

1ο Πανελλήνιο Συνέδριο Φυσικών Επιστημών στην Υγεία:
Καινοτομίες και Προοπτικές
22-23 Σεπτεμβρίου 2023

Νανოსωματίδια Πρωτεΐνης/Πολυσακχαρίτη: Παρασκευή, Φυσικοχημικός Χαρακτηρισμός και Αλληλεπίδραση με Επιφανειοδραστικό

Ιωάννης Πίσπας^{1,2}, Αριστείδης Παπαγιαννόπουλος¹

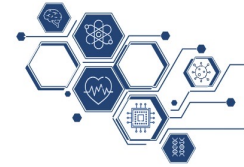
¹Ινστιτούτο Θεωρητικής και Φυσικής Χημείας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα, Ελλάδα

²Σχολή Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Αθήνα, Ελλάδα

Διοργανωτές



1. Εισαγωγή-Σκοπός



1ο Πανελλήνιο Συνέδριο Φυσικών Επιστημών στην Υγεία:
Καινοτομίες και Προοπτικές
22-23 Σεπτεμβρίου 2023

β-Λακτογλοβουλίνη (β-lactoglobulin, BLG)

- Πρωτεΐνη που ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια των λιποκαλινών
- Προέλευση κατά κύριο λόγο από βοδινό γάλα
- Παρούσα ακόμη σε αρκετά θηλαστικά με σημαντική εξαίρεση τον άνθρωπο (λόγω της έλλειψης ενός ομολόγου της)
- Μπορεί να συνδεθεί με υδροφοβικά μόρια και να βελτιώσει την μεταφορά τους
- Αξιόλογη δέσμευση με άτομα σιδήρου μέσω χαρακτηριστικών συστατικών, των σιδηροφορέων (siderophores), που εμφανίζονται συχνά σε μικροοργανισμούς, όπως βακτήρια και μύκητες

Σκοπός

- Ηλεκτροστατική συμπλοκοποίηση της πρωτεΐνης BLG με τον ανιοντικό πολυσακχαρίτη θειϊκή χονδροϊτίνη (chondroitin sulfate, CS)
- Παρασκευή καλά καθορισμένων νανοσωματιδίων και σταθεροποίηση αυτών σε ουδέτερο και όξινο pH με κατάλληλη θερμική κατεργασία
- Μελέτη της αλληλεπίδρασης των νανοσωματιδίων με το ουδέτερο επιφανειοδραστικό Tween 80 για περαιτέρω σταθεροποίηση και βελτίωση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του συστήματος

2. Μέθοδοι και Υλικά (I)



1ο Πανελλήνιο Συνέδριο Φυσικών Επιστημών στην Υγεία:
Καινοτομίες και Προοπτικές
22-23 Σεπτεμβρίου 2023

Υλικά και Παρασκευή δειγμάτων

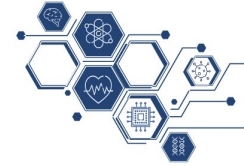
β-Λακτογλοβουλίνη (β-lactoglobulin, BLG) από βοδινό γάλα της Sigma Aldrich ($M_w \sim 18,400 \text{ gmol}^{-1}$), Θειϊκή χονδροϊτίνη (chondroitin sulfate CS) της Bioiberica ($M_w \sim 20,000 \text{ gmol}^{-1}$) και το βιοσυμβατό επιφανειοδραστικό Tween 80 (T80).

Τα αρχικά διαλύματα (stock solutions) της BLG, της CS και του T80 παρασκευάστηκαν με κατάλληλη ανάδευση αυτών μέσα σε απεσταγμένο νερό σε pH=4 και παράμειναν για διάστημα 20-24 ώρες σε θερμοκρασία 4 °C για εξισορρόπηση. Όλα τα αρχικά διαλύματα παρασκευάστηκαν με συγκεντρώσεις $C=1.0 \text{ mg/mL}$.

Τα σύμπλοκα παρασκευάστηκαν με ανάμειξη των παραπάνω αρχικών διαλυμάτων σε διαφορετικές αναλογίες υπό ανάδευση σε pH=4. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο διάλυμα ήταν 0.1 mg/mL. Για μεταβολές του pH σε τιμές pH=7 και pH=1.5 χρησιμοποιήθηκαν NaOH και HCl συγκέντρωσης 1 M αντίστοιχα.

