

Karakterizacija strukturnih obilježja valovite faze fosfokolinskih liposoma FT-IR spektroskopijom

Pišonić, Marina

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:217:739690>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-29**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Kemijski odsjek

Marina Pišonić

**KARAKTERIZACIJA STRUKTURNIH OBILJEŽJA
VALOVITE FAZE FOSFOKOLINSKIH LIPOSOMA
FT-IR SPEKTROSKOPIJOM**

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za kemiju u modelnim biološkim sustavima pri Zavodu za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković pod mentorstvom dr. sc. Danijele Bakarić i neposrednim voditeljstvom dr. sc. Ive Crnolatca. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je prof. dr. sc. Snežana Miljanić.

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 dragoj mentorici dr. sc. Danijeli Bakarić (Institut Ruđer Bošković) na pruženoj prilici, uloženom vremenu i radu, strpljenju, pomoći i znanju prenesenom tijekom izrade diplomskog rada. Nikako ne bih uspjela bez njezine pomoći i podrške.

Zahvaljujem neposrednom voditelju dr. sc. Ivi Crnolatu kao i ostalim zaposlenicima Zavoda za organsku i biokemiju Instituta Ruđer Bošković na pomoći i prenesenom znanju prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se doktorandici Ini Erceg iz Laboratorija za biokoloide i površinsku kemiju, Zavoda za fizičku kemiju Instituta Ruđer Bošković, radi mjerenja veličine priređenih liposoma.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Snežani Miljanić na susretljivosti i neizmjernoj podršci.

Zahvaljujem se mojim prijateljima na podršci od početka do kraja.

A najveća hvala Njemu i mojoj obitelji koja nikad nije prestala vjerovati u mene, koja je bila tu u najboljim i najgorim trenucima, hvala na bezuvjetnoj ljubavi i vječnoj podršci.

SADRŽAJ

SAŽETAK.....	IX
ABSTRACT	XI
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Struktura membrana i membranski lipidi	3
2.2. Modelne lipidne membrane.....	6
2.2.1. <i>Liposomi.....</i>	7
2.2.2. <i>Fazni prijelazi membranskih lipida</i>	8
2.3. Instrumentalne tehnike određivanja temeprature faznog prijelaza	10
2.3.1. <i>Razlikovno-pretražna kalorimetrija</i>	10
2.3.2. <i>Infracrvena spektroskopija.....</i>	11
2.3.2.1. <i>Osnove FT-IR spektroskopije</i>	11
2.3.2.2. <i>FT-IR spektrometar</i>	12
2.3.2.3. <i>FT-IR spektroskopija u određivanju faznih prijelaza lipida</i>	13
2.3.3. <i>Dinamičko raspršenje svjetlosti</i>	14
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	15
3.1. Materijali	15
3.2. Priprema uzoraka	15
3.2.1. <i>Uzorci za FT-IR spektroskopiju</i>	15
3.2.2. <i>Uzorci za DSC.....</i>	16
3.2.3. <i>Uzorci za DLS.....</i>	16
3.3. Mjerne tehnike	16
3.3.1. <i>Mjerenje FT-IR spektara.....</i>	16
3.3.2. <i>Mjerenje DSC krivulja</i>	17
3.3.3. <i>Određivanje veličine suspendiranih čestica.....</i>	18

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA.....	19
§ 5. ZAKLJUČAK.....	27
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (PREMA POTREBI).....	28
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	29
§ 8. DODATAK	XV
§ 9. ŽIVOTOPIS	XXI



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

KARAKTERIZACIJA STRUKTURNIH OBILJEŽJA VALOVITE FAZE FOSFOKOLINSKIH LIPOSOMA FT-IR SPEKTROSKOPIJOM

Marina Pišonić

Molekule 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfokolina (engl. *1,2-dipalmitoyl-sn-glicero-3-phosphatidylcholine*, DPPC) u vodenom mediju stvaraju hidrirane dvosloje koji se, ovisno o temperaturi, nalaze u određenoj fazi. Prijelaz DPPC-a iz faze gela ($L_{\beta'}$) u fazu fluida (L_{α}), odnosno glavni fazni prijelaz opažen pri temperaturi mekšanja (T_m), prekinut je valovitom fazom ($P_{\beta'}$) koja se opaža pri temperaturi pretprijelaza (T_p). Budući da su T_m i T_p iznimno osjetljive na ugradnju organskih molekula u lipidni dvosloj, posebice onih koje su kadre primati i otpuštati proton, u sklopu ovog diplomskog rada istraženi su višestruki hidrirani dvosloji DPPC lipida u odsutnosti i prisutnosti male količine palmitinske kiseline (engl. *palmitic acid*, PA) u puferima različitih pH vrijednosti. T_m i T_p određene su analizom vibracijskih potpisa metilenskih ($\nu_s\text{CH}_2$) i fosfatnih ($\nu_{as}\text{PO}_2^-$) skupina iz temperaturno-ovisnih FT-IR spektara. Dobiveni podaci su djelomično upotpunjeni onima dobivenima iz razlikovno-pretražne kalorimetrije (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC).

(37 stranica, 14 slika, 1 tablica, 39 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: DSC, fazni prijelaz, fosfokolin, FT-IR, valovita faza

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

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): prof. dr. sc. Snežana Miljanić

Ocjenitelji:

1. Prof. dr. sc. Snežana Miljanić
 2. Prof. dr. sc. Željka Soldin
 3. Izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković
- Zamjena: doc. dr. sc. Adriana Kendel

Datum diplomskog ispita: 30. rujna 2021.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF THE STRUCTURAL FEATURES OF RIPPLE PHASE OF PHOSPHOCHOLINE LIPOSOMES USING FT-IR SPECTROSCOPY

Marina Pišonić

1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocoline form hydrated bilayers in an aqueous medium which, depending on the temperature, can be found in certain phase. The transition from gel ($L_{\beta'}$) to fluid phase (L_{α}), assigned as the main phase transition with a peak at melting point temperature (T_m), is interrupted by the ripple phase ($P_{\beta'}$) observed at the pretransition temperature (T_p). Since T_m and T_p are extremely sensitive to the incorporation of organic molecules into the lipid bilayer, especially those capable of receiving and releasing a proton, multiple hydrated bilayers of DPPC lipids in the absence and presence of small amounts of palmitic acid (PA) in buffers of different pH values have been investigated across this thesis. T_m and T_p have been determined by the analysis of vibrational signatures of methylene ($\nu_s\text{CH}_2$) and phosphate ($\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-$) groups from temperature-dependent FT-IR spectra. These data have been partially supplemented by those obtained from differential scanning calorimetry (DSC).

(37 pages, 14 figures, 1 table, 39 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: DSC, FT-IR, phosphocoline, phase transition, ripple phase

Mentor: Dr. Danijela Bakarić, Research Associate

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Snežana Miljanić, Professor

Reviewers:

1. Dr. Snežana Miljanić, Professor
 2. Dr. Željka Soldin, Professor
 3. Dr. Vesna Petrović Peroković, Associate Professor
- Substitute: Dr. Adriana Kendel, Assistant Professor

Date of exam: 30th September 2021

§ 1. UVOD

Lipidi su amfifilne molekule s nepolarnim ugljikovodičnim lancima (repovima) i polarnim skupinama (glavama) koji predstavljaju jedne od temeljnih građevnih elemenata bioloških membrana.¹ Budući da su struktura i funkcija bioloških membrana iznimno složene, njihova se pojedina strukturalna obilježja proučavaju na jednostavnijim modelnim membranskim sustavima među kojima su liposomi jedni od najčešćih. Liposomi su sferne tvorevine koje nastaju slaganjem molekula lipida u jedan ili više lipidnih dvosloja razdvojenih slojevima vode na način da su nepolarni ugljikovodični lanci okrenuti jedni prema drugima, a polarne hidrofilne glave prema vodi.² Jedan od uobičajenih modelnih lipida je 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfokolin (engl. *1,2-dipalmitoyl-sn-glicero-3-phosphatidylcholine*, DPPC)² čiji se dvosloji, u temperaturnom rasponu od 10 °C do 100 °C, mogu naći u tri faze: i) faza gela ($L_{\beta'}$), ii) valovita faza ($P_{\beta'}$) te iii) fluidna faza (L_{α}).³ Premda se kod većine modelnih lipida glavnim faznim prijelazom smatra prijelaz $L_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$ koji se opaža pri temperaturi mekšanja (T_m), kod DPPC-a postoji i pretprijelaz ($L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta'}$) s maksimumom pri temperaturi pretprijelaza (T_p ; $T_p < T_m$) koji je karakterističan po pojavi valova na površini lipidnih dvosloja.⁴ Budući da je pretprijelaz proces niske kooperativnosti,⁴ iznimno je osjetljiv na ugradnju različitih organskih molekula u lipidni dvosloj kao i na sastav hidratacijskog medija u kojem su liposomi suspendirani. Ugradnjom molekula poput palmitinske kiseline (engl. *palmitic acid*, PA) te uz promjenu, odnosno kontrolu pH-vrijednosti medija, istodobno se mogu izazvati promjene u valovitoj fazi, ne samo zbog umetanja PA, već i zbog mogućnosti izmjene protona između karboksilne skupine (COO(H)) PA molekula i hidratacijskog medija.

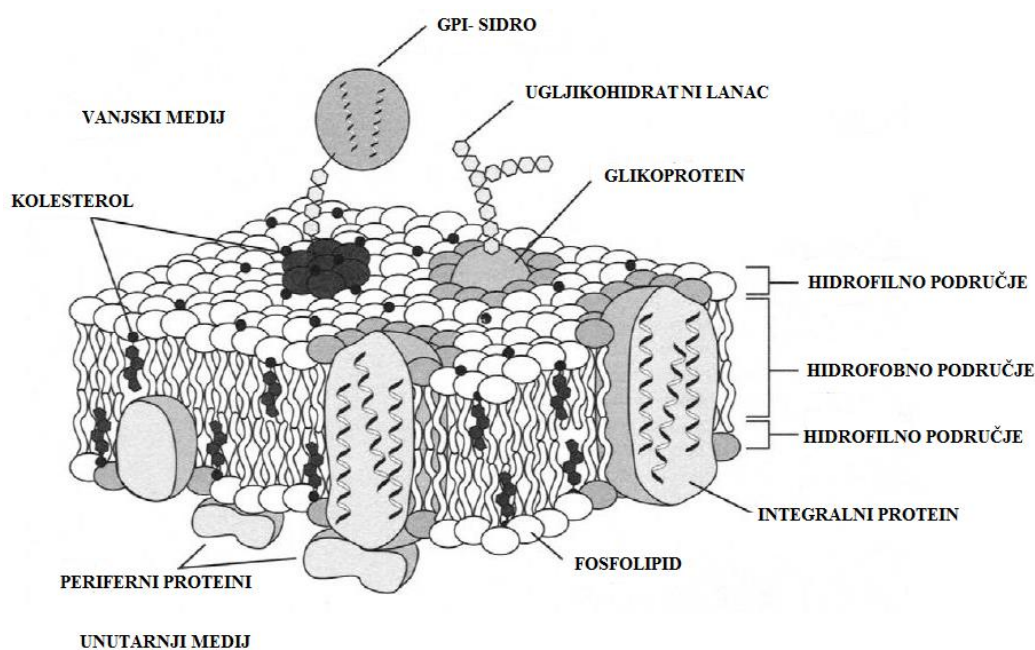
Cilj ovog diplomskog rada je odrediti T_p i T_m liposoma sastavljenih od DPPC-a u odsutnosti i u prisutnosti PA molekula suspendiranih u puferima pH vrijednosti u rasponu $4 \leq \text{pH} \leq 9$. Primarna tehnika koja će se koristiti u tu svrhu je temperaturno-ovisna FT-IR spektroskopija. Iako je već desetljećima poznato da se iz temperaturne ovisnosti signala određenih funkcijskih skupina lipida može odrediti temperatura pojedinog faznog prijelaza^{5,6,7}, najnovija istraživanja na tom području pokazuju da se može procijeniti i koliko je pojedini dio molekule lipida osjetljiv na dani fazni prijelaz.⁸ Budući da PA može biti, ovisno o pH vrijednosti medija, protonirana ili deprotonirana i time više ili manje pomaknuta

od ravnine površine pojedinog dvosloja,⁹ analizom FT-IR spektara će biti moguće procijeniti koliko prisutnost male količine PA i u kojem obliku izaziva promjene na valovitoj površini lipidnog dvosloja. Spektroskopski rezultati djelomično će se nadopuniti onima dobivenima razlikovno-pretražnom kalorimetrijom (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC) koja predstavlja standardnu tehniku u određivanju T_p odnosno T_m .¹⁰ Snimljeni FT-IR spektri i DSC krivulje će se detaljno analizirati i iz njih će se odrediti T_p i T_m DPPC liposoma u odsutnosti i prisutnosti PA.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Struktura membrana i membranski lipidi

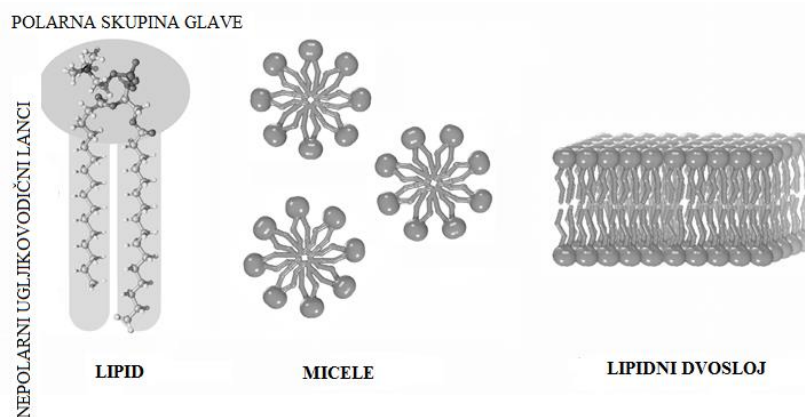
Jedna od najvažnijih uloga membrane je kontrola prolaska malih nepolarnih molekula (O_2 , CO_2 , H_2O), makromolekula poput TAT peptida (engl. *trans-activator of transcription*, TAT)¹¹ te nabijenih vrsta (H^+ , K^+ , HCO_3^- , Mg^{2+} , Ca^{2+} itd.).¹ Izgled i uloga biološke membrane je funkcija slaganja njezinih osnovnih građevnih elemenata među kojima najvažnije mjesto zauzimaju lipidi i proteini.¹² Primjerice, na slici 1 membrana je prikazana kao sustav lipidnog dvosloja s integralnim te perifernim membranskim proteinima. Istaknuta je i nakupina kolesterola (engl. *lipid raft*) u koju je usidren protein glikozil-fosfatidilinozitol.



