

# Određivanje temperature glavnog faznog prijelaza neutralnih lipida UV/Vis spektroskopijom

---

Munivrana, Jana

Master's thesis / Diplomski rad

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:217:153741>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-24**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Jana Munivrana

**Određivanje temperature glavnog faznog  
prijelaza neutralnih lipida UV/Vis  
spektroskopijom**

**Diplomski rad**

predložen Kemijskom odsjeku  
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu  
radi stjecanja akademskog zvanja  
magistre kemije

Zagreb, 2022.



Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković u Laboratoriju za inženjering biomembrana pod mentorstvom dr. sc. Danijele Bakarić i neposrednim voditeljstvom Petre Maleš, mag. chem. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je doc. dr. sc. Adriana Kendel.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom „Model demijelinizacije na molekularnoj skali pri fiziološkim i patološkim uvjetima“ (UIP-2020-02-7669).



## Zahvale

*Prvenstveno velika hvala dragoj mentorici dr. sc. Danijeli Bakarić na pruženoj prilici da svoj diplomski rad izradim u sklopu ovog projekta. Vaše strpljenje, trud i povjerenje mnogo su mi značili.*

*Neizmjereno hvala neposrednoj voditeljici Petri Maleš na velikom angažmanu, beskrajnoj pomoći i vječno ugodnoj radnoj atmosferi. Svaki bi diplomant bio sretan da te ima!*

*Zahvaljujem dr. sc. Ivi Crnolatu i dr. sc. Dariji Domazet Jurašin na pomoći u provedbi DSC i DLS analiza. Hvala i svim ostalim zaposlenicima Zavoda za organsku kemiju i biokemiju, posebno Lei čija mi je podrška u laboratoriju uvijek olakšala!*

*Zahvaljujem doc. dr. sc. Adriani Kendel na susretljivosti i uloženom trudu.*

*Hvala svim mojim prijateljima na vrijednim uspomnama koje preostaju s ovog putovanja. Od srca hvala mojoj Dori na podršci i prijateljstvu.*

*Naposljetku, najveća hvala mojoj obitelji, posebno sestri Karli i dedi Rudi – moj ste putokaz i čvrsti oslonac! ♥ Bez vašeg povjerenja i ljubavi puno bi toga ostalo nedostižno.*

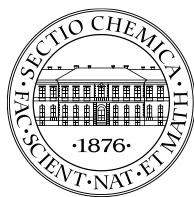


# Sadržaj

<b>SAŽETAK</b> .....	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XI</b>
<b>§ 1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. Biološke membrane i membranski lipidi</b> .....	<b>3</b>
2.1.1. <i>Vrste lipida u biološkim membranama</i> .....	4
2.1.2. <i>Samoorganizacija lipida</i> .....	7
2.1.3. <i>Fazni prijelazi lipida</i> .....	10
<b>2.2. Instrumentalne metode određivanja temperature faznog prijelaza</b> .....	<b>12</b>
2.2.1. <i>Razlikovna pretražna kalorimetrija (DSC)</i> .....	12
2.2.2. <i>UV/Vis spektroskopija</i> .....	14
<b>2.3. Određivanje veličine liposoma u suspenziji (DLS)</b> .....	<b>16</b>
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>17</b>
<b>3.1. Kemikalije</b> .....	<b>17</b>
<b>3.2. Priprema uzoraka</b> .....	<b>17</b>
3.2.1. <i>Uzorci za DSC</i> .....	17
3.2.2. <i>Uzorci za UV/Vis spektroskopiju</i> .....	18
3.2.3. <i>Uzorci za DLS</i> .....	18
<b>3.3. Mjerne tehnike i uređaji</b> .....	<b>18</b>
3.3.1. <i>Mjerenje DSC krivulja</i> .....	18
3.3.2. <i>Mjerenje UV/Vis spektara</i> .....	19
3.3.3. <i>Određivanje veličine liposoma DLS tehnikom</i> .....	20
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>21</b>
<b>4.1. Analiza apsorpcijskih UV/Vis spektara</b> .....	<b>21</b>
<b>4.2. Analiza DSC krivulja</b> .....	<b>27</b>
<b>§ 5. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>32</b>
<b>§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA</b> .....	<b>33</b>
<b>§ 7. LITERATURNI IZVORI</b> .....	<b>34</b>
<b>§ 8. DODATAK</b> .....	<b>XV</b>
<b>§ 9. ŽIVOTOPIS</b> .....	<b>XVII</b>







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

Diplomski rad

## SAŽETAK

### ODREĐIVANJE TEMPERATURE GLAVNOG FAZNOG PRIJELAZA NEUTRALNIH LIPIDA UV/VIS SPEKTROSKOPIJOM

Jana Munivrana

Lipidi u vodenom mediju tvore liposome, sferične strukture u kojima se slažu u dvosloje. Faza, odnosno način slaganja lipida u dvosloje, funkcija je temperature. Glavni fazni prijelaz je prijelaz lipida iz faze gela u fazu fluida i opaža se pri temperaturi mekšanja  $T_m$ . Uz razlikovnu pretražnu kalorimetriju kao rutinsku tehniku određivanja  $T_m$  odnedavno se ističe i UV/Vis spektroskopija. U sklopu ovog rada pripravljene su suspenzije 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfokolina (DPPC), 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (DPPE), 2-oleil-1-palmitoil-glicero-3-fosfoetanolamina (POPE) i sfingomijelina (SM) u acetatnom, fosfatnom i karbonatnom puferu (pH = 4,09; 7,01; 9,19). Razlikovnom pretražnom kalorimetrijom i temperaturno-ovisnom UV/Vis spektroskopijom određene su vrijednosti  $T_m$  lipida te je ispitan utjecaj pH medija na  $T_m$ . Pokazano je da je temperaturno-ovisna UV/Vis spektroskopija prikladna za određivanje  $T_m$  te da promjena pH najviše utječe na DPPE i POPE liposome.

(37 stranica, 19 slika, 2 tablice, 36 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: DSC, fazni prijelaz, liposomi, UV/Vis spektroskopija

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

Neposredni voditelj: Petra Maleš, mag. chem.

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): doc. dr. sc. Adriana Kendel

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Adriana Kendel
  2. prof. dr. sc. Tajana Begović
  3. prof. dr. sc. Željka Soldin
- Zamjena: doc. dr. sc. Tomislav Jednačak

Datum diplomskog ispita: 19. listopada 2022.





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

Diploma Thesis

## ABSTRACT

### DETERMINATION OF THE MAIN PHASE TRANSITION TEMPERATURE OF NEUTRAL LIPIDS BY UV/VIS SPECTROSCOPY

Jana Munivrana

Lipids form liposomes in which they arrange into bilayers. The transition of lipids from the gel to the fluid phase, namely the main phase transition, is observed at the melting temperature  $T_m$ . Alongside differential scanning calorimetry (DSC), a routine technique for  $T_m$  determination, UV/Vis spectroscopy recently stood out. As part of this thesis, suspensions of 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC), 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DPPE), 2-oleyl-1-palmitoyl-glycero-3-phosphoethanolamine (POPE) and sphingomyelin (SM) in three buffers (pH = 4.09; 7.01; 9.19) were prepared. Using DSC and temperature-dependent UV/Vis spectroscopy,  $T_m$  of lipids were determined and the influence of pH on  $T_m$  was examined. It was shown that temperature-dependent UV/Vis spectroscopy is suitable for determining  $T_m$  and that DPPE and POPE liposomes are affected by the change in the pH.

(37 pages, 19 figures, 2 tables, 36 references, original in Croatian)

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

Keywords: DSC, liposomes, phase transition, UV/Vis spectroscopy

Mentor: Dr. Danijela Bakarić, Research Associate

Assistant mentor: Petra Maleš, mag. chem.

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Adriana Kendel, Assistant Professor

Reviewers:

1. Dr. Adriana Kendel, Assistant Professor

2. Dr. Tajana Begović, Professor

3. Dr. Željka Soldin, Professor

Substitute: Dr. Tomislav Jednačak, Assistant Professor

Date of exam: 19 October 2022



## § 1. UVOD

Strukturna i funkcionalna svojstva bioloških membrana posljedica su interakcija njihovih sastavnih elemenata među kojima izuzetno važno mjesto zauzimaju molekule lipida. Lipidi su amfifilne molekule sastavljene od polarnih glava i nepolarnog repa zbog čega se samoorganiziraju u agregate među kojima se ističu liposomi, sferične tvorevine lipidnih molekula organiziranih u dvosloj u čijem se središtu nalazi vodeni medij.<sup>1</sup> Zbog svoje jednostavnosti često zamjenjuju biološke membrane u istraživanjima, a zbog mogućnosti ugradnje malih hidrofobnih i hidrofilnih molekula primjenu nalaze u industriji i medicini.<sup>2-5</sup>

U lipidnom dvosloju, glavnom strukturnom motivu liposoma, ovisno o temperaturi molekule lipida se mogu naći u nekoliko različitih faza među kojima su najvažnije faza gela ( $L_{\beta}$ ) i faza fluida ( $L_{\alpha}$ ). U fazi gela C–C veze u masnokiselinskim lancima nalaze se u *trans* konformaciji, dok fluidnu fazu karakterizira istovremena prisutnost *trans* i *gauche* konformacija nastala uslijed pucanja van der Waalsovih interakcija među lancima koju prati niži stupanj uređenosti strukture dvosloja. Fazni prijelaz  $L_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$  s maksimumom pri temperaturi mekšanja ( $T_m$ ) je visokokooperativan prijelaz praćen izmjenom velike količine energije i naziva se glavnim faznim prijelazom. Vrijednost  $T_m$  ovisi o strukturi lipida, točnije o duljini i stupnju zasićenosti masnokiselinskih lanaca i funkcijskim skupinama koje čine polarne glave lipida.<sup>6</sup> Kod fosfokolinских (engl. *phosphocholine*, PC) lipida zasićenih ugljikovodičnih lanaca određenih duljina, glavni fazni prijelaz  $L_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$  je prekinut preprijelazom koji se opaža  $\sim 10$  °C ispod  $T_m$  ( $T_p$ ;  $T_p < T_m$ ). Budući da stvaranje valova na površini lipidnog dvosloja kao glavnog strukturnog obilježja preprijelaza iziskuje malu, ali ipak izvjesnu energiju, niskokooperativni preprijelaz označava prolazak lipida kroz valovitu fazu ( $P_{\beta}$ ) odnosno  $L_{\beta} \rightarrow P_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$ .<sup>6</sup>

Glavni fazni prijelaz lipida termodinamički se određuje razlikovnom pretražnom kalorimetrijom (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC). DSC je rutinska tehnika određivanja  $T_m$  lipida zbog svoje jednostavnosti i dostupnosti, ali ipak nedostatna za analizu strukturnih promjena i dinamike faznih prijelaza na molekulskoj razini.<sup>7</sup> Spomenuti nedostatak se može nadomjestiti spektroskopskim tehnikama poput infracrvene<sup>8,9</sup> i NMR spektroskopije<sup>10,11</sup> kao i difrakcijskim tehnikama.<sup>12</sup> Međutim, nedavno se pokazalo da se i

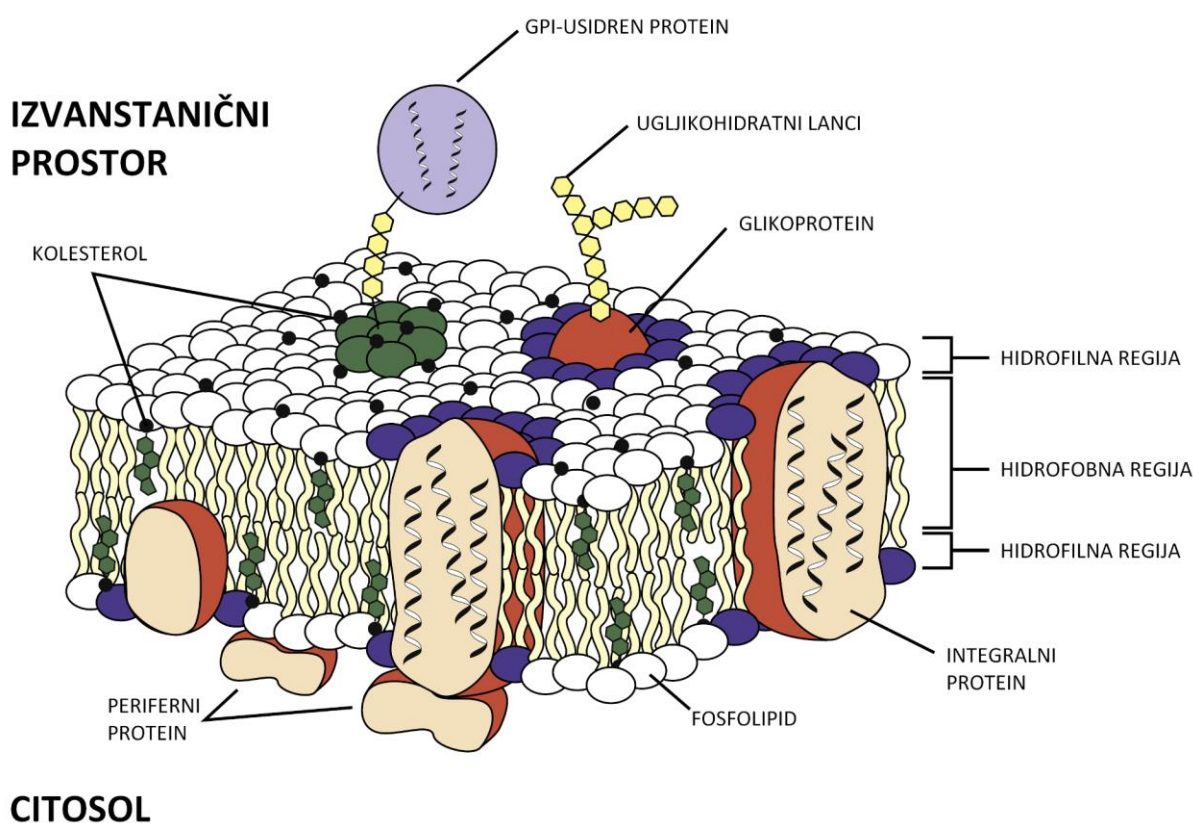
UV/Vis spektroskopijom, bez obzira na nepostojanje kromofornih skupina u molekulama lipida, može odrediti ne samo  $T_m$  1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidil-kolina (DPPC), već i  $T_p$  svojstvena značajno slabijem preprijelazu koji prethodi glavnom prijelazu.<sup>13,14</sup>

Svrha ovog diplomskog rada je odrediti  $T_m$  liposoma priređenih od četiri neutralna (*zwitterionska*) lipida: DPPC, 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidil-etanolamina (DPPE), 2-oleil-1-palmitoil-glicero-3-fosfatidil-etanolamina (POPE) i sfingomijelina (SM) pripremljenih hidratacijom puferima različite pH vrijednosti, koristeći UV/Vis spektroskopiju i DSC tehniku. Valja naglasiti da će rezultati dobiveni potonjom tehnikom prvenstveno poslužiti za provjeru i potvrdu slaganja vrijednosti  $T_m$  određenih UV/Vis spektroskopijom, a čiji se rezultati smatraju standardnima. UV/Vis apsorpcijski spektri analizirat će se univarijantnim pristupom. Visoka osjetljivost spektroskopske tehnike iskoristit će se za istraživanje utjecaja vrijednosti pH medija na strukturne promjene ispitivanih liposoma.

## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Biološke membrane i membranski lipidi

Granicu između stanice i njezine okoline, kao i između njezinih odjeljaka kod eukariota, čini membrana. Sastavljena je od lipidnog dvosloja u koji su ugrađeni proteini od kojih su mnogi glikozilirani, a često su na membranu vezane i sastavnice citoskeleta (slika 1) koje određuju položaj organela u stanici. Biološke su membrane opisane općeprihvaćenim modelom tekućeg mozaika za koji se zasluge pripisuju znanstvenicima Singeru i Nicolsonu,<sup>15</sup> a koji podrazumijeva pokretljivost lipidnih i proteinskih jedinica unutar membrane što omogućuje njihovu prilagodbu na temperaturu okoline, tlak te polarnost medija u kojem se membrana nalazi.<sup>6</sup>



Slika 1. Shematski prikaz stanične membrane. Preuzeto<sup>16</sup> i doručeno



Membrane stanica različitih tkiva i vrsta razlikuju se u udjelima proteina i lipida ovisno o funkciji stanice. Membranski proteini su podijeljeni na integralne, periferne i kovalentno vezane hidrofobnom molekulom „sidra“ kao što je glikozilfosfatidilinozitol (GPI) čiji udio varira u membranama različitih tipova stanica i organela ovisno o funkciji. Primjerice, vanjska membrana mitohondrija mjesto je zbivanja procesa oksidativne fosforilacije u stanici zbog čega obiluje membranskim proteinima, dok su neuroni obavijeni pretežno lipidnom mijelinskom ovojnicom, koja djeluje kao električni izolator.<sup>1</sup>

Osim temeljne strukturne podrške stanici, lipidni dvosloj predstavlja i barijeru za prodiranje tvari topljivih u vodenom mediju iz izvanstaničnog prostora u citosol. U teoriji je moguć proces difuzije molekula kroz lipidni dvosloj niz koncentracijski gradijent, a brzina navedenog procesa će uvelike varirati za molekule različitih svojstava. Male nepolarne molekule poput O<sub>2</sub> i CO<sub>2</sub> lako će se otapati u lipidnom dvosloju i brzo difundirati, dok je za relativno velike i/ili nabijene molekule difuzija vrlo spora; drugim riječima, za takve je molekule lipidni dvosloj (bez proteinskih aktivnih ili pasivnih transportera) gotovo nepropustan.<sup>17</sup> Na taj se način održava karakteristična razlika u sastavu unutarstaničnog i izvanstaničnog prostora odijeljenih membranom. Posljedično tome membrana je polarizirana, a razlika potencijala membrane u mirovanju najčešće iznosi od -60 do -70 mV.<sup>18</sup>

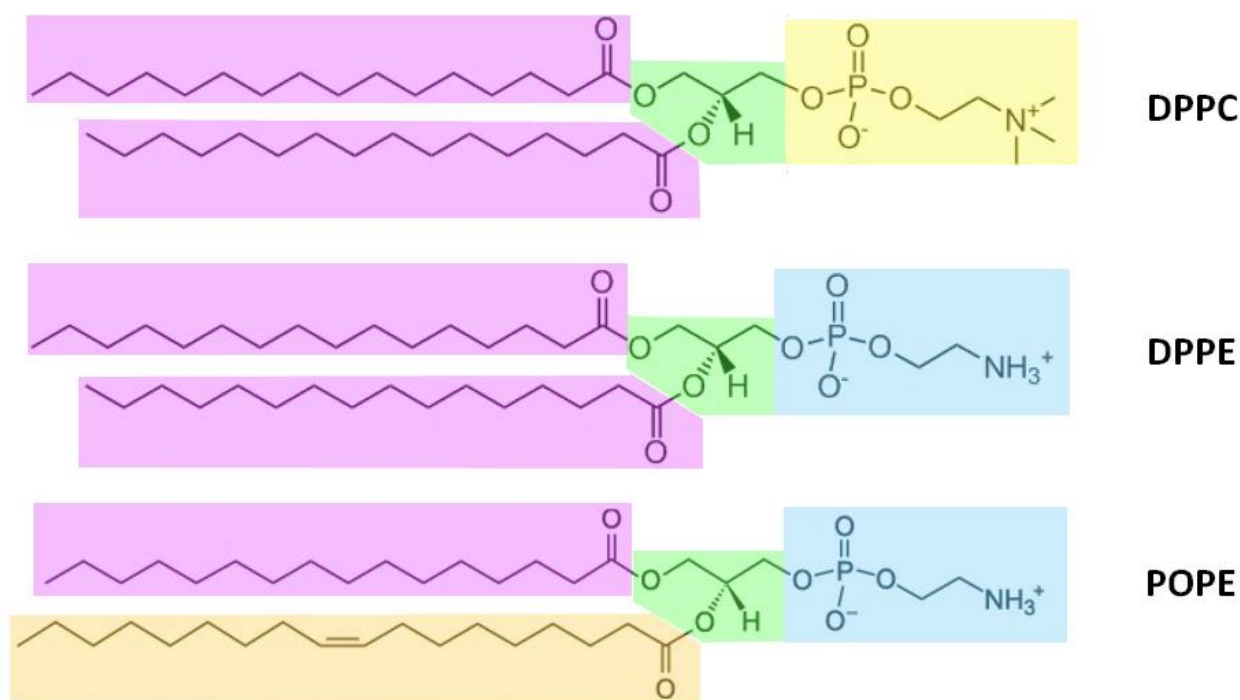
### 2.1.1. Vrste lipida u biološkim membranama

Glavne lipidne sastavnice bioloških membrana su glicerofosfolipidi, sfingolipidi i steroli. U stanicama većine vrsta tkiva najzastupljeniji su glicerofosfolipidi. Strukturno ih karakterizira glicerolna okosnica; polarna, hidrofilna glava na položaju C3 glicerola koja sadrži fosfatnu skupinu te područje nepolarnog, hidrofobnog repa koje čine dvije masne kiseline. Masne kiseline najčešće sadrže ugljikovodične lance duljine 14 – 24 atoma ugljika vezane na položaje C1 i C2 glicerolne okosnice. Osim varijacija u duljini ugljikovodičnih lanaca masnih kiselina, moguć je i različit stupanj nezasićenosti ugljik-ugljik veza unutar lanaca. *Cis*-dvostruka veza u ugljikovodičnom lancu stvara „pregib“ unutar lanca i na taj način onemogućava gusto pakiranje lipida što posljedično mijenja fluidnost membrane.<sup>16,19</sup>

Postojanje hidrofilne i hidrofobne regije unutar iste molekule čini glicerofosfolipide, ali i lipide općenito, amfifilnim molekulama. Iz svojstva amfifilnosti lipida proizlaze svojstva molekule potrebna za izgradnju funkcionalnih bioloških membrana. U staničnim membranama sisavaca visoko su zastupljeni glicerofosfolipidi fosfoetanolamin (PE), fosfoserin (PS) i

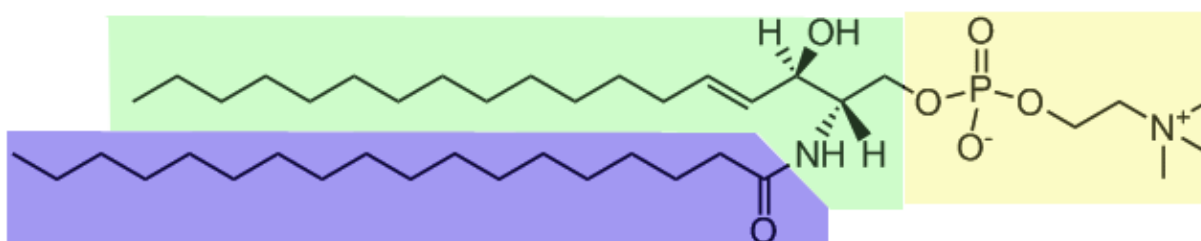
fosfokolin (PC) koji imaju različite polarne glave. PC i PE unutar područja glave imaju negativno nabijenu fosfatnu skupinu i pozitivno nabijen dušikov atom u kolinskoj ( $-N(CH_3)_3^+$ ) odnosno etanolaminskoj ( $-NH_3^+$ ) skupini što ih svrstava u *zwitterionske* tj. neutralne lipide. Ovisno o pH vrijednosti medija, spomenute skupine mogu biti (de)protonirane pa se tako mogu naći kao kationi pri niskom pH odnosno kao anioni pri visokom.<sup>19</sup>

U glicerofosfolipide ubrajaju se i tri neutralna lipida korištena u ovom radu: 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidil-kolin (DPPC), 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidil-etanolamin (DPPE) i 2-oleil-1-palmitoil-glicero-3-fosfatidil-etanolamin (POPE) prikazani na slici 2. Razlikuju se u vrsti funkcijske skupine vezane na diacil-glicerol-3-fosfat esterskom vezom. Riječ je o kolinu ( $-N(CH_3)_3^+$ ) kod DPPC odnosno etanolaminu ( $-NH_3^+$ ) kod DPPE i POPE. POPE se od ostala dva razlikuje u masnim kiselinama vezanim na okosnicu. Kod DPPC i DPPE radi se o dvije palmitinske kiseline, a kod POPE o jednoj palmitinskoj te jednoj oleinskoj masnoj kiselini s C9–C10 nezasićenom vezom.<sup>20</sup>



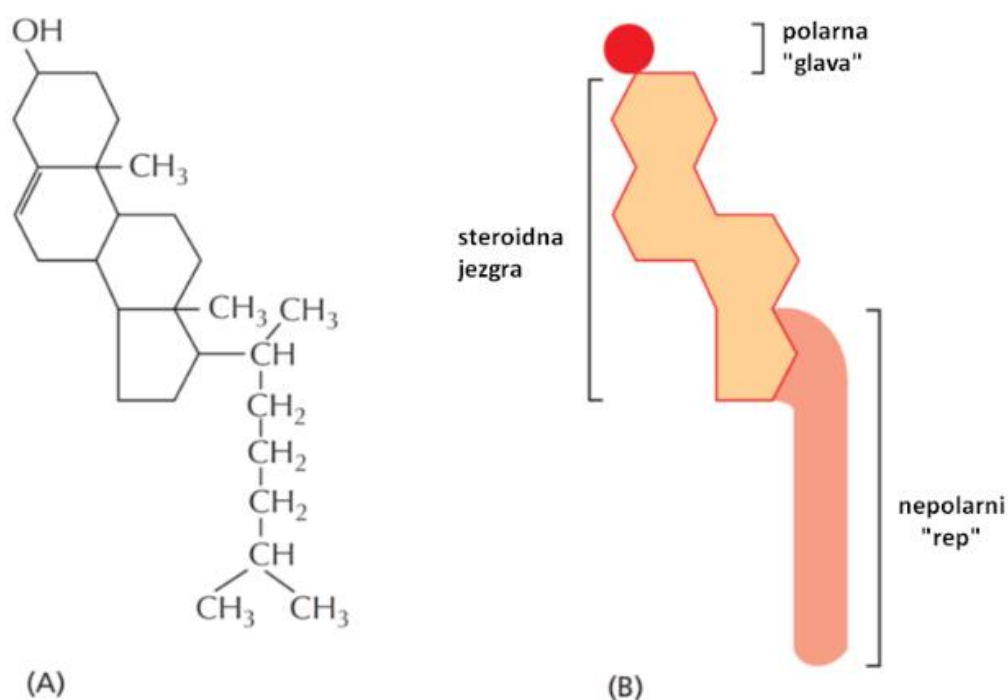
Slika 2. Kemijske strukture glicerofosfolipida DPPC, DPPE i POPE sastavljenih od glicerolne okosnice (zeleno), polarne glave (žuto fosfatidilkolin, plavo fosfatidiletanolamin) i nepolarnog repa (ljubičasto palmitinska kiselina, narančasto oleinska kiselina)

Sfingolipidi su lipidi koji se od glicerofosfolipida razlikuju u molekuli okosnice koja je u ovom slučaju aminoalkohol sfingoizin (slika 3).<sup>17</sup> U velikoj količini se nalaze u membranama neurona poznatim po svojoj lipidnoj kompleksnosti. Gangliozidi, podvrsta glikosfingolipida, u sastavu neurona i sive tvari mozga, kao i sfingomijelin, galaktozilceramid i galaktozilsulfatid u oligodendrocitima i mijelinskoj ovojnici, važni su za razvoj i održavanje funkcije živčanog sustava.<sup>21</sup> Kao predstavnik sfingolipida ističe se najzastupljeniji među njima, sfingomijelin (SM), koji zajedno s već spomenutim DPPE-om, DPPC-om te 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidil-serinom (DPPS) izgrađuje većinu staničnih membrana sisavaca.<sup>17</sup> Sudjeluje u prijenosu signala u stanici i regulaciji odgovora na upalne procese. Zbog velike zastupljenosti u mijelinskoj ovojnici neurona, ključan je za održavanje funkcije mijelina i sazrijevanje moždanog tkiva što je bitno za razvoj moždanih mreža i kognitivnih sposobnosti u dječjoj dobi.<sup>22</sup>



Slika 3. Kemijska struktura sfingomijelina sastavljenog od sfingoizinske okosnice (zeleno), polarne glave (žuto) i nepolarnog repa (plavo)

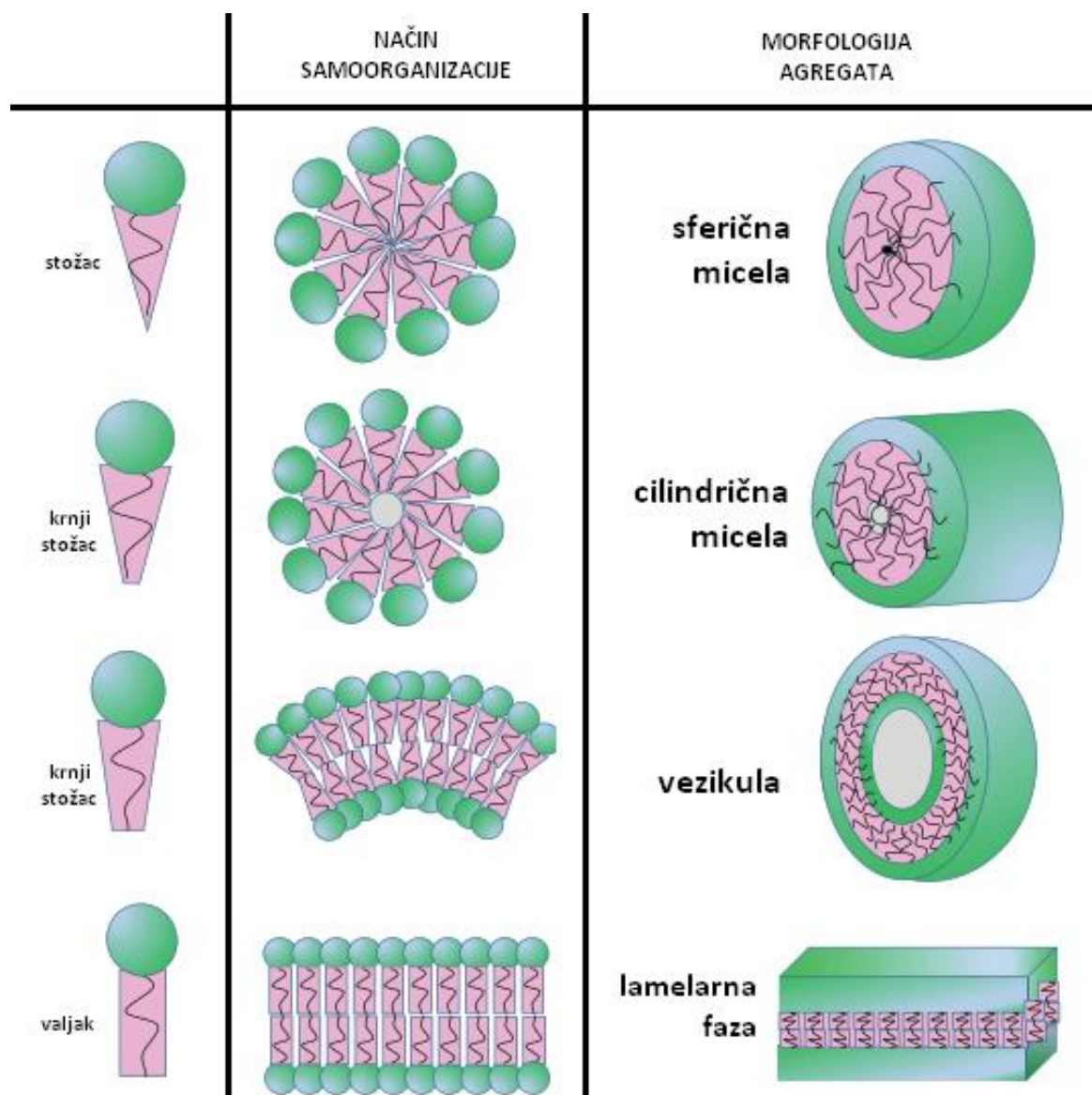
Posljednja visokozastupljena skupina membranskih lipida su steroli. Među sterolima ističu se kolesterol i ergosterol, često uklopljeni u sastav staničnih membrana eukariota i gljiva.<sup>6</sup> Glavna strukturalna jedinica sterola je rigidna steroidna jezgra sastavljena od četiri fuzionirana prstena. Na nju se s jedne strane nastavlja polarna glava, a s druge nepolarni rep kao što je prikazano na slici 4.<sup>17</sup>