Η θερμική κατεργασία/σταθεροποίηση των νανοσωματιδίων πραγματοποιείται σε φούρνο υπό σταθερή θερμοκρασία 85 °C για 50 λεπτά. Υπό αυτές τις συνθήκες πραγματοποιείται η μετουσίωση της δομής της πρωτεΐνης, οδηγώντας σε πρωτεϊνική συσσωμάτωση.

2. Μέθοδοι και Υλικά (II)



1ο Πανελλήνιο Συνέδριο Φυσικών Επιστημών στην Υγεία:
Καινοτομίες και Προοπτικές
22-23 Σεπτεμβρίου 2023

Τεχνικές χαρακτηρισμού:

Δυναμική και Στατική Σκέδαση Φωτός (Dynamic/Static Light Scattering, DLS/SLS)

Πειράματα σκέδασης φωτός πραγματοποιήθηκαν σε φωτόμετρο σκέδασης φωτός πολλαπλών γωνιών της ALV GmbH με την χρήση laser He-Ne ($\lambda=632.8$ nm).

Ηλεκτροφορητική Σκέδαση Φωτός – ζ Δυναμικό (Electrophoretic Light Scattering – Zeta Potential)

Οι μετρήσεις του ζ δυναμικού πραγματοποιήθηκαν σε ένα Zetasizer Nano-ZS από την Malvern Instruments Ltd. μέσω ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός.

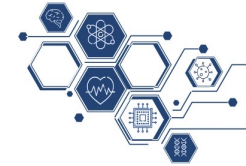
Φασματοσκοπία FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR)

Χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier Bruker Equinox 55 στη διαμόρφωση ολικής αποσβενύμενης ανάκλασης (ATR-FTIR) σε επιφάνεια διαμαντιού (SENS-IR).

Φασματοσκοπία Φθορισμού (Fluorescence Spectroscopy)

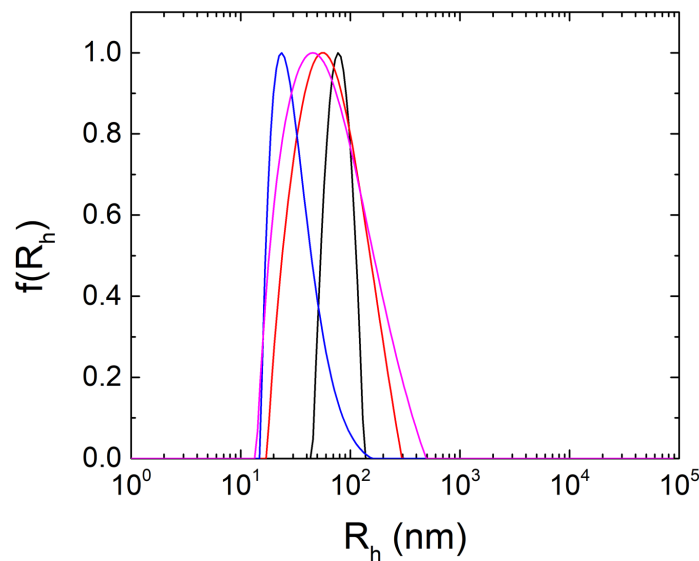
Χρησιμοποιήθηκε ένα φασματόμετρο φθορισμού Fluorolog-3 (model FL3-21, Jobin Yvon-Spex) με μήκος κύματος διέγερσης $\lambda=290$ nm για την διέγερση του αμινοξέος τρυπτοφάνης στη δομή της πρωτεΐνης.

