



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Petra Maleš

**FIZIKALNO-KEMIJSKA SVOJSTVA MODELNIH
LIPIDNIH MEMBRANA MIJELINA U UVJETIMA
DEMIJELINIZACIJE**

DOKTORSKI RAD

Mentorica:

dr. sc. Danijela Bakarić

Zagreb, 2026.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Petra Maleš

**PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF MYELIN
MODEL LIPID MEMBRANES UNDER
DEMYELINATION CONDITIONS**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:

Dr. Danijela Bakarić

Zagreb, 2026.



Doktorska disertacija izrađena je na Zavodu za organsku kemiju i biokemiju, Instituta Ruđer Bošković pod vodstvom dr. sc. Danijele Bakarić u sklopu Poslijediplomskog studija fizikalne kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.



Rad je sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom UIP-2020-02-7669 „Model demijelinizacije na molekularnoj skali pri fiziološkim i patološkim uvjetima“ voditeljice dr. sc. Danijele Bakarić.



Rad je nastao pod pokroviteljstvom Nacionalnog programa L'Oréal-UNESCO „Za žene u znanosti 2025.“ dodjeljen Petri Maleš od L'Oréal Adrije i Hrvatskog povjerenstva za UNESCO pri Ministarstvu kulture i medija za izvrsnost u znanstvenom radu.

ZAHVALA

Sadržaj

SAŽETAK.....	XII
ABSTRACT	XIV
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	4
2.1. Struktura bioloških membrana	4
2.1.1. Vrste lipida u membranskom dvosloju	6
2.1.2. Kolesterol.....	9
2.1.3. Membranski proteini	10
2.2. Mijelin	12
2.2.1. Struktura mijelina	12
2.2.2. Mijelinski bazični protein.....	14
2.2.3. Demijelinizacija	16
2.3. Modeli staničnih membrana.....	18
2.3.1. Samoorganizacija lipida	18
2.3.2. Liposomi.....	20
2.3.3. Primjena liposoma	23
2.4. Fazni prijelazi lipida	24
2.5. Instrumentalne tehnike.....	26
2.5.1. Razlikovno-pretražna kalorimetrija	26
2.5.2. UV-Vis spektroskopija.....	28
2.5.3. FTIR-ATR spektroskopija	30
2.5.4. Dinamičko i elektroforetsko raspršenje svjetlosti	35
2.5.5. Konfokalna mikroskopija	37
2.5.6. CD spektroskopija.....	38
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	40
3.1. Materijali	40
3.2. Priprema liposoma	40
3.3. DLS i ELS	44
3.4. Konfokalna mikroskopija.....	45
3.5. Razlikovno-pretražna kalorimetrija	45
3.6. UV-Vis spektroskopija.....	46
3.7. FTIR-ATR spektroskopija	46

3.8. CD spektroskopija.....	47
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	49
4.1. Veličina, zeta-potencijal i morfologija modelnih membrana	49
4.1.1. DLS, ELS i konfokalna mikroskopija MMM-ova sa zasićenim lancima i kolesterolom	49
4.1.2. DLS, ELS i konfokalna mikroskopija MMM'-ova sa zasićenim lancima bez kolesterola	51
4.2. Termotropna svojstva modelnih membrana	53
4.2.1. Termotropna svojstva MMM-ova sa zasićenim lancima i kolesterolom.....	56
4.2.2. Termotropna svojstva MMM'-ova sa zasićenim lancima bez kolesterola.....	58
4.3. FTIR-ATR spektroskopija modelnih membrana.....	60
4.3.1. Molekulske značajke MMM-ova sa zasićenim lipidima s kolesterolom.....	62
4.3.2. Molekulske značajke MMM'-ova sa zasićenim lipidima bez kolesterola	65
4.3.3. Molekulske značajke MMM-ova s nezasićenim lancima s kolesterolom	69
4.3.4. Molekulske značajke MMM'-ova s nezasićenim lancima bez kolesterola.....	71
4.4. CD spektroskopija modelnih membrana	74
4.4.1. Sekundarne strukture MBP-a kod MMM-ova sa zasićenim lancima i kolesterolom	75
4.4.2. Sekundarne strukture MBP-a kod MMM'-ova sa zasićenim lancima bez kolesterola	78
4.4.3. Sekundarne strukture MBP-a kod MMM-ova s nezasićenim lancima s kolesterolom	80
4.4.4. Sekundarne strukture MBP-a kod MMM'-ova s nezasićenim lancima bez kolesterola	83
§ 5. ZAKLJUČAK	87
§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ (PREMA POTREBI)	89
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	91
§ 8. DODATAK.....	XVI
8.1. DLS, ELS i konfokalna mjerenja (Dodatak poglavlju 4.1.)	xvi
8.1.1. Tablice DLS i ELS mjerenja MMM i MMM' sa zasićenim lancima.....	xvi
8.1.2. DLS i ELS mjerenja MMM i MMM' s nezasićenim lancima.....	xix
8.1.3. Konfokalna mikroskopija uzoraka sa zasićenim lancima	xxii
8.1.4. Konfokalna mikroskopija uzoraka s nezasićenim lancima	xxiii
8.2. DSC krivulje i UV-Vis spektri (Dodatak poglavlju 4.2.)	xxv
8.3. FTIR-ATR spektari (Dodatak poglavlju 4.3.)	xxix
§ 9. ŽIVOTOPIS	XXX

Ova stranica je namjerno ostavljena prazna tako da dokument bude prilagođen za obostrani ispis, a ovaj tekst je potrebno izbrisati prije predaje rad



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

FIZIKALNO-KEMIJSKA SVOJSTVA MODELNIH LIPIDNIH MEMBRANA MIJELINA U UVJETIMA DEMIJELINIZACIJE

Petra Maleš
Institut Ruđer Bošković

Učinkovito provođenje živčanih impulsa omogućeno je mijelinom, višeslojnom membranom čija stabilnost i kompaktnost ovise o lipidnom sastavu i mijelinskom bazičnom proteinu. U ovom radu istražene su interakcije u modelnim mijelinskim membranama koje predstavljaju normalni i promijenjeni mijelin, s naglaskom na utjecaj omjera lipida, (ne)zasićenosti ugljikovodičnih lanaca i kolesterola. Pokazano je da ti parametri značajno određuju termotropna i molekulska svojstva membrana te adsorpciju i konformacijsku prilagodljivost mijelinskog bazičnog proteina. Rezultati kalorimetrijskih, spektroskopskih i mikroskopskih mjerenja upućuju na to da prisutnost mijelinskog bazičnog proteina, ovisno o lipidnom sastavu, različito modulira interakcije u hidrofobnom dijelu membrane i elektrostatske interakcije s fosfatnim skupinama. Uočen je i proteinom induciran proces agregacije membrana, čija veličina ovisi o omjeru lipida, kao i uloga kolesterola u stabilizaciji pojedine faze lipidnog dvosloja. Dobiveni rezultati pružaju novi molekulski uvid u povezanost lipidnog sastava, stabilnosti membrane i funkcije MBP-a te doprinose razumijevanju demijelinizacijskih bolesti.

(101 + XXXIII stranica, 45 + VII slika, 5 + XVII tablica, 198 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: CD/ demijelinizacija/ FTIR/ lipidi/ MBP/ mijelin/ UV-Vis

Mentor: dr. sc. Danijela Bakarić, v. zn. sur.

Rad prihvaćen: 4. ožujka 2026.

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Davor Kovačević
2. prof. dr. sc. Snežana Miljanić
3. dr. sc. Marijana Radić Stojković, zn. savj. IRB

Zamjena: dr. sc. Davor Margetić, zn. savj. u trajnom zvanju



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF MYELIN MODEL LIPID MEMBRANES UNDER DEMYELINATION CONDITIONS

Petra Maleš
Ruđer Bošković Institute

Efficient conduction of nerve impulses is made possible by myelin, a multi-layered membrane whose stability and compactness depend on the lipid composition and myelin basic protein. In this paper, the interactions in model myelin membranes representing normal and altered myelin were investigated, with an emphasis on the influence of lipid ratio, (un)saturation of hydrocarbon chains, and cholesterol. It has been shown that these parameters significantly determine the thermotropic and molecular properties of membranes, as well as the adsorption and conformational adaptability of myelin basic protein. The results of calorimetric, spectroscopic, and microscopic measurements suggest that, depending on the lipid composition, myelin basic protein modulates hydrophobic interactions within the membrane and electrostatic interactions with phosphate groups. A protein-induced membrane aggregation process was also observed, the size of which depends on the lipid ratio, and the role of cholesterol in the stabilization of the particular phase of lipid bilayer is highlighted. The results obtained provide new molecular insight into the relationship between lipid composition, membrane stability, and MBP function and contribute to the understanding of demyelinating diseases.

(101 + XXXIII pages, 45 + VII figures, 5 + XVII tables, 198 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: CD/ demyelination/ FTIR/ lipids/ MBP/ myelin/ UV-Vis

Supervisor: Dr. Danijela Bakarić, Senior Research Associate

Thesis accepted: 4th March 2026.

Reviewers:

1. Prof. Dr. Davor Kovačević
2. Prof. Dr. Snežana Miljanić
3. Dr. Marijana Radić Stojković, Research Advisor RBI

Substitute: Dr. Davor Margetić, Research Advisor RBI

§ 1. UVOD

Mijelin je visoko organizirana, višeslojna biološka membrana koja obavija aksone neurona te omogućuje brzo i energetski učinkovito provođenje živčanih impulsa u središnjem i perifernom živčanom sustavu.¹ Za razliku od plazma membrana, mijelin se odlikuje iznimno visokim udjelom lipida (70–80 %), dok proteini čine preostali dio strukture.² Takav sastav omogućuje stvaranje gusto pakiranih lipidnih dvosloja razdvojenih vrlo tankim vodenim slojevima, čime se postiže visoka električna izolacija i mehanička stabilnost aksona.³ Lipidni sastav mijelina izrazito je specifičan i uključuje kolesterol, fosfolipide i glikosfingolipide u približnom omjeru 40 : 40 : 20.⁴ Kolesterol ima ključnu ulogu u regulaciji lateralne organizacije lipida i faze membrane, dok fosfolipidi poput fosfatidilkolina (engl. *phosphatidylcholine*, PC), fosfatidiletanolamina (engl. *phosphatidylethanolamine*, PE) i fosfatidilserina (engl. *phosphatidylserine*, PS) određuju zakrivljenost, hidrataciju i elektrostatska svojstva dvosloja.⁵ Promjene u omjerima ovih lipida dokazano utječu na stabilnost lamelarne strukture i sklonost membrane prema stvaranju nelamelarnih faza.⁶ Središnji protein mijelina je mijelinski bazični protein (engl. *myelin basic protein*, MBP) koji sudjeluje u adheziji susjednih lipidnih membrana i pripada skupini intrinzično neuređenih proteina (engl. *intrinsically disordered protein*, IDP) obilježenih visokom konformacijskom fleksibilnošću, niskim udjelom hidrofobnih aminokiselina i izraženim pozitivnim neto-nabojem.⁷ Ova svojstva omogućuju MBP-u snažne interakcije s negativno nabijenim lipidima, ali i značajnu osjetljivost njegove sekundarne strukture na sastav i fizikalna svojstva membrane.⁸

Demijelinizacija je ključni proces u nizu neurodegenerativnih i autoimunih bolesti, među kojima je najpoznatija multipla skleroza (MS). U eksperimentalnim modelima eksperimentalnog autoimunog encefalomijelitisa (EAE) kod životinja, bolesti ekvivalentnoj MS-u, zabilježene su značajne promjene u lipidnom sastavu mijelina, osobito povećani udio PE lipida i smanjena funkcionalnost MBP-a.^{4,9} Takve promjene dovode do promjene u interakcijama između lipida i proteina, smanjene kompaktnosti mijelinskih slojeva i povećane osjetljivosti membrane na mehaničke i temperaturne oscilacije.¹⁰ Unatoč intenzivnim istraživanjima, fizikalno-kemijski mehanizmi demijelinizacije na molekularnoj razini još uvijek nisu razjašnjeni. Posebno je nejasno na koji način promjene u lipidnom sastavu, stupnju

zasićenosti ugljikovodičnih lanaca i prisutnosti kolesterola utječu na konformaciju MBP-a i njegovu ulogu u stabilizaciji membrane.^{11,12} U tom kontekstu, uporaba modelnih mijelinskih membrana (MMM) predstavlja iznimno vrijedan eksperimentalni pristup jer omogućuje preciznu kontrolu sastava sustava i izolirano proučavanje pojedinih parametara.^{13,14} MMM, najčešće pripremljene u obliku multilamelarnih liposoma, široko se koriste za proučavanje faznih svojstava lipida, interakcija lipid-lipid i lipid-protein te termodinamičkih svojstava membrana.^{15,16} U kombinaciji s dodatkom MBP-a, takvi sustavi omogućuju kvantitativno i kvalitativno istraživanje adsorpcije proteina, promjena u njenoj sekundarnoj strukturi te utjecaja membrane na konformacijsku heterogenost IDP-a.¹⁷

Cilj ove doktorske disertacije je istražiti utjecaj MBP-a na termotropna i fizikalno-kemijska svojstva lipida u MMM, te razumjeti kako prisutnost ili odsutnost kolesterola oblikuje ove interakcije. Posebna pažnja posvetit će se utjecaju faze lipidne membrane na adsorpciju MBP-a u pri fiziološkim i patološkim uvjetima definiranih različitim omjerom mijelinskih lipida. Dobiveni rezultati preispituju sljedeće hipoteze: adsorpcija MBP-a na MMM-ove razlikuje se u fiziološkim i patološkim uvjetima; prisutnost kolesterola smanjuje interakciju MBP-a s MMM-ovima; te MMM-ovi u fluidnoj fazi jače intereagiraju s MBP-om nego kada su u fazi gela.

U ovom doktorskom radu primijenjen je skup spektroskopskih i analitičkih tehnika s ciljem dobivanja uvida u termotropna i molekulska svojstva MMM-ova i MBP-a. Termotropna svojstva lipidnih dvosloja, koja uključuju prijelaz iz gel-faze (L_{β}) u fluidnu (L_{α}) fazu, standardno je okarakteriziran razlikovno-pretražnom kalorimetrijom (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC). Osim navedene tehnike, korištena je i temperaturno-ovisna UV-Vis spektroskopija.¹⁸ Veličina liposoma i njihov površinski naboj, pri čemu je potonje odraz stabilnosti liposoma, rutinski su određene tehnikama dinamičkog raspršenja svjetlosti (engl. *dynamic light scattering*, DLS) za hidrodinamički promjer i elektroforetskog raspršenja svjetlosti (engl. *electrophoretic light scattering*, ELS) za zeta (ζ)-potencijal. FTIR-ATR spektroskopija korištena je za praćenje vibracija reprezentativnih funkcijskih skupina lipida, posebice normalnih modova metilenskih skupina ugljikovodičnih lanaca, karbonilnih i fosfatnih skupina lipida, čime se dobivaju informacije o interakcijama između lanaca, slaganju lipida, hidrataciji polarnih skupina i faznim prijelazima membrane.^{19,20} Cirkularni dikroizam (CD) primijenjen je za analizu sekundarne strukture MBP-a adsorbiranog na MMM-ove. Za

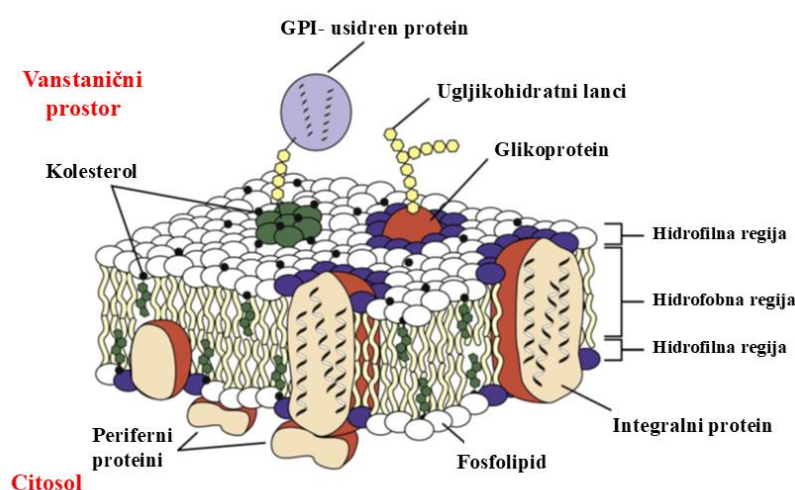
vizualizaciju i morfološku analizu pripremljenih modelnih membrana korištena je konfokalna laserska skenirajuća mikroskopija (engl. *confocal laser scanning microscopy*, CLSM), a koja će se u nastavku teksta nazivati skraćeno samo konfokalna mikroskopija.

Kombinacija ovih tehnika omogućuje kvalitativnu i kvantitativnu karakterizaciju fizikalno-kemijskih i molekulskih svojstava lipidnih membrana i njihove interakcije s MBP-om kroz širok temperaturni raspon, od faznih prijelaza lipida do konformacijskih promjena proteina te mikrostrukturnih organizacijskih obilježja. Dobiveni rezultati doprinose razjašnjavanju uloge lipidnog sastava u promjeni proteinske strukture i predstavljaju temelj za buduća istraživanja usmjerena na demijelinizacijske bolesti, uključujući MS.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Struktura bioloških membrana

Biološke membrane predstavljaju kompleksne i dinamične strukture koje razdvajaju stanični sadržaj od izvanstaničnog prostora te omogućuju prostornu i funkcionalnu organizaciju stanice (slika 1.). Njihova strukturna složenost proizlazi iz velikog broja različitih lipidnih i proteinskih komponenti raspoređenih u membranskom dvosloju, između kojih kooperativno djeluju nekovalentne interakcije elektrostatskog karaktera poput vodikovih veza (engl. *hydrogen bond*, HB) i van der Waalsovih interakcija.²³ Energija ovih nekovalentnih interakcija ($\approx 1\text{--}60 \text{ kJ mol}^{-1}$) znatno je manja u usporedbi s energijom kovalentnih veza ($\approx 200\text{--}800 \text{ kJ mol}^{-1}$), što membranskim sustavima omogućuje visok stupanj konformacijske slobode, fluidnosti i fleksibilnosti.²⁴ Iako su membranski proteini ključni nositelji mnogih specifičnih funkcija membrane, u suvremenoj literaturi sve se više naglašava aktivna uloga lipidnih molekula. Lipidi unutar stanice djeluju kao selektivne fizičke barijere koje povećavaju biokemijsku učinkovitost reakcija i sprječavaju gubitak reakcijskih produkata.³¹

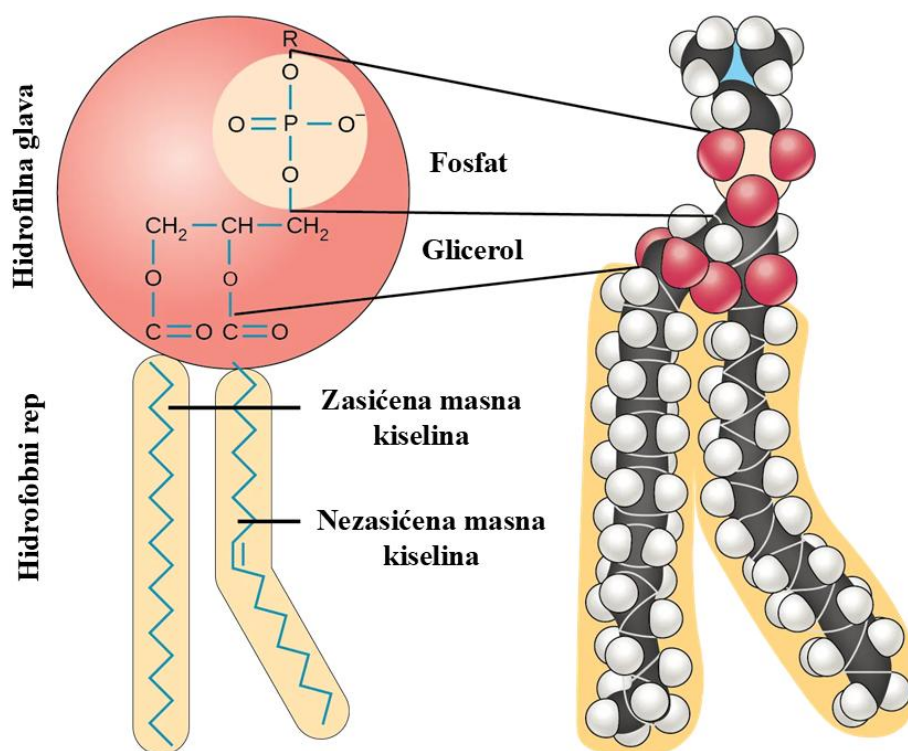


Slika 1. Shematski prikaz stanične membrane. Preuzeto i doradeno.²⁵

Zbog izražene lateralne pokretljivosti lipidnih i proteinskih komponenti, biološke membrane se često opisuju kao dvodimenzionalne otopine, što je konceptualno obuhvaćeno modelom tekućeg mozaika koji su predložili Singer i Nicolson. Prema tom modelu, lipidi i proteini mogu se slobodno gibati unutar ravnine membrane, dok je njihov prijelaz između unutarnjeg i vanjskog sloja membrane izrazito ograničen.²⁶ Posljedica toga je membranska asimetrija, pri čemu se sastav citoplazmatske strane membrane razlikuje od vanjske strane okrenute prema izvanstaničnom prostoru. Asimetrična raspodjela lipida i proteina ima ključnu ulogu u formiranju membranskog potencijala, pri čemu je citoplazmatska strana membrane električki negativnija u odnosu na vanjsku.²⁷ Ovaj potencijal od presudne je važnosti za procese transporta tvari i pretvorbu energije. Nadalje, membranska asimetrija značajno utječe na procese membranske fuzije i fisije, interakcije lipida s proteinima te signalne putove unutar stanice.²⁸ Osim asimetrije, nehomogena lateralna raspodjela lipida i proteina unutar membrane dovodi do stvaranja funkcionalnih domena ili agregata, čija fizikalna svojstva i biološke funkcije ovise o njihovom molekulskom sastavu. Takve domene, uključujući lipidne raftove (engl. *lipid rafts*), sudjeluju u organizaciji signalnih kompleksa i regulaciji membranskih procesa.²⁹

2.1.1. Vrste lipida u membranskom dvosloju

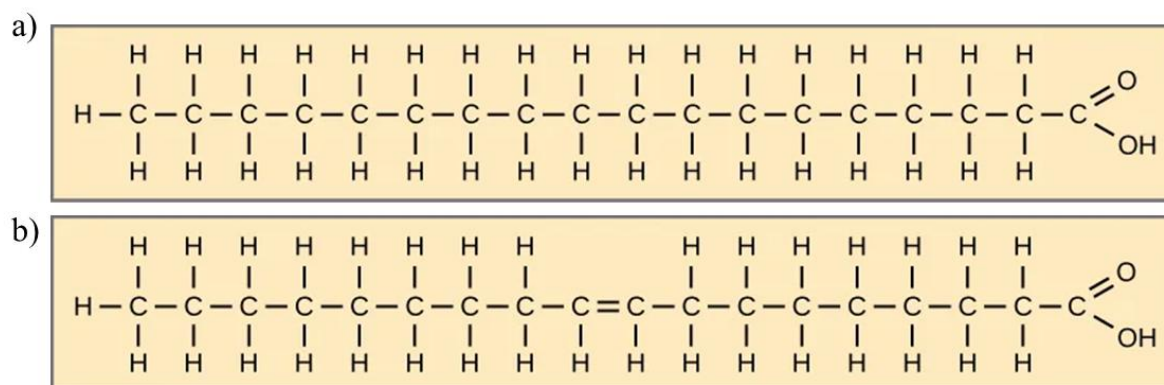
Jedan od literaturnih primjera amfifilnih molekula su lipidi građeni od hidrofobnih repova i hidrofilne glave (slika 2.). Polarne skupine, poput fosfatnih skupina, čine polarne (hidrofilne) glave lipida koje su orijentirane prema vodenom mediju, s kojim stvaraju i HB. Nepolarni (hidrofobni) repovi građeni su od dugih ugljikovodičnih lanaca masnih kiselina te su usmjereni jedni prema drugima, čime se izbjegava njihov kontakt s vodom.^{23,25}



Slika 2. Shematski i strukturni prikaz amfifilne molekule, fosfolipida. Preuzeto i dorađeno.³⁰

Masne kiseline mogu biti zasićene ili nezasićene, ovisno o prisutnosti dvostrukih veza u ugljikovodičnom lancu (slika 3.). Zasićene masne kiseline sadrže isključivo jednostruke veze, dok nezasićene masne kiseline imaju jednu ili više dvostrukih veza. Nezasićene masne kiseline mogu postojati u *cis* ili *trans* konfiguraciji, pri čemu većina masnih kiselina prisutnih u membranskim lipidima ima *cis* konfiguraciju.³¹ *Cis*-dvostruka veza u ugljikovodičnom lancu onemogućava gusto pakiranje lipida, što dovodi do povećanja fluidnosti membrane zbog slabijih van der Waalsovih interakcija između ugljikovodičnih lanaca. Osim stupnja

zasićenosti, duljina ugljikovodičnog lanca predstavlja važno svojstvo masnih kiselina, a time i membrana. U živim organizmima masne kiseline najčešće sadrže između 14 i 24 ugljikova atoma, pri čemu su najzastupljenije masne kiseline s 16 i 18 ugljikovih atoma.^{32,33}



Slika 3. Primjeri struktura masnih kiselina: zasićene, stearinske (a) i nezasićene, oleinske (b).

