

Interakcija flavonoida s modelnim membranama

Mandić, Lucija

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:952508>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-01**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Lucija Mandić

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, srpanj 2016. g.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Lucija Mandić

INTERAKCIJA FLAVONOIDA S MODELNIM MEMBRANAMA

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: doc. dr. sc. Helena Otmačić Ćurković

**Neposredni voditelj rada: dr. sc. Suzana Šegota, viši znanstveni
suradnik IRB-a**

Članovi ispitnog povjerenstva:

doc. dr. sc. Helena Otmačić Ćurković
dr. sc. Suzana Šegota viši znanstveni suradnik IRB-a
izv. prof. dr. sc. Elvira Vidović

Zagreb, srpanj 2016. g.

Zahvale

Neizmjerno se zahvaljujem svojim mentoricama dr. sc. Suzani Šegoti i doc. dr. sc. Heleni Otmačić Ćurković te ostalim djelatnicima Instituta Ruđer Bošković na njihovoj pristupačnosti i pomoći. Posebice se zahvaljujem dr. sc. Suzani Šegota na uloženom trudu, susretljivosti, strpljenju, poticajima i savjetima koji su mi bili od neizmjerne važnosti pri izradi ovog završnog rada.

Zahvaljujem se mojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci, ohrabrenju i strpljenju tijekom cijelog školovanja. Hvala mojim prijateljima koji su uvijek bili uz mene.

Hvala dragom Bogu koji mi je snaga i zaštita kroz cijeli život.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za fizičku kemiju na Institutu Ruđer Bošković pod neposrednim vodstvom dr. sc. Suzane Šegote, više znanstvene suradnice IRB-a

SAŽETAK RADA

Cilj ovog rada je različitim tehnikama shvatiti što se događa na nivou membrane kada dođe do interakcije flavonoida s membranom.

Infracrvenom spektroskopijom (IR) je istražen utjecaj flavonola miricetina (MCE) i miricitrina (MCI) na temperaturu prijelaza, T_m , modelnog membranskog lipida 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfokolina (DMPC) iz stanja gela u stanje tekućih kristala. Mikroskopijom atomskih sila (AFM) istražene su orijentacije lipida u membrani, a pomoću tehnike dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS) istražen je naboj liposoma. Multilamelarni liposomi snimani su u transmisiji kako bi se odredila T_m , dok su spektri hidratiziranih višestrukih lipidnih dvosloja snimani apsorpcijsko-refleksijskom spektroskopijom na horizontalnoj površini (HATR) kako bi se odredio smještaj flavonola u dvosloju. Rezultati dobiveni mjerenjima pokazuju da flavonoli snizuju T_m DMPC-a što je posljedica njihove ugradnje u dvosloj. MCE ulazi dublje u lipidni dvosloj, dok MCI zaostaje na hidrofilnoj površini dvosloja.

Ključne riječi: miricetin, miricitrin, DMPC, infracrvena spektroskopija, mikroskopija atomskih sila, dinamičko raspršenje svjetlosti

SUMMARY

The aim of this research is to understand what happens on membrane level when it comes to interaction with flavonoids by using various techniques.

IR spectroscopy was used to study effects of flavonols myricetin (MCE) and myricitrin (MCI) on temperature of phase transition, T_m , from gel phase to liquid crystalline phase of model membrane lipid 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC). The orientation of lipids in the membrane was observed using Atomic force microscopy (AFM) and charge of liposomes by using Dynamic light scattering (DLS). Multilamellar liposomes were recorded in transmission in order to determine T_m . Spectra of the hydrated multibilayers were recorded by Horizontal Attenuated Total Reflection (HATR) technique to determine their position in the bilayer. Results indicate that flavonols interact with DMPC and that their incorporation in the bilayer causes lowering of T_m . MCE goes deeper into the lipid bilayer, while MCI is more on the hydrophilic surface of the bilayer.

Keywords: myricetin, myricitrin, DMPC, infrared spectroscopy, atomic force microscopy, dynamic light scattering

Sadržaj

SAŽETAK RADA	i
SUMMARY	ii
1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2. 1. Biološke membrane	4
2. 2. Flavonoidi	9
2. 2. 1. <i>Kemijska struktura flavonoida i biološka uloga</i>	9
2. 2. 2. <i>Kvercetin, miricetin i miricitrin</i>	12
2. 3. Interakcije flavonoida s modelnim membranama	14
2. 3. 1. <i>Temperatura prijelaza lipidnih membrana</i>	16
2. 4. Lipidna peroksidacija	17
2. 5. Mjerne tehnike	20
2. 5. 1. <i>Mikroskopija atomskih sila</i>	20
2. 5. 2. <i>Infracrvena spektroskopija</i>	21
2. 5. 3. <i>Dinamičko raspršenje svjetlosti i elektroforetsko raspršenje svjetlosti</i>	22
3. EKSPERIMENTALNI DIO	24
3. 1. Materijali	25
3. 2. Priprema uzorka	25
3. 2. 1. <i>IR spektroskopija disperzija DMPC, DMPC+MCE, DMPC+MCI</i> .	25
3. 2. 2. <i>IR spektroskopija filmova DMPC, DMPC+MCE, DMPC+MCI</i>	26
3. 2. 3. <i>Priprema uzoraka za AFM oslikavanja¹</i>	26
3. 2. 4. <i>Priprema uzoraka za mjerenje zeta potencijala</i>	26
3. 3. Mjerni uređaji	26
3. 3. 1. <i>IR spektroskopija</i>	26
3. 3. 2. <i>AFM oslikavanje</i>	27

3. 3. 3. Mjerenje zeta potencijala.....	27
3. 4. Obrada spektara i analiza podataka	27
3. 4. 1. IR spektri disperzija u transmisiji	27
3. 4. 2. IR spektri filmova: HATR.....	28
3. 4. 3. Analiza podataka dobivenih AFM mjerenjem	28
3. 4. 4. Analiza podataka dobivenih mjerenjem zeta potencijala	28
4. 1. IR spektroskopija	30
4. 1. 1. Analiza spektara disperzije DMPC-a	30
4. 1. 2. Rezultati oslikavanjem mikroskopijom atomskih sila u istraživanju ugradnje MCE-a i MCI-a u dvosloj DMPC-a ¹	31
4. 1. 3. Izmjereni zeta potencijal DMPC liposoma s ugrađenim flavonoidima	33
5. ZAKLJUČAK.....	35
6. LITERATURA	38
7. ŽIVOTOPIS.....	42

1.UVOD

1. Uvod

Flavonoidi su polifenolni spojevi biljnog porijekla koji pokazuju blagotvorne učinke na organizam sisavaca. Pronađeni su u voću, povrću, sjemenkama, cvijeću te pićima poput čaja, kave, pive i vina. Njihova značajna biološka aktivnost uključuje antiupalno, antivirusno, antialergijsko, antibakterijsko i antikancerogeno ponašanje na metabolizam sisavaca. Različiti flavonoidi ispituju se kod istraživanja interakcija flavonoida sa staničnim, odnosno modelnim membranama te njihov utjecaj na fizikalno-kemijska svojstva membrane. Promjenom membranskog sastava mijenjaju se i fizikalno-kemijska svojstva membrane među kojima je i temperatura faznog prijelaza iz gel faze u fluidnu fazu.

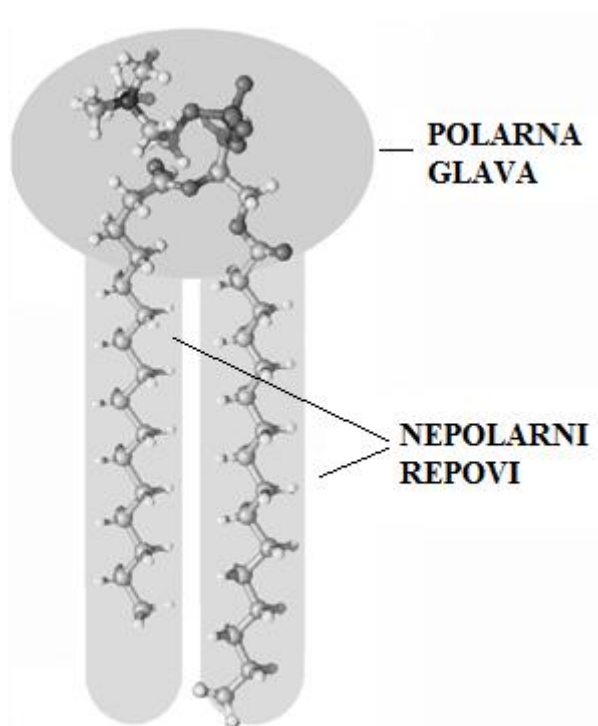
Svrha ovog rada je različitim tehnikama istražiti strukturno reorganiziranje lipida u membrani tokom interakcije s flavonoidima.

Metode odabrane za istraživanje su infracrvena (IR) spektroskopija, mikroskopija atomskih sila (AFM) te dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS) i elektroforetsko raspršenje svjetlosti. Kao modelni membranski sustavi poslužit će: multilamelarni liposomi te višestruki lipidni dvosloji 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfokolina s različitim udjelima MCE-a, odnosno MCI-a u fosfatnom puferu (PBS od engl. *Phosphate Buffer Saline*). Multilamelarni liposomi snimani su s ciljem određivanja koliko prisustvo pojedinog flavonola i u kojem omjeru mijenja T_m u odnosu na T_m samog DMPC-a (23,6 °C). Mjerenja su provedena u transmisiji u temperaturnom intervalu 15–30 °C. Spektri hidratiziranih višestrukih lipidnih dvosloja snimani su apsorpcijsko-refleksijskom spektroskopijom na horizontalnoj površini (HATR, engl. *Horizontal Attenuated Total Reflection*). Rezultati dobiveni IR spektroskopskom tehnikom uspoređuju se s podacima mjerenja dobivenih pomoću mikroskopije atomskih sila (AFM, engl. *Atomic Force Microscopy*) i dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS, engl. *Dynamic light scattering*).

2.TEORIJSKI DIO

2. 1. *Biološke membrane*

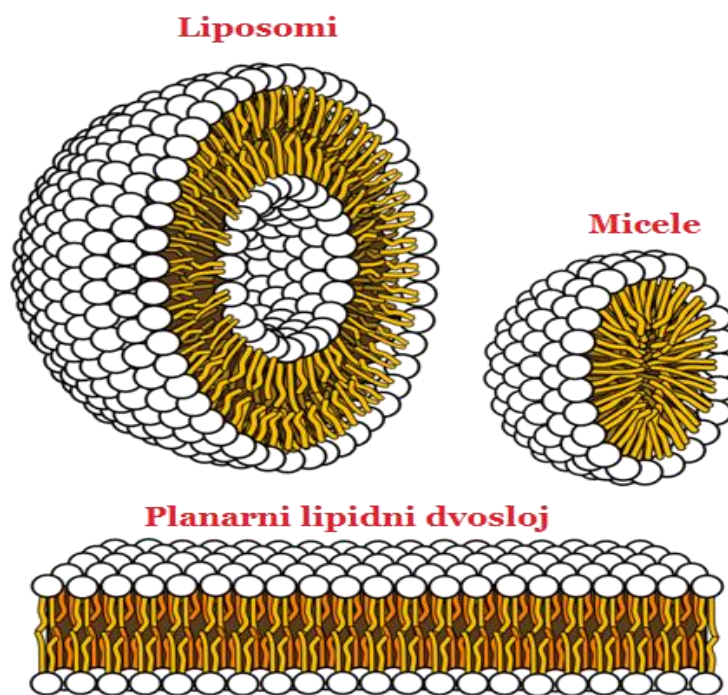
Biološke membrane su barijere koje dijele stanični od izvanstaničnog prostora te posjeduju svojstvo selektivne permeabilnosti tako što sadržavaju transportne sustave koji omogućuju opskrbu željenim specijama te prolazak nepoželjnih specija iz stanice.¹ Također imaju sposobnost skladištenja energije, primanja signala, selektivnosti, provođenja informacija i distribucije fosfolipida.^{1,2} Prosječna debljina membrane je između 60Å (6 nm) i 100Å (10 nm).¹ Funkcija bioloških membrana ovisi o njihovom sastavu.³ Većinom se sastoje od lipida i proteina. Međutim membrane sadrže i ugljikohidrate vezane za lipide i proteine. Lipidi su biomolekule netopljive u vodi, a topljive u organskim otapalima. Sastoje se od hidrofobnih repova i hidrofilne glave što znači da su amfipatske molekule.⁴ Kod većine lipida polarna glava ostvaruje kontakt s vodenim medijem, a nepolarni repovi okrenuti su prema unutrašnjosti membrane i stupaju u međusobne interakcije.¹