3. Αποτελέσματα (I)

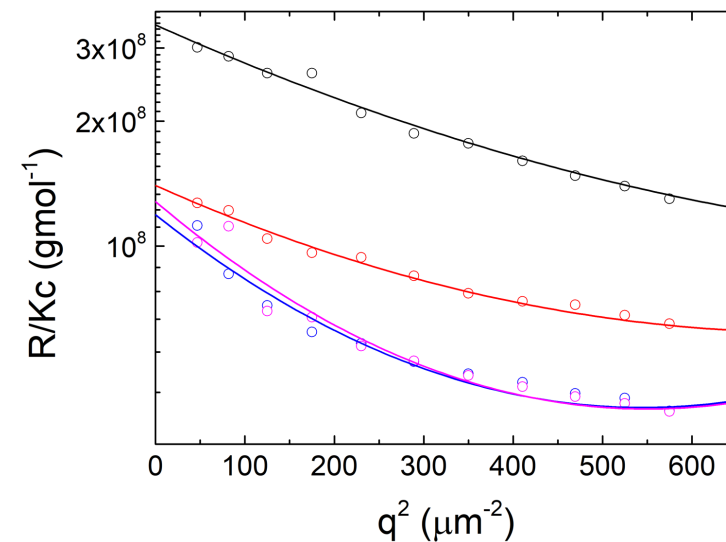


1ο Πανελλήνιο Συνέδριο Φυσικών Επιστημών στην Υγεία:
Καινοτομίες και Προοπτικές
22-23 Σεπτεμβρίου 2023

Προσδιορισμός βέλτιστου λόγου $r_m (=C_{CS}/C_{BLG})$ μέσω σκέδασης φωτός (DLS και SLS)



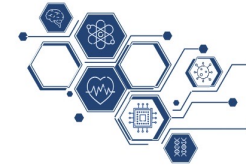
Σχήμα 1.: Κατανομές μεγεθών CONTIN σε γωνία 90° συμπλόκων BLG/CS σε $pH=4$ για λόγους $r_m=0.4$ (μαύρο), 0.8 (κόκκινο), 1.0 (μπλε) και 1.2 (μωβ).



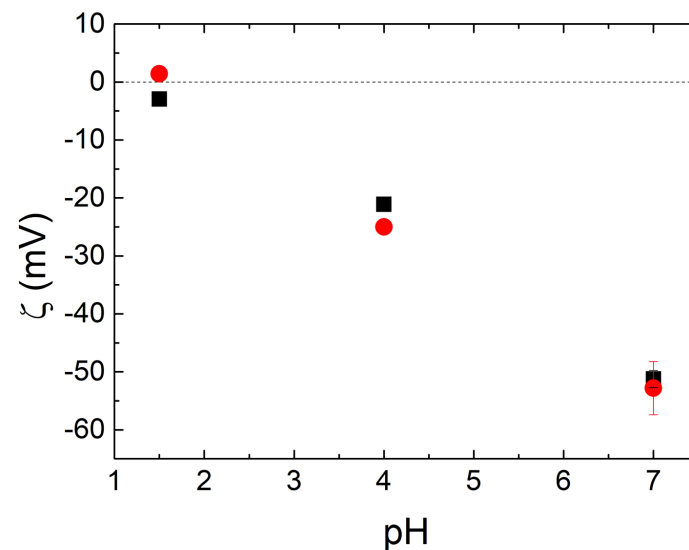
Σχήμα 2.: Διαγράμματα Guinier συμπλόκων BLG/CS σε $pH=4$ για λόγους $r_m=0.4$ (μαύρο), 0.8 (κόκκινο), 1.0 (μπλε) και 1.2 (μωβ).

Υδροδυναμική ακτίνα R_h : ~ 70 nm, Μοριακό βάρος M_w : $\sim 3 \cdot 10^8$ gmol $^{-1}$, Γυροσκοπική ακτίνα R_g : ~ 90 nm

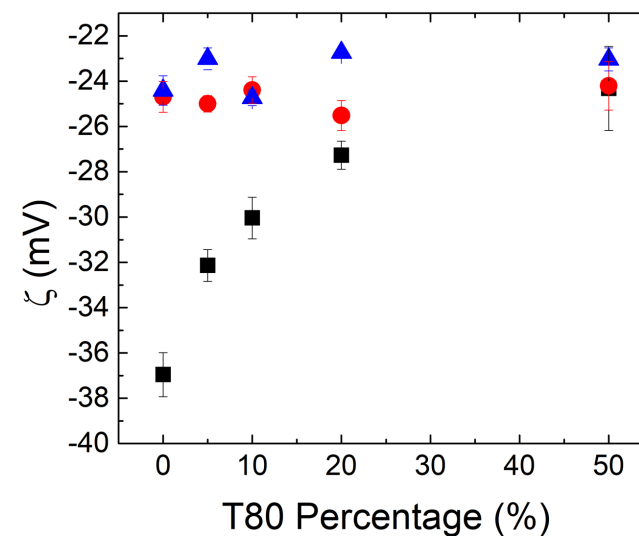
3. Αποτελέσματα (II)



