

Zaštita modelnih membrana flavonoidima u procesu lipidne peroksidacije

Sadžak, Anja

Doctoral thesis / Disertacija

2022

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:217:317659>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-24**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Anja Sadžak

ZAŠTITA MODELNIH MEMBRANA FLAVONOIDIMA U PROCESU LIPIDNE PEROKSIDACIJE

DOKTORSKI RAD

Mentor:
dr. sc. Suzana Šegota

Zagreb, 2022.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Anja Sadžak

**PROTECTION OF MODEL MEMBRANES BY
FLAVONOIDS DURING LIPID PEROXIDATION
PROCESS**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:
Dr. Suzana Šegota

Zagreb, 2022

Zahvale

Hvala mojoj mentorici dr. sc. Suzani Šegota na pruženoj prilici te ukazanom povjerenju, strpljenju i podršci tijekom cijelog doktorskog studija. Preneseno znanje i iskustvo u znanstvenom radu bili su mi od neizmjerne važnosti za provedbu istraživanja i pisanje doktorske disertacije.

Hvala članicama Laboratorija za biokoloide i površinsku kemiju na druženjima. Hvala Luciji na svakodnevnoj podršci i druženju te na svim ugodnim trenucima provedenima u laboratoriju 103, kao i na zajedničkim putovanjima. Hvala Ini na raspravama, dijeljenju iskustava i brojnim druženjima na poslu i izvan njega.

Hvala svim suradnicima koji su svojom stručnošću doprinijeli ovom radu. Posebno hvala dr. sc. Janu Příbylu sa Sveučilišta Masaryk u Brnu, dr. sc. Manfredu Kriechbaumu sa Sveučilišta u Grazu te dr. sc. Zoranu Arsovu i dr. sc. Janezu Mravljaku sa Sveučilišta u Ljubljani na pomoći u kreiranju eksperimenata i obradi podataka te na iznimnom gostoprimstvu prilikom poslovnih posjeta. Hvala dr. sc. Nadici Maltar-Strmečki na pomoći u provedbi i obradi EPR eksperimenata.

Hvala mojoj obitelji, prijateljima i kolegama na bezuvjetnoj podršci, pruženom povjerenju i razumijevanju te na mnoštvu lijepih uspomena nakupljenih tijekom svih ovih godina. Hvala Mihaelu na beskrajnom strpljenju, zajedničkim trenucima i konstruktivnim raspravama bez kojih ova disertacija ne bi bila to što je.

Konačno, hvala Hrvatskoj zakladi za znanost na financiranju projekta (IP-2016-06-8415) u sklopu kojeg je izrađena ova doktorska disertacija.

Anja

Sadržaj

SAŽETAK.....	XI
ABSTRACT	XIII
§ 1. UVOD.....	1
1.1. Cilj i opseg rada.....	3
§ 2. LITERATURNI PREGLED	5
2.1. Struktura stanične membrane	5
2.1.1. Lipidni dvosloj.....	6
2.1.2. Membranski proteini	9
2.1.3. Fluidnost stanične membrane	10
2.2. Modelne stanične membrane	11
2.2.1. Liposomi.....	12
2.2.2. Lipidni dvosloj na nosaču	14
2.2.3. Istraživanja s modelnim membranama	15
2.3. Lipidna peroksidacija	17
2.3.1. Reaktivne kisikove vrste	17
2.3.2. Neenzimatska lipidna peroksidacija	19
2.3.3. Utjecaj željeza na neenzimatsku lipidnu peroksidaciju.....	20
2.3.4. Enzimatska lipidna peroksidacija	22
2.3.5. Produkti i biološki značaj lipidne peroksidacije.....	22
2.3.6. Mehanizmi obrane od štetnih učinaka lipidne peroksidacije.....	26
2.4. Flavonoidi	27
2.4.1. Struktura i klasifikacija flavonoida	27
2.4.2. Antimikrobno djelovanje flavonoida	30
2.4.3. Antioksidativno djelovanje flavonoida	31
2.4.4. Kvercetin	33
2.4.5. Miricetin.....	35
2.4.6. Miricitrin.....	36
2.5. Nanosustavi za dostavu lijekova	37
2.5.1. Klasifikacija nanomaterijala.....	38
2.5.2. Sinteza nanonosaa.....	46
2.5.3. Fiziološka svojstva nanočestica	48
2.5.4. Ciljana dostava lijekova.....	49

2.5.5. Kinetika otpuštanja lijeka iz nanonosaa	51
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	56
3.1. Materijali	56
3.2. Priprava i strukturalna svojstva liposoma	57
3.2.1. Priprava liposoma	57
3.2.2. Diferencijalna pretražna kalorimetrija: termotropna svojstva lipidnog dvosloja	58
3.2.3. Mikroskopija atomskih sila i spektroskopija sila: morfološka i nanomehanička svojstva lipidnog dvosloja	59
3.3. Lipidna peroksidacija	60
3.3.1. Inicijacija	60
3.3.2. Ugradnja modelnog produkta	61
3.3.3. Masena spektrometrija visoke rezolucije: određivanje produkata i dosega lipidne peroksidacije	61
3.3.4. Raspršenje rendgenskog zračenja pri malim kutevima: profili elektronske gustoće liposoma	63
3.3.5. Mikroskopija atomskih sila i spektroskopija sila: morfološka i nanomehanička svojstva lipidnog dvosloja	65
3.3.6. Elektronska paramagnetska rezonancija: fluidnost lipidnog dvosloja	65
3.3.7. Infracrvena spektroskopija: doseg lipidne peroksidacije	67
3.3.8. Spektrofotometrijsko određivanje reaktivnih vrsta tiobarbiturne kiseline	69
3.4. Nestabilnost flavonoida u fiziološkim uvjetima	71
3.4.1. Elektronska paramagnetska rezonancija: efikasnost uklanjanja radikala flavonoidima	71
3.4.2. Kinetika raspada flavonoida	71
3.5. Sintaza i karakterizacija nanonosaa	74
3.5.1. Sintaza nanočestica magnetita	74
3.5.2. Difrakcija rendgenskog zračenja na polikristalnom uzorku	74
3.5.3. Infracrvena spektroskopija	75
3.5.4. Pretražna elektronska mikroskopija	75
3.5.5. Transmisijska elektronska mikroskopija	76
3.5.6. Mikroskopija atomskih sila i spektroskopija sila	76
3.5.7. Magnetska mjerenja	76
3.5.8. Agregacija nanočestica u mediju: dinamičko raspršenje svjetlosti	76
3.5.9. Izoelektrična točka: elektrokinetička mjerenja	77
3.5.10. Ugradnja flavonoida u nanočestice	78
3.6. Otpuštanje flavonoida iz nanonosaa	79
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	81
4.1. Interakcija lipida i flavonoida	81
4.1.1. Termotropna svojstva lipidnog dvosloja	81

4.1.2. Nanomehanička svojstva lipidnog dvosloja	84
4.2. Lipidna peroksidacija lipida s mononezasićenom masnom kiselinom	86
4.2.1. Produkti lipidne peroksidacije	86
4.2.2. Elektronska gustoća lipidnog dvosloja	90
4.2.3. Morfologija i nanomehanička svojstva lipidnog dvosloja	93
4.2.4. Fluidnost lipidnog dvosloja	98
4.2.5. Doseg lipidne peroksidacije	101
4.3. Ugradnja produkta lipidne peroksidacije u membranu	103
4.3.1. Elektronska gustoća lipidnog dvosloja	103
4.3.2. Morfologija i nanomehanička svojstva lipidnog dvosloja	106
4.3.3. Fluidnost lipidnog dvosloja	110
4.4. Lipidna peroksidacija lipida s polinezasićenom masnom kiselinom	112
4.4.1. Doseg lipidne peroksidacije	112
4.4.2. Elektronska gustoća lipidnog dvosloja	115
4.4.3. Morfologija i nanomehanička svojstva lipidnog dvosloja	117
4.4.4. Kvantifikacija reaktivnih vrsta tiobarbiturne kiseline	120
4.5. Nestabilnost flavonoida u fiziološkim uvjetima	125
4.5.1. Efikasnost uklanjanja radikala	125
4.5.2. Kinetika raspada kvercetina	127
4.5.3. Kinetika raspada miricetina	131
4.5.4. Kinetika raspada miricitrina	134
4.6. Sinteza i karakterizacija nanonosaa	137
4.6.1. Rendgenska difrakcija na polikristalnom uzorku	137
4.6.2. Infracrvena spektroskopija	138
4.6.3. Mikroskopijske metode	139
4.6.4. Magnetska svojstva	141
4.6.5. Agregacija nanočestica u mediju	142
4.6.6. Izoelektrična točka	143
4.6.7. Ugradnja flavonoida u nanonosaa	145
4.7. Otpuštanje flavonoida iz nanonosaa	147
§ 5. ZAKLJUČAK	153
§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ	156
§ 7. LITERATURNI IZVORI	159
§ 8. ŽIVOTOPIS	XV



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

ZAŠTITA MODELNIH MEMBRANA FLAVONOIDIMA U PROCESU LIPIDNE PEROKSIDACIJE

Anja Sadžak

Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb, Republika Hrvatska

Polinezasićene masne kiseline u sastavu stanične membrane iznimno su podložne lipidnoj peroksidaciji zahvaljujući velikom broju dvostrukih veza. Lipidna peroksidacija podrazumijeva oksidativnu razgradnju lipida induciranu slobodnim radikalima te rezultira oštećenjem membrane. Smatra se da lipidna peroksidacija ima ulogu u razvoju velikog broja bolesti. Flavonoidi, prirodni polifenolni antioksidansi, istražuju se kao potencijalni lijekovi za mnoge bolesti uzrokovane oksidativnim stresom. Međutim, njihova primjenjivost ograničena je slabom topljivošću u vodenim medijima i nestabilnošću u fiziološkim uvjetima. Navedeni problem moguće je riješiti ugradnjom flavonoida u nanonosae. Zahvaljujući specifičnim magnetskim svojstvima, kao nanonosai se posebno ističu superparamagnetske nanočestice. U sklopu ove doktorske disertacije istražena je interakcija lipida i flavonoida te je uočeno da tri strukturno različita flavonoida štite cjelovitost membrane tijekom lipidne peroksidacije. Nadalje, pripravljeni su nanonosai sa superparamagnetskim svojstvima. Pokazano je da upotreba vanjskog magnetskog polja poboljšava otpuštanje flavonoida iz nanočestica.

(182 stranice, 89 slika, 18 tablica, 479 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: flavonoidi/lipidna peroksidacija/magnetit/membrana/nanočestice

Mentor: dr. sc. Suzana Šegota, viši zn. sur.

Rad prihvaćen: 7. rujna 2022.

Ocjenitelji

1. prof. dr. sc. Davor Kovačević, PMF, Zagreb
2. dr. sc. Danijela Bakarić, zn. sur., IRB, Zagreb
3. prof. dr. sc. Nives Galić, PMF, Zagreb



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

PROTECTION OF MODEL MEMBRANES BY FLAVONOIDS DURING LIPID PEROXIDATION PROCESS

Anja Sadžak

Ruder Bošković Institute, Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb, Republic of Croatia

Polyunsaturated fatty acids, which are abundant in cell membranes, are susceptible to lipid peroxidation due to the large number of double bonds. Lipid peroxidation is oxidative degradation of lipids induced by free radicals which results in membrane damage. It has been correlated with numerous diseases. Flavonoids, natural polyphenolic antioxidants, are being investigated as potential therapeutics. However, their applicability is limited by poor solubility in aqueous media and instability under physiological conditions. One possible solution for the aforementioned problem is incorporation of flavonoids into nanocarriers, among which superparamagnetic nanocarriers stand out due to their exceptional magnetic properties. Within this doctoral dissertation, interaction between lipids and flavonoids has been investigated and it has been shown that three structurally different flavonoids exhibit protective behaviour of the membrane upon initiated lipid peroxidation. Moreover, superparamagnetic nanoparticles were prepared and used as nanocarriers. Drug release was improved with use of an external magnetic field.

(182 pages, 89 figures, 18 tables, 479 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: flavonoids/lipid peroxidation/magnetite/membrane/nanoparticles

Supervisor: Dr. Suzana Šegota, Senior Research Associate

Thesis accepted: 7th September 2022

Reviewers:

Dr. Davor Kovačević, Professor

Dr. Danijela Bakarić, Research Associate

Dr. Nives Galić, Professor

§ 1. UVOD

Stanična membrana, čije su glavne komponente lipidi i proteini formirani u dvosloje, čini fizičku barijeru te osigurava fluidnost i protok tvari kroz stanicu.¹ Lipidi u sastavu stanične membrane su amfipatski, odnosno sastoje se od hidrofobnog i hidrofilnog dijela, te se razlikuju po stupnju zasićenosti. Upravo prisutnost polinezasićenih masnih kiselina u fosfolipidnom dvosloju čini membranu podložnom oksidaciji. Lipidna peroksidacija je proces koji podrazumijeva oksidativnu razgradnju lipida te uzrokuje strukturna oštećenja i nastanak toksičnih produkata. Tijekom lipidne peroksidacije nastaju primarni produkti, primjerice lipidni hidroperoksidi i konjugirani dieni ili trieni. Primarni produkti su u pravilu nestabilni te njihovim daljnjim raspadom nastaju sekundarni produkti. Sekundarni produkti uključuju aldehide, ketone, alkohole i ostale spojeve ugljika.² Pokazano je da su neki sekundarni produkti, poput malondialdehida i 4-hidroksi-2,3-nonenala, toksični i utječu na nekoliko staničnih procesa, uključujući ekspresiju gena i prijenos signala unutar stanice.³ Nadalje, lipidna peroksidacija povezana je s mnogim bolestima i poremećajima, među kojima su i bolesti neurološkog i kardiovaskularnog sustava.⁴ S obzirom na to da su stanice tih sustava izuzetno kompleksne, kao modelne stanične membrane u istraživanjima se često koriste liposomi. Liposomi su lipidne strukture sastavljene od najmanje jednog fosfolipidnog dvosloja, a do njihovog formiranja u vodenim medijima dolazi spontano. Ovisno o načinu pripreme, nastali liposomi mogu posjedovati različitu lamelnost, pri čemu se dominantno razlikuju unilamelarni i mutlilamelarni liposomi. Veličinu i broj slojeva moguće je kontrolirati procesom ekstrudiranja koji omogućava pripravu uniformnog sustava.^{5,6}

Jedan od načina zaštite membrane od štetnog utjecaja lipidne peroksidacije je upotreba antioksidansa. Flavonoidi su prirodni antioksidansi polifenolne strukture koji su rasprostranjeni u voću, povrću, čaju i vinu. Ovisno o supstituentima, dijele se na flavonole, flavone, katehine, flavanone, antocijanidine i isoflavonole.⁷ Dva glavna mehanizma antioksidativne zaštite su izravno uklanjanje slobodnih radikala i stvaranje kelatnih kompleksa s metalnim ionima. Izravno uklanjanje radikala temelji se na postojanju hidroksilnih skupina u strukturi flavonoida koje mogu reagirati s radikalnim vrstama.⁸ S druge strane, kompleksiranje metalnih iona inhibira reakciju lipidne peroksidacije u kojoj su metalni ioni česti katalizatori.⁹ Primjerice, Fentonova reakcija, u kojoj sudjeluju vodikov peroksid i željezovi(II) ioni, često se koristi za

istraživanje lipidne peroksidacije, s obzirom na to da je pokazano da ioni prijelaznih metala mogu katalizirati Fentonovu reakciju *in vivo* pri fiziološkim koncentracijama vodikovog peroksida.¹⁰ Ovisno o kemijskoj strukturi lipida i flavonoida, flavonoidi se mogu smještati unutar lipidne membrane ili na međupovršini lipida i vodenog medija. Primjerice, pokazano je da se flavonoidi planarne strukture preferirano smještaju unutar membrane.¹¹ Lokacija flavonoida utječe i na stupanj zaštite membrane. Ukoliko su flavonoidi smješteni unutar nepolarnog dijela dvosloja, mogu ograničiti kretanje hidrofobnih repova unutar membrane te tako utjecati na njenu fluidnost, dok hidrofilniji flavonoidi mogu tvoriti vodikove veze s polarnim skupinama lipida te na taj način pružiti dodatnu zaštitu prilikom interakcije s radikalima. Flavonoidi mogu mijenjati i stupanj uređenosti membranskog sustava te na taj način utjecati na temperaturu faznih prijelaza lipida.¹² Glavni nedostatak flavonoida je njihova nestabilnost i netopljivost u fiziološkim uvjetima te se iz tog razloga javlja potreba za pronalaskom alternativnih načina njihove dostave u stanice organizma.

Razvojem nanotehnologije došlo je i do razvitka nanosustava za dostavu lijekova. Jedno od najbitnijih svojstava takvih sustava je velika specifična površina koja omogućava ugradnju velike količine lijeka. Dodatna prednost je mogućnost ugađanja parametara tijekom sinteze kako bi se pripravili nanonosaci željenih svojstava. Za primjenu u dostavi lijekova, nanonosaci moraju biti biokompatibilni, biorazgradivi i netoksični.¹³ Skupina nanočestica koje pokazuju izniman potencijal u biomedicini su superparamagnetske nanočestice željezovih oksida. Osim što su biokompatibilne i netoksične¹⁴, njihova magnetska svojstva, poput velike magnetizacije zasićenja i visoke magnetske susceptibilnosti, omogućavaju dodatnu kontrolu procesa otpuštanja lijeka. Primjenom vanjskog magnetskog polja moguće je postići kontrolirano otpuštanje lijekova i ciljanu dostavu, pri čemu je lijek zaštićen tijekom prijenosa kroz organizam. Funkcionalizacijom nanočestica može se povećati stabilnost te kontrolirati interakcija s enzimima, proteinima ili antitijelima u organizmu, pri čemu se čestice najčešće funkcionaliziraju polimerima.¹⁵ S obzirom na slabu topljivost i nestabilnost flavonoida pri fiziološkim uvjetima, njihovom ugradnjom u nanočestice postiže se zaštita samih antioksidansa te osigurava njihova dostava do ciljnog mjesta. Zahvaljujući svojoj veličini, nanočestice mogu proći kroz stanične membrane i ostale fiziološke barijere.¹⁶ Lijek se u nanočestice može ugraditi metodom inkorporacije ili adsorpcije, dok se za kvantifikaciju ugradnje uobičajeno koriste kapacitet ili efikasnost ugradnje.¹³ Kontrolom svojstava nanonosaca moguće je ugađati brzinu otpuštanja lijeka kako bi se postigao željeni kinetički profil. Tri najčešća kinetička modela su:

model kinetike nultog reda, model kinetike prvog reda te Higuchijev model temeljen na difuzijskom modelu.¹⁷

1.1. Cilj i opseg rada

Temeljni cilj ovog rada je ispitivanje zaštitne uloge flavonoida tijekom procesa lipidne peroksidacije. U tu je svrhu istražena interakcija flavonoida i modelnih membrana prije i nakon inducirane lipidne peroksidacije. Pretpostavlja se da će svi flavonoidi pružati određeni stupanj zaštite modelne membrane te da će mehanizam i način zaštite ovisiti o strukturi flavonoida. Uz to, kako bi se riješio problem njihove nestabilnosti, flavonoidi su ugrađeni u nanočestice magnetita funkcionalizirane poli(etilen-glikolom). Kinetika otpuštanja flavonoida ispitana je pod utjecajem vanjskog magnetskog polja, uz pretpostavku da upotreba vanjskog magnetskog polja poboljšava otpuštanje flavonoida iz nanočestica.

Korištena su tri strukturno različita flavonoida, kvercetin, miricetin i miricitrin koji se međusobno razlikuju po broju i vrsti supstituenta te tri lipida različitog stupnja zasićenosti. Interakcija flavonoida i lipidne membrane ispitana je diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom i mikroskopijom atomskih sila. Lipidna peroksidacija katalizirana je željezovim(II) ionima te su nastali produkti identificirani masenom spektroskopijom visoke rezolucije. Interakcija lipida i flavonoida prije i nakon lipidne peroksidacije praćena je mikroskopijom atomskih sila, spektroskopijom sila, elektronskom paramagnetskom rezonancijom i raspršenjem rendgenskih zraka pod malim kutevima. Nadalje, infracrvenom spektroskopijom praćena je promjena intenziteta vrpca karakterističnih za lipide i produkte lipidne peroksidacije, dok je u slučaju polinezasićenog lipida doseg reakcije kvantificiran spektrofotometrijski i masenom spektrometrijom.

Superparamagnetske nanočestice magnetita sintetizirane su solvotermalnom metodom te karakterizirane difrakcijom rendgenskih zraka na praškastom uzorku, mikroskopijskim i spektroskopijskim tehnikama. Njihova superparamagnetska svojstva provjerena su magnetskim mjerenjima. Flavonoidi su u nanočestice ugrađeni metodom adsorpcije te je ugradnja kvantificirana korištenjem UV-Vis spektrofotometrije. UV-Vis spektrofotometrija korištena je i za praćenje količine otpuštenog flavonoida iz nanočestica pod utjecajem magnetskog polja te je dobiven kinetički profil otpuštanja.

Sustavno istraživanje interakcije strukturno različitih molekula flavonoida i lipida tijekom lipidne peroksidacije omogućit će bolje razumijevanje mehanizma reakcije lipidne

peroksidacije, kao i mehanizma zaštitne uloge flavonoida. Uz to, priprema magnetskih nanočestica kao nosača flavonoida predstavlja jedno od mogućih rješenja problema slabe topljivosti i nestabilnosti flavonoida pri fiziološkim uvjetima.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Struktura stanične membrane

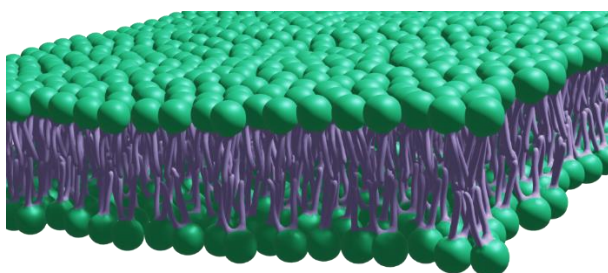
Stanična membrana odvaja unutarstanični od izvanstaničnog dijela stanice te je ključna za njezino preživljavanje. Osim stanice, stanična membrana ograđuje i pojedine dijelove unutar stanice, uključujući endoplazmatski retikulum, Golgijevo tijelo i mitohondrij. S obje strane stanične membrane postoji ionski gradijent reguliran membranskim proteinima, koji je zaslužan za sintezu ATP-a, propuštanje tvari u i iz stanice te prijenos električnih signala. Sve stanične membrane sadrže i proteine koji detektiraju vanjske signale i omogućavaju stanici prilagodbu vanjskim uvjetima.

Iako se stanične membrane stanica međusobno razlikuju, strukturna obilježja svih membrana su jednaka. Svaka stanična membrana sastoji se od dvosloja molekula lipida i proteina međusobno povezanih nekovalentnim interakcijama te se te molekule mogu lateralno kretati unutar membrane, što ju čini dinamičnom i fluidnom. Uz lateralno kretanje, može doći i do 'flip-flop' prijelaza u kojem molekula lipida prelazi s vanjskog u unutarnji sloj membrane ili obrnuto. Takvi prijelazi katalizirani su enzimima flofazama i flipazama.

Molekule lipida samoudružuju se u dvosloj čija debljina ovisi o strukturi lipidne molekule. Lipidni dvosloj čini glavninu strukture stanične membrane te služi kao barijera za prolazak većine molekula topljivih u vodi, dok molekule proteina omogućavaju prijenos specifičnih molekula. U većini bioloških membrana, oko 50% njihove mase čine proteini. S obzirom na to da su molekulske mase lipida relativno male u odnosu na molekulske mase proteina, procjenjuje se da na jednu molekulu proteina postoji oko pedeset molekula lipida. No, u pojedinim se membranama, ovisno o funkciji, javljaju i drugačiji omjeri lipida i proteina. Primjerice, mijelinsku membranu čini 82% lipida i 18% proteina, dok membranu mitohondrija, koja aktivno sudjeluje u metabolizmu stanice, čini 25% lipida i 75% proteina.^{1,18,19}

2.1.1. Lipidni dvosloj

Lipidi su molekule netopljive u vodi, koje se u stanici većinom sintetiziraju u endoplazmatskom retikulumu (ER). Uz ER, do sinteze određenih lipida, primjerice sfingolipida, dolazi i u Golgijevom tijelu. Procjenjuje se da 1 μm^2 stanične membrane sadrži oko $5 \cdot 10^6$ lipidnih molekula, a zahvaljujući varijacijama u strukturi, u svakoj eukariotskoj stanici postoji više od tisuću različitih molekula lipida.²⁰ Sve lipidne molekule u staničnoj membrani su amfipatske te se sastoje od hidrofilnog i hidrofobnog dijela, pri čemu su najzastupljeniji fosfolipidi koji posjeduju fosfatnu polarnu glavu i hidrofobni rep. Hidrofobni dio uglavnom čine masne kiseline različitih duljina lanca te uobičajeno jedan lanac posjeduje jednu ili više *cis*-dvostrukih veza, odnosno nezasićen je, dok je drugi lanac zasićen, tj. bez dvostrukih veza. Zahvaljujući strukturi i amfipatskoj prirodi, molekule lipida u vodenoj otopini spontano formiraju dvosloj, pri čemu su hidrofilni dijelovi izloženi vodenom mediju, dok se hidrofobni dijelovi okreću prema unutrašnjosti membrane (slika 2.1.1).



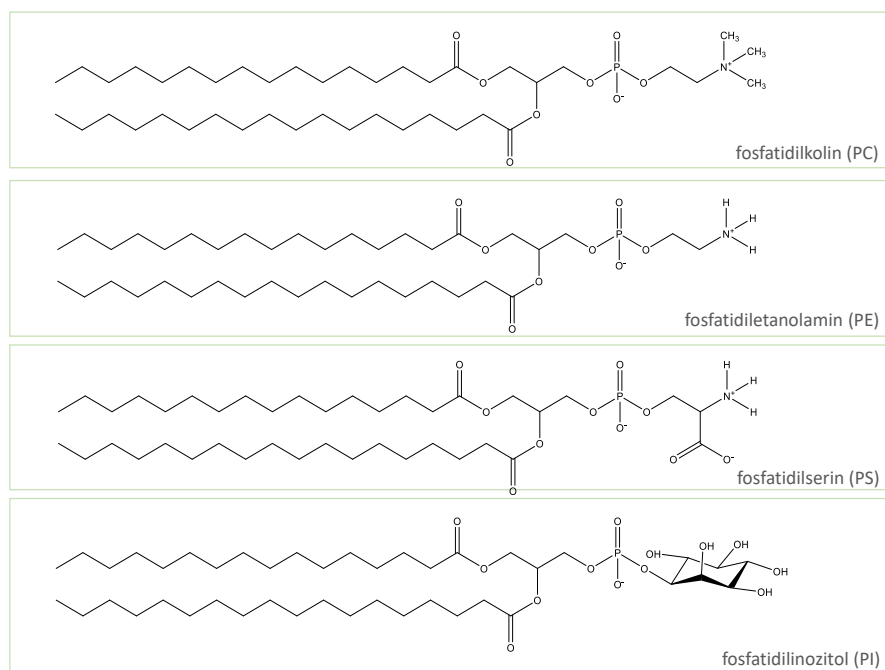
Slika 2.1.1. Struktura fosfolipidnog dvosloja.

Upravo je samoorganizacija lipidnih molekula omogućila prvim stanicama odvajanje unutarstaničnog prostora od okoline, a analogan princip prisutan je i unutar stanice kako bi se formirali organeli. Iako su za mnogo funkcija stanične membrane zaslužni membranski proteini, u literaturi se sve više naglašava značaj lipidnih molekula. Primjerice, lipidi koji se nalaze u obliku triacilglicerola i sterolnih estera služe za skladištenje energije. Ograničavanje prostora na kojem se događaju specifične kemijske reakcije unutar stanice povećava biokemijsku efikasnost samih reakcija te sprječava nekontrolirano širenje reakcijskih produkata. Uz to što predstavljaju fizičku barijeru, membranski lipidi omogućavaju pupanje, stvaranje tubula, fisiju i fuziju, što su procesi ključni za diobu stanica i biološku reprodukciju. Ovisno o funkciji membranskog proteina te lipidnom okruženju, neki proteini unutar lipidnog

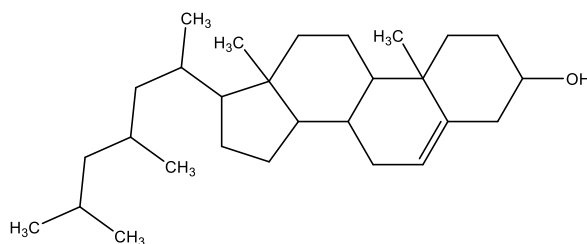
dvosloja agregiraju, dok se drugi dispergiraju. Konačno, lipidi mogu biti primarni ili sekundarni glasnici u procesima provođenja signala i molekularnog prepoznavanja.²¹

Lipidni dvosloj posjeduje dva važna svojstva. Prvo, hidrofobna jezgra čini nepropusnu barijeru koja onemogućava difuziju hidrofilnih molekula. Funkcija membrane kao barijere dodatno je modulirana prisutnošću membranskih proteina koji služe za prijenos specifičnih molekula preko nepropusne membrane. Drugo važno svojstvo dvosloja je njegova stabilnost. Struktura dvosloja određena je hidrofobnim i van der Waalsovima interakcijama između lipidnih lanaca te su, iako vodeno okruženje može mijenjati ionsku jakost i pH-vrijednost, te interakcije dovoljno jake da dvosloj zadrži svoju karakterističnu strukturu. Kako bi kontakt hidrofobnih dijelova s vodom bio minimalan, dvosloj se spaja na svojim krajevima te tvori zatvorenu strukturu.^{1,22}

Prema sastavu, biološke membrane sadrže tri klase lipida: fosfogliceride, sfingolipide i steroide. Najzastupljeniji lipidi su fosfogliceridi, derivati glicerol-3-fosfata. Molekula fosfoglicerida uobičajeno se sastoji od hidrofobnog repa, kojeg čine dva lanca masne kiseline vezana na hidroksilne skupine glicerol-fosfata, te hidrofilne glave, koju čini fosfatna skupina. Dva lanca masne kiseline mogu se razlikovati u duljini i stupnju zasićenosti. Fosfogliceridi se klasificiraju ovisno o prirodi polarne skupine (slika 2.1.2.).



Slika 2.1.2. Općenite strukture različitih skupina fosfoglicerida. U membrani je kod većine fosfoglicerida jedna masna kiselina (poli)nezasićena, pri čemu broj i položaj dvostrukih veza mogu varirati.



Slika 2.1.4. Struktura kolesterola.

Pri fiziološkoj pH-vrijednosti, većina fosfoglicerida je neutralna, dok su neki, poput PS, negativno nabijeni. Unatoč tome, molekule svih fosfolipida mogu se organizirati u fosfolipidne dvosloje. Sfingomijelini, koji su oblikom slični fosfogliceridima, također mogu tvoriti dvoslojne strukture, pri čemu nastaje miješani dvosloj fosfoglicerida i sfingomijelina. Kolesterol i ostali steroidi imaju prevelik hidrofobni karakter te ne mogu tvoriti dvosloj, osim ako su pomiješani s fosfolipidima.²²

2.1.2. Membranski proteini

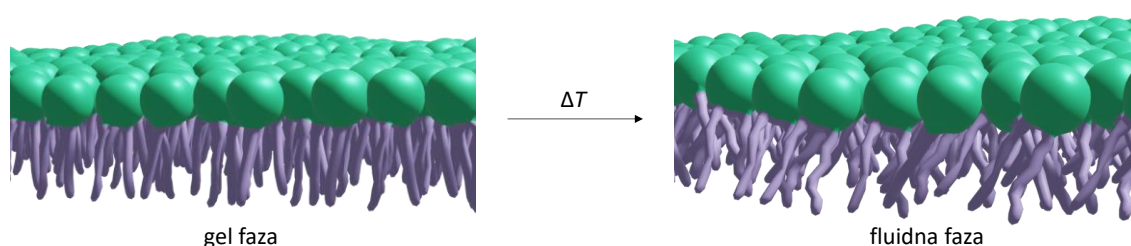
Ovisno o vrsti interakcije s membranom, u stanici se razlikuju transmembranski i periferni proteini.¹ Transmembranski proteini su, kao i lipidi, amfipatske molekule. Hidrofobni dijelovi u interakciji su s hidrofobnim lancima lipidnih molekula u unutrašnjosti dvosloja, dok su hidrofilni dijelovi izloženi vodi s bilo koje strane membrane. Membranski proteini mogu se i kovalentno vezati za lance masnih kiselina, što dodatno pojačava njihovu hidrofobnost, dok neki membranski proteini niti ne ulaze u unutrašnjost membrane, već su vezani na druge membranske proteine nekovalentnim interakcijama. Takvi proteini lako se mogu otpustiti s membrane promjenom nekog vanjskog parametra, npr. ionske jakosti ili pH-vrijednosti te se nazivaju perifernim membranskim proteinima.¹ S druge strane, transmembranski proteini i proteini vezani na lipide i druge proteine koji se ne mogu otpustiti istim promjenama nazivaju se integralni membranski proteini. Samo transmembranski proteini djeluju s obje strane dvosloja te mogu prenositi molekule unutar i van stanice. Većina membranskih integralnih proteina sadrži jednu ili više α -zavojnica koje prodiru kroz membranu te se hidrofilni dijelovi takvih proteina nalaze i u egzoplazmatskom i u citosolnom prostoru, dok su neki samo djelomično uronjeni u membranu.¹

Membranski proteini sudjeluju u nizu staničnih procesa, pri čemu njihova uloga ovisi o položaju i načinu vezanja s membranom. Proteini koji se nalaze na membrani imaju ulogu

receptora te prenose informacije iz okoline do stanice, omogućavajući joj prilagodbu na vanjske uvjete. Neki membranski proteini sudjeluju i u staničnim procesima ključnima za stvaranje energije. Unutarnja membrana mitohondrija, primjerice, posjeduje proteinske komplekse respiratornog lanca koji sudjeluju u procesu staničnog disanja i sintezi ATP-a.¹ Proteinski nosači i kanalni proteini čine skupinu transportnih proteina. Kanalni proteini tvore vodene pore u membrani, koje omogućavaju prolaz specifičnih molekula, dok su proteinski nosači u izravnom kontaktu s molekulom koja se prenosi.¹⁹ Proteinski nosač veže se za molekulu te prolazi kroz niz konformacijskih promjena kako bi ju dostavio s druge strane membrane. Većina nosača specijalizirana je za određenu vrstu spojeva, poput šećera ili aminokiselina.¹⁹

2.1.3. Fluidnost stanične membrane

Fluidnost stanične membrane ima velik biološki značaj te ovisi o sastavu i temperaturi. Pri određenoj temperaturi, kod molekula fosfolipida dolazi do faznog prijelaza. Visoko uređena faza naziva se gel faza te je u njoj kretanje hidrofobnih lanaca ograničeno.¹ Porast temperature omogućava brže gibanje hidrofobnih lanaca te prijelaz membrane u manje uređenu, fluidnu fazu (slika 2.1.5.). Pri fiziološkim uvjetima, hidrofobna unutrašnjost membrane uobičajeno ima nisku viskoznost te je u fluidnoj fazi. Temperatura faznog prijelaza smanjuje se smanjenjem duljine ugljikovodičnog lanca te porastom broja dvostrukih veza.¹ Kraći ugljikovodični lanci u pravilu pokazuju slabiju međusobnu interakciju, a interakcija je dodatno otežana u prisustvu *cis*-dvostrukih veza koje narušavaju gusto pakiranje hidrofobnih dijelova. Sinteza spojeva s *cis*-dvostrukim vezama osigurava fluidnost membrane i pri nižim temperaturama. Primjerice, bakterije čija se temperatura mijenja ovisno o temperaturi okoliša, prilagođavaju sastav masnih kiselina u membrani kako bi se zadržala fluidnost na način da pri nižoj temperaturi sintetiziraju veći broj masnih kiselina s *cis*-dvostrukim vezama.^{1,22}



Slika 2.1.5. Shematski prikaz faznog prijelaza lipida iz gel faze u fluidnu fazu.

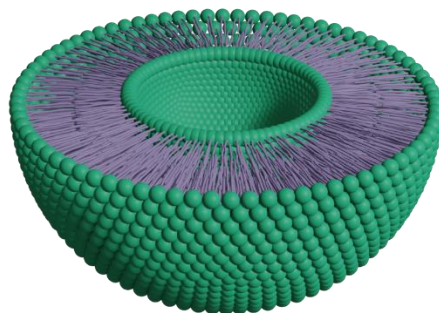
Uz fosfolipide, na fluidnost membrane značajno utječe i kolesterol. Kolesterol se u membranu smješta na način da su hidroksilne skupine u blizini polarne glave fosfolipida, dok su rigidni, sterolni prsteni u interakciji s hidrofobnim lancima. Prisutnost kolesterola smanjuje mobilnost ugljikovodičnih lanaca, što stabilizira strukturu dvosloja te, pri uobičajenim fiziološkim koncentracijama, smanjuje fluidnost i permeabilnost za male molekule topljive u vodi. Pri nižim koncentracijama kolesterola, steroidnim prstenovima se razdvajaju i dispergiraju ugljikovodični lanci, prilikom čega membrana postaje fluidnija.²⁸ Dok je kolesterol glavni predstavnik sterola u stanicama sisavaca, u sastavu stanične membrane određenih organizama nalaze se i drugi steroli. Primjerice, ergosterol sastavni je dio membrana gljiva, dok se lanosterol može pronaći u prokariotskim membranama.²⁸ Lipidni sastav dvosloja utječe i na debljinu membrane, pri čemu su sfingomijelin i kolesterol povezani s debljim dvoslojem i manje fluidnom membranom od fosfolipida.^{1,22}

2.2. Modelne stanične membrane

Stanična membrana ključna je sastavnica stanica svih živih bića te su mnoga biofizička svojstva membrana od kritične važnosti za preživljavanje organizma.⁶ Pokazano je da čak i mikroskopske promjene u debljini, fluidnosti, permeabilnosti i naboju membrane mogu narušiti makroskopsku strukturu i dovesti do gubitka funkcije barijere.²⁹ Iz tog je razloga ključno istražiti strukturne promjene membrane uzrokovane vanjskim faktorima i interakcijom s drugim molekulama. S obzirom na kompleksnost strukture te izazove koji se javljaju prilikom izolacije i rada sa staničnom membranom, javlja se potreba za razvojem biomimetičkih sustava, koji bi omogućili *in vitro* istraživanja fosfolipidnih struktura, a podrazumijevaju lipidne dvosloje različitih sastava i morfologije.

2.2.1. Liposomi

Liposomi su sferične strukture načinjene od jednog ili više lipidnih dvosloja u čijoj se unutrašnjosti, odnosno između susjednih dvosloja, nalazi vodeni medij (slika 2.2.1.).



Slika 2.2.1. Struktura liposoma.

Uz to što se često koriste kao modelne stanične membrane, liposomi se, zahvaljujući svojoj biokompatibilnosti i biorazgradivosti, koriste i u dostavi lijekova.^{30–33} Do formiranja lipidnih dvosloja u vodenom mediju dolazi spontano, pri čemu se hidrofilne glave orijentiraju prema vodi, dok se lipofilni lanci okreću jedni prema drugima te dolazi do spajanja krajeva i nastanka globularne strukture. U takvoj su strukturi polarni dijelovi orijentirani prema vanjskoj i unutarnjoj vodenoj fazi, dok se nepolarni dijelovi nalaze u unutrašnjosti membrane.³⁴

Lamelarnost označava broj dvosloja koji se nalaze u strukturi, pri čemu se razlikuju unilamelarne (engl. *unilamellar vesicles*, UV) i multilamelarne (engl. *multilamellar vesicles*, MLV) vezikule. Ovisno o veličini, liposomi se mogu dodatno klasificirati. Male unilamelarne vezikule (eng. *small unilamellar vesicles*, SUV) čine liposomi u rasponu veličina 20 nm–100 nm, velike unilamelarne vezikule (engl. *large unilamellar vesicles*, LUV) su veličine iznad 100 nm, dok su ogromne unilamelarne vezikule (engl. *giant unilamellar vesicles*, GULV) veličine iznad 1000 nm. Kod vezikula koje se sastoje od više koncentričnih lipidnih dvosloja razlikuju se oligolamelarne vezikule (engl. *oligolamellar vesicles*, OLV), koje mogu biti u rasponu veličina 100 nm–1000 nm, te multilamelarne velike vezikule (engl. *multilamellar large vesicles*, MLLV), uobičajeno veličine iznad 500 nm. Vezikule promjera većeg od 1000 nm nazivaju se multivezikularne te njihova veličina može sezati i do nekoliko mikrometara.^{34,35}

Liposomi se, u svrhu biomimetike staničnih membrana, uobičajeno pripremaju od prirodnih ili sintetskih fosfolipida koji se mogu pronaći u membranama sisavaca i drugih organizama. Za proučavanje staničnih membrana prokariota najčešće se koriste negativno

nabijeni fosfolipidi, primjerice dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), palmitoiloleoilfosfatidilglicerol (POPG), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG) i dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG). Za proučavanje membrana eukariotskih organizama uglavnom se koriste lipidi 'zwitterionske' prirode. Najčešće korišteni su fosfatidilkolini (PC), primjerice dioleoilfosfatidilkolin (DOPC), dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC) i dimiristoilfosfatidilkolin (DMPC). Uz fosfatidilkoline, koriste se i fosfatidiletanolamini (PE), fosfatidilserini (PS) i fosfatidilgliceroli (PG).³⁶

Najstarija metoda pripreme liposoma je metoda hidratacije lipidnog filma.³⁷ Ukratko, lipid se otapa u organskom otapalu koje se potom uparava pod vakuumom, pri čemu na stijenkama okrugle tikvice nastaje lipidni film. Dodatkom vodenog medija dolazi do spontanog formiranja liposoma, a mehaničkim miješanjem i naglim promjenama temperature osigurava se potpuno odvajanje filma od stijenke. Ovim procesom nastaju MLV heterogene raspodjele veličina. Temperatura tijekom cijelog procesa hidratacije mora biti viša od temperature faznog prijelaza lipida. Termodinamički, MLV su stabilnije su od UV, stoga je potrebno uložiti mehaničku energiju kako bi se postigla homogena raspodjela veličina.^{38,39} Male unilamelarne vezikule mogu se dobiti sonifikacijom ili ekstrudiranjem. Ekstrudiranje je proces koji uključuje višestruko provlačenje suspenzije liposoma kroz polikarbonatnu membranu željene veličine pora, dok sonifikacija podrazumijeva izlaganje suspenzije ultrazvučnim valovima.⁴⁰

Osim metode hidratacije lipidnog filma, mogu se koristiti i metode injektiranja⁵, pri čemu se kao organsko otapalo najčešće koriste dietil-eter i etanol. Lipidi otopljeni u organskom otapalu injektiraju se u vodeni medij koji je u velikom suvišku, a organsko se otapalo, ovisno o injektiranoj količini, može ukloniti isparavanjem pod sniženim tlakom. Važnu ulogu u metodama pripreme liposoma imaju i deterdženti⁵, koji se pri kritičnoj micelizacijskoj koncentraciji koriste za otapanje lipida. Deterdžent se najčešće uklanja dijalizom te, njegovim uklanjanjem, micle postaju sve zasićenije fosfolipidima koji se na kraju spontano organiziraju u GUV. Glavni nedostatak ove metode je otežano pročišćavanje s obzirom na to da su u liposomima, i nakon uklanjanja, u nekim slučajevima pronađeni tragovi deterdženta. Iz tog se razloga intenzivno radi na razvoju učinkovitijih tehnika pročišćavanja suspenzija liposoma.⁵ Metoda razrjeđenja alkoholom pokazala se učinkovitom za pripravu velike količine liposoma. Sastoji se od miješanja membranskih komponenti, odnosno lipida, s polarnim, nehlapljivim alkoholom, primjerice glicerolom ili propilen-glikolom. Smjesa se potom dispergira u vodenom mediju.⁴¹

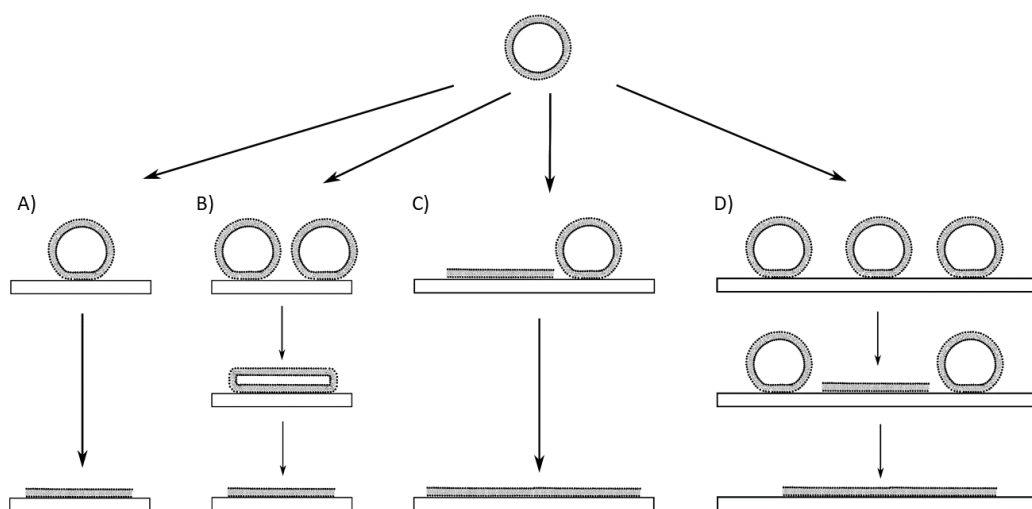
2.2.2. Lipidni dvosloj na nosaču

Jedan od najjednostavnijih modelnih sustava za opis stanične membrane je lipidni dvosloj na nosaču (engl. *supported lipid bilayer*, SLB), koji se sastoji od jednog lipidnog dvosloja fiksiranog na čvrstu podlogu. Najčešći nosači su staklo, silika i tinjac.³⁸ Lipidni se dvosloj na podlogu može vezati direktno, kovalentnim vezama ili ionskim mostovima. Uz to, lipidni dvosloj može biti odvojen od podloge na način da se između nalazi tanak sloj molekula vode ili hidratiziranih polimera.^{42–44}

Lipidni dvosloj na nosaču tradicionalno se pripravlja korištenjem Langmuir-Blodgettove depozicije, metode koja se općenito često koristi za pripravu tankih filmova na podlozi. Prilikom vertikalnog uranjanja podloge u suspenziju lipida dolazi do prijenosa molekula lipida iz međupovršinskog prostora na granici faza voda/zrak te posljedičnog vezanja na supstrat. Slojevi na podlozi rastu vertikalno, a njihov broj ovisi o sastavu lipida i supstrata te o broju uranjanja, pri čemu prilikom svakog uranjanja dolazi do nastanka homogenog sloja.⁴⁵

Do nastanka lipidnog dvosloja na čvrstoj podlozi može doći i raspadom liposoma, ukoliko su interakcije između podloge i lipidnog dvosloja jače nego interakcije koje održavaju vezikularnu strukturu liposoma.^{46–48} Spontano pucanje liposoma i adsorpcija na podlogu ovisе o vrsti lipida i podloge.^{49,50} Uz to, na proces depozicije značajno utječe i stabilnost vezikula. Veće vezikule su stabilnije te je mogućnost spontanog pucanja i formiranja planarnog dvosloja manja, dok su manje vezikule, radi veće zakrivljenosti, podložnije raspadu. Pronađeno je da su vezikule promjera oko 20 nm idealne za formiranje planarne membrane na supstratu.^{50,51}

U literaturi je predloženo nekoliko mehanizama pucanja liposoma i stvaranja planarnog lipidnog dvosloja. Ukoliko su interakcije između molekula lipida i podloge dovoljno jake, dolazi do spontanog pucanja individualnih liposoma (slika 2.2.2.A). Uz to, može doći do spajanja susjednih, adsorbiranih liposoma, što potom dovodi do pucanja (slika 2.2.2.B). Ukoliko je na podlogu već adsorbiran dvosloj, interakcije njegovih krajnjih molekula i liposoma mogu inducirati pucanje susjednog liposoma (slika 2.2.2.C). Konačno, kooperativna interakcija nekoliko susjednih liposoma može uzrokovati pucanje pri vrijednosti koja odgovara kritičnoj vezikularnoj prekrivenosti (slika 2.2.2.D).⁵²



Slika 2.2.2. Mehanizmi stvaranja lipidnog dvosloja na nosaču pucanjem liposoma: A) Spontatno pucanje individualnih liposoma; B) Spajanje susjednih liposoma; C) Interakcija liposoma s adsorbiranim dvoslojem; D) Kooperativna interakcija susjednih liposoma.

2.2.3. Istraživanja s modelnim membranama

Modelne lipidne membrane uspješno se koriste za istraživanje sastava staničnih membrana. Pokazano je da na membranama mogu nastati lipidne domene bogate kolesterolom okružene fluidnom fazom, koje je moguće detektirati korištenjem modelnih membrana.^{53,54} Korištenje planarnih membrana omogućava veću kontrolu sastava i svojstava od liposoma, stoga su na nosačima uspješno pripravljene i asimetrične lipidne membrane⁵⁵, koje vjerodostojnije opisuju biološke membrane od onih simetričnih. I liposomi i lipidni dvosloji na nosaču koriste se za istraživanje sastava, morfologije i strukture membrane.^{56–59} Primjerice, Aburai i suradnici⁶⁰ koristili su rendgensko raspršenje svjetlosti kako bi odredili položaj kolesterola u liposomima pripremljenim od DPPC. Uz to, određeni su difuzijski koeficijenti mnogih lipida iz skupina fosfokolina i sfingomijelina.^{61–63} Fluidnost lipidnog dvosloja istraživana je i u prisutnosti membranskih proteina te je uočeno da je mobilnost proteina moguće zadržati ukoliko se između podloge i lipidnog dvosloja nanese dodatni sloj albumina goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumine*, BSA).⁶⁴ Nanomehanička svojstva membrana različitih sastava istražuju se uporabom mikroskopije atomskih sila i spektroskopije sila.^{65,66} Primjerice, u istraživanju fosfatidilkolinskih liposoma s ugrađenim kolesterolom pokazano je da Youngov modul elastičnosti raste s povećanjem koncentracije kolesterola. Uz to, pokazano je da se stabilnost

liposoma adsorbiranih na supstrat razlikuje od stabilnosti liposoma u otopini.⁶⁷ Mikroskopijom atomskih sila moguće je pratiti i sam proces adhezije liposoma na supstrat, njegovo pucanje te nastanak lipidnog dvosloja.⁶⁸ Kombinacijom spektroskopije sila i dinamičkog raspršenja svjetlosti uočeno je da, uz vrstu i koncentraciju lipida te koncentraciju kolesterola, na rigidnost liposoma utječe i njihova veličina.⁶⁹ Korištenjem fluorescencije pokazano je da je promjenom vanjskih, makroskopskih faktora moguće inicirati i kontrolirati strukturne promjene lipida na nanometarskoj razini.⁷⁰ Temperature faznih prijelaza mnogih lipida određene su korištenjem modelnih membrana, pri čemu se istražuje i utjecaj kolesterola na fazni prijelaz. Primjerice, u slučaju 1-miristoil-2-palmitoil-*sn*-glicero-3-fosfokolina (MPPC) uočeno je da dodatak kolesterola snižava temperaturu faznog prijelaza.⁷¹ Najčešće korištene metode za određivanje temperature faznih prijelaza su fluorescencijske metode te diferencijalna pretražna kalorimetrija.^{72,73} Uz to, za istraživanje faznih prijelaza moguće je koristiti i tehnike magnetske rezonancije, nuklearnu magnetsku rezonanciju i elektronsku spinsku rezonanciju.⁷⁴

Modelne membrane koriste se i za istraživanje interakcija lipida s ostalim staničnim molekulama. Primjerice, Shaw i suradnici⁷⁵ pratili su interakcije kationskih peptida s modelnim membranama upotrebom mikroskopije atomskih sila, dok su Barfoot i suradnici⁴⁷ istraživali preferencijalno vezanje F-aktina i lipidnih dvosloja u koje je ugrađen membranski protein potikulin, čime je poboljšana biomimetika plazmatskih membrana eukariotskih stanica. Lipidne modelne membrane koriste se i u razvoju lijekova. Baciú i suradnici⁷⁶ koristili su kationske amfifilne lijekove kako bi odredili količinu i mehanizam prijenosa lijeka preko membrane, dok se modelne membrane intenzivno primjenjuju i u studijama toksičnosti lijekova.^{77,78} S obzirom na to da je pokazana korelacija između narušavanja strukture lipidnih dvosloja i toksičnosti određenih spojeva, istraživanjem interakcija lipida i lijekova moguće je predvidjeti koncentraciju pri kojoj neki lijek pokazuje toksično djelovanje.^{79,80} Uz to, dodatak lijeka lipidnom dvosloju utječe na temperaturu faznog prijelaza, što dodatno naglašava važnost razumijevanja interakcija između lipida i lijekova.⁸¹ Osim neutralnih lipida, za pripremu i proučavanje svojstava liposoma uspješno su korišteni i kationski te anionski lipidi, najčešće u smjesi s nenabijenim lipidima, kako bi se omogućilo formiranje liposoma.^{82,83}

2.3. Lipidna peroksidacija

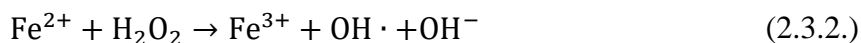
Jedna od osnovnih gradivnih jedinica stanične membrane su fosfolipidi koji posjeduju nezasićenu masnu kiselinu vezanu na 2-hidroksilnu skupinu glicerolne podjedinice. Mnoge od tih kiselina su polinezasićene, s dvostrukim vezama odvojenima metilenskim skupinama. Visoka koncentracija polinezasićenih masnih kiselina u fosfolipidima, uz to što ih čini podložnima oksidaciji, omogućava im sudjelovanje u radikalnim lančanim reakcijama. Najzastupljenija polinezasićena masna kiselina u stanicama je linoleinska kiselina te se procjenjuje da u lančanoj reakciji oksidacije jedna molekula oksidansa uzrokuje reakciju na, u prosjeku, 60 molekula kiseline.^{2,84}

Lipidna peroksidacija kompleksan je proces koji se događa u životinjama i u biljkama. Uključuje nastanak i propagaciju lipidnih radikala, reakciju s molekularnim kisikom te preslagivanje dvostrukih veza u nezasićenim lipidima. Na kraju dolazi do raspada lipida te nastanka velikog broja produkata. Prema mehanizmu, lipidna peroksidacija može biti enzimatska i neenzimatska. Enzimatska peroksidacija katalizirana je lipoksigenazama, skupinom enzima koji oksigeniraju slobodne i esterificirane polinezasićene masne kiseline, pri čemu nastaju peroksilni radikali. Neenzimatska lipidna peroksidacija može biti radikalna i neradikalna, ovisno o inicijatoru reakcije. U tijelu se najčešće paralelno odvijaju i enzimatska i neenzimatska lipidna peroksidacija.^{2,85}

2.3.1. Reaktivne kisikove vrste

Reaktivne kisikove vrste skup su molekula nastalih djelomičnom redukcijom molekularnog kisika te u tijelu nastaju kao neizbježna posljedica aerobnog okruženja u kojem živimo. Većina reaktivnih kisikova vrsta koje nastaju u tijelu su radikali, vrste koje posjeduju barem jedan nespareni elektron, što ih čini potencijalnim inicijatorima radikalne lipidne peroksidacije.⁸⁶ Procjenjuje se da prosječna odrasla osoba dnevno u organizam unese 600 g kisika. Glavna uloga molekularnog kisika u stanici je u procesu staničnog disanja koji se odvija u mitohondriju, a u kojem dolazi do redukcije kisika u vodu pomoću enzima citokrom oksidaze. U navedenom procesu, oko 90% kisika se uspješno reducira, dok se preostalih 10% djelomično reducira te nastaju superoksidni anion ($O_2^{\cdot-}$) (jednadžba 2.3.1) i vodikov peroksid (H_2O_2) koji lako mogu difundirati iz mitohondrija u citosol stanice.⁸⁴ Uz superoksidni radikal, reaktivne kisikove vrste

koje nastaju uključuju hidroksilni radikal ($\text{OH}\cdot$), koji nastaje u prisutnosti željezovih(II) iona (jednadžba 2.3.2), i hidroperoksilni radikal ($\text{HO}_2\cdot$), koji nastaje protonacijom superoksidnog radikala (jednadžba 2.3.3). Iz hidroperoksilnog radikala može nastati nova molekula vodikovog peroksida (jednadžba 2.3.4).^{87,88}



Hidroksilni radikal iznimno je reaktivan radikal ($E_{\text{red}}(\text{OH}\cdot/\text{H}_2\text{O}) = 2,3 \text{ V}$) te je najjači oksidans proteina i lipida.⁸⁵ Iako mu je procijenjeno vrijeme poluživota samo 1 ns ⁸⁹, iznimno je opasan jer u reakciji s drugom molekulom stvara novu reaktivnu vrstu. Uz to, može napasti širok spektar bioloških molekula, uključujući sve proteine, DNA te polinezasićene masne kiseline u staničnim membranama.⁴ Superoksidni anion slabije je reaktivan prema lipidima i proteinima ($E_{\text{red}}(\text{O}_2^- \cdot/\text{H}_2\text{O}_2) = 0,89 \text{ V}$), no njegov protonirani oblik, hidroperoksilni radikal, znatno je reaktivniji ($E_{\text{red}}(\text{HO}_2\cdot/\text{H}_2\text{O}_2) = 1,06 \text{ V}$).⁸⁵

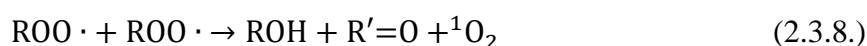
Vodikov peroksid uglavnom nastaje u enzimatskim reakcijama te, iako sama molekula nije radikal, lako difundira kroz staničnu membranu nakon čega može oksidirati mnoge stanične molekule. Primjerice, pokazano je da, u uvjetima oksidativnog stresa, kod određene skupine citoplazmatskih proteina dolazi do oksidacije cisteina i stvaranja disulfidne veze, što dovodi do poremećaja u prijenosu signala unutar stanice.⁹⁰ U biljnim i životinjskim stanicama, glavnu ulogu u uklanjanju reaktivnih kisikovih vrsta imaju enzim superoksid dismutaza koja katalizira reakciju disproporcioniranja superoksidnog radikala, pri čemu nastaje vodikov peroksid te enzim katalaza koja sudjeluje u uklanjanju vodikovog peroksida na način da katalizira njegov raspad na dvije molekule vode i molekularni kisik.⁴ Ova dva enzima u kombinaciji posjeduju prirodnu antioksidativnu aktivnost. Uz navedene, vrlo važnu ulogu u uklanjanju vodikovog peroksida ima i glutation peroksidaza.^{4,86} Vodikov peroksid nije jedina neradikalska reaktivna kisikova vrsta. Reakcijom dva peroksilna radikala može nastati i singletni kisik koji sudjeluje u daljnjem stvaranju peroksida.⁸⁶ Singletni kisik također može nastati prilikom ozračivanja određenih molekula u prisutnosti kisika, pri čemu dolazi do apsorpcije fotona i prelaska u pobuđeno elektronsko stanje u kojem se spin jednog nesparenog elektrona mijenja te dolazi do sparivanja elektrona dva suprotna spina.⁹¹ Nastanak singletnog kisika prilikom ozračivanja

uočen je kod molekula porfirina, riboflavina i bilirubina. Pokazano je da nakupljanje porfirina kod pacijenata koji boluju od određene vrste porfirije može dovesti do oštećenja kože ukoliko porfirini interagiraju sa Sunčevom svjetlosti, pri čemu nastaje singletni kisik.⁹² Singletni kisik u stanici najčešće napada proteine te može reagirati s većinom aminokiselina, pri čemu je koeficijent brzine reakcije najveći za histidin, triptofan, tirozin, cistein i metionin.⁹³ Uz to što je povezan s inaktivacijom mnogih enzima⁹⁴, povezan je i s oštećenjem DNA molekule u *E. Coli*.⁹⁵

2.3.2. Neenzimatska lipidna peroksidacija

Neenzimatska lipidna peroksidacija je lančana reakcija koja se sastoji od koraka inicijacije, propagacije i terminacije. U slučaju radikalske lipidne peroksidacije inicijator je hidroksilni radikal, dok je u slučaju neradikalske peroksidacije inicijator singletni kisik.⁸⁵ Reakcija započinje eliminacijom atoma vodika ili adicijom kisikovog radikala, pri čemu dolazi do nastanka aktiviranog metilenskog mosta.² Prijelazna struktura u reakciji eliminacije atoma vodika posjeduje polarni i radikalni karakter. Do polarizacije dolazi zbog interakcije s heteroatomom iz radikala koji uklanja vodik, dok je radikalni karakter posljedica homolitičkog cijepanja C–H veze. Polarni i radikalni karakter mogu se rezonantno stabilizirati ukoliko je na susjednom atomu ugljika prisutna dvostruka veza, što smanjuje energiju aktivacije i ubrzava reakciju.⁹⁶ Iz tog su razloga metilenski mostovi u polinezasićenim masnim kiselinama posebice podložni peroksidaciji. Eliminacijom vodikovog atoma, na ugljikovom atomu ostaje nespareni elektron (jednadžba 2.3.5.). Tako nastali radikal stabilizira se preslagivanjem dvostrukih veza, pri čemu nastaje konjugirani dien. Konjugirani dien u reakciji s molekularnim kisikom tvori peroksilni radikal koji potom napada novu molekulu polinezasićene masne kiseline te na taj način dolazi do propagacije reakcije. Duljina lipidne peroksidacije ovisi o mnogo faktora, uključujući omjer lipida i proteina u membrani, lipidni sastav, količinu kisika i prisutnost antioksidansa koji mogu prekinuti lančanu reakciju doniranjem vodika koji inaktivira peroksilni radikal.⁸⁶ Nastali radikali masnih kiselina ponovno se stabiliziraju preslagivanjem u konjugirane diene, pri čemu su najstabilniji hidroperoksidi, alkoholi, aldehidi i alkani. Lipidni hidroperoksid prvi je stabilan produkt lipidne peroksidacije te, pri fiziološkim uvjetima, prijelazni metali igraju važnu ulogu u njegovom daljnjem raspadu. Lančana reakcija zaustavlja se reakcijom dva radikala, što označava terminaciju lipidne peroksidacije (jednadžba 2.3.8.).

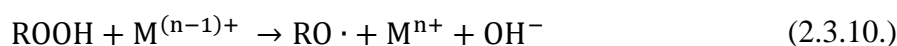
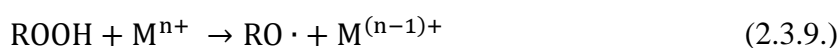
Terminacija je također moguća u prisustvu spoja koji pokazuje antioksidativno djelovanje, poput vitamina E. U tom slučaju, vitamin E stvara stabilniji fenoksilni radikal koji se može ukloniti drugim staničnim antioksidansima, poput askorbata ili glutationa.^{9,97}



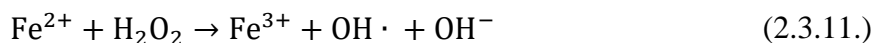
2.3.3. Utjecaj željeza na neenzimatsku lipidnu peroksidaciju

Brzinu i mehanizam lipidne peroksidacije određuju priroda i lokalna koncentracija oksidansa. Niska koncentracija vodikovog peroksida u većini stanica ($c = 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3} - 10^{-10} \text{ mol dm}^{-3}$) nije dovoljna za inicijaciju peroksidacije te velik omjer $[O_2]/[H_2O_2]$ uobičajeno prisutan u stanicama sugerira da je za inicijaciju potreban i katalizator.⁹⁸ Mnogi metalni kompleksi koji uspješno kataliziraju lipidnu peroksidaciju prisutni su *in vivo*, od kojih su najzastupljeniji kompleksi željeza⁹, a pronađeno je da u katalizi mogu sudjelovati i bakrovi(I) te kromovi(II) ioni.² Željezo se u tijelu pojavljuje kao Fe^{2+} ili Fe^{3+} ion, a prosječna odrasla osoba u tijelu ima oko 5 g željeza.⁹⁹ Pri tome je oko 65% željeza u obliku hemoglobina, 10% je u sastavu mioglobina, citokroma i enzima koji sadrže željezo, a 25% je vezano na proteine koji služe za skladištenje željeza, poput feritina i hemosiderina.¹⁰⁰

Reducirani oblici željezovih kompleksa (Fe^{2+}) mogu reagirati s lipidnim peroksidima i tvoriti alkoksilne radikale, dok oksidirani oblici (Fe^{3+}) reagiraju sporije te tvore peroksilne radikale. Oba radikala mogu sudjelovati u propagaciji lančane reakcije. Krajnji produkti kataliziranog raspada uključuju citotoksične aldehide i ugljikovodične plinove poput etana.² Ioni prijelaznih metala također mogu generirati nove radikale iz lipidnih hidroperoksida, čime se ponovno inicira lipidna peroksidacija (jednadžbe 2.3.9 i 2.3.10.).¹⁰



Jedna od najčešćih reakcija koja uzrokuje lipidnu peroksidaciju *in vivo* je Fentonova reakcija koja uključuje reakciju željezovog(II) iona s vodikovim peroksidom, pri čemu nastaju željezov(III) ion, hidroksilni radikal te hidroksidni ion (jednadžba 2.3.11.).⁸⁷



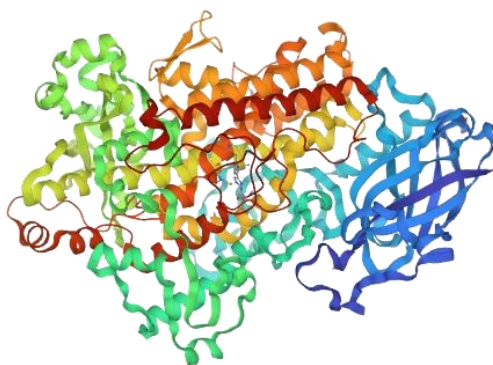
S molekularnog stajališta, nastanak hidroksilnog radikala iz vodikovog peroksida i željezovih(II) iona Fentonovom reakcijom smatra se korakom koji određuje brzinu reakcije lipidne peroksidacije.¹⁰¹ Pokazano je da su čak i niske stanične koncentracije (nmol dm^{-3}) iona prijelaznih metala dovoljne za kataliziranje Fentonove reakcije *in vivo*, pri fiziološkim koncentracijama vodikovog peroksida ($0,1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ – $1,0 \mu\text{mol dm}^{-3}$).¹⁰² Uz Fentonovu reakciju, pokazano je i da Fe^{2+} ioni u aerobnim uvjetima mogu reducirati molekularni kisik, pri čemu nastaje superoksidni anion (jednadžba 2.3.12.), a ta se reakcija događa i unutarstanično i vanstanično.⁹⁹



Količina iona željeza koji mogu katalizirati reakciju u tijelu je strogo kontrolirana. Željezovi ioni absorbiraju se iz organa trbušne šupljine te se prenose do stanica pomoću proteina transferina. Željezo vezano za transferin ne sudjeluje u radikalskim reakcijama, a višak željeza pohranjuje se u obliku feritina i hemosiderina. Zaštitni mehanizmi u tijelu osiguravaju da je pri fiziološkim uvjetima uvijek prisutna mala količina slobodnog željeza. Katalitička aktivnost Fe^{2+} iona izrazito ovisi o ligandima u njegovom okruženju. Uobičajen koordinacijski broj željeza je 6, a veća zasićenost ligandima implicira i manju katalitičku aktivnost željezovih vrsta. Iz tog se razloga heksadentantni ligandi smatraju najučinkovitijim ligandima za zaštitu od prekomjernog stvaranja hidroksilnih radikala. Pokazano je da se u slučaju oksidativnog stresa iz proteina koji skladište željezo otpušta prevelika količina željeza, što za posljedicu ima nastanak nekontroliranog broja reaktivnih kisikovih vrsta.^{4,99,103}

2.3.4. Enzimatska lipidna peroksidacija

Enzimatsku lipidnu peroksidaciju kataliziraju lipoksigenaze prisutne u bakterijama, biljkama i sisavcima.¹⁰⁴ Lipoksigenaze su dioksigenaze koje u svojoj strukturi sadrže željezo te kataliziraju regioselektivnu i enantioselektivnu oksidaciju masnih kiselina koje sadrže jednu ili više penta-1,4-dienskih jedinica.¹⁰⁵ Sastoje se od jednog polipeptida s dvije domene. Glavninu katalitičke domene čini α -zavojnica, a N-terminalnu domenu čini β -bačva (slika 2.3.1.).¹⁰⁶ S obzirom na to da lipoksigenaze kataliziraju lipidnu peroksidaciju na masnim kiselinama, lipidi se prvo hidroliziraju lipazama, a slobodne se molekule masnih kiselina otpuštaju iz membrane prije peroksidacije.^{85,107} Kao i kod neenzimatske lipidne peroksidacije, reakcija započinje eliminacijom atoma vodika. Enzim u svojem Fe(III) obliku prima elektron s masne kiseline te dolazi do eliminacije atoma vodika s ugljikovog atoma koji se nalazi na metilenskom mostu. Za razliku od neenzimatske lipidne peroksidacije, u ovom je slučaju eliminacija vodika stereoselektivna. Nakon eliminacije dolazi do preslagivanja dvostrukih veza te Z,E-dienske konjugacije. Na kraju dolazi do reakcije s molekularnim kisikom, pri čemu nastaje lipidni peroksilni radikal. Redukcijom i protonacijom peroksilnog radikala, uz pomoć Fe(II) iona, nastaje lipidni hidroperoksid.^{108,109} U tijelu su lipoksigenaze uključene u biosintezu lipidnih hormona, poput leukotriena i lipoksina. Uz to, određene vrste lipoksigenaza povezane su i s degradacijom organela i diferencijacijom stanica.¹¹⁰



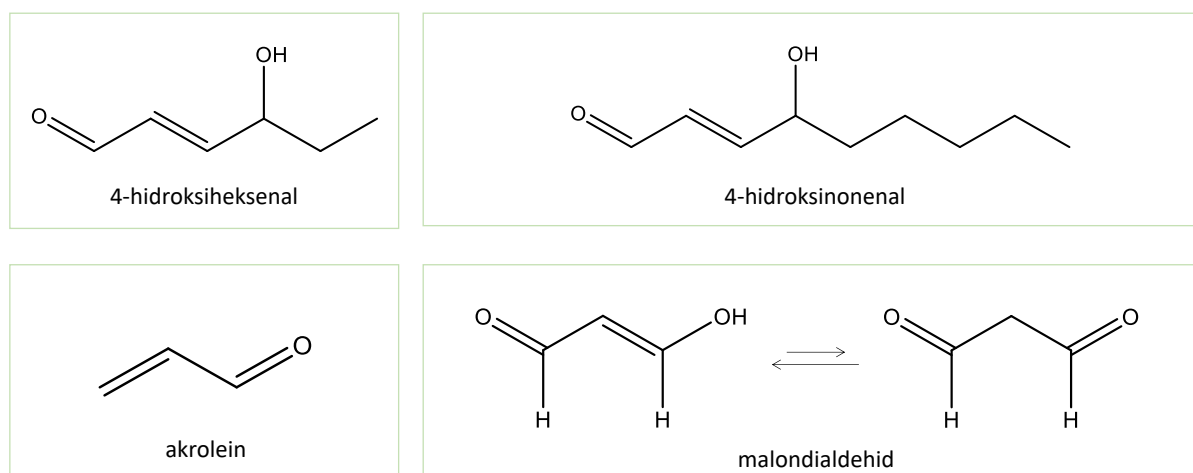
Slika 2.3.1. Struktura lipoksigenaze-B.¹¹¹

2.3.5. Produkti i biološki značaj lipidne peroksidacije

Oksidativna degradacija bioloških fosfolipida događa se u većini staničnih membrana, uključujući mitohondrije, mikrosome i peroksisome.² Oksidativni stres povezan je s mnogim neurodegenerativnim bolestima poput Alzheimerove^{112,113} i Parkinsonove bolesti¹¹⁴ te

pojedininim vrstama polineuropatije.¹¹⁵ Uz neurodegenerativne, oksidativni stres povezan je i s mnogim drugim bolestima, uključujući bolesti probavnog trakta¹¹⁶, jetre i bubrega.¹¹⁷ Stanična membrana je, zahvaljujući velikom broju polinezasićenih masnih kiselina, iznimno podložna oksidativnom napadu, a pokazano je i da podložnost oksidaciji raste s porastom broja konjugiranih dvostrukih veza.^{2,118} Uz nastanak velikog broja toksičnih produkata, lipidna peroksidacija za posljedicu ima i strukturne promjene stanične membrane. Polinezasićene masne kiseline imaju važnu fiziološku ulogu, primjerice, određuju strukturu, fluidnost i selektivnu permeabilnost stanične membrane te reguliraju ekspresiju gena, prijenos staničnih signala i opskrbu energijom.¹¹⁹ Pokazano je da lipidna peroksidacija smanjuje fluidnost membrane, utječe na fazne prijelaze lipida u sastavu membrane te smanjuje električni otpor.⁹⁷ Ukoliko dođe do pucanja lanaca masnih kiselina, može doći do inaktivacije enzima i poremećaja u procesima diobe stanice. Uz polinezasićene masne kiseline, reaktivne kisikove vrste, poput superoksidnog aniona i vodikovog peroksida, mogu dovesti do oštećenja mnogih drugih bioloških molekula, uključujući nukleinske kiseline i aminokiseline. Interakcija radikala s proteinima uzrokuje denaturaciju, agregaciju, fragmentaciju te, naposljetku, gubitak funkcije vezivnih tkiva, primjerice kolagena.¹⁰²

U reakciji lipidne peroksidacije razlikuju se primarni i sekundarni produkti (slika 2.3.2).



