

The Entrapment of Somatostatin in a Lipid Formulation: Retarded Release and Free Radical Reactivity.

Larocca AV, Toniolo G, Tortorella S, Krokidis MG, Menounou G, Di Bella G, Chatgililoglu C, Ferreri C. *Molecules*. 2019 Aug 25;24(17):3085. doi:

10.3390/molecules24173085.PMID: 31450691 **Free PMC article.**

L'intrappolamento della somatostatina in una formulazione lipidica: rilascio ritardato e reattività dei radicali liberi

[Anna Vita Larocca](#)^{1,†}, [Gianluca Toniolo](#)^{2,†}, [Silvia Tortorella](#)^{3,‡}, [Marios G Krokidis](#)², [Georgia Menounou](#)³, [Giuseppe Di Bella](#)⁴, [Chrysostomos Chatgililoglu](#)^{1,3}, [Carla Ferreri](#)^{1,3,*}

Redattore: Chrysostomos Chatgililoglu

- Informazioni sull'autore
- Note dell'articolo
- Informazioni su copyright e licenza

Codice PMC: PMC6749267 Codice PMI: [31450691](#)

Astratto

Il peptide naturale somatostatina possiede effetti ormonali e citostatici esercitati dal legame a specifici recettori in vari tessuti. Gli usi terapeutici sono fortemente ostacolati dalla sua brevissima emivita biologica di 1-2 minuti dovuta all'idrolisi enzimatica, pertanto vengono esplorate metodologie di incapsulamento per superare la necessità di regimi di infusione continua. Liposomi multilamellari a base di fosfatidilcolina naturale sono stati utilizzati per l'incorporazione di una miscela di somatostatina e sorbitolo disciolti in tampone citrato a pH = 5. Sono state eseguite la liofilizzazione e la ricostituzione della sospensione, dimostrando la flessibilità di questa preparazione. È stata ottenuta una caratterizzazione completa di questa sospensione in termini di granulometria, efficienza di incapsulamento e proprietà di rilascio ritardato in mezzo acquoso e plasma umano. La somatostatina liposomiale incubata a 37 °C in presenza di sali di Fe(II) e (III) è stata utilizzata come modello biomimetico dell'interazione farmaco-membrana cellulare, evidenziando i processi di perossidazione e isomerizzazione dei radicali liberi che trasformano le porzioni di acidi grassi insaturi delle vescicole lipidiche. Questo studio offre nuove informazioni su un sistema di somministrazione liposomiale e mette in luce la reattività molecolare dei farmaci contenenti zolfo con il suo vettore o le membrane biologiche per applicazioni farmacologiche.

Parole chiave: somatostatina liposomiale, rilascio ritardato, radicali liberi, isomerizzazione, lipidi trans, perossidazione

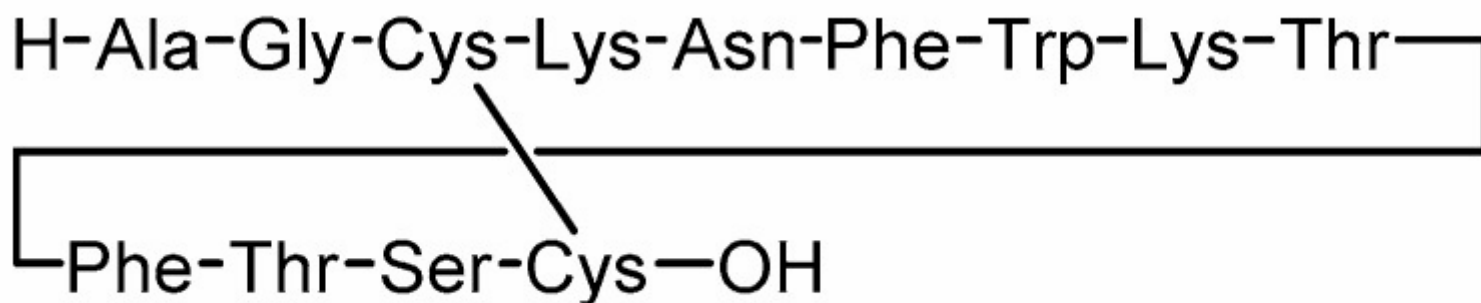
1. Introduzione

La somatostatina (nota anche come fattore inibitore del rilascio della somatotropina o fattore inibitore del rilascio dell'ormone della crescita, SST) è un peptide ciclico di 14 aminoacidi isolato per la prima volta dall'ipotalamo ovino e noto per inibire la secrezione di

molteplici ormoni (ad esempio, ormone della crescita, insulina, glucagone, gastrina), acido gastrico ed enzimi pancreatici. Nel sistema nervoso centrale, questo peptide agisce come neurotrasmettitore e influenza l'attività locomotoria e le funzioni cognitive [1]. La SST esercita la sua attività legandosi ad almeno cinque diversi sottotipi di recettori specifici (SSTR 1-5) situati sulle cellule bersaglio con un'ampia gamma di effetti biologici che possono essere sfruttati per il trattamento di una varietà di malattie umane [2 , 3 , 4]. Le vie di segnalazione attivate dall'interazione SST-recettore (come la via della proteina chinasi attivata da mitogeni, l'inibizione dell'adenilato ciclasi, l'attivazione della fosfotirosina fosfatasi, i cambiamenti nell'attività del canale del calcio e del potassio della membrana plasmatica) vengono evocate per le attività antineoplastiche e antiproliferative [5 , 6]. Il potenziale terapeutico di SST è fortemente limitato dalla sua emivita molto breve inferiore a 1-2 minuti nel plasma [7], come previsto per diversi ormoni neuropeptidici che devono essere rapidamente inattivati dopo il loro rilascio e l'interazione con i loro recettori. Infatti, nelle colture di cellule neuronali è stata misurata la degradazione di SST e si è scoperto che le proteasi legate alla membrana o le proteasi rilasciate nel mezzo di incubazione sono responsabili di questa inattivazione [8].

Sono state proposte soluzioni al breve tempo di vita basandosi su due approcci principali: (a) preparazione di analoghi dell'SST che legano uno o più gruppi alla molecola peptidica, come il gruppo N-metilico, in grado di agire come scudo per l'idrolisi in vivo [9]; (b) incapsulamento dell'SST o dei suoi analoghi in materiali polimerici, come nanocapsule di poli(alchil cianoacrilato) [10], o in vescicole fosfolipidiche naturali, eventualmente rivestite con agenti che assicurano la circolazione nel sangue, come il polietilenglicole (PEG), che protegge i liposomi dal riconoscimento e dalla rapida rimozione dalla circolazione da parte del sistema fagocitico [11]. L'SST, il suo analogo octreotide o altri analoghi sintetici sono studiati anche in formulazioni liposomiali combinate con farmaci antitumorali come la daunorubicina o con radiofarmaci, per la loro capacità di colpire le cellule tumorali ricche di SSTR [12 , 13 , 14 , 15]. La biocompatibilità e la biodegradabilità dei liposomi hanno un'importanza fondamentale, motivando così la ricerca ad approfondire l'uso di fosfolipidi naturali come componenti per il rilascio di farmaci. Vale la pena notare che, per quanto riguarda le formulazioni lipidiche naturali, la scelta della qualità degli acidi grassi è importante per il comportamento dei liposomi, poiché influenza le proprietà di fluidità e permeabilità legate al rilascio del farmaco [16]. Nell'ambito del nostro interesse per i liposomi come strumenti per le indagini in chimica biomimetica, abbiamo recentemente proposto liposomi contenenti doppi legami trans per sistemi di rilascio di farmaci con comportamento differenziato rispetto a quelli realizzati con lipidi insaturi naturali, che mostrano geometria cis [17]. Infatti, è noto che i doppi legami trans modificano le proprietà molecolari dell'assemblaggio lipidico, rispetto ai doppi legami cis, spostandosi verso doppi strati lipidici meno fluidi e permeabili [18]. Inoltre, l'isomerizzazione del doppio legame cis-trans può verificarsi come processo endogeno nelle cellule, a causa della formazione di radicali centrati sullo zolfo durante lo stress ossidativo e della loro reazione con i lipidi insaturi [19]. Recentemente, l'isomerizzazione e la perossidazione dei lipidi sono state osservate nei liposomi con farmaci antitumorali leganti il ferro come la bleomicina in presenza di tioli [20]. Siamo rimasti incuriositi dalla struttura SST, che contiene il legame disolfuro tra Cys-3 e Cys14 (Figura 1) che in condizioni di radicali liberi può produrre radicali tiolici e reagire con i lipidi insaturi. Tale reattività per SST non è stata ancora segnalata.