Επιφανειακό φορτίο – ζ δυναμικό για διαφορετικά pH και ποσότητες T80



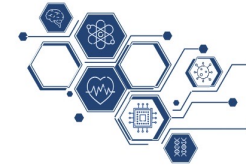
Σχήμα 3.: ζ δυναμικό των συμπλόκων BLG/CS σε pH=1.5, 4 και 7 αντίστοιχα για θερμικά κατεργασμένα (κόκκινο) και μη (μαύρο) νανοσωματίδια.



Σχήμα 4.: ζ δυναμικό των συμπλόκων BLG/CS σε pH=4 για θερμικά κατεργασμένα με προσθήκη T80 πριν (μπλε), μετά (κόκκινο) και μη θερμικά κατεργασμένα (μαύρο) νανοσωματίδια.

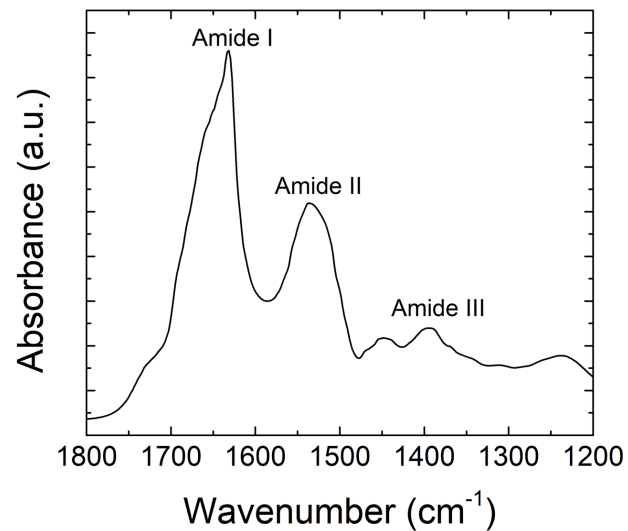
ζ δυναμικό εγγύς των -20 mV, όχι ιδιαίτερες διαφοροποιήσεις με προσθήκη του T80 πριν ή μετά της θέρμανσης, αύξηση δυναμικού με προσθήκη T80 σε μη θερμικά κατεργασμένα νανοσωματίδια

3. Αποτελέσματα (III)

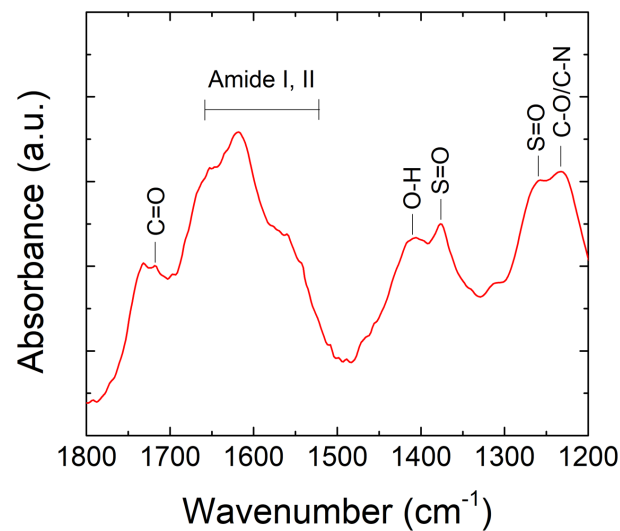


1ο Πανελλήνιο Συνέδριο Φυσικών Επιστημών στην Υγεία:
Καινοτομίες και Προοπτικές
22-23 Σεπτεμβρίου 2023

