



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΓΓΕΛΙΚΗ ΣΚΛΑΠΑΝΗ

«Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός βιοϋλικών που παρασκευάζονται από πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες με βιοσυμβατές μεθόδους»

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ:

Απόστολος Κυρίτσης, Αναπληρωτής Καθηγητής, ΣΕΜΦΕ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Απόστολος Κυρίτσης, Αναπλ. Καθηγητής, ΣΕΜΦΕ

Αλέξανδρος Γεωργακίλας, Καθηγητής, ΣΕΜΦΕ

Εύη Κοντού-Δρούγκα, Καθηγήτρια, ΣΕΜΦΕ

Σεπτέμβριος 2021

ΑΘΗΝΑ

© (2021) Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο. All rights Reserved. Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς το συγγραφέα. Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σ' αυτό το έγγραφο εκφράζουν το συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευτεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

«Αυτά τα οποία μετρούν κυρίως στις σπουδές και στη ζωή σου είναι όλη η κουλτούρα που έχεις και όλη η εκπαίδευσή σου από τότε που ήσουν παιδί ως τη στιγμή που βρίσκεις λύση σ' αυτό που προσπαθείς.»

Κωνσταντίνος Δασκαλάκης

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, ολοκληρώνεται ο κύκλος των προπτυχιακών μου σπουδών στη σχολή Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών.

Η περάτωση αυτής της εργασίας θα ήταν αδύνατη χωρίς την εμπιστοσύνη του επιβλέποντα καθηγητή μου, Απόστολου Κυρίτση, Αν. Καθηγητή ΣΕΜΦΕ, τον οποίο ευχαριστώ θερμά.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω επίσης στον ερευνητικό μου επιβλέποντα, Αριστείδη Παπαγιαννόπουλο, εντεταλμένο ερευνητή στο Ινστιτούτο Θεωρητικής και Φυσικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (ΙΘΦΧ/ΕΙΕ), για τη διεξοδική καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές του επί της οργάνωσης και του περιεχομένου των πειραμάτων. Κυρίως όμως, τον ευχαριστώ για την πίστη του στις ικανότητές μου και την ανεξάντλητη προθυμία του για συζήτηση και διευκρινίσεις μέσω των οποίων με βοήθησε να διαμορφώσω χαρακτήρα πειραματικού φυσικού. Παράλληλα ευχαριστώ το Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών (ΕΙΕ) για την εποικοδομητική συνεργασία με το πολυτεχνείο μας.

Νιώθω, επιπλέον, υποχρεωμένη να ευχαριστήσω τον Σωκράτη Τεγόπουλο, διδακτορικό ερευνητή, τόσο για την βοήθειά του στο εργαστήριο του πολυτεχνείου όσο και για τη διδασκαλία των απαραίτητων γνώσεων.

Τέλος, θα ήθελα να απευθύνω ευχαριστίες στους γονείς μου, στον αδελφό μου και στους συνοδοιπόρους μου σε αυτό το απαιτητικό διάστημα εκπόνησης της διπλωματικής για την υπομονή, τη στήριξη και την ενθάρρυνσή τους.

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2021

Αγγελική Σκλαπάνη

Περίληψη

Τα πρωτεϊνικά νανοσωματίδια όντας βιοσυμβατά, βιοδιασπώμενα, μεταβολίσιμα και μη τοξικά, συνιστώνται σε εφαρμογές μεταφοράς φαρμακευτικών και διατροφικών συστατικών. Μία από τις ποικίλες καθιερωμένες μεθόδους σύνθεσης πρωτεϊνικών νανοσωματιδίων είναι η ηλεκτροστατική σύμπλεξη με πολυσακχαρίτες. Πρόκειται για μία ευέλικτη τεχνική αυτοοργάνωσης η οποία οδηγεί σε βιοσυμβατά και μη-τοξικά νανοσωματίδια.

Πρόσφατα, άρχισε να συμπεριλαμβάνεται στη διαδικασία κατασκευής τους, θερμική κατεργασία με σκοπό να αντιμετωπιστεί η αστάθεια των συμπλόκων στις μεταβολές pH και κατ' επέκταση να εξασφαλίζεται η αντοχή τους στις διάφορες περιοχές του ανθρώπινου σώματος. Δημιουργούνται, έτσι, καλά καθορισμένα νανοσωματίδια τα οποία δύνανται να ενθυλακώνουν υδροφοβικές βιοδραστικές ουσίες. Αυτά τα νανοσωματίδια κληρονομούν την ικανότητα των πρωτεϊνών να αλληλεπιδρούν με συστατικά διαφορετικής φύσης μέσω της υδροφοβικότητας και του επιφανειακού τους φορτίου.

Η παρούσα εργασία έχει ως αφετηρία την κατασκευή νανοσωματιδίων με τον τρόπο που αναφέρθηκε παραπάνω και συγκεκριμένα αξιοποιεί την πρωτεΐνη αιμοσφαιρίνη και τους πολυσακχαρίτες υαλουρονικό οξύ και χονδροϊτίνη, τον εκάστοτε σε διαφορετικό σύστημα. Οι δύο συγκεκριμένοι πολυσακχαρίτες αποτελούν συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και των χόνδρων και αξιοποιούνται στη μηχανική των ιστών. Δια τούτου η μελέτη τους για κατασκευή νανοσωματιδίων παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Στο πλαίσιο αυτής τη μελέτης διερευνάται η σύμπλεξη, το μέγεθος, η σταθερότητα και το επιφανειακό φορτίο των νανοσωματιδίων καθώς και η ενθυλάκωση δυο βιοδραστικών ουσιών, κουρκουμίνης και β-καροτίνης στα εν λόγω νανοσωματίδια.

Στη συνέχεια ακολουθεί η κατασκευή υδρογελών από την πρωτεΐνη αλβουμίνη ορού βοειδούς και τον πολυσακχαρίτη ξανθάνη, ένα σύστημα το οποίο έχει ήδη μελετηθεί ως προς τα παραπάνω φαινόμενα και έχει αποδειχθεί ότι δημιουργεί σταθερά νανοσωματίδια ικανά να ενθυλακώσουν κουρκουμίνη. Σκοπός είναι η χρησιμοποίηση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων πολυσακχαριτών-πρωτεϊνών για την παρασκευή τριδιάστατων δικτύων ως επέκταση τις εφαρμογής σε νανοδομημένα υλικά διαφορετικής αρχιτεκτονικής. Οι εν λόγω υδρογέλες μελετούνται ως προς τις διηλεκτρικές τους ιδιότητες.

Η κατασκευή υδρογελών με το σύστημα ξανθάνη-αλβουμίνη ορού βοοειδούς επιλέχθηκε αφού η παρασκευή νανοσωματιδίων με το εν λόγω ζεύγος έχει πραγματοποιηθεί με επιτυχία πριν την παρούσα εργασία και συνεπώς έχει επιβεβαιωθεί η δυνατότητα ηλεκτροστατικής σταυροδέσμησης μεταξύ των δύο βιοπολυμερών. Επιπλέον, η ξανθάνη είναι μεγάλου μοριακού βάρους πολυσακχαρίτης που από μόνος του σχηματίζει διαλύματα ιξωδοελαστικών ρευστών λόγω έντονης αλληλεπικάλυψης και αλληλεπίδρασης ανάμεσα στις μακρομοριακές αλυσίδες.

Αξίζει να σημειωθεί πως η κατασκευή υδρογελών και η κατασκευή νανοσωματιδίων από διαφορετικό σύστημα οφείλεται στο συνδυασμό του περιορισμένου πειραματικού χρόνου λόγω covid και του μεγαλύτερου ποσοστού επιτυχίας ενός ήδη μελετημένου συστήματος. Η εργασία επικεντρώθηκε στην εξοικείωση του μελετητή με τους τρόπους κατασκευής και μελέτης.

Abstract

Protein NPs being biocompatible, biodegradable, metabolizable and non-toxic are suggested for pharmaceutical and nutraceutical compounds delivery applications. One of the various established methods of nanoparticle synthesis is electrostatic complexation with polysaccharides. It is a versatile technique of self-assembly which creates biocompatible and non-toxic nanoparticles.

Recently, thermal treatment was introduced in NPs development in order to prevent instability in polysaccharide/protein complexes upon pH changes and consequently to ensure their stability in the various parts of human body. This way, well defined NPs are created which are able to encapsulate hydrophobic bioactive substances. These NPs inherit the ability of proteins to interact with components of different nature via their hydrophobicity and charge patch.

This work starts with production of NPs with the technique mentioned above and the use of the protein Hemoglobin (Hgb) and the polysaccharides Hyaluronic Acid (HA) and Chondroitin Sulfate (CS) in a different system each. These two polysaccharides consist part of the extracellular matrix and the cartilage and are used in tissue engineering and drug delivery. Hence their study for NPs construction is of great interest. This present study investigates the complexation, the size, the stability, the surface charge as well as the encapsulation of two bioactive substances, curcumin and β -carotene of these NPs.

Then there is hydrogels production using the protein Bovine Serum Albumin (BSA) and the polysaccharide Xanthan Gum (XG), a system which has been investigated towards the above phenomena and it has been proved that it creates stable nanoparticles capable of encapsulating curcumin. The purpose is the use of electrostatic interaction between polysaccharides and proteins for the construction of three dimensional networks as an expansion of its application on nanostructured materials of different architecture. These hydrogels are studied for their dielectric properties.

The system XG-BSA was selected for the production of hydrogels because it has been tested before this project and subsequently the ability of formation of electrostatic cross-links between the two biopolymers has been confirmed. In addition, xanthan gum consists a polysaccharide of high molecular weight which forms viscoelastic fluid solutions by itself due to strong overlap and interaction between macromolecular chains.

It is worth mentioning that the production of hydrogels and nanoparticles from a different system is due to the combination of limited available experimental time because of covid and the higher success possibility of an already studied system. The project focused on the familiarisation with the production and research methods.

Πίνακας Περιεχομένων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	12
1. 1 Πρωτεΐνες	12
1.1.1 Λειτουργίες μιας πρωτεΐνης.....	12
1.1.2 Αμινοξέα.....	13
1.1.2.1 Δομή αμινοξέων.....	13
1.1.2.2 Ταξινόμηση αμινοξέων.....	13
1.1.3 Δομή πρωτεΐνης.....	15
1.1.3.1 Πρωτοταγής δομή.....	15
1.1.3.2 Δευτεροταγής δομή.....	15
1.1.3.3 Τριτογενής δομή.....	16
1.3.4 Τεταρτογενής δομή.....	17
1.4 Δυνάμεις σταθεροποίησης πρωτεϊνών.....	17
1.4.1. Ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις.....	17
1.4.2. Μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις.....	17
1.5 Ιδιότητες.....	18
1.5.1. Ph.....	18
1.1.5.2. Διαλυτότητα πρωτεϊνών.....	19
1.1.5.3 Υδροφοβικότητα.....	19
1.1.6 Αποδόμηση πεπτικού δεσμού.....	20
1.1.7 Αποδιάταξη πρωτεϊνών (unfolding).....	20
1.2. Πολυσακχαρίτες	20
1.2.1 Δομή Πολυσακχαριτών.....	20
1.2.1.1 Μονοσακχαρίτες.....	20
1.2.1.2 Πολυσακχαρίτες.....	21
1.2.1.3. Γλυκοσιδικός δεσμός.....	21
1. 2.2. Λειτουργίες πολυσακχαριτών.....	21
1.2.2.1 Αποθήκευση ενέργειας.....	21
1.2.2.2. Κυτταρική σηματοδότηση.....	21
1.2.2.3. Δομική στήριξη.....	21
1.2.3. Ιδιότητα σχηματισμού γέλης.....	22
1.2.4 Χονδροϊτίνη.....	22
1.2.5 Υαλουρονικό οξύ.....	22
1.2.6 Ξανθάνη (Xanthan Gum).....	23

1.3. Νανοσωματίδια από πρωτεΐνες	24
1.3.1 Ορισμός νανοσωματιδίου	24
1.3.2 Ιδιότητες νανοσωματιδίων	24
1.3.3 Πρωτεϊνικά νανοσωματίδια	24
1.3.3.1 Πλεονεκτήματα για βιοϊατρικές εφαρμογές	24
1.3.4. Τρόποι κατασκευής	25
1.3.4.1. Αποδιαλυτοποίηση (desolvation).....	25
1.3.4.2. Αυτοοργάνωση (self-assembly).....	25
1.3.4.3. Γαλακτωματοποίηση (Emulsification)	26
1.3.4.4. Ηλεκτροψεκασμός (electrospraying).....	26
1.3.5. Συμπεριφορά νανοσωματιδίων σε υδατικό διάλυμα	27
1.3.5.1. ζ-δυναμικό	27
1.3.5.2 Κίνηση Μπράουν	28
1.3.5.3. Θερμική κατεργασία.....	29
4. Κουρκουμίνη	29
1.4.1. Κουρκουμάς.....	29
1.4.2. Ιδιότητες σκόνης.....	29
1.4.3. Χρήσεις	29
1.4.3.1 Φαρμακευτική χρήση	30
1.4.4. Περιορισμοί χρήσης.....	30
1.4.4.1. Προτάσεις αντιμετώπισης	30
1.5 β-Καροτίνη	31
1.5.1. Ιδιότητες β-καροτίνης.....	31
1.6 Αιμοσφαιρίνη	31
1.6.1 Δομή αιμοσφαιρίνης	31
1.6.2 Ιδιότητες της αιμοσφαιρίνης.....	32
1.6.3 Εφαρμογές στην ιατρική.....	32
1.6.3.1 Περιορισμοί εφαρμογής τους	33
1.6.3.2 Προσπάθειες για αντιμετώπιση περιορισμών	34
1.6.3.3 Νανοσωματίδια και αιμοσφαιρίνη	34
1.7 Υδρογέλες	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ, ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	35
2.1. Υλικά	35
2.2 Πειραματικές Τεχνικές	35
2.2.1. Σκέδαση φωτός-Light Scattering (LS)	35
2.2.1.1 Δυναμική Σκέδαση Φωτός - (Dynamic Light Scattering-DLS)	35

2.2.1.2 Στατική Σκέδαση φωτός - Static Light Scattering (SLS).....	36
2.2.2 Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier - Fourier Transformed Infrared (FTIR) Spectroscopy	38
2.2.2.1. Αρχές Λειτουργίας	38
2.2.2.2 Διάταξη οργάνου	38
2.2.3 Φασματοσκοπία Φθορισμού – Fluorescence spectroscopy	39
2.2.3.1 Αρχές Λειτουργίας	39
2.2.3.2 Διάταξη οργάνου	39
2.2.4. Διηλεκτρική Φασματοσκοπία Εναλασσόμενου Πεδίου (Diffuse Reflectance Spectroscopy-DRS).....	39
2.2.4.1. Αρχές λειτουργίας.....	39
2.2.4.2. Διάταξη Οργάνου.....	40
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	41
3.1 Ηλεκτροστατική σύμπλεξη Hgb-CS και Hgb-HA.....	41
3.2 Σταθεροποίηση νανοσωματιδίων Hgb-CS και Hgb-HA με θερμική κατεργασία	44
3.3 Επιφανειακό Φορτίο Νανοσωματιδίων	47
3.4 Ενθυλάκωση κουρκουμίνης και β-Καροτίνης σε νανοσωματίδια Hgb-CS και Hgb-HA.....	50
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΥΔΡΟΓΕΛΩΝ.....	53
4.1 Σύστημα ΧG-BSA	53
4.2 Παρασκευή υδρογελών	56
4.3 Μελέτη διηλεκτρικών ιδιοτήτων υδρογελών.....	57
4.4 Ανακεφαλαίωση - Συζήτηση για το μέλλον.....	62
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	63
Ξενόγλωσσες πηγές	63
Ελληνικές Πηγές	66

Πίνακας Εικόνων

Εικόνα 1.1. Βασική Δομή Αμινοξέων	13
www.technologynetworks.com/applied-sciences/articles/	
Εικόνα 1.2. Ταξινόμηση αμινοξέων με κριτήριο την πλευρική ομάδα R, microbenotes	14
www.microbenotes.com/amino-acids-properties-structure-classification-and-functions/	
Εικόνα 1.3 Βασικές δομές πρωτεΐνης	15
www.researchgate.com	
Εικόνα 1.4 Δημιουργία δεσμών υδρογόνου σε α-έλικα	16
Biochemistry, Sixth Edition, 2007 W.H.Freeman and Company	
Εικόνα 1.5. Δυνάμεις σταθεροποίησης πρωτεϊνών	18
Pearson Education Inc., publishing as Benjamin Cummings	
Εικόνα 1.6 Τιμές pH στο ανθρώπινο σώμα	19
www.alkanature.in	
Εικόνα 1.7 Είδη μονοσακχαριτών	20
courses.lumenlearning.com	
Εικόνα 1.8 Δομή Χονδροϊτίνης	22
Sigmaaldrich.com	
Εικόνα 1.9 Δομή Γαλουρονικού Οξέος	23
Sigmaaldrich.com	
Εικόνα 1.10 Δομή Ξανθάνης	23
Sigmaaldrich.co	
Εικόνα 1.11 Σχηματική απεικόνιση της σχέσης Coulomb κατά τη διαδικασία ηλεκτροψεκασμού	27
HadisRostamabadi et al. Electro spraying as a novel process for the synthesis of particles/nanoparticles loaded with poorly water-soluble bioactive molecules	
Εικόνα 1.12 Επεξήγηση ζ-δυναμικού ενός σωματιδίου	28
www.nanoComposix.gr	
Εικόνα 1.13 Καμπύλη ζ-δυναμικού συναρτήσει του Ph όπου σημειώνονται οι περιοχές που η κατανομή θεωρείται σταθερή	28
Research.colostate.edu .	
Εικόνα 1.13 Δομή αιμοσφαιρίνης και αίμης	32
Κεφάλαιο 2, Λουκόπουλος	
Εικόνα 2.1. ALV-CG-3-goniometer/ALV-50000/EPP multi tau digital correlator	35
www.eie.gr/nhrf/institutes...	
Εικόνα 2.2. Mid- infrared FTIR spectrometer Bruker Equinox 55 equipped with Attenuated Total Reflectance (ATR) accessory and coupled to an infrared Bruker Hyperion 2000 xyz stage microscope. Spectral range 400-6000 cm-1	38
www.eie.gr/nhrf/institutes .	

Εικόνα 2.3 Πειραματική Διάταξη DRS, αντίστοιχη με αυτή του εργαστηρίου διηλεκτρικής φασματοσκοπίας (αριστερά). Κυψελίδα μέτρησης (δεξιά) 40
Θερμική και ηλεκτρική αγωγιμότητα νανοσύνθετων πολυμερικής μήτρας πολυαιθυλενίου και εγκλεισμάτων νανοσωλήνων άνθρακα, Μεταπτυχιακή εργασία Σωκράτη Τεγόπουλου

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. 1 Πρωτεΐνες

1.1.1 Λειτουργίες μιας πρωτεΐνης

Από όλα τα μόρια που απαντώνται στους ζωντανούς οργανισμούς, οι πρωτεΐνες έχουν τις πιο ποικίλες λειτουργίες. Οι λειτουργίες αυτές συνεισφέρουν σε μία ή περισσότερες από τις παρακάτω κατηγορίες:

Δομή (structural proteins)

Οι δομικές πρωτεΐνες συμβάλλουν στη διαμόρφωση της υφής και στη διατήρηση της μορφολογίας ιστών, κυττάρων και υποκυτταρικών στοιχείων. Δύο από τις πιο γνωστές είναι το κολλαγόνο και η ελαστίνη. Το κολλαγόνο αποτελεί κύριο στοιχείο του δέρματος των ιστών, των τενόντων και των χόνδρων των αρθρώσεων, έχει μεγάλη μηχανική αντοχή και προσδίδει συνεκτικότητα. Η ελαστίνη προσδίδει αντοχή και ελαστικότητα και βρίσκεται σε όργανα όπως οι αρτηρίες, η αορτή, η τραχεία, οι βρόγχοι και οι πνεύμονες.

Κατάλυση (catalytic proteins-enzymes)

Με τον όρο κατάλυση αναφερόμαστε στην επιτάχυνση χημικών αντιδράσεων. Οι καταλυτικές πρωτεΐνες ονομάζονται ένζυμα και αυξάνουν την ταχύτητα αντιδράσεων σχετικών με την πέψη, την απορρόφηση ενέργειας και τη βιοσύνθεση, από ένα εκατομμύριο έως και ένα τρισεκατομμύριο φορές. Τα ένζυμα λειτουργούν σε συγκεκριμένες θερμοκρασιακές συνθήκες (θερμοκρασία σώματος περίπου 37° C) και σε συγκεκριμένες τιμές pH ανάλογα το σημείο του σώματος στο οποίο βρίσκονται.

Κίνηση (motor proteins)

Οι κινητικές πρωτεΐνες επιτρέπουν στα κύτταρα να κινούνται και να αλλάζουν σχήμα. Στον κυτταροσκελετό, ένα δυναμικό σκελετό από μικροσωληνίσκους, μικροϊνίδια και ενδιάμεσα ινίδια, συσταλτές πρωτεΐνες επιτελούν τη λειτουργία της κίνησης. Παράδειγμα αποτελούν η τουμπουλίνη και η G-ακτίνη, δομικές πρωτεΐνες των μικροσωληνίσκων και των μικροϊνιδίων αντίστοιχα.

Μεταφορά (transport proteins)

Πολλές πρωτεΐνες λειτουργούν ως μεταφορείς μορίων ή ιόντων σε μεμβράνες ή μεταξύ κυττάρων. Η αιμοσφαιρίνη στα ερυθρά αιμοσφαίρια συλλέγει οξυγόνο από τους πνεύμονες και τα μεταφέρει σε όλους τους ιστούς του σώματος. Οι πρωτεΐνες του κυτοχρώματος c, στα μιτοχόνδρια, μεταφέρουν ηλεκτρόνια από ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών στο άλλο, δημιουργώντας ενέργεια για να τροφοδοτήσουν το κύτταρο.

Άμυνα (defense proteins)

Το ανοσοποιητικό σύστημα αποτελεί ένα δίκτυο μεταξύ κυττάρων και πρωτεϊνών που βρίσκεται σε όλο το σώμα παρέχοντας άμεση ανταπόκριση σε πιθανές μολύνσεις. Όταν σε έναν οργανισμό εισέρχονται εισβολείς (αλλεργιογόνα, βακτήρια κ.α.), παράγονται ανοσοσφαιρίνες (πρωτεΐνες των αντισωμάτων) ώστε να τους εξουδετερώσουν. Επίσης, πρωτεΐνες όπως η θρομβίνη, μέσω του μηχανισμού της πήξεως συμβάλλουν στην αιμόσταση σε περίπτωση αιμορραγίας.

Αποθήκευση (storage proteins)

Ορισμένες πρωτεΐνες λειτουργούν σαν δεξαμενή θρεπτικών συστατικών. Για παράδειγμα, η φερριτίνη λειτουργεί σαν αποθήκη σιδήρου, η μυοσφαιρίνη ως αποθήκη οξυγόνου και η καζεΐνη του γάλακτος ως αποθήκη ασβεστίου και φωσφόρου.

Ρύθμιση (regulatory proteins-hormones)

Ορισμένες πρωτεΐνες λειτουργούν ως μέσα επικοινωνίας μεταξύ των κυττάρων δίνοντας τα κατάλληλα σήματα. Παράδειγμα αποτελεί η EGF (παράγοντας επιδερμικής ανάπτυξης), η οποία απελευθερώνεται στην περιοχή μιας πληγής και ενεργοποιεί τον υποδοχέα EGF, ο οποίος σηματοδοτεί κύτταρα δέρματος να αναπτυχθούν και να διαχωριστούν κατά την επούλωση τραύματος. Οι ορμόνες επηρεάζουν τις μεταβολικές δραστηριότητες του κυττάρου. Για παράδειγμα η ινσουλίνη και η γλυκαγόνη είναι πεπτικές ορμόνες που ρυθμίζουν το επίπεδο γλυκόζης στο αίμα.

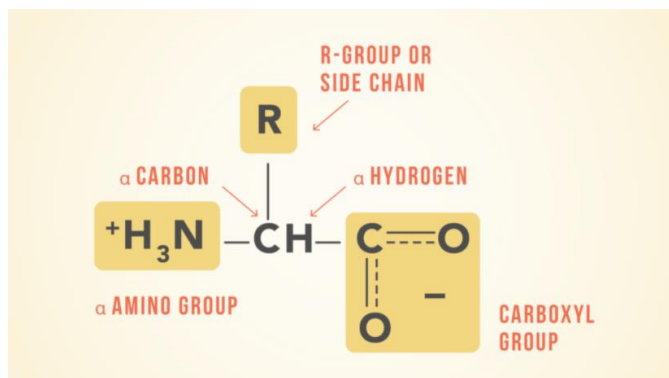
Προσαρμοστικότητα

Σε περίπτωση έκθεσης σε μη φυσιολογικές συνθήκες, ενεργοποιούνται εξειδικευμένες πρωτεΐνες με σκοπό την ομαλή λειτουργία του οργανισμού. Παράδειγμα αποτελούν τα κυτοχρώματα P450, μια ποικιλόμορφη ομάδα ενζύμων που βρίσκεται σε ζώα και φυτά η οποία συνήθως μετατρέπει ένα εύρος τοξικών ρύπων σε λιγότερο τοξικά παράγωγα. Υπερβολικά υψηλές θερμοκρασίες και άλλες «στρεσογόνες» συνθήκες οδηγούν στη σύνθεση πρωτεϊνών οι οποίες καλούνται πρωτεΐνες θερμικού σοκ και προάγουν τη σωστή αναδίπλωση φθαρμένων πρωτεϊνών ή την αποσύνθεση κατεστραμμένων πρωτεϊνών.

Συνοπτικά, οι πρωτεΐνες καθορίζουν τις κυτταρικές δομές και υπαγορεύουν τις κυτταρικές λειτουργίες.

1.1.2 Αμινοξέα

1.1.2.1 Δομή αμινοξέων



Εικόνα 1.1. Βασική δομή αμινοξέων

Παρόλο που υπάρχουν πάνω από 200 αμινοξέα στη φύση, μόνο 20 από αυτά συμβάλλουν στην πρωτεϊνοσύνθεση, είναι δηλαδή οι δομικοί λίθοι της πρωτεΐνης. Όλα τα αμινοξέα μοιράζονται μια βασική δομή η οποία αποτελείται από ένα κεντρικό άτομο άνθρακα, γνωστό ως άλφα (α) άνθρακα ενωμένο με μια αμινομάδα ($-NH_2$), μία καρβοξυλομάδα ($-COOH$) και ένα άτομο υδρογόνου. Κάθε αμινοξύ έχει επίσης ένα άλλο άτομο ή ομάδα ατόμων ενωμένα στο κεντρικό άτομο, γνωστή ως R ομάδα η οποία καθορίζει την ταυτότητα του αμινοξέος. Αν για παράδειγμα η ομάδα R είναι ένα άτομο υδρογόνου, τότε πρόκειται για το αμινοξύ γλυκίνη.

1.1.2.2 Ταξινόμηση αμινοξέων

Τα αμινοξέα μπορούν να ταξινομηθούν με ποικίλους τρόπους. Το πρώτο κριτήριο που μπορούμε να εξετάσουμε είναι την ικανότητα σύνθεσης από τον ανθρώπινο οργανισμό ή μη. Σύμφωνα με αυτό, έχουμε διάκριση σε απαραίτητα και μη-απαραίτητα αμινοξέα. Απαραίτητα αμινοξέα είναι εκείνα που δεν συνθέτει ο ανθρώπινος οργανισμός αλλά λαμβάνει μέσω της διατροφής (ιστιδίνη, ισολευκίνη, λευκίνη, βαλίνη, φαινυλαλανίνη, τρυπτοφάνη, μεθειονίνη, θρεονίνη, λυσίνη). Μη απαραίτητα είναι

εκείνα που παράγονται από τον οργανισμό μας (αργινίνη, γλουταμίνη, τυροσίνη, κυστεΐνη, προλίνη, γλυκίνη, αλανίνη, ασπαραγίνη, ασπαρτ, ορνιθίνη, συρίνη). Ο παραπάνω διαχωρισμός δεν είναι αυστηρός καθώς υπό συγκεκριμένες συνθήκες κάθε αμινοξύ δύναται να λειτουργήσει διαφορετικά.

Ένα δεύτερο κριτήριο ταξινόμησης είναι τα άτομα της πλευρικής ομάδας R σύμφωνα με το οποίο τα αμινοξέα μπορεί να είναι:

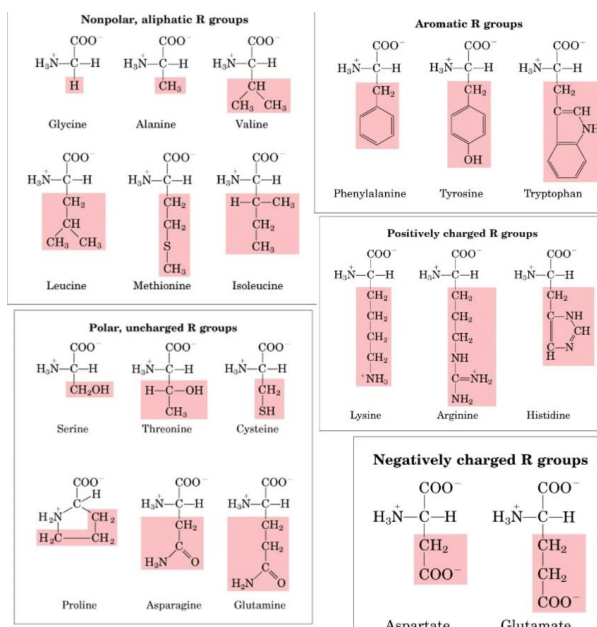
- **Μη πολικά:** Περιλαμβάνουν κυρίως άτομα άνθρακα και υδρογόνου στην πλευρική ομάδα R, αλειφατική ομάδα. Οι αλειφατικές ομάδες R είναι μη πολικές και υδροφοβικές, δηλαδή τείνουν να απωθούνται από το νερό. Παραδείγματα μη πολικών αμινοξέων είναι η γλυκίνη, η αλανίνη, η λευκίνη και η προλίνη.

- **Πολικά:** Οι ομάδες R είναι πλάγιες πολικές αλλά μη ιονιζόμενες όπως -OH, -SH, -CONH₂. Είναι περισσότερο διαλυτές στο νερό, ή υδροφιλικές, διότι περιέχουν λειτουργικές ομάδες που δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου στο νερό. Πρόκειται για μη φορτισμένα αμινοξέα. Ενδεικτικά παραδείγματα είναι η κυστεΐνη, η ασπαραγίνη και η γλουταμίνη.

- **Αρωματικά:** Διαθέτουν μια αρωματική πλευρική ομάδα, δηλαδή ένα αρωματικό σύστημα δαχτυλιδιού. Πρόκειται για «πλανητικό» σύστημα το οποίο περιλαμβάνει ηλεκτρόνια που μοιράζονται σε όλη τη δομή τους. Είναι σχετικά μη πολικά και μπορούν να συμμετέχουν σε υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις. Τα αρωματικά αμινοξέα απορροφούν την υπεριώδη ακτινοβολία, το καθένα σε διαφορετικό βαθμό. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η τυροσίνη και η τρυπτοφάνη.