Slika 2.3.2. Izdvojeni produkti lipidne peroksidacije.

Primarni produkti uvijek su monohidroperoksidi koji se najčešće nazivaju lipidni hidroperoksidi (LOOH). Broj monomernih izomera hidroperoksida koji mogu nastati iz jedne molekule polinezasićene masne kiseline ovisi o broju dvostrukih veza (n) te je jednak $2n-2$.

Međutim, u tkivima sisavaca su polinezasićene masne kiseline vezane na mnoge druge lipidne molekule, poput sfingozina, fosfatidil-serina i estera kolesterola, stoga je broj lipidnih hidroperoksida koji nastaju *in vivo* mnogo veći.⁸⁴ Lipidni peroksidi u tijelu se reduciraju u nereaktivne alkohole masnih kiselina pomoću glutation peroksidaze ili nastavljaju reakciju i prelaze u sekundarne produkte.¹²⁰ Najzastupljeniji sekundarni produkti su oni koji nastaju kao produkti pucanja lanca, poput aldehida, ketona, alkohola, furana itd. Identificirano je preko 30 aldehidnih produkata lipidne peroksidacije te se oni mogu podijeliti u nekoliko skupina koje čine zasićeni aldehidi (npr. propanal, butanal, heksanal, oktanal, dekanal), 2,3-trans-nezasićeni aldehidi (npr. heksenal, oktenal, nonenal, undekenal) te 4-hidroksilirani-2,3-trans-nezasićeni aldehidi (npr. 4-hidroksiundekenal, 4-hidroksinonenal). Uz kratkolančane molekule, velik broj produkata može nastati i preslagivanjem monohidroperoksida, nakon čega slijedi daljnja oksidacija. Ti produkti, između ostalih, uključuju peteročlane monocikličke perokside, dihidroperokside te mono-, di-, tri-, keto- i epoksihidroksidne vrste. Produkti većih molekulskih masa mogu nastati u reakcijama polimerizacije u kojima dolazi do nastanka intermolekulskih veza između oksidiranih molekula.⁸⁴

Aldehidi pokazuju vrlo visoku reaktivnost prema biomolekulama, poput proteina, molekule DNA i fosfolipida. Skupina vrlo reaktivnih aldehida s dva elektrofilna reakcijska centra su alken-2-ali za koje je pokazano da, pri određenim uvjetima, mogu reagirati s gotovo svim aminokiselinama.¹²¹ Među njima se posebno ističu heksen-2-al, akrolein te njegov metilirani derivat krotonaldehid. Akrolein je iznimno citotoksičan. Pokazano je da u kontaktu s ljudskim bronhijalnim epitelnim stanicama inhibira rast i diobu stanice, narušava integritet membrane te dovodi do nekoliko oštećenja DNA i RNA molekula.^{122,123} Prilikom unosa u tijelo inhalacijom, akrolein dovodi do iritacije, pri čemu dolazi do hiperplazije i metaplazije u respiratornom traktu.¹²⁴

Jedan od najistraživanijih i najštetnijih produkata lipidne peroksidacije je 4-hidroksinonenal (HNE) koji nastaje kao produkt oksidacije ω -6 polinezasićenih kiselina. To je lipidni elektrofil i α,β -nezasićeni aldehid koji je vrlo reaktivan i lako se veže na proteine, DNA i fosfolipide. S obzirom na prisutnost konjugirane dvostruke veze između α i β atoma ugljika, β -ugljik je elektron-deficijentan, zbog čega HNE lako reagira s nukleofilnim lancima aminokiselina u reakciji koja se naziva Michealova adicija. Produkti Michaelove adicije su kovalentni adukti između elektrofila i bočnih lanaca aminokiselina, poput lizina¹²⁵, histidina i cisteina.¹²⁶ HNE djeluje kao unutarstanični signal koji može modificirati ekspresiju gena, dijeljenje i

diferencijaciju stanica te, konačno, izazvati apoptozu.² Procjenjuje se da se HNE može nakupljati u stanicama u koncentracijama $10 \mu\text{mol dm}^{-3}$ – 5mmol dm^{-3} nakon izlaganja oksidativnom stresu.¹²⁷ Uz to, pokazano je da vezanje HNE na velik broj enzima dovodi do njihove inaktivacije. Ti enzimi uključuju gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu¹²⁸, glutation-S-transferazu¹²⁹ i glutation reduktazu.¹³⁰ Uz to, adukti HNE i staničnih biomolekula identificirani su prilikom istraživanja Alzheimerove¹³¹ i Parkinsonove bolesti¹³² te su povezani i sa staničnom smrću neurona.¹³³ Osim neurodegenerativnih bolesti, adukti HNE s proteinima identificirani su u tkivima pacijenata koji boluju od karcinoma¹³⁴, amiloidoze¹³⁵, preeklampsije¹³⁶ i primarne bilijarne ciroze.¹³⁷

U slučaju ω -3 polinezasićenih kiselina, jedan od štetnijih produkata je 4-hidroksiheksen-2-al (HHE). Pokazano je da je glavni izvor HHE u tijelu dokosaheksaenoilna kiselina koja je zastupljena u većini tkiva.^{138,139} S obzirom na nisku lipofilnost i manju kemijsku reaktivnost, smatra se manje štetnim od HNE, no pri visokim koncentracijama pokazano je njegovo patološko djelovanje.¹³⁹ Primjerice, neurotoksičnost HHE povezana je s Alzheimerovom bolešću, iako u manjoj mjeri nego kod HNE.¹⁴⁰ Uz to, potvrđeno je da HHE inducira apoptozu endotelnih stanica.¹⁴¹

Svaka polinezasićena masna kiselina koja u strukturi posjeduje barem dvije dvostruke veze odvojene metilenskim mostom kao produkt peroksidacije može imati malondialdehid (MDA). Ovisno o pH-vrijednosti, MDA u vodenim otopinama može postojati u različitim formama. S obzirom na to da pK_a vrijednost enolne hidroksidne skupine iznosi $pK_a = 4,5$ ¹⁴², u neutralnim i lužnatim uvjetima MDA je većinom u obliku enolatnog aniona koji je slabo reaktivan. Međutim, i za takvu formu je pokazano da može stvarati adukte s dušičnim bazama DNA molekule.¹⁴³ U jako kiselim uvjetima ($\text{pH} < 4,5$), MDA je većinom u obliku enolnog tautomera. Konfiguracija dvostruke veze uglavnom je *cis* te u strukturi može doći do stvaranja unutar-molekulskih vodikovih veza i nastanka cikličke kelatne strukture. Pokazano je da MDA može inhibirati enzime poput ribonukleaze⁵¹, ući u interakcije s primarnim aminima¹⁴⁴ te modificirati strukturu kolagena.¹⁴⁵ Kancerogeno djelovanje MDA prvi je put detektirano još 1970-ih godina¹⁴⁶, nakon čega dolazi do porasta broja istraživanja povezanosti MDA i različitih tumora. Primjerice, MDA je detektiran u tumorima dojke¹⁴⁷, grlića maternice¹⁴⁸ i želudca.¹⁴⁹ Uz to, povišena koncentracija MDA u tijelu povezana je i s dijabetesom¹⁵⁰, Alzheimerovom¹⁵¹ te kardiovaskularnim bolestima.¹⁵²

2.3.6. Mehanizmi obrane od štetnih učinaka lipidne peroksidacije

Glavni mehanizam obrane od prekomjernog stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta i lipidne peroksidacije su antioksidansi. Antioksidansi su molekule koje pri niskim koncentracijama sprječavaju ili umanjuju oksidativnu razgradnju biomolekula.¹⁵³ U izvanstaničnim tekućinama postoji velik broj molekula koje pokazuju antioksidativno djelovanje, na način da sprječavaju inicijaciju peroksidacije ili reakciju lipidnog peroksilnog radikala s novom biomolekulom u koraku propagacije. U ljudskoj plazmi postoji velik broj proteina koji se mogu vezati na prijelazne metale te na taj način onemogućuju peroksidaciju kataliziranu metalima. Uz to, stanične membrane i lipoproteini sadrže lipofilne antioksidanse koji mogu reagirati s lipidnim peroksilnim radikalom i dovesti do terminacije. Vrlo je važno kooperativno djelovanje antioksidansa koji se nalaze u različitim okruženjima. Primjerice, tokoferoksilni radikali koji se nalaze u lipidnoj membrani, mogu se reducirati uz pomoć askorbata koji se nalazi u vodenoj fazi. Iz tog je razloga u organizmu vrlo bitna ravnoteža između antioksidansa u vodenoj i lipidnoj fazi. Među hidrofilnim antioksidansima ističu se askorbat, urat, glutation, bilirubin i albumin, dok su od lipofilnih antioksidansa najzastupljeniji α - i γ -tokoferol, likopen i lutein.¹⁵⁴ U *in vitro* eksperimentima pokazano je da, u odsustvu hidrofilnog antioksidansa, tokoferoksilni radikal može napasti vodik na polinezasićenoj masnoj kiselini i djelovati prooksidativno.¹⁵⁵ Nadalje, askorbinska kiselina, ovisno o uvjetima, može pokazivati i prooksidativno i antioksidativno djelovanje.¹⁵⁶

Molekule antioksidansa, osim što mogu izravno reagirati s radikalnim molekulama doniranjem atoma vodika, mogu stvarati komplekse s prijelaznim metalima te na taj način uklanjati katalizator potreban za reakciju peroksidacije. Primjerice, hidroksilni radikal je vrlo reaktivan te reagira s gotovo svim molekulama u stanicama, pri čemu su koeficijenti brzine tih reakcija u rasponu (10^9 – 10^{10}) mol dm⁻³ s⁻¹.¹⁵⁷ Iako u tijelu postoje spojevi koji mogu izravno ukloniti hidroksilne radikale, nijedna molekula nema specifično tu ulogu te je izglednije da je glavni mehanizam antioksidativnog djelovanja u slučaju hidroksilnog radikala vezanje prijelaznog metala potrebnog za njegov nastanak.¹⁵³

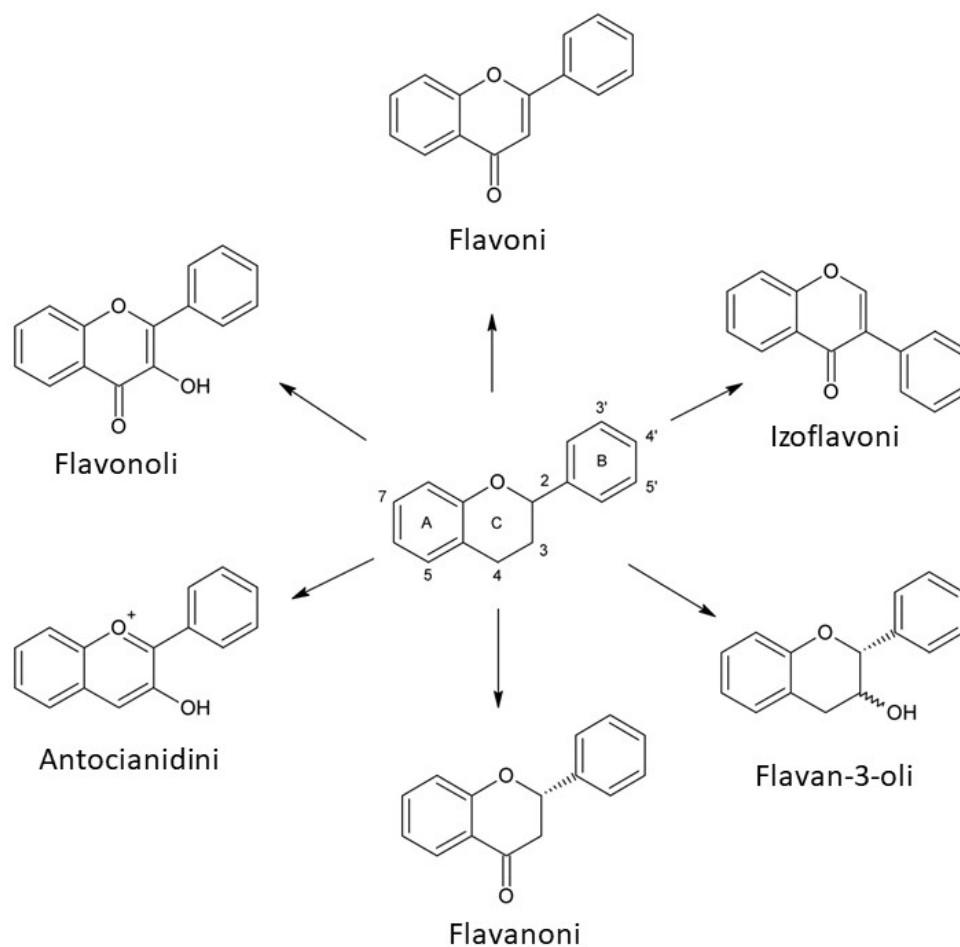
2.4. Flavonoidi

Flavonoidi su sekundarni metaboliti biljaka koji, za razliku od primarnih metabolita, nisu ključni za preživljavanje biljke.¹⁵⁸ Moguće ih je pronaći u različitim dijelovima biljke te se procjenjuje da u prirodi postoji više od 10000 flavonoida različitih struktura. Široka raznolikost rezultat je velikog broja mogućih strukturnih modifikacija.¹⁵⁹ Mnogi su flavonoidi, u kombinaciji s karotenoidima, sastavni dijelovi biljnih pigmenata zaslužnih za boju i miris cvijeća.⁷ U slučaju voća i povrća, flavonoidi privlače kukce te pospješuju oprašivanje¹⁶⁰, a služe i za zaštitu od nametnika.¹⁶¹ Pokazano je da flavonoidi štite biljke od ultraljubičastog zračenja¹⁶² te sudjeluju u prijenosu biljnog hormona rasta auksina.¹⁶³ U biljkama se flavonoidi sintetiziraju u citosolu polipropanoidnim putem iz fenilalanina i malonil-koenzima A.¹⁶⁴

S obzirom na to da nastaju metabolizmom biljnih vrsta, flavonoide je moguće pronaći i u hrani i piću biljnog porijekla, poput voća, povrća, čaja, vina i meda. Takvi se flavonoidi nazivaju prehrambeni flavonoidi.^{165,166}

2.4.1. Struktura i klasifikacija flavonoida

Svi flavonoidi posjeduju istu osnovnu C6-C3-C6 strukturu koju čini 2-fenil-benzopiran. Struktura se sastoji od dva aromatska C6 prstena (A i B) i heterocikličkog prstena (C) u čijem je sastavu jedan atom kisika. U prirodi se velik broj flavonoida nalazi u glikozidnoj formi, pri čemu šećerne podjedinice i hidroksilne skupine posjeduju polarni, a metilne skupine i izopentilne jedinice nepolarni karakter.¹⁶⁴ Ovisno o supstituentima i stupnju nezasićenosti, flavonoidi se mogu podijeliti u nekoliko skupina koje uključuju flavone, flavonole, flavanone, flavan-3-ole, izoflavone i antocianidine (slika 2.4.1.).⁸⁷



Slika 2.4.1. Strukture različitih podskupina flavonoida.

Flavone karakterizira dvostruka veza između ugljikovih atoma na položajima C2 i C3 te karbonilna skupina na položaju C4. Većina flavona u voću i povrću posjeduje hidroksilnu skupinu na položaju C5 u A prstenu, dok hidroksilacija na ostalim položajima, prvenstveno C7, C3' i C4', ovisi o vrsti voća ili povrća. Najzastupljeniji predstavnici flavona su luteolin, apigenin i tangeritin, a neki od važnih izvora u prirodi su menta, celer, kamilica i peršin. Uz to, pokazano je da je kora citrusnog voća bogata polimetoksiliranim flavonima, tageretinom, nobiletinom i sinensetinom.⁷

Flavonoli su flavonoidi koji posjeduju karbonilnu skupinu na položaju C4 te hidroksilnu skupinu na položaju C3 koja može biti glikozilirana. Smatraju se najvećom i najzastupljenijom podskupinom flavonoida u voću i povrću, pri čemu ih je moguće pronaći u luku, salati, rajčicama, jabukama, grožđu te bobičastom voću. Uz to, crveno vino i čaj također su važan izvor flavonola. Flavonoli pokazuju mnogo blagotvornih učinaka za organizam, kao što je

smanjenje rizika od vaskularnih bolesti. Glavni predstavnici ove skupine su kvercetin, miricetin, kaempferol i fisetin.⁷

Flavanoni se još nazivaju i dihidroflavoni te ih karakterizira zasićenost C prstena. Jedina strukturna razlika između njih i flavona je zasićenost veze između ugljikovih atoma na položajima C2 i C3. Prisutni su u svom citrusnom voću te su odgovorni za gorak okus njihovog soka i kore, a pokazano je da posjeduju antioksidativno i protuupalno djelovanje te snižavaju ukupnu razinu kolesterola u krvi. Najpoznatiji predstavnici su hesperitin i naringenin.⁷

Struktura izoflavona se od strukture flavona razlikuje u položaju fenilne skupine. U prirodi ih uglavnom sintetiziraju biljke iz porodice mahunarki, pri čemu je najčešći izvor izoflavona u ljudskoj prehrani soja. Glavni predstavnici su danidzein i genistein koji su, osim iz biljaka, izolirani i iz određenih bakterija.¹⁶⁷ Nakon unosa, izoflavoni se u tijelu prevode u biljne estrogene koji inhibiraju enzime odgovorne za rast zloćudnih tumora povezanih s lučenjem hormona.⁷

Flavan-3-oli, koji se još nazivaju i dihidroflavonoli, su 3-hidroksi derivati flavanona. Ukoliko su u monomernoj formi nazivaju se katehini, dok se polimeri flavan-3-ola nazivaju proantocijanidini.¹⁶⁸ Za razliku od većine flavonoida, ne posjeduju dvostruku vezu između ugljikovih atoma na položajima C2 i C3 ni karbonilnu skupinu na C prstenu. Uz to, flavan-3-oli u prirodi nisu prisutni u glikoziliranoj formi.⁷ Katehine je moguće naći u voću, pri čemu je njihov najbogatiji izvor marelica. Također su prisutni u crnom vinu, zelenom čaju i čokoladi.¹⁶⁹ Crni čaj sadrži nekoliko monomernih flavan-3-ola koji zagrijavanjem listova oksidiraju te dolazi do njihove kondenzacije i nastanka dimera teaflavina i polimera tearubigina.¹⁶⁸ U voću su glavni predstavnici flavan-3-ola katehin i epikatehin, dok se galokatehin i epigalokatehin mogu naći u sjemenkama povrća, grožđu i čaju.

Proantocijanidini, koji se još nazivaju i kondenzirani tanini, su dimeri, oligomeri i polimeri katehina međusobno povezani preko ugljikovih atoma na položajima C4 i C8 ili C6. Stupanj polimerizacije može značajno varirati te je pronađeno da je, primjerice u jabukama, srednji stupanj polimerizacije u rasponu vrijednosti 4–11.¹⁷⁰ Pretpostavlja se da je polimerizacija tanina odgovorna za smanjenje njegove koncentracije do kojeg dolazi uslijed sazrijevanja voća.¹⁶⁸

Antocijanidini su sastavni dio pigmenta odgovornih za boju biljaka te se iz tog razloga istražuju i u svrhu pripreve prirodnih bojila, kao alternative sintetskim aditivima. Njihova boja ovisi o pH-vrijednosti i stupnju metilacije ili acilacije na hidroksilnim skupinama A i B prstenova. Dok je većina flavonoida slabo topljiva u vodenim medijima, antocijanidini su dobro

topljivi, što im omogućava primjenu u vodenim sustavima. U prirodi ih je moguće pronaći u grožđu, borovnicama te crvenom kupusu, a neki od predstavnika su cianidin, delfinidin i malvidin.^{7,171}

2.4.2. Antimikrobno djelovanje flavonoida

Flavonoidi se sve više istražuju u medicinske svrhe zahvaljujući svojim antimikrobnim učincima koji uključuju antibakterijsko, antiviralno i antifugalno djelovanje.

Pokazano je da propolis, čije se antibakterijsko djelovanje pripisuje upravo velikoj količini flavonoida u sastavu, uspješno štiti od Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, iako je učinak izraženiji kod Gram-pozitivnih bakterija.¹⁶⁶ Kvercetin i apigenin pokazali su antibakterijsko djelovanje u kontaktu s bakterijama *Helicobacter pylori* i *Escherichia coli*¹⁷², dok su Konstantinopoulou i suradnici¹⁷³ izolirali deset flavonoida poznatih struktura iz visokog jarmena te ispitivali njihovo antibakterijsko djelovanje u kontaktu s bakterijom *Bacillus cereus*. U navedenom istraživanju, većina flavonoida pokazala je antibakterijsku aktivnost, pri čemu su se aglikoni flavonoida pokazali učinkovitijima od glikozidnih oblika. Uz to, uočeno je da je prisustvo orto-hidroksilne skupine ključno za antimikrobnu ulogu. Konačno, flavonoidi iz skupina flavonola i flavona pokazuju antibakterijsko djelovanje čak i u kontaktu s bakterijama otpornima na antibiotike.¹⁷⁴ Uz kvercetin i apigenin, antibakterijsko djelovanje u kontaktu s *Helicobacter pylori* pokazali su i ponciretin, hesperetin, naringenin i diosmetin.¹⁷⁵ Arima i suradnici¹⁷⁶ istraživali su antibakterijsko djelovanje rutina u prisutnosti drugih flavonoida, pri čemu je istraživana bakterija *Salmonella enteritidis*. Uočeno je da rutin bez prisustva drugih flavonoida ne pokazuje antibakterijsko djelovanje, no u kombinaciji s drugim flavonoidima značajno pojačava njihovo antibakterijsko djelovanje. S druge strane, rutin je pokazao antibakterijsko djelovanje u kontaktu s Gram-negativnim bakterijama *Pseudomonas aeruginosa* i *Klebsiella pneumoniae*.¹⁷⁷

Antiviralno djelovanje flavonoida prvi je put zabilježeno 1940-ih kada je uočeno profilaktičko djelovanje kvercetina kod miševa zaraženih bjesnoćom.¹⁷⁸ Do danas, antiviralno djelovanje potvrđeno je kod velikog broja flavonoida. Kaul i suradnici¹⁷⁹ istraživali su utjecaj prirodnih flavonoida, kvercetina, naringina, hesperitina i katehina na infektivnost i replikaciju nekoliko virusa, uključujući herpes simpleks virus tip 1 (HSV-1), polio-virus tip 1, parainfluenza virus tip 3 (Pf-3) i respiratorni sincicijski virus RSV. Uočeno je da kvercetin, ovisno o koncentraciji, smanjuje infektivnost svakog od navedenih virusa. Uz to, smanjena je i

replikacija virusa kada je, nakon infekcije, u medij dodan kvercetin. Hesperitin nije pokazao utjecaj na infektivnost, ali također smanjuje postotak replikacije svakog istraživanog virusa. S druge strane, katehin inhibira infektivnost, ali ne i replikaciju RSV i HSV-1, dok je utjecaj na ostale viruse zanemariv. Naringin nije pokazao utjecaj niti na jedan proučavani virus. Zaključeno je da flavonoidi posjeduju širok spektar antiviralnog djelovanja i u slučaju DNA (HSV-1) i RNA (polio, RSV, Pf-3) virusa. Antiviralno djelovanje flavonoida potvrđeno je i kod denga virusa¹⁸⁰ te enterovirusa 71, koji uzrokuje bolest ruku, nogu i usta.¹⁸¹

Propolis, osim antibakterijskog, pokazuje i antifungalno djelovanje. Cafarchia i suradnici¹⁸² istraživali su uzorke propolisa iz Apulije, regije u jugoistočnoj Italiji u kontaktu s dermatofitima, gljivicom *Aspergillus flavus* i kvascem. Svi uzorci propolisa pokazali su antifungalno djelovanje, pri čemu učinkovitost ovisi o geografskom području s kojeg je uzet uzorak, na temelju čega je zaključeno da kemijski sastav propolisa ovisi o njegovoj okolnoj vegetaciji. Tomas-Barberán i suradnici¹⁸³ izolirali su osam flavonoida iz afričke biljke *Helichrysum herbaceum*, dok su kao supstrat korištene spore patogena koja napada krastavac, *Cladosporium cucumerinum*. Uočeno je da vrlo male količine flavonoida zaustavljaju rast gljivica. Uz to, neki od flavonoida koji su pokazali antifungalno djelovanje su galangin¹⁸⁴, kaempferol¹⁸⁵ te citrusni flavonoidi kvercetin, naringin i neohesperidin.¹⁸⁶

2.4.3. Antioksidativno djelovanje flavonoida

Flavonoidi su poznati po svojoj antioksidativnoj aktivnosti, što podrazumijeva zaštitu stanica od oštećenja uzrokovanog slobodnim radikalima. Skoro svaka skupina flavonoida pokazuje antioksidativno djelovanje, pri čemu je ono najizraženije kod flavona i flavan-3-ola.⁷ Prilikom istraživanja povezanosti strukture flavonoida i antioksidativne aktivnosti, pokazano je da antioksidativna aktivnost ovisi o stupnjevima hidroksilacije i glikolizacije.¹⁸⁷ S obzirom na to da se uspješna antioksidativna zaštita pripisuje postojanju fenolnih hidroksilnih skupina, očekuje se da će učinkovitiji antioksidansi biti oni flavonoidi koji posjeduju viši stupanj hidroksilacije A i B prstena.¹⁸⁸ Identificirano je nekoliko mehanizama zaštitnog djelovanja flavonoida, pri čemu je najčešći izravno uklanjanje radikala. Temelji se na činjenici da su flavonoidi fenolni spojevi podložni oksidaciji u kinone koji, zahvaljujući reaktivnosti hidroksilnih skupina, stabiliziraju radikale.^{7,161} Elektronskom spinskom rezonancijom pokazano je da postoji korelacija između strukture flavonoida i sposobnosti uklanjanja superoksidnog aniona. Flavonoidi s tri hidroksilne skupine pokazali su se učinkovitijima u

uklanjanju radikala od onih s dvije hidroksilne skupine. Uz to, floroglucinol, koji posjeduje fenolnu hidroksilnu skupinu na meta položaju, mnogo lošije uklanja radikale od pirogalola i galne kiseline, koji posjeduju hidroksilnu skupinu na orto položaju. Flavonoidi s većim brojem hidroksilnih skupina koji posjeduju kateholne skupine također su pokazali izrazitu sposobnost uklanjanja radikala. U svrhu ispitivanja fizikalno-kemijskih svojstava proučavanih flavonoida, ispitana je sposobnost uklanjanja radikala pirokatehola s različitim supstituentima. Uočeno je da je utjecaj supstituenata na uklanjanje radikala povezan s redukcijskim potencijalom, što sugerira da je antioksidativno djelovanje derivata katehola određeno njihovim elektron-donorskim svojstvima.¹⁸⁹ Flavoni, koji ne posjeduju kateholne skupine, pokazali su se manje učinkovitim u uklanjanju radikala.¹⁹⁰ Prema literaturi, flavonoidi koji posjeduju nezasićenu vezu između ugljikovih atoma na položajima C2 u C3 u kombinaciji s hidroksilnom skupinom na ugljikovom atomu na položaju C4 najuspješniji su u uklanjanju radikala, što se pripisuje rezonantnoj stabilizaciji aromatskog prstena.⁸ S druge strane, flavonoidi u glikoziliranoj formi pokazuju slabiju antioksidativnu aktivnost.¹⁹¹

Uz direktno uklanjanje, flavonoidi mogu stvarati kelatne komplekse s metalnim ionima koji kataliziraju lipidnu peroksidaciju te na taj način inhibirati reakciju. Primjerice, pokazano je da kvercetin i rutin mogu stvarati kelatne komplekse sa željezovim ionima u tijelu. Takvi kompleksi, osim što uspješno uklanjaju željezove ione iz sustava, mogu i izravno uklanjati slobodne radikale. Pri tome je inhibicija kompleksiranjem izraženija kod rutina nego kod kvercetina. Zaključeno je da i rutin i kvercetin mogu utjecati na reakciju tijekom tri različita koraka u mehanizmu: nastanak superoksidnog iona, stvaranje hidroksilnog radikala tijekom Fentonove reakcije te nastanak lipidnog peroksidnog radikala.¹⁹²

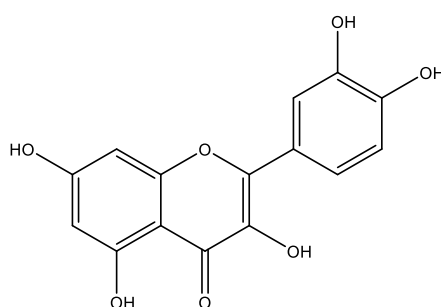
U literaturi je zabilježeno mnogo primjera antioksidativnog djelovanja prirodnih flavonoida izoliranih iz biljaka. Primjerice, pokazano je da svi fenolni spojevi izolirani iz crnog vina mogu uklanjati radikale i inhibirati oksidaciju lipoproteina niske gustoće (engl. *low-density lipoprotein*, LDL), pri čemu najizraženije antioksidativno djelovanje pokazuju katehini, monomerni antocianidini i fenolne kiseline.¹⁹³ Slično ponašanje uočeno je i u slučaju flavonoida izoliranih iz čaja. Od flavan-3-ola, najjače antioksidativno djelovanje pokazao je epigalokatehin, dok su još jaču zaštitnu ulogu pokazali teaflavini. Harguchi i suradnici¹⁹⁴ pokazali su da flavonoidi izolirani iz majčine dušice inhibiraju mitohondrijsku i mikrosomalnu lipidnu peroksidaciju te štite eritrocite od oksidativne hemolize. Rutin je vrlo zastupljen flavonoid kojeg je moguće pronaći u više od 860 namirnica¹⁹⁵ koje su u svakodnevnoj upotrebi

te je njegovo antioksidativno djelovanje potvrđeno *in vitro*¹⁹⁶ i *in vivo*.¹⁹⁷ U biljkama je pokazano da je reakcija između flavonoida i enzima peroksidaze uspješan mehanizam za uklanjanje vodikovog peroksida i zaštitu od oksidativnog stresa.^{198,199}

Flavonoidi pokazuju zaštitno djelovanje od oksidativnog oštećenja i u slučaju DNA molekule. Primjerice, Duthie i suradnici²⁰⁰ proučavali su citoprotektivno djelovanje kvercetina, miricetina, kaempferola i rutina prilikom oksidacije DNA molekule u kolonocitima te su zaključili da kvercetin i miricetin uspješno inhibiraju oksidaciju.

2.4.4. Kvercetin

Kvercetin (slika 2.4.2.) pripada skupini flavonola te je jedan od najistraživanijih flavonoida. U prirodi je široko zastupljen, pri čemu ga se u najvećoj količini može pronaći u čaju, voću i povrću.⁷ Primjerice, značajne količine pronađene su u jabukama, marelicama te grožđu.²⁰¹ Justesen i suradnici²⁰² proveli su kvalitativnu i kvantitativnu analizu flavonoida u voću i povrću te zabilježili najveću količinu kvercetina u luku, kelju i brusnicama.



Slika 2.4.2. Struktura kvercetina.

Apsorpcija kvercetina nakon unosa u organizam ovisi o glikozilaciji te o izvoru samog flavonoida. Većina se flavonoida u prirodi nalazi u glikoziliranom obliku koji je pogodniji za apsorpciju. Različiti izvori sadrže različito supstituirane flavonoide koji se različito apsorbiraju u tijelu. Primjerice, kvercetin u luku u svojoj strukturi sadrži jedino glukozide te je primijećena brža apsorpcija u odnosu na kvercetin u čaju, čiji su supstituenti uglavnom rutinozidne skupine.^{203,204} Hollman i suradnici²⁰⁵ uočili su da se, prilikom unosa kvercetin- β -glukozida, u ljudskom tijelu apsorpira oko 52% ukupne količine, dok se u slučaju aglikonskog kvercetina, koji u strukturi nema šećernu skupinu i kvercetin- β -rutinozida apsorбирalo samo 20%. Uz to, uočeno je da se kvercetin- β -glukozid iz luka, nakon brze apsorpcije, izlučuje polako tijekom

vremena od jednog dana, što sugerira da može značajno doprinijeti antioksidativnoj zaštiti organizma.²⁰⁶

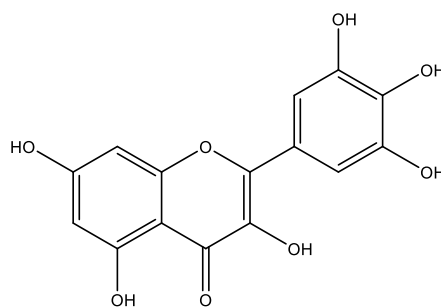
Kvercetin u medicini pronalazi široku primjenu te je jedan od najistraživanijih flavonoida u onkološkim granama. Ferry i suradnici²⁰⁷ proveli su prvu kliničku studiju koja uključuje kvercetin te uočili da uzrokuje inhibiciju enzima tirozin kinaze, što omogućava antitumorsko djelovanje kvercetina. Antitumorsko djelovanje potvrdili su Avila i suradnici²⁰⁸ proučavajući MDA-MB468 staničnu liniju tumora dojke. Terapeutsko djelovanje kvercetina zabilježeno je i u slučaju raka gušterače²⁰⁹, debelog crijeva²¹⁰ i jajnika.²¹¹ U eksperimentima provedenim na štakorima, potvrđeno je hepatoprotektivno i antifibrotično djelovanje.²¹² Osim navedenih, u literaturi je zabilježeno i antibakterijsko djelovanje kvercetina. Li i Xu²¹³ istraživali su interakciju između ekstrakta lotusa i pet različitih mikroorganizama povezanih s periodontitisom. Uz potvrđeno antimikrobno djelovanje ekstrakta, upravo je kvercetin okarakteriziran kao ključna komponenta zaslužna za antibakterijsko djelovanje. Pokazano je i da kvercetin može pojačavati djelovanje lijekova s antiviralnim djelovanjem, poput interferona²¹⁴ i 5-etil-2'-deoksiuridina.²¹⁵

Antioksidativno djelovanje kvercetina potvrđeno je *in vivo* i *in vitro*.²¹⁶ Nghakliana i suradnici²¹⁷ koristili su kvercetin biljnog podrijetla te uočili učinkovito uklanjanje radikala, pri čemu su korišteni radikali 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), superoksidni anion i 2,2'-azino-bis-3-etil-benzotiazolin-6-sulfonska kiselina (ABTS). Isti biljni ekstrakti korišteni su i za ispitivanje antihemolitičke i inhibitorne aktivnosti tijekom procesa lipidne peroksidacije u *ex vivo* eksperimentima na mišjim eritrocitima i stanicama jetre. Antioksidativno djelovanje kvercetina potvrđeno je i u ribljem ulju gdje je uočeno da kvercetin sprječava oksidaciju masnih kiselina i nastanak aldehida, pri čemu se antioksidativno djelovanje pripisuje stvaranju derivata estera iz masnih kiselina i kvercetina.²¹⁸

Uz to što sudjeluje u izravnom uklanjanju radikala, kvercetin može stvarati kelatne komplekse s ionima prijelaznih metala zahvaljujući kateholnom B prstenu.²¹⁹ Margina i suradnici²²⁰ istraživali su povezanost između biofizičkih svojstava membrane i antioksidativnog potencijala, s obzirom na to da je bioaktivnost flavonoida usko povezana s njihovim interakcijama s membranom. Pokazali su da inkorporacija kvercetina može dovesti do hiperpolarizacije i očvršćivanja membrane, što onemogućava mobilnost slobodnih radikala. Drugim riječima, smanjenje fluidnosti membrane dovodi do inhibicije lipidne peroksidacije.

2.4.5. Miricetin

Miricetin također pripada skupini flavonola, a u odnosu na kvercetin, posjeduje jednu dodatnu hidroksilnu skupinu na C5' položaju B prstena (slika 2.4.3.). Moguće ga je pronaći u mnogim prehrambenim namirnicama, pri čemu je najzastupljeniji u voću, npr. grožđu²⁰¹, brusnicama²⁰² i crnom ribizu.²²¹



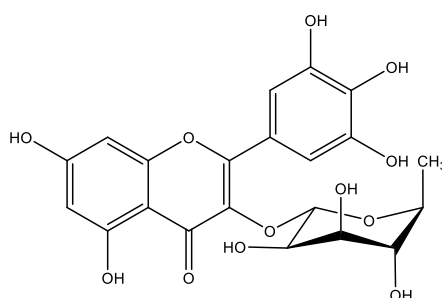
Slika 2.4.3. Struktura miricetina.

Miricetin, kao i kvercetin, djeluje kao inhibitor enzima. Primjerice, kvercetin i miricetin inhibiraju butirilkolinesterazu koja, iako manje zastupljena esteraza od acetilkolinesteraze, djeluje na isti način te je povezana s razvojem Alzheimerove i drugih neurodegenerativnih bolesti.²²² Antitumorsko djelovanje miricetina primijećeno je u različitim tipovima stanica. Primjerice, Feng i suradnici²²³ uočili su da miricetin inhibira širenje i uzrokuje apoptozu stanica raka želudca, a apoptoza uzrokovana miricetinom zabilježena je i kod tumorskih stanica jajnika²²⁴ i debelog crijeva.²²⁵ Antioksidativno djelovanje uočeno je tijekom enzimatske i neenzimatske lipidne peroksidacije.²²⁶ Pokazano je da miricetin iz ekstrakta *Ginkgo bilobe*, u kombinaciji s kvercetinom, inhibira oksidaciju neurona u mozgu²²⁷, a nekoliko istraživačkih skupina pokazalo je i inhibiciju oksidacije LDL-a, što je ključno za zaštitu organizma od ateroskleroze.^{228,229} Nadalje, Robak i Gryglewski²³⁰ pokazali su da miricetin inhibira nastanak jednog od glavnih produkata lipidne peroksidacije, malondialdehida, u jetri štakora. Miricetin posjeduje i antihipertenzijsko djelovanje. Godse i suradnici²³¹ proučavali su porast krvnog tlaka uzrokovanog prehranom bogatom fruktozom kod štakora te su zaključili da miricetin inhibira porast krvnog tlaka na način da poništava metaboličke promjene uzrokovane fruktozom. Uz navedeno, miricetin pokazuje i antitrombotsko djelovanje koje se pripisuje njegovoj sposobnosti da inhibira agregaciju trombocita *in vivo* i *in vitro*.²³² *In vitro* eksperimenti i eksperimenti na životinjama pokazali su da miricetin pokazuje hipoglikemijski efekt na način

da regulira inzulinsku rezistenciju, što nalazi primjenu u liječenju dijabetesa i komplikacija uzrokovanih dijabetesom.²³³

2.4.6. Miricitrin

Miricitrin je 3-O-ramnozid miricetina (slika 2.4.4.). Široko je zastupljen u prirodi te je uspješno izoliran iz cvjetova plavog lotusa²³⁴, biljke *Clausena excavata*²³⁵ i drugih.



Slika 2.4.4. Struktura miricitrina.

Ekstrakt tropske biljke *Lansea mirocarpum*, u čijem je sastavu miricitrin, pokazao je protuupalno djelovanje *in vivo*.²³⁶ Okoth i suradnici²³⁷ izolirali su niz flavonoida iz biljke *Lansea alata*, a upravo je miricitrin pokazao najučinkovitije antimikrobno djelovanje u kontaktu s nekoliko sojeva Gram-pozitivnih bakterija, kao i antioksidativno djelovanje u prisutnosti DPPH radikala. Antioksidativno djelovanje uočeno je i u slučaju miricitrina izoliranog iz biljaka *Elaeocarpus serratus*²³⁸ i *Acacia confusa*²³⁹, dok je miricitrin izoliran iz listova Judinog drveta pokazao antitrombotsko djelovanje *in vitro* i *in vivo*.²⁴⁰ Meotti i suradnici²⁴¹ su, u *in vivo* pokusima na miševima, potvrdili protuupalno djelovanje, pri čemu se miricitrin pokazao djelotvornim u ublažavanju induciranih kroničnih bolova, dok su Domitrović i suradnici²⁴², također u eksperimentima na miševima, ukazali na hepatoprotektivno djelovanje. Uz to što uspješno uklanja DPPH radikale, antioksidativno djelovanje miricitrina pokazano je u slučaju molekule DNA, pri čemu miricitrin štiti DNA od oksidativnog oštećenja uzrokovanog peroksinitritom.²⁴³ Miricitrin, kao i drugi flavonoidi, inhibira oksidaciju LDL-a.²⁴⁴ Antikancerogeno djelovanje uočeno je na stanicama humane mijeloidne leukemije (HL-60)²⁴⁵, dok su Yan i suradnici²⁴⁶ uočili zaštitno djelovanje miricitrina *in vivo* i *in vitro* te predložili potencijalno korištenje u liječenju osteoartritisa.

2.5. Nanosustavi za dostavu lijekova

Nanočestice i nanostrukturirani materijali istražuju se u različitim granama znanosti i tehnologije. Primjenu nalaze u širokom području istraživanja zahvaljujući činjenici da je tijekom sinteze nanosustava moguće ugađati fizikalno-kemijska svojstva, ovisno o željenoj primjeni.

Nanometar je definiran u SI sustavu mjernih jedinica te predstavlja 10^{-9} m, a nanomaterijali se općenito opisuju kao materijali s duljinom 1 nm–1000 nm u barem jednoj dimenziji. Međutim, u primjeni se nanomaterijali većinom definiraju kao materijali promjera u rasponu 1–100 nm, a i dalje ne postoji jedinstvena međunarodno prihvaćena definicija.²⁴⁷ Prema Agenciji za zaštitu okoliša (Environmental Protection Agency, EPA), nanomaterijali pokazuju jedinstvena svojstva, različita od svojstava materijala ekvivalentnog kemijskog sastava većih dimenzija.²⁴⁸ Američka agencija za hranu i lijekove (The US Food and Drug Administration, USFDA) nanomaterijal definira kao materijal koji ima bar jednu dimenziju u rasponu 1 nm–100 nm te posjeduje svojstva koja ovise o veličini.²⁴⁹ Sličnu definiciju predlaže i Europska komisija, prema kojoj je nanomaterijal umjetni ili prirodni materijal koji posjeduje nevezane, agregirane ili aglomerirane čestice, pri čemu je vanjska dimenzija u rasponu veličine 1 nm–100 nm.²⁵⁰ Međunarodna organizacija za standardizaciju (The International Organization for Standardization, ISO) nanomaterijale opisuje kao materijale s bilo kojom vanjskom dimenzijom ili unutarnjom površinskom strukturom nanometarskih dimenzija.²⁵¹ Odstupanje koje se javlja prilikom definiranja nanomaterijala značajno usporava razvoj i široku primjenu nanomaterijala s obzirom na to da je, ovisno o regulatornoj agenciji, za identične nanomaterijale potrebno zadovoljiti različite kriterije.²⁴⁷ U fizikalno-kemijskim istraživanjima, općeprihvaćena je definicija nanočestica kao čestica koje u mediju zadržavaju svojstva koloida.

Primjena nanotehnologije u razvoju lijekova temelji se na biofizičkim i biokemijskim svojstvima nosača i lijeka. Glavne prednosti takvih sustava su smanjenje toksičnosti, povećanje stabilnosti u fiziološkim uvjetima te mogućnost modifikacije nanonosaa na način da se postigne kontrolirano otpuštanje lijeka, pri čemu je najčešći cilj postizanje konstantne brzine otpuštanja.¹⁷ Nanoformulacije se uspješno koriste u istraživanjima liječenja tumora²⁵², kardiovaskularnih bolesti, kao i u području dermatologije i kozmetike.²⁵³ Nanočestice široku primjenu nalaze i u liječenju neuroloških bolesti.²⁵⁴ S obzirom na to da je mozak prekriven krvno-moždanom barijerom, mnogi lijekovi ne mogu proći barijeru i doći do ciljanog mjesta.

Krvno-moždana barijera permeabilna je samo za lipofilne molekule ili molekule s molekulskom masom između 400 Da i 600 Da, što onemogućava liječenje mnogim makromolekularnim lijekovima. Nanočestice, pogotovo one koje u sastavu imaju polimere, pokazale su se uspješnima u prolasku kroz krvno-moždanu barijeru i dopremanju lijeka do ciljanog mjesta.²⁵⁴

2.5.1. Klasifikacija nanomaterijala

Nanomaterijali, ovisno o podrijetlu, mogu biti prirodni ili sintetski. Sintetski nanomaterijali najčešće se pripremaju ciljano, kako bi se postigla željena svojstva. Uz ciljano pripremljene, u sintetske materijale ubrajaju se i incidentalni nanomaterijali koji nastaju kao nusprodukti industrijskih procesa, poput nanočestica nastalih tijekom procesa izgaranja. Prirodni nanomaterijali nastaju u različitim organizmima, biljkama, kukcima i ljudskom tijelu.²⁴⁷ Ipak, najčešća podjela nanomaterijala je ona s obzirom na kemijski sastav, što određuje i fizikalno-kemijska svojstva samog materijala.

Lipidni nanosustavi bili su prvi korišteni sustavi za dostavu lijekova te su pripremljeni tako da oponašaju postojeće strukture u organizmu, poput micela i liposoma. Zahvaljujući amfipatskoj prirodi lipidnih molekula, u vodenom okruženju dolazi do samoudruživanja molekula, pri čemu se polarni dijelovi grupiraju i okreću prema vodenom mediju, dok se nepolarni dijelovi smještaju u unutrašnjost. Samoudruživanjem mogu nastati micide, koje se sastoje od hidrofobne jezgre i hidrofilne ljuske, ili liposomi, koji se sastoje od najmanje jednog fosfolipidnog dvosloja koji zatvara određeni volumen vodenog medija. Ovisno o kemijskim svojstvima, prvenstveno polarnosti, lijek se može ugrađivati u hidrofobnu unutrašnjost dvosloja ili u vanjski, polarniji dio dvosloja. U oba slučaja lijek je zaštićen od preranog uklanjanja iz organizma od strane imunološkog sustava.²⁵⁵

Prvi nanonoslač odobren od strane Američke agencije za hranu i lijekove bio je liposom građen od fosfatidilkolina, kolesterola, soli fosfatidiletanolamina i alfatokoferola te funkcionaliziran poli(etilen-glikolom).²⁵⁶ U liposome je ugrađen antitumorski lijek doksorubicin te su tretirani pacijenti s Kaposijevim sarkomom za kojeg je poznato da reagira na mnoge kemoterapijske lijekove, uključujući i doksorubicin.²⁵⁷ Pokazano je da je više od 95% lijeka ugrađeno u liposome, a nakon injektiranja liposoma u miševе, u tumorskim je stanicama uočena mnogo veća količina doksorubicina u odnosu na kontrolnu skupinu koja je primila standardnu dozu doksorubicina. Perspektivni rezultati potaknuli su velik broj istraživanja lipidnih nanosustava. Lipidni nanosustav koji u sastavu ima 1,2-dioleoil-3-trimetilamonijev

propan (DOTAP) i kolesterol se u pretkliničkim studijama uspješno koristi u genskoj terapiji, za dostavu tumor-supresorskih gena do tumorskih stanica u plućima.²⁵⁸ Castro i suradnici²⁵⁹ sintetizirali su čvrste lipidne nanočestice te u njih ugrađivali retinsku kiselinu, koja se u dermatologiji često koristi za liječenje akni. Pokazano je da nanošenje retinske kiseline u obliku pripremljenog nanosustava dovodi do manjih iritacija kože u odnosu na komercijalno dostupnu kremu koja u sastavu sadrži retinsku kiselinu. Chaves i suradnici²⁶⁰ su u nanoliposome ugradili kurkumin i vitamin D3, pri čemu je pokazano da kurkumin i nakon ugradnje zadržava antioksidativnu aktivnost. Nadalje, u nanoliposome je uspješno ugrađen velik broj lijekova, uključujući eukaliptol²⁶¹, naringenin²⁶² i lutein.²⁶³ Liposomi u koje je ugrađen antitumorski lijek gemcitabin također su pokazali citotoksično djelovanje, koje je izraženije u slučaju modifikacije liposoma hijaluronskom kiselinom. Pretpostavlja se da je pojačano antitumorsko djelovanje rezultat činjenice da se hijaluronska kiselina može vezati za CD44 receptor, koji je u velikim količinama prisutan u tumorskim stanicama.²⁶⁴ Konačno, lipidne nanočestice koriste se i u dostavi mRNA molekule te su upravo mRNA cjepiva temeljena na lipidnim nanočesticama kao nosačima u kliničkoj upotrebi u slučaju COVID-19 virusa.²⁶⁵

Ugljikovi nanosustavi posjeduju specifična svojstva, poput kemijske stabilnosti, vodljivosti i termičkih svojstava te primjenu nalaze u širokom području. Klasificiraju se u nekoliko kategorija, uključujući ugljikove nanocijevi (engl. *carbon nanotubes*, CNTs), nanovlakna (engl. *carbon nanofibers*, CNFs), fullerene, grafen i nanožice (engl. *carbon nanowires*, CNWs). Grafen je alotropska modifikacija ugljika koja se sastoji od jednog sloja ugljikovih atoma koji čine dvodimenzionalnu šesterokutnu strukturu. Zahvaljujući visokoj termičkoj vodljivosti, iznimnim mehaničkim svojstvima te mogućnosti prijenosa elektrona, istražuje se u širokom rasponu grana znanosti i tehnologije, uključujući biomedicinu te dostavu lijekova.¹⁶ Osim grafena, u istraživanjima je vrlo zastupljen i grafenov oksid. Primjerice, Yousuf i suradnici²⁶⁶ koristili su grafenov oksid kao nosač za proučavanje antitumorskog djelovanja nanočestica 1-[(2-hidroksietil)amino]-2-amino-1,2-dideoksi-D-glukoza trifeniltina. Strukturni motiv grafena pojavljuje se i u ostalim ugljikovim strukturama. U dostavi lijekova najčešće se koriste ugljikove nanocijevi, čiju strukturu čini grafen cilindričnog oblika.²⁶⁷ Zahvaljujući cilindričnom obliku i velikoj specifičnoj površini, u nanocijevi je moguće ugraditi veliku količinu lijeka. Ugljikove nanocijevi su hidrofobne i netopljive u većini otapala i bioloških medija, što im ograničava biomedicinsku primjenu. Kako bi se povećale biokompatibilnost i topljivost, nanocijevi se u pravilu funkcionaliziraju, što omogućava dodatne strukturne modifikacije.

Primjerice, ukoliko se nanocjevčice modificiraju amfifilnim surfaktantima, moguće je povećati njihovu topljivost u vodenim medijima.²⁶⁸ Funkcionalizaciju je generalno moguće izvesti na dva načina: oksidacijom krajeva cijevi, što dovodi do nastanka karboksilnih, karbonilnih ili hidroksilnih skupina, koje se potom koriste za daljnje reakcije, ili izravnom modifikacijom grafenske plahte, primjerice oksidacijom ili fluoriranjem. Oksidaciju je moguće provesti vodenim otopinama oksidansa ili oksidansima u plinovitoj fazi, poput kisika, ozona ili ugljikovog dioksida. Vodene otopine oksidansa koje se najčešće koriste su dušična kiselina, kalijev dikromat, vodikov peroksid i kalijev permanganat. Reakcije amidacije i esterifikacije provode se uz međureakciju s tionil-kloridom, pri čemu nastaje acil-klorid. Postupak amidacije potom uključuje reakciju s aminom, pri čemu nastaje amidna veza, a postupak esterifikacije reakciju s alkoholom, pri čemu nastaje esterska veza. Odabirom funkcionalnih skupina na alkoholu ili aminu modificira se i topljivost u određenom otapalu.²⁶⁸ Nanocjevčice je moguće funkcionalizirati i s bočne strane, kovalentnim vezanjem kemijskih skupina reakcijama na π -konjugiranom kosturu ili nekovalentnom adsorpcijom različitih funkcionalnih molekula.²⁶⁸ Kemijske reakcije uključuju reakcije adicije i supstitucije te alternativne postupke poput ozonolize ili mehanokemijske modifikacije. Tijekom adicije dolazi do pucanja jedne dvostruke veze na heksagonskom prstenu pri čemu dolazi do nastanka nesparenog elektrona, što omogućuje vezanje sredstva za modifikaciju. Nevalentno vezanje temelji se na van der Waalsovima i π - π interakcijama, pri čemu ne dolazi do promjene strukture i svojstava nanocjevčica.²⁶⁸

Dostava lijekova korištenjem ugljikovih nanocjevčica temelji se na njihovoj mogućnosti da prijeđu membranske barijere u organizmu. Primjerice, ugljikove nanocjevčice s jednom stijenkom modificirane kitozonom korištene su za dostavu antitumorskog lijeka doksorubicina.²⁶⁹ Kitozan je nekovalentno vezan oko nanocjevčice, što dodatno poboljšava topljivost i biokompatibilnost. S obzirom na to da je u tumorskim tkivima ekspresija receptora folata izraženija nego u zdravim, nanočestice folne kiseline mogu prodrijeti u tumorske stanice endocitozom. Iz tog je razloga folna kiselina vezana na kitozan omotan oko nanocjevčica te je postignuta ciljana dostava lijeka u tumorska tkiva. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je preživljavanje tumorskih stanica znatno smanjeno u slučaju primjene kompozita u odnosu na izravnu primjenu lijeka.²⁶⁹ Heister i suradnici²⁷⁰ koristili su trostruko funkcionalizirane nanocjevčice za ciljanu dostavu doksorubicina u tumorska tkiva, dok su Zhang i suradnici²⁷¹ u istu svrhu koristili nanocjevčice s jednom stijenkom derivatizirane karboksilatnim skupinama i

obložene polisaharidom. Osim doksorubicina, ugljikove nanocijevi uspješno su pripravljene i kao nosači za druge lijekove, primjerice karboplatin.²⁷²

Osim u dostavi lijekova, ugljikove nanocijevi primjenu nalaze i u mikroskopiji atomskih sila²⁷³, katalizi²⁷⁴ te kao materijali u litij-ionskim baterijama²⁷⁵ i kemijskim senzorima.²⁷⁶

Polimeri u biomedicini nalaze široku primjenu zahvaljujući biokompatibilnosti, jednostavnom dizajnu i pripravi, raznolikosti struktura i biomimetičkom karakteru. U farmaceutskoj industriji koriste se za povećanje efikasnosti otpuštanja lijeka u konstantnim dozama kroz dulji vremenski period. Polimeri su generalno stabilni i posjeduju velik kapacitet ugradnje lijeka, što omogućava dulju farmakološku aktivnost. U dostavi lijekova primjenu nalaze prirodni i sintetski polimeri. Neki od najčešće korištenih prirodnih polimera su ciklodekstrin, kitozan, škrob i hijaluronska kiselina, dok se od sintetskih polimera najčešće koriste poliakrilna kiselina (PAA), polimljična kiselina (PLA), polimetilmetakrilat (PMMA) i polikaprolakton (PCL).¹⁶

Jedan od najčešće korištenih polimera u dostavi lijekova je kitozan, linearni polisaharid građen od D-glukozaminskih i N-acetil-D-glukozaminskih podjedinica. Niaz i suradnici²⁷⁷ pripravili su nanosače od kitozana u koje su ugradili lijekove s antihipertenzivnim djelovanjem. Pokazano je da je u pripravljen nanosustav moguće ugraditi veliku količinu lijeka, a otpuštanje je sporo i jednoliko, što ukazuje na potencijal ovakvog sustava za primjenu u liječenju visokog tlaka. Nadalje, pokazano je da se nanočestice kitozana funkcionalizirane folnom kiselinom mogu koristiti za fotodinamičku detekciju raka debelog crijeva te da, ukoliko se u takve nanočestice ugradi alginat, dolazi do poboljšanog otpuštanja lijeka u stanični lizosom.²⁷⁸ Ryu i suradnici²⁷⁹ pripravili su nanočestice kitozana funkcionalizirane glikolom u svrhu detekcije katepsina B povezanog s procesom metastaziranja, dok su Fernández-Urrusuno i suradnici²⁸⁰ pokazali da korištenje kitozana kao nanonosača poboljšava apsorpciju inzulina u nazalnom području. Pignatello i suradnici²⁸¹ koristili su komercijalno dostupne polimere za pripravu suspenzije nanočestica u koje je ugrađen lijek flurbiprofen s ciljem dostave u intraokularno područje. Protuupalno djelovanje ispitano je nakon inducirane očne traume kod zečeva u odnosu na kontrolni sustav. Pokazano je da korištenje navedenog nanosustava omogućava primjenu manje koncentracije u odnosu na komercijalno dostupne očne kapi, pri čemu ne dolazi do smanjenja učinkovitosti lijeka. Nadalje, genska terapija korištenjem biokompatibilnih nanočestica pripravljenih od poli(mljične-glikolne) kiseline (PLGA) pokazala je antiproliferativno djelovanje u slučaju tumorske stanične linije MDA-MB-435S²⁸², dok su

nanokapsule pripravljene od poli- ϵ -kaprolaktona s ugrađenim klorheksidinom pokazale antimikrobno djelovanje u kontaktu s bakterijom *Staphylococcus epidermidis*.²⁸³ Većina nanosustava koji se koriste za dostavu lijekova za liječenje neuroloških bolesti su polimerne nanočestice, s obzirom na to da se pokazalo da mogu zapremiti veliku količinu lijeka i proći krvno-moždanu barijeru, a kombinacijom sa specifičnim ligandima omogućena je ciljana dostava lijeka do aktivnog mjesta. Primjerice, Ding i suradnici²⁸⁴ pokazali su da korištenje binarnih micela građenih od kopolimera poli(etilen-glikola) za dostavu lijeka borneola dovodi do uspješnog prolaska kroz krvno-moždanu barijeru i povećanja koncentracije lijeka u mozgu. Pokazano je i da je doksorubicin, koji se često koristi u liječenju karcinoma, moguće dostaviti na ciljno mjesto u mozgu korištenjem nanočestica pripremljenih od poli(butil-cijanoakrilata) obloženih polisorbitom 80.²⁸⁵

Posebnu skupinu polimernih materijala čine razgranate makromolekule dendrimeri. Prvi sintetizirani dendrimeri bili su poliamidoamini. Struktura dendrimera sastoji se tri dijela. Unutrašnjost dendrimera čini jezgra na koju su vezani unutarnji slojevi građeni od ponavljajućih jedinica, a vanjski dio uobičajeno sadrži terminalne funkcionalne skupine.²⁸⁶ Zahvaljujući šupljikavoj i razgranatoj strukturi, dendrimeri u svoju makromolekularnu unutrašnjost mogu zarobiti manje molekule, što je temelj njihove primjene u dostavi lijekova. Za razliku od linearnih polimera, dendrimeri su monodisperzne molekule. Postoje dva mehanizma dostave lijekova korištenjem dendrimera. Prvi je *in vivo* cijepanje kovalentne veze između lijeka i dendrimera, koje ovisi o enzimatskom okruženju. Drugi način je otpuštanje lijeka promjenom nekog vanjskog parametra, poput pH-vrijednosti ili temperature.²⁸⁶ Pozitivno nabijeni dendrimeri korišteni su u kombinaciji s lijekom enoksaparinom te je pokazano da je navedeni kompleks učinkovit u sprječavanju tromboze.²⁸⁷ Dendrimeri su korišteni i u transdermalnoj dostavi lijekova, pri čemu je pokazana poboljšana efikasnost i biodostupnost aktivne tvari.²⁸⁸ Kesharwani i suradnici²⁸⁹ funkcionalizirali su dendrimere hijaluronskom kiselinom te proučavali vezanje za CD44 receptor u stanicama tumora gušterače. Uz dendrimere, visoku biokompatibilnost pokazuju i nanostrukture bazirane na molekuli DNA.²⁹⁰

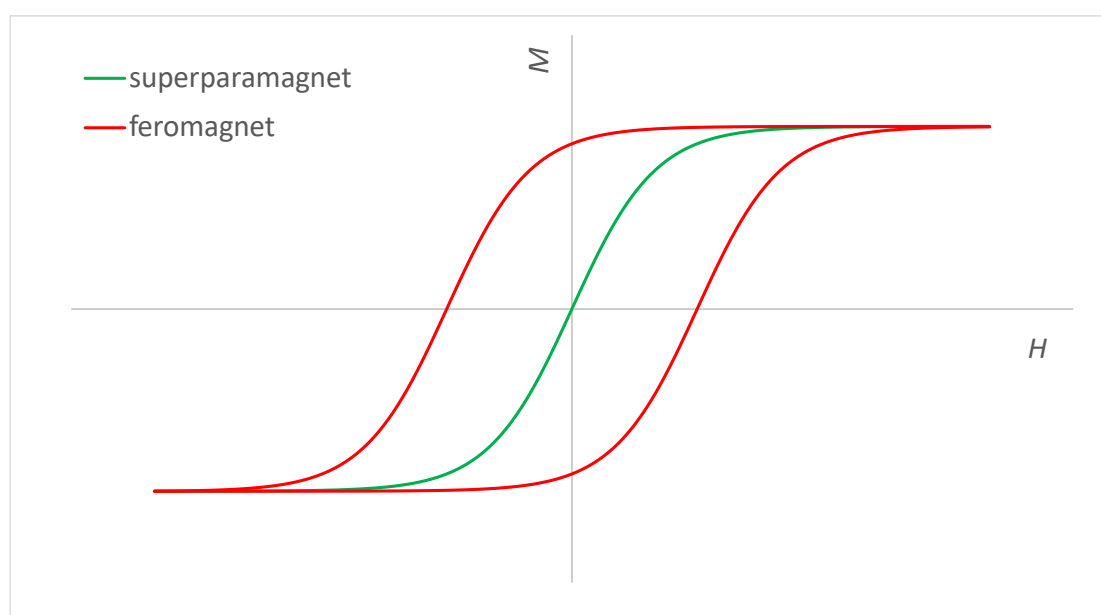
U anorganske nanosustave ubrajaju se sve nanočestice koje nisu građene od kostura ugljikovih atoma, pri čemu se najčešće koriste metali i metalni ioni. Od nemetalnih nanočestica ističu se mezoporozne nanočestice silike. Zahvaljujući širokoj primjeni, posebnu skupinu metalnih nanonosaa čine magnetske nanočestice.¹⁴

U literaturi je poznato da određene nanočestice metala i njihovih oksida pokazuju antimikrobno djelovanje. Primjerice, titanijev dioksid pokazuje antibakterijsko djelovanje u kontaktu s velikim brojem bakterija, uključujući bakterije iz sojeva *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus hirae*, i *Bacteroides fragilis*.²⁹¹ Nanočestice srebra komercijalno su dostupne te, zahvaljujući antibakterijskom djelovanju, primjenu nalaze u liječenju rana i opekline te kao sredstva za dezinfekciju. Uz to, premazi od nanočestica srebra koriste se za oblaganje implantata i tekstila.²⁹² Nanočestice zlata također se intenzivno koriste u biomedicini zahvaljujući jedinstvenim optičkim, elektronskim i biokemijskim svojstvima.²⁸⁹ Primjerice, Hirsch i suradnici²⁹³ pokazali su da se zlatne nanočestice funkcionalizirane silikom mogu koristiti za termalnu ablaciju tumora. Ugađanjem svojstava nanočestica na način da absorbiraju zračenje u infracrvenom području postignuta je stanična smrt stanica tumora dojke *in vivo* i *in vitro*.

Mezoporozne nanočestice silike (engl. *mesoporous silica nanoparticles*, MSNs) istražuju se zahvaljujući velikoj specifičnoj površini, biokemijskoj stabilnosti i biokompatibilnosti u fiziološkim uvjetima.²⁹⁴ Ugađanjem parametara sinteze moguće je kontrolirati svojstva nosača, poput veličine pora, čime se povećava specifična površina i omogućavaju uspješnija ugradnja lijeka i dulja cirkulacija u krvi. Kako bi se spriječio preuranjeni izlazak lijeka iz čestice, ulazi u pore mogu se prekriti materijalima osjetljivima na vanjske ili unutarnje stimulanse. Na taj se način promjenom nekog vanjskog faktora, poput pH-vrijednosti ili temperature, aktivira otvaranje pora i omogućava otpuštanje lijeka.²⁹⁴ Za svaki je nanonosac poželjno da se nakon otpuštanja lijeka učinkovito razgradi u organizmu, kako ne bi došlo do toksičnih efekata. Matrica mezoporoznih čestica silike sastoji se od –Si–O– veza koje su, iako kemijski relativno jake, podložne nukleofilnom napadu hidroksidnog iona iz vode, što rezultira hidrolitičkim cijepanjem –Si–O–Si– skupina, pri čemu nastaje ortosilikatna kiselina koja se iz tijela izlučuje urinom.²⁹⁴ Jednostavna razgradnja i izbjegnuta akumulacija nanočestica u organizmu glavne su prednosti silike u odnosu na metalne nanočestice. Uklanjanje nanočestica iz organizma dodatno se može ubrzati dopiranjem s metalnim ionima.²⁹⁵ Mezoporozne nanočestice silike pokazale su se uspješnima u dostavi velikog broja lijekova, uključujući antibiotik eritromicin²⁹⁶ i bifosfonate, lijekove koji sprječavaju gubitak koštane mase.²⁹⁷

Nanočestice željezovih oksida jedni su od najistraživanijih nanomaterijala za biomedicinske primjene zahvaljujući jedinstvenim kemijskim, fizičkim i biološkim svojstvima, poput stabilnosti, netoksičnosti i biokompatibilnosti.¹⁴ Od magnetskih svojstava ističu se visoka

magnetska susceptibilnost i magnetizacija zasićenja. Upravo magnetska svojstva omogućavaju njihovu primjenu kao nanonosača, s obzirom na to da je primjenom vanjskog magnetskog polja moguće postići kontrolu otpuštanja i ciljanu dostavu. Željezovi oksidi javljaju se u dva oksidacijska stanja, željezov(II) oksid, FeO , te željezov(III) oksid, Fe_2O_3 . Miješani željezov(II,III) oksid, Fe_3O_4 , naziva se magnetit. Željezov(III) oksid posjeduje različite polimorfe, uključujući $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$, $\beta\text{-Fe}_2\text{O}_3$, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ i $\varepsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Od navedenih, maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) i magnetit (Fe_3O_4) pokazuju najbolju biokompatibilnost, pri čemu se za biomedicinske primjene najčešće koristi magnetit.¹⁵ Magnetska svojstva magnetita određena su veličinom čestica.²⁹⁸ Ukoliko su čestice dovoljno male, svaka čestica predstavlja zasebnu magnetsku domenu te takve čestice pokazuju superparamagnetična svojstva koja omogućavaju dobar odaziv na primijenjeno magnetsko polje. Kod superparamagnetskih čestica primjenom vanjskog magnetskog polja dolazi do snažne magnetizacije koja u odsustvu polja nestaje, odnosno čestice se vraćaju u prvobitno stanje. Za razliku od njih, kod feromagnetskih materijala je magnetizacija zadržana i nakon gašenja magnetskog polja. Posljedično tome, krivulje magnetizacije za feromagnetske i superparamagnetske materijale se razlikuju. U slučaju feromagnetizma, u krivulji magnetizacije javlja se histereza kao posljedica zadržavanja magnetizacije. S druge strane, krivulje magnetizacije superparamagnetskih materijala karakterizira odsustvo histereze.²⁹⁸



Slika 2.5.1. Krivulje magnetizacije feromagneta i superparamagneta.

Zbog prisutnosti željezovih(II) iona, magnetit na zraku može oksidirati, zbog čega je nanočestice nužno funkcionalizirati. Uz zaštitu od oksidacije, funkcionalizacija sprječava agregaciju i aglomeraciju te omogućava specifično vezanje proteina, enzima, antitijela ili lijekova. Za funkcionalizaciju se najčešće koriste polimeri te su uspješno sintetizirane i primijenjene nanočestice magnetita funkcionalizirane kitozanom^{299,300}, poli(etilen-glikolom)³⁰¹, dekstranom³⁰² i drugim polimerima. Uz polimere, nanočestice magnetita uspješno su funkcionalizirane i silikom.^{303,304} Jedinствена magnetska svojstva omogućavaju široku primjenu u ciljanoj dostavi lijekova. Primjerice, nanočestice magnetita funkcionalizirane kitozanom pokazale su se obećavajućim sustavima za dostavu lijekova metotreksata³⁰⁰, cisplatina³⁰⁵ i 6-merkaptopurina.³⁰⁶ Shen i suradnici³⁰⁷ sintetizirali su nanočestice magnetita obložene poli(etilen-glikolom) te pokazali uspješnu ugradnju i otpuštanje doksorubicina. Doksorubicin je uspješno ugrađen i dostavljen korištenjem nanočestica magnetita funkcionaliziranih fosfatima³⁰⁸, silikom³⁰³ i poli(etilen-glikolom).³⁰⁹ Li i suradnici³¹⁰ sintetizirali su nanočestice magnetita funkcionalizirane karboksimetilkitozanom, a kao modelni lijek koristili su antitumorski lijek rapamicin. Navedeni sustav pokazao je dvofazni model otpuštanja, pri čemu na početku dolazi do naglog otpuštanja velike količine lijeka (engl. *burst*), nakon čega slijedi kontrolirano otpuštanje manje količine lijeka. Rapamicin otpušten iz nanočestica pokazao je manju toksičnost u kontaktu s jetrenom staničnom linijom LO2, a veću citotoksičnost u kontaktu s tumorskim stanicama HepG2 u odnosu na izravan tretman rapamicinom. Na temelju dobivenih rezultata, zaključeno je da bi se korištenjem navedenih nanočestica moglo poboljšati ljekovito djelovanje rapamicina u slučaju tumorskih stanica, a istovremeno i smanjiti nepoželjni učinci na zdravim stanicama.