Figura 1.



Somatostatin

[Apri in una nuova scheda](#)

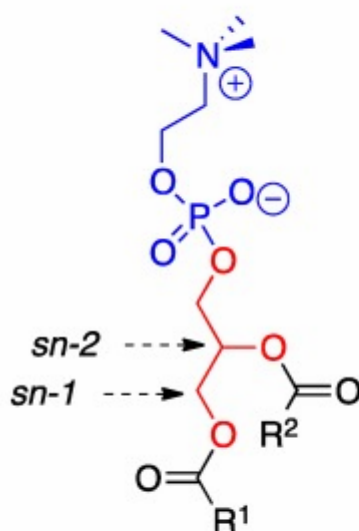
Sequenza aminoacidica del peptide somatostatina (SST).

In questo studio, riportiamo l'intrappolamento di SST in una formulazione liposomica, con caratterizzazione completa di dimensioni e proprietà, tra cui efficienza di incapsulamento, rilascio ritardato e possibilità di liofilizzazione-ricostituzione dell'emulsione. Liposomi contenenti SST e gruppi di acidi grassi insaturi sono stati utilizzati anche come modello biomimetico dello stress da radicali liberi indotto dal ferro, evidenziando il verificarsi di processi di isomerizzazione e perossidazione lipidica. Questo studio contribuisce a nuove conoscenze nel campo interdisciplinare dei liposomi e dei meccanismi farmacologici.

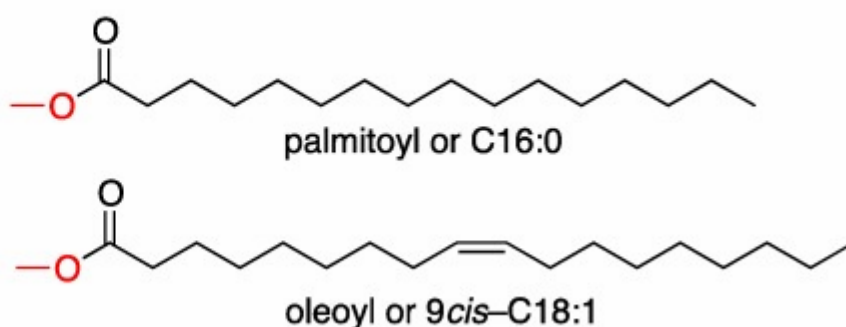
2. Risultati e discussione

Le formulazioni lipidiche utilizzate in questo studio erano costituite da L- α -fosfatidilcolina (PC) naturale derivata da lecitina di soia, la cui formula generale è mostrata in [Figura 2 A](#), che presenta la colina come testa idrofila mentre le code idrofobiche sono composte da diversi acidi grassi. Nella [Figura 2 B](#) le frazioni di acidi grassi della lecitina di soia sono mostrate come percentuali relative (%rel). Per studiare il comportamento chimico della SST, abbiamo utilizzato anche il fosfolipide sintetico 1-palmitoil-2-oleoil fosfatidilcolina (POPC), che contiene l'acido grasso saturo (SFA) palmitico (C16:0) e l'acido grasso monoinsaturo (MUFA) oleico (9 *cis* -C18:1) ([Figura 2 C](#)).

Figura 2.

A**L- α -Phosphatidyl Choline (PC)****B****Fatty acid moieties in soybean lecithin (% rel)**

Palmitoyl	16.4%
Stearoyl	3.6%
Oleoyl	10%
Vaccenoyl	1.7%
Linoleoyl	65%

C**POPC: R¹ = Palmitoyl, R² = Oleoyl**[Apri in una nuova scheda](#)

Strutture lipidiche: (**A**) struttura generale DELLA L - α -fosfatidilcolina (PC); (**B**) elenco degli acidi grassi presenti nella lecitina di soia e relative percentuali ottenute dall'analisi gascromatografica; (**C**) strutture dell'acido palmitico e dell'acido oleico presenti nella 1-palmitoil-2-oleoil fosfatidilcolina (POPC).

Sono stati condotti esperimenti di rilascio di SST e resistenza alla degradazione con preparazioni di liposomi di lecitina di soia, esplorando il comportamento dei liposomi dopo liofilizzazione-ricostituzione. I liposomi POPC e i liposomi di lecitina di soia contenenti SST sono stati quindi utilizzati come modelli biomimetici di stress da radicali liberi indotto da metalli per evidenziare la reattività tra peptidi e lipidi insaturi.

Liposomi di lecitina di soia sono stati preparati per gli esperimenti di rilascio di questo studio. L' α -fosfatidilcolina dalla soia è stata sciolta in etanolo fino a raggiungere una concentrazione di 5 mM e questa soluzione etanolica è stata evaporata sotto vuoto per ottenere un film lipidico senza tracce di solvente. In acqua tridistillata, è stato preparato un tampone citrato 0,1 M a pH 5 e addizionato di sorbitolo 2 mM. Il peptide SST (0,5 mg/mL) è stato sciolto in questo tampone. A questo pH, più vicino al suo punto isoelettrico (pH = 5,6) [21], il peptide ha dimostrato di essere stabile come stabilito dalle analisi LC in diversi punti temporali (per i metodi vedere la parte sperimentale). La soluzione peptidica è stata aggiunta al film lipidico, calcolando un rapporto lipide:peptide di 20:1 in tutte le preparazioni. Dopo 5 minuti al vortice, la sospensione è stata caratterizzata mediante DLS (Dynamic Light Scattering) per valutare la dimensione delle particelle e l'indice di polidispersità (PDI) prima di essere liofilizzata. Il diametro medio è risultato essere $159,5 \pm 12$ nm (PDI $0,16 \pm 0,01$). Le misurazioni del diametro medio della nanoemulsione (NE)

sono state eseguite in un intervallo di tempo di 5 ore, dimostrando che la dimensione non subisce variazioni. È interessante notare che dopo liofilizzazione e ricostituzione il diametro medio è risultato simile alla preparazione originale. È stata valutata l'efficienza di incapsulamento (EE) nei liposomi di lecitina di soia, risultando pari al $66,9 \pm 2,9\%$. Utilizzando liposomi formati da lecitina di soia sono stati progettati due esperimenti in vitro per il rilascio di SST: in tampone citrato acquoso (pH 5) e, per testare la resistenza alle peptidasi, nel plasma umano.

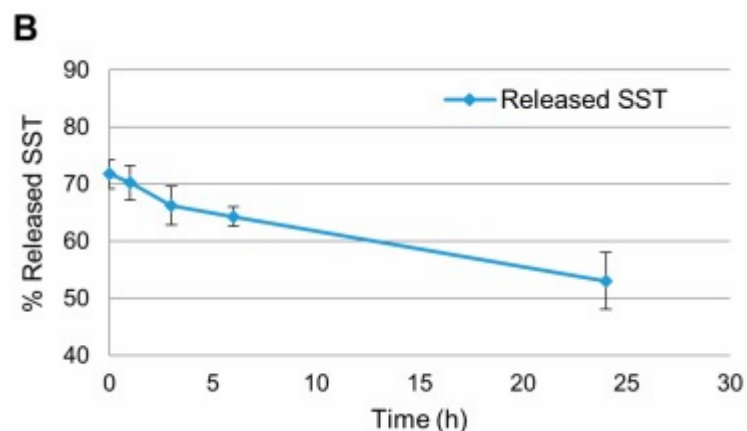
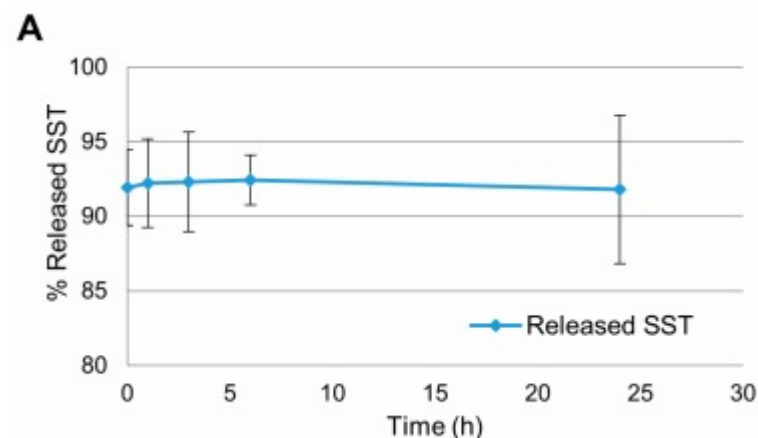
2.1. Esperimenti di rilascio in tampone citrato acquoso

Per ogni serie di esperimenti sono stati utilizzati 5 mg di SST e, dopo la liofilizzazione, la sospensione è stata ricostituita utilizzando 10 mL di acqua tridistillata.

