

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΛΙΠΟΣΩΜΙΚΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΡΕΛΑΞΙΝΗΣ 2 ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥΣ

Γ. Κόγκκος^{1,2}, Φ. Γκάρτζιου^{1,2}, Σ. Μουρτάς^{1,2}, Α. Μαραζιώτη^{1,2}, Κ.Κ Μπάρλος³, Κ. Μπάρλος³, Σ.Γ Αντιμησιάρη^{1,2*}

¹Εργαστήριο Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, Ελλάδα

²Ινστιτούτο Τεχνολογίας και Έρευνας/Ινστιτούτο Επιστημών Χημικής Μηχανικής (ΙΤΕ/ΙΕΧΜΗ),

Πάτρα, Ελλάδα

³CBL-Πάτρας, Βιομηχανική ζώνη Πάτρας, Πάτρα

(*santimis@upatras.gr)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Ρελαξίνη-2 είναι μία πρωτεϊνική ορμόνη με πλειοτροπική δράση, η οποία ανήκει στην οικογένεια των ινσουλινοειδών πεπτιδίων. Παίζει σημαντικό ρόλο στην εγκυμοσύνη των θηλαστικών, ενώ βρίσκεται σε πολλούς ιστούς και η δράση της συσχετίζεται, μεταξύ άλλων, με την προστασία της καρδιάς, των πνευμόνων και των νεφρών. Ως πεπτίδιο δεν έχει μεγάλη σταθερότητα κατά την κυκλοφορία του στο αίμα για αυτό προτείνεται ο εγκλωβισμός του σε λιποσωμικούς φορείς με στόχο τη προστασία του φαρμάκου από πρωτεολυτικούς παράγοντες και την αύξηση του χρόνου ζωής του. Για τον σκοπό αυτό, παρασκευάστηκαν λιποσωμικές μορφές της Ρελαξίνης 2 σε διάφορες λιπιδικές συστάσεις, για τις οποίες πραγματοποιήθηκε φυσικοχημικός χαρακτηρισμός αναφορικά με τον προσδιορισμό του μεγέθους, της πολυδιασποράς και του φορτίου. Επίσης, για κάθε λιπιδική σύσταση μελετήθηκε το ποσοστό εγκλωβισμού ενώ πραγματοποιήθηκαν και πειράματα απελευθέρωσης του φαρμάκου από τις λιποσωμικές μορφές σε θερμοκρασία 37°C. Επιπλέον, μελετήθηκε η βιολογική δραστηριότητα της λιποσωμικής μορφής της Ρελαξίνης 2 μέσω προσδιορισμού του κυκλικού AMP (cAMP) το οποίο παράγεται κατά τη δέσμευση της Ρελαξίνης 2 στους αντίστοιχους ειδικούς υποδοχείς β κυττάρων (RXFP1). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αποδεικνύουν διαφορετικά ποσοστά εγκλωβισμού και αποδέσμευσης του δραστικού πεπτιδίου για διαφορετικές λιπιδικές συστάσεις λιποσωμικών φορέων ρελαξίνης.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ανθρώπινη Ρελαξίνη-2 αποτελεί μία πεπτιδική ορμόνη, μοριακού μεγέθους 6 kDa που απαρτίζεται από 53 αμινοξέα και χαρακτηρίζεται από δομική ομοιότητα με την ινσουλίνη^[1].

Στη βιβλιογραφία, η Ρελαξίνη είναι περισσότερο διαδεδομένη για την βιολογική της δράση κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης. Σε αυτή τη δράση συμπεριλαμβάνονται η μεταμόρφωση των κυττάρων του στρώματος σε κύτταρα φθαρτού κατά την εμφύτευση του εμβρύου, η αύξηση και ανάπτυξη της μήτρας, του μαστικού αδένος και της θηλής του μαστού, η σύσπαση του μυομητρίου, η διαμεσολάβηση καρδιαγγειακών μεταβολών κατά την εγκυμοσύνη και η οσμωρύθμιση του πλάσματος^[2-4]. Επιπλέον, η Ρελαξίνη φέρει αντι-ινώδεις ιδιότητες συμβάλλοντας στη ρύθμιση της αναδιαμόρφωσης του εξωκυττάρου στρώματος στην καρδιά^[5,6], τον πνεύμονα^[7] και τον νεφρό^[8,9] καθώς και την επούλωση πληγών (wound healing)^[10].

