



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Petra Maleš

**Određivanje temperature faznih prijelaza
fosfokolinskih i fosfoetanolaminskih liposoma
FT-IR spektroskopijom i diferencijalnom
pretražnom kalorimetrijom**

Diplomski rad

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

Zagreb, 2020.

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

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom „Molekularni aspekti oksidativnih procesa u stanicama“ (UIP-2014-09-6090).

Zahvale

*Veliko hvala dragoj mentorici dr. sc. Danijeli Bakarić
na pruženoj prilici, velikom strpljenju i iskazanom povjerenju tijekom izrade
ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se neposrednom voditelju dr.sc. Ivi Crnolatu i dr.sc. Atiđi Selmani na prenesenom
znanju i pomoći prilikom izrade ovog rada, kao i ostalim zaposlenicima Zavoda za organsku
kemiju i biokemiju, posebice Laboratorija za kemiju u modelnim biološkim sustavima.*

*Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Snežani Miljanić na podršci u najključnijim trenucima i uloženom
vremenu i trudu.*

*Hvala mojim prijateljima na svim lijepim i veselim trenucima tijekom svih ovih godina, a ima ih
puno. 😊*

*Na kraju, najviše želim zahvaliti mojim roditeljima koji su mi sve ovo omogućili i bez kojih ne bi
bila to što jesam, te svom najdražem bratu koji mi je najveća podrška od početka.*

Sadržaj

SAŽETAK	VI
ABSTRACT	VII
§ 1. UVOD	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Struktura membrana i membranskih lipida	3
2.1.1. Vrste membranskih lipida.....	6
2.1.2. Ostali agregati lipida	8
2.1.3. Temperatura faznih prijelaza membranskih lipida	9
2.1.4. Fosfokolin (DPPC) i fosfoetanolamin (DPPE).....	12
2.2. Instrumentalne tehnike određivanja temperature faznog prijelaza	13
2.2.1. Diferencirajuća pretražna kalorimetrija (DSC).....	13
2.2.2. Infracrvena spektroskopija.....	14
3.1. Određivanje veličine suspendiranih čestica.....	19
4.1. Utjecaj ionske jakosti i kationa na fazne promjene lipida	20
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	23
3.1. Materijali.....	23
3.2. Priprema uzoraka	23
3.2.1. Uzorci za FT-IR spektroskopiju.....	23
3.2.2. Uzorci za DLS mjerenja.....	23
3.2.3. Uzorci za DSC mjerenja	23
3.3. Mjerni uređaji.....	24
3.3.1. FT-IR spektroskopija	24
3.3.2. Dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS)	25
3.3.3. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC)	25
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA.....	26
4.1. FT-IR spektri uzoraka	26
4.1.1. Analiza FT-IR spektara DPPC-a.....	26
4.1.2. Analiza FT-IR spektara DPPE-a.....	28
4.2. Analiza DSC krivulja DPPC-a i DPPE-a.....	30
4.3. Određivanje T_m usporednom analizom FT-IR spektara i DSC krivulja za DPPC i DPPE ...	32
§ 5. ZAKLJUČAK.....	37

§ 6. LITERATURNI IZVORI.....	38
§ 7. DODATAK	VIII
§ 8. ŽIVOTOPIS	X



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

ODREĐIVANJE TEMPERATURE FAZNIH PRIJELAZA FOSFOKOLINSKIH I FOSFOETANOLAMINSKIH LIPOSOMA FT-IR SPEKTROSKOPIJOM I DIFERENCIJALNOM PRETRAŽNOM KALORIMETRIJOM

Petra Maleš

Prijelaz lipida u lipidnim dvoslojima iz faze gela u fluidnu fazu javlja se pri temperaturi mekšanja (T_m) koja ovisi o van der Waalsovima interakcijama između ugljikovodičnih lanaca molekula lipida i nekovalentnim interakcijama između polarnih skupina molekula lipida i molekula vode. Standardna tehnika za određivanje T_m je diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC), dok se FT-IR spektroskopijom u temperaturno ovisnom načinu snimanja mogu istodobno odrediti T_m i strukturne promjene u slaganju lipida. U ovom diplomskom radu pripremljeni su lipidni dvosloji od 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfokolina (DPPC) i 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (DPPE) u vodenoj otopini NaCl (100 mmol/L). Vrijednosti T_m su za oba uzorka određene FT-IR spektroskopijom i DSC metodom: na temelju FT-IR spektara analizom vrpce koje potječu od simetričnog istezanja metilenskih skupina $\nu_s\text{CH}_2$ i strižne vibracije metilenskih skupina γCH_2 te iz pojedinih parametara DSC krivulje. Za dvosloj DPPC lipida T_m određena spomenutim metodama je unutar granica nesigurnosti, dok je za DPPE lipid opaženo odstupanje od ~ 2 °C. Opažena odstupanja pripisana su promjenama nekovalentnih interakcija između nepolarnih i polarnih skupina kod DPPE lipida u lipidnom dvosloju.

(42 stranica, 21 slika, 6 tablica, 33 literaturna 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, fosfokolina, fosfoetanolamin, FT-IR

Mentor: dr. sc. Danijela Bakarić, znanstveni suradnik, IRB

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

Ocjenitelji:

1. izv. prof. izv. dr. sc. Snežana Miljanić
 2. prof. dr. sc. Željka Soldin
 3. doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski
- Zamjena: prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Datum diplomskog ispita: 26. veljače 2020.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

DETERMINATION OF THE PHASE TRANSITION TEMPERATURES OF PHOSPHOCHOLINE AND PHOSPHOETHANOLAMINE LIPOSOMES WITH FT-IR SPECTROSCOPY AND DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY

Petra Maleš

Transition of lipids in lipid bilayers from gel to fluid phase occurs at melting temperature (T_m), which depends on van der Waals interactions between hydrocarbon chains and noncovalent interactions created by lipid polar groups with water molecules. Standard technique for determination of T_m is differential scanning calorimetry (DSC), whereas FT-IR spectroscopy applied in temperature-dependent regime provides simultaneously T_m and lipid structural order changes. In this diploma work lipid bilayers are made of 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC) and 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DPPE) dissolved in NaCl water solution (100 mmol/L). For both sample sets T_m values were determined using FT-IR spectroscopy and DSC: in FT-IR spectra the bands originated from symmetric methylene group stretching $\nu_s\text{CH}_2$ and methylene group scissoring γCH_2 were analyzed, and from particular parameters from a DSC curve. T_m determined by these two methods coincides for bilayers made of DPPC lipids, whereas a discrepancy of $\sim 2^\circ\text{C}$ was observed for DPPE lipid. Observed deviations were attributed to unsynchronized changes in noncovalent interactions between nonpolar and polar groups of DPPE lipids in the lipid bilayer.

(42 pages, 21 figures, 6 tables, 33 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, the phase transition, phosphocholine, phosphoethanolamine, FTIR

Mentor: Dr. Danijela Bakarić, Research Associate, IRB

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

Reviewers:

1. Dr. Snežana Miljanić, Associate Professor
2. Dr. Željka Soldin, Professor
3. Dr. Aleksandra Maršavelski, Assistant Professor

Substitute: Dr. Iva Juranović Cindrić, Professor

Date of exam: 26th February 2020.

§ 1. UVOD

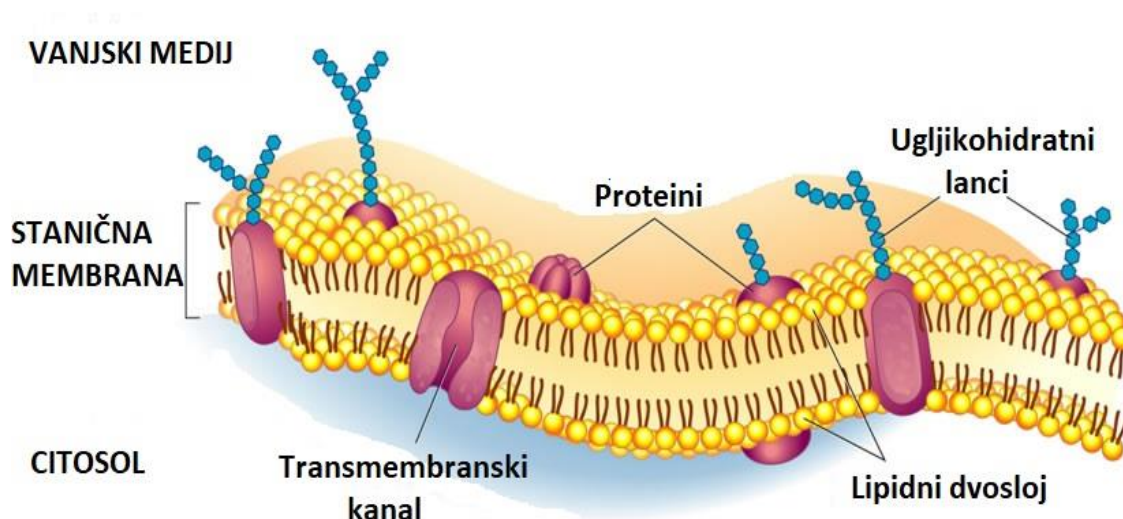
Struktura i funkcija bioloških membrana rezultat su interakcija između njezinih sastavnih dijelova. Među najvažnije sastojke bioloških membrana ubrajaju se lipidi, amfipatske molekule koje se u vodenom okruženju orijentiraju u dvosloje na način da su njihovi dugački ugljikovodični lanci okrenuti jedni prema drugima, a polarne skupine prema vodi. Modelne lipidne membrane često korištene u eksperimentalne svrhe su liposomi, sferne strukture nalik vezikulama, i najčešće su građene od više lipidnih dvosloja.² Lipidi se mogu razlikovati prema strukturi polarne glave i prema strukturi i duljini hidrofobnog repa; primjerice, fosfokolini (engl. *phosphatidylcholine*, PC) imaju polarnu kolinsku skupinu, dok fosfoetanolamini (engl. *phosphatidylethanolamine*, PE) imaju amino skupinu. Ovisno o uređenju lipida u liposomu, razlikujemo različite faze lipida, npr. kristaliničnu (L_c), gel (L_β), valovitu (P_β) te fluidnu (L_α) fazu. Prijelaz iz jedne faze u drugu funkcija je strukture lipida i javlja se pri određenoj temperaturi. Glavnim faznim prijelazom koji pokazuju lipidni dvosloji smatra se prijelaz iz gela u fluid pri temperaturi mekšanja (T_m).⁴ T_m lipida PE je veća u odnosu na T_m lipida PC zbog mogućnosti stvaranja vodikovih veza između amino skupina lipida i molekula vode, dok kolinske skupine PC lipida nemaju tu mogućnost. T_m se rutinski određuje diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC) koja mjeri razliku u brzini zagrijavanja uzorka i referentnog materijala koja se očituje uslijed termotropnog događaja poput faznog prijelaza. Unatoč osjetljivosti u detekciji fazne promjene, spomenuta tehnika nije u mogućnosti opaženi termotropni događaj interpretirati u kontekstu promjene međumolekulskih interakcija lipida. Za razliku od DSC, infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama (FT-IR) je analitička metoda koja, primijenjena u temperaturno-ovisnom režimu, daje uvid u temperaturno-ovisne strukturne promjene uzorka i to na razini funkcionalnih skupina. Fazni prijelaz iz FT-IR spektara rutinski se određuje iz temperaturno-ovisnog pomaka vrpce koje potječu od vibracija metilenskih skupina ($-\text{CH}_2-$) ugljikovodičnih lanaca. Radi spomenute mogućnosti, FT-IR spektroskopija se koristi ne samo za određivanje temperature faznog prijelaza lipida već i za karakterizaciju strukturnih promjena uzorka.¹⁶

Svrha ovog rada je odrediti temperaturu mekšanja (T_m) za odabrane lipide koji su dvojni ioni („zwitterioni“): 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfokolin (DPPC) i 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamin (DPPE) na dva načina: FT-IR spektroskopijom i DSC-om. Uz to, u ovom radu je na temelju FT-IR spektara T_m određena analizom temperaturne ovisnosti apsorbancije vrpce koje potječu od vibracija pojedinih funkcionalnih skupina molekula. Naposljetku, ovim se radom nastoji prikazati jedan originalan pristup u određivanju T_m pomoću FT-IR spektara, ali i ukazati na određena odstupanja između T_m vrijednosti određenih različitim tehnikama za različite lipide.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

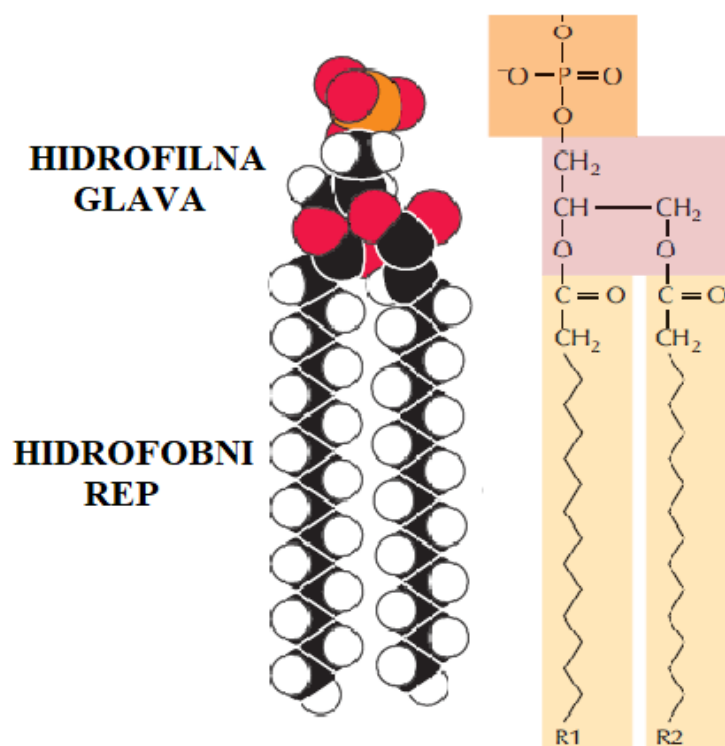
2.1. Struktura membrana i membranskih lipida