L'esperimento di rilascio è stato progettato per analizzare non solo l'SST rilasciato direttamente (nella fase acquosa della nanoemulsione (NE) - analisi diretta) ma anche la quantità di SST non rilasciato, ancora nelle goccioline lipidiche (analisi indiretta). Poiché l'SST può presentare problemi di stabilità, la determinazione del peptide rimasto nella fase lipidica aveva lo scopo di raccogliere importanti informazioni aggiuntive per la caratterizzazione del profilo di rilascio della NE. L'analisi diretta consisteva nella misurazione della concentrazione di SST nella frazione acquosa dell'emulsione dopo centrifugazione, utilizzando l'analisi LC/MS seguendo un protocollo pubblicato [[22](#)]. Nell'analisi indiretta il peptide è stato estratto dalle goccioline lipidiche, separato mediante centrifugazione e analizzato nuovamente mediante LC/MS.

Inoltre, gli esperimenti di rilascio sono stati condotti utilizzando le emulsioni di NE ricostituite dai campioni liofilizzati, seguendo due protocolli diversi. Nel Protocollo 1 (dati riportati in [Figura 3](#)), i NE liofilizzati contenenti SST (0,5 mg/mL) sono stati ricostituiti in acqua per ricreare le stesse condizioni della preparazione originale e i campioni sono stati lasciati per i tempi indicati; le quantità di SST a ciascun punto temporale sono state quindi calcolate come mostrato in [Figura 3](#) A,B: (a) la prima dalle analisi di ciascun campione trattato per centrifugazione e quindi considerando entrambe le quantità di SST nella fase acquosa e lipidica. In [Figura 3](#) A queste due quantità danno circa il 93% di SST rilasciato, che è costante nel tempo; (b) la seconda quantificazione considerando la % di SST rilasciata nella fase acquosa. In [Figura 3](#) B è chiaramente mostrato che il peptide diminuisce nel tempo quando si considera come quantità iniziale l'SST incapsulato (0,5 mg/mL).

Figura 3.

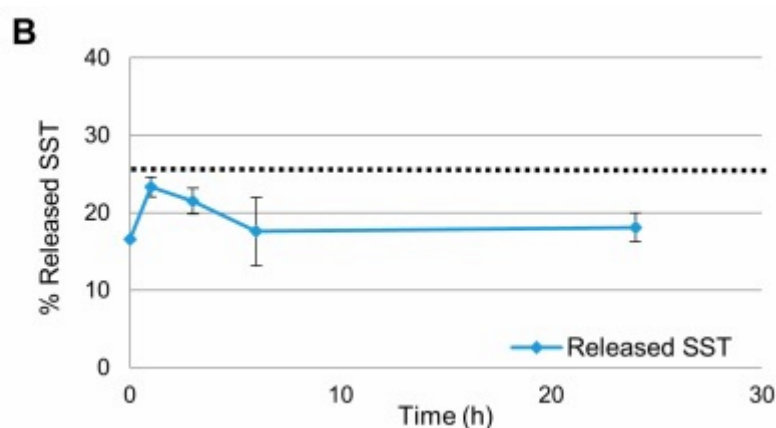
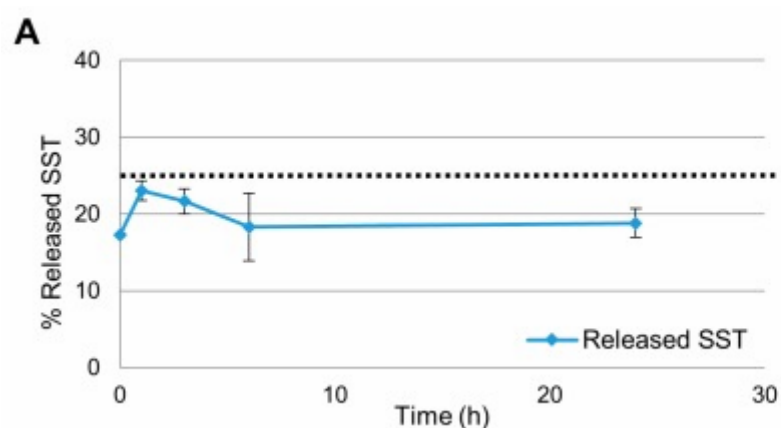


[Apri in una nuova scheda](#)

Somatostatina rilasciata (SST) dalle nanoemulsioni (NE) seguendo il protocollo 1 in tampone citrato 0,1 M pH 5,0. (**A**) % SST rilasciata considerando la somma della frazione SST trovata nella fase acquosa (analisi diretta) e la frazione SST nelle goccioline lipidiche (analisi indiretta) in ogni punto temporale. (**B**) % SST rilasciata nella fase acquosa considerando come 100% la quantità iniziale di SST utilizzata nella procedura di preparazione (0,5 mg/mL).

Volevamo anche determinare la SST rilasciata dai NE con la rimozione della fase acquosa sostituita a ogni punto temporale da tampone fresco. Ciò ha portato al secondo protocollo (Protocollo 2 - dati in [Figura 4](#)) che prevedeva la fase di centrifugazione per rimuovere la fase acquosa del NE; il pellet lipidico contenente SST risultante è stato quindi sospeso in tampone citrato 0,1 M a pH 5,0 e l'esperimento di rilascio è stato eseguito ai tempi indicati. Ancora una volta, nelle [Figure 4 A e B](#) le quantità di SST sono riportate in modo complementare: nella [Figura 4 A](#) è calcolato dalle analisi diretta e indiretta, e nella [Figura 4 B](#) è riportato il rilascio nel tampone dall'analisi diretta.

Figura 4.



[Apri in una nuova scheda](#)

SST rilasciato dai NE seguendo il protocollo 2. (**A**) Considerando come 100% la somma della frazione rilasciata, della frazione ancora incapsulata e di quella non incapsulata in ogni punto temporale. (**B**) Considerando come 100% la quantità di SST prevista nei campioni dalla fase di centrifugazione. La linea tratteggiata rappresenta il 25%, la quantità di SST disponibile dopo la centrifugazione per rimuovere la frazione non incapsulata di SST.

In tutti i casi, la LC/MS utilizzando SST come calibrazione e standard di riferimento, come descritto nella sezione Materiali e Metodi, è stata eseguita ai tempi (0, 1 h, 3 h, 6 h, 24 h) in cui i campioni sono stati raccolti e analizzati. La % di SST rilasciata è stata calcolata considerando come 100% la quantità iniziale di SST utilizzata per la preparazione degli NE (0,5 mg/mL).

I due protocolli hanno fornito una visione più chiara del comportamento dell'SST e della dinamica di rilascio dell'NE. In particolare, il primo protocollo ha fornito informazioni sul comportamento dell'NE e sulle variazioni nella ripartizione dell'SST tra le due fasi nel tempo; il secondo ha fornito informazioni sulla diffusione dell'SST dalle goccioline lipidiche alla fase acquosa meno concentrata. Inoltre, poiché gli esperimenti sono stati condotti per 24 ore, è stato possibile valutare l'effetto stabilizzante dell'NE sull'SST.