Slika 1. Molekula lipida građena od polarne glave usmjerene k vodenom mediju i nepolarnih repova usmjerenih k unutrašnjosti membrane³

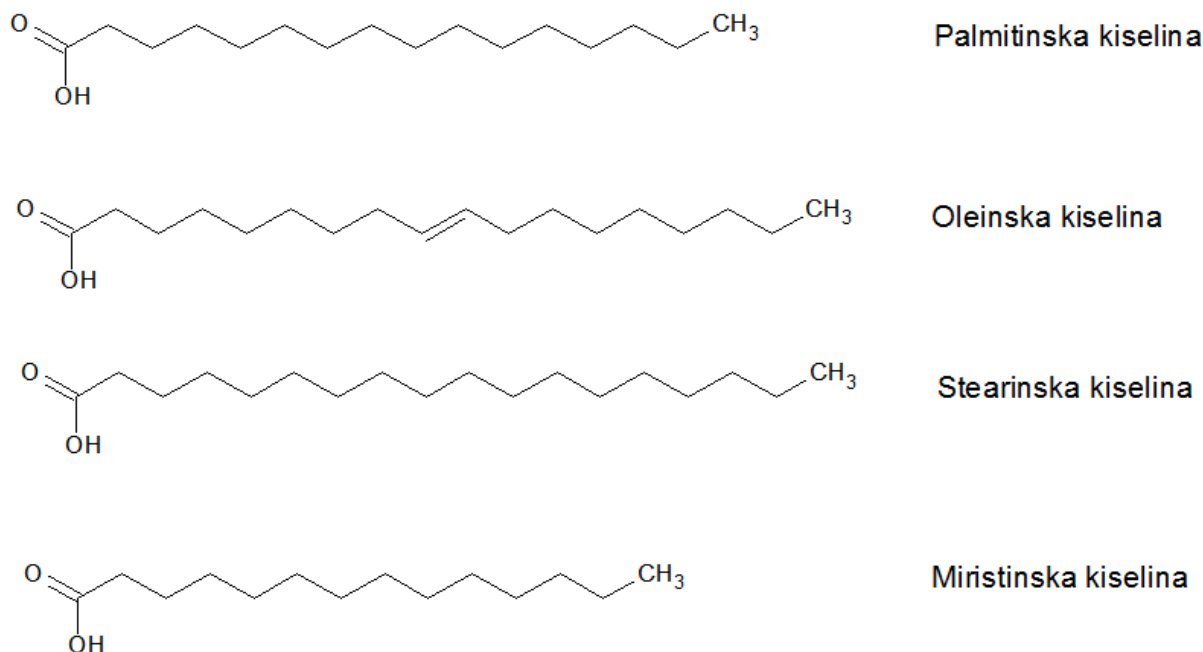
Postoje tri strukture u kojima lipidi mogu samoorganizirati kada se nalaze u prisustvu vodenog medija, a to su micle, vezikule i planarni dvosloj-lamele.⁴ Micle su male (do 200

nm), sferni samoasocijati građeni od lipidnih molekula s jednim ugljikovodičnim lancem, a hidrofilne glave uronjene su vodeni medij. 1925. Gorter i Grendel uočili su drugu strukturu asociiranih lipida, lipidni dvosloj.⁵ Lipidni dvosloj naziva se i bimolekulskim listom, a sastoji se od sloja lipidnih molekula s dva ugljikovodična, hidrofobna lanca koja međusobno reagiraju i hidrofilnih glava koje reagiraju s vodom na površini svakog sloja.^{1,3} Krajevi ili rubovi dvosloja izloženi su nepovoljnom okolišu odnosno doticaju s vodom pa tako dolazi do transformacije odnosno zakrivljenja planarne strukture, lamele u liposome ili vezikule.^{3,5} Liposomi su vodeni odjeljci okruženi lipidnim dvoslojem. Takve strukture koriste se kao modelni sustavi u istraživanjima propusnosti membrane ili transporta tvari izvan ili u stanicu.



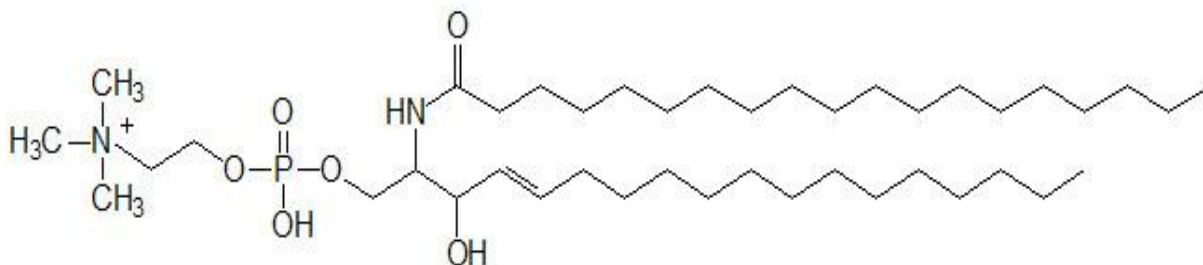
Slika 2. Strukture lipida u prisustvu vode ⁶

Biološke membrane čine tri glavne skupine lipida, a to su fosfolipidi (fosfoglicerolipidi), sfingolipidi i steroidi. Fosfolipidi su spojevi koji se sastoje od trovalentnog alkohola glicerola, jedne ili više masnih kiselina, fosfata i polarne skupine koja određuje vrstu molekule fosfolipida. Masne kiseline osiguravaju hidrofobnu barijeru dok ostatak molekule ima hidrofilna svojstva koja omogućavaju interakciju s vodenim okolišem. Masne kiseline koje u sebi imaju jednu ili više dvostrukih veza zovu se nezasićene masne kiseline, a one koje sadržavaju samo jednostruke veze zasićene masne kiseline.



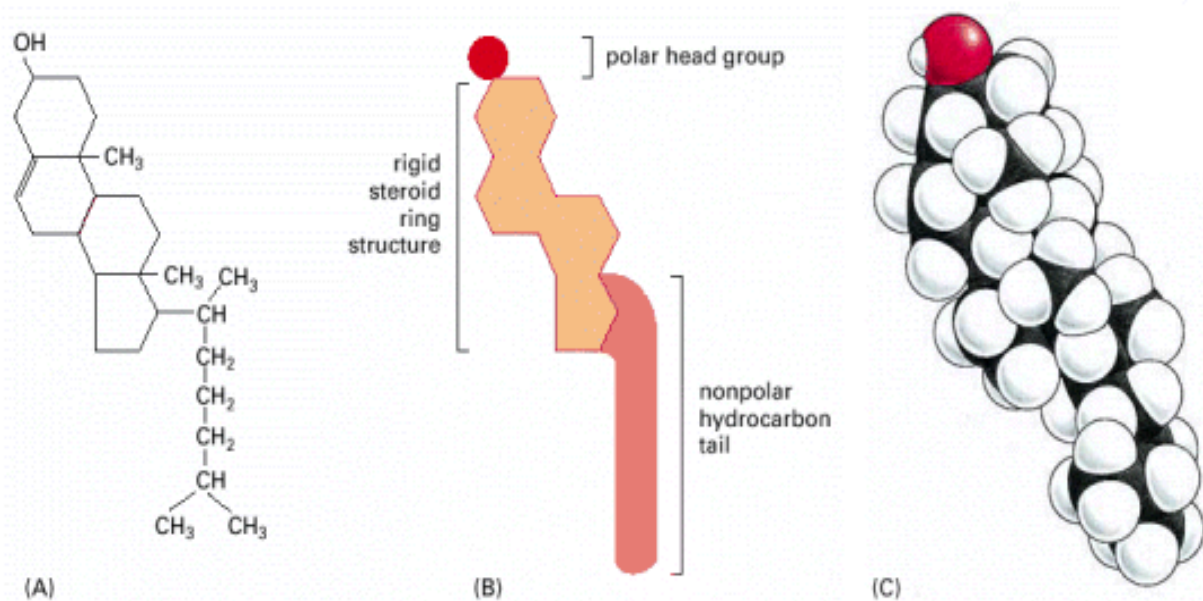
Slika 3. Prikaz najzastupljenijih masnih kiselina koje tvore lipidne repove

Membrana jedne stanice sastoji se preko 1000 različitih lipidnih molekula fosfolipida. Različite molekule fosfolipida asimetrično su raspoređene u lipidnom dvosloju što je ključan čimbenik interakcija membranskih lipida s proteinima i procesa prijenosa signala. Gubitak strukturne membranske simetrije dovodi do pojave različitih bolesti i izostanka normalnog rada staničnih funkcija. Asimetriji membrana pridonose i sfingolipidi. Sfingolipidi su molekule koje posjeduju polarnu glavu i dva nepolarna lanca koja su vezana za dugolančani amino-alkohol sfingozin.⁷ Postoje dvije vrste sfingolipida, a to su sfingomijelin i glikosfinoglipidi.^{3,8} Molekule sfingolipida u membranama manje su zastupljene nego molekule fosfolipida.⁷



Slika 4. Strukturna građa sfingomijelina sastoji se fosfokolinske glave i sfingozida na koji je esterski vezana palmitinska ili stearinska kiselina⁸

Steroidi su molekule sastavljene od četiri povezana ugljikovodična prstena i kratkog ugljikovodičnog lanca. Predstavnik steroida je kolesterol, planarna molekula smještena unutar membrane paralelno s nepolarnim repovima, a OH skupina reagira s najbližom polarnom skupinom fosfolipida.



Slika 5. Struktura kolesterola: A-formula, B-shematski prikaz, C –prostorni model²

Kolesterol ima dvojnu ulogu u membranama. On istovremeno čini membrane fluidnima i čvrstima budući da je fluidnost membrane bitna za odvijanje transportnih procesa. Molekule kolesterola nalaze se između molekula fosfolipida i sprječavaju međusobno povezivanje lanaca masnih kiselina, a s druge strane molekule kolesterola istovremeno djeluju kao stabilizatori koji održavaju normalnu funkciju membrana u slučaju da dođe do promjenjivih uvjeta, npr. temperature.⁷

Naime u biološkim membranama osim membranskih lipida postoje i različiti membranski proteini koji obuhvaćaju 25 do 75% mase različitih staničnih membrana.^{1,9} Proteini imaju jedinstvenu orijentaciju u membranama i osiguravaju razliku između površine unutarnje i vanjske membrane.⁵ Membranske proteine dijelimo u dvije skupine, a to su integralni ili transmembranski i periferni ili asocirani membranski proteini.¹⁰ Integralni membranski proteini protežu se kroz cijeli lipidni dvosloj, pokazuju amfipatsko svojstvo te su globularni.