Membrane su dinamičke strukture koje predstavljaju granice između staničnog sadržaja i izvanstaničnoga prostora. Pretežno se sastoje od lipida i proteina poslaganih u dvosloj među kojima brojne nekovalentne interakcije djeluju kooperativno i čine membrane jako fluidnim strukturama.¹ Usprkos frazi da su membrane *dvodimenzionalne otopine orijentiranih lipida i proteina* ni molekule lipida ni proteina ne mogu slobodno prelaziti s jedne na drugu stranu membranskog dvosloja. Na takav način se održava i sama asimetričnost membrane jer je unutarnja strana (citoplazmatska) uvijek različita od vanjske (vanstanični prostor). Razlika između vanjske i unutranje strane membrane vidljiva je i u vrijednosti membranskog potencijala (unutarnja strana je negativnija), što ima jako važnu ulogu u transportu tvari, pobudljivosti stanica i pretvorbi energije.² Lipidne komponente čine barijeru za propusnost tvari kroz membranu, dok proteini djeluju kao transportni sustav crpki i kanala. Zahvaljujući svojoj strukturi membrane imaju znatnu ulogu u prijenosu, distribuciji, aktivnosti i selektivnosti biomolekula i upravo je zbog toga vrlo važno shvatiti molekulske mehanizame interakcija različitih bioloških molekula s lipidima u modelnim membranama.³



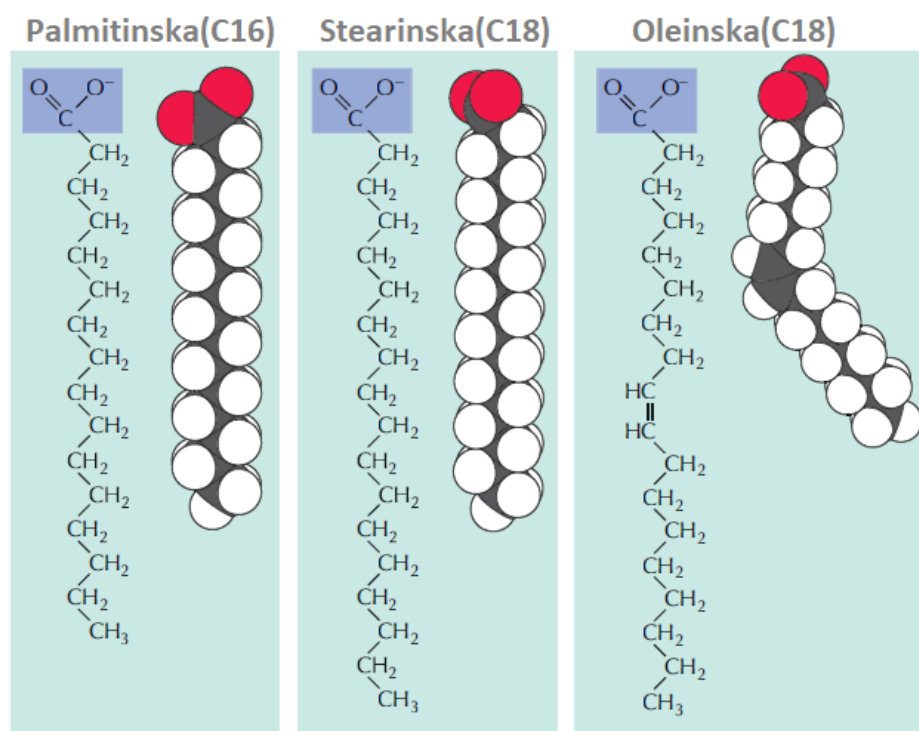
Slika 1. Shematski prikaz membranskog dvosloja u biološkoj stanici.⁵

Proteini i lipidi nisu homogeno raspoređeni unutar membrane te mogu stvarati različite domene, klastere ili agregate. Funkcija bioloških membrana ovisi upravo o njihovom sastavu, a one mogu sadržavati stotine različitih lipida i proteina.⁴ Osim lipida i proteina, membrane grade i šećeri, uglavnom u obliku glikolipida i oligosaharida koji također imaju funkcionalnu ulogu.² Na temelju lakoće izdvajanja proteina iz membranskog dvosloja, proteine u membranama dijelimo na: periferne i integralne ili transmembranske proteine. Periferni membranski proteini su vezani polarnim interakcijama kao što su elektrostatske ili vodikove veze za polarne glave lipida pa se nalaze na površini membrana. Oni su najčešće enzimi i hormoni uključeni u mnogobrojne bitne funkcije stanične membrane. Integralni ili transmembranski proteini su povezani čvršćim nepolarnim interakcijama za ugljikovodične lance masnih kiselina lipida (više o građi lipida u sljedećem odjeljku). Transmembranski proteini imaju važnu ulogu kao ionski kanali i proteinske pumpe te su ključni u transportu tvari kroz membranu. Specifični periferni i transmembranski proteini su zaslužni za gotovo sve njene funkcije osim barijere propusnosti za koju su odgovorni lipidi.²



Slika 2. Struktura lipida: polarna glava okrenuta prema vodenom mediju, a nepolarni repovi orijentirani prema unurašnjosti membrane.¹

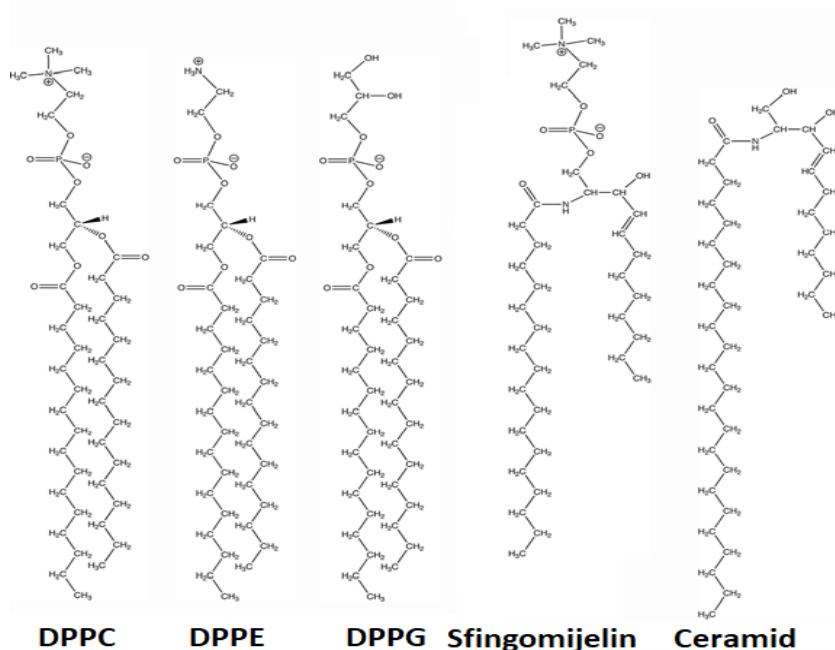
Lipidi su amfipatske molekule građene od hidrofobnih repova i hidrofilne glave (slika 2.). Polarne glave su sastavljene od polarnih skupina kao što su fosfati, koje ostvaruju interakcije s vodom, te su iz tog razloga okrenute prema vodenom mediju. Nepolarni repovi su građeni od dugih ugljikovodičnih lanaca masnih kiselina i ne reagiraju s vodom te su orijentirani jedni prema drugima.⁴ Masne kiseline mogu biti zasićene i nezasićene što ovisi o tome imaju li ili nemaju dvostruku vezu u ugljikovodičnom lancu. Sami naziv zasićenih masnih kiselina govori da one sadrže isključivo jednostruke veze, a nezasićene masne kiseline imaju jednu ili više dvostrukih veza. Nezasićene masne kiseline postoje u dvije konfiguracije, *cis* i *trans*. Većina nezasićenih masnih kiselina ima *cis* konformaciju. Duljina alkilnog lanca i stupanj zasićenosti lanca reguliraju svojstva masnih kiselina, a samim time i svojstva membrana.^{4,6} Masne kiseline u živim organizmima obično imaju od 14 do 24 C-atoma, a najčešće su one sa 16 i 18 C-atoma.⁶ Takva samoorganizacija lipida u dvosloje u vodenom mediju je brz i spontan proces gdje su presudne hidrofobne interakcije između alkilnih lanaca različitih lipidnih vrsta.⁴



Slika 3. Primjeri osnovnih struktura zasićenih (palmitinska i stearinska) i nezasićenih masnih kiselina (oleinska).¹

2.1.1. Vrste membranskih lipida

Postoje tri glavne skupine membranskih lipida s obzirom na vrstu polarne glave, a to su fosfolipidi, glikolipidi, sfingolipidi i steroli (kolesterol). U biološkim membranama najzastupljeniji su fosfogliceridi (fosfolipidi). Građeni su od trohidroksilnog alkohola glicerola kao osnove na koju su esterskom vezom vezana dva lanca masnih kiselina. Na treću hidroksilnu skupinu glicerola vezan je fosfat i polarna skupina koja određuje vrstu molekule fosfolipida.² Za većinu fosfolipida karakteristično je svojstvo kiralnosti, te je većinom kiralni centar središnji ugljikov atom na glicerolskoj osnovici.⁴



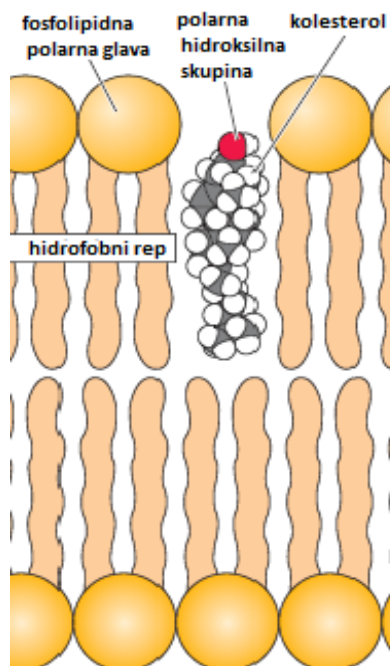
Slika 4. Strukturne formule nekih fosfolipida koji se mogu naći u membrani.⁴

Različite vrste fosfolipida nastaju vezanjem različitih funkcionalnih skupina na najjednostavniji fosfoglicerid *fosfatidat* (*diacilglicerol-3-fosfat*). Na *fosfatidat* esterskom vezom se može vezati hidroksilna skupina alkohola, aminokiselina serin, glicerol, inozitol, etanolamin i kolin. Na takav način nastaju fosfatidilserin, fosfatidilglicerol, fosfatidilinozitol i fosfoetanolamin koji su najzastupljeniji u unutarnjem sloju membranskog dvosloja koji je okrenut prema citosolu stanice, dok je fosfokolin u vanjskome sloju okrenutom prema vanstaničnom mediju.² Asimetričnost membrana u živim bićima se manifestira zbog različitog sastava membranskih lipida, gdje bitnu ulogu ima i duljina alkilnih lanaca odgovarajućih

masnih kiselina. Svojstvo asimetrije membrana ima bitnu ulogu kod membranskih fuzija i dioba, interakcija membranskih lipida s proteinima i procesa prijenosa signala. Ukoliko izostane asimetrija membrane, stanica gubi svoje funkcije te se potiče apoptoza (stanična smrt) i pojavljuju se razne bolesti.⁷

Važan membranski lipid koji također doprinosi asimetriji membrane je sfingomijelin. Njegova okosnica, za razliku od fosfolipida, nije glicerol već sfingozin, dugolančani nezasićeni aminoalkohol na čiju je primarnu hidroksilnu skupinu esterificiran fosforilkolin te je amidnom vezom povezana masna kiselina (najčešće palmitinska ili stearinska kiselina). Pretpostavlja se da su sfingolipidi važni za formiranje mikrodomena u biološkim stanicama.^{2,4} Na lipide u membranama mogu se vezati šećeri čineći strukture koje se nazivaju glikolipidima. Oni čine drugu vrstu membranskih lipida te je njihova građa jako slična građi prethodno navedenog sfingomijelina, ali razlika je što je umjesto fosforilkolina vezan šećer ili nekoliko šećera (najčešće glukoza ili galaktoza). Glikolipidi na membranama su uvijek šećernim ostatkom orijentirani prema vanstaničnoj strani.²

Posljednja skupina lipida koji grade membrane su steroli, od kojih je najbitniji kolesterol koji gradi 20% eukariotskih membrana i plazma membrana.⁴ Kolesterol je građen od četiri međusobno povezana ugljikovodična prstena, gdje je na jednom kraju vezan ugljikovodični lanac, a na drugom hidroksilna skupina. U membrani smješten je paralelno na repove masnih kiselina fosfolipida, a OH- skupina interagira s najbližom polarnom skupinom fosfolipida. Kolesterol djeluje kao stabilizator u membranama, povećavajući fluidnost pri nižim temperaturama, a pri višim temperaturama ih čini čvršćima.^{7,8} Ujedno ima jako važnu ulogu u membranama živčanih stanica.²

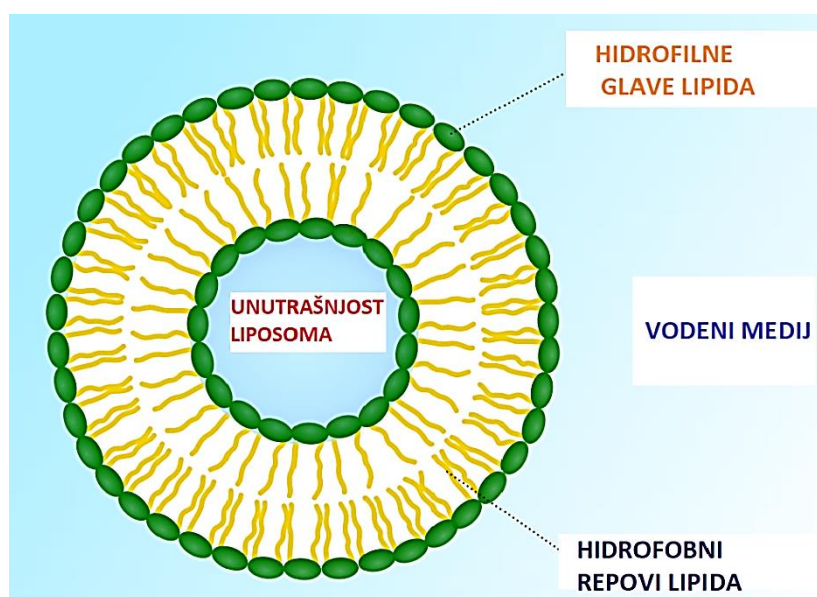


Slika 5. Kolesterol ugrađen u membranski dvosloj polarnom hidroksilnom skupinom orijentiranom prema polarnim hidrofilnim glavama lipida.¹