- **Όξινα:** Η ομάδα R απαρτίζεται από μία επιπλέον πλάγια καρβοξυλική ομάδα η οποία ιονίζεται απελευθερώνοντας ένα άτομο υδρογόνου και προσδίδει όξινες ιδιότητες όπως στο γλουταμινικό και ασπαραγινικό οξύ.

- **Βασικά:** Η ομάδα R απαρτίζεται από μία επιπλέον αμινοομάδα η οποία κατά την πρόσληψη πρωτονίου προσδίδει θετικό φορτίο. Στην ομάδα αυτή ανήκουν η λυσίνη, η αργινίνη και η ιστοιδίνη.



Εικόνα 1.2. Ταξινόμηση αμινοξέων με κριτήριο την πλευρική ομάδα R

Δύο αμινοξέα μπορούν να ενωθούν μεταξύ τους με πεπτιδικό δεσμό και να σχηματίσουν ένα μόριο, το διπεπτίδιο. Κατά την ένωση αυτή, έχουμε αντίδραση της καρβοξυλομάδας του ενός αμινοξέος με την αμινοομάδα του δεύτερου αμινοξέος και την απελευθέρωση ενός μορίου νερού H₂O. Γι' αυτό ο δεσμός αυτός αναφέρεται συχνά και ως αντίδραση συμπύκνωσης ή αφυδάτωσης.

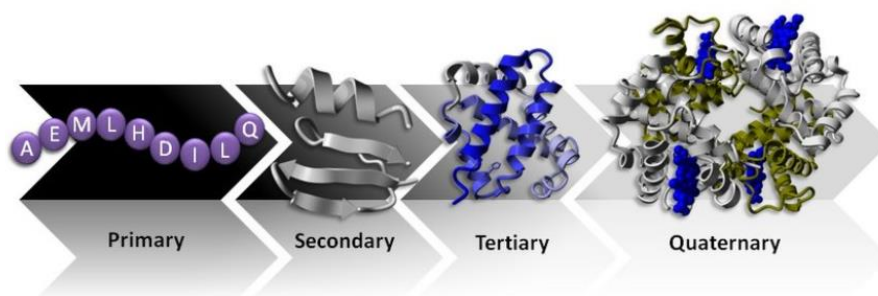
Παρόμοια, ένα τρίτο αμινοξύ μπορεί να δημιουργήσει πεπτιδικό δεσμό με το δεύτερο αμινοξύ του διπεπτιδίου για να δημιουργήσει ένα τριπεπτίδιο. Συνεπώς μπορεί κάθε φορά να προστίθεται οποιοδήποτε από τα 20 πρωτεϊνικά αμινοξέα σχηματίζοντας μια πεπτική αλυσίδα στην οποία το πρώτο αμινοξύ θα έχει ελεύθερη την αμινομάδα και το τελευταίο θα έχει ελεύθερη την καρβοξυλομάδα.

Πολυπεπτιδικές αλυσίδες με περισσότερα από 10 αμινοξέα ονομάζονται πολυπεπτίδια ενώ με λιγότερα ολιγοπεπτίδια. Κάθε μονάδα αμινοξέος στο πολυπεπτίδιο ονομάζεται κατάλοιπο. Στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες υπάρχει ένα τμήμα, η κύρια αλυσίδα ή κορμός, που επαναλαμβάνεται σταθερά και ένα μεταβλητό τμήμα που συνιστάται από τις διάφορες πλευρικές αλυσίδες.

Ο πεπτιδικός δεσμός έχει μερικό χαρακτήρα διπλού δεσμού (λειτουργεί άλλοτε ως απλός και άλλοτε ως διπλός δεσμός) αποτρέποντας την περιστροφή γύρω από τον εαυτό του και καθιστώντας τον επίπεδο. Οι πεπτιδικοί δεσμοί είναι ισχυροί, πολύ σταθεροί (>400kJ/mol) και ομοιοπολικοί. Είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι στην υπεριώδη ακτινοβολία καθώς το μήκος κύματος της απορρόφησης τους είναι 190-230 nm.

1.1.3 Δομή πρωτεΐνης

Μία πρωτεΐνη περιέχει ένα ή περισσότερα πολυπεπτίδια. Ουσιαστικά, οι πρωτεΐνες είναι μακριές αλυσίδες αμινοξέων που συγκρατούνται μέσω πεπτικών δεσμών. Η δομή μιας πρωτεΐνης χαρακτηρίζεται σε διάφορα επίπεδα τα οποία αναλύονται παρακάτω:



Εικόνα 1.3. Βασικές Δομές Πρωτεΐνης

1.1.3.1 Πρωτοταγής δομή

Αποτελεί το πρώτο και πιο απλό επίπεδο πρωτεϊνικής δομής. Περιγράφει την αλληλουχία των αμινοξέων η οποία είναι μοναδική και απόλυτα καθορισμένη για κάθε πρωτεΐνη από γενετικές πληροφορίες.

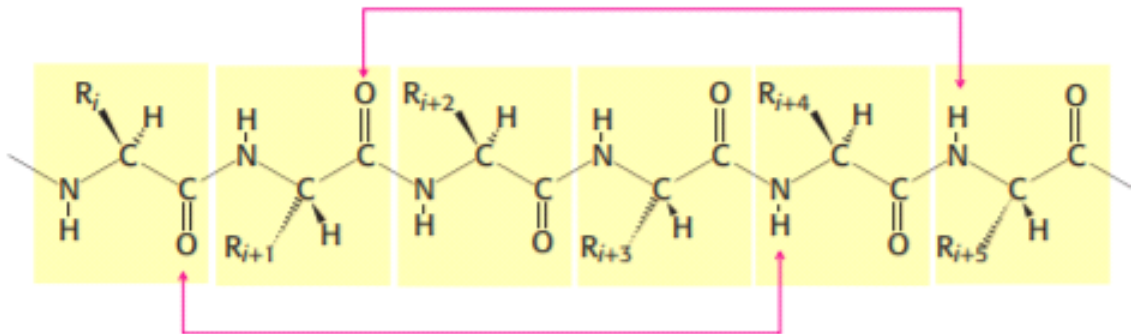
1.1.3.2 Δευτεροταγής δομή

Υποδεικνύει τη στερεοδιάταξη συνεχόμενων τμημάτων των πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Με πιο απλά λόγια περιγράφει τον τρόπο με τον οποίο «διπλώνεται» μια πρωτεΐνη. Κατά το πρωτεϊνικό δίπλωμα επιδιώκεται ελαχιστοποίηση της ελεύθερης ενέργειας. Οι δευτεροταγείς δομές διακρίνονται σε κανονικές και σε μη κανονικές ανάλογα με το αν παρουσιάζουν περιοδική επανάληψη των υδρογονικών δεσμών ή όχι. Οι επικρατέστερες δευτεροταγείς δομές είναι¹:

¹ Σημειώνεται ότι μια πρωτεΐνη μπορεί να περιέχει παραπάνω από μία δομές σε διαφορετικά ποσοστά.

1.1.3.2.1 Α έλικα

Πρόκειται για μια σπυρωτή δομή που σταθεροποιείται με ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου. Πιο περιγραφικά, πραγματοποιείται ένωση της ομάδας CO κάθε αμινοξέος με την ομάδα NH του αμινοξέος που βρίσκεται τέσσερα κατάλοιπα μπροστά στην αλληλουχία. Κάθε στροφή της έλικας περιέχει 3.6 κατάλοιπα αμινοξέων και η απόσταση μεταξύ γειτονικών αμινοξέων είναι 1.5Å. Οι έλικες μπορεί να είναι είτε δεξιόστροφες είτε αριστερόστροφες με τις δεξιόστροφες να είναι ενεργειακά προτιμητέες. Δια τούτου όλες οι α-έλικες που απαντούν στις πρωτεΐνες είναι δεξιόστροφες.



Εικόνα 1.4 Δημιουργία δεσμών υδρογόνου σε α-έλικα

1.1.3.2.2 β-πτυχωτή επιφάνεια

Αποτελείται από δύο ή περισσότερες πολυπεπτιδικές αλυσίδες, που ονομάζονται β-πτυχώσεις και έχουν ως βασική μονάδα τον β-κλώνο. Οι κύριες αλυσίδες των β-κλώνων είναι σχεδόν εκτεταμένες με τις ομάδες CO και NH κάθετες στον κύριο άξονα. Αυτή η διάταξη επιτρέπει το σχηματισμό υδρογονικών δεσμών ανάμεσα στις β-πτυχώσεις οι οποίες διατεταγμένες η μία δίπλα στην άλλη συνδέονται προκειμένου να δημιουργήσουν β-επιφάνειες. Αν οι διαδοχικές β-πτυχώσεις έχουν την ίδια κατεύθυνση πρόκειται για παράλληλη β-πτυχωτή επιφάνεια, ενώ αν έχουν αντίθετη κατεύθυνση πρόκειται για αντιπαράλληλη. Η αξονική απόσταση μεταξύ διαδοχικών καταλοίπων (Cα ανθράκων) ενός β-κλώνου είναι 3.4 Å στις αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες και 3.2 Å στις παράλληλες. Τις περισσότερες φορές, οι β-κλώνοι δεν είναι ακριβώς παράλληλοι μεταξύ τους αλλά παρουσιάζουν μια χαρακτηριστική στροφή (twist), περίπου 25 μοιρών. Το αποτέλεσμα είναι να δημιουργούνται στραμμένες β-πτυχωτές επιφάνειες.

1.1.3.2.3 Στροφή

Η στροφή ανήκει στα μη κανονικά στοιχεία δευτεροταγούς δομής και στοχεύει κυρίως στην αναστροφή της πολυπεπτιδικής αλυσίδας (στροφή αναστροφής). Χαρακτηρίζεται από τη δημιουργία ενός υδρογονικού δεσμού μεταξύ της ομάδας -CO ενός αμινοξέος με την ομάδα -NH του καταλοίπου που βρίσκεται τρεις θέσεις μακριά στην αμινοξική αλληλουχία. Η στροφή αναστροφής μεταξύ δύο αντιπαράλληλων β-κλώνων ονομάζεται φουρκέτα.

1. 1.3.3 Τριτογενής δομή

Περιγράφει τη στερεοδιαμόρφωση στο χώρο της πρωτεΐνης. Πιο απλά, δίνει συγκεκριμένο τρισδιάστατο σχήμα στην πολυπεπτιδική αλυσίδα. Για παράδειγμα, υδατοδιαλυτές σφαιροειδείς πρωτεΐνες τείνουν να αποκτήσουν διαμόρφωση ώστε τα υδρόφοβα αμινοξέα να διατάσσονται στο εσωτερικό και τα υδρόφιλα ομοιόμορφα στην επιφάνεια, ενώ οι μεμβρανικές πρωτεΐνες αναδιπλώνονται σε συμπαγείς δομές με πολικά κέντρα και υδρόφοβο εξωτερικό. Η τελική διαμόρφωση σταθεροποιείται από αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πλευρικών ομάδων R των αμινοξέων. Τέτοιες αλληλεπιδράσεις μπορεί να είναι υδρόφοβες (μεταξύ μη-πολωμένων ομάδων), υδρόφιλες

(μεταξύ ιονισμένων ομάδων και νερού), ιοντικές/ηλεκτροστατικές/γέφυρες άλατος (ανάμεσα σε όξινα και βασικά αμινοξέα), υδρογονικοί και δισουλφιδικοί δεσμοί. Ο δισουλφιδικός δεσμός είναι ομοιοπολικός και αναπτύσσεται μεταξύ των ατόμων θείου της πλευρικής ομάδας της κυστεΐνης. (S-S)

1.3.4 Τεταρτογενής δομή

Είναι το ανώτερο επίπεδο οργάνωσης των πρωτεϊνών για εκείνες που αποτελούνται από δύο ή περισσότερες πεπτιδικές αλυσίδες. Κάθε πολυπεπτιδική αλυσίδα σε αυτά τα μόρια ονομάζεται υπομονάδα. Ο τρόπος που εμπλέκονται μεταξύ τους οι υπομονάδες σταθεροποιείται με τις ίδιες αλληλεπιδράσεις που διαμορφώνεται η τριτογενής δομή.

Μια άλλη κατηγοριοποίηση των πρωτεϊνών με άξονα τη μορφή τους είναι σε **ινώδεις** και **σφαιρικές**. Οι ινώδεις πρωτεΐνες σχηματίζουν επιμήκεις δέσμες, είναι σταθερές, αδιάλυτες στο νερό και συνήθως έχουν δομικό ρόλο. Οι σφαιρικές πρωτεΐνες έχουν πιο συμπαγή και στρογγυλεμένη δομή, είναι περισσότερο ευαίσθητες σε μεταβολές π.χ. του pH ή της θερμοκρασίας, είναι ευδιάλυτες στο νερό και συνήθως έχουν λειτουργικό ρόλο.

1.4 Δυνάμεις σταθεροποίησης πρωτεϊνών

Ο σχηματισμός των πρωτεϊνικών μορίων και συγκεκριμένα η διαμόρφωση της τριτογενούς και τεταρτογενούς δομής, περιλαμβάνουν δεσμούς και διαμοριακές δυνάμεις που προσδίδουν σταθερότητα στη δομή και διαχωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: σε ομοιοπολικές και μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις.

1.4.1. Ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις

Οι ομοιοπολικοί δεσμοί είναι οι ισχυρότεροι χημικοί δεσμοί που συνεισφέρουν στην πρωτεϊνική δομή. Ο κυριότερος είναι ο πεπτιδικός δεσμός (βλ παρ 1.3.3). Εξίσου σημαντικός ωστόσο είναι και ο δισουλφιδικός δεσμός ο οποίος αναπτύσσεται όταν πλησιαστούν δύο αμινοξέα κυστεΐνης ως αποτέλεσμα οξειδωσης. Συγκεκριμένα, αναπτύσσεται μεταξύ δύο ατόμων θείου (SH) της πλευρικής ομάδας της κυστεΐνης.

1.4.2. Μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις

Οι μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις παρόλο που είναι τάξεις μεγέθους ασθενέστερες από τις ομοιοπολικές, παίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό και τη διατήρηση της τρισδιάστατης δομικής ακεραιότητας των πρωτεϊνών. Οι επικρατέστερες είναι οι εξής:

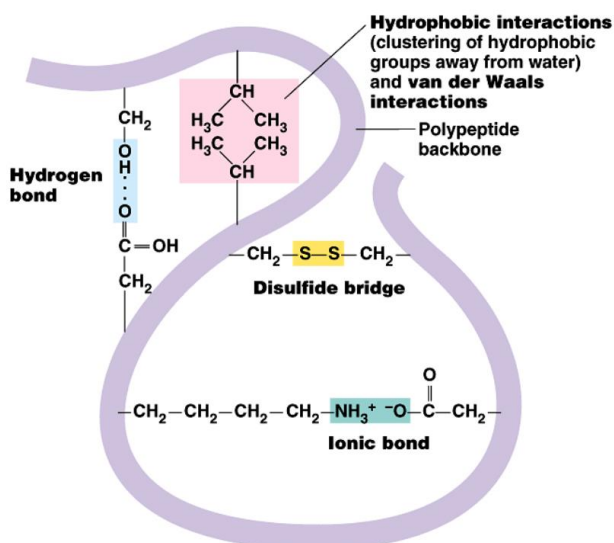
A. Υδρόφοβες Αλληλεπιδράσεις : αναπτύσσονται μεταξύ των πλευρικών ομάδων μη πολικών αμινοξέων, οι οποίες ως υδρόφοβες όταν βρεθούν σε υδατικό περιβάλλον τείνουν να συσσωματωθούν ώστε να μειώσουν την έκθεσή τους στο νερό. Θεωρούνται σημαντικές αλληλεπιδράσεις όχι λόγω της ισχύς τους αλλά λόγω του πλήθους τους.

B. Δεσμοί υδρογόνου : αναπτύσσονται κυρίως μεταξύ των πλευρικών ομάδων πολικών αμινοξέων και συγκεκριμένα μεταξύ ενός οξυγόνου καρβοξυλίου και μιας υδρογονικής ομάδας που λειτουργεί ως δότης. Το συγκεκριμένο είδος δεσμού διακρίνεται για την ισχυρή κατευθυντικότητα του. Ο δεσμός είναι περισσότερο ισχυρός όταν το οξυγόνο και το υδρογόνο είναι ευθυγραμμισμένα.

Γ. Αλληλεπιδράσεις Van der Waals : συνιστούν μια παροδική, αδύναμη ηλεκτρική έλξη μεταξύ δύο ατόμων. Η ύπαρξη τους οφείλεται στο γεγονός πως κάθε άτομο διαθέτει ένα νέφος ηλεκτρονίων που μπορεί να μεταβάλλεται μετατρέποντάς το προσωρινά σε ηλεκτρικό δίπολο. Όταν δύο άτομα πλησιαστούν, δημιουργείται μια ηλεκτροστατική έλξη από την αλληλεπίδραση των διπόλων η οποία δύναται να είναι απωθητική ή ελκτική ανάλογα με τη εγγύτητα των αλληλεπιδρώντων ατόμων.

Δ. Ιονικοί δεσμοί – Γέφυρες άλατος : είναι δεσμοί ανάμεσα σε αντίθετα φορτισμένα αμινοξέα, δηλαδή ανάμεσα σε ένα όξινο και ένα βασικό. Πρόκειται ουσιαστικά για έλξη ετερόνυμων φορτίων.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι αλληλεπιδράσεις σε φθίνουσα σειρά με βάση την ισχύ τους.



Είδος αλληλεπίδρασης	Ισχύς (kJ/mol)
Δισουλφιδικός δεσμός	167
Ιονικός δεσμός	10 έως 40
Υδρογονικός δεσμός	8 έως 40
Δυνάμεις Van der Waals	4-17 στο εσωτερικό πρωτεΐνης
Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις	4 έως 12

Εικόνα 1.5 Δυνάμεις σταθεροποίησης πρωτεϊνών

1.5 Ιδιότητες

1.5.1. Ph

1.5.1.1. Ορισμός

Το pH είναι ένα μέτρο του πόσο όξινο ή βασικό είναι ένα υδατικό διάλυμα και εκφράζεται σε λογαριθμική κλίμακα. Λαμβάνει τιμές από 0 έως 14 με την τιμή 7 να αντιστοιχεί σε ουδέτερο pH, τιμές χαμηλότερες του 7 να αντιστοιχούν σε όξινα διαλύματα και τιμές μεγαλύτερες του 7 να αντιστοιχούν σε βασικά διαλύματα. Πρόκειται ουσιαστικά για ένα μέτρο της σχετικής ποσότητας ιόντων ελεύθερων υδρογόνων και ιόντων ελεύθερων υδροξυλίων στο νερό. Αν τα ελεύθερα ιόντα που υπερτερούν σε ένα υδατικό διάλυμα είναι υδρογόνου, το διάλυμα είναι όξινο ενώ αν είναι υδροξυλίου, το διάλυμα είναι βασικό. Το pH μπορεί να επηρεαστεί από τη μεταβολή της χημικής σύστασης του διαλύματος, γεγονός που το καθιστά ένα σημαντικό δείκτη στη μελέτη υδατικών διαλυμάτων.

1.5.1.2 Ισοηλεκτρικό σημείο

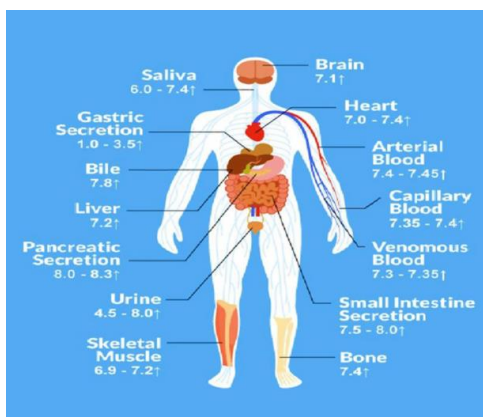
Ορισμός: Ισοηλεκτρικό σημείο (pI) – (isoelectric point, IEP) μιας πρωτεΐνης ονομάζεται η τιμή pH του διαλύματος στην οποία το άθροισμα φορτίων των αμινοξέων που την αποτελούν είναι μηδέν, έχουμε δηλαδή ίσο αριθμό θετικά και αρνητικά φορτισμένων ιόντων. Τα αμινοξέα σε αυτή την περίπτωση έχουν τη μορφή διπλού ιόντος (zwitterion)

Αν μια πρωτεΐνη βρίσκεται σε διαφορετικό pH από αυτό που αντιστοιχεί στο ισοηλεκτρικό της σημείο, φορτίζεται. Συγκεκριμένα όταν το pH του ρυθμιστικού διαλύματος είναι μεγαλύτερο του pI της πρωτεΐνης, τότε πρωτεΐνη είναι αρνητικά φορτισμένη (ανιόν) ενώ αν είναι μικρότερο, η πρωτεΐνη είναι θετικά φορτισμένη (κατιόν). Το ισοηλεκτρικό σημείο περιγράφει τις συνθήκες για τις οποίες σε ηλεκτροκινητικές μετρήσεις δεν μετρείται φορτίο, δεν υπάρχει δηλαδή μετακίνηση σε ηλεκτρικό πεδίο.

1.5.1.3 pH στο ανθρώπινο σώμα

Το ανθρώπινο σώμα δεν χαρακτηρίζεται από μία μοναδική τιμή pH για όλα τα μέρη που το απαρτίζουν, αλλά από διάφορες επιμέρους ανάλογα την περιοχή και τα σωματικά υγρά. Το pH του αίματος παίρνει τιμές ανάμεσα σε 7.35-7.45, το pH του σάλιου κυμαίνεται από 6.5-7.5, το άνω μέρος

του στομαχιού έχει pH 4.0-6.5 , το κάτω μέρος του στομαχιού είναι ιδιαίτερα όξινο με τιμές 1.5-4.0 ενώ η περιοχή του εντέρου είναι ελαφρώς βασική με pH 7.0-8.5.



Εικόνα 1.6 Τιμές pH στο ανθρώπινο σώμα

1.1.5.2. Διαλυτότητα πρωτεϊνών

Η διαλυτότητα των πρωτεϊνών επηρεάζεται από πληθώρα παραγόντων. Πρωταρχικό ρόλο παίζει η οξύτητα του διαλύματος. Οι πρωτεΐνες είναι διαλυτές όταν το υδατικό διάλυμα έχει τιμή pH μικρότερη ή μεγαλύτερη του ισοηλεκτρικού Στο ισοηλεκτρικό σημείο, οι πρωτεΐνες παρουσιάζουν την ελάχιστη διαλυτότητα και γι'αυτό είναι ασταθείς. Δεύτερον, εξίσου καθοριστική είναι η ιονική ισχύς του διαλύματος. Χαμηλή ιονική ισχύς, μικρές συγκεντρώσεις ανόργανων αλάτων, αυξάνει τη διαλυτότητα των πρωτεϊνών ενώ αντίστοιχα υψηλή ιονική ισχύ την ελαττώνει. Ελάττωση της διαλυτότητας προκαλεί, επίσης, η παρουσία ουδέτερων υδατοδιαλυτών οργανικών διαλυτών όπως αιθανόλη, ακετόνη κλπ καθώς και αλκαλοειδών παραγόντων όπως πικρικό ή τριχλωρικό οξύ. Η δράση των τελευταίων οφείλεται στην ένωσή τους με τις αμινικές ομάδες του πρωτεϊνικού μορίου και τη δημιουργία αδιάλυτων πρωτεϊνικών αλάτων. Τέλος, σημαντικό παράγοντα αποτελεί η θερμοκρασία. Η θερμοκρασία μέχρι κάποιο όριο (40-50° C) προκαλεί αύξηση της διαλυτότητας, ενώ πέρα από αυτό δρα καταστροφικά στις ανώτερες δομές των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την ελάττωση της διαλυτότητάς τους και την καταβύθισή τους στο διάλυμα.

1.1.5.3 Υδροφοβικότητα

Η υδροφοβικότητα αποτελεί ιδιότητα των μορίων να «φοβούνται» το νερό, όπως φανερώνει και το όνομά της (ύδωρ + φόβος). Είναι ένα μέτρο της σχετικής τάσης μιας προσδιοριζόμενης ουσίας να προτιμά μη υδατικό περιβάλλον από υδατικό. Γενικά, η εγγενής δομή της πρωτεΐνης περιέχει τα πιο υδρόφοβα αμινοξέα στον εσωτερικό της πυρήνα, ωστόσο κάποια από αυτά συχνά εμφανίζονται στην επιφάνειά της. Ο αριθμός των υδρόφοβων αμινοξέων, η κατανομή τους και η σχετική υδροφοβικότητα είναι χαρακτηριστικά για κάθε πρωτεΐνη. Πρακτικά, τα υδρόφοβα μόρια είναι μη πολικά που αντί να μένουν εκτεθειμένα στο νερό, ομαδοποιούνται για να σχηματίσουν μικκύλια. Συχνά χρησιμοποιείται ως ισοδύναμος όρος του υδρόφοβου ο όρος λιπόφιλος. Επισημαίνεται ότι παρόλο που οι περισσότερες υδρόφοβες ουσίες είναι επίσης λιπόφιλες, οι δύο λέξεις έχουν διαφορετική σημασία.

Για τον καθορισμό της υδροφοβικότητας μιας πρωτεΐνης, είναι απαραίτητο να ποσοτικοποιηθεί η υδρόφοβη συνεισφορά κάθε αμινοξέος. Γενικά, για τις πρωτεΐνες έχει επικρατήσει πως η υδροφοβικότητα των επιφανειών τους είναι το άθροισμα των υδροφοβικοτήτων των εκτεθειμένων αμινοξέων.

1.1.6 Αποδόμηση πεπτικού δεσμού

Η αποδόμηση ενός πεπτικού δεσμού επιτυγχάνεται μέσω της διαδικασίας της υδρόλυσης και δια τούτου προϋποθέτει την ύπαρξη μορίων νερού. Ο μερικός διπλός δεσμός μεταξύ άνθρακα και αζώτου οδηγεί το άτομο άνθρακα να παράγει ένα ελαφρώς θετικό φορτίο το οποίο σε αλληλεπίδραση με τα ιόντα υδροξυλίου του νερού (OH⁻) οδηγούν στην αποδόμηση του πεπτικού δεσμού. Η αποδόμηση πεπτικού δεσμού συνιστά μια ιδιαίτερη αργή εξώθερμη αντίδραση η οποία απελευθερώνει περίπου 8-16 KJol/mole ενέργειας

1.1.7 Αποδιάταξη πρωτεϊνών (unfolding)

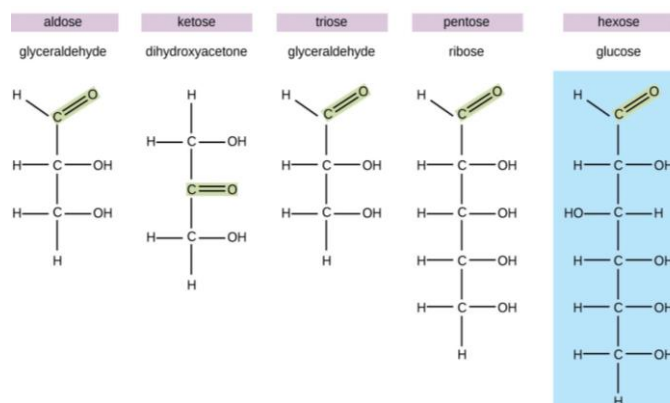
Αποδιάταξη πρωτεϊνών συμβαίνει όταν οι δυνάμεις που διατηρούν τις δευτερογενείς, τριτογενείς, τεταρτογενείς δομές των πρωτεϊνών δασπώνται από φυσικούς ή χημικούς παράγοντες ή εναλλακτικά αποδιάταξη πρωτεϊνών είναι οι μεταβολές στις βιολογικές, χημικές και φυσικές ιδιότητες μια πρωτεΐνης λόγω ήπιας διάσπασης της δομής της (P. David Eckersall, 2008). Παράγοντες που μπορούν να επιφέρουν αποδιάταξη μιας πρωτεΐνης είναι ακραίες τιμές pH (υπερβολικά όξινα ή βασικά διαλύματα), υψηλές θερμοκρασίες (υπέρβαση ενός ορισμένου ορίου), αποδιατακτικοί παράγοντες (χημικές ουσίες όπως το θειικό δωδεκυλικό νάτριο. Η αποδιάταξη μιας πρωτεΐνης συνιστά αντιστρεπτή διαδικασία. Στην περίπτωση που η αλλαγή της πρωτεϊνικής δομής είναι μη αντιστρεπτή, χρησιμοποιούμε τον όρο «μετουσίωση». Η αποδιάταξη και η μετουσίωση διαφόρων πρωτεϊνών μπορούν να μετρηθούν ποσοτικά με διάφορες βιοχημικές και βιοφυσικές παραμέτρους.

1.2. Πολυσακχαρίτες

1.2.1 Δομή Πολυσακχαριτών

1.2.1.1 Μονοσακχαρίτες

Οι μονοσακχαρίτες είναι οι απλούστεροι **υδατάνθρακες (ή σάκχαρα)**, μόρια που έχουν ως βάση τον άνθρακα και έχουν πλήθος υδροξυλομάδων. Περιγράφονται από τον γενικό τύπο $C_nH_{2n}O_n$. Ονομάζονται αλδόζες ή κετόζες με βάση αν περιέχουν αλδεϋδομάδα (CH=O) ή κετονομάδα (C=O) αντίστοιχα. Μονοσακχαρίτες με πέντε ή έξι άτομα άνθρακα υιοθετούν κυκλική δομή που προκύπτει από την ενδομοριακή αντίδραση μεταξύ ενός υδροξυλίου τους με την αλδεϋδομάδα ή την κετονομάδα τους, οπότε σχηματίζεται ημιακεταλική δομή. Η ένωση δύο ή τριών μονοσακχαριτών δίνουν δισακχαρίτες και τρισακχαρίτες αντίστοιχα.



Εικόνα 1.7 Είδη μονοσακχαριτών

1.2.1.2 Πολυσακχαρίτες

Οι πολυσακχαρίτες είναι πολυμερή τα οποία περιέχουν πάνω από δέκα μόρια μονοσακχαριτών που ενώνονται μεταξύ τους με γλυκοσιδικό δεσμό. Διακρίνονται σε ομογενείς και σε ετερογενείς ανάλογα αν αποτελούνται μόνον από ιδίους μονοσακχαρίτες ή αν περιέχουν διαφορετικούς μονοσακχαρίτες ή και παράγωγα μονοσακχαριτών, αντίστοιχα. Η μορφή των πολυσακχαριτών ποικίλει με βάση το ποιοι μονοσακχαρίτες και ποιοι άνθρακες στους μονοσακχαρίτες ενώνονται. Ένα μόριο με ευθυγραμμισμένη αλυσίδα μονοσακχαριτών ονομάζεται γραμμικός πολυσακχαρίτης, ενώ αν η αλυσίδα σχηματίζει στροφές και παρακλάδια, ονομάζεται διακλαδισμένος πολυσακχαρίτης.

1.2.1.3. Γλυκοσιδικός δεσμός

Ο δεσμός ανάμεσα σε δύο μονοσακχαρίτες σχηματίζεται όταν από τον ένα χάνεται μία υδροξυλική ομάδα του άνθρακα κα από τον άλλο ένα υδρογόνο μιας υδροξυλικής ομάδας. Ο άνθρακας στο πρώτο μόριο θα αξιοποιήσει το οξυγόνο του δεύτερου σαν δικό του και θα σχηματιστεί γλυκοσιδικός δεσμός. Αυτό το είδος αντίδρασης ονομάζεται και αντίδραση συμπύκνωσης καθώς κατά το σχηματισμό του δεσμού χάνονται δύο άτομα υδρογόνου και ένα οξυγόνο που συνιστούν ένα μόριο νερού.