Sastoje se od dvaju hidrofilnih krajeva između kojih se nalazi hidrofobno područje koje prolazi kroz hidrofobnu jezgru dvosloja.⁵ Najvažnija uloga integralnih membranskih proteina je prijenos raznih molekula i iona te izgradnja proteinskih nosača, ionskih kanala i proteinskih crpki.^{2,5} Perferni membranski proteini su enzimi i hormoni uključeni u bitne funkcije stanične membrane.¹ Oni nemaju izravno međudjelovanje s hidrofobnom jezgrom fosfolipidnog dvosloja te su vezani za hidrofilna područja određenih integralnih proteina i fosfolipidne glave.⁵ Osim lipida i proteina membrane grade membranski ugljikohidrati odnosno šećeri koji su većinom u obliku glikolipida i oligosaharida.

2. 2. Flavonoidi

2. 2. 1. Kemijska struktura flavonoida i biološka uloga

Flavonoidi su skupina polifenolnih spojeva koji su pronađeni u voću, povrću, sjemenkama, cvijeću te pićima poput čaja, kave, pive i vina. Nobelovac Albert Szent Gyorgyi 1930. godine izolirao je spoj iz naranče, vjerujući da se radi o novoj vrsti vitamina. Međutim uspostavilo se da je riječ o flavonoidu (rutin). Potom su započela brojna istraživanja kojim se nastojalo izolirati različite pojedinačne flavonoide te utvrditi mehanizme njihovog djelovanja.¹¹ Danas je poznato više od 6000 različitih flavonoida.¹² Mnogi flavonoidi pokazuju značajnu biološku aktivnost koja uključuje antialergijsko, antiupalno, antivirusno i antikancerogeno ponašanje na metabolizam sisavaca. Zbog pozitivnih učinaka na zdravlje flavonoidi su izuzetno važan dio ljudske prehrane. Ljudi normalnom dnevnom prehranom osobito voćem i povrćem unose 1-2 g flavonoida.¹¹

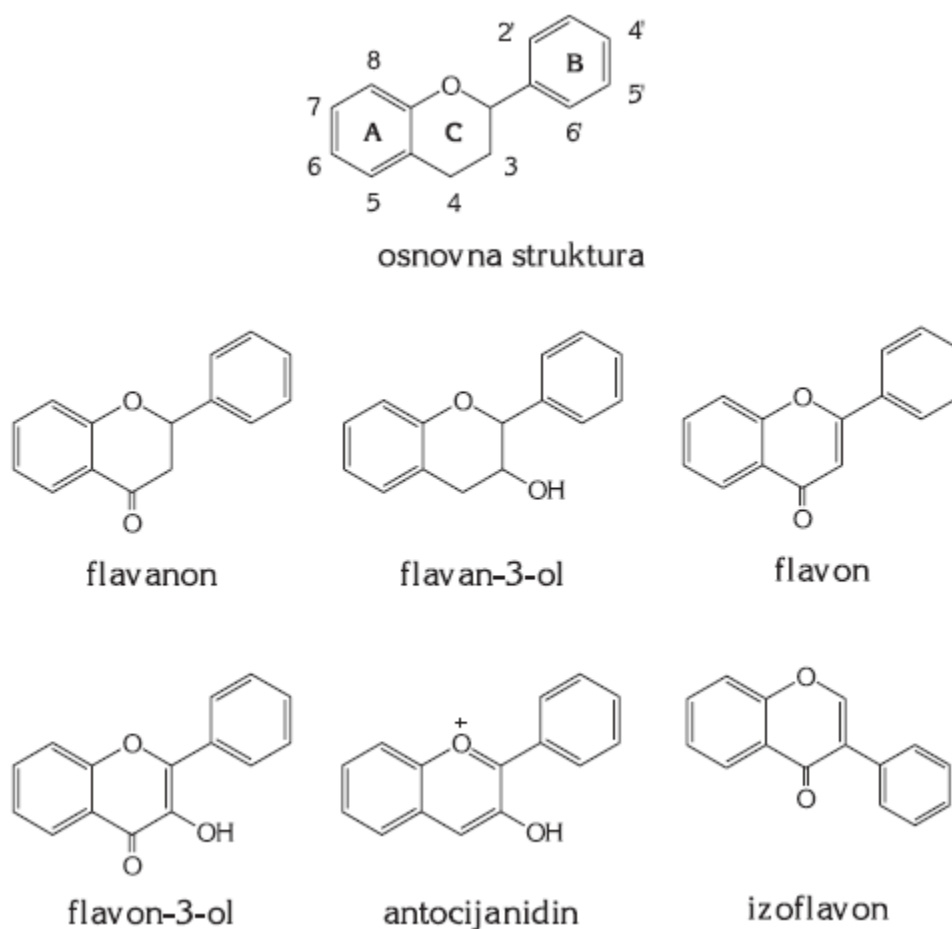
Posljednjih nekoliko godina istraživanja su pokazala da flavonoidi imaju učinak na središnji živčani sustav, posebice kod neurodegenerativnih bolesti kao što su Alzeimerova i Parkinsonova bolest.¹³ Flavonoidi mogu regulirati razne neurološke funkcije te tako održavaju kognitivne funkcije kod ljudi. Pretpostavljeno je da do tog dolazi preko zaštite živčanih stanica, poboljšanja njihove funkcije i regeneracije. Reaktivni kisikovi i dušikovi spojevi povezani su s razvijanjem velikog broja neurodegenerativnih bolesti, a flavonoidi se uspješno suprotstavljaju oksidativnom oštećenju živaca.¹⁴ Bioraspoloživost, metabolizam i biološka aktivnost flavonoida ovise o konfiguraciji, ukupnom broju hidroksilnih skupina i supstituciji funkcionalnih grupa unutar njihove nuklearne strukture.¹¹ U samim biljkama flavonoidi djeluju antioksidacijski, antimikrobno, kao fotoreceptori, regulatori rasta te kao agensi za privlačenje pozornosti.

Osnovnu strukturu flavonoida čini difenilpropan (C6-C3-C6) odnosno 1-fenil-3-(2-hidroksifenil)propan-1-ol iz kojeg gubitkom vode i zatvaranjem C-prstena rezultira flavan od kojega proizlaze osnovne strukture flavonoida:

- i) flavanoni,
- ii) flavanoli,
- iii) flavoni,
- iv) flavonoli,
- v) antocijanidini,
- vi) izoflavoni.¹⁵

Tablica 1. Najčešći flavonoidi u prehrani¹⁵

PODSKUPINA	FLAVONOIDI U HRANI	HRANA KAO IZVOR
Antocijanidini	Cijanidin, Delfinidin, Malvidin, Pelargonidin, Peonidin, Petunidin	Bobičasto voće; crno grožđe i vino
Flavanoli	Katehin, Epikatehin, Epigalokatehin Epikatehin galat, Epigalokatehin galat, Proantocijanidini	Katehini: čaj (posebno zeleni i bijeli), čokolada, grožđe, bobičasto voće, jabuke; Proantocijanidini: čokolada, jabuke, bobičasto voće, crno grožđe i vino
Flavanoni	Hesperetin, Naringenin, Eriodictiol	Citrusno voće i sokovi, npr. naranče, limun
Flavonoli	Kvercetin, Kempferol, Miricetin, Izoramnetin	Žuti luk, kelj, brokula, jabuke, bobičasto voće, čajevi
Flavoni	Apigenin, Luteolin	Peršin, majčina dušica, celer, paprika
Izoflavoni	Daidzein, Genistein, Glicitein	Soja i hrana od soje



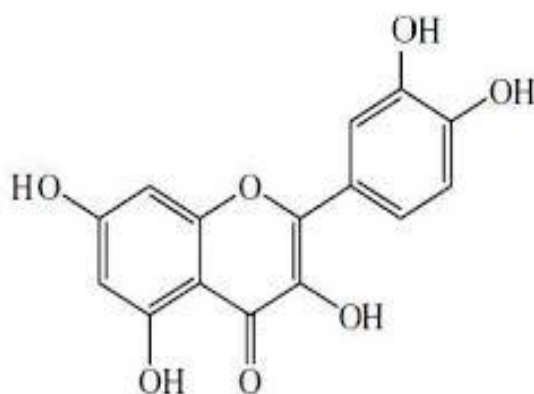
Slika 1. Osnovna struktura flavonoida i glavnih vrsta flavonoida¹⁴

Strukturalna raznolikost flavonoida rezultat je brojnih modifikacija osnovne skeletne strukture, koje uvjetuju reakcije hidrogenacije, hidroksilacije, O-metilacije hidroksilnih grupa, dimerizacije, vezanja neorganskog sulfata i glikolizacije hidroksilnih grupa (O-glikozidi) ili flavonoidne jezgre (C-glikozidi). Flavonoidi se pojavljuju kao glikozidi, aglikoni i metilirani derivati. Glikozidacija kod flavonoida najčešće se događa u položaju 3-, a manje u položaju 7-. Šećer koji se najčešće javlja jest glukoza, no javljaju se i galaktoza, ramnoza i ksiloza. Osim šećera na sebe još mogu vezati i hidroksilne i metoksilne skupine. Kod flavonoida postoji i velika sklonost umrežavanju i polimerizaciji.¹⁵

Najraširenija podvrsta flavonoida su flavonoli i u manjoj mjeri flavoni. Najpoznatiji flavoni su apigenin i luteolin, a najrašireniji flavanoli su kvercetin, kemferol, miricetin.

2. 2. 2. Kvercetin, miricetin i miricitrin

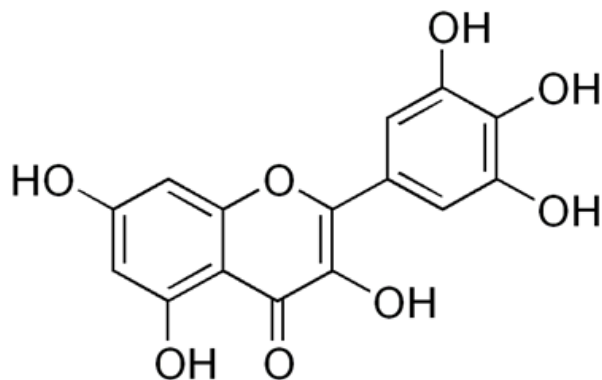
Kvercetin je polifenolni spoj koji se sastoji od dva benzenska prstena A i B i prstena C te posjeduje pet hidroksilnih skupina. Nalazi se u povrću, bobičastom voću, čaju te crvenom vinu. Kvercetinu se pridaje veliki značaj zbog brojnih učinaka kao što su antitumorsko i protuupalno djelovanje, smanjuje rizik od smrti radi ishemije srca i rizik od raka pluća. Kvercetin i epigalokatehin te ekstrakti zelenog čaja koji su bogati flavonoidima inhibiraju rast tumorskih stanica inhibirajući pojedine faze staničnog ciklusa ili blokiranjem i kompeticijom za mjestima hormonskih receptora.¹⁹ Međutim potrebna su još brojna istraživanja kako bi se utvrdili mehanizmi i međudjelovanje brojnih učinaka flavonoida u sprječavanju nastanka i borbi protiv raka.