Nella [Figura 3 A](#) la quantità di SST è stata trovata pari a circa il 92% al tempo 0 e la sua concentrazione è rimasta costante fino a 24 ore. [La Figura 3 B](#) mostra che la SST rilasciata nella fase acquosa al tempo 0 era pari a circa il 72% e si è ridotta al 53% dopo 24 ore. È interessante notare che al tempo 0 la quantità iniziale di SST era diversa nei due grafici: parte della SST era già non disponibile al tempo 0, corrispondente a circa il 22%, come può essere calcolato considerando a) il valore al tempo 0 di circa il 92% dato dalla somma della frazione rilasciata e della frazione nelle goccioline lipidiche, come mostrato nella [Figura 3 A](#), e b) il valore al tempo 0 di circa il 28%. Il 28% di SST non è stato trovato nella fase acquosa rispetto alla concentrazione iniziale di SST, come mostrato in [Figura 3 B](#). I risultati in [Figura 3 B](#) hanno anche dimostrato che alcuni processi di degradazione/agggregazione possono verificarsi nell'SST dalla sua preparazione originale durante le fasi di liofilizzazione e manipolazione, poiché si verifica una diminuzione della concentrazione del peptide dopo la ricostituzione. Tuttavia, quando l'SST è stato rimosso dalla fase acquosa, parte dell'SST associato alla fase lipidica è stato rilasciato ed è passato alla fase acquosa, come mostrato in [Figura 3 A](#), dove il rapporto rilasciato/totale è rimasto costante fino a 24 ore. Confrontando i due grafici è chiaro che, mentre una parte di SST viene degradata nella fase acquosa, una parte di SST nelle goccioline lipidiche è stata rilasciata al fine di mantenere una presenza costante di peptide nella frazione acquosa. Poiché l'SST viene costantemente rilasciato nella fase acquosa del NE per 24 ore, il sistema può essere considerato in grado di rilasciare il peptide in modo prolungato.

Nel protocollo 2, gli NE liofilizzati sono stati prima ricostituiti utilizzando la fase acquosa e poi centrifugati per rimuovere la frazione non incapsulata di SST, per comprendere la quantità di farmaco immediatamente rilasciata dalle goccioline dopo la ricostituzione. Il pellet ottenuto dopo la centrifugazione è stato sospeso in tampone a pH 5 per iniziare il follow-up del rilascio. Anche in questo caso, i risultati del protocollo 2 ([Figura 4](#)) sono stati espressi in due modi. Nella [Figura 4 A](#) il 100% è rappresentato dalla somma di SST trovata con l'analisi diretta e l'analisi indiretta e nella [Figura 4 B](#) il 100% è stato considerato come la quantità di SST utilizzata per la preparazione degli NE (0,5 mg/mL).

La fase acquosa rimossa per centrifugazione conteneva il 75% del peptide ingerito, pertanto solo il 25% è stato calcolato per gli esperimenti di rilascio (contrassegnati con la linea tratteggiata in [Figura 4](#)). Non vi è alcuna differenza significativa tra [la Figura 4 A](#) e [B](#): in entrambi i casi, al momento iniziale, il 17% della quantità totale di SST era nella fase acquosa della NE. Dopo 1 ora, il picco di concentrazione è stato raggiunto in entrambe le condizioni (23% della SST totale, corrispondente al 90% della quantità disponibile).

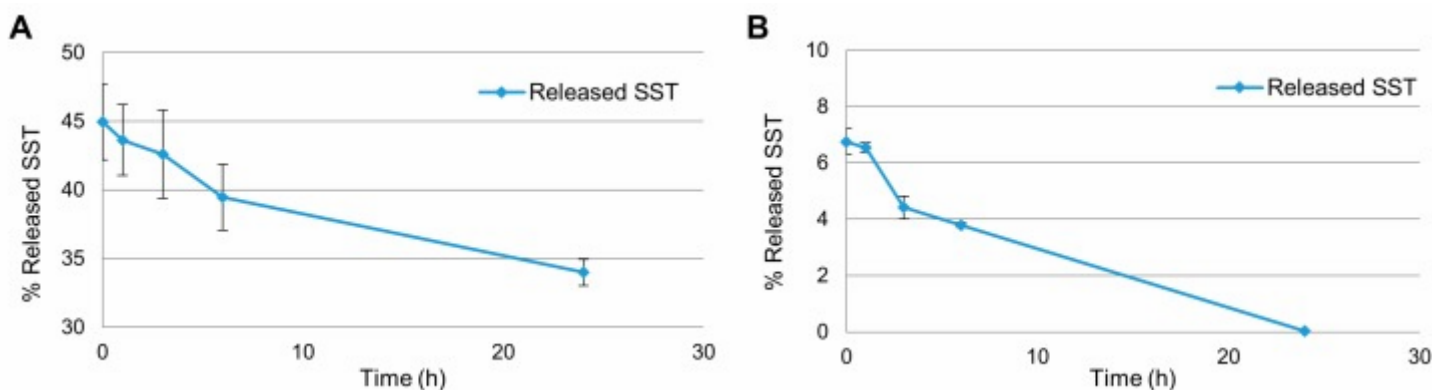
Successivamente, la concentrazione ha iniziato a diminuire, attestandosi al 19% dopo 24 ore (85% del farmaco disponibile). La somiglianza tra [la Figura 4 A e B](#) suggerisce che durante questo esperimento si sia verificata una degradazione nulla o molto ridotta. Probabilmente ciò è dovuto alla concentrazione complessivamente inferiore del peptide e, di conseguenza, l'effetto stabilizzante della NE è più evidente. Inoltre, è chiaro che dopo la ricostituzione l'SST si distribuisce immediatamente tra le due fasi e, a parte il picco a 1 h, la concentrazione di SST rimane costante in entrambi i compartimenti per l'intero esperimento.

2.2. Esperimenti di rilascio nel plasma umano

Per valutare la concentrazione di SST negli esperimenti di rilascio di NE utilizzando plasma umano è stata utilizzata solo l'analisi diretta, poiché l'analisi indiretta si è rivelata inadatta per il sistema LC/MS quando si lavora con il plasma. Pertanto, il 100% di SST rilasciato corrisponde alla quantità di SST utilizzata per la preparazione dei NE (0,5 mg/mL).

Gli esperimenti sono stati condotti seguendo due protocolli simili a quelli descritti sopra. La prima procedura consisteva nel ricostituire l'NE liofilizzato direttamente nel plasma per avviare l'esperimento di rilascio ([Figura 5 A](#)). Nella seconda, l'NE è stato prima ricostituito in acqua, quindi sottoposto a centrifugazione per rimuovere la frazione non incapsulata di SST e il pellet risultante è stato sospeso in plasma umano per avviare l'esperimento ([Figura 5 B](#)).

Figura 5.



[Apri in una nuova scheda](#)

(**A**) Misurazione della concentrazione di SST nel plasma dopo la ricostituzione degli NE direttamente nel plasma (protocollo 1). (**B**) Misurazione della concentrazione di SST nel plasma dopo la rimozione della frazione di SST non incapsulata (protocollo 2). Le percentuali sono calcolate dalle analisi LC/MS relative alla concentrazione iniziale di 0,5 mg/mL.

Nella [Figura 5 A](#), la quantità di SST misurata nella fase acquosa del NE era pari al 45% della concentrazione iniziale (0,5 mg/mL) al tempo 0 e diminuiva al 34% dopo 24 ore. Quando il profilo di rilascio del NE è stato studiato seguendo il protocollo 2, circa il 7% del SST è stato trovato nel plasma al tempo 0 e dopo 24 ore sono state trovate solo tracce di SST (0,03%) ([Figura 5 B](#)). Questi risultati implicano che vi sia stata una diminuzione della concentrazione dovuta alla degradazione del peptide. Tuttavia, è noto che il SST ha

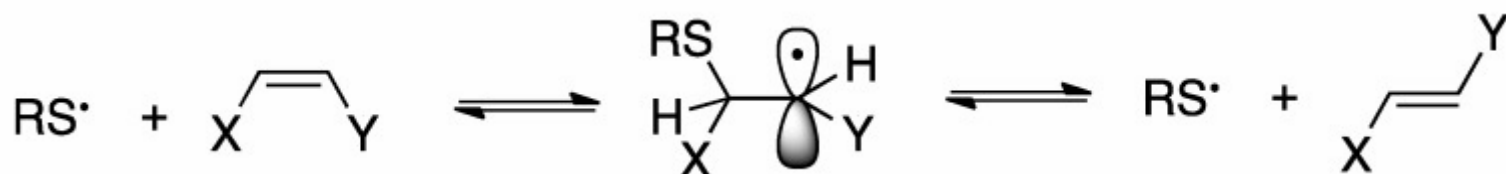
un'emivita molto breve nel plasma [7] e il NE si è dimostrato efficace nel migliorare l'emivita del peptide, mantenendo la sua concentrazione misurabile almeno per le prime 7-8 ore.