1. 2.2. Λειτουργίες πολυσακχαριτών

Οι πολυσακχαρίτες συμβάλλουν σε ένα εύρος λειτουργιών στη φύση με επικρατέστερες την αποθήκευση ενέργειας, την κυτταρική σηματοδότηση και την παροχή στήριξης σε κύτταρα και ιστούς.

1.2.2.1 Αποθήκευση ενέργειας

Τα ένζυμα που παράγουν ενέργεια δρουν στους μονοσακχαρίτες. Οι πολυσακχαρίτες με την ικανότητά τους να διπλώνονται, μπορούν να περικλείουν πολλούς μονοσακχαρίτες σε μια πυκνή περιοχή. Επιπρόσθετα, οι πλευρικές αλυσίδες των μονοσακχαριτών σχηματίζουν όσο περισσότερους υδρογονικούς δεσμούς είναι εφικτό μεταξύ τους αποτρέποντας έτσι το νερό να εισχωρεί στα μόρια το οποία αποκτούν υδροφοβικό χαρακτήρα. Αυτή η ιδιότητα επιτρέπει στα μόρια να παραμένουν ενωμένα χωρίς να διαλύονται στην κυτοσόλη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μειώνεται η συγκέντρωση σακχάρου στο κύτταρο και να αυξάνεται εκείνη που μπορεί να ληφθεί. Οι πολυσακχαρίτες, λοιπόν, όχι μόνο αποθηκεύουν ενέργεια, αλλά επιτρέπουν και αλλαγές στη βαθμίδα συγκέντρωσης η οποία μπορεί να επηρεάσει την κυτταρική πρόσληψη θρεπτικών συστατικών και νερού.

1.2.2.2. Κυτταρική σηματοδότηση

Οι πολυσακχαρίτες μπορούν να ενωθούν ομοιοπολικά με πρωτεΐνες και λιπίδια. Τα γλυκολιπίδια και οι γλυκοπρωτεΐνες που σχηματίζονται, δύνανται να μεταφέρουν σήματα μεταξύ και εντός των κυττάρων. Οι πολυσακχαρίτες μπορούν να συμβάλλουν στην πρόσδεση της πρωτεΐνης ή άλλων ουσιών σε μικροσωληνίσκους. Το σύστημα των μικροσωληνίσκων και των πρωτεϊνών εντός των κυττάρων μπορούν να μεταφέρουν οποιαδήποτε ουσία στην περιοχή που προορίζεται εφόσον εκείνη σημανθεί πρώτα από κατάλληλους πολυσακχαρίτες. Τέλος, οι πολυσακχαρίτες βοηθούν στην ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος στους πολυκύτταρους οργανισμούς.

1.2.2.3. Δομική στήριξη

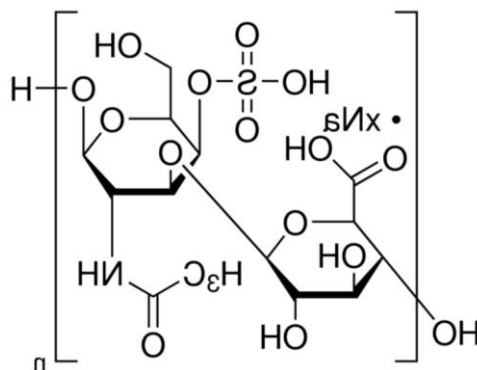
Κάθε φυτό στη γη στηρίζεται με τη βοήθεια του πολυσακχαρίτη κυτταρίνη. Άλλοι οργανισμοί όπως έντομα και μύκητες χρησιμοποιούν τον πολυσακχαρίτη κυτίνη για να στηρίξουν τον εξωκυτταρικό τους σκελετό. Ένας πολυσακχαρίτης μπορεί να αναμειχθεί με οποιοδήποτε άλλο συστατικό και να σχηματίσει ιστούς που είναι περισσότερο ή λιγότερο άκαμπτοι ή ακόμα και υλικά με ξεχωριστές ιδιότητες. Από το ξύλο των δέντρων μέχρι τα κελύφη ζώων, τα πάντα παράγονται από κάποιο είδος πολυσακχαρίτη.

1.2.3. Ιδιότητα σχηματισμού γέλης

Πολλοί πολυσακχαρίτες χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να σχηματίζουν γέλες (τζελ), δηλαδή στερεά τρισδιάστατα συγκροτήματα μακρομορίων, τα οποία συγκρατούν τη υγρή φάση μέσα στο πλέγμα τους. Ο σχηματισμός γέλης σε ένα διάλυμα είναι, κατά μία έννοια, η μετάβαση από την αταξία σε μια μορφή τάξης, η οποία δημιουργείται από τη μερική σύνδεση αλυσίδων ή τμημάτων από αλυσίδες. Όσο περισσότερο συνδέονται οι αλυσίδες ή τα τμήματα των αλυσίδων, τόσο πιο σταθερή είναι η γέλη. Αν η οργάνωση γίνει πολύ μεγάλη, η δομή προσομοιάζει με ίζημα. Ο σχηματισμός γέλης είναι αναστρέψιμος επειδή οι δεσμοί μεταξύ πολυμερών είναι ασθενείς.

1.2.4 Χονδροϊτίνη

Η χονδροϊτίνη (chondroitin sulfate) συνιστά ένα υδατοδιαλυτό πολυμερές που αποτελείται από αλυσίδες εναλασσόμενων σακχάρων. Οι αλυσίδες της είναι μη διακλαδισμένοι (γραμμικοί) πολυσακχαρίτες ποικίλων μηκών που περιέχουν δύο μονοσακχαρίτες που εναλλάσσονται: D-γλυκουρονικό οξύ και N-ακετο-γαλακτοσαμίνη. Ο κάθε μονοσακχαρίτης μπορεί να θειωθεί σε διάφορες θέσεις. Απαντάται στη θέση ασβεστοποίησης τους οστού, συνιστά σημαντικό δομικό στοιχείων του χόνδρου και εξάγεται κυρίως από γουρούνια, βοειδή, κότες και καρχαρίες. Πρακτικά συμβάλλει στην απορρόφηση νερού στους ιστούς του χόνδρου ενισχύοντας την ικανότητα αντίστασης του στη συμπίεση.



Εικόνα 1.8 Δομή Χονδροϊτίνης

Έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει την καταστροφή του χόνδρου και ενισχύει το μεταβολισμό χονδροκυττάρων επιφέροντας τη σύνθεση περισσότερου κολλαγόνου. (Ming-Yeah Hu, Syam Nukavarapu, 2019). Παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην πρόληψη και την αντιμετώπιση καρδιαγγειακών ασθενειών ενώ αξιοποιείται και ενάντια σε νευροπαθητικούς πόνους. Η χονδροϊτίνη από καρχαρία έχει αποδειχθεί ότι διαθέτει αντικαρκινικές ιδιότητες.

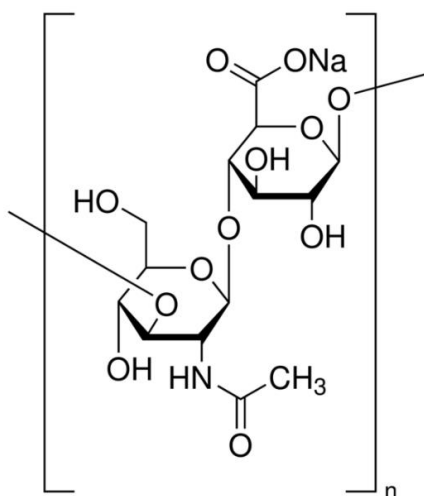
Έχει μελετηθεί επίσης για την ανάπτυξη φαρμάκων μέσω του σχηματισμού νανοσυζεύξεων από τις οποίες το υδρόφοβο μέρος διασπάται και απελευθερώνεται σε συγκεκριμένες θέσεις. Η σύζευξη φαρμάκου με θεική χονδροϊτίνη μπορεί επίσης να βελτιώσει τη διαλυτότητα ενός υδρόφοβου φαρμάκου.

Αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα το γεγονός ότι δεν έχουν αναφερθεί κάποιου είδους παρενέργειες από χρήση υψηλών δοσολογιών θεικής χονδροϊτίνης. Μάλιστα, το 2003 η ομάδα εργασίας της Ευρωπαϊκής Ένωσης κατά των ρευματισμών (EULAR) κατέταξε το επίπεδο τοξικότητάς της στην τιμή 6 σε μια κλίμακα από 0 έως 100.

1.2.5 Υαλουρονικό οξύ

Το υαλουρονικό οξύ (hyaluronic acid) είναι μια μη θεική γλυκοσαμινογλυκάνη που απαντάται σε όλα τα σπονδυλωτά. Πρόκειται για ένα ανιονικό πολυμερές, γραμμικό δισακχαρίτη, που βρίσκεται

κυρίως σε συνδεδετικούς, νευρικούς και επιθηλιακούς ιστούς παίζοντας σημαντικό ρόλο στη λίπανση, την κυτταρική διαφοροποίηση και την κυτταρική ανάπτυξη. Γενικά, ρυθμίζει τις ιδιότητες του δέρματος όπως την περιεκτικότητα νερού, την ελαστικότητα και την κατανομή θρεπτικών συστατικών.

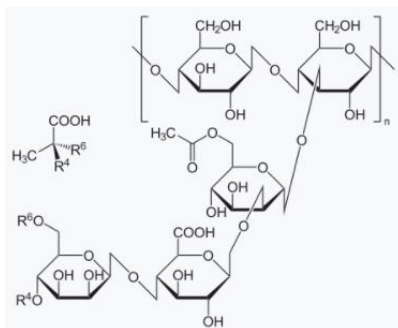


Εικόνα 1.9 Δομή Υαλουρονικού Οξέος (υπό μορφή άλατος Νατρίου)

Το υαλουρονικό οξύ χρησιμοποιείται επίσης στην μηχανική ιστών ως βιοϋλικό ικρίωμα λόγω της υψηλής βιοσυμβατότητας και άφθονης παρουσίας του στην εξωκυτταρική μήτρα των ιστών. Ωστόσο, οι ανεπαρκείς μηχανικές του ιδιότητες καθιστούν απαραίτητη τη χημική τροποποίησή του ή την προσθήκη άλλων βιολογικών για την ανάπτυξη σταθερών και ανθεκτικών ικρωμάτων.

1.2.6 Ξανθάνη (Xanthan Gum)

Η ξανθάνη είναι ένας πολυσακχαρίτης υψηλής μοριακής μάζας που εκκρίνεται από το φυτό *Xanthomonas campestris* και συνήθως παράγεται με ζύμωση (Sworn, 2009). Είναι ένας ανιονικός πολυηλεκτρολύτης με τρισακχαριδικές πλευρικές αλυσίδες ενσωματωμένες σε κυτταρίνη. Το φορτίο της προέρχεται από τις ομάδες μανόζης των πλευρικών ομάδων. Κατέχει διαδεδομένη χρήση στην τροφική βιομηχανία λόγω της ικανότητας της να ρυθμίζει το ιξώδες και της ασφάλειας της σε απεριόριστη κατανάλωση. Σε υδατικά διαλύματα, σχηματίζει ιξωδοελαστικά υγρά και μπορεί να μετατραπεί σε κολλοειδές υγρό κατά την αλληλεπίδραση με φορτισμένες ουσίες όπως κατιονικές επιφανειοδραστικές ουσίες.



Εικόνα 1.10 Δομή Ξανθάνη

1.3. Νανοσωματίδια από πρωτεΐνες

1.3.1 Ορισμός νανοσωματιδίου

Ως νανοσωματίδιο ορίζεται ένα σωματίδιο το οποίο έχει μήκος σε τουλάχιστον μία από τις τρεις διαστάσεις του μεγαλύτερο από 1 nm και μικρότερο από 100nm (Borm et al.,2006).

1.3.2 Ιδιότητες νανοσωματιδίων

Οι φυσικές και χημικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων διαφέρουν από τις αντίστοιχες των υλικών τους σε μακροκλίμακα. Αυτό ευθύνεται αρχικά στην αύξηση των λόγων του εμβαδού ως προς τον όγκο τους και δεύτερον στο μέγεθός τους. Καθώς το μέγεθος του σωματιδίου ελαττώνεται, η σχετική αναλογία των ατόμων της επιφάνειας ως προς τα άτομα του εσωτερικού μεγαλώνει. Επομένως τα επιφανειακά φαινόμενα αρχίζουν να κυριαρχούν και κατ' επέκταση να ευνοούνται οι αλληλεπιδράσεις με άλλα άτομα κάνοντας τα νανοσωματίδια ιδιαίτερα ενεργά χημικά και οπτικά. Για εξαιρετικά μικρά σώματα, κάνουν την εμφάνισή τους και κβαντικά φαινόμενα.

1.3.3 Πρωτεϊνικά νανοσωματίδια

Τα νανοσωματίδια από πρωτεΐνες έχουν πλατύ εύρος εφαρμογών που κυμαίνεται από μεταφορά φαρμάκων και εμβολίων μέχρι βιοκαταλύτες και βιοαισθητήρες. Η μορφολογία και το μέγεθος των νανοσωματιδίων παίζουν καθοριστικό ρόλο στην καταλληλότητά τους για τις διάφορες εφαρμογές. Για παράδειγμα όσον αφορά τη μεταφορά φαρμάκων, μια μείωση στο μέγεθος συχνά επιφέρει αυξημένη πρόσληψη κυττάρων. Στον αντίποδα, σχετικά μεγάλα σωματίδια ευνοούν μη-ιατρικές εφαρμογές όπως η κατάσχεση του διοξειδίου του άνθρακα εξαιτίας του χαμηλότερου κόστους και της γρήγορης ανάκτησης των σωματιδίων μετά από αντίδραση. Ωστόσο ο αποτελεσματικός έλεγχος του μεγέθους τους αποτελεί ακόμα σημαντική πρόκληση στην κατασκευή τους.

1.3.3.1 Πλεονεκτήματα για βιοϊατρικές εφαρμογές

Τα νανοσωματίδια από πρωτεΐνες μπορούν να ενθυλακώσουν φάρμακα για την αντιμετώπιση ασθενειών επιφέροντας ενισχυμένη θεραπευτική αποτελεσματικότητα. Αρχικά, μπορούν να βελτιώσουν τη διαλυτότητα των υδρόφοβων φαρμάκων και να ενθυλακώσουν υδατοδιαλυτά φάρμακα που υπό άλλες συνθήκες δεν θα «προλάβαιναν» να φτάσουν στη στοχευμένη θέση. Δεύτερον, έχουν την δυνατότητα όχι μόνο να ανιχνεύουν το επιθυμητό όργανο-στόχο αλλά και να απελευθερώνουν το φάρμακο εφόσον έχουν φτάσει στην περιοχή όπου προορίζονται. Μάλιστα, μπορούν να πετύχουν ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκου για παρατεταμένη περίοδο.

Ιδιαίτερα, στην περίπτωση του καρκίνου, τα νανοσωματίδια δύνανται να συσσωρευτούν αποκλειστικά στην περιοχή του όγκου λόγω του φαινομένου αυξημένης διαπερατότητας και συγκράτησης (epf effect) κατά το οποίο μόρια συγκεκριμένου μεγέθους (λιπίδια, νανοσωματίδια) τείνουν να συγκεντρώνονται περισσότερο σε καρκινικούς ιστούς από ότι σε κανονικούς. Επιπρόσθετα, κατά τη θεραπεία καρκινικών κυττάρων, ο οργανισμός αναπτύσσει αμυντικούς μηχανισμούς όπως ενισχυμένη εκροή φαρμάκου, επισκευή του DNA του πυρήνα και τροποποιήσεις στο μεταβολισμό φαρμάκων, οι οποίοι περιορίζουν σημαντικά την κλινική αποτελεσματικότητα των χημειοθεραπειών. Αναδύεται, κατά συνέπεια, η ανάγκη χορήγησης υψηλών δόσεων φαρμάκων ώστε να φτάνει εν τέλει ικανοποιητική ποσότητα στον ασθενικό ιστό. Τα νανοσωματίδια παρέχουν την ικανότητα όχι μόνο να αποθηκεύουν μεγάλες ποσότητες φαρμάκου αλλά και να χορηγούνται δια του στόματος ή με εισπνευστήρα. Αξίζει να σημειωθεί πως η αύξηση της ποσότητας των φαρμακευτικών δόσεων, χωρίς το πλεονέκτημα της στοχοποιημένης θεραπείας των νανοφορέων, καταστρέφει και τους υγιείς ιστούς επιφέροντας παρενέργειες όπως ναυτία, απώλεια μαλλιών, κόπωση, στειρότητα και καταστροφές οργάνων. Τέλος, τα ενθυλακωμένα φάρμακα παρουσιάζουν ελάχιστη τοξικότητα

σε σχέση με τα συμβατικά. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων περιορίζουν σημαντικά τις παρενέργειες και βελτιώνουν την αποτελεσματικότητα των φαρμάκων χωρίς να χρειάζεται απαραίτητα αύξηση της ποσότητας ή της συχνότητάς τους.

1.3.4. Τρόποι κατασκευής

Υπάρχουν ποικίλοι τρόποι κατασκευής νανοσωματιδίων από πρωτεΐνες. Παρακάτω θα αναλυθούν οι πιο διαδεδομένοι.

1.3.4.1. Αποδιαλυτοποίηση (*desolvation*)

Αυτή η μέθοδος βασίζεται κυρίως στην αρχή του διαχωρισμού φάσης με τη χρήση διαλυτών όπως ακετόνη, αιθανόλη ή διάλυμα αλατιού. Οι διαλύτες αυτοί μειώνουν το επίπεδο ενυδάτωσης και τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης σε υδατικό διάλυμα μέσω αλλαγών στη διαμόρφωση, επιφέροντας σχηματισμό νανοσωματιδίων. Έπειτα προστίθενται σταυροδεσμοί για περαιτέρω σταθεροποίηση. Για τη δημιουργία μικρών νανοσωματιδίων, το pH είναι σημαντικό να απέχει από την τιμή του ισοηλεκτρικού σημείου. Μείωση μεγέθους μπορεί να επέλθει και από την αύξηση των σταυροδεσμών.

Μειονέκτημα αυτής της μεθόδου μπορεί να αποτελέσει η πρωτεϊνική μετουσίωση κατά τη διαδικασία κατασκευής. Μετουσιωμένες πρωτεΐνες ενδέχεται να έχουν αρνητικές αλληλεπιδράσεις με υποδοχείς-στόχους ή με την κυκλοφορία του αίματος, εμποδίζοντας την περαιτέρω εφαρμογή τους.

1.3.4.2. Αυτοοργάνωση (*self-assembly*)

Η διαδικασία της αυτοοργάνωσης περιλαμβάνει την αυθόρμητη οργάνωση μικρότερων υπομονάδων σε μεγαλύτερες, οργανωμένες διατάξεις. Η παραγωγή νανοσωματιδίων προκύπτει από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των σωματιδίων σε ένα διάλυμα τα οποία επιδιώκουν θερμοδυναμική ισορροπία και μείωση της ελεύθερης ενέργειας του συστήματος. Τα νανοσωματίδια πρακτικά αυτοοργανώνονται μέσω των διαμοριακών δυνάμεων ανάμεσα στις πρωτεΐνες. Ειδική περίπτωση της αυτοοργάνωσης συνιστά η ηλεκτροστατική σύμπλεξη.

1.3.4.2.1 Ηλεκτροστατική σύμπλεξη μέσω πολυσακχαριτών

Οι πρωτεΐνες και οι πολυσακχαρίτες μπορούν να συνδεθούν μεταξύ τους όταν έχουν αντίθετο ηλεκτρικό φορτίο, για παράδειγμα ένας ανιονικός πολυσακχαρίτης με μια θετικά φορτισμένη πρωτεΐνη (Norton and Frith 2001; Tolstoguzov 2003, 2006). Το μέγεθος των σύμπλοκων που προκύπτουν εξαρτάται από τις αναλογίες πολυσακχαρίτη και πρωτεΐνης που αναμειγνύονται καθώς και από την ιοντική δύναμη που αναπτύσσεται. Στην κατανομή του μεγέθους επηρεάζουν επίσης τόσο οι συνθήκες του διαλύματος όπως pH και θερμοκρασία καθώς και ο τρόπος παρασκευής όπως η σειρά ανάμειξης και η ανακίνηση του διαλύματος. Το pH κατέχει καθοριστικό ρόλο διότι η μεταβολή του προκαλεί έντονη μεταβολή στο φορτίο της πρωτεΐνης.

Οι διάφορες μέθοδοι παρασκευής μπορούν να επιφέρουν διαφορές στην αποτελεσματικότητα φόρτωσης φαρμάκου, στον τρόπο απελευθέρωσης φαρμάκου, στο μέγεθος και τη σταθερότητα των σωματιδίων. Με τον έλεγχο διάφορων παραμέτρων όπως για παράδειγμα του διαλύτη, του pH, της θερμοκρασίας, της συγκέντρωσης του πρωτεϊνικού διαλύματος, του ρυθμού πρόσθεσης διαλύτη και της ποσότητας σταυροδεσμών, μπορούν ως ένα βαθμό να τροποποιηθούν τα τελικά σωματίδια. Ωστόσο, απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή ώστε η μεταβολή των συνθηκών του διαλύματος να μην επηρεάζει τη λειτουργικότητα των τελικών σωματιδίων.

1.3.4.3. Γαλακτωματοποίηση (Emulsification)

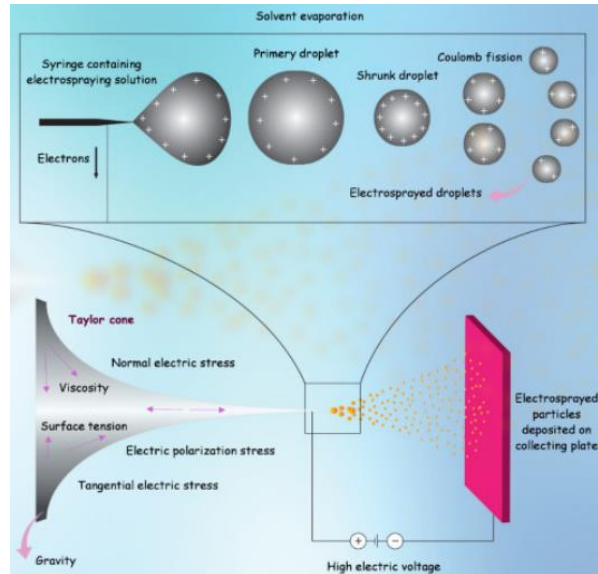
Τα γαλακτώματα είναι μείγματα δύο ή περισσότερων μη αναμίξιμων υγρών στα οποία ένα ή περισσότερα υγρά διαδίδονται σε άλλο υγρό. Εκείνα που χρησιμοποιούνται συνήθως για φαρμακευτικές εφαρμογές είναι γαλακτώματα όπως νερό σε λάδι, λάδι σε νερό ή λάδι σε νερό σε λάδι. Σωματίδια μπορούν να δημιουργηθούν κονιορτοποιώντας ένα γαλάκτωμα σε ρεύμα θερμού αέρα υπό έντονη εξάτμιση διαλύτη. Συνήθως αξιοποιείται ηλεκτροσπρί που είναι μια ροή συνεχούς υγρού και πίεσης που χορηγείται συνήθως μέσω μιας βελόνας σε ένα υψηλό ηλεκτρικό πεδίο δημιουργώντας λεπτά σταγονίδια. Πολλές φορές γίνεται χρήση υπερηχητικής διάτμησης ή ομογενοποίησης υψηλής ταχύτητας. Στη συνέχεια, η μη υδατική οργανική ή ελαιώδης φάση στο γαλάκτωμα μπορεί να απομακρυνθεί με εξάτμιση ή εξαγωγή.

Τα γαλακτώματα είναι συνήθως θερμοδυναμικά ασταθή και δια τούτου επιφανειοδραστικές ουσίες και σταθεροποιητές είναι απαραίτητοι για τη σταθεροποίηση των σταγονιδίων του γαλακτώματος. Οι πρωτεΐνες στο υδατικό διάλυμα μπορούν να παίζουν το ρόλο των σταθεροποιητών.

1.3.4.4. Ηλεκτροψεκασμός (electrospraying)

Ο Ηλεκτροψεκασμός πηγάζει από τον ψεκασμό φορτισμένων πολυμερικών σταγονιδίων μέσω κατάλληλων ηλεκτρικών δυνάμεων. Αυτή η προσέγγιση χρησιμοποιεί ένα υψηλό ηλεκτρικό πεδίο για να αποσπάσει φορτισμένα σωματίδια από ένα πολυμερικό διάλυμα σε προκαθορισμένη ταχύτητα. Σύμπλοκα κατασκευάζονται αν εφαρμοστεί και διαδικασία εξάτμισης διαλύτη.

Η συμβατική διαμόρφωση μια συσκευής ηλεκτροψεκασμού αποτελείται από τέσσερα συστατικά: μία παροχή ηλεκτρικού ρεύματος με υψηλή τάση, ένα μεταλλικό τριχοειδές ακροφύσιο, ένα σύστημα άντλησης και έναν γειωμένο μεταλλικό συλλέκτη. Αρχικά, μεταφέρουμε με μια σύριγγα εφοδιασμένη με το μεταλλικό τριχοειδές ακροφύσιο πολυμερικό διάλυμα και το ψεκάζουμε σε μια επιθυμητή ταχύτητα συνήθως με το σύστημα άντλησης, Το μεταλλικό ακροφύσιο, συνδεδεμένο σε ένα υψηλό ηλεκτρικό πεδίο (θετικά φορτισμένο), και η πλάκα συλλογής, συνήθως γειωμένη ή αρνητικά φορτισμένη, τοποθετούνται σε κατάλληλη απόσταση μερικών εκατοστών από το ακροφύσιο. Το υψηλό δυναμικό παράγει ηλεκτροστατικές δυνάμεις κατά μήκος της σταγόνας οι οποίες ανταγωνίζονται με την τάση στην επιφάνεια της σταγόνας παράγοντας μια κωνική μορφολογία (κώνος Taylor), χαρακτηριστική μιας φορτισμένης σταγόνας. Συνεπώς, οι θετικά φορτισμένες σταγόνες που αποσπώνται από την άκρη του ακροφυσίου κατευθύνονται προς το γειωμένο συλλέκτη. Ο διαλύτης από τα φορτισμένα σωματίδια εξατμίζεται δημιουργώντας μικρότερες δομές υψηλότερου φορτίου έως ότου οι ηλεκτροστατικές απωστικές δυνάμεις εντός της σταγόνας υπερνικήσουν την επιφανειακή τάση οδηγώντας τελικά σε διάσπαση (σχάση Coulomb) σε πληθώρα σταγονιδίων μικρότερου φορτίου και μεγέθους. Η παρουσία ηλεκτροστατικών απωστικών δυνάμεων Coulomb ανάμεσα στα παραγόμενα σταγονίδια επιφέρει καλή κατανομή. Τα νέα σωματίδια θα υποστούν με τη σειρά τους διαδοχική διάλυση μέχρι την κατασκευή νανοσωματιδίων που θα διαθέτουν περίπου ένα θετικό φορτίο.



Εικόνα 1.11 Σχηματική απεικόνιση της σχάσης Coulomb κατά τη διαδικασία ηλεκτροψεκασμού.

1.3.5. Συμπεριφορά νανοσωματιδίων σε υδατικό διάλυμα

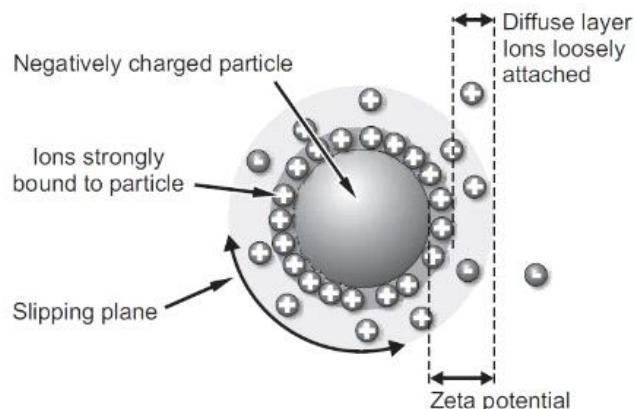
1.3.5.1. ζ-δυναμικό

Τα περισσότερα υγρά περιέχουν ιόντα, θετικά και αρνητικά, τα οποία αλληλεπιδρούν με την επιφάνεια των νανοσωματιδίων, η οποία είναι πιθανό να απορροφήσει κάποια από αυτά. Αν απορροφηθούν περισσότερα κατιόντα από ανιόντα, τότε σχηματίζεται θετικό ηλεκτρικό φορτίο. Λόγω της ανάπτυξης ηλεκτρικών φορτίων στην επιφάνειά τους, αποτρέπεται η προσέγγιση και η συσσωμάτωσή τους με αποτέλεσμα να μην αποκτούν μέγεθος ικανό για καθίζηση. Τα σωματίδια αυτά ονομάζονται κolloειδή (colloids).

Το φορτίο στην επιφάνεια των κolloειδών κατανέμεται σε δύο στρώματα από κυρίως αντίθετα φορτισμένα ιόντα (counter ions). Μία σταθερή κοντά στην επιφάνειά τους και μία διάχυτη η οποία εκτείνεται ως σύννεφο γύρω από το σωματίδιο. Οι δύο αυτές στρώματα μαζί αποτελούν τη λεγόμενη διπλή στρώματα. Κατά την κίνηση του κolloειδούς στο διάλυμα, κινείται παράλληλα τόσο η σταθερή στρώματα όσο και ένα μέρος της διάχυτης. Το ηλεκτρικό δυναμικό που δημιουργείται στο επίπεδο διάτμησης της διάχυτης στρώματος κατά την κίνηση του σωματιδίου ονομάζεται ζ-δυναμικό ή ζ-potential και δίνεται από τη σχέση :

$$\zeta = \frac{4 \pi \eta \mu}{\varepsilon}$$

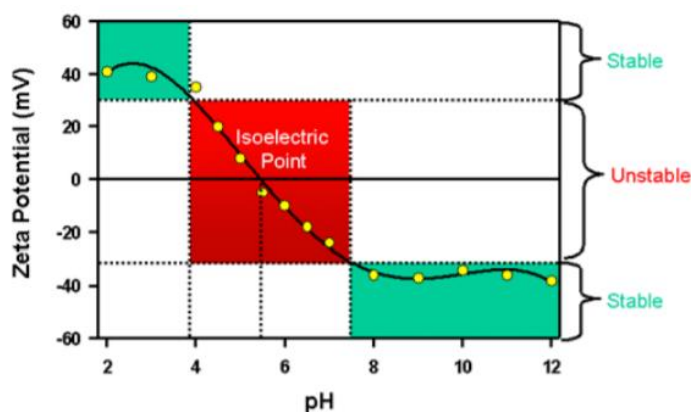
όπου q = φορτίο ανά μονάδα επιφάνειας, d = πάχος στρώματος που περιβάλλει τη διατμητική επιφάνεια, ε = διηλεκτρική σταθερά του υγρού.