Osim u dostavi lijekova, nanočestice magnetita pokazale su se učinkovitima i prilikom biooslikavanja, gdje se često koriste kao kontrastni agensi. Hong i suradnici³¹¹ sintetizirali su nanočestice magnetita obložene dekstranom, koje su koristili prilikom magnetske rezonancije jetre, koštane srži i limfe. Uočili su da, nakon injektiranja nanočestica, u zdravim tkivima dolazi do promjene intenziteta signala, dok do promjene ne dolazi u slučaju tumorskih tkiva. Na temelju zapažanja zaključeno je da pripravljene nanočestice pokazuju potencijal za primjenu u prepoznavanju i dijagnostici tumorskih tkiva. Kao učinkoviti kontrastni agensi u magnetskoj rezonanciji pokazale su se i nanočestice magnetita obložene poli(vinil-pirolidonom) (PVP)³¹², poli(vinil-pirolidonjodidom) (PVPI)³¹³, folnom kiselinom³¹⁴ i zlatom.³¹⁵ Primjenom vanjskog magnetskog polja moguće je inducirati zagrijavanje nanočestica magnetita, što omogućava

primjenu u liječenju hipertermijom. Primjerice, Zhao i suradnici³¹⁶ sintetizirali su niz nanočestica različitih magnetskih svojstava te ispitivali porast temperature primjenom izmjeničnog magnetskog polja u svrhu lokaliziranog liječenja tumora hipertermijom. Uočeno je da se svojstvo induciranog zagrijavanja smanjuje s porastom koercitivnosti te povećava s povećanjem magnetizacije zasićenja. Egzotermno djelovanje uočeno je i slučaju funkcionaliziranih nanočestica magnetita, pri čemu je, između ostalih, uspješno hipertermijsko djelovanje uočeno za magnetit funkcionaliziran kitozonom²⁹⁹, oleinskom kiselinom³¹⁷, poli(etilen-glikolom)³¹⁷ i folnom kiselinom.³¹⁴ Funkcionaliziranjem folnom kiselinom, osim zadržavanja svojstva induciranog zagrijavanja, omogućeno je i ciljano vezanje na KB stanice tumora koje posjeduju receptor za folate.³¹⁴

2.5.2. *Sinteza nanonosaa*

Postoji velik broj metoda za sintezu nanomaterijala koje se generalno mogu podijeliti u konstruktivne ili „*bottom-up*“ metode i destruktivne ili „*bottom-down*“ metode.³¹⁸ Konstruktivne metode podrazumijevaju formiranje materijala iz atoma ili klastera. Jedna od najjednostavnijih konstruktivnih metoda je sol-gel metoda.³¹⁸ U ovoj se metodi uobičajeno koristi prekursor, koji je najčešće metalni oksid ili klorid. Prekursor se potom dispergira u tekućinu treskanjem, miješanjem ili sonifikacijom te nastaje sustav koji se sastoji od vodene i čvrste faze. Do razdvajanja faza dolazi sedimentacijom, filtracijom ili centrifugiranjem. Ostale konstruktivne metode uključuju sintezu korištenjem rotirajućeg diska, pirolizu, kemijsko taloženje iz plinovite faze te biosintezu. Sinteza korištenjem rotirajućeg diska omogućava visok stupanj kontrole svojstava nanočestica koja su, između ostalih, određena protokom, brzinom rotiranja i površinom diska. Sinteza se uobičajeno provodi u reaktoru ispunjenim inertnim plinom, pri čemu se u sustav dodaju prekursor i voda. Rotacijom pri različitim brzinama dolazi do spajanja atoma ili molekula i precipitacije nanočestica. Ovom metodom uspješno su pripravljene nanočestice magnezijevog hidroksida i oksida.³¹⁹ Kemijsko taloženje iz plinovite faze podrazumijeva depoziciju tankog filma reaktanta iz plinovite faze na supstrat. Depozicija se odvija u reakcijskoj komori koja se zagrijava te do reakcije dolazi kad supstrat dođe u kontakt s molekulama u plinovitoj fazi, pri čemu na supstratu dolazi do taloženja produkta. Na svojstva nanočestica značajno utječe temperatura supstrata. Ovom metodom nastaju čiste, uniformne nanočestice, a glavni nedostatak je nastanak toksičnih nusprodukata.³²⁰ Piroliza je najčešće

korištena metoda sinteze u industriji za pripravu velike količine nanočestica te uključuje izgaranje plinovitog ili tekućeg prekursora pri visokom tlaku.³²¹ Biosinteza je ekološki prihvatljiva metoda u kojoj se uz prekursore koriste bakterije, biljni ekstrakti ili gljivice.³²²

Destruktivne metode podrazumijevaju redukciju veličine materijala na nanometarsku skalu. Najčešće korištena metoda je mehaničko mljevenje. Prilikom mljevenja dolazi do prijenosa energije s kuglica za mljevenje na čestice. Ugađanjem parametara mljevenja moguće je kontrolirati svojstva nastalih nanočestica.³²³ Nanolitografija još je jedna metoda koja se ubraja u destruktivne metode. Litografija je proces tiskanja željenog oblika ili struktura na materijal, a podrazumijeva fotolitografiju, litografiju snopom elektrona, litografiju skenirajućom probom i druge.³²⁴ Glavna prednost ove metode je mogućnost kontrole svojstava nanosustava, dok je nedostatak potreba za sofisticiranom tehnologijom, koja za posljedicu ima visoke troškove. Laserska ablacija koristi se za sintezu iz različitih otapala. Podrazumijeva ozračivanje metala uronjenog u tekućinu laserom, nakon čega iz plazme nastaju nanočestice. Metoda je ekološki prihvatljiva te, s obzirom na to da nastaju stabilne nanočestice i u vodenom i u organskom mediju, ne zahtijeva dodatak stabilizatora.³²⁵ Termalna dekompozicija je endotermni proces u kojem pod utjecajem visoke temperature dolazi do pucanja kemijskih veza i nastanka produkta. Ovom se metodom najčešće pripremaju metalne nanočestice nastale dekompozicijom metala.³²⁶

Najjednostavnija i najbrža metoda sinteze nanočestica s ugrađenim lijekom je nanoprecipitacija koja se najčešće koristi za pripravu polimernih nanočestica. Podrazumijeva otapanje polimera, lijeka i lipofilnog surfaktanta u otapalu manje polarnom od vode, poput acetona, etanola ili dimetilformamida. Za korištenje ove metode otapalo se mora miješati s vodom te polimer ne smije biti topljiv u vodenoj fazi. Dodatkom organskog otapala dolazi do difuzije otapala u vodenu fazu i spontanog formiranja nanočestica promjera do 200 nm s uskom raspodjelom veličina.³²⁷ Ovom metodom uspješno su pripravljene nanočestice poli(mliječne kiseline)³²⁸ i poli- ϵ -kaprolaktona.³²⁹ Emulzifikacijom i isparavanjem otapala moguće je pripremiti nanočestice prosječne veličine 250 nm. Iako se ova metoda većinom koristi za pripravu nanočestica za ugradnju lipofilnih lijekova, uspješno su inkorporirani i hidrofilni lijekovi. Najčešće korištena otapala su diklormetan, kloroform i etilacetat.³²⁷ Ovom metodom pripravljene su nanočestice polilaktida-ko-glikolida s ugrađenim lijekovima paklitakselom³³⁰ i pratikvantelom.³³¹ Emulzifikacija se može koristiti i u kombinaciji s difuzijom otapala, pri čemu je ključan korak difuzija organskog otapala u vodenu fazu. U ovoj metodi, organsko otapalo

mora biti djelomično topljivo u vodi, a najčešće se koriste 2-butanon, metilacetat, etilacetat i izopropilacetat. Kao produkt nastaju nanočestice veličine oko 150 nm te je metoda pogodna za ugradnju lijekova slabo topljivih u vodi. Dodatkom male količine ulja u organsku fazu moguće je pripremiti i nanokapsule.^{327,332}

2.5.3. Fiziološka svojstva nanočestica

Uz kemijski sastav, ponašanje nanočestica u tijelu određuju i fizikalna svojstva. Čestice promjera manjeg od 200 nm dulje se zadržavaju u organizmu u odnosu na one većih promjera. Primjerice, Gaur i Sahoo³³³ sintetizirali su nanočestice poli(vinilpirolidona) promjera manjeg od 100 nm te su uočili da je manje od 1% nanočestica uklonjeno iz organizma fagocitozom u jetri i slezeni te da 5%–10% čestica cirkulira u organizmu čak i 8 h nakon injektiranja. S druge strane, nanočestice promjera manjeg od (20–30) nm eliminiraju se filtriranjem u bubrezima, dok se čestice veće od 200 nm uklanjaju fagocitozom.³³⁴ Hasani i suradnici³³⁵ promatrali su selektivnu adheziju polistirenskih nanočestica različitih veličina na upaljeno tkivo čira na želudcu. Pokazano je da je adhezija najmanjih nanočestica promjera 50 nm najizraženija, dok su najlošije rezultate pokazale najveće nanočestice, promjera 750 nm. Uz brzinu razgradnje, veličina značajno utječe i na prijenos krvotokom. Gibanje manjih čestica uglavnom je kontrolirano difuzijski, a kod većih se čestica radi o kombinaciji difuzije i konvektivnog protoka. U slučaju visokih intersticijskih tlakova, za uspješno prodiranje nanočestica do, primjerice tumorskog tkiva, potrebna je i veća brzina protoka. Upravo iz tog razloga raspodjela većih čestica unutar tumorskog tkiva ovisi o lokalnom protoku krvi. Veličina nanočestica ne određuje raspodjelu samo oko ciljanog mjesta, već i unutar cijelog organizma. Muro i suradnici³³⁶ istraživali su polistirenske nanočestice i nanodiskove promjera u rasponu (0,1–10) µm. Uočeno je da se akumulacija čestica u jetri smanjuje s porastom veličine čestica, dok se istovremeno s porastom veličine akumulacija u plućima povećava. Na temelju rezultata, očito je da optimalna veličina nanočestica ovisi o promatranom tipu stanice. Primjerice, u slučaju HeLa stanica uočeno je da je optimalna veličina zlatnih nanočestica promjera 50 nm, dok su s česticama promjera 14 nm i 74 nm dobiveni lošiji rezultati.³³⁷

Osim veličine, na raspodjelu nanočestica u tkivima utječe i njihov oblik.³³⁸ Iako su prve istraživane nanočestice bile sferičnog oblika, razvojem nanotehnologije razvili su se i protokoli za pripremu nanoštapića, nanoprizmi, nanodiskova, nanokockica, itd. Generalno,

hidrodinamičke sile koje djeluju na nanočestice asimetričnog oblika nisu uniformne te uzrokuju njihovo sudaranje sa stijenkama krvnih žila, što može dovesti do njihovog nakupljanja. Međutim, asimetrija nanočestica poboljšava njihovo prodiranje i nakupljanje u tumorskim tkivima. Primjerice, uočeno je da se unutar sferičnog tumora nanodiskovi akumuliraju u većoj količini u odnosu na nanoštapiće.³³⁹ Općenito, asimetrične čestice do ciljanog mjesta dolaze pod različitim kutevima, što utječe na njihovo prodiranje i akumulaciju. Ukoliko izdužena čestica do ciljanog mjesta dolazi na način da je orijentirana tangencijalno u odnosu na staničnu membranu, prodiranje će biti otežano u usporedbi s česticom koja dolazi okomito na staničnu membranu.

2.5.4. Ciljana dostava lijekova

Konvencionalni načini unosa lijeka u organizam podrazumijevaju oralni i injektivni unos. Zadnjih nekoliko desetljeća istražuju se i drugi oblici unosa, primjerice transdermalni, transmukozalni, okularni i unos implantacijom. Novi načini unosa zahtijevaju i razvoj novih materijala koji bi osigurali uspješan transport lijeka do ciljanog mjesta u organizmu. Najčešće korišteni materijali podrazumijevaju polimere³⁴⁰ te materijale temeljene na siliciju, ugljiku i metalima, a pripremaju se u različitim oblicima na mikrometarskoj i nanometarskoj skali. Najčešće korišteni metali su zlato, srebro, paladij i željezo.¹⁷

Kako bi se smanjila količina materijala potrebnog za primjenu lijeka, važno je da nanonosач posjeduje veliki kapacitet ugradnje. Generalno postoje dvije metode za ugradnju lijeka u nosač. Metodom inkorporacije lijek je prisutan tijekom sinteze nanomaterijala te kao produkt nastaje nanonosач s ugrađenim lijekom. S druge strane, metoda adsorpcije podrazumijeva ugradnju lijeka nakon što je nanonosач već sintetiziran te se najčešće provodi inkubacijom nosača u koncentriranoj otopini lijeka kroz određeni vremenski period.¹³ Za kvantifikaciju ugradnje lijeka koriste se dvije veličine. Efikasnost ugradnje (engl. *entrapment efficiency*, *EE*) govori koliki je postotak lijeka uspješno inkorporiran u nanočesticu:

$$EE = \frac{c_0 - c_n}{c_0} \cdot 100\% , \quad (2.5.1.)$$

pri čemu je c_0 ukupna koncentracija lijeka, a c_n koncentracija neugrađenog lijeka. Kapacitet ugradnje (engl. *loading capacity*, LE) govori koliki postotak ukupne mase sustava nanočestica-lijek zauzima inkorporirani lijek:

$$LE = \frac{m_l}{m_n} \cdot 100\% , \quad (2.5.2.)$$

pri čemu je m_l masa lijeka, a m_n masa nosača.

Učinkovitost dostave lijeka u različite dijelove tijela ovisi o veličini čestica.³⁴¹ Upravo se iz tog razloga radi na razvoju nanonosača koji mogu poboljšati biodostupnost, kontrolu otpuštanja i ciljanu dostavu. Općenito, manje čestice omogućavaju brže otpuštanje, dok kod većih čestica dolazi do sporijeg otpuštanja.³⁴¹ Dodatna prednost nanosustava je mogućnost direktnog unosa u stanicu. Primjerice, Kneuer i suradnici³⁴² koristili su modificirane nanočestice silike za transfekciju, odnosno prijenos plazmidne DNA izravno u stanicu. Anatomija određenih struktura u organizmu, poput krvno moždane barijere i razgranate strukture dišnog sustava, onemogućavaju nesmetan prolazak lijekova do željenog mjesta. Upravo nanonosači omogućavaju prolazak i prijenos te uspješnu dostavu. Desai i suradnici³⁴³ proučavali su gastrointestinalni unos biorazgradivih čestica različitih veličina. Najmanje proučavane čestice, one od 100 nm, pokazale su 15–250 puta bolje rezultate u odnosu na veće čestice. Uz to, pokazano je da čestice od 100 nm difundiraju kroz submukozni sloj tkiva, dok se veće čestice većinom zadržavaju i lokaliziraju u epitelnom dijelu tkiva.

Postoje tri različita načina za ciljanu dostavu lijeka, pasivno, aktivno te fizikalno ciljanje.²⁵⁵ Pasivno ciljanje temelji se na efektu pojačane permeabilnosti i retencije prema kojem se čestice određenih veličina intenzivnije akumuliraju u tumorskim tkivima nego u zdravim. Međutim, s obzirom na to da se korištenjem ovog pristupa nanočestice kratko zadržavaju u organizmu, ovakav pristup ograničen je na tumore u organima koji čine mononuklearni fagocitni sustav, poput jetre, koštane srži i slezene. S druge strane, aktivno ciljanje podrazumijeva funkcionalizaciju nanonosača različitim ligandima poput antitijela, proteina i peptida, koji ulaze u interakciju s receptorima prisutnima na ciljanom mjestu. Temelji se na pretjeranoj ekspresiji određenih epitopa ili receptora u tumorskim stanicama. Nanonosači osjetljivi na vanjske stimulanse temelj su fizikalnog ciljanja. U tom se slučaju koriste vanjski izvori za dopremanje nanonosača do ciljanog mjesta i kontrolu procesa otpuštanja, primjerice u fototermalnoj ili

hipertermijskoj terapiji. U sva tri načina ciljanja, otpuštanje lijeka može se postići promjenom vanjskih parametara, poput temperature, pH-vrijednosti ili njihovom kombinacijom.^{255,344}

2.5.5. Kinetika otpuštanja lijeka iz nanonosača

Brzina kojom se lijek otpušta ovisi o svojstvima nosača i lijeka. Općenito je mehanizam otpuštanja kontroliran difuzijski kada je brzina difuzije lijeka veća od brzine razgradnje matrice. Kod velikog broja nanosustava na početku dolazi do naglog otpuštanja velike količine lijeka (engl. *burst*), što se pripisuje slabo vezanim ili adsorbiranim molekulama lijeka. Ovaj efekt manje je izražen ukoliko se za ugradnju koristi metoda inkorporacije. Brzinu otpuštanja moguće je kontrolirati i dodatkom reagensa koji može stvarati ionske interakcije s lijekom. Na taj način dolazi do nastanka slabo topljivog kompleksa reagensa i lijeka, što usporava otpuštanje i onemogućava početno oslobađanje velike količine lijeka.¹³

Ugađanjem svojstava nanosustava moguće je kontrolirati kinetički profil otpuštanja lijeka. Za većinu lijekova, idealnim modelom otpuštanja smatra se model kinetike nultog reda čime se osigurava otpuštanje konstantne količine lijeka tijekom cijelog procesa.¹⁷ Većina tehnika koje se koriste za praćenje otpuštanja temelji se na dijalizi te podrazumijeva smještanje nanočestica u polupropusnu membranu kroz koje mogu proći molekule lijeka, ali ne i čestice.¹³

Difuzijski model otpuštanja lijeka temelji se na Fickovim zakonima difuzije. Prvi Fickov zakon povezuje tok čestica, odnosno fluks, s gradijentom koncentracije:

$$J = -D \frac{dc}{dx}, \quad (2.5.3.)$$

pri čemu je J fluks, D difuzijski koeficijent, a dc/dx gradijent koncentracije. Negativan predznak ukazuje na činjenicu da se difuzija događa u smjeru suprotnom od gradijenta koncentracije. Prvi Fickov zakon opisuje gibanje molekula iz područja više koncentracije u područje niže koncentracije. S obzirom na to da brzina ovisi o koncentraciji jedne vrste, radi se o kinetici prvog reda. Drugi Fickov zakon vrijedi u slučaju kad se koncentracija mijenja s vremenom te opisuje vremensku ovisnost promjene koncentracije čestica o drugoj derivaciji koncentracije po koordinati u smjeru u kojem se difuzija odvija:

$$\frac{dc}{dt} = D \frac{d^2c}{dx^2}. \quad (2.5.4.)$$

Iz jednadžbe (2.5.4.) vidljivo je da je promjena koncentracije u vremenu proporcionalna promjeni koncentracijskog gradijenta u trenutku t . Jednadžbe korištene u difuzijskom modelu izvedene su iz Fickovih zakona:

$$\frac{Q_t}{Q_0} = 4 \left(\frac{Dt}{\pi h^2} \right)^{\frac{1}{2}}, \quad (2.5.5.)$$

$$\frac{Q_t}{Q_0} = 1 - \left(\frac{8}{\pi^2} \right) \exp \left(\frac{-\pi^2 Dt}{h^2} \right). \quad (2.5.6.)$$

U jednadžbama (2.5.5) i (2.5.6.), Q_t je količina otpuštenog lijeka u trenutku t , Q_0 je ukupna količina lijeka inkorporiranog u nosač, D je difuzijski koeficijent, a h je debljina nosača. Jednadžba (2.5.5.) opisuje kumulativno otpuštanje prvih 60% lijeka ($0 \leq Q/Q_0 \leq 0,6$), dok jednadžba (2.5.6.) opisuje otpuštanje ostatka lijeka ($0,4 \leq Q/Q_0 \leq 1$). Za opis kinetike otpuštanja temeljenog na difuziji potrebno je pretpostaviti da su fizikalna svojstva nosača konstantna. Uz to, potrebno je poznavati vrijednost difuzijskog koeficijenta, kojeg je moguće odrediti nuklearnom magnetskom rezonancijom ili korelacijskom spektroskopijom.³⁴⁵ Velik broj sustava nanonosač-lijek pokazao je slaganje s difuzijskim modelom. Primjerice, brzina otpuštanja ibuprofena iz mezoporoznih čestica silike prati difuzijski model, pri čemu je brzina otpuštanja veća što su pore veće.³⁴⁶

U slučaju kinetike nultog reda, količina lijeka koji se otpušta u vremenu je konstatna. Jednadžba koja opisuje takvo otpuštanje glasi

$$f_t = kt, \quad (2.5.7.)$$

pri čemu je f_t udio otpuštenog lijeka u vremenu t , a k koeficijent brzine reakcije. Eksperimentalni podaci otpuštanja prikazuju se kao ovisnost kumulativne količine oslobođenog lijeka o vremenu. Pretpostavlja se da ne dolazi do promjene površine matrice i da se ne postižu ravnotežni uvjeti.³⁴⁷ S obzirom na to da je kinetika nultog reda poželjna u slučaju otpuštanja lijekova, mnoge istraživačke skupine bave se razvojem sustava koji će pratiti upravo taj model. Primjerice, kinetika nultog reda uočena je u slučaju otpuštanja lijeka amoksicilina iz

mezoporoznih nanočestica silike³⁴⁸ te u slučaju otpuštanja antitumorskog lijeka paklitaksela iz liposoma.³⁴⁹

Otpuštanje lijeka koje prati kinetiku prvog reda opisano je jednadžbom:

$$\ln f_t = kt. \quad (2.5.8.)$$

Iz jednadžbe (2.5.8.) vidljivo je da udio otpuštenog lijeka eksponencijalno ovisi o vremenu. Za nekoliko je sustava pokazano da prate kinetiku prvog reda³⁵⁰, a to su većinom oni koji se sastoje od vrlo poroznog nanonosača i lijeka koji je dobro topljiv u vodenom mediju. U tom je slučaju količina oslobođenog lijeka u nekom vremenskom intervalu proporcionalna količini lijeka koji ostaje unutrašnjosti, tako da se s vremenom smanjuje.³⁴⁷

Higuchijev model predložen je 1960-ih s ciljem opisivanja kinetike oslobađanja lijeka iz matrice ukoliko je proces kontroliran difuzijski.³⁵¹ Temelj ovog modela je pretpostavka da je lijek u obliku krutine suspendirane u matrici nosača te vrijedi sve dok je količina lijeka po jedinici volumena matrice veća od njegove topljivosti. Uz to, pretpostavlja se da je difuzijski koeficijent lijeka konstantan i da ne dolazi do raspada matrice. Jednadžba glasi:

$$Q_t = A\sqrt{D(2c - 2c_s)c_s t}, \quad (2.5.9.)$$

pri čemu je Q_t količina lijeka otpuštena u vremenu t , A je površina nosača, c ukupna količina lijeka po jedinici volumena matrice, a c_s topljivost lijeka u mediju. Izraz (2.5.9.) je moguće pojednostaviti na način da se svi konstantni parametri izraze preko Higuchijeve konstante (K_H) te u tom slučaju promatrana ovisnost poprima oblik:

$$Q_t = K_H\sqrt{t}, \quad (2.5.10.)$$

pri čemu je

$$K_H = A\sqrt{D(2c - 2c_s)c_s}. \quad (2.5.11.)$$

Kao i u difuzijskom modelu, količina oslobođenog lijeka ovisi o korijenu vremena. Različite formulacije nanonosača pokazale su dobro eksperimentalno slaganje s Higuchijevim modelom. Cicuéndez i suradnici³⁵² proučavali su kinetiku otpuštanja levofloksacina iz mezoporoznih

nanočestica silike sintetiziranih na dva različita načina te su uočili da modeli u oba slučaja prate Higuchijev model. Higuchijev kinetički model prate i otpuštanje lijeka nimesulida iz polimernog nosača pripremljenog od poli(mliječne kiseline)³⁵³ te otpuštanje 5-fluorouracila iz liposoma različitih formulacija.³⁵⁴

Weibullova empirijska jednadžba (jednadžba 2.5.12.) prilagođena je 1970-ih za primjenu u procesima otpuštanja i otapanja.³⁵⁵

$$f_t = 1 - \exp\left(\frac{-(t - T_i)^b}{a}\right) \quad (2.5.12.)$$

U navedenoj jednadžbi a i b su empirijski parametri, a T_i je lokacijski parametar koji označava vremenski pomak prije početka otpuštanja te je u većini slučajeva jednak nuli. Linearizacijom jednadžbe (2.5.11.) dobiva se izraz:

$$\log(-\ln(1 - ft)) = b \log(t - T_i) - \log a. \quad (2.5.13.)$$

Empirijski parametar b je parametar oblika te, s obzirom na njegovu vrijednost, krivulja može biti eksponencijalna ($b = 1$), sigmoidalna ($b > 1$) ili parabolična ($b < 1$). Empirijski parametar a definira vremensku skalu procesa, a u primjeni se može zamijeniti parametrom T_d prema izrazu

$$a = (T_d)^b. \quad (2.5.14.)$$

Parametar T_d je moguće očitati iz grafičkog prikaza u trenutku kad je

$$-\ln(1 - ft) = 1. \quad (2.5.15.)$$

S obzirom na to da je izraz (2.5.14) ekvivalentan vrijednosti $ft = 0,632$, parametar T_d govori koliki je vremenski interval potreban za otpuštanje 63,2% lijeka. Pri korištenju ovog modela treba imati na umu da je dobiven empirijski te da nema kinetičku pozadinu na temelju koje bi se moglo zaključiti nešto o mehanizmu otpuštanja ili svojstvima samog lijeka. Ipak, za velik broj sustava pokazano je da prate upravo ovaj model. Primjerice, baicalin ugrađen u liposome prati Weibullov model prilikom otpuštanja, a u *in vivo* pokusima pokazano je da takav način

dostave povećava biodostupnost čak tri puta.³⁵⁶ Otpuštanje oksaliplatina iz liposoma također prati Weibullov model.³⁵⁷

Korsmeyer i suradnici su 1983. godine osmislili semiempirijski matematički model za praćenje otpuštanja lijeka. Za određivanje mehanizma otpuštanja koristi se prvih 60% otpuštenog lijeka ($Q_t/Q_0 < 0,6$). Korsmeyer-Peppasova jednadžba otpuštanja lijeka glasi:

$$\frac{Q_t}{Q_0} = kt^n, \quad (2.5.16.)$$

pri čemu je k konstanta otpuštanja, a n eksponent otpuštanja. Vrijednost eksponenta n koristi se za karakterizaciju mehanizma otpuštanja, pri čemu $n \leq 0,45$ odgovara difuziji koja prati Fickove zakone.³⁵⁵ Postoje mnoga istraživanja koja su pokazala slaganje ovog modela s eksperimentalnim podacima, primjerice otpuštanje kvercetina iz liposoma pripremljenih od diheksadecilfosfata.³⁵⁸ Najčešće se koristi kad mehanizam otpuštanja nije poznat ili kad postoji mogućnost da je više različitih procesa uključeno u proces otpuštanja.³⁵⁵

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

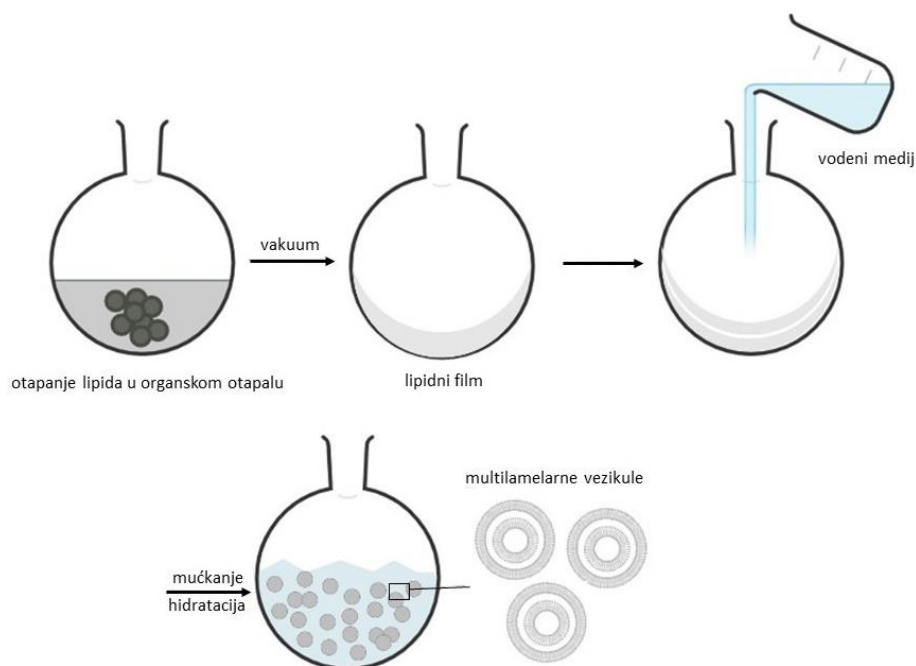
U radu su korištene sljedeće kemikalije, bez dodatnog pročišćavanja.

- 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfokolin (DOPC) (>99%), C₄₄H₈₄NO₈P, Avanti
- 1,2-didokosaheksaenoil-*sn*-glicero-3-fosfokolin (DDPC) (>99%), C₅₂H₈₀NO₈P, Avanti
- 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfokolin (DMPC) (>99%), C₃₆H₇₂NO₈P, Avanti
- kvercetin (QUE) (≥95%), C₁₅H₁₀O₇, Sigma-Aldrich
- miricetin (MCE) (>97%), C₁₅H₁₀O₈, TCI Chemicals Pvt. Ltd.
- miricitrin (MCI) (>98%), C₂₁H₂₀O₁₂, TCI Chemicals Pvt. Ltd.
- dodekanska dikiselina (DDA) (99%), C₁₂H₂₂O₄, Sigma-Aldrich
- 2-tiobarbiturna kiselina (TBA) (>98%), C₄H₄N₂O₂S, TCI Chemicals Pvt. Ltd.
- 1,1,3,3-tetraetoksipropan (TEP) (≥96%), C₁₁H₂₄O₄, Sigma-Aldrich
- klorovodična kiselina (35%), HCl, Lach-ner
- natrijeva lužina (*p.a.*), NaOH, Lach-ner
- kalijev bromid (*p.a.*), KBr, Sigma-Aldrich
- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) (99%), C₁₈H₁₂N₅O₆, Sigma-Aldrich
- 5-DOXYL-stearinska kiselina (5-DSA), C₂₂H₄₂NO₄, (99%), Sigma-Aldrich
- željezov(II) klorid tetrahidrat (98%), FeCl₂·4H₂O, Alfa Aesar
- željezov(III) klorid heksahidrat (99%), FeCl₃·6H₂O, Acros Organics
- amonijev acetat (*p.a.*), CH₃COONH₄, Lach-ner
- poli(etilen-glikol) (PEG) (*p.a.*), M_w = 4000 Da, Acros Organics
- etilen-glikol (EG), C₂H₆O₂ (*p.a.*), Lach-ner
- etanol (96%), C₂H₅OH, Lach-ner
- metanol (99,5%), CH₃OH, Kemika
- kloroform (99,93%), CH₃Cl, Lach-ener
- vodikov peroksid (30%), H₂O₂, Lach-ner
- puferirana fiziološka otopina (engl. *phosphate buffer saline*, PBS) u obliku tableta; pH = 7,4, I_c = 0,15 mol dm⁻³, Sigma-Aldrich

3.2. Priprava i strukturalna svojstva liposoma

3.2.1. Priprava liposoma

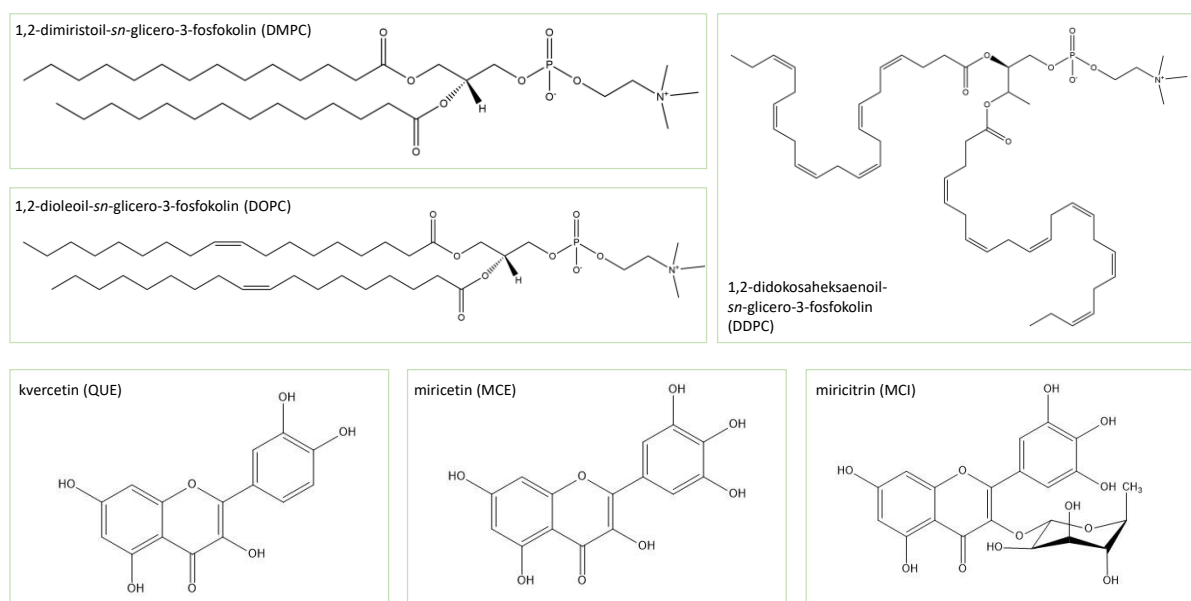
Svi liposomi pripremljeni su metodom hidratacije tankog filma³⁷ (slika 3.2.1.), pri čemu je koncentracija liposoma ovisila o korištenoj metodi te će biti navedena u svakom poglavlju.



Slika 3.2.1. Shematski prikaz priprave liposoma metodom hidratacije tankog filma.

Korištena su tri strukturno različita lipida, zasićeni 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfokolin (DMPC), nezasićeni 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfokolin (DOPC), koji sadrži po jednu dvostruku vezu na svakom lancu te nezasićeni 1,2-didokosaheksaenoil-*sn*-glicero-3-fosfokolin (DDPC) koji na svakom lancu sadrži po šest dvostrukih veza (slika 3.2.2.). Kontrolni uzorci u svim su metodama neoksidirani liposomi bez dodanih flavonoida. Za pripravu liposoma, lipid je otopljen u kloroformu te je otapalo ispareno pod vakuumom korištenjem rotacijskog uparivača, nakon čega na stijenkama okrugle tikvice zaostaje tanki lipidni film. Lipidni film resuspendiran je u puferiranoj fiziološkoj otopini (pH = 7,4), pri čemu uslijed mehaničkog miješanja i naizmjeničnog uranjanja tikvice u vruću vodu i led dolazi do odvajanja filma od stijenke i spontanog formiranja liposoma. Sve suspenzije liposoma ostavljene su 24 h u hladnjaku kako bi se stabilizirale. Liposomi s ugrađenim flavonoidima pripremljeni su na isti

način, no prije isparavanja kloroforma, u otopinu je dodana i željena količina metanolne otopine flavonoida ($c_0 = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$). Korišteni flavonoidi su kvercetin (QUE), miricetin (MCE) i miricitrin (MCI) (slika 3.2.2.) u različitim množinskim udjelima, koji će biti navedeni u svakom poglavlju. S obzirom na to da je literaturno pokazano da proces ekstrudiranja dovodi do gubitka materijala ugrađenog u liposome^{359,360}, u eksperimentima su korišteni multilamelarni liposomi. Na taj se način osigurava konstantan množinski udio flavonoida tijekom svih provedenih eksperimenata.



Slika 3.2.2. Strukture korištenih lipida i flavonoida.

3.2.2. Diferencijalna pretražna kalorimetrija: termotropna svojstva lipidnog dvosloja

Diferencijalna pretražna kalorimetrija (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC) je tehnika koja se koristi za ispitivanje termodinamičkih svojstava sustava u odnosu na referentni sustav.³⁶¹ Temelji se na promjeni temperature sustava te mjerenju količine topline potrebne za tu promjenu. DSC se, između ostalog, primjenjuje za istraživanje faznih prijelaza sustava. Ta se istraživanja temelje na činjenici da, ovisno o tome je li endotermna ili egzotermna, fazna promjena zahtijeva više ili manje toplinske energije za istu promjenu temperature u odnosu na referentni sustav. Razlika u toplini između promatranog i referentnog sustava tada odgovara toplini primljenoj ili otpuštenoj prilikom faznog prijelaza. Kao rezultat DSC eksperimenta dobiva se krivulja ovisnosti topline o temperaturi, čijim je integriranjem moguće izračunati entalpiju faznog prijelaza. Entalpija faznog prijelaza, ΔH jednaka je

$$\Delta_t H = KA, \quad (3.2.1.)$$

pri čemu je K konstanta kalorimetra, a A površina ispod signala. Konstanta kalorimetra uobičajeno se određuje analizom uzorka poznate entalpije faznog prijelaza.

Kako bi se ispitala termotropna svojstva i interakcija flavonoida s lipidima, pripremljeni su DMPC liposomi s različitim množinskim udjelima MCE ($x = 0,12; 0,17; 0,25; 0,30$) i MCI ($x = 0,09; 0,17; 0,21; 0,27$). S obzirom na zasićenost i stabilnost DMPC lipida, taj je sustav odabran kao modelni za proučavanje navedenih interakcija. MCI i MCE odabrani su jer posjeduju istu osnovnu strukturu te je jedina razlika u stupnju glikozilacije. Konačna koncentracija liposoma iznosila je 5 g dm^{-3} , a korištena je ćelija volumena 300 mm^3 . Mjerenja su provedena uz tri ponavljanja na kalorimetru *Nano-DSC* (*TA Instruments*, New Castle, USA) s brzinom skeniranja $2 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ u temperaturnom rasponu $\vartheta = (8-40) \text{ }^\circ\text{C}$. Analiza podataka provedena je korištenjem *TA Instruments Nano Analyze* programskog paketa.

3.2.3. Mikroskopija atomskih sila i spektroskopija sila: morfološka i nanomehanička svojstva lipidnog dvosloja

Mikroskopija atomskih sila (engl. *atomic force microscopy*, AFM) i spektroskopija sila (engl. *force spectroscopy*, FS) metode su koje se koriste za oslikavanje i istraživanje nanomehaničkih svojstava uzoraka. U mikroskopiji atomskih sila dolazi do oslikavanja površine korištenjem oštrog šiljka nanometarskih dimenzija koji se nalazi na kraju savitljive opruge. Interakcije između vrha šiljka i površine uzorka uzrokuju otklon poluge proporcionalan sili između šiljka i površine. Otklon opruge mjeri se optičkim sustavom koji se sastoji od lasera i diode. Kretanje uzorka u odnosu na vršak kontrolirano je piezoelektričnim elementom.³⁶²

Općenito, sile između vrška i površine uzorka određuju način na koji se provodi mjerenje. Te sile mogu biti privlačne, ukoliko je udaljenost između vrška i površine manja od 1 nm , te odbojne, ukoliko je navedena udaljenost veća od 100 nm . Ukoliko je sila kontinuirano odbojna, vršak je uvijek u dodiru s površinom te se radi o kontaktnom načinu rada. Takav je način snimanja pogodan za ravne i rigidne površine. S druge strane, ukoliko je sila kontinuirano privlačna, vršak ne dolazi u dodir s površinom te se radi o beskontaktnom načinu. Beskontaktni način pogodan je za istraživanje vrlo mekih uzoraka te se najčešće primjenjuje u vakuumu jer je na zraku vrlo teško izbjeći kontakt između vrška i uzorka. Postoji i dodatan način

snimanja, tzv. tapkajući način, u kojem vršak oscilira na frekvenciji koja se mijenja ovisno o položaju vrška, a ukupna sila može biti privlačna ili odbojna. Tapkajući način uobičajeno se koristi za istraživanje mekih, bioloških uzoraka.³⁶²

AFM omogućava određivanje mehaničkih svojstava uzoraka korištenjem spektroskopije sila. U navedenoj metodi, uzorak na nosaču se pomiče te se mjeri otklon opruge. Kao rezultat, u svakoj se točki dobiva krivulja koja opisuje otklon i udaljenost. Iz otklona opruge može se izračunati sila primijenjena na uzorak, dok je iz krivulje sile moguće izračunati deformaciju, elastičnost i udubljenje uzorka.³⁶³

Za AFM i FS mjerenja pripremljeni su DMPC liposomi s ugrađenim MCE i MCI pri $x = 0,17$. Konačna koncentracija liposoma iznosila je $0,5 \text{ g dm}^{-3}$. Kako bi se formirao lipidni dvosloj na nosaču, suspenzija liposoma ($V = 100 \text{ mm}^3$) nanosena je na nosač u fluidnoj ćeliji. Nakon 10 minuta, neadsorbirani liposomi isprani su puferiranom fiziološkom otopinom te termostimirani na $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. Kako bi se dobila reprezentativna topografija uzoraka, sva mjerenja provedena su minimalno tri puta.

AFM mjerenja provedena su u fluidnoj ćeliji korištenjem AFM Bioscope (*Bruker Billerica*, USA) mikroskopa uz PeakForce QNM način rada. Korištena je *SNL-10 Bruker* proba koja je kalibrirana metodom termalnog šuma ($k = 0,5 \text{ N m}^{-1}$, $f = 65 \text{ kHz}$). Rezolucija skeniranja bila je 256 uzoraka po liniji. Maksimalna sila ($F_{\max} \approx 300 \text{ pN}$) kontrolirana je prije svakog doticaja vrška s uzorkom kako ne bi došlo do oštećenja lipidnog dvosloja. Nanomehanički podaci dobiveni su mjerenjem DMT modula u sklopu programskog paketa *Bruker*. Analiza podataka provedena je u programu *NanoScope Analysis* (v 1,9).

3.3. Lipidna peroksidacija

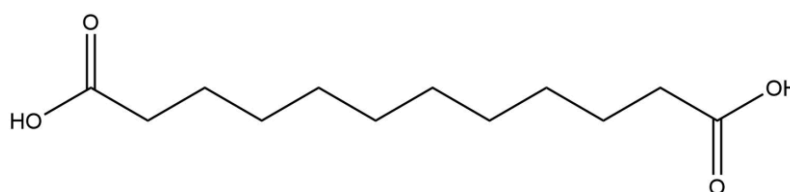
3.3.1. Inicijacija

U slučaju DOPC lipida, lipidna peroksidacija inicirana je Fentonovom reakcijom (jednadžba 2.3.11.). U sustav su istovremeno dodane vodene otopine $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($c_0 = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) i H_2O_2 ($c_0 = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$), pri čemu je konačna koncentracija svakog reaktanta u otopini bila $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. Koncentracija H_2O_2 ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) odgovara izvanstaničnoj koncentraciji u uvjetima oksidativnog stresa.³⁶⁴ Sve vodene otopine pripremljene su u redistiranoj vodi. Reakcija je tekla $t = 1 \text{ h}$ pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ prije daljnje analize. S obzirom na to

da je temperatura faznog prijelaza u slučaju DOPC lipida niža od temperature na kojoj su provedeni eksperimenti, $T_m = -16,5 \text{ }^\circ\text{C}$ ³⁶⁵, lipid je u svim eksperimentima u fluidnoj fazi. DDPC lipid je, zbog velikog broja dvostrukih veza, nestabilniji i podložniji lipidnoj peroksidaciji te nije potreban dodatak vodikovog peroksida kako bi reakcija započela. Za iniciranje reakcije je u većini eksperimenata dodana samo vodena otopina $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, a iznimke će biti navedene u pojedinim poglavljima. Ishodna otopina $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ pripravljena je u vodi propuhanoj zrakom kako bi koncentracija kisika u sustavu bila stalna. Ravnotežna koncentracija Fe(II) iona iznosila je $c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$.

3.3.2. Ugradnja modelnog produkta

Tijekom lipidne peroksidacije nastaje velik broj karbonilnih spojeva. Kako bi se ispitala interakcija produkata i fosfolipidnog dvosloja, kao modelni produkt odabrana je dodekanska dikiselina (DDA) koja, zahvaljujući karboksilnim skupinama na oba kraja, može tvoriti interakcije s fosfolipidnim dvoslojem. DDA je ugrađena u DOPC liposome prilikom njihove pripreme, a liposomi su pripremljeni metodom hidratacije tankog filma. Ishodna otopina DDA pripravljena je u kloroformu ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) te dodana kloroformnoj otopini lipida, pri čemu su konačni množinski udjeli DDA bili $x = 0,05$ i $x = 0,10$. Kako bi se ispitaio utjecaj dodatka flavonoida na interakciju DDA i DOPC, u liposome su ugrađena i dva flavonoida, MCE i MCI ($x = 0,05$).

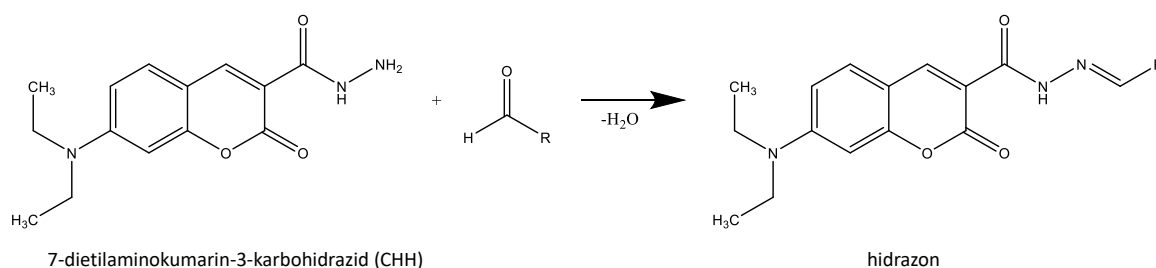


Slika 3.3.1. Struktura dodekanske dikiseline (DDA).

3.3.3. Masena spektrometrija visoke rezolucije: određivanje produkata i dosega lipidne peroksidacije

Masena spektrometrija visoke rezolucije (engl. *high-resolution mass spectrometry*, HR-MS) korištena je za analizu produkata lipidne peroksidacije. S obzirom na niske koncentracije produkata te niski afinitet za protone, produkti su derivatizirani 7-dietilaminokumarin-3-

karbohidrazidom (CHH) sintetiziranim na Fakultetu za Farmaciju, Sveučilište u Ljubljani, Slovenija. Derivatizacija osigurava visoki protonski afinitet i pojačava ionizaciju prilikom snimanja u pozitivnom ionskom načinu, čime je omogućena detekcija mnogih produkata lipidne peroksidacije. Pretpostavlja se da je reakcija između CHH i karbonilnih spojeva brza i specifična. Nadalje, hidrofobnost i relativno velika molarna masa CHH omogućavaju ekstrakciju kratkolančanih i dugolančanih spojeva u organskom otapalu. Na taj se način detektiraju i kraći karbonilni spojevi, koji bi se bez derivatizacije prilikom ekstrakcije zadržali u vodenom sloju.



Slika 3.3.2. Shema derivatizacije karbonilnih spojeva s CHH.

Oksidacija DOPC liposoma ($c = 1,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) inicirana je Fentonovom reakcijom. Nakon $t = 1 \text{ h}$, nastali produkti derivatizirani su metanolnom otopinom CHH ($V = 50 \text{ mm}^3$, $c = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$) pri $\vartheta = 37 \text{ }^\circ\text{C}$, $t = 1 \text{ h}$. Potom su uzorci ekstrahirani u istom volumenu kloroforma te razrijeđeni na koncentraciju $c = 10 \text{ nmol dm}^{-3}$ u smjesi metanola i kloroforma (2:1, v/v).

Korišten je maseni spektrometar *Q Exactive™ Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap™* (Thermo Scientific™) s *Orbitrap* detektorom (Fakultet za farmaciju, Sveučilište u Ljubljani, Slovenija). Raspon snimanja bio je 50–6000 m/z s masenom rezolucijom od 140,000 FWHM te točnosti $<1 \text{ ppm}$. Spektri su dobiveni u FT skenirajućem načinu s ciljanom masenom rezolucijom od 100,000 pri $m/z = 400$ uz period $t = 15 \text{ min}$. Analiza je provedena u programu *Thermo Xcalibur Qual Browser (Xcalibur 4.2 SP1, Thermo Fisher Scientific Inc.)*. Svi spektri ručno su pretraženi za potencijalne karbonilne spojeve s točnošću mase od 5 ppm.

U slučaju DDPC lipida, određen je doseg lipidne peroksidacije te je u tu svrhu korišten vezani sustav tekućinski kromatograf-maseni spektrometar, pri čemu su uvjeti snimanja masenih spektara opisani u prethodnom odlomku. Korištena je kromatografska kolona *Acquity UPLC BEH C18 1,7 μm*. Mobilne faze bile su 600/390/10 (acetonitril/voda/vodena otopina

amonijevog formijata ($c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$) u mravljoj kiselini ($w = 0,1\%$) i 900/90/10 (izopropanol/acetonitril/vodena otopina amonijevog formijata ($c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$) u mravljoj kiselini ($w = 0,1\%$), dok je volumen injektiranja iznosio $V = 3 \text{ mm}^3$, uz brzinu protoka $v = 0,4 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Liposomi su otopljeni u metanolu, pri čemu je koncentracija lipida iznosila $\gamma = 50 \text{ mg dm}^{-3}$. Lipidna peroksidacija inicirana je Fentonovom reakcijom ($c(\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}) = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$). Za određivanje kalibracijske krivulje, provedena su mjerenja uzoraka poznate koncentracije lipida. Eksperimenti su provedeni tri puta.

3.3.4. Raspršenje rendgenskog zračenja pri malim kutovima: profili elektronske gustoće liposoma

Raspršenje rendgenskog zračenja pri malim kutovima (engl. *small angle X-ray scattering*, SAXS) je tehnika kojom je moguće kvantificirati elektronsku gustoću.³⁶⁶ Intenzitet raspršenja ($I(q)$) jednak je

$$I(q) = nP(q)S(q), \quad (3.3.1)$$

gdje je $P(q)$ faktor oblika, $S(q)$ strukturni faktor, a n brojčana gustoća čestica. Faktor oblika opisuje unutarnju strukturu čestica, dok strukturni faktor opisuje interakciju između čestica. Vrijednost q je magnituda vektora raspršenja te je povezana s kutom raspršenja jednadžbom

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin(\theta), \quad (3.3.2)$$

gdje je λ valna duljina, a 2θ kut raspršenih zraka. Za lamelarne strukture, faktor oblika može se izraziti kao

$$P(q) = \frac{2\pi r^2 A}{q^2} P_1(q), \quad (3.3.3)$$

pri čemu je A površina lamelarne faze. Faktor oblika može se povezati s profilom elektronske gustoće u fosfolipidnom dvosloju

$$P_1(q) = 4 \int_0^\infty \int_0^\infty \rho_1(r_1) \rho_1(r + dr) \cos(qr) dr_1 dr, \quad (3.3.4)$$

pri čemu je ρ_1 elektronska gustoća dvosloja na udaljenosti r .

Konačna koncentracija liposoma za SAXS eksperimente iznosila je $\gamma = 50 \text{ g dm}^{-3}$. Lipidna peroksidacija inicirana je dodatkom $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$). Mjerenja su provedena u transmisijskom načinu na instrumentu *SAXS-Point 2.0* (Anton Paar, Graz, Austrija). Na kameru je smješten mikroizvor rendgenskog zračenja koji radi pri 50 W te je korišteno Cu-K α zračenje ($\lambda = 0,1542 \text{ nm}$) uz 2D detektor (*EIGER2 R 500K*, Dectris, Švicarska). Udaljenost između uzorka i detektora bila je 571 mm. Svi izotropni dvodimenzionalni SAXS uzorci kutno su uprosječeni kako bi se dobile jednodimenzionalne SAXS krivulje, pri čemu je od svake krivulja oduzeta krivulja koja odgovara otapalu. Kutni q -raspon bio je $q = (0,01-6,00) \text{ nm}^{-1}$, što odgovara kutevima $2\theta = 0,14^\circ-7,00^\circ$. Kao ćelija za snimanje je korištena kvarena kapilara promjera $d = 1 \text{ mm}$ i debljine stijenke $t = 10 \text{ }\mu\text{m}$ umetnuta u termostirani nosač ($\vartheta = 30 \text{ }^\circ\text{C}$). Vakuum prilikom snimanja održavan je na $p \approx 1 \text{ mbar}$, a vrijeme ekspozicije bilo je 6·300 s.

Za obradu SAXS spektara korišten je program Genfit.³⁶⁷ Odabran je model u kojem se elektronska gustoća zapisuje kao linearna kombinacija triju funkcija

$$\rho(z) = \rho_0 + \frac{1}{2} \sum_{i=1}^3 (\rho_{i-1} - \rho_i) \left[\text{erf} \left(\frac{z - z_i}{\frac{1}{2\sqrt{2}}\sigma_i} \right) - \text{erf} \left(\frac{z + z_i}{\frac{1}{2\sqrt{2}}\sigma_i} \right) \right], \quad (3.3.5)$$

gdje su z_i i σ_i položaji i standardne devijacije i -tog koraka error funkcije, dok ρ_0 odgovara elektronskoj gustoći otapala. U navedenom modelu utočnjavaju se parametri ρ_i , z_i i σ_i . Za multilamelarne liposome, intenzitet ovisi i o strukturnom faktoru koji je modeliran uporabom modificirane Cailléove teorije (engl. *modified Caillé theory*, MCT). MCT pretpostavlja da lipidni dvosloji nisu savršeno ravni i jednako udaljeni, već da dolazi do termalne fluktuacije relativnih položaja dvosloja, uz postojanje savijanja dvosloja. Uz te pretpostavke, dobiva se strukturni faktor oblika

$$S(q) = N + \left\{ 2 \sum_{m=1}^{N-1} (N - m) \cos(mqd) \exp \left[- \left(\frac{d}{2\pi} \right)^2 q^2 \eta_1 \gamma \right] (\pi m)^{- \left(\frac{d}{2\pi} \right)^2 q^2 \eta_1} \right\}, \quad (3.3.6)$$

pri čemu je N broj dvosloja u jednoj vezikuli, d je duljina ponavljajuće jedinice, γ je Eulerova konstanta, a η Cailleov parametar, koji je dan s formulom

$$\eta_1 = \frac{q_1^2 k_B T}{8\pi (K_c B)^2}, \quad (3.3.7.)$$

gdje je q_1 položaj prvog maksimuma u spektru, k_B Boltzmannova konstanta, T temperatura, K_c modul savijanja, a B modul stlačivosti. Parametri η_1 , N i d utočnjeni su tijekom obrade podataka.

3.3.5. Mikroskopija atomskih sila i spektroskopija sila: morfološka i nanomehanička svojstva lipidnog dvosloja

Za AFM i FS eksperimente pripremljeni su fosfolipidni dvosloji na čvrstom nosaču na način opisan u poglavlju 3.2.3. Ukupna koncentracija suspenzije liposoma iznosila je $\gamma = 5 \text{ g dm}^{-3}$. Eksperimenti su provedeni u fluidu na *AFM FastScan Dimension (Bruker Billerica)* mikroskopu (Masaryk Sveučilište, Brno, Češka) korištenjem *PeakForce QNM* načina te *Scanfastsyst-Fluid* i *Bruker* proba. Nominalna konstanta opruge iznosila je $k = 0,7 \text{ N m}^{-1}$, dok je nominalna rezonantna frekvencija iznosila $\nu = 150 \text{ kHz}$. Sustav je termostatiran na $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. Kalibracija je provedena metodom termalnog ugađanja poznatom u literaturi.³⁶⁸ Mjerenja nanomehaničkih svojstava provedena su korištenjem DMT modula unutar programskog paketa *Bruker*. Sve slike su obrađene i analizirane u programu *NanoScope Analysis* (verzija 1,9).

3.3.6. Elektronska paramagnetska rezonancija: fluidnost lipidnog dvosloja

Elektronska paramagnetska rezonancija (engl. *electron paramagnetic resonance*, EPR) spektroskopska je tehnika koja se koristi za istraživanje paramagnetskih vrsta, uključujući organske i anorganske radikale i tripletna stanja. Temelji se na interakciji vanjskog magnetskog polja i nesparenog elektrona u molekuli. Primjenom magnetskog polja elektron se može naći u dva spinska stanja, $m_s = \pm \frac{1}{2}$ koja se mogu izmijenjivati pod utjecajem elektromagnetskog zračenja. U slučaju elektronskih spinskih prijelaza radi se o mikrovalnom dijelu elektromagnetskog spektra. Energetska razlika dvaju spinskih stanja dana je jednadžbom

$$\Delta E = E_+ - E_- = h\nu = g\beta B, \quad (3.3.8.)$$

pri čemu je h Planckova konstanta, ν frekvencija zračenja, β Bohrov magneton, a B jakost magnetskog polja. Faktor g poznat je kao g -faktor te opisuje unutarnji magnetski moment elektrona. Za slobodan elektron g -faktor iznosi 2,0023. U molekularnim sustavima, g -faktor može varirati te ga se, uz konstantno magnetsko polje i frekvenciju spektrometra, može izračunati iz jednadžbe (3.3.8.). Koncept g -faktora analogan je kemijskom pomaku u nuklearnoj magnetskoj rezonanciji (engl. *nuclear magnetic resonance*, NMR).³⁶⁹

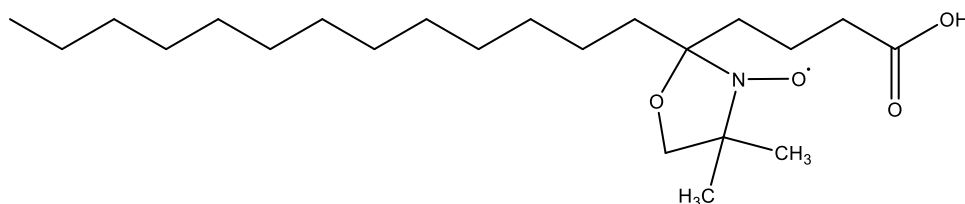
Ovisno o fluidnosti, ugrađena proba može se gibati unutar membrane. Takvo gibanje definira kut koji zatvaraju os definirana duž probe i normala na fosfolipidni dvosloj. Ovisno o promjeni kuta, mijenja se cijepanje unutar tripleta EPR signala. Iz signala se može izračunati parametar uredenosti, S :

$$S = \frac{\bar{A}_{\parallel} - \bar{A}_{\perp}}{A_{zz} - \frac{1}{2}(A_{xx} + A_{yy})}, \quad (3.3.9.)$$

pri čemu su \bar{A}_{\parallel} i \bar{A}_{\perp} parametri koji se određuju iz eksperimentalnog spektra probe u membrani, a A_{xx} , A_{yy} i A_{zz} parametri koji se odrede iz spektra probe u referentnom uzorku slične polarности u kojem je gibanje probe onemogućeno. Parametar S izravno je povezan s rasponom kuteva pod kojim se proba može njihati te govori o rigidnosti membrane, pri čemu veći parametar S odgovara ograničenijem gibanju i rigidnijoj membrani. Maksimalna vrijednost parametra S iznosi 1, što odgovara potpuno uređenoj strukturi.³⁷⁰

EPR spektroskopija korištena je za istraživanje fluidnosti membrane uslijed lipidne peroksidacije. Spektri su snimljeni modificiranim *Varian E-109* spektrometrom s mikrovalnim mostom (*Bruker ER XG*), uz dva ponavljanja. Parametri snimanja za praćenje fluidnosti dvosloja bili su: modulirajuća frekvencija magnetskog polja 100 kHz, središnje magnetsko polje 331,0 mT, snaga mikrovalnog zračenja 4,9 mW, amplituda modulacijskog signala 0,1 mT. Temperatura u EPR šupljini ($\vartheta = 25$ °C) kontrolirana je protokom dušika s točnošću 1 °C te praćena temperaturnim kontrolerom (*Bruker ER 4111*). Za kalibraciju magnetskog polja u spektrometru korištena je standardna referenca, Mn^{2+} ioni u MnO. EPR spektri obrađeni su u programu *MATLAB* (*The MathWorks Inc.*) korištenjem programskog paketa *EasySpin*. Svi uzorci pripremljeni su s ugrađenom probom. Kao proba je korištena 5-DOXYL stearinska

kiselina (5-DSA). Ishodna otopina probe pripravljena je u etanolu ($c = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$). Volumni udio probe unutar liposoma iznosio je 1%, dok je koncentracija liposoma iznosila $\gamma = 5 \text{ g dm}^{-3}$.



Slika 3.3.3. Struktura 5-DSA probe.

3.3.7. Infracrvena spektroskopija: doseg lipidne peroksidacije

Prigušena totalna refleksija (engl. *attenuated total reflection spectroscopy*, ATR) je tehnika infracrvene spektroskopije koja se intenzivno koristi za proučavanje membrana. Čvrsti ili tekući uzorak smješta se u blizinu optičkog elementa. Snop infracrvenog zračenja pada na granicu između optičkog elementa i uzorka, pri čemu dolazi do potpune refleksije zračenja te djelomične apsorpcije na molekulama uzorka koje se nalaze na granici. Zahvaljujući maloj dubini prodiranja, tehnika je prikladna za snažno apsorbirajuće uzorke te za uzorke koje je moguće pripremiti u obliku tanke površine ili filma. Uz to, snažna apsorpcija molekula vode koja često predstavlja problem u klasičnoj infracrvenoj spektroskopiji značajno je smanjena korištenjem ATR tehnike.³⁷¹

Mjerenja su provedena za DOPC liposome s tri ugrađena flavonoida u tri različita množinska udjela. Koncentracija liposoma u metodi infracrvene spektroskopije bila je $\gamma = 20 \text{ g dm}^{-3}$. Mjerenja su provedena na instrumentu *PerkinElmer „Spectrum 400 Series“* (Institut Jožef Stefan, Ljubljana, Slovenija) na kojeg je postavljen ATR element (*Harrick Scientific*) s trapezoidalnim kristalom germanija. Korišten je DTGS detektor. Nominalna rezolucija tijekom snimanja iznosila je 4 cm^{-1} te je svaki prikazani spektar srednja vrijednost 32 snimana spektra, pri čemu su mjerenja ponavljana tri puta. Nosač za ATR kristal bio je u kontaktu s aluminijskim blokom te je sustav termostatiran na $\vartheta = 30 \text{ }^\circ\text{C}$. Volumen od 200 mm^3 nanesen je na ATR kristal na način da je cijeli kristal prekriven. Uzorak je potom sušen dušikom. Tijekom sušenja, praćeno je smanjenje intenziteta široke vrpce na $\tilde{\nu} = 3200\text{--}3600$

cm^{-1} koja odgovara $\nu(\text{O-H})$ istezanju kako bi se osiguralo da je film potpuno suh prije provedbe eksperimenta.³⁷²

Modifikacijom postupka kojeg su koristili Oleszko i suradnici³⁷³, kvantificiran je doseg lipidne peroksidacije. S obzirom na to da u lipidnoj peroksidaciji nastaje mnoštvo karbonilnih spojeva, očekuje se da će nakon peroksidacije doći do promjene u integriranoj apsorbanciji $\nu(\text{C=O})$ vrpce pri $\tilde{\nu} = 1737 \text{ cm}^{-1}$. Ta vrpca analizirana je u odnosu na vrpce kod koje se ne očekuje promjena, $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ pri $\tilde{\nu} = 2959 \text{ cm}^{-1}$. Integrirane apsorbancije izračunate su u programu *Origin Pro 2021b*. U IR spektrima krutina uobičajeno se javljaju signali koji se mogu opisati Gaussovom funkcijom, dok se u IR spektrima plinova signali mogu opisati Lorentzovom funkcijom.³⁷⁴ Prema tome, očekuje se da bi se vrpce u spektru lipida koji je u fluidnoj fazi mogle opisati linearnom kombinacijom Lorentzove i Gaussove funkcije. Prilikom analize spektara, uočeno je da vrpca u rasponu valnih brojeva $\tilde{\nu} = 2800\text{--}3100 \text{ cm}^{-1}$ pokazuje značajan 'lorencijanski' karakter, dok vrpca u rasponu valnih brojeva $\tilde{\nu} = 1600\text{--}1800 \text{ cm}^{-1}$ pokazuje značajan 'gausijanski' karakter. Prema tome, za analizu vrpce istezanja karbonilne skupine korištena je Gaussova funkcija, dok je za analizu vrpce istezanja metilne skupine korištena Lorentzova funkcija. Tijekom prve iteracije varirani su svi parametri. Dobivene širine vrpca potom su korištene za računanje prosječnih širina vrpca za sustave koji sadrže flavonoid. Konačno, integrirane apsorbancije izračunate su uz fiksiranje širine vrpce kako bi se smanjile međusobne ovisnosti parametara. Omjer integriranih apsorbancija r_i izračunat je za sve uzorke prije i nakon lipidne peroksidacije, pri čemu $i = 0$ odgovara uzorku bez flavonoida, dok $i = 1, 2, 3$ odgovara uzorcima s ugrađenim flavonoidima:

$$r_i = \frac{A_i(\nu(\text{C} = \text{O}))}{A_i(\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3))}. \quad (3.3.10.)$$

Promjena u omjeru nakon lipidne peroksidacije (LP), izračunata je u odnosu na kontrolni uzorak, odnosno uzorak liposoma prije LP:

$$\rho_i = \frac{r_i^{\text{LP}} - r_i}{r_i}. \quad (3.3.11.)$$

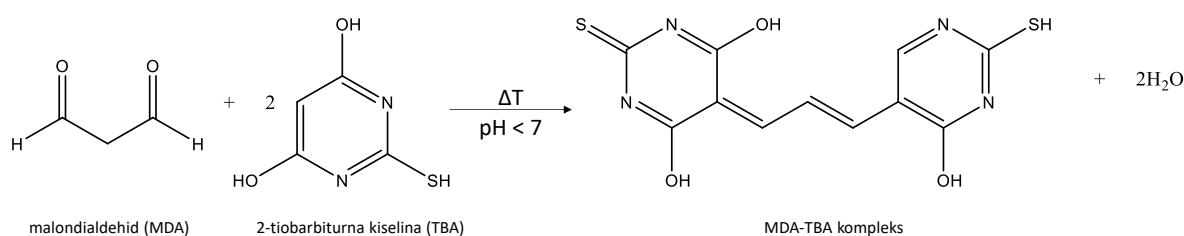
Ukoliko broj karbonilnih skupina raste, omjer ρ_i također raste. Postotak inhibicije za svaki flavonoid izračunat je prema formuli

$$R_i = \frac{\rho_i - \rho_0}{\rho_0}, \quad (3.3.12.)$$

pri čemu ρ_0 odgovara relativnom omjeru integriranih apsorbancija za lipid bez ugrađenih flavonoida ($i = 0$). Ukoliko flavonoidi inhibiraju reakciju lipidne peroksidacije, omjer R_i poprima negativne vrijednosti, pri čemu je minimalna moguća vrijednost $R_i = -1$ koja odgovara potpunoj inhibiciji.

3.3.8. Spektrofotometrijsko određivanje reaktivnih vrsta tiobarbiturne kiseline

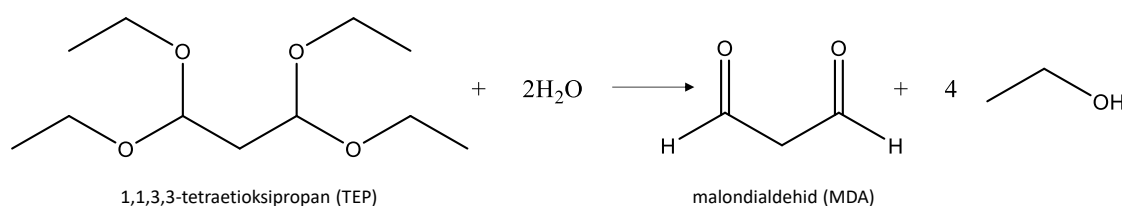
Spektrofotometrijsko određivanje reaktivnih vrsta tiobarbiturne kiseline (engl. *thiobarbituric acid reactive substances*, TBARS) intenzivno se koristi za kvantifikaciju produkata lipidne peroksidacije. Jedan od najčešćih produkata lipidne peroksidacije, malondialdehid (MDA), pri povišenoj temperaturi i u kiselim uvjetima reagira s 2-tiobarbiturnom kiselinom (TBA), pri čemu nastaje ružičasto obojen spektralno aktivan kompleks.



Slika 3.3.4. Shematski prikaz reakcije MDA i TBA.

S obzirom na to da je za nastanak MDA kao produkta lipidne peroksidacije nužno postojanje barem dvije dvostruke veze u jednom lancu lipida, za ove eksperimente korišten je DDPC lipid koji posjeduje šest dvostrukih veza na svakom lancu. Pripravljene su liposomi ($\gamma = 0,1 \text{ g dm}^{-3}$) s ugrađenim QUE, MCE i MCI ($x = 0,05$). Za inicijaciju lipidne peroksidacije korišteni su Fe(II) ioni te su sve otopine pripravljene korištenjem redestilirane vode zasićene kisikom kako bi se koncentracija reaktanata u sustavu držala stalnom. Vodikov peroksid nije korišten kako bi se izbjegla prebrza oksidacija MDA. Iz istog je razloga, za kvantifikaciju nastalog MDA,

inkubacija s TBA započeta nakon 10 minuta trajanja reakcije LP. Preliminarnim eksperimentima utvrđeno je da je to optimalno vrijeme za reakciju TBA i MDA, prije nego dođe do oksidacije MDA u malonsku kiselinu. Za praćenje kinetike lipidne peroksidacije, inkubacija s TBA započeta je u različitim vremenima. Ishodna otopina TBA ($c = 0,025 \text{ mol dm}^{-3}$) pripravljena je u smjesi etanola i klorovodične kiselina (v/v 50/50). Za inicijaciju lipidne peroksidacije pomiješano je 500 mm^3 liposoma ($\gamma = 0,1 \text{ g dm}^{-3}$), 100 mm^3 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) i $1,4 \text{ cm}^3$ PBS. U smjesu u kojoj se odvija lipidna peroksidacija dodana je otopina TBA ($V = 1 \text{ cm}^3$, $c = 0,025 \text{ mol dm}^{-3}$) te je inkubacija provedena pri $\vartheta = 80 \text{ }^\circ\text{C}$, $t = 1 \text{ h}$. UV-Vis spektri snimljeni su u kvarcnoj kivetu ($l = 1 \text{ cm}$, $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$) na *WTW photoLab® 7600* UV-Vis spektrofotometru (*Xylem*, NY, SAD), pri čemu je za kvantifikaciju korištena apsorbancija pri valnoj duljini $\lambda = 533 \text{ nm}$. Za određivanje baždarnog pravca, korišten je prekursor MDA, 1,1,3,3-tetraetoksiopropan (TEP). TEP u vodenom mediju prelazi u MDA u jednakom stehiometrijskom omjeru.



Slika 3.3.5. Shematski prikaz reakcije hidrolize TEP-a.

U svrhu određivanja kalibracijskog pravca pripravljene su otopine različitih koncentracija TEP-a u smjesi te je provedena inkubacija s TBA pri istim uvjetima kao i za lipidnu peroksidaciju. S obzirom na to da iz jedne molekule TEP-a nastaje jedna molekula MDA, pretpostavlja se da je koncentracija TEP-a jednaka koncentraciji MDA. Nadalje, u reakcijskoj je smjesi TBA u velikom suvišku, a MDA je limitirajući reaktant pa se pretpostavlja da je koncentracija MDA približno jednaka koncentraciji kompleksa MDA-TBA. Prema tome, određeni su spektralni profili i molarni apsorpcijski koeficijent kompleksa MDA-TBA.

3.4. Nestabilnost flavonoida u fiziološkim uvjetima

3.4.1. Elektronska paramagnetska rezonancija: efikasnost uklanjanja radikala flavonoidima

EPR spektri snimljeni su na instrumentu i pri uvjetima opisanim u poglavlju 3.3.6. Za određivanje antioksidativne efikasnosti flavonoida EPR spektroskopijom korišten je 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal. Pripravljene su ishodne otopina DPPH i flavonoida u etanolu ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) te je provjerena stabilnost otopine DPPH. Tijekom $t = 24 \text{ h}$ nije zamijećen gubitak signala DPPH radikala u EPR spektru. Ishodna otopina DPPH ($V = 4,050 \text{ cm}^3$) dodana je otopini flavonoida ($V = 450 \text{ mm}^3$) te je smjesa kratko miješana. EPR kapilara napunjena je smjesom te smještena u standardnu kvarcnu cijev. Spektri su snimani u vremenu te je efikasnost uklanjanja DPPH radikala za svaki flavonoid izračunata dvostrukom integracijom EPR spektra. Intenzitet signala DPPH otopine prije dodatka flavonoida snimljen je netom prije eksperimenta i korišten kao referentni signal (I_0) u trenutku $t = 0$. Intenzitet signala DPPH radikala uz dodatak flavonoida praćen je kroz 20 minuta pri čemu su intervali snimanja bili $t = 30 \text{ s}$ i $t = 60 \text{ s}$, ovisno o intenzitetu signala pojedinog uzorka. Količina preostalih DPPH radikala normirana je i izražena kao postotak I_N u odnosu na referentni signal:

$$I_N = \frac{I}{I_0} \times 100\%, \quad (3.4.1.)$$

gdje je I intenzitet signala DPPH radikala mjeren u vremenu t . Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost 3 mjerenja.

3.4.2. Kinetika raspada flavonoida

Kako bi se ispitala kinetika raspada flavonoida u fiziološkim uvjetima, provedena su mjerenja vremenske ovisnosti UV-Vis spektara svih flavonoida. Pripravljene su otopine flavonoida ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u puferiranoj fiziološkoj otopini ($\text{pH} = 7,4$). Sustav je termostatiran na $\vartheta = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ (Corio CD-201F Julabo GmbH, Seelback, Njemačka) te su UV-Vis spektri snimani u različitim vremenskim razmacima kroz $t = 50 \text{ h}$. Za snimanje spektara korišten je WTW photoLab® 7600 UV-Vis spektrofotometar (Xylem, NY, SAD).