2.3. Reattività dell'SST nelle vescicole liposomiche

Eravamo interessati allo studio della reattività del ponte disolfuro presente nella struttura dell'SST, tra i residui di cisteina in posizione 3 e 14 ([Figura 1](#)), poiché una varietà di condizioni può influenzare la reattività di questo gruppo funzionale, come la presenza di ioni metallici redox-attivi. Infatti, è nota la capacità di chelazione dei metalli verso i disolfuri e può agire per generare quantità catalitiche di radicali tiolici insieme come noto per Fe(III) e la sua riduzione a Fe(II) [23]. Poiché abbiamo lavorato in condizioni aerobiche ed è noto che i complessi con Fe(II) possono essere ossidati a Fe(III) in aria [24], abbiamo utilizzato sali di Fe(II) e Fe(III) nei nostri esperimenti al fine di seguire la reattività dei liposomi in entrambi i casi. D'altra parte, come menzionato nell'introduzione, le ricerche condotte da alcuni di noi hanno dimostrato che il legame del ferro nel caso del farmaco antitumorale bleomicina era in grado di indurre la formazione di radicali tiolici, che reagiscono con le vescicole liposomiali in termini di isomerizzazione cis-trans e perossidazione delle frazioni di acidi grassi insaturi dei lipidi delle vescicole [20]. Abbiamo anche utilizzato la forma ridotta di SST (red-SST), con i gruppi tiolici liberi nelle posizioni 3 e 14, che è disponibile in commercio, per confrontare i risultati dei due residui di cisteina liberi con la frazione di cisteina del peptide naturale nella formazione del complesso del ferro, incluso il ruolo dei radicali tiolici nella conseguente reazione di isomerizzazione. In effetti, si ritiene che la riduzione di SST avvenga in vivo ed è associata alla formazione di fibrille rilevanti per l'immagazzinamento e la secrezione [25] ma non è mai stata collegata alla reattività chimica.

Abbiamo utilizzato il modello biomimetico costituito da una grande vescicola unilamellare mediante la tecnica di estrusione con 200 nm di diametro (LUVET) [26], in presenza di SST o red-SST per studiare il comportamento dei fosfolipidi di membrana. Sono state impiegate due diverse composizioni di liposomi: in primo luogo, il fosfolipide sintetico, 1-palmitoil-2-oleoil fosfatidil colina (POPC) è stato utilizzato per studiare la reattività della frazione MUFA dell'acido oleico (9 *cis* -C18:1, [Figura 2 C](#)) che si prevede venga direttamente trasformato dall'isomerizzazione cis-trans catalizzata da radicali tiolici nel suo corrispondente isomero trans geometrico, acido elaidico (9 *trans* -C18:1) mediante il meccanismo di addizione-eliminazione rappresentato per il doppio legame in [Figura 6](#) . Il secondo materiale utilizzato per la formazione dei liposomi è stata la lecitina di soia, contenente varie percentuali di acidi grassi saturi, mono- e polinsaturi (MUFA e PUFA) ([Figura 2 B](#)). I residui PUFA dei liposomi di lecitina di soia possono essere trasformati sia tramite percorsi ossidativi che di isomerizzazione. In particolare, l'acido linoleico (9 *cis* , 12 *cis* -C18:2), il PUFA più rappresentativo nella lecitina (65% della composizione totale degli acidi grassi), può dare isomeri trans geometrici che vengono separati, riconosciuti e quantificati mediante analisi GC [18 , 19 , 26 , 27]. La perossidazione lipidica può essere stimata indirettamente dalla quantità di acido linoleico PUFA in ciascun esperimento, evidenziandone la diminuzione utilizzando le curve di calibrazione GC rispetto al residuo grasso saturo dell'acido palmitico (C16:0), come precedentemente descritto [20 , 28]. L'analisi GC è il gold standard per la quantificazione degli acidi grassi.

Figura 6.



[Apri in una nuova scheda](#)

Meccanismo di reazione per l'isomerizzazione cis-trans di un doppio legame catalizzata da radicali tiilici.

I sali di ferro utilizzati negli esperimenti sono stati: solfato di ammonio ferroso (II) $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ e solfato ferrico (III) $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$. I sali alla concentrazione di $100 \mu\text{M}$ sono stati aggiunti alla sospensione liposomica (2 mM) e quindi l'aggiunta di SST o red-SST ($100 \mu\text{M}$) alla sospensione acquosa delle vescicole è stata effettuata tramite pompa a siringa, mantenendo le fiale a 37°C in un agitatore orbitale per il tempo di reazione indicato. Gli esperimenti sono stati condotti in condizioni aerobiche e anaerobiche e i risultati sono riassunti nella [Tabella 1](#). Gli esperimenti in bianco includevano la reazione liposomica senza il peptide e in presenza/assenza di ferro, al fine di stimare meglio il contributo del farmaco alla reattività lipidica. Gli esperimenti in bianco senza SST con POPC e con o senza sali di Fe hanno prodotto una quantità non rilevabile di isomeri trans (risultati non mostrati).

Tabella 1.

Formazione di isomeri trans di acidi grassi monoinsaturi (MUFA) e consumo di residui di acidi grassi polinsaturi (PUFA) ¹ in sospensioni acquose di liposomi (2 mM) trattate con $100 \mu\text{M}$ di SST/red-SST e $100 \mu\text{M}$ di sali di Fe a 37°C ($n = 3$ di ciascun esperimento).

Iscrizione	Liposoma	O ₂	Peptide	Fe(II)	Fe(III)	trans -18:1 (%)	traslazione -18:2 (%)	Consumo di PUFA (%)
1	POPC ²	NO	SST		X	tr		
2	POPC ²	NO	SST	X		$0,9 \pm 0,1$		
3	POPC ²	NO	rosso-SST	X		$0,7 \pm 0,2$		
4	POPC ²	NO	rosso-SST		X	$29,9 \pm 0,2$		
5	POPC ²	SÌ	rosso-SST		X	$5 \pm 0,3$		
6	lecitina di soia ³	SÌ	SST			e	e	$2,2 \pm 1,4$
7	lecitina di soia ³	SÌ	SST	X		tr	tr	$95,9 \pm 0,3$
8	lecitina di soia ³	SÌ	SST	4 pezzi		$0,3 \pm 0,0$	$0,2 \pm 0,1$	$75,5 \pm 0,4$
9	lecitina di soia ³	SÌ	rosso-SST	4 pezzi		$0,4 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$	$84,1 \pm 2,6$
10	lecitina di soia ³	SÌ	SST		4 pezzi	tr	tr	$35,9 \pm 0,2$

11	lecitina di soia ³	SÌ	rosso- SST	4 pezzi	tr	tr	92,3±0,4
----	----------------------------------	----	---------------	---------	----	----	----------

[Apri in una nuova scheda](#)

Nd = non rilevabile; tr = tracce (<0,1%) ¹ I residui di acidi grassi sono stati ottenuti dalla sospensione liposomica dopo l'estrazione dei lipidi e la transesterificazione, come descritto nei Materiali e metodi. ² Incubazione di 24 ore. ³ Incubazione di 8 ore. ⁴ Incubazione con sale Fe(II) 30 µM.

Con SST-sale di Fe(III) e SST-sale di Fe(II) in condizioni anaerobiche (voci 1 e 2), l'isomero trans di MUFA è stato rilevato a <1% con sale di Fe(II) in condizioni anaerobiche. Con la forma ridotta del peptide e il sale di Fe(II), la reattività per l'isomerizzazione era ancora bassa (voce 3). Invece, il red-SST con sale di Fe(III) in condizioni anaerobiche ha prodotto la reazione di isomerizzazione più efficace, raggiungendo il 30% dopo 24 ore di incubazione (voce 4). In condizioni aerobiche, lo stesso esperimento ha prodotto isomerizzazione, sebbene a basse concentrazioni (5%) (voce 5).

