



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

KEMIJSKI ODSJEK

Sveučilišni poslijediplomski studij kemije

Fizikalna kemija

**KEMIJSKI SEMINAR I**

**Kalorimetrijska i spektroskopska analiza utjecaja kolesterola na fazne promjene fosfolipidnih dvosloja**

(prema radu: M.G. K. Benesch, D. A. Mannock, R. N. A. H. Lewis, R. N. McElhaney, *Biochemistry* **50 (46)** (2011), 9982–9997.

Petra Maleš

Svibanj 2022.

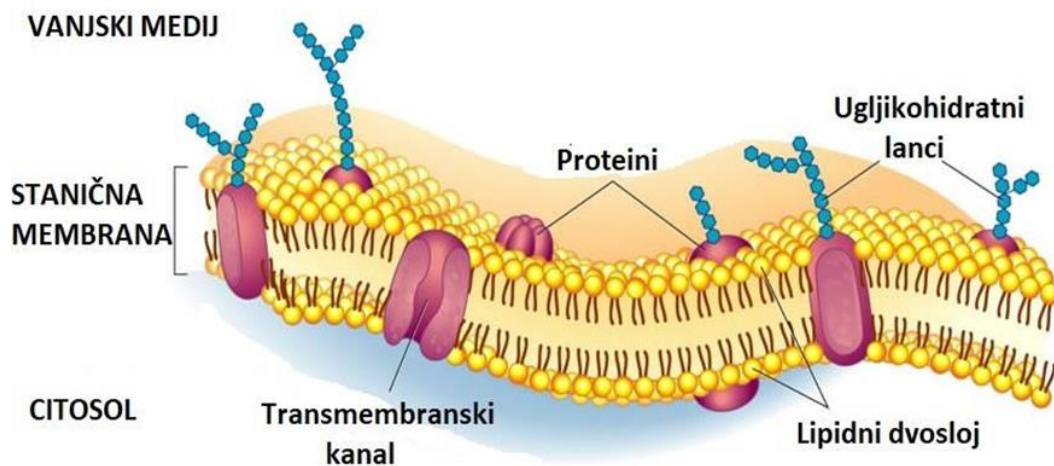
## Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1. Struktura membrana i membranskih lipida.....	1
1.2. Fosfolipidi .....	2
1.3. Kolesterol i latosterol .....	3
1.4. Fazne promjene lipidnih dvosloja .....	5
2. RASPRAVA .....	6
2.1. Razlikovna- pretražna kalorimetrija (DSC) .....	6
2.2. Termotropni odnos sterola i DPPC lipidnog dvosloja .....	6
2.3. FTIR spektroskopija.....	9
2.4. CH <sub>2</sub> deformacijska vrpca .....	11
3. ZAKLJUČAK.....	12
4. LITERATURA .....	13

# 1. UVOD

## 1.1. Struktura membrana i membranskih lipida

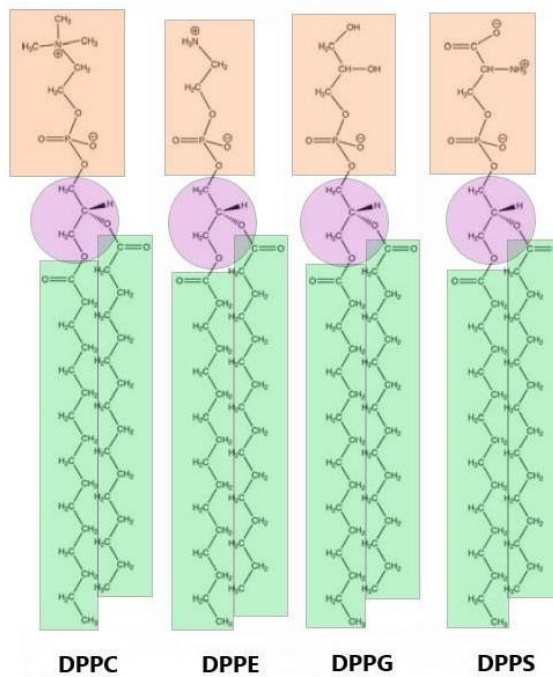
Biološke membrane su dinamičke strukture koje se sastoje od lipida i proteina poslaganih u dvosloj među kojima su brojne nekovalentne interakcije. Osim lipida i proteina, membrane grade i šećeri, uglavnom u obliku glikolipida i oligosaharida koji također imaju funkcionalnu ulogu.<sup>1</sup> Usprkos fluidnosti ni molekule lipida ni proteina ne mogu slobodno prelaziti s jedne na drugu stranu membranskog dvosloja. Zahvaljujući svojoj strukturi membrane imaju važnu ulogu u prijenosu, distribuciji, aktivnosti i selektivnosti biomolekula, te je vrlo važno shvatiti molekulske mehanizame interakcija bioloških molekula s lipidima kroz sustave modelnih membrana.<sup>2</sup> Membranski lipidi su male amfifilne molekule s hidrofobnom ugljikovodičnom regijom i hidrofilnom glavom. Hidrofilne polarne glave su sastavljene od polarnih skupina kao što su fosfati, koje ostvaruju interakcije s vodom, te su iz tog razloga okrenute prema vodenom mediju. Nepolarni hidrofobni repovi su građeni od dugih ugljikovodičnih lanaca masnih kiselina i ne reagiraju s vodom te su orijentirani jedni prema drugima.<sup>3</sup> Masne kiseline mogu biti zasićene i nezasićene što ovisi o tome imaju li ili nemaju dvostruku vezu u ugljikovodičnom lancu. O stupnju zasićenosti i duljini alkilnog lanca ovise svojstva masnih kiselina, a samim time i svojstva membrana. Masne kiseline u živim organizmima obično imaju od 14 do 24 C-atoma, a najčešće su one sa 16 i 18 C-atoma. Takva samoorganizacija lipida u dvosloje u vodenom mediju je brz i spontan proces gdje su presudne hidrofobne interakcije između alkilnih lanaca različitih lipidnih vrsta.<sup>3,4</sup>



