

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Martina ZIRDUM

**VPLIV NATRIJEVEGA KLORIDA NA TERMIČNO STABILNOST
VELIKIH ENOSLOJNIH LIPOSOMOV SESTAVLJENIH IZ
RAZLIČNIH LIPIDOV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF SODIUM CHLORIDE ON THERMAL STABILITY
OF LARGE UNILAMELLAR LIPOSOMES CONSISTING OF
VARIOUS LIPIDS**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo na Katedri za biokemijo in kemijo živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Za mentorico diplomskega dela je imenovana prof. dr. Nataša Poklar Ulrich, za somentorja dr. Janez Valant in za recenzentko doc. dr. Polona Jamnik.

Mentorica: prof. dr. Nataša Poklar Ulrich

Somentor: dr. Janez Valant

Recenzentka: doc. dr. Polona Jamnik

Komisija za zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Diplomska naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Martina Zirdum

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 577.352:577.115:544.032(043)=163.6
KG lipidi / biološke membrane / fluidnost membran / liposomi / veliki enoslojni liposomi / LUV / arheje / *Aeropyrum pernix* / arheosomi / temperatura faznega prehoda / vpliv temperature / vpliv natrijevega klorida / fluorescenčna spektrometrija
AV ZIRDUM, Martina
SA POKLAR ULRIH, Nataša (mentorica)/ VALANT, Janez (somentor)/ JAMNIK, Polona (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2012
IN VPLIV NATRIJEVEGA KLORIDA NA TERMIČNO STABILNOST VELIKIH ENOSLOJNIH LIPOSOMOV SESTAVLJENIH IZ RAZLIČNIH LIPIDOV
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XI, 46 str., 3 pregl., 27 sl., 30 vir.
IJ sl
JI sl/en
AL Fosfolipidi so glavni predstavniki membranskih lipidov. Zanje je značilno, da je hidroksilna skupina fosforne(V) kisline lahko zaestrena z različnimi alkoholi. Fosfolipidi se urejajo v lipidne dvosloje in lahko tvorijo liposome. Da bi ugotovili, kako dolžina nepolarnih verig in različni alkoholi, vezani na fosfatno skupino, vplivajo na termično stabilnost liposomov, smo iz posameznih lipidov naredili velike enoslojne liposome (LUV) in vanje vgradili fluorescenčno barvilo kalcein. Liposome smo pripravili iz dipalmitoil-fosfatidilholina (DPPC), distearoil-fosfatidilholina (DSPC), dibehenoil-fosfatidilholina (DBPC), dipalmitoil-fosfatidilinozitola (DPPI), dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (DPPE), dipalmitoil-fosfatidilglicerola (DPPG), di-O-heksadecil-fosfatidilhoilna (DHPC) in iz lipidov, izoliranih iz arheje *Aeropyrum pernix*. S fluorescenčno spektrometrijo smo spremljali sproščanje kalceina pri različnih koncentracijah natrijevega klorida v temperaturnem območju od 15 do 95 °C. Zanimala nas je predvsem temperatura faznega prehoda, ko lipidi preidejo iz gel v tekoče stanje. Ugotovili smo, da so bili med vsemi liposomi najbolj stabilni liposomi, pripravljeni iz lipidov, izoliranih iz arheje *Aeropyrum pernix*, saj so sproščali najmanj kalceina v celotnem temperaturnem območju. Tako smo dokazali, da etrska vez v primerjavi z estrsko vezjo termično stabilizira liposome. Ugotovili smo tudi, da se stabilnost liposomov povečuje z daljšanjem dolžine nepolarnega repa, med različnimi skupinami, ki so vezane na fosfatno skupino, pa k stabilnosti najbolj prispeva etanolaminska skupina.

KEY WORD DOCUMENTATION

ND Dn
DC UDK 577.352:577.115:544.032(043)=163.6
CX lipids / biological membranes / membrane fluidity / liposomes / large unilamellar vesicles / LUV / archaea / *Aeropyrum pernix* / archaeosomes / phase transition temperature / influence of temperature / influence of sodium chloride / fluorescence spectrometry
AU ZIRDUM, Martina
AA POKLAR ULRIH, Nataša (supervisor) / VALANT, Janez (co-advisor) / JAMNIK, Polona (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2012
TI INFLUENCE OF SODIUM CHLORIDE ON THERMAL STABILITY OF LARGE UNILAMELLAR LIPOSOMES CONSISTING OF VARIOUS LIPIDS
DT Graduation thesis (University studies)
NO XI, 46 p., 3 tab., 27 fig., 30 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Phospholipids are the main group of membrane lipids. Their typical feature is that the hydroxy group of the phosphoric(V) acid can be converted into esters with different alcohols. Phospholipids can be ordered into lipid double layers and thus build liposomes. To discover how the length of non-polar chains and different alcohols linked to the phosphate group affect the liposome stability, we created large unilamellar vesicles (LUV) and built into them a fluorescent colouring agent calcein. We created the vesicles from dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC), distearoyl phosphatidylcholine (DSPC), dibehenoyl phosphatidylcholine (DBPC), dipalmitoyl phosphatidylinositol (DPPI), dipalmitoyl phosphatidylethanolamin (DPPE), dipalmitoyl phosphatidylglycerol (DPPG), di-O-hexadecyl phosphatidylcholine, as well as lipids, isolated from the *Aeropyrum pernix* archaea. We followed the calcein release with different sodium chloride concentrations in temperatures ranging from 15 to 95 °C using fluorescence spectroscopy. We were predominately interested in the temperature of the phase transition. We discovered that ether bond in comparison to ester bond more stabilizes the liposomes. We also discovered that the liposome stability increases with the length of the nonpolar tail, whereas among different groups linked to the phosphate groups, the ethanolamine group is the one that contributes most to the stability.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORD DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI

1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA IN DELOVNA HIPOTEZA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 BIOLOŠKE MEMBRANE	3
2.2 FOSFOLIPIDI V ŽIVILSKI INDUSTRIJI	6
2.3 FLUIDNOST LIPIDNEGA DVOSLOJA	6
2.4 LIPOSOMI	7
2.4.1 Arheosomi	8
2.4.2 Klasifikacija liposomov	8
2.4.3 Najpogosteje uporabljeni fosfolipidi pri izdelavi liposomov	9
2.4.3.1 Fosfatidilholin.....	9
2.4.3.2 Fosfatidiletanolamini	10
2.4.3.3 Fosfatidilinozitoli	10
2.4.3.4 Fosfatidilgliceroli	11
2.5 ARHEJE	11
2.5.1 <i>Aeropyrum pernix</i>	12

2.5.2 Arhealni membranski lipidi.....	12
3 MATERIALI IN METODE	15
3.1 MATERIALI	15
3.1.1 Laboratorijska oprema	16
3.2 METODE	17
3.2.1 Gojenje <i>Aeropyrum pernix</i> K1	17
3.2.2 Izolacija lipidov.....	17
3.2.3 Priprava raztopine kalceina	18
3.2.4 Priprava liposomov	18
3.2.5 Fluorescenčna spektrometrija	19
3.2.5.1 Jablonski diagram	20
3.2.5.2 Metode fluorescenčne spektrometrije.....	21
3.2.5.3 Zgradba fluorescenčnega spektrometra	21
3.2.5.4 Merjenje intenzitete fluorescence kalceina, vgrajenega v liposome	23
4 REZULTATI.....	24
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	38
5.1 RAZPRAVA.....	38
5.2 SKLEPI.....	42
6 POVZETEK.....	43
7 VIRI	44
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Fizikalne lastnosti nekaterih najbolj uporabljenih fosfolipidov (Lasič, 1993).
..... 9

Preglednica 2: Sestava gojišča za gojenje arheje *Aeropyrum pernix* K1. 17

Preglednica 3: Fazni prehodi liposomov v prisotnosti različne koncentracije natrijevega klorida. T_m - temperatura faznega prehoda, ΔT - območje faznega prehoda.
..... 37

KAZALO SLIK

Slika 1: Biološka membrana: model tekočega mozaika. Sestavljena je iz lipidnega dvosloja z vključenimi integralnimi in perifernimi proteini (Boyer, 2005).....	3
Slika 2: Strukturne formule alkoholov, ki so najpogosteje vezane na fosfatno skupino: (a) serin, (b) etanolamin, (c) holin in (č) inozitol (Stryer, 1996).	4
Slika 3: Strukturne formule fosfolipidov, ki smo jih uporabili v eksperimentalnem delu diplomske naloge: (a) DPPC, (b) DSPC, (c) DBPC, (č) DPPE, (d) DPPG, (e) DPPI in (f) DHPC (Avanti Polar Lipids, 2012).....	5
Slika 4: Struktura lipidnega dvosloja, sestavljenega iz fosfatidilholina in fosfatidiletanolamina: (a) nad in (b) pod temperaturo faznega prehoda (Voet D in Voet GJ, 2004).	7
Slika 5: Shematska predstavitev enoslojnega liposoma (Kočevar Glavač in Kristl, 2005). .	7
Slika 6: Različne vrste liposomov: SUV (majhni enoslojni liposomi), LUV (veliki enoslojni liposomi), GUV (enoslojni liposomi celičnih velikosti) in MLV (večslojni liposomi) (Voskhul in Ravoo, 2009).	9
Slika 7: Struktura fosfatidilholina (Stryer, 1996).	9
Slika 8: Struktura fosfatidiletanolamina (Stryer, 1996).....	10
Slika 9: Struktura fosfatidilinozitola (Stryer, 1996).	11
Slika 10: Rast <i>Aeropyrum pernix</i> glede na (a) temperaturo in (b) slanost. Čas podvajanja je bil izračunan iz naklona rastne krivulje (Sako in sod., 1996).	12

Slika 11: Struktura (a) glicerolnega dietra (ftalin), (b) diglicerolnega tetraetra (biftalin) in (c) bifitanil diola s štirimi ciklopentanskimi obroči (Bullock, 2000).	13
Slika 12: Struktura 2,3-di-O-sesterterpanil- <i>sn</i> -glicero-1-fosfo-1'-(2'-O- α -D-glukozil)- <i>mio</i> - inozitola in 2,3-di-O-sesterterpanil- <i>sn</i> -glicero-1-fosfo- <i>mio</i> -inozitola (Gmajner in Poklar Ulrih, 2011).	13
Slika 13: Značilne strukture arhealnih fosfolipidov v primerjavi z bakterijskimi fosfolipidi (Koga in Morii, 2006).	14
Slika 14: Jablonski diagram (Jain in sod., 2009).	20
Slika 15: Zgradba fluorescenčnega spektromетra (Lakowicz, 1999).	22
Slika 16: Vpliv temperature in koncentracije NaCl na sproščanje kalceina iz LUV liposomov DPPC (c=0,023 mg/mL) pri pH 7,0 (20 mM HEPES).	25
Slika 17: Vpliv temperature in koncentracije NaCl na sproščanje kalceina iz LUV liposomov DSPC (c=0,023 mg/mL) pri pH 7,0 (20 mM HEPES).	26
Slika 18: Vpliv temperature in koncentracije NaCl na sproščanje kalceina iz LUV liposomov DBPC (c=0,023 mg/mL) pri pH 7,0 (20 mM HEPES).	27
Slika 19: Vpliv temperature in koncentracije NaCl na sproščanje kalceina iz LUV liposomov DPPG (c=0,023 mg/mL) pri pH 7,0 (20 mM HEPES).	28
Slika 20: Vpliv temperature in koncentracije NaCl na sproščanje kalceina iz LUV liposomov DPPE (c=0,023 mg/mL) pri pH 7,0 (20 mM HEPES).	29

Slika 21: Vpliv temperature in koncentracije NaCl na sproščanje kalceina iz LUV liposomov DPPI (c=0,023 mg/mL) pri pH 7,0 (20 mM HEPES).	30
Slika 22: Vpliv temperature in koncentracije NaCl na sproščanje kalceina iz LUV liposomov DHPC (c=0,023 mg/mL) pri pH 7,0 (20 mM HEPES).	31
Slika 23: Vpliv temperature in koncentracije NaCl na sproščanje kalceina iz LUV liposomov, pripravljenih iz arhealnih lipidov (c=0,023 mg/mL), pri pH 7,0 (20 mM HEPES).	32
Slika 24: Vpliv temperature na sproščanje kalceina iz LUV liposomov, pripravljenih iz DPPC, DSPC in DBPC, brez prisotnosti NaCl (c=0,023 mg/mL) pri pH 7,0 (20 mM HEPES).	33
Slika 25: Vpliv temperature na sproščanje kalceina iz LUV liposomov, pripravljenih iz DPPC, DPPE, DPPG in DPPI, brez prisotnosti NaCl (c=0,023 mg/mL) pri pH 7,0 (20 mM HEPES).	34
Slika 26: Vpliv temperature na sproščanje kalceina iz LUV liposomov, pripravljenih iz DPPC in DHPC, brez prisotnosti NaCl (c=0,023 mg/mL) pri pH 7,0 (20 mM HEPES).	35
Slika 27: Vpliv temperature na sproščanje kalceina iz LUV liposomov, pripravljenih iz DPPC, DSPC, DBPC, DPPE, DPPG, DPPI, DHPC in iz arhealnih lipidov, brez prisotnosti NaCl (c=0,023 mg/mL) pri pH 7,0 (20 mM HEPES).	36

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

DBPC	1,2-dibehenoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholin
DHPC	1,2-di-O-heksadecil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholin
DPPC	1,2-diheksadecanoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholin
DPPE	1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanolamin
DPPG	1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoglicerol
DPPI	1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoinozitol
DSPC	1,2-distearoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholin
GUV	enoslojni liposomi celičnih velikosti (giant unillamellar vesicles)
HEPES	4-(2-hidroksietyl)-1-piperazinetansulfonska kislina
LUV	veliki enoslojni liposomi (large unillamellar vesicles)
MLV	večslojni liposomi (multilamellar vesicles)
SUV	majhni enoslojni liposomi (small unilamellar vesicles)

1 UVOD

Maščobne kisline so biološke molekule, ki vsebujejo polarno karboksilno skupino (-COOH), vezano na nerazvezano alifatsko verigo. Te strukturne značilnosti jim dajejo dvojno naravo: en konec je polaren, nasprotni konec (ogljikovodikova veriga) pa ima nepolarne lastnosti. Take molekule imenujemo tudi amfifilne molekule (Boyer, 2005). Redko so maščobne kisline v naravi proste, pogosteje se pojavijo zaestrene kot glavna komponenta številnih lipidov. V višjih rastlinah in živalih prevladujejo maščobne kisline s C₁₆ (palmitinska) in C₁₈ atomi (stearinska, oleinska, linolna, linolenska) (Voet D in Voet GJ, 2005).

Fosfolipidi so osrednji gradniki bioloških membran. V fosfolipidih je hidroksilna skupina na mestu C₁ in C₂ glicerola zaestrena s karboksilno skupino dveh maščobnih kislin (Stryer, 1996). Analiza številnih fosfolipidov je pokazala, da prevladujejo nasičene maščobne kisline na mestu 1 in nenasičene na mestu 2 (Boyer, 2005). Hidroksilna skupina na mestu C₃ pa je zaestrena s fosforo kislino. Tak najpreprostejši fosfolipid imenujemo fosfatid. V bioloških membranah je fosfatid le malo prisoten, vendar pa je ključen v biosintezi ostalih fosfolipidov (Stryer, 1996).

Liposomi so sferično zaprte strukture, sestavljene iz ukrivljenih lipidnih dvoslojev. V živilski industriji se liposome uporablja kot emulgatorje za pripravo krem, gelov, trdnih snovi ali komponent, ki se drugače ne bi mešale. Taki izdelki so majoneza, čokolada in instant praški za pripravo pijač. Liposome uporabljamo tudi za mikroenkapsulacijo arom, vitaminov, antioksidantov, protimikrobnih snovi in konzervansov ter jim tako izboljšamo topnost, mešanje in jih zaščitimo pred kemijskimi reagenti (Lasič, 1993).

1.1 NAMEN DELA IN DELOVNA HIPOTEZA

V raziskavi smo proučevali termično stabilnost velikih enoslojnih liposomov (LUV), sestavljenih iz različnih lipidov. Uporabili smo 1,2-diheksadecanoil-*sn*-glicero-3-fosfoholin (DPPC), 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfoholin (DSPC), 1,2-dibehenoil-*sn*-glicero-3-fosfoholin (DBPC), 1,2-di-O-heksadecil-*sn*-glicero-3-fosfoholin (DHPC), 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamin (DPPE), 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol (DPPG), 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoinozitol (DPPI) in arhealne lipide, ki smo jih izolirali iz hipertermofilne arheje *Aeropyrum pernix* K1. Namen dela je bil preučiti, kako dodatek soli (NaCl) vpliva na termično stabilnost velikih enoslojnih liposomov (LUV), sestavljenih iz lipidov z različnimi hidrofilnimi glavami in hidrofobnimi repi, in na propustnost liposomov.