Έχει αποδειχθεί ότι η ρελαξίνη εμπλέκεται στην ενεργοποίηση αρκετών σηματοδοτικών μονοπατιών, συμπεριλαμβανομένης της ενδοκυττάριας παραγωγής cAMP (3'-5'-κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη) η οποία σχηματίζεται σε απόκριση της ειδικής διασύνδεσης της RLX2 με τον ανθρώπινο υποδοχέα της ρελαξίνης RXFP1 (relaxin family peptide receptor-1)

Η τεχνική των αφυδατωμένων-επανευδατωμένων κυστιδίων ως μέθοδος ενσωμάτωσης φαρμακευτικών μορίων ή ενεργών βιομορίων σε λιποσωμικούς νανοφορείς αναπτύχθηκε αρχικά το 1984 από τους C. Kirby και G.Gregoriadis^[11]. Αποτελούν όλιγο- ή πολύ-στοιβαδικά λιποσώματα τα οποία φέρουν την ιδιότητα του εγκλωβισμού μεγάλων ποσοτήτων υδατοδιαλυτών μορίων. Το γεγονός ότι η μέθοδος των DRV περιλαμβάνει τον σχηματισμό

σωματιδίων κάτω από ήπιες συνθήκες (οι οποίες δεν προκαλούν αποσύνθεση ή απώλεια της δραστηριότητας βιο-ενεργών μορίων) καθιστά την εν λόγω τεχνική ιδανική επιλογή για την παραγωγή λιποσωμικών συνθέσεων που περιλαμβάνουν ευαίσθητα ενεργά μόρια, όπως είναι τα πεπτιδία, οι πρωτεΐνες και τα ένζυμα. Η υψηλή ικανότητα εγκλωβισμού των DRV's οφείλεται στο γεγονός ότι τα προπαρασκευασμένα μικρά μονο-στοιβαδικά "κενά" κυστίδια διαρρηγνύονται κατά την διάρκεια ενός κύκλου ψύξης-αφυδάτωσης υπό την παρουσία της προς εγκλωβισμό διαλελυμένης ουσίας. Ακολούθως, κατά τη διάρκεια της ελεγχόμενης ενυδάτωσης που πραγματοποιείται παρουσία ενός συμπυκνωμένου διαλύματος της διαλελυμένης ουσίας (προς εγκλωβισμό), τα κυστίδια συγχωνεύονται σε μεγάλα oligo- η πολυστοιβαδικά κυστίδια τα οποία εγκλωβίζουν υψηλές συγκεντρώσεις της διαλελυμένης ουσίας. Μέχρι σήμερα τα DRV λιποσώματα έχουν εφαρμοστεί για τον εγκλωβισμό διαφόρων ενεργών ουσιών, οι οποίες χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: 1. Χαμηλού μοριακού μεγέθους φαρμακευτικά μόρια^[12,13], 2. Πρωτεΐνες, πεπτιδία και ένζυμα^[14,15], 3. DNA ή ολιγονουκλεοτίδια^[16,17].

Η τεχνική active loading βασίζεται στην ύπαρξη διαφορετικού pH στο εσωτερικό περιβάλλον των λιποσωμάτων σε σχέση με το εξωτερικό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να δημιουργείται κίνηση πρωτονίων από το ένα περιβάλλον στο άλλο ωθώντας το φάρμακο προς το εσωτερικό των λιποσωμάτων, εγκλωβίζοντας το^[18].

