



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Κτηνιατρικής
Εργαστήριο Βιοχημείας



Διδακτορική Διατριβή

**“Μελέτη σύνδεσης και βιοδραστικότητας
βιταμινών μετά από τη σύνδεσή τους με
πρωτεϊνικά και λιπιδικά μόρια.”**

Μαγδαληνή Δημ. Ροβολή

Μοριακή Βιολόγος- Γενετίστρια (BSc, Msc)

Καρδίτσα, Φεβρουάριος 2015



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος II . Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- 1) Γεώργιος Κοντοπίδης, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Κτηνιατρικής ,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (**Επιβλέπων Καθηγητής**)
- 2) Όλγα Γκορτζή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων,
Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλίας
- 3) Ιωάννης Παππάς, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Κτηνιατρικής ,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- 1) Γεώργιος Κοντοπίδης, Αναπλ. Καθηγητής Τμήματος Κτηνιατρικής ,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 2) Όλγα Γκορτζή, Αναπλ. Καθηγήτρια Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων,
Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλίας
- 3) Ιωάννης Παππάς, Αναπλ. Καθηγητής Τμήματος Κτηνιατρικής , Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας
- 4) Σταύρος Λαλάς, Καθηγητής Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων, Τεχνολογικό
Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλίας
- 5) Ανδρέας Τσακάλωφ, Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας
- 6) Δημήτριος Λεωνίδας, Αναπλ. Καθηγητής Τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 7) Ηλίας Ηλιόπουλος, Καθηγητής Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας,
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

EΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά την περίοδο 2011-2014. Έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος II. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.

Καταρχήν θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, αναπληρωτή καθηγητή κ. Γεώργιο Κοντοπίδη, που μου εμπιστεύθηκε την εκπόνηση της διατριβής αυτής. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για την άριστη συνεργασία που είχαμε όλα αυτά τα χρόνια, για την συνεχή επιστημονική του επίβλεψη κατά τη διάρκεια της εκπόνησης και της συγγραφής αυτής της εργασίας. Επίσης, τον ευχαριστώ για τις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις του τόσο στο επιστημονικό κομμάτι όσο και για όλες τις συζητήσεις μας που με βοήθησαν να συνεχίσω να προχωρώ και να δημιουργώ.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την αναπληρώτρια καθηγήτρια, κα. Όλγα Γκορτζή κατ' αρχήν για την τιμή να είναι μέλος της τριμελούς επιστημονικής επιτροπής της αυτής διατριβής αλλά και για την άψογη συνεργασία μας και την καθοριστική συμβολή και καθοδήγησή της στην επιτυχή ολοκλήρωση της διατριβής αυτής, για τον πολύτιμο χρόνο που μου αφιέρωσε καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της μελέτης αυτής καθώς και για τις καίριες συμβουλές της.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αναπληρωτή καθηγητή, κο Ιωάννη Παππά, για την τιμή να είναι μέλος της τριμελούς επιστημονικής επιτροπής της αυτής διατριβής αλλά και για την καθοριστική και πολύτιμη βοήθειά στην πραγματοποίηση των *in vivo* πειραμάτων, για την διάθεση του εργαστηρίου του, καθώς και την άριστη

συνεργασία μας και τις καίριες συμβουλές του για την επιτυχή ολοκλήρωση της μελέτης αυτής.

Ευχαριστώ τον καθηγητή κο Σταύρο Λαλά, για την διάθεση του εργαστηρίου του καθώς και την άριστη συνεργασία μας και τις καίριες συμβουλές του για την επιτυχή ολοκλήρωση της διατριβής αυτής.

Ευχαριστώ τον επίκουρο καθηγητή κο Ανδρέα Τσακάλωφ για τις πολύτιμες συμβουλές του όσον αφορά το πρωτόκολλο που αφορούσε την εξαγωγή της ρετινόλης από το αίμα των πειραματοζώων, πριν τον ποσοτικό της προσδιορισμό, καθώς επίσης και για την ευγενική διάθεση του εργαστηρίου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους καθηγητές της επταμελούς μου επιτροπής για την τιμή που μου έκαναν να συμμετάσχουν και για τις γόνιμες παρατηρήσεις τους.

Θερμά ευχαριστώ όλα τα παιδιά από το εργαστήριο της Βιοχημείας, της Κτηνιατρικής Σχολής για την πολύτιμη βοήθεια τους. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους μεταδιδακτορικούς ερευνητές και φίλους Χρίστο Παπανεοφύτου, Αστέρη Γρηγορούδη και Κώστα Κατσούλη για την πολύτιμη βοήθεια τους σε πολλά κομμάτια της διατριβής αυτής καθώς και για τις υπέροχες συζητήσεις μας και τις ωραίες στιγμές που περάσαμε εντός και εκτός του εργαστηρίου. Τους συνυποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου Βιοχημείας της Κτηνιατρικής Σχολής και φίλους πια, Ανθή Μέττου και Βάιο Νικολόπουλο για την υπέροχη «συγκατοίκηση» στο εργαστήριο Βιοχημείας, για την βοήθεια τους, το ευχάριστο κλίμα και την άψογη συνεργασία μας. Ευχαριστώ πολύ επίσης τον Βασίλη Αθανασιάδη από το εργαστήριο Ενόργανης Αναλυτικής Χημείας τους Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του ΤΕΙ Θεσσαλίας για την πολύτιμη βοήθεια του σε πολλά πειράματα που διεξήχθησαν εκεί και για όλη την άψογη συνεργασία μας.

Χίλια ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου, στους αδελφικούς φίλους μου: Ειρήνη, Στέλλα, Λίτσα, Γιάννη, Ζωή, Βάσω, Μυρτώ και Αντιγόνη που με στήριξαν ακούραστα όλα αυτά τα χρόνια και η αγάπη τους και η πίστη τους σε μένα ήταν κινητήριο δύναμη για να προχωρώ. Την «οικογένεια» μου από το Θεσσαλικό Χοροστάσι που με βοήθησαν να γεμίζω τις μπαταρίες μου και να συνεχίζω με κέφι και όρεξη να προσπαθώ.

Τέλος, αν και δεν μπορεί ένα ευχαριστώ να αποτυπώσει την ευγνωμοσύνη μου, ευχαριστώ πάρα πολύ την οικογένειά μου, τους γονείς μου Δημήτρη και Κατερίνα και τον αδελφό μου Χρήστο, χωρίς την δική τους πολύπλευρη βοήθεια τίποτα δεν θα είχε γίνει. Τους ευχαριστώ γιατί πιστεύουν σε μένα.

«Το ιδανικό μου δεν είναι να πλουτίσω,
αλλά να εργασθώ, να δράσω, να δημιουργήσω.
Να κάνω κάτι αντάξιο ενός ανθρώπου ηθικού και δυνατού.»

Γεώργιος Παπανικολάου (1883-1962)

Αφιερώνεται στην οικογένειά μου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	- 3 -
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	- 8 -
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	- 12 -
ABSTRACT	- 14 -
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	- 16 -
1.1 Οι βιταμίνες.....	- 16 -
1.1.1 Βιταμίνη Α.....	- 20 -
1.1.2 Βιταμίνη D	- 24 -
1.1.3 Βιταμίνη Ε	- 27 -
1.1.4 Βιταμίνη Κ.....	- 29 -
1.2 Τα λιποσώματα.....	- 32 -
1.2.1 Λιπίδια ως συνθετικές μονάδες των λιποσωμάτων	- 35 -
1.2.2 Η χοληστερόλη και ο ρόλος της	- 43 -
1.2.3 Πλεονεκτήματα – μειονεκτήματα λιποσωμάτων.....	- 46 -
1.2.4 Ταξινόμηση των λιποσωμάτων.....	- 49 -
1.2.5 Μέθοδοι παρασκευής λιποσωμάτων	- 55 -
1.2.6 Χαρακτηρισμός λιποσωμάτων	- 61 -
1.2.7 Σταθερότητα λιποσωμάτων	- 63 -
1.2.8 Μεταβολική πορεία των λιποσωμάτων στον οργανισμό.....	- 66 -
1.3 Η συμβολή της νανοτεχνολογίας στην προστασία των λιπόφιλων βιταμινών ...	- 68 -
1.4 Πρωτεϊνικά μόρια με θέση πρόσδεσης λιπόφιλων μορίων: Η β-γαλακτοσφαιρίνη.....	- 72 -
1.4.1 Βιοσύνθεση.....	- 75 -

1.4.2	Δομή.....	- 75 -
1.4.3	Γενετική ποικιλότητα.....	- 79 -
1.4.4	Λειτουργία	- 80 -
1.5	Η β-Lg ως φορέας προστασίας των λιπόφιλων μορίων	- 85 -
1.6	Στόχος της παρούσας μελέτης.....	- 88 -
2	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	- 89 -
2.1	Υλικά και μέθοδοι	- 89 -
2.1.1	Όργανα.....	- 89 -
2.1.2	Υλικά	- 90 -
2.2	Μέθοδοι.....	- 92 -
2.2.1	Παρασκευή λιποσωμικών διασπορών που περιέχουν την πρωτεΐνη β-γαλακτοσφαιρίνη	- 92 -
2.2.2	Εκτίμηση του ποσοστού εγκλωβισμού της β-Lg στα λιποσώματα	- 94 -
2.2.3	Εκτίμηση της σταθερότητας των λιποσωμικών παρασκευών στα οποία εγκλωβίστηκε η β-Lg.....	- 98 -
2.2.4	Μορφολογικός προσδιορισμός των λιποσωμικών παρασκευών στα οποία εγκλωβίστηκε η β-Lg.....	- 99 -
2.3	Παρασκευή λιποσωμικών διασπορών για τον εγκλωβισμό των λιπόφιλων βιταμινών E, D και A	- 102 -
2.3.1	Εκτίμηση του ποσοστού εγκλωβισμού των βιταμινών A, D & E στα λιποσώματα	- 104 -
2.3.2	Εκτίμηση της σταθερότητας των λιποσωμικών παρασκευών στα οποία εγκλωβίστηκαν οι λιπόφιλες βιταμίνες A, D & E	- 105 -
2.3.3	Μορφολογικός προσδιορισμός των λιποσωμικών παρασκευών στα οποία εγκλωβίστηκαν οι λιπόφιλες βιταμίνες	- 106 -

2.4 Μελέτη της επίδρασης του περιβάλλοντος και του μέσου στην ικανότητα σύνδεσης και επιλογή των συνθηκών μέσα στις οποίες οι πρωτεϊνικοί φορείς παρουσιάζουν την μέγιστη απόδοση.	- 108 -
2.4.1 Κρυστάλλωση πρωτεϊνών.....	- 108 -
2.4.2 Θερμιδομετρία Ισόθερμης Τιτλοδότησης (Isothermal Titration Calorimetry-ITC)	- 110 -
2.5 Εκτίμηση της σύνδεσης των λιπόφιλων βιταμινών A, E & D στην πρωτεΐνη β-γαλακτοσφαιρίνη (β-Lg).....	- 113 -
2.6 Έλεγχος της βιοδραστικότητας της βιταμίνης A- <i>In vivo</i> μελέτη της βιοκατανομής της βιταμίνης στο αίμα ποντικών.	- 115 -
2.6.1 Χορήγηση δυο διαφορετικών μορφών βιταμίνης A (ρετινόλης) δια του στόματος (Oral Gavage) σε ποντίκια.....	- 116 -
2.6.2 Προσδιορισμός της βιοκατανομής της βιταμίνης A (ρετινόλης) στο αίμα των ποντικών (Oral Gavage)	- 118 -
2.7 Επικύρωση μεθόδων.....	- 121 -
2.8 Στατιστική ανάλυση	- 123 -
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	- 124 -
3.1 Εκτίμηση του εγκλωβισμού της β-Lg σε διαφορετικές λιποσωμικές παρασκευές.....	- 124 -
3.1.1 Προσδιορισμός του ποσοστού εγκλωβισμού της β-Lg στα λιποσώματα.....	- 124 -
3.1.2 Μελέτες της σταθερότητας του συμπλόκου λιπόσωμα- β-Lg.....	- 134 -
3.1.3 Μελέτες της μορφολογίας του συμπλόκου λιπόσωμα- β-Lg	- 138 -
3.2 Εκτίμηση του εγκλωβισμού των λιπόφιλων βιταμινών A, E & D σε λιποσωμικές παρασκευές.....	- 142 -
3.2.1 Προσδιορισμός του ποσοστού εγκλωβισμού των βιταμινών στα λιποσώματα.....	

.....	- 143 -
3.2.2 Μελέτες της σταθερότητας των λιποσωμάτων που εγκλώβισαν τις βιταμίνες A, D & E	- 149 -
3.2.3 Μελέτη της μορφολογίας του συμπλόκου λιπόσωμα- β-Lg- βιταμίνης E ...	- 158 -
3.3 Μελέτη της επίδρασης του περιβάλλοντος και του μέσου, στην ικανότητα σύνδεσης σε πρωτεϊνικούς φορείς (β-Lg)	- 160 -
3.3.1 Κρυστάλλωση πρωτεϊνών.....	- 160 -
3.3.2 Θερμοδυναμική της ένωσης μη φυσικών λιπαρών οξέων με την β-γαλακτοσφαιρίνη	- 161 -
3.4 Εκτίμηση του εγκλωβισμού των λιπόφιλων βιταμινών A, E & D στην πρωτεΐνη β-γαλακτοσφαιρίνη (β-Lg).....	- 166 -
3.5 Έλεγχος της βιοδραστικότητας της βιταμίνης A: <i>In vivo</i> μελέτη της βιοκατανομής της βιταμίνης στο αίμα ποντικών.	- 170 -
3.5.1 Προσδιορισμός της βιοκατανομής της βιταμίνης A (ρετινόλης) στο αίμα των ποντικών (Oral Gavage)	- 172 -
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	- 179 -
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	- 182 -
4 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I: ΕΙΚΟΝΕΣ	- 202 -
5 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II: ΠΙΝΑΚΕΣ.....	- 207 -

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αντικείμενο της συγκεκριμένης διατριβής είναι η μελέτη της σύνδεσης των τεσσάρων λιποδιαλυτών βιταμινών με πρωτεϊνικά και λιπιδικά μόρια.

Οι βιταμίνες αποτελούν μία τάξη οργανικών χημικών ενώσεων, απαραίτητες για τον οργανισμό. Οι λιποδιαλυτές βιταμίνες (A, D, E και K) είναι ευαίσθητα μόρια και εξαρτώνται από τα διατροφικά λιπαρά για την απορρόφηση και μεταφορά τους.

Ένα πρόβλημα των λιποδιαλυτών βιταμινών αποτελεί η μειωμένη απορρόφησή τους σε τρόφιμα με χαμηλά λιπαρά λόγω της απουσίας των κατάλληλων φορέων τους, των λιποπρωτεϊνών. Για τον λόγο αυτό, η πρόσληψη και απορρόφηση των λιπόφιλων βιταμινών από τα τρόφιμα αυτά είναι αισθητά μειωμένη μιας και η διαλυτότητά τους σε υδατικά διαλύματα είναι εξαιρετικά χαμηλή.

Η ανάγκη δημιουργίας ενός φορέα μέσω του οποίου θα επιτευχθεί αύξηση της πρόσληψης αλλά και της απορρόφησης των λιπόφιλων βιταμινών σε υδατικά μέσα αποτελεί επιτακτική ανάγκη. Η χρήση πρωτεϊνικών μορίων και αμφίφυλων λιπιδικών υπερδομών (λιποσωμάτων) μπορεί να αποβεί χρήσιμη αφού αυξάνει την διαλυτότητα των βιταμινών, χωρίς να αλλάζει τον υδρόφιλο χαρακτήρα του μέσου. Η μελέτη δυο διαφορετικών φορέων δίνει την δυνατότητα επιλογών σχετικά με: το μέγεθος του φορέα, την φύση (λιπόσωμα ή πρωτεϊνικό μόριο), το είδος (φυσικό προϊόν ή κατασκευασμένο) και φυσικά το κόστος.

Στα πλαίσια λοιπόν της μελέτης της σύνδεσης των λιπόφιλων βιταμινών με λιπιδικές υπερδομές, έγινε η ανάπτυξη και η εκτίμηση ενός νέου λιπιδικού φορέα (λιπόσωμα/β-Lg) που προσομοιάζει με την δομή της κυτταρικής μεμβράνης αφού περιέχει εκτός των λιπιδίων και την πρωτεΐνη β-γαλακτοσφαιρίνη (β-Lg).

Τα λιποσώματα έχουν ήδη αξιολογηθεί ως αποδοτικοί φορείς για την προστασία, την μεταφορά και την ελεγχόμενη διάθεση ευαίσθητων μορίων. Η β-Lg έχει

επιλεχθεί ως πρωτεΐνη μοντέλο εξαιτίας της ικανότητάς της να προσδένει λιπόφιλα μόρια. Διάφορες τεχνικές χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση τόσο της απόδοσης όσο και της σταθερότητας του νέου αυτού φορέα.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής έδειξαν ότι το νεοδημιουργηθέν σύστημα εγκλωβισμού στο οποίο συνδυάζονται ο λιποσωμικός φορέας και η β-Lg (και τα οποία είναι φυσικής προελεύσεως) παρουσίασε υψηλό ποσοστό εγκλωβισμού για τις βιταμίνες A, E και D και μία βελτιωμένη σταθερότητα. Κατ' επέκταση μπορεί να παρέχει αυξημένη προστασία για το εγκλωβιζόμενο μόριο. Τα χαρακτηριστικά αυτά υποδηλώνουν ότι ο νέος φορέας αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο σύστημα εγκλωβισμού και μεταφοράς.

Για να αξιολογηθεί περαιτέρω η αποτελεσματικότητα του νέου φορέα, πειράματα βιοδραστικότητας της βιταμίνης A έγιναν σε πειραματόζωα, δείχνοντας μία ικανοποιητική βιοδιαθεσιμότητα στο αίμα, όταν αυτή χορηγήθηκε σε υδατικό μέσο, εγκλωβισμένη στον νέο φορέα.

Επιπλέον, η σύνδεση των βιταμινών με την πρωτεΐνη- φορέα β- Lg μελετήθηκε εκτενώς. Εκτιμήθηκε πόσο ισχυρά συνδέονται οι τέσσερις λιπόφιλες βιταμίνες στην θέση πρόσδεσης που φέρει με μία εξαιρετικά ευαίσθητη τεχνική προσδιορισμού (Θερμιδομετρία Ισόθερμης Τίτλοδότησης). Υπολογίστηκε μία σταθερά σύνδεσης αρκετά ικανοποιητική και για τις τέσσερις βιταμίνες, καθιστώντας έτσι την β-Lg έναν ισχυρό και αποτελεσματικό πρωτεϊνικό φορέα.

Εν κατακλείδι, η τροποποιημένη συγκέντρωση, αντιοξειδωτική προστασία και βιοδιαθεσιμότητα των βιταμινών μετά από τον εγκλωβισμό ή σύνδεση με τους συγκεκριμένους λιπιδικούς και πρωτεϊνικούς φορείς που μελετήθηκαν σε αυτή την εργασία, αναμένεται να έχει άμεσες εφαρμογές σε τρόφιμα ή/και φαρμακευτικά σκευάσματα.

ABSTRACT

The aim of this thesis is the association and bioactivity studies of lipophilic vitamins' binding to proteins and lipid molecules.

Vitamins are organic compounds, vital for an organism. Fat-soluble vitamins (A, D, E and K) are sensitive molecules, fat dependent for their adequate absorption. As a consequence, fat soluble vitamins have limited intake and absorption in low fat food due to absence of their natural carriers (lipoproteins), which are removed from these foods and due to their low solubility in aqueous solutions.

Encapsulation systems [use of specific proteins and lipidic vehicles (liposomes)] are a promising approach to preserve encapsulated lipophilic vitamins' native properties over time and increase their concentration in aqueous media but also enhance absorption and bioavailability. Protein molecules which possess carrier properties and lipid structures such liposomes can efficiently entrap and deliver-release the encapsulated sensitive molecules.

Studying two different carries provides the advantage of choice, regarding size, type (liposome and protein), origin (synthetic or natural molecule) and of course cost.

In order to evaluate the encapsulation of lipophilic vitamins within a new lipid carrier, a liposome-protein complex was developed. This new formulation contained both lipidic and protein molecules [beta-Lactoglobulin (β -Lg)], and simulates structure of cell membrane.

Liposomes have been assessed as efficient carriers for protection, controlled delivery and performance of sensitive molecules. The β -Lg has been selected as a model protein because of its own ability to bind lipophilic molecules. Various different techniques were used to evaluate this new formulation.

The results of this study showed that the newly synthesized delivery system (liposome/ β -Lg) presents high encapsulation efficiency of vitamins A, E and D. and a promising stability behavior. This could be an important factor, regarding its use as a carrier for sensitive molecules.

To further evaluate the effectiveness of this new carrier, in vivo experiments of vitamin A were carried out in laboratory animals (mice). According to the results, vitamin A proved to have an efficient bioavailability profile in serum when it was encapsulated into the new carrier and administered in aqueous media.

The binding properties of the four vitamins with β -Lg (the selected model carrier protein) were also studied. The binding affinity of the fat soluble vitamins with the β -Lg was evaluated by using a highly sensitive technique (Isothermal Titration Calorimetry-ITC). Satisfactory binding constants were measured for all vitamins, thus making β -Lg a powerful and effective protein carrier.

In conclusion, the results of this study can be used as a model for assessing the actual behavior of lipid and protein carriers, in various applications such as foods and/or biological systems. The modified concentration, bioavailability and antioxidant protection of vitamins, after their encapsulation or binding with specific lipidic and/or protein carriers which studied under this thesis, are expected to have applications in food and pharmaceutical formulations.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

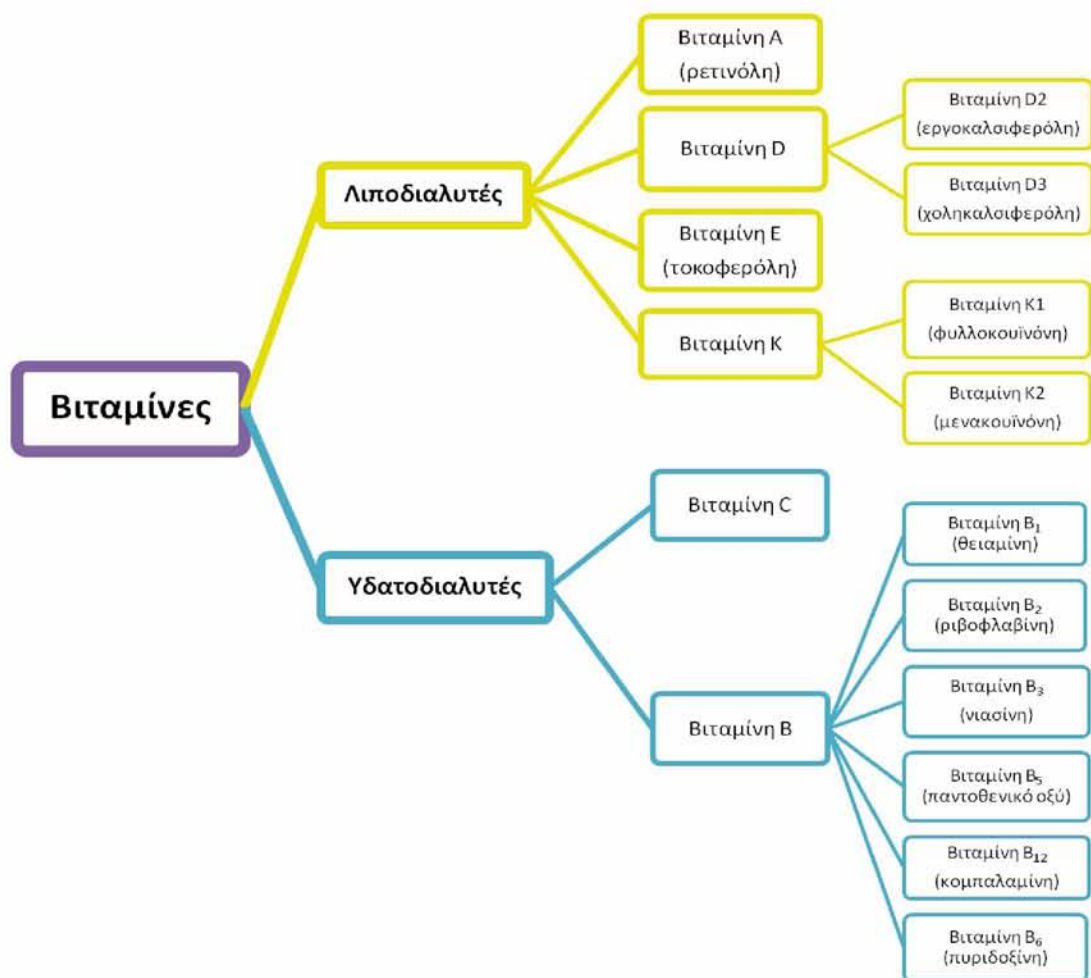
1.1 Οι βιταμίνες

Η λέξη «βιταμίνη» είναι ένας σχετικά νέος όρος. Καταγράφηκε για πρώτη φορά στα λεξικά το 1912 ενώ επινοήθηκε για να περιγράψει οργανικές ουσίες που περιέχονται στις τροφές και είναι απαραίτητες για τις περισσότερες χημικές διεργασίες του οργανισμού.

Οι βιταμίνες αποτελούν μία τάξη οργανικών χημικών ενώσεων, οι οποίες είναι απαραίτητες για την κανονική ανάπτυξη και λειτουργία ενός ζωντανού οργανισμού, ο οποίος δεν είναι σε θέση να τις συνθέσει. Λειτουργούν ως συστατικά συνενζύμων ή ενζύμων σε διάφορες χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στον οργανισμό. Απαιτούνται σε πολύ μικρές ποσότητες και εμπλέκονται σε βασικές λειτουργίες του οργανισμού, όπως η ανάπτυξη και ο μεταβολισμός (Combs Jr, 2012b).

Αυτό υποδηλώνεται και από την ερμηνεία της λέξης αφού βιταμίνες σημαίνει αμίνες της ζωής (vital amines). Οι βιταμίνες διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, στις υδατοδιαλυτές που διαλύονται στο νερό (η βιταμίνη C και οι βιταμίνες του συμπλέγματος B) και στις λιποδιαλυτές που δεν διαλύονται στο νερό (οι βιταμίνες A, D, E και K) (εικόνα 1.1).

Με εξαίρεση τις βιταμίνες D, K και B₃, το ανθρώπινο σώμα δεν μπορεί να συνθέσει βιταμίνες και για το λόγο αυτό είναι απαραίτητη η λήψη τους με την τροφή, ενώ όλες οι βιταμίνες δρουν ακόμη και σε πολύ μικρές ποσότητες, ενώ δεν έχουν θερμιδική αξία (Zempleni J., 2013).



Εικόνα 1.1: Κατηγοριοποίηση βιταμινών με βάση την διαλυτότητά τους

Η έννοια της βιταμίνης διατυπώθηκε πρώτη φορά από τον Ολλανδό ιατρό Christiaan Eijkman, ο οποίος τιμήθηκε με Βραβείο Νόμπελ το 1929 όταν ανακάλυψε ότι η ασθένεια μπέρι-μπέρι οφειλόταν στη χρήση αποφλοιωμένου ρυζιού (λόγω της έλλειψης βιταμίνης B₁), ενώ με το πλήρες ρύζι (το οποίο περιείχε την βιταμίνη) δεν εμφανιζόταν. Παρουσίασε ένα πείραμα με εκχύλισμα πλήρους ρυζιού κατά της νόσου και η ιδιότητα αυτή αποδόθηκε σε μία αζωτούχο ένωση. Το 1912, ο Πολωνός βιοχημικός Kazimierz Funk πρότεινε τον όρο βιταμίνη, ο οποίος και υιοθετήθηκε, αλλά αποδείχθηκε μάλλον ατυχής, καθώς πολλές ενώσεις της τάξης των βιταμινών δεν περιέχουν άζωτο. Οι βιταμίνες συμβολίστηκαν με λατινικά γράμματα σύμφωνα με την σειρά ανακάλυψης κάθε μίας από αυτές, ενώ στη πορεία του χρόνου τους δόθηκαν

κατάλληλες ονομασίες που έχουν να κάνουν με τη χημική τους δομή. Σήμερα είναι γνωστές με ένα γράμμα του λατινικού αλφαβήτου ή με την εμπειρική τους ονομασία (Combs Jr, 2012a).

Η δράση τους έγκειται στην ρύθμιση διαφόρων μεταβολικών αντιδράσεων και ενεργειακών μετατροπών που συμβαίνουν στον οργανισμό, ενώ μεταβολίτες όπως τα λίπη, οι υδατάνθρακες και οι πρωτεΐνες χρησιμοποιούνται ως πρώτη ύλη αυτών των αντιδράσεων. Έλλειψη μιας βιταμίνης σταματάει τις ειδικές μεταβολικές εργασίες και μπορεί να αλλάξει τη μεταβολική ισορροπία στον οργανισμό (Bender, 2003).

Οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες [η βιταμίνη C και το σύμπλεγμα των βιταμινών B (B₁/θειαμίνη, B₂/ριβοφλαβίνη, B₃/νιασίνη, B₅/παντοθενικό οξύ, B₆/πυριδοξίνη, B₁₂/κομπαλαμίνη)] συμμετέχουν στη μεταφορά ενέργειας και στο μεταβολισμό των πρωτεϊνών, των υδατανθράκων και των λιπών. Είναι απλά μόρια που περιέχουν υδρογόνο, οξυγόνο και άνθρακα ενώ μερικά θείο, άζωτο και κοβάλτιο. Η διαλυτότητα τους στο νερό είναι διαφορετικός και αυτή η ιδιότητα επηρεάζει την απορρόφηση τους από το έντερο και στη συνέχεια την απέκκριση τους ή την αποθήκευση τους στους ιστούς του οργανισμού. Στην ελεύθερη μορφή τους οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες είναι ανενεργές και ενεργοποιούνται όταν συνδεθούν ενζυμικά. Αφού σχηματιστεί ένα ενεργό συνένζυμο πρέπει να συνδεθεί με το κατάλληλο συστατικό πρωτεΐνης έτσι ώστε να μπορέσουν να πραγματοποιηθούν οι διάφορες αντιδράσεις (Stanger O., 2012).

Οι λιποδιαλυτές βιταμίνες εξαρτώνται από τα διατροφικά λιπαρά για την απορρόφηση και μεταφορά τους. Κατανέμονται σε 4 ομάδες: A, D, E και K. Οι βιταμίνες αυτές δεν προσφέρονται όλες από τροφικές πηγές ενώ μερικές δημιουργούνται και συντίθενται από τον οργανισμό. Η απορρόφηση και η μεταφορά των λιποδιαλυτών βιταμινών σχετίζεται άμεσα με την απορρόφηση και την μεταφορά των λιπιδίων. Για την απορρόφηση των λιποδιαλυτών βιταμινών απαιτείται η παρουσία

χολικών αλάτων και η μεταφορά τους γίνεται από τα χυλομικρά. Σε αντίθεση με τις υδατοδιαλυτές βιταμίνες, οι λιποδιαλυτές αποθηκεύονται στον οργανισμό σε διαφορετικά βέβαια ποσοστά για την κάθε μία από αυτές (Combs Jr, 2012b).

Μερικές από τις λιποδιαλυτές βιταμίνες αποτελούν βασικό τμήμα των βιολογικών μεμβρανών και παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της λειτουργικής τους ακεραιότητας. Ορισμένες δρουν σε γενετικό επίπεδο και ελέγχουν τη σύνθεση ορισμένων ενζύμων. Συνδεδεμένες με τα διατροφικά λιπαρά, απορροφώνται στον γαστρεντερικό σωλήνα. Στη συνέχεια κυκλοφορούν μέσω του λεμφικού συστήματος, ενσωματωμένες στις λιποπρωτεΐνες. Παντελής ή μερική στέρηση μίας ή περισσότερων βιταμινών από τον οργανισμό προκαλεί διάφορες παθολογικές καταστάσεις (αβιταμίνωση ή υποβιταμίνωση) (Zempleni J., 2013).

Στο πίνακα 1.1 αναγράφονται οι ημερήσιες ανάγκες στις λιποδιαλυτές βιταμίνες, ανάλογα με το φύλο, την ηλικία, κατά την διάρκεια της κύησης και του θηλασμού.

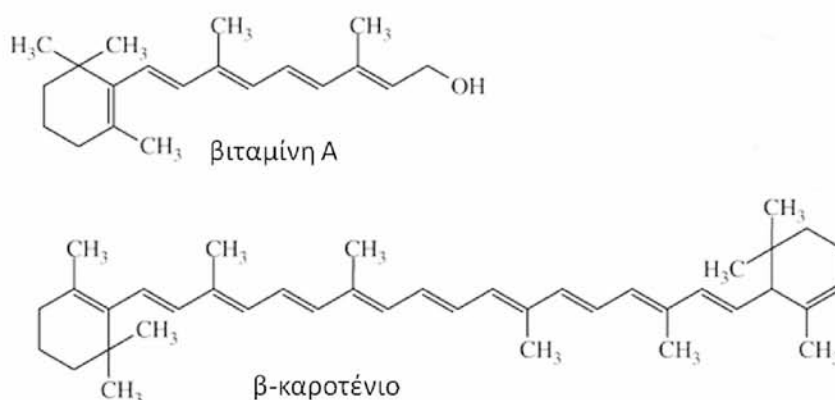
Ομάδες/ ηλικία	Βιταμίνη Α (mcg ¹ /RAE)	Βιταμίνη D (mcg ²)	Βιταμίνη Ε (mcg α-ΤΕ ³)	Βιταμίνη Κ (mcg)
Βρέφη				
0 - 6 μηνών	400*	10*	4*	2.0*
6 - 12 μηνών	500*	10*	5*	2.5*
Παιδιά				
1 - 3 ετών	300	15	6	30*
4 - 8 ετών	400	15	7	55*
Ανδρες				
9 - 13 ετών	600	15	11	60*
14 - 18 ετών	900	15	15	75*
19 - 30 ετών	900	15	15	120*
31 - 50 ετών	900	15	15	120*
51 - 70 ετών	900	15	15	120*
>70 ετών	900	20	15	120*
Γυναίκες				
9 - 13 ετών	600	15	11	60*
14 - 18 ετών	700	15	15	75*
19 - 30 ετών	700	15	15	90*
31 - 50 ετών	700	15	15	90*
51 - 70 ετών	700	15	15	90*
>70 ετών	700	20	15	90*
Εγκυμονούσες				
14 - 18 ετών	750	15	15	75
19 - 30 ετών	770	15	15	90
31 - 50 ετών	770	15	15	90
Θηλάζουσες				
14 - 18 ετών	1200	15	19	75
19 - 30 ετών	1300	15	19	90
31 - 50 ετών	1300	15	19	90

Πίνακας 1.1 Ημερήσιες ανάγκες των λιποδιαλυτών βιταμινών, ανάλογα με το φύλο, την ηλικία, κατά την διάρκεια της κύησης και του θηλασμού

Σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρούνται διαταραχές του οργανισμού, εξαιτίας πολύ μεγάλων δόσεων βιταμινών (υπερβιταμινώσεις) που είναι αντίστοιχες με τις διαταραχές της παντελούς έλλειψης.

1.1.1 Βιταμίνη Α

Με τον όρο βιταμίνη Α αναφερόμαστε σε μία σειρά ενώσεων που βρίσκονται σε μεγάλη ποικιλία τροφίμων. Στα ζωικά τρόφιμα, η βιταμίνη Α βρίσκεται κυρίως ως ρετινόλη ή ρετινάλη. Στα φυτικά τρόφιμα, η βιταμίνη Α βρίσκεται με τη μορφή του β-καροτένιου, που είναι μία προβιταμίνη (εικόνα 1.2). Η ρετινόλη βρίσκεται κυρίως στα ιχθυέλαια, ενώ η ρετινάλη βρίσκεται κυρίως στα αυγά (Loveday & Singh, 2008).



Εικόνα 1.2 Οι χημικές δομές των δύο βασικών μορφών της βιταμίνη Α

Τα καροτενοειδή συντίθενται από μία ποικιλία φυτών, των οποίων αποτελούν χρωστικές. Βρίσκονται κυρίως στα κίτρινα, κόκκινα και πράσινα λαχανικά και φρούτα. Σημαντικά ποσά καροτενοειδών περιέχει η ντομάτα, το καρότο και η κίτρινη κολοκύθα. Η περιεκτικότητα των λαχανικών σε καροτενοειδή εξαρτάται από τον βαθμό ωρίμανσής τους. Γενικά, τα ώριμα φρούτα και λαχανικά περιέχουν μεγαλύτερα ποσά καροτενοειδών. Καροτενοειδή μπορούν επίσης να αποθηκευτούν σε όργανα ζώων (συκώτι) και τον κρόκο του αυγού (Ross, 2010).

Η βιταμίνη Α είναι από τις ασταθέστερες λιποδιαλυτές βιταμίνες (Ko & Lee, 2010). Είναι ευαίσθητη στο ατμοσφαιρικό οξυγόνο και την υπεριώδη ακτινοβολία. Είναι σχετικά σταθερή στη θέρμανση, αλλά παρατεταμένη έκθεσή της σε υψηλές θερμοκρασίες οδηγεί σε καταστροφή της. Η σταθερότητα των καροτενοειδών είναι παρόμοια με αυτή της βιταμίνης Α ως προς την ευαισθησία στο οξυγόνο και στο φως (Sauvant, Cansell, Hadj Sassi, & Atgié, 2012).

Τα καροτενοειδή βρίσκονται στις εξωτερικές κυτταρικές μεμβράνες και στις λιποπρωτεΐνες και δρουν αντιοξειδωτικά (Biesalski, 1997). Μελέτες έχουν δείξει ότι το β-καροτένιο δρα συνεργιστικά με τη βιταμίνη Ε στη δέσμευση ελεύθερων ριζών και άρα στην αποφυγή της οξείδωσης των λιπιδίων. Τα καροτενοειδή λειτουργούν

προστατευτικά έναντι των καρδιαγγειακών παθήσεων και του καρκίνου. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι άτομα που καταναλώνουν μεγάλες ποσότητες φρούτων και λαχανικών (που περιέχουν υψηλά ποσοστά καροτενοειδών) παρουσιάζουν μικρότερη συχνότητα εμφάνισης των παραπάνω ασθενειών (Alizadeh, Bolhassani, Khavari, Bathaie, Naji, & Bidgoli, 2014).

Τα κυριότερα συμπτώματα έλλειψης βιταμίνης Α περιλαμβάνουν ανορεξία, καθυστέρηση της ανάπτυξης, αυξημένη ευαισθησία σε μολύνσεις, νυκταλωπία και ξηροφθαλμία (Tanumihardjo, 2004).

1.1.1.1 Ημερήσια ανάγκη

Είναι δύσκολο να καθοριστεί η απαιτούμενη ποσότητα σε βιταμίνη Α. Στις ζωικές τροφές υπάρχει ως ρετινόλη ενώ στις φυτικές ως β-καροτένιο, μορφή η οποία είναι λιγότερη αποδοτική στην παραγωγή βιταμίνης Α. Για τον λόγο αυτό οι ποσότητες που συνιστώνται δίνονται ως ισοδύναμα ρετινόλης (retinol equivalents, RE). Η ποσότητα που συνιστάται σε βιταμίνη Α είναι 1000 μg RE την ημέρα για τους άνδρες και 800 μg για τις γυναίκες.

1.1.1.2 Καλύτερες πηγές

Τα λαχανικά και τα φρούτα είναι οι πλουσιότεροι φορείς της βιταμίνης Α. Τα περισσότερα τρόφιμα που περιέχουν βιταμίνη Α εμφανίζουν έντονο χρώμα (χωρίς να σημαίνει ότι όλα τα έντονα σε χρώμα τρόφιμα περιέχουν βιταμίνη Α). Λαχανικά πλούσια σε βιταμίνη Α είναι τα καρότα, οι γλυκοπατάτες, το σπανάκι και τα πεπόνια cantaloupe. Το γάλα, το τυρί, το βούτυρο και τα αυγά επίσης περιέχουν βιταμίνη Α.

1.1.1.3 Λειτουργίες

Η βιταμίνη Α είναι σημαντική για τη διατήρηση του κερατοειδούς χιτώνα και των επιθηλιακών κυττάρων και συνεπώς για την όραση. Βοηθά επίσης στην ανάπτυξη

και την αναπαραγωγή των οστών και των δοντιών. Παίζει σημαντικό ρόλο στη σύνθεση και ρύθμιση των ορμονών και προστατεύει έναντι του καρκίνου. Επιδρά και στο ανοσοποιητικό σύστημα. Πιστεύεται ότι είναι απαραίτητη για τη λειτουργία των T-λεμφοκυττάρων και για την αντίδραση σε βακτηριακές λοιμώξεις.

1.1.1.4 Συμπτώματα έλλειψης

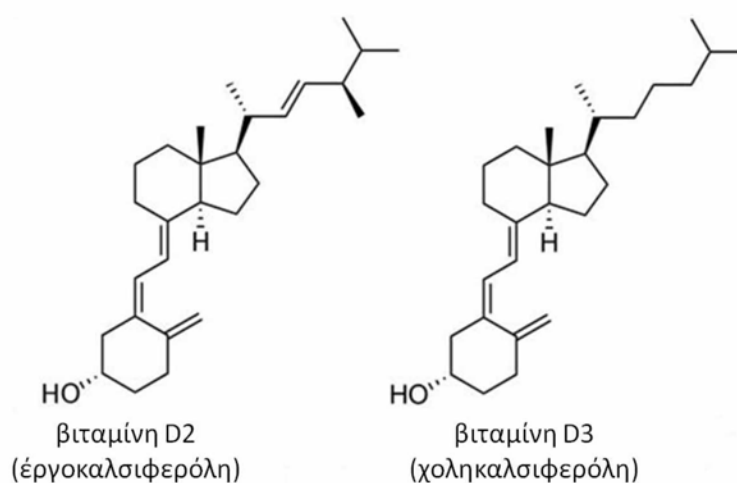
Η έλλειψη της βιταμίνης Α μπορεί να έχει πολύ σοβαρές επιπτώσεις. Συνήθως συνοδεύεται από έλλειψη ψευδαργύρου και πρωτεϊνών. Στο σώμα μπορεί να αποθηκευτεί ποσότητα ίση για να καλυφθούν οι ανάγκες για ένα χρόνο. Αυτό σημαίνει ότι τα συμπτώματα έλλειψης δεν εμφανίζονται άμεσα. Όμως σε περίπτωση που τα συμπτώματα εμφανιστούν μετά από μεγάλο διάστημα μη λήψης της βιταμίνης, αυτά είναι πολύ σοβαρά. Ένα από τα πρώτα συμπτώματα είναι η αδυναμία όρασης στο σκοτάδι. Αν η έλλειψη συνεχιστεί, μπορεί να προκαλέσει βλάβη του κερατοειδούς χιτώνα που μπορεί να προκαλέσει τύφλωση. Μπορεί επίσης να εμποδίσει την ανάπτυξη των οστών ή να προκαλέσει αλλοίωση του σχήματός τους, καθώς επίσης μπορεί να οδηγήσει και στην αποσύνθεση των δοντιών. Άλλη μία συνέπεια είναι η αναιμία. Τέλος, επηρεάζει το νευρικό και μυϊκό σύστημα και μπορεί να οδηγήσει σε παράλυση.

1.1.1.5 Τοξικότητα

Τοξικότητα δεν πρόκειται να παρατηρηθεί από την καθημερινή λήψη της βιταμίνης Α από την διατροφή, αλλά μπορεί να συμβεί από τη λήψη συμπληρωμάτων. Τα συμπτώματα είναι ναυτία, έμετος, πόνος στην κοιλιά, διάρροια και απώλεια βάρους. Το νευρικό και μυϊκό σύστημα μπορούν επίσης να επηρεαστούν προκαλώντας συμπτώματα όπως ανορεξία, νευρικότητα, κόπωση, αϋπνία, πονοκεφάλους και μυϊκή ατονία.

1.1.2 Βιταμίνη D

Με τον όρο βιταμίνη D καλούνται μία σειρά ενώσεων, με κύριες την εργοκαλσιφερόλη και την χοληκαλσιφερόλη (εικόνα 1.3). Η βιταμίνη D βρίσκεται κυρίως σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης, όπως το συκώτι, τα αυγά, τα γαλακτοκομικά προϊόντα (γάλα, βούτυρο και τυρί) και σε κάποια ψάρια του αλμυρού νερού, όπως ο σολομός, η σαρδέλα και ο τόνος. Τα φρούτα και οι ξηροί καρποί είναι τροφές πολύ φτωχές σε βιταμίνη D (Van Den Berg, 1997).



Εικόνα 1.3 Οι χημικές δομές των δύο βασικών μορφών της βιταμίνης D

Σε αρκετές χώρες, κάποια τρόφιμα εμπλουτίζονται με τη βιταμίνη αυτή. Στις Ηνωμένες Πολιτείες και σε κάποιες χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης εμπλουτίζονται κυρίως το γάλα, τα δημητριακά, η μαργαρίνη και το ψωμί (Lamberg-Allardt, 2006). Η βιταμίνη D που λαμβάνεται από την τροφή απορροφάται από τα εντερικά κύτταρα σε ποσοστό 50%. Ο μεταβολισμός της βιταμίνης D συνδέεται άμεσα με τις αλληλεπιδράσεις της με το ασβέστιο, το φώσφορο και τη βιταμίνη K. Ανεπαρκής πρόσληψη σιδήρου προκαλεί ελαττωμένη απορρόφηση της βιταμίνης D. Στα βρέφη και στα παιδιά, η έλλειψη βιταμίνης D προκαλεί ραχίτιδα. Η ραχίτιδα χαρακτηρίζεται από αδυναμία εναπόθεσης ασβεστίου και φωσφόρου στα οστά. Στην περίπτωση των βρεφών, οι χόνδροι των υποφύσεων αυξάνουν χωρίς να γίνεται οστεοποίηση ή

μεταλλοποίηση (Barba, Esteve, & Frígola, 2011). Τα οστά γίνονται μακριά και μαλακά, γεγονός που δυσκολεύει την κίνηση και τη στάση. Η σπονδυλική στήλη κάμπτεται και παρουσιάζονται διάφορες δυσμορφίες. Στους ενήλικες, η έλλειψη βιταμίνης D οδηγεί σε μειωμένη απορρόφηση ασβεστίου και πιθανώς φωσφόρου. Η ομοιόσταση του ασβεστίου του ορού διατηρείται εν μέρει λόγω της δράσης της παραθορμόνης. Όταν η πρόσληψη φωσφόρου είναι σε οριακά επίπεδα και υπάρχει έλλειψη βιταμίνης D, είναι δύσκολο να διατηρηθεί το ποσοστό του φωσφόρου σε αποδεκτά επίπεδα, διακινδυνεύοντας έτσι περεταίρω τη μεταλλοποίηση των οστών. Αποτέλεσμα της διαταραχής του ποσοστού των μετάλλων των οστών είναι οι πόνοι στα οστά και η οστεομαλάκυνση.

Συνήθως, η έκθεση στον ήλιο παρέχει ικανοποιητικά ποσά βιταμίνης D για το μεγαλύτερο ποσοστό του πληθυσμού. Εντούτοις, υπάρχουν κάποιες ομάδες του πληθυσμού και παθολογικές καταστάσεις που εγκυμονούν τον κίνδυνο εμφάνισης ανεπάρκειας βιταμίνης D. Αιτίες της πρόκλησης ανεπάρκειας βιταμίνης D είναι η ανεπαρκής έκθεση στον ήλιο και η ηλικία. Οι ηλικιωμένοι εκτίθενται για μικρά διαστήματα στον ήλιο και εξαιτίας της γήρανσης δεν μπορεί να ενεργοποιηθεί η δραστική μορφή της βιταμίνης D. Τα βρέφη βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο εμφάνισης ανεπάρκειας εξαιτίας δύο λόγων: το μητρικό γάλα είναι σχετικά φτωχό σε βιταμίνη D και εκτίθενται ελάχιστα στον ήλιο (Dixon & Mason, 2009).

1.1.2.1 Ημερήσια ανάγκη

Η βιταμίνη D έχει ένα χαρακτηριστικό που την ξεχωρίζει από όλες τις άλλες βιταμίνες, το γεγονός ότι μπορεί να παραχθεί από το ηλιακό φως. Αυτό σημαίνει ότι με συχνή έκθεση στο ηλιακό φως δε χρειάζεται επιπλέον λήψη βιταμίνης D. Η απαραίτητη ποσότητα της βιταμίνης D σύμφωνα με την συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη είναι 5 mg. Παρά το γεγονός ότι η ποσότητα της βιταμίνης D που συντίθενται αυξάνει με την

αύξηση του χρόνου έκθεσης στον ήλιο, το ηλιακό φως από μόνο του δεν μπορεί να κάνει τη βιταμίνη D να φτάσει τα όρια τοξικότητάς της.

1.1.2.2 Καλύτερες πηγές

Τρόφιμα πλούσια σε βιταμίνη D είναι τα αυγά, το συκώτι, τα ψάρια, καθώς επίσης και το εμπλουτισμένο γάλα και η εμπλουτισμένη μαργαρίνη.

1.1.2.3 Λειτουργίες

Η βιταμίνη D ρυθμίζει το μεταβολισμό του ασβεστίου και του φωσφόρου. Αυτός αφορά την απορρόφησή τους, την ενσωμάτωσή τους στα οστά, τη διατήρηση της στάθμης τους στο αίμα και τελικά την αποβολή τους από τα νεφρά.

1.1.2.4 Συμπτώματα έλλειψης

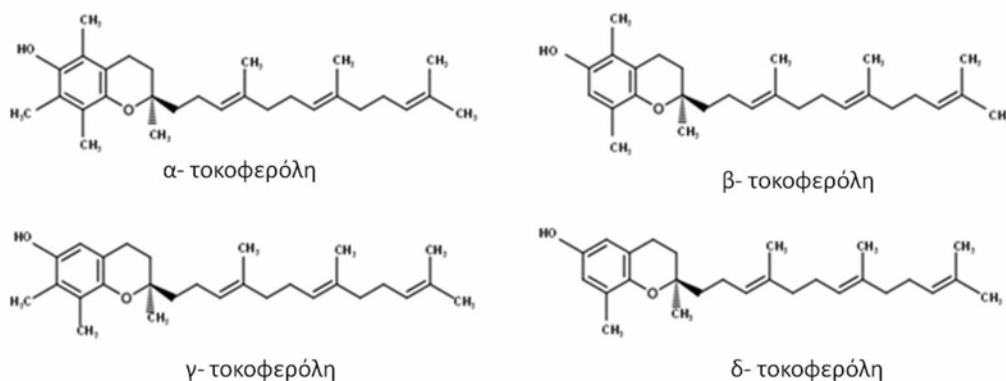
Έλλειψη της βιταμίνης D προκαλεί τα ίδια συμπτώματα με αυτά της έλλειψης ασβεστίου. Τα οστά μπορούν να γίνουν τόσο αδύναμα, ώστε να λυγίζουν από το σωματικό βάρος. Έλλειψη της βιταμίνης D μπορεί επίσης να προκαλέσει παραμόρφωση των άκρων, της σπονδυλικής στήλης, του θώρακα και της λεκάνης. Μπορεί επίσης να προκαλέσει βλάβες στο νευρικό και μυϊκό σύστημα προκαλώντας σπασμούς των μυών.

1.1.2.5 Τοξικότητα

Υπερβολική λήψη βιταμίνης D προκαλεί υψηλή συγκέντρωση ασβεστίου στο αίμα. Το ασβέστιο μπορεί να σχηματίσει πέτρες στα νεφρά. Υψηλή συγκέντρωση ασβεστίου στο αίμα μπορεί επίσης να προκαλέσει ασβεστοποίηση στα αγγεία, γεγονός πολύ επικίνδυνο για τις αρτηρίες της καρδιάς και των πνευμόνων και μπορεί να προκαλέσει ακόμα και το θάνατο. Επιπλέον συμπτώματα είναι η ανορεξία, πονοκέφαλοι, αδυναμία, κόπωση, αφυδάτωση, νευρικότητα και απάθεια.

1.1.3 Βιταμίνη E

Η βιταμίνη E είναι γνωστή ως μεμβρανικός σταθεροποιητής εξαιτίας της ισχυρής της συγγένειας με τις βιομεμβράνες μέσω αλληλεπιδράσεων με τα μεμβρανικά φωσφολιπίδια (Gonnet, Lethuaut, & Boury, 2010). Η «βιταμίνη E» είναι το γενικό όνομα για ένα μείγμα τεσσάρων διαφορετικών τύπων μορφών: τις α-, β-, γ- και δ-τοκοφερόλες που απαντώνται στα τρόφιμα (Dwiecki, Górnas, Wilk, Nogala-Kałucka, & Polewski, 2007) και οι οποίες διαφέρουν στον αριθμό και την θέση των μεθυλομάδων στο μόριό τους (Liolios, Gortzi, Lalas, Tsaknis, & Chinou, 2009) (εικόνα 1.4). Η α-τοκοφερόλη είναι η περισσότερο ενεργή μορφή της βιταμίνης E, αποτελεί το 90% της συνολικής βιταμίνης E στους ιστούς (Gortzi, Lalas, Chinou, & Tsaknis, 2006) και στην οποία αποδίδεται η σημαντικότερη βιολογική ενεργότητα (Liolios, Gortzi, Lalas, Tsaknis, & Chinou, 2009).



Εικόνα 1.4 Οι χημικές δομές των τεσσάρων βασικών μορφών της βιταμίνης E

Η βιταμίνη E είναι ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αντιοξειδωτικού (Lalas, Athanasiadis, Gortzi, Bounitsi, Giovanoudis, Tsaknis, et al., 2011). Παρόλα αυτά, έχει χαμηλή απορρόφηση και βιοδιαθεσιμότητα, χαρακτηριστικά που περιορίζουν την κλινική εφαρμογή της (Colletier, Chaize, Winterhalter, & Fournier, 2002; Dwiecki, Górnas, Wilk, Nogala-Kałucka, & Polewski, 2007).

Ο κύριος βιολογικός ρόλος της βιταμίνης Ε είναι να προστατεύει τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (polyunsaturated fatty acids- PUFAs) και άλλα συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών από την οξειδωση από ελεύθερες ρίζες. Αυξημένα επίπεδα από προϊόντα λιπιδικής υπεροξειδωσης σχετίζονται με διάφορες ασθένειες. Η βιταμίνη Ε κυρίως βρίσκεται στις κυτταρικές μεμβράνες και τις μεμβράνες των οργανιδίων όπου μπορεί να ασκήσει την μέγιστη προστατευτική της δράση σε συγκέντρωση που δεν ξεπερνά το ένα μόνο μόριο για κάθε 2000 φωσφολιπιδικά μόρια. Αυτό υποδηλώνει ότι αφού αλληλεπιδράσει με τις ελεύθερες ρίζες, αναγεννάται ταχέως πιθανώς μέσω άλλων αντιοξειδωτικών παραγόντων (X. Zhang & Keiderling, 2006).

1.1.3.1 Ημερήσια ανάγκη

Η συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη βιταμίνης Ε είναι 10 mg για τους άνδρες και 8 mg την ημέρα για τις γυναίκες.

1.1.3.2 Καλύτερες πηγές

Η βιταμίνη Ε υπάρχει σε μεγάλη ποσότητα στα λαχανικά και τα σπορέλαια που υπάρχουν, στη μαργαρίνη και στις κρέμες ζαχαροπλαστικής. Το σογιέλαιο και το λάδι από τις φύτρες σιταριού έχουν ιδιαίτερα υψηλή περιεκτικότητα σε βιταμίνη Ε. Το ηλιέλαιο και το καλαμποκέλαιο καταλαμβάνουν τη δεύτερη θέση. Ένα κουτάλι σούπας από τα παραπάνω προϊόντα παρέχει την μισή ημερήσια ανάγκη του οργανισμού σε βιταμίνη Ε. Αντιθέτως, ζωικά λίπη, όπως το βούτυρο και το λίπος του γάλακτος, δεν περιέχουν σχεδόν καθόλου βιταμίνη Ε. Επειδή η βιταμίνη Ε καταστρέφεται από την θέρμανση των τροφίμων, είναι προτιμότερο να λαμβάνεται από φρέσκα τρόφιμα.

1.1.3.3 Λειτουργίες

Η βιταμίνη Ε, όπως και η βιταμίνη C, εμφανίζει αντιοξειδωτική δράση. Βοηθά στην σταθεροποίηση της μεμβράνης των κυττάρων, ρυθμίζει τις οξειδωτικές

αντιδράσεις και προστατεύει τη βιταμίνη Α, την καροτίνη, τις ορμόνες που παράγονται από το βλεννογόνο, τα επινεφρίδια, τις ορμόνες του αναπαραγωγικού συστήματος και διάφορα ακόρεστα λιπαρά οξέα, από την οξείδωση. Η πιο σημαντική της λειτουργία ως αντιοξειδωτικό, είναι το γεγονός ότι έχει πολύ σημαντική επίδραση στα λευκά και ερυθρά αιμοσφαίρια που περνούν μέσα από τους πνεύμονες.

1.1.3.4 Συμπτώματα έλλειψης

Όταν τα επίπεδα της βιταμίνης Ε στο αίμα είναι πολύ χαμηλά, μπορεί να προκληθεί καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Θεραπεία με χορήγηση βιταμίνης Ε μπορεί να θεραπεύσει αυτό το σύμπτωμα. Έλλειψη βιταμίνης Ε μπορεί επίσης να επηρεάσει το νευρικό και μυϊκό σύστημα, να προκαλέσει στειρότητα, αδυναμία, δυσκολία στο περπάτημα και πόνο στις γάμπες.

1.1.3.5 Τοξικότητα

Τοξικότητα μπορεί να προκληθεί μόνο από τη λήψη συμπληρωμάτων σε μεγάλη ποσότητα, αλλά δε συμβαίνει το ίδιο εύκολα όπως με τις βιταμίνες Α και D. Συμπτώματα της τοξικότητας είναι οι πονοκέφαλοι, η αδυναμία, η ζάλη, η κόπωση και οι οπτικές δυσλειτουργίες.

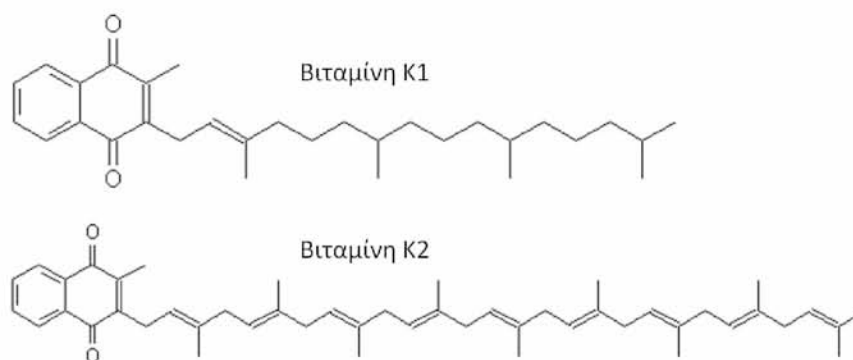
1.1.4 Βιταμίνη Κ

Η βιταμίνη Κ είναι κυρίως γνωστή για τον ρόλο της στην ορθή πήξη του αίματος (Booth & Rajabi, 2008). Ο γράμμα «Κ» προέρχεται από το γερμανικό της όνομα «Koagulations vitamin» που σημαίνει βιταμίνη της πήξης. Επιπλέον η βιταμίνη Κ είναι ένα σημαντικό μόριο για την υγεία των οστών, μιας και είναι απαραίτητη για την μοναδική μεταμεταφραστική χημική τροποποίηση σε μία μικρή ομάδα πρωτεϊνών με ιδιότητες δέσμευσης ασβεστίου γνωστές ως πρωτεΐνες εξαρτώμενες από την

βιταμίνη K ή Gla πρωτεΐνες (Bügel, 2008). Οι εξαρτημένες από την βιταμίνη K πρωτεΐνες της πήξεως συντίθενται στο ήπαρ και περιλαμβάνουν τους παράγοντες II, VII, IX, και X, οι οποίοι έχουν αιμοστατικό ρόλο (π.χ. είναι παράγοντες που αναστέλλουν και αποτρέπουν την αιμορραγία) και τις πρωτεΐνες C και S που έχουν έναν αντιπηκτικό ρόλο (π.χ. αναστέλλουν την διαδικασία πήξης) (Wilson, Rashid, Durie, Tsang, Kalnins, Andrew, et al., 2001).

Ο όρος βιταμίνη K αντιπροσωπεύει μία οικογένεια μορίων με κοινή χημική δομή. Η φυλλοκουϊνόνη ή βιταμίνη K1 είναι μία ουσία που υπάρχει σε όλα τα φωτοσυνθέτοντα φυτά (Gross, Won, Lezhneva, Falk, Krupinska, Shinozaki, et al., 2006).

Στην δίαιτα του ανθρώπου η φυλλοκουϊνόνη είναι η κυρίαρχη μορφή της βιταμίνης K που λαμβάνει ο άνθρωπος μέσω της διατροφής. Γενικά, τα λαχανικά με πράσινα φύλλα περιέχουν την μεγαλύτερη γνωστή ποσότητα φυλλοκουϊνόνης και συνεισφέρουν περίπου το 60% της συνολικής ποσότητας φυλλοκουϊνόνης που λαμβάνουμε με την τροφή (McKeown, Jacques, Gundberg, Peterson, Tucker, Kiel, et al., 2002). Η μενακουϊνόνη (ή βιταμίνη K2) είναι κυρίως βακτηριακής προέλευσης μορφή της βιταμίνης K και διαφέρει από την φυλλοκουϊνόνη στην δομή των 3-υποκατεστημένων λιπόφιλων πλευρικών αλυσίδων (εικόνα 1.5).



Εικόνα 1.5 Οι χημικές δομές των δύο βασικών μορφών της βιταμίνης K

1.1.4.1 Ημερήσια ανάγκη

Μεγάλη ποσότητα από την ημερήσια ανάγκη του οργανισμού σε βιταμίνη Κ συντίθενται από βακτήρια στην περιοχή των εντέρων. Τρόφιμα πλούσια σε βιταμίνη Κ είναι το συκώτι, γενικά τα πράσινα φυλλώδη λαχανικά και το γάλα.

1.1.4.2 Καλύτερες πηγές

Το έντερο περιέχει βακτήρια που συνθέτουν τη βιταμίνη Κ, η οποία απορροφάται μερικώς και αποθηκεύεται στο συκώτι. Ο ανθρώπινος οργανισμός δεν χρειάζεται τη λήψη επιπλέον ποσότητας βιταμίνης Κ από τη διατροφή.

1.1.4.3 Λειτουργίες

Η βιταμίνη Κ είναι πολύ σημαντική για τη σύνθεση ορισμένων πρωτεϊνών που βοηθούν την κανονική πήξη του αίματος. Επίσης, είναι απαραίτητη για τη σωστή ανάπτυξη των οστών.