Slika 2. Kemijska struktura kvercetina- u prstenu C ima 2,3-dvostruku vezu i 4-keto-skupinu što mu omogućava veću sposobnost hvatanja radikala

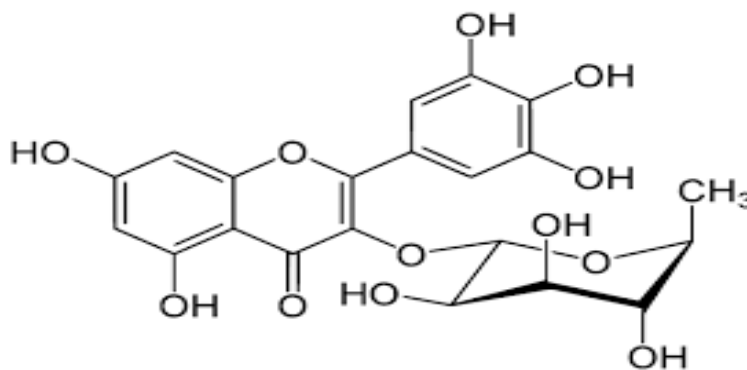
Superiornost kvercetina u inhibiciji oksidativnih oštećenja djelomično se pripisuje njegovoj slobodnoj hidroksilnoj skupini u položaju 3- za koju se pretpostavlja da povećava stabilnost flavonoidnog radikala. Flavonoli i flavanoli koji imaju hidroksilnu skupinu u položaju 3- su planarni, a planarnost dopušta konjugaciju, delokalizaciju elektrona i povećava stabilnost flavonoidnih fenoksilnih radikala. Uklanjanje hidroksilne skupine s položaja 3- ukida se koplanarnost i konjugativnost, a time i sposobnost stabilizacije radikala. Kvercetin je snažni hvatač peroksidnih radikala, a zatim slijede njegovi O-metilirani i O-glikozidirani derivati.¹⁵

Miricetin ($C_{15}H_{10}O_8$) je polifenolni spoj koji se sastoji od 2 benzenska prstena A i B i prstena C te posjeduje hidroksilne skupine na pozicijama 3, 5, 7, 3', 4' i 5'.¹⁶ Zastupljen je u orašastim plodovima, bobičastom voću, luku te crvenom grožđu. Miricetin pokazuje antiupalno, antidijabetičko, antiproliferativno, antioksidativno, antikancerogeno djelovanje.¹⁸ Također pozitivno djeluje na liječenje infekcija mokraćnog trakta, štiti jetru i djeluje pozitivno u sprječavanju stvaranja tromboze. Njegov pozitivni učinak na liječenje Parkinsonove bolesti dokazan je *in vivo* i *in vitro* na način da smanjuje učinak oksidacije i apoptoze.¹⁷



Slika 3. Kemijska struktura miricetina

Miricitrin je polifenolni spoj koji se sastoji od 2 benzenska prstena A i B te središnjeg prstena C. Hidroksilne skupine su na 5, 7, 3', 4' i 5' pozicijama. Na trećoj poziciji središnjeg C-prstena nalazi se šećer ramnoza umjesto OH skupine.



Slika 4. Kemijska struktura miricitrina

Miricitrin pokazuje pozitivan učinak na liječenje anksioznosti kao inhibitor dušikovog oksida (NO) i protein-kinaze C te raznih neuroloških bolesti kao što je Parkinsonova bolest. Dokazano je antimutagensko djelovanje miricitrina što se pripisuje sposobnosti uklanjanja slobodnih hidroksilnih radikala.²⁰

2. 3. Interakcije flavonoida s modelnim membranama

Biološke membrane imaju važnu ulogu u biološkom transportu, selektivnosti, provođenju informacija i distribucije fosfolipida. Zbog sve većeg korištenja flavonoida u prevenciji raznih bolesti i liječenju veoma je bitno razumjeti mehanizam interakcije flavonoida s membranama stanica. Flavonoidi prodiru u lipidni dvosloj i time nastaju promjene elektrostatskih naboja flavonoida i lipidne membrane.²¹

Postoje dva moguća mehanizma interakcije flavonoida i lipida:

- i) interakcije s nepolarnim dijelom lipidne membrane što je povezano s hidrofobnošću flavonoida
- ii) interakcije s polarnim dijelom membrane koje ovise o vodikovim vezama hidroksilnih skupina²²

Pawlikowska-Pawłęga i suradnici proučavali su utjecaj flavonoida kvercetina, genisteina i apigenina na liposome 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfokolina (DPPC). Naime, flavonoidi se ugrađuju u DPPC stvaranjem vodikovih veza između polarnih glava DPPC-a i OH-skupina flavonoida. Ugradnjom flavonoida dolazi do smanjenja slobode kretanja lipidne polarne glave i hidrofobnih repova lipida.²⁵⁻²⁸

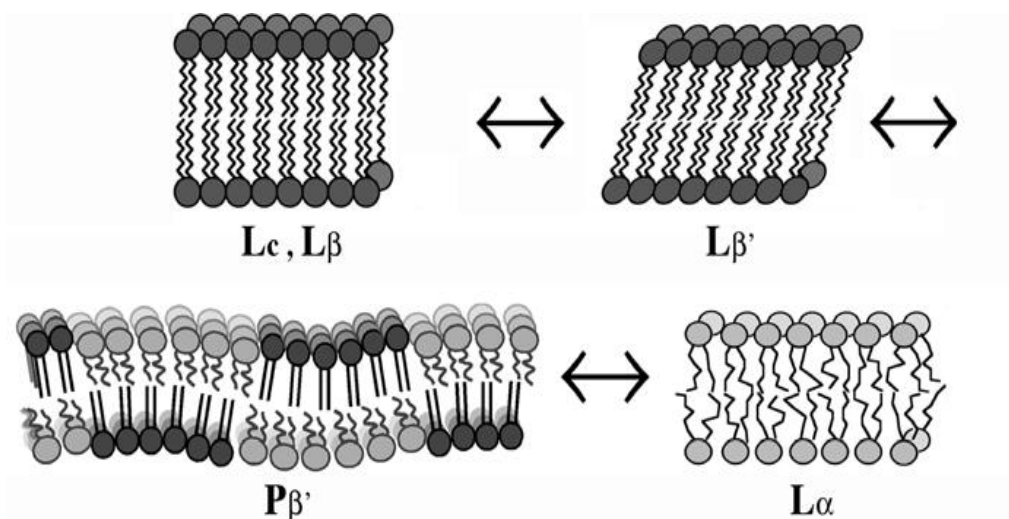
Cieślak-Boczula i suradnici promatrali su utjecaj kvercetina, genisteina i njegovih derivata na liposome DPPC-a. Tijekom interakcije flavonoida s lipidnim dvoslojem dolazi do nastanka vodikove veze s nekoliko komponenata polarnih glava te do promjene prostornog smještaja tih dijelova lipida i relaksacije molekula. Relaksacija dvosloja vidljiva je i promatranjem ugljikovodičnih lanaca, u porastu broja *gauche* lipidnih konformera čije je nastajanje inducirano prisutnošću flavonoida. Lokacija ovih spojeva u polarnom dijelu lipidnog dvosloja također ukazuje na njihovu antioksidativnu ulogu.²⁹

Merz i suradnici proučavali su različite izoflavone koji se nalaze u listovima crvene djeteline kao što su daidzein, genstein i biokanin A.²³ Uglavnom se pojavljuju glukozidi ili slobodni aglikoni u vakuolama. Genstein posjeduje najveću farmakološku aktivnost, inhibira protein-tirozin kinazu (PTK) i na taj način doprinosi antikancerogenoj aktivnosti. Genstein također inhibira topoizomerazu I i II i protein histidin kinazu koje i time pokazuje svoj proapoptotički učinak. Također je dokazano da genstein ima i snažan antioksidativni učinak, tj. da štiti stanice od oksidativnog oštećenja, inhibirajući ekspresiju gena odgovornih za stres.²⁴

Genistein utiče na lipide plazme tako što smanjuje LDL kolesterol te ukupni kolesterol kod žena u predmenopauzi.²³ Genistein posjeduje hidroksilnu skupinu na C-5 ugljikovom atomu i u odnosu s daidzeinom pokazuje veću antioksidativnu aktivnost. Ovo upućuje na to da hidroksilna skupina na poziciji C-5 povećava antioksidativnu aktivnost. Biokanin A je metilirani derivat genisteina. Također pokazuje antikancerogeni učinak na testiranim tumorskim stanicama, kao što je rak dojke. Posjeduje antioksidativnu aktivnost i može zaštititi stanice od oksidativnog oštećenja izazvanog utjecajem raznih ksenobiotika.

2. 3. 1. Temperatura prijelaza lipidnih membrana

Strukturu membranskih lipida ovisi o nizu faktora koji se mogu mijenjati kao što su pH, tlak, temperatura i kemijski potencijal raznih iona. Lipidni dvosloj je u početku pri nižim temperaturama uređene, čvrste strukture, a svi lanci nalaze se u *trans* konformaciji. Takva faza naziva se L_c faza ili kristalinična lipidna faza. Povišenjem temperature lipidni dvosloj prelazi iz čvrste strukture u takozvanu gel fazu, odnosno $L_{\beta'}$ fazu. Lanci su uređene strukture kod kojih je većina u *trans* položajima, ali je struktura poremećena u odnosu na početnu jer su lipidi nagnuti pod određenim kutom. Takvi kutovi ovise o skupinama koje čine glavu lipida. Daljnjim porastom temperature dolazi do formiranja $P_{\beta'}$ faza u kojoj se na površini dvosloja stvaraju nabori koji su uzrokovani periodničnom izmjenom lipida u stanju gela i u fluidnom stanju. Ova faza nastaje prije glavnog faznog prijelaza te se sastoji od većinom djelomično omekšane lipidne faze sa smanjenim stupnjem uređenosti lanaca gdje je dio njih prešao u *cis* konfiguraciju. Završna faza lipidne transformacije je fluidna faza, odnosno L_{α} faza u kojoj u potpunosti nestaje uređenost lanaca. Na slici 5. prikazana je transformacija lipidnog dvosloja do koje dolazi povišenjem temperature.³



Slika 5. Faze lipidnog dvosloja koje se pojavljuju povišenjem temperature³

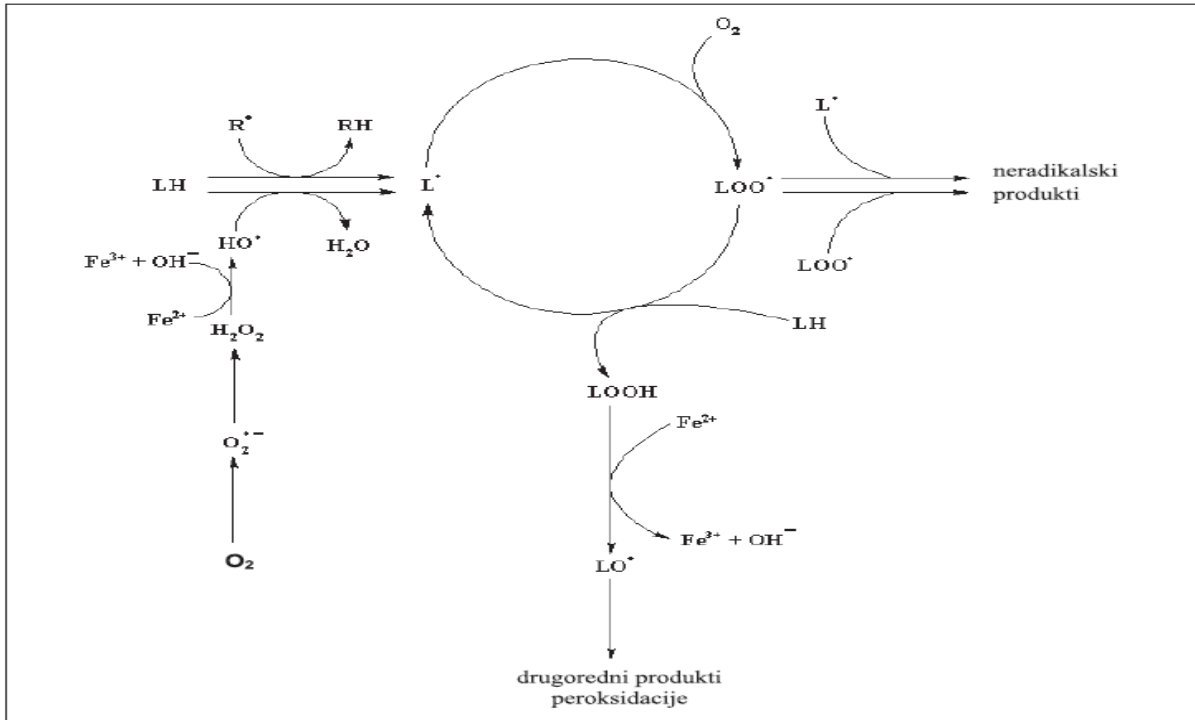
2. 4. Lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija rezultira promjenom ili oštećenjem lipidne molekulske strukture. Budući da su oštećeni lipidi sastavni dio bioloških membrana, nastupaju poremećaji strukturne organizacije i uređenja lipidnog dvosloja.³⁰

