temperatūrų intervale (žr. III. 9 pav.). Lipidų SPC/GDO mišinys patiria $I_2 \rightarrow L_2$ fazinį virsmą labiau fiziologinėse temperatūrose, didėjant GDO daliai nuo lipidų SPC/GDO svorio santykio 38/62. Atvirkštinių micelių $P6_3/mmc$ heksagoninės fazės stabilumas mažėja, didėjant GDO daliai mišinyje.

III. 9 paveiksle pateikiami trijų pasirinktų lipidų SPC/GDO mišinių svorio santykių: a) 35/65; b) 37/63 ir c) 39/61 MKReD profiliai. Siekiama išsiaiškinti tikslesnius fazių virsmų temperatūros intervalus. Kaip matome, atvirkštinė kubinė fazė (SPC/GDO svorio santykis 35/65) pereina į atvirkštinių micelių fazę, kai temperatūra siekia 31 °C. Mažėjant lipidų mišinyje GDO daliai, perėjimas į L_2 fazę vyksta aukštesnėse temperatūrose, kai lipidų SPC/GDO svorio santykiai 37/63 ir 39/61, atitinkamai, 37 °C ir 40 °C temperatūroje. Gauti rezultatai leidžia susieti vaistų išėjimo iš nešiklio duomenis su fazių elgsena, keičiant aplinkos temperatūrą.



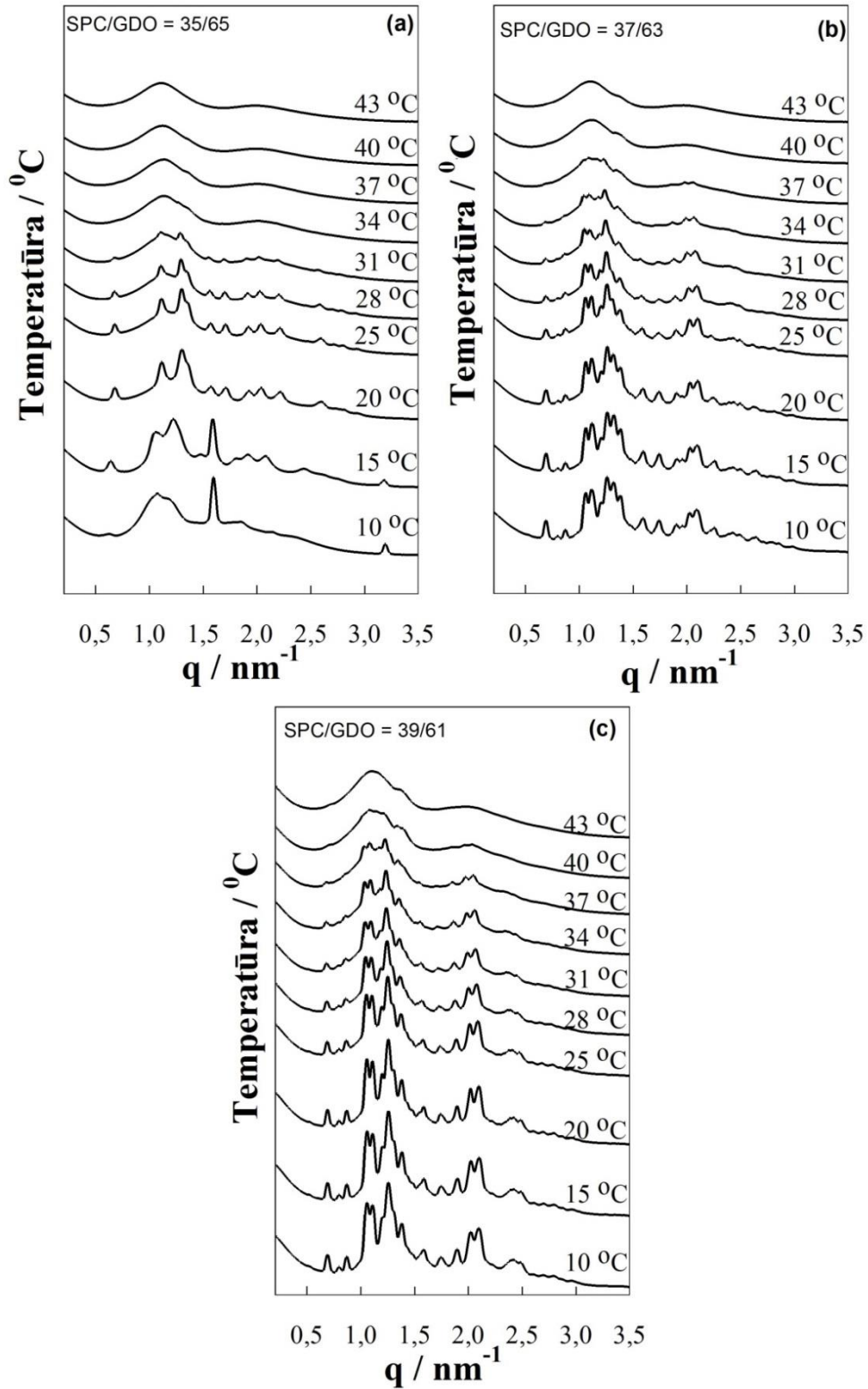
III. 7 pav. Visiškai hidratuotų (90 % fiziologinio tirpalo) lipidų SPC/GDO mišinių MKReD profiliai skirtingose temperatūrose

Lipidų SPC/GDO mišinių, svorio santykiai kinta kas 5 % tarp 65/35 ir 25/75, MKReD profiliai skirtingose temperatūrose: a) 25 °C, b) 37 °C ir c) 42 °C. Pastaba: GDO dalis mišinyje didėja nuo apačios į viršų.



III. 8 pav. Visiškai hidratuotų (90 % fiziologinio tirpalo) lipidų SPC/GDO mišinių MKReD profiliai skirtingose temperatūrose

Lipidų SPC/GDO mišinių, svorio santykiai kinta kas 1 % tarp 42/58 ir 35/65, MKReD profiliai skirtingose temperatūrose: a) 25 °C, b) 37 °C ir c) 43 °C. Pastaba: GDO dalis mišinyje didėja nuo apačios į viršų.



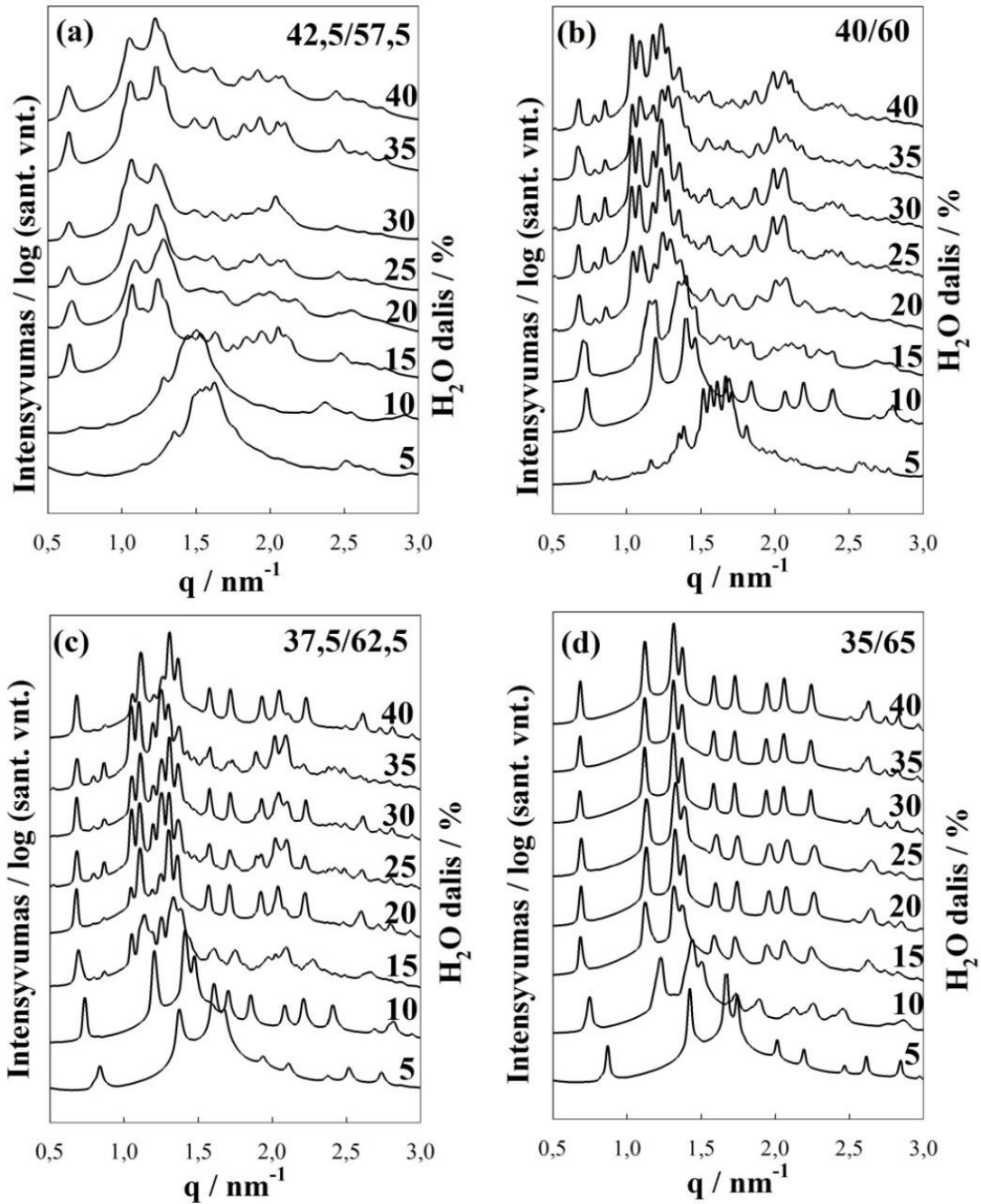
III. 9 pav. Visiškai hidratuotų (90 % fiziologinio tirpalo) lipidų SPC/GDO mišinių MKReD profiliai

Lipidų SPC/GDO mišinių svorio santykių: a) 35/65, b) 37/63 ir c) 39/61 MKReD profiliai temperatūrų 10–43 $^{\circ}\text{C}$ intervale.

1.4. Skystakristalio monolito brinkimas

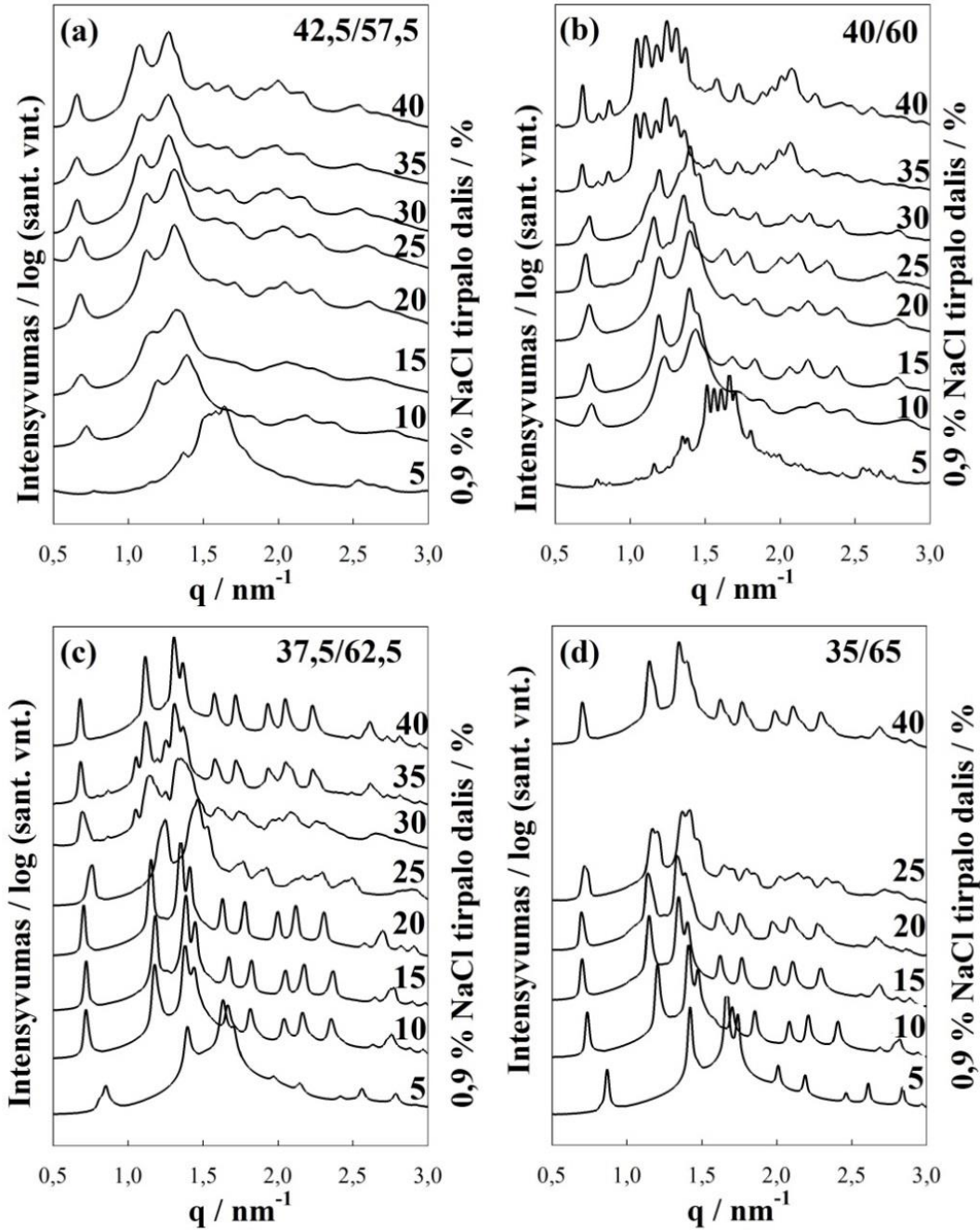
Aptartos skystųjų kristalų fazės, formuojamos visiškos hidratacijos metu, atitinka galutinę monolito fazių struktūrą biologiškai aktyviosios medžiagos išėjimo metu. Tačiau vis dar neaišku kaip greitai formuojasi SK fazės ir kaip jų apvalkalo dydis siejamas su pernešimo efektyvumu. Taigi, šioje darbo dalyje didesnę dėmesį skirsime fazės elgsenos tyrimui dalinės hidratacijos sąlygomis. Kokie vyksta faziniai virsmai kiekviename mišinyje, didėjant vandeninės fazės daliai; kokios fazių sritys ir t.t.?

Tikslinga ištirti tarpinių tarp H_2 ir $Fd3m$ fazių lipidų mišinių fazinę elgseną ir dalinės hidratacijos sąlygomis. Dalinės hidratacijos sąlygomis, 5–40 % gryno vandens arba fiziologinio tirpalo, formuojami faziniai virsmai, atitinkamai, pateikti **III. 10** ir **III. 11 paveiksluose**. Visuose lipidų SPC/GDO mišiniuose (svorio santykiai kinta kas 2,5 % tarp 45/55 ir 35/65) fazinė elgsena fiziologiniame tirpale stebima panaši kaip ir gryname vandenyje: *i*) kai SPC/GDO svorio santykis 45/55 hidratacijos metu tarp 15–40 % formuojama $2D-H_2$ fazė; *ii*) kai SPC/GDO svorio santykis 42,5/57,5 tarp 15–40 % vandeninės fazės egzistuoja atvirkštinių micelių kubinė fazė; *iii*) kai SPC/GDO svorio santykis 40/60 hidratacijos metu fiziologiniame tirpale tarp 10–30 % egzistuoja atvirkštinių micelių kubinė fazė, o vandenyje šios fazės sritis siauresnė ir išsidėsčiusi 10–15 % vandens regione; *iv*) kai SPC/GDO svorio santykis 37,5/62,5 fiziologiniame tirpale 5–40 % ribose egzistuoja atvirkštinių micelių kubinė fazė, o vandenyje matome šiek tiek kitą fazinę elgseną: 5–10 % vandens atvirkštinių micelių kubinė fazė, 15–40 % nenustatytos struktūros; *v*) kai SPC/GDO svorio santykis 35/65 visame hidratacijos regione suformuojama atvirkštinių micelių $Fd3m$ kubinė fazė. Kai kurie difraktogramose pateikti profiliai lieka nenustatyti, nes iš tikrųjų sudėtinga priskirti Brego pikus tam tikrai struktūrai. Vis dėlto dalinės hidratacijos mišinių virsmų tendencijos yra panašios kaip ir vandeninės fazės pertekliuje.



III. 10 pav. Skirtingų lipidų SPC/GDO mišinių brinkimo elgsenos MKReD profiliai vandenyje

Lipidų SPC/GDO mišinių, kurių svorio santykiai: (a) 42,5/57,5; (b) 40/60; (c) 37,5/62,5; (d) 35/65, brinkimas vandenyje (0–40 %)



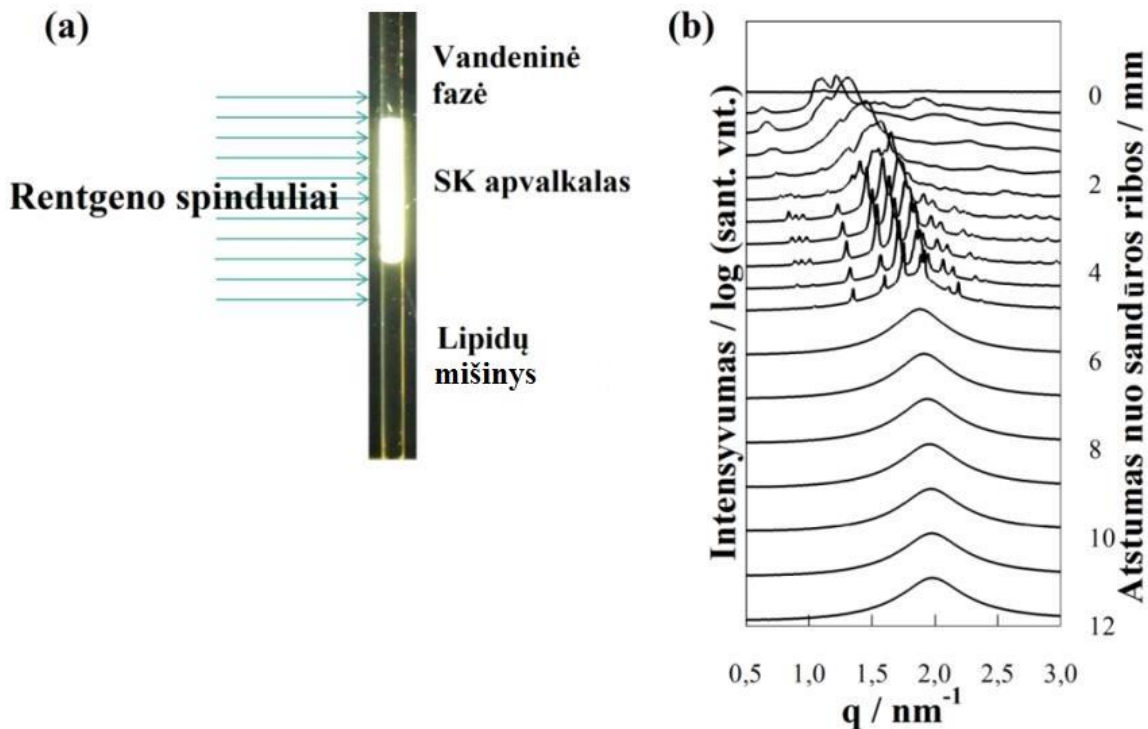
III. 11 pav. Skirtingų SPC/GDO mišinių brinkimo elgsenos MKReD profiliai fiziologiniame tirpale

Lipidų SPC/GDO mišinių, kurių svorio santykiai: 45/55 (a), 42,5/57,5 (b), 40/60 (c), 37,5/62,5 (d) ir 35/65 (e), brinkimas fiziologiniame tirpale (0–40 %).

1.5. Skystakristalio monolito brinkimo eigos tyrimas

Aukščiau pateikti duomenys charakterizuoja fazių virsmus dalinėje hidratacijoje pusiausvyrinėmis sąlygomis. Tačiau vis dar neaišku per kurį laiką iš

tikrųjų susiformuoja tam tikros struktūros, t.y. kokia hidratacijos eiga nepusiausvyrinėmis sąlygomis. Tuo tikslu SK fazių pirmtakai užlašinami į kapiliarus, o iš viršaus užpildoma fiziologiniu tirpalu (žr. III. 12 pav.). Mėginiai paliekami vertikaliaje padėtyje. Po nustatyto laiko skirtingose kapiliaro vietose gauti MKReD profiliai. Tokiu būdu modeliuojamos apvalkalo brinkimo sąlygos. Suleisto į paodį SK fazių pirmtako išorėje brinkimo metu susidaro skirtingo storio SK apvalkalas. Skystakristalio apvalkalo storis nustatomas iš gautų MKReD profilių pagal susiformavusias SK fazes, atstumas skaičiuojamas nuo sandūros ribos tarp lipido ir fiziologinio tirpalo.

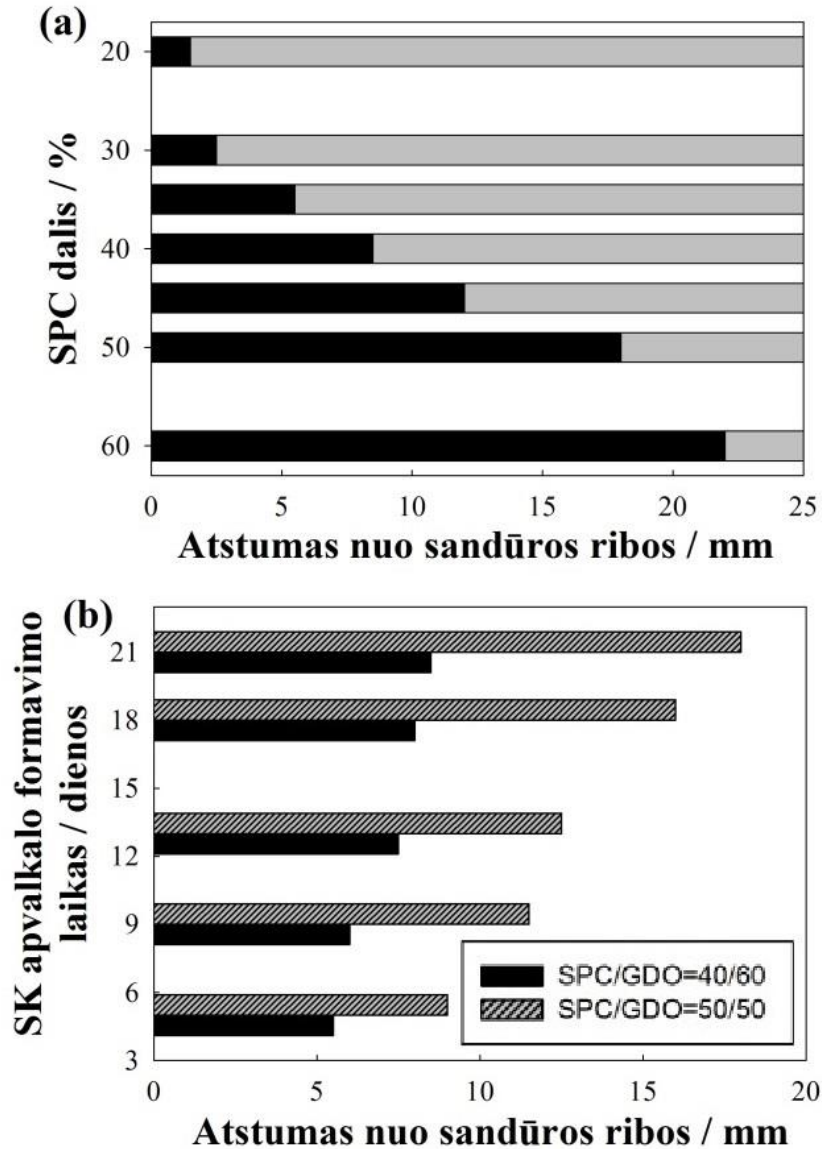


III. 12 pav. SK monolito brinkimas

Hidratacija kapiliaruose (a). SK apvalkalo storis apskaičiuojamas iš gautų MKReD profilių (b). Riba tarp lipido ir fiziologinio tirpalo pažymėta „0 mm“.