Slika 1. Shematski prikaz primjera biološke membrane¹

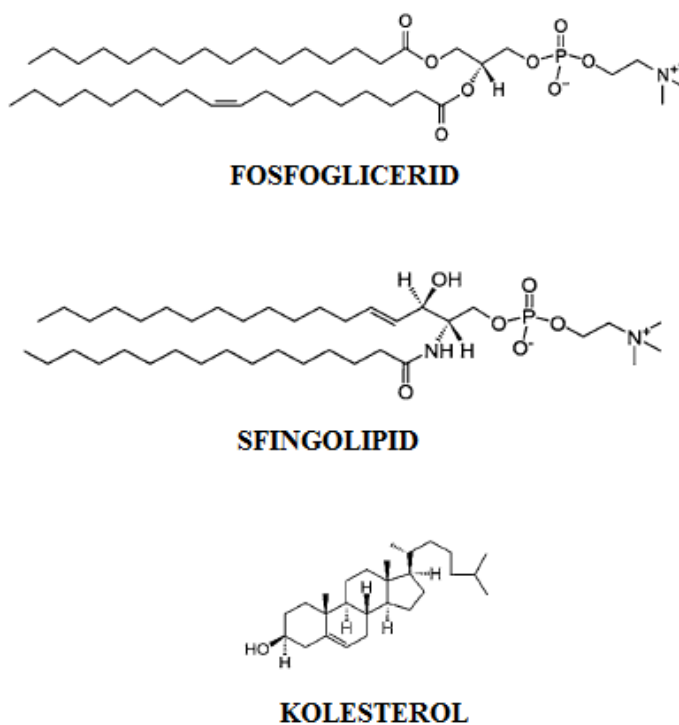
Lipidi su amfifilne molekule koje se sastoje od hidrofobnog ugljikovodičnog lanca i hidrofilne glave koja sadrži nabijenu/e funkcijsku/e skupinu/e; npr. u fosfokolinskim lipidima hidrofilnu glavu čine fosfatna PO_4^{3-} i kolinska ($-N(CH_3)_3^+$) skupina. U vodi spontano stvaraju agregate u kojima su ugljikovodični lanci okrenuti jedni prema drugima, a polarna glava

prema vodi (slika 2). Ovisno o koncentraciji lipida te o temperaturi, tlaku i pH medija lipidi mogu stvarati različito strukturirane agregate: monomere (pri izrazito niskim koncentracijama), micelle te dvosloje.³



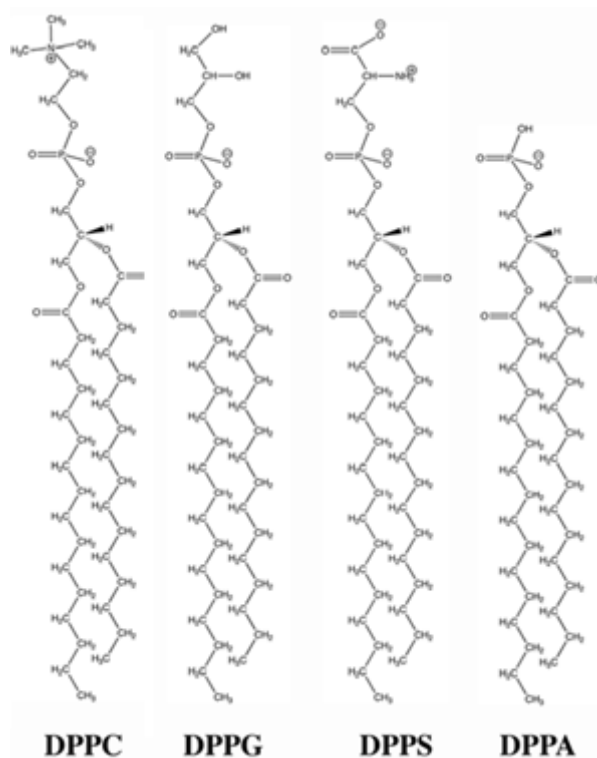
Slika 2. Shematski prikaz lipida i lipidnih agregata³

U najzastupljenije membranske lipide ubrajaju se fosfolipidi (fosfogliceridi), sfingolipidi i steroli (kolesterol) (slika 3).¹³



Slika 3. Prikaz tri osnovne skupine membranskih proteina: fosfoglicerid kao 1-oleoil-2-palmitoil-fosfatidilkolin, sfingolipid kao *N*-palmitoil sfingomijelin⁸

Kod fosfolipida polarne glave sadrže: i) fosfatnu skupinu koja je pri fiziološkim pH-vrijednostima negativno nabijena¹⁴ te ii) polarnu skupinu poput fosfatne kiseline (engl. *phosphatidic acid*, PA), kolina (PC engl. *phosphocholine*), serina (PS engl. *phosphoserine*) ili glicerola (PG engl. *phosphoglycerol*)¹ (slika 4). Kod najzastupljenijih fosfolipida u biološkim membranama (fosfoglicerida) na dva mjesta glicerolne okosnice vezani su lanci masnih kiselina od kojih je na položaju *sn*-1 vezana zasićena, a na položaju *sn*-2 nezasićena masna kiselina. Duljina lanaca masnih kiselina može varirati od 14 do 24 atoma ugljika, a stupanj nezasićenosti može imati do najviše 6 dvostrukih kovalentnih veza u lancu.¹⁵



Slika 4. Strukturne formule fosfolipida s različitim polarnim glavama¹

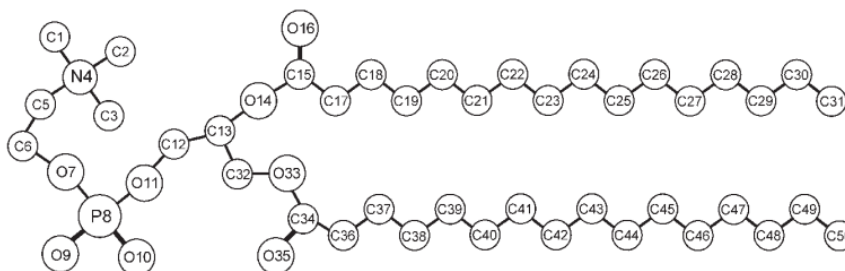
Sfingomijelin je fosfolipid prisutan u membranama koje nisu derivirane iz glicerola (slika 3). Njegovu okosnicu čini sfingozin, aminoalkohol koji sadrži dugi, nezasićeni ugljikovodični lanac, koji je povezan s masnom kiselinom amidnom vezom. Primarna hidroksilna skupina sfingozina je esterificirani fosforilkolin.¹⁶

Treća skupina važnih membranskih lipida su steroli od kojih je najpoznatiji kolesterol (slika 3). Molekule kolesterola umetnute između molekula fosfolipida sprječavaju jaku interakciju susjednih lanaca masnih kiselina, a istodobno održavaju normalnu dinamiku i funkciju membrana u slučajevima promijenjenih temperaturnih ili drugih uvjeta.¹⁵

2.2. Modelne lipidne membrane

Jedan od najistraživanijih modelnih fosfolipida je 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfokolin (engl. *1,2-dipalmitoyl-sn-glicero-3-phosphatidylcholine*, DPPC) koji sadrži dva lanca palmitinske kiseline (engl. *palmitic acid*, PA) i čija polarna glava ima jednak broj pozitivnog i negativnog naboja pri fiziološkim pH-vrijednostima (slika 5). DPPC se pri

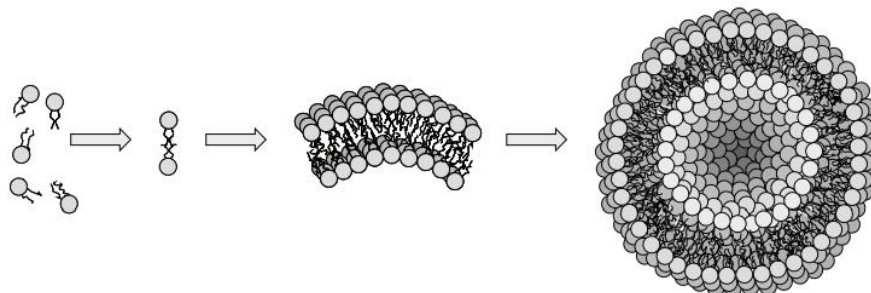
sobnim uvjetima (25 °C) nalazi u fazi L_{β} , pri fiziološkim uvjetima (37 °C) je u P_{β} fazi, a u L_{α} fazu prelazi pri 41,3 °C.¹⁷



Slika 5. Prikaz DPPC-a¹⁷

2.2.1. Liposomi

Liposomi su sferne tvorevine nastale samoorganizacijom molekula lipida u vodenom mediju (slika 6).¹⁸ Kao modelne lipidne membrane često se priređuju u obliku jednostrukih odnosno višestrukih lipidnih dvosloja.

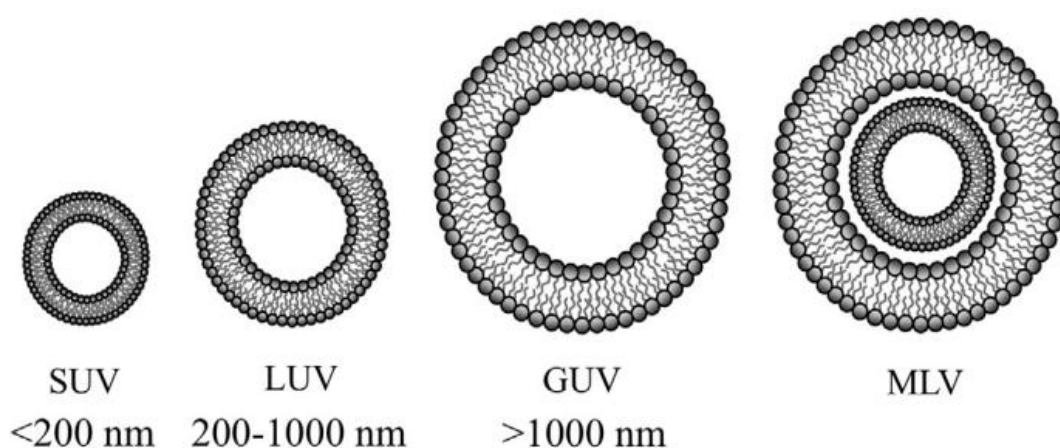


Slika 6. Shematski prikaz nastajanja liposoma¹⁹

Liposomi se dijele u dvije skupine (slika 7):

- 1) Unilamelarne liposome (engl. *unilamellar vesicles*, UV) koji sadrže jedan hidrirani lipidni dvosloj, a prema veličini se dijele na:
 - a) male unilamelarne liposome (engl. *small unilamellar vesicles*, SUV), promjera 20–100 nm,
 - b) velike unilamelarne liposome (engl. *large unilamellar vesicles*, LUV) promjera 100–1000 nm te

- c) vrlo velike unilamelarne liposome (engl. *giant unilamellar vesicles*, GUV) promjera većeg od 1 000 nm
- 2) Oligolamelarne liposome (engl. *oligolamellar vesicles*, OLV) koji sadrže nekoliko koncentričnih lipidnih dvosloja okruženih vodenim medijem
- 3) Multilamelarne liposome (engl. *multilamellar vesicles*, MLV) odnosno višestruke hidrirane lipidne dvosloje koje karakterizira postojanje velikog broja koncentričnih lipidnih dvosloja razdvojenih slojevima vodenog medija. Veličina im se kreće od 1000 do 2000 nm.²⁰



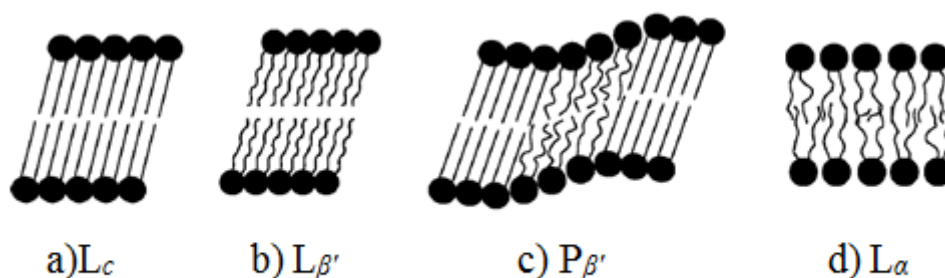
Slika 7. Klasifikacija liposoma prema veličini i broju fosfolipidnih dvosloja³⁷