Slika 4. Kemijska struktura kolesterola (A) i shematski prikaz strukture sterola (B). Preuzeto<sup>17</sup> i doručeno

### 2.1.2. Samoorganizacija lipida

Jedno od bitnih svojstava lipida proizašlo iz amfifilnog karaktera molekule je njihovo samoorganiziranje u agregate različitih veličina i oblika. Polarna glava amfifila ostvaruje povoljne interakcije s molekulama vode vodikovim vezama, dok se lipofilni rep usmjerava prema drugom, manje polarnom mediju (npr. zraku ili nepolarnoj tekućini). Kada ostvarivanje takvih interakcija nije moguće, hidrofobni će lanci međusobno ostvarivati hidrofobne interakcije. Posljedično nastaju agregati i oslobađaju se molekule vode koje su prethodno bile uređeno smještene oko hidrofobnih lanaca lipida. Rezultat je porast entropije sustava što čini proces samoorganizacije spontanom odnosno termodinamički povoljnim. Nastanak i stabilnost agregata lipida poput micela (sferičnih i cilindričnih) te dvosloja (vezikula i lamelarnih faza) prikazanih na slici 5 ovise o temperaturi i koncentraciji lipida u suspenziji.<sup>6,19</sup>

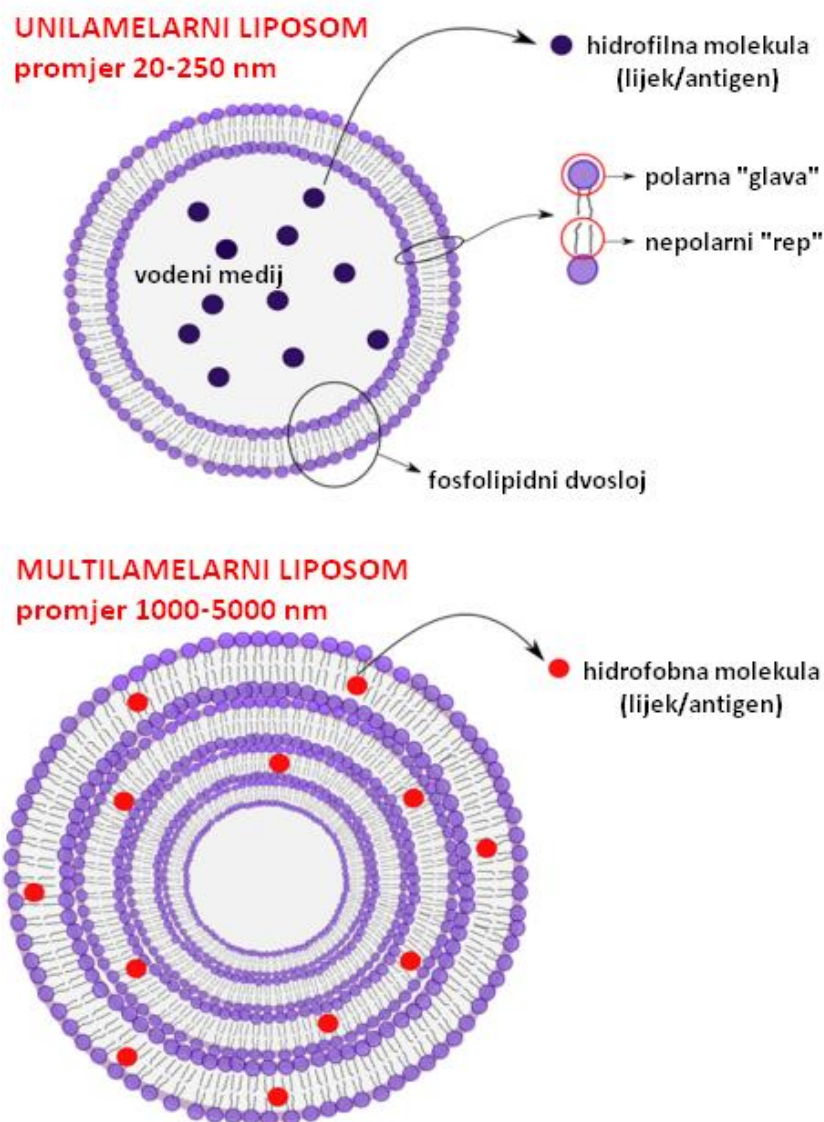


Slika 5. Načini samoorganizacije amfifilnih molekula u agregate. Preuzeto<sup>19</sup> i doradeno

Lamelarne faze (slika 5) nastaju pri višim koncentracijama lipida u otopini kada se micelarne strukture rastegnu do mjere pretvorbe u dvodimenzionalnu planarnu strukturu. Samozatvaranjem zbog doticaja hidrofobnog dijela dvosloja na njegovim krajevima s polarnim medijem, nastaju vezikule tj. liposomi. Riječ je o metastabilnim strukturama koloidnih dimenzija (10 nm – 10 μm) pripremljenim metodom miješanja, sonikacije ili ekstrudiranja u vodenom mediju.<sup>16</sup>

Najpoznatiji modelni membranski sustavi su liposomi koji zbog svoje jednostavne strukture i mogućnosti kontrole sastava pokazuju velik potencijal u kozmetici i medicini.<sup>2-4</sup> Ovisno o veličini i broju hidriranih lipidnih dvosloja koji čine sferičnu strukturu, liposomi se dijele na

unilamelarne (izgrađene od jednog dvosloja; engl. *large unilamellar vesicles*, LUV) i multilamelarne (izgrađene od više hidriranih dvosloja; engl. *multilamellar vesicles*, MLV) u kojima razmak između dvosloja čine slojevi vode debljine  $\sim 20 \text{ \AA}$  (slika 6).<sup>6</sup>



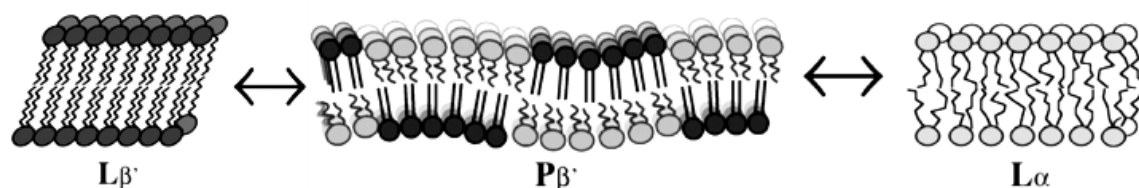
Slika 6. Shematski prikaz načina ugradnje hidrofilnih i hidrofobnih molekula u unutrašnjost unilamelarnog i u dvosloje multilamelarnog liposoma. Preuzeto<sup>23</sup> i doručeno

Kao što je prikazano na slici 6, u unutrašnjost liposoma moguća je ugradnja malih molekula, što je posebice korisno za molekule netopljive u vodi. Budući da ugradnja nepolarne molekule lijeka ili antigena unutar hidrofobnog sučelja lipidnog dvosloja skriva molekulu od vodenog medija, MLV predstavlja sustav dostave nepolarnog lijeka (engl. *drug delivery*) u stanicu. Isto

tako molekula topljiva u vodi može biti ugrađena u LUV (otopljena u vodenom mediju u unutrašnjosti) i na takav je način zaštićena tijekom prijenosa do ciljnog tkiva.<sup>23</sup> Aktualan je primjer mRNA cjepiva protiv bolesti COVID-19 koja koriste tehnologiju lipofekcije. Injekcijom se u tkivo unose liposomi s ugrađenim molekulama mRNA koje su ugradnjom u liposom zaštićene od nukleaza na putu do ciljnog tkiva. Fuzijom lipidnog dvosloja sa staničnom membranom, molekula mRNA se unosi u citosol ciljne stanice gdje zatim podliježe translaciji.<sup>5</sup>

### 2.1.3. Fazni prijelazi lipida

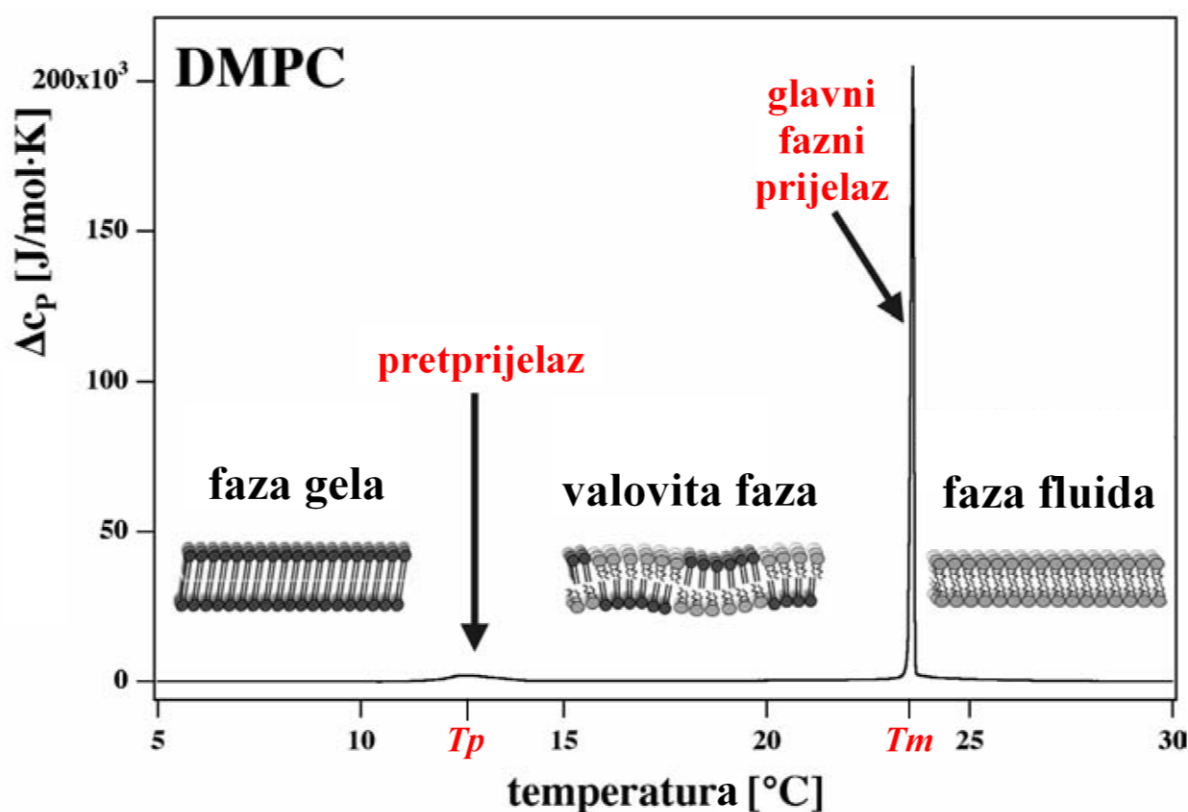
Nastanak lipidnih agregata ovisan je o njihovoj koncentraciji, a struktura i stupanj uređenosti unutar njih samih mijenja se s temperaturom. Lipidi u lipidnom dvosloju s povišenjem temperature u otopini mogu proći kroz više faza među kojima su (za ovaj diplomski rad) najvažnije faza gela ( $L_{\beta'}$ ), valovita faza ( $P_{\beta'}$ ) i fluidna faza ( $L_{\alpha}$ ) koje su za DPPC prikazane na slici 7 i koje će se dalje detaljnije opisati.<sup>6</sup>



Slika 7. Shematski prikaz faznih prijelaza DPPC lipida u lipidnom dvosloju između faza gela ( $L_{\beta'}$ ), valovite ( $P_{\beta'}$ ) i fluidne faze ( $L_{\alpha}$ ) s porastom temperature (slijeva na desno). Preuzeto<sup>6</sup> i doručeno

U fazi gela ( $L_{\beta'}$ ) većina masnokiselinskih lanaca je *trans* konformacije s postojanim van der Waalsovima interakcijama između lanaca i periodičkim uređenjem molekule lipida. Zagrijavanjem DPPC lipidi prolaze kroz valovitu fazu ( $P_{\beta'}$ ) koja se opaža pri temperaturi pretprijelaza (engl. *pretransition*)  $T_p$  i u kojoj su molekule DPPC nagnute pod kutem od  $30^\circ$  u odnosu na normalu ravnine lipidnog dvosloja. Stupanj uređenosti strukture je niži nego u fazi gela što se manifestira u obliku periodički ponavljajućih nabora (engl. *ripples*) na vanjskoj površini dvosloja, a napuštanje uređene strukture te poprimanje istovremeno *trans* i *gauche* konformacija C–C veza u masnokiselinskim lancima, karakteristike su fluidne faze lipidnih dvosloja ( $L_{\alpha}$ ). Temperatura prijelaza  $L_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$  (glavni fazni prijelaz) naziva se temperaturom

mekšanja (engl. *melting temperature*)  $T_m$ . Pretprijelaz i glavni prijelaz usko su povezani fenomeni. Primjerice, uvećavanjem kalorimetrijskog profila mekšanja na primjeru 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfatidil-kolina (DMPC) (slika 8) može se uočiti da se vrijednost promjene toplinskog kapaciteta  $\Delta c_p$  ne vraća u potpunosti u razinu bazne linije odnosno ne poprima vrijednost  $\Delta c_p = 0 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  sve do završetka glavnog prijelaza. Iz toga se izvodi zaključak o sprezi pretprijelaza i glavnog prijelaza, stoga se temperaturni raspon  $T_p - T_m$  može promatrati kao kontinuirani režim mekšanja.



Slika 8. Kalorimetrijski profil mekšanja 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfatidil-kolina (DMPC). Dva vrha krivulje odgovaraju temperaturama pretprijelaza ( $T_p$ ) i mekšanja ( $T_m$ ).