Quando vengono utilizzati liposomi di lecitina di soia, è stata monitorata la reattività degli acidi grassi polinsaturi (PUFA) e lo scenario è cambiato in particolare evidenziando il consumo di PUFA dovuto a processi di perossidazione in condizioni aerobiche, come illustrato per la prima volta per i complessi bleomicina-Fe [[20](#)]. Il ruolo del sale di ferro è importante per la reattività del sistema, poiché SST in condizioni aerobiche ma senza sali di Fe ha indotto un leggero processo di perossidazione e nessuna isomerizzazione dopo 24 ore (voce 6, [Tabella 1](#)). La reattività delle vescicole contenenti PUFA in presenza sia di SST che di sale di Fe(II) è aumentata verso la perossidazione dei residui polinsaturi, riducendo il tempo di reazione a 8 ore invece di 24 ore per rilevare un consumo quasi totale di PUFA (96%, vedere voce 7, [Tabella 1](#)). In questo momento, il forte consumo di PUFA non ha permesso di evidenziare alcun processo di isomerizzazione. Abbassando la concentrazione di Fe(II) a 30 µM, il processo di perossidazione è diminuito a circa il 75% (voce 8). Quando la bassa concentrazione di sale di Fe(II) viene utilizzata con red-SST, la perossidazione aumenta leggermente rispetto alla forma ciclica del peptide (voce 9). Infine, con 30 µM di sale di Fe(III) il processo di perossidazione si è verificato sia con SST che con red-SST, tuttavia quest'ultimo si è rivelato più efficiente (cfr., voce 10 e voce 11).

Sono necessari ulteriori studi per comprendere appieno la complessa reattività che coinvolge gli addotti metallo-zolfo nei liposomi, tenendo conto che le diverse rese di isomerizzazione possono essere attribuite anche alla diffusione di specie radicaliche reattive all'interno del doppio strato lipidico. Vale la pena ricordare che l'interazione di SST con i suoi recettori di membrana [[2](#) , [5](#) , [6](#)] porta questo peptide in stretto contatto con il doppio strato lipidico, pertanto la sua reattività con i lipidi non può essere esclusa. I risultati attuali ottenuti con il modello biomimetico di liposomi utilizzando SST o la sua forma ridotta evidenziano il ruolo delle biomolecole contenenti zolfo come innesco di processi basati sui radicali ossidativi che possono trasformare gli acidi grassi insaturi, che sono importanti costituenti delle membrane cellulari. Questa è una reattività molto interessante, che dovrebbe essere presa in considerazione poiché la bioconiugazione lipide-peptide è utilizzata nella tecnologia dei liposomi [[29](#)]. La perossidazione lipidica e l'isomerizzazione sono già state evidenziate per i farmaci antitumorali [[20](#)], e oggi l'aspetto ossidativo è considerato non solo come un effetto collaterale indotto dalla terapia antitumorale, ma anche come una condizione per creare uno squilibrio ossidante-antiossidante nelle cellule tumorali [[30](#)]. Ciò è collegato allo stato redox del metallo dell'ambiente cellulare che può

essere un importante innesco di reazioni radicaliche, come mostrato per la reattività dei complessi di rame [31 , 32]. I composti tiolici sono specie reattive in questo contesto come nel nuovo modello qui proposto per SST, ampliando l'attuale conoscenza delle proprietà molecolari di questo peptide per applicazioni farmacologiche.

3. Conclusioni

In questo articolo abbiamo descritto l'intrappolamento di SST in una formulazione lipidica che ha aumentato di 10 volte la stabilità del peptide nel plasma umano. Questi risultati sono promettenti per l'applicazione come sistema di rilascio di farmaci, tramite estensione ad esperimenti appropriati in contesto biologico, utilizzando cellule o modelli murini, attualmente in corso. Inoltre, l'inclusione di SST o del suo derivato aciclico in vescicole liposomiali è stata utilizzata come modello biomimetico in presenza di sali di ferro, per evidenziare la reattività tra il peptide e il suo trasportatore lipidico con formazione di radicali tiolici e induzione di processi di isomerizzazione/perossidazione lipidica. Vengono fornite nuove conoscenze molecolari che possono essere ulteriormente sviluppate per strategie farmacologiche sinergiche.

4. Materiali e metodi

La somatostatina (SST) e la sua forma aciclica sono state fornite da Bachem, Germania, e utilizzate senza ulteriore purificazione. Il POPC e LA L - α -fosfatidilcolina da soia sono stati forniti da Avanti Polar Lipids, USA, e utilizzati senza ulteriore purificazione. L'acido formico e il formiato di ammonio sono stati acquistati da Sigma-Aldrich, Milano, e utilizzati tal quali. L'acetonitrile, il citrato di sodio, l'acido citrico e l'etanolo assoluto sono stati acquistati da Sigma-Aldrich, Milano, e utilizzati senza ulteriore purificazione.

4.1. Preparazione di nanoemulsioni (NE)

Per preparare 10 mL di NE, 0,2 g di L - α -fosfatidilcolina (2% *p / v*) sono stati sciolti in etanolo assoluto, posti in un pallone a fondo tondo e quindi il solvente è stato rimosso a pressione ridotta per produrre un film lipidico sottile e uniforme sulla parete del pallone. Cinque milligrammi di SST (0,5 mg/mL) e 72,8 mg di sorbitolo (2 mM) sono stati sciolti in 10 mL di tampone citrato 0,1 M. La soluzione di SST è stata quindi aggiunta al film lipidico e il contenuto del pallone è stato mantenuto sotto agitazione con vortex per 5 minuti. Il NE così ottenuto è stato liofilizzato e, quando necessario per ulteriori esperimenti, ricostituito con 10 mL di acqua q.b.

4.2. Analisi LC/MS

È stato utilizzato il sistema di purificazione LC/MS automatizzato Agilent 1260 Infinity e le analisi sono state eseguite con una colonna C-18 a fase inversa (ZORBAX SB-C18 Rapid Resolution HT 2,1 $\times$ 50 mm 1,8 micron 600 Bar). È stata utilizzata anche una cartuccia di pre-filtrazione per HPLC Phenomenex. Le fasi mobili erano (A) H₂O + acido formico allo 0,1% e (B) Acetonitrile + acido formico allo 0,1%. I campioni sono stati eluiti con un gradiente lineare di B dal 5% al 90% in 15 min, B è stato quindi ridotto al 5% in 5 min (20 min) e mantenuto a tale livello per 5 min (25 min).

4.3. Esperimenti di rilascio in vitro in tampone

L'esperimento di rilascio è stato progettato per analizzare non solo la SST rilasciata direttamente (rilevata nel mezzo), ma anche la quantità di SST non rilasciata, ancora intrappolata nelle goccioline lipidiche (analisi indiretta). Sono stati seguiti due protocolli diversi: (1) la NE liofilizzata è stata ricostituita in tampone citrato a pH 5,0 0,1 M per iniziare l'esperimento di rilascio e dopo ogni punto temporale le analisi della SST presente nelle fasi acquosa e lipidica risultanti sono state eseguite come descritto di seguito; (2) dopo la ricostituzione in acqua, la NE è stata immediatamente centrifugata, la frazione lipidica è stata isolata e risospesa in tampone citrato fresco a pH 5,0 0,1 M per iniziare l'esperimento. La NE contenente SST è stata mantenuta in un agitatore orizzontale a 37 °C (velocità di agitazione 100 rpm). Raggiunto il punto temporale (0 min, 1 h, 3 h, 6 h, 24 h), sono stati raccolti tre campioni da 0,2 mL per ciascun protocollo, centrifugati (15.000 rpm $\times$ 5 min $\times$ 4 °C) e 50 μ L di surnatante sono stati analizzati direttamente tramite LC/MS (analisi diretta). I pellet lipidici rimanenti sono stati quindi sciolti in una miscela di tampone esano/formiato a pH 3,0 (0,2 mL ciascuno, volume totale 0,4 mL), agitati su vortex per 5 min e dopo 10 min sono stati prelevati 50 μ L di fase acquosa e analizzati con LC/MS (analisi indiretta). L'esperimento è stato eseguito tre volte per l'analisi statistica.