Jedan od najpoznatijih načina pripreme višestrukih hidriranih lipidnih dvosloja DPPC-a uključuje:⁸ i) otapanje lipida (najčešće krutog uzorka) u organskom otapalu (najčešće u CHCl_3), ii) pipetiranje određenog volumena otopine (koja sadrži određenu količinu, tj. masu lipida) u tikvicu, iii) uparavanje organskog otapala do suha (dok se ne dobije film lipida), iv) hidrataciju željenim medijem, v) naizmjeničnu intenzivnu trešnju (engl. *vortex*), grijanjem u vrućoj kupelji te hlađenjem u ledenoj kupelji (ponoviti minimalno 3 puta). Radi postizanja jednolike veličine liposoma te SUV-ova radi se i sonikacija (no to nije potrebno u sklopu izrade ovog diplomskog rada).²¹

2.2.2. Fazni prijelazi membranskih lipida

Dvosloj DPPC lipida može se naći u nekoliko različitih faza ovisno o temperaturi, tlaku te hidrataciji (slika 8). Pri niskim temperaturama DPPC se nalazi u kristalnoj fazi (L_c)

(slika 8.a), koja tijekom zagrijavanja prelazi u fazu $L_{\beta'}$ (slika 8.b). U toj je fazi dvosloj više hidratiziran nego u L_c fazi i molekule lipida su nagnute pod određenim kutom (30°) (otud oznaka \cdot).²² Nastavkom zagrijavanja dvosloj DPPC lipida prelazi iz $L_{\beta'}$ u $P_{\beta'}$ fazu; taj se prijelaz, karakterističan po pojavi valova na površini dvosloja, naziva pretprijelazom i opaža se pri temperaturi pretprijelaza T_p ($33,5^\circ\text{C}$)²³ (slika 8.c). Spomenuti prijelaz je znatno izraženiji kod višestrukih (MLV) nego jednostrukih (SUV) lipidnih dvosloja.³ Daljnjim porastom temperature dolazi do promjene konformacije metilenskih skupina iz *trans* u *gauche*, odnosno dolazi do izomerizacije C–C veza u ugljikovodičnim lancima. Spomenuta pojava je ujedno glavna karakteristika prijelaza DPPC-a u L_α fazu (slika 8.d). Prijelaz iz $L_{\beta'}$, odnosno $P_{\beta'}$ u L_α fazu se također naziva i glavnim faznim prijelazom i opaža se pri temperaturi mekšanja (T_m) (41°C).^{22,37}



Slika 8. Shematski prikaz faza lipidnih membrane prilikom povećanja temperature²²: a) kristalna faza (L_c); b) faza gela ($L_{\beta'}$); c) valovita faza ($P_{\beta'}$); d) fluidna faza (L_α)

Vrijednosti T_m za lipide različitih duljina lanaca variraju jer su one, u prvom redu, funkcija van der Waalsovih interakcija među ugljikovodičnim lancima. Zbog toga prisutnost dvostrukih veza u lancima kod npr. 1-palmitoil-2-oleoil-glicero-3-fosfokolina (engl. *1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholine*, POPC) značajno smanjuje T_m jer ugljikovodični lanci ne mogu biti gusto slagani kao kod DPPC-a ($T_m = -2^\circ\text{C}$)²⁴. Utjecaj polarne skupine lipidnih molekula, odnosno njihove međusobne interakcije, kao i one s vodom, predstavljaju sekundarni faktor u veličini T_m pojedinog lipida. Primjerice, 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamin (engl. *1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine*, DPPE) ima jednake ugljikovodične lance kao i DPPC, no zbog

interakcija koje stvaraju amino-skupinu ($-\text{NH}_3^+$) u odnosu na kolinsku skupinu ($-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$) njegova T_m je znatno viša ($T_m(\text{DPPE}) = 63 \text{ }^\circ\text{C}$).³

Dodatak malih organskih molekula u dvosloj DPPC-a utječe na pojavnost i temperature pojedinih faznih prijelaza.³ Primjerice, ugradnjom palmitinske kiseline (engl. *phosphatidic acid*, PA) ne samo da se mijenjaju T_p i T_m u odnosu na MLV čistog DPPC-a, već se, pri većim količinama PA ugrađene u dvosloj, pretprijelaz više ne može vidjeti iz DSC krivulje.^{10,25} Utjecaj ugrađene PA na pretprijelaz višestrukih lipidnih dvosloja DPPC-a dodatno se može očitovati i promjenom pH medija u kojem je DPPC suspendiran budući da PA može biti protonirana (COOH) ili deprotonirana (COO^-). U vodenom mediju njezina pK_a vrijednost je 4,75, dok je u membrani, kad je množinski udio (x) ugrađene PA oko 10 %, pK_a vrijednost oko 7,7.²⁶

2.3. Instrumentalne tehnike određivanja temeprature faznog prijelaza

Fazni prijelazi lipida samoorganiziranih u liposome mogu se mjeriti različitim načinima pri čemu primarno mjesto tradicionalno zauzima razlikovno-pretražna kalorimetrija (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC) jer daje termodinamičke podatke karakteristične za pojedini fazni prijelaz.⁴ Međutim, i spektroskopske tehnike poput FT-IR spektroskopije mogu dati važne informacije koje se događaju na molekulskoj razini prilikom pojedinog faznog prijelaza⁸ pa upravo ova tehnika, djelomično upotpunjena DSC-om, zauzima središnje mjesto u ovom diplomskom radu.

2.3.1. Razlikovno-pretražna kalorimetrija

Razlikovno-pretražna kalorimetrija (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC) je jedna od najčešće korištenih tehnika pomoću koje se određuju termička svojstva materijala.²⁷ 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,²⁸ a DSC mjeri apsorbiranu odnosno otpuštenu toplinu iz materijala kao funkciju temperature. Time je omogućeno određivanje termodinamičkih veličina poput temperature faznih prijelaza (T_p i T_m), ali i promjene specifičnog toplinskog kapaciteta (Δc_p) uslijed pojedinog faznog prijelaza.²⁹ Temperatura

faznog prijelaza se može odrediti na dva načina: iz ekstrapolirane temperature početka signala (engl. *onset*) DSC krivulje koja ne ovisi o brzini zagrijavanja (T_{onset})³⁰ te iz maksimuma krivulje (T_{maks}) pri kojoj je 50 % molekula lipida već prošlo kroz dani fazni prijelaz. U ovom će se diplomskom radu iskazivati temperature faznih prijelaza određene na oba načina jer je u značajnom broju radova T_m DPPC-a iskazana preko T_{maks} .⁴

Važno je naglasiti da uzorak koji se analizira DSC-om obavezno prolazi minimalno dva ciklusa grijanja i hlađenja; budući da prvo zagrijavanje uzorka, osim termodinamičkih (i kinetičkih) svojstava uzorka sadrži i njegovu termalnu povijest, spomenuta svojstva uzorka se obično tumače iz drugog zagrijavanja uzorka.²⁸

2.3.2. Infracrvena spektroskopija

2.3.2.1. Osnove FT-IR spektroskopije

Infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama (FT-IR) je jedna od najstarijih i najčešće korištenih tehnika u identifikaciji spojeva budući da različiti spojevi, izuzev enantiomera te homomolekulskih diatomnih molekula, daju različit FT-IR spektar.³¹ Među ostalim, njena velika prednost se iskazuje u mogućnosti istraživanja različitih spojeva (anorganski, organski, biološki) na različite načine (u čvrstom, tekućem i plinovitom stanju).³² Energija IR zračenja proteže se od 14000 cm^{-1} do 20 cm^{-1} i dijeli se na: blisko infracrveno područje od 14000 cm^{-1} do 3600 cm^{-1} (engl. *near-infrared*, NIR), srednje infracrveno područje od 3600 cm^{-1} do 200 cm^{-1} (engl. *mid-infrared*, MIR) i daleko infracrveno područje od 200 cm^{-1} do 20 cm^{-1} (engl. *far-infrared*, FIR).³³

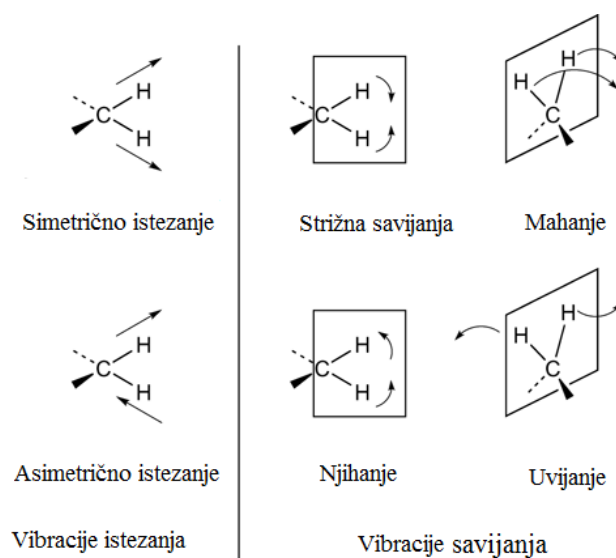
FT-IR spektar je posljedica promjene vibracijske (i rotacijske) energije molekule uslijed apsorpcije IR zračenja i bilježi se kao vrpca određenog intenziteta čiji se maksimum nalazi na određenom valnom broju ($\tilde{\nu}$). Položaj vrpce u spektru karakterističan je za način vibriranja (normalni mod) određene funkcijske skupine, a ovisi o jačini veze između atoma te o masi atoma sa svake strane veze:

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

pri čemu je $\tilde{\nu}$ valni broj (recipročna vrijednost valne duljine (λ) izražena mjernom jedinicom cm^{-1}), k konstanta veze, μ reducirana masa, a c brzina svjetlosti u vakuumu koja iznosi

približno 3×10^8 m/s. Intenzitet vrpce ovisi o promjeni dipolnog momenta molekule koja se događa uslijed apsorpcije zračenja (odnosno uslijed promjene vibracijske energije).³³

Molekulske vibracije troatomne molekule koje ostavljaju otisak u FT-IR spektru se općenito dijele na istežanja (engl. *stretching*) i svijanje (engl. *bending*). Vibracije istežanja uključuju promjenu duljine veze, dok vibracije savijanja uključuju promjenu kuta veze (engl. *bond angle*) (slika 9). Vibracije istežanja su vibracije duž kemijske veze, a mogu biti simetrične i antisimetrične. Vibracije savijanja uzrokuju promjenu kuta između kemijskih veza u molekuli. U slučaju troatomnih molekula ili funkcijskih skupina, koje se sastoje od dva atoma jedne vrste vezane na središnji atom druge vrste, vibracije svijanja su: njihanje, strižna savijanja, uvijanje i mahanje (slika 9).³⁴ Za složenije molekulske strukture, vibracije deformacije dijele se na svijanja u ravnini i izvan ravnine.

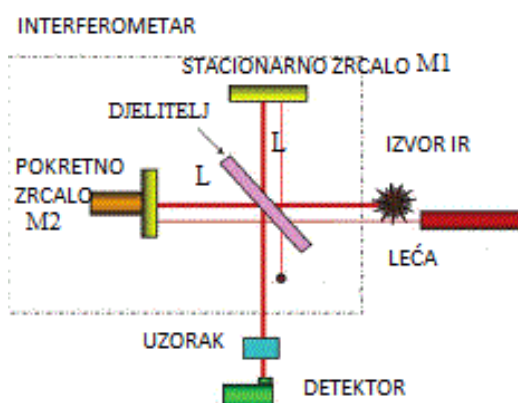


Slika 9. Prikaz vibracija istežanja i vibracija savijanja³⁴

2.3.2.2. FT-IR spektrometar

Glavni dijelovi FT-IR spektrometra su: izvor zračenja, interferometar i detektor (slika 10.) Izvor zračenja uglavnom je globarov štapić načinjen od silicijeva karbida u obliku štapića ili spirale, koji zagrijavanjem oko 1500 K emitira infracrveno zračenje. Zračenje dolazi do interferometra u kojem ga dijelitelj zrake dijeli na dva snopa: jedan snop pada na nepokretno, a drugi na pomično zrcalo koje se kreće određenom brzinom. Nakon odbijanja od zrcala snopovi zračenja se vraćaju na djelitelj zrake gdje interferiraju (konstruktivno ili destruktivno, ovisno o tome u kojoj su fazi), prolaze kroz uzorak i dolaze do detektora koji

optičke signale pretvara u električne. Sve frekvencije infracrvenog izvora na detektor padaju istovremeno što je velika prednost u odnosu na disperzivne spektrometre u kojima se frekvencije infracrvenog zračenja detektiraju jedna po jedna, čime se vrijeme snimanja spektra produljuje. U konačnici se na detektoru registrira signal, odnosno dobiva se interferogram, a primjenom matematičkih operacija, odnosno Fourierovih transformacija, iz interferograma se dobiva FT-IR spektar.³³



Slika 10. Konstrukcija FT-IR spektrometra³³

2.3.2.3. FT-IR spektroskopija u određivanju faznih prijelaza lipida

Za određivanje temperature faznih prijelaza lipida najčešće se promatraju istežanja metilenske skupine (slika 9).³³ Konkretno, promjenom konformacije metilenske skupine ($-\text{CH}_2-$) ugljikovodičnih lanaca iz *trans* u *gauche* (tj. prilikom glavnog faznog prijelaza) dolazi do značajnog pomaka vrpce koje proizlaze iz antisimetričnog ($\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$) te simetričnog ($\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$) istežanja CH_2 skupine i koje apsorbiraju pri oko 2920 cm^{-1} i 2850 cm^{-1} . Vrpce CH_2 strižnog uvijanja i njihanja (pri 1470 cm^{-1} i 720 cm^{-1}) također se djelomično koriste kod određivanja temperatura faznih prijelaza jer je njihov položaj iznimno osjetljiv na lateralno slaganje lipidnih molekula.⁴

Prilikom promjene faze ne mijenjaju se samo signali koji potječu od ugljikovodičnih lanaca, već i oni koji su posljedica istežanja karbonilne skupine glicerolne okosnice ($\nu\text{C}=\text{O}$) s maksimumom apsorpcije pri oko 1700 cm^{-1} te antisimetričnog ($\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-$) i simetričnog ($\nu_{\text{s}}\text{PO}_2^-$) istežanja PO_2^- skupine s maksimumima pri $\sim 1230\text{ cm}^{-1}$ te $\sim 1080\text{ cm}^{-1}$.⁵ Štoviše, promjene u spomenutim signalima također ukazuju i na to u kojoj mjeri vrpce, koje opisuju

načine vibriranja polarnih glava lipida, odražavaju pojedini fazni prijelaz. U ovom diplomskom radu posebna će se pažnja posvetiti analizi vrpce koje potječu od $v_s\text{CH}_2$ i $v_{as}\text{PO}_2^-$.