Στη παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε η ενσωμάτωση ενός συνθετικού πεπτιδίου της ρελαξίνης-2^[19] σε λιποσωμικούς νανοφορείς (διαφόρων λιπιδικών συστάσεων) αξιοποιώντας τις τεχνικές DRV και Active Loading καθώς και συγκριτική μελέτη αναφορικά με τα ποσοστά εγκλωβισμού του φαρμάκου που επιτεύχθηκαν με τις δύο τεχνικές και τον φυσικοχημικό χαρακτηρισμό των λιποσωμάτων. Σε ένα επόμενο στάδιο μελετήθηκε ο ρυθμός αποδέσμευσης του συνθετικού πεπτιδίου από λιποσώματα διαφόρων λιπιδικών συστάσεων που παρασκευάστηκαν με την μέθοδο DRV καθώς και ο έλεγχος της ενεργότητας του λιποσωμικού φαρμάκου με μέτρηση της ενδοκυττάριας cAMP.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Παρασκευές λιποσωμάτων για εγκλωβισμό Ρελαξίνης 2-FITC

A) Παρασκευή λιποσωμάτων με την τεχνική των αφυδατωμένων-επανενυδατωμένων κυστιδίων (Dehydrated-Rehydrated Vesicles, DRV's)

Για την παρασκευή τους χρησιμοποιήθηκαν τα εξής λιπίδια : Φωσφατιδυλοχολίνη (PC), Φωσφατιδυλογλυκερόλη (PG), και χοληστερόλη (Chol). Συγκεκριμένα παρασκευάστηκαν λιποσώματα με λιπιδικές συστάσεις PC, PC:Chol (2:1), PC:Chol (1:1) PC:PG:Chol (9:1:5), PC:PG:Chol (8:2:5), PC:PG:Chol (9:1:10). Αρχικά πραγματοποιήθηκε η τεχνική ενυδάτωσης του λεπτού υμενίου. Το υμένιο ενυδατώθηκε με 10 % ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS). Ακολούθησε εφαρμογή υπερήχων με ακίδα τιτανίου για τον σχηματισμό SUV (small unilamellar vesicles), απομάκρυνση του τιτανίου από το δείγμα με φυγοκέντρηση και αναδιάταξη των μεμβρανών στη θερμοκρασία μετάπτωσης του εκάστοτε λιπιδίου για 45 λεπτά. Εν συνεχεία έγινε ανάμιξη των κενών λιποσωμάτων με το φάρμακο το οποίο διαλύθηκε σε απεσταγμένο νερό. Στη συνέχεια το δείγμα ψύχθηκε στους - 80 °C και πραγματοποιήθηκε λυοφιλοποίηση του. Μετά τη λυοφιλοποίηση το δείγμα ενυδατώθηκε προς σχηματισμό DRV λιποσωμάτων.

B) Παρασκευή λιποσωμάτων με την τεχνική Active Loading

Παρασκευάστηκαν λιποσώματα με λιπιδική σύσταση PC:Chol (2:1). Για την εφαρμογή της μεθόδου χρησιμοποιούνται δύο ισότονα ρυθμιστικά διαλύματα με διαφορετικό pH. Το πρώτο ρυθμιστικό (οξικό ασβέστιο pH=8.2 ή κιτρικό pH=5.5 θειϊκό αμμώνιο pH=5.8) εισάγεται κατά την ενυδάτωση του λεπτού υμενίου ενώ στη συνέχεια ακολουθούν ο σχηματισμός των μονοστοιβαδικών κυστιδίων (SUV), η απομάκρυνση του τιτανίου με φυγοκέντρηση και η διαδικασία του annealing. Στη συνέχεια παραγματοποιείται καθαρισμός του εξωτερικού περιβάλλοντος των λιποσωμάτων από το πρώτο ρυθμιστικό και εισαγωγή του δεύτερου

ρυθμιστικού (PBS, pH 7.4), το οποίο περιέχει το φάρμακο. Κατά την εισαγωγή του δεύτερου ρυθμιστικού τα λιποσώματα αφήνονται για επώαση σε διάφορα χρονικά διαστήματα και θερμοκρασίες.

Διαχωρισμός εγκλωβισμένης/μη-εγκλωβισμένης ρελαξίνης-2(RLX 2)

Πραγματοποιήθηκε με υγρή χρωματογραφία αποκλεισμού μοριακών μεγεθών σε στήλη Sepharose διαστάσεων 40x1 cm. Η έκλουση γινόταν με το ισότονο ρυθμιστικό διάλυμα PBS (PH. 7.4).

