

# Istraživanje utjecaja palmitinske kiseline na svojstva valovite faze fosfokolinških lipida razlikovno-pretražnom kalorimetrijom

---

Momčilov, Marina

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:058274>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Marina Momčilov

**Istraživanje utjecaja palmitinske kiseline na  
svojstva valovite faze fosfokolinskih lipida  
razlikovno-pretražnom kalorimetrijom**

**Diplomski rad**

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 2020.



Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđera Boškovića u Laboratoriju za kemiju u modelnim i biološkim sustavima pod mentorstvom dr. sc. Danijele Bakarić i neposrednim voditeljstvom dr. sc. Ive Crnolatca. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je doc. dr. sc. Marko Močibob.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekata Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom „Molekularni aspekti oksidativnih procesa u stanicama“ (UIP-2014-09-6090) te „Prijenos tvari kroz biološke membrane potpomognut proteinima“ (IP-2019-04-3804).



## Zahvale

*Veliko hvala mentorici dr. sc. Danijeli Bakarić (Institut Ruđer Bošković, Zavod za organsku kemiju i biokemiju) na pruženoj prilici, povjerenju, prenesenom znanju i strpljenju tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem neposrednom voditelju dr. sc. Ivi Crnolatu i ostalim zaposlenicima Zavoda za organsku kemiju i biokemiju na susretljivosti i pomoći prilikom izrade ovog rada.*

*Zahvaljujem doktorandici Ini Erceg (Zavod za fizičku kemiju, Laboratorij za biokoloide i površinsku kemiju) na mjerenju veličine priređenih liposoma.*

*Zahvaljujem doc. dr. sc. Marku Močibobu na uloženom vremenu i trudu, podršci i savjetima prilikom izrade ovog rada.*

*Hvala dragim prijateljima i kolegama na pomoći, razumijevanju i lijepim trenucima tijekom svih ovih godina.*

*Posebna zahvala mojoj obitelji koja mi je bila najveća podrška i koja mi je omogućila sve ovo, hvala na motivaciji i na velikom uloženom trudu i strpljenju.*



## Sadržaj

<b>SAŽETAK</b> .....	<b>V</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VI</b>
<b>§ 1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. Struktura membrana i membranskih lipida</b> .....	<b>3</b>
2.1.1. Vrste membranskih lipida .....	4
2.1.2. Liposomi i ostali agregati lipida .....	7
2.1.3. Fazni prijelazi membranskih lipida .....	8
<b>2.2. Instrumentalne tehnike određivanja temperature faznog prijelaza</b> .....	<b>10</b>
2.2.1. Razlikovno-pretražna kalorimetrija (DSC).....	10
<b>2.3. Određivanje veličine suspendiranih čestica</b> .....	<b>13</b>
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>14</b>
<b>3.1. Materijali</b> .....	<b>14</b>
<b>3.2. Priprema uzoraka</b> .....	<b>14</b>
3.2.1. Uzorci za DSC mjerenja .....	14
3.2.2. Uzorci za DLS mjerenja.....	15
<b>3.3. Mjerni uređaji</b> .....	<b>15</b>
3.3.1. Razlikovno-pretražna kalorimetrija (DSC).....	15
3.3.2. Dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS) .....	16
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>17</b>
<b>4.1. Analiza DSC krivulja</b> .....	<b>17</b>
<b>§ 5. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>24</b>
<b>§ 6. LITERATURNI IZVORI</b> .....	<b>25</b>
<b>§ 7. DODATAK</b> .....	<b>VII</b>
<b>§ 8. ŽIVOTOPIS</b> .....	<b>XI</b>







Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

Diplomski rad

## SAŽETAK

### ISTRAŽIVANJE UTJECAJA PALMITINSKE KISELINE NA SVOJSTVA VALOVITE FAZE FOSFOKOLINSKIH LIPIDA RAZLIKOVNO-PRETRAŽNOM KALORIMETRIJOM

Marina Momčilov

Najznačajnije faze lamelarnih struktura načinjenih od glicerofosfolipida su faze gela (čvrsta uređena faza) i fluida (tekuća neuređena faza). Temperaturom izazvani prijelaz iz gel-faze u fluidnu fazu posljedično se naziva glavnim faznim prijelazom i događa se pri temperaturi taljenja ( $T_m$ ). Pojedini lipidi se mogu naći i u fazi svojstvenoj po valovitoj površini koja je posljedica promjene u lipidnom uređenju i zakrivljenosti membrane. Spomenuta faza se javlja pri temperaturi pretprijelaza ( $T_p$ ) koja se najčešće nalazi nekoliko stupnjeva ispod  $T_m$ . Standardna tehnika za određivanje temperature faznog prijelaza je razlikovno-pretražna kalorimetrija koja je u ovom diplomskom radu korištena za karakterizaciju valovite faze lipidnih dvosloja načinjenih od 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfokolina. Promjene u valovitoj strukturi izazvane su promjenom pH-vrijednosti hidratacijskog medija te dodatkom male količine palmitinske kiseline jednake duljine lanca kao i lipidi.

(27 stranica, 16 slika, 1 tablica, 14 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfokolina, DSC, fazni prijelaz, palmitinska kiselina, valovita faza

Mentor: dr. sc. Danijela Bakarić, zn. sur., IRB

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): doc. dr. sc. Marko Močibob

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski
  2. prof. dr. sc. Željka Soldin
  3. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
- Zamjena: doc. dr. sc. Morana Dulić

Datum diplomskog ispita: 28. rujna 2020.





University of Zagreb  
Faculty of Science  
**Department of Chemistry**

Diploma Thesis

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF PALMITIC ACID IMPACT ON THE PROPERTIES OF PHOSPHOCHOLINE LIPIDS RIPPLE PHASE BY DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY

Marina Momčilov

The most important phases of glycerophospholipid lamellar structures are gel (solid ordered) and fluid (liquid disordered) phases. The temperature of gel-to-fluid phase transition is consequently called the main phase transition and occurs at the melting temperature ( $T_m$ ). Some lipids can be found in a phase characterized by the ripple surface as a consequence of changes in the lipid ordering and curvature of the membrane. This phase appears at pretransition temperature ( $T_p$ ) and is usually registered several degrees below  $T_m$ . The standard technique for determining the phase transition temperature is differential scanning calorimetry, which was used in this diploma thesis for characterization of the ripple phase of lipid bilayers made of 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine. Changes in the ripple structure are induced by changing the pH value of the hydration medium and by adding a small amount of palmitic acid with the same chain length as lipids.

(27 pages, 16 figures, 1 table, 14 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, DSC, palmitic acid, phase transition, ripple phase

Mentor: Dr. Danijela Bakarić, Research Associate, IRB

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Marko Močibob, Assistant Professor

Reviewers:

1. Dr. Aleksandra Maršavelski, Assistant Professor
  2. Dr. Željka Soldin, Professor
  3. Dr. Iva Juranović Cindrić, Professor
- Substitute: Dr. Morana Dulić, Assistant Professor

Date of exam: 28<sup>th</sup> September 2020.



## § 1. UVOD

Lipidi se, uz proteine, ubrajaju među najvažnije građevne jedinice bioloških membrana. Budući da su u pitanju amfifilne molekule, u vodenim otopinama se slažu u lipidne dvosloje tako da su njihove polarne skupine okrenute prema vodenom mediju, a njihovi ugljikovodični lanci jedni prema drugima. Sferne tvorevine koje se sastoje od najmanje jednog lipidnog dvosloja su liposomi i predstavljaju najčešće korištene modelne lipidne membrane. Lipidne membrane se pojavljuju u različitim fazama, od kojih su među najistraženijima faza gela i fluidna faza. Prijelaz iz gel-faze u fluidnu fazu naziva se glavnim faznim prijelazom i događa se pri temperaturi taljenja (engl. *melting temperature*,  $T_m$ ).<sup>1</sup> Kod liposoma načinjenih od fosfokolinских (engl. *phosphocholine*, PC) lipida određenih duljina lanaca, između faze gela i fluidne faze postoji i valovita (engl. *ripple*, r) faza, koja se javlja pri temperaturi pretprijelaza (engl. *pretransition temperature*,  $T_p$ ).<sup>1</sup> Pretprijelaz je prijelaz niske kooperativnosti koji se nalazi nekoliko stupnjeva ispod glavnog prijelaza. U određivanju temperature faznih prijelaza te količine topline koja se apsorbira ili oslobađa tijekom faznih prijelaza često se koristi razlikovno-pretražna kalorimetrija (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC).<sup>2</sup> DSC može precizno izmjeriti temperaturu, entalpiju i kooperativnost prijelaza lipidne faze, kao i njihovu kinetiku u određenim uvjetima. Premda su difrakcijska i mikroskopska mjerenja potvrdila postojanje valova na površini pojedinog lipidnog dvosloja,<sup>1</sup> još se ne može sa sigurnošću reći jesu li valovi posljedica koegzistencije domena izgrađenih od lipida u fazama gela i fluida ili se javljaju uslijed promjena u slaganju molekula lipida koji se nalaze isključivo u fazi gela.<sup>3,4,5</sup>

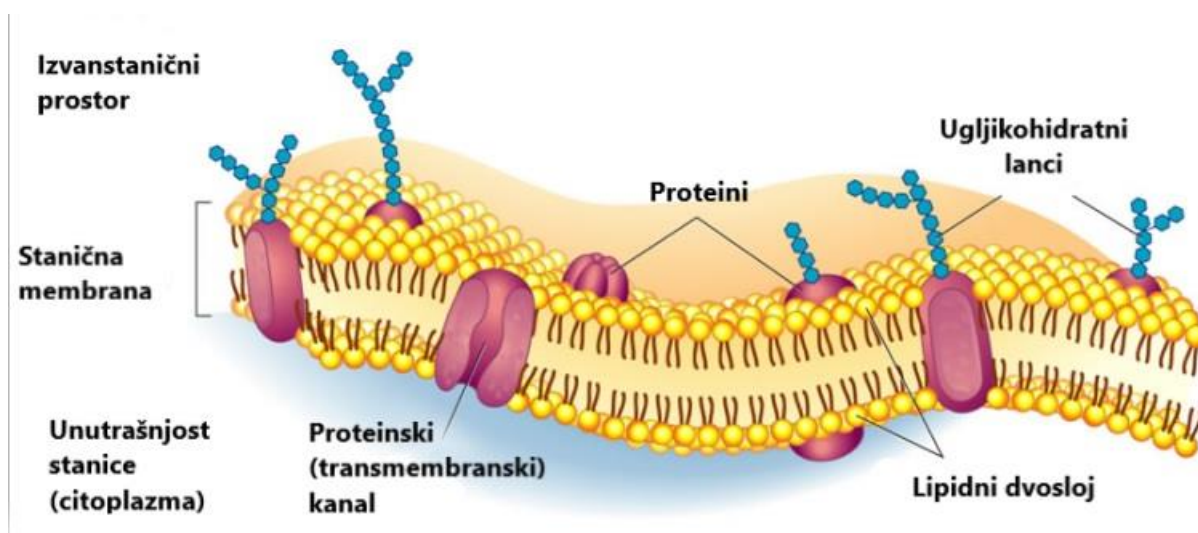
Cilj ovog diplomskog rada je okarakterizirati valovitu fazu liposoma načinjenih od fosfokolinских lipida u puferima različitih pH-vrijednosti upotrebom DSC tehnike. Analizom DSC krivulja odredit će se termodinamički parametri spomenutih faznih prijelaza u ovisnosti o pH-vrijednosti medija. Nadalje, dodatkom male količine masne kiseline koja je, ovisno o pH-vrijednosti medija, protonirana ili deprotonirana i time više ili manje pomaknuta od ravnine površine pojedinog dvosloja,<sup>6</sup> ispitat će se utjecaj longitudinalnog pomaka masne kiseline na pojavu valova. Za pripremu liposoma u obliku višestrukih hidriranih lipidnih dvosloja korišten je 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfokolin (DPPC) te palmitinska kiselinu (engl. *palmitic acid*,

PA). Dobiveni podaci usporedit će se s onima literaturno poznatima i koristiti u daljnjem istraživanju valovite faze DPPC liposoma FT-IR spektroskopijom.

## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Struktura membrana i membranskih lipida

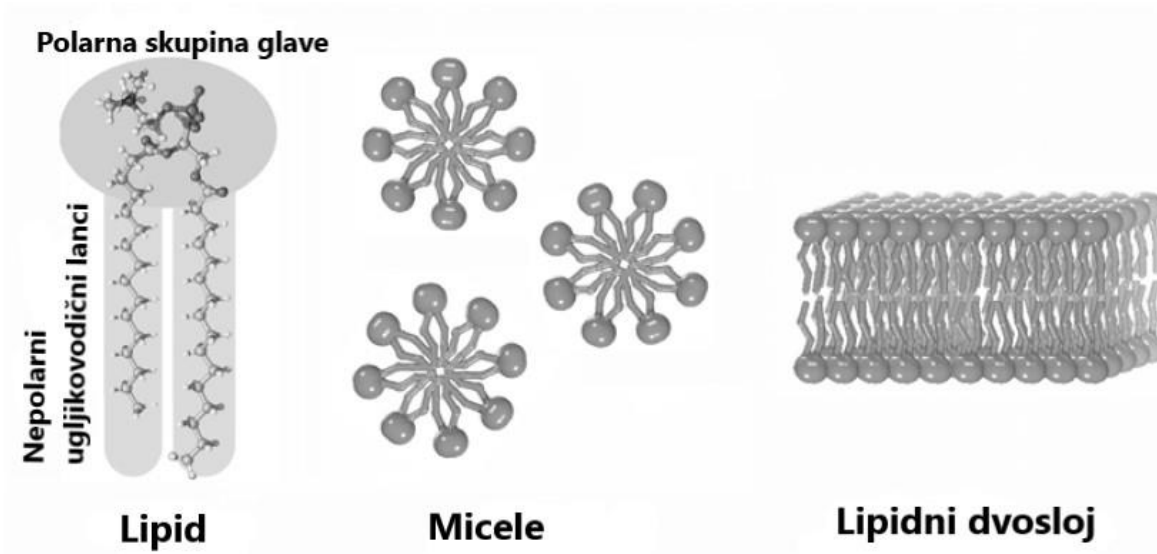
Stanice i njihovi odjeljci definirani su membranama koje ne samo da okružuju stanicu, već i organele poput jezgre, mitohondrija ili endoplazmatskog retikuluma. Debljina većine membrana je između 60 Å (6 nm) i 100 Å (10 nm).<sup>7</sup> Biološke membrane igraju životno važne uloge poput skladištenja energije i prijenosa informacija, a spomenute uloge su funkcija slaganja njihovih građevnih elemenata i njihovih međusobnih interakcija. Uz proteine te (u određenoj količini) ugljikohidrate, glavne građevne jedinice membrana su brojne različite lipidne vrste (slika 1).<sup>1</sup>



Slika 1. Shematski prikaz stanične membrane.<sup>8</sup>

Membranski lipidi su male amfifilne molekule s hidrofobnom ugljikovodičnom regijom i hidrofilnom skupinom glave. U vodenim otopinama spontano stvaraju agregate čiji oblik ovisi o koncentraciji i vrsti lipida te o temperaturi (slika 2).<sup>9</sup>





Slika 2. Prikaz strukture membranskih lipida i lipidnih agregata.<sup>1</sup>

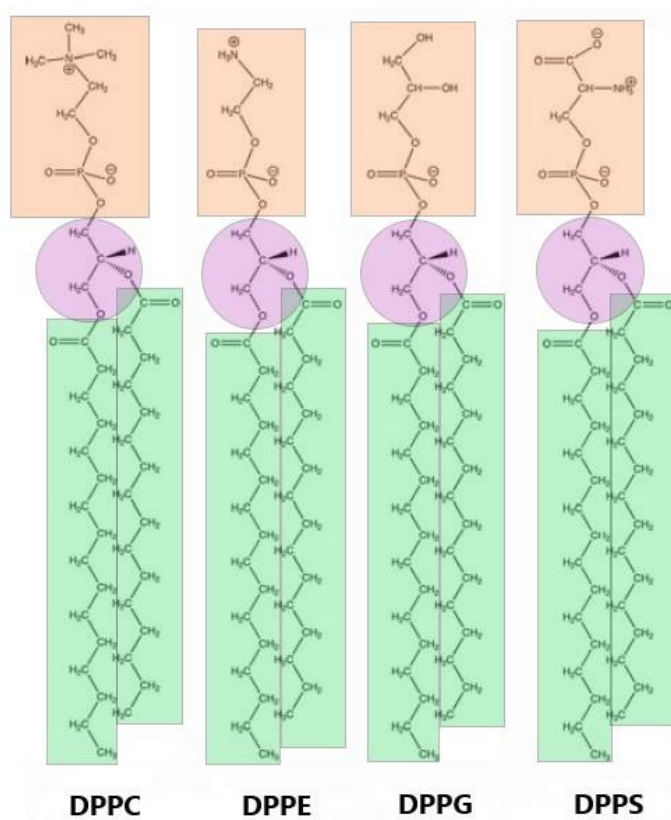
Primjerice, monomerni lipidi i micelle su prisutni pri niskim koncentracijama, a pri većim koncentracijama lipida micelle prerastu u proširene dvodimenzionalne listove, nazvane dvoslojima.<sup>1</sup> Budući da su hidrofobne regije na rubovima planarnog dvosloja u doticaju s vodom, takve strukture su nestabilne i spontano tvore šuplju sferu postižući maksimalnu stabilnost u svom vodenom okruženju. Energetski najpovoljnija struktura većine fosfolipida u vodenom mediju je lipidni dvosloj, a ne micela. Razlog je taj što su dva lanca masnih kiselina fosfolipida previše glomazna da bi se uklopila u unutrašnjost micelle. Budući da je slaganje lipida također ovisno o temperaturi,<sup>9</sup> lipidi odnosno njihovi agregati se pri različitim temperaturama mogu naći u različitim fazama.

### 2.1.1. Vrste membranskih lipida

Iako većina lipida posjeduje dva ugljikovodična lanca i jednu hidrofilnu glavu, sastav lanaca i skupine glave može značajno varirati.<sup>1</sup>

Prema vrsti polarnih glava, razlikujemo tri glavne skupine membranskih lipida: fosfolipidi, glikolipidi i steroli. Fosfolipidi su glavna klasa membranskih lipida i rasprostranjeni su u svim biološkim membranama. Molekula fosfolipida izgrađena je od tri komponente (slika 3): masne kiseline (zeleno područje, slika 3), okosnice na koju su vezane masne kiseline (glicerol ili sfingozin) (ljubičasto područje, slika 3) i fosfatne skupine s različitim polarnim glavama (narančasto područje, slika 3). Fosfolipidi dobiveni iz glicerola nazivaju se fosfogliceridi. Fosfoglicerid se sastoji od okosnice glicerola na koju su vezana dva lanca masnih kiselina i

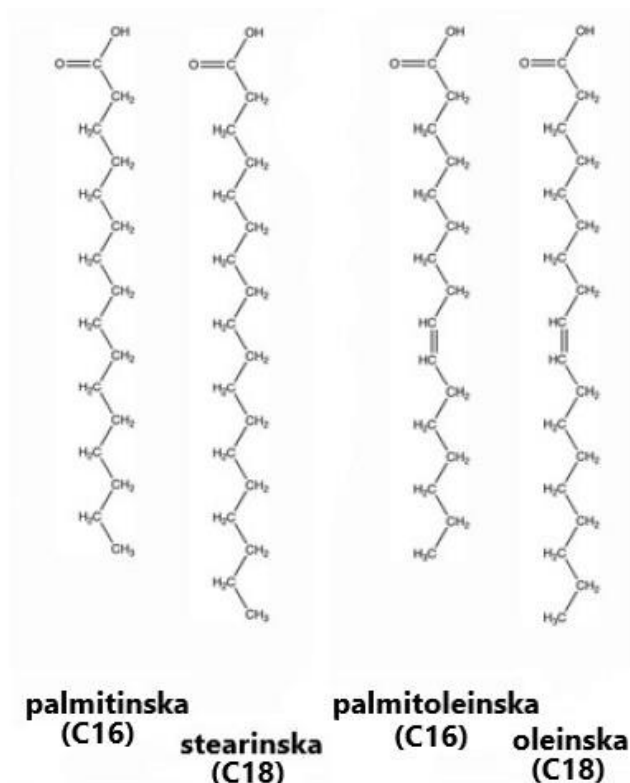
fosforilirani alkohol. Glavni fosfogliceridi dobivaju se iz fosfatidata stvaranjem esterske veze između fosfatne skupine fosfatidata i hidroksilne skupine jednog od nekoliko alkohola od koji su česti kolin ( $(\text{H}_3\text{C})_3\text{N}^+(\text{CH}_2)_2\text{OH}$ ; C), etanolamin ( $\text{H}_3\text{N}^+(\text{CH}_2)_2\text{OH}$ ; E), glicerol ( $(\text{HOCH}_2)_2\text{CHOH}$ ; G) te aminokiselina serin ( $\text{HOCH}_2\text{CHNH}_2\text{COOH}$ ; S).<sup>10</sup> Fosfolipidi su tipično glicerolipidi, tj. oni imaju dvije masne kiseline vezane na prvi i drugi položaj molekule glicerola, dok je skupina glave koja sadrži fosfat vezana na treći. Stoga se lipid s fosfatidilkolinskom skupinom glave i dva lanca palmitoila naziva 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfokolin (DPPC). Na slici 3 prikazani su fosfolipidi s navedenim polarnim skupinama (C, E, G i S) čiji su lanci palmitinske masne kiseline.



Slika 3. Prikaz struktura čestih fosfolipida sa palmitinskim lancima masnih kiselina: fosfatidilkolin (DPPC), fosfatidiletanolamin (DPPE), fosfatidilglicerol (DPPG) i fosfatidilserin (DPPS).<sup>1</sup>

Sastav ugljikovodičnih lanaca lipidnih membrana je također vrlo raznolik. Oni se razlikuju u duljini lanca i stupnju zasićenosti. Lipidi koji u svojim lancima sadrže dvostruke veze nazivaju se nezasićenim lipidima, a lipidi bez dvostrukih veza su zasićeni lipidi. Pojednostavljena nomenklatura za ove spojeve opisuje duljinu lanca i broj dvostrukih veza

odvojenih dvotočkom; na primjer, zasićena palmitinska kiselina sa 16 ugljika skraćeno je 16:0, a oleinska kiselina s 18 ugljika, s jednom dvostrukom vezom, je 18:1. Položaji dvostrukih veza navedeni su indeksima koji slijede  $\Delta$  (delta); masna kiselina s 20 ugljika s jednom dvostrukom vezom između C-9 i C-10 (C-1 je karboksilni ugljik) i druga između C-12 i C-13 označena je 20:2 ( $\Delta^{9,12}$ ).<sup>11</sup> Među najzastupljenijim masnim kiselinama su palmitinska (PA, 16:0), stearinska (SA, 18:0), palmitoleinska (POA, 16:1 ( $\Delta^7$ )) i oleinska kiselina (OA, 18:1 ( $\Delta^9$ )), prikazane na slici 4.