2.1.2. Ostali agregati lipida

Osim spomenutog lipidnog dvosloja, lipidi u vodenom mediju mogu formirati i druge oblike agregata, ovisno o uvjetima (koncentraciji) i vrsti (strukturi) lipida; u uvjetima visokih razrjeđenja lipidi, bez obzira na strukturu, mogu postojati kao monomeri, dok lipidi koji imaju jedan ugljikovodični lanac umjesto dva tvore micide. Micide su najčešće sferne strukture koje se sastoje od nekoliko desetaka do nekoliko tisuća amfipatskih lipida. Budući da su građene od lipida koje imaju samo jedan ugljikovodični lanac, hidrofobni lanci orijentirani su prema unutrašnjosti gdje nema vode, a hidrofilne glave su na površini, u kontaktu s vodom.⁴ Za razliku od micela, kod lipidnih dvosloja hidrofobne regije ostvaruju interakcije međusobno, a hidrofilne glave reagiraju s vodom i to na površini svakog sloja. Budući da, doticaj hidrofobne regije s vodom na njihovim krajevima dovodi do nestabilnosti takve planarne strukture, dolazi do spontanog nastajanja liposoma, sfernih struktura koje mogu imati i nekoliko lipidnih dvosloja poredanih poput koncentričnih kružnica između kojih se nalaze slojevi vode.⁹

Liposomi su najčešće korišteni modelni sustavi za istraživanje propusnosti membrane ili mehanizama unošenja različitih tvari u stanice. Zbog svog oblika još se nazivaju *lipidnim mjehurićima*. Način pripreme liposoma je jako jednostvan jer je potrebno u vodeni medij suspenzirati određeni lipid te suspenziju sonificirati (djelovanje visokofrekventnih ultrazvučnih valova). Sonifikacijom se dobivaju liposomi približno jednakih veličina što je jako korisno u daljnjem eksperimentalnom radu.² U području farmakološke nanotehnologije, lipidni dvosloji u obliku liposoma imaju široku primjenu i to najčešće kao vezikule za prijenos lijekova unutar stanica ili između stanica.¹⁰

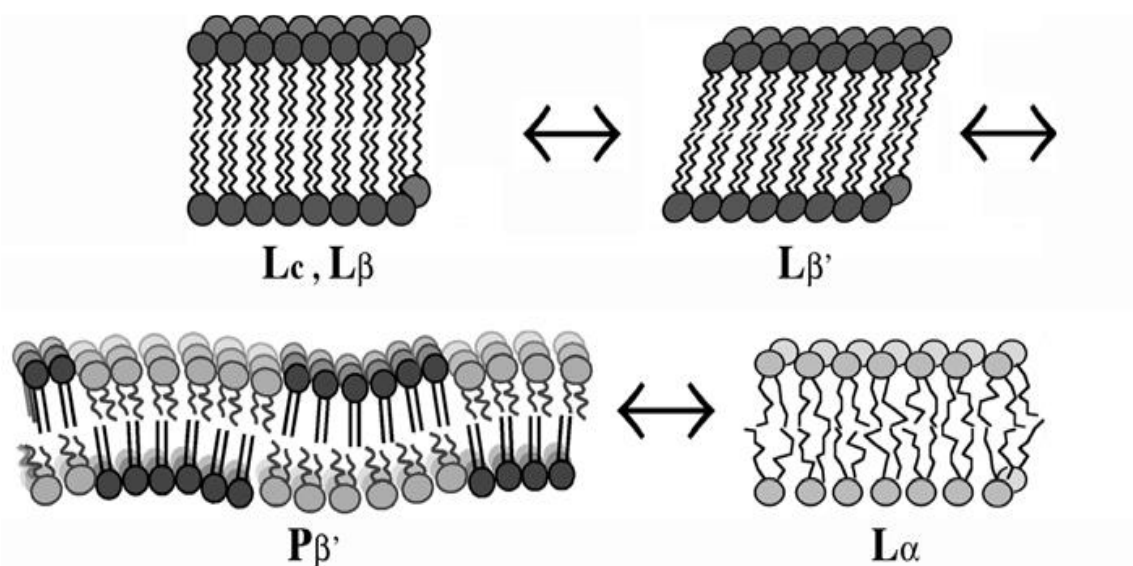


Slika 6. Shematska struktura liposoma u vodenom mediju.¹¹

2.1.3. Temperatura faznih prijelaza membranskih lipida

Već je spomenuto da su membrane fluidne tvorevine, čija dinamika i struktura ovisi o nizu faktora kao što su pH, temperatura, tlak, te kemijski potencijal raznih iona. Mijenjanjem tih faktora možemo uzrokovati razaranje lipidnih agregata ili nastanak nekih novih oblika.⁴ Budući da se u ovom radu proučavaju fazni prijelazi lipida uzrokovani promjenom temperature, u ovom poglavlju detaljnije se razmatra samo utjecaj temperature na membranski lipidni dvosloj. Membrane se najviše proučavaju u fazi gela (čvrsta uređena faza) i fazi fluida (tekuća neuređena faza).¹⁰ Pri nižim temperaturama, lipidni dvosloj je uređena, čvrsta struktura, a svi lanci masnih kiselina nalaze se u *trans* konformaciji (slika 7.). Takva faza naziva se L_c faza ili kristalinična lipidna faza. Povišenjem temperature lipidni dvosloj prelazi

iz čvrste strukture u gel fazu, odnosno $L_{\beta'}$ fazu (slika 7.). Struktura lanaca u gel fazi ne mijenja se drastično u odnosu na kristaličnu formu, pa su lanci i dalje u *trans* položajima, ali lipidi mogu biti nagnuti pod određenim kutem koji ovise o skupinama koje čine glavu lipida. Primjerice, fosfokolini (PC) u ovoj fazi pokazuju nagib od 30° u odnosu na normalu membrane, dok npr. fosfatidiletanolamini (PE) ne pokazuju nikakav nagib (L_{β}). Sljedeća faza koja može nastati daljnjim porastom temperature je $P_{\beta'}$ faza (slika 7.) u kojoj se na površini dvosloja stvaraju nabori (engl. *ripples*), većinom dugački 15–30 nm, za koje se, među ostalim, smatra da su uzrokovani periodničnom izmjenom lipida koji se nalaze u fazi gela ($L_{\beta'}$) i fazi fluida (L_{α}). Ova faza nastaje prije glavnog faznog prijelaza pri temperaturi pretprijelaza (engl. *pretransition*, T_p) i sastoji se od većinom djelomično omekšane lipidne faze sa smanjenim stupnjem uređenosti lanaca.⁴ Većina lipida u ovoj fazi i dalje sadrže samo masne kiseline s *trans*-konfiguracijom alkilnih lanaca kao i u gel fazi.¹² Pojavnost ove faze znatno ovisi o glavama lipida. Fosfatidiletanolamini i glikolipidi nemaju promjenu prije glavnog faznog dok je promjena kod fosfatidilkolina i fosfatidilglicerola dokazana. Osim toga, smatra se da je za ovu fazu jako bitan utjecaj otapala.⁴ Većina proučavanja ove faze se provodi na multilamelarnim liposomima, iako neki radovi sugeriraju pojavu nabora i kod unilamelarnih vezikula. Kod unilamelarnih vezikula uočeni su manje kooperativni procesi prije glavne fazne promjene.^{13,14} Kod multilamelarnih liposoma nabori se mogu jednostavno detektirati difrakcijskim tehnikama dok je to kod unilamelarnih liposoma znatno teže zbog pojave nekoherentnog sparivanja zračenja.¹³ Pretpostavlja se da su procesi pretprijelaza i glavnog faznog prijelaza dva međusobno povezana fenomena koja zajedno uzrokuju promjenu faze lipida, osim što su vidljivi kao dva odvojena događaja.⁴ Zadnja faza lipidne transformacije uzrokovane temperaturom je fluidna faza (L_{α}) u kojoj u potpunosti nestaje uređenost lanaca (slika 7.).

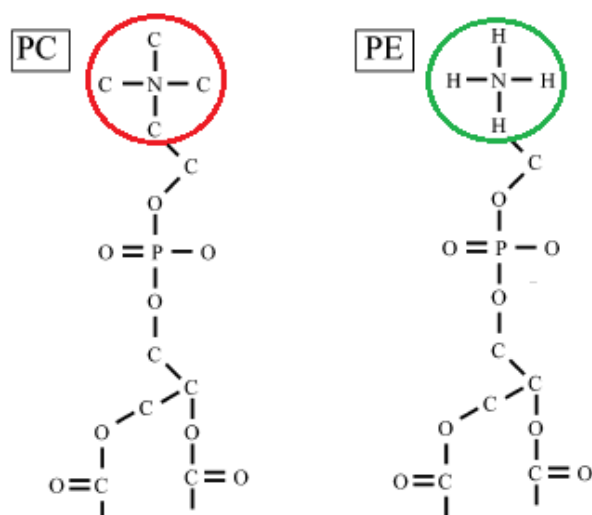


Slika 7. Fazni prijelazi membranskog dvosloja koji nastaju povišenjem temperature.⁴

Temperatura pri kojoj se faza mijenja iz gela ($L_{\beta'}$) u fluid (L_α) je temperatura mekšanja T_m .¹⁰ Ta temperatura ovisi o duljini lanaca i njihovom stupnju nezasićenosti te o polarnoj glavi lipida. Što je veća duljina lanaca, to je i T_m veća jer su van der Waalsove interakcije između lanaca jače. Pojava dvostrukih veza u lancima drastično smanjuje T_m jer je tada membrana opuštenija te je dvosloj fluidniji. Primjerice, lipid 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfokolin (DOPC) ima T_m oko -20 °C, dok 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfokolin (DSPC) ima T_m oko 53 °C. Jedina razlika između ta dva lipida je dvostruka veza između C9 i C10 u oleilnim lancima DOPC-a. Također, proces mekšanja se događa pri temperaturi karakterističnoj za svaki lipid ovisno i o građi same lipidne glave jer se mogu stvarati različite međumolekulske interakcije, kao što su npr. vodikove veze između polarnih glava i vodenog medija.⁴

2.1.4. Fosfokolin (DPPC) i fosfoetanolamin (DPPE)

U prethodnom poglavlje prikazani su neki od mogućih membranskih lipida koji mogu graditi lipidne agregate odnosno biološke membrane (slika 4.). U ovom radu izabrana su dva lipida različitih polarnih glava koji su poslužili za pripremu liposoma koji su istraživani dvjema instrumentalnim tehnikama: FT-IR spektroskopijom i diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom. Ta dva lipida su 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfokolin (DPPC) i 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamin (DPPE). Zajednička strukturna svojstva navedenim lipidima su dvije palmitinske masne kiseline u strukturi te su oba lipida dvojni ioni, odnosno imaju jednak broj pozitivnog i negativnog naboja pri fiziološkoj pH vrijednosti. Razlika u građi DPPC-a i DPPE-a je u polarnoj glavi jer fosfokolin (DPPC) ima vezan kolin ($-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$), dok fosfoetanolamin (DPPE) sadrži amino skupinu ($-\text{NH}_3^+$) (slika 8.).



Slika 8. Polarne skupine DPPE i DPPC; bojom označena kolinska skupina (crveno) i amino skupina (zeleno).³⁵

Za razliku od DPPC lipida čija kolinska skupina ne sudjeluje kao donor H-atoma u vodikovoj vezi, DPPE lipidi međusobno mogu stvarati i intra- te intermolekulske vodikove veze zahvaljujući fosfatnim i amino skupinama. Posljedično, T_m DPPE lipida je veća u odnosu na T_m DPPC lipida zbog jačih vodikovih veza između polarnih glava lipida.

2.2. Instrumentalne tehnike određivanja temperature faznog prijelaza

Postoji više različitih vrsta tehnika koje mogu poslužiti za praćenje faznih prijelaza modelnih i bioloških membrana, te za određivanje njihove točne temperature. Tehnike koje se mogu koristiti imaju različitu teorijsku osnovu te se mogu svrstati u spektroskopske, termičke, mikroskopske i florescencijske tehnike.¹⁵⁻¹⁹ U ovom radu su korištene dvije instrumentalne tehnike, a to su termička analiza diferencirajućom pretražnom kalorimetrijom i IR spektroskopska metoda FT-IR .

2.2.1. Diferencirajuća pretražna kalorimetrija (DSC)

Diferencirajuća pretražna kalorimetrija (DSC) je vrlo moćna termoanalitička tehnika koja se koristi za identifikaciju faznih promjena membranskih dvosloja te za određivanje termodinamičkih parametara, napose T_m . Način rada se temelji na usporednom zagrijavanju (ili hlađenju) uzorka i inertnog referentnog materijala, koji ne pokazuje fazni prijelaz u temperaturnom intervalu kojeg promatramo. Uzorak je obično suspenzija lipida ili membrane u vodi ili u puferu, a referentni materijal je samo otapalo (voda ili pufer). Razlika u brzini zagrijavanja (odnosno hlađenja) između uzorka i referentnog materijala bilježi se kao ovisnost otpuštene (egzotermna reakcija) ili primljene (endotermna reakcija) topline u ovisnosti o temperaturi. Podaci koje možemo dobiti iz DSC krivulje koja pokazuje fazni prijelaz su:

1. T_m faznog prijelaza (maksimum signala)
2. T_{onset} (početak faznog prijelaza)
3. $T_{m1/2}$ (temperatura na polovici širine signala faznog prijelaza)
4. Enalpija fazne promjene (površina ispod signala).^{20,21}

Kao analitička tehnika DSC nudi puno prednosti. Neke od njih su jednostavnost pripreme uzoraka (vidi pripremu uzoraka za DSC na str. 23), te osjetljivost i preciznost u određivanju promjena termodinamičkih svojstava fosfolipidnih membrana dodatkom kemikalije koja se može ugraditi u lipidni dvosloj. Najveća prednost DSC-a za naš rad je ta što točno može odrediti T_m i što kao tehnika može poslužiti za određivanje temperaturnog intervala faznih promjena koji bi poslužio kod drugih eksperimentalnih tehnika.