Preuzeto i dorađeno.³⁰

U literaturi je opisano više klasifikacija lipida, a jedna od najčešće korištenih temelji se na vrsti polarne glave, prema čemu se lipidi dijele na fosfolipide, glikolipide, sfingolipide i sterole. Najzastupljeniji lipidi u biološkim membranama su fosfolipidi, čiju osnovu čini trovalentni alkohol glicerol, na koji su s dvije esterske veze vezana dva lanca masnih kiselina. Treća hidroksilna skupina glicerola esterskom je vezom povezana s fosfatnom skupinom, koja čini polarnu glavu molekule.³⁴ Različite vrste fosfolipida nastaju vezanjem različitih funkcijskih skupina na fosfatnu skupinu, pri čemu se mogu vezati hidroksilne skupine alkohola, aminokiselina serin, glicerol, inozitol, etanolamin, kolin i druge skupine. Navedene funkcijske skupine mogu biti protonirane ili deprotonirane, ovisno o pH vrijednosti medija, pa se mogu pojaviti u kationskom ili anionskom obliku. Većina fosfolipida pokazuje svojstvo kiralnosti, pri čemu se kiralni centar najčešće nalazi na središnjem ugljikovom atomu glicerola.^{33,34}

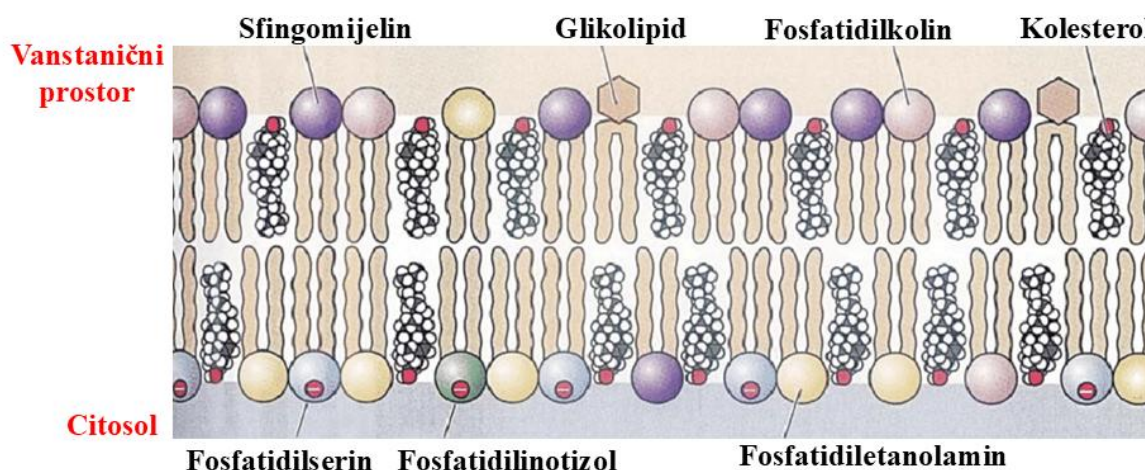
Za razliku od fosfolipida s glicerolom kao okosnicom, sfingolipidi imaju okosnicu građenu od dugolančanog nezasićenog aminoalkohola sfingozina. Primarna hidroksilna skupina sfingozina esterificirana je fosforilkolinom, dok je masna kiselina (najčešće palmitinska ili stearinska) vezana amidnom vezom. Najpoznatiji i najznačajniji membranski sfingolipid je sfingomijelin.³⁵

Osim lipida i proteina, u membranama su prisutni i ugljikohidrati, koji se mogu vezati na lipide tvoreći glikolipide. Njihova je građa slična građi sfingomijelina, uz ključnu razliku da umjesto fosforilkolina sadrže jednu ili više šećernih jedinica, najčešće glukozu ili galaktozu. Šećerni ostaci glikolipida u membranama orijentirani su prema vanstaničnoj strani membrane.³⁶

Steroli predstavljaju posljednju skupinu lipida koji sudjeluju u izgradnji bioloških membrana, a njihovu osnovnu strukturu čini rigidni četveročlani ugljikovodični prsten. Najzastupljeniji sterol u staničnim membranama sisavaca je kolesterol, koji može činiti i do 20 % ukupnog lipidnog udjela eukariotskih membrana.^{24,37} Molekula kolesterola građena je od četiri međusobno povezana ugljikovodična prstena, s ugljikovodičnim lancem na jednom kraju i hidroksilnom skupinom na drugom. U membrani je kolesterol orijentiran paralelno uz repove masnih kiselina fosfolipida, pri čemu njegova hidroksilna skupina ostvaruje interakcije s polarnim glavama fosfolipida. Kolesterol djeluje kao regulator membrane, utječući na njezinu rigidnost i permeabilnost. Poput ostalih sterola, zbog izraženog hidrofobnog karaktera kolesterol ne može samostalno formirati lipidni dvosloj te su u membranama prisutni u kombinaciji s fosfolipidima i sfingomijelinima koji se spontano organiziraju u dvoslojne strukture.³⁸

2.1.2. Kolesterol

U prethodnom potpoglavlju o vrstama membranskih lipida, spomenut je kolesterol, koji je ključna komponenta u eukariotskim membranama jer sudjeluje u regulaciji njihove fluidnosti, stabilnosti i organizacijske heterogenosti. Zbog svoje rigidne i planarne strukture, kolesterol se interkalira između fosfolipidnih ugljikovodičnih lanaca te smanjuje njihovu pokretljivost, čime stabilizira dvosloj i povećava njegovu otpornost na temperaturne promjene (slika 4.).³⁹ Pri nižim temperaturama kolesterol sprječava pretjerano zbijanje lipidnih lanaca, dok pri višim temperaturama ograničava prekomjernu fluidnost membrane, modulirajući prijelaz između gel-faze u fluidnu fazu membrane.³⁵



Slika 4. Kolesterol unutar membranskog dvosloja. Preuzeto i doradeno.²⁴

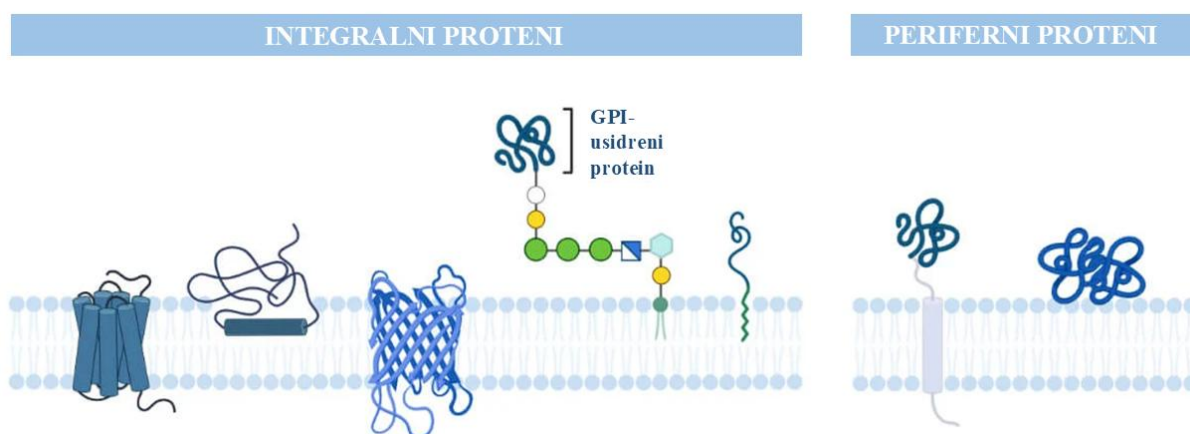
Osim učinka na mehanička svojstva membrane, kolesterol je ključan za formiranje lipidnih raftova.⁴⁰ Ove strukture bogate sfingolipidima i kolesterolom predstavljaju platforme za organizaciju membranskih proteina, uključujući receptore, signalne molekule i proteine zaslužne za transport.⁴¹ Stabilnost ovih domena temelji se na snažnim hidrofobnim interakcijama između kolesterola i zasićenih ugljikovodičnih lanaca sfingolipida, što omogućuje stvaranje „tekuće-uređene“ (engl. *liquid-ordered*) faze s niskom fluidnošću.³¹

U živčanom sustavu kolesterol ima dodatnu ulogu u stvaranju mijelina i njegovoj stabilizaciji. Oligodendrociti zahtijevaju visoke razine kolesterola za pravilnu izgradnju kompaktnih mijelinskih lipidnih dvosloja, a smanjenje njegove dostupnosti dovodi do

strukturnih oštećenja i smanjene funkcionalnosti mijelinske ovojnice. Time kolesterol postaje ne samo osnovna strukturna komponenta, već i regulator organizacijskih i signalnih svojstava membrane.⁴² Patološka stanja povezana s biokemijskim procesima kolesterola dodatno naglašavaju njegovu važnost. Na razini membrane, oksidirani derivati kolesterola, koji se akumuliraju tijekom upalnih procesa i oksidativnog stresa, mogu destabilizirati lipidne dvosloje, pojačati permeabilnost membrane i potaknuti apoptozu, dodatno ugrožavajući strukturnu cjelovitost stanica.⁴³ Sveukupno, kolesterol predstavlja ključnu komponentu ne samo u strukturnom i mehaničkom održavanju membrana, nego i u regulaciji signalnih, razvojnih i regeneracijskih procesa. Njegova pravilna homeostaza nužna je za očuvanje membrane kao dinamične, ali stabilne platforme za staničnu funkciju.⁴⁴

2.1.3. Membranski proteini

Membrane različitih tipova stanica razlikuju se prema relativnim udjelima lipida i proteina, kao i prema njihovom sastavu, što je izravno povezano s funkcijom pojedinih membrana.²⁶ Dok neke membrane, poput unutarnje membrane mitohondrija, sadrže izrazito visok udio proteina, druge, poput mijelinske ovojnice neurona, karakterizira dominantno lipidni sastav.⁴⁵ Membranski proteini sudjeluju u nizu ključnih staničnih procesa, a njihova biološka uloga ovisi o prostornom položaju u membrani, načinu vezanja te interakcijama s lipidnom okolinom.^{23,46} Prema načinu interakcije s membranom, membranski proteini se u osnovi dijele na periferne i integralne (transmembranske) proteine (slika 5.). Periferni membranski proteini vezani su za površinu membrane, najčešće za polarne glave lipida ili za druge membranske proteine, putem elektrostatskih interakcija i HB. Takve interakcije su relativno slabe, zbog čega se periferni proteini mogu reverzibilno ukloniti s membrane promjenom vanjskih uvjeta, poput pH vrijednosti ili ionske jakosti otopine.⁴⁷ Periferni proteini često djeluju kao enzimi, regulatorni proteini ili komponente signalnih puteva te sudjeluju u procesima poput signalne transdukcije, regulacije citoskeleta i modulacije aktivnosti integralnih proteina.^{45,48}



Slika 5. Shematski prikaz vrsta membranskih proteina. Izrađeno u BioRenderu.⁴⁹

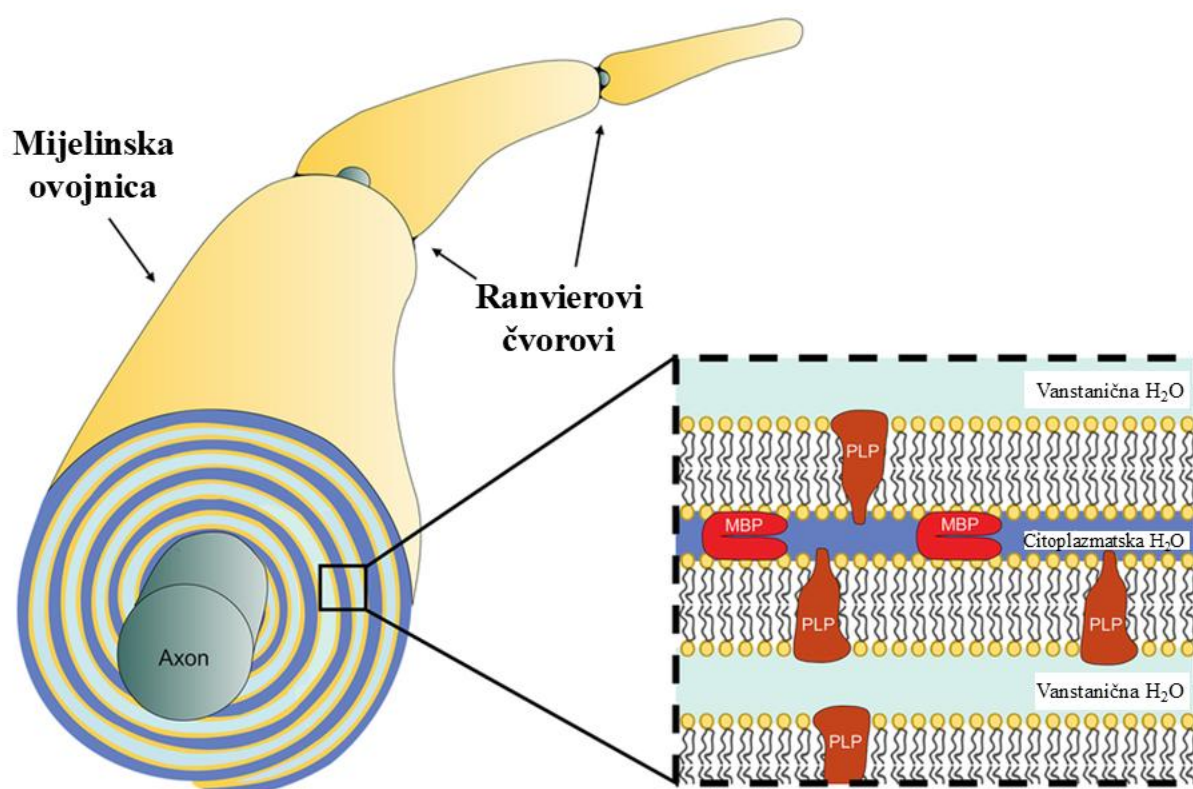
Za razliku od perifernih, integralni ili transmembranski proteini čvrsto su ugrađeni u lipidni dvosloj putem hidrofobnih interakcija između nepolarnih dijelova proteinske strukture i ugljikovodičnih lanaca lipida. Ovi proteini imaju izražen amfifilni karakter, pri čemu se hidrofobne regije, najčešće u obliku jedne ili više α -uzvojnica, protežu kroz hidrofobnu jezgru membrane, dok su hidrofilni dijelovi proteina izloženi vodenom okolišu s vanstanične i citosolne strane membrane.⁴²

Jedna od najvažnijih funkcija transmembranskih proteina je transport tvari kroz membranu. Oni mogu djelovati kao ionski kanali, koji omogućuju pasivni protok iona niz elektrokemijski gradijent, ili kao aktivne proteinske pumpe koje, uz utrošak energije, najčešće u obliku ATP-a, prenose ione i molekule protiv gradijenta koncentracije.⁴⁶ Osim toga, specijalizirani transmembranski proteinski nosači vežu specifičnu molekulu na jednoj strani membrane te je, putem niza konformacijskih promjena, prenose na suprotnu stranu lipidnog dvosloja. Takvi nosači pokazuju visoku selektivnost prema određenim supstratima, poput aminokiselina, šećera ili nukleotida, čime omogućuju preciznu regulaciju unosa i izlaska tvari iz stanice.⁵⁰ Funkcije membranskih proteina iznimno su raznolike i uključuju staničnu signalizaciju, gdje transmembranski receptori omogućuju prijenos informacija iz vanstaničnog okoliša u unutrašnjost stanice, kao i obrnuto. Zbog svoje strukturne i funkcionalne raznolikosti, membranski proteini predstavljaju temeljne elemente bioloških membrana i ključne nositelje njihove funkcionalnosti.⁴⁵

2.2. Mijelin

2.2.1. Struktura mijelina

Mijelin je visoko specijalizirana lipidno-proteinska struktura koja obavija aksone neurona i omogućuje brzu i efikasnu provodljivost živčanih impulsa. Kao kompaktna, višeslojna struktura proizvodi se u oligodendrocitima u središnjem živčanom sustavu, te u Schwannovim stanicama u perifernom živčanom sustavu (slika 6.).¹¹ Ključna značajka mijelina je iznimno visok udio lipida, otprilike 70–80 % njegove suhe mase, što premašuje lipidni udio u ostalim biološkim membranama i osigurava specifična fizikalno-kemijska svojstva potrebna za njegovu biološku funkciju.⁵¹



Slika 6. Shematski prikaz građe aksona i mijelina. Preuzeto i dorađeno.⁵²

Što se tiče sastava lipida, mijelin se dominantno sastoji od kolesterola, fosfolipida i glikolipida. Kolesterol je ključan za stabilnost i čvrstoću mijelinske ovojnice jer svojom ugradnjom između ugljikovodičnih lanaca ostalih lipida, smanjuje fluidnost membrane, omogućujući visok stupanj organiziranosti i smanjenu propusnost mijelinske membrane.⁵³ Fosfolipidi mijelina, među kojima dominiraju fosfatidiletanolamin i fosfatidilkolin, daju membrani amfifilnost te doprinose formiranju dvoslojne strukture membrane mijelina. Iako su manje rigidni od sfingolipida, njihova raznolikost omogućuje finu regulaciju lokalne fluidnosti membrane, što je ključno za interakcije s mijelinskim proteinima.⁵⁴

Galaktocerebrozidi su najpoznatiji glikolipidi i prepoznatljivi markeri mijelina, koji imaju visok stupanj zasićenosti ugljikovodičnih lanaca te se zbog toga snažno pakiraju u membrani. Imaju jako stabilnu gel-fazu što doprinosi rigidnosti mijelinskih lamela. Kombinacija rigidnih i fleksibilnih lipida daje mijelinu jedinstvenu mehaničku stabilnost uz održavanje ograničene, ali funkcionalne dinamike membrane.¹¹

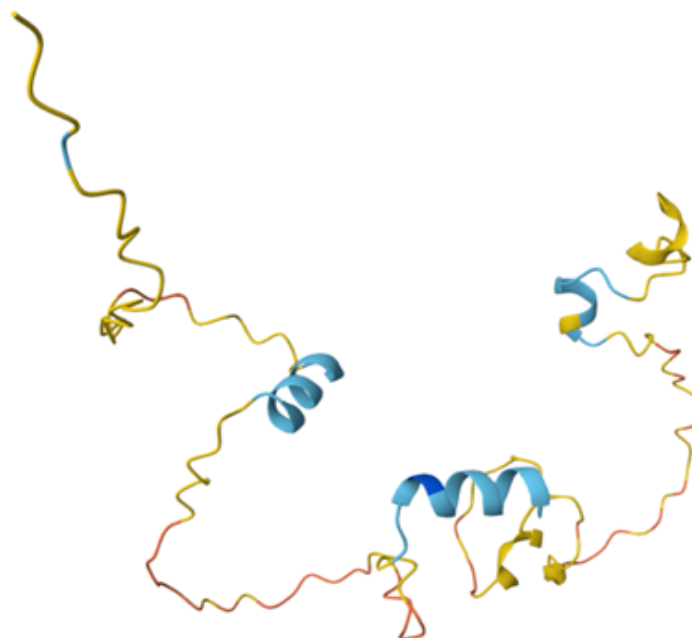
Proteinski udio u mijelinu je oko 20–30 % i ključan je za njegovo formiranje i funkciju. Najzastupljeniji protein u središnjem živčanom sustavu je MBP, dok u perifernom živčanom sustavu dominira transmembranski glikoprotein P0 (engl. *myelin protein zero*) ostvarujući interakcije između svojih imunoglobulinskih domena u ekstracelularnom prostoru, tvoreći stabilne tetramerne komplekse koji mehanički učvršćuju mijelin.⁵⁴ Ovi proteini, zajedno s PLP-om (engl. *proteolipid protein*, PLP), stabiliziraju lamelarnu strukturu mijelina specifičnim elektrostatskim, hidrofobnim i hidrofilnim interakcijama.⁵⁵ Kombinirani učinci lipidnih domena niske fluidnosti i proteinskih adhezivnih kompleksa stvaraju izrazito stabilan supramolekulski sklop, ključan za održavanje električne izolacije aksona i pravilnu provodljivost živčanog signala.⁵⁶ Promjene u lipidnom sastavu ili strukturi mijelinskih proteina narušavaju arhitekturu mijelina i povezane su s procesom demijelinizacije i razvojem patoloških stanja poput MS (više u poglavlju 2.2.3).