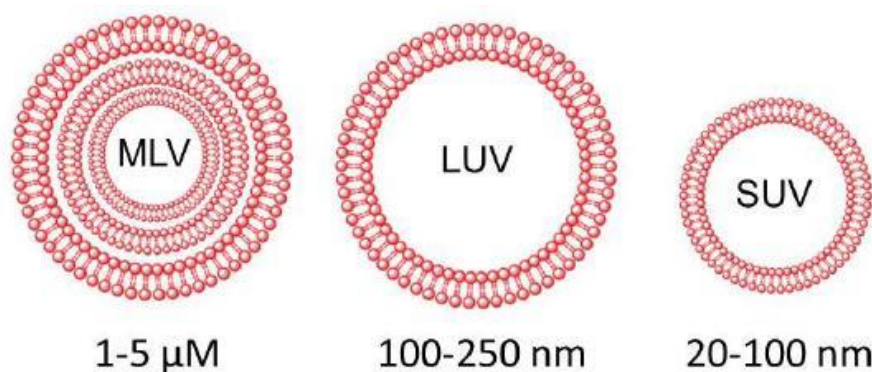


Slika 4. Prikaz struktura nekih zasićenih (palmitinska (16:0) i stearinska (18:0)) i nezasićenih (palmitoleinska (16:1 ( $\Delta^7$ )) i oleinska (18:1 ( $\Delta^9$ )) masnih kiselina.<sup>1</sup>

Sastav lipida se ne razlikuje samo u različitim tipovima stanica i organela<sup>12</sup> već i unutar dvaju slojeva iste membrane. Negativno nabijeni fosfatidilserini uglavnom su smješteni u unutarnjoj membrani eritrocita, (prelazak fosfatidilserina u vanjski sloj membrane je signal za apoptozu stanice) a isto vrijedi i za fosfatidiletanolamin.<sup>13</sup> Lipidi poput fosfatidiletanolamina, koji imaju manju polarnu skupinu glave od fosfatidilkolina, imaju približno stožast oblik i tako nameću negativnu zakrivljenost membrane, pri čemu se monosloj s takvim lipidima savija na takav način da se polarne skupine glave približe.<sup>14</sup> Fosfatidilkolini i sfingomijelini nalaze se pretežno u vanjskoj membrani.<sup>13</sup>

### 2.1.2. Liposomi i ostali agregati lipida

Liposomi su sferne tvorevine u kojima su vodeni odjeljci zatvoreni lipidnim dvoslojem,<sup>10</sup> i često se koriste kao modelne lipidne membrane, primjerice za proučavanje svojstava i ponašanja bioloških membrana poput orijentacije lipida u dvosloju, te fizikalno-kemijske karakterizacije transporta lipida i iona kroz bio membrane. Nadalje, intenzivno se koriste za dostavu lijekova jer štite lijek od razgradnje i smanjuju nespecifičnu toksičnost povezanu s lijekom i mogu se lako proizvesti i formulirati za ciljanu specifičnu isporuku. Liposomi se mogu klasificirati na temelju veličine i broja lipidnih dvosloja međusobno odijeljenih vodenim medijem; ukoliko su načinjeni od nekoliko dvosloja, nazivaju se multilamelarnim vezikulama (engl. *multilamellar vesicles*, MLV, slika 5) i promjer ( $d$ ) im je reda veličine 1  $\mu\text{m}$ , a ako su načinjeni od jednog dvosloja nazivaju se unilamelarnim vezikulama (engl. *unilamellar vesicles*, UV, slika 5). Budući da se UV mogu prirediti u različitim veličinama, potonji se nadalje razlikuju prema njihovim promjerima. Ukoliko su liposomi promjera  $d = 100\text{-}250\text{ nm}$ , klasificiraju se kao LUV (engl. *large unilamellar vesicles*), a ukoliko je promjer  $d = 20\text{-}100\text{ nm}$ , klasificiraju se kao SUV (engl. *small unilamellar vesicles*), kako je prikazano na slici 5.<sup>15</sup>



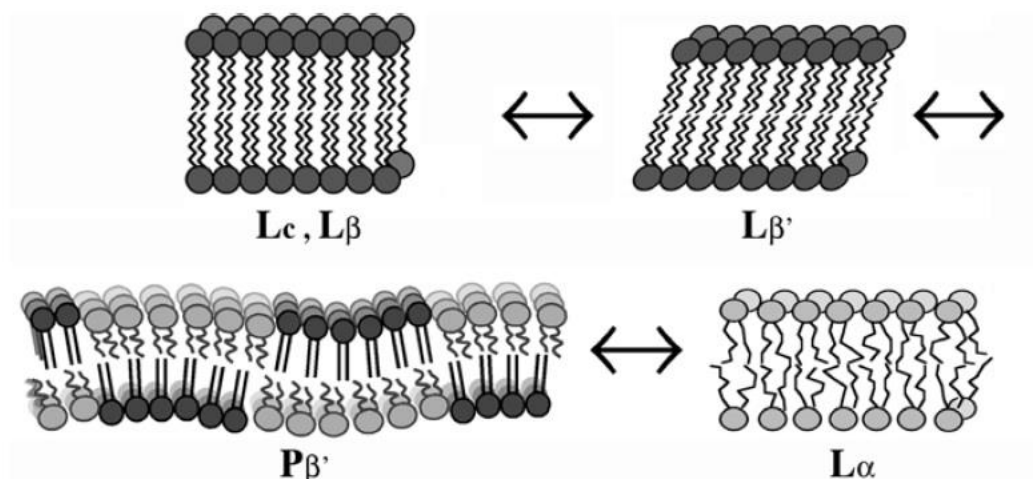
Slika 5. Klasifikacija liposoma na temelju veličine i slojevitosti: multilamelarni liposomi (engl. *multilamellar vesicles*, MLV), veliki unilamelarni liposomi (engl. *large unilamellar vesicles*, LUV), mali unilamelarni liposomi (engl. *small unilamellar vesicles*, SUV).<sup>15</sup>

Liposomi se mogu pripremiti suspenzijom željenog lipida, poput fosfatidilkolina, u vodenom mediju, te zatim sonikacijom (tj. miješanjem pomoću visokofrekventnih zvučnih valova) da se dobije suspenzija mjehurića (liposoma) koji su prilično ujednačenih veličina. Uz to, mogu se pripremiti polaganim uparavanjem organskog otapala iz otopine fosfolipida te

suspendiranjem lipidnog filma u vodenom mediju.<sup>11</sup> LUV i MUV ujednačenih veličina se dobivaju ekstruzijom MLV kroz membrane željene veličine pora.<sup>16</sup>

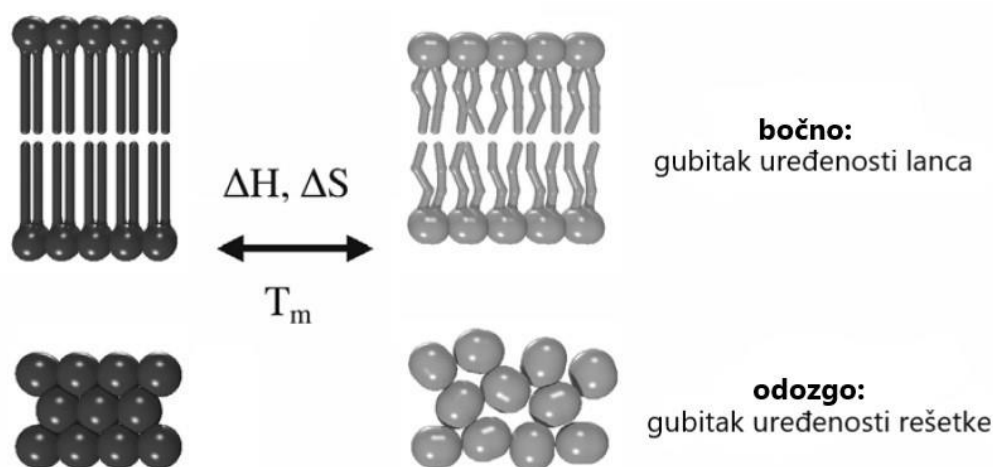
### 2.1.3. Fazni prijelazi membranskih lipida

Membranski lipidi mogu se slagati na različite načine i lako prelaziti iz jedne vrste slagaline – faze – u drugu promjenom temperature, što se naziva faznim prijelazom.<sup>2</sup> Faze lipidnih membrana prikazane su na slici 6. Pri nižim temperaturama lipidi se nalaze u uređenoj kristaliničnoj fazi ( $L_c$  faza) u kojoj su lipidi raspoređeni u heksagonsku slagalinu, a svi lipidni lanci su u *trans* konformaciji. Porastom temperature većina lipidnih lanaca i dalje ostaje u *trans* položaju, a kod nekih lipida se može pojaviti određeni nagib u odnosu na normalu membrane. Ova faza se naziva fazom gela ( $L_{\beta'}$  faza). Ugljikovodični lanci pojedinih lipida u fazi gela mogu biti pod određenim kutem u odnosu na normalu membrane pa stoga imaju oznaku  $L_{\beta'}$ , dok lipidi čiji ugljikovodični lanci ne pokazuju značajan nagib imaju iznaku  $L_{\beta}$ . Oznaka ' znači da su ugljikovodični lanci nagnuti pod određenim kutem u gel-fazi. Prisutnost nagiba ovisi o skupini glave lipida, npr. fosfatidilkolini prikazuju kut nagiba od oko  $30^\circ$  dok fosfatidiletanolamini uopće ne pokazuju nagib (i posljedično je njihova gel-faza označena kao  $L_{\beta}$ ). Daljnjim porastom temperature pojedini lipidi stvaraju valovitu fazu ( $P_{\beta'}$  faza) karakterističnu po periodičnim jednodimenzionalnim valovima na površini membrane. Ova faza se javlja pri temperaturi pretprijelaza ( $T_p$ ) obično nekoliko stupnjeva ispod glavnog faznog prijelaza.<sup>1</sup> Uzrok pojavi valova još uvijek nije razjašnjen i prema dvjema najznačajnijim hipotezama valovi su ili posljedica koegzistencije lipida u fazama gela i fluida,<sup>3,4</sup> ili su svi lipidi u fazi gela s time da dolazi do promjena u slaganju molekula lipida.<sup>5,17,18</sup> Budući da pojava valovite faze ovisi o skupinama glave lipida, tj. pojavljuje se kod fosfatidilkolinskih i fosfatidilglicerolskih lipida čiji su lanci određenih duljina ( $C_{14}$ ,  $C_{16}$ ,  $C_{18}$ ), dok fosfatidiletanolaminski lipidi i glikolipidi ne pokazuju valovitu fazu, smatra se i da interakcija s otapalom može igrati ulogu u nastajanju takvih faza.<sup>19,20</sup> Proučavanja valovite faze se uglavnom provode na multilamelarnim liposomima ali je pojava pretprijelaza uočena i kod velikih unilamelarnih liposoma (slika 6).<sup>21,22</sup>



Slika 6. Faze lipidnih membrana koje se javljaju s povišenjem temperature.<sup>1</sup>

Temperatura pri kojoj se događa glavni fazni prijelaz je temperatura taljenja ili mekšanja ( $T_m$ ). Najvažnija strukturna obilježja fluidne ( $L_\alpha$ ) faze su neuređenost lanaca te gubitak uređenosti heksagonske slagaline (slika 7).<sup>1</sup> Neuređenost lanaca se odnosi na promjenu konformacije metilenskih skupina ( $-(CH_2)$ ) ugljikovodičnih lanaca iz *trans* u *gauche* uslijed drastičnog slabljenja van der Waalsovih interakcija među njima; posljedično,  $T_m$  ovisi o duljini lanca i stupnju zasićenja (tj. broju dvostrukih veza u lancu). Što su lanci dulji, to je veća  $T_m$  zbog jačih van der Waalsovih interakcija.<sup>1</sup> Međutim, dvostruke veze u lancu drastično snižavaju temperaturu taljenja jer čine membranu fluidnijom. Također,  $T_m$  ovisi i o polarnoj skupini glave lipida zbog međumolekulskih interakcija kao što je stvaranje vodikove veze, kao i zbog interakcije s otapalom.<sup>1</sup>