Podaci su obrađeni u programu *Origin Pro 2021b*. Iz vremenske ovisnosti apsorbancije maksimuma u prvom dijelu snimanja procijenjeni su koeficijenti brzine prvog koraka reakcije (k_1) utočnjavanjem na eksponencijalnu funkciju

$$A_{\max}(t) = Ae^{-k_1 t} + B, \quad (3.4.2.)$$

dok su koeficijenti brzine drugog koraka reakcije (k_2) procijenjeni analogno, korištenjem dvije eksponencijalne funkcije

$$A_{\max}(t) = A_1 e^{-k_1 t} + A_2 e^{-k_2 t} + B. \quad (3.4.3.)$$

Dobiveni koeficijenti korišteni su za izračun koncentracijskih profila reaktanta (R), međuprodukta (MP) i produkta (P), uz pretpostavku uzastopnih reakcija prvog reda:



$$c_R(t) = c_0 e^{-k_1 t} \quad (3.4.5.)$$

$$c_{MP}(t) = \frac{c_0 k_1}{k_2 - k_1} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) \quad (3.4.6.)$$

$$c_P(t) = -\frac{c_0 k_2}{k_2 - k_1} e^{-k_1 t} + \frac{c_0 k_1}{k_2 - k_1} e^{-k_2 t} + c_0 \quad (3.4.7.)$$

Dobiveni koncentracijski profili korišteni su u metodi alternirajućih najmanjih kvadrata (engl. *alternating least squares*, ALS).³⁷⁵ Cilj ove metode je istovremeno utočniti i koncentracije i molarne apsorpcijske koeficijente sustava. Apsorbancije su modelirane kao zbroj tri doprinosa:

$$A_i(t_j) = \varepsilon_{R,i} c_R(t_j) + \varepsilon_{MP,i} c_{MP}(t_j) + \varepsilon_{P,i} c_P(t_j). \quad (3.4.8.)$$

Matrični zapis jednak je

$$\mathbf{A} = \boldsymbol{\varepsilon} \mathbf{c}. \quad (3.4.9.)$$

Iz procijenjenih koncentracijskih profila može se odrediti procjena molarnih apsorpcijskih koeficijenata

$$\mathbf{A} \mathbf{c}^T (\mathbf{c} \mathbf{c}^T)^{-1} = \boldsymbol{\varepsilon}. \quad (3.4.10.)$$

Ukoliko je neki od molarnih apsorpcijskih koeficijenata negativan, postavljen je na nulu. Dobivene procjene ε zatim se koriste za dobivanje bolje procjene koncentracijskih profila, također uporabom multilinearne regresije. Bitna razlika je da je multilinearne regresija za koncentracije provedena uz uvjet da je zbroj sve tri koncentracije u svim vremenima stalan

$$c_R(t_j) + c_{MP}(t_j) + c_P(t_j) = c_0, \quad (3.4.11.)$$

čime se model svodi na

$$A_i(t_j) = \varepsilon_{R,i}c_0 + (\varepsilon_{MP,i} - \varepsilon_{R,i})c_{MP}(t_j) + (\varepsilon_{P,i} - \varepsilon_{R,i})c_P(t_j). \quad (3.4.12.)$$

Ukupna koncentracija c_0 aproksimirana je koncentracijom reaktanta u $t = 0$

$$A_i(t_j) - \varepsilon_{R,i}c_R(0) = \tilde{\varepsilon}_{MP,i}c_{MP}(t_j) + \tilde{\varepsilon}_{P,i}c_P(t_j) \quad (3.4.13.)$$

$$\tilde{A}_i(t_j) = \tilde{\varepsilon}_{MP,i}c_{MP}(t_j) + \tilde{\varepsilon}_{P,i}c_P(t_j). \quad (3.4.14.)$$

Simbol \sim označava razliku odgovarajućih veličina i njihovih vrijednosti za reaktant. U matričnom obliku, model odgovara izrazu

$$\tilde{\mathbf{A}} = \tilde{\boldsymbol{\varepsilon}}\tilde{\mathbf{c}}. \quad (3.4.15.)$$

Korištenjem navedenog modela provedena je alternirajuća multilinearne regresija. Iz molarnih apsorpcijskih koeficijenata dobiveni su novi koncentracijski profili

$$(\tilde{\boldsymbol{\varepsilon}}^T \tilde{\boldsymbol{\varepsilon}})^{-1} \tilde{\boldsymbol{\varepsilon}}^T \tilde{\mathbf{A}} = \tilde{\mathbf{c}}. \quad (3.4.16.)$$

Ukoliko je neka koncentracija negativna, postavljena je u nulu. Dodatno, u slučaju QUE je pretpostavljeno da je koncentracijski profil reaktanta monotono padajuća funkcija, a koncentracijski profil produkta monotono rastuća funkcija. Prema tome, ukoliko je dobivena koncentracija reaktanta u t_i veća nego u t_{i-1} , postavljena je na istu vrijednost. Analogno je napravljeno za produkt. Dobiveni koncentracijski profili zatim su ponovno korišteni za određivanje molarnih apsorpcijskih koeficijenata. Cijeli postupak ponovljen je 15 puta, dok nije primijećeno da se koncentracije i molarni apsorpcijski koeficijenti više ne mijenjaju. Dobiveni

koncentracijski profili korišteni su za određivanje koeficijenata brzine reakcije. Koeficijent brzine za prvi korak određen je iz koncentracijskog profila reaktanta, dok je koeficijent brzine za drugi korak, gdje je bilo moguće, određen iz koncentracijskih profila međuprodukta i produkta, uz fiksiran koeficijent brzine prvog koraka raspada.

3.5. Sinteza i karakterizacija nanonosača

3.5.1. Sinteza nanočestica magnetita

Nanočestice magnetita sintetizirane su modificiranom solvotermalnom sintezom.^{376,377} U okruglu dvogrlu tikvicu dodani su amonijev acetat ($m(\text{CH}_3\text{COONH}_4) = 5,0$ g), željezov(III) klorid heksahidrat ($m(\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}) = 1,36$ g), poli(etilen-glikol) ($m(\text{PEG}) = 1,00$ g, $M_w = 4000$ Da) te etilen-glikol ($V(\text{EG}) = 70$ cm⁻³). Smjesa je miješana na magnetskoj miješalici (*Heidolph MR Hei-Standard Mixer, Schwabach*) $t = 1$ h pri $\vartheta = 160$ °C u inertnoj atmosferi dušika. Nakon $t = 1$ h nastaje tamno-smeđa otopina te se reakcija zaustavlja. Reakcijska smjesa se potom prebacuje u autoklav s teflonskim umetkom (*BHL 800 Berghof, Eningen*) priključenim na temperaturni kontroler (*BTR-2000A, Berghof*). Autoklav se zagrijava na $\vartheta = 200$ °C te se reakcija provodi $t = 20$ h, nakon čega se sustav hladi, a dobivena suspenzija centrifugira (8000 rpm, $t = 10$ min, *Universal 320 Hettich Zentrifugen, Tuttlingen*). Supernatant je dekantiran te su čestice tri puta isprane etanolom i osušene u eksikatoru za daljnju karakterizaciju.

3.5.2. Difrakcija rendgenskog zračenja na polikristalnom uzorku

U svrhu potvrde strukture sintetiziranog magnetita korištena je difrakcija rendgenskog zračenja na polikristalnom uzorku (engl. *powder X-Ray Diffraction, PXRD*). Kao izvor monokromatskog rendgenskog zračenja najčešće se koristi klasična rendgenska cijev. Prilikom interakcije zračenja s materijalom dolazi do difrakcije zračenja, što se bilježi pomoću detektora. Difrakciju rendgenskog zračenja opisuje Braggov zakon:

$$n\lambda = 2d\sin\theta, \quad (3.5.1.)$$

pri čemu je n red difrakcije, d međuravninska udaljenost, λ valna duljina zračenja, a θ kut difrakcije. Difrakcija rendgenskog zračenja najčešće je korištena metoda za kvalitativnu analizu

nepoznatog kristaliničnog uzorka, s obzirom na to da svaka tvar ima karakterističan difraktogram.³⁷⁸

Difraktogram je snimljen *Philips MPD 1880* difraktometrom (Brooklyn, NY, SAD) s monokromatskim $\text{CuK}\alpha$ zračenjem ($\lambda = 0,154$ nm). Područje snimanja bilo je u rasponu kuteva $2\theta = 10^\circ - 70^\circ$ uz pomicanje brojača za $0,02^\circ$ te fiksni vremenski korak $t = 10$ s. Prosječna veličina kristalita izračunata je iz Scherrerove jednadžbe³⁷⁹ koja glasi

$$D_p = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta'} \quad (3.5.2.)$$

pri čemu je D_p srednji promjer kristalita, K je faktor oblika, a β je širina na polovici difrakcijskog maksimuma. Za račun parametara u Scherrerovoj jednadžbi difrakcijski maksimum opisan je Lorentzovom funkcijom, čiji su parametri utočnjeni korištenjem programa *Origin Pro 2021b*. Korišten je faktor oblika koji odgovara sferičnim kristalitim te iznosi $K = 1,11$.

3.5.3. Infracrvena spektroskopija

U svrhu karakterizacije nanočestica infracrvenom spektroskopijom, mala količina uzorka pomiješana je s deset puta većom količinom KBr i prešana u pastilu. Spektar je sniman korištenjem *Alpha-T FTIR* spektrometra (*Bruker, Billerica, MA, SAD*). Raspon valnih brojeva tijekom snimanja bio je $4000 \text{ cm}^{-1} - 350 \text{ cm}^{-1}$ uz nominalnu rezoluciju 4 cm^{-1} . Dobiveni spektar prosjek je 16 snimanja, a mjerenje je provedeno pri $\vartheta = 25$ °C.

3.5.4. Pretražna elektronska mikroskopija

U svrhu istraživanja morfologije i veličine sintetiziranih nanočestica magnetita, korištena je pretražna elektronska mikroskopija (engl. *scanning electron microscopy*, SEM). Korišten je *JEOL JSM-7000F* mikroskop (Tokio, Japan) povezan na *EDS/INCA 350* analizator (*Oxford Instruments LTD, London, UK*). Analiza dobivenih slika i veličine nanočestica provedena je u programu *ImageJ* (verzija 1,53J).

3.5.5. Transmisijska elektronska mikroskopija

Morfološka analiza provedena je i na transmisijskom elektronskom mikroskopu (engl. *transmission electron microscopy*, TEM), *Zeiss EM10* (Oberkochen, Njemačka), pri naponu 100 kV. Nanočestice su suspendirane u redestiliranoj vodi te nanosene na bakrene mrežice obložene ugljikom. Eksperimenti su provedeni nakon sušenja, a analiza slika provedena je u programu *ImageJ* (verzija 1,53J).

3.5.6. Mikroskopija atomskih sila i spektroskopija sila

Nanočestice su nanosene na tinjac te tri puta isprane redestiliranom vodom ($V = 60 \text{ cm}^3$) kako bi se uklonile zaostale nečistoće. Korišten je *Multimode Scanning Probe* mikroskop s *Nanoscopella* kontrolerom (*Bruker, Billerica, MA, USA*), uz *SJV-JV-130 V* skener (*Bruker, Billerica, MA, USA*). Mjerenje je provedeno u tapkajućem načinu korištenjem silikonskog vršca (*T-TESPA, Bruker*) nominalne frekvencije $\nu = 300 \text{ kHz}$ te konstante $k = 40 \text{ N m}^{-1}$. Sva mjerenja provedena su pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. Dobiveni podaci analizirani su u programu *NanoScope Analysis* (verzija 1,9).

3.5.7. Magnetska mjerenja

Magnetska svojstva sintetiziranih nanočestica izmjerena su komercijalnim magnetometrom (*Quantum Design MPMS-5 SQUID*). Praškasti uzorak smješten je u ampulu čiji je dijamagnetični doprinos oduzet od dobivenih rezultata. Ovisnost magnetizacije o magnetskom polju mjerena je pri $T = 300 \text{ K}$ uz primjenu vanjskog magnetskog polja do $H = 10 \text{ kOe}$ u oba smjera.

3.5.8. Agregacija nanočestica u mediju: dinamičko raspršenje svjetlosti

U svrhu određivanja veličine agregata magnetita, provedena su mjerenja metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti (engl. *dynamic light scattering*, DLS). Općenito, kao izvor zračenja koristi se laser, pri čemu dolazi do raspršenja zračenja na česticama. Nakon raspršenja svjetlosti dolazi do interferencije koja može biti konstruktivna, pri čemu nastaju maksimumi intenziteta, ili destruktivna, pri čemu nastaju minimumi intenziteta. S obzirom na to da se čestice u suspenziji

gibaju nasumično, odnosno Brownovim gibanjem, intenzitet raspršene svjetlosti u vremenu fluktuiraju. Fluktuacije su izraženije za manje čestice. Pod pretpostavkom da su čestice sfernog oblika, moguće je odrediti hidrodinamički promjer (d_h) prema Stokes-Einstenovoj jednadžbi

$$d_h = \frac{k_B T}{3\pi D \eta'} \quad (3.5.3.)$$

gdje je D difuzijski koeficijent, T temperatura, η viskoznost otapala, a k_B Boltzmannova konstanta.

Suspenzija nanočestica magnetita koncentracije ($\gamma = 0,5 \text{ g dm}^{-3}$) pripravljena je u puferiranoj fiziološkoj otopini (pH = 7,4). Hidrodinamički promjer izmjeren je šest puta tijekom $t = 26 \text{ h}$ u svrhu ispitivanja stabilnosti u duljem vremenskom periodu te određen kao maksimum funkcije koja opisuje volumnu raspodjelu veličina čestica. Svaki rezultat srednja je vrijednost 10 mjerenja. Sva mjerenja provedena su na foton-korelacijskom spektrofotometru, *Zeta Sizer Nano ZS (Malvern, UK)* sa zelenim laserom ($\lambda = 532 \text{ nm}$) pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. Rezultati su obrađeni u programu *Zetasizer software 6,32 (Malvern, UK)*.

3.5.9. Izoelektrična točka: elektrokinetička mjerenja

Izoelektrična točka određena je mjerenjem elektrokinetičkog potencijala u ovisnosti o pH-vrijednosti. Mjerenje elektrokinetičkog potencijala zasniva se na Dopplerovom efektu. U kivetu s uzorkom uranja se elektroda koja generira električno polje o čijoj jačini ovisi gibanje čestica. Upadna zraka lasera poznate frekvencije raspršuje se u kontaktu s uzorkom te se mjeri frekvencija raspršenog zračenja. Pokretljivost čestica u električnom polju veća je što je veća razlika u frekvenciji između upadnog i raspršenog zračenja. Iz pokretljivosti čestica (μ), primjenom različitih modela, moguće je izračunati elektrokinetički potencijal (ζ). Općenito, elektrokinetički potencijal odgovara elektrokinetičkoj plohi unutar difuznog sloja u modelu električnog međupovršinskog dvosloja. Prilikom gibanja nabijenih čestica, dio otopine se giba zajedno s česticom, dok ostatak otopine miruje. Elektrokinetička ploha predstavlja granicu između pokretnog i nepokretnog dijela difuznog sloja, dok elektrokinetički potencijal predstavlja otpor kidanju nabijenih slojeva oko čestice.³⁸⁰

U proučavanom sustavu korišten je model Smoluchowskog pa je elektrokinetički potencijal (ζ) izračunat iz jednadžbe:

$$\mu = \frac{\varepsilon \zeta}{\eta}, \quad (3.5.4.)$$

pri čemu je μ pokretljivost, ε permitivnost, a η viskoznost otapala. Model Smoluchowskog primjenjiv je kad je umnožak recipročne Debyejeve duljine i radijusa čestica mnogo veći od 1 ($\kappa a \gg 1$). Izoelektričnoj točki odgovara pH-vrijednost pri kojoj vrijednost elektrokinetičkog potencijala mijenja predznak.

U svrhu određivanja izoelektrične točke izmjeren je elektrokinetički potencijal nanočestica ($\gamma = 0,1 \text{ g dm}^{-3}$) u ovisnosti o pH-vrijednosti. Suspenzija je pripravljena u vodenoj otopini KBr ($c = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$) kako bi ionska jakost sustava bila konstanta. Ispitan je niz otopina pH-vrijednosti u rasponu pH = 2–12, pri čemu je za postizanje kiselih uvjeta korištena vodena otopina HCl ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$), a za postizanje lužnatih uvjeta vodena otopina NaOH ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$). Za mjerenje pH-vrijednosti korišten je pH-metar *SI analytics Lab 845*. Elektrokinetička mjerenja provedena su na *Zetasizer Nano ZS* (Malvern, UK) fotokorelacijskom spektrofotometru sa zelenim laserom ($\lambda = 532 \text{ nm}$). Vrijednosti elektrokinetičkog potencijala izračunate su korištenjem modela Smoluchowskog i prikazane kao srednja vrijednost 3 neovisna mjerenja. Sva mjerenja provedena su pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. Rezultati su obrađeni u programu *Zetasizer software 6,32* (Malvern, UK).

3.5.10. Ugradnja flavonoida u nanočestice

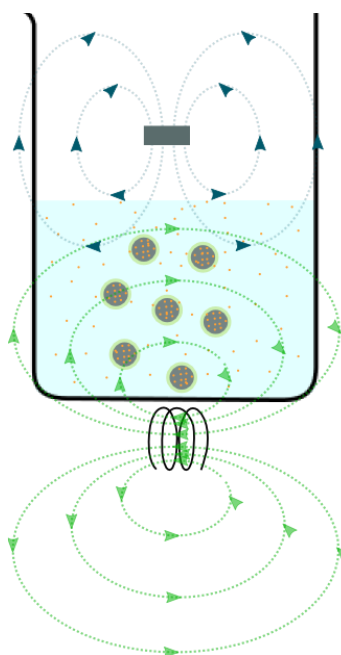
Specifična površina i dimenzije pora određene su BET (Brunauer–Emmett–Teller) analizom koja se temelji na adsorpciji i desorpciji dušika. Mjerenje je provedeno na instrumentu *ASAP2020* (Micromeritics, Norcross, GA, SAD). Prije mjerenja, uzorci su degasirani pri sniženom tlaku i $\vartheta = 120 \text{ }^\circ\text{C}$ tijekom najmanje $t = 6 \text{ h}$. Svi eksperimenti napravljeni su u duplikatu.

U svrhu ugradnje flavonoida u nanočestice, pripravljene su ishodne otopine flavonoida u etanolu ($c = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$). Točna koncentracija određena je spektrofotometrijski. Na nanočestice magnetita ($m = 100 \text{ mg}$) dodano je 25 cm^3 otopine flavonoida. Suspenzija je miješana $t = 24 \text{ h}$ pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ (*IKA Loopster*) na 30 rpm. Nakon 24 h, suspenzija je

centrifugirana (*Universal 230 Hettich Zentrifugen*) 10 minuta pri 8000 rpm te je supernatant odvojen od nanočestica. Koncentracija flavonoida u supernatantu određena je spektrofotometrijski (*WTW photoLab® 7600 UV-Vis spektrofotometar (Xylem, NY, SAD)*). U svrhu određivanja molarnog apsorpcijskog koeficijenta u etanolu, korištenjem istog instrumenta, određen je baždarni pravac za svaki flavonoid. Na temelju razlike koncentracija etanolnih otopina flavonoida prije i nakon ugradnje, kvantificirana je količina ugrađenog flavonoida.

3.6. Otpuštanje flavonoida iz nanonosača

U svrhu određivanja kinetičkog profila otpuštanja, nanočestice s ugrađenim flavonoidima ($m = 50$ mg) suspendirane su u puferiranoj fiziološkoj otopini ($\text{pH} = 7,4$, $V_c = 150$ cm³). Reakcijska komora termostatisirana je na $\vartheta = 37$ °C (*Corio CD-201F Julabo GmbH, Seelback, Njemačka*). Korištena je kombinacija stalnog ($B = 11$ mT) i oscilirajućeg magnetskog polja ($f = 100$ kHz) uz stalnu jakost struje ($I = 100$ mA). Oscilirajuće magnetsko polje postignuto je generatorom (*Wavetek 164 30 MhZ, San Diego, CA, SAD*) i zavojnicom ($N = 270$, $l = 4$ cm). Generator je povezan na osciloskop (*DS1000Z, Rigol Technologies, Peking, Kina*) koji omogućava praćenje oblika sinusoidnog vala.



Slika 3.6.1. Shematski prikaz eksperimenta otpuštanja flavonoida iz nanočestica magnetita.

Kako bi se izbjegao utjecaj različite efikasnosti ugradnje, svako mjerenje u odsustvu i prisustvu polja provedeno je korištenjem nanočestica dobivenih iz istog eksperimenta ugradnje. Prema tome, razlika u dobiven rezultatima posljedica je primijenjenog magnetskog polja. Sva mjerenja provedena su u duplikatu. Reakcijska smjesa cijelo je vrijeme miješana (*Ministar 20 control*, *IKA-Werke GmbH & Co*, Staufen, Njemačka) na 200 rpm. Koncentracija je određena spektrofotometrijski (*WTW photoLab® 7600 UV-Vis* spektrofotometar (*Xylem*, NY, SAD)) uzimanjem alikvota ($V_a = 1 \text{ cm}^3$) u odabranim vremenskim intervalima. Prije snimanja spektra, alikvot je filtriran kako bi se uklonile zaostale nanočestice (*Chromafil, XTRA PRFE-20/36*, filter 0,20 μm). Svaki alikvot nadomješten je istim volumenom puferirane fiziološke otopine (pH = 7,4) te je izračunata kumulativna masa otpuštenog flavonoida u svakom trenutku (m_k) prema formuli

$$m_k = c_k \cdot M \cdot V_c + \sum_{i=1}^{k-1} c_i \cdot M \cdot V_a, \quad (3.6.1.)$$

pri čemu su c_k i c_i koncentracije u danim trenucima, a M molarna masa flavonoida. Obrada podataka provedena je u programu *Origin Pro 2021b*. Koncentracije otpuštenih flavonoida izračunate su multilinearom regresijom, pri čemu su korišteni karakteristični spektri dobiveni eksperimentima kinetike raspada flavonoida. S obzirom na to da dolazi do otpuštanja i oksidiranog i neoksidiranog oblika flavonoida, snimljeni spektar utočnjen je korištenjem karakterističnih spektara flavonoida i produkata nakon raspada te je ukupna količina otpuštenog flavonoida dobivena kao njihov zbroj. Pretpostavljeno je da je bazna linija linearna funkcija čiji su parametri također određeni utočnjavanjem. Ispitivanje različitih kinetičkih modela provedeno je u istom programu.

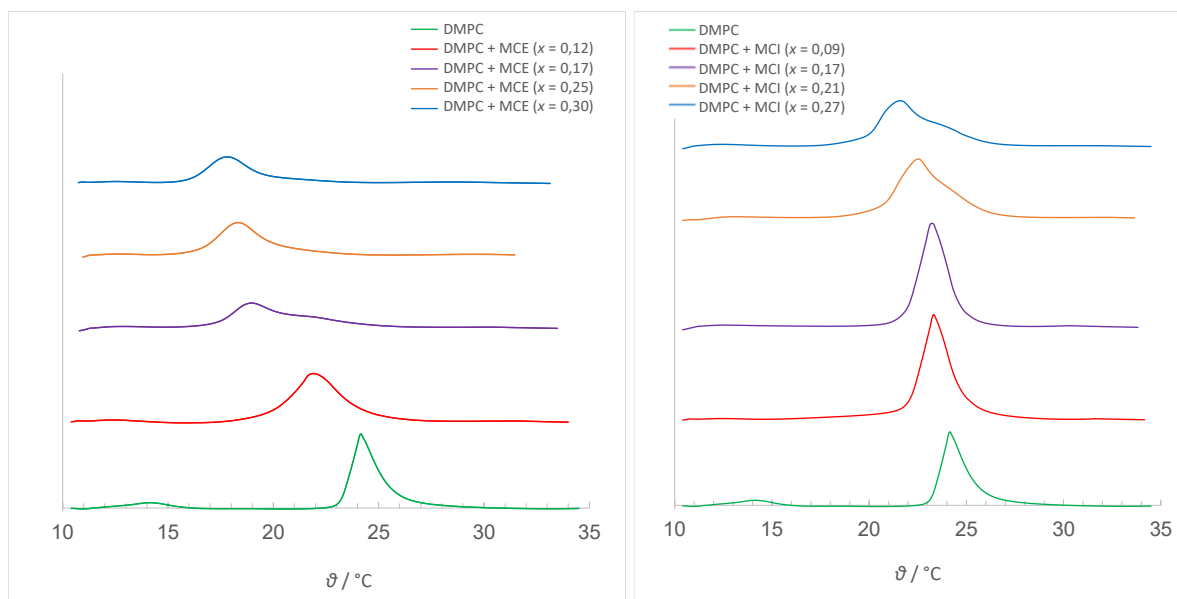
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Interakcija lipida i flavonoida

S obzirom na slabu topljivost flavonoida u vodenim medijima, prilikom interakcije s lipidnom membranom može doći do njihove lokalizacije unutar membrane i stvaranja agregata. Agregacija omogućava interakcije flavonoida s različitim receptorima i prijenosnicima signala, što uzrokuje modulaciju njihovog djelovanja. Uz to, agregati mogu uzrokovati stvaranje defekata u membrani i povećati njezinu permeabilnost.³⁸¹ Agregacija flavonoida vrlo je važna za njihovo biološko djelovanje te se iz tog razloga intenzivno istražuje. Primjerice, Pohjala i suradnici³⁸² proučavali su agregaciju 117 fenolnih spojeva u Tris-HCl puferu (pH = 7,5), pri čemu je najizraženija agregacija zabilježena kod flavonoida. Agregacija flavonoida utječe i na njihovu bioaktivnost. Općenito je uočeno da porast koncentracije flavonoida uzrokuje nehomogenu raspodjelu molekula unutar membrane, akumulaciju na međupovršini te, konačno, stvaranje klastera ili agregata.³⁸³ U sklopu istraživanja agregacije flavonoida u DMPC lipidnoj membrani, ispitana su termodinamička i nanomehanička svojstva DMPC liposoma s ugrađenim MCE i MCI. DMPC je zasićen lipid te na zraku ne oksidira, što ga čini pogodnim modelnim sustavom za proučavanje interakcija lipida i flavonoida. MCE i MCI su aglikonski i glikonski oblici istog flavonoida te se očekuje da će, zahvaljujući dodatnoj šećernoj skupini kod MCI, koja povećava njegovu hidrofilnost, interakcija s lipidnom membranom biti različita.

4.1.1. Termotropna svojstva lipidnog dvosloja

Diferencijalna pretražna kalorimetrija (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC) je tehnika koja se koristi za praćenje termodinamičkih svojstava sustava, pri čemu je, u slučaju lipida, moguće odrediti temperaturu faznog prijelaza. Iz tog su razloga provedena DSC mjerenja DMPC liposoma. Kako bi se ispitaio utjecaj flavonoida na termotropna svojstva liposoma, mjerenja su provedena i nakon ugradnje MCE i MCI u različitim množinskim udjelima.



Slika 4.1.1. DSC krivulje DMPC liposoma s ugrađenim MCE i MCI u različitim množinskim udjelima.

Na slici 4.1.1. prikazane su dobivene DSC krivulje za dvije smjese: DMPC s ugrađenim MCE i MCI pri različitim množinskim udjelima. U oba slučaja, najniža krivulja odnosi se na kontrolni sustav, multilamelarne DMPC liposome bez ugrađenih flavonoida gdje do faznog prijelaza dolazi pri $T_m = (24,1 \pm 0,1) ^\circ\text{C}$ ($\Delta_m H = (18,0 \pm 0,3) \text{ kJ mol}^{-1}$). Uz glavni fazni prijelaz, u slučaju DMPC lipida uočeno je da dolazi i do pretprijelaza pri $T_p = (14,1 \pm 0,1) ^\circ\text{C}$ ($\Delta_p H = (2,2 \pm 0,1) \text{ kJ mol}^{-1}$). Dobivene vrijednosti u skladu su s literaturnim podacima.³⁸⁴ Pretprijelaz je pojava koja se uočava kod određenih lipida pri temperaturi nižoj od temperature faznog prijelaza, a javlja se kao dodatan korak u prijelazu između gel i fluidne faze lipida. Podrazumijeva povećanje fluidnosti, pri čemu dolazi do mrežkanja i nastanka valovite strukture fosfolipidnog dvosloja. Najčešće se javlja kod fosfokolina, kao posljedica razlike u veličini fosfatnih glava i acilnih lanaca. Postojanje faznog pretprijelaza indikacija je mobilnosti polarnih glava, dok se mobilnost nepolarnih lanaca očituje u glavnom faznom prijelazu.^{385,386}

Dodatak flavonoida uzrokovao je perturbaciju DMPC dvosloja te nestanak faznog pretprijelaza, što je u skladu s literaturnim zapažanjima prema kojima je pretprijelaz osjetljiv na dodatak bilo koje komponente u sustav.³⁸⁷ Primjerice, dodatak dihalogeniranih fenolnih spojeva u DPPC liposome u različitim množinskim udjelima onemogućava fazni pretprijelaz liposoma.³⁸⁸ S obzirom na to da se pretprijelaz povezuje s kretanjem polarnih glava, pretpostavlja se da hidrofilni dijelovi flavonoida mogu tvoriti interakcije, prvenstveno vodikove

veze, s hidrofilnim dijelovima lipida te im na taj način ograničavati mobilnost. Promjena mobilnosti hidrofobnih lanaca nakon dodatka flavonoida očituje se i u smanjenju temperature glavnog faznog prijelaza, pri čemu je smanjenje izraženije s povećanjem množinskog udjela flavonoida. Takva promjena pripisuje se stvaranju interakcija između hidrofobnih lanaca i nepolarnih dijelova flavonoida, prvenstveno fenolnih prstenova, pri čemu najjače interakcije odgovaraju najvećem smanjenju temperature faznog prijelaza. Općenito, pad temperature faznog prijelaza ukazuje na interakciju molekula s hidrofobnom unutrašnjosti lipidnog dvosloja.³⁸⁹ Ukupno smanjenje u slučaju MCE ($\Delta T_m = (-6,6 \pm 0,2) \text{ }^\circ\text{C}$) izraženije je nego u slučaju MCI ($\Delta T_m = (-2,0 \pm 0,3) \text{ }^\circ\text{C}$), što je u skladu s očekivanjima, s obzirom na to da je MCI, zahvaljujući šećernoj skupini, polarniji ($\log P = 0,5$)³⁹⁰ u odnosu na MCE ($\log P = 1,2$)³⁹⁰ te se unutar dvosloja smješta bliže hidrofilnim glavama.

Osim pomaka u temperaturi faznog prijelaza, dodatak flavonoida utječe i na oblik krivulje, pri čemu s povećanjem množinskog udjela flavonoida dolazi do povećanja širine signala te izraženije asimetričnosti. Asimetričan oblik indikacija je nehomogene raspodjele flavonoida unutar dvosloja, odnosno stvaranja klastera ili agregata uzrokovanog različitim interakcijama hidrofobnih i hidrofilnih dijelova lipida i flavonoida. Takvo ponašanje u literaturi je uočeno u slučaju velikog broja flavonoida, pri čemu klasteriranje ovisi o hidrofilnosti ugrađenih spojeva.^{391,392} Nehomogena se raspodjela kod MCE javlja pri nižim množinskim udjelima u odnosu na MCI. Ugradnja MCI pri $x \leq 0,17$ uzrokuje pomak signala, ali vrpca zadržava svoju simetriju i oblik. Pri višim množinskim udjelima, oštri i simetrični signali postaju širi i asimetrični. Prema tome, pristup MCI unutrašnjosti dvosloja je ograničen, pogotovo pri nižim množinskim udjelima te se može zaključiti da MCI većinu interakcija s molekulama lipida stvara upravo s polarnim glavama.

Pri niskim množinskim udjelima flavonoida dolazi do porasta entalpije faznog prijelaza u odnosu na DMPC bez ugrađenih flavonoida. Općenito, porast entalpije faznog prijelaza u membranama s ugrađenim lijekom posljedica je uređenja sustava koje uključuje poravnanje molekula lijeka s molekulama lipida. S povećanjem množinskog udjela flavonoida dolazi do pomaka molekula prema vanjskom dijelu dvosloja te smanjenja entalpije faznog prijelaza, što sugerira stvaranje klastera flavonoida blizu površine membrane.³⁹³

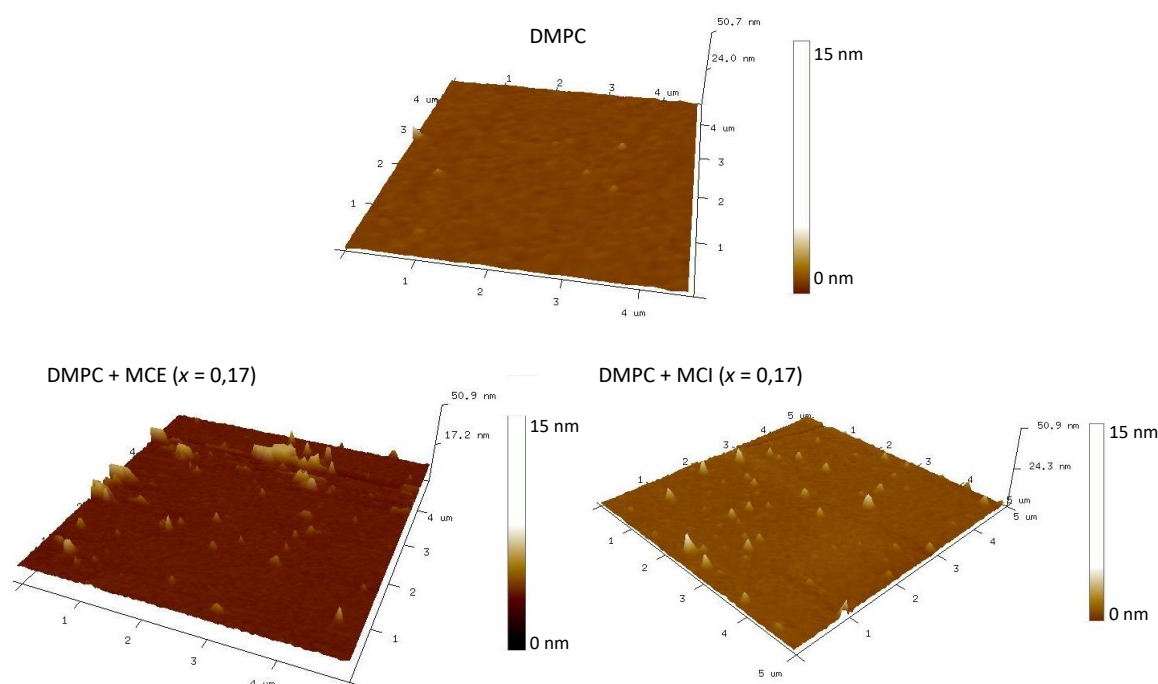
Tablica 4.1.1. Termotropna svojstva DMPC liposoma uz dodatak flavonoida.

	$T_m / ^\circ\text{C}$	$\Delta T_m / ^\circ\text{C}$	$\Delta H / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta\Delta H / \text{kJ mol}^{-1}$
DMPC	$24,1 \pm 0,1$	0,0	$18,0 \pm 0,3$	0,0
$x(\text{MCE})$				
0,12	$22,2 \pm 0,1$	$-1,9 \pm 0,2$	$19,4 \pm 0,3$	$1,4 \pm 0,6$
0,17	$19,0 \pm 0,1$	$-5,1 \pm 0,2$	$12,5 \pm 0,2$	$-5,5 \pm 0,5$
0,25	$18,3 \pm 0,2$	$-5,8 \pm 0,3$	$11,2 \pm 0,2$	$-6,8 \pm 0,5$
0,30	$17,6 \pm 0,1$	$-6,5 \pm 0,2$	$9,5 \pm 0,2$	$-8,5 \pm 0,5$
$x(\text{MCI})$				
0,09	$23,6 \pm 0,1$	$-0,5 \pm 0,2$	$28,6 \pm 0,6$	$10,6 \pm 0,9$
0,17	$23,3 \pm 0,1$	$-0,8 \pm 0,2$	$26,1 \pm 0,5$	$8,1 \pm 0,8$
0,21	$22,4 \pm 0,1$	$-1,7 \pm 0,2$	$25,0 \pm 0,5$	$7,0 \pm 0,8$
0,27	$22,1 \pm 0,2$	$-2,0 \pm 0,3$	$21,7 \pm 0,4$	$3,7 \pm 0,7$

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je interakcija lipida i flavonoida izravno povezana s njihovom strukturom koja određuje njihovu hidrofilnost, odnosno hidrofobnost. Hidrofilniji flavonoid MCI stvara jače interakcije s hidrofilnim dijelom lipida, odnosno polarnim glavama, dok se hidrofobniji MCE ugrađuje bliže nepolarnim lancima. Kako bi se detaljnije istražilo stvaranje klastera, ispitana su i nanomehanička svojstva DMPC liposoma.

4.1.2. Nanomehanička svojstva lipidnog dvosloja

U svrhu daljnjeg istraživanja interakcije DMPC liposoma i flavonoida, korištena je mikroskopija atomskih sila (engl. *atomic force microscopy*, AFM). Za ova mjerenja odabrani su uzorci liposoma s relativno visokim množinskim udjelom flavonoida, $x = 0,17$.

Slika 4.1.2. Topografija DMPC liposoma s ugrađenim MCE i MCI ($x = 0,17$).Tablica 4.1.2. Hrapavost (R_a), Youngov modul (E) i visina klastera (H_{kl}) DMPC dvosloja s ugrađenim MCE i MCI. N je broj klastera na odabranoj površini ($A = 25 \mu\text{m}^2$).

uzorak	R_a / nm	E / MPa	H_{kl} / nm
DMPC	$0,3 \pm 0,2$	$27,0 \pm 5,0$	-
DMPC + MCE ($x = 0,17$)	$0,4 \pm 0,1$	$26,0 \pm 7,0$	$12,0 \pm 5,0$ ($N = 21$)
DMPC + MCI ($x = 0,17$)	$1,2 \pm 0,6$	$27,0 \pm 6,0$	$13,0 \pm 5,0$ ($N = 61$)

Iz tablice 4.1.2. vidljivo je da ugradnja flavonoida uzrokuje porast prosječne hrapavosti površine DMPC dvosloja, dok na Youngov modul nema značajnog utjecaja. U slučaju MCI, porast hrapavosti izraženiji je nego u slučaju MCE, što je posljedica njihove razlike u hidrofobnosti. S obzirom na to da je MCI polarniji od MCE, dolazi do stvaranja jačih interekcija s hidrofilnim fosfatnim glavama i ugradnje bliže površini. Hidrofobniji MCE ugrađuje se u unutrašnjost dvosloja i nema značajnog utjecaja na površinska svojstva. Youngov modul DMPC fosfolipidnog dvosloja ($E = (27,0 \pm 5,0)$ MPa) u skladu je s literaturnim vrijednostima³⁹⁴, a zanemariva promjena u Youngovom modulu nakon ugradnje flavonoida ukazuje na činjenicu da korišten množinski udio MCE i MCI nije dovoljan za značajno narušavanje strukture dvosloja. Iako vrijednosti nanomehaničkih parametara ne ukazuju na

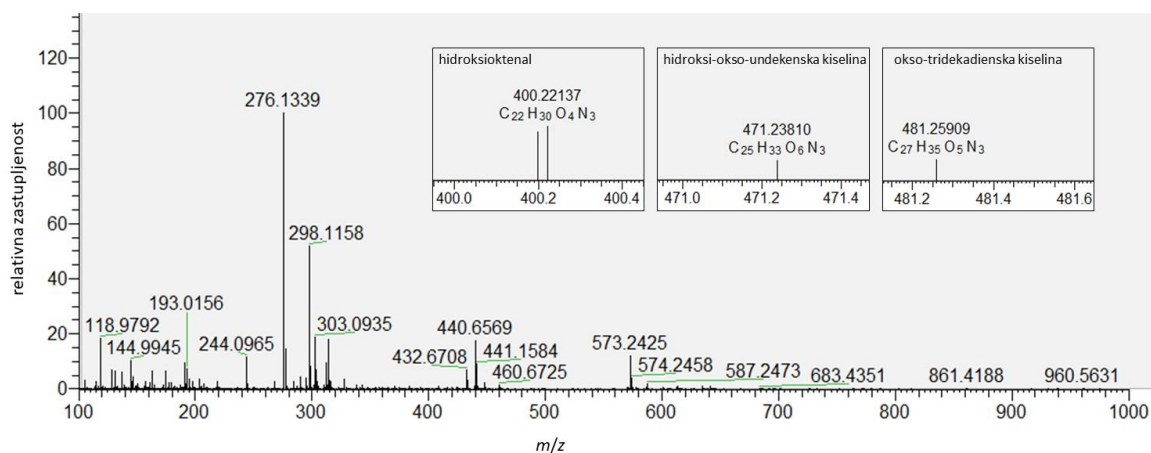
značajne strukturne promjene, flavonoidi uzrokuju lokalizirane promjene. Na slici 4.1.2. je vidljivo da je, u slučaju DMPC dvosloja bez ugrađenih flavonoida, površina glatka i homogena, dok nakon ugradnje flavonoida dolazi do nastanka agregata. Agregacija je izraženija u slučaju MCI, što se, osim u promjeni hrapavosti, očituje i u većem broju zapaženih agregata na promatranoj površini. Stvaranje klastera u literaturi je zabilježeno i kod drugih flavonoida. Primjerice, Samoilov i suradnici³⁹⁵ uočili su agregaciju kvercetina, pri čemu je najveći proučavani množinski udio bio $x = 0,11$.

4.2. Lipidna peroksidacija lipida s mononezasićenom masnom kiselinom

Lipidna peroksidacija povezana je s oksidativnom razgradnjom lipida te uzrokuje strukturnu preraspodjelu membrane.² Kao modelni sustav u ovim eksperimentima korišten je DOPC lipid koji posjeduje po jednu dvostruku vezu na svakom lancu. Iako mononezasićeni lipidi nisu toliko osjetljivi na lipidnu peroksidaciju kao polinezasićeni, i u slučaju DOPC zamijećeno je narušavanje uređene strukture dvosloja uslijed lipidne peroksidacije. Masenom spektrometrijom visoke rezolucije karakteriziran je niz produkata peroksidacije te je istražen nastanak istih produkata u sustavima u kojima su u liposome ugrađeni flavonoidi. Uz to, infracrvenom spektroskopijom kvantificirani su doseg i postotak inhibicije lipidne peroksidacije flavonoidima. U literaturi je poznato da lipidna peroksidacija uzrokuje promjene u mnogim strukturnim parametrima membrane te su te promjene istražene mikroskopijom atomskih sila, raspršenjem rendgenskih zraka pri malim kutevima i elektronskom paramagnetskom rezonancijom. Zaštitna uloga triju strukturno različitih flavonoida pri tri različita množinska udjela istražena je u kontekstu njihovog položaja unutar membrane.

4.2.1. Produkti lipidne peroksidacije

Masena spektrometrija visoke rezolucije (engl. *high-resolution mass spectrometry*, HR-MS) korištena je za kvalitativno određivanje produkata lipidne peroksidacije DOPC liposoma. Iniciranjem lipidne peroksidacije i derivatizacijom identificirani su kratkolančani i dugolančani produkti prikazani u tablici 4.2.1.



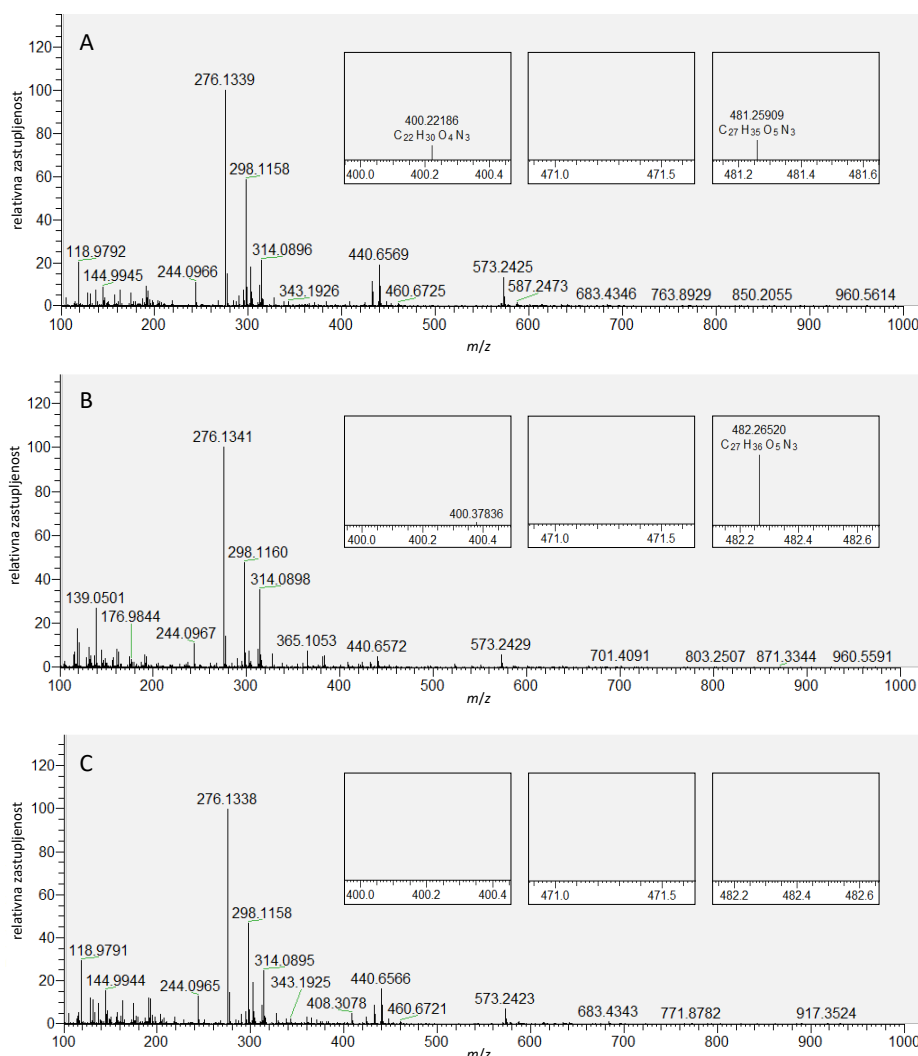
Slika 4.2.1. Maseni spektar derivatiziranih produkata lipidne peroksidacije DOPC liposoma bez ugrađenih flavonoida.

Tablica 4.2.1. Derivatizirani produkti lipidne peroksidacije DOPC liposoma bez dodatka flavonoida. Kod dugolančanih kiselina uočene su m/z vrijednosti koje mogu odgovarati protoniranim ili deprotoniranim vrstama.

ime spoja	molekulska formula	monoizotopna masa	m/z nakon derivatizacije (teorijski)	m/z nakon derivatizacije (eksperimentalni)	δ / ppm
metanal	CH ₂ O	30,011	288,13	288,13415	-0,375
akrolein	C ₃ H ₄ O	56,026	314,15	314,14902	-2,859
butanal	C ₄ H ₈ O	72,058	330,18	330,18094	-0,842
heksanal	C ₆ H ₁₂ O	100,089	358,21	358,21222	-0,833
6-hidroksiheptanal	C ₇ H ₁₄ O ₂	130,099	388,22	388,22403	2,440
hidroksioktenal	C ₈ H ₁₄ O ₂	142,099	400,22	400,22293	-0,382
hidroksi-okso-undekenska kiselina	C ₁₁ H ₁₈ O ₄	214,120	472,24	473,25073	-2,762
okso-dekenska dikiselina	C ₁₀ H ₁₄ O ₅	214,084	472,21	471,23810 473,21609	3,635 0,863
okso-tridekatrienska kiselina	C ₁₃ H ₁₈ O ₃	222,126	480,25	479,24329	3,792
okso-tridekadienska kiselina	C ₁₃ H ₂₀ O ₃	224,141	482,26	481,25778	1,366
okso-dodekadienska dikiselina	C ₁₂ H ₁₆ O ₅	240,100	498,23	499,23343	4,263
okso-dodekenska dikiselina	C ₁₂ H ₁₈ O ₅	242,115	500,40		

U slučaju liposoma bez ugrađenih flavonoida identificirano je 11 različitih produkata, pri čemu su neki aldehidi poput butanala i heksanala već zabilježeni u literaturi.^{396,397} Uz navedene, jedan od značajnijih identificiranih produkata je i akrolein, neurotoksin za kojeg je pokazano da već pri niskim koncentracijama izaziva fiziološki odgovor.^{398,399}

Analogni eksperimenti provedeni su i za liposome s tri ugrađena flavonoida pri tri različita množinska udjela ($x = 0,01, 0,05$ i $0,1$) te su spektri pretraženi za sve produkte navedene u tablici 4.2.1. Za tri produkta istaknuta na slici 4.2.2. uočeno je da postupno nestaju s dodatkom flavonoida (tablica 4.2.2.). Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 4.2.2., a za primjer je prikazan maseni spektar produkata lipidne peroksidacije DOPC liposoma s ugrađenim kvercetinom.



Slika 4.2.2. Maseni spektri derivatiziranih produkata lipidne peroksidacije DOPC liposoma u koje je ugrađen QUE: A) $x = 0,01$; B) $x = 0,05$; C) $x = 0,1$. Istaknuta su područja u kojima dolazi do nestanka signala produkta.

Tablica 4.2.2. Derivatizirani produkti lipidne peroksidacije DOPC liposoma s ugrađenim flavonoidima. Kod dugolančanih kiselina uočene su m/z vrijednosti koje mogu odgovarati protoniranim ili deprotoniranim vrstama.

Ime spoja	m/z nakon derivatizacije (teorijski)	m/z nakon derivatizacije (eksperimentalni) δ / ppm											
		QUE				MCE				MCI			
		$x = 0,01$	$x = 0,05$	$x = 0,1$	$x = 0,01$	$x = 0,05$	$x = 0,1$	$x = 0,01$	$x = 0,05$	$x = 0,1$	$x = 0,01$	$x = 0,05$	$x = 0,1$
metanal	288,13	-	-	288,13383 -1,520	-	-	288,13391 -1,242	-	-	288,13370 -1,971	288,13365 -2,145	288,13368 -2,041	-
akrolein	314,15	-	-	-	-	-	-	-	314,149 -2,381	-	-	-	-
butanal	330,18	330,18029 -2,811	330,18051 -2,145	330,18036 -2,599	-	330,18054 -2,054	330,18048 -2,236	-	330,18039 -2,508	330,18057 -1,963	-	-	-
heksanal	380,19	358,21188 -1,782	358,21154 -2,731	358,21216 -1,000	358,21194 -1,614	358,21198 -1,503	358,21194 -1,614	-	358,21201 -1,419	-	-	-	-
6-hidroksiheptanal	388,22	388,22342 0,868	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
hidroksioktenal	400,22	400,22168 -3,505	-	400,22330 0,542	-	400,22221 -2,181	-	-	400,22197 -2,781	-	-	-	-
hidroksi-okso-undekenska kiselina	472,24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	473,25259 1,168
okso-dekenska dikiselina	472,21	473,21539 -0,553	-	-	473,21530 -0,743	-	-	-	-	-	-	-	-
okso-tridekatrienska kiselina	480,25	481,25909	-	-	481,25897 3,839	-	-	-	-	-	-	-	-
okso-tridekadienska kiselina	482,26	4,088	482,26508 0,585	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
okso-dodekadienska dikiselina	498,23	-	499,23181 1,018	-	-	-	-	-	499,23126 -0,084	499,23273 2,861	-	-	-
okso-dodekenska dikiselina	500,40	500,23923 0,206	-	-	500,23956 0,866	-	-	-	-	-	-	-	-

Ukupan broj produkata određen je za svaki uzorak te je na temelju njega uspoređeno antioksidativno djelovanje svih flavonoida pri svim množinskim udjelima. Za najhidrofilniji flavonoid, MCI, broj produkata se najviše smanjuje, pri čemu je antioksidativno djelovanje najizraženije pri najmanjem množinskom udjelu. Smanjenje zaštitne uloge s porastom množinskog udjela može se pripisati dualnom djelovanju flavonoida, gdje pri višim koncentracijama flavonoida dolazi do prooksidativnog efekta.⁴⁰⁰ U slučaju MCE, broj produkata se također smanjuje, ali smanjenje je manje izraženo nego u slučaju MCI. Uz to, ukupan broj nastalih produkata jednak je za sva tri množinska udjela flavonoida. Kod najhidrofobnijeg flavonoida, QUE, smanjenje broja produkata je najmanje izraženo. Vrlo štetan produkt akrolein, uz DOPC liposome bez ugrađenih flavonoida, identificiran je samo u uzorku s ugrađenim MCE ($x = 0,10$).

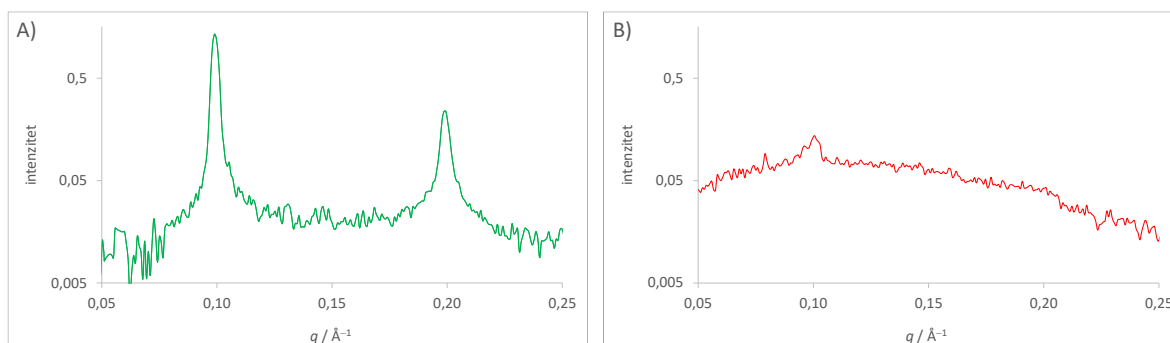
U literaturi je poznato da se hidrofobniji antioksidansi smještaju u lipofilnom dijelu membrane, dok se hidrofilniji antioksidansi smještaju bliže površini.⁴⁰¹ Dobiveni rezultati u skladu su s već objavljenim istraživanjima prema kojima se efikasnost uklanjanja radikala smanjuje ukoliko radikal prodire dublje u unutrašnjost membrane.⁴⁰² Prema tome, očekuje se da će flavonoidi koji se smještaju u unutrašnjost biti lošiji antioksidansi u odnosu na one smještene bliže površini. S obzirom na to da je MCI smješten bliže površini membrane, do uklanjanja radikala može doći na međupovršini između membrane i vodenog medija, što onemogućava ulazak radikala u membranu. Na temelju dobivenih rezultata, može se zaključiti da na efikasnost zaštite, osim kemijskih svojstava flavonoida, utječe i njihovo smještanje unutar membrane.

4.2.2. Elektronska gustoća lipidnog dvosloja

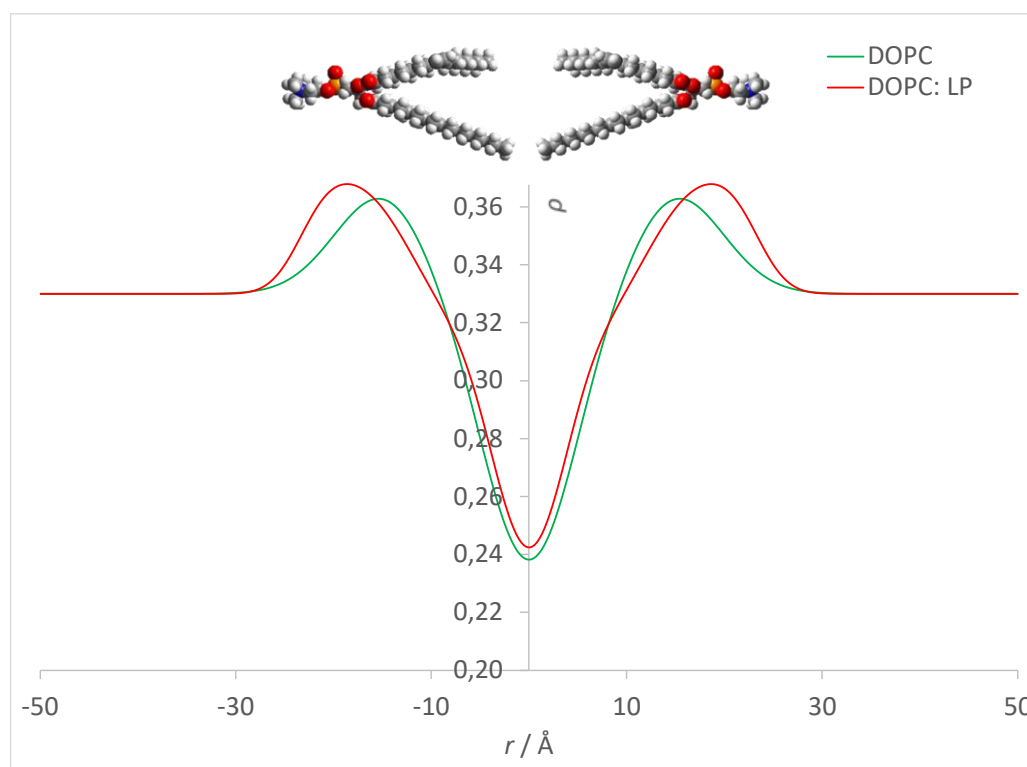
Raspršenje rendgenskog zračenja pri malim kutevima (engl. *small angle X-ray scattering*, SAXS) je metoda koja se temelji na raspršenju rendgenskih zraka te se koristi za dobivanje informacija o profilima elektronske gustoće. U svrhu proučavanja modelnih membrana koristi se od 1960-ih godina. Intenzitet raspršenog zračenja je, u slučaju konačnog broja jednako razmaknutih slojeva, povezan s promjenom elektronske gustoće te može dati informaciju o strukturnim parametrima membrane, poput debljine ili savijanja.³⁶⁶ Primjerice, Buscema i suradnici⁴⁰³ koristili su SAXS za istraživanje liposoma pripremljenih od 1,3-diaminofosfolipida, dok su Varga i suradnici⁴⁰⁴ istraživali stukturu sterički stabiliziranih liposoma. Nadalje, ukoliko

ugradnja nekog lijeka u liposome uzrokuje porast elektronske gustoće, moguće je odrediti njegov položaj unutar membrane.⁴⁰⁵ Uz to, moguće je pratiti dinamiku spontanog formiranja liposoma.^{406,407}

Općenito, oštri Braggovi signali u SAXS spektrima karakteristični su za multilamelarne sustave, dok unilamelarne liposome karakterizira pojava širokog signala.⁴⁰⁸



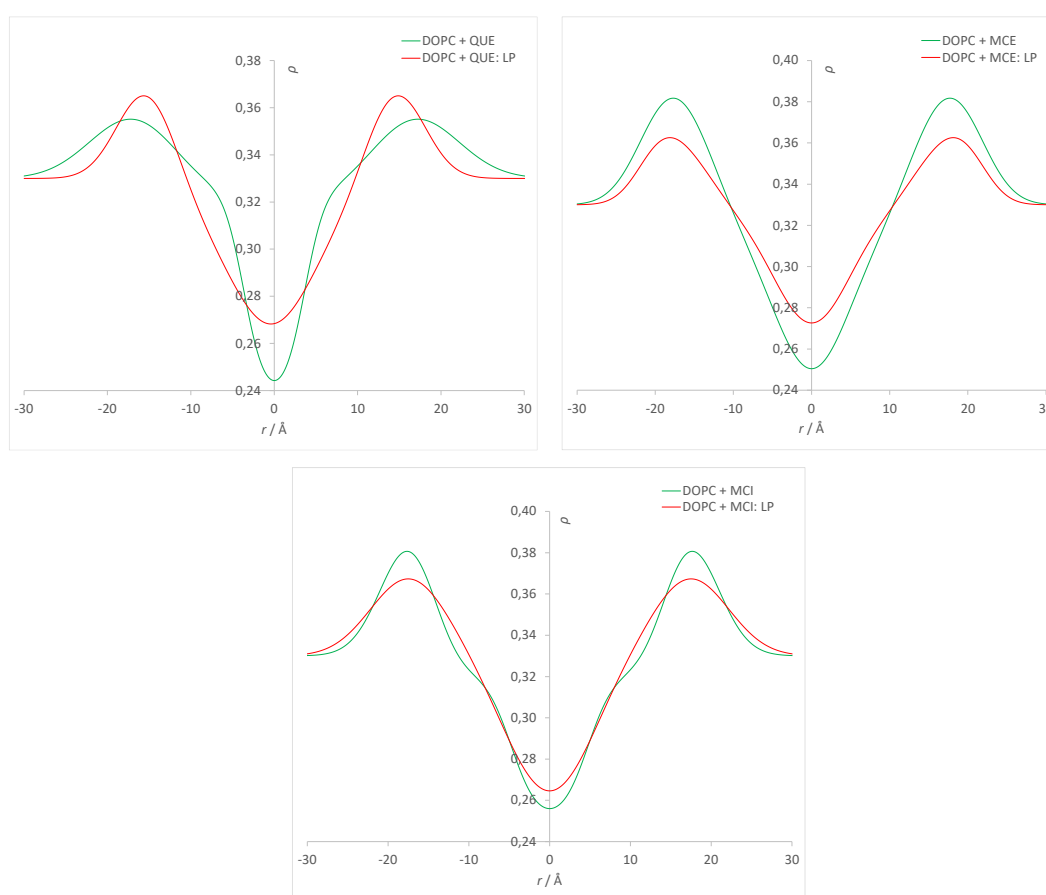
Slika 4.2.3. SAXS spektri DOPC liposoma A) prije i B) nakon lipidne peroksidacije.



Slika 4.2.4. Profili elektronske gustoće DOPC liposoma prije i nakon lipidne peroksidacije.

Dobiveni profili elektronske gustoće karakteristični su za lipidne membrane, pri čemu maksimumi odgovaraju položajima polarnih glava lipida, odnosno fosfatnim skupinama bogatim elektronima.³⁶⁶ Iz profila elektronske gustoće vidljivo je da nakon lipidne

peroksidacije dolazi do povećanja elektronske gustoće u sredini lipidnog dvosloja. Takvo povećanje vjerojatno je posljedica nastanka dugolančanih produkata koji su hidrofobniji te se smještaju u lipofilnom dijelu membrane, dok su kratkolančani, hidrofilni produkti u interakciji s fosfatnim glavama. Molekularnim simulacijama uočeno je da tijekom procesa formiranja pora, karakterističnog za lipidnu peroksidaciju, dolazi do interakcije metilnih skupina neoksidiranih lanaca u unutrašnjosti dvosloja.⁴⁰⁹ Nastanak produkata različitih duljina lanaca u našem je istraživanju eksperimentalno potvrđen masenom spektrometrijom. Uz to, elektronska gustoća u području fosfatnih glava ukazuje na zadebljanje dvosloja nakon lipidne peroksidacije.



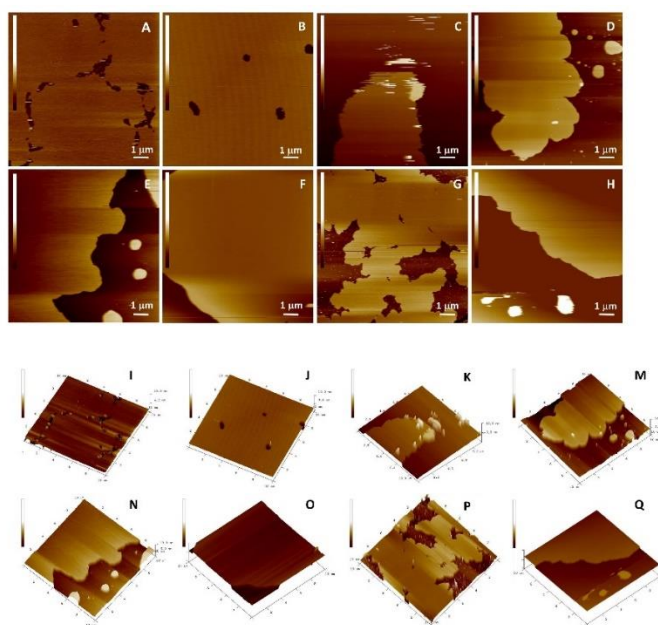
Slika 4.2.5. Profili elektronske gustoće DOPC liposoma s ugrađenim flavonoidima prije i nakon lipidne peroksidacije.

U slučaju ugradnje svih triju flavonoida dolazi do povećanja elektronske gustoće u središnjem dijelu dvosloja, što ukazuje na djelomičnu ugradnju flavonoida u nepolarni dio membrane. Uz to, dolazi do zadebljanja membrane koje nastaje kao posljedica steričkih i elektrostatskih interakcija flavonoida i lipida. Nakon lipidne peroksidacije dolazi do dodatnog povećanja

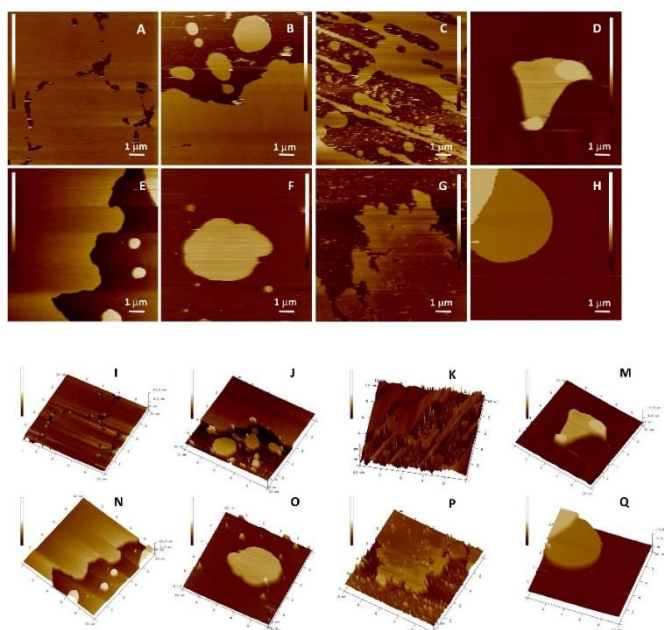
elektronske gustoće u središnjem dijelu dvosloja koje je uočeno i u uzorku bez flavonoida, pri čemu je povećanje izraženije u uzorcima s flavonoidima. Povećanje elektronske gustoće u središtu dvosloja može se objasniti prisutnošću Fe(II) iona bogatih elektronima. S obzirom na to da flavonoidi mogu stvarati kelatne komplekse s ionima prijelaznih metala, pretpostavlja se da je nastali kompleks manje polaran od slobodnog flavonoida te da se djelomično ugrađuje u membranu. Uz to, postoji mogućnost da se oksidirani oblici flavonoida nastali nakon interakcije s radikalima također smještaju dublje u membranu zbog smanjene mogućnosti stvaranja vodikovih veza.

4.2.3. Morfologija i nanomehanička svojstva lipidnog dvosloja

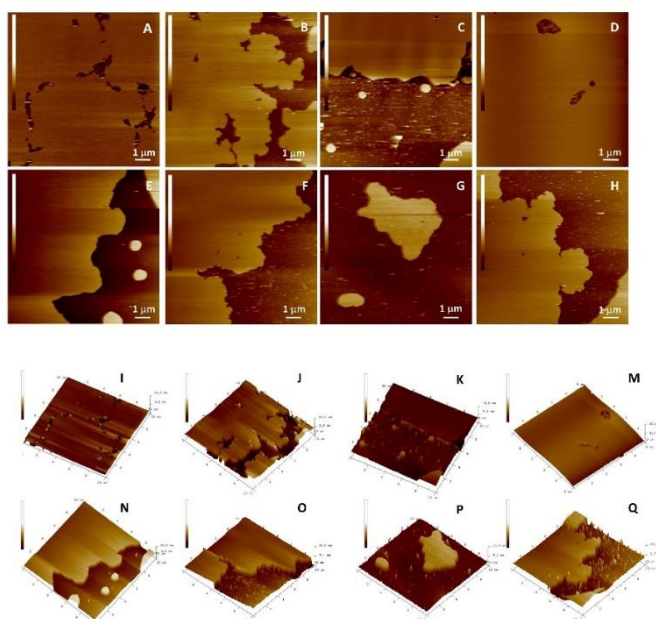
Mikroskopija atomskih sila intenzivno se koristi za istraživanje strukturnih svojstava lipidnih dvosloja te mehanizma njihovog nastanka.⁴¹⁰ Zaštitna uloga flavonoida ovisi o njihovoj interakciji s molekulama lipida koja je rezultat njihovog smještanja unutar membrane. Ugradnja flavonoida u membranu uzrokuje deformaciju površine, što se očituje u promjeni hrapavosti i debljine membrane. Uz to, lipidna peroksidacija uzrokuje fragmentaciju i strukturno oštećenje membrane.



Slika 4.2.6. Morfologija DOPC dvosloja s ugrađenim QUE prije lipidne peroksidacije: (A, I) $x = 0$; (B, J) $x = 0,1$; (C, K) $x = 0,05$; (D, M) $x = 0,1$ te nakon inducirane lipidne peroksidacije: (E, N) $x = 0$; (F, O) $x = 0,1$; (G, P) $x = 0,05$; (H, Q) $x = 0,1$. Vertikalna skala na svim slikama iznosi 6 nm.



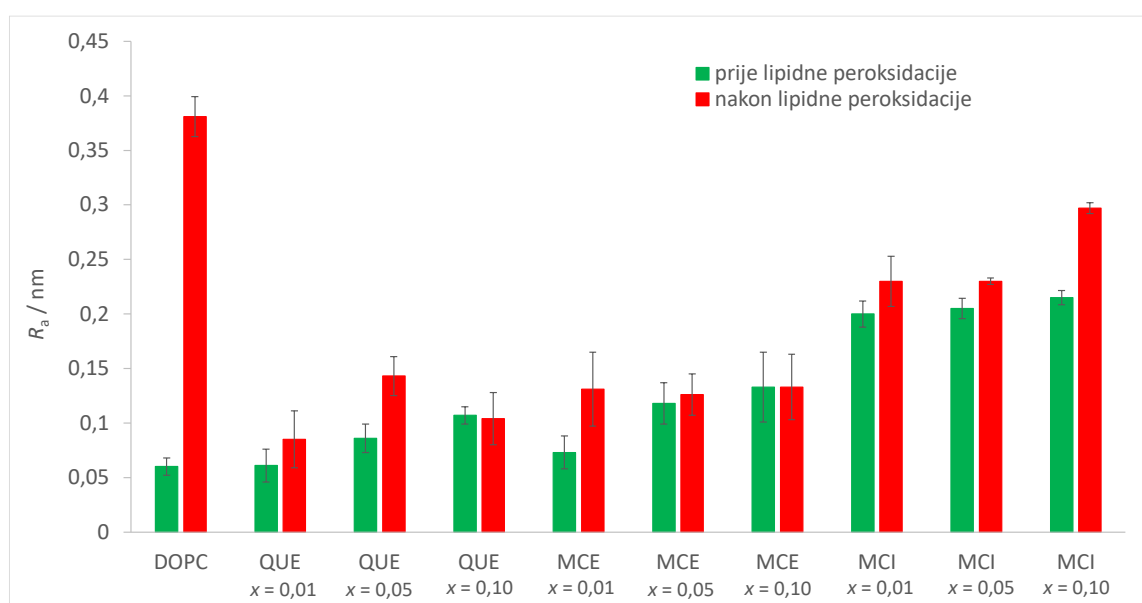
Slika 4.2.7. Morfologija DOPC dvosloja s ugrađenim MCE prije lipidne peroksidacije: (A, I) $x = 0$; (B, J) $x = 0,1$; (C, K) $x = 0,05$; (D, M) $x = 0,1$ te nakon inducirane lipidne peroksidacije: (E, N) $x = 0$; (F, O) $x = 0,1$; (G, P) $x = 0,05$; (H, Q) $x = 0,1$. Vertikalna skala na svim slikama iznosi 6 nm.



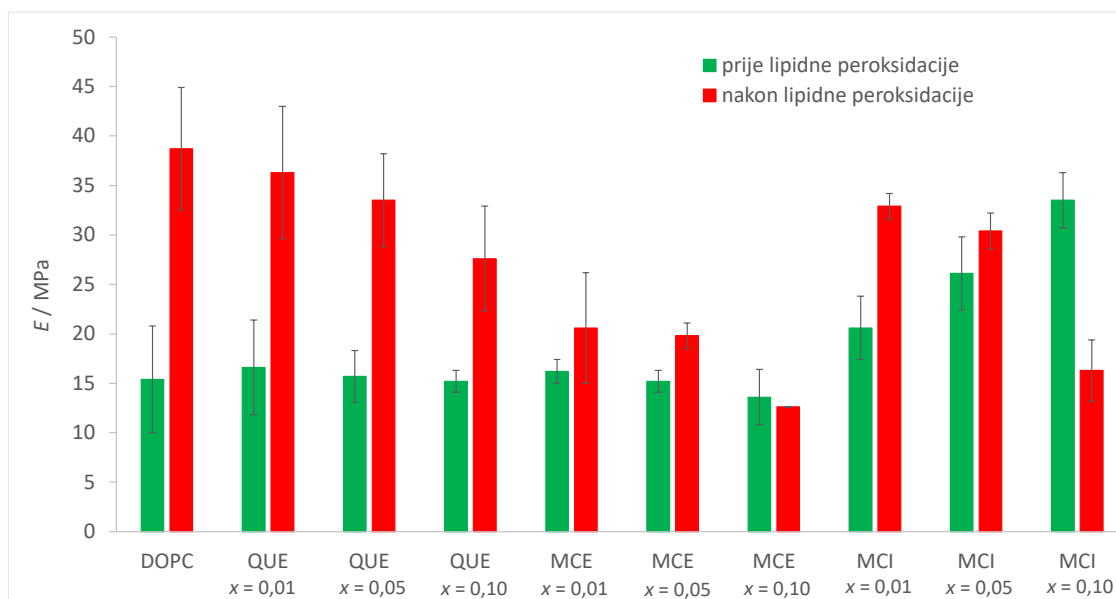
Slika 4.2.8. Morfologija DOPC dvosloja s ugrađenim MCI prije lipidne peroksidacije: (A, I) $x = 0$; (B, J) $x = 0,1$; (C, K) $x = 0,05$; (D, M) $x = 0,1$ te nakon inducirane lipidne peroksidacije: (E, N) $x = 0$; (F, O) $x = 0,1$; (G, P) $x = 0,05$; (H, Q) $x = 0,1$. Vertikalna skala na svim slikama iznosi 6 nm.

Tablica 4.2.3. Hrapavost (R_a), Youngov modul (E) i debljina (d) DOPC lipidnog dvosloja prije i nakon ugradnje flavonoida te prije i nakon inducirane lipidne peroksidacije (LP) ($n = 6$).