Εικόνα 1.12 Επεξήγηση ζ-δυναμικού ενός σωματιδίου

Το ζ-δυναμικό συνιστά μέγεθος καθορισμού της σταθερότητας του εναιωρήματος καθώς αντικατοπτρίζει την ικανότητα των σωματιδίων να απωθούν το ένα το άλλο ηλεκτροστατικά. Αύξηση στο ζ δυναμικό προκαλεί αύξηση στις απωθητικές ενέργειες, μειώνοντας ή ακόμη και προλαμβάνοντας συσσώρευση. Το ζ-δυναμικό μπορεί να πάρει τόσο θετικές όσο και αρνητικές τιμές. Όσο μεγαλύτερο κατ' απόλυτη τιμή είναι το ζ-δυναμικό, τόσο πιο σταθερό είναι το κolloειδές. Αντίθετα, όταν το ζ-δυναμικό πλησιάζει στο μηδέν, ευνοείται η αποσταθεροποίηση του κolloειδούς.

Η τιμή του ζ-δυναμικού επηρεάζεται έντονα από δύο παράγοντες. Ο πρώτος είναι η τιμή του pH καθώς μεταβολή στο pH, επηρεάζει μέσω των αντιδράσεων υδατικής ισορροπίας τα σταθερά φορτία στην επιφάνεια του κolloειδούς. Στο ισοηλεκτρικό σημείο, το ζ δυναμικό της επιφάνειας του σωματιδίου έχει μηδενική τιμή. Ο δεύτερος είναι η ιοντική ισχύς του διαλύματος, που καθορίζεται από τις επιμέρους συγκεντρώσεις ιόντων στο διάλυμα. Όταν η συγκέντρωση είναι μεγάλη, υπάρχουν πολλά ιόντα αντίθετα φορτισμένα και έτσι δε χρειάζεται η διάχυτη στοιβάδα να επεκτείνεται πολύ.



Εικόνα 1.13 Καμπύλη ζ-δυναμικού συναρτήσει του Ph όπου σημειώνονται οι περιοχές που η κατανομή θεωρείται σταθερή

1.3.5.2 Κίνηση Μπράουν

Τα κolloειδή εντός του διαλύματος υλοποιούν κίνηση Μπράουν. Κίνηση Μπράουν (Brownian motion) είναι η τυχαία, ανεξέλεγκτη κίνηση των σωματιδίων σε ένα υγρό καθώς συγκρούονται συνεχώς με άλλα μόρια (Mitchell and Kogure, 2006). Η κίνηση αυτή παρατηρείται πιο έντονη, δηλαδή τα σωματίδια κινούνται με μεγαλύτερες ταχύτητες, σε λιγότερο ιξώδη υγρά, για σωματίδια

μικρότερου μεγέθους και για μεγαλύτερες θερμοκρασίες. Η κίνηση Μπράουν θεωρείται μια διαδικασία διάχυσης της οποίας η σταθερά διάχυσης D εκφράζεται μέσω της εξίσωσης **Stokes-Einstein**:

$$D = \frac{k_B \cdot T}{6\pi \cdot R_H \cdot \eta}$$

όπου k_B : η σταθερά Boltzman, η : το ιξώδες του διαλύματος, T : η θερμοκρασία, R_H : υδροδυναμική ακτίνα

Από την παραπάνω σχέση εξάγουμε την εξής σχέση για την υδροδυναμική ακτίνα: $R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D}$ η οποία αντιπροσωπεύει την ακτίνα που θα είχε το σωματίδιο αν ήταν σφαιρικό και είχε τον συγκεκριμένο συντελεστή διάχυσης.

1.3.5.3. Θερμική κατεργασία

Η θερμική κατεργασία περιλαμβάνει θέρμανση διαλυμάτων σε ορισμένη θερμοκρασία και διάρκεια με χρήση φούρνου, μαγνητικού αναδευτήρα ή άλλων μέσων. Πρόσφατα πειράματα έχουν δείξει ότι η μέθοδος της θερμικής κατεργασίας σε σύμπλοκα πρωτεϊνών-πολυσακχαριτών ενισχύει τη σταθερότητά τους έναντι της αποσύνθεσης σε ουδέτερο και υψηλό pH (Paragiannopoulos, Vlasi & Radulescu, 2019). Συγκεκριμένα, αύξηση της θερμοκρασίας του διαλύματος επιφέρει αύξηση στη μοριακή μάζα των νανοσωματιδίων καθώς σφαιρίδια σχηματίζουν δυσουλφιδικές γέφυρες ενισχύοντας τη σταθερότητα των συμπλόκων. Χωρίς θερμική κατεργασία τα σύμπλοκα σε υψηλό pH θα αποσυντίθονταν.

4. Κουρκουμίνη

1.4.1. Κουρκουμάς

Ο κουρκουμάς ή *Curcuma longa* (Κουρκούμη η μακρά), αποτελεί βότανο και συγκεκριμένα ιθαγενές φυτό της τροπικής Νότιας Ασίας. Ευδοκιμεί σε μέσες θερμοκρασίες 20-30° C και σε περιοχές με αρκετή ετήσια βροχόπτωση. Το φυτό φτάνει σε ύψος 1 m, έχει μακριά επιμήκη λογχοειδή φύλλα και εμφανίζει άνθη στο επάνω μέρος του. Μια χημική ουσία κίτρινου χρώματος που ονομάζεται κουρκουμίνη κάνει τις ρίζες του κιτρινο-καφεοειδείς εξωτερικά ενώ στο εσωτερικό τους σκούρο πορτοκαλί. Οι ρίζες του φυτού αξιοποιούνται όχι μόνο για εκ νέου καλλιέργεια αλλά και για ποικίλες άλλες εφαρμογές με τη μετατροπή τους σε σκόνη.

1.4.2. Ιδιότητες σκόνης

Η παραγόμενη σκόνη έχει ιδιότητες βαφικές και αρωματικές. Οι χρωματικές της ιδιότητες διατηρούνται για πάντα ενώ οι αρωματικές φθίνουν με το πέρασμα του χρόνου. Προστασία από την έκθεση στον ήλιο, καθυστερεί την αλλοίωση που επέρχεται με το χρόνο. Χάρη στο συστατικό κουρκουμίνη, η σκόνη διαθέτει επιπλέον φαρμακευτικές ιδιότητες οι οποίες επεκτείνονται σε αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, νευροπροστατευτικές, αντιμικροβιακές και αντικαρκινικές. Επισημαίνεται η ασήμαντη τοξικότητά της ακόμα και κατά τη χορήγησή της σε υψηλές δόσεις (12mg ημερησίως). Πρόκειται για και λιποδιαλυτή ουσία και δυσδιάλυτη στο νερό.

1.4.3. Χρήσεις

Ο κουρκουμάς έχει μια ευρεία ποικιλία εφαρμογών. Αρχικά χρησιμοποιείται ως μπαχαρικό, κυρίως στην ασιατική κουζίνα. Έχει ζεστή, πικρή γεύση και χρησιμοποιείται συχνά για να δώσει γεύση και χρώμα σε σκόνες κάρυ, μουστάρδα, βούτυρα και τυριά. Δεύτερον χρησιμοποιείται ως χρωστική για τη βαφή της μετάξης και του ερίου. Αξιοποιείται επίσης για αιώνες ως φάρμακο στην παραδοσιακή

ιατρική Ασιατικών χωρών όπως της Ινδίας. Τα τελευταία χρόνια η χρήση της έχει αυξηθεί σημαντικά στην ιατρική όχι μόνο ασιατικών χωρών.

1.4.3.1 Φαρμακευτική χρήση

Η κουρκουμίνη είναι εξίσου δραστική με τις ουσίες που περιέχουν συμβατικά παυσίπονα όπως η παρακεταμόλη και η ιβουπροφαίνη. Πλεονεκτεί με την ελάχιστη τοξικότητά της και με το γεγονός πως δεν προκαλεί στομαχικές και γαστρικές παρενέργειες.

Η κουρκουμίνη με τις ισχυρές αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές της, και την ικανότητά της να καταπολεμά μια φλεγμονή σε μοριακά επίπεδο, φτάνει την αποτελεσματικότητα ορισμένων αντιφλεγμονωδών φαρμάκων. Σημαντικές χρόνιες ασθένειες όπως οι καρδιακές, ο καρκίνος, το μεταβολικό σύνδρομο, το Αλτσχάιμερ κ.α. έχουν να κάνουν με χρόνιες φλεγμονές χαμηλού επιπέδου. Επομένως η κουρκουμίνη αξιοποιείται για την πρόληψη και την θεραπεία αυτών των ασθενειών .

Επιπρόσθετα, χρησιμοποιείται ως αντιοξειδωτικό διότι χάρη στη χημική της δομή, μπορεί να εξουδετερώσει τις ελεύθερες ρίζες του οργανισμού οι οποίες σχετίζονται με τη γήρανση και την εκδήλωση πολλών ασθενειών. Παράλληλα διεγείρει και τους φυσικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, δηλαδή τα αντιοξειδωτικά ένζυμα που έχει ο οργανισμός από μόνος του.

Ασθένειες όπως η κατάθλιψη και το αλτσχάιμερ συνδέονται με μειωμένα επίπεδα της ορμόνης BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) στον εγκέφαλο. Έχει αποδειχθεί πως η κουρκουμίνη μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα αυτής της ορμόνης έχοντας ως αποτέλεσμα την καθυστέρηση ή ακόμα και την αναστροφή ασθενειών που σχετίζονται με τον εγκέφαλο. Ταυτόχρονα συμβάλλει όχι μόνο στον περιορισμό της κατάπτωσης των εγκεφαλικών λειτουργιών που έρχεται φυσικά με την πάροδο του χρόνου, αλλά και στην ενίσχυση της γνωστικής λειτουργίας του εγκεφάλου.

1.4.4. Περιορισμοί χρήσης

Η κουρκουμίνη έχει φτωχή βιοδιαθεσιμότητα εξαιτίας της χαμηλής διαλυτότητάς της στο νερό, της φτωχής απορροφητικότητας της και του έντονου μεταβολισμού της. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να χρειάζονται υψηλές δόσεις όταν χορηγείται από το στόμα αν η δράση που αποσκοπείται είναι για παράδειγμα στο συκώτι, στη χολή ή στο έντερο.

1.4.4.1. Προτάσεις αντιμετώπισης

Μία υποσχόμενη μέθοδος αντιμετώπισης των παραπάνω μειωνεκτημάτων είναι η μεταφορά κουρκουμίνης με νανο-φορείς όπως λιποσώματα , πολυμερικά μικκύλια, φωσφολιπιδιακά σύμπλοκα ή μικρογαλακτώματα. Νανοδομημένα υλικά, τόσο οργανικά όσο και μη οργανικά, έχουν καταφέρει με επιτυχία να επεκτείνουν την απελευθέρωση κουρκουμίνης. Τα πλεονεκτήματα των νανοδομημένων περιλαμβάνουν την υψηλή χωρητικότητα φορτίου, την ελεγχόμενη απελευθέρωση, την αυξημένη διάρκεια ζωής και τη στοχευμένη παράδοση των ενθυλακωμένων φαρμάκων.

Ένας άλλος τρόπος αντιμετώπισης είναι η συγχορήγησή της με άλλες συνοδές βιοενισχυτικές ουσίες, όπως η πιπερίνη. Η πιπερίνη έχει αποδειχθεί να αυξάνει τη βιοδιαθεσιμότητα της κουρκουμίνης κατά 20 φορές χάρη στην ικανότητά της να αναστέλλει ηπατικές και εντερικές διαδικασίες του βιομετασχηματισμού της κουρκουμίνης. Με αυτή τη μέθοδο, ωστόσο, το μόριο παραμελείται εξαιτίας της έλλειψης κατάλληλου συστήματος μεταφοράς για επαρκή αξιοποίηση των θεραπευτικών ιδιοτήτων του.

1.5 β-Καροτίνη

Η β-καροτίνη συνιστά τον κυριότερο αντιπρόσωπο των καροτενοειδών, είναι φυτικής προέλευσης και το μόριό του είναι λιπόφιλο. Περιέχει χρωστικές που της δίνουν πορτοκαλί χρώμα, εξού και το πορτοκαλί χρώμα των καρότων, ενώ απαντάται ακόμα στο μπρόκολο, στα νεκταρίνια, στην παπάγια, στα βερίκοκα και στα γκρέιπφρουτ. Πρόκειται για πρόδρομη ουσία της βιταμίνης Α. Ως λιποδιαλυτή ουσία, απορροφάται από το λεπτό έντερο μαζί με άλλα λιπίδια όπου και διασπάται στη συνέχεια στο βλεννογόνο του εντέρου σε βιταμίνη Α.

Επισημαίνεται πως η μεγάλη κατανάλωση βιταμίνης Α, ή «υπερβιταμίνωση Α» μπορεί να προκαλέσει συμπτώματα τοξικότητας καθώς οι λιποδιαλυτές βιταμίνες τείνουν να αποθηκεύουν το πλεόνασμά τους στο σώμα, συχνά στο σημείο της βλάβης. Στις έγκυες γυναίκες, μάλιστα, υπάρχει ενδεχόμενο να μεταφερθούν στο έμβρυο σοβαρές γενετικές ανωμαλίες. Παρόλο που η β-καροτίνη αποθηκεύεται στο λιπώδη ιστό και σε μικρότερο βαθμό στο ήπαρ, δεν έχει τις τοξικές και τερατογόνες δράσεις της βιταμίνης Α.

1.5.1. Ιδιότητες β-καροτίνης

Η β-καροτίνη είναι αντιοξειδωτικό που έχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα ενάντια στα ενεργά μονήρη οξυγόνα σε σύγκριση με τη βιταμίνη Ε και τη βιταμίνη C (Sies et al., 1992). Στα φυτά, προστατεύουν τους φυτικούς ιστούς από τη δράση της υπεριώδους ακτινοβολίας (UV), ενώ φαίνεται να έχουν αντίστοιχη δράση και στον άνθρωπο. Μελέτες δείχνουν πως η λήψη β-καροτενίων βοηθά στην προστασία του δέρματος από την υπεριώδη ακτινοβολία, στην πρόληψη εμφάνισης εγκαύματος καθώς και στην πρόληψη εμφάνισης καρκίνου.

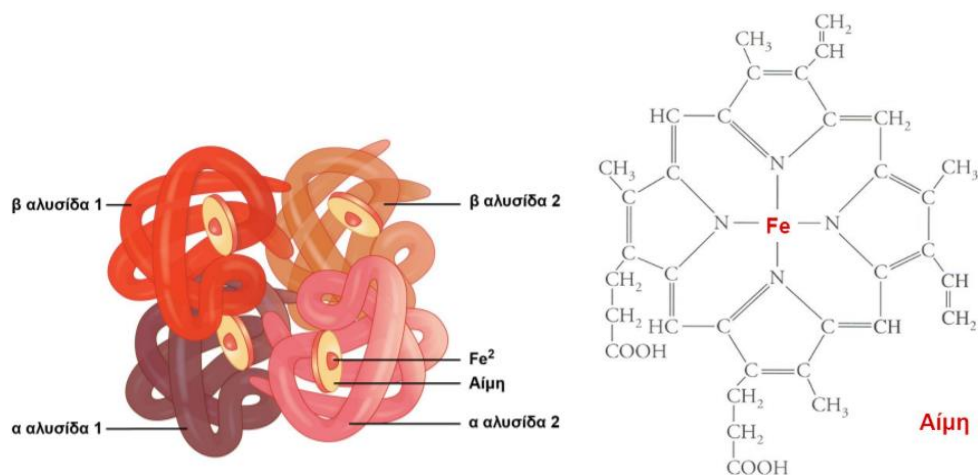
1.6 Αιμοσφαιρίνη

Η αιμοσφαιρίνη είναι πρωτεΐνη που βρίσκεται στα ερυθροκύτταρα του αίματος. Τα ερυθροκύτταρα καταλαμβάνουν περισσότερο από το 99% των κυττάρων του αίματος και περιέχουν κυρίως τα μόρια της αιμοσφαιρίνης (περίπου 3×10^8). Η κυριότερη λειτουργία της αιμοσφαιρίνης είναι η μεταφορά οξυγόνου που προσλαμβάνεται από τους πνεύμονες, και του διοξειδίου του άνθρακα που παράγεται από τα κύτταρα του σώματος.

1.6.1 Δομή αιμοσφαιρίνης

Η ανθρώπινη αιμοσφαιρίνη αποτελείται από την πρωτεΐνη σφαιρίνη χημικά ενωμένη με 4 μόρια αίμης. Συγκεκριμένα αποτελείται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες όμοιες ανά δύο ή από τη σκοπιά της τεταρτοταγούς δομής, η αιμοσφαιρίνη συνιστά ένα τετραμερές μόριο με δύο πανομοιότυπα διμερή. Ανάμεσα στα μέλη των διμερών αναπτύσσονται ιοντικοί δεσμοί και δεσμοί υδρογόνου, οι δύο αλυσίδες σε κάθε διμερές συγκροτούνται μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, ενώ τα δύο διμερή συνδέονται κυρίως με πολικούς δεσμούς. Η κάθε αλυσίδα περιέχει μια ομάδα αίμης και μία θέση δέσμευσης οξυγόνου.

Η αίμη συνίσταται από ένα μόριο πρωτοπορφυρίνης IX, στο κέντρο του οποίου βρίσκεται συνδεδεμένο ένα άτομο σιδήρου. Αναλυτικά, η πρωτοπορφυρίνη είναι το ισομερές που απαντάται στα βιολογικά συστήματα το οποίο αποτελείται από τέσσερις δακτύλιους πυρρόλης (C_4H_5N) συνδεδεμένους μεταξύ της κυκλικά με μεθενυλικές γέφυρες ($=CH-$). Περιφερειακά στο δακτύλιο συνδέονται τέσσερις μη πολικές μεθυλικές ($-CH_3$), δύο μη πολικές βινυλικές ($-CH = CH_2$) και δύο πολικές προπιονικές ($-CH_2 - CH_2 - COOH$) ομάδες. Τα τέσσερα άτομα αζώτου της κορυφής των πυρρολικών δακτυλίων ενώνονται με ένα άτομο δισθενούς σιδήρου. Ο δισθενής σίδηρος μετατρέπεται σε τρισθενή χάνοντας ένα ηλεκτρόνιο μέσω της οξειδωσης. Το νέο μόριο ονομάζεται αιματίνη. Επιπλέον αναγωγή οδηγεί στη δημιουργία της αίμης.



Εικόνα 1.13 Δομή αιμοσφαιρίνης και αίμης

Το εσωτερικό του μορίου της αιμοσφαιρίνης είναι διαρκώς μη πολικό, καθώς οποιαδήποτε αλλαγή αφορά την αντικατάσταση της μη πολικού αμινοξέος από ένα άλλο, γεγονός που συμβάλλει στη σταθεροποίηση της τρισδιάστατης δομής της. Αντίθετα τα αμινοξέα στην επιφάνεια της αιμοσφαιρίνης συνήθως φέρουν φορτίο, θετικό ή αρνητικό.

1.6.2 Ιδιότητες της αιμοσφαιρίνης

Η αιμοσφαιρίνη εκτός από οξυγόνο, μεταφέρει υδρογόνο (H^+) και διοξείδιο του άνθρακα (CO_2). Οι ιδιότητες της δέσμευσης ρυθμίζονται από αλληλεπιδράσεις διαφορετικών, μη γειτονικών θέσεων. Το οξυγόνο δεσμεύεται συνεργειακά στην αιμοσφαιρίνη, δηλαδή η δέσμευση ενός μορίου οξυγόνου διευκολύνει τη δέσμευση του επόμενου μορίου οξυγόνου στο ίδιο μόριο της αιμοσφαιρίνης. Για κάθε μόριο O_2 που απελευθερώνεται, δεσμεύεται από την αιμοσφαιρίνη περίπου $0.5 H^+$, γεγονός που βοηθά στη ρύθμιση του pH στους ιστούς με έντονη μεταβολική δραστηριότητα. Το CO_2 δεσμεύεται στις τελικές αμινομάδες της αιμοσφαιρίνης και ελαττώνει τη συγγενεία της για οξυγόνο. Η δέσμευση του οξυγόνου εξαρτάται από το pH, από το μόριο του διοξειδίου του άνθρακα καθώς και από φωσφορικές ενώσεις όπως 2,3-διφωσφογλυκερικό (BPG). Οι παράγοντες αυτοί ονομάζονται «αλλοστερικοί» διότι οι επιδράσεις τους σε μια περιοχή του μορίου επηρεάζει την πρόσδεση οξυγόνου από ομάδα αίμης σε διαφορετική περιοχή του μορίου. Αυτό συμβαίνει γιατί οι ομάδες αίμης μιας αιμοσφαιρίνης επικοινωνούν μεταξύ τους. Εν γένει τα μόρια H^+ , CO_2 , O_2 , BPG δεσμεύονται σε διαφορετικές θέσεις, καθώς τα μόρια αυτά έχουν πολύ διαφορετικές δομές.

1.6.3 Εφαρμογές στην ιατρική

Οι εξαιρετικά υψηλές ανάγκες χορήγησης αίματος σε ασθενείς για αναπλήρωση από τραυματισμούς, χρόνιες παθήσεις, έκτακτες αιμορραγίες κλπ. σε συνδυασμό με το γεγονός πως τα ερυθρά αιμοσφαίρια δύνανται να αποθηκευτούν μόνο για μια μικρή χρονική περίοδο καθώς και να μολυνθεί κατά τη διάρκεια αυτής, καθιστούν τα αποθέματα των τραπεζών αίματος ανεπαρκή. Αναδύεται έτσι η ανάγκη εξασφάλισης υποκατάστατων αίματος τα οποία θα διαθέτουν αυτόνομη σταθερότητα και θα ταιριάζουν σε κάθε τύπο αίματος.

Οι απόπειρες που γίνονται επικεντρώνονται στην κατασκευή φορέων οξυγόνου με βάση την αιμοσφαιρίνη (HBCOs) οι οποίοι συνθέτονται από χημικά ή γενετικά τροποποιημένη ανθρώπινη ή βοειδή αιμοσφαιρίνη και μπορούν να αξιοποιηθούν σαν εναλλακτική στα παραδοσιακά υγρά αναπλήρωσης όπως κρυσταλλοειδή, τεχνητά κολλοειδή και αίμα. Σκοπός αυτών των χημικών/γενετικών τροποποιήσεων είναι η σταθεροποίηση του μορίου της αιμοσφαιρίνης και η

βελτίωση της ικανότητάς της στη μεταφορά οξυγόνου. Οι κύριες στρατηγικές που έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι τώρα είναι οι σταυροδεσμοί αιμοσφαιρίνης, ο πολυμερισμός και η ενθυλάκωση αιμοσφαιρίνης σε λιποσώματα, υδρογέλες ή πορώδη μικροσωματίδια. Με τον πολυμερισμό ενισχύεται ο ενδοαγγειακός χρόνος παραμονής των HBCOs. Ο τελευταίος τρόπος περιλαμβάνει αλληλεπίδραση με μη πρωτεϊνικούς φορείς όπως γλυκόλη πολυεθυλενίου (PEG) ή πολυοξυεθυλένιο (POE) για ενίσχυση του χρόνου παραμονής στην κυκλοφορία και διατήρηση χαμηλών δυνατοτήτων συγγένειας οξυγόνου.

Έχουν κατασκευαστεί μάλιστα και κυστίδια, σφαιρικοί φορείς οξυγόνου με αιμοσφαιρίνη ενθυλακωμένη σε λιπώδη μεμβράνη η οποία τροποποιείται με γλυκόλη πολυαιθυλενίου, τα οποία παρουσίασαν ορισμένα πλεονεκτήματα όπως η έλλειψη κινδύνου μόλυνσης από ιούς και η διατήρηση των φυσικοχημικών και λειτουργικών χαρακτηριστικών τους για περισσότερο από 2 χρόνια σε θερμοκρασία δωματίου.

1.6.3.1 Περιορισμοί εφαρμογής τους

Τα προαναφερθέντα υποκατάστατα έχουν περιορισμένη ιατρική εφαρμογή καθώς πληθώρα πειραμάτων έδειξαν μεγαλύτερη θνησιμότητα σε ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκαν τροποποιημένοι φορείς έναντι συμβατικών.

Οι τοξικότητες που σχετίζονται με τους HBCOs φαίνεται να έχουν μια κοινή βιοχημική προέλευση που προέρχεται και καθοδηγείται από την προσθετική ομάδα αίματος της αιμοσφαιρίνης. Το κυριότερο παράδειγμα είναι η αντίδραση των HBCOs, της ομάδας αίματός τους, και του διοξειδίου του αζώτου (NO), ένα σημαντικό διατομικό αέριο σηματοδότησης και αγγειοσυστολής που παράγεται από το αγγειακό σύστημα. Η αντίδραση διαρκεί μόλις μερικά δευτερόλεπτα αλλά οι συνέπειες της όπως η συστολή των αιμοφόρων αγγείων και η αύξηση της συστηματικής και πνευμονικής πίεσης του αίματος είναι βαθιές. Επισημαίνεται βέβαια πως οι αυξήσεις στην πίεση του αίματος παρατηρήθηκε να επιστρέφουν στο φυσιολογικό εντός δύο ωρών.

Υπάρχει επίσης κίνδυνος εμφράγματος μυοκαρδίου ο οποίος εξηγείται από την εξάντληση της προστατευτικής δράσης του νιτρικού οξέος ως φυσικού αναστολέα της συσσωμάτωσης και της προσκόλλησης αιμοπεταλίων. Σε γαστρεντερικές εφαρμογές έχουν υπάρξει γαστρεντερικές επιπλοκές που κυμαίνονται από πόνο και κράμπες μέχρι νεκρωτική παγκρεατίτιδα². Στο ουροποιητικό σύστημα, ο διμερισμός και η σπειραματική διήθηση³ της αιμοσφαιρίνης οδηγεί σε νεφρική ανεπάρκεια. Γενικά, η αύξηση της συγκέντρωσης του σιδήρου μπορεί να οδηγήσει σε πολλαπλασιασμό βακτηρίων και επιπλοκές μόλυνσης.

Βραχυπρόθεσμες παρενέργειες της καταστροφής του αζώτου περιλαμβάνουν παροδικές καρδιακές βλάβες, ανοσολογικές αλλαγές στους ιστούς των νεφρών και γαστρεντερικές συνέπειες

Τα υποκατάστατα εν γένει καλούνται να ξεπεράσουν την οξεία νεφρική τοξικότητα που σχετίζεται με τη μεταφορά της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης στο κυκλοφορικό σύστημα και να αποτρέψουν τη γρήγορη αποβολή της από το αίμα, την αγγειοσυστολή και τις σοβαρές καρδιακές επιδράσεις.

² Παγκρεατίτιδα είναι η φλεγμονή του παγκρέατος με συμπτώματα όπως πόνος στο επιγάστριο, ναυτία και έμετοι.

³ Ο εκτιμώμενος ρυθμός σπειραματικής διήθησης είναι μια τιμή που καταδεικνύει πόσο καλά διηθούν οι νεφροί τα απόβλητα προϊόντα από το αίμα. Αποτελεί μέτρο της νεφρικής λειτουργίας με υψηλές τιμές να υποδεικνύουν καλύτερη λειτουργία των νεφρών.

1.6.3.2 Προσπάθειες για αντιμετώπιση περιορισμών

Έχουν ακολουθηθεί διάφορες στρατηγικές για την αντιμετώπιση των παραπάνω περιορισμών. Μία από αυτές είναι η χρήση δοτών NO ή η ενίσχυση των συνθετικών οδών των NO για την αποκατάσταση των ανισορροπιών που επέρχονται με την έγχυση HBCOs. Μία ακόμη ευφάνταστη και βραχυπρόθεσμη απόπειρα ήταν ο έλεγχος της αύξησης της πίεσης του αίματος μέσω της μετατροπής της αιμοσφαιρίνης σε φορέα NO ή με τη βοήθεια ενζύμων μετατροπή της αιμοσφαιρίνης σε πηγή NO. Ωστόσο καμία από τις δύο δεν κατάφερε να επιφέρει μακροπρόθεσμες βελτιώσεις στην τοξικότητα των οργάνων.

Πρόσφατες μελέτες μετατόπισαν το ενδιαφέρον από τις λύσεις με άξονα το NO στη διαμερισματοποίηση της αιμοσφαιρίνης. Χρήση απτοσφαιρίνης (Hp) και αιμοπεξίνης (Hxp) σε σκύλους, ινδικά χοιρίδια και ποντίκια με δρεπανοκύτταρα φάνηκε να περιορίζει τις τοξικές επιδράσεις της εγχυμένης χωρίς-κύτταρα αιμοσφαιρίνης. Δεδομένα από αυτά τα πειράματα αποκάλυψαν ότι ο σχηματισμός σύμπλοκων Hb-Hp μετρίασε την υπερτασική αντίδραση κατά την έκθεση σε αιμοσφαιρίνη και απέτρεψε την υπεροξειδωτική τοξικότητα της Hb σε εξωαγγειακά τμήματα όπως το νεφρό. Ωστόσο, η στρατηγική αυτή απαιτεί χημικές ή γενετικές τροποποιήσεις αιμοσφαιρίνης ή των μορίων της αιμοσφαιρίνης για την επιτυχή σύνδεση δύο πρωτεϊνών.

1.6.3.3 Νανοσωματίδια και αιμοσφαιρίνη

Η νανοτεχνολογία χαράσσει ένα νέο δρόμο στην κατασκευή αυτών των υποκατάστατων με απαραίτητη προϋπόθεση να μπορεί να ελεγχθεί η αλληλεπίδραση μεταξύ των νανοσωματιδίων και της αιμοσφαιρίνης σε μοριακή κλίμακα και οι επιδράσεις στις ιδιότητες οξυγόνωσης.

Έχει διαπιστωθεί υψηλή έλξη της ανθρώπινης αιμοσφαιρίνης από νανοσωματίδια οξειδίου του πυριτίου η οποία οδηγεί σε απορρόφηση τετραμερών αιμοσφαιρίνης στην επιφάνειά τους. Αυτή η διαδικασία απορρόφησης έχει ως αποτέλεσμα μια αξιοσημείωτη διατήρηση των ιδιοτήτων οξυγόνωσης της ανθρώπινης ενήλικης αιμοσφαιρίνης και της δρεπανοκυτταρικής αιμοσφαιρίνης που σχετίζεται με μία αύξηση στη δέσμευση οξυγόνου. Με άλλα λόγια, τα νανοσωματίδια από οξείδιο του πυριτίου μπορούν να λειτουργήσουν ως τελεστές για ανθρώπινη φυσική και μεταλλαγμένη αιμοσφαιρίνη ανοίγοντας νέους δρόμους για σχεδιασμό καινοτόμων HBCOs.

1.7 Υδρογέλες

Οι υδρογέλες (hydrogels) είναι τρισδιάστατα διασυνδεδεμένα δίκτυα πολυμερών τα οποία μπορούν να απορροφήσουν και να διατηρήσουν μεγάλη ποσότητα νερού. Έχουν το πλεονέκτημα να μην διαλύονται χάρη στην ύπαρξη χημικών ή φυσικών δεσμών μεταξύ των διασυνδεδεμένων αλυσίδων.