1.1.4.4 Συμπτώματα έλλειψης

Σε περίπτωση έλλειψης της βιταμίνης Κ, το αίμα δεν μπορεί να πήξει. Αυτό μπορεί να προκαλέσει αιμορραγίες. Η έλλειψη βιταμίνης Κ είναι πολύ σπάνια, μόνο τα βρέφη είναι ευαίσθητα σε αυτήν, διότι το έντερό τους δεν περιέχει τα βακτήρια που την συνθέτουν. Επίσης, το γάλα του θηλασμού περιέχει μόνο μικρές ποσότητες και για το λόγο αυτό, στα βρέφη γίνεται χορήγηση βιταμίνης Κ με τη γέννησή τους.

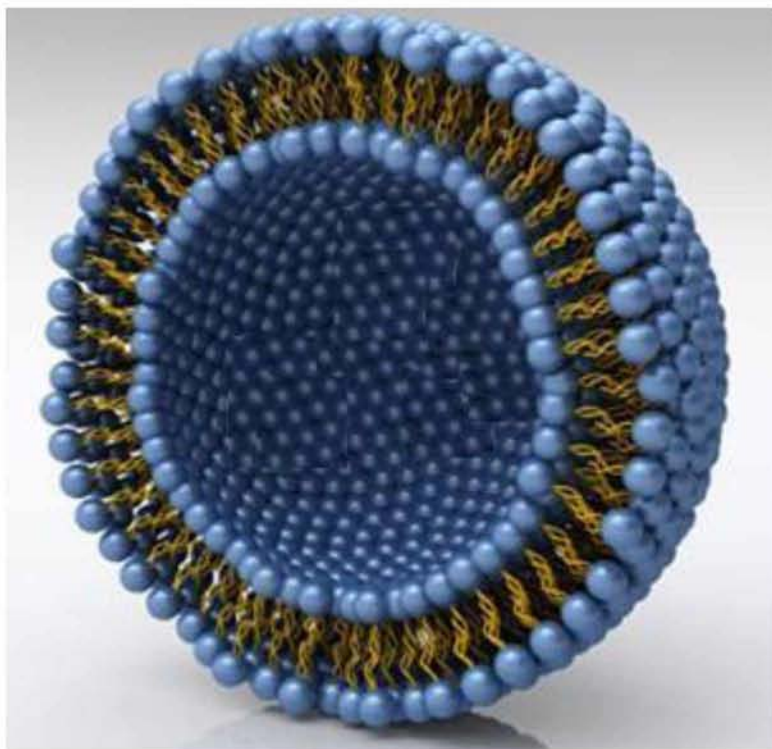
1.1.4.5 Τοξικότητα

Τοξικότητα από βιταμίνη Κ μπορεί να προκληθεί μόνο σε άτομα που παίρνουν υδατοδιαλυτά συμπληρώματα βιταμίνης Κ. Τα συμπληρώματά της είναι η αιμόλυση των ερυθρών αιμοσφαιρίων, ίκτερος και εγκεφαλικές βλάβες (Nestle, 1987; Ζερφυρίδης, 1998).

1.2 Τα λιποσώματα

Τα λιποσώματα περιγράφηκαν για πρώτη φορά από τον Bangham και τους συνεργάτες του το 1965 στο Πανεπιστήμιο του Κέμπριτζ (Bangham, Standish, & Watkins, 1965), από τότε σημαντικές εξελίξεις έχουν λάβει χώρα στην παρασκευή, τον χαρακτηρισμό και την χρησιμοποίησή τους ως φορείς βιοενεργών ουσιών .

Τα λιποσώματα είναι κολλοειδή σωματίδια σφαιρικού σχήματος τα οποία αποτελούνται από μία ή περισσότερες διπλοστοιβάδες λιπιδίων που εναλλάσσονται με υδατικά τμήματα (εικόνα 1.6).



Εικόνα 1.6 Σχηματική απεικόνιση ενός λιποσώματος σε διατομή

Μπορούν να συντεθούν χρησιμοποιώντας αμιγώς φυσικά βιομόρια ή βιομόρια που απατώνται στο σώμα μας, και τα οποία κατ'έκταση είναι βιοσυμβατά και αποδεκτά για ανθρώπινη κατανάλωση (Mozafari, Johnson, Hatziantoniou, & Demetzos, 2008) (Goldberg & Klein, 2012; Rao, Chawan, & Veeramachaneni, 1995). Συνήθως

αποτελούνται από φυσικά ή/και συνθετικά λιπίδια (φωσφο- και σφίγγο-λιπίδια) και μπορούν να περιέχουν και άλλα συστατικά, όπως χοληστερόλη και υδρόφιλα πολυμερή (Mozafari, Reed, Rostron, Kocum, & Piskin, 2002).

Τα λιποσώματα σχηματίζονται αυθόρμητα, όταν τα φωσφολιπίδια διασπαρούν σε θερμοκρασία πάνω από την θερμοκρασία μετάπτωσής τους (T_m) σε πλούσιο υδατικό περιβάλλον, με το μέγεθος τους να κυμαίνεται από τάξεις δεκάδων νανομέτρων έως δεκάδων μικρομέτρων σε διάμετρο (C. K. Kim, Chung, Lee, Choi, & Kim, 1999).

Τα λιποσώματα μελετώνται για την απόδοση βιολογικά δραστικών ουσιών κυρίως λόγω: 1) της αδυναμίας αυτών των ουσιών να επιτύχουν την επιθυμητή συγκέντρωση στην επιθυμητή περιοχή, 2) της κυτταροτοξικότητάς τους, και 3) των προβλημάτων που σχετίζονται με τη χορήγησή τους (για παράδειγμα χαμηλή διαλυτότητά τους σε κατάλληλο φορέα).

Τα λιποσώματα μπορούν να ταξινομηθούν όπως θα δούμε και παρακάτω αναλυτικότερα, με διάφορους τρόπους (μέγεθος, σύσταση, φορτίο επιφάνειας, δομή), κυρίως όμως ταξινομούνται με βάση τη σύστασή τους και με βάση το μέγεθος τους (Tan, Choong, & Dass, 2010).

Ανάλογα με το μέγεθός τους και τον αριθμό των διπλοστοιβάδων τους τα λιποσώματα μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κατηγορίες: 1) πολυκυστιδιακά σωματίδια (Multilamellar Vehicles- MLVs), 2) μεγάλα μονοκυστιδιακά σωματίδια (Large Unilamellar Vehicles- LUVs) και 3) μικρά μονοκυστιδιακά σωματίδια (Small Unilamellar Vehicles- SUVs). Το μέγεθός τους κυμαίνεται γενικά από πολύ μικρά ($0.025\ \mu\text{m}$) μέχρι μεγάλα σωματίδια ($2.5\ \mu\text{m}$) και αποτελεί κρίσιμο παράγοντα όσον αφορά το χρόνο ημιζωής τους στο κυκλοφορικό σύστημα και την έκταση του εγκλεισμού σε αυτά (Elizondo, Moreno, Cabrera, Córdoba, Sala, Veciana, et al., 2011; S. Kim, Turker, Chi, Sela, & Martin, 1983; Zawada, 2004).

Με βάση τη σύστασή τους και τον μηχανισμό της απόδοσης της εγκλεισμένης ουσίας εντός του κυττάρου τα λιποσώματα μπορούν να ταξινομηθούν σε: 1) συμβατικά (conventional) λιποσώματα (CL), 2) κατιονικά λιποσώματα, 3) ανοσολιποσώματα και 4) λιποσώματα σταθεροποιημένα στερεοχημικά/ μακράς παραμονής στο κυκλοφορικό (Stealth liposomes/ LCL, long-circulating liposomes).

Τα λιποσώματα λόγω του αμφίφιλου χαρακτήρα τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο ως φορείς λιπόφιλων όσο και υδρόφιλων ουσιών (Laridi, Kheadr, Benech, Vuillemand, Lacroix, & Fliss, 2003). Ανάλογα με τη διαλυτότητα και τα χαρακτηριστικά της κατανομής της εγκλωβιζόμενης ουσίας, αυτή μπορεί να εντοπιστεί σε διαφορετικά σημεία του κυστιδίου των λιποσωμάτων και να έχει διαφορετική παγίδευση και ιδιότητες απελευθέρωσης (Mozafari, Khosravi-Darani, Borazan, Cui, Pardakhty, & Yurdugul, 2008).

Οι ισχυρά λιπόφιλες ουσίες παγιδεύονται σχεδόν αποκλειστικά στη λιπιδική διπλοστιβάδα των λιποσωμάτων επειδή είναι ελάχιστα διαλυτές στο νερό, έτσι τα προβλήματα που σχετίζονται με την απώλεια της εγκλωβισμένης ουσίας στο υδατικό περιβάλλον των λιποσωμάτων κατά την αποθήκευση, είναι αμελητέα.

Πολυάριθμες είναι οι πιθανές εφαρμογές της χρήσης των λιποσωμάτων και των νανολιποσωμάτων στην βιομηχανία τροφίμων, περιλαμβάνοντας την προστασία ευαίσθητων συστατικών με στόχο την αύξηση της αποτελεσματικότητας των τροφικών πρόσθετων. (Mozafari, Khosravi-Darani, Borazan, Cui, Pardakhty, & Yurdugul, 2008)

Τα τελευταία χρόνια, η τεχνολογία των λιποσωμάτων βρίσκεται στο επίκεντρο του ερευνητικού ενδιαφέροντος, ως φορείς βελτιωμένης μεταφοράς για ένα ευρύ φάσμα παραγόντων όπως φαρμάκων και βιολογικά δραστικών ουσιών όπως πρωτεϊνών, ενζύμων, βιταμινών, αντιοξειδωτικών και γεύσεων (Chavhan, Petkar, & Sawant, 2011;

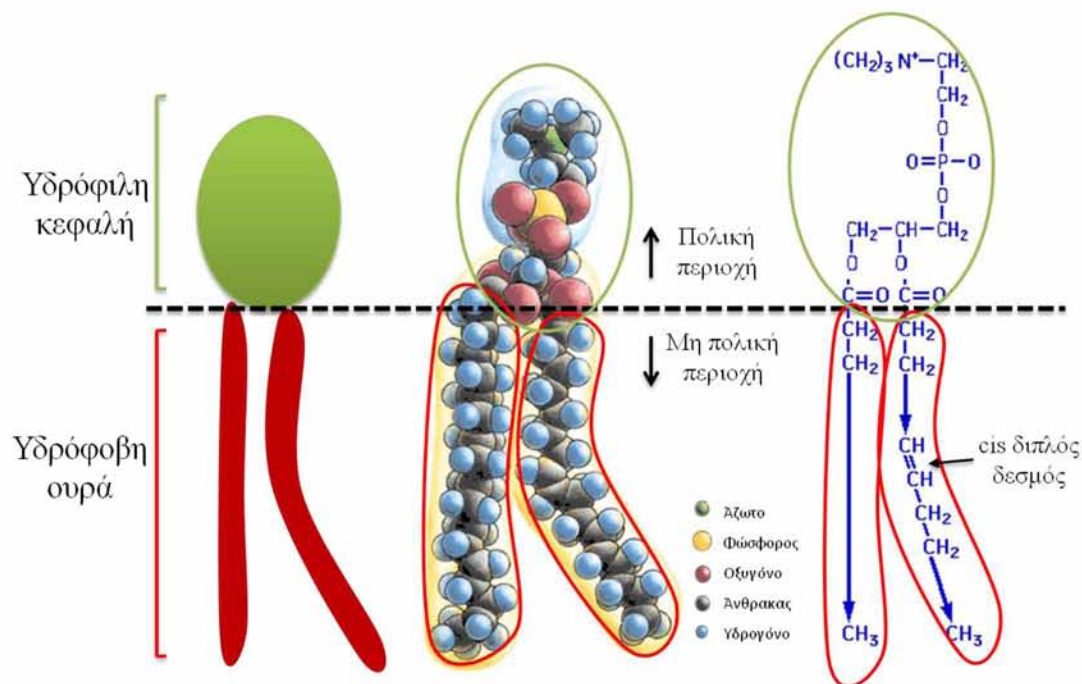
da Silva Malheiros, Daroit, & Brandelli, 2010; Shanmugam & Banerjee, 2011; Todorova, 2011).

1.2.1 Λιπίδια ως συνθετικές μονάδες των λιποσωμάτων

Τα λιποσώματα μπορούν να παρασκευαστούν από ποικιλία λιπιδίων και μιγμάτων λιπιδίων. Ένα από τα βασικά είδη μεμβρανικών λιπιδίων περιλαμβάνουν τα φωσφολιπίδια. Τα φωσφολιπίδια είναι μια μεγάλη ομάδα εξαιρετικά σύνθετων μορίων που συναντώνται εκτεταμένα στις βιολογικές μεμβράνες και έχουν μια φωσφορική εστερομάδα, ως κοινό γνώρισμα. Συγκεκριμένα αποτελούνται από μια πολική κεφαλή και δύο υδρογονανθρακικές αλυσίδες.

Υπάρχουν δύο είδη φωσφολιπιδίων: τα φωσφογλυκερίδια και τα σφιγγολιπίδια, μαζί με τα αντίστοιχα προϊόντα υδρόλυσής τους (Antimisiaris, 2008)).

Αναπαράσταση της δομής ενός φωσφολιπιδίου με τις πολικές και μη πολικές περιοχές του παρουσιάζεται στην εικόνα 1.7. Οι υδρόφοβες ουρές έλκονται μεταξύ τους, ενώ οι υδρόφιλες κεφαλές συνδέονται με το υδατικό μέσο (υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις, υδρόφοβη επίδραση) εξωτερικά και εσωτερικά της λιποσωμικής επιφάνειας. Με τον τρόπο αυτό σχηματίζονται διπλές λιπιδικές στοιβάδες οι οποίες σφραγίζουν και δημιουργούν μικρά σωματίδια παρόμοια με τα σωματικά κύτταρα και τα οργανίδια τους (εικόνα 1.6).



Εικόνα 1.7 Αναπαράσταση δομής φωσφολιπιδίου

Οι δυνάμεις που αναπτύσσονται και σταθεροποιούν τα λιποσώματα ταξινομούνται ως εξής:

1. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των λιπιδίων: υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις πολικές ομάδες και αλληλεπιδράσεις Van der Waals ανάμεσα στις υδρογονανθρακικές αλυσίδες και

2. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ λιπιδίων και νερού: υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις, (υδρόφοβη επίδραση). Το ακραίο τμήμα των λιπιδίων που ξεκινά με κατιον τεταρτοταγους αμμωνίου στα φωσφολιπίδια είναι η πολική ομάδα (ή πολική κεφαλή). Συνδέεται μέσω της γλυκερόλης με δύο λιπαρές αλυσίδες. Μια από τις αλυσίδες είναι ευθεία λιπαρή αλυσίδα (κορεσμένη), ενώ η άλλη παρουσιάζει κυρτότητα λόγω cis διπλού δεσμού (μη κορεσμένη). Αυτό επηρεάζει το πακετάρισμα και την κίνηση στο πλευρικό επίπεδο της μεμβράνης.

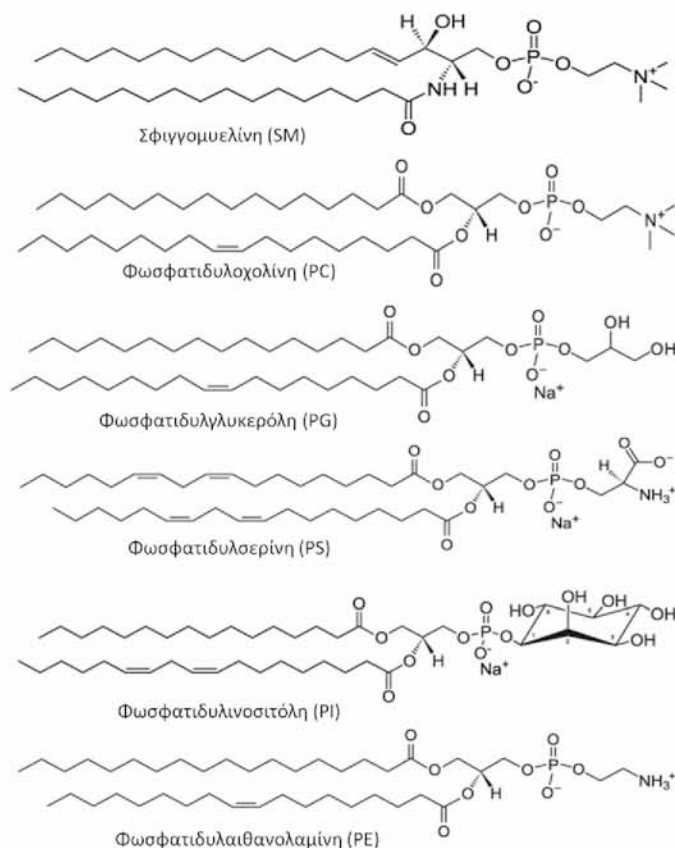
Τα πιο κοινά φωσφολιπίδια είναι τα μόρια φωσφατιδυλογολίνης (PC), αμφίφιλα μόρια στα οποία μια γέφυρα γλυκερόλης συνδέει ένα ζεύγος υδρόφοβων υδρογονανθρακικών

αλυσίδων με μια υδρόφιλη πολική κεφαλή, τη φωσφοχολίνη (K. A. Edwards & Baemner, 2006).

Τα μόρια αυτά είναι αδιάλυτα στο νερό και σε υδατικό μέσο, διατάσσονται ευθύγραμμα σε διπλοστοιβάδες με μορφή επίπεδων φύλλων ώστε να μειωθούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της λιπαρής αλυσίδας των υδρογονανθράκων και του υδατικού περιβάλλοντος. (Crommelin, Daemen, Scherphof, Vingerhoeds, Heeremans, Kluft, et al., 1997).

Εκτός από τη φωσφατιδυλοχολίνη, λιπιδικές διπλοστοιβάδες μπορούν να σχηματιστούν και με σφιγγομυελίνη ή με ανάλογα αλκυλ-αιθέρων της λεκιθίνης. Στη σφιγγομυελίνη, η παρουσία αμιδίου και υδροξυλομάδων προκαλεί τη δημιουργία δεσμών υδρογόνου οι οποίοι μπορεί να εξηγούν την καλύτερα διατεταγμένη φάση γέλης σε σχέση με τη φωσφατιδυλοχολίνη.

Ένα άλλο ουδέτερο φωσφολιπίδιο που απαντάται σε φυσικές μεμβράνες είναι η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (PE). Το λιπίδιο αυτό διαφέρει από το PC στο ότι η χαρακτηριστική ομάδα είναι μικρότερη και επίσης μπορεί να σχηματίσει δεσμούς υδρογόνου με γειτονικά μόρια στη μεμβράνη. Στα αρνητικά φορτισμένα λιπίδια ανήκουν η φωσφατιδυλγλυκερόλη (PG), η φωσφατιδυλινοσιτόλη (PI) και η φωσφατιδυλσερίνη (PS) (εικόνα 1.8).



Εικόνα 1.8 Οι δομές των κυριότερων λιπιδίων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή λιποσωμάτων

Οι αλυσίδες των λιπαρών οξέων στα φωσφολιπίδια και τα γλυκολιπίδια συνήθως περιέχουν έναν άρτιο αριθμό ατόμων άνθρακα, συνήθως μεταξύ 14 και 24. Πιο συχνά βρίσκουμε τα λιπαρά οξέα με 16 και 18 άτομα άνθρακα. Τα λιπαρά οξέα μπορεί να είναι ακόρεστα ή κορεσμένα. Το ισομερές που ανευρίσκεται στα ακόρεστα λιπαρά είναι σχεδόν πάντα στη *cis* μορφή. Ένα κεκορεσμένο λιπαρό οξύ περιέχει μόνο απλούς δεσμούς ενώ τα ακόρεστα λιπαρά οξέα έχουν διπλούς δεσμούς στην υδρογονανθρακική αλυσίδα τους. Οι διπλοί δεσμοί των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων χωρίζονται από μια τουλάχιστον μεθυλενική ομάδα. Η διαμόρφωση και ο αριθμός αυτών των διπλών δεσμών καθώς και το μήκος της αλυσίδας επιδρά στο σημείο τήξης και στα χαρακτηριστικά ρευστότητας της μεμβράνης. Τα περισσότερα φυσικά φωσφολιπίδια είναι μικτά, δηλαδή τα λιπαρά οξέα που περιέχουν διαφέρουν το ένα από

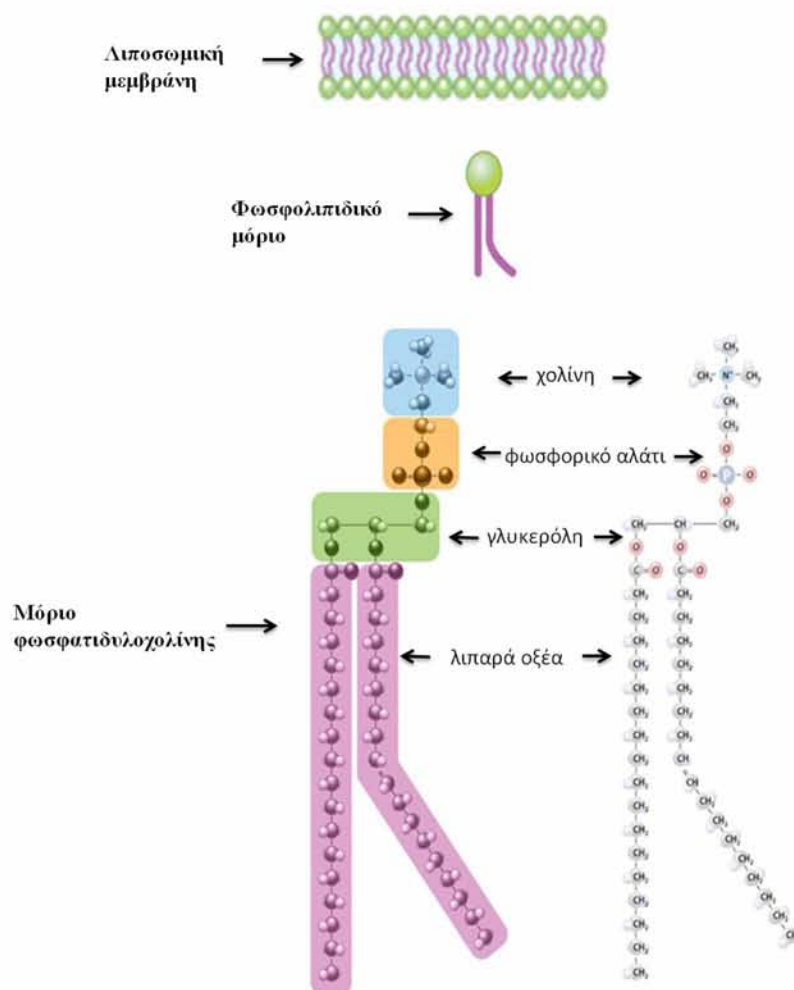
το άλλο (Hsieh, Chen, Wang, Chang, & Chang, 2002). Συνήθως, το λιπαρό οξύ που συνδέεται στην θέση 1 του κορμού της γλυκερόλης δεν περιέχει ακόρεστους δεσμούς, ενώ το λιπαρό οξύ που συνδέεται στην θέση 2 περιέχει έναν ή περισσότερους ακόρεστους δεσμούς. Στον πίνακα 1.2 παρουσιάζονται οι χημικές δομές και ονομασίες των βασικών κυτταρικών λιπαρών οξέων

ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ	ΟΝΟΜΑΣΙΑ
Κορεσμένο λιπαρό οξύ	
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	Λαουρικό
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	Μυριστικό
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	Παλμιτικό
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	Στεαρικό
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	Αραχιδικό
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$	Λινοσσερικό
Ακόρεστο λιπαρό οξύ	
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Παλμιτολεϊκό
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Ολεϊκό
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Λινολεϊκό
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	Αραχιδονικό
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Λινολενικό

Πίνακας 1.2 Κυτταρικά λιπαρά οξέα

1.2.1.1 Φωσφατιδυλοχολίνη

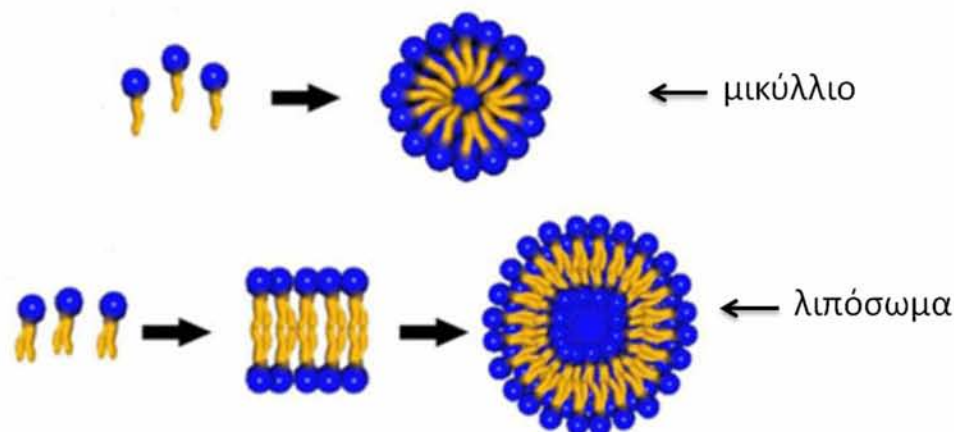
Το πιο κοινά απαντώμενο φωσφολιπίδιο είναι η φωσφατιδυλοχολίνη, γνωστή και ως ‘λεκιθίνη’, ένα αμφίφιλο μόριο, ο κορμός του οποίου, η γλυκερόλη, συγκρατεί δύο υδρόφοβες υδρογονανθρακικές αλυσίδες (λιπαρά οξέα) και μια υδρόφιλη κεφαλή, την φωσφοχολίνη (φωσφορικό οξύ και χολίνη) (εικόνα 1.9).



Εικόνα 1.9 Δομή φωσφολιπιδίου και χαρακτηριστικές ομάδες

Τα μόρια της φωσφατιδυλοχολίνης δεν είναι υδατοδιαλυτά και όταν βρεθούν σε υδατικό μέσο παρατάσσονται σε επίπεδα διπλοστιβαδικά φύλλα, έτσι ώστε οι υδρόφοβες αλυσίδες τους να αποφεύγουν την επαφή με το υδατικό μέσο (Vemuri & Rhodes, 1995). Κάτι τέτοιο επιτυγχάνεται πλήρως στη συνέχεια με τον σχηματισμό κλειστών, σφαιρικών κυστιδίων. Αυτή είναι και η κύρια διαφορά των μορίων της φωσφατιδυλοχολίνης από άλλα αμφιπαθητικά μόρια, που προτιμούν να σχηματίζουν δομές μικκυλίου. Η εξήγηση για τον σχηματισμό αυτόν είναι η ύπαρξη των δύο υδρογονανθρακικών αλυσίδων, οι οποίες προσδίδουν στο μόριο ένα κυλινδρικό σχήμα, καταλληλότερο για σχηματισμό διπλοστοιβάδων σε αντίθεση π.χ. με μόρια απορρυπαντικών, των οποίων η μονή αλυσίδα και το κωνικό σχήμα τους ταιριάζει

καλύτερα στην σφαιρική δομή του μικκυλίου (εικόνα 1.10). Μόρια επιφανειοδραστικών, που περιέχουν δυο υδρογονανθρακικές αλυσίδες, μπορούν επίσης, κάτω από ορισμένες συνθήκες, να σχηματίσουν σφαιρίδια με διπλοστιβαδική μεμβράνη.



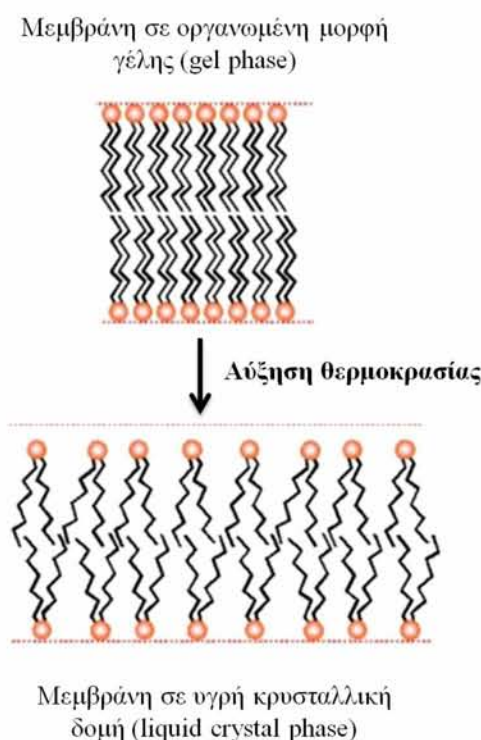
Εικόνα 1.10 Σχηματική δομή ενός μικκυλίου και ενός λιποσώματος

Η φωσφατιδυλοχολίνη μπορεί να ληφθεί τόσο από φυσικές, όσο και συνθετικές πηγές. Λαμβάνεται εύκολα από τον κρόκο των αυγών, την σόγια και λιγότερα συχνά από καρδιά ή νωτιαίο μυελό βοοειδούς (Hsieh, Chen, Wang, Chang, & Chang, 2002). Εκτός του ότι αποτελεί το κύριο λιπίδιο των κυτταρικών μεμβρανών, ο λόγος για τον οποίο χρησιμοποιείται ευρέως σε πολλές φαρμακευτικές εφαρμογές, είναι και το χαμηλό της κόστος σε σχέση με άλλα φωσφολιπίδια, το ουδέτερο φορτίο της και η χημική της αδράνεια (Lis, McAlister, Fuller, Rand, & Parsegian, 1982). Η λεκιθίνη που προέρχεται από φυσικές πηγές είναι στην πραγματικότητα ένα μίγμα από μόρια φωσφατιδυλοχολίνης με διάφορες παράπλευρες υδρογονανθρακικές αλυσίδες, καθεμιά από τις οποίες διαφέρει ως προς το μέγεθος και τον αριθμό ακόρεστων δεσμών. Συνήθως, η φωσφατιδυλοχολίνη που προέρχεται από φυτικές πηγές έχει μεγαλύτερο αριθμό ακόρεστων δεσμών στις αλυσίδες της, από ότι η φωσφατιδυλοχολίνη που προέρχεται από ζωικές πηγές.

1.2.1.2 Θερμοκρασία μετάπτωσης φάσης (Phase transition temperature- T_m)

Οι μεμβράνες που αποτελούνται από μόρια φωσφατιδυλοχολίνης μπορεί να βρεθούν σε διαφορετικές φάσεις όταν βρίσκονται σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Η μετάβαση από τη μία φάση στην άλλη μπορεί να διαπιστωθεί με φυσικές μεθόδους κατά την αύξηση της θερμοκρασίας. Η πλέον διαδεδομένη τεχνική για τον προσδιορισμό της θερμοκρασίας μετάπτωσης είναι η θερμιδομετρία (Pentak, 2014).

Οι πιο συχνά παρατηρούμενες αλλαγές φάσης συμβαίνουν στην θερμοκρασία μετάπτωσης φάσης που ορίζεται ως η υψηλότερη θερμοκρασία, στην οποία η μεμβράνη αναδιατάσσεται από την οργανωμένη μορφή της γέλης (gel) ή του στερεού (solid) και μεταβαίνει σε υγρή κρυσταλλική δομή κατά την οποία οι βαθμοί ελευθερίας των μορίων είναι περισσότεροι. Αυτό φαίνεται ευκρινώς στην εικόνα 1.11. Σε γενικές γραμμές, αύξηση του μήκους της λιπαρής αλυσίδας ή αύξηση του κορεσμού της αλυσίδας οδηγεί σε αύξηση της T_m .



Εικόνα 1.11 Σχέση ανάμεσα στη φάση της μεμβράνης και τη θερμοκρασία

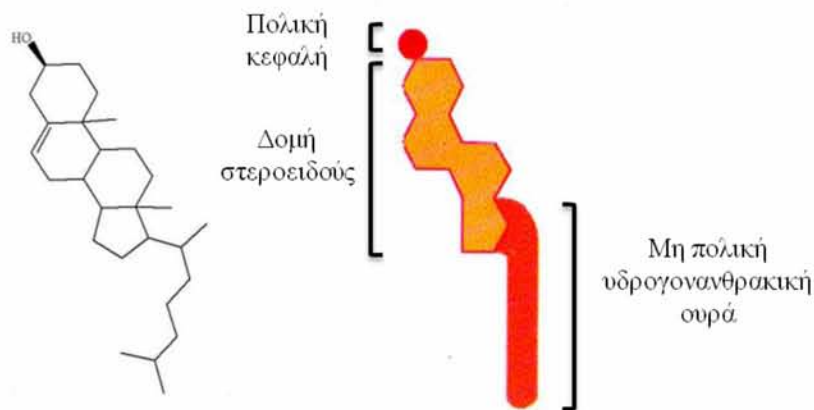
Η θερμοκρασία μετάπτωσης για τα φωσφολιπίδια που προέρχονται από κρόκο αυγού ποικίλλει μεταξύ -15°C (υψηλός βαθμός ακορεστότητας) έως πάνω από 50°C για πλήρη κεκορεσμένα φωσφολιπίδια όπως είναι η διστεαροϋλο-γλυκεροφωσφατιδυλοχολίνη (DSPC) (Chen, Han, Cai, & Tang, 2010). (Πίνακας 1.3)

ΤΥΠΟΣ	ΣΥΝΤΗΜΗΣΗ	ΦΟΡΤΙΟ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΦΑΣΗΣ, $T_m (^{\circ}\text{C})$
ΟΥΔΕΤΕΡΑ ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΑ			
Φωσφατιδυλοχολίνη	PC	0	35
Διστεαρόνιο- φωσφατιδυλοχολίνη (C 14)	DMPC	0	23
Διστεαρόνιο- φωσφατιδυλοχολίνη (C 16)	DPPC	0	41
Διστεαρόνιο- φωσφατιδυλοχολίνη (C 18)	DSPC	0	58
Σφιγγομυελίνη	SM	0	32
Φωσφατιδυλο-αιθανολαμίνη	PE	0	-
Διμυριστόνιο-φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη	DMPE	0	48
Διπαλμιτόνιο-φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη	DPPE	0	60
ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΑ			
Φωσφατιδυλοσερίνη	PS	<0	6 έως 8
Διπαλμιτόνιο-φωσφατιδυλοσερίνη	DPPS	-1	51
Φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη	PI	-1	-
Διμυριστόνιο-φωσφατιδυλογλυκερόλη	DMPG	-1	23
Διπαλμιτόνιο-φωσφατιδυλογλυκερόλη	DPPG	-1	41
Διπαλμιτόνιο-φωσφατιδικό οξύ	DPPA	-1	67

Πίνακας 1.3 Το φορτίο και η θερμοκρασία μετάπτωσης φάσης διαφόρων φωσφολιπιδίων που χρησιμοποιούνται στην παρασκευή των λιποσωμάτων.

1.2.2 Η χοληστερόλη και ο ρόλος της

Η χοληστερόλη αποτελεί βασικό συστατικό των βιολογικών μεμβρανών επιτελώντας σημαντικές λειτουργίες (McIntosh, 1978; Radhakrishnan & McConnell, 1999). Η χημική δομή της απεικονίζεται στην εικόνα 1.12.

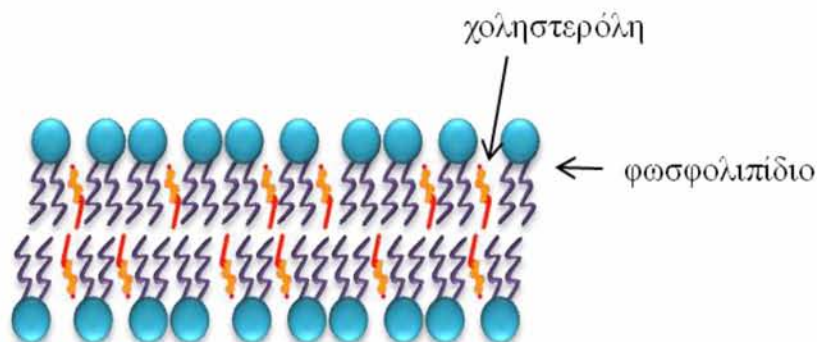


Εικόνα 1.12 Χημική δομή της χοληστερόλης, όπου φαίνεται η πολική και η μη πολική περιοχή

Είναι ένα από τα πιο σημαντικά, φυσιολογικώς ενεργά, στεροειδή, που συντίθεται στο ήπαρ από αιθανικό οξύ, μέσω μεβαλονικού οξέος και σκουαλενίου. Βρίσκεται σε όλους τους ιστούς, ιδιαίτερα στον εγκέφαλο. Περιέχει τέσσερις συμπυκνωμένους δακτυλίους, τρεις εξαμελείς και έναν πενταμελή. Η υδρόφιλη περιοχή της χοληστερόλης είναι αρκετά μικρή, αποτελούμενη από μία ενιαία ομάδα αλκοόλης. Στο αντίθετο άκρο της δομής των δακτυλίων υπάρχει μια μικρής αλυσίδας υδρογονανθρακική ουρά. Η χοληστερόλη δεν σχηματίζει από μόνη της διπλοστιβάδες, αλλά ενσωματώνεται σε φωσφολιπιδικές μεμβράνες επιφέροντας αλλαγές στις ιδιότητές τους π.χ. στη ρευστότητα και διαπερατότητά τους.

Στα λιποσώματα που χρησιμοποιούνται ως μοντέλα που προσομοιάζουν κυτταρικές μεμβράνες, συνήθως προστίθεται χοληστερόλη για διάφορους λόγους. Αρχικά, είναι γνωστό ότι η χοληστερόλη προσδίδει σταθερότητα στις διπλοστιβάδες των λιποσωμάτων, ιδίως όταν πρόκειται για ασταθή λιποσώματα (PC). Συγκεκριμένα, η χοληστερόλη ενσωματώνεται σε φωσφολιπιδικές μεμβράνες (εικόνα 1.13) επιφέροντας αλλαγές στις ιδιότητές τους π.χ. στη ρευστότητα και διαπερατότητά τους. Αυτό οφείλεται στη μεταβολή της κάμψης της αλυσίδας του φωσφολιπιδίου με αποτέλεσμα

να σχηματίζονται πιο συμπαγείς μεμβράνες σε σύγκριση με λιποσώματα των οποίων οι μεμβράνες δεν περιέχουν χοληστερόλη (Vemuri & Rhodes, 1995).



Εικόνα 1.13 Λιποσωμική διπλοστιβάδα που περιέχει και μόρια χοληστερόλης

Άλλοι λόγοι προσθήκης χοληστερόλης σε λιποσώματα μπορεί να είναι οι εξής:

- Η παρουσία χοληστερόλης στη μεμβράνη των λιποσωμάτων οδηγεί σε σημαντική αύξηση (ή μείωση) της σειράς προσανατολισμού των υδρογονανθρακικών αλυσίδων πάνω (ή κάτω) από τη θερμοκρασία μετάπτωσης φάσης και μείωση της γωνίας κλίσης της φωσφολιπιδικής αλυσίδας στη ρευστή φάση.
- Η χοληστερόλη μεταβάλλει τη θερμοκρασία μετάπτωσης φάσης των λιποσωμικών μεμβρανών, ανάλογα με την κατάσταση του λιπιδίου. Συγκεκριμένα, όταν το λιπίδιο βρίσκεται σε θερμοκρασίες υψηλότερες από την θερμοκρασία μετάπτωσης φάσης, η χοληστερόλη συμβάλλει στη μείωση της ελευθερίας των ανθρακικών αλυσίδων και τη συμπύκνωση τελικά της μεμβράνης και μείωση της ρευστότητάς της. Αντίθετα, χαμηλότερα από την θερμοκρασία μετάπτωσης φάσης, η απόσταση μεταξύ των φωσφολιπιδίων αυξάνεται, η οργάνωση των πολικών κεφαλών εξασθενεί και η ρευστότητα της μεμβράνης αυξάνει (Hjort Ipsen, Karlström, Mourtisen, Wennerström, & Zuckermann, 1987; Johnson, 1973).

1.2.3 Πλεονεκτήματα – μειονεκτήματα λιποσωμάτων

Τα λιποσώματα εκτός από το ότι είναι βιοαποικοδομήσιμα λόγω των φυσικών τους συστατικών, είναι ιδιαίτερα φιλικά τόσο για λιπόφιλα όσο και για υδρόφιλα μόρια. Λόγω του αμφίφιλου χαρακτήρα των λιπιδίων τους, μπορούν να μεταφέρουν υδατοδιαλυτά και μη υλικά και ταυτόχρονα να τα προφυλάσσουν από αποικοδόμηση, οξείδωση και άλλες χημικές διεργασίες, παρουσία ενζύμων, πρωτεϊνών, κτλ (Lim, Banerjee, & Önyüksel, 2012). Ένα επιπλέον πλεονέκτημα που πηγάζει από την φυσική δομή των λιποσωμάτων είναι το γεγονός ότι δεν είναι τοξικά ή αντιγονικά, ακριβώς επειδή αποτελούνται κυρίως από φωσφολιπίδια. Ακόμη, σημαντικό πλεονέκτημα των λιποσωμάτων θεωρείται το ότι η λιπιδική τους επιφάνεια αποτελεί κατάλληλο έδαφος για πολλών ειδών τροποποιήσεις, απαραίτητες για εξειδικευμένη χρήση των λιποσωμάτων, για παράδειγμα στην επιφάνεια τους μπορούν να προσδεθούν αντιγόνα, πρωτεΐνες, αντισώματα, μόρια πολυμερούς και πολλά άλλα είδη μορίων ανάλογα πάντα με τον σκοπό της λιποσωμικής παρασκευής.

Επίσης, με τροποποίηση της φαρμακοκινητικής τους, μέσω ρύθμισης της σύστασης τους, του μεγέθους τους και άλλων παραγόντων, προσφέρουν έλεγχο της απελευθέρωσης και του χρόνου παραμονής των ενώσεων που φέρουν στον οργανισμό. Στην περίπτωση της χρήσης των λιποσωμάτων σε φαρμακευτικά σκευάσματα, αυτό συνεπάγεται βελτίωση του φαρμακευτικού σχήματος, αφού μεγαλύτεροι χρόνοι παραμονής μειώνουν την συχνότητα των χορηγήσεων (Kulkarni & Vargha-Butler, 1995).

Από την πρώτη έγκριση του Αμερικανικού Οργανισμού Φαρμάκων του πρώτου λιποσωμικού συστήματος μεταφοράς φαρμάκου, της λιποσωμικής αμφοτερισίνης B το 1990, περισσότερα από 10 σκευάσματα λιποσωμικών φαρμάκων έχουν γίνει εμπορικά διαθέσιμα για να θεραπεύσουν διάφορες ασθένειες, από τον καρκίνο και τις

μυκητιασικές λοιμώξεις έως μυϊκές εκφυλίσεις. Έτσι τα λιποσωμικά συστήματα μεταφοράς φαρμάκων έχουν ωφελήσει πάνω από 10 εκατομμύρια ασθενών. Το μέσο κόστος και ο μέσος χρόνος που απαιτούνται για την ανάπτυξη ενός νέου φαρμάκου σε λιποσωμικό φορέα (περίπου 20-50 εκατομμύρια δολάρια και 3-4 χρόνια αντίστοιχα) είναι σημαντικά χαμηλότερα από την ανάπτυξη ενός νέου συμβατικού φαρμάκου (περίπου 500 εκατομμύρια δολάρια και πάνω από 10 χρόνια). Έτσι λοιπόν δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι στην αμερικανική αγορά τα προηγμένα λιποσωμικά φάρμακα έχουν αυξηθεί από 75 εκατομμύρια δολάρια το 2001 σε 121 εκατομμύρια το 2010 (Y. Zhang, Chan, & Leong, 2013) (πίνακας 1.4).

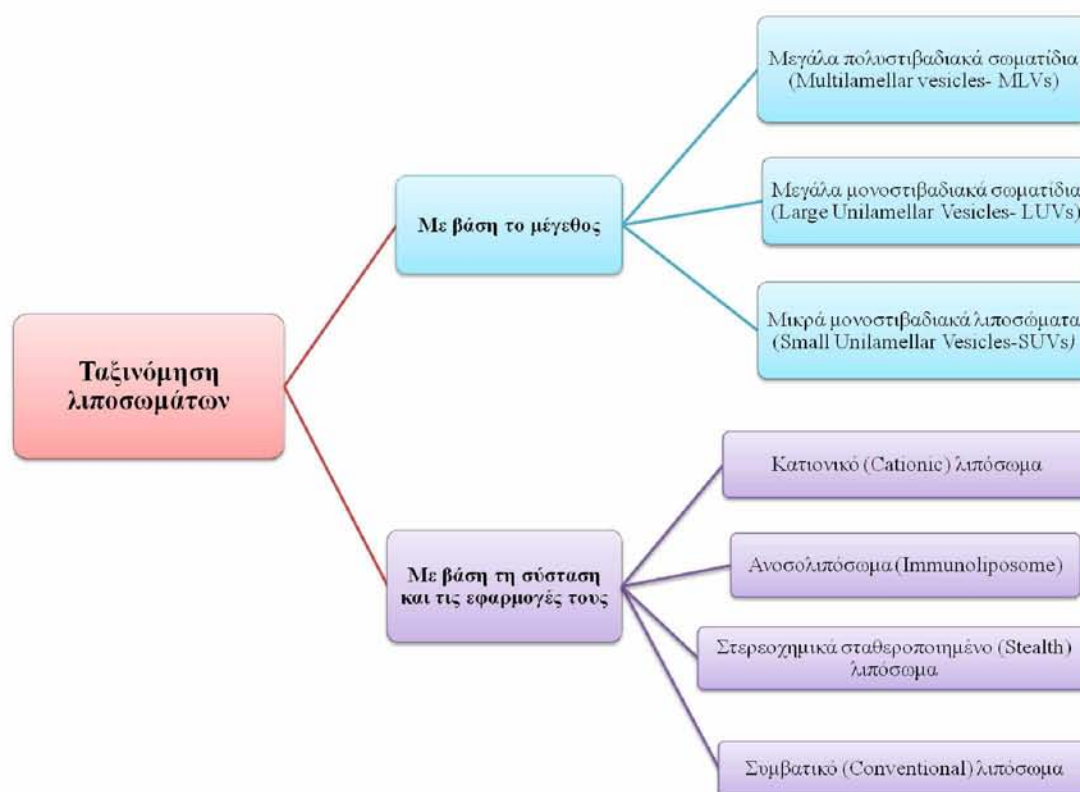
Το λιποσωμικό σύστημα μεταφοράς φαρμάκων διαθέτει ένα μεγάλο πλεονέκτημα έναντι άλλων κολλοειδών συστημάτων μεταφοράς: Επιτρέπει σχεδόν άπειρες πιθανότητες μεταβολής των δομικών και φυσικοχημικών χαρακτηριστικών. Αυτό το χαρακτηριστικό της ευελιξίας επιτρέπει στους επιστήμονες να τροποποιούν την *in vivo* συμπεριφορά των λιποσωμάτων.

Product name and category	Year of approval	Technology	Indication
> Doxil	1995	PEGylated liposomal doxorubicin	Various types of cancer
> Daunoxome	1996	Liposomal daunorubicin	Advanced HIV-associated Kaposi's sarcoma
> Ambisome	1997	Liposomal amphotericin B	Fungal infections
> Depocyt	1999	Liposomal cytarabine	Lymphomatous meningitis
> Visudyne	2000	Liposomal verteporfin	Age-related macular degeneration
> DepoDur	2004	Liposomal morphine sulfate	Postoperative pain

Πίνακας 1.4 Ενδεικτική λίστα με φάρμακα που βασίζονται στο λιποσωμικό σύστημα μεταφοράς εγκεκριμένα από τον Αμερικανικό Οργανισμό Φαρμάκων (Πηγή: Ιστοσελίδα του Αμερικανικού Οργανισμού Φαρμάκων: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda>).

Στα μειονεκτήματα των λιποσωμάτων συγκαταλέγεται το γεγονός ότι μόλις εισέλθουν στην κυκλοφορία του αίματος τείνουν να συσσωρεύονται κι έτσι προσλαμβάνονται γρήγορα από τα φαγοκύτταρα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος (ΔΕΣ), γεγονός που θεωρείται πλεονέκτημα αν η χορήγηση των λιποσωμάτων στοχεύει τα μακροφάγα, το ΔΕΣ ή τα ηπατικά κύτταρα Kupffer, αλλά μειονέκτημα αν σκοπός της χορήγησης είναι η κατανομή των λιποσωμάτων και των ενώσεων που μεταφέρουν σε άλλα σημεία και ιστούς του οργανισμού (Torchilin, 2005). Άλλο μειονέκτημα των λιποσωμάτων είναι η απελευθέρωση του υδατικού τους περιεχομένου μετά από αποσταθεροποίηση και διάρρηξη της λιπιδικής τους μεμβράνης, λόγω αλληλεπίδρασης με τις πρωτεΐνες του πλάσματος, κυρίως τις υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (HDL) και τις οψωνίνες. Επίσης, ανάλογα με την λιπιδική τους σύσταση και τις χημικές τους ιδιότητες, τα λιποσώματα μπορεί να χαρακτηρισθούν από μικρή ικανότητα φόρτωσης ενώσεων, μη ικανής να προκαλέσει την επιθυμητή φαρμακευτική απόκριση.

1.2.4 Ταξινόμηση των λιποσωμάτων



Εικόνα 1.14 Σχηματική απεικόνιση της κύριας ταξινόμησης των λιποσωμάτων βάση μεγέθους ή βάση της σύστασης και των εφαρμογών τους

1.2.4.1 Ταξινόμηση με βάση το μέγεθος

Με βάση το μέγεθος και τον αριθμό των στιβάδων τους, τα λιποσώματα διακρίνονται σε τρεις κύριες κατηγορίες: 1) Μεγάλα πολυστιβαδιακά σωματίδια (Multilamellar vesicles- MLVs), 2) Μεγάλα μονοστιβαδιακά σωματίδια (Large Unilamellar Vesicles- LUVs) και 3) Μικρά μονοστιβαδιακά λιποσώματα (Small Unilamellar Vesicles-SUVs)

1.2.4.1.1 Μεγάλα πολυστιβαδιακά σωματίδια (Multilamellar vesicles- MLVs)

Πρόκειται για τον απλούστερο τύπο λιποσωμάτων όσον αφορά την παρασκευή τους. Τα MLVs λιποσώματα αποτελούνται από έναν μεγάλο αριθμό παράλληλων,

ομόκεντρων φωσφολιπιδικών διπλοστιβάδων. Η κυριότερη μέθοδος παρασκευής MLV λιποσωμάτων είναι η μέθοδος του Bangham (μέθοδος εξάτμισης του διαλύτη- solvent evaporation method) (Bangham, Standish, & Watkins, 1965). Φάρμακα, καθώς και άλλες διαλυτές ενώσεις μπορούν να εγκλωβιστούν στα υδατικά μεσοδιαστήματα ανάμεσα στις μεμβράνες, ενώ τα υδρόφοβα τμήματά τους ή υδρόφοβα φάρμακα μπορούν να διαλυτοποιηθούν στο εσωτερικό της διπλοστιβάδας.

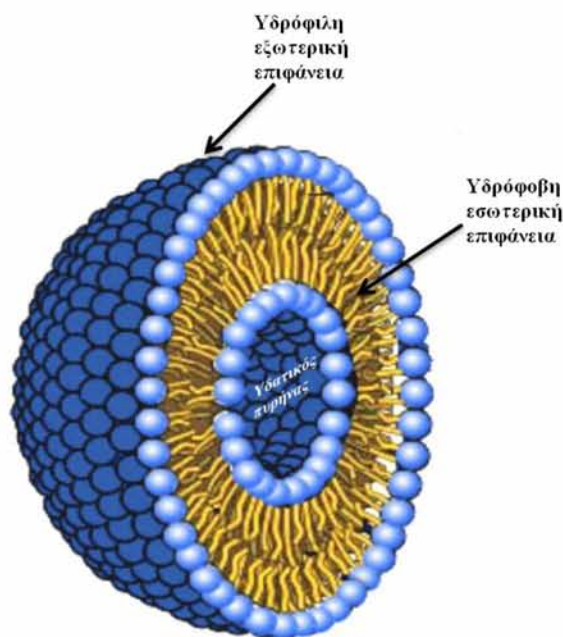
Τα λιποσώματα αυτά έχουν μεγάλες και ετερογενείς διαμέτρους (1-10 μ m), χαμηλή ικανότητα εγκλωβισμού όγκου ανά μόριο λιπιδίου και παρουσιάζουν πολλαπλά εσωτερικά διαμερίσματα (εικόνα 1.15). Η απόσταση μεταξύ των διαδοχικών διπλοστιβάδων καθορίζεται από την ισορροπία των ελκτικών δυνάμεων Van der Waals, ηλεκτροστατικών και άλλων δυνάμεων άπωσης. Όλα αυτά τα χαρακτηριστικά καθιστούν τη χρήση τους ως φορείς φαρμάκων και μεμβρανικά μοντέλα αρκετά πολύπλοκη. Στην εικόνα 1.15 παρουσιάζεται ένα πολυστιβαδιακό λιπόσωμα σε διατομή.



Εικόνα 1.15 Σχηματική απεικόνιση πολυστιβαδιακού λιποσώματος σε διατομή

1.2.4.1.2 Μεγάλα μονοστιβαδιακά σωματίδια (*Large Unilamellar Vesicles- LUVs*)

Τα λιποσώματα αυτά έχουν διάμετρο της τάξης των 1000 nm και είναι μονοστιβαδιακά (εικόνα 1.16). Ανάλογα με το επιθυμητό μέγεθος, τα LUVs μπορούν να παρασκευασθούν με διάφορες μεθόδους, όπως είναι η απομάκρυνση απορρυπαντικού, η μηχανική διασπορά και τα διφασικά συστήματα.

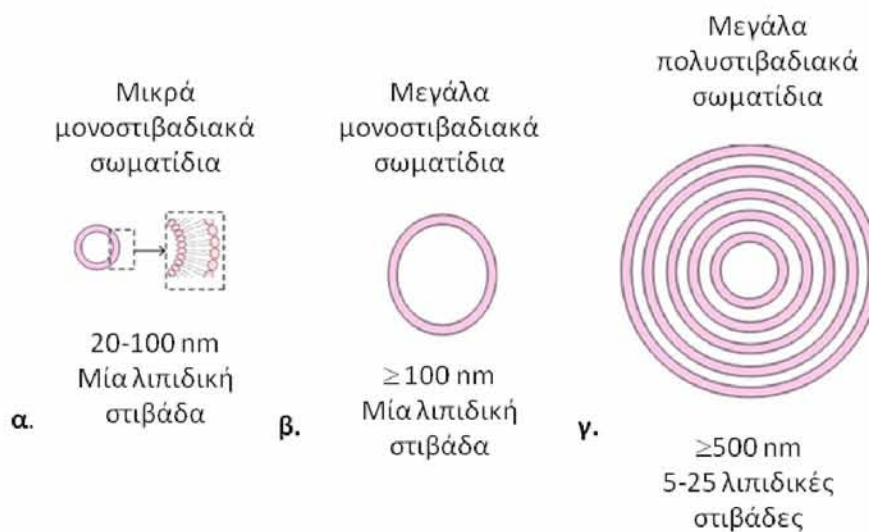


Εικόνα 1.16 Διατομή ενός μονοστιβαδιακού λιποσώματος.

Τα λιποσώματα αυτά θεωρούνται κατάλληλα για εγκλωβισμό υδατοδιαλυτών υλικών, αν και η παρουσία μιας μόνο λιπιδικής μεμβράνης έχει ως συνέπεια μικρότερη μηχανική σταθερότητα και συγκράτηση της ουσίας σε σχέση με τα MLVs. Ωστόσο, αυτός ο τύπος λιποσωμάτων κρίνεται αρκετά κατάλληλος για την ενεργή φόρτωση ιοντιζόμενων μορίων.

1.2.4.1.3 Μικρά μονοστιβαδιακά λιποσώματα (*Small Unilamellar Vesicles-SUVs*)

Τα SUVs λιποσώματα αποτελούνται μόνο από μια διπλοστιβάδα και έχουν διάμετρο 20-100nm. Διαθέτουν το μικρότερο δυνατό μέγεθος στο οποίο ένα φωσφολιπίδιο μπορεί να σχηματίσει λιποσωμική μορφή (εικόνα 1.17).

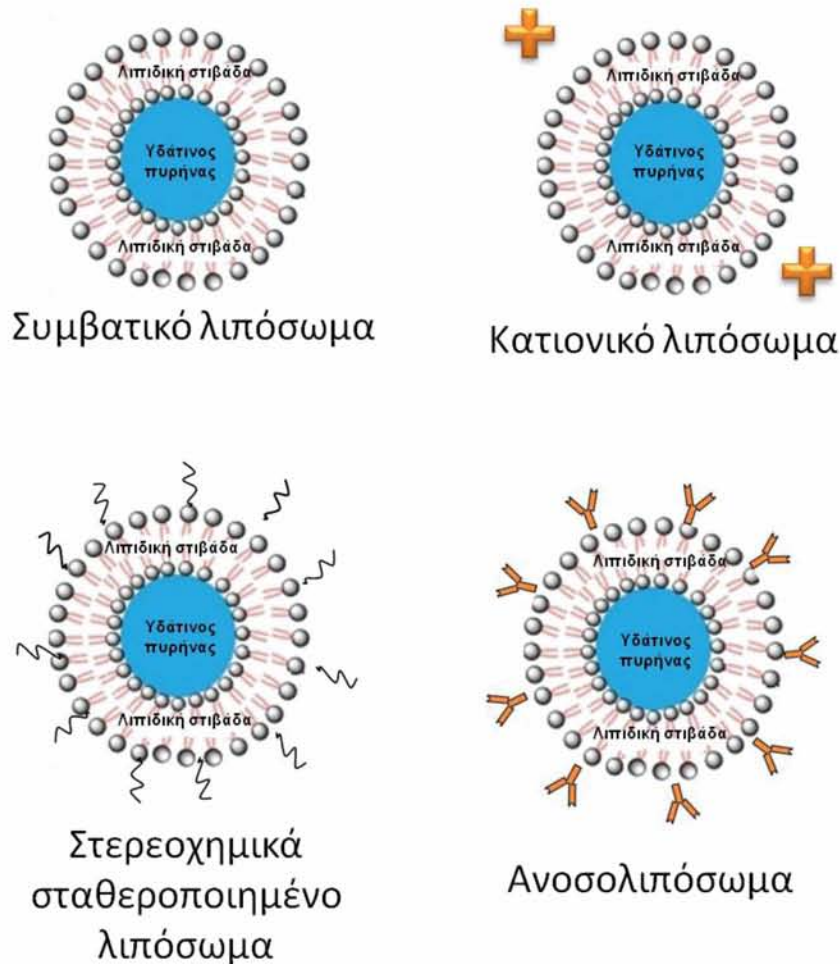


Εικόνα 1.17 Κατάταξη λιποσωμάτων με βάση το μέγεθος και τον αριθμό των στοιβάδων τους

Η δυνατότητα αυτή εξαρτάται από την ιονική ισχύ του διαλύματος φωσφολιπιδίου και από τη λιπιδική σύσταση των μεμβρανών. Πρόκειται για θερμοδυναμικά ασταθή λιποσώματα που είναι επιρρεπή σε συσσωμάτωση και σύντηξη, ιδίως κάτω από τη θερμοκρασία μετάπτωσης φάσης. Οι μέθοδοι παρασκευής SUV λιποσωμάτων είναι (i) η κατεργασία με υπέρηχους και (ii) η μέθοδος διαδοχικών κύκλων ψύξης - απόψυξης (freeze - thaw).

1.2.4.2 Ταξινόμηση με βάση τη σύσταση και τις εφαρμογές τους

Με βάση τη σύνθεση και την επιθυμητή *in vivo* εφαρμογή, τα λιποσώματα διακρίνονται σε τέσσερις μεγάλες κατηγορίες (εικόνα 1.18): Συμβατικό (Conventional) λιπόσωμα, Κατιονικό (Cationic) λιπόσωμα, Στερεοχημικά σταθεροποιημένο (Stealth) λιπόσωμα, Ανοσολιπόσωμα (Immunoliposome) (εικόνα 1.18) (Safinya & Ewert, 2012; Storm & Crommelin, 1998).



Εικόνα 1.18 Κατάταξη λιποσωμάτων με βάση τη σύσταση και τις εφαρμογές του.

1.2.4.2.1 Συμβατικά λιποσώματα

Στην κατηγορία αυτή μπορούν να συμπεριληφθούν λιποσώματα που αποτελούνται μόνο από φωσφολιπίδια (ουδέτερα ή/και αρνητικά φορτισμένα) ή/και χοληστερόλη. Πρόκειται για την πλέον χρησιμοποιούμενη κατηγορία λιποσωμάτων στη μεταφορά φαρμάκων. Διαφέρουν ως προς τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, όπως το μέγεθος, τη λιπιδική σύσταση, το επιφανειακό φορτίο και τον αριθμό και ρευστότητα των λιπιδικών διπλοστιβάδων.

Τα συμβατικά λιποσώματα χαρακτηρίζονται από σχετικά μικρό χρόνο κυκλοφορίας στο αίμα. Όταν χορηγούνται *in vivo* (συχνά ενδοφλέβια) έχουν την τάση να συσσωρεύονται γρήγορα στα φαγοκύτταρα του μονοκυτταρικού συστήματος

φαγοκυττάρων, γνωστό επίσης και ως δικτυοενδοθηλιακό σύστημα (Reticuloendothelial system- RES). Τα κύρια όργανα συσσώρευσης είναι το ήπαρ και ο σπλήνας. Το γεγονός αυτό έχει αποτελέσει στόχο για διάθεση φαρμάκων μέσω λιποσωμάτων σε μολυσμένα μακροφάγα. Επιπλέον, τα συμβατικά λιποσώματα έχουν χρησιμοποιηθεί για μεταφορά αντιγόνων. Λιποσωμικά εμβόλια έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικά κατά ιικών, βακτηριακών και παρασιτικών μολύνσεων καθώς επίσης και εναντίον όγκων (Alving, 1991; Arias, 2013; Ghaffar, Giddam, Zaman, Skwarczynski, & Toth, 2014).

1.2.4.2.2 Στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα (*Stealth liposomes*)

Τα μακράς διαρκείας ή στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα (*Stealth, Long Circulating, Sterically stabilized liposomes*), ονομάζονται και λιποσώματα δεύτερης γενιάς και χρησιμοποιούνται επί χρόνια ως φορείς φαρμάκων και στόχευσης ιστών. Έχουν την ικανότητα να βγαίνουν εκτός κυκλοφορίας σε περιοχές όπου η διαπερατότητα του αγγειακού τοιχώματος είναι αυξημένη, λόγω του ότι οι περιοχές αυξημένης τριχοειδικής διαπερατότητας περιλαμβάνουν παθολογικές περιοχές, όπως στέρεους όγκους και περιοχές μολύνσεως και φλεγμονής. Ο πιο δημοφιλής τρόπος παραγωγής τέτοιων λιποσωμάτων είναι η ομοιοπολική σύνδεση του πολυμερούς πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) στην εξωτερική επιφάνεια

1.2.4.2.3 Ανοσολιποσώματα

Τα ανοσολιποσώματα διαθέτουν ειδικά αντισώματα ή κλάσματα αντισωμάτων (Fab ή αντισώματα μονής αλυσίδας) στην επιφάνειά τους προκειμένου να ενισχύσουν τη στοχευμένη εντόπιση. Όπως και άλλα σωματίδια στην κυκλοφορία του αίματος, είναι δύσκολο στα ανοσολιποσώματα να εγκαταλείψουν την κυκλοφορία σε άλλα διαμερίσματα πλην του ήπατος και του σπλήνα. Γι' αυτό, προκειμένου να εξασφαλιστεί

η προσέγγιση των υποδοχέων, επιχειρείται τοπική χορήγηση των λιποσωμάτων στις σωματικές κοιλότητες.