Ποσοτικός Προσδιορισμός λιπιδίου

Η ποσοτική ανάλυση του λιπιδίου πραγματοποιήθηκε με με χρωματομετρικό προσδιορισμό στα 485 nm με την μέθοδο Stewart

Ποσοτικός προσδιορισμός εγκλωβισμένης ρελαξίνης-2

Για να διευκολυνθεί η ποσοτική ανάλυση της Ρελαξίνης 2, πραγματοποιήθηκε σήμανσή της με φθορίζουσα ουσία. Η φθορίζουσα ουσία που χρησιμοποιήθηκε είναι το FITC I (Fluorescein isothiocyanate isomer 1) και για την αλληλεπίδραση της με το πεπτίδιο ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που παρέχεται από την κατασκευάστρια εταιρεία (Sigma, F7250). Το προϊόν (FITC-Relaxin 2) αναλύθηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) σε στήλη αντίστροφης φάσης, ενώ οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ως κινητή φάση είναι ακετονιτρίλιο και νερό με 0.1% TFA (trifluoroacetic acid) σε κάθε έναν από αυτούς. Η μέθοδος gradient που ακολουθήθηκε για την ανάλυση της πρωτεΐνης είναι από 20 έως 80 % ακετονιτρίλιο σε 15 λεπτά ενώ για την ποσοτική ανάλυση της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής φθορισμού.

Για την ποσοτική ανάλυση της λιποσωμικής FITC-RLX 2, προστίθεται μεθανόλη σε συγκεκριμένη ποσότητα λιποσωμάτων και με πολύ καλή ανάμιξη πραγματοποιείται διάρρηξή τους. Εν συνεχεία γίνεται ανάλυση του δείγματος στην HPLC και με τη χρήση της πρότυπης καμπύλης υπολογίζεται η συγκέντρωση του λιποσωμικού φαρμάκου.

Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των λιποσωμάτων

Ο φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των λιποσωμάτων περιλαμβάνει το προσδιορισμό του μεγέθους, της πολυδιασποράς μεγέθους και του ζ-δυναμικού των λιποσωμάτων. Η μέτρηση των δειγμάτων ως προς τα παραπάνω, πραγματοποιείται με την τεχνική δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) (Zetasizer 5000 Malvern Instruments, UK), στους 25^οC σε γωνία 90^ο. Για τον υπολογισμό της κατανομής του μεγέθους, τα λιποσωμικά εναιωρήματα αραιώνονται σε διάλυμα PBS σε συγκεντρώσεις κάτω των 0.2 mg/ml. Η λιποσωμική διασπορά μετράται αμέσως και προσδιορίζονται οι μέσοι διάμετροι των σωματιδίων και οι κατανομές μεγέθους. Για τις μετρήσεις του ζ-δυναμικού, το λιποσωμικό εναιώρημα αραιώνεται σε PBS (όπως προηγουμένως) και η ηλεκτροφορητική κινητικότητα μετράται στους 25^οC (Zetasizer 5000 Malvern Instruments, UK). Οι τιμές του ζ-δυναμικού των λιποσωμικών εναιωρημάτων υπολογίζονται απευθείας από το μηχάνημα, με βάση την εξίσωση Smoluchowski.