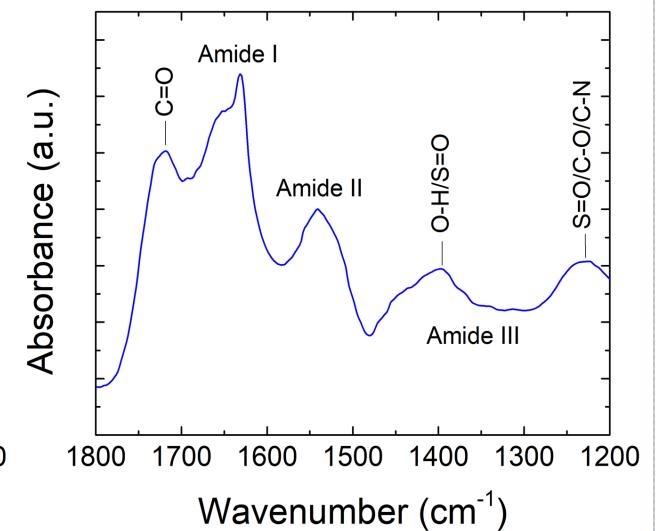
Φασματοσκοπία FTIR προς επιβεβαίωση σύμπλεξης BLG με CS σε pH=4



Σχήμα 5.: Φάσμα FTIR BLG με C=0.1 mg/mL και φαινόμενο λόγο $r_m=0.4$



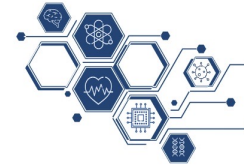
Σχήμα 6.: Φάσμα FTIR CS με φαινόμενο λόγο $r_m=0.4$



Σχήμα 7.: Φάσμα FTIR συμπλόκων BLG/CS με C=0.1 mg/mL και $r_m=0.4$

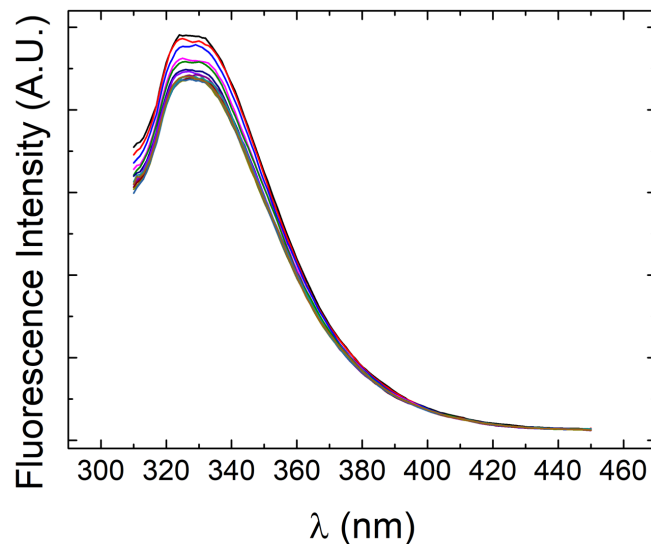
Εμφανής ύπαρξη των ενεργών ομάδων και των δύο συστατικών – Μείωση εντάσεων και διεύρυνση κορυφών
→ Αλληλεπίδραση BLG με CS και επιτυχής ηλεκτροστατική σύμπλεξη

3. Αποτελέσματα (IV)

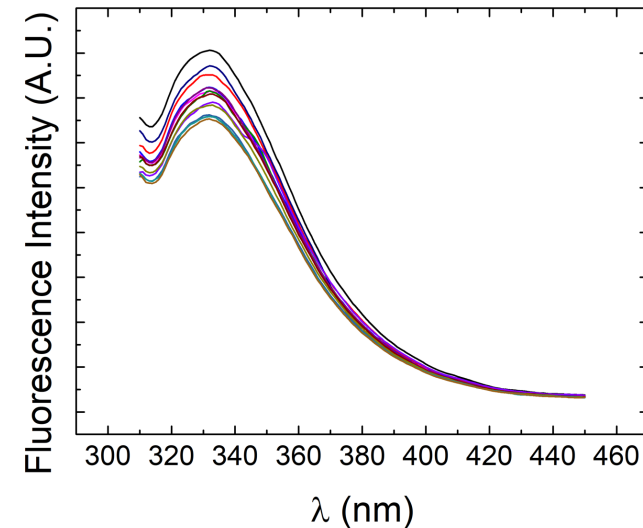


1ο Πανελλήνιο Συνέδριο Φυσικών Επιστημών στην Υγεία:
Καινοτομίες και Προοπτικές
22-23 Σεπτεμβρίου 2023