Slika 1. Shematski prikaz strukture staničnog membranskog dvosloja.<sup>5</sup>

## 1.2. Fosfolipidi

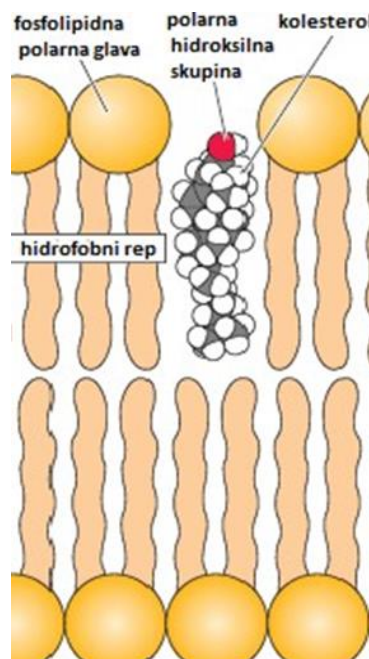
Postoje tri glavne skupine membranskih lipida s obzirom na vrstu polarne glave, a to su fosfolipidi, glikolipidi, sfingolipidi i steroli (kolesterol). U biološkim membranama najzastupljeniji su fosfogliceridi (fosfolipidi). Građeni su od trohidroksilnog alkohola glicerola kao osnove na koju su esterskom vezom vezana dva lanca masnih kiselina. Na treću hidroksilnu skupinu glicerola vezan je fosfat i polarna skupina koja određuje vrstu molekule fosfolipida.<sup>2</sup> Različite vrste fosfolipida nastaju vezanjem različitih funkcionalnih skupina na najjednostavniji fosfoglicerid fosfatidat (diacilglicerol-3-fosfat). Na fosfatidat esterskom vezom se mogu vezati različite skupine kao što su npr. hidroksilna skupina alkohola, aminokiselina serin, glicerol, inozitol, etanolamin i kolin. Na takav način nastaju fosfatidilserin, fosfatidilglicerol, fosfatidilinozitol i fosfoetanolamin koji su najzastupljeniji u unutarnjem sloju membranskog dvosloja koji je okrenut prema citosolu stanice, dok je fosfokolin u vanjskome sloju okrenutom prema vanstaničnom mediju. Stoga se na primjer lipid s fosfatidilkolinskom skupinom glave i dva lanca palmitoila naziva 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfokolin (DPPC).<sup>2</sup> Važan membranski lipid koji također doprinosi asimetriji membrane je sfingomijelin. Njegova okosnica, za razliku od fosfolipida, nije glicerol već sfingozin, dugolančani nezasićeni aminoalkohol.<sup>3</sup> (Slika 2.)



Slika 2. Strukturne formule fosfolipida s različitim polarnim glavama.<sup>3</sup>

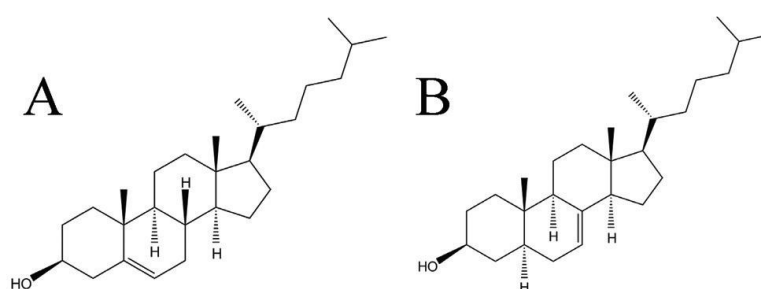
### 1.3. Kolesterol i latosterol

Steroli su skupina membranskih lipida od kojih je daleko prevladavajući kolesterol koji gradi 20% eukariotskih membrana i plazma membrana.<sup>3</sup> Kolesterol je građen od četiri međusobno povezana ugljikovodična prstena, gdje je na jednom kraju vezan ugljikovodični lanac, a na drugom hidroksilna skupina. U membrani smješten je paralelno na repove masnih kiselina fosfolipida, a OH- skupina interagira s najbližom polarnom skupinom fosfolipida (slika 3.).<sup>2</sup> Iako kolesterol ima niz različitih funkcija u životinjskim stanicama, jedna od njegovih primarnih uloga je stabilizacija fizičkih svojstava i lateralne organizacije lipidnog dvosloja plazma membrane. Studijama je ustvrđeno da je jedan od glavnih učinaka ugradnje kolesterola na fosfolipidne modelne membrane proširenje i eliminiranje kooperativnog faznog prijelaza gela u fluidnu fazu. Njegova prisutnost značajno povećava orijentacijski red fosfolipidnih ugljikovodičnih lanaca i smanjuje površinu poprečnog presjeka koju zauzimaju molekule fosfolipida uz umjereno ograničavanje gibanja ugljikovodičnih lanaca.<sup>6</sup> Uz navedenu ulogu u reguliranju fluidnosti i reda unutar lipidnog dvosloja membrane, kolesterol je također uključen u regulaciju biokemijskih i staničnih bioloških procesa.<sup>7</sup> Dva glavna puta za biosintezu kolesterola su Kandutsch-Russell i Bloch put koji počinju od latosterola, prvog cikličkog međuprodukta koji nastaje u biosintezi svih sterola.<sup>8</sup>



Slika 3. Kolesterol ugrađen u membranski dvosloj.<sup>1</sup>

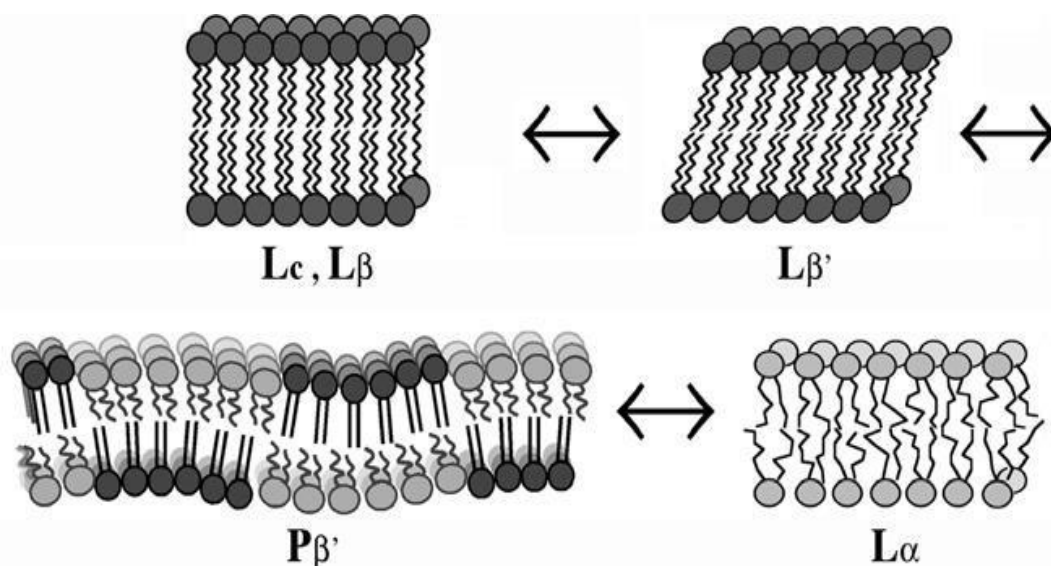
Latosterol je preposljednji međuprodukt u Kandutsch–Russell biosintetskom putu kolesterola i zajedno dijele jako sličnu kemijsku strukturu. Latosterol i kolesterol su gotovo identični, osim položaja dvostruke veze u prstenu B, koji se nalazi između C7 i C8 u latosterolu i C5 i C6 u kolesterolu. Međutim, latosterol kao i drugi kasni intermedijeri biosintetskih puteva kolesterola prvenstveno se akumuliraju u lipidnim nakupinama (engl. *raft*), čime destabiliziraju njihovu organizaciju i ometaju njihov signalni slijed. Učinak latosterola i kolesterola na strukturu i svojstva modelnih lipidnih membrana je proučavan u brojnim biofizičkim studijama, ali rezultati se često međusobno ne slažu.<sup>6,8</sup> Interakcije između sterola (u ovom slučaju latosterola i kolesterola) i dvosloja modelnih lipidnih membrana mogu se detektirati razlikovnom- pretražnom kalorimetrijom (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC) promatrajući termotropno fazno ponašanje modelnih membrana, kao i korištenje FTIR spektroskopije koja omogućava uvid u organizaciju i kemijsku konfiguraciju promatranih molekula.<sup>6,9</sup>



Slika 4. Strukturne formule kolesterola (A) i latosterola (B).<sup>6</sup>

## 1.4. Fazne promjene lipidnih dvosloja

Membrane kao fluidne tvorevine ovisi o nizu faktora kao što su npr. temperatura, pH, tlak, te kemijski potencijal iona u mediju. Mijenjanjem tih faktora možemo uzrokovati razaranje lipidnih agregata ili nastanak nekih novih oblika. Membrane se najviše proučavaju u fazi gela (čvrsta uređena faza) i fazi fluida (tekuća neuređena faza). Pri nižim temperaturama, lipidni dvosloj je uređena, čvrsta struktura, a svi lanci masnih kiselina nalaze se u *trans* konformaciji. Takva faza naziva se  $L_c$  faza ili kristalinična lipidna faza. Povišenjem temperature lipidni dvosloj prelazi iz čvrste strukture u gel fazu, odnosno  $L_{\beta'}$  fazu (slika 5.). Struktura lanaca u gel fazi ne mijenja se drastično u odnosu na kristaliničnu formu, pa su lanci i dalje u *trans* položajima, ali lipidi mogu biti nagnuti pod određenim kutem koji ovisi o skupinama koje čine glavu lipida. Primjerice, fosfokolini (PC) u ovoj fazi pokazuju nagib od  $30^\circ$  u odnosu na normalu membrane, dok npr. fosfatidiletanolamini (PE) ne pokazuju nikakav nagib ( $L_{\beta}$ ).<sup>10</sup> Sljedeća faza koja može nastati daljnjim porastom temperature je  $P_{\beta'}$  faza (slika 5.) u kojoj se na površini dvosloja stvaraju nabori (engl. *ripples*).<sup>3</sup> Uzrok pojave nabora još uvijek nije razjašnjen, ali prema dvjema najznačajnijim hipotezama nabori su ili posljedica koegzistencije lipida u fazama gela i fluida ili su svi lipidi u fazi gela s time da dolazi do promjena u slaganju molekula lipida.<sup>11</sup> Ova faza nastaje prije glavnog faznog prijelaza pri temperaturi pretprijelaza (predtranzicije)  $T_p$  (engl. *pretransition*). Pretpostavlja se da su procesi pretprijelaza i glavnog faznog prijelaza dva međusobno povezana fenomena koja zajedno uzrokuju promjenu faze lipida, osim što su vidljivi kao dva odvojena događaja. Zadnja faza lipidne transformacije uzrokovane temperaturom je fluidna faza ( $L_{\alpha}$ ) u kojoj u potpunosti nestaje uređenost lanaca. Temperatura pri kojoj se faza mijenja iz gela ( $L_{\beta'}$ ) u fluid ( $L_{\alpha}$ ) je temperatura mekšanja  $T_m$ . Ta temperatura ovisi o duljini lanaca i njihovom stupnju nezasićenosti te o polarnoj glavi lipida. Što je veća duljina lanaca, to je i  $T_m$  veća jer su van der Waalsove interakcije između lanaca jače. Pojava dvostrukih veza u lancima drastično smanjuje  $T_m$  jer je tada membrana opuštenija te je dvosloj fluidniji. Također, proces mekšanja se događa pri temperaturi karakterističnoj za svaki lipid ovisno i o građi same lipidne glave jer se mogu stvarati različite međumolekulske interakcije, kao što su npr. vodikove veze između polarnih glava i vodenog medija.<sup>3,10</sup>



Slika 5. Faze lipidnih dvosloja koje se javljaju s povišenjem temperature.<sup>3</sup>

## 2. RASPRAVA

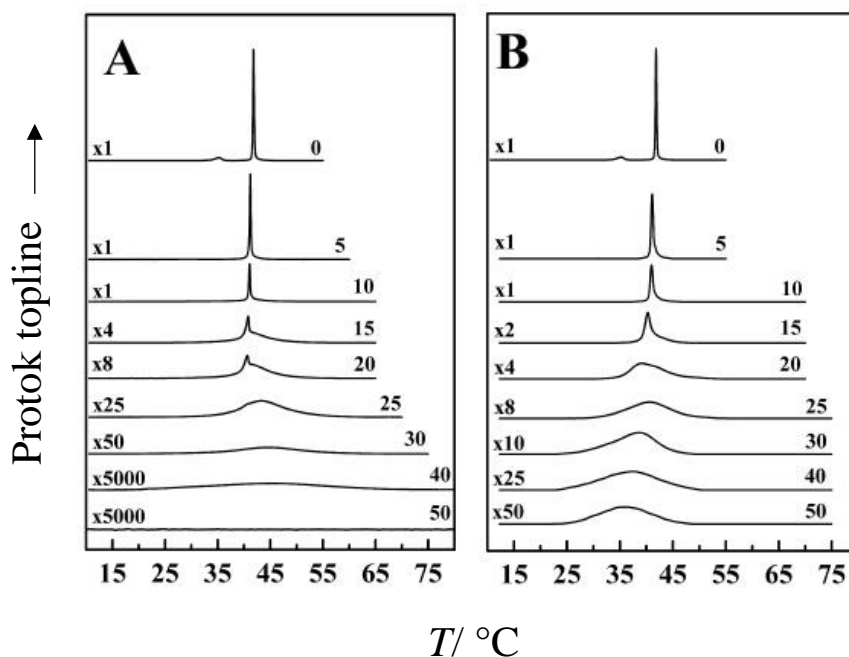
### 2.1. Razlikovna- pretražna kalorimetrija (DSC)

Više različitih analitičkih tehnika mogu poslužiti za praćenje faznih promjena modelnih i bioloških membrana, te za određivanje točne temperature tih prijelaza. Tehnike koje se mogu koristiti imaju različitu teorijsku osnovu te se mogu svrstati u spektroskopske, termičke, mikroskopske i fluorescencijske tehnike.<sup>6,9,12,13</sup> Razlikovna- pretražna kalorimetrija (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC) je jednostavna, ali moćna fizikalna tehnika, pogodna za otkrivanje i termodinamičku karakterizaciju termotropnih faznih promjena membranskih dvosloja, te za određivanje njihovih termodinamičkih parametara. Riječ je o usporednom zagrijavanju (ili hlađenju) uzorka i inertnog referentnog materijala, koji ne pokazuje fazni prijelaz u temperaturnom intervalu koji se promatra. Razlika u brzini zagrijavanja (odnosno hlađenja) između uzorka i referentnog materijala bilježi se kao ovisnost otpuštene (egzotermna reakcija) ili primljene (endotermna reakcija) topline u ovisnosti o temperaturi. Kad god se unutar uzorka dogodi termotropni događaj, dolazi do temperaturne razlike između uzorka i referentne tvari, a instrument ili aktivno mijenja ulaznu snagu u ćeliji s uzorkom kako bi poništio temperaturnu razliku (kalorimetrija kompenzacije snage) ili pasivno bilježi rezultirajuće promjene u brzini protoka topline u ćeliji s uzorkom sve dok se temperaturna razlika na kraju ne poništi (kalorimetrija provodljivosti topline). Termodinamički podaci koje možemo dobiti iz DSC krivulje nalik onoj Gaussovoj raspodjeli, kad je riječ o endotermnom procesu poput faznog prijelaza lipida su:  $T_m$  faznog prijelaza (maksimum signala),  $T_{onset}$  (početak faznog prijelaza),  $T_{m1/2}$  (temperatura na polovici širine signala faznog prijelaza), te  $H$  entalpija fazne promjene (površina ispod signala).<sup>14,15</sup> Velika prednost DSC-a kao analitičke tehnike je jednostavna priprema uzorka, te precizno određivanje termodinamičkih parametara lipidnih membrana dodatkom kemikalije koja se može ugraditi u lipidni dvosloj. Jedan veliki nedostatak tehnici je što može detektirati pomjene u strukturi uzoraka, ali ih ne može povezati s događajima na molekularnoj razini kao na primjer FTIR spektroskopija.<sup>16</sup>

### 2.2. Termotropni odnos sterola i DPPC lipidnog dvosloja

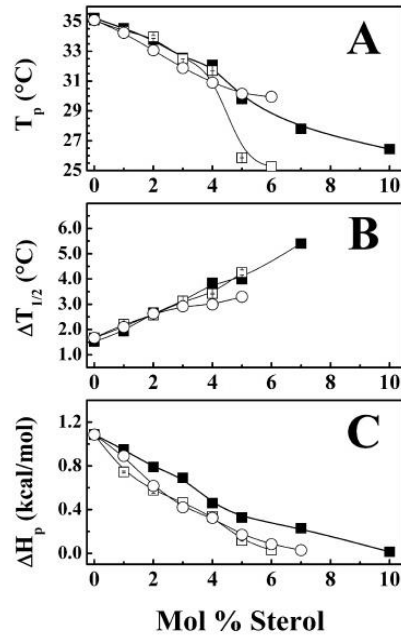
U radu su komentirana DSC mjerenja 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfokolina (DPPC) koji prolazi faznu promjenu zagrijavanjem koja je na DSC krivulji vidljiva kao dva oštra endotermna vrha na temperaturi od 35 i 41,7 °C, što odgovara predtranzicijskom ( $L_{\beta'}$  u  $P_{\beta'}$ ) i glavnom ( $P_{\beta'}$  u  $L_{\alpha}$ ) faznom prijelazu čistog lipida. U binarnim smjesama lipida i sterola, povećanjem koncentracije sterola (latosterola i kolesterola) postupno se proširuje predtranzicija i smanjuje njena temperatura, entalpija i samim tim kooperativnost procesa. Slično je i u slučaju glavnog faznog prijelaza, povećanje koncentracije oba sterola utječe na proširenje DSC endotermne krivulje, što dovodi do smanjenja entalpije te krivulja progresivno pokazuje pomak maksimuma prema nižoj temperaturi (slika 6.). Također, proces fazne promjene gubi svoju kooperativnost. Postoje značajne razlike u obrascu termotropnih događaja uočenih u uzorcima DPPC/ Kol i DPPC/ Lat što ukazuje da je ponašanje potonjeg kvantitativno različito od prvog, unatoč njihovoj sličnoj kemijskoj strukturi.<sup>6,17</sup>





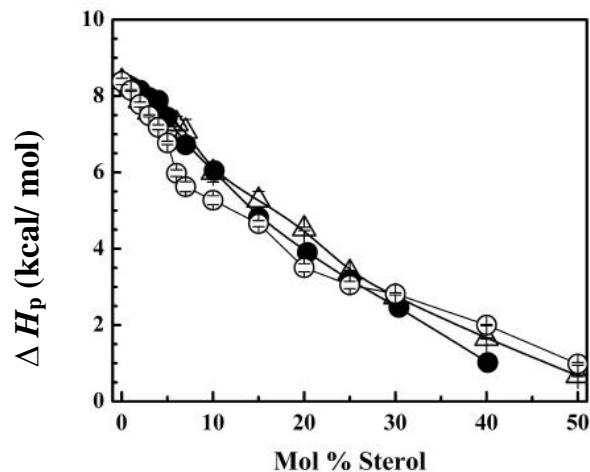
Slika 6. DSC termogrami utjecaja kolesterola (A) i latosterola (B) na faznu promjenu DPPC lipida brzinom  $10^{\circ}\text{C}/\text{h}$ .<sup>6</sup>

Uzorci DPPC/Lat i DPPC/ Kol pokazuju usporedive padove  $T_p$  s povećanjem koncentracije sterola do koncentracija sterola od  $\sim 4$  mol %. Povećanjem koncentracije,  $T_p$  smjese DPPC/Lat naglo se smanjuje za  $7^{\circ}\text{C}$  između 4 i 6 mol % sterola. Suspenzija DPPC/ Kol pokazuje manji pad  $T_p$  pri 4 mol %, koji se smanjuje za  $6^{\circ}\text{C}$  u rasponu koncentracija od 4 do 10 mol % kolesterola, što sugerira da je slična promjena u svojstvima prijelaza raspoređena na šire područje. Odgovarajuće  $\Delta T_{1/2}$  vrijednosti dobivene iz DPPC smjesa koje sadrže ili latosterol (Lat) ili kolesterol (Kol) povećanjem koncentracije sterola u osnovi su identične, jer pri vrlo niskim koncentracijama, na sličan način proširuju DPPC pretprijelaz, unatoč razlikama u položaju dvostruke veze prstena B. Ista analogija vrijedi i za vrijednosti  $\Delta H_p$ , gdje DPPC/ Lat suspenzije slijede padajuću krivulju s povećanjem koncentracije sterola brzinom nešto većom od onih DPPC dvosloja koji sadrže kolesterol. Predtranzicijska entalpija je blizu  $0$  kcal/mol pri koncentraciji latosterola od  $\sim 6$  mol %, a kolesterola od  $\sim 10$  mol%. Dakle, možemo zaključiti da latosterol u molarnoj osnovi učinkovitije prekida predtranziciju DPPC lipida nego kolesterol.<sup>6</sup>



Slika 7. Utjecaj povećanja koncentracije sterola na termodinamičke parametre pretprijelaza DSC krivulja DPPC / Kol (●) i DPPC/ Lat (Δ).<sup>6</sup>

Pri niskim do umjerenim ( $\leq 20$  mol %) koncentracijama sterola, DPPC dvosloji koja sadrže Lat i Kol pokazuju asimetrične termograme koji se mogu dekonvolvirati u dva preklapajuća, simetrična toplinska događaja. Jedna komponenta je znatno oštrija od druge, čija temperatura maksimuma i kooperativnost se lagano smanjuju, a entalpija značajno opada s povećanjem koncentracije sterola. Druga komponenta je znatno šira, te njena temperatura maksimuma pokazuje složeniju ovisnost o strukturi i koncentraciji sterola, i ona je prisutna u širem rasponu koncentracija. Razdvojene komponente jednog faznog prijelaza pripisane su različitom taljenju lipidnih domena u prisustvu ili odsustvu sterola. Jedina značajna razlika u ponašanju DPPC lipida ovisno o koncentraciji dodanog sterola vezana je uz kvantitativni aspekt pripremljenih uzoraka. Dodatkom 50 mol % kolesterola u uzorak DPPC-a dolazi do prekida fazne promjene lipida, dok dodatkom 50 mol % latosterola u DPPC dvosloj, uzorak i dalje prolazi kroz fazni prijelaz jako male entalpije. Iznosi entalpije na početku i kraju samog faznog prijelaza ukazuju da se u DPPC uzorku s kolesterolom učinkovitije prekida taljenje DPPC acilnih lanaca nego u slučaju DPPC/ Lat i to pri višim, fiziološki relevantnim koncentracijama.<sup>6</sup>



Slika 8. Vrijednosti entalpija  $\Delta H_p$  za uzorke DPPC / Kol (●) i DPPC/ Lat (Δ).<sup>6</sup>

### 2.3. FTIR spektroskopija

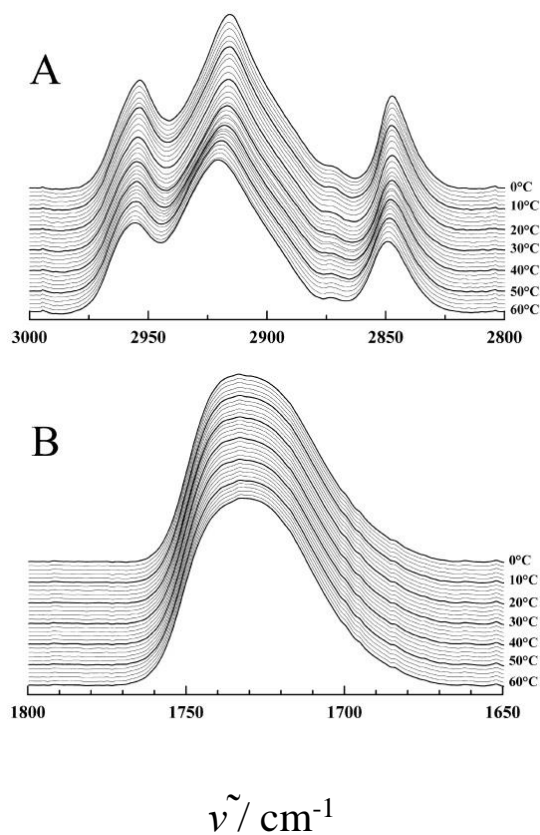
Apsorpcije zračenja u infracrvenom području elektromagnetskoga zračenja u rasponu od  $14000\text{ cm}^{-1}$  do  $20\text{ cm}^{-1}$  odgovaraju promjenama vibracijskih i rotacijskih razina u molekulima, do kojih dolazi kada se frekvencija promjenjivog električnog polja izjednači s razlikom frekvencija vibracijskih i rotacijskih stanja molekule. Drugim riječima, IR zračenjem pobuđuju se prijelazi između vibracijskih stanja molekula, ako u trenutku apsorpcije postoji promjena dipolnog momenta, taj se prijelaz bilježi kao signal u IR spektru. Intenzitet vrpce ovisi o promjeni dipolnog momenta prilikom vibracije odnosno apsorpcije zračenja. Za dobivanje IR spektara u kratkom vremenskom razdoblju zaslužna je primjena Fourierove transformacije (FT).<sup>16,18</sup> FTIR spektar predstavlja ovisnost propuštenog ili apsorbiranog zračenja o valnom broju zračenja čineći vrpce, odnosno apsorpcijske maksimume uzrokovane vibracijama molekule. Položaj vrpce u spektru karakterističan je za vibraciju određene funkcionalne skupine, a ovisi o jačini veze između atoma i o masi atoma sa svake strane veze i dan je relacijom:

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

pri čemu je  $\tilde{\nu}$  valni broj,  $k$  konstanta veze,  $\mu$  reducirana masa, a  $c$  brzina svjetlosti u vakuumu koja iznosi približno  $3 \times 10^8\text{ m s}^{-1}$ .

Uslijed faznog prijelaza lipida dolazi do konformacijske promjene metilenskih ( $-\text{CH}_2-$ ) skupina alkilnih lanaca iz *trans* u *gauche*. U različitoj konformaciji  $-\text{CH}_2-$  skupine apsorbiraju pri drukčijem valnom broju, pa se iz FTIR spektara može odrediti u kojoj se fazi nalaze lipidi. S obzirom na to, fazni prijelaz se može detektirati promjenom položaja i apsorpcije vrpce koje odgovaraju simetričnom ( $\nu_s$ ) i antisimetričnom ( $\nu_{as}$ ) istezanju metilne ( $\text{CH}_3$ ) i metilenske ( $\text{CH}_2$ ) skupine, te deformacijama  $\text{CH}_2$  skupine. Vrpca simetričnog i antisimetričnog istezanja  $\text{CH}_2$  skupine pojavljuje se pri otprilike  $2850\text{ cm}^{-1}$ , odnosno  $2920\text{ cm}^{-1}$ . Ovisno o duljini i kemijskoj strukturi lipidnih ugljikovodičnih lanaca, strukturi polarnih glava lipida, prirodni aditiva koji mogu biti prisutni i o samoj prirodi faznog prijelaza, fazni prijelaz se očituje pomakom valnog broja maksimuma vrpce za  $1,5\text{--}3\text{ cm}^{-1}$ .<sup>19</sup> Povećanjem stupnja neuređenosti lipidnog dvosloja dolazi do smanjenja apsorpcije vrpce. Iako se obje vrpce mogu koristiti za praćenje faznog prijelaza, vrpca pri  $2920\text{ cm}^{-1}$ , koja odgovara  $\nu_{as}\text{CH}_2$  rijeđe se koristi jer postoji mogućnost preklapanja s vrpcom  $\text{CH}_3$  skupine i s Fermijevom rezonancijom prvih tonova strižne vibracije  $\text{CH}_2$  skupine.<sup>14</sup> Kod simetričnog istezanja  $\text{CH}_2$  skupine ( $\nu_s\text{CH}_2$  pri  $2850\text{ cm}^{-1}$ ) ne postoje takva preklapanja vrpce te je zbog toga vrpca simetričnog istezanja metilenske skupine korisnija za analizu faznog prijelaza modelnih i bioloških membrane, kao i za semikvantitativnu karakterizaciju promjena u ugljikovodičnom lancu prilikom fazne promjene. Metilenske deformacijske vibracijske vrpce također se mogu koristiti za detekciju faznog prijelaza. Strižne vibracije i vibracije njihanja ( $\sim 1470\text{ cm}^{-1}$  i  $\sim 720\text{ cm}^{-1}$ ) su osjetljive na lateralne interakcije između *trans*-polimetilenskih lanaca, što može indicirati način pakiranja ugljikovodičnih lanaca u fazi gela. Faznim prijelazom povećava se mobilnost lipida te se širina vrpce tih normalnih modova povećava. Povećanjem *gauche* rotamera smanjuje se duljina segmenata lanca koji su u *trans* konformaciji, uslijed čega se smanjuje intenzitet vrpce, što može dovesti do njihovog nestajanja nakon faznog prijelaza. S dodatnim oprezom se trebaju interpretirati vrpce zibanja metilenskih skupina jer su jako slabe i najčešće se nalaze između mnogo jačih vrpca otapala i/ili IR-aktivnih skupina lipidne polarne glave.<sup>7</sup> Veliki izazov kod karakterizacije faznoga prijelaza modelnih membranskih lipida FTIR spektroskopijom predstavlja prisustvo vodenog medija, koji je jak IR apsorbers i prekriva veći dio IR spektra u području od  $3280\text{ cm}^{-1}$  do  $3920\text{ cm}^{-1}$ , u kojem se javljaju vibracije simetričnog i antisimetričnog istezanja molekule vode ( $\nu_{\text{sym}}\text{OH}$  i  $\nu_{\text{as}}\text{OH}$ ), koje djelomično prekrivaju i vrpce simetričnog i antisimetričnog istezanja metilne i metilenske skupine. Postoji još i dodatna mogućnost korištenja FTIR spektroskopske tehnike u koja se temelji na prigušenoj refleksiji

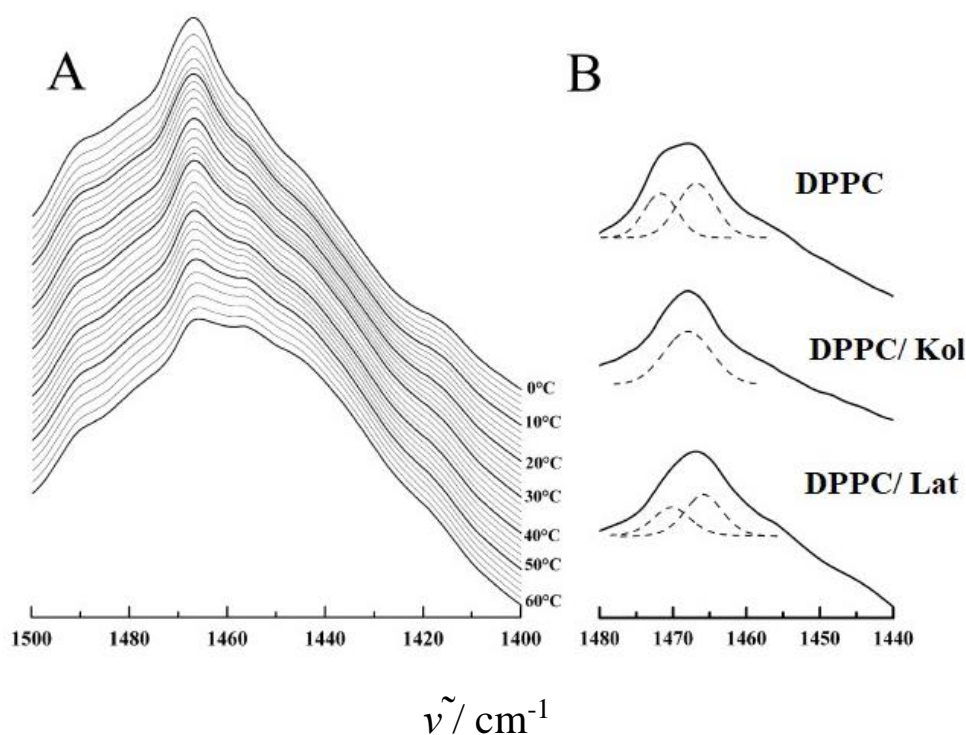
zračenja (engl. *attenuated total reflection*, ATR) tehnika kojom se učinkovito rješava problem intenzivnih vrpci otapala (vode) u spektrima, no istodobno se smanjuje i intenzitet vrpci uzorka.<sup>12</sup>



Slika 9. FTIR spektri 30% mol DPPC/ Lat u temperaturnom intervalu 10– 60 °C. Pod A je prikaz apsorpcijske vrpce C– H istežanja, a pod B je C= O istežanja.<sup>6</sup>

## 2.4. CH<sub>2</sub> deformacijska vrpca

Lipidni dvosloji DPPC-a korišteni za FTIR spektroskopiju sadržavali su 30 mol % sterola, što je dovoljna razina da se izbjegnu nejasnoće između DPPC uzoraka bogatih ili siromašnih sterolom, odnosno dovoljno niske da se latosterol u potpunosti miješa s DPPC-om. Steroli ne sudjeluju u faznom prijelazu fosfolipida i njihovih ugljikovodičnih lanaca zbog čega može doći do nesigurnosti u tumačenju vrpce C–H istežanja (3000–2800 cm<sup>-1</sup>) u smislu konformacije istih. Diskontinuirano povećanje frekvencije (2-5 cm<sup>-1</sup>) i širine (~15%) apsorpcijskih vrpca se primjeti na temperaturi glavnog faznog prijelaza, zbog povećanja *gauche* rotamera ugljikovodičnih lanaca. Glavna karakteristika C–H deformacijske vrpce između 1500 i 1400 cm<sup>-1</sup> je centrirana apsorpcijska vrpca blizu 1465–1472 cm<sup>-1</sup> (slika 10.), koja proizlazi iz metilenske strižne (engl. *scissoring*) vibracije, osjetljive na bočne interakcije između susjednih ugljikovodičnih lanaca lipidnog dvosloja. Pri nižim temperaturama, glavna C–H apsorpcijska vrpca je sa središtem između 1472 i 1466 cm<sup>-1</sup>. Zagrijavanjem uzorka u temperaturnom rasponu od 10 do 60 °C dolazi do širenja vrpce u DPPC uzorcima sa ili bez sterola što se objašnjava povećanjem pokretljivosti metilenskih skupina ugljikovodičnih lanaca lipida tijekom faznog prijelaza iz gela u fluid. Ugradnjom 30 mol % sterola (latosterola i kolestreola) u DPPC dvosloje dolazi do potpune inhibicije stvaranja proširenih domena *trans* ugljikovodičnih lanaca lipida na nižim temperaturama, gdje latosterol samo djelomično utječe na njihovu konformaciju za razliku od kolesterola.<sup>6,7</sup>



Slika 10. FTIR spektri DPPC/ Lat (30% mol) u temperaturnom rasponu od 0– 60 °C (A); utjecaj sterola na CH<sub>2</sub> strižnu deformacijsku vrpca (B).<sup>6</sup>

### 3. ZAKLJUČAK

Važnost sterola, njihove konformacije i interakcije s lipidnim vrstama u membranama ima veliki značaj za biokemijske procese na samoj membrani, kao i u samoj stanici živih organizama. Provedena istraživanja utjecaja odabranih sterola, latosterola i kolesterola, na DPPC lipidne dvosloje korištenjem analitičkih tehnika kao što su razlikovna- pretražna kalorimetrija (DSC) i FTIR spektroskopija implicira da razlika u konfiguraciji prstena B navedenih sterola posljedično ima učinak na prirodu i stehiometriju DPPC- sterol interakcija i ugradnju obje molekule u lipidni dvosloj. S obzirom da kolesterol ima malu površinu poprečnog presjeka te vrlo malu polarnu glavu, potrebna je ugradnja veće količine da bi utjecao na nagib ugljikovodičnih lanaca DPPC lipida, kao i na sami fazni prijelaz. U suprotnom, veća poprečna površina latosterola čini ga sposobnijim u implementaciji među ugljikovodične lance već i pri nižim koncentracijama što je vidljivo i u gel fazi tj. pri nižim temperaturama. Položaj dvostruke veze u strukturi latosterola u odnosu na kolesterol ukida predtranziciju DPPC-a, što je vidljivo u termodinamičkim parametrima iz DSC mjerenja. Interpretacije eksperimentalnih podataka dobivenih proučavanjem sterola s lipidnim dvoslojima mogu biti mnogo kompliciranije nego što se pretpostavlja.<sup>7,20</sup> Rezultati ovog rada ukazuju da prisutnost i položaj dvostruke veze u kolesterolu kao i u njegovom analogu latosterolu mogu biti ključni za fluidnost membrane. Fizička svojstva i interakcije latosterola s fosfolipidnim dvoslojima se razlikuju dovoljno od onih od kolesterola, tako da bi njegov učinak na rast i razvoj stanice nizom biokemijskih i regulatornih mehanizama, mogao biti negativan.<sup>6</sup>

## 4. LITERATURA

1. G. M. Cooper, R. E. Hausman, *Stanica*, Medicinska naklada, Zagreb, 2014, str. 79–82, 483–490.
2. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, W. H. Freeman, New York, 2007, str. 326–345.
3. T. Heimburg, *Thermal Biophysics of Membranes*, Wiley-VCH, Berlin, 2007, str. 1–41, 75–99, 173–189.
4. R. V. Hoffman, *Organic Chemistry 2. Edition*, John Wiley & Sons Inc., New Jersey, 2004, str. 129–139.
5. Cell membrane, 6.2.2014., PHHS Biology, <http://phhsbiology.weebly.com/cell-membrane.html> (datum pristupa 29.4.2022.).
6. M.G. K. Benesch, D. A. Mannoek, R. N. A. H. Lewis, R. N. McElhaney, *Biochemistry* **50** (46) (2011), 9982–9997.
7. T. P. W. McMullen, R. N. McElhaney, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1** (1996) 83–90.
8. B. M. Cabrera-Vivas, J. C. Ramirez, L. M. R. Martinez-Aguila, C. Kubli-Garfias, *THEOCHEM* **584** (2002), 5–14.
9. P. Maleš, Z. Brkljača, D. Domazet Jurašin, D. Bakarić, *Spectrochimica Acta Part A* (2022), 121013.
10. M Stepniewski, A. Bunker, M. Pasenkiewicz-Gierula, M. Karttunen, T. RoćG, *J. Phys. Chem. B* **114** (2010), 11784–11792.
11. K. Akabori, J. F. Nagle, *Soft Matter* **11** (2015), 918–926.
12. B. Peng, X.Y. Ding, C. Sun, Y.N. Yang, Y.J. Gao, X. Zhao, *RSC Adv.* **7** (2017), 29386–29394.
13. K. Ciešlik-Boczula, J. Szwed, A. Jaszczyszyn, K. Gasiorowski, A. Koll, *J. Phys. Chem. B.* **113** (2009) 15495–15502.
14. A. M. Dopico, *Methods in Molecular Biology: Methods in Membrane Lipids* **400**, Humana Press (2006), str. 207–223, 171–195.
15. R. N. McElhaney, *Chem. Phys. Lipids* **30** (1982), 229 – 259.
16. B. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals And Applications*, John Wiley & Sons, West Sussex, 2004, str. 5–15.
17. Thewalt, J. L., and Bloom, M., *Biophys. J.* **63** (1992), 1176–1181.
18. H. Günzler, H.U. Gremlich, *Uvod u infracrvenu spektroskopiju*, Školska knjiga, Zagreb, 2006, str. 23–59.
19. A. M. Bouchet, M. A. Frías, F. Lairion, F. Martini, H. Almaleck, G. Gordillo, E. A. Disalvo, *Biochim. Biophys. Acta* **1788** (2009), 918–925.
20. T. P. W. McMullen, R. N. A. H. Lewis, R. N. McElhaney, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **8** (2004), 459–468.