Έλεγχος δραστικότητας Ρελαξίνης-2

Η μέτρηση των επιπέδων του κυκλικού AMP σε κύτταρα HEK293 (Human Embryonic Kidney, ανθρώπινα εμβρυϊκά νεφρικά κύτταρα), παροδικά διαμολυσμένα (transiently transfected) με τον ανθρώπινο υποδοχέα της ρελαξίνης, RXFP1, πραγματοποιήθηκε με ELISA ανταγωνιστικού τύπου. 37×10^5 κύτταρα ανά περίπτωση διαμολύνθηκαν με τον υποδοχέα RXFP1 και 36 ώρες μετά, επώαστηκαν για 1 ώρα με αυξανόμενες συγκεντρώσεις: **0,1-, 1-, 10-, 100 nM** RLX2. Ακολούθησε η παρασκευή κυτταρικών εκχυλισμάτων και η απευθείας ανάλυσή τους με το kit cAMP Immunoassay Kit (ab65355), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μέση τιμή της διαμέτρου των λιποσωμάτων με τη μέθοδο active loading, καθώς και οι τιμές του ζ-δυναμικού αναγράφονται στον πίνακα 1. Τα λιποσώματα με εσωτερικό buffer calcium acetate στους 25 (overnight) και 37 °C (1 h) αλλά και τα λιποσώματα με κιτρικό στους 25 °C παρουσιάζουν μέση διάμετρο μεγαλύτερη από 200 nm ενώ τα υπόλοιπα δείγματα κυμαίνονται σε μεγέθη από 88 έως 150 nm. Η πολυδιασπορά όλων των δειγμάτων είναι αρκετά μεγάλη με μικρότερη τιμή να παρουσιάζει η τεχνική του θειϊκού αμμωνίου στους 37 °C και μεγαλύτερη τιμή η τεχνική με το κιτρικό στους 37 °C. Από τις μετρήσεις του ζ-δυναμικού παρατηρείται ότι τα λιποσώματα δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στο επιφανειακό τους φορτίο δεδομένου ότι η λιπιδική σύσταση είναι ίδια για όλα τα δείγματα. Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται τα ποσοστά εγκλωβισμού όλων των δειγμάτων που παρασκευάστηκαν με την τεχνική του active loading. Παρατηρούνται παρόμοια ποσοστά εγκλωβισμού για όλα τα δείγματα, αλλά πιο χαμηλά από την αντίστοιχη λιπιδική σύσταση PC:CHOL (2:1) των DRV λιποσωμάτων.

Πίνακας 1: Μέσες τιμές διαμέτρου (nm) και ζ-δυναμικού λιποσωμάτων ίδιας λιπιδικής σύστασης με διαφορετικό πρωτόκολλο active loading (διαφορετικό εσωτερικό ρυθμιστικό και διαφορετικές θερμοκρασίες επώασης). Σε κάθε δείγμα αντιστοιχούν 3 επαναλήψεις.

Sample	Size (nm) \pm SD	PDI	ζ -potential (mV) \pm SD
25 °C (o/n) Calcium acetate (in)	250.0 \pm 62	0.303	-4.86 \pm 0.83
37 °C (1 hr) Calcium acetate (in)	263.8 \pm 40.8	0.300	-4.71 \pm 0.21
25 °C (o/n) Citrate buffer (in)	271.2 \pm 38.7	0.304	-6.45 \pm 0.47
37 °C (1 hr) Citrate buffer (in)	88.2 \pm 1.4	0.433	-8.23 \pm 1.64
25 °C (o/n) Ammonium Sulfate (in)	118.3 \pm 22.9	0.321	-5.81 \pm 0.30
37 °C (1 hr) Ammonium sulfate (in)	150.5 \pm 17.4	0.246	-6.49 \pm 1.14

Πίνακας 2: Ποσοστά (%) εγκλωβισμού Ρελαξίνης 2 καθώς και αρχικοί και τελικοί λόγοι φαρμάκου προς λιπίδιο. Σε κάθε δείγμα αντιστοιχούν 3 επαναλήψεις.

Sample	Αρχικό Drug/Lipid (mol/mol) ($\times 10^3$)	Τελικό Drug/Lipid (mol/mol) ($\times 10^3$)	% εγκλωβισμός
25 °C (o/n) Calcium acetate (in)	1.96	0.127 \pm 0.031	6.52 \pm 1.59
37 °C (1 hr) Calcium acetate (in)	1.96	0.145 \pm 0.036	7.42 \pm 1.83
25 °C (o/n) Citrate buffer (in)	1.96	0.213 \pm 0.007	10.9 \pm 0.34
37 °C (1 hr) Citrate buffer (in)	1.96	0.226 \pm 0.128	11.5 \pm 6.52
25 °C (o/n) Ammonium Sulfate (in)	1.96	0.120 \pm 0.070	6.11 \pm 3.58
37 °C (1 hr) Ammonium sulfate (in)	1.96	0.136 \pm 0.030	6.96 \pm 1.55