Iš MKReD profilių išmatuotas atstumas nuo sandūros ribos tarp lipido ir fiziologinio tirpalo, t.y. ir SK apvalkalo storis, kuris didėja, didėjant sojos fosfatidilcholino daliai mišinyje (žr. III. 13 a pav.). Priklausomai nuo mišinio sudėties kiekviename kapiliare stebimi panašūs fazių virsmai: $H_2 \rightarrow Fd3m \rightarrow L_2$. Duomenys nepateikiami, nes sudėtinga kai kuriuos profilius priskirti tam tikrai

struktūrai dėl fazių ribų persiklojimo. Priklausomai nuo mišinio SK fazių apvaskalas po 21 dienos svyruoja nuo 1,5 mm (SPC/GDO svorio santykis 20/80) iki 22 mm (SPC/GDO svorio santykis 60/40).



III. 13. pav. Skystojo kristalo apvaskalo storis

Skystojo kristalo apvaskalo storio priklausomybė nuo SPC % dalies lipidų SPC/GDO mišinyje po 21 dienos (a). SK fazių apvaskalo suformavimas po: 5, 9, 13, 18 ir 21 dienos (b). Pastaba: tamsi spalva – lipidų SPC/GDO svorio santykis 40/60, pilka užtušuota – lipidų SPC/GDO svorio santykis 50/50. Etanolis nugarintas, 25 °C.

Tarpusavyje sulyginami lipidų SPC/GDO svorio santykių 40/60 ir 50/50 mišiniai (žr. III. 13 b pav.). Pasirodo, didesnė SPC dalis mišinyje ne tik gerina brinkimo savybes, bet ir hidratacija akivaizdžiai spartesnė. Akivaizdu, jog

skystakristalės fazės formuojasi jau pirmosiomis dienomis. Abiejų mišinių atveju, po 5 dienų SK fazių apvalkalas siekė daugiau negu 5 mm. Lipidų SPC/GDO mišinių svorio santykių 40/60 ir 50/50 apvalkalo storis atitinkamai buvo 5,5 mm ir 9 mm. Tačiau per likusį laiką, iki 21 dienos, lipidų SPC/GDO svorio santykių 40/60 ir 50/50 mišiniuose apvalkalas padidėjo, atitinkamai, iki 8,5 mm ir 18 mm, t.y. nuo 1,5 iki 2 karto.

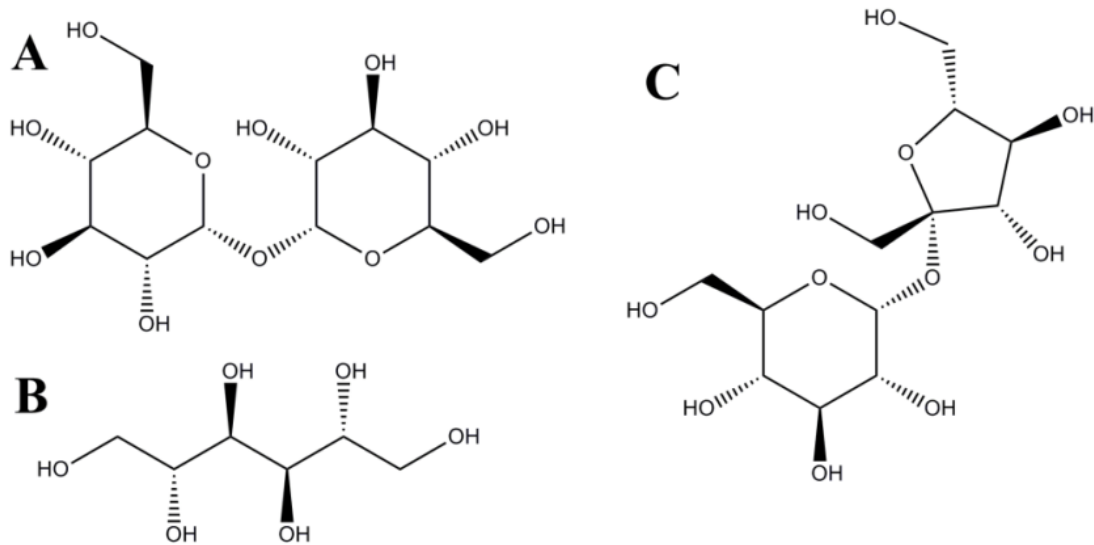
Atkreiptinas dėmesys, kad šie rezultatai gauti nugarinus etanolį iš SK fazių pirmtakų. Taip pat atlikti matavimai su tirpikliu (etanolis sudarė 10 % nuo bendros mišinio masės) parodė, jog skystakristalio monolito brinkimo tendencijos tokios pat kaip ir be etanolio. Tačiau šiuo atveju brinkimas vyksta sparčiau ir susiformavęs SK fazių apvalkalas po 3 savaitių storesnis. SPC/GDO/fiziologinio tirpalo mišinių hidratacija kapiliaruose suteikia naudingos informacijos apie skirtingų SPC/GDO mišinių brinkimo eigą.

1.6. Modelinės medžiagos įterpimas

Kuriant vaistų nešiklius, svarbu, jog nešikliai būtų stabilūs ir jų nanostruktūros nepaveiktų įterpta vaistinė medžiaga. Šiam tikslui bandyta vizualiai įvertinti kiek galima ištirpinti papildomos medžiagos lipidų mišinyje. Taigi, įvairūs cukrūs: trehalozė, manitolis ir sacharozė, jų struktūrinės formulės pateiktos **III. 14 paveikslyje**, sumaišomi su SK fazių pirmtakais iki tol, kol mišinys išlieka homogeniniu. Atkreiptinas dėmesys, jog skystakristalių fazių pirmtakai paruošti su 10 % etanolio. Daugiausia įterpta trehalozės (daugiau negu 3 % nuo mišinio masės be etanolio), o manitolio ir sacharozės, atitinkamai, tik po 1 ir 2 % nuo mišinio masės be etanolio.

Toliau buvo ruošiami trehalozės ir įvairių fermentų: krienų peroksidazės, lizocimo ir pepsino (žr. III. 15 pav.) (1:1) mišiniai, kurie po liofilizacijos sumaišomi su SK fazių pirmtakais. Cukrus šiuo atveju naudojamas fermento apsaugai nuo skilimo šaldymo metu. Atkreiptinas dėmesys, kad neliofilizuoti fermentai netirpsta SK monolito pirmtake. Vėliau mėginiai atitinkamai

hidratuojami. Modeliuojamos lipidų SPC/GDO mišinių fazių elgsenos stabilumo sąlygos, pridėjus kitų medžiagų. Fermentai parinkti kaip modelinės skirtingų molekulinė masių medžiagos. Vėliau juos naudojant būtų galima nustatyti, ar prarandamas iš nešiklių išėjusių aktyviųjų medžiagų funkcinis aktyvumas.



III. 14 pav. *Struktūrinės cukrų formulės: a) D(+)-trehalozė, b) D-manitolis; c) sacharozė*

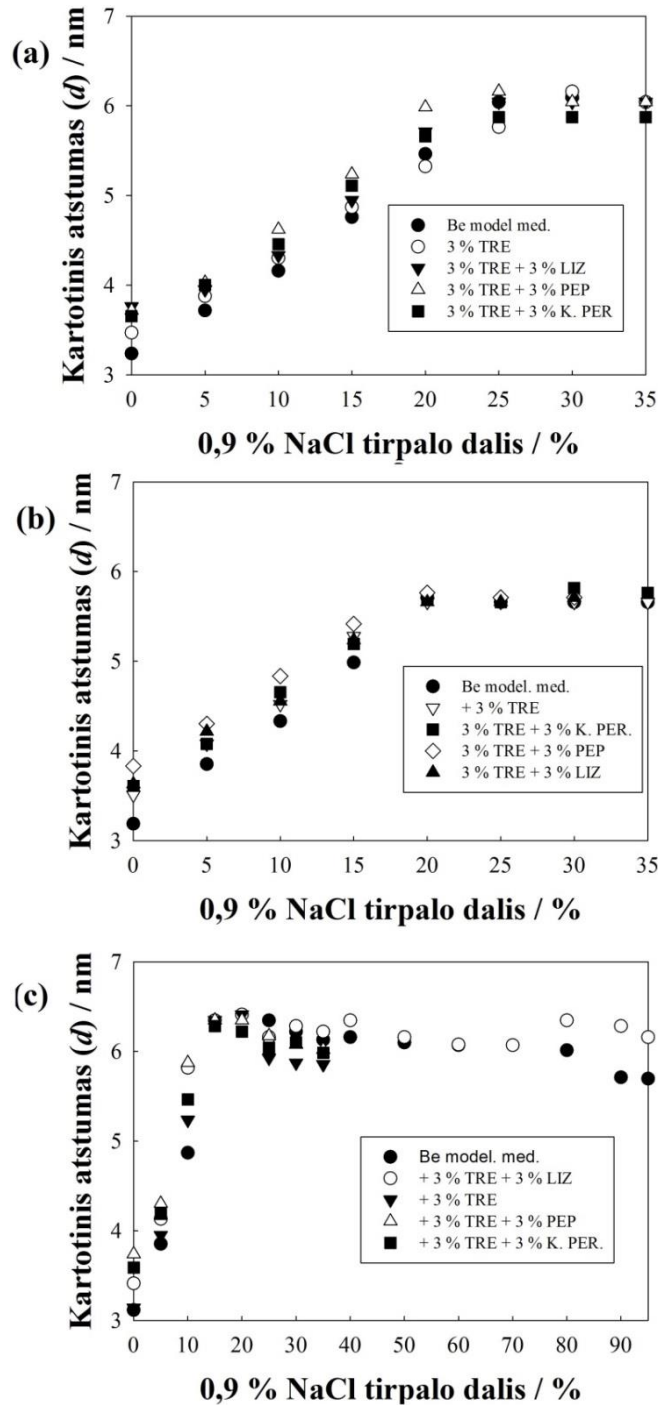


III. 15 pav. *3D fermentų struktūros*

Lizocimas **132L**; krienu peroksidazė **1HCH** ir pepsinas **5PEP** (šaltinis: PDB duomenų bazė).

Įterpto fermento įtaka nešiklio struktūrai įvertinta, apskaičiavus kartotinių atstumų tarp atominių plokštumų (*d*). **III. 16 paveiksle** pateiktos lipidų SPC/GDO svorio santykių: 35/65; 50/50 ir 60/40 mišinių, su įterptomis skirtingomis modelinėmis medžiagomis, *d* parametro priklausomybės nuo fiziologinio tirpalo

koncentracijos. Maksimali įterpimo riba 6 % (3 % trehalozės ir 3 % baltymo) nuo masės be etanolio, virš kurios mėginiai tampa nevienalyčiais.



III. 16 pav. Tarpplokštuminio kartotinio atstumo kitimo priklausomybė nuo fiziologinio tirpalo koncentracijos

Lipidų SPC/GDO mišinių tarpusavio svorio santykiai: (a) 60/40; (b) 50/50 ir (c) 35/65. Žymėjimai: Be model. med. – be modelinės medžiagos („tuščias“ nešiklis); TRE – trehalozė; LIZ – lizocimas; PEP – pepsinas; K. PER. – krienų peroksidazė.

Kaip matome iš pateiktų duomenų parametras d didėja nuo 3 nm iki 6 nm, didėjant fiziologinio tirpalo koncentracijai iki 20 proc. Toliau didinant vandeninės fazės koncentraciją, atstumas tarp plokštumų nebedidėja. Ryškiausiai tai pateikta **III. 16 c paveikslyje**, kai lipidų SPC/GDO mišiniai su įterptais baltymais brinkinami iki 95 % fiziologinio tirpalo nuo bendros mišinio masės. Galima įžvelgti, jog tuščių (be liofilizuoto baltymo) mišinių tarpplokštuminis atstumas mažiausias. Didėjant d parametrai, didėja atstumas tarp plokštumų. „Tuščių“ nešiklių d parametras didėja dėl hidratacijos, o nešiklių su įterptais baltymų ir cukrų mišiniais tarpplokštumis atstumas didesnis dar ir dėl įterptų medžiagų.

MKReD profilių analizė: a) kai lipidų SPC/GDO mišinio svorio santykis 60/40, mišiniai visais nagrinėtais atvejais pereina į atvirkštinę heksagoninę fazę iš karto po kontakto su vandenine terpe (5 % fiziologinio tirpalo); b) kai lipidų SPC/GDO mišinio svorio santykis 50/50, mišiniai visais nagrinėtais atvejais pereina į atvirkštinę heksagoninę fazę su 10 % fiziologinio tirpalo; c) kai lipidų SPC/GDO mišinio svorio santykis 35/65, mišiniai visais nagrinėtais atvejais lieka atvirkštinių micelių tirpalo fazėje. Galime teigti, jog pasirinktų lipidų SPC/GDO mišinių vidinė struktūra lieka nepakitusi, įterpus aktyviausias modelines medžiagas.

Kaip matome, galima įterpti didelės molekulinės masės junginius, pvz. krienų peroksidazę ~ 44 kDa, nekeičiant vidinės nešiklio nanostruktūros. Taip pat tolimesniuose tyrimuose tikėtina būtų įmanoma analizuoti baltymų struktūrinių pokyčių priklausomybę nuo vandens dalies nešiklyje arba įvertinti sąveikas tarp lipidų ir įterptų baltymų.

1.7. Funkcija ir fluoresceino *in vitro* išėjimas

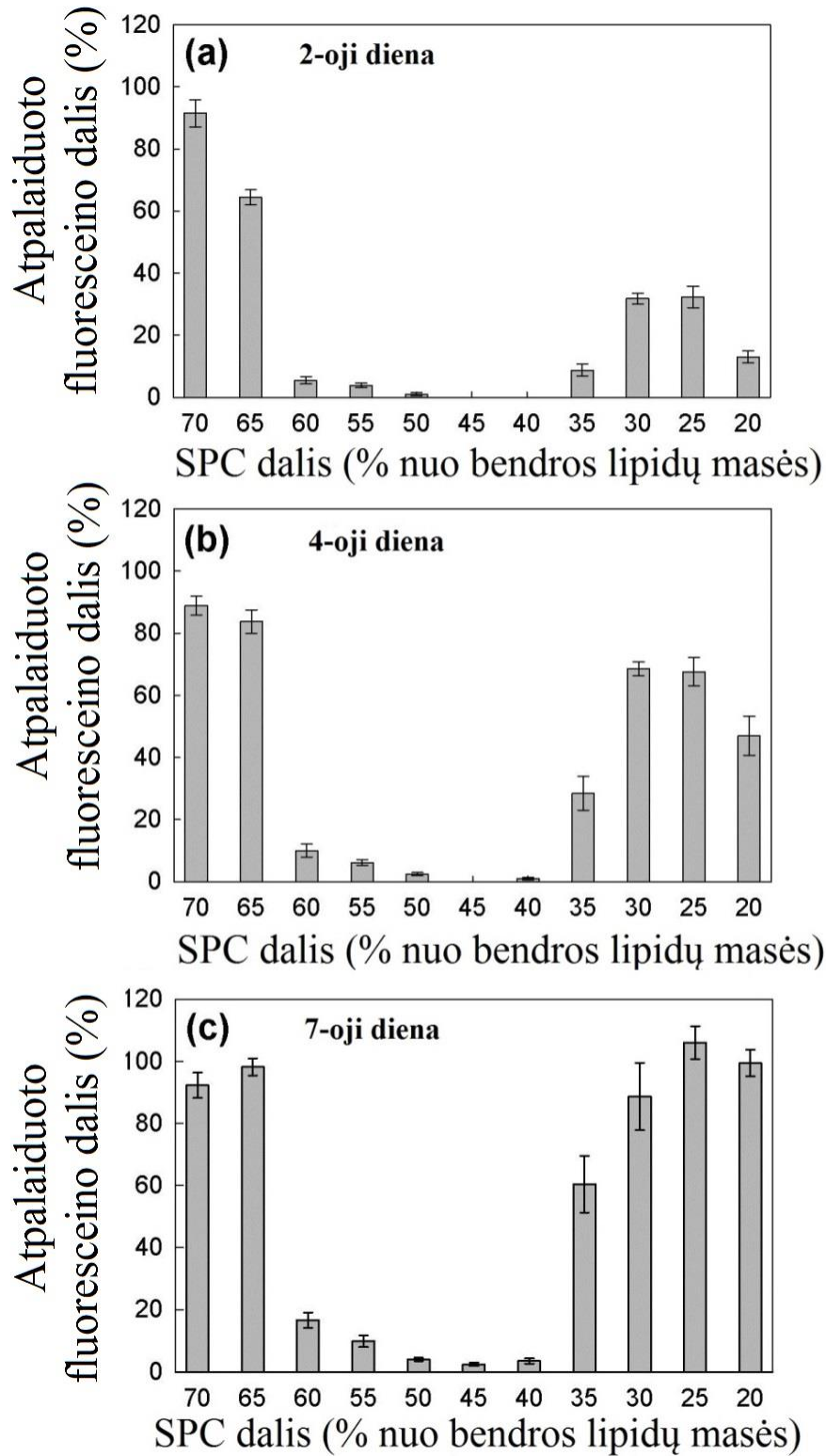
Pagrindinis šios darbo dalies tikslas ištirti sąryšį tarp lipido skystojo kristalo atpalaidavimo savybių ir konkretaus lipidų mišinio agregacijos elgsenos. Atliekant tyrimą, bandoma susieti struktūrines/funkcines nešiklio savybes, kurios gali pagelbėti, kuriant lipidų SK turinčias ilgo veikimo atpalaidavimo sistemas. Šiam tikslui pasiekti, visiškos ir dalinės hidratacijos sąlygomis gauti lipidų

SPC/GDO mišinių fazės elgesio savybių duomenys papildomi *in vitro* išėjimo matavimais.

Siekiant nustatyti įvairių lipidų SPC/GDO mišinių *in vitro* išėjimo savybes, paruošta 11 bevandenių SK fazių pirmtakų su 0,5 % dinatrio fluoresceinu (Fluo) mišinių. Lipidų SPC/GDO svorio santykiai varijavo nuo 70/30 iki 20/80 (žr. III. 17 pav.). SK fazių pirmtakai išvirkščiami į fosfato buferį, inkubuoti 37 °C temperatūroje ir Fluo išėjimas matuotas po 2, 4 ir 7 dienų nuo inkubacijos pradžios. Atkreiptinas dėmesys, jog naudoti lipidų SPC/GDO mišiniai su 10 % etanolio. Taip SK fazė atsiranda iš karto po kontakto su vandenine terpe ar tai būtų *in vivo* įleidimo vieta ar kontaktuojant su buferiniu tirpalu *in vitro*.

III. 17 paveiksle pateikiamos Fluo išėjimo iš įvairių SPC/GDO mišinių priklausomybės nuo mišinio sudėties. Iš pateiktų duomenų stebime, jog Fluo išėjimas priklauso nuo lipidų SPC/GDO mišinio sudėties. Atsižvelgiant į išėjimo elgseną, visi mišiniai gali būti suskirstyti į tris grupes. Fluo išėjimas iš mišinių su didele SPC dalimi (70/30 ir 65/35 pagal svorį) masyvus ir greitas. Beveik visas Fluo išėjo po kelių dienų inkubacijos. Mišiniai su gana lygiomis SPC ir GDO dalimis (tarp 60/40 ir 40/60 pagal svorį) parodo geras užlaikyto išėjimo savybes, tik keli Fluo procentai atpalaiduoti netgi po savaitės inkubacijos. Kai kuriems mišiniams, ypač tarp lipidų SPC/GDO svorio santykių 50/50 ir 40/60, išėjęs Fluo kiekis po savaitės siekė tik 2–4 %. Toliau didėjant GDO daliai lipidų mišinyje, staigiai padidėja dažo išėjimas. Beveik visas fluoresceinas iš lipidų SPC/GDO mišinių svorio santykių tarp 35/65 ir 20/80 išėjo per savaitę.

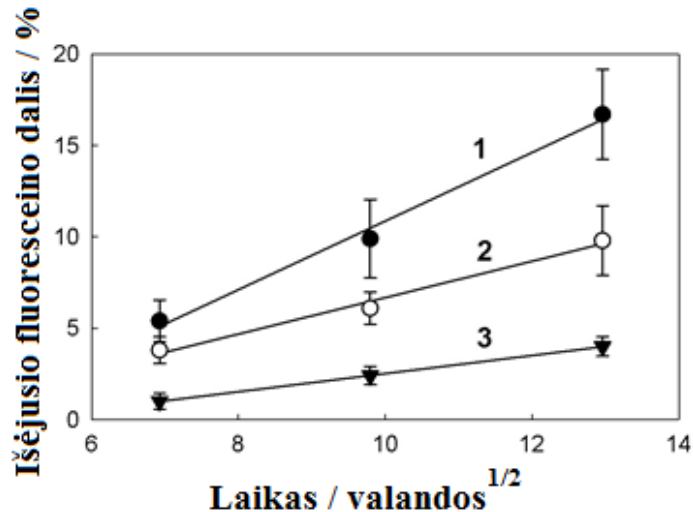
III. 18 paveiksle pateikiama išėjimo kinetika, apibūdinama mišinių užlaikyto išėjimo savybių priklausomybe nuo laiko kvadratinės šaknies. Iš duomenų stebime, jog Fluo išėjimas difuzijos kontroliuojamas, kadangi jo tiesinė priklausomybė nuo laiko kvadratinės šaknies (visais atvejais r^2 geriau negu 0,98). Tokia išėjimo kinetikų elgsena sutampa su kitų lipidų SK mišinių tyrimais. Atkreiptinas dėmesys, jog prieš tai tyrimai aprašė vienkomponentę vaistų nešiklių sistemą, pvz., glicerolio monooleato, kuris spontaniškai formuoja besitęsiančią SK



III. 17 pav. *In vitro* atpalaiduotos fluoresceino dalies priklausomybė nuo lipidų SPC/GDO mišinio

Atpalaiduota fluoresceino iš lipidų mišinio dalis (\pm standartinis nuokrypis) po 2 (a), 4 (b) ir 7 dienų (c), 37 °C temperatūroje. Kiekvienam mišiniui naudoti trys bandiniai.

kubinę fazę sąlytyje su vandeniu (Drummond ir Fong, 1999; Shah ir kt., 2001; Helledi ir Schubert, 2001; Peng ir kt., 2010; Chang ir Bodmeier, 1997). Be to, daugelyje tyrimų naudotos paruoštos SK fazės, kurių tinkama išėjimo kinetika trunka trumpai, iš tikrųjų klampios ir netinka tikram *in vivo* panaudojimui. Keli išėjimo savybių patobulinimai pasiekti su sintetiniais glicerato dariniais, parodyta, jog specifinė SK struktūra būtina užlaikytam išėjimui (Boyd ir kt., 2006).