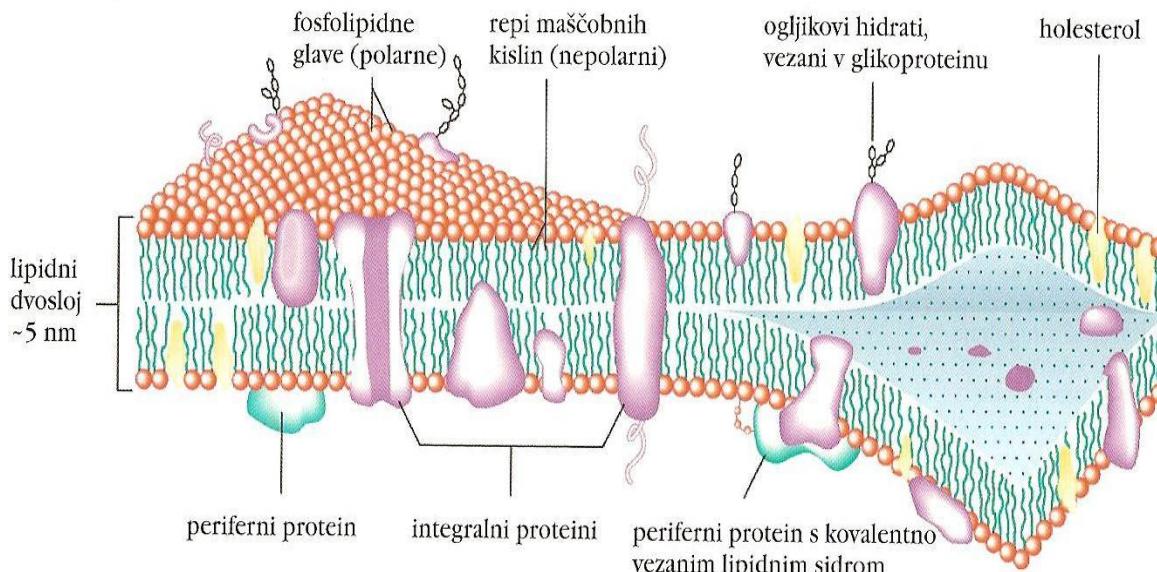
Predvidevamo, da se temperatura faznega prehoda lipidov spremeni zaradi dodatka NaCl, prav tako pa se spremeni propustnost liposomov, ki jo bomo spremljali z deležem sproščenega kalceina. Domnevamo, da bodo med vsemi proučevanimi liposomi imeli najmanjšo propustnost za kalcein liposomi, ki bodo pripravljeni iz lipidov, izoliranih iz *A. pernix*.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BIOLOŠKE MEMBRANE

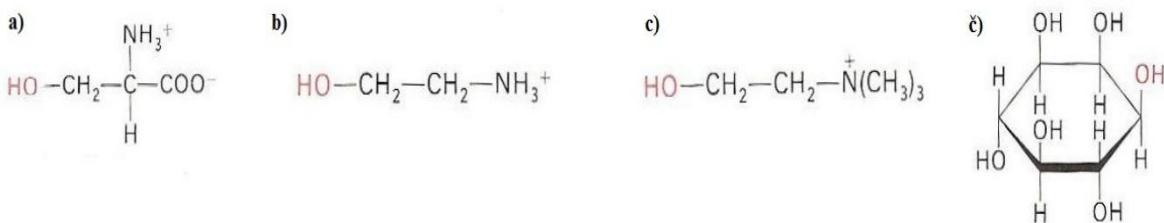
Biološke membrane se razlikujejo po strukturi, kljub temu pa imajo vse številne enake lastnosti. Debelina večine bioloških membran znaša med 6 in 10 nm, so asimetrične in sestavljene pretežno iz lipidov in proteinov. Masno razmerje med proteini in lipidi je v večini bioloških membran od 1:4 do 4:1. Membrane vsebujejo tudi ogljikove hidrate, ki so vezani na lipide in proteine. Membranski lipidi so relativno majhne molekule, ki so tako hidrofilne kot hidrofobne sestave. Lipidni dvosloj je tako ovira toka polarnih in velikih nepolarnih molekul in selektivno propustna pregrada za majhne nepolarne molekule (kisik, ogljikov dioksid in ogljikovodiki) in vodo. Specifični proteini v membrani služijo kot črpalke, receptorji, energijski pretvorniki in encimi (Stryer, 1996).

zunanja površina



Slika 1: Biološka membrana: model tekočega mozaika. Sestavljena je iz lipidnega dvosloja z vključenimi integralnimi in perifernimi proteini (Boyer, 2005).

Membranske lipide delimo na: fosfolipide, glikolipide in holesterol. Fosfolipidi so glavni razred membranskih lipidov, saj so zelo razširjeni v vseh bioloških membranah. Sestavljeni so lahko iz glicerola (fosfoglyceridi) ali sfingozina. Fosfoglyceridi imajo na glicerol vezani dve maščobnokislinski verigi in fosfatno skupino (Stryer, 1996). Fosfatna skupina lahko reagira z eno, dvema ali tremi alkoholnimi enotami, pri čemer nastanejo mono-, di- in triestri. Običajno je to ena od naslednjih molekul: aminoalkohol, etanolamin ali holin, aminokislina serin ali polihidroksialkohol inozitol. Z izjemo inozitola imajo vsi alkoholi aminsko ali drugo funkcionalno skupino, ki je pri fiziološkem pH ionizirana. Pri tem pH imajo vsi glicerofosfolipidi razen fosfatidiletanolamina ali fosfatidilholina negativen neto naboj (Boyer, 2005).

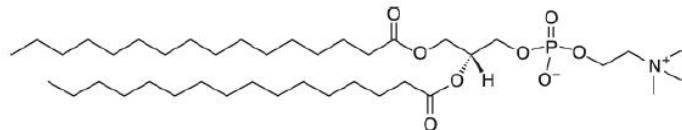


Slika 2: Strukturne formule alkoholov, ki so najpogosteje vezane na fosfatno skupino: (a) serin, (b) etanolamin, (c) holin in (č) inozitol (Stryer, 1996).

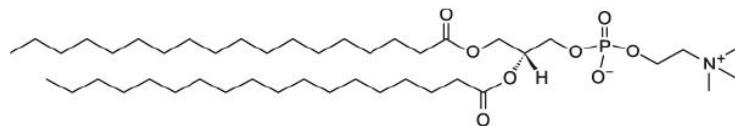
Sfingomielini so edini membranski fosfolipidi, ki ne izhajajo iz glicerola, ampak iz sfingozina, ki je aminoalkohol, sestavljen iz dolge nenasičene ogljikovodikove verige. V sfingomielinu je amino skupina sfingozina povezana z maščobno kislino preko amidne vezi (Stryer, 1996).

V poskusih, ki smo jih izvajali, smo uporabili naslednje fosfolipide:

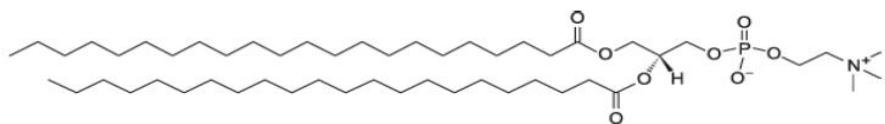
a)



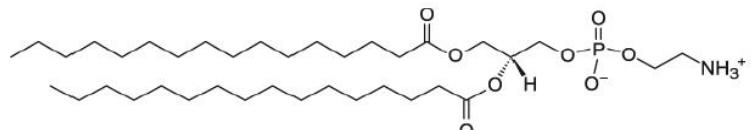
b)



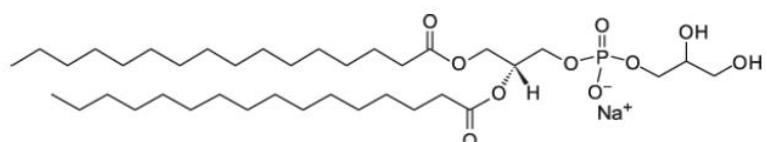
c)



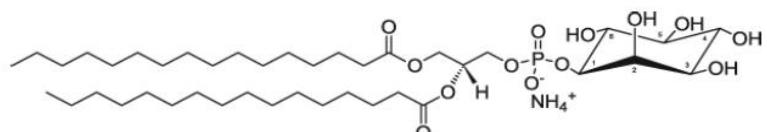
č)



d)



e)



f)



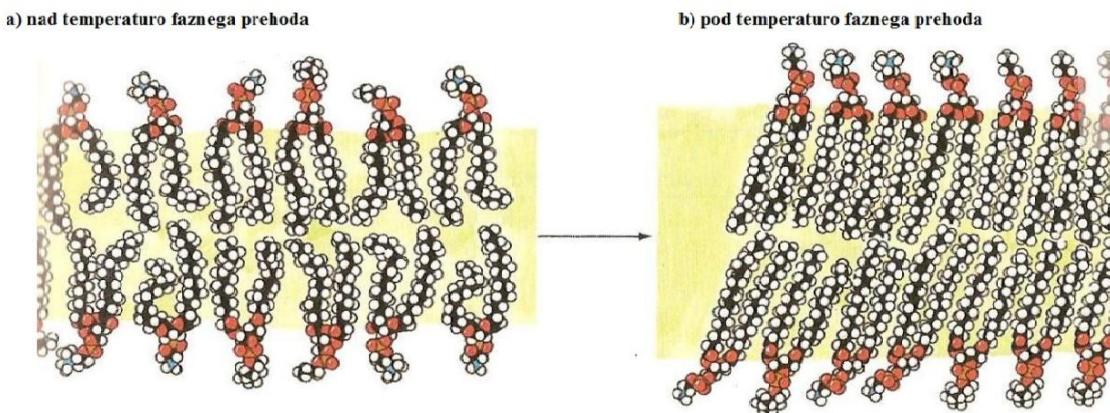
Slika 3: Strukturne formule fosfolipidov, ki smo jih uporabili v eksperimentalnem delu diplomske naloge:
(a) DPPC, (b) DSPC, (c) DBPC, (č) DPPE, (d) DPPG, (e) DPPI in (f) DHPC (Avanti Polar Lipids, 2012).

2.2 FOSFOLIPIDI V ŽIVILSKI INDUSTRiji

Večino omenjenih fosfolipidov, ki tvorijo liposome, se v živilski industriji uporablja kot emulgatorje polarne/nepolarne površine in tvorbe emulzij olja v vodi in vode v olju. Ti sistemi se uporabljam za pripravo krem, gelov, trdnih snovi ali komponent, ki se drugače ne bi mešale, kot so majoneza, čokolada ali instant praški za pripravo pijač. V živilski industriji se liposome uporablja tudi za veliko načinov mikroenkapsulacij. V lipidne sisteme se tako mikroenkapsulira arome, vitamine, antioksidante, protimikrobne snovi in konzervanse. S postopkom mikroenkapsulacije v veliko primerih izboljšamo topnost, zaščitimo spojine pred kemijskimi reagenti, izboljšamo rokovanie in mešanje spojin, ki se drugače ne bi mešale. V primeru reaktivnih sestavin izboljšamo časovno in prostorsko delovanje z boljšo razpršitvijo in trajno ali nadzorovano sproščanje (Lasič, 1993).

2.3 FLUIDNOST LIPIDNEGA DVOSLOJA

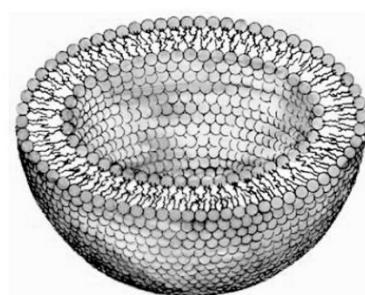
Zelo pomembna lastnost lipidnega dvosloja je fluidnost (Styer, 1996). S fluidnostjo membrane definiramo gibanje molekul v membrani in urejenost lipidnega dvosloja. Fluidost je obratnosorazmerna mikroviskoznosti. Obstajajo razlike med zunanjim in notranjim slojem membrane, in sicer je zunanji del membrane zaradi holesterola, ki se zadržuje bolj v zunanjem delu membrane, manj fluiden (Živec in Ziherl, 2006). Pomembna lastnost lipidnega dvosloja je tudi temperatura faznega prehoda (T_m) (Styer, 1996). Membranski lipidi so pod T_m togi, urejeni in tesno zloženi, kar pomeni, da imajo nižjo fluidnost (gel stanje). Nad T_m pa so lipidi bolj fleksibilni, prisotna je lateralna difuzija (tekočini podobno stanje). T_m narašča z dolžino verige in stopnjo nasičenosti maščobnih kislin. T_m večine bioloških membran se giblje med 10 in 40 °C (Voet D in Voet GJ, 2004). T_m je pomembna fizikalna lastnost membrane, ki je funkcija kemijske sestave membrane, ionske moči in pH medija (Lasič, 1993).



Slika 4: Struktura lipidnega dvosloja, sestavljenega iz fosfatidilholina in fosfatidiletanolamina: (a) nad in (b) pod temperaturo faznega prehoda (Voet D in Voet GJ, 2004).

2.4 LIPOSOMI

Liposomi ali lipidni vezikli so sferično zaprte strukture, sestavljene iz ukrivljenih lipidnih dvoslojev, ki ujamejo delce topila, v katerem prosto plavajo. Lahko so sestavljeni iz ene ali več različnih koncentričnih membran. Njihova velikost se giblje med 20 nm do več deset mikrometrov, medtem ko debelina membrane znaša približno 4–10 nm. Amfifilne molekule imajo en konec polaren, drugi konec pa nepolaren. Polaren konec vodo privlači, medtem ko jo hidrofobni odbija, zato se amfifilne molekule v vodnem okolju povežejo v urejene strukture. Amfifilne molekule z enim nepolarnim repom tvorijo micele, medtem ko se tiste z dvemi nepolarnimi repi povežejo v lipidni dvosloj in tako polarna površina ščiti nepolarno sredino. Ker pa je nepolarna sredina na robovih še vedno izpostavljena vodi se take lamele zaprejo v zaključene strukture (Lasič, 1993).



Slika 5: Shematska predstavitev enoslojnega liposoma (Kočev Glavač in Kristl, 2005).

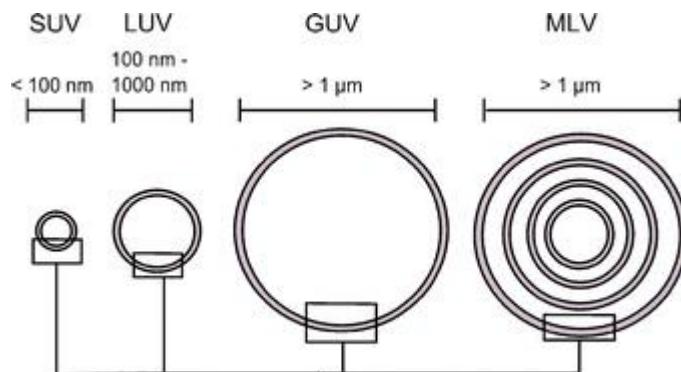
V liposome lahko vgrajujemo tako hidrofilne in amfifilne kot tudi lipofilne molekule (nizkomolekularne učinkovine, peptide, proteine, RNA, DNA). Hidrofilne se nahajajo v vodnem mediju v osrednjem delu liposoma in ob njegovi membrani. Amfifilne so razporejene ob membrani in se z lipofilnim delom vanjo delno vgradijo. Lipofilne učinkovine pa so popolnoma vključene v lipidni dvosloj (Kočevar Glavač in Kristl, 2005).

2.4.1 Arheosomi

Arheosomi so liposomi, pripravljeni iz naravnih lipidov, najdenih v arhejah, ali iz sintetično pridobljenih komponent, ki imajo enake lastnosti kakor arhealni lipidi (Jacquemet in sod., 2009). Arheosomi so tako bolj stabilni in manj permeabilni od običajnih liposomov, ki pogosto potrebujejo več kot 33 % holesterola za izboljšanje svoje stabilnosti. Formulacija arhealnih lipidov kaže relativno veliko stabilnost na oksidativni stres, alkalen pH, aktivnost fosfolipaz, žolčnih soli in serumski medij. Zaradi značilnosti arhealnih lipidov so arheosomi lahko oblikovani pri katerikoli temperaturi znotraj fiziološkega območja ali pri nižji temperaturi. To omogoča enkapsulacijo termično labilnih komponent. Lahko so pripravljeni in shranjeni tudi v prisotnosti zraka brez morebitnih poškodb. *In vitro* in *in vivo* študije kažejo, da so arheosomi varni in ne izzovejo toksičnosti v miših (Jacquemet in sod., 2009).

2.4.2 Klasifikacija liposomov

Na podlagi velikosti in števila membran delimo liposome v več skupin. Glede na število membran jih delimo na enoslojne liposome (ULV) in večslojne liposome (MLV). Enoslojne liposome nadalje delimo na majhne enoslojne liposome (SUV), velike enoslojne liposome (LUV) in enoslojne liposome celičnih velikosti (GUV) (Kristl in sod., 1992; Douilez in sod., 2003).



Slika 6: Različne vrste liposomov: SUV (majhni enoslojni liposomi), LUV (veliki enoslojni liposomi), GUV (enoslojni liposomi celičnih velikosti) in MLV (večslojni liposomi) (Voskhul in Ravoo, 2009).

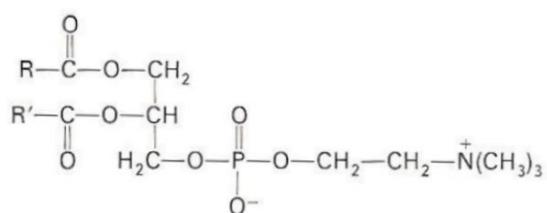
2.4.3 Najpogosteje uporabljeni fosfolipidi pri izdelavi liposomov

Preglednica 1: Fizikalne lastnosti nekaterih najbolj uporabljenih fosfolipidov (Lasič, 1993).

Lipid	T _{tališča} (°C)	T _m (°C)	pKa	ΔH _m (kJ mol ⁻¹)	ΔS _m (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)
DPPC	234	41,4	1	34,8	111
DSPC	231	55,1		42,3	129
DPPG		41,5	2,9	37,2	118
DPPE	186	64,0	1	24,0	105

2.4.3.1 Fosfatidilholin

Pogosto je poimenovan kot lecitin (iz 'lekithos', grška beseda za jajčni rumenjak) in je nedvomno najpogosteje uporabljen lipid v liposomih. V naravnem lecitinu je približno polovica maščobnih kislin nasičenih, predvsem 16:0 v *sn*-1-poziciji, medtem ko je R₂ skupina običajno oleinska veriga (16:1). Glavni izvor lecitina je kokošji jajčni rumenjak. Cenejši izvor je soja, ki tvori manj nasičen lecitin (Lasič, 1993).