2.3.3. Dinamičko raspršenje svjetlosti

Dinamičko raspršenje svjetlosti (engl. *dynamic light scattering*, DLS) je tehnika koja se koristi za mjerenje veličine čestica na temelju njihovog Brownovog gibanja. Brownovo gibanje je nasumično kretanje čestica zbog sudaranja s molekulama otapala. Na brzinu Brownovog gibanja utječu: veličina čestice, viskoznost uzorka i temperatura. Što je manja čestica, brzina Brownovog gibanja postaje veća i obrnuto; također viša temperatura ubrzava Brownovo gibanje. Prema Stokes-Einsteinovom izrazu brzina Brownovog gibanja je definirana translacijskim difuzijskim koeficijentom, te se pomoću izraza može izračunati hidrodinamički promjer čestice:

$$D_H = \frac{kT}{3\pi \eta D}$$

gdje je D_H hidrodinamički promjer, k Boltzmannova konstanta, T apsolutna temperatura, η koeficijent viskoznosti, a D difuzijski koeficijent.

Komponente DLS sustava su:

1. Izvor svjetlosti, najčešće laser (HeNe, u čvrstom stanju ili diodni laser)
2. Čelija za uzorak, najčešće cilindrična kiveta s promjerom između 10–30 mm, te ako je moguće s termostatom
3. Detektor, fotomultiplikatorska cijev (ili vrlo osjetljiva lavinska fotodioda (engl. *avalanche photo diode*, APD)) te uz nju povezana optika³⁵

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

Kemikalije koje su se koristile u eksperimentima za ovaj diplomski rad su: 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfokolin (DPPC, 99 % čistoće, Avanti polar lipids), palmitinska kiselina (PA, p.a., Kemika), kloroform (CH_3Cl , p.a., Gram-Mol), acetatni pufer (pH = 4,0 i pH = 5,0) sastava: octena kiselina (CH_3COOH , p.a., Kemika) i natrijev acetat (CH_3COONa , p.a., Kemika), fosfatni pufer (pH = 6,0, pH = 6,9, pH = 7,3) sastava: natrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4 , > 99 % čistoće, Alfa Aesar), natrijev dihidrogenfosfat (NaH_2PO_4 , p.a., Fluka) te karbonatni pufer (pH = 9,1) sastava: natrijev karbonat (Na_2CO_3 , p.a., Kemika), natrijev hidrogenkarbonat (NaHCO_3 , p.a., Gram-Mol). Svi puferi su priređeni u trostruko destiliranoj vodi i njihova ionska jakost iznosi $I = 100 \text{ mol L}^{-3}$.

3.2. Priprema uzoraka

3.2.1. Uzorci za FT-IR spektroskopiju

Izvagano je 292 mg DPPC praha i otopljeno u 5 mL kloroforma (CHCl_3). Dobivena otopina korištena je za pripremu DPPC multilamelarnih liposoma bez prisutnosti i u prisutnosti PA. Filmovi DPPC-a bez PA pripremljeni su na način da je pipetirano 500 μL spomenute otopine DPPC i upareno u tikvici na rotacijskom uparivaču. Dobiveni filmovi su suspendirani u puferima sljedećih pH-vrijednosti: 4,0 i 5,0 (acetatni pufer), 6,0, 6,9 i 7,3 (fosfatni pufer) i 9,1 (karbonatni pufer) tako da je dodano 600 μL pojedinog pufera u tikvicu, nakon čega slijedi uzastopno intenzivno miješanje, zagrijavanje u vrućoj vodenoj kupelji na 80 °C i hlađenje u ledenoj kupelji u barem 3 ciklusa, dok nije dobivena suspenzija. Masena koncentracija lipida u DPPC-u iznosila je 48,7 mg/mL.

Otopljeno je 211 mg PA u 100 mL kloroforma (CHCl_3). Pipetirano je 500 μL DPPC otopine i 100 μL priređene otopine PA u istu tikvicu. Nakon uparavanja otapala na rotacijskom uparivaču i dobivanja suhih filmova DPPC + PA, priređene su njihove suspenzije u puferima različitih pH-vrijednosti na isti način kao i za čiste DPPC liposome (prethodni

odlomak). Masena koncentracija lipida u DPPC + PA iznosila je 292 mg/mL, dok je monožinski udio PA iznosio 2 %.

3.2.2. *Uzorci za DSC*

Priprema uzorka za razlikovno-pretražnu kalorimetriju (DSC) identična je gore navedenoj pripremi uzorka za FT-IR spektroskopiju (3.2.1). Ukratko, za pripremu DPPC filma otopljeno je 15 mg DPPC praha u 250 μ L kloroforma. Nakon uparavanja kloroforma film DPPC-a suspendiran je u 3 mL fosfatnog pufera pH-vrijednosti 6,9. Liposomi DPPC-a s ugrađenom PA priređeni su na analogan način, tj. pomiješana je otopina DPPC-a u kloroformu (15 mg DPPC praha u 250 μ L kloroforma) s prethodno priređenom otopinom PA u kloroformu (150 μ L otopine PA tako da je koncentracija DPPC-a u priređenim uzorcima bila \sim 5 mg/mL, a množinski udio PA (x) je iznosio 2 %. Dodatni korak je otplinjavanje u komori tijekom 15 minuta, u svrhu uklanjanja zraka iz uzorka koji može utjecati na DSC krivulju.

3.2.3. *Uzorci za DLS*

Za mjerenje veličine pripremljenih multilamelarnih liposoma korištene su suspenzije koje su priređene za DSC mjerenja (DPPC (+PA)) u puferu (pH = 6,9) koje su dodatno razrijeđene (odgovarajućim puferom) tako da je koncentracija DPPC iznosila 0,3 mg/mL.

3.3. Mjerne tehnike

3.3.1. *Mjerenje FT-IR spektara*

FT-IR spektri suspenzija DPPC u odsutnosti i prisutnosti PA snimljeni su pomoću ABB Bomem MB102 FT-IR spektrometra opremljenog optikom od CsI i DTGS detektorom. FT-IR spektri uzoraka (i suspenzija i pripadajućih pufera) su mjereni u dvjema ćelijama s prozorima od CaF₂ debljina $d = 25 \mu\text{m}$ i $d = 50 \mu\text{m}$. Ćelija je smještena unutar metalnog plašta čija je temperatura regulirana pomoću grijača Specac 3000 Series. Otprilike 150 μ L uzorka (suspenzije, odnosno pufera) je unešeno u ćeliju pomoću pipete pazeći da ne uđe zrak. Nakon postignute željene temperature snimljeni su spektri uzoraka. Spektri su snimani u temperaturnom intervalu od 30 °C do 51 °C uz brzinu zagrijavanja od 1 °C/min. Svaki uzorak je mjeran tri puta (tri neovisna punjenja ćelije). Razlučivanje pri kojoj su snimljeni spektri

iznosilo je 8 cm^{-1} , a broj snimljenih snimaka za spektar bio je 10. Dobiveni FT-IR spektri su analizirani pomoću programa Origin 8.5 i Spectragryph v1.2.11.



Slika 11. Korišteni IR spektrometar ABB Bomem MB102 i visokotemperaturni grijač Specac 3000 Series (fotografirano u Laboratoriju za biomolekularne interakcije i spektroskopiju Zavoda za organsku kemiju i biokemiju IRB-a)

3.3.2. Mjerenje DSC krivulja

Za kalorimetrijska mjerenja suspenzija korišten je mikrokalorimetar Nano-DSC, TA Instruments, New Castle, USA. Budući da su DSC podaci za DPPC (+PA) suspenzije već dokumentirani i poznate su temperature faznih prijelaza,^{25,10} jedan set suspenzija (DPPC te DPPC+PA u puferu pH = 6,9) koristit će se kao kontrola za T_m i T_p određene analizom FT-IR spektara. Volumen ćelije za uzorke je $300 \mu\text{L}$. Uzorci su snimani u temperaturnom intervalu od $10 \text{ }^\circ\text{C}$ do $80 \text{ }^\circ\text{C}$ uz brzinu zagrijavanja $1 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$. Svaki uzorak je izmjeren tri puta u dva ciklusa grijanja i hlađenja (osim pufera koji je izmjeren jednom u dva ciklusa grijanja i hlađenja). (DSC krivulje oba ciklusa prikazane su na slici D1 u Dodatku). DSC krivulje iz drugog zagrijavanja su analizirane na način da je prvo oduzeta DSC krivulja pufera iz odgovarajućeg koraka grijanja da bi se nakon toga provela očitavanja temperature faznih prijelaza (i iz *onseta* i iz maksimuma DSC krivulje).



Slika 12. Mikrokalorimetar Nano-DSC, TA Instruments, New Castle, USA (fotografirano u Laboratoriju za biomolekularne interakcije i spektroskopiju Zavoda za organsku kemiju i biokemiju IRB-a)

3.3.3. *Određivanje veličine suspendiranih čestica*

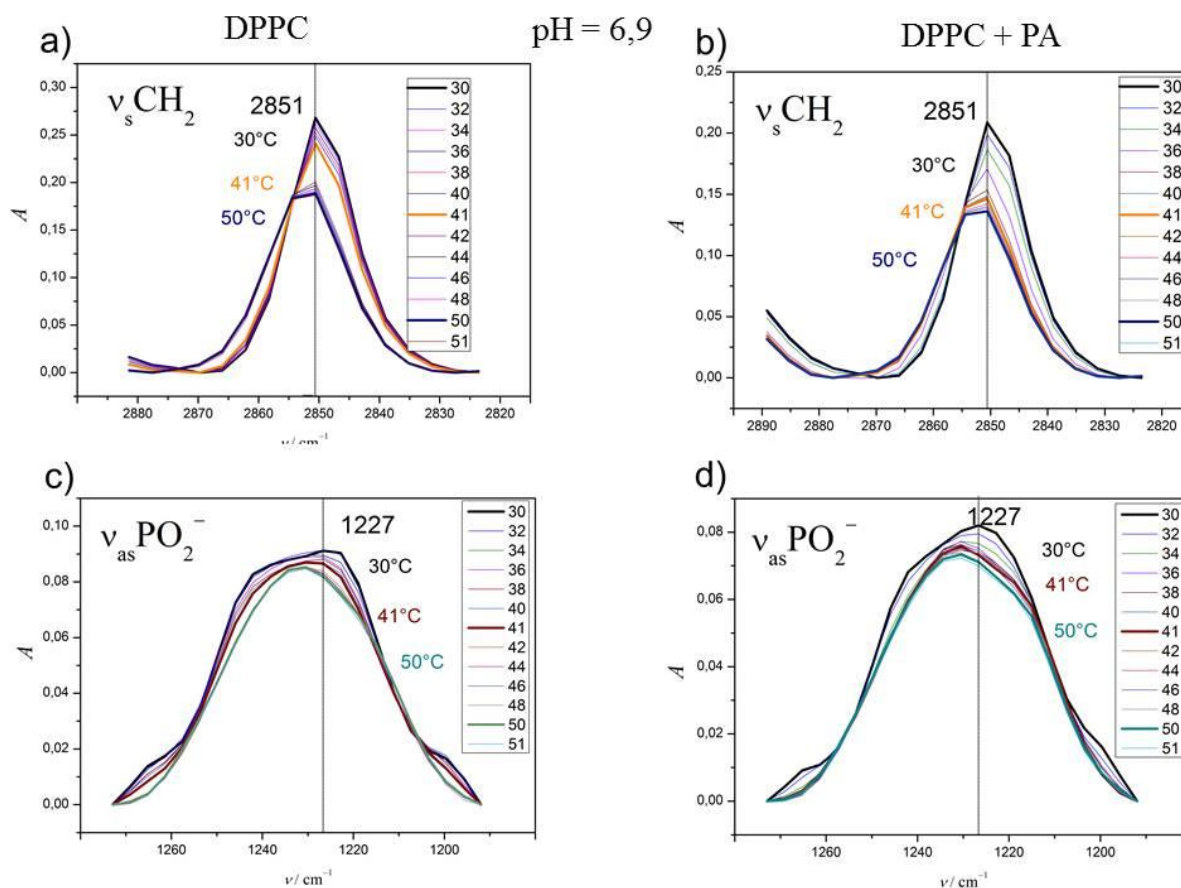
Veličina pripremljenih DPPC (+PA) liposoma u puferu pH = 6,9 izmjerena je uređajem Zetasizer Ultra, Malvern Panalytical, Velika Britanija, opremljenim s crvenim He/Ne laserom koji emitira zračenje valne duljine 632,8 nm maksimalne snage 10 mW. Mjerenje veličine čestica provedeno je pod kutem od 173°, uz fotodiodu kao detektor. Prosječna veličina liposoma je $D_H = 1000 \pm 200$ nm.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Analiza FT-IR spektara

Pri određivanju T_m i T_p vrijednosti DPPC-a u odsutnosti i prisutnosti PA analizirana su spektralna područja u kojima se nalaze vrpce koje potječu od simetričnog istežanja metilenske skupine ($\nu_s\text{CH}_2$) i antisimetričnog istežanja PO_2^- skupine ($\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-$); drugim riječima, analizirano je područje od 2980 do 2924 cm^{-1} ($\nu_s\text{CH}_2$) i od 1273 do 1190 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-$). Nakon korekcije bazne linije u spomenutom spektralnom području očitane su vrijednosti apsorbancija pri valnim brojevima 2851 cm^{-1} ($\nu_s\text{CH}_2$), odnosno 1227 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-$).