Polinezasićene masne kiseline (PUFA) izvrsne su ciljane molekule za napad slobodnih radikala zbog mnogostrukih nezasićenih dvostrukih veza. Ova vrsta oksidacije neophodna je za stvaranje ateroskleroznih plakova.³¹

Lipidnu peroksidaciju najčešće uzrokuje hidroksilni radikal (OH^\bullet), međutim i pojedini drugi radikali mogu pokrenuti proces peroksidacije. Proces lipidne peroksidacije odvija se u tri stupnja: inicijacija, propagacija i terminacija. U lipidnim sustavima početak peroksidacijskoga niza (inicijacija) odnosi se na napad reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) čija je sposobnost izdvajanje atoma vodika iz metilenske skupine. Tako iz PUFA-e nastaju slobodni lipidni radikali. Slobodni radikali koji mogu oksidirati PUFA-u su OH^\bullet , HO_2^\bullet , RO^\bullet , te RO_2^\bullet , a superoksidni je radikal nedovoljno reaktivan za eliminaciju vodika. Ugljikovi radikali nastoje se stabilizirati reorganizacijom molekula, oblikujući konjugirane diene. U aerobnim uvjetima konjugirani dieni mogu se spajati s O_2 , te stvarati peroksidne radikale LOO^\bullet koji dalje mogu eliminirati H^\bullet iz druge organske molekule, uključujući PUFA-u, pri čemu dolazi do oblikovanja lipidnih hidroperoksida te reaktivnih ugljikovih radikala te time nastavljaju reakciju slobodno radikalnim mehanizmom (faza propagacije). Tijekom propagacije LOOH u prisutnosti željeza disocira do LO^\bullet i LOO^\bullet koji dovode do reinicijacije peroksidacije. Lipidnu peroksidaciju katalizira hem i nehem željezo. Disocijacijom LOOH -a dolazi do nakupljanja kratkolančanih konačnih produkata peroksidacije – od aldehida, ketona, ugljikovodika (etana, etena, pentana), epoksida, do aktivnih radikala.³² Hem je molekula koja sadržava željezo i porfirinski prsten (protoporfirin IX). Veže se s proteinima kao prostetička skupina, tvoreći hemoproteine. Četiri dušikova atoma, porfirina kao kelat vežu ion željeza (Fe^{2+}). To željezo reverzibilno veže kisik u hemoglobinu i mioglobinu. Hem željezo nalazi se u hrani životinjskog podrijetla poput crvenog mesa, peradi, iznutrica, školjki i riba. Nehem željezo odnosno Fe^{3+} nalazi se u namirnicama biljnog podrijetla. Željezo u hrani životinjskog porijekla dobro se apsorbira, a u hrani biljnog porijekla apsorbira se dvostruko slabije. Da bi se željezo uopće moglo apsorbirati u organizmu, ono se mora iz svog prvotnog trovalentnog oblika reducirati u dvovalentni oblik. Apsorpciju nehem željeza inhibiraju polifenoli (u

žitaricama, bilju), tanini (u čaju i kavi), kalcij i biljni proteini (u soji i lješnjacima). Apsorpciju općenito pospješuje vitamin C (u voću i povrću) i organske kiseline.



Slika 6. Pregled lipidne peroksidacije³²

Lipidna peroksidacija rezultira promjenom ili oštećenjem lipidne molekularne strukture. U biološkim membranama dovodi do gubitka fluidnosti, opadanja vrijednosti membranskoga potencijala, povećanja permeabilnosti prema H^+ i drugim ionima te do moguće puknuće stanice i otpuštanja njena sadržaja. Sprječavanje lipidne peroksidacije je osnovni proces u aerobnim organizmima jer lipidna peroksidacija može uzrokovati oštećenje DNA.

Lipidna peroksidacija glavni je izvor citotoksičnih produkata poput aldehida koji nastaju raspadanjem lipidnih hidroperoksida. Nastali aldehidi su biološki aktivni, odnosno citotoksični, te mogu dovesti do stvaranja unakrsnih veza proteina što dovodi do inaktivacije mnogih sastavnih dijelova stanice, uključujući membrane i enzime. Kao zaštitu od potencijalne citotoksičnosti stanice su razvile mehanizme uklanjanja ovih aldehida.³²

Salvamani i suradnici istražili su da kvercetin smanjuje krvni tlak pojačanjem aktivnosti endotelne NO kinaze i smanjenjem NADPH-oksidaza-ovisne produkcije superoksida.

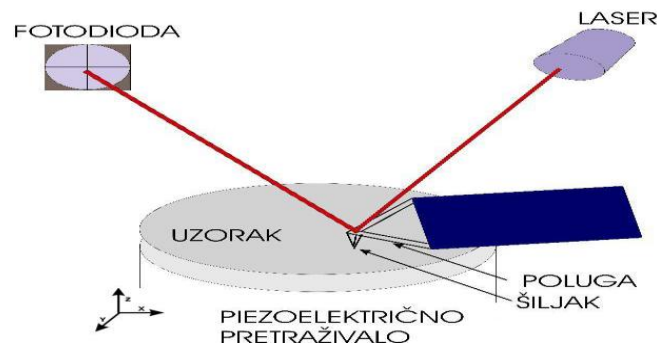
Također, kvercetin pozitivno utječe na dislipidemiju, smanjuje oksidativni stres stimulacijom aktivnosti lipolize te povećava ekspresiju adipocitnih gena, čime se poboljšava lipidna beta oksidacija. Terapija kvercetinom kod pretilih animalnih modela dovela je do smanjenja tjelesne mase i smanjenja akumulacije masnoća u jetri. Naime, kvercetin usporava razvoj aterosklerotskih lezija kod LDL-receptor deficijernih miševa poboljšanjem rezistencije LDL-a na oksidativne modifikacije čime značajno smanjuje veličinu aterosklerotskih lezija. Pozitivni učinci kvercetina upućuju na njegov potencijal kao alternativne terapije u aterosklerozi, hipertenziji i pretilosti.³³

Dokazano je da miricetin potiskuje dobivanje tjelesne mase i akumulaciju tjelesnih masnoća povećavajući oksidaciju masnih kiselina kod štakora s hiperlipidemijom, odnosno posjeduje hipolipemično svojstvo. Također, dokazano je da ima protektivni učinak na oksidaciju LDL-a u krvi, potaknutu metalnim ionima i slobodnim radikalima.³³

2. 5. Mjerne tehnike

2. 5. 1. Mikroskopija atomskih sila

Mikroskopija atomskih sila (engl. *Atomic Force Microscopy*, AFM) je tehnika koja omogućava određivanje strukture površine uzorka s visokom rezolucijom te daje informacije o topografiji površine uzorka.³⁴ Mikroskop atomskih sila pretražuje površinu uzorka pomoću oštrog šiljka. Pomak poluge proporcionalan je sili koja djeluje između šiljka i uzorka. Optički sustav koji se sastoji od laserske diode i pozicijski osjetljive diode prati otklon poluge i interakcijske sile koje ovise o udaljenosti šiljka i površine uzorka. Za vrijeme snimanja uzorak se nalazi na piezoelektričnom pretraživaču s povratnom spregom koja omogućuje precizno pozicioniranje uzorka. Opisani princip odgovara kontaktnom režimu oslikavanja (*contact mode*) u kojem je šiljak u stalnom kontaktu s uzorkom.



Slika 7. Shematski prikaz principa rada AFM-a³⁵

Kontaktni režim rada nije uvijek najpogodniji pa se koristi i tapkajući režim rada (*tapping mode*). Nekontaktni režim rada osigurava mjerenje topografije uzorka bez kontakta (ili s vrlo malo kontakta) između vrha i uzorka što predstavlja prednost pri proučavanju mekih uzoraka kao što su stanice.

Atomske sile koje se javljaju između vrška i uzorka su 10^{-6} - 10^{-10} N, a to su van der Waalsove sile, sile adhezije, kohezijske sile, elektrostatske sile itd.³⁶

Metoda AFM-a je vrlo korisna za istraživanje membrane jer je za snimanje potrebna mala količina uzorka, moguće je trodimenzijsko oslikavanje i snimanje u vodenom mediju te ima vertikalnu rezoluciju od 0,1 nm. AFM metoda je uvrštena kao glavno oruđe u karakterizaciji površina spojeva, primjerice kod mikrodomena i modelnih membrana. Istraživanje interakcija raznih molekula s lipidnim dvoslojem, proučavanje faznih prijelaza i detekcija temperature faznog prijelaza samo su neke od primjene AFM metode.³⁶

2. 5. 2. Infracrvena spektroskopija

Infracrvena (IR) spektroskopija je analitička tehnika koja proučava interakcije molekula i elektromagnetskoga zračenja u rasponu od 12800cm^{-1} do 10 cm^{-1} . IR zračenjem pobuđuju se prijelazi među vibracijskim stanjima molekula, a prijelaz se zabilježava kao signal u IR spektru ukoliko se tijekom vibracije skupine atoma u molekuli mijenja dipolni moment. Osnovne vibracije molekula obuhvaćaju vibracije istežanja i deformacije. Vibracije istežanja karakteristične su za promjenu duljine veze između dva atoma, a dijele se na simetrično i antisimetrično istežanje. Deformacijske vibracije posljedica su promjene kuta između dviju veza te se dijele na deformacije u ravnini i izvan ravnine.³⁷

IR apsorpcijski spektri sadrže veliki broj maksimuma i minimuma čak i za vrlo jednostavne spojeve. Maksimumi pomoću kojih se prepoznaju funkcionalne skupine nalaze se u području manjih valnih duljina IR područja (od 2,5 do 8,5 mikrometara). Za kompletnu identifikaciju potrebne su baze spektara. Područje srednjeg IR spektra dijeli se na 2 dijela:

- 1.) 4000cm^{-1} - 2000 cm^{-1} – grupne frekvencije, posljedica istežanja
- 2.) Ispod 2000cm^{-1} tj. 1500 cm^{-1} – savijanje, područje otiska prsta³⁸

Izbor tehnike za pripremu uzorka kao i ćelije za snimanje spektra zavisi o agregatnom stanju ispitivanog uzorka. Priprema KBr-pastile je najjednostavnija tehnika pripreme krutog uzorka za snimanje spektra. Uzorak se dobro usitni u tarioniku ili elektromagnetskom vibratoru, pomiješa sa suhim kalijevim bromidom u homogenu smjesu i preša u hidrauličkoj preši u oblik pastile. Pastila se stavi u odgovarajući nosač spektrofotometra te potom snimi spektar te dobiveni spektar mora odgovarati analiziranoj supstanciji.