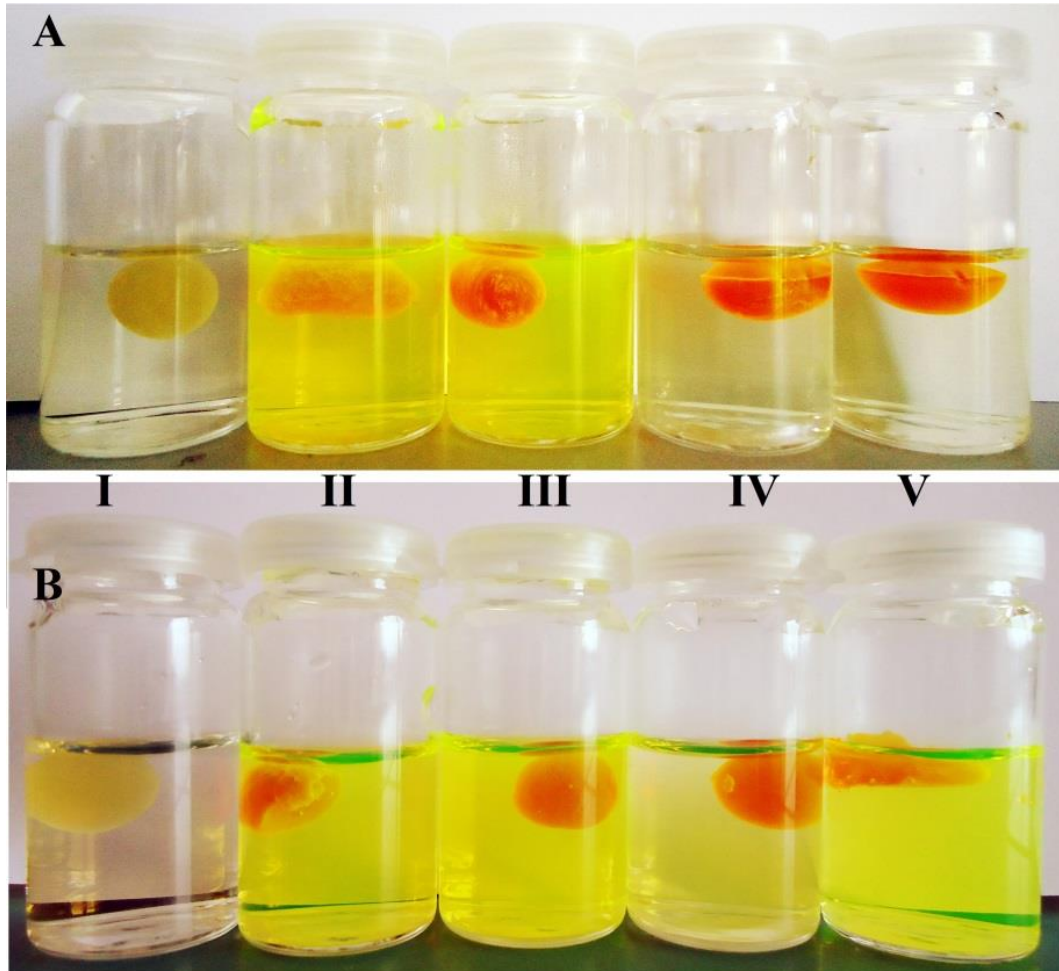


III. 18 pav. Išėjusios iš lipidų SPC/GDO mišinių fluoresceino dalies (\pm standartinis nuokrypis) priklausomybė nuo laiko kvadratinės šaknies

Lipidų SPC/GDO mišinių svorio santykiai: 60/40 (1), 55/45 (2) ir 50/50 (3), 37 °C. Kiekvienam mišiniui panaudoti trys bandiniai. 100 % atitinka visišką fluoresceino išėjimą iš lipidų mišinio į tirpalą.

Skirtumas tarp atpalaidavimo dažnių iš skirtingų skystakristalių fazių dažnai minimas kaip potencialus mechanizmas pritaikyti vaisto išėjimo elgsenai. Pasirodo, jog besitęsiančios kubinės fazės pasižymi didžiausiu difuzijos koeficientu, o atvirkštinės heksagoninė ir micelinė fazės pasižymi mažesniu ir labai panašiu difuzijos koeficientu. Vaisto difuzija iš monolito difuzijos kontroliuojamas procesas valdomas vandens kanalų dydžių ir kristalinės gardelės matmenimis (Phan ir kt., 2011; Boyd ir kt., 2006, Clogston ir Caffrey, 2005). Pateiktame **III. 17 paveiksle** mažiausiu Fluo išėjimu pasižymėjo lipidų SPC/GDO mišinio svorio santykių tarp 60/40 ir 40/60. Šis intervalas aprėpia $2D-H_2$ regiono pabaigą \rightarrow netvarkingą atvirkštinių micelių $Fd3m$ kubinę \rightarrow atvirkštinių micelių $P6_3/mmc$ heksagoninę fazes.

Fluoresceino išėjimo vizualizacijai iš pasirinktų mišinių matavimai atlikti ir kambario temperatūroje (25 °C). Lipidų SPC/GDO mišiniai fotografuoti laiko atžvilgiu. Norint palyginti bandymo rezultatus, buvo paruošti atitinkamų mišinių mėginiai fiziologiniame tirpale (37 °C). **III. 19 paveiksle** pateikiamos mišinių nuotraukos po 24 val. nuo suleidimo. Tirpalai su įlašintais lipidų SPC/GDO mišiniais, kurių tarpusavio svorio santykis 60/40, H_2 fazė, jau po kelių valandų po suleidimo pakeitė spalvą iš skaidrios į šviesiai gelsvą. Reikėtų pažymėti, jog staigus spalvos pokytis įvyko abiem atvejais (25 °C ir 37 °C), bet laikui bėgant mažai tebekito. Tai galima susieti su pradiniu Fluo išėjimo sprogimu iš 2D atvirkštinės heksagoninės fazės.



III. 19 pav. Tirpalai su išėjusiu fluoresceinu *in vitro* po 24 val. nuo įlašinimo Lipidų SPC/GDO mišiniai su Fluo įlašinti kambario temperatūroje į vandenį (**A**) ir į fiziologinį tirpalą 37 °C temperatūroje (**B**). Iš kairės į dešinę lipidų SPC/GDO svorio santykiai: **I.** 50/50 be Fluo. **II.** 60/40 su Fluo. **III.** 50/50 su Fluo. **IV.** 40/60 su Fluo ir **V.** 35/65 su Fluo.

Aukštesnėje temperatūroje (37 °C) išėjimo procesas vyksta kur kas sparčiau nei kambario temperatūroje. Reikėtų atminti, jog temperatūros padidėjimas link fiziologiškai labiau tinkamų (37–42 °C) veikia atvirkštinių micelių $P6_3/mmc$ heksagoninės (SPC/GDO svorio santykis 40/60) ir $Fd3m$ kubinės (SPC/GDO svorio santykis 35/65) fazių stabilumą (žr. III. 7 pav.). Fluo iš lipidų SPC/GDO mišinio svorio santykis 35/65, $Fd3m$, stebimas praėjus savaitei po suleidimo kambario temperatūroje, kai 37 °C temperatūroje iš L_2 fazės išėjimas vyksta kur kas sparčiau. Šio mišinio spalvos intensyvumas po 17 dienų didesnis nei likusių mišinių 25 °C, o mišiniuose paliktuose 37 °C panašus efektas pasireiškė po 5 dienų.

Fluo išėjimas iš atvirkštinių micelių $P6_3/mmc$ heksagoninės fazės (SPC/GDO svorio santykis 40/60) tiek 25 °C, tiek ir 37 °C pasižymėjo minimumu. Praėjus tam pačiam laikui, aukštesnėje temperatūroje spalva intesyvesnė, t.y. daugiau išėjusio Fluo į vandeninę fazę. Vizualiai po kurio laiko visų mišinių spalva esant 37 °C temperatūrai nebesiskyrė, išskyrus sodresnę lipidų SPC/GDO mišinio svorio santykio 35/65 spalvą. Įdomu tai, kad išėjimo minimumas kambario temperatūroje po laiko nusistovėjo ties lipidų SPC/GDO svorio santykiais 50/50 ir 40/60, šiek tiek intesyvesnė SPC/GDO svorio santykio 60/40 mišinio spalva. Tinkamiausi šiuo atveju uždelstam ilgalaikiam biologiškai aktyviųjų medžiagų išėjimui lipidų SPC/GDO mišiniai, kurių svorio santykiai 50/50 (atvirkštinė kubinė fazė, erdvinė grupė $Fd3m$) ir 40/60 (3D heksagoninė fazė, erdvinė grupė $P6_3/mmc$).

1.8. Lipidų skystakristalių fazių elgsenos apibendrinimas

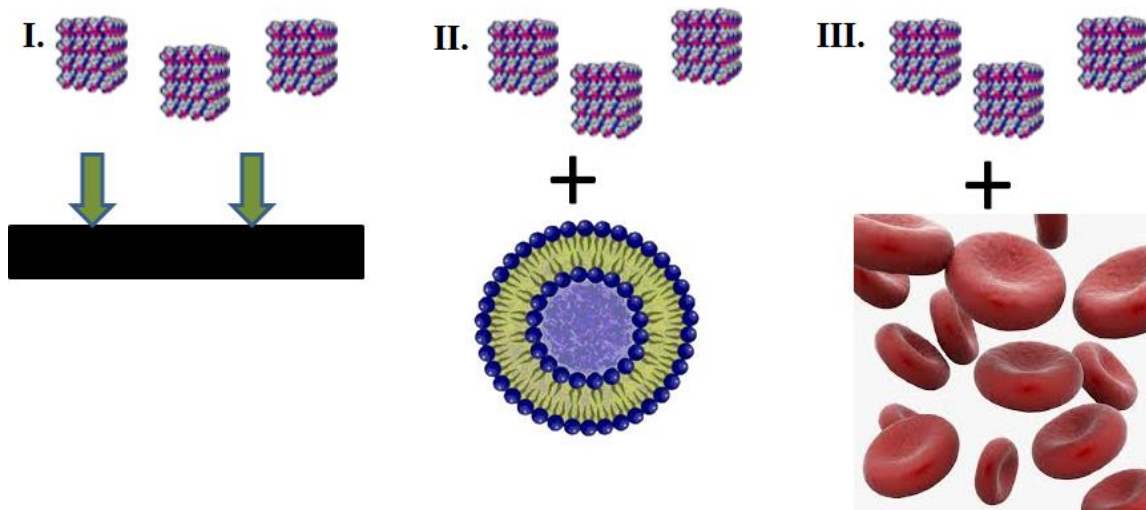
Lipidų sojos fosfatidilcholino ir glicerolio dioleato mišinių formuojamos savitvarkės struktūros ištirtos mažojo kampo rentgeno spindulių difrakcija. Iš gausių MKReD profilių 25 °C temperatūroje nustatyta, kad vandeninės fazės pertekliuje šie mišiniai formuoja skirtingas atvirkštinio tipo nanostruktūras. Lipidų SPC/GDO mišinys pasižymi sudėtinga ir turtinga fazių įvairove. Nustatyta, jog

kontroliuojant lipidų tarpusavio svorio santykius, sukuriama pageidaujama savybių turinti stabili vaistų nešiklių sistema. Išnagrinėti lipidų SPC/GDO mišinio faziniai virsmai ir skirtingose aplinkos temperatūrose, tokiu būdu duomenys labiau atspindi savitvarkių struktūrų buvimą fiziologinėmis sąlygomis. Siekiant imituoti poodinį vaistų suleidimą, atlikti fluoresceino išėjimo iš mišinių tyrimai laiko atžvilgiu. Dažo išėjimas iš lipidų SPC/GDO skystakristalių struktūrų priklausomas nuo difuzijos.

Ateityje vaisto išėjimo mechanizmui apibūdinti iš *in situ* formuojamų savitvarkių nanostruktūrų reikėtų papildomų tyrimų. Reikėtų įvertinti įvairius veiksnius tokius, kaip vaisto fizikocheminės savybės, savitvarkės struktūros atpalaidavimo paviršiaus plotas, kitų išorinių veiksnių buvimas. Taip pat šiems poveikiams patikrinti, reikėtų *in vivo* tyrimų. Lipidų SPC/GDO mišiniai patrauklūs užlaikytam, ilgalaikiam vaistų pernešimui.

2. Disperguotų SPC/GDO mišinių skystakristalių fazių nanodalelės

Lipidų skystakristalės fazės išskaidomos vandeninės terpės pertekliuje su stabilizuojančiais agentais (pvz., Polisorbatas 80) į atitinkamas skystakristales nanodaleles. Kaip keičiasi vidinė SK fazių nanostruktūra pereinant į stabilizuotas nanodaleles? Aptarsime lipidų SPC/GDO/P80 mišinio morfologiją ir fizikinius parametrus, taip pat SK nanodalelių adsorbcijos ypatybes ant skirtingų paviršių: ant skirtingų kietųjų paviršių (hidrofilinis, hidrofobinis ir katijoninis), su fosfolipidų liposomomis ir eritrocitais (žr. III. 20 pav.).



III. 20 pav. Disperguotų lipidų SPC/GDO mišinių skystakristalių fazių nanodalelių tyrimų strategijos

Pateiktos strategijos: *I.* adsorbcija ant hidrofilinio, hidrofobinio ir katijoninio silicio paviršių; *II.* susiliejimas su fosfolipidų liposomomis; *III.* hemolizinis poveikis.

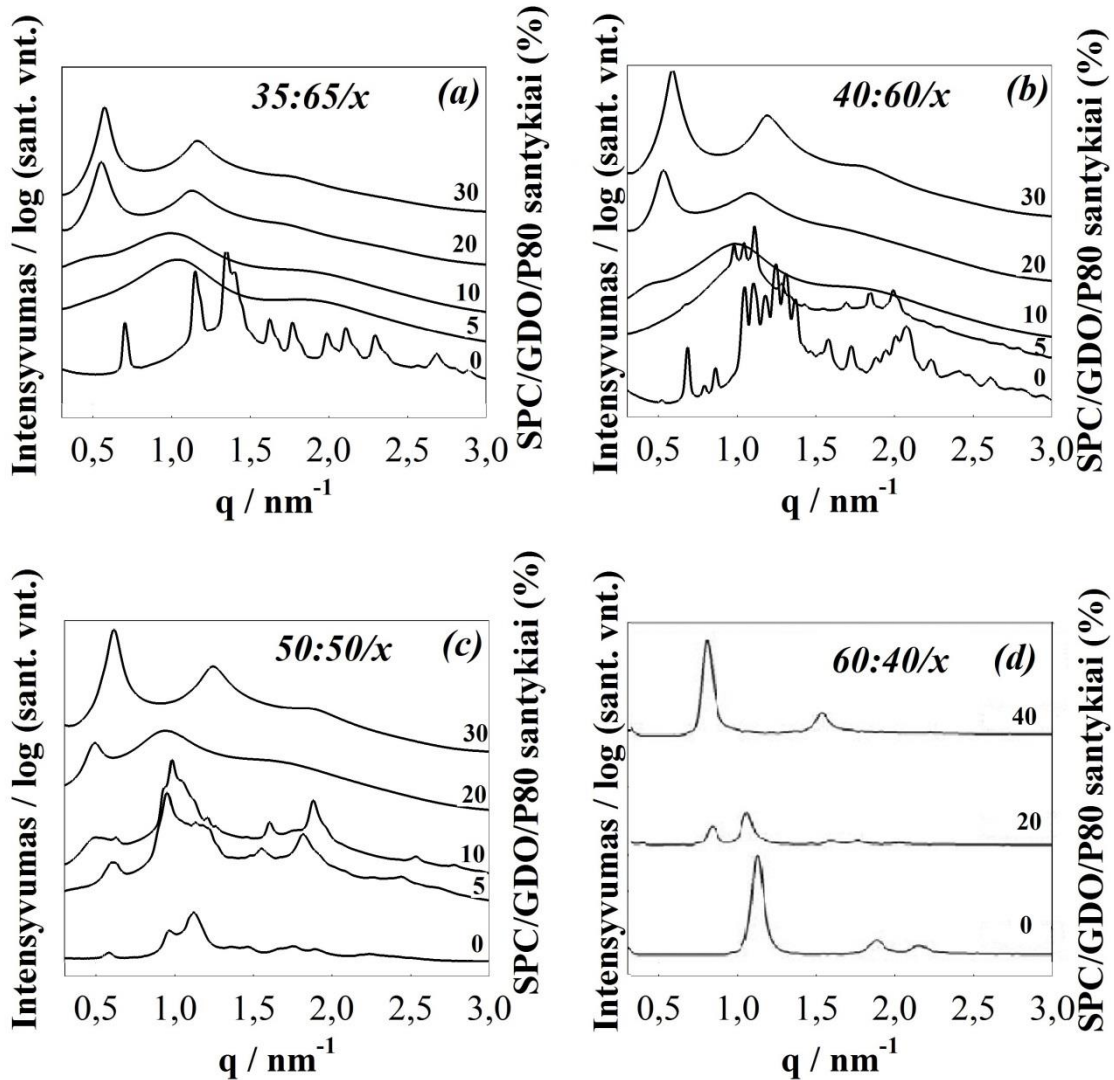
2.1. SPC:GDO/P80 mišinių struktūros tyrimas

Gauti keturių SPC/GDO/P80/vanduo sudedamųjų dalių mišinio MKReD duomenys: vandeninės aplinkos pertekliaus sąlygomis, kai lipidų SPC/GDO svorio santykiai 35/65, 40/60, 50/50, ir 60/40 ir įvairioms P80 svorio dalimis. Skirtingų mišinių MKReD profiliai pateikiami **III. 21 paveiksle**. Kaip išsamiai aprašyta aukščiau, atkreipiame dėmesį, kad lipidų SPC/GDO mišinio fazinis elgesys vandenyje iš tikrųjų yra sudėtingas, su papildomais siaurais fazių regionais ir sudėtingomis struktūromis. Kalbant apie P80 poveikį, fragmentuojančio ir stabilizuojančio agento, iš **III. 21 paveikslo** difraktogramų

matome, kad santykinai mažos paviršiaus aktyviojo etileno oksido monoacilintų lipidų dalys mišinyje sąlygoja palyginti gana radikalius fazės struktūros pokyčius. Labiausiai stebimi pokyčiai tenka didžiausią GDO dalį turintiems mišiniams. Šiuo atveju, kai lipidų SPC/GDO svorių santykis lygus 35/65, netgi 5 % P80 skatina perėjimą iš kubinės $Fd3m$ fazės į L_2 . Atvirkščių micelių fazė apibūdinama išsisklaidžiusiomis difrakcijos smailėmis (žr. III. 21 a pav.). Pirmos ir antros eilės Brego smailės stebimos ties maždaug 1 ir 2 nm^{-1} q reikšmėmis, nurodo vidutinį atstumą $d = 6,3$ nm tarp atvirkštinių micelių L_2 fazėje. Padidėjus P80 daliai tarp 10 ir 20 %, atsiranda L_α fazė, apibūdinama trimis Brego smailėmis. Kai 30 % P80, apskaičiuojamas šios fazės kartotinis atstumas $d \sim 11,2$ nm. Smailių piko platėjimas apibūdina mažiau tvarkingų ir labiau lanksčių dvisluoksnių buvimą.

Panašus P80 poveikis taip pat stebėtas lipidų SPC/GDO svorio santykiui 40/60 (žr. III. 21 b pav.), kur originali 3D heksagoninė fazė su $P6_3/mmc$ erdvine grupe pirmiausia yra transformuojama į L_2 fazę, kai P80 sudaro maždaug 10 % nuo bendros lipidų masės. Toliau didėjant stabilizatoriaus daliai, daugiau negu 20 %, atsiranda L_α fazė su $d = 10,9$ nm. Mišinyje su vienodu lipidų SPC/GDO (50/50) svorio santykiu, didėjant P80 daliai (žr. III. 21 c pav.), stebimi keli fazių perėjimai. Kai P80 sudaro 5 ir 10 %, originali $Fd3m$ fazė pereina į tarpinę skystakristalę fazę ar fazių mišinį, nes negalime priskirti apibūdinamus Brego atspindžius tam tikrai nanostruktūrai. Kita vertus, SPC/GDO/P80 mišiniai rodo tik vieną siaurą Brego smailę ties $q = 0,48$ nm^{-1} ir dvi plačias difrakcines smailes maždaug ties 0,92 ir 1,70 nm^{-1} . Šie duomenys netinka griežtai nustatyti skystakristalę fazę (-es); taigi, išanalizuota mėginių serija su skirtinga 5–50 % vandens koncentracija ir gautos difraktogramos pateikiamos **III. 22 paveiksle**. Kai vandens ≤ 15 %, formuojama atvirkštinė heksagoninė fazė, kuriai būdingi trys skiriamieji atspindžiai santykinėse q pozicijose 1: $\sqrt{3}$:2. Aukštesniuose hidratacijos lygiuose, ši fazė pereina į lamelinę fazę (L_α) su būdingomis Brego smailėmis, kurių santykinės q pozicijos sudaro eilę 1, 2, ir 3. Didėjant vandens koncentracijai,

lamelinis kartotinis atstumas padidėja nuo ~ 8 nm, kai vanduo sudaro 25 % vandens, iki beveik 14 nm, kai vanduo sudaro 50 %.

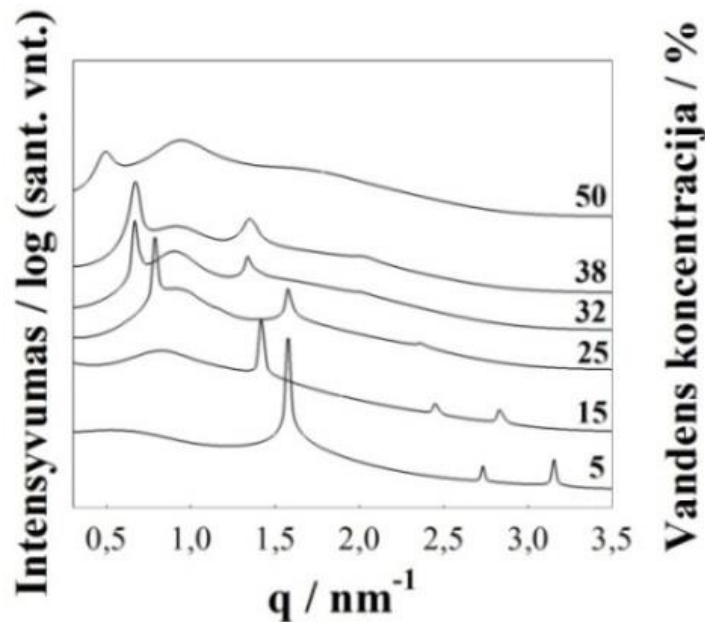


III. 21 pav. Lipidų SPC/GDO mišinių su skirtingomis P80 koncentracijomis MKReD profiliai perteklinio vandens sąlygomis (50 %),

Lipidų SPC/GDO mišinių svorio santykiai: 35/65 (a), 40/60 (b), 50/50 (c), ir 60/40 (d). Visi matavimai atlikti 25 °C temperatūroje. *Pastaba:* P80 dalis mišinyje – skaičiai dešinėje paveikslų pusėje.