U nastavku teksta prikazani su i detaljnije diskutirani podatci dobiveni na temelju FT-IR spektara suspenzija DPPC (+PA) suspendiranih u fosfatnom puferu $\text{pH} = 6,9$ te pripadajućih DSC krivulja (slika 14, tablica 1). Temperature faznih prijelaza ostalih suspenzija određene su na temelju FT-IR spektara te navedene u tablici 1 (slike D2–D6 u Dodatku).



Slika 13. FT-IR spektri suspenzija DPPC i DPPC+PA pri pH-vrijednosti 6,9 u temperaturnom intervalu od 30 °C do 51 °C s istaknutim valnim brojevima maksimuma apsorpcije u sljedećim spektralnim područjima: a) $\nu_s \text{CH}_2$ za DPPC ($\tilde{\nu}_{\text{maks}} = 2851 \text{ cm}^{-1}$), b) $\nu_s \text{CH}_2$ za DPPC + PA ($\tilde{\nu}_{\text{maks}} = 2851 \text{ cm}^{-1}$), c) $\nu_{as} \text{PO}_2^-$ za DPPC ($\tilde{\nu}_{\text{maks}} = 1227 \text{ cm}^{-1}$), d) $\nu_{as} \text{PO}_2^-$ za DPPC+PA ($\tilde{\nu}_{\text{maks}} = 1227 \text{ cm}^{-1}$).

Na slici 13 vidljiv je pad intenziteta vrpce DPPC-a (tj. spektralnih potpisa) uslijed porasta temperature. Uz to, nagli pomak maksimuma $\nu_s \text{CH}_2$ vrpce prema višim valnim brojevima opažen je pri temperaturi koja se podudara s T_m , dok se oblik $\nu_{as} \text{PO}_2^-$ vrpce mijenja s porastom temperature (naročito pri T_m) zbog značajne promjene mreže vodikovih veza u koju su uključene fosfatne skupine, u skladu s literaturnim podacima.⁴¹ Ovisnost apsorpcije vrpce $\nu_s \text{CH}_2$ i $\nu_{as} \text{PO}_2^-$ pri 2851 cm^{-1} i 1227 cm^{-1} o temperaturi daje krivulje koje pokazuju diskontinuitete pri određenim temperaturama, a njihove točke infleksije odgovaraju temperaturama faznih prijelaza.

Prije navođenja temperatura faznih prijelaza DPPC / DPPC+PA suspenzija određenih analizom $v_s\text{CH}_2$ i $v_{as}\text{PO}_2^-$ vrpce ukratko će se predstaviti način njihova označavanja:

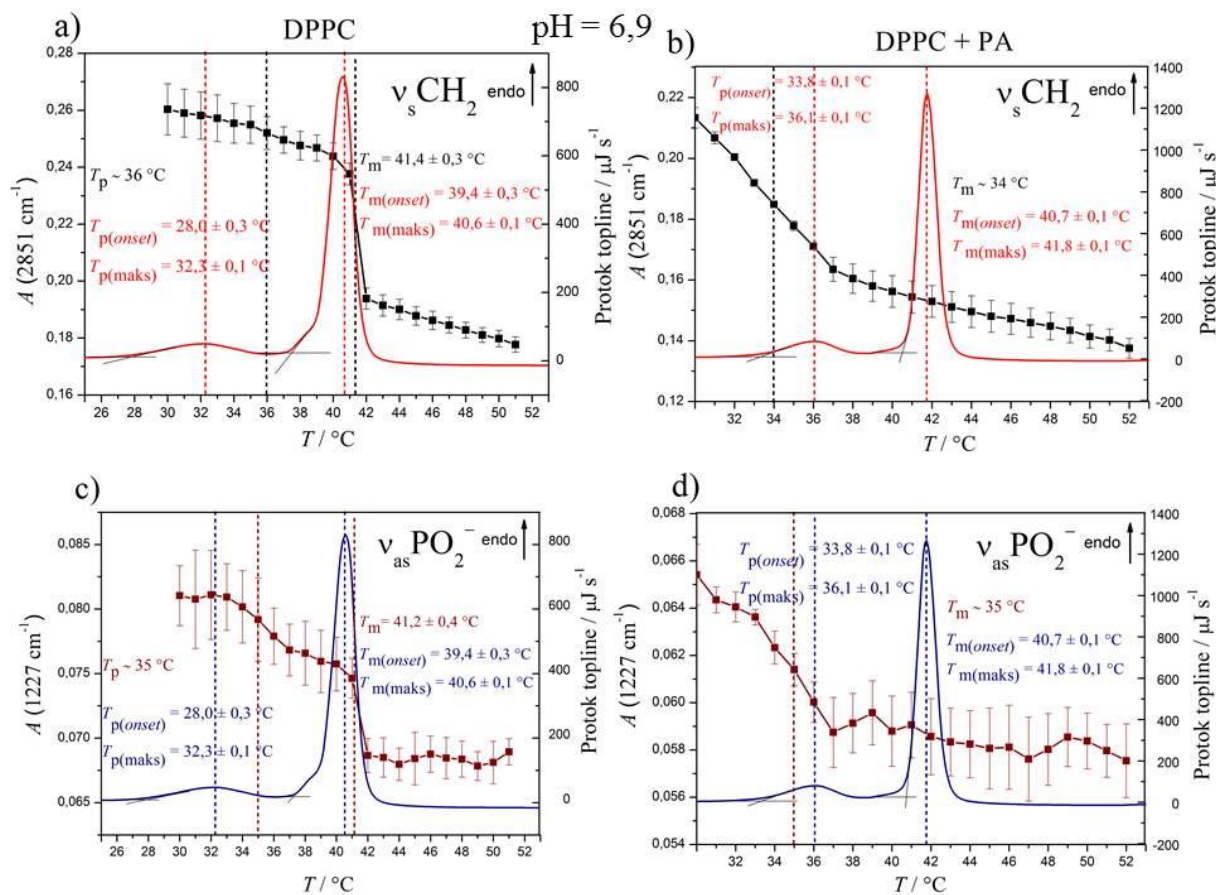
i) u slučaju prilagodbe dobivene krivulje (A u ovisnosti o $T / ^\circ\text{C}$) na sigmoidalnu (Boltzmannovu) funkciju, čime se dolazi do točke infleksije,⁸ navest će se temperatura faznog prijelaza u obliku $ab(c) \pm d(e) ^\circ\text{C}$ (što se isključivo odnosi na T_m),

ii) oznaka \sim znači da je vrijednost procijenjena (vrijedi za određivanje i T_p i T_m),

iii) znak $-$ znači da se T_p ne može procijeniti, tj. izdvojiti.

Za suspenzije DPPC / DPPC+PA u puferu pH = 6,9 točke infleksije dobivene analizom $v_s\text{CH}_2$ vrpce opažene pri $\sim 36 ^\circ\text{C}$ / $-$ pripisane su T_p , a one koje su opažene pri $41,4 \pm 0,3 ^\circ\text{C}$ / $\sim 34 ^\circ\text{C}$ pripisane su T_m ; analogne vrijednosti dobivene analizom $v_{as}\text{PO}_2^-$ vrpce opažene pri $\sim 35 ^\circ\text{C}$ / $-$ pripisane su T_p , a one opažene pri $41,2 \pm 0,4 ^\circ\text{C}$ / $\sim 35 ^\circ\text{C}$ pripisane su T_m (slika 14). Budući da je diskontinuitet svih krivulja znatno naglašeniji pri temperaturama koje se podudaraju s T_m (odnosno proglašene su T_m), značajnije promjene na molekularnoj razini se očekivano događaju uslijed $P_{\beta'} \rightarrow L_\alpha$ prijelaza višestrukih hidriranih dvosloja DPPC-a nego uslijed $L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta'}$ prijelaza.⁸

Analizom DSC krivulje suspenzije čistog DPPC-a pri drugom grijanju, temperature faznih prijelaza očitane iz *onseta* (i maksimuma) DSC krivulje su: $T_p = 28,0 \pm 0,3 ^\circ\text{C}$ ($32,3 \pm 0,1 ^\circ\text{C}$) te $T_m = 39,4 \pm 0,3 ^\circ\text{C}$ ($40,6 \pm 0,1 ^\circ\text{C}$). Dodatkom PA temperature faznih prijelaza se ponešto mijenjaju i postaju: $T_p = 33,8 \pm 0,1 ^\circ\text{C}$ ($36,1 \pm 0,1 ^\circ\text{C}$) te $T_m = 40,7 \pm 0,1 ^\circ\text{C}$ ($41,8 \pm 0,1 ^\circ\text{C}$).



Slika 14. Temperaturna ovisnost apsorbancije FT-IR vrpci DPPC-a u odsutnosti i prisutnosti PA s pripadajućim DSC krivuljama pri pH = 6,9: a) DPPC: $\nu_s \text{CH}_2$ ($\tilde{\nu}_{\text{maks}} = 2851 \text{ cm}^{-1}$); b) DPPC + PA: $\nu_s \text{CH}_2$ ($\tilde{\nu}_{\text{maks}} = 2851 \text{ cm}^{-1}$); c) DPPC: $\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$ ($\tilde{\nu}_{\text{maks}} = 1227 \text{ cm}^{-1}$); d) DPPC + PA: $\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$ ($\tilde{\nu}_{\text{maks}} = 1227 \text{ cm}^{-1}$) (FT-IR – crna i smeđa krivulja, DSC – crvena i plava krivulja)

Tablica 1. Temperature faznih prijelaza (T_{fp} izražena u °C) višestrukih hidriranih dvosloja DPPC (+PA) suspendiranih u puferima različitih pH-vrijednosti (4,0; 5,0; 6,0; 6,9; 7,3; 9,1) određene analizom vrpci $\nu_s\text{CH}_2$ ($\tilde{\nu}_{maks} = 2851 \text{ cm}^{-1}$) i $\nu_{as}\text{PO}_2^-$ ($\tilde{\nu}_{maks} = 1227 \text{ cm}^{-1}$) u FT-IR spektrima te DSC tehnikom (samo za pH = 6,9)

$T_{fp} / ^\circ\text{C}$				
pH	DPPC		DPPC+PA	
	$\nu_s\text{CH}_2$	$\nu_{as}\text{PO}_2^-$	$\nu_s\text{CH}_2$	$\nu_{as}\text{PO}_2^-$
4,0	$T_p = -$	$T_p \sim 34$	$T_p = -$	$T_p \sim 35$
	$T_m = 40,5 \pm 0,4$	$T_m = 40,5 \pm 0,3$	$T_m = 40,9 \pm 0,4$	$T_m = 40,8 \pm 0,6$
5,0	$T_p \sim 36$	$T_p \sim 35$	$T_p = -$	$T_p = -$
	$T_m = 41,5 \pm 0,2$	$T_m = 41,4 \pm 0,2$	$T_m \sim 35$	$T_m \sim 35$
6,0	$T_p \sim 35$	$T_p \sim 35$	$T_p \sim 35$	$T_p \sim -$
	$T_m = 41,3 \pm 0,2$	$T_m = 41,2 \pm 0,1$	$T_m = 40 \pm 2$	$T_m \sim 39$
6,9	$T_p \sim 36$	$T_p \sim 35$	$T_p = -$	$T_p \sim -$
	$T_m = 41,4 \pm 0,3$	$T_m = 41,2 \pm 0,4$	$T_m \sim 34$	$T_m \sim 35$
	$T_{p(onset/maks)} = 28,0 \pm 0,3 / 32,3 \pm 0,1$		$T_{p(onset/maks)} = 33,8 \pm 0,1 / 36,1 \pm 0,1$	
$T_{m(onset/maks)} = 39,4 \pm 0,3 / 40,6 \pm 0,1$		$T_{m(onset/maks)} = 40,7 \pm 0,1 / 41,8 \pm 0,1$		
7,3	$T_p = -$	$T_p \sim 36$	$T_p = -$	$T_p = -$
	$T_m = 41,5 \pm 0,1$	$T_m = 40,5 \pm 0,5$	$T_m \sim 39$	$T_m = 38 \pm 1$
9,1	$T_p \sim 36$	$T_p \sim 35$	$T_p = -$	$T_p \sim 35$
	$T_m = 40,5 \pm 0,3$	$T_m = 40,5 \pm 0,1$	$T_m = 41,1 \pm 0,5$	$T_m = 41,1 \pm 0,3$

Međusobnom usporedbom FT-IR podataka, kao i njihovom usporedbom s DSC podacima, uočavaju se određene pravilnosti, ali i odstupanja. T_p i T_m vrijednosti suspenzija čistog DPPC-a u puferu pH-vrijednosti 6,9 dobivene analizom $\nu_s\text{CH}_2$, odnosno $\nu_{as}\text{PO}_2^-$ vrpce daju gotovo jednake vrijednosti: $T_p \sim 36$ °C, odnosno $T_p \sim 35$ °C i $T_m = 41,4 \pm 0,3$ °C odnosno $T_m = 41,2 \pm 0,4$ °C. Analogno vrijedi i za suspenzije DPPC+PA u istom puferu, uz iznimku očitavanja samo jednog faznog prijelaza koji je proglašen za T_m i procijenjen je na $T_m \sim 34$ °C ($\nu_s\text{CH}_2$), odnosno $T_m \sim 35$ °C ($\nu_{as}\text{PO}_2^-$).