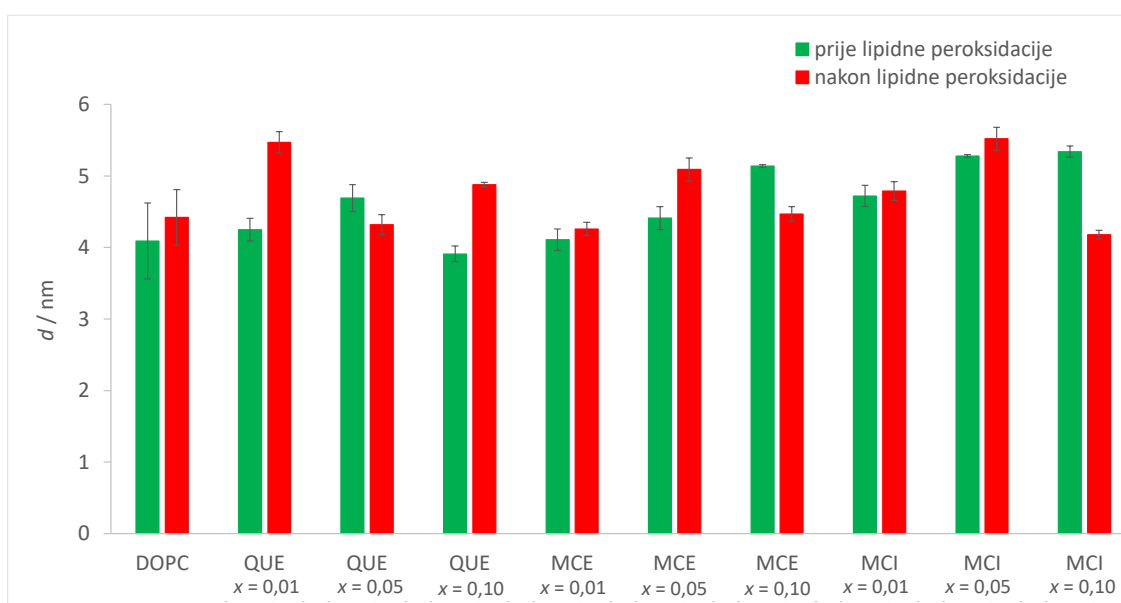
uzorak	R_a / nm		E / MPa		d / nm	
	prije LP	nakon LP	prije LP	nakon LP	prije LP	nakon LP
DOPC	0,060 ± 0,008	0,381 ± 0,018	15,4 ± 5,4	38,7 ± 6,2	4,09 ± 0,53	4,42 ± 0,39
DOPC + QUE ($x = 0,01$)	0,061 ± 0,015	0,085 ± 0,026	16,6 ± 4,8	36,3 ± 6,7	4,25 ± 0,16	5,47 ± 0,15
DOPC + QUE ($x = 0,05$)	0,086 ± 0,013	0,143 ± 0,018	15,7 ± 2,6	33,5 ± 4,7	4,69 ± 0,19	4,32 ± 0,14
DOPC + QUE ($x = 0,10$)	0,107 ± 0,008	0,104 ± 0,024	15,2 ± 1,1	27,6 ± 5,3	3,91 ± 0,11	4,88 ± 0,03
DOPC + MCE ($x = 0,01$)	0,073 ± 0,015	0,131 ± 0,034	16,2 ± 1,2	20,6 ± 5,6	4,11 ± 0,15	4,26 ± 0,09
DOPC + MCE ($x = 0,05$)	0,118 ± 0,019	0,126 ± 0,019	15,2 ± 1,1	19,8 ± 1,3	4,41 ± 0,16	5,09 ± 0,16
DOPC + MCE ($x = 0,10$)	0,133 ± 0,032	0,133 ± 0,030	13,6 ± 2,8	12,6 ± 0,1	5,14 ± 0,02	4,78 ± 0,10
DOPC + MCI ($x = 0,01$)	0,200 ± 0,012	0,230 ± 0,023	20,6 ± 3,2	32,9 ± 1,3	4,72 ± 0,15	4,79 ± 0,13
DOPC + MCI ($x = 0,05$)	0,205 ± 0,094	0,230 ± 0,003	26,1 ± 3,7	30,4 ± 1,8	5,28 ± 0,02	5,52 ± 0,16
DOPC + MCI ($x = 0,10$)	0,215 ± 0,006	0,297 ± 0,005	33,5 ± 2,8	16,3 ± 3,1	5,34 ± 008	4,18 ± 0,06



Slika 4.2.9. Hrapavost površine DOPC lipidnog dvosloja uslijed ugradnje flavonoida i inducirane lipidne peroksidacije.



Slika 4.2.10. Youngov modul DOPC lipidnog dvosloja uslijed ugradnje flavonoida i inducirane lipidne peroksidacije.



Slika 4.2.11. Debljina DOPC lipidnog dvosloja uslijed ugradnje flavonoida i inducirane lipidne peroksidacije.

Ugradnja flavonoida i inicirana lipidna peroksidacija značajno mijenjaju nanomehanička i strukturalna svojstva lipidnog dvosloja. Prilikom ugradnje flavonoida dolazi do povećanja hrapavosti površine koje je najizraženije kod najhidrofilnijeg flavonoida, MCI. Takav rezultat ukazuje na to da se MCI ugrađuje najbliže površini dvosloja, što je u skladu s rezultatima dobivenima prethodno spomenutim tehnikama. Uz to, izraženo povećanje hrapavosti prilikom ugradnje MCI uočeno je u i slučaju DMPC liposoma. Hidrofobniji flavonoidi, MCE i QUE,

prodiru dublje u unutrašnjost dvosloja te nemaju toliki utjecaj na površinska svojstva. Iz ovih je rezultata vidljivo da hrapavost površine može biti indikacija lokacije flavonoida unutar dvosloja. Nadalje, lipidna peroksidacija, proces koji dovodi do fragmentacije i strukturnih oštećenja membrane, uzrokuje značajan porast hrapavosti u odnosu na kontrolni uzorak. Ta promjena manja je s dodatkom flavonoida, što ukazuje na njihovu ulogu u zaštiti integriteta i strukture membrane.

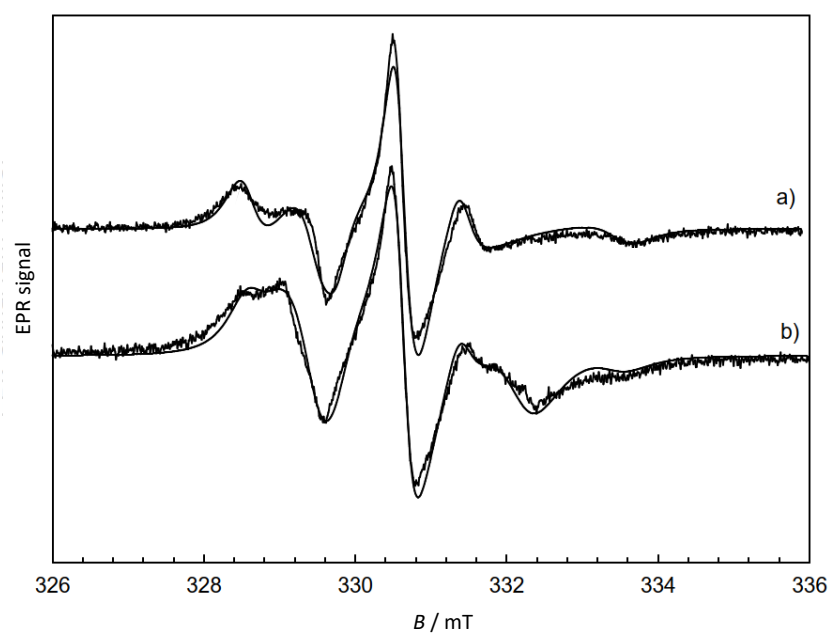
Interakcija lipida i flavonoida proučavana je i u kontekstu elastičnosti membrane, mjerenjem Youngovog modula. Dobivena vrijednost za DOPC lipidni dvosloj bez ugrađenih flavonoida odgovara fluidnoj fazi te iznosi $E = (15,4 \pm 5,4)$ MPa, što je u skladu s literaturnim vrijednostima.⁴¹¹ Ugradnja flavonoida dovodi od povećanja Youngovog modula, pri čemu je povećanje najizraženije u slučaju hidrofilnog MCI. Takvo opažanje u skladu je s pretpostavljenom lokacijom MCI unutar membrane. Jake interakcije između MCI i fosfatnih skupina lipida dovode do promjene orijentacije lipidnih dipola te nastanka velikog broja vodikovih veza, što za posljedicu ima povećanje rigidnosti dvosloja. Slični rezultati već su objavljeni u literaturi, primjerice u istraživanju ugradnje hesperitina i hesperidina u lipidne dvosloje gdje je uočena ovisnost između partijskog koeficijenta i dubine prodiranja u dvosloj.⁴¹¹ Lipidna peroksidacija također dovodi do povećanja Youngovog modula. Prema tome, fragmentacija i strukturna reorganizacija membrane za posljedicu imaju povećanje elastičnosti dvosloja. Povećanje Youngovog modula nakon peroksidacije u većini je slučajeva manje izraženo s porastom množinskog udjela flavonoida. Međutim, pri najvećem množinskom udjelu MCE ne dolazi do značajne promjene, dok kod MCI dolazi do smanjenja Youngovog modula. Hidrofilni flavonoidi, pogotovo MCI, osim u interakcije s membranom, mogu ulaziti i u interakcije s karbonilnim produktima lipidne peroksidacije, tvoreći vodikove veze. Ukoliko su interakcije s produktima povoljnije od interakcija polarnih skupina flavonoida s fosfatnim skupinama, može doći do uklanjanja flavonoida s površine membrane, što za posljedicu ima smanjenje elastičnosti.

Ugradnjom QUE i MCE ne dolazi do značajnog povećanja debljine dvosloja, što je posljedica njihovog prodiranja u unutrašnjost membrane. Pretpostavlja se da zadebljanje uočeno SAXS-som nije moguće detektirati AFM-om radi eksperimentalne pogreške. Prema očekivanjima, porast debljine vrlo je izražen u slučaju MCI čije vezanje na površinu ima značajniji utjecaj na debljinu u odnosu na hidrofobnije flavonoide. Nakon lipidne peroksidacije, dolazi do porasta debljine dvosloja, što se može objasniti adsorpcijom produkata na površinu

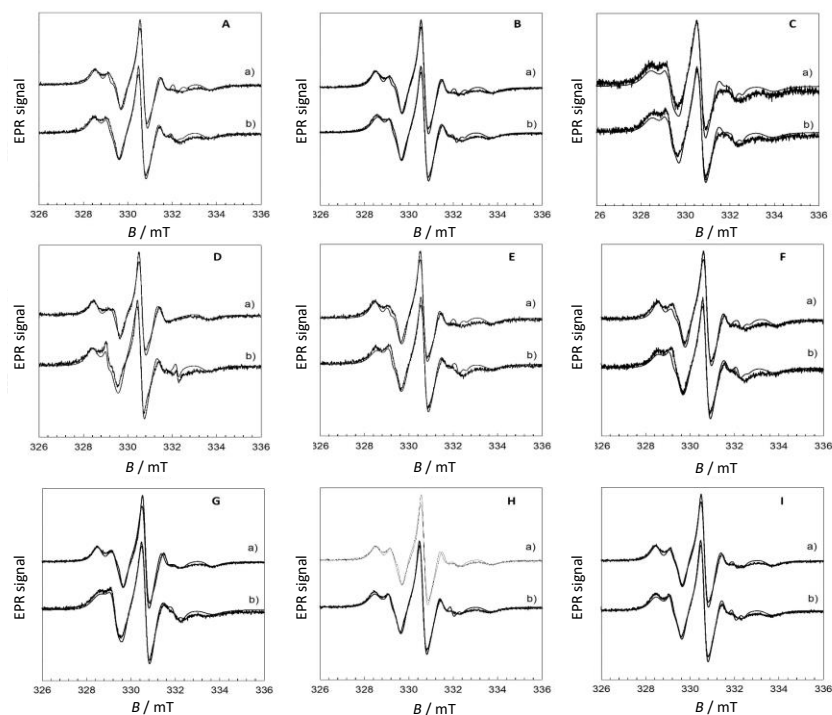
membrane. Hidrofilniji produkti mogu stvarati interakcije s polarnim glavama lipida te na taj način uzrokovati zadebljanje dvosloja. Porast debljine manje je izražen s dodatkom flavonoida. Interakcijom s molekulama lipida flavonoidi onemogućavaju interakciju radikala i produkata s membranom te ju na taj način štite. Debljina dvosloja s najvećim množinskim udjelom MCE i MCI pokazuje sličan trend kao i Youngov modul, što potvrđuje mogućnost interakcije flavonoida i produkata lipidne peroksidacije.

4.2.4. Fluidnost lipidnog dvosloja

Analiza EPR spektra probe 5-DSA radikala omogućava istraživanje svojstava okoline u kojoj se proba nalazi. Iz tog su razloga snimljeni EPR spektri DOPC liposoma s ugrađenim flavonoidima prije i nakon lipidne peroksidacije. Aksijalna anizotropija nitroksidne skupine u 5-DSA probi uzrokuje cijepanje spektra i omogućava izračun spektralnih parametara.

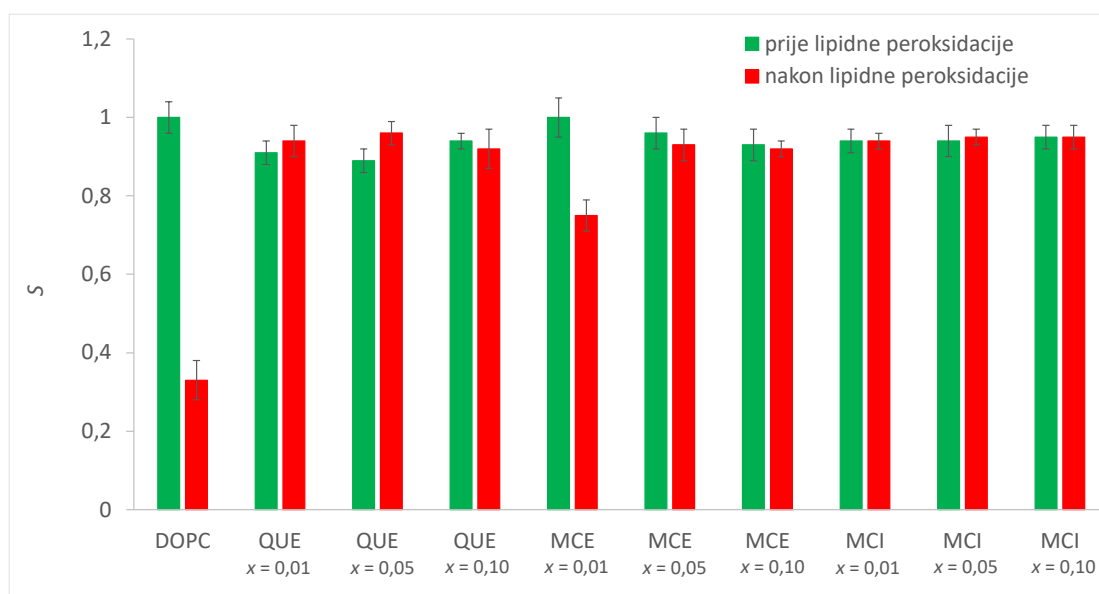


Slika 4.2.12. EPR spektar DOPC liposoma a) prije i b) nakon lipidne peroksidacije.



Slika 4.2.13. EPR spektri DOPC liposoma a) prije i b) nakon lipidne peroksidacije s ugrađenim QUE: A) $x = 0,01$, B) $x = 0,05$, C) $x = 0,1$; MCE: D) $x = 0,01$, E) $x = 0,05$, F) $x = 0,1$ i MCI G) $x = 0,01$, H) $x = 0,05$, I) $x = 0,1$.

Očekuje se da će ugradnja flavonoida, a pogotovo lipidna peroksidacija, smanjiti parametar uređenosti sustava, odnosno povećati fluidnost membrane. Iz tog je razloga iz spektara izračunat parametar uređenosti S .



Slika 4.2.14. Parametri uređenosti (S) za DOPC liposome s ugrađenim flavonoidima prije i nakon lipidne peroksidacije.

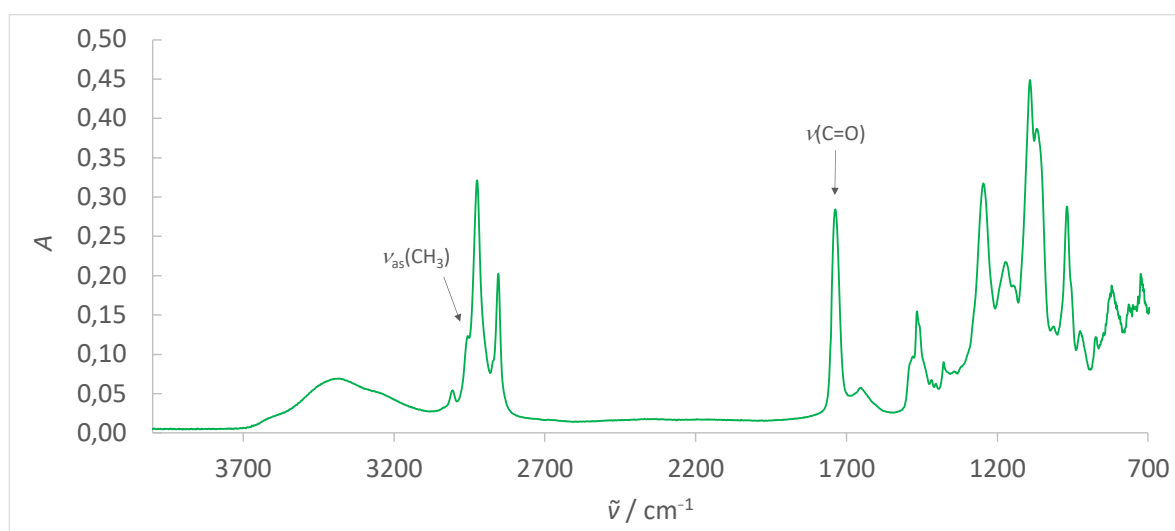
Tablica 4.2.4. Parametri uređenosti (S) za DOPC liposome s ugrađenim flavonoidima prije i nakon lipidne peroksidacije.

uzorak	S	
	prije LP	nakon LP
DOPC	1,00 ± 0,04	0,33 ± 0,05
DOPC + QUE ($x = 0,01$)	0,91 ± 0,03	0,94 ± 0,04
DOPC + QUE ($x = 0,05$)	0,89 ± 0,03	0,96 ± 0,03
DOPC + QUE ($x = 0,10$)	0,94 ± 0,02	0,92 ± 0,05
DOPC + MCE ($x = 0,01$)	1,00 ± 0,05	0,75 ± 0,04
DOPC + MCE ($x = 0,05$)	0,96 ± 0,04	0,93 ± 0,04
DOPC + MCE ($x = 0,10$)	0,93 ± 0,04	0,92 ± 0,02
DOPC + MCI ($x = 0,01$)	0,94 ± 0,03	0,94 ± 0,02
DOPC + MCI ($x = 0,05$)	0,94 ± 0,04	0,95 ± 0,02
DOPC + MCI ($x = 0,10$)	0,95 ± 0,03	0,95 ± 0,03

Ugradnja flavonoida smanjuje rigidnost membrane, ali u većini je slučajeva ta promjena vrlo mala. Smanjenje parametra uređenosti membrane najizraženije je kod QUE. Pretpostavlja se da je to posljedica njegovog hidrofobnijeg karaktera koji omogućava ugradnju u unutrašnjost dvosloja. Nakon ugradnje QUE u područje nepolarnih repova lipida, oni više nisu poravnati kao prije ugradnje, što uzrokuje povećanje fluidnosti membrane. Parametar uređenosti za DOPC liposom nakon lipidne peroksidacije značajno pada, što ukazuje na povećanje fluidnosti membrane. Povećanje fluidnosti posljedica je nastanka spojeva kraćih lanaca u odnosu na lipid, kao i porasta broja spojeva s hidroksilnim skupinama koji mogu tvoriti vodikove veze. Sličan porast u fluidnosti DOPC lipidnog dvosloja nakon peroksidacije uočili su i Tai i suradnici⁴¹² fluoerescencijskom korelacijskom spektroskopijom. U liposomima s ugrađenim flavonoidima ne dolazi do drastične promjene parametra uređenosti nakon lipidne peroksidacije, što ukazuje na njihovu zaštitnu ulogu. Na temelju dobivenih rezultata, zaključeno je da lipidna peroksidacija dovodi do narušavanja strukturne uređenosti lipidne membrane i povećanja njezine fluidnosti te da sva tri flavonoida pri sva tri množinska udjela pokazuju zaštitno djelovanje i štite integritet membrane.

4.2.5. Doseg lipidne peroksidacije

Za daljnju analizu i kvantifikaciju dosega lipidne peroksidacije u prisustvu flavonoida, provedeni su IR eksperimenti. Na slici 4.2.12. prikazan je IR spektar DOPC ($\vartheta = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$). Vrpce su asignirane na temelju literaturnih spektara sličnih spojeva.⁴¹³

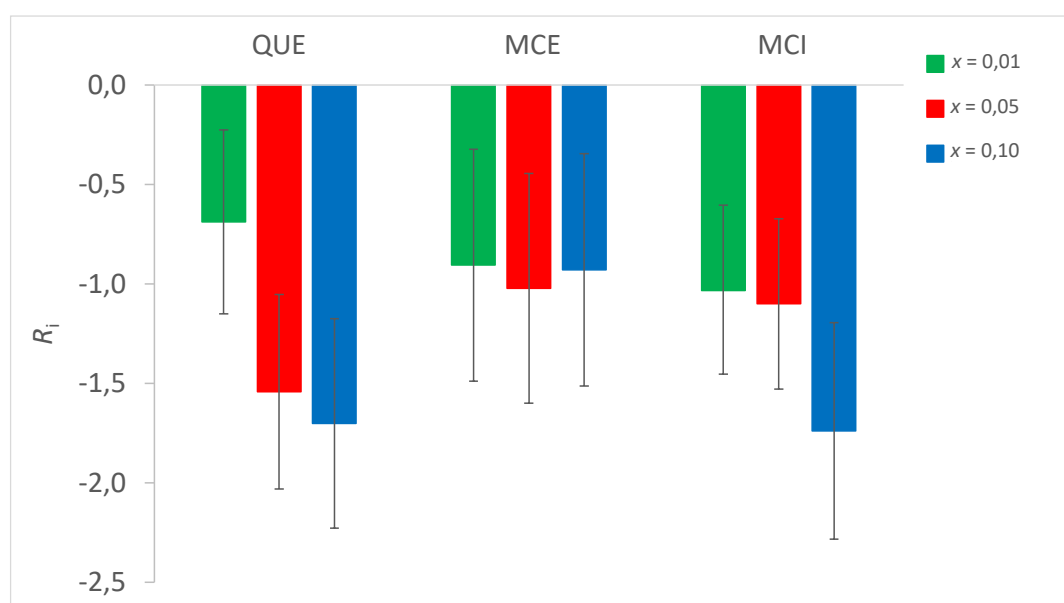


Slika 4.2.15. IR spektar DOPC s istaknutim vrpčama korištenim za daljnju analizu.

Područje $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ u infracrvenom spektru odgovara $\nu(\text{C-H})$ vibracijama metilenskih i metilnih skupina alifatskih molekula.⁴¹³ Dvije vrpce najvećeg intenziteta su pri $\tilde{\nu} = 2924\text{ cm}^{-1}$ i $\tilde{\nu} = 2854\text{ cm}^{-1}$ te odgovaraju metilenskom antisimetričnom i simetričnom istežanju. Vrpca pri $\tilde{\nu} = 3006\text{ cm}^{-1}$ odgovara $=\text{C-H}$ *cis*-olefinskom istežanju, dok vrpca pri $\tilde{\nu} = 2959\text{ cm}^{-1}$ odgovara antisimetričnom istežanju metilnih skupina. Oštra vrpca pri $\tilde{\nu} = 1737\text{ cm}^{-1}$ odgovara karbonilnom stezanju, dok vrpca slabijeg intenziteta pri $\tilde{\nu} = 1652\text{ cm}^{-1}$ odgovara *cis* $\text{C}=\text{C}$ istežanju. Pri $\tilde{\nu} = 1377\text{ cm}^{-1}$ nalazi se vrpca koja odgovara savijanju metilenskih skupina, dok vrpca pri $\tilde{\nu} = 1377\text{ cm}^{-1}$ odgovara simetričnom savijanju metilnih skupina. Vrpce u području $\tilde{\nu} < 1300\text{ cm}^{-1}$ potječu od polarne fosfatne skupine. Vrpce antisimetričnog i simetričnog PO_2^- istežanja nalaze se pri $\tilde{\nu} = 1246\text{ cm}^{-1}$ i $\tilde{\nu} = 1091\text{ cm}^{-1}$. Vrpca pri $\tilde{\nu} = 1172\text{ cm}^{-1}$ odgovara C-O istežanju, dok se vrpce antisimetričnog i simetričnog kolinskog istežanja ($\text{C-N}^+\text{-C}$) nalaze pri $\tilde{\nu} = 969\text{ cm}^{-1}$ and $\tilde{\nu} = 926\text{ cm}^{-1}$.⁴¹³

Tablica 4.2.5. Izračunati postotak inhibicije lipidne peroksidacije DOPC liposoma flavonoidima pri 3 različita množinska udjela flavonoida.

uzorak	R_i
DOPC + QUE ($x = 0,01$)	$-0,7 \pm 0,5$
DOPC + QUE ($x = 0,05$)	$-1,5 \pm 0,5$
DOPC + QUE ($x = 0,10$)	$-1,7 \pm 0,5$
DOPC + MCE ($x = 0,01$)	$-0,9 \pm 0,6$
DOPC + MCE ($x = 0,05$)	$-1,0 \pm 0,6$
DOPC + MCE ($x = 0,10$)	$-0,9 \pm 0,6$
DOPC + MCI ($x = 0,01$)	$-1,0 \pm 0,4$
DOPC + MCI ($x = 0,05$)	$-1,1 \pm 0,4$
DOPC + MCI ($x = 0,10$)	$-1,7 \pm 0,5$



Slika 4.2.16. Izračunati postotak inhibicije lipidne peroksidacije DOPC liposoma flavonoidima pri tri različita množinska udjela flavonoida.

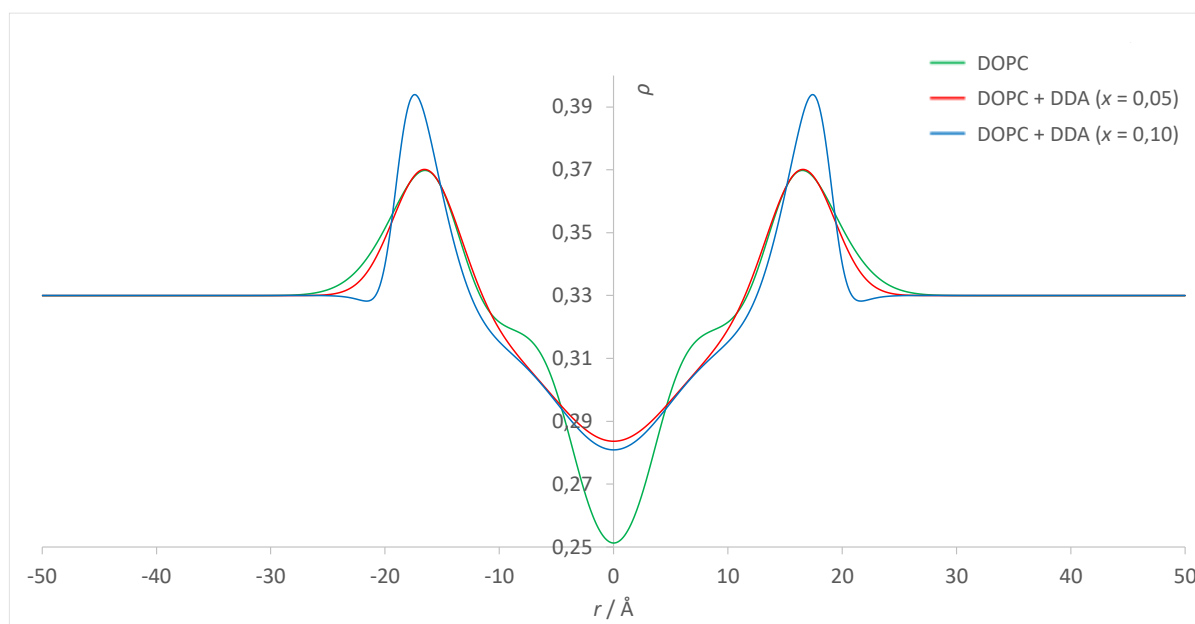
Veličina R_i odgovara postotku inhibicije pod pretpostavkom da ugradnja flavonoida ne dovodi do značajne promjene molarnog apsorpcijskog koeficijenta i omjera produkata lipidne peroksidacije. Iz rezultata je vidljivo da se pri većim množinskim udjelima flavonoida ti efekti ne mogu zanemariti, s obzirom na to da je apsolutna vrijednost $|R_i| > 1$. S obzirom na velike greške u računu, provedena je statistička analiza te je zaključeno da razlika u R_i između pojedinih flavonoida nije značajna ($p = 0,22$). Iako izravna usporedba tri flavonoida u kontekstu kvantifikacije inhibicije nije moguća, potvrđeno je da sva tri flavonoida pri sva tri množinska udjela pokazuju zaštitno djelovanje.

4.3. Ugradnja produkta lipidne peroksidacije u membranu

Poznato je da lipidna peroksidacija uzrokuje značajne strukturne promjene u membranama. Jedan od uzroka promjena je i prisustvo velikog broja produkata. Produkti lipidne peroksidacije uglavnom su hidroperoksidi i karbonilni spojevi koji na svojim krajevima sadrže oksidirane skupine koje mogu stvarati interakcije s polarnim dijelovima membrane i uzrokovati narušavanje integriteta membrane.⁴¹⁴ U svrhu istraživanja interakcije lipidne membrane s produktima lipidne peroksidacije, u DOPC liposom ugrađena je dodekanska dikiselina (engl. *dodecanedioic acid*, DDA), u dva različita množinska udjela ($x = 0,05$ i $x = 0,10$). S obzirom na to da je DOPC stabilan i nije sklon autooksidaciji, sve strukturne razlike posljedica su prisustva ugrađenog spoja. Iako su u MS eksperimentima kao produkt peroksidacije DOPC identificirane dugolančane okso-dikiseline (tablica 4.2.1.), pretpostavlja se da su za većinu interakcija s membranom odgovorne karboksilne skupine na krajevima lanca te da je DDA prikladan modelni produkt lipidne peroksidacije. Općenito, karboksilne dikiseline koje imaju manje od 12 ugljikovih atoma u tijelu se uklanjaju urinom. Međutim, u istraživanjima na štakorima pokazano je da se, u slučaju DDA, samo 3,9% uklanja putem urina, dok se ostatak može apsorbirati u organizmu.⁴¹⁵ Iz tog je razloga ključno istražiti interakciju membrana i dugolančanih produkata koji se dulje zadržavaju u stanicama.

4.3.1. Elektronska gustoća lipidnog dvosloja

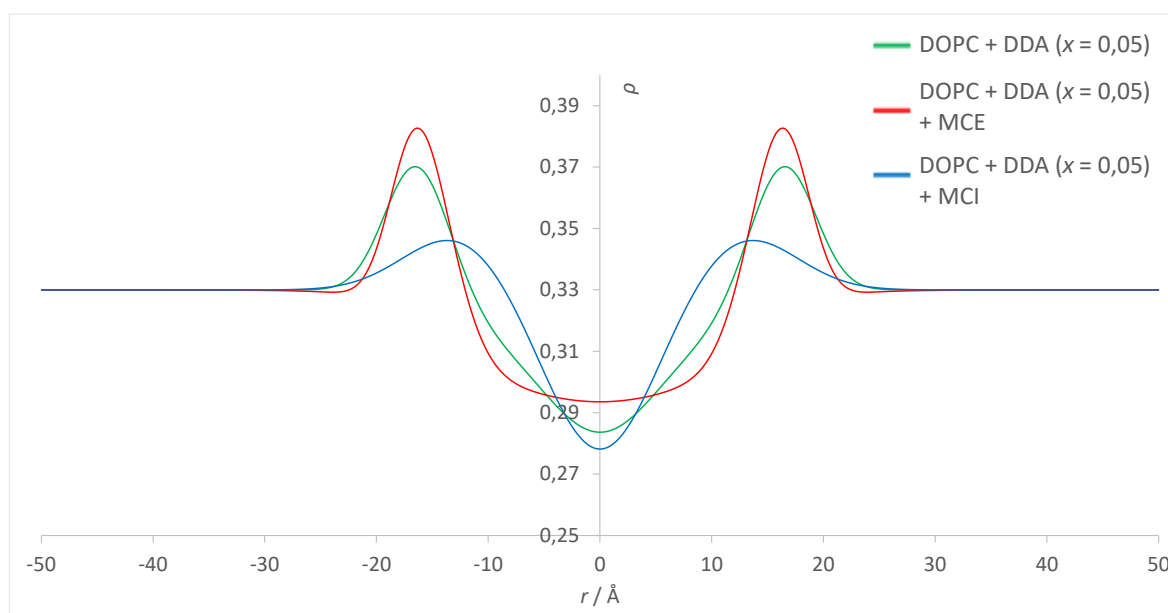
Za istraživanje utjecaja dodatka DDA na strukturna svojstva liposoma te interakcije DDA s MCE i MCI, snimljeni su SAXS spektri u kojima su uočena dva oštra difrakcijska maksimuma karakteristična za multilamelarne sustave.³⁶⁶ Iz spektara su izračunati profili elektronske gustoće.



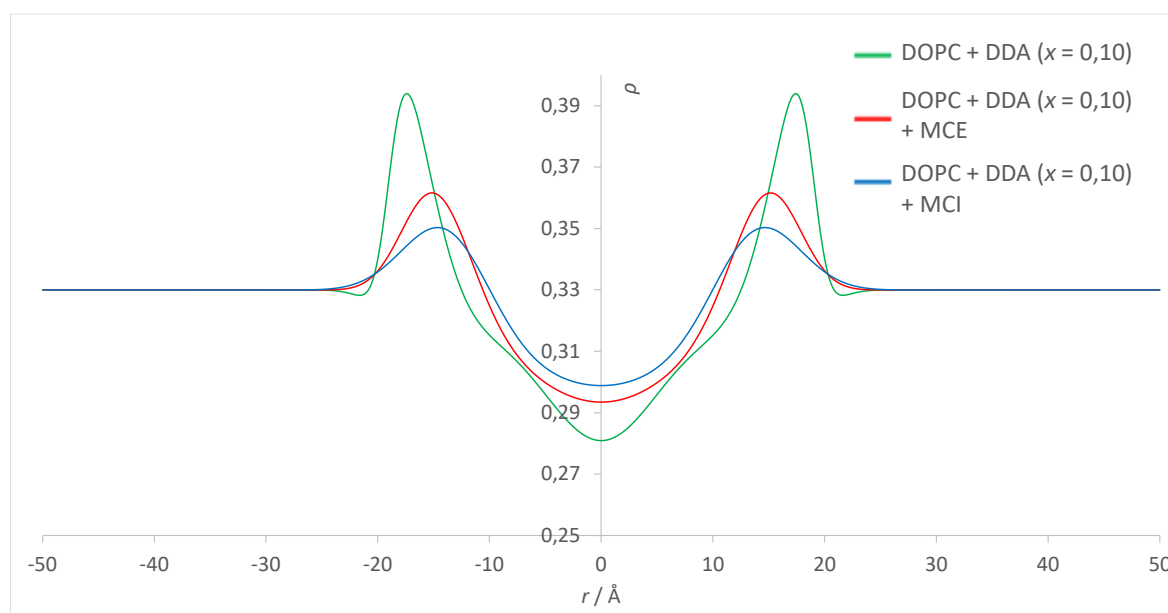
Slika 4.3.1. Profili elektronske gustoće DOPC liposoma s ugrađenom DDA u dva množinska udjela.

Usporedbom profila elektronske gustoće prije i nakon ugradnje, moguće je procijeniti lokaciju ugrađenog spoja unutar membrane. Na sličan je način proučavana lokalizacija kolesterola u DPPC membranama⁶⁰ te peptida u DOPC membranama.⁴¹⁶ Iz profila elektronske gustoće vidljivo je da s dodatkom DDA dolazi do povećanja elektronske gustoće u sredini dvosloja, što odgovara položajima metilnih skupina. Takvo povećanje može se objasniti ugradnjom ugljikovodičnog lanca DDA u središte dvosloja. Analogno povećanje gustoće u sredini dvosloja nakon ugradnje oksidiranih produkata uočeno je simulacijama u slučaju PLPC⁴¹⁷ i DOPC.⁴⁰⁹ De Rosa i suradnici⁴¹⁸ eksperimentalno su uočili da se ugradnjom lipidnog hidroperoksida u POPC dvosloj 95% hidroperoksidnih skupina smješta u polarni dio membrane. S obzirom na to da DDA na svakom kraju posjeduje hidroksilnu skupinu, pretpostavlja se da dolazi do interakcije između hidroksilnih skupina DDA i fosfatnih skupina lipida sa svake strane membrane, pri čemu se ugljikovodični lanac kiseline smješta u lipofilnom dijelu membrane. Slično smještanje unutar membrane pokazuju i određeni polipeptidi, pri čemu povećanje elektronske gustoće u području fosfatnih glava i u sredini dvosloja odgovara položaju proteina koji se proteže kroz cijeli dvosloj.⁴¹⁹ Također je vidljivo da pri većoj koncentraciji DDA dolazi do sužavanja distribucije fosfatnih skupina, što ukazuje na ograničeno gibanje polarnih dijelova molekula lipida. Pretpostavlja se da je ograničeno gibanje posljedica interakcija između DDA

i fosfatnih skupina, prvenstveno stvaranja vodikovih veza, što rezultira uređenijom i rigidnijom strukturom.



Slika 4.3.2. Profili elektronske gustoće DOPC liposoma s ugrađenim flavonoidima ($x = 0,05$) i DDA ($x = 0,05$).



Slika 4.3.3. Profili elektronske gustoće DOPC liposoma s ugrađenim flavonoidima ($x = 0,05$) i DDA ($x = 0,10$).

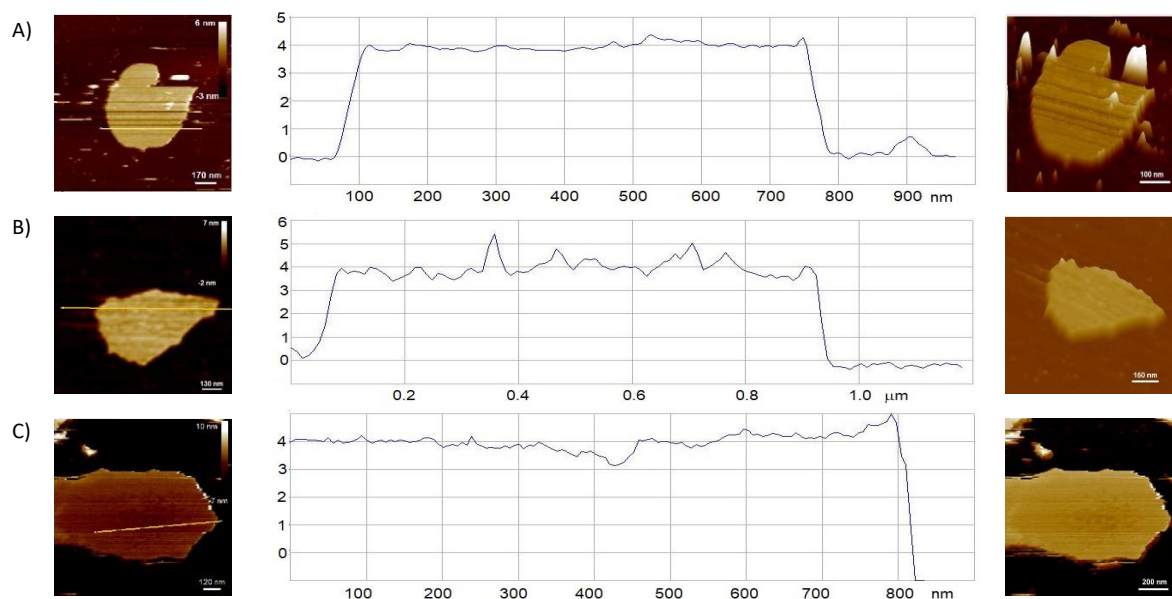
Na slikama 4.3.2. i 4.3.3. prikazani su profili elektronske gustoće za DOPC liposome s ugrađenim MCE i MCI pri dva različita množinska udjela DDA. S dodatkom MCE vidljivo je

dodatno povećanje elektronske gustoće u sredini dvosloja pri obje koncentracije DDA. Navedeno ukazuje na djelomičnu ugradnju MCE u nepolarni dio lipidnog dvosloja, što je u skladu s njegovom hidrofobnošću. Takva zapažanja također su u skladu s dosadašnjim rezultatima, gdje je uočeno da se hidrofobniji flavonoidi smještaju dublje u unutrašnjost dvosloja. U području koje odgovara položaju fosfatnih skupina primijećeno je da dodatak MCE pri većem množinskom udjelu DDA smanjuje nametnuto uređenje polarnih skupina uzrokovano interakcijama s DDA. Smanjenje uređenosti u području oko polarnih skupina uočili su i Tran i suradnici.⁴²⁰ Jedno od mogućih objašnjenja za navedene strukturne promjene je kompeticija polarnih glava i MCE kod stvaranja vodikovih veza s DDA. Sličan efekt primijećen je i u slučaju DMPC liposoma s ugrađenim MCE, gdje je uočen nestanak faznog pretprijelaza u DSC krivuljama. S obzirom na to da je struktura DDA slična strukturi produkta lipidne peroksidacije, analogno ponašanje se očekuje i za strukturno slične produkte te ukazuje na zaštitnu ulogu flavonoida.

U slučaju MCI, povećanje elektronske gustoće između sredine dvosloja i polarnih glava te značajno perturbiranje raspodjele fosfatnih skupina ukazuje na smještanje MCI bliže polarnim dijelovima molekula lipida. Takva zapažanja također su u skladu s dosadašnjim rezultatima. Dobiveni položaji MCI posljedica su postojanja šećerne skupine u strukturi koja je hidrofilna te može stvarati povoljne interakcije s hidrofilnim dijelovima molekule lipida. Povećanje elektronske gustoće u području između sredine i polarnih skupina ukazuje na položaj hidrofobnih fenolnih prstenova MCI. Slično ponašanje zapaženo je i prilikom ugradnje lijeka 2,4-dibromofenola u DPPC liposome, gdje je pri većoj koncentraciji lijeka primijećeno smještanje u blizini polarnih glava.⁴⁰⁵

4.3.2. *Morfologija i nanomehanička svojstva lipidnog dvosloja*

AFM i FS eksperimenti provedeni su kako bi se istražila promjena nanomehaničkih svojstava uslijed ugradnje DDA i flavonoida.

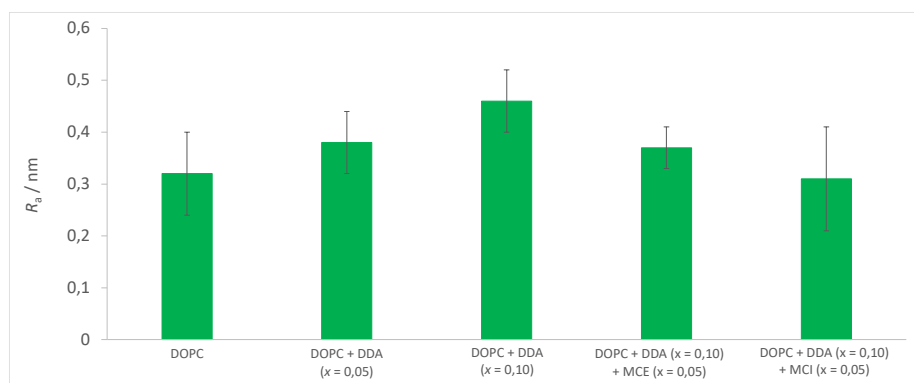


Slika 4.3.4. AFM slike i poprečni presjeci DOPC dvosloja s ugrađenom DDA:

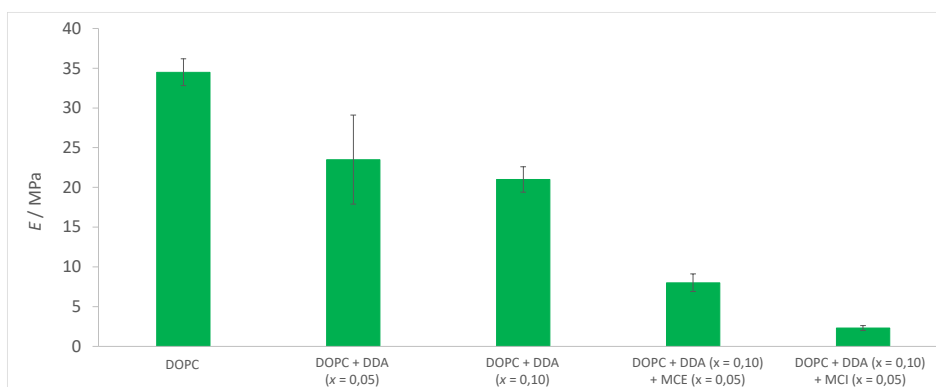
A) $x(\text{DDA}) = 0$; B) $x(\text{DDA}) = 0,05$; C) $x(\text{DDA}) = 0,10$.

Tablica 4.3.1. Nanomehanički parametri DOPC dvosloja s ugrađenom DDA i flavonoidima.

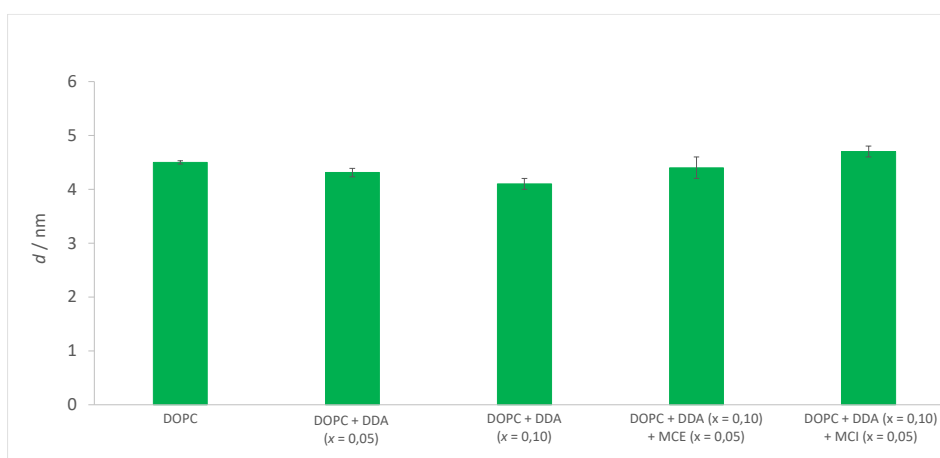
uzorak	R_a / nm	E / MPa	d / nm
DOPC	$0,32 \pm 0,08$	$34,5 \pm 1,7$	$4,50 \pm 0,03$
DOPC + DDA ($x = 0,05$)	$0,38 \pm 0,06$	$23,5 \pm 5,6$	$4,31 \pm 0,08$
DOPC + DDA ($x = 0,10$)	$0,46 \pm 0,06$	$21,0 \pm 1,6$	$4,10 \pm 0,10$
DOPC + DDA ($x = 0,10$) + MCE ($x = 0,05$)	$0,37 \pm 0,04$	$8,0 \pm 1,1$	$4,40 \pm 0,20$
DOPC + DDA ($x = 0,10$) + MCI ($x = 0,05$)	$0,31 \pm 0,10$	$2,3 \pm 0,3$	$4,70 \pm 0,10$



Slika 4.3.5. Hrapavost površine DOPC lipidnog dvosloja s ugrađenom DDA i flavonoidima.



Slika 4.3.6. Youngov modul DOPC lipidnog dvosloja s ugrađenom DDA i flavonoidima.



Slika 4.3.7. Debljina DOPC lipidnog dvosloja s ugrađenom DDA i flavonoidima.

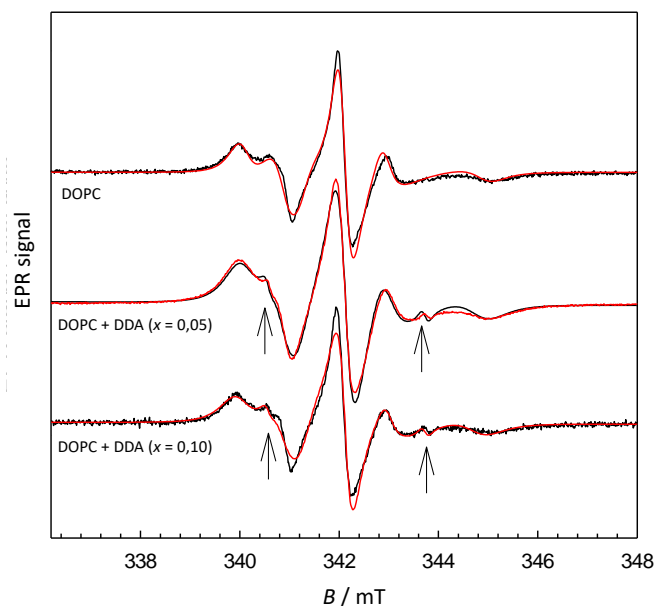
U slučaju DOPC dvosloja, hrapavost površine iznosi $R_a = (0,32 \pm 0,08)$ nm. Ugradnjom DDA dolazi do porasta hrapavosti od 19% u slučaju manjeg množinskog udjela DDA te 44% u slučaju većeg udjela DDA. Nadalje, iz poprečnih presjeka dvosloja vidljivo je da je površina DOPC homogena, dok dodatak DDA uzrokuje lokalne perturbacije i stvaranje defekata na površini. Defekti su posljedica orijentiranja oksidiranih molekula lipida prema površini membrane te se intenzivno istražuju molekularnom dinamikom. U slučaju oksidacije DOPC dvosloja, prepostavlja se da su uočeni defekti početak nastanka vodenih pora. U navedenim simulacijama, nastale pore povećavale su se s vremenom, pri čemu je promjer najužeg dijela pore iznosio oko 1,5 nm.⁴⁰⁹ Nadalje, uočeno je da u zadnjim stadijima procesa formiranja pora dolazi do međusobne interakcije metilnih skupina neoksidiranih lanaca u unutrašnjosti dvosloja. S obzirom na to da ugradnjom oksidiranog lipida dolazi do reorganizacije fosfatnih skupina, permeabilnost membrane također se povećava. Povećanje permeabilnosti membrane uslijed ugradnje oksidiranih produkata potvrđeno je i eksperimentalno.⁴²¹ Uz povećanje

hrapavosti, dodatak DDA za posljedicu ima i stanjivanje membrane. Stanjivanje dvosloja uslijed ugradnje produkta lipidne peroksidacije poznato je u literaturi. Primjerice, De Rosa i suradnici⁴¹⁸ eksperimentalno su uočili stanjivanje POPC membrane od 20% nakon ugradnje peroksidiranog spoja, dok su slična zapažanja dobivena i molekularnom dinamikom.⁴²² Stanjivanje membrane pripisuje se kretanju hidrofilnih, oksidiranih krajeva lanaca prema vodenom mediju, odnosno polarnim glavama lipida. Konačno, s povećanjem množinskog udjela DDA smanjuje se Youngov modul. Mogući razlog smanjenja Youngovog modula je stvaranje agregata u membrani za koje je u literaturi zamijećeno da se očituje u smanjenju elastičnosti.⁴²³

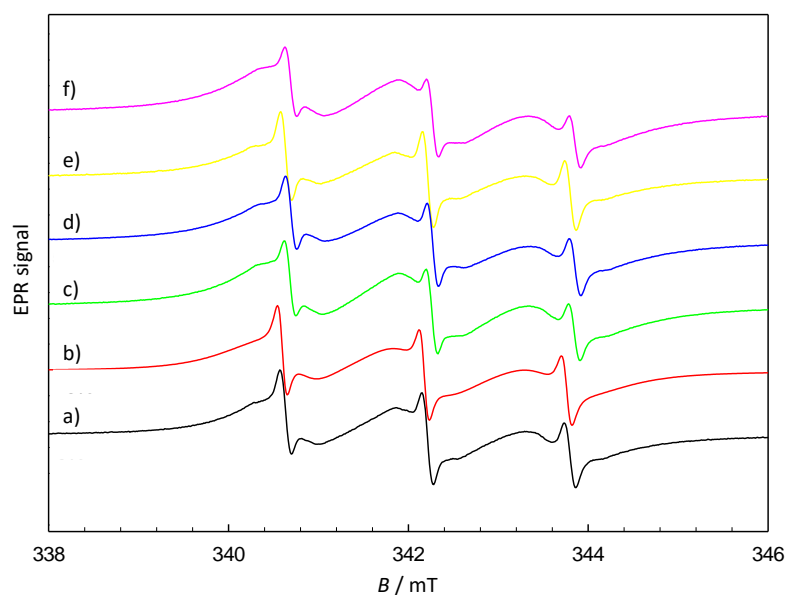
S obzirom na to da je utjecaj DDA izraženiji pri većem množinskom udjelu, eksperimenti s ugrađenim flavonoidima provedeni su pri većem množinskom udjelu, $x(\text{DDA}) = 0,10$. Ugradnjom MCE dolazi do povećanja hrapavosti površine u odnosu na kontrolni uzorak, DOPC. U slučaju dvosloja s ugrađenom DDA, povećanje hrapavosti je manje u odnosu na uzorak s DDA bez flavonoida. Nadalje, ugradnjom MCI u DOPC uzorak s DDA, hrapavost površine poprima približno sličnu vrijednost kao i kontrolni uzorak. Prema tome, flavonoidi smanjuju promjenu hrapavosti uslijed ugradnje DDA. Ugradnja flavonoida uzrokuje i značajan pad Youngovog modula membrane. S obzirom na to da je u eksperimentima s DMPC pokazano da flavonoidi agregiraju u doticaju s membranom, pretpostavlja se da u ovom slučaju također dolazi do agregacije. Zbog mogućnosti stvaranja vodikovih veza između DDA i flavonoida, agregati flavonoida vjerojatno nastaju u blizini agregata DDA, što uzrokuje drastičan pad Youngovog modula. Kompeticija interakcije DDA s fosfatnim glavama i flavonoidima predložena na temelju SAXS eksperimenata potvrđena je i FS eksperimentima u kojima je uočen smanjen utjecaj DDA na hrapavost površine nakon dodatka flavonoida. Simulacijama je također uočeno da oksidirani lipidni produkti mogu stvarati vodikove veze s vodom, karbonilnim skupinama i fosfatnim skupinama lipida.⁴²² Iz istog je razloga stanjivanje dvosloja uzrokovano ugradnjom DDA manje izraženo nakon dodatka flavonoida. Uz to, u slučaju MCI, debljina postiže veće vrijednosti u odnosu na kontrolni uzorak. Takav rezultat vjerojatno je posljedica njegove hidrofilnosti i vezanja na površinu membrane.

4.3.3. Fluidnost lipidnog dvosloja

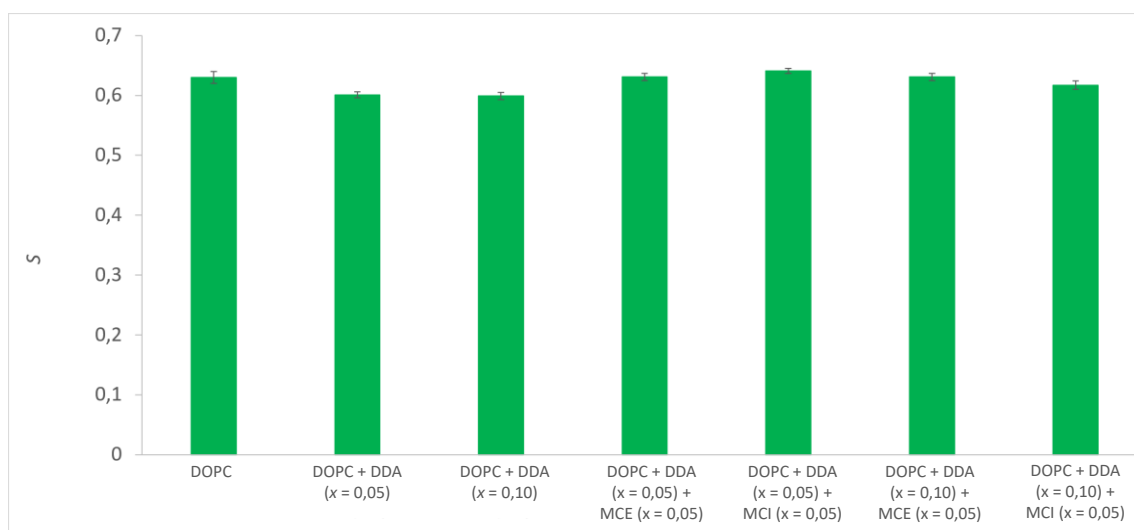
Za istraživanje utjecaja ugradnje DDA na fluidnost membrane, provedeni su EPR eksperimenti te je za svaki uzorak izračunat parametar uređenosti S .



Slika 4.3.8. EPR spektri DOPC liposoma s ugrađenom DDA pri dva množinska udjela.



Slika 4.3.9. Slika. EPR spektri DOPC liposoma s ugrađenim DDA i flavonoidima ($x = 0,05$):
 a) DOPC + DDA ($x = 0,05$); b) DOPC + DDA ($x = 0,10$); c) DOPC + DDA ($x = 0,05$) + MCI;
 d) DOPC + DDA ($x = 0,05$) + MCE; e) DOPC + DDA ($x = 0,10$) + MCE; f) DOPC +
 DDA ($x = 0,10$) + MCI.



Slika 4.3.10. Parametar uređenosti DOPC liposoma s ugrađenom DDA i flavonoidima pri različitim množinskim udjelima.

Tablica 4.3.2. Parametri uređenosti za DOPC liposome s ugrađenim flavonoidima ($x = 0,05$) i DDA.

uzorak	S
DOPC	0,63 ± 0,01
DOPC + DDA ($x = 0,05$)	0,601 ± 0,005
DOPC + DDA ($x = 0,10$)	0,599 ± 0,006
DOPC + DDA ($x = 0,05$) + MCE ($x = 0,05$)	0,631 ± 0,006
DOPC + DDA ($x = 0,10$) + MCE ($x = 0,05$)	0,641 ± 0,004
DOPC + DDA ($x = 0,05$) + MCI ($x = 0,05$)	0,631 ± 0,006
DOPC + DDA ($x = 0,10$) + MCI ($x = 0,05$)	0,617 ± 0,007

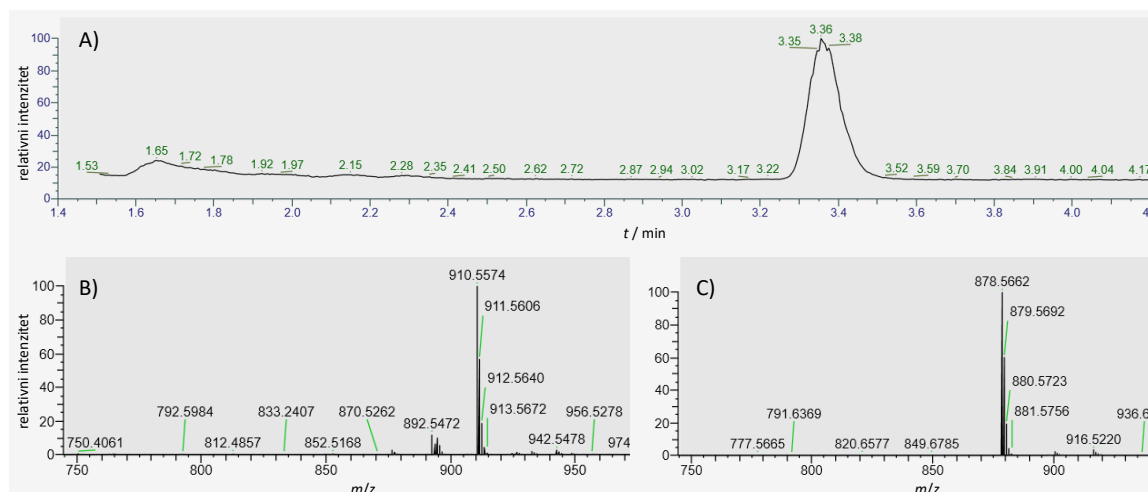
Ugradnja DDA u DOPC, prema očekivanjima, na parametar uređenosti djeluje na analogan način kao i inicirana lipidna peroksidacija. Dolazi do smanjenja parametra uređenosti, što za posljedicu ima povećanje fluidnosti membrane. Takvi rezultati u skladu su s dosadašnjim zapažanjima, s obzirom na to da povećanje fluidnosti također može biti posljedica nastanka defekata u strukturi i nastanka pora, već povezanih s povećanjem permeabilnosti membrane.⁴²¹ Ugradnjom flavonoida navedeni pad manje je izražen. U slučaju oba flavonoida do značajnije promjene parametra uređenosti u odnosu na kontrolni uzorak dolazi pri većoj koncentraciji

DDA. Takva zapažanja posljedica su izraženijih interakcija flavonoida i DDA, što je još jedna potvrda kompeticije interakcije DDA s fosfatnim glavama i flavonoidima. Hidrofobniji MCE pri većem množinskom udjelu DDA uzrokuje dodatno uređenje membrane. S druge strane, hidrofilni MCI uzrokuje smanjenje uređenosti, s obzirom na to da, zahvaljujući polarnosti, može stvarati više interakcija s DDA i fosfatnim skupinama.

4.4. Lipidna peroksidacija lipida s polinezasićenom masnom kiselinom

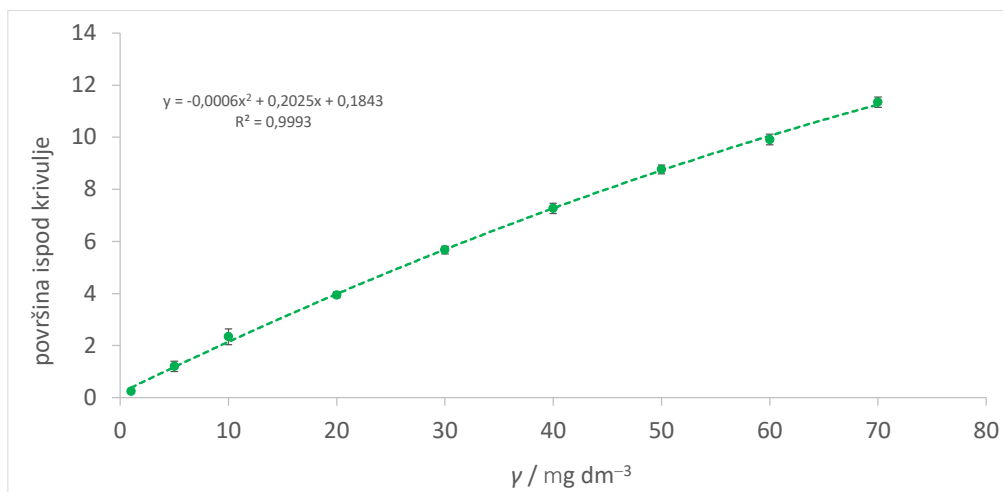
4.4.1. Doseg lipidne peroksidacije

U slučaju DDPC liposoma, određena je količina lipida u uzorku prije i nakon lipidne peroksidacije korištenjem vezanog sustava tekućinske kromatografije i spektrometrije masa (engl. *liquid chromatography-mass spectrometry*, LC-MS). S obzirom na to da je praćena količina lipida, korišteni su uzorci liposoma s manjim množinskim udjelom ugrađenih flavonoida ($x = 0,01$). Primjer kromatograma i masenog spektra DDPC lipida ($m/z = 878,5662$) bez ugrađenih flavonoida prikazan je na slici 4.4.1. te je određeno retencijsko vrijeme DDPC lipida koje iznosi $t_R = 3,36$ min.



Slika 4.4.1. A) Kromatogram DDPC lipida prije inicirane lipidne peroksidacije, B) Maseni spektar DDPC lipida prije lipidne peroksidacije, $t_R = 1,65$ min i C) $t_R = 3,36$ min.

U svrhu kvantifikacije, određena je kalibracijska krivulja praćenjem odaziva detektora u ovisnosti o poznatoj koncentraciji lipida.

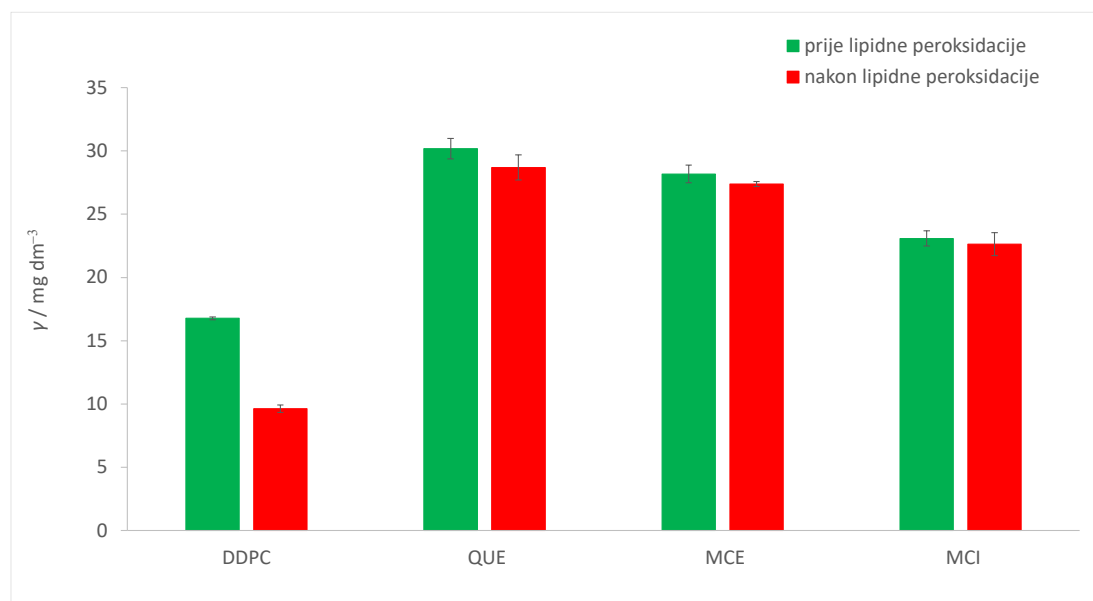


Slika 4.4.2. Kalibracijska krivulja DDPC lipida dobivena LC-MS tehnikom.

Dobivena kalibracijska krivulja potom je korištena za računanje količine preostalog lipida nakon lipidne peroksidacije u uzorcima liposoma bez i s ugrađenim flavonoidima.

Tablica 4.4.1. Količina preostalog DDPC lipida određena LC-MS tehnikom prije i nakon inicirane lipidne peroksidacije (LP).

uzorak	$\gamma / \text{mg dm}^{-3}$	
	prije LP	nakon LP
DDPC	$16,8 \pm 0,1$	$9,6 \pm 0,3$
DDPC + QUE ($x = 0,01$)	$30,2 \pm 0,8$	$28,7 \pm 0,9$
DDPC + MCE ($x = 0,01$)	$28,2 \pm 0,7$	$27,4 \pm 0,2$
DDPC + MCI ($x = 0,01$)	$23,1 \pm 0,6$	$22,6 \pm 0,9$



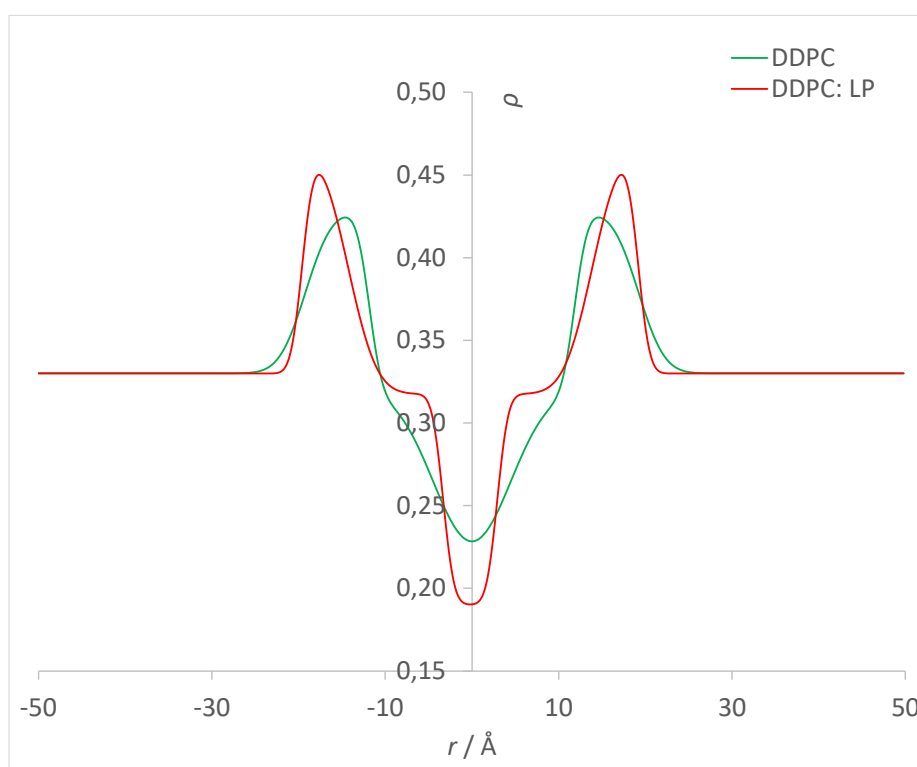
Slika 4.4.3. Količina preostalog DDPC lipida određena LC-MS tehnikom prije i nakon lipidne peroksidacije (LP).

Početna koncentracija lipida u DDPC liposomima bila je jednaka $\gamma = 50 \text{ mg dm}^{-3}$, dok izračunata koncentracija preostalog DDPC lipida prije iniciranja lipidne peroksidacije iznosi $\gamma = 16,77 \text{ mg dm}^{-3}$. Prema tome, do oksidacije lipida dolazi i prije same inicijacije. Autooksidacija uzoraka potvrđena je i na temelju pojave signala koji odgovara monohidroperoksidu DDPC lipida ($m/z = 910,5574$, $t_R = 1,65 \text{ min}$). Takav rezultat nije neočekivan, s obzirom na to da za LC-MS eksperimente lipidi moraju biti otopljeni, pri čemu je kao otapalo korišten metanol. Dodatak metanola dovodi do narušavanja globularne strukture liposoma te su otopljene molekule lipida podložnije oksidativnom napadu u odnosu na vezikulu prisutnu u vodenom mediju. Prema tome, do peroksidacije dolazi i tijekom samog eksperimenta. S obzirom na to da su svi eksperimenti provedeni pri istim uvjetima te da je oksidacija potaknuta metanolom trajala jednako dugo u svim eksperimentima, rezultati se mogu međusobno uspoređivati. Autooksidacija lipida prisutna je i u slučaju liposoma s ugrađenim flavonoidima. U slučaju ugradnje QUE, koncentracija DDPC u uzorku iznosi $\gamma = 30,18 \text{ mg dm}^{-3}$, u slučaju MCE $\gamma = 28,18 \text{ mg dm}^{-3}$, dok je kod MCI najmanja te iznosi $\gamma = 23,08 \text{ mg dm}^{-3}$. Manji pad koncentracije lipida prije inicirane lipidne peroksidacije ukazuje na zaštitnu ulogu sva tri flavonoida. Nakon iniciranja lipidne peroksidacije, u uzorku bez flavonoida dolazi do pada koncentracije DDPC od 42,58%. S druge strane, promjene do kojih dolazi u slučaju liposoma s ugrađenim flavonoidima su zanemarive. Dobiveni rezultati ukazuju

na iznimnu zaštitnu ulogu flavonoida, pri čemu dolazi do potpune supresije oksidacije inicirane Fentonovom reakcijom.