Για την εύρεση της βέλτιστης λιπιδικής σύστασης με την τεχνική DRV μελετήθηκαν οι λιπιδικές συστάσεις που αναγράφονται στους πίνακες 3 (size, PDI και z-potential) και 4 (ποσοστά εγκλωβισμού). Η μέση διάμετρος των κυστιδίων (που έχουν υποστεί σμίκρυνση μέσω εξώθησης από φίλτρα των 400 και 100nm) κυμαίνεται από 154 έως 194 nm παρουσιάζοντας συγχρόνως ικανοποιητική πολυδιασπορά. Από τις μετρήσεις του ζ-δυναμικού καταδεικνύεται ότι το αρχικό επιφανειακό φορτίο ήταν σημαντικά μεγαλύτερο για τα λιποσώματα που περιέχουν το φορτισμένο λιπίδιο PG στις μεμβράνες τους, όπως αναμένονταν. Από το πίνακα 5 φαίνεται ότι τα λιποσώματα με φωσφατίδουλογλυκερόλη (PG) παρουσιάζουν μειωμένο εγκλωβισμό σε σχέση με τα λιποσώματα που περιέχουν φωσφατίδουλοχολίνη (PC) και χοληστερόλη (chol) μόνο. Επιπλέον φαίνεται ότι οι λιπιδικές συστάσεις PC:CHOL (2:1), PC:CHOL (1:1) και PC έχουν παρόμοιους εγκλωβισμούς με μικρές αποκλίσεις.

Πίνακας 3: Μέσες τιμές διαμέτρου (nm) και ζ-δυναμικού DRV λιποσωμάτων διαφόρων λιπιδικών συστάσεων που εγκλωβίζουν RLX2. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων από τρία διαφορετικά δείγματα.

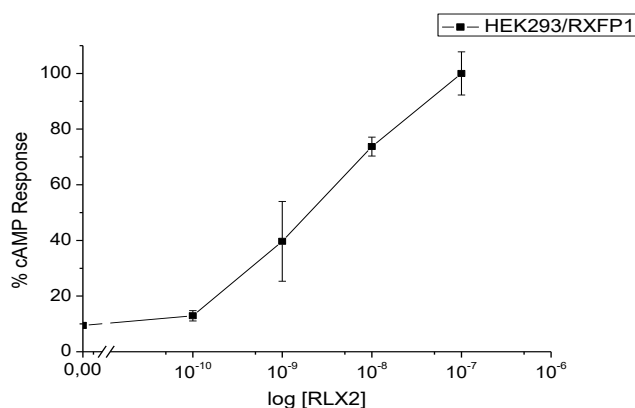
Sample (v=3)	Size (nm) \pm SD	PDI	ζ-potential (mV) \pm SD
PC	154.4 \pm 7.06	0.157	-2.96 \pm 0.63
PC:CHOL (2:1)	161.4 \pm 1.8	0.135	-7.23 \pm 0.7
PC:CHOL (1:1)	155.8 \pm 11.7	0.155	-3.59 \pm 0.32
PC:PG:CHOL (8:2:5)	184.7 \pm 9.42	0.15	-25.45 \pm 1.06
PC:PG:CHOL (9:1:5)	167.1 \pm 14.1	0.139	-16.85 \pm 0.35
PC:PG:CHOL (9:1:10)	194.3 \pm 4.99	0.108	-14.26 \pm 1.06

Πίνακας 4: Ποσοστά εγκλωβισμού Ρελαξίνης 2 σε DRV λιποσώματα με διαφορετική λιπιδική σύσταση καθώς και οι αρχικοί και τελικοί λόγοι φαρμάκου προς λιπίδιο .

Sample (v=3)	Αρχικό Drug/Lipid (mol/mol) ($\times 10^{-3}$)	Τελικό Drug/Lipid (mol/mol) ($\times 10^{-3}$)	% Εγκλωβισμός
PC	1.27	0.274 \pm 0.047	21.52 \pm 3.74
PC:CHOL (2:1)	1.27	0.245 \pm 0.032	19.19 \pm 2.48
PC:CHOL (1:1)	1.27	0.190 \pm 0.038	14.95 \pm 3.01
PC:PG:CHOL (8:2:5)	1.27	0.136 \pm 0.015	10.6 \pm 1.2
PC:PG:CHOL (9:1:5)	1.27	0.164 \pm 0.06198	12.9 \pm 4.9
PC:PG:CHOL (9:1:10)	1.27	0.126 \pm 0.0158	9.9 \pm 1.2

Έλεγχος δραστηριότητας Ρελαξίνης-2

Τα αποτελέσματα της επίδρασης των κυττάρων HEK293/RXFP1 με αυξανόμενες συγκεντρώσεις ρελαξίνης-2 αποδεικνύουν μία δοσο-εξαρτώμενη από την RLX2 επαγωγή της cAMP (Σχήμα 1).