Usporedbom FT-IR i DSC podataka DPPC (+PA) suspenzija dobivenih u puferu pH = 6,9 opaža se izvjesno neslaganje u temperaturama faznih prijelaza (slika 14). Kada je posrijedi određivanje T_p iz DPPC suspenzija, FT-IR podatci (iz oba spektralna područja) daju nešto višu vrijednost nego DSC (tablica 1), a kod određivanja T_m odstupanje je nešto manje. Neslaganja između FT-IR i DSC podataka se za čiste DPPC suspenzije mogu pripisati unošenju nesigurnosti prilikom određivanja točke infleksije, kao i činjenici da se mjerila apsorbancija vrpce u maksimumu (intenzitet vrpce), a ne čitava vrpca (površina vrpce). To sa sobom također povlači i veliku nesigurnost kod analize pojedinih vrpce što je vidljivo na slici 14 te na slikama D2–D6. Drugim riječima, očekuje se da bi primjena multivarijatne analize na FT-IR spektrima dala pouzdanije i vjerojatno usporedivije podatke s onima dobivenima analizom DSC krivulja.⁸ Analiza FT-IR podataka DPPC+PA suspenzija u puferu pH-vrijednosti 6,9 pokazuje još veće neslaganje s DSC podacima (slika 14, tablica 1); štoviše, krivulje temperaturne ovisnosti apsorbancije za obje vrpce daju samo jedan diskontinuitet, koji je proglašen za T_m , i koji se po svojoj vrijednosti javlja između T_p i T_m vrijednosti dobivenih iz DSC krivulje (slika 14, tablica 1). Valja napomenuti da se vrijednosti T_p i T_m dobivene iz DSC krivulje čistog DPPC-a, kao i nešto veće vrijednosti za suspenzije DPPC+PA zbog stabilizacije faze $L_{\beta'}$ odnosno $P_{\beta'}$, dobro slažu s već objavljenim podacima.^{10,25}

Prije nego se ponudi moguće objašnjenje opaženih pojava u FT-IR spektrima DPPC (+PA) suspenzija, kao i neslaganje FT-IR i DSC podataka, potrebno je komentirati i FT-IR podatke DPPC (+PA) suspenzija u ostalim puferima. Prema podacima iz tablice 1 (i slika D2–D6 u Dodatku) za suspenzije DPPC (+PA) pri pH = 4,0 se T_p može eventualno samo procijeniti ($T_p \sim 34\text{--}35$ °C) i to analizom $\nu_{as}PO_2^-$ vrpce, dok se iz ν_sCH_2 vrpce ne može doći do tog podatka. T_m su određene analizom oba spektralna područja i uglavnom se kreću oko jednakih vrijednosti (između 40,5 i 41,0 °C). Kod suspenzija pri pH = 5,0 se iz signala obje vrpce čistog DPPC-a mogu procijeniti, odnosno odrediti T_p (35–36 °C), odnosno T_m (40,8–40,9 °C), dok se u prisutnosti PA pri istoj pH-vrijednosti samo T_m može, u najboljem slučaju, procijeniti na oko 35 °C. Za DPPC i DPPC+PA suspenzije u puferu pH = 6,0 T_p je procijenjena iz oba spektralna područja pri ~ 35 °C, dok se T_m kreće u rasponu od 39 do 41 °C. Kod suspenzija pripremljenih u puferu pH-vrijednosti 7,3 T_p vrijednost se može samo procijeniti ($T_p \sim 36$ °C) analizom $\nu_{as}PO_2^-$ čistog DPPC-a, dok se analizom vrpce ν_sCH_2 ne

može doći do podataka. T_m vrijednosti oba spektralna područja kod suspenzije DPPC+PA se kreću oko jednakih vrijednosti ($\sim 38\text{--}39\text{ }^\circ\text{C}$), dok su za čisti DPPC vrijednosti između $40,5$ i $41,5\text{ }^\circ\text{C}$. Za suspenziju čistog DPPC-a pri pH-vrijednosti $9,1$ analizom vrpce $\nu_s\text{CH}_2$ T_p vrijednost se može samo procijeniti ($\sim 36\text{ }^\circ\text{C}$), kao i analizom vrpce $\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-$, u kojem slučaju iznosi $\sim 35\text{ }^\circ\text{C}$. T_m vrijednost se kreće kod obje vrste oko jednakih vrijednosti $40,5\text{ }^\circ\text{C}$. Vrijednost T_p se analizom vrpce $\nu_s\text{CH}_2$ ne može odrediti za suspenziju kojoj je dodana PA, a analizom vrpce $\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-$ T_p se procijenjuje na $\sim 35\text{ }^\circ\text{C}$. T_m vrijednost dobivena analizom obje vrpce se kreće oko $41\text{ }^\circ\text{C}$.

S obzirom na nesigurnosti u vrijednostima pojedinih temperatura faznih prijelaza nije moguće dati jednoznačno objašnjenje zašto se iz određenog spektralnog područja pri danoj pH vrijednosti, u odsutnosti, odnosno prisutnosti PA, T_p mogu u najboljem slučaju samo procijeniti, a T_m odrediti u većini slučajeva s relativno malim rasipanjem dobivenih podataka (razlozi zašto je tome tako diskutirano je gore u tekstu). Ono što se može navesti s izvjesnom sigurnošću je veća osjetljivost fosfatne skupine u odnosu na metilensku skupinu na pretprijelaz (slika 14, slike D2–D6). Budući da je poznato da se PA, ovisno o tome je li (de)protonirana, nalazi na različitoj dubini u lipidnom dvosloju (COO^- strši, dok je COOH uronjena u dvosloj),⁹ povećanjem pH-vrijednosti više je COO^- skupina koje mogu pojačavati valovitost površine DPPC dvosloja. To se naročito vidi kod suspenzija priređenih u puferu pH $9,1$ (slika D6).

Dobiveni podatci upućuju na mogućnost da na valovitu fazu DPPC+PA multilamelarnih liposoma utječu i neki drugi procesi koje, konkretno, FT-IR spektroskopija može zabilježiti (odnosno, dovoljno je osjetljiva), dok DSC ne može. S obzirom na proton-donorsku, odnosno akceptorsku sposobnost PA, ovisno o pH-vrijednosti medija, prvi mogući događaj koji remeti valovitu fazu onakvu kakva je prikazana FT-IR spektrima bi mogao biti prijenos protona između COO(H) skupine PA i hidratacijskog medija.^{36,39} Tome u prilog ide činjenica da se prijenos protona događa na pikosekundnoj skali na kojem se događa i promjena vibracijske energije.³⁸ Za bilo kakve daljnje navode potrebno je provesti DSC mjerenja za suspenzije svih pH-vrijednosti kako bi se provjerilo postoji li odstupanje između svih FT-IR podataka i DSC krivulja ili se ona opaža samo pri određenim pH vrijednostima; primjerice, onima pri kojima je pH približno jednak pK_a PA.⁹ U konačnici, dobiveni spektri bi

se trebali analizirati i multivarijatnim metodama kako bi se dobili što pouzdaniji podaci o temperaturama faznih prijelaza.⁸

§ 5. ZAKLJUČAK

Višestruki hidrirani dvosloji DPPC-a, u odsutnosti i prisutnosti male količine PA ($x = 2\%$), suspendirani su u puferima pH-vrijednosti u rasponu $4 \leq \text{pH} \leq 9$. Temperature faznih prijelaza suspenzija DPPC (+PA) određene su iz temperaturno ovisnih promjena vrpca $\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$ te $\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-$ u FT-IR spektrima. Vrpce su analizirane na način da je očitana apsorbancija vrpca pri valnim brojevima 2851 cm^{-1} i 1227 cm^{-1} (koji predstavljaju maksimume apsorpcije zračenja pri odgovarajućim vibracijama) i prikazana njena ovisnost o temperaturi. Dobivene krivulje su sigmoidalnog karaktera čije se točke infleksije podudaraju s literaturnim navodima temperatura faznih prijelaza, posebice T_m . Iz FT-IR spektara DPPC liposoma moguće je odrediti T_m analizom vrpca $\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$ te $\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-$, dok je T_p pretežno moguće odrediti samo iz temperaturno ovisnih promjena vrpca $\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-$. Za suspenzije DPPC+PA, čak i pri malom množinskom udjelu PA (2%), temperature faznih prijelaza se razlikuju u odnosu na DPPC uz istodobno narušavanje sigmoidalnog karaktera dobivenih krivulja. FT-IR podatci djelomično su nadopunjeni podacima iz DSC krivulje (samo za $\text{pH} = 6,9$). S obzirom na variranje temperature faznih prijelaza s pH-vrijednostima, kao i sigmoidalan karakter krivulja ovisnosti apsorbancija o temperaturi, pretpostavlja se da razmjena protona između PA i hidratacijskog medija utječe na valovitu fazu DPPC dvosloja onako kako ih bilježi FT-IR spektroskopija.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (PREMA POTREBI)

DPPC – 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfokolin

DSC – razlikovno-pretražna kalorimetrija

PA – palmitinska kiselina

T_m – temperatura glavnog faznog prijelaza lipida

T_p – temperatura pretprijelaza lipida

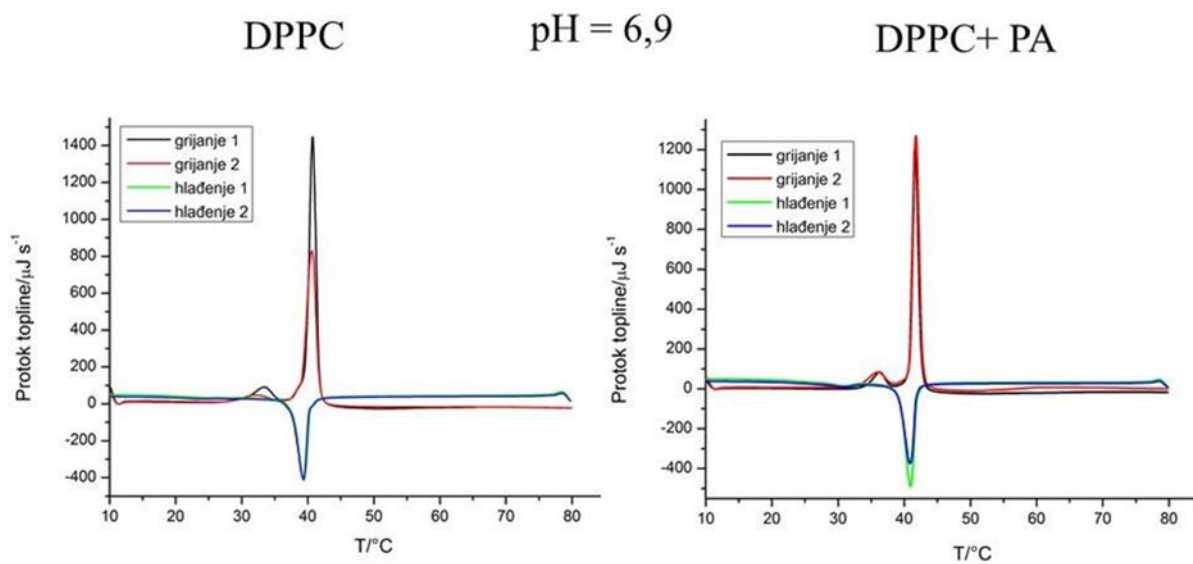
§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. W. Dowhan, M. Bogdanov, E. Mileykovskaya, *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, D.E. Vance, J. E Vance, Houston, 2008, str. 1–40.
2. C. T. Sengel-Turk, M. Gumustas, B. Uslu, S. A. Ozkan, *Nano and- Microscale Drug Delivery , Design and Fabrication*, Alenxandru Mihai Grumezescu, Bucharest, 2017, str. 165–195.
3. T. Heimburg, *Thermal Biophysics of Membranes*, Wiley-VCH, Berlin, 2007, str. 1–30, 75–99.
4. R. N. A. H. Lewis, D. A. Mannoek, R. N. McElhaney, *Methods in Molecular Biology: Methods in Membrane Lipids*, Humana Press, New Yersey, 2006, str. 171–195.
5. R. N. A. H. Lewis, R. N. McElhaney, *Biochim. Biophys. Acta* **1828** (2013) 2347–2358.
6. H. L. Casal, H. H. Mantsch, *Biochim. Biophys. Acta* **735** (1983) 387–396.
7. D. G. Cameron, H. L. Casal, H. H. Mantsch, *Biochemistry* **19** (1980) 3665–3672.
8. P. Maleš, Z. Brkljača, I. Crnolatac, D. Bakarić, *Colloids. Surf. B: Biointerfaces* **201** (2021) 111645
9. A. A. Pashkovskaya, M. Vazdar, L. Zimmermann, O. Jovanović, P. Pohl, E. E. Pohl, *Biophys. J.* **14** (2018) 2142–2151.
10. S. Mabrey, J. M. Sturtevant, *Biochim. Biophys. Acta*, **486** (1977) 444–450
11. D. V. Soloviov, Y. E. Gorshkova, O. I. Ivankov, A. N. Zhiguno, L. A. Bulavin, V. I. Gordeliy, A. I. Kuklin, *J. Phys.* **351** (2012) 012010.
12. G. M. Cooper, R. E. Hausman, *The Cell: Molecular Approach*, 4. izdanje, Sinauer Associates, Boston, 2006, str. 58.
13. R. M. Epand, *Methods in Membrane Lipids*, 2. Izdanje, D.M.Owen, Humana Press, New York, 2014, str. 1–6.
14. <https://courses.lumenlearning.com/introchem/chapter/phospholipids/> (8.8.2021.)
15. A. Buretić-Tomljanović, *Medi. Flumn.*, **50** (4) (2014) 391–413.
16. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, 5. izd., W. H. Freeman, New York, 2002, str. 493–498.
17. S. Leekumjorn, A. K. Sum, *Biophys. J.* **90** (2006) 3951–3965.