4.4.2. Elektronska gustoća lipidnog dvosloja

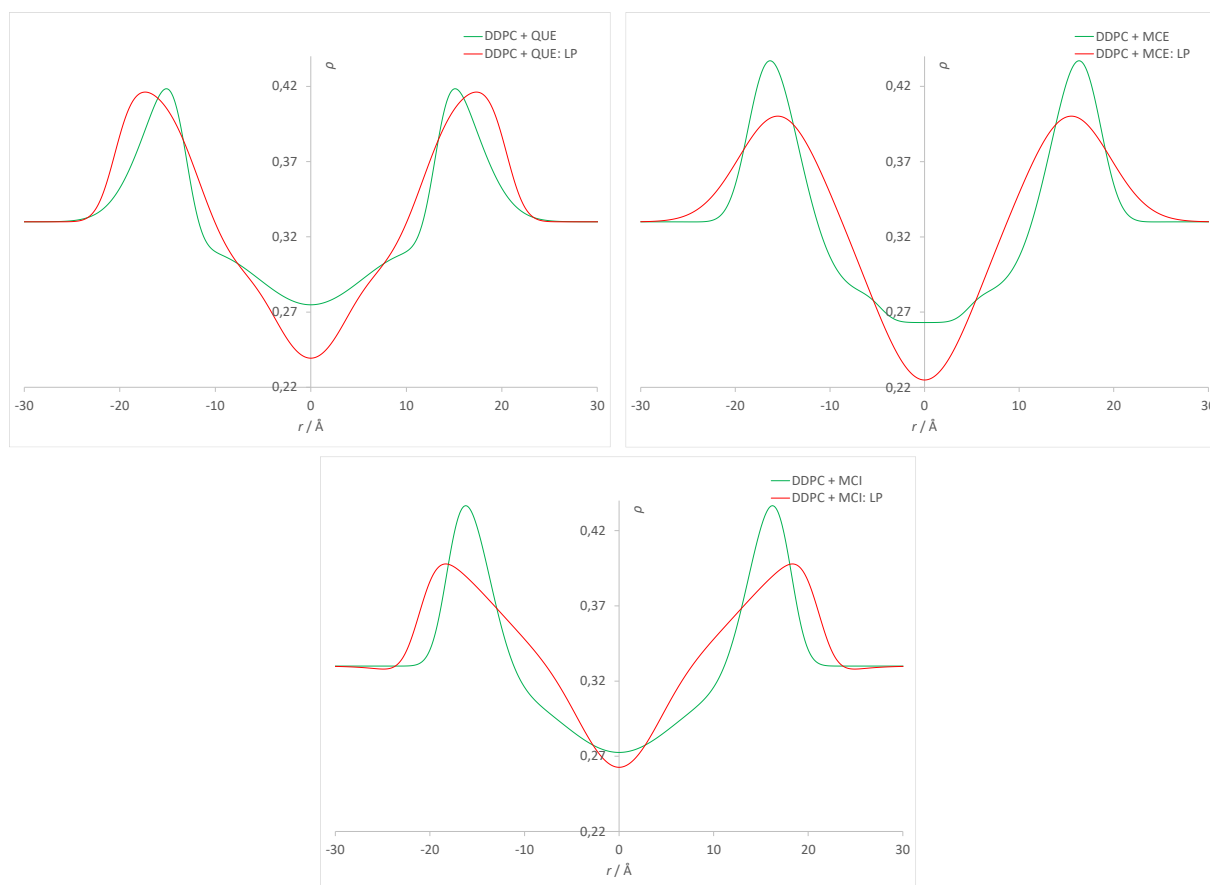
SAXS spektri snimljeni su za DDPC liposome s ugrađenim flavonoidima ($x = 0,01$) prije i nakon lipidne peroksidacije.



Slika 4.4.4. Profili elektronske gustoće DDPC liposoma prije i nakon lipidne peroksidacije.

Profil elektronske gustoće DDPC liposoma razlikuje se u odnosu na DOPC liposome radi prisutnosti većeg broja dvostrukih veza i duljeg lanca ugljikovih atoma. Općeniti oblik krivulje je analogan te odgovara fosfolipidnom dvosloju. Nakon lipidne peroksidacije dolazi do smanjenja elektronske gustoće u sredini dvosloja, što je u suprotnosti s rezultatima dobivenima za DOPC liposome. Takvi rezultati posljedica su nastanka drugačijih produkata i drugačijeg sastava samog dvosloja. Izraženo povećanje elektronske gustoće u području koje odgovara položaju između sredine dvosloja i fosfatnih skupina ukazuje na ugradnju produkata u tom dijelu membrane. Pretpostavlja se da je takvo povećanje posljedica nastanka produkata kraćih

ugljikovodičnih lanaca koji posjeduju oksidiranu polarnu skupinu. Takva skupina ne može stvarati vodikove veze s fosfatnim skupinama lipida. Iz tog razloga ne dolazi do interakcija s polarnim glavama lipida i stvaranja vodikovih veza, već se produkt zadržava dublje u membrani.



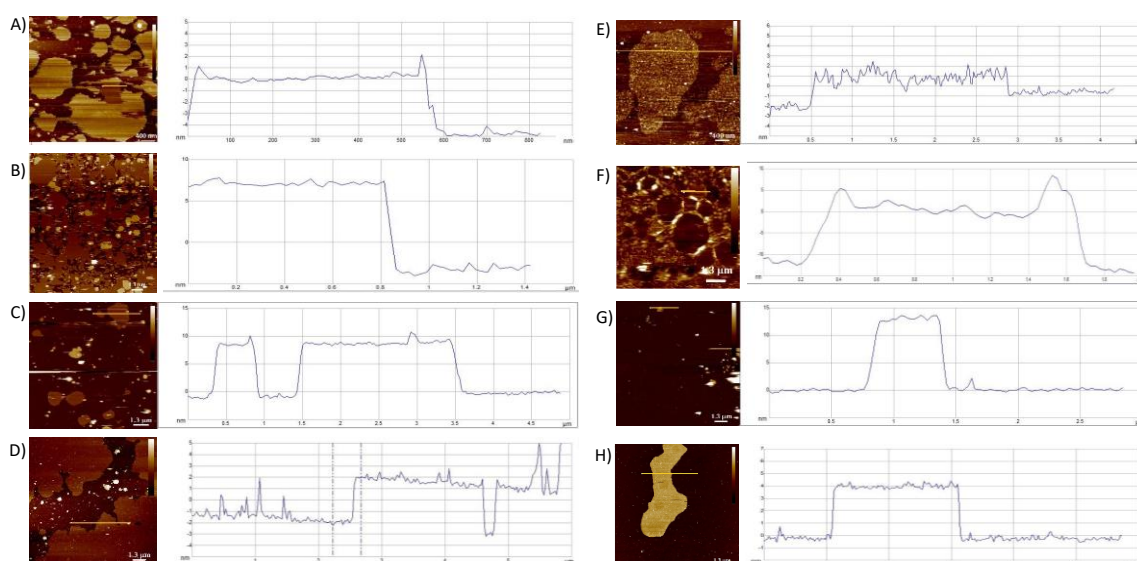
Slika 4.4.5. Profili elektronske gustoće DDPC liposoma s ugrađenim flavonoidima ($x = 0,05$) prije i nakon lipidne peroksidacije.

Ugradnja sva tri flavonoida u DDPC liposome uzrokuje promjene analogne onima kod DOPC liposoma. Dolazi do povećanja elektronske gustoće u sredini fosfolipidnog dvosloja te zadebljanja membrane, što ukazuje na činjenicu da se i u slučaju DDPC liposoma dio flavonoida smješta u središnji dio dvosloja. Uz to, dolazi do perturbacije fosfatnih skupina. Nakon lipidne peroksidacije DDPC liposoma s ugrađenim QUE i MCE dolazi do pada elektronske gustoće u središnjem dijelu dvosloja, ali je pad manje izražen nego u slučaju liposoma bez flavonoida, što ukazuje na njihovu zaštitnu ulogu. U slučaju QUE, porast elektronske gustoće veći je u sredini dvosloja, dok je kod MCE porast primijećen u području između sredine dvosloja i polarnih glava. Pretpostavlja se da porast elektronske gustoće

uzrokuju oksidirani flavonoidi koji se, ovisno o hidrofobnosti, različito smještaju u dvosloj. U slučaju ugradnje MCI dolazi do pertubracije cijele lipidne membrane, što je posljedica prisustva dodatne šećerne skupine u strukturi.

4.4.3. Morfologija i nanomehanička svojstva lipidnog dvosloja

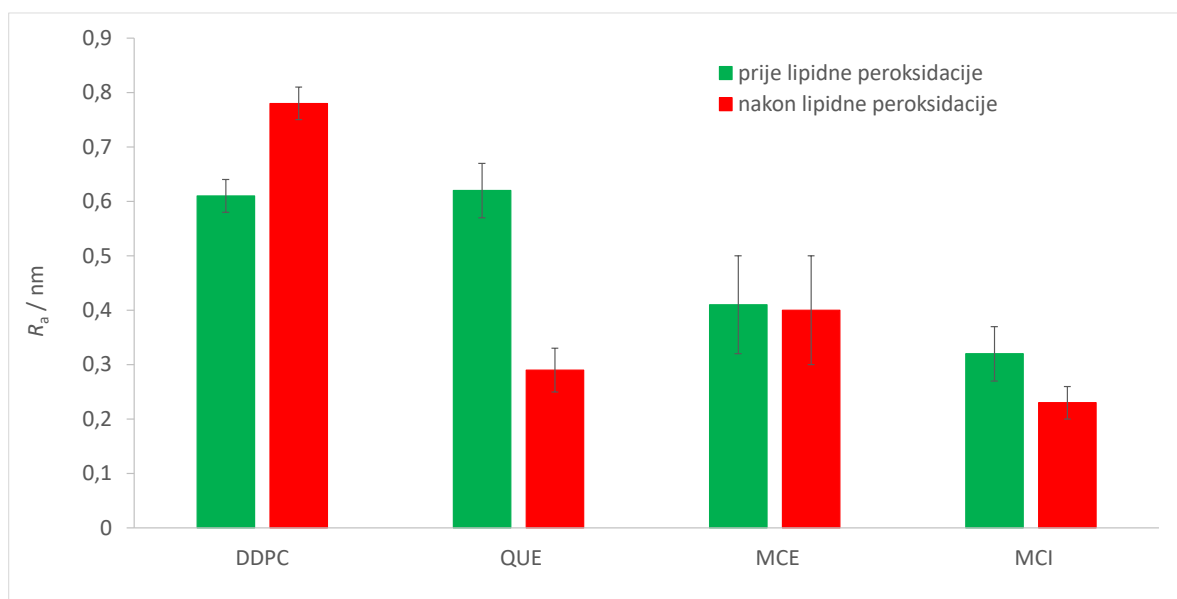
Kako bi efekt ugradnje flavonoida bio izraženiji, u AFM i FS eksperimentima korišteni su DDPC liposomi s množinskim udjelom flavonoida $x = 0,05$.



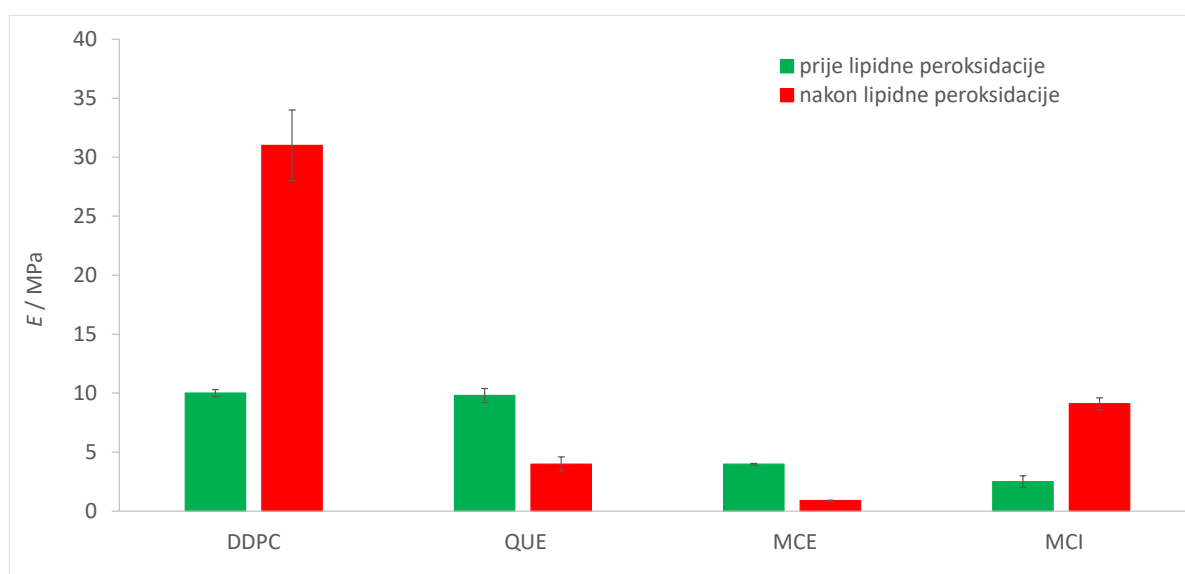
Slika 4.4.6. Morfologija i poprečni presjek DDPC dvosloja s ugrađenim flavonoidima ($x = 0,05$) prije lipidne peroksidacije: A) DDPC; B) DDPC + QUE; C) DDPC + MCE; D) DDPC + MCI te nakon lipidne peroksidacije: E) DDPC; F) DDPC + QUE; G) DDPC + MCE; H) DDPC + MCI.

Tablica 4.4.2. Nanomehanički parametri DDPC liposoma s ugrađenim flavonoidima ($x = 0,05$) prije i nakon lipidne peroksidacije (LP) ($n = 6$).

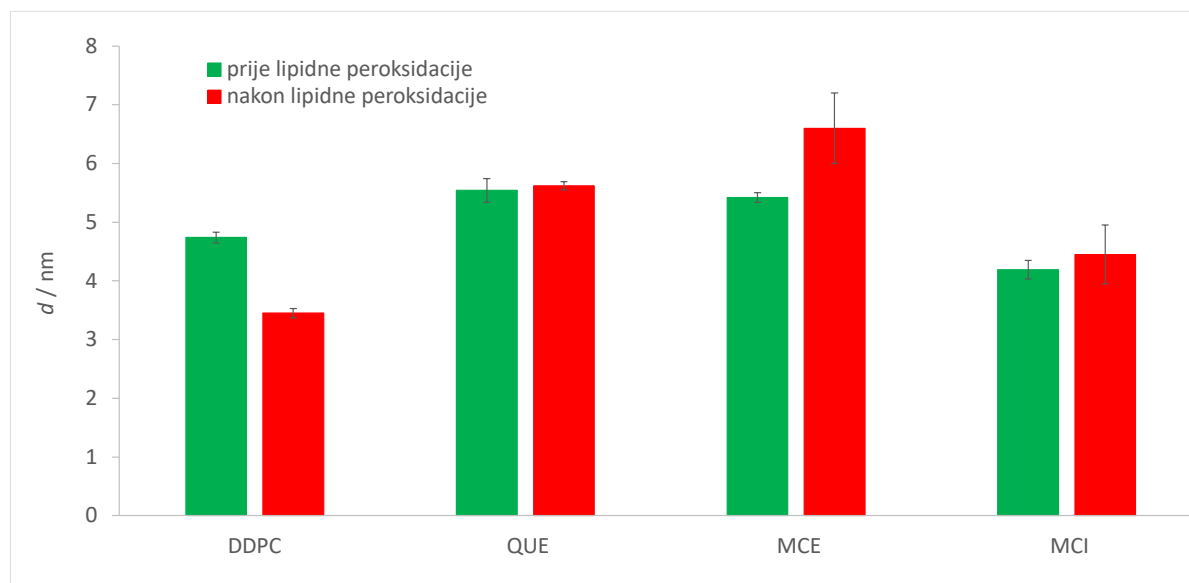
uzorak	R_a / nm		E / MPa		d / nm	
	prije LP	nakon LP	prije LP	nakon LP	prije LP	nakon LP
DDPC	$0,61 \pm 0,03$	$0,78 \pm 0,03$	$10,0 \pm 0,36$	$31,0 \pm 3,0$	$4,74 \pm 0,09$	$3,45 \pm 0,08$
DDPC + QUE	$0,62 \pm 0,05$	$0,29 \pm 0,04$	$9,80 \pm 0,60$	$4,00 \pm 0,6$	$5,54 \pm 0,20$	$5,62 \pm 0,07$
DDPC + MCE	$0,41 \pm 0,09$	$0,40 \pm 0,10$	$3,98 \pm 0,07$	$0,90 \pm 0,04$	$5,42 \pm 0,08$	$6,60 \pm 0,60$
DDPC + MCI	$0,32 \pm 0,05$	$0,23 \pm 0,03$	$2,50 \pm 0,50$	$9,10 \pm 0,50$	$4,19 \pm 0,16$	$4,45 \pm 0,50$



Slika 4.4.7. Hrapavost površine DDPC lipidnog dvosloja uslijed ugradnje flavonoida ($x = 0,05$) i inducirane lipidne peroksidacije.



Slika 4.4.8. Youngov modul DDPC lipidnog dvosloja uslijed ugradnje flavonoida ($x = 0,05$) i inducirane lipidne peroksidacije.



Slika 4.4.9. Debljina DDPC lipidnog dvosloja uslijed ugradnje flavonoida ($x = 0,05$) i inducirane lipidne peroksidacije.

Na temelju dobivenih rezultata, vidljivo je da se hrapavost površine ugradnjom QUE značajno ne mijenja, dok do blagog pada dolazi ugradnjom MCE i MCI. Takva zapažanja razlikuju se od rezultata dobivenih korištenjem DOPC lipida. Na hrapavost površine dvosloja značajno utječe i struktura lipida. Hrapavost površine DOPC dvosloja bez ugrađenih flavonoida znatno je manja ($R_a = (0,060 \pm 0,008)$ nm) u odnosu na hrapavost DDPC dvosloja ($R_a = 0,61 \pm 0,03$) nm, što ukazuje na različito pakiranje molekula lipida u dvosloj. Razlika u pakiranju vjerojatno je posljedica postojanja velikog broja dvostrukih veza u DDPC lipidu. Prema tome, pretpostavlja se i da će promjene nanomehaničkih parametara uslijed ugradnje i lipidne peroksidacije biti drugačije. Uslijed lipidne peroksidacije dolazi do povećanja hrapavosti DDPC dvosloja, što ukazuje na fragmentaciju i narušavanje uređene strukture dvosloja. Razlika u hrapavosti manje je izražena nego u slučaju DOPC liposoma te se pretpostavlja da je to posljedica deset puta veće hrapavosti DDPC dvosloja u odnosu na DOPC pa daljnje narušavanje strukture nema toliko izražen utjecaj na hrapavost površine. Nakon peroksidacije DDPC dvosloja s ugrađenim flavonoidima, kod QUE i MCI dolazi do smanjenja hrapavosti, dok se kod MCE hrapavost značajno ne mijenja. Pretpostavlja se da je smanjenje hrapavosti posljedica interakcije produkata oksidacije flavonoida s lipidima u dvosloju. Navedeni rezultati ukazuju na očuvanje integriteta membrane u slučaju ugrađenih flavonoida.

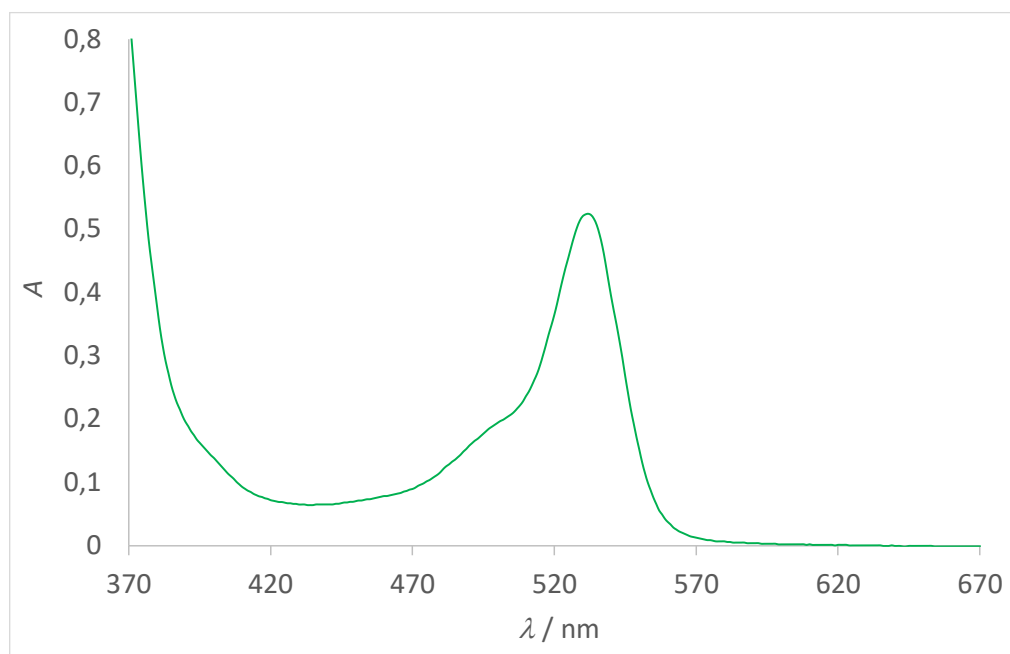
Lipidnom peroksidacijom DDPC dvosloja, kao i u slučaju DOPC, dolazi do povećanja Youngovog modula koje je posljedica interakcije produkata lipidne peroksidacije i dvosloja.

Prilikom ugradnje flavonoida dolazi do smanjenja elastičnosti membrane. S obzirom na to da je smanjenje Youngovog modula uočeno i u istraživanjima provedenima na dvosloju s ugrađenim modelnim produktom peroksidacije, pretpostavlja se da i u ovom slučaju dolazi do agregacije flavonoida unutar dvosloja. Dodatan pad Youngovog modula javlja se nakon lipidne peroksidacije u slučaju QUE i MCE. Smanjenje elastičnosti dvosloja potencijalno ukazuje na agregaciju produkata u blizini flavonoida i njihovih oksidiranih oblika. Agregacija produkata smanjuje njihovu dostupnost za interakciju s fosfatnim skupinama lipida. Analogna kompeticija interakcija uočena je i u slučaju DOPC dvosloja s ugrađenom DDA. Pad elastičnosti dvosloja ukazuje na smanjeno narušavanje integriteta membrane. U slučaju MCI, Youngov modul poprima slične vrijednosti kao i DDPC bez ugrađenih flavonoida, što ukazuje na narušavanje nastalih agregata MCI uslijed njegove oksidacije.

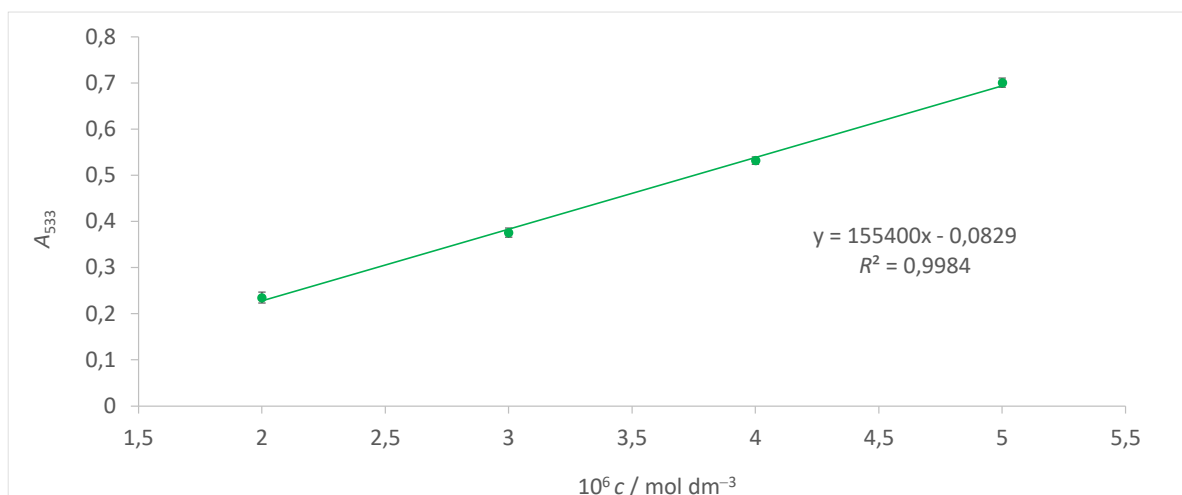
Debljina DDPC dvosloja bez ugrađenih flavonoida smanjuje se nakon lipidne peroksidacije. Stanjenje membrane vjerojatno je posljedica pucanja ugljikovodičnih lanaca uslijed oksidacije i nastanka karbonilnih i karboksilnih produkata koji mogu tvoriti vodikove veze ukoliko se dva sloja lipidnih molekula međusobno približe. Navedeni efekt nije uočen u slučaju DOPC dvosloja jer je poznato da kod zasićenijih lipida ugljikovodični lanci posjeduju veću slobodu torzijskih gibanja, što uzrokuje interakciju oksidiranih krajeva lanaca s polarnim glavama istog monosloja.⁴¹⁸ Ugradnjom flavonoida ne dolazi do stanjenja membrane uslijed lipidne peroksidacije, što ukazuje na odustnost oksidiranih lanaca.

4.4.4. Kvantifikacija reaktivnih vrsta tiobarbiturne kiseline

Za kvantitativno određivanje produkata lipidne peroksidacije korištena je metoda spektrofotometrijskog određivanja reaktivnih vrsta tiobarbiturne kiseline (engl. *thiobarbituric acid reactive substances*, TBARS). Malondialdehid (MDA) je jedan od najistraživanijih produkata lipidne peroksidacije. Kao prekursor MDA korišten je 1,1,3,3-tetraetoksipropan (TEP) iz kojeg MDA nastaje u jednakom stehiometrijskom omjeru. Prema tome, može se pretpostaviti da je koncentracija MDA jednaka koncentraciji TEP-a. Reakcijom s tiobarbiturom kiselinom (TBA) nastaje ružičasto obojeni kompleks koji u UV-Vis spektru ima maksimum pri $\lambda = 533 \text{ nm}$ (slika 4.4.10).



Slika 4.4.10. UV-Vis spektar kompleksa MDA-TBA, $l = 1$ cm, $\vartheta = 25$ °C.



Slika 4.4.11. Baždarni pravac MDA-TBA kompleksa; $\lambda = 533$ nm, $l = 1$ cm, $\vartheta = 25$ °C.

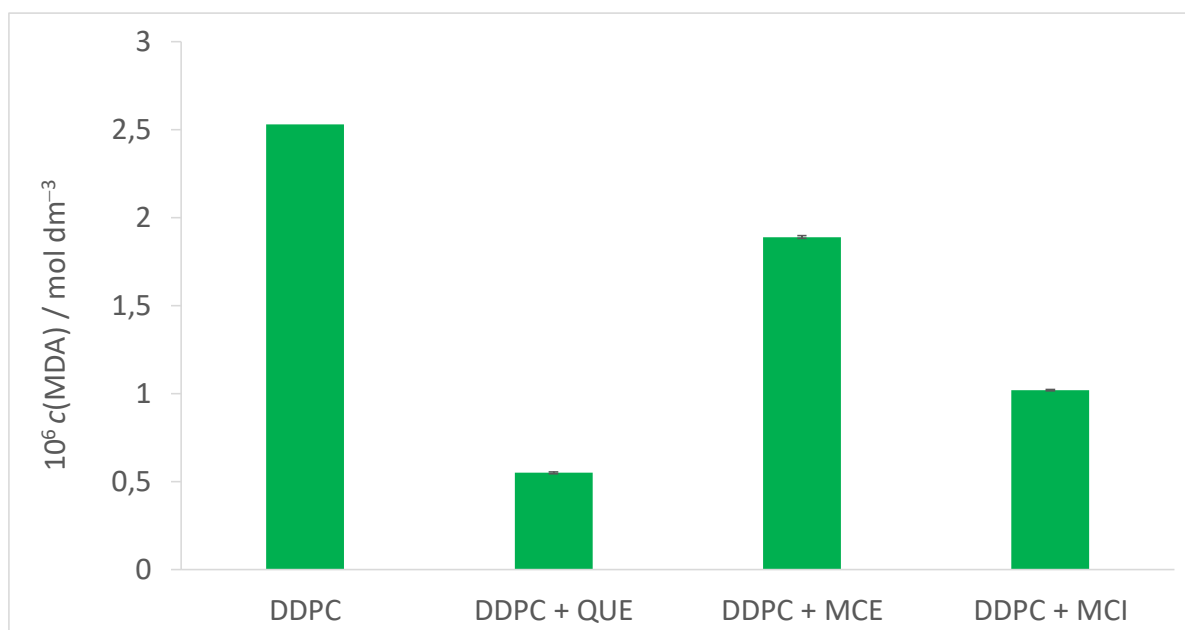
Iz baždarnog pravca određen je molarni apsorpcijski koeficijent kompleksa MDA-TBA, $\varepsilon = 155400 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$, koji je u dobrom slaganju s literaturnim vrijednostima.⁴²⁴

Nakon iniciranja lipidne peroksidacije, određena je količina nastalog MDA-TBA kompleksa u različitim vremenima reakcija. Zaključeno je da je optimalno vrijeme reakcije $t = 10$ min, s obzirom na to da nakon duljeg vremena dolazi do oksidacije MDA u malonsku kiselinu, što onemogućava daljnje vezanje s TBA. Za navedene eksperimente, pripremljeni su DDPC liposomi s većim udjelom flavonoida ($x = 0,05$) kako bi se postigao veći odziv. MDA

nije jedini spoj koji reagira s TBA, pri čemu nastaje kompleks koji apsorbira na navedenoj valnoj duljini.⁸⁶ Primjerice, TBA može reagirati i s djelomično oksidiranim lancima lipida. Iz tog razloga treba imati na umu da koncentracija MDA izračunata iz baždarnog pravca ne predstavlja nužno stvarnu koncentraciju, već joj je proporcionalna, uz očekivanja da su navedena odstupanja mala. Iz tog se razloga dobivene koncentracije MDA promatraju kao ekvivalenti MDA.

Tablica 4.4.3. Koncentracija nastalog MDA tijekom lipidne peroksidacije DDPC liposoma s ugrađenim flavonoidima.

uzorak	$10^6 \cdot c(\text{MDA}) / \text{mol dm}^{-3}$
DDPC	2,53
DDPC + QUE	0,55
DDPC + MCE	1,89
DDPC + MCI	1,02

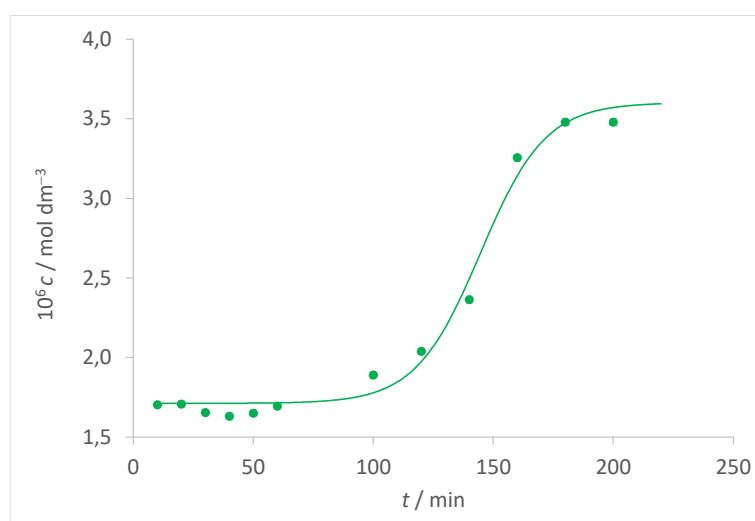


Slika 4.4.12. Koncentracija nastalog MDA tijekom lipidne peroksidacije DDPC liposoma s ugrađenim flavonoidima u odnosu na uzorak DDPC liposoma bez ugrađenih flavonoida.

Iz rezultata je vidljivo da nakon inicirane lipidne peroksidacije svi flavonoidi pokazuju zaštitnu ulogu. Dodatkom QUE dolazi do nastanka najmanje količine MDA, pri čemu nastaje samo 21,55% količine u odnosu na DDPC bez ugrađenih flavonoida. U slučaju MCE nastaje 74,9% MDA, dok je u slučaju MCI taj postotak manji te iznosi 40,5%. Zaštitna uloga flavonoida u

slučaju DPPC razlikuje se od rezultata dobivenih korištenjem DOPC liposoma. Mogući razlog je razlika u strukturi lipida, što za posljedicu ima i drugačije smještanje flavonoida u membrani. Uz to, u slučaju DOPC liposoma praćene su strukturne promjene kao posljedica lipidne peroksidacije, dok je TBARS metodom izravno praćena količina nastalih produkata. Produkti koji nastaju peroksidacijom DOPC i DDPC liposoma su različiti te su samo jedan od faktora koji utječu na strukturna i morfološka svojstva membrane.

Uz kvantifikaciju nastalog produkta, promatrana je i kinetika reakcije lipidne peroksidacije. Inkubacija suspenzije liposoma s TBA započeta je u različitim vremenima lipidne peroksidacije, pri čemu je vrijeme inkubacije jednako za svaki uzorak.



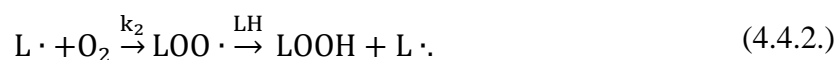
Slika 4.4.13. Vremenska ovisnost koncentracije nastalog MDA tijekom lipidne peroksidacije DDPC liposoma, $\vartheta = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Dobiveni eksperimentalni podaci mogu se opisati sigmoidalnom krivuljom. Takav oblik krivulje lipidne peroksidacije eksperimentalno je zabilježen u literaturi.⁴²⁵ Sigmoidalna krivulja karakterizira mehanizam koji se sastoji od dvije uzastopne autokatalitičke reakcije.

U koraku inicijacije, lipid reagira s molekularnih kisikom pri čemu nastaje lipidni radikal.



Nastali radikal $\text{L}\cdot$ u koraku propagacije reagira s drugom molekulom kisika generirajući hidroperoksidni radikal koji u nastavku reakcije daje lipidni radikal i lipidni hidroperoksid



Raspadom lipidnog hidroperoksida nastaje MDA. Prema tome, jednadžba ukupne reakcije glasi



Zakoni brzina reakcija jednaki su

$$\frac{dc(L \cdot)}{dt} = k_1 c(O_2) \quad (4.4.4.)$$

$$\frac{dc(O_2)}{dt} = -k_1 c(O_2) - k_2 c(L \cdot) c(O_2). \quad (4.4.5.)$$

Supstituiranjem, rješavanjem sustava dvije jednadžbe s dvije nepoznanice i integriranjem po vremenu, dobiva se izraz koji opisuje vremensku promjenu koncentracije lipidnog radikala

$$\frac{dc(L \cdot)}{dt} = -k_1 c(L \cdot) - \frac{k_2}{2} c^2(L \cdot) + A. \quad (4.4.6.)$$

Uz pretpostavku da je u $t = 0$ koncentracija lipidnog radikala jednaka nuli i uvrštavanjem u diferencijalnu jednadžbu 1. reda, izraz (4.4.6.) postaje

$$\frac{dc(L \cdot)}{dt} = k_1 c_0(O_2) - k_1 c(L \cdot) - \frac{k_2}{2} c^2(L \cdot). \quad (4.4.7.)$$

Rješavanjem diferencijalne jednadžbe (4.4.7.), dobiva se izraz

$$c(L \cdot) = x_2 + \frac{x_2(x_1 - x_2)}{x_2 - x_1 e^{\frac{-k_2}{2}(x_1 - x_2)t}}, \quad (4.4.8.)$$

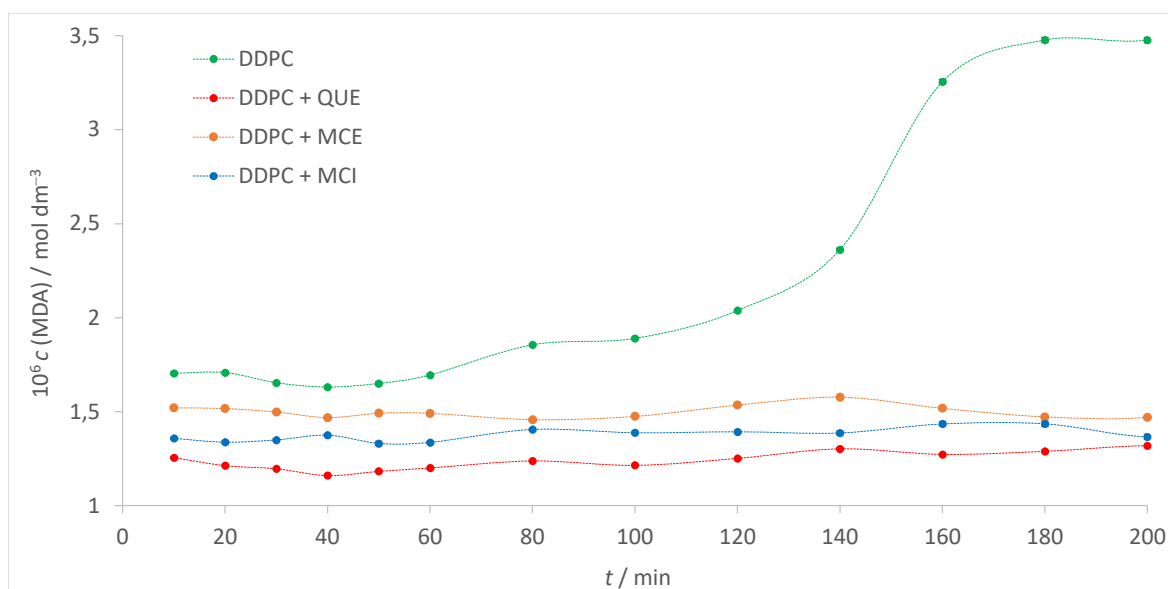
gdje je

$$x_{1,2} = -\frac{k_1}{k_2} \pm \frac{1}{2} \sqrt{\frac{4k_1^2}{k_2^2} + \frac{8k_1}{k_2} c_0(O_2)}. \quad (4.4.9.)$$

Izraz (4.4.8.) opisuje krivulju sigmoidalnog oblika. Treba napomenuti da koncentracija lipidnog radikala nije jednaka koncentraciji MDA praćenju spektrofotometrijski. Međutim, TBA, osim

s MDA, može reagirati i s lipidnim radikalima nastalim tijekom peroksidacije.⁴²⁵ Iz tog se razloga očekuje da će i koncentracija ekvivalenata MDA pratiti sigmoidalnu ovisnost.

Analogni eksperimenti provedeni su i za liposome s ugrađenim flavonoidima.



Slika 4.4.14. Vremenska ovisnost koncentracije nastalog MDA tijekom lipidne peroksidacije DDPC liposoma prije i nakon ugradnje flavonoida, $\vartheta = 25$ °C.

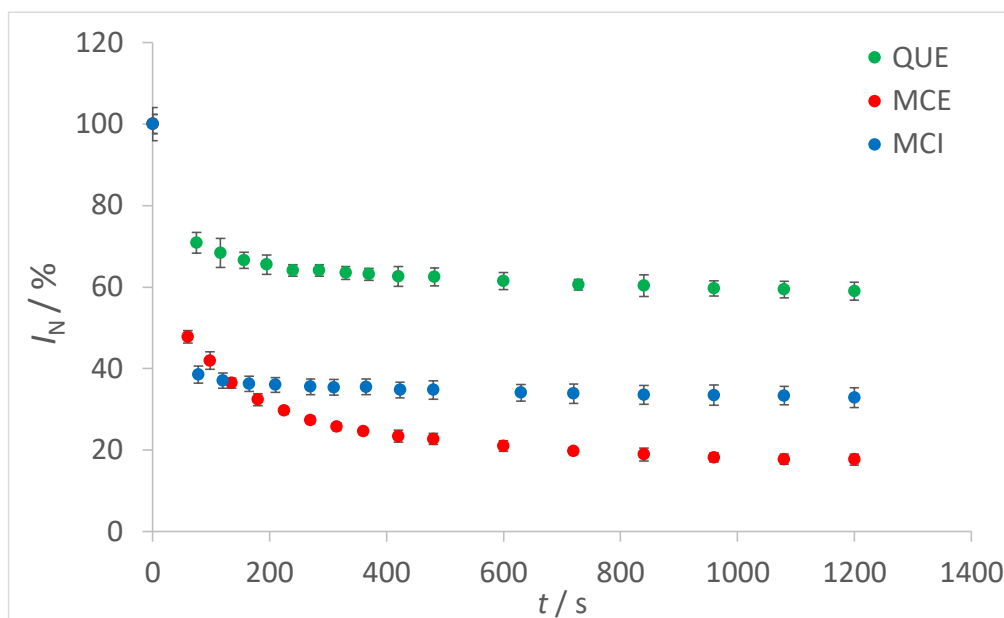
Iz prikazanih krivulja vidljivo je da lipidna peroksidacija ne prati isti mehanizam kao prije ugradnje flavonoida, već da dolazi do inhibicije reakcije, pri čemu je količina nastalog produkta približno jednaka u cijelom vremenskom rasponu. Količina nastalog produkta u prisutnosti flavonoida manja je u odnosu na količinu nastalu peroksidacija DDPC liposoma bez ugrađenih flavonoida, što ukazuje na njihovu zaštitnu ulogu.

4.5. Nestabilnost flavonoida u fiziološkim uvjetima

4.5.1. Efikasnost uklanjanja radikala

Većina istraživanja antioksidativne aktivnosti flavonoida provedena je u uljima, emulzijama i lipoproteinima niske gustoće, pri čemu se, ovisno o korištenom mediju, rezultati razlikuju.^{426,427} Primjerice, MCE je pokazao veću antioksidativnu aktivnost od QUE u istraživanju oksidativnih procesa u ulju, dok je obrnuti efekt primijećen u liposomima pripremljenim od ribljih fosfolipida.^{428,429} S obzirom na to da se antioksidativna aktivnost QUE, MCE i MCI temelji na

sposobnosti uklanjanja radikala, EPR eksperimentima određena je količina radikala koju pojedini flavonoid može ukloniti u određenom vremenskom periodu. Signal u EPR spektru potječe od DPPH radikala te se dodatkom flavonoida u vremenu intenzitet signala smanjuje, ovisno o efikasnosti uklanjanja radikala pojedinog flavonoida.

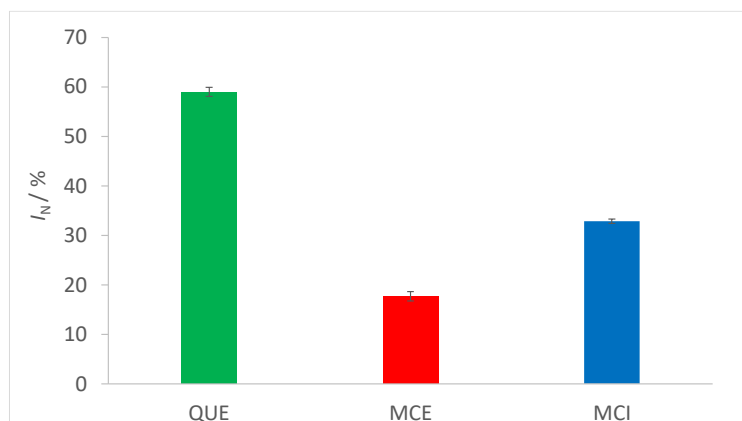


Slika 4.5.1. Vremenska ovisnost normiranog intenziteta EPR signala DPPH radikala za sva tri flavonoida.

S obzirom na to da nakon 20 minuta snimanja integrirani EPR intenziteti postižu stalnu vrijednost, uspoređena je efikasnost uklanjanja radikala pojedinih flavonoida u $t = 1200$ s.

Tablica 4.5.1. Normirani intenziteti EPR signala u trenutku $t = 1200$ s za sva tri flavonoida.

uzorak	$I_N / \%$
QUE	$59,0 \pm 0,9$
MCE	$17,7 \pm 0,9$
MCI	$32,9 \pm 0,4$



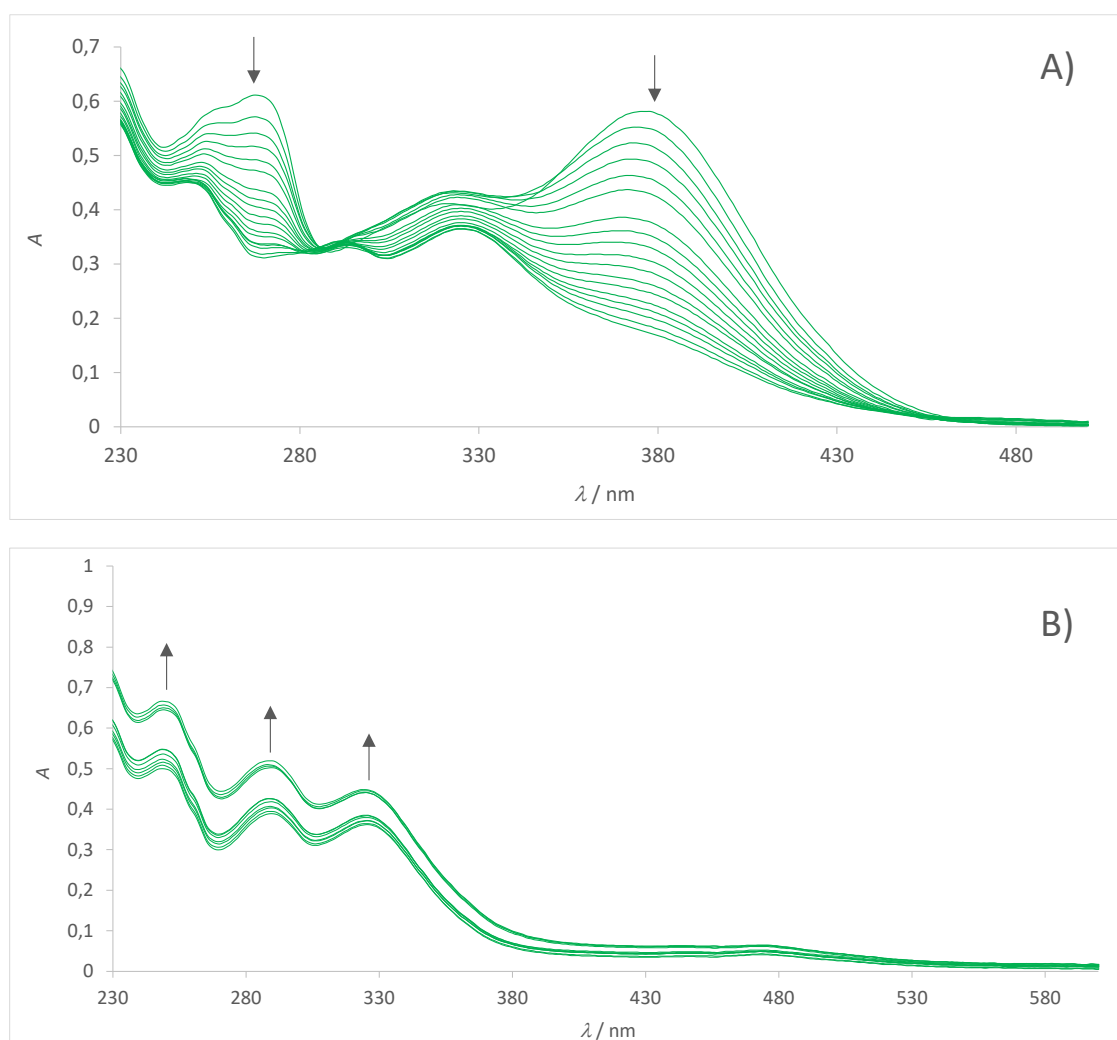
Slika 4.5.2. Normirani intenziteti EPR signala u trenutku $t = 1200$ s za sva tri flavonoida.

Iz rezultata je vidljivo da MCE uklanja najveću količinu radikala, odnosno pokazuje najjaču antioksidativnu aktivnost. Najslabiju antioksidativnu aktivnost posjeduje QUE. Takav rezultat u skladu je s očekivanjima, s obzirom na to da MCE i MCI posjeduju jednu hidroksilnu skupinu više u odnosu na QUE. Izravno uklanjanje radikala pripisuje se postojanju hidroksilnih skupina u strukturi flavonoida te su u pravilu bolji antioksidansi spojevi koji posjeduju veći broj hidroksilnih skupina.¹⁸⁸ Šećerna skupina u strukturi MCI ne sudjeluje izravno u uklanjanju radikala te su ovi rezultati u skladu s literaturnim podacima prema kojima flavonoidi u svojoj glikoziliranoj formi pokazuju slabiju antioksidativnu aktivnost u odnosu na aglikonsku formu.¹⁹¹ S druge strane, šećerna je skupina ključna za pozicioniranje flavonoida unutar membrane. Ovi rezultati još su jedna potvrda da antioksidativna aktivnost spojeva ugrađenih u membranu ovisi o njihovom smještaju unutar dvosloja te se ne može predvidjeti samo na temelju sposobnosti izravnog uklanjanja radikala u otopini. Razlika u antioksidativnoj aktivnosti koja se javlja u odnosu na eksperimente s liposomima posljedica je i različitog mehanizma antioksidativnog djelovanja. Osim direktnog uklanjanja, poznato je da flavonoidi membranu štite i stvaranjem kelatnih kompleksa s metalnim ionima korištenima u Fentonovoj reakciji za iniciranje lipidne peroksidacije.²¹⁹

4.5.2. Kinetika raspada kvercetina

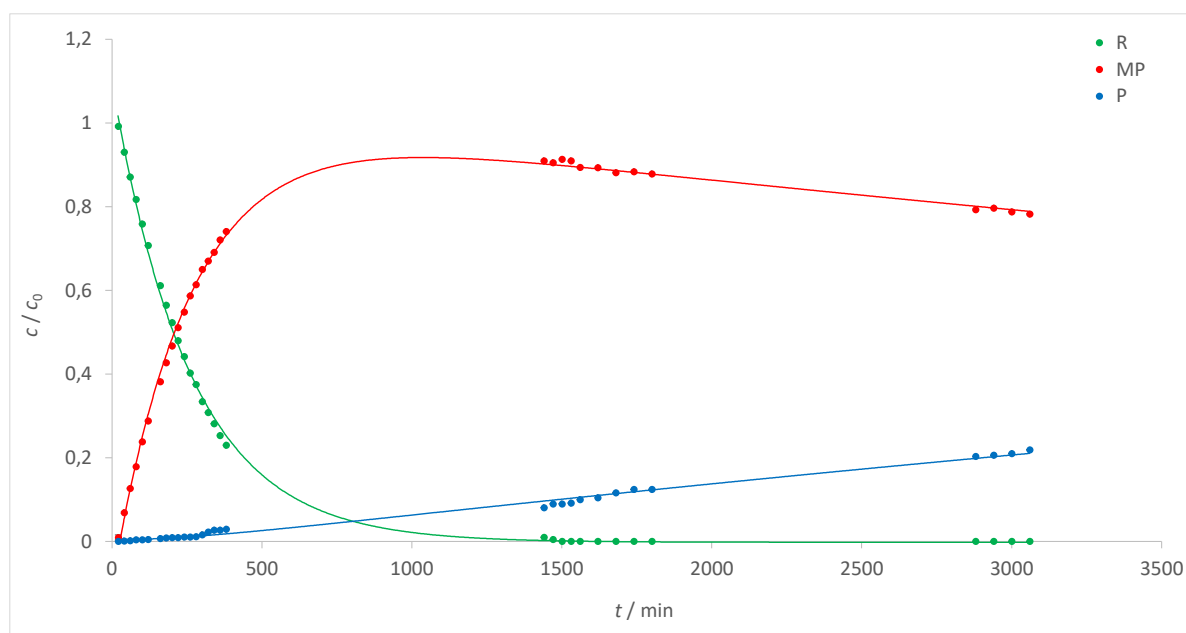
Flavonoidi su u vodenim otopinama nestabilni, što rezultira njihovim raspadom, odnosno smanjenjem koncentracije. Za velik broj flavonoida potvrđeno je da njihov raspad prati kinetiku prvog reda.^{430,431} U slučaju QUE, raspad uključuje oksidaciju, hidroksilaciju i uklanjanje prstenova u strukturi.^{432,433} U literaturi je predloženo nekoliko različitih mehanizama raspada

QUE. Primjerice, Zhou i suradnici⁴³⁴ uočili su da tijekom elektrokemijskog raspada QUE, nakon hidroksilacije na C2 položaju može doći do pucanja O1–C2, C2–C3 ili C3–C4 veze i posljedičnog otvaranja prstena. U slučaju raspada QUE predložen je velik broj međuprodukata. Brown i suradnici⁴³⁵ koristili su izotopno obilježen kisik za istraživanje raspada QUE te predložili nastanak oksohidroperoksidnog međuprodukta nakon čega slijedi nukleofilni napad na ugljikov atom na položaju C4. U literaturi je poznat velik broj istraživanja raspada QUE u različitim uvjetima te uz različite načine inicijacije, uključujući radiolizu⁴³⁶, katalitičke⁴³⁷ i fotoinducirane reakcije.⁴³⁸ U ovom radu, s obzirom na to da se radi o autooksidaciji QUE pri fiziološkoj temperaturi i pH-vrijednosti, očekuje se jednostavniji mehanizam.



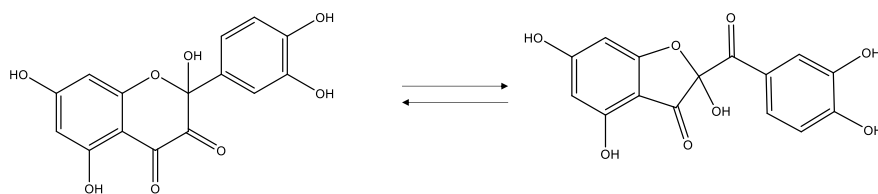
Slika 4.5.3. Kinetika raspada QUE ($c = 4 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u puferiranoj fiziološkoj otopini (pH = 7,4) tijekom A) prvih 24 h, B) preostalih 26 h; $l = 1 \text{ cm}$, $\vartheta = 37 \text{ }^\circ\text{C}$.

S obzirom na to da je oksidacija kvercetina provedena u sustavu zasićenom kisikom, može se pretpostaviti je koncentracija kisika stalna i mnogo veća u odnosu na koncentraciju kvercetina. Prema tome, raspad se može opisati modelom kinetike pseudo-prvog reda. Iz spektara se može uočiti da dolazi do smanjenja apsorbancija vrpce pri $\lambda = 377$ nm. Nakon duljeg vremena, $t = 24$ h, dolazi do potpunog pomaka maksimuma prema nižim valnim duljinama. Pojavljivanje novih maksimuma pri $\lambda = 290$ nm i $\lambda = 254$ nm u skladu je s literaturom te je indikacija raspada B i C prstenova.⁴³⁴ Porast apsorbancije na nižim valnim duljinama tipičan je za adukte s molekulom vode. Pretpostavlja se da kinetiku reakcije određuje jednoelektronska oksidacija aniona kvercetina, nakon koje slijedi reakcija disproporcioniranja radikala i adicija vode na nastale kinone.⁴³⁹ Iz dobivenih rezultata vidljivo je da se reakcija odvija u dva koraka.



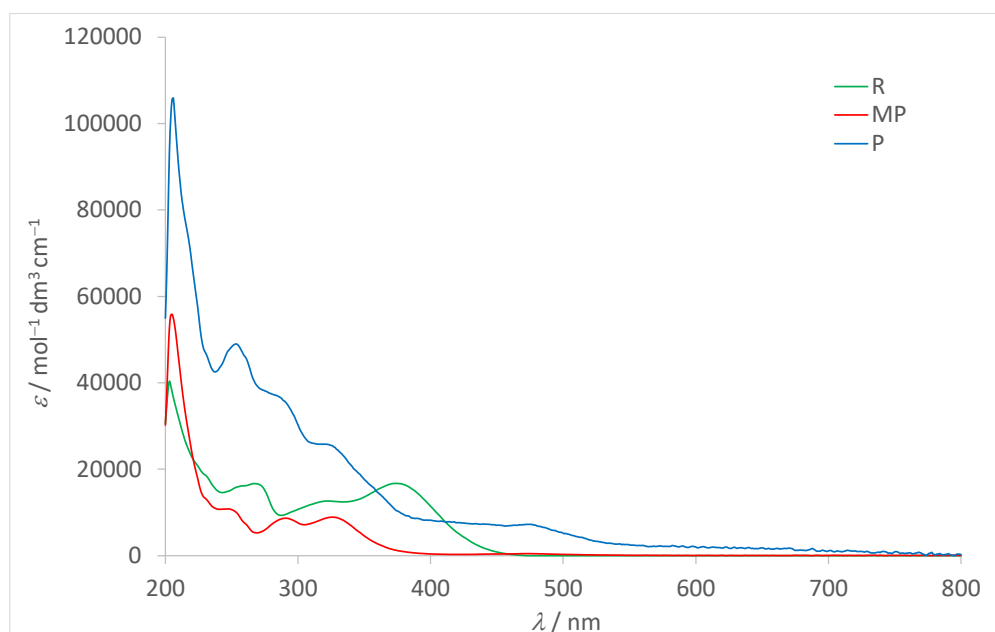
Slika 4.5.4. Koncentracijski profili reaktanta (R), međuprodukta (MP) i produkta (P) reakcije raspada QUE ($c = 4 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³) u puferiranoj fiziološkoj otopini (pH = 7,4) pri $\theta = 37$ °C.

Na slici 4.5.4. prikazani su koncentracijski profili reaktanta, međuprodukta i produkta reakcije raspada QUE te krivulje korištene za opis eksperimentalno dobivenih podataka. Eksperimentalni podaci pokazuju dobro slaganje s modelom kinetike pseudo-prvog reda. Pretpostavlja se da je međuprodukt u ovom slučaju kinon s adiranom vodom.



Slika 4.5.5. Predloženi međuprodukt reakcije raspada QUE u puferiranoj fiziološkoj otopini (pH = 7,4).

Iz koncentracijskog profila reaktanata određen je koeficijent brzine prvog koraka reakcije koji iznosi $k_1 = (3,84 \pm 0,05) \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, pri čemu vrijeme polureakcije iznosi $t_{1/2} = (180,5 \pm 2,4) \text{ min}$. Sličan koeficijent brzine reakcije dobili su i El Hajji i suradnici⁴⁴⁰ pri usporedivim uvjetima ($k = (3,45 \pm 0,02) \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$). Koeficijent brzine drugog koraka nije bilo moguće utočniti jer se koncentracija produkta nakon $t \approx 50 \text{ h}$ i dalje linearno mijenja. Iz tog razloga postoji zavisnost između apsolutnih vrijednosti molarnih apsorpcijskih koeficijenata i koeficijenta brzine reakcije te širok raspon koeficijenata podjednako dobro opisuje eksperimentalne podatke. Procijenjen je red veličine koeficijenta brzine drugog koraka koji iznosi $k_2 \approx 10^{-5} \text{ min}^{-1}$. Uz koeficijente brzine, procijenjeni su i karakteristični spektri svakog sudionika reakcije.

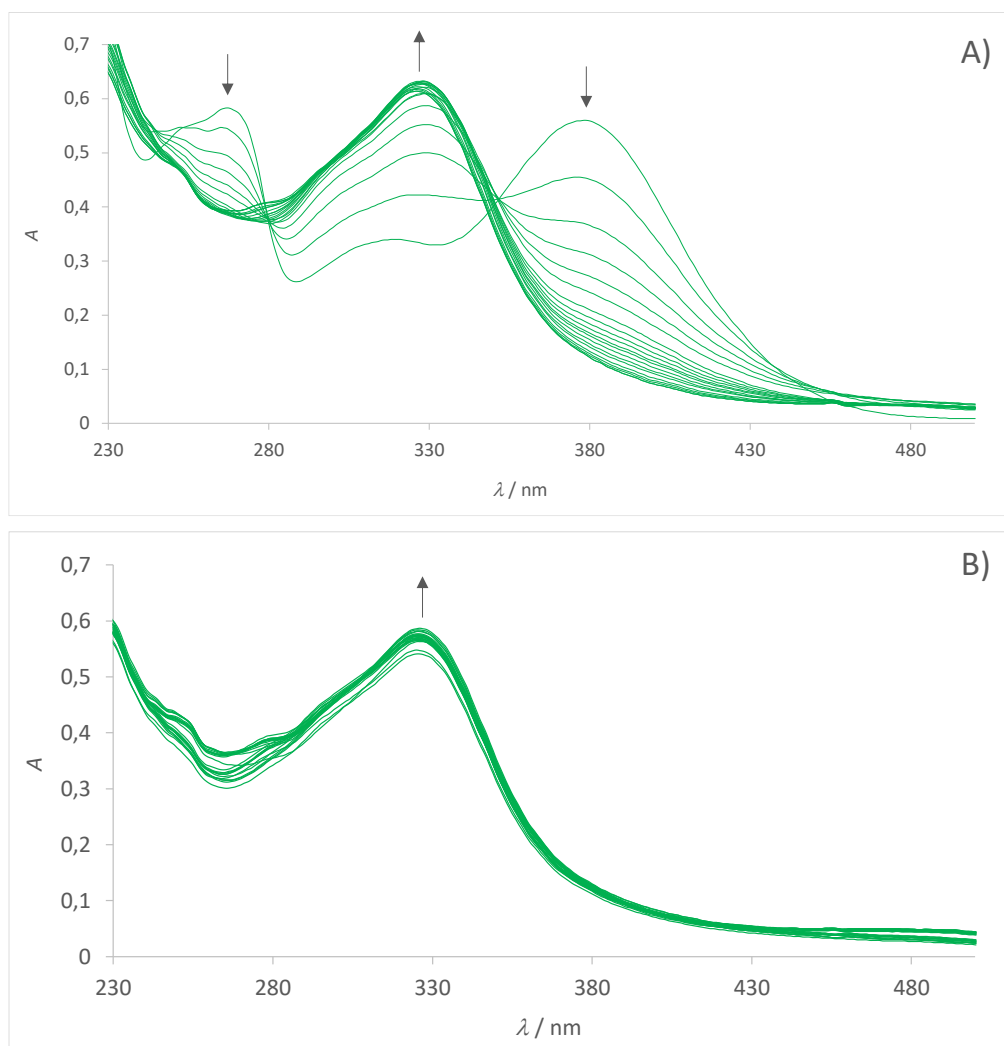


Slika 4.5.6. Karakteristični spektri reaktanta (R), međuprodukta (MP) i produkta (P) reakcije raspada QUE ($c = 4 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u puferiranoj fiziološkoj otopini (pH = 7,4); $l = 1 \text{ cm}$, $\vartheta = 37 \text{ }^\circ\text{C}$.

Iz karakterističnog spektra produkta, koji ima dugačak rep i oblik sličan funkciji raspršenja, može se zaključiti da, uz nastajanje produkta, dolazi i do njegove precipitacije, koja uzrokuje raspršenje ultraljubičastog zračenja. Navedeno također može uzrokovati poteškoće u određivanju koeficijenta brzine drugog koraka reakcije raspada kvercetina. Uz to, u literaturi je uočeno i da tijekom duljeg vremena dolazi do daljnjeg sporog raspada konačnih produkata oksidacije, poli(hidroksibenzojevih) kiselina, pri čemu nastaju fenolne karboksilne kiseline manje molekulske mase.⁴³³

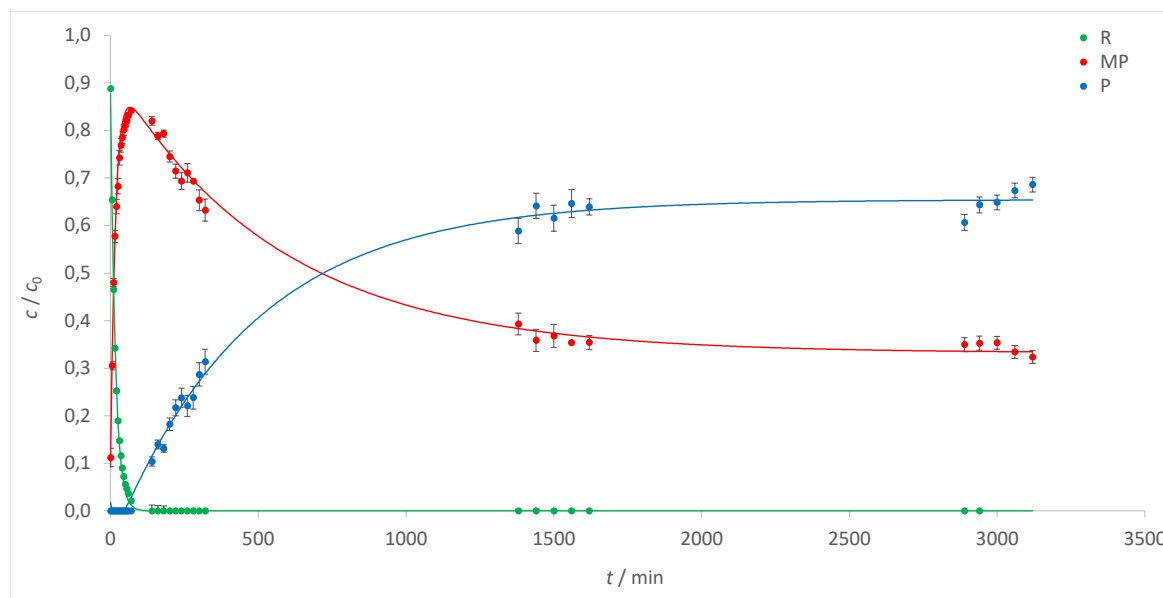
4.5.3. Kinetika raspada miricetina

Kinetika raspada MCE u literaturi je manje istraživana u odnosu na kinetiku raspada QUE. S obzirom na to da je jedina strukturna razlika jedna hidroksilna skupina, pretpostavlja se da tijekom raspada MCE dolazi do procesa analognih onima pri raspadu QUE. Lin i suradnici⁴⁴¹ proučavali su metabolizam MCE u štakorima. Uočeno je da, nakon unosa MCE, dolazi do metilacije, glukuronidacije i pucanja fenolnog prstena. Neki od identificiranih produkata su 3,4,5-trihidroksifeniloctena kiselina, MCE monoglukuronid te višestruko metilirani MCE.



Slika 4.5.7. Kinetika raspada MCE ($c = 4 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u puferiranoj fiziološkoj otopini (pH = 7,4) tijekom A) prvih 24 h, B) preostalih 26 h pri $\vartheta = 37 \text{ }^\circ\text{C}$.

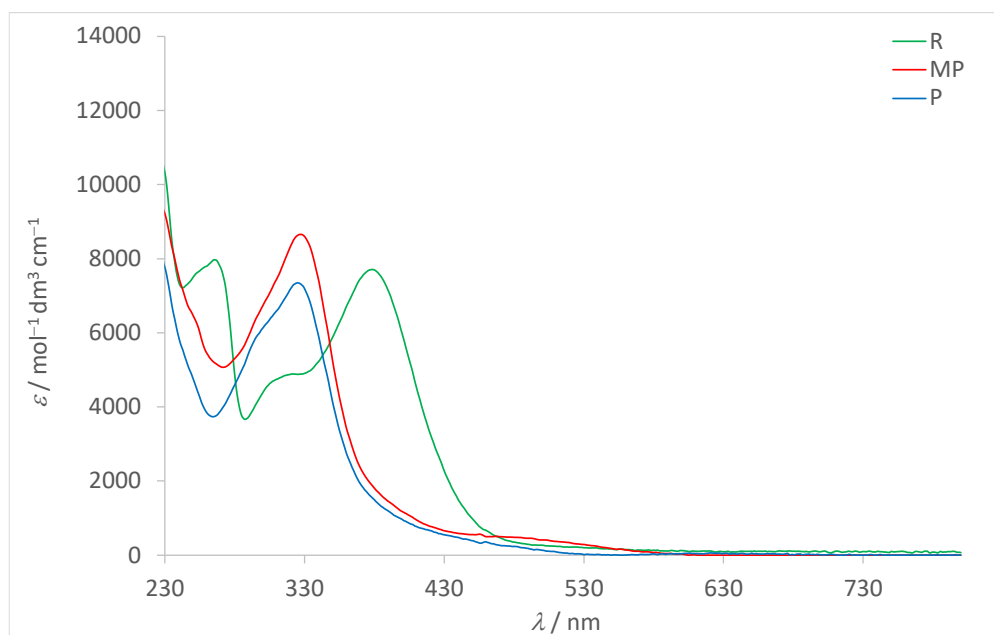
Na slici 4.5.7 prikazana je vremenska ovisnost spektara MCE. Kao i slučaju raspada QUE, i raspad MCE odvija se u dva koraka, na što ukazuje pomak izosbestičke točke u spektrima.



Slika 4.5.8. Koncentracijski profili reaktanta (R), međuprodukta (MP) i produkta (P) reakcije raspada MCE ($c = 4 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u puferiranoj fiziološkoj otopini ($\text{pH} = 7,4$) pri $\vartheta = 37 \text{ }^\circ\text{C}$.

Ekperimentalni podaci mogu se opisati modelom kinetike pseudo-prvog reda, što je u skladu s literaturnim podacima.⁴⁴² Uz to, iz rezultata je vidljivo da je oksidacija MCE znatno brža u odnosu na oksidaciju QUE. Yao i suradnici⁴⁴³ pratili su raspad MCE pri različitim pH-vrijednostima, no koeficijent brzine raspada uspješno su odredili samo u kiselim uvjetima, dok je pri $\text{pH} = 7,4$ raspad bio prebrz za detekciju. Nadalje, Cai i suradnici¹⁸⁷ pratili su antioksidativno djelovanje velikog broja flavonoida. Iako MCE posjeduje jednu hidroksilnu skupinu više u odnosu na QUE te je za očekivati da će njegovo antioksidativno djelovanje biti izraženije, takvi rezultati nisu dobiveni. Slabija antioksidativna aktivnost pripisana je upravo nestabilnosti i brzom raspadu MCE te se pretpostavlja da je do raspada došlo tijekom samog mjerenja, što je onemogućilo precizno određivanje antioksidativnog djelovanja. Chobot i suradnici⁴⁴⁴ pulsnom su voltametrijom također zaključili da hidroksilacija B prstena omogućava bržu oksidaciju MCE u odnosu na flavonoide s manjim stupnjem hidroksilacije. Konačno, Zhu i suradnici⁴⁴⁵ istraživali su stabilnost flavonoida pri $\text{pH} = 7,4$ te zaključili da je MCE mnogo nestabilniji od QUE, pri čemu do potpunog raspada MCE dolazi nakon $t = 1 \text{ h}$, dok se u istom periodu raspadne samo 20% QUE. Na slici 4.5.8. vidljivo je da i u našim mjerenjima u usporedivom vremenskom periodu koncentracija reaktanta pada na 0. Određen je koeficijent brzine prvog koraka reakcije te iznosi $k_1 = (6,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, uz vrijeme polureakcije $t_{1/2} = (11,5 \pm 0,3) \text{ min}$. S obzirom na to da je cijeli raspad znatno brži u odnosu na

QUE, bilo je moguće odrediti i koeficijent brzine drugog koraka reakcije koji iznosi $k_2 = (3,69 \pm 0,07) \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ($t_{1/2} = (187,8 \pm 3,6) \text{ min}$). Ovakvi rezultati u skladu su s dobivenom efikasnosti uklanjanja radikala, gdje je MCE u jednakom vremenu uklonio veću količinu radikala u odnosu na QUE.



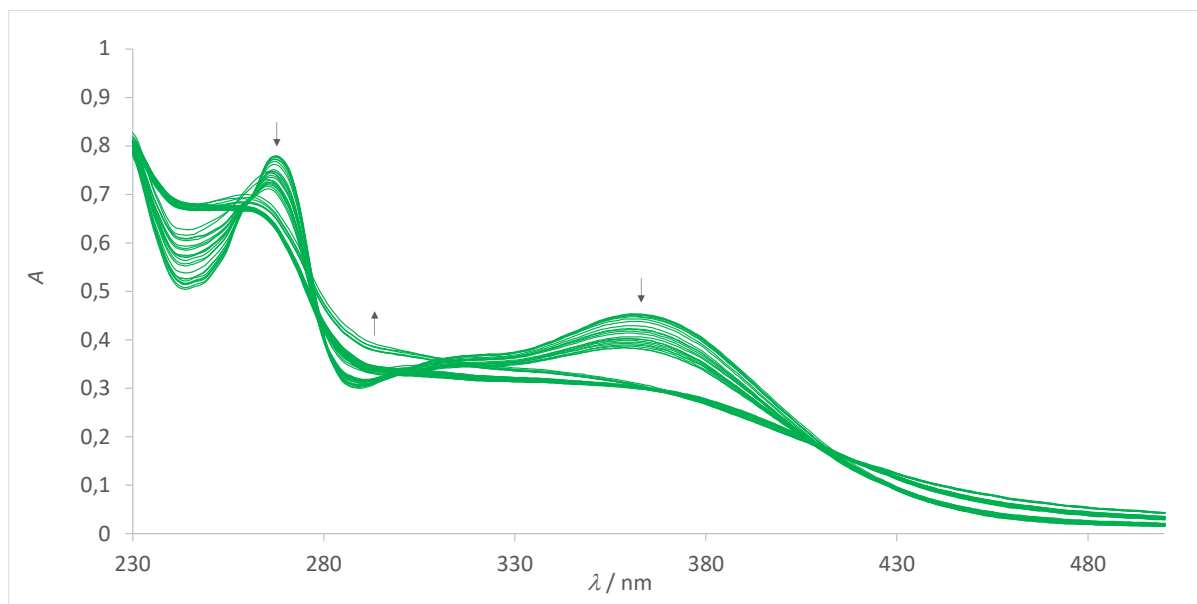
Slika 4.5.9. Karakteristični spektri reaktanta (R), međuprodukta (MP) i produkta (P) reakcije raspada MCE ($c = 4 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u puferiranoj fiziološkoj otopini (pH = 7,4); $l = 1 \text{ cm}$, $\vartheta = 37 \text{ }^\circ\text{C}$.