Kao i svaka analitička metoda i DSC ima svoje nedostatke, primjerice, DSC krivulje faznih prijelaza različitih lipida DPPC-a i DHPC-a jako slično izgledaju, a riječ je o različitim lipidima. Nadalje, DSC može detektirati promjene u strukturi uzoraka, ali ih ne može povezati

s događajima na molekularnoj razini.²² Iznimno je važno naglasiti da uzorak koji se analizira DSC-om obavezno prolazi minimalno dva ciklusa grijanja i hlađenja; budući da prilikom prvog zagrijavanja uzorka DSC krivulja, uz karakteristike termičkog ponašanja uzorka, sadrži i njegovu termalnu povijest, obično se teži tumačenju termičkih svojstava uzorka iz drugog zagrijavanja uzorka.²¹

2.2.2. Infracrvena spektroskopija

2.2.2.1. Osnove FT-IR spektroskopije

Infracrvena spektroskopija je analitička metoda koja proučava interakcije molekula i elektromagnetskoga zračenja u rasponu od 14000 cm^{-1} do 20 cm^{-1} . Apsorpcije zračenja u infracrvenom području odgovaraju promjenama vibracijskih i rotacijskih razina u molekuli, do kojih dolazi kada se frekvencija promjenjivog električnog polja izjednači s razlikom frekvencija vibracijskih i rotacijskih stanja molekule. Drugim riječima, IR zračenjem pobuđuju se prijelazi između vibracijskih stanja molekula, ako u trenutku apsorpcije postoji promjena dipolnog momenta, taj se prijelaz bilježi kao signal u IR spektru. Za dobivanje IR spektara u kratkom vremenskom razdoblju zaslužna je primjena Fourierove transformacije (FT), no o tome se neće opširnije pisati u ovom radu,²² a u nastavku će se samo navoditi FT-IR. Signal se u FT-IR spektru bilježi pri određenom valnom broju ($\tilde{\nu}$) koji je recipročna vrijednost valne duljine (λ) izražena mjernom jedinicom cm^{-1} , proporcionalan je s energijom (E) i frekvencijom fotona (ν), brzinom elektromagnetskog zračenja u vakuumu (c) i Planckovom konstantom ($h = 6,626 \times 10^{-34}\text{ J s}$).

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda}$$

$$\nu = \frac{c}{\lambda}$$

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} = hc\tilde{\nu}$$

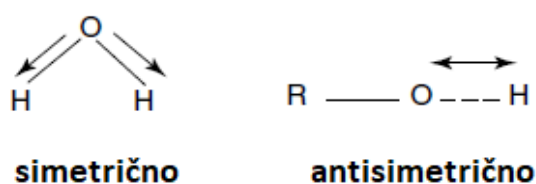
Područje infracrvenog zračenja podijeljeno je na tri dijela: blisko, srednje i daleko (tablica 1.). U području bliskog infracrvenog zračenja događaju se elektronski prijelazi nižih energija kao i neke promjene u vibracijskim, odnosno rotacijskim razinama molekula. Srednje područje infracrvenog zračenja je od posebne važnosti jer se u njemu uglavnom nalaze

vibracijsko-rotacijske promjene većine molekula. U području dalekog infracrvenog zračenja uočavaju se promjene u rotacijskim razinama u molekuli, za razliku od bliskog i srednjeg, gdje se promjene vibracijskih razina slažu zajedno s promjenama u rotacijskim razinama.^{22,23}

Tablica 1. Podjela IR spektralnog područja s odgovarajućim valnim duljinama (λ) i valnim brojevima ($\tilde{\nu}$).²³

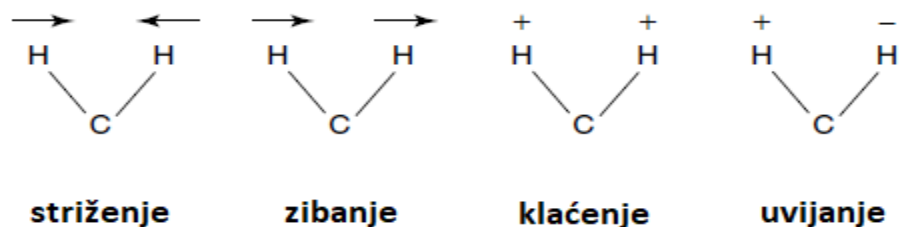
IR područje	Valna duljina (λ)	Valni broj ($\tilde{\nu}$)
blisko	0,7 μm –2,8 μm	14000 cm^{-1} –3600 cm^{-1}
srednje	2,8 μm –50 μm	3600 cm^{-1} –200 cm^{-1}
daleko	50 μm –500 μm	200 cm^{-1} –20 cm^{-1}

Apsorpcijom IR zračenja iz srednjeg IR područja molekule, odnosno njihovi pojedini dijelovi vrše određeno gibanje koje predstavlja molekulske vibracije koje su podijeljene u dvije osnovne skupine: vibracije istežanja i vibracije deformacije. Vibracije istežanja odgovaraju promjeni duljine veze između dva atoma i mogu biti simetrične ili antisimetrične. Simetrično istežanje je vibracija pri kojoj se dvije jezgre istovremeno približavaju istoj točki ili se od nje udaljavaju. Antisimetrično istežanje se događa kad se jedna jezgra približava centru masa dok se druga istovremeno od njega udaljava.



Slika 9. Primjeri vibracija istežanja.²⁴

Deformacijske vibracije su gibanja jezgara koja uzrokuju promjene kuta između veza koje vibriraju, što znači da molekula mora imati najmanje dvije veze, odnosno tri atoma. Vibracije deformacije troatomne skupine u kojoj su dva atoma jedne vrste vezana na atom druge vrste su: striženje, zibanje, klaćenje i uvijanje.²⁴



Slika 10. Primjeri deformacijskih vibracija kod troatomne molekule.²⁴

Na koliko načina molekula može vibrirati ovisi o broju atoma u molekuli (N). Za nelinearne molekule broj vibracija jednak je $3N-6$, a za linearne molekule $3N-5$. Taj broj vibracija proizlazi iz toga što kod nelinearnih molekula postoje 3 stupnja slobode translacije i 3 stupnja slobode rotacije, a kod linearnih molekula je jedan stupanj slobode manje jer rotacija oko internuklearne osi ne predstavlja gibanje.²⁵

Tablica 2. Broj i vrsta stupnjeva slobode kod linearnih i nelinearnih molekula.²⁴

Vrste stupnjeva slobode	Linearne molekule	Nelinearne molekule
Translacijske	3	3
Rotacijske	2	3
Vibracijske	$3N-5$	$3N-6$
Ukupno	$3N$	$3N$

Snimljeni FT-IR spektar predstavlja ovisnost propuštenog ili apsorbiranog zračenja o valnom broju zračenja. FT-IR spektar čine vrpce, odnosno apsorpcijski maksimumi u spektru uzrokovani vibracijama molekule. Položaj vrpce u spektru karakterističan je za vibraciju određene funkcionalne skupine, a ovisi o jačini veze između atoma i o masi atoma sa svake strane veze i dan je relacijom:

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

pri čemu je $\tilde{\nu}$ valni broj, k konstanta veze, μ reducirana masa, a c brzina svjetlosti u vakuumu koja iznosi približno $3 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$. Intenzitet vrpce ovisi o promjeni već spomenutog dipolnog momenta prilikom vibracije odnosno apsorpcije zračenja.²²

2.2.2.2. FT-IR spektroskopija u određivanju temperature faznih prijelaza lipida

Uslijed faznog prijelaza mijenja se konformacija metilenskih ($-\text{CH}_2-$) skupina alkilnih lanaca iz *trans* u *gauche*. Budući da $-\text{CH}_2-$ skupine u različitoj konformaciji apsorbiraju pri drugačijem valnom broju, iz FT-IR spektara se može odrediti nalaze li se lipidi u fazi gela ili fazi fluida. Drugim riječima, fazni prijelaz se detektira promjenom položaja i apsorpcije vrpce koje odgovaraju simetričnom (ν_s) i antisimetričnom (ν_{as}) istezanju metilne (CH_3) i metilenske (CH_2) skupine, deformacijama CH_2 skupine, poput zibanja, klaćenja, njihanja te strižnih deformacija. Vrpca simetričnog i antisimetričnog istezanja CH_2 skupine pojavljuje se pri otprilike 2850 cm^{-1} , odnosno 2920 cm^{-1} . Fazni prijelaz se očituje pomakom valnog broja maksimuma vrpce za $1,5\text{--}3 \text{ cm}^{-1}$, ovisno o duljini i kemijskoj strukturi lipidnih ugljikovodičnih lanaca, strukturi polarnih glava lipida, prirodni aditiva koji mogu biti prisutni i o samoj prirodi faznog prijelaza.^{26,27} Povećanjem stupnja neuređenosti lipidnog dvosloja dolazi do smanjenja apsorpcije vrpce. Iako se obje vrpce mogu koristiti za praćenje faznog prijelaza, vrpca pri 2920 cm^{-1} , koja odgovara $\nu_{as}\text{CH}_2$ rijeđe se koristi jer postoji mogućnost preklapanja s vrpcom CH_3 skupine i s Fermijevom rezonancijom prvih tonova strižne vibracije CH_2 skupine.²¹ Kod simetričnog istezanja CH_2 skupine ($\nu_s\text{CH}_2$ pri 2850 cm^{-1}) ne postoje takva preklapanja vrpce te je zbog toga vrpca simetričnog istezanja metilenske skupine korisnija za analizu faznog prijelaza modelnih i bioloških membrane, kao i za

semikvantitativnu karakterizaciju promjena u ugljikovodičnom lancu prilikom fazne promjene. Metilenske deformacijske vibracijske vrpce također se mogu koristiti za detekciju faznog prijelaza. Strižne vibracije i vibracije njihanja ($\sim 1470\text{ cm}^{-1}$ i $\sim 720\text{ cm}^{-1}$) su osjetljive na lateralne interakcije između *trans*-polimetilenskih lanaca, što može indicirati način pakiranja ugljikovodičnih lanaca u fazi gela. Faznim prijelazom povećava se mobilnost lipida te se širina vrpce tih normalnih modova povećava. Vibracije zibanja CH_2 skupina ugljikovodičnih lanaca se također mogu koristiti za odeđivanje faznog prijelaza s obzirom da intenzitet ovih vrpce u fazi gela ovisi o duljini lanca. Povećanjem *gauche* rotamera smanjuje se duljina segmenata lanca koji su u *trans* konformaciji, uslijed čega se smanjuje intenzitet vrpce, što može dovesti do njihovog nestajanja nakon faznog prijelaza. S dodatnim oprezom se trebaju interpretirati vrpce zibanja metilenskih skupina jer su jako slabe i najčešće se nalaze između mnogo jačih vrpca otapala i/ili IR-aktivnih skupina lipidne polarne glave.²¹

Veliki izazov kod karakterizacije faznoga prijelaza modelnih membranskih lipida FTIR spektroskopijom predstavlja prisustvo vodenog medija, koji je jak IR apsorbens i prekriva veći dio IR spektra u području od 3280 cm^{-1} do 3920 cm^{-1} , u kojem se javljaju vibracije simetričnog i antisimetričnog istezanja molekule vode ($\nu_{\text{sym}}\text{OH}$ i $\nu_{\text{as}}\text{OH}$), koje djelomično prekrivaju i vrpce simetričnog i antisimetričnog istezanja metilne i metilenske skupine. Radi toga je pri snimanju IR transmisijskih spektara potrebno koristiti jako koncentrirane uzorke (za lipide se najčešće uzima 2–5 mg uzorka u 50 μL vode) te veoma kratke duljine puta zračenja kako bi se smanjili signali vode. Još jedna mogućnost je koristiti deuteriranu vodu (D_2O) umjesto obične (H_2O) jer su vrpce vibracija teške vode pomaknute prema nižim valnim brojevima te ne prekrivaju vrpce antisimetričnog i simetričnog istezanja metilne i metilenske skupine.²⁸ Postoji još i dodatna mogućnost korištenja FT-IR spektroskopske tehnike u koja se temelji na prigušenoj refleksiji zračenja (engl. *attenuated total reflection*, ATR) tehnikom kojom se učinkovito rješava problem intenzivnih vrpce otapala (vode) u spektrima, no istodobno se smanjuje i intenzitet vrpce uzorka.¹⁶

Osim korištenih tehnika diferencijalne pretražne kalorimetrije i FT-IR spektroskopije postoje i mnoge druge instrumentalne metode koje se mogu primijeniti za proučavanje strukturnih promjena pri faznim promjenama lipida u membranama te geometrije i raspodjele funkcionalnih skupina unutar pojedine faze. Te tehnike su mikroskopija atomskih sila (AFM)^{15,17}, difrakcija rendgenskim zrakama (engl. *X-ray diffraction*, XRD)¹⁸, nuklearna

magnetska rezonancija (NMR)¹⁹ te fluorescentna mikroskopija.^{16,21} Iako se T_m već desetljećima rutinski određuje DSC tehnikom, nastoje se razviti nove tehnike za određivanje T_m . Jedna od njih je nanoplazmonsko senzorno određivanje (engl. *nanoplasmonic sensing*, NPS) koje je manje osjetljivo na intrinzičnu promjenu temperature i komplementarno se koristi s QCM-D tehnikom (eng. *quartz crystal microbalance with dissipation monitoring*, QCM-D) koja ima velik potencijal u detekciji manjih strukturnih promjena biomolekula.²⁹

3.1. Određivanje veličine suspendiranih čestica

Dinamičko raspršenje svjetlosti (engl. *dynamic light scattering*, DLS) je jedan od najkorisnijih alata za određivanje veličine čestica u koloidnim disperzijama. Brownovim gibanjem se opisuje nasumično kretanje čestica u otopinama koje su ometane molekulama otapala koje ih okružuju. Veće čestice se sporije gibaju od manjih čestica. Brzina Brownovog gibanja se mjeri i definirana je kao translacijski koeficijent difuzije (D). Korištenjem Stokes-Einsteinove jednadžbe iz translacijskog koeficijenta difuzije se računa hidrodinamički promjer (D_H):

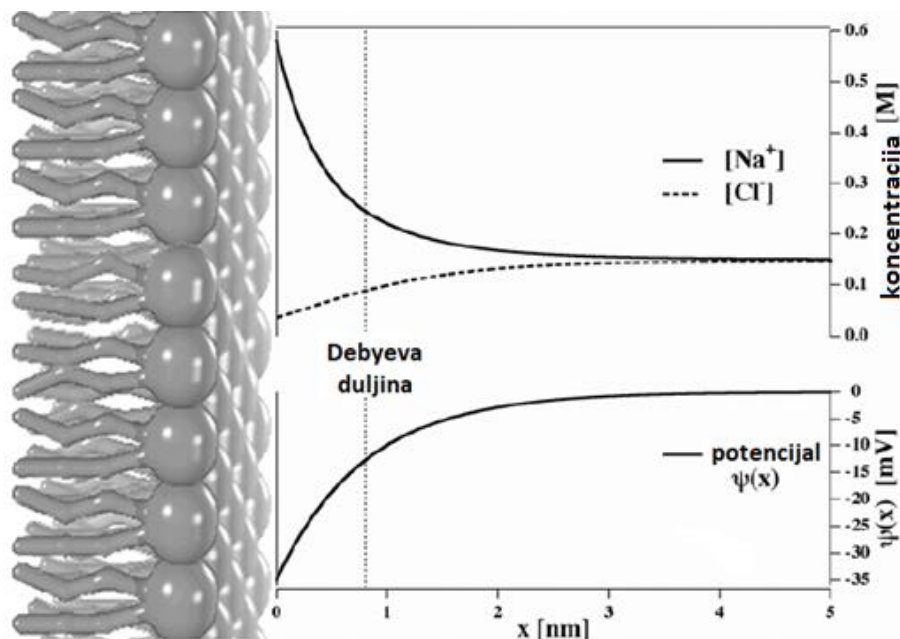
$$D_H = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

gdje je D_H = hidrodinamički promjer, D = translacijski koeficijent difuzije, k = Boltzmannova konstanta, T = apsolutna temperatura, η = viskoznost.