Εξαιτίας των ευκολορυθμιζόμενων ιδιοτήτων τους καθώς και των ποικίλων μεθόδων κατασκευής τους, έχουν αξιοποιηθεί σε μεγάλο εύρος βιοιατρικών και μηχανικών εφαρμογών από μηχανική των ιστών και αναγεννητική ιατρική μέχρι επεξεργασία λυμάτων και ρομποτική. Στον τομέα της βιοϊατρικής συγκεκριμένα, ενέσιμες υδρογέλες έχουν δείξει θεραπευτικές ιδιότητες στην επιδιόρθωση πληγών αλλά τα περισσότερα από αυτά παρουσιάζουν μικρή μηχανική δύναμη. Έρευνες έχουν δείξει πως κύτταρα του συνδετικού ιστού, ινοβλάστες, αναπτύσσονται γρηγορότερα στην επιφάνεια πιο σκληρών υδρογελών, ενώ πειράματα σε ζώα απέδειξαν πως οι υδρογέλες συμβάλλουν στην αύξηση εναπόθεσης κολλαγόνου και στην αγγειοποίηση (Rong Yang et al. 2021).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ, ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Υλικά

Παρακάτω παρουσιάζονται τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τις πειραματικές μετρήσεις καθώς και η προέλευσή τους.

Αιμοσφαιρίνη από βοδινό αίμα (Hemoglobing from bovine blood-Hgb) , αλβουμίνη ορού βοειδούς (bovine serum albumin), κιτρικό οξύ (Citric Acid-CA) κουρκουμίνη (curcumin-cur) και β-καροτίνη (β-carotene) αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich. Το υλουρονικό οξύ (Sodium Hyaluronate-HA, μοριακού βάρους ~5k) και η χρονδροϊτίνη (chondroitin sulfate, μοριακού βάρους ~20k) ήταν ευγενική χορηγία της ελληνικής εταιρίας uni-pharma.

Πρωτογενή υδατικά διαλύματα (stock) HA (1.0 mgml⁻¹), CS (1.0 mgml⁻¹), CA (1.0 mgml⁻¹), Hgb (1.0 mgml⁻¹) κατασκευάζονταν με τη χρήση αποσταγμένου νερού ως διαλύτη και διατηρούνταν σε θερμοκρασία ψυγείου 4°C για να ισορροπήσουν. Σύμπλοκα Hgb-CS και Hgb-HA δημιουργούνταν με την ανάμιξη κατάλληλων όγκων απεσταγμένου νερού και πρωτογενών διαλυμάτων υπό ελαφριά ανάδευση. Αρχικά προστέθηκε στο απεσταγμένο νερό διάλυμα CA ώστε να ρυθμιστεί η τιμή του pH στο 5. Αμέσως μετά προστέθηκε το διάλυμα του πολυσακχαρίτη, CS ή HA στο κάθε σύστημα και το πρωτεϊνικό διάλυμα της Hgb προστέθηκε στο τέλος. Τα διαλύματα με τα σύμπλοκα φυλάσσονταν για μια μέρα στους 4°C για να ισορροπήσουν. Νανοσωματίδια Hgb-CS και Hgb-HA δημιουργήθηκαν με την εφαρμογή θερμικού πρωτόκολλου σε σφραγισμένα φιαλίδια στους 60° για 2 ώρες και την μετέπειτα ψύξη τους σε θερμοκρασία δωματίου. Για τη ρύθμιση των διαλυμάτων σε pH 7 χρησιμοποιήθηκε διάλυμα NaOH συγκέντρωσης 0.1 M.

Για τη μετέπειτα φόρτωση των νανοσωματιδίων με κουρκουμίνη και β-καροτίνη, οι βιοδραστικές ουσίες διαλύθηκαν στην επιθυμητή συγκέντρωση σε αιθανόλη και σε ακετόνη αντίστοιχα. Συγκεκριμένα αρχικά παρασκευάζονταν 0.5 $\frac{mg}{ml}$ από την κάθε βιοδραστική ουσία και στη συνέχεια η κουρκουμίνη αραιωνόταν με τη διάλυση 736 μL από το διάλυμα των 0.5 mg/ml σε 9264 μL αιθανόλη και η β-καροτίνη με διάλυση 1073 μL από το διάλυμα των 0.5 mg/ml σε 8927 μL ακετόνη.

2.2 Πειραματικές Τεχνικές

2.2.1. Σκέδαση φωτός-Light Scattering (LS)

Σε μία διάταξη σκέδασης φωτός μπορούν να πραγματοποιηθούν μετρήσεις τόσο δυναμικής σκέδασης όσο και στατικής σκέδασης (Static Light Scattering-SLS).

2.2.1.1 Δυναμική Σκέδαση Φωτός - (Dynamic Light Scattering-DLS)

Η δυναμική σκέδαση φωτός είναι μία καθιερωμένη μη-επεμβατική τεχνική για τον καθορισμό του μεγέθους ή της κατανομής μεγέθους μορίων και σωματιδίων στην κλίμακα των νανομέτρων και των μικρομέτρων. Μέσω αυτής, δηλαδή, μπορούμε να επιβεβαιώσουμε την ύπαρξη ή μη συσσωματωμάτων σε ένα δείγμα. Χρησιμοποιείται επίσης για τη μελέτη σταθερότητας συμπλόκων σε ένα δείγμα.

Στο εργαστήριο, οι μετρήσεις πάρθηκαν σε σύστημα ALV (ALV-CG-3-goniometer/ALV-50000/EPP multi tau digital correlator) με laser He-Ne ($\lambda=632.8$ nm).



Εικόνα 2. 1. ALV-CG-3-goniometer/ALV-50000/EPP multi tau digital correlator

2.2.1.1.1 Αρχές Λειτουργίας

Ως μέθοδος, στηρίζει τη λειτουργία της στην κίνηση Μπράουν των σωματιδίων (§3.4.2) η οποία περιγράφεται από την εξίσωση Stokes-Einstein⁴. Επομένως, μέσω του υπολογισμού του συντελεστή διάχυσης ενός δείγματος, είναι εφικτός ο καθορισμός της υδροδυναμικής ακτίνας των σωματιδίων του, αν οι τιμές των υπόλοιπων παραμέτρων (θερμοκρασία, ιξώδες) είναι γνωστές. Σημαντικό παράγοντα αποτελεί να μην υπάρχει καθίζηση στα διαλύματα καθώς η καθίζηση επενεργεί κατασταλτικά στην κίνηση Μπράουν.

2.2.1.1.2 Διάταξη οργάνου

Η διάταξη αποτελείται από ένα μονοχρωματικό laser το οποίο κατευθύνεται προς το προς-εξέταση δείγμα και από έναν ανιχνευτή φωτός ο οποίος δύναται να μετακινείται πάνω σε γωνιόμετρο. Το δείγμα τοποθετείται σε ειδική διάφανη κυβέττα, της οποίας τα τοιχώματα οφείλουν να παραμένουν καθαρά ώστε η καταγραφόμενη σκέδαση να προέρχεται αποκλειστικά από το περιεχόμενο της και όχι από άλλους παράγοντες (π.χ σκόνη, δαχτυλιές κλπ). Η ύπαρξη σωματιδίων στο δείγμα, θα προκαλέσει σκέδαση των φωτονίων της εισερχόμενης δέσμης προς όλες τις κατευθύνσεις. Το σκεδαζόμενο φως ανιχνεύεται από τον ανιχνευτή σε συγκεκριμένη γωνία, η οποία καθορίζεται από το χειριστή.

Το όργανο διαθέτοντας ενσωματωμένο συσχετιστή, παρέχει τις συναρτήσεις αυτοσυσχέτισης της σκεδαζόμενης έντασης φωτός $g_2(\tau)$ όπου τ είναι ο χρόνος συσχέτισης (χρονική καθυστέρηση ανάμεσα στις σκεδάσεις ή μεταξύ των μετρήσεων έντασης). Μέσω της σχέσης Siegert: $g_2(\tau) - 1 = \beta |g_1(\tau)|^2$ όπου β μια σταθερά κανονικοποίησης, υπολογίζονται οι συναρτήσεις αυτοσυσχέτισης πεδίου $g_1(\tau)$. Για την εξαγωγή των χαρακτηριστικών χρόνων χαλάρωσης τ_c εφαρμόζεται CONTIN ανάλυση. Οι κατανομές των χρόνων χαλάρωσης τ_c μετατρέπονται σε κατανομές υδροδυναμικών ακτίνων R_h μέσω της σχέσης $D = \frac{1}{\tau_c q^2}$ και της εξίσωσης Stokes-Einstein. (§3.5.2)

2.2.1.2 Στατική Σκέδαση φωτός - Static Light Scattering (SLS)

Η στατική σκέδαση φωτός συνιστά επίσης μία μη-επεμβατική μέθοδο η οποία μετράει την ένταση του σκεδαζόμενου φωτός για τον καθορισμό του μέσου μοριακού βάρους M_w ενός μακρομορίου, όπως ενός πολυμερούς ή μιας πρωτεΐνης, σε ένα διάλυμα. Μετρήσεις της σκεδαζόμενης έντασης σε πολλές τιμές γωνιών επιτρέπει τον υπολογισμό της μέσης γυροσκοπικής ακτίνας R_g και του παράγοντα δομής από όπου εκτιμάται το μοριακό βάρος των σωματιδίων.

⁴ $R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D}$ όπου k_B : η σταθερά Boltzman, D : ο συντελεστής διάχυσης και η : το ιξώδες του διαλύματος

2.2.1.2.1 Διάταξη οργάνου

Η διάταξη του οργάνου είναι παρόμοια με εκείνη της DLS με τη διαφορά ότι η SLS καταγράφει την ένταση της σκέδασης ως συνάρτηση της γωνίας σκέδασης θ μέσω ενός ή περισσότερων ανιχνευτών. Με άλλα λόγια, μία μέτρηση SLS περιλαμβάνει δεδομένα από πολλές διαφορετικές γωνίες και όχι από μία προκαθορισμένη.

2.2.1.2.2 Ανάλυση των δεδομένων

Στη μέθοδο SLS, καταγράφονται μετρήσεις του λόγου Rayleigh $R(q)$ μέσω των οποίων εξάγεται το μέσο μοριακό βάρος M καθώς και ο παράγοντας μορφής $P(q)$ των σκεδαζόμενων σωματιδίων. Η παραπάνω εξαγωγή γίνεται με χρήση της εξίσωσης:

$$\frac{Kc}{R(q)} = \frac{1}{MP(q)} \quad (2)$$

όπου c είναι η συγκέντρωση μάζας των διαλυμένων μορίων, $q = \frac{4\pi n_0}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2}$ το διάνυσμα σκέδασης και $K = \frac{4\pi^2 n_0^2}{N_A \lambda^4} \left(\frac{\theta n}{\theta c}\right)^2$ ο συντελεστής αντίθεσης για LS όπου n_0 ο δείκτης διάθλασης του διαλύτη και $\frac{\theta n}{\theta c}$ η αύξηση του δείκτη διάθλασης του συστήματος διαλύτη.

Μέσω της προσέγγισης Guiner $P(q) = e^{-\frac{1}{3}q^2 R_g^2}$, εξάγεται η γυροσκοπική ακτίνα R_g των σκεδαζόμενων σωματιδίων. Για να διευκολυνθεί η προσαρμογή όλων των διαγραμμάτων Guiner, εφαρμόζεται μια τετραγωνική προσέγγιση στο q^2 για τον παράγοντα μορφής.

Φασματοσκοπικές Τεχνικές

Η φασματοσκοπία περιλαμβάνει το σύνολο των πειραματικών τεχνικών με τις οποίες μελετάται η αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη (άτομα, μόρια, ιόντα). Η αλληλεπίδραση της ακτινοβολίας με την ύλη περιλαμβάνει φαινόμενα απορρόφησης, εκπομπής ή σκέδασης.

Οι φασματοσκοπικές μέθοδοι εμφανίζουν κάποια κοινά χαρακτηριστικά ως προς τη δομή των μετρητικών τους οργάνων, των φασματόμετρων. Αρχικά, όλα περιλαμβάνουν μία πηγή παραγωγής ακτινοβολίας ανάλογα με την περιοχή του φάσματος που αξιοποιούν. Δεύτερον, σε όλα υπάρχει ένας μονοχρωματιστής, μια οπτική συσκευή που μέσω φίλτρων δύναται να αποκόπτει τα μήκη κύματος που παράγει η πηγή επιτρέποντας να διαπεράσει μόνο το επιθυμητό. Τρίτον, υπάρχει ένας θάλαμος όπου τοποθετείται το δείγμα και τέλος υπάρχει ο φωτοανιχνευτής που καταγράφει στην εκάστοτε μέθοδο την εξεταζόμενη ποσότητα (εκπομπή, απορρόφηση, σκέδαση).

Το δείγμα στις φασματοσκοπικές μεθόδους τοποθετείται σε ειδικές κυψελίδες συγκεκριμένων χωρητικότητας για την κάθε διάταξη. Οι κυψελίδες κατασκευάζονται από πλαστικό, γυαλί ή χαλαζία και είναι διαφανείς. Ως εκ τούτου, είναι απαραίτητο τα τοιχώματα τους να διατηρούνται καθαρά ώστε να εξασφαλίζεται αξιοπιστία στις μετρήσεις. Η ακρίβεια των μετρήσεων ενισχύεται επίσης μέσω της μέτρησης του υπόβαθρου. Στην περίπτωση υγρών δειγμάτων για παράδειγμα, η μεμονωμένη μέτρηση του διαλύτη και η αφαίρεσή της από την τελική μέτρηση του δείγματος, οδηγεί σε πιο ακριβή αποτελέσματα.

2.2.2 Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier - Fourier Transformed Infrared (FTIR) Spectroscopy

Η φασματοσκοπία υπέρυθρου προσφέρει μια ποσοτική και ποιοτική ανάλυση τόσο οργανικών όσο και ανόργανων υλικών. Παρέχει πληροφορίες για τη φύση των ατόμων που βρίσκονται σε ένα μόριο καθώς και τη διάταξή τους στο χώρο.

Τα πειράματα FTIR διεξήχθησαν σε όργανο φασματοσκοπίας Fourier Bruker Equinox 55 το οποίο περιλάμβανε εξάρτημα διαμαντιού εξασθενημένης ολικής ανακλαστικότητας (ATR), από την SENS-IR. Μία σταγόνα δείγματος τοποθετούνταν στο κέντρο του δειγματικού χώρου και στεγνωνόταν με τη βοήθεια αζώτου. Σε κάθε μέτρηση πραγματοποιούνταν 64 σαρώσεις σε εύρος 500-5000 cm^{-1} σε ανάλυση 2 cm .



Εικόνα 2.2. Mid- infrared FTIR spectrometer Bruker Equinox 55 equipped with Attenuated Total Reflectance (ATR) accessory and coupled to an infrared Bruker Hyperion 2000 xyz stage microscope. Spectral range 400-6000 cm^{-1} .

2.2.2.1. Αρχές Λειτουργίας

Το εύρος της υπέρυθρης περιοχής του φάσματος χωρίζεται στο εγγύς υπέρυθρο (0.75-2.5 μm), στο μέσο υπέρυθρο (2.5 – 25 μm) και στο άνω υπέρυθρο (25 – 300 μm). Με τη μελέτη καθημιάς από τις παραπάνω τρεις περιοχές αντλούμε πληροφορίες για τις υπερτονικές και αρμονικές δονήσεις, για τις μεταβολές στη δόνηση των μορίων λόγω απορρόφησης ακτινοβολίας και για τις δονήσεις βαρέων ατόμων και κρυσταλλικού πλέγματος αντίστοιχα. Πρακτικά η φασματοσκοπία FTIR μετράει την απορρόφηση υπεριώδους ακτινοβολίας ενός δείγματος σε διάφορα μήκη κύματος για τον καθορισμό της μοριακής σύνθεσης και δομής του υλικού.

2.2.2.2 Διάταξη οργάνου

Ένα όργανο FTIR αποτελείται από μια πηγή υπέρυθρης ακτινοβολίας, ένα συμβολόμετρο, το οποίο διαθέτει ένα σταθερό και ένα κινητό κάτοπτρο, ένα θάλαμο δείγματος και έναν ανιχνευτή υπέρυθρου. Η υπέρυθρη ακτινοβολία που εκπέμπεται από την πηγή κατευθύνεται στο διαχωριστή δέσμης όπου διαχωρίζεται σε δύο δέσμες, εκ των οποίων η μία προσπίπτει στο σταθερό κάτοπτρο ενώ η άλλη στο κινητό και στη συνέχεια, αφού ανακλαστούν, επιστρέφουν στο διαχωριστή δέσμης όπου συμβάλλουν. Μετά τη συμβολή ένα τμήμα της ακτινοβολίας οδηγείται στο θάλαμο του δείγματος όπου απορροφάται ως συνάρτηση της μοριακής δομής του δείγματος. Το συμβολόγραμμα που προκύπτει μετατρέπεται μέσω μετασχηματισμού Fourier από σήμα έντασης-χρόνου σε φάσμα έντασης-συχνότητας. Για κάθε μόριο ή χημική δομή θα παράξει ένα μοναδικό φάσμα καθώς το φάσμα απορρόφησης υπέρυθρου αποτελεί θεμελιώδη ιδιότητα κάθε μορίου λειτουργώντας σαν το «δαχτυλικό του αποτύπωμα». Για μετρήσεις υδατικών διαλυμάτων το όργανο δύναται να συνδεθεί με εξάρτημα παροχής αζώτου ώστε να επιφέρει «στέγνωμα» και να καταγραφεί μέτρηση του περιεχομένου του διαλύματος.

2.2.3 Φασματοσκοπία Φθορισμού – Fluorescence spectroscopy

Η φασματοσκοπία φθορισμού χρησιμοποιείται για τη μελέτη δομικών αλλαγών σε συζευγμένα συστήματα, αρωματικά μόρια και άκαμπτες επίπεδες ενώσεις λόγω μεταβολών στη θερμοκρασία, το pH, την ιονική δύναμη, το διαλύτη και τα σύμπλοκα.

Στο πείραμά μας χρησιμοποιήθηκε φασματοσκόπιο φθορισμού fluo-3 (model FL3-21, Jobin Yvon-Spex). Το μήκος κύματος διέγερσης ήταν $\lambda=290$ nm για την τρυπτοφάνη (TRP), $\lambda=290$ nm για την τυροσίνη (TYR) και $\lambda=420$ nm για την κουρκουμίνη (CUR). Σε όλες τις μετρήσεις εφαρμόστηκε χρόνος ένταξης 0.5 s.

2.2.3.1 Αρχές Λειτουργίας

Ο φθορισμός είναι ένα είδος φωταύγειας, παραγωγής φωτός, η οποία προκαλείται όταν ένα μόριο απορροφήσει ενέργεια ορισμένου μήκους κύματος, διεγερθεί και κατά την αποδιέγερσή του εκπέμψει ακτινοβολία μήκους κύματος μεγαλύτερου από εκείνο της διεγείρουσας ακτινοβολίας. Παρόλο που η απορρόφηση ενέργειας πραγματοποιείται σε χρονική κλίμακα μικρότερη από 10^{-15} δευτερόλεπτα, η διαδικασία της αποδιέγερσης είναι πολύ πιο αργή. Ως εκ τούτου, ο φθορισμός μπορεί να παρέχει πληροφορίες για τις αλληλεπιδράσεις της φθοροφόρας ουσίας με τα περιβάλλοντα μόρια και τους διαλύτες, σε αντίθεση με την απορρόφηση.

Για την ένταση φθορισμού ισχύει η σχέση: $F = 2.303 \cdot K \cdot I_0 \cdot \varepsilon \cdot b \cdot c$ όπου

K : σταθερά της γεωμετρίας του οργάνου,

I_0 : η ένταση της διεγείρουσας ακτινοβολίας,

b : το μήκος διαδρομής

c : η συγκέντρωση

ε : η μοριακή απορροφητικότητα της φθοροφόρας ουσίας,

Στις μετρήσεις, προτιμούνται δείγματα με χαμηλές συγκεντρώσεις για να αποφεύγεται η επαναπορρόφηση της διεγείρουσας ακτινοβολίας από τη φθοροφόρα ουσία και να εξασφαλίζεται η διεξόδυση της ακτινοβολίας σε όλο το πλάτος του δείγματος.

Ορισμένα υλικά είναι εγγενώς φθορίζοντα όπως η χλωροφύλλη και τα αμινοξέα τρυπτοφάνη (Trp), φενυλαλίνη (Phe) και τυροσίνη (Tyr), ενώ άλλα μόρια συνθέτονται ως σταθερές οργανικές βαφές ή ετικέτες με σκοπό να προστεθούν σε μη φθορίζοντα συστήματα.

2.2.3.2 Διάταξη οργάνου

Τα φθοροόμετρα αποτελούνται από μία λευκή πηγή φωτός, ένα μονοχρωματιστή διέγερσης, ένα θάλαμο δείγματος, ένα μονοχρωματιστή εκπομπής και έναν φωτοανιχνευτή. Κατά τη φασματοσκοπία ενός δείγματος, μπορούν να αποκτηθούν δύο ειδών φάσματα, το φάσμα διέγερσης που δίνει την ένταση σε διάφορα μήκη κύματος διέγερσης με σταθερό το μήκος κύματος εκπομπής και το φάσμα εκπομπής που δίνει την ένταση σε διάφορα μήκη κύματος εκπομπής με σταθερό το μήκος κύματος διέγερσης. Το σχήμα του φάσματος εκπομπής είναι ανεξάρτητο του μήκους κύματος διέγερσης.

2.2.4. Διηλεκτρική Φασματοσκοπία Εναλασσόμενου Πεδίου (Diffuse Reflectance Spectroscopy-DRS)

Με την τεχνική της διηλεκτρικής φασματοσκοπίας μελετώνται οι διηλεκτρικές ιδιότητες ενός υλικού και κατ' επέκταση οι τρόποι κινητικότητας των μορίων του.

2.2.4.1. Αρχές λειτουργίας

Στη συγκεκριμένη τεχνική, κεντρικό ρόλο κατέχει η διπολική ροπή των σωματιδίων ή αλλιώς τα δίπολα που βρίσκονται σε ένα υλικό, και η απόκρισή τους στην εφαρμογή εναλασσόμενου πεδίου. Κάθε υλικό χαρακτηρίζεται από μια σύνθετη μιγαδική διηλεκτρική συνάρτηση της μορφής:

$\epsilon^*(f, T) = \epsilon' \pm i\epsilon''$ όπου το μέγεθος ϵ' σχετίζεται με την ενέργεια που αποθηκεύεται στο υλικό με μορφή πόλωσης και το μέγεθος ϵ'' σχετίζεται με τις απώλειες ενέργειας με την μορφή θερμότητας. Σε πρακτικό επίπεδο, τοποθετώντας το δείγμα μας σε έναν πυκνωτή και εφαρμόζοντας εναλλασσόμενο ρεύμα σε ένα εύρος συχνοτήτων f από 10^{-1} έως 10^6 Hz, καταγράφονται τα αδιάστατα μεγέθη ϵ' και ϵ'' . Όσο μεγαλύτερη η τιμή του ϵ' , τόσο περισσότερα δίπολα πολώνονται στο υλικό μας και όσο μεγαλύτερη η τιμή του ϵ'' τόσο περισσότερα δίπολα δαπανούν ενέργεια στην προσπάθειά τους να πολωθούν. Η μελέτη διευρύνεται και με την παράμετρο της θερμοκρασίας.

Η διηλεκτρική συνάρτηση ενός υλικού συνδέεται άμεσα με τους μηχανισμούς μοριακής κινητικότητας του υλικού. Τέτοιοι μηχανισμοί είναι για παράδειγμα η πόλωση προσαντολισμού μόνιμων μοριακών μορίων, η μετατόπιση ηλεκτρονικού νέφους, η μετατόπιση ιόντων, η πόλωση φορτίων χώρου κ.α. Επομένως η παραπάνω τεχνική προσφέρει μια εποπτεία για τη δομή, τη μορφολογία και τις ιδιότητες του υλικού.

2.2.4.2. Διάταξη Οργάνου

Η διάταξη αποτελείται από μια φιάλη αζώτου η οποία μέσω αντλιών συνδέεται με το δείγμα και δύνανται να ρυθμίζει τη θερμοκρασία του. Το δείγμα τοποθετείται σε μια ειδική κυψελίδα με τέτοιο τρόπο ώστε να εφάπτεται σε δύο ηλεκτρόδια (πυκνωτής). Οι σπλισμοί του πυκνωτή έχουν τη δυνατότητα εφαρμογής πεδίου και συνδέονται με έναν αναλυτή απόκρισης συχνότητας (Frequency Response Analyzer). Τα δεδομένα αντλούνται από ηλεκτρονικό υπολογιστή ο οποίος είναι εφοδιασμένος με κατάλληλο λογισμικό.

Στις μετρήσεις που καταγράφηκαν, ως σπλισμοί χρησιμοποιήθηκαν δύο πολύ καλά γυαλισμένοι ορειχάλκινοι δίσκοι συνολικού πάχους 1.098 mm και διαμέτρου 25mm και 12mm ο εκάστοτε.



Εικόνα 2.3 Πειραματική Διάταξη DRS, αντίστοιχη με αυτή του εργαστηρίου διηλεκτρικής φασματοσκοπίας (αριστερά). Κυψελίδα μέτρησης (δεξιά)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Ηλεκτροστατική σύμπλεξη Hgb-CS και Hgb-HA

Η δημιουργία συμπλόκων ευνοείται όταν υπάρχει ηλεκτροστατική ουδετερότητα ανάμεσα στα φορτία της πρωτεΐνης και του πολυσακχαρίτη (Paragiannopoulos A., Sklarani A.) Σε πρώτο επίπεδο, λοιπόν, μελετήσαμε την *ηλεκτροστατική ουδετερότητα* ανάμεσα στα συστατικά μας για να αποφανθούμε σε τι αναλογία θα τα «αναμείξουμε» για τη δημιουργία σταθερών συμπλόκων. Το φορτίο της πρωτεΐνης εξαρτάται από την τιμή του pH (§ 1.6.1.2). Επιλέχθηκε η τιμή pH 4 διότι εμπειρικά εκεί προκύπτουν τα βέλτιστα νανοσωματίδια.

Βιβλιογραφικά, σε pH = 4 ισχύουν τα εξής:

	HGB	CS	HA
Φορτίο ανά μόριο πρωτεΐνης / μονομερές πολυσακχαρίτη (Z)	54	1	1
Μοριακό βάρος (M)	64000	379	384
Φορτίο ανά 1 mol ($r = \frac{Z}{M}$)	0,000844	0,002639	0,002604

από τα οποία παίρνουμε τις αναλογίες της ηλεκτροστατικής ουδετερότητας:

$$\frac{r_{Hgb}}{r_{CS}} = 0,319781 \text{ και } \frac{r_{Hgb}}{r_{HA}} = 0,324$$

Η αρχική παρασκευή των νανοσωματιδίων επομένως επιλέχθηκε να γίνει γύρω από την αναλογία 0.3 και για τους δύο πολυσακχαρίτες. Συγκεκριμένα επιλέξαμε τις τιμές αναλογιών: 0.05, 0.1, 0.2, 0.4.

Τα δείγματα που ετοιμάστηκαν ήταν υδατικά διαλύματα συγκέντρωσης 1 ml τα οποία ρυθμίζονταν σε pH ~ 4 με τη χρήση CA. Για παράδειγμα, ένα δείγμα Hgb-CS αναλογίας 0,05 αποτελούταν από: 795 μL H_2O + 100 μL CA + 5 μL CS + 100 μL Hgb.

(Η σειρά με την οποία αναμειγνύουμε τα υλικά μας είναι αυστηρή για τη δημιουργία συμπλόκων).

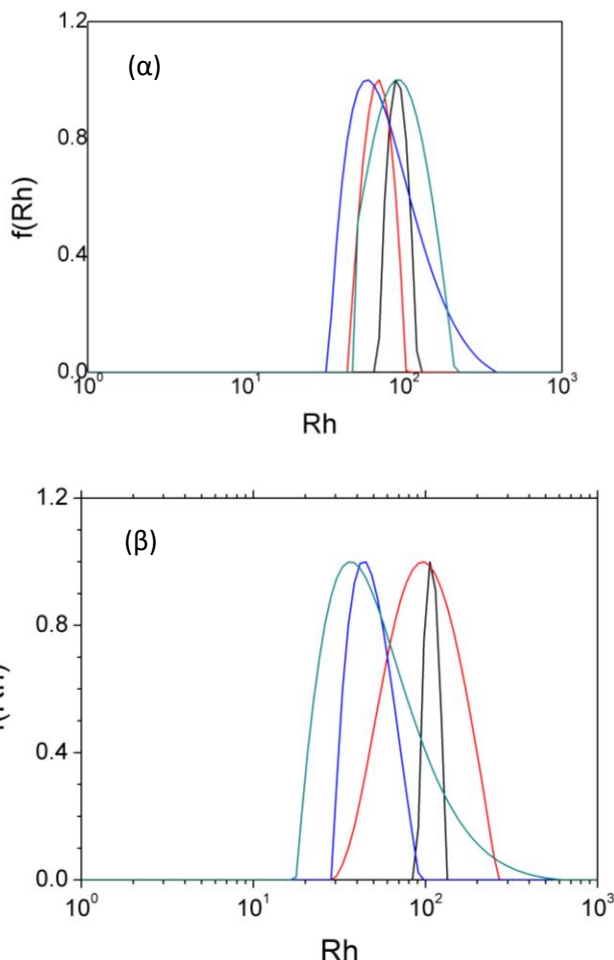
Με αντίστοιχο τρόπο για τις υπόλοιπες αναλογίες προκύπτει ο παρακάτω πίνακας:

Όνομα Δείγματος	Αναλογία	H ₂ O (μL)	CA (1 mg/ml) (μL)	CS (1 mg/ml) (μL)	HA (1 mg/ml) (μL)	Hgb (1 mg/ml) (μL)
Hgb-CS-1	0,05	795	100	5	-	100
Hgb-CS-2	0,1	790	100	10	-	100
Hgb-CS-3	0,2	780	100	20	-	100
Hgb-CS-4	0,4	760	100	40	-	100
Hgb-HA-1	0,05	795	100	-	5	100
Hgb-HA-2	0,1	790	100	-	10	100
Hgb-HA-3	0,2	780	100	-	20	100
Hgb-HA-4	0,4	760	100	-	40	100

Πίνακας 1: Σύσταση δειγμάτων με σκοπό τη δημιουργία νανοσωματιδίων από Hgb και πολυσακχαρίτη.

Αμέσως μετά την κατασκευή των δειγμάτων, με μετρήσεις DLS-SLS έπρεπε να εξετάσουμε αν πετύχαμε τη δημιουργία συμπλόκων στα δείγματά μας και αν ναι, να βρούμε την τάξη μεγέθους της υδροδυναμικής ακτίνας αυτών.