Iz karakterističnih spektara vidljivo je da do porasta apsorpcije pri $\lambda = 500 \text{ nm}$ koji se u slučaju QUE javlja kod produkta, kod MCE dolazi već kod međuprodukta. Na temelju tog, postoji mogućnost da je međuprodukt MCE analogan produktu QUE koji se dalje raspada.

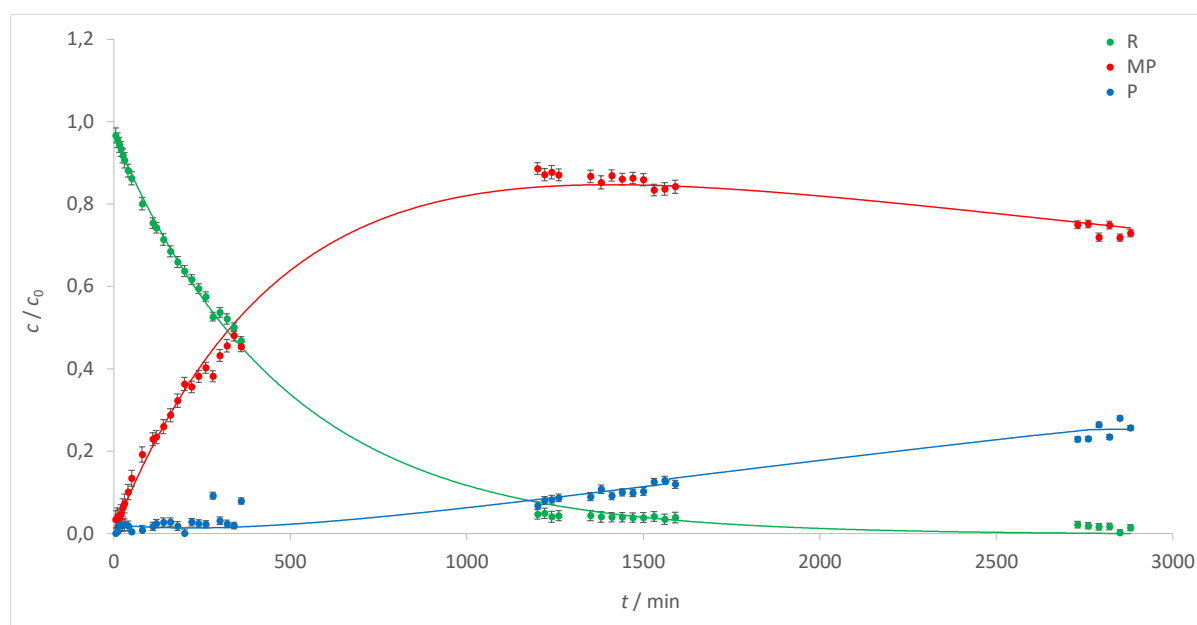
4.5.4. Kinetika raspada miricitrina

Raspad MCI najmanje je istraživao od svih korištenih flavonoida. Yokomizo i Moriwaki²⁴⁴ u sklopu istraživanja antioksidativne aktivnosti MCI istražili su i stabilnost pri različitim pH-vrijednostima. Slično kao i njegova aglikonska struktura MCE, i MCI se pokazao stabilnim pri nižim pH-vrijednostima, dok u blago lužnatim uvjetima (pH = 7,4–8,5) dolazi do raspada. Međutim, pokazano je i da produkti raspada također pokazuju antioksidativno djelovanje, što

je ključno za primjenu MCI u biomedicini. Općenito je uočeno da je antioksidativno djelovanje MCI slabije u odnosu na MCE.⁴⁴⁶

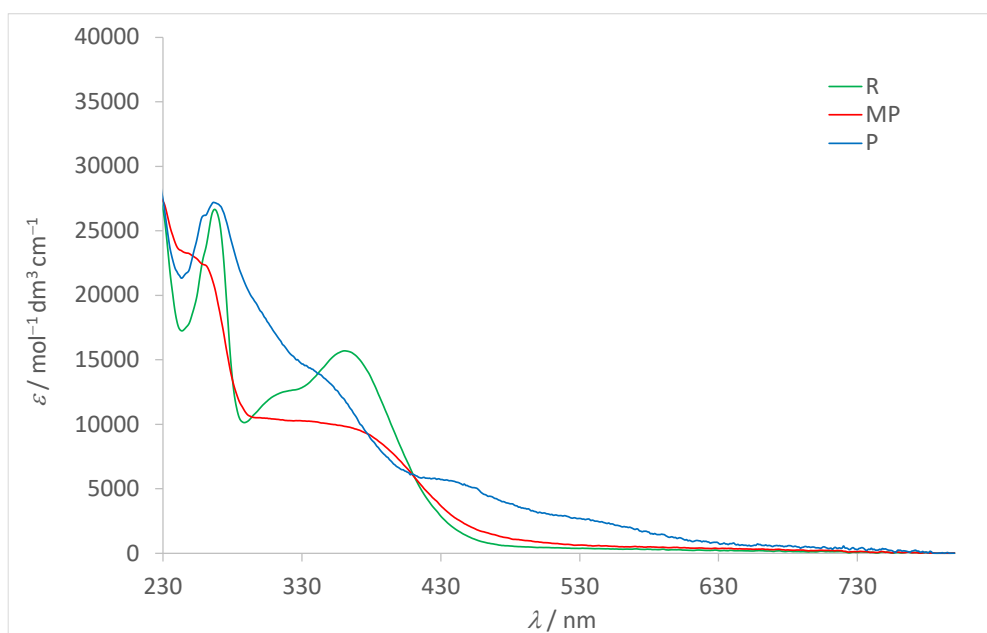


Slika 4.5.10. Kinetika raspada MCI ($c = 4 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u puferiranoj fiziološkoj otopini (pH = 7,4); $l = 1 \text{ cm}$, $\vartheta = 37 \text{ }^\circ\text{C}$.



Slika 4.5.11. Koncentracijski profili reaktanta (R), međuprodukta (MP) i produkta (P) reakcije raspada MCE ($c = 4 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u puferiranoj fiziološkoj otopini (pH = 7,4) pri $\vartheta = 37 \text{ }^\circ\text{C}$.

Iz vremenske ovisnosti spektara MCI vidljivo je da su promjene manje izražene u odnosu na QUE i MCI. Eksperimentalni podaci, kao i u slučaju preostala dva flavonoida, prate model kinetike pseudo-prvog reda. Koeficijent brzine prvog koraka raspada MCI iznosi $k_1 = (2,19 \pm 0,07) \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, pri čemu je vrijeme poluraspada $t_{1/2} = (316,5 \pm 10,1) \text{ min}$. Prvi korak raspada MCI najsporiji je od sva tri promatrana flavonoida. Pretpostavlja se da je uzrok sporijeg raspada prisutnost šećerne skupine koja za posljedicu ima povećanje energije hidratacije u odnosu na aglikonski oblik MCE. Usporedbom s mjerenjima efikasnosti uklanjanja radikala QUE i MCI, vidljivo je da dolazi do odstupanja u rezultatima, odnosno MCI, iako učinkovitiji antioksidans od QUE u etanolu, pokazuje sporiju oksidaciju u puferiranoj fiziološkoj otopini. Prema tome, izbor otapala znatno utječe na sam proces oksidacije. Pretpostavlja se da je solvatacijsku sferu MCI lakše narušiti u nepolarnom otapalu te je samim time doprinos energije solvatacije manje izražen. Također postoji mogućnost da šećerna skupina na MCI stvara vodikove veze s nitro-skupinama DPPH te na taj način smanjuje energiju aktivacije za uklanjanje radikala.



Slika 4.5.12. Karakteristični spektri reaktanta (R), međuprodukta (MP) i produkta (P) reakcije raspada MCI ($c = 4 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u puferiranoj fiziološkoj otopini (pH = 7,4) pri $\vartheta = 37 \text{ }^\circ\text{C}$.

Iz karakterističnih spektara vidljivo je da u prvom koraku dolazi do smanjenja intenziteta signala u rasponu valnih duljina $\lambda = (300\text{--}430) \text{ nm}$, dok u drugom koraku dolazi do povećanja

intenziteta pri svim valnim duljinama. Kao i u slučaju QUE, javlja se rep u spektru produkta karakterističan za raspršenje zračenja.

4.6. Sinteza i karakterizacija nanonosča

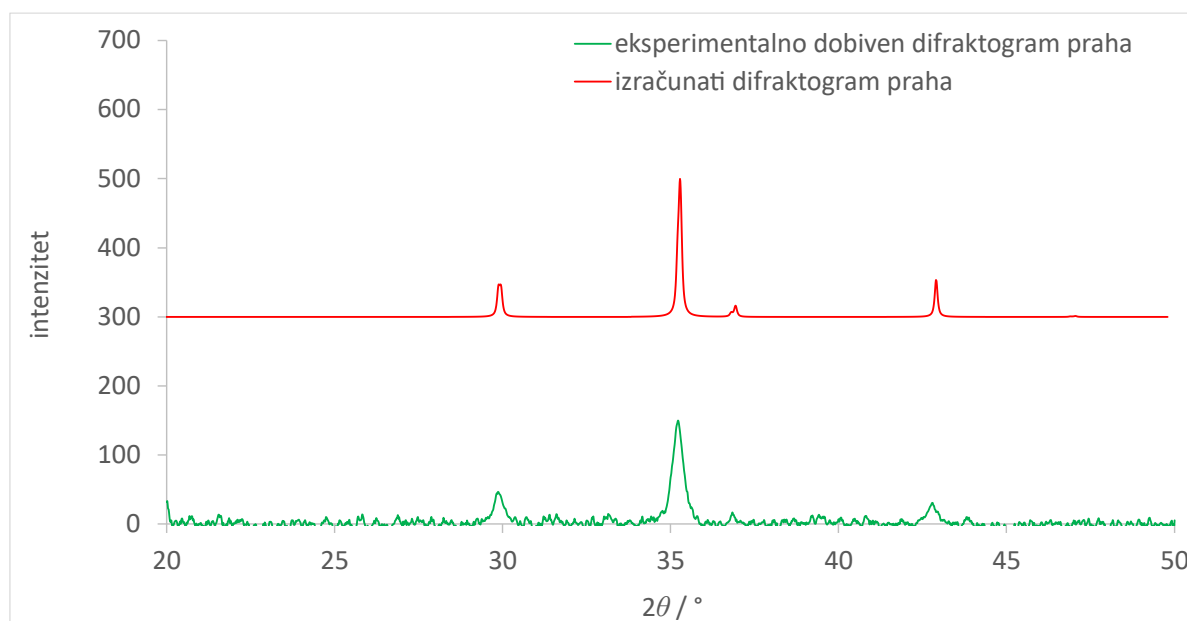
Nanočestice magnetita sintetizirane su solvotermalnom metodom. Prosječna dobivena masa po sintezi iznosi $m \approx (230 \pm 12)$ mg. Flavonoidi su u nanočestice ugrađeni metodom adsorpcije.



Slika 4.6.1. Slika sintetiziranih nanočestica.

4.6.1. Rendgenska difrakcija na polikristalnom uzorku

U svrhu identifikacije, snimljen je difraktogram praha sintetiziranih nanočestica. Eksperimentalno dobiven difraktogram praha uspoređen je s difraktogramom izračunatim iz poznate strukture korištenjem programa *Mercury*⁴⁴⁷, čime je potvrđeno da se radi o magnetitu.

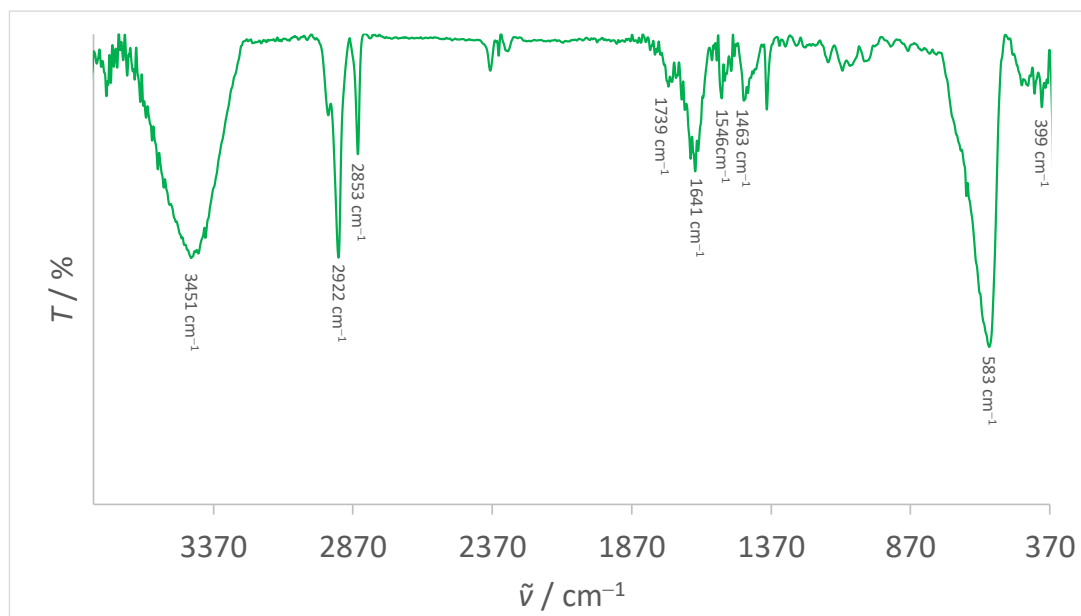


Slika 4.6.2. Usporedba eksperimentalno dobivenog difraktograma s difraktogramom izračunatim iz poznate strukture magnetita.

Karakteristični difrakcijski maksimumi javljaju se pri $2\theta = 30,205^\circ$, $2\theta = 35,515^\circ$ i $2\theta = 43,325^\circ$ te odgovaraju kristalnim plohama (220), (311) i (400). Dobiveni rezultati ukazuju na strukturu inverznog spinela koja karakterizira magnetit.⁴⁴⁸ U strukturi, O^{2-} ioni tvore plošno centriranu kubičnu rešetku, dok željezovi kationi zauzimaju intersticijska mjesta. Polovica Fe^{3+} iona smješta se u tetraedarske šupljine, dok se preostali Fe^{3+} i Fe^{2+} ioni smještaju u oktaedarske šupljine. Jedinčna ćelija sastoji se od 32 O^{2-} iona s duljinom jedinične ćelije $a = 8,389 \text{ \AA}$.⁴⁴⁹ Veličina kristalita određena je primjenom Scherrerove jednadžbe na difrakcijski maksimum pri $2\theta = 35,515^\circ$ koji je aproksimiran Lorentzovom funkcijom, u svrhu određivanja parametara Scherrerove jednadžbe. Izračunati srednji promjer kristalita iznosi $D_p = (27,83 \pm 0,45) \text{ nm}$.

4.6.2. Infracrvena spektroskopija

Infracrvena spektroskopija korištena je za karakterizaciju funkcionalnih skupina sintetiziranih nanočestica magnetita. Dobiveni spektar prikazan je na slici 4.6.3. Asignacija vrpci provedena je na temelju literaturno poznatih spektara nanočestica magnetita.⁴⁵⁰

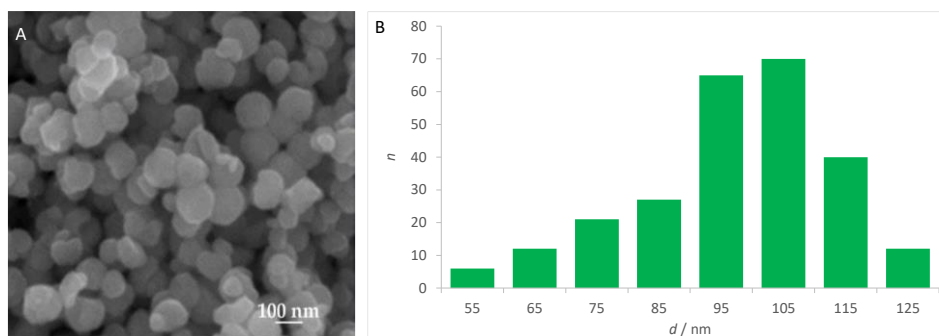


Slika 4.6.3. Infracrveni spektar sintetiziranih nanočestica magnetita.

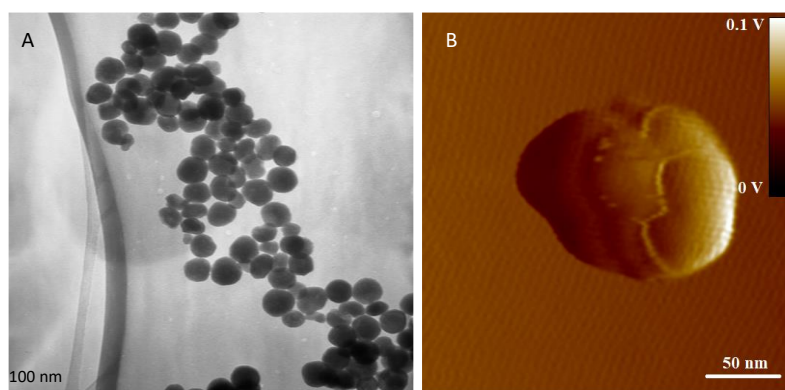
Vrpca na valnom broju $\tilde{\nu} = 3451 \text{ cm}^{-1}$ odgovara istežanjima hidroksilne skupine te potvrđuje prisutnost PEG-a u strukturi⁴⁵¹, odnosno uspješnu funkcionalizaciju. Oštre vrpce pri $\tilde{\nu} = 2922 \text{ cm}^{-1}$, $\tilde{\nu} = 2853 \text{ cm}^{-1}$ te vrpca pri $\tilde{\nu} = 1463 \text{ cm}^{-1}$ odgovaraju antisimetričnom i simetričnom istežanju $-\text{CH}_2$ skupine i savijanju hidrofobnog lanca PEG-a. Prisutnost PEG-a potvrđena je i vrpcama u rasponu $1300\text{--}1700 \text{ cm}^{-1}$ koje odgovaraju $-\text{O}-\text{CH}_2$ istežanju, $-\text{OH}$ istežanju te eterskom $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ istežanju.⁴⁵² Vrpce pri $\tilde{\nu} = 583 \text{ cm}^{-1}$ i $\tilde{\nu} = 399 \text{ cm}^{-1}$ odgovaraju simetričnom $\text{Fe}-\text{O}$ istežanju. IR spektroskopijom potvrđena je uspješna funkcionalizacija PEG-om.

4.6.3. Mikroskopijske metode

U svrhu daljnje karakterizacije, odnosno istraživanja veličine i morfologije sintetiziranih nanočestica, korištene su tri mikroskopijske metode, pretražna elektronska mikroskopija (engl. *scanning electron microscopy*, SEM), transmisijska elektronska mikroskopija (engl. *transmission electron microscopy*, TEM) i mikroskopija atomskih sila (engl. *atomic force microscopy*, AFM).



Slika 4.6.4. A) SEM mikrograf sintetiziranih nanočestica; B) histogram veličina dobiven analizom SEM mikrografa ($n = 250$).

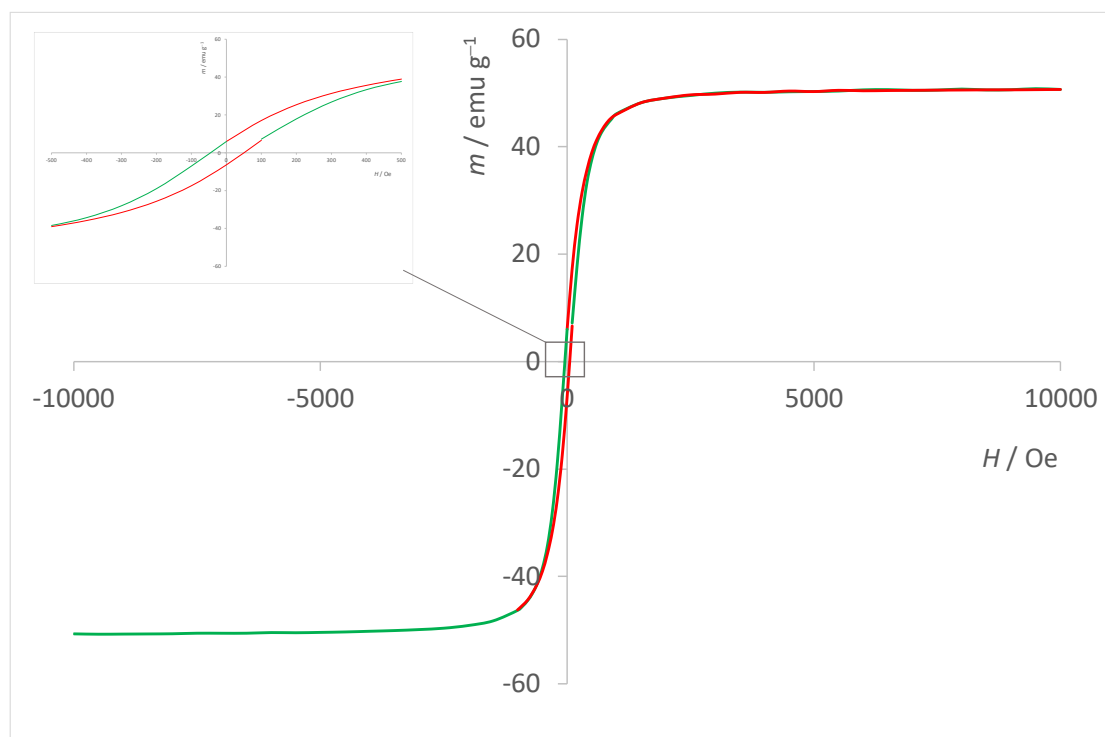


Slika 4.6.5. A) TEM mikrograf sintetiziranih nanočestica; B) AFM amplitudni prikaz sintetiziranih nanočestica.

Sintetizirane nanočestice su sfernog oblika te se uočava da, unatoč funkcionalizaciji, dolazi do agregacije. Agregacija je posljedica elektrostatskih i magnetskih interakcija između čestica. Iz histograma veličina vidljivo je da je najveći broj nanočestica promjera $d \approx 100$ nm, dok je srednja veličina dobivena TEM eksperimentima $d = (96 \pm 10)$ nm, što je u dobrom slaganju. AFM eksperimentima određena je hrapavost nanočestica koja iznosi $R_a = (11 \pm 2)$ nm, što sugerira da se lanci PEG-a ne smještaju linearno duž čestice, već dolazi do uvijanja lanaca.⁴⁵² AFM eksperimentima također je uočeno da sintetizirane nanočestice agregiraju u klustere, pri čemu su strukture unutar klastera promjera $d = (15-35)$ nm, što približno odgovara i veličini kristalita dobivenoj iz difraktograma praha.

4.6.4. Magnetska svojstva

Magnetska svojstva sintetiziranih nanočestica određena su magnetskim mjerenjima.



Slika 4.6.6. Krivulja magnetizacije sintetiziranih nanočestica magnetita.

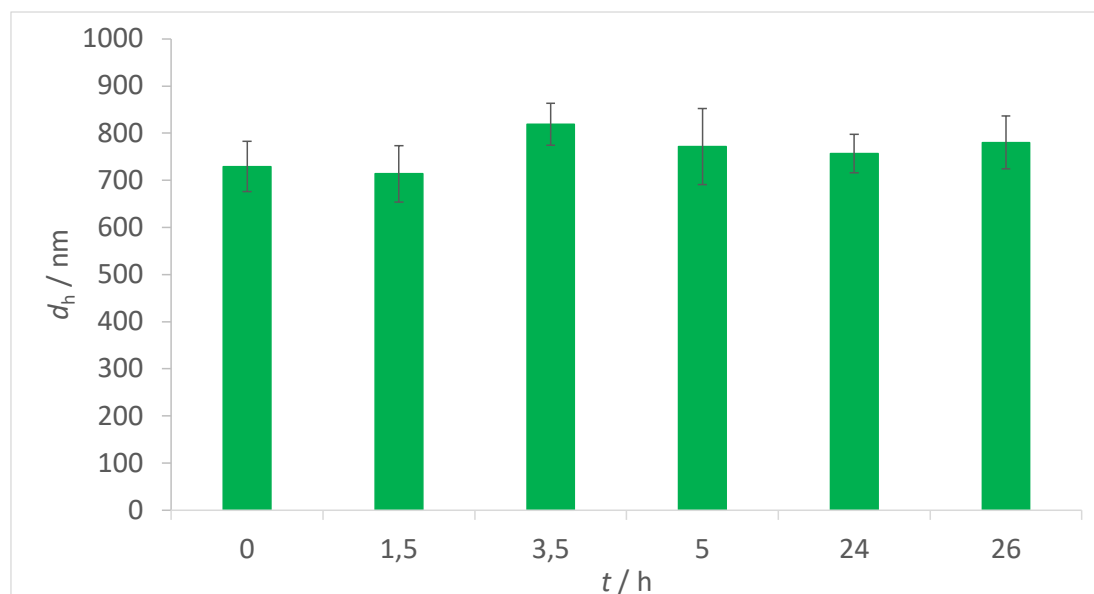
Određivanje krivulje magnetizacije podrazumijeva praćenje ovisnosti magnetizacije o primijenjenom vanjskom magnetskom polju te se iz njenog oblika mogu odrediti magnetska svojstva materijala. Površina koju krivulja u suprotnom smjeru zatvara s krivuljom koja odgovara povećanju magnetskog polja ukazuje na histerezu koja govori o količini magnetske energije pohranjene u materijalu. Prema tome, kod superparamagnetičnih materijala očekuje se izostanak histereze. Mjerenjima je dobivena sigmoidalna krivulja tipična za superparamagnetske materijale, pri čemu magnetizacija ovisi o iznosu primijenjenog magnetskog polja, ali ne i o njegovom smjeru. Histereza koja se javlja je zanemarivo mala i u skladu s literaturnim podacima za superparamagnetske nanočestice.^{453,454} Određena je magnetizacija zasićenja koja iznosi $m_s = 51 \text{ emu g}^{-1}$. Magnetska mjerenja potvrdila su superparamagnetičnost sintetiziranih nanočestica i mogućnost korištenja magnetskog polja za kontrolu otpuštanja flavonoida iz nanonosaa.

4.6.5. Agregacija nanočestica u mediju

Ekperimenti dinamičkog raspršenja svjetlosti (engl. *dynamic light scattering*, DLS) provedeni su za ispitivanje stabilnosti sintetiziranih nanočestica u puferiranoj fiziološkoj otopini (pH = 7,4). U tu je svrhu mjereno hidrodinamički promjer kroz vremenski period od $t = 26$ h kako bi se ispitala stabilnost

Tablica 4.6.1. Vremenska ovisnost hidrodinamičkog promjera sintetiziranih nanočestica magnetita ($\gamma = 0,1 \text{ g dm}^{-3}$) u puferiranoj fiziološkoj otopini (pH = 7,4) pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

t / h	d_h / nm
0	729 ± 53
1,5	714 ± 60
3,5	819 ± 45
5,0	772 ± 81
24	757 ± 41
26	780 ± 56



Slika 4.6.7. Vremenska ovisnost hidrodinamičkog promjera sintetiziranih nanočestica magnetita ($\gamma = 0,1 \text{ g dm}^{-3}$) u puferiranoj fiziološkoj otopini (pH = 7,4) pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

S obzirom na klasteriranje uočeno mikroskopskim metodama koje nastaje kao posljedica jakih elektrostatskih i magnetskih interakcija, u vodenom mediju očekuje se dodatna agregacija. Upravo to je potvrđeno DLS eksperimentima. U puferiranoj fiziološkoj otopini (pH = 7,4)

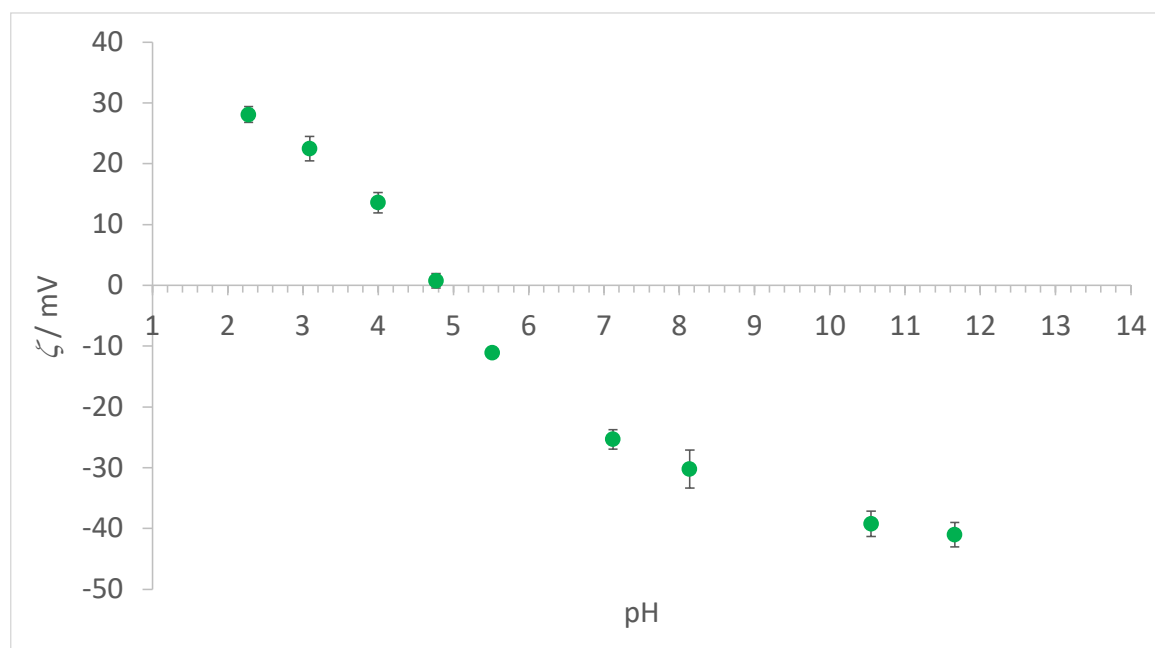
nanočestice magnetita agregiraju odmah, pri čemu vrijednost hidrodinamičkog promjera iznosi $d_h = (729 \pm 53)$ nm. Agregacija magnetita dobro je poznata u literaturi.⁴⁵⁵ Primjerice, Yallapu i suradnici⁴⁵⁰ dobili su vrlo slične rezultate za magnetitne nanočestice funkcionalizirane PEG-om, pri čemu je različit hidrodinamički promjer uočen za PEG različite molarne mase. Iako u vodenom okruženju dolazi do agregacije, suspenzija se pokazala stabilnom tijekom 26 h, odnosno s vremenom nije došlo do daljnjeg agregiranja nanočestica.

4.6.6. Izoelektrična točka

Izoelektrična točka sintetiziranih nanočestica magnetita određena je mjerenjem elektroforetske pokretljivosti u ovisnosti o pH-vrijednosti sustava. Iz elektroforetske pokretljivosti je, korištenjem modela Smoluchowskog, određena izoelektrična točka. Prema modelu električnog međupovršinskog dvosloja, izoelektrična točka je pH-vrijednost u kojoj je elektrokinetički potencijal jednak nuli te mijenja predznak.

Tablica 4.6.2. Ovisnost elektrokinetičkog potencijala nanočestica magnetita ($\gamma = 0,1 \text{ g dm}^{-3}$) o pH-vrijednosti otopine KBr ($c = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$) pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

pH	ζ / mV
2,28	28 ± 1
3,09	23 ± 2
4,00	14 ± 2
4,77	$0,8 \pm 1$
5,52	-11 ± 1
8,14	-30 ± 3
7,12	-25 ± 2
10,55	-39 ± 2
11,66	-41 ± 2



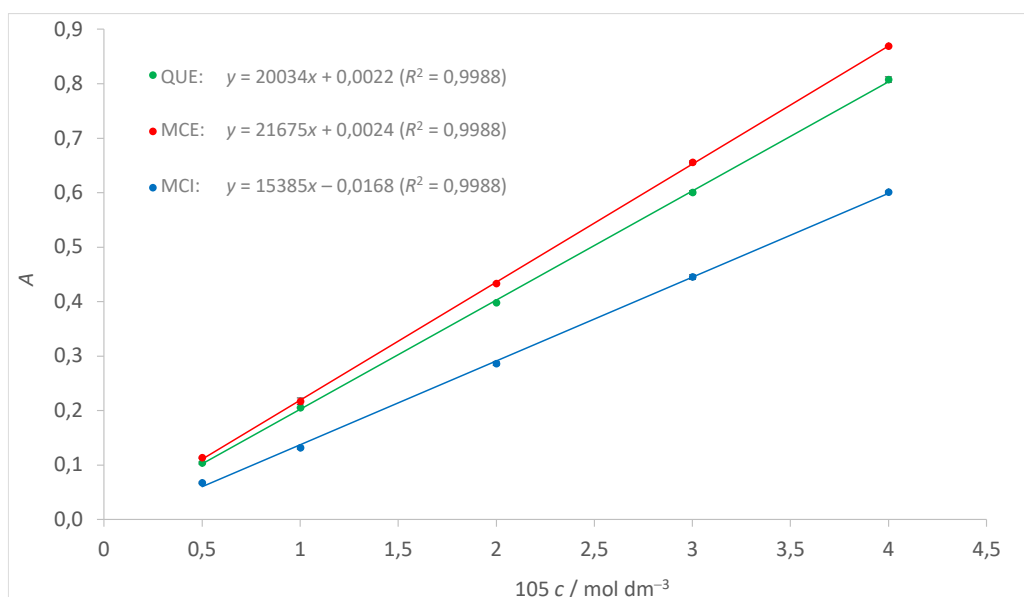
Slika 4.6.8. Ovisnost elektrokinetičkog potencijala nanočestica magnetita ($\gamma = 0,1 \text{ g dm}^{-3}$) o pH-vrijednosti otopine KBr ($c = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$) pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Izoelektrična točka sintetiziranih nanočestica jednaka je $\text{pH}_{\text{iep}} \approx 4,8$. Literaturna vrijednost izoelektrične točke nefunkcionaliziranih nanočestica magnetita uobičajeno je u rasponu $\text{pH}_{\text{iep}} = 6\text{--}8$. Funkcionalizacija dovodi do pomicanja izoelektrične točke prema nižim vrijednostima. Primjerice, Kalkan i suradnici⁴⁵⁶ uočili su da funkcionalizacija kitozonom dovodi do pomaka izoelektrične točke s $\text{pH}_{\text{iep}} = 7,91$ na $\text{pH}_{\text{iep}} = 6,86$, dok su Chang i Chen⁴⁵⁷ za isti polimer uočili pomak s $\text{pH}_{\text{iep}} = 6,70$ na $\text{pH}_{\text{iep}} = 5,95$. U literaturi je također poznato da PEG, ovisno o molarnoj masi, uzrokuje pomak izoelektrične točke. Primjerice, izoelektrična točka magnetita funkcionaliziranog PEG-om ($M_w = 1000$) iznosi $\text{pH}_{\text{iep}} = 6,4$, dok funkcionalizacija PEG-om veće molarne mase ($M_w = 8000$) pomiče izoelektričnu točku prema mnogo nižim vrijednostima, $\text{pH}_{\text{iep}} = 3,4$.⁴⁵⁸ Izraženija promjena posljedica je većeg utjecaja polimera na elektrostatske interakcije u električnom međupovršinskom sloju. Prema tome, eksperimentalno dobivena izoelektrična točka u skladu je s očekivanjima. Na temelju dobivenih rezultata, zaključeno je da je površina magnetita u puferiranoj fiziološkoj otopini ($\text{pH} = 7,4$) korištenom u eksperimentima otpuštanja lijeka negativno nabijena.

4.6.7. Ugradnja flavonoida u nanonosae

BET analiza provedena je u svrhu određivanja specifične površine i veličine pora nanočestica. Adsorpcijske i desorpcijske izoterme potvrdile su mezoporoznu strukturu čestica. Dobivena specifična površina iznosi $s = 19,3 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, dok su veličina i volumen pora jednaki $d = 24,6 \text{ nm}$ i $V = 0,11 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$. Dobivena specifična površina relativno je mala u usporedbi s literaturno poznatim nanosustavima³⁷⁶, što se pripisuje agregiranju nanočestica. S obzirom na to da su veličina i volumen pora relativno veliki, pretpostavlja se da se velik dio flavonoida, osim adsorpcije na površinu, ugrađuje i u pore.

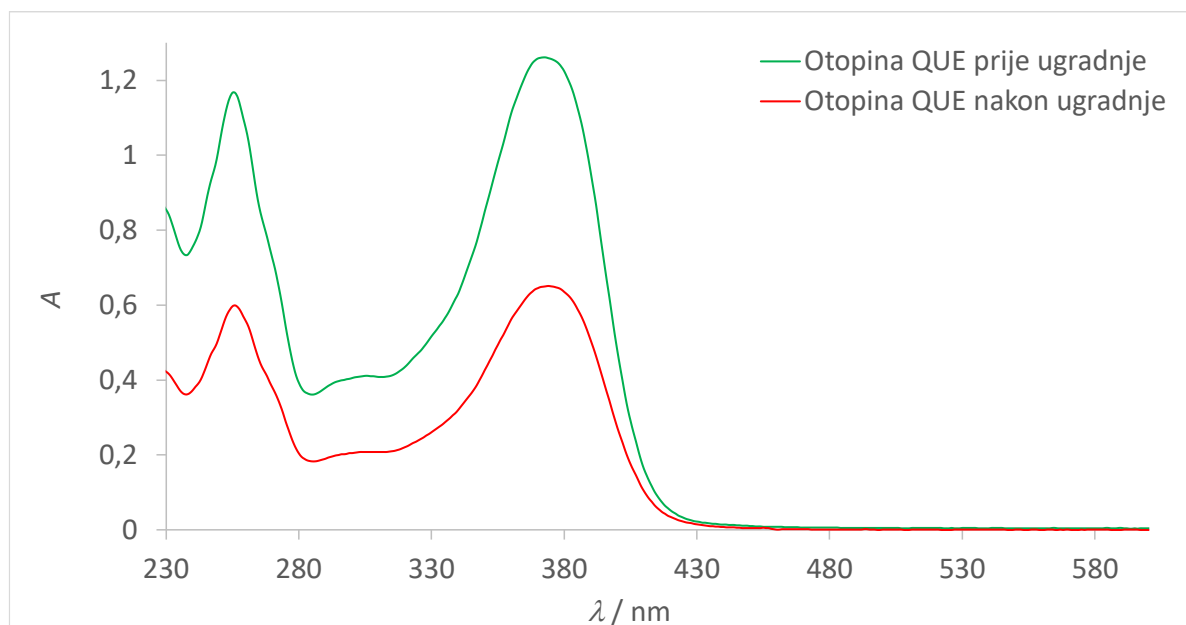
QUE, MCE i MCI ugrađeni su u nanočestice metodom adsorpcije. Nanočestice su inkubirane u koncentriranoj otopini flavonoida 24 h. Količina ugrađenog flavonoida određena je iz razlike koncentracija otopina flavonoida prije i nakon ugradnje. U svrhu računanja koncentracije, za svaki je flavonoid određen baždarni pravac te molarni apsorpcijski koeficijent u etanolu (λ_{max} (QUE) = 353 nm, λ_{max} (MCE) = 381 nm, λ_{max} (MCI) = 358 nm).



Slika 4.6.9. Baždarni pravci flavonoida u etanolu; $l = 1 \text{ cm}$, $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ (λ_{max} (QUE) = 353 nm, λ_{max} (MCE) = 381 nm, λ_{max} (MCI) = 358 nm).

Molarni apsorpcijski koeficijenti iznose $\varepsilon(\text{QUE}) = 20034 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$, $\varepsilon(\text{MCE}) = 21781 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$, $\varepsilon(\text{MCI}) = 15385 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$. Ugradnja flavonoida potvrđena je snimanjem spektara otopina flavonoida prije i nakon inkubacije. Primjeri spektara prije i nakon ugradnje

QUE prikazani su na slici 4.6.10. Na temelju baždarnih pravaca izračunate su koncentracije otopina flavonoida te je izračunata efikasnost ugradnje (engl. *loading efficiency*, *LE*).



Slika 4.6.10. UV-Vis spektri otopina QUE u etanolu prije i nakon ugradnje flavonoida u nanočestice, $l = 10$ mm, $\vartheta = 25$ °C.

Tablica 4.6.3. Efikasnost ugradnje (*LE*) flavonoida u nanočestice magnetita.

flavonoid	<i>LE</i> (%)
QUE	14 ± 2
MCE	11 ± 1
MCI	11 ± 2

Dobivene vrijednosti *LE* usporedive su s literaturno poznatim vrijednostima za slične sustave.⁴⁵⁹ Iako mala specifična površina ograničava količinu flavonoida koja se može ugraditi, dobivene vrijednosti pokazale su se dostatnima za provedbu eksperimenata otpuštanja.

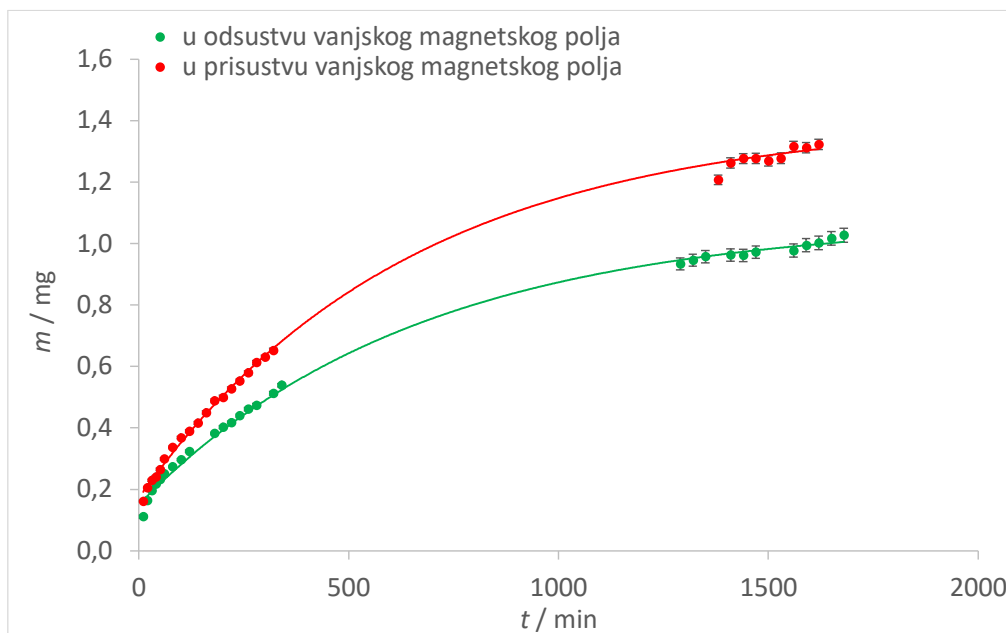
4.7. Otpuštanje flavonoida iz nanonosaa

Za opis otpuštanja flavonoida iz sintetiziranih nanočestica, eksperimentalni podaci obrađeni su korištenjem nekoliko različitih literaturno poznatih modela. Uz modele kinetike nultog i prvog reda, za opis je korišten i Korsmejer-Peppasov model s obzirom na to da mehanizam otpuštanja nije poznat. Slaganje s Korsmejer-Peppasovim modelom u literaturi je zabilježeno za velik broj sustava, uključujući i otpuštanje ibuprofena iz magnetskih nanočestica funkcionaliziranih dekstranom, kitozanom i PEG-om.⁴⁶⁰ U navedenom modelu, eksponent n daje informaciju o mehanizmu otpuštanja. U slučaju sferičnih čestica, vrijednost eksponenta $n = 0,43$, odgovara difuzijski kontroliranoj kinetici otpuštanja koja se može opisati Fickovim zakonom. Drugi granični slučaj odgovara eksponentu $n = 0,85$ te opisuje proces kontroliran relaksacijom, tzv. Case-II prijenos. Takav prijenos određen je bubrenjem i opuštanjem matrice te je neovisan o vremenu. U slučaju polimernih matrica, može doći i do tzv. super case-II prijenosa koji je kontroliran relaksacijom makromolekulskih lanaca te odgovara vrijednostima $n > 0,85$. Ukoliko eksponent n poprima vrijednost u rasponu $0,43 < n < 0,85$, mehanizam otpuštanja odgovara kombinaciji dva granična slučaja, odnosno anomalnom otpuštanju.⁴⁶¹ Anomalno otpuštanje je pojam koji se koristi kako bi se opisao niz eksperimentalno dobivenih podataka koji značajno odstupaju od klasičnih zakona difuzije.⁴⁶² Takvo ponašanje u literaturi je uočeno u slučaju gibanja molekula i telomera unutar stanice^{463,464} te elektronskih i toplinskih prijenosa.^{465,466}

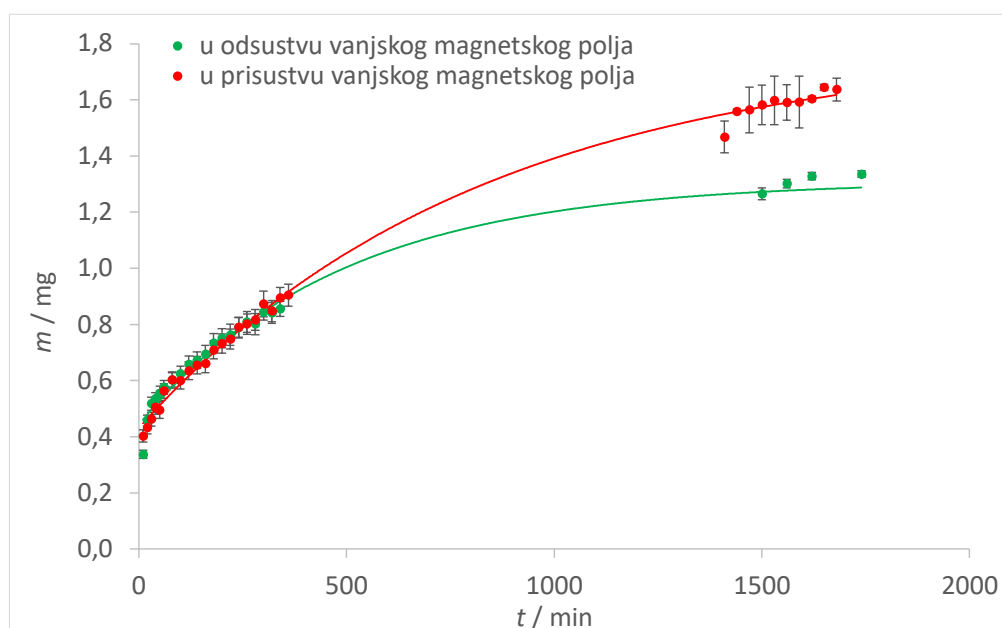
Tablica 4.7.1. Kinetički parametri otpuštanja flavonoida iz nanočestica magnetita u odsustvu i prisustvu kombinacije stalnog i oscilirajućeg magnetskog polja, $\vartheta = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

QUE						
	nulti red		prvi red		Korsmeyer-Peppasov model	
	$10^3k / \text{min}^{-1}$	R^2	$10^3k / \text{min}^{-1}$	R^2	n	R^2
$f = 0\text{ kHz}$	5 ± 2	0,9663	$1,51 \pm 0,08$	0,9968	$0,57 \pm 0,09$	0,9762
$f = 100\text{ kHz}$	$0,66 \pm 0,03$	0,9679	$1,57 \pm 0,04$	0,9992	$0,67 \pm 0,03$	0,9983
MCE						
	nulti red		prvi red		Korsmeyer-Peppasov model	
	$10^3k / \text{min}^{-1}$	R^2	$10^3k / \text{min}^{-1}$	R^2	n	R^2
$f = 0\text{ kHz}$	$0,46 \pm 0,04$	0,8951	$2,0 \pm 0,2$	0,9857	$0,32 \pm 0,02$	0,9962
$f = 100\text{ kHz}$	$0,67 \pm 0,02$	0,9763	$1,23 \pm 0,06$	0,9982	$0,54 \pm 0,01$	0,9989
MCI						
	nulti red		prvi red		Korsmeyer-Peppasov model	
	$10^3k / \text{min}^{-1}$	R^2	$10^3k / \text{min}^{-1}$	R^2	n	R^2
$f = 0\text{ kHz}$	$0,07 \pm 0,01$	0,5794	7 ± 1	0,9258	-	
$f = 100\text{ kHz}$	$0,09 \pm 0,02$	0,4548	6 ± 1	0,9790		

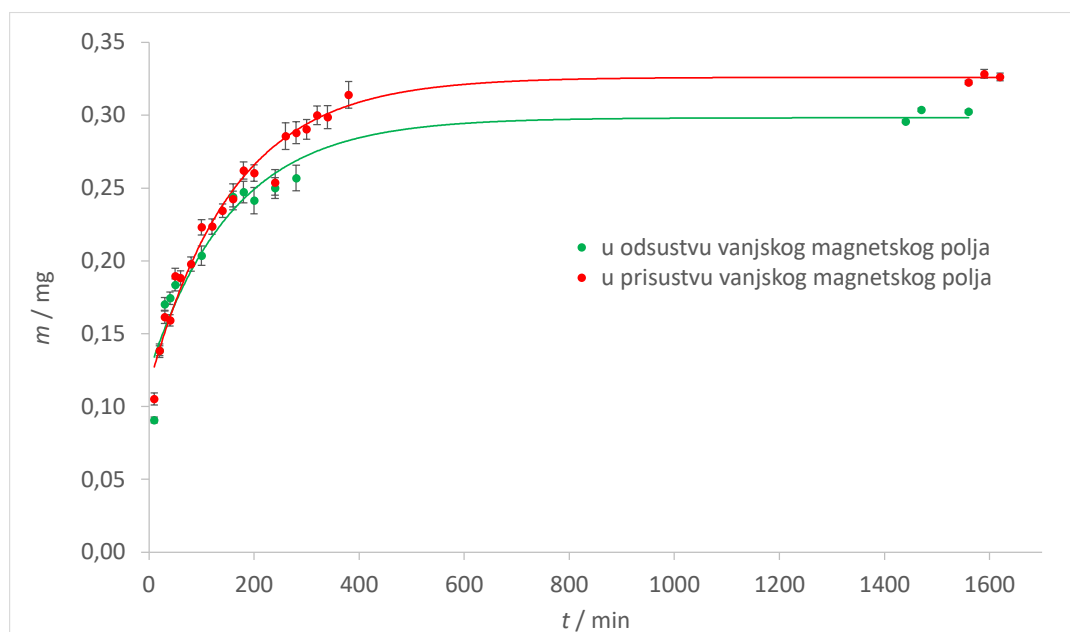
Na temelju rezultata, vidljivo je da model kinetike prvog reda pokazuje dobro slaganje s eksperimentalnim podacima za sva tri flavonoida, pri čemu je u nekim slučajevima uočeno i dobro slaganje s Korsmeyer-Peppasovim modelom. Model kinetike prvog reda u literaturi je već uočen za otpuštanje QUE iz alginata⁴⁶⁷ i halozita.⁴⁶⁸



Slika 4.7.1. Eksperimentalno dobiveni podaci otpuštanja QUE iz nanočestica magnetita uz opis modelom kinetike prvog reda, $\vartheta = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Slika 4.7.2. Eksperimentalno dobiveni podaci otpuštanja MCE iz nanočestica magnetita uz opis modelom kinetike prvog reda, $\vartheta = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Slika 4.7.3. Eksperimentalno dobiveni podaci otpuštanja MCI iz nanočestica magnetita uz opis modelom kinetike prvog reda, $\theta = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Kod sva tri flavonoida dolazi do naglog otpuštanja velike količine na samom početku eksperimenta. Takav fenomen odgovara otpuštanju molekula slabo adsorbiranih ili vezanih na površinu.⁴⁶⁹ S obzirom na to da su nakon ugradnje flavonoida iste čestice korištene u oba eksperimenta, pretpostavlja se da je ukupna ugrađena masa konstantna za svaki flavonoid. Prema tome, iz dobivenih *LE* nakon ugradnje moguće je izračunati masu flavonoida u vaganoj masi čestica korištenoj za otpuštanje.

Tablica 4.7.2. Mase flavonoida ugrađenih u nanočestice magnetita.

flavonoid	m / mg
QUE	$12,4 \pm 0,2$
MCE	$9,6 \pm 0,1$
MCI	$10,1 \pm 0,2$

Ukupna otpuštena masa QUE iz nanočestica nakon $t = 28\text{ h}$ iznosi $m = 1,03\text{ mg}$ bez primjene polja te $m = 1,32\text{ mg}$ nakon primjene polja, što odgovara 8,30%, odnosno 10,65%. Takvi rezultati u skladu su s literaturnim podacima, gdje je već zabilježeno kontrolirano i sporo otpuštanje QUE. Primjerice, nakon ugradnje QUE u nanočestice alginata, u prvih 6 h otpustilo se samo 3,7% količine, dok se 50% količine otpustilo tek nakon $t = 108\text{ h}$.⁴⁷⁰ Uz to, Kumari i

suradnici⁴⁷¹ istraživali su otpuštanje QUE iz nanočestica polilaktida te postigli potpuno otpuštanje nakon 4 dana, dok je QUE otpušten iz nanočestica magnetita i kopolimera postigao maksimum od 14,5% nakon $t = 96$ h.⁴⁷² Općenito, kontrolirano i sporo otpuštanje poboljšava učinkovitost lijeka u odnosu na primjenu lijeka iz otopine.⁴⁷³

Usporedbom kinetičkih parametara, može se uočiti da nema značajne razlike u koeficijentima brzine otpuštanja prije i nakon primjene vanjskog magnetskog polja. Pri tome treba imati na umu da se u ovom slučaju radi o slabim magnetskim poljima, s obzirom na to da je pokazano da primjena jakog magnetskog polja može imati štetne posljedice za organizam.⁴⁷⁴ Međutim, iako primjena magnetskog polja ne ubrzava samo otpuštanje flavonoida, vidljivo je da omogućava otpuštanje veće količine materijala iz magnetitnih nanočestica. Takvo ponašanje također je skladu s literaturom. Primjerice, u slučaju otpuštanja doksorubicina iz kompozita hidrogela i magnetita, uočeno je povećanje otpuštene količine od 16% u slučaju primjene oscilirajućeg magnetskog polja.⁴⁷⁵ Pretpostavlja se da primjena magnetskog polja omogućava lakšu rotaciju magnetskih domena, što inducira otpuštanje lijeka.

Uz model kinetike prvog reda, dobro slaganje s eksperimentalnim podacima pokazuje i Korsmeyer-Peppasov model. Primjenom magnetskog polja dolazi do povećanja eksponenta s $n = 0,57 \pm 0,09$ na $n = 0,67 \pm 0,03$. Iako vrijednosti oba eksponenta ukazuju na anomalni transport, primjenom magnetskog polja dolazi do značajnijeg odstupanja od difuzijskog transporta, što je posljedica primjene dodatnog vanjskog stimulansa. Prema tome, količinu otpuštenog materijala i mehanizam otpuštanja lijeka moguće je ugađati upotrebom magnetskog polja.

Ukupna otpuštena masa MCE nakon $t = 28$ h iznosi $m = 1,33$ mg bez primjene polja te $m = 1,64$ mg nakon primjene polja, što odgovara 13,8%, odnosno 17,0%. Koeficijent brzine otpuštanja prvog reda smanjuje se s primjenom vanjskog magnetskog polja. Takvi rezultati ukazuju na mogućnost postizanja kontrole otpuštanja. Brzo otpuštanje velike količine lijeka može dovesti do toksičnosti⁴⁷⁶, pri čemu je za flavonoide poznato da pri dovoljno velikoj koncentraciji pokazuju prooksidativno djelovanje.⁴⁷⁷ Usporavanjem reakcije moguće je postići kontinuirano otpuštanje manje količine lijeka. Kontrola otpuštanja MCE iz nanonosaa zabilježena je i u kiselim i neutralnim uvjetima.⁴⁷⁸ Usporedbom eksponenata dobivenih iz Korsmeyer-Peppasovog modela, uočava se porast s primjenom vanjskog magnetskog polja, no može se zaključiti da je u oba slučaja dominantan difuzijski kontroliran transport. Difuzijska

kontrola otpuštanja uočena je i u slučaju otpuštanja MCE iz nosača baziranih na nanogelovima kitozana.⁴⁷⁹

Kinetički profil MCI razlikuje se od profila preostala dva flavonoida, pri čemu se u prvih 6 h otpusti maksimalna moguća količina. U odsustvu polja, otpuštena masa iznosi $m = 0,30$ mg (3,0%), dok je u prisustvu polja jednaka $m = 0,33$ mg (3,3%). Eksperimentalno dobiveni podaci za MCI pokazuju najlošije slaganje s modelom kinetike prvog reda, dok upotrebom Korsmejer-Peppasovog modela nije bilo moguće postići konvergenciju. Pretpostavlja se da se Korsmejer-Peppasov model ne može koristiti jer se u kratkom vremenu otpusti prevelika količina MCI, a model vrijedi samo za prvih 60% ukupne mase koja se može otpustiti. Uz to, za MCI je uočena najmanja otpuštena količina od svih proučavanih flavonoida, iako i kod njega dolazi do povećanja otpuštene mase s primjenom magnetskog polja. Može se uočiti da se na početku oba eksperimenta otpušta približno jednaka količina MCI, a do povećanja uslijed primjene polja dolazi nakon $t \approx 200$ min. U odnosu na preostala dva flavonoida, koeficijent brzine otpuštanja MCI značajno je veći. Pretpostavlja se da je brže otpuštanje posljedica hidrofilnosti MCI, pri čemu je otpuštanje u polarni medij preferabilno u odnosu na inkorporaciju unutar čestica.

§ 5. ZAKLJUČAK

U sklopu doktorske disertacije istražena je zaštitna uloga flavonoida u očuvanju svojstava lipidnih membrana izloženih oksidativnom stresu. Problematika je istražena iz tri različita smjera. Jedan smjer istraživanja čini proučavanje interakcije flavonoida i lipidnih dvosloja. Uz to, istražena je reakcija lipidne peroksidacije lipida s različitim stupnjevima nezasićenosti te zaštitno djelovanje odabranih flavonoida. Konačno, potvrđena je nestabilnost flavonoida u fiziološkim uvjetima te je ispitana upotreba nanočestica magnetita kao potencijalnih nanonosača.

Ovisno o strukturi flavonoida, odnosno njihovoj hidrofobnosti, dolazi do različitog smještanja unutar dvosloja, pri čemu se polarniji flavonoidi smještaju u područje bliže fosfatnim glavama, dok se nepolarni flavonoidi smještaju u unutrašnjost membrane. Uz to, dodatak flavonoida uzrokuje promjenu mobilnosti ugljikovodičnih lanaca lipida, koja se očituje u pomaku temperature faznog prijelaza prema nižim vrijednostima. Istraživanjem nanomehaničkih svojstava ustanovljeno je da, pri dovoljno visokim množinskim udjelima, flavonoidi stvaraju agregate u membrani. Nadalje, uočeno je povećanje hrapavosti i Youngovog modula dvosloja prilikom ugradnje sva tri flavonoida, pri čemu je najizraženije u slučaju najhidrofilnijeg flavonoida, MCI. MCI se smješta najbliže površini membrane te je najizraženiji utjecaj na površinska svojstva u skladu s očekivanjima. Osim dodatka flavonoida, strukturne promjene lipidnog dvosloja uzrokuje i lipidna peroksidacija.

Iz profila elektronske gustoće vidljivo je da lipidna peroksidacija uzrokuje narušavanje multilamelarne strukture liposoma, pri čemu, ovisno o vrsti lipida, dolazi do promjena elektronske gustoće u različitim područjima dvosloja. Također je pokazano da do djelomične ugradnje flavonoida dolazi i u nepolarnom dijelu dvosloja i u blizini fosfatnih glava. Promjene u elektronskoj gustoći nakon lipidne peroksidacije manje su izražene u slučaju liposoma s ugrađenim flavonoidima. Dobiveni rezultati potkrijepljeni su promjenama u nanomehaničkim svojstvima dvosloja. Nakon lipidne peroksidacije dolazi do značajnog porasta hrapavosti i Youngovog modula dvosloja. Porast navedenih parametara ukazuje na fragmentaciju i strukturna oštećenja membrane, što za posljedicu ima povećanje elastičnosti. Promjene nanomehaničkih parametara manje su izražene kod dvosloja s ugrađenim flavonoidima. Također, nakon lipidne peroksidacije dolazi do značajnog pada parametra uređenosti, što je

pokazatelj povećanja fluidnosti. Ugradnja MCI, za razliku od QUE i MCE, uzrokuje zadebljanje membrane. Zadebljanje je uočeno i nakon lipidne peroksidacije, što se pripisuje nastanku hidrofilnih produkata koji stvaraju interakcije s fosfatnim skupinama te, slično kao i MCI, uzrokuju porast debljine dvosloja. Konačno, utvrđena je inhibicija reakcije lipidne peroksidacije kod dvosloja s ugrađenim flavonoidima u slučaju oba proučavana lipida.

Identificiran je velik broj produkata lipidne peroksidacije, među kojima su i produkti za koje je pokazana povezanost s različitim bolestima. Jednu klasu produkata čine dugolančane karboksilne dikiseline te je iz tog razloga proučena interakcija modelnog produkta DDA s lipidnim dvoslojem. Utvrđeno je da DDA uzrokuje stanjivanje dvosloja te povećanje elektronske gustoće u njegovom središtu, za što se pretpostavlja da je posljedica njegovog protezanja kroz čitav dvosloj te interakcije s fosfatnim skupinama lipida. Uz stanjivanje dvosloja, uočen je i porast hrapavosti popraćen stvaranjem lokaliziranih defekata nakon ugradnje DDA. Dodatak flavonoida uzrokuje značajan pad Youngovog modula uzrokovan stvaranjem vodikovih veza između DDA i flavonoida te nastankom agregata. Prema očekivanjima, DDA, analogno lipidnoj peroksidaciji, uzrokuje pad parametra uređenosti koji je manje izražen s dodatkom flavonoida.

Potvrđena je nestabilnost sva tri flavonoida u puferiranoj fiziološkoj otopini. Utvrđeno je da raspad svih proučavanih flavonoida prati model kinetike pseudo-prvog reda, u slučaju približno konstantne koncentracije kisika u sustavu. Najbrži raspad primijećen je u slučaju MCE, dok je najsporiji raspad uočeno u slučaju MCI. Uz to, ispitana je efikasnost uklanjanja radikala DPPH navedenim flavonoidima u etanolu, pri čemu se najefikasnijim pokazao MCE.

S obzirom na pokazanu nestabilnost flavonoida u mediju, sintetizirani su nanonosači u obliku nanočestica magnetita funkcionaliziranih PEG-om. Nanočestice su karakterizirane spektroskopijskim i mikroskopijskim tehnikama, dok je superparamagnetičnost potvrđena magnetskim mjerenjima. Suspenzija nanočestica, unatoč brznoj agregaciji, pokazala se stabilnom kroz dulji vremenski period te je određena izoelektrična točka koja iznosi $\text{pH}_{\text{iep}} \approx 4,8$. U sintetizirane nanočestice ugrađena su tri flavonoida te su provedeni eksperimenti otpuštanja u prisustvu magnetskog polja. Otpuštanje sva tri flavonoida može se opisati modelom kinetike prvog reda. Primjenom kombinacije stalnog i oscilirajućeg magnetskog polja postignuta je bolja kontrola otpuštanja te veća količina otpuštenih flavonoida u odnosu na sustav u odsustvu magnetskog polja.

Rezultati dobiveni u okviru doktorske disertacije upućuju na izniman potencijal uporabe flavonoida u svrhu smanjenja utjecaja oksidativnog stresa na lipidne membrane. Potvrđena je dvostruka zaštitna uloga flavonoida, koja se očituje u inhibiciji same reakcije lipidne peroksidacije te u smanjenju utjecaja nastalih produkata na morfološka i mehanička svojstva lipidnog dvosloja. Također, proučena je mogućnost uporabe nanočestica magnetita kao nosača za dostavu flavonoida u organizmu, čime se potencijalno može zaobići problem njihove slabe topljivosti i nestabilnosti u fiziološkim uvjetima. Potvrđena je i kontrola kinetike otpuštanja flavonoida iz navedenih nanonosaa uporabom kombinacije stalnog i oscilirajućeg magnetskog polja, što otvara vrata njihovoj široj primjeni u medicini.

§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

5-DSA	5-DOXYL-stearinska kiselina
ABTS	2,2'-azino-bis-3-etil-benzotiazolin-6-sulfonska kiselina
AFM	mikroskopija atomskih sila (engl. <i>atomic force microscopy</i>)
ALS	metoda alternirajućih najmanjih kvadrata (engl. <i>alternating least squares</i>)
ATP	adenozin trifosfat
ATR	prigušena totalna refleksija (engl. <i>attenuated total reflectance</i>)
BET	Brunauer–Emmett–Teller
BSA	albumin iz goveđeg seruma (engl. <i>bovine serum albumine</i>)
CHH	7-dietilaminokumarin-3-karbohidrazid
CNFs	ugljikova nanovlakna (engl. <i>carbon nanofibers</i>)
CNTs	ugljikove nanocijevi (engl. <i>carbon nanotubes</i>)
CNWs	ugljikove nanožice (engl. <i>carbon nanowires</i>)
DDA	dodekanska dikiselina
DDPC	1,2-didokosaheksaenoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfokolin
DLS	dinamičko raspršenje svjetlosti (engl. <i>dynamic light scattering</i>)
DMPC	1,2-dimiristoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfokolin
DMPG	dimiristoilfosfatidilglicerol
DMT	Derjagin, Muller, Toropov model
DOPC	1,2-dioleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfokolin
DOPG	dioleoilfosfatidilglicerol
DOTAP	1,2-dioleoil-3-trimetilamonijev propan
DPPC	dipalmitoilfosfatidilkolin
DPPG	dipalmitoilfosfatidilglicerol
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DSC	diferencijalna pretražna kalorimetrija (engl. <i>differential scanning calorimetry</i>)
DTGS	deuterirani triglicin sulfat
EE	efikasnost ugradnje (engl. <i>entrapment efficiency</i>)
EPA	Agencija za zaštitu okoliša (<i>Environmental Protection Agency</i>)

EPR	elektronska paramagnetska rezonancija (engl. <i>electron paramagnetic resonance</i>)
ER	endoplazmatski retikulum
FS	spektroskopija sila (engl. <i>force spectroscopy</i>)
GULV	ogromne unilamelarne vezikule (engl. <i>giant unilamellar vesicles</i> , GULV)
HHE	4-hidroksiheksen-2-al
HNE	4-hidroksinonenal
HR-MS	masena spektrometrija visoke rezolucije (engl. <i>high-resolution mass spectrometry</i>)
IR	infracrvena spektroskopija (engl. <i>infrared spectroscopy</i>)
ISO	Međunarodna organizacija za standardizaciju (<i>The International Organization for Standardization</i>)
LC-MS	vezani sustav tekućinski kromatograf i spektrometar masa (engl. <i>liquid chromatography-mass spectrometry</i>)
LDL	lipoprotein niske gustoće (engl. <i>low-density lipoprotein</i>)
LE	kapacitet ugradnje (engl. <i>loading capacity</i>)
LP	lipidna peroksidacija
LUV	velike unilamelarne vezikule (engl. <i>large unilamellar vesicles</i>)
MCE	miricetin
MCI	miricitrin
MCT	modificirana Cailléova teorija (engl. <i>modified Caillé theory</i>)
MDA	malondialdehid
MLLV	multilamelarne velike vezikule (engl. <i>multilamellar large vesicles</i>)
MLV	multilamelarne vezikule (engl. <i>multilamellar vesicles</i>)
MPPC	1-miristoil-2-palmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfokolin
MS	masena spektrometrija
MSNs	mezoporozne nanočestice silike (engl. <i>mesoporous silica nanoparticles</i> , MSNs)
NMR	nuklearna magnetska rezonancija (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
OLV	oligolamelarne vezikule (engl. <i>oligolamellar vesicles</i>)
PAA	poliakrilna kiselina
PC	fosfatidilkolin
PCL	polikaprolakton

PE	fosfatidiletanolamin
PEG	poli(etilen-glikol)
PG	fosfatidilglicerol
PI	fosfatidilinozitol
PLGA	poli(mliječna-glikolna) kiselina
pH _{iep}	izoelektrična točka (engl. <i>isoelectric point</i>)
PLA	polimliječna kiselina
PMMA	polimetilmetakrilat
POPG	palmitoiloleoilfosfatidilglicerol
PS	fosfatidilserin
PVP	poli(vinil-pirolidon)
PVPI	poli(vinil-pirolidonjodid)
PXRD	difrakcija rentgenskog zračenja na polikristalnom uzorku (engl. <i>powder X-ray diffraction</i>)
QNM	quantitative nanomechanics
QUE	kvercetin
ROS	reaktivne kisikove vrste (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
SAXS	raspršenje rendgenskog zračenja pri malim kutevima (engl. <i>small angle X-ray scattering</i>)
SEM	pretražna elektronska mikroskopija (engl. <i>scanning electron microscopy</i>)
SLB	lipidni dvosloj na nosaču (engl. <i>supported lipid bilayer</i>)
SUV	male unilamelarne vezikule (engl. <i>small unilamellar vesicles</i>)
TBA	2-tiobarbiturna kiselina
TBARS	reaktivne vrste tiobarbiturne kiseline (engl. <i>thiobarbituric acid reactive substances</i>)
TEM	transmisijska elektronska mikroskopija (engl. <i>transmission electron microscopy</i>)
TEP	1,1,3,3-tetraetoksipropan
USFDA	Američka agencija za hranu i lijekove (<i>The US Food and Drug Administration</i>)
UV	unilamelarne vezikule (engl. <i>unilamellar vesicles</i>)

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. Watson, N. Orme, K. Hesketh-Moore, *Molecular biology of the cell*, Garland Science, New York, 1994, str. 477–490.
2. M. Repetto, J. Semprine, A. Boveris u A. Catala (ur.) *Lipid Peroxidation*, InTech, London, UK, 2012, str. 3–31.
3. M. Parola, G. Robino, *J. Hepatol.* **35** (2001) 297–306.
4. O. I. Aruoma, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **75** (1998) 199–212.
5. J. Dua, A. Rana, A. Bhandari, *Int. J. Pharm. Stud. Res.* **3** (2012) 14–20.
6. S. J. Routledge, J. A. Linney, A. D. Goddard, *Biochem. Soc. Trans.* **47** (2019) 919–932.
7. A. N. Panche, A. D. Diwan, S. R. Chandra, *J. Nutr. Sci.* **5** (2016)
8. C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, G. Paganga, *Free Radic. Biol. Med.* **20** (1996) 933–956.
9. B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, *Biochem. J.* **219** (1984) 1–14.
10. M. G. Repetto, N. F. Ferrarotti, A. Boveris, *Arch. Toxicol.* **84** (2010) 255–262.
11. C. Van Dijk, A. J. M. Driessen, K. Recourt, *Biochem. Pharmacol.* **60** (2000) 1593–1600.
12. P. I. Oteiza, A. G. Erlejman, S. V. Verstraeten, C. L. Keen, C. G. Fraga, *Clin. Dev. Immunol.* **12** (2005) 19–25.
13. B. Kumar, K. Jalodia, P. Kumar, H. K. Gautam, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **41** (2017) 260–268.
14. J. Wallyn, N. Anton, T. F. Vandamme, *Pharmaceutics* **11** (2019) 601.
15. K. McNamara, S. A. M. Tofail, *Adv. Phys. X* **2** (2016) 54–88.
16. D. Sathish Sundar, M. Gover Antoniraj, C. Senthil Kumar, S. S. Mohapatra, N. N. Houreld, K. Ruckmani, *Curr. Med. Chem.* **23** (2016) 3730–3751.
17. G. A. Hughes, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **1** (2005) 22–30.
18. G. Guidotti, *Annu. Rev. Biochem.* **41** (1972) 731–752.
19. S. Tan, T. T. Hwee, M. C. M. Chung, *Proteomics* **8** (2008) 3924–3932.
20. M. Sud, E. Fahy, D. Cotter, A. Brown, E. A. Dennis, C. K. Glass, A. H. Merrill, R. C. Murphy, C. R. H. Raetz, D. W. Russell, S. Subramaniam, *Nucleic Acids Res.* **35** (2007) D527–D532.