Preuzeto<sup>6</sup> i doradeno

Temperatura mekšanja liposoma načinjenih od jedne vrste lipida suspendiranih u vodenoj otopini ovisi o kemijskoj prirodi i tipu polarne glave, duljini i stupnju nezasićenosti masnokiselinskih lanaca. Temperature mekšanja za DPPC ( $T_m = 41 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) i DPPE ( $T_m = 63 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ), glicerofosfolipide različite samo u funkcijskoj skupini glave, razlikuju se za čak  $22 \text{ }^{\circ}\text{C}$  jer etanolaminska skupina ostvaruje intramolekulske i intermolekulske vodikove veze za čije je



narušavanje potreban veći ulog energije. Usporedbom temperature mekšanja za DPPE ( $T_m = 63$  °C) i POPE ( $T_m = 25$  °C) očekivana bi bila obrnuta situacija zbog veće duljine jednog masnokiselinskog lanca unutar molekule POPE, ali prisutnost nezasićene veze čini pakiranje molekula POPE u dvosloj manje gustim, stoga je i manja količina energije potrebna za glavni prijelaz.<sup>24</sup> Ostali parametri o kojima ovisi vrijednost  $T_m$  su ionska jakost otapala, tlak i pH.<sup>6,8</sup>

## 2.2. Instrumentalne metode određivanja temperature faznog prijelaza

Široku primjenu liposoma u području industrije i medicine omogućila su brojna istraživanja lipidnih agregata u čiju su svrhu razvijene brojne analitičke metode. Neke od metoda karakterizacije liposoma su pretražna (engl. *scanning electron microscopy*, SEM) i transmisijska elektronska mikroskopija (engl. *transmission electron microscopy*, TEM), mikroskopija atomskih sila (engl. *atomic force microscopy*, AFM), FT-IR spektroskopija, fluorimetrija, protočna citometrija i spektroskopija nuklearne magnetne rezonancije (NMR).<sup>8-10,12,25,26</sup> U ovom radu za određivanje temperature mekšanja liposoma primijenit će se razlikovna pretražna kalorimetrija (DSC), već uhodana termoanalitička tehnika u ovom području, te UV/Vis spektroskopija koja se odnedavno koristi za određivanje temperature faznih prijelaza.<sup>14</sup>

### 2.2.1. Razlikovna pretražna kalorimetrija (DSC)

Razlikovna pretražna kalorimetrija (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC) je termoanalitička tehnika kojom se termodinamička svojstva tvari određuju temperaturnim mjerenjima. Osim mogućnosti detekcije i karakterizacije faznih prijelaza, odlikuje ju i mogućnost izravnog određivanja vrijednosti termodinamičkih veličina poput promjene entalpije  $\Delta H$  i entropije prijelaza  $\Delta S$  što joj daje prednost pred spektroskopskim metodama. Uz sve navedeno tehnika je brza, jednostavne izvedbe i lako dostupna što ju čini čestim izborom u istraživanju termotropnog ponašanja modelnih i bioloških membranskih lipidnih dvosloja.<sup>7,27</sup>

DSC eksperiment podrazumijeva istovremeno zagrijavanje ili hlađenje uzorka i referentnog uzorka. U ovom radu riječ je o uzorku suspenzije liposoma u puferu i referentnoj puferskoj otopini koja ne pokazuje nikakav termotropni događaj unutar temperaturnog raspona u kojem dolazi do faznog prijelaza lipidnog dvosloja. Uzorak suspenzije liposoma mora biti čist i homogen, dakle hidratacija liposoma mora biti potpuna, a dispergiranoš u puferu uniformna.<sup>7</sup>

Nekoliko je različitih izvedbi razlikovnih pretražnih kalorimetara, a za potrebe izrade ovog diplomskog rada korišten je razlikovni pretražni kalorimetar uz kompenzaciju snagom (engl.

*power-compensated*) koji se temelji na programiranom održavanju jednake temperature uzorka i referentnog uzorka. Temperature u obje ćelije mijenjaju se linearno uz pomoć dva grijača, svaki za jednu od ćelija, ugrađenih u toplinski spremnik čija se temperatura kontrolira. Instrument bilježi snagu potrebnu za održavanje jednake temperature u obje ćelije kao funkciju temperature. Snaga ili razlika protoka topline kroz dvije ćelije prikazana u ovisnosti o temperaturi naziva se DSC krivuljom.<sup>27</sup>

Kod DSC krivulje lipida pri temperaturama nižim od  $T_m$  temperature uzorka i referentnog uzorka mijenjaju se linearno u vremenu. Razlika protoka topline u dvjema ćelijama je stalna. Na DSC krivulji se pritom bilježi bazna linija koja je u idealnom slučaju potpuno ravna i horizontalna. Prilikom faznog prijelaza lipida pojavljuje se razlika u temperaturama uzorka i referentnog uzorka, a instrument je kompenzira promjenom snage grijanja. Uložena snaga mjeri se koju instrument bilježi kao pozitivno ili negativno odstupanje od bazne linije u slučaju endotermnog odnosno egzotermnog faznog prijelaza. Završetkom termotropnog događaja se prati ponovna uspostava stabilne horizontalne bazne linije koja se u slučaju promjene specifične topline uzorka razlikuje od početne. Ako kinetika procesa faznog prijelaza i značajke vremena odziva instrumenta nisu uravnotežene, moguća je pojava prekomjerne kompenzacije snage u *power-compensated* načinu snimanja što je čest slučaj kod snimanja brzog, visokoenergetskog i visokokooperativnog procesa glavnog faznog prijelaza sintetičkih fosfolipida. Ovoj pojavi se može doskočiti smanjenjem brzine skeniranja ili količine uzorka.<sup>7</sup>

Prilagodba protokola DSC analize u vidu zanemarivanja rezultata prvog ciklusa hlađenja nužna je zbog termalne povijesti lipida koja utječe na njihovo termotropno ponašanje.<sup>7</sup> Budući da je DSC krivulja prikaz ovisnosti promjene toplinskog kapaciteta  $\Delta c_p$  o temperaturi, vrijedi:

$$\Delta H = \int_{T_0}^{T_1} c_p dT \quad (1)$$

gdje je  $T_0$  temperatura početka faznog prijelaza (engl. *onset*), a  $T_1$  temperatura završetka faznog prijelaza. Promjenu entalpije faznog prijelaza  $\Delta H$  moguće je odrediti integriranjem površine ispod maksimuma signala nakon kalibracije poznatim standardom. Promjenu entropije faznog prijelaza  $\Delta S$  moguće je odrediti iz  $\Delta H$  i  $T_m$  jer je na polovici faznog prijelaza promjena Gibbsove energije  $\Delta G = 0$ , stoga za oštre signale vrijedi aproksimacija:

$$\Delta S = \int_{T_{m-\Delta}}^{T_{m+\Delta}} \frac{c_p}{T} dT \approx \frac{1}{T_m} \int_{T_{m-\Delta}}^{T_{m+\Delta}} c_p dT = \frac{\Delta H}{T_m} \quad (2)$$

gdje je  $\Delta$  mali temperaturni interval iznad ili ispod temperature faznog prijelaza.<sup>6,28</sup> Temperatura faznih prijelaza se može odrediti na dva načina: iz *onset* vrijednosti te iz maksimuma signala. Vrijednost temperature koja odgovara početku termotropnog događaja određuje se iz sjecišta tangenti na ekstrapoliranu baznu liniju i nagib krivulje koji odgovara početku faznog prijelaza. Takav način određivanja vrijednosti  $T_m$  manje je podložan utjecajima promjene eksperimentalnih uvjeta u odnosu na metodu određivanja temperature faznog prijelaza iz temperature maksimuma krivulje.<sup>29</sup>

Relativno cjenovno dostupna instrumentacija, brzo snimanje uzoraka i jednostavna interpretacija rezultata glavne su prednosti ove tehnike. Nadalje, DSC za razliku od nekih spektroskopskih metoda ne zahtijeva dodatak molekule sonde za koje je pokazano da se mogu nakupljati na granicama faza i utjecati na sustav. Razvoj visokoosjetljivih instrumenata omogućio je snimanje uzoraka širokog raspona vrijednosti pH i ionskog sastava vodenog medija. Ipak, unatoč velikoj prednosti izravnog termodinamičkog opisa sustava, DSC tehnika nedostatna je za određivanje molekulske strukture i dinamike gdje je mogu nadopuniti difrakcijske tehnike, spektroskopija NMR ili vibracijska spektroskopija.<sup>8-10,12,28</sup>

### 2.2.2. UV/Vis spektroskopija

U mnoštvu instrumentalnih analitičkih metoda UV/Vis spektroskopija svakako se ističe po svojoj širokoj i učestaloj primjeni. Najviše se koristi za kvantitativno određivanje niza organskih, anorganskih ili bioloških spojeva.<sup>30</sup> Temelj metode je mjerenje propusnosti otopine analita za elektromagnetsko zračenje iz ultraljubičastog (engl. *ultraviolet*, UV) ili vidljivog (engl. *visible*, Vis) dijela spektra koja se izražava fizikalnim veličinama transmitancijom  $T$  ili apsorbancijom  $A$  povezanih izrazom:

$$A = -\log T \quad (3)$$

gdje je transmitancija  $T$  dana izrazom:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (4)$$

pri čemu je  $I_0$  intenzitet upadnog zračenja, a  $I$  intenzitet zračenja propuštenog kroz uzorak.

Vrijednost apsorbancije analita proporcionalna je njegovoj koncentraciji što je opisano Lambert-Beerovim zakonom:

$$A = \varepsilon bc \quad (5)$$

gdje je  $\varepsilon$  molarni apsorpcijski koeficijent pojedinog prijelaza,  $b$  duljina puta zračenja i  $c$  koncentracija tvari koja apsorbira zračenje iz ultraljubičastog ili vidljivog dijela spektra elektromagnetskog zračenja.<sup>27,31</sup>

Glavna prednost ove analitičke spektroskopske metode je jednostavnost izvedbe. Zraka UV/Vis svjetlosti koju emitira kontinuirani izvor zračenja usmjerava se kroz uzorak otopine sadržan u ćeliji (najčešće kiveti) načinjenoj od materijala propusnog za UV/Vis zračenje, do detektora. Budući da se zračenje reflektira na sučeljima triju medija različite optičke gustoće (zraka, otopine i stijenki ćelija) te raspršuje na većim česticama u otopini, ono se prigušuje. Efekt prigušenja korigira se uspoređivanjem snage propušenog zračenja kroz uzorak otopine analita s onim propuštenim kroz čisto otapalo. Na rezultate utječe i održavanje ćelije za uzorak jer nečistoće poput otisaka prstiju i masnoća mogu utjecati na propusnost ćelije za zračenje. Potrebno ih je temeljito očistiti prije odnosno nakon korištenja te se njima treba pažljivo rukovati za vrijeme punjenja i stavljanja u držač unutar instrumenta.<sup>27</sup>

Iako je primjena UV/Vis spektroskopije u svrhu kvantitativnog određivanja temeljenog na Lambert-Beerovom zakonu (5) najčešća, ova je metoda daleko šire primjene. Temperaturno ovisna UV/Vis spektroskopija pokazala se kao tehnika prikladna za određivanje temperatura faznih prijelaza lipida.<sup>14</sup> Prethodno je ova metoda primijenjena u svrhu detekcije niskih koncentracija molekula lijeka koje sadrže kromofor, uklopljenih u liposom.<sup>32</sup> Budući da liposomi, izgrađeni od molekula lipida koje nemaju kromofore, ne apsorbiraju zračenje iz UV i vidljivog dijela spektra, detekcija ugradnje lijeka u liposome na temelju spektra bila je jednostavna i očita. Kao takva, UV/Vis spektroskopija kojom bi se istovremeno detektirala apsorpcija kromofora u molekuli lijeka i promjena faza liposoma predstavlja velik potencijal za primjenu u farmakološkim istraživanjima.<sup>14</sup>

Upravo je nedostatak UV/Vis signala lipida razlog zbog kojeg se UV/Vis spektroskopija rijetko koristila u karakterizaciji termotropnog ponašanja samih liposoma.<sup>14</sup> Primjerice, Cevc i suradnici su na temelju temperaturno-ovisnog zamućenja lipidnih suspenzija načinjenih od fosfokolina i masnih kiselina, a što se odražavalo kao promjena apsorbancije suspenzije, odredili temperature glavnih faznih prijelaza lipida. Jakost zamućenja otopine porasla je za tri

reda veličine pri postizanju temperature prijelaza liposoma u obrnutu heksagonalnu strukturu ( $H_{II}$ ), stoga je UV/Vis spektroskopija predložena kao povoljna, a uz to lako dostupna i jednostavna metoda za određivanje temperatura prijelaza iz lamelarne u nelamelarnu fazu.<sup>13</sup>

Maleš i suradnici nastavili su ispitivanje prikladnosti ove apsorpcijske spektroskopske metode za određivanje faznih prijelaza DPPC liposoma uz multivarijatnu analizu dobivenih spektara, pri čemu su uspješno odredili ne samo  $T_m$ , već i  $T_p$  DPPC lipida.<sup>9,14</sup> Zaključeno je da je sprega UV/Vis spektroskopije i multivarijatne analize uspješna i iznimno osjetljiva metoda određivanja temperatura faznih prijelaza lipida.<sup>14</sup>

### 2.3. Određivanje veličine liposoma u suspenziji (DLS)

Veličinu čestica koloidnih dimenzija u suspenziji moguće je odrediti metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti (engl. *dynamic light scattering*, DLS). Uzorak se osvjetli monokromatskim laserskim zračenjem koje se zatim raspršuje na makromolekulama u svim smjerovima kao funkcija njihove veličine i oblika. Budući da na makromolekule u otopini djeluju nasumične sile kao posljedica stalnog sudaranja s molekulama otapala, gibanje im je također nasumično te se naziva Brownovo gibanje. Mjerenjem i analizom fluktuacija intenziteta zračenja raspršenog na česticama u otopini koje su posljedica Brownovog gibanja dobiva se vrijednost difuzijskog koeficijenta  $D$ , poveznice Brownovog gibanja i veličine čestice. Gibanje čestica u otopini, osim o njihovoj veličini i obliku, ovisi i o temperaturi te viskoznosti otapala. Pomoću Einstein-Stokesove jednadžbe:

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (6)$$

gdje je  $R_H$  hidrodinamički radijus,  $k_B$  Boltzmannova konstanta,  $T$  apsolutna temperatura,  $\eta$  viskoznost medija i  $D$  difuzijski koeficijent, moguće je povezati vrijednost difuzijskog koeficijenta dobivenog DLS eksperimentom s hidrodinamičkim promjerom čestice.<sup>33</sup>

Tehnika je prikladna za istraživanja uzoraka pripremljenih u širokom rasponu koncentracija i vrsta pufera, pri širokom rasponu temperatura. Nadalje, prednost je neinvazivnost tehnike i potreba za relativno malom količinom uzorka. Sve navedeno čini DLS često primjenjivanom tehnikom u istraživanju bioloških uzoraka (DNA, RNA, kompleksa nukleinskih kiselina)<sup>33</sup> i razvoju sustava dostave lijekova, dijagnostičkih i terapijskih alata (liposoma, polimera i metalnih nanočestica).<sup>34</sup>

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Kemikalije

Kemikalije korištene u eksperimentima provedenim u sklopu ovog diplomskog rada su: 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidil-kolin (DPPC,  $\geq 99\%$  čistoće, Avanti Polar Lipids), 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidil-etanolamin (DPPE, 98% čistoće, Cayman Chemical), 2-oleil-1-palmitoil-glicero-3-fosfatidil-etanolamin (POPE,  $>99\%$  čistoće, Avanti Polar Lipids), sfingomijelin (SM,  $>99\%$  čistoće, Avanti Polar Lipids), kloroform ( $\text{CHCl}_3$ , p.a., Carlo Erba Reagents), acetatni pufer (pH = 4,09; octena kiselina,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , p.a., KEFO; natrijev acetat,  $\text{C}_2\text{H}_4\text{NaO}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$ , p.a., Kemika), fosfatni pufer (pH = 7,01; natrijev hidrogenfosfat,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $>99\%$  čistoće, Alfa Aesar; natrijev dihidrogenfosfat,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , p.a. Fluka) i karbonatni pufer (pH = 9,19; natrijev karbonat,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , p.a., Kemika; natrijev hidrogenkarbonat,  $\text{NaHCO}_3$ , p.a., Kemika). Pufferi su pripremljeni u trostruko destiliranoj vodi te im ionska jakost iznosi  $I = 100 \text{ mol dm}^{-3}$ .