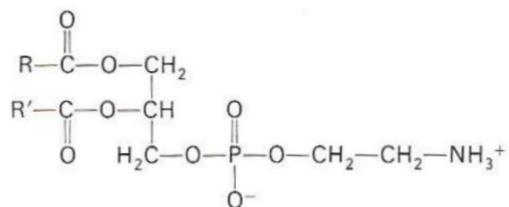
Slika 7: Struktura fosfatidilhololina (Stryer, 1996).

Fosfatidilholin ima celokupni naboj nič (je nevtralen) in je glavni lipid membran živali. V velikem obsegu je najden tudi pri rastlinah in v manjših količinah v nekaterih bakterijah. (Gunstone in sod., 1994).

V naših poskusih smo uporabili nevtralne lipide DPPC, ki imajo na glicerolu zaestreni dve palmitinski kislini (nasičeni maščobni kislini s 16 C atomi), na fosfatno skupino pa je vezan holin.

2.4.3.2 Fosfatidiletanolamini

Drugače jih imenujemo tudi kefalini. Kot pove njihovo ime, so bili sprva izolirani iz možganskih lipidov. Kot v lecitinu je nasičena veriga (običajno je to stearil) na poziciji *sn*-1, medtem ko lahko nenasiciene verige vsebujejo različne skupine. Polarna glava je v primerjavi z ogljikovodikovo verigo relativno majhna in ti lipidi sami ne tvorijo dvosloja ali liposomov pri normalnih pogojih. Pri pH>8 se zwitterionska polarna glava nabije, poveča se velikost med hidracijo in tako lahko pripravimo liposome (Lasič, 1996).



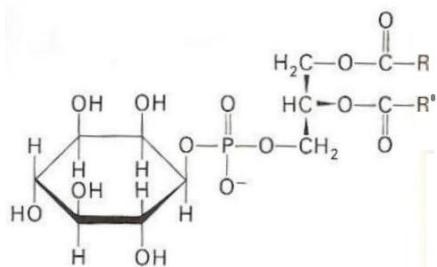
Slika 8: Struktura fosfatidiletanolamina (Stryer, 1996).

So zelo razširjeni in so eni glavnih lipidov. Deloma metilirani derivati so najdeni v majhnih količinah v mnogih organizmih in so metabolni intermediati pri pretvorbi fosfatidiletanolamina v fosfatidilholin (Gunstone in sod., 1994).

Za proučevanje stabilnosti liposomov, narejenih iz fosfatidiletanolaminov, smo uporabili nevtralne DPPE lipide, ki imajo tako kot DPPC na glicerolu zaestreni dve palmitinski kislini, na fosfatno skupino pa imajo vezan etanolamin.

2.4.3.3 Fosfatidilinozitoli

Fosfatidilinozitoli so negativno nabiti lipidi. So razširjeni lipidi, vendar v majhnih količinah. Difosfoinozitid in trifosfoinozitid so bili najdeni v mnogih evkariontih, vključno z živalmi, rastlinami in kvasovkami (Gunstone in sod., 1994).



Slika 9: Struktura fosfatidilinozitola (Stryer, 1996).

V diplomski nalogi smo v eksperimentalnem delu uporabili negativno nabite DPPI lipide, ki imajo tako kot DPPC na glicerolu zaestreni dve palmitinski kislini, na fosfatno skupino pa je vezan sladkorni alkohol inozitol.

2.4.3.4 Fosfatidilgliceroli

Fofatidilgliceroli prevladujejo v višjih rastlinah (30 %) in se nahajajo v kloroplastu. Najdemo jih tudi v mitohondrijih sesalcev (Lasič, 1996).

V poskusih smo uporabili negativne DPPG lipide, ki se od DPPC razlikujejo le v skupini, vezani na fosfatno skupino, ki je v DPPG primeru trivalentni alkohol glicerol.

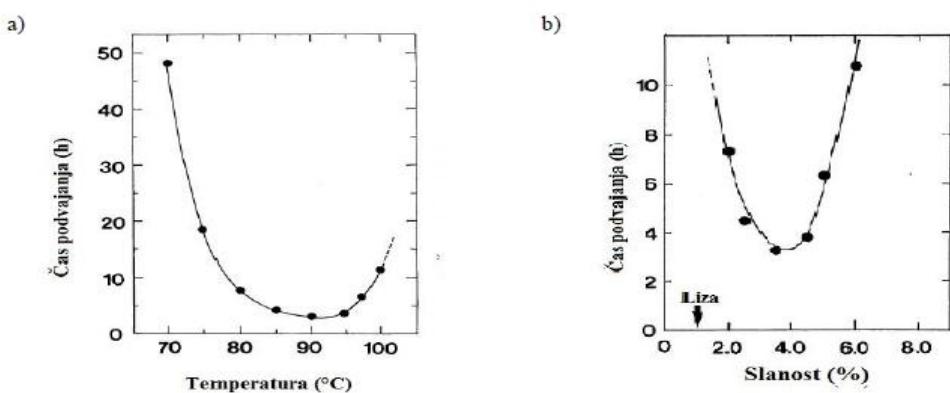
2.5 ARHEJE

Domena arhej je večinoma sestavljena iz ekstremofilnih prokarionskih organizmov in predstavlja tretjo evolucijsko linijo poleg dobro znanih in preučenih bakterijske in evkarionske domene. Vrsta različnih filogenetskih argumentov je vodila mnogo avtorjev do predloga, da so arhebakterije morda odigrale pomembno vlogo v zgodnji zgodovini življenja. Nekatere arheje so preživele do danes, domnevno zaradi zmožnosti umika v okolja, kjer jim kompeticija ne more slediti. Arheje kolonizirajo ekstremna okolja, za katera so značilni visoka slanost (halofili), anaerobne atmosfere (metanogeni), temperature od 60 °C do 113 °C (termofili in hipertermofili) ali 0 °C (psihrofili), kislost okoli pH 0 (acidofili in termoacidofili) ali tlaki okoli 400 zemeljskih atmosfer (Benvegnu in. sod., 2008). Za arheje je značilna molekulska prilagoditev, ki jim omogoča preživetje in rast v ekstremnem okolju. Ta se kaže v spremenjenem razmerju gvanin-citozin v DNA/RNA strukturah, superzvitju in združenje s kationskimi proteini. Tako lahko arheje obdržijo strukturo in celovitost nukleinskih kislin pri višjih temperaturah. Na proteinsko stabilizacijo ima velik vpliv zamenjava nekaterih amino kislin. Velika prilagoditev arhej na

ekstremna okolja pa se kaže tudi v edinstveni kemijski sestavi membranskih lipidov (Bullock, 2000).

2.5.1 *Aeropyrum pernix*

Celice *Aeropyrum pernix* so gramnegativne in so nepravilni kokoidi. Celice so običajno velike med 0,8 in 1,0 μm . Debelina ovojnice, ki obdaja celico, je običajno 25 nm. *A. pernix* uvrščamo med striktno aerobe, heterotrofe in hipertermoneutrofile. Rast se pojavi med 70 in 100 °C (optimalno med 90 in 95 °C), pri pH 5 do 9 (optimalno pH 7) in med 1,8 do 7,0 % slanostjo (optimalno 3,5 % slanost). Rasti ni opaziti pod temperaturo 68 °C in nad 102 °C. Pri slanosti, manjši od 1,5 %, celice lizirajo zaradi osmotskega šoka (Sako in sod., 1996).

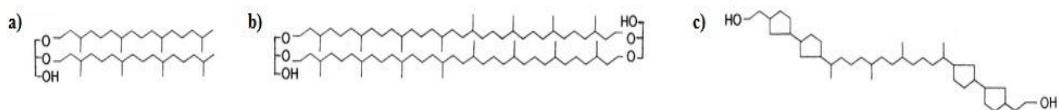


Slika 10: Rast *Aeropyrum pernix* glede na (a) temperaturo in (b) slanost. Čas podvajanja je bil izračunan iz naklona rastne krivulje (Sako in sod., 1996).

2.5.2 Arhealni membranski lipidi

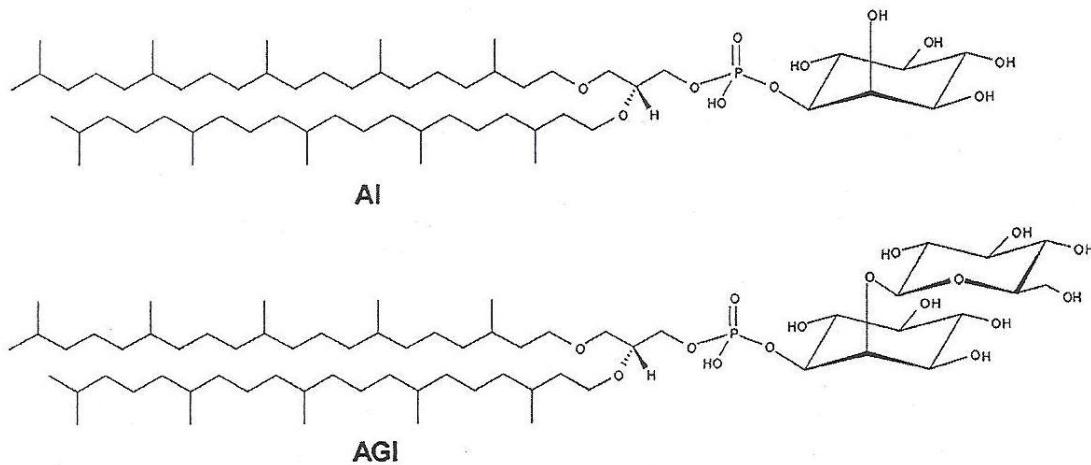
Arhealni membranski lipidi imajo nenavadno strukturo, ki temelji na izoprenoidnih verigah različnih dolžin z etrsko povezavo z glicerolom (Jacquemet in sod., 2009). Glavne komponente membran arhej so tako glicerolni dietri z dvema C₂₀ verigama in diglycerolni tetraetri z dvema C₄₀ verigama. Za membrane termofilov pa so značilni tudi štirje ciklopentanski obroči v ogljikovodikovi verigi. Za glicerolne dietre je značilno, da tvorijo lipidni dovosloj, medtem ko diglycerolni tetraetri tvorijo lipidni monosloj (Bullock, 2000). Membranske lastnosti arhealnih tetraetrov dajejo liposomom rigidnost. Bipolarni lipidi so pomembni za prilaganje arhej na ekstremna okolja z optimizacijo membranske organizacije in za lastnosti, ki vplivajo na rast organizma (Jacquemet in sod., 2009).

To velja zlasti za membranske lipide termofilnih arhej, za katere je značilna prisotnost dveh polarnih glav in hidrofobne izoprenoidne molekule, ki je v primerjavi z navadnimi estrskimi lipidi dvakrat daljša (Berzina in sod., 1995).



Slika 11: Struktura (a) glicerolnega dietra (ftalin), (b) diglicerolnega tetraetra (bifatin) in (c) bifitanil diola s štirimi ciklopentanskimi obroči (Bullock, 2000).

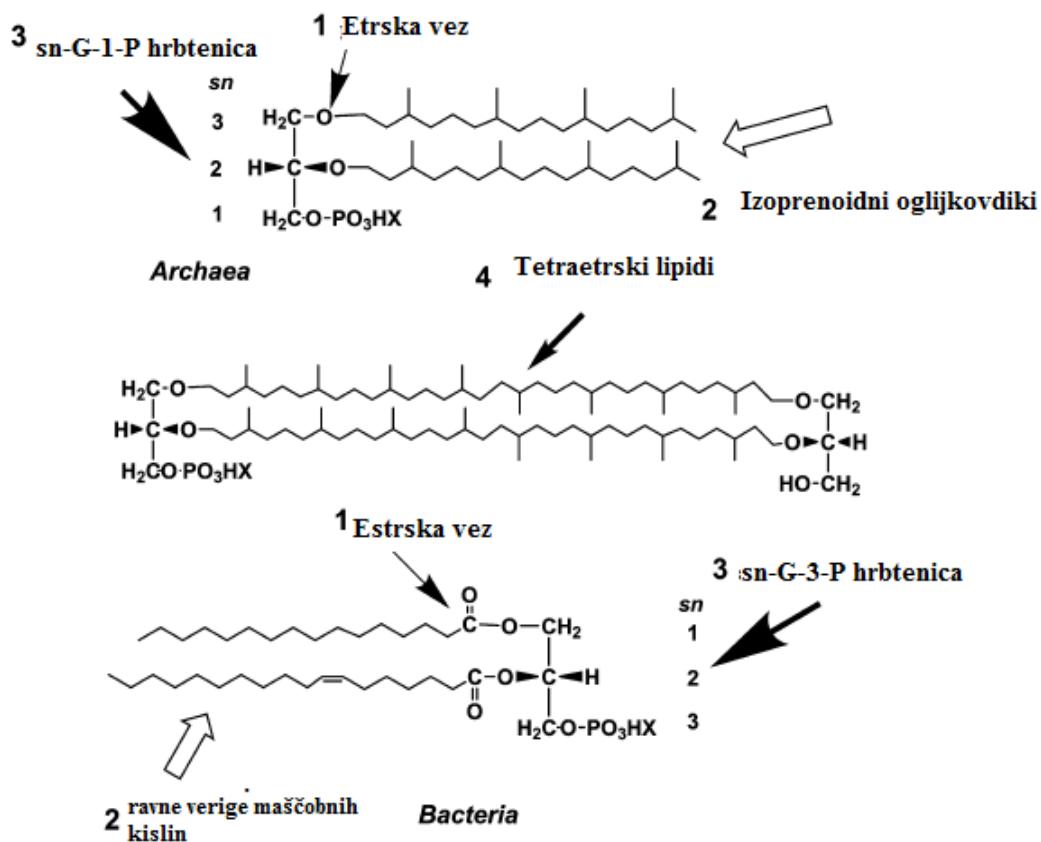
Večino lipidov *A. pernix* sestavlja izključno disesterteranil (C_{25},C_{25}) glicerolni etski lipidi. Polarne lipide sestavlja pet komponent, od teh pa prevladujeta samo 2,3-di-O-sesterterpanil-sn-glicero-1-fosfo-1'-(2'-O- α -D-glukozil)-myo-inozitol (AGI; 91 %), ki vsebuje inozitol in glukozo, in 2,3-di-O-sesterterpanil-sn-glicero-1-fosfo-myo-inozitol (AI; 9 %), ki ima kot polarno komponento glave samo inozitol (Sako in sod., 1996). Lipidi so v *A. pernix* urejeni v dvosloj (Koga in Morii, 2006).



Slika 12: Struktura 2,3-di-O-sesterterpanil-sn-glicero-1-fosfo-1'-(2'-O- α -D-glukozil)-mio-inozitola in 2,3-di-O-sesterterpanil-sn-glicero-1-fosfo-mio-inozitola (Gmajner in Poklar Ulrich, 2011).

Arhealni lipidi se razlikujejo od bakterijskih lipidov v štirih lastnostih. Glicerofosfatna hrbtenica arhealnih lipidov je sestavljena iz sn-glicerol-1-fosfata (G-1-P), ki je enantiomer sn-glicerol-3-fosfata (G-3-P) v bakterijskih fosfolipidih. Ogljikovodikove verige so vezane

na sn-2 in -3 mestu glicerolne molekule v arhealnih lipidih, medtem ko imajo bakterijski lipidi sn-1,2- radialne verige. Ogljikovodikove verige arhealnih lipidov so vezane na glicerol izključno z etrsko vezjo, medtem ko je za bakterijske značilna estrska vez. Za arhealne polarne lipide je značilna tudi visoka metiliranost izoprenoidov in izopranoidov, za bakterijske pa ravne verige. Številne vrste arhej vsebujejo bipolarne tetraetrske lipide, ki pa so v bakterijah redko najdeni (Poklar Ulrich in sod., 2009).



Slika 13: Značilne strukture arhealnih fosfolipidov v primerjavi z bakterijskimi fosfolipidi (Koga in Morii, 2006).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

DPPC (Avanti Polar Lipids , ZDA)

DBPC (Avanti Polar Lipids , ZDA)

DHPC (Avanti Polar Lipids , ZDA)

DPPE (Avanti Polar Lipids , ZDA)

DPPG (Avanti Polar Lipids , ZDA)

DPPI (Avanti Polar Lipids , ZDA)

DSPC (Avanti Polar Lipids , ZDA)

kloroform (Merck, Nemčija)

HEPES (Sigma- Aldrich, Nemčija) za pripravo pufra in kot sestavina gojišča za gojenje arheje *A. pernix*

hipertermofilna arheja *Aeropyrum pernix* K1-JCM 9820 (Japan Collection of Microorganisms, Saitama, Japonska)

destilirana voda

bidestilirana voda

gojišče: Marine Broth 2216 (Difco, Becton, Dickinson & Co., Sparks, MD 21152 ZDA)

kalcein: C₃₀H₂₆N₂O₁₃ (Sigma Nemčija)

metanol (Merck, Nemčija)

natrijev tiosulfat: Na₂S₂O₃× 5H₂O (Alkaloid, Skopje, Makedonija)

NaOH (Merck, Nemčija) za pripravo 1 M raztopine NaOH

HCl (Merck, Nemčija) za pripravo 1 M raztopine HCl

Sephadex G-50 medium (Sigma, ZDA)

Triton

3.1.1 Laboratorijska oprema

avtoklav	(Sujetska, Srbija)
ekstrudor	(Avanti Polar Lipids , ZDA)
rotavapor	(Büchi, Švica)
pH meter	(Mettler Toledo, Švica)
fluorimeter	(Cary Eclipse, Varian, Avstralija)
mešalnik	(Tehtnica Železniki, Slovenija)
tehtnica	(Tehtnica Železniki, Slovenija)
centrifuga	(Hettich Zentrifugen, Nemčija)
sušilnik	(Memmert, Nemčija)
avtomatske pipete	(Eppendorf, Nemčija)
3 mL, 1cm kvarčne kivete	(FLR Cary, Varian, Avstralija)
laboratorijska steklovina	
steklene kroglice	
gorilnik	
centrifugirke	
spatula	
plastične ladjice za tehtanje	
magnetna mešala	
1000 mL filtrna steklenica za gojenje <i>A. pernix</i>	
parafilm	
aluminijasta folija	

3.2 METODE

3.2.1 Gojenje *Aeropyrum pernix* K1

Hipertermofilno arhejo *A. pernix* smo gojili v gojišču (1 L) z naslednjo sestavo:

Preglednica 2: Sestava gojišča za gojenje arheje *Aeropyrum pernix* K1.