Svjetlost se raspršuje s površine čestica otopljenih u otopini. Svaka promjena na površini čestice, koja utječe na brzinu difuzije, mijenja prividnu veličinu čestice. Glavna svrha korištenja DLS tehnike u analitičkoj kemiji je određivanje veličine, stabilnosti i prisutnosti makromolekula u otopini. Dodatno se može koristiti za objašnjenje kako eksperimentalne varijable (npr. temperatura, koncentracija, pH itd.) utječu na aglomeraciju (stvaranje agregata).^{30,31} DLS se lako izvodi uz napomenu da ne može sa sigurnošću mjeriti veličine čestica ako postoji velika razlika u promjeru dispergiranih molekula i molekula otapala.¹⁵

4.1. Utjecaj ionske jakosti i kationa na fazne promjene lipida

U fiziološkim uvjetima, lipidi u biološkim membranama reagiraju s otopinom soli, čiji sastav ovisi u kojem dijelu stanice ili organela se nalazi membrana. Najvažniji kationi koji se mogu naći u otopini su Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} i Mg^{2+} . Vrijednost ionske koncentracije natrijeva klorida u biološkim stanicama je oko 150 mM, koja može biti čak i do 400 mM kod nekih morskih organizama.⁴ Vezanjem iona na membrane povećavaju se međusobne interakcije između lipida što dovodi do sabijanja membrane. Utjecaj iona na fosfolipidne membrane je utvrđen interakcijom kationa s karbonilnom ($\text{C}=\text{O}$) skupinom, dok kloridni anioni (Cl^-) ostaju u vodenom mediju. Jačina i način interakcije kationa s lipidom membrane ovise o vrsti kationa i samom lipidu. Primjerice, DPPC i Na^+ pokazuju jaču interakciju od one koja nastaje između DPPC i K^+ , jer je K^+ znatno veći od Na^+ .³² Što se tiče utjecaja kationa na fosfoetanolamine (DPPE), uočava se znatno slabiji efekt u odnosu na fosfokolinske (DPPC) lipide. Vezanje Na^+ je znatno slabije kod DPPE u odnosu na DPPC, dok se vezanje K^+ gotovo ni ne primjećuje. Spomenuti efekt ima važnu ulogu u biološkim membranama jer unutarnja strana membrane (gdje se većinom nalaze PE) graniči s velikom molarnom koncentracijom kalijevih kationa. Posljedica slabe interakcije PE i K^+ iona je nastajanje puno gušće membranske strukture. Kationi mogu prodrati u membranu jako duboko, najčešće do same karbonilne skupine gdje se formiraju jaki kompleksi s lipidnim molekulama.³² Promjene ionske jakosti (ili pH) znatno utječu na elektrostatske sile između makromolekula u fiziološkim uvjetima. Elektrostatski potencijal membrane (Ψ) pri fiziološkim uvjetima ne ovisi o ionskoj jakosti, no znatno varira pri nižim ionskim jakostima. Na površini membrane elektrostatski potencijal doseže svoj maksimum, a udaljavanjem od površine se smanjuje.



Slika 11. Utjecaj koncentracije Na^+ i Cl^- na elektrostatski potencijal membranske površine pri ionskoj jakosti od 150 mM NaCl. Na samoj površini površini potencijal je -36 mV, a Debyeova duljina je 0,8 nm.⁴

Doseg elektrostatskog naboja opisuje veličina koja se zove Debyeova duljina ili polumjer (engl. *Debye length*). Predstavlja recipročnu vrijednost Debyeve konstante (κ) zadane formulom:

$$\kappa = \left(2 \frac{e^2}{\epsilon_0 \epsilon k T} c_0 \right)^{0.5}$$

gdje je e naboj elektrona ($e = 1.602 \times 10^{-19}$ C), ϵ_0 relativna permitivnost ($\epsilon_0 = 8.854 \times 10^{-12}$ C²/J m), ϵ permitivnost koja je tablično zadana, k Boltzmannova konstanta ($k = 1.3806 \times 10^{-23}$ J/K), T termodinamička temperatura te c_0 ionska jakost.

S obzirom da su sve veličine osim ionske jakosti konstantne ili tablične vrijednosti, Debyeova duljina (κ^{-1}) ovisi prvenstveno o ionskoj jakosti :

$$\kappa^{-1} = 0.3082 / \sqrt{c_0}$$

Iz prethodnog izraza je vidljivo da se povećanjem ionske jakosti (c_0) smanjenje Debyeve duljine (κ^{-1}). Kod faznih promjena lipida mijenja se elektrostatski potencijal membrane (Ψ). Prelaskom iz gela u fluid lipidima se povećava površina, time i njihova efektivna površina unutar membrane, što smanjuje elektrostatsku slobodnu energiju membrane (F_{el}). Pri T_m uravnotežene su elektrostatske energije oba fazna stanja.⁴

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

U ovom diplomskom radu kemikalije koje su korištene su 1,2 dipalmitol- 2-glicero-3-fosfokolin (DPPC, bijeli prah, 99% čistoće, Avanti Polar Lipids) i 1,2-dipalmitol- 2-glicero-3-fosfoetanolamin (DPPE, bijeli prah, 98% čistoće, Cayman Chemical). Kao otapalo za navedene lipide (DPPC i DPPE) korištena je otopina natrijeva klorida koncentracije 100 mmol/L i pH~5 pripravljena otapanjem NaCl (Kemika) u mili-Q vodi.

3.2. Priprema uzoraka

3.2.1. Uzorci za FT-IR spektroskopiju

Za pripremu DPPC multilamelarnih liposoma, izvagano je 25 mg praha (DPPC) koji je otopljen u 500 μ L otopine NaCl (100 mmol/L). Korištena otopina NaCl (100 mmol/L) je prvotno napravljena otapanjem 59,34 mg NaCl u 10 mL mili-Q-vode. Suspenzije liposoma su priređene na način da su miješane pomoću Vortex miješalice nekoliko minuta, zagrijavane u vrućoj vodenoj kupelji zagrijanoj pri 80 °C (jer se DPPC tali na 41 °C) do 2 minute te hladene u hladnoj kupelji. Taj proces je ponavljan najmanje 3 puta dok nije dobivena blago mliječna otopina. Drugi korišteni lipid DPPE, pripremljen je na isti način kao i DPPC uz jednu iznimku: izvagana masa od 26 mg praha DPPE-a otopljna je u 1000 μ L otopine NaCl (100 mmol/L). Po potrebi se ciklus miješanja i zagrijavanja u vodenoj kupelji provodi više puta dok nije dobiven bijela otopina bez taloga, koja se koristila za mjerenje.

3.2.2. Uzorci za DLS mjerenja

Za mjerenje veličine pripremljenih multilamelarnih liposoma DPPC i DPPE izvagano je po 1 mg svakog lipida koji su otopljeni zasebno u 10 mL otopine NaCl (100 mmol/L). Suspenzije su priređene na način jednak onome za FT-IR mjerenja.

3.2.3. Uzorci za DSC mjerenja

Priprema uzoraka za mjerenja diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom je analogna pripremi uzoraka za FT-IR spektroskopiju. Koncentracija priređenih uzoraka (DPPC i DPPE) bila je ~5 mg/mL. Detaljnije, 17 mg DPPC-a otopljeno je u 3 mL otopine NaCl (100

mmol/L), dok je 16 mg DPPE-a otopljeno u 3 mL otopine NaCl (100 mmol/L). Suspenzije su priređene na način jednak onome opisanom u 3.2.1. Dodatni korak pripreme uzoraka prije DSC mjerenja je otplinjavanje uzoraka u otplinjavajućoj komori 15 minuta. Ovaj korak je jako bitan jer otapanjem uzoraka može zaostati zrak, te mogu nastati plinovi (pretežno CO₂) koji mogu uzrokovati artefakte u DSC krivulji.

3.3. Mjerni uređaji

3.3.1. FT-IR spektroskopija

FT-IR spektri suspenzija DPPC-a i DPPE-a snimljeni su pomoću IR spektrometra ABB Bomem MB102 opremljenog optikom od CsI i DTGS detektorom. Kiveta s uzorkom je smještena u metalnom plaštu koji je hlađen vodom, čija je temperatura regulirana pomoću visokotemperaturnog kontrolera Specac 3000 Series. Kiveta za uzorak sadrži prozore od CaF₂ koji su međusobno udaljeni 27,37 μm, što se odredilo interferometrijski. Uzorak je potrebno pomoću pipete oprezno unositi u kivetu kako ne bi zaostao zrak u kiveti koji bi ometao transmisiju. Nakon postignute željene temperature regulirane pomoću kontrolera, snimaju se spektri uzoraka. Spektri DPPC-a su snimani u temperaturnom intervalu od 30 °C do 52 °C, a spektri DPPE-a od 53 °C do 75 °C uz brzinu zagrijavanja uzorka od 1 °C min⁻¹. Svaki uzorak je mjereno tri puta u tri zasebna neovisna punjenja kivete (osim vodene otopine NaCl koja je mjerena jedanput). Svako punjenje kivete grijano je dva puta (R1 i R2). Nakon prvog grijanja uzorka tijekom kojeg su snimani spektri (R1) kiveta je ohlađena kako bi se ponovno grijala za drugo mjerenje istog uzorka (R2). Rezolučivanje pri kojem su snimljeni spektri iznosilo je 2 cm⁻¹, a broj snimljenih snimaka za spektar bio je 10. Dobiveni FT-IR spektri su analizirani pomoću programa Origin 8.5 i Spectragryph v1.2.11.



Slika 12. Korišteni IR spektrometar ABB Bomem MB102 i visokotemperaturni kontroler Specac 3000 Series (fotografirano u Laboratoriju za biomolekularne interacije i spektroskopiju Zavoda za organsku kemiju i biokemiju IRB-a).

3.3.2. Dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS)

Veličina čestica uzoraka izmjerena je uređajem Zetasizer Ultra, Malvern Panalytical, Velika Britanija, opremljenim s crvenim He/Ne laserom koji emitira zračenje valne duljine 632,8 nm. Laser je izvor zračenja koji daje maksimalnu snagu od 10 mW uz fotodiodu kao detektor. Mjerenje veličine uzoraka je bilo pod kutem od 173° zbog bolje osjetljivosti. Dobiveni rezultati su prikazani u Dodatku u Tablici D1.

3.3.3. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC)

Za kalorimetrijska mjerenja korišten je mikrokalorimetar Nano-DSC, TA Instrumenti, New Castle, USA. Volumen ćelije za uzorke je 700 μL , te su uzorci snimani u temperaturnom intervalu od 10 $^\circ\text{C}$ do 80 $^\circ\text{C}$. Porast temperature je tekao brzinom od 1 $^\circ\text{C}$ u minuti. Svaki uzorak je sniman tri puta, nakon tri zasebna punjenja. Svako punjenje je dva puta izloženo ciklusima zagrijavanja i hlađenja. Prvi ciklus zagrijavanja uzoraka liposoma se dogovorno zanemaruje pri analizi podataka jer sadrži termalnu povijest.⁴⁰ DSC mjerenja provedena su i za otapalo (vodena otopina NaCl 100 mmol/L) na isti način kao i za uzorke, ali samo jednom. DSC krivulja referentne otopine oduzeta je od DSC krivulje DPPC i DPPE suspenzija.