1.2.4.2.4 Κατιονικά λιποσώματα

Τα κατιονικά λιποσώματα αποτελούνται από κατιονικά λιπίδια όπως η διολευλοφωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (DOPE). Τα συστατικά των λιποσωμάτων αυτών αντιδρούν με το DNA, παρουσιάζουν μεγάλη συγγένεια σύνδεσης με τις κυτταρικές μεμβράνες και χρησιμοποιούνται ως συστήματα μεταφοράς γενετικού υλικού στον πυρήνα.

1.2.5 Μέθοδοι παρασκευής λιποσωμάτων

Υπάρχουν διάφορες τεχνικές παρασκευής λιποσωμάτων που επιλέγονται ανάλογα με την προς εγκλωβισμό βιοδραστική ένωση, το επιθυμητό ποσοστό εγκλωβισμού και την τελική μορφή των λιποσωμάτων που θέλουμε να παρασκευάσουμε. Ποικίλες μελέτες έχουν δημοσιευτεί για να περιγράψουν και να συγκρίνουν διάφορες μεθόδους για την παρασκευή των λιποσωμάτων (Akbarzadeh, Rezaei-Sadabady, Davaran, Joo, Zarghami, Hanifehpour, et al., 2013; Mozafari, 2005; Patil & Jadhav, 2014).

1.2.5.1 Μηχανική διασπορά

Με αυτή την τεχνική, που είναι και η πιο απλή, σχηματίζεται λεπτό υμένιο (thin film) κατά την εξάτμιση οργανικού ή μείγμα οργανικών διαλυτών, στους οποίους έχει προηγουμένως διαλυθεί το λιπίδιο. Η θερμοκρασία κατά την εξάτμιση του διαλύτη πρέπει να παραμένει πάνω από το T_m και αφού σχηματιστεί το λεπτό υμένιο για την πιστοποίηση της απομάκρυνσης όλου του όγκου του διαλύτη και για να αποφευχθεί η

χημική αποικοδόμηση του λιπιδίου π.χ. οξείδωση, το εσωτερικό της σφαιρικής φιάλης στο οποίο σχηματίζεται το λεπτό υμένιο, εφαρμόζεται ρεύμα αζώτου.

Η ενυδάτωση (hydration) του υμενίου που ακολουθεί πραγματοποιείται με νερό ή με ρυθμιστικό διάλυμα ή με διάλυμα της προς εγκλωβισμό βιοδραστικής ουσίας. Και σε αυτό το στάδιο, όπως και το στάδιο της εξάτμισης των διαλυτών, η θερμοκρασία πρέπει να παραμένει πάνω από την T_m . Για αυτόν τον λόγο το διάλυμα που προορίζεται για την ενυδάτωση έχει προθερμανθεί σε αυτή τη θερμοκρασία και η προσθήκη αυτού στη σφαιρική φιάλη γίνεται εντός υδατόλουτρου. Με μηχανική ανάδευση της φιάλης (vortex) το υμένιο αποκολλάται από τα τοιχώματά της, οπότε λαμβάνεται μια θολερή διασπορά με πολυστιβαδικά λιποσώματα μεγάλου μεγέθους MLV. Η μείωση του μεγέθους των MLVs λιποσωμάτων και η δημιουργία ομοιογενούς σε αναφορά με το μέγεθος πληθυσμού, υλοποιείται με τη χρήση κυρίως λουτρού υπερήχων (bath sonicator), αλλά και διαφόρων άλλων τεχνικών, όπως εξώθηση μέσω φίλτρων ή μεμβρανών (extrusion), μικρογαλακτοποίηση (microemulcification). Στο τελευταίο στάδιο πραγματοποιείται η διαδικασία της ομαλοποίησης (annealing), κατά την οποία τα λιποσώματα τοποθετούνται σε υδατόλουτρο και πάντα σε θερμοκρασία υψηλότερη αυτής της μετάπτωσης του λιπιδίου, όπου παραμένουν για μία περίπου ώρα ώστε να ολοκληρωθεί και να ομαλοποιηθεί η μορφοποίηση της δομής τους. Η διάμετρος των λιποσωμάτων που λαμβάνονται με την μέθοδο αυτή κυμαίνεται από 5 έως 6 μm .

1.2.5.2 Υπερήχηση

Τα λιποσώματα που λαμβάνονται μετά από την ενυδάτωση του φιλμ είναι MLV και για την μετατροπή τους σε SUV γίνεται χρήση ακίδας υπερήχων. Δεδομένου ότι αυτά τα σωματίδια θα σπάσουν ολοκληρωτικά στην πορεία, δεν είναι απαραίτητο να ληφθεί ιδιαίτερη προσοχή σχετικά με το αρχικό μέγεθος των MLV λιποσωμάτων, το

ποσοστό εγκλωβισμού και το πάχος του λιπιδικού υμενίου. Η ακίδα υπερήχων προτιμάται για διασπορές που απαιτούν υψηλή ενέργεια σε μικρό όγκο (π.χ. υψηλές συγκεντρώσεις λιπιδίου, ή παχύρρευστη υδατική φάση), ενώ το λουτρό υπερήχων είναι περισσότερο κατάλληλο για μεγάλους όγκους διαλυμένου λιπιδίου και για περιπτώσεις που δεν είναι απαραίτητη η απόδοση οριακού μεγέθους σωματιδίων. Μετά την εφαρμογή της ακίδας υπερήχων, ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 15.000 g για δέκα λεπτά προκειμένου να απομακρυνθούν τα ρινίσματα τιτανίου που αποκολλήθηκαν από την ακίδα υπερήχων λόγω τριβής της στη διασπορά και όση ποσότητα αδιάσπαρτου λιπιδίου και MLV.

1.2.5.3 Παρασκευή αφυδατωμένων – ενυδατωμένων σωματιδίων (DRVs)

Τα αφυδατωμένα- ενυδατωμένα λιποσώματα (dried-rehydrated vesicles-DRVs) τα οποία αναπτύχθηκαν αρχικά από τους Kirby & Gregoriadis το 1984 (Kirby & Gregoriadis, 1984), είναι ικανά να εγκλωβίζουν μεγάλες ποσότητες υδατοδιαλυτών μορίων κάτω από ήπιες συνθήκες (π.χ. συνθήκες που δεν προκαλούν αποικοδόμηση ή απώλεια ενεργότητας των υπό εγκλωβισμό ουσιών).

Σύμφωνα με την τεχνική αυτή, πραγματοποιείται λυοφιλοποίηση (freeze - drying) διασποράς άδειων SUV λιποσωμάτων παρουσία διαλύματος της προς εγκλωβισμό ουσίας. Εδώ, σε αντίθεση με την κλασική παρασκευή μέσω εξάτμισης του διαλύτη όπου τα μόρια του λιπιδίου είναι σε τυχαία κατανομή, το λιπίδιο το οποίο βρίσκεται στα κενά SUV είναι πολύ καλά οργανωμένο στη δομή της μεμβράνης. Έτσι, κατά την προσθήκη του υδατικού μέσου σχηματίζονται λιποσώματα με υψηλή ικανότητα εγκλωβισμού και διάμετρο από 400 nm μέχρι μερικά μm .

Μερικά από τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι: η απλότητα στη χρήση, οι ήπιες συνθήκες που χρησιμοποιούνται (σημαντικές για ευαίσθητα μόρια), και η υψηλή ικανότητα εγκλωβισμού για μεγάλη ποικιλία ουσιών. Η απλότητα της μεθόδου καθιστά

ιδιαίτερα δυνατή την διαδικασία scale-up προκειμένου για εφαρμογή στη φαρμακευτική βιομηχανία. Η πιθανότητα διακοπής της διαδικασίας μετά το στάδιο της αφυδάτωσης και η αποθήκευση κάτω από ειδικές συνθήκες αποτελεί ένα επιπλέον πλεονέκτημα. Σε αντίθεση με τη διασπορά ενός στεγνού λιπιδικού υμενίου, η ανασύσταση του λυοφιλοποιημένου προϊόντος είναι εξαιρετικά ταχεία. Η DRV μέθοδος διαφέρει από τις περισσότερες άλλες μεθόδους υψηλής ικανότητας εγκλωβισμού στο ότι παράγεται μεγάλη αναλογία όλιγο- και πολυστιβαδιακών λιποσωμάτων.

Η ύπαρξη λιποσωμάτων με πολλές στοιβάδες έχει το πλεονέκτημα ότι μειώνει το ρυθμό απώλειας της εγκλωβισμένης ουσίας παρουσία πρωτεϊνών ορού. Ο κύριος περιορισμός της μεθόδου, ο οποίος είναι κοινός και σε άλλες μεθόδους που παράγουν μεγάλα λιποσώματα είναι το γεγονός ότι τα DRV λιποσώματα τείνουν να παρουσιάζουν ετερογένεια όσον αφορά το μέγεθος. Η ομοιογένεια στο μέγεθος μπορεί να μη θεωρείται απαραίτητη για φαρμακευτικούς σκοπούς, αλλά είναι σημαντική για την επαναληψιμότητα πειραμάτων. Τα DRVs μπορούν να μετατραπούν σε πιο ομοιογενείς παρασκευές αν χρειαστεί, χρησιμοποιώντας συνδυασμό φίλτρων και διαπίδυσης (Rodriguez-Nogales, 2004).

Η παρασκευή DRV λιποσωμάτων είναι η μέθοδος εκλογής όταν επιθυμούμε να παρασκευάσουμε λιποσώματα για εγκλωβισμό ευαίσθητων πρωτεϊνικών μορίων ή ενζύμων. Η αυξημένη ικανότητα εγκλωβισμού αυτού του τύπου λιποσωμάτων έγκειται στο γεγονός ότι η δημιουργία «κενών» μικρών μονοκυστιδιακών σωματιδίων αποδιατάσσονται κατά την διάρκεια του σταδίου ψύξης- απόψυξης παρουσία του διαλύματος που λαμβάνει χώρα ο εγκλωβισμός. Συνεπώς, κατά την διάρκεια της ελεγχόμενης επανενυδάτωσης, η οποία λαμβάνει χώρα στο επιθυμητό υδατικό διάλυμα για τον εγκλωβισμό, τα σωματίδια συντήκονται σε μεγάλα μονοκυστιδιακά σωματίδια

που έχουν την ικανότητα να εγκλωβίζουν μεγάλες ποσότητες υδατικού διαλύματος (Ntimenou, Mourtas, Christodoulakis, Tsilimbaris, & Antimisiaris, 2006).

1.2.5.4 Μέθοδος Ψύξης-Απόψυξης (Freeze-Thaw)

Η προηγούμενη DRV μέθοδος είναι παραλλαγή μίας άλλης παρόμοιας μεθόδου που αναπτύχθηκε νωρίτερα από τον (Pick, 1981), κατά την οποία το προς εγκλωβισμό υλικό εισάγεται στα λιποσώματα επίσης μετά το σχηματισμό τους. Σε αυτή την περίπτωση ακολουθείται μία πορεία επαναλαμβανόμενης ψύξης – απόψυξης για τη διάρρηξη των SUV λιποσωμάτων, κατά τη διάρκεια της οποίας η διαλυμένη ουσία εξισορροπείται μεταξύ εσωτερικού και εσωτερικού, ενώ τα λιποσώματα συντήκονται και αυξάνουν σε μέγεθος. Έτσι επιτυγχάνονται ποσοστά εγκλωβισμού μέχρι και 30%. Τα λιποσώματα που παράγονται με τη μέθοδο αυτή παρουσιάζουν σημαντικά μειονεκτήματα σε σύγκριση με τα DRV λιποσώματα. Το κυριότερο είναι ότι δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ουδέτερα λιπίδια και ειδικά το PC, γιατί πιθανώς η παρουσία φορτίου απαιτείται για το σχηματισμό των κρυστάλλων κατά τη διαδικασία της ψύξης, που βοηθούν στη συνέχεια την πορεία θραύση/ σύντηξη. Για παρόμοιους λόγους η σακχαρόζη, δισθενή μεταλλικά ιόντα (που μπορούν να εξουδετερώνουν το επιφανειακό φορτίο) και υψηλής ιονικής ισχύος διαλύματα αλάτων δεν μπορούν να εγκλωβιστούν αποτελεσματικά. Ωστόσο, η μέθοδος είναι πολύ απλή, ταχεία, ήπια και καταλήγει σε μεγάλα μονοστιβαδικά σωματίδια, χρήσιμα για τη μελέτη φαινομένων μεταφοράς μέσω μεμβρανών.

1.2.5.5 Εξώθηση MLV και SUV λιποσωμάτων μέσω φίλτρων

Η μείωση του μεγέθους στο επιθυμητό μέγεθος επιτυγχάνεται με τη χρήση φίλτρων των οποίων οι πόροι έχουν συγκεκριμένη διάμετρο. Ανάλογα με το επιθυμητό τελικό μέγεθος επιλέγεται και το φίλτρο με το ανάλογο μέγεθος πόρων. Η μέθοδος

παρέχει επαναλήψιμα αποτελέσματα κάτι που αποτελεί και το πλεονέκτημά της έναντι άλλων μεθόδων, ενώ το λιπίδιο δεν υφίσταται κάποια σημαντική μεταβολή. Επιπλέον μπορεί να διπλασιαστεί το ποσοστό εγκλωβισμού διαφόρων ουσιών. Η εξώθηση μέσω φίλτρων διαμέτρου 0,2 μm οδηγεί σε εξαιρετικά ομοιογενείς πληθυσμούς λιποσωμάτων διαμέτρου 270 nm (Morton, Saludes, & Yin, 2012; Olson, Hunt, Szoka, Vail, & Parahadjopoulos, 1979).

1.2.5.6 Χρήση μικρογαλακτωματοποιητή

Για την παρασκευή λιποσωμάτων μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν γαλακτωματοποιητές. (Mayhew, Lazo, Vail, King, & Green, 1984) Οι μικρογαλακτωματοποιητές είναι συσκευές που αντλούν τα λιποσώματα με πολύ υψηλές πιέσεις (μέχρι και 1000 p.s.i., 600-700 bar) μέσα από φίλτρα διαμέτρου 5 μm . Τα λιπίδια εισάγονται στο μικρογαλακτωματοποιητή με την μορφή εναιωρήματος μεγάλων λιποσωμάτων MLV ή με τη μορφή μη ενυδατωμένου λιπιδίου εντός υδατικού μέσου. Με την τεχνική αυτή παρασκευάζονται μικρά σε μέγεθος λιποσώματα με καλή κατανομή μεγέθους 100-200 nm (micro-emulsification liposomes- MEL). Οι γαλακτωματοποιητές μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στη βιομηχανική παραγωγή για την παρασκευή μεγάλων ποσοτήτων λιποσωμάτων (Vemuri & Rhodes, 1995).

1.2.5.7 Εξώθηση με θάλαμο εφαρμογής υψηλής πίεσης

Η τεχνική περιλαμβάνει την εισαγωγή προσχηματισμένων μεγάλων λιποσωμάτων σε θάλαμο υπό υψηλή πίεση (20000-40000 p.s.i.) και αποδίδει ομογενείς μόνο- ή όλιγο- στιβαδικές λιποσωμικές διασπορές ενδιάμεσων μεγεθών (30-80 nm σε διάμετρο ανάλογα με την εφαρμοζόμενη πίεση) (Barenholz, Amselem, & D, 1979). Τα λιποσώματα που λαμβάνονται με τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται για τη μεταφορά

ευαίσθητων μακρομορίων και είναι σταθερά από τα κατεργασμένα με υπερήχους λιποσώματα.

1.2.5.8 Ένεση λιπιδίων

Περιλαμβάνει μεθόδους κατάλληλες για την παρασκευή SUV και LUV λιποσωμάτων. Διάλυμα λιπιδίου σε οργανικό διαλύτη ενίεται ταχέως σε περίσσεια υδατικού μέσου που περιέχει την ουσία που πρόκειται να εγκλωβιστεί στα λιποσώματα. Στη διεπιφάνεια μεταξύ νερού και οργανικού διαλύτη, τα φωσφολιπίδια αυτοδιατάσσονται σε λιποσώματα μικρής διαμέτρου. Τα πλεονεκτήματα των μεθόδων αυτών είναι η εύκολη εφαρμογή τους και ο περιορισμένος κίνδυνος αποικοδόμησης των λιπιδίων. Μειονέκτημα των μεθόδων αυτών είναι το χαμηλό ποσοστό εγκλωβισμού για υδατοδιαλυτές ουσίες.

1.2.6 Χαρακτηρισμός λιποσωμάτων

Ο χαρακτηρισμός των λιποσωμάτων τόσο μετά την παρασκευή τους όσο και κατά την αποθήκευσή τους είναι απαραίτητος προκειμένου να εξασφαλιστεί ο έλεγχος της ποιότητας του παρασκευάσματος. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον χαρακτηρισμό πρέπει να είναι σχετικά φθηνές, γρήγορες και επαναλήψιμες.

Οι φυσικές ιδιότητες των λιποσωμάτων μας βοηθούν να χαρακτηρίσουμε την συμπεριφορά τους. Οι ιδιότητες που μελετώνται κυρίως είναι:

1. Προσδιορισμός του ποσοστού του εγκλωβισμένου φαρμάκου στο λιπόσωμα.
2. Το μέγεθος και η κατανομή αυτού

1.2.6.1 Προσδιορισμός του ποσοστού του εγκλωβισμένου μορίου στο λιπόσωμα.

Ο βαθμός εγκλωβισμού ενός μορίου στα λιποσώματα μπορεί να προσδιοριστεί με τεχνικές χρωματογραφίας στήλης ή με άλλες τεχνικές ανάλογα με την φύση της εγκλωβιζόμενης ουσίας. Το λιποσωμικό παρασκεύασμα είναι ένα μίγμα κλασμάτων εγκλωβισμένου και μη εγκλωβισμένου μορίου. Το κλάσμα της μη εγκλωβισμένης ουσίας αναφέρεται ως "ελεύθερη ουσία". Στην πλειοψηφία των τεχνικών ο διαχωρισμός της ελεύθερης από την εγκλωβισμένη ουσία για τον προσδιορισμό του ποσοστού εγκλωβισμού αποτελεί το πρώτο πειραματικό βήμα. Στη συνέχεια στο κλάσμα που περιέχει την εγκλωβισμένη ουσία προστίθενται ένα απορρυπαντικό ή ένας οργανικός διαλύτης (εάν πρόκειται για λιπόφιλη ουσία) προκειμένου να διασπαστούν τα λιποσώματα και αφού η εγκλωβιζόμενη ουσία απελευθερωθεί, μπορεί έπειτα να ποσοτικοποιηθεί με διάφορες τεχνικές, μία από τις οποίες είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (High-performance liquid chromatography- HPLC).

Το ποσοστό του εγκλωβιζόμενου μορίου μπορεί να υπολογισθεί και έμμεσα ως το ποσοστό της ποσότητας του μορίου που δεν εγκλωβίστηκε στα λιποσώματα σε σχέση με την ολική ποσότητα του μορίου που προστέθηκε κατά την παρασκευή και την διαδικασία εγκλωβισμού. Όταν πρόκειται για πρωτεϊνικό μόριο ο προσδιορισμός του ελεύθερου μορίου μπορεί να λάβει χώρα με την τεχνική της φασματοσκοπίας φθορισμού (Ntimenou, Mourtas, Christodoulakis, Tsilimbaris, & Antimisiaris, 2006).

Τέλος ο εγκλωβισμός, όχι ποσοτικά αλλά ποιοτικά, ενός μορίου σε έναν λιποσωμικό φορέα μπορεί να προσδιοριστεί και να εκτιμηθεί και με τις επιπρόσθετες τεχνικές όπως είναι: η φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier transform infrared spectroscopy-FT-IR) (Mady, Shafaa, Abbase, & Fahium, 2012) και η θερμιδομετρία διαφορικής σάρωσης υπό αδρανείς συνθήκες (Differential Scanning

Calorimetry- DSC) (Gokce, Korkmaz, Tuncay-Tanriverdi, Deller, Sandri, Cristina Bonferoni, et al., 2012).

1.2.6.2 Μέτρηση μεγέθους λιποσωμάτων

Το μέσο μέγεθος και η κατανομή του μεγέθους των λιποσωμάτων αποτελούν ιδιαίτερα σημαντικές παραμέτρους όταν τα λιποσώματα προορίζονται για θεραπευτική χρήση και ιδιαίτερα όταν χορηγούνται παρεντερικά ή με εισπνοή. Για τον προσδιορισμό του μεγέθους των λιποσωμάτων υπάρχει μια ποικιλία τεχνικών που διαφέρουν μεταξύ τους τόσο στην πολυπλοκότητα όσο και στις βασικές αρχές τους με τις βασικότερες να είναι οι:

- Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) (Park, Choi, Davaa, & Park, 2011)
- Δυναμική σκέδαση φωτός (Dynamic Light Scattering-DLS) (Nasrollahi, Sharifi, & Barahe, 2014)

1.2.7 Σταθερότητα λιποσωμάτων

Τα λιποσώματα είναι ετερογενή στο μέγεθός τους και παρουσιάζουν προβλήματα χημικής και φυσικής σταθερότητας. Η κατανομή μεγέθους των λιποσωμάτων για παράδειγμα μεταβάλλεται κατά την αποθήκευσή τους, ενώ τείνουν να συντήκονται και να σχηματίζουν μεγαλύτερα σωματίδια. Η σύντηξη και η αποικοδόμηση των λιποσωμάτων κατά την αποθήκευσή τους δημιουργεί σοβαρά προβλήματα λόγω διαφυγής του φαρμάκου από το λιπόσωμα. Επίσης η αλληλεπίδραση του φαρμάκου με το λιπόσωμα δημιουργεί επιπλέον προβλήματα χημικής σταθερότητας. Από χημικής πλευράς είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα σε υδρολυτικές και οξειδωτικές αντιδράσεις. Άλλοι παράγοντες που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη πριν

από το ξεκίνημα μιας μελέτης σταθερότητας είναι οι συνθήκες παρασκευής των λιποσωμάτων, αλλά και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που ενδεχομένως να επηρεάσουν τη σταθερότητα του παρασκευάσματος. Στις συνθήκες παρασκευής των λιποσωμάτων περιλαμβάνονται το pH, το είδος του ρυθμιστικού διαλύματος, η ιονική ισχύς και το σύστημα διαλυτών. Η επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων όπως η θερμοκρασία, το φως, το οξυγόνο και διάφορων μεταλλικών ιόντων από την άλλη πλευρά μπορεί να προκαλέσει χημικές ή φυσικές αντιδράσεις. Οι αντιδράσεις αυτές περιλαμβάνουν αλλαγές στο μέγεθος των σωματιδίων, οξείδωση και υδρόλυση των λιπιδίων.

1.2.7.1 Χημική σταθερότητα

Η βασική μονάδα των λιποσωμάτων, το λιπίδιο προέρχεται από φυσικές ή συνθετικές πηγές φωσφολιπιδίων. Τα φωσφολιπίδια τα οποία περιέχουν μη κορεσμένα λιπαρά οξέα είναι γνωστό ότι υφίστανται συχνά οξειδωτική αντίδραση. Τα προϊόντα της αντίδρασης αυτής μπορεί να προκαλέσουν αλλαγές στη διαπερατότητα της διπλοστιβάδας των λιποσωμάτων. Έχει βρεθεί ότι η υπεροξείδωση και η υδρόλυση των λιπιδίων είναι βασική αιτία για την αποικοδόμηση των λιποσωμάτων. Η οξειδωτική αποικοδόμηση των λιποσωμάτων μπορεί να αποφευχθεί με την προστασία των λιπιδικών παρασκευασμάτων από το φως, με την προσθήκη αντιοξειδωτικών όπως η τοκοφερόλη, με την προσθήκη EDTA για την απομάκρυνση βαρέων μετάλλων ή με την παρασκευή των λιποσωμάτων σε περιβάλλον αζώτου ή αργού. Επίσης η υδρόλυση των λιπιδίων οδηγεί στο σχηματισμό λυσο-φωσφατιδυλοχολίνης, η παρουσία της οποίας αυξάνει τη διαπερατότητα των λιποσωμάτων. Γι' αυτό πρέπει η συγκέντρωση της να διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα. Ο έλεγχος της χημικής σταθερότητας μπορεί να επιτευχθεί με την τεχνική της διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης υπό οξειδωτικές

συνθήκες (Differential Scanning Calorimetry- DSC) (Gortzi, Lalas, Chinou, & Tsaknis, 2006).

1.2.7.2 Φυσική σταθερότητα

Η σύντηξη των λιποσωμάτων και η διαρροή των εγκλωβισμένων σ' αυτά ουσιών, μπορεί να οφείλεται σε κάποια ελαττώματα στη τοποθέτηση των λιπιδίων της μεμβράνης, τα οποία προκαλούνται κατά τη διάρκεια της παρασκευής τους. Αυτό μπορεί να αποφευχθεί με τη διαδικασία του «annealing», η οποία αποτελεί την επώαση των λιποσωμάτων σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από τη θερμοκρασία μετάπτωσης του λιπιδίου για χρονικό διάστημα διάρκειας 1 ώρας. Με τον τρόπο αυτό εξισορροπούνται οι διαφορές της πυκνότητας των λιπιδίων κατά την τοποθέτηση τους στις μεμβράνες. Η συσσωμάτωση και καθίζηση ουδέτερων λιποσωμάτων οφείλεται σε ανάπτυξη δυνάμεων Van der Waals που είναι ισχυρότερες στην περίπτωση των λιποσωμάτων μεγάλου μεγέθους. Ο απλούστερος τρόπος για την παρεμπόδιση τέτοιων φαινομένων είναι με τη χρησιμοποίηση στη λιπιδική σύσταση μικρής ποσότητας φορτισμένου λιπιδίου (π.χ 10% φωσφατιδυλογλυκερόλη). Το φαινόμενο της σύντηξης είναι σύνθηες στα SUV τα οποία τείνουν να μειώσουν τις δυνάμεις που αναπτύσσονται λόγω της μεγάλης κυρτότητας της μεμβράνης τους. Παρατηρείται μάλιστα σε θερμοκρασίες πολύ κοντά στην T_m του λιπιδίου και έτσι ενδείκνυται η φύλαξή τους σε θερμοκρασίες χαμηλότερες αυτής ή και η προσθήκη κατάλληλης ποσότητας χοληστερόλης η οποία καταργεί την επίδραση της θερμοκρασίας μετάβασης του λιπιδίου. Η διαπερατότητα των λιποσωμικών μεμβρανών εξαρτάται κατά πολύ από τη λιπιδική τους σύσταση και τα χαρακτηριστικά της εγκλωβισμένης ουσίας. Γενικά η λιποσωμική μεμβράνη είναι σταθερότερη όταν είναι άκαμπτη, δηλαδή όταν αποτελείται από περισσότερα κορεσμένα λιπίδια και μεγάλη ποσότητα χοληστερόλης. Ο έλεγχος της φυσικής

σταθερότητας μπορεί να αξιολογηθεί με την τεχνική της θολερομετρίας (turbidity measurements) (Dwiecki, Górnaś, Wilk, Nogala-Kałużka, & Polewski, 2007).

1.2.8 Μεταβολική πορεία των λιποσωμάτων στον οργανισμό

Τα λιποσώματα προστατεύουν τα εγκλωβισμένα μόρια από αποσύνθεση και μπορούν παθητικά να στοχεύσουν ιστούς ή όργανα που έχουν ασυνεχές ενδοθήλιο, όπως το ήπαρ, ο σπλήνας, και ο μυελός των οστών. Στην ενδοφλέβια χορήγηση, τα λιποσώματα προσλαμβάνονται γρήγορα από το μονοπύρρηνο σύστημα φαγοκύτταρων (MPS) και αφαιρούνται από την κυκλοφορία του αίματος (Allen & Cullis, 2013). Αυτή η συμπεριφορά έχει χρησιμοποιηθεί για την αποτελεσματική χορήγηση αντιπαρασιτικών και αντιμικροβιακών βιοδραστικών ουσιών για μολύνσεις που εντοπίζονται στο μονοπύρρηνο φαγοκυτταρικό σύστημα. Εντούτοις, όταν η περιοχή στόχευσης είναι μετά από το MPS, η αποδοτική λήψη των λιποσωμάτων από τα μακροφάγα, και η κατά συνέπεια αφαίρεση τους από την κυκλοφορία, είναι ένα από τα κύρια μειονεκτήματα για την πιθανή χρήση των λιποσωμάτων ως συστήματα παράδοσης βιοδραστικών ουσιών. Η σύνδεση των πρωτεϊνών του ορού (οψονίνες) είναι το πρώτο σήμα για την αφαίρεση των λιποσωμάτων, μιας και το MPS δεν αναγνωρίζει τα ίδια τα λιποσώματα αλλά, μάλλον, αναγνωρίζει τις οψονίνες, που είναι συνδεδεμένες στην επιφάνεια των λιποσωμάτων.

Η αστάθεια των λιποσωμάτων στο πλάσμα οφείλεται στην αλληλεπίδραση τους με τις υψηλής (HDL) και χαμηλής (LDL) πυκνότητας λιποπρωτεΐνες κάτι που έχει ως αποτέλεσμα την γρήγορη απελευθέρωση της εγκλωβισμένης βιοδραστικής ουσίας στο πλάσμα. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των λιποσωμάτων, όπως το επιφανειακό φορτίο, η υδροφοβικότητα, το μέγεθος, η ρευστότητα, και η διευθέτηση των στοιβάδων των λιπιδίων, επηρεάζει τη σταθερότητά τους και τον τύπο πρωτεϊνών που τα δεσμεύουν

(Oja, Semple, Chonn, & Cullis, 1996). Οι πρώτες προσπάθειες για να υπερνικηθούν τα προβλήματα αυτά, στράφηκαν στα συστατικά της λιπιδικής μεμβράνης προκειμένου να τροποποιηθεί η ρευστότητα των στοιβάδων. Οι (Fang, Lin, Hsu, & Tsai, 1997) έδειξαν ότι η ενσωμάτωση της χοληστερόλης (CH), προκαλώντας το αυξανόμενο πακετάρισμα των φωσφολιπιδίων στην στοιβάδα, μειώνει τη μεταφορά των φωσφολιπιδίων από τις HDL. Ο (Senior, 1990) έδειξε ότι τα λιποσώματα από φωσφατιδυλοχολίνη (PC) με κορεσμένα λιπαρά οξέα (με υψηλή θερμοκρασία μετάπτωσης) ή από σφιγγομυελίνη (SM) είναι σταθερότερα στο αίμα από λιποσώματα που προετοιμάζονται από PC με ακόρεστα λιπαρά οξέα. Διάφορες προσεγγίσεις έχουν λάβει επίσης υπόψιν το μέγεθος και το φορτίο των λιποσωμάτων, ώστε να μειωθεί η πρόσληψη από το MPS. Γενικά, τα μεγαλύτερα λιποσώματα αποβάλλονται από το αίμα γρηγορότερα από τα μικρότερα (Senior, 1990). Τα SUV έχουν χρόνο ημιζωής μεγαλύτερο από τα πολυστιβαδικά λιποσώματα (MLVs) (500–5000 nm). Αυτό φανερώνει ότι τα φαγοκύτταρα μπορούν να διακρίνουν τα μεγέθη των ξένων μορίων. Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις, είναι εμφανές ότι η σύνδεση των οψονινών στα λιποσώματα εξαρτάται από το μέγεθός των λιποσωμάτων, και αυτό κατά συνέπεια δείχνει ότι η ενισχυμένη πρόσληψη των λιποσωμάτων από το MPS καθώς και από το ήπαρ είναι εξαρτώμενη από το μέγεθος (Ai, Biazar, Jafarpour, Montazeri, Majdi, Aminifard, et al., 2011; Harashima, Sakata, Funato, & Kiwada, 1994).

1.3 Η συμβολή της νανοτεχνολογίας στην προστασία των λιπόφιλων βιταμινών

Οι λιπόφιλες βιταμίνες είναι ευαίσθητα μόρια. Λόγω της υψηλής ευαισθησίας τους, όταν βρίσκονται σε συνθήκες περιβάλλοντος, αποικοδομούνται ταχύτατα και χάνουν κατ' επέκταση την ενεργότητά τους ή γίνονται επικίνδυνα λόγω οξειδωτικών αλλαγών που συμβαίνουν σε αυτά. Έτσι είναι εξαιρετικά αναγκαία η προστασία τους από οξειδωτικά στοιχεία που θα μπορούσαν να έχουν επίδραση στην χημική τους ακεραιότητα και να μειώσουν, με τον τρόπο αυτό, τα φυσιολογικά τους οφέλη.

Ένα επιπλέον πρόβλημα των λιποδιαλυτών βιταμινών αποτελεί η μειωμένη απορρόφησή τους στην περίπτωση κατανάλωσης τροφίμων με χαμηλά λιπαρά (όπως το αποβουτυρωμένο γάλα), ακόμα και όταν έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε λιποδιαλυτές βιταμίνες λόγω της απουσίας των κατάλληλων φορέων τους, των λιποπρωτεϊνών, οι οποίες αφαιρούνται από τα τρόφιμα στα πλαίσια μείωσης του ποσοστού λίπους που φέρουν. Για τον λόγο αυτό, η πρόσληψη και απορρόφηση των λιπόφιλων βιταμινών από τα τρόφιμα που έχουν υποστεί επεξεργασία απομάκρυνσης ποσοστού λίπους είναι αισθητά μειωμένη, μιας και η διαλυτότητα των λιποδιαλυτών βιταμινών σε υδατικά διαλύματα είναι εξαιρετικά χαμηλή.

Έτσι λοιπόν η ανάγκη δημιουργίας ενός φορέα μέσω του οποίου θα επιτευχθεί αύξηση της πρόσληψης αλλά και της απορρόφησης των λιπόφιλων βιταμινών στα τρόφιμα χαμηλών λιπαρών, αλλά και γενικότερη αύξηση της προστασίας και της διαλυτότητας τους σε υδατικά μέσα, αποτελεί επιτακτική ανάγκη.

Τα συστήματα εγκλωβισμού είναι μία πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για να: α) διατηρηθούν μέσα στο χρόνο οι φυσικές ιδιότητες ευαίσθητων μορίων όπως είναι οι λιπόφιλες βιταμίνες, β) να αυξηθεί η συγκέντρωσή τους σε υδατικά μέσα αλλά και γ) να

αυξηθεί η απορρόφηση και δ) η βιοδιαθεσιμότητά τους (Nacka, Cansell, Méléardb, & Combe, 2001). Επιπλέον ο εγκλωβισμός αποτελεί ένα μέσο για να βελτιωθούν οι βιολογικές ιδιότητες των εγκλωβιζόμενων ουσιών, όπως η ημίσεια ζωή τους, να ρυθμιστεί αποτελεσματικά η ενεργή μεταφορά των ουσιών και να αποτραπεί η εμφάνιση παρενεργειών.

Τα κλασικά συστήματα που αναπτύσσονται για νάνο- ή μικροεγκλωβισμό βασίζονται στην δημιουργία δεξαμενών ή σωματιδιακών πλεγμάτων. Αυτά τα συστήματα μπορεί να αποτελούν έναν φυσικοχημικό φραγμό ενάντια σε προοξειδωτικούς παράγοντες όπως οι ελεύθερες ρίζες, το οξυγόνο και τη ακτινοβολία UV (Gonnet, Lethuaut, & Boury, 2010).

Πιο συγκεκριμένα, ο εγκλωβισμός μειώνει: α) την αλληλεπίδραση του υπό εγκλωβισμό μορίου (στην συγκεκριμένη περίπτωση της λιπόφιλης βιταμίνης) με το περιβάλλον (νερό, οξυγόνο, φως), β) την τοξικότητά του, γ) την αποικοδόμησή και δ) ενισχύει την βιοδιαθεσιμότητα και την προστασία του (Mozafari, Khosravi-Darani, Borazan, Cui, Pardakhty, & Yurdugul, 2008; Perrie, Frederik, & Gregoriadis, 2001).

Για να βελτιωθεί η βιοδιαθεσιμότητα των λιπόφιλων βιταμινών (η ποσότητα των ενεργών χορηγούμενων μορίων) που εγκλωβίζονται σε έναν φορέα, τα χαρακτηριστικά των σωματιδίων που αποτελούν τον φορέα πρέπει να προσαρμοστούν στην οδό της χορήγησής που θα ακολουθηθεί και η οποία μπορεί να είναι χορήγηση από το στόμα, τοπική χορήγηση, παρεντερική χορήγηση ή χορήγηση με τοπική ένεση.

Ο εγκλωβισμός με την μορφή των λιποσωμάτων (αποτελούμενα κυρίως από διπλοστιβάδες λιπιδίων ή/και φωσfolιπιδίων) παρουσιάζει πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλα συστήματα μεταφοράς και/ή παράδοσης ουσιών, αφού είναι βιοαποικοδομήσιμα, μη τοξικά, και μη ανοσογόνα (Mozafari, Reed, Rostron, Kocum, & Piskin, 2002; Park, Choi, Davaa, & Park, 2011). Το γεγονός ότι τα λιποσώματα αποτελούνται από φυσικά

συστατικά ή ενδογενή βιομόρια επιτρέπει την χρήση τους για την δημιουργία βιοσυμβατών και αποδεκτών από τον οργανισμό διασπορών για ανθρώπινη κατανάλωση, αποτελεί ένα εξαιρετικό χαρακτηριστικό και πλεονέκτημα της χρήσης λιποσωμάτων για την προστασία από το περιβάλλον και από χημικές μεταβολές και την χορήγηση διαφόρων μορίων όπως είναι και οι λιπόφιλες βιταμίνες (Mozafari, Khosravi-Darani, Borazan, Cui, Pardakhty, & Yurdugul, 2008).

Διάφοροι τύποι λιποσωμικών διασπορών έχουν γίνει διαθέσιμοι προς εγκλωβισμό ευαίσθητων μορίων, καθένας από τους οποίους διαφέρει στις διαστάσεις (Muthu, Kulkarni, Xiong, & Feng, 2011), στη σύνθεση, στο επιφανειακό φορτίο και στη δομή, ενώ κάποιοι από τους οποίους είναι σχεδιασμένοι με βάση έναν συνδυασμό διαφορετικών τύπων λιποσωμάτων (Balkina, Selischeva, & Larionova, 2009; K. A. Edwards & Baeumner, 2006; Hădărugă, Hădărugă, Lăzău, Rațiu, Crăciun, & Grozescu, 2010; L. Zhang & Granick, 2006).

Ένας τύπος λιποσωμάτων, τα αφυδατωμένα-επανυδατωμένα σωματίδια (DRVs) έχει αναφερθεί ότι έχει πολλά πλεονεκτήματα συμπεριλαμβανομένου την αρκετά υψηλή ικανότητα εγκλωβισμού και την μικρή πιθανή καταστροφής της ευαίσθητης εγκλωβιζόμενης ουσίας (Chen, Han, Cai, & Tang, 2010).

Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των λιποσωμάτων επηρεάζονται από την μέθοδο της παρασκευής τους και από τον τύπο των λιπιδίων που χρησιμοποιούνται. Επιπρόσθετα, και η χοληστερόλη μπορεί να μεταβάλλει τα φυσικά χαρακτηριστικά της λιποσωμικής μεμβράνης (Ohtake, Schebor, Palecek, & De Pablo, 2005) και να βελτιώσει την σταθερότητά τους (Varnier Agasøster, Halskau, Fuglebakk, Frøystein, Muga, Holmsen, et al., 2003).

Το μείγμα φωσφατιδυλοχολίνης/ χοληστερόλης (PC/CH) είναι το πιο ευρέως διαδεδομένο μείγμα για την παρασκευή λιποσωμάτων σύμφωνα με την βιβλιογραφία

(Kawano, Takayama, Nagai, & Maitani, 2003; Rodríguez-Nogales & López, 2006; Zaru, Mourtas, Klepetsanis, Fadda, & Antimisiaris, 2007).

Ο εγκλωβισμός σε λιποσώματα έχει αναφερθεί ότι ενισχύει την απορρόφηση και την βιοδιαθεσιμότητα της βιταμίνης E (Nacka, Cansell, Méléardb, & Combe, 2001; Rovoli, Gortzi, Lalas, & Kontopidis, 2014), της βιταμίνης A (Lee, Lee, Kim, & Lim, 2005; Singh & Das, 1998) και της βιταμίνης D (Khrestovaya, Apukhovskaya, & Gurina, 1990; Tian & Holick, 1999).

Παρόλη την πληθώρα των συστημάτων εγκλωβισμού που έχουν χρησιμοποιηθεί για τον εγκλωβισμό των λιπόφιλων βιταμινών αλλά και γενικότερα ευαίσθητων μορίων έως σήμερα, η ανάγκη δημιουργίας ενός αποδοτικότερου και σταθερότερου φορέα αποτελούμενου από φυσικά συστατικά, μέσω του οποίου θα επιτευχθεί αύξηση της πρόσληψης αλλά και της προστασίας- απορρόφησης των λιπόφιλων βιταμινών σε υδατικά μέσα αποτελεί επιτακτική ανάγκη.

1.4 Πρωτεϊνικά μόρια με θέση πρόσδεσης λιπόφιλων μορίων:

Η β-γαλακτοσφαιρίνη

Η β-γαλακτοσφαιρίνη (β-lactoglobulin-β-Lg) αποτελεί την κύρια πρωτεΐνη του ορού του γάλακτος, ο οποίος αποτελεί και την κύρια φυσική πηγή προμήθειάς της. Επιπλέον στον ορό του γάλακτος απαντώνται και οι πρωτεΐνες: α-λακταλβουμίνη (α-lactalbumin), η αλβουμίνη του ορού (bovine serum albumin, BSA), ανοσοσφαιρίνες (immunoglobulins, Ig) (κυρίως IgG, IgM, IgA), ένζυμα όπως η λυσοζύμη, λιπάσες, πρωτεάσες, πρωτεόζες-πεπτόνες (protease-peptones, PP), πρωτεΐνες που δεσμεύουν σίδηρο (iron-binding proteins) (lactoferrin & transferrin), πρωτεΐνες που δεσμεύουν βιταμίνες, κ.α. (Fox & Kelly, 2003)

Η β-Lg ανήκει στην οικογένεια των λιποκαλινών ή λιποκαλυσινών. Οι λιποκαλίνες (lipocalins) αποτελούν μία εκτεταμένη οικογένεια μικρών (160-180 αμινοξικά κατάλοιπα) εξωκυττάρων πρωτεϊνών, ευκαρυωτικών αλλά και προκαρυωτικών οργανισμών. Η ονομασία τους προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις λίπος και κάλυκας λόγω του κοινού χαρακτηριστικού της οικογένειας των λιποκαλινών, που είναι η παρουσία ενός σταθερού κάλυκα μέσα στον οποίο εγκλωβίζονται υδρόφοβα μόρια, με τελικό αποτέλεσμα την μεταφορά, αποθήκευση ή/και προστασία τους. Έχουν ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών και περιλαμβάνουν πρωτεΐνες δέσμευσης γεύσης και οσμής, ένζυμα, γλυκοπρωτεΐνες σχετιζόμενες με ανοσοσφαιρίνες, φωτοδραστικές πρωτεΐνες, χρωμοφόρα κ.α. και για τον λόγο αυτό είναι ιδιαίτερα πολύτιμες στη βιομηχανία τροφίμων ως γαλακτωματοποιητές και για τις ιδιότητές τους ως σταθεροποιητές γαλακτώματος.

Η β-Lg αποτελεί την κύρια πρωτεΐνη του ορού γάλακτος των μηρυκαστικών, όπως η αγελάδα και το πρόβατο και οι ιδιότητές της έχουν εκτενώς μελετηθεί

(Chanasattru, Decker, & McClements, 2007; Ge, Zhang, & Keiderling, 2010; Hansted, Wejse, Bertelsen, & Otzen, 2011; J. I. Loch, Bonarek, Polit, Riès, Dziedzicka-Wasylewska, & Lewiński, 2013; Sawyer, Kontopidis, & Wu, 1999). Επιπλέον έχει ανιχνευθεί στο γάλα των μονογαστρικών όπως το γουρούνι, το άλογο, τον σκύλο, την γάτα και αλλά και στα μαρσιποφόρα αλλά απουσιάζει από το γάλα των τρωκτικών, των λαγόμορφων και των ανθρώπων (εικόνα 1.19).

Cow (<i>Bos taurus</i> , <i>B. javanicus</i> , <i>B. grunniens</i> , <i>B. indicus</i>)	✓✓
Buffalo (<i>Bubalus arnee</i> , <i>B. bubalis</i>)	✓✓
Bison (<i>Bison bison</i>)	✓✓
Musk ox (<i>Ovibos moschatus</i>)	✓
Eland (<i>Taurotragus oryx</i>)	✓
Goat (<i>Capra hircus</i>)	✓✓
Sheep (<i>Ovis aries</i> , <i>O. ammon musimon</i>)	✓✓
Red deer (<i>Cervus elaphus</i> L.)	✓
European elk (<i>Alces alces</i> L.)	✓
Reindeer (<i>Rangifer tarandus</i> L.)	✓✓
White-tailed deer (<i>Odocoileus virginianus</i>)	✓
Fallow deer (<i>Dama dama</i>)	✓
Caribou (<i>Rangifer arcticus</i>)	✓
Giraffe (<i>Giraffa camelopardalis</i>)	✓
Okapi (<i>Okapia johnstoni</i>)	✓
Pronghorn antelope (<i>Antilocapra americana</i>)	✓
Giant panda (<i>Ailuropoda melanoleuca</i>)	✓
Bears (<i>Ursus americanus</i> , <i>U. maritimus</i> , <i>U. arctos horribilis</i> , <i>U. arctos yesoensis</i> , <i>U. arctos middendorffi</i> , <i>U. malayanus</i>)	✓
Peccary (<i>Pecari tajacu</i>)	✓
Pig (<i>Sus scrofa domestica</i>)	✓✓
Horses (<i>Equus caballus</i> , <i>E. quagga</i> , <i>E. asinus</i>)	✓✓
Rhinoceros (<i>Diceros bicornis</i>)	✓
Rhinoceros (<i>Rhinoceros unicornis</i>)	✓
Fur seals (<i>Callorhinus ursinus</i> , <i>Arctocephalus gazella</i> , <i>A. pusillus doriferus</i> , <i>A. tropicalis</i>)	✓✓
Dolphin (<i>Tursiops truncatus</i>)	✓✓
Manatee (<i>Trichechus manatus latirostris</i>)	✓✓
Dog (beagle) (<i>Canis familiaris</i>)	✓✓
Cat (<i>Felis catus</i>)	✓✓
Grey kangaroo (<i>Macropus giganteus</i> , <i>M. rufus</i> , <i>M. eugenii</i>)	✓✓
Echidna (<i>Tachyglossus aculeatus</i>)	✓✓
Brush tail possum (<i>Trichosurus vulpecula</i>)	✓✓
Platypus (<i>Ornithorhynchus anatinus</i>)	✓✓
Yellow baboon (<i>Papio hamadryas</i>)	✓✓
Macaque (<i>Macaca fascicularis</i>)	✓✓
Human (<i>Homo sapiens</i>)	✓
Rabbit (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	
Camel (<i>Camelus dromedarius</i>)	
Llama (<i>Lama glama</i> L.)	
Mouse (<i>Mus musculus</i>)	
Rat (<i>Rattus norvegicus</i>)	
Guinea pig (<i>Cavia porcellus</i>)	

Εικόνα 1.19 Η παρουσία της β-Lg στο γάλα διαφόρων ειδών (✓προσδιορισμός της ύπαρξης της πρωτεΐνης, ✓✓διαθέσιμες κάποιες πληροφορίες από την ακολουθία της πρωτεΐνης) (Sawyer, 2013)

Αντίθετα με την άλλη κύρια πρωτεΐνη του ορού του γάλακτος, την α-γαλακταλβουμίνη (α-LA) η οποία έχει μία ξεκάθαρη ενζυμική επαγωγική ενεργότητα στην σύνθεση της λακτόζης, η β-Lg δεν έχει μία σαφώς αναγνωρίσιμη λειτουργία (Kontopidis, Holt, & Sawyer, 2004). Υπάρχουν ενδείξεις ότι η β-Lg ευθύνεται εν μέρει για την αλλεργία των βρεφών στο αγελαδινό γάλα (Sawyer, 2013). Ο όρος αλλεργία στο γάλα αγελάδας αναφέρεται στις ανεπιθύμητες εκδηλώσεις που προκαλούνται με τη μεσολάβηση ανοσολογικών μηχανισμών έναντι των πρωτεϊνών του αγελαδινού γάλακτος.

Η β-Lg από βοοειδή είναι η περισσότερο μελετημένη πρωτεΐνη του γάλακτος και μπορεί να απομονωθεί εύκολα από αυτό (Hansted, Wejse, Bertelsen, & Otzen, 2011; Papiz, Sawyer, & Eliopoulos, 1986; Sawyer, Brownlow, Polikarpov, & Wu, 1998; Stojadinovic, Burazer, Ercili-Cura, Sancho, Buchert, Velickovic, et al., 2012; Taheri-Kafrani, Bordbar, Mousavi, & Haertl, 2008; X. Zhang, Ge, & Keiderling, 2007).

In vitro μελέτες πρόσδεσης που έχουν λάβει χώρα στην β-Lg των βοοειδών, έχουν δείξει ότι είναι ικανή να προσδένει μία ποικιλία προσδετών, οι περισσότεροι από τους οποίους είναι μικρά υδρόφοβα μόρια όπως λιπαρά οξέα ή βιταμίνες. Η β-Lg υφίσταται διάφορες αλλαγές στερεοδιαμόρφωσης κάτω από συνθήκες pH μεταξύ 2 και 9, με πιθανώς την πιο σημαντική να είναι η αλλαγή N \leftrightarrow R ή γνωστή ως μετατροπή Tanford, η οποία συμβαίνει σε φυσιολογικό εύρος τιμών pH. Η β-Lg των μηρυκαστικών είναι, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, ένα διμερές, ενώ η ίδια πρωτεΐνη άλλων ειδών φαίνεται να απαντάται και σε μονομερή μορφή.

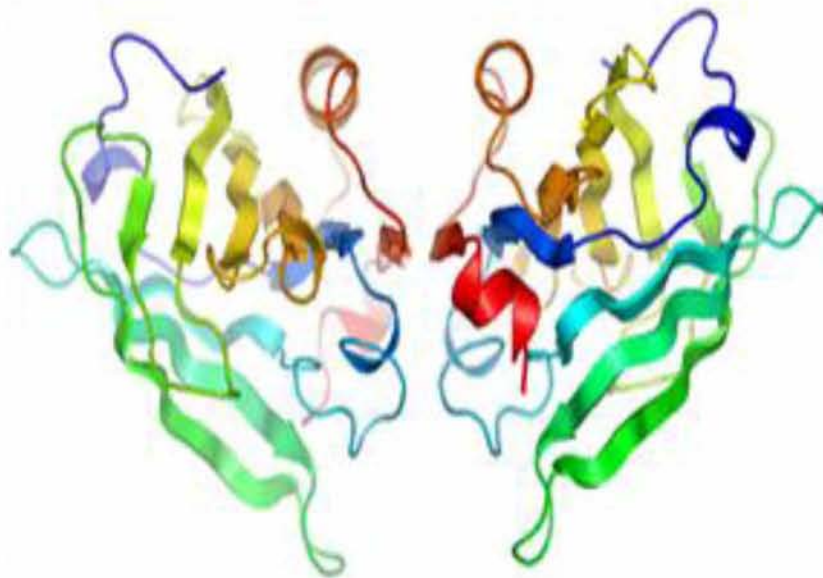
1.4.1 Βιοσύνθεση

Η β-Lg συντίθεται στα εκκριτικά επιθηλιακά κύτταρα του μαστικού αδένος κάτω από τον έλεγχο του ενδοκρινικού συστήματος και ειδικά της προλακτίνης, από τα μέσα περίπου της εγκυμοσύνης. Η πρόωπη μορφή της β-Lg έχει 180 αμινοξέα μετά τη μετάφραση του mRNA που κωδικοποιεί την β-Lg.

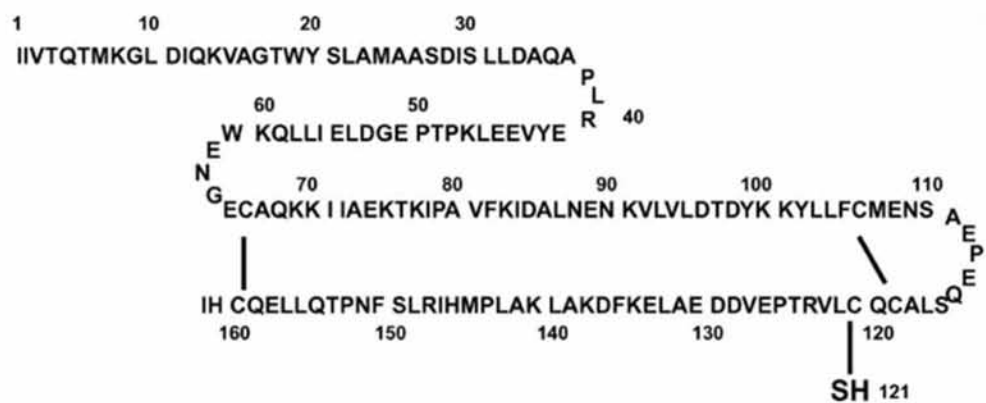
Το πεπτίδιο οδηγός εμφανίζεται υψηλά συντηρημένο μεταξύ των ειδών και περιέχει πολλά κυρίως υδρόφοβα αμινοξέα. Μετά την αποκοπή του πεπτιδίου οδηγού, η ώριμη πρωτεΐνη μπορεί να υποβληθεί σε μέτα-μεταφραστική τροποποίηση στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο, ακολουθούν η μεταφορά στο σύστημα Golgi και η ενσωμάτωση στα εκκριτικά κυστίδια και τέλος η έκκριση στον αυλό της αδενοκυψέλης, όπου συσσωρεύεται στο γάλα και απομακρύνεται με το θηλασμό (Vilotte, Whitelaw, Ollivier-Bousquet, & Shennan, 2003).

1.4.2 Δομή

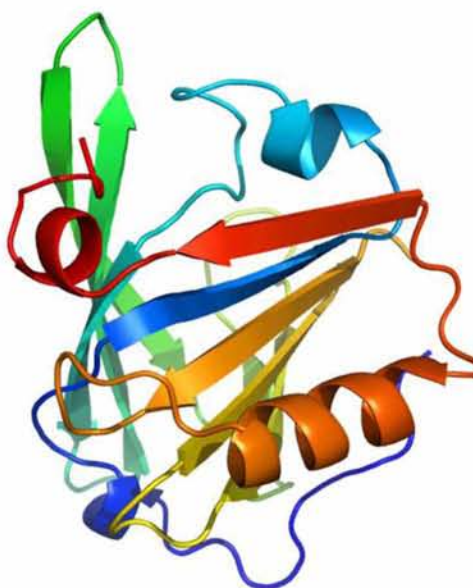
Η β-γαλακτοσφαιρίνη είναι μία διμερής σφαιρική πρωτεΐνη (εικόνα 1.20) με 162 αμινοξικά κατάλοιπα (εικόνα 1.21 α) και μοριακό βάρος κάθε μονομερούς περίπου 18.400 Da. Από τα 162 αμινοξέα από τα οποία αποτελείται, συμπεριλαμβάνονται 5 κατάλοιπα κυστεΐνης και δύο δισουλφιδικές γέφυρες, οι οποίες απαντώνται, η μία ανάμεσα στην κυστεΐνη 106 και την κυστεΐνη 119 και η δεύτερη ανάμεσα στην κυστεΐνη 66 και την κυστεΐνη 160. Μία ελεύθερη κυστεΐνη εντοπίζεται στην θέση 121. (H. C. Liu, Chen, & Mao, 2007)



Εικόνα 1.20 Το διμερές της β -Lg



α.



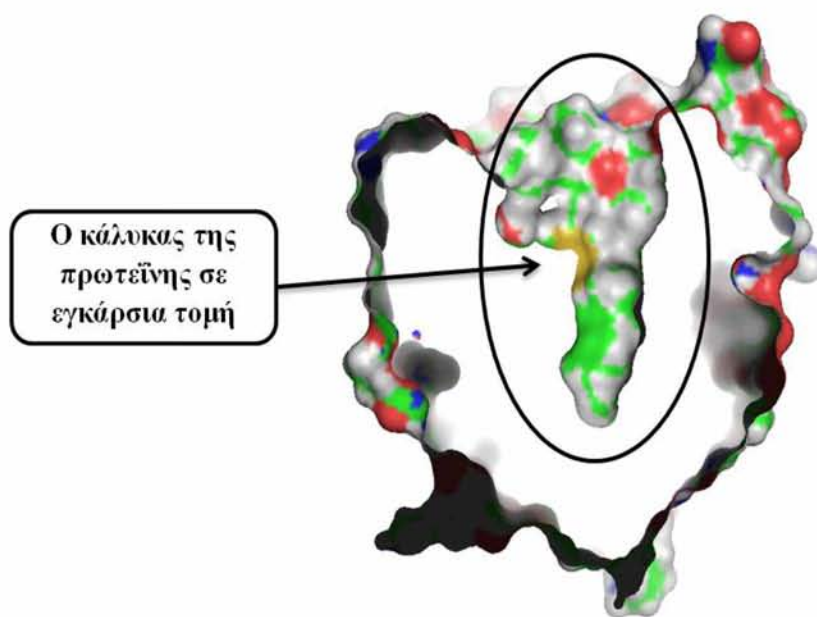
β.

Εικόνα 1.21 α: Η πρωτοταγής δομή της β -Lg β: Η τριτοταγής δομή της β -Lg

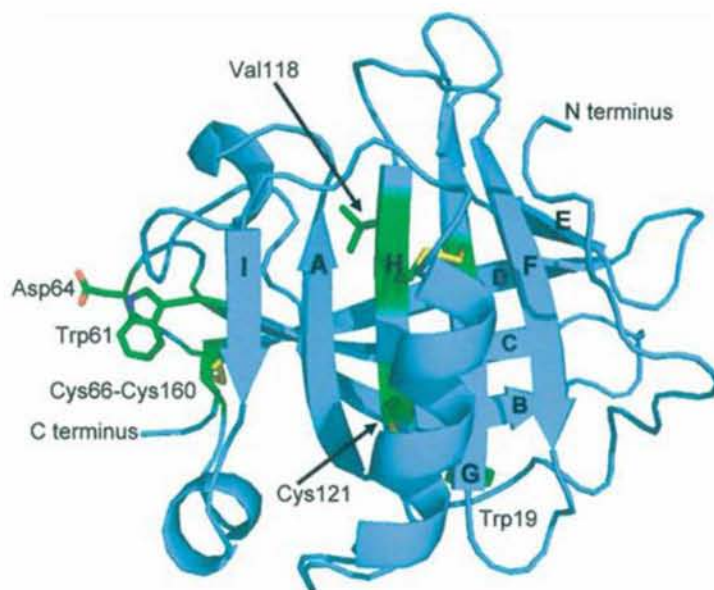
Μπορεί να υπάρξει σε διάφορες ολιγομερείς μορφές σαν αποτέλεσμα του pH, της θερμοκρασίας, της συγκέντρωσης και της γενετικής παραλλαγής από την οποία προέρχεται. Η δευτεροταγής δομή της β -Lg αποτελείται από 15% α -έλικα, 50% β -πτυχωτή επιφάνεια και 15-20% στροφή (Creamer, Parry, & Malcolm, 1983). Η β -Lg έχει μία πολύ συμπαγή σφαιρική δομή. Κάθε μονομερές υπάρχει περίπου ως σφαίρα με διάμετρο περίπου 3,6 nm. Η δομή της είναι άνω- και κάτω- β -πτυχωτή επιφάνεια ή βαρέλι (εικόνα 1.21 β). Στην φυσική της μορφή, η β -Lg έχει κατά κύριο λόγο μία α -δομή, αποτελούμενη από μία α -έλικα και εννέα β -αντιπαράλληλα φύλλα, οι οποίοι δημιουργούν ένα πεπλατυσμένο πυρήνα (κάλυκα) στο β -βαρέλι, ο οποίος παρέχει μία θέση πρόσδεσης για μία μεγάλη ποικιλία αμφίφιλων και υδρόφοβων προσδετών συμπεριλαμβανομένου επιφανειοδραστικών ουσιών, λιπαρών οξέων, πολλών μικρών αλκανών, αλιφατικών κετονών και έναν αριθμό από απλά και πολύπλοκα ιόντα (εικόνα 1.22) (Lefèvre & Subirade, 2000).



Εικόνα 1.22 Δομή β -Lg με λιπαρό οξύ προσδεμένο στον κάλυκα της πρωτεΐνης



α.



β.

Εικόνα 1.23 α. Ο κεντρικός κάλυκας της β -Lg σε τρισδιάστατη δομή.

β. Το μονομερές της β -Lg A. (Sawyer, 2013)

Η δομή του κάλυκα δημιουργείται όταν οκτώ από τα εννέα αντιπαράλληλα φύλλα καμπυλώνονται και τυλίγονται έτσι ώστε δημιουργείται ένα πεπλατυσμένο κωνικό βαρέλι. Το φύλλο A κάμπτεται κατά 90° περίπου γύρω από τα κατάλοιπα 21-22 και επιτρέπει κατ' αυτόν τον τρόπο να δημιουργείται μία αντιπαράλληλη αλληλεπίδραση με το φύλλο H και έτσι να ολοκληρώνεται η δομή του κάλυκα. Ο κάλυκας είναι περίπου

κυλινδρικού σχήματος και έχει όγκο 3,15 Å και μήκος της τάξης των 15 Å. Έχει προταθεί ότι ο κάλυκας είναι άδειος εκτός και αν καταλαμβάνεται από κάποιον προσδέτη (Qvist, Davidovic, Hamelberg, & Halle, 2008).