2.2.2. Mijelinski bazični protein

MBP jedan je od ključnih strukturnih proteina mijelina središnjeg živčanog sustava i čini približno 30 % ukupnog proteinskog sadržaja mijelinske ovojnice. Riječ je o kationskom, visokopozitivno nabijenom perifernom proteinu smještenom na citoplazmatskoj strani mijelinske membrane, gdje ima presudnu ulogu u stvaranju i održavanju strukture kompaktnih mijelinskih lamela.¹¹ MBP se sintetizira u oligodendrocitima te se specifično usmjerava prema mjestima aktivne mijelinizacije, što uključuje strogo reguliran transport mRNA i lokaliziranu translaciju u mijelinskim procesima.⁵⁷

Strukturno, MBP pripada skupini intrinzično nestrukturiranih proteina (engl. *intrinsically disordered protein*, IDP). U vodenoj otopini pokazuje visok stupanj konformacijske fleksibilnosti, no pri vezanju na membrane bogate kiselim fosfolipidima povećava se udio α -helikalne strukture. Ova indukcija sekundarne strukture ključna je za njegovu funkciju "molekulskog ljepila". Pozitivno nabijeni ostaci lizina i arginina stvaraju snažne elektrostatske interakcije s negativno nabijenim fosfatnim skupinama PS i fosfatidilinozitola (engl. *phosphatidylinositol*, PI), neutralizirajući međumembransko odbijanje i omogućujući prijanjanje dvaju citoplazmatskih lipidnih dvosloja.⁵⁸ MBP je također uključen u regulaciju dinamike lipida unutar mijelinske membrane. Njegova sposobnost interakcije sa sfingolipidima i kolesterolom pridonosi segregaciji stabilnih lipidnih domena niske fluidnosti, što dodatno učvršćuje mijelinske lamele.⁵⁹ Osim uloge u stabilnosti membrane, MBP sudjeluje u signalnim procesima unutar oligodendrocita, inteeagira s citoskeletnim proteinima, poput aktina, te s regulatornim molekulama kao što su kalmodulin i protein kinaza C, što upućuje na širu funkciju u organizaciji mijelinskih procesa.^{11,54}

Postoje brojne izoforme MBP-a nastale procesom alternativnog izrezivanja (engl. *alternative splicing*), među kojima je najistraženija 18,5 kDa izoforma (slika 7.). Izoforme se razlikuju po naboju i afinitetu prema lipidima te time sudjeluju u finoj regulaciji strukture mijelina u različitim razvojnim fazama.⁶⁰

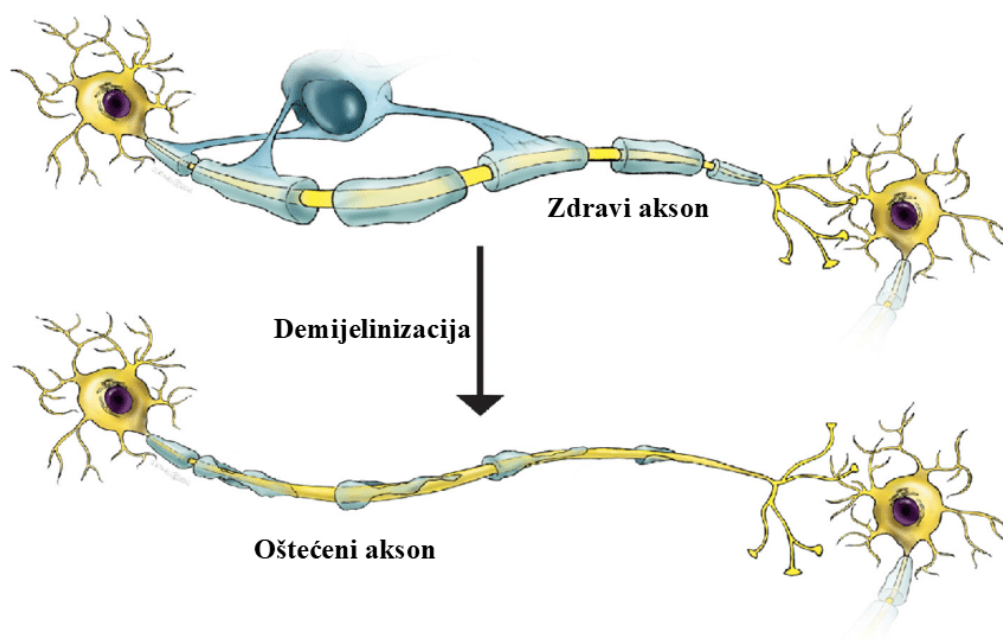


Slika 7. Model mijelinskog bazičnog proteina goveda preuzet iz AlphaFold proteinske strukturne baze (struktura: P02687).⁶¹

U patološkim stanjima poput MS-a dolazi do posttranslacijske modifikacije MBP-a, osobito deaminacije (pretvorbe arginina u citrulin), koja smanjuje njegov pozitivan naboj i narušava stabilnost interakcije s membranom. MBP je stoga ključni faktor u ravnoteži između stabilnosti i dinamike mijelinskih lamela, te je razumijevanje molekulskih mehanizama djelovanja MBP-a ključno za shvaćanje procesa stvaranja mijelina (mijelinizacije) i patogeneze demijelinizacijskih bolesti.

2.2.3. Demijelinizacija

Demijelinizacija je biokemijski proces koji uzrokuje oštećenje ili gubitak mijelinske ovojnice, pri čemu dolazi do narušavanja njene kompaktne lamelarne strukture koja je ključna za učinkovitu provodljivost živčanih impulsa (slika 8.). Budući da su fizikalno-kemijska svojstva lipida i proteina mijelina te njihove međusobne molekulske interakcije od presudne važnosti za stabilnost mijelinskih lamela, svaka promjena u sastavu ili strukturi tih komponenti može pokrenuti proces demijelinizacije. Posebno su važni poremećaji u lipidnim domenama bogatim kolesterolom i sfingolipidima, kao i disfunkcija MBP-a, koji služi kao primarni stabilizator citoplazmatskih mijelinskih membranskih površina.^{62,63,64} Budući da je MBP ključan za održavanje kompaktnosti putem elektrostatskih interakcija s negativno nabijenim fosfolipidima, njegove strukturne ili kemijske promjene mogu oslabiti međuslojne interakcije te dovesti do razdvajanja lamela.⁶² Posttranslacijske modifikacije MBP-a, posebice deaminacija argininskih ostataka u citrulin, smanjuju njegov pozitivan naboj i afinitet prema lipidnim dvoslojima. Ovaj proces je dokumentiran kod MS-a, te je povezan s oslabljenim vezanjem MBP-a na membranu i povećanom osjetljivošću mijelina na mehanička i imunološka oštećenja. Uz to, citrulinirani MBP postaje snažnije imunogen, što može potaknuti autoimunu reakciju i daljnju destrukciju mijelina.⁶⁵



Slika 8. Prikaz oštećenja aksona uzrokovano procesom demijelinizacije.⁶⁶

Uloga lipida u procesu demijelinizacije jednako je važna. Poremećaji metabolizma kolesterola ili glikolipida mogu narušiti stabilnost lipidnih domena niske fluidnosti koje tvore osnovu kompaktnih lipidnih dvosloja. Primjerice, smanjenje razine kolesterola u oligodendrocitima, rezultira slabijom organizacijom mijelinskih dvosloja i povećanom propusnošću membrane, što čini mijelin osjetljivijim na oksidativni stres i upalne citokine.⁴² Upalni i autoimuni procesi često su inicijatori ili akceleratori demijelinizacije. Kod MS-a infiltracija T-limfocita i makrofaga u središnji živčani sustav dovodi do otpuštanja citokina, slobodnih radikala i proteaza koje ciljaju mijelin i oligodendrocite. Proteolitička razgradnja MBP-a i PLP-a dodatno narušava cjelovitost lamela i ubrzava gubitak mijelinske ovojnice.⁶⁷ Demijelinizacija se javlja i u perifernom živčanom sustavu, primjerice kod Charcot–Marie–Toothove bolesti, nasljedne neuropatije koja često uključuje mutaciju gena za P0 protein čime se mijenja njegova sposobnost adhezije u mijelinskoj membrani.⁶⁸ Demijelinizaciju mogu uzrokovati i upalni procesi, poput onih u Guillain–Barréovu sindromu, u kojem antitijela napadaju Schwannove stanice i mijelin perifernih živaca zbog molekulske mimikrije bakterijskih antigena.^{69,70}

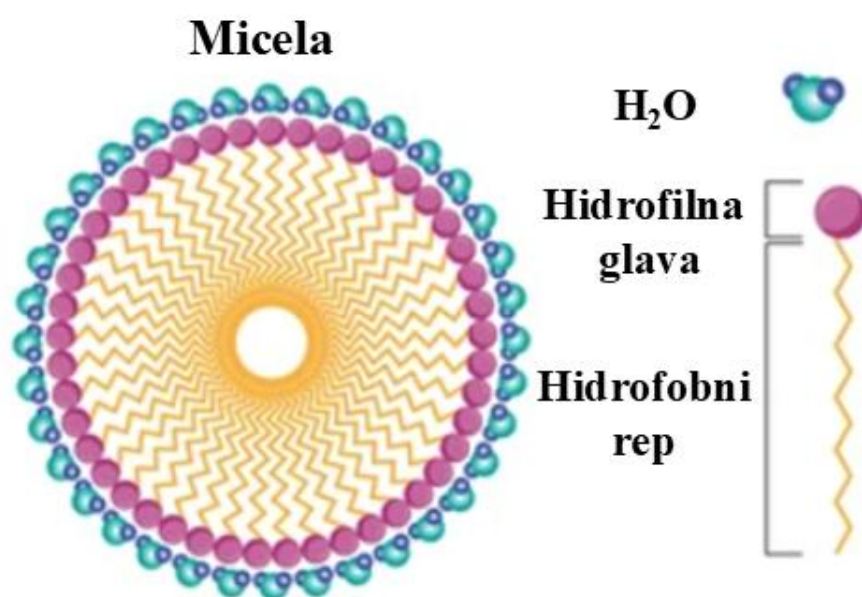
Bez obzira na uzrok, demijelinizacija vodi do usporene ili blokirane aksonske provodljivosti živčanog impulsa. Dugotrajna demijelinizacija može rezultirati sekundarnom degeneracijom aksona zbog gubitka metaboličke potpore koju oligodendrociti normalno pružaju.^{71,72} Shodno tome, razumijevanje molekulskih mehanizama demijelinizacije ključ je za razvoj terapijskih pristupa usmjerenih na stabilizaciju mijelina i poticanje remijelinizacije, odnosno procesa stvaranja mijelina.⁷³

2.3. Modeli staničnih membrana

2.3.1. Samoorganizacija lipida

Kompleksnost strukture bioloških membrana, kao i tehnički izazovi povezani s njihovom izolacijom i stabilnim očuvanjem iz prirodnog okruženja, doveli su do razvoja biomimetičkih, odnosno modelnih membranskih sustava. Takvi sustavi omogućuju sustavno i kontrolirano ispitivanje fizikalno-kemijskih svojstava lipidnih dvosloja, čija se morfologija i sastav mogu precizno definirati te mogu uključivati različite vrste lipida, proteina i ugljikohidrata. Modelne membrane stoga predstavljaju ključni alat za razumijevanje osnovnih mehanizama organizacije, stabilnosti i funkcije bioloških membrana.⁷⁴ Lipidi u vodenom okolišu spontano podliježu procesu samoorganizacije u agregate različitih oblika i veličina, što je izravna posljedica njihovog amfifilnog karaktera. Polarni, hidrofilni dijelovi lipidnih molekula ostvaruju interakcije s molekulama vode, prvenstveno putem HB, dok hidrofobni ugljikovodični lanci nastoje izbjeći vodeno okruženje te međusobno ostvaruju hidrofobne interakcije. Takav prostorni raspored molekula dovodi do povećanja ukupne entropije sustava, osobito oslobađanjem molekula vode iz uređenih hidratacijskih omotača, čime proces samoorganizacije postaje termodinamički povoljan i spontan.^{25,75}

Ključni parametri koji određuju vrstu i stabilnost lipidnih agregata su koncentracija lipida, temperatura te njihova molekulska struktura, uključujući duljinu i zasićenost ugljikovodičnih lanaca te prirodu polarne glave. Pri vrlo niskim koncentracijama lipidi se u vodenom mediju nalaze u obliku monomera, dok lipidi s jednim ugljikovodičnim lancem, poput surfaktanata, iznad kritične micelarne koncentracije (engl. *critical micelle concentration*, CMC) spontano tvore micle različite morfologije.^{25,35} U sfernim micelama hidrofobni ugljikovodični lanci orijentirani su prema unutrašnjosti agregata, gdje su zaštićeni od vode, dok se hidrofilne polarne glave nalaze na površini u izravnom kontaktu s vodenom fazom (slika 9.).



Slika 9. Shematski prikaz micela. Izrađeno u BioRenderu.⁴⁹

Pojedinačna micela može sadržavati od nekoliko desetaka do nekoliko tisuća lipidnih molekula, ovisno o njihovoj strukturi i uvjetima u otopini. Povećanjem koncentracije lipida ili promjenom geometrije molekule, agregati mogu poprimiti izdužene ili planarno organizirane strukture, uključujući lipidne dvosloje.³⁵

Za razliku od micela, lipidni dvosloj sastoji se od dvaju sučeljenih monomolekulskih slojeva u kojima su hidrofobni lanci usmjereni jedni prema drugima, dok su hidrofilne polarne glave izložene vodenoj fazi s obje strane membrane. Upravo takva organizacija čini lipidni dvosloj osnovnim strukturnim elementom bioloških membrana te ga čini posebno prikladnim modelnim sustavom za njihovo proučavanje.⁷⁶ Jedan od često korištenih modelnih sustava su lipidni dvosloji vezani na čvrsti nosač (engl. *supported lipid bilayer*, SLB), koji se sastoji od jednog kontinuiranog lipidnog dvosloja fiksiranog na površinu čvrstog supstrata. Kao nosači najčešće se koriste materijali poput stakla, silicijevog dioksida ili tinjca, koji osiguravaju glatku i kemijski stabilnu podlogu.⁷⁷ Lipidni dvosloj može biti vezan za nosač izravno putem van der Waalsovih sila, ionskih mostova ili kovalentnih veza, ili pak odvojen tankim hidratacijskim slojem vode ili hidratiziranih polimera, što omogućuje očuvanje lateralne pokretljivosti lipida.^{78,79} SLB sustavi rutinski se pripremaju Langmuir–Blodgettovom i Langmuir–Schaeferovom depozicijom, metodama karakterističnima za pripravu tankih filmova na čvrstim podlogama. Langmuir–Blodgettovom tehnikom monomolekulski sloj lipida s međupovršine

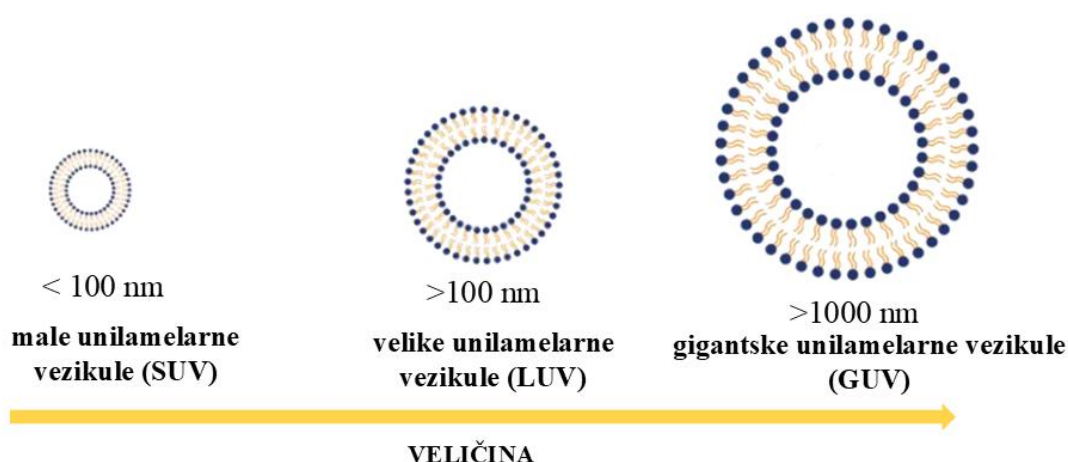
zrak/voda prenosi se na čvrsti nosač kontroliranim vertikalnim uranjanjem supstrata u lipidni film. Ponovljenim uranjanjem moguće je formirati višeslojne strukture, pri čemu broj i organizacija slojeva ovise o sastavu lipida, sastavu podfaze te eksperimentalnim uvjetima.^{80,81}

U odsustvu čvrstog supstrata, doticaj vodenog medija s rubovima hidrofobnih regija lipidnih dvosloja dovodi do energetski nepovoljne izloženosti hidrofobnih lanaca vodi, što rezultira nestabilnošću planarne strukture dvosloja. Kako bi se smanjila slobodna energija sustava, lipidni dvoslojevi spontano se zatvaraju u liposome, zatvorene sferične strukture. Ovaj proces vođen je hidrofobnim učinkom i predstavlja termodinamički povoljan oblik samoorganizacije amfifilnih lipidnih molekula u vodenom okolišu.^{34,82}

2.3.2. *Liposomi*

Liposomi su sferične strukture građene od jednog ili više lipidnih dvoslojeva poredanih koncentrično, između kojih se nalaze slojevi vode. Objašnjavaju se kao vezikularne strukture pa su često sinonim samim vezikulama, te se smatraju metastabilnim koloidnim sustavima čije se dimenzije kreću u rasponu od približno 10 nm do 10 µm. Tijekom njihove pripreme hidrofilne polarne glave lipida orijentiraju se prema unutarnjoj i vanjskoj vodenoj fazi, dok su hidrofojni ugljikovodični lanci usmjereni jedni prema drugima u unutrašnjosti membrane, čime se učinkovito izbjegava njihov kontakt s vodom. Takva organizacija rezultira strukturom koja u velikoj mjeri oponaša arhitekturu bioloških membrana.^{25,76}

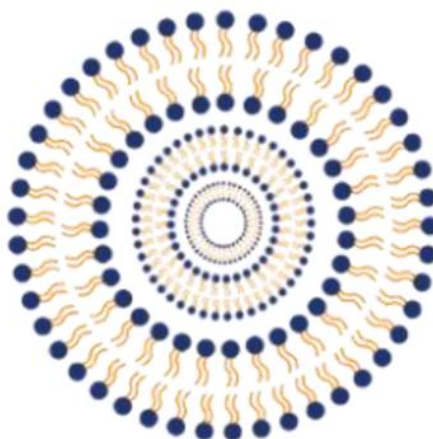
Klasifikacija liposoma temelji se ponajprije na njihovoj veličini i lamelarnosti, odnosno broju lipidnih dvoslojeva u strukturi. Jednoslojne ili unilamelarne vezikule dijele se prema promjeru na male unilamelarne vezikule (engl. *small unilamellar vesicles*, SUV) veličine 30–100 nm, velike unilamelarne vezikule (engl. *large unilamellar vesicles*, LUV) većih od 100 nm, te gigantske unilamelarne vezikule (engl. *giant unilamellar vesicles*, GUV) veće od 1000 nm (slika 10).⁸³



Slika 10. Shematski prikaz unilameralnih vezikula prema porastu veličine. Preuzeto i dorađeno.⁸⁴

Multilamelarni liposomi (engl. *multilamellar vesicles*, MLV) predstavljaju klasičan i široko prihvaćen modelni sustav u istraživanjima bioloških membrana. Strukturno se sastoje od više koncentričnih lipidnih dvoslojeva razdvojenih tankim vodenim slojevima (slika 11.), pri čemu njihov promjer može varirati od nekoliko stotina nanometara do nekoliko mikrometara.⁸⁵ Zbog takve slojevite organizacije, MLV sustavi omogućuju istodobno proučavanje svojstava pojedinačnih lipidnih dvoslojeva i međuslojnih interakcija, što ih čini posebno pogodnima za istraživanje kompleksnih membranskih struktura. Zbog svoje relativno jednostavne pripreme, stabilnosti i mogućnosti precizne kontrole lipidnog sastava, MLV sustavi omogućuju sustavno proučavanje fizikalnih svojstava membrana, uključujući fazno ponašanje lipida, lateralnu organizaciju alkilnih lanaca te interakcije lipida i proteina.⁸⁶

U istraživačkom kontekstu, multilamelarni liposomi se često koriste kao kontrolirani modeli za ispitivanje interakcija lipida i proteina, budući da omogućuju ugradnju perifernih i integralnih membranskih proteina bez značajne perturbacije ukupne lamelarne strukture.^{87,88} Njihova primjena obuhvaća proučavanje mehanizama vezanja proteina na membrane, promjena u organizaciji lipidnih dvoslojeva induciranih proteinima te utjecaja ionske jakosti, pH vrijednosti i sastava membrane na stabilnost sustava.⁸⁹ Zbog tih svojstava, MLV-ovi predstavljaju nezaobilazni alat u biofizici membrana, osobito u istraživanjima koja zahtijevaju strukturno relevantan, ali eksperimentalno jednostavan sustav.^{14,17,90}



**multilamelarne vezikule
(MLV)**

Slika 11. Shematski prikaz multilamelarne vezikule (MLV). Preuzeto i doručeno.⁸⁴

U kontekstu biomimetike staničnih membrana, liposomi predstavljaju jedan od najčešće korištenih modelnih membranskih sustava jer omogućuju kontrolirano proučavanje fizikalno-kemijskih svojstava lipidnih dvoslojeva sastavljenih od prirodnih i/ili sintetskih fosfolipida. Ovisno o tome modeliraju li se prokariotske ili eukariotske membrane, koriste se različite kombinacije lipida. Za modeliranje prokariotskih membrana često se koriste negativno nabijeni fosfolipidi poput fosfatidilglicerola (engl. *phosphatidylglycerol*, PG), primjerice 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol (engl. *1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol*, DPPG), 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol (engl. *1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol*, POPG), 1,2-dioleil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol (engl. *1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol*, DOPG), 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol (engl. *1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol*, DMPG).^{19,91} Nasuprot tome, modelne membrane eukariotskih stanica najčešće se temelje na fosfolipidima zwitterionske prirode, poput PC i PE lipida, i negativno nabijenih PS lipida (u rasponu fizioloških pH vrijednosti) PS i fosfatidilglicerola (engl. *phosphatidylglycerol*, PG). Takvi sustavi su često u kombinaciji s kolesterolom, koji značajno utječe na mehanička i dinamička svojstva membrane.²⁹ Najstarija i eksperimentalno najjednostavnija metoda pripreme liposoma jest hidratacija suhog lipidnog filma. U tom postupku lipidi se najprije otapaju u organskom otapalu koje se uklanja uparavanjem, pri čemu na stijenkama posude ostaje tanki lipidni film. Dodavanjem vodenog

medija dolazi do hidratacije filma i spontanog stvaranja liposoma. Temperatura procesa mora biti iznad temperature faznog prijelaza lipida kako bi se osigurala dovoljna fluidnost lanaca. Ovom metodom najčešće nastaju multilamelarni liposomi široke raspodjele veličina, odnosno velikog koeficijenta polidisperznosti.⁹² Ova metoda je korištena u ovom radu i detaljnije je opisana u Eksperimentalnom dijelu (poglavlje 3.2.).