Kaip matyti iš **III. 22 paveikslėlio**, H_2 ir L_α fazės dalinės ir visiškos hidratacijos difraktogramose turi papildomą plačią difrakcijos smaile, kai q reikšmė maždaug lygi 0,8–0,9 nm⁻¹, kurią galima priskirti atvirkštinių micelių tirpalo fazei. Stebėta q reikšmė atitinka kai kurių fazių vidutinį atstumą tarp atvirkštinių micelių 7–8 nm. Brinkimo elgsenos MKReD duomenys ir jų

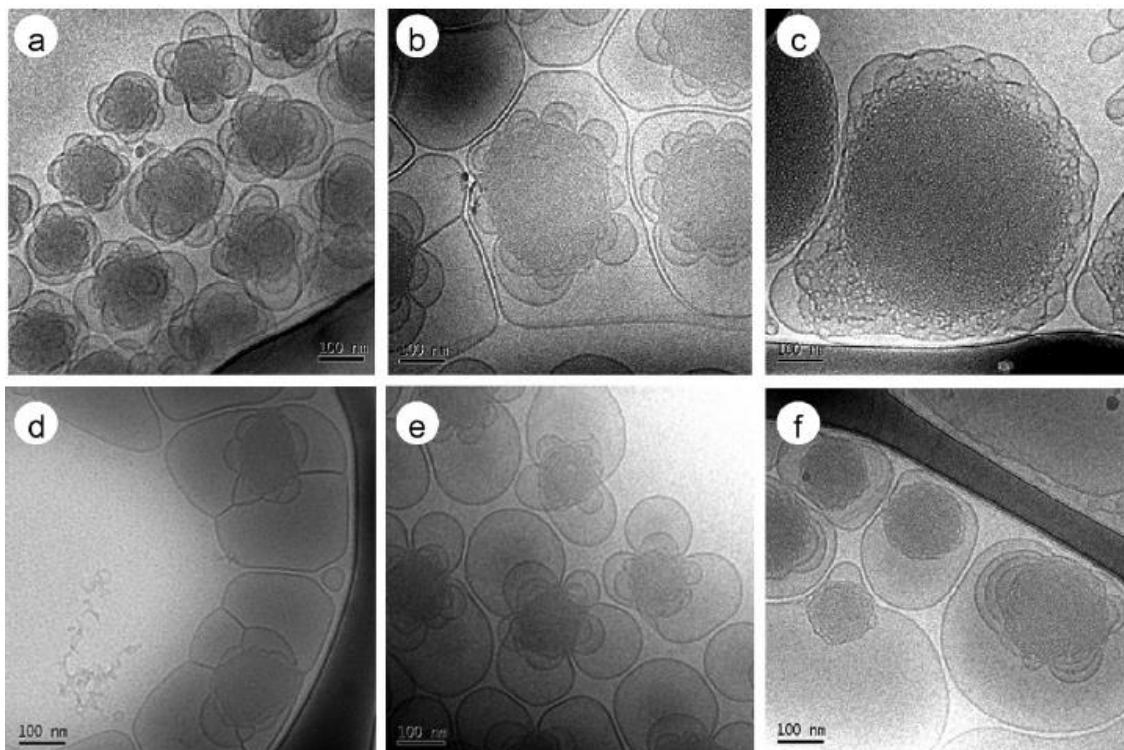
palyginimas su duomenimis be P80 rodo, jog SPC/GDO/P80 mišinį sudaro L_α ir L_2 fazių mišinys visiškios hidratacijos sąlygomis. Iš jungtinių MKReD ir krio-TEM rezultatų galime daryti išvadą (žr. III. 23 pav.), jog LSKN dalelių branduolys turi didelę lipidų dalį su netvarkinga skystakristale struktūra, labiausiai tikėtina, jog tai L_2 , o apvalkalas yra daugiau vandeniui išbrinkęs su išorine dalimi, kurios lamelinė struktūra suteikia koloidinį stabilumą (Barauskas ir kt., 2005 a ir b). Su didėjančia P80 koncentracija ši fazė (-ės) virsta į menamąją L_2 fazę ir galiausiai į L_α fazę su $d = 10,5$ nm, kai P80 sudaro 30 % nuo bendros lipidų masės.



III. 22 pav. SPC/GDO/P80 (40/40/20) mišinių MKReD duomenys dalinės ir visiškios hidratacijos sąlygomis

Vandens dalis kinta nuo 5 % (dalinė hidratacija), iki visiškai hidratuotų, kai vanduo sudaro 50 % nuo bendros mišinio masės. Visi matavimai atlikti 25 °C temperatūroje.

Galiausiai, kai lipidų SPC/GDO mišinio svorio santykis 60/40, suformuojama H_2 fazė (šioje lipidų sudėtyje yra ir $Fd3m$ fazės frakcija), kuri pasižymi trimis skirtingomis Brego smailėmis santykinėse pozicijose $1:\sqrt{3}:\sqrt{4}$. Be to, pridėjus 20 % P80, mišinyje atsiranda H_2 ir L_α fazės, kurios padidinus iki 40 % P80 dalies, transformuojamos į gryną L_α fazę ($d = 8,3$ nm). **III. 2 lentelėje** pateikiama šių rezultatų santrauka.



III. 23 pav. LSKN krio-TEM nuotraukos su skirtingais lipidų santykiais (SPC, GDO) ir P80

P80 sudaro 15 % (viršutinė eilė: a – c) ir 20 % (apatinė eilė: d – f) nuo bendros lipidų masės. SPC:GDO/P80 svorio santykiai (a) 35:65/15, (b) 50:50/15, (c) 65:35/15, (d) 40:60/20, (e) 50:50/20, ir (f) 60:40/20. Žymėjimo skalė 100 nm.

III. 2 lentelė. SPC/GDO/P80 skystakristalių struktūrų MKReD duomenų apžvalga vandens pertekliuje (50 %), 25 °C temperatūroje

P80 (%)	SPC/GDO			
	35/65	40/60	50/50	60/40
0	kubinė $Fd3m$	3D heksagoninė $P6_3/mmc$	kubinė $Fd3m$	H_2+Fd3m
5	L_2	3D heksagoninė $P6_3/mmc$	nenustatyta	
10	L_2+L_α	L_2+L_α	nenustatyta	
20	L_α	L_α	L_2+L_α	H_2+L_α
30	L_α	L_α	L_α	
40				L_α

Įdomu tai, jog atvirkštinių micelių $Fd3m$ kubinė fazė jautriausia P80 pridėjimui bei yra toliausiai nuo „normalių“ fazių, formuojamų vien tik paviršiaus aktyviosios medžiagos vandenyje (Barauskas ir kt., 2006). Iš tiesų, mažiau nei 5 % P80 galima pridėti, išsaugojant I_2 fazės savybes. Daroma išvada, kad P80 skatina lamelinių struktūrų formavimąsi. Įdomu tai, kad virsmas į lamelines fazes vyksta aukštą neigiamą kreivumą turinčiose fazėse, pvz., atvirkštinė kubinė micelinė fazė, kai P80 sudaro mažesnę dalį. O heksagoninė fazė struktūriškai labiau tvirtesnė ir tęsiasi iki ne mažiau kaip 20 % P80. Be to, kartotinas atstumas $d_{L\alpha}$ fazei mažėja, didėjant SPC daliai.

2.2. Dydžio ir krūvio kontrolė

Prieš aptariant SPC:GDO/P80 LSKN sąlyčio savybes, nanodalelių dispersijų savybės apibūdintos, atsižvelgus į jų dalelės dydį, krūvį, morfologiją, ir vidinę struktūrą. Įvairių SPC:GDO/P80 (35:65/15, 50:50/15, 65:35/15, 40:60/20, 50:50/20, ir 60:40/20) mišinių dydis ir dydžio pasiskirstymai apibūdinti dinaminės šviesos sklaidos metodu. Kaip parodyta **III. 3 lentelėje**, LSKN dispersijos gan gerai apibūdinamos, dalelių skersmenų dydžiai tarp 240 ir 420 nm ir su polidispersiškumo indeksais tarp 0,06 ir 0,17 – abiem atvejais didėja, didėjant SPC daliai. Įdomu tai, jog vidutinis dalelių dydis ir Pdl didėja nežymiai, didėjant SPC daliai mišinyje. O struktūros su didesniu GDO ir mažesniu SPC labiausiai jautrios P80 daliai. Tačiau nanodalelių sistema turinti papildomą laisvės laipsnį, skirtingi blokai lokalizuoti pirmiausiai dalelės šerdyje arba paviršiaus plote.

Paviršiaus ir tūrio santykis dar priklauso nuo LSKN dydžio (žr. III. 23 pav.). Taigi, tankesnė nanodalelių šerdis praturtinta GDO, kai į lamelę panašios apvalkalo struktūros daugiausia susideda iš SPC ir ypač P80. Tai taip pat paaiškina P80 tirpinimo gebą, atsirandančią iš sąveikų tarp besitęsiančių P80 turinčių į lamelę panašių fragmentų. Įdomu, kad GDO turtingos LSKN ir mažesnės pagal dydį ir mažiau polidispersiškos. Tai paaiškina mažiau hidratuotų SPC:GDO/P80 65:35/x mišinių aukštesnė fazių atskyrimo tendencija, palyginus

su 50:50/x ir 60:40/x mišiniais. Visais atvejais apvalkalo storis didėja, didėjant P80 daliai mišinyje. LSKN stabilizuotos su 20 % P80 turi ženkliai storesnį sluoksnį, negu tos su 15 % P80 (žr. III. 23 pav.). Tai patvirtina nuomonę apie P80 turtingą apvalkalą, užtikrinantį koloidinį stabilumą LSKN paruošimo metu ir laikant ilgą laiką.

III. 3 lentelė. SPC:GDO/P80 LSKN (paruoštų iš skirtingų lipidų ir stabilizatoriaus svorio santykių): dalelių vidutinis skersmuo (d), polidispersiškumo indeksas ir zeta potencialas (matuota MilliQ vandenyje)

Mišinys (SPC:GDO/P80)	d (nm)	PdI	Zeta potencialas (mV)
35:65/15	243	0,06	-17
50:50/15	307	0,09	-17
65:35/15	418	0,15	-17
40:60/20	282	0,11	-14
50:50/20	309	0,10	-12
60:40/20	356	0,17	-13

Kalbant apie LSKN krūvio savybes, pateiktas **III. 3 lentelėje**, pastebime, jog dalelės yra nežymiai neigiamai įkrautos, išskyrus žemiausias tirtas pH reikšmes. Krūvis, tikėtina, yra susijęs su lipidų ir P80 mėginuose esančiomis riebalų rūgščių mažomis frakcijomis, kurios jau buvo stebėtos LSKN sistemose (Shen ir kt., 2010; Svensson ir kt., 2008). Zeta potencialai atskleidžia izoelektrinį tašką tarp pH 3 ir 4 ir potencialą nuo -12 iki -17 mV tarp pH 5 ir 6. Taip pat stebima neigiamo potencialo mažėjimo tendencija, didėjant P80 daliai, tai galėtų būti dėl labiau išstėtų lamelinio paviršiaus domenų ir pokytis nėra pakankamai reikšmingas kiekybiniam įvertinimui.

2.3. Adsorbicija ant hidrofobinio, hidrofilinio ir katijoninio silicio paviršių

Sukūrus tinkamus nešiklius, reikia modelinių sistemų atkuriančių įvairias vaistų nešiklio adsorbicijos situacijas transportavimo metu (pvz. pernešimo

konteineris, švirškštis). Modeliuojami veiksniai, kai laikant arba transportuojant biologinės medžiagos praradimas minimalus, o tikslineje vietoje (pvz. ląstelė) visiškai nešiklio suskaidymas su vaisto išėjimu. Ištirta dalelių mišinio poveikio adsorbcijos efektyvumui ant įvairiai modifikuotų (hidrofilinio, hidrofobinio ir katijoninio) silicio paviršių priklausomybė nuo laiko elipsometrijos metodu. Matavimai apima dvejus veiksnius: kai kinta stabilizatoriaus P80 dalis ir kitas, kai kinta lipidų SPC:GDO tarpusavio svorio santykis.

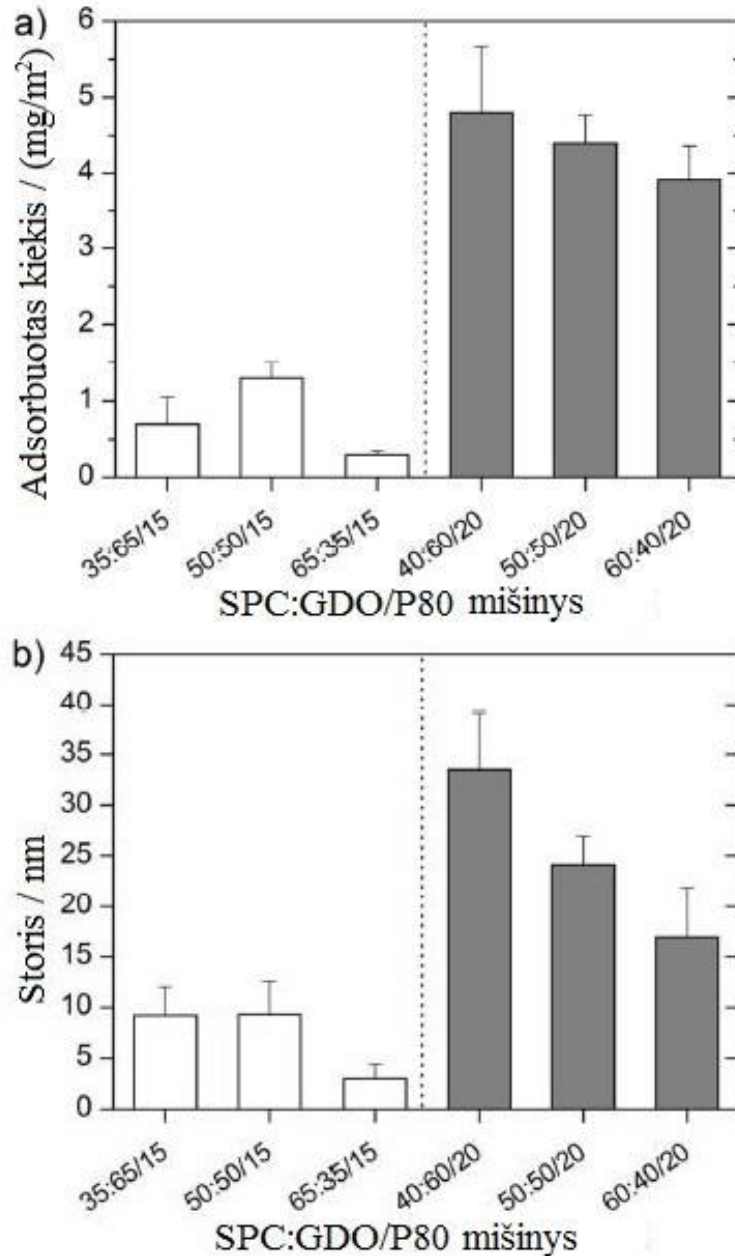
Adsorbcija ant **hidrofilinių paviršių**. Hidrofilinis paviršius, šiuo atveju silicio oksido paviršius, atitinka laikymo talpų, pvz., stiklinių buteliukų, paviršių. Pažymėtina, jog ant hidrofilinio silicio paviršiaus adsorbcija vykdyta fiziologinėse druskų koncentracijose (0,1 M NaCl ir 0,017 M CaCl₂) arba žemame pH (pH 4), kad išvengtume stūmos atsirandančios nuo neigiamą krūvį turinčio silicio ir LSKN aukštesnėse pH reikšmėse. Be to, nebuvo stebima adsorbcija gryname vandenyje, kai pH 5,5. Silicio paviršiaus izoelektrinis taškas (IET) – pH ~ 2. Virš IET, neigiamas paviršiaus krūvis stipriai priklauso nuo pH ir druskų koncentracijų. 0,1 mM HCl pridėjimas sumažina vandens pH reikšmę nuo 5,5 iki 4, kur silicio paviršiaus krūvio tankis labai žemas (Bolt, 1957). SPC:GDO/P80 LSKN adsorbcijos elgsena ženkliai priklauso nuo mišinio sudėties ir dalelių savybių, bet adsorbcija visais atvejais beveik negrįžtama, nuplovus su grynu tirpikliu. Vis dėlto, adsorbcijos dažnis ir nekintamo būvio savybės (storis ir adsorbuotas kiekis) kontroliuojami abiejų ir SPC:GDO svorio santykiu, ir P80 dalimi. Tuo pat metu adsorbuotas sluoksnis didėja nuo kelių nanometrų iki 15–35 nm, – tai atitinka daugiasluoksnį arba struktūriškai ant paviršiaus deformuotas daleles (žr. III. 24 B pav.).

Stabilizatorius P80 iš tikrųjų stabilizuoja dalelių dispersiją, bet taip pat padidina adsorbciją ant silicio paviršiaus. Dalelių šerdies fazės pokyčiai taip pat nurodo, jog trumpa Polisorbato 80 PEO grandis yra ne tik ant dalelių paviršiaus. P80 dalies didėjimas, skatina adsorbcijos varomosios jėgos augimą, ypač turint omeny, kad pirmiausia P80 išsidėstys ant dalelių paviršiaus, ir tokiu būdu

skatinama adsorbicija. Tačiau kiti netiesioginiai veiksniai taip pat gali daryti įtaką. Įskaitant aiškų zeta potencialo mažėjimą, didėjant P80 daliai, kuris gali būti sumažėjusios stūmos tarp silpnai neigiamo dalelės paviršiaus ir silicio paviršiaus, kai pH 4, padariniu. Be to, lamelinių LSKN dalelių savybėmis pasižymintis kiautas lankstesnis, kai P80 sudaro 20 %, negu, kai paviršiaus aktyvioji medžiaga sudaro 15 % nuo bendros lipidų masės (žr. III. 24 pav.). Šiuo atveju, palengvinama adsorbicija ir LSKN prisitvirtinimas ant paviršiaus. Išskyrus P80 poveikį, SPC:GDO svorio santykis taip pat daro įtaką. Mažėja adsorbicijos polinkis, didėjant SPC daliai, ypač kai P80 sudaro 20 % nuo bendros koncentracijos. Šie efektai gali būti paaiškinami tuo, jog sojos fosfatidilcholinu turtingą dalelę sudaro daugiau tirpiklio ir ji mažiau supakuota sandūroje (žr. III. 23 pav.).

Iš išmatuoto storio priklausomybės nuo laiko, akivaizdu, jog mažesnių SPC:GDO svorio santykių adsorbuotas sluoksnis formuojamas tiesioginės dalelių adsorbicijos, o LSKN turinčių daugiau SPC sąveikos sluoksnis pasirodo formuojamas vienų paskui kitus pavienių sudedamųjų dalių adsorbicijos. Paaiškinti šį stebėjimą nėra lengva. Tai galima būtų susieti su skirtingomis relaksacijomis sandūroje: dalelės turinčios daugiau SPC gali iš pradžių suirti į dvisluoksniu struktūrą prieš tolimesnį augimą, o dalelės su didesne GDO dalimi struktūriškai stabilesnės. Iš duomenų matome, jog GDO neadsorbuojasi vienas ant silicio, o P80 ir SPC adsorbuojasi atitinkamose pH sąlygose (žr. III. 4 lentelę).

Taigi, P80 dalies didėjimas skatina adsorbiciją ant silicio paviršiaus. Bent jau per traukos sąveiką tarp galvutės grupės etileno oksido segmentų ir silicio paviršiaus, kai didėjant SPC daliai sumažėja efektyvi adsorbicija dėl didesnės dalelių vandens dalies. Adsorbicijos greitis mažėja, didėjant SPC daliai, labiausiai tikėtina dėl atvirkštinio sąryšio tarp LSKN dalelių dydžio ir difuzijos greičio, mažinamas išsklaidytas LSKN pernešimas ant paviršiaus.



III. 24 pav. Galutinis SPC/GDO/P80 nanodalelių (a) adsorbuotas kiekis ir (b) storis ant hidrofilinio silicio paviršiaus po nuplovimo

Stabilizatoriaus P80 koncentracijos 15 proc. (balti stulpeliai) ir 20 proc. (pilki stulpeliai). Matavimai atlikti pH 4 vandeniniame tirpale ir nanodalelių koncentracija 0,1 mg/ml. Vidutinės dviejų nepriklausomų matavimų reikšmės pateiktos su standartinio nuokrypio paklauda.

Duomenys silicio paviršiui apibūdina palyginti silpnų neelektrostatinių sąveikų varomą adsorbciją ir koku būdu maži pokyčiai mišinyje veikia adsorbciją. Kitam stipresnių elektrostatinių (traukos) sąveikų spektrui iširti tarp LSKN ir sandūros, taip pat tyrėme adsorbciją ant **katijoninio paviršiaus**. Šiam

tikslui panaudoti du katijoniniai paviršiai: chitozanu dengtas paviršius ir APTES-silanizuotas silicio paviršius. Chitozано amino grupės pK_a apytikriai yra lygi 6,5 reikšmei (Allan ir Peyron, 1995), todėl paviršius tampa nežymiai teigiamai įkrautu matavimo metu, kai pH 5,5. LSKN adsorbcija ganėtinai panaši kaip ir ant silicio (pH 4 arba su druskomis pH 5,5). Teigiamas chitozanu dengto paviršiaus krūvis skatina dalelių prikabinimą, bet adsorbcija gana silpna dėl sąlyginai žemo chitozано krūvio pertekliaus.

III. 4 lentelė. Adsorbuoti kiekiai, sluoksnio storiai ir pradinės LSKN ir pavienių sudedamųjų dalių (SPC, GDO ir P80 mišinyje 40:40/20) adsorbcijos kinetikos ant hidrofobinio DMOCS-Si (CH_3), hidrofiliinio Si (OH) ir katijoninio APTES-Si (NH_3^+) paviršių^a.