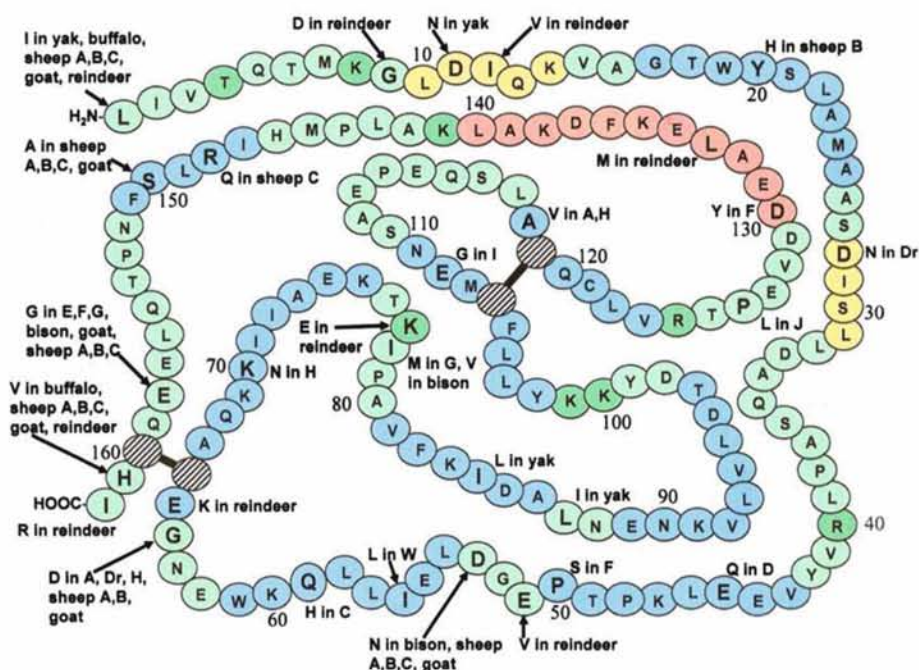
Η θέση πρόσδεσης μέσα στον κάλυκα- βαρέλι της β-Lg απαρτίζεται από υδρόφοβα κατάλοιπα που παρέχουν ένα υδρόφοβο περιβάλλον για τα λιπόφιλα μόρια-προσδέτες. Το ένα άκρο του βαρελιού είναι ανοιχτό στο διαλύτη, ενώ το άλλο άκρο είναι κλειστό εξαιτίας ενός κατάλοιπου τρυπτοφάνης (Trp 19) (Εικόνα 1.23 α,β).

Η β-Lg αποτελεί μία από τις εκτενέστερα μελετημένες πρωτεΐνες (Sawyer, Kontopidis, & Wu, 1999) και η αφθονία της στον ορό του γάλακτος, η ευκολία του καθαρισμού της και η σημαντικότητά της για την βιομηχανία τροφίμων εξηγεί εν μέρει την τεράστια βιβλιογραφία που την καλύπτει. Τρισδιάστατες δομικές πληροφορίες για μία πρωτεΐνη μπορούν να συλλεχθούν πειραματικά είτε με κρυσταλλογραφική μελέτη ακτίνων-X είτε με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Η κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών αποτελεί μια ισχυρή τεχνική με την οποία έχει προσδιοριστεί η πλειοψηφία των πρωτεϊνικών δομών της που είναι γνωστές ως σήμερα (Sawyer, 2013).

1.4.3 Γενετική ποικιλότητα

Η πρωτεΐνη που απομονώθηκε από τον Palmer το 1934 από γάλα αγελάδας εμφάνιζε ετερογένεια κατά την ανάλυσή της με κάποιες φυσικοχημικές τεχνικές. Η αιτία αποκαλύφθηκε από τους Aschaffenburg & Drewry το 1955 (Aschaffenburg & Drewry, 1955) και ήταν η ύπαρξη δύο αλληλομόρφων, που ονομάστηκαν β-Lg A και β-Lg B. Η πρώτη αμινοξική ακολουθία της β-Lg αναφέρθηκε από τους Braunitzer et al, το 1972 (Braunitzer, Chen, Schrank, & Stangl, 1972) και από τότε οι ακολουθίες των β-

Lgs από πολλά μηρυκαστικά καθώς και από άλλα είδη έχουν καθοριστεί πλήρως (Sawyer, 2013) (εικόνα 1.24)



Εικόνα 1.24 Η παραλλαγή της αμινοξικής αλληλουχίας της β-Lg ανάμεσα στα είδη των μηρυκαστικών σε σχέση με το αλληλόμορφο Β της βόειας β-Lg. (Sawyer, 2013)

Μεταξύ των αλληλόμορφων Α και Β της β-Lg η αλλαγή Val/Ala στη θέση 118 δεν προκαλεί καμία ανιχνεύσιμη τροποποίηση στη στερεοδιάταξη, αλλά έχει ως αποτέλεσμα ο υδρόφοβος πυρήνας του αλληλόμορφου Β να είναι λιγότερο συμπαγής και μπορεί να ευθύνεται για τη χαμηλότερη θερμική σταθερότητα του αλληλόμορφου Β. Η αποσταθεροποίηση αυτή στο αλληλόμορφο Β σε σχέση με το Α έχει εκτιμηθεί περίπου στα 5 kJ/mol που είναι μία τιμή που έχει βρεθεί και αλλού για την απώλεια των δύο ομάδων μεθυλίου (Sawyer, 2013).

1.4.4 Λειτουργία

Η β-γαλακτοσφαιρίνη περιέχει και τα 20 αμινοξέα γεγονός που την καθιστά πολύτιμη για την θρεπτική της αξία (Hambræus & Lönnerdal, 2003). Βιοενεργά πεπτίδια που προέρχονται από την β-Lg βρίσκονται στο στάδιο εντατικών μελετών.

Αποτελεί εξαιρετική πηγή τέτοιων πεπτιδίων για τα οποία οι μελέτες προτείνουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικής δράσης όπως αντιυπερτασική, αντιμικροβιακή, αντιοξειδωτική, αντικαρκινική και ανοσορρυθμιστική. Οι έρευνες των λειτουργικών και θρεπτικών χαρακτηριστικών της, αναφέρουν πιθανή χρήση της σε βιολειτουργικά τρόφιμα και για βιοχημικές εφαρμογές (Livney, 2010)

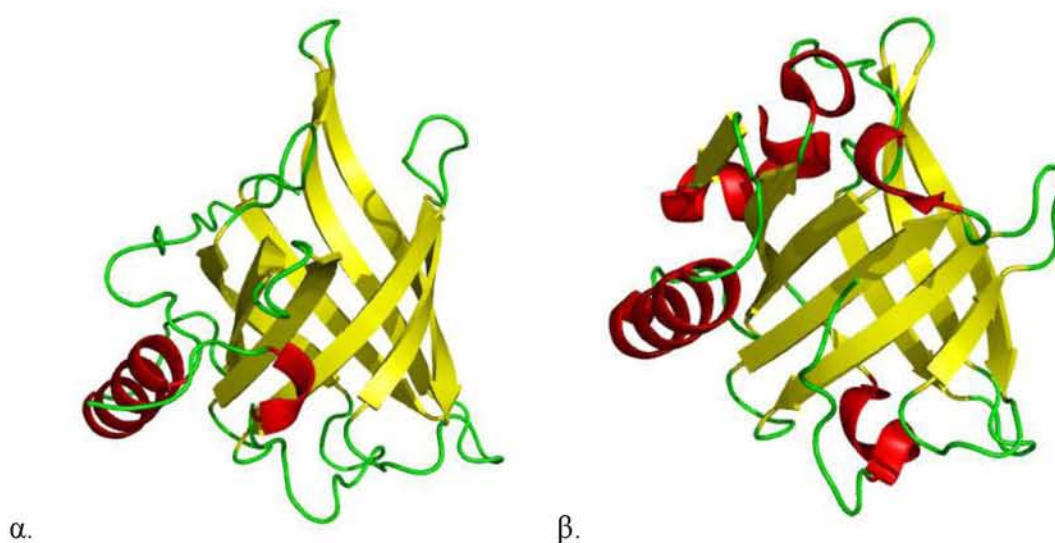
Παρά τον μεγάλο αριθμό μελετών ο φυσιολογικός ρόλος της δεν είναι ακόμη πλήρως γνωστός. Διάφορα έχουν προταθεί για την βιολογική λειτουργία αυτής της αινιγματικής πρωτεΐνης του γάλακτος (Sawyer, 2013). Το 1987 οι Farrell et al πρότειναν ότι πιθανά παίζει ρόλο στο μεταβολισμό του φωσφόρου στο μαστικό αδέν (Farrell Jr, Behe, & Enyeart, 1987). Το 1986 οι Papiz et al. πρότειναν ότι λειτουργεί ως μία μεταφορική πρωτεΐνη ρετινοειδών (Papiz, Sawyer, & Eliopoulos, 1986), όπως η βιταμίνη Α, από τη μητέρα στο νεογνό, καθώς μπορεί να δεσμεύει τη ρετινόλη σε μία υδρόφοβη θέση πρόσδεσης, προστατεύοντάς την από την οξείδωση και να τη μεταφέρει μέσω του στομάχου στο λεπτό έντερο, από όπου η ρετινόλη μπορεί να μεταφερθεί στη πρωτεΐνη δέσμευσης της ρετινόλης (retinol binding protein, RBP) με την οποία η β-Lg έχει δομική ομοιότητα. Ενώ το 1989 οι Perez et al, πρότειναν έναν εξειδικευμένο ρόλο που συνδέεται με τη διευκόλυνση της πέψης του λίπους του γάλακτος κατά τη διάρκεια της νεογνικής περιόδου των βοοειδών, διεγείροντας τη δράση της λιπάσης μέσα από την ικανότητα της β-Lg να δεσμεύει λιπαρά οξέα (Perez, Diaz de Villegas, Sanchez, Aranada, Ena, & Calvo, 1989).

Πιθανολογείται ότι μία παρόμοια λειτουργία πρέπει να είναι και ο φυσιολογικός λόγος για τις σημαντικές ποσότητες της πρωτεΐνης αυτής στο γάλα (η οικιακή αγελάδα παράγει 2 με 3 gr/ λίτρο, ποσότητα που εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως, η φυλή, η διατροφή και το στάδιο της γαλουχίας), ενώ έχει συσχετισθεί λεπτομερώς με

φαινόμενα συσσωμάτωσης και μετουσίωσης που λαμβάνουν χώρα κατά την επεξεργασία του γάλακτος (Kontopidis, Holt, & Sawyer, 2004).

Οι μοριακές ιδιότητες της και ιδιαίτερα η ανθεκτικότητά της σε οξύ και πεψίνη (Guo, Fox, Flynn, & Kindstedt, 1995; Miranda & Pelissier, 1983) και η δέσμευση υποστρωμάτων οδηγούν στην υπόθεση ότι υπάρχουν άλλες πιο εξειδικευμένες λειτουργίες. Η β-γαλακτοσφαιρίνη βρέθηκε να δεσμεύει λιπαρά οξέα, κατά το διαχωρισμό της υπό ήπιες συνθήκες και η δέσμευση του υποστρώματος είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της σταθερότητας της πρωτεΐνης. (Creamer, 1995; Shimoyamada, Yoshimura, Tomida, & Watanabe, 1996)

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, η β-Lg παρουσιάζει εξαιρετική ομοιότητα στην τριτοταγή δομή με την RBP (εικόνα 1.25).



Εικόνα 1.25 Η ομοιότητα της τριτοταγούς δομής (α) της RBP και (β) της β-Lg

Οι Papiz et al (1986) ανέφεραν ειδικούς υποδοχείς της β-Lg στο έντερο του νεογνού μόσχου προτείνοντας έναν πιθανό ρόλο στη μεταφορά ή πρόσληψη ρετινόλης (Papiz, Sawyer, & Eliopoulos, 1986). Οι Wang et al. (1997) επισημαίνουν ότι η βιταμίνη D₂ δεσμεύεται στην β-Lg ισχυρότερα από τη ρετινόλη (Wang, Allen, &

Swaisgood, 1997). Ίσως έτσι γενικεύεται ο ρόλος της στη διευκόλυνση πρόσληψης βιταμινών. Επίσης έχει προταθεί μία γενική λειτουργία της β-Lg ως ανασταλτικός παράγοντας, τροποποιητής ή ενισχυτής δράσης ενζύμων (Perez et al, 1995).

Ωστόσο η έρευνα για τη λειτουργία της πρωτεΐνης στο νεογνό ενδέχεται να είναι απατηλή, διότι η β-Lg δεν είναι παρούσα στο γάλα όλων των ειδών. Επιπρόσθετα ένα ακόμη ερώτημα που προκύπτει είναι αν η πραγματική της λειτουργία συνδέεται με κάποια διαδικασία στη μητέρα. Αν και η β-Lg απουσιάζει από το ανθρώπινο γάλα, δύο άλλες εκκριτικές λιποκαλίνες παρουσιάζουν περιορισμένη ομοιότητα στην ακολουθία τους αλλά κοντινή δομική ομοιότητα με την αγελαδινή β-Lg. Η γλυκοδελίνη (glycodelin), μία γλυκοζυλιωμένη λιποκαλίνη που σχετίζεται πιο στενά εξελικτικά με την β-γαλακτοσφαιρίνη και συγκεκριμένα μετά από φυλογενετική μελέτη προκύπτει ότι είναι πιο στενά συσχετισμένη με τη β-γαλακτοσφαιρίνη από το γάλα μπαμπούνου. Έχει προταθεί ότι η β-Lg προέκυψε από διπλασιασμό του γονιδίου της γλυκοδελίνης. Η γλυκοδελίνη είναι μία πρωτεΐνη που δεσμεύει ρετινόλη και εκφράζεται κατά το πρώτο τρίμηνο της ανθρώπινης κύησης στο ενδομήτριο ενώ η λειτουργία της παραμένει ασαφής. Η ρετινόλη είναι σημαντικός διαμορφωτής της διαφοροποίησης. Έτσι θα μπορούσε να υποτεθεί ότι η β-Lg έχει εξελιχθεί από μία πρωτεΐνη του ενδομητρίου απαραίτητη στη μητέρα στην αρχή της εγκυμοσύνης, αλλά υπάρχει στην έκκριση του μαστού λόγω της θρεπτικής της αξίας (Kontopidis, Holt, & Sawyer, 2004).

Δομικές και λειτουργικές μελέτες δείχνουν ότι η «tear lipocalin», η κύρια πρωτεΐνη στα δάκρυα, δεσμεύει ένα ευρύ φάσμα υδρόφοβων μορίων όπως η β-Lg (Glasgow, Abduragintov, Farahbakhsh, Faull, & Hubbell, 1995). Εμφανίζεται σημαντική η διατήρηση όχι μόνο της Glu89 σε όλες τις ακολουθίες των β-Lgs που βρέθηκαν μέχρι σήμερα αλλά και η διαμόρφωση της EF στροφής που επάγεται από το pH, όπως των β-Lgs (και μάλιστα και της tear lipocalin). Αυτή η διατήρηση δεν

συνάδει με έναν αποκλειστικό θρεπτικό ρόλο της β-Lg, αν και η καταγωγή του γονιδίου της β-Lg από την γλυκοδελίνη παραμένει μία ενδιαφέρουσα πιθανότητα (Kontopidis, Holt, & Sawyer, 2004).

1.5 Η β-Lg ως φορέας προστασίας των λιπόφιλων μορίων

Η β-Lg έχει την ικανότητα να δεσμεύει μεγάλο αριθμό μικρών μορίων αν και η θέση που δεσμεύεται το υπόστρωμα συνεχίζει να παράγει διαμάχες! Υπάρχουν στοιχεία για τρεις δυνητικά θέσεις πρόσδεσης της β-Lg. Η κύρια θέση στο εσωτερικό του κάλυκα, αποτελεί την πρωταρχική θέση δέσμευσης.

Στη β-Lg έχειδειχθεί ότι προσδένονται διάφορα υδρόφοβα μόρια όπως τα λιπαρά οξέα (π.χ. οκτανοϊκό, δεκανοϊκό, λαυρικό, μυριστικό, παλμιτικό, βρωμοδεκανοϊκό, στεατικό, ολεϊκό, λινολεϊκό οξύ κ.α), το ρετινοϊκό οξύ, το μη ιονικό απορρυπαντικό DDM (n-Dodecyl-β-D-maltoside) καθώς και προσδέτες λακτόζης αλλά και η βιταμίνη A, η βιταμίνη D₂, η βιταμίνη D₃. Την τελευταία δεκαετία έγιναν 111 εισαγωγές δομών της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στην τράπεζα των πρωτεϊνικών δομών, με 76 διαφορετικούς προσδέτες (Sawyer, 2013). Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα έχειδειχθεί να προσδένονται στην βόεια β-Lg με έναν τρόπο εξαρτώμενο από το μήκος της ανθρακικής τους αλυσίδας, με ισχυρότερη πρόσδεση να έχει παρατηρηθεί για το παλμιτικό οξύ. Εξέταση της κοιλότητας του κάλυκα δείχνει ότι υπάρχει λίγος χώρος πρόσδεσης για λιποφιλά μόρια με μήκος μεγαλύτερο από αυτό του παλμιτικού οξέος. Επιπλέον οι δομές της πρωτεΐνης με τα κορεσμένα λιπαρά οξέα C12, C14, C16, C18 δημοσιεύθηκαν πρόσφατα από τους Loch et al (J. I. Loch, Polit, Bonarek, Olszewska, Kurpiewska, Dziedzicka-Wasylewska, et al., 2012).

Η προσβασιμότητα των προσδετών στον κάλυκα είναι pH-εξαρτώμενη. Ανάλυση NMR και ακτίνων X έδειξε ότι το ανοιχτό άκρο του κάλυκα ελέγχεται από την ευκίνητη EF θηλιά. Όλες οι δομές της πρωτεΐνης που έχουν περιγραφεί και φέρουν προσδέτη στον κάλυκα εμφανίζουν μια ανοιχτή EF θηλιά, προτείνοντας ότι ο κάλυκας είναι προσβάσιμος σε ουδέτερο pH. Η εξάρτηση της πρόσδεσης από το pH δείχνει ότι η

πρόσδεση βελτιώνεται όταν αυξάνεται το pH σε συμφωνία με την κίνηση της EF θηλιάς που δρα ως «πώμα» στην κοιλότητα. Μελέτες NMR έχουν δείξει ότι δεν μπορεί να προσδεθεί κανένα μόριο παλμιτικού σε pH κάτω από 3.

Στην εικόνα 1.22 φαίνεται η δέσμευση ενός λιπαρού οξέος στο εσωτερικό του κάλυκα της β-Lg. Το υδρόφιλο άκρο της λιπαρού οξέος (μία ουρά OH) βρίσκεται στο ανοιχτό άκρο του βαρελιού. Το υδρόφοβο τμήμα του μορίου του πακετάρεται στον πυρήνα του βαρελιού μαζί με υδρόφοβες πλευρικές ομάδες από τα β-φύλλα.

Επιπλέον, έχει αναφερθεί και μία δεύτερη θέση πρόσδεσης που συμμετέχουν τα κατάλοιπα Trp19, Tyr20, Tyr42, Glu44, Gln59, Gln68, Leu156, Glu157, Glu158 και His161 και μία τρίτη θέση με τη συμμετοχή των καταλοίπων Tyr102, Leu104 και Asp129 (P. B. Edwards, Creamer, & Jameson, 2008).

Πρόσφατες μελέτες NMR που αφορούν τη δέσμευση του παλμιτικού οξέος, στο διμερές της βόειας β-Lg με τη «φιλική» για NMR Ala34Cys μετάλλαξη, έδειξαν ότι παρόλο που μία σταθερή σύνδεση διαμορφώνεται από την πρωτεΐνη για το υπόστρωμα στο κάτω μέρος του κάλυκα, η αλληλεπίδραση στο ανοιχτό άκρο (open end) του κάλυκα είναι πιο δυναμική (Konuma, Sakurai, & Goto, 2007). Αυτές οι παρατηρήσεις συμπληρώνουν εκείνες των (Ragona, Fogolari, Catalano, Ugolini, Zetta, & Molinari, 2003) καθώς και των κρυσταλλογραφικών μελετών με ακτίνες-X για τη δέσμευση λιπαρών οξέων, που έδειξαν την καρβοξυλική ομάδα της κεφαλής να είναι σημαντικά λιγότερο καλά διατεταγμένη, από ότι η υδρόφοβη ουρά (J. I. Loch, et al., 2012; Wu, Pérez, Puyol, & Sawyer, 1999). Τα αποτελέσματα της μελέτης των Konuma et al (Konuma, Sakurai, & Goto, 2007) με τη μετάλλαξη Ala34Cys προτείνουν ότι είναι η πλαστικότητα του D-κλώνου και οι EF και GH θηλιές που επιτρέπουν στη β-Lg να φιλοξενεί ένα τόσο ευρύ φάσμα υποστρωμάτων. Με εξαίρεση τις αλλαγές στη διαμόρφωση των πλευρικών αλυσίδων των Phe105 και Met107, μελέτες ακτίνων-X και

NMR δείχνουν ότι ο πυρήνας της δομής της λιποκαλίνης παραμένει αναλλοίωτος μετά τη δέσμευση του υποστρώματος. Κρυσταλλογραφικές μελέτες καταδεικνύουν σαφώς ότι τόσο τα λιπαρά οξέα όσο και η ρετινόλη (Kontopidis, Holt, & Sawyer, 2002; J. Loch, Polit, Görecki, Bonarek, Kurpiewska, Dziedzicka-Wasylewska, et al., 2011; Sawyer, Brownlow, Polikarpov, & Wu, 1998) δεσμεύονται στον κάλυκα.

Μεμονωμένα, η β-Lg μπορεί να παράγει αυξημένης σταθερότητας αιωρήματα-διασπορές παρόλα αυτά όμως, οι τροφές περιέχουν και άλλες ουσίες, π.χ. φωσφολιπίδια, οι οποίες είναι παρόντες στις φυσικές τροφές όπως είναι η λιπιδική σφαιρική μεμβράνη του γάλακτος (milk fat globule membrane (MFGM)) και άλλοι σταθεροποιητές που προστίθενται εξωγενώς.

Αυτοί οι διαφορετικοί τύποι πρόσθετων μπορούν να αλληλεπιδράσουν και να σχηματίσουν σύμπλοκα με την πρωτεΐνη με βελτιωμένη σταθεροποιητική συμπεριφορά σε σχέση με την σταθεροποίηση της διασποράς που προσδίδει η παρουσία της πρωτεΐνης από μόνη της (Lefèvre & Subirade, 2000).

Έχουν προταθεί διάφοροι μέθοδοι παρασκευής σφαιρικών φορέων-κυστιδίων με στόχο τον εγκλωβισμό της πρωτεΐνης σε αυτά (μίξη οργανικών διαλυτών/ υδατικού διαλύματος ή ενυδάτωση λιπιδικού υμενίου). Η μέθοδος ενυδάτωσης λιπιδικού υμενίου επιτρέπει τον εγκλωβισμό σφαιρικών πρωτεϊνών στην λειτουργική τους μορφή και για τον λόγο αυτό χρησιμοποιείται ευρέως (B. Liu, Mazouchi, & Gradinaru, 2010).

Με pI 5.3, η β-Lg θα είναι φορτισμένη αρνητικά σε pH 7.4 οπού γίνεται η παρασκευή των λιποσωμάτων. Αυτές οι συνθήκες ευνοούν την δέσμευση (πρόσδεση) αρνητικά φορτισμένων σωματιδίων όπως η β-Lg στην επιφάνεια (εξωτερική και εσωτερική) των λιποσωμάτων που υπάρχουν θετικά φορτισμένες ομάδες όπως η τεταρτοταγής αμίνη της PC.

1.6 Στόχος της παρούσας μελέτης

Η χαμηλή διαλυτότητα των λιποδιαλυτών βιταμινών σε υδατικά διαλύματα, αποτελεί σημαντικό πρόβλημα για την επαρκή βιοδιαθεσιμότητα τους. Η χρήση πρωτεϊνικών μορίων και αμφίφιλων λιπιδικών υπερδομών (λιποσωμάτων) μπορεί να αποβεί χρήσιμη αφού αυξάνει την διαλυτότητά τους, τροποποιεί την σταθερότητα χωρίς να αλλάζει τον υδρόφιλο χαρακτήρα του μέσου.

Ο στόχος της παρούσας διατριβής είναι:

- 1) η παρασκευή φορέων (λιπιδικής και πρωτεϊνικής φύσεως) για τον εγκλωβισμό και κατ'επέκταση την προστασία ευαίσθητων μορίων όπως είναι οι λιπόφιλες βιταμίνες,
- 2) η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών με τους οποίους αυτό επιτυγχάνεται, με την εφαρμογή βιοφυσικών και βιοχημικών τεχνικών, θα χρησιμεύσει ώστε να επιτευχθεί οξειδωτική προστασία των βιταμινών από το χημικό τους περιβάλλον,
- 3) ο έλεγχος του ρυθμού αποδέσμευσης από τον φορέα του προσδέτη (ligand) με αποτέλεσμα αποδοτικότερη μεταφορά-απομάκρυνση και σταθερότητα των συμπλόκων που δημιουργούνται,
- 4) ο έλεγχος της βιοδιαθεσιμότητας λιποδιαλυτών ουσιών και βιταμινών ειδικότερα. Η τροποποιημένη βιοδραστικότητα-βιοδιαθεσιμότητα των εγκλωβισμένων ή συνδεδεμένων βιταμινών σχετίζεται με τις τροποποιημένες φυσικοχημικές τους ιδιότητες μετά τον εγκλωβισμό τους και κατ'επέκταση με την διαφοροποιημένη ικανότητα διαπέρασης κυτταρικών μεμβρανών.

2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Υλικά και μέθοδοι

2.1.1 Όργανα

(τα ειδικά όργανα και συσκευές, περιγράφονται στις πειραματικές διαδικασίες των επιμέρους μελετών)

- pH-μετρο WTW pH 522
- Υδατόλουτρο και λουτρό υπερήχων ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας Ultrasonic Elmasonic SH075EL
- Ακίδα Υπερήχων (Labsonic M) Sartorius Stedim
- Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας Scaltec SBC 31
- Μαγνητικός αναδευτήρας και θερμαινόμενη πλάκα Heidolph MR 30001
- Αναδευτήρας (vortex) Mixer Uzusio LMS Model VTX-3000L
- Περιστρεφόμενος Εξατμιστήρας (Rotary Evaporator) BÜCHI RE 111
- Όργανο μέτρησης της δυναμικής σκέδασης φωτός Malvern Nanosizer ZS, Malvern Instruments (UK), εξοπλισμένο με ένα 4 mW He-Ne λέιζερ
- Φασματοφωτόμετρο (Spectrophotometer UV-VIS) Shimadzu UV-1205
- Φασματοφωτόμετρο φθορισμού Hitachi F-2500 (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan)
- Φυγόκεντρος Biofuge 28 RS (HERAEUS SEPATECH)
- Σύστημα υγρής χρωματογραφίας (CBM-20A, Shimadzu) αποτελούνταν από:
Αντλία (LC-20AD, Shimadzu)
Αυτόματος δειγματολήπτης (SIL-20AC, Shimadzu)
Θερμοστατούμενος κλίβανος (CTO-20A, Shimadzu).
- Θολερόμετρο (Hanna Instruments, USA)

- Όργανο διαφορικής θερμιδομετρία σάρωσης Perkin-Elmer Diamond-DSC (Perkin Elmer Corp., Norwalk, USA)
- Όργανο φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier Shimadzu IR Prestige-21 (Shimadzu, Tokyo, Japan)
- Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης Jeol JSM 5600 SEM (Jeol Ltd, Tokyo, Japan)
- Όργανο θερμιδομετρίας ισόθερμης τιτλοδότησης Nano ITC instrument (TA Instruments, USA)

2.1.2 Υλικά

- Φωσφατιδυλοχολίνη από κρόκο αυγού $\geq 99\%$ (Purified egg yolk phosphatidylcholine) από την εταιρεία Sigma-Aldrich Γερμανίας.
- Χοληστερόλη (Cholesterol) καθαρότητας $\geq 90\%$ σε μορφή σκόνης από την εταιρεία Sigma-Aldrich Γερμανίας.
- β-γαλακτοσφαιρίνη (β-lactoglobulin) καθαρότητας $\geq 90\%$ σε μορφή σκόνης από την εταιρεία Sigma-Aldrich Γερμανίας.
- Βιταμίνη A (retinol) καθαρότητας $\geq 97,5\%$ σε μορφή σκόνης από την εταιρεία Sigma-Aldrich Γερμανίας.
- Βιταμίνη E (α-tocopherol) καθαρότητας $\geq 96\%$ σε μορφή σκόνης από την εταιρεία Sigma-Aldrich Γερμανίας.
- Βιταμίνη D (cholecalciferol) καθαρότητας $\geq 98\%$ σε μορφή σκόνης από την εταιρεία Sigma-Aldrich Γερμανίας
- Βιταμίνη K (phylloquinone) καθαρότητας $\geq 99\%$ σε μορφή σκόνης από την εταιρεία Sigma-Aldrich Γερμανίας

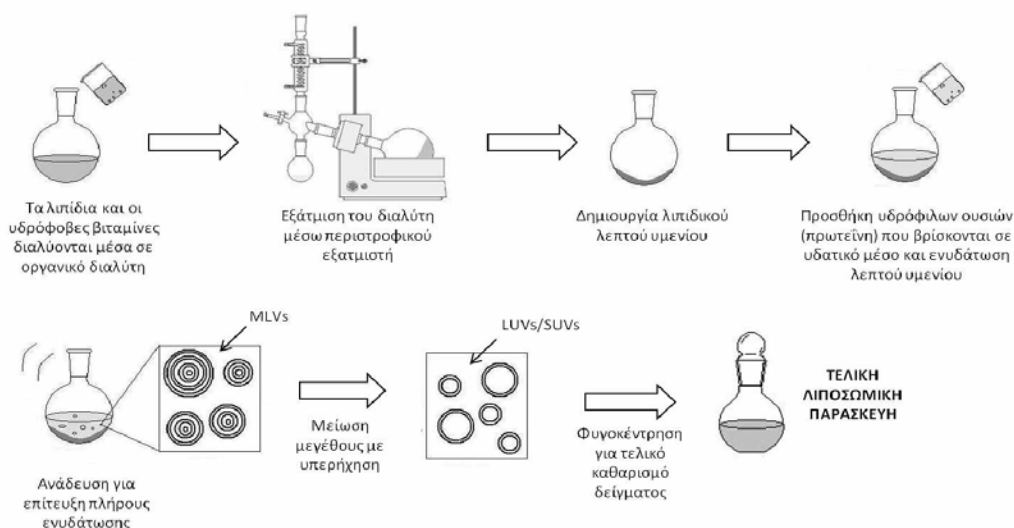
- Τα χημικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν όλα αναλυτικής καθαρότητας από την εταιρεία Serva (Γερμανίας) και την Sigma-Aldrich Γερμανίας
- Όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν HPLC καθαρότητας από τη εταιρεία Serva (Γερμανίας) και Merck KGaA (Γερμανίας).

2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Παρασκευή λιποσωμικών διασπορών που περιέχουν την πρωτεΐνη β-γαλακτοσφαιρίνη

Η φωσφατιδυλοχολίνη (ΦΔ) και η χοληστερόλη (ΧΟ) χρησιμοποιήθηκαν σε μοριακές αναλογίες ΦΔ/ΧΟ 2/1 και ΦΔ/ΧΟ 3/1 για την παρασκευή των λιποσωμάτων.

Τα αφυδατωμένα-επανυδατωμένα σωματίδια (DRVs) στα οποία εγκλωβίστηκε η β-Lg παρασκευάστηκαν σύμφωνα με την μέθοδο των Kim et al (C. K. Kim, Chung, Lee, Choi, & Kim, 1999) με κάποιες τροποποιήσεις με στόχο την δημιουργία ενός σταθερότερου φορέα για τον εγκλωβισμό των λιπόφιλων βιταμινών. Εν συντομία, μίγματα των ΦΔ/ΧΟ 2/1 και ΦΔ/ΧΟ 3/1 (ΦΔ/ΧΟ 2/1: ΦΔ= 100 mg, ΧΟ= 27,6 mg, ΦΔ/ΧΟ 3/1: ΦΔ= 100 mg, ΧΟ= 18,4 mg). διαλύθηκαν σε 10 mL χλωροφορμίου το κάθε μείγμα, το οποίο μετά από ανάδευση για την πλήρη διάλυση των λιπιδίων σε αυτό, εξατμίστηκε (χρησιμοποιώντας περιστρεφόμενο εξατμιστήρα υπό κενό) σε θερμοκρασία υψηλότερη από τη θερμοκρασία μετάπτωσης του λιπιδίου, που χρησιμοποιήθηκε (35°C) μέχρι να σχηματιστεί στα τοιχώματα της της φιάλης ένα φιλμ λεπτού υμενίου. Έπειτα η φιάλη τοποθετήθηκε σε ρεύμα αζώτου για να απομακρυνθούν τυχόν ίχνη διαλύτη, αλλά και για την αποφυγή χημικής αποικοδόμησης του λιπιδίου



Εικόνα 2.1 Σχηματική αναπαράσταση παρασκευής SUV λιποσωμάτων

Το φιλμ του λεπτού υμενίου έπειτα επανυδατώνεται με 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος Tris Buffered Saline, pH 7.4 (TBS). Μικρά μονοστιβαδιακά λιποσωματίδια (SUV liposomes) δημιουργούνται υποβάλλοντας την επανυδατωμένη παρασκευή για 30 λεπτά στην ακίδα υπερήχων. Μετά το πέρας της υπερήχησης ακολούθησε φυγοκέντρηση της παρασκευής στις 15.000 g για δέκα λεπτά, έτσι ώστε να απομακρυνθούν τυχόν συσσωματώματα λιποσωμάτων που δεν μειώθηκε το μέγεθος τους καθώς και τα υπολείμματα τιτανίου που αποκολλώνται από την ακίδα λόγω της μεγάλης τριβής της με το δείγμα. Τέλος ο μισός όγκος της λιποσωμικής παρασκευής (5 mL) αναμειγνύεται με 5 mL διαλύματος β-Lg σε TBS (1 mg/mL). Μετά από ανάδευση για πλήρη ομογενοποίηση τόσο το μείγμα των λιποσωμάτων στο οποίο προστέθηκε β-Lg όσο και των κενών λιποσωμάτων, αφού ψυχθεί στους -80 °C, τοποθετείται στο λυοφιλοποιητή για 24 ώρες (εικόνα 2,1).

Το λυοφιλοποιημένο δείγμα επανυδατώθηκε ελεγχόμενα ως εξής : α. Προστίθεται στο δείγμα 250 μl TBS, ακολουθεί έντονη μηχανική ανάδευση (vortex) και έπειτα το δείγμα αφήνεται σε ηρεμία για 30 λεπτά σε θερμοκρασία πάνω από την θερμοκρασία μετάπτωσης του λιπιδίου (35°C). β. Ακολουθεί επιπλέον προσθήκη 250μl

TBS και επαναλαμβάνεται ακριβώς η παραπάνω διαδικασία και γ. Προστίθεται στο δείγμα 9,5 mL TBS (έως ότου φτάσει στον αρχικό όγκο του δείγματος, 10 mL), το δείγμα αναδεύεται μηχανικά και αφήνεται τελικά σε ηρεμία για μισή ώρα. Τα δύο πρώτα βήματα της επανυδάτωσης είναι και τα πλέον καθοριστικά για τον εγκλωβισμό της β-Lg εντός των λιποσωμάτων. Τέλος το δείγμα φυγοκεντρείται για 30 λεπτά στις 24.000 g στους 25°C για την απομάκρυνση της μη εγκλωβισμένης πρωτεΐνης. Απομακρύνεται το υπερκείμενο με την μη εγκλωβισμένη πρωτεΐνη και το ίζημα επαναιωρείται με TBS στον αρχικό όγκο. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται δύο ακόμη φορές. Το τελικό δείγμα ψύχεται στους -80 °C, τοποθετείται για 24 ώρες για την τελική λυοφιλοποίησή του. Το λυοφιλοποιημένο δείγμα συλλέγεται και αφού ζυγιστεί, υπό μορφή σκόνης, φυλάσσεται για περαιτέρω μελέτη στους -80 °C.

2.2.2 Εκτίμηση του ποσοστού εγκλωβισμού της β-Lg στα λιποσώματα

2.2.2.1 Διαχωρισμός ελεύθερης από την εγκλωβισμένη στα λιποσώματα β-γαλακτοσφαιρίνης.

Ο καθαρισμός των λιποσωμάτων από τη μη εγκλωβισμένη σ' αυτά β-γαλακτοσφαιρίνη είναι απαραίτητο βήμα πριν τον προσδιορισμό του ποσοστού εγκλωβισμού της στα λιποσώματα.

Ο καθαρισμός μπορεί να επιτευχθεί όπως περιγράφηκε ήδη παραπάνω, με διαδοχικές επαναιώρησεις και φυγοκεντρήσεις διάρκειας 30 λεπτών στις 25.000 g και σε θερμοκρασία 10°C. Κατά τις φυγοκεντρήσεις απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρείται με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος TBS (pH=7,4) και μηχανική ανάδευση (vortex). Οι φυγοκεντρήσεις επαναλαμβάνονται τρεις φορές ώστε τελικά να είμαστε σίγουροι ότι το λιποσωμικό δείγμα έχει καθαριστεί πλήρως από τη

μη-εγκλωβισμένη β-γαλακτοσφαιρίνη. Το ίζημα που περιέχει τα καθαρά πλέον λιποσώματα επαναιωρείται με TBS (pH=7,4).

2.2.2.2 Φασματοσκοπία Φθορισμού

Η φθορισμομετρία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης, μέσω της μέτρησης του φθορισμού των καταλοίπων: τρυπτοφάνης και τυροσίνης, τα οποία έχουν την τάση να φθορίζουν όταν ακτινοβοληθούν με μονοχρωματική ακτίνα συγκεκριμένου μήκους κύματος (Schwedt, 1998).

Το ποσοστό της συγκέντρωσης της β-Lg που εγκλωβίστηκε στα λιποσώματα υπολογίστηκε με φασματοσκοπία φθορισμού χρησιμοποιώντας το φασματοφωτόμετρο φθορισμού Hitachi F-2500 (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) (μήκος κύματος διέγερσης: 295 nm, μήκος κύματος εκπομπής: 336 nm, εγκοπή διέγερσης: 5 nm, εγκοπή εκπομπής: 5 nm).

Το ποσοστό εγκλωβισμού (EE%) υπολογίστηκε έμεσα ως το ποσοστό της ποσότητας της β-Lg που δεν εγκλωβίστηκε στα αφυδατωμένα-επανυδατωμένα σωματίδια σε σχέση με την ολική ποσότητα β-Lg που προστέθηκε κατά την παρασκευή και την διαδικασία εγκλωβισμού (Ntimenou, Mourtas, Christodoulakis, Tsilimbaris, & Antimisariis, 2006) σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

$$[EE\%] = \frac{[Ολική\ πρωτεΐνη - Μη\ εγκλωβισμένη\ πρωτεΐνη] \text{ (mg)}}{Ολική\ πρωτεΐνη \text{ (mg)}} \times 100$$

2.2.2.3 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης με χρήση SDS

Η παρουσία της β-Lg στα λιποσώματα αφού αυτά διαρραγούν με μεθανόλη, εκτιμήθηκε και με την μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμίδης με χρήση SDS (Badiiee, Jaafari, Khamesipour, Samiei, Soroush, Kheiri, et al., 2009) Πιο ειδικά τα δείγματα των λυοφιλοποιημένων λιποσωμικών δειγμάτων: α) κενά

λιποσώματα με μοριακή αναλογία ΦΔ/XO 2/1 και ΦΔ/XO 3/1 και β) λιποσώματα με τις ίδιες αναλογίες που όμως περιέχουν και β-Lg διασπάστηκαν με διάλυμα μεθανόλης (σε 1 mg δείγματος προστέθηκαν 2 mL μεθανόλης). Το δείγμα αφού ανακινήθηκε πολύ καλά για να επιτευχθεί πλήρη διάσπαση των λιποσωμάτων, εξατμίστηκε η μεθανόλη και το δείγμα τέλος υποβλήθηκε σε ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμίδης με χρήση SDS έτσι ώστε να εκτιμηθεί η παρουσία της πρωτεΐνης. Τα δείγματα των λιποσωμάτων, καθαρή μορφή της β-Lg καθώς και δείκτες μοριακού βάρους φορτώθηκαν σε 12% πηκτή πολυακρυλαμίδης- SDS και ηλεκτροφορήθηκαν σε συσκευή Mini-Protean II (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA). Η ηλεκτροφόρηση διεξήχθη κάτω από σταθερή τάση 120 V για 45 λεπτά. Τόσο η ηλεκτροφόρηση όσο και οι ζώνες των πρωτεϊνών οπτικοποιήθηκαν με την χρήση Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma-Aldrich) όπως περιγράφεται από τους Sambrook et al (Sambrook & Russell, 2001).

2.2.2.4 Θερμιδομετρία Διαφορικής Σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry- DSC) υπό αδρανείς συνθήκες (N₂)

Η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC), χρησιμοποιείται για τη μελέτη των μεταβάσεων από μια φάση σε άλλη (π.χ. από υγρό σε αέριο). Αυτό συμβαίνει κατά την θέρμανση ή ψύξη, ευρέως φάσματος υλικών όπως κεραμικά, πολυμερή, υγροκρυσταλλικά υλικά και συστήματα όπως οι λιπιδικές διπλοστιβάδες.

Κατά τη διάρκεια της λειτουργίας του θερμιδόμετρου υπάρχει σταθερή ροή ξηρού αερίου N₂ ώστε να είναι αδρανές το περιβάλλον των δειγμάτων.

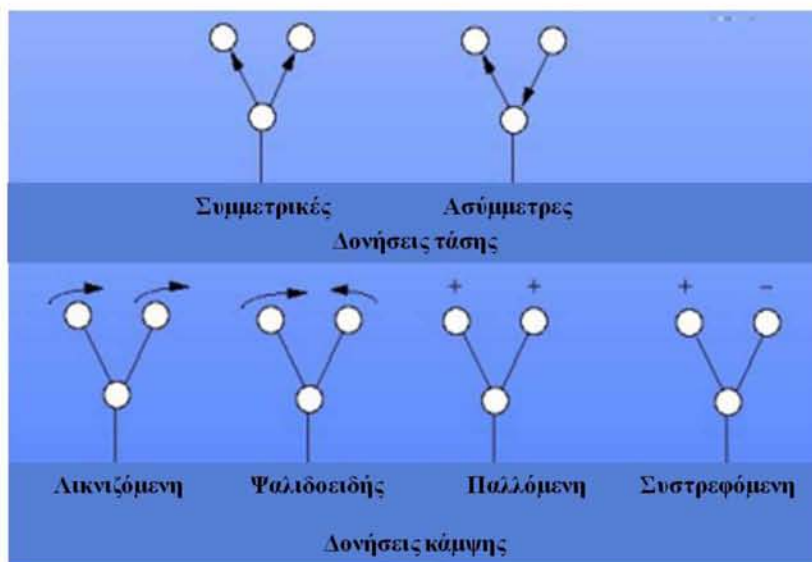
Λυοφιλοποιημένη β-Lg, κενά λιποσώματα (ΦΔ/XO 2/1 και ΦΔ/XO 3/1) καθώς και λιποσώματα με τις ίδιες μοριακές αναλογίες που έχουν εγκλωβίσει β-Lg αναλύθηκαν με την μέθοδο της θερμιδομετρίας διαφορικής σάρωσης έτσι ώστε να εκτιμηθεί ο εγκλωβισμός της β-Lg. Τα δείγματα (~3 mg) τοποθετήθηκαν σε ειδικά

σφραγισμένα σκεύη αλουμινίου και η ανάλυση των δειγμάτων έλαβε χώρα σε όργανο Perkin-Elmer Diamond-DSC (Perkin Elmer Corp., Norwalk, USA). Η ανάλυση των δειγμάτων έγινε υπό ροή αζώτου (20 mL/λεπτό) και σε ένα εύρος θερμοκρασιών από 25 έως 250 °C (Gokce, et al., 2012).

2.2.2.5 Φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier transform infrared spectroscopy-FT-IR)

Η φασματοσκοπία υπέρυθρου είναι στην ουσία η μελέτη της αλληλεπίδρασης του υπέρυθρου φωτός με την ύλη. Όταν η υπέρυθρη ακτινοβολία αλληλεπιδρά με την ύλη είναι δυνατό να απορροφηθεί προκαλώντας τη δόνηση των χημικών δεσμών ενός υλικού.

Οι προκύπτουσες δονήσεις ανήκουν στις βασικές κατηγορίες της τάσης (stretching) και της κάμψης (bending) (εικόνα 2.2).



Εικόνα 2.2 Κατηγορίες μοριακών δονήσεων (το + υποδεικνύει κίνηση από το επίπεδο της σελίδας προς τον αναγνώστη, το – δείχνει κίνηση προς την αντίθετη κατεύθυνση)

Ο χαρακτηρισμός των αλληλεπιδράσεων της β-Lg με τα λιποσώματα καθορίστηκε με την τεχνική της FTIR χρησιμοποιώντας το όργανο Shimadzu IR Prestige-21 (Shimadzu, Tokyo, Japan).

Όλα τα δείγματα προς ανάλυση που βρίσκονταν υπό μορφή σκόνης, αραιώθηκαν 1:100 με βρωμιούχο κάλιο (KBr) και αφού ομογενοποιήθηκαν με την σκόνη του KBr, τοποθετήθηκαν σε ειδική συσκευή υπό πίεση 10 τόνων για την δημιουργία των ειδικών για ανάλυση στο FT-IR, δισκίων (παστίλιας). Τα δισκία σαρώθηκαν υπό αδρανής συνθήκες σε ένα εύρος μήκους κύματος από 4000-1000 cm^{-1} με ταχύτητα σάρωσης 2 mm/λεπτό και με ανάλυση 4 cm^{-1} σε θερμοκρασία δωματίου (Mady, Shafaa, Abbase, & Fahium, 2012).

2.2.3 Εκτίμηση της σταθερότητας των λιποσωμικών παρασκευών στα οποία εγκλωβίστηκε η β-Lg

2.2.3.1 Μετρήσεις θολερομετρίας

Θολερότητα είναι οπτική ιδιότητα και εκφράζει τον βαθμό σκέδασης από ευθεία διαδρομή του φωτός που διέρχεται μέσα από ένα δείγμα. Υπάρχει μία συσχέτιση μεταξύ των ολικών αιωρούμενων σωματιδίων στο υγρό και της έντασης του φωτός λόγω της διασποράς των σωματιδίων

Για να προσδιοριστεί η φυσική σταθερότητα των σωματιδίων, εκτιμήθηκε η θολερότητα των λυοφιλοποιημένων λιποσωμάτων (αφού επανυδατώθηκαν σε TBS ή νερό) σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (0 ώρες, 24 ώρες, 48 ώρες και 72 ώρες). Τα επανυδατωμένα λιποσώματα διατηρούνταν στους 4 °C στο σκοτάδι και πριν κάθε μέτρηση της θολερότητας, τοποθετούνταν για εξισορρόπηση για 30 λεπτά στους 25 °C. Η θολερότητα μετρήθηκε στα 450 nm χρησιμοποιώντας ένα HI 83414 θολερόμετρο

(Hanna Instruments, USA) (Dwiecki, Górnaś, Wilk, Nogala-Kałużka, & Polewski, 2007).

2.2.3.2 Θερμιδομετρία Διαφορικής Σάρωσης (*Differential Scanning Calorimetry- DSC*) υπό οξειδωτικές συνθήκες (O_2)

Στη διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC), υπό οξειδωτικές συνθήκες, κατά τη διάρκεια της λειτουργίας του θερμιδόμετρου υπάρχει σταθερή ροή ξηρού αερίου O_2 για να είναι το περιβάλλον των δειγμάτων οξειδωτικό.

Η αντιοξειδωτική δράση τόσο των κενών λιποσωμάτων (ΦΔ/ΧΟ 2/1 και ΦΔ/ΧΟ 3/1) όσο και των λιποσωμάτων με τις ίδιες μοριακές αναλογίες που έχουν εγκλωβίσει β-Lg αλλά και η συμπεριφορά σε οξειδωτικές συνθήκες της β-Lg σε καθαρή μορφή εκτιμήθηκαν χρησιμοποιώντας ένα όργανο DSC (Perkin-Elmer Diamond-DSC, Perkin Elmer Corp., Norwalk, USA). Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε αναπροσαρμόστηκε από τους (Gortzi, Lalas, Chinou, & Tsaknis, 2006), η ροή οξυγόνου (20 mL/λεπτό) και σε ένα εύρος θερμοκρασιών από 180 έως 580 °C (ως θερμοκρασία της οξείδωσης του δείγματος προσδιορίζεται η θερμοκρασία έναρξης της οξειδωτικής κορυφής

2.2.4 Μορφολογικός προσδιορισμός των λιποσωμικών παρασκευών στα οποία εγκλωβίστηκε η β-Lg

2.2.4.1 Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (*Scanning Electron Microscopy- SEM*)

Η Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM) είναι μία από τις πιο σύγχρονες μεθόδους ανάλυσης για την μελέτη της υφής των υλικών, όπως το μέγεθος και το σχήμα των σωματιδίων, επιφανειακά χαρακτηριστικά, ασυνέχειες της επιφάνειας.

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης είναι ένα όργανο που λειτουργεί όπως περίπου και ένα οπτικό μικροσκόπιο μόνο που χρησιμοποιεί δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας αντί για φως, για να εξετάσει αντικείμενα σε λεπτομερή κλίμακα και με μεγάλη δυνατότητα εστίασης. Η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης συνδυάζει μεγάλη μεγέθυνση και μεγάλο βάθος πεδίου, παράγοντες οι οποίοι είναι πολύ περιορισμένοι στην οπτική μικροσκοπία. Η εικόνα σχηματίζεται από ηλεκτρικό σήμα χωρίς τη χρήση μεγεθυντικών φακών, και έτσι αποφεύγονται τα σφάλματα των φακών (Reimer, 2000).

Η μορφολογία των παρασκευασθέντων λιποσωμάτων εκτιμήθηκε με ένα όργανο Jeol JSM 5600 SEM (Jeol Ltd, Tokyo, Japan) μετά από την ευγενική του παραχώρηση από τον Καθηγητή κο. Πομόνη Φίλιππο, στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Τα λυοφιλοποιημένα δείγματα αφού επικαλύφθηκαν με χρυσό με την χρήση ενός εξατμιστήρα κενού τέθηκαν υπό παρατήρηση με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης υπό τάση επιτάχυνσης 20 kV (Park, Choi, Davaa, & Park, 2011).

2.2.4.2 Δυναμική σκέδαση φωτός (Dynamic Light Scattering-DLS)

Το ηλεκτρικό δυναμικό των λιποσωμάτων μετράται με την δυναμική σκέδαση φωτός (Dynamic Light Scattering- DLS) ή αλλιώς φασματοσκοπία συσχέτισης φωτονίων (Photon correlation spectroscopy- PCS). Η δυναμική σκέδαση του φωτός είναι μια πολύ καλή μέθοδος για τη μέτρηση των διαστάσεων των μακρομορίων. Με αυτή τη μέθοδο μπορούμε να υπολογίσουμε την υδροδυναμική ακτίνα R_H για σκεδάζοντα σωματίδια, η οποία για άπειρη αραιώση σχετίζεται με το συντελεστή διάχυσης τους.

Η δυναμική σκέδαση φωτός (γωνία μέτρησης, 173°) πραγματοποιήθηκε με την χρήση του οργάνου Malvern Nanosizer ZS, Malvern Instruments (UK), μετά από την ευγενική του παραχώρηση από τον Επίκουρο Καθηγητή κο. Φατούρο Δημήτριο, στο

Τμήμα Φαρμακευτικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Το συγκεκριμένο όργανο είναι εξοπλισμένο με ένα 4 mW He-Ne λέιζερ ως πηγή φωτός που λειτουργεί σε μήκη κύματος ≥ 633 nm καθώς και με ένα συσχετιστή φωτονίων. Οι αναφερόμενες τιμές του δείκτη πολυδιασποράς (polydispersity index- PDI), κυμαίνονται από 0, για ένα ιδανικό δείγμα χωρίς καθόλου διασπορά μέχρι και 1, για πολύ μεγάλου μεγέθους διασπορές. Οι τιμές αυτές προκύπτουν από την εξίσωση $PDI = \sigma^2 / D_h^2$, όπου σ είναι η τυπική απόκλιση της κατανομής (nm) και D_h είναι η μέση υδροδυναμική διάμετρος. Οι ηλεκτροφορητικές κινητικότητες τόσο των κενών λιποσωμάτων όσο και των λιποσωμάτων που έχουν εγκλωβίσει β-γαλακτοσφαιρίνη μετρήθηκαν στους 25 °C αφού επανυδατώθηκαν με απεσταγμένο νερό (Nasrollahi, Sharifi, & Barahoie, 2014).

2.3 Παρασκευή λιποσωμικών διασπορών για τον εγκλωβισμό των λιπόφιλων βιταμινών E, D και A

Η φωσφατιδυλοχολίνη (ΦΔ) και η χοληστερόλη (ΧΟ) χρησιμοποιήθηκαν σε μοριακή αναλογία ΦΔ/ΧΟ 2/1.

Τα αφυδατωμένα-επανυδατωμένα σωματίδια στα οποία εγκλωβίστηκε τόσο η βιταμίνη Α, όσο και η βιταμίνη Ε και η βιταμίνη D και τα οποία περιείχαν και την β-Lg, παρασκευάστηκαν με την μέθοδο των αφυδατωμένων επανυδατωμένων σωματιδίων (Dehydrated Rehydrated Vehicles-DRVs). Εν συντομία, μίγματα των ΦΔ/ΧΟ 2/1 και βιταμινών (διαλύθηκαν σε 10 mL αιθανόλης το οποίο μετά από ανάδευση για την πλήρη διάλυση των λιπιδίων σε αυτό, εξατμίστηκε (χρησιμοποιώντας περιστρεφόμενο εξατμιστήρα υπό κενό) σε θερμοκρασία υψηλότερη από τη θερμοκρασία μετάπτωσης του λιπιδίου, που χρησιμοποιήθηκε (35°C) μέχρι να σχηματιστεί στα τοιχώματα της φιάλης ένα φιλμ λεπτού υμενίου. Οι βιταμίνες προστέθηκαν στα φωσφολιπίδια σε αναλογία 0,01:1 (w/w) (ΦΔ/ΧΟ 2/1: ΦΔ= 100 mg, ΧΟ= 27,6 mg, βιταμίνη:1 mg). Έπειτα η φιάλη τοποθετήθηκε σε ρεύμα αζώτου για να απομακρυνθούν τυχόν ίχνη διαλύτη, αλλά και για την αποφυγή χημικής αποικοδόμησης του λιπιδίου.

Το φιλμ του λεπτού υμενίου στη συνέχεια επανυδατώνεται με 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος TBS, pH 7.4. Μικρά μονοστιβαδικά λιποσωμικά σωματίδια (SUV liposomes) δημιουργούνται υποβάλλοντας την επανυδατωμένη παρασκευή για 30 λεπτά στην ακίδα υπερήχων. Μετά το πέρας της υπερήχησης ακολούθησε φυγοκέντρηση της παρασκευής στις 15.000 g για δέκα λεπτά, έτσι ώστε να απομακρυνθούν τυχόν συσσωματώματα λιποσωμάτων, τα οποία δεν μειώθηκε το μέγεθός τους, καθώς και τα υπολείμματα τιτανίου που αποκολλώνται από την ακίδα λόγω της μεγάλης τριβής της με το δείγμα. Τέλος ο μισός όγκος της λιποσωμικής

παρασκευής χωρίς την παρουσία βιταμίνης (5 mL) αναμειγνύεται με 5 mL διαλύματος β-Lg σε TBS (1 mg/mL) όπως και ο μισός όγκος της λιποσωμικής παρασκευής που περιείχε βιταμίνη. Μετά από ανάδευση για πλήρη ομογενοποίηση όλα τα υπό μελέτη δείγματα, αφού ψυχθούν στους -80 °C, τοποθετούνται στο λυοφιλοποιητή για 24 ώρες.

Το λυοφιλοποιημένο δείγμα επανυδατώνονται ελεγχόμενα ως εξής: α) Προστίθεται στο δείγμα 250 μL TBS, ακολουθεί έντονη μηχανική ανάδευση (vortex) και έπειτα το δείγμα αφήνεται σε ηρεμία για 30 λεπτά σε θερμοκρασία πάν από την θερμοκρασία μετάπτωσης του λιπιδίου (35°C). β) Ακολουθεί προσθήκη 250μl TBS και επαναλαμβάνεται ακριβώς η παραπάνω διαδικασία και γ). Προστίθεται στο δείγμα 9,5 mL TBS (έως ότου φτάσει στον αρχικό όγκο του δείγματος, 10 mL), το δείγμα αναδεύεται μηχανικά και αφήνεται τελικά σε ηρεμία για μισή ώρα. Τα δύο πρώτα βήματα της επανυδάτωσης είναι και τα πλέον καθοριστικά για τον εγκλωβισμό της β-Lg εντός των λιποσωμάτων. Τέλος το δείγμα φυγοκεντρείται για 30 λεπτά στις 24.000 g στους 25°C για την απομάκρυνση της μη εγκλωβισμένης πρωτεΐνης. Απομακρύνεται το υπερκείμενο με την μη εγκλωβισμένη πρωτεΐνη και το ίζημα επαναιωρείται με TBS στον αρχικό όγκο. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται δύο ακόμη φορές. Το τελικό δείγμα ψύχεται στους -80 °C και τοποθετείται για 24 ώρες για την τελική λυοφιλοποίησή του. Το λυοφιλοποιημένο δείγμα συλλέγεται και αφού ζυγιστεί, υπό μορφή σκόνης, φυλάσσεται για περαιτέρω μελέτη στους -80 °C.

2.3.1 Εκτίμηση του ποσοστού εγκλωβισμού των βιταμινών A, D & E στα λιποσώματα

2.3.1.1 Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (*High-performance liquid chromatography- HPLC*)

Για τον υπολογισμό του ποσοστού εγκλωβισμού των τριών λιπόφιλων βιταμινών στα λιποσώματα παρουσία και απουσία της β-Lg χρησιμοποιήθηκε η τεχνική HPLC κανονικής φάσης σε συνδυασμό με ανιχνευτή φθορισμού (βιταμίνη E) και η HPLC ανάστροφης φάσης σε συνδυασμό με ανιχνευτή υπεριώδους – ορατού (βιταμίνη A & D).

Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας (CBM-20A, Shimadzu) αποτελούνταν από:

- Αντλία (LC-20AD, Shimadzu)
- Αυτόματος δειγματολήπτης (SIL-20AC, Shimadzu)
- Θερμοστατούμενος κλίβανος (CTO-20A, Shimadzu).

Το ποσοστό εγκλωβισμού (EE%) και για τις τρεις υπό μελέτη πρωτεΐνες υπολογίστηκε ως το ποσοστό της ποσότητας της κάθε βιταμίνης που εγκλωβίστηκε στα αφυδατωμένα-επανυδατωμένα σωματίδια σε σχέση με την ολική ποσότητά της που προστέθηκε κατά την παρασκευή και την διαδικασία εγκλωβισμού σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

$$[EE\%] = \frac{\text{Εγκλωβισμενη_βιταμινη (mg)}}{\text{Ολικη_βιταμινη(mg)}} \times 100$$

2.3.1.1.1 Προσδιορισμός βιταμίνης E

Η μέθοδος προσδιορισμού της βιταμίνης E (α- τοκοφερόλη) βασίστηκε στην μέθοδο του Lalas et al (Lalas, et al., 2011). (Shimadzu RF-10AXL fluorescence detector)

2.3.1.1.2 Προσδιορισμός βιταμίνης A

Η μέθοδος προσδιορισμού της βιταμίνης A προέκυψε από τροποποιήσεις επί του πρωτοκόλλου της μεθόδου των Rodas Mendoza et al (Rodas Mendoza, Morera Pons, Castellote Bargalló, & López-Sabater, 2003). Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η αναλυτική στήλη Luna C₁₈, 250 x 4.6 mm, 5μm (phenomenex, Torrance, USA). Η κινητή φάση αποτελούνταν από 100% μεθανόλη, με ταχύτητα ροής 1ml/min. Επιπλέον η θερμοκρασία της αναλυτικής στήλης διατηρούνταν σταθερή καθ' όλη την διάρκεια της ανάλυσης στους 30°C. Ο προσδιορισμός της all trans ρετινόλης πραγματοποιήθηκε με την χρήση του ανιχνευτή UV-DAD με μήκος κύματος 325 nm.

2.3.1.1.3 Προσδιορισμός βιταμίνης D

Η μέθοδος προσδιορισμού της βιταμίνης D προήλθε από τροποποιήσεις επί της μεθόδου του Byrdwell et al (Byrdwell, 2009). Για τον προσδιορισμό της βιταμίνης D, χρησιμοποιήθηκε η αναλυτική στήλη Luna C₁₈, 250 x 4.6 mm, 5μm (phenomenex, Torrance, USA). Η έκλουση ήταν ισοκρατική με μείγμα διαλυτών ακετονιτριλίου : μεθανόλης με αναλογία όγκων 55:45. Για την ανίχνευση της ουσίας χρησιμοποιήθηκε ο ανιχνευτής UV-DAD με μήκος κύματος 265 nm.

2.3.2 Εκτίμηση της σταθερότητας των λιποσωμικών παρασκευών στα οποία εγκλωβιστήκαν οι λιπόφιλες βιταμίνες A, D & E

2.3.2.1 Μετρήσεις θολερομετρίας

Για να προσδιοριστεί η φυσική σταθερότητα των σωματιδίων στα οποία εγκλωβίστηκαν οι τρεις λιπόφιλες βιταμίνες, εκτιμήθηκε η θολερότητα των λυοφιλοποιημένων λιποσωμάτων (αφού επανυδατώθηκαν σε TBS ή νερό) σε

συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (0 ώρες, 24 ώρες, 48 ώρες και 72 ώρες). Τα επανυδατωμένα λιποσώματα αποθηκεύθηκαν στους 4 °C στο σκοτάδι και πριν κάθε μέτρηση της θολερότητας, τοποθετούνταν για εξισορρόπηση για 30 λεπτά στους 25 °C. Η θολερότητα μετρήθηκε στα 450 nm χρησιμοποιώντας ένα HI 83414 θολερόμετρο (Hanna Instruments, USA) (Dwiecki, Górnaś, Wilk, Nogala-Kałużka, & Polewski, 2007).

2.3.2.2 Θερμιδομετρία Διαφορικής Σάρωσης (*Differential Scanning Calorimetry- DSC*) υπό οξειδωτικές συνθήκες (O₂)

Η αντιοξειδωτική δράση τόσο των ΦΔ/ΧΟ 2/1 κενών λιποσωμάτων όσο και των λιποσωμάτων με την ίδια μοριακή αναλογία που έχουν εγκλωβίσει βιταμίνη Α ή D ή Ε αλλά και β-Lg αλλά και η συμπεριφορά σε οξειδωτικές συνθήκες των λιπόφιλων αυτών βιταμινών σε καθαρή μορφή εκτιμήθηκαν χρησιμοποιώντας ένα όργανο DSC (Perkin-Elmer Diamond-DSC, Perkin Elmer Corp., Norwalk, USA). Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε αναπροσαρμόστηκε από τους Gortzi et al (Gortzi, Lalas, Chinou, & Tsaknis, 2006), με ροή οξυγόνου (20 mL/λεπτό) και σε ένα εύρος θερμοκρασιών από 180 έως 580 °C (ως θερμοκρασία της οξείδωσης του δείγματος προσδιορίζεται η θερμοκρασία έναρξης της οξειδωτικής κορυφής).