Sestavina:	Količina:
Sol za akvarijsko vodo Reef salt	24,48 g
Pepton	3,60 g
Kvasni ekstrakt	0,72 g
Natrijev tiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0,72 g
HEPES	3,43 g
Destilirana voda	0,72 L

Gojišče smo pripravili tako, da smo vse sestavine zatehtali, jih stresli v filtrno steklenico in nato dodali še 720 mL destilirane vode in magnet. Postavili smo na magnetno mešalo in pustili, da so se vse sestavine raztopile. Nato smo pH uravnali na 7 s pomočjo 1 M raztopine NaOH in 1 M raztopine HCl. Steklenico smo prekrili z aluminijasto folijo in dodali samolepilni indikatorski trak, ki služi temu, da ugotovimo, če so bili pogoji sterilizacije doseženi. Sterilizacijo smo izvajali v avtoklavu pri pogojih 15 minut pri 120 °C (Milek in sod., 2005).

Sterilnemu gojišču smo aseptično dodali 80 g biomase *A. Pernix*, pridobljene s predhodno kultivacijo. Gojenje je potekalo na magnetnem mešalu z grelno ploščo. Mešanje smo nastavili na 700 min^{-1} , temperaturo na 92 °C, prezračevanje pa z dovajanjem zraka 0,5 L/min preko 0,45 µL filtra. Glede na to, da se je gojišče segrevalo in je voda izhlapevala, smo izhlapevanje vode preprečili z Liebingovim hladilnikom. Kulturo smo pri teh pogojih gojili 40 ur. Brozgo smo nato prelimi v 4 centrifugirke in jih centrifugirali pri velikosti rotorja 139 mm, in sicer 11 minut pri 11000 min^{-1} . Supernatant smo odlili, centrifugirke pa smo postavili v zamrzovalnik (Milek in sod., 2005).

3.2.2 Izolacija lipidov

Izolacijo lipidov *A. pernix* smo izvedli z metodo po Blightu in Dyerju (1959), modificirano po Mancusovi in sod (1986).

Najprej smo liofilizirali celice *A. pernix*. Nato smo odmerili 45–55 μ g biomase v 10 mL silanizirano epruveto, dodali 5 mL metanola in dali v ultrazvočno kopel. Na ta način smo dosegli, da so se razgradili skupki celic. Po dodatku 2,5 mL kloroforma in 2 mL fosfatnega pufra s pH 7,4 je potekala ekstrakcija lipidov 18 ur. Sledilo je centrifugiranje 10 min pri 4000 min $^{-1}$. V lij ločnik smo prelili supernatant, dodali 2,5 mL kloroforma in 2,0 mL 50 mM fosfatnega pufra s pH 7,4 in pustili 18 ur, da je prišlo do ločitve faz. Nato smo kloroformovo fazo, ki je bila spodaj, spustili skozi filter papir v silanizirano bučko in na rotavaporju odparili topilo. Lipide smo nato hranili pri temperaturi -20 °C (Gmajner in sod., 2011).

3.2.3 Priprava raztopine kalceina

1,24 g kalceina smo raztopili v 20 mL deionizirane vode, dodali smo 800 μ L 10 M NaOH in dopolnili z vodo do 25 mL. V bučko smo dali magnet in mešali 5–10 minut na magnetnem mešalu. Koncentracija kalceina je bila 50 mM.

3.2.4 Priprava liposomov

Komercialne lipide v prahu in arhealne lipide smo posamezne raztoplili v mešanici kloroforma in metanola v razmerju 7:3 (v/v). V 10 mL bučko smo odpipetirali raztopljen lipid in topilo pod znižanim tlakom odparili na rotavaporju (temperatura vodne kopeli je bila 35 °C). Dobili smo tanek film, ki smo mu dodali kalcein, segret nad temperaturo faznega prehoda lipida. Vedno smo dodali toliko kalceina, da je bila koncentracija 1 mg lipida v 1 mL raztopine kalceina ($c_{kalceina}=50\text{mM}$). V bučko smo dodali še 10 do 15 steklenih kroglic in jo postavili na mešalnik, tako da so kroglice mehansko odstranile lipidni sloj, lipidi pa so se zaradi hidrofobnosti zaprli v liposome (MLV liposomi). Nato smo vsebino iz bučke (brez kroglic) odpipetirali v kriovialo, zamrznili v tekočem dušiku in nato položili kriovialo v vrelo vodo. Proces zamrzovanja in segrevanja smo ponovili 6-krat.

Iz MLV smo dobili LUV z uporabo ekstrudorja, v katerega smo dali po 2 nosilca membrane na vsaki strani in eno 100 nm membrano. Prehod čez membrano smo ponovili 21-krat. Dobljene LUV smo morali še ločiti od kalceina, ki se ni ujel v liposome. To smo naredili tako, da smo si predhodno pripravili gel (Sephadex G-50 z 20 mM HEPES pufrom) in liposome skupaj s kalceinom, ki se ni vgradil v liposome, odpipetirali na gel. Gel smo nato postavili v centrifugo pri pogojih 10 min pri 500 min $^{-1}$.

3.2.5 Fluorescenčna spektrometrija

Skladno s kvantno teorijo ima vsak elementarni delec enoten niz energijskih stanj: osnovna in vzbujena. Z absorpcijo energije preide delec v vzbujeno stanje, relaksacijski procesi pa ga vrnejo v energijsko stabilnejše osnovno stanje. Fluorescenza je eden od teh relaksacijskih procesov (Mlekuž, 1995). Vrnitev v osnovno stanje se zgodi hitro z emisijo fotona, to se zgodi v približno 10^{-8}s^{-1} , tako je tipična življenska doba fluorescence 10 ns (Lakowicz, 1999). Okolje molekule (pH, topilo, temperatura, raztopljeni kisik) in njena struktura (konjugiranost, funkcionalne skupine, togost idr.) pa odločata, ali bo molekula fluorescirala ali ne (Mlekuž, 1995).

Za fluorescenco sta značilni ekscitacijski (vzbujevalni) in emisijski spekter. Emisijski spekter se navadno vedno pojavi pri daljših valovnih dolžinah kot vzbujevalni, saj je energija emitirane svetlobe v tem primeru nižja od ekscitacijske. Ta premik imenujemo *Stokesov premik*, ki za večino primerov ni večji od 100 nm (Mlekuž, 1995).

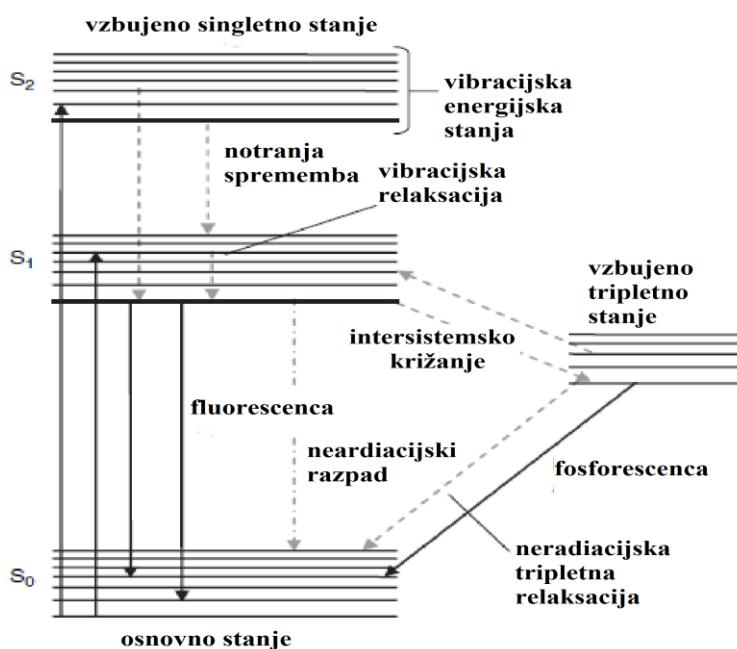
Pri sobni temperaturi se večina delcev (atomov molekul, ionov) nahaja v energijsko najnižjem (osnovnem) stanju. Za molekulo, ki ima v svojem osnovnem stanju vse elektrone v parih z nasprotnimi spini, pravimo, da je v osnovnem singletnem stanju S_0 . Celokupni spin singletnega stanja je nič. Pri prehodu fotona blizu elementarnega delca je absorpcija verjetna, samo če je energija fotona povsem enaka razliki energij med osnovnim stanjem in enim od višjih energijskih stanj delca. Absorbirana energija se prenese na atom ali molekulo in povzroči preskok elektrona v energijsko višjo atomske ali molekulsko orbitalo. To je vzbujeno ali ekscitatorno stanje, kjer sta dve orbitali zasedeni s po enim elektronom. Oba elektrona imata lahko še vedno nasproten spin, temu stanju pravimo vzbujeno singletno stanje S_1, S_2 , ali pa imata enak spin, čemur pravimo tripletno vzbujeno stanje. (Mlekuž, 1995).

V vsakem energijskem stanju S_0 , S_1 in S_2 lahko fluorofor obstaja v številnih vibracijskih energijskih nivojih. Prehod med stanji ponazarjajo navpične črte. Prehodi se pojavijo v 10^{-15} sekund, kar je prekratek čas za signifikantni premik jeder. Temu pravimo Frank-Codonov princip. Absorpcija in emisija se pojavit predvsem pri molekulah z nižjo vibracijsko energijo. Večja energijska razlika med S_0 in S_1 vzbujenimi stanji je prevelika za termalno populacijsko S_1 , zato za indukcijo fluorescence uporabljamo svetlobo in ne segrevanja. Fluorofor je navadno vzbujen v višjih vibracijskih stanjih (S_1 ali S_2)

(Lakowicz, 1999). Pri relaksaciji nato vzbujeni delec odda višek energije in se vrne v energijsko nižje (osnovno) stanje. To se kaže kot fluorescencija ali fosforescencija (Mlekuž, 1995).

3.2.5.1 Jablonski diagram

Proces, ki se dogaja med absorpcijo in emisijo svetlobe, je navadno prikazan z Jablonskim diagramom.



Slika 14: Jablonski diagram (Jain in sod., 2009).

Poleg fluorescence obstaja več drugih mehanizmov za prehod v osnovno stanje: vibracijska relaksacija, notranja in zunanja sprememba, intersistemsko križanje ali fosforescencija. Prevlada pa tista pot, ki najbolj skrajša čas obstoja delca v vzbujenem stanju. Vibracijska relaksacija poteka med relaksacijskimi nivoji, tako da molekule v vzbujenem stanju trkajo z molekulami topila in jim na ta način v več zaporednih stopnjah prenesejo višek vibracijske energije, kar se kaže kot porast temperature medija. Notranja sprememba (internal conversion) pa je tip relaksacije, kjer ne pride do emisije svetlobe. Možna pa je takrat, ko sta dve elektronski energijski stanji dovolj blizu, da lahko pride do delnega prekrivanja z vibracijskimi energijskimi stopnjami. Med zunanje spremembe (external conversion) sodi deaktivacija vzbujenega elektronskega stanja, ki lahko vključuje

interakcije ali energijski prenos med vzbujeno molekulo in molekulami topila ali drugim topljencem. Intersistemsko križanje je proces, kjer se obrne spin vzbujenega elektrona, kar se kaže kot spremenjena multipliciteta molekule. Fosforescenza pa sodi med radiacijske deaktivacijske procese, vendar ta proces ni pogost, saj obstaja tripletno vzbujeno stanje od 10^{-4} s do nekaj sekund in bolj verjetno pride do notranje ali zunanje spremembe. Fosforescenza poteče le pri zelo nizkih temperaturah, visoki viskoznosti medija ali pri molekulah, ki so adsorbirane na trdno površino (Mlekuž, 1995).

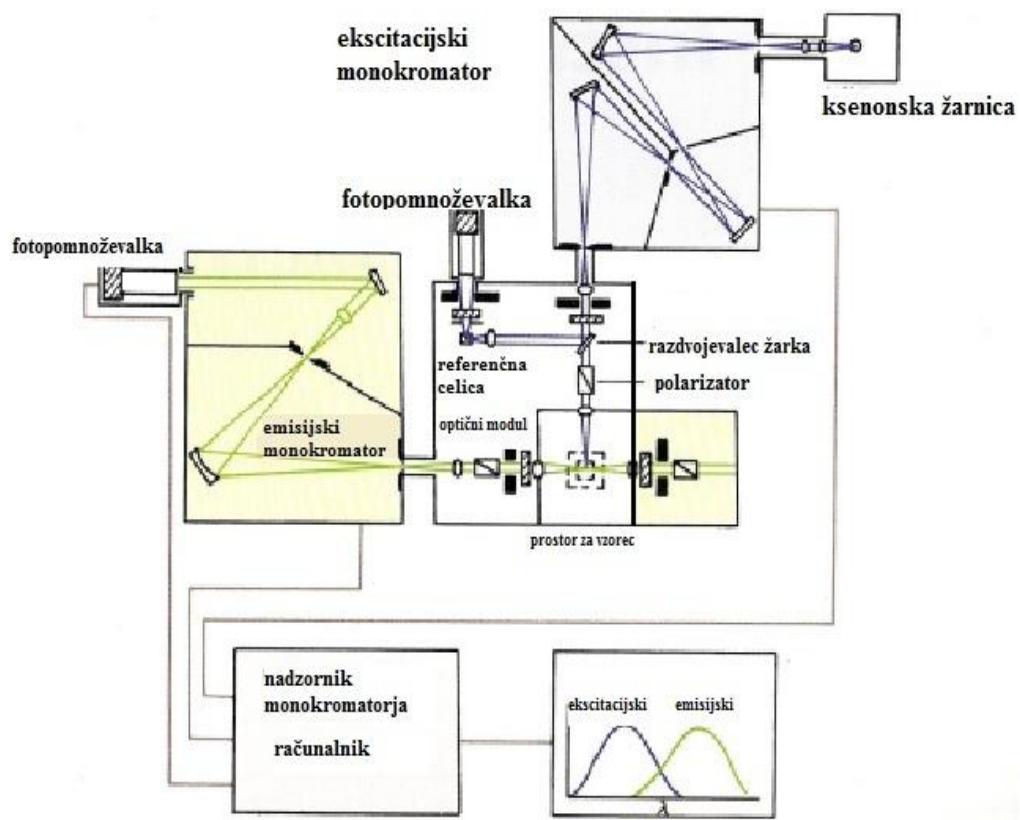
3.2.5.2 Metode fluorescenčne spektrometrije

Metode fluorescenčne spektrometrije razdelimo v tri skupine:

1. DIREKTNE METODE, kjer merimo intenziteto naravne fluorescirajoče spojine
2. DERIVATIZACIJSKE METODE, kjer nefluorescirajočo preiskovano spojino pretvorimo v fluorescirajoči derivat
3. METODE POGASITVE (QUENCHING), kjer zmanjšamo signal fluorescirajoče molekule z dodatkom analizirane spojine, ki deluje kot gasilna molekula (Mlekuž, 1995)

3.2.5.3 Zgradba fluorescenčnega spektrometra

Ksenonska žarnica je izvor ekscitacijske svetlobe. Tovrstne žarnice so splošno uporabne zaradi njihove visoke jakosti pri vseh valovnih dolžinah od 250 nm naprej. Monokromatorji oz. primarni filtri prepustijo samo ekscitacijske valovne dolžine. Za ekscitacijski monokromator sta značilni dve zrcali, ki zmanjšata nezaželeno svetlobo, to je tista, ki se po valovni dolžini razlikuje od izbrane. Najprimernejše je opazovanje pravokotno na vzbujevani žarek, ki zato ne pade na drug monokromator. Oba monokromatorja dovoljujeta samodejno skeniranje valovne dolžine. Referenčni žarek gre skozi atenuator, ki zniža njegovo moč in ga s tem približa intenziteti fluorescenčnega sevanja. Referenčni žarek in žarek iz vzorca gresta vsak skozi svojo fotopomnoževalko, ki fluorescenco kvantificira z ustrezнимi elektronskimi napravami. Izhodni podatki so navadno pokazani v grafični podobi in se tudi digitalno shranijo (Mlekuž, 1995; Lakowicz, 1999).



Slika 15: Zgradba fluorescenčnega spektrometra (Lakowicz, 1999).

3.2.5.4 Merjenje intenzitete fluorescence kalceina, vgrajenega v liposome

Pri merjenju fluorescence smo preučevali termično stabilnost liposomov z vgrajenim fluorescenčnim barvilkom kalceinom med segrevanjem pri različnih koncentracijah natrijevega klorida. Meritve smo izvajali v 0, 20, 50, 100, 500 in 1000 mM raztopinah natrijevega klorida.