Padėklai	pH	Medžiagos	Kiekis (mg/m^2)	Storis (nm)	Pradinės kinetikos ($mg \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$)
CH_3	5,5	SPC:GDO/P80	$0,8 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,3$	0,0020
		LSKN			
CH_3	5,5	P80	$1,8 \pm 0,04$	$0,9 \pm 0,1$	0,0152
CH_3	5,5	SPC	$2,9 \pm 0,01$	$61,0 \pm 0,1$	0,0013
CH_3	5,5	GDO	$0,4 \pm 0,02$	$2,3 \pm 0,9$	0,0001
OH	4	SPC:GDO/P80	$4,7 \pm 0,01$	$26,5 \pm 0,2$	0,0196
		LSKN			
OH	4	P80	$2,6 \pm 0,03$	$4,0 \pm 0,2$	0,0111
OH	4	SPC	$4,0 \pm 0,01$	$15,9 \pm 0,3$	0,0020
OH	4	GDO		nėra adsorbcijos	
NH_3^+	4	SPC:GDO/P80	$19,7 \pm 0,06$	$134,0 \pm 0,2$	0,0033
		LSKN			
NH_3^+	4	P80	$1,4 \pm 0,01$	$4,7 \pm 0,3$	0,0072
NH_3^+	4	SPC		nėra adsorbcijos	
NH_3^+	4	GDO		nėra adsorbcijos	

^aPateikiamos matavimų paklaidų vidutinės reikšmės \pm standartiniai nuokrypiai, po nuplovimo pasiekus pastovų lygį

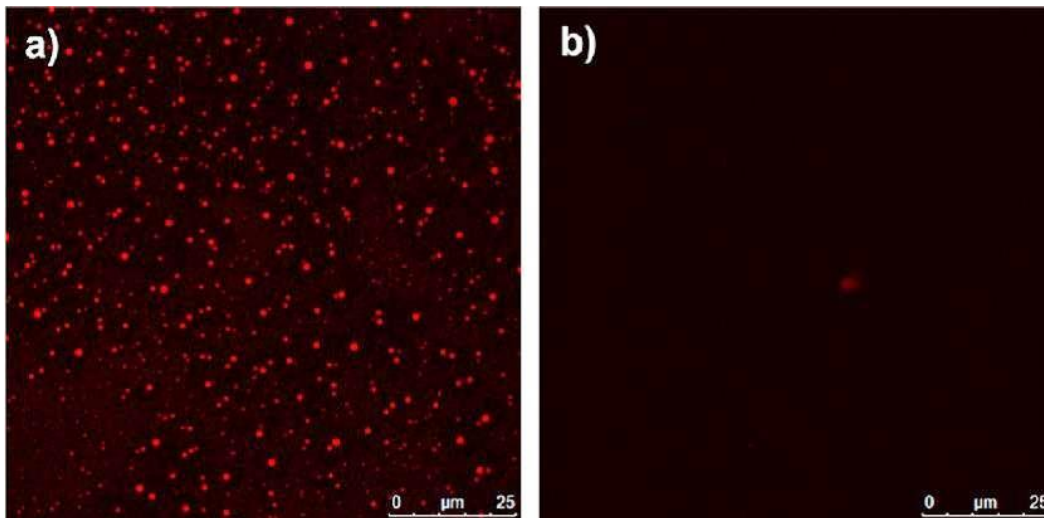
Kad padidintume paviršiaus krūvio tankį, silicio paviršius chemiškai funkcionalizuotas teigiamą krūvį turinčiu silanu, APTES, sudaromas katijoninis, didelio krūvio tankio paviršius. APTES-silanizuotas silicis, kurio teigiamas krūvis žemiau pH 11 (Guillot ir kt., 2002). LSKN adsorbcija žymiai stipresnė šiam negu tik vien silicio paviršiui, kai pH 4. Įdomu tai, jog dalis frakcijos gali būti nuplauta nuo paviršiaus mišiniuose su 15 % P80 ir mažesniais lipidų SPC:GDO svorio santykiais, kai kitiems mišiniams adsorbcija beveik negrįžtama. Po nuplovimo sluoksnio storis siekė apie 80–140 nm. Skirtingai nuo hidrofilinio silicio, adsorbcija, palyginti, nepriklauso nuo LSKN mišinio sudėties, nepaisant akivaizdaus P80 poveikio zeta potencialui. Visų adsorbcijos kinetikų greičiai yra panašūs, išskyrus LSKN su 15 % P80 ir mažesnėmis SPC:GDO frakcijomis, kai vyksta žymiai greitesnė adsorbcija. Įmanoma, jog tai didina paviršiaus persotinimą, kuris desorbuotas, nuplaunant su pertekliniu vandeniu.

Nustatyta, kad SPC:GDO/P80 LSKN adsorbcija ant katijoninio paviršiaus yra tiesioginės dalelių adsorbcijos padarinys, dėl to gautas aukštas paviršiaus paviršius ir didelis sluoksnio storis. Sluoksnio storis atitinka maždaug vieną LSKN hidrodinaminį skersmenį arba jo trečdalį. Turint omeny, kad elipsometrinis storis nurodo vidutinį optinį storį, priimant homogenišką sluoksnį, tai turėtų būti žymiai mažesnis nei atitinkamas hidrodinaminis storis. Taigi, įmanoma, jog adsorbuotas sluoksnis susideda iš dalinai nepažeistų LSKN dalelių, kurios gali būti nežymiai deformuotos dėl sąlyčio buvimo. Apskritai šie stebėjimai sutampa su atominės jėgos mikroskopijos duomenimis (Neto ir kt., 1999), rodančiais sveikų, bet suplotų LSKN buvimą sąlytyje.

Norint patvirtinti, kad LSKN sandūroje nepažeistos, panaudota konfokalinė mikroskopija. Katijoninio paviršiaus nuotraukose (žr. III. 25 pav.) matome gausų šviesių ir sąlyginai didelių taškų būrį, kuris patvirtina adsorbciją ir individualių LSKN buvimą ant paviršiaus. Dalelės pasiskirsto atsitiktiniu būdu be aiškios lateralinės organizacijos arba susiliejimo. Laikui bėgant imobilizuotos ant paviršiaus dalelės nejuda. Ant hidrofilinio silicio paviršiaus nestebimos jokios

matomos dalelės, tai įrodo plonesnį sąlyčio sluoksnį su mažesniais arba mažiau aiškiais lateraliniais domenais. Taigi, tai atitinka elipsometrijos duomenis, kai ant hidrofiliinio paviršiaus adsorbuojasi ženkliai plonesnis sluoksnis ir mažesnis kiekis, lyginant su katijoniniu paviršiumi.

Adsorbicija ant **hidrofobinių paviršių**. Hidrofobinis paviršius atstovauja skirtingoms polimerinėms medžiagoms, kuriomis dengiami vamzdeliai ir kateteriai, kurie naudojami pernešant vaistus. Ant hidrofobinio DMOCS-silanizuoto silicio paviršiaus gautos LSKN adsorbicijos savybės iš esmės nepriklauso nuo pradinio dalelių dydžio. Lipidai SPC, GDO ir P80 adsorbuojasi monosluoksniu. Šie pastebėjimai atitinka tyrimų duomenis su GMO turinčiomis kubinėmis nanodalelėmis, kurios taip pat adsorbavosi monosluoksniu ant hidrofobinio paviršiaus (Vandoolaeghe ir kt., 2006).



III. 25 pav. *Konfokalinės mikroskopijos nuotraukos*

APTES-silanizuoto silicio paviršius (a) ir lygus silicio paviršius (b), nuplauti po 1 val. inkubacijos su 1 mg/ml SPC:GDO/P80 LSKN (50:50/20) tirpalu, kai pH 4.

Šie tyrimai parodė, jog paviršiaus chemija ir tirpikliu galima kontroliuoti LSKN adsorbiciją sąlyčio riboje. Kaip ir tikėtasi, didžiausia adsorbicija vyksta ant labai įkrauto katijoninio paviršiaus, kai tirpalo pH paveikia adsorbicijos eigą ir galutinę adsorbuotą kiekį. Adsorbicijos elgseną galima, priklausomai nuo LSKN paviršiaus sąveikos, suskirstyti į tris tipus: (1) labai stipri adsorbicija ir storo sluoksnio struktūros (atitinkamai, $> 8 \text{ mg/m}^2$ ir $> 60 \text{ nm}$) ant labai įkrautų

katijoninių paviršių; (2) storos daugiasluoksnės struktūros (atitinkamai, 4–6 mg/m² ir 20–35 nm) ant hidrofiliųjų silpnai įkrautų paviršių ir (3) mišrūs lipidų monosluoksniai (atitinkamai, <1 mg/m² ir 1–2 nm) ant hidrofobiųjų paviršių. Iš šių duomenų nustatyta, jog hidrofobinė traukos sąveika tarp lipidų ir paviršiaus visiškai suardo LSKN struktūrą ant hidrofobiųjų paviršių, todėl formuojasi vienas lipidų monosluoksnis ant paviršiaus, kuris trukdo tolimesnei adsorbicijai. Priešingai, LSKN adsorbuojasi sąlyginai nepažeistos ant labai įkrautų katijoninių paviršių, pavienių dalelių struktūros padengia paviršių. Adsorbicijos elgsena priklauso nuo paviršiaus pavienių LSKN sudedamųjų dalių ir padėklo paviršiaus pusiausvyros. Adsorbuotą kiekį ir gautas sluoksnio struktūras nulemia elektrostatinės dalelė–paviršius sąveikos, taip pat kaip neelektrostatinė trauka tarp polimero ir paviršiaus. Žemame pH arba druskų tirpaluose ant hidrofiliųjų silpnai įkrautų, tokių kaip silicio ir chitozanu dengto silicio, paviršių stebimos tarpinės daugiasluoksnės struktūros. Sąveikos mechanizmas tarp LSKN ir padėklo paviršių priklauso nuo padėklo chemijos. Ant hidrofobinio paviršiaus, hidrofobinė trauka tarp padėklo paviršiaus ir hidrofobinės lipidų uodegos lemia paviršiaus padengimą monosluoksniu. Ant katijoninio paviršiaus elektrostatinė sąveika tarp neigiamai įkrautų LSKN ir teigiamai įkrauto paviršiaus tampa pagrindine adsorbicijos varomąja jėga.

Taip pat parodėme, jog tarpfazinė sąveika tarp lipidų skystakristalių nanodalelių ir paviršiaus gali būti tinkamai valdoma, keičiant LSKN mišinio sudėtį, t.y. SPC:GDO svorio santykį ir P80 dalį. Taip pat parodyta, jog lipidų mišinys tinkamas tarpfazinei struktūrai kontroliuoti, LSKN paviršiaus sluoksnio suformavimui ir sustiprintam vaistų pernešimui. Paviršiaus chemiją ir tirpiklio sąlygos veikia dalelių adsorbiciją.

2.4. Susilieėjimas su fosfolipidų liposomomis

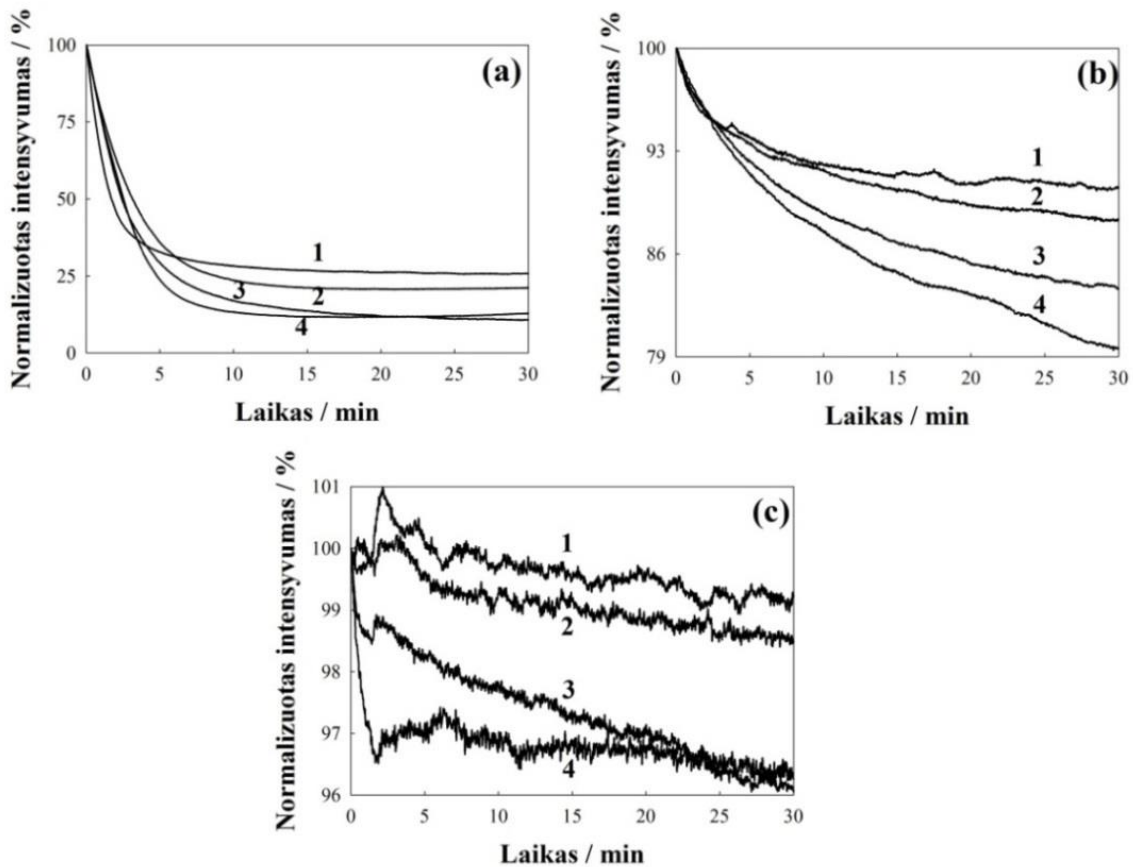
Lipidų skystakristalės nanodalelės pasižymi mažais dalelių dydžiais, mažu klampumu, biologiniu suderinamumu ir termodinaminiu stabilumu vandens

pertekliuje, todėl tinkamos intraveniniam suleidimui. Pagrindinis tikslas išsiaiškinti struktūrinės/funkcinės nešiklio savybes ir sąryšį su tokiomis savybėmis, kaip toksiškumas ir stabilumas sisteminėje apytakoje *in vivo*. Tuo tikslu, atlikti skirtingų nelamelinių lipidų skystakristalių nanodalelių maišymosi su modelinėmis fosfolipidinėmis liposomomis tyrimai. Įvairių lipidų mišinių skystakristalės nanodalelės su įterptais žymėtais lipidais panaudotos sąveikų su fosfolipidų liposomomis analizei. Fioresterio rezonanso energijos pernaša – tinkamas metodas tirti disperguotų lipidų nanodalelių susiliejimą su fosfolipidų liposomomis.

Šioje disertacijos dalyje skirtingos LSKN maišomos su sojos fosfatidilcholino daugiasluoksniomis liposomomis. **III. 26 paveiksle** pateikti FREP kinetikos duomenys, gauti iš GMO/F127, DGMO:GDO/P80, ir SPC:GDO/P80 LSKN susiliejimo su fosfolipidų liposomomis. Fluorescencijos intensyvumo kritimas parodo, jog GMO turinčios dispersijos pasižymėjo didžiausiu sąveikos aktyvumu (žr. III. 26 a pav.). Pridėjus SPC liposomas, fluorescencijos intensyvumas sunyko iki 20 % pradinės vertės jau per pirmąsias 30 min. maišymosi eksperimento. Vidutinis atstumas tarp įterptų GMO/F127 nanodalelėse fluoroforų sparčiai išaugo. Taigi, šių lipidų nanodalelių maišymosi su SPC liposomomis sparti kinetika. Taip pat nėra akivaizdžios lipidų maišymosi elgsenos priklausomybės nuo F127 koncentracijos.

„Kempinės“ tipo DGMO:GDO/P80 LSKN pasižymėjo vidutiniu susiliejimu su SPC liposomomis (žr. III. 26 b pav.). Šiuo atveju, fluorescencijos intensyvumai gęsta tik 15 % nuo pradinės vertės. Atkreiptinas dėmesys, jog fluorescencijos intensyvumo gesinimas šiuo atveju priklauso nuo stabilizuojančio agento koncentracijos. DGMO:GDO/P80 (lipidai/P80 svorio santykiai: 70/30 ir 80/20) dispersijų fluorescencija gęsta tik apie 10 % nuo pradinio intensyvumo. O dispersijų (lipidas/P80 svorio santykiai: 85/15 ir 92,5/7,5) fluorescencija gęsta, atitinkamai, per 16 ir 20 %. Kitaip tariant, padidėjusi P80 dalis iki tam tikro laipsnio, sutrukdė tokių „kempinės“ tipo LSKN dispersijų susiliejimui su SPC

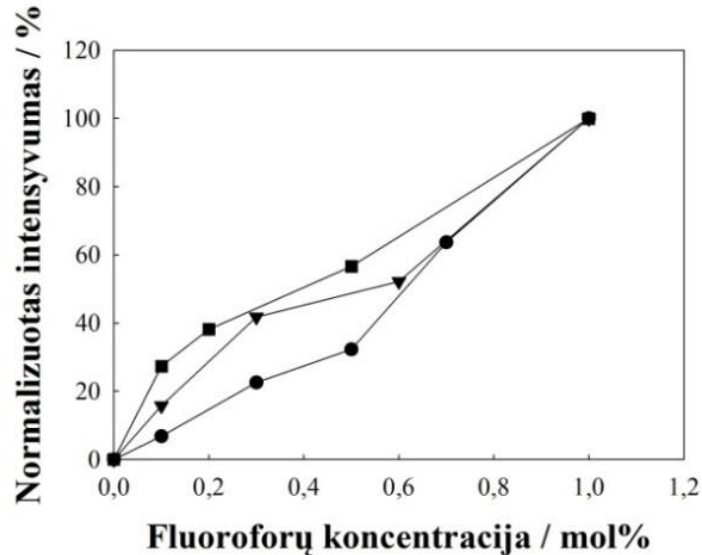
dvisluoksniais. Viename iš pastarųjų metų tyrimų parodyta, jog vidinė DGMO/GDO/P80 LSKN nanostruktūra priklauso nuo P80 koncentracijos (Barauskas ir kt., 2006). Būtent, didėjant P80 koncentracijai, storėja išorinis „kempinės“ fazės nanodalelių sluoksnis, kuriame P80 molekulės geriau išsidėsto. Taigi, tikėtina, jog P80 dalies nanodalelėse didėjimas, suteikia keletą papildomų erdvinės stabilizacijos laipsnių ir riboja susiliejamą su fosfolipidų liposomomis. Vidutinis susiliejo su liposomomis efektas taip pat stebėtas heksagoninio tipo DGMO:GDO/F127 (lipidai/polimeras 9/1) LSKN. Šiuo atveju, fluorescencijos intensyvumas gėsta apie 30 % nuo jo pradinės vertės (duomenys nepateikiami).



III. 26 pav. FREP fluorescencijos intensyvumo gesimas

SPC daugialamelinės liposomos sumaišytos su fluorescencine žyme (NBD-PE ir DHPE) turinčiomis (a) GMO/F127 LSKN su skirtingais GMO/polimeras svorio santykiais: 70/30 (1), 80/20 (2), 90/10 (3), ir 75/25 (4); (b) DGMO:GDO/P80 (50:50/x) LSKN su skirtingais lipidų/P80 svorio santykiais: 80/20 (1), 70/30 (2), 85/15 (3), ir 92,5/7,5 (4); ir (c) SPC:GDO/P80 (lipidas/20) LSKN su SPC:GDO svorio santykiais: 70:30 (1), 50:50 (2), 30:70 (3), ir 10:90 (4). Sužadinimo bangos ilgis 463 nm ir emisija užrašoma 580 nm bangos ilgyje. 100 % atitinka pradinį įterptų fluoroforų nanodalelėse fluorescencijos emisijos intensyvumą.

Kaip matyti iš duomenų pateiktų **III. 26 c paveiksle**, vandeninės SPC:GDO/P80 dispersijos pasižymi labai mažu susilieimo su SPC liposomomis laipsniu. Tik kelis procentus nuo pradinio fluorescencijos intensyvumo praranda paruoštos dispersijos su nepriklausomais lipidų SPC:GDO svorio santykiais (nuo 70:30 iki 10:90). Tokiu būdu praktiškai nevyksta lipidų susimaišymas su SPC dvisluoksniu.



III. 27 pav. FREP fluorescencijos intensyvumo priklausomybė nuo bendros NBD-PE ir DHPE koncentracijos

Fluoroforai įterpti į: GMO/F127 (kvadratai), DGMO:GDO/P80 (trikampiai) ir SPC:GDO/P80 (apskritimai) LSKN dispersijas. Sužadinimo bangos ilgis 463 nm ir emisija užrašoma 580 nm bangos ilgyje.

Padaryti papildomi kalibraciniai eksperimentai, norint geriau suprasti sąveikų savybes tarp nelamelinių LSKN ir SPC daugiasluoksnių liposomų. Atlikti lipidų dvisluoksniu praskiedimo maišymosi metu apytikri skaičiavimai, matuojant emisijos intensyvumą ($\lambda_{emisijos} = 580$ nm) skirtingose bendrų fluoroforų (NBD-PE ir DHPE), kurie yra įterpti į LSKN, koncentracijose. Tokiu būdu įmanoma apytiksliai apskaičiuoti lipidų maišymosi laipsnį, pvz., susieti tarpusavyje santykinę emisijos gesinimą su fluorescencinių žymenų skiedimu. **III. 27 paveiksle** apibendrinami trijų skirtingų LSKN dispersijų sistemų: GMO/F127, DGMO:GDO/P80 ir SPC:GDO/P80 rezultatai. Kalibracinės kreivės parodė artimą tiesei fluorescencijos intensyvumo kritimą, mažėjant fluoroforo koncentracijai.

Vis dėlto, ypač mažesnėse fluorescuojančių žymenų koncentracijose, trijų LSKN dispersijų priklausomybės skyrėsi nežymiai. Pavyzdžiui, SPC/GDO-turinčių LSKN dispersijų fluorescencijos intensyvumas, mažėjant fluoroforų koncentracijai, gėsta greičiau negu GMO/F127 LSKN (žr. III. 27 pav.). Tai turbūt susiję su skirtingomis LSKN nanostruktūrinėmis organizacijomis ir skirtingomis lokalizacijomis, ir energijos pernešimo savybėmis tarp fluorescuojančių žymenų, esančių atitinkamų lipidų nanodalelėse. Svarbu tai, jog iš kalibracinių kreivių (žr. III. 27 pav.) galima apytikriai įvertinti tikrąją pernešimo masę gautuose lipidų maišymosi kinetiniuose duomenyse. Tokiu būdu, sumaišant GMO/F127 LSKN dispersijas su SPC liposomomis, fluorescencijos intensyvumai gėsta apie 80 % nuo pradinės vertės (žr. III. 26 a pav.). Toks staigus (labai greitas) lipidų susimaišymas atitinka daugiau nei 10-ies kartų fluorescencinių žymenų skiedimą nanodalelėse (žr. III. 27 pav.). Atsižvelgę į tai, jog matavimai atlikti, kai LSKN/SPC liposomų santykis lygus 1/10, galime teigti, jog per 30 minučių GMO turinčios LSKN ir SPC liposomos visiškai susimaišo. Priešingai, SPC:GDO/P80 LSKN labai ribotai sąveikauja su SPC liposomomis, beveik jokių lipidų mainų ir praktiškai jokio fluoroforų prasiskiedimo. “Kempinės” tipo (DGMO:GDO/P80) LSKN parodė nedidelę maišymosi elgseną su SPC, kuri atitinka dalinį masės pernešimą ir apie 1,2 karto fluorescencinių žymenų atskiedimą.