Απόσβεση φθορισμού (Fluorescence quenching) τρυπτοφάνης με προσθήκη T80

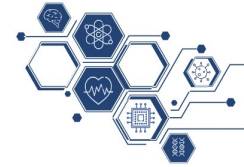


Σχήμα 8.: Φθορισμός τρυπτοφάνης σε μη θερμικά κατεργασμένα σύμπλοκα BLG/CS με $r_m=0.4$ σε pH=4 με ποσοστά T80 0 (μαύρο), 5 (κόκκινο), 10 (μπλε), 15 (ροζ), 20 (πράσινο), 25 (σκούρο μπλε), 30 (μωβ), 35 (σκούρο μωβ), 40 (καφέ), 45 (πράσινο ελιάς), 50 (γαλάζιο), 55 (ανοιχτό πράσινο) και 60 (ανοιχτό καφέ) τοις εκατό.



Σχήμα 9.: Φθορισμός τρυπτοφάνης σε θερμικά κατεργασμένα σύμπλοκα BLG/CS με $r_m=0.4$ σε pH=4 με ποσοστά T80 0 (μαύρο), 5 (κόκκινο), 10 (μπλε), 15 (ροζ), 20 (πράσινο), 25 (σκούρο μπλε), 30 (μωβ), 35 (σκούρο μωβ), 40 (καφέ), 45 (πράσινο ελιάς), 50 (γαλάζιο), 55 (ανοιχτό πράσινο) και 60 (ανοιχτό καφέ) τοις εκατό.

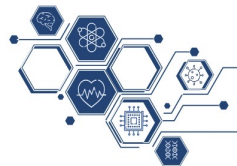
4. Συμπεράσματα



1ο Πανελλήνιο Συνέδριο Φυσικών Επιστημών στην Υγεία:
Καινοτομίες και Προοπτικές
22-23 Σεπτεμβρίου 2023

- Επιτυχής ηλεκτροστατική σύμπλεξη BLG/CS
- Προσδιορισμός βέλτιστης αναλογίας συγκεντρώσεων CS/BLG πειραματικά – Ικανοποιητική συμφωνία με το θεωρητικά αναμενόμενο λόγο r_m
- Σταθεροποίηση συμπλόκων σε pH=7 με κατάλληλη θερμική κατεργασία
- Αποσταθεροποίηση συμπλόκων σε pH=1.5 με κατάλληλη θερμική κατεργασία
- Εμφανής επίδραση επιφανειοδραστικού T80 στον φθορισμό τρυπτοφάνης – Μικρές διαφορές μεταξύ θερμικά κατεργασμένων και μη συμπλόκων/νανοσωματιδίων BLG/CS
- Ευστάθεια νανοσωματιδίων μετά το πέρας διαστήματος ενός μήνα
- Λόγω της φύσης των πρόδρομων ενώσεων και των κολλοειδών ιδιοτήτων των νανοσωματιδίων BLG/CS → Δυνητικοί βιοσυμβατοί νανοφορείς φαρμάκων
- Μελλοντικοί στόχοι: Περαιτέρω ανάλυση και επεξεργασία φασμάτων FTIR – Προσδιορισμός α-έλικας και β-πτυχωτή

5. Βιβλιογραφία



1ο Πανελλήνιο Συνέδριο Φυσικών Επιστημών στην Υγεία:
Καινοτομίες και Προοπτικές
22-23 Σεπτεμβρίου 2023

- [1] Sawyer L., In *Advanced Dairy Chemistry: 1. Proteins*, Fox P.F., McSweeney P.L. (eds.), Elsevier Applied Science, 1992, 141.
- [2] Roth-Walter F., Pacios L.F., Gomez-Casado C., Hofstetter G., Roth G.A., Singer J., et al., *PLOS ONE*, 2014, 9, e104803.
- [3] Rubinstein A., Nakar D. and Sintov A., *Int. J. Pharm.*, 1991, 84, 141.
- [4] Shpigelman A., Israeli G., Livney Y. D., *Food Hydrocoll.*, 2010, 24, 735.
- [5] Papagiannopoulos A., Vlasi E., *Food Hydrocoll.*, 2019, 87, 602.
- [6] Trampari S., Papagiannopoulos A. and Pispas S., *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 2019, 515 (2), 282.