Σχήμα 1: Δοσο-εξαρτώμενη από την RLX-2 επαγωγή της cAMP. Η ποσοτικοποίηση της cAMP έγινε συναρτήσει της ολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης του εκάστοτε δείγματος

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Για τον εγκλωβισμό της Ρελαξίνης 2 φαίνεται ότι η τεχνική DRV παρουσιάζει ελάχιστα αυξημένο ποσοστό εγκλωβισμού (περίπου 19%) με μικρότερο βαθμό πολυδιασποράς συγκριτικά με τα λιποσώματα που παρασκευάστηκαν με την τεχνική active loading. Στην παρούσα μελέτη προτείνεται για πρώτη φορά η μέθοδος DRV ως βέλτιστη για την ενσωμάτωση ευαίσθητων βιοενεργών μορίων, όπως είναι τα πεπτίδια.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία υλοποιήθηκε στα πλαίσια του ερευνητικού έργου «Ανάπτυξη προηγμένων NANOμορφών ΙΝΣουλινολιπιδίων με παρατεταμένη δράση [NANO_INΣ]», το οποίο χρηματοδοτείται από την Ειδική Υπηρεσία Διαχείρισης Επιχειρησιακού Προγράμματος Δυτικής Ελλάδας (ΕΥΔΕΠ ΔΕ) στο πλαίσιο της δράσης «Ενίσχυση Μικρομεσαίων Επιχειρήσεων για ερευνητικά έργα στους τομείς Μικροηλεκτρονική και των προηγμένων υλικών» με κωδικό ΟΠΣ 2154, και συγχρηματοδοτείται από το Πρόγραμμα Δημοσίων Επενδύσεων, με κωδ. ΣΑ ΕΠ0011.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] James R, Niall H, Kwok S, Bryand-Greenwood G. *Nature* 267 (1977) 544-6.
- [2] Parry LJ, Vodstrcil LA. *Adv. Exp. Med. Biol* 612 (2007) 34-48.
- [3] Sherwood OD. *Endocr. Rev.* 25 (2004) 205-234.
- [4] Sherwood OD. Raven Press: New York, (1994); 861-1009.
- [5] Bani D. *Vasc. Health Risk Manag.* 4 (2008) 515-524.
- [6] Du XJ. *J. Cell Mol. Med.* 11 (2007) 1101-1104
- [7] Samuel CS, Royce SG, Burton MD, Zhao C, Tregear GW, Tang ML. *Endocrinology* 148 (2007) 4259-4266.
- [8] Samuel CS, Hewitson TD. *Kidney Int.* 69 (2006) 1498-1502
- [9] Samuel CS, Hewitson TD. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 18 (2009) 9-14.
- [10] Girling JE, Rogers PA. *Angiogenesis* 8 (2005) 89-99.
- [11] Kirby C, Gregoriadis G *Biotechnology* 2 (1984) 979-984
- [12] Seltzer SE, Gregoriadis G, Dick R. *Invest Radiol* 23 (1988) 131-138
- [13] Cajal Y, Alsina MA, Busquets MA, Cabanes A, Reig F, Garcia-Anton JM *J Liposome Res* 2 (1992) 11-22.
- [14] Gregoriades G, Panagiotidi C. *Immunol Lett* 20 (1989) 237-240
- [15] Ntimenou V, Mourtas S, Christodoulakis EV, Tsilimbaris M, Antimisiaris SG. *J Liposome Res* 16 (2006) 403-416.
- [16] Badiie A, Jaafari MR, Khamesipour A. *Exp Parasitol* 115 (2007) 127-134
- [17] Perrie Y, Barralet JE, McNeil S, Vangala A. *Int J Pharm* 284 (2004) 31-41
- [18] Hwang SH¹, Maitani Y, Qi XR, Takayama K, Nagai T. *Int J Pharm* 179(1) (1999) 85-95.
- [19] Barlos K. K, Gatos D, Vasileiou Z, Barlos K. *J Pept Sci* 16(4) (2010) 200-11.