Prigušena totalna refleksija (*Attenuated Total Reflection*, ATR) tehnika je infracrvene spektroskopije koja se temelji na fenomenu totalne unutarnje refleksije. Refleksijski elementi nužni za izvedbu ATR spektroskopije većinom su kristali visokog indeksa loma i slabe topljivosti u vodi koji ne apsorbiraju IR zračenje. Najčešće korišteni ATR elementi su cinkov selenid (ZnSe), germanij (Ge), dijamant i talijev jodid (TII). Metoda je nedestruktivna i zahtjeva minimalnu pripravu uzoraka.³⁷

2. 5. 3. Dinamičko raspršenje svjetlosti i elektroforetsko raspršenje svjetlosti

DLS je tehnika koja se temelji na apsorpciji i raspršenju elektromagnetskog zračenja. Do raspršenja zračenja dolazi samo u heterogenim sustavima, zbog razlike u optičkim svojstvima između dispergiranih čestica i medija u kojem se one nalaze.³⁹ Čestice suspendirane u mediju se neprestano gibaju tzv. Brownovim gibanjem. Brownovo gibanje je nasumično gibanje čestica do kojeg dolazi zbog sudaranja s molekulama otapala.⁴⁰ Što je čestica veća, to je njeno gibanje sporije. DLS mjeri brzinu Brownovog gibanja i povezuje ju s veličinom čestice u suspenziji.

Vrijednost difuzijskog koeficijenta ovisi o veličini čestice, ionskoj jakosti medija, vrsti prisutnih iona, strukturi površine i o obliku čestice. Ionska jakost medija i vrsta iona utječu na brzinu difuzije čestice tako da mijenjaju debljinu električkog međupovršinskog sloja. Bilo koja promjena površine čestice koja utječe na brzinu difuzije rezultirat će promjenom hidrodinamičkog promjera. Hidrodinamički promjer čestice koja nema oblik sfere jednak je promjeru sfere koja ima jednaku translacijsku difuzijsku brzinu kao istraživana čestica. Ako se oblik čestice promijeni tako da mijenja brzinu difuzije, tada će se promijeniti i hidrodinamički promjer.⁴⁰

Postoje tri teorije kojima se opisuje raspršenje svjetlosti: Rayleighova aproksimacija, Mieova i Rayleigh–Gans–Debye teorija. Rayleighova aproksimacija vrijedi za čestice koje su u usporedbi s valnom duljinom lasera male $\left(d = \frac{\lambda}{10}\right)$ i pokazuje da je $I \sim d^6$ i $I \sim \frac{1}{\lambda^4}$, gdje je I intenzitet raspršenog zračenja, d promjer čestice, a λ valna duljina lasera. Rayleigh–Gans–Debye teorija primjenjuje se za nešto veće čestice koje imaju mali relativni indeks loma svjetlosti te omogućuje transformaciju izmjerene raspodjele veličine po intenzitetu u raspodjelu po volumenu. Mieova teorija primjenjuje se za čestice čija je veličina približno jednaka valnoj duljini lasera ($d \approx \lambda$).⁴¹

Primarne informacije dobivene DLS-om izražene su kao raspodjela veličine po intenzitetu. Ako raspodjela veličine po intenzitetu daje više pikova ili je asimetrična, općenito vrijedi: $d(\text{intenzitet}) > d(\text{volumen}) > d(\text{broj})$.⁴⁰

Kako bi se procijenila kvaliteta rada DLS instrumenta, koriste se standardne suspenzije čestica određene veličine. Standardi imaju različite raspodjele, istaknute kao „uske“ i „široke“.

Suspenzije polistirenskog lateksa i zrnca stakla raznih veličina vrlo često se koriste kao standardi, s obzirom na to da su te čestice stabilne u vodenim suspenzijama. Standardne čestice su sferične te se koriste i u elektronskoj mikroskopiji.⁴⁰

Zeta potencijal ne može se direktno izmjeriti, već se određuje mjerenjem elektroforetske pokretljivosti. Elektroforetska pokretljivost je kretanje nabijene čestice pod utjecajem električnog polja prema elektrodi suprotnog naboja. Zeta potencijal može se izračunati pomoću Henryeve jednadžbe:

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta f(K_a)}{3\eta} \quad (1)$$

gdje je ζ zeta potencijal, U_E elektroforetska pokretljivost, ε permitivnost otapala, η viskoznost, a $f(K_a)$ Henryeva funkcija. K_a je omjer promjera čestice i debljine električkog međupovršinskog sloja (Debyeva duljina). Za Henryevu funkciju obično se koriste dvije aproksimacije: aproksimacija Smoluchowskog, koja se koristi za čestice veće od 0,2 μm i čestice suspendirane u elektrolitu čija je množina veća od 10^{-3} mola, a vrijednost funkcije iznosi 1,5, te aproksimacija Hückela koja se koristi za male čestice ili mjerenja koja se provode u nevodenim otapalima, a vrijednost funkcija iznosi 1,0.⁴⁴

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3. 1. Materijali

Kemikalije korištene tijekom izrade završnog rada bile su 1,2-*sn*-dimiristoil-glicero-3-fosfokolin (DMPC), 99 %-tne čistoće, kupljen od Sigma Aldrich tvrtke. Flavonoidi miricetin i miricitrin kupljeni su od tvrtke Extrasynthese, Genay, Francete fosfatni pufer (PBS, engl. *Phosphate Buffer Salt*, pH 7,4) kupljen od Sigma Aldrich tvrtke. Za pripravu liposoma DMPC-a i MCE koristio se kloroform (CHCl_3), a za liposome DMPC-a i MCI se uz CHCl_3 koristio i metanol (CH_3OH).

3. 2. Priprema uzoraka

3. 2. 1. IR spektroskopija disperzija DMPC, DMPC+MCE, DMPC+MCI

Za pripremu disperzija DMPC-a koristilo se oko 20 mg DMPC-a s određenim masama MCE, odnosno MCI. Prema odvagama danima u Tablici 1 određeni su množinski omjeri DMPC i MCE, odnosno DMPC i MCI.

Tablica 2. Priprema disperzija DMPC-a s MCE i MCI

Uzorak	MCE + DMPC		MCI+ DMPC	
	$m[(\text{DMPC})]/(\text{MCE})/\text{mg}$	$n(\text{DMPC}) : n(\text{MCE})$	$m[(\text{DMPC})]/(\text{MCI})/\text{mg}$	$n(\text{DMPC}) : n(\text{MCI})$
1	22,28 / 2,30	1 : 0,21	20,00 / 2,56	1 : 0,20

Smjesa DMPC i MCE otopljena je u 1 ml CHCl_3 , a smjesa DMPC i MCI otopljena je u 1 ml CHCl_3 uz dodatak određenog volumena CH_3OH koji je iznosio 100 i 200 μl . Da bismo dobili filmove DMPC-a s MCE, odnosno MCI iz reakcijske tikvice pripremljene za disperziju, prije uparavanja odvoji se alikvot od 200 μl koji se potom nanese na HATR-prozor od ZnSe te se stavi u eksikator na 2 sata i pusti CHCl_3 da ispari. Za dobivanje liposoma DMPC i flavonola iz preostale smjese, otapalo je upareno na rotacijskom evaporatoru *Rotavapor R-210*. Nakon uparavanja, tikvica s uzorkom ostavljena je u eksikatoru na ~ 2 sata. Pri završetku sušenja, u tikvicu s uzorkom dodaje se PBS, i to u onoj količini koja je dostatna za otapanje uzorka. Sastojci u tikvici su se intenzivno miješali na vrtložnoj (engl. *vortex*) miješalici te se tikvica uranjala u vruću vodu na otprilike minute, a zatim u hladnu.

3. 2. 2. IR spektroskopija filmova DMPC, DMPC+MCE, DMPC+MCI

Filmovi DMPC+MCE i DMPC+MCI pripremljeni su na prozoru ZnSe. Nakon sušenja prozor se stavlja u nosač IR spektrometra, poklopi se i snima pri temperaturi 22 °C. Pri završetku snimanja suhog filma, poklopac se makne, prozor ostaje na nosaču kako bi se što manje utjecalo na uzorak raznim vanjskim uvjetima te se hidratizira s 200 µl PBS-a. Postupak snimanja hidratiziranog filma isti je kao i za suhi film.

3. 2. 3. Priprema uzoraka za AFM oslikavanja¹

DMPC s MCE-om, odnosno MCI-om u odnosu 1:0,3 otopljen je u kloroformu te u kloroformu i metanolu kada se liposom priprema s MCI-om. Otapalo je uklonjeno pomoću rotacijskog evaporatora te potom se dobiveni film dispergira u PBS-u. Dobivena disperzija s ugrađenim flavonolima nanijeta je na ravnu i čistu površinu tinjca koji je prethodno fiksiran na metalnu pločicu. Na površini tinjca dolazi do fuzije liposoma te tako nastaje lipidni dvosloj na čvrstoj podlozi.

3. 2. 4. Priprema uzoraka za mjerenje zeta potencijala

Disperzije liposoma pripremljene za formiranje lipidnog dvosloja na čvrstoj podlozi prethodno su izmjerene na 25 °C dinamičkim raspršenjem svjetlosti te je izmjeren zeta potencijal pripremljenih liposoma.

3. 3. Mjerni uređaji

3. 3. 1. IR spektroskopija

IR spektri disperzija DMPC-a snimljeni su pomoću IR-spektrometra *ABB Bomem MB102* opremljenim optikom od CsI i DTGS detektorom.

Ćelija s disperzijom smještena je u metalni plašt, hlađen vodom, čija se temperatura regulira Specac 3000 Series visokotemperaturnim kontrolerom. Disperzije su snimane u

transmisiji u temperaturnom području od 15 °C do 30 °C uz brzinu zagrijavanja uzorka od 1°C min⁻¹. Nakon postignute željene temperature, uzorak se stabilizirao 5 minuta pri toj temperaturi te se onda snimao spektar. Uzorci su snimani u ćeliji s prozorima od CaF₂ debljine $d=25 \mu\text{m}$. Nominalna rezolucija pri kojoj su snimljeni spektri iznosila je 2 cm⁻¹, a broj ponavljajućih sekvenci bio je 20.

Filmovi DMPC-a te smjesa DMPC-a i MCE odnosno MCI snimani su na HATR-prozoru od ZnSe pri nominalnoj rezoluciji od 2 cm⁻¹, a broj skenova iznosio je 128. Temperatura snimanja iznosila je 22 °C. Filmovi su snimani kao suhi i kao hidratizirani PBS-om.

3. 3. 2. AFM oslikavanje

AFM oslikavanje dvosloja DMPC-a s ugrađenim flavonolima provedeno je na zraku pri temperaturi 25 °C na mikroskopu sa skenirajućom probom MultiMode s Nanoscope IIIa kontrolerom (proizvođača Bruker) i s vertikalnim 125 μm pretraživalom. Kako bi se postigla što manja sila interakcije između probe i površine tokom oslikavanja u tapkajućem načinu rada, omjer postavljene i slobodne amplitude vibriranja iznosio je 0,8-0,9. Linearna brzina oslikavanja bila je 1,0 Hz s rezolucijom od 512 točaka po liniji.

3. 3. 3. Mjerenje zeta potencijala

Zeta potencijal (ζ) DMPC liposoma dopiranih s MCI i MCE mjereni su pomoću Zetasizer Nano ZS (Malvern, Velika Britanija) opremljen s zelenim laserom valne duljine 532 nm uz korištenje M3-PALS tehnike.