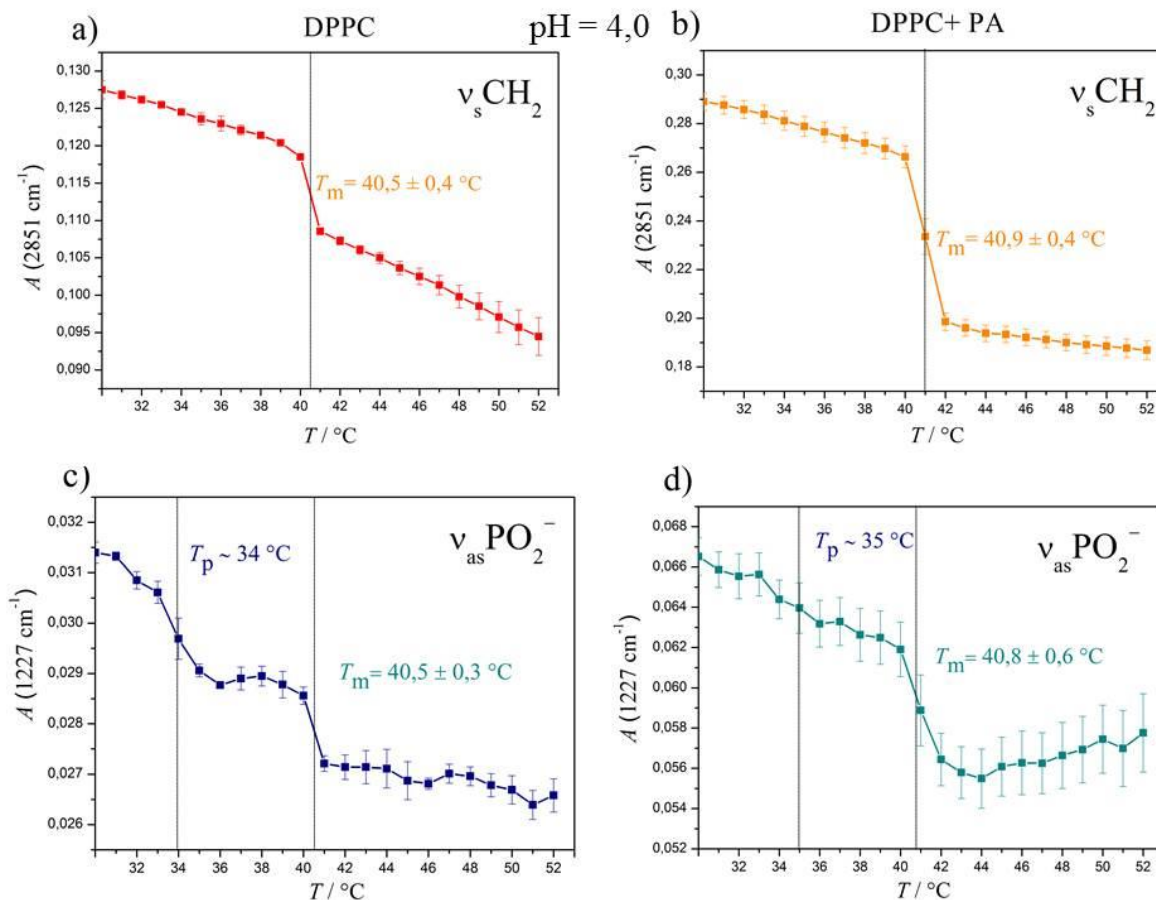
18. S. Shailesh, S. Neelam, K. Sandeep, G. D. Gupta, *J. Pharma. Res.* **2(7)** (2009) 1163–1167.
19. D. A. Balazs, W.T. Godby, *J. Drug. Deliv.*, Hindawi Publishing Corporation (2011) 326497
20. Ž. Vanić, *Farma.glas.* **68,6** (2012) 391–400.
21. J. S. Dua, A. C. Rana, A. K. Bhandari, *Intern. J. Pharm. Stud. Res.* **3** (2015) 2229–4619.
22. M. Kranenburg, B. Smit, *J. Phys. Chem. B* **109**,14 (2005) 6553–6563.
23. K. A. Riske, R. P. Barroso, C.C. Vequi-Suplicy, R. Germano, V. B. Henriques, M. T. Lamy, *Biochim. Biophys. Acta* **1788** (2009) 954–963.
24. <https://avantilipids.com/product/850457> (12.9.2021.)
25. S. Mabrey, J. M. Sturtevant, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73** (1976) 3862–3866.
26. M. S. Fernández, M. T. González-Martínez, E. Calderón, *Biochim. Biophys. Acta* **863** (1986) 156–164.
27. P. J. Henies, *Thermal Methods of Analysis*, Chapman & Hall, Glasgow, 1995, str. 63–122.
28. R. N. A. H. Lewis, D. A. Mannoock, R. N. McElhaney, *Membranes u Methods in Membrane Lipids* (ur. Alex M. Dopico), Humana Press, Totowa, New Jersey, 2007, str. 171–195.
29. K. Lukas, P. L., *Differential Scanning Calorimetry: Fundamental Overview*, Department of Physics, Central Connecticut State University, New Britain, 2009, str. 807–817.
30. G. W. H. Hoehne, H. K. Cammenga, W. Eysel, E. Gmelin, W. Hemminger, *Thermochim. Acta* **160** (1990) 1–12.
31. R. N. A. H. Lewis, R. N. McElhaney, *Methods in Molecular Biology: Methods in Membrane Lipids*, Humana Press, 2006, str. 207–226.
32. B. Matijević, M. Blažić, *Mljekarstvo* **58** (2) (2008) 151–169
33. H. Günzler, H. U. Gremlich, *Uvod u infracrvenu spektroskopiju*, Školska knjiga, Zagreb 2006, str. 23– 59, 130–135.
34. R. Silverstein, *Spectroscopy-Chemistry NMR FTIR MS*, 7.izdanje 2005, str. 25–31, 72–79.
35. <https://lsinstruments.ch/en/theory/dynamic-light-scattering-dls/introduction> (20.8.2021.)
36. R. B. Gennis, *Biophysic. J.* **110** (2016) 1909.–1911.

37. J. Swaminathan, C. Ehrhardt, *Controlled for pulmonary drug delivery*, H. D. C. Smyth, A. J. Hickey, New York, 2011, str. 313–334.
38. T. H. Nguyen, C. Zhang, E. Weichselbaum, D. G. Knyazev , P. Pohl , P. Carloni, *Plos one* **13**(2) (2018) 1–14.
39. N. Agmon, H. J. Bakker, R. K. Campen, R. H. Henchman, P. Pohl, S. Roke, M. Thämer, A. Hassanali , *Chem. Rev.* **116** (2016) 7642– 7672.

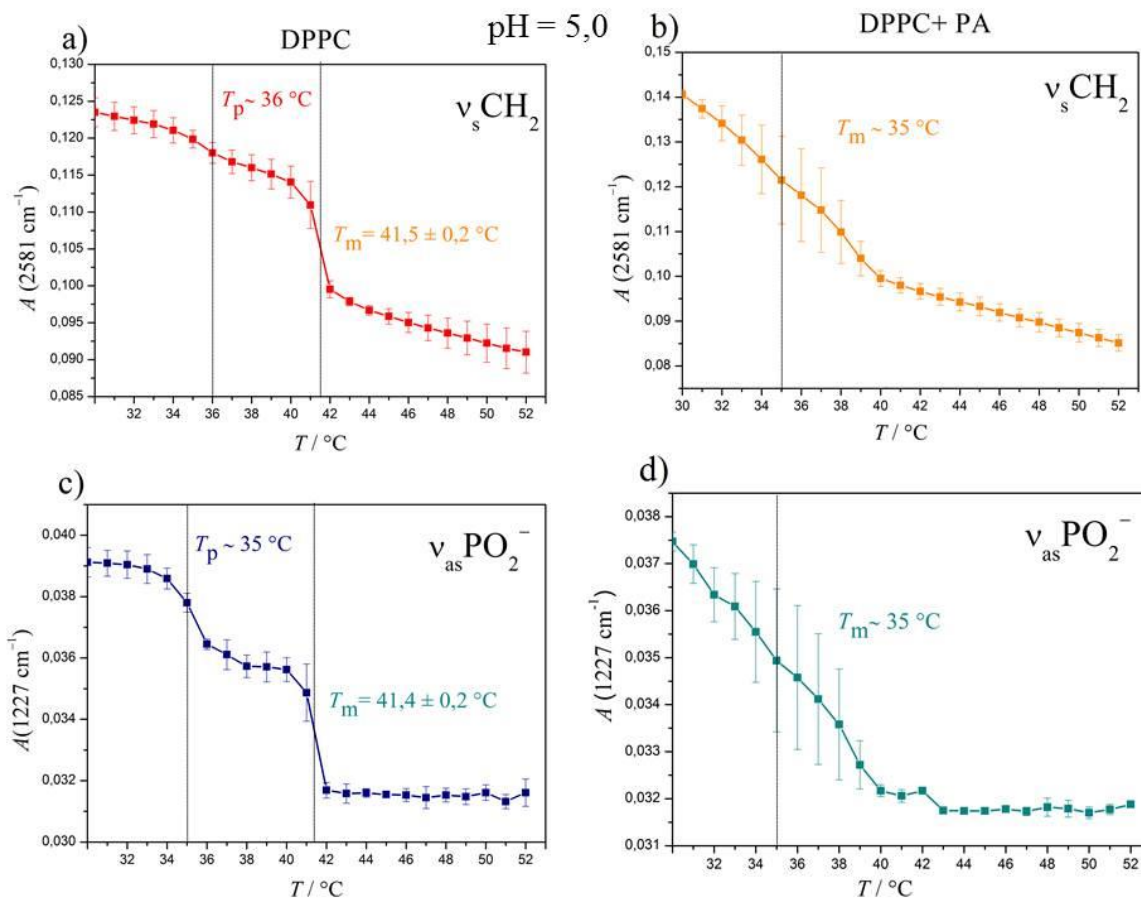
§ 8. DODATAK



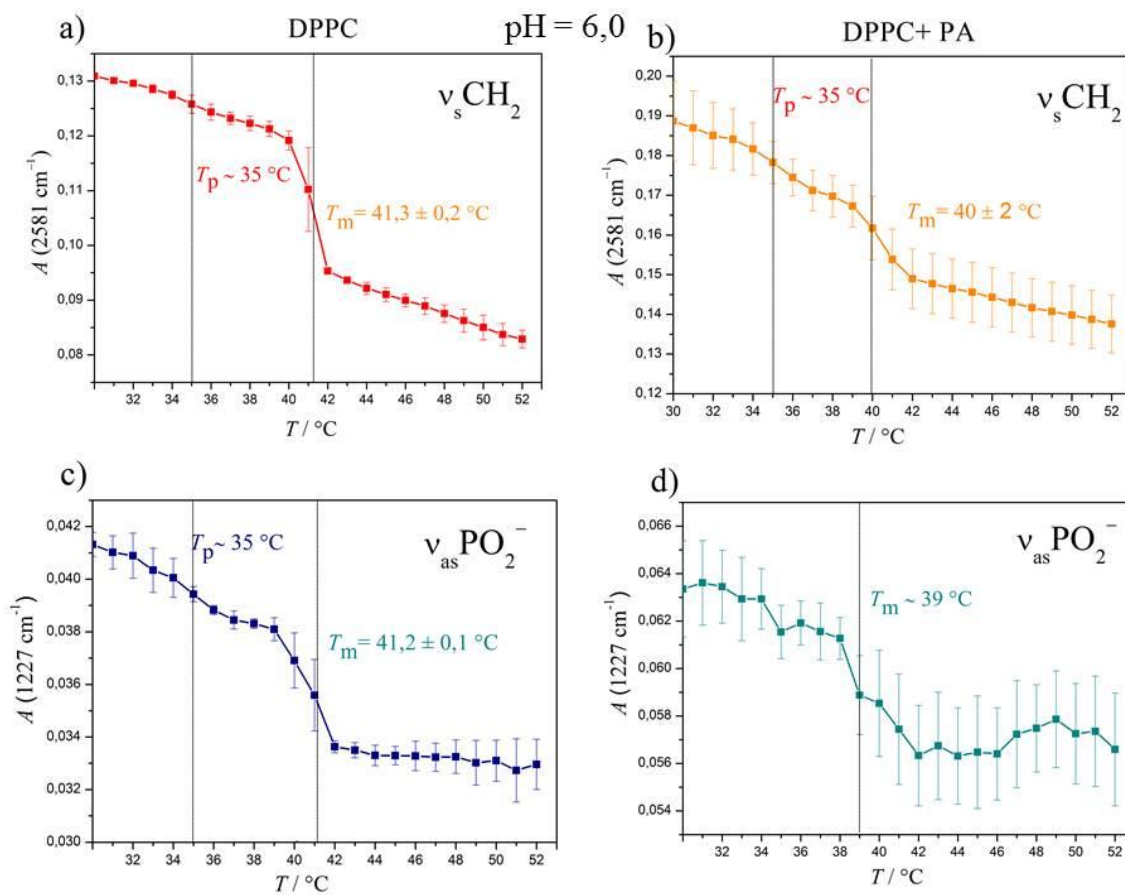
Slika D1. DSC krivulje DPPC liposoma u odsutnosti (lijevo) i prisutnosti PA (desno) prilikom dva ciklusa grijanja i dva ciklusa hlađenja