2.3.3 Μορφολογικός προσδιορισμός των λιποσωμικών παρασκευών στα οποία εγκλωβίστηκαν οι λιπόφιλες βιταμίνες

2.3.3.1 Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (*Scanning Electron Microscopy- SEM*)

Η μορφολογία των παρασκευασθέντων λιποσωμάτων που είχαν εγκλωβίσει τόσο την β-Lg όσο και την βιταμίνη Ε, εκτιμήθηκε με ένα όργανο Jeol JSM 5600 SEM (Jeol Ltd, Tokyo, Japan). Τα λυοφιλοποιημένα δείγματα αφού επικαλύφθηκαν με χρυσό

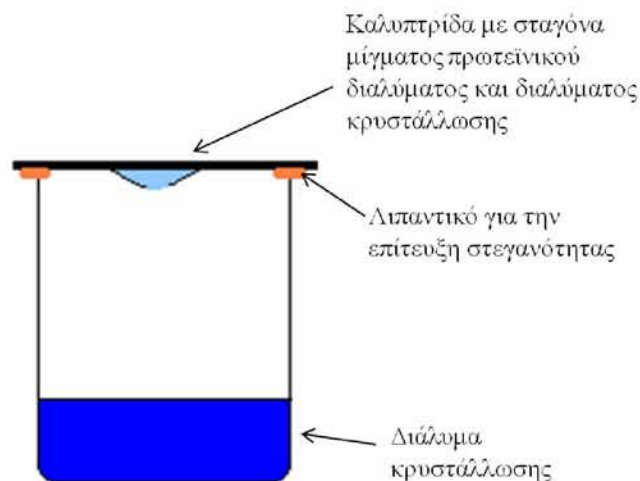
με την χρήση ενός εξατμιστήρα κενού τέθηκαν υπό παρατήρηση με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης υπό τάση επιτάχυνσης 20 kV (Park, Choi, Davaa, & Park, 2011).

2.4 Μελέτη της επίδρασης του περιβάλλοντος και του μέσου στην ικανότητα σύνδεσης και επιλογή των συνθηκών μέσα στις οποίες οι πρωτεϊνικοί φορείς παρουσιάζουν την μέγιστη απόδοση.

Στα πλαίσια της κατανόησης τόσο της επίδρασης του περιβάλλοντος αλλά και του μέσου στην ικανότητα σύνδεσης, όσο και της επιλογής των κατάλληλων συνθηκών μέσα στις οποίες οι πρωτεϊνικοί φορείς παρουσιάζουν την μέγιστη απόδοση, έγιναν πειράματα κρυστάλλωσης της πρωτεΐνης β-Lg με προσθήκη ως πιθανό προσδέτη το συνθετικό λιπαρό οξύ, τριδεκανοϊκό οξύ (tridecanoic acid, C13), καθώς και συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων ακτίνων-X και προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής της β-Lg και της ακριβής θέσης πρόσδεσης του λιπαρού οξέος. Επιπλέον εκτενή πειράματα θερμιδομετρίας ισόθερμης τιτλοδότησης (Isothermal Titration Calorimetry-ITC) της β-Lg με συγκεκριμένους προσδέτες έλαβαν χώρα για την θερμοδυναμική μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεΐνης και προσδέτη σε πραγματικό χρόνο και αξιολόγηση του βαθμού σύνδεσής τους.

2.4.1 Κρυστάλλωση πρωτεϊνών

Ο προσδιορισμός μιας πρωτεϊνικής δομής μπορεί να επιτευχθεί με κρυστάλλωση της πρωτεΐνης και ανάλυση της κρυσταλλικής αυτής δομής. Για την ανάλυση των δομών απαιτούνται μεγάλοι και καλοσχηματισμένοι κρύσταλλοι. Μία ευρέως διαδεδομένη τεχνική με την οποία επιτυγχάνεται κρυστάλλωση πρωτεϊνικών μορίων είναι η τεχνική της κρεμάμενης σταγόνας (εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.3 Η μέθοδος της κρεμαστής σταγόνας σχηματικά

Κρύσταλλοι από το σύμπλεγμα β -Lg-C13 δημιουργήθηκαν με την μέθοδο της κρεμάμενης σταγόνας. Η σταγόνα αποτελούνταν από 4 μ L της β -Lg (20 mg/mL), C13 (10 mM), 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8 αναμίχθηκαν με 4 μ L του διαλύματος κρυστάλλωσης. Οι σταγόνες εξισορρόπησαν με 1000 μ L του διαλύματος κρυστάλλωσης που περιείχε 1.43 M Sodium Citrate & 0.1 M Hepes, pH 7.5. Οι καλύτερης ποιότητας κρύσταλλοι αποκτήθηκαν όταν η συγκέντρωση του προσδέτη (C13) ήταν 10 mM σε 100% αιθανόλη. Κρύσταλλοι του συμπλόκου της β -Lg με τον προσδέτη εμφανίστηκαν μετά από 48 ώρες και έφτασαν στο μέγιστο μέγεθός τους (έως 0.3 mm) μετά από περίπου έξι μέρες.

2.4.1.1 Συλλογή Κρυσταλλογραφικών Δεδομένων

Η συλλογή των δεδομένων ανάλυσης του κρυστάλλου έγινε στους -153,15 °C (120 K) με μία γεννήτρια παραγωγής ακτίνων X Oxford Diffraction, εξοπλισμένη με μικροεστίαση Cu K α (1.54 Å) στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών μετά από την ευγενική παραχώρηση των εγκαταστάσεών του. Η γεννήτρια των ακτίνων X λειτουργεί στα 50 kV και 1 mA και 135 mm CCD. Ένας κρύσταλλος μήκους 0.2-0.3 mm συλλέχθηκε με την χρήση ενός ειδικού βρόγχου (Cryoloop) διαμέτρου 0.4 mm (Hampton Research

Inc.), εμβαπτίστηκε για ελάχιστο χρόνο σε ένα κρυοπροστατευτικό διάλυμα (10% glycerol in 1.34 M Sodium Citrate in 0.1 M Tris Buffer, pH 8), και έπειτα μεταφέρθηκε σε έναν ειδικό μαγνητικό γωνιόμετρο, αφέθηκε να παγώσει υπό ρεύμα N₂ στους 100 K (Cryostream; Oxford Cryosystems). Τα δεδομένα επεξεργάστηκαν με τα προγράμματα CRYSALISPro (Agilent, 2010) και SCALA από το πακέτο CCP4.

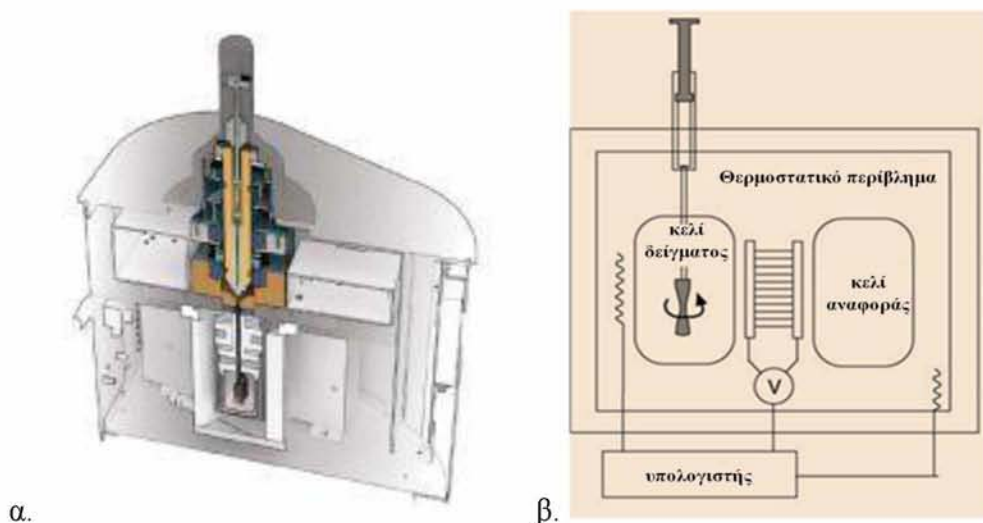
2.4.1.2 Λύση και βελτιστοποίηση της δομής

Ο υπολογισμός που πραγματοποιήθηκε για την βελτιστοποίηση της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου της β-Lg με το C13 έλαβε χώρα με χρήση επαναλαμβανόμενων κύκλων των προγραμμάτων REFMAC & COOT (Emsley & Cowtan, 2004; Murshudov, Vagin, & Dodson, 1997), ενώ τα μόρια του νερού προστέθηκαν στη δομή με το πρόγραμμα COOT (Emsley & Cowtan, 2004).

2.4.2 Θερμιδομετρία Ισόθερμης Τιτλοδότησης (Isothermal Titration Calorimetry-ITC)

Η Θερμιδομετρία Ισόθερμης Τιτλοδότησης (Isothermal Titration Calorimetry-ITC) αποτελεί μία σημαντική μέθοδο για το χαρακτηρισμό των μοριακών αλληλεπιδράσεων καθώς και για την κατανόηση της θερμοδυναμικής της πρόσδεσης βιολογικών μορίων και βιολογικών συστημάτων.

Οι αλληλεπιδράσεις των λιπαρών οξέων με την β-Lg μελετήθηκαν με την τεχνική ITC στους 25°C (298 K) χρησιμοποιώντας το μηχάνημα Nano ITC (TA Instruments, USA) (εικόνα 2.4).



**Εικόνα 2.4 α) Κάθετη διατομή του για την σχηματική απεικόνιση της εσωτερικής του δομής
β) Σχηματική αναπαράσταση της εσωτερικής διάταξης του μηχανήματος ITC**

Παρασκευάστηκε μητρικό διάλυμα του λιπαρού οξέος 20-40 mM σε 100% αιθανόλη και αραιώθηκε πριν την μέτρηση σε διάλυμα 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) σε τελική συγκέντρωση αιθανόλης 10%. Η διαλυτότητα στο διάλυμα 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) προσδιορίστηκε με πρότυπα διαλύματα λιπαρών οξέων σε 100% αιθανόλη. Στο διάλυμα της πρωτεΐνης προστέθηκε αιθανόλη σε ίδιο ποσοστό με αυτό που περιέχεται στο διάλυμα του λιπαρού οξέος. Λόγω πολύ χαμηλής διαλυτότητας του συνθετικού λιπαρού οξέος σε υδατικά διαλύματα, υπήρχε δυσκολία ανίχνευσης της θερμότητας από την αντίδραση πρόσδεσης του λιπαρού οξέος με την πρωτεΐνη. Σε μια προσπάθεια να αυξηθεί η συγκέντρωση του λιπαρού οξέος και έως εκ τούτου το σήμα, η τιτλοδότηση έγινε με ανεστραμμένη διάταξη. Στο κελί του δείγματος τοποθετήθηκε το διάλυμα του λιπαρού οξέος ενώ το διάλυμα της πρωτεΐνης τοποθετήθηκε στην σύριγγα η οποία πραγματοποιεί τις ενέσεις (εικόνα 2.4).

Σε ένα τυπικό πείραμα, πραγματοποιήθηκαν 25 ενέσεις από 5-10 μL του διαλύματος της πρωτεΐνης, η οποία προστίθενται στο κελί του δείγματος που περιείχε τον προσδέτη (κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε τουλάχιστον 3 φορές).

Για να ελαχιστοποιήσουμε την συμμετοχή της θερμότητας λόγω της διάχυσης στην μέτρηση της αλλαγής της θερμοκρασίας του δείγματος, το διάλυμα της πρωτεΐνης και το διάλυμα του λιπαρού οξέος είχαν ακριβώς την ίδια σύσταση. Οι προσθήκες πρωτεΐνης στο διάλυμα λιπαρών οξέων συνεχίστηκαν για 5-6 φορές ακόμη μετά τον κορεσμό έτσι ώστε η θερμότητα που εκλύεται από το διάλυμα του προσδέτη (απλή διάχυση) να είναι εφικτό να προσδιοριστεί από την ενέργεια που δίνουν οι επιπρόσθετες αυτές κορυφές.

Η σταθερή ταχύτητα ανάδευσης (300 rpm) διατηρήθηκε κατά την διάρκεια όλων των πειραμάτων έτσι ώστε να διασφαλιστεί η σωστή ανάμιξη μετά από κάθε ένεση. Η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα NanoAnalyze scientific plotting software σύμφωνα με το μοντέλο των ανεξάρτητων θέσεων πρόσδεσης.

2.5 Εκτίμηση της σύνδεσης των λιπόφιλων βιταμινών A, E & D στην πρωτεΐνη β-γαλακτοσφαιρίνη (β-Lg)

Η εκτίμηση της σύνδεσης των τεσσάρων λιπόφιλων βιταμινών με την β-Lg έγινε με την χρήση της τεχνικής ITC στους 25 °C (298 K) χρησιμοποιώντας το μηχάνημα Nano ITC (TA Instruments, USA), όπως περιγράφεται παραπάνω για την πρόσδεση λιπαρών οξέων στην β-Lg.

Παρασκευάστηκε μητρικό διάλυμα της κάθε μίας βιταμίνης 20-40 mM σε 100% αιθανόλη και αραιώθηκαν πριν την μέτρηση σε διάλυμα 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) σε συγκέντρωση χαμηλότερη της κρίσιμης συγκέντρωσης μικυλίου (critical micelle concentration- CMC). Στο διάλυμα της πρωτεΐνης προστέθηκε αιθανόλη σε ίδιο ποσοστό με αυτό που περιέχεται στο διάλυμα της βιταμίνης. Λόγω πολύ χαμηλής διαλυτότητας των λιπόφιλων βιταμινών σε υδατικά διαλύματα, η τιτλοδότηση έγινε με ανεστραμμένη διάταξη. Στο κελί του δείγματος τοποθετήθηκε το διάλυμα της βιταμίνης ενώ το διάλυμα της πρωτεΐνης τοποθετήθηκε στην σύριγγα η οποία πραγματοποιεί τις ενέσεις. Σε ένα τυπικό πείραμα, πραγματοποιήθηκαν 17 ενέσεις από 5-15 μ L του διαλύματος της πρωτεΐνης, η οποία προστίθενται στο κελί του δείγματος που περιείχε την βιταμίνη (κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε τουλάχιστον 3 φορές).

Για να ελαχιστοποιήσουμε την συμμετοχή της θερμότητας λόγω της διάχυσης στην μέτρηση της αλλαγής της θερμοκρασίας του δείγματος, το διάλυμα της πρωτεΐνης και το διάλυμα της βιταμίνης είχαν ακριβώς την ίδια σύσταση. Οι προσθήκες πρωτεΐνης στο διάλυμα των βιταμινών συνεχίστηκαν για αρκετές φορές ακόμη μετά τον κορεσμό έτσι ώστε η θερμότητα που εκλύεται από τη διάχυση του διαλύματος του προσδέτη να είναι εφικτό να προσδιοριστεί από την ενέργεια που δίνουν οι επιπρόσθετες αυτές κορυφές.

Η σταθερή ταχύτητα ανάδευσης (300 rpm) διατηρήθηκε κατά την διάρκεια όλων των πειραμάτων έτσι ώστε να διασφαλιστεί η σωστή ανάμιξη μετά από κάθε ένεση. Η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα NanoAnalyze scientific plotting software σύμφωνα με το μοντέλο των ανεξάρτητων θέσεων πρόσδεσης.

2.6 Έλεγχος της βιοδραστικότητας της βιταμίνης Α- In vivo μελέτη της βιοκατανομής της βιταμίνης στο αίμα ποντικών.

Μελετήθηκε η βιοκατανομή της ρετινόλης στο αίμα 72 ποντικών. Χρησιμοποιήθηκαν ενήλικα (10-12 εβδομάδων) αρσενικά ποντίκια γενοτύπου CBA/C57, βάρους κατά μέσο όρο 20 γρ. (εικόνα 2.5). Η προμήθεια των πειραματόζων ήταν μία ευγενική προσφορά της εταιρίας Biomedcode Hellas SA.



Εικόνα 2.5 Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της βιοκατανομής της ρετινόλης στο αίμα.

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων, τα πειραματόζωα κρατήθηκαν σε κατάλληλες συνθήκες, σύμφωνες με τους διεθνείς κανονισμούς φροντίδας και διαχείρισης εργαστηριακών ζώων (“Guideline on the Care and Use of Laboratory Animals”). Συγκεκριμένα φυλάσσονταν σε κλωβούς ομαδικής στέγασης, υπό ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας με εναλλασσόμενους κύκλους φωτός/ σκότους 12 h, ενώ διατρέφονταν με τυποποιημένη τροφή και νερό βρύσης.

\

2.6.1 Χορήγηση δυο διαφορετικών μορφών βιταμίνης Α (ρετινόλης) δια του στόματος (Oral Gavage) σε ποντίκια

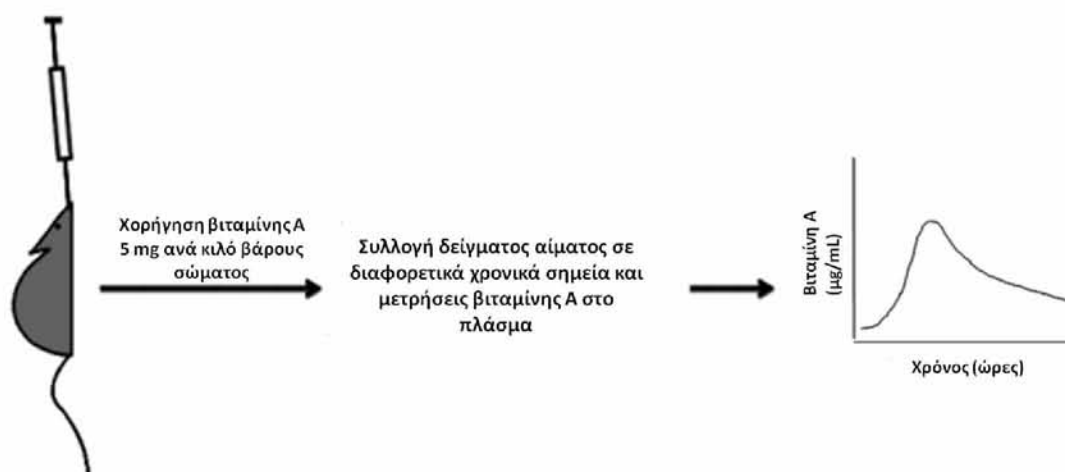
Καθώς η βιταμίνη Α (ρετινόλη-ROH) είναι λιπόφιλη, διαλυτοποιήθηκε η καθαρή μορφή της (Sigma Aldrich, 95144) σε σογιέλαιο έτσι ώστε να δημιουργηθεί το διάλυμα με την βιταμίνη σε ελεύθερη μορφή, ενώ παρασκευάστηκαν και λιποσωμικές διασπορές (ΦΧ/ΧΟ 2/1 + β-Lg) που περιείχαν βιταμίνη ίδιας συγκέντρωσης με το διάλυμα της ελεύθερης μορφής. Οι λιποσωμικές παρασκευές με την εγκλωβισμένη βιταμίνη διαλυτοποιήθηκαν σε νερό (υδατικό μέσο) για να συγκριθεί η κατανομή της βιταμίνης στα δύο διαφορετικά μέσα (το λάδι και τα λιποσώματα που διαλυτοποιήθηκαν σε υδατικό μέσο).

Τα ποντίκια τέθηκαν σε νηστεία για 16 ώρες πριν την χορήγηση της βιταμίνης Α (Kane, Folias, & Napoli, 2008) και στη συνέχεια τους χορηγήθηκε δια του στόματος (*per os*) 200 μ L του διαλύματος βιταμίνης 0,5 mg/ml (που αντιστοιχούσε σε 5 mg/kg βάρους σώματος ζώου) (Gao, Maeda, Okano, & Palczewski, 2012) σε μορφή σύμφωνα με την ομάδα στην οποία άνηκε το κάθε πειραματόζωο (πίνακας 2.1). Σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές μετά την χορήγηση (πίνακας 2.1) τα ζώα θυσιάστηκαν.

Συγκέντρωση ρετινόλης στο αίμα και στο ήπαρ	Ομάδα Α: ελεύθερη ROH σε έλαιο	Ομάδα Β: ROH+λιποσώματα
t=0 ώρες	*6 ποντίκια	*6 ποντίκια
t=2 ώρες	*6 ποντίκια	*6 ποντίκια
t=5 ώρες	*6 ποντίκια	*6 ποντίκια
t=8 ώρες	*6 ποντίκια	*6 ποντίκια
t=12 ώρες	*6 ποντίκια	*6 ποντίκια
t=24 ώρες	*6 ποντίκια	*6 ποντίκια
	36	36
Συνολικός αριθμός πειραματόζωων	72	

Πίνακας 2.1 Το χρονοδιάγραμμα της χορήγησης των δύο διαφορετικών μορφών βιταμίνης Α στα πειραματόζωα

Η χορήγηση των δύο διαφορετικών διαλυμάτων βιταμίνης έγινε με χρήση ειδικής βελόνας για *per os* χορήγηση υγρών σε ποντίκια (εικόνες 2.6, 2.7), η οποία διαθέτει μια στρογγυλή άκρη ώστε κατά την εισαγωγή της στον οισοφάγο του ποντικού να αποφευχθεί τυχόν τραυματισμός.



Εικόνα 2.6 Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας που ακολουθήθηκε για την χορήγηση και τον έλεγχο της βιοδραστικότητας της βιταμίνης Α σε ποντίκια



Εικόνα 2.7 Φωτογραφία από την πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για την χορήγηση της βιταμίνης Α στα ποντίκια

Μετά την χορήγηση της βιταμίνης σε κάθε πειραματόζωο, έγινε λήψη αίματος σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα μετά την χορήγηση (πίνακας 2.1) και ακολούθησε προσδιορισμός των επιπέδων της βιταμίνης Α στο πλάσμα. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν αναλύονται σε γραφική παράσταση σε συνάρτηση με το χρόνο.

Αναλυτικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την λήψη του αίματος ήταν η εξής: Αφού τα ποντίκια αναισθητοποιούνταν σε κλειστό δοχείο με εμποτισμένο βαμβάκι από διαιθυλαιθέρα, ποσότητα αίματος, περίπου 500 μL , απομονωνόταν από την καρδιά σε ειδικά σωληνάρια που περιείχαν ηπαρίνη (lithium heparin 68 I.U.) ως αντιπηκτικό παράγοντα (BD Vacutainer Lithium Heparin 4ml-368884). Το αίμα, αμέσως μετά τη λήψη, ανακινούνταν ελαφρώς για να αναμιχθεί με την ηπαρίνη και εν συνεχεία διατηρούνταν σε πάγο.

Στη συνέχεια, τα ναρκωμένα ποντίκια υποβάλλονταν σε ευθανασία με σπονδυλική μετατόπιση. Τέλος, μετά την συλλογή του, το αίμα φυγοκεντρήθηκε στις 3.000 g για 15 λεπτά σε μίνι-φυγόκεντρο, ώστε να διαχωριστεί το πλάσμα από τα κυτταρικά στοιχεία του αίματος. Τέλος, το πλάσμα συλλέχθηκε σε φιαλίδια τύπου erpendorf 0.5 mL και φυλάχθηκε στους -80°C έως ότου λάβει χώρα η περαιτέρω ανάλυσή του (Manolescu, Sima, & Bhat, 2010; Wassef, Spiegler, & Quadro, 2013).

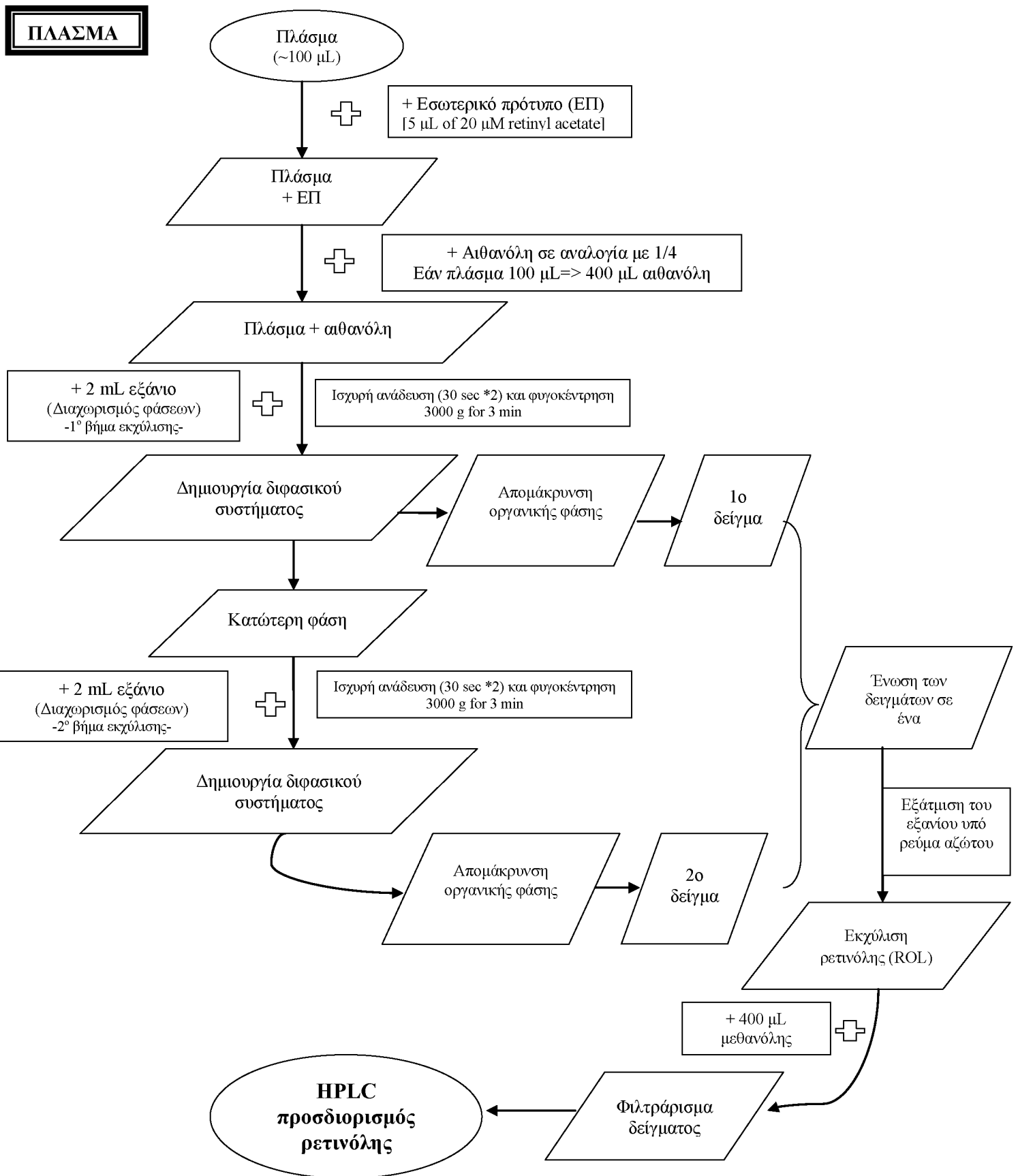
2.6.2 Προσδιορισμός της βιοκατανομής της βιταμίνης Α (ρετινόλης) στο αίμα των ποντικών (Oral Gavage)

Ο προσδιορισμός της βιοκατανομής της βιταμίνης Α στο αίμα των πειραματοζώων έγινε με την τεχνική HPLC ανάστροφης φάσης σε συνδυασμό με ανιχνευτή υπεριώδους – ορατού.

Η μέθοδος προσδιορισμού της βιταμίνης Α προέκυψε από τροποποιήσεις επί του πρωτοκόλλου της μεθόδου των Mendoza et al (Rodas Mendoza, Morera Pons, Castellote Bargalló, & López-Sabater, 2003). Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η αναλυτική στήλη Luna C₁₈, 250 x 4.6 mm, 5μm (phenomenex, Torrance, USA). Η κινητή φάση αποτελούνταν από 100% μεθανόλη, με ταχύτητα ροής 1 ml/min. Επιπλέον η θερμοκρασία της αναλυτικής στήλης διατηρούνταν σταθερή καθ' όλη την διάρκεια της ανάλυσης στους 30°C. Ο προσδιορισμός της all trans ρετινόλης, καθώς και του εσωτερικού προτύπου που χρησιμοποιήθηκε (retinyl acetate), πραγματοποιήθηκε με την χρήση του ανιχνευτή UV-DAD με μήκος κύματος 325 nm.

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την εξαγωγή της ρετινόλης από το αίμα προέκυψε από μικρές τροποποιήσεις επί του πρωτοκόλλου της μεθόδου των Kim και Quadro (Y. K. Kim & Quadro, 2010) (εικόνα 2.8).

Τέλος οι βασικές φαρμακοκινητικές παράμετροι που σχετίζονται με την απορρόφηση, κατανομή και απομάκρυνση της ρετινόλης από το πλάσμα του αίματος των πειραματόζώων σε σχέση με την χορηγούμενη δόση υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα WinNonlin version 4.0.1 (Pharsight Corp., Mountain View, CA, USA).



Εικόνα 2.8 Διαγραμματική απεικόνιση του πρωτοκόλλου που ακολουθήθηκε για την εξαγωγή της ρετινόλης από το αίμα των πειραματόζώων

2.7 Επικύρωση μεθόδων

Η ανάγκη για επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων (Analytical Method Validation) γίνεται όλο και εντονότερη τα τελευταία χρόνια, προκειμένου να αποδειχθεί ότι η κάθε μέθοδος δίνει αξιόπιστα αποτελέσματα. Ουσιαστικά με τον όρο «επικύρωση» ορίζεται η επιβεβαίωση που προκύπτει μετά από την εξέταση σειράς πρότυπων και εμβολιασμένων δειγμάτων και τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων τους. Οπότε η επικύρωση αναλυτικής μεθόδου είναι μια διαδικασία, με σκοπό να αποδειχθεί ότι η αναλυτική διαδικασία που έχει επιλεγεί για μία συγκεκριμένη δοκιμασία, είναι τελικά κατάλληλη για το σκοπό της.

Γενικά η επικύρωση μιας αναλυτικής μεθόδου περιλαμβάνει μελέτες για την εξειδίκευση της μεθόδου, τη γραμμικότητα, την ακρίβεια, την επαναληψιμότητα, το εύρος, τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού και την ανθεκτικότητά της.

Ως ορισμοί των παραπάνω μελετών δίνονται:

Η γραμμικότητα (linearity), διερευνάται με την κατασκευή καμπυλών αναφοράς και λαμβάνονται μετρήσεις σε τουλάχιστον πέντε επίπεδα συγκεντρώσεων χρησιμοποιώντας διαλύματα μιγμάτων των προσδιοριζόμενων ενώσεων.

Ως ακρίβεια (accuracy), νοείται η εγγύτητα του αποτελέσματος μιας δοκιμής και της αποδεκτής τιμής αναφοράς. Προσδιορίζεται με τον προσδιορισμό της ορθότητας και της πιστότητας. Η ορθότητα ορίζεται ως η εγγύτητα μεταξύ της τιμής του μέσου όρου που λαμβάνεται από μια μεγάλη σειρά αποτελεσμάτων δοκιμών και της αποδεκτής τιμής αναφοράς. Για τον προσδιορισμό της ορθότητας χρησιμοποιείται ένα πιστοποιημένο υλικό αναφοράς (CRM), ενώ στην περίπτωση που δεν υπάρχει CRM, αντί για την ορθότητα προσδιορίζεται η ανάκτηση. Ως πιστότητα (precision) νοείται η

εγγύτητα μεταξύ των αποτελεσμάτων ανεξαρτήτων δοκιμών υπό ρητά καθορισμένες συνθήκες.

Ως επαναληψιμότητα (repeatability), νοείται ο έλεγχος της πιστότητας υπό συνθήκες επαναληψιμότητας, οι οποίες ορίζονται ως οι συνθήκες εκείνες υπό τις οποίες τα αποτελέσματα ανεξάρτητων δοκιμών αποκτώνται με την ίδια μέθοδο επί ταυτόσημων τεμαχίων δοκιμής στο ίδιο εργαστήριο, με τον ίδιο χειριστή που χρησιμοποιεί τον ίδιο εξοπλισμό.

Ως Όριο Ανίχνευσης (Limit of Detection- LOD) ή Αναλυτική ευαισθησία (Analytical Sensitivity) μιας μεθόδου είναι η ελάχιστη συγκέντρωση μιας παραμέτρου που μπορεί να ανιχνευθεί «αξιόπιστα» από τη μέθοδο αυτή. Ή αλλιώς μπορούμε να ορίσουμε ότι το Όριο Ανίχνευσης ενός συστατικού με μία μέθοδο είναι η συγκέντρωση για την οποία η απόκριση της μεθόδου διαφέρει από την απόκριση του τυφλού κατά το διπλάσιο της τυπικής απόκλισης (standard deviation-SD) του μέσου όρου του τυφλού.

$(LOD)=2 \times SD$, για στάθμη εμπιστοσύνης 95%.

Ως Όριο Ποσοτικοποίησης (Limit of Quantitation- LOQ) ή Λειτουργική ευαισθησία (Functional Sensitivity) είναι η ελάχιστη συγκέντρωση της μετρούμενης παραμέτρου, που μπορεί να ποσοτικοποιηθεί (να προσδιορισθεί ποσοτικά) με αποδεκτή ακρίβεια και επαναληψιμότητα. $LOQ=10 \times SD$ (Δεληγιαννάκης, 2010).

2.8 Στατιστική ανάλυση

Όλοι οι προσδιορισμοί έλαβαν χώρα εις τριπλούν για κάθε δείγμα και για τρία ταυτόσημα δείγματα κάθε φορά και οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσες τιμές \pm τυπική απόκλιση (εκτός από τις περιπτώσεις του FTIR και του DLS). Για την στατιστική σύγκριση όπου αυτό ήταν απαραίτητο, χρησιμοποιήθηκε unpaired two tailed *t*-test καθώς και το πρόγραμμα ANOVA (one-way layout and randomized blocks designs). Για όλους αυτούς τους λόγους θεωρήθηκε σημαντική μία τιμή $P < 0.05$.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Εκτίμηση του εγκλωβισμού της β-Lg σε διαφορετικές λιποσωμικές παρασκευές

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα του εγκλωβισμού στα λιποσώματα μπορούν να διαιρεθούν γενικώς σε δύο κατηγορίες, την διαδικασία παρασκευής και τα συστατικά του παρασκευάσματος. Η αποτελεσματικότητα του εγκλωβισμού των πρωτεϊνών εξαρτάται από την αλληλεπίδραση μεταξύ της πρωτεΐνης και της λιπιδικής διπλοστιβάδας και ο εγκλωβισμός μπορεί να αυξηθεί με την τροποποίηση της σύστασης της λιπιδικής διπλοστιβάδας ή με αύξηση της συγκέντρωσης των λιπιδίων έτσι ώστε να ευνοηθούν οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις (Colletier, Chaize, Winterhalter, & Fournier, 2002).

Τέσσερις διαφορετικές τεχνικές χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη του εγκλωβισμού της β-Lg στα λιποσώματα, τρεις για να επιβεβαιώσουν ποιοτικά τον εγκλωβισμό της πρωτεΐνης (DSC, SDS-PAGE & FTIR) και μία τεχνική για τον ποσοτικό προσδιορισμό του ποσοστού εγκλωβισμού (φασματοσκοπία φθορισμού) (Gortzi, Rovoli, Lalas, & Kontopidis, 2015).

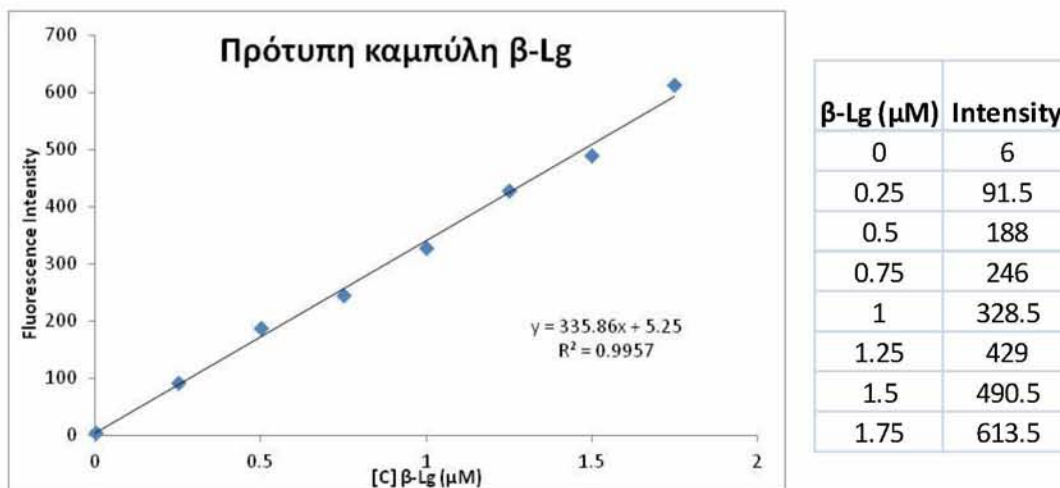
3.1.1 Προσδιορισμός του ποσοστού εγκλωβισμού της β-Lg στα λιποσώματα

3.1.1.1 Φασματοσκοπία φθορισμού

Δύο διαφορετικές μοριακές αναλογίες φωσφολιπιδίων χρησιμοποιήθηκαν (ΦΔ/ΧΟ 2/1 και ΦΔ/ΧΟ 3/1) για την δημιουργία λιποσωμάτων που θα εγκλώβιζαν την β-Lg. Το μείγμα της φωσφατιδυλοχολίνης με την χοληστερόλη είναι ένας ευρέως

χρησιμοποιούμενος συνδυασμός για την παρασκευή λιποσωμάτων σύμφωνα με την βιβλιογραφία (Rodríguez-Nogales & López, 2006).

Πιο συγκεκριμένα, η αποτελεσματικότητα του εγκλωβισμού προσδιορίστηκε με μία έμμεση μέθοδο προσδιορισμού, υπολογίζοντας την μη εγκλωβισμένη πρωτεΐνη που παρέμεινε στο υπερκείμενο (στο διάλυμα TBS, pH 7.4) κατά την παρασκευή των λιποσωμάτων. Ο προσδιορισμός έγινε σύμφωνα με την εξίσωση που προέκυψε ($y = 335.86x + 5.25$, $R^2 = 0.9957$) από την πρότυπη καμπύλη που δημιουργήθηκε από διαφορετικές συγκεντρώσεις β -Lg (0- 1.75 μ M) σε TBS



Εικόνα 3.1 Πρότυπη καμπύλη διαφόρων συγκεντρώσεων β -γαλακτοσφαιρίνης με την τεχνική της φασματοσκοπίας φθορισμού

Τα αποτελέσματα του εγκλωβισμού της β -Lg στα DRV λιποσώματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα

Λιπιδική σύσταση λιποσώματος	Μέσο ποσοστό (%) εγκλωβισμού β -Lg
ΦΧ/ΧΟ 2/1	97.93 \pm 0.35 %
ΦΧ/ΧΟ 3/1	97.1 \pm 1.3 %

Πίνακας 3.1 Ποσοστό εγκλωβισμού (%) της β -Lg σε ΦΧ/ΧΟ λιποσώματα (n = 3)

Και στις δύο λιποσωμικές παρασκευές, το ποσοστό εγκλωβισμού της πρωτεΐνης είναι υψηλότερο από αυτά που έχουν καταγραφεί στην βιβλιογραφία για άλλες πρωτεΐνες που εγκλωβίστηκαν σε λιποσώματα της ίδιας σύστασης (Ntimenou, Mourtas, Christodoulakis, Tsilimbaris, & Antimisiaris, 2006; Park, Choi, Davaa, & Park, 2011). Αυτό μπορεί μερικώς να εξηγηθεί από την ικανότητα της β-Lg να προσδένει μία ποικιλία υδρόφοβων μορίων (Kontopidis, Holt, & Sawyer, 2004).

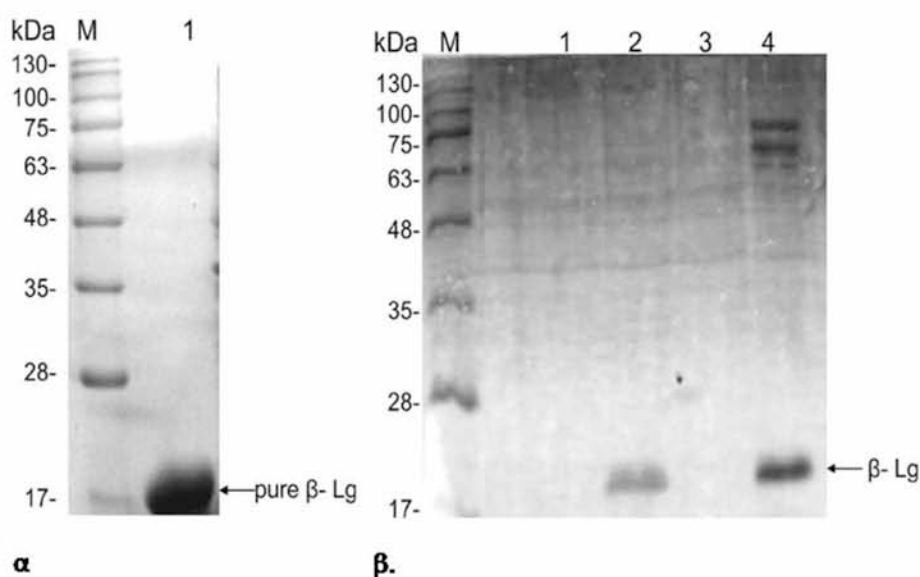
Όπως υποδεικνύεται από τα αποτελέσματα, το ποσοστό εγκλωβισμού της β-Lg στα DRV λιποσώματα με μοριακή αναλογία ΦΧ/ΧΟ 2/1 είναι παρόμοια (μεγαλύτερη χωρίς σημαντική διαφορά) από αυτό στα λιποσώματα με μοριακή αναλογία ΦΧ/ΧΟ 3/1. Γενικά, μία υψηλότερη λιπιδική συγκέντρωση οδηγεί σε υψηλότερα ποσοστά εγκλωβισμού της βιοενεργής ουσίας με την συσχέτιση αυτή να πιάνει πλατό πάνω από μία συγκεκριμένη τιμή (Zaru, Mourtas, Klepetsanis, Fadda, & Antimisiaris, 2007). Επιπλέον η μεγαλύτερη συγκέντρωση χοληστερόλης μπορεί να οδηγεί σε υψηλότερα ποσοστά εγκλωβισμού καθώς η παρουσία της βελτιώνει τα χαρακτηριστικά της λιπιδικής διπλοστιβάδας και προσδίδει μεγαλύτερη σταθερότητα στο σύστημα (Vemuri & Rhodes, 1995).

Αυτό μπορεί να εξηγήσει τα αποτελέσματά μας, σύμφωνα με τα οποία τα λιποσώματα με μοριακή αναλογία ΦΧ/ΧΟ 3/1 είχαν ήδη ένα πολύ υψηλό ποσοστό εγκλωβισμού την πρωτεΐνης (97,1%) ενώ αλλάζοντας την μοριακή αναλογία σε ΦΧ/ΧΟ 2/1 το ποσοστό αυτό δεν μπορούσε να αυξηθεί πολύ παραπάνω (97.7%).

Οι συγκεκριμένες λιπιδικές μοριακές αναλογίες που χρησιμοποιήθηκαν για τον εγκλωβισμό της β-Lg, είναι από τις περισσότερο ευρέως χρησιμοποιούμενες αναλογίες που χρησιμοποιούνται στη βιβλιογραφία (Ntimenou, Mourtas, Christodoulakis, Tsilimbaris, & Antimisiaris, 2006; X. Zhang & Keiderling, 2006).

3.1.1.2 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης με χρήση SDS

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης με χρήση SDS είναι μία από τις πιο συνήθεις τεχνικές για τον προσδιορισμό πρωτεϊνών στις κυτταρικές μεμβράνες (Jagannadham & Chowdhury, 2012; G. Li & Young, 2012). Η παρουσία της πρωτεΐνης στα λιποσώματα ανιχνεύθηκε με την τεχνική αυτή. Η εκτίμηση της β -Lg έγινε μετά την διάσπαση των λιποσωμάτων με μεθανόλη. Οι πηκτές που ελήφθησαν με την μέθοδο αυτή παρουσιάζονται στην εικόνα 3.2 παρακάτω:



Εικόνα 3.2 Πηκτή πολυακρυλαμίδης με χρήση SDS της β -Lg που εξάχθηκε από τα λιποσώματα με μοριακή αναλογία ΦΔ/ΧΟ 2/1 και ΦΔ/ΧΟ 3/1

α. Διαδρομές: M: Δείκτες μοριακού βάρους, 1: β -Lg σε καθαρή μορφή.

β. Διαδρομές: M: Δείκτες μοριακού βάρους, 1: ΦΔ/ΧΟ 2/1 λιποσώματα, 2. β -Lg μετά από την διάσπαση ΦΔ/ΧΟ 2/1 λιποσωμάτων 3: ΦΔ/ΧΟ 3/1 λιποσώματα, 4: β -Lg μετά από την διάσπαση ΦΔ/ΧΟ 3/1 λιποσωμάτων.

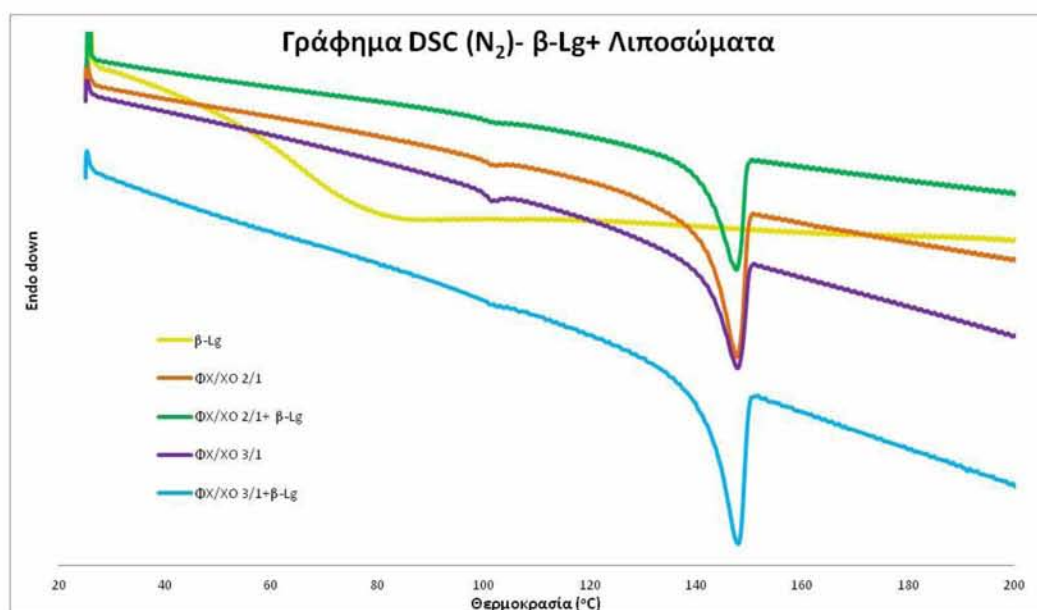
Όπως αναμένονταν, οι διαδρομές 1 και 3 (κενά λιποσώματα) στην εικόνα 3.2β, δεν παρουσιάζουν καμία πρωτεϊνική παρουσία. Στις διαδρομές 2 και 4, πρωτεϊνικές μπάντες παρουσιάζονται σε ύψος 18 kDa που αναλογεί στο μοριακό βάρος της β -Lg (18,4 kDa).

Επιπλέον, καθαρή μορφή της β -Lg υποβλήθηκε σε μία διαφορετική πηκτή πολυακρυλαμιδίου με χρήση SDS (εικόνα 3.2α, διαδρομή 1) και όπως αναμενόταν εμφανίζεται μία μπάντα στο ύψος που αναλογεί σε μοριακό βάρος περίπου στα 18,4 kDa.

Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την παρουσία της β -Lg στις λιποσωμικές παρασκευές.

3.1.1.3 Θερμιδομετρία Διαφορικής Σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry- DSC) υπό αδρανείς συνθήκες (N_2)

Η μελέτη με DSC υπό αδρανείς συνθήκες μπορεί να προσδιορίσει εάν η πρωτεΐνη είναι εγκλωβισμένη στα λιποσώματα. Στην εικόνα 3.3 παρουσιάζονται τα θερμογραφήματα των λυοφιλοποιημένων κενών λιποσωμάτων με μοριακή αναλογία ΦΔ/ΧΟ 2/1 και ΦΔ/ΧΟ 3/1 και λιποσωμάτων ίδιας σύστασης που έχουν εγκλωβίσει β -Lg, καθώς επίσης και το θερμογράφημα της καθαρής β -Lg κάτω από αδρανείς συνθήκες.



Εικόνα 3.3 DSC θερμογραφήματα των λιποσωμικών διασπορών παρουσία και απουσία της β -Lg υπό αδρανείς συνθήκες

Οι ενδόθερμες κορυφές περιγράφουν την προ- και την κύρια- μετάπτωση φάσης και είναι καλοί δείκτες της ποιότητας των λιποσωμικών λιπιδίων και της παρουσίας αλληλεπιδράσεων κάποιας ουσίας με την διπλοστιβάδα (Samuni, Crommelin, Zuidam, & Barenholz, 1998).

Η κύρια θερμοκρασία μετάπτωσης φάσης των λιποσωμάτων με μοριακές αναλογίες ΦΔ/ΧΟ 2/1 και ΦΔ/ΧΟ 3/1 σε αφυδατωμένη μορφή (χωρίς την παρουσία της β-Lg), είναι περίπου στους 147 °C.

Η κύρια θερμοκρασία μετάπτωσης φάσης έδειξε πολύ μικρές αλλαγές για όλα τα δείγματα. Αυτή η θερμοτροπική συμπεριφορά των λιποσωμάτων (και για τις δύο λιπιδικές αναλογίες που εξετάστηκαν) οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η κύρια θερμοκρασία μετάπτωσης παρέμεινε σχεδόν σταθερή μετά τον εγκλωβισμό της β-Lg. Αυτά τα πειραματικά αποτελέσματα θερμιδομέτρησης αποδεικνύουν ότι καμία θεμελιώδης δομική αλλαγή (όπως π.χ. η δημιουργία εξαγωνικών διευθετήσεων) δεν παρατηρήθηκε στη δομή των λιποσωμάτων όταν η β-Lg ενσωματώθηκε σε αυτά. Επιπλέον, οι θερμοδυναμικές παράμετροι τροποποιήθηκαν ελάχιστα με την παρουσία της πρωτεΐνης (Bermúdez, Martinez, Mora, Sagristá, & De Madariaga, 1999).

Επιπρόσθετα, η κορυφή της θερμοκρασίας προ-μετάπτωσης τόσο για τα ΦΔ/ΧΟ 2/1 όσο και για τα ΦΔ/ΧΟ 3/1 λιποσώματα εξαφανίστηκε στα θερμογραφήματα των λιποσωμικών δειγμάτων που είχαν εγκλωβίσει β-Lg, παρατήρηση που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η παρουσία της πρωτεΐνης αλληλεπιδρά με τα φωσφολιπίδια (Heywang, Chazalet, Masson, Garnier-Suillerot, & Bolard, 1996).

Η εξαφάνιση της κορυφής της θερμοκρασίας προ-μετάπτωσης είναι ένα ευαίσθητο κριτήριο για την ενσωμάτωση ουσιών στη λιπιδική διπλοστιβάδα (Bernsdorff, Reszka, & Winter, 1999). Αυτό το γεγονός ερμηνεύεται σαν αποτέλεσμα της ενσωμάτωσης της πρωτεΐνης στην διπλοστιβάδα, κάτι που προκαλεί μεταβολές στις

υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις των λιπιδικών μορίων. Η ενσωμάτωση της πρωτεΐνης μεταξύ των πολικών κεφαλών των λιποσωμάτων μπορεί να ευνοεί την δημιουργία μίας λιγότερο συμπαγούς υγρής κρυσταλλικής δομής από ότι η φάση γέλης και να αυξάνει έτσι ελαφρώς την θερμοκρασία μετάπτωσης από την μορφή γέλης στην υγρή-κρυσταλλική μορφή όπως αυτή παρατηρείται με την τεχνική DSC (Fa, Ronkart, Schanck, Deleu, Gaigneaux, Goormaghtigh, et al., 2006).

Η παραπάνω παρατηρήσεις συμφωνούν με προηγούμενα δεδομένα (Mady, Shafaa, Abbase, & Fahium, 2012) όσον αφορά το γεγονός ότι η αλληλεπίδραση της εγκλωβιζόμενης ουσίας με τα λιπιδικά συστατικά μπορεί να αλλάξουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες των λιποσωμάτων.

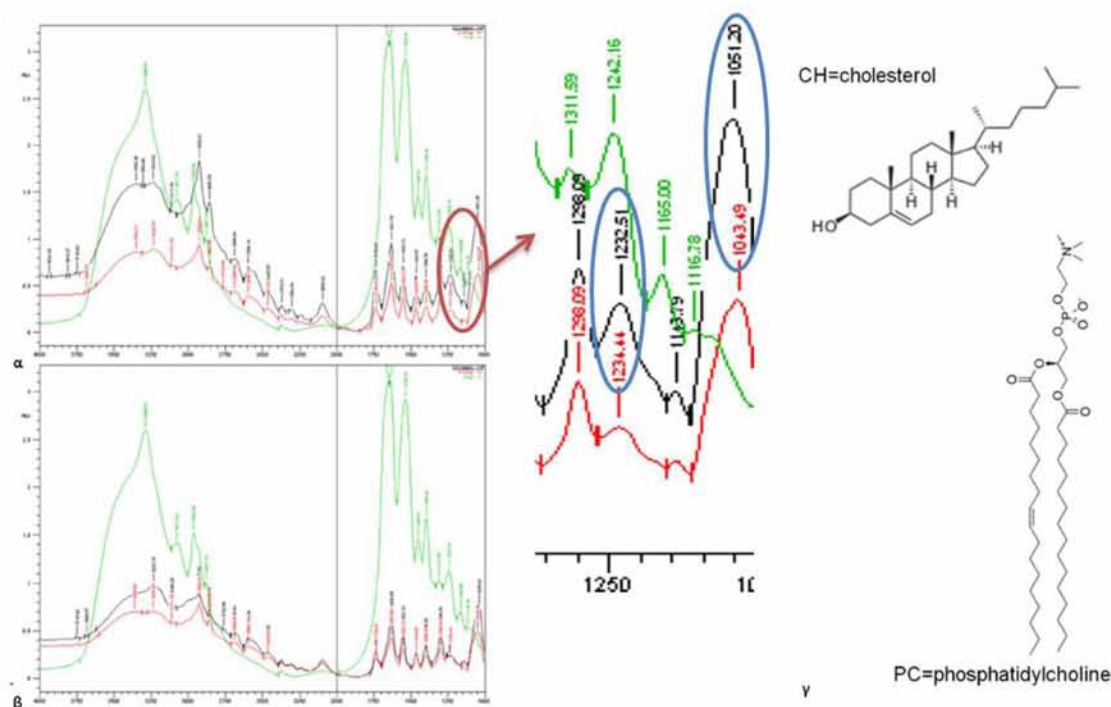
Επιπρόσθετα, το θερμογράφημα της καθαρής λυοφιλοποιημένης β-Lg παρουσιάζει ένα πλατό τήξης περίπου στους 83 °C. Αυτό το πλατό της β-Lg δεν παρατηρείται σε κανένα από τα θερμογραφήματα των λιποσωμάτων που εγκλώβισαν την πρωτεΐνη. Γεγονός που υποδεικνύει ότι δημιουργείται μια καλή αλληλεπίδραση με τα υπόλοιπα συστατικά. Λόγω της υδρόφιλης φύσης της, η β-Lg, είναι πιθανό να έχει εγκλωβιστεί μία ποσότητά της και στον υδατικό πυρήνα των λιποσωμάτων (Gokce, et al., 2012).

3.1.1.4 Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier transform infrared spectroscopy-FT-IR)

Ο χαρακτηρισμός των αλληλεπιδράσεων των DRV λιποσωμάτων με την β-Lg έλαβε χώρα με FT-IR. Οι μεταπτώσεις τόσο στην δευτεροταγή δομή της πρωτεΐνης όσο και στην δομή του σωματιδίου φωσφατιδυλοχολίνης μπορεί να μελετηθεί με την παραπάνω τεχνική (Fidorra, Heimburg, & Seeger, 2009).

Η εικόνα 3.4 δείχνει όλα τα φάσματα των ΦΔ/ΧΟ 2/1 (εικόνα 3.4α) και ΦΔ/ΧΟ 3/1 (εικόνα 3.4β) λιποσωμικών δειγμάτων. Οι συμμετρικές και ασύμμετρες δονήσεις

της ομάδας P=O 1051 και 1232 cm^{-1} των ΦΔ/ΧΟ 2/1 λιποσωμάτων και των ΦΔ/ΧΟ 2/1+β-Lg μεταφέρθηκαν στα μήκη κύματος 1043 and 1234 cm^{-1} αντίστοιχα.



Εικόνα 3.4 α. FTIR φάσμα από: Καθαρή β-Lg (πράσινο), ΦΧ/ΧΟ 2/1 κενά λιποσώματα (μαύρο) και ΦΧ/ΧΟ 2/1 + β-Lg λιποσώματα (κόκκινο)

β. FTIR φάσμα από: Καθαρή β-Lg (πράσινο), ΦΧ/ΧΟ 3/1 κενά λιποσώματα (μαύρο) και ΦΧ/ΧΟ 3/1 + β-Lg λιποσώματα (κόκκινο)

γ. Μόρια χοληστερόλης και φωσφατιδυλοχολίνης.

Η φωσφορική ομάδα (της οποίας οι δονήσεις καταγράφηκαν στο FTIR) είναι μέρος του μορίου της φωσφατιδυλοχολίνης μιας και ούτε η β-Lg αλλά ούτε και η χοληστερόλη έχει φωσφορική ομάδα το μόριό τους (Εικόνα 3.4γ). Η παραπάνω μεταβολή στο φάσμα υποδεικνύει αλληλεπιδράσεις μεταξύ της φωσφορικής ομάδας της φωσφατιδυλοχολίνης και της εγκλωβισμένης β-Lg.

Επιπρόσθετα, η δόνηση (τέντωμα) του δεσμού C-N της αμίνης (1144 cm^{-1}), που αποτελεί ομάδα της φωσφατιδυλοχολίνης εξαφανίζεται στα λιποσώματα που περιέχουν την πρωτεΐνη. Γεγονός που πιστοποιεί επιπρόσθετα την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης και με την πολική κεφαλή της φωσφατιδυλοχολίνης. Λόγω του pI, η β-Lg είναι

φορτισμένη αρνητικά σε pH 7.4 που έλαβε χώρα η παρασκευή των λιποσωμάτων. Υπό αυτές τις συνθήκες, η β -Lg αλληλεπιδρά με την υδρόφιλη επιφάνεια των λιποσωμάτων που υπάρχουν θετικά φορτισμένες αμινομάδες. Αυτά τα αποτελέσματα (πίνακας 3.2) συμφωνούν με τα δεδομένα που δίνει και η βιβλιογραφία (Mady, Shafaa, Abbase, & Fahium, 2012).

Όνομα λειτουργικής ομάδας	Τύπος δόνησης	$\Phi X/XO$ 2/1 κενά λιποσώματα	$\Phi X/XO$ 2/1 + β -Lg λιποσώματα	$\Phi X/XO$ 3/1 κενά λιποσώματα	$\Phi X/XO$ 3/1 + β -Lg λιποσώματα	β -Lg (καθαρή πρωτεΐνη)
Αλκοόλη	O-H τέντωμα	3352	3354	3352	3360	3289
	O-H λύγισμα	1398	1398	1398	1398	1396
Αλκάνια	Λύγισμα αλυσίδας ($-(CH_2)_n$)	1464	1464	1464	1464	1450
	Συμμετρικό τέντωμα αλυσίδας ($-(CH_2)_n$)	2857	2857	2857	2857	2878
	Ασύμμετρο τέντωμα αλυσίδας ($-(CH_2)_n$)	2926	2926	2926	2926	2963
Φωσφορική ομάδα	Ασύμμετρο τέντωμα ομάδας P=O	1233	1234	1233	1234	1242
	Συμμετρικό τέντωμα ομάδας P=O	1051	1043	1051	1049	-
Αιθέρας	C-O τέντωμα	1051	1043	1051	1049	1117
	C=O τέντωμα	1736	1736	1736	1736	
Αμίνες	C-N τέντωμα	1144	-	1144	-	1165
	N-H λύγισμα	1632	1630	1632	1630	1639
	N-H λύγισμα	3352	3354	3352	3360	3289

Πίνακας 3.2 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από τις κύριες κορυφές που ελήφθησαν από τα φάσματα FTIR κάθε δείγματος

Ακόμη, απόδειξη που υποστηρίζει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της εγκλωβισμένης β-Lg και των λιποσωμάτων, προέρχεται από τις αλλαγές στις δονήσεις του τεντώματος του δεσμού O-H (3354 cm^{-1}). Αυτό το μήκος κύματος είναι χαρακτηριστικό για την O-H ομάδα του μορίου της χοληστερόλης, ενώ αυτό της ομάδας O-H της πρωτεΐνης παρατηρείται στα 3289 cm^{-1} . Το συγκεκριμένο μήκος κύματος μεταβλήθηκε από τα 3354 cm^{-1} στα 3360 cm^{-1} μετά την προσθήκη της β-Lg στο σύστημα.

Τόσο οι αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στην φωσφορική ομάδα (P=O) και στην αμινομάδα (C-N) της φωσφατιδυλοχολίνης όσο και στην υδροξυλομάδα (OH) της χοληστερόλης τοποθετούνται στην πολική κεφαλή και των δύο μορίων, κάτι που υποδηλώνει ότι η β-Lg τοποθετείται εκεί και έτσι αλληλεπιδρά με το υδρόφιλο κομμάτι (πολική κεφαλή) της φωσφατιδυλοχολίνης (Cong, Liu, Liang, Wang, & Luo, 2009). Αυτό επίσης επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι δεν παρατηρείται καμία αλλαγή στην συχνότητα των ζωνών εκπομπής της καρβοξυλικής αλυσίδας ($-\text{CH}_2-$)_n (συμμετρικές 2857 cm^{-1} , ασύμμετρες 2926 cm^{-1} stretch or bending 1463 cm^{-1}) κάτι που υποδεικνύει απουσία αλληλεπιδράσεων της β-Lg με τις αλκαλικές αλυσίδες όπως ήταν αναμενόμενο. Επιπρόσθετα αυτό υποδηλώνει ότι η β-Lg δεν μεταβάλλει την δομή της διπλοστιβάδας αφού καμία αλλαγή δεν παρατηρείται στο λιπόφιλο κομμάτι του λιποσώματος (πλευρικές αλυσίδες της φωσφατιδυλοχολίνης).