Preden smo pričeli z meritvami, kjer smo liposome izpostavili temperaturnemu programu od 15 °C do 95 °C, smo se morali prepričati, da po dodatku Tritona X-100, detergenta, ki povzroči razpad liposomov, zaradi česar se iz njih sprosti ves kalcein, signal ne presega zgornjega območja merjenja. V kvarčno kiveto smo odpipetirali 50 µL liposomov s koncentracijo 1 mg/mL in dodali 2150 µL raztopine natrijevega klorida ustrezne koncentracije (od 0 do 1000 mM NaCl). Koncentracija lipidov v kiveti je bila 0,023 mg/mL. Valovno dolžino vzbujanja smo nastavili na 495 nm, intenziteto emisije pa smo merili pri 515 nm. Hitrost segrevanja vzorca je bila 1 °C/min, v temperaturnem intervalu od 15 °C do 95 °C. Ohlajali smo s hitrostjo 1 °C/min na 25 °C. Nato smo vzorcu dodali triton in tako sprostili preostali kalcein iz liposomov.

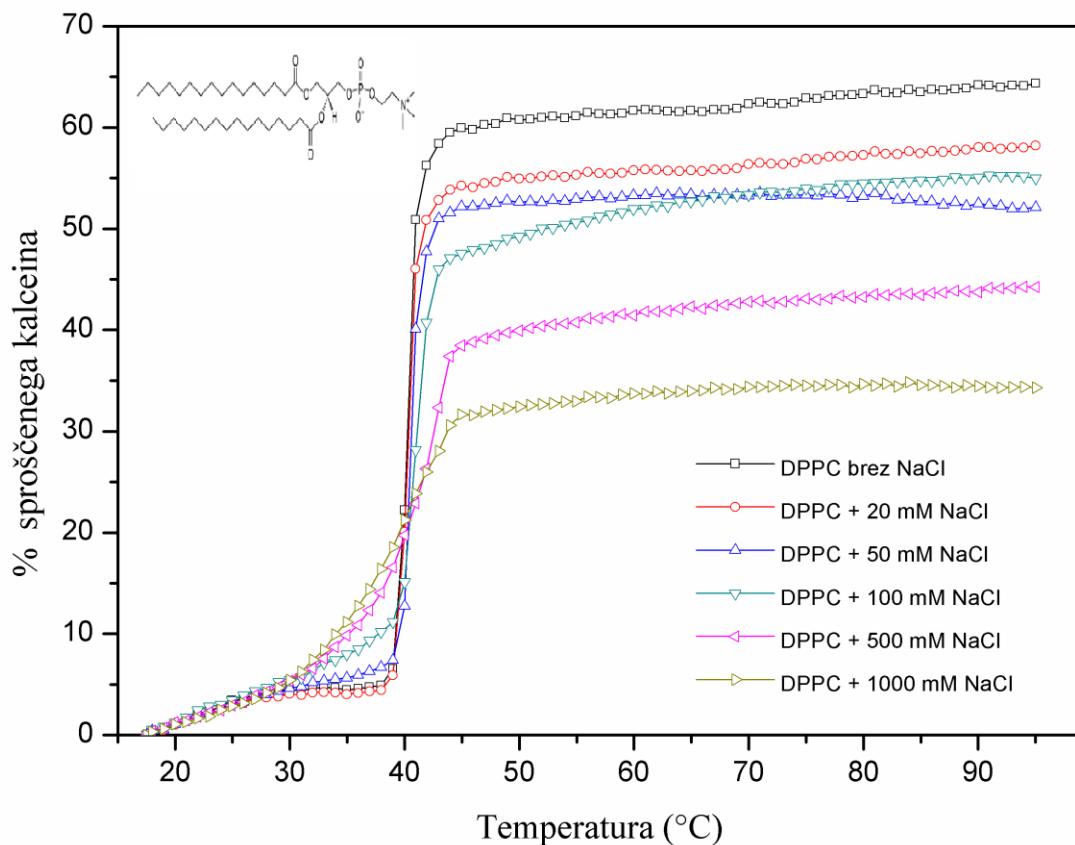
Delež sproščenega kalceina smo izračunali po enačbi:

$$\% \text{ sproščenega kalceina} = \left(F - \frac{F_{\min}}{F_{\max}} \right) \times 100, \quad \dots(1)$$

kjer je F oznaka za fluorescenčno emisijsko intenziteto (merjeno pri različnih temperaturah), F_{\min} (bazna linija) je oznaka za minimalno fluorescenco prostega kalceina, ki ima enako emisijsko intenziteto kot liposomi z vgrajenim kalceinom na začetku vsakega poskusa, in F_{\max} je oznaka za največjo fluorescenco kalceina, ki je izmerjena po dodatku 10 µL 16 mM Tritona X-100.

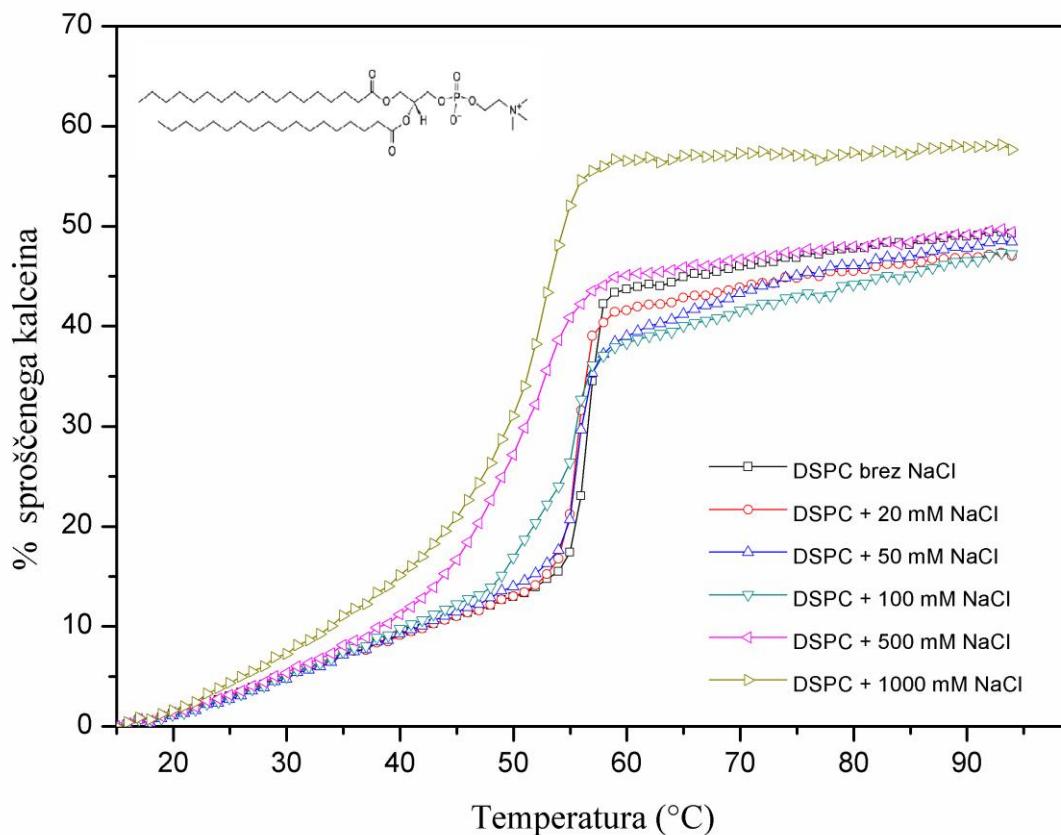
4 REZULTATI

V raziskavi smo proučevali termično stabilnost velikih enoslojnih liposomov (LUV). Namen dela je bil preučiti, kako dodatek soli (NaCl) vpliva na termično stabilnost in na propustnost LUV, sestavljenih iz lipidov z različnimi hidrofilnimi glavami in hidrofobnimi repi. Uporabili smo 1,2-diheksadekanoil-*sn*-glicero-3-fosfoholin (DPPC), 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfoholin (DSPC), 1,2-dibehenoil-*sn*-glicero-3-fosfoholin (DBPC), 1,2-di-O-heksadecil-*sn*-glicero-3-fosfoholin (DHPC), 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamin (DPPE), 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol (DPPG), 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoinozitol (DPPI) in arhealne lipide, ki smo jih izolirali iz hipertermofilne arheje *Aeropyrum pernix* K1.



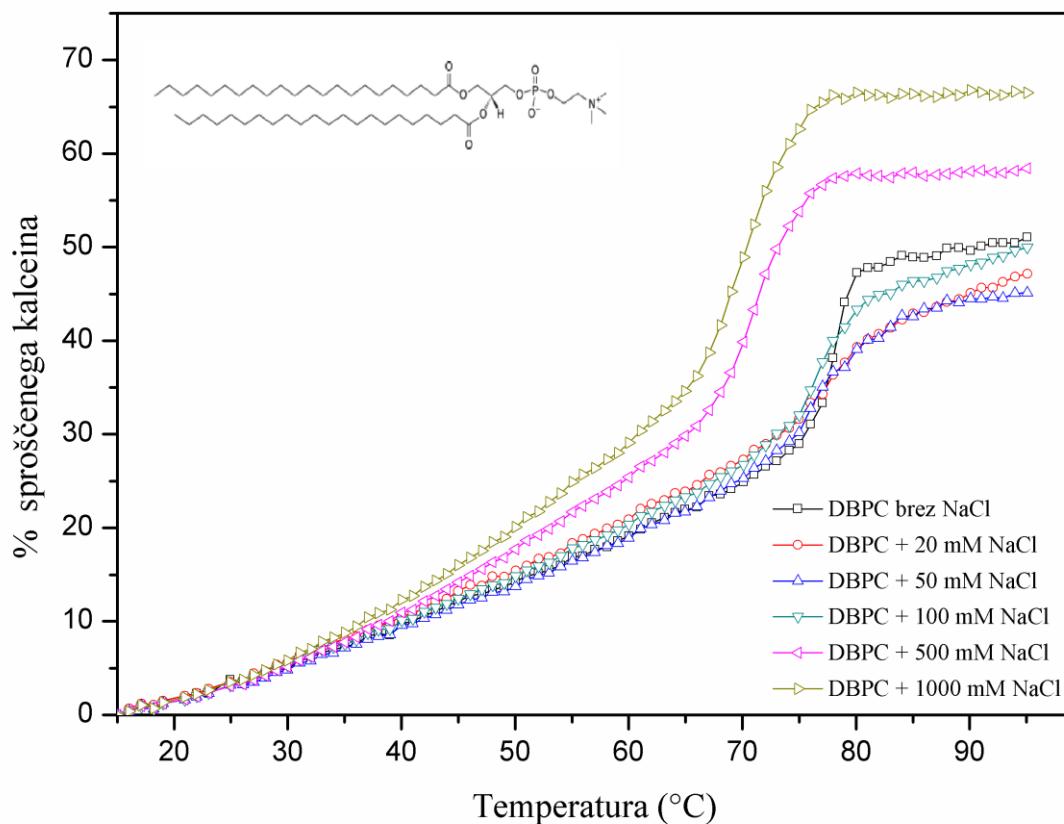
Slika 16: Vpliv temperature in koncentracije NaCl na sproščanje kalceina iz LUV liposomov DPPC ($c=0,023 \text{ mg/mL}$) pri pH 7,0 (20 mM HEPES).

Slika 16 prikazuje sproščanje kalceina iz DPPC liposomov z višanjem temperature in pri različnih koncentracijah NaCl. Opazimo, da je prisoten oster fazni prehod pri 41°C , ki se pri različnih koncentracijah NaCl bistveno ne spremeni. S slike je razvidno tudi to, da z večanjem koncentracije NaCl liposomi vedno manj sproščajo kalcein. Pri 500 in 1000 mM NaCl se začne kalcein sproščati že pri nižji temperaturi (pod temperaturo faznega prehoda), pri višjih temperaturah (nad temperaturo faznega prehoda) pa se ga sprosti manj.



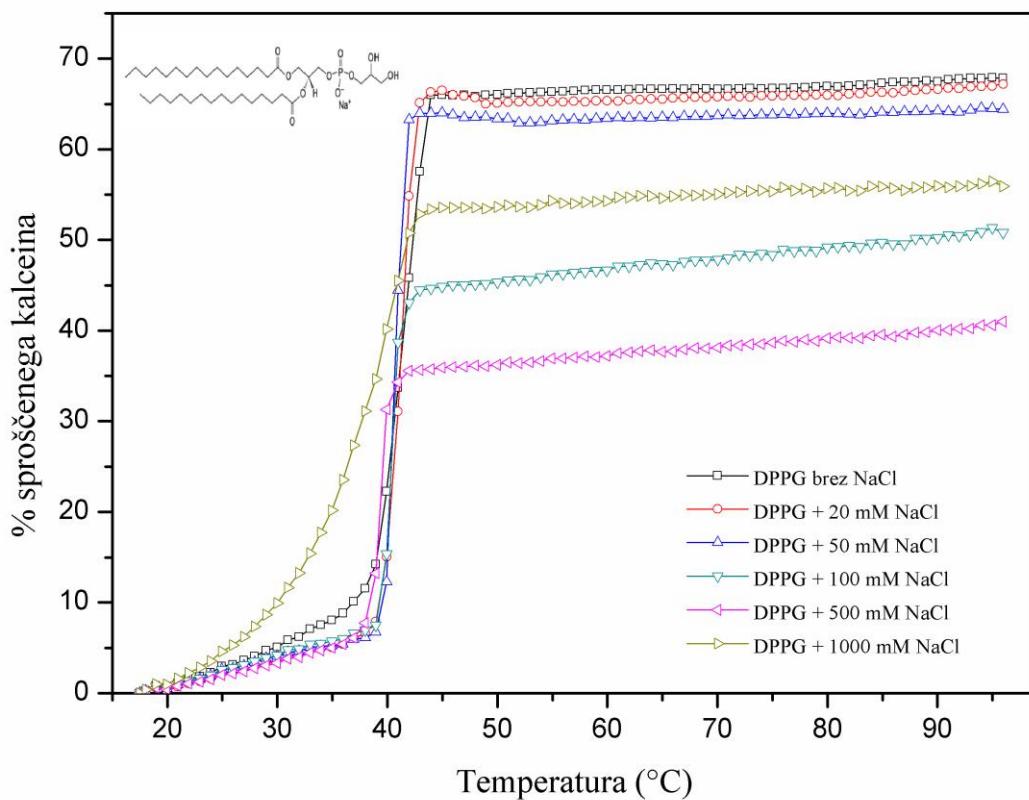
Slika 17: Vpliv temperature in koncentracije NaCl na sproščanje kalceina iz LUV liposomov DSPC ($c=0,023 \text{ mg/mL}$ pri pH 7,0 (20 mM HEPES).

Slika 17 prikazuje sproščanje kalceina iz DSPC liposomov z višanjem temperature in pri različnih koncentracijah NaCl. Opazen je oster fazni prehod pri 55°C . Z dodatkom 20 in 50 mM NaCl se temperatura faznega prehoda bistveno ne spremeni. Z višanjem koncentracije NaCl opazimo, da se temperatura faznega prehoda pomika k manjši vrednosti in delež sproščenega kalceina narašča.



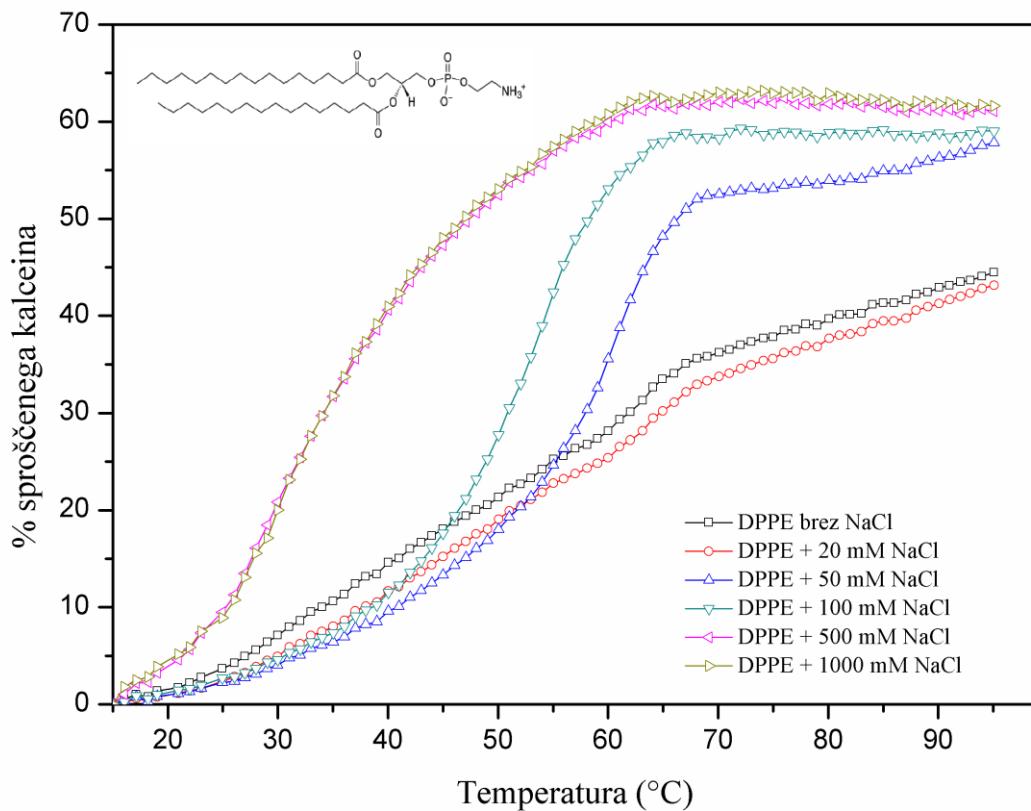
Slika 18: Vpliv temperature in koncentracije NaCl na sproščanje kalceina iz LUV liposomov DBPC ($c=0,023 \text{ mg/mL}$) pri pH 7,0 (20 mM HEPES).