### 3.2. Priprema uzoraka

#### 3.2.1. Uzorci za DSC

Priprava multilamelarnih liposoma uključivala je otapanje lipida za ishodne otopine u kloroformu ( $c = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ ), uparavanje otapala i zatim hidrataciju lipidnog filma u odgovarajućem puferu ( $c = 5 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Za pripravu SM liposoma izvagano je 102 mg praha SM i otopljeno u 10 mL kloroforma ( $\text{CHCl}_3$ ). Po 3 mL otopine je prebačeno u tri tikvice s okruglim dnom te je kloroform uparen na rotacijskom uparivaču. Eventualni tragovi neuparenog otapala uklonjeni su izlaganjem sadržaja tikvice struji argona. Dobiveni filmovi suspendirani su u 6 mL acetatnog (pH = 4,09), fosfatnog (pH = 7,01) odnosno karbonatnog pufera (pH = 9,19) tako što je ponavljano uzastopno intenzivno miješanje na *vortex* miješalici, zatim su zagrijavani u vrućoj kupelji na  $52 \text{ }^\circ\text{C}$  te ohlađeni u ledenoj kupelji. Ciklus je ponavljan barem pet puta sve do nastanka bijele suspenzije bez taloga.

Postupak pripreme POPE liposoma jednak je postupku pripreme SM liposoma, različit jedino u masi izvaganog POPE (96,8 mg) i temperaturi vruće kupelji ( $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Ishodne otopine DPPE i DPPC lipida pripremljene su otapanjem 51,0 mg DPPE odnosno 50,6 mg DPPC u 5 mL

kloroforma. Postupak pripreme DPPC i DPPE liposoma je identičan kao i u prethodnim slučajevima kod sva tri pufera, osim što su suspenzije pripravljene na vrućim kupeljima na 79 °C za DPPE i 56 °C DPPC.

Neposredno prije DSC mjerenja pripremljeni uzorci suspenzija liposoma te njima odgovarajući puferi degazirani su 10 minuta u otplinjavajućoj komori uz magnetsko miješanje s ciljem uklanjanja mjehurića zraka koji mogu utjecati na konačan izgled DSC krivulje.

### 3.2.2. Uzorci za UV/Vis spektroskopiju

Suspenzije liposoma četiriju lipida (SM, POPE, DPPC i DPPE) pripravljene za DSC eksperiment ( $c = 5 \text{ mg mL}^{-1}$ ), (opisano u poglavlju 3.2.2.) uz iznimku koraka degaziranja, poslužile su kao ishodne suspenzije za pripremu uzoraka za UV/Vis spektroskopiju. U četiri različite kivete ishodna je suspenzija liposoma peterostruko razrijeđena puferom ( $c = 1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) do konačnog volumena od 1 mL, dok je u petu kivetu dodan 1 mL odgovarajućeg čistog pufera.

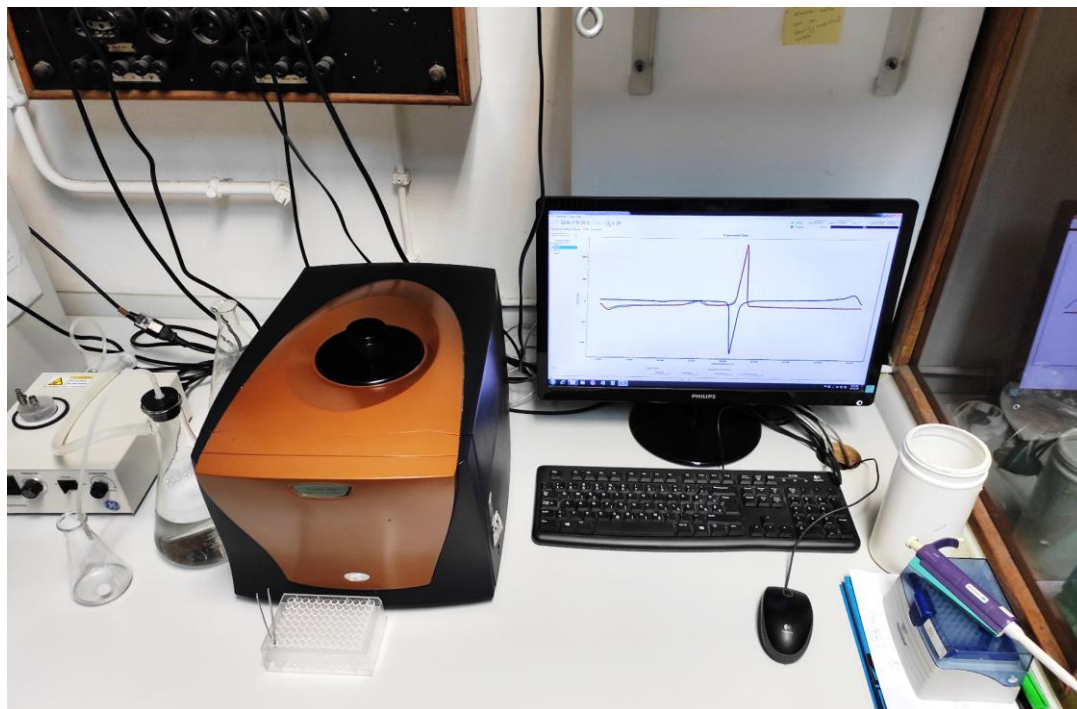
### 3.2.3. Uzorci za DLS

Suspenzije liposoma četiriju lipida pripravljene za DSC eksperiment ( $c = 5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) (opisano u poglavlju 3.2.2) uz iznimku koraka degaziranja, poslužile su kao ishodne suspenzije za pripremu uzoraka za DLS eksperiment. Svaka je od ishodnih suspenzija liposoma stostruko razrijeđena ( $c = 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ ) tako da je konačan volumen iznosio 1 mL, a kao usporedba korišteni su uzorci čistih pufera volumena 1 mL.

## 3.3. Mjerne tehnike i uređaji

### 3.3.1. Mjerenje DSC krivulja

Za DSC mjerenja korišten je mikrokalorimetar Nano-DSC (TA Instruments) prikazan na slici 9. U ćelije volumena 500  $\mu\text{L}$  stavljeni su degazirani uzorak suspenzije liposoma u puferu odnosno odgovarajući pufer kao referenca. Programirani temperaturni porast iznosio je  $1 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$  te je primijenjen u rasponu temperatura 30 – 75 °C za DPPE, 20 – 60 °C za DPPC, 10 – 60 °C za POPE te 10 – 60 °C za SM. Svaki je uzorak sniman dva puta nakon dva zasebna punjenja te je jedanput snimana samo otopina pufera. Jedno je mjerenje uključivalo po dva ciklusa zagrijavanja i hlađenja. Zbog postojanja termalne povijesti liposoma posebno će se analizirati DSC krivulje dobivene iz drugog ciklusa zagrijavanja.<sup>7</sup>



Slika 9. Mikrokalorimetar Nano-DSC (TA Instruments) fotografiran na Zavodu za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković

### 3.3.2. Mjerenje UV/Vis spektara

Za temperaturno ovisnu UV/Vis spektroskopiju korišten je UV/Vis spektrofotometar Cary 100 Bio (Varian) prikazan na slici 10. Uzorci volumena 1 mL snimani su u kvarcnim kivetama začepljenim plastičnim čepićem i postavljenim u termoregulirani držač za kivete unutar instrumenta. Mjerenje je provedeno u rasponu valnih duljina pobudnog zračenja 250 – 500 nm u temperaturnom intervalu 40 – 80 °C za DPPE, 10 – 40 °C za POPE, 20 – 50 °C za SM te 30 – 52 °C za DPPC bez korekcije bazne linije. Uzorak je primijenjenoj temperaturi izložen u trajanju od jedne minute prije početka mjerenja.





Slika 10. UV/Vis spektrofotometar Cary 100 Bio (Varian) fotografiran na Zavodu za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković

### 3.3.3. *Određivanje veličine liposoma DLS tehnikom*

U svrhu DLS eksperimenta korišten je instrument Zetasizer Nano-ZS (Malvern Panalytical) koji ima ugrađen He/Ne laser kao izvor monokromatskog linijskog zračenja valne duljine 632,8 nm snage do 10 mW te fotodiodu, postavljenu pod kutem od  $173^\circ$  u odnosu na upadnu zraku, kao detektor zračenja raspršenog na suspendiranim česticama. Za svaki je uzorak provedeno 6 mjerenja za raspon veličina 0,6 – 5000 nm na  $25^\circ\text{C}$ . Dobiveni rezultati prikazani su u Dodatku u tablici D1.

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

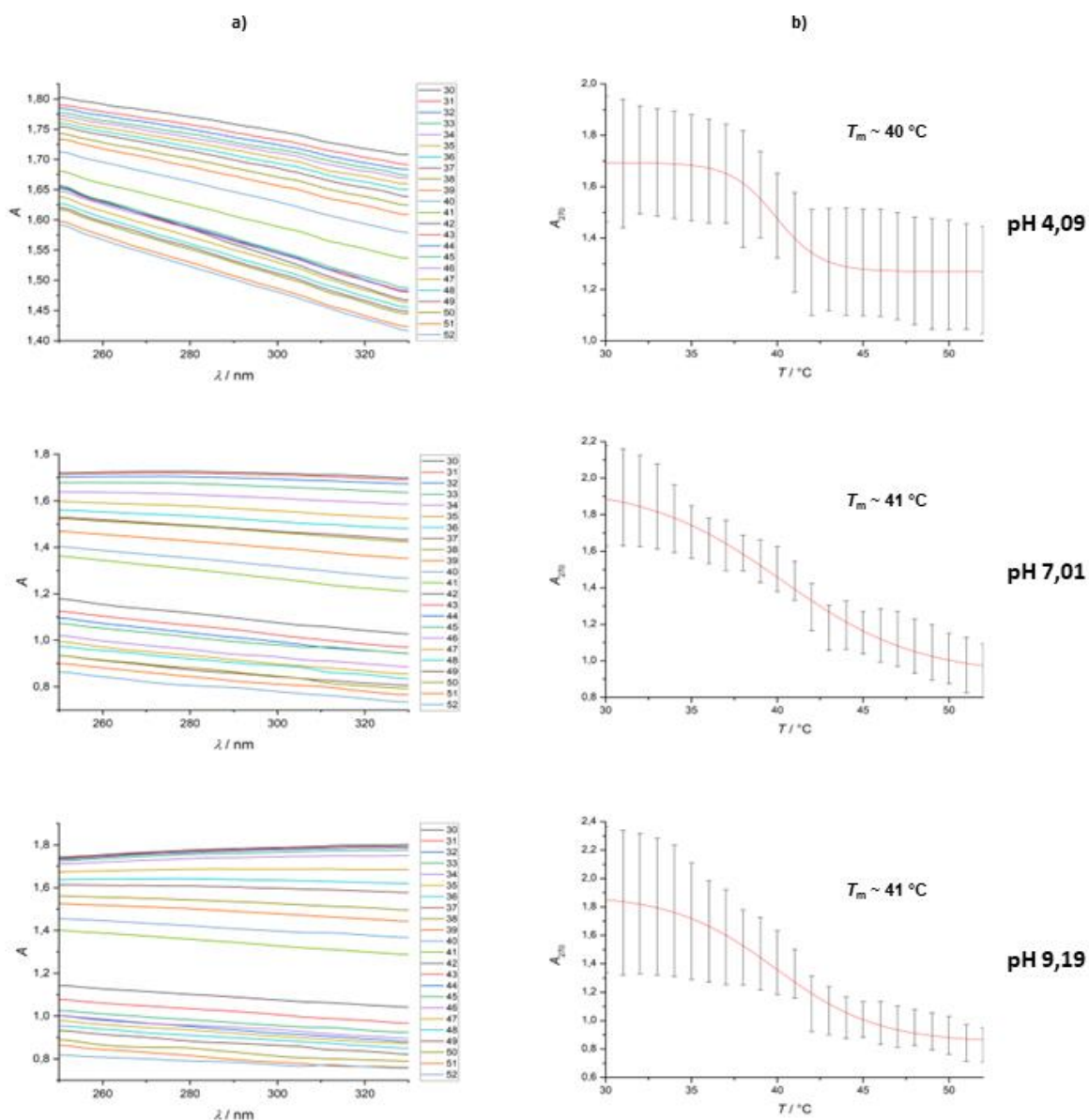
### 4.1. Analiza apsorpcijskih UV/Vis spektara

Apsorpcijski spektri suspenzija liposoma u puferu i čistih puferskih otopina prikupljeni su u rasponu valnih duljina pobude 250 – 500 nm. Za određivanje vrijednosti  $T_m$  liposoma analizirana je promjena apsorbancije pozadinskog zračenja u rasponu valnih duljina 250 – 330 nm s obzirom na to da se na valnoj duljini od 350 nm mijenja izvor pobudnog zračenja (iz područja vidljivog u UV područje), a što se u spektru opaža kao pojačan šum. Spektri su izglučani Savitzky-Golay algoritmom (polinom trećeg stupnja kroz 10 točaka) i dalje analizirani bez korekcije bazne linije.<sup>14</sup> Za potrebe univarijatne analize temperaturno-ovisnih UV/Vis spektara odabrana je valna duljina od 270 nm jer je procijenjeno da se u toj točki temperaturno-ovisne promjene u UV/Vis spektrima najbolje opažaju. Obradeni apsorpcijski spektri uzoraka suspenzija liposoma DPPC, DPPE, POPE i SM u acetatnom (pH = 4,09), fosfatnom (pH = 7,01) i karbonatnom puferu (pH = 9,19) prikazani su redom na slikama 11 – 14.

Krivulje koja prikazuje temperaturnu ovisnost apsorbancije suspenzija pri 270 nm su sigmoidalnog karaktera, stoga je na njima provedena regresijska analiza pri čemu su aproksimirane Boltzmannovom funkcijom. Vrijednost temperature koja odgovara točki infleksije aproksimirane krivulje uzeta je kao vrijednost  $T_m$  lipida<sup>14</sup> jer nagla promjena apsorbancije s promjenom temperature (diskontinuitet očitao u točki infleksije) nastaje zbog nagle promjene zamućenja suspenzije, odnosno zbog faznog prijelaza. Zamućenje suspenzije smanjuje se s porastom temperature zbog povećanja udjela lipida *cis* konformacije masnokiselinskih lanaca u lipidnom dvosloju.<sup>13</sup> Apsorpcijski spektri čistih puferskih otopina gotovo su ravne linije jer ne apsorbiraju elektromagnetsko zračenje iz UV ili Vis dijela spektra (temperaturno-ovisni UV/Vis spektri pufera prikazani su na slici D1 u Dodatku).