4.4. Profilo di rilascio in vitro nel plasma umano

Sono stati seguiti due protocolli diversi secondo quanto riportato anche in letteratura [[33](#)]: (1) il NE liofilizzato è stato ricostituito direttamente nel plasma umano per iniziare l'esperimento di rilascio; (2) dopo la ricostituzione in acqua tridistillata, il NE è stato immediatamente centrifugato, la frazione lipidica è stata isolata e sospesa nel plasma umano per iniziare l'esperimento. Il NE contenente SST è stato mantenuto in un agitatore orizzontale a 37 °C (velocità di agitazione 100 rpm). Raggiunto il punto temporale (0 min, 1 h, 3 h, 6 h, 24 h), tre campioni da 0,2 mL per ciascun protocollo sono stati raccolti e centrifugati (15.000 rpm $\times$ 5 min $\times$ 4 °C). A 100 μ L del surnatante così ottenuto sono stati aggiunti 100 μ L di TCA al 6% (concentrazione finale di TCA al 3%) e il prodotto è stato posto in un bagno di ghiaccio per 10 minuti e centrifugato nuovamente (15.000 rpm $\times$ 5 minuti $\times$ 4 °C). 100 μ L del surnatante risultante sono stati raccolti, raffreddati con una soluzione di NaOH 1 M e analizzati tramite LC/MS [[1](#)]. L'analisi indiretta non è stata eseguita a causa dell'incompatibilità con la colonna HPLC.

4.5. Esperimenti sui liposomi

Grandi vescicole unilamellari sono state preparate con metodologie note [[26](#)]. In breve, POPC o lecitina di soia sono stati sciolti in cloroformio e quindi evaporati fino a formare un film sottile in una provetta sotto flusso di argon. Nel passaggio successivo la provetta è rimasta sotto vuoto per 30 minuti. È stata aggiunta acqua degassata e le vescicole multilamellari sono state formate mediante vortice in atmosfera di argon per 7 minuti. Per ottenere le vescicole LUVET di 200 nm di diametro, le emulsioni sono state estruse mediante passaggio per 19 volte attraverso due membrane di policarbonato con la specifica dimensione dei pori. In una fiala da 4 mL è stata aggiunta una sospensione di vescicole 2 mM insieme al complesso di ferro (0,1 mM) e la fiala è stata mantenuta in incubazione a 37 °C aggiungendo una soluzione di somatostatina (0,1 mM) goccia a goccia tramite una pompa a siringa (0,5 mm/min). La miscela di reazione è stata lavorata dopo il tempo riportato (8 o 24 ore) aggiungendo cloroformio/metanolo 2:1 (1 mL) per estrarre i lipidi. La fase organica è stata essiccata su solfato di sodio anidro ed evaporata sotto vuoto a temperatura ambiente fino a secchezza. L'estratto fosfolipidico risultante è stato quindi trattato con KOH/MeOH 0,5 M per 10 minuti a temperatura ambiente, convertendoli nei corrispondenti esteri metilici degli acidi grassi (FAME). La reazione è

stata spenta con l'aggiunta di acqua tridistillata ed è seguita un'estrazione con n-esano. Lo strato organico contenente i corrispondenti FAME è stato analizzato mediante GC in condizioni note per esaminare gli isomeri degli acidi grassi cis e trans [[25](#) , [27](#)]. Per gli esperimenti in condizioni anaerobiche, tutte le soluzioni sono state degassate con argon per 15 minuti e l'aggiunta di tutti i reagenti è avvenuta sotto un flusso di argon. Durante il periodo di incubazione sono state mantenute condizioni anaerobiche creando pressione di argon all'interno della fiala di reazione.

Ringraziamenti

Si ringrazia Lipinutragen srl per aver messo a disposizione il suo laboratorio di ricerca e sviluppo e le sue strutture per realizzare parte del lavoro sperimentale qui descritto.

Contributi degli autori

Concettualizzazione, CF; Metodologia, CF, CC, MGK, GT, ST, AVL, GM; Analisi dei dati, CC, GDB e CF; Scrittura - Preparazione della bozza originale, CF e CC; Scrittura - Revisione e modifica, CF, CC, GT, GDB; Supervisione, CF Tutti gli autori hanno redatto, letto e approvato la versione finale del manoscritto.

Finanziamento

Questo progetto ha ricevuto finanziamenti dal programma di ricerca e innovazione Horizon 2020 dell'Unione Europea nell'ambito dell'accordo di sovvenzione n. 642023 (ClickGene) in termini di stipendi per GT e GM. Si ringrazia la Fondazione Di Bella per il supporto alle sovvenzioni concesse a ST e AVL.

Conflitti di interesse

Gli autori dichiarano di non avere conflitti di interesse. I finanziatori non hanno avuto alcun ruolo nella progettazione dello studio, nella raccolta, analisi o interpretazione dei dati, nella stesura del manoscritto o nella decisione di pubblicare i risultati.

Note a piè di pagina

Disponibilità dei campioni: campioni dei composti “nanoemulsioni di SST” sono disponibili presso gli autori.

Riferimenti

- 1. Weckbecker G., Raulf F., Stolz B., Bruns C. Analoghi della somatostatina per la diagnosi e il trattamento del cancro. *Pharmacol. Ther.* 1994;60:245–264. doi: 10.1016/0163-7258(93)90009-3. [[DOI](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- 2. Raulf F., Pérez J., Hoyer D., Bruns C. Espressione differenziale di cinque sottotipi del recettore della somatostatina, SST1-5, nel sistema nervoso centrale e nei tessuti periferici. *Digestione.* 1994;55(Suppl. 3):46–53. doi: 10.1159/000201201. [[DOI](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

- 3.Lamberts SW, Krenning EP, Reubi JC Il ruolo della somatostatina e dei suoi analoghi nella diagnosi e nel trattamento dei tumori. *Endocr. Rev.* 1991;12:450–482. doi: 10.1210/edrv-12-4-450. [[DOI](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- 4.Scarpignato C., Pelosini L. Analoghi della somatostatina per il trattamento e la diagnosi del cancro: una panoramica. *Chemotherap.* 2001;47(Suppl. 2):1–29. doi: 10.1159/000049157. [[DOI](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- 5.Florio T., Morini M., Villa V., Arena S., Corsaro A., Thellung S., Culler MD, Pfeffer U., Noonan DM, Schettini G., et al. La somatostatina inibisce l'angiogenesi e la crescita tumorale tramite la regolazione mediata dal recettore 3 della somatostatina delle attività della sintasi endoteliale dell'ossido nitrico e della proteina chinasi attivata da mitogeni. *Endocrinologia.* 2003;144:1574–1584. doi: 10.1210/en.2002-220949. [[DOI](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- 6.Lahlou H., Guillermet J., Hortala M., Vernejoul F., Pyronnet S., Bousquet C., Susini C. Segnalazione molecolare dei recettori della somatostatina. *Anna. New York Accademico. Sci.* 2004;1014:121–131. doi: 10.1196/annals.1294.012. [[DOI](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- 7.Rai U., Thrimawithana TR, Valery C., Young SA Usi terapeutici della somatostatina e dei suoi analoghi: visione attuale e potenziali applicazioni. *Pharmacol. Ther.* 2015;152:98–110. doi: 10.1016/j.pharmthera.2015.05.007. [[DOI](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- 8.Lucius R., Mentlein R. Degradazione del neuropeptide somatostatina da parte di cellule neuronali e gliali coltivate. *J. Biol. Chem.* 1991;266:18907–18913. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- 9.Biron E., Chatterjee J., Ovadia O., Langenegger D., Brueggen J., Hoyer D., Schmid HA, Jelinek R., Gilon C., Hoffman A., et al. Miglioramento della biodisponibilità orale dei peptidi mediante N-metilazione multipla: analoghi della somatostatina. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008;27:2505–2599. doi: 10.1002/anie.200705797. [[DOI](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- 10.Demgé C., Vonderscher J., Marbach P., Pinget M. Nanocapsule di poli(alchil cianoacrilato) come sistema di somministrazione nel ratto per l'octreotide, un analogo della somatostatina a lunga durata d'azione. *J. Pharm. Pharm.* 1997;49:949–954. doi: 10.1111/j.2042-7158.1997.tb06022.x. [[DOI](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- 11.Sanarova E., Lantsova A., Oborotova N., Polozkova A., Dmitrieva M., Orlova O., Nikolaeva L., Borisova L., Shprakh Z. Sviluppo di una forma di dosaggio liposomiale per un nuovo analogo della somatostatina. *Indian J. Pharm. Sci.* 2019;81:146–149. doi: 10.4172/pharmaceutical-sciences.1000490. [[DOI](#)] [[Google Scholar](#)]
- 12.Helbok A., Rangger C., von Guggenberg E., Saba-Lepek M., Radolf T., Thurner G., Andreae F., Prassi R., Decristoforo C. Proprietà di targeting delle nanoparticelle liposomiali radiomarcate modificate con peptidi. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 2012;8:112–118. doi: 10.1016/j.nano.2011.04.012. [[DOI](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