Siekdami įvertinti paveiktą nanodalelėmis liposomų membranų pralaidumą, atlikome priešingą FREP – savigesinančios fluorescencijos tyrimą. Šiuo atveju, karboksifluoresceinas įterpiamas į vienlamelinių SPC liposomų vidinę vandeninę fazę. Fluorescencijos intensyvumas padidėja, kai liposomų membrana suardoma ir KF išėina iš liposomų. Dažas pereina į monomerinę formą. Įvertintas įvairių mišinių SK nanodalelių: GMO/F127 (80/20); SPC/GDO/P80 (40/40/20) ir DGMO/GDO/P80 (40/40/20) poveikis vienlamelinių liposomų (apie 200 nm dydžio) pralaidumui. Paruoštos atitinkamų nanodalelių dispersijos sumaišomos su vienlamelinėmis liposomomis santykiu 1:1 (galutinė kiekvienos iš sudedamųjų dalių koncentracija kvarco kiuvetėje $6 \cdot 10^{-5}$ %). Susiliejiimo tarp

nanodalelių ir liposomų trukmė 30 min, iš kurių pirmas 3 min. stebimas liposomų stabilumas laiko atžvilgiu. Tokiu būdu kontroliuojamas spontaninis fluorescuojančio dažo išėjimas iš liposomų. Praėjus pradiniam laikui, pridedami atitinkami nanodalelių kiekiai. Fluorescencijos intensyvumo padidėjimas siejamas su SPC liposomų membranos suardymu ir KF ištekėjimu (Hernandez ir kt., 2011). Kaip ir FREP tyrimuose, didžiausiu poveikiu pasižymėjo besitęsiančios kubinės fazės GMO/F127 nanodalelių dispersijos. Intensyvumo pokytis išreikštas procentais nuo pradinio liposomų su įterptu KF intensyvumo, prilygintam pradinei 100 % reikšmei. Mėginiai atskiesti atitinkamai pagal fluorimetro darbinę intensyvumų skalę. Taigi, paveikus liposomų su įterptu KF dispersija GMO/F127 nanodalelių dispersiją, fluorescencijos intensyvumas padidėja apie 140 % nuo pradinės vertės. Atkreiptinas dėmesys, kad DGMO/GDO/P80 ir SPC/GDO/P80 pasižymėjo labai artimu fluorescencijos procentiniu intensyvumų padidėjimu, atitinkamai, 3 ir 0–1 %. Taip pat kiekybiškai įvertinta liposomų ir nanodalelių susilieimo efektyvumas. Maksimalus (100 %) KF išėjimas pasiektas, sumaišius SPC liposomas su 10 µl 5 % Triton X-100 tirpalo. Sumaišius SPC liposomas su GMO/F127 (80/20) nanodalelėmis vidutinis fluorescencijos intensyvumas siekė 65 proc. nuo maksimalios reikšmės, o DGMO/GDO/P80 (40/40/20) ir SPC/GDO/P80 (40/40/20), atitinkamai, 3,8 % ir 1,85 %.

2.5. Sąveikos su eritrocitais

Šioje disertacijos dalyje daugiausia dėmesio skiriama skirtingų lipido ir polimero mišinių LSKN hemoliziniam poveikiui. Siekdami nustatyti hemolizinį poveikį, buvo atlikti LSKN sąveikų su šviežiu nemonifikuotu žiurkių krauju *in vitro* tyrimai. Matavimai atlikti su kubinės fazės GMO/F127 ir GMO/P80, skirtingų lipidų ir polimero svorio santykių (90/10, 85/15, 80/20, 75/25, ir 70/30), nanodalelių dispersijomis. Kaip parodyta **III. 5 lentelėje**, nepaisant skirtingų stabilizuojančio polimero dalių, visų GMO/F127 nanodalelių hemolizė buvo masyvi ir siekė 117–137 %, lyginant su santykinę pozityvia kontrole. F127

pakeitimas (20 %, lyginant su GMO dalimi) kitu skaidymo agentu, P80 (20 %, lyginant su GMO dalimi), baigiasi panašiu rezultatu (136 % hemolizės), parodoma, jog skaidymo agento prigimtis nedaro įtakos hemolizės aktyvumui GMO turinčiose dispersijose. Taip pat heksagoninių ir „kempinės“ tipo DGMO/GDO, stabilizuotų su F127 (10 %) ir P80 (7,5, 15, 20, ir 30 %, atsižvelgus į bendrą lipidų mišinio dalį), turinčių LSKN sąveikos su eritrocitais rezultatai pateikti **III. 5 lentelėje**. Nepaisant skirtingų struktūrinių organizacijų ir stabilizuojančio/skaidymo agento prigimties ir jo koncentracijos, visos DGMO/GDO-turinčios dispersijos pasižymėjo labai panašiu ir ganėtinai mažu hemolizės aktyvumu laipsniu, siekiančiu 1–2 %. SPC:GDO/P80 mišiniai formuoja stabilias ir struktūriškai gerai apibrėžtas nelamelinės LSKN dispersijas vandeninėje terpėje, taip pat tinka intraveniniam pernešimui (Johnsson ir kt., 2006, a; Cervin ir kt., 2009). Paruoštos bei ištirtos dispersijos, stabilizuotos su vienoda P80 dalimi, bet su skirtingais SPC:GDO svorio santykiais (70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, ir 10:90) (žr. III. 5 lentelę). Nei vienoje iš dispersijų nevyksta sąveika su eritrocitais, lyginant su teigiama kontrole.

Taip pat ištirtas abiejų stabilizuojančio polimero (F127) ir paviršiaus aktyviosios medžiagos (P80) tirpalų hemolizės poveikis duomenų apie skirtingas LSKN papildymui. 1 % P80 ir 1 % F127 micelinų tirpalų hemolizė, atitinkamai, 7 % ir 0 %. Tokiu būdu pats P80, ištirpintas vandeninėje aplinkoje, kaip aprašyta ir literatūroje (Miwa ir kt., 1998), pasižymi vidutiniu hemoliziniu aktyvumu, o Pluronic F127 pasirodo yra inertiškas hemolizei. Atkreiptinas dėmesys, jog P80 sudarė 20 % nuo bendros lipidų koncentracijos SPC/GDO/P80 LSKN dispersijose (žr. III. 5 lentelę) ir tai, kad 5 % LSKN dispersijų (sumaišyta santykiu 1/1 pagal tūrį su žiurkės krauju), panaudotų hemolizės matavimams, atitinka galutinę 1 % P80 koncentraciją. Tokiu būdu sumaišytas P80 su SPC/GDO, neveikia hemolizės, pvz., P80 aktyvumas ženkliai mažesnis mišinyje, negu lyginant su gryno P80 vandeniniu tirpalu. Panašus poveikis ir DGMO:GDO/P80 LSKN dispersijų. Apskritai, sąveikų su eritrocitais rezultatai aiškiai nurodo, kad skirtingų

nelamelinių LSKN dispersijų hemolizės poveikis daugiausiai nulemiamas lipido molekulių prigimties ir būdingo lipidų mišinio, bet ne stabilizuojančio polimero (F127) ar paviršiaus aktyviosios medžiagos (P80).

III. 5 lentelė. Skirtingų lipidų mišinių LSKN sumaišytų su žiurkių krauju bei vandeninių F127 ir P80 tirpalų *in vitro* hemolizės rezultatai ir dalelių dydžių duomenys

Lipidų tarpusavio svorio santykiai (%)				Polimeras (% nuo lipidų)		Dalelių dydžio pasiskirstymas		Hemolizė (%) (n ≥ 3)	
GMO	DGMO/GDO	SPC/GDO	SPC/GDO/GMO	P80	F127	d (nm)	PdI	Vi-dur-kis	SD
100					10	196	0,11	120	14
100					15	199	0,17	114	10
100					20	204	0,17	116	3,4
100					25	206	0,23	114	22
100					30	186	0,26	114	32
100				20		339	0,22	122	16
	50/50				10	154	0,14	1,6	0,2
	50/50			7,5		141	0,14	1,3	0,2
	50/50			15		130	0,16	1,7	0,6
	50/50			20		138	0,21	1,7	0,2
	50/50			30		153	0,23	1,6	0,2
		70/30		20		160	0,17	0,0	0,0
		60/40		20		148	0,18	0,1	0,1
		50/50		20		125	0,20	0,0	0,1
		40/60		20		116	0,20	0,2	0,1
		30/70		20		102	0,24	0,4	0,2
		20/80		20		105	0,22	0,3	0,2
		10/90		20		116	0,20	0,3	0,2
			40/30/30	20		146	0,17	4,2	2,1
			40/24/36	20		141	0,21	4,3	2,1
			40/18/42	20		152	0,13	4,9	2,3
			40/12/48	20		191	0,17	6,2	2,6
			40/6/54	20		236	0,24	11	3,3
			40/0/60	20		226	0,26	18	5,7
				100		11,3	0,11	6,6	1,4
					100	24,4	0,27	0,0	0,0

Apskritai paėmus, sąlyginai geras sąryšis tarp *in vitro* skirtingų LSKN sąveikų su raudonais kraujo kūneliais sąlygotų efektų ir jų maišymosi elgsenos su SPC liposomomis. Kaip parodyta, GMO-turinčios LSKN demonstruoja masyvią hemolizę, sumaišant su šviežiu žiurkių krauju. Atitinkamai greitas ir beveik visiškas lipidų susimaišymas su SPC liposomomis stebėtas FREP eksperimentuose. SPC/GDO/P80 dispersijos, kita vertus, nehemolizinės ir FREP matavimuose beveik nepasižymėjo lipidų susiliejimu su fosfolipidų liposomomis.

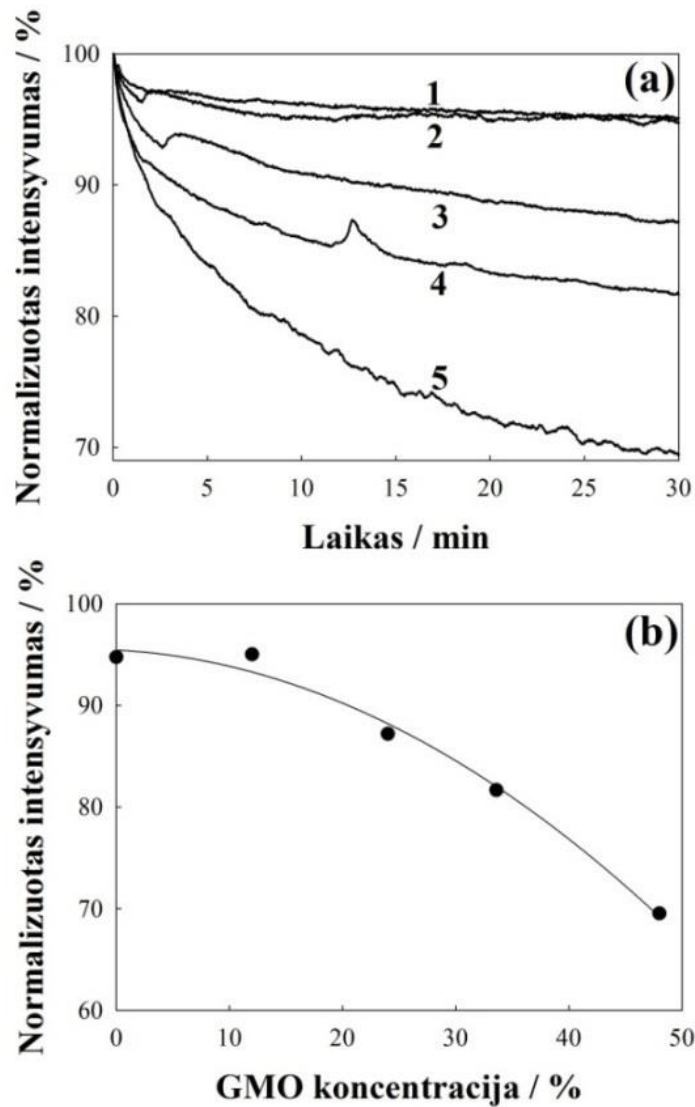
2.6. Glicerolio monooleato koncentracijos įtaka

III. 28 paveiksle pateikiami keturių sudedamųjų dalių SPC/GDO/GMO/P80 LSKN susiliejimo su liposomomis FREP kinetiniai duomenys. Aukščiau pateikti duomenys (žr. III. 26 a pav.) aiškiai parodo, kad GMO gali būti apibūdinamas kaip labai „skatinantis susiliejimą“, atsižvelgus į lipidų susiliejimą su SPC liposomomis. Iš tikrųjų, palaipsniui keičiant GDO į GMO, gauname lipidų maišymosi augimą, pasireiškiantį fluorescencijos intensyvumo kritimu (žr. III. 28 a pav.). Tuomet, kai GDO visiškai pakeitė GMO, vyko vidutinis susiliejimas tarp dispersijų su SPC liposomomis, fluorescencijos intensyvumas gęsta iki 30 % nuo pradinės vertės.

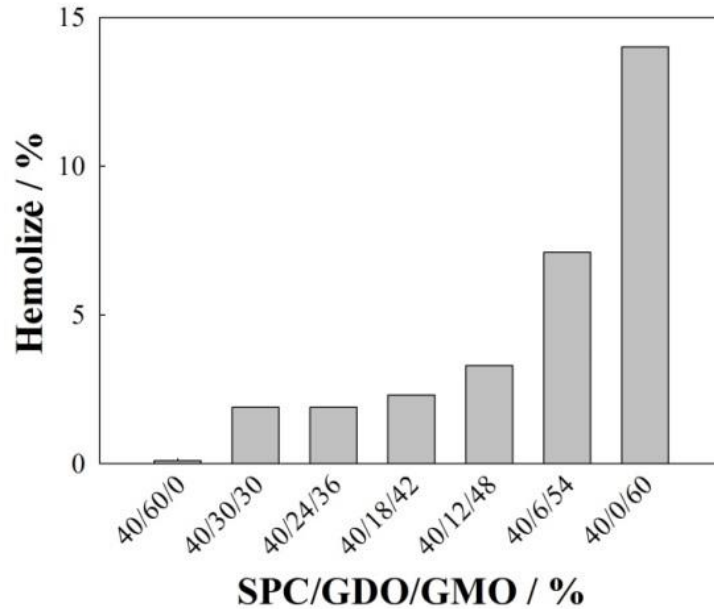
Gana įdomūs hemolizės rezultatai gauti lipidų SPC/GDO/GMO mišiniui (žr. III. 5 lentelę ir III. 29 pav.). Hemolizės aktyvumas tolygiai didėja nuo 0,2 % (GDO/GMO svorio santykis 100/0) iki 18 %, kai GDO, kuris yra LSKN dispersijose, visiškai pakeistas į GMO (GDO/GMO svorio santykis 0/100). Tokia SPC/GDO/P80 LSKN dispersijų elgsena dėl labai hemolizėje aktyvaus GMO, parodė, jog SPC/GDO/P80 turinčios dispersijos gali apimti didelius monogliceridų (arba GMO) „priemaišų“ kiekius ir vis dar pasižymėti žemu hemoliziniu aktyvumu.

Įdomu, jog GMO ryškus poveikis abiem, ir lipidų susiliejimui ir hemolizei. GMO kritinė agregacijos koncentracija (*kak*) ar kritinė micelių koncentracija (*kmc*) apytikri $4 \cdot 10^{-6}$ M skaitinei reikšmei (Ho ir Storch, 2001) ir, lyginant su SPC

ir GDO, kurių apskaičiuotos *kak* (arba *k_{mk}*) reikšmės nuo 10^{-9} iki 10^{-10} M (Tanford, 1991), GMO turi aukštesnį monomero aktyvumą. Pridėjus GMO į SPC/GDO, hemolizė ir lipidų maišymasis ženkliai mažėja, lyginant su grynu GMO mišiniu, bet auga tolygiai, didėjant GMO frakcijai lipidų mišinyje (žr. III. 28 a ir III. 29 pav.).



III. 28 pav. *FREP fluorescencijos gesimas ir priklausomybė nuo GMO koncentracijos*
Pateikta: (a) *FREP fluorescencijos intensyvumas gęsta dėl SPC daugiasluoksnių liposomų maišymosi su fluoroforais (NBD-PE ir DHPE) žymėtomis SPC/GDO/GMO/P80 LSKN. Lipidų SPC/GDO/GMO mišinių svorio santykiai: 40/45/15 (1), 40/60/0 (2), 40/30/30 (3), 40/18/42 (4), ir 40/0/60 (5). (b) FREP fluorescencijos intensyvumo priklausomybė nuo GMO koncentracijos SPC/GDO/GMO/P80 LSKN (koncentracija išreikšta kaip % dalis nuo bendros mišinio masės) po 30 min. maišymosi su SPC daugiasluoksniomis liposomomis. Sužadinimo bangos ilgis 463 nm ir emisijos intensyvumas užrašytas 580 nm bangos ilgyje.*



III. 29 pav. LSKN dispersijų indukuota Žiurkių kraujo hemolizė

Lipidų SPC/GDO/GMO/P80 LSKN dispersijos su skirtingais lipidų SPC/GDO/GMO svorio santykiais (40/60/0, 40/30/30, 40/24/36, 40/18/42, 40/12/48, 40/6/54 ir 40/0/60). P80 sudaro 20 % nuo bendros mišinio dalies (taip pat žr. III. 5 lentelę).

Šie poveikiai gali būti paaiškinami GMO monomero aktyvumo mažėjimu mišinyje. Darant prielaidą, jog maišymasis idealus, galima apytikriai apskaičiuoti *kak* (*kmk*) lipidų mišiniams pateiktiems **III. 5 lentelėje**. Pavyzdžiui, SPC/GMO/P80 32/48/20 % mišinio, atitinkamos SPC, GMO ir P80 *kak* (ar *kmk*) skaitinės reikšmės 10^{-9} M, $4 \cdot 10^{-6}$ M ir $6 \cdot 10^{-6}$ M (Thorsteinsson ir kt., 2005), ir panaudojus lygtį (III.3) (kai α_i ir kmk_i tai, atitinkamai, *i*-tojo komponento molinė dalis ir *kmk*), mišrus *kmk* apytikriai lygus $5 \cdot 10^{-9}$ M reikšmei.

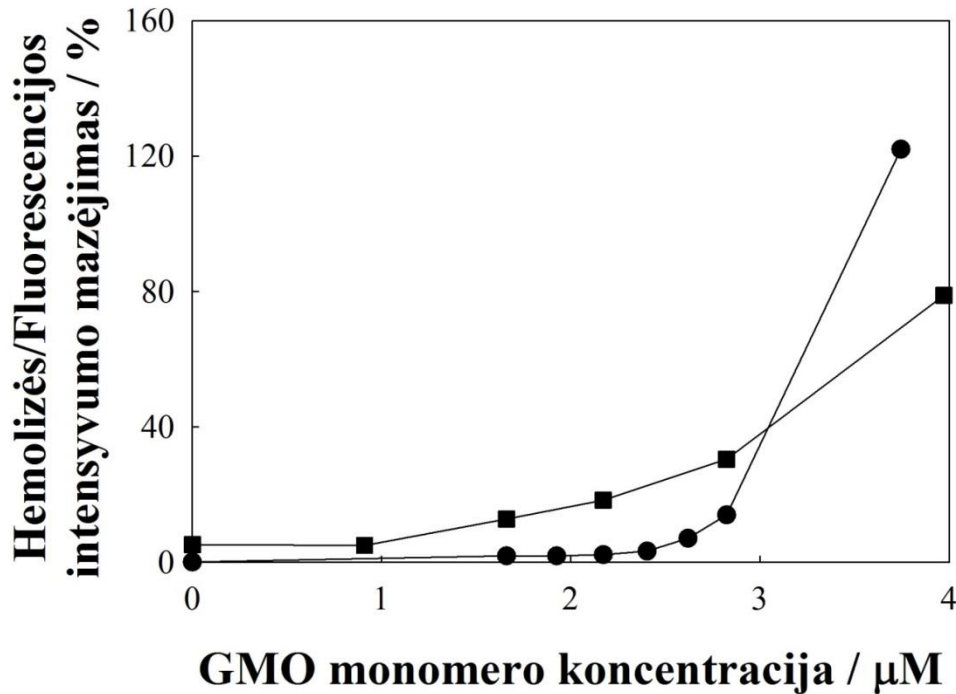
$$\frac{1}{kmk_{mišrus}} = \sum_i \left(\frac{\alpha_i}{kmk_i} \right) \quad (\text{III.3})$$

Apskaičiuotas mišrus *kmk* nanomolių ribose, nurodo, jog visuose čia panaudotose eksperimentinėse sąlygose bus lipidų agregatai/dalelės, lygtis (III.4) tinka GMO monomero koncentracijai įvertinti, darant prielaidą, jog maišymasis idealus:

$$C_{GMO}^{monomero} = X_{GMO} kmk_{GMO}, \quad (\text{III.4})$$

kai, X_{GMO} ir kmk_{GMO} , atitinkamai, molinės GMO frakcijos lipidų mišinyje ir *kmk* gryno GMO. Pagrindžiant ankstesnės prielaidas, monomero GMO koncentracija,

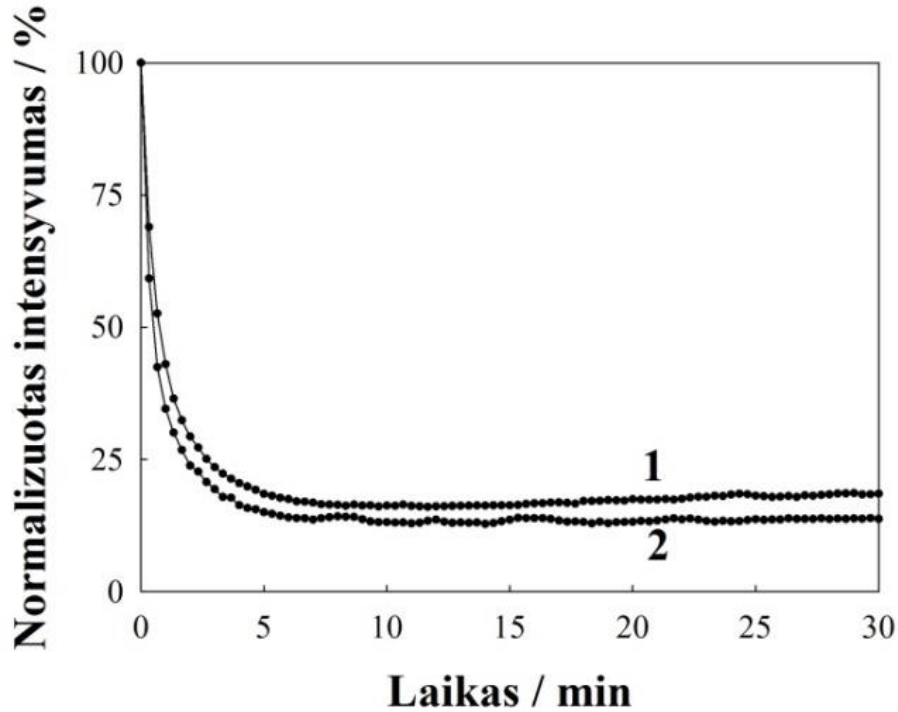
atitinkamuose lipidų mišiniuose hemolizės ir lipidų maišymosi (FREP) eksperimentuose, apskaičiuota, o tyrimo rezultatai apibendrinti **III. 30 paveiksle**.



III. 30 pav. Hemolizės (apskritimai) ir lipidų maišymosi (fluorescencijos intensyvumo mažėjimo išraiška) (kvadratai) priklausomybės nuo apskaičiuotos GMO monomero koncentracijos mišriose SPC/GDO/GMO/P80 mišiniuose

Nulinės GMO koncentracijos reikšmės atitinka SPC/GDO/P80 LSKN, o didesnės hemolizės skaitinės reikšmės paimtos iš GMO/P80 (80/20) LSKN ir didžiausia lipidų maišymosi ar intensyvumo mažėjimo reikšmė paimta iš GMO/F127 (80/20) LSKN.