Analizom temperaturno-ovisnih apsorpcijskih krivulja u temperaturnom rasponu 30 – 52 °C određene su vrijednosti  $T_m$  (DPPC). Premda su točke infleksije ( $T_m$ ) dobivene regresijom, zbog izrazito velike nesigurnosti koja je proizašla kao posljedica univarijatne analize, njihove će se vrijednosti pisati s  $\sim$ . Za dvije puferne suspenzije (pH 7,01; 9,19) određene su vrijednosti  $T_m$  (DPPC)  $\sim 41$  °C, dok je za suspenziju pH = 4,09 određena vrijednost  $\sim 40$  °C. U slučaju suspenzije DPPC liposoma u acetatnom puferu (pH = 4,09) relativno nagli pad apsorbancije

pozadinskog zračenja uočljiv je već pri 40 °C, ali ipak najizraženiji iznad 41 °C kada se varijacija apsorbancije ponovno relativno stabilizira (slika 11). Određene vrijednosti u skladu su s teorijskom vrijednosti  $T_m$  (DPPC) = 41 °C.<sup>24</sup>

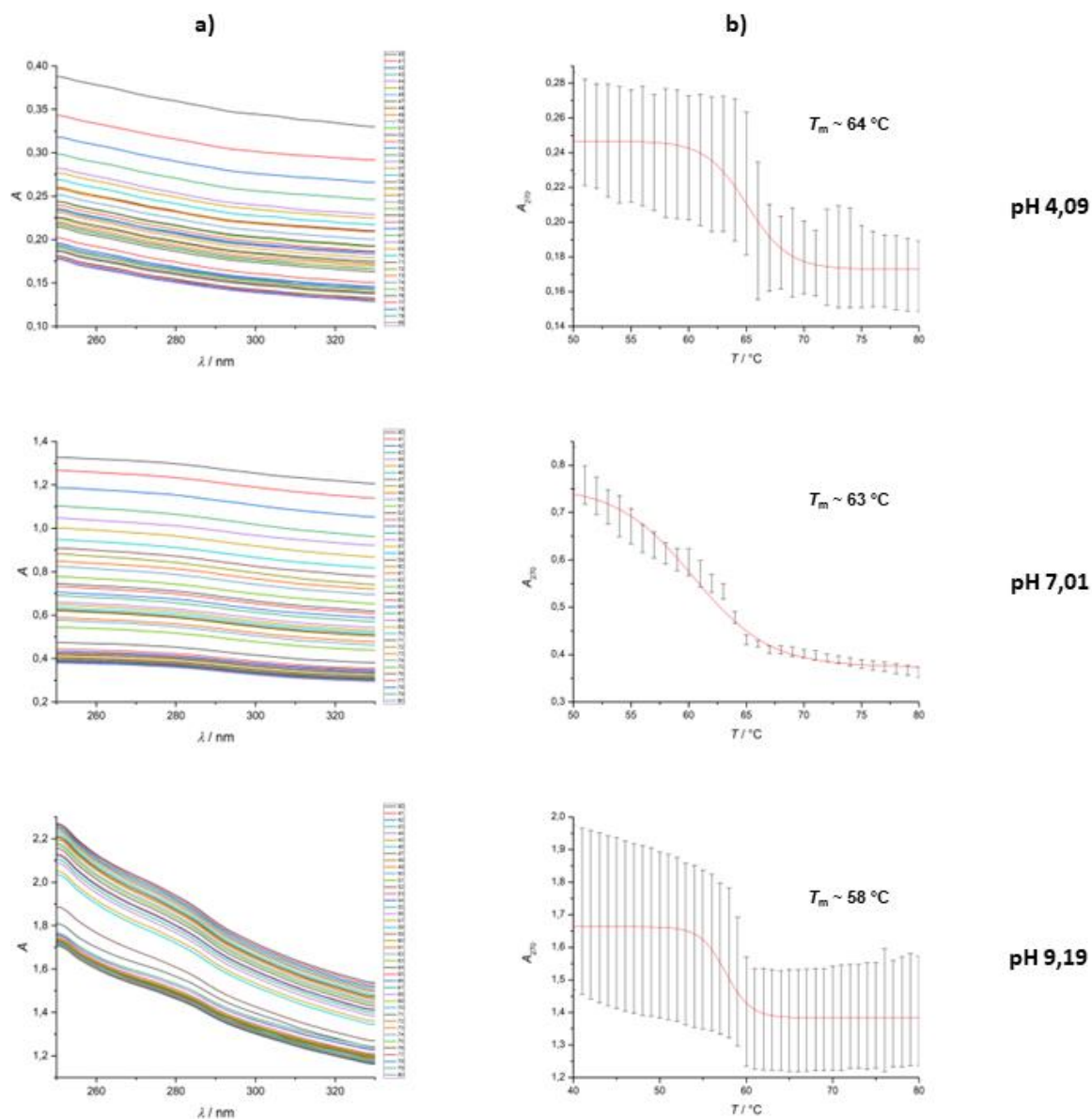


Slika 11. Temperaturno ovisni UV/Vis apsorpcijski spektri (a) i temperaturna ovisnost apsorbancije DPPC liposoma suspendiranih u acetatnom (pH = 4,09), fosfatnom (pH = 7,01) i karbonatnom puferu (pH = 9,19) pri 270 nm (b)

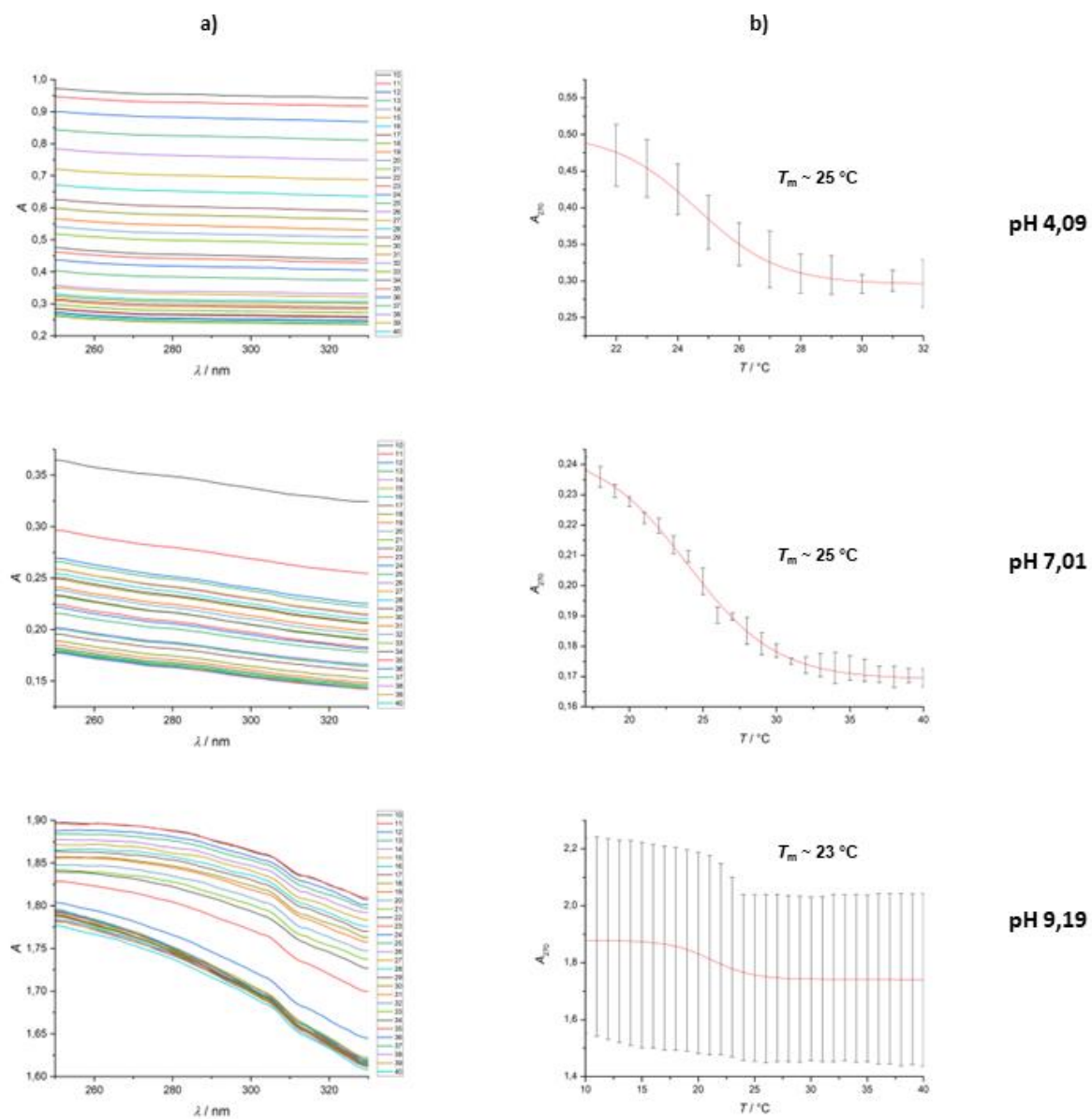
Na isti način su određene vrijednosti  $T_m$  DPPE i POPE liposoma. S porastom vrijednosti pH iznose:  $\sim 64$  °C,  $\sim 63$  °C i  $\sim 58$  °C za DPPE te  $\sim 25$  °C,  $\sim 25$  °C i  $\sim 23$  °C za POPE (slike 12 i 13).

Određene vrijednosti  $T_m$  pri pH 4,09 i 7,01 slažu se s literaturnim vrijednostima  $T_m$  (DPPE) = 64 °C i  $T_m$  (POPE) = 25 °C.<sup>24</sup> Za obje vrste lipida primijećeno je smanjenje vrijednosti  $T_m$  u karbonatnom puferu (pH = 9,19) što se može pripisati djelomičnoj deprotonaciji amino skupine pri pH medija većem od pH izoelektrične točke makromolekule. Posljedično, dio amino skupina polarne glave postaje negativno nabijen. Pojava istovrsnog naboja na relativno malim udaljenostima unutar dvosloja energetski je nepovoljna zbog pojave elektrostatskih odbojnih sila, stoga je manje energije potrebno za narušavanje uređene strukture. U skladu s time, mekšanje dvosloja zbiva se pri nižim temperaturama.<sup>6,35</sup>

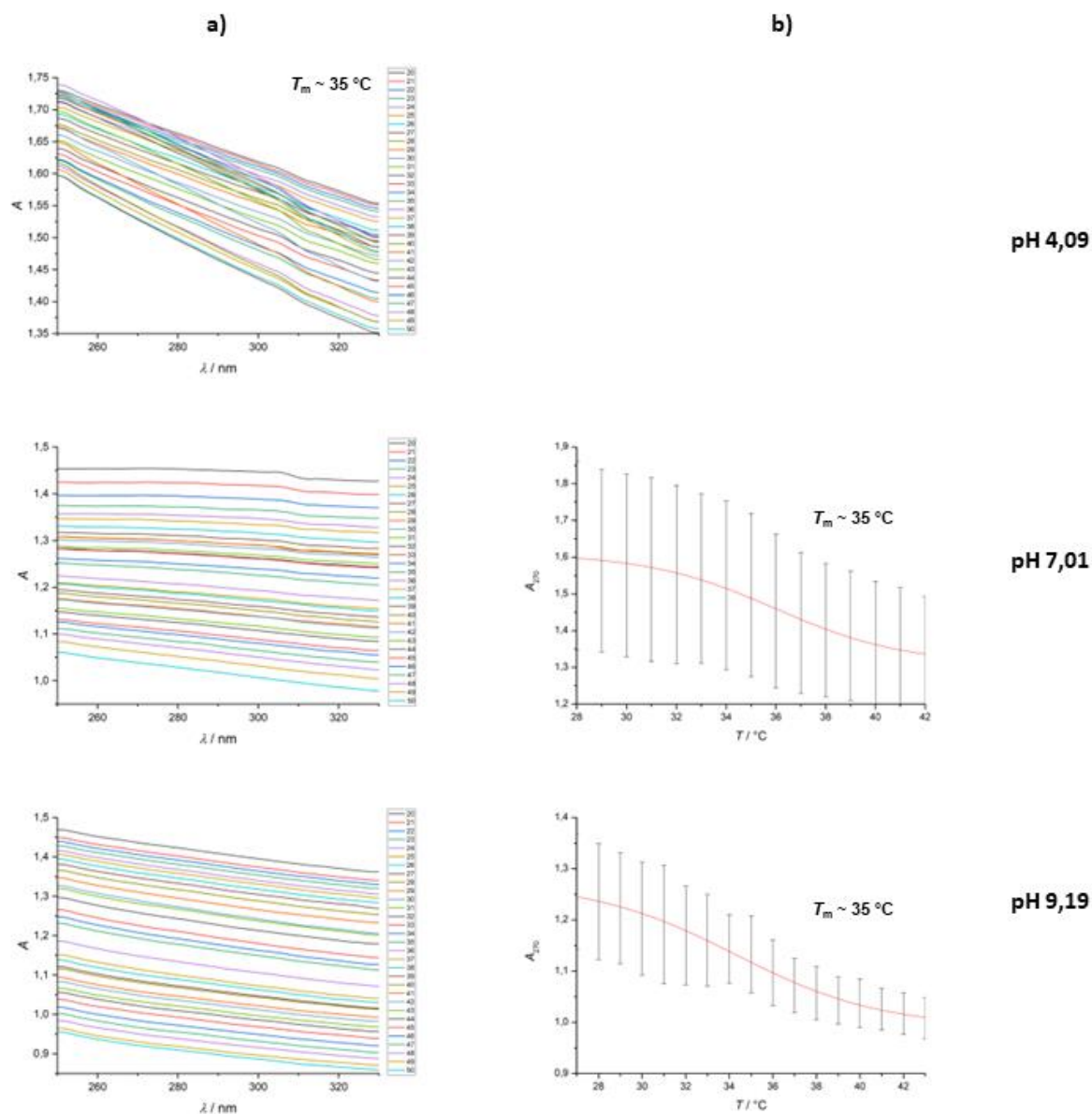
Iz diskontinuiteta očitano u točki infleksije krivulje temperaturne ovisnosti  $A_{270}$  u temperaturnom rasponu 20 – 50 °C određene su vrijednosti  $T_m$  (SM) za suspenzije u puferima pH = 7,01; 9,19 odnosno iz diskontinuiteta udaljenosti temperaturno-ovisnih apsorpcijskih krivulja za suspenziju u puferu pH = 4,09 zbog relativno velike pogreške dobivene regresijskom analizom (slika 14). U sva tri pufera određena je vrijednost ~35 °C. Kao i za DPPC liposome, temperatura mekšanja ne ovisi o pH što se može pripisati fosfokolinskoj skupini glave koja je za razliku od fosfoetanolaminske kod DPPE i POPE „otpornija“ na promjene vrijednosti pH i zadržava *zwitterionski* oblik pri pH = 9,19. Budući da je korišteni sfingomijelin zapravo smjesa sfingomijelina različitih duljina masnokiselinskih lanaca, za fazni se prijelaz uzima teorijska srednja vrijednost  $T_m$  (SM) = 35 °C.<sup>36</sup> Iz tog je razloga nešto manje očit diskontinuitet u udaljenostima apsorpcijskih krivulja, nego što je slučaj kod DPPC, DPPE i POPE.