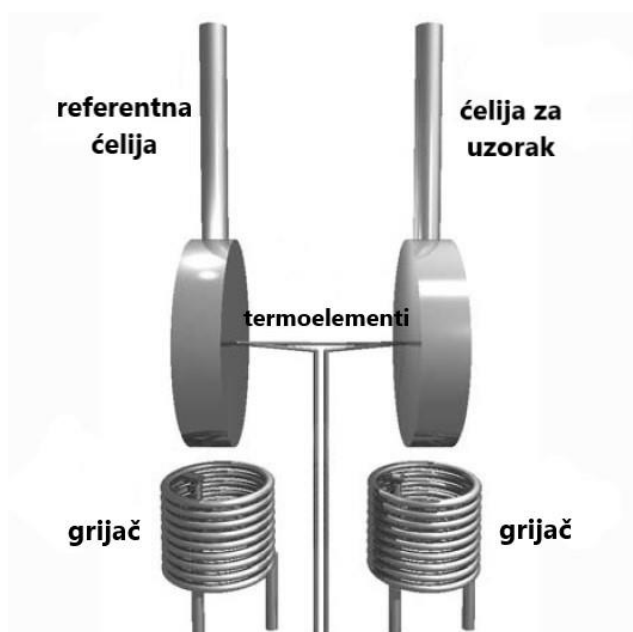
Slika 7. Shematski prikaz taljenja lipida iz čvrste uređene u tekuću neuređenu fazu.<sup>1</sup>

## 2.2. Instrumentalne tehnike određivanja temperature faznog prijelaza

Za proučavanje faznih prijelaza postoje različite instrumentalne tehnike, primjerice termoanalitičke te spektroskopske metode. Razlikovno-pretražna kalorimetrija (DSC) ima prednost što izravno daje važne termodinamičke informacije (npr. temperaturu faznog prijelaza te promjenu entalpije uslijed promjene faze) koje nisu dostupne (bez interpretacije) iz spektroskopije.<sup>1</sup>

### 2.2.1. Razlikovno-pretražna kalorimetrija (DSC)

Razlikovno-pretražna kalorimetrija (DSC) je jednostavna, ali moćna fizikalna tehnika, koja je pogodna za otkrivanje i termodinamičku karakterizaciju termotropnih faznih prijelaza i u lipidnim i u biološkim membranama. Ova tehnika uključuje istovremeno zagrijavanje (ili hlađenje) uzorka i inertne referentne tvari, materijala usporedive toplinske mase i toplinskog kapaciteta, koji ne pokazuje termotropne događaje unutar temperaturnog područja od interesa. Zagrijavanje se odvija s unaprijed određenom konstantnom brzinom u kalorimetru u kojem se mjeri razlika brzine protoka topline u uzorku u odnosu na referentnu inertnu tvar.<sup>2</sup> Na slici 8 je prikazan shematski nacrt diferencirajućeg kalorimetra, koji se sastoji od dvije ćelije (jedna ćelija za uzorak i jedna referentna ćelija koja se obično puni vodom ili puferom) s volumenom od 0,5-1 cm<sup>3</sup>. Obje ćelije zagrijavaju se Peltierovim grijačima sa konstantnom brzinom skeniranja.<sup>1</sup>



Slika 8. Shematski nacrt kalorimetra koji sadrži ćeliju za uzorak i referentnu ćeliju.<sup>1</sup>

Pri temperaturama daleko od bilo kakvih termotropnih događaja, temperature ćelija s uzorkom i referentnih ćelija linearno se mijenjaju s vremenom, a temperaturna razlika između njih ostaje konstantna. U takvim uvjetima, DSC instrument bilježi stalnu razliku između brzina protoka topline u ćeliji s uzorkom i referentnih ćelija, što se u idealnom slučaju odražava ravnom, vodoravnom baznom linijom. Kad god se unutar uzorka dogodi termotropni događaj, dolazi do temperaturne razlike između uzorka i referentne tvari, a instrument ili aktivno mijenja ulaznu snagu u ćeliji s uzorkom kako bi poništio temperaturnu razliku (kalorimetrija kompenzacije snage) ili pasivno bilježi rezultirajuće promjene u brzini protoka topline u ćeliji s uzorkom sve dok se temperaturna razlika na kraju ne poništi (kalorimetrija provodljivosti topline). U oba slučaja, razlike u brzini protoka topline u uzorku i referentnim ćelijama se mijenjaju i dolazi do egzotermnog ili endotermnog odstupanja od bazne linije. Po završetku toplinskog događaja, instrument ili ponovno uspostavlja svoju izvornu baznu liniju ili uspostavlja novu ako se dogodila promjena specifične topline uzorka, stvarajući tako krivulju koji prikazuje protok topline kao funkciju temperature.<sup>2</sup>

Povećanjem temperature u sustavu povećava se i njegova unutarnja energija ( $U$ ). Termodinamička veličina kojom je opisano povećanje unutarnje energije u uvjetima stalnog tlaka ( $p$ ) ili volumena ( $V$ ) (poput onih u DSC kalorimetru) je entalpija ( $H$ ) sustava odnosno njezina promjena:

$$dH = dU + pdV \quad pdV = \text{const.} \quad (1)$$

Budući da je odziv DSC kalorimetra protok topline ( $Q$ ) u ovisnosti o temperaturi ( $T$ ) (obično dobiven u uvjetima konstantnog tlaka), DSC krivulja u konačnici prikazuje specifični toplinski kapacitet uzorka ( $c_p$ ).

$$c_p = \left(\frac{dQ}{dT}\right)_p \quad (2)$$

Budući da je

$$dH = dQ + Vdp \quad (3)$$

pri konstantnom tlaku dobiva se

$$c_p = \left(\frac{dH}{dT}\right)_p \quad (4) \quad (\text{ref. 1})$$

Endotermni proces poput taljenja molekula lipida dovodi do stvaranja više-manje zvonolike krivulje nalik Gaussovoj raspodjeli čiji su najistaknutiji parametri: i)  $T_s$  ili  $T_{\text{onset}}$  (označava početak faznog prijelaza), ii)  $T_m$  ili  $T_{\text{peak}}$  (maksimum signala kad je 50 % molekula lipida prešlo u drugu fazu), iii)  $\Delta T_{1/2}$  (poluširina signala na polovici visine koja je povezana s usklađenošću odnosno brzinom faznog prijelaza) te iv) površina ispod signala ( $\Delta H_{\text{cal}}$  tj. entalpija faznog



prijelaza).  $\Delta H_{cal}$  je molarna kalorimetrijska entalpija postupka koja u kombinaciji s veličinom uzorka definira ukupnu promjenu entalpije povezane s termotropnim procesom koji se ispituje. Osim spomenute entalpije, može se odrediti i  $\Delta H_0$ , tj. van't Hoffova promjena entalpije koja predstavlja toplinu koja je potrebna da svaka kooperativna jedinica prođe fazni prijelaz, a izražava se preko  $T_{1/2}$  i univerzalne plinske konstante ( $R$ ):

$$\Delta H_0 = 3,5255 \times R \times \frac{T_m^2 \times (\Delta T_{1/2})^2}{\Delta T_{1/2}} \quad (5)$$

Ukoliko je vrijednost  $\Delta T$  mala u odnosu na  $T_m$ ,  $\Delta H_0$  se može dobiti sljedećom aproksimacijom:

$$\Delta H_0 \approx 3,5255 \times R \frac{T_m^2}{\Delta T_{1/2}} \quad (6)$$

gdje se vidi da je vrijednost  $\Delta H_0$  obrnuto proporcionalna širini signala.

Promjena entropije određena je iz

$$\Delta S = \frac{\Delta H_{cal}}{T_{p/m}} \quad (7)$$

Kod većine lipidnih faznih prijelaza, izraz  $\Delta H_0$  je znatno veći od  $\Delta H_{cal}$ , i njihov omjer predstavlja veličinu kooperativne jedinice (engl. *cooperative unit size*, CUS).

$$CUS = \frac{\Delta H_0}{\Delta H_{cal}} \quad (8)$$

CUS označava procjenu broja molekula lipida odnosno veličinu lipidnih klastera koje podliježu faznom prijelazu.<sup>2</sup> Kod kooperativnih prijelaza i prije postizanja temperature faznog prijelaza, molekule se počinju reorganizirati i kretati u međusobnoj suradnji pa tako taljenje jedne molekule lipida olakšava taljenje susjednih lipida. Kako se temperatura približava  $T_m$ , raspon udaljenosti ove suradnje između molekula raste.<sup>23</sup> Posljedično, što su lipidi u jačoj interakciji, to će taljenje biti brži i usklađeniji, odnosno kooperativniji proces. CUS je stoga mjera stupnja intermolekularne kooperativnosti između molekula lipida (više detalja u ref. 2). Budući da na izgled DSC krivulje utječu ne samo termodinamička i kinetička svojstva pojedinog termotropnog događaja (konkretno, faznog prijelaza lipida), već i termalna povijest uzorka (tretiranje i skladištenje uzorka), prvo DSC mjerenje se najčešće odbacuje.<sup>2</sup> Termodinamičke veličine se stoga određuju najčešće iz DSC krivulje drugog (ili nekog od sljedećih) ciklusa grijanja odnosno hlađenja.<sup>24</sup>

### 2.3. Određivanje veličine suspendiranih čestica

Dinamičko raspršivanje svjetlosti (engl. *dynamic light scattering*, DLS) najčešća je metoda određivanja veličine čestica u nanometarskim rasponima, sve do nekoliko mikrometara. Tehnika se temelji na Brownovom gibanju čestica otopljenih odnosno suspendiranih u tekućini koje se kreću nasumično u svim smjerovima. Budući da se veće čestice gibaju sporije od manjih, brzina Brownovog gibanja definirana preko translacijskog koeficijenta difuzije ( $D$ ) omogućuje određivanje hidrodinamičkog promjera ( $D_H$ ) iz Stokes-Einsteinove jednadžbe:

$$D_H = \frac{k_B T}{3\pi\eta D} \quad (9)$$

gdje je  $D_H$  = hidrodinamički promjer,  $D$  = translacijski koeficijent difuzije,

$k_B$  = Boltzmannova konstanta,  $T$  = termodinamička temperatura i  $\eta$  = viskoznost.

Analiza podataka obrađuje se automatski u računalnom programu. DLS pruža informacije o prosječnoj veličini čestica kao i o raspodjeli veličine čestica. Kao takva, primjenjuje se za određivanje veličine proteina, nanočestica i koloida.<sup>25,26</sup>

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali

Kemikalije korištene u ovom diplomskom radu su: 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfokolin (DPPC, 99% čistoće, Avanti Polar Lipids), palmitinska kiselina (PA, p.a., Riedel), kloroform ( $\text{CHCl}_3$ , p.a., CARLO ERBA Reagents), acetatni pufer (pH = 4,00: octena kiselina,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , p.a., Kemika; natrijev acetat,  $\text{CH}_3\text{COONa}$ , p.a., Kemika), fosfatni pufer (pH = 6,78: natrijev hidrogenfosfat,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , >99% čistoće, Alfa Aesar; natrijev dihidrogenfosfat,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , p.a., Fluka), karbonatni pufer (pH = 9,00: natrijev karbonat,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , p.a., Kemika; natrijev hidrogenkarbonat,  $\text{NaHCO}_3$ , p.a., Gram-Mol). Svi puferi su priređeni u trostruko destiliranoj vodi i njihova ionska jakost iznosi  $I = 100 \text{ mol dm}^{-3}$ .