3. 4. Obrada spektara i analiza podataka

3. 4. 1. IR spektri disperzija u transmisiji

IR spektri obrađeni su programima Origin Pro7 i SpekWin32. Da bi se što točnije odredila T_m analizira se spektralno područje od 3050 cm⁻¹ do 2400 cm⁻¹. To je područje u kojem se vide vrpce simetričnog istezanja metilenske skupine ($\lambda=2850\text{cm}^{-1}$) i vrpce

antisimetričnog istežanja metilenske skupine ($\lambda=2920\text{ cm}^{-1}$) koje su najbolji pokazatelji faznog prijelaza. Bazna linija analiziranog područja zahtijeva dodatnu korekciju i tako da se izrežu dijelovi spektra u kojima se nalaze vrpce simetričnog i antisimetričnog istežanja metilnih i metilenskih skupina ($\sim 2967\text{--}2753\text{ cm}^{-1}$). To omogućuje točnije određivanje maksimuma. Preostala krivulja se prilagodi polinomu 5. stupnja te se dobivena bazna linija oduzme od početnog spektra što rezultira korigiranim spektrom koji služi za daljnju analizu i iz kojeg su očitani valni brojevi maksimuma vrpce koje odgovaraju simetričnom istežanju metilenske skupine. Zatim se uzmu točke maksimuma i dvije točke prije i dvije nakon maksimuma te se kroz njih provuče krivulja drugog stupnja. Iz jednadžbe krivulje izračunaju se maksimumi te se izračunate vrijednosti dodaju prethodno očitanoj vrijednosti maksimuma vrpce simetričnog istežanja metilenske skupine. Pomoću dobivenih vrijednosti konstruiraju se grafovi ovisnosti valnog broja o temperaturi. Podaci se još dodatno interpoliraju i deriviraju te se iz maksimuma derivacije očita T_m .

3. 4. 2. IR spektri filmova: HATR

HATR-spektri obrađeni su pomoću programa Origin Pro7. Kod ovih spektara analizira se spektralno područje od 1720 cm^{-1} do 800 cm^{-1} . U spektralnom području od 4000 cm^{-1} do 1720 cm^{-1} nisu vidljive razlike između samih flavonola čak i kada su oni u interakciji s DMPC-om te zbog toga taj dio spektra nije uzet u obzir tijekom analize spektara.

3. 4. 3. Analiza podataka dobivenih AFM mjerenjem

Za obradu i analizu slika korišten je NanoScope TM program. Za analizu se koristila površina dvosloja od $5 \times 5\ \mu\text{m}^2$, a rezultati su prikazani kao 2D i 3D topografske slike.

3. 4. 4. Analiza podataka dobivenih mjerenjem zeta potencijala

Podaci su obrađeni Zetasizer softverom 6.32. Potencijal je izračunat iz izmjerene elektroforetske pokretljivosti pomoću Henryjeve jednadžbe koristeći Smoluchowski aproksimacijom ($f(Ka) = 1.5$).

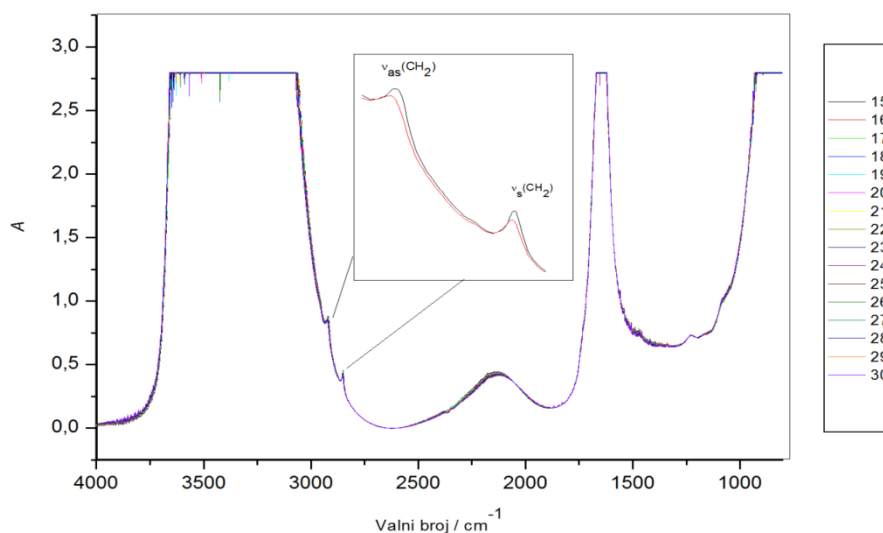
4. REZULTATI I RASPRAVA

4. 1. IR spektroskopija

IR spektroskopijom odredit će se T_m samog DMPC-a te kada su u njega ugrađeni flavonoli MCE, odnosno MCI. Nastojati će se razjasniti koje funkcionalne skupine međusobno ostvaruju interakcije kod ugradnje flavonola. Temperaturno ovisna transmisijska mjerenja liposoma samog DMPC-a, te DMPC+MCE i DMPC+MCI u određenim količinama MCE-a odnosno MCI-a koriste se za određivanje T_m . Refleksijskim mjerenjima dobivene su informacije o promjenama u pojedinim signalima koje su nastale uslijed ugradnje MCE-a, odnosno MCI-a u DMPC.

4. 1. 1. Analiza spektara disperzije DMPC-a

IR-spektar DMPC-a u temperaturnom intervalu od 15 °C do 30 °C prikazan je na Slici 8. Proučavana su 2 maksimuma pri valnim brojevima koja su karakteristična za simetrično i antisimetrično istežanje CH_2 skupina, a to su oni pri $2850,6 \text{ cm}^{-1}$ i maksimum pri 2920 cm^{-1} . Povišenjem temperature ti maksimumi pomiču se prema višim valnim brojevima, odnosno prema manjim valnim duljinama. Vrpce simetričnog ($2850,6 \text{ cm}^{-1}$, odnosno $2851,5 \text{ cm}^{-1}$) i antisimetričnog istežanja CH_2 skupine (2920 cm^{-1} , odnosno $2922,9 \text{ cm}^{-1}$) prikazane su uvećano kako bi bio uočljiviji pomak maksimuma vrpce.



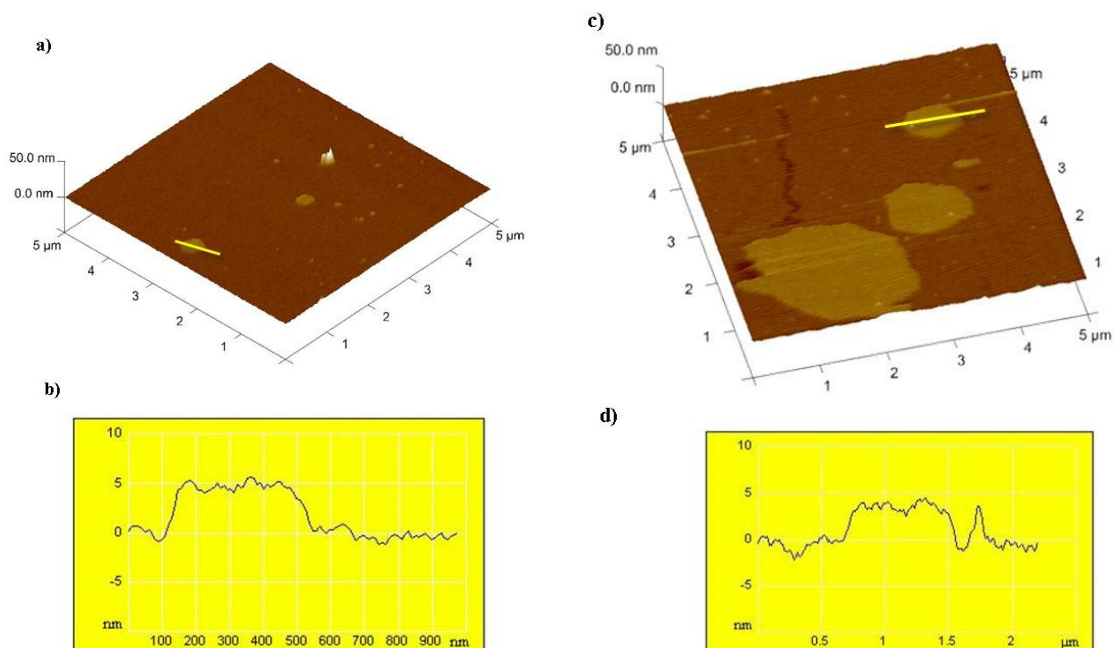
Slika 8. IR spektri DMPC-a u temperaturnom intervalu od 15 °C do 30 °C.

S porastom temperature dolazi do pomicanja vrpce prema višim valnim brojevima. Pomak vrpce u maksimumima za antisimetrično istežanje je od 2920 cm^{-1} do $2925,8\text{ cm}^{-1}$, a za simetrično istežanje od $2850,6\text{ cm}^{-1}$ do $2853,5\text{ cm}^{-1}$.

Temperatura faznog prijelaza u IR spektrima DMPC-a očituje se kao pomak u valnom broju vrpce koje odgovaraju metilenskim skupinama DMPC-a. Budući da je do pomaka došlo jedino u slučaju simetričnog i antisimetričnog istežanja CH_2 skupina te su vrpce pogodne za određivanje T_m . S obzirom da kod vrpce antisimetričnog istežanja CH_2 skupine dolazi do preklapanja s vrpcom O–H istežanja vode te je otežano očitovanje maksimuma, za određivanje temperature faznog prijelaza pogodnija je vrpca simetričnog istežanja CH_2 skupine. Zbog tih razloga temperatura faznog prijelaza se u ovom slučaju određuje iz maksimuma vrpce simetričnog istežanja CH_2 skupine.

4. 1. 2. Rezultati oslikavanjem mikroskopijom atomskih sila u istraživanju ugradnje MCE-a i MCI-a u dvosloj DMPC-a

Ugradnju flavonola u DMPC moguće je potvrditi istraživanjem topografije površine. Na Slici 9 prikazani su lipidni dvosloji s ugrađenim MCE-om, odnosno MCI-om. Iz profila presjeka duž naznačene linije uočavaju se domene MCE iznad površine lipidnog dvosloja. Vizualizacija lipidne membrane s flavonolima ukazuje da oni formiraju domene unutar lipidnog dvosloja. Za MCE srednja vrijednost visine iznad lipidnog dvosloja iznosi $4,9 \pm 0,2$ nm. Za MCI ta vrijednost iznosi $5,3 \pm 0,2$ nm ukazujući da se MCE zbog veće hidrofobnosti od MCI dublje ugrađuje u sam dvosloj, dok MCI zaostaje više na hidrofilnoj površini modelne membrane.



Slika 9. Rezultati AFM oslikavanja. Trodimenzionalni topografski prikaz (*surface plot*) MCE-a (a) i MCI-a (c), te visina nakupina MCE-a (b) i MCI (d) u membrani duž presjeka naznačenog crnom linijom na dvodimenzionalnom topografskom prikazu veličine $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ s vertikalnom skalom od 15 nm.

Na temelju slike vidljive su nakupine flavonola u membrani te time je dokazana njihova ugradnja u istu. Smeđom bojom označene su membrane, dok su žuto obojani flavonoli koji izlaze iz membrane.

Dobiveni rezultati pomoću AFM-a su u skladu s rezultatima dobivenima pomoću IR. Time se pokazalo da dolazi do ugradnje flavonola MCE-a i MCI-a u lipidni dvosloj. U slučaju MCE-a ugradnja je značajnija jer ulazi dublje u lipidni dvosloj, dok je u slučaju MCI-a uočeno zaostajanje na hidrofilnoj površini dvosloja.

4. 1. 3. Izmjereni zeta potencijal DMPC liposoma s ugrađenim flavonoidima

Tablica 3. Izmjereni zeta potencijal DMPC liposoma s ugrađenim flavonoidima

liposom	n(DMPC) : n(flavonoidi)	ζ /mV
DMPC	1:0	-9,2±0,8
DMPC_MCE	1:0,21	-11,3±0,9
DMPC_MCI	1:0,20	-8,2±0,5

Mjerenje zeta-potencijala za liposome s i bez MCE i MCI u PBS-u na sobnoj temperaturi, pokazuje da nakon dodavanja MCE i MCI u DMPC, zeta potencijal samog DMPC liposoma ($\zeta = -9,2 \pm 0,8\text{mV}$) bitno se mijenja na više negativne vrijednosti u slučaju MCE. Dakle, doprinos MCE odražava se u povećanju liposoma zeta potencijala s više pozitivnih $\zeta = -9,2 \pm 0,8\text{mV}$ do više negativnih $\zeta = -11,3 \pm 0,6 \text{ mV}$ (DMPC_MCE) ili MCI od $\zeta = -8,2 \pm 0,5\text{mV}$ (DMPC_MCI). Razlika je u zeta potencijal vrijednosti $\Delta\zeta = -2,1\text{mV}$ i $-1,0 \text{ mV}$ za MCE i MCI ugrađenih u liposome.