Slika 18 prikazuje delež sproščenega kalceina iz DBPC liposomov z višanjem temperature in pri različnih koncentracijah NaCl. Opazimo, da je oster fazni prehod prisoten samo pri liposomih, kjer ni NaCl ($T_m=75^\circ\text{C}$). Pri DBPC liposomih v prisotni 20, 50 in 100 mM NaCl je sproščanje kalceina večje, pri temperaturah, višjih od 75°C , pa opazimo manjše sproščanje kalceina. Pri liposomih DBPC v prisotni 500 in 1000 mM NaCl opazimo fazni prehod pri nižji temperaturi. Intenziteta sproščenega kalceina pa je v celotnem območju precej višja.



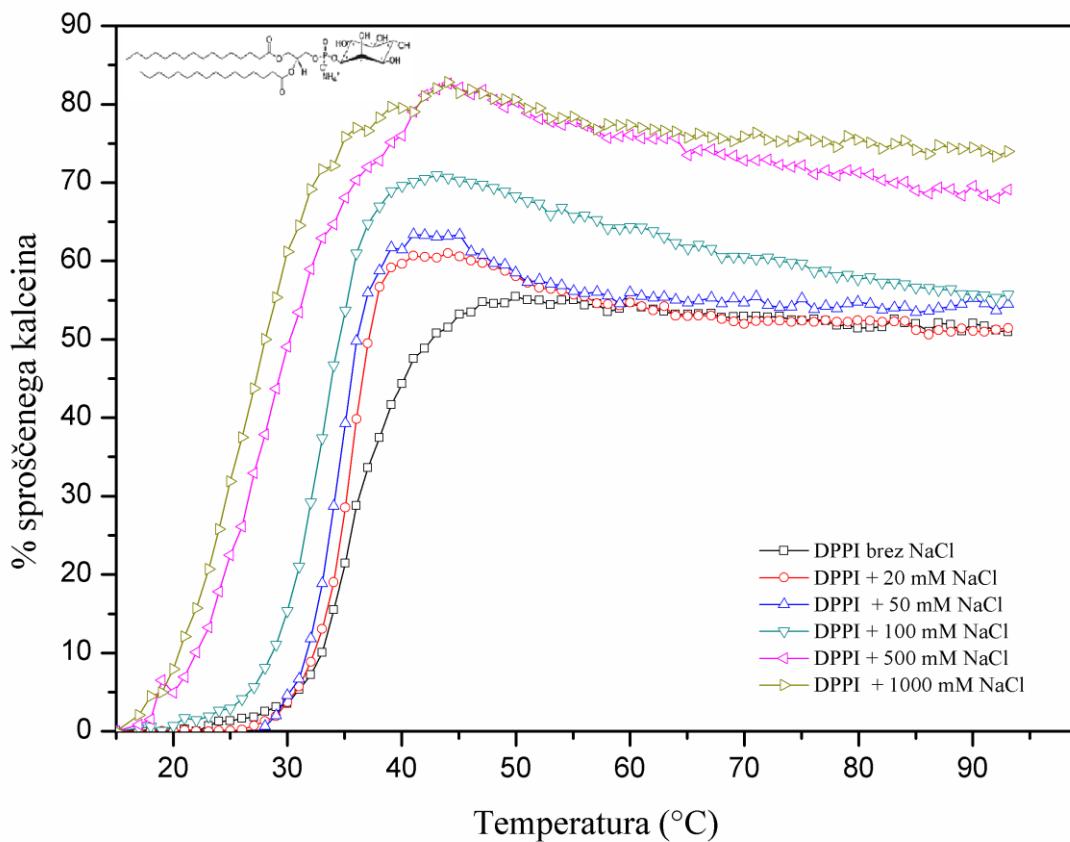
Slika 19: Vpliv temperature in koncentracije NaCl na sproščanje kalceina iz LUV liposomov DPPG ($c=0,023 \text{ mg/mL}$) pri pH 7,0 (20 mM HEPES).

Slika 19 prikazuje sproščanje kalceina iz DPPG liposomov z višanjem temperature in pri različnih koncentracijah NaCl. Pri koncentracijah do 500 mM NaCl je prisoten oster fazni prehod pri 41 °C, propustnost liposomov pa se z višanjem koncentracije NaCl manjša. Pri 1000 mM NaCl pa opazimo, da so liposomi manj termično stabilni in sproščajo kalcein že pri nižjih temperaturah.



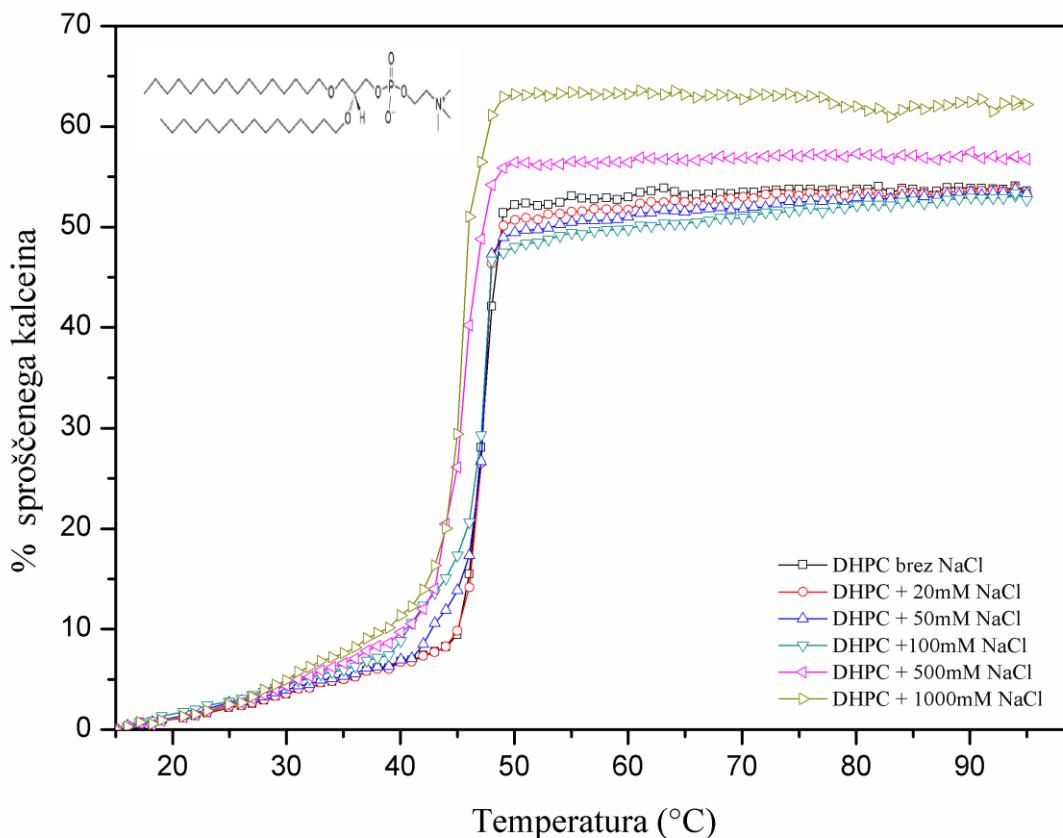
Slika 20: Vpliv temperature in koncentracije NaCl na sproščanje kalceina iz LUV liposomov DPPE ($c=0,023 \text{ mg/mL}$) pri pH 7,0 (20 mM HEPES).

Slika 20 prikazuje sproščanje kalceina iz DPPE liposomov z višanjem temperature in pri različnih koncentracijah NaCl. S slike je razvidno, da pri DPPE liposomih brez NaCl in v 20 mM NaCl ni izrazito ostrega faznega prehoda ($T_m=64^\circ\text{C}$). Razlog za neizrazit fazni prehod so relativno majhne polarne glave v primerjavi z ogljikovodikovo verigo, zato DPPE ne tvorijo dvoslojev pri normalnih pogojih. Liposome DPPE bi lahko pripravili pri pH, višjih od 8,0, saj se zwitterionska polarna glava nabije in se med hidracijo poveča velikost. Naše meritve smo izvedli pri pH 7,0, zato DPPE niso bili v gel stanju in posledično ni izrazitih faznih prehodov. S slike 20 lahko opazimo, da 20 mM koncentracija NaCl nima bistvenega vpliva na obliko krivulje in temperaturo faznega prehoda. V prisotnosti 50 mM NaCl pa opazimo izrazitejši fazni prehod, ki se pojavi pri nižji temperaturi ($T_m=60^\circ\text{C}$). Pri 100 mM koncentraciji se temperatura faznega prehoda zniža na 55°C . S slike je razvidna tudi bistveno manjša termična stabilnost liposomov pri dodatku 500 in 1000 mM NaCl. Kalcein se sprosti že pri nižjih temperaturah.



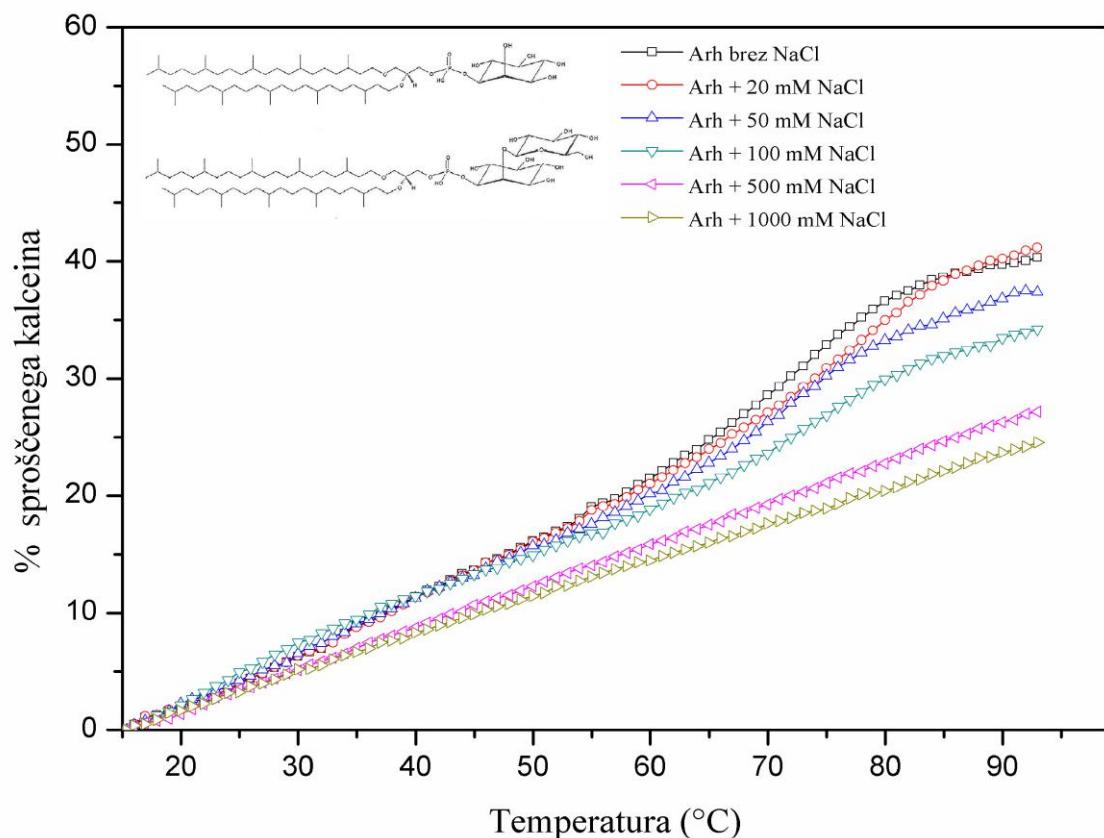
Slika 21: Vpliv temperature in koncentracije NaCl na sproščanje kalceina iz LUV liposomov DPPI ($c=0,023 \text{ mg/mL}$) pri pH 7,0 (20 mM HEPES).

Slika 21 prikazuje sproščanje kalceina iz DPPI liposomov z višanjem temperature in pri različnih koncentracijah NaCl. Za liposome, pripravljene iz DPPI, je značilen oster fazni prehod pri temperaturi 35 °C. Najbolj so liposomi termično stabilni brez dodanega NaCl, propustnost liposomov je brez dodanega NaCl najnižja v celotnem temperaturnem intervalu. Z večanjem koncentracije NaCl postajajo liposomi vse manj termično stabilni. Do sproščanja kalceina prihaja pri nižjih temperaturah.



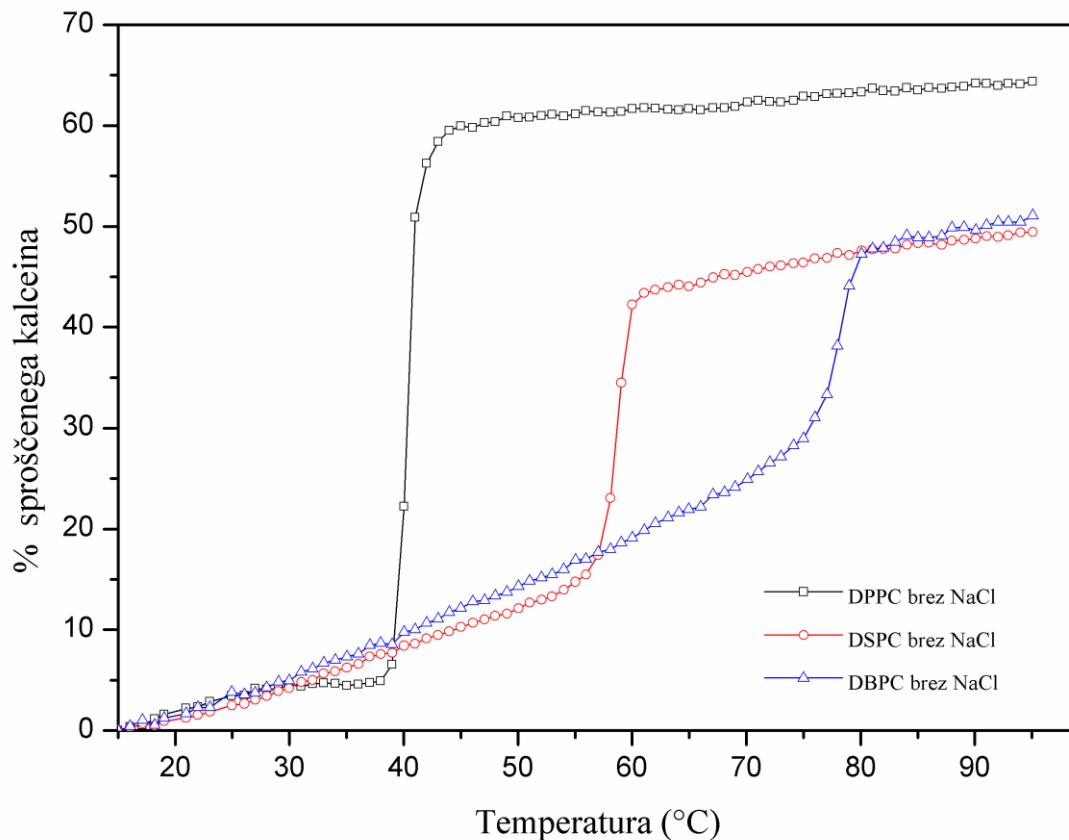
Slika 22: Vpliv temperature in koncentracije NaCl na sproščanje kalceina iz LUV liposomov DHPC ($c=0,023$ mg/mL) pri pH 7,0 (20 mM HEPES).

Za DHPC liposome in liposome, pripravljene iz arhealnih lipidov, je značilna etsrska vez, kar je bistvena razlika v primerjavi z ostalimi liposomi, za katere je značilna estrska vez. Na sliki 22 je opazen oster fazni prehod DHPC liposomov brez NaCl in pri 20 mM NaCl ($T_m=47$ °C). Z višanjem koncentracije do 100 mM NaCl opazimo, da se sproščanje kalceina začne že pri nižjih temperaturah, vendar je to sproščanje manjše kot pri liposomih brez NaCl. Za liposome pri 500 in 1000 mM NaCl pa je opazen oster fazni prehod, ki se pojavi pri 45 °C. Liposomi so pri teh koncentracijah NaCl nekoliko manj termično stabilni, njihova propustnost za kalcein pa je nekoliko višja. Opazimo, da so DHPC liposomi manj občutljivi na prisotnost NaCl v primerjavi z ostalimi proučevanimi liposomi.