- 13. Perche F., Torchilin VP Tendenze recenti nei nanocarrier liposomiali multifunzionali per un targeting tumorale migliorato. *J. Drug Deliv.* 2013;2013:705265. doi: 10.1155/2013/705265. [[DOI](#)] [[Articolo gratuito PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- 14. Ju RJ, Cheng L., Peng XM, Wang T., Li CQ, Song XL, Liu S., Chao JP, Li XT Liposomi modificati con octreotide contenenti daunorubicina e diidroartemisinina per il trattamento del carcinoma mammario invasivo. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2018;46(Suppl. 1):616–628. doi: 10.1080/21691401.2018.1433187. [[DOI](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- 15. Chatzisideri T., Leonidis G., Sarli V. Sistemi di somministrazione mirati al cancro basati su peptidi. *Future Med. Chem.* 2018;10:2201–2226. doi: 10.4155/fmc-2018-0174. [[DOI](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- 16. Arouri A., Mouritsen OG Effetto perturbatore di membrana degli acidi grassi e dei lisolipidi. *Prog. Lipid Res.* 2013;52:130–140. doi: 10.1016/j.plipres.2012.09.002. [[DOI](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- 17. Giacometti G., Marini M., Papadopoulos K., Ferreri C., Chatgililoglu C. Liposomi contenenti doppi legami trans come potenziali vettori per il rilascio di farmaci. *Molecules.* 2017;22:2082. doi: 10.3390/molecules22122082. [[DOI](#)] [[Articolo gratuito PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- 18. Ferreri C., Pierotti S., Barbieri A., Zambonin L., Landi L., Rasl S., Luisi PL, Barigelletti F., Chatgililoglu C. Confronto delle proprietà della vescicola di fosfatidilcolina relative all'isomerismo geometrico. *Fotochimica. Fotobiolo.* 2006;82:274–280. doi: 10.1562/2005-06-01-RA-559. [[DOI](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- 19. Chatgililoglu C., Ferreri C., Melchiorre M., Sansone A., Torreggiani A. Isomeria geometrica dei lipidi: dalla chimica alla biologia e alla diagnostica. *Chem. Rev.* 2014;114:255–284. doi: 10.1021/cr4002287. [[DOI](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- 20. Cort A., Ozben T., Sansone A., Barata-Vallejo S., Chatgililoglu C., Ferreri C. Formazione di lipidi trans indotta da bleomicina nelle membrane cellulari e nei modelli di liposomi. *Org. Biomol. Chem.* 2015;13:1100–1105. doi: 10.1039/C4OB01924E. [[DOI](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- 21. Punto isoelettrico. [(consultato il 24 agosto 2019)]; Disponibile online: <https://www.mybiosource.com/sst-recombinant-protein/somatostatin-sst/2011722> .
- 22. Reithmeier H., Herrmann J., Göpferich A. Sviluppo e caratterizzazione di microparticelle lipidiche come vettore di farmaci per la somatostatina. *Int. J. Pharm.* 2001;218:133–143. doi: 10.1016/S0378-5173(01)00620-2. [[DOI](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- 23. Sakurai H., Yokoyama A., Tanaka H. Studi sugli agenti chelanti contenenti zolfo. XXXI. Effetto catalitico dello ione rame (II) sulla formazione di disolfuro misto. *Chem. Pharm. Bull.* 1971;19:1416–1423. doi: 10.1248/cpb.19.1416. [[DOI](#)] [[Google Scholar](#)]

- 24. Antholine WE, Petering DH Sulla reazione della bleomicina di ferro con tioli e ossigeno. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1979;90:384–389. doi: 10.1016/0006-291X(79)91636-X. [[DOI](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- 25. Anoop A., Ranganathan S., Das Dhaked B., Nath Jha N., Pratihal S., Ghosh S., Sahav S., Kumar S., Das S., Kombrabail M., et al. Chiarimento del ruolo del legame disolfuro sulla formazione di amiloide e sulla reversibilità delle fibrille della somatostatina-14. *J. Biol. Chem.* 2014;289:16884–16903. doi: 10.1074/jbc.M114.548354. [[DOI](#)] [[Articolo gratuito PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- 26. Ferreri C., Sassatelli F., Samadi A., Landi L., Chatgililoglu C. Isomerizzazione cis–trans regioselettiva dei doppi legami arachidonici da parte dei radicali tillici: l'influenza dell'organizzazione sopramolecolare dei fosfolipidi. *J. Am. Chem. Soc.* 2004;126:1063–1072. doi: 10.1021/ja038072o. [[DOI](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- 27. Ferreri C., Chatgililoglu C. Lipidi trans: il percorso dei radicali liberi. *Acc. Chem. Res.* 2005;36:441–448. doi: 10.1021/ar0400847. [[DOI](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- 28. Chatgililoglu C., Ferreri C., Guerra M., Samadi A., Bowry V. La reazione del radicale tillico con il linoleato di metile: completare il quadro. *J. Am. Chem. Soc.* 2017;139:4704–4714. doi: 10.1021/jacs.6b11320. [[DOI](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- 29. De la Fuente-Herreruela D., Monnappa AK, Muñoz-Úbeda M., Morallón-Piñ A., Enciso E., Sánchez E., Giusti F., Natale P., López-Montero I. Bioconiugazione lipide-peptide attraverso la chimica della reazione del disolfuro di piridile e la sua applicazione nel targeting cellulare e nel rilascio di farmaci. *J. Nanobiotechnologia.* 2019;17:77. doi: 10.1186/s12951-019-0509-8. [[DOI](#)] [[Articolo gratuito PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- 30. Yokohama C., Sueyoshi Y., Ema M., Takaishi K., Hisatomi H. Induzione dello stress ossidativo da parte di farmaci antitumorali in presenza e assenza di cellule. *Oncol. Lett.* 2017;14:6066–6070. doi: 10.3892/ol.2017.6931. [[DOI](#)] [[Articolo gratuito PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- 31. Toniolo G., Louka M., Menounou G., Fantoni NZ, Mitrikas G., Efthimiadou EK, Masi A., Bortolotti M., Polito L., Bolognesi A., et al. [Cu(TPMA)(Phen)](ClO4)2: Rilascio di nanocontenitori di metallofarmaci e lipidomica di membrana di una linea cellulare di neuroblastoma accoppiata a un modello biomimetico di liposomi focalizzato sulla reattività degli acidi grassi. *ACS Omega.* 2018;3:15952–15965. doi: 10.1021/acsomega.8b02526. [[DOI](#)] [[Articolo gratuito PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- 32. Jomova K., Valko M. Progressi nello stress ossidativo indotto dai metalli e nelle malattie umane. *Tossicologia.* 2011;283:65–87. doi: 10.1016/j.tox.2011.03.001. [[DOI](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- 33. Böttger R., Hoffmann R., Knappe D. Stabilità differenziale di peptidi terapeutici con diversi siti di scissione proteolitica nel sangue, nel plasma e nel siero. *PLoS ONE.*

2017;12:e0178943. doi: 10.1371/journal.pone.0178943. [[DOI](#)] [[Articolo gratuito PMC](#)]
[[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]