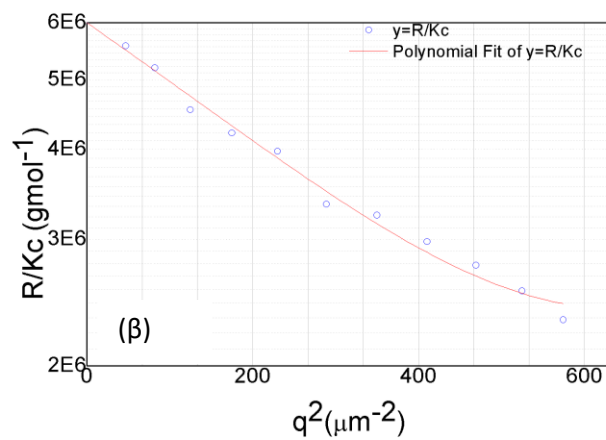
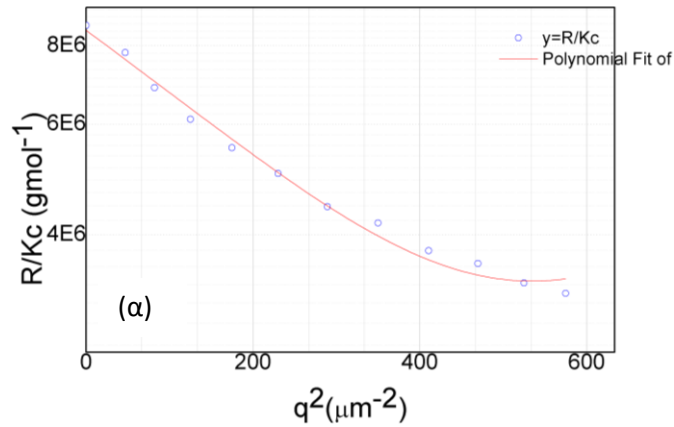
Οι μετρήσεις DLS των δειγμάτων στα δύο συστήματα παρουσιάζονται παρακάτω:



Γράφημα 1: (α) Κατανομή υδροδυναμικών ακτίνων σε διαλύματα συμπλόκων Hgb-CS-1 (πράσινο), Hgb-CS-2 (μπλε), Hgb-CS-3 (κόκκινο), Hgb-CS-4 (μαύρο). (β) : Κατανομή υδροδυναμικών ακτίνων σε διαλύματα συμπλόκων Hgb-HA-1 (πράσινο), Hgb-HA-2 (μπλε), Hgb-HA-3 (κόκκινο), Hgb-HA-4 (μαύρο).

Από τα διαγράμματα φαίνεται πως στα δείγματα υπάρχει μία μονοδιάσπαρτη κατανομή (μία οξεία κορυφή) συμπλόκων. Η μέση υδροδυναμική ακτίνα των συμπλόκων είναι της τάξης των 40-110 nm και για τις 4 αναλογίες που μελετάμε σε κάθε σύστημα. Σειρά είχε να μελετηθεί η σταθερότητα αυτών των συμπλόκων.

Οι αντίστοιχες μετρήσεις SLS των δειγμάτων μας στα δύο συστήματα, συγκεντρώνονται στα παρακάτω διαγράμματα και στον πίνακα 2. Η ανάλυση της SLS με διαγράμματα Guiner (γραφήματα 3 και 4) έγινε με τετραγωνική προσέγγιση (εξίσωση 2). Η μη γραμμική μορφή των διαγραμμάτων προέρχεται από το γεγονός ότι οι παρατηρούμενες γυροσκοπικές ακτίνες είναι μεγαλύτερες από 100 nm και ότι για τιμές του q όπου $q > 1/R_g$ εξετάζεται η εσωτερική δομή των νανοδομών.



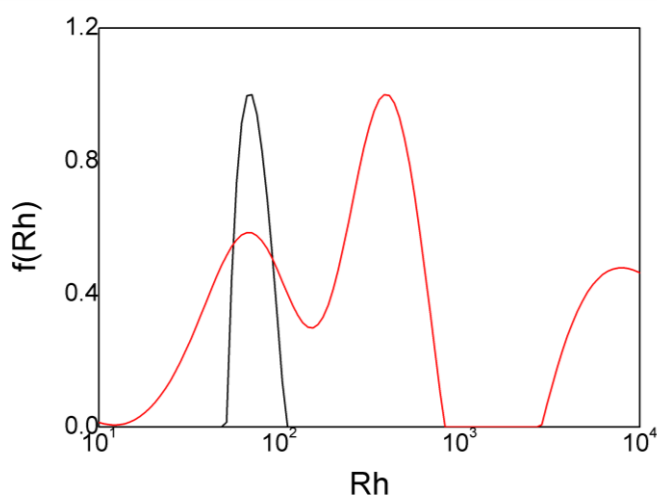
Γράφημα 2: (α) Διάγραμμα Guinier για Hgb-CS σύμπλοκα αναλογίας 0,1 σε pH 4 με 1 mg ml^{-1} Hgb. (β): Διάγραμμα Guinier για Hgb-HA σύμπλοκα αναλογίας 0,1 σε pH 4 με 1 mg ml^{-1} Hgb

Δείγμα	Μοριακό Βάρος [10^7 g/mol]	Γυροσκοπική ακτίνα [nm]
Hgb-CS-1	3.835	117.7
Hgb-CS-2	8.610	92.08
Hgb-CS-3	43.15	91.47
Hgb-CS-4	92.04	98.32
Hgb-HA-1	3.522	94.37
Hgb-HA-2	6.050	80.10
Hgb-HA-3	20.20	103.1
Hgb-HA-4	80.39	112.3

Πίνακας 2: Μοριακό Βάρος και Γυροσκοπική Ακτίνα των δειγμάτων Hgb-CS-1,2,3,4 και Hgb-HA-1,2,3,4 σε pH=4 όπως προκύπτουν από μετρήσεις SLS

Στον παραπάνω πίνακα συγκεντρώνονται τα μοριακά βάρη και οι γυροσκοπικές ακτίνες των δειγμάτων όπως προκύπτουν από προσέγγιση Guinier των δεδομένων SLS. Παρατηρούμε μεγάλης τάξης μοριακά βάρη, γεγονός που φανερώνει ότι τα δείγματά μας και στα δύο συστήματα περιείχαν σταθερά σύμπλοκα. Επιπλέον οι τιμές των γυροσκοπικών ακτίνων κυμαίνονται από 80 nm έως 117 nm, επιβεβαιώνοντας ότι τα σωματίδια στα δείγματά μας ήταν της τάξης των νανομέτρων.

Στα ίδια δείγματα, σε εκείνα που επιβεβαιωμένα είχαν δημιουργηθεί σταθερά νανοσύμπλοκα, αυξήσαμε την τιμή pH από 4 σε 7 για να εξετάσουμε την αντοχή τους σε βασικά περιβάλλοντα. Αυτή η αύξηση στο pH υλοποιήθηκε με τη χρήση καυστικού νατρίου (NaOH) σε ποσότητα 13 μL συγκέντρωσης 0.1 mg/ml και 10 μL συγκέντρωσης 0.01 mg/ml όπως προέκυψε μετά από εντατική μελέτη η οποία περιλάμβανε σταδιακή προσθήκη NaOH στα διαλύματά μας και μετρήσεις με πεχαμετρικό χαρτί. Επαναλάβαμε μετρήσεις DLS-SLS για να εξετάσουμε αν τα σύμπλοκα κατάφεραν να διατηρήσουν το μέγεθος και τη σταθερότητά τους. Παρουσιάζεται ενδεικτικά παρακάτω το δείγμα Hgb-HA-3 σε pH4 και σε pH7. Παρόμοια αποτελέσματα έδωσαν και τα υπόλοιπα δείγματα.



Γράφημα 3: Κατανομή υδροδυναμικής ακτίνας τους δείγματος Hgb-HA-3 σε pH4 (μαύρο) και σε pH7 (κόκκινο).

Παρατηρούμε ότι κατά την αύξηση του pH, η μονοδιάσπαρτη κατανομή καταστράφηκε και οι κορυφές στην κατανομή της υδροδυναμικής ακτίνας έγιναν πιο πλατιές, αναδεικνύοντας το σχηματισμό συσσωματωμάτων και επομένως τη διάλυση των νανοσωματιδίων. Επιπρόσθετα σε αυτό, οι μετρήσεις έδιναν κακής ποιότητας συναρτήσεις αυτοσυσχέτισης. Αυτό σημαίνει ότι τα σύμπλοκα δεν διατηρούν τη δομή και την κατανομή των μεγεθών τους σε ουδέτερο pH και συνεπώς ούτε σε βασικό.

3.2 Σταθεροποίηση νανοσωματιδίων Hgb-CS και Hgb-HA με θερμική κατεργασία

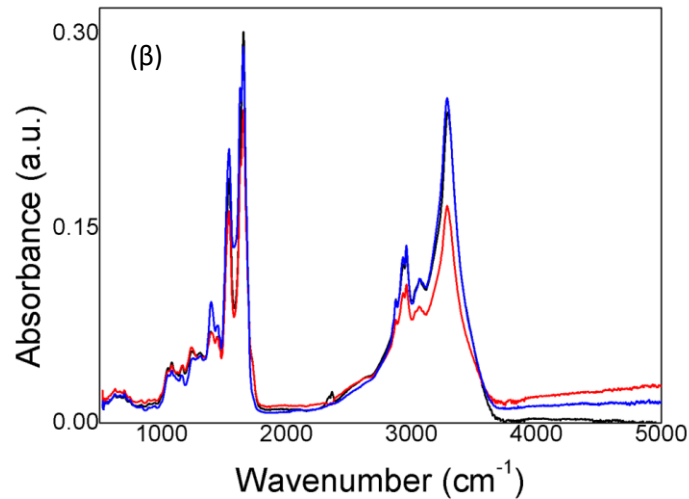
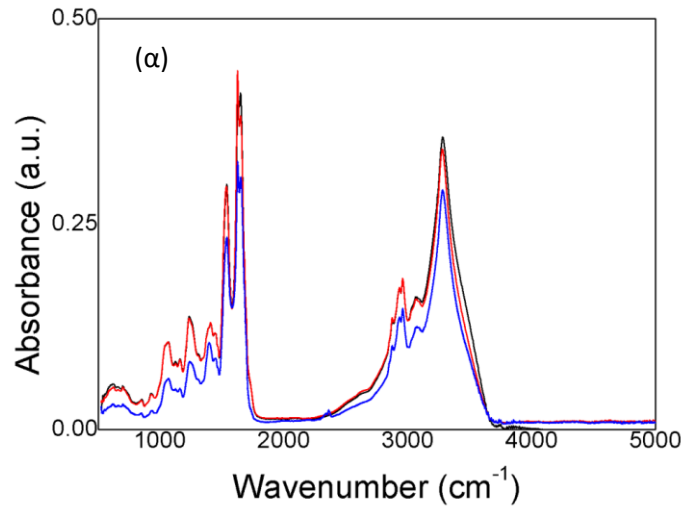
Στην προσπάθειά μας να αποτρέψουμε αυτή τη διάλυση, υποβάλλαμε τα δείγματά μας, εκείνα με pH=4, σε θερμική κατεργασία 2 ωρών σε θερμοκρασία 60° (Jose Wilson P. Carvalho et al. 2013). Η επιλογή θερμοκρασίας και διάρκειας έγινε έπειτα από μελέτη, κύριο κριτήριο της οποίας υπήρξε η αποφυγή δημιουργίας συσσωματωμάτων ορατών με γυμνό μάτι. Πάρθηκαν μετρήσεις DLS-SLS και στα τρία στάδια, προ θερμικής κατεργασίας σε pH4, μετά από θερμική κατεργασία σε pH4 και μετά από θερμική κατεργασία σε pH 7.

Τα αποτελέσματα βρίσκονται συγκεντρωμένα στον Πίνακα 3 ο οποίος αρχικά επιβεβαιώνει για δεύτερη φορά πειραματικά ότι δημιουργήθηκαν σταθερά νανοσωματίδια στα δείγματά μας σε pH4. Δεύτερον παρατηρούμε ότι τα νανοσωματίδια διατήρησαν το μέγεθος και τη σταθερότητά τους μετά τη θερμική κατεργασία. Τρίτον, τα θερμικά κατεργασμένα σύμπλοκα διατήρησαν τη σταθερότητά και το μέγεθός τους, παρόλο που υπήρξε, μείωση στο μοριακό βάρος, ακόμη και με την αύξηση του pH. Μάλιστα τα δείγματα με αυξημένο pH, συνέχισαν να δίνουν ισχυρά σήματα και ομαλές συναρτήσεις αυτοσυσχέτισης.

Δείγμα (Hgb-Cs)	Μοριακό Βάρος (*10 ⁷)[g/mol]	Γυροσκοπική ακτίνα [nm]	Δείγμα(Hgb-HA)	Μοριακό Βάρος [10 ⁷ g/mol]	Γυροσκοπική ακτίνα [nm]
Hgb-CS-1 before thermal treatment	0.13	58	Hgb-HA-1 before thermal treatment	0.352	94.4
Hgb-CS-1 after thermal treatment_pH4	3.26	177	Hgb-HA-1 after thermal treatment_pH4	4.73	172
Hgb-CS-1 after thermal treatment_pH7	2.41	176	Hgb-HA-1 after thermal treatment_pH7	1.27	179
Hgb-CS-2 before thermal treatment	0.86	92	Hgb-HA-2 before thermal treatment	0.60	80
Hgb-CS-2 after thermal treatment_pH4	0.43	36	Hgb-HA-2 after thermal treatment_pH4	4.73	143
Hgb-CS-2 _after thermal treatment_pH7	3.86	49	Hgb-HA-2 _after thermal treatment_Ph10	21.3	168
Hgb-CS-3 before thermal treatment	4.31	91	Hgb-HA-3 before thermal treatment	2.02	103
Hgb-CS-3 after thermal treatment_pH4	7.81	22	Hgb-HA-3 after thermal treatment_pH4	5.02	130
Hgb-CS-3 after thermal treatment_pH7	4.70	25	Hgb-HA-3 after thermal treatment_pH7	3.52	140
Hgb-CS-4 before thermal treatment	9.20	98	Hgb-HA-4 before thermal treatment	8.04	112
Hgb-CS-4 after thermal treatment_pH4	11.1	40	Hgb-HA-4 after thermal treatment_pH4	9.56	121
Hgb-CS-4 after thermal treatment_pH7	4.86	35	Hgb-HA-4 after thermal treatment_pH7	4.15	123

Πνακας 3: Μοριακό βάρος και Γυροσκοπική ακτίνας Δειγμάτων Hgb-CS-1,2,3,4 και Hgb-HA-1,2,3,4 σε pH=4, μετά από θερμική κατεργασία σε pH=4 και μετά από θερμική κατεργασία σε pH=7.

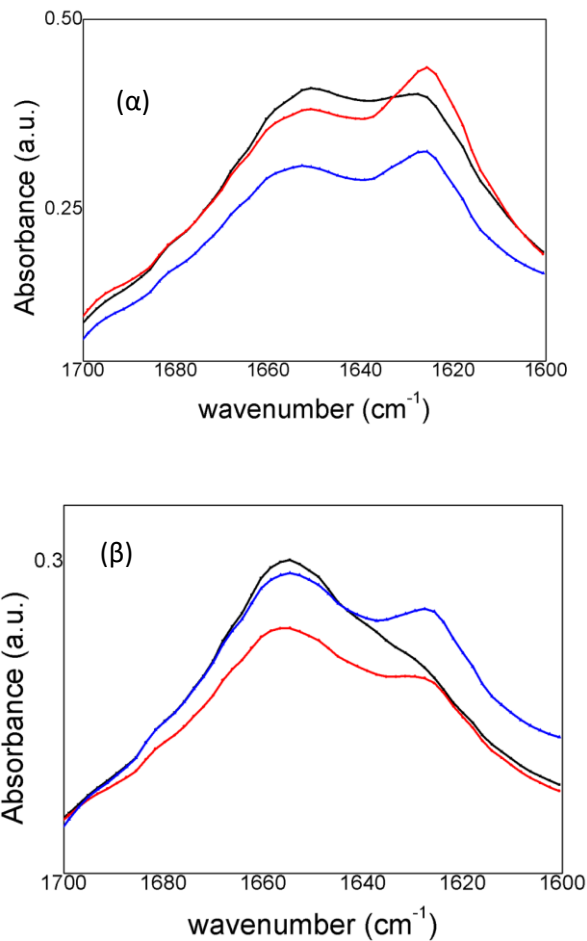
Συμπληρωματικές μετρήσεις στη μελέτη σταθεροποίησης των νανοσωματιδίων είναι οι μετρήσεις FTIR. Μελετήσαμε τη μεταβολή της δομής των συμπλόκων στις τρεις διαφορετικές συνθήκες (pH=4, υπό θερμική κατεργασία pH=4 και μετά από θερμική κατεργασία pH=7). Επισημαίνεται ότι στις μετρήσεις FTIR στεγνώναμε κάθε φορά τη σταγόνα του δείγματός μας με τη βοήθεια αζώτου. Παρακάτω παρουσιάζονται ενδεικτικά τα γραφήματα από ένα δείγμα σε κάθε σύστημα.



Γράφημα 4: (α) Φάσμα FTIR δείγματος Hgb-CS-4 στις τρεις διαφορετικές συνθήκες, ακατέργαστο σε pH=4 (μαύρο), θερμικά κατεργασμένο pH=4(κόκκινο) και θερμικά κατεργασμένο pH=7 (μπλε). (β): Φάσμα FTIR δείγματος Hgb-HA-4 στις τρεις διαφορετικές συνθήκες, ακατέργαστα σε pH=4 (μαύρο), θερμικά κατεργασμένα pH=4 (κόκκινο) και θερμικά κατεργασμένα pH=7 (μπλε)

Από το γεγονός ότι δεν υπάρχει έντονη μετατόπιση κορυφής στον άξονα των μηκών κύματος, παρατηρούμε ότι η διαμόρφωση των συμπλόκων παραμένει σε μεγάλο ποσοστό σταθερή. Επιβεβαιώθηκε έτσι ότι δεν προκαλείται στα σύμπλοκα κάποια καταστροφική/μη αντιστρεπτή μετάβαση κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας τους.

Δίνοντας ιδιαίτερη έμφαση στη μεταβολή της διαμόρφωσης της πρωτεΐνης, μελετήθηκε η πρώτη αμιδική ζώνη I, δηλαδή, το εύρος μηκών κύματος $1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$ καθώς αυτή περιλαμβάνει πληροφορίες για τα διάφορα δομικά συστατικά της πρωτεΐνης(α έλικες, β-φύλλα κ.α.). Σκοπός μας ήταν να μελετήσουμε τη μεταβολή στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης κατά τη θερμική κατεργασία. Συγκεκριμένα μελετήσαμε αν υφίστατο μετουσίωση, αν «άνοιξαν» οι έλικες της, αν «απλώθηκε» περισσότερο στο χώρο για να επιβεβαιώσουμε το λόγο που ύστερα από θερμική κατεργασία οδηγούμαστε σε πιο σταθερά σύμπλοκα ακόμη και σε μεγάλες τιμές pH. Παρακάτω παρατίθενται τα διαγράμματα στα συγκεκριμένα μήκη κύματος για τα δείγματα Hgb-CS-4 και Hgb-HA-4.



Γράφημα 5: (α) Φάσμα FTIR δείγματος Hgb-CS-4 στις τρεις διαφορετικές συνθήκες, ακατέργαστο σε pH=4 (μαύρο), θερμικά κατεργασμένο pH=4(κόκκινο) και θερμικά κατεργασμένο pH=7 (μπλε) στην περιοχή μήκους κύματος 1600-1700 cm^{-1} . (β): Φάσμα FTIR δείγματος Hgb-HA-4 στις τρεις διαφορετικές συνθήκες, ακατέργαστο σε pH=4 (μαύρο), θερμικά κατεργασμένα pH=4 (κόκκινο) και θερμικά κατεργασμένα pH=7 (μπλε) στην περιοχή μήκους κύματος 1600-1700 cm^{-1} .

Για την καλύτερη μελέτη των παραπάνω γραφημάτων οφείλει να αναφερθεί η βιβλιογραφική αντιστοίχιση των δομικών στοιχείων (β 1.3) στα μήκη κύματος. Συγκεκριμένα η περιοχή 1678-1688 cm^{-1} αντιστοιχεί στις β -πτυχωτές επιφάνειες και στις β -στροφές, η περιοχή 1654-1658 cm^{-1} αντιστοιχεί στην α -έλικα, η περιοχή 1635-1639 cm^{-1} σε μικρά κομμάτια αλυσίδων που συνδέουν α -ελικοειδή κομμάτια και η περιοχή 1615-1630 cm^{-1} σε ενδομοριακές β -πτυχωτές επιφάνειες.

Στο γράφημα 5 παρατηρούμε στις καμπύλες έπειτα από τη θερμική κατεργασία μια ελαφριά μεταβολή στην περιοχή 1630-1610 cm^{-1} . Με γνώμονα τις παραπάνω αντιστοιχίσεις διαπιστώνουμε πως πρόκειται για μια σημαντική αύξηση στην ενδομοριακή διαμόρφωση των β -πτυχωτών επιφανειών, γεγονός που φανερώνει ότι εντός των συμπλόκων με CS και HA υφίσταται μια μετάβαση που διατηρείται ακόμη και όταν η θερμοκρασία επιστρέφει σε θερμοκρασία δωματίου. Επισημαίνεται ότι στο σύστημα Hgb-HA, η μεταβολή της ενδομοριακής διαμόρφωσης είναι εντονότερη.

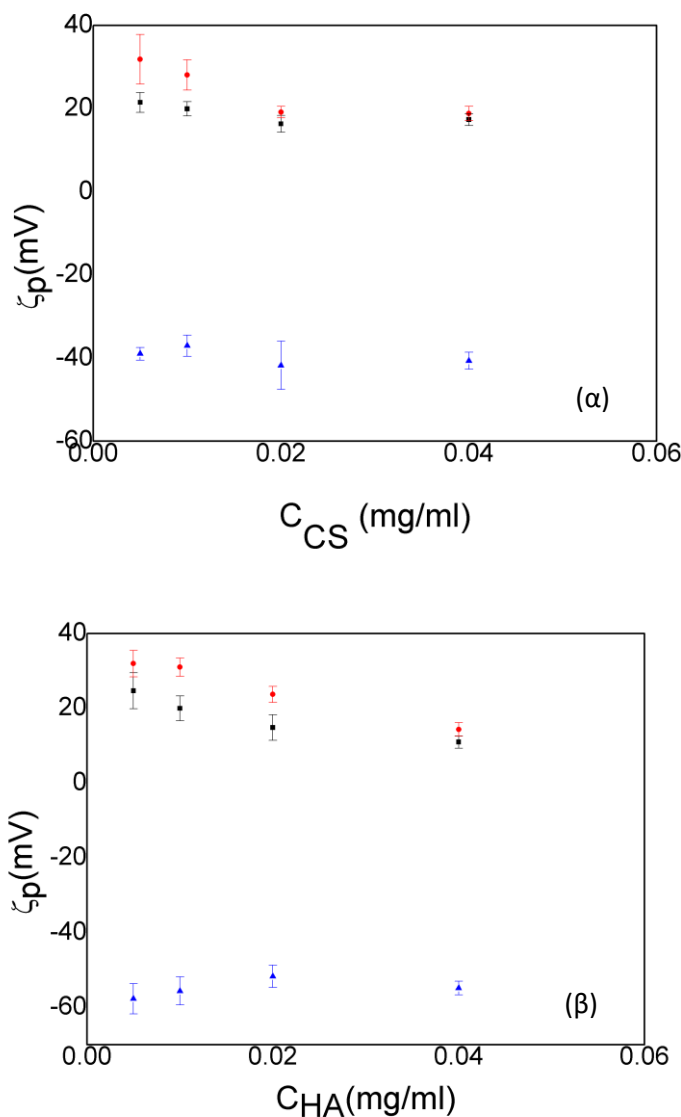
3.3 Επιφανειακό Φορτίο Νανοσωματιδίων

Διευρύνοντας τη μελέτη σταθερότητας των νανοσωματιδίων, μελετήσαμε το επιφανειακό φορτίο των νανοσωματιδίων στις τρεις διαφορετικές συνθήκες (pH=4, υπό θερμική κατεργασία pH=4 και υπό θερμική κατεργασία pH=7) καταγράφοντας για τα δείγματα του πίνακα 3 μετρήσεις ζ-δυναμικού

(§3.4.1). Η αλληλεπίδραση των νανοσωματιδίων με άλλα βιολογικά μακρομόρια όπως οι πρωτεΐνες και το DNA, αναμένεται να είναι ηλεκτροστατικής φύσεως . Το ολικό επιφανειακό φορτίο των νανοσωματιδίων σχετίζεται με το δυναμικό στην επιφάνειά τους.

Επισημαίνεται ότι οι μετρήσεις ζ-δυναμικού υλοποιήθηκαν με όργανο Zetasizer Nano-ZS της εταιρείας Malvern Instruments Ltd.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο παρακάτω γράφημα:



Γράφημα 6: (α) Μετρήσεις ζ-δυναμικού για τα δείγματα Hgb-CS-1,2,3,4 ακατέργαστα σε pH=4 (μαύρο), θερμικά κατεργασμένα pH=4 (κόκκινο) και θερμικά κατεργασμένα pH=7 (μπλε) σε συγκέντρωση Hgb 1 mg/ml. (β): Μετρήσεις ζ-δυναμικού για τα δείγματα Hgb-HA-1,2,3,4 ακατέργαστα σε pH=4 (μαύρο), θερμικά κατεργασμένα pH=4 (κόκκινο) και θερμικά κατεργασμένα pH=7 (μπλε) σε συγκέντρωση Hgb 1 mg/ml.

Παρατηρούμε ότι σε pH = 4 το ζ-δυναμικό είναι περίπου 20 mV. Μετά από θερμική κατεργασία η τιμή του ζ-δυναμικού αυξάνεται περίπου 10 – 12 mV πιθανώς λόγω προτίμησης έκθεσης των θετικά φορτισμένων τμημάτων της Hgb στη διεπιφάνεια νανοσωματιδίων-νερού. Το ζ-δυναμικό για θερμικά κατεργασμένα δείγματα σε pH = 7 παίρνει αρνητικές τιμές και φτάνει ~ - 40 mV για το σύστημα Hgb-

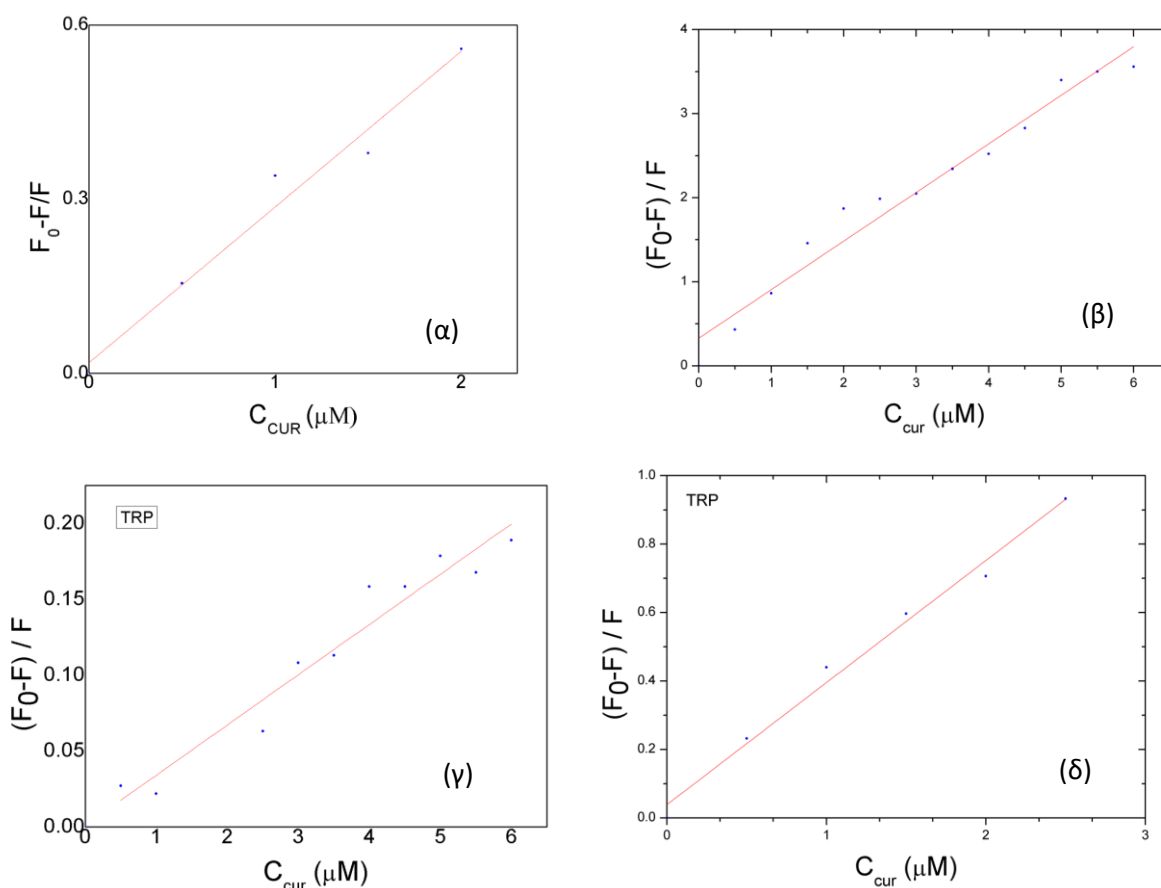
CS και $\sim -55\text{ mV}$ για το σύστημα Hgb-HA. Οι αρνητικές τιμές οφείλονται στο ότι η πρωτεΐνη με την αύξηση του pH, ξεπερνάει το ισοηλεκτρικό της σημείο και γίνεται αρνητικά φορτισμένη (§1.5.1.2). Το μέτρο ωστόσο του δυναμικού ακόμα και σε βασικό περιβάλλον είναι υψηλό επιβεβαιώνοντας την ισχύριότητα της σύμπλεξης και την αντοχή στις μεταβολές pH.