2.3.3. Primjena liposoma

Minimalne promjene u debljini, fluidnosti, permeabilnosti i naboju membrane mogu narušiti njenu strukturu i svojstva, što posljedično može dovesti do gubitka njene funkcije. Stoga su istraživanja svojstava membrana na jednostavnijim modelima ključna u razjašnjavanju fizikalno-kemijskih promjena na membranama, uzrokovanih vanjskim faktorima i/ili interakcijom s drugim molekulama.⁹³ Stoga se liposomi i lipidni dvoslojevi na nosaču često koriste SLB u proučavanju sastava, morfologije i struktura membrana.^{94,95,96} Liposomi se zbog svog oblika još nazivaju *lipidnim mjehurićima* te se kao takvi primjenjuju u području farmakološke nanotehnologije, najčešće kao vezikule za prijenos lijekova unutar stanica ili između stanica.⁹⁷ Osim prijenosa lijekova koriste se i u njihovom razvoju, primjerice za određivanje količine efektivnog djelovanja, toksičnosti i mehanizma utjecaja lijeka na membranu. Promjene u strukturi lipidnih dvoslojeva uzrokovane toksičnim djelovanjem određenih spojeva usmjeravaju istraživanja interakcija lipida i lijekova prema određivanju koncentracija pri kojima lijek pokazuje toksično djelovanje.^{98,99}

Liposomi se primjenjuju u istraživanju interakcija lipidnih molekula s drugim staničnim molekulama, kao i u mnogim istraživanjima utjecaja kolesterola na lipidne domene unutar membrana. Termodinamički parametri faznih prijelaza mnogih lipida određeni su korištenjem modelnih membrana, kao i utjecaj kolesterola na fazni prijelaz.^{100,101} Lewis i McElhaney su još od 1980-ih godina objavili niz publikacija u kojima su pratili utjecaj sterola (većinom kolesterola i njegovih prekusora) na liposome priređene od različitih lipida; primjerice, korištenjem FTIR spektroskopije pratili su promjene u organizaciji i kemijskoj konfiguraciji liposoma građenih od 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfokolina (DPPC), kolesterola ili lanosterola, kao i njihova termotropna svojstva pomoću razlikovno-pretražne kalorimetrije.^{102,103}

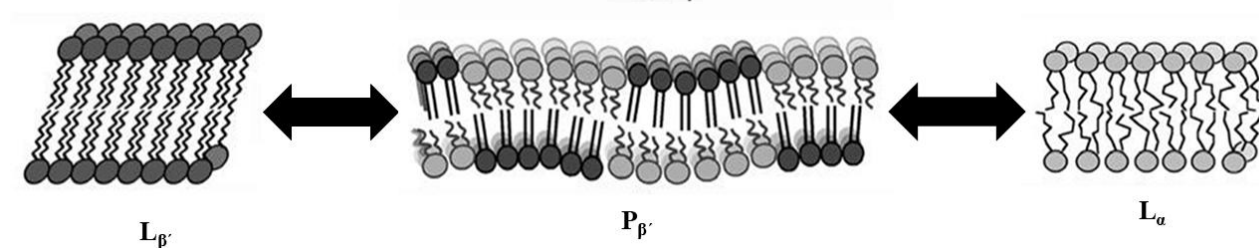
2.4. Fazni prijelazi lipida

Membranski sustavi predstavljaju dinamične strukture čija su svojstva uvelike određena fizikalno-kemijskim faktorima okoline, poput pH vrijednosti, temperature, tlaka te kemijskog potencijala različitih iona.³⁴ Promjenom navedenih faktora može doći do destabilizacije postojećih lipidnih agregata ili do formiranja novih strukturnih oblika.³⁵ Proučavanje utjecaja temperature na strukturu i dinamiku membranskog lipidnog dvosloja omogućuje analizu dviju faza: gel-faze (uređene faze) i fluidne (neuređene) faze, koje su najtemeljitije istražene na PC-lipidnim dvoslojima, osobito na DPPC-u.¹⁰⁴

Najvažnija odlika gel-faze ($L_{\beta'}$) kod DPPC lipida su metilenske skupine ugljikovodičnih lanaca u *trans*-konfiguraciji s postojanim van der Waalovim interakcijama. Također, lipidi mogu biti nagnuti pod određenim kutem koji ovisi o skupini koja čini glavu lipida. Primjerice, PE-lipidi ne pokazuju nikakav nagib, za razliku od (DP)PC-lipida koji pokazuju nagib od 30° u odnosu na os simetrije pa se gel-faza PE-lipida označava bez 'u indeksu. Daljnjim porastom temperature, DPPC lipidni dvoslojevi prelaze u valovitu ($P_{\beta'}$) fazu u kojoj se na površini dvosloja stvaraju nabori (engl. *ripples*), dugački većinom 15–30 nm. Uzrok nastanka nabora još nije u potpunosti razjašnjen. Međutim, dvije najznačajnije teorije navode da nastaju ili zbog koegzistencije lipida u fazama gela i fluida ili zbog promjene u slaganju molekula lipida u fazi gela.^{105,106,107} Ova faza nastaje prije glavnog faznog prijelaza, pri temperaturi pretprijelaza (engl. *pretransition*, T_p), i odlikuje je niži stupanj uređenosti lipidnih lanaca. Većina lipida u ovoj fazi i dalje sadrže samo masne kiseline s *trans*-konfiguracijom alkilnih lanaca kao i u gel-fazi.¹⁰⁸ Pojava ove faze znatno ovisi o vrsti glave lipida i otapala. PE i glikolipidi nemaju promjenu prije glavnog faznog prijelaza dok je promjena uočena kod nekih PC i PG lipida. Većina istraživanja ove faze provedena je na MLV-ovima, iako postoje dokazi o pojavi nabora i kod LUV-ova, ali uz manju kooperativnost faznih prijelaza.³⁵ Kod MLV-ova nabori se mogu jednostavno detektirati difrakcijskim tehnikama, dok je kod LUV-ova proces detekcije otežan upravo zbog nižeg stupnja kooperativnosti, koji je jako izražen kod LUV-ova.^{109,110}

Smatra se da su proces pretprijelaza i glavni fazni prijelaz međusobno povezani fenomeni koji zajednički doprinose promjeni faze lipida, iako se kod pojedinih lipida eksperimentalno očituju kao dva zasebna događaja (slika 12.). Završna faza temperaturno inducirane promjene lipidnih dvosloja je fluidna faza (L_α), u kojoj dolazi do potpunog gubitka

uređenosti u slaganju molekula lipida te van der Waalsovih interakcija između alkilnih lanaca.¹¹⁰



Slika 12. Shematski prikaz faznih prijelaza membranskog dvosloja nastalih povišenjem temperature. Preuzeto i doručeno.³⁵

Kod lipida koji zagrijavanjem ne prolaze kroz $P_{\beta'}$ fazu, glavni faznog prijelaz označava prijelaz iz faze gela ($L_{\beta'}$) u fazu fluida (L_{α}) i događa se pri temperaturi mekšanja (T_m). Neuređenost lanaca u L_{α} fazi se veže uz promjenu konfiguracije metilenskih skupina ($-\text{CH}_2$) ugljikovodičnih lanaca iz *trans* u *gauche* uslijed drastičnog slabljenja van der Waalsovih interakcija među njima. T_m ovisi o duljini i stupnju zasićenosti ugljikovodičnih lanaca te o polarnoj glavi lipida. Što je veća duljina lanaca, jače su van der Waalsove interakcije među njima, te je i T_m viša.^{35,97}

Kad je riječ o lipidima s dvostrukim vezama u lancima, njihova T_m je značajno niža od onih sa zasićenim ugljikovodičnim lancima jer je potrebno uložiti manje topline da oslabe (intrinzično slabije) van der Waalsove interakcije među njima. Kao primjer se može uzeti, lipid 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilkolin (engl. *1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine*, DOPC) koji ima T_m oko $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, a 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilkolin (engl. *1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine*, DSPC) ima T_m oko $53\text{ }^{\circ}\text{C}$. Jedina strukturna razlika između ta dva lipida je dvostruka veza između C9 i C10 u oleilnim lancima DOPC-a.⁸⁶

Sam proces mekšanja se događa pri temperaturi karakterističnoj za svaki lipid ovisno i o kemijskoj strukturi lipidne glave jer se mogu stvarati različite međumolekulske interakcije, kao npr. HB između polarnih glava i vodenog medija.³⁵

2.5. Instrumentalne tehnike

2.5.1. Razlikovno-pretražna kalorimetrija

Razlikovno-pretražna kalorimetrija (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC) je termoanalitička tehnika prikladna za termodinamičku karakterizaciju faznih prijelaza membranskih dvosloja. Osim mogućnosti detekcije i karakterizacije faznih prijelaza u smislu određivanja temperature pri kojima se pojedini fazni prijelaz događa, ona omogućuje i izravno određivanje vrijednosti termodinamičkih veličina poput promjene entalpije ΔH i entropije faznih prijelaza ΔS .¹¹¹ Razlika u brzini zagrijavanja (odnosno hlađenja) između uzorka i referentnog materijala bilježi se kao ovisnost otpuštene (egzotermni proces) ili primljene (endotermni proces) topline u ovisnosti o temperaturi. Do temperaturne razlike između uzorka i referentne tvari dolazi kad se unutar uzorka dogodi termotropni događaj. Po završetku termotropnog događaja, instrument ili ponovno uspostavlja svoju izvornu baznu liniju ili uspostavlja novu ako se dogodila promjena specifične topline uzorka, stvarajući tako krivulju koji prikazuje protok topline kao funkciju temperature.^{111,112}

U DSC kalorimetru se pri uvjetima stalnog tlaka (p) ili volumena (V) kontinuiranim povećanjem temperature sustava povećava i njegova unutarnja energija (U). Termodinamička veličina koja opisuje povećanje unutarnje energije pri stalnim uvjetima je entalpija (H) sustava odnosno njezina promjena:

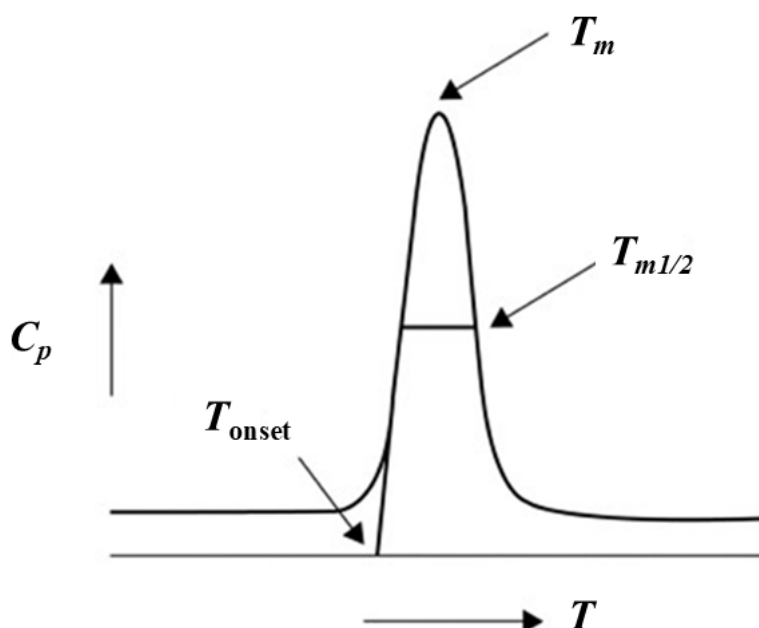
$$dH = dU + pdV \quad pdV = \text{const.} \quad (1)$$

Budući da je odziv DSC kalorimetra protok topline (Q) u ovisnosti o temperaturi (T) (obično dobiven u uvjetima konstantnog tlaka), DSC krivulja u konačnici prikazuje specifični toplinski kapacitet (c_p):

$$c_p = \left(\frac{dQ}{dT} \right)_p \quad (2)$$

Iz DSC krivulje faznog prijelaza lipidnih dvoslojeva mogu se odrediti termodinamički parametri poput T_m faznog prijelaza (prema dogovoru, maksimum signala, kada je 50 %

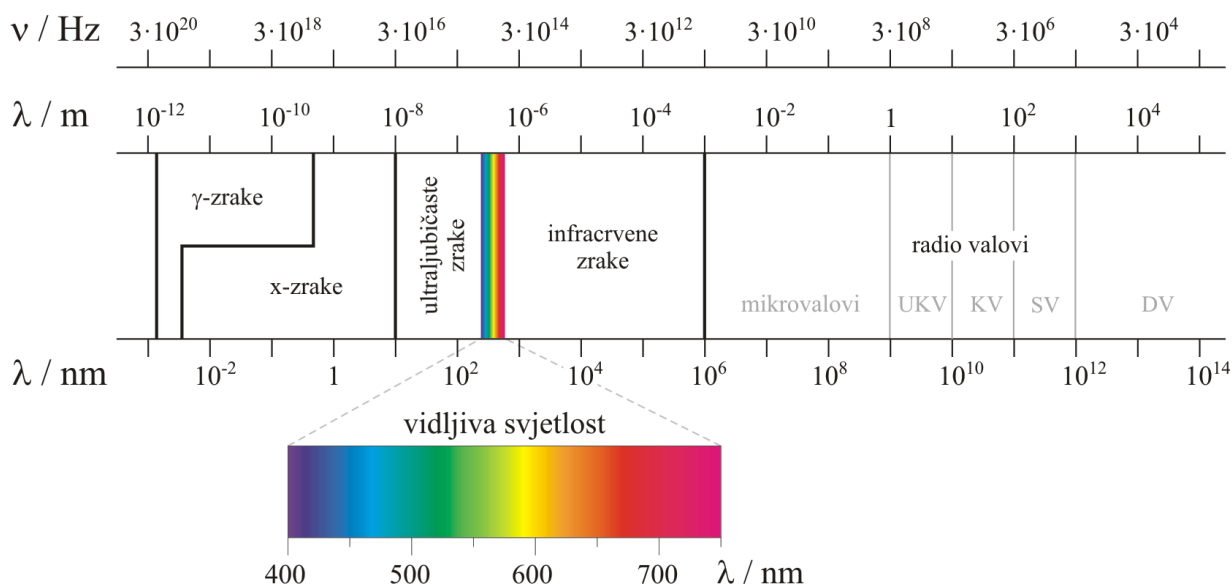
molekula lipida prešlo u drugu fazu), T_{onset} (početak faznog prijelaza), $T_{m1/2}$ (temperatura na polovici širine signala faznog prijelaza), te promjenu entalpije fazne promjene ΔH (površina ispod signala) (slika 13.).^{111,102} Na izgled DSC krivulje utječu termodinamička i kinetička svojstva pojedinog termotropnog događaja (faznog prijelaza lipida), ali i termalna povijest uzorka (tretiranje i skladištenje uzorka). Stoga se kod istraživanja lipidnih membrana termodinamičke veličine određuju najčešće iz DSC krivulja drugog (ili nekog od sljedećih) ciklusa grijanja odnosno hlađenja.¹⁰²



Slika 13. Termodinamički parametri endotermne DSC krivulje. Preuzeto i modificirano.¹⁰²

2.5.2. UV-Vis spektroskopija

UV-Vis spektroskopija je instrumentalna analitička tehnika koja se ističe po svojoj širokoj primjeni i to najčešće za kvantitativnu karakterizaciju niza organskih, anorganskih ili bioloških spojeva. Tehnikom se mjeri propusnost otopine analita za elektromagnetsko zračenje iz ultraljubičastog (engl. *ultraviolet*, UV) ili vidljivog (engl. *visible*, Vis) dijela spektra (slika 14.).¹¹³ Molekule analita koje sadrže kromofore određene kemijske strukture apsorbiraju određeni dio zračenja, dok ostatak svjetlosti prolazi kroz uzorak. Intenzitet propuštene svjetlosti zatim se mjeri u ovisnosti o valnoj duljini pomoću odgovarajućeg detektora kako bi se dobio karakterističan UV-Vis spektar analizirane tvari.¹¹⁴

Slika 14. Spektar elektromagnetskog zračenja. Preuzeto.¹¹⁵

U svrhu kvantitativnog mjerenja UV-Vis spektroskopija se oslanja na Lambert-Beerov zakon, koji opisuje proporcionalni odnos između apsorbancije (količine apsorbirane svjetlosti) i koncentracije otopljene tvari:

$$A = \epsilon bc \quad (3)$$

gdje je ϵ molarni apsorpcijski koeficijent, b duljina puta zračenja i c koncentracija tvari koja apsorbira zračenje iz ultraljubičastog ili vidljivog dijela spektra elektromagnetskog zračenja.¹¹⁶

Kod liposoma, koji sadrže isključivo molekule lipida koje nemaju kromofore, ne dolazi do apsorpcije zračenja iz UV i vidljivog dijela spektra. Nedostatak UV-Vis signala lipida je razlog zbog kojeg se UV-Vis spektroskopija rijetko koristila u karakterizaciji termotropnog ponašanja samih liposoma. Još krajem 1980-tih, Cevc i suradnici su proučavali promjene zamućenja lipidnih suspenzija PC-lipida i masnih kiselina praćenjem promjene temperature. Uspješno su uočili promjenu jakosti zamućenja (turbiditeta) suspenzija pri temperaturi faznog prijelaza lipida.¹¹⁷ Jednaka metodologija je korištena i u novijim istraživanjima u kojima se temperaturno-ovisna UV-Vis spektroskopija pokazala uspješnom, jednostavnom i neinvazivnom u određivanju temperature faznih prijelaza lipida, budući da promjene jakosti zamućenja lipidnih suspenzija uzrokuju mjerljive promjene apsorbancije.^{18,118}

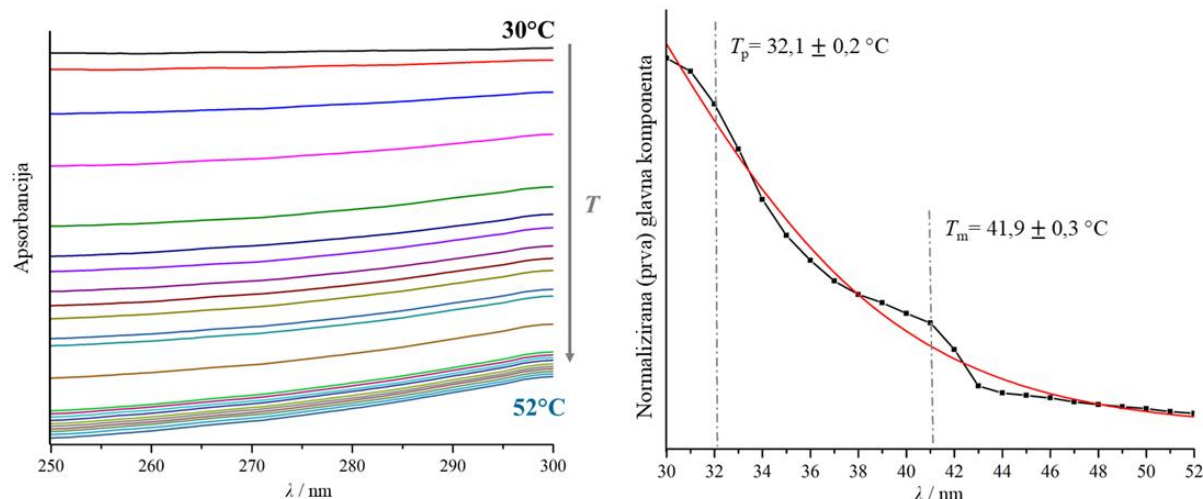
Iako UV-Vis spektri lipidnih suspenzija ne pokazuju apsorpcijske vrpce tipične za kromoforne skupine zbog nepostojanja kromofornih skupina, na temelju temperaturno-ovisne promjene zamućenja lipidnih suspenzija moguće je odrediti temperature faznih prijelaza lipida uz pomoć kemometričkih alata. S tim ciljem, izmjereni temperaturno-ovisni UV-Vis spektri (slika 15., lijevo) analiziraju se kemometrički i to multivarijantnim pristupom metode izmjeničnih najmanjih kvadrata uz analizu promjenjivih faktora (engl. *multivariate curve resolution with alternating least squares* i *evolving factor analysis*, MCR-ALS with EFA). Radi jednostavnosti, u nastavku će se za spomenuti pristup koristiti naziv multivarijantna analiza krivulja (engl. *multivariate curve analysis*, MCA). Pod pretpostavkom poznat broj komponenti koje opisuju temperaturnu varijabilnost spektra (u slučaju lipidnih suspenzija bez kromofora – jedne komponente), skup eksperimentalno dobivenih temperaturno-ovisnih spektra (**D**) može se matematički, u matričnom obliku, izraziti kao produkt koncentracijskih (**C**) i spektralnih (**S**) profila pripadajuće (jedne) komponente:

$$\mathbf{D} = \mathbf{CS}^T + \mathbf{E} \quad (4)$$

pri čemu **E** predstavlja dio varijable koji nije objašnjen umnoškom $\mathbf{CS}^T$.

Koncentracijski profil jedne (pretpostavljene) komponente pokazuje sigmoidalni oblik, pri čemu se točke infleksije podudaraju s temperaturama faznih prijelaza (slika 15., desno).