Pažymėtina, jog hemolizės ir FREP matavimai atlikti iš esmės skirtingomis galutinėmis lipidų (LSKN) koncentracijomis, pvz., po sumaišymo su žiurkių krauju galutinė bendra lipidų (LSKN) koncentracija siekė 2,5 % (arba 25 mg/ml), o, atliekant FREP matavimus, bendra lipidų (LSKN) koncentracija siekė 0,003 % (arba 30 $\mu\text{g/ml}$). Iš **III. 30 paveikslo** matome, jog, nepaisant beveik 3 eilių skirtumo galutinėse lipidų (LSKN) koncentracijose, hemolizės ir lipidų maišymosi tendencijos tokios pačios. Abiejuose atvejuose stebima “poveikio pradžia”, kai apskaičiuota GMO monomero koncentracija siekia apie 2–3 μM . Taigi, ši GMO monomero koncentracija palengvina sąveiką su žiurkių raudonais kraujo kūneliais ir SPC daugiasluoksnėmis liposomomis greičiau nei tiesioginės dalelė–dalelė sąveikos (arba susiliejimai).



III. 31 pav. FREP fluorescencijos intensyvumo kritimas

FREP fluorescencijos intensyvumo kritimas dėl SPC (1) ir SPC/PEG-lipidas (84/16) (2) vienlamelinių liposomų maišymosi su fluorescencinėm žymėm (NBD-PE ir DHPE) žymėtai GMO/F127 (90/10). Sužadavimo bangos ilgis 463 nm ir emisijos intensyvumas užrašytas 580 nm bangos ilgyje.

Siekiant patvirtinti, jog sąveika su lipidų membranomis varoma GMO monomero, GMO/F127 (svorio santykis 90/10) LSKN sumaišytos su gryno SPC arba SPC/PEG-lipidų, turinčio 16 % (arba atitinkamai 5 mol%) PEG-lipido (DOPE–PEG(2000)), viensluoksnėmis liposomomis. Tikėtasi, jog PEG-lipidų buvimas lipidinėje membranoje veiksmingai sumažins dalelė–dalelė sąveikas per erdvinę stabilizaciją (Kenworthy ir kt., 1995; Čeh ir kt., 1997; Johnsson ir Edwards, 2003). Lipidų maišymosi kinetika turėtų pakisti, jeigu sąveikos vedamąją jėga yra dalelių susilieėjimas labiau negu monomerų mainai. **III. 31 paveiksle** parodyta, jog lipidų maišymosi kinetikos iš esmės vienodos gryno SPC ir SPC/PEG-lipidų liposomoms, tokiu būdu vėl parodyta, kad svarbiausias veiksnys – GMO monomero mainai.

Įdomu tai, kad nesotūs monogliceridai tokie, kaip GMO pasižymėjo aukštu priešvirusiniu aktyvumu prieš apgaubtus virusus (Sands ir kt., 1979), o sotūs

papildiniai yra neaktyvūs. Reikia 1 μM GMO koncentracijos 50 % *herpes simplex virus* (HSV-2) inaktyvavimui. Žemiau 4 μM kmk_{GMO} , vėl parodoma monomero koncentracijos svarba membranos „aktyvumui“. Sands ir kt. tyrime, parodyta, jog maišant GMO (ar monooleiną) su GDO (dioleinu) ar PC, GMO sukelta dviejų tipų bakteriofagų inaktyvacija iš esmės nuslopinama, taip abudu GDO ir PC susilpnina GMO priešvirusinį aktyvumą ir sumažina GMO monomero aktyvumą mišriame mišinyje. Taip pat pažymėtina, jog *bendra* monoacilinių glicerolių (MAG) (nežinoma frakcija – tai nesotūs MAG turintys GMO) dalis žmogaus plazmoje sudaro < 1 % nuo bendros acilglicerolių (MAG, diaciliniai gliceroliai (DAG) ir triaciliniai gliceroliai (TAG)) dalies. MAG dalis plazmoje siekia 2–5 μM eilę (Fielding ir kt., 1993). Taigi, bendra MAG ir dėl to GMO (ir kitų nesočiųjų MAG) koncentracija plazmoje natūraliai palaikoma santykinai maža ir tai fiziologiškai svarbu, turint omeny aukštą glicerolio monooleato veiklą destabilizuojant membranas.

Tampa aišku, kad atitinkamų lipidų ar paviršiaus aktyviosios medžiagos tirpalo monomero koncentracija svarbi hemoliziniam aktyvumui. Tačiau akivaizdu, jog tai vienintelis veiksnys, pvz., GMO ir P80 turi maždaug tą patį kmk , bet sukelia skirtingą hemolizės poveikį. Kitas svarbus veiksnys, ypač lipidų/paviršiaus aktyviosios medžiagos įterpimui į ląstelių membraną, – tai struktūrinis poveikis. Pvz., GMO ir P80, vienas suformuoja kubinę, o kitas „normalių“ micelių fazę. Aišku, kubinę fazę formuojantis GMO turi labiau išreikštą destabilizuojantį poveikį membranoms, – tai gali būti susiję su potencialių fazių atskyrimu ląstelės membranoje, atsiranda porų struktūros ir, todėl gaunamas ląstelių turinio nuotėkis. Šis porų susidarymo tipas taip pat gali atsirasti normalių paviršiaus aktyviųjų medžiagų/membranos lipidų mišinyje (Edwards ir Almgren, 1992). Tačiau, priklausomai nuo paviršiaus aktyviosios medžiagos molekulinės prigimties, dažniausiai neatsiranda labai pralaidžių lipidų membranų iki santykinai aukštos aktyviosios paviršiaus medžiagos frakcijos, esant lipidų dvisluoksniui. Taigi, cheminis aktyvumas, lipido ar paviršiaus

aktyviosios medžiagos vietinis poveikis ląstelės membranos struktūrinėms savybėms pasirodo daro įtaką hemoliziniam aktyvumui ir vaistų pernešimo pritaikymui.

2.7. Sąveikų su skirtingais ląstelių membranų modeliais apibendrinimas

Lipidų skystakristalių fazių nanodalelės tinka intraveniniam vaistų pernešimui. Šiame darbe nebuvo nagrinėtas nešiklio patekimo į organizmą aspektas ir tik modeliuojami atitinkamų sąveikų scenarijai. Parodyta, jog sąveika sąlyčio riboje tarp LSKN ir paviršiaus gali būti tinkamai kontroliuojama tiesiog keičiant LSKN sudėtį, t.y. lipidų SPC/GDO tarpusavio santykį ir P80 dalį. Tokiu būdu dalelių mišiniai gali būti pritaikomi kaip paviršių dangalai ar sustiprintai vaistų pernašai. Taip pat ištirta LSKN adsorbcija ant skirtingų savybių paviršių. Paviršiaus chemija ir tirpiklis veikia dalelių adsorbciją. Ant hidrofobinio silicio paviršiaus dėl stiprios hidrofobinės sąveikos nanodalelės suyra ir formuojamas lipidų monosluoksnis. Ant hidrofilinio silicio paviršiaus druskų tirpale ar žemame jo pH formuojamas storesnis daugiasluoksnis. Ant katijoninio silicio paviršiaus elektrostatinė trauka tarp neigiamai įkrautų dalelių ir teigiamai įkrauto paviršiaus lėmė nepažeistų dalelių adsorbciją.

Taip pat disperguotų lipidų SPC/GDO mišinių skystakristalių fazių nanodalelės dalinai maišosi su SPC modelinėmis membranomis ir nepasižymi hemoliziniu poveikiu. Pastaroji savybė būtina intraveninio patekimo vaistų nešikliams. Abiejų nepriklausomų tyrimų rezultatai tarpusavyje koreliuoja. Taigi, FREP metodas tinka lipidų mišinių tinkamų parenteriniam vaistų pernešimui, konkrečiai intraveniniam patekimui, atrankai.

IŠVADOS

1. Sojos fosfatidilcholino (SPC) ir glicerolio dioleato (GDO) mišiniai vandens pertekliuje, didėjant GDO daliai ir 25 °C temperatūroje, patiria tokius fazinius virsmus: lamelinė → atvirkštinė 2D heksagoninė → atvirkštinių micelių $Fd3m$ kubinė → atvirkštinių micelių $P6_3/mmc$ heksagoninė → nenustatytos struktūros → $Fd3m$ → atvirkštinių micelių tirpalas.

2. Lipidų SPC/GDO mišinių atvirkštinių skystakristalių fazių perėjimas į netvarkingą struktūrą vyksta, didėjant GDO daliai, žemesnėse temperatūrose.

3. Fluoresceino išėjimo iš lipidų SPC/GDO mišinių skystojo kristalo monolito minimumas 37 °C temperatūroje stebimas, kai formuojamas atvirkštinių micelių $Fd3m$ kubinės ir $P6_3/mmc$ heksagoninės fazių mišinys.

4. Adsorbavusios disperguotų lipidų SPC/GDO mišinių skystakristalės nanodalelės ant hidrofobinio ir hidrofilinio silicio paviršių atitinkamai formuoja monosluoksnį ir daugiasluoksnį. O ant katijoninio silicio paviršiaus nanodalelės adsorbuojasi nepažeistos.

5. Disperguotų monogliceridų ir digliceridų mišinių nanodalelės pasižymi stipriu susiliejimu su fosfolipidų liposomomis ir hemoliziniu poveikiu. O, lyginant su šiomis dispersijomis, disperguotų lipidų SPC/GDO mišinių nanodalelės nepasižymi šiomis savybėmis.

6. Nustatyta, jog disperguotų lipidų SPC/GDO ir glicerolio monooleato mišinių nanodalelių susiliejimo stipris su fosfolipidų liposomomis ir hemolizinis poveikis nekinta, kai glicerolio monooleato koncentracija mišinyje mažesnė nei 30 %.

PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA

STRAIPSNIAI

1. Tiberg F., Johnsson M., **Jankunec M.**, Barauskas J. Phase behavior, functions and medical applications of soy phosphatidyl choline and diglyceride lipid compositions. *Chemistry Letters* 2012 (41): 1090–1092.
2. Chang D. P., **Jankunec M.**, Barauskas J., Tiberg T., Nylander T. Adsorption of lipid liquid crystalline nanoparticles on cationic, hydrophilic, and hydrophobic surfaces. *ACS Applied Materials & Interfaces* 2012 (4): 2643–2651.
3. Chang D. P., **Jankunec M.**, Barauskas J., Tiberg T., Nylander T. Adsorption of lipid liquid crystalline nanoparticles: effects of particle composition, internal structure, and phase behavior. *Langmuir* 2012 (28): 10688–10696.
4. Barauskas J., Cervin C., **Jankunec M.**, Spandyreva M., Ribokaite K., Tiberg F., Johnsson M. Interactions of lipid-based liquid crystalline nanoparticles with model and cell membranes. *International Journal of Pharmaceutics* 2010 (391): 284–291.

TEZĖS/Konferencijų medžiaga

1. **Jankunec M.**, Harwigsson I., Thuresson K., Johnsson M., Barauskas J., Kocherbitov V. The phase behavior of dioleoylphosphatidylcholine in water. 26th European Colloid and Interface Society (ECIS2012) meeting, 2012, rugsėjis (Malmė, Švedija). **Stendinis pranešimas.**
2. **Jankunec M.**, Persson L., Tiberg F., Johnsson M., Barauskas J. Hydration behavior, functions and medical applications of soy phosphatidylcholine and diglyceride lipid compositions. 26th European Colloid and Interface Society (ECIS2012) meeting, 2012, rugsėjis (Malmė, Švedija). **Stendinis pranešimas.**
3. **Jankunec M.**, Johnsson M., Barauskas J., Kocherbitov V. The aqueous phase behavior of dioleoylphosphatidylcholine. Biofilms 7th annual workshop. Biomaterials: From Fundamentals to Market Application. 2011, spalio (Malmė, Švedija). **Stendinis pranešimas.**

4. **Jankunec M.**, Johnsson M., Tiberg F., Barauskas J. The phase behavior of aqueous soy phosphatidylcholine/ glycerol dioleate mixtures. 25th European Colloid and Interface Society (ECIS2011) meeting, 2011, rugsėjis (Berlynas, Vokietija). **Stendinis pranešimas.**

5. **Jankunec M.** Lipidų matricių struktūriniai tyrimai. Projekto „Studentų mokslinės veiklos skatinimas“ dalies „Doktorantų stažuotės užsienio mokslo centruose“ dalyvių konferencija. 2011, kovas (Vilnius, Lietuva). **Žodinis pranešimas.**

6. **Jankunec M.**, Barauskas J., Tiberg F., Johnsson M. “SAXS study of the phase behavior of aqueous soy phosphatidyl choline/ glycerol dioleate mixtures”, 23rd Annual MaxLab User meeting. 2010, lapkritis (Lundas, Švedija). **Stendinis pranešimas.**

7. **Jankunec M.**, Cervin C., Špandyreva M., Ribokaitė K., Tiberg F., Johnsson M., Barauskas J. Interactions of lipid-based liquid crystalline nanoparticles with model and cell membranes. Biofilms 6th annual workshop. Biomaterials: From Fundamentals to Market Application. 2010, spalio (Malmė, Švedija). **Stendinis pranešimas.**

8. **Jankunec M.**, Cervin C., Špandyreva M., Ribokaitė K., Tiberg F., Johnsson M., Barauskas J. Interactions of lipid-based liquid crystalline nanoparticles with model membranes. 15-oji Tarptautinė studentų ir jaunųjų mokslininkų konferencija "Chemija ir cheminė technologija 2010", 2010 m. gegužės mėn. 07 d. (Vilnius), **žodinis pranešimas.**

LITERATŪROS SĄRAŠAS

Darbe cituojami 181 literatūros šaltiniai.

Allan G. G., Peyron M. Molecular weight manipulation of chitosan. I: Kinetics of depolymerization by nitrous acid. *Carbohydr. Res.* 1995 (277): 257–272.

Allen T. M., Cullis P. R. Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science* 2004 (303): 1818–1822.

Almeida A. J., Souto E. Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. *Adv. Drug deliver. Rev.* 2007 (59): 478–490.

Amar-Yuli I., Libster D., Aserin A., Garti N. Solubilization of food bioactives within lyotropic liquid crystalline mesophases. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2009 (14): 21–32.

Bangham A. D., Standish M. M., Watkins J. C. Diffusion of univalent ions across lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* 1965 (13): 238–252.

Barakat N. S., Taleb D. A. B., Al Salehi A. S. Target nanoparticles: an appealing drug delivery platform. *J. Nanomedic. Nanotechnol.* 2012, S4–009.

Barauskas J., Cervin C., Tiberg F., Johnsson M. Structure of lyotropic self-assembled lipid nonlamellar liquid crystals and their nanoparticles in mixtures of phosphatidyl choline and alpha-tocopherol (vitamin E). *PCCP* 2008 (10): 6483–6485.

Barauskas J., Johnsson M., Joabsson F., Tiberg F. Cubic phase nanoparticles (cubosome): principles for controlling size structure and stability. *Langmuir* 2005 (21): 2569–2577, a.

Barauskas J., Johnsson M., Tiberg F. Self-assembled lipid superstructures: beyond vesicles and liposomes. *Nano Lett.* 2005 (5): 1615–1619, b.

Barauskas J., Landh T. Phase behavior of the phytantriol/water system. *Langmuir* 2003 (19): 9562–9565.

Barauskas J., Misiunas A., Gunnarsson T., Tiberg F., Johnsson M. “Sponge” nanoparticle dispersions in aqueous mixtures of diglycerol monooleate, glycerol dioleate, and polysorbate 80. *Langmuir* 2006 (22): 6328–6334.

Bergentahl B. A., Stenius P. Phase diagrams of dioleoylphosphatidylcholine with formamide, methylformamide and dimethylformamide. *J. Phys. Chem.* 1987 (91): 5944–5948.

Bhansali S. H., Malik A. S., Jarvis J. M., Akartuna I., Dabbs D. M., Carbeck J. D., Aksay I. A. The stability of L3 sponge phase in acidic solutions. *Langmuir* 2006 (22): 4060–4064.

Boyd B. J., Dong Y. D., Rades T. Non-lamellar liquid crystalline nanostructured particles: advances in materials and structure determination. *J. Liposome Res.* 2009 (19): 12–28.

Boyd B. J., Khoo S. M., Whittaker D. V., Davey G., Porter C. J. H. A lipid-based liquid crystalline matrix that provides sustained release and enhanced oral bioavailability for a model poorly water soluble drug in rats. *Int. J. Pharm.*, 2007 (340): 52–60.

Boyd B. J., Whittaker D. V., Khoo S.-M., Davey G. Lyotropic liquid crystalline phases formed from glycerate surfactants as sustained release drug delivery systems. *Int. J. Pharm.* 2006 (309): 218–226.

Bolt G. H. Determination of the charge density of silica sols. *J. Phys. Chem.* 1957 (61): 1166–1169.

Borné J., Nylander T., Khan A. Microscopy, SAXD, and NMR studies of phase behavior of the monoolein–diolein–water system. *Langmuir* 2000 (16): 10044–10054.

Camurus AB, farmacinė įmonė (Švedija), 2012, <http://www.camurus.com>.

Cerenius Y., Stahl K., Svensson L. A., Ursby T., Oskarsson A., Albertsson J., Liljas A. The crystallographic beamline at I711 at MAX II. *J. Synchrotron Rad.* 2000 (7): 203–208.

Cervin C., Tinzl M., Johnsson M., Abrahamsson P. A., Tiberg F., Dizeyi N. Properties and effects of a novel liquid crystal nanoparticle formulation of docetaxel in a prostate cancer mouse model. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2010 (41): 369–375.

Cervin C., Vandoolaeghe P., Nistor C., Tiberg F., Johnsson M. A combined *in vitro* and *in vivo* study on the interactions between somatostatin and lipid-based liquid crystalline drug carriers and bilayers. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2009 (36): 377–385.

Cevc, G. (red.) *Phospholipids Handbook*; Marcel Dekker: New York. 1993.

Chang C. M., Bodmeier R. Swelling of and drug release from monoglyceride-based drug delivery systems. *J. Pharm. Sci.* 1997 (86): 747–752.

Chen M. –L. Lipid excipients and delivery systems for pharmaceutical development: a regulatory perspective. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2008 (60): 768–777.

Christie W. W. High-performance liquid chromatography and lipids. Pergamon Books: Oxford. 1987.

Clogston J., Caffrey M. Controlling release from the lipidic cubic phase. Amino acids peptides proteins and nucleic acids. *J. Control. Release* 2005 (107): 97–111.

Conn C. E., Darmanin C., Sagnella S. M., Mulet X., Greaves T. L., Varghese J. N., Drummond C. J. Incorporation of the dopamine D2L receptor and bacteriorhodopsin within bicontinuous cubic lipid phases. 2. Relevance to in meso crystallization of integral membrane proteins in novel lipid systems. *Soft Matter* 2010 (6): 4838–4846.

Čeh B., Winterhalter M., Frederik P. M., Vallner J. J., Lasic D. D. Stealth liposomes: from theory to product. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1997 (24): 165–177.

Das S., Rand R. O. Modification by diacylglycerol of the structure and interaction of various phospholipid bilayer membranes. *Biochemistry* 1986 (25): 2882–2889.

de Campo L., Yaghmur A., Sagalowicz L., Leser M. E., Watzke H., Glatter O. Reversible phase transitions in emulsified nanostructured lipid systems. *Langmuir* 2004 (20): 5254–5261.

De Feijter J. A., Benjamins J., Veer F. A. Ellipsometry as a tool to study the adsorption behavior of synthetic and biopolymers at the air–water interface. *Biopolymers* 1978 (17): 1759–1772.

De Jong W. H., Borm P. J. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *Int. J. Nanomedicine* 2008 (3): 133–149.

Drummond C. J., Fong C. Surfactant self-assembly objects as novel drug delivery vehicles. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 1999 (4): 449–456.

Edwards K., Almgren M. Surfactant-induced leakage and structural change of lecithin vesicles: effect of surfactant headgroup size. *Langmuir* 1992 (8): 824–832.

Engstrom S., Engstrom L. Phase-behavior of the lidocaine monoolein- water system. *Int. J. Pharm.* 1992 (79): 113–122.

Engstrom S., Lindman B., Larsson K. Method of preparing controlled-release preparations for biologically active materials and resulting compositions. *Int. Patent App. WO8402076*, 1983.

Ericsson B., Eriksson P. O., Löfroth J. E., Engström S. Cubic phases as delivery systems for peptide drugs, polymeric drugs and drug delivery system. Washington, DC: American Chemical Society; 1991: 251–265.

Esposito E., Cortesi R., Drechsler M., Paccamiccio L., Mariani P., Contado C., Stellin E., Menegatti E., Bonina F., Puglia C. Cubosome dispersions as delivery systems for percutaneous administration of indomethacin. *Pharm. Res.* 2005 (22): 2163–2173.

Fanun M. (red.) Surfactant science series. Colloids in drug delivery, Vol. 150. CRC Press. ISBN-13: 9781439818251. 2010.

Ferrari M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat. Rev. Cancer* 2005 (5): 161–171.

Fielding B. A., Humphreys S. M., Allman R. F. C., Frayn K. N. Mono-, di- and triacylglycerol concentrations in human plasma: effects of heparin injection and a high-fat meal. *Clin. Chim. Acta* 1993 (216): 167–173.

Fogden A., Hyde S. T. Continuous transformations of cubic minimal surfaces. *EPJ B* 1999 (7): 91–104.

Fontell K. Cubic phases in surfactant and surfactant-like lipid systems. *Colloid Polym. Sci.* 1990 (268): 264–285.

- Friedel G. Mesomorphic states of matter. *Ann. Phys.* 1922 (18): 273–474.
- Garti N., Somasundaran P., Mezzenga R. (red.) Self-assembled supramolecular architectures. Lyotropic liquid crystals. John Wiley & Sons: Wiley Series on surface and interfacial chemistry (NY). 2012.
- Guillot M., Richard-Plouet M., Vilminot S. Structural characterisations of a lamellar organic-inorganic nickel silicate obtained by hydrothermal synthesis from nickel acetate and (aminopropyl)-triethoxysilane. *J. Mater. Chem.* 2002 (12): 851–857.
- Guinier A. X-ray diffraction in crystals, imperfect crystals, and amorphous bodies. Dover Publications, Inc.: New York, 1994.
- Gursoy N. R., Benita S. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomed. Pharmacother.* 2004 (58): 173–182.
- Gurtovenko A. A., Anwar J. Interaction of ethanol with biological membranes: the formation of nonbilayer structures within the membrane interior and their significance. *J. Phys. Chem. B* 2009 (113): 1983–1992.
- Gustafsson J., Ljusberg-Wahren H., Almgren M., Larsson K. Submicron particles of reversed lipid phases in water stabilized by a nonionic amphiphilic polymer. *Langmuir* 1997 (13): 6964–6971.
- Hahn T. (red.). International tables for crystallography. Volume A. Space-group symmetry. 5th edition. Springer, for the International union of crystallography (2005), ISBN 0-7923-6590-9.
- Han S., Shen J. Q., Gan Y., Geng H. M., Zhang X. X., Zhu C. L., Gan L. Novel vehicle based on cubosomes for ophthalmic delivery of flurbiprofen with low irritancy and high bioavailability. *Acta Pharmacol. Sin.* 2010 (31): 990–998.
- Hatefi A., Amsden B. Biodegradable injectable in situ forming drug delivery systems. *J. Control. Release* 2002 (80): 9–28.
- Helledi L. S., Schubert L. Release kinetics of acyclovir from a suspension of acyclovir incorporated in a cubic phase delivery system. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2001 (27): 1073–1081.
- Hernandez V. A., Karlsson G., Edwards K. Intrinsic heterogeneity in liposome suspensions caused by the dynamic spontaneous formation of hydrophobic active sites in lipid membranes. *Langmuir* 2011 (27): 4873–4883.
- Higuchi T. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. *J. Pharm. Sci.* 1961 (50): 874–875.
- Hyde S. T. Identification of lyotropic liquid crystalline mesophases. Knygoje: Holmberg K. (red.). Handbook of applied surface and colloid chemistry. New York: Wiley; 2001. p. 299–332.
- Hyde S. T., Andersson S., Ericsson B., Larsson K. A cubic structure consisting of a lipid bilayer forming an infinite periodic minimum surface of the gyroid type in the glycerolmonooleate-water system. *Z. Kristallog.* 1984 (168): 213–219.
- Ho S.-Y., Storch J. Common mechanism of monoacylglycerol and fatty acid uptake by human intestinal Caco-2 cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2001 (281): 1106–1117.
- Hu F. Q., Hong Y., Yuan H. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles containing peptide. *Int. J. Pharm.* 2004 (273): 29–35.
- Husson F., Mustacchi H., Luzzati V. La structure des colloïdes d'association. II. Description des phases liquide-cristallines de plusieurs systèmes amphiphile-eau: amphiphiles anioniques, cationiques, non-ioniques. *Acta Cryst.* 1960 (13): 668–677.
- Invitrogen imonès internetinis puslapis (JAV), 2012: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home.html>.
- Israelachvili J. N. Intermolecular and surfaces forces. 2-as leid., Academic, New York, 1991.
- Israelachvili J. N., Mitchell D. J., Ninham B. W. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 1976 (72): 1525–1568.
- Israelachvili J. The science and applications of emulsions – an overview. *Colloid. Surface. A.* 1994 (91): 1–8.
- Yaghmur A., de Campo L., Sagalowicz L., Leser M. E., Glatter O. Emulsified microemulsions and oil-containing liquid crystalline phases. *Langmuir* 2005 (21): 569–577.