### 3.2. Priprema uzoraka

#### 3.2.1. Uzorci za DSC mjerenja

Za pripremu multilamelarnih DPPC liposoma, izvagano je 179,3 mg DPPC praha koji je otopljen u 3 mL kloroforma ( $\text{CHCl}_3$ ). Pipetirano je 250  $\mu\text{L}$  ove otopine i upareno u tikvici na rotacijskom uparivaču. Dobiveni filmovi su suspendirani u puferima sljedećih pH-vrijednosti: 4,00 (acetatni pufer), 6,78 (fosfatni pufer) i 9,00 (karbonatni pufer) tako da je dodano 3 mL pojedinog pufera u tikvicu, nakon čega slijedi uzastopno intezivno miješanje na Vortex mješalici, naglo zagrijavanje u vrućoj vodenoj kupelji na 80 °C i hlađenje u ledenoj kupelji u barem pet ciklusa, dok nije dobivena suspenzija. Koncentracija DPPC-a za DSC mjerenja je bila 4,97 mg/mL. Multilamelarni DPPC liposomi sa dodatkom male količine palmitinske kiseline (PA) pripremljeni su tako da je 0,99 mg PA otopljeno u 50 mL  $\text{CHCl}_3$ , a 50  $\mu\text{L}$  ove otopine je dodano u 250  $\mu\text{L}$  otopine DPPC pripremljene na već opisan način. Otopine su uparene na rotacijskom uparivaču i suspendirane u puferima pH-vrijednosti 4,00 (PA je protonirana), 6,78 (PA je djelomično protonirana) i 9,00 (PA je deprotonirana). Množinski udio PA je  $\sim 2\%$ . Prije DSC mjerenja uzorci su degazirani u otplinjavajućoj komori 15 minuta kako u uzorcima ne bi zaostao zrak što može utjecati na DSC krivulje.

### 3.2.2. *Uzorci za DLS mjerenja*

Za mjerenje veličine pripremljenih multilamelarnih liposoma korištene su iste suspenzije priređene za DSC mjerenja, koje su dodatno razrijeđene odgovarajućim puferima tako da koncentracija DPPC iznosi 0,3 mg/mL.

## 3.3. Mjerni uređaji

### 3.3.1. *Razlikovno-pretražna kalorimetrija (DSC)*

Za kalorimetrijska mjerenja korišten je mikrokolorimetar Nano-DSC, TA Instruments, New Castle, USA (slika 9). Volumen ćelija za uzorke iznosi 300  $\mu$ L. Uzorci su snimani u temperaturnom rasponu od 10 °C do 70 °C uz brzinu zagrijavanja 1 °C/min. Kao referentna otopina za uzorke korišten je odgovarajući pufer. Svaki uzorak je snimljen tri puta i svako punjenje je dva puta izloženo ciklusima zagrijavanja i hlađenja. Prvi ciklus zagrijavanja i hlađenja se zanemaruje pri analizi podataka jer na DSC termogram utječe termalna povijest uzorka.<sup>2</sup> Mjerenja su provedena na referentnim otopinama pufera na isti način, ali samo s jednim ciklusom zagrijavanja i hlađenja za svaku.



Slika 9. Mikrokalorimetar Nano-DSC, TA Instruments, New Castle, USA (fotografirano u Laboratoriju za biomolekularne interakcije i spektroskopiju Zavoda za organsku kemiju i biokemiju IRB-a.

### 3.3.2. Dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS)

Veličina čestica pripremljenih liposoma izmjerena je uređajem Zetasizer Ultra, Malvern Panalytical, Velika Britanija, opremljenim s crvenim He/Ne laserom koji emitira zračenje valne duljine 632,8 nm. Laser je izvor zračenja koji daje maksimalnu snagu od 10 mW, a mjerenje veličine čestica je bilo pod kutem od  $173^\circ$ , uz fotodiodu kao detektor. Dobiveni rezultati prikazani su u Dodatku na slici D1.

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Analiza DSC krivulja

Od DSC krivulje DPPC (+ PA) suspenzije oduzeta je DSC krivulja odgovarajuće referentne otopine (pufera). Dobivene DSC krivulje su podijeljene u dva područja: jedno koje obuhvaća pretprijelaz (30-38 °C za pH = 4,00 te 31-39 °C za pH = 6,78 i pH = 9,00) i drugo koje obuhvaća glavni prijelaz (38-45 °C za pH = 4,00 te 39-46 °C za pH = 6,78 i pH = 9,00). Priređeni DSC profili su dodatno korigirani povlačenjem bazne linije kroz dvije (rubne) točke. Nadalje, DSC profili (u jedinicama  $\mu\text{J s}^{-1}$ ) su pretvoreni u  $c_p$  profile (u jedinicama  $\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$ ) dijeljenjem s masom (4,97 mg/ml), volumenom (0,3 ml), množenjem s  $M$  (739,04 g  $\text{mol}^{-1}$ ) te dijeljenjem s brzinom grijanja (1 K/min) pomoću programa Origin 8.5 i Spectragryph v1.2.14. Prema relacijama iz ref. 2 (sekcija 2.2.) određeni su najvažniji termodinamički parametri pretprijelaza i glavnog faznog prijelaza multilamelarnih DPPC liposoma bez i s PA (DPPC (+ PA)) liposoma u ovisnosti o pH-vrijednosti medija (tablica 1) iz drugog ciklusa grijanja (Tablica 1). DSC krivulje svakog uzorka (prvo mjerenje, drugi ciklus grijanja i hlađenja) prikazane su u Dodatku.

Tablica 1. Termodinamički parametri prijelaza gel → fluid multilamelarnih DPPC (+ PA) liposoma pri sljedećim pH-vrijednostima medija: 4,00, 6,78 i 9,00. Nesigurnost je određena kao standardna devijacija mjerenja.

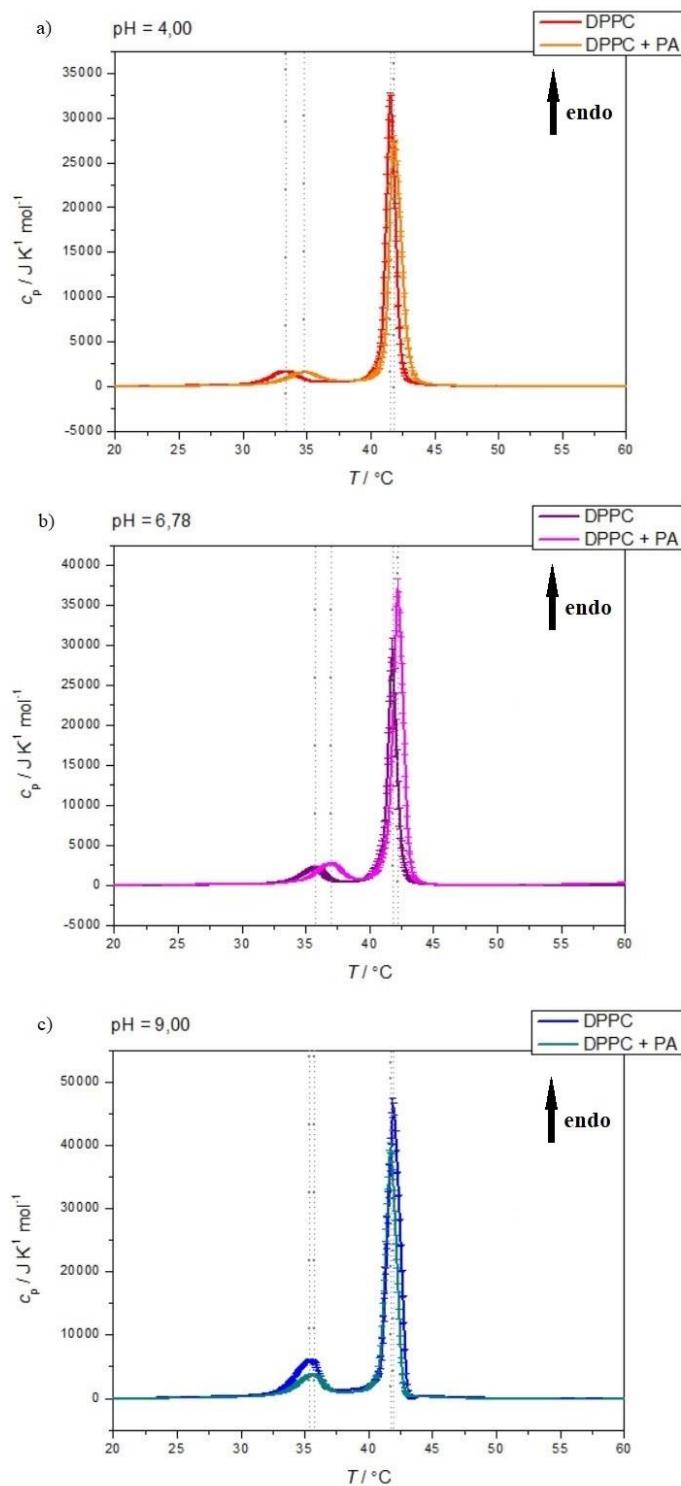
Sustav / DPPC (+ PA) - pufer	Pretprijelaz							Glavni fazni prijelaz						
	$T_p$		$\Delta T_{1/2}$ / K	$\Delta H_{cal}$ / kJ mol <sup>-1</sup>	$\Delta S$ / J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup>	$10^{-6} \cdot \Delta H_0$ / J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup>	CUS	$T_m$		$\Delta T_{1/2}$ / K	$\Delta H_{cal}$ / kJ mol <sup>-1</sup>	$\Delta S$ / J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup>	$10^{-6} \cdot \Delta H_0$ / J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup>	CUS
	°C	K						°C	K					
DPPC (pH = 4,00)	33,3	306,4	2,3	3,3 ± 0,1	10,7	1,2	365 ± 11	41,6	314,7	0,9	30,9 ± 0,8	98,1	3,4	111 ± 3
DPPC + PA (pH = 4,00)	34,8	307,9	2,5	3,3 ± 0,1	10,6	1,1	336 ± 6	41,8	315,0	1,1	33 ± 1	105,7	2,7	81 ± 2
DPPC (pH = 6,78)	35,8	308,9	2,0	4,0 ± 0,4	13,0	1,4	343 ± 34	41,8	314,9	0,8	27 ± 3	86,3	3,8	139 ± 14
DPPC + PA (pH = 6,78)	37,0	310,1	2,1	4,7 ± 0,1	15,0	1,3	285 ± 9	42,2	315,4	0,9	39 ± 2	123,8	3,1	80 ± 3
DPPC (pH = 9,00)	35,4	308,6	2,0	10,9 ± 0,1	35,3	1,4	130 ± 1	41,9	315,1	1,1	55,5 ± 0,7	176,1	2,6	47 ± 1
DPPC + PA (pH = 9,00)	35,6	308,8	2,1	7,0 ± 0,1	22,8	1,3	187 ± 3	41,7	314,9	1,0	40 ± 1	127,9	3,0	74 ± 3

Nesigurnost je određena kao standardna devijacija mjerenja. Prilikom određivanja  $T_p$  i  $T_m$  je nesigurnost u temperaturi iznosila najviše  $\pm 0,1$  °C (K) i stoga će se svi podaci o temperaturama faznih prijelaza,  $T_{1/2}$  te  $\Delta H_0$  razmatrati s navedenom pogreškom. Budući da se promjena entropije dobiva iz relacija (7) u sekciji 2.2.1., pripadajuća nesigurnost iznosi najviše  $\pm 0,9$  J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>.