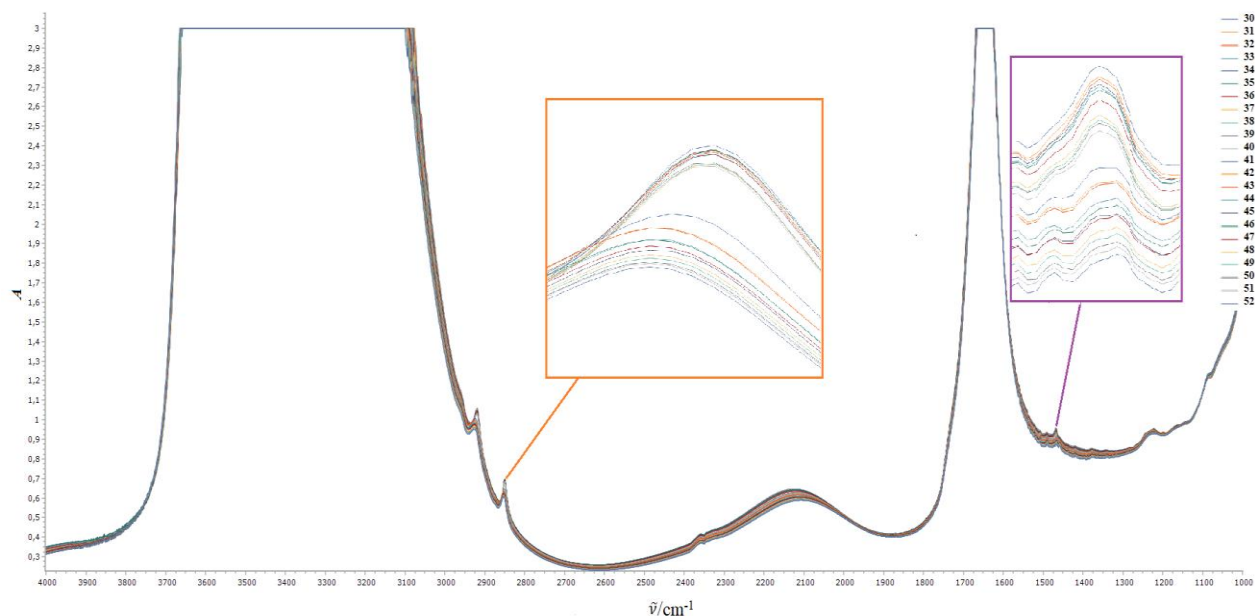
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. FT-IR spektri uzoraka

FT-IR spektri analizirani su u svrhu određivanja T_m faznog prijelaza na temelju promjena položaja i potencijalno apsorbancije vrpce koje odgovaraju istežanju karbonilne skupine ($\nu_{C=O}$), antisimetričnom istežanju fosfatne skupine ($\nu_{as}PO_4^{2-}$), simetričnom i antisimetričnom istežanju metilenske skupine (ν_sCH_2 i $\nu_{as}CH_2$) te iz deformaciji metilenske skupine γCH_2 . Za analizu IR spektara uzoraka potrebno je odrediti spektralno područje u kojem apsorbira pojedina funkcionalna skupina te provesti korekciju bazne linije. Vrpce koje su analizirane u ovom radu potječu od simetričnog istežanja metilenske skupine ν_sCH_2 i strižne deformacije metilenske skupine γCH_2 koje se nalaze u sljedećem spektralnom području: $3075\text{--}2625\text{ cm}^{-1}$, te $1505\text{--}1427\text{ cm}^{-1}$. Ti dijelovi spektra se prilagode polinomu 5. stupnja te se dobivena bazna linija oduzme od početnog spektra (da bi se eliminirao utjecaj vrpce istežanja vode) čime se dobije korigirani spektar koji se dalje analizira. Literaturno je poznato da se temperatura faznih prijelaza (napose T_m) može odrediti mjerenjem temperaturne ovisnosti položaja vrpce koje potječu od odgovarajućih molekulskih vibracija. Međutim, u ovom radu je jedna od novosti ta da se T_m određivala iz temperaturne ovisnosti apsorbancije odgovarajućih vrpce.

4.1.1. Analiza FT-IR spektara DPPC-a

U tablici D2. u Dodatku su navedeni položaji važnijih vrpce iz spektra uzorka DPPC u vodenoj otopini NaCl pri temperaturama prije ($35\text{ }^\circ\text{C}$) i poslije ($46\text{ }^\circ\text{C}$) faznog prijelaza u prvom (R1) i u drugom mjerenju (R2). Iz rezultata je vidljivo da se povećanjem temperature u intervalu od $30\text{--}52\text{ }^\circ\text{C}$ maksimumi pomiču prema višim valnim brojevima (slika 13.)

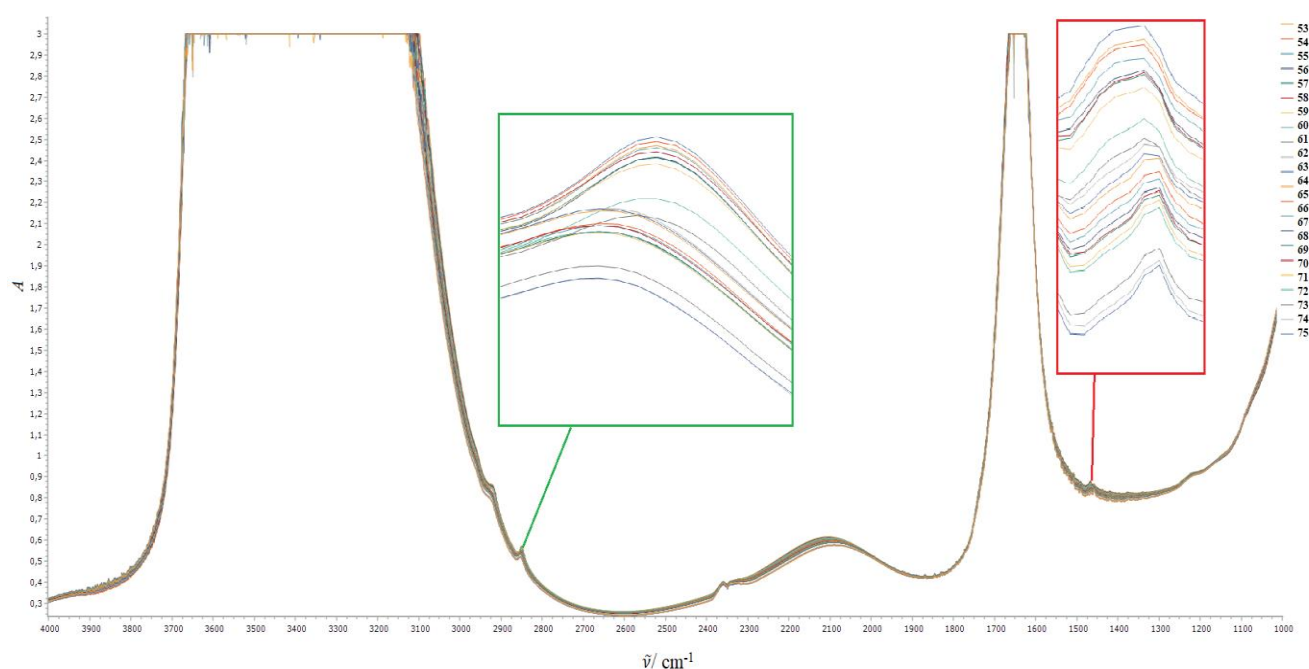


Slika 13. FT-IR spektari DPPC-a u temperaturnom intervalu od 30 °C do 52 °C tijekom prvog mjerenja (R1). Uvećane su vrpce karakteristične za simetrično istežanje $\nu_s\text{CH}_2$ i strižnu deformaciju metilenske skupine γCH_2 kako bi bio uočljiviji pomak maksimuma vrpce s porastom temperature.

Kao što je i literaturno poznato,²¹ temperatura faznog prijelaza u IR spektrima DPPC-a i DPPE-a očituje se kao pomak valnog broja vrpce simetričnog istežanja metilenske skupine $\nu_s\text{CH}_2$, ali i strižne deformacije metilenske skupine γCH_2 , istežanja karbonilne skupine $\nu\text{C=O}$ te antisimetričnog istežanja fosfatne skupine $\nu_{\text{as}}\text{PO}^{2-}$. Vrpca antisimetričnog istežanja CH_2 skupine ($2916\text{--}2936\text{ cm}^{-1}$) preklapa se s vrpcom istežanja O–H vode, stoga ona nije pogodna za određivanje T_m . Za određivanje temperature faznog prijelaza pogodnija je vrpca simetričnog istežanja CH_2 skupine. Na slici 15. su prikazani spektri prvog mjerenja uzorka vodene otopine DPPC-a u temperaturnom intervalu od 30 °C do 52 °C. Izdvojene su dvije vrpce koje odgovaraju $\nu_s\text{CH}_2$ i γCH_2 , pri čemu se pri dvije različite temperature uočava pomak maksimuma vrpce, ali i nagli pad apsorbancije. Upravo taj nagli pad ukazuje na konformacijsku promjenu prelaskom iz gela u fluid DPPC liposoma. Očitani valni brojevi pri kojima se apsorbancija najviše promijenila promjenom temperature, za simetrično istežanje metilenske skupine $\nu_s\text{CH}_2$ i strižnu deformaciju metilenske skupine γCH_2 za DPPC liposome, iznosili su 2848 cm^{-1} , odnosno 1467 cm^{-1} .

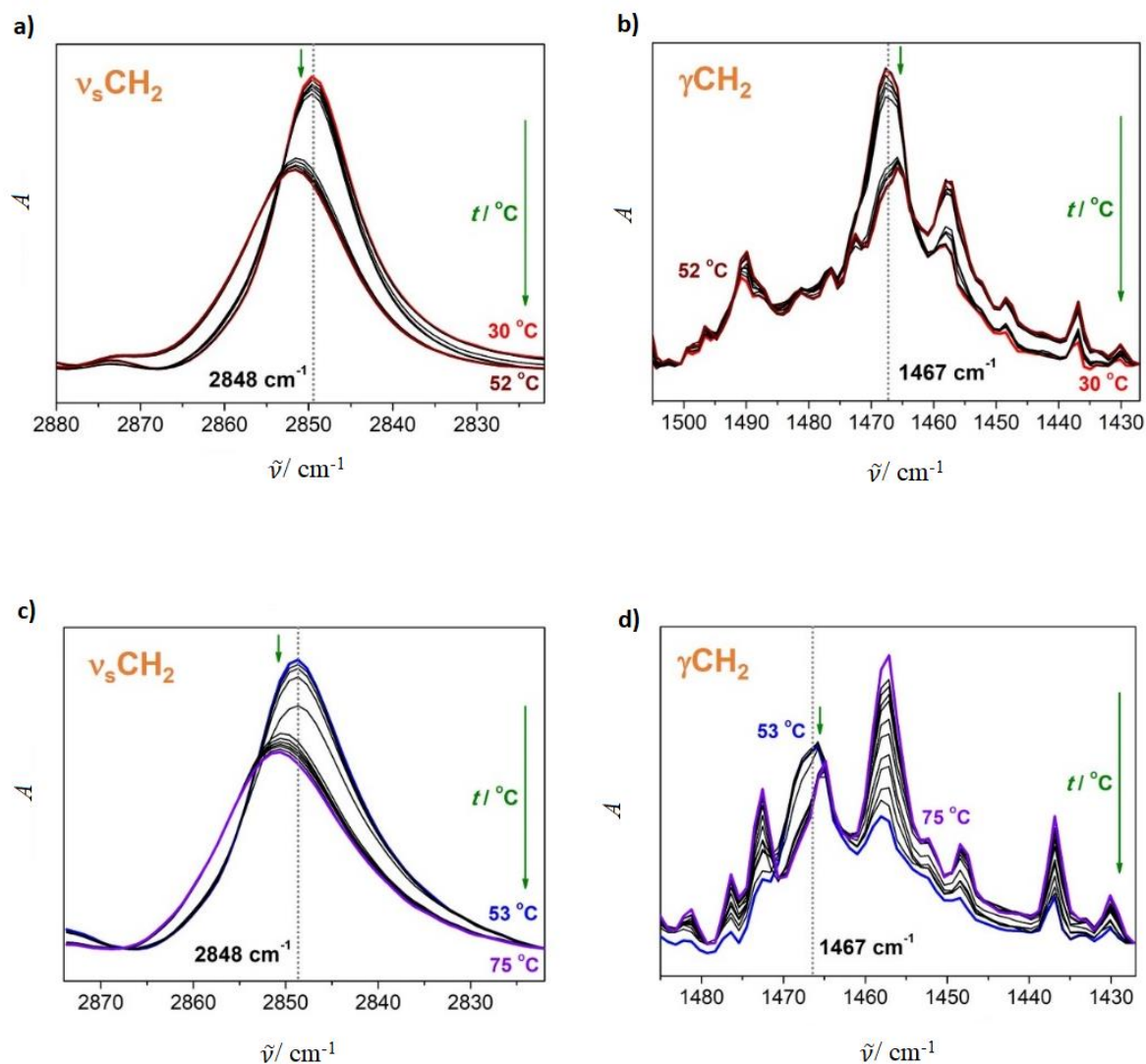
4.1.2. Analiza FT-IR spektara DPPE-a

Analizirani FT-IR spektri uzorka vodene otopine DPPE-a pokazali slične promjene kao i spektri DPPC liposoma. Najvažnije vibracijske vrpce pri temperaturi prije (56 °C) i poslije (70 °C) fazne promjene navedene su u tablici D2. u Dodatku. Fazna promjena DPPE liposoma iz gela u fluidnu fazu događa se pri 64 °C, na što upućuje nagli pomak vrpce prema većim valnim brojevima s povećanjem temperature (tablica D3.). Kao i kod DPPC-a, za određivanje T_m mogle su se koristiti i druge vrpce kao što su istežanje karbonilne skupine ($\nu\text{C=O}$) i antisimetrično istežanje fosfatne skupine $\nu_{\text{as}}\text{PO}^{2-}$. Veća odnosno lakše mjerljiva promjena položaja i apsorbancije se ipak očituje kod simetričnog istežanja $\nu_s\text{CH}_2$ i strižne deformacije metilenske skupine γCH_2 . Promatrano područje za $\nu_s\text{CH}_2$ je bilo od 2874–2822 cm^{-1} , a za γCH_2 1485–1427 cm^{-1} (slika 16.). Naglo smanjenje apsorbancije vrpce je najizraženije pri 2848 cm^{-1} za $\nu_s\text{CH}_2$ i pri 1467 cm^{-1} za γCH_2 . Taj pomak pri različitim temperaturama dokazuje promjenu strukture uzrokovanu faznom promjenom iz gel stanja u fluidno stanje liposoma.



Slika 14. FT-IR spektri DPPE-a u temperaturnom intervalu od 53 °C do 75 °C tijekom prvog mjerenja (R1), s uvećanim vrpcama simetričnog istežanja $\nu_s\text{CH}_2$ i strižne deformacije metilenske skupine γCH_2 .