Tablica 4. Izmjerene T_m za DMPC+MCE, odnosno DMPC+MCI

	$T_m / ^\circ\text{C}$	
	DMPC+MCE	DMPC+MCI
x	Izmjerena	Izmjerena
0	23,5	23,5
0,2	20,5	21,5

Rezultati pokazuju da je promjena točke mekšanja lipidnih membrana uzrokovana ugradnjom flavonoida. Osim na temperaturu faznog prijelaza, flavonoidi utječu na razna svojstva lipidnih membrana kao što su njena permeabilnost i hemoliza.⁴³

5. ZAKLJUČAK

5. Zaključak

IR spektroskopijom određene su temperature faznog prijelaza DMPC-a u obliku multilamelarnih liposoma, a dodatnom analizom spektara filmova DMPC-a odredio se smještaj flavonola MCE-a i MCI-a u liposomu DMPC-a. MCE i MCI utječu na DMPC tako što mu snizuju T_m te se fazni prijelaz iz gel stanja u fluidno stanje za DMPC+flavonol događa pri nižim temperaturama u odnosu na sam DMPC. Temperature faznog prijelaza za DMPC+MCE redom od najmanje koncentracije MCE do najveće iznose: 20,5 °C, dok su za DMPC+MCI one: 21,5 °C. Na temelju samo tih rezultata ne može se sa sigurnošću zaključiti gdje se i u kojoj mjeri ugrađuju u DMPC te se s toga AFM mjerenjima tražila potvrda za ugradnju. AFM oslikavanjem pokazalo se da MCE zbog svoje hidrofobnosti ulazi dublje u lipidni dvosloj dok MCI zaostaje na hidrofilnoj površini dvosloja. Primjenom DLS tehnike odredili smo površinski naboj liposoma. Negativne vrijednosti upućuju na fizički stabilne disperzije liposoma.

Flavonoli MCE i MCI pokazuju značajna terapijska svojstva te bi se u budućnosti mogli koristiti u liječenju raznih bolesti, primjerice Parkinsonove bolesti, dijabetesa i dr. zbog čega su vrlo važna daljnja istraživanja njihovog utjecaja na modelne membrane, a što je još važnije na biološke membrane.

Popis simbola

AFM	mikroskopija atomskih sila (engl. <i>Atomic Force Microscopy</i>)
DLS	dinamičko raspršenje svjetlosti (engl. <i>Dynamic Light Scattering</i>)
IR	infracrvena spektroskopija (engl. <i>Infrared Spectroscopy</i>)
DPPC	1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfokolin (engl. <i>1,2 - dipalmitoyl - sn - glycerol - 3 - phosphocholine</i>)
PUFA	polinezasićene masne kiseline (engl. <i>Polyunsaturated Fatty Acid</i>)
LDL	lipoprotein niske gustoće (engl. <i>Low Density Lipoproteine</i>)
ROS	reaktivni kisikovi spojevi (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
ATR	prigušena totalna refleksija (engl. <i>attenuated total reflection</i>)
PBS	fosfatni pufer (engl. <i>Phosphate Buffer Salt</i>)
MCI	miricitrin (engl. <i>myricitrin</i>)
MCE	miricetin (engl. <i>myricetin</i>)
DMPC	1,2- <i>sn</i> -dimiristoil-glicero-3-fosfokolin (engl. <i>1,2 - dimyristoyl - sn - glycerol - 3 - phosphocholine</i>)
HATR	apsorpcijsko-refleksijska spektroskopija na horizontalnoj površini (engl. <i>Horizontal Attenuated Total Reflection</i>)
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (engl. <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>)
PTK	protein-tirozin kinazu (engl. <i>protein - tyrosine kinase</i>)

6. LITERATURA

6. Literatura

- [1] Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer, *Biokemija* 1.hrvatsko izd., Školska knjiga, Zagreb, 2013.
- [2] <https://www.fkit.unizg.hr/download/repository/3.Biomembrane%5B3%5D.pdf> (pristup 13.05.2016)
- [3] T. Heimburg, *Thermal Biophysics of Membranes*, Wiley-VCH, Berlin, 2007.
- [4] D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry* 5. izd. Worth Publishers, New York, 2008.
- [5] Robert K. Murray, David A. Bender, Kathleen M. Botham, Petar J. Kennelly, Victor W. Rodwell, P. Anthony Weil, *Harperova ilustrirana biokemija* 28. izd., Medicinska naklada, Zagreb, 2011.
- [6] https://en.wikipedia.org/wiki/Lipid_bilayer (pristup 15.05.2016.)
- [7] A. Buretić-Tomljanović, *Medicina Fluminensis* 50 (2014.) 391–413
- [8] <http://themedicalbiochemistrypage.org/sphingolipids.php> (pristup 19.05.2016.)
- [9] M. Cooper, Robert E. Hausman, *Stanica, Molekularni pristup* 5. izd Medicinska naklada, Zagreb, 2010.
- [10] Peter Karlson, *Biokemija za studente kemije i medicine*, Školska knjiga, Zagreb, 1993.
- [11] Kumar, S., Pandey, A.K., *Chemistry and Biological Activities of Flavonoids*, The Scientific World Journal (2013.), 1-16
- [12] Cesar G. Fraga, *Plant Phenolics and human health*, Wiley, New York, 2009.
- [13] Anna K. Jäger, Lasse Saaby, *Flavonoids and CNS*, *Molecules*, 1471-1485 (2011.)
- [14] A. Kozłowska, D. Szostak-Węgierek, *Rocz. Panstw. Zakł. Hig.* 65 (2014) 79–85
- [15] Kazazić, S.P., *Antioksidacijska i antiradikalna aktivnost flavonoida*, *Arh Hig Rada Toksikol* 55, 279-290 (2004.)

- [16] T. Yan, Z. Xiao-Mian, W. Shu-Jun, Y. Yang, C. Ying-Lin, *Arch. Pharm. Res* 32 (2009) 527–533
- [17] Y. Lin, B. Wu, Z. Li, T. Hong, M. Chen, Y. Tan, J. Jiang i C. Huang, *Chromatographia* 75 (2012) 655–660 1
- [18] S. Willoughby, A. Holmes, J. Losalzo, *Eur. J. Cardiovasc. Nurs* 1 (2002) 273–288
- [19] G. Di Carlo, N. Mascolo, A. A. Izzo i F. Capasso, *Life Sci* 65 (1999) 337–353
- [20] R. Edenharder i D. Grünhage, *Mutat. Res* 540 (2003) 1–18
- [21] S. Tarahovsky, Y. A. Kim, E. A. Yagolnik i E. N. Muzafarov, *Biochim. Biophys. Acta* 1838 (2014) 1235–1246
- [22] M. Arczewska, D. M. Kamiński, E. Górecka, D. Pocięcha, E. Rój, A. Sławińska-Brych, M. Gagoś, *Biochim. Biophys. Acta* 1828 (2013) 213–222
- [23] Merz Demlow, B.E., Duncan, A.M., Wangen, K.E., Xu, X., Carr, T.P., Phipps, W.R., Kurzer, M.S., *Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic, premenopausal women*. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71 (2000.) 1462–1469
- [24] Lamartiniere, C.A., *Protection against breast cancer with genistein: a component of soy*. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71(2000) 1705-1707.
- [25] B. Pawlikowska-Pawłęga, H. Dziubińska, E. Król, K. Trębacz, A. Jarosz-Wilkołazka, R. Paduch, A. Gawron, W. I. Gruszecki, *Biochim. Biophys. Acta* 1838 (2014) 254–265
- [26] B. Pawlikowska-Pawłęga, L. E. Misiak, B. Zarzyka, R. Paduch, A. Gawron, W. I. Gruszecki, *Biochim. Biophys. Acta* 1828 (2013) 518–527
- [27] B. Pawlikowska-Pawłęga, L. E. Misiak, B. Zarzyka, R. Paduch, A. Gawron, W. I. Gruszecki, *Biochim. Biophys. Acta* 1818 (2012) 1785–1793
- [28] B. Pawlikowska-Pawłęga, W. I. Gruszecki, L. Misiak, R. Paduch, T. Piersiak, B. Zarzyka, J. Pawelec, A. Gawron, *Biochim. Biophys. Acta* 1768 (2007) 2195–2204
- [29] K. Cieślik-Boczula, J. Maniewska, G. Gryniewicz, W. Szeja, A. Koll, A. B. Hendrich, *Vib. Spec.* 62 (2012) 64–69
- [30] Grinna L.S. *Age related changes in the lipids of the microsomal and the mitochondrial membranes of rat liver and kidney*, *Mech Ageing Dev.* 6 (1977.) 197-205
- [31] Nordberg J., Arner E.S., *Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system*, *Free Radic Biol Med.* 31, (2001) 1287-1312
- [32] Štefan L., Tepšić T., Zavidčić T., Urukalo M., Tota D., Domitrović R., *Lipidna peroksidacija – uzroci i posljedice*, *Medicina.* 43, (2007) 84-93
- [33] Salvamani S, Gunasekaran B, Shaharuddin NA, Ahmad SA, Shukor MY, *Antiatherosclerotic Effects of Plant Flavonoids*, *BioMed Res Int*, 2014.

- [34] E. I. Goksu, J. M. Vanegas, C. D. Blanchette, W. C. Lin i M. L. Longo, *Biochim. Biophys. Acta* 1788 (2009) 256 – 266
- [35] Svetličić V, Țutić V, Mišić T., *Mikroskopija atomskih sila*, Metode u molekularnoj biologiji, Institut Ruđer Bošković, (2007) 764-770
- [36] B. Seantier, M. C. Giocondi, C. Le Grimellec i P. E. Milhiet, *Curr. Opin. Colloid In.* 13 (2008) 326 – 337
- [37] B. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons, West Sussex, 2004.
- [38] https://www.fkit.unizg.hr/download/repository/2_predavanje_KIM-KM-2012-2013-Asperger_Danijela.pdf (pristup 09.06.2016.)
- [39] R. Finsy, *Adv. Colloid Interface Sci.* 52 (1994) 79–143.
- [40] M. Kaszuba, *Zetasizer nano series and HPPS training course*, Malvern, 2012.
- [41] P. A. Hassan, S. Rana, G. Verma, *Langmuir* 31 (2015) 3–12.
- [42] D. P. Kharakoz, *Biosci.Rep.* 21 (2001) 801–830
- [43] T. Heimburg i A. D. Jackson, *Biophys. J.* 92 (2007) 3159–3165
- [44] Zetasizer Nano Series, User Manual, Malvern Instruments Ltd, Worcestershier, UK, 2005.

7. ŽIVOTOPIS

7. Životopis

Lucija Mandić, rođena 9. lipnja 1993. godine u Splitu. Nakon završene Prve osnovne škole u Širokom Brijegu, pohađa srednju školu Fra gimnazija Dominika Mandića, smjer opća gimnazija, gdje je maturirala 2012. godine. Iste godine upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, smjer Kemija i inženjerstvo materijala. Nakon druge godine studija odrađuje praksu u trajanju od mjesec dana u INI – Industrija nafte u dva sektora, Laboratorij za korozijska ispitivanja i Laboratorij za karakterizaciju fluida i reologiju.