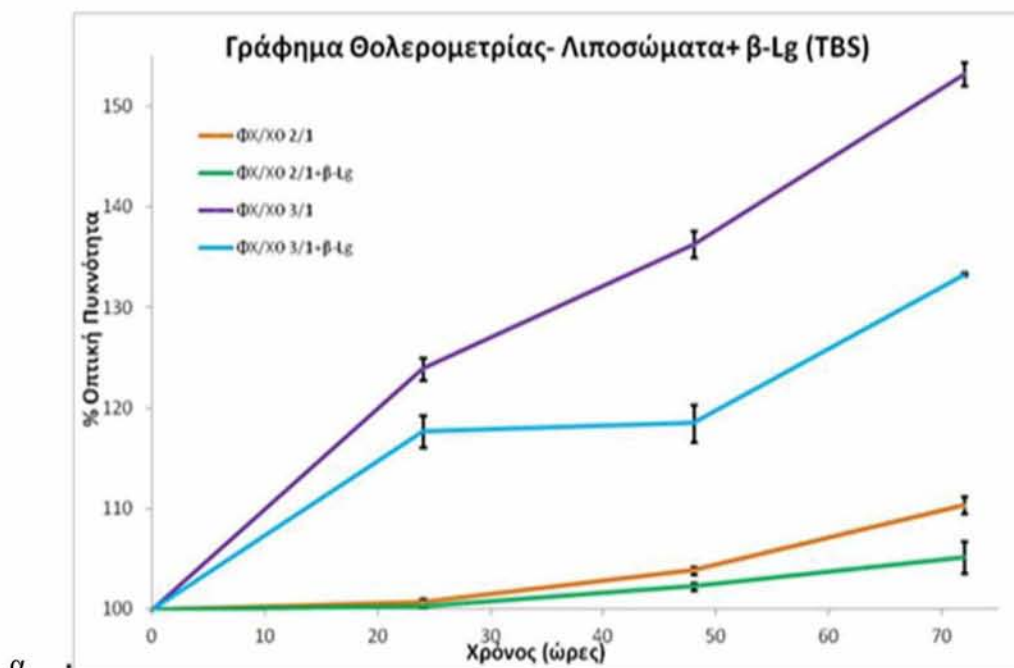
Αυτές οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της β-Lg και του λιποσώματος υποστηρίζουν την δημιουργία μιας νέας δομής (λιποσώματος- β-Lg) και κατ' επέκταση την βελτιωμένη σταθερότητα που παρατηρείται, όπως θα δειχθεί παρακάτω, για το ΦΧ/ΧΟ λιπόσωμα μετά την προσθήκη της πρωτεΐνης.

3.1.2 Μελέτες της σταθερότητας του συμπλόκου λιπόσωμα- β-Lg

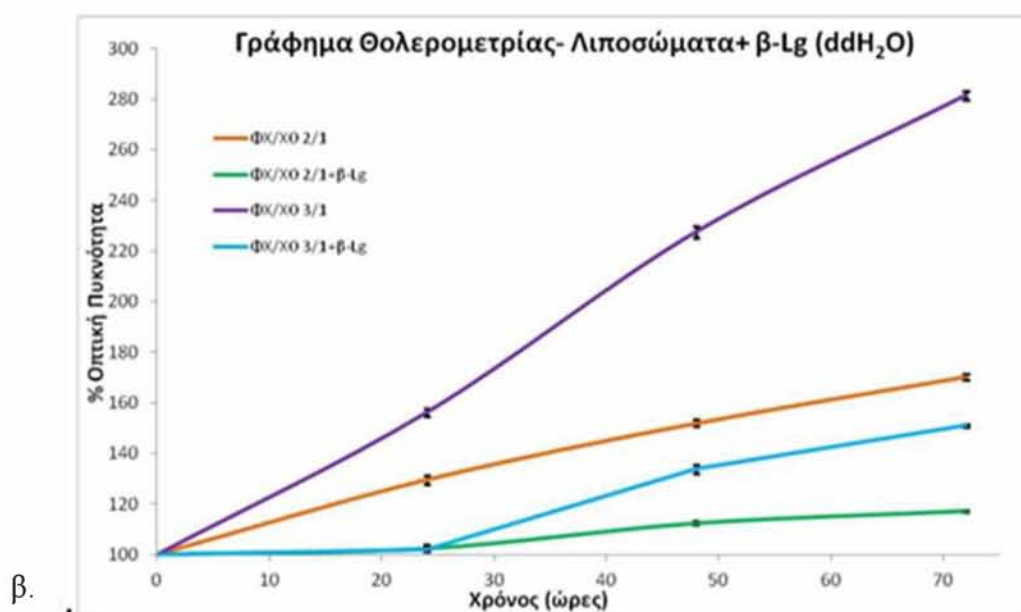
3.1.2.1 Μετρήσεις θολερομετρίας

Η σταθερότητα των λιποσωμάτων κατά την διάρκεια της αποθήκευσης εξετάστηκε, αφού αποτελεί έναν σημαντικό παράγοντα για τον προσδιορισμό της ικανότητας του συστήματος να προστατεύει το εγκλωβιζόμενο μόριο (Park, Choi, Davaa, & Park, 2011).

Οι μετρήσεις θολερότητας αποτελούν συχνά ένα εργαλείο για τον προσδιορισμό του μεγέθους και της σταθερότητας των διασπειρόμενων σωματιδίων (Dwiecki, Górnas, Wilk, Nogala-Kałucka, & Polewski, 2007). Στην περίπτωση των λιποσωμάτων, μία αύξηση της θολερότητας ερμηνεύεται ως αύξηση της συσσωμάτωσης των σωματιδίων φαινόμενο που παρατηρείται ως απόρροια της μείωσης της σταθερότητας των δομών. Η αύξηση της οπτικής πυκνότητας συνδέεται στενά με αύξηση της θολερότητας και κατά συνέπεια αυτή η παράμετρος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση των αλλαγών στην σταθερότητα του δείγματος. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται στην εικόνα 3.5 βασίζονται στα αποτελέσματα τριών διαφορετικών σετ πειραμάτων.



α.



β.

Εικόνα 3.5 Εκτίμηση της σταθερότητας των λιποσωμάτων:

α. Μετρήσεις θολερομετρίας των λιποσωμικών διασπορών μετά από ενυδάτωσή τους σε ddH₂O

β. Μετρήσεις θολερομετρίας των λιποσωμικών διασπορών μετά από ενυδάτωσή τους σε TBS.

Οι τιμές σκέδασης των κενών λιποσωμάτων υποδεικνύουν ότι η σταθερότητα των σωματιδίων φωσφατιδυλοχολίνης εξαρτάται από το αρχικό επίπεδο της χοληστερόλης

που περιλαμβάνεται σε αυτά. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι και στα δύο υδατικά μέσα που μελετήθηκαν [ddH₂O (εικόνα 3.5α) και TBS (εικόνα 3.5β)] τα λιποσώματα με μοριακή αναλογία ΦΧ/ΧΟ 2/1 παρουσιάζουν μία βελτιωμένη συμπεριφορά όσον αφορά την σταθερότητά τους σε σχέση με αυτά με μοριακή αναλογία ΦΧ/ΧΟ 3/1.

Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι τα ΦΧ/ΧΟ 2/1 λιποσώματα περιέχουν μία σχετικά υψηλότερη ποσότητα χοληστερόλης. Όπως είναι ευρέως αποδεδειγμένο, η χοληστερόλη όταν ενσωματώνεται στην λιπιδική διπλοστιβάδα, βελτιώνει την σταθερότητα της δομής της καθώς και την υδροφοβικότητα και μειώνει την διαπερατότητα (Rodríguez-Nogales & López, 2006).

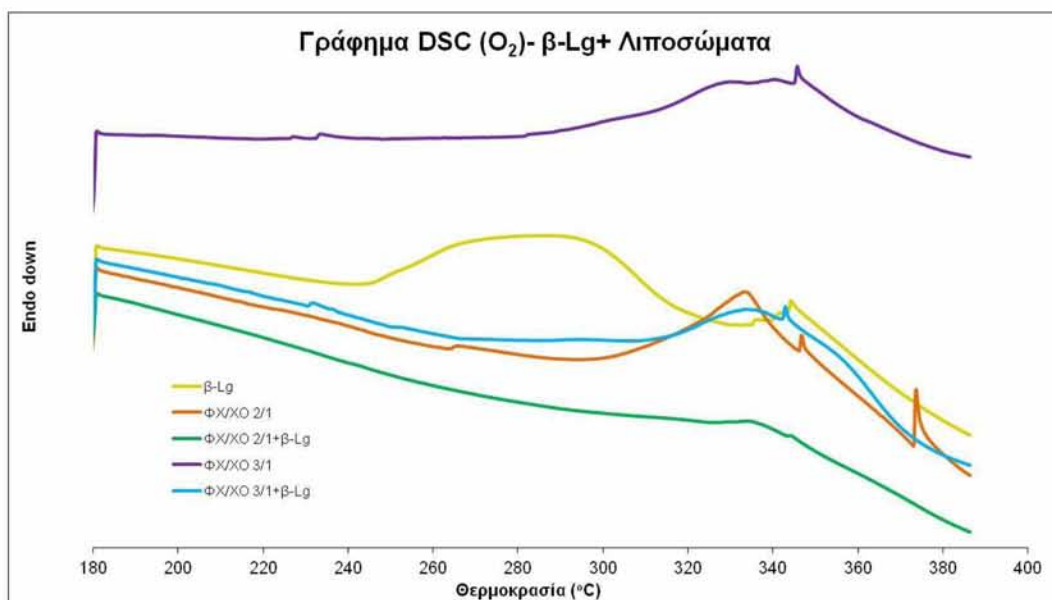
Η προσθήκη της χοληστερόλης αυξάνει την σταθερότητα των λιποσωμάτων όταν αυτά επανυδατώνονται τόσο σε ddH₂O όσο και σε TBS. Το ελάχιστο μέγεθος των σωματιδίων που δημιουργούνται παρουσία της β-Lg μέσα σε TBS, βρέθηκε να είναι ανεξάρτητο από την αρχική συγκέντρωση της χοληστερόλης. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της θολερότητας επιπλέον υποστηρίζουν το γεγονός ότι η παρουσία της πρωτεΐνης επιφέρει φυσικοχημικές αλλαγές στην μεμβράνη των λιποσωμάτων και βελτιώνει έτσι την σταθερότητα του συστήματος ειδικά σε ddH₂O (εικόνα 3.5α).

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, οι πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος είναι γνωστές για την ικανότητά τους να σταθεροποιούν γαλακτώματα στην δημιουργία τροφών (Junghans, Champagne, Cayot, Loupiac, & Köper, 2011).

Το σύμπλοκο ΦΧ/ΧΟ 2/1 μετά τον εγκλωβισμό της β-Lg βρέθηκε να είναι το περισσότερο σταθερό σύστημα. Η παρουσία της πρωτεΐνης στα λιποσώματα, έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία ενός περισσότερο σταθερού συστήματος (X. Zhang, Tanner, Graff, Palivan, & Meier, 2012).

3.1.2.2 Θερμιδομετρία Διαφορικής Σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry- DSC) υπό οξειδωτικές συνθήκες (O₂)

Η αυτοοξείδωση των λιπών και των λιπαρών οξέων είναι μία πολύ καλά εδραιωμένη εξώθερμη διαδικασία και μέθοδοι θερμικών αναλύσεων, όπως είναι το DSC, είναι πολύτιμες για την μελέτη της θερμοσταθερότητας και της θερμοοξείδωσης (Chiavaro, Rodriguez-Estrada, Bendini, Rinaldi, & Cerretani, 2011), ενώ οι κινητικές παράμετροι της οξείδωσης των λιπαρών οξέων μπορούν και αυτές να προσδιοριστούν με αυτή τη μέθοδο (Liolios, Gortzi, Lalas, Tsaknis, & Chinou, 2009). Η αντιοξειδωτική ενεργότητα εκτιμάται με την εκλυόμενη θερμότητα στην αρχή της οξειδωτικής διαδικασίας βασιζόμενη σε μετρήσεις μιας συγκεκριμένης περιόδου επώασης (Gortzi, Lalas, Chinou, & Tsaknis, 2006). Στην εικόνα 3.6 παρουσιάζονται οι καμπύλες των DSC θερμογραφημάτων των λιποσωμικών διασπορών παρουσία και απουσία της β-Lg υπό οξειδωτικές συνθήκες.



Εικόνα 3.6 Θερμογραφήματα DSC των λιποσωμικών διασπορών παρουσία και απουσία της β-Lg. υπό οξειδωτικές συνθήκες

Η εξώθερμη κορυφή της καθαρής β -Lg παρατηρείται περίπου στους 250-310 °C ενώ η διαδικασία της αυτό οξειδωσης στις λιποσωμικές παρασκευές δίνει κορυφή περίπου σε ένα εύρος 320-350 °C.

Χρησιμοποιώντας τις καμπύλες, μπορεί να προσδιοριστεί η θερμοκρασία έναρξης της αυτό οξειδωσης. Όπως φαίνεται στην εικόνα, η προσθήκη της β -Lg στα λιποσώματα έχει μία περισσότερο έντονη αντιοξειδωτική δράση (στατιστικά σημαντική $P<0.05$) από ότι σε καθαρή μορφή. Στον ίδιο ρυθμό θέρμανσης του δείγματος, η θερμοκρασία έναρξης της οξειδωτικής αντίδρασης στα λιποσώματα είναι σημαντικά ($P<0.05$) υψηλότερη. Η τροποποιημένη αντιοξειδωτική δράση της β -Lg κατά τον εγκλωβισμό της στα λιποσώματα ήταν αναμενόμενη αφού το σύμπλοκο λιπόσωμα- β -Lg αποτελεί ένα νέο σύστημα. Επίσης, η αντιοξειδωτική δράση των κενών λιποσωμάτων της ίδιας λιπιδικής σύστασης εμφανίζεται χαμηλότερη σε σχέση με αυτά που έχουν εγκλωβίσει β -Lg πράγμα που σημαίνει ότι ο εγκλωβισμός της πρωτεΐνης σταθεροποιεί τα λιποσωμικές μεμβράνες (θερμοκρασία έναρξης οξειδωσης: καθαρή β -Lg= 286 °C, ΦΧ/ΧΟ 3/1 κενά λιποσώματα=330 °C, ΦΧ/ΧΟ 3/1 λιποσώματα + β -Lg= 332 °C, ΦΧ/ΧΟ 2/1 κενά λιποσώματα = 334 °C, ΦΧ/ΧΟ 2/1 λιποσώματα + β -Lg= 336 °C).

3.1.3 Μελέτες της μορφολογίας του συμπλόκου λιπόσωμα- β -Lg

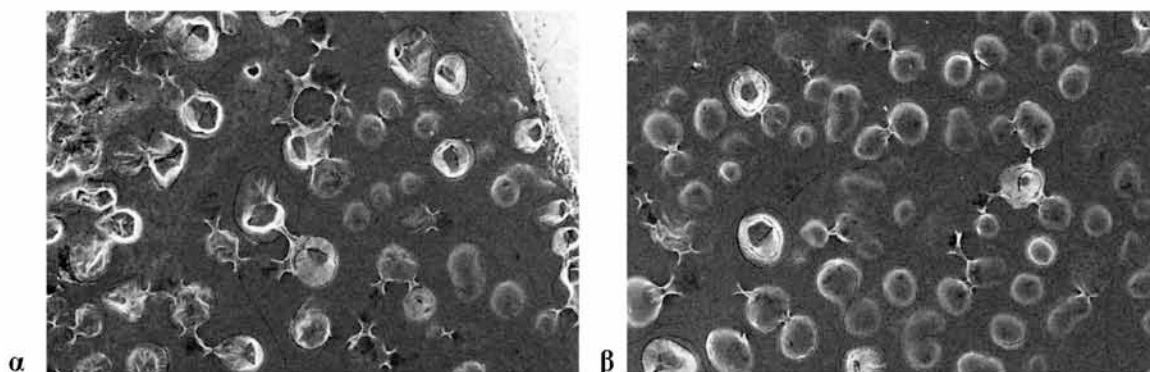
3.1.3.1 Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (Scanning Electron Microscopy-SEM)

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία είναι γνωστή σαν ένα εργαλείο για την οπτικοποίηση της επιφάνειας μιας μεμβράνης και να αποκαλυφθούν απευθείας κάποια σημαντικά χαρακτηριστικά όπως η μορφολογία, η ομοιομορφία ή το μέγεθος. Οι περισσότερες τεχνικές μικροσκοπίας είναι γρήγορες, εύκολες και παρέχουν σχετικά

απευθείας οπτικοποίηση του δείγματος (X. Zhang, Tanner, Graff, Palivan, & Meier, 2012).

Η μορφολογία (σχήμα και δομή) των λυοφιλοποιημένων λιποσωμάτων εξετάστηκε με την τεχνική SEM, μιας και η μορφολογία σχετίζεται με τις φυσικοχημικές ιδιότητες των λιποσωμάτων.

Η μικροσκοπική παρατήρηση έδειξε ότι τα σωματίδια έχουν σφαιρικό σχήμα (εικόνα 3.7). Και οι δύο φωτογραφίες στην εικόνα 3.7 παρουσιάζονται στην ίδια μεγέθυνση για εύκολη σύγκριση.



Εικόνα 3.7 Εικόνες από μικροσκόπιο ηλεκτρονικής σάρωσης των DRV λιποσωμάτων.

α. κενά λιποσώματα και β. λιποσώματα στα οποία εγκλωβίστηκε η β-Lg

Τα κενά λιποσώματα που δημιουργούνται από την μέθοδο DRV, φαίνεται να είναι ετερογενή με ένα ευρύ φάσμα κατανομής του μεγέθους τους σε σχέση με αυτά που έχουν εγκλωβίσει την β-Lg (εικόνα 3.7α). Όπως αποκαλύπτουν οι φωτογραφίες, η πλειοψηφία των λιποσωμάτων που περιέχουν β-Lg (εικόνα 3.7β) έχουν ένα πιο σφαιρικό και ομοιογενές σχήμα σε σχέση με τα λιποσώματα που δεν έχουν εγκλωβίσει την πρωτεΐνη.

Με βάση τα αποτελέσματα της θολερομετρίας, προτείνεται ότι η παρουσία της β-Lg στις μεμβράνες σχηματίζουν περισσότερο σταθερά ΦΧ/ΧΟ σωματίδια. Αυτή η

πρόταση συμφωνεί καλώς με τις εικόνες των σωματιδίων που λάβαμε με την τεχνική SEM όπου φαίνονται να είναι πιο μικρά τα λιποσώματα που περιείχαν β-Lg.

Με την μέθοδο παρασκευής που ακολουθήθηκε για τον νέο φορέα (DRV λιποσώματα), η αφυδάτωση των σωματιδίων ακολουθείται από μία ελεγχόμενη επανυδάτωση σε θερμοκρασία πάνω από την T_m κάτι που οδηγεί σε σύντηξη των μικρών σωματιδίων SUVs που είχαν δημιουργηθεί έχοντας ως τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία MLVs σωματιδίων. Μετά την επανυδάτωση, τα νέα σωματίδια που δημιουργούνται είναι κατά πολύ μεγαλύτερα σε σχέση με τα αρχικά SUVs (Martins, Sarmento, Ferreira, & Souto, 2007).

3.1.3.2 Δυναμική σκέδαση φωτός (Dynamic Light Scattering-DLS)

Η επίδραση του εγκλωβισμού της β-Lg στο μέσο μέγεθος των DRV λιποσωμικών παρασκευών μελετήθηκε επιπλέον με την μέθοδο DLS. Βρέθηκε ότι τα ΦX/XO 2/1 και τα ΦX/XO 3/1 κενά λιποσώματα είχαν μέση διάμετρο σε ένα εύρος 922.00 ± 9.16 nm και 1296.66 ± 289.36 nm αντίστοιχα, ενώ τα λιποσώματα με την εγκλωβισμένη β-Lg είχαν μικρότερη μέση διάμετρο περίπου 501.66 ± 67.15 nm για τα ΦX/XO 2/1+ β-Lg λιποσώματα και 447.33 ± 59.18 nm για τα ΦX/XO 3/1+ β-Lg λιποσώματα.

Ωστόσο, οι τιμές της πολυδιασποράς είναι αρκετά υψηλές (ΦX/XO 2/1 λιποσώματα: 0.790 ± 0.010 , ΦX/XO 2/1+ β-Lg λιποσώματα: 0.522 ± 0.030 , ΦX/XO 3/1 λιποσώματα: 0.831 ± 0.095 και ΦX/XO 3/1+ β-Lg λιποσώματα: 0.492 ± 0.009) κάτι που σημαίνει υψηλά ετερογενή πληθυσμούς σωματιδίων.

Τα παραπάνω αποτελέσματα είναι σε καλή συμφωνία με τις εικόνες SEM και τα αποτελέσματα θολερότητας που ελήφθησαν από τα ίδια δείγματα, σύμφωνα με τα οποία επιβεβαιώνεται ότι η παρουσία της β-Lg στα λιποσώματα επάγει τον σχηματισμό περισσότερο σταθερών ΦX/XO σωματιδίων (με μικρότερη μέση διάμετρο και

χαμηλότερες τιμές πολυδιασποράς για τα λιποσώματα που έχουν β-Lg). Το γεγονός ότι τα ΦΧ/ΧΟ 3/1 λιποσώματα παρουσιάζουν υψηλότερη μέση διάμετρο και υψηλότερες τιμές πολυδιασποράς σε σχέση με τα αντίστοιχα ΦΧ/ΧΟ 2/1 λιποσώματα, επιβεβαιώνει ότι η υψηλότερη μοριακή αναλογία χοληστερόλης οδηγεί σε περισσότερο σταθερά, μικρά και ομοιογενή σωματίδια.

Οι μεγάλοι μέσοι διάμετροι που παρατηρήθηκαν μπορεί να οφείλονται στο γεγονός ότι τα λιποσώματα έχουν δημιουργήσει συσσωματώματα πριν τις μετρήσεις, ενώ και η μέθοδος freeze-drying και η επανυδάτωση επάγει την δημιουργία συντήξεων μεταξύ γειτονικών μεμβρανών έχοντας ως τελικό αποτέλεσμα την δημιουργία MLVs (με διάμετρο 0.1 to 2.0 μm) (Martins, Sarmiento, Ferreira, & Souto, 2007; Ulrich, 2002).

3.2 Εκτίμηση του εγκλωβισμού των λιπόφιλων βιταμινών A, E & D σε λιποσωμικές παρασκευές

Σύμφωνα με την τελευταία αναζήτηση την βιβλιογραφίας αυτή είναι η πρώτη φορά που χρησιμοποιούνται DRV λιποσώματα που περιέχουν και την πρωτεΐνη β-γαλακτοσφαιρίνη για τον εγκλωβισμό των βιταμινών A, E και D.

Τα λιποσώματα DRV επιλέχθηκαν λόγω της ικανότητάς τους να εγκλωβίζουν ευαίσθητα μόρια (πχ βιταμίνες, πρωτεΐνες) υπό συνθήκες που δεν έχουν ως αποτέλεσμα την διάσπαση ή το χάσιμο της ενεργότητας των ενεργών ουσιών που εγκλωβίζονται (Rodríguez-Nogales & López, 2006; West, Whitmon, Williamson, Moura, Nelson, Melnick, et al., 2012).

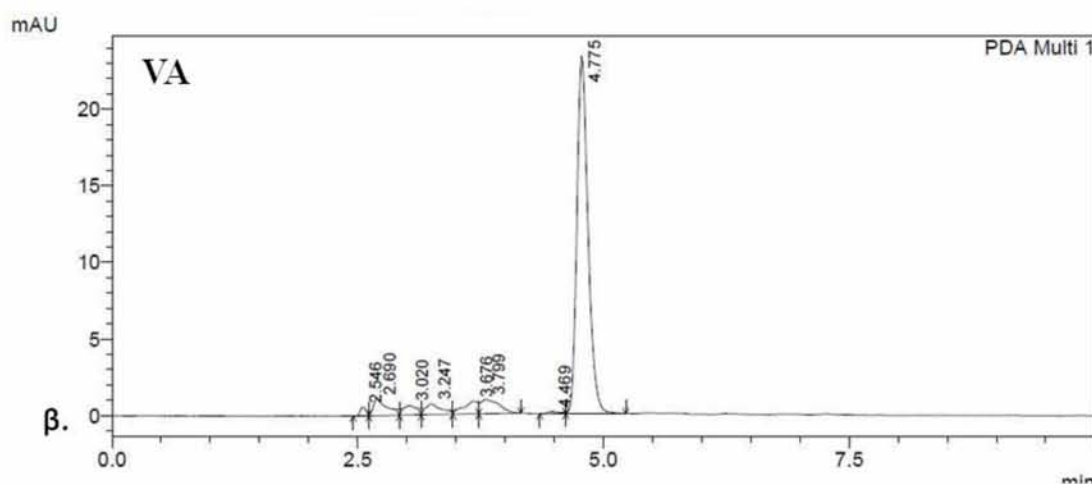
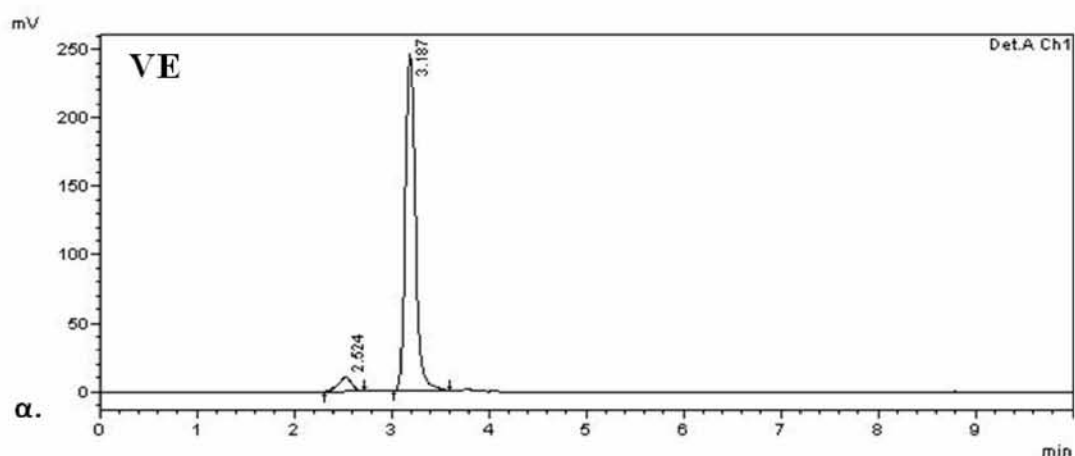
Με την μέθοδο αφυδάτωσης-επανυδάτωσης, το ποσοστό εγκλωβισμού και η σταθερότητα αποθήκευσης των λιποσωμάτων βελτιώνεται (G. Li & Young, 2012; Ntimenou, Mourtas, Christodoulakis, Tsilimbaris, & Antimisiaris, 2006). Η ικανότητα των λιποσωμάτων να εγκλωβίζουν λιπόφιλα μόρια όπως οι βιταμίνες θα μπορούσε να βελτιωθεί περαιτέρω με την προσθήκη ενός δεύτερου φορέα στο σύστημα (Kawano, Takayama, Nagai, & Maitani, 2003).

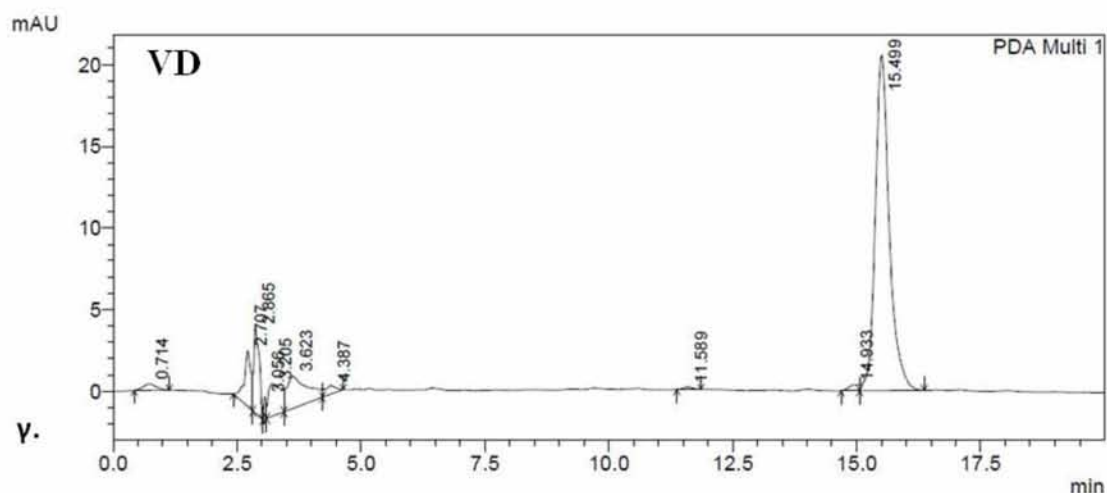
Η β-Lg είναι μία πρωτεΐνη μοντέλο για να προσεγγίσουμε την παραπάνω ιδέα λόγω της ιδιότητάς της να προσδένει λιπιδικά μόρια (όπως λιπαρά οξέα και βιταμίνες) (Kontopidis, Holt, & Sawyer, 2002). Η προσθήκη της στην λιποσωμική παρασκευή θα μπορούσε να έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία ενός φορέα περισσότερο αποδοτικού για τον εγκλωβισμό των λιπόφιλων βιταμινών σε υδατικά μέσα.

3.2.1 Προσδιορισμός του ποσοστού εγκλωβισμού των βιταμινών στα λιποσώματα

3.2.1.1 Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (High-performance liquid chromatography- HPLC)

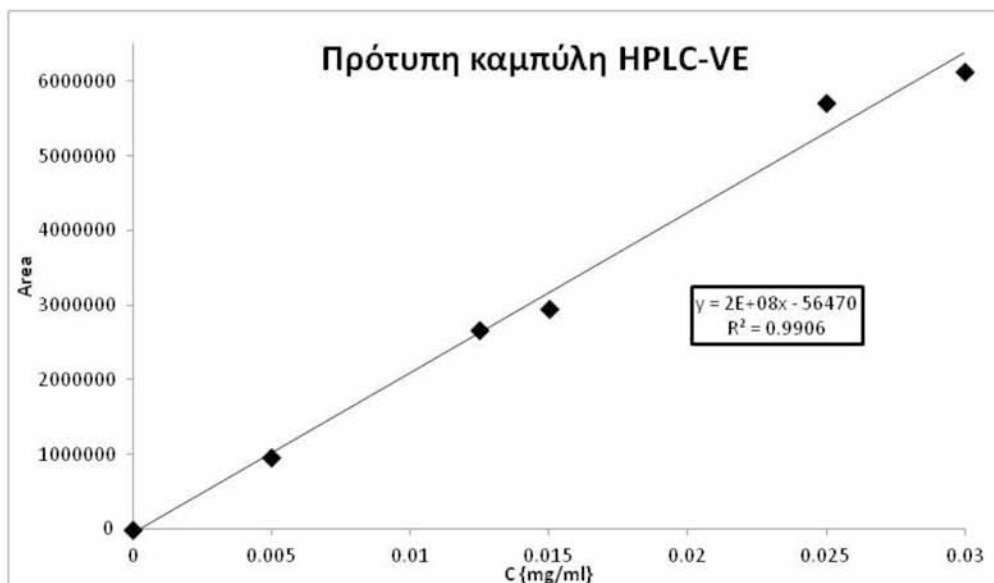
Η αποδοτικότητα του εγκλωβισμού [EE (%)] για τις τρεις υπό μελέτη λιπόφιλες βιταμίνες στα DRVs λιποσώματα με ή χωρίς την παρουσία της β-Lg εκτιμήθηκε με την μέθοδο HPLC (εικόνα 3.8) και τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 3.3.





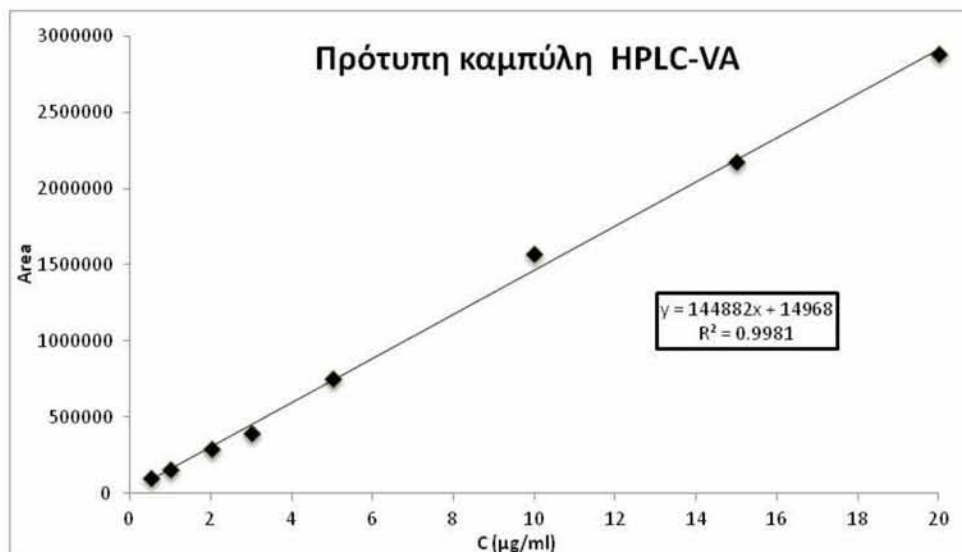
Εικόνα 3.8 Χρωματογραφικός προσδιορισμός λιποδιαλυτών βιταμινών E (α), A (β) και D (γ).

Ο προσδιορισμός της βιταμίνης E έγινε σύμφωνα με την εξίσωση που προέκυψε ($y = 2E+08x - 63388$, $R^2 = 0.9972$) από την πρότυπη καμπύλη που δημιουργήθηκε από έξι πρότυπα διαλύματα VE (0- 0.5 mg/mL) σε εξάνιο που κάλυπταν το 50%-150% της αναμενόμενης τιμής και εκτελέστηκαν 4 επαναλαμβανόμενες μετρήσεις, για τη χάραξη των καμπυλών αναφοράς της χρωματογραφικής μεθόδου που αναπτύχθηκε. (εικόνα 3.9). Η γραμμικότητα της μεθόδου προσδιορίστηκε έπειτα από την κατασκευή προτύπων καμπυλών που προήλθαν από τον συσχετισμό των συγκεντρώσεων των προτύπων διαλυμάτων και του εμβαδού κάτω από την καμπύλη στο αντίστοιχο χρωματογράφημα και εκτείνεται μέχρι 0.03 mg/mL, ενώ σύμφωνα με την ανάλυση παλινδρόμησης ο συντελεστής γραμμικότητας ευρέθηκε 0.99. Το όριο ανίχνευσης (LoD) και το όριο ποσοτικοποίησης (LoQ) ήταν 20 και 60 ng/mL αντίστοιχα.



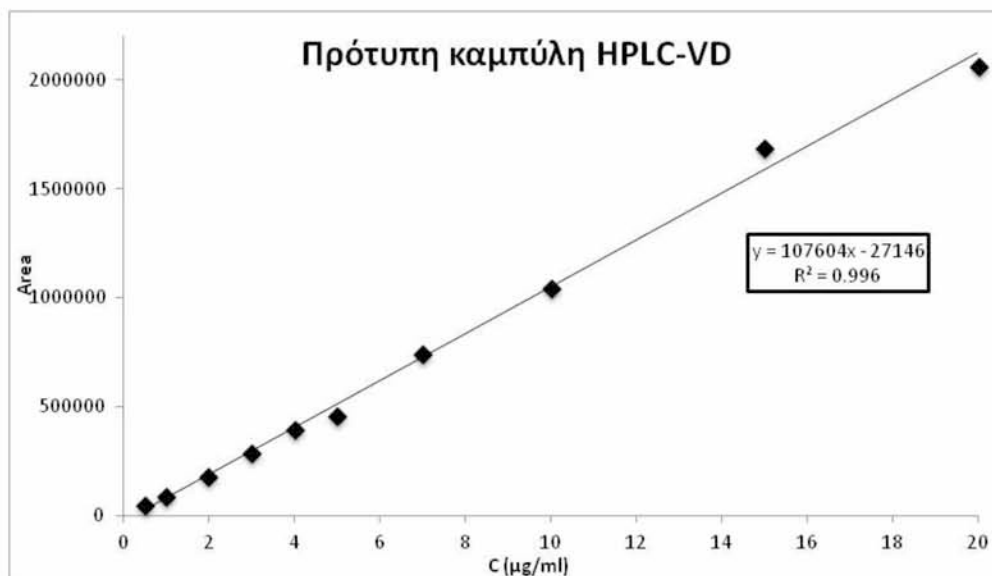
Εικόνα 3.9 Πρότυπη καμπύλη διαφορετικών συγκεντρώσεων βιταμίνης E με την τεχνική HPLC

Ο προσδιορισμός της βιταμίνης A έγινε σύμφωνα με την εξίσωση που προέκυψε ($y = 144882x + 14968$, $R^2 = 0.9981$) από την πρότυπη καμπύλη που δημιουργήθηκε από οκτώ πρότυπα διαλύματα VA (0.5- 20 $\mu\text{g/mL}$) σε μεθανόλη (εικόνα 3.10). Η γραμμικότητα της μεθόδου προσδιορίστηκε έπειτα από την κατασκευή προτύπων καμπυλών που προήλθαν από τον συσχετισμό των συγκεντρώσεων των προτύπων διαλυμάτων και του εμβαδού κάτω από την καμπύλη στο αντίστοιχο χρωματογράφημα και εκτείνεται μέχρι 20 $\mu\text{g/mL}$, ενώ σύμφωνα με την ανάλυση παλινδρόμησης ο συντελεστής γραμμικότητας ευρέθηκε 0.998. Το όριο ανίχνευσης (LoD) και το όριο ποσοτικοποίησης (LoQ) ήταν 2 και 7 ng/mL αντίστοιχα.



Εικόνα 3.10 Πρότυπη καμπύλη διαφορετικών συγκεντρώσεων βιταμίνης Α με την τεχνική HPLC

Ο προσδιορισμός της βιταμίνης D έγινε σύμφωνα με την εξίσωση που προέκυψε ($y = 107604x - 27146$, $R^2 = 0.996$) από την πρότυπη καμπύλη που δημιουργήθηκε από από δέκα πρότυπα διαλύματα VD (0,5- 20 µg/mL) σε μεθανόλη (εικόνα 3.11). Η γραμμικότητα της μεθόδου προσδιορίστηκε έπειτα από την κατασκευή προτύπων καμπυλών που προήλθαν από τον συσχετισμό των συγκεντρώσεων των προτύπων διαλυμάτων και του εμβαδού κάτω από την καμπύλη στο αντίστοιχο χρωματογράφημα και εκτείνεται μέχρι 20 µg/mL, ενώ σύμφωνα με την ανάλυση παλινδρόμησης ο συντελεστής γραμμικότητας ευρέθηκε 0.996. Το όριο ανίχνευσης (LoD) και το όριο ποσοτικοποίησης (LoQ) ήταν 6 και 15 ng/mL αντίστοιχα.



Εικόνα 3.11 Πρότυπη καμπύλη διαφορετικών συγκεντρώσεων βιταμίνης D με την τεχνική HPLC

Τόσο το ποσοστό του εγκλωβισμού της VE όσο και της VA και της VD στα λιποσώματα που περιέχουν β-Lg φαίνεται να είναι αυξημένο σε σχέση με το ποσοστό του εγκλωβισμού των τριών βιταμινών στα λιποσώματα από τα οποία απουσιάζει η πρωτεΐνη (πίνακας 3.3).

ΔΕΙΓΜΑ	ΕΕ (%)
ΦX/XO (2/1) + VE	59.42 ± 2.31
ΦX/XO (2/1)+ β-Lg+ VE	96.59 ± 1.52
ΦX/XO (2/1) + VA	50.64 ± 1.29
ΦX/XO (2/1)+ β-Lg+ VA	56.17 ± 1.90
ΦX/XO (2/1) + VD	76.47 ± 0.96
ΦX/XO (2/1)+ β-Lg+ VD	81.47 ± 1.77

5

Πίνακας 3.3 Τα % ποσοστά εγκλωβισμού των τριών λιπόφιλων βιταμινών, E-A και D, σε δύο διαφορετικά λιπιδικά σύμπλοκα

Όπως έχει δειχθεί σε προηγούμενες μελέτες (Kontopidis, Holt, & Sawyer, 2002), η β-Lg προσδένει ένα μόριο VA, VD και VE (μοριακή αναλογία 1:1). Τα moles των εγκλωβιζόμενων βιταμινών αυξάνονται στο σύμπλοκο ΦΧ/ΧΟ/β-Lg. Η περίσσεια της μοριακής αναλογίας και των τριών προσδίδει μία επιπρόσθετη ιδιότητα στο ΦΧ/ΧΟ/ β-Lg σύστημα. Το γεγονός αυτό μαζί, με την βελτιωμένη σταθερότητα του συστήματος ΦΧ/ΧΟ/β-Lg, αποτελούν διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες και έτσι ενισχύεται το επιχείρημα ότι το νεοδημιουργηθέν λιποσωμικό σύστημα (ΦΧ/ΧΟ/ β-Lg) διαθέτει τροποποιημένες φυσικοχημικές ιδιότητες.

Όσον αφορά τα ευρήματα άλλων ομάδων (Badiie, et al., 2009; C. Li, Shen, Wei, Xie, & Lu, 2012) που χρησιμοποίησαν διαφορετικούς τύπους λιποσωμάτων (MLV ή GOL) για τον εγκλωβισμό των τριών αυτών λιπόφιλων βιταμινών, ανέφεραν ποσοστά εγκλωβισμού που κυμαίνονταν από 50 % έως 99%. Αυτές οι μεγάλες διαφοροποιήσεις στα ποσοστά εγκλωβισμού οφείλονται στις διαφορές στις λιπιδικές αναλογίες, τους τύπους των λιπιδίων που χρησιμοποιούνται, την μέθοδο παρασκευής αλλά και την μοριακή αναλογία των λιπιδίων/ βιταμινών που χρησιμοποιούνται.

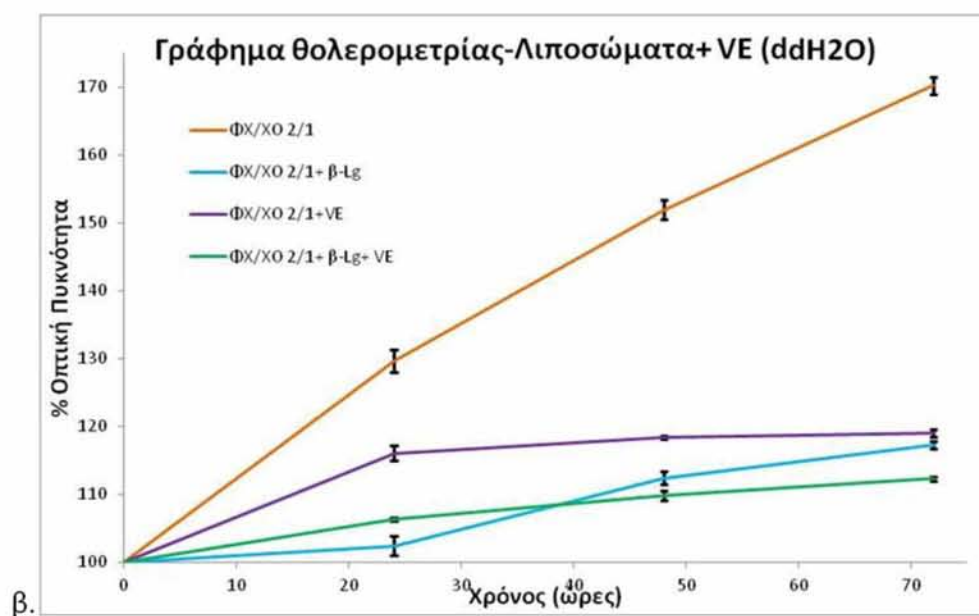
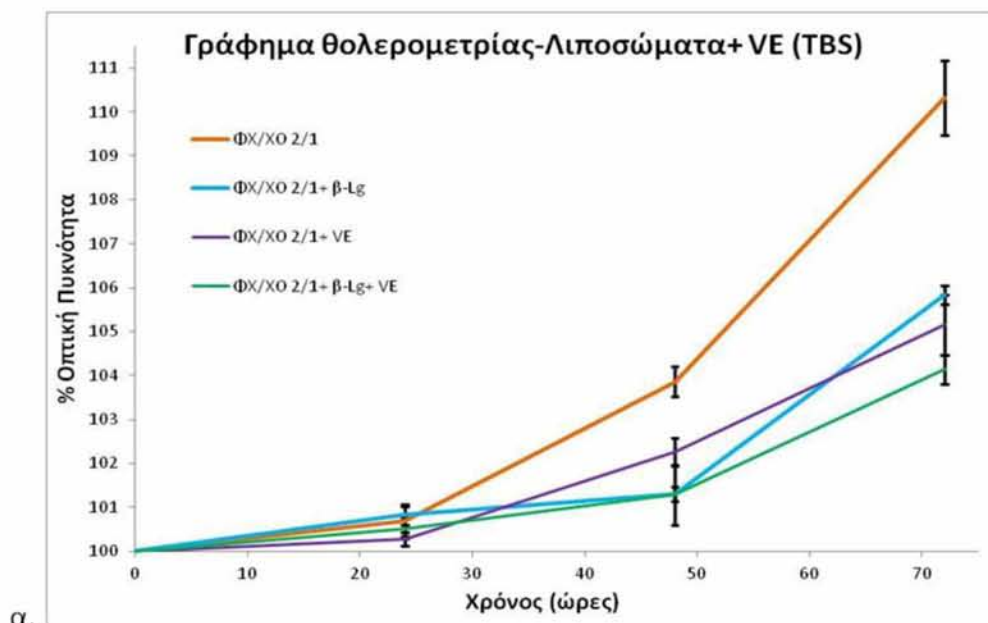
Για να κατανοηθεί πλήρως η συμπεριφορά της VE στις μεμβράνες, πρέπει να αποδεχθούμε ότι η πλευρική αλυσίδα της είναι ικανή να καταλαμβάνει πολλές διαφορετικές διαμορφώσεις εκτός από την πλήρως εκτεταμένη. Οι λόγοι για την επιλογή μίας συγκεκριμένης προτιμητέας θέσης της VE στις μεμβράνες είναι εξαιρετικά εξαρτώμενοι από τον τύπο του φωσφολιπιδίου που χρησιμοποιείται για την δημιουργία της μεμβράνης (Barba, Esteve, & Frígola, 2011; Lefèvre & Subirade, 2001; Marsanasco, Márquez, Wagner, del V. Alonso, & Chiaramoni, 2011).

3.2.2 Μελέτες της σταθερότητας των λιποσωμάτων που εγκλωβίζουν τις βιταμίνες A, D & E

3.2.2.1 Μετρήσεις θολερομετρίας

Μετρήσεις θολερομετρίας μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν ένα εναλλακτικό εργαλείο για τον προσδιορισμό των τροποποιήσεων του μεγέθους των σωματιδίων που μελετώνται και έτσι κατ' επέκταση για τον προσδιορισμό της σταθερότητας των λιποσωμικών παρασκευών (Dwiecki, Górnaś, Wilk, Nogala-Kałucka, & Polewski, 2007). Στην περίπτωση των λιποσωμάτων, μία αύξηση στην θολερότητα του δείγματος συνεπάγεται και αύξηση στην συσσωμάτωση των σωματιδίων λόγω μείωσης της σταθερότητάς τους (C. Li, Shen, Wei, Xie, & Lu, 2012).

Κατά συνέπεια, μία αύξηση στο ποσοστό της οπτικής πυκνότητας συνδέεται πολύ συχνά με μία αύξηση της θολερότητας και τελικώς με μείωση της σταθερότητας των δειγμάτων. Τα δεδομένα θολερομετρίας που παρουσιάζονται (εικόνα 3.12) βασίζονται στα αποτελέσματα τριών διαφορετικών μετρήσεων των δειγμάτων. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν μία βελτιωμένη σταθερότητα των λιποσωμάτων που περιείχαν και την β-Lg και για τις τρεις υπό μελέτη βιταμίνες και στα δύο υδατικά μέσα στα οποία μελετήθηκαν (TBS και ddH₂O).

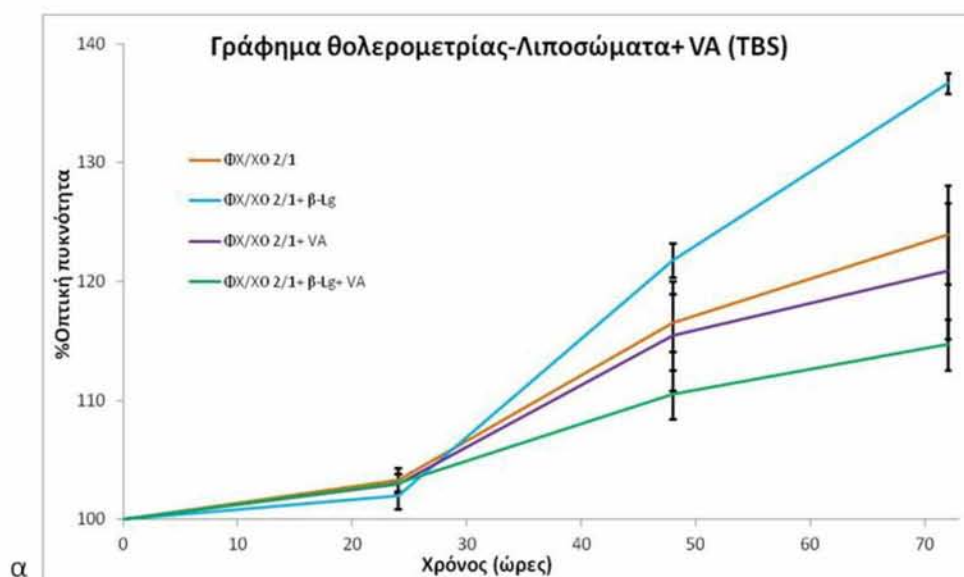


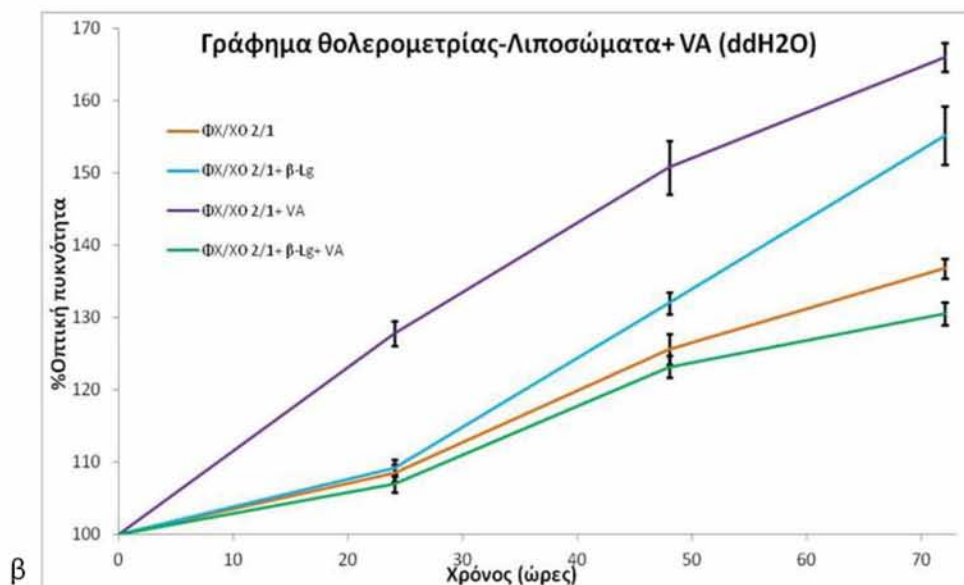
Εικόνα 3.12 Εκτίμηση της σταθερότητας των λιποσωμάτων που έχουν εγκλωβίσει βιταμίνη E:
α. Μετρήσεις θολερομετρίας των λιποσωμικών διασπορών μετά από ενυδάτωσή τους σε TBS
β. Μετρήσεις θολερομετρίας των λιποσωμικών διασπορών μετά από ενυδάτωσή τους σε ddH₂O

Η βελτιωμένη σταθερότητα όσον αφορά την βιταμίνη E, εκτός της παρουσίας της β-Lg, μπορεί να εξηγηθεί και από τις ιδιότητες της βιταμίνης να δρα ως σταθεροποιητικός παράγοντας των μεμβρανών και ως προστατευτικός παράγοντα της υπεροξείδωσης των μεμβρανικών λιπιδίων. Αυτό συμβαίνει λόγω της δημιουργίας

συμπλόκων με τα ακόρεστα λιπαρά οξέα ή περιορίζοντας την μοριακή κινητικότητα των μεμβρανικών συστατικών (Lefèvre & Subirade, 2001; Ramana, Sharma, Sethuraman, Ranga, & Krishnan, 2012). Η προσθήκη της βιταμίνης E επιπλέον έχει δείχθει ότι αυξάνει την σταθερότητα των λιποσωμάτων αλλά μόνο σε μία σχετικά χαμηλή συγκέντρωση (mol % VE/ PC ratio) (Dwiecki, Górnaś, Wilk, Nogala-Kałucka, & Polewski, 2007; C. Li, Shen, Wei, Xie, & Lu, 2012). Σαν αποτέλεσμα, ένα χαμηλό ποσοστό μοριακής αναλογίας χρησιμοποιήθηκε για την συγκεκριμένη βιταμίνη (2/1/0.035 ΦΧ/ΧΟ/VE μοριακή αναλογία).

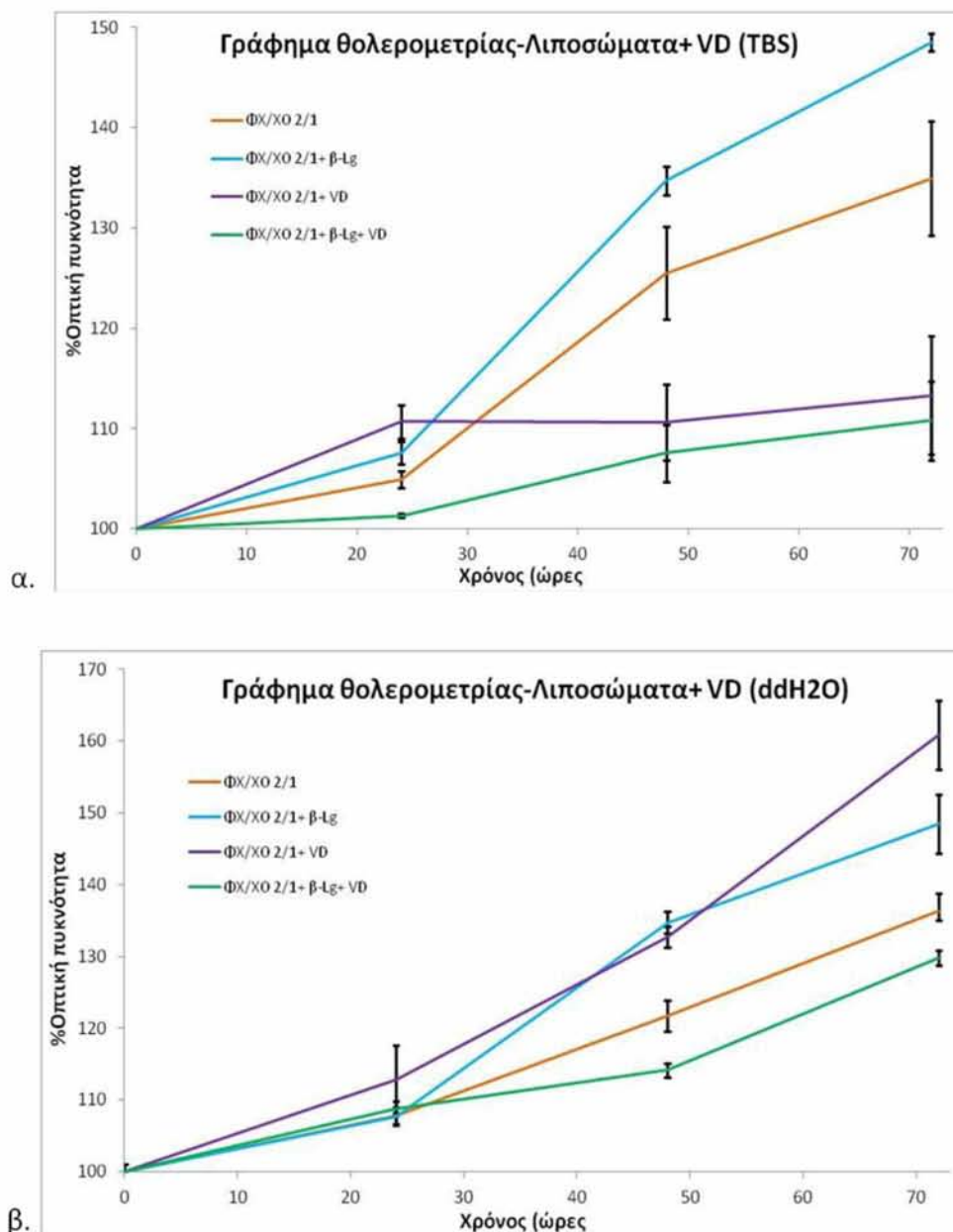
Η μοριακή εξήγηση της μειωμένης κινητικότητας μπορεί να αποδοθεί στους δεσμούς υδρογόνου που αναπτύσσονται (μεταξύ της ομάδας του υδροξυλίου της α-τοκοφερόλης και του οξυγόνου της φωσφορικής ομάδας της φωσφατιδυλοχολίνης) (M. Liu, Gan, Chen, Zhu, Xu, & Hao, 2012) και τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις (μεταξύ α-τοκοφερόλης και της αλυσίδας των λιπαρών οξέων της φωσφατιδυλοχολίνης).





Εικόνα 3.13 Εκτίμηση της σταθερότητας των λιποσωμάτων που έχουν εγκλωβίσει βιταμίνη Α:
α. Μετρήσεις θολερομετρίας των λιποσωμικών διασκορύν μετά από ενυδάτωσή τους σε TBS
β. Μετρήσεις θολερομετρίας των λιποσωμικών διασκορύν μετά από ενυδάτωσή τους σε ddH₂O

Το σύστημα που περιείχε τόσο την ρετινόλη όσο και την β-Lg παρουσίασε την μικρότερη θολερότητα, συνεπώς και την μεγαλύτερη σταθερότητα τόσο στο TBS όσο και στο νερό. Η ρετινόλη φαίνεται να διανέμεται μέσα στον υδρόφοβο τμήμα των λιποσωμάτων, ενώ και η χοληστερόλη συμβάλει στην τοποθέτησή της βιταμίνης στην φωσφορική διπλοστιβάδα μέσω της υδροφοβικότητάς της (Ko & Lee, 2010; Lee, Lee, Kim, & Lim, 2005). Η ρετινόλη λόγω της παρουσίας μιας πολικής υδροξυλικής ομάδας στο μόριό της μπορεί να αλληλεπιδρά αποτελεσματικά και με τις πολικές κεφαλές των φωσφολιπιδίων (Singh & Das, 1998), καθιστώντας την σύνδεσή της στο λιπόσωμα σταθερότερη.



Εικόνα 3.14 Εκτίμηση της σταθερότητας των λιποσωμάτων που έχουν εγκλωβίσει βιταμίνη D:
α. Μετρήσεις θολερομετρίας των λιποσωμικών διασπορών μετά από ενυδάτωσή τους σε TBS.
β. Μετρήσεις θολερομετρίας των λιποσωμικών διασπορών μετά από ενυδάτωσή τους σε ddH₂O.

Η βιταμίνη D₃ έχει ήδη δειχθεί από προηγούμενες μελέτες (Merz & Sternberg, 1994) ότι μπορεί να ενσωματωθεί αποτελεσματικά στην διπλοστιβάδα των λιποσωμάτων που αποτελούνται από φωσφατιδυλοχολίνη αυγού, όπως τα λιποσώματα στην παρούσα μελέτη. Επιπλέον η VD είναι ικανή να απομακρύνεται από τις μεμβράνες με ένα ρυθμό μεγαλύτερο αυτού της απομάκρυνσης της χοληστερόλης, κάτι

που υποδεικνύει ότι η VD συνδέεται με την διπλοστιβάδα φωσφατιδυλοχολίνης με χαλαρότερο τρόπο από αυτό της χοληστερόλης (Tang, Voo, Nguyen, & Tuckey, 2010; Tuckey, Nguyen, & Slominski, 2008). Η παρουσία της β-γαλακτοσφαιρίνης φαίνεται να προσδίδει μία επιπλέον σταθερότητα στο σύμπλοκο ΦΧ/ΧΟ/VD και να υποβοηθά στην διατήρηση της βιταμίνης στην διπλοστιβάδα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

Όπως φαίνεται από όλα τα διαγράμματα, η οπτική πυκνότητα (άρα και η θολερότητα) των λιποσωμάτων που διαλυτοποιήθηκαν στο νερό αυξήθηκε περισσότερο από ότι αυτή των λιποσωμάτων σε TBS σε σχέση με τον χρόνο. Αυτό αποδεικνύει ότι το TBS συνέβαλε περισσότερο στην διατήρηση της σταθερότητας όλων των λιποσωμικών διασπορών μιας και η διαλυτοποίησή τους σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα με pH κοντά στο 7 συμβάλλει στην αύξηση της σταθερότητάς των λιποσωμάτων (Lee, Lee, Kim, & Lim, 2005).

Τα αποτελέσματά μας για την λιποσωμική σταθερότητα μέσα στον χρόνο συμφωνούν με αυτά άλλων μελετών (Park, Choi, Davaa, & Park, 2011). Οι μετρήσεις οπτικής πυκνότητας έδειξαν μία σημαντική αύξηση της σταθερότητας του νέου φορέα ΦΧ/ΧΟ/ β-Lg και για τις τρεις βιταμίνες που εγκλωβίστηκαν σε αυτόν.