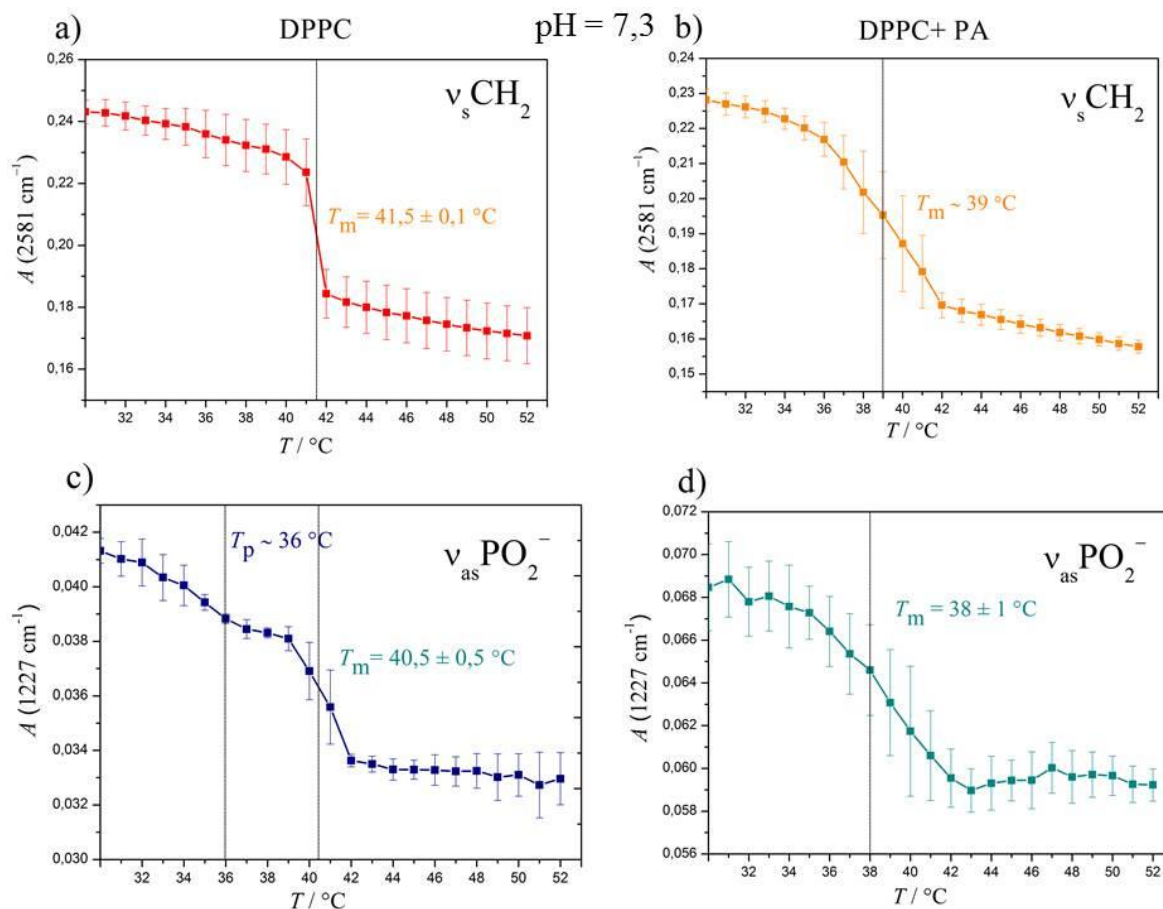
Slika D2. Temperaturna ovisnost apsorbancije IR vrpci pri pH vrijednosti 4,0: a) $\nu_s \text{CH}_2$ ($\tilde{\nu}_{\text{maks}} = 2851 \text{ cm}^{-1}$) za DPPC; b) $\nu_s \text{CH}_2$ ($\tilde{\nu}_{\text{maks}} = 2851 \text{ cm}^{-1}$) za DPPC+PA; c) $\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$ ($\tilde{\nu}_{\text{maks}} = 1227 \text{ cm}^{-1}$) za DPPC; d) $\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$ ($\tilde{\nu}_{\text{maks}} = 1227 \text{ cm}^{-1}$) za DPPC+PA. Vrijednosti temperatura faznih prijelaza su navedene na slici i u tablici 1.



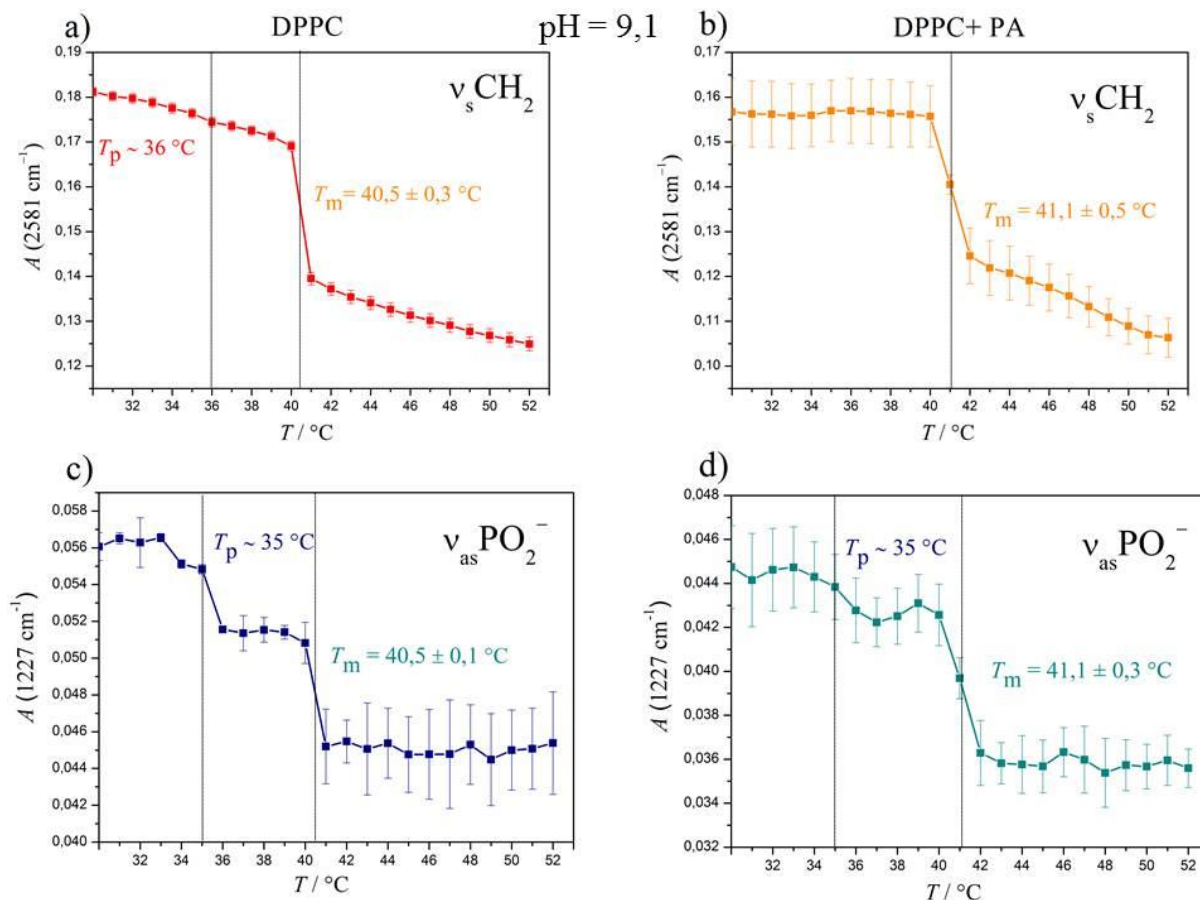
Slika D3. Temperaturna ovisnost apsorbancije IR vrpci pri pH vrijednosti 5,0: a) $\nu_s \text{CH}_2$ ($\tilde{\nu}_{\text{maks}} = 2851 \text{ cm}^{-1}$) za DPPC; b) $\nu_s \text{CH}_2$ ($\tilde{\nu}_{\text{maks}} = 2851 \text{ cm}^{-1}$) za DPPC+PA; c) $\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$ ($\tilde{\nu}_{\text{maks}} = 1227 \text{ cm}^{-1}$) za DPPC; d) $\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$ ($\tilde{\nu}_{\text{maks}} = 1227 \text{ cm}^{-1}$) za DPPC+PA. Vrijednosti temperatura faznih prijelaza su navedene na slici i u tablici 1.



Slika D4. Temperaturna ovisnost apsorbancije IR vrpci pri pH vrijednosti 6,0: a) $\nu_s \text{CH}_2$ ($\tilde{\nu}_{\text{maks}} = 2851 \text{ cm}^{-1}$) za DPPC; b) $\nu_s \text{CH}_2$ ($\tilde{\nu}_{\text{maks}} = 2851 \text{ cm}^{-1}$) za DPPC+PA; c) $\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$ ($\tilde{\nu}_{\text{maks}} = 1227 \text{ cm}^{-1}$) za DPPC; d) $\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$ ($\tilde{\nu}_{\text{maks}} = 1227 \text{ cm}^{-1}$) za DPPC+PA. Vrijednosti temperatura faznih prijelaza su navedene na slici i u tablici 1.



Slika D5. Temperaturna ovisnost apsorbancije IR vrpci pri pH vrijednosti 7,3: a) $v_s \text{CH}_2$ ($\tilde{\nu}_{\text{maks}} = 2851 \text{ cm}^{-1}$) za DPPC; b) $v_s \text{CH}_2$ ($\tilde{\nu}_{\text{maks}} = 2851 \text{ cm}^{-1}$) za DPPC+PA; c) $v_{as} \text{PO}_2^-$ ($\tilde{\nu}_{\text{maks}} = 1227 \text{ cm}^{-1}$) za DPPC; d) $v_{as} \text{PO}_2^-$ ($\tilde{\nu}_{\text{maks}} = 1227 \text{ cm}^{-1}$) za DPPC+PA. Vrijednosti temperatura faznih prijelaza su navedene na slici i u tablici 1.



Slika D6. Temperaturna ovisnost apsorbancije IR vrpci pri pH vrijednosti 9,1: a) $\nu_s \text{CH}_2$ ($\tilde{\nu}_{\text{maks}} = 2851 \text{ cm}^{-1}$) za DPPC; b) $\nu_s \text{CH}_2$ ($\tilde{\nu}_{\text{maks}} = 2851 \text{ cm}^{-1}$) za DPPC+PA; c) $\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$ ($\tilde{\nu}_{\text{maks}} = 1227 \text{ cm}^{-1}$) za DPPC; d) $\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$ ($\tilde{\nu}_{\text{maks}} = 1227 \text{ cm}^{-1}$) za DPPC+PA. Vrijednosti temperatura faznih prijelaza su navedene na slici i u tablici 1.

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Marina Pišonić

Datum rođenja: 11. studenog 1994.

Mjesto rođenja: Nova Gradiška

Obrazovanje

2001.–2009. Osnovna škola Matije Antuna Relkovića Davor

2009.–2013. Opća gimnazija Nova Gradiška

2013.–2016. Preddiplomski studij Odjel za kemiju Sveučilište J.J. Strossmayera
Osijek

2017.– Diplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet,
Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Publikacije

1. M. Pišonić, A. Stanković, M. Medvidović – Kosanović, *Ispitivanje elektrokemijskih svojstava rutina u različitim inertnim elektrolitima*, Međunarodna konferencija 16. Ružičkini dani : Danas znanost – sutra industrija, Osijek, 2016, str. 19 – 24.