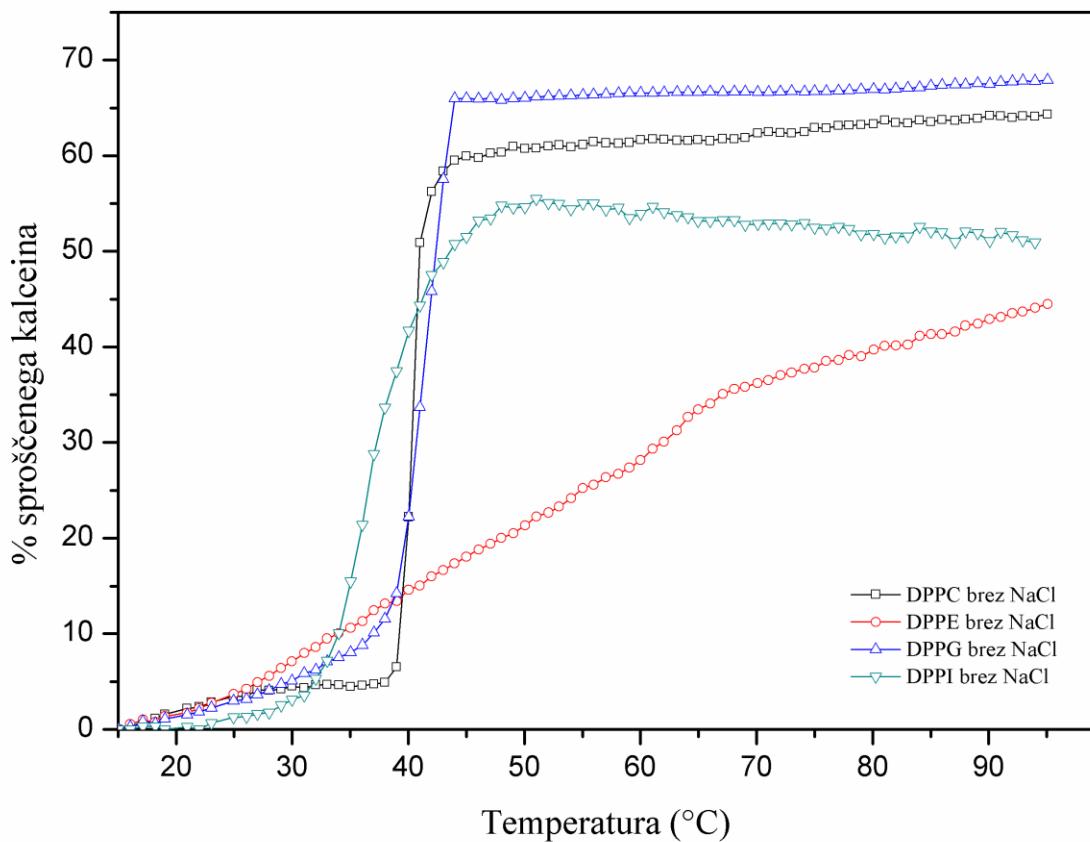
Slika 23: Vpliv temperature in koncentracije NaCl na sproščanje kalceina iz LUV liposomov, pripravljenih iz arhealnih lipidov ($c=0,023 \text{ mg/mL}$), pri pH 7,0 (20 mM HEPES).

Slika 23 prikazuje spremljanje fluorescence kalceina, sproščenega iz liposomov, pripravljenih iz arhealnih lipidov. Razvidno je, da ni ostrega faznega prehoda v celotnem temperaturnem območju in da so med vsemi proučevanimi liposomi najbolj stabilni, saj z večanjem koncentracije NaCl sproščajo manj kalceina.



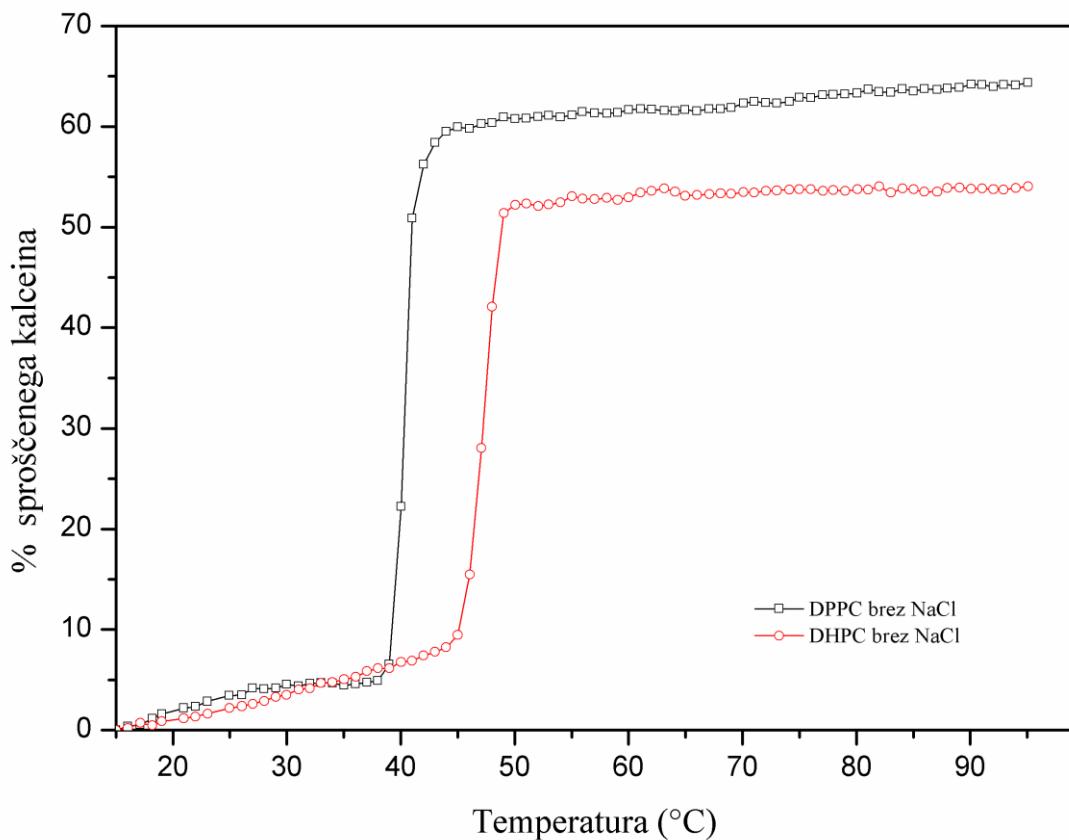
Slika 24: Vpliv temperature na sproščanje kalceina iz LUV liposomov, pripravljenih iz DPPC, DSPC in DBPC, brez prisotnosti NaCl ($c=0,023$ mg/mL) pri pH 7,0 (20 mM HEPES).

Znano je, da temperatura faznega prehoda narašča z dolžino verige maščobnih kislin (Voet D in Voet GJ, 2004). To dokazuje slika 24, kjer je prikazano sproščanje kalceina iz liposomov, pripravljenih iz DPPC (ogljikovodikova veriga iz 16 ogljikovih atomov), DSPC (ogljikovodikova veriga iz 18 ogljikovih atomov) in DBPC (ogljikovodikova veriga iz 22 ogljikovih atomov). Pri DPPC liposomih je opazna najnižja temperatura faznega prehoda ($T_m=41$ °C), ki pa se z naraščanjem dolžine verige zvišuje. Tako je pri DSPC temperatura faznega prehoda 55 °C in pri DBPC 75 °C. Pri DPPC liposomih je ta fazni prehod zelo oster, z daljšanjem verige pa se ostrina manjša. Pri DPPC liposomih je opazna tudi večja propustnost za kalcein, saj se ga sprosti 65 %, v primerjavi z DSPC in DBPC, kjer se ga pri temperaturah nad temperaturo faznega prehoda sprosti le 50 %.



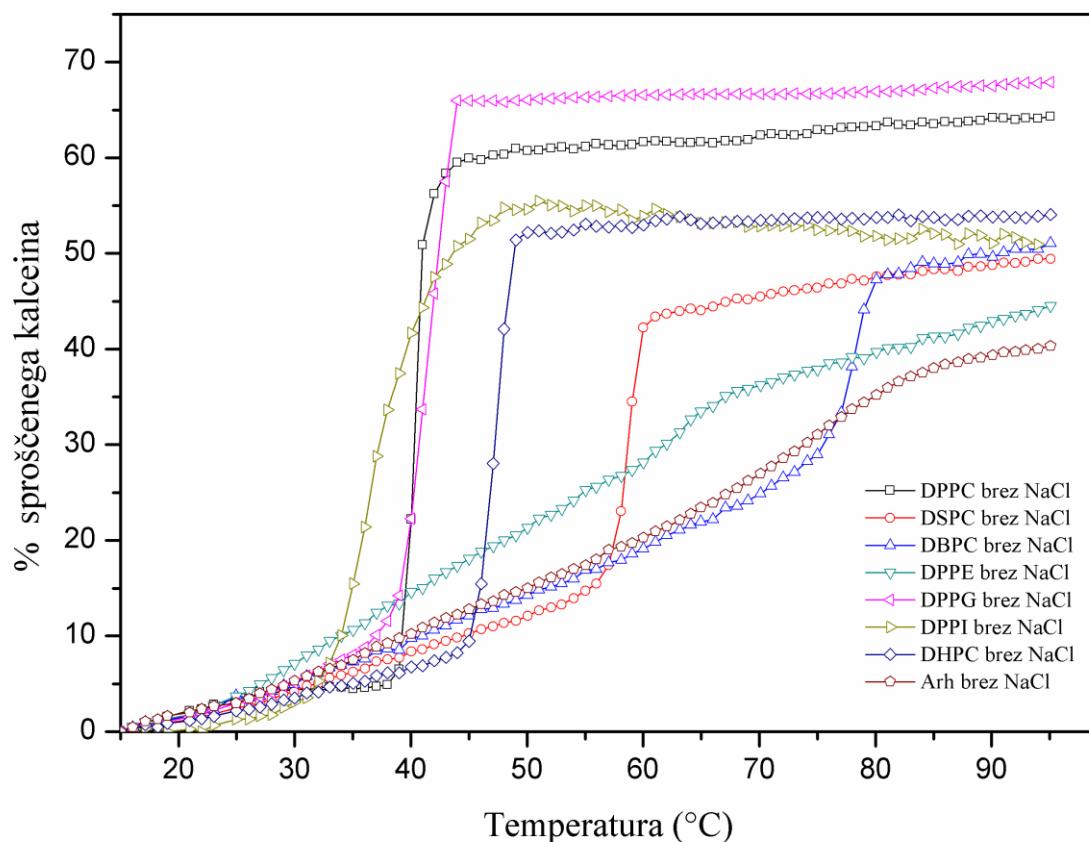
Slika 25: Vpliv temperature na sproščanje kalceina iz LUV liposomov, pripravljenih iz DPPC, DPPE, DPPG in DPPI, brez prisotnosti NaCl ($c=0,023$ mg/mL) pri pH 7,0 (20 mM HEPES).

Med seboj smo primerjali liposome iz lipidov z enakimi verigami maščobnih kislin in spremenjeno polarno glavo. Tako smo med seboj primerjali: holin (DPPC), etanolamin (DPPE), glicerol (DPPG) in inozitol (DPPI). S slike 25 je razvidno, da imajo najmanjšo temperaturo faznega prehoda liposomi, pripravljeni iz DPPI ($T_m=35$ °C), medtem ko pri DPPC ($T_m=41$ °C) in DPPG ($T_m=41$ °C) liposomih ni bistvene razlike. Med vsemi krivuljami najbolj izstopa sproščanje kalceina iz liposomov, pripravljenih iz DPPE, ki v temperturnem območju nad 40 °C sproščajo kalcein bistveno manj kot drugi liposomi, fazni prehod pa ni izrazit, ker lahko DPPE liposome pripravimo pri pH nad 8,0. Pri pH manj od 8,0 DPPE niso v gel stanju. Največ kalceina se med primerjanimi liposomi sprosti pri DPPG, manj pri DPPC in še manj pri DPPE. Najmanj kalceina se sprosti pri liposomih, pripravljenih iz DPPI.



Slika 26: Vpliv temperature na sproščanje kalceina iz LUV liposomov, pripravljenih iz DPPC in DHPC, brez prisotnosti NaCl ($c=0,023$ mg/mL) pri pH 7,0 (20 mM HEPES).

Bistvena razlika med DPPC in DHPC liposomi je v tem, da je za DPPC lipide značilna estrska vez, za DHPC pa etsrska. Slike 26 sta razvidna ostra fazna prehoda liposomov, pripravljenih iz DPPC in DHPC. Pri DHPC liposomih je ta fazni prehod pri temperaturi 47 °C in je višji od DPPC, kjer je temperatura faznega prehoda 41 °C. Iz tega lahko sklepamo, da etsrska vez pripomore k večji termični stabilnosti liposomov. Liposomi, pripravljeni iz DHPC, so tudi manj propustni od liposomov, pripravljenih iz DPPC, saj je pri DHPC sproščanje kalceina v celotnem temperaturnem območju manjše.



Slika 27: Vpliv temperature na sproščanje kalceina iz LUV liposomov, pripravljenih iz DPPC, DSPC, DBPC, DPPE, DPPG, DPPI, DHPC in iz arhealnih lipidov, brez prisotnosti NaCl ($c=0,023 \text{ mg/mL}$) pri pH 7,0 (20 mM HEPES).

Slike 27 je razvidno, da je fazni prehod DPPI liposomov najnižji izmed vseh ($T_m=35^\circ\text{C}$). Po vrsti si nato sledijo DPPC ($T_m=41^\circ\text{C}$), DPPG ($T_m=41^\circ\text{C}$), DHPC ($T_m=47^\circ\text{C}$), DSPC ($T_m=55^\circ\text{C}$), DPPE ($T_m=64^\circ\text{C}$), DBPC ($T_m=75^\circ\text{C}$) in z najvišjim faznim prehodom liposomi, pripravljeni iz arhealnih lipidov. Izmed vseh na grafu največ kalceina sprostijo DPPG, nekoliko manj DPPC. DPPI, DHPC, DSPC in DBPC sproščajo približno enako kalceina. Liposomi, pripravljeni iz DPPE, in liposomi iz arhealnih lipidov imajo podobno obliko krivulje: fazni prehod se pojavi pri višjih temperaturah, bistvena razlika med njima pa je, da so DPPE liposomi manj termično stabilni od arhealnih. Opazimo lahko, da so arhealni liposomi najbolj termično stabilni in imajo najvišjo temperaturo faznega prehoda izmed vseh merjenih liposomov.

Preglednica 3: Fazni prehodi liposomov v prisotnosti različne koncentracije natrijevega klorida.
 T_m - temperatura faznega prehoda, ΔT - območje faznega prehoda.

	c NaCl [mM]	T_m [$^{\circ}$ C]	ΔT [$^{\circ}$ C]
DPPC	0	$41,0 \pm 0,5$	6 ± 1
	20	$41,0 \pm 0,5$	6 ± 1
	50	$41,0 \pm 0,5$	5 ± 1
	100	$41,0 \pm 0,5$	6 ± 1
	500	$40,0 \pm 0,5$	12 ± 1
	1000	$40,0 \pm 0,5$	14 ± 1
DSPC	0	$55,0 \pm 0,5$	5 ± 1
	20	$55,0 \pm 0,5$	6 ± 1
	50	$55,0 \pm 0,5$	6 ± 1
	100	$53,0 \pm 0,5$	11 ± 1
	500	$50,0 \pm 0,5$	20 ± 1
	1000	$49,0 \pm 0,5$	21 ± 1
DBPC	0	$75,0 \pm 0,5$	6 ± 1
	20	$75,0 \pm 0,5$	6 ± 1
	50	$74,0 \pm 0,5$	6 ± 1
	100	$74,0 \pm 0,5$	8 ± 1
	500	$71,0 \pm 0,5$	14 ± 1
	1000	$69,0 \pm 0,5$	16 ± 1
DPPE	0	$64,0 \pm 0,5$	10 ± 1
	20	$64,0 \pm 0,5$	10 ± 1
	50	$60,0 \pm 0,5$	0 ± 1
	100	$55,0 \pm 0,5$	31 ± 1
	500	$37,0 \pm 0,5$	35 ± 1
	1000	$37,0 \pm 0,5$	35 ± 1
DPPI	0	$35,0 \pm 0,5$	19 ± 1
	20	$35,0 \pm 0,5$	14 ± 1
	50	$35,0 \pm 0,5$	13 ± 1
	100	$33,0 \pm 0,5$	16 ± 1
	500	$28,0 \pm 0,5$	26 ± 1
	1000	$26,0 \pm 0,5$	29 ± 1
DHPC	0	$47,0 \pm 0,5$	6 ± 1
	20	$47,0 \pm 0,5$	6 ± 1
	50	$47,0 \pm 0,5$	8 ± 1
	100	$47,0 \pm 0,5$	11 ± 1
	500	$46,0 \pm 0,5$	10 ± 1
	1000	$45,0 \pm 0,5$	13 ± 1
DPPG	0	$41,0 \pm 0,5$	11 ± 1
	20	$41,0 \pm 0,5$	10 ± 1
	50	$41,0 \pm 0,5$	6 ± 1
	100	$40,0 \pm 0,5$	6 ± 1
	500	$40,0 \pm 0,5$	10 ± 1
	1000	$39,0 \pm 0,5$	15 ± 1

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Stabilnost velikih enoslojnih liposomov smo spremljali s sproščanjem fluorescenčnega barvila kalceina. Sproščanje smo spremljali pri različnih koncentracijah NaCl (0, 20, 50, 100, 500 in 1000 mM) v temperaturnem območju od 15 do 95 °C. Fluorescenco smo merili s fluorescenčnim spektrometrom. Valovna dolžina vzbujanja je bila 495 nm, emisije 515 nm, hitrost segrevanja pa je bila 1 °C/min.

Najprej smo merili sproščanje kalceina iz liposomov, narejenih iz nevtralno nabitih lipidov DPPC. Opazen je oster fazni prehod pri 41 °C, ki pa se z večanjem koncentracije NaCl bistveno ne spreminja. Liposomi so z naraščanjem koncentracije NaCl sprostili manj kalceina. Iz navedenega lahko sklepamo, da se iz LUV, narejenih iz DPPC, z naraščanjem koncentracije NaCl propustnost manjša, temperatura faznega prehoda pa se ne spreminja.

Nevtralni lipidi DSPC se od DPPC razlikujejo v tem, da sta maščobnokislinski verigi na C₁ in C₂ daljši za dva ogljikova atoma. Pri LUV, narejenih iz DSPC, je opazen oster fazni prehod pri 55 °C, z naraščanjem koncentracije NaCl do 100 mM pa se bistveno ne spreminja. Šele pri 500 in 1000 mM opazimo znižanje faznega prehoda, torej so liposomi pri teh koncentracijah manj termično stabilni.

DBPC ima v primerjavi z DPPC maščobnokislinski verigi daljši za 6 ogljikovih atomov. Temperatura faznega prehoda pri liposomih, pripravljenih iz DBPC, je 75 °C. Z dodajanjem NaCl do 100 mM se temperatura faznega prehoda ne spreminja. Sproščanje kalceina je pri teh koncentracijah do temperature faznega prehoda večje, nad temperaturo faznega prehoda pa manjše. Tovrstni liposomi so pri 500 in 1000 mM NaCl manj termično stabilni, saj se temperatura faznega prehoda zniža, so pa bolj propustni za kalcein v celotnem temperaturnem območju.