Slika 12. Temperaturno ovisni UV/Vis apsorpcijski spektri (a) i temperaturna ovisnost apsorbancije DPPE liposoma suspendiranih u acetatnom (pH = 4,09), fosfatnom (pH = 7,01) i karbonatnom puferu (pH = 9,19) pri 270 nm (b)



Slika 13. Temperaturno ovisni UV/Vis apsorpcijski spektri (a) i temperaturna ovisnost apsorpcije POPE liposoma suspendiranih u acetatnom (pH = 4,09), fosfatnom (pH = 7,01) i karbonatnom puferu (pH = 9,19) pri 270 nm (b)



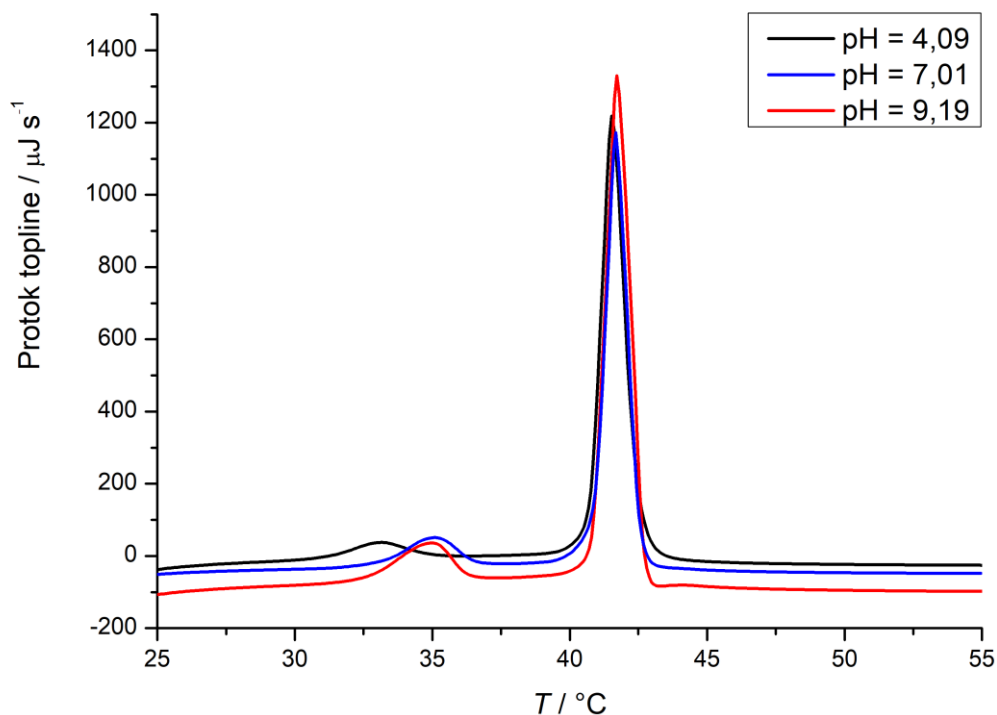
Slika 14. Temperaturno ovisni UV/Vis apsorpcijski spektri (a) SM liposoma suspendiranih u acetatnom (pH = 4,09), fosfatnom (pH = 7,01) i karbonatnom puferu (pH = 9,19) te temperaturna ovisnost apsorbanije SM liposoma suspendiranih u fosfatnom (pH = 7,01) i karbonatnom puferu (pH = 9,19) pri 270 nm (b). Posljednje nije prikazano za suspenziju u acetatnom puferu (pH = 4,09) zbog prevelike pogreške i nemogućnosti aproksimacije Boltzmannovom funkcijom

## 4.2. Analiza DSC krivulja

DSC tehnikom analizirani su uzorci suspenzija liposoma u puferu uz puferu otopinu kao referentni uzorak. Nakon oduzimanja DSC krivulje pufera od DSC krivulje lipidnih suspenzija dvama načinima određene su temperature mekšanja liposoma iz DSC krivulja drugog zagrijavanja. Riječ je o određivanju iz maksimuma DSC krivulje i tzv. *onset* određivanju temperature faznog prijelaza. Potonje podrazumijeva određivanje temperature početka termotropnog događaja iz sjecišta tangenti na ekstrapoliranu baznu liniju i nagib krivulje koji odgovara početku faznog prijelaza, a poželjno je zbog manje izražene podložnosti utjecajima promjene eksperimentalnih uvjeta, posebice brzini zagrijavanja/hlađenja, u odnosu na metodu određivanja temperature faznog prijelaza iz maksimuma krivulje.<sup>29</sup>

Rezultati analize prikazani su na slikama 15 – 18 i u tablici 1. Na DSC krivulji DPPC liposoma uočava se odstupanje signala od bazne linije koje prethodi glavnom prijelazu i odgovara pretprijelazu, odnosno  $T_p$  spomenutoj u dijelu 2.1.3. Iz DSC krivulje drugog zagrijavanja određena je vrijednost  $T_m$  za DPPC liposome u puferkim otopinama pH vrijednosti 4,09; 7,01 i 9,19 redom:  $40,5 \pm 0,1$  °C,  $40,9 \pm 0,1$  °C i  $40,6 \pm 0,1$  °C što je u suglasju s teorijskom vrijednosti  $T_m$  (DPPC) = 41 °C.<sup>24</sup> Posebno je dobro slaganje za vrijednost  $T_m$  u puferskoj otopini fiziološkog pH. Maksimum krivulje daje nešto višu vrijednost  $T_m$ :  $41,6 \pm 0,1$  °C,  $41,8 \pm 0,1$  °C i  $41,7 \pm 0,1$  °C redom s porastom vrijednosti pH. *Onset* određivanjem dobiva se temperatura početka faznog prijelaza, a određivanjem iz maksimuma krivulje temperatura pri kojoj je polovica lipida unutar dvosloja u gel, a druga u fluidnoj fazi, što objašnjava razliku između vrijednosti  $T_m$  dobivenih navedenim metodama.<sup>7</sup>





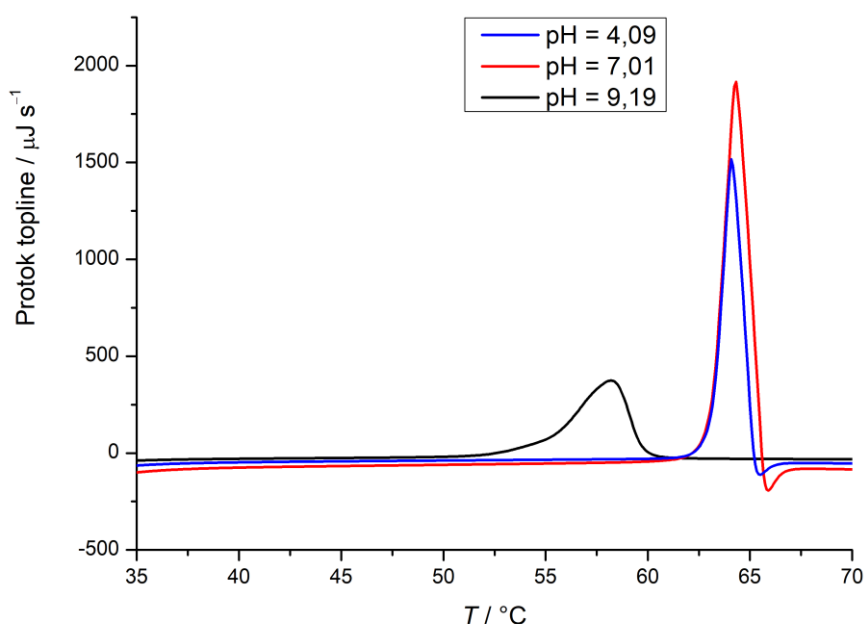
Slika 15. DSC krivulje drugog ciklusa zagrijavanja DPPC liposoma suspendiranih u acetatnom (pH = 4,09), fosfatnom (pH = 7,01) i karbonatnom puferu (pH = 9,19)

Vrijednosti  $T_m$  liposoma priređenih od DPPE i POPE, dva glicerofosfolipida strukturno jednaka u regiji glave, određene su u trima puferima različitih vrijednosti pH (4,09; 7,01; 9,19) (slike 16 i 17). *Onset* određivanjem dobivene su vrijednosti  $T_m$  s porastom pH:  $62,4 \pm 0,1$  °C,  $62,4 \pm 0,1$  °C i  $52,8 \pm 0,1$  °C za DPPE te  $21,6 \pm 0,1$  °C,  $22,1 \pm 0,1$  °C i  $17,1 \pm 0,1$  °C za POPE. Određivanjem iz maksimuma krivulje dobivene su vrijednosti  $T_m$  s porastom pH:  $64,1 \pm 0,1$  °C,  $64,3 \pm 0,1$  °C i  $58,2 \pm 0,1$  °C za DPPE te  $24,8 \pm 0,1$  °C,  $25,1 \pm 0,1$  °C i  $22,2 \pm 0,1$  °C za POPE. Rezultati se relativno dobro slažu s teorijskim vrijednostima  $T_m$  (DPPE) = 63 °C i  $T_m$  (POPE) = 25 °C.<sup>24</sup> Za obje vrste liposoma vrijednost  $T_m$  niža je u karbonatnom puferu (pH = 9,19). Isto je primijećeno i u spektroskopskom određivanju  $T_m$ . Pri pH višem od pH izoelektrične točke lipida dolazi do deprotonacije amino skupine i negativnog nabijanja skupine glave. Na relativno malim udaljenostima unutar dvosloja pojavljuje se destabilizirajuće elektrostatsko odbijanje, stoga je manje toplinske energije potrebno za narušavanje uređene strukture tj. mekšanje dvosloja. Znatno manje izraženo, ali ipak primjetno je i smanjenje vrijednosti  $T_m$  za DPPE i

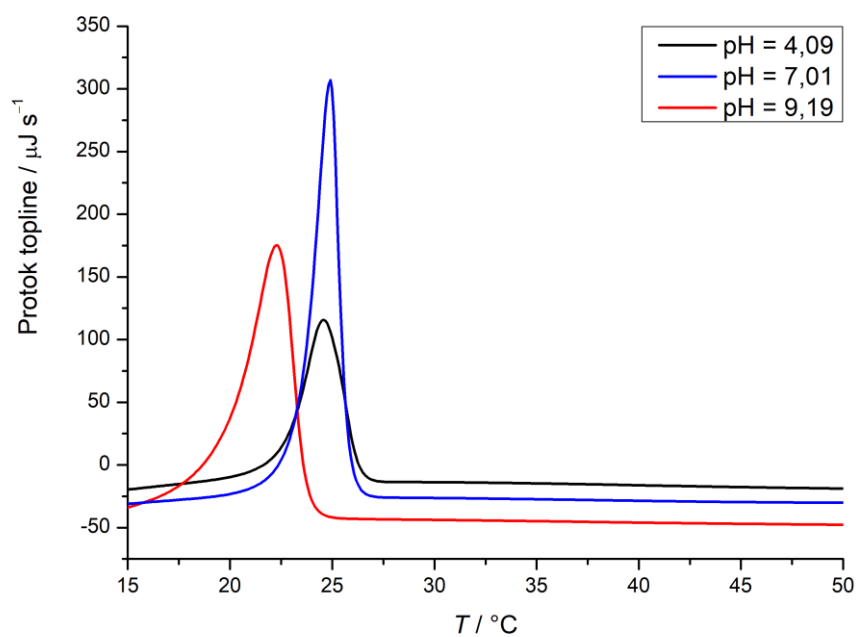
POPE liposome u acetatnom puferu ( $\text{pH} = 4,09$ ). Navedeno može biti posljedica prevladavanja pozitivnog naboja protonacijom kisika u fosfatnoj skupini. Taj fenomen nije primijećen iz UV/Vis spektroskopskih mjerenja zbog, vrlo vjerojatno, velike pogreške koja proizlazi iz univarijatne analize ovakvog seta podataka (bez apsorpcije u uobičajenom smislu riječi i očitavanju apsorpcije pri samo jednom valnom broju), što dodatno opravdava primjenu DSC tehnike kao standardne u izučavanju termotropnog ponašanja lipidnih tvorevina.<sup>6,13</sup>

*Onset* određivanjem dobivene su vrijednosti  $T_m$  s porastom  $\text{pH}$ :  $28,9 \pm 0,1$  °C,  $28,1 \pm 0,1$  °C i  $28,2 \pm 0,1$  °C za SM. Iz maksimuma krivulje dobivene su vrijednosti  $T_m$ :  $34,6 \pm 0,1$  °C,  $34,8 \pm 0,1$  °C i  $35,1 \pm 0,1$  °C za SM. Primjetna je razlika između vrijednosti  $T_m$  dobivenih različitim metodama, što se kao i kod spektroskopske tehnike može pripisati prisustvu sfingomijelina različitih duljina ugljikovodičnih lanaca u pripremljenom uzorku.

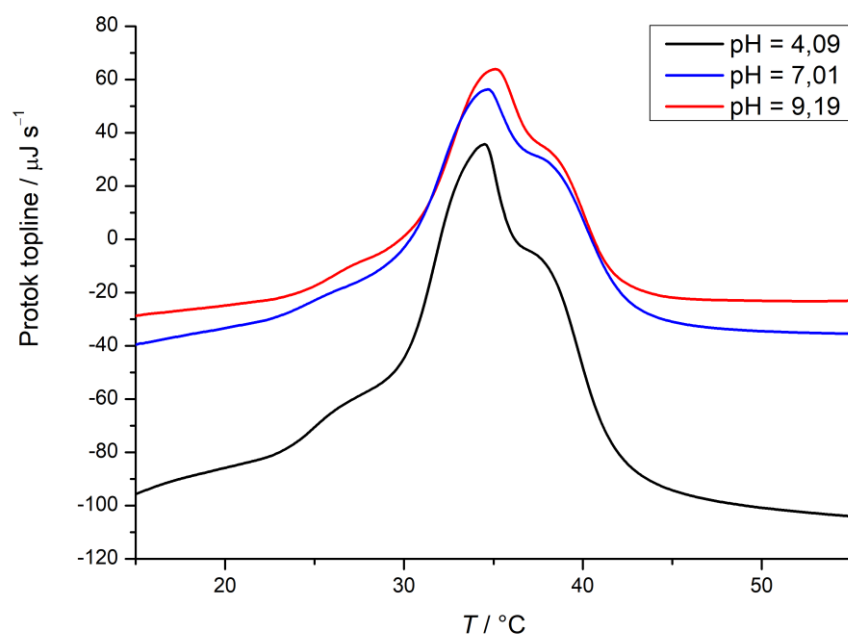
Rezultati određivanja vrijednosti  $T_m$  DPPC, DPPE, POPE i SM liposoma suspendiranih u acetatnom ( $\text{pH} = 4,09$ ), fosfatnom ( $\text{pH} = 7,01$ ) i karbonatnom puferu ( $\text{pH} = 9,19$ ) DSC tehnikom i UV/Vis spektroskopijom prikazani su u tablici 1. Vrijednosti  $T_m$  određene UV/Vis spektroskopijom se, uz pojedine iznimke, podudaraju s onima određenim iz maksimuma DSC krivulja.