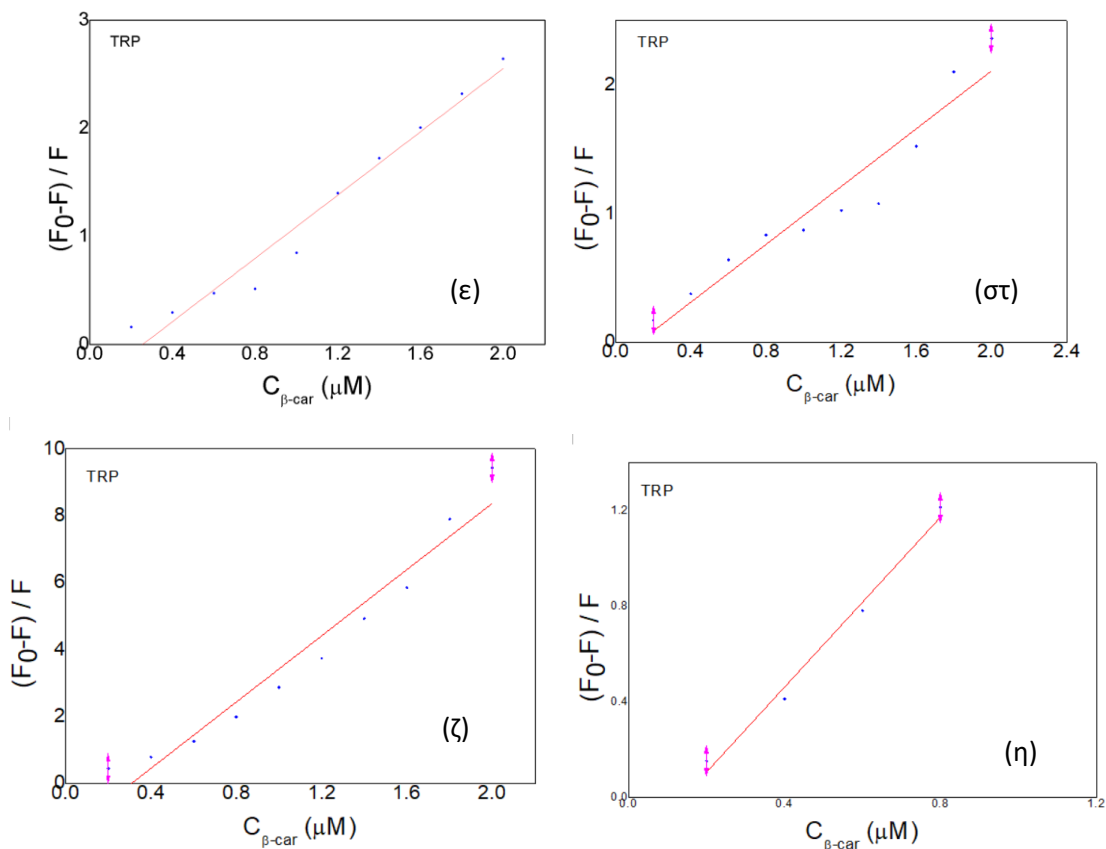
3.4 Ενθυλάκωση κουρκουμίνης και β-Καροτίνης σε νανοσωματίδια Hgb-CS και Hgb-HA

Με την ολοκλήρωση της παρασκευής σταθερών νανοσωματιδίων, σειρά είχε η απόπειρα ενθυλάκωσης βιοδραστικών ουσιών οι οποίες έχουν χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα και οι νανοφορείς συνιστούν πιθανή λύση αξιοποίησης τους. Στα πλαίσια αυτής της εργασίας ενθυλακώσαμε στα νανοσωματίδια μας τις βιοδραστικές ουσίες κουρκουμίνη και β-καροτίνη (\$4, \$5).

Συγκεκριμένα πήραμε μετρήσεις Fluorescence όπου ξεκινούσαμε με 1 ml δείγματός και προσθέταμε σταδιακά δόσεις 5 μL Cur ή 2 μL β-καροτίνης καταγράφοντας το φάσμα διέγερσης της τρυπτοφάνης, της τυροσίνης και της εκάστοτε βιοδραστικής ουσίας. Επισημαίνεται ότι τρυπτοφάνη και τυροσίνη είναι αμινοξέα της αιμοσφαιρίνης.

Με την αύξηση της βιοδραστικής ουσίας, περισσότερα μόρια αλληλεπιδρούν με την τρυπτοφάνη μέσω υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων. Η ένταση του φθορισμού (F) στο μέγιστο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω χαρακτηρισμό της διαδικασίας διαμόρφωσης δεσμών. Στην εξίσωση Stern-Volmer, μία σταθερά απόσβεσης (quenching constant) K_{SV} εξάγεται από τη σχέση: $\frac{F_0-F}{F} = K_{SV} \cdot c_{CUR}$ ή $\beta-car$ όπου F_0 είναι η ένταση στην απουσία cur ή $\beta-car$ αντίστοιχα. Παρακάτω παρατίθενται τα διαγράμματα του λόγου $\frac{F_0-F}{F}$ ως προς τη συγκέντρωση cur για 1 δείγμα από κάθε σύστημα σε τιμή pH 4 και pH7 για την κάθε βιοδραστική ουσία χωριστά καθώς οι σταθερές K_{SV} που προκύπτουν από την κλίση τους.





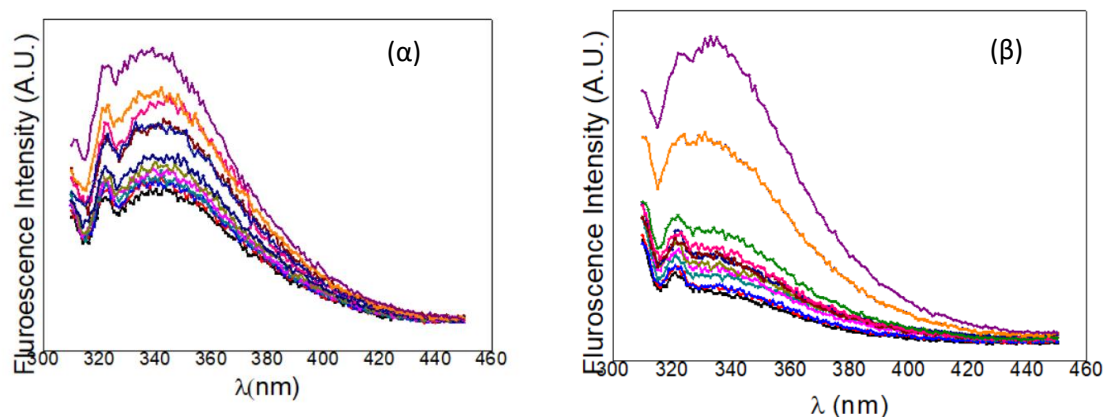
Γράφημα 7: $\frac{F_0-F}{F}$ για την εκάστοτε συγκέντρωση cur για το δείγμα (α) Hgb-CS-2 pH4 (β) Hgb-CS-2 pH7 (γ) Hgb-HA-2 pH4 (δ) Hgb-HA-2 pH7. $\frac{F_0-F}{F}$ για την εκάστοτε συγκέντρωση cur για το δείγμα (ε) Hgb-CS-2 pH4 (στ) Hgb-CS-2 pH7 (ζ) Hgb-HA-2 pH4 (η) Hgb-HA-2 pH7

Δείγμα	$K_{SV(cur)}$ (μM^{-1})	Σφάλμα $K_{SV(cur)}$ (μM^{-1})	$K_{SV(\beta-car)}$ (μM^{-1})	Σφάλμα $K_{SV(\beta-car)}$ (μM^{-1})
Hgb-CS-2 pH4	0.268	0.025	1.464	0.091
Hgb-CS-2 pH7	0.431	0.277	1.123	0.112
Hgb-HA-2 pH4	0.677	0.308	4.947	0.388
Hgb-HA-2 pH7	0.572	0.059	1.777	0.139

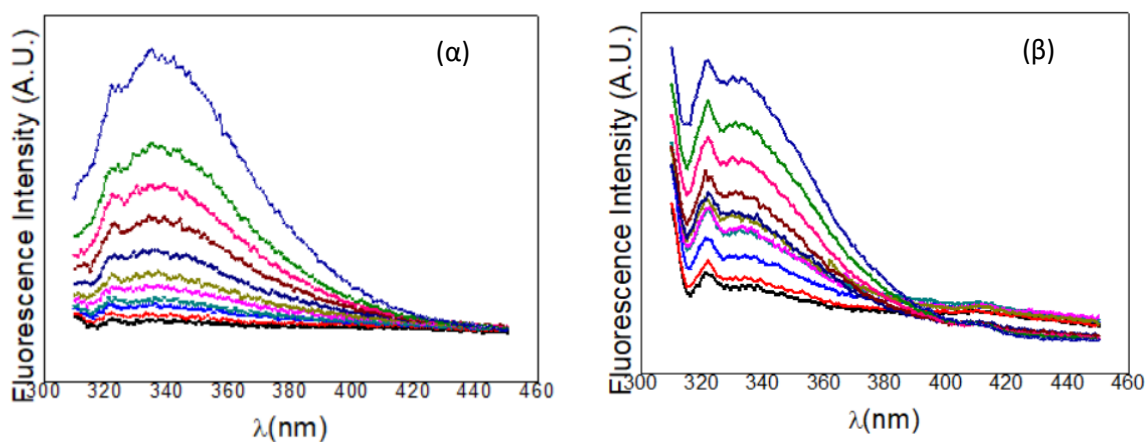
Πίνακας 4: Σταθερές $K_{SV(cur)}$, $K_{SV(\beta-car)}$ και τα αντίστοιχα σφάλματα σφάλμα $K_{SV(cur)}$, σφάλμα $K_{SV(\beta-car)}$ για τα δείγματα Hgb-CS-2, Hgb-HA-2 σε όξινο και βασικό περιβάλλον

Παρατηρούμε ότι οι σταθερές $K_{SV(cur)}$ $K_{SV(\beta-car)}$ έχουν τιμές συγκρίσιμες με προηγούμενες μελέτες γύρω από την ενθυλάκωση σε καθαρή πρωτεΐνη, γεγονός που αναδεικνύει ότι τα νανοσωματίδια

κληρονομούν την ικανότητα της Hgb να ενθυλακώνουν Cur και β-καροτίνη. Η εν λόγω ενθυλάκωση αποτυπώνεται σαφέστερα και στη μείωση της έντασης φθορισμού της τρυπτοφάνης με την προσθήκη βιοδραστικής ουσίας όπως φαίνεται στα παρακάτω διαγράμματα. Παρουσιάζεται ενδεικτικά ένα δείγμα από το σύστημα Hgb-CS στις δύο τιμές pH για την ενθυλάκωση cur και ένα δείγμα από το σύστημα Hgb-HA στις δύο τιμές pH για την ενθυλάκωση β-καροτίνης. Παρόμοια αποτελέσματα είχαν και τα υπόλοιπα δείγματα.



Γράφημα 8: Φθορισμός τρυπτοφάνης από θερμικά κατεργασμένα νανοσωματίδια (α) Hgb-CS-2 pH4 για συγκέντρωση cur σε μM 0 (μωβ), 0.5 (πορτοκαλί), 1 (μπλε), 1.5 (πράσινο), 2 (ροζ), 2.5 (καφέ), 3 (μπλε σκούρο), 3.5 (λαδί), 4 (λιλά), 4.5 (κυανό), 6 (μπλε ανοιχτό), 5.5 (κόκκινο), 6 (μαύρο) (β) Hgb-CS-2 pH7 με τις συγκεντρώσεις cur να αντιστοιχούν στα ίδια χρώματα με το (α)



Γράφημα 9: Φθορισμός Τρυπτοφάνης από θερμικά κατεργασμένα νανοσωματίδια (α) Hgb-HA-2 pH4 για συγκέντρωση β-καροτίνης σε μM 0 (μπλε), 0.2 (πράσινο), 0.4 (ροζ), 0.6 (καφέ), 0.8 (μπλε σκούρο), 1 (λαδί), 1.2 (λιλά), 1.4 (κυανό), 1.6 (μπλε ανοιχτό), 1.8 (κόκκινο), 2 (μαύρο) (β) Hgb-HA-2 pH4 με τις συγκεντρώσεις β-καροτίνης να αντιστοιχούν στα ίδια χρώματα με το (α)

Η παρατηρούμενη μείωση φανερώνει ότι η εκάστοτε βιοδραστική ουσία προσδέθηκε στα νανοσωματίδια διότι απέτρεπε την πρωτεΐνη από το να φθορίζει με ρυθμό ανάλογο της αύξησης της συγκέντρωσής της.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΥΔΡΟΓΕΛΩΝ

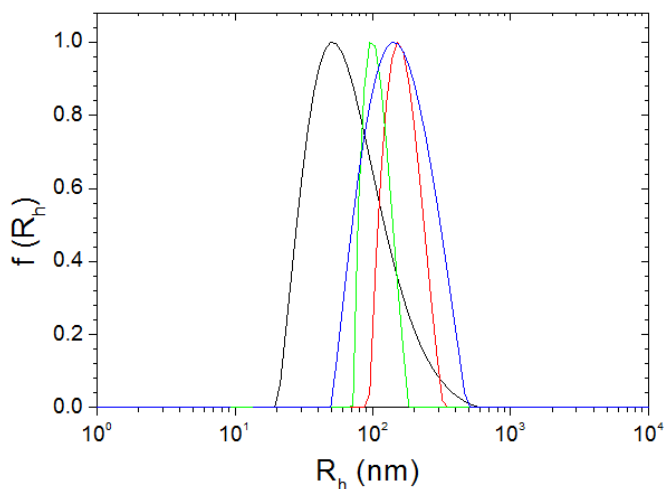
4.1 Σύστημα XG-BSA

Το σύστημα XG-BSA έχει ήδη μελετηθεί στο παρελθόν με όλες τις παραπάνω τεχνικές και έχει δείξει να δημιουργεί σταθερά νανοσωματίδια (Paragiannopoulos A., Sklarani A.). Τα δείγματα είχαν παρασκευαστεί με την ίδια τεχνική που κατασκευάστηκαν και τα δείγματα στα συστήματα Hgb-CS και Hgb-HA και είχαν υποβληθεί σε θερμική κατεργασία υπό ανάδευση σε νερό στους 70° C για 5 λεπτά. Η ακριβής σύσταση αυτών των δειγμάτων παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα.

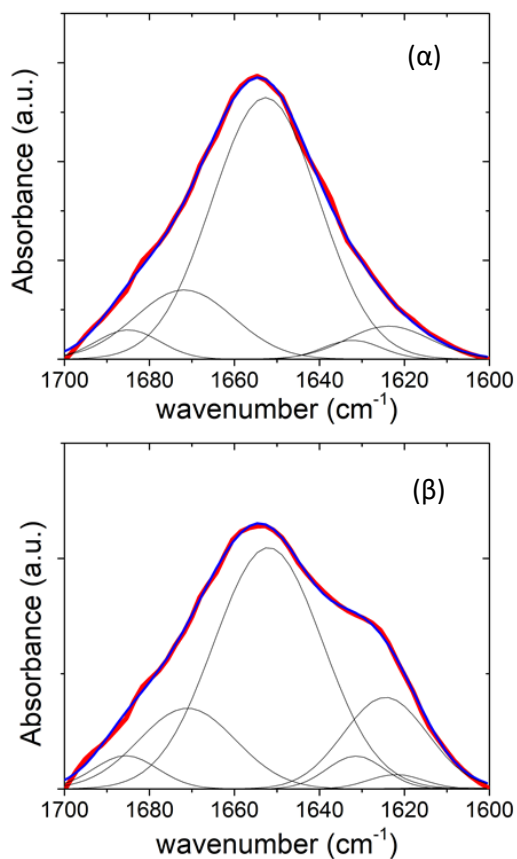
Όνομα Δείγματος	Αναλογία μαζών	H ₂ O (μL)	CA (1 mg/ml) (μL)	XG (0.1 mg/ml) (μL)	BSA (1 mg/ml) (μL)
XG-BSA-1	0,05	830	20	50	100
XG-BSA -2	0,06	820	20	60	100
XG-BSA -3	0,07	810	20	70	100
XG-BSA -4	0,08	800	20	80	100

Πίνακας 5: Σύσταση Δειγμάτων XG-BSA που έχουν ήδη μελετηθεί.

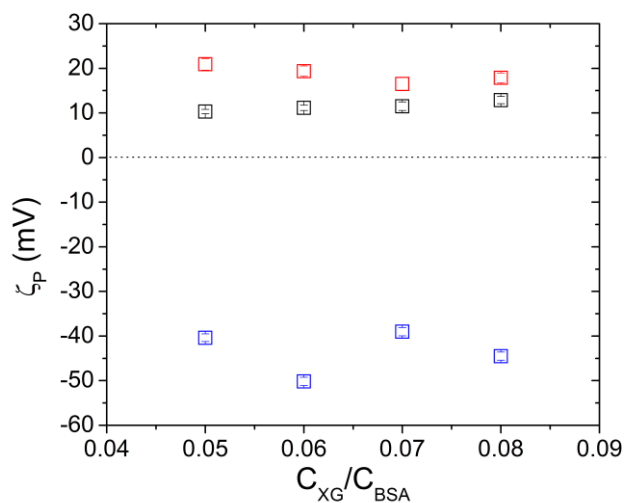
Παρακάτω παρατίθενται εν συντομία τα αποτελέσματα της μελέτης του συστήματος XG-BSA από τις αντίστοιχες πειραματικές τεχνικές της μελέτης του συστήματος Hgb-CS και Hgb-HA



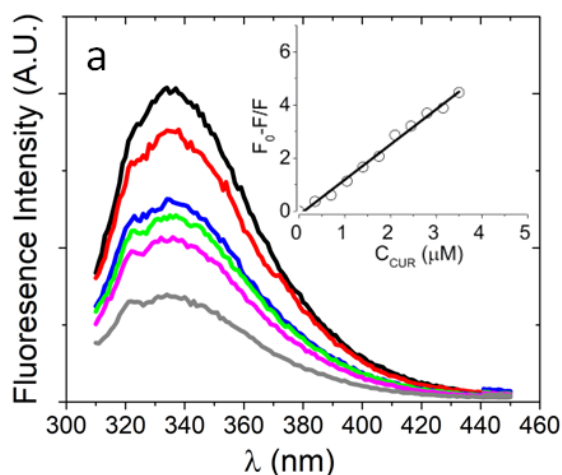
Γράφημα 10: Κατανομή υδροδυναμικών ακτίνων σε διαλύματα συμπλόκων XG-BSA αναλογίας $5 \cdot 10^{-2}$ (μαύρο), XG-BSA αναλογίας $6 \cdot 10^{-2}$ (κόκκινο), XG-BSA αναλογίας $7 \cdot 10^{-2}$ (πράσινο), XG-BSA αναλογίας $8 \cdot 10^{-2}$ (μπλε).



Γράφημα 11: Φάσμα απορρόφησης FTIR (κόκκινο) από νανοσωματίδια XG-BSA αναλογίας $6 \cdot 10^{-2}$ και συγκέντρωση BSA 1 mg/ml^{-1} σε pH 5 πριν (α) και μετά (β) από θερμική κατεργασία.



Γράφημα 12: Μετρήσεις ζ-δυναμικού για τα δείγματα XG-BSA αναλογιών $(5,6,7,8) \cdot 10^{-2}$ ακατέργαστα σε pH=5 (μαύρο), θερμικά κατεργασμένα pH=5 (κόκκινο) και θερμικά κατεργασμένα pH=7 (μπλε) σε συγκέντρωση BSA 1 mg/ml .



Γράφημα 13: Φθορισμός τρυπτοφάνης από θερμικά κατεργασμένα νανοσωματίδια XG-BSA αναλογίας $8 \cdot 10^{-2}$ pH7 για συγκέντρωση cur σε μM 0 (μαύρο), 0.35 (κόκκινο), 0.70 (μπλε), 1.05 (πράσινο), 1.40 (ροζ), 1.75 (γκρι).

Παρατηρούμε πως τα παραπάνω διαγράμματα παρουσιάζουν αρκετή συνάφεια με τα αντίστοιχα που καταγράψαμε για τα συστήματα της αιμοσφαιρίνης. Πιο συγκεκριμένα, μέσω του συστήματος XG-BSA, παράγονται μονοδιάσπαρτα σύμπλοκα με υδροδυναμική ακτίνα γύρω στα 100 nm (γράφημα 10).

Αναφορικά με την απορρόφηση, παρατηρείται ενίσχυση στην περιοχή των ενδομοριακών β-επιπέδων ($1615 - 1630 \text{ cm}^{-1}$) στα σύμπλοκα που έχουν υποστεί θερμική κατεργασία, υποδηλώνοντας το σχηματισμό ενδοσφαιρικών συνδέσεων, μια μετάβαση που διατηρείται και όταν η θερμοκρασία επιστρέψει σε θερμοκρασία δωματίου (γράφημα 11). Το παραπάνω γεγονός αποδεικνύει την ενίσχυση της σταθερότητας των συμπλόκων με την αξιοποίηση θερμικής κατεργασίας.

Το ζ-δυναμικό, επιφανειακό φορτίο, των ακατέργαστων σωματιδίων κυμαίνεται γύρω στα 10 mV. Έπειτα από θερμική κατεργασία αυξάνεται 1-10 mV. Με τη μεταβολή του pH σε τιμή 7, αποκτά αρνητικές τιμές με απόλυτη τιμή 40-55 mV (γράφημα 12). Η συμπεριφορά του δυναμικού κατά τη διαδικασία της θέρμανσης και αύξησης του pH φανερώνει ισχυρή σύμπλεξη των σωματιδίων.

Τέλος, η καθοδική πορεία του φθορισμού της τρυπτοφάνης με την σταδιακή προσθήκη κουρκουμίνης και η παράλληλη αύξηση φθορισμού της κουρκουμίνης (γράφημα 13) φανερώνει ότι τα σύμπλοκα δύνανται να ενθυλακώσουν την υδρόφοβη βιοουσία.

4.2 Παρασκευή υδρογελών

Από το σύστημα που παρουσιάστηκε παραπάνω επιχειρήσαμε να κατασκευάσουμε υδρογέλες. Στην κατασκευή υδρογελών από πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες έχουν επικρατήσει τρεις μέθοδοι παρασκευής που διαφοροποιούνται ως προς τη σειρά και τον τρόπο ανάμειξης των συστατικών καθώς και ως προς τη χρονική στιγμή ρύθμισης του pH.

Ένας πρώτος τρόπος είναι να διαλύσει κανείς πολυσακχαρίτη και πρωτεΐνη χωριστά, ρυθμίζοντας την τιμή του pH του κάθε διαλύματος στην επιθυμητή τιμή, και να υλοποιήσει την παρασκευή τοποθετώντας-απλώνοντας πρώτα πολυσακχαρίτη και εναποθέτοντας από πάνω του πρωτεΐνη (π.χ. με τη χρήση πιπέτας). Ένας δεύτερος τρόπος είναι τοποθετήσει κανείς αδιάλυτο τον πολυσακχαρίτη και την πρωτεΐνη στο ίδιο δοχείο και στη συνέχεια να διαλύσει από κοινού τις δύο ουσίες με νερό. Τέλος, ένας τρίτος τρόπος είναι να διαλύσει κανείς τον πολυσακχαρίτη και την πρωτεΐνη χωριστά χωρίς τη χρήση κιτρικού οξέος, δηλαδή χωρίς να επέμβει στην τιμή του pH, να αναμείξει τις κατάλληλες ποσότητες και να προσθέσει στο τελικό μείγμα κιτρικό οξύ. Επισημαίνεται πως όλες οι μέθοδοι απαιτούν έντονη ανάδευση.

Διερευνώντας τη συμπεριφορά των υδρογελών, κατασκευάσαμε ποικίλα δοκίμια δοκιμάζοντας τους παραπάνω τρόπους και μεταβάλλοντας τις αναλογίες των συστατικών. Από προηγούμενες μελέτες έχει προκύψει εμπειρικά πως η αναλογία μαζών $\frac{XG}{BSA} = 1$ είναι αρκετά ευνοϊκή για την παρασκευή υδρογελών. Επισημαίνεται πως αξιοποιήθηκε και σε αυτή τη διαδικασία η θερμική κατεργασία για μεγαλύτερη σταθερότητα και αντοχή. Τα δείγματα που έδειξαν να σχηματίζουν σταθερές, ομογενείς υδρογέλες καθώς και ο τρόπος παρασκευής τους παρουσιάζονται παρακάτω:

Δείγμα 0 : Αρχικά κατασκευάσαμε διάλυμα XG 20 mg/ml σε pH 4 και διάλυμα BSA 20 mg/ml σε pH 4. Στη συνέχεια τοποθετήσαμε σε ένα δισκίδιο 213 μ L από το διάλυμα XG και εναποθέσαμε από πάνω 213 μ L από το διάλυμα BSA.

Δείγμα 1: Αρχικά τοποθετήσαμε σε ένα δισκίδιο αδιάλυτα 30 mg XG και 30 mg BSA και τα διαλύσαμε σε 3 ml H₂O αναδεύοντας με γυάλινη ράβδο έως ότου επέλθει ομογενοποίηση. Στη συνέχεια εναποθέσαμε στο δείγμα 2 ml CA συγκέντρωσης 1 mg/ml και το ψήσαμε στους 90° C για 15 λεπτά.

Δείγμα 2: Αρχικά τοποθετήσαμε σε ένα δισκίδιο αδιάλυτα 30 mg XG, 30 mg BSA και 1 mg CA και τα διαλύσαμε σε 3 ml H₂O αναδεύοντας με γυάλινη ράβδο έως ότου επέλθει ομογενοποίηση. Στη συνέχεια ψήσαμε στους 90° C για 15 λεπτά.

Δείγμα 3: Αρχικά τοποθετήσαμε σε ένα δισκίδιο αδιάλυτα 30 mg XG και 30 mg BSA και τα διαλύσαμε σε 3 ml H₂O αναδεύοντας με γυάλινη ράβδο έως ότου επέλθει ομογενοποίηση. Στη συνέχεια εναποθέσαμε στο δείγμα 2 ml CA συγκέντρωσης 1 mg/ml και το ψήσαμε στους 70° C για 15 λεπτά.

4.3 Μελέτη διηλεκτρικών ιδιοτήτων υδρογελών

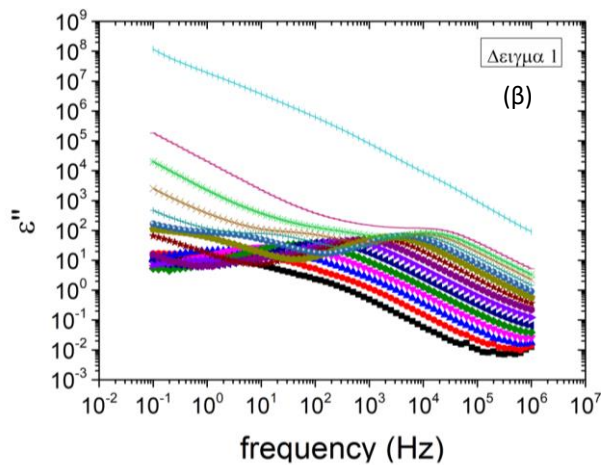
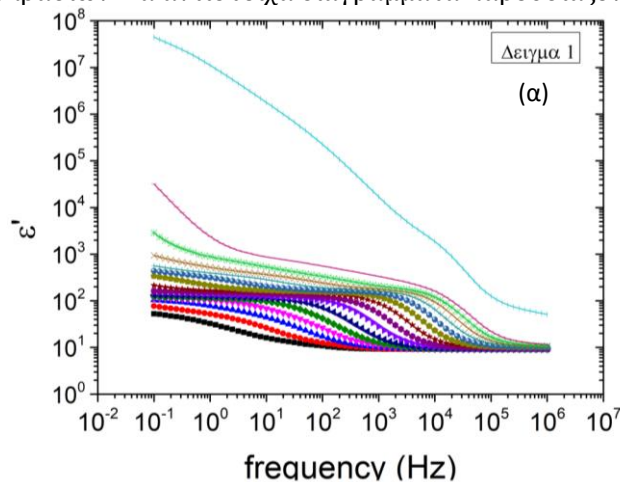
Μετά την κατασκευή συμπαγών, ομογενών υδρογελών προεκτείναμε τη μελέτη μέσω της μελέτης των διηλεκτρικών τους ιδιοτήτων. Τα παραπάνω δείγματα υποβλήθηκαν σε μετρήσεις διηλεκτρικής φασματοσκοπίας εναλασόμενου πεδίου.

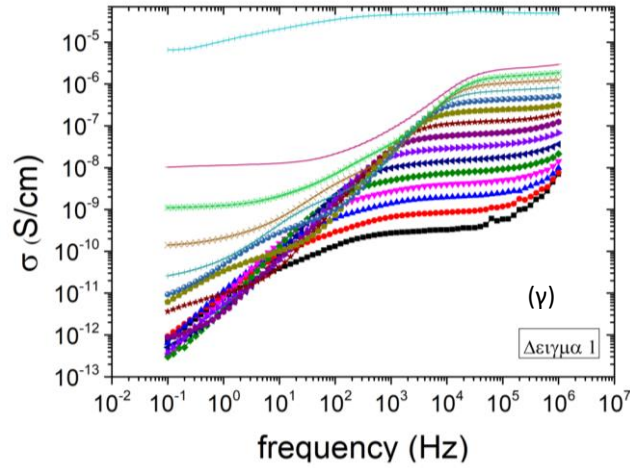
Πριν την έναρξη μέτρησης κάθε δείγματος, καταγραφόταν το πάχος του. Σημειώνεται ότι η αβεβαιότητα στη μέτρηση του πάχους είναι μεγάλη, εξαιτίας της φύσης των υλικών αλλά και της μορφολογίας τους. Τα πάχη των δειγμάτων που μετρήθηκαν παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον παρακάτω πίνακα.