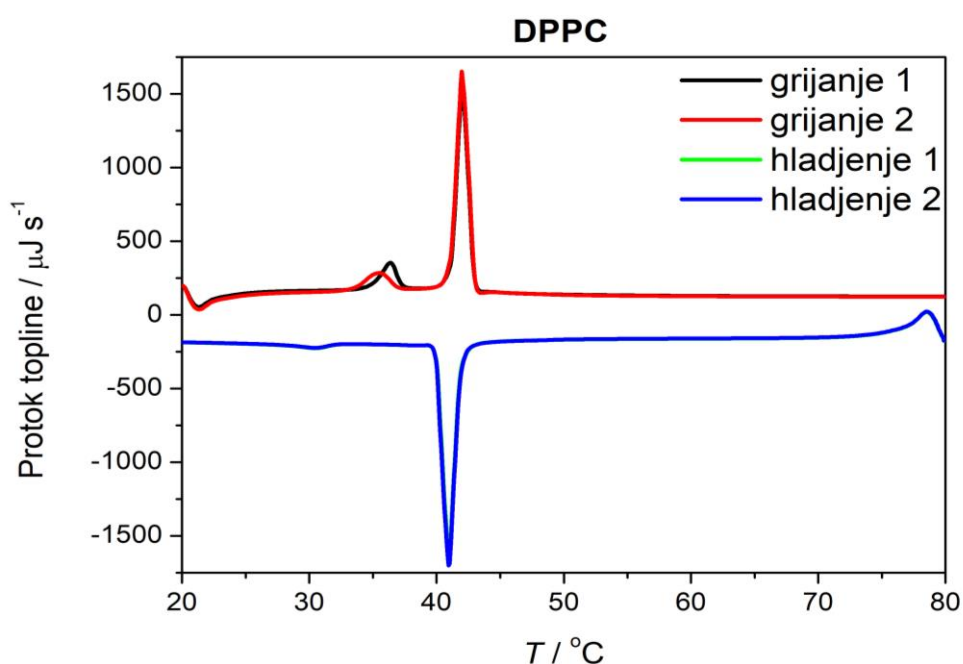
Usporedba FT-IR spektara liposoma DPPC-a i DPPE-a prikazana je na slici 15.



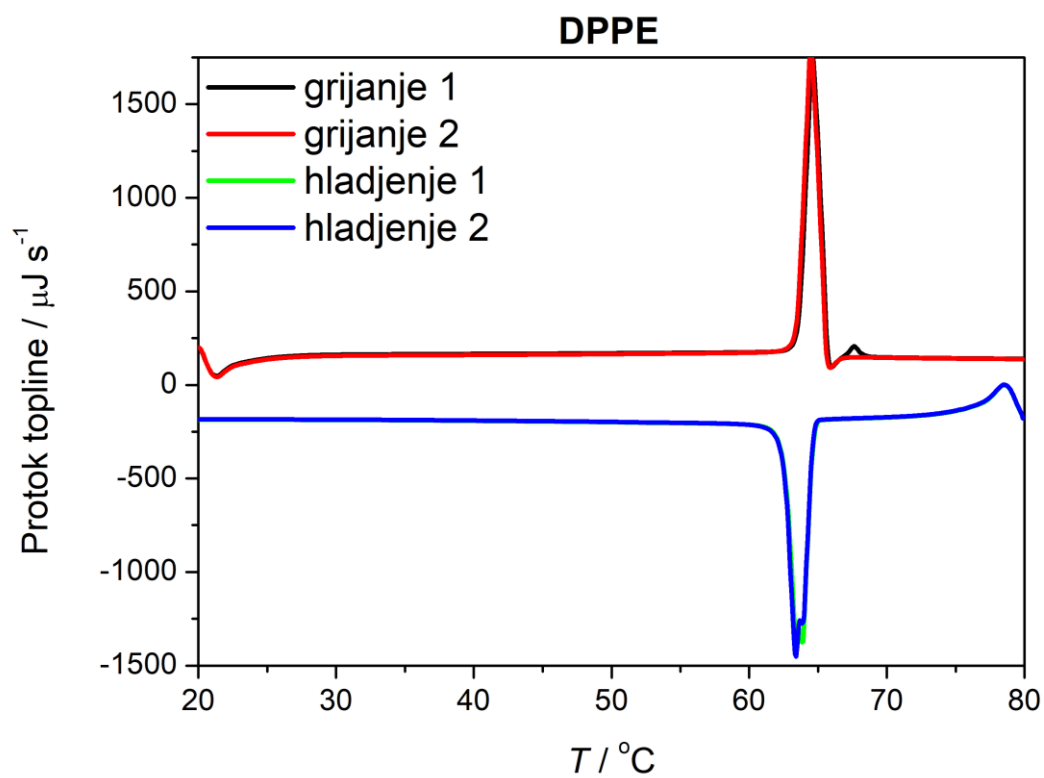
Slika 15. Područja FT-IR spektara DPPC i DPPE suspenzija: a) $\nu_s\text{CH}_2$ za DPPC, b) γCH_2 za DPPC, c) $\nu_s\text{CH}_2$ za DPPE, d) γCH_2 za DPPE. Istaknuti su valni brojevi pri kojim se uočava najveća promjena u apsorbancije s porastom temperature.

4.2. Analiza DSC krivulja DPPC-a i DPPE-a

Za određivanje T_m termoanalitičkom tehnikom kao što je DSC mogu se koristiti dva načina: onset određivanje ili određivanje iz maksimuma DSC krivulje. Ekstrapolirana temperatura početka signala (engl. *onset*) se dobije iz sjecišta tangente na rastući ili padajući nagib signala i linearno ekstrapolirane početne osnovne linije. Iako je kod liposoma najčešći način određivanja T_m iz maksimuma DSC krivulje, ovdje je korišteno mjerenje onseta jer spomenuta veličina ne ovisi o promjeni brzine grijanja i općenito je manje podložna varijaciji s eksperimentalnih uvjeta pri određivanju temperature mekšanja.³³ DSC krivulje DPPC liposoma prikazani su na slici 16. Fazni prijelaz iz gela u fluid je endoterman, a očitana vrijednost T_m je $40,8 \pm 0,1$ °C, što je u izvrsnom skladu s literaturnim podacima od oko 41 °C.³³ Izmjerena temperatura pretprijelaza (T_p) je $34,6 \pm 0,1$ °C za prvi ciklus grijanja (R1), a $33,4 \pm 0,2$ °C za drugi ciklus (R2). Iz slike 17. DSC tehnikom za DPPE liposome određena je T_m $63,4 \pm 0,1$ °C za R1 te $63,5 \pm 0,1$ °C za R2. Literaturna vrijednost T_m za DPPE iznosi 64 °C.⁴



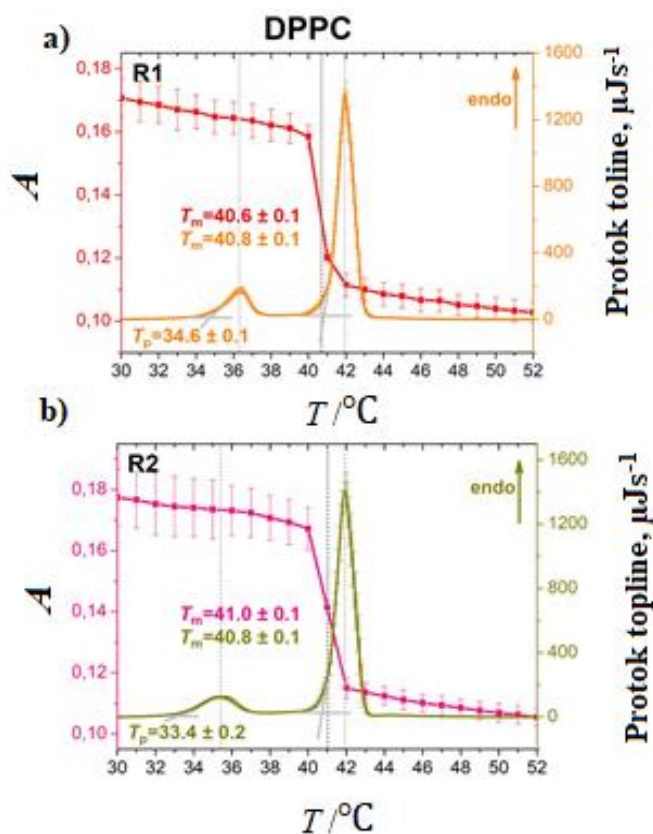
Slika 16. DSC krivulje DPPC liposoma.



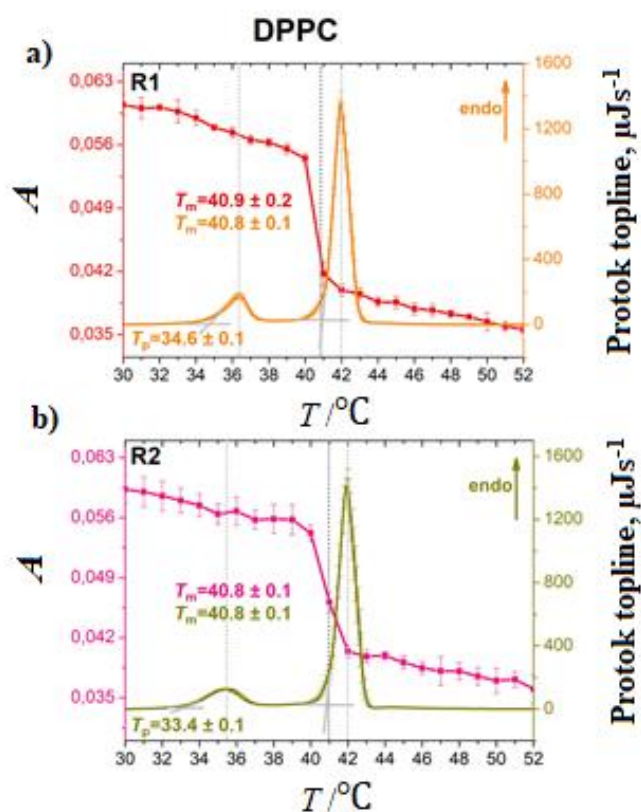
Slika 17. DSC krivulje DPPE liposoma.

4.3. Određivanje T_m usporednom analizom FT-IR spektara i DSC krivulja za DPPC i DPPE

Graf ovisnosti apsorbancije analiziranih vrpca ($\nu_s\text{CH}_2$ pri 2848 cm^{-1} i γCH_2 pri 1467 cm^{-1}) o temperaturi otkriva diskontinuitet kod oba uzorka, a točka infleksije takve sigmoidalne krivulje se podudara s T_m . To vrijedi za sve navedene primjere (slike 18.–21.).

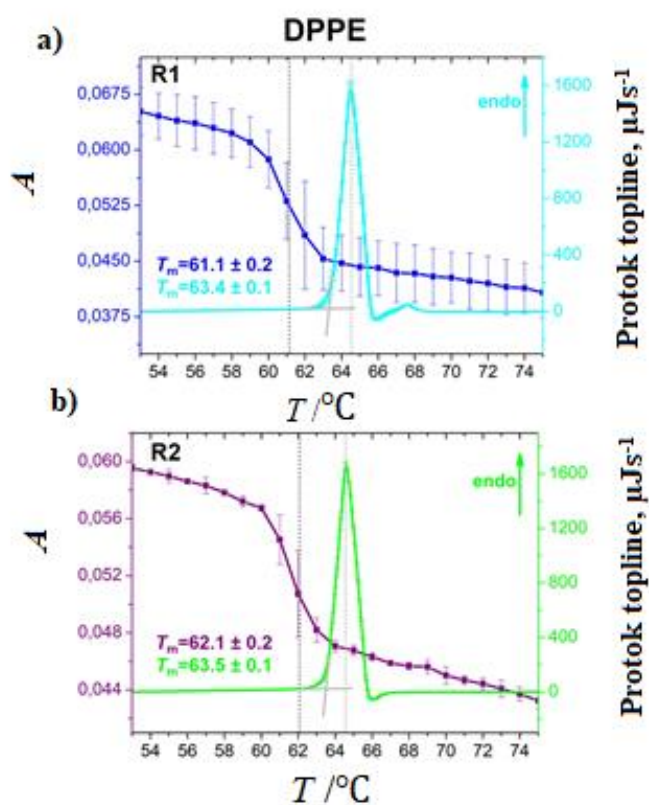


Slika 18. Temperaturna ovisnost apsorbancije IR vrpce simetričnog istežanja metilenske skupine $\nu_s\text{CH}_2$ pri 2848 cm^{-1} i DSC krivulja DPPC-a: a) prvi ciklus zagrijavanja (R1) (FT-IR - crvena krivulja, DSC - narančasta krivulja) i b) drugi ciklus (R2) (FT-IR - ružičasta, DSC - tamnožuta).

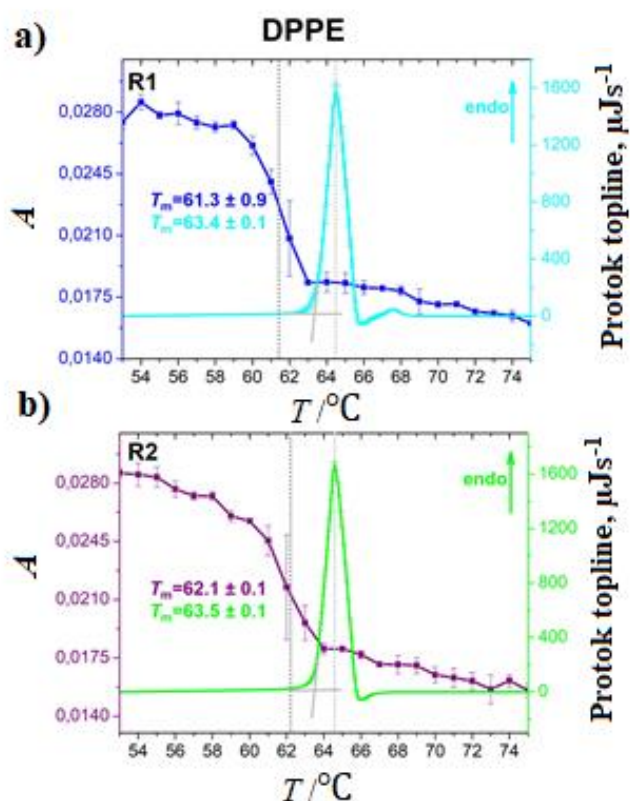


Slika 19. Temperaturna ovisnost apsorbancije IR vrpce deformacije metilenske skupine γCH_2 pri 1467 cm^{-1} i DSC krivulja DPPC-a : a) prvi ciklus zagrijavanja (R1) (FT-IR - crvena krivulja, DSC - narančasta krivulja) i b) drugi ciklus zagrijavanja (R2) (FT-IR - ružičasta, DSC - tamnožuta).