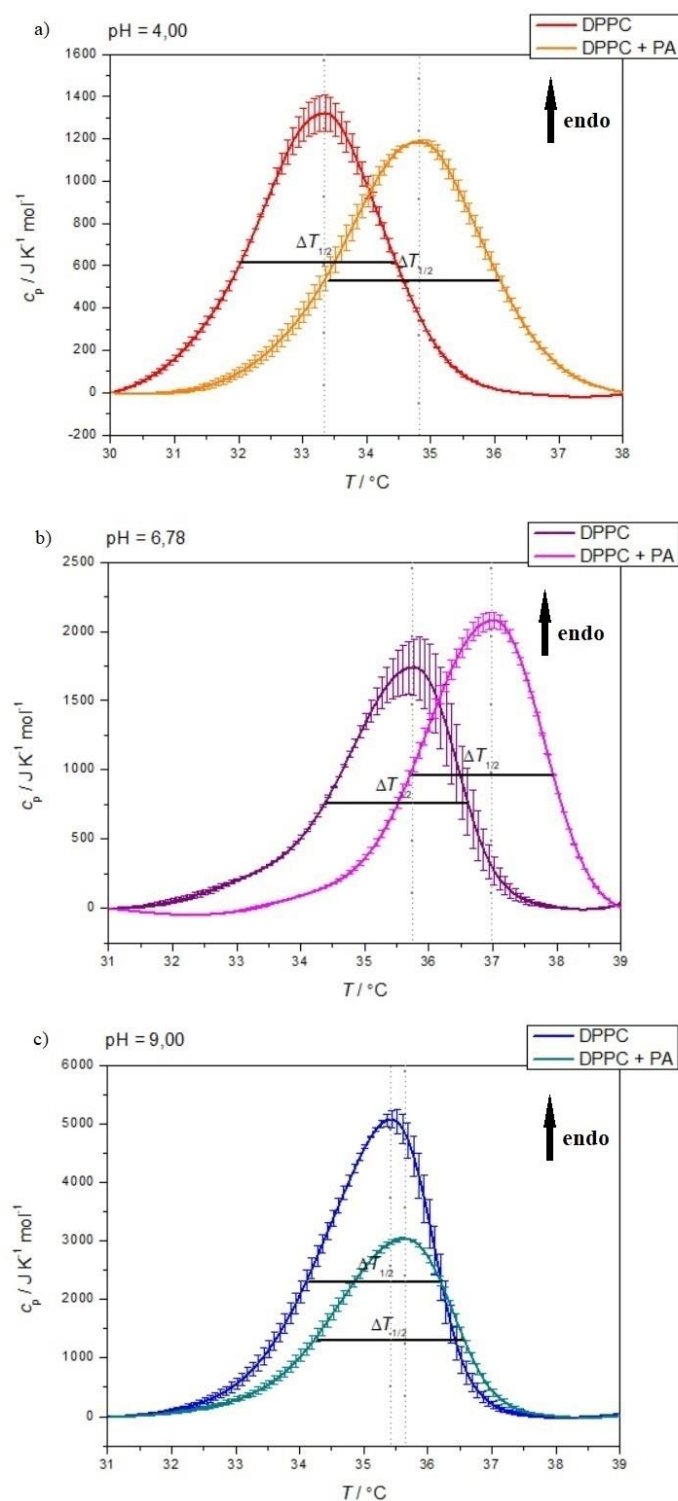
Profili specifičnog toplinskog kapaciteta DPPC liposoma pri različitim pH-vrijednostima medija su prikazani na slici 10. Entalpije pojedinih faznih prijelaza određene su zasebno rezanjem temperaturnog područja i integriranjem dobivenih krivulja uslijed svakog faznog prijelaza čime je dobivena površina ispod krivulja, odnosno  $\Delta H_{cal}$  (tablica 1). Dobivene su vrijednosti  $\Delta H_{cal}$  u rasponu od  $3,3 \pm 0,1$  kJ mol<sup>-1</sup> do  $10,9 \pm 0,1$  kJ mol<sup>-1</sup> za  $T_p$ , te od  $27 \pm 3$  kJ mol<sup>-1</sup> do  $55,5 \pm 0,7$  kJ mol<sup>-1</sup> za  $T_m$ . Prisustvo PA ne uzrokuje značajne promjene u  $\Delta H_{cal}$  pri pH 4,00 i 6,78 za pretprijelaz, dok se  $\Delta H_{cal}$  povećava dodatkom PA za glavni fazni prijelaz. Pri pH = 9,00 dolazi do značajnog smanjenja  $\Delta H_{cal}$  i za pretprijelaz i glavni fazni prijelaz dodatkom PA, što se ne događa pri nižim pH-vrijednostima.

Vidljiv je utjecaj pH-vrijednosti medija i prisutnosti PA na  $T_p$  (slika 11). Dobivene  $T_p$  su u rasponu od 33,3 °C do 37,0 °C. Pri pH-vrijednosti 4,00 je najniža  $T_p$ , a tada je i najveća razlika u  $T_p$  između DPPC liposoma bez ( $T_p = 33,3$  °C) i sa dodatkom PA ( $T_p = 34,8$  °C). Povećavanjem pH-vrijednosti na 6,78  $T_p$  se povećava, a razlika u  $T_p$  između čistih DPPC liposoma ( $T_p = 35,8$  °C) i onih sa dodatkom PA je nešto manja ( $T_p = 37,0$  °C). Daljnjim povećavanjem pH-vrijednosti na 9,00 razlika u  $T_p$  između DPPC liposoma bez ( $T_p = 35,4$  °C) i sa dodatkom PA ( $T_p = 35,6$  °C) se prilično smanjuje.  $T_m$  je u svim slučajevima podjednaka, kao što je i očekivano, u uskom rasponu od 41,6 do 42,2 °C (slika 12).<sup>27</sup> Dobivene temperature i entalpije faznih prijelaza se podudaraju s rezultatima drugih autora, što potvrđuje točnost i preciznost mjerenja.<sup>21,28,29</sup> Primjerice, S. Ali i sur. su za DPPC dobili temperaturu pretprijelaza 34,5°C ( $\Delta T_{1/2} = 1,9$  °C i  $\Delta H_{cal} = 8,2$  kJ mol<sup>-1</sup>), a temperatura glavnog faznog prijelaza je iznosila 42°C ( $\Delta T_{1/2} = 0,25$  °C i  $\Delta H_{cal} = 35,6$  kJ mol<sup>-1</sup>), D. Lichtenberg i sur. su za multilamelarne DPPC liposome dobili  $T_p = 35,3$  °C ( $\Delta H_{cal} = 7,5 \pm 1,3$  kJ mol<sup>-1</sup>) i  $T_m = 41,3 \pm 0,1$  °C ( $\Delta H_{cal} = 33,5 \pm 2,1$  kJ mol<sup>-1</sup>), dok su S. Mabrey i J. M. Sturtevant za smjesu ½ (DPPC + 2 PA) dobili  $T_m = 61,5$  °C ( $\Delta H_{cal} = 35,2$  kJ mol<sup>-1</sup>, CUS = 250).

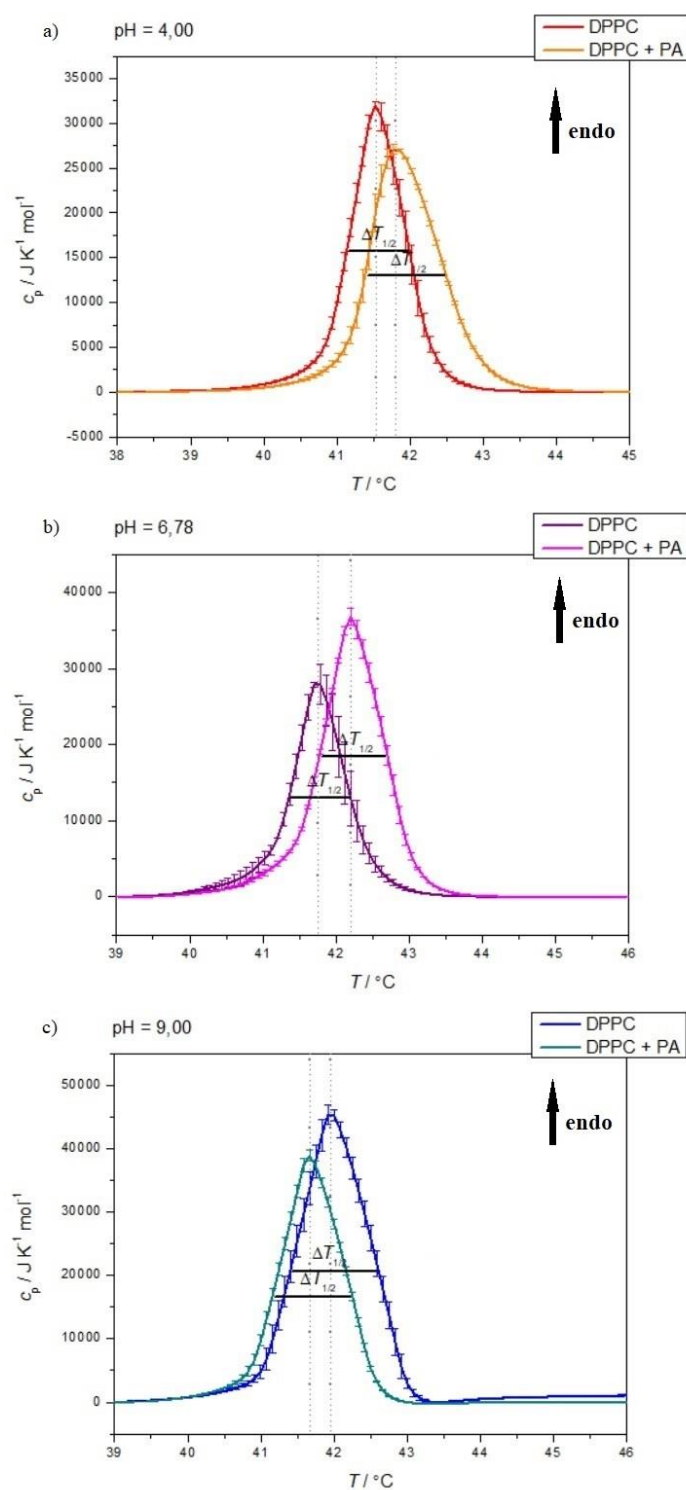




Slika 10. Profili specifičnog toplinskog kapaciteta ( $c_p$ ) multilamelarnih DPPC liposoma pri pH-vrijednostima medija: (a) pH = 4,00; (b) pH = 6,78; (c) pH = 9,00. Trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju mjerenja.



Slika 11. Prikaz krivulje specifičnog toplinskog kapaciteta ( $c_p$ ) multilamelarnih DPPC liposoma u području temperature pretprijelaza ( $T_p$ ) pri pH-vrijednostima medija: (a) pH = 4,00; (b) pH = 6,78; (c) pH = 9,00. Trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju mjerenja.



Slika 12. Prikaz krivulje specifičnog toplinskog kapaciteta ( $c_p$ ) multilamelarnih DPPC liposoma u području temperature glavnog faznog prijelaza ( $T_m$ ) pri pH-vrijednostima medija: (a) pH = 4,00; (b) pH = 6,78; (c) pH = 9,00. Trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju mjerenja.