Δείγμα	Πάχος
Δείγμα 0	0,274 mm
Δείγμα 1	1,064 mm
Δείγμα 2	2,876 mm
Δείγμα 3	

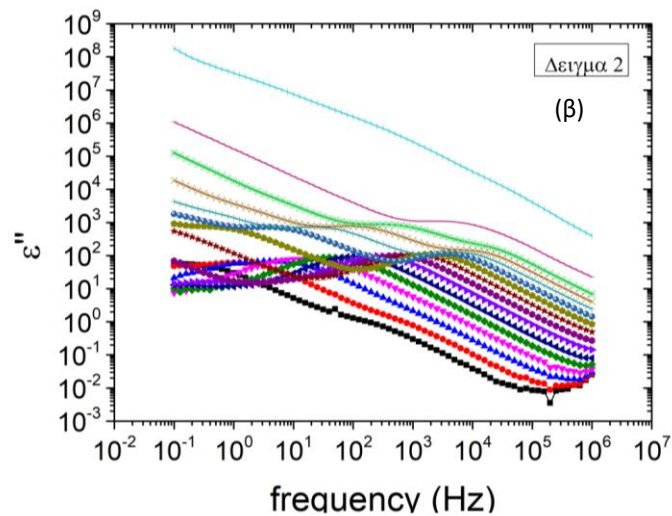
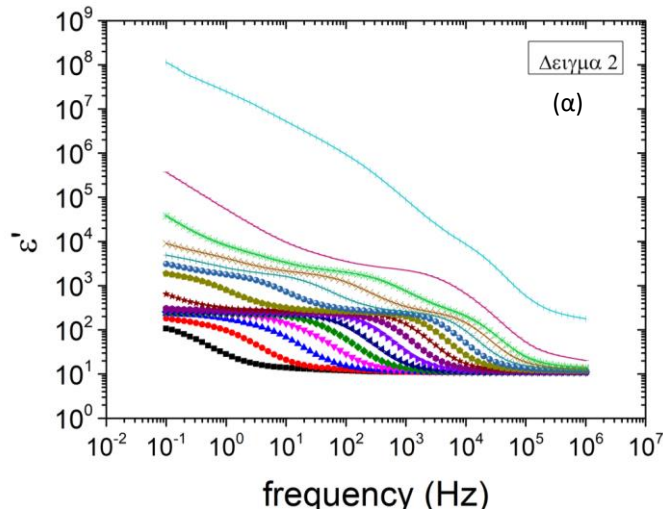
Πίνακας 6: Πάχη δειγμάτων που μετρήθηκαν με DRS

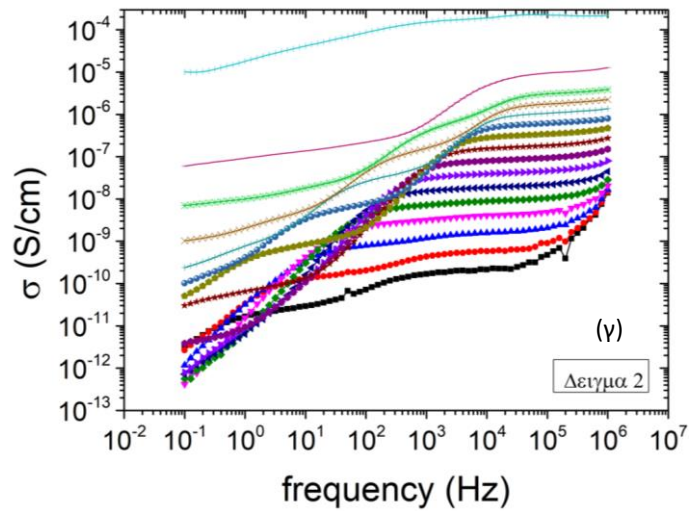
Για κάθε δείγμα καταγράψαμε μετρήσεις αναφορικά με το πραγματικό και φανταστικό μέρος της σύνθετης διηλεκτρικής συνάρτησης (ϵ' και ϵ''), καθώς και την αγωγιμότητα, συναρτήσει της συχνότητας, σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών. Τα αντίστοιχα διαγράμματα παρουσιάζονται παρακάτω:



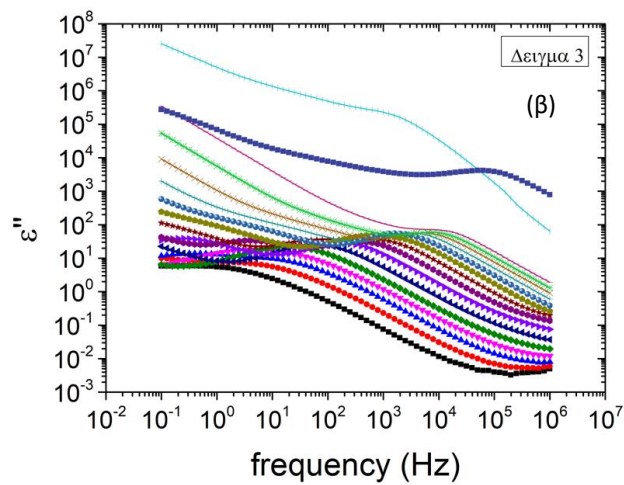
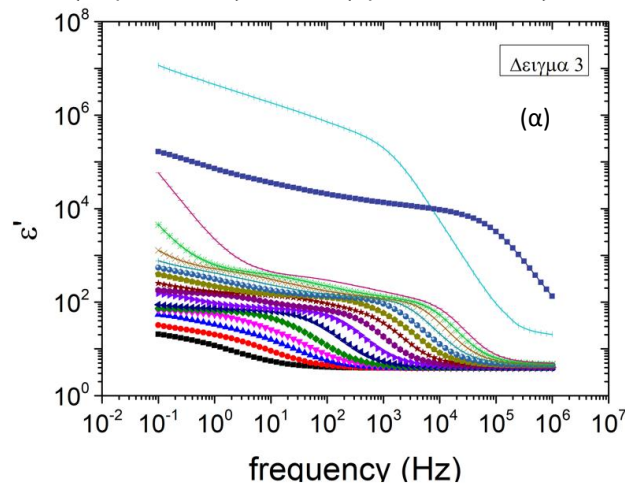


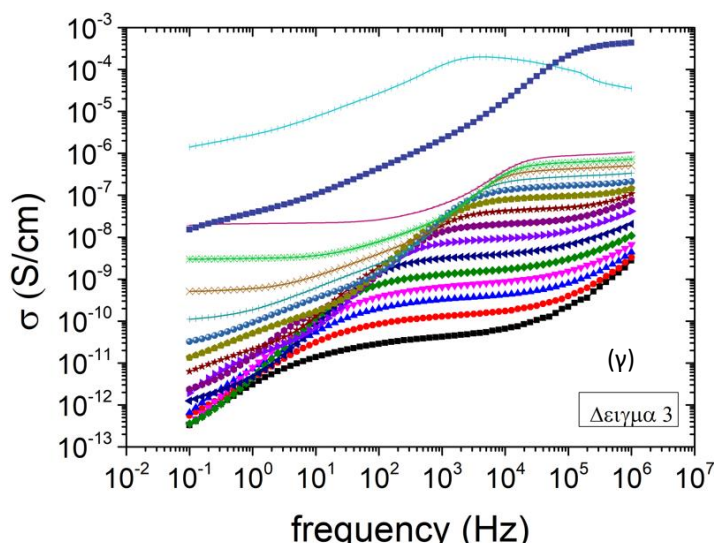
Γράφημα 14: Πραγματικό μέρος διηλεκτρικής συνάρτησης ϵ' (α), φανταστικό μέρος διηλεκτρικής συνάρτησης ϵ'' (β) και ηλεκτρική αγωγιμότητα (γ) του δείγματος 1 συναρτήσει της συχνότητας f του ηλεκτρικού πεδίου για θερμοκρασίες -150°C (μαύρο), -140°C (κόκκινο), -130°C (μπλε), -120°C (ροζ), -110°C (πράσινο σκούρο), -100°C (μπλε σκούρο), -90°C (μωβ), -80°C (μωβ σκούρο), -70°C (καφέ), -60°C (λαδί), -50°C (πετρέλ), -40°C (πετρέλ ανοιχτό), -30°C (καφέ ανοιχτό), -20°C (πράσινο ανοιχτό), -10°C (ροζ σκούρο), 0°C (γαλάζιο).





Γράφημα 15: Πραγματικό μέρος διηλεκτρικής συνάρτησης ϵ' (α), φανταστικό μέρος διηλεκτρικής συνάρτησης ϵ'' (β) και ηλεκτρική αγωγιμότητα (γ) του δείγματος 2 συναρτήσει της συχνότητας f του ηλεκτρικού πεδίου για θερμοκρασίες -150°C (μαύρο), -140°C (κόκκινο), -130°C (μπλε), -120°C (ροζ), -110°C (πράσινο σκούρο), -100°C (μπλε σκούρο), -90°C (μωβ), -80°C (μωβ σκούρο), -70°C (καφέ), -60°C (α) -50°C (λαδί), -50°C (πετρέλ), -40°C (πετρέλ ανοιχτό), -30°C (καφέ ανοιχτό), -20°C (πράσινο ανοιχτό), -10°C (ροζ σκούρο), 0°C (γαλάζιο).





Γράφημα 16: Πραγματικό μέρος διηλεκτρικής συνάρτησης ϵ' (α), φανταστικό μέρος διηλεκτρικής συνάρτησης ϵ'' (β) και ηλεκτρική αγωγιμότητα (γ) του δείγματος 3 συναρτήσει της συχνότητας f του ηλεκτρικού πεδίου για θερμοκρασίες -150°C (μαύρο), -140°C (κόκκινο), -130°C (μπλε), -120°C (ροζ), -110°C (πράσινο σκούρο), -100°C (μπλε σκούρο), -90°C (μωβ), -80°C (μωβ σκούρο), -70°C (καφέ), -60°C (λαδί), -50°C (πετρόλ), -40°C (πετρόλ ανοιχτό), -30°C (καφέ ανοιχτό), -20°C (πράσινο ανοιχτό), -10°C (ροζ σκούρο), 0°C (γαλάζιο), 10°C (πετρόλ με ρόμβους)

Στα παραπάνω διαγράμματα δεν περιλαμβάνεται το δείγμα 0 διότι κατά την καταγραφή της μέτρησης δεν κατάφερε να διατηρηθεί αέριο με αποτέλεσμα να προκαλέσει βραχυκύκλωμα, επαφή των δύο οπλισμών, και κατ' επέκταση έδωσε μη αντιπροσωπευτικές μετρήσεις. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το μικρό πάχος του δείγματος (βλ. Πίνακα 6) φανερώνει ότι ο πρώτος τρόπος παρασκευής δεν ενδύκνεται για την κατασκευή ανθεκτικών υδρογελών.

Αξίζει επίσης να αναφερθεί πως τα δείγματα 1 και 2 υφίσταντο σημαντική αλλοίωση όταν η θερμοκρασία έφτανε τους 10°C (άστατα σήματα), ενώ το δείγμα 3 ήταν το μόνο που παρέμεινε σταθερό ακόμα και στη μέτρηση των 10°C . Εξάγεται έτσι το συμπέρασμα ότι το «ψήσιμο» σε μικρότερες θερμοκρασίες ενδεχομένως να οδηγεί σε μεγαλύτερη σταθερότητα.

Από τα παραπάνω διαγράμματα, παρατηρούμε ποιοτικά ότι όσο αυξάνεται η θερμοκρασία, τόσο η έναρξη του πλατώ (μεγιστοποίηση της πόλωσης) του πραγματικού μέρους της διηλεκτρικής συνάρτησης μετατοπίζεται σε ολοένα και μεγαλύτερες συχνότητες, γεγονός που υποδηλώνει ότι όσο θερμαίνονται οι υδρογέλες τόσα περισσότερα δίπολα μπορούν να ακολουθούν το πεδίο και σε μεγαλύτερες συχνότητες ενισχύοντας την πόλωση. Η καμπύλη που αντιστοιχεί στους 0°C είναι αρκετά πιο ψηλά από τις υπόλοιπες και το πλατώ της αρχίζει στην πιο μεγάλη συχνότητα από όλες τις θερμοκρασίες. Στη θερμοκρασία αυτή, ο πάγος που βρίσκεται εντός των υδρογελών τήκεται με αποτέλεσμα τη μεγάλη αύξηση (κατά τάξεις μεγέθους) στο ϵ' .

Στο διάγραμμα του φανταστικού μέρους της διηλεκτρικής συνάρτησης, φαίνεται όλες οι καμπύλες να ακολουθούν γενικά καθοδική πορεία με την αύξηση της συχνότητας και να αποκτούν πιο έντονη κλίση μετά από μια ορισμένη τιμή. Αυτή η τιμή αντιστοιχεί στον «κορεσμό» της πόλωσης, από εκείνη τη συχνότητα και έπειτα, τα δίπολα δεν «καταβάλλουν πια προσπάθεια» να ευθυγραμμιστούν γιατί αδυνατούν να προλαβούν να αντιληφθούν τις εναλλαγές της συχνότητας. Στις αρχικές θερμοκρασίες (-150°C έως -100°C) παρατηρούμε τις καμπύλες είτε να σχηματίζουν ένα μικρό πλατώ είτε να ακολουθούν μια ελαφρώς ανοδική πορεία σε χαμηλές συχνότητες. Αυτό συμβαίνει διότι στις

χαμηλές θερμοκρασίες εφόσον τα περισσότερα δίπολα είναι παγωμένα, δεν μπορούν να κινηθούν και άρα δεν καταναλώνουν ενέργεια ώστε να σημειώνεται αύξηση των απωλειών. Όσο αυξάνεται η θερμοκρασία, κάποια δίπολα κινούνται, συμμετέχουν στην πόλωση και καταναλώνουν ενέργεια. Όταν έχουμε μεγιστοποίηση των διπόλων που ακολουθούν το πεδίο, παρατηρούμε ένα βήμα (step) στο ε' και μια κορυφή (μεγιστοποίηση) στις απώλειες ε''. Το βήμα και η κορυφή μετατοπίζονται σε ολοένα και μεγαλύτερες συχνότητες όσο αυξάνεται περαιτέρω η θερμοκρασία και τα δίπολα γίνονται πιο ευκίνητα. Η καμπύλη της μηδενικής θερμοκρασίας ξεχωρίζει και σε αυτό το γράφημα τοποθετημένη αρκετά πάνω απ' όλες διότι το νερό που τήκεται στο εσωτερικό των υδρογελών προκαλεί μεγάλη αύξηση (κατά τάξεις μεγέθους) των απωλειών.

Αναφορικά με την αγωγιμότητα, όλες οι καμπύλες ακολουθούν είτε γραμμική είτε ελαφρώς ανοδική πορεία με την αύξηση της συχνότητας και μεταβάλλουν έντονα την κλίση τους σε κάποια ορισμένη τιμή. Μέχρι αυτή την τιμή, στις χαμηλές δηλαδή συχνότητες, η αγωγιμότητα αντιστοιχεί στην αγωγιμότητα συνεχούς πεδίου, ενώ από εκείνη και ύστερα αποτυπώνεται η αγωγιμότητα εναλασσόμενου πεδίου η οποία αυξάνεται έντονα με την αύξηση της συχνότητας. Η αύξηση αυτή οφείλεται στην παρουσία δέσμιων ή ημιδέσμιων φορτίων στην περιοχή. Γενικά, όσο θερμαίνονται οι υδρογέλες τόσο πιο αγωγιμες γίνονται. Η καμπύλη της μηδενικής θερμοκρασίας βρίσκεται στην υψηλότερη θέση καθώς σε εκείνη τη θερμοκρασία έχουμε τη μεγαλύτερη αγωγιμότητα.

4.4 Ανακεφαλαίωση - Συζήτηση για το μέλλον

Υπάρχει πληθώρα φαρμάκων και θρεπτικών ουσιών τα οποία παρόλο που διαθέτουν ιδιαίτερα ευεργετικές ιδιότητες και δύνανται να συμβάλλουν στην πρόληψη ή ακόμη και στην αντιμετώπιση ορισμένων ασθενειών, χαρακτηρίζονται από υδροφοβικότητα και χαμηλή υδατική διαλυτότητα με αποτέλεσμα να διαλύονται μέχρι να φτάσουν στο σημείο αξιοποίησης τους. Το ζήτημα αυτό έχει απασχολήσει αρκετά την επιστημονική κοινότητα. Αρκετά υποσχόμενες είναι οι τεχνικές που έχουν εφαρμοστεί στο εύρος της νανοτεχνολογίας οι οποίες έχουν επικεντρωθεί κυρίως στη σύνθεση βιολογικών νανουλικών ώστε να είναι ακίνδυνα προς τον ανθρώπινο οργανισμό. Τα νανουλικά αυτά έχουν ως σκοπό να λειτουργήσουν ως «φορείς» των συγκεκριμένων φαρμάκων ώστε να τα μεταφέρουν στο εκάστοτε επιθυμητό σημείο χωρίς εκείνα να διαλύονται και ύστερα να τα αποδεσμεύουν. Η πραγματική πρόκληση σε αυτές τις τεχνικές είναι η κατασκευή νανουλικών με τέτοιο τρόπο ώστε να μπορεί να αναπαραχθεί εύκολα με την ίδια ακρίβεια και αποτελεσματικότητα. Είναι σημαντικό, δηλαδή, να μπορεί κανείς να συνθέσει υλικά στα οποία να μπορεί να ελέγξει τη μορφολογία και την κατανομή τους. Ο έλεγχος αυτός υλοποιείται ποικιλοτρόπως με διάφορες πειραματικές μεθόδους.

Στην παρούσα εργασία επιχειρήσαμε να κατασκευάσουμε βιολογικά νανοσωματίδια από πρωτεΐνη και πολυσακχαρίτη μέσω ηλεκτροστατικής σύμπλεξης. Εξοικειωθήκαμε με τεχνικές μέσω των οποίων μελετάται η σύμπλεξη, η σταθερότητα και η δυνατότητα ενθυλάκωσης βιοουσιών για αυτά τα υλικά. Επιπλέον συνθέσαμε υδρογέλες από πρωτεΐνη και πολυσακχαρίτη και καταγράψαμε φάσματα αναφορικά με τις διηλεκτρικές τους ιδιότητες.

Οι τεχνικές και ο τρόπος προσέγγισης που έχει περιγραφεί στην παραπάνω μελέτη μπορούν να αξιοποιηθούν και στη σύνθεση νανοσωματιδίων από διαφορετικούς συνδυασμούς πρωτεϊνών και πολυσακχαριτών που ακόμα παραμένουν ανεξερεύνητοι. Κάποιος συνδυασμός ενδεχομένως να δημιουργεί νανοφορείς με πιο αποτελεσματικές ιδιότητες.

Επιπρόσθετα, δεδομένου ότι η κατασκευή βιολογικών υδρογελών είναι ένας τομέας που πρόσφατα έχει αρχίσει να ερευνάται, μπορεί κανείς με αφετηρία τις μεθόδους παρασκευής που παρουσιάζονται παραπάνω να επιχειρήσει να κατασκευάσει υδρογέλες τόσο από τα συστήματα Hgb-CS και Hgb-HA των οποίων η συμπεριφορά έχει μελετηθεί, όσο και από οποιονδήποτε άλλο συνδυασμό πρωτεΐνης και πολυσακχαρίτη εφόσον έχει πρώτα βεβαιωθεί για την αξιοποίησιμη συμπεριφορά του συστήματος (παραγωγή μονοδιάσπαρτων σταθερών νανοσωματιδίων με δυνατότητα ενθυλάκωσης ουσιών).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξενόγλωσσες πηγές

2.3: *Structure & Function- Proteins I*, LibreTexts, Biology, Mind Touch, doi: [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Biochemistry/Book%3A_Biochemistry_Free_For_All_\(Ahern_Rajagopal_and_Tan\)/02%3A_Structure_and_Function/203%3A_Structure__Function-_Proteins_I](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Biochemistry/Book%3A_Biochemistry_Free_For_All_(Ahern_Rajagopal_and_Tan)/02%3A_Structure_and_Function/203%3A_Structure__Function-_Proteins_I)

Abdu I. Alayash, *Hemoglobin-Based Blood Substitutes and the Treatment of Sickle Cell Disease: More Harm than Help?*, Biomolecules, doi: 10.3390/biom7010002

Amir Pourabed, Tayyaba Younas, Chang Liu, Bhuvana K.Shanbhag, Lizhong He, Tuncay Alan, *High throughput acoustic microfluidic mixer controls self-assembly of protein nanoparticles with tuneable sizes*, Journal of Colloid and Interface Science

Aristeidis Papagiannopoulos, Eleni Vlassi, Aurel Radulescu, *Reorganizations inside thermally stabilized protein/polysaccharide nanocarriers investigated by small angle neutron scattering*, Carbohydrate Polymers, 15 August 2019, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.077>

BD Editors, *Polysaccharide*, biology dictionary, October 2019, doi: <https://biologydictionary.net/polysaccharide/>

Chapter 6 - *Physics of electrorheological fluids*, *Studies in Interface Science*, Volume 22, 2005, Pages 235-340, doi: [https://doi.org/10.1016/S1383-7303\(05\)80021-3](https://doi.org/10.1016/S1383-7303(05)80021-3)

Dr Gajendra Kumar Azad, *Stabilising forces in protein structure*, Post Graduate Department of Zoology Patna University, doi: <https://www.patnauniversity.ac.in/e-content/science/zoology/MScZoo41.pdf>

Dr. Murli Dharmadhikari, *pH and Protein Instability*, Vineyard and Vintage View, Mountain Grove, MO, doi: <https://www.extension.iastate.edu/wine/files/page/files/phandproteininstability.pdf>

Eleni Vlassi, Aristeidis Papagiannopoulos, *Nanoformulation of fibrinogen by thermal stabilization of its electrostatic complexes with hyaluronic acid*, International Journal of Biological Macromolecules, 1 September 2020

F.C.Jentoft, *Surface Inorganic Chemistry and Heterogeneous Catalysis*, Comprehensive Inorganic Chemistry II (Second Edition), 2013

Fluorescence Spectroscopy (The Basics), Jas.co, doi: <https://jascoinc.com/learning-center/theory-of-spectroscopy/fluorescence-spectroscopy/>

FTIR Spectroscopy, Understand Molecules and Molecular Structures with FTIR Spectroscopy Equipment, Mettler Toledo, Indonesia

Function of proteins, lumen, Biology for Majors, doi: <https://courses.lumenlearning.com/wm-biology1/chapter/reading-function-of-proteins/>

Gökçe Şeker Karatoprak, *Antioxidants with hepatoprotective activity in Influence of Nutrients*, Bioactive Compounds, and Plant Extracts in Liver Diseases, 2021, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816488-4.00008-5>

HadisRostamabadi, *Electrospraying as a novel process for the synthesis of particles/nanoparticles loaded with poorly water-soluble bioactive molecules*, *Advances in Colloid and Interface Science*, Volume 290, April 2021

Haroon Iqbal , Tao Yang , Ting Li , Miya Zhang , Hengte Ke , Dawei Ding , Yibin Deng , Huabing Chen, *Serum protein-based nanoparticles for cancer diagnosis and treatment*, *Journal of controlled release*

Hossein Abolhassani, Seyed Abbas Shojaosadati, *A comparative and systematic approach to desolvation and self-assembly methods for synthesis of piperine-loaded human serum albumin nanoparticles*, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, June 2019

Ibrahim Khan, Khalid Saeed, Idrees Khan, *Nanoparticles: Properties, applications and toxicities*, King Saud University , *Arabian Journal of Chemistry* (2019) 12, 908-931

J. E. Halver, Chapter 3. *Proteins and Amino Acids*, University of Washington

J.H. Kristensen, M.A. Karsdal, *Elastin, Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin*, 2016

J.Shaikh, D.D.Ankola, V.Beniwal, D.Singh, M.N.V. Ravi Kumar, *Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer*, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, June 2009

Jose Wilson P. Carvalhoa, Francisco A.O. Carvalhoa, Patricia S. Santiago Marcel Tabak, *Thermal denaturation and aggregation of hemoglobin of Glossoscolex paulistus in acid and neutral media*, *International Journal of Biological Macromolecules* 54 (2013) 109– 118, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.11.022>

Joseph Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, third edition, Springer

K.A. Floyd, A.R. Eberly, M. Hadjifrangiskou, 3 - *Adhesion of bacteria to surfaces and biofilm formation on medical devices*, *Biofilms and Implantable Medical Devices*, 2017, Pages 47-95, doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100382-4.00003-4>

K.J.Velthove P.F.W.Strengers, Chapter 33 - *Blood, blood components, plasma, and plasma products*, doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62635-6.00033-4>

Karishma Jain, Aleksandar Y. Mehandzhiyski, Igor Zozoulenko, Lars Wagberg, *PEDOT:PSS nano-particles in aqueous media: A comparative experimental and molecular dynamics study of particle size, morphology and z-potential*, *Journal of Colloid and Interface Science* 5584 (2021) 57-66

Khan Academy, *Introduction to proteins and amino acids* doi: <https://www.khanacademy.org/science/biology/macromolecules/proteins-and-amino-acids/a/introduction-to-proteins-and-amino-acids>

Kim KW Wong, Stephen Mann, *Small-scale structures in biomineralisation and biomimetic materials chemistry*, *Current Opinion in Colloid and interface Science*, 1998

Lubert Stryer, *Κεφ.2 Πρωτεΐνες, Βιοχημεία* 1, doi: <http://www.biology.uoc.gr/courses/BIOL154/documents/Lecture2.pdf>

M. Michael Gromiha, *Protein Structure Prediction, Protein Bioinformatics*, 2010

Márcia T.Rodrigues, Pedro P.Carvalho, Manuela E.Gomes, Rui L.Reis, Chapter 11 - *Biomaterials in Preclinical Approaches for Engineering Skeletal Tissues*, *Translational Regenerative Medicine* 2015, Pages 127-139, doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410396-2.00011-6>

Masahiro Tokuno, Kazuaki Taguchi, Hiromi Sakai, Sumio Ohtsuki, Keishi Yamasaki, Masaki Otagiri, *Assessing cytochrome P450-based drug-drug interactions with hemoglobin-vesicles, an artificial red blood cell preparation, in healthy rats*, Drug Metabolism and Pharmacokinetics, doi: <https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2020.06.005>

Memory and Brain Amyloid and Tau Effects of a Bioavailable Form of Curcumin in Non-Demented Adults: A Double-Blind, Placebo-Controlled 18-Month Trial, The American Journal of Geriatric Psychiatry, March 2018

Ming-Yeah Hu, Syam Nukavarapu, *Scaffolds for cartilage tissue engineering*, in Handbook of Tissue Engineering Scaffolds: Volume One, 2019

Murali Sastry, *Nanostructured Materials, Micelles, and Colloids*, Handbook of Surfaces and Interfaces of Materials, 2001

Neda Alasvand, Masoud Mozafari, *Therapeutic Nanoparticles for Targeted Delivery of Anticancer Drugs, Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics*, 2017

Nidhi Raval, Rahul Maheshwari, Dnyanshwar Kalyane, Susanne R. Youngren-Ortiz, Mahavir B. Chougule, Rakesh K. Tekade, Chapter 10 - *Importance of Physicochemical Characterization of Nanoparticles in Pharmaceutical Product Development*, Basic Fundamentals of Drug Delivery, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817909-3.00010-8>

Ogadimma D.Okagu, JianJin Chibuike C.Udenigwe, *Impact of succinylation on pea protein-curcumin interaction, polyelectrolyte complexation with chitosan, and gastrointestinal release of curcumin in loaded-biopolymer nano-complexes*, Journal of molecular liquids

P. David Eckersall, *Proteins, Proteomics, and the Dysproteinemias*, Clinical Biochemistry of Domestic Animals (Sixth Edition), 2008

Particle Size Analysis – Dynamic Light Scattering (DLS). International Organization for Standardization. ISO 22412:2017.

R. Kaliszan, *Quantitative Structure–Retention Relationships (QSRRs) in Chromatography*, Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering, 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.11535-5>

Ratchapol Jenjob , Treethip Phakkeeree , Farzad Seidi , Man Theerasilp , Daniel Crespy, *Emulsion Techniques for the Production of Pharmacological Nanoparticles*, Macromolecular Bioscience/ Volume 19, Issue 6, 24 April 2019, doi: <https://doi.org/10.1002/mabi.201900063>

Rong Yang, Jinjian Huang , Wenjie Zhang , Wenliang Xue , Yungang Jiang, Sicheng Li, Xiuwen Wu, Hong Xu, Jianan Ren, BoChi, *Mechanoadaptive injectable hydrogel based on poly(γ -glutamic acid) and hyaluronic acid regulates fibroblast migration for wound healing*, Carbohydrate Polymers Volume 273, 1 December 2021, 118607, doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118607>

Ryutaro Honda, Tomohiro Gyobu, Hideto Shimahara, Yoshiko Miura, Yu Hoshino, *Electrostatic Interactions between Acid-/Base-Containing Polymer Nanoparticles and Proteins: Impact of Polymerization pH*, Applied Bio Materials, May 21, 2020, <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c00390>

Seattle, Washington, doi: <http://www.fao.org/3/x5738e04.htm>

ShobhitKumar*JavedAli†SanjulaBaboota†, 16 - *Polysaccharide nanoconjugates for drug solubilization and targeted delivery*, Polysaccharide Carriers for Drug Delivery 2019, Pages 443-475, <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102553-6.00016-7>

Somchai Pinlaor, Chanakan Jantawong, Kitii Intuyod, Thirawat Sirijindalert, Porntip Pinlaor, Chawalit Pairojkul, Lankhanawan Charoensuk, Chutima Sitthirach, Kulthida Vaeteewoottacharn, Ploenthip Puthongking, Aroonsri Priprem, *Solid dispersion improves release of curcumin from nanoparticles: Potential benefit for intestinal absorption*, materialstoday communications, March 2020

Stephanie Davineau, Laurent Kiger, Frederic Galacteros, Veronique Baudin-Creuzat, Michael Marden, Jean Phillippe Renault and Serge Pin, *Manipulating hemoglobin oxygenation using silica nanoparticles: a novel prospect for artificial oxygen carriers*, doi: <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017012153>

StephenClark, *Beta Carotene*, xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference 2007, Pages 1-3, <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.61302-9>

Sumeyra CigdemSozer, Tugce Ozmen, Egesoy , MerveBasol , GulcinCakan-Akdogan, YasarAkdogan, *A simple desolvation method for production of cationic albumin nanoparticles with improved drug loading and cell uptake*, Journal of Drug Delivery Science and Technology, December 2020

Surendra Nimesh, *Tools and techniques for physico-chemical characterization of nanoparticles*, Gene Therapy: Potential Applications of Nanotechnology, 2013, <https://doi.org/10.1533/9781908818645.43>

Sven Kriegseis, Antoinette Yasemin, Vogl, Lukas Aretz, Thorsten Tonnesen, Rainer Telle, *Zeta potential and long-term stability correlation of carbon-based suspensions for material jetting*, open ceramic, volume 4, November 2020, 100037

Sworn, G. (2009). *Xanthan Gum. Food Stabilisers, Thickeners and Gelling Agents* (pp. 325-342): Wiley-Blackwell.

Thingreila Muinao, ... Mintu Pal, *Current advances on polysaccharide-based nanoconjugates for efficient and targeted drug delivery in cancer treatment*, Polysaccharide Carriers for Drug Delivery, 2019, <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102563-5.00011-3>

Tim Newmann, *Enzymes: How they work and what they do*, Medical News Today, 2018, doi: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/319704?c=1501587463423#conditions>

USGS, *pH and water*, Water Science School, Science for a changing world, doi: https://www.usgs.gov/special-topic/water-science-school/science/ph-and-water?qt-science_center_objects=0#qt-science_center_objects

Young VR. *Protein and Amino Acids. Nutrition and Immunology: Principles and Practice*. Totowa, NJ: Humana Press, 2000; 49-64.

Zakariya K. Shihaby, Chapter 3 - *Capillary electrophoresis for the determination of drugs in biological fluids*, Handbook of Analytical Separations, Volume 5, 2004, pages 77-94,

Ελληνικές Πηγές

Δρ. Κωνσταντίνος Ε. Βοργιάς, *Γενικά περί πρωτεϊνών*, Περίληψη θεμάτων Γενικής Βιοχημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα 2010, doi: <https://eclass.uoa.gr/modules/document/file.php/BIOL199/PERI%20PROTEINON.pdf>

Βιολογία (B Λυκείου), 3.2 ENZYMA – ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΚΑΤΑΛΥΤΕΣ, Βιβλίο μαθητή, Διαδραστικά σχολικά βιβλία, doi: http://ebooks.edu.gr/ebooks/v/html/8547/2668/Biologia_B-Lykeiou_html-empl/index3_2.html

Επιστήμη και τεχνολογία των υλικών, 9η έκδοση, William D.Callister. JR, David G.Rethwisch, εκδόσεις Τζιόλα

Καψάλης Θάνος, *Ριβοσώματα: Οι δραστήριες μικροσκοπικές μηχανές παραγωγής πρωτεϊνών*, biology4u, Αύγουστος 2014, dio: <https://www.biology4u.gr/?p=1661>

Κονταρίδης Δημήτρης, *Μοριακή φασματοσκοπία*, Πολυτεχνική Σχολή Χημικών Μηχανικών, Πανεπιστήμιο Πατρών

Λιναρδάτος Ανδρέας, *Μάθε τι είναι οι πρωτεΐνες*, Elite Coaching, 2019 doi: <https://elite-coaching.gr/%CF%80%CF%81%CF%89%CF%84%CE%B5%CE%90%CE%BD%CE%B5%CF%82/>

Ο κυτταροσκελετός, Παιδεία Μπροστά, 2ο Επιχειρησιακό Πρόγραμμα Εκπαίδευσης και Αρχικής Επαγγελματικής Κατάρτισης, dio: <https://www.aua.gr/fasseas/biologia%2014.pdf>

Τεγόπουλος Σωκράτης, *Θερμική και ηλεκτρική αγωγιμότητα νανοσύνθετων πολυμερικής μήτρας πολυαιθυλενίου και εγκλεισμάτων νανοσωλήνων άνθρακα*, Μεταπτυχιακή εργασία, Σχολή Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών

Τσέλικα Σμαράγδα, *Ευκαρυωτική πρωτεϊνοσύνθεση σε αγρίου τύπου και μεταλλαγμένα ριβοσώματα ζύμης με τη χρήση συνθετικών mRNA και η αναστολή της από αντιβιοτικά*, Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών, σχολή επιστημών υγείας-τμήμα ιατρικής, Πάτρα 2008