Iz FT-IR spektara DPPC-a određene su sljedeće vrijednosti T_m $40,6 \pm 0,1$ °C (R1) i $41,0 \pm 0,1$ °C (R2) na temelju vrpce vibracije $\nu_s\text{CH}_2$ (2848 cm^{-1}) te $40,9 \pm 0,2$ °C (R1) i $40,8 \pm 0,1$ °C (R2) na temelju vrpce vibracije γCH_2 (1467 cm^{-1}). Vrijednosti T_m očitanih iz DSC krivulja su iste za oba ciklusa zagrijavanja $40,8 \pm 0,1$ °C (R1) i $40,8 \pm 0,1$ °C (R2). T_m vrijednosti određene dvjema tehnikama odlično se podudaraju.



Slika 20. Temperaturna ovisnost apsorbancije IR vrpce simetričnog istežanja metilenske skupine $\nu_s\text{CH}_2$ pri 2848 cm^{-1} i DSC krivulja DPPE-a: a) prvi ciklus zagrijavanja (R1) (FT-IR - tamnoplava, DSC - svjetloplava) i b) drugi ciklus zagrijavanja (R2) (FT-IR - ljubičasta, DSC - zelena)



Slika 21. Temperaturna ovisnost apsorbancije IR vrpce deformacije metilenske skupine γCH_2 pri 1467 cm^{-1} i DSC krivulja DPPE-a: a) prvi ciklus zagrijavanja (R1) (FT-IR - tamnoplava, DSC - svjetloplava) i b) drugi ciklus zagrijavanja (R2) (FT-IR - ljubičasta, DSC - zelena).

Na isti način kao što je određena za DPPC, vrijednost T_m je određena i za DPPE (slika 20. i 21.). Analizom temperaturno ovisnih promjena IR vrpce vibracije $\nu_s\text{CH}_2$ 2848 cm^{-1} određene su vrijednosti T_m : $61,1 \pm 0,2\text{ }^\circ\text{C}$ (R1) i $62,1 \pm 0,2\text{ }^\circ\text{C}$ (R2), dok su na temelju IR vrpce vibracije γCH_2 1467 cm^{-1} vrijednosti T_m iznosile $61,3 \pm 0,9\text{ }^\circ\text{C}$ (R1) i $62,1 \pm 0,1\text{ }^\circ\text{C}$ (R2). DSC tehnikom izmjerene su vrijednosti $63,4 \pm 0,1\text{ }^\circ\text{C}$ (R1) i $63,5 \pm 0,1\text{ }^\circ\text{C}$ (R2).

Rezultati određivanja vrijednosti T_m liposoma DPPE i DPPC liposoma u vodenoj otopini NaCl (100 mmol/L) FT-IR spektroskopijom i DSC metodom prikazani su u tablici 3. Vrijednosti T_m DPPC lipida u oba ciklusa mjerenja i primjenom obje metode se potpuno poklapaju: FT-IR na temelju $\nu_s\text{CH}_2$ $40,6 \pm 0,1$ °C (R1), $41,0 \pm 0,1$ °C (R2); FT-IR na temelju γCH_2 $40,9 \pm 0,2$ °C (R1), $40,8 \pm 0,1$ °C (R2); DSC $40,8 \pm 0,1$ °C (R1), $40,8 \pm 0,1$ °C (R2). Za DPPE je uočeno odstupanje od ~ 2 °C: FT-IR na temelju $\nu_s\text{CH}_2$ $61,1 \pm 0,2$ °C (R1), $62,1 \pm 0,2$ °C (R2); FTIR na temelju γCH_2 $61,3 \pm 0,9$ °C (R1), $62,1 \pm 0,1$ °C (R2); DSC $63,4 \pm 0,1$ °C (R1), $63,5 \pm 0,1$ °C (R2) koje se može objasniti kao mogućnost neusklađenosti kidanja, odnosno promjene nekovalentnih interakcija između nepolarnih i polarnih skupina kod DPPE lipida u lipidinom dvosloju.

Tablica 3. Vrijednosti T_m liposoma DPPC i DPPE u vodenoj otopini NaCl (100 mmol/L) određene FT-IR spektroskopijom i DSC metodom.

Tehnika	$T_m(\text{DPPC}) / ^\circ\text{C}$		$T_m(\text{DPPE}) / ^\circ\text{C}$	
	R1	R2	R1	R2
DSC onset	$40,8 \pm 0,1$	$40,8 \pm 0,1$	$63,4 \pm 0,1$	$63,5 \pm 0,1$
FT-IR $\frac{\nu\text{CH}_2}{\gamma\text{CH}_2}$	$\frac{40,6 \pm 0,1}{40,9 \pm 0,2}$	$\frac{41,0 \pm 0,1}{40,8 \pm 0,1}$	$\frac{61,1 \pm 0,2}{61,3 \pm 0,9}$	$\frac{62,1 \pm 0,2}{62,1 \pm 0,1}$

§ 5. ZAKLJUČAK

Transmisijskom FT-IR spektroskopijom u temperaturno ovisnom načinu snimanja i termoanalitičkom metodom diferencijalne pretražne kalorimetrije moguće je odrediti temperaturu faznog prijelaza različitih lipida i detektirati strukturne promjene uslijed navedenog procesa. U FT-IR spektrima lipida DPPC i DPPE analizirane su vrpce vibracija metilenske skupine, i to simetričnog istežanja $\nu_s\text{CH}_2$ pri 2848 cm^{-1} i strižne deformacije γCH_2 pri 1467 cm^{-1} u ovisnosti o temperaturi, pri čemu je pri određenoj temperaturi opažen diskontinuitet. Temperatura diskontinuiteta odgovara temperaturi mekšanja (T_m) koja upućuje na glavni fazni prijelaz lipida DPPC i DPPE iz gela u fluid. Vrijednost T_m određene FT-IR spektroskopijom za DPPC lipide u dva ciklusa zagrijavanja (R1 i R2) odlično se slažu s vrijednostima očitanim iz DSC krivulja. Za lipid DPPE opaženo je odstupanje od $\sim 1^\circ\text{C}$ između vrijednosti određenih FT-IR spektroskopijom i DSC-om u oba ciklusa zagrijavanja (R1 i R2); detaljnije, FT-IR spektri ukazuju na nižu T_m nego DSC krivulje. Pretpostavlja se da je spomenuto odstupanje posljedica neusklađenosti faznog prijelaza u slučaju DPPE lipida zbog slabljenja van der Waalsovih interakcija između ugljikovodičnih lanaca i promjene nekovalentnih interakcija u kojima sudjeluju polarne skupine DPPE-a.

§ 6. LITERATURNI IZVORI

1. G. M. Cooper, R. E. Hausman, *Stanica*, Medicinska naklada, Zagreb, 2014, str. 79–82, 483–490.
2. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, W. H. Freeman, New York, 2007, str. 326–345.
3. M. Arczewska, D. M. Kamiński, E. Górecka, D. Pociecha, E. Rój, A. Sławińska-Brych, M. Gagoś, *Biochim. Biophys. Acta* **1828** (2013) 213–222.
4. T. Heimburg, *Thermal Biophysics of Membranes*, Wiley-VCH, Berlin, 2007, str. 1–41, 75–99, 173–189.
5. *Cell membrane*, 6.2.2014., *PHHS Biology*,
<http://phhsbiology.weebly.com/cell-membrane.html> (datum pristupa 10.1.2020.).
6. R. V. Hoffman, *Organic Chemistry 2. Edition*, John Wiley & Sons Inc., New Jersey, 2004, str. 129–139.
7. A. Buretić-Tomljanović, *Medicina fluminensis* **50** (2014) 391–413.
8. B. Stidder, G. Fragneto, S.J. Roser, *Soft Matter* **3** (2007) 214–222.
9. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry* 5. izd., WorthPublishers, New York, 2008, str. 349–355.
10. M Stepniewski, A. Bunker, M. Pasenkiewicz-Gierula, M. Karttunen, T. Roč, *J. Phys. Chem. B* **114** (2010), 11784–11792.
11. <https://bs.wikipedia.org/wiki/Liposom> (datum pristupa 10.1.2020.).
12. K. Sengupta, V. A. Raghunathan, J. Katsaras, *Phys. Rev. E* **68** (2003) 031710.
13. P. C. Mason, B. D. Gaulin, R. M. Epand, G. D. Wignall, J. S. Lin, *Phys. Rev. E* **59** (1999) 3361–3367.

14. R. A. Parente, B. R. Lentz, *Biochemistry* **23** (1986) 2353–2362.
15. C. M. Hoo, N. Starostin, P. West, M. L. Mecartney, *J. Nanopart. Res.* **10** (2008) 89–96.
16. B. Peng, X.Y. Ding, C. Sun, Y.N. Yang, Y.J. Gao, X. Zhao, *RSC Adv.* **7** (2017) 29386–29394.
17. B. Seantier, M. C. Giocondi, C. Le Grimellec, P. E. Milhiet, *Colloid Interface Sci.* **13** (2008) 326–337.
18. S. J. Attwood, Y. Choi, Z. Leonenko, *Int. J. Mol. Sci* **14** (2013), 3514–3539.
19. K. Cieřlik-Boczula, J. Szwed, A. Jaszczyszyn, K. Gasiorowski, A. Koll, *J. Phys. Chem. B.* **113** (2009) 15495–15502.
20. R. N. Mcelhaney, *Chem. Phys. Lipids* **30** (1982) 229 – 259.
21. A. M. Dopico, *Methods in Molecular Biology: Methods in Membrane Lipids* 400, Humana Press (2006), str. 207–223, 171–195.
22. H. Günzler, H.U. Gremlich, *Uvod u infracrvenu spektroskopiju*, Školska knjiga, Zagreb, 2006, str. 23–59.
23. D. Grdenić, *Molekule i Kristali*, Školska Knjiga, Zagreb, 1987, str. 14–19.
24. B. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals And Applications*, John Wiley & Sons, West Sussex, 2004, str. 5–15.
25. P. Novak, T. Jednaćak, *Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama*, Tiva, Varaždin, 2013, str. 51.
26. A. M. Bouchet, M. A. Frías, F. Lairion, F. Martini, H. Almaleck, G. Gordillo, E. A. Disalvo, *Biochim. Biophys. Acta* **1788** (2009) 918–925.
27. K. A. Riske, R. P. Barroso, C. C. Vequi-Suplicy, R. Germano, V. B. Henriques, M. T. Lamy, *Biochim. Biophys. Acta* **1788** (2009) 954–963.
28. M. Falk, T. A. Ford, *Can. J. Chem.* **44** (1966) 1699–1707.

-
29. W. Chen, F. Duša, J. Witos, S.K. Ruokonen, S. K. Wiedmer, *Scientific Reports* **8** (2018) 14815–14826.
 30. M. Kaszuba, D. McKnight, M.T. Connah, F.K. McNeil-Watson, U. Nobbmann, *J. Nanopart. Research* **10** (2007) 823–829.
 31. <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/technology/light-scattering/dynamic-light-scattering> (datum pristupa 27.1.2020.).
 32. A. A. Gurtovenko, I. Vattulainen, *J. Phys. Chem. B* **112** (2008) 1953–1962.
 33. D. Pentak, *Thermochim. Acta* **584** (2014) 36–44.

§ 7. DODATAK

Tablica D1. Rezultati dobivenih veličina liposoma DLS tehnikom.

	DPPC (30°C) / μM	DPPE (52°C) / μM
D_H/nm	3000	200

Tablica D2. Asignacija važnijih vrpca u IR spektrima za R1 i R2 za uzorak vodene otopine DPPC-a na temperaturi prije (35 °C) i nakon faznog prijelaza (46 °C).

$\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$				
R1		R2		ASIGNACIJA
35 °C	46 °C	35 °C	46 °C	
3659,6	3662,8	3655,8	3660,8	$\nu_s(\text{O-H})$
3121,6	3130,5	3115,8	3126,4	-
2849,9	-	2850	-	$\nu_s(\text{CH}_2)$
2120,1	2109,8	2121,7	2109,9	kombinacija: $\delta(\text{HOH})$ + libracija H ₂ O
1630,7	1625,9	1625,9	1627,6	$\delta(\text{HOH})$
1467,4	1466,4	1467,6	1466,6	$\gamma(\text{CH}_2)$
1222	1224,5	1222,6	1224,1	$\nu_{as}(\text{PO}_2)$

Tablica D3. Asignacija važnijih vrpca u IR spektrima za R1 i R2 za uzorak vodene otopine DPPE-a na temperaturi prije (56 °C) i nakon faznog prijelaza (70 °C).

$\tilde{\nu}/ \text{cm}^{-1}$				
R1		R2		
56 °C	70 °C	56 °C	70 °C	ASIGNACIJA
3664,6	3666,2	3664,3	3665,5	$\nu_s(\text{O-H})$
3138,9	3156,1	3625,9	3152,4	-
2099,2	-	3136,1	-	-
1664,3	1661,6	1661,1	1661,1	$\delta(\text{HOH})$
1627,6	1624,8	1624,9	1624,6	$\gamma(\text{CH}_2)$

§ 8. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Petra Maleš

Datum rođenja: 12. travnja 1994.

Mjesto rođenja: Šibenik

Obrazovanje

2000.–2008. Osnovna škola Vidici Šibenik

2009.–2012. Gimnazija Antuna Vrančića, Šibenik

2013.–2016. Preddiplomski sveučilišni studij Biologija i kemija,

Prirodoslovno-matematički fakultet,

Sveučilište u Splitu

2017.-2020. Diplomski sveučilišni studij Kemija;

Smjer: istraživački (grane: biokemija i analitička kemija)

Prirodoslovno-matematički fakultet,

Sveučilište u Zagrebu

Nagrade i priznanja

2016. Dekanova nagrada Prirodoslovno-matematičkog fakulteta,
Sveučilište u Splitu

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2015. Festival znanosti na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu,
Sveučilište u Splitu

2017. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka, Prirodoslovno-matematički fakultet,
Sveučilište u Zagrebu