Vrijednosti CUS (engl. *cooperative unit size*) se smanjuju sa dodatkom PA pri pH-vrijednostima 4,00 i 6,78, dok je pri pH-vrijednosti 9,00 došlo do povećanja kooperativnosti, što je primjećeno kod pretprijelaza kao i kod glavnog faznog prijelaza. Dobivene CUS su u skladu sa vrijednostima iz literature.<sup>29,30</sup> Ovo opažanje je posebno zanimljivo jer je vrijednost CUS općenito veća kod pH = 4,00 i pH = 6,78 nego kod pH = 9,00. PA je potpuno protonirana pri pH-vrijednosti 4,00 i djelomično protonirana pri pH vrijednosti 6,78. Položaj protonirane karboksilne skupine je pomaknut prema unutrašnjosti membrane zbog vodikove veze hidroksilne skupine sa fosfatnim i karbonilnim skupinama DPPC-a.<sup>4</sup> Kada je pH-vrijednost medija 9,00, PA je potpuno deprotonirana i pomaknuta od ravnine površine lipidnog dvosloja bliže vodenoj fazi, što pogoduje stvaranju vodikovih veza s okolnim molekulama vode.<sup>4</sup> Dobiveni podaci ukazuju na to da deprotoniranje i pomak PA prema vodenom mediju povećavaju kooperativnost nastajanja valovite faze.

U konačnici, važno je naglasiti da se izgledi DSC krivulja za DPPC i posebice za DPPC + PA sustave, bez obzira da li je PA protonirana ili deprotonirana, kvalitativno ne razlikuju; drugim riječima, stvaranje valova (pri  $T_p$ ) te taljenje (pri  $T_m$ ) su razlučivi termotropni procesi. Nasuprot tome, preliminarna istraživanja valovite faze FT-IR spektroskopijom na analognim sustavima ukazuju na pojavu nerazlučivosti valovite faze od taljenja u DPPC + PA sustavima u rasponu pH vrijednosti  $4,00 \leq \text{pH} \leq 9,00$ . Dobiveni rezultati će stoga biti od iznimne pomoći u izgradnji termodinamički vjerodostojne molekulske slike valovite faze i dati doprinos rasvjetljenju njezine strukture.<sup>31,32</sup>

## § 5. ZAKLJUČAK

Razlikovno-pretražna kalorimetrija je moćna termoanalitička tehnika pogodna za termodinamičku karakterizaciju faznih prijelaza lipidnih membrana. Uz uobičajene faze gela i fluida u kojima se mogu naći lipidne membrane, posebno je zanimljiva valovita faza u kojoj se, u određenom temperaturnom rasponu, nalaze DPPC liposomi. Radi karakterizacije valovite faze u termodinamičkom smislu ( $T_{p/m}$ ,  $\Delta H_{cal}$  i CUS), priređeni su i analizirani multilamelarni liposomi načinjeni od DPPC lipida bez i uz dodatak male količine PA. Liposomi su suspendirani u puferima pH vrijednosti 4,00, 6,78 te 9,00. Ovisno o pH-vrijednosti medija, PA je protonirana ili deprotonirana i time pomaknuta od površine liposoma što utječe na stvaranje većih ili manjih valova lipidnog dvosloja. Pri pH = 4,00 i pH = 6,78  $T_p$  je niža i veća je razlika u  $T_p$  nakon dodatka PA nego kod pH = 9,00; nadalje,  $\Delta H_{cal}$  se povećava za  $T_m$ , no ne mijenja se za  $T_p$ , dok se CUS smanjuje dodatkom PA za  $T_p$  i za  $T_m$ . Pri pH-vrijednosti medija 9,00, kada je PA deprotonirana i pomaknuta od ravnine površine lipidnog dvosloja prema vodenoj fazi, dolazi do značajnog smanjenja vrijednosti  $\Delta H_{cal}$  i povećanja CUS dodatkom PA, a razlika u  $T_p$  između DPPC liposoma bez i sa dodatkom PA je najmanja.  $T_m$  je podjednaka u svim slučajevima. Iz navedenih opažanja može se zaključiti da deprotoniranje i pomak PA prema sučelju lipidne membrane i vodenog medija povećava kooperativnost lipida prilikom stvaranja valovite faze.

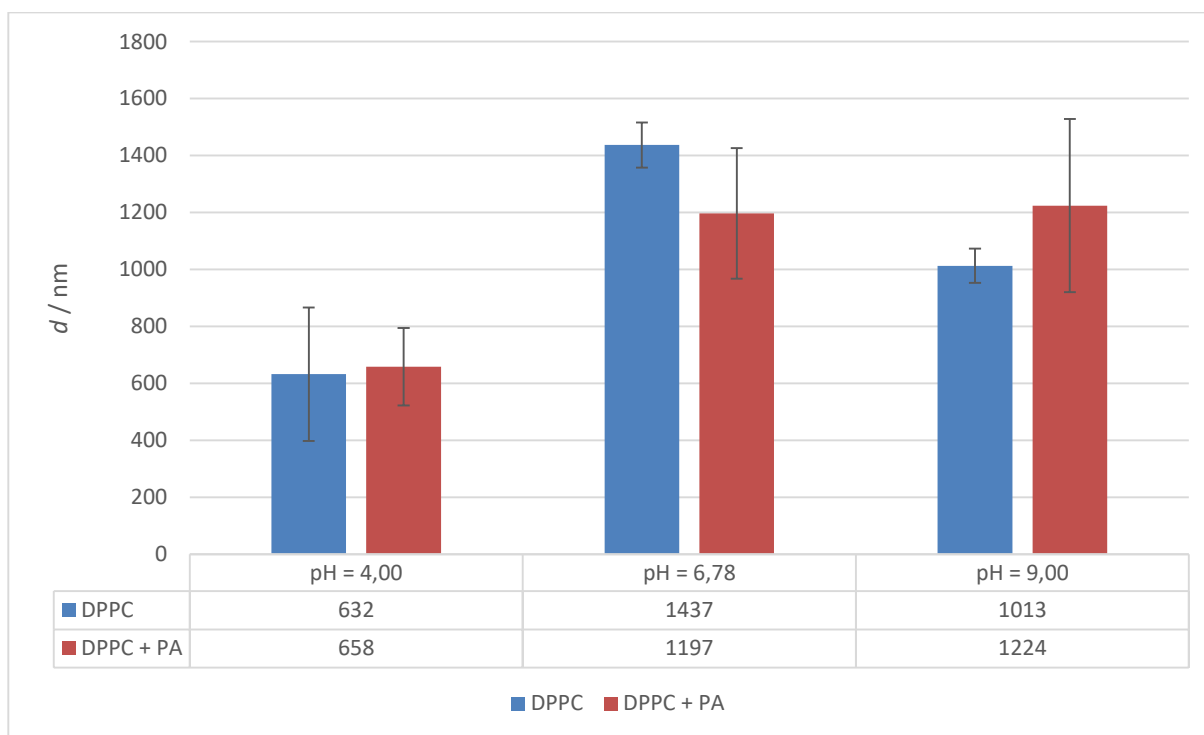
Dobiveni podaci se odlično slažu s već literaturno poznatim vrijednostima za navedene fazne prijelaze. S ciljem dobivanja molekulske slike stvaranja valovite faze, u daljnjem će se istraživanju podaci dobiveni iz DSC profila usporediti s rezultatima dobivenih iz FT-IR spektara.

## § 6. LITERATURNI IZVORI

1. T. Heimburg, *Thermal Biophysics of Membranes*, Wiley-VCH, Berlin, 2007, str. 1–41, 75–99.
2. R. N. A. H. Lewis, D. A. Mannock, R. N. McElhaney, *Differential Scanning Calorimetry in the Study of Lipid Phase Transitions in Model and Biological Membranes* u *Methods in Membrane Lipids* (ur. Alex M. Dopico), Humana Press, Totowa, New Jersey, 2007, str. 171–195.
3. S. A. Kirsch, R. A. Böckmann, *Biophys. J.* **116** (2019) 2131–2148.
4. T. Heimburg, *Biophys. J.* **78** (2000) 1154–1165.
5. K. Sengupta, V. A. Raghunathan, *Europhys. Lett.* **49** (2000) 722–728.
6. A. A. Pashkovskaya, M. Vazdar, L. Zimmermann, O. Jovanovic, P. Pohl, E. E. Pohl, *Biophys. J.* **14** (2018) 2142–2151.
7. J. F. Nagle, S. Tristram-Nagle, *Biochim. Biophys. Acta* **1469** (2000) 159–195.
8. *Cell membrane*, 6.2.2014., *PHHS Biology*, <http://phhsbiology.weebly.com/cell-membrane.html> (datum pristupa 21.8.2020.).
9. V. Luzzati, *J. Phys. II*, **5** (1995) 1649–1669.
10. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, 5. izd., W. H. Freeman, New York, 2002, str. 487–501.
11. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry* 4. izd., W.H. Freeman, New York, 2005, str. 348–357.
12. D. Casares, P. V. Escribá, C. A. Rosselló, *Int. J. Mol. Sci.* **20** (2019) 1–30
13. G. van Meer, D. R. Voelker, G. W. Feigenson, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9** (2008) 112–124.
14. H. T. McMahon, E. Boucrot, *J. Cell Sci.* **128** (2015) 1065–1070.
15. H. Pandley, R. Rani, V. Agarwal, *Braz. Arch. Biol. Technol.* **59** (2016) 1–10.
16. M. J. Hope, R. Nayar, L. D. Mayer, P. R. Cullis, *Liposome Technol.* **1** (1993) 123–139.
17. K. Akabori, J. F. Nagle, *Soft Matter* **11** (2015) 918–926.
18. K. Sengupta, V. A. Raghunathan, Y. Hatwalne, *Phys. Rev. Lett.* **87** (2001) 055705.
19. B. A. Cunningham, D. H. Wolfe, L. J. Lis, P. J. Quinn, J. M. Collins, W. Tamura-lis, O. Kucuk, M. P. Westerman, *Mol. Cryst. Liq. Cryst. Sci. Technol., Sect. A* **225** (1993) 33–41.
20. G. Cevc, *Biochim. Biophys. Acta* **1062** (1991) 59–69.

21. D. Lichtenberg, M. Menashe, S. Donaldson, R. L. Biltonen, *Lipids* **19** (1984) 395–400.
22. R. L. Biltonen, D. Lichtenberg, *Chem. Phys. Lipids* **64** (1993) 129-142.
23. S. M. Ohline, M. L. Campbell, M. T. Turnbull, S. J. Kohler, *J. Chem. Educ.* **78** (2001) 1251–1260.
24. C. Chen, D. Han, C. Cai, X. Tang, *J. Controlled Release* **142** (2010) 299–311.
25. <https://wiki.anton-paar.com/en/the-principles-of-dynamic-light-scattering/>  
(datum pristupa 21.8.2020.).
26. [https://www.horiba.com/en\\_en/en-en/technology/measurement-and-control-techniques/material-characterization/dynamic-light-scattering/](https://www.horiba.com/en_en/en-en/technology/measurement-and-control-techniques/material-characterization/dynamic-light-scattering/)  
(datum pristupa 21.8.2020.).
27. M. S. Fernández, M.T. González-Martínez, Estela Calderón, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **863** (1986) 156–164.
28. S. Ali, S. Minchey, A. Janoff, E. Mayhew, *Biophys. J.* **78** (2000) 246–256.
29. S. Mabrey, J. M. Sturtevant, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73** (1976) 3862–3866.
30. S. Mabrey, J. M. Sturtevant, *Biochim. Biophys. Acta* **486** (1977) 444–450.
31. T. Le Bihan, M. Pézolet, *Chem. Phys. Lipids* **94** (1998) 13–33.
32. D. G. Cameron, H. L. Casal, H. H. Mantsch, *Biochemistry* **19** (1980) 3665–3672.

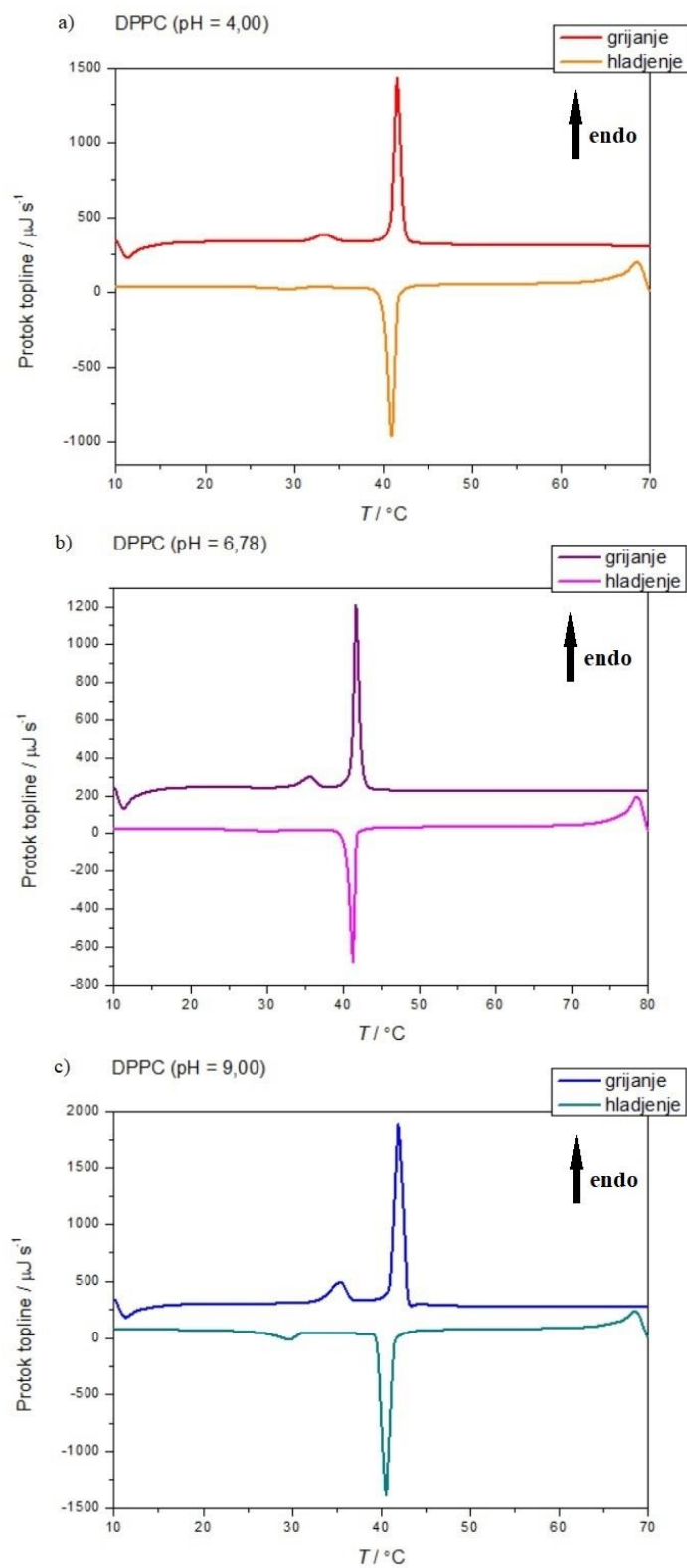
## § 7. DODATAK



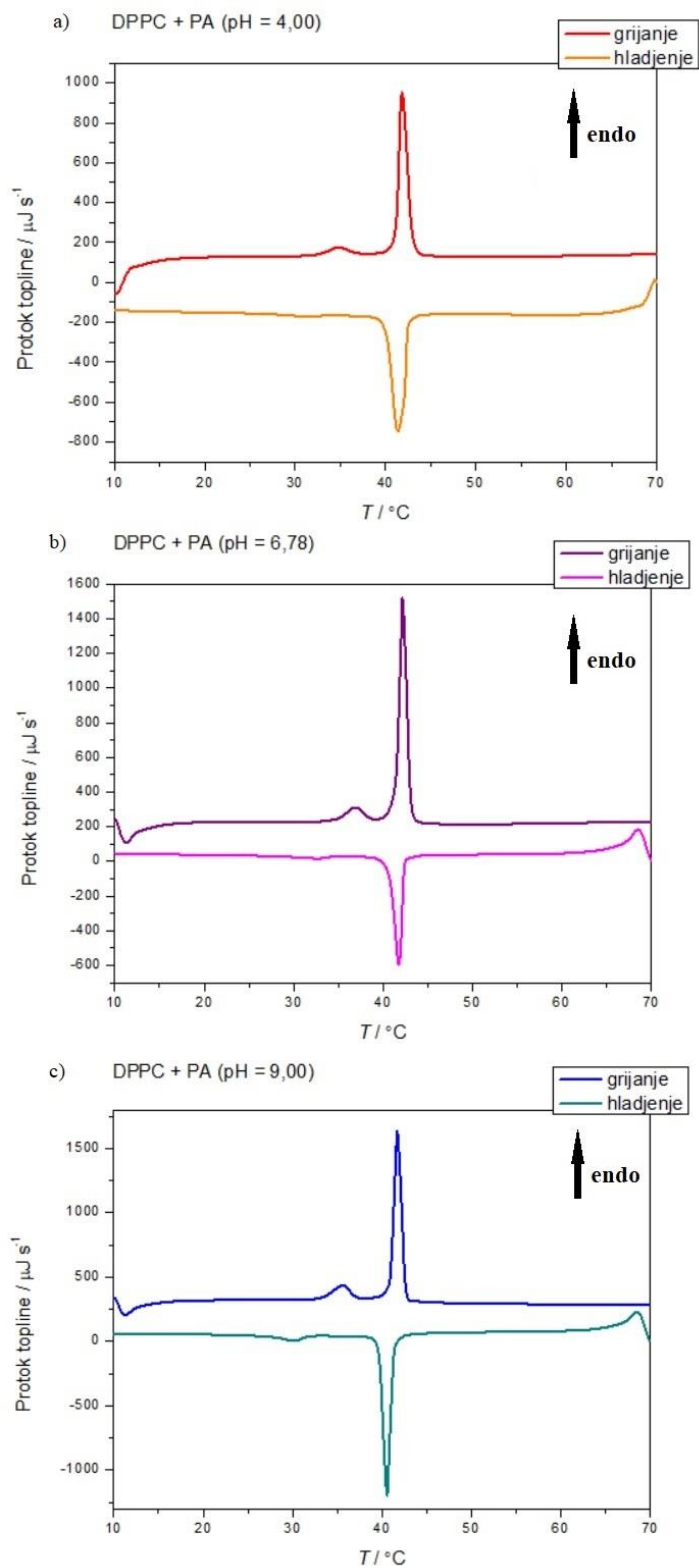
Slika D1. Rezultati dobivenih veličina liposoma DLS tehnikom. Dobivene veličine predstavljaju srednje vrijednosti dobivene iz najmanje pet neovisnih mjerenja za svaki uzorak.

Trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju mjerenja.

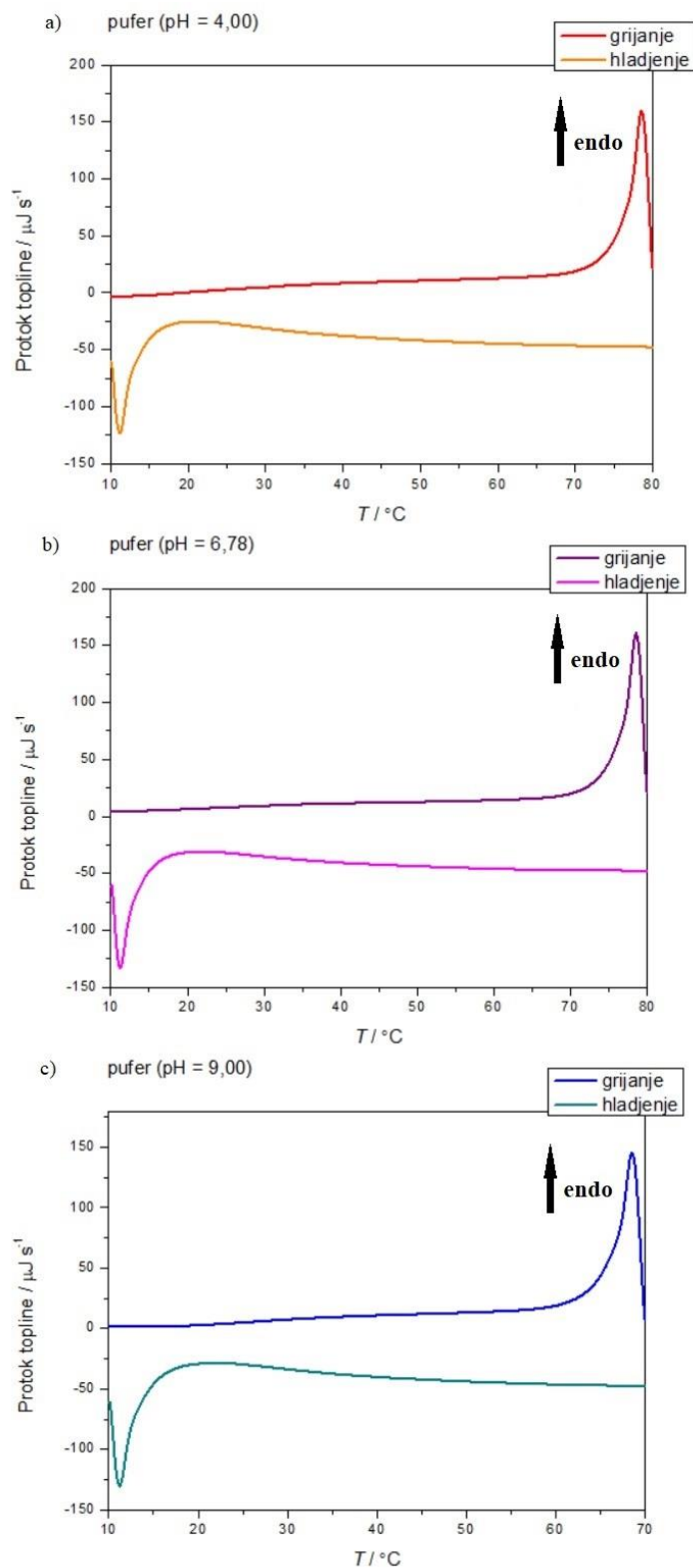




Slika D2. DSC termogrami multilamelarnih DPPC liposoma pri pH-vrijednostima medija:  
(a) pH = 4,00; (b) pH = 6,78; (c) pH = 9,00.



Slika D3. DSC termogrami multilamelarnih DPPC liposoma sa dodatkom palmitinske kiseline pri pH-vrijednostima medija: (a) pH = 4,00; (b) pH = 6,78; (c) pH = 9,00.



Slika D4. DSC termogrami referentnih otopina za uzorke liposoma:

(a) acetatni pufer (pH = 4,00); (b) fosfatni pufer (pH = 6,78); karbonatni pufer (pH = 9,00).

## § 8. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Marina Momčilov

Datum rođenja: 5. studenoga 1993.

Mjesto rođenja: Osijek

### Obrazovanje

2001.–2009. Osnovna škola Darda

2009.–2012. Medicinska škola Osijek

2012.–2017. Preddiplomski sveučilišni studij Kemija

Odjel za kemiju

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

2017.–2020. Diplomski sveučilišni studij Kemija

Smjer: istraživački (grane: biokemija i organska kemija)

Prirodoslovno-matematički fakultet

Sveučilište u Zagrebu