

Interakcija modelnih membrana s flavonoidima ugrađenim u magnetske nanočestice pod utjecajem vanjskog magnetskog polja

Mandić, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:060572>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-28**



FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Lucija Mandić

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2018. g.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Lucija Mandić

**INTERAKCIJA MODELNIH MEMBRANA S FLAVONOIDIMA UGRAĐENIH U
MAGNETSKE NANOČESTICE POD UTJECAJEM VANJSKOG MAGNETSKOG
POLJA**

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: izv. prof. dr. sc. Helena Otmačić Ćurković

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

Članovi ispitnog povjerenstva:

izv. prof. dr. sc. Helena Otmačić Ćurković
dr. sc. Suzana Šegota viši znanstveni suradnik IRB-a
prof. dr. sc. Emi Govorčin Bajsić

Zagreb, rujan 2018. g.

Zahvale

Zahvaljujem se svojim mentoricama dr. sc. Suzani Šegoti i izv. prof. 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, vremenu, susretljivosti, strpljenju, poticajima i savjetima koji su mi bili od neizmjerne važnosti pri izradi ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se kolegici Anji Sadžak na brojnim korisnim raspravama, druženjima, motivaciji i dobronamjernim sugestijama usmjerenim k podizanju znanstvene razine diplomskog rada.

Najviše se zahvaljujem mojim roditeljima i sestrama na bezuvjetnoj podršci, ljubavi i potpori tijekom školovanja.

Zahvaljujem se Ani Lovrić, bez koje ovaj period života ne bi bio zabavan i ispunjen lijepim i nezaboravnim trenucima. Hvala ti što si uvijek bila uz mene!

Zahvaljujem se ostatku obitelji, prijateljima i kolegama koji su na bilo koji način bili uz mene tijekom cijelog školovanja.

Ovaj rad izrađen je na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu, Zavod za fizičku kemiju, u Laboratoriju za biokoloide i površinsku kemiju, akademske godine 2017./2018. i financiran u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost IP-06-2016-8415 "Zaštitni mehanizmi i učinci flavonoida ugrađenih u nanonosače u modelnim membranama i neuronima", voditelj dr. sc. Suzana Šegota, pod neposrednim vodstvom dr. sc. Suzane Šegote, više znanstvene suradnice IRB-a

SAŽETAK RADA

U okviru ovog rada provedena je strukturna, morfološka i fizičko-kemijska karakterizacija magnetskih Fe₃O₄ mezoporoznih nanočestica sljedećim tehnikama: rendgenskom difrakcijom na polikristalnom uzorku (XRPD), pretražnom elektronskom mikroskopijom (SEM), Brunauer-Emmett-Teller (BET) analizom, UV/Vis spektrofotometrijom te infracrvenom spektroskopijom (FTIR).

Provedena su ispitivanja s tri strukturno različita flavonoida (kvercetin, miricetin i miricitrin) koji su ugrađeni u Fe₃O₄ nanočestice. Količina ugrađenih flavonoida u nanočestice određena je spektrofotometrijskim mjerenjima apsorbancije supernatanta pomoću UV/Vis spektrofotometra. Nakon ugradnje flavonoida u mezoporozne nanočestice, praćena je kinetika njihova otpuštanja iz nanočestica u ovisnosti o eksternoj stimulaciji, tj. pri normalnim uvjetima, pod utjecajem permanentnog i oscilirajućeg magnetskog polja. Promjena strukturnih i morfoloških svojstava modelnih membrana inducirana njihovom reakcijom s flavonoidima, otpuštanim iz nanočestica pri različitim eksternim uvjetima, prije i poslije induciranog oksidativnog stresa istražena je mikroskopijom atomskih sila (AFM). Učinkovitost ugrađenih flavonoida u zaštiti modelnih membrana od oksidativnog stresa te njihova zaštitna uloga potvrđena je metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS) te mjerenjima zeta potencijala.

Ključne riječi: kvercetin, miricetin, miricitrin, Fe₃O₄, liposomi, oksidacijski stres

SUMMARY

The structural, morphological and physico-chemical characterizations of mesoporous magnetic Fe₃O₄ nanoparticles were conducted within the framework of this research using several techniques: X-ray diffraction (XRPD), scanning electron microscopy (SEM), Brunauer-Emmett-Teller (BET) analysis, UV/Vis spectrophotometry and infrared spectroscopy (FTIR).

The research was performed using three different flavonoids (quercetin, myricetin and myricitrin) and incorporated in Fe₃O₄ nanoparticles. The quantity of incorporated flavonoids in nanoparticles was determined by spectrophotometric measurement of supernatant with UV/Vis spectrophotometer. After incorporation of flavonoid within nanoparticles, their release profiles were followed by during the experiment the focus was on releasing the flavonoids from the nanoparticles at the standard conditions and in permanent and oscillating magnetic field using UV/Vis spectrophotometry. Changing the structural and morphological properties of model membranes induced by their reaction with flavonoids, laid off from the nanoparticles in different extreme conditions, before and after induced oxidative stress was investigated by atomic force microscopy. The efficiency of embedded flavonoids in protecting of model membranes from oxidative stress and their protective role was confirmed by dynamic light scattering and zeta potential measurements.

Keywords: quercetin, myricetin, myricitrin, Fe₃O₄, liposomes, oxidative stress

Sadržaj

SAŽETAK RADA.....	i
SUMMARY	ii
1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Biološke membrane.....	3
2.2. Flavonoidi	7
2.2.1. <i>Kemijska struktura flavonoida i biološka uloga</i>	7
2.2.2. <i>Kvercetin, miricetin i miricitrin</i>	9
2.3. Lipidna peroksidacija.....	11
2.4. Nanomaterijali	12
2.4.1. <i>Nanočestice</i>	12
2.4.2. <i>Magnetska svojstva Fe₃O₄ nanočestica</i>	13
3. MJERNE TEHNIKE.....	14
3.1. Rendgenska difrakcija polikristalnog uzorka.....	14
3.2. Pretražna elektronska mikroskopija	15
3.3. Brunauer-Emmett-Teller (BET) analiza	16
3.4. Ultraljubičasta/vidljiva spektrofotometrija	17
3.5. Magnetska karakterizacija	18
3.6. Infracrvena spektroskopija.....	18
3.7. Dinamičko raspršenje svjetlosti.....	19
3.8. Zeta potencijal.....	20
3.9. Mikroskopija atomskih sila	21
4. EKSPERIMENTALNI DIO	22
4.1. Materijali	22
4.2. Sinteza magnetskih Fe ₃ O ₄ nanočestica	22
4.3. Karakterizacija magnetskih Fe ₃ O ₄ nanočestica.....	24
4.4. Ugradnja flavonoida u nanočestice	25

4.5.	Određivanje kinetike otpuštanja flavonoida iz mezoporoznih magnetskih Fe ₃ O ₄ nanočestica u vanjskom permanentnom i oscilirajućem magnetskom polju.....	26
4.6.	Priprava DOPC liposoma	27
4.7.	Ugradnja flavonoida u liposome.....	27
4.8.	Mjerenje zeta potencijala liposoma nakon otpuštanja flavonoida iz magnetskih nanočestica.....	27
4.9.	Priprava uzoraka za oslikavanje.....	28
4.9.1.	<i>Oslikavanje mikroskopom atomskih sila</i>	28
5.	REZULTATI I RASPRAVA	29
5.1.	Rendgenska difrakcija polikristalnog uzorka (XRPD).....	29
5.2.	Pretražna elektronska mikroskopija (SEM).....	30
5.3.	Brunauer-Emmett-Teller (BET) analiza	31
5.4.	Magnetska karakterizacija	32
5.5.	Ugradnje magnetitnih NČ flavonoidima	33
5.6.	Kinetika otpuštanja flavonoida iz magnetitnih NČ.....	38
5.7.	Infracrvena spektroskopija.....	42
5.8.	Dinamičko raspršenje svjetlosti i zeta potencijal.....	43
5.9.	Mikroskopija atomskih sila	46
6.	ZAKLJUČAK	53
7.	POPIS SIMBOLA I KRATICA	55
8.	LITERATURA.....	56

UVOD

1. UVOD

Flavonoidi su polifenolni spojevi biljnog porijekla koji posjeduju blagotvorne učinke na organizam sisavaca. Pronađeni su u voću, povrću, sjemenkama, cvijeću te pićima poput čaja, kave, piva i vina. Njihova značajna biološka aktivnost uključuje protuupalno, antivirusno, antialergijsko, antibakterijsko i antikancerogeno djelovanje na metabolizam sisavaca.^{1,2} Zbog značajnih djelotvornosti flavonoida, u ovom radu kvercetin, miricetin i miricitrin korišteni su kao modeli lijekova. Kvercetin postiže znatnu zaštitu neurona od oksidacijskog stresa kao i povećani stupanj njihove regeneracije.³ Miricetin posjeduje protutumorsko i protuupalno djelovanje s izrazitom sposobnošću uklanjanja radikala.⁴ Miricitrin posjeduje učinkovito antioksidacijsko, analgetičko i protuupalno djelovanje te se pokazalo da može zaštititi različite stanice od oštećenja kako *in vitro* tako *in vivo*.⁵ Međutim, uz brojne prednosti, flavonoidi imaju ograničenu primjenu zbog slabe topljivosti u vodi, tj. visoke hidrofobnosti i kemijske nestabilnosti pod fiziološkim uvjetima (temperatura, svjetlost, pH).⁶ Jedno od mogućih rješenja za isporuku djelotvorne količine slabo topljivih lijekova ili drugih biološki aktivnih molekula jest njihova ugradnja u nanočestice (NČ) kao nosače.^{7,8,9} Među različitim vrstama NČ, biokompatibilne NČ istaknule su se kao nanonosaci za ciljanu isporuku cjepiva, gena, lijekova i drugih bioaktivnih molekula.¹⁰ Za isporuku flavonoida, dosada su se s različitim uspjehom koristile kako organske (liposomi, dendrimeri, polimerne NČ i lipidne NČ) tako i anorganske NČ (zlatne, TiO₂). Sve istražene NČ pokazuju određene prednosti, ali i brojne nedostatke. U novije vrijeme, magnetske mezoporozne Fe₃O₄ NČ privlače pažnju kao gotovo idealni sustavi za isporuku biološki aktivnih molekula. Fe₃O₄ mezoporozne NČ koriste se kao efikasni nosači lijeka primjenom vanjskih stimulacija, tj. vanjskih magnetskih polja, bilo za oslobađanje i / ili isporuku lijekova na terapijski poželjan način.¹¹ Prednost primjene superparamagnetskih nanočestica jest njihova visoka magnetizacija zasićenja te njihova reakcija na vanjsko oscilirajuće magnetsko polje. Magnetski odziv i svojstva NČ se određuju iz mjerenja petlji histereze (*M-H*) i krivulje magnetizacije u ovisnosti o temperaturi (*M-T*).¹²

Zbog velike aktivne površine i velikog volumena pora mezoporozne NČ posjeduju visoki kapacitet ugradnje, te je u njih moguće ugraditi kemijski različite vrste molekula koje su tako zaštićene od djelovanja vanjskih utjecaja kakvi vladaju prilikom endogenih enzimatskih aktivnosti.¹¹ Inovativnosti rada doprinosi i utvrđivanje strukturne reorganizacije membrana u uvjetima oksidacijskog stresa kombinacijom metoda oslikavanja s uobičajenim metodama

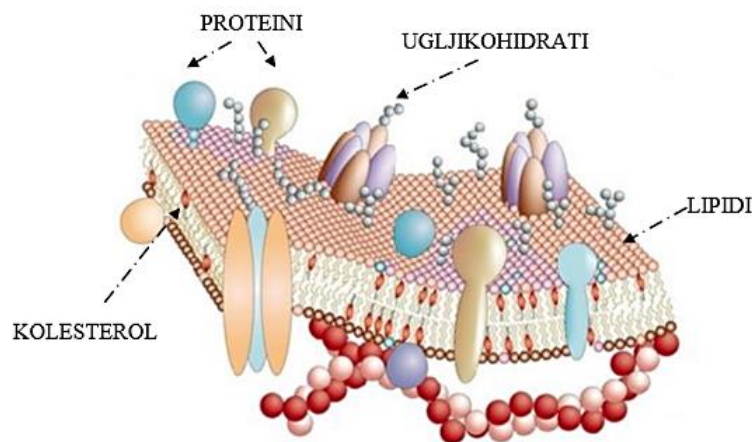
karakterizacije nanomaterijala. Veličina i površinska svojstva NČ mogu se učinkovito kontrolirati.¹³ Primjenom različitih eksperimentalnih tehnika kao što su mikroskopija atomskih sila (AFM), infracrvena spektroskopija (FTIR), dinamičko raspršenje svjetla (DLS), pretražna elektronska mikroskopija (SEM), ovaj rad je u konačnici doveo do detaljnih informacija o utjecaju kemijske strukture i hidrofobnosti flavonoida na efikasnost njihove ugradnje u NČ, a dalje reflektira na naboj NČ pa tako i na njihovu kinetiku otpuštanja i interakciju s modelnim membranama u uvjetima s i bez oksidacijskog stresa. Takav pristup omogućuje određivanje promjena strukturnih i morfoloških svojstava modelnih membrana u uvjetima oksidacijskog stresa te razlučivanje zaštitnog mehanizma pojedinog flavonoida s obzirom na njegov lokalitet.

TEORIJSKI DIO

2. TEORIJSKI DIO

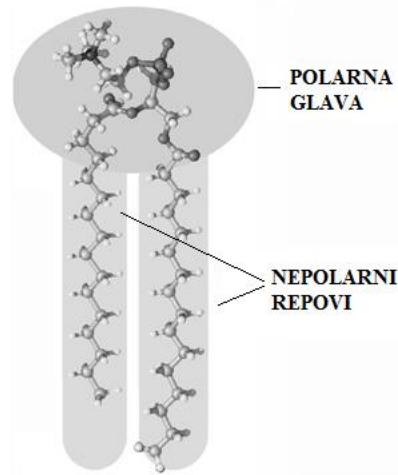
2.1. Biološke membrane

Biološke membrane su barijere koje razdvajaju unutarstanični od izvanstaničnog prostora te posjeduju svojstvo selektivne permeabilnosti tako što sadrže transportne sustave koji omogućuju opskrbu željenim tvarima te prolazak nepoželjnih tvari iz stanice.¹⁴ Odlike bioloških membrana jesu održavanje različitog sadržaja vodenih otopina s jedne i druge strane, sidrenje integralnih i perifernih proteina te regulacija izmjene tvari sa staničnom okolinom.¹⁵ Naime, biološke membrane posjeduju niz drugih specifičnih i esencijalnih uloga koje omogućuju i održavaju život ne samo pojedine stanice već i organizma u cjelini. Također imaju sposobnost skladištenja energije, primanja signala, selektivnosti, provođenja informacija i distribucije fosfolipida.^{14,15} Prosječna debljina membrane je između 60-100 Å (6-10 nm).¹⁴ Funkcija bioloških membrana ovisi o njihovom sastavu.¹⁶ Biološke membrane građene su od velikog broja raznovrsnih molekula lipida, proteina i ugljikohidrata (slika 1).



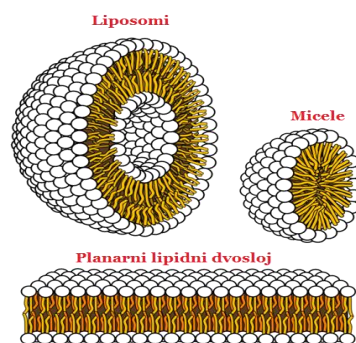
Slika 1. Struktura stanične membrane¹⁷

Lipidi su biomolekule netopljive u vodi, a topljive u organskim otapalima. Lipidi postoje u velikom broju različitih molekula od kojih u membranama nalazimo fosfolipide, sfingolipide i kolesterol. Molekule lipida su amfipatske molekule koje se sastoje se od hidrofobnih repova i hidrofilne glave te se samoorganiziraju u lipidne dvosloje u kojima su u stalnim međusobnim interakcijama djelovanjem slabih fizičkih sila kao što su van der Waalsove i hidrofobne.¹⁸ Kod većine lipida polarna glava ostvaruje kontakt s vodenim medijem, a nepolarni repovi okrenuti su prema unutrašnjosti membrane (slika 2).¹⁴



Slika 2. Molekula lipida građena od polarne glave usmjerene k vodenom mediju i nepolarnih repova usmjerenih k unutrašnjosti membrane¹⁶

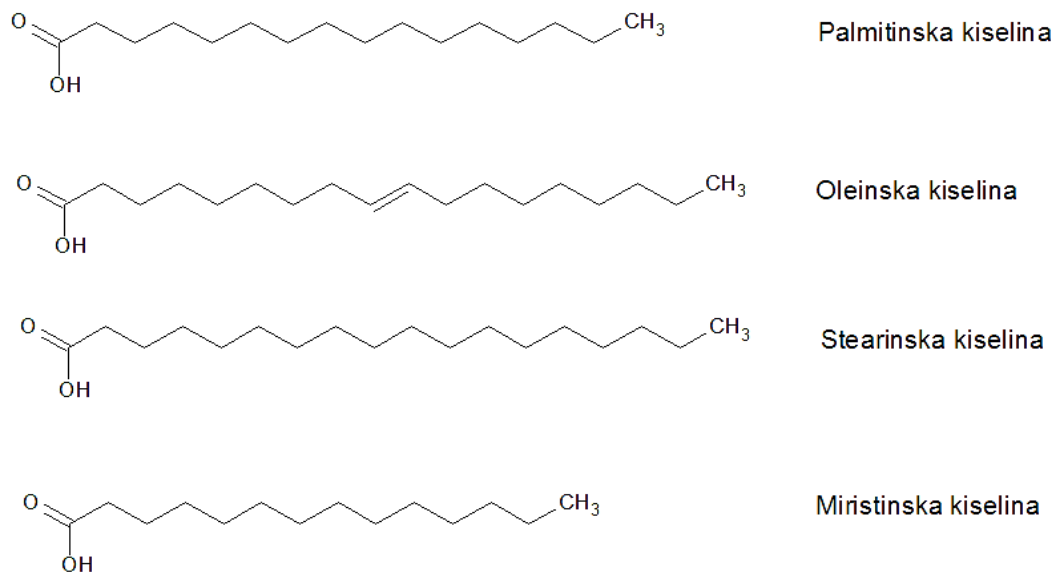
Ovisno o veličini polarne glave, broju i duljini nepolarnih repova, lipidi se u vodenom mediju mogu samoorganizirati u micide, vezikule i planarni dvosloj-lamele (slika 3).¹⁸ Micide su mali sferni samoasocijati (do 200 nm) građeni od lipidnih molekula s jednim ugljikovodičnim lancem, a hidrofilne glave orijentirane su prema vodenom mediju. 1925. Gorter i Grendel uočili su drugu strukturu asociiranih lipida, lipidni dvosloj.¹⁹ Lipidni dvosloj naziva se i bimolekulskim listom, a sastoji se od sloja lipidnih molekula s dva ugljikovodična, hidrofobna lanca i hidrofilnih glava koje su u kontaktu s vodom na površini svakog sloja.^{14,16} Rubovi dvosloja izloženi su nepovoljnom okolišu odnosno doticaju s vodom pa tako dolazi do transformacije odnosno zakrivljenja planarne strukture, lamele u liposome ili vezikule.^{16,19} Liposomi su vodeni odjeljci okruženi lipidnim dvoslojem. Takve strukture koriste se kao modelni sustavi u istraživanjima membrana ili transporta tvari kroz membranu.



Slika 3. Strukture lipida u prisustvu vode²⁰

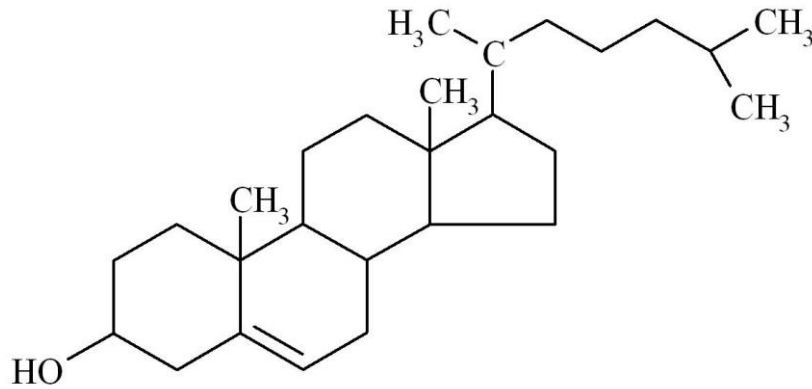
Biološke membrane građene su od tri glavne skupine lipida, a to su fosfolipidi (fosfoglicerolipidi), sfingolipidi i steroidi.¹⁴ Fosfolipidi su spojevi građeni od trovalentnog alkohola glicerola, jedne ili više masnih kiselina, fosfata i polarne skupine koja određuje vrstu

molekule fosfolipida. U membranama jedne stanice postoji više od 1 000 različitih molekula fosfolipida. Različiti fosfolipidi asimetrično su raspoređeni u dvosloju. Funkcijska važnost asimetrične raspodjele fosfolipida očituje se u činjenici da je prelaženje molekula fosfolipida iz jednog sloja membrane u drugi termodinamički kontrolirano. Asimetrija sastava fosfolipida u membranama ključan je čimbenik membranskih fuzija i dioba, interakcija membranskih lipida s proteinima i procesa prijenosa signala te transporta tvari. Gubitak specifične membranske asimetrije za stanicu znači gubitak normalnih staničnih funkcija, poticanje apoptoze i pojavu različitih bolesti. Asimetriji membrana pridonose i sfingolipidi. Sfingolipidi su molekule koje posjeduju polarnu glavu i dva nepolarna lanca koja su vezana za dugolančani amino-alkohol sfingozin.²¹ Postoje dvije vrste sfingolipida, a to su sfingomijelin i glikosfinoglipidi.^{16,22} Molekule sfingolipida u membranama manje su zastupljene nego molekule fosfolipida.²¹ Masne kiseline osiguravaju hidrofobnu barijeru dok ostatak molekule ima hidrofilna svojstva koja omogućavaju interakciju s vodenim okolišem. Masne kiseline koje posjeduju jednu ili više dvostrukih veza zovu se nezasićene masne kiseline, a one koje sadržavaju samo jednostruke veze zasićene masne kiseline (slika 4).



Slika 4. Prikaz najzastupljenijih masnih kiselina koje tvore lipidne repove²³

Steroidi su molekule sastavljene od četiri povezana ugljikovodična prstena i kratkog ugljikovodičnog lanca. Predstavnik steroida je kolesterol (slika 5.), planarna molekula smještena unutar membrane paralelno s nepolarnim repovima, a OH skupina reagira s najbližom polarnom skupinom fosfolipida.



Slika 5. Kemijska struktura kolesterola²⁴

Kolesterol ima dvojnju ulogu u membranama-istovremeno čini membrane fluidnima i čvrstim 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 promjene uvjeta, npr. temperature.²¹

Nadalje, biološke membrane osim membranskih lipida posjeduju i različite membranske proteine koji čine 25 - 75% mase različitih staničnih membrana.^{14,25} Proteini imaju specifičnu orijentaciju u membranama i osiguravaju razliku površine između unutarnje i vanjske membrane.¹⁹ Membranske proteine dijelimo u dvije skupine, a to su integralni ili transmembranski i periferni ili asocijacijski membranski proteini.²⁶ 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.¹⁹ Periferni membranski proteini su enzimi i hormoni koji nemaju izravno međudjelovanje s hidrofobnom jezgrom fosfolipidnog dvosloja te su vezani za hidrofilna područja određenih integralnih proteina i fosfolipidne glave.^{14,19} 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*

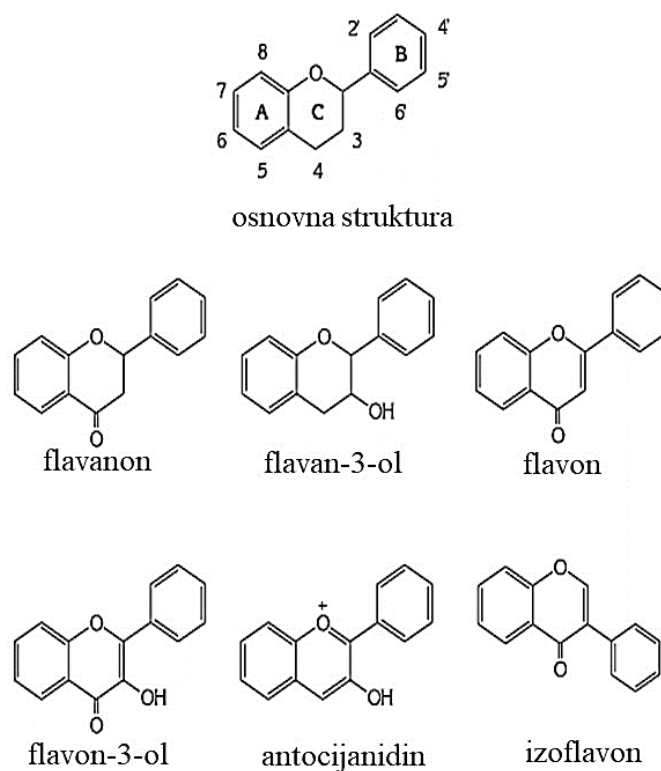
Flavonoidi su skupina polifenolnih spojeva lako dostupnih ljudskoj populaciji, a nalaze se u voću, povrću, sjemenkama, cvijeću te pićima poput čaja, kave, pive i vina. Nobelovac Albert Szent Györgyi 1930. godine izolirao je spoj iz naranče, vjerujući da se radi o novoj vrsti vitamina. Međutim uspostavilo se da je riječ o flavonoidu (rutin). Potom su započela brojna istraživanja kojim se nastojalo izolirati flavonoide te utvrditi mehanizme njihova djelovanja.² Danas je poznato više od 6000 različitih flavonoida.¹ 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.² Epidemiološke studije pokazuju da unos hrane bogate flavonoidima smanjuje rizik kardiovaskularnih bolesti.²⁶ Brojna istraživanja pokazala su da flavonoidi iz hrane imaju mnoga biološka i medicinska djelovanja kao npr. antioksidativno, protuupalno itd. Flavonoidi također imaju pozitivan učinak na središnji živčani sustav, posebice kod neurodegenerativnih bolesti kao što su Alzheimerova i Parkinsonova bolest.²⁷ Naime, flavonoidi mogu regulirati razne neurološke funkcije te tako poboljšati 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.²⁸ Bioraspoloživost, metabolizam i biološka aktivnost flavonoida ovise o konfiguraciji, ukupnom broju i položaju hidroksilnih i drugih funkcionalnih skupina.²

Tablica 1. *Najčešći flavonoidi u prehrani*²⁹

<i>Podskupina</i>	<i>Ime</i>	<i>Glavni izvor</i>
flavanoni	taksifolin	limun, gorka naranča
flavanoli	katihein	jabuka, čaj
flavoni	apigenin, luteolin	peršin, rajčica
flavonoli	kvercetin, miricetin, rutin	luk, trešnja, brokula, kelj
antocijanidini	cijanidin, malvidin	bobičasto voće, vino
izoflavoni	daidzein, genistein, glicetin	soja, povrće

Osnovnu strukturu flavonoida (slika 6.) čini difenilpropan ($C_6-C_3-C_6$) odnosno 1-fenil-3-(2-hidroksifenil)propan-1-ol iz kojeg gubitkom vode i zatvaranjem C-prstena rezultira flavan iz kojega proizlaze osnovne strukture flavonoida²⁹:

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



Slika 6. Osnovna struktura flavonoida i glavnih skupina flavonoida⁵

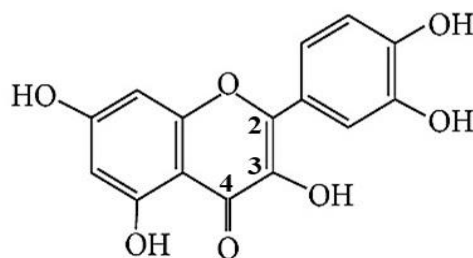
Strukturalna raznolikost flavonoida rezultat je brojnih modifikacija osnovne prstenaste strukture, koje uvjetuju reakcije hidrogenacije, hidroksilacije, O-metilacije hidroksilnih grupa, dimerizacije, vezanja neorganskog sulfata i glikolizacije hidroksilnih grupa (O-glikozidi) ili flavonoidne jezgre (C-glikozidi). Flavonoidi se pojavljuju kao glikozidi, aglikoni i metilirani derivati. Glikozidacija flavonoida najčešće se događa u položaju 3-, a manje u položaju 7-. Od svih šećera (glukoza, galaktoza, ramnoza i ksiloza), glukoza je najčešće prisutna. Osim šećera

na sebe još mogu vezati i hidroksilne i metoksilne skupine. Kod flavonoida postoji i velika sklonost umrežavanju i polimerizaciji.²⁹

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

2.2.2. Kvercetin, miricetin i miricitrin

Kvercetin (C₁₅H₁₀O₇) je polifenolni spoj koji se sastoji od dva benzenska prstena A i B, prstena C te pet supstituiranih hidroksilnih skupina. Nalazi se u povrću, bobičastom voću, čaju te crvenom vinu. Kvercetinu se pripisuje veliki značaj zbog brojnih pozitivnih učinaka kao što su antitumorsko i protuupalno djelovanje, smanjenja rizika od smrti radi ishemije srca i rizika od raka pluća. Također, kvercetin je dokazani antioksidans, štiti LDL (engl. *low-density lipoprotein*) i kolesterol od oksidacije te smanjuje njegovo nakupljanje na unutarnjim stijenkama arterija. Dodatak kvercetina u prehranu dijabetičara dovodi do smanjenja razine kolesterola u krvi kao izrazito visokog faktora rizika kod kardiovaskularnih bolesti povezanih s dijabetesom. Kvercetin i epigalokatehin te ekstrakti zelenog čaja koji su bogati flavonoidima inhibiraju rast tumorskih stanica, inhibiraju ili blokiraju pojedine faze staničnog ciklusa. Međutim potrebna su još brojna istraživanja kako bi se utvrdili mehanizmi i međudjelovanje brojnih učinaka flavonoida u sprječavanju nastanka karcinoma.³⁰

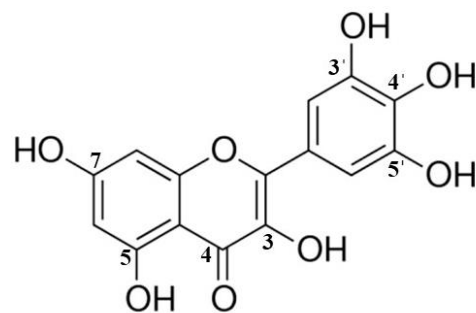


Slika 7. Kemijska struktura kvercetina- u prstenu C ima 2,3-dvostruku vezu i 4-keto-skupinu što mu omogućava veću sposobnost hvatanja radikala³¹

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- posjeduju planarnu strukturu, a planarnost dopušta konjugaciju, delokalizaciju elektrona i

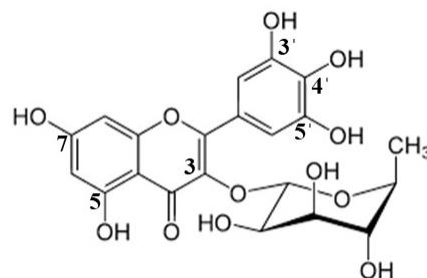
povećava stabilnost flavonoidnih fenoksilnih radikala. Uklanjanjem hidroksilne skupine s položaja 3- ukida se koplanarnost i konjugativnost, a time i sposobnost stabilizacije radikala. Kvercetin je snažni hvatač peroksidnih radikala, a zatim slijede njegovi O-metilirani i O-glikozidirani derivati.²⁹

Miricetin (C₁₅H₁₀O₈) je polifenolni spoj koji se sastoji od 2 benzenska prstena A i B, prstena C te hidroksilnih skupina na pozicijama 3, 5, 7, 3', 4' i 5'.³² Zastupljen je u orašastim plodovima, bobičastom voću, crvenom luku te crvenom grožđu. Miricetin posjeduje protuupalno, antidijabetičko, antiproliferativno, antioksidativno i antikancerogeno djelovanje.³³ Također pozitivno djeluje na liječenje infekcija mokraćnog trakta, štiti jetru i djeluje pozitivno u sprječavanju stvaranja tromboze. Njegov pozitivan učinak u liječenju Parkinsonove bolesti dokazan je *in vivo* i *in vitro* na način da smanjuje učinak oksidacije i apoptoze.³⁴ Također, dokazano je da miricetin ima zaštitni učinak na oksidaciju LDL-a u krvi potaknutu metalnim ionima i slobodnim radikalima.³⁵



Slika 8. Kemijska struktura miricetina³⁶

Miricitrin (C₂₁H₂₀O₁₂) je polifenolni spoj koji se sastoji od 2 benzenska prstena A i B, središnjeg prstena C, a hidroksilne skupine su na 5, 7, 3', 4' i 5' položajima. Na trećoj poziciji središnjeg C-prstena nalazi se šećer ramnoza.



Slika 9. Kemijska struktura miricitrina³⁷

Miricitrin kao inhibitor dušikovog oksida (NO) i protein-kinaze C pokazuje pozitivan učinak na liječenje anksioznosti te raznih neuroloških bolesti kao što je Parkinsonova bolest. Dokazano je antimutagensko djelovanje miricitrina što se pripisuje sposobnosti uklanjanja slobodnih hidrosilnih radikala.³⁷

2.3. Lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija rezultira promjenom ili oštećenjem lipidne molekulske strukture. To je sekundarna reakcija na stres, a izazivaju je primarni proizvodi stresa kao što su radikali kisika. Tokom lipidne peroksidacije dolazi do oštećenja lipida kao sastavnih dijelova bioloških membrana što uzrokuje strukturnu reorganizaciju lipidnog dvosloja.³⁸ Lipidnu peroksidaciju najčešće uzrokuju hidrosilni radikal (OH^{\bullet}), te drugi radikali koji mogu pokrenuti proces peroksidacije. Proces mogu započeti: toplina, svjetlo, ionizirajuće zračenje, kemijski inicijatori i ioni prijelaznih metala. Lipidna peroksidacija odvija se u tri stupnja: inicijacija, propagacija i terminacija. Hidrosilni radikal i singletni kisik nastali u stresnim uvjetima reagiraju s metilenskom skupinom mono- i poli-nezasićenih masnih kiselina uz izdvajanje vodika s metilne skupine te nastajanje peroksidnih radikala. Peroksidni radikal je vrlo reaktivan i reagira s drugom nezasićenom masnom kiselinom. Tada nastaju lipidni hidrosiperoksid i lipidni radikal koji nastavlja lančanu reakciju. Lanac reakcija završava nastajanjem produkta od dva radikala.³⁹ U biološkim membranama dovodi do gubitka fluidnosti, smanjenja membranskoga potencijala, povećanja permeabilnosti H^+ i drugim ionima te do mogućeg puknuća 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. 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 nastalih aldehida.⁴⁰ Salvamani i suradnici³⁵ istražili su da između mnogih, kvercetin smanjuje krvni tlak pojačanjem aktivnosti endotelne NO kinaze i smanjenjem NADPH-oksida-ovisne produkcije superoksida. Terapija kvercetinom kod pretilih animalnih modela dovela je do smanjenja tjelesne mase i smanjenja akumulacije masnoća u jetri. Naime, kvercetin usporava razvoj aterosklerotskih lezija 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.³⁵ Nadalje, osim kvercetina, pozitivni učinci su utvrđeni i kod drugih flavanola. Tako je dokazano da miricetin inhibira povećanje tjelesne mase i akumulaciju tjelesnih masnoća povećavajući oksidaciju masnih kiselina kod štakora. Također, dokazano je da ima zaštitni učinak na oksidaciju LDL-a u krvi, potaknutu metalnim ionima i slobodnim radikalima.³⁵

2.4. Nanomaterijali

Prefiks nano znači faktor 10^{-9} , a nanoskala u pravilu podrazumijeva duljinu od atomske razine (oko 0,1 nm) do 100 nm. Nanostrukture ili nanomaterijali oblici su materije na nanoskali, odnosno oni materijali koji sadržavaju čestice kojima je barem jedna dimenzija u navedenom nanopodručju. Nanotehnologija ili nanotehnika podrazumijeva kreiranje funkcionalnih materijala, uređaja i sustava kontroliranjem oblika i veličina na nanometarskoj razini. Nanomaterijali se mogu podijeliti s obzirom na dimenzionalnost odnosno na broj dimenzija u rasponu od 1-100 nm:

- 1D nanomaterijali (samo jedna dimenzija u rasponu 1 – 100 nm),
- 2D nanomaterijali (dvije dimenzije u rasponu 1 – 100 nm) i
- 3D nanomaterijali (sve tri dimenzije u rasponu 1 – 100 nm).

Druga podjela odnosi se na kemijski sastav i to na organske (polimerne) nanomaterijale, ugljikove (ugljikove nanocjevčice, grafen, fulereni), anorganske (metali, metalni oksidi) i kompozitne nanomaterijale.⁴¹

2.4.1. Nanočestice

Nanočestice su skupina koja podrazumijeva čestice promjera između 1 i 100 nm. Svojstva koja NČ čine jedinstvenima i koja trenutačno pobuđuju veliko zanimanje u industrijskoj i biomedicinskoj primjeni jesu veličina, oblik, aglomeracijsko stanje, topljivost, površinska svojstva (velika specifična površina, naboj). Prema nekim procjenama, čovjek hranom koja

sadržava različite aditive u prosjeku dnevno konzumira 10^{12} čestica submikronskih veličina (primarno TiO_2 i aluminosilikati), dok razina NČ u zraku u vrlo prometnim područjima može biti u rasponu od 5 000 do čak 3 000 000 čestica/cm³.⁴¹

2.4.2. Magnetska svojstva Fe_3O_4 nanočestica

Magnetske NČ su čestice izrazitih magnetskih svojstava čija veličina u barem jednoj dimenziji ne prelazi vrijednost reda veličine 100 nm. Kod njih do izražaja najviše dolazi njihovo svojstvo magnetizacije, odnosno, one nose vektorski magnetski moment. Kemijska formula magnetita je Fe_3O_4 ($\text{FeO} \times \text{Fe}_2\text{O}_3$). Magnetit je crni željezov oksid u kojem željezovi atomi imaju dva oksidacijska stanja, +2 i +3. Fe_3O_4 ima kubičnu inverznu strukturu koja se sastoji od kubično raspoređenih nabijenih oksidnih iona, gdje svi Fe^{2+} ioni zauzimaju polovicu oktaedarskih mjesta, dok su Fe^{3+} podijeljeni preko oktaedarskog i tetraedarskog mjesta. Atom željeza posjeduje jak magnetski moment zbog nesparenih elektrona u 3d orbitalama, što znači da kristali koji sadrže atome željeza mogu pokazivati različita magnetska stanja. Magnetit pripada skupini ferita te ga se prema magnetskim svojstvima svrstava u ferimagnete. Međutim istraživanja su utvrdila da magnetska svojstva nano magnetita ovise o promjenama u morfologiji kristala. Ispod Curieve temperature, magnetski momenti tetraedarskih položaja koje zauzimaju Fe^{3+} ioni su feromagnetski usklađeni, odnosno magnetski momenti su paralelni.⁴² Fe_3O_4 pokazuje ferimagnetizam na sobnoj temperaturi, s magnetizacijom zasićenja do 92 emu g⁻¹.⁴³ Magnetit postaje superparamagnetičan na sobnoj temperaturi kada je veličina kristalita unutar NČ ispod 15 nm. Porastom temperature i približavanjem Curie-voj temperaturi, temperaturene promjene poništavaju feromagnetsku usklađenost magnetskih momenata na tetraedarskim položajima magnetita te je smanjen ferimagnetizam. Kada se postigne Curie-va temperatura, ukupna magnetizacija je jednaka nuli te se opaža superparamagnetsko ponašanje magnetita. Curie-va temperatura magnetita iznosi 850 K.⁴² Najznačajnija magnetska svojstva su njihova reakcija na vanjsko magnetsko polje i njihova magnetizacija. Ona se određuju mjerenjem petlji histereze ($M-H$) i krivulje magnetizacije u ovisnosti o temperaturi ($M-T$). Magnetizacija zasićenja (M_s), može se odrediti iz petlje histereze. U slučaju kada su NČ superparamagnetske $M-H$ krivulja ne pokazuje histerezu, a krivulje magnetizacije snimane u oba smjera se preklapaju.⁴⁴

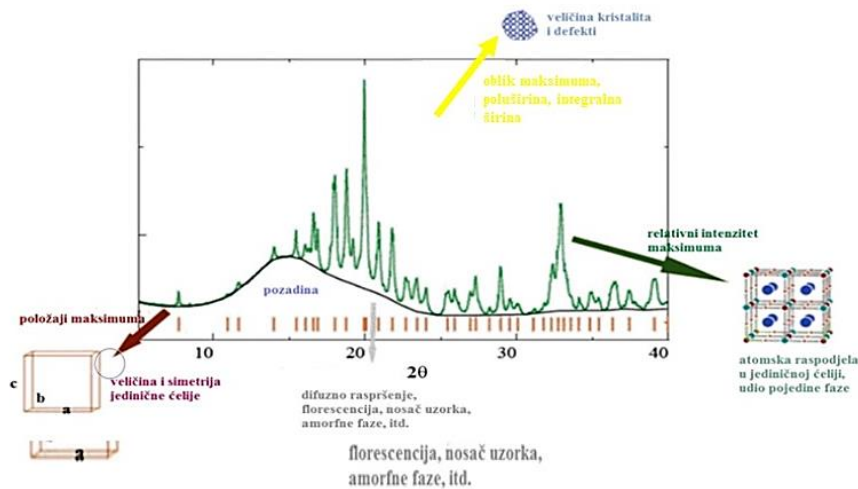
Nanočestice željezova oksida zbog magnetskih svojstava pronalaze široku primjenu u područjima kao što su: magnetske brtve i tinte, magnetski mediji za snimanje, katalizatori, ferrofluidi, kontrastni agensi za snimanje magnetske rezonancije, terapijski agensi za liječenje

raka i drugo.⁴² NČ magnetita zanimljive su za primjenu u različitim područjima, pogotovo u biomedicini. Za biomedicinske primjene, potrebno je sintetizirati mezoporozne magnetske NČ koje su disperzibilne u većini bioloških medija. Funkcionalizacija osigurava visoku koloidnu stabilnost i igra značajnu ulogu u njihovoj biorazgradnji.⁴⁵ Veliki broj prirodnih i sintetičkih biorazgradljivih polimera služi za funkcionalizaciju. Funkcionalizirane superparamagnetske NČ magnetita, u kombinaciji s vanjskim magnetskim poljem omogućuju isporuku lijeka do željenog cilja. Vanjsko magnetsko polje uzrokuje preusmjerenje magnetskih momenata pojedine čestice duž primijenjenog polja na niskim temperaturama odnosno primjenom vanjskog izmjeničnog magnetskog polja javlja se preorijentacija NČ i time povećava njihova precesija koja uzrokuje učinkovitije otpuštanje lijeka iz NČ. NČ koja se koristi za dostavu nositelj je lijekova, proteina i genetskog materijala kako bi se postigla lokalizirana dostava tih terapijskih agensa.⁴⁶

3. MJERNE TEHNIKE

3.1. Rendgenska difrakcija polikristalnog uzorka

Rendgenska difrakcija polikristalnog uzorka (engl. *X-ray powder diffraction*, XRPD) nedestruktivna je metoda koja ima vrlo značajnu ulogu u istraživanjima u području fizike i kemije čvrstog stanja, nanomaterijala, strukturne i koordinacijske kemije, polimorfije farmaceutskih spojeva te u istraživanju novih materijala. Rendgenska difrakcija na polikristalnom uzorku ima široku primjenu u karakterizaciji kristalinih materijala koji se ne mogu ili ne žele prirediti u formi monokristala te dijelom i amorfni tvari. Konkretno, rendgenska difrakcija polikristala služi za provođenje kvantitativne i kvalitativne fazne analize višefaznih uzoraka, određivanje deformacija kristalne rešetke i veličine kristalita, razlikovanje kristalnog od amornog materijala te za rješavanje i utočnjavanje kristalne strukture. U difrakcijskoj strukturnoj analizi koristi se monokromatsko rendgensko zračenje s malim valnim duljinama u području od 0,05 do 0,25 nm što odgovara energijama fotona od 1 do 120 kV. Budući da se valna duljina rendgenskog zračenja približila veličini atoma ovo zračenje je pogodno za određivanje strukturnog uređenja atoma i molekula različitih materijala.



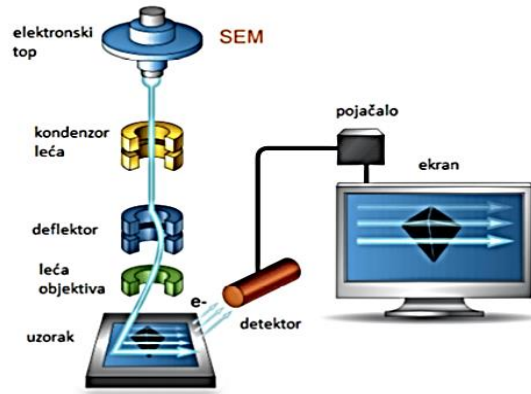
Slika 10. Anatomija difrakcijske slike polikristalnog materijala

Položaj difrakcijskih maksimuma određen je kristalnom rešetkom, odnosno veličinom i oblikom jedinične ćelije, a intenzitet difrakcijskih maksimuma vrstom atoma i njihovim prostornim razmještajem u jediničnoj ćeliji prema zahtjevima simetrije, tj. o kristalnoj strukturi (slika 10.). Kao prvo, prisutan je utjecaj intenziteta koherentnog raspršenja na jednom elektronu ali i doprinos svih elektrona u atomu koji vibrira. Kao drugo interferentne pojave raspršenja na različitim atomima i to iz različitih mjesta u jediničnoj ćeliji. Jedino poznavanjem tih informacija može se točno izračunati difrakcijska slika.

3.2. Pretražna elektronska mikroskopija

Pretražna elektronska mikroskopija (SEM), metoda je identifikacije površine materijala na bazi ultra-visokog vakuuma (UHV), kojom se dobiva slika uzorka, povećana i do 100 000 puta, prelaskom fokusiranog snopa elektrona po površini vodljivog uzorka. Pretražna elektronska mikroskopija omogućava promatranje suhih uzoraka pri visokom povećanju te razlučivanje detalja koje je nemoguće postići konvencionalnom optičkom mikroskopijom. Osnove rada pretražnog elektronskog mikroskopa uključuju pretraživanje površine ispitivanog uzorka vrlo precizno fokusiranim snopom elektrona. Uzorak se nalazi na nosaču u komori mikroskopa, a izvor elektrona je tzv. elektronski top, koji je građen od skupa elektroda (katoda i anoda) koje stvaraju uzak snop elektrona podjednake brzine. Razlika potencijala između katode i anode vrlo je velika i obično iznosi između 20 000 i 100 000 V. Elektroni se izbijaju iz katode udarcima

pozitivnih iona ili žarenjem, pri čemu se obično koristi užarena volframova nit. Pozitivno nabijena elektroda, anoda, privlači elektrone i propušta ih kroz središnji otvor. Elektroni se dalje fokusiraju i usmjeruju pomoću magnetskih leća na površinu uzorka. Svi dijelovi mikroskopa kroz koje prolazi snop elektrona nalaze se u vrlo visokom vakuumu, jer bi čestice zraka mogle zaustaviti ili usporiti kretanje elektrona (slika 11.).



Slika 11. Shematski prikaz pretražnog elektronskog mikroskopa⁴⁷

SEM omogućava analizu površine koja je potrebna kod istraživanja površina koje se spajaju, načina popuštanja adhezijskog spoja, načina popuštanja kod kompozita. SEM-om je vidljiva: topografija površine uzorka, morfologija (oblik, veličina i raspodjela čestica u uzorku), kompozicija te uređenost strukture.⁴⁷

3.3. Brunauer-Emmett-Teller (BET) analiza

Određivanje fizikalnih značajki poroznih krutih materijala temelji se na mjerenju adsorpcije dušika prema Brunauer-Emmett-Teller (BET) metodi. Metoda je volumetrijska i pogodna je za određivanje fizikalnih značajki poroznih krutih materijala kao što su ukupna specifična površina, volumena pora te veličine pora. Količina adsorbiranog plina ovisi o dostupnosti površine na kojoj se plin adsorbira, temperaturi, tlaku plina i o jačini međudjelovanja između molekula plina i površine na koju se adsorbira. Prilikom BET analize površine najčešće se kao adsorbens koristi plinoviti dušik koji je komercijalno dostupan u visokom stupnju čistoće, ali i zbog njegove točke vrenja od 77 K. Da bi se odredila adsorpcijska izotermna krivulja volumetrijskom metodom, poznata količina plina dozira se postepeno u cjevčicu s ispitivanim uzorkom. Pri svakom doziranju plina, plin se adsorbira na uzorak što uzrokuje pad tlaka sve dok se ne postigne ravnoteža između adsorbata i adsorbтива. Količina adsorbiranog plina je

razlika između količine doziranog plina i količine koji ispunjava mrtvi volumen (slobodni prostor u cjevčici iznad uzorka) koji se odredi primjenom opće plinske jednadžbe. Adsorpcijska izotermna krivulja prikazuje se kao ovisnost količine ili volumena adsorbiranog plina o odgovarajućim relativnim tlakovima p/p_0 . Kapacitet monosloja na površini uzorka izračunava se primjenom BET jednadžbe.

3.4. Ultraljubičasta/vidljiva spektrofotometrija

UV/Vis spektroskopija ili spektrofotometrija predstavlja studij interakcije materije i svjetla odnosno elektromagnetskog zračenja. Osnovni princip je da svaka komponenta apsorbira ili propušta svjetlo u određenom rasponu valnih duljina. Kada govorimo o ultraljubičastoj/vidljivoj spektrofotometriji, govorimo o energijama koje pobuđuju molekulu iz osnovnog stanja, odnosno koje izazivaju elektronske prijelaze. Spektrofotometar je instrument koji mjeri količinu fotona (intenzitet svjetla) nakon što prođe kroz uzorak. Područja mjerenja UV/Vis spektrofotometara su obično 200-380 nm za ultraljubičasti (UV) i 380-780 nm za vidljivi (Vis) dio spektra. Dok svjetlo prolazi kroz otopinu ispitivane molekule dio se apsorbira od strane molekule, a spektrofotometar mjeri neapsorbirano ili propušteno zračenje. Količina apsorbiranog zračenja može se izraziti na više načina. Transmitancija je omjer intenziteta transmitiranog svjetla I_T i intenziteta upadnog svjetla I_0 . Što je veći broj molekula koje apsorbiraju zračenje to je apsorpcija veća. Što molekula učinkovitije apsorbira svjetlo na određenoj valnoj duljini, to je apsorpcija veća. Iz ovoga proizlazi Beer-Lambertov zakon koji kaže da je apsorbancija proporcionalna koncentraciji apsorbirajuće vrste dok molarni apsorpcijski koeficijent ε govori o tome kolika je vjerojatnost apsorpcije na određenoj valnoj duljini te je specifično svojstvo za svaku tvar,

$$A = \varepsilon cl \quad (1)$$

gdje je A apsorbancija na danoj valnoj duljini, c je molarna koncentracija otopine (mol dm^{-3}), l je duljina ćelije (cm), a ε je molarni apsorpcijski koeficijent ($\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Iz snimljenog spektra može se očitati na kojoj valnoj duljini ispitivana molekula najbolje apsorbira, a osim toga uz pomoć Beer-Lambertovog zakona može se analitički odrediti koncentracija otopine ispitivane molekule iz izmjerene apsorbancije.⁴⁸

3.5. Magnetska karakterizacija

Magnetoencefalografija (MEG) – tehnika je mjerenja magnetskih polja. MEG je najosjetljivija metoda koja se koristi za mjerenje najslabijih magnetskih polja, najčešće u medicini. *MPMS-5* je uređaj koji može izuzetno precizno mjeriti magnetski moment u temperaturnom području od 1,7 K do 400 K, pa i šire, do 800 K, u magnetskim poljima jakosti do 5.5 T. Uređaj je zasnovan na supravodljivoj tehnologiji koja omogućuje dobivanje jakih i vrlo stabilnih magnetskih polja te detekciju promjena u tom polju koje mogu biti i 14 redova veličine slabije. Najvažnija komponenta magnetometra je supravodljivi kvantni interferometar (engl. *Superconducting Quantum Interference Device*), *SQUID*. Mjerenja magnetometrom *MPMS-5* vrše se provlačenjem uzorka kroz detekcijske zavojnice koje su smještene unutar supravodljivog magneta. Gibanjem uzorka odnosno njegovog magnetskog momenta inducira se struja u detekcijskim zavojnicama, koje su povezane s ulaznim krugom *SQUID-a*. *SQUID* djeluje kao izuzetno precizni strujno-naponski pretvarač te se svaka promjena struje u detekcijskim zavojnicama odražava kao odgovarajuća promjena izlaznog napona *SQUID-a*. Iz ovisnosti izlaznog napona o položaju uzorka, računalnom prilagodbom se kao izlazna veličina dobiva magnetski dipolni moment uzorka, izražen u $1 \text{ emu} = 10^{-3} \text{ Am}^2$.

3.6. Infracrvena spektroskopija

Infracrvena (IR) spektroskopija je analitička tehnika koja proučava interakcije molekula i elektromagnetskoga zračenja u rasponu $12800 \text{ cm}^{-1} - 10 \text{ cm}^{-1}$. IR zračenjem pobuđuju se prijelazi među vibracijskim stanjima molekula, a prijelaz se zabilježava kao vrpca u IR spektru ukoliko se tijekom vibracije skupine atoma u molekuli mijenja dipolni moment. Osnovne vibracije molekula obuhvaćaju vibracije istezanja i deformacije. Vibracije istezanja karakteristične su za promjenu duljine veze između dva atoma, a mogu biti simetrična i antisimetrična istezanja. Deformacijske vibracije posljedica su promjene kuta između dviju veza te se dijele na deformacije u ravnini i izvan ravnine. IR 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 μm). Za kompletnu identifikaciju potrebne su baze spektara. Područje srednjeg IR spektra dijeli se na 2 dijela:

1.) 4000 cm^{-1} - 2000 cm^{-1} – grupne frekvencije, posljedica istezanja

2.) 2000 cm^{-1} tj. 1500 cm^{-1} – savijanje, područje otiska prsta

Izbor tehnike za pripremu uzorka kao i ćelije za snimanje spektra zavisi o agregatnom stanju ispitivanog uzorka. Priprema KBr-pastile je brza 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 uzorka spektrofotometra te se potom snimi spektar. Dobiveni spektar mora odgovarati analiziranoj tvari.⁴⁹

3.7. Dinamičko raspršenje svjetlosti

Dinamičko raspršenje svjetlosti, DLS, tehnika je koja se temelji na raspršenju elektromagnetskog zračenja. Do raspršenja zračenja dolazi samo u heterogenim sustavima, zbog razlike u optičkim svojstvima između dispergiranih čestica i medija u kojem se nalaze.⁵⁰ Čestice suspendirane u mediju se neprestano gibaju tzv. Brownovim gibanjem. Brownovo gibanje je nasumično gibanje čestica do kojeg dolazi zbog sudaranja s molekulama otapala. Što je čestica veća, to je njeno gibanje sporije. DLS mjeri brzinu Brownovog gibanja čestica i povezuje ju s njezinom veličinom u suspenziji. Vrijednost difuzijskog koeficijenta ovisi o veličini i obliku čestice, ionskoj jakosti medija, vrsti prisutnih iona i strukturi površine. 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.⁵¹

Postoje tri teorije kojima se opisuje raspršenje svjetlosti: Rayleigheva aproksimacija, Mieova i Rayleigh–Gans–Debye teorija. Rayleigheva aproksimacija vrijedi za čestice čije dimenzije su

u usporedbi s valnom duljinom lasera male $\left(d = \frac{\lambda}{10}\right)$ i pokazuje da je $I \sim d^6$ 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. Mieova teorija primjenjuje se za čestice čija je veličina približno jednaka ili veća od valne duljine lasera ($d \approx \lambda$).⁵²

Primarne informacije dobivene DLS-om izražene su kao raspodjela veličine čestica po intenzitetu⁵¹. 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 sferne te se koriste i u elektronskoj mikroskopiji.⁵¹

3.8. Zeta potencijal

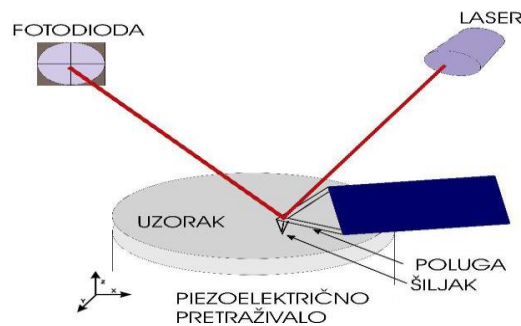
Zeta-potencijal je fizikalno svojstvo koje je izraženo na bilo kojoj čestici u suspenziji, na površini makromolekule ili materijala. Može se koristiti kako bi se optimizirala formulacija suspenzije, emulzije i otopine, predvidjele interakcije s površinom i optimiziralo stvaranje filma i premaza. Zeta 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:

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

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 (Debyeova 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. Čestice s zeta-potencijalom većim od ± 30 mV obično se smatraju stabilnima. Ako čestice imaju veću gustoću od disperzivnog sredstva, iako se dispergiraju, dolazi do taloženja.⁵³

3.9. 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.⁵⁴ Mikroskop atomskih sila pretražuje površinu uzorka pomoću oštrog šiljka. Pomak poluge proporcionalan je sili koja djeluje između šiljka i uzorka. Detekcijski sustav koji se sastoji od laserske zrake koja se reflektira s poluge do pozicijski osjetljive diode i prati otklon poluge i interakcijske sile koje ovise o udaljenosti šiljka i površine uzorka. Za vrijeme oslikavanja uzorak se nalazi na piezoelektričnom pretraživaču s povratnom spregom koja omogućuje precizno pozicioniranje uzorka. Postoje dva režima rada AFM-a: kontaktni i tapkajući. Kod kontaktnog režima rada šiljak je u konstantnom dodiru s uzorkom.



Slika 12. Shematski prikaz principa rada AFM-a⁵⁵

Kontaktni režim rada nije uvijek najpogodniji pa se koristi i tapkajući režim rada (engl. *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.

Metoda AFM-a je vrlo korisna za istraživanje membrane jer je za snimanje potrebna mala količina uzorka, moguće je trodimenzionalno oslikavanje i snimanje u vodenom mediju te ima vertikalnu rezoluciju od 0,1 nm. AFM metoda je uvrštena kao glavni alat 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 primjena AFM metode.⁵⁶

EKSPERIMENTALNI DIO

4. EKSPERIMENTALNI DIO

4.1. Materijali

Flavonoid **kvercetin**, $\geq 99\%$, ($C_{15}H_{10}O_7$) *Lach-ner, Češka*, flavonoid, **miricetin**, $\geq 97\%$, ($C_{15}H_{10}O_8$) i **miricitrin**, $\geq 97\%$, ($C_{21}H_{20}O_{12}$), *TCI Tokio Kasei*. Ostale kemikalije korištene u ovom radu su:

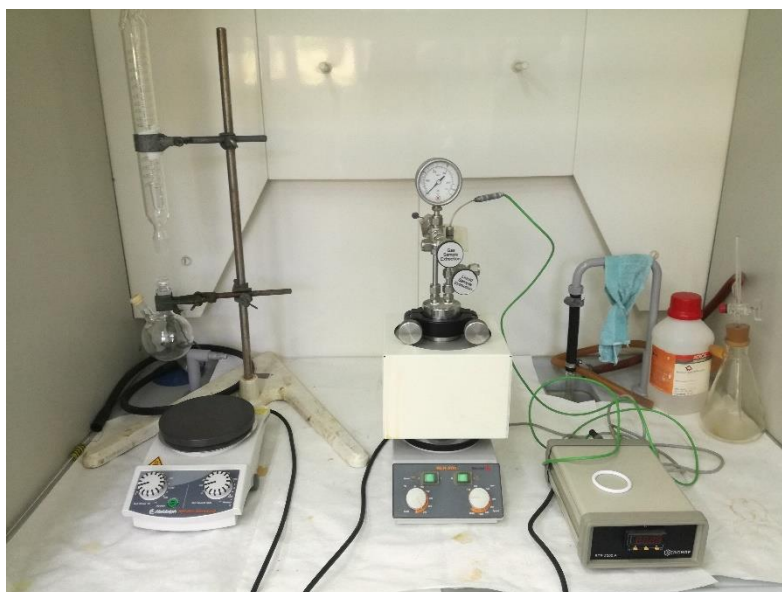
- 1) Etanol, C_2H_6OH , *TTT d.o.o., Sveta Nedelja, Republika Hrvatska*
- 2) Željezov (III) klorid heksahidrat, $FeCl_3 \times 6H_2O$, *Alfa Easar, Njemačka*
- 3) Amonijev acetat, NH_4OAc , *Sigma Aldrich, Sjedinjene Američke Države*
- 4) Polietilen glikol 4000, PEG 4000 Da, $C_{2n}H_{4n+2}O_{n+1}$, *Sigma Aldrich, Sjedinjene Američke Države*
- 5) Etilen glikol, $C_2H_6O_2$, *Lach-ner, Češka*
- 6) Fosfatni pufer, PBS (pH= 7,4), *Sigma Aldrich, Sjedinjene Američke Države*
- 7) 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfokolin, DOPC, *Avanti Lipids, Sjedinjene Američke Države*
- 8) Metanol, CH_3OH , *Kemika, Republika Hrvatska*
- 9) Kloroform, $CHCl_3$, *Lach-ner, Češka*
- 10) Vodikov peroksid, H_2O_2 , *Kemika, Republika Hrvatska*
- 11) Silikonsko ulje, visoko temperturno ulje, *Acros organics, Francuska*
- 12) Kalijev bromid, za FTIR spektroskopiju, *Sigma Aldrich, Sjedinjene Američke Države*
- 13) Dušik, (komprimirani), *Messer, Njemačka*
- 14) Deionizirana H_2O , Millipore mili Q- H_2O

4.2. Sinteza magnetskih Fe_3O_4 nanočestica

Mezoporozne magnetske Fe_3O_4 nanočestice pripremljene su modificiranom solvotermalnom reakcijom.^{1,2} U dvogrlu tikvicu volumena 250 mL opremljenu magnetskim štapićem volumena 250 mL i 70 mL etilen glikola dodano je 1,35 g $FeCl_3 \times 6H_2O$, 3,85 g NH_4OAC i 0,5 g PEG (M = 4000 Da) 4000. Smjesa je uz snažno miješanje (miješalica *Heidolph MR Hei-Standard*) zagrijavana u kupelji sa silikonskim uljem pri temperaturi 160°C. Kemijska reakcija u aparaturi (Slika 13.) odvijala se u inertnoj atmosferi dušika 60 minuta sve dok se nije dobila homogena smeđa otopina. Nakon sat vremena kemijska reakcija je zaustavljena, te je sustav ohlađen do

EKSPERIMENTALNI DIO

sobne temperature. Nakon toga, reakcijska smjesa je prebačena u teflonski inox autoklav (*BLH 800 Berghof*) spojen na temperaturni kontroler. Kemijska reakcija u reaktoru odvijala se pri 200°C i vremenu od 990 min, nakon čega je sustav ohlađen na temperaturu 50 °C. Odvajanje nanočestica od supernatanta provedeno je centrifugiranjem (*Universal 320 Hettich Zentrifugen*) 10 minuta pri 9000 okretaja. Nakon odvajanja, nanočestice su isprane 2 puta etanolom, te dispergirane miješalicom između svakog ispiranja. Na kraju, magnetske Fe₃O₄ nanočestice ostavljene su na sušenje u eksikatoru.



Slika 13. Aparatura za sintezu Fe₃O₄ NČ

4.3. Karakterizacija magnetskih Fe₃O₄ nanočestica

Metode

1) Rendgenska difrakcija polikristalnog uzorka (XRPD)

Strukturne značajke mezoporoznih Fe₃O₄ nanočestica određene su pomoću rendgenske difrakcije praha pri sobnoj temperaturi korištenjem difraktometra *Philips MPD 1880* s nanokromatiziranim CuK α zračenjem. Uzorak je snimljen pri kutevima 2θ u rasponu od 10-70° s korakom od 0,02° te fiksim vremenom od 10 s po koraku. Strukturno utočnjavanje provedeno je Rietveldovom metodom pomoću programa *X'Pert Highscore Plus2* te korištenjem pseudo-Voigtove profilne funkcije i polinomne funkcije za opisivanje pozadinskog šuma.

2) Pretražna elektronska mikroskopija (SEM)

Morfologija nanočestica promatrana je pretražnim elektronskim mikroskopom *JEOL JSM-7000F*. Pretražni elektronski mikroskop je korišten kao primarna tehnika kako bi se utvrdila morfologija nanočestica. Također se koristi za određivanje veličine i raspodjele veličina čestica. Raspodjela veličina čestica tj. njihovog promjera određena je iz mikrografija korištenjem programa *Image-J (Media Cybernetics, USA)* te prikazana kao histogram promjera nanočestica uzorka s $N=500$.

3) BET

Određivanje fizikalnih značajki poroznih krutih materijala temelji se na mjerenju adsorpcije plina dušika prema Brunauer-Emmet-Teller (BET) linearnoj jednadžbi prema standardnoj ispitnoj modificiranoj metodi ASTM D 3663-15 pomoću instrumenta *ASAP 2020*, tvrtke *Micromeritics*.

Tablica 2. Uvjeti BET analize.

Faza evakuacije		Faza zagrijavanja	
<i>Brzina zagrijavanja</i>	10,0 °C/min	<i>Brzina</i>	10,0 °C/min
<i>Teperatura</i>	100 °C	<i>Temperatura</i>	110 °C
<i>Brzina</i>	1333,2239 Pa/s	<i>Vrijeme</i>	12 sati (720 min)
<i>Tlak</i>	2,67 Pa		
<i>Vrijeme</i>	60 min		

4) UV-VIS spektrofotometrija

UV/VIS spektrofotometar *Varian Cary 100* s dvostrukom zrakom korišten je za kvantitativno određivanje koncentracije flavonoida u supernatantu. Mjerenja su izvedena u kvarcnoj kiveti duljine puta zrake $l = 10$ mm pri kontroliranoj temperaturi od 25 °C. Za obradu i snimanje spektara korišten je integrirani program *Scan*.

5) Magnetska karakterizacija

Za potvrdu superparamagnetskih svojstava sintetiziranih mezoporoznih Fe₃O₄ nanočestica provedena su mjerenja njihovih magnetskih svojstava. Ampula za snimanje napunjena je praškastim uzorkom nanočestica mase $m = 120$ mg te je izmjerena magnetizacija uzorka pomoću komercijalnog magnetometra *MPMS-5* opremljenog supravodljivim kvantnim interferometrom, *Squid*. Magnetska histereza petlje, $M(H)$ izmjerena je pri temperaturi 290 K pri jakosti polja 10 kOe.

6) FTIR spektroskopija

FTIR spektri mezoporoznih magnetskih Fe₃O₄ nanočestica dobiveni su mjerenjima na IR spektrometru *Bruker Alpha-T* u području od 4000 cm⁻¹ do 350 cm⁻¹. Svi spektri snimljeni su u nominalnoj rezoluciji od 4 cm⁻¹ pri temperaturi 25 °C, a ukupan broj snimanja iznosio je 16. Uzorci su prethodno temeljito osušeni, pomiješani s KBr, te prešani u male pastile.

4.4. Ugradnja flavonoida u nanočestice

Ugradnja flavonoida provedena je miješanjem otopine flavonoida u etanolu i mezoporoznih nanočestica magnetita. Zasićena otopina kvercetina pripravljena je otapanjem 634,2 mg kvercetina u 100 mL etanola. U 31,5 mL zasićene otopine kvercetina dodano je 60 mg mezoporoznih magnetskih Fe₃O₄ nanočestica. Isti postupak je ponovljen za miricetin (450,12 mg u 60 mL etanola) i miricitrin (36,51 mg u 300 mL vode). Smjesa nanočestica s izabranim flavonoidom mehanički je miješana u termokontroliranoj tresilici (*Barnstead Lab-lie 4450 e-class*) tijekom 24 h pri 30 °C. Nakon 24 h, spektrofotometrijski je određena koncentracija flavonoida u supernatantu. Potom je iz razlike koncentracija prije i poslije punjenja određena učinkovitost ugradnje. Nakon ugradnje, napunjene mezoporozne Fe₃O₄ su osušene i pohranjene u eksikatoru prije daljnje upotrebe i karakterizacije.

Učinkovitost ugradnje (eng. *loading efficiency*, *LE*) flavonoida (kvercetina, miricetina i miricitrina) izračunata je pomoću sljedeće jednadžbe:

$$LE = \frac{m_{\text{ugrađeno}}}{m_{\text{NČ}}} \times 100\% \quad (3)$$

gdje $m_{\text{ugrađeno}}$ predstavlja masu flavonoida ugrađenih u nanočestice i izračunata je pomoću sljedeće jednadžbe:

$$m_{\text{ugrađeno}} = m_{\text{dodano}} - m_{\text{neugrađeno}} \quad (2)$$

gdje je $m_{\text{NČ}}$ ukupna masa NČ koja je dodana za ugradnju, a $m_{\text{neugrađeno}}$ je masa flavonoida koja je ostala u supernatantu nakon odvajanja od nanočestica.

Baždarni pravac određen je iz mjerenja apsorbancija otopina poznatih koncentracija flavonoida u rasponu 200 nm - 1100 nm u čistom etanolu, pripremljenim otapanjem različitih količina flavonoida. Količina flavonoida u supernatantu određena je spektrofotometrijski. Temperatura u mjerenom odjeljku je kontrolirana i održavala se na 25 °C. Mjerenja su provedena u 10 mm kvarcnim kivetama. Utvrđeno je da je linearnost kalibracije važeća u rasponu koncentracija 1×10^{-6} - 1×10^{-4} mol/dm³.

4.5. Određivanje kinetike otpuštanja flavonoida iz mezoporoznih magnetskih Fe₃O₄ nanočestica u vanjskom permanentnom i oscilirajućem magnetskom polju

Kako bi se odredilo dugotrajno otpuštanje flavonoida iz mezoporoznih Fe₃O₄ nanočestica, potrebno je 30 mg napunjenih nanočestica staviti u membrane-crijevo za dijalizu, dodati 750 μl smjese PBS/EtOH volumnog omjera 50/50 te zatvoriti držačima za membrane i potom ih staviti u posudu u kojoj se nalazi 30 mL PBS/EtOH smjese. U različitim vremenima, 1,5 mL supernatanta pipetiran je u kivete, a preostaloj otopini dodana je ista količina smjese PBS/EtOH. Vanjsko oscilirajuće magnetsko polje postignuto je pomoću funkcijskog generatora MA 3730 koji je spojen na zavojnicu ($N = 270$, $l = 4$ cm). Izvor permanentnog magnetskog polja je magnet jakosti polja 0,19 T. Mjerenje je provedeno u periodu 4 h pri frekvencijama 0,1 Hz, 1 Hz, 10 Hz te bez primjene magnetskog polja. Koncentracija flavonoida u supernatantu određena je spektrofotometrijski.

4.6. Priprava DOPC liposoma

Liposomi su pripremljeni prema metodi tankog filma. Ukratko, DOPC liposomi su pripremljeni otapanjem 75 mg DOPC (*Lach-ner, Češka*) u 5 mL kloroforma (*Lach-ner, Češka*). Nakon isparavanja kloroforma na rotacijskom isparivaču, zaostali lipidni film je osušen na vakuumu 1 h te zatim dispergirani pomoću vortex mješalice pri 25°C u PBS (pH =7, sastava 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 6,5 mM Na₂HPO₄,) do konačne koncentracije lipida 0,5 mg mL⁻¹. Tijekom rehidracije lipidni film je polako odvajao sa stjenke okrugle tikvice formirajući multilamelarne liposome. Disperzija liposoma je ostavljena preko noći kako bi se dvosloji dovoljno hidratizirali i stabilizirali. Svi uzorci liposoma pripremljeni su na jednaki način kako bi se osigurala pouzdanost rezultata.

4.7. Ugradnja flavonoida u liposome

Membransko crijevo za dijalizu napunjeno je s 30 mg magnetskih nanočestica s ugrađenim flavonoidima i postavljeno u disperziju liposoma ($\gamma = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) volumena 30 mL. Nakon postavljene aparature, disperzija liposoma bila je podvrgnuta otpuštanju flavonoida iz magnetskih nanočestica:

- a) bez vanjskog magnetskog polja
- b) pod utjecajem kombiniranog alternirajućeg magnetskog polja amplitude 10 Hz i permanentnog magnetskog polja jakosti 0,2 T. Disperzije liposoma su bile izložene otpuštanjem flavonoidima miricetinu i miricitrinu iz magnetskih nanočestica tijekom 4 sata, nakon čega su bile izolirane i spremljene za mjerenje zeta potencijala te oslikavanje mikroskopijom atomskih sila.

4.8. Mjerenje zeta potencijala liposoma nakon otpuštanja flavonoida iz magnetskih nanočestica

Zeta (ξ) potencijal DOPC liposoma prije i poslije inducirane lipidne peroksidacije izmjeren je *Zetasizer Nano ZS* (*Malvern, UK*) opremljenim zelenim laserom ($\lambda = 532 \text{ nm}$) upotrebom *M3-PALS* tehnike. Lipidna peroksidacija je izazvana dodatkom 100 μL otopine H₂O₂ ($c = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$) i 100 μL otopine FeSO₄·7H₂O ($c = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$) disperziji liposoma volumena 2 mL. Nakon dva sata sva mjerenja su provedena pri $25 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$. Obrada podataka izvedena je *Zetasizer*

softwareom 6.32 (Malvern instruments). Zeta potencijal je izračunat iz mjerenja elektroforetske mobilnosti upotrebom Henryeve jednadžbe uz Smoluchowski aproksimacije ($f(Ka) = 1.5$). Rezultati su iskazani kao srednje vrijednosti 3 neovisna mjerenja.

4.9. Priprava uzoraka za oslikavanje

Svi uzorci liposoma prije i poslije inducirne lipidne peroksidacije za oslikavanje pomoću mikroskopa atomskih sila pripremljeni su pri jednakim eksperimentalnim uvjetima metodom pozicioniranja kapi disperzije liposoma na svježe pripremljenoj i očišćenoj površini tinjca pričvršćenog za metalni disk. Disperzija liposoma nakon otpuštanja flavonoida iz magnetskih nanočestica volumena 100 mL je nananesena na hidrofilnu površinu tinjca, inkubirana 5 minuta te isprana s *miliQ* H₂O tri puta kako bi se uklonili neadsorbirani liposomi. Uzorci su sušeni na zraku 2 sata pod kontroliranim uvjetima vlage. Zatim su oslikani mikroskopom atomskih sila.

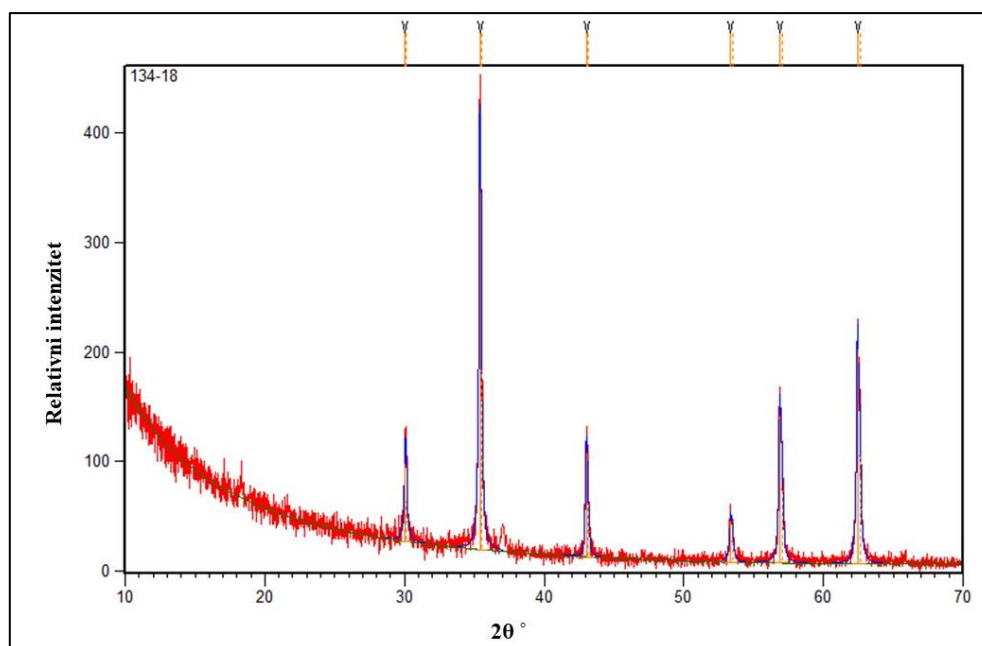
4.9.1. Oslikavanje mikroskopom atomskih sila

Veličina i morfologija liposoma je detektirana *MultiMode* mikroskopom s *Nanoscope IIIa* kontrolerom i "J" pretraživalom (JV) 125 μm (*Bruker*). Tapkajući način rada je primijenjen na zraku s probom (*TESP, Bruker*, nominalne frekvencija 320 kHz, nominalna konstanta sprezanja 42 N m⁻¹). Brzina oslikavanja je optimalizirana između 1,0 and 1,5 Hz pri kutu oslikavanja 0°. Slike su analizirane offline *AFM NanoScope softwarem*, verzijom 5.12r5. Dimenzije liposoma određene su analizom poprečnog presjeka uzduž liposoma.

REZULTATI I RASPRAVA

5. REZULTATI I RASPRAVA

5.1. Rendgenska difrakcija polikristalnog uzorka (XRPD)

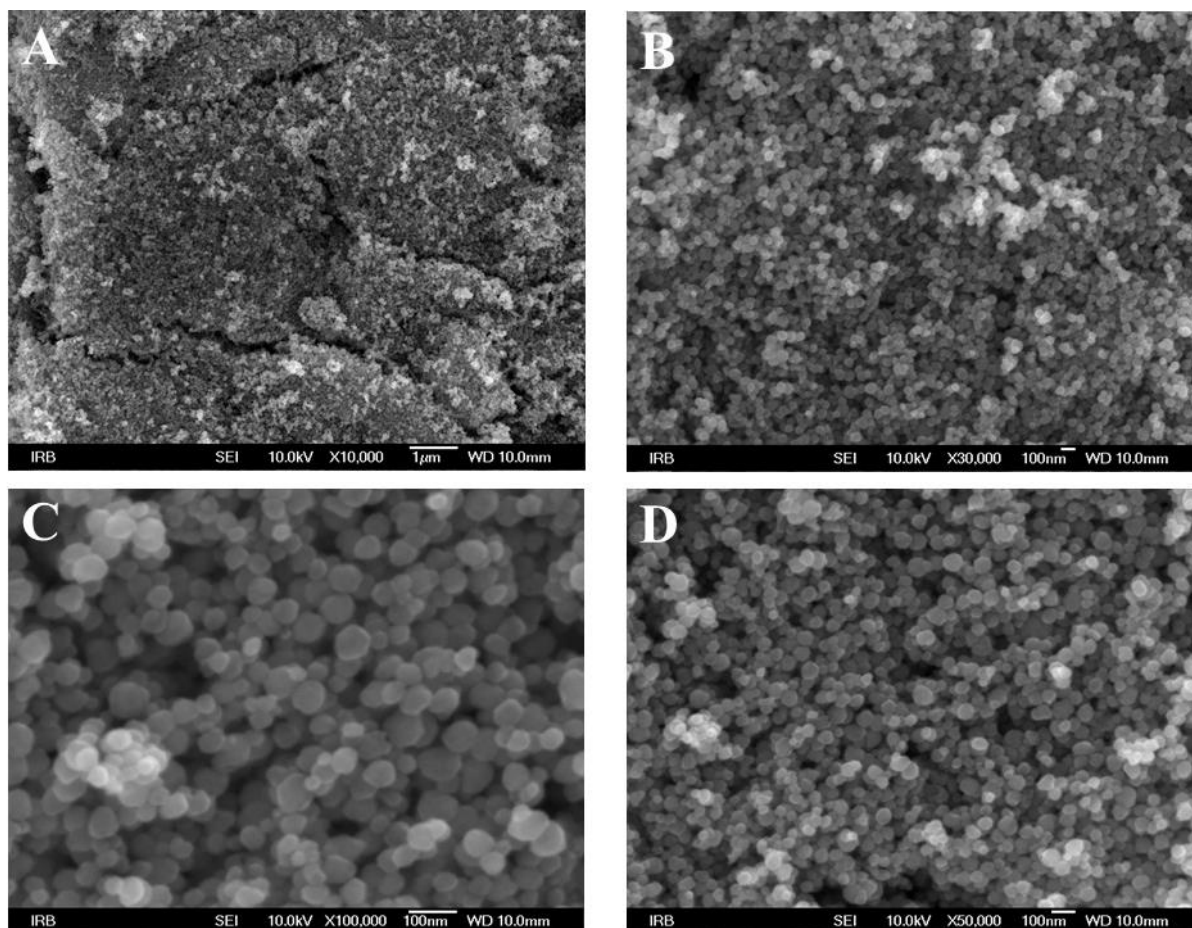


Slika 14. Rendgenski difraktogram magnetita

Na slici 14. prikazan je rendgenski difraktogram ispitivanog uzorka, magnetita, Fe_3O_4 koji posjeduje inverznu spinelsku strukturu. Iz grafičkog prikaza uočavaju se dobro definirani, oštri difrakcijski maksimumi koji ukazuju na visoku čistoću i visoku kristalnost uzorka. Također široki difrakcijski maksimumi ukazuju na ultrafinu prirodu NČ i malu kristalite (35 nm).

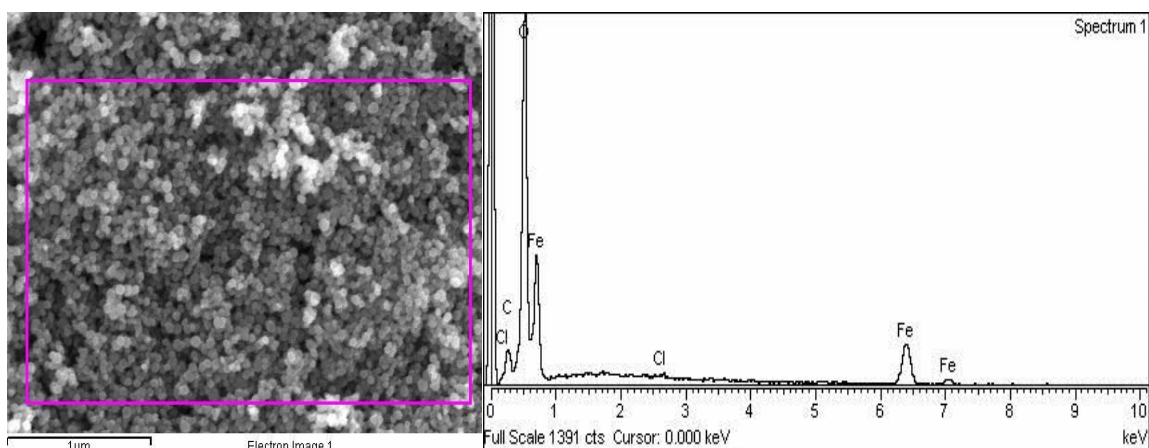
5.2. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM)

Morfologija mezoporoznih Fe₃O₄ NČ dobivena je snimanjem mikrografije (slika 15.) pretražnom elektronskom mikroskopijom.



Slika 15. SEM mikrografije mezoporoznih NČ magnetita

Na SEM mikrografijama može se uočiti mnoštvo malih i aglomeriranih NČ. Također može se uočiti da su mezoporozne NČ magnetita sfernog oblika različitih veličina. Srednja vrijednost veličine sfernih magnetitnih NČ je 58 nm, odnosno najmanja veličina sfernih NČ je 27 nm te najveća 117 nm.



Slika 16. SEM mikrografija magnetita i odgovarajući EDS spektar

EDS analizom (slika 16.) potvrđeno je prisustvo glavnih komponenata željeza i kisika u strukturi magnetita. Dodatni pikovi u EDS spektru javljaju se zbog načina pripreme, odnosno sinteze mezoporoznih NČ magnetita.

5.3. Brunauer-Emmett-Teller (BET) analiza

Određivanje fizikalnih značajki kao što su ukupna specifična površina, volumen pora te veličina pora mezoporoznih NČ magnetita određuje se mjerenjem adsorpcije plina dušika prema Brunauer-Emmet-Teller (BET) metodi.

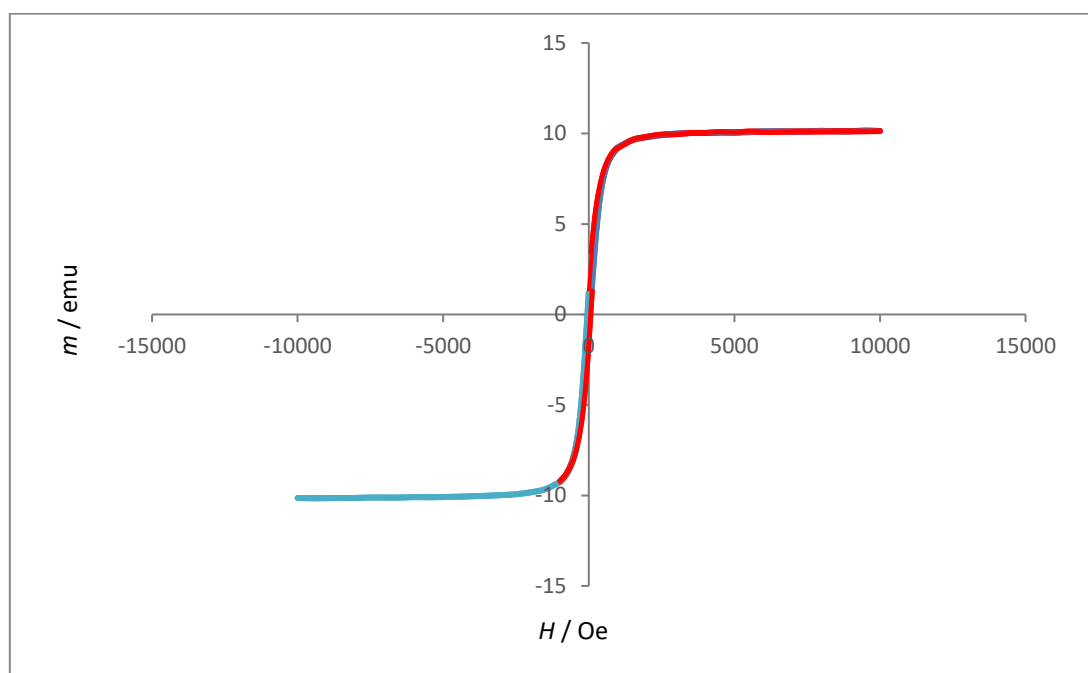
Tablica 3. Rezultati BET analize

Značajke	Jedinice	Rezultat	Metoda
Specifična površina	m ² /g	16,69	ASTM D 3663
Volumen pora	cm ³ /g	0,1060	ASTM D 3663
Veličina pora	nm	25,93	ASTM D 3663

Prema klasifikaciji Međunarodne unije za čistu i primijenjenu kemiju (*International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC*)⁴¹, porozni su materijali podijeljeni su u tri skupine ovisno o promjeru pora. Razlikuju se: mikropore (promjer do 2 nm), mezopore (promjer od 2 do 50 nm) i makropore (promjer veći od 50 nm). Na temelju rezultata BET analize iz tablice 3. može se utvrditi da veličina pora Fe₃O₄ NČ spada u mezopore. Specifična površina mezoporoznih NČ magnetita odnosi se na površinu NČ po jediničnoj masi i ona iznosi 16,69 m²/g.

5.4. Magnetska karakterzacija

Magnetna svojstva Fe₃O₄ mezoporoznih NČ određena su na temelju krivulje magnetizacije pri sobnoj temperaturi. Prednost primjene magnetskih nanočestica jest njihova reakcija na vanjsko magnetsko polje i njihova izrazito visoka magnetizacija zasićenja, koja se obično određuje iz mjerenja petlji histereze (*M-H*) i krivulje magnetizacije u ovisnosti o temperaturi (*M-T*).¹²



Slika 17. Krivulja histereze za Fe₃O₄ NČ

Fe₃O₄ pokazuje ferimagnetizam na sobnoj temperaturi, s magnetizacijom zasićenja do 92 emu g⁻¹, a mezoporozne magnetitne NČ postaju superparamagnetske na sobnoj temperaturi kada je veličina kristalita unutar NČ-a ispod 15 nm. Kada su mezoporozne NČ superparamagnetske, *M-H* krivulja ne pokazuje histerezu, a krivulje magnetizacije snimane u oba smjera se preklapaju. Na slici 17. može se uočiti da se krivulje magnetizacije preklapaju i dokazuju da su mezoporozne NČ magnetita superparamagnetične.

5.5. Ugradnje magnetitnih NČ flavonoidima

Rezultati ugradnje flavonoida kvercetina, miricetina i miricitrina u magnetitne NČ prikazani su u tablicama 4., 5. i 6., a na slikama 18. – 23. su prikazani baždarni pravci za kvercetin, miricetin te miricitrin.

Tablica 4. Rezultati ugradnje kvercetina u magnetitne NČ

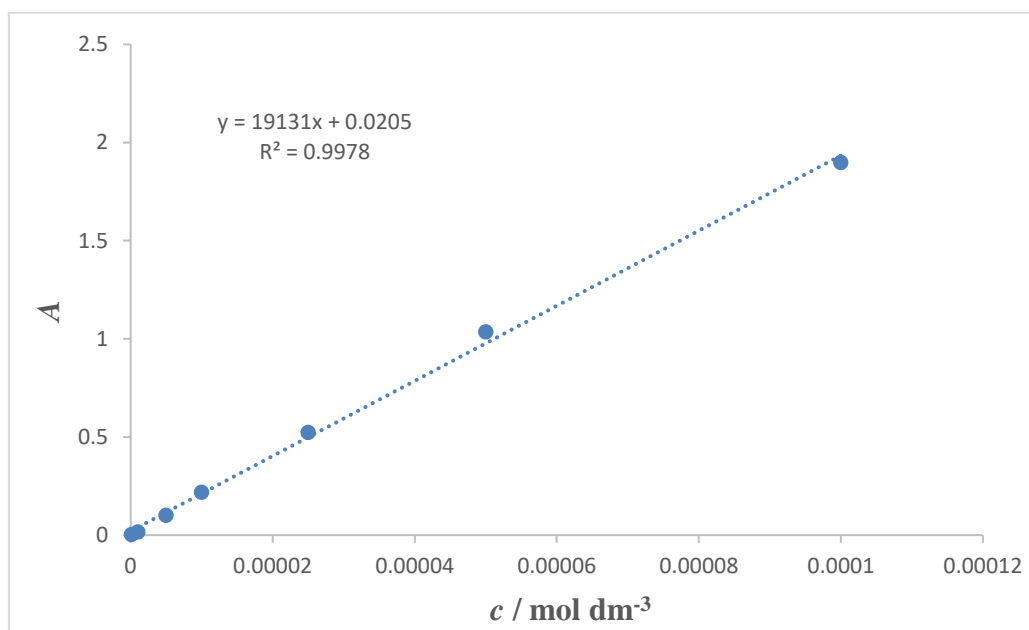
OTOPINA	1	2	3	4	5	6
m (Fe_3O_4), mg	60,78	60,57	60,24	60,52	60,48	60,44
c (zas. ot. kvercetina), mol dm^{-3}	0,01973	0,01973	0,02080	0,02140	0,02407	0,02080
V (zas. ot. kvercetina), mL	31,5	31,5	31,5	31,5	31,5	31,5
c (kvercetin, supernatant), mol dm^{-3}	0,01833	0,01896	0,01790	0,01960	0,02203	0,01750
c (kvercetin, ugrađeno) mol dm^{-3}	0,00140	0,00077	0,00290	0,00160	0,00204	0,00330
m (kvercetin, ugrađeno), g	0,013329	0,007331	0,027609	0,0157233	0,321232	0,519812
LE (učinkovitost ugradnje), %	21,90	12,10	45,80	25,17	32,10	51,96

Tablica 5. Rezultati ugradnje miricetina u magnetitne NČ

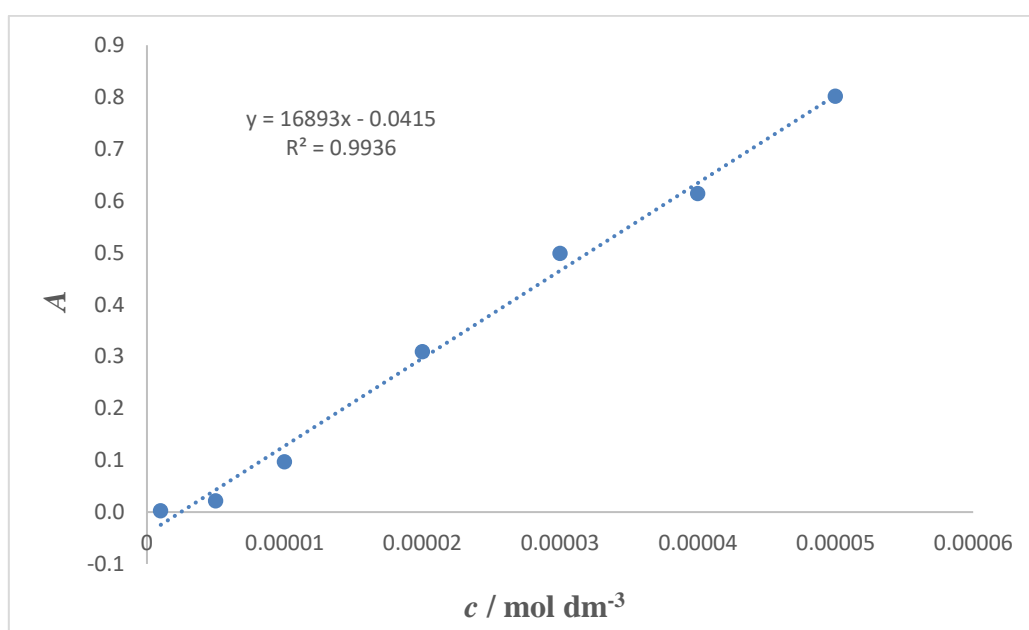
OTOPINA	1	2
m (Fe_3O_4), mg	200,58	200,47
c (zas. otopina miricetina), mol dm^{-3}	0,0246	0,0246
V (zas. otopina miricetina), mL	30	30
c (miricetin, supernatant), mol dm^{-3}	0,0238	0,0230
c (miricetin, ugrađeno) mol dm^{-3}	0,0008	0,0016
m (miricetin, ugrađeno), g	0,0076380	0,00152755
LE (učinkovitost ugradnje), %	0,380780	0,761985
	3,80	7,62

Tablica 6. Rezultati ugradnje miricitrina u magnetitne NČ

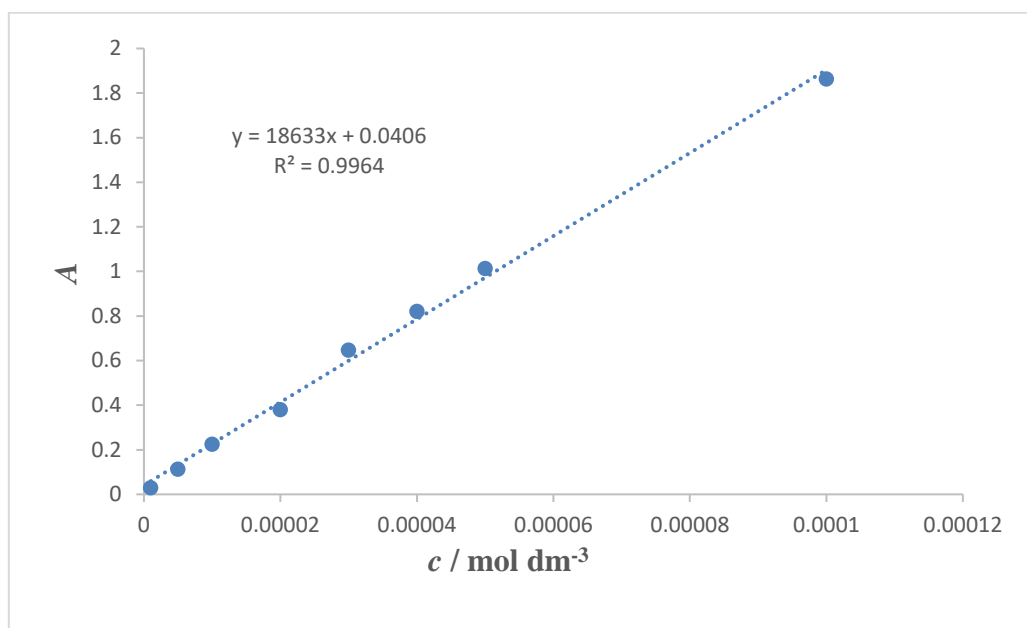
OTOPINA	1	2	3	4
m (Fe_3O_4), mg	90,23	90,04	89,98	90,10
c (zas. otopina miricitrina), mol dm^{-3}	0,0002770	0,0002768	0,0002770	0,0002768
V (zas. otopina miricitrina), mL	50	50	50	50
c (miricitrin, supernatant), mol dm^{-3}	0,0001340	0,0001630	0,0001470	0,0001706
c (miricitrin, ugrađeno) mol dm^{-3}	0,0001430	0,0001138	0,0001300	0,0000106
m (miricitrin, ugrađeno), g	0,0332570	0,0026423	0,0030140	0,0273680
LE (učinkovitost ugradnje), %	0,0367470	0,293461	0,0334940	0,0273680
	3,60	2,90	3,30	2,70



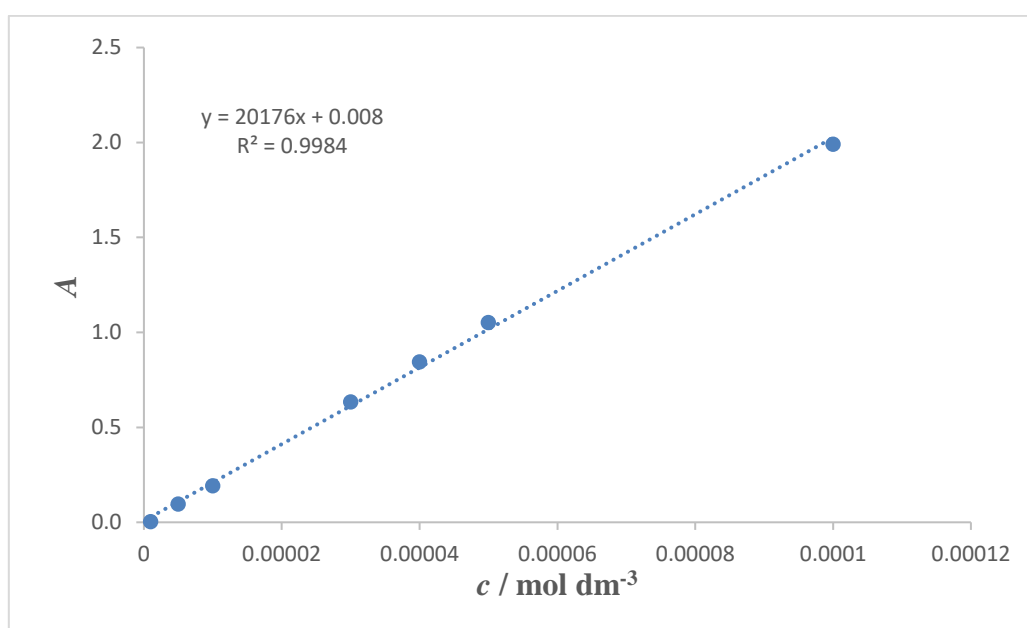
Slika 18. Kalibracijski pravac kvercetina u etanolu pri maksimumu 374,19 nm,
 $l = 1 \text{ cm}$, $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$



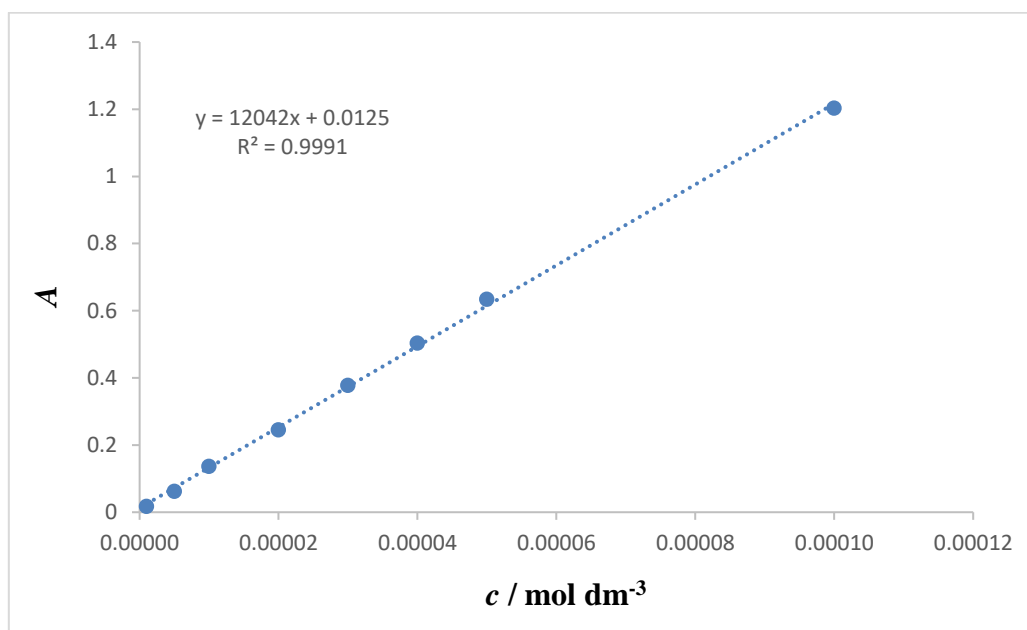
Slika 19. Kalibracijski pravac kvercetina u otopini etanola i PBS u volumnom omjeru 50:50
 pri maksimumu 382,72 nm, $l = 1 \text{ cm}$, $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$



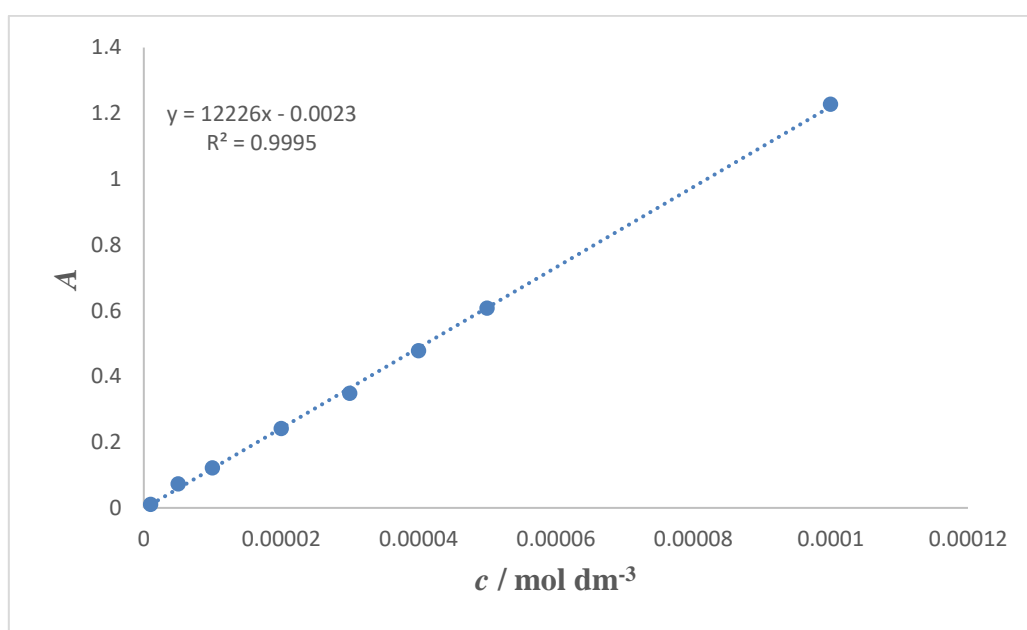
Slika 20. Kalibracijski pravac miricetina u otopini etanola pri maksimumu 377,89 nm,
 $l = 1 \text{ cm}$, $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$



Slika 21. Kalibracijski pravac miricetina u otopini etanola i PBS u volumnom omjeru 50:50
pri maksimumu 340,06 nm, $l = 1 \text{ cm}$, $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$



Slika 22. Kalibracijski pravac miricitrina u vodenoj otopini pri maksimumu 346,62 nm, $l = 1 \text{ cm}$, $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$



Slika 23. Kalibracijski pravac miricitrina u otopini etanola i PBS u volumnom omjeru 50:50 pri maksimumu 351,46 nm, $l = 1 \text{ cm}$, $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$

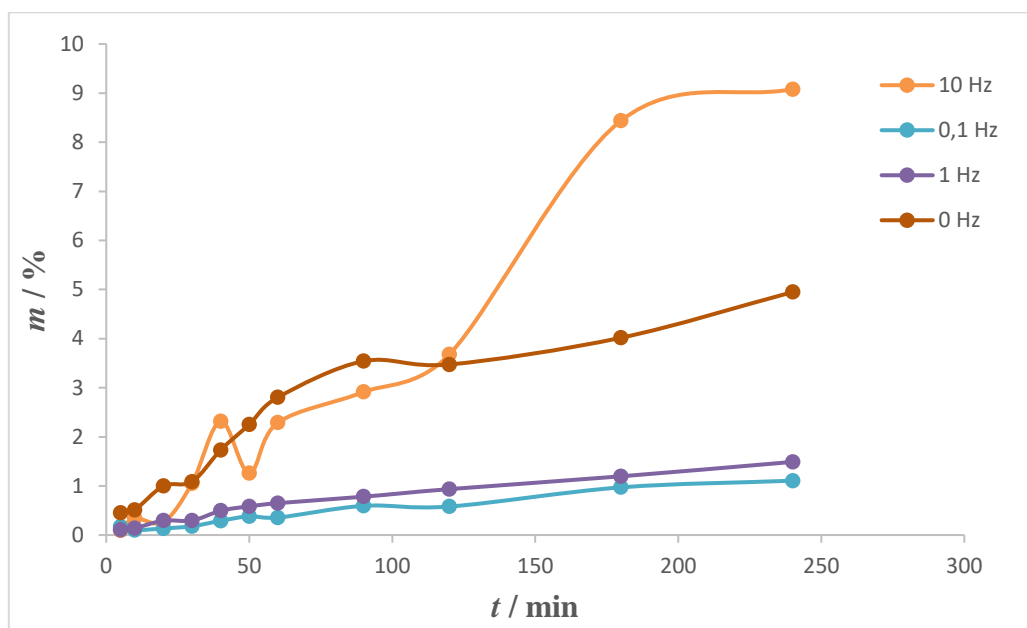
Na temelju baždarnih pravaca prikazanih na slikama 18.-23., izračunata je koncentracija prije i nakon ugradnje flavonoida u nanočestice. Iz razlike koncentracije izračunata je efikasnost ugradnje. Ugradnja kvercetina u rasponu je od 12,1 % do 51,98 %, miricetina u rasponu od 3,80

% do 7,62 %, te miricitrina u rasponu od 2,70% do 3,60%. Na temelju rezultata kvercetin je flavonoid koji je ugrađivan najveći broj puta te je pokazao najbolji postotak ugradnje i dobru reproducibilnost.

5.6. Kinetika otpuštanja flavonoida iz magnetitnih NČ

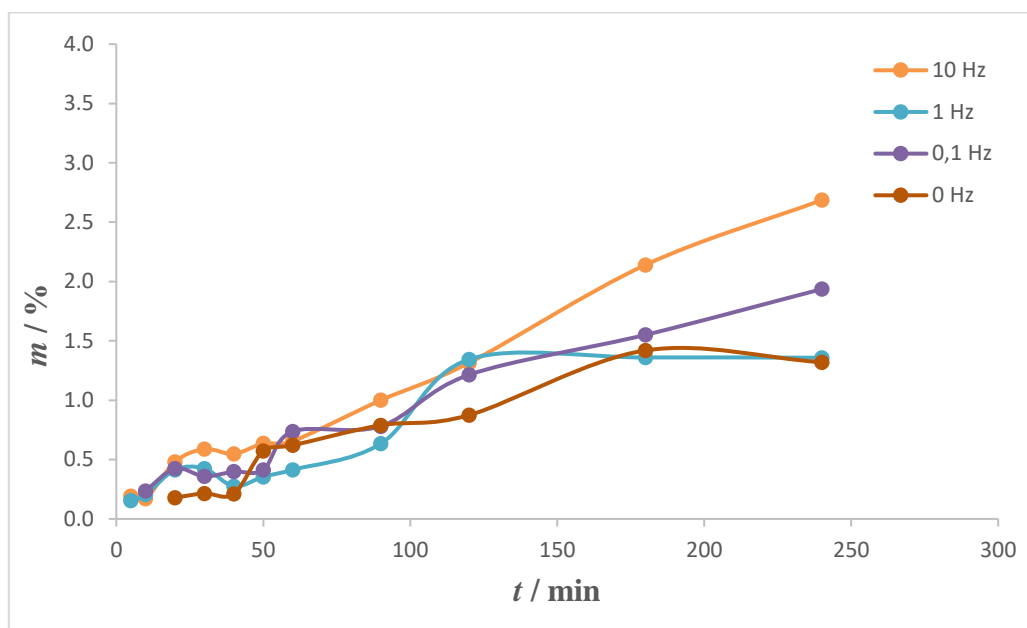
Otpuštanje flavonoida u otopini etanola i PBS volumnog omjera 50:50 iz mezoporoznih NČ postavljenih u membrane određeno je pomoću UV/VIS spektrofotometrije. Svako mjerenje obavljeno je unutar 240 min, a rezultati su prikazani kao promjena postotka mase ugrađenog flavonoida u vremenu.

Na slici 24. prikazano je otpuštanje kvercetina bez i pod utjecajem magnetskog polja. U ranoj fazi otpuštanja nije primijećeno nagli porast u masi otpuštenog flavonoida primjenom oscilirajućeg magnetskog polja 0,1 Hz te 1,0 Hz. Također u tim slučajevima nije primijećeno naglije povećanje te otpuštanje kvercetina vrlo nisko (1 % nakon 4 h). Bez utjecaja magnetskog polja u ranijem stupnju otpuštanja primijećen je nagli rast otpuštanja kvercetina. Nakon 120 min otpuštanje kvercetina doseglo je nešto više od 3 % te nakon čega slijedi stagnacija sve do 160-e min kada otpuštanje raste i na kraju doseže oko 4 %. Pri otpuštanju primjenom oscilirajućeg magnetskog polja 10 Hz prvi nagli rast primijećen je u 40-oj minuti kada prelazi 2 %. Nakon pada oko 50-e minute slijedi rast otpuštanja od 3,7 % te nakon 2 sata do konačnih 9 %. Uočava se da je otpuštanje skoro dvostruko veće u usporedbi s otpuštanjem bez magnetskog polja (5 %). Vrlo niskofrekventna oscilirajuća magnetska polja u kombinaciji s permanentnim magnetskim poljem 0,19 T značajno utječu na otpuštanje profila.



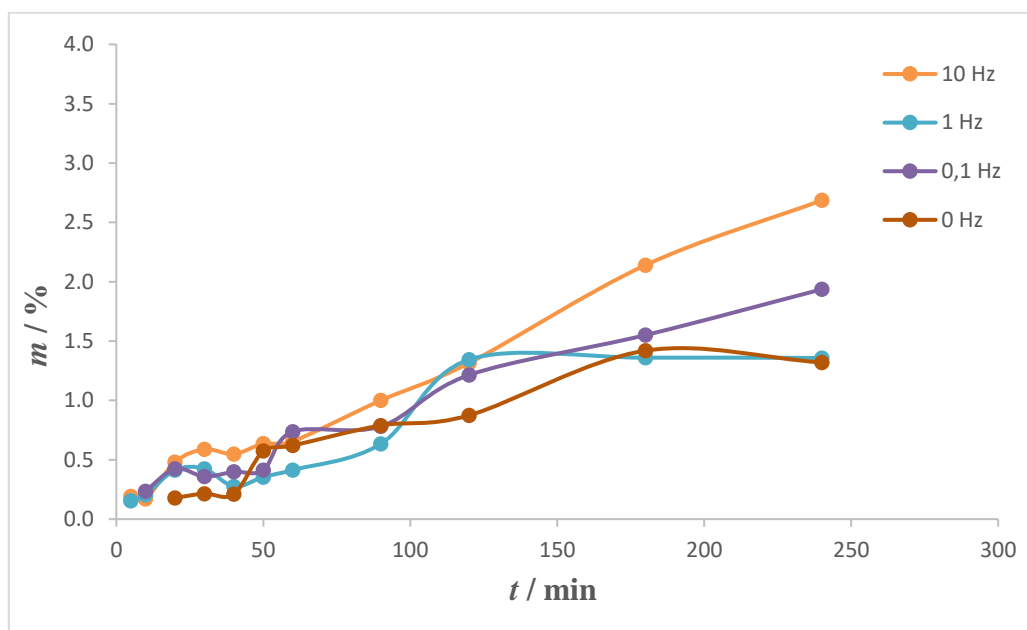
Slika 24. Otpuštanje kvercetina bez i pod utjecajem magnetskog polja

Na slici 25. prikazano je otpuštanje miricetina pri jednakim uvjetima. Prvih sat vremena otpuštanja primjenom oscilirajućeg magnetskog polja od 1,0 Hz primjećuje se najveći porast mase otpuštenog flavonoida. Otpuštanje i dalje raste te nakon 2 h doseže 2,15 %. Zatim slijedi stagnacija te potom otpuštanje od 3 % nakon 4 sata. Primjenom izmjeničnog magnetskog polja od 0,1 Hz uočava se konstantni rast otpuštanja od prvog sata te nakon 4 sata doseže 2,90 %. Bez utjecaja magnetskog polja otpuštanje raste sve do 90-e minute nakon čega slijedi pad na 0,6 %, a nakon 4 h rast do 2,3 %. Primjenom izmjeničnog magnetskog polja od 10 Hz u prvih 60 minuta primjećuje se slabo otpuštanje ispod 1 %, a potom konstantan rast nakon 4 sata do 3,5 %.



Slika 25. Otpuštanje miricetina bez i pod utjecajem magnetskog polja

Na slici 26. prikazani su rezultati otpuštanja miricitrina. U prvih sat vremena najveće otpuštanje primjećuje se primjenom oscilirajućeg magnetskog polja od 10 Hz koje raste tijekom 4 h i doseže vrijednost od 2,70 %. Primjenom magnetskog polja 1,0 Hz uočavaju se dva nagla rasta nakon pola sata te nakon 2 sata kada je otpuštanje približno onom pri magnetskom polju od 10 Hz te iznosi 1,35 %. Nakon toga slijedi stagnacija i otpuštanje se zadržava na istom nivou. Primjenom magnetskog polja od 0,1 Hz prvi porast primjećuje se nakon 20 minuta i iznosi 0,40 %. Nakon toga otpuštanje raste gotovo linearno sve dok u konačnici ne dosegne 1,90 %. Bez primjene magnetskog bolja primjećuju se dva porasta, 0,60 % nakon 50 min i 1,40 % nakon 3 sata. Nakon 4 sata otpuštanje ostaje na istoj razini.

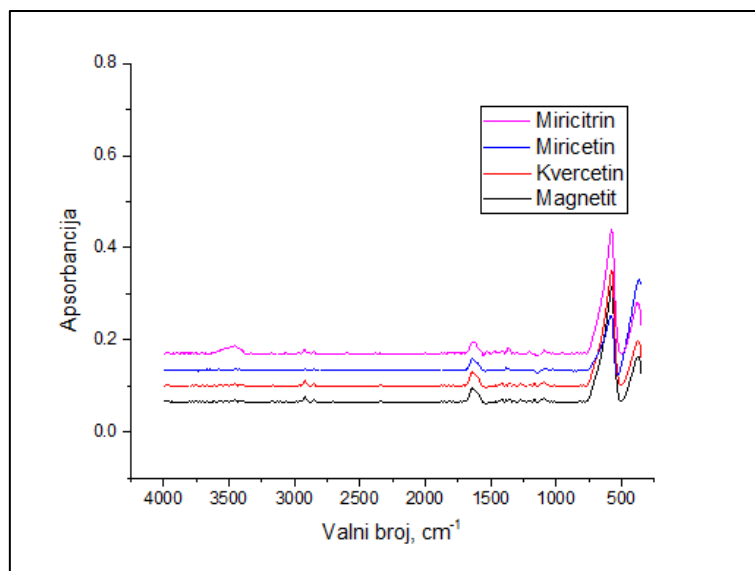


Slika 26. Otpuštanje miricitrina bez i pod utjecajem magnetskog polja

Nadalje, uočava se da otpuštanje primjenom izmjeničnog magnetskog polja 10 Hz dvostruko veće (2,70 %) nego u usporedbi s otpuštanjem bez primijenjenog magnetskog polja (1,30 %), isto kao kod otpuštanja kvercetina. Može se zaključiti da je snaga stalnog magnetskog polja i frekvencija izmjeničnog polja povezana s ponašanjem mezoporoznih magnetitnih NČ u viskoznom mediju. Čestice se okreću zbog zakretnog momenta izazvanog oscilirajućim magnetskim poljem. Sveukupni učinak je slabljenje interakcija između čestica zbog sada povećanih udaljenosti među česticama te bržeg oslobađanja flavonoida iz unutrašnjosti NČ. S druge strane, rotacija NČ je vrhunska u relativnom jakom magnetskom polju od 0,19 T. Kinetika konačnog otpuštanja ovisi o doprinosu dvaju suprotnih učinaka. Kombiniranjem permanentnog magnetskog polja 0,19 T i oscilirajućeg magnetskog polja 10 Hz otpuštanje se povećava, dok kombinacije istog trajnog magnetskog polja s dvije niže frekvencije smanjuje kinetiku otpuštanja. Tim se može zaključiti da kombinacijom permanentnog i oscilirajućih magnetskih polja može kontrolirati otpuštanje lijeka.

5.7. Infracrvena spektroskopija

Na slici 27. prikazani su IR spektri koji služe kako bi se dokazao sastav NČ te ugradnja flavonoida u mezoporozne NČ magnetita.

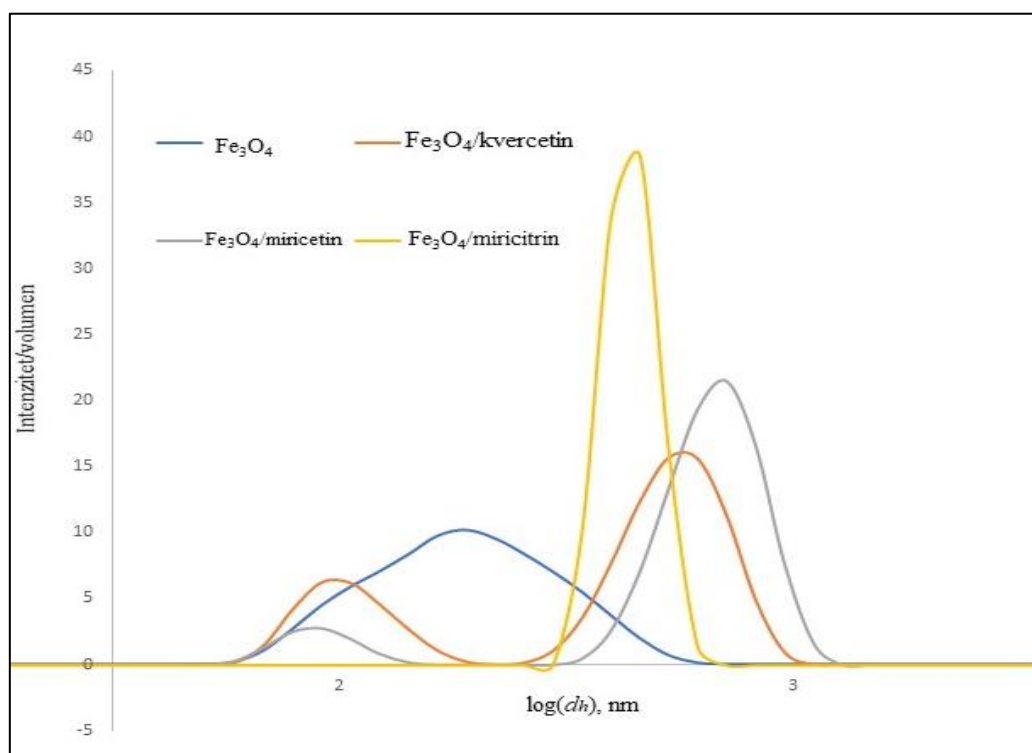


Slika 27. IR spektri čistog magnetita i magnetita s ugrađenim kvercetinom, miricetinom te miricitrinom

Kod IR spektra čistog magnetita uočava se karakteristična vibracijska vrpca Fe-O istezanja u valnom području 540 cm^{-1} . Također se uočavaju vrpce na 1642 cm^{-1} i 1386 cm^{-1} koje odgovaraju vibracijama veza između karboksilne skupine PEG 4000 i atoma Fe na površini mezoporoznih Fe_3O_4 NČ. Ugradnjom kvercetina i miricetina u mezoporozni Fe_3O_4 ne uočavaju se promjene na vrpcama IR spektra, dok kod ugradnje miricitrina dolazi do pojave novih vrpce primjerice vrpca na 3430 cm^{-1} što odgovara istezanju OH skupinama i vrpca 1353 cm^{-1} koja odgovara C-OH deformacijskim vibracijama.

5.8. Dinamičko raspršenje svjetlosti i zeta potencijal

Kako bi se potvrdila koloidna stabilnost NČ te NČ s ugrađenim flavonoidima na slici 28. prikazani su rezultati volumne raspodjele veličine NČ u PBS-u pomoću dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS).

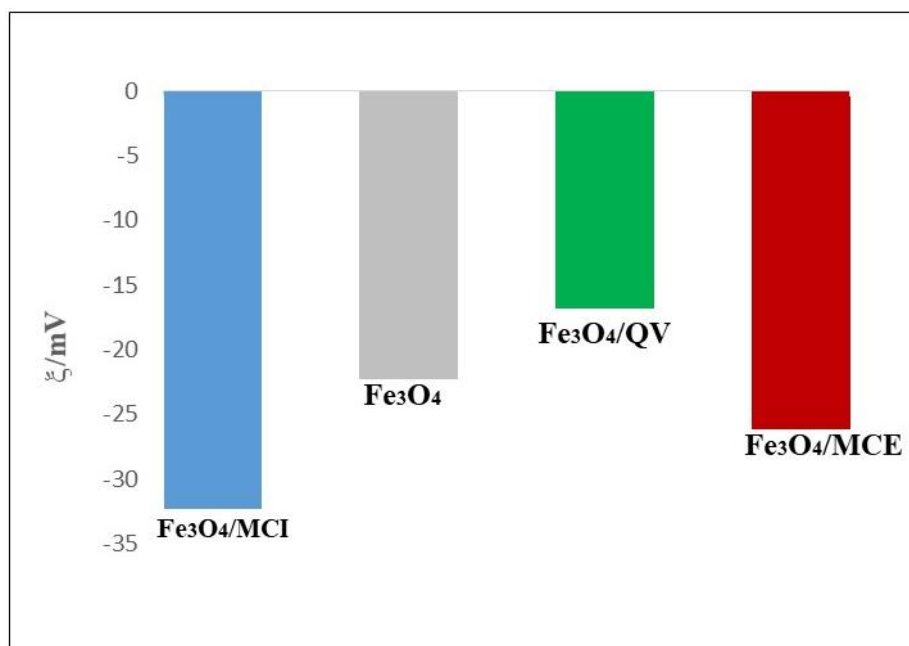


Slika 28. Raspodjela veličine NČ

U PBS-u čiste NČ pokaimaju vrijednost hidrodinamičkog promjera od 190 nm, a ugradnjom kvercetina u NČ uočavaju se dvije raspodjele veličina, na prvom piku hidrodin promjer iznosi 91,3 nm, a na drugom piku 531 nm. Ugradnjom miricetina u NČ također postoje dvije raspodjele veličina, prva raspodjela na 91,3 nm, a druga raspodjela na 712 nm. Ugradnjom miricitrina u NČ uočava se samo jedna raspodjela na 459 nm. Prva, odnosno manja raspodjela veličine NČ odnosi se na pojedinačne NČ, a druga tj. veća raspodjela veličine NČ na agregate. Razlog zbog kojeg miricitrin ima samo jednu raspodjelu veličine NČ je što u svojoj strukturi ima šećer ramnozu vezan na 3. poziciji središnjeg C prstena te je samim tim hidrofilniji dok su kvercetin i miricetin hidrofobniji, rade veće agregate budući da su okruženi vodom i to im je okruženje nepovoljno.

REZULTATI I RASPRAVA

Provedena su mjerenja zeta potencijala kako bi se proučio naboj na površini magnetita te je potvrđena ugradnja kvercetina, miricetina i miricitrina u NČ magnetita.



Slika 29. Zeta potencijal Fe₃O₄ NČ i Fe₃O₄ NČ s ugrađenim kvercetinom, miricetinom i miricitrinom

Na slici 29. je prikazan zeta potencijal mezoporoznih magnetitnih NČ i Fe₃O₄ NČ napunjenih s flavonoidima kvercetinom, miricetinom i miricitrinom. Prazne Fe₃O₄ nanočestice imaju negativan zeta potencijal ($-22,2 \pm 0,8$ mV), a razlog tome je njihova velika stabilnost. Zeta potencijal NČ napunjenih kvercetinom je $-16,7 \pm 1,1$ mV, miricetinom $-26,1 \pm 1,2$ mV te miricitrinom $-32,3 \pm 1,7$ mV. Uočava se da je najveća promjena zeta potencijala vidljiva kod miricitrina jer je hidrofilan i on je lociran i na površini NČ. Promjena zeta potencijala potvrđuje uspješnu ugradnju flavonoida na površinu mezoporoznih magnetitnih NČ te izrazitu stabilnost u PBS puferu.

REZULTATI I RASPRAVA

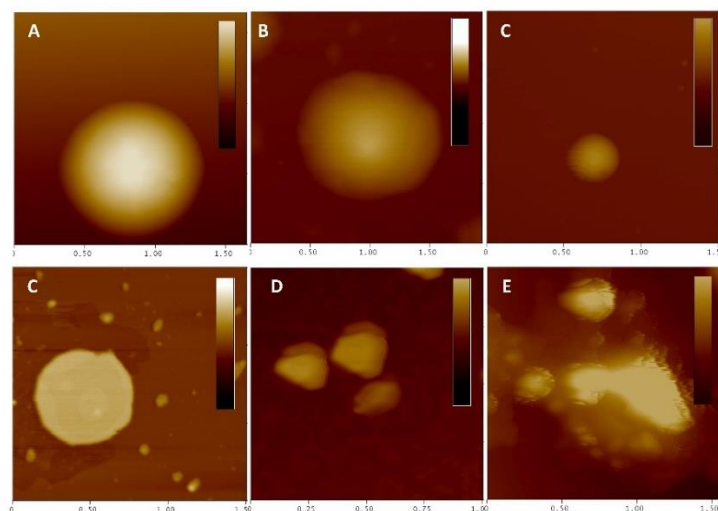
Nadalje, u tablici 7. prikazane su vrijednosti zeta potencijala liposoma DOPC ($\gamma=0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) u PBS-u prije i nakon ugradnje flavonoida, te prije i poslije inducirane lipidne peroksidacije.

Tablica 7. Rezultati zeta potencijala prije i poslije inducirane lipidne peroksidacije

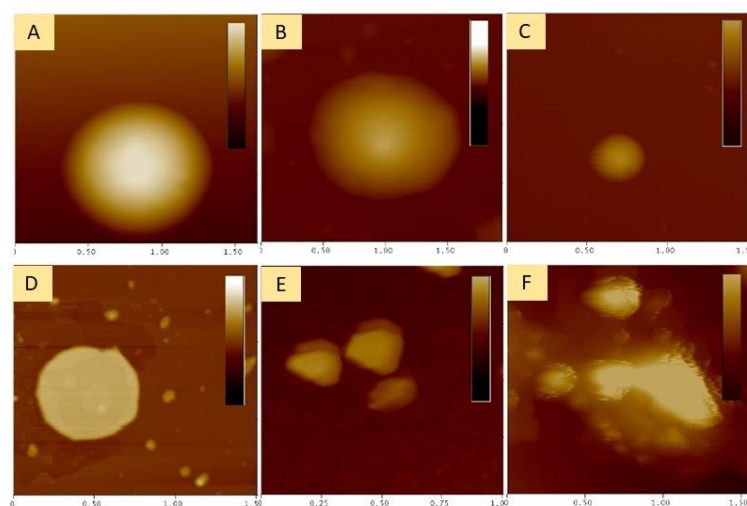
Uzorak	ξ prije dodatka H_2O_2 i $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$		ξ nakon dodatka H_2O_2 i $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	
	0 Hz	10 Hz	0 Hz	10 Hz
DOPC ($\gamma= 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$)	-2,2±0,6 mV	/	-8,2±0,7 mV	/
DOPC ($\gamma= 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) + miricetin	-3,5±0,4 mV	-3,9±0,5 mV	-9,9±0,8 mV	-2,5±0,2 mV
DOPC ($\gamma= 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) + miricitrin	-19±2 mV	-13±1 mV	-8,9±2 mV	-15,6±0,7 mV

Dok za kontrolni uzorak liposoma, DOPC-a u PBS-u prije lipidne peroksidacije vrijednost zeta potencijala iznosi $\xi = (-2,2 \pm 0,6) \text{ mV}$, nakon lipidne peroksidacije dolazi do promjene vrijednosti na $\xi = (-8,2 \pm 0,7) \text{ mV}$ što ukazuje na narušavanje njegovog lipidnog dvosloja. Ugradnjom miricetina i miricitrina pod djelovanjem magnetskog polja vrijednosti se pomiču prema negativnim vrijednostima $\xi = (-3,5 \pm 0,4) \text{ mV}$ i $\xi = (-19 \pm 2) \text{ mV}$ u slučaju primijenjenog vanjskog magnetskog polja. Bez primijenjenog magnetskog polja, zeta potencijal se neznatno mijenja u slučaju miricetina $\xi = (-3,9 \pm 0,5) \text{ mV}$, dok se u slučaju miricitrina zeta potencijal mijenja znatno više prema negativnim vrijednostima $\xi = (-13 \pm 1) \text{ mV}$. Dobivene vrijednosti potvrđuju ne samo da su flavonoidi ugrađeni u liposome znatno više u uvjetima vanjskog primijenjenog magnetskog polja (miricetin), nego indirektno govore da je hidrofobni miricetin ugrađen u unutarnji dio lipidnog dvosloja, dok se hidrofilni miricitrin ugradio u površinski dio lipidnog dvosloja mijenjajući zeta potencijal značajnije nego miricetin. Nakon lipidne peroksidacije, struktura lipidnog dvosloja je narušena što se reflektiralo u izmjeranim vrijednostima zeta potencijala bez i pod utjecajem vanjskog magnetskog polja prikazanim u tablici 7.

5.9. Mikroskopija atomskih sila

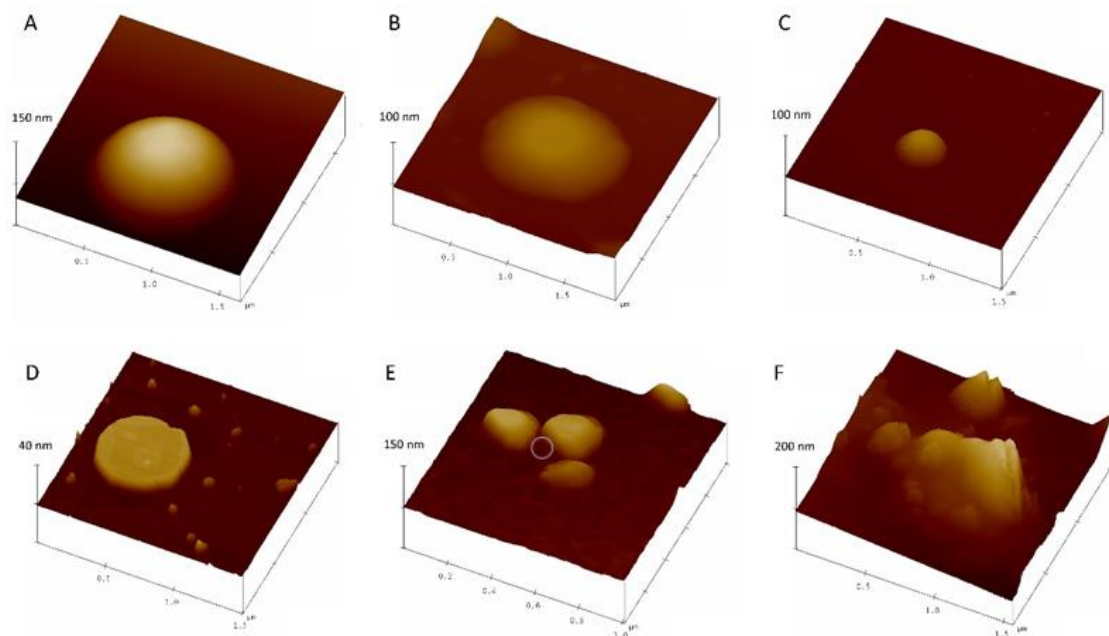


Slika 30. Topografija DOPC liposoma bez i s ugrađenim miricitrinom prije i poslije inducirane lipidne peroksidacije (LP): (A) DOPC liposomi prije LP; (D) DOPC liposomi poslije LP; (B) DOPC liposomi s ugrađenim miricitrinom pod djelovanjem magnetskog polja 10 Hz prije LP; (E) DOPC liposomi s ugrađenim miricitrinom pod djelovanjem magnetskog polja 10 Hz poslije LP; (C) DOPC liposomi s ugrađenim miricitrinom bez magnetskog polja prije LP; (F) DOPC liposomi s ugrađenim miricitrinom bez magnetskog polja poslije LP.

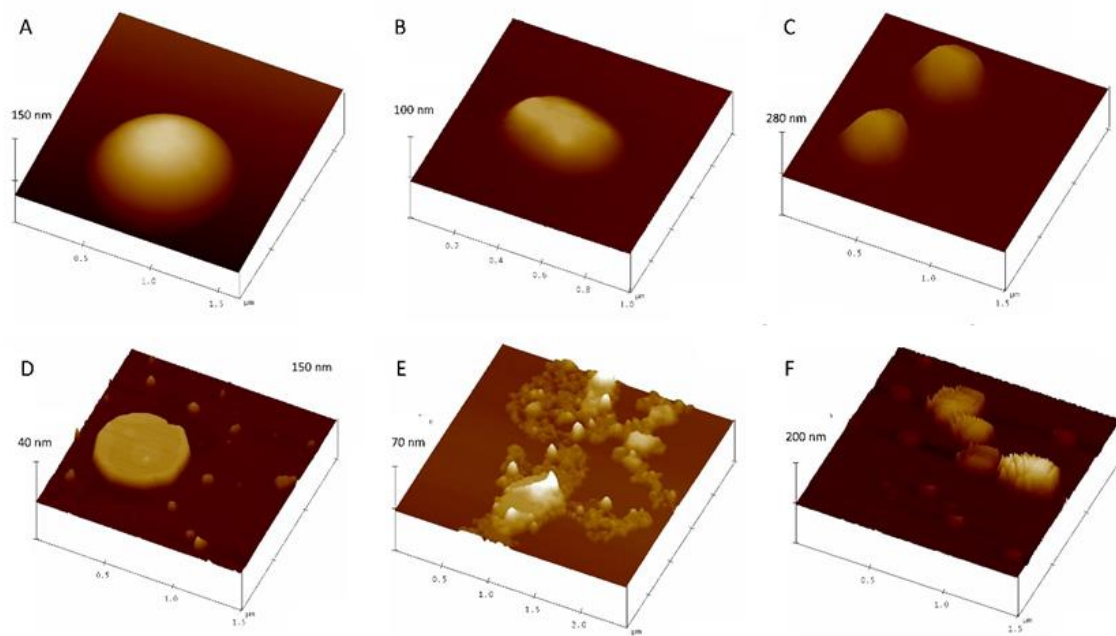


Slika 31. Topografija DOPC liposoma bez i s ugrađenim miricetinom prije i poslije inducirane lipidne peroksidacije (LP): (A) DOPC liposomi prije LP; (D) DOPC liposomi poslije LP; (B) DOPC liposomi s ugrađenim miricetinom pod djelovanjem magnetskog polja 10 Hz prije LP; (E) DOPC liposomi s ugrađenim miricetinom pod djelovanjem magnetskog polja 10 Hz poslije

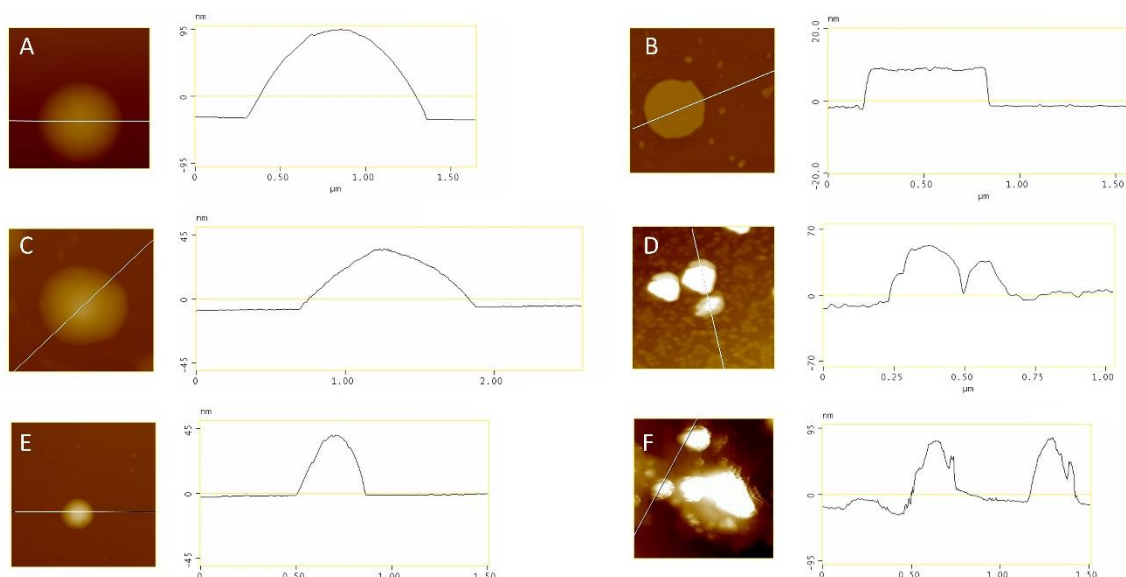
LP; (C) DOPC liposomi s ugrađenim miricitinom bez magnetskog polja prije LP; (F) DOPC liposomi s ugrađenim miricitinom bez magnetskog polja poslije LP.



Slika 32. 3D topografski prikaz DOPC liposoma bez i s ugrađenim miricitinom prije i poslije inducirane lipidne peroksidacije (LP): (A) DOPC liposomi prije LP; (D) DOPC liposomi poslije LP; (B) DOPC liposomi s ugrađenim miricitinom pod djelovanjem magnetskog polja 10 Hz prije LP; (E) DOPC liposomi s ugrađenim miricitinom pod djelovanjem magnetskog polja 10 Hz poslije LP; (C) DOPC liposomi s ugrađenim miricitinom bez magnetskog polja prije LP; (F) DOPC liposomi s ugrađenim miricitinom bez magnetskog polja poslije LP.

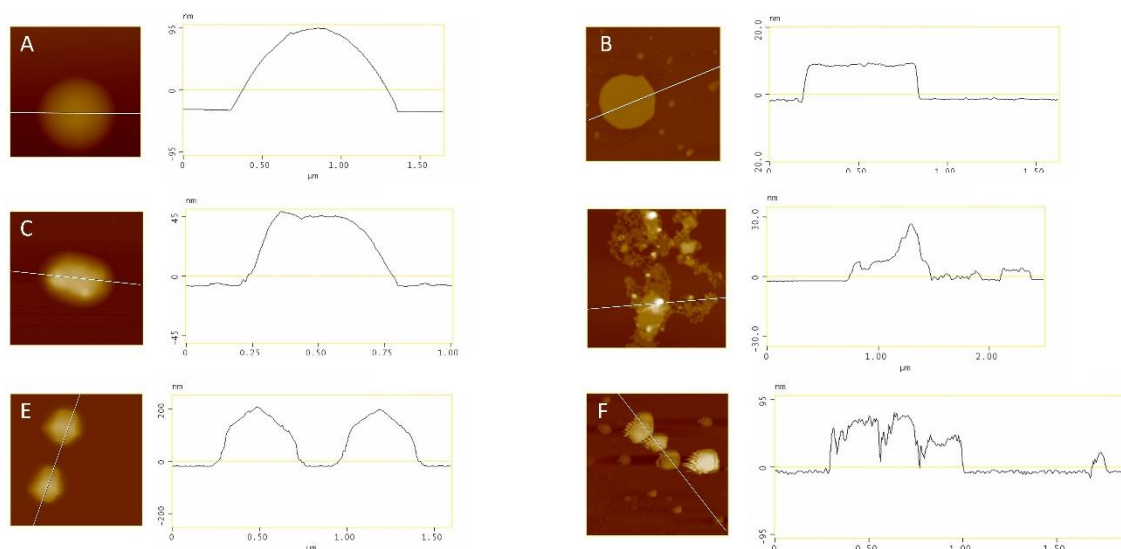


Slika 33. 3D topografski prikaz DOPC liposoma bez i s ugrađenim miricetinom prije i poslije inducirane lipidne peroksidacije (LP): (A) DOPC liposomi prije LP; (D) DOPC liposomi poslije LP; (B) DOPC liposomi s ugrađenim miricetinom pod djelovanjem magnetskog polja 10 Hz prije LP; (E) DOPC liposomi s ugrađenim miricetinom pod djelovanjem magnetskog polja 10 Hz poslije LP; (C) DOPC liposomi s ugrađenim miricetinom bez magnetskog polja prije LP; (F) DOPC liposomi s ugrađenim miricetinom bez magnetskog polja poslije LP.

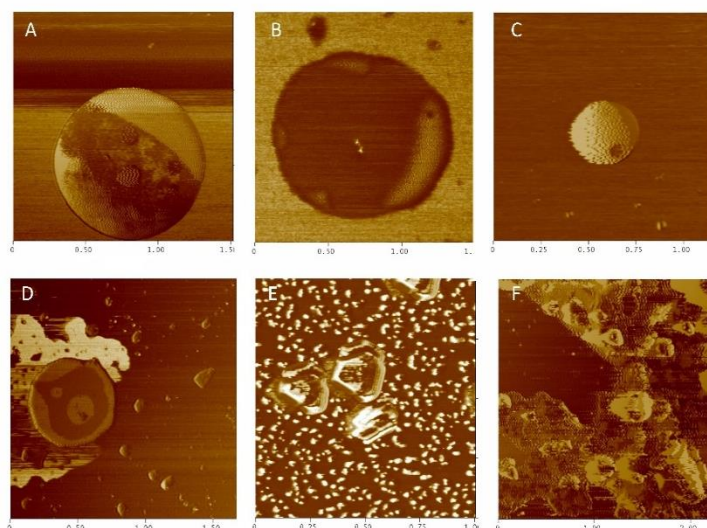


Slika 34. Prikaz poprečnog presjeka DOPC liposoma bez i s ugrađenim miricetinom prije i poslije inducirane lipidne peroksidacije (LP): (A) DOPC liposomi prije LP; (B) DOPC liposomi poslije LP; (C) DOPC liposomi s ugrađenim miricetinom pod djelovanjem

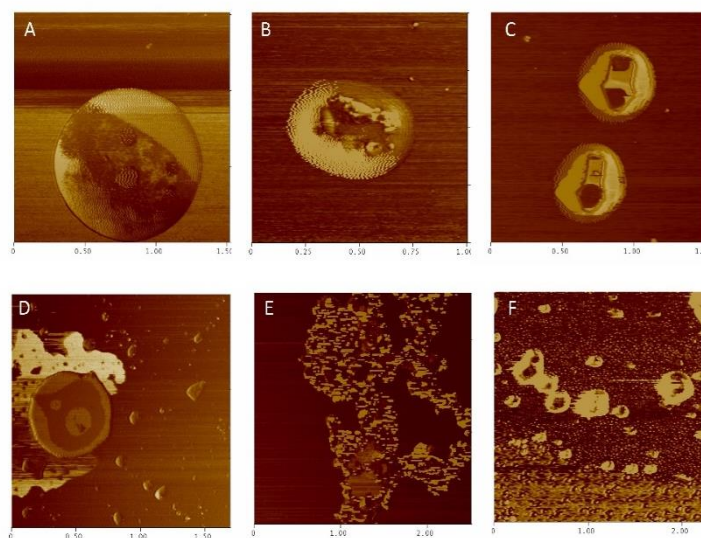
magnetskog polja 10 Hz prije LP; (D) DOPC liposomi s ugrađenim miricitrinom pod djelovanjem magnetskog polja 10 Hz poslije LP; (E) DOPC liposomi s ugrađenim miricitrinom bez magnetskog polja prije LP; (F) DOPC liposomi s ugrađenim miricitrinom bez magnetskog polja poslije LP.



Slika 35. Prikaz poprečnog presjeka DOPC liposoma bez i s ugrađenim miricetinom prije i poslije inducirane lipidne peroksidacije (LP). (A) DOPC liposomi prije LP; (B) DOPC liposomi poslije LP; (C) DOPC liposomi s ugrađenim miricetinom pod djelovanjem magnetskog polja 10 Hz prije LP; (D) DOPC liposomi s ugrađenim miricetinom pod djelovanjem magnetskog polja 10 Hz poslije LP; (E) DOPC liposomi s ugrađenim miricetinom bez magnetskog polja prije LP; (F) DOPC liposomi s ugrađenim miricetinom bez magnetskog polja poslije LP.



Slika 36. Fazni prikaz DOPC liposoma bez i s ugrađenim miricitrinom prije i poslije inducirane lipidne peroksidacije (LP): (A) DOPC liposomi prije LP; (D) DOPC liposomi poslije LP; (B) DOPC liposomi s ugrađenim miricitrinom pod djelovanjem magnetskog polja 10 Hz prije LP; (E) DOPC liposomi s ugrađenim miricitrinom pod djelovanjem magnetskog polja 10 Hz poslije LP; (C) DOPC liposomi s ugrađenim miricitrinom bez magnetskog polja prije LP; (F) DOPC liposomi s ugrađenim miricitrinom bez magnetskog polja poslije LP.



Slika 37. Fazni prikaz DOPC liposoma bez i s ugrađenim miricetinom prije i poslije inducirane lipidne peroksidacije (LP). (A) DOPC liposomi prije LP; (C) DOPC liposomi poslije LP; (B) DOPC liposomi s ugrađenim miricetinom pod djelovanjem magnetskog polja 10 Hz prije LP;

REZULTATI I RASPRAVA

(E) DOPC liposomi s ugrađenim miricetinom pod djelovanjem magnetskog polja 10 Hz poslije LP; (C) DOPC liposomi s ugrađenim miricetinom bez magnetskog polja prije LP; (F) DOPC liposomi s ugrađenim miricetinom bez magnetskog polja poslije LP.

Tablica 8. Vrijednosti lateralne dimenzije DOPC liposoma bez i s ugrađenim flavonoidima prije i poslije inducirane lipidne peroksidacije

Lateralni presjek (ϕ), μm	Prije dodatka H_2O_2 i $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$		Nakon dodatka H_2O_2 i $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	
	0 Hz	10 Hz	0 Hz	10 Hz
Kontrolni uzorak DOPC ($\gamma = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$)	1-1,5	-	0,5-0,7	-
DOPC ($\gamma = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) + miricetin	0,4-0,5	1,2-1,3	0,3-0,35	0,16-0,27
DOPC ($\gamma = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) + miricitrin	0,4-0,45	0,4-0,5	0,3-0,4	0,35-0,4

Tablica 9. Vrijednosti izmjerenih visina DOPC liposoma bez i s ugrađenim flavonoidima prije i poslije inducirane lipidne peroksidacije

Visina (h), nm^{-1}	Prije dodatka H_2O_2 i $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$		Nakon dodatka H_2O_2 i $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	
	0 Hz	10 Hz	0 Hz	10 Hz
Kontrolni uzorak DOPC ($\gamma = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$)	10-15	/	10-11	/
DOPC ($\gamma = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) + miricetin	200-230	40-50	80-90	100-160
DOPC ($\gamma = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) + miricitrin	40-45	40-50	100-120	100-120

Iz topografskih 2D i 3D prikaza liposoma prikazanim na slikama 30., 31., 32. i 33., uočava se da se morfologija površine liposoma ne mijenja značajno s ugradnjom miricitrina, ali se bitno mijenja s ugradnjom hidrofobnog miricetina. Kao kontrolni uzorak liposoma poslužio je čisti DOPC prije i nakon inducirane lipidne peroksidacije. DOPC liposomi posjeduju savršenu kupolu s morfologijom glatke polusfere adsorbirane na površinu tinjca. Nakon dodatka vodikovog peroksida i iona željeza, reagenasa koji induciraju lipidnu peroksidaciju, lipidni dvosloj se restruktuirao i na tinjcu zaostaje dvosloj debljine 10 -12 nm, što odgovara debljini dvosloja. Liposomi s ugrađenim miricetinom posjeduju površinu koja više nije glatka oblika kupole (slika 31 B, 31C) kao što je to vidljivo kod liposoma s ugrađenim miricitrinom (slika 30 B, 30 C). Za razliku od miricitrina, hidrofobni miricetin ulazi i ugrađuje se u dublje, nepolarne dijelove lipidnog dvosloja te stoga bitno utječe na slaganje lipidnih molekula unutar njega. To se reflektiralo i na morfologiju samih liposoma s ugrađenim miricetinom. Štoviše, uspoređivanjem poprečnog presjeka liposoma s ugrađenim miricetinom pod utjecajem vanjskog magnetskog polja (slika 35 B), deformacija kupole je jače izražena nego u slučaju ugradnje miricetina bez utjecaja magnetskog polja (slika 35 C). Ugradnja miricetina u liposome potvrđuju i slike faznog pomaka (slika 37 B i 37C). Topografija površine dobivena iz faznog pomaka amplitude probe pomoću primjene mikroskopije atomskih sila vrlo je učinkovit alat za detekciju površina s različitim kemijskim sastavom. Na slici 37 B i 37 C lijepo se uočavaju tamnije mrlje na svjetlijim površinama liposoma koja ukazuju na mjesta ugradnje samog flavonoida. Primjenom magnetskog polja, miricetin se znatno više ugradio nego u slučaju njegove odsutnosti. Budući da je hidrofilni miricitrin uglavnom smješten na površinskom dijelu membrane, njegovom ugradnjom strukturiranje lipidnih molekula bitno se ne mijenja. Poprečni presjek samih liposoma je više-manje i dalje ostao poput simetrične kupole (slika 34 C i 34 E).

Zadatak ovog rada je bio ustanoviti efikasnost ugradnje flavonoida te njihovu učinkovitost u zaštiti od lipidne peroksidacije. Iz slika poprečnih presjeka jasno se uočava da je morfologija liposoma nakon lipidne peroksidacije ostala više zadržana u slučaju liposoma s ugrađenim miricitrinom. Iako narušena sferna morfologija (slika 34 D, 34 F), liposomi i dalje zadržavaju svoju zatvorenu strukturu, više kod primijenjenog magnetskog polja (slika 34 D) nego bez polja (slika 34C), dok je u slučaju liposoma s ugrađenim miricetinom (slika 35 D i 35 F), zaštitni efekt znatno slabiji. Iz navedenih podataka zaključujemo da je proces lipidne peroksidacije površinski proces te stoga hidrofilni flavonoidi imaju ključnu ulogu u protektivnom djelovanju pri procesu lipidne peroksidacije.

ZAKLJUČAK

6. ZAKLJUČAK

Flavonoidi su polifenolni spojevi biljnog porijekla koji posjeduju blagotvorne učinke na organizam sisavaca. Njihova značajna biološka aktivnost uključuje protuupalno, antivirusno, antialergijsko, antibakterijsko i antikancerogeno ponašanje na metabolizam sisavaca. Međutim, uz brojne prednosti, flavonoidi imaju ograničenu primjenu zbog slabe topljivosti u vodi. Jedno od mogućih rješenja za isporuku djelotvorne količine slabo topljivih lijekova ili drugih biološki aktivnih molekula jest njihova ugradnja u nanočestice (NČ) kao nosače. U novije vrijeme, magnetske mezoporozne Fe_3O_4 NČ privlače pažnju kao gotovo idealni sustavi za isporuku biološki aktivnih molekula. Fe_3O_4 mezoporozne NČ koriste se kao efikasni nosači lijeka primjenom vanjskih stimulacija, tj. vanjskih magnetskih polja, bilo za oslobađanje i / ili isporuku lijekova na terapijski poželjan način. Sintetizirane mezoporozne Fe_3O_4 NČ posjeduju veliku magnetizaciju, usku raspodjelu veličina NČ i svojstva površine koja potvrđuju njihovu mezoporoznost. Također, rendgenskom difrakcijom na polikristalnom uzorku (XRPD), pretražnom elektronskom mikroskopijom (SEM), Brunauer-Emmett-Teller (BET) analizom te infracrvenom spektroskopijom (FTIR) potvrđena je mezoporoznost Fe_3O_4 NČ. Količina ugrađenih flavonoida u nanočestice određena je spektrofotometrijskim mjerenjima apsorbancije supernatanta pomoću UV/VIS spektrometra. FTIR analizom potvrđena je uspješnost ugradnje, a najbolje rezultate ugradnje pokazao je kvercetin. Nakon ugradnje flavonoida u mezoporozne nanočestice, praćena je kinetika njihova otpuštanja iz nanočestica u ovisnosti o eksternoj stimulaciji, tj. pri normalnim uvjetima, pod utjecajem permanentnog i oscilirajućeg magnetskog polja. Kinetika otpuštanja flavonoida iz mezoporoznih Fe_3O_4 NČ pomoću permanentnog slabog vanjskog magnetskog polja te oscilirajućeg s vrlo niskom frekvencijom od 10 Hz pokazala je vrlo uspješnom posebice kod kvercetina koji je pokazao otpuštanje u velikoj količini. Promjena strukturnih i morfoloških svojstava modelnih membrana inducirana njihovom reakcijom s flavonoidima, otpuštanjem iz nanočestica pri različitim eksternim uvjetima, prije i poslije inducirano oksidativnog stresa istražena je mikroskopijom atomskih sila (AFM). Liposomi s ugrađenim miricetinom posjeduju površinu koja više nije glatka oblika kupole kao što je to vidljivo kod liposoma s ugrađenim miricitrinom. Za razliku od miricitrina, hidrofobni miricetin ulazi i ugrađuje se u dublje, nepolarne dijelove lipidnog dvosloja te stoga bitno utječe na slaganje lipidnih molekula unutar njega. Primjenom magnetskog polja, miricetin se znatno više ugradio nego u slučaju njegove odsutnosti. Budući da je hidrofilni miricitrin uglavnom smješten na površinskom dijelu membrane, njegovom

ugradnjom strukturiranje lipidnih molekula bitno se ne mijenja. Iz navedenih podataka zaključujemo da je proces lipidne peroksidacije površinski proces te stoga hidrofilni flavonoidi imaju ključnu ulogu u protektivnom djelovanju pri procesu lipidne peroksidacije. Učinkovitost ugrađenih flavonoida u zaštiti modelnih membrana od oksidativnog stresa te njihova zaštitna uloga potvrđena je i dinamičkim raspršenjem svjetlosti (DLS) te mjerenjima zeta potencijala. Dobivene vrijednosti zeta potencijala potvrđuju ne samo da su flavonoidi ugrađeni u liposome znatno više u uvjetima vanjskog primijenjenog magnetskog polja (miricetin), nego indirektno govore da je hidrofobni miricetin ugrađen u unutarnji dio lipidnog dvosloja, dok se hidrofilni miricitrin ugradio u površinski dio lipidnog dvosloja mijenjajući zeta potencijal značajnije nego miricetin.

Na kraju, može se zaključiti flavonoidi kvercetin, miricetin te miricitrin pokazuju značajna terapijska svojstva te bi se u budućnosti mogli koristiti u liječenju raznih bolesti, primjerice Parkinsonove i Alzheimerove bolesti, dijabetesa i dr. Također, mezoporozne Fe_3O_4 NČ pokazale su veliki potencijal kao nosači hidrofobnih lijekova te prednost utjecaja magnetskog polja.

POPIS SIMBOLA I KRATICA

7. POPIS SIMBOLA I KRATICA

<u>Simbol</u>	<u>Značenje</u>
AFM	mikroskopija atomskih sila
BET	Brunauer-Emmet-Teller metoda
DLS	dinamičko raspršenje svjetlosti
DOPC	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfokolin
EtOH	etanol
IR	infracrvena spektroskopija
LDL	lipoprotein niske gustoće
MEG	magnetoencefalografija
MCE	miricetin
MCI	miricitrin
NČ	nanočestice
QU	kvercetin
PBS	fosfatni pufer, pH= 7,4
PEG	polietilen glikol
SEM	pretražna elektronska mikroskopija
SQUID	supravodljivi kvantni interferometar
XRPD	rendgenska difrakcija polikristalnog uzorka

8. LITERATURA

1. Fraga, C. G., *Plant Phenolics and human health*, Wiley, New York, 2009.
2. Kumar, S., Pandey, A. K., *Chemistry and Biological Activities of Flavonoids*, *The Scientific World Journal* 2013, (2013), 1-16.
3. Jazvinščak Jembrek M., Vuković L., Puhović J., Erhardt J., Oršolić N., *Neuroprotective effect of quercetin against hydrogen peroxide-induced oxidative injury in P19 neurons* *Journal of molecular neuroscience* 47 (2012) 286-299.
4. Choi S. M., Cho B. C. K. Y. H., Choi, J. Chang K. H., Park M. S., Kyu. Kim M., Cho K. H., Kim J. K., *Effects of Flavonoid Compounds on β -amyloid-peptide-induced Neuronal Death in Cultured Mouse Cortical Neurons*, *Chonnam. Medical Journal* 50 (2014) 45-51.
5. Domitrović R., Rashed K., Cvijanović O., Vladimir-Knežević S., Škoda M., Višnić A., *Myricitrin exhibits antioxidant, anti-inflammatory and antifibrotic activity in carbon tetrachloride-intoxicated mice*, *Journal Chemico-biological Interactions* 230 (2015) 21–29.
6. Pool H., Quintanar D., Figueroa J. D., Mano C. M., Bechara J. E. H., Godínez L. A., Mendoza S., *Antioxidant Effects of Quercetin and Catechin Encapsulated into PLGA Nanoparticles*, *Journal of Nanomaterials*, 2012 (2012) 1-12.
7. Baezaab A., Colillaab M., Vallet-Regí M., *Advances in mesoporous silica nanoparticles for targeted stimuli-responsive drug delivery*, *Expert Opin. Drug Deliver.* 12 (2015) 319-337.
8. Wang Y., Zhao Q., Han N., Bai L., Li J., Liu J., Che E., Hu L., Zhang Q., Jiang T., Wang S., *Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications*, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 11 (2015) 313-327.
9. Kierys A., Rawski M., Goworek J., *Polymer–silica composite as a carrier of an active pharmaceutical ingredient*, *Microporous and mesoporous materials*, 193 (2014) 40-46.
10. Mahapatro A., Singh D. K., *Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines*, *Journal of nanobiotechnology* 55 (2011) 1-11.
11. Han N., Wang Y., Bai J., Liu J., Wang Y., Gao Y., Jiang T., Kang W., Wang S., *Facile synthesis of the lipid bilayer coated mesoporous silica nanocomposites and their*

-
- application in drug delivery, *Microporous and mesoporous materials* 219 (2016) 209-218.
12. Wu W., Xiao X. H., Zhang S. F., Li H., Zhou X. D., Jiang C. Z., One-pot reaction and subsequent annealing to synthesis hollow spherical magnetite and maghemite, *Nanoscale Res Lett*, 4(8) (2009), 926-931.
 13. Bennet D., Kim S., *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*, InTech, 2014., str. 257-308.
 14. Berg J. M. , Tymoczko J. H., Stryer L. , *Biokemija 1. hrvatsko izdanje*, Školska knjiga, Zagreb, 2013.
 15. https://www.fkit.unizg.hr/_download/repository/3.Biomembrane%5B3%5D.pdf (pristup 29.07.2018.)
 16. Heimburg T., *Thermal Biophysics of Membranes*, Wiley-VCH, Berlin, 2007.
 17. Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L., *Biochemistry 5th Ed.*, W. H. Freeman and Company, New York, 2002, str. 319–341.
 18. Nelson D. L., Cox M. M., *Lehninger Principles of Biochemistry*, Worth Publishers, New York, 2008.
 19. Murray R. K., Bender D. A., Botham K. M., Kennelly P. J., Rodwell V. W., Weil P. A., *Harperova ilustrirana biokemija 28. izd.*, Medicinska naklada, Zagreb, 2011.
 20. https://en.wikipedia.org/wiki/Lipid_bilayer (pristup 29.07.2018.)
 21. A. Buretić-Tomljanović, Zašto je važno zdravlje bioloških membrana, *Medicina Fluminensis* **50** (2014) 391–413.
 22. <http://themedicalbiochemistrypage.org/sphingolipids.php> (pristup 29.07.2018.)
 23. <https://repositorij.fkit.unizg.hr/islandora/object/fkit:367/preview> (pristup: 29.07.2018.)
 24. https://www.google.com/search?biw=1264&bih=891&tbm=isch&sa=1&ei=IbZVW7WuMsGskwWj9KjQCw&q=cholesterol+structural+formula&oq=cholesterol+structura&gs_l=img.1.0.0i19k112j0i8i30i19k112.4776.5257.0.7930.2.2.0.0.0.135.211.1j1.2.0....0...1c.1.64.img..0.1.135....0.TOUjKpID8NY#imgrc=TMg2saJGoih7FM: (pristup 24.7.2018.)
 25. Cooper M., Hausman R. E., *Stanica: Molekularni pristup*, Medicinska naklada, Zagreb, 2010.
 26. Manach C., Mazur A., Scalbert A., Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases, *Current Opinon in Lipidology* 16(1) (2005) 77-84.
 27. Jäger A. K., Sabay L., Flavonoids and CNS, *Molecules* 16(2) (2011) 1471-1485.

28. Kozłowska A., Szostak-Węgierek D., Flavonoids-food sources and health benefits, *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny* 65 (2014) 79–85.
29. Kazazić, S. P., Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida, *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 55, (2004) 279-290.
30. Carlo G. D., Mascolo N., Izzo A. A., Capasso F., Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs, *Life Science* 65 (1999) 337–353.
31. https://www.google.com/search?biw=1264&bih=842&tbm=isch&sa=1&ei=KrZVW6nwIc_6kwWmrKPYBQ&q=quercetin+structural+formula&oq=quercetin+structural+formula&gs_l=img.3...199448.203541.0.204415.20.14.0.0.0.117.1220.7j6.13.0....0...1c.1.64.img..9.4.358...0i7i30k1j0i19k1j0i8i7i30k1.0.DFlXum30fCA#imgrc=C2Ov4cTmtDWRM: (pristup: 23.07.2018.)
32. Yan T., Xiao-Mian Z., Shu-Jun W., Yang Y., Ying-Lin C., Analgesic activity of myricetin isolated from *Myrica rubra* Sieb. et Zucc. Leaves, *Archives of Pharmacal Research* 32 (2009) 527–533.
33. Willoughby S., Holmes A., Loscalzo J., Platelets and cardiovascular disease, *The European Journal of Cardiovascular Nursing* 1(4) (2002) 273–288.
34. Lin Y., Wu B., Li Z., Zhang T., Chen M., Tan Y., Jiang J., Huang C., Metabolite identification of myricetin in rats using HPLC coupled with ESI-MS, *Chromatographia* 75 (2012) 655–660.
35. Salvamani S, Gunasekaran B, Shaharuddin N. A, Ahmad S. A, Shukor M. Y. Antiatherosclerotic effects of plant flavonoids, *BioMed Research International* 2014 (2014) 1-11.
36. https://www.google.com/search?biw=1264&bih=842&tbm=isch&sa=1&ei=KrZVW6nwIc_6kwWmrKPYBQ&q=myricetin+structural+formula&oq=myricetin+structural+formula&gs_l=img.3...4786.10142.0.11659.20.14.0.0.0.163.1370.10j4.14.0....0...1c.1.64.img..9.6.644...0i7i30k1j0i19k1.0.qRD0wDRYrvq#imgrc=IX1vBLVDf1ExaM: (pristup 23.07.2018.)
37. Edenharder R, Grünhage D. Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102, *Mutation Research* 540 (2003) 1–18.
38. Grinna L. S. ,Age related changes in the lipids of the microsomal and the mitochondrial membranes of rat liver and kidney, *Mechanisms of Ageing and Development* 6 (1977) 197-205.

39. Brash A. R., Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate, *Journal of Biological Chemistry* 274 (1999) 23679-23682.
40. Štefan L., Tepšić T., Zavidic T., Urukalo M., Tota D., Domitrović R., Lipidna peroksidacija – uzroci i posljedice, *Medicina* 43 (2007) 84-93.
41. Ivanković M., Nanomaterijali i nanoproizvodi-mogućnosti i rizici, *POLIMERI* 32 (2011), 23-28.
42. Teja A. S., Koh P. Y., Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles, *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials* 55 (2009) 22 – 45.
43. Yamaura M., Camilo R. L., Sampaio L. C., Macedo M. A., Nakamura N., Toma H. E., Preparation and characterization of (3-aminopropyl) triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 279 (2004) 1-14.
44. Wu W., Xiao X. H., Zhang S. F., Li H., Zhou X. D., Jiang C. Z., One-pot reaction and subsequent annealing to synthesis hollow spherical magnetite and maghemite Nanocages, *Nanoscale Res Lett* 4 (2009) 926-931.
45. Yang X. Q., Grailer J. J., Rowland I. J., Javadi A., Hurley S. A., Steeber D. A., Gong S.Q., Multifunctional SPIO/DOX-loaded wormlike polymer vesicles for cancer therapy and MR imaging, *Biomaterials* 31 (2010) 9065-9073.
46. Wu W., Xiao X. H., Ren F., Zhang S. F., Jiang C. Z., A comparative study of the magnetic behaviour of single and tubular clustered magnetite nanoparticles, *Journal of Low Temperature Physics* 168 (2012) 306-313.
47. <http://li155-94.members.linode.com/myscope/sem/practice/principles/layout.php> (pristup 24.3.2018.)
48. https://www.fkit.unizg.hr/_download/repository/Nastavni_tekst_Molekulska_spektroskopija.pdf (pristup 19.8.2018.)
49. Stuart B. H., *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons, West Sussex, 2004.
50. Finsy R. Particle sizing by quasi-elastic light scattering, *Advances in Colloid and Interface Science* 52 (1994) 79–143.
51. Kaszuba M., Zetasizer nano series and HPPS training course, Malvern, (2012)
52. Hassan P., Rana S., Verma G. Making sense of Brownian motion: colloid characterization by dynamic light scattering. *Langmuir* 31 (2014) 3–12.
53. Zetasizer Nano Series, User Manual, Malvern Instruments Ltd, Worcestershier, UK, 2005.

54. Goksu E. I., Vanegas J. M., Blanchette C. D., Lin W. C., Longo M. L., AFM for structure and dynamics of biomembranes, *Biochimica et Biophysica Acta* 1788 (2009) 256–266.
55. Svetličić V, Ťutić V, Mišić T., Mikroskopija atomskih sila, *Metode u molekularnoj biologiji*, Institut Ruđer Bošković, (2007) 764-770.
56. Seantier B., Giocondi M. C., Le Grimellec C., Milhiet P. E., Probing supported model and native membranes using AFM, *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 13 (2008) 326 – 337.

ŽIVOTOPIS

████████████████████ Osnovnu školu pohađala sam u Širokom Brijegu, Bosna i Hercegovina. Nakon završene osnovne škole upisujem srednju školu, Gimnazija fra Dominika Mandića Široki Brijeg, opći smjer te završavam srednjoškolsko obrazovanje 2012. godine. Iste godine upisala sam preddiplomski studij Kemija i inženjerstvo materijala na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. Nakon druge godine studija odradila sam stručnu praksu u INI-Industrija nafte u dva sektora, Laboratorij za korozijska ispitivanja i Laboratorij za karakterizaciju fluida i reologiju. Preddiplomski studij završila sam 2016. godine, sa završnim radom *Interakcija flavonoida s modelnim membranama*, izrađenim na Zavodu za fizičku kemiju na Institutu Ruđer Bošković pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Helene Otmačić Ćurković i dr. sc. Suzane Šegota, više znanstvene suradnice Instituta Ruđer Bošković. Iste godine upisala sam diplomski studij Kemija i inženjerstvo materijala. Dobitnica sam Rektorove nagrade za individualni znanstveni i umjetnički rad 2017./2018. godine u polju tehničke znanosti pod nazivom *Utjecaj kompatibilizatora na primjenska svojstva biorazgradljivih PE-LD/TPS mješavina* zajedno s kolegicom Anamarijom Turković te pod mentorstvom dr. sc. Vesne Očelić Bulatović. Također, koautor sam na radu *Ekološki prihvatljivi biokompoziti* koji je prihvaćen za Zbornik radova I. međunarodne konferencije "Cjeloviti pristup okolišu" u Sisku 13.-14. rujna 2018. godine.