21. G. Van Meer, D. R. Voelker, G. W. Feigenson, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9** (2008) 112–124.
22. H. Lodish, A. Berk, P. Matsudaira, C. Kaiser, M. Krieger, M. Scott, L. Zipursky, J. Darnell, *Molecular cell biology*, W. H. Freeman and Company, New York, 2003, str. 148.
23. G. L. Nicolson, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1838** (2014) 1451–1466.
24. N. Bartke, Y. A. Hannun, *J. Lipid Res.* **50** (2009) S91–S96.
25. M. Adada, D. Canals, Y. A. Hannun, L. M. Obeid, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1841** (2014) 727–737.
26. I. Herr, *EMBO J.* **16** (1997) 6200–6208.
27. S. K. Rodal, G. Skretting, Ø. Garred, F. Vilhardt, B. van Deurs, K. Sandvig, *Mol. Biol. Cell* **10** (1999) 961–974.
28. X. Cheng, J. C. Smith, *Chem. Rev.* **119** (2019) 5849–5880.
29. S. Marcelja, *Biophys. J.* **76** (1999) 593–594.
30. V. P. Torchilin, *Nat. Rev. Drug Discov.* **4** (2005) 145–160.
31. M. Fathi, M. R. Mozafari, M. Mohebbi, *Trends Food Sci. Technol.* **23** (2012) 13–27.
32. S. Nguyen, M. Hiorth, M. Rykke, G. Smistad, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **77** (2011) 75–83.
33. A. S. Abu Lila, T. Ishida, *Biol. Pharm. Bull.* **40** (2017) 1–10.
34. C. Isalomboto Nkanga, A. Murhimalika Bapolisi, N. Ikemefuna Okafor, R. Werner Maçedo Krause u A. Catala (ur.) *Liposomes - Adv. Perspect.*, InTech, London, UK, 2019, str. 3–7.
35. B. S. Pattni, V. V. Chupin, V. P. Torchilin, *Chem. Rev.* **115** (2015) 10938–10966.
36. M. Pinheiro, J. Magalhães, S. Reis, *Chem. Phys. Lipids* **222** (2019) 36–46.
37. A. D. Bangham, J. De Gier, G. D. Greville, *Chem. Phys. Lipids* **1** (1967) 225–246.
38. M. Chabanon, J. C. Stachowiak, P. Rangamani, *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **9** (2017) 20–22.
39. H. T. Jung, B. Coldren, J. A. Zasadzinski, D. J. Iampietro, E. W. Kaler, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98** (2001) 1353–1357.
40. M. J. Hope, M. B. Bally, G. Webb, P. R. Cullis, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **812** (1985) 55–65.
41. H. Kikuchi, H. Yamauchi, S. Hirota, *J. Liposome Res.* **4** (1994) 71–91.

42. Q. Ye, R. Konradi, M. Textor, E. Reimhult, *Langmuir* **25** (2009) 13534–13539.
43. E. Sackmann, *Science (80-.)*. **271** (1996) 43–48.
44. M. L. Wagner, L. K. Tamm, *Biophys. J.* **79** (2000) 1400–1414.
45. M. M. Velázquez, T. Alejo, D. López-Díaz, B. Martín-García, M. D. Merchán u K. Nayak (ur.), *Two-dimensional Mater. - Synth. Charact. Potential Appl.*, InTech, London, UK, 2016, str. 21–25.
46. P. S. Cremer, J. T. Groves, L. A. Kung, S. G. Boxer, *Langmuir* **15** (1999) 3893–3896.
47. R. J. Barfoot, K. H. Sheikh, B. R. G. Johnson, J. Colyer, R. E. Miles, L. J. C. Jeuken, R. J. Bushby, S. D. Evans, *Langmuir* **24** (2008) 6827–6836.
48. P. S. Cremer, S. G. Boxer, *J. Phys. Chem. B* **103** (1999) 2554–2559.
49. C. A. Keller, B. Kasemo, *Biophys. J.* **75** (1998) 1397–1402.
50. T. G. Pomorski, T. Nylander, M. Cárdenas, *Adv. Colloid Interface Sci.* **205** (2014) 207–220.
51. K. S. Chio, A. L. Tappel, *Biochemistry* **8** (1969) 2827–2832.
52. R. P. Richter, R. Bérat, A. R. Brisson, *Langmuir* **22** (2006) 3497–3505.
53. V. Kiessling, J. M. Crane, L. K. Tamm, *Biophys. J.* **91** (2006) 3313–3326.
54. J. M. Crane, L. K. Tamm, in ,2007 481–488. doi:10.1007/978-1-59745-519-0_32
55. J. M. Crane, V. Kiessling, L. K. Tamm, *Langmuir* **21** (2005) 1377–1388.
56. Y. Onuki, C. Hagiwara, K. Sugibayashi, K. Takayama, *Chem. Pharm. Bull.* **56** (2008) 1103–1109.
57. T. Okazaki, T. Inaba, Y. Tatsu, R. Tero, T. Urisu, K. Morigaki, *Langmuir* **25** (2009) 345–351.
58. S. J. Johnson, T. M. Bayerl, D. C. McDermott, G. W. Adam, A. R. Rennie, R. K. Thomas, E. Sackmann, *Biophys. J.* **59** (1991) 289–294.
59. T. Shoaib, P. C. Nalam, Y. He, Y. Chen, R. M. Espinosa-Marzal, *Langmuir* **33** (2017) 7105–7117.
60. K. Aburai, T. Ogura, R. Hyodo, H. Sakai, M. Abe, O. Glatter, *J. Oleo Sci.* **62** (2013) 913–918.
61. C. Rossi, E. Briand, P. Parot, M. Odorico, J. Chopineau, *J. Phys. Chem. B* **111** (2007) 7567–7576.
62. J. Ries, S. Chiantia, P. Schwille, *Biophys. J.* **96** (2009) 1999–2008.
63. S. Ytzhak, J. P. Wuskell, L. M. Loew, B. Ehrenberg, *J. Phys. Chem. B* **114** (2010)

- 10097–10104.
64. A. J. Diaz, F. Albertorio, S. Daniel, P. S. Cremer, *Langmuir* **24** (2008) 6820–6826.
65. S. Garcia-Manyes, G. Oncins, F. Sanz, *Electrochim. Acta* **51** (2006) 5029–5036.
66. A. Jacquot, G. Francius, A. Razafitianamaharavo, F. Dehghani, A. Tamayol, M. Linder, E. Arab-Tehrany, *PLoS One* **9** (2014) 1–11.
67. X. Liang, G. Mao, K. Y. S. Ng, *J. Colloid Interface Sci.* **278** (2004) 53–62.
68. I. Reviakine, A. Brisson, *Langmuir* **16** (2000) 1806–1815.
69. K. Nakano, Y. Tozuka, H. Yamamoto, Y. Kawashima, H. Takeuchi, *Int. J. Pharm.* **355** (2008) 203–209.
70. A. Kunding, D. Stamou, *J. Am. Chem. Soc.* **128** (2006) 11328–11329.
71. J. Wang, K.-W. Liu, L. Segatori, S. L. Biswal, *J. Phys. Chem. B* **118** (2014) 171–178.
72. U. Subuddhi, S. Haldar, S. Sankararaman, A. K. Mishra, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **200** (2008) 381–387.
73. A. Rolland, A. Brzokewicz, B. Shroot, J. C. Jamouille, *Int. J. Pharm.* **76** (1991) 217–224.
74. D. L. Melchior, J. M. Steim, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **5** (1976) 205–238.
75. J. E. Shaw, R. F. Epand, J. C. Y. Hsu, G. C. H. Mo, R. M. Epand, C. M. Yip, *J. Struct. Biol.* **162** (2008) 121–138.
76. M. Baciú, S. C. Sebai, O. Ces, X. Mulet, J. A. Clarke, G. C. Shearman, R. V Law, R. H. Templer, C. Plisson, C. A. Parker, A. Gee, *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **364** (2006) 2597–2614.
77. K. Hąc-Wydro, P. Dynarowicz-Łątka, J. Grzybowska, E. Borowski, *Biophys. Chem.* **116** (2005) 77–88.
78. M. Baginski, J. Czub, K. Sternal, *Chem. Rec.* **6** (2006) 320–332.
79. K. U. Maheswari, T. Ramachandran, D. Rajaji, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1463** (2000) 230–240.
80. C. Peetla, A. Stine, V. Labhassetwar, *Mol. Pharm.* **6** (2009) 1264–1276.
81. S. Ali, S. Minchey, A. Janoff, E. Mayhew, *Biophys. J.* **78** (2000) 246–256.
82. R. B. Campbell, S. V. Balasubramanian, R. M. Straubinger, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1512** (2001) 27–39.
83. B. K. Kim, G. B. Hwang, Y. B. Seu, J. S. Choi, K. S. Jin, K. O. Doh, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1848** (2015) 1996–2001.

84. H. Esterbauer, F. Muskiet, D. F. Horrobin, *Am. J. Clin. Nutr.* **57** (1993)
85. P. Pospíšil, Y. Yamamoto, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1861** (2017) 457–466.
86. B. Halliwell, S. Chirico, *Am. J. Clin. Nutr.* **57** (1993) 715–25.
87. H. S. El-Beltagi, H. I. Mohamed, *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca* **41** (2013) 44–57.
88. L. J. Marnett, J. N. Riggins, J. D. West, *J. Clin. Invest.* **111** (2003) 583–593.
89. W. Pryor, *Annu. Rev. Physiol.* **48** (1986) 657–667.
90. R. C. Cumming, N. L. Andon, P. A. Haynes, M. Park, W. H. Fischer, D. Schubert, *J. Biol. Chem.* **279** (2004) 21749–21758.
91. E. G. Hrycay, S. M. Bandiera, in ,2015 35–84. doi:10.1016/bs.apha.2015.03.003
92. N. I. Krinsky, *Free Radic. Biol. Med.* **7** (1989) 617–635.
93. F. Wilkinson, W. P. Helman, A. B. Ross, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **24** (1995) 663–677.
94. L. I. Grossweiner, *Curr. Top. Radiat. Res. Q.* **11** (1976) 141–99.
95. H. Wefers, P. Di Mascio, H.-P. Do-Thi, D. Schulte-Frohlinde, H. Sies u M. Simic, K. Taylor, J. Ward, C. Sonntag (ur.), *Oxyg. Radicals Biol. Med.*, Springer US, Boston, MA, 1988, str. 473–477.
96. Z. A. M. Zielinski, D. A. Pratt, *J. Org. Chem.* **82** (2017) 2817–2825.
97. T. P. A. Devasagayam, K. K. Bloor, T. Ramasarma, *Indian J. Biochem. Biophys.* **40** (2003) 300–308.
98. A. Reis, C. M. Spickett, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1818** (2012) 2374–2387.
99. K. Jomova, M. Valko, *Curr. Pharm. Des.* **17** (2011) 3460–3473.
100. M. Valko, H. Morris, M. Cronin, *Curr. Med. Chem.* **12** (2005) 1161–1208.
101. S. V. Verstraeten, L. V. Nogueira, S. Schreier, P. I. Oteiza, *Arch. Biochem. Biophys.* **338** (1997) 121–127.
102. B. Chance, H. Sies, A. Boveris, *Physiol. Rev.* **59** (1979) 527–605.
103. B. R. Bacon, A. S. Tavill, G. M. Brittenham, C. H. Park, R. O. Recknagel, *J. Clin. Invest.* **71** (1983) 429–439.
104. J. Choi, J. K. Chon, S. Kim, W. Shin, *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **70** (2008) 1023–1032.
105. S. Nanda, J. S. Yadav, *J. Mol. Catal. B Enzym.* **26** (2003) 3–28.
106. C. Schneider, D. A. Pratt, N. A. Porter, A. R. Brash, *Chem. Biol.* **14** (2007) 473–488.
107. M. L. Oldham, A. R. Brash, M. E. Newcomer, *J. Biol. Chem.* **280** (2005) 39545–

- 39552.
108. I. Feussner, C. Wasternack, *Annu. Rev. Plant Biol.* **53** (2002) 275–297.
109. H. Kuhn, B. J. Thiele, *FEBS Lett.* **449** (1999) 7–11.
110. K. Van Leyen, R. M. Duvoisin, H. Engelhardt, M. Wiedmann, *Nature* **395** (1998) 392–395.
111. B. Youn, G. E. Sellhorn, R. J. Mirchel, B. J. Gaffney, H. D. Grimes, C. Kang, *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **65** (2006) 1008–1020.
112. R. O. Domínguez, E. R. Marschoff, E. M. Guareschi, M. G. Repetto, A. L. Famulari, M. A. Pagano, J. A. Serra, E. L. Bartolomé, S. González, G. D'Abbraccio, M. Arata, L. Oudkerk, L. Garau, F. Krinsky, E. Labos, C. Ruiz, G. Frechtel, A. Arana, S. Lovecchio, *J. Neural Transm.* **115** (2008) 77–84.
113. A. L. Famulari, E. R. Marschoff, S. F. Llesuy, S. Kohan, J. A. Serra, R. O. Dominguez, M. Repetto, C. Reides, E. S. De Lustig, *J. Neurol. Sci.* **141** (1996) 69–78.
114. J. Blesa, I. Trigo-Damas, A. Quiroga-Varela, V. R. Jackson-Lewis, *Front. Neuroanat.* **9** (2015) 1–9.
115. M. L. Fiszman, M. Di Egidio, K. C. Ricart, M. G. Repetto, L. N. Borodinsky, S. F. Llesuy, R. D. Saizar, P. L. Trigo, S. Riedstra, P. P. Costa, A. M. Villa, N. Katz, J. C. Lendoire, R. E. P. Sica, *Arch. Neurol.* **60** (2003) 593–597.
116. M. Repetto, A. Maria, J. Guzmán, O. Giordano, S. Llesuy, *J. Pharm. Pharmacol.* **55** (2010) 551–557.
117. M. G. Repetto, G. Ossani, A. J. Monserrat, A. Boveris, *Exp. Mol. Pathol.* **88** (2010) 143–149.
118. J. P. Cosgrove, D. F. Church, W. A. Pryor, *Lipids* **22** (1987) 299–304.
119. A. Catalá, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38** (2006) 1482–1495.
120. L. J. Marnett, *Carcinogenesis* **21** (2000) 361–370.
121. H. Esterbauer, R. J. Schaur, H. Zollner, *Free Radic. Biol. Med.* **11** (1991) 81–128.
122. R. C. Grafström, J. M. Dvpbukt, J. C. Willey, K. Sundqvist, C. Edman, L. Atzori, C. C. Harris, *Cancer Res.* **48** (1988) 1717–1721.
123. C. Leuchtenberger, M. Schumacher, T. Haldimann, *Zeitschrift für Präventivmedizin - Rev. Médecine Préventive* **13** (1968) 130–141.
124. C. Izard, C. Libermann, *Mutat. Res. Genet. Toxicol.* **47** (1978) 115–138.
125. Y. Shimozu, K. Hirano, T. Shibata, N. Shibata, K. Uchida, *J. Biol. Chem.* **286** (2011)

- 29313–29324.
126. J. C. Ullery, L. J. Marnett, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1818** (2012) 2424–2435.
127. K. Uchida, *Prog. Lipid Res.* **42** (2003) 318–343.
128. K. Uchida, L. I. Szweda, H. Z. Chae, E. R. Stadtman, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90** (1993) 8742–8746.
129. A. E. Mitchell, D. Morin, M. W. Lame, A. D. Jones, *Chem. Res. Toxicol.* **8** (1995) 1054–1062.
130. D. L. Vander Jagt, L. A. Hunsaker, T. J. Vander Jagt, M. S. Gomez, D. M. Gonzales, L. M. Deck, R. E. Royer, *Biochem. Pharmacol.* **53** (1997) 1133–1140.
131. Y. Ando, T. Brännström, K. Uchida, N. Nyhlin, B. Näsman, O. Suhr, T. Yamashita, T. Olsson, M. EL Salhy, M. Uchino, M. Ando, *J. Neurol. Sci.* **156** (1998) 172–176.
132. A. Yoritaka, N. Hattori, K. Uchida, M. Tanaka, E. R. Stadtman, Y. Mizuno, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93** (1996) 2696–2701.
133. N. Shibata, R. Nagai, K. Uchida, S. Horiuchi, S. Yamada, A. Hirano, M. Kawaguchi, T. Yamamoto, S. Sasaki, M. Kobayashi, *Brain Res.* **917** (2001) 97–104.
134. K. Okamoto, S. Toyokuni, K. Uchida, O. Ogawa, J. Takenawa, Y. Kakehi, H. Kinoshita, Y. Hattori-Nakakuki, H. Hiai, O. Yoshida, *Int. J. Cancer* **58** (1994) 825–829.
135. Y. Ando, N. Nyhlin, O. Suhr, G. Holmgren, K. Uchida, M. El Sahly, T. Yamashita, H. Terasaki, M. Nakamura, M. Uchino, M. Ando, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **232** (1997) 497–502.
136. S. Morikawa, O. Kurauchi, M. Tanaka, M. Yoneda, K. Uchida, A. Itakura, K. Furugori, S. Mizutani, Y. Tomoda, *IUBMB Life* **41** (1997) 767–775.
137. K. Kawamura, Y. Kobayashi, F. Kageyama, T. Kawasaki, M. Nagasawa, S. Toyokuni, K. Uchida, H. Nakamura, *Am. J. Gastroenterol.* **95** (2000) 3596–3601.
138. F. J. G. M. Van Kuijk, L. L. Holte, E. A. Dratz, *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* **1043** (1990) 116–118.
139. Y. Riahi, G. Cohen, O. Shamni, S. Sasson, *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **299** (2010) E879–E886.
140. E. K. Long, T. C. Murphy, L. J. Leiphon, J. Watt, J. D. Morrow, G. L. Milne, J. R. H. Howard, M. J. Picklo, *J. Neurochem.* **105** (2008) 714–724.

141. J. Y. Lee, J. H. Je, D. H. Kim, S. W. Chung, Y. Zou, N. D. Kim, M. Ae Yoo, H. Suck Baik, B. P. Yu, H. Y. Chung, *Eur. J. Biochem.* **271** (2004) 1339–1347.
142. T.-W. Kwon, B. Watts, *J. Food Sci.* **29** (1964) 294–302.
143. L. J. Marnett, *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **424** (1999) 83–95.
144. K. Uchida, *Free Radic. Biol. Med.* **28** (2000) 1685–1696.
145. D. Del Rio, A. J. Stewart, N. Pellegrini, *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **15** (2005) 316–328.
146. R. Shamberger, T. Andreone, C. Willis, *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **53** (1974) 1771–1773.
147. H. Akbulut, K. G. Akbulut, F. Icli, A. Büyükcelik, *Cancer Detect. Prev.* **27** (2003) 122–126.
148. K. Kolanjiappan, S. Manoharan, M. Kayalvizhi, *Clin. Chim. Acta* **326** (2002) 143–149.
149. E. Bakan, *Jpn. J. Clin. Oncol.* **32** (2002) 162–166.
150. N. Dierckx, G. Horvath, C. van Gils, J. Vertommen, J. van de Vliet, I. De Leeuw, B. Manuel-y-Keenoy, *Eur. J. Clin. Nutr.* **57** (2003) 999–1008.
151. N. Delibas, R. Ozcankaya, I. Altuntas, *Clin. Biochem.* **35** (2002) 137–141.
152. M. C. Polidori, K. Savino, G. Alunni, M. Freddio, U. Senin, H. Sies, W. Stahl, P. Mecocci, *Free Radic. Biol. Med.* **32** (2002) 148–152.
153. B. Halliwell, *Free Radic. Res. Commun.* **9** (1990) 1–32.
154. B. Halliwell, *Biochem. Pharmacol.* **37** (1988) 569–571.
155. P. M. Abuja, R. Albertini, *Clin. Chim. Acta* **306** (2001) 1–17.
156. D. D. M. Wayner, G. W. Burton, K. U. Ingold, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **884** (1986) 119–123.
157. M. Anbar, P. Neta, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **18** (1967) 493–523.
158. C. S. Buer, N. Imin, M. A. Djordjevic, *J. Integr. Plant Biol.* **52** (2010) 98–111.
159. R. A. Dixon, G. M. Pasinetti, *Plant Physiol.* **154** (2010) 453–457.
160. Y. Mo, C. Nagel, L. P. Taylor, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89** (1992) 7213–7217.
161. B. H. Havsteen, *Pharmacol. Ther.* **96** (2002) 67–202.
162. A. Takahashi, K. Takeda, T. Ohnishi, *Plant Cell Physiol.* **32** (1991) 541–547.
163. W. A. Peer, A. S. Murphy, *Trends Plant Sci.* **12** (2007) 556–563.
164. D. S. K. Samanta Amalesh, Das Gouranga, *Int J Pharm Sci Tech* **6** (2011) 12–35.
165. T. P. T. Cushnie, A. J. Lamb, *Int. J. Antimicrob. Agents* **26** (2005) 343–356.

166. J. M. Grange, R. W. Davey, *J. R. Soc. Med.* **83** (1990) 159–160.
167. A. Matthies, T. Clavel, M. Gütschow, W. Engst, D. Haller, M. Blaut, A. Braune, *Appl. Environ. Microbiol.* **74** (2008) 4847–4852.
168. C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, L. Jiménez, *Am. J. Clin. Nutr.* **79** (2004) 727–747.
169. I. C. W. Arts, B. van de Putte, P. C. H. Hollman, *J. Agric. Food Chem.* **48** (2000) 1746–1751.
170. S. Guyot, N. Marnet, D. Laraba, P. Sanoner, J.-F. Drilleau, *J. Agric. Food Chem.* **46** (1998) 1698–1705.
171. M. M. Giusti, R. E. Wrolstad, *Biochem. Eng. J.* **14** (2003) 217–225.
172. D. Wu, Y. Kong, C. Han, J. Chen, L. Hu, H. Jiang, X. Shen, *Int. J. Antimicrob. Agents* **32** (2008) 421–426.
173. M. Konstantinopoulou, A. Karioti, S. Skaltsas, H. Skaltsa, *J. Nat. Prod.* **66** (2003) 699–702.
174. H.-X. Xu, S. F. Lee, *Phyther. Res.* **15** (2001) 39–43.
175. E.-A. Bae, M. Han, D.-H. Kim, *Planta Med.* **65** (1999) 442–443.
176. H. Arima, H. Ashida, G. Danno, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66** (2002) 1009–1014.
177. M. Singh, R. Govindarajan, A. K. S. Rawat, P. B. Khare, *Am. Fern J.* **98** (2008) 98–103.
178. W. C. Cutting, R. H. Dreisbach, B. J. Neff, *Stanford Med Bull.* **7** (1949) 137.
179. T. N. Kaul, E. Middleton, P. L. Ogra, *J. Med. Virol.* **15** (1985) 71–79.
180. I. Sanchez, F. Gomez-Garibay, J. Taboada, B. H. Ruiz, *Phyther. Res.* **14** (2000) 89–92.
181. S. Lalani, C. L. Poh, *Viruses* **12** (2020) 184.
182. C. Cafarchia, N. De Laurentis, M. Milillo, V. Losacco, V. Puccini, *Parassitologia* **41** (2000) 587–590.
183. F. A. Tomas-Barberán, J. D. Msonthi, K. Hostettmann, *Phytochemistry* **27** (1988) 753–755.
184. A. Afolayan, J. J. Meyer, *J. Ethnopharmacol.* **57** (1997) 177–181.
185. Y. Jia, C. Li, M. Yin, J. Lin, L. Zhang, N. Li, N. Jiang, Q. Xu, Q. Wang, L. Gu, B. Yu, G. Zhao, *Exp. Eye Res.* **216** (2022) 108960.
186. P. S. Pok, V. A. García Londoño, S. Vicente, A. Pacin, S. M. Alzamora, S. L. Resnik, *J. Appl. Microbiol.* **132** (2022) 2234–2248.

187. Y.-Z. Cai, Mei Sun, Jie Xing, Q. Luo, H. Corke, *Life Sci.* **78** (2006) 2872–2888.
188. J. P. Brown, *Mutat. Res. Genet. Toxicol.* **75** (1980) 243–277.
189. S. Kitagawa, H. Fujisawa, H. Sakurai, *Chem. Pharm. Bull.* **40** (1992) 304–307.
190. A. Sekher Pannala, T. S. Chan, P. J. O'Brien, C. A. Rice-Evans, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **282** (2001) 1161–1168.
191. L. R. Fukumoto, G. Mazza, *J. Agric. Food Chem.* **48** (2000) 3597–3604.
192. I. B. Afanas'ev, A. I. Dcrozshko, A. V. Brodskii, V. A. Kostyuk, A. I. Potapovitch, *Biochem. Pharmacol.* **38** (1989) 1763–1769.
193. N. L. Kerry, M. Abbey, *Atherosclerosis* **135** (1997) 93–102.
194. H. Haraguchi, T. Saito, H. Ishikawa, H. Date, S. Kataoka, Y. Tamura, K. Mizutani, *Planta Med.* **62** (1996) 217–221.
195. B. Gullón, T. A. Lú-Chau, M. T. Moreira, J. M. Lema, G. Eibes, *Trends Food Sci. Technol.* **67** (2017) 220–235.
196. J. Yang, J. Guo, J. Yuan, *LWT - Food Sci. Technol.* **41** (2008) 1060–1066.
197. N. Kamalakkannan, P. S. M. Prince, *Mol. Cell. Biochem.* **293** (2006) 211–219.
198. H. Yamasaki, Y. Sakihama, N. Ikehara, *Plant Physiol.* **115** (1997) 1405–1412.
199. A. Michalak, *Polish J. Environ. Stud.* **15** (2006) 523–530.
200. S. J. Duthie, V. L. Dobson, *Eur. J. Nutr.* **38** (1999) 28–34.
201. M. G. L. Hertog, P. C. H. Hollman, M. B. Katan, *J. Agric. Food Chem.* **40** (1992) 2379–2383.
202. U. Justesen, P. Knuthsen, T. Leth, *J. Chromatogr. A* **799** (1998) 101–110.
203. J. H. de Vries, P. C. Hollman, S. Meyboom, M. N. Buysman, P. L. Zock, W. A. van Staveren, M. B. Katan, *Am. J. Clin. Nutr.* **68** (1998) 60–65.
204. P. C. . Hollman, J. M. . van Trijp, M. N. C. . Buysman, M. S. v.d. Gaag, M. J. . Mengelers, J. H. . de Vries, M. B. Katan, *FEBS Lett.* **418** (1997) 152–156.
205. P. C. Hollman, J. H. de Vries, S. D. van Leeuwen, M. J. Mengelers, M. B. Katan, *Am. J. Clin. Nutr.* **62** (1995) 1276–1282.
206. P. C. H. Hollman, M. V.D. Gaag, M. J. B. Mengelers, J. M. P. Van Trijp, J. H. M. De Vries, M. B. Katan, *Free Radic. Biol. Med.* **21** (1996) 703–707.
207. D. R. Ferry, A. Smith, J. Malkhandi, D. W. Fyfe, P. G. DeTakats, D. Anderson, J. Baker, D. J. Kerr, *Clin. Cancer Res.* **2** (1996) 659–668.
208. M. A. Avila, J. A. Velasco, J. Cansado, V. Notano, *Cancer Res.* **54** (1994) 2424–2428.

209. P. Asgharian, A. P. Tazehkand, S. R. Soofiyani, K. Hosseini, M. Martorell, V. Tarhriz, H. Ahangari, N. Cruz-Martins, J. Sharifi-Rad, Z. M. Almarhoon, A. Ydyrys, A. Nurzhanyat, A. Yessenbekova, W. C. Cho, *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2021** (2021) 1–13.
210. S. G. Darband, M. Kaviani, B. Yousefi, S. Sadighparvar, F. G. Pakdel, J. A. Attari, I. Mohebbi, S. Naderi, M. Majidinia, *J. Cell. Physiol.* **233** (2018) 6544–6560.
211. D. Teekaraman, S. P. Elayapillai, M. P. Viswanathan, A. Jagadeesan, *Chem. Biol. Interact.* **300** (2019) 91–100.
212. E.-S. Lee, H.-E. Lee, J.-Y. Shin, S. Yoon, J.-O. Moon, *J. Pharm. Pharmacol.* **55** (2003) 1169–1174.
213. M. Li, Z. Xu, *Arch. Pharm. Res.* **31** (2008) 640–644.
214. A. Veckenstedt, J. Güttner, I. Béládi, *Antiviral Res.* **7** (1987) 169–178.
215. I. Mucsi, *Acta Virol.* **28** (1984) 395–400.
216. Y. Zeng, J. Song, M. Zhang, H. Wang, Y. Zhang, H. Suo, *Antioxidants* **9** (2020) 732.
217. F. Nghakliana, C. Lalmuansangi, M. Zosangzuali, M. Lalremruati, Zothansiam, *Indian J. Biochem. Biophys.* **58** (2021) 543–556.
218. S. Liu, Y. Zhu, N. Liu, D. Fan, M. Wang, Y. Zhao, *J. Agric. Food Chem.* **69** (2021) 1057–1067.
219. M. Leopoldini, N. Russo, S. Chiodo, M. Toscano, *J. Agric. Food Chem.* **54** (2006) 6343–6351.
220. D. Margina, M. Ilie, G. Manda, I. Neagoe, M. Mocanu, D. Ionescu, D. Gradinaru, C. Ganea, *Gen. Physiol. Biophys.* **31** (2012) 47–55.
221. K. Herrmann, *Int. J. Food Sci. Technol.* **11** (1976) 433–448.
222. M. Katalinić, G. Rusak, J. Domaćinović Barović, G. Šinko, D. Jelić, R. Antolović, Z. Kovarik, *Eur. J. Med. Chem.* **45** (2010) 186–192.
223. J. Feng, X. Chen, Y. Wang, Y. Du, Q. Sun, W. Zang, G. Zhao, *Mol. Cell. Biochem.* **408** (2015) 163–170.
224. Y. Xu, Q. Xie, S. Wu, D. Yi, Y. Yu, S. Liu, S. I, Z. Li, *Mol. Med. Rep.* **13** (2016) 2094–2100.
225. J. H. Lee, Y. J. Choi, S.-H. Park, M. J. Nam, *Food Chem. Toxicol.* **116** (2018) 315–322.
226. K. C. Ong, H.-E. Khoo, *Gen. Pharmacol. Vasc. Syst.* **29** (1997) 121–126.

227. Y. Oyama, P. A. Fuchs, N. Katayama, K. Noda, *Brain Res.* **635** (1994) 125–129.
228. T.-W. Lian, L. Wang, Y.-H. Lo, I.-J. Huang, M.-J. Wu, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1781** (2008) 601–609.
229. D. T. Ha, P. T. Thuong, N. D. Thuan, *Vietnam J. Chem.* **45** (2014) 768.
230. J. Robak, R. J. Gryglewski, *Biochem. Pharmacol.* **37** (1988) 837–841.
231. S. Godse, M. Mohan, V. Kasture, S. Kasture, *Pharm. Biol.* **48** (2010) 494–498.
232. R. Landolfi, R. L. Mower, M. Steiner, *Biochem. Pharmacol.* **33** (1984) 1525–1530.
233. Y. Li, Y. Ding, *Food Sci. Hum. Wellness* **1** (2012) 19–25.
234. T. Fossen, P. Larsen, B. Kiremire, O. Andersen, *Phytochemistry* **51** (1999) 1133–1137.
235. C. Seo, E.-K. Ahn, J.-S. Kang, J.-H. Lee, J. S. Oh, S. S. Hong, *Phytochem. Lett.* **20** (2017) 93–97.
236. P. Picerno, T. Mencherini, R. D. Loggia, M. Meloni, R. Sanogo, R. P. Aquino, *J. Pharm. Pharmacol.* **58** (2010) 981–988.
237. D. A. Okoth, H. Y. Chenia, N. A. Koorbanally, *Phytochem. Lett.* **6** (2013) 476–481.
238. L. Jayasinghe, N. R. Amarasinghe, B. G. S. Arundathie, G. K. Rupasinghe, N. H. A. N. Jayatilake, Y. Fujimoto, *Nat. Prod. Res.* **26** (2012) 717–721.
239. Y.-T. Tung, J.-H. Wu, C.-Y. Hsieh, P.-S. Chen, S.-T. Chang, *Food Chem.* **115** (2009) 1019–1024.
240. N. He, P. Wang, Y. Niu, J. Chen, C. Li, W. Kang, *Ind. Crops Prod.* **129** (2019) 536–541.
241. F. C. Meotti, F. C. Missau, J. Ferreira, M. G. Pizzolatti, C. Mizuzaki, C. W. Nogueira, A. R. S. Santos, *Biochem. Pharmacol.* **72** (2006) 1707–1713.
242. R. Domitrović, K. Rashed, O. Cvijanović, S. Vladimir-Knežević, M. Škoda, A. Višnić, *Chem. Biol. Interact.* **230** (2015) 21–29.
243. W. Chen, J. Zhuang, Y. Li, Y. Shen, X. Zheng, *Food Chem.* **141** (2013) 927–933.
244. A. Yokomizo, M. Moriwaki, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69** (2005) 693–699.
245. M. K. Sarkar, A. Kar, A. Jayaraman, K. Shanmugam, V. Vadivel, S. K. Mahapatra, *Mol. Biol. Rep.* **48** (2021) 5327–5334.
246. Z. Yan, Z. Lin, Y. Wu, J. Zhan, W. Qi, J. Lin, J. Shen, X. Xue, X. Pan, *Int. Immunopharmacol.* **84** (2020) 106511.
247. J. Jeevanandam, A. Barhoum, Y. S. Chan, A. Dufresne, M. K. Danquah, *Beilstein J. Nanotechnol.* **9** (2018) 1050–1074.

248. <https://www.epa.gov/chemical-research/research-nanomaterials> (preuzeto 12.5.2022.)
249. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/considering-whether-fda-regulated-product-involves-application-nanotechnology> (preuzeto 12.5.2022.)
250. J. Potocnik, *Off. J. Eur. Union* **54** (2011) 275: 38–40.
251. <<https://www.iso.org/standard/51240.html> (preuzeto 12.5.2022.)
252. J. LaRocque, D. J. Bharali, S. A. Mousa, *Mol. Biotechnol.* **42** (2009) 358–366.
253. D. Papakostas, F. Rancan, W. Sterry, U. Blume-Peytavi, A. Vogt, *Arch. Dermatol. Res.* **303** (2011) 533–550.
254. M. Saeedi, M. Eslamifar, K. Khezri, S. M. Dizaj, *Biomed. Pharmacother.* **111** (2019) 666–675.
255. X. Yu, I. Trase, M. Ren, K. Duval, X. Guo, Z. Chen, *J. Nanomater.* **2016** (2016) 1–15.
256. D. W. Northfelt, F. J. Martin, P. Working, P. A. Volberding, J. Russell, M. Newman, M. A. Amantea, L. D. Kaplan, *J. Clin. Pharmacol.* **36** (1996) 55–63.
257. P. S. Gill, B. Akil, P. Colletti, M. Rarick, C. Loureiro, M. Bernstein-Singer, M. Krailo, A. M. Levine, *Am. J. Med.* **87** (1989) 57–61.
258. B. Gopalan, I. Ito, C. D. Branch, C. Stephens, J. A. Roth, R. Ramesh, *Technol. Cancer Res. Treat.* **3** (2004) 647–657.
259. G. A. Castro, A. L. L. R. Coelho, C. A. Oliveira, G. A. B. Mahecha, R. L. Oréfice, L. A. M. Ferreira, *Int. J. Pharm.* **381** (2009) 77–83.
260. M. A. Chaves, L. Baldino, S. C. Pinho, E. Reverchon, *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **132** (2022) 104120.
261. M. N. M. Izham, Y. Hussin, N. F. C. Rahim, M. N. M. Aziz, S. K. Yeap, H. S. Rahman, M. J. Masarudin, N. E. Mohamad, R. Abdullah, N. B. Alitheen, *BMC Complement. Med. Ther.* **21** (2021) 254.
262. A. Munir, F. Muhammad, Y. Zaheer, A. Ali, M. Iqbal, M. Rehman, M. U. Munir, B. Akhtar, T. J. Webster, A. Sharif, A. Ihsan, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **66** (2021) 102854.
263. M. Liu, F. Wang, C. Pu, W. Tang, Q. Sun, *Food Chem.* **358** (2021) 129840.
264. S. Arpicco, C. Lerda, E. Dalla Pozza, C. Costanzo, N. Tsapis, B. Stella, M. Donadelli, I. Dando, E. Fattal, L. Cattel, M. Palmieri, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **85** (2013) 373–380.

265. X. Hou, T. Zaks, R. Langer, Y. Dong, *Nat. Rev. Mater.* **6** (2021) 1078–1094.
266. S. Yousuf, H. R. Siddique, F. Arjmand, S. Tabassum, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **71** (2022) 103281.
267. S. K. Vashist, D. Zheng, G. Pastorin, K. Al-Rubeaan, J. H. T. Luong, F.-S. Sheu, *Carbon N. Y.* **49** (2011) 4077–4097.
268. C. Klumpp, K. Kostarelos, M. Prato, A. Bianco, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1758** (2006) 404–412.
269. Z. Ji, G. Lin, Q. Lu, L. Meng, X. Shen, L. Dong, C. Fu, X. Zhang, *J. Colloid Interface Sci.* **365** (2012) 143–149.
270. E. Heister, V. Neves, C. Tilmaciu, K. Lipert, V. S. Beltrán, H. M. Coley, S. R. P. Silva, J. McFadden, *Carbon N. Y.* **47** (2009) 2152–2160.
271. X. Zhang, L. Meng, Q. Lu, Z. Fei, P. J. Dyson, *Biomaterials* **30** (2009) 6041–6047.
272. S. Hampel, D. Kunze, D. Haase, K. Krämer, M. Rauschenbach, M. Ritschel, A. Leonhardt, J. Thomas, S. Oswald, V. Hoffmann, B. Büchner, *Nanomedicine* **3** (2008) 175–182.
273. L. Guo, R. Wang, H. Xu, J. Liang, *Phys. E Low-dimensional Syst. Nanostructures* **27** (2005) 240–244.
274. B. Frank, J. Zhang, R. Blume, R. Schlögl, D. S. Su, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **48** (2009) 6913–6917.
275. S. Fang, L. Shen, X. Zhang, *Application of Carbon Nanotubes in Lithium-Ion Batteries Ind. Appl. Carbon Nanotub.*, Elsevier Inc., Amsterdam, 2017, str. 251–276.
276. J. Kong, N. R. Franklin, C. Zhou, M. G. Chapline, S. Peng, K. Cho, H. Dai, *Science* **287** (2000) 622–625.
277. T. Niaz, S. Shabbir, S. Manzoor, A. Rehman, A. Rahman, H. Nasir, M. Imran, *Carbohydr. Polym.* **142** (2016) 268–274.
278. S.-J. Yang, F.-H. Lin, H.-M. Tsai, C.-F. Lin, H.-C. Chin, J.-M. Wong, M.-J. Shieh, *Biomaterials* **32** (2011) 2174–2182.
279. J. H. Ryu, J. H. Na, H. K. Ko, D. G. You, S. Park, E. Jun, H. J. Yeom, D. H. Seo, J. H. Park, S. Y. Jeong, I.-S. Kim, B.-S. Kim, I. C. Kwon, K. Choi, K. Kim, *Biomaterials* **35** (2014) 2302–2311.
280. R. Fernandez-Urrusuno, P. Calvo, C. Remunan-Lopez, J. Vila-Jato, M. Alonso, *Pharm. Res.* **16** (1999) 1576–1581.

281. R. Pignatello, C. Bucolo, G. Spedalieri, A. Maltese, G. Puglisi, *Biomaterials* **23** (2002) 3247–3255.
282. S. Prabha, V. Labhasetwar, *Mol. Pharm* **1** (2004) 211–219.
283. H. Lboutounne, J.-F. Chaulet, C. Ploton, F. Falson, F. Pirot, *J. Control. Release* **82** (2002) 319–334.
284. J. Ding, Y. Sun, J. Li, H. Wang, S. Mao, *J. Drug Target.* **25** (2017) 532–540.
285. A. Gulyaev, S. Gelperina, I. Skidan, A. Antropov, G. Kivman, J. Kreuter, *Pharm. Res.* **16** (1999) 1564–1569.
286. S. Tripathy, M. Das, *J. Appl. Pharm. Sci.* **3** (2013) 142–149.
287. S. Bai, C. Thomas, F. Ahsan, *J. Pharm. Sci.* **96** (2007) 2090–2106.
288. A. S. Chauhan, S. Sridevi, K. B. Chalasani, A. K. Jain, S. K. Jain, N. . Jain, P. V Diwan, *J. Control. Release* **90** (2003) 335–343.
289. P. Kesharwani, L. Xie, S. Banerjee, G. Mao, S. Padhye, F. H. Sarkar, A. K. Iyer, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **136** (2015) 413–423.
290. P. Charoenphol, H. Bermudez, *Mol. Pharm.* **11** (2014) 1721–1725.
291. Y.-H. Tsuang, J.-S. Sun, Y.-C. Huang, C.-H. Lu, W. H.-S. Chang, C.-C. Wang, *Artif. Organs* **32** (2008) 167–174.
292. X. Chen, H. J. Schluesener, *Toxicol. Lett.* **176** (2008) 1–12.
293. L. R. Hirsch, R. J. Stafford, J. A. Bankson, S. R. Sershen, B. Rivera, R. E. Price, J. D. Hazle, N. J. Halas, J. L. West, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100** (2003) 13549–13554.
294. M. Vallet-Regí, M. Colilla, I. Izquierdo-Barba, M. Manzano, *Molecules* **23** (2018) 1–19.
295. K. K. Pohaku Mitchell, A. Liberman, A. C. Kummel, W. C. Trogler, *J. Am. Chem. Soc.* **134** (2012) 13997–14003.
296. J. C. Doadrio, E. M. B. Sousa, I. Izquierdo-Barba, A. L. Doadrio, J. Perez-Pariente, M. Vallet-Regí, *J. Mater. Chem.* **16** (2006) 462–466.
297. F. Balas, M. Manzano, P. Horcajada, M. Vallet-Regí, *J. Am. Chem. Soc.* **128** (2006) 8116–8117.
298. M. R. Ghazanfari, M. Kashefi, S. F. Shams, M. R. Jaafari, *Biochem. Res. Int.* **2016** (2016) 1–32.
299. J. Qu, G. Liu, Y. Wang, R. Hong, *Adv. Powder Technol.* **21** (2010) 461–467.
300. S. Mohammadi-Samani, R. Miri, M. Salmanpour, N. Khalighian, S. Sotoudeh, N.

- Erfani, *Res. Pharm. Sci.* **8** (2013) 25–33.
301. K. Hervé, L. Douziech-Eyrolles, E. Munnier, S. Cohen-Jonathan, M. Soucé, H. Marchais, P. Limelette, F. Warmont, M. L. Saboungi, P. Dubois, I. Chourpa, *Nanotechnology* **19** (2008) 465608.
302. M. L. Mojica Piscioti, E. Lima, M. Vasquez Mansilla, V. E. Tognoli, H. E. Troiani, A. A. Pasa, T. B. Creczynski-Pasa, A. H. Silva, P. Gurman, L. Colombo, G. F. Goya, A. Lamagna, R. D. Zysler, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **102** (2014) 860–868.
303. C.-W. Zhang, C.-C. Zeng, Y. Xu, *Nano* **09** (2014) 1450042.
304. M. Z. Iqbal, X. Ma, T. Chen, L. Zhang, W. Ren, L. Xiang, A. Wu, *J. Mater. Chem. B* **3** (2015) 5172–5181.
305. Y. Arum, Y.-O. Oh, H. W. Kang, S.-H. Ahn, J. Oh, *Fish. Aquat. Sci.* **18** (2015) 89–98.
306. D. Dorniani, M. Zobir, A. U. Kura, S. Fakurazi, A. Halim Shaari, Z. Ahmad, *Drug Des. Devel. Ther.* **7** (2013) 1015–1026.
307. S. Shen, L. Wu, C.-R. Wang, X.-Y. Qi, Y.-R. Ge, Y. Jin, *Yao Xue Xue Bao* **48** (2013) 1844–9.
308. P. Sharma, S. Rana, K. C. Barick, C. Kumar, H. G. Salunke, P. A. Hassan, *New J. Chem.* **38** (2014) 5500–5508.
309. J. Wu, S. Xu, W. Jiang, Y. Shen, M. Pu, *Biotechnol. Lett.* **37** (2015) 585–591.
310. G. Li, L. Cao, Z. Zhou, Z. Chen, Y. Huang, Y. Zhao, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **128** (2015) 379–388.
311. R. Y. Hong, B. Feng, L. L. Chen, G. H. Liu, H. Z. Li, Y. Zheng, D. G. Wei, *Biochem. Eng. J.* **42** (2008) 290–300.
312. Y. Zhang, J.-Y. Liu, S. Ma, Y.-J. Zhang, X. Zhao, X.-D. Zhang, Z.-D. Zhang, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **21** (2010) 1205–1210.
313. G. Wang, Y. Chang, L. Wang, Z. Wei, J. Kang, L. Sang, X. Dong, G. Chen, H. Wang, M. Qi, *J. Magn. Magn. Mater.* **340** (2013) 57–60.
314. Q. L. Jiang, S. W. Zheng, R. Y. Hong, S. M. Deng, L. Guo, R. L. Hu, B. Gao, M. Huang, L. F. Cheng, G. H. Liu, Y. Q. Wang, *Appl. Surf. Sci.* **307** (2014) 224–233.
315. T. Ahmad, H. Bae, I. Rhee, Y. Chang, S.-U. Jin, S. Hong, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **12** (2012) 5132–5137.
316. D.-L. Zhao, X.-W. Zeng, Q.-S. Xia, J.-T. Tang, *J. Alloys Compd.* **469** (2009) 215–218.

317. R. Ghosh, L. Pradhan, Y. P. Devi, S. S. Meena, R. Tewari, A. Kumar, S. Sharma, N. S. Gajbhiye, R. K. Vatsa, B. N. Pandey, R. S. Ningthoujam, *J. Mater. Chem.* **21** (2011) 13388.
318. S. Anu Mary Ealia, M. P. Saravanakumar, *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* **263** (2017) 032019.
319. C. Y. Tai, C.-T. Tai, M.-H. Chang, H.-S. Liu, *Ind. Eng. Chem. Res.* **46** (2007) 5536–5541.
320. M. Adachi, S. Tsukui, K. Okuyama, *Jpn. J. Appl. Phys.* **42** (2003) L77–L79.
321. H. K. Kammler, L. Mädler, S. E. Pratsinis, *Chem. Eng. Technol.* **24** (2001) 583–596.
322. P. Kuppusamy, M. M. Yusoff, G. P. Maniam, N. Govindan, *Saudi Pharm. J.* **24** (2016) 473–484.
323. T. Prasad Yadav, R. Manohar Yadav, D. Pratap Singh, *Nanosci. Nanotechnol.* **2** (2012) 22–48.
324. A. Pimpin, W. Srituravanich, *Eng. J.* **16** (2012) 37–56.
325. V. Amendola, M. Meneghetti, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **11** (2009) 3805.
326. M. Salavati-Niasari, F. Davar, N. Mir, *Polyhedron* **27** (2008) 3514–3518.
327. R. N. Saha, S. Vasanthakumar, G. Bende, M. Snehalatha, *Mol. Membr. Biol.* **27** (2010) 215–231.
328. U. Bilati, E. Allémann, E. Doelker, *AAPS PharmSciTech* **6** (2005) E594–E604.
329. Z. Zili, S. Sfar, H. Fessi, *Int. J. Pharm.* **294** (2005) 261–267.
330. L. Mu, S.-S. Feng, *Pharm. Res.* **20** (2003) 1864–1872.
331. R. M. Mainardes, R. C. Evangelista, *Int. J. Pharm.* **290** (2005) 137–144.
332. C. Vauthier, K. Bouchemal, *Pharm. Res.* **26** (2009) 1025–1058.
333. U. Gaur, S. K. Sahoo, T. K. De, P. C. Ghosh, A. Maitra, P. . Ghosh, *Int. J. Pharm.* **202** (2000) 1–10.
334. T. Sahu, Y. K. Ratre, S. Chauhan, L. V. K. S. Bhaskar, M. P. Nair, H. K. Verma, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **63** (2021) 102487.
335. S. Hasani, Y. Pellequer, A. Lamprecht, *Pharm. Res.* **26** (2009) 1149–1154.
336. S. Muro, C. Garnacho, J. A. Champion, J. Leferovich, C. Gajewski, E. H. Schuchman, S. Mitragotri, V. R. Muzykantov, *Mol. Ther.* **16** (2008) 1450–1458.
337. B. D. Chithrani, A. A. Ghazani, W. C. W. Chan, *Nano Lett.* **6** (2006) 662–668.
338. R. Toy, K. Roy, *Bioeng. Transl. Med.* **1** (2016) 47–62.

339. R. Agarwal, P. Journey, M. Raythatha, V. Singh, S. V. Sreenivasan, L. Shi, K. Roy, *Adv. Healthc. Mater.* **4** (2015) 2269–2280.
340. K. E. Uhrich, S. M. Cannizzaro, R. S. Langer, K. M. Shakesheff, *Chem. Rev.* **99** (1999) 3181–3198.
341. D. A. LaVan, D. M. Lynn, R. Langer, *Nat. Rev. Drug Discov.* **1** (2002) 77–84.
342. C. Kneuer, M. Sameti, U. Bakowsky, T. Schiestel, H. Schirra, H. Schmidt, C.-M. Lehr, *Bioconjug. Chem.* **11** (2000) 926–932.
343. M. P. Desai, V. Labhasetwar, G. L. Amidon, R. J. Levy, *Pharm. Res.* **13** (1996) 1838–1845.
344. F. Xiong, S. Huang, N. Gu, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **44** (2018) 697–706.
345. Y. Fu, W. J. Kao, *Expert Opin. Drug Deliv.* **7** (2010) 429–444.
346. P. Horcajada, A. Rámila, J. Pérez-Pariente, M. Vallet-Regí, *Microporous Mesoporous Mater.* **68** (2004) 105–109.
347. P. Costa, J. M. Sousa Lobo, *Eur. J. Pharm. Sci.* **13** (2001) 123–133.
348. M. Vallet-Regí, J. C. Doadrio, A. L. Doadrio, I. Izquierdo-Barba, J. Perez-Pariente, *Solid State Ionics* **172** (2004) 435–439.
349. Z. Yang, S. Nie, W. W. Hsiao, W. Pam, *Int. J. Nanomedicine* **6** (2011) 151–166.
350. S. B. Nicoll, S. Radin, E. M. Santos, R. S. Tuan, P. Ducheyne, *Biomaterials* **18** (1997) 853–859.
351. Higuchi T., *J. Pharm. Sci.* **52** (1963) 1145–1149.
352. M. Cicuéndez, I. Izquierdo-Barba, M. T. Portolés, M. Vallet-Regí, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **84** (2013) 115–124.
353. M. N. Freitas, J. M. Marchetti, *Int. J. Pharm.* **295** (2005) 201–211.
354. M. Glavas-Dodov, E. Fredro-Kumbaradzi, K. Goracinova, S. Calis, M. Simonoska, A. A. Hincal, *Acta Pharm.* **53** (2003) 241–250.
355. A. Jain, S. K. Jain, *Chem. Phys. Lipids* **201** (2016) 28–40.
356. L. Zhao, Y. Wei, J. Guo, X. Zheng, J. Wu, Y. Zhou, Y. Yu, L. Zhang, Y. Ye, *Int. J. Nanomedicine* **9** (2014) 3623–3630.
357. Y. Gao, J. Chen, H. Jiang, Y. Wu, Y. Li, *Drug Des. Devel. Ther.* **9** (2015) 2265–2275.
358. S. Jeon, C. Y. Yoo, S. N. Park, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **129** (2015) 7–14.
359. B. Elorza, M. A. Elorza, M. C. Sainz, J. R. Chantres, *J. Microencapsul.* **10** (1993) 237–248.

360. M. B. Frampton, A. Blais, Z. Raczynowski, A. Castle, P. M. Zelisko, *RSC Adv.* **11** (2021) 13014–13023.
361. C. H. Spink, *Methods in Cell biology* **84** (2008) 115–141.
362. S. V Kontomaris, A. Stylianou, *Eur. J. Phys.* **38** (2017) 033003.
363. D. Alsteens, H. E. Gaub, R. Newton, M. Pfreundschuh, C. Gerber, D. J. Müller, *Nat. Rev. Mater.* **2** (2017) 17008.
364. H. Sies, *Redox Biol.* **11** (2017) 613–619.
365. A. S. Ulrich, M. Sami, A. Watts, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1191** (1994) 225–230.
366. G. Pabst, *Biophys. Rev. Lett.* **01** (2006) 57–84.
367. F. Spinozzi, C. Ferrero, M. G. Ortore, A. De Maria Antolinos, P. Mariani, *J. Appl. Crystallogr.* **47** (2014) 1132–1139.
368. M. Jazvinščak Jembrek, J. Vlanić, V. Čadež, S. Šegota, *PLoS One* **13** (2018) e0200119.
369. M. M. Roessler, E. Salvadori, *Chem. Soc. Rev.* **47** (2018) 2534–2553.
370. O. Hayes Griffith, P. Jost u L. Berliner (ur.), *Spin labeling Theory Appl.*, Academic Press, New York, 1976, str. 454–520.
371. J. Grdadolnik, *Acta Chim.Slov* **49** (2002) 631–642.
372. Z. Arsov, M. Rappolt, J. Grdadolnik, *ChemPhysChem* **10** (2009) 1438–1441.
373. A. Oleszko, S. Olsztyńska-Janus, T. Walski, K. Grzeszczuk-Kuč, J. Bujok, K. Gałęcka, A. Czerski, W. Witkiewicz, M. Komorowska, *Biomed Res. Int.* **2015** (2015) 1–9.
374. M. S. Bradley, J. H. Krech, *J. Phys. Chem.* **97** (1993) 575–580.
375. M. Shariati-Rad, M. Irandoust, T. Amini, M. Hasani, M. Shamsipur, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **122** (2013) 84–92.
376. B. Luo, S. Xu, A. Luo, W.-R. Wang, S.-L. Wang, J. Guo, Y. Lin, D.-Y. Zhao, C.-C. Wang, *ACS Nano* **5** (2011) 1428–1435.
377. B. Luo, S. Xu, W.-F. Ma, W.-R. Wang, S.-L. Wang, J. Guo, W.-L. Yang, J.-H. Hu, C.-C. Wang, *J. Mater. Chem.* **20** (2010) 7107.
378. R. Feidenhans'l, *Surf. Sci. Rep.* **10** (1989) 105–188.
379. A. Monshi, M. R. Foroughi, M. R. Monshi, *World J. Nano Sci. Eng.* **02** (2012) 154–160.
380. N. Kallay, T. Preočanin, D. Kovačević, J. Lutzenkirchen, E. Chibowski, *Croat. Chem.*

- Acta* **83** (2010) 357.
381. Y. S. Tarahovsky, Y. A. Kim, E. A. Yagolnik, E. N. Muzafarov, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1838** (2014) 1235–1246.
382. L. Pohjala, P. Tammela, *Molecules* **17** (2012) 10774–10790.
383. A. Saija, F. Bonina, D. Trombetta, A. Tomaino, L. Montenegro, P. Smeriglio, F. Castelli, *Int. J. Pharm.* **124** (1995) 1–8.
384. M. Caffrey, J. Hogan, *Chem. Phys. Lipids* **61** (1992) 1–109.
385. K. A. Riske, R. P. Barroso, C. C. Vequi-Suplicy, R. Germano, V. B. Henriques, M. T. Lamy, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1788** (2009) 954–963.
386. R. Sinha, A. Joshi, U. J. Joshi, S. Srivastava, G. Govil, *Eur. J. Med. Chem.* **80** (2014) 285–294.
387. R. N. McElhaney, *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* **864** (1986) 361–421.
388. A. Bóta, E. Klumpp, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **265** (2005) 124–130.
389. R. Sinha, U. J. Joshi, A. Joshi, G. Govil, *Int. J. Curr. Pharm. Res.* **10** (2018) 60.
390. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> (preuzeto 12.5.2022.)
391. H. A. Scheidt, A. Pampel, L. Nissler, R. Gebhardt, D. Huster, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1663** (2004) 97–107.
392. B. Pawlikowska-Pawlęga, L. E. Misiak, B. Zarzyka, R. Paduch, A. Gawron, W. I. Gruszecki, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1828** (2013) 518–527.
393. S. Ali, S. Minchey, A. Janoff, E. Mayhew, *Biophys. J.* **78** (2000) 246–256.
394. J. Zhou, D. Liang, S. Contera, *Nanoscale* **7** (2015) 17102–17108.
395. A. N. Samoilov, S. S. Minenko, O. Y. Sushynskiy, L. N. Lisetski, N. I. Lebovka, *J. Mol. Liq.* **295** (2019) 111689.
396. I. Milic, R. Hoffmann, M. Fedorova, *Anal. Chem.* **85** (2013) 156–162.
397. B. Hollebrands, E. Varvaki, S. Kaal, H.-G. Janssen, *Anal. Bioanal. Chem.* **410** (2018) 5421–5429.
398. C. P. Bernardes, N. A. G. Santos, T. R. Costa, F. Sisti, L. Amaral, D. L. Menaldo, M. K. Amstalden, D. L. Ribeiro, L. M. G. Antunes, S. V. Sampaio, A. C. Santos, *Neurotox. Res.* **37** (2020) 227–237.
399. Mano, Biswas, Sugimoto, *Plants* **8** (2019) 391.
400. X. Fang, W. Gao, Z. Yang, Z. Gao, H. Li, *J. Agric. Food Chem.* **68** (2020) 6202–6211.
401. E. Niki, Y. Yoshida, Y. Saito, N. Noguchi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**

- (2005) 668–676.
402. S. Toro-Uribe, L. J. López-Giraldo, E. A. Decker, *J. Agric. Food Chem.* **66** (2018) 4490–4502.
403. M. Buscema, H. Deyhle, T. Pfohl, A. Zumbuehl, B. Müller, *Mater. Today Bio* **1** (2019) 100003.
404. Z. Varga, S. Berényi, B. Szokol, L. Órfi, G. Kéri, I. Peták, A. Hoell, A. Bóta, *J. Phys. Chem. B* **114** (2010) 6850–6854.
405. Z. Varga, A. Bóta, G. Goerigk, *J. Phys. Chem. B* **110** (2006) 11029–11032.
406. T. M. Weiss, T. Narayanan, C. Wolf, M. Gradzielski, P. Panine, S. Finet, W. I. Helsby, *Phys. Rev. Lett.* **94** (2005) 038303.
407. S. Schmölzer, D. Gräbner, M. Gradzielski, T. Narayanan, *Phys. Rev. Lett.* **88** (2002) 258301.
408. S. Ristori, J. Oberdisse, I. Grillo, A. Donati, O. Spalla, *Biophys. J.* **88** (2005) 535–547.
409. L. Cwiklik, P. Jungwirth, *Chem. Phys. Lett.* **486** (2010) 99–103.
410. S. Attwood, Y. Choi, Z. Leonenko, *Int. J. Mol. Sci.* **14** (2013) 3514–3539.
411. L. Picas, F. Rico, S. Scheuring, *Biophys. J.* **102** (2012) L01–L03.
412. W.-Y. Tai, Y.-C. Yang, H.-J. Lin, C.-P. Huang, Y.-L. Cheng, M.-F. Chen, H.-L. Yen, I. Liao, *J. Phys. Chem. B* **114** (2010) 15642–15649.
413. I. Sánchez-Alonso, P. Carmona, M. Careche, *Food Chem.* **132** (2012) 160–167.
414. R. Itri, H. C. Junqueira, O. Mertins, M. S. Baptista, *Biophys. Rev.* **6** (2014) 47–61.
415. G. Mingrone, A. V. Greco, A. De Gaetano, A. Tataranni, C. Raguso, M. Castagneto, *J. Parenter. Enter. Nutr.* **18** (1994) 225–230.
416. X. Chen, S. Liu, B. Deme, V. Cristiglio, D. Marquardt, R. Weller, P. Rao, Y. Wang, J. Bradshaw, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1859** (2017) 910–916.
417. J. Wong-ekkabut, Z. Xu, W. Triampo, I.-M. Tang, D. Peter Tieleman, L. Monticelli, *Biophys. J.* **93** (2007) 4225–4236.
418. R. De Rosa, F. Spinozzi, R. Itri, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1860** (2018) 2299–2307.
419. T. Narayanan, D. Weerakkody, A. G. Karabadzak, M. Anderson, O. A. Andreev, Y. K. Reshetnyak, *J. Phys. Chem. B* **120** (2016) 11484–11491.
420. I. C. Tran, R. H. Tunuguntla, K. Kim, J. R. I. Lee, T. M. Willey, T. M. Weiss, A. Noy, T. van Buuren, *Nano Lett.* **16** (2016) 4019–4024.

421. K. A. Runas, N. Malmstadt, *Soft Matter* **11** (2015) 499–505.
422. P. Siani, R. M. de Souza, L. G. Dias, R. Itri, H. Khandelia, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1858** (2016) 2498–2511.
423. A.-A. Ungureanu, I. Benilova, O. Krylychkina, D. Braeken, B. De Strooper, C. Van Haesendonck, C. G. Dotti, C. Bartic, *Sci. Rep.* **6** (2016) 25841.
424. E. Nagababu, J. M. Rifkind, S. Boindala, L. Nakka, *Methods Mol. Bio.* **610** (2010) 165–180.
425. P. A. C. McPherson, A. Bole, K. A. Cruz, I. S. Young, J. McEneny, *Chem. Phys. Lipids* **165** (2012) 682–688.
426. N. P. Das, T. A. Pereira, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **67** (1990) 255–258.
427. E. N. Frankel, A. L. Waterhouse, P. L. Teissedre, *J. Agric. Food Chem.* **43** (1995) 890–894.
428. A. Mehta, T. Seshadri, *J. Sci. Ind. Res.* **18B** (1959) 24–28.
429. L. Ramanathan, N. P. Das, Q.-T. Li, *Biol. Trace Elem. Res.* **40** (1994) 59–70.
430. A. Kırca, M. Özkan, B. Cemeroglu, *Food Chem.* **101** (2007) 212–218.
431. B. Cemeroglu, S. Velioglu, S. Isik, *J. Food Sci.* **59** (1994) 1216–1218.
432. I. Zenkevich, A. Eshchenko, S. Makarova, A. Vitenberg, Y. Dobryakov, V. Utsal, *Molecules* **12** (2007) 654–672.
433. J. S. Barnes, F. W. Foss, K. A. Schug, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **24** (2013) 1513–1522.
434. A. Zhou, O. A. Sadik, *J. Agric. Food Chem.* **56** (2008) 12081–12091.
435. S. B. Brown, V. Rajananda, J. A. Holroyd, E. G. Evans, *Biochem. J.* **205** (1982) 239–244.
436. A. Marfak, P. Trouillas, D.-P. Allais, Y. Champavier, C.-A. Calliste, J.-L. Duroux, *J. Agric. Food Chem.* **50** (2002) 4827–4833.
437. A. Nishinaga, T. Tojo, H. Tomita, T. Matsuura, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1** (1979) 2511–2516.
438. T. Matsuura, H. Matsushima, R. Nakashima, *Tetrahedron* **26** (1970) 435–443.
439. O. Dangles, G. Fargeix, C. Dufour, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1** (1999) 1387–1395.
440. H. El Hajji, E. Nkhili, V. Tomao, O. Dangles, *Free Radic. Res.* **40** (2006) 303–320.
441. Y. Lin, B. Wu, Z. Li, T. Hong, M. Chen, Y. Tan, J. Jiang, C. Huang, *Chromatographia* **75** (2012) 655–660.

442. Y. L. Quek, D. Huang, *Tetrahedron Lett.* **52** (2011) 5384–5387.
443. Y. Yao, G. Lin, Y. Xie, P. Ma, G. Li, Q. Meng, T. Wu, *Pharmazie* **69** (2014) 19–26.
444. V. Chobot, F. Hadacek, G. Bachmann, W. Weckwerth, L. Kubicova, *Molecules* **25** (2020) 5850.
445. Q. Y. Zhu, Y. Huang, Z.-Y. Chen, *J. Nutr. Biochem.* **11** (2000) 14–21.
446. A. Hopia, M. Heinonen, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **76** (1999) 139–144.
447. N. C. Tombs, H. P. Rooksby, *Acta Crystallogr.* **4** (1951) 474–475.
448. G.-Y. Li, Y.-R. Jiang, K.-L. Huang, P. Ding, L.-L. Yao, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **320** (2008) 11–18.
449. M. Friák, A. Schindlmayr, M. Scheffler, *New J. Phys.* **9** (2007) 5–5.
450. M. M. Yallapu, S. P. Foy, T. K. Jain, V. Labhasetwar, *Pharm. Res.* **27** (2010) 2283–2295.
451. M. Rozenberg, A. Loewenschuss, Y. Marcus, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **54** (1998) 1819–1826.
452. A. Masoudi, H. R. Madaah Hosseini, M. A. Shokrgozar, R. Ahmadi, M. A. Oghabian, *Int. J. Pharm.* **433** (2012) 129–141.
453. S. A. Gudoshnikov, B. Y. Liubimov, N. A. Usov, *AIP Adv.* **2** (2012) 012143.
454. V. V. Mody, A. Singh, B. Wesley, *Eur. J. Nanomedicine* **5** (2013)
455. D. Chicea, *Optoelectron. Adv. Mater.* **3** (2009) 1299–1305.
456. N. A. Kalkan, S. Aksoy, E. A. Aksoy, N. Hasirci, *J. Appl. Polym. Sci.* **123** (2012) 707–716.
457. Y.-C. Chang, D.-H. Chen, *J. Colloid Interface Sci.* **283** (2005) 446–451.
458. R. H. Gonçalves, C. A. Cardoso, E. R. Leite, *J. Mater. Chem.* **20** (2010) 1167–1172.
459. X. Li, H. Li, G. Liu, Z. Deng, S. Wu, P. Li, Z. Xu, H. Xu, P. K. Chu, *Biomaterials* **33** (2012) 3013–3024.
460. E. Gronczewska, A. Defort, J. J. Koziol, *Pharm. Chem. J.* **50** (2016) 491–499.
461. P. L. Ritger, N. A. Peppas, *J. Control. Release* **5** (1987) 37–42.
462. C. Mejía-Monasterio, R. Metzler, J. Vollmer, *Front. Phys.* **8** (2020)
463. M. J. Saxton, *Biophys. J.* **81** (2001) 2226–2240.
464. I. Bronstein, Y. Israel, E. Kepten, S. Mai, Y. Shav-Tal, E. Barkai, Y. Garini, *Phys. Rev. Lett.* **103** (2009) 018102.
465. J.-P. Bouchaud, A. Georges, *Phys. Rep.* **195** (1990) 127–293.

466. S. Lepri, *Phys. Rep.* **377** (2003) 1–80.
467. C. Özbilenler, E. M. Altundağ, M. Gazi, *J. Macromol. Sci. Part A* **58** (2021) 22–31.
468. S.-T. Liu, X.-G. Chen, S.-L. Zhang, X.-M. Liu, J.-J. Zhang, *Clays Clay Miner.* **69** (2021) 94–104.
469. J. L. Arias, M. A. Ruiz, V. Gallardo, Á. V. Delgado, *J. Control. Release* **125** (2008) 50–58.
470. S. Selvaraj, S. Shanmugasundaram, M. Maruthamuthu, B. Venkidasamy, S. Shanmugasundaram, *J. Clust. Sci.* **32** (2021) 1507–1518.
471. A. Kumari, S. K. Yadav, Y. B. Pakade, B. Singh, S. C. Yadav, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **80** (2010) 184–192.
472. A. C. H. Barreto, V. R. Santiago, S. E. Mazzetto, J. C. Denardin, R. Lavín, G. Mele, M. E. N. P. Ribeiro, I. G. P. Vieira, T. Gonçalves, N. M. P. S. Ricardo, P. B. A. Fechine, *J. Nanoparticle Res.* **13** (2011) 6545–6553.
473. M. Usacheva, B. Layek, S. S. Rahman Nirzhor, S. Prabha, *J. Nanomater.* **2016** (2016) 1–11.
474. H. Möller, D. von Cramon, *RöFo - Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der Bildgeb. Verfahren* **180** (2008) 293–301.
475. M. Uva, L. Mencuccini, A. Atrei, C. Innocenti, E. Fantechi, C. Sangregorio, M. Maglio, M. Fini, R. Barbucci, *Gels* **1** (2015) 24–43.
476. Wahajuddin, Arora, *Int. J. Nanomedicine* **7** (2012) 3445–3471.
477. A. Engen, J. Maeda, D. E. Wozniak, C. A. Brents, J. J. Bell, M. Uesaka, Y. Aizawa, T. A. Kato, *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* **784–785** (2015) 15–22.
478. W. Xia, B. Zheng, T. Li, F. Lian, Y. Lin, R. Liu, *Carbohydr. Polym.* **250** (2020) 116848.
479. Y. Yao, M. Xia, H. Wang, G. Li, H. Shen, G. Ji, Q. Meng, Y. Xie, *Eur. J. Pharm. Sci.* **91** (2016) 144–153.

§ 8. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Anja Sadžak

Datum i mjesto rođenja: 29. rujna 1993., Zagreb

Obrazovanje

- 2000.-2008. Osnovna škola Ivana Filipovića, Zagreb
2008.-2012. XV. gimnazija, Zagreb
2012.-2015. Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
2015.-2018. Diplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
Smjer: istraživački, grane: fizikalna i analitička kemija
2018.-danas Doktorski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, grana: fizikalna kemija

Radno iskustvo

- 2018.-danas Institut Ruđer Bošković, Laboratorij za biokoloide i površinsku kemiju, Zavod za fizičku kemiju

Publikacije

1. J. Salopek, A. Sadžak, D. Kuzman, J. Požar, D. Kovačević, *Croat. Chem. Acta* **90** (2017) 281–287.
2. T. Klačić, A. Sadžak, J. Jukić, T. Preočanin, D. Kovačević, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* **570** (2019) 32–38.
3. L. Mandić, A. Sadžak, V. Strasser, G. Baranović, D. Domazet Jurašin, M. Dutour Sikirić, S. Šegota, *Int. J. Mol. Sci.* **20** (2019) 2709–2731.
4. A. Sadžak, J. Mravljak, N. Maltar-Strmečki, Z. Arsov, G. Baranović, I. Erceg, M. Kriechbaum, V. Strasser, J. Příbyl, S. Šegota, *Antioxidants* **9** (2020) 430–460.
5. A. Sadžak, Z. Brkljača, I. Crnolatac, G. Baranović, S. Šegota, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **193** (2020) 111147, 20.
6. A. Sadžak, I. Vlašić, Z. Kiralj, M. Batarelo, N. Oršolić, M. Jazvinščak Jembrek, I. Kušen, S. Šegota, *Molecules* **26** (2021) 4, 845, 28.
7. L. Mandić, A. Sadžak, I. Erceg, G. Baranović, S. Šegota, *Antioxidants* **10** (2021) 1212–1231.
8. M. Jazvinščak Jembrek, N. Oršolić, L. Mandić, A. Sadžak, S. Šegota, *Antioxidants* **10** (2021) 1628.

Poglavlja u knjigama

1. A. Sedaghat Doost, M. Nikbakht Nasrabadi, A. Sadžak, P. Van der Meeren, Production of food nanomaterials by specialized equipment, Handbook of Food Nanotechnology: Applications and approaches, S. Mahdi Jafari (ur.), Cambridge, Massachusetts, SAD: Academic Press, Elsevier, 2020. str. 161-204.

Sudjelovanja na skupovima

1. 08/2018 – 14th Greta Pifat Mrzljak International School of Biophysics (Split, Hrvatska), postersko priopćenje "Enhanced protection of biological membrane using flavonoid embedded nanoparticles"
2. 12/2018 – 13th Biophysics Christmas Workshop (Tuheljske Toplice, Hrvatska), usmeno priopćenje, "AFM and FTIR spectroscopy studies on the interaction of flavonoids with model cell membranes"
3. 12/2018 – 2nd Symposium of Supramolecular Chemistry (Zagreb, Hrvatska), postersko priopćenje, "Surface potential study of ceria/poly(4-styrenesulfonate) interface"
4. 06/2019 - European Student Colloid Conference (Varna, Bugarska), postersko priopćenje "Investigation of lipid peroxidation in model membranes and enhanced protection using flavonoid embedded nanoparticles"
5. 06/2019 - Solid State Science & Research Meeting (Zagreb, Croatia), postersko priopćenje, "Flavonoid loaded mesoporous silica nanoparticles as potential drug carriers"
6. 09/2019 - 33 Conference of The European Colloid and Interface Society (Leuven, Belgija), postersko priopćenje, "Flavonoid embedded superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Protection from lipid peroxidation"
7. 09/2019 - 14 Multinational Congress on Microscopy (Belgrade, Srbija), postersko priopćenje: "Oxidative stress in model membranes: Protection via flavonoid embedded nanoparticles"
8. 12/2019 – 14th Christmas Biophysics Workshop (Gradisca d'Isonzo, Italija), usmeno priopćenje, "Protection of lipid membranes during oxidative stress using flavonoid embedded silica nanoparticles"
9. 09/2021 – 35th Conference of the European Colloid & Interface Society (ECIS) (Atena, Grčka), postersko priopćenje: "Protective role of flavonoids incorporated into DOPC liposomes upon initiated lipid peroxidation"

Sudjelovanja na istraživačkim projektima

2018. – 2019. "The lipid-peroxidation inhibition governed by interactions between nanocarried flavonoids and model lipid membranes", hrvatsko-slovenski bilateralni projekt

2018. – 2020. "NanoFlavNeuroProtect - Zaštitni mehanizmi i učinci flavonoida ugrađenih u nanonosae u modelnim membranama i neuronima ", Hrvatska zaklada za znanost

2020 – 2021. "Kvantitativna analiza lipidne peroksidacije modelnih polinezasićenih lipidnih membrana u prisutnosti flavonoida masenom i FTIR spektroskopijom", hrvatsko-slovenski bilateralni projekt