Επίσης η παρουσία της πρωτεΐνης στα λιποσώματα φαίνεται να βελτιώνει τη γενικότερη σταθερότητα του συστήματος. Μελέτες έχουν δείξει ότι η β-Lg παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην μορφολογία και τη δομή των φωσφολιπιδικών διπλοστιβάδων (Alexander, Acero Lopez, Fang, & Corredig, 2012; C. K. Kim, Chung, Lee, Choi, & Kim, 1999; Lefèvre & Subirade, 2000; X. Zhang, Tanner, Graff, Palivan, & Meier, 2012). Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, οι πρωτεΐνες του γάλακτος (συμπεριλαμβανομένου και της β-Lg) είναι γνωστές για την ικανότητά τους να σταθεροποιούν τα γαλακτώματα στα τρόφιμα (Fidorra, Heimbürg, & Seeger, 2009; Vermonden, Censi, & Hennink, 2012). Επιπλέον οι αλλαγές στην διαμόρφωση των

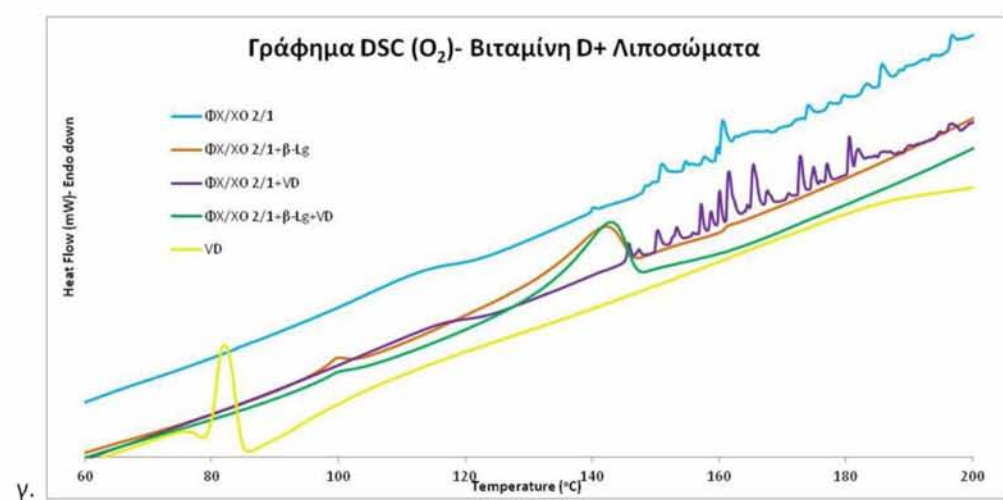
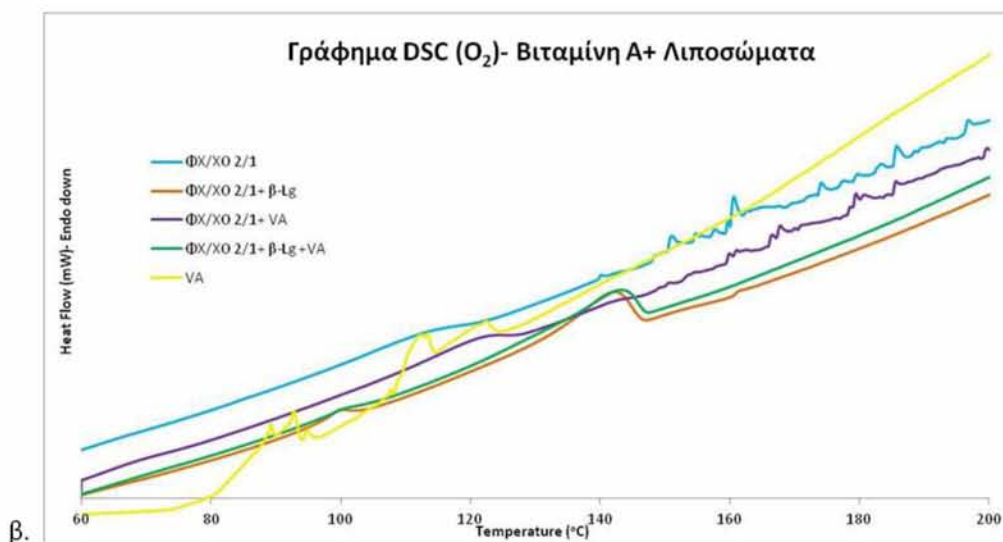
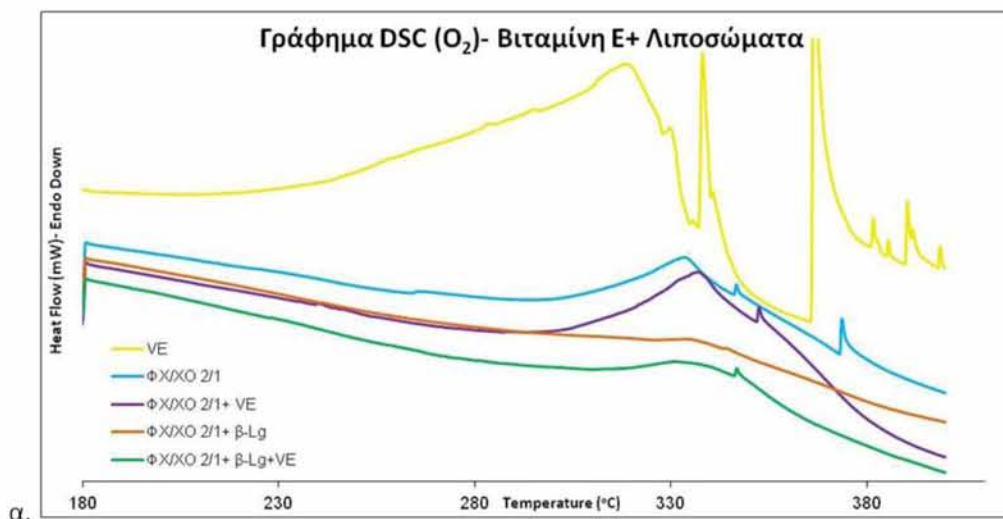
λιπιδίων λόγω της παρουσίας της β-Lg μπορεί να ποικίλουν αρκετά λόγω της φύσης των λιπιδίων (Lefèvre & Subirade, 2000).

3.2.2.2 Θερμιδομετρία Διαφορικής Σάρωσης (*Differential Scanning Calorimetry- DSC*) υπό οξειδωτικές συνθήκες (O_2)

Η αυτοοξείδωση των λιπών, των λιπαρών οξέων και των λιπιδίων είναι μία καλά χαρακτηρισμένη εξώθερμη διαδικασία και μέθοδοι θερμικής ανάλυσης όπως είναι το DSC είναι πολύτιμες για την μελέτη της θερμοσταθερότητας και της θερμοοξείδωσης (X. Zhang, Ge, & Keiderling, 2007) ενώ μπορούν επίσης να προσδιοριστούν και οι κινητικές παράμετροι της οξείδωσης των λιπαρών οξέων (Liolios, Gortzi, Lalas, Tsaknis, & Chinou, 2009).

Η αντιοξειδωτική ενεργότητα υπολογίζεται από την εκλυόμενη θερμοκρασία στην αρχή της οξειδωτικής διαδικασίας σύμφωνα με τις μετρήσεις που καταγράφονται κατά την διάρκεια της επώασης (Junghans, Champagne, Cayot, Loupiac, & Köper, 2011).

Όπως φαίνεται από την εικόνα, όλα τα δείγματα παρουσιάζουν διαφορετικές DSC καμπύλες. Οι διαφορές στα σχήματα υποδηλώνουν διαφορές στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του κάθε συστήματος (Samuni, Crommelin, Zuidam, & Barenholz, 1998).



Εικόνα 3.15 Οι καμπύλες θερμιδομετρίας διαφορετικής σάρωσης λιποσωμικών διασπορών παρουσία και απουσία της β-Lg και στα οποία έχουν εγκλωβιστεί οι λιπόφιλες βιταμίνες E (α), A (β) και D (γ) αντίστοιχα.

Τόσο η θερμική οξειδωτική αποδόμηση των καθαρών ουσιών (καθαρή VE, VA και VD), όσο και η αποικοδόμηση των λιποσωμικών παρασκευών (τα οποία περιέχουν ή μη αυτά τα μόρια) μελετήθηκαν χρησιμοποιώντας ως θερμοκρασία έναρξης (T_0) των καμπυλών, την θερμοκρασία όπου η οξειδωτική διαδικασία ξεκινάει για την κάθε μία βιταμίνη. Τα δεδομένα δείχνουν ότι η προσθήκη της β -Lg στα λιποσώματα που εγκλωβίστηκαν και οι τρεις βιταμίνες, επιφέρει και για τις τρεις βιταμίνες μία πιο έντονη οξειδωτική αντίδραση ($\Phi X/XO$ 2/1+ β -Lg+VE: $T_0=310$ °C, $\Phi X/XO$ 2/1+ β -Lg+VA: $T_0=143$ °C, $\Phi X/XO$ 2/1+ β -Lg+VD: $T_0=142$ °C) από ότι η οξειδωτική αντίδραση των λιποσωμάτων που περιείχαν τις βιταμίνες απουσία της πρωτεΐνης ($\Phi X/XO$ 2/1+VE: $T_0=292$ °C, $\Phi X/XO$ 2/1+VA: $T_0=124$ °C, $\Phi X/XO$ 2/1+VD: $T_0=117$ °C) (στατιστικά σημαντική $P<0.05$).

Ενώ η εξώθερμη κορυφή των καθαρών μορφών των τριών βιταμινών παρατηρείται: για την VE: $T_0=285$ °C, για την VA: $T_0=89$ °C, για την VD: $T_0=82$ °C). Η μετατόπιση της οξειδωτικής αντίδρασης των δειγμάτων που περιείχαν την κάθε βιταμίνη εγκλωβισμένη στον λιποσωμικό φορέα σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες, σημαίνει επιπρόσθετη προστασία της κάθε βιταμίνης στο σύστημα, λόγω του εγκλωβισμού (εικόνα 3.15) (στατιστικά σημαντική $P<0.05$).

Έτσι, στην περίπτωση των λιποσωμάτων που περιέχουν β -Lg+βιταμίνη, παρατηρείται μία αύξηση στην αντιοξειδωτική δράση (και κατ' επέκταση στην αύξηση της σταθερότητας του β -Lg/λιπόσωμα/ βιταμίνη συμπλέγματος (Neunert, Polewski, Markiewicz, Walejko, Witkowski, & Polewski, 2010).

Η τροποποιημένη αντιοξειδωτική δράση των τριών βιταμινών κατά την διάρκεια του εγκλωβισμού τους στον φορέα β -Lg/λιπόσωμα ήταν αναμενόμενη, αφού το νέο σύστημα διαθέτει νέα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και η βιοενεργότητά του εξαρτάται από την δομή και το μέγεθος του συστήματος.

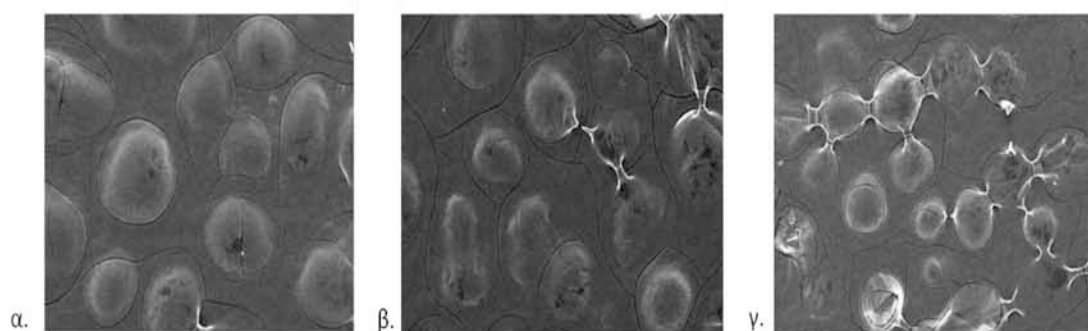
Επιπρόσθετα, η παρουσία της πρωτεΐνης στα λιποσώματα βελτιώνει την σταθερότητά τους και έχει ως αποτέλεσμα μία νέα πολύ σταθερότερη δομή, λόγω των πιθανών αλληλεπιδράσεων που δημιουργούνται μεταξύ των λιπιδίων και της πρωτεΐνης (Kawano, Takayama, Nagai, & Maitani, 2003).

3.2.3 Μελέτη της μορφολογίας του συμπλόκου λιπόσωμα- β -Lg-βιταμίνης E

3.2.3.1 Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (*Scanning Electron Microscopy-SEM*) του συμπλόκου λιπόσωμα/ β -Lg/VE

Η μικροσκοπία είναι μία διαδεδομένη τεχνική για την οπτικοποίηση της επιφάνειας μιας μεμβράνης και για να αποκαλυφθούν άμεσα σημαντικές πτυχές, όπως η μορφολογία, η ομοιομορφία ή το μέγεθος. Οι περισσότερες τεχνικές μικροσκοπίας είναι γρήγορες, εύκολες στην υλοποίησή τους και παρέχουν μία σχετικά εύκολη οπτικοποίηση του δείγματος (Kawano, Takayama, Nagai, & Maitani, 2003).

Η μορφολογία (σχήμα και δομή) των λυοφιλοποιημένων λιποσωμάτων μελετούνται συχνά με την μέθοδο SEM (Ntimenou, Mourtas, Christodoulakis, Tsilimbaris, & Antimisiaris, 2006). Οι μικροσκοπικές παρατηρήσεις έδειξαν ότι τα λιποσωμικά σωματίδια είχαν ως επι το πλείστον σφαιρικό σχήμα. Όλες οι φωτογραφίες στην εικόνα 3.16 παρουσιάζονται στην ίδια μεγέθυνση για εύκολη σύγκριση.



*Εικόνα 3.16 Εικόνες από ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης λιποσωμικών διασπορών
α) Κενά ΦΧ/ΧΟ 2/1 λιποσώματα, β) ΦΧ/ΧΟ 2/1 +β-Lg λιποσώματα, γ) ΦΧ/ΧΟ 2/1 +β-Lg + VE
λιποσώματα*

Τα κενά λιποσώματα (εικόνα 3.16Α), που δημιουργήθηκαν με την μέθοδο του λεπτού υμενίου, παρουσιάζουν ένα μεγαλύτερο μέσο μέγεθος, είναι περισσότερο ετερογενή και με μεγαλύτερο εύρος κατανομής σε σύγκριση με αυτά που περιείχαν μόνο β-Lg (εικόνα 3.16Β) ή αυτά που περιείχαν β-Lg+VE (εικόνα 3.16C).

Ο εγκλωβισμός της VE στην ΦΧ/ΧΟ μεμβράνη φαίνεται να μειώνει την διάμετρο των σωματιδίων, πιθανόν λόγω της δημιουργία νέων δομών. Αυτή η παρατήρηση συμφωνεί με αυτές άλλων ερευνητών (Afri, Ehrenberg, Talmon, Schmidt, Cohen, & Grimer, 2004), υποδηλώνοντας ότι ο εγκλωβισμός της VE μέσα στην λιποσωμική διπλοστιβάδα οδηγεί στην δημιουργία μικρότερων λιποσωμάτων.

Από τις εικόνες φαίνεται ότι τα λιποσώματα που περιέχουν β-Lg είναι μικρότερα σε σύγκριση με τα κενά λιποσώματα ενώ τα λιποσώματα που περιέχουν β-Lg+VE φαίνεται να είναι ακόμη μικρότερα. Επίσης, τόσο η παρουσία της β-Lg όσο και της VE οδηγούν στην δημιουργία γεφυρών μεταξύ των γειτονικών λιποσωμικών σωματιδίων.

3.3 Μελέτη της επίδρασης του περιβάλλοντος και του μέσου, στην ικανότητα σύνδεσης σε πρωτεϊνικούς φορείς (β -Lg)

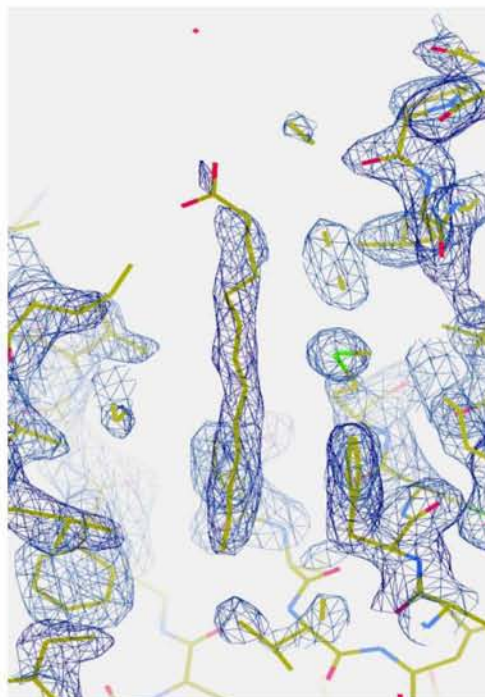
3.3.1 Κρυστάλλωση πρωτεϊνών

Κρύσταλλοι από το σύμπλεγμα β -Lg-τριδεκανοϊκού οξέος (C13) (εικόνα 3.17) δημιουργήθηκαν όπως αναφέρθηκε με την μέθοδο της κρεμάμενης σταγόνας.



Εικόνα 3.17 Κρύσταλλοι του συμπλέγματος β -Lg-τριδεκανοϊκού οξέος (C13)

Πιο αναλυτικά, η δομή της β -Lg-C13 προσδιορίστηκε με περίθλαση ακτίνων X, σε ευκρίνεια 2.10 \AA και η πρώτη διαφορά του χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας ($2F_o - 1F_c$) αποκάλυψε ότι η κεντρική θέση πρόσδεσης του κάλυκα καταλαμβάνεται από ένα μόριο C13 (εικόνα 3.18).



Εικόνα 3.18 Το μόριο του τριδεκανοϊκού οξέος στον κεντρικό κάλυκα της β-Lg όπως φαίνεται από την ανάλυση του χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας

Η δομή που αποκτήθηκε από την ανάλυση του κρυστάλλου με τις ακτίνες Χ δείχνει ότι το τελικό κομμάτι της υδρογονανθρακικής αλυσίδας του προσδέτη είναι πάντα προσδεδεμένο βαθιά μέσα στο υδρόφοβο κομμάτι του β-βαρελίου του κάλυκα, ενώ η καρβοξυλική ομάδα τοποθετείται κοντά στην είσοδο του κάλυκα.

Ο κεντρικός κάλυκας είναι η μόνη θέση πρόσδεσης που παρατηρήθηκε από την ανάλυση της δομής του συμπλόκου της β-Lg-C13. Ενώ η πρόσδεση του C13 στην β-Lg δεν επηρεάζει σημαντικά την διαμόρφωση των κύριων αλυσίδων της πρωτεΐνης.

3.3.2 Θερμοδυναμική της ένωσης μη φυσικών λιπαρών οξέων με την β-γαλακτοσφαιρίνη

Η θερμοδυναμική μελέτη της ένωσης τεσσάρων μη φυσικών λιπαρών οξέων [τριδεκανοϊκό οξύ (C13), το πενταδεκανοϊκό οξύ (C15), το επταδεκανοϊκό οξύ (C17) και το εννιαδεκανοϊκό οξύ (C19)] με την β-γαλακτοσφαιρίνη έγινε με την εξαιρετικά

ευαίσθητη μέθοδο του ITC.

Παρόλο που κάποιες μελέτες όσον αφορά την β -Lg δείχνουν να έχει και δεύτερη θέση πρόσδεσης για λιπόφιλα μόρια, οι περισσότερες μελέτες που έχουν δημοσιευθεί μέχρι σήμερα δείχνουν ότι η πρωτεΐνη μπορεί να προσδέσει με μεγάλη συγγένεια ένα μόνο μόριο λιπαρού οξέος στο κάλυκα που σχηματίζεται από το β -βαρέλι, θέση η οποία θεωρείται ως η κύρια θέση πρόσδεσης για τα λιπαρά οξέα (J. Loch, et al., 2011; Wu, Pérez, Puyol, & Sawyer, 1999).

Επιπρόσθετα, και τα σύμπλοκα της β -Lg με τα μη φυσικά λιπαρά οξέα που παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία, περιέχουν μόνο ένα μόριο λιπαρού οξέος στο β -βαρέλι. Οι χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας δεν αποκάλυψαν την παρουσία κάποιου επιπρόσθετου μορίου προσδέτη συνδεδεμένο με την πρωτεΐνη σε άλλη πιθανή θέση πρόσδεσης της πρωτεΐνης.

Οι ιδιότητες πρόσδεσης (προσδιορισμός της σταθεράς σύνδεσης- K_a , της στοιχειομετρίας- n , της ενθαλπίας- ΔH , της σταθεράς αποδέσμευσης- K_d και της εντροπίας- ΔS) που προσδιορίστηκαν για το σύμπλοκο β -Lg με τα: C13, C15, C17 και C19 συνοψίζονται στον πίνακα 3.4 παρακάτω.

	$K_a [M^{-1}] \times 10^6$	n	ΔH (kJ/mol)	$K_d [M] \times 10^{-7}$	ΔS (J/mol·K)
C13	5.19 ± 0.69	1.04 ± 0.01	-18.36 ± 0.41	1.93 ± 0.31	66.97 ± 2.59
C15	3.43 ± 1.1	0.769 ± 0.09	-37.06 ± 1.46	2.91 ± 1.17	0.81 ± 1.31
C17	2.43 ± 0.97	0.549 ± 0.1	-55.19 ± 6.23	4.11 ± 1.29	-62.84 ± 5.77
C19	1.15 ± 0.35	0.465 ± 0.16	-49 ± 6.36	8.67 ± 1.84	-48.29 ± 6.16

Πίνακας 3.4 Ιδιότητες πρόσδεσης των C13, C15, C17 & C19 με την β -Lg όπως αυτές προσδιορίστηκαν με την μέθοδο ITC.

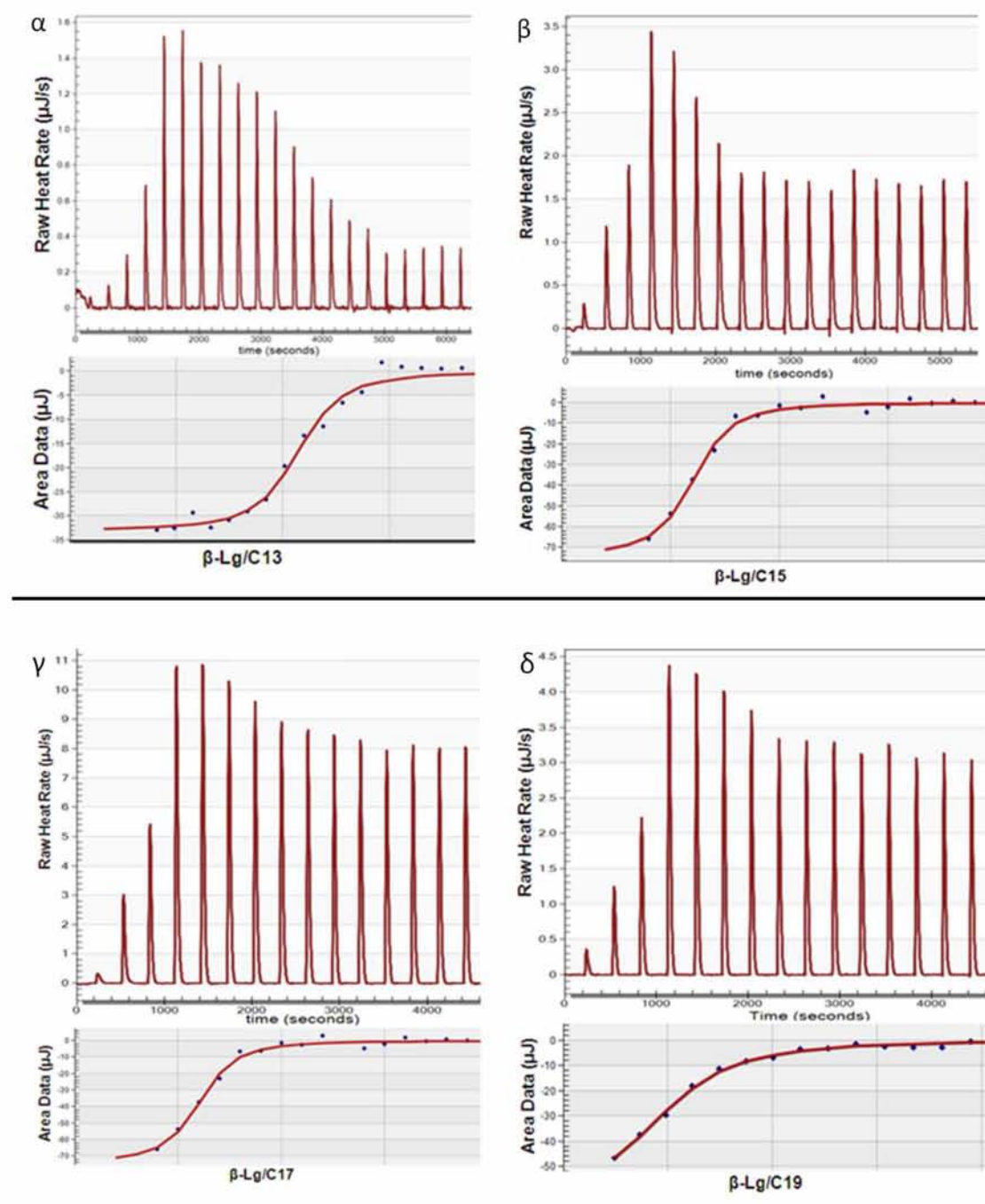
Οι προσδιορισμένες σταθερές σύνδεσης είναι παρόμοιες για όλα τα σύμπλοκα. Οι τιμές των υπολοίπων θερμοδυναμικών παραμέτρων υποδεικνύουν ότι η πρόσδεση των C13 & C15 στην β-Lg είναι κυρίως οδηγούμενη από την εντροπία της σύνδεσης, ενώ η πρόσδεση των C17 & C19 στην β-Lg είναι κυρίως οδηγούμενη από την ενθαλπία της σύνδεσης. Τα αποτελέσματα της θερμιδομετρίας ισόθερμης τιτλοδότησης για τα τέσσερα λιπαρά οξέα δείχνουν ότι η σύνδεσή τους στην πρωτεΐνη είναι αυθόρμητη και εξώθερμη.

Η στοιχειομετρία της πρόσδεσης των λιπαρών οξέων στην β-Lg όπως αυτή προσδιορίστηκε από τα πειράματα ITC ποικίλει για τα διάφορα λιπαρά οξέα. Υπολογίζεται πολύ κοντά στο 1.00 για το σύμπλοκο β-Lg –C13 αλλά για τα υπόλοιπα σύμπλοκα οι τιμές είναι χαμηλότερες από ότι αναμενόταν [0.769 ± 0.09 για το C15, 0.549 ± 0.1 για το C17 και 0.465 ± 0.1 για το C19 (Πίνακας 3.4)]. Η χαμηλότερη μεταβολή εντροπίας (ΔS) παρατηρήθηκε από τον σχηματισμό του συμπλόκου της πρωτεΐνης με το C17 και η τιμή της φαίνεται να αυξάνει όσο μειώνεται το μήκος της αλφατικής αλυσίδας (πίνακας 3.4).

Η συνιστώσα της ενθαλπίας εξαρτάται κυρίως από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των λιπαρών οξέων, του διαλύτη και της πρωτεΐνης ενώ η μεταβολή της εντροπίας εξαρτάται κυρίως από επιδράσεις που σχετίζονται με αλλαγές στη διαμόρφωση του προσδέτη, μετατόπιση του διαλύτη από την θέση πρόσδεσης ή απελευθέρωσή του όταν το λιπαρό οξύ εισέρχεται στην κοιλότητα που φέρει την θέση πρόσδεσης.

Τα πειραματικά δεδομένα επεξεργάστηκαν με το μοντέλο της ανεξάρτητης θέσης πρόσδεσης (εικόνα 3.19). Τα διαφορετικά ύψη των κορυφών που αντιστοιχούν στον κορεσμό της αντίδρασης για κάθε λιπαρό οξύ είναι εξαιτίας των διαφορετικών ποσοστών συγκέντρωσης αιθανόλης που χρησιμοποιήθηκε για κάθε προσδέτη

(διαφορετικά ποσοστά αιθανόλης χρησιμοποιήθηκαν λόγω διαφοράς στην διαλυτότητα κάθε λιπαρού οξέως σε υδατικό μέσο).



Εικόνα 3.19 Τα διαγράμματα θερμιδομετρίας ισόθερμης τιτλοδότησης και οι καμπύλες πρόσδεσης που ελήφθησαν για τα σύμπλοκα: (α) β-Lg-C13, (β) β-Lg-C15, (γ) β-Lg-C17 και (δ) β-Lg-C19

Οι διαφορετική συνεισφορά της ενθαλπίας και της εντροπίας στο ΔG αντανακλά τις διαφορετικές ενεργειακές επιδράσεις που συνοδεύουν την δημιουργία του

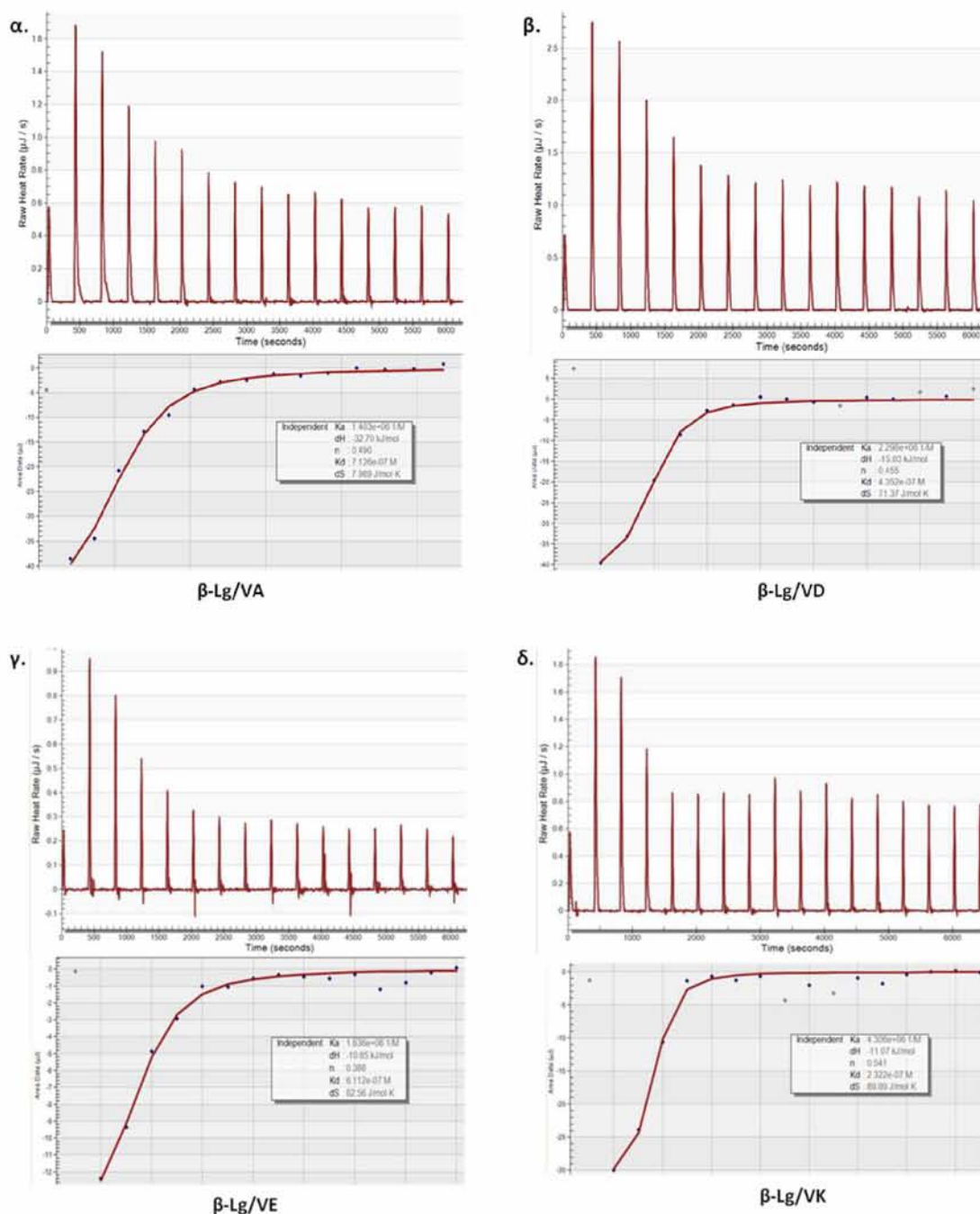
συμπλόκου πρωτεΐνης/ προσδέτη. Ανάμεσα στους κυριότερους παράγοντες που αυξάνουν την συνεισφορά της ενθαλπίας στην ΔG είναι οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και οι αλληλεπιδράσεις λόγω σχηματισμού δεσμών υδρογόνου και οι αλληλεπιδράσεις Van der Waals. Οι δυνάμεις διασποράς μεταξύ: α) των ατόμων του προσδέτη σε ελεύθερη και δεσμευμένη κατάσταση, β) προσδέτη και πρωτεΐνης ή γ) προσδέτη και του ήδη υπάρχοντος δικτύου νερού, έχουν θετική ή αρνητική επίδραση. Η συνιστώσα της εντροπίας στον υπολογισμό του ΔG επηρεάζεται κυρίως από την αλλαγή στους βαθμούς ελευθερίας του προσδέτη και των πλευρικών αλυσίδων της πρωτεΐνης, από την απώλεια νερού από την θέση πρόσδεσης και/ ή την αποδέσμευση διαλύτη από την θέση πρόσδεση λόγω της εισαγωγής του προσδέτη σε αυτήν.

3.4 Εκτίμηση του εγκλωβισμού των λιπόφιλων βιταμινών A, E & D στην πρωτεΐνη β-γαλακτοσφαιρίνη (β-Lg)

Όπως έχει εκτενώς παρουσιαστεί από πολλές μελέτες και έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο, η β-Lg έχει μία θέση πρόσδεσης για λιπόφιλα μόρια στο εσωτερικό του κάλυκα που δημιουργείται από το β-βαρέλι και όπως έχουν δείξει κρυσταλλογραφικές μελέτες η βιταμίνη A προσδένεται επιτυχώς σε αυτό (Kontopidis, Holt, & Sawyer, 2002). Όσον αφορά την βιταμίνη D, κάποιοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι εκτός από την κύρια θέση πρόσδεσης στον κάλυκα της πρωτεΐνης, υπάρχει και μία δεύτερη στο εξωτερικό μέρος της πρωτεΐνης, κοντά στο σημείο που ενώνονται τα δύο μονομερή της. Κάτι τέτοιο όμως είναι αμφίβολο γιατί τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα που το υποστηρίζουν δεν είναι αρκετά ευκρινή για να το πιστοποιήσουν (Kontopidis, Holt, & Sawyer, 2004).

Επιπρόσθετα, και τα σύμπλοκα της β-Lg με τα μη φυσικά λιπαρά οξέα που παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία, περιέχουν μόνο ένα μόριο λιπαρού οξέος στο β-βαρέλι. Οι χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας δεν αποκάλυψαν την παρουσία κάποιου επιπρόσθετου μορίου προσδέτη συνδεδεμένο με την πρωτεΐνη σε άλλη πιθανή θέση πρόσδεσης της πρωτεΐνης.

Η εκτίμηση του εγκλωβισμού των τεσσάρων λιπόφιλων βιταμινών με την β-Lg πραγματοποιήθηκε με την εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδο του ITC (εικόνα 3.20).



Εικόνα 3.20 Τα διαγράμματα θερμιδομετρίας ισόθερμης τιτλοδότησης και οι καμπύλες πρόσδεσης που ελήφθησαν για τα σύμπλοκα: (α) β -Lg-VA, (β) β -Lg-VD, (γ) β -Lg-VE και (δ) β -Lg-VK

Τα πειραματικά δεδομένα επεξεργάστηκαν με το μοντέλο της μονής θέσης πρόσδεσης. Τα διαφορετικά ύψη των κορυφών που αντιστοιχούν στον κορεσμό της αντίδρασης για κάθε βιταμίνη είναι εξαιτίας των διαφορετικών ποσοστών συγκέντρωσης αιθανόλης που χρησιμοποιήθηκε για κάθε προσδέτη (διαφορετικά

ποσοστά αιθανόλης χρησιμοποιήθηκαν λόγω διαφοράς στην διαλυτότητα κάθε βιταμίνης σε υδατικό μέσο).

Οι ιδιότητες πρόσδεσης (προσδιορισμός της σταθεράς σύνδεσης- K_a , της στοιχειομετρίας- n , της ενθαλπίας- ΔH , της σταθεράς αποδέσμευσης- K_d και της εντροπίας- ΔS) που προσδιορίστηκαν για το σύμπλοκο β -Lg με την βιταμίνη A (VA), την βιταμίνη D (VD), την βιταμίνη E (VE) και την βιταμίνη K (VK) συνοψίζονται στον πίνακα 3.5 παρακάτω.

	$K_a [M^{-1}] \times 10^6$	n	ΔH (kJ/mol)	$K_d [M] \times 10^{-7}$	ΔS (J/mol·K)
VA	1.40 \pm 0.41	0.490 \pm 0.11	-32.70 \pm 0.87	7.126 \pm 0.52	7.989 \pm 1.24
VD	2.298 \pm 1.71	0.455 \pm 0.13	-15.03 \pm 1.51	4.352 \pm 1.91	71.37 \pm 1.03
VE	1.636 \pm 1.12	0.388 \pm 0.16	-10.85 \pm 2.33	6.112 \pm 1.87	82.56 \pm 3.66
VK	4.306 \pm 0.97	0.541 \pm 0.17	-11.07 \pm 1.75	2.322 \pm 1.11	89.89 \pm 4.21

Πίνακας 3.5 Ιδιότητες πρόσδεσης των VA, VD, VE & VK με την β -Lg όπως αυτές προσδιορίστηκαν με την μέθοδο ITC

Οι προσδιορισμένες σταθερές σύνδεσης είναι παρόμοιες για όλα τα σύμπλοκα ($K_a [M^{-1}] \times 10^6$). Οι τιμές των υπολοίπων θερμοδυναμικών παραμέτρων υποδεικνύουν ότι η πρόσδεση και των τεσσάρων λιπόφιλων βιταμινών στην β -Lg είναι κυρίως οδηγούμενη από την εντροπία της σύνδεσης. Τα αποτελέσματα της θερμιδομετρίας ισόθερμης τιτλοδότησης για τις τέσσερις βιταμίνες δείχνουν ότι η σύνδεσή τους στην πρωτεΐνη είναι αυθόρμητη και εξώθερμη.

Η στοιχειομετρία της πρόσδεσης των λιπόφιλων βιταμινών στην β -Lg όπως αυτή προσδιορίστηκε από τα πειράματα ITC ποικίλει ελάχιστα για κάθε μία. Οι τιμές είναι χαμηλότερες από ότι αναμενόταν [0.490 \pm 0.11 για την VA, 0.455 \pm 0.13 για την VD, 0.388 \pm 0.16 για την VE και 0.541 \pm 0.17 για την VK (Πίνακας 3.5)]. Η χαμηλότερη

μεταβολή εντροπίας (ΔS) παρατηρήθηκε από τον σχηματισμό του συμπλόκου της πρωτεΐνης με την VA και η τιμή της φαίνεται να αυξάνει για τις άλλες βιταμίνες (πίνακας 3.5).

Η μεταβολή της ενθαλπίας εξαρτάται κυρίως από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βιταμινών, του διαλύτη και της πρωτεΐνης ενώ η μεταβολή της εντροπίας εξαρτάται κυρίως σε επιδράσεις που σχετίζονται με αλλαγές στη διαμόρφωση του προσδέτη, μετατόπιση του διαλύτη από την θέση πρόσδεσης ή απελευθέρωσή του όταν η βιταμίνη εισέρχεται στην κοιλότητα της θέσης πρόσδεσης.

3.5 Έλεγχος της βιοδραστικότητας της βιταμίνης A: *In vivo* μελέτη της βιοκατανομής της βιταμίνης στο αίμα ποντικών.

Μελέτες σε καλλιέργειες κυττάρων και σε πειραματόζωα έχουν τεκμηριώσει την ικανότητα των φυσικών και τεχνητών ρετινοειδών να μειώνουν σημαντικά την καρκινογένεση του δέρματος, του μαστού, του ήπατος, του παχέος εντέρου, του προστάτη, και άλλων σημείων (Alizadeh, Bolhassani, Khavari, Bathaie, Naji, & Bidgoli, 2014).

Με το να διατηρούν την ικανότητά τους να ρυθμίζουν την ανάπτυξη και να επάγουν την διαφοροποίηση στην διάρκεια της ζωής, τα ρετινοειδή επηρεάζουν την ανάπτυξη πολλών ογκογονικών κυτταρικών σειρών σε καλλιέργειες (Altucci & Gronemeyer, 2001). Οι ευεργετικές επιδράσεις της «διαφοροποιημένης θεραπείας» που έχουν σαν βάση τα ρετινοειδή είχε εντυπωσιακά αποτελέσματα στην περίπτωση της οξείας προμυελωτικής λευχαιμίας (Ozpolat, Lopez-Berestein, & Mehta, 2001).

Σε αντίθεση με την επιθετική δράση τους ενάντια στα καρκινικά κύτταρα, τα ρετινοειδή είναι εξαιρετικά ασταθή στην παρουσία οξειδωτικών, ουσίες που παράγουν ελεύθερες ρίζες και το φως (ειδικά στα UV μήκη κύματος κάτω από 415 nm) που μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτική αποδόμηση και/ή ισομερισμό τους.

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η βιταμίνη A αποικοδομείται πολύ γρήγορα στα υδατικά διαλύματα (Sauvant, Cansell, Hadj Sassi, & Atgié, 2012). Επιπλέον εξαιτίας της χαμηλής πολικότητας, η βιταμίνη A παρουσιάζει χαμηλή διαλυτότητα σε υδατικούς διαλύτες. Την μέγιστη ενεργότητα της βιταμίνης A παρουσιάζει η all-trans-ρετινόλη και όλη η διαδικασία ισομερισμού έχει ως αποτέλεσμα σε μερική απώλεια της ενεργότητας (Semenova, Cooper, Wilson, & Converse, 2002).

Για τον λόγο αυτό, διάφορων ειδών μικροσωματίδια εγκλωβισμού έχουν αναπτυχθεί για να βελτιώσουν τόσο την σταθερότητα όσο και την απελευθέρωση της βιταμίνης A (Loveday & Singh, 2008).

Με σκοπό να βρεθεί ένας καινοτόμος τρόπος προστασίας και χορήγησης της βιταμίνης A, πιθανώς ξεπερνώντας και μειώνοντας τα προβλήματα της διαλυτότητας, της ειδικότητας και της τοξικότητας που σχετίζονται με την χρήση των ρετινοειδών, πολλές μελέτες έχουν προτείνει την χρήση λιποσωμάτων ως εξειδικευμένα συστήματα μεταφοράς (Cortesi, Esposito, Gambari, Menegatti, & Nastruzzi, 1994; Singh & Das, 1998).

Για όλους τους παραπάνω λόγους και για την σημαντική δράση των ρετινοειδών κατά του καρκίνου, έγινε εγκλωβισμός της βιταμίνης A στον νέο φορέα (σύμπλοκο λιποσώματος/ β-γαλακτοσφαιρίνης) και εκτιμήθηκε η βιοδιαθεσιμότητά της μετά τον εγκλωβισμό. Πραγματοποιήθηκε χορήγησή της από το στόμα στα πειραματόζωα, τόσο στον νέο φορέα- σε υδατικό μέσο όσο και σε ελεύθερη μορφή σε έλαιο και αξιολογήθηκε η βιοκατανομή της σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα στο πλάσμα του αίματος.

Από όσο γνωρίζουμε έως τώρα, αυτή είναι η πρώτη φορά που χρησιμοποιείται ως σύστημα προστασίας και μεταφοράς της βιταμίνης A το σύμπλοκο λιποσώματος και β-Lg. Εξαιτίας του αυξημένου ποσοστού εγκλωβισμού καθώς και της βελτιωμένης σταθερότητας που προσδιορίστηκε *in vitro* για το συγκεκριμένο σύστημα, για τον λόγο αυτό μελετήθηκε περαιτέρω η βιοδραστικότητα της εγκλωβισμένης βιταμίνης A στο νέο αυτό σύστημα εγκλωβισμού.

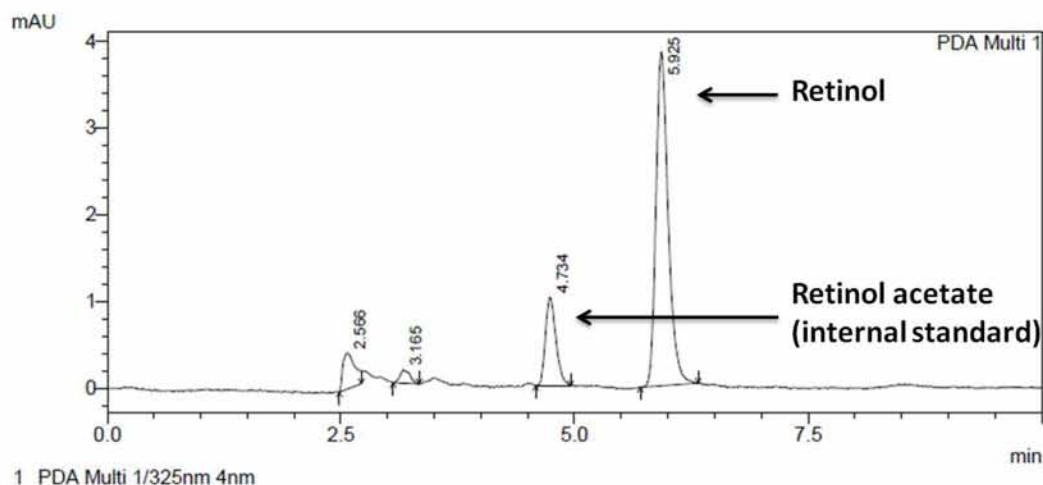
3.5.1 Προσδιορισμός της βιοκατανομής της βιταμίνης Α (ρετινόλης) στο αίμα των ποντικών (Oral Gavage)

Όλες οι μελέτες που έγιναν στα πειραματόζωα διεξήχθησαν σύμφωνα με τους διεθνείς κανονισμούς που διέπουν τον χειρισμό πειραματόζωων (Guillén, 2014; Kostomitsopoulos N., 2007).

Μελετήθηκε η κατανομή της βιταμίνης Α (ρετινόλης- ROH) στο αίμα 72 αρσενικών ποντικών 2, 5, 8, 12 και 24 ώρες μετά από του στόματος χορήγηση 200 μ L διαλύματος ρετινόλης 0,5 mg/mL, που αντιστοιχεί περίπου σε 5 mg/kg βάρους σώματος ζώου. Οι δύο μορφές που χορηγήθηκαν ήταν:

- ROH σε καθαρή μορφή διαλυτοποιημένη σε έλαιο
- ROH εγκλωβισμένη σε λιποσώματα (ΦΧ/ΧΟ 2/1 + β -Lg) διαλυτοποιημένα σε υδατικό μέσο.

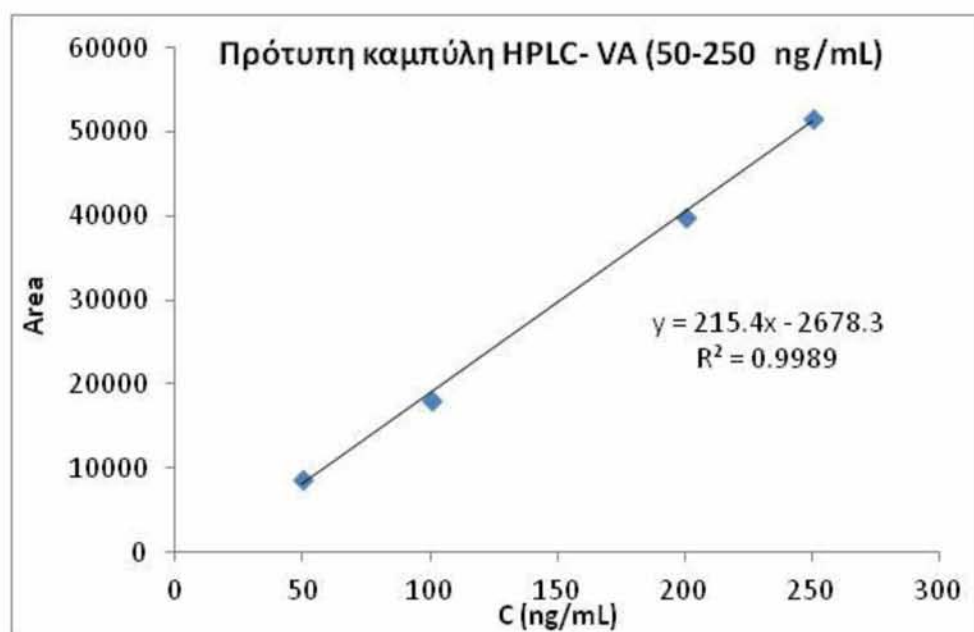
Τα επίπεδα της ROH στο αίμα των πειραματόζωων εκτιμήθηκαν με την μέθοδο HPLC (εικόνα 3.21) (Y. K. Kim & Quadro, 2010). Το ποσοστό ανάκτησης του εσωτερικού προτύπου έφτασε σε ποσοστό 78,7% με τυπική απόκλιση 15,1%.



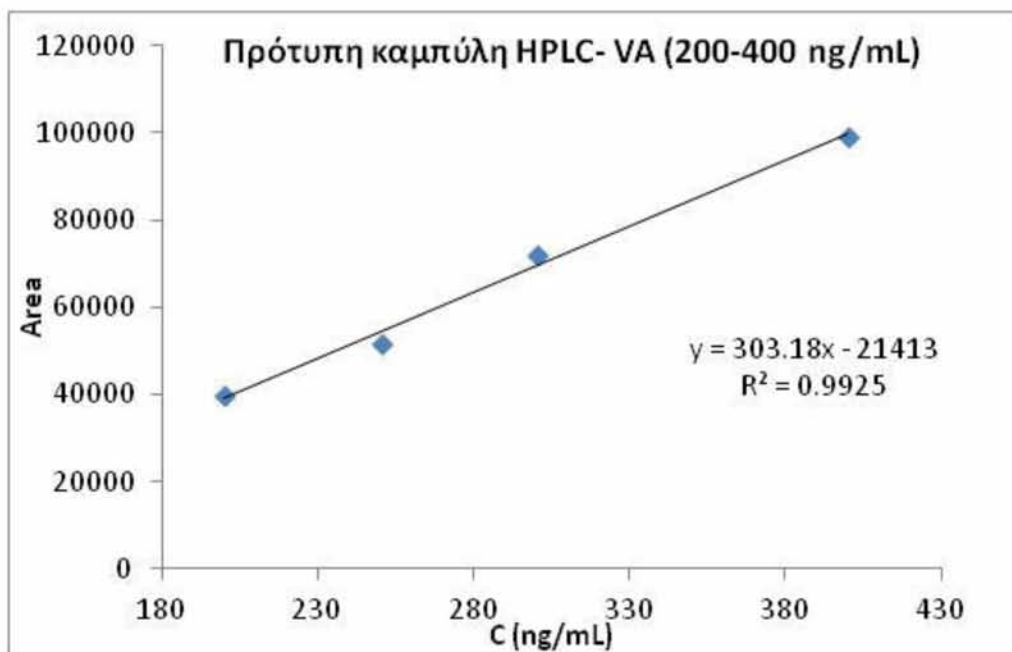
Εικόνα 3.21 Τυπικό HPLC χρωματογράφημα βιταμίνης Α (retinol) από δείγμα πλάσματος στο οποίο έχει προστεθεί γνωστή συγκέντρωση ποσότητας εσωτερικού προτύπου (retinol acetate)

Η συγκέντρωσή της βιταμίνης υπολογίστηκε σύμφωνα με τις εξισώσεις που προέκυψαν από τις πρότυπες καμπύλες που δημιουργήθηκαν από διαφορετικές συγκεντρώσεις VA καθαρής μορφής (50- 2000 ng/mL) σε μεθανόλη:

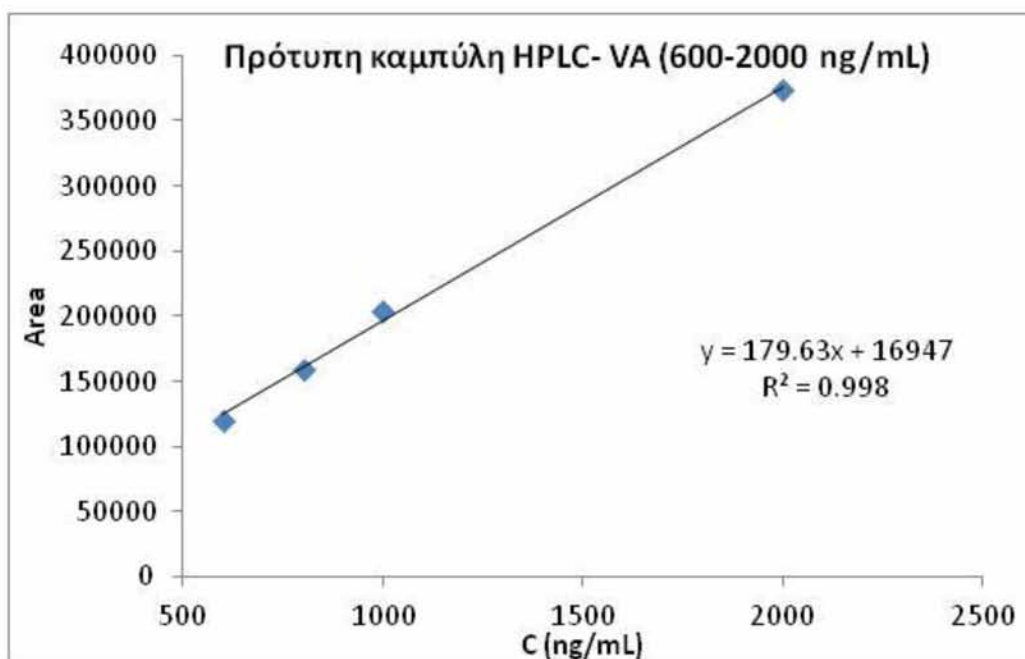
- για ROH 50- 250 ng/mL: $y = 215.4x - 2678.3$, $R^2 = 0.9989$
- για ROH 200- 400 ng/mL: $y = 303.18x - 21413$, $R^2 = 0.9925$
- για ROH 600- 2000 ng/mL: $y = 179.63x + 16947$, $R^2 = 0.998$



Εικόνα 3.22 Πρότυπη καμπύλη καθαρής βιταμίνης Α σε συγκεντρώσεις 50-250 ng/mL με την μέθοδο HPLC

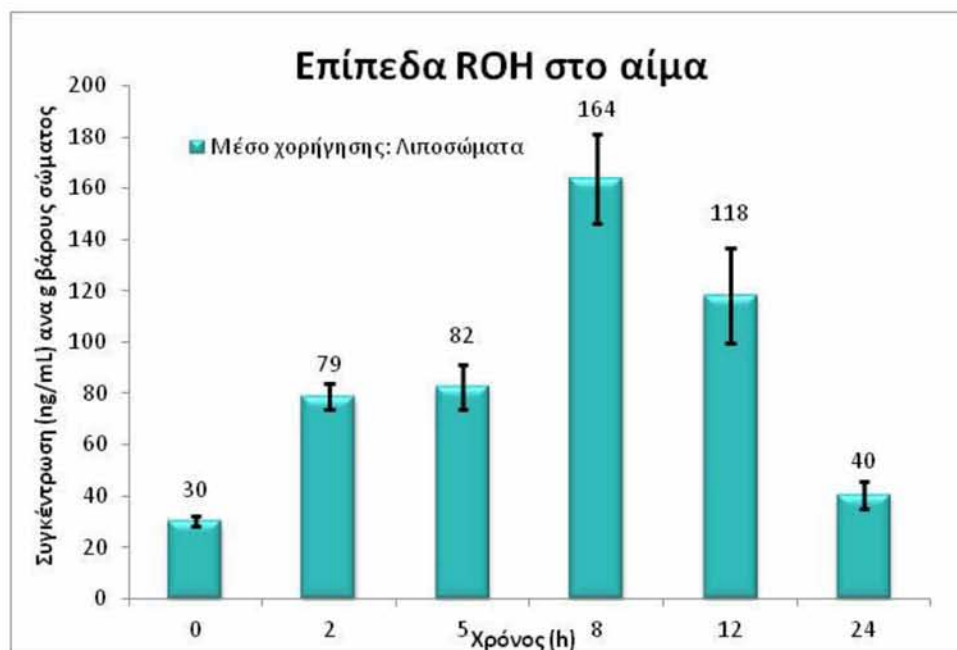


Εικόνα 3.23 Πρότυπη καμπύλη καθαρής βιταμίνης Α σε συγκεντρώσεις 200-400 ng/mL με την μέθοδο HPLC

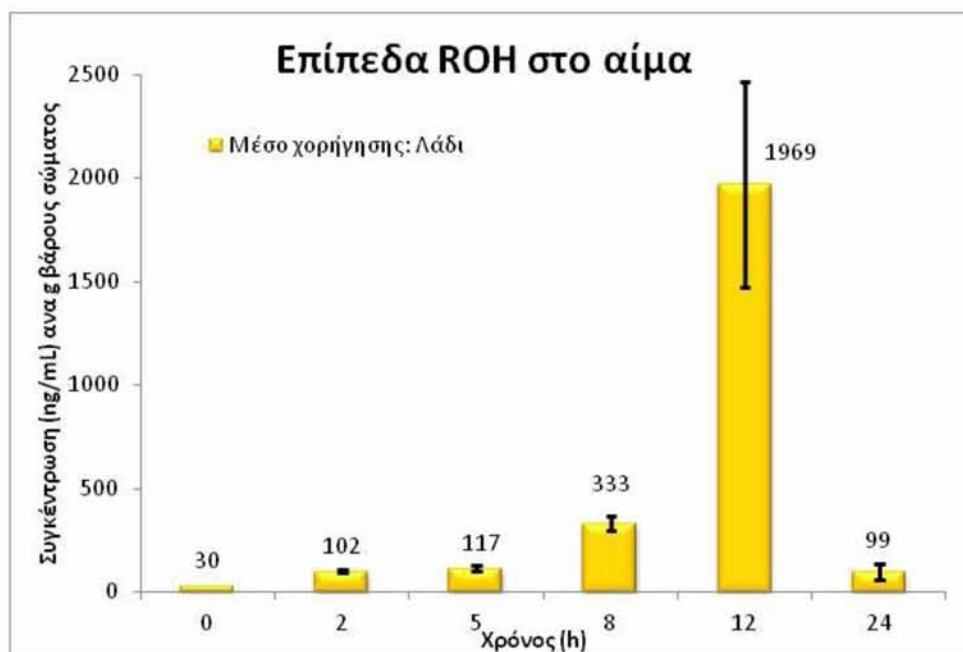


Εικόνα 3.24 Πρότυπη καμπύλη καθαρής βιταμίνης Α σε συγκεντρώσεις 600-2000 ng/mL με την μέθοδο HPLC

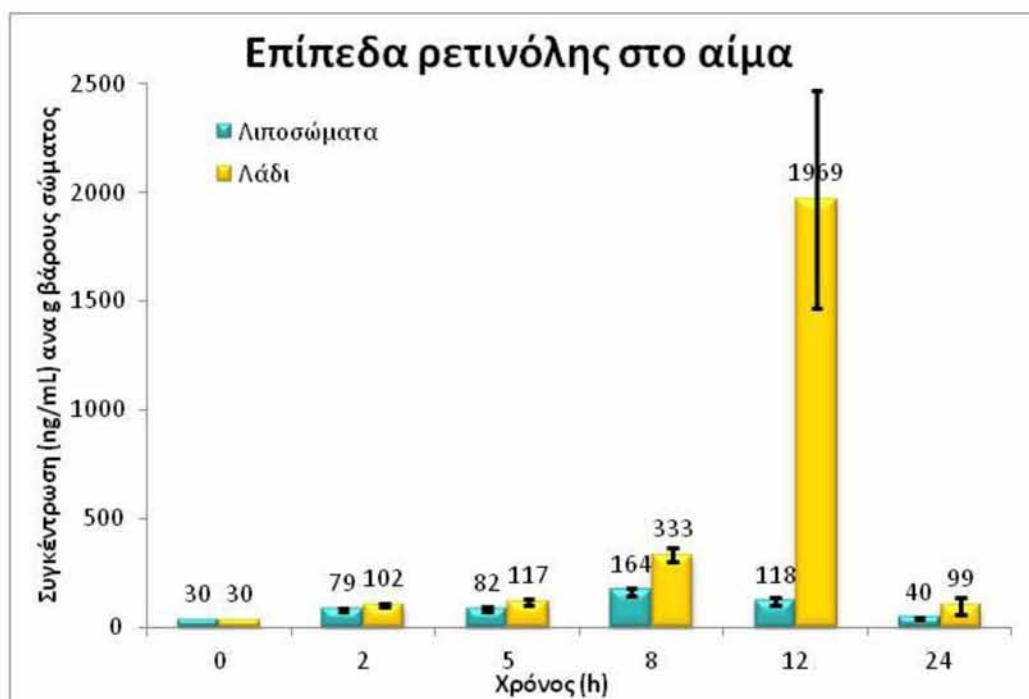
Τα αποτελέσματα της βιοκατανομής καθώς και οι φαρμακοκινητικές παράμετροι που υπολογίστηκαν για τις δυο μορφές εξωγενούς χορήγησης της ρετινόλης που εξετάστηκαν δίνονται στις εικόνες 3.25, 3.26 και 3.27 και στον πίνακα 3.6.



Εικόνα 3.25 Χρονική διακύμανση (εντός 24 ωρών) της συγκέντρωσης της ρετινόλης στο πλάσμα των πειραματόζωων που έλαβαν ρετινόλη εγκλωβισμένη σε λιποσώματα μέσω υδατικού μέσου



Εικόνα 3.26 Χρονική διακύμανση (εντός 24 ωρών) της συγκέντρωσης της ρετινόλης στο πλάσμα των πειραματόζωων που έλαβαν ρετινόλη σε καθαρή μορφή μέσω ελαίου.



Εικόνα 3.27 Συγκριτική παρουσίαση της συγκέντρωσης της ρετινόλης στο πλάσμα των πειραματόζωων που έλαβαν εξωγενώς ρετινόλη σε καθαρή μορφή μέσω λιποσωμάτων ή ελαίου

	Λιποσώματα (n=6)		Έλαιο (n=6)		
Παράμετρος	Μέση τιμή	Απόκλιση	Μέση τιμή	Απόκλιση	p
k_{el} (1/h) (Σταθερά ταχύτητα αποβολής)	0,0046	0,0010	0,0587	0,0183	0,0027*
C_{max} (ng/ml) (Μέγιστη συγκέντρωση)	163,68	38,73	1969,47	1115,52	0,0223*
t_{max} (h) (Μέγιστη συγκέντρωση)	8	0	12	0	
$t_{1/2}$ (h) (Χρόνος ημίσειας ζωής)	157,80	33,78	2,53	0,32	0,0005*
Vd (L/kg) (Όγκος κατανομής)	4,98	0,36	5,16	0,45	0,5035
CL (L/h/Kg) (Κάθαρση)	0,0198	0,0043	0,2542	0,0792	0,0027*
AUC _{0-24h} (h ng/L) (Εμβαδό κάτω από την καμπύλη 0-24h)	2239,17	434,36	17936,58	8975,86	0,0173*
AUC _{0-∞} (h ng/L) (Εμβαδό κάτω από την καμπύλη 0-∞)	38058,20	2714,98	64676,96	48428,64	0,1273

Πίνακας 3.6 Φαρμακοκινητικές παράμετροι της βιταμίνης Α σε ποντίκια (*: $p \leq 0,05$)

Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως στην περίπτωση της χορήγησης ρετινόλης σε καθαρή μορφή μέσω ελαίου, τα ποσοστά που βρέθηκαν στο πλάσμα του αίματος είναι υψηλότερα σε σχέση με εκείνα που βρέθηκαν στην περίπτωση της χορήγησης εγκλωβισμένης ρετινόλης σε λιποσώματα (ΦΧ/ΧΟ 2/1 + β-Lg) μέσω υδατικού μέσου, υποδηλώνοντας ότι η μετακίνηση της ρετινόλης από το γαστρεντερικό σύστημα στο κυκλοφορικό είναι ταχύτερη μετά από χορήγηση καθαρής μορφής σε έλαιο σε σύγκριση με χορήγησή της σε εγκλωβισμένη μορφή σε λιποσώματα.