Dobivene vrijednosti točaka infleksije za DPPC MLV-ove odlično se podudaraju s temperaturama faznih prijelaza (T_p i T_m) određenima DSC-om.^{18,119,120}



Slika 15. Temperaturno-ovisni UV-Vis spektri DPPC-a (lijevo; pune krivulje) i (desno) koncentracijski profil (prve glavne) komponente dobiven višedimenzionalnom analizom krivulja (MCA) (točkasta crna krivulja) i krivulja usklađivanja na dvostruki Boltzmannov profil (crvena krivulja). Istaknute su temperature pri kojima su određene točke infleksije.¹⁸

2.5.3. FTIR-ATR spektroskopija

Infracrvena (IR) spektroskopija predstavlja analitičku tehniku koja se temelji na proučavanju interakcije molekula s elektromagnetskim zračenjem u području valnih brojeva od 14000 cm^{-1} do 20 cm^{-1} . Apsorpcija zračenja u tom području odgovara promjenama vibracijskih energijskih razina unutar molekule.¹²¹ Do apsorpcije dolazi kada energija upadnog elektromagnetskog zračenja odgovara razlici energija između dvaju vibracijskih stanja molekule. Drugim riječima, infracrveno zračenje potiče prijelaze između vibracijskih stanja molekula, pri čemu je osnovni uvjet za pojavu apsorpcijskog maksimuma promjena dipolnog momenta tijekom vibracije. Takvi prijelazi očituju se kao karakteristični signali u IR spektru, što omogućuje identifikaciju funkcijskih skupina i proučavanje strukture molekula.¹²² Suvremeni IR spektrometri najčešće se temelje na tehnici Fourierove transformacije (FTIR), koja omogućuje

brzo prikupljanje podataka i visoku osjetljivost mjerenja. U FTIR spektru, signal se prikazuje kao funkcija valnog broja ($\tilde{\nu}$), koji predstavlja recipročnu vrijednost valne duljine (λ) i izražava se u jedinicama cm^{-1} . Valni broj je proporcionalan energiji (E) i frekvenciji fotona (ν) prema jednadžbama:

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda} \quad (5)$$

$$\nu = \frac{c}{\lambda} \quad (6)$$

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} = hc\tilde{\nu} \quad (7)$$

gdje je h Planckova konstanta ($6,626 \times 10^{-34}$ J s), a c brzina elektromagnetskoga zračenja u vakuumu.¹²³

Unutar elektromagnetskoga spektra infracrveno (IR) zračenje dijeli se na tri dijela: blisko (engl. *near infrared*, NIR), srednje (engl. *mid infrared*, MIR) i daleko (engl. *far infrared*, FIR) (tablica 1.). U NIR području su dominantni prijelazi koji uključuju više tonove, kombinacijske prijelaze, kao i elektronske prijelaze niže energije. MIR područje ima najveću analitičku važnost jer se u tom području opažaju fundamentalni vibracijski prijelazi većine molekula. U FIR području se uočavaju vibracije koje uključuju teške atome, okosnicu molekule te vibracije kristalne rešetke.^{122,123}

Tablica 1. Podjela IR spektralnog područja s pripadajućim valnim duljinama (λ) i valnim brojevima ($\tilde{\nu}$).¹²²

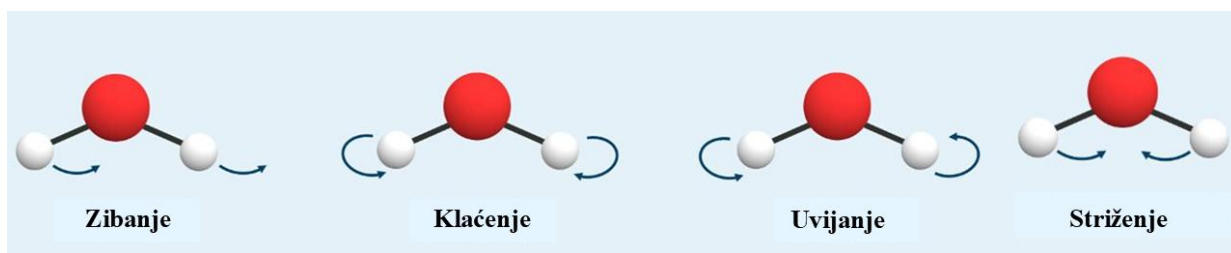
IR područje	Valna duljina λ / μm	Valni broj $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$
Blisko (NIR)	0,7–2,8	14000–3600
Srednje (MIR)	2,8–50	3600–200
Daleko (FIR)	50–500	200–20

Apsorpcijom zračenja u MIR području pobuđuju se molekulske vibracije, koje se dijele u dvije osnovne kategorije: vibracije istezanja i vibracije deformacije. Vibracije istezanja uključuju promjenu duljine kemijske veze između dvaju atoma i mogu biti simetrične ili antisimetrične. Kod simetričnog istezanja jezgre se istodobno približavaju ili udaljavaju od zajedničkog centra mase, dok se kod antisimetričnog istezanja jedna jezgra približava, a druga udaljava (slika 16.).^{19,124}



Slika 16. Primjeri vibracija istezanja. Preuzeto i dorađeno.¹²⁵

Deformacijske vibracije uzrokuju promjene kuta između dviju veza koje vibriraju te se javljaju u molekulama s najmanje tri atoma. Za skupine od tri atoma koje se sastoje od središnjeg atoma jedne vrste i atoma druge vrste smještenih na krajevima veza, ovisno o smjeru gibanja, razlikuju se četiri osnovna tipa deformacijskih vibracija: striženje, zibanje, klaćenje i uvijanje (slika 17.).¹⁹ Za skupine većeg broja atoma vibracije deformacije se dijele na deformacije u ravnini i izvan ravnine.



Slika 17. Primjeri deformacijskih istezanja. Preuzeto i dorađeno.¹²⁵

Snimljeni FTIR spektar predstavlja ovisnost apsorpcije ili transmitancije o valnom broju ($\tilde{\nu}$), pri čemu se svaka apsorpcijska vrpca odnosi na vibraciju određene funkcijske skupine. Položaj vrpce određen je jakošću kemijske veze i masama atoma koji sudjeluju u vibraciji te je opisan formulom:

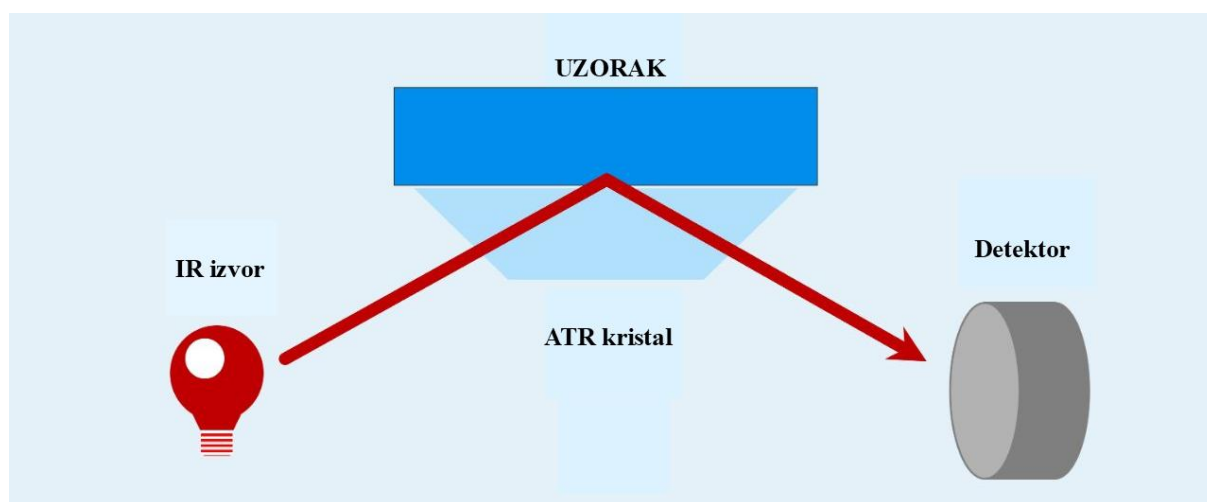
$$\tilde{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (8)$$

gdje su k konstanta sile veze, μ reducirana masa, a c brzina svjetlosti u vakuumu ($\approx 3 \times 10^8$ m s⁻¹).

Budući da metilenske skupine u različitim konfiguracijama (*trans/gauche*) apsorbiraju zračenje pri različitim valnim brojevima, FTIR spektroskopijom moguće je razlikovati lipidne dvoslojeve u gel- i fluidnoj fazi.¹²⁶ Sam fazni prijelaz se može detektirati prvenstveno pomakom maksimuma vrpce uslijed promjene faze (izazvane promjenom temperature) i promjenom njihove apsorpcije. Posebno su značajne vrpce koje odgovaraju antisimetričnom (ν_{as}) i simetričnom (ν_s) istezanju metilenske ($-\text{CH}_2-$) skupine ($\nu_{as}\text{CH}_2$ i $\nu_s\text{CH}_2$) te deformacijskim vibracijama CH_2 skupina, ističući strižnu vibraciju (γCH_2). Maksimumi vrpce $\nu_{as}\text{CH}_2$ i $\nu_s\text{CH}_2$ javljaju se pri približno 2920 cm^{-1} i 2850 cm^{-1} , a pomak maksimuma za otprilike ili do 4 cm^{-1} obično označava gel-fluid fazni prijelaz. Položaj i intenzitet tih vrpce ovise o duljini i zasićenosti ugljikovodičnih lanaca, strukturi polarnih glava lipida, prisutnosti aditiva te samoj prirodi faznog prijelaza.¹²⁷ U membranskim sustavima koji sadrže proteine i peptide, njihov doprinos apsorpciji $\nu_{(a)s}\text{CH}_2$ vrpce može utjecati na interpretaciju spektra. Međutim, ako je taj udio zanemariv, promjene u lipidnim lancima i dalje se mogu precizno pratiti FTIR-om.^{128,129} Zbog mogućeg preklapanja vrpce antisimetričnog istezanja ($\nu_{as}\text{CH}_2$) s vrpcom CH_3 skupine i Fermijevom rezonancijom prvih tonova strižne vibracije CH_2 skupina, za analizu je korisnije pratiti simetrično istezanje CH_2 skupine ($\nu_s\text{CH}_2$), koje se pokazalo pouzdanijim pokazateljem faznog prijelaza kod modelnih membranskih sustava.¹³⁰

Deformacijske strižne vibracije (γCH_2 ; $\sim 1470\text{ cm}^{-1}$) i vibracije njihanja (ωCH_2 ; $\sim 720\text{ cm}^{-1}$) dodatno se koriste za procjenu lateralne organizacije alkilnih lanaca u fazi gela.¹³¹ Prijelazom iz faze gela u fluidnu fazu povećava se pokretljivost lanaca, što rezultira širenjem, smanjenjem intenziteta pa čak i nestajanjem vrpce. Treba napomenuti da se tako slabe vrpce često preklapaju sa signalima otapala ili polarnih glava lipida, što treba imati na umu prilikom interpretacije spektara takvih uzoraka.¹³²

Uz signale ugljikovodičnih lanaca, vibracije istezanja glicerolne okosnice ($\nu_{\text{C=O}}$) te polarnih glava lipida (antisimetrično istezanje fosfatne skupine; $\nu_{\text{asPO}_2^-}$) također pružaju informacije o međumolekulskim interakcijama i faznim prijelazima. Međutim, karakterizacija $\nu_{\text{C=O}}$ vrpce otežana je zbog intenzivne i djelomično preklapajuće apsorpcijske vrpce vode u području $1750\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$ (linearno svijanje; δHOH) što se donekle može poboljšati primjenom FTIR tehnike prigušene totalne refleksije (engl. *attenuated total reflection*, ATR, slika 18.).¹³³



Slika 18. Shematski prikaz ATR tehnike. Preuzeto i doručeno.¹³⁴

ATR je jedan od najčešće korištenih pristupa u prikupljanju IR spektara jer omogućuje brzu i jednostavnu analizu uzoraka bez potrebe za složenom pripremom. Temelji se na fenomenu potpune unutarnje refleksije koji nastaje kada infracrveno zračenje, pod određenim kutom, prelazi iz optički gušćeg u rjeđi medij. Upadna zraka na granici između kristala i uzorka se lomi uslijed prodiranja nekoliko mikrometara u uzorak (dubina prodiranja je ovisna o optičkom elementu), reflektira se prije nego dođe do detektora i uzrokuje pojavu apsorpcijskih spektara.^{135,136} Budući da dolazi do loma svjetlosti uslijed prikupljanja spektara, a indeks loma svakog optičkog elementa je ovisan o frekvenciji,¹³⁷ relativni intenziteti apsorpcijskih vrpca u ATR spektru razlikuju u različitim dijelovima spektra, a u određenoj mjeri i od onih u klasičnim transmisijskim spektrima.¹³⁸ Ipak, položaji maksimuma vrpca (valni brojevi) i njihov oblik (posebice kad je riječ o izoliranim vrpca) ostaju praktički nepromijenjeni jer ovise o intrinzičnim vibracijskim energijama molekula, a ne o načinu uzorkovanja.¹³⁹ Osim u

kvalitativnoj identifikaciji spojeva, FTIR-ATR-om se mogu pratiti dinamički procesi poput kemijskih reakcija u stvarnom vremenu, adsorpcije ili difuzije molekula kroz površinu.^{140,141} FTIR-ATR spektroskopija je u novije vrijeme postala vrijedan alat u istraživanju lipidnih suspenzija jer omogućuje praćenje molekulskih interakcija unutar membranskih sustava bez potrebe za dodatnim označavanjem uzoraka,^{142,143} kao i jedinstven uvid u strukturnu dinamiku membrana i njihovu interakciju s biomolekulama. Dodatno, upotrebom višeslojnih senzora i kontroliranih protoka uzoraka moguće je pratiti stvaranje i stabilnost lipidnih filmova u realnom vremenu.¹⁴⁴

2.5.4. Dinamičko i elektroforetsko raspršenje svjetlosti

Veličina čestica koloidnih dimenzija u suspenzijama može se pouzdano odrediti tehnikom dinamičkog raspršenja svjetlosti (engl. *dynamic light scattering*, DLS). Ova tehnika temelji se na osvjetljavanju uzorka monokromatskim laserskim zračenjem, pri čemu se svjetlost raspršuje na makromolekulama prisutnima u uzorku. Raspršenje se odvija u svim smjerovima, a intenzitet i kut raspršenja ovise o veličini, obliku i koncentraciji čestica u otopini.¹⁴⁵ Makromolekule (poput lipida i proteina) u otopini neprestano su pod utjecajem nasumičnih sila koje proizlaze iz sudara s molekulama otapala, što rezultira njihovim slučajnim gibanjem poznatim kao Brownovo gibanje. Analizom fluktuacija intenziteta raspršene svjetlosti, koje su posljedica tog gibanja, moguće je odrediti difuzijski koeficijent (D), koji predstavlja poveznicu između dinamike Brownovog gibanja i veličine čestice. Brzina gibanja čestica u otopini ovisi ne samo o njihovoj veličini i obliku, već i o temperaturi te viskoznosti medija.¹⁴⁶ Veza između difuzijskog koeficijenta (D) i hidrodinamičkog promjera (d_H) čestice definirana je Einstein–Stokesovom jednadžbom:

$$d_H = \frac{k_B \cdot T}{3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D} \quad (9)$$

gdje je d_H hidrodinamički promjer, D translacijski koeficijent difuzije, k_B Boltzmannova konstanta, T apsolutna temperatura, a η viskoznost.¹⁴⁵

Svjetlost se raspršuje s površine čestica dispergiranih u otopini, a svaka promjena njihove površine koja utječe na brzinu difuzije očituje se kao promjena prividne veličine čestica. Osim

određivanja veličine i stabilnosti čestica u otopini, DLS tehnika se može koristiti za proučavanje utjecaja različitih eksperimentalnih parametara (npr. temperature, koncentracije, pH vrijednosti) na procese stvaranja agregata ili sličnih samoorganizirajućih molekulskih struktura. Prikladna je za analizu uzoraka u širokom rasponu pufera, kao i pri različitim temperaturama. Prednosti ove tehnike uključuju njezinu neinvazivnost te potrebu za relativno malom količinom uzorka. Treba napomenuti da pouzdanost DLS mjerenja može biti ograničena u sustavima u kojima postoji velika razlika između promjera dispergiranih čestica i molekula otapala.^{146,147}

Elektroforetsko raspršenje svjetlosti (engl. *electrophoretic light scattering*, ELS) predstavlja jednu od najčešće primjenjivanih metoda za određivanje elektroforetske pokretljivosti i (ζ)-potencijala koloidnih sustava.^{148,149} Metoda se temelji na mjerenju brzine gibanja nabijenih čestica u primijenjenom električnom polju, pri čemu se elektroforetska pokretljivost (μ) definira kao omjer elektroforetske brzine čestice (v) i jakosti električnog polja (E):

$$\mu = \frac{v}{E} \quad (10)$$

U ELS mjerenju uzorak se smješta u mjernu kivetu opremljenu elektrodama između kojih se uspostavlja homogeno električno polje.¹⁵⁰ Pod njegovim utjecajem nabijene čestice gibaju se prema elektrodi suprotnog naboja. Istodobno, kroz uzorak prolazi koherentna laserska zraka koja se raspršuje na česticama. Gibanje čestica uzrokuje promjenu frekvencije raspršene svjetlosti uslijed Dopplerova efekta, a analiza frekvencijskog pomaka omogućuje određivanje njihove brzine, odnosno elektroforetske pokretljivosti.¹⁴⁹ Iz dobivene elektroforetske pokretljivosti, ζ -potencijal se izračunava primjenom Henryjeve jednadžbe:

$$\zeta = \frac{3\mu\eta}{2\varepsilon_r \varepsilon_0 f(\kappa a)} \quad (11)$$

gdje je ε_r dielektrična permitivnost medija, ε_0 dielektrična permitivnost vakuuma, η viskoznost, a $f(\kappa a)$ Henryjeva funkcija koja ovisi o omjeru debljine difuznog sloja i radijusa čestice. U vodenim medijima srednje i više ionske jakosti najčešće se primjenjuje Smoluchowskijeva aproksimacija ($f(\kappa a) = 1,5$).¹⁴⁸ Iako ne predstavlja izravnu mjeru površinskog naboja, ζ -potencijal se smatra ključnim parametrom za procjenu koloidne stabilnosti, budući da odražava ravnotežu elektrostatskih i privlačnih međučestičnih sila u sustavu.^{148,149} Sustavi s apsolutnim

vrijednostima ζ -potencijala većim od približno 30 mV općenito pokazuju povećanu kinetičku stabilnost uslijed izraženijeg elektrostatskog odbijanja među česticama.¹⁵⁰

Liposomima je ζ -potencijal određen sastavom lipidnog dvosloja i disperzivnog medija.¹⁴⁸ Fosfolipidi koji sadrže negativno nabijenu skupinu (npr. serin) doprinose negativnom površinskom naboju, dok se dodatkom kationskih lipida može postići pozitivan ζ -potencijal.¹⁵¹ Vrijednost ζ -potencijala ovisi i o pH-vrijednosti te ionskoj jakosti medija, te se povećanjem koncentracije iona u mediju uzrokuje kompresija električnog dvosloja i smanjenje apsolutna vrijednost ζ -potencijala, što može dovesti do povećane agregacije liposoma.^{148,149} Dodatno, adsorpcija proteina na površinu liposoma što može promijeniti izmjereni ζ -potencijal te utjecati na distribuciju makromolekula u sustavu, stoga je kontrola ζ -potencijala jedan od ključnih parametara pri razvoju liposomskih formulacija, osobito u kontekstu optimizacije stabilnosti i osiguravanju reproducibilnosti uzoraka.¹⁵²

2.5.5. Konfokalna mikroskopija

Konfokalna laserska pretražna mikroskopija (engl. *confocal laser scanning microscopy*, CLSM), skraćeno konfokalna mikroskopija, napredna je tehnika svjetlosne mikroskopije kojom se omogućuje detekcija svjetlosti iz vrlo tankog optičkog presjeka uzorka. Za razliku od klasične mikroskopije širokog polja, u kojoj se cijelo vidno polje istodobno osvjetljava, u konfokalnoj mikroskopiji fokusirana laserska zraka osvjetljava uzorak točku po točku, a emitirana svjetlost prolazi kroz ušicu (engl. *pin-hole*) koja blokira signal iz izvanfokalnih slojeva. Iako je prostorna razlučivost konfokalnog mikroskopa slična onoj u mikroskopiji širokog polja (lateralno oko 200 nm, aksijalno 500–700 nm), poboljšana z-rezolucija omogućuje optičko sekcioniranje i trodimenzionalnu rekonstrukciju bez fizičkog rezanja uzorka.¹⁵³ U usporedbi s mikroskopijom širokog polja, konfokalna mikroskopija nudi bolji kontrast i smanjenu pozadinsku fluorescenciju, no zahtijeva dulje vrijeme snimanja i može uzrokovati fotoizbjeljivanje fluoroformata. Za razliku od elektronske mikroskopije TEM (engl. *transmission electron microscopy*, TEM) i SEM (engl. *scanning electron microscopy*, SEM), omogućuje neinvazivno snimanje bioloških uzoraka u fiziološkim uvjetima, bez potrebe za vakuumom, dok u usporedbi s mikroskopijom atomskih sila (engl. *atomic force microscopy*, AFM) omogućuje vizualizaciju unutarnjih volumena, a ne samo površine uzorka.¹⁵⁴

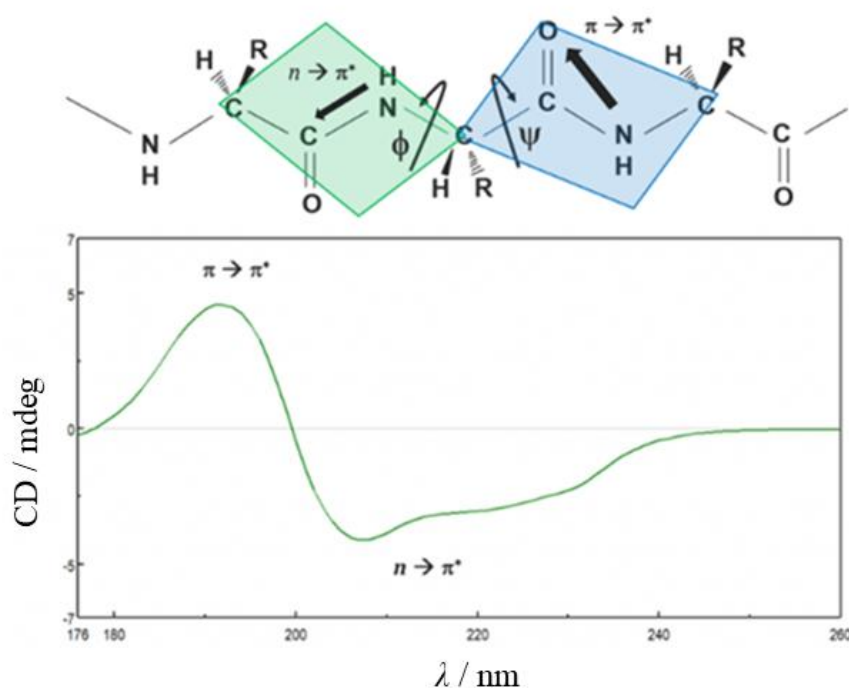
Ograničenja konfokalne mikroskopije uključuju ograničenu dubinu prodiranja svjetlosti ($\sim 100 \mu\text{m}$), dulje vrijeme skeniranja, fototoksične učinke kod živih stanica i neophodno korištenje fluorescentnih proba koje mogu u izvjesnoj mjeri utjecati na rezultate. Unatoč tome, konfokalna mikroskopija ima važnu ulogu u istraživanjima stanične biologije, biokemije i materijalnih znanosti jer omogućuje praćenje prostorne distribucije biomolekula, dinamike membranskih sustava te interakcija proteina i liganada u stvarnom vremenu.¹⁵⁵ U istraživanju lipidnih modelnih sustava poput na primjer GUV-ova (engl. *giant unilamellar vesicles*) i SUV-ova (engl. *small unilamellar vesicles*) omogućuje optičko oslikavanje po dubini uzorka, analizu unutrašnjih slojeva vezikula, kao i praćenje raspodjele fluorescentno obilježenih lipida te dinamike faznog razdvajanja u membranama.¹⁵⁶ Budući da iziskuje korištenje proba koji posjeduju fluorofore koji emitiraju zračenje pri različitim valnim duljinama ovisno o okruženju u kojem se nalaze (npr. Laurdan, DiI, NBD), njome je moguće razlikovati gel- i fluidnu fazu lipidnih dvosloja u kojima se probe nalaze te kvantificirati promjene u membranskoj fluidnosti i heterogenosti.^{157,158,159,160} Konfokalna mikroskopija omogućuje i praćenje interakcija peptida i proteina s membranama, poput umetanja amfifilnih heliksa, formiranja pore ili destabilizacije dvosloja.^{14,161}