Rezultati merjenja stabilnosti velikih enoslojnih liposomov, narejenih iz nevtralnih lipidov DPPC, DSPC in DBPC, brez NaCl ustrezajo trditvi, da se temperatura faznega prehoda viša z naraščanjem dolžine acilne verige (Voet D in Voet GJ, 2004).

DPPC, DPPG in DPPI se razlikujejo le v skupini, vezani na fosfatno skupino: pri DPPC je to holin, pri DPPG glicerol, pri DPPI pa inozitol. Razlikujejo se tudi v naboju, saj je DPPC

nevtralen, DPPG in DPPI pa sta negativno nabita. Naše meritve kažejo, da imata DPPC in DPPG enaki temperaturi faznega prehoda (41°C) in da se z naraščanjem koncentracije NaCl sproščanje kalceina zniža. Pri liposomih, pripravljenih iz DPPG, se pri 1000 mM NaCl temperatura faznega prehoda zniža ($T_m=39^{\circ}\text{C}$), sproščanje kalceina pa je večje.

V raziskavi Mansour in sod. (2001) navajajo, da je temperatura faznega prehoda DPPG $40,3^{\circ}\text{C}$. Zanimivo je, da je DPPG anionski, pa vendar ima skoraj enako temperaturo faznega prehoda kot DPPC. Posledično mešani liposomi DPPC/DPPG težijo k enakemu mešanju, blizu idealnega obnašanja, čeprav je DPPG negativno nabit. Iz literature je razvidno, da ima fosfatidilglicerolna polarna glava enako velikost kot fosfatidilholinska glava.

DPPI je prav tako kot DPPG anionski, vendar se temperature faznega prehoda med raziskavami razlikujejo. V raziskavi Mansour in sod. (2001) so uporabili diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC) in prišli do rezultata, da je temperatura faznega prehoda DPPI $-24,9^{\circ}\text{C}$. Redfern in Gericke (2004) pa v svoji raziskavi navajata, da je fazni prehod za DPPI, ki sta ga navedla Mansour in sod. (2001) presenetljivo nizek. V svoji raziskavi sta z enako metodo (diferenčno dinamično kalorimetrijo) prišla do ugotovitev, da ima DPPI dva fazna prehoda, in sicer enega pri $38,5^{\circ}\text{C}$ in drugega pri $40,9^{\circ}\text{C}$. Naše meritve kažejo na to, da je območje faznega prehoda pri DPPI izmed vseh merjenih liposomov najdaljše in da je temperatura faznega prehoda brez dodanega NaCl 35°C . Z večanjem koncentracije NaCl postanejo liposomi manj termično stabilni in bolj propustni za kalcein.

Nevtralni lipidi DPPE imajo na fosfatno skupino vezan etanolamin. Temperatura faznega prehoda brez NaCl je 64°C . Leekumjorn in Sum (2007) sta v raziskavi ugotovila, da je fazno preoblikovanje DPPE podobno faznemu preoblikovanju DPPC lipidov. Razlika je le v strukturnih lastnostih (manjša polarna glava DPPE), ki ima za posledico to, da je dvosloj pod temperaturo faznega prehoda bolj urejen. Manjša površina na enoto DPPE lipida pa se kaže v tesnem pakiranju lipidov in posledično z manj nagnjenimi koti lipidnih repov. Wong in Faller (2007) sta raziskovala mešane liposome DPPE in DPPC in prišla do ugotovitev, da fosfatidiletanolamin vodi k večji urejenosti ter manjši površini, posledično pa so temperature faznega prehoda DPPE/DPPC liposomov višje od temperature faznega prehoda, če bi liposome naredili samo iz DPPC. Razlog za višjo temperaturo faznega prehoda DPPE v primerjavi z DPPC pa izvira iz močnejših interakcij med

fosfatidiletanolaminskimi glavami v primerjavi z interakcijami fosfatidilholinskih glav med seboj. Močnejše interakcije vodijo v večje stiskanje glav in posledično v večjo urejenost, kar se odraža tudi v višji temperaturi faznega prehoda. V naših poskusih smo ugotovili, da je temperatura faznega prehoda pri DPPE 64 °C le še pri 20 mM NaCl, vendar ta prehod ni izrazit. Za DPPE je namreč značilno, da jih lahko pripravimo pri pH, višjih od 8,0. Pri nižjih pH je polarna glava v primerjavi z ogljikovodikovo verigo majhna in ti lipidi sami ne morejo tvoriti dvoslojev ali liposomov. Liposome bi lahko pripravili pri pH, višjih od 8,0, saj bi se polarna glava nabila, povečala bi se njena velikost med hidracijo in tvorili bi se liposomi. Naše meritve so bile izvedene pri pH 7,0, zato DPPE lipidi niso bili v gel stanju in posledično tudi fazni prehodi niso izraziti.

Arhejo *A. pernix* smo gojili, izolirali njene lipide in iz njih naredili velike enoslojne liposome, ki jih imenujemo arheosomi. Sproščanje kalceina iz liposomov kaže na to, da pri tovrstnih lipidih ni ostrega faznega prehoda in da so z naraščanjem koncentracije NaCl vedno manj propustni. Da so arhealni lipidi manj fleksibilni kot normalni lipidi, dokazuje tudi raziskava Gmajner in Poklar Ulrich (2011), ki navajata, da so tetraetrske lipidne verige bolj urejene. Šele pri 80 °C je opazna fleksibilnost tovrstnih lipidnih verig in se približuje fluidnosti lipidnih dvoslojev, vendar nimajo izrazitega faznega prehoda. Navajata pa tudi, da so arhealni lipidi zaradi ekstremno nizke propustnosti topljenca iz liposomov odličen izvor za tvorjenje mešanih liposomov. Z vgraditvijo arhealnih lipidov v liposome, narejene iz komercialnih lipidov, kot je npr. DPPC, lahko zmanjšamo propustnost topljencev, kot je kalcein.

DHPC lipidi so neutralni lipidi in imajo tako kot arhealni lipidi etsko vez. Za razliko od arhealnih pa je prisoten oster fazni prehod pri nižji temperaturi ($T_m=47\text{ }^{\circ}\text{C}$). Z naraščanjem koncentracije NaCl se temperatura faznega prehoda bistveno ne spremeni, delež sproščenega kalceina pa se z naraščajočo koncentracijo NaCl manjša. Pri 500 in 1000 mM NaCl opazimo manjšo termično stabilnost, saj se fazni prehod zniža za 1 oz. 2 °C, delež sproščenega kalceina pa je v celotnem temperaturnem območju večji. Med vsemi proučevanimi liposomi so LUV, izdelani iz DHPC, najmanj občutljivi na NaCl.

Razlika med DHPC in DPPC je le v vezi: pri DPPC je ta vez estrska, pri DHPC pa etska. Število ogljikovih atomov v verigi je enako, enaka pa je tudi polarna glava (holin). V primerjavi z DPPC ima DHPC za 6 °C višjo temperaturo faznega prehoda.

V raziskavi, ki so jo izvedli Guler in sod. (2009), so pokazane majhne razlike med strukturami fluidnih faz DHPC v primerjavi z DPPC dvosloji. Največja razlika med dvosloji iz estrskih in etrskih vezi je membranski dipolni potencial, ki je za DHPC za polovico manjši od DPPC, in razlika v elektronski gostoti. Obe razliki izhajata iz kemijske nadomestitve močno dipolarne C=O skupine s -CH₂ skupino, ki ima manjšo elektronsko gostoto.

5.2 SKLEPI

- LUV, narejeni iz DPPC, postanejo z večanjem koncentracije NaCl manj propustni za kalcein.
- LUV, narejeni iz DHPC, v primerjavi z LUV, ki so narejeni iz DPPC, propuščajo manj kalceina in imajo višjo temperaturo faznega prehoda, kar pomeni, da etska vez pripomore k večji termični stabilnosti liposomov. DHPC liposomi so tudi manj občutljivi na prisotnost NaCl v primerjavi z ostalimi proučevanimi liposomi.
- LUV, narejeni iz DPPI, postanejo z večanjem koncentracije NaCl manj termično stabilni in bolj propustni za kalcein.
- LUV, narejeni iz DSCP, DBCP in DHPC, postanejo v prisotnosti 20, 50 ali 100 mM NaCl manj propustni za kalcein, pri višjih koncentracijah NaCl pa postanejo manj termično stabilni in bolj propustni.
- LUV, narejeni iz DPPG, so z višanjem koncentracije NaCl do 500 mM manj propustni, temperatura faznega prehoda ostaja enaka. Pri 1000 mM NaCl se temperatura faznega prehoda zniža, sproščanje kalceina pa se začne že pri nižjih temperaturah.
- LUV ne moremo narediti iz DPPE pri pH 7,0, saj je polarna glava v primerjavi z ogljikovodikovo verigo relativno majhna, zato DPPE sami ne tvorijo dvosloja ali liposomov pri normalnih pogojih. Iz DPPE bi lahko LUV naredili pri pH, višjih od 8,0.
- Arheosomi so izmed vseh LUV, ki smo jim merili fluorescenco, zaradi najvišje temperature faznega prehoda in najmanj sproščenega kalceina v celotnem temperaturnem območju najbolj termično stabilni.
- Z naraščanjem dolžine verige maščobnih kislin se temperatura faznega prehoda zvišuje.

6 POVZETEK

Fosfolipidi so glavni predstavniki membranskih lipidov. Zanje je značilno, da je hidroksilna skupina fosforne kisline lahko zaestrena z različnimi alkoholi. Lahko se urejajo v lipidne dvosloje in liposome. Da bi ugotovili, kako dolžina nepolarnih verig in različni alkoholi, vezani na fosfatno skupino, vplivajo na stabilnost liposomov, smo iz posameznih lipidov naredili velike enoslojne liposome (LUV) in vanje vgradili fluorescenčno barvilo kalcein. Liposome smo naredili iz dipalmitoil-fosfatidilholina (DPPC), distearoil-fosfatidilholina (DSPC), dibehenoil-fosfatidilholina (DBPC), dipalmitoil-fosfatidilinozitola (DPPI), dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (DPPE), dipalmitoil-fosfatidilglicerola (DPPG), di-O-heksadecil-fosfatidilholina (DHPC) in iz lipidov, izoliranih iz arheje *Aeropyrum pernix*. S fluorescenčno spektrometrijo smo spremljali sproščanje kalceina pri različnih koncentracijah natrijevega klorida v temperaturnem območju od 15 do 95 °C. Zanimala nas je predvsem temperatura faznega prehoda, ko lipid preide iz gela v tekoče stanje.

Ugotovili smo, da so bili med vsemi liposomi najbolj termično stabilni liposomi, narejeni iz lipidov, izoliranih iz arheje *Aeropyrum pernix*, saj so imeli najvišjo temperaturo faznega prehoda. Hkrati pa so najmanj propustni, saj so sprostili najmanj kalceina v celotnem temperaturnem območju. Tako smo dokazali, da etrska vez najbolj prispeva k termični stabilnosti in propustnosti liposomov. Ugotovili smo tudi, da se stabilnost liposomov povečuje z daljšanjem dolžine nepolarnega repa. Med različnimi skupinami, ki so vezane na fosfatno skupino, pa k stabilnosti liposomov najbolj prispeva etanolaminska skupina.

7 VIRI

- Avanti Polar Lipids. 2012. Lipid products: Phospholipids. Alabaster, Avanti Polar Lipids, Inc: 1 str.
http://avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=100&Itemid=108
(20. avg. 2012)
- Benvegnu T., Lemiègre L., Cammas-Marion S. 2008. Archeal lipids: Innovative materials for biotechnological applications. European Journal of Organic Chemistry, 28: 4725-4744
- Berzina T.S., Troitsky V.I., Vakula S., Riccio A., Morana A., De Rosa M., Dante S., Maccioni E., Rustichelli F., Accossato P., Nicolini C. 1995. Langmuir-Blodgett films of bipolar lipids from thermophilic archaea. Materials Science and Engineering, 3, 1: 13-21
- Blight E.G., Dyer W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 37, 8: 911-917. Cit po: Mancuso C.A., Nichols P.D., White D.C. 1986. A method for the separation and characterization of archaebacterial signature ether lipids. Journal of Lipid Research, 27, 1: 49-56
- Boyer R.F. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 634 str.
- Bullock C. 2000. The *Archaea*: biochemical perspective. Biochemistry and Molecular Biology Education, 28: 186–191
- Doulié J.P., Lavenant L., Renard D. 2003. Formation of tubules and giant vesicles from large multilamellar vesicles. Journal of Colloid and Interface Science, 266: 477-480
- Gmajner D., Ota A., Šentjurc M., Poklar Ulrich N. 2011. Stability of diether C_{25,25} liposomes from the hyperthermophilic archeon *Aeropyrum pernix* K1. Chemistry and Physics of Lipids, 164, 3: 236-45
- Gmajner D., Poklar Ulrich N. 2011. Thermotropic phase behaviour of mixed liposomes of archaeal diether and conventional diester lipids. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 106: 255-260

- Guler S.D., Ghosh D.D., Pan J., Mathai J.C., Zeidel M.L., Nagle J.F., Tristram-Nagle S. 2009. Effects of ether vs. ester linkage on lipid bilayer structure and water permeability. *Chemistry and Physics of Lipids*, 160, 1: 33-44
- Gunstone D.F., Hawood L.J., Padley B.F. 1994. The lipid handbook. 2nd ed. London, Chapman & Hall: 551 str.
- Jacquemet A., Barbeau J., Lemiègre L., Benvegnu T. 2009. Archaeal tetraether bipolar lipids: Structures, functions and applications. *Biochimie*, 91, 6: 711-717
- Jain A., Blum C., Subramaniam V. 2009. Fluorescence lifetime spectroscopy and imaging of visible fluorescent proteins. V: Advances in biomedical engineering. Verdonick P. (ed.) Amsterdam, Elsevier: 147-176
- Kočevar Glavač N., Kristl J. 2005. Ciljana dostava učinkovin v tumorske celice z liposomi. *Farmacevtski vestnik*, 56, 3: 202-206
- Koga Y., Morii H. 2006. Special methods for the analysis of ether lipid structure and metabolism in archaea. *Analytical Biochemistry*, 348, 1: 1-14
- Kristl J., Šmid Korbar J., Srčič S. 1992. Farmacevtska tehnologija. 1. del in praktikum. Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 157-159
- Lakowicz R.J. 1999. Principles of fluorescence spectroscopy. 2nd ed. New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers: 698 str.
- Lasic D.D. 1993. Liposomes: from physics to applications. Amsterdam, Elsevier: 575 str.
- Leekumjorn S., Sum A.K. 2007. Molecular studies of the gel to liquid-crystalline phase transition for fully hydrated DPPC and DPPE bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1768, 2: 354-365
- Mansour H., Wang D.S., Chen C.S., Zografi G. 2001. Comparison of bilayer and monolayer properties of phospholipid systems containing dipalmitoylphosphatidylglycerol and dipalmitoylphosphatidylinositol. *Langmuir*, 17, 21: 6622-6632

Milek I., Cigić B., Skrt M., Kaletunç G., Poklar Ulrich N. 2005. Optimization of growth for the hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* on a small-batch scale. Canadian Journal of Microbiology, 51, 9: 805-809

Mlekuž S. 1995. Teoretične osnove in uporabnost fluorescenčne spektroskopije v farmaciji. Farmacevtski vestnik, 46: 305-328

Poklar Ulrich N., Gmajner D., Raspor P. 2009. Structural and physicochemical properties of polar lipids from thermophilic archaea. Applied Microbiology and Biotechnology, 84, 2: 249-260

Redfern A.D., Gericke A. 2004. Domain formation in phosphatidylinositol monophosphate/phosphatidylcholine mixed vesicles. Biophysical Journal, 86, 5: 2980-2992

Sako Y., Nomura N., Uchida A., Ishida Y., Morii H., Koga Y., Hoaki T., Maruyama T. 1996. *Aeropyrum pernix* gen. nov., sp. nov., a novel aerobic hyperthermophilic archaeon growing at temperatures up to 100 °C. International Journal of Systematic Bacteriology, 46, 4: 1070-1077

Stryer L. 1999. Biochemistry. 4th ed. New York, W. H. Freeman: 1064 str.

Voet D., Voet G.J. 2004. Biochemistry. 3rd ed. Hoboken, J. Wiley & Sons: 1591 str.

Voskuhl J., Ravoo B.J. 2009. Molecular recognition of bilayer vesicles. Chemical Society Reviews, 38: 495-505

Živec K., Ziherl K. 2006. Fluidnost eritrocitnih membran pri rakavih bolnikih- študija z elektronsko paramagnetno resonanco. Medicinski razgledi, 45: 3-19

Wong B.Y., Faller R. 2007. Phase behavior and dynamic heterogeneities in lipids: a coarse-grained simulation study of DPPC-DPPE mixtures. Biochimica et Biophysica Acta, 1768, 3: 620-627

ZAHVALA

Za strokovno pomoč in vzpodbudo pri izdelavi diplomske naloge se zahvaljujem mentorici prof. dr. Nataši Poklar Ulrich in somentorju asist. dr. Janezu Valantu.

Hvala mami, očetu in bratu, ker so me podpirali v vseh letih šolanja in mi stojijo ob strani na vseh poteh življenja.

Hvala Damjanu za podporo in motivacijo.

Hvala Amadeji, Mateji, Mojci, Katarini in Sanji za lepa in brezskrbna študentska leta.

Hvala Markotu, Ajdi, Tjaši in Katji za pomoč in prijetno vzdušje v laboratoriju.

Velika hvala tudi s. Magdi za podporo na vseh študijskih poteh.