Τα επίπεδα της ρετινόλης στο αίμα των πειραματόζων που είχαν λάβει καθαρή ρετινόλη σε έλαιο, είναι αρκετά υψηλότερα από αυτά των πειραματόζων στα οποία χορηγήθηκαν τα λιποσώματα, παρουσιάζοντας την μέγιστη συγκέντρωση μετά από 12 ώρες από την χορήγησή της. Η μέγιστη συγκέντρωση της ρετινόλης στις 12 ώρες παρουσιάζει μια υψηλή κορυφή σε σχέση με τις συγκεντρώσεις πριν και μετά από αυτή την χρονική περίοδο, υποδηλώνοντας ότι η συγκέντρωση της ρετινόλης αυξάνεται απότομα (σχεδόν 6 φορές παραπάνω) από τις 8 μέχρι τις 12 ώρες μετά την χορήγηση. Η τόσο απότομη αυξομείωση των επιπέδων της δεν αποτελεί θετικό παράγοντα για την ομαλή απορρόφηση της ρετινόλης από τα όργανα στόχους.

Σε αντίθεση, τα επίπεδα της ρετινόλης στο αίμα όταν αυτήν χορηγήθηκε εγκλωβισμένη σε λιποσώματα φαίνεται, αν και σε χαμηλότερα επίπεδα, να παρουσιάζουν μια χρονική σταθερότητα υποδηλώνοντας μία βραδεία και σταδιακή αποδέσμευση της από το γαστρεντερικό σωλήνα στο αίμα και να μην παρουσιάζουν μεγάλες και απότομες αυξομειώσεις. Η μέγιστη συγκέντρωση της ρετινόλης που παρουσιάζεται 8 ώρες μετά την χορήγηση φαίνεται να διατηρείται έως και τις 12 ώρες κάτι που καταδεικνύει μία παρατεταμένη, σε σχέση με την χορήγηση σε λάδι, αποδέσμευση της ρετινόλης από τα λιποσώματα. Η επίτευξη διατήρησης αυξημένων συγκεντρώσεων της βιταμίνης στο αίμα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα υποδεικνύει

ότι τα λιποσώματα με (ΦΧ/ΧΟ 2/1 + β-Lg) μπορούν απουσία λιπόφιλου μέσου να επιτύχουν παρατεταμένη αποδέσμευση της ουσίας που έχουν εγκλωβίσει το αίμα.

Τέλος, από την σύγκριση των φαρμακοκινητικών παραμέτρων που υπολογίσθηκαν τόσο για την παρουσία της ρετινόλης στο πλάσμα, όταν αυτή χορηγηθεί μέσω ελαίου όσο και μέσω λιποσωμάτων είναι σαφής η μεγάλη διαφορά του χρόνου ημίσειας ζωής [λιποσώματα: $t_{1/2}$ (h)=157,80 ±33,78, έλαιο: $t_{1/2}$ (h)=2,53±0,32] καθώς και η κάθαρση της ουσίας [λιποσώματα: CL (L/h/Kg) = 0,0198 ±0,0043, έλαιο: CL (L/h/Kg) = 0,2542 ±0,0792] όταν χορηγείται με τα δύο διαφορετικά μέσα. Επιπλέον, όσον αφορά την παράμετρο του εμβαδού κάτω από την καμπύλη, όταν αυτή αφορά την χρονική περίοδο 0-24 h η τιμή (17936,58) είναι οκτώ φορές μεγαλύτερη για την χορήγηση σε έλαιο από την τιμή (2239,17) για την χορήγηση σε λιποσώματα. Η διαφορά αυτή αλλάζει σημαντικά όταν υπολογίζεται χωρίς χρονικό όριο ($0 \rightarrow \infty$) και γίνεται μόλις διπλάσια για το έλαιο (64676,96) σε σύγκριση με τα λιποσώματα (38058,20). Αυτό αποδεικνύει ότι η βιοδιαθεσιμότητα της ρετινόλης μπορεί να είναι χαμηλότερη όταν αυτή χορηγείται μέσω λιποσωμάτων σε σχέση με την χορήγηση σε έλαιο, παρόλα αυτά είναι αρκετά ικανοποιητική αν αναλογιστούμε ότι αποφεύγουμε την χρήση λιπώδους μέσου για την χορήγησή της, ενός μέσου με πολλαπλά μειονεκτήματα για τον οργανισμό.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μελέτη δυο διαφορετικών φορέων (πρωτεϊνικής και λιπιδικής φύσεως) για τον εγκλωβισμό, μεταφορά, προστασία και βιοδιαθεσιμότητα των λιπόφιλων βιταμινών ολοκληρώθηκε με επιτυχία.

Η δημιουργία και ο χαρακτηρισμός του συμπλόκου λιπόσωμα/ β -Lg και ο προσδιορισμός της απόδοσης του εγκλωβισμού της πρωτεΐνης μελετήθηκαν έτσι ώστε να αναπτυχθεί ένας νέος, πιο αποδοτικός και σταθερός λιποσωμικός φορέας. Η β -Lg εγκλωβίστηκε σε λιποσώματα με δύο διαφορετικές λιπιδικές συστάσεις, τα οποία δημιουργήθηκαν με την μέθοδο DRV και μετρήθηκε η σταθερότητά τους.

Τα αποτελέσματα του FT-IR και του DSC επιβεβαίωσαν την δημιουργία αλληλεπιδράσεων μεταξύ φωσφατιδυλοχολίνης και β -Lg και κατ' επέκταση την δημιουργία του συμπλόκου λιποσώματος/ β -Lg.

Τα ποσοστά εγκλωβισμού για την συγκεκριμένη πρωτεΐνη βρέθηκαν να είναι υψηλότερα σε σχέση με τα βιβλιογραφικά αναφερόμενα για άλλες πρωτεΐνες που εγκλωβίστηκαν σε λιποσώματα. Όπως έγινε εμφανές από τις εικόνες που ελήφθησαν μέσω SEM και τα αποτελέσματα του DLS, τα λιποσώματα που δημιουργήθηκαν με την μέθοδο DRV και περιέχουν την β -γαλακτοσφαιρίνη είναι μικρότερα και περισσότερο ομοιογενή, υποδεικνύοντας ότι τα μόρια της πρωτεΐνης σταθεροποιούν την λιπιδική διπλοστιβάδα. Η βελτιωμένη σταθερότητα πιστοποιήθηκε και με μετρήσεις θολερομετρίας και DSC.

Και οι δύο λιπιδικές αναλογίες που μελετήθηκαν απέδωσαν πολύ υψηλά ποσοστά εγκλωβισμού για την πρωτεΐνη. Σαν αποτέλεσμα, το σύμπλοκο λιποσώματος/ β -Lg διαθέτει όλες τις απαιτούμενες ιδιότητες για να χρησιμοποιηθεί σαν ένας αποδοτικός φορέας για την παράδοση βιοεναίσθητων μορίων (φαρμάκων, βιταμινών, λιπόφιλων μορίων). Αυτό το βελτιωμένο σύστημα που δημιουργήθηκε στα πλαίσια

αυτής της μελέτης μπορεί να ανοίξει τον δρόμο για την χρήση τους ως φορέα για πολυάριθμα μόρια.

Ο παραπάνω φορέας χρησιμοποιήθηκε για τον εγκλωβισμό και την προστασία τριών λιπόφιλων βιταμινών (βιταμίνης E, A και D). Οι λιπόφιλες βιταμίνες είναι πολύ ευαίσθητα μόρια και για τον λόγο αυτό η ανάγκη να προστατευθούν αποτελεσματικά είναι μεγάλης σημασίας. Η ευεργετική επίδραση της θεραπευτικής χορήγησης συμπληρωμάτων λιπόφιλων βιταμινών είναι πολύ καλά τεκμηριωμένη για διάφορες καταστάσεις δυσαπορρόφησης στον άνθρωπο.

Το ποσοστό εγκλωβισμού και για τις τρεις βιταμίνες στον νεοδημιουργηθέν λιποσωμικό φορέα ήταν υψηλότερο παρουσία της πρωτεΐνης παρά εν απουσία της. Η ικανότητα της β -Lg να προσδένει λιπόφιλα μόρια όπως είναι οι βιταμίνες E, A και D δεν μπορεί από μόνη της να εξηγήσει την αύξηση του ποσοστού εγκλωβισμού επομένως οι φυσικοχημικές διαφοροποιήσεις που προκαλεί η παρουσία της β -Lg στην λιπιδική διπλοστιβάδα εξηγεί την επίτευξη υψηλότερων ποσοστών εγκλωβισμού. Έτσι και οι τρεις λιπόφιλες βιταμίνες εμφάνισαν υψηλό ποσοστό εγκλωβισμού στην νέα λιπιδική υπερδομή που δημιουργήθηκε (λιπόσωμα/ β -Lg) και της οποίας τα συστατικά ήταν φυσικής προελεύσεως.

Επιπλέον, η πολλά υποσχόμενη βελτιωμένη σταθερότητα των λιποσωμικών παρασκευών που περιέχουν την πρωτεΐνη και στα οποία εγκλωβίστηκαν οι λιπόφιλες βιταμίνες, μπορεί να αποδειχθεί ένα σημαντικός παράγοντας για την χρήση του συμπλόκου λιποσώματος/ β -Lg σαν φορέα για τον επιτυχή εγκλωβισμό και χορήγηση των ευαίσθητων λιπόφιλων βιταμινών.

Για να αξιολογηθεί περαιτέρω η αποτελεσματικότητα του νέου φορέα, πειράματα βιοδραστικότητας της βιταμίνης A, τόσο σε ελεύθερη μορφή όσο και εγκλωβισμένη στον νέο φορέα, έγιναν σε πειραματόζωα. Η διαφορετική βιοδραστικότητα-

βιοδιαθεσιμότητα της εγκλωβισμένης βιταμίνης σχετίζεται με τις τροποποιημένες φυσικοχημικές ιδιότητες του νέου φορέα και κατ' επέκταση με την διαφοροποιημένη ικανότητα προσρόφησης από τον οργανισμό, παρουσιάζοντας ένα πολύ ενδιαφέρον φαρμακοκινητικό προφίλ όταν αυτή χορηγήθηκε εγκλωβισμένη στον νέο φορέα.

Για την μελέτη και την αξιολόγηση της σύνδεσης των λιπόφιλων βιταμινών με πρωτεϊνικά μόρια ως πρωτεΐνη φορέας επιλέχθηκε η β-Lg, τόσο λόγω της φυσικής της προέλευσης (ορός γάλακτος) όσο και της ήδη τεκμηριωμένης θέσης πρόσδεσης του διαθέτει για μία ποικιλία υδρόφοβων προσδετών. Αξιολογήθηκε ο βαθμός σύνδεσής της με τις λιπόφιλες βιταμίνες και εκτιμήθηκε για πρώτη φορά πόσο ισχυρά συνδέονται οι τέσσερις αυτές βιταμίνες στην θέση πρόσδεσης που φέρει, με μία εξαιρετικά ευαίσθητη τεχνική προσδιορισμού (ITC). Υπολογίστηκε μία σταθερά σύνδεσης αρκετά ικανοποιητική ($K_a [M^{-1}] \times 10^6$) και για τις τέσσερις βιταμίνες που μελετήθηκαν, κάνοντας έτσι την β-Lg έναν ισχυρό και αποτελεσματικό πρωτεϊνικό φορέα και για τις τέσσερις βιταμίνες.

Συμπερασματικά, η τροποποιημένη και ελεγχόμενη διαλυτότητα, αντιοξειδωτική προστασία και βιοδιαθεσιμότητα των λιπόφιλων βιταμινών μετά από τον εγκλωβισμό ή σύνδεση με τους συγκεκριμένους λιπιδικούς και πρωτεϊνικούς φορείς που μελετήθηκαν σε αυτή την εργασία, αναμένεται να έχει εφαρμογές σε τρόφιμα και φαρμακευτικά ή καλλυντικά σκευάσματα. Γενικότερα τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοντέλο για την εκτίμηση της συμπεριφοράς λιπιδικών και πρωτεϊνικών φορέων σε τρόφιμα και βιολογικά συστήματα διευρύνοντας το φάσμα της κατανόησης λειτουργίας των φορέων αυτών.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Afri, M., Ehrenberg, B., Talmon, Y., Schmidt, J., Cohen, Y., & Frimer, A. A. (2004). Active oxygen chemistry within the liposomal bilayer: Part III: Locating Vitamin E, ubiquinol and ubiquinone and their derivatives in the lipid bilayer. *Chemistry and Physics of Lipids*, 131(1), 107-121.
- Ai, J., Biazar, E., Jafarpour, M., Montazeri, M., Majdi, A., Aminifard, S., Zafari, M., Akbari, H. R., & Rad, H. G. (2011). Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical designs. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 1117-1127.
- Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M., & Nejati-Koshki, K. (2013). Liposome: Classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*, 8(1), 1-8.
- Alexander, M., Acero Lopez, A., Fang, Y., & Corredig, M. (2012). Incorporation of phytosterols in soy phospholipids nanoliposomes: Encapsulation efficiency and stability. *LWT - Food Science and Technology*, 47(2), 427-436.
- Alizadeh, F., Bolhassani, A., Khavari, A., Bathaie, S. Z., Naji, T., & Bidgoli, S. A. (2014). Retinoids and their biological effects against cancer. *International Immunopharmacology*, 18(1), 43-49.
- Allen, T. M., & Cullis, P. R. (2013). Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(1), 36-48.
- Altucci, L., & Gronemeyer, H. (2001). The promise of retinoids to fight against cancer. *Nature Reviews Cancer*, 1(3), 181-193.
- Alving, C. R. (1991). Liposomes as carriers of antigens and adjuvants. *Journal of Immunological Methods*, 140(1), 1-13.
- Antimisiaris, S. G. (2008). A special issue on nanomedicines. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 4(3), 217.

- Arias, J. L. (2013). Liposomes in drug delivery: A patent review (2007 - present). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 23(11), 1399-1414.
- Aschaffenburg, R., & Drewry, J. (1955). Occurrence of different beta-lactoglobulins in cow's milk [15]. *Nature*, 176(4474), 218-219.
- Bügel, S. (2008). Vitamin K and Bone Health in Adult Humans. In *Vitamins and Hormones*, vol. 78 (pp. 393-416).
- Badiee, A., Jaafari, M. R., Khamesipour, A., Samiei, A., Soroush, D., Kheiri, M. T., Barkhordari, F., McMaster, W. R., & Mahboudi, F. (2009). The role of liposome charge on immune response generated in BALB/c mice immunized with recombinant major surface glycoprotein of Leishmania (rgp63). *Experimental Parasitology*, 121(4), 362-369.
- Balkina, A. S., Selischeva, A. A., & Larionova, N. I. (2009). Liposomal formulations of protein proteinase inhibitors: Preparation and specific activity. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 3(1), 48-53.
- Bangham, A. D., Standish, M. M., & Watkins, J. C. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, 13(1), 238-252.
- Barba, F. J., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2011). Determination of vitamins E (α -, γ - and δ -tocopherol) and D (cholecalciferol and ergocalciferol) by liquid chromatography in milk, fruit juice and vegetable beverage. *European Food Research and Technology*, 232(5), 829-836.
- Barenholz, Y., Amselem, S., & D, L. (1979). A new method for preparation of phospholipid vesicles (liposomes) - french press. *FEBS Letters*, 99(1), 210-214.
- Bender, D. A. (2003). *Nutritional Biochemistry of the Vitamins*: Cambridge University Press.
- Bermúdez, M., Martínez, E., Mora, M., Sagristá, M. L., & De Madariaga, M. A. (1999). Molecular and physicochemical aspects of the interactions of the tuberculostatics ofloxacin and rifampicin with liposomal bilayers: A ^{31}P - NMR and DSC study. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 158(1-2), 59-66.

- Bernsdorff, C., Reszka, R., & Winter, R. (1999). Interaction of the anticancer agent Taxol(TM) (paclitaxel) with phospholipid bilayers. *Journal of Biomedical Materials Research*, 46(2), 141-149.
- Biesalski, H. K. (1997). Bioavailability of vitamin A. *European Journal of Clinical Nutrition*, 51(SUPPL. 1), S71-S75.
- Booth, S. L., & Rajabi, A. A. (2008). Determinants of Vitamin K Status in Humans. In *Vitamins and Hormones*, vol. 78 (pp. 1-22).
- Braunitzer, G., Chen, R., Schrank, B., & Stangl, A. (1972). Automatic sequence analysis of a protein (beta-lactoglobulin AB). *Automatische Sequenzanalyse eines Proteins (beta-Lactoglobulin AB.)*, 353(5), 832-834.
- Byrdwell, W. C. (2009). Comparison of analysis of vitamin D 3 in foods using ultraviolet and mass spectrometric detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(6), 2135-2146.
- Chanasattru, W., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2007). Modulation of thermal stability and heat-induced gelation of β -lactoglobulin by high glycerol and sorbitol levels. *Food Chemistry*, 103(2), 512-520.
- Chavhan, S. S., Petkar, K. C., & Sawant, K. K. (2011). Nanosuspensions in drug delivery: Recent advances, patent scenarios, and commercialization aspects. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 28(5), 447-488.
- Chen, C., Han, D., Cai, C., & Tang, X. (2010). An overview of liposome lyophilization and its future potential. *Journal of Controlled Release*, 142(3), 299-311.
- Chiavaro, E., Rodriguez-Estrada, M. T., Bendini, A., Rinaldi, M., & Cerretani, L. (2011). Differential scanning calorimetry thermal properties and oxidative stability indices of microwave heated extra virgin olive oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(2), 198-206.

- Colletier, J. P., Chaize, B., Winterhalter, M., & Fournier, D. (2002). Protein encapsulation in liposomes: Efficiency depends on interactions between protein and phospholipid bilayer. *BMC Biotechnology*, 2.
- Combs Jr, G. F. (2012a). Chapter 2 - Discovery of the Vitamins. In G. F. Combs (Ed.), *The Vitamins (Fourth Edition)*, (pp. 7-31). San Diego: Academic Press.
- Combs Jr, G. F. (2012b). Chapter 3 - Properties of Vitamins. In G. F. Combs (Ed.), *The Vitamins (Fourth Edition)*, (pp. 33-70). San Diego: Academic Press.
- Cong, W., Liu, Q., Liang, Q., Wang, Y., & Luo, G. (2009). Investigation on the interactions between pirarubicin and phospholipids. *Biophysical Chemistry*, 143(3), 154-160.
- Cortesi, R., Esposito, E., Gambari, R., Menegatti, E., & Nastruzzi, C. (1994). Liposome-associated retinoids: Production, characterization and antiproliferative activity on neoplastic cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(4), 281-291.
- Creamer, L. K. (1995). Effect of sodium dodecyl sulfate and palmitic acid on the equilibrium unfolding of bovine β -lactoglobulin. *Biochemistry*, 34(21), 7170-7176.
- Creamer, L. K., Parry, D. A. D., & Malcolm, G. N. (1983). Secondary structure of bovine β -lactoglobulin B. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 227(1), 98-105.
- Crommelin, D. J. A., Daemen, T., Scherphof, G. L., Vingerhoeds, M. H., Heeremans, J. L. M., Kluft, C., & Storm, G. (1997). Liposomes: Vehicles for the targeted and controlled delivery of peptides and proteins. *Journal of Controlled Release*, 46(1-2), 165-175.
- da Silva Malheiros, P., Daroit, D. J., & Brandelli, A. (2010). Food applications of liposome-encapsulated antimicrobial peptides. *Trends in Food Science and Technology*, 21(6), 284-292.
- Dixon, K. M., & Mason, R. S. (2009). Vitamin D. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 41(5), 982-985.

- Dwiecki, K., Górnaś, P., Wilk, A., Nogala-Kałużka, M., & Polewski, K. (2007). Spectroscopic studies of D- α -tocopherol concentration-induced transformation in egg phosphatidylcholine vesicles. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 12(1), 51-69.
- Edwards, K. A., & Baeumner, A. J. (2006). Analysis of liposomes. *Talanta*, 68(5), 1432-1441.
- Edwards, P. B., Creamer, L. K., & Jameson, G. B. (2008). Structure and Stability of Whey Proteins. In *Milk Proteins*, (pp. 163-203).
- Elizondo, E., Moreno, E., Cabrera, I., Córdoba, A., Sala, S., Veciana, J., & Ventosa, N. (2011). Liposomes and other vesicular systems: Structural characteristics, methods of preparation, and use in nanomedicine. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, vol. 104 (pp. 1-52).
- Emsley, P., & Cowtan, K. (2004). Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 60(12 I), 2126-2132.
- Fa, N., Ronkart, S., Schanck, A., Deleu, M., Gaigneaux, A., Goormaghtigh, E., & Mingeot-Leclercq, M. P. (2006). Effect of the antibiotic azithromycin on thermotropic behavior of DOPC or DPPC bilayers. *Chemistry and Physics of Lipids*, 144(1), 108-116.
- Fang, J. Y., Lin, H. H., Hsu, L. R., & Tsai, Y. H. (1997). Characterization and stability of various liposome-encapsulated enoxacin formulations. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 45(9), 1504-1509.
- Farrell Jr, H. M., Behe, M. J., & Enyeart, J. A. (1987). Binding of p-nitrophenyl phosphate and other aromatic compounds by beta-lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*, 70(2), 252-258.
- Fidorra, M., Heimburg, T., & Seeger, H. M. (2009). Melting of individual lipid components in binary lipid mixtures studied by FTIR spectroscopy, DSC and Monte Carlo simulations. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1788(3), 600-607.
- Fox, P. F., & Kelly, A. L. (2003). Developments in the chemistry and technology of milk proteins
1. Overview of major milk proteins. *Food Australia*, 55(3), 104-108.

- Gao, S. Q., Maeda, T., Okano, K., & Palczewski, K. (2012). A microparticle/hydrogel combination drug-delivery system for sustained release of retinoids. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 53(10), 6314-6323.
- Ge, N., Zhang, X., & Keiderling, T. A. (2010). Kinetic studies of the interaction of β -Lactoglobulin with model membranes: Stopped-flow CD and fluorescence studies. *Biochemistry*, 49(41), 8831-8838.
- Ghaffar, K. A., Giddam, A. K., Zaman, M., Skwarczynski, M., & Toth, I. (2014). Liposomes as nanovaccine delivery systems. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 14(9), 1194-1208.
- Glasgow, B. J., Abduragintov, A. R., Farahbakhsh, T., Faull, K. F., & Hubbell, W. L. (1995). Tear lipocalins bind a broad array of lipid ligands. *Current Eye Research*, 14(5), 363-372.
- Gokce, E. H., Korkmaz, E., Tuncay-Tanriverdi, S., Deller, E., Sandri, G., Cristina Bonferoni, M., & Ozer, O. (2012). A comparative evaluation of coenzyme Q10-loaded liposomes and solid lipid nanoparticles as dermal antioxidant carriers. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 5109-5117.
- Goldberg, R., & Klein, J. (2012). Liposomes as lubricants: beyond drug delivery. *Chemistry and Physics of Lipids*, 165(4), 374-381.
- Gonnet, M., Lethuaut, L., & Boury, F. (2010). New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. *Journal of Controlled Release*, 146(3), 276-290.
- Gortzi, O., Lalas, S., Chinou, I., & Tsaknis, J. (2006). Reevaluation of antimicrobial and antioxidant activity of Thymus and spp. extracts before and after encapsulation in liposomes. *Journal of Food Protection*, 69(12), 2998-3005.
- Gortzi, O., Rovoli, M., Lalas, S., & Kontopidis, G. (2015). Development and Evaluation of a Phospholipid-sterol-protein Membrane Resembling System. *Food Biophysics*.
- Gross, J., Won, K. C., Lezhneva, L., Falk, J., Krupinska, K., Shinozaki, K., Seki, M., Herrmann, R. G., & Meurer, J. (2006). A plant locus essential for phyloquinone (vitamin K1)

- biosynthesis originated from a fusion of four eubacterial genes. *Journal of Biological Chemistry*, 281(25), 17189-17196.
- Guillén, J. (2014). *Laboratory Animals: Regulations and Recommendations for Global Collaborative Research*.
- Guo, M. R., Fox, P. F., Flynn, A., & Kindstedt, P. S. (1995). Susceptibility of beta-lactoglobulin and sodium caseinate to proteolysis by pepsin and trypsin. *Journal of Dairy Science*, 78(11), 2336-2344.
- Hădărugă, D. I., Hădărugă, N. G., Lăzău, C., Rațiu, C., Crăciun, C., & Grozescu, I. (2010). Liposomes containing undoped and Au +/Ag + doped titanium dioxide nanoparticles. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 5(4), 919-925.
- Hambræus, L., & Lönnerdal, B. (2003). Nutritional Aspects of Milk Proteins. In P. F. Fox & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins*, (pp. 605-645): Springer US.
- Hansted, J. G., Wejse, P. L., Bertelsen, H., & Otzen, D. E. (2011). Effect of protein-surfactant interactions on aggregation of β -lactoglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1814(5), 713-723.
- Harashima, H., Sakata, K., Funato, K., & Kiwada, H. (1994). Enhanced hepatic uptake of liposomes through complement activation depending on the size of liposomes. *Pharmaceutical Research*, 11(3), 402-406.
- Heywang, C., Chazalet, M. S. P., Masson, M., Garnier-Suillerot, A., & Bolard, J. (1996). Incorporation of exogenous molecules inside mono- and bilayers of phospholipids: Influence of the mode of preparation revealed by SERRS and surface pressure studies. *Langmuir*, 12(26), 6459-6467.
- Hjort Ipsen, J., Karlström, G., Mourtisen, O. G., Wennerström, H., & Zuckermann, M. J. (1987). Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. *BBA - Biomembranes*, 905(1), 162-172.

- Hsieh, Y. F., Chen, T. L., Wang, Y. T., Chang, J. H., & Chang, H. M. (2002). Properties of liposomes prepared with various lipids. *Journal of Food Science*, 67(8), 2808-2813.
- Jagannadham, M. V., & Chowdhury, C. (2012). Differential expression of membrane proteins helps Antarctic *Pseudomonas syringae* to acclimatize upon temperature variations. *Journal of Proteomics*, 75(8), 2488-2499.
- Johnson, S. M. (1973). The effect of charge and cholesterol on the size and thickness of sonicated phospholipid vesicles. *BBA - Biomembranes*, 307(1), 27-41.
- Junghans, A., Champagne, C., Cayot, P., Loupiac, C., & Köper, I. (2011). Probing protein-membrane interactions using solid supported membranes. *Langmuir*, 27(6), 2709-2716.
- Kane, M. A., Folias, A. E., & Napoli, J. L. (2008). HPLC/UV quantitation of retinal, retinol, and retinyl esters in serum and tissues. *Analytical Biochemistry*, 378(1), 71-79.
- Kawano, K., Takayama, K., Nagai, T., & Maitani, Y. (2003). Preparation and pharmacokinetics of pirarubicin loaded dehydration-rehydration vesicles. *International Journal of Pharmaceutics*, 252(1-2), 73-79.
- Khrestovaya, N. L., Apukhovskaya, L. I., & Gurina, N. M. (1990). Biological activity of vitamin D3 in liposomes. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 24(11), 836-839.
- Kim, C. K., Chung, H. S., Lee, M. K., Choi, L. N., & Kim, M. H. (1999). Development of dried liposomes containing β -galactosidase for the digestion of lactose in milk. *International Journal of Pharmaceutics*, 183(2), 185-193.
- Kim, S., Turker, M. S., Chi, E. Y., Sela, S., & Martin, G. M. (1983). Preparation of multivesicular liposomes. *BBA - Biomembranes*, 728(3), 339-348.
- Kim, Y. K., & Quadro, L. (2010). Reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis of retinol and retinyl esters in mouse serum and tissues. In *Methods in Molecular Biology*, vol. 652 (pp. 263-275).

- Kirby, C., & Gergoriadis, G. (1984). Dehydration-rehydration vesicles: A simple method for high yield drug entrapment in liposomes. *Bio/Technology*, 2(11), 979-984.
- Ko, S., & Lee, S. C. (2010). Effect of nanoliposomes on the stabilization of incorporated retinol. *African Journal of Biotechnology*, 9(37), 6158-6161.
- Kontopidis, G., Holt, C., & Sawyer, L. (2002). The ligand-binding site of bovine β -lactoglobulin: Evidence for a function? *Journal of Molecular Biology*, 318(4), 1043-1055.
- Kontopidis, G., Holt, C., & Sawyer, L. (2004). Invited review: β -lactoglobulin: Binding properties, structure, and function. *Journal of Dairy Science*, 87(4), 785-796.
- Konuma, T., Sakurai, K., & Goto, Y. (2007). Promiscuous Binding of Ligands by β -Lactoglobulin Involves Hydrophobic Interactions and Plasticity. *Journal of Molecular Biology*, 368(1), 209-218.
- Kostomitsopoulos N., A. A., Dile X., Papadopoulos H., Papatsiros V.G., Kyriakis S. (2007). Legal framework on the protection, health and welfare of animals used for experimental and educational purposes. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 58(3), 270-274.
- Kulkarni, S. B., & Vargha-Butler, E. I. (1995). Study of liposomal drug delivery systems 2. Encapsulation efficiencies of some steroids in MLV liposomes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 4(2), 77-85.
- Lalas, S., Athanasiadis, V., Gortzi, O., Bounitsi, M., Giovanoudis, I., Tsaknis, J., & Bogiatzis, F. (2011). Enrichment of table olives with polyphenols extracted from olive leaves. *Food Chemistry*, 127(4), 1521-1525.
- Lamberg-Allardt, C. (2006). Vitamin D in foods and as supplements. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 92(1), 33-38.
- Laridi, R., Kheadr, E. E., Benech, R. O., Vuilleumard, J. C., Lacroix, C., & Fliss, I. (2003). Liposome encapsulated nisin Z: Optimization, stability and release during milk fermentation. *International Dairy Journal*, 13(4), 325-336.

- Lee, S. C., Lee, K. E., Kim, J. J., & Lim, S. H. (2005). The effect of cholesterol in the liposome bilayer on the stabilization of incorporated retinol. *Journal of Liposome Research*, 15(3-4), 157-166.
- Lefèvre, T., & Subirade, M. (2000). Interaction of β -lactoglobulin with phospholipid bilayers: a molecular level elucidation as revealed by infrared spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 28(1), 59-67.
- Lefèvre, T., & Subirade, M. (2001). Conformational rearrangement of β -lactoglobulin upon interaction with an anionic membrane. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1549(1), 37-50.
- Li, C., Shen, J., Wei, X., Xie, C., & Lu, W. (2012). Targeted delivery of a novel palmitylated D-peptide for antiglioblastoma molecular therapy. *Journal of Drug Targeting*, 20(3), 264-271.
- Li, G., & Young, K. D. (2012). Isolation and identification of new inner membrane-associated proteins that localize to cell poles in Escherichia coli. *Molecular Microbiology*, 84(2), 276-295.
- Lim, S. B., Banerjee, A., & Önyüksel, H. (2012). Improvement of drug safety by the use of lipid-based nanocarriers. *Journal of Controlled Release*, 163(1), 34-45.
- Liolios, C. C., Gortzi, O., Lalas, S., Tsaknis, J., & Chinou, I. (2009). Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of Origanum dictamnus L. and in vitro antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 112(1), 77-83.
- Lis, L. J., McAlister, M., Fuller, N., Rand, R. P., & Parsegian, V. A. (1982). Interactions between neutral phospholipid bilayer membranes. *Biophysical Journal*, 37(3), 657-665.
- Liu, B., Mazouchi, A., & Gradinaru, C. C. (2010). Trapping single molecules in liposomes: Surface interactions and freeze-thaw effects. *Journal of Physical Chemistry B*, 114(46), 15191-15198.

- Liu, H. C., Chen, W. L., & Mao, S. J. T. (2007). Antioxidant Nature of Bovine Milk β -Lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*, 90(2), 547-555.
- Liu, M., Gan, L., Chen, L., Zhu, D., Xu, Z., & Hao, Z. (2012). A novel liposome-encapsulated hemoglobin/silica nanoparticle as an oxygen carrier. *International Journal of Pharmaceutics*, 427(2), 354-357.
- Livney, Y. D. (2010). Milk proteins as vehicles for bioactives. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 15(1-2), 73-83.
- Loch, J., Polit, A., Görecki, A., Bonarek, P., Kurpiewska, K., Dziedzicka-Wasylewska, M., & Lewiński, K. (2011). Two modes of fatty acid binding to bovine β -lactoglobulin-crystallographic and spectroscopic studies. *Journal of Molecular Recognition*, 24(2), 341-349.
- Loch, J. I., Bonarek, P., Polit, A., Riès, D., Dziedzicka-Wasylewska, M., & Lewiński, K. (2013). Binding of 18-carbon unsaturated fatty acids to bovine β -lactoglobulin-Structural and thermodynamic studies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 57, 226-231.
- Loch, J. I., Polit, A., Bonarek, P., Olszewska, D., Kurpiewska, K., Dziedzicka-Wasylewska, M., & Lewiński, K. (2012). Structural and thermodynamic studies of binding saturated fatty acids to bovine β -lactoglobulin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50(4), 1095-1102.
- Loveday, S. M., & Singh, H. (2008). Recent advances in technologies for vitamin A protection in foods. *Trends in Food Science and Technology*, 19(12), 657-668.
- Mady, M. M., Shafaa, M. W., Abbase, E. R., & Fahium, A. H. (2012). Interaction of Doxorubicin and Dipalmitoylphosphatidylcholine Liposomes. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 62(3), 481-486.

- Manolescu, D. C., Sima, A., & Bhat, P. V. (2010). All-trans retinoic acid lowers serum retinol-binding protein 4 concentrations and increases insulin sensitivity in diabetic mice. *Journal of Nutrition*, 140(2), 311-316.
- Marsanasco, M., Márquez, A. L., Wagner, J. R., del V. Alonso, S., & Chiaramoni, N. S. (2011). Liposomes as vehicles for vitamins E and C: An alternative to fortify orange juice and offer vitamin C protection after heat treatment. *Food Research International*, 44(9), 3039-3046.
- Martins, S., Sarmiento, B., Ferreira, D. C., & Souto, E. B. (2007). Lipid-based colloidal carriers for peptide and protein delivery - Liposomes versus lipid nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 2(4), 595-607.
- Mayhew, E., Lazo, R., Vail, W. J., King, J., & Green, A. M. (1984). Characterization of liposomes prepared using a microemulsifier. *BBA - Biomembranes*, 775(2), 169-174.
- McIntosh, T. J. (1978). The effect of cholesterol on the structure of phosphatidylcholine bilayers. *BBA - Biomembranes*, 513(1), 43-58.
- McKeown, N. M., Jacques, P. F., Gundberg, C. M., Peterson, J. W., Tucker, K. L., Kiel, D. P., Wilson, P. W. F., & Booth, S. L. (2002). Dietary and nondietary determinants of vitamin K biochemical measures in men and women. *Journal of Nutrition*, 132(6), 1329-1334.
- Merz, K., & Sternberg, B. (1994). Incorporation of vitamin D3-derivatives in liposomes of different lipid types. *Journal of Drug Targeting*, 2(5), 411-417.
- Miranda, G., & Pelissier, J. P. (1983). Kinetic studies of in vivo digestion of bovine unheated skim-milk proteins in the rat stomach. *Journal of Dairy Research*, 50(1), 27-36.
- Morton, L. A., Saludes, J. P., & Yin, H. (2012). Constant pressure-controlled extrusion method for the preparation of nano-sized lipid vesicles. *Journal of Visualized Experiments*(64).
- Mozafari, M. R. (2005). Liposomes: An overview of manufacturing techniques. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 10(4), 711-719.

- Mozafari, M. R., Johnson, C., Hatziantoniou, S., & Demetzos, C. (2008). Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. *Journal of Liposome Research*, 18(4), 309-327.
- Mozafari, M. R., Khosravi-Darani, K., Borazan, G. G., Cui, J., Pardakhty, A., & Yurdugul, S. (2008). Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology. *International Journal of Food Properties*, 11(4), 833-844.
- Mozafari, M. R., Reed, C. J., Rostron, C., Kocum, C., & Piskin, E. (2002). Formation and characterisation of non-toxic anionic liposomes for delivery of therapeutic agents to the pulmonary airways. *Cellular & molecular biology letters*, 7(2), 243-244.
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A., & Dodson, E. J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 53(3), 240-255.
- Muthu, M. S., Kulkarni, S. A., Xiong, J., & Feng, S. S. (2011). Vitamin e TPGS coated liposomes enhanced cellular uptake and cytotoxicity of docetaxel in brain cancer cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 421(2), 332-340.
- Nacka, F., Cansell, M., Méléardb, P., & Combe, N. (2001). Incorporation of α -tocopherol in marine lipid-based liposomes: In vitro and in vivo studies. *Lipids*, 36(12), 1313-1320.
- Nasrollahi, A., Sharifi, S., & Barahoie, D. (2014). Liposomal suspension of DSPC/cholesterol with polyethylene glycol: a study by light and X-ray scattering. *Physics and Chemistry of Liquids*, 53(2), 221-229.
- Nestle, M. (1987). *Διατροφή στην κλινική πράξη*: Εκδόσεις Παρισιάνου.
- Neunert, G., Polewski, P., Markiewicz, M., Walejko, P., Witkowski, S., & Polewski, K. (2010). Partition of tocopheryl glucopyranoside into liposome membranes studied by fluorescence methods. *Biophysical Chemistry*, 146(2-3), 92-97.

- Ntimenou, V., Mourtas, S., Christodoulakis, E. V., Tsilimbaris, M., & Antimisiaris, S. G. (2006). Stability of protein-encapsulating DRV liposomes after freeze-drying: A study with BSA and t-PA. *Journal of Liposome Research*, 16(4), 403-416.
- Ohtake, S., Schebor, C., Palecek, S. P., & De Pablo, J. J. (2005). Phase behavior of freeze-dried phospholipid-cholesterol mixtures stabilized with trehalose. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1713(1), 57-64.
- Oja, C. D., Semple, S. C., Chonn, A., & Cullis, P. R. (1996). Influence of dose on liposome clearance: Critical role of blood proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1281(1), 31-37.
- Olson, F., Hunt, C. A., Szoka, F. C., Vail, W. J., & Papahadjopoulos, D. (1979). Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *BBA - Biomembranes*, 557(1), 9-23.
- Ozpolat, B., Lopez-Berestein, G., & Mehta, K. (2001). ATRA(ouble in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 15(2), 107-122.
- Papiz, M. Z., Sawyer, L., & Eliopoulos, E. E. (1986). The structure of β -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. *Nature*, 324(6095), 383-385.
- Park, S. J., Choi, S. G., Davaa, E., & Park, J. S. (2011). Encapsulation enhancement and stabilization of insulin in cationic liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 415(1-2), 267-272.
- Patil, Y. P., & Jadhav, S. (2014). Novel methods for liposome preparation. *Chemistry and Physics of Lipids*, 177(0), 8-18.
- Pentak, D. (2014). Physicochemical properties of liposomes as potential anticancer drugs carriers. Interaction of etoposide and cytarabine with the membrane: Spectroscopic studies. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 122, 451-460.

- Perez, M. D., Diaz de Villegas, C., Sanchez, L., Aranada, P., Ena, J. M., & Calvo, M. (1989). Interaction of fatty acids with β -lactoglobulin and albumin from ruminant milk. *Journal of Biochemistry*, 106(6), 1094-1097.
- Perrie, Y., Frederik, P. M., & Gregoriadis, G. (2001). Liposome-mediated DNA vaccination: The effect of vesicle composition. *Vaccine*, 19(23-24), 3301-3310.
- Pick, U. (1981). Liposomes with a large trapping capacity prepared by freezing and thawing of sonicated phospholipid mixtures. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 212(1), 186-194.
- Qvist, J., Davidovic, M., Hamelberg, D., & Halle, B. (2008). A dry ligand-binding cavity in a solvated protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(17), 6296-6301.
- Radhakrishnan, A., & McConnell, H. M. (1999). Cholesterol - Phospholipid complexes in membranes. *Journal of the American Chemical Society*, 121(2), 486-487.
- Ragona, L., Fogolari, F., Catalano, M., Ugolini, R., Zetta, L., & Molinari, H. (2003). EF loop conformational change triggers ligand binding in β -lactoglobulins. *Journal of Biological Chemistry*, 278(40), 38840-38846.
- Ramana, L. N., Sharma, S., Sethuraman, S., Ranga, U., & Krishnan, U. M. (2012). Investigation on the stability of saquinavir loaded liposomes: Implication on stealth, release characteristics and cytotoxicity. *International Journal of Pharmaceutics*.
- Rao, D. R., Chawan, C. B., & Veeramachaneni, R. (1995). Liposomal encapsulation of beta-galactosidase: Comparison of two methods of encapsulation and in vitro lactose digestibility. *Journal of Food Biochemistry*, 18(4), 239-251.
- Reimer, L. (2000). Scanning Electron Microscopy: Physics of Image Formation and Microanalysis, Second Edition. *Measurement Science and Technology*, 11(12), 1826.

- Rodas Mendoza, B., Morera Pons, S., Castellote Bargalló, A. I., & López-Sabater, M. C. (2003). Rapid determination by reversed-phase high-performance liquid chromatography of Vitamins A and E in infant formulas. *Journal of Chromatography A*, 1018(2), 197-202.
- Rodriguez-Nogales, J. M. (2004). Kinetic behaviour and stability of glucose oxidase entrapped in liposomes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79(1), 72-78.
- Rodríguez-Nogales, J. M., & López, A. D. (2006). A novel approach to develop β -galactosidase entrapped in liposomes in order to prevent an immediate hydrolysis of lactose in milk. *International Dairy Journal*, 16(4), 354-360.
- Ross, A. C. (2010). Vitamin A. In *Encyclopedia of Human Nutrition*, (pp. 329-339).
- Rovoli, M., Gortzi, O., Lalas, S., & Kontopidis, G. (2014). β -Lactoglobulin improves liposome's encapsulation properties for vitamin e delivery. *Journal of Liposome Research*, 24(1), 74-81.
- Safinya, C. R., & Ewert, K. K. (2012). Materials chemistry: Liposomes derived from molecular vases. *Nature*, 489(7416), 372-374.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samuni, A. M., Crommelin, D. J. A., Zuidam, N. J., & Barenholz, Y. (1998). Differential scanning calorimetry. A tool to assess physical and chemical alterations in liposomes. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 51(1), 37-48.
- Sauvant, P., Cansell, M., Hadj Sassi, A., & Atgié, C. (2012). Vitamin A enrichment: Caution with encapsulation strategies used for food applications. *Food Research International*, 46(2), 469-479.
- Sawyer, L. (2013). β -Lactoglobulin. In L. H. F. McSweeney, P.F. (Ed.), *Advanced Dairy Chemistry, Volume 1A: Proteins: Basic Aspects* 4th ed., (pp. 211-259): Springer.
- Sawyer, L., Brownlow, S., Polikarpov, I., & Wu, S. Y. (1998). β -lactoglobulin: Structural studies, biological clues. *International Dairy Journal*, 8(2), 65-72.

- Sawyer, L., Kontopidis, G., & Wu, S. Y. (1999). β -Lactoglobulin - A three-dimensional perspective. *International Journal of Food Science and Technology*, 34(5-6), 409-418.
- Schwedt, G., & Υφαντής, Δ. Κ. (1998). *Εγχειρίδιο των φυσικών και χημικών μεθόδων ανάλυσης* (Αναθεωρ. και βελτιωμ. εκδ.). Αθήνα: Γρ. Παρισιάνος.
- Semenova, E. M., Cooper, A., Wilson, C. G., & Converse, C. A. (2002). Stabilization of all-trans-retinol by cyclodextrins: A comparative study using HPLC and fluorescence spectroscopy. *Journal of Inclusion Phenomena*, 44(1-4), 155-158.
- Senior, J. H. (1990). Liposomes in vivo: prospects for liposome-based pharmaceuticals in the 1990s. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 8, 279-317.
- Shanmugam, T., & Banerjee, R. (2011). Nanostructured self assembled lipid materials for drug delivery and tissue engineering. *Therapeutic Delivery*, 2(11), 1485-1516.
- Shimoyamada, M., Yoshimura, H., Tomida, K., & Watanabe, K. (1996). Stabilities of bovine β -lactoglobulin/retinol or retinoic acid complexes against tryptic hydrolysis, heating and light-induced oxidation. *LWT - Food Science and Technology*, 29(8), 763-766.
- Singh, A. K., & Das, J. (1998). Liposome encapsulated vitamin A compounds exhibit greater stability and diminished toxicity. *Biophysical Chemistry*, 73(1-2), 155-162.
- Stanger O. (2012). *Water Soluble Vitamins. Clinical Research and Future Application*: Springer.
- Stojadinovic, M., Burazer, L., Ercili-Cura, D., Sancho, A., Buchert, J., Velickovic, T. C., & Stanic-Vucinic, D. (2012). One-step method for isolation and purification of native β -lactoglobulin from bovine whey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(7), 1432-1440.
- Storm, G., & Crommelin, D. J. A. (1998). Liposomes: Quo vadis? *Pharmaceutical Science and Technology Today*, 1(1), 19-31.
- Taheri-Kafrani, A., Bordbar, A. K., Mousavi, S. H. A., & HaertlΓ©, T. (2008). β -lactoglobulin structure and retinol binding changes in presence of anionic and neutral detergents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), 7528-7534.

- Tan, M. L., Choong, P. F. M., & Dass, C. R. (2010). Recent developments in liposomes, microparticles and nanoparticles for protein and peptide drug delivery. *Peptides*, 31(1), 184-193.
- Tang, E. K. Y., Voo, K. J. Q., Nguyen, M. N., & Tuckey, R. C. (2010). Metabolism of substrates incorporated into phospholipid vesicles by mouse 25-hydroxyvitamin D3 1 α -hydroxylase (CYP27B1). *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 119(3–5), 171-179.
- Tanumihardjo, S. A. (2004). Assessing Vitamin A Status: Past, Present and Future. *Journal of Nutrition*, 134(1), 290S-293S.
- Tian, X. Q., & Holick, M. F. (1999). A liposomal model that mimics the cutaneous production of vitamin D3: Studies of the mechanism of the membrane-enhanced thermal isomerization of previtamin D3 to vitamin D3. *Journal of Biological Chemistry*, 274(7), 4174-4179.
- Todorova, R. (2011). Comparative analysis of the methods of drug and protein delivery for the treatment of cancer, genetic diseases and diagnostics. *Drug Delivery*, 18(8), 586-598.
- Torchilin, V. P. (2005). Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov*, 4(2), 145-160.
- Tuckey, R. C., Nguyen, M. N., & Slominski, A. (2008). Kinetics of vitamin D3 metabolism by cytochrome P450scc (CYP11A1) in phospholipid vesicles and cyclodextrin. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 40(11), 2619-2626.
- Ulrich, A. S. (2002). Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. *Bioscience Reports*, 22(2), 129-150.
- Van Den Berg, H. (1997). Bioavailability of vitamin D. *European Journal of Clinical Nutrition*, 51(SUPPL. 1), S76-S79.
- Varnier Agasøster, A., Halskau, Ø., Fuglebakk, E., Frøystein, N. A., Muga, A., Holmsen, H., & Martinez, A. (2003). The interaction of peripheral proteins and membranes studied

- with α -lactalbumin and phospholipid bilayers of various compositions. *Journal of Biological Chemistry*, 278(24), 21790-21797.
- Vemuri, S., & Rhodes, C. T. (1995). Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: A review. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 70(2), 95-111.
- Vermonden, T., Censi, R., & Hennink, W. E. (2012). Hydrogels for protein delivery. *Chemical Reviews*, 112(5), 2853-2888.
- Vilotte, J. L., Whitelaw, B., Ollivier-Bousquet, M., & Shennan, D. B. (2003). Biosynthesis of Milk Proteins. In P. L. H. McSweeney (Ed.), *Advanced Dairy Chemistry*, vol. 1 (pp. 699-738): Springer US.
- Wang, Q., Allen, J. C., & Swaisgood, H. E. (1997). Binding of Vitamin D and Cholesterol to β -Lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*, 80(6), 1054-1059.
- Wassef, L., Spiegler, E., & Quadro, L. (2013). Embryonic phenotype, β -carotene and retinoid metabolism upon maternal supplementation of β -carotene in a mouse model of severe vitamin A deficiency. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 539(2), 223-229.
- West, R., Whitmon, J., Williamson, Y. M., Moura, H., Nelson, M., Melnick, N., Tondella, M. L. C., Schieltz, D., Rees, J., Woolfitt, A. R., Barr, J. R., Ades, E. W., Carlone, G. M., & Sampson, J. S. (2012). A rapid method for capture and identification of immunogenic proteins in *Bordetella pertussis* enriched membranes fractions: A fast-track strategy applicable to other microorganisms. *Journal of Proteomics*, 75(6), 1966-1972.
- Wilson, D. C., Rashid, M., Durie, P. R., Tsang, A., Kalnins, D., Andrew, M., Corey, M., Shin, J., Tullis, E., & Pencharz, P. B. (2001). Treatment of vitamin K deficiency in cystic fibrosis: Effectiveness of a daily fat-soluble vitamin combination. *Journal of Pediatrics*, 138(6), 851-855.
- Wu, S. Y., Pérez, M. D., Puyol, P., & Sawyer, L. (1999). β -Lactoglobulin binds palmitate within its central cavity. *Journal of Biological Chemistry*, 274(1), 170-174.

- Zaru, M., Mourtas, S., Klepetsanis, P., Fadda, A. M., & Antimisiaris, S. G. (2007). Liposomes for drug delivery to the lungs by nebulization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 67(3), 655-666.
- Zawada, Z. H. (2004). Vesicles with a double bilayer. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 9(4 A), 589-602.
- Zempleni J., S. W. J., Gregory III F. J. and Stover J. P. (2013). *Handbook of Vitamins* (Fifth Edition ed.): CRC Press 2013.
- Zhang, L., & Granick, S. (2006). How to stabilize phospholipid liposomes (Using nanoparticles). *Nano Letters*, 6(4), 694-698.
- Zhang, X., Ge, N., & Keiderling, T. A. (2007). Electrostatic and hydrophobic interactions governing the interaction and binding of β -lactoglobulin to membranes. *Biochemistry*, 46(17), 5252-5260.
- Zhang, X., & Keiderling, T. A. (2006). Lipid-induced conformational transitions of β -lactoglobulin. *Biochemistry*, 45(27), 8444-8452.
- Zhang, X., Tanner, P., Graff, A., Palivan, C. G., & Meier, W. (2012). Mimicking the cell membrane with block copolymer membranes. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 50(12), 2293-2318.
- Zhang, Y., Chan, H. F., & Leong, K. W. (2013). Advanced materials and processing for drug delivery: The past and the future. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(1), 104-120.
- Δεληγιαννάκης, Ι. (2010). *Ενόργανη περιβαλλοντική ανάλυση*: Εκδόσεις: Α. Τζιόλα & Υιοί Α.Ε.
- Ζερφυρίδης, Γ. (1998). *Διατροφή του ανθρώπου*: Εκδόσεις Γιαχούλη-Γιαπούλη.

4 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι: ΕΙΚΟΝΕΣ

Εικόνα 1.1: Κατηγοριοποίηση βιταμινών με βάση την διαλυτότητά τους	- 17 -
Εικόνα 1.2 Οι χημικές δομές των δύο βασικών μορφών της βιταμίνης Α	- 21 -
Εικόνα 1.3 Οι χημικές δομές των δύο βασικών μορφών της βιταμίνης D.....	- 24 -
Εικόνα 1.4 Οι χημικές δομές των τεσσάρων βασικών μορφών της βιταμίνης Ε.....	- 27 -
Εικόνα 1.5 Οι χημικές δομές των δύο βασικών μορφών της βιταμίνης Κ.....	- 30 -
Εικόνα 1.6 Σχηματική απεικόνιση ενός λιποσώματος σε διατομή	- 32 -
Εικόνα 1.7 Αναπαράσταση δομής φωσφολιπιδίου	- 36 -
Εικόνα 1.8 Οι δομές των κυριότερων λιπιδίων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή λιποσωμάτων	- 38 -
Εικόνα 1.9 Δομή φωσφολιπιδίου και χαρακτηριστικές ομάδες.....	- 40 -
Εικόνα 1.10 Σχηματική δομή ενός μικκυλίου και ενός λιποσώματος.....	- 41 -
Εικόνα 1.11 Σχέση ανάμεσα στη φάση της μεμβράνης και τη θερμοκρασία	- 42 -
Εικόνα 1.12 Χημική δομή της χοληστερόλης, όπου φαίνεται η πολική και η μη πολική περιοχή.....	- 44 -
Εικόνα 1.13 Λιποσωμική διπλοστιβάδα που περιέχει και μόρια χοληστερόλης	- 45 -
Εικόνα 1.14 Σχηματική απεικόνιση της κύριας ταξινόμησης των λιποσωμάτων βάσει μεγέθους ή βάσει της σύστασης και των εφαρμογών τους.....	- 49 -
Εικόνα 1.15 Σχηματική απεικόνιση πολυστιβαδιακού λιποσώματος σε διατομή....	- 50 -
Εικόνα 1.16 Διατομή ενός μονοστιβαδιακού λιποσώματος.....	- 51 -
Εικόνα 1.17 Κατάταξη λιποσωμάτων με βάση το μέγεθος και τον αριθμό των στοιβάδων τους.....	- 52 -
Εικόνα 1.18 Κατάταξη λιποσωμάτων με βάση τη σύσταση και τις εφαρμογές του.-	53 -

Εικόνα 1.19 Η παρουσία της β-Lg στο γάλα διαφόρων ειδών (✓ προσδιορισμός της ύπαρξης της πρωτεΐνης, ✓✓ διαθέσιμες κάποιες πληροφορίες από την ακολουθία της πρωτεΐνης) (Sawyer, 2013).....	- 73 -
Εικόνα 1.20 Το διμερές της β-Lg	- 76 -
Εικόνα 1.21 α: Η πρωτοταγής δομή της β-Lg β: Η τριτοταγής δομή της β-Lg	- 76 -
Εικόνα 1.22 Δομή β-Lg με λιπαρό οξύ προσδεμένο στον κάλυκα της πρωτεΐνης...	- 77 -
Εικόνα 1.23 α. Ο κεντρικός κάλυκας της β- Lg σε τρισδιάστατη δομή.....	- 78 -
Εικόνα 1.24 Η παραλλαγές της αμινοξικής αλληλουχίας της β-Lg ανάμεσα στα είδη των μηρυκαστικών σε σχέση με το αλληλόμορφο Β της βόειας β-Lg.(Sawyer, 2013)	- 80 -
Εικόνα 1.25 Η ομοιότητα της τριτοταγούς δομής (α) της RBP και (β) της β-Lg	- 82 -
Εικόνα 2.1 Σχηματική αναπαράσταση παρασκευής SUV λιποσωμάτων	- 93 -
Εικόνα 2.2 Κατηγορίες μοριακών δονήσεων (το + υποδεικνύει κίνηση από το επίπεδο της σελίδας προς τον αναγνώστη, το – δείχνει κίνηση προς την αντίθετη κατεύθυνση)..	- 97 -
Εικόνα 2.3 Η μέθοδος της κρεμαστής σταγόνας σχηματικά.....	- 109 -
Εικόνα 2.4 α) Κάθετη διατομή του για την σχηματική απεικόνιση της εσωτερικής του δομής	- 111 -
Εικόνα 2.5 Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της βιοκατανομής της ρετινόλης στο αίμα.	- 115 -
Εικόνα 2.6 Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας που ακολουθήθηκε για την χορήγηση και τον έλεγχο της βιοδραστικότητας της βιταμίνης Α σε ποντίκια	- 117 -
Εικόνα 2.7 Φωτογραφία από την πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για την χορήγηση της βιταμίνης Α στα ποντίκια	- 117 -

Εικόνα 2.8 Διαγραμματική απεικόνιση του πρωτοκόλλου που ακολουθήθηκε για την εξαγωγή της ρετινόλης από το αίμα των πειραματοζώων.....	- 120 -
Εικόνα 3.1 Πρότυπη καμπύλη διαφόρων συγκεντρώσεων β-γαλακτοσφαιρίνης με την τεχνική της φασματοσκοπίας φθορισμού.....	- 125 -
Εικόνα 3.2 Πηκτή πολυακρυλαμίδης με χρήση SDS της β-Lg που εξάχθηκε από τα λιποσώματα με μοριακή αναλογία ΦΔ/ΧΟ 2/1 και ΦΔ/ΧΟ 3/1	- 127 -
Εικόνα 3.3 DSC θερμογραφήματα των λιποσωμικών διασπορών παρουσία και απουσία της β-Lg υπό αδρανείς συνθήκες.....	- 128 -
Εικόνα 3.4 α. FTIR φάσμα από: Καθαρή β-Lg (πράσινο), ΦΧ/ΧΟ 2/1 κενά λιποσώματα (μαύρο) και ΦΧ/ΧΟ 2/1 + β-Lg λιποσώματα (κόκκινο).....	- 131 -
Εικόνα 3.5 Εκτίμηση της σταθερότητας των λιποσωμάτων:	- 135 -
Εικόνα 3.6 Θερμογραφήματα DSC των λιποσωμικών διασπορών παρουσία και απουσία της β-Lg. υπό οξειδωτικές συνθήκες.....	- 137 -
Εικόνα 3.7 Εικόνες από μικροσκόπιο ηλεκτρονικής σάρωσης των DRV λιποσωμάτων.-	139 -
Εικόνα 3.8 Χρωματογραφικός προσδιορισμός λιποδιαλυτών βιταμινών Ε (α), Α (β) και D (γ)......	- 144 -
Εικόνα 3.9 Πρότυπη καμπύλη διαφορετικών συγκεντρώσεων βιταμίνης Ε με την τεχνική HPLC	- 145 -
Εικόνα 3.10 Πρότυπη καμπύλη διαφορετικών συγκεντρώσεων βιταμίνης Α με την τεχνική HPLC	- 146 -
Εικόνα 3.11 Πρότυπη καμπύλη διαφορετικών συγκεντρώσεων βιταμίνης D με την τεχνική HPLC.....	- 147 -
Εικόνα 3.12 Εκτίμηση της σταθερότητας των λιποσωμάτων που έχουν εγκλωβίσει βιταμίνη Ε:.....	- 150 -

Εικόνα 3.13 Εκτίμηση της σταθερότητας των λιποσωμάτων που έχουν εγκλωβίσει βιταμίνη A:	- 152 -
Εικόνα 3.14 Εκτίμηση της σταθερότητας των λιποσωμάτων που έχουν εγκλωβίσει βιταμίνη D:	- 153 -
Εικόνα 3.15 Οι καμπύλες θερμιδομετρίας διαφορικής σάρωσης λιποσωμικών διασπορών παρουσία και απουσία της β-Lg και στα οποία έχουν εγκλωβιστεί οι λιπόφιλες βιταμίνες E (α), A (β) και D (γ) αντίστοιχα.....	- 156 -
Εικόνα 3.16 Εικόνες από ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης λιποσωμικών διασπορών	- 159 -
Εικόνα 3.17 Κρύσταλλοι του συμπλέγματος β-Lg-τριδεκανοϊκού οξέος (C13)....	- 160 -
Εικόνα 3.18 Το μόριο του τριδεκανοϊκού οξέος στον κεντρικό κάλυκα της β-Lg όπως φαίνεται από την ανάλυση του χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας.....	- 161 -
Εικόνα 3.19 Τα διαγράμματα θερμιδομετρίας ισόθερμης τιτλοδότησης και οι καμπύλες πρόσδεσης που ελήφθησαν για τα σύμπλοκα: (α) β-Lg-C13, (b) β-Lg-C15, (c) β-Lg-C17 και (d) β-Lg-C19	- 164 -
Εικόνα 3.20 Τα διαγράμματα θερμιδομετρίας ισόθερμης τιτλοδότησης και οι καμπύλες πρόσδεσης που ελήφθησαν για τα σύμπλοκα: (α) β-Lg-VA, (β) β-Lg-VD, (γ) β-Lg-VE και (δ) β-Lg-VK.....	- 167 -
Εικόνα 3.21 Τυπικό HPLC χρωματογράφημα βιταμίνης A (retinol) από δείγμα πλάσματος στο οποίο έχει προστεθεί γνωστή συγκέντρωση ποσότητας εσωτερικού προτύπου (retinol acetate)	- 172 -
Εικόνα 3.22 Πρότυπη καμπύλη καθαρής βιταμίνης A σε συγκεντρώσεις 50-250 ng/mL με την μέθοδο HPLC	- 173 -
Εικόνα 3.23 Πρότυπη καμπύλη καθαρής βιταμίνης A σε συγκεντρώσεις 200-400 ng/mL με την μέθοδο HPLC	- 174 -

Εικόνα 3.24 Πρότυπη καμπύλη καθαρής βιταμίνης Α σε συγκεντρώσεις 600-2000 ng/mL με την μέθοδο HPLC	- 174 -
Εικόνα 3.25 Χρονική διακύμανση (εντός 24 ωρών) της συγκέντρωσης της ρετινόλης στο πλάσμα των πειραματόζων που έλαβαν ρετινόλη εγκλωβισμένη σε λιποσώματα μέσω υδατικού μέσου	- 175 -
Εικόνα 3.26 Χρονική διακύμανση (εντός 24 ωρών) της συγκέντρωσης της ρετινόλης στο πλάσμα των πειραματόζων που έλαβαν ρετινόλη σε καθαρή μορφή μέσω ελαίου.-	175 -
Εικόνα 3.27 Συγκριτική παρουσίαση της συγκέντρωσης της ρετινόλης στο πλάσμα των πειραματόζων που έλαβαν εξωγενώς ρετινόλη σε καθαρή μορφή μέσω λιποσωμάτων ή ελαίου	- 176 -

5 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ: ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1.1 Ημερήσιες ανάγκες των λιποδιαλυτών βιταμινών, ανάλογα με το φύλο, την ηλικία, κατά την διάρκεια της κύησης και του θηλασμού	- 20 -
Πίνακας 1.2 Κυτταρικά λιπαρά οξέα	- 39 -
Πίνακας 1.3 Το φορτίο και η θερμοκρασία μετάπτωσης φάσης διαφόρων φωσφολιπιδίων που χρησιμοποιούνται στην παρασκευή των λιποσωμάτων.	- 43 -
Πίνακας 1.4 Ενδεικτική λίστα με φάρμακα που βασίζονται στο λιποσωμικό σύστημα μεταφοράς εγκεκριμένα από τον Αμερικανικό Οργανισμό Φαρμάκων (Πηγή: Ιστοσελίδα του Αμερικανικού Οργανισμού Φαρμάκων: http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda).	- 47 -
Πίνακας 2.1 Το χρονοδιάγραμμα της χορήγησης των δύο διαφορετικών μορφών βιταμίνης Α στα πειραματόζωα	- 116 -
Πίνακας 3.1 Ποσοστό εγκλωβισμού (%) της β-Lg σε ΦΧ/ΧΟ λιποσώματα (n = 3)	- 125 -
Πίνακας 3.2 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από τις κύριες κορυφές που ελήφθησαν από τα φάσματα FTIR κάθε δείγματος	- 132 -
Πίνακας 3.3 Τα % ποσοστά εγκλωβισμού των τριών λιπόφιλων βιταμινών, E-A και D, σε δύο διαφορετικά λιπιδικά σύμπλοκα	- 147 -
Πίνακας 3.4 Ιδιότητες πρόσδεσης των C13, C15, C17 & C19 με την β-Lg όπως αυτές προσδιορίστηκαν με την μέθοδο ITC.	- 162 -
Πίνακας 3.5 Ιδιότητες πρόσδεσης των VA, VD, VE & VK με την β-Lg όπως αυτές προσδιορίστηκαν με την μέθοδο ITC	- 168 -
Πίνακας 3.6 Φαρμακοκινητικές παράμετροι της βιταμίνης Α σε ποντίκια	- 176 -