2.5.6. CD spektroskopija

Spektroskopija cirkularnog dikroizma (engl. *circular dichroism*, CD) je jedna od ključnih kirooptičkih tehnika u kemiji i strukturnoj biologiji za određivanje konformacije proteina, peptida i polipeptida. Temelji se na pojavi cirkularnog dikroizma, odnosno razlici u apsorpciji lijevo- i desno-cirkularno polariziranog svjetla kod kiralnih molekula koje sadrže optički aktivne kromofore. Također, riječ je o apsorpcijskoj tehnici u kojoj vrijedi Beer-Lambertov zakon (opisan u poglavlju 2.5.2.), prema kojem količina svjetlosti koju uzorak apsorbira ovisi o koncentraciji i duljini puta mjerenja.¹⁶²

U dalekom UV području (190–250 nm) dominantni su elektronski prijelazi amidnih skupina ($n \rightarrow \pi^*$ i $\pi \rightarrow \pi^*$) koji daju dvije karakteristične apsorpcijske vrpce (slika 19.), čija energija i intenzitet ovise o geometriji peptidne okosnice. Dekonvolucijom spomenutih apsorpcijskih vrpce mogu se procijeniti sekundarne strukture proteina poput α -uzvojnica i β -nabranih ploča pri različitim eksperimentalnim uvjetima. Iako sve sekundarne strukture

proteina, pa i one neuređene, imaju različite CD spektre, dekonvolucija je složenija od dodjeljivanja vrpce pojedinoj strukturnoj komponenti.^{163,164} Analiza sekundarnih struktura zahtjeva kemometričke alate prilagođavanja krivulje temeljene na skupu referentnih spektara s poznatim komponentama sekundarne strukture koje se koriste za procjenu komponenti u uzorku putem regresijske analize.^{15,165}



Slika 19. CD spektar peptidne veze u dalekom UV području. Preuzeto i dorađeno.¹⁶⁶

Analizom CD spektara moguće je odrediti kiralnost i konformaciju molekula, pratiti promjene povezane s denaturacijom, vezanjem liganda ili interakcijama između biomolekula.¹⁶⁵ Signali u CD spektrima mogu nastati i od inducirane kiralnosti i reorganizacije lipidnih dvoslojeva nastalih prilikom interakcije s drugim biomolekulama, poput proteina ili peptida.^{17,165} U kombinaciji s drugim tehnikama poput NMR-a, FTIR-a, DLS-a i fluorescentne spektroskopije, analiza CD spektara pruža uvid u molekularni mehanizam stabilizacije liposomskih nosača lijekova i promjena u fluidnosti membrane.^{139,140}

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

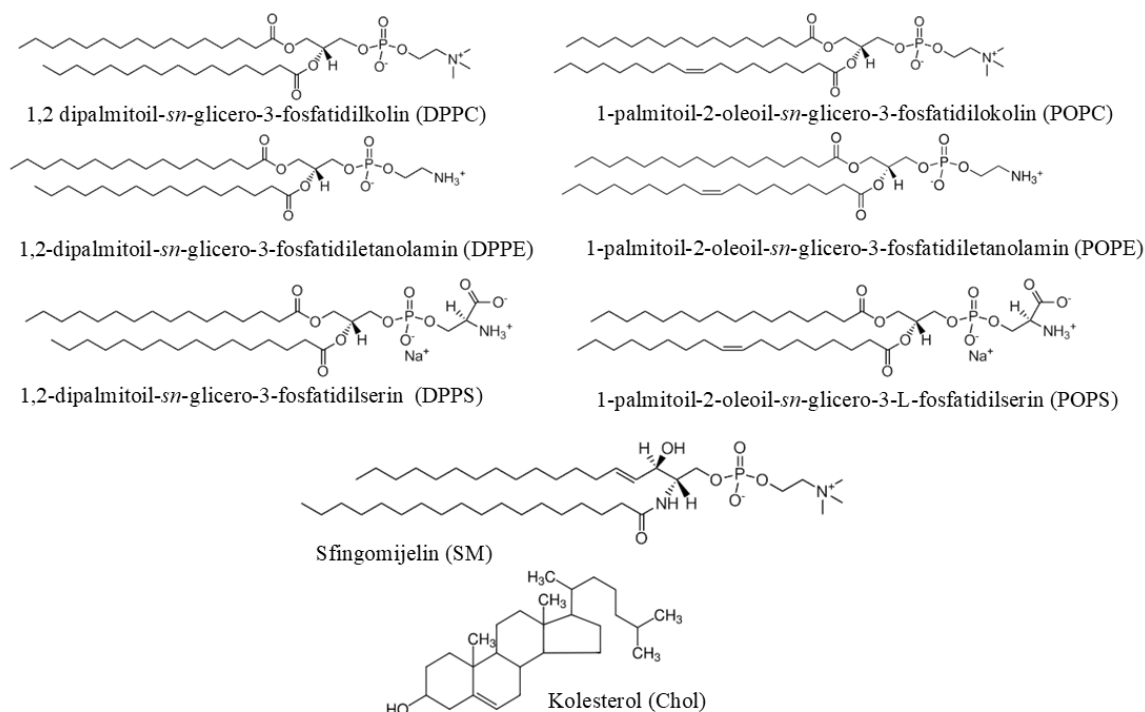
U radu su korištene sljedeće kemikalije:

1. DPPC – 1,2 dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilkolin ($\geq 99\%$ čistoće, Avanti Polar Lipids)
2. DPPS – 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilserin ($\geq 99\%$ čistoće, Avanti Polar Lipids)
3. DPPE – 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidiletanolamin ($\geq 98\%$ čistoće, Cayman Chemical)
4. bSM – sfingomijelin iz mozga (svinjski, $\geq 99\%$ čistoće, Avanti Polar Lipids)
5. Chol – kolesterol ($\geq 98\%$ čistoće, Avanti Polar Lipids)
6. POPC – 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilokolin ($\geq 99\%$ čistoće, Avanti Polar Lipids)
7. POPE – 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidiletanolamin ($\geq 99\%$ čistoće, Avanti Polar Lipids)
8. POPS – 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-L-fosfatidilserin ($\geq 99\%$ čistoće, Avanti Polar Lipids)
9. CHCl_3 – kloroform (p.a., Carlo Erba Reagents)
10. NaCl – natrijev klorid (p.a., Kemika, Zagreb)
11. MBP – mijelinski bazični protein (govedi, 90% čistoće, Sigma-Aldrich)

3.2. Priprema liposoma

Za pripremu početnih otopina odvagano je 100 mg svakog lipida, potom su otopljeni u 10 mL kloroforma (CHCl_3) do koncentracije $\gamma = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ ($c(\text{DPPC}) = 0,013 \text{ M}$; $c(\text{DPPE}) = 0,014 \text{ M}$; $c(\text{DPPS}) = 0,013 \text{ M}$; $c(\text{bSM}) = 0,013 \text{ M}$; $c(\text{Chol}) = 0,026 \text{ M}$; $c(\text{POPC}) = 0,013 \text{ M}$; $c(\text{POPE}) = 0,014 \text{ M}$; $c(\text{POPS}) = 0,013 \text{ M}$). Ove otopine služile su za pripremu tankih lipidnih filmova, iz kojih su dobiveni MLV-ovi (strukturne formule svih korištenih lipida prikazane su na slici 20., te su u tablici 2. navedene temperature njihovih glavnih faznih prijelaza (T_m). Korišteni sfingomijelin je bSM (engl. *brain sphingomyelin*), koji je smjesa lipida različitih duljina

zasićenih i nezasićenih ugljikovodičnih lanaca (C16: C18: C20: C22: C24: C24(1): nepoznato)
= 2: 50: 5: 7: 5: 21: 10.



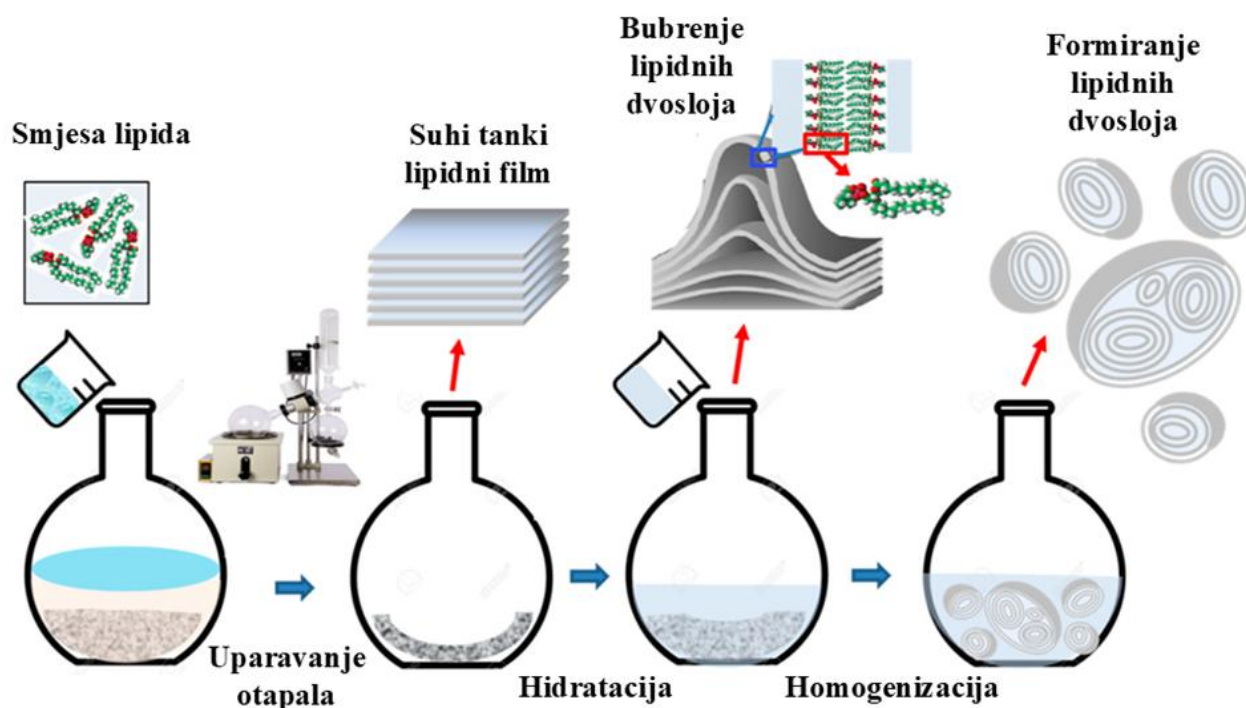
Slika 20. Strukturne formule i puni nazivi svih korištenih lipida za pripremu MLV-ova.

Tablica 2. Temperaturne vrijednosti glavnog faznog prijelaza (T_m) korištenih komercijalno dostupnih lipida.^{118,167,168,169,170,171}

Lipid (zasićeni lanci)	$T_m/^\circ\text{C}$	Lipid (nezasićeni lanci)	$T_m/^\circ\text{C}$
DPPC	41	POPC	-2
DPPE	63	POPE	25
DPPS	54	POPS	14
bSM	25–45	*	*
Chol	148	*	*

* Nema analoga s PC, PE i SM lipidima.

MLV-ovi koji predstavljaju modelni mijelin pri fiziološkim uvjetima (normalni MMM) kao i MLV-ovi koji predstavljaju modelni mijelin pri patološkim uvjetima (promijenjeni MMM) pripremljeni su metodom hidratacije tankog lipidnog filma temeljenoj na klasičnom Banghamovom postupku (slika 21.).⁹²



Slika 21. Shematski prikaz pripreme liposoma. Preuzeto i doradeno.¹⁷²

Konkretno, odgovarajući volumeni otopina pojedinih lipida pipetirani su u zasebne okrugle staklene tikvice s ciljem dobivanja lipida u odgovarajućim omjerima u prisustvu/odsustvu Chol te u odsustvu/prisustvu MBP-a. Molni omjeri lipida (s Chol) u normalnim MMM-ovima su $(n(\text{PC}): n(\text{PE}): n(\text{PS}): n(\text{bSM}): n(\text{Chol}) = 27: 21: 4: 6: 42)$ s/bez MBP-a, a u promijenjenim MMM-ovima (s Chol) su omjeri $(n(\text{PC}): n(\text{PE}): n(\text{PS}): n(\text{bSM}): n(\text{Chol}) = 19: 22: 9: 2: 48)$. Ekvivalentno su priređeni MMM-ovi koji imaju DPPC, DPPE i DPPS lipide kao i POPC, POPE i POPS lipide. S ciljem utvrđivanja utjecaja Chol na normalne i promijenjene MMM-ove, priređeni su MMM' (bez Chol) u navedenim omjerima lipida bez dodanog Chol za normalne MMM'-ove $(n(\text{PC}): n(\text{PE}): n(\text{PS}): n(\text{bSM}) = 47: 36: 7: 10)$ i za promijenjene MMM'-ove $(n(\text{PC}): n(\text{PE}): n(\text{PS}): n(\text{bSM}) = 37: 42: 17: 4)$. Ovi omjeri temelje se na literaturnim podacima o relativnim zastupljenostima lipida u mijelinskoj ovojnici, kao i na modelima koji se koriste za praćenje promjena u promijenjenim (patološkim) stanjima (tablica 3.).⁵⁶

Tablica 3. Omjeri korištenih lipida sa zasićenim i nezasićenim lancima u MMM-ovima i MMM'-ovima.⁵⁶

Molarni omjeri lipida (zasićeni/ nezasićeni lanci)	MMM sustavi- normalni uvjeti	MMM sustavi- promijenjeni uvjeti	MMM' sustavi- normalni uvjeti	MMM' sustavi- promijenjeni uvjeti
<i>n</i> (DPPC / POPC)	27	19	47	37
<i>n</i> (DPPE / POPE)	21	22	36	42
<i>n</i> (DPPS / POPS)	4	9	7	17
<i>n</i> (bSM)	6	2	10	4
<i>n</i> (Chol)	42	48	/	/

Nakon što su lipidi dodani otopina lipidau tikvice, iz smjesa je uklonjeno organsko otapalo (kloroform) na rotacijskom isparivaču pod sniženim tlakom sve do formiranja homogenog, suhog lipidnog filma na stijenkama tikvica. Preostali tragovi otapala uklonjeni su dodatnim sušenjem pod blagim protokom inertnog plina (Ar), čime se osigurala potpuna desolvatacija otapala od lipida i stabilnost formiranog filma. Lipidni filmovi su suspendirani ili vodenom otopinom natrijeva klorida (NaCl(aq); $I_c = 100$ mM, pH ≈ 6), ili NaCl(aq) u kojoj je otopljen MBP do koncentracije $\gamma = 0,6$ mg mL⁻¹. Dodani volumeni MBP-a otopljenog u NaCl(aq) odabrani su tako da ukupni omjer proteina i lipida bude oko 1:200, što odgovara omjeru prisutnom u ljudskom mijelinu.⁴ Primjena fizioloških ionskih uvjeta (korištenjem NaCl(aq)) u pripremi MBP otopina temelji se na poznatoj osjetljivosti MBP-a na ionsku jakost i pH, što utječe na njegovu konformaciju i afinitet vezanja za membrane.⁵⁶ Nakon dodavanja otapala, uzorci su podvrgnuti standardiziranim ciklusima homogenizacije koji uključuju: i) zagrijavanje

u vodenoj kupelji ($\sim 70^{\circ}\text{C}$), ii) miješanje na vortex-mješalici te iii) hlađenje u ledenoj kupelji ($\sim 4^{\circ}\text{C}$). Navedeni ciklusi ponovljeni su tri puta, što je u skladu s ranije opisanim protokolima za učinkovitu resuspenziju i formiranje MLV-ova.^{173,174} Svježe pripremljene lipidne suspenzije (i MMM-ovi i MMM'-ovi, sa/bez MPB-a) korištene su odmah nakon pripreme u skladu s preporučenim koncentracijama za pojedine tehnike. Za DSC, FTIR i konfokalnu mikroskopiju uzorci su korišteni bez razrjeđenja pri koncentraciji od $\gamma = 5 \text{ mg mL}^{-1}$. Za UV-Vis spektroskopiju CD uzorci su razrijeđeni na $\gamma = 1 \text{ mg mL}^{-1}$, a za DLS i ELS mjerenja na $\gamma = 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$.

3.3. DLS i ELS

Raspodjela veličina MLV-ova određena je primjenom DLS tehnike koristeći spektrofotometar za korelaciju fotona Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) opremljen zelenim laserom valne duljine 532 nm. Prosječni hidrodinamički promjer (d_H) definiran je kao vrijednost koja odgovara maksimumu vrha u raspodjeli volumena čestica. Prikazani rezultati predstavljaju aritmetičku sredinu šest neovisnih mjerenja provedenih pri kontroliranoj temperature od 25°C .

Tehnikom elektroforetskog raspršenja svjetlosti (engl. *electrophoretic light scattering*, ELS) određen je zeta- (ζ) potencijal upotrebom preklopne kapilarne ćelije (Malvern, Panalytical Folded Capillary Zeta Cell). Vrijednosti ζ -potencijala izračunate su na temelju izmjerene elektroforetske mobilnosti primjenom Henryjeve jednadžbe, koristeći Smoluchowskijevu aproksimaciju koja je prikladna za sustave više ionske jakosti. Mjerenja su provedena tri puta za jedan uzorak pri koncentraciji od $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$. Svi DLS i ELS podaci obrađeni su u softverskom paketu Zetasizer, verzija 7.13 (Malvern Instruments).

3.4. Konfokalna mikroskopija

Analiza morfoloških obilježja MMM-ova, u odsutnosti i prisutnosti MBP-a, provedena je konfokalnom laserskom skenirajućom mikroskopijom (CLSM) koristeći sustav Leica TCS-SP8 (Leica Microsystems, Mannheim, Njemačka). Mikroskop je bio opremljen imerzijskim objektivom za uranjanje u vodu povećanja $63\times$ visoke numeričke aperture, čime je omogućena visoka prostorna rezolucija i minimalna refrakcijska aberacija tijekom snimanja vodenih lipidnih sustava.¹⁵³ Za ekscitaciju je korišten OPSL-488 laser (Coherent, Berlin, Njemačka), pri snazi od 1 %, a sva mjerenja izvedena su u svjetlosnom (engl. *bright-field*) načinu rada pri sobnoj temperature (25 °C) kako bi se očuvala nativna struktura membranskih modela.¹⁷⁵

Dobivene slike pohranjene su i dokumentirane pomoću softverskog paketa *LAS X Life Science Microscope Software* (Leica Microsystems, Mannheim, Njemačka).¹⁷⁶ Naknadna obrada slike, uključujući korekciju kontrasta, uklanjanje šuma te odabir reprezentativnih prikaza, provedena je u programu Fiji ImageJ (v2), koji je standardni softverski alat za analizu mikroskopskih podataka u otvorenom pristupu.¹⁷⁷

3.5. Razlikovno-pretražna kalorimetrija

Mjerenja razlikovno-pretražnom kalorimetrijom (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC) izvedena su pomoću mikrokolorimetra Nano-DSC (TA Instruments, New Castle, DE, SAD). Za sve eksperimente korištene su suspenzije lipida, s ili bez MBP-a, pri koncentraciji od 5 mg mL⁻¹. Prije analize uzorci su degazirani 15 minuta pod smanjenim tlakom (0,60 bara) kako bi se uklonila prisutnost otopljenih plinova i osigurala stabilna bazna linija tijekom mjerenja.

Eksperimentalni protokol uključivao je dva uzastopna ciklusa zagrijavanja i hlađenja, pri brzini promjene temperature od 1 °C min⁻¹, unutar raspona od 10 do 90 °C. Vodena otopina natrijeva klorida (NaCl(aq), $I = 100$ mM) korištena je kao referentni uzorak te je zasebno izmjerena u istom temperaturnom području 10–90 °C. Također, termotropna svojstva MBP-a u NaCl(aq) istražena su na jednak način u istom temperaturnom rasponu. Za obradu rezultata korišteni su podaci drugog ciklusa zagrijavanja, čime se eliminira moguć utjecaj pripreme suspenzije (odnosno otopine kad je u pitanju MBP u NaCl(aq)).¹⁷⁸

Analiza DSC krivulja provedena je u softveru Nano Analyze (TA Instruments). Nakon oduzimanja referentne krivulje (NaCl(aq)), DSC krivulje uzoraka dodatno su korigirane u

odnosu na baznu liniju i analizirane u temperaturnom intervalu od 20 do 52 °C. Kod MMM i MMM' sustava su temperature (glavnog) faznog prijelaza određene iz maksimuma (jednog ili više njih) i označene s T_m (kao i kod čistih DPPC, DPPE, DPPS i bSM lipida).

3.6. UV-Vis spektroskopija

UV-Vis spektri u temperaturno-ovisnom režimu snimljeni i izmjereni su na UV-Vis spektrofotometru JASCO V-730 (ABL&E Handels GmbH, Wien, Austria) u spektralnom intervalu od 250 do 500 nm. Uzorci koncentracije $\gamma = 1 \text{ mg mL}^{-1}$ pipetirani su u kvarcne kivete volumena 1 mL, hermetički zatvoreni i postavljeni u temperaturno kontrolirani držač kiveta kako bi se osigurala stabilnost eksperimentalnih uvjeta tijekom mjerenja. Spektri lipidnih suspenzija s/bez MBP-a snimani su najmanje dvaput unutar temperaturnog raspona od 20 do 50 °C za uzorke s nezasićenim, odnosno od 30 do 60 °C sa zasićenim ugljikovodičnim lancima.