Slika 16. DSC krivulje drugog ciklusa zagrijavanja DPPE liposoma suspendiranih u acetatnom ( $\text{pH} = 4,09$ ), fosfatnom ( $\text{pH} = 7,01$ ) i karbonatnom puferu ( $\text{pH} = 9,19$ )



Slika 17. DSC krivulje drugog ciklusa zagrijavanja POPE liposoma suspendiranih u acetatnom (pH = 4,09), fosfatnom (pH = 7,01) i karbonatnom puferu (pH = 9,19)



Slika 18. DSC krivulje drugog ciklusa zagrijavanja SM liposoma suspendiranih u acetatnom (pH = 4,09), fosfatnom (pH = 7,01) i karbonatnom puferu (pH = 9,19)

Tablica 1. Vrijednosti  $T_m$  DPPC, DPPE, POPE i SM liposoma suspendiranih u acetatnom (pH = 4,09), fosfatnom (pH = 7,01) i karbonatnom puferu (pH = 9,19) određenih DSC tehnikom (iz *onset* vrijednosti i maksimuma krivulje) i UV/Vis spektroskopijom.

	pH	$T_m / ^\circ\text{C}$		
		DSC onset	DSC max	UV/Vis
DPPC	4,09	40,5 ± 0,1	41,6 ± 0,1	~ 40
	7,01	40,9 ± 0,1	41,8 ± 0,1	~ 41
	9,19	40,6 ± 0,1	41,7 ± 0,1	~ 41
DPPE	4,09	62,4 ± 0,1	64,1 ± 0,1	~ 64
	7,01	62,4 ± 0,1	64,3 ± 0,1	~ 63
	9,19	52,8 ± 0,1	58,2 ± 0,1	~ 58
POPE	4,09	21,6 ± 0,1	24,8 ± 0,1	~ 25
	7,01	22,1 ± 0,1	25,1 ± 0,1	~ 25
	9,19	17,1 ± 0,1	22,2 ± 0,1	~ 23
SM	4,09	28,9 ± 0,1	34,6 ± 0,1	n. o.
	7,01	28,1 ± 0,1	34,8 ± 0,1	~ 35
	9,19	28,2 ± 0,1	35,1 ± 0,1	~ 35
n.o. - nije određivo				

## § 5. ZAKLJUČAK

Tehnikama UV/Vis spektroskopije i razlikovne pretražne kalorimetrije određene su temperature mekšanja DPPC, DPPE, POPE i SM lipida suspendiranih u puferima pH vrijednosti 4,09, 7,01 i 9,19. Spektroskopsko određivanje  $T_m$  temeljeno je na temperaturno-ovisnoj različitoj prozirnosti lipidnih suspenzija što se očituje kao spektar na različitoj visini na ordinati u temperaturno-ovisnim UV/Vis spektrima. Temperatura pri kojoj se pojavljuje diskontinuitet u apsorbanciji UV/Vis spektara lipidnih suspenzija, a koja je izmjerena pri 270 nm, okarakterizirana je kao  $T_m$  lipida, odnosno temperatura glavnog faznog prijelaza  $L_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$ . Rezultati dobiveni UV/Vis spektroskopijom u skladu su s rezultatima kalorimetrijske analize, a pojedina odstupanja su pripisana izazovnoj reproducibilnosti UV/Vis spektara odnosno velikim nesigurnostima u mjerenjima kao i uni- (a ne multivarijatnoj) analizi. Objema metodama utvrđeno je smanjenje vrijednosti  $T_m$  za liposome načinjene od DPPE i POPE, *zwitterionskih* lipida s fosfoetanolaminskom polarnom skupinom glave, pri pH vrijednosti medija 9,19 u odnosu na niže vrijednosti pH. Taj se fenomen objašnjava nabijanjem skupine glave negativno, dakle pojavom elektrostatskog odbijanja unutar dvosloja. Za liposome načinjene od DPPC i SM, *zwitterionskih* lipida fosfokolinske polarne skupine, pokazano je da  $T_m$  ne ovisi o pH vrijednosti medija. Dosad rijetko primjenjivana metoda temperaturno ovisne UV/Vis spektroskopije u svrhu istraživanja faznih prijelaza lipida pokazala se prikladnom za detekciju i određivanje temperature glavnog faznog prijelaza multilamelarnih liposoma načinjenih od neutralnih lipida uz potporu rutinski korištene DSC kalorimetrije.

## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

AFM	mikroskopija atomskih sila
DLS	dinamičko raspršenje svjetlosti
DMPC	1,2-dimiristoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidil-kolin
DPPC	1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidil-kolin
DPPE	1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidil-etanolamin
DPPS	1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidil-serin
DSC	razlikovna pretražna kalorimetrija
FT-IR	infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom
GPI	glikozilfosfatidilinozitol
H <sub>II</sub>	obrnuta heksagonalna faza
LUV	unilamelarni liposomi
L <sub>α</sub>	faza fluida
L <sub>β'</sub>	faza gela
MLV	multilamelarni liposomi
NMR	nuklearna magnetska rezonancija
PC	fosfokolin
PE	fosfoetanolamin
POPE	2-oleil-1-palmitoil-glicero-3-fosfatidil-etanolamin
PS	fosfoserin
P <sub>β'</sub>	valovita faza
SEM	pretražna elektronska mikroskopija
SM	sfingomijelin
TEM	transmisijska elektronska mikroskopija
T <sub>m</sub>	temperatura mekšanja
T <sub>p</sub>	temperatura pretprijelaza
UV	ultraljubičasto
Vis	vidljivo

## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W H Freeman & Co, New York, 2005, str. 369–416.
2. H. Barani and M. Montazer, *J. Liposome Res.* **18** (2008) 249–262.
3. S. A. Rahman, N. S. Abdelmalak, A. Badawi, T. Elbayoumy, N. Sabry, A. El Ramly, *Drug Deliv.* **23** (2016) 1184–1193.
4. B. Maherani, E. Arab-Tehrany, M. R. Mozafari, C. Gaiani, M. Linder, *Curr. Nanosci.* **7** (2011) 436–452.
5. E. Bettini, M. Locci, *Vaccines* **9** (2020) 1–20.
6. T. Heimburg, *Thermal Biophysics of Membranes*, Wiley-VCH, Berlin, 2007, str. 15–40, 66–98.
7. R. N. A. H. Lewis, D. A. Mannock, R. N. McElhaney, u A. M. Dopico (ur.), *Methods in Molecular Biology: Methods in Membrane Lipids*, Humana Press, 2007, str. 171–195.
8. R. N. A. H. Lewis, R. N. McElhaney, *Biochim. Biophys. Acta* **1828** (2013) 2347–2358.
9. P. Maleš, Z. Brkljača, I. Crnolatac, D. Bakarić, *Colloids Surf., B* **201** (2021) 111645, 8.
10. O. Cruciani, L. Mannina, A. P. Sobolev, C. Cametti, A. L. Segre, *Molecules* **11** (2006) 334–344.
11. N. M. Tsvetkova, B. L. Phillips, L. M. Crowe, J. H. Crowe, S. H. Risbud, *Biophys. J.* **75** (1998) 2947–2955.
12. D. Bach, E. Wachtel, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1610** (2003) 187–197.
13. G. Cevc, J. M. Seddon, R. Hartung, W. Eggert, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **940** (1988) 219–240.
14. P. Maleš, Z. Brkljača, D. Domazet Jurašin, D. Bakarić, *Spectrochim. Acta, Part A* **272** (2022) 121013, 7.
15. S. J. Singer, G. L. Nicolson, *Science* **175** (1972) 720–731.
16. N. D. Ridgway, R. S. McLeod, *Biochemistry Of Lipids, Lipoproteins And Membranes*, Elsevier, Halifax, 2015, str. 1–38.
17. B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, D. Morgan, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molecular Biology of The Cell*, Garland Science, New York, 2015, str. 565–596.
18. H. Lodish, A. Berk, C. A. Kaiser, M. Krieger, A. Bretscher, H. Ploegh, A. Amon, K. C.

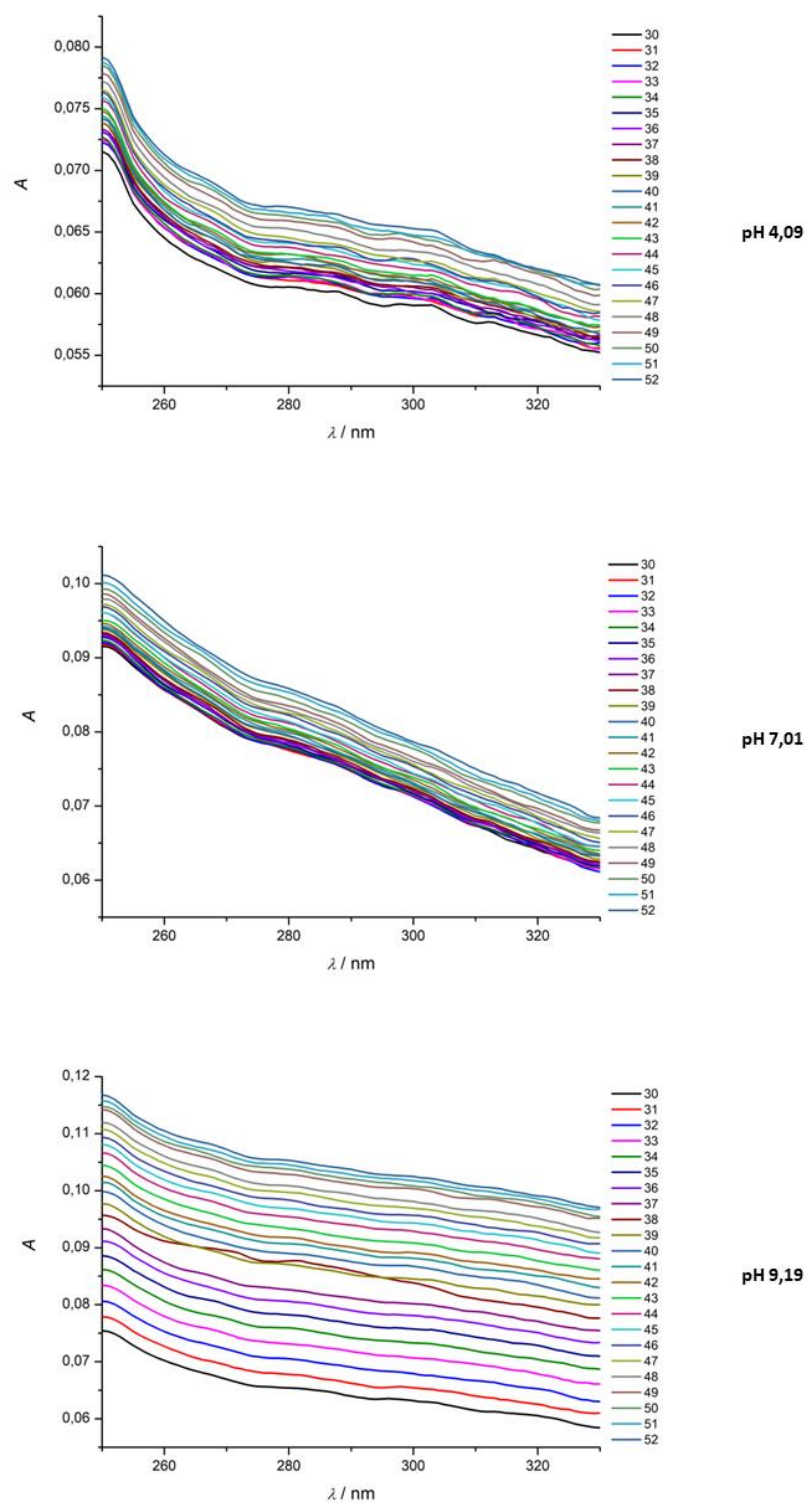
- Martin, *Molecular Cell Biology*, W. H. Freeman and Company, New York, 2016, str. 317–334.
19. D. Lombardo, M. A. Kiselev, S. Magazù, P. Calandra, *Adv. Condens. Matter Phys.* **2015** (2015) 151683.
  20. <http://www.chemspider.com> (datum pristupa 13. srpnja 2022.)
  21. A. S. B. Olsen, N. J. Færgeman, *Open Biol.* **7(5)** (2017) 170069.
  22. N. Schneider, J. Hauser, M. Oliveira, E. Cazaubon, S. C. Mottaz, B. V. O'Neill, P. Steiner, S. C. L. Deoni, *Eneuro* **6(4)** (2019) 1–13.
  23. R. Nisini, N. Poerio, S. Mariotti, F. De Santis, M. Fraziano, *Front. Immunol.* **9** (2018) 155.
  24. <https://avantilipids.com/tech-support/physical-properties/phase-transition-temps> (datum pristupa 25. lipnja 2022.)
  25. C. Chen, D. Han, C. Cai, X. Tang, *J. Control. Release* **142** (2010) 299–311.
  26. B. Ruozi, D. Belletti, A. Tombesi, G. Tosi, L. Bondioli, F. Forni and M. A. Vandelli, *Int. J. Nanomedicine* **6** (2011) 557.
  27. D. A. Skoog, J. F. Holler, S. R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*, Cengage Learning, Boston, 2018, str. 303–361, 824–831.
  28. R. N. McElhaney, *Chem. Phys. Lipids* **30** (1982) 229–259.
  29. D. Pentak, *Thermochim. Acta* **584** (2014) 36–44.
  30. H. H. Perkampus, *UV Spectroscopy and Its Applications*, Springer-Verlag, Berlin, 1992
  31. H. G. Pfeiffer, H. A. Liebhafsky, *J. Chem. Educ.* **28(3)** (1951) 123–125.
  32. D. Xu, J. Xie, X. Feng, X. Zhang, Z. Ren, Y. Zheng, J. Yang, *Front. Chem.* **6** (2008) 237.
  33. J. Stetefeld, S. A. McKenna and T. R. Patel, *Biophys. Rev.* **8** (2016) 409–427.
  34. P. M. Carvalho, M. R. Felício, N. C. Santos, S. Gonçalves, M. M. Domingues, *RSC Adv.* **10** (2020) 10352.
  35. K. Janicka, P. Beldowski, T. Majewski, W. Urbaniak, A. D. Petelska, *Molecules*, **24(12)** (2019) 2248.
  36. H. W. Meyer, H. Bunjes, A. S. Ulrich, *Chem. Phys. Lipids* **99** (1999) 111–123.



## § 8. DODATAK

Tablica D1. Rezultati određivanja veličine DPPC, DPPE, POPE i SM liposoma suspendiranih u acetatnom (pH = 4,09), fosfatnom (pH = 7,01) i karbonatnom puferu (pH = 9,19) tehnikom dinamičkog raspršenja svjetlosti.

	<b>pH</b>	<b><math>d_H / \text{nm}</math></b>
<b>DPPC</b>	4,09	$260 \pm 100$
	7,01	$1350 \pm 500$
	9,19	$3200 \pm 1200$
<b>DPPE</b>	4,09	$490 \pm 100$
	7,01	$450 \pm 170$
	9,19	$2800 \pm 280$
<b>POPE</b>	4,09	$240 \pm 95$
	7,01	$765 \pm 260$
	9,19	$1500 \pm 300$
<b>SM</b>	4,09	$230 \pm 30$
	7,01	$245 \pm 15$
	9,19	$1260 \pm 555$



Slika D1. Temperaturno ovisni UV/Vis apsorpcijski spektri acetatnog (pH = 4,09), fosfatnog (pH = 7,01) i karbonatnog pufera (pH = 9,19) prikupljeni u temperaturnom rasponu 30 – 52 °C

## § 9. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Jana Munivrana

Datum rođenja: 2. prosinca 1997.

Mjesto rođenja: Zagreb, Republika Hrvatska

### Obrazovanje

2004.–2012. Osnovna škola Ante Kovačića, Zagreb

2012.–2016. Gimnazija Lucijana Vranjanina, Zagreb

2016.–2020. Preddiplomski studij Kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2020.–2022. Diplomski studij Kemija, istraživački smjer, grane: analitička kemija i biokemija; Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2017. 10. Otvoreni dan Kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2018. 11. Otvoreni dan Kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu