



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Utjecaj masnih kiselina na termodinamičku stabilnost membrana

Kemijski seminar I

F. Saitta et. al., *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 176, 2019, 167–175

Vedrana Krajnović

Zagreb 2025.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Struktura membrana.....	1
1.2. Svojstva membrana	3
1.3. Struktura i svojstva masnih kiselina.....	4
2. Prikaz teme	6
3. Zaključak	16
4. Popis kratica	17
5. Literatura.....	18

1. UVOD

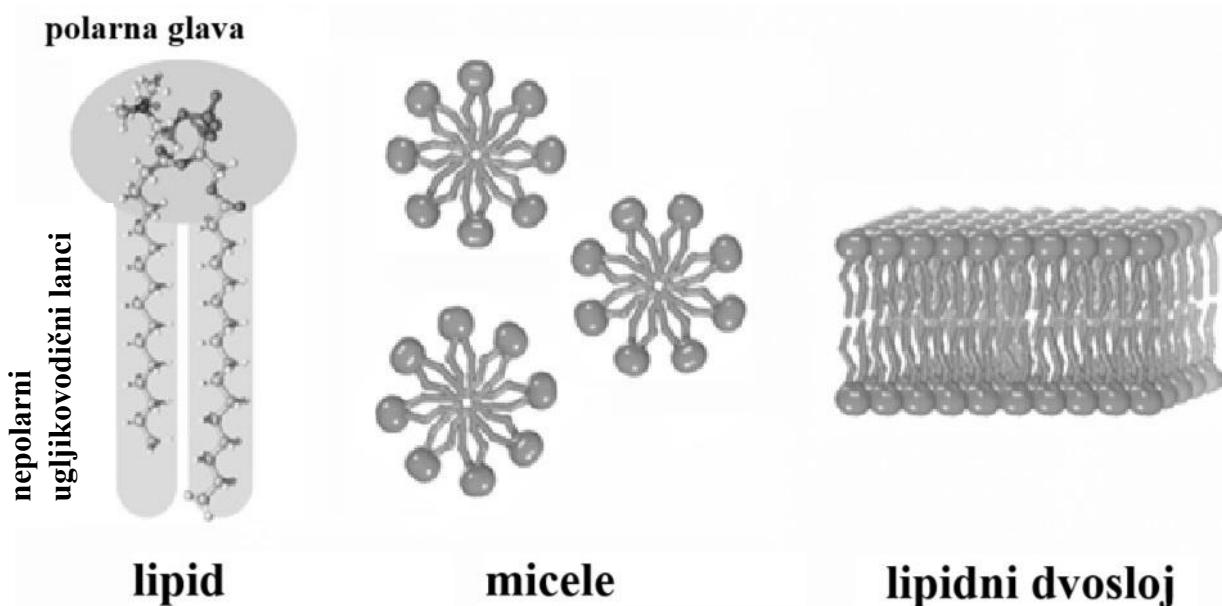
Stanice u svim živim organizmima okružene su membranom debljine od nekoliko nanometara koja je vitalna za funkcioniranje stanice. Membrane su definirane kao dvodimensijska tekućina, koja čini granicu između unutarstaničnog i vanstaničnog prostora, u kojoj razni lipidi i ugrađeni proteini slobodno lateralno difundiraju. Membrana u svom tekućem stanju djeluje kao polupropusna barijera koja manipulira sastavom lipida kako bi kontrolirala transport i difuziju malih molekula i proteina između dvaju prostora. Bitno je regulirati fluidnost membrane kako bi se mogli odvijati bitni stanični procesi, ali i kako bi se spriječio ulazak toksičnih agensa u stanicu. Transmembranski gradijent pokreće mnoge ključne stanične funkcije. Model membrane je godinama razvijan i nadograđivan s novim otkrićima i tako je s vremenom postao kompleksan sustav sastavljen od lipidnih domena koje variraju u sastavu i fizikalno-kemijskim svojstvima. [1,2,3] Domene i međupovršinska struktura između domena glavne su determinante propusnosti, osobito kod lipidnih faznih prijelaza. Lipidi imaju cilindričan oblik, a ugradnja necilindričnih stranih amfifilnih molekula u stabilan lipidni dvosloj će destabilizirati dvosloj, povećati naprezanje zakriviljenosti i povećati propusnost. Taj fenomen se može iskoristiti u dizajnu sustava za isporuku lijekova. Masne kiseline, zbog svoje amfifilne prirode, mogu ući u membrane i promijeniti zakriviljenost dvosloja i posljedično smanjiti propusnost. [4]

1.1. Struktura membrane

Gradivna jedinica bioloških membrana jesu lipidi. Lipidi su amfifilne molekule koje se sastoje od hidrofilne polarne glave koja je uglavnom nabijena i hidrofobnih nepolarnih ugljikovodičnih repova. [5] Membranski lipidi osim što pokazuju strukturnu raznolikost koja se očituje u velikom rasponu vrsta grada glave i glicerolske okosnice lipidnih molekula, raznolikost membranskih lipida potiče i od različitih duljina, stupnja zasićenosti i drugih strukturnih modifikacija acilnih lanaca. [1] S obzirom na sastav grupe glave lipida razlikujemo tri glavne skupine: glicerofosfolipide, sfingolipide i sterole. [6] Glicerofosfolipidi su najčešći vrsta lipida i uglavno su to lipidi s glicerolnom okosnicom gdje su na prve dvije pozicije (sn-1 i sn-2) vezani lanci repova, a na trećoj poziciji (sn-3) je vezana fosfatna skupina. S obzirom na fosfatnu skupinu razlikujemo zwitterionske (DPPC i DPPE) i negativno nabijene lipide (DPPG, DPPS, DPPI, DPPA), dok pozitivno nabijeni lipidi ne postoje u prirodi. Sfingolipidi nemaju glicerolnu okosnicu nego sfingoidnu bazu, a često se pojavljuju s dugim zasićenim lancima. [5, 6] Ugljik na drugoj poziciji glicerolne okosnice je kiralno središte lipida. [5]

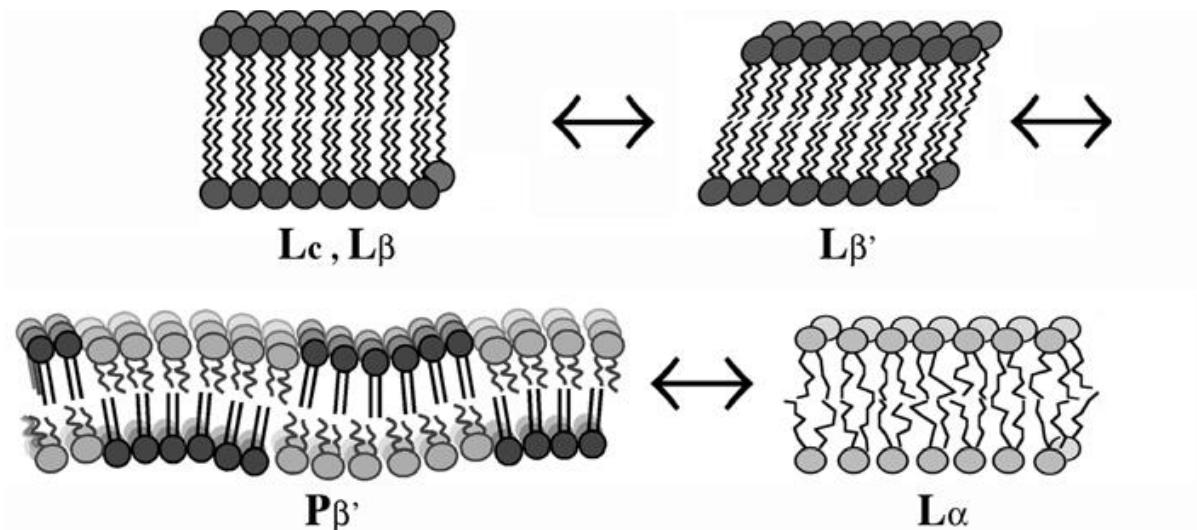
Lanci masnih kiselina vezani na pozicijama sn-1 i sn-2 uglavnom variraju po dužini lanca, stupnju zasićenosti i načinu vezanja na glicerolnu okosnicu (ester, alkil eter ili alkenil eter). [6] Duljina acilnog lanca je glavna odrednica debljine membrane i faznog prijelaza. Osim duljine acilnog lanca, specifične strukture masnih kiselina i sn-1 i sn-2 položaj glicerofosfolipida imaju značajan utjecaj na fazno ponašanje i temperaturu prijelaza. Uvođenje cis-dvostrukе veze stvara prelom od 30° u acilnom lancu, što smanjuje gustoću slaganja u lipidnom dvosloju. Ovaj poremećaj pakiranja u lamelarnoj strukturi je izraženiji kada se cis-dvostruka veza nalazi u sredini acilnih lanaca. [1] S obzirom na takav sastav, lipidi stvaraju aggregate kako bi sučelje hidrofobnih repova i vode bilo što manje. Stvaranje većih

agregata postaje energetski povoljnije s povećanjem koncentracije lipida. Budući da je hidrofobni učinak ovisan o temperaturi, izgled agregata vjerojatno ovisi o temperaturi. U vodenom mediju lipidi mogu stvarati razne strukture, ovisno o koncentraciji: monomeri, micele, lamelarni liposom (dvosloj), kubičnu strukturu i invertiranu heksagonalnu strukturu. [5] Lipidi u bakterijskim membranama uglavnom se slažu u lipidni dvosloj. [2]



Slika 1. Predodžba lipida i njihovih agregata. [5]

Lamelarna faza primjećuje se kod većih koncentracija lipida. [5] Biološke membrane kao i modelne lipidne membrane imaju termotropne fazne prijelaze, odnosno dvosloj može postojati u raznim stanjima ovisno o temperaturi okoliša. [5,7] Tako razlikujemo L_c , $L_{\beta'}$, $P_{\beta'}$ i L_{α} faze. L_c je kristalna lipidna faza s uređenjem u tri smjera gdje između dvosloja nema vode i svi nezasićeni lanci su trans izomeri. $L_{\beta'}$ je gel faza u kojoj su nezasićeni lanci većinski trans izomeri, a „' „, u indeksu označava da su lipidi nagnuti u odnosu na ravninu membrane. Ova faza se naziva čvrsto uređenom fazom. $P_{\beta'}$ je valovita faza koja nastaje prije taljenja glavnog lanca i sastoji se od djelomično otopljene lipidne faze s nižim stupnjem uređenja nego $L_{\beta'}$ faza. Valovi u ovoj fazi nastaju izmjenom domena sa lipidima u čvrstom i tekućem stanju. L_{α} faza je tekuća faza gdje su lanci i rešetka uglavnom neuređeni. [5]



Slika 2. Prikaz lamelarnih lipidnih faza. [5]

Fazni prijelaz iz lamelarnog gela (L_β) u lamelarni tekući kristal (L_α) glavni je fazni prijelaz lipidnih dvosloja, koji je proučavan u smislu kooperativnosti, redoslijeda lipidnih molekula, uloge skupina glave i konformacije acilnog lanca. Fazni prijelaz $L_\beta - L_\alpha$ popraćen je bočnim širenjem sa smanjenjem debljine dvosloja i povećanjem površine. Fazni prijelaz povezan je s trans-gauche izomerizacijom acilnog lanca, međumolekularnim interakcijama, polarnim silama između hidrofilnih dijelova, bočnim tlakom u dvosloju zbog steričkih odbijanja, elektrostatskim interakcijama i hidrofobnim učinkom. Na sve te parametre utječe temperatura, hidratacija, tlak, pH i ionska jakost. [1]

Lateralnom interakcijom između lipida može doći do razdvajanja faza što dovodi do stvaranja prostorno odvojenih membranskih područja, odnosno domena veličine od nano- do mikrometra, koje imaju različit sastav i fizikalno kemijska svojstva. Ova heterogenost razlikuje se između unutarnjih i vanjskih slojeva membrane te može utjecati na zakrivljenost membrane. Ovakvo razdavajanje faza je diktirano temperaturom i intrinzičnim svojstvima lipida. [1,2,3]

1.2. Svojstva membrane

Svojstva membrane mogu se podijeliti na statička svojstva, koja uključuju debljinu, površinski naboј i zakrivljenost, i dinamička svojstva, koja se odnose na koncept "fluidnosti" membrane i uključuju molekularno pakiranje. Ova se svojstva također moraju uzeti u obzir zajedno s indeksom zasićenja lipida, brojem i položajem mjesta nezasićenosti lipida, konfiguracijom cis-trans, glavnim skupinama lipida i specifičnim nefosfolipidnim sadržajem. [1] Membrane prilagođavaju svojstva, odnosno sastav lipida, kao način prilagodbe promjenjivim uvjetima. Mnoge stanice pokazuju naponski ili pH gradijent preko svoje membrane, a razlike u naponu su rezultat naboja skupina glave lipida u unutarnjem i vanjskom sloju. Na primjer, asimetrična distribucija zwitterionskih, anionskih i kationskih glavnih skupina između unutarnjeg i vanjskog membranskog sloja optimalna je kako bi se održala ispravna topologija i sklop proteina. Ovo znači da i fizikalna svojstva variraju između dva sloja iste membrane te se javlja gradijent elektrostatskog polja ili razlike u kemijskom potencijalu. Održavanje površinskog naboja membrane ključno je za električni potencijal

membrane, koji regulira ponašanje stanica u membranskom transportu, pokretljivosti stanica, diobi stanica itd. [1,5]

Poznato je da lipidne membrane prolaze kroz fazne prijelaze koji ovise o duljini i zasićenosti lance. Što je duži lanac, viša je temperatura faznog prijelaza (T_m), osim u slučaju nezasićenih lanaca koji drastično snižavaju temperaturu prijelaza. Prisutnost nezasićenih fosfolipida povećava vjerojatnost trans-gauche izomerizacije i stoga snižava temperaturu glavnog $L_\beta - L_\alpha$ faznog prijelaza. Fino podešavanje omjera zasićenih prema nezasićenim masnim kiselinama je jedan od nekoliko mehanizama za promjenu organizacije lipida kako bi se održalo dosljedno tekuće-kristalno stanje. Povišenje tlaka pomiče temperaturu prijelaza prema višim temperaturama kao i sniženje pH. Također, treba naglasiti da što je veća kooperativnost membrane, to je prijelazni signal uži. Veliki multilamelarni liposomi općenito pokazuju mnogo uže prijelazne signale od unilamelarnih liposoma. [1,5] Osim glavnog faznog prijelaza, membrane mogu imati i predprijelaz (eng. *pretransition*) koji je prijelaz s malom kooperacijom i nalazi se par stupnjeva ispod glavnog prijelaza. Između dva fazna prijelaza dokazano je da membrane pokazuju periodične valovitosti (P_β), odnosno nabore (eng. *ripples*). Nastanak nabora je direktna posljedica istovremene promjene uređenosti lipida i zakriviljenosti membrane. U ovoj fazi dvosloj je još uvijek uređen, ali sa niskim stupnjem fluidnosti. Oba fazna prijelaza su povezani fenomeni koji su uzrokovani procesomtopljenja lanca lipida. [5]

Modifikacija membranskih fosfolipida igra glavnu ulogu u regulaciji fluidnosti membrane kako bi izdržala uvjete okoline. Fluidnost je povezana sa stupnjem uređenosti/gustoće slaganja fosfolipidne membrane, procesom kojim upravlja sastav polarne glave i konformacija acilnog lanca. Veličina i naboј skupina glave određuju opseg membranskih domena i tako modulirajući fluidnost membrane. Međutim, promjene u polarnim glavama pojavljuju se rjeđe u usporedbi s promjenama u sastavu masnih kiselina i manje su učinkovite u promjeni fluidnosti membrane. Na primjer, membrane koje sadrže dugolančane masne kiseline gusto su zbijene i manje fluidne, dok su one koje se sastoje od nezasićenih masnih kiselina manje uređene i fluidnije. Kod većine bakterija omjer razgranatih/herazgranatih, nezasićenih/zasićenih i kratkolančanih/dugolančanih masnih kiselina je najvažniji parametar koji utječe na fluidnost i krutost membrane. [3, 8]

Kako bi se razumio međuodnos između sastava lipida i strukturnih karakteristika membrane, mnoga komparativna istraživanja membranskih struktura temeljila su se na različitim modelima membranskih sustava, a ne na realnim staničnim sustavima. [1] Neki primjeri takvih istraživanja biti će predstavljeni u 2. poglavljju.

1.3. Masne kiseline

Masne kiseline (eng. *fatty acid-FA*) su amfifilne molekule kao i lipidi, odnosno imaju hidrofobni i hidrofilni dio, s necilindričnom molekulskom geometrijom. [9] To su karboksilne kiseline s dugim zasićenim ili nezasićenim alifatskim lancima. Većina prirodnih masnih kiselina sastoji se od nerazgranatog lanca s parnim brojem ugljikovih atoma od 4 do 28. Obično su prisutne u organizmima kao tri glavne klase estera: trigliceridi, fosfolipidi i esteri kolesterola, i važne su strukturne komponente stanica. Dvostrukе veze omogućuju postojanje

nezasićenih masnih kiselina u cis ili trans izomerima, pri čemu je cis izomer dominantna konfiguracija za većinu nezasićenih masnih kiselina koje se pojavljuju u prirodi. Trans konfiguracija nije prirodna konfiguracija, a trans masti se proizvode postupkom umjetne sinteze. [10] Slobodne masne kiseline (eng. *free fatty acid - FFA*) sudjeluju u nekoliko staničnih membranskih procesa (npr. transport proteina potpomognut lipidima kroz membranu, promjena mikrodomena fosfolipidnog dvosloja kao i njihovih svojstava) te djeluju kao signalne molekule za nekoliko staničnih mehanizama (npr. lučenje inzulina). Njihov utjecaj ovisan je o njihovoj strukturi. [11]

U vodenom mediju masna kiselina može postojati kao monomer i u micelama, a ako je koncentracija iznad kritične koncentracije micela (eng. *Critical Micelle Concentration - CMC*) onda se stvara ravnoteža između monomera i micela, kao što je predviđeno Gibbsovim faznim pravilom, koje kaže da pod konstantnim volumenom i tlakom, koncentracija monomera ostaje konstantna, odnosno jednaka CMC, bez obzira na ukupnu koncentraciju. Kada se masne kiseline uvedu u vodenim medijima s liposomima, mora se postići ravnoteža u vodenom mediju koji se nalazi unutar i izvan liposoma. Proces ravnoteže može se podijeliti u nekoliko koraka: 1) Razmjena između monomera i micela u otopini u masi; 2) Difuzija kroz ustajali sloj vode koji okružuje liposome; 3) Adsorpcija monomera u vanjski monosloj; 4) Adsorpcija micela u vanjski monosloj; 5) „Flip-flop“ monomera preko dvosloja i 6) Desorpcija s membrane s obje strane. Ugradnja masnih kiselina u membranu dovodi do nekoliko fenomena koji mogu uzrokovati propuštanje membrane: povećano naprezanje zakriviljenosti uzrokovano necilindričnom molekulskom geometrijom masnih kiselina, stanjivanje membrane, odvajanje faza, stvaranje pora i/ili izmjena fosfolipida s micelama. Međutim, masne kiseline su citotoksične što znači da ih se treba koristiti u koncentracijama koje su ispod njihove citotoksične granice. Kritična koncentracija micela (CMC) obrnuto je proporcionalna dužini lanca masne kiseline, a temperatura topljenja je proporcionalna dužini lanca. Kada su masne kiseline prisutne u koncentracijama iznad njihove kritične micelarne koncentracije, očekuje se da će se brzo ugraditi u lipidne dvoslojeve s potencijalno destabilizirajućim učinkom. [4,9]

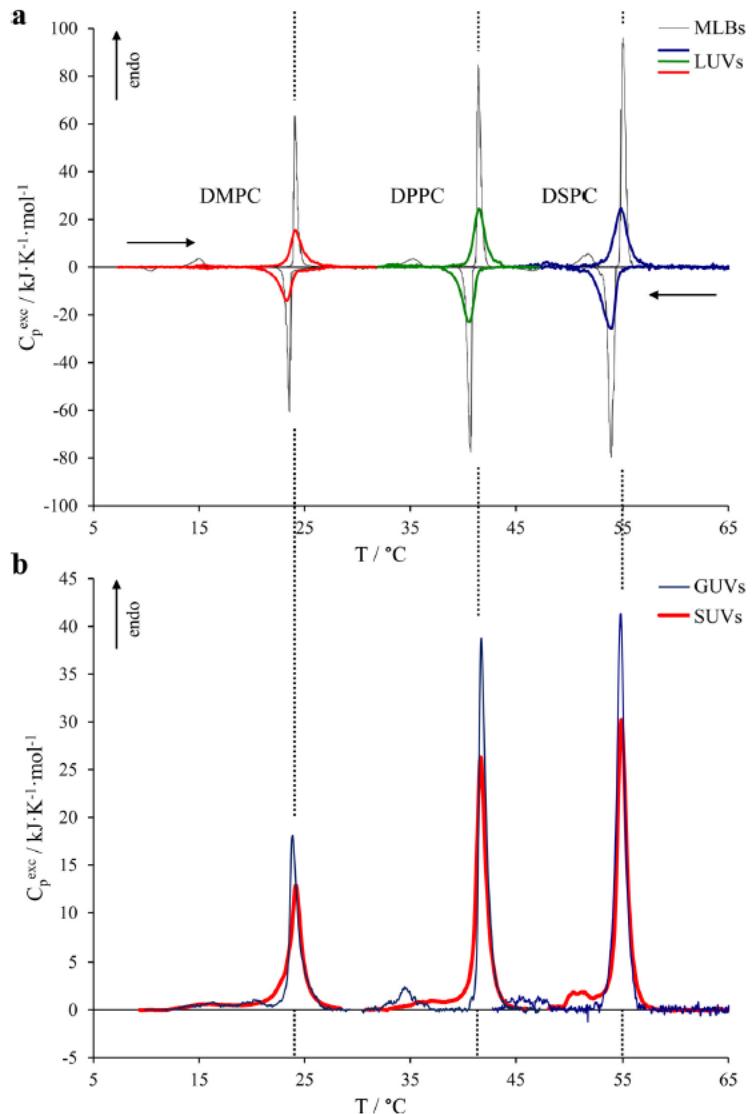
Tablica 1. Vrste i svojstva nekih masnih kiselina [9,12,13]

Kiseline	Kratika	CMC (mM)	MP (°C)
Kaprilna	C8	384	15
Kaprinska	C10	93	31
Laurinska	C12	23	43
Miristinska	C14	5,5	54
Palmitinska	C16	1,3	62
Stearinska	C18	0,3	69
Arahidska	C20	0,08	75
Oleinska	C18:1 cis-9	0,018	13
Linolna	C18:2 cis-9,12	0,022	-5

2. PRIKAZ TEME

Saitta i suradnici kalorimetrijski su odredili utjecaj slobodnih masnih kiselina na termodnimačka svojstva modelnih membrana koje će što više predstavljati realan sustav inzulin lučecih membrana (eng. Insulin secreting granules – ISG). Kako bi lakše mogli utvrditi pojedine utjecaje na termodinamičku stabilnost, koristili su lipide koji imaju istu skupinu glave (fosfokolin), odnosno koristili su čiste i miješane sustave ovih lipida: DMPC, DPPC, DSPC i DOPC. Pri izvođenju mjerjenja koristili su se unilamelarnim membranama raznih veličina (male- eng. *small unilamellar vesicles* (SUV), velike- eng. *large unilamellar vesicles* (LUV) i divovske- eng. *giant unilamellar vesicles* (GUV)) čije postojanje su potvrdili dinamičnim raspršenjem svjetla (eng. *dynamic light scattering* – DLS). [11] Veličina SUV-ova je otprilike između 15-30 nm, veličina LUV-ova je između 100-200 nm, a GUV-ovi se smatraju svime što je iznad 1 μm . [14]

Prvo su utvrdili termodinamička svojstva čistih sustava (kasnije referentni) pomoću diferencijalno pretražne kalorimetrije (eng. *differential scanning calorimetry* – DSC) za sve prethodno navedene unilamelarne sustave i multilamelarne sustave (koji se dobiju pri rađenju suspenzije). [11]

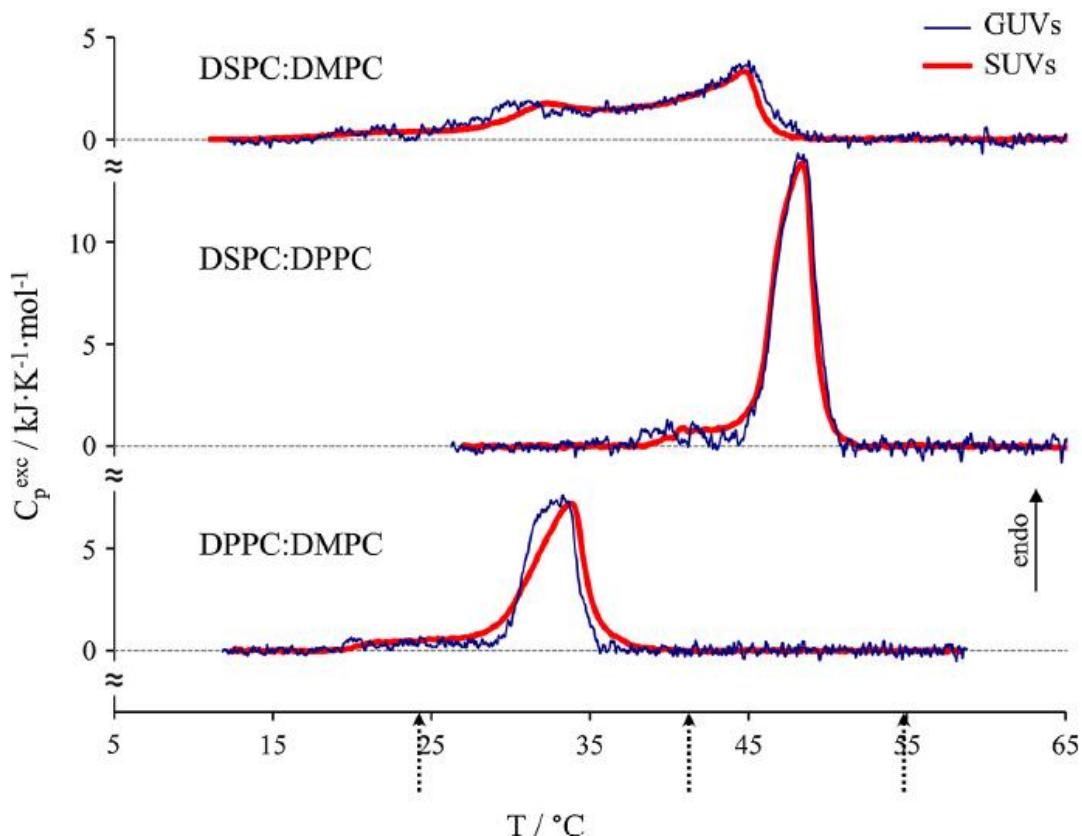


Slika 3. DSC krivulje čistih sustava; **a** DSC krivulje MLV i LUV liposomi čistih sustava DMPC, DPPC i DSPC; **b** DSC krivulje GUV i SUV liposoma istih sustava. [11]

Iz slike 3. vidljivo je da DSC krivulje multilamelarnih liposoma pokazuju oštре signale koji označavaju fazni prijelaz iz uređene-gel u neuređenu-tekuću fazu. Glavnom faznom prijelazu prethodi puno manji i širi signal koji predstavlja predprijelaz. Može se uočiti da je temperatura faznog prijelaza ovisna o dužini acilnog lanca lipida te su fazni prijelazi tako poredani DMPC-DPPC-DSPC. DSC krivulje unilamelarnih liposoma pokazuju puno manje i šire signale pri istim temperaturama što se može pripisati povećanju geometrije membrane/zakriviljenosti membrane, odnosno što je veća zakriviljenost manja je kooperativnost faznog prijelaza. Niska kooperativnost odražava raspršenost domena različitih svojstava. S povećanjem zakriviljenosti membrane (GUV<LUV<SUV) sve je manje uočljiv predprijelaz. S obzirom da se fazni prijelaz odvija pri istoj temperaturi zaključeno je da je utjecaj zakriviljenosti membrane entropijske prirode. [11]

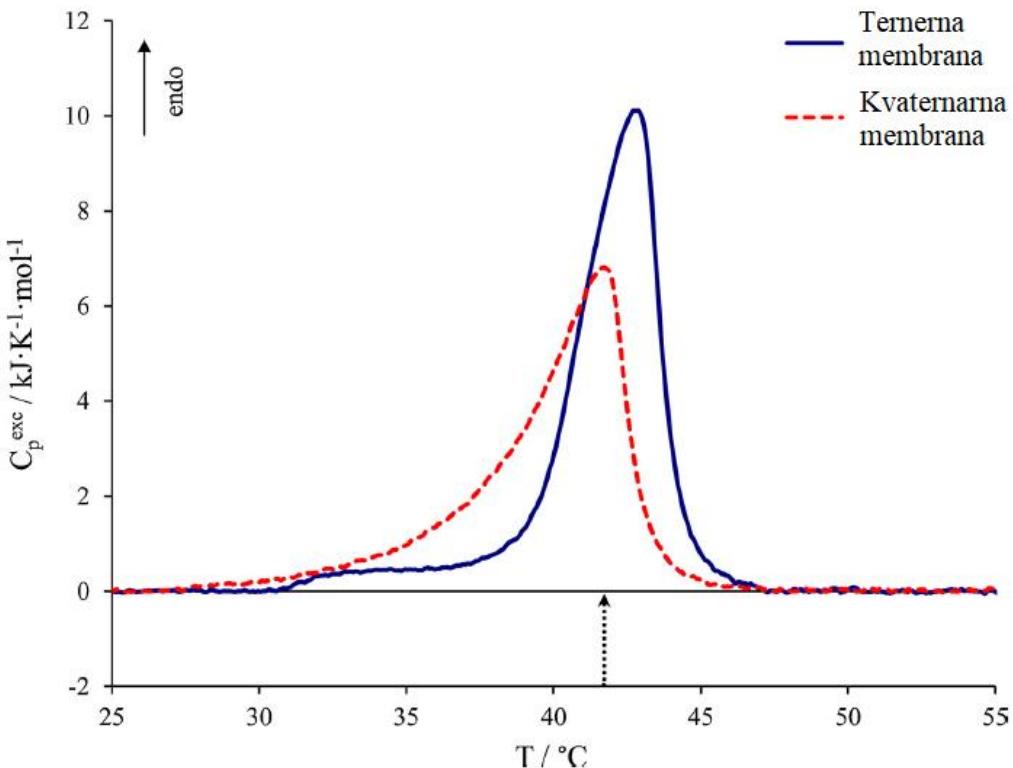
Tablica 2. Termodinamički parametri procijenjeni iz mikro-DSC istraživanja: glavna prijelazna entalpija (ΔH°), vršna maksimalna temperatura (Tmax) i prosječni indeks kooperativnosti (ACI) [11]

Sustavi		ΔH (kJ/mol)	T _{max} (°C)	ACI (°C)	
				MLV	$\sim 0,2 \pm 0,1$
DMPC		24 ± 2	24,0 ± 0,2	SUV	$\sim 1,2 \pm 0,1$
DPPC		35 ± 2	41,6 ± 0,2	LUV	$\sim 1,0 \pm 0,1$
DSPC		44 ± 2	54,9 ± 0,2	GUV	$\sim 0,6 \pm 0,1$
DSPC:DMPC	GUV	38 ± 2	45.0 ± 0.3	7.1 ± 0.2	
	SUV	37 ± 2	44.8 ± 0.3	6.9 ± 0.2	
DSPC:DPPC	GUV	46 ± 2	48.1 ± 0.3	2.3 ± 0.2	
	SUV	45 ± 2	48.4 ± 0.3	2.0 ± 0.2	
DPPC:DMPC	GUV	33 ± 2	33.3 ± 0.3	3.0 ± 0.2	
	SUV	35 ± 2	33.8 ± 0.3	3.3 ± 0.2	
Ternarna memb.	Bez FA	37 ± 2	42.8 ± 0.3	2.5 ± 0.2	
	+ 10% PA	42 ± 2	44.4 ± 0.3	2.7 ± 0.2	
	+ 25% PA	55 ± 2	49.3 ± 0.3	2.8 ± 0.2	
	+ 10% SA	41 ± 2	44.3 ± 0.3	2.7 ± 0.2	
	+ 25% SA	41 ± 2	52.2 ± 0.3	3.9 ± 0.2	
	+ 10% OA	30 ± 2	41.1 ± 0.3	2.4 ± 0.2	
	+ 25% OA	30 ± 2	39.2 ± 0.3	2.9 ± 0.2	
Kvaternarna memb.	Bez FA	33 ± 2	41.7 ± 0.3	3.0 ± 0.2	
	+ 10% PA	38 ± 2	44.4 ± 0.3	3.9 ± 0.2	
	+ 25% PA	41 ± 2	49.9 ± 0.3	4.2 ± 0.2	
	+ 10% SA	39 ± 2	43.9 ± 0.3	4.1 ± 0.2	
	+ 25% SA	38 ± 2	52.3 ± 0.3	4.6 ± 0.2	
	+ 10% OA	33 ± 2	40.6 ± 0.3	3.0 ± 0.2	
	+ 25% OA	34 ± 2	39.4 ± 0.3	3.4 ± 0.2	



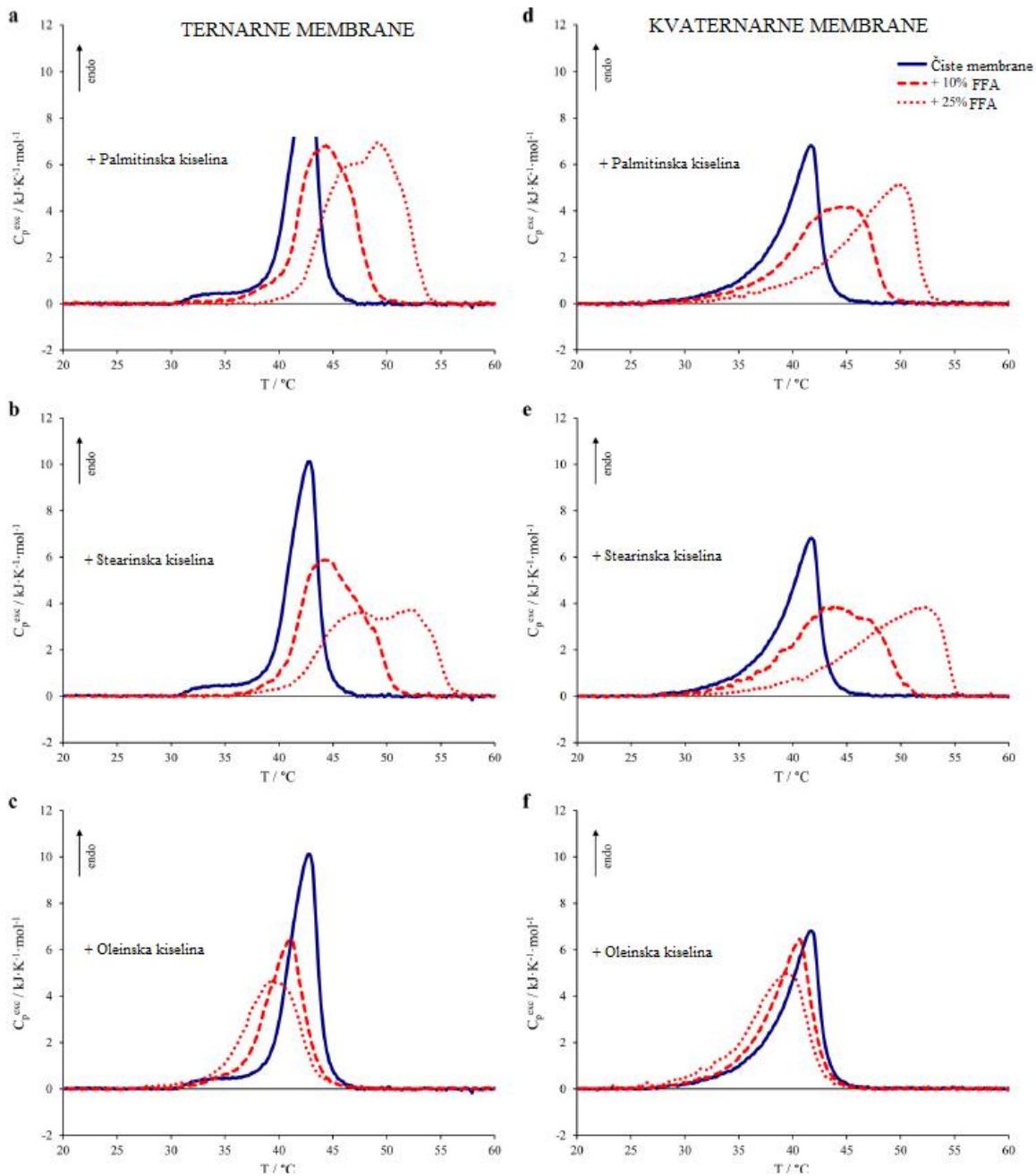
Slika 4. DSC krivulje binarnih sustava za GUV i SUV liposome. [11]

Mjerenja su provedena i za binarne sustave koji su napravljeni u molarnim omjerima 1:1 i samo za granične sustave SUV i GUV što je prikazano na slici 4. Za smjese fosfolipida koji odstupaju za dva ugljikova atoma u duljini lance uočeno je da se fazni prijelazi odvijaju pri temperaturi koja je između temperatura faznog prijelaza čistih/referentnih sustava. Ovakvi rezultati govore da su fosfolipidi sličnih duljina lanaca kompatibilni. Dobiveni signali su širi nego što su kod referentnih sustava i imaju „ramena“ prema lipidima s kraćim lancima repa. „Rame“ na početku signala može se primijetiti u svim slučajevima i dokazuje prisutnost faza bogatijih fosfolipidom s kraćim repovima (što odgovara fazi bogatoj DPPC u DSPC:DPPC i fazi bogatoj DMPC u DSPC:DMPC i DPPC:DMPC). Za sustav gdje je veća razlika u duljini repova vidi se širok i asimetričan signal koji je gotovo dvofazan. Pretpostavlja se da je došlo do razdvajanja faza, odnosno da je stupanj termodinamičke kompatibilnosti povezan sa sastavom lipida/odstupanjem u duljini lanca. Nema značajnih entalpijskih razlika između GUV i SUV liposoma. Razlike učinka zakriviljenosti u binarnim sustavima između GUV i SUV su zanemarive, osim u DSPC:DMPC sustavu, ali u usporedbi s jednokomponentnim sustavima utjecaj zakriviljenosti je gotovo zanemariv i Saitta i suradnici se dalje nisu njime bavili u radu. Naime, u radu je korišten sustav molarnog omjera 1:1 te je pokazan zanemariv utjecaj zakriviljenosti, dok je u realnom sustavu od interesa molarni omjer 1:7, što znači da zakriviljenost ima još manji utjecaj. Smanjenje učinka zakriviljenosti pripisano je tome da u čistim sustavima bilo kakva razina neuređenosti puno je očitija s obzirom na početni sustav, nego u binarnim sustavima gdje je u početni sustav već unesena doza neuređenosti. [11]



Slika 5. mikro-DSC krivulja potpuno zasićene ternarne membrane i kvaternarne membrane koja uključuje i 5% nezasićene komponente (DOPC) u ternarnoj membrani za SUV liposome. [11]

Saitta i suradnici napravili su još dva sustava, ternarnu membranu koja se sastojala od 7 DPPC : 2 DSPC : 1 DMPC i kvaternarnu membranu, koja uključuje i 5% nezasićenog lipida DOPC, a sastoji se od 6,7 DPPC : 1,8 DSPC : 1,0 DMPC : 0,5 DOPC, i obje su pripremljene kao SUV disperzije. DSC krivulja ternarne membrane nalikuje termogramu binarnih sustava, ali s nešto višom temperaturom prijelaza od temperature prijelaza čistog DPPC koji je glavna komponenta sustava što odražava prisustvo DSPC, a "rame" na početku termograma označava prisustvo DMPC. DSC krivulja kvaternarne membrane pokazuju širi i asimetrični signal bez „ramena“ što govori o homogenijoj distribuciji faza kao posljedici dodavanja nezasićenosti koja u potpunosti pokriva "rame" koje je prisutno kod ternarne membrane. Štoviše, T_{\max} je malo pomaknut prema nižim temperaturama ($41,7 ^\circ\text{C}$). Uvođenje nezasićene komponente ima jak utjecaj (s obzirom na dodanu količinu) kako u pogledu distribucije faza, koje postaju šire i homogenije, tako i u pogledu entropijskog učinka, koji ugrožava ukupnu termodinamičku stabilnost. Svi ti učinci omogućuju prikaz hijerarhije opaženih entropijskih doprinosa termodinamičkoj stabilnosti ovih modelnih membrana, tj. prisutnost nezasićenosti $>$ duljina repova $>$ zakriviljenost. [11]

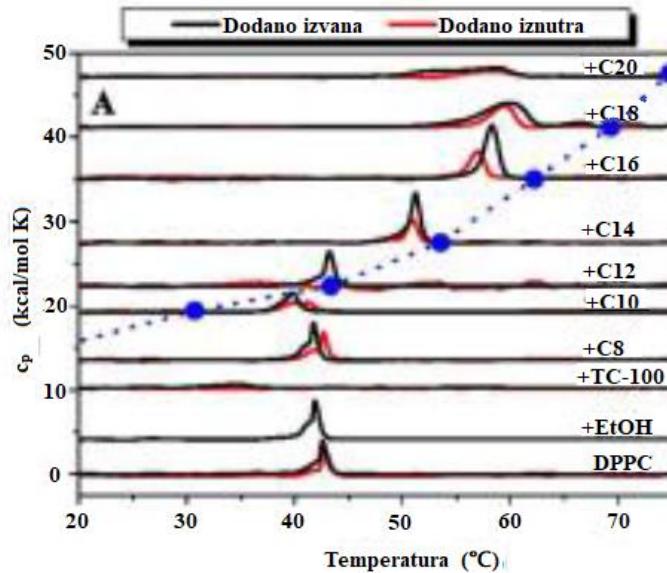


Slika 6. Učinci slobodnih masnih kiselina na toplinsku stabilnost složenih sustava. [11]

Autori su u ternarne i kvaternarne sustave dodali i 10% i 25% masnih kiselina (palmitinska- PA, stearinska- SA i oleinska- OA) i kalorimetrijski provjerili promjene u termodynamičkoj stabilnosti sustava. Uočili su da su zasićene masne kiseline stabilizirale obje membrane, dok se suprotno dogodilo u prisutnosti nezasićene masne kiseline. U slučaju zasićenih masnih kiselina primjetili su blagi porast entalpije koji je dosegao razinu zasićenja, s iznimkom palmitinske kiseline u ternarnoj membrani za koju je entalpijski porast pratio količinu dodanih masnih kiselina. Pretpostavlja se da interakcija između masnih kiselina i membranskih fosfolipida povećava broj kontakata rep-rep u uređenom stanju što se otkriva povećanjem prijelazne entalpije. S obzirom da su učinci zasićenja entalpije opaženi za SA, a ne za PA, autori su prepostavili da zasićene masne kiseline reagiraju s fosfolipidima iste duljine repa, a to objašnjava veću relevantnost entalpijskog učinka PA na membranu koja sadrži 70% DPPC. S druge strane, prisutnost nezasićenih slobodnih masnih kiselina uzrokovala je suprotne

učinke koji ukazuju na to da prisutnost nezasićenog lanca između fosfolipidnih repova remeti fazu gela i dovodi do smanjenja ukupne prijelazne entalpije u obje membrane. Što se tiče doprinosa entropiji, prisutnost zasićenih slobodnih masnih kiselina uzrokovala je snažan entropijski stabilizirajući učinak pomicanjem krivulja prema višim temperaturama i evidentno pojačanje razdvajanja faza. DSC krivulje prikazane na slici 6 i ACI vrijednosti u tablici 2. sugeriraju da ti entropijski učinci ovise o duljini lanca masnih kiselina, postajući jači kako se duljina povećava. Nasuprot tome, prisutnost oleinske kiseline uzrokovala je destabilizirajući učinak, u skladu sa smanjenjem entalpije, snižavajući područje temperature prijelaza i šireći signale. Što se tiće razlika između ternarnih i kvaternarnih membrana, tj. prisutnosti 5% DOPC-a koji dovodi do veće neuređenosti dvosloja, entropijski učinci imaju skroman doprinos, što znači da entropijski učinci većinski diktiraju termodinamičku stabilnost. U slučaju zasićenih masnih kiselina stabilizirajući učinci ovise o dužini lanca i izraženiji su u manje stabilnim membranama, na primjer kvaternarnoj. Naprotiv, u slučaju nezasićenih masnih kiselina destabilizirajući učinci su izraženiji u stabilnijim membranama, kao što je ternarna. [11]

Arouri i suradnici istražili su utjecaj zasićenih masnih kiselina (C8-C20) na propusnost modelnih LUV DPPC membrana. Pomoću diferencijalno-pretražne kalorimetrije (DSC) pratio se utjecaj masnih kiselina na fazne prijelaze liposoma, a utjecaj masnih kiselina na smanjenje propusnosti DPPC membrane se kvantitativno odredio primjenom testa otpuštanja kalceina. Za kalorimetrijska mjerena pripremili su dvije vrste sustava, u jedne sustave masne kiseline dodane su iznutra (dodane lipidima prije nego što su suspendirani liposomi), a u druge masne keline su dodane izvana (dodano u otopinu s već formiranim liposomima). [9]

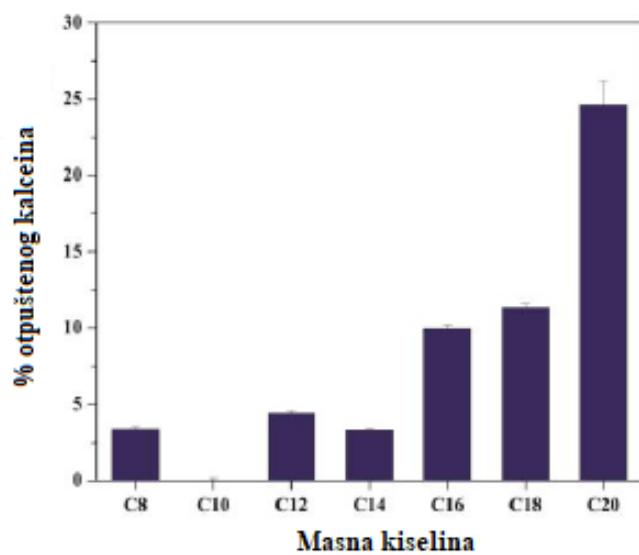


Slika 7. Termogrami modelne membrane i dodanih masnih kiselina. [9]

Potpuno hidratizirani dvosloj DPPC ima glavni fazni prijelaz na oko 42°C. Male razlike u DSC krivulji čistog DPPC-a između uzoraka pripremljenih izvana i pripremljenih iznutra uzrokovane su različitim postupcima pripreme. Za pripremu izvana koristio se etanol (EtOH), za otapanje masnih kiselina (konačna koncentracija etanola < 0,2 vol.%), koji je jedva utjecao na fazni prijelaz DPPC-a, koji je onda u potpunosti nestao nakon dodatka Triton X-100 deterdženta. Kao što je prikazano na slici 7, čini se da kratke masne keline (C8 i C10)

destabiliziraju dvosloj DPPC, što je izraženije u slučaju C10 (smanjenje T_m i ΔH). Masne kiseline duljih lanaca (C12 do C20) značajno su stabilizirale DPPC dvosloj povećavajući i T_m i ΔH . Stabilizacija membrane bila je proporcionalna duljinama masnih kiselina i dosegla je plato na C16. Za liposome DPPC pripremljene iznutra s C12 masnom kiselinom došlo je do eliminacije glavnog faznog prijelaza DPPC-a. Osim povećanja gustoće slaganja DPPC lipidnih lanaca i stabilizacije dvosloja, DSC podaci pokazuju da C18 i C20 proširuju fazni prijelaz vjerojatno zbog formiranja lipidnih domena. To bi mogao biti pokazatelj razdvajanja masnih kiselina (tj. C18 i C20) i DPPC liposoma kao rezultat neusklađenosti između dviju komponenti. Utjecaj masnih kiselina na fazni prijelaz DPPC-a bio je manje izražen u slučaju uzoraka gdje je masna kiselina dodana iznutra, posebno u pogledu promjena ΔH . To bi moglo biti zbog postupka pripreme, tijekom kojeg bi se molekule lipida i masne kiseline mogle posložiti da minimiziraju stres u formiranom miješanom dvosloju. Osim toga, u liposomima, gdje su masne kiseline dodane iznutra, masne kiseline imaju mogućnost interakcije s oba lipidna sloja, što bi moglo dodatno smanjiti destabilizirajuće učinke masnih kiselina. [9]

Kako bi se utvrdio utjecaj masnih kiselina na propusnost membrane napravljeni su liposomi u kojima se nalazi zarobljen kalcein (fluorescentna proba) u koncentraciji pri kojoj dolazi do samogašenja (eng. *self-quenching*) njegove emisije. Vrijednosti postotka otpuštanja kalceina (%CR) za testirane masne kiseline prikazane su na slici 8. Osim za C8, čini se da se curenje kalceina izazvano masnom kiselinom pojačava s duljinom masne kiseline, u rasponu od 0% za C10 do 25% za C20. [9]

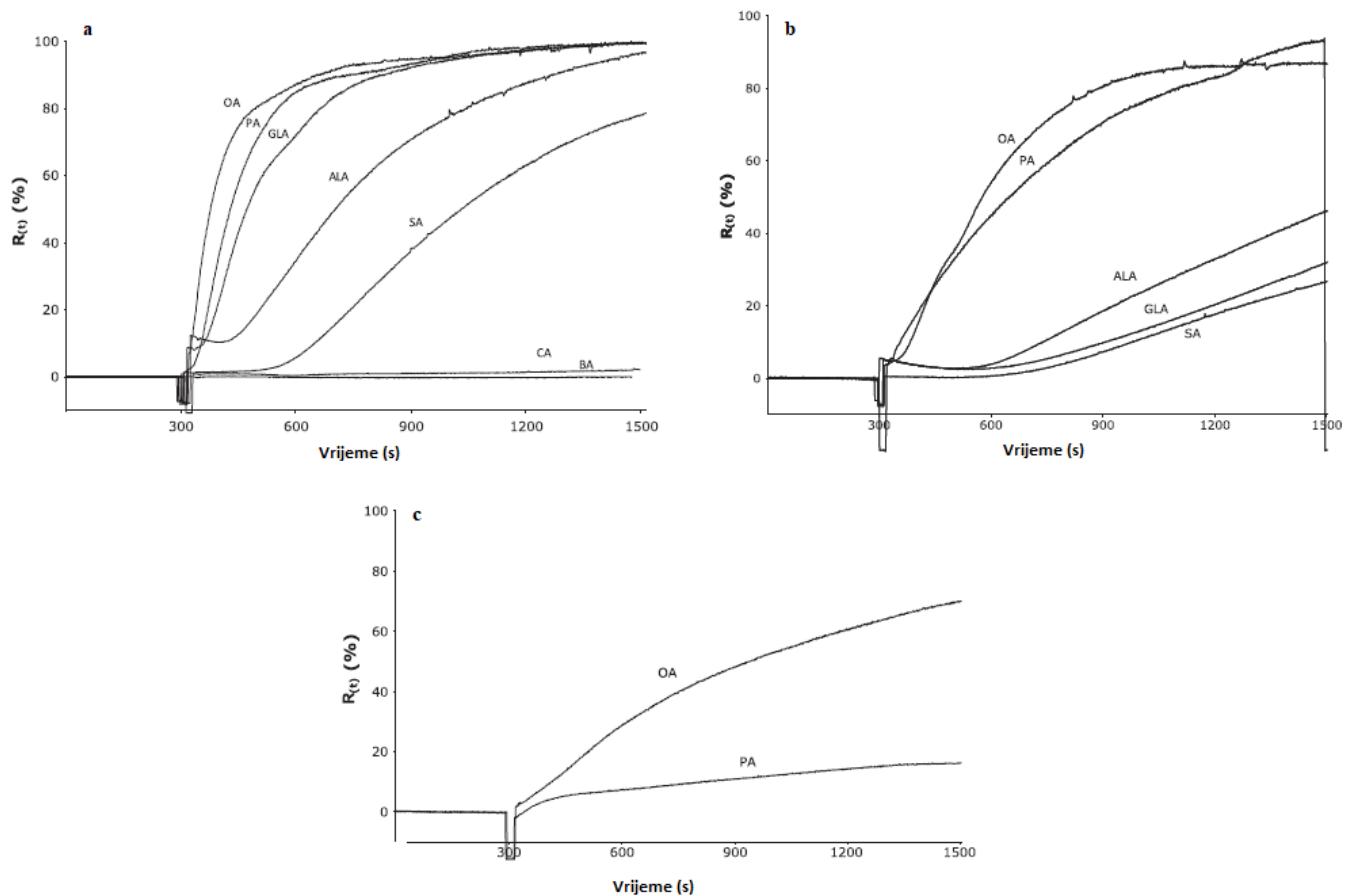


Slika 8. Maksimalno oslobođanje kalceina iz DPPC liposoma nakon dodatka raznih masnih kiselina (C8 – C20) [9]

Ugradnja masnih kiselina u lipidne membrane i njihovo kretanje kroz dvosloj događa se gotovo trenutačno, a to će povećati stres zakrivenosti unutar lipidnog dvosloja zbog necilindrične geometrije masne kiseline. Lokalno nakupljanje masnih kiselina u membrani stvorilo je male heterogenosti i defekte membrane, što je moguće popraćeno stvaranjem pora i morfološkim promjenama membrane, što će sve destabilizirati membranu i smanjiti njezinu propusnost. Ovi rezultati jasno pokazuju da su poremećaji izazvani masnim kiselinama proporcionalni duljinama masne kiseline. Dok kratke masne kiseline imaju tendenciju destabilizirati lipidni dvosloj, duže masne kiseline mogu stabilizirati membrane čineći ih krućima, ali i stvoriti nestabilnost membrane i morfološke promjene. Utvrđeno je da je odnos

između duljine lanca masne kiseline i koeficijenta raspodjele (K) linearan; povećanje duljine masne kiseline za dva ugljikova atoma povećalo je K za gotovo jedan red veličine. Ugradnja kratke masne kiseline C10 u DPPC gel-stanje dvosloja bila je povezana s pozitivnom (egzotermnom) entalpijom raspodjele (ΔH_p) što ukazuje na visoke povoljne entropijske sile. Razdvajanje dužih masnih kiselina bilo je povezano s jačim egzotermnim događajima, s maksimalnim ΔH_p postignutim za C14. Glavne egzotermne pokretačke sile za ugradnju masnih kiselina i amfifilnih molekula općenito su van der Waalsovo vezivanje i membranska particija, dok su desolvatacija molekule i poremećaji membrane endotermni događaji. Veći učinak C8 od očekivanog može se pripisati činjenici da je, za razliku od svih masnih kiselina, C8 u tekućem (ulje) stanju na 25°C, što je moglo povećati inducirane poremećaje membrane. Drugo moguće objašnjenje je veća nepodudarnost između C8 i DPPC (C16 acilnih lanaca), što je moglo smanjiti njihovu mješljivost. [9]

Jespersen i suradnici izabrali su liposome POPC lipida kao predstavnike jednokomponentne lipidne membrane u tekućoj fazi na kojoj su pratili otpuštanje doksorubicina (DOX) prije i nakon dodavanja 20 i 10 μM masnih kiselina (OA, PA, SA, CA, BA, GLA, ALA), što odgovara 50 mol % ukupne količine POPC-a. DPPC su izabrali da predstavlja jednokomponentnu lipidnu membranu u gel fazi na kojoj su pratili otpuštanje DOX-a prije i nakon dodavanja 20 μM masnih kiselina (OA i PA). [4]



Slika 9. Oslobađanje DOX-a iz liposoma nakon dodatka raznih masnih kiselina; **a** oslobađanje DOX-a iz POPC liposoma nakon dodatke 20 mM masnih kiselina; **b** oslobađanje DOX-a iz POPC liposoma nakon dodatka 10 mM masnih kiselina; **c** oslobađanje DOX-a iz DPPC liposoma nakon dodatka 20 mM masnih kiselina [4]

Učinak masnih kiselina na POPC liposome u fazi neuređene tekućine ne pokazuje izravnu vezu s duljinom acilnog lanca. PA (16:0) proizvodi veće oslobađanje od CA (10:0), SA (18:0) i BA (22:0). Ovo je iznenađujuće jer se na određenoj temperaturi membranska particija zasićenih masnih kiselina povećava s povećanjem duljine lanca. Nije pronađen izravan odnos između učinka propusnosti i zasićenja acilnog lanca. Održavanje duljine lanca konstantnom uz povećanje broja dvostrukih veza s nijedne (SA) na jednu (OA) uzrokovalo je značajno povećanje otpuštanja DOX-a, dok su dodatne dvije dvostrukе veze u ALA i GLA izazvale blago smanjenje otpuštanja u usporedbi s OA. Različiti učinci uočeni za različite masne kiseline vjerojatno odražavaju komplikiranu ravnotežu između razlika u kinetici inkorporacije i njezinih učinaka na dvosloj. Sigmoidni oblik krivulja otpuštanja odražava i kinetiku i uzinemirujući učinak na membranu. [4] Dodavanje 20 mM masnih kiselina (OA i PA) DPPC liposomima uzrokuje samo manje oslobađanje u usporedbi s POPC liposomima u fazi neuređene tekućine. Krivulja otpuštanja za OA doseže 70%, ali nastavlja rasti nakon 20 minuta, dok se čini da se otpuštanje uzrokovano PA zaustavlja na 16%. Uređena gel membrana može se smatrati kristalnom strukturom i stoga može sadržavati jednofazna sučelja ili granice zrna. Vjeruje se da su one posebno sklone inkorporaciji stranih molekula i mogu poslužiti kao mjesta nukleacije za male lipidne domene s odvojenim fazama, kroz koje permeanti mogu curiti. Nadalje, lateralna difuzija u uređenim gel membranama je spora u usporedbi s membranama u tekućoj fazi, tako da će moguća pojava defekata u nanosmjeru odgoditi samozatvaranje i omogućiti povećano curenje. Ako se pretpostavi da su masne kiseline ugrađenu u DPPC dvosloj kao dimeri, on ima dovoljno različite karakteristike pakiranja da bi došlo do razdvajanja faza u maloj mjeri, što bi dovelo do povećanog curenja. [4]

3. ZAKLJUČAK

Rezultati predstavljenih radova ukazuju na to da masne kiseline utječu na termodinamička svojstva modelnih lipidnih membrana, govorili o acilnim lancima koji su sastavni dio lipida ili o slobodnim masnim kiselinama koje su dodane u sustave membrane. Saitta i suradnici pokazali su da fazni prijelaz jednokomponentnih modelnih membrana ovisi o dužini acilnog lanca lipida, odnosno da temperatura i entalpija prijelaza rastu s dužinom lanca. U slučaju binarnih sustava, gdje se lanci razlikuju za 2 C atoma, uočeno je da se temperature i entalpije faznih prijelaza pomiču na vrijednosti koje se nalaze između vrijednosti čistih komponenti. Pripremom ternarne, odnosno trokomponentne, membrane pokazano je da su vrijednosti temperature i entalpije faznog prijelaza najsličnije vrijednostima najzastupljenije komponente što je u ovom slučaju bio 70% DPPC. Stoga, utjecaj duljine lipidnog lanca biti će značajan samo kada je količina tog lipida dovoljno velika. Pripremom kvaternarne, odnosno četverokomponentne, membrane u koju je kao četvrta komponenta dodan lipid s nezasićenim acilnim lancima primjećen je značajan utjecaj na temperaturu i entalpiju prijelaza tako što su se obje vrijednosti smanjile u odnosu na ternarnu membranu. U ovom slučaju vidljivo je da nezasićenost acilnog lanca ima velik utjecaj s obzirom na malu zastupljenost u sustavu. Zaključeno je i da zakriviljenost membrane ima utjecaj na fazni prijelaz, ali je taj utjecaj zanemariv.

Dodavanjem slobodnih masnih kiselina u membrane Saitta i suradnici i Arouri i suradnici pokazali su da zasićene masne kiseline pomiču vrijednosti temperature i entalpije faznog prijelaza na više vrijednosti. Ovaj je fenomen objašnjen time da zasićene masne kiseline stabiliziraju membranu i čine je gušće pakiranom i time doprinose povišenju promatranih vrijednosti. Iznimku čine zasićene masne kiseline čija je duljina lanca puno kraća od duljine lanaca lipida (C8 i C10) koje smanjuju vrijednosti temperature i entalpije i vjerojatno imaju efekt kao i lipidi kraćeg lanca u binarnim sustavima koje su prikazali Saitta i suradnici. Arouri i suradnici pokazali su da se dodavanjem slobodnih masnih kiselina C18 i C20 proširuje fazni prijelaz što su objasnili nastajanjem domena zbog nekompatibilnosti sustava, odnosno razdvajanjem masnih kiselina od lipida. Dodatak slobodnih nezasićenih masnih kiselina uzrokovao je smanjenje temperature i entalpije prijelaza. Smanjenje temperature se pospješilo povećanjem dodane količine nezasićene masne kiseline. Cis-nezasićene masne kiseline u membrane unose neuređenost svojim acilnim lancima koji imaju prijelom od 30° zbog dvostrukе veze te tako destabiliziraju membranu.

Arouri i suradnici dokazali su i da masne kiseline imaju utjecaj na propusnost membrane tako što se propusnost povećava s duljinom lanca. Uređena gel membrana može sadržavati granice zrna za koje se vjeruje da mogu poslužiti kao mjesta nastanka lipidnih domena gdje će se masne kiseline ugraditi i na tim mjestima permeanti mogu curiti.. Jespersen i suradnici pokazali su da nezasićeni acilni lanac uvelike poboljšava propusnost membrane što je bilo najčešće usporedbom utjecaja C18 i C18:1, ali povećanje broja nezasićenih veza neće imati isti efek, odnosno C18:2 je čak smanjio propusnost u odnosu na C18:1. Značajan utjecaj na povećanje propusnosti imala je i C16 na lipidnu membranu koja je pri sobnoj temperaturi u tekućem neuređenom stanju (POPC). Utjecaj C16 i C18:1 masnih kiselina smanjio se u slučaju uredene gel membrane (DPPC), što znači da je učinak masnih kiselina ovisan i o fizikalno-kemijskom sastavu i fazi membrane.

4. POPIS KRATICA

DPPC - 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfokolin
DPPE - 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamin
DPPG - 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (natrijeva sol)
DPPS - 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serin (natrijeva sol)
DPPI - 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-mio-inozitol) (amonijeva sol)
DPPA - 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfat (natrijeva sol)
POPC – 1-palmitoil-2-oleoil-glicero-3-fosfokolin
DMPC - 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfokolin
DSPC - 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfokolin
DOPC - 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfokolin
PA - palmitinska kiselina (eng. *Palmitic Acid*)
SA - stearinska kiselina (eng. *Stearic Acid*)
OA - oleinska kiselina (eng. *Oleic Acid*)
GLA – γ -linoleinska kiselina (eng. γ -*Linoleic Acid*)
ALA - α -linoleinska kiselina (eng. α -*Linoleic Acid*)
CA – kaprinska kiselina (eng. *Capric Acid*)
FA - masna kiselina (eng. *Fatty Acid*)
CMC - kritična micelna koncentracija (eng. *Critical Micelle Concentration*)
ISG - inzulin lučeće membrane (eng. *Insulin Secreting Granules*)
SUV - mali unilamelarni liposomi (eng. *Small Unilamellar Vesicles*)
LUV - veliki unilamelarni liposomi (eng. *Large Unilamellar Vesicles*)
GUV - divovski unilamelarni liposomi (eng. *Giant Unilamellar Vesicles*)
MLV - multilamelarni liposomi (eng. *Multilamellar Vesicles*)
DSC – diferencijalno pretražna kalorimetrija (eng. *Differential Scanning Calorimetry*)
DLS – dinamično raspršenje svjetla (eng. *Dynamic Light Scattering*)
DOX – dokсорубицин (eng. *Doxorubicin*)
ACI - prosječni indeks kooperativnosti (eng. *Average Cooperativity Index*)

5. LITERATURA

- [1] T. H. Lee et al., *Chem. Sci.*, 15, 2024, 3408.
- [2] H. Strahl et. al., *Annu. Rev. Microbiol.*, 71 , 2017, 519–538.
- [3] Y. Yoon et. al., *Food Res. Int.*, 72, 2015, 25–36.
- [4] H. Jespersen et. al., *Biochimie*, 94, 2012, 2-10.
- [5] T. Heimburg, Thermal Biophysics of Membranes, Wiley-VCH, Weinheim, 2007., 15-80.
- [6] Ü. Coskun et. al, *Structure*, 19, 2011, 1543-1548.
- [7] A.M. Dopico, Methods in Membrane Lipids, Humana Press, 2006, 587-588.
- [8] M. Wenzel et. al., *Bio-protoc.*, 8, 2018, e3063-e3063
- [9] A. K. E. Arouri et. al, *Chem. Phys. Lipids*, 200, 2016, 139-146.
- [10] I. Kimura et. al., *Physiol. Rev.*, 100, 2020, 171–210.
- [11] F. Saitta et. al, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 176, 2019, 167–175.
- [12] Y. Wang et. al., *RSC Adv.*, 7, 2017, 41561-41572.
- [13] J. C. Allen, *Eur. J. Biochem.*, 4, 1968, 201–208.
- [14] <https://avantiresearch.com/news/suv-vs-luv-whats-the-difference> (datum dostupnosti 01. listopada 2019.)