Sirovi spektralni podaci dodatno su obrađeni primjenom Savitzky–Golay algoritma (polinom trećeg stupnja, 10 točaka), metode najmanjeg kvadrata, u spektralnom području od 250 do 300 nm.¹⁷⁴ Obrađeni spektri su analizirani primjenom MCA koristeći javno dostupni Matlab kod.¹⁸

Prikupljeni spektri organizirani su u matricu (**D**), koju je moguće prikazati kao umnožak dviju matrica: matrice (**C**), koja opisuje koncentracijski profil komponente odgovorne za temperaturno inducirane promjene u spektrima, i matrice (**S**), koja definira njezin spektralni profil (detaljnije objašnjeno u poglavlju 2.5.).¹⁷

3.7. FTIR-ATR spektroskopija

FTIR-ATR spektroskopska mjerenja provedena su korištenjem spektrometra INVENIO-S (Bruker), opremljenog jedinicom BioATR II i fotonaponskim LN-MCT detektorom te programom OPUS 8.5 SP1 (20200710). Za sva mjerenja korišten je KBr razdjelnik svjetlosnog snopa, postavljen na otvor od 1 mm, dok je brzina skeniranja detektora bila podešena na 15 kHz kako bi se povećala osjetljivost. Kružna BioATR II ćelija ima radijus od 2 mm te sadrži dva kristala, gornji izrađen od silicija (Si), te donji od cinkova selenida (ZnSe). ATR ćelija se pri

radu kontinuirano propuhuje plinovitim dušikom (N_2) iz vanjskog spremnika, a njezina je temperatura stabilizirana cirkulacijom vode koju kontrolira temperaturni regulator Huber Ministat 125. Za svako mjerenje je nanošeno po 20 μ L uzorka u ćeliju pri koncentracijama: MMM ($\gamma = 5 \text{ mg mL}^{-1}$), MMM+MBP ($\gamma(\text{MBP}) = 0,6 \text{ mg mL}^{-1}$; $\gamma(\text{MMM}) = 5 \text{ mg mL}^{-1}$) te MBP u NaCl(aq)-u. FTIR spektri lipidnih suspenzija sa zasićenim ugljikovodičnim lancima su prikupljeni pri temperaturama od 30 °C i 60 °C, odnosno pri 20 °C i 50 °C sa nezasićenim ugljikovodičnim lancima, zbog karakterizacije u uvjetima koji odgovaraju pretežno gel-fazi (30 °C) i fluidnoj (60 °C) fazi. Za svaki uzorak izvedena su tri neovisna mjerenja, osim za NaCl(aq), koji je snimljen jednom. Svi spektri prikupljeni su pri nominalnoj spektralnoj razlučivosti od 2 cm^{-1} i prosjek su 256 snimaka.

Snimljeni spektri analizirani su u sljedećim spektralnim područjima:

- (i) 2980–2820 cm^{-1} , gdje se nalaze vrpce antisimetričnog ($\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$) i simetričnog ($\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$) istezanja metilenskih skupina u ugljikovodičnim lancima lipida;
- (ii) 1762–1690 cm^{-1} , koje obuhvaća vrpce istezanja karbonilne skupine glicerolne okosnice lipida ($\nu\text{C}=\text{O}(\text{OR})$);
- (iii) 1485–1430 cm^{-1} , unutar kojeg se pojavljuje strižna vrpca metilenskih skupina (γCH_2) te vrpca svijanja protonirane amino-skupine (δNH_3^+) MBP-a i DPPE lipida;
- (iv) 1275–1190 cm^{-1} , u kojem se nalazi vrpca antisimetričnog antisimetrično istezanja fosfatnih skupina u polarnim glavama lipida ($\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-$), kao i antisimetrično istezanje C–O skupina ($\nu_{\text{as}}\text{C}=\text{O}$). Detaljnije o važnosti izabranih spektralnih područja se nalazi u Rezultatima i raspravi (poglavlje 4.3.).

U navedenim spektralnim područjima, spektri su izgladeni postupkom Savitzky–Golay (polinom trećeg stupnja, 30 točaka), korigirani prema baznoj liniji te obrađeni u programu Spectragryph.¹⁷⁹

3.8. CD spektroskopija

CD spektri su izmjereni korištenjem Jasco J-815 spektrometra opremljenog Peltierovim sustavom za preciznu kontrolu temperature, uz uporabu kvarcnih kiveta optičkog puta od 0,01 cm. U svako mjerenju je korišteno 40 μ L uzorka: MBP ($\gamma(\text{MBP}) = 1,3 \text{ mg mL}^{-1}$; $c(\text{MBP}) = 67,4 \text{ }\mu\text{M}$), MMM ($\gamma(\text{MMM}) = 1 \text{ mg mL}^{-1}$, MBP + MMM ($\gamma(\text{MBP}) = 1 \text{ mg mL}^{-1}$), te NaCl(aq). Kivete su postavljene u temperaturno-kontrolirani CD blok, a mjerenja su provedena pri 30 °C i 60 °C

s lipidima koji imaju zasićene ugljikovodične lance, te pri 20 °C i 50 °C s lipidima koji imaju nezasićene ugljikovodične lance. Za svaki uzorak zabilježena su najmanje dva neovisna spektra radi potvrde reproducibilnosti. CD spektri su snimani u području 300–190 nm, brzinom snimanja 200 nm min⁻¹ i uz dvije akumulacije, u skladu s preporukama za CD eksperimente proteina u dalekom UV području.¹⁷⁸ Sirovi spektri MMM + MBP korigirani su oduzimanjem spektra odgovarajućih MMM-ova u NaCl(aq). Nakon toga, spektri su izglađeni primjenom Savitzky–Golay algoritma (polinom trećeg stupnja, 30 točaka), potom su korigirani prema baznoj liniji te obrađeni u programu Spectragryph.¹⁷⁹

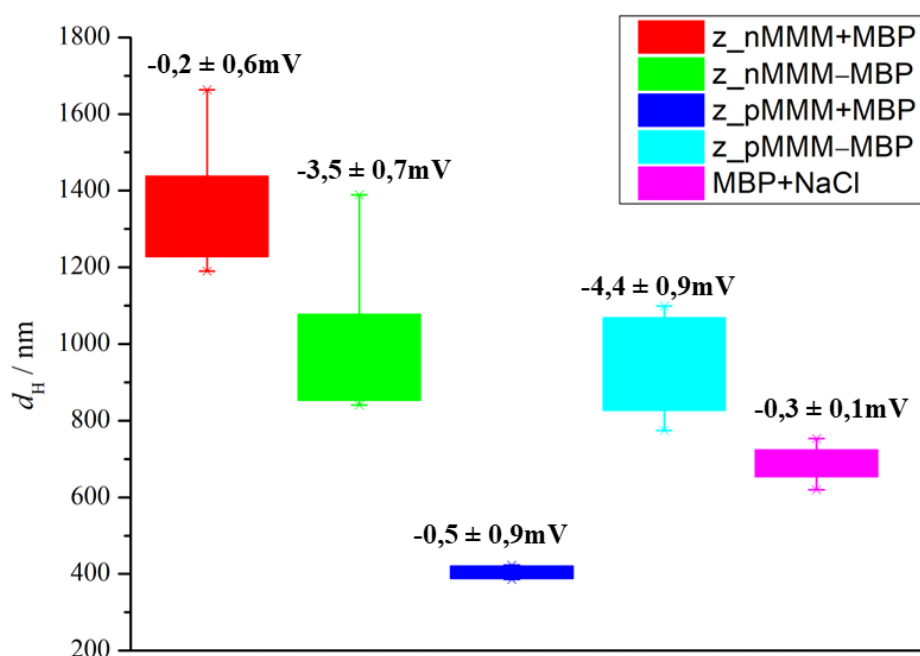
Za kvantitativnu analizu udjela sekundarnih struktura MBP-a iz CD spektara korišten je program BeStSel (engl. *Beta Structure Selection*). BeStSel je specijaliziran algoritam za dekonvoluciju CD spektara u dalekom UV području koji omogućuje precizno određivanje udjela α -uzvojnica, β -struktura (uključujući paralelne i antiparalelne β -ploče), zavoja i neuređenih konformacija, čak i kod proteina s visokim udjelom intrinzične neuređenosti poput MBP-a.^{175,180} Metoda se temelji na unaprijeđenoj klasifikaciji β -struktura i usporedbi eksperimentalnih spektara s referentnim skupom proteina poznate strukture, čime se povećava pouzdanost analize u odnosu na klasične CD dekonvolucijske pristupe.¹⁸⁰

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Veličina, zeta-potencijal i morfologija modelnih membrana

4.1.1. DLS, ELS i konfokalna mikroskopija MMM-ova sa zasićenim lancima i kolesterolom

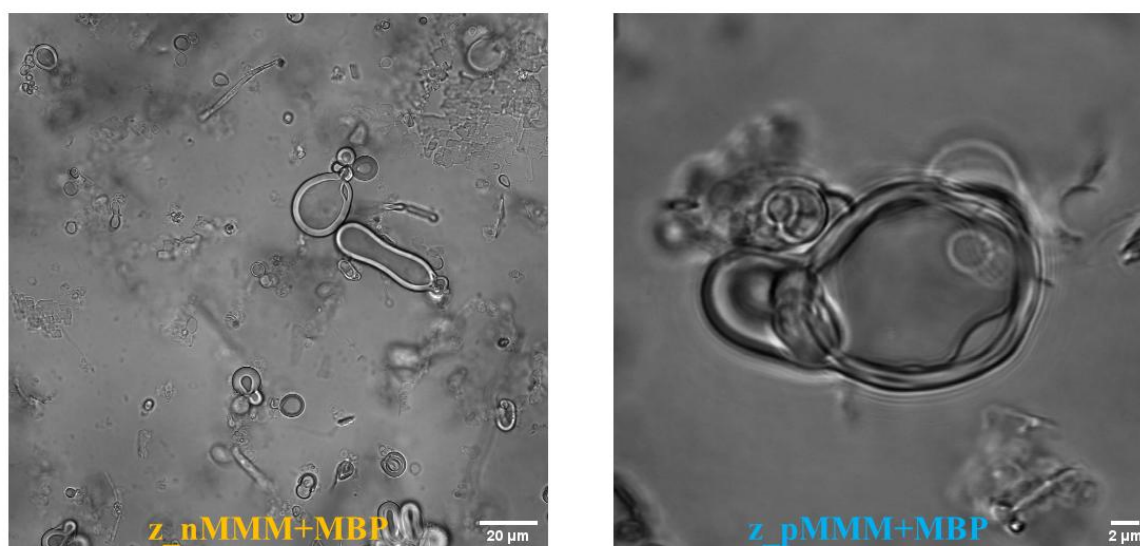
DLS i ELS mjerenja MMM-ova pokazuju velike razlike u vrijednosti hidrodinamičkog promjera (d_H) normalnih i promijenjenih MMM-ova u prisutnosti MBP-a (slika 22.). Normalni MMM-ovi priređeni od lipida sa zasićenim lancima s Chol (z_nMMM) su 3-4x su veći i pokazuju znatno širi raspon vrijednosti u odnosu na promijenjene MMM-ove (z_pMMM). Oba opažena fenomena ukazuju na različitu prirodu interakcija između MBP-a i dvaju tipova MMM-ova, što proizlazi iz njihovih različitih omjera lipida, posebno udjela anionskog DPPS-a koji. Naime, DPPS unosi različitu količinu negativnog naboja u MMM-ove (dvostruko je veći kod promijenjenih nego kod normalnih MMM-ova), čime značajno mijenja elektrostatsku privlačnost između membrane i pozitivno nabijenog MBP-a pri pH vrijednosti medija u kojem su mjerenja provedena.^{11,181}



Slika 22. Veličina (d_H) i ζ -potencijal MMM-ova sa zasićenim lancima i Chol s/bez MBP-a, te samog MBP-a.

Zanimljivo je da obje vrste MMM-ova bez MBP-a ($z_n\text{MMM-MBP}$ i $z_p\text{MMM-MBP}$) pokazuju usporediv d_H , što potvrđuje da su u ovim sustavima razlike u veličini povezane i s interakcijom proteina i lipidnih dvoslojeva membrane, a ne samo sa svojstvima lipida.

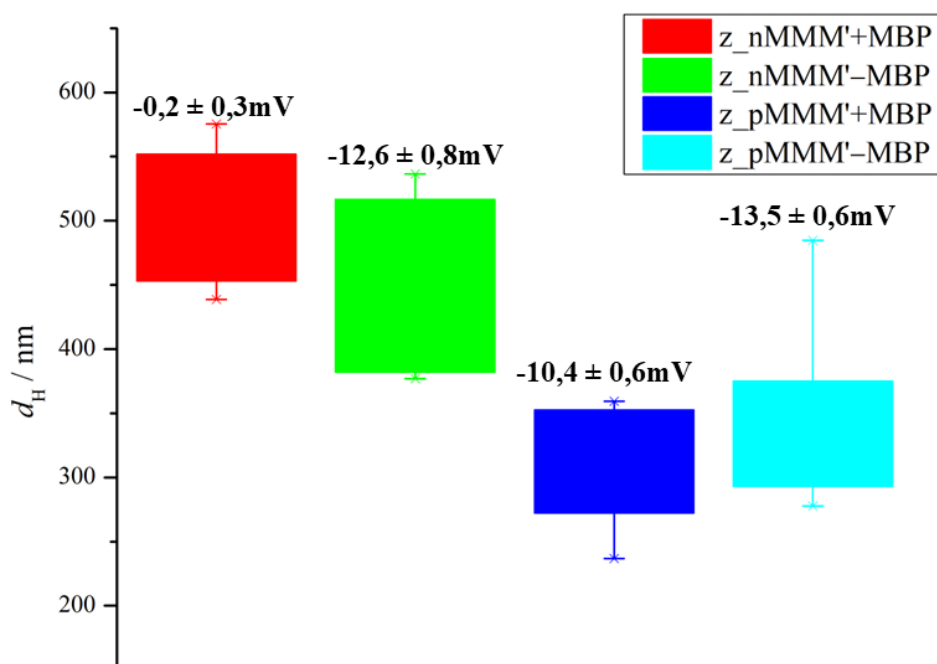
U prisustvu MBP-a, ζ -potencijal oba sustava pomiče se prema vrijednostima blizu nule, što je očekivano zbog povezivanja pozitivno nabijenog MBP-a s negativno nabijenim lipidima u suspenzijama. Smanjenje površinskog naboja ujedno je glavni čimbenik destabilizacije vezikularnih sustava i olakšava njihovu agregaciju. Rezultati konfokalne mikroskopije dodatno potvrđuju ovaj zaključak. Snimanje jasno pokazuje agregaciju MMM-ova u prisutnosti MBP-a (slika 23.), pri čemu agregati variraju u veličini i morfologiji. Ostale snimke konfokalne mikroskopije, kao i sve vrijednosti DLS i ELS mjerenja su u Dodatku 8.1.



Slika 23. Snimke MMM-ova sa zasićenim lipidima, Chol i MBP-om dobivene konfokalnom mikroskopijom. Lijevo je uzorak pri normalnim uvjetima, a desno pri promijenjenim uvjetima.

4.1.2. DLS, ELS i konfokalna mikroskopija MMM'-ova sa zasićenim lancima bez kolesterola

Kod MMM'-ova sa zasićenim lancima bez Chol uočava se veće odstupanje u rezultatima (slika 24.). Kada je riječ o MMM'-sustavima pri fiziološkim uvjetima, veća je veličina čestica u prisustvu MBP-a ($z_n\text{MMM}' + \text{MBP}$), nego u odsustvu ($z_n\text{MMM}' - \text{MBP}$). Istodobno je ζ -potencijal blizu nuli ($-0,2 \pm 0,3 \text{ mV}$) u uzorku s MBP-om, što upućuje na neutralizaciju negativnog naboja membranskih lipida uslijed adsorpcije pozitivnog MBP-a.

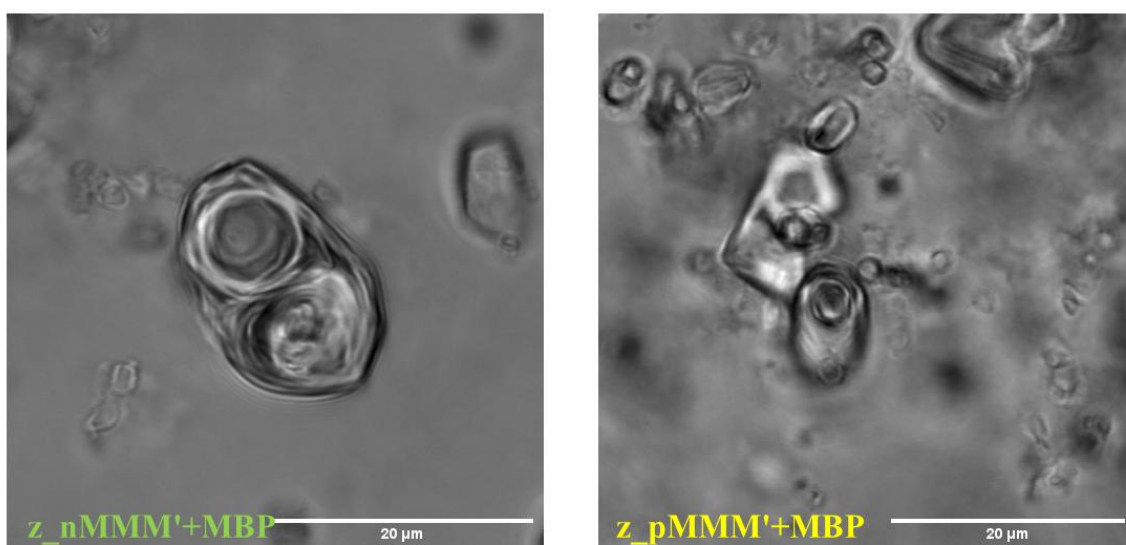


Slika 24. Veličina (d_H) i ζ -potencijal MMM'-ova sa zasićenim lancima s/bez MBP-a.

Nadalje, u normalnom MMM'-u bez MBP-a ($z_n\text{MMM}' - \text{MBP}$), liposomi zadržavaju izrazito negativan ζ -potencijal ($-12,6 \pm 0,8 \text{ mV}$), čime se održava njihova stabilnost i sprječava agregacija. Međutim, potpuno drugačiji trend uočen je u uzorcima pri promijenjenim uvjetima. Iako MMM'-ovi s MBP-om ($z_p\text{MMM}' + \text{MBP}$) pokazuju nešto manje negativni ζ -potencijal u odnosu na liposome bez MBP-a ($z_p\text{MMM}' - \text{MBP}$), ukupna promjena površinskog naboja je znatno manja nego pri normalnim uvjetima. Negativni ζ -potencijal ($-10,4 \pm 0,6 \text{ mV}$) ukazuje na oslabljenu interakciju između MBP-a i anionskih lipidnih glava. Posljedično, d_H ostaje

relativno malen (~ 330 nm), bez značajnih znakova agregacije. Bez MBP-a ($z_p\text{MMM}'\text{-MBP}$), liposomi imaju najnegativniji ζ -potencijal u ovom skupu ($-13,5 \pm 0,6$ mV).

Kao i u prethodnom skupu MMM-ova s Chol, konfokalnom mikroskopijom su se morfološki potvrdili rezultati dobiveni DLS i ELS tehnikama (slika 25.). Rezultati uzoraka s nezasićenim lipidima s/bez Chol i s/bez MBP-a DLS-om, ELS-om i konfokalnom mikroskopijom nalaze se u Dodatku 8.1.



Slika 25. Snimke MMM'-ova sa zasićenim lancima i MBP-om dobivene konfokalnom mikroskopijom. Lijevo je uzorak pri normalnim uvjetima, a desno pri promijenjenim uvjetima.

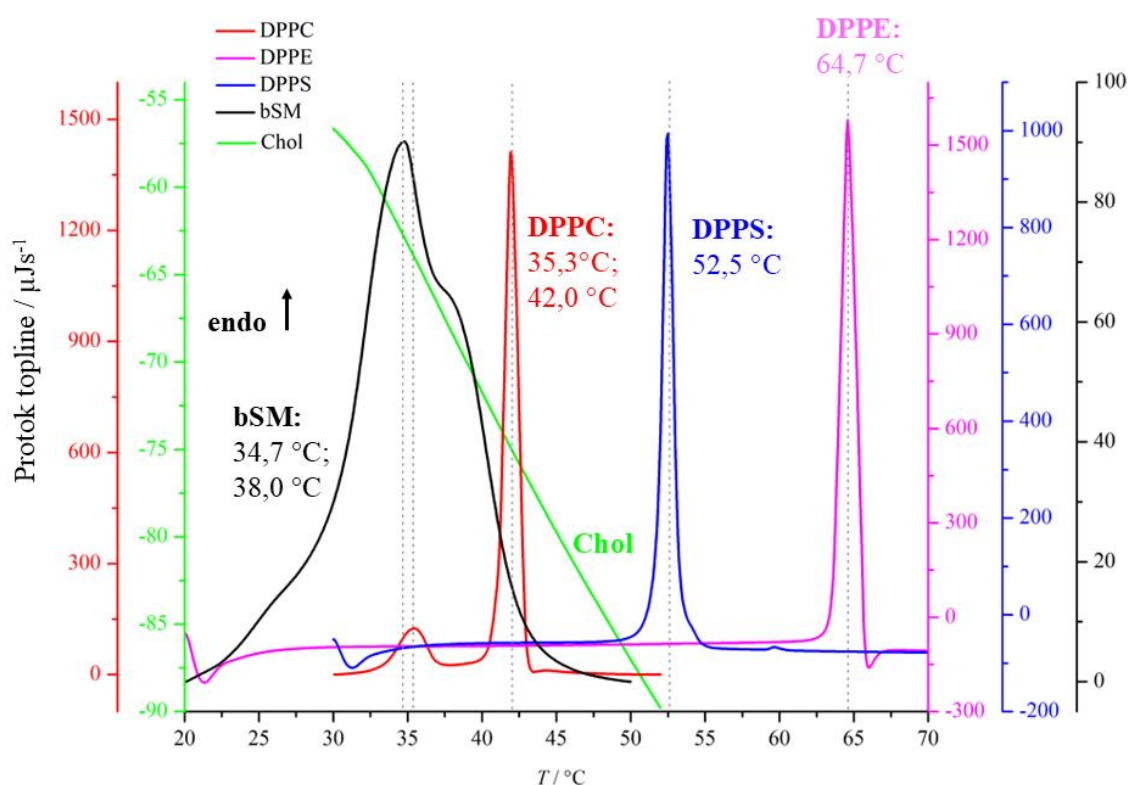
4.2. Termotropna svojstva modelnih membrana

U okviru analize termotropnih svojstava modelnih lipidnih membrana, najvažniji događaj je glavni fazni prijelaz, tijekom kojega lipidni dvosloj prelazi iz gel-faze (L_β) u tekuću fazu (L_α). Ovaj prijelaz obilježen je maksimumom pri temperaturi taljenja (T_m), a njegova vrijednost prvenstveno ovisi o duljini i stupnju zasićenosti ugljikovodičnih lanaca sastavnih lipida. Na molekulskoj razini, glavni fazni prijelaz odražava slabljenje van der Waalsovih sila među lipidnim lancima, povećanje hidratacije u području polarne glave te posljedično stanjivanje dvosloja i povećanje lateralne pokretljivosti molekula lipida.^{182,183}

S obzirom na to da sve lipidne suspenzije pokazuju temperaturno-ovisno zamućenje, primjenom MCA na temperaturno-ovisne UV-Vis spektre određene su vrijednosti T_m koje su usporedive s vrijednostima dobivenim iz DSC krivulja.¹⁰³ Takva usporedba je napravljena za uzorke bez dodanog Chol. Njegov dodatak najčešće uzrokuje formiranje membranskih domena s različitim indeksima loma, promjenu bazne linije spektra te induciranje prividnih pomaka apsorbancije.¹⁷² Naposljetku, pokazali smo da termotropna svojstva MLV-ova, priređenih od DPPC lipida s 20% (x) Chol, više ne pokazuju odlično podudaranje s onima dobivenim DSC tehnikom.¹⁸

U ovom poglavlju cilj je istražiti na koji način MBP utječe na termotropna svojstva modelnih lipidnih membrana pri fiziološkim i patološkim uvjetima, te da li prisutstvo ili odsustvo Chol igra bitnu ulogu u fazi modelnih membrana. Budući da su T_m vrijednosti MMM-ova sa zasićenim ugljikovodičnim lancima dovoljno visoke da budu izmjerene dostupnim instrumentima (DSC kalorimetrom i UV-Vis spektrofotometrom), one su detaljnije razmatrane u nastavku teksta. Mjerenja ostalih uzoraka sa zasićeni/nezasićeni lipidi, s/bez kolesterola, s/bez MBP-a, koja nisu navedena u Rezultatima i raspravi nalaze u Dodatku 8.2.