Yaghmur A., de Campo L., Salentinig S., Sagalowicz L., Leser M. E., Glatter O. Oil-loaded monolinolein-based particles with confined inverse discontinuous cubic structure (Fd3m). *Langmuir* 2006 (22): 517–521.

Yaghmur A., Glatter O. Characterization and potential application of nanostructured aqueous dispersions. *Adv. Colloid. Interface Sci.* 2009 (147-148): 333–342.

Yang D., Armitage B., Marder S. R. Cubic liquid-crystalline nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004 (43); 4402–4409.

Jain K. K. (red.). *Methods in molecular biology*, Vol. 437. Humana Press: Totowa, NJ. 2008.

Jain K. K. *The handbook of nanomedicine*. Springer Science+Business Media: New York. 2012.

Janmey P. A., Kinnunen P. K. Biophysical properties of lipids and dynamic membranes. *Trends Cell Biol.* 2006 (16): 538–546.

Johnsson M., Barauskas J., Norlin A., Tiberg F. Physicochemical and drug delivery aspects of lipid-based liquid crystalline nanoparticles: a case study of intravenously administered propofol. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2006 (6): 3017–3024, a.

Johnsson M., Barauskas J., Tiberg F. Cubic phases and cubic phase dispersions in a phospholipid-based system. *J. Am. Chem. Soc.* 2005 (127): 1076–1077, a.

Johnsson M., Bergstrand N. Phase behavior of DOPE/TritonX100 (reduced) in dilute aqueous solution: aggregate structure and pH-dependence. *Colloid Surface B* 2004 (34): 69–76.

Johnsson M., Edwards K. Liposomes, disks, and spherical micelles: aggregate structure in mixtures of gel phase phosphatidylcholines and poly(ethylene glycol) – phospholipids. *Biophys. J.* 2003 (85): 3839–3847.

Johnsson M., Edwards K. Phase behavior and aggregate structure in mixtures of dioleoylphosphatidylethanolamine and poly(ethylene glycol)-lipids. *Biophys. J.* 2001 (80): 313–323.

Johnsson M., Joabsson F., Tiberg F. Compositions forming non-lamellar dispersions. – *Int. Patent App. WO2006/013369*, 2006, b.

Johnsson M., Lam Y., Barauskas J., Tiberg F. Aqueous phase behavior and dispersed nanoparticles of diglycerolmonooleate/glyceroldioleate mixtures. *Langmuir* 2005 (21): 5159–5165, b.

Johnsson M., Tiberg F. Pharmaceutical lipid compositions. – *Int. Patent App. WO2006/077362*, 2006.

Kenworthy A. K., Hristova K., Needham D., McIntosh T. J. Range and magnitude of the steric pressure between bilayers containing phospholipids with covalently attached poly(ethylene glycol). *Biophys. J.* 1995 (68): 1921–1936.

Knaapila M., Svensson C., Barauskas J., Zackrisson M., Nielsen S. S., Toft K. N., Vestergaard B., Arleth L., Cerenius Y. A new small-angle X-ray scattering set-up on the crystallography beamline I711 at MAX-lab. *J. Synchrotron Rad.* 2009 (16): 498–504.

Kobayashi Y., Fukada K. The lamellar repeat distance of phospholipid bilayers in excess H₂O and D₂O. A small-angle X-ray scattering study. *Chem. Lett.* 1998 (11): 1105–1106.

Landau E. M., Rosenbusch J. P. Lipidic cubic phases: a novel concept for the crystallization of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996 (93): 14532–14535.

Landh T., Larsson K. Particles, method of preparing said particles and uses thereof. USA Patent 5531925, 1996.

Larsson K. Aqueous dispersions of cubic lipid-water phases. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2000 (5): 64–69.

Larsson K. Cubic lipid-water phases: structures and biomembrane aspects. *J. Phys. Chem.* 1989 (93): 7304–7314.

Larsson K., Fontell K., Krog N. Structural relationships between lamellar cubic and hexagonal phases in monoglyceride-water systems - possibility of cubic structures in biological-systems. *Chem. Phys. Lipids* 1980 (27): 321–328.

Lasic D. D. *Liposomes: from physics to applications*. Elsevier Science Publishers: Amsterdam, 1993.

Laughlin R. G. *The aqueous phase behavior of surfactants*. Academic press: London, 1994.

- Lee K. W. Y., Nguyen T.-H., Hanley T., Boyd B. J. Nanostructure of liquid crystalline matrix determines *in vitro* sustained release and *in vivo* oral absorption kinetics for hydrophilic model drugs. *Int. J. Pharm.* 2009 (365): 190–199.
- Li D., Caffrey M. Lipid cubic phase as a membrane mimetic for integral membrane protein enzymes. *PNAS* 2011 (108): 8639–8644.
- Lindblom G., Rilfors L. Cubic phases and isotropic structures formed by membrane lipids – possible biological relevance. *Biochim. Biophys. Acta* 1989 (988): 221–256.
- Lopes L. B., Ferreira D. A., de Paula D., Garcia M. T., Thomazini J. A., Fantini M. C., Bentley M. V. Reverse hexagonal phase nanodispersion of monoolein and oleic acid for topical delivery of peptides: *in vitro* and *in vivo* skin penetration of cyclosporin A. *Pharm. Res.* 2006 (23): 13332–1342.
- Lopes L. B., Speretta F. F., Bentley M. V. Enhancement of skin penetration of vitamin K using monoolein-based liquid crystalline systems. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2007 (32): 209–215.
- Lubensky T. C., MacKintosh F. C. Theory of “ripple” phases of lipid bilayers. *Phys. Rev. Lett.* 1993 (71): 1565–1568.
- Lutton E. S. Phase behavior of aqueous systems of monoglycerides. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 1965 (42): 1068–70.
- Luzzati V. X-ray diffraction studies of lipid-water systems. Knygoje: Chapman D. (red.), *Biological membranes*. Vol. 1, Academic Press: New York, 1968: 71–123.
- Luzzati V., Husson F. Structure of liquid-crystalline phases of lipid-water systems. *J. Cell Biol.* 1962 (12): 207–219.
- Luzzati V., Mustacchi H., Skoulios A. E. Structure of the liquid-crystal phases of the soap–water system: middle soap and neat soap. *Nature* 1957 (180): 600–601.
- Luzzati V., Tardieu A. Lipid phases: structure and structural transitions. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 1974 (25): 79–94.
- Luzzati V., Vargas R., Gulik A., Mariani P., Seddon J. M., Rivas E. Lipid polymorphism: A correction. The structure of the cubic phase of extinction symbol Fd – consists of two types of disjointed reverse micelles embedded in a 3D hydrocarbon matrix. *Biochemistry* 1992 (31): 279–285.
- Luzzati V., Vargas R., Mariani P., Gulik A., Delacroix H. Cubic phases of lipid-containing systems - elements of a theory and biological connotations. *J. Mol. Biol.* 1993 (229): 540–551.
- Makadia H. K., Siegel S. J. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers* 2011 (3): 1377–1397.
- Malmsten M. Phase Transformations in self-assembly systems for drug delivery applications. *J. Dispersion Sci. Technol.* 2007 (28): 63–72.
- Malmsten M. Soft drug delivery systems. *Soft Matter* 2006 (2): 760–769.
- Martins S., Sarmiento B., Ferreira D. C., Souto E. B. Lipid-based colloidal carriers for peptide and protein delivery – liposomes versus lipid nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* 2007 (2): 595–607.
- Matsuki H., Okuno H., Sakano F., Kusube M., Kaneshina S. Effect of deuterium oxide on the thermodynamic quantities associated with phase transitions of phosphatidylcholine bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 2005 (1712): 92–100.
- Miwa A., Ishibe A., Nakano M., Yamashira T., Itai S., Jinno S., Kawahara H. Development of novel chitosan derivatives as micellar carriers of taxol. *Pharm. Res.* 1998 (15): 1844–1850.
- Moghimi S. M., Hunter A. C., Andresen T. L. Factors controlling nanoparticle pharmacokinetics: an integrated analysis and perspective. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2012 (52): 481–503.
- Mulet X., Boyd B. J., Drummond C. J. Advances in drug delivery and medical imaging using colloidal lyotropic liquid crystalline dispersions. *J. Colloid. Interface Sci.* 2013 (393): 1–20.
- Mulet X., Gong X., Waddington L. J., Drummond C. J. Observing self-assembled lipid nanoparticles building order and complexity through low-energy transformation processes. *ACS Nano.* 2009 (3): 2789–2797.
- Nakano M., Teshigawara T., Sugita A., Leesajakul W., Taniguchi A., Kamo T., Matsuoka H., Handa T. Dispersions of liquid crystalline phases of the monoolein/oleic acid/Pluronic F127 system. *Langmuir* 2002 (18): 9283–9288.

- Neto C., Aloisi G., Baglioni P., Larsson K. Imaging soft matter with the atomic force microscope: Cubosomes and hexosomes. *J. Phys. Chem. B* 1999 (103): 3896–3899.
- Nguyen T. H., Hanley T., Porter C. J. H., Boyd B. J. Nanostructures crystalline particles provide long duration sustained-release effect for a poorly water soluble drug after oral administration. *J. Control. Release* 2011 (153): 180–186.
- Norling T., Lading P., Engström S., Larsson K., Krog N., Nissen S.S. Formulation of a drug delivery system based on a mixture of monoglycerides and triglycerides for use in treatment of periodontal disease. *J. Clin. Periodont.* 1992 (19): 687–692.
- Okumu F. W., Dao L. N., Fielder P. J., Dybdal N., Brooks D., Sane S., Cleland J. L. Sustained delivery of human growth hormone from a novel gel system: SABER™. *Biomaterials* 2002 (23): 4353–4358.
- Onn C. E., Darmanin C., Sagnella S. M., Mulet X., Greaves T. L., Varghese J. N., Drummond C. J. Incorporation of the dopamine D2L receptor and bacteriorhodopsin within bicontinuous cubic lipid phases. 2. Relevance to in meso crystallization of integral membrane proteins in novel lipid systems. *Soft Matter* 2010 (6): 4838–4846.
- Orädd G., Lindblom G., Fontell K., Ljusberg-Wahren H. Phase diagram of soybean phosphatidylcholine-diacylglycerol-water studied by x-ray diffraction and ³¹P- and pulsed field gradient ¹H-NMR: evidence for reversed micelles in the cubic phase. *Biophys. J.* 1995 (68): 1856–1863.
- Orive G., Hernández R. M., Rodríguez Gascón A., Domínguez-Gil A., Pedraz J. L. Drug delivery in biotechnology; Present and future. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2003 (14): 659–664.
- Packhaeuser C. B., Schnieders J., Oster C. G., Kissel T. In situ forming parenteral drug delivery systems: an overview. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2004 (58): 445–455.
- Peng X. S., Wen X. G., Pan X., Wang R. C., Chen B., Wu C. B. Design and in vitro evaluation of capsaicin transdermal controlled release cubic phase gels. *AAPS PharmSciTech* 2010 (11): 1405–1410.
- Phan S., Fong W., Kirby N., Hanley T., Boyd B. Evaluating the link between self-assembled mesophase structure and drug release. *Int. J. Pharm.* 2011 (421): 176–182.
- Phosphagenics imonès internetinis puslapis (Australija), 2012: <http://www.phosphagenics.com>.
- Pouton C. W., Porter C. J. H. Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: Materials, methods and strategies. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 2008 (60): 625–637.
- Protein Data Bank internetinis puslapis, 2012: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>.
- Puri A., Loomis K., Smith B., Lee J. –H. Yavlovich A., Heldman E., Blumenthal R. Lipid-based nanoparticles as pharmaceutical drug carriers: from concepts to clinic. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier. Syst.* 2009 (26): 523–580.
- Qiu H., Caffrey M. The phase diagram of the monoolein/water system: metastability and equilibrium aspects. *Biomaterials* 2000 (21): 223–34.
- Rangelov S., Almgren M. Particulate and bulk bicontinuous cubic phases obtained from mixtures of glyceryl monooleate and copolymers bearing blocks of lipid-mimetic anchors in water. *J. Phys. Chem. B.* 2005 (109): 3921–3929.
- Rappolt M. The biologically relevant lipid mesophases as "seen" by x-rays. Knygoje: Leitmannova-Liu A. (red.). *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes* (Vol. 5). Elsevier Inc., Amsterdam, 2006: 253–283.
- Rizwan S. B., Assmus D., Boehnke A., Hanley T., Boyd B. J., Rades T., Hook S. Preparation of phytantriol cubosomes by solvent precursor dilution for the delivery of protein vaccines. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2011 (79): 15–22.
- Rosenbaum E., Tavelin S., Johansson L. B.-Å. A characterisation study on the application of inverted lyotropic phases for subcutaneous drug release. *Int. J. Pharm.* 2010 (388): 52–57.
- Ruel-Gariépy E., Leroux J.-C. In situ –forming hydrogels – review of temperature – sensitive systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2004 (58): 409–426.
- Rummel G., Hardmeyer A., Widmer C., Chiu M. L., Nollert P., Locher K. P., Pedruzzi I. I., Landau E. M., Rosenbusch J.P. Lipidic cubic phases: new matrices for the three-dimensional crystallization of membrane proteins. *J. Struct. Biol.* 1998 (121): 82–91.

Sagalowicz L., Leser M. E., Watzke H. J., Michel M. Monoglyceride self-assembly structures as delivery vehicles. *Trends Food Sci. Technol.* 2006 (17): 204–214.

Sands J., Aupein D., Snipes W. Extreme sensitivity of enveloped viruses including hepes simplex, to long-chain unsaturated monoglycerides and alcohols. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1979 (15): 67–73.

Schmidt C. Nanocarriers in drug delivery – design, manufacture and physicochemical properties. Knygoje Lamprecht A. Nanotherapeutics. Drug delivery concepts in nanoscience. Pan Stanford Publishing, 2008: 3–37.

Seddon J. M. An inverse face-centered cubic phase formed by diacylglycerol-phosphatidylcholine mixtures. *Biochemistry* 1990 (29): 7997–8002 a.

Seddon J. M. Lyotropic phase behaviour of biological amphiphiles. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 1996 (100): 380–393.

Seddon J. M. Structure of the inverted hexagonal (HII) phase and non-lamellar phase-transitions of lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1990 (1031): 1–69 b.

Seddon J. M., Robins J., Gulik-Krzywicki T., Delacroix H. Inverse micellar phases of phospholipids and glycolipids. Invited lecture. *PCCP* 2000 (20): 4485–4493.

Seddon J. M., Templer R. H. Polymorphism of lipid-water systems. Knygoje Lipowsky R., Sackmann E (red.). Handbook of biological physics. Volume 1. Elsevier Science B.V., 1995.

Seddon J., Hogan J., Warrender N., Pebay-Peyroula E. Structural studies of phospholipid cubic phases. *Prog. Colloid. Polym. Sci.* 1990 (81): 189–197.

Senior J. Fate and behaviour of liposomes *in vivo*: a review of controlling factors. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 1987 (3): 123–193.

Senior J., Gregoriadis G. Methodology in assessing liposomal stability in the presence of blood, clearance from circulation of injected animals, and uptake by tissues. Knygoje Gregoriadis G. (red.) *Liposome technology*. CRC Press, Boca Raton, JAV. 1984 (Vol. 3): 263–282.

Shah J., Sadhale Y., Chilukuri D. M. Cubic phase gels as drug delivery systems. *Adv. Drug Del. Rev.* 2001 (47): 229–250.

Sharma M. Mokomasis internetinis puslapis, 2012: <http://mkschem.blogspot.com/>.

Shearman G. C., Tyler A. I. I., Brooks N. J., Templer R. H., Ces O., Law R. V., Seddon J. M. A 3-D hexagonal inverse micellar lyotropic phase. *J. Am. Chem. Soc.* 2009 (131): 1678–1679.

Shen H. H., Crowston J. G., Huber F., Saubern S., McLean K. M., Hartley P. G. The influence of dipalmitoyl phosphatidylserine on phase behaviour of and cellular response to lyotropic liquid crystalline dispersions. *Biomaterials* 2010 (31): 9473–9481.

Small D. M. A classification of biological lipids based upon their interaction in aqueous systems. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 1968 (45): 108–119.

Spicer P. T., Hayden K. L., Lynch M. L., Ofori-Boateng A., Burns J. L. Novel process for producing cubic liquid crystalline nanoparticles (cubosomes). *Langmuir* 2001 (17): 5748–5756.

Stelzer M., Flores-de-Jacoby L. Topical metronidazole application compared with subgingival scaling. A clinical and microbiological study on recall patients. *J. Clin. Periodontol.* 1996 (23): 24–29.

Strickley R. G. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. *Pharm. Res.* 2004 (21): 201–230.

Stryer L., Haugland R. P. Energy transfer: a spectroscopic ruler. *PNAS USA* 1967 (58): 719–726.

Struck D. K., Hoekstra D., Pagano R. E. Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion. *Biochemistry* 1981 (20): 4093–4099.

Svensson O., Thuresson K., Arnebrant T. Interactions between drug delivery particles and mucin in solution and at interfaces. *Langmuir* 2008 (24): 2573–2579.

Swarnakar N. K. Jain V., Dubey V., Mishra D., Jain N. K. Enhanced oromucosal delivery of progesterone via hexosomes. *Pharm. Res.* 2007 (24): 2223–2230.

Takahashi H., Jojiki K. Effect of heavy water on nonlamellar structures of phospholipid and monoolein molecular assemblies. *Chem. Lett.* 2012 (41): 1101–1103.

Tanford C. The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes. 2-as leid. Krieger Publishing Company, Florida, 1991.

Thorsteinsson M. V., Richter J., Lee A. L., DePhilips P. 5-Dodecanoylamino fluorescein as a probe for the determination of critical micelle concentration of detergents using fluorescence anisotropy. *Anal. Biochem.* 2005 (340): 220–225.

Thuresson K., Tiberg F., Johansson M., Harwigsson I., Johnsson M., Joabsson F. EP1768650: Liquid depot formulations. 2005.

Tiberg F., Cavallin-Ståhl E., Linden M., Thuresson K., Hadjieva T. Treatment of oral mucositis pain by a bioadhesive barrier forming lipid solution. *Support Cancer Care* 2009 (17): 918.

Tiberg F., Joabsson F. Lipid liquid crystals for parenteral sustained-release applications: combining ease of use and manufacturing with consistent drug release control. Injectable drug delivery: formulations focus. *ONdrugDELIVERY*. 2010.

Tiberg F., Joabsson F. Lipid self-assembly in drug delivery: pretty structures and a seriously handsome commercial proposition. Delivering injectables: formulations, auto-injectors & needle-free. *ONdrugDELIVERY*. 2008.

Tiberg F., Johnsson M. Drug delivery applications of non-lamellar liquid crystalline phases and nanoparticles, *J. Drug Del. Sci. Tech.* 2011 (21): 101–109.

Tiberg F., Johnsson M., Nistor C., Joabsson F. Self-assembling lipid formulations. Knygoje: Wright J. C., Burgess D. J. (red.). *Long acting injections and implants*. Advanced in delivery science and technology. Controlled Release Society, 2012: 315–333.

Tiberg F., Landgren M. Characterization of thin nonionic surfactant films at the silica/water interface by means of ellipsometry. *Langmuir* 1993 (9): 927–932.

Torchilin V. P. Drug targeting. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2000 (11): S81–S91.

Tresset G. The multiple faces of self-assembled lipidic systems. *PMC Biophys.* 2009 2 (1): 3.

Underwood C., van Eps A. W. Nanomedicine and veterinary science: the reality and the practicality. *Vet. J.* 2012 (193): 12–23.

Vandoolaeghe P., Barauskas J., Johnsson M., Tibeg F., Nylander T. Interaction between lamellar (vesicles) and nonlamellar lipid liquid-crystalline nanoparticles as studied by time-resolved small-angle X-ray diffraction. *Langmuir* 2009 (25): 3999–4008, a.

Vandoolaeghe P., Rennie A. R., Campbell R. A., Nylander T. Neutron reflectivity studies of the interaction of cubic-phase nanoparticles with phospholipid bilayers of different coverage. *Langmuir* 2009 (25): 4009–4020, b.

Vandoolaeghe P., Rennie A. R., Campbell R. A., Thomas R. K., Hook F., Fragneto G., Tiberg F., Nylander T. Adsorption of cubic liquid crystalline nanoparticles on model membranes. *Soft Matter* 2008 (4): 2267–2277.

Vandoolaeghe P., Tiberg F., Nylander T. Interfacial Behavior of Cubic Liquid Crystalline Nanoparticles at Hydrophilic and Hydrophobic Surfaces. *Langmuir* 2006 (22): 9169–9174.

Warren B. E. X-ray diffraction. Dover Publications, Inc.: New York, 1990.

Winter R. Effects of hydrostatic pressure on lipid and surfactant phases. *Curr. Opin. Colloid In.* 2001 (6): 303–312.

Winterhalter M., Frederik P. M., Vallner J. J., Lasic D. D. Stealth(R) liposomes: from theory to product. *Adv. Drug Del. Rev.* 1997 (24): 165–177.

Xia X., Hu Z., Marquez M. Physically bonded nanoparticle networks: a novel drug delivery system. *J. Control. Release*, 2005 (103): 21–30.

Zeng N., Gao X., Hu Q., Song Q., Xia H., Liu Z., Gu G., Jiang M., Pang Z., Chen H., Chen J., Fang L. Lipid-based liquid crystalline nanoparticles as oral drug delivery vehicles for poorly water-soluble drugs: cellular interaction and in vivo absorption. *Int. J. Nanomedicine* 2012 (7): 3703–3718.

Zeng X., Liu Y., Imperor-Clerc M. Hexagonal close packing of nonionic surfactant micelles in water. *J. Phys. Chem. B* 2007 (111): 5174–5179.