Termotropna svojstva sastavnih lipida sa zasićenim ugljikovodičnim lancima (DPPC, DPPE, DPPS) te bSM i Chol, analizirana su DSC-om s ciljem razumijevanja njihovog doprinosa faznim svojstvima složenih lipidnih mješavina kao što su MMM(')-ovi (slika 26.). U MMM-ovima, pojedinačna termotropna svojstva lipida ne manifestiraju se izolirano, već kroz međusobne interakcije koje rezultiraju značajnim promjenama faznih svojstava u odnosu na čiste komponente.¹¹



Slika 26. DSC krivulje konstitutivnih lipida sa zasićenim ugljikovodičnim lancima u NaCl(aq) s naznačenim temperaturama (glavnih) faznih prijelaza.

Rezultati DSC-a za krivulja DPPC slažulipida podudara se s literaturno poznatim termotropnim svojstvima zasićenog fosfatidilkolina i objavljenim kalorimetrijskim podacima, s jasno izraženim niskokooperativnim pretprijelazom pri približno 35,3 °C (T_p) i glavnim, visokokooperativnim prijelazom iz gel- ($L_{\beta'}$) u fluidnu fazu (L_{α}) pri 42,0 °C. Oštar karakter glavnog prijelaza ukazuje na visoki stupanj uređenosti i kooperativnosti ugljikovodičnih lanaca, što DPPC čini pogodnim referentnim lipidom za proučavanje utjecaja drugih komponenti na

membransku fluidnost. U kontekstu MMM(')-ova, DPPC doprinosi stvaranju lamelarne strukture.⁸⁶

DPPE pokazuje znatno višu temperaturu glavnog faznog prijelaza ($T_m = 64,7\text{ °C}$), što je posljedica jačine HB u kojima sudjeluje manja etanolaminska polarna glava, a koja ujedno omogućuje gušće pakiranje lipidnih molekula. Ovakvo ponašanje ukazuje na izraženu sklonost DPPE-a prema formiranju krutih membranskih domena niske fluidnosti.³³ U MMM(')-ovima DPPE potencijalno ima stabilizacijsku ulogu, pridonoseći povećanoj mehaničkoj čvrstoći i otpornosti membrane na temperaturne fluktuacije, osobito u kombinaciji s Chol i sfingomijelinom.^{11,184}

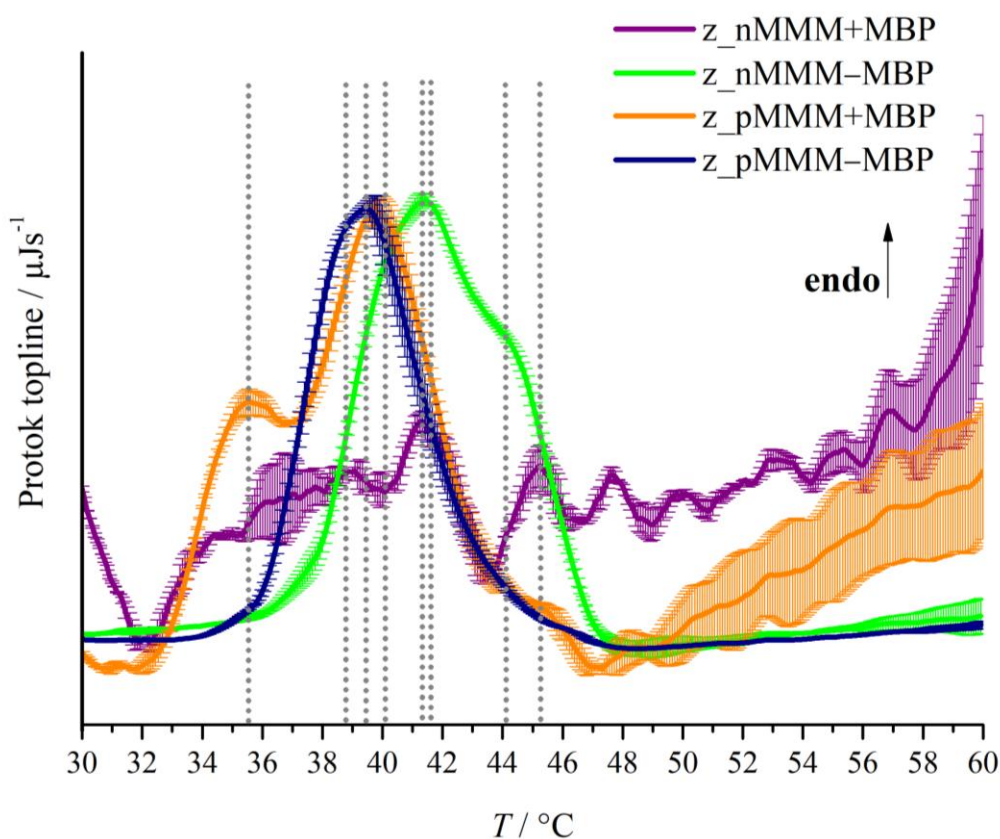
DPPS pokazuje glavni fazni prijelaz pri $52,5\text{ °C}$, pri čemu negativno nabijena serinska polarna glava omogućuje dodatne elektrostatske interakcije i umrežavanje ionskog karaktera. U kontekstu MMM(')-ova, DPPS ima ključnu ulogu jer doprinosi ukupnom negativnom naboju membrane, čime se omogućuju snažne elektrostatske interakcije s pozitivno nabijenim MBP-om. Time DPPS ne utječe samo na termotropna svojstva membrane, već i na njezinu biološku funkcionalnost.^{11,33}

Sfingomijelin iz mozga (bSM) pokazuje širok i složen endotermni prijelaz s maksimumima oko $34,7\text{ °C}$ i $38,0\text{ °C}$, što odražava heterogenost ugljikovodičnih lanaca i prisutnost više molekulskih vrsta. Sfingomijelini su poznati po snažnim intermolekulskim HB i visokom stupnju lateralne organizacije, što ih čini ključnim komponentama rigidnih membranskih domena.¹⁸⁵

Iako ne pokazuje termotropni događaj u istraženom temperaturnom rasponu, Chol ima snažan modulacijski učinak na termotropna svojstva ostalih lipida. Njegova prisutnost smanjuje kooperativnost faznih prijelaza fosfolipida, proširuje temperaturni raspon prijelaza te dovodi do visoke lateralne uređenosti s određenim stupnjem fluidnosti.¹⁸⁶

4.2.1. Termotropna svojstva MMM-ova sa zasićenim lancima i kolesterolom

Na DSC krivulji MMM-sustava sa zasićenim lipidima (s kolesterolom) pri fiziološkim uvjetima bez MBP-a ($z_n\text{MMM-MBP}$) su detektirana dva nerazriješena endotermna maksimuma smještena na $41,5 \pm 0,1$ °C i $44,2 \pm 0,1$ °C (slika 27.). Ovakav dvostruki signal sugerira određeni stupanj mikrodomenske organizacije sustava, vjerojatno od glavnih faznih prijelaza konstitutivnih lipida.^{118,167,168,169,170,171} Suprotno tome, u prisustvu MBP-a ($z_n\text{MMM+MBP}$) eventualni signali koji se praktički ne mogu razlučiti od šuma, ukazuju na to da MBP značajno narušava van der Waalsove interakcije između ugljikovodičnih lanaca čim se adsorbira na površinu normalnih MMM-ova, do te mjere da se glavni fazni prijelaz više ne može detektirati DSC-om. Usporediva DSC krivulja (u danom temperaturnom rasponu) dobivena je i za MMM-ove priređene od lipida s nezasićenim ugljikovodičnim lancima (vidjeti sliku D4. u Dodatku pod 8.2.).



Slika 27. DSC krivulje MMM-ova sa zasićenim lancima u odsutnosti/prisutnosti MBP-a s pripadajućim nesigurnostima. Temperature faznih prijelaza istaknute su isprekidanim linijama i dodatno su napisane u tablici 4.

Tablica 4. Temperature faznih prijelaza zasićenih MMM-ova sa/bez MBP-a određene iz maksimuma DSC krivulja.

MMM sustav	DSC
	$T_m / ^\circ\text{C}$
z_nMMM+MBP	–
z_nMMM–MBP	41,5 / 44,2 $\pm$ 0,1
z_pMMM+MBP	35,5 / 40,0 / 45,6 $\pm$ 0,1
z_pMMM–MBP	39,5 $\pm$ 0,1

U promijenjenim MMM-ovima, utjecaj MBP-a je kvalitativno i kvantitativno drugačiji. U odsutnosti MBP-a (**z_pMMM–MBP**), prisutan je jedan dominantan prijelaz na 39,5 $\pm$ 0,1 $^\circ\text{C}$, što je u skladu s termotropnim svojstvima pojedinačnih lipida uključenih u formulaciju (dominantno manji udio DPPC-a i veći udjeli DPPE-a i DPPS-a).^{120,170} Međutim, u prisutnosti MBP-a (**z_pMMM+MBP**) DSC krivulja sadrži tri jasno razdvojena maksimuma pri 35,5 $\pm$ 0,1 $^\circ\text{C}$, 40,0 $\pm$ 0,1 $^\circ\text{C}$ i 45,6 $\pm$ 0,1 $^\circ\text{C}$. Pojava višestrukih prijelaza ukazuje na heterogenost sastava lipidnog dvosloja, te na reorganizaciju i destabilizaciju membranskih struktura kao posljedicu interakcija s proteinom.

Temperaturno-ovisni UV-Vis spektri MMM-ova koji sadrže Chol nisu bili pogodni za daljnju kvantitativnu analizu. Prisustvo kolesterola dovodi do povećane sklonosti membranskih sustava agregaciji i stvaranju većih heterogenih struktura, što rezultira izraženim raspršenjem svjetlosti i povišenom osnovnom linijom spektra, osobito pri višim masenim koncentracijama lipida ($\gamma = 1 \text{ mg mL}^{-1}$), što je u ovom slučaju bilo potrebno zbog dodanog MBP-a.¹⁸⁷ Takvi efekti maskiraju suptilne promjene apsorbancije povezane s temperaturnim prijelazima i onemogućuju pouzdanu interpretaciju spektralnih promjena. Slična ograničenja UV-Vis spektroskopije u analizi lipidnih membrana s kolesterolom već su ranije opisana u literaturi, gdje se ističe da je metoda izrazito osjetljiva na agregaciju i turbiditet uzorka.¹⁸⁸

4.2.2. Termotropna svojstva MMM'-ova sa zasićenim lancima bez kolesterola

U nastavačku slijedi usporedba termotropnih svojstava MMM'-ova sa zasićenim lancima u prisutnosti i odsutnosti MBP-a dobivenih kalorimetrijski i spektroskopski, odnosno iz DSC krivulje s temperaturno-ovisnim UV-Vis spektrima analiziranim MCA metodom. Tom metodom dobiveni su koncentracijski profili karakterističnog sigmoidalnog oblika, pri čemu točke infleksije odgovaraju T_m vrijednostima određenima DSC mjerenjima je u analizi rezultata potonje tehnike korištena MCA (slika 28.).

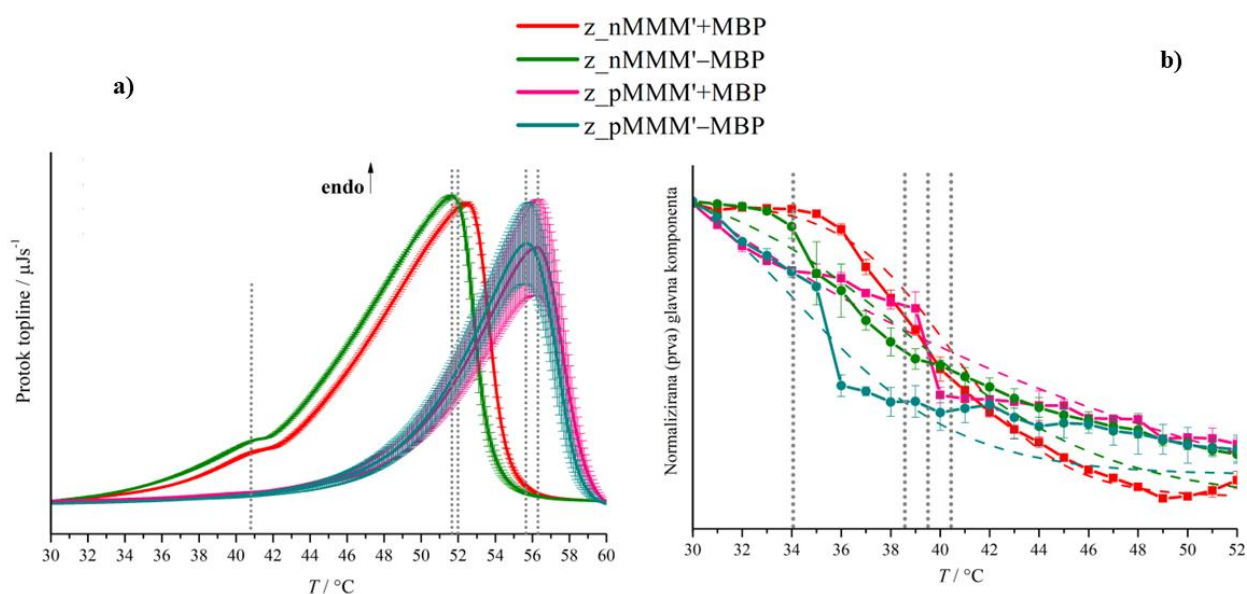
Na DSC krivulji zasićenih MMM'-ova u prisutnosti MBP-a ($z_nMMM'+MBP$) pri fiziološkim uvjetima, ističu se dva maksimuma na temperaturama $41,1 \pm 0,1^\circ\text{C}$ i $52,5 \pm 0,1^\circ\text{C}$.¹⁶⁶ Iako je maksimum pri nižoj temperaturi slabije izražen, on upućuje na heterogenost unutar lipidnih dvoslojeva i/ili na prisutnost mikrodomena lipida različitih stabilnosti.

Slično se događa u uzorku MMM'-ova bez MBP-a ($z_nMMM'-MBP$) s time što su uočeni maksimumi opaženi pri nižim temperaturama od $40,8 \pm 0,1^\circ\text{C}$ i $51,7 \pm 0,1^\circ\text{C}$.¹⁷¹ Točke infleksije iz koncentracijskih profila određene MCA metodom analizom UV-Vis spektara pokazuju niže vrijednosti T_m u odnosu na one očitane iz DSC krivulje: $40,4 \pm 0,4^\circ\text{C}$ za $z_nMMM'+MBP$ i $38,6 \pm 0,5^\circ\text{C}$ za $z_nMMM'-MBP$. Naime, kod UV-Vis spektroskopije se detektira promjena turbiditeta već na samom početku fazne promjene, što se u značajnoj mjeri podudara s vrijednostima prvih maksimuma na DSC krivuljama. Nasuprot tome, kod DSC mjerenja T_m očitava se u maksimumu, kada je približno polovica molekula u gel fazi, a polovica u fluidnoj fazi (tablica 5.).¹⁸⁹

Kod uzoraka koji oponašaju mijelin pri patološkim uvjetima, $z_pMMM'+MBP$ i $z_pMMM'-MBP$, najvidljiviji su pomaci T_m vrijednosti prema višim vrijednostima u odnosu na $z_nMMM'+MBP$ i $z_nMMM'-MBP$. Takve promjene mogu se povezati s omjerom lipida u MMM'-ovima, odnosno većim udjelom DPPE i DPPS lipida koji imaju više T_m vrijednosti od ostalih (vidjeti tablicu 2.), te manjim udjelom DPPC-a. Kad se doda MBP, ($z_pMMM'+MBP$), uočava se jedan maksimum na DSC krivulji pri $56,1 \pm 0,1^\circ\text{C}$, dok u uzorku bez dodanog MBP-a vrijednost T_m iznosi $55,7 \pm 0,1^\circ\text{C}$ ($z_pMMM'-MBP$). Nakon analize UV-Vis spektara MCA metodom određene točke infleksije koncentracijskih profila pokazuju niže vrijednosti u odnosu na one zamjećene na DSC krivuljama: $39,4 \pm 0,2^\circ\text{C}$ i $34,2 \pm 0,6^\circ\text{C}$.¹⁷¹ Navedene vrijednosti su niže u odnosu na one očitane iz maksimuma DSC krivulja, što se može obrazložiti na jednak način kao i kod ostalih uzoraka odnosno razlikom između temperature određene na početku

taljenja (UV-Vis metoda) i temperature pri kojoj je rastaljeno 50% lipida (DSC metoda u fluidnoj fazi).

Dodatno, uočeno je da prisutnost MBP-a, i kod normalnih i kod promijenjenih MMM'-ova, dovodi do povećanja T_m vrijednosti maksimuma i do blagog širenja DSC krivulja MMM'-ova. Takva opažanja sugeriraju da MBP u uzorcima bez Chol (MMM') utječe na jačanje van der Wallsovih sila između ugljikovodičnih lanaca lipida, što rezultira povećanjem T_m -ova.



Slika 28. DSC krivulje (a) i koncentracijski profili normirane (prve) glavne komponente dobiveni temperaturno ovisnom UV-Vis spektroskopijom (b) MMM'-ova sa zasićenim lancima bez Chol u odsutnosti/prisutnosti MBP-a s pripadajućim nesigurnostima. Temperature faznih prijelaza istaknute su isprekidanim linijama i pod a) i pod b), te su dodatno ispisane u tablici 5.

Tablica 5. Temperature faznih prijelaza MMM'-ova sa zasićenim lancima s/bez MBP-a određene iz maksimuma DSC krivulja i iz točaka infleksije koncentracijskih profila dobivenih multivarijantnom analizom krivulja (MCA).

MMM' sustav	DSC	UV-Vis
	$T_m / ^\circ\text{C}$	$T_m / ^\circ\text{C}$
z_nMMM'+MBP	41,1 / 52,5 $\pm$ 0,1	40,4 $\pm$ 0,4
z_nMMM'–MBP	40,8 / 51,7 $\pm$ 0,1	38,6 $\pm$ 0,5
z_mMMM'+MBP	56,1 $\pm$ 0,1	39,4 $\pm$ 0,2
z_mMMM'–MBP	55,7 $\pm$ 0,1	34,2 $\pm$ 0,6

4.3. FTIR-ATR spektroskopija modelnih membrana

FTIR-ATR spektroskopija je korištena za praćenje promjena vibracijskih signala lipida kao funkcije njihova okruženja i faze lipidnih dvoslojeva. Budući da su vibracijske vrpce lipida izrazito osjetljive na stupanj uredenosti ugljikovodičnih lanaca, hidrataciju i međumolekulske interakcije^{190,191}, mjerenja su provedena pri temperaturama pri kojima su lipidni dvoslojevi dominantno u gel-fazi ($L_{\beta'}$) i fluidnoj (L_α) fazi.^{192,193}

Osim signala lipida, analiza FTIR-ATR spektara omogućila je i opažanje signala MBP-a te njegove modulacije ovisno o fazi lipidnih dvoslojeva kao i o omjeru lipida u ispitivanim MMM sustavima. Unatoč činjenici da je koncentracija MBP-a bila znatno niža od koncentracije lipida (omjer 1:200 molekula proteina u odnosu na molekule lipida)⁴, interakcija MBP-a s membranom očitovala se kroz promjene u vibracijskim vrpama lipida neovisno o promjeni temperature. To je u skladu s literaturnim podacima koji ukazuju na snažan utjecaj membranskih proteina na fizikalna svojstva lipidnih dvoslojeva čak i pri niskim molnim udjelima.¹¹ Takav pristup omogućio je djelomičan uvid u način na koji MBP utječe na slaganje lipida u dvoslojevima te na intra- i intermolekulske interakcije pri fiziološkim (normalne MMM) i patološkim (promijenjene MMM) uvjetima.

Kao što je najavljeno u podsekciji 3.6, u analizi svih MMM-ova razmatrana su ova četiri spektralna područja:

i) 2980–2820 cm^{-1} koje obuhvaća $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ i $\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$ vrpce te se koristi kao osjetljiv pokazatelj konfiguracije metilenskih skupina u ugljikovodičnim lancima. Promjene položaja i širine ovih vrpce izravno su povezane s faznim prijelazima i jačinom van der Waalsovih interakcija unutar dvosloja.¹⁹²

ii) 1762–1690 cm^{-1} u kojem se opažaju $\nu\text{C}=\text{O}$ vrpce. Ove vrpce odražavaju stupanj hidratacije međupovršinskog sloja, budući da karbonilne skupine mogu biti uključene ili neuključene u HB ($\nu\text{C}=\text{O}_{\text{HB}}$ ili neuključene $\nu\text{C}=\text{O}_{\text{non-HB}}$) s molekulama vode ili drugim HB-donorima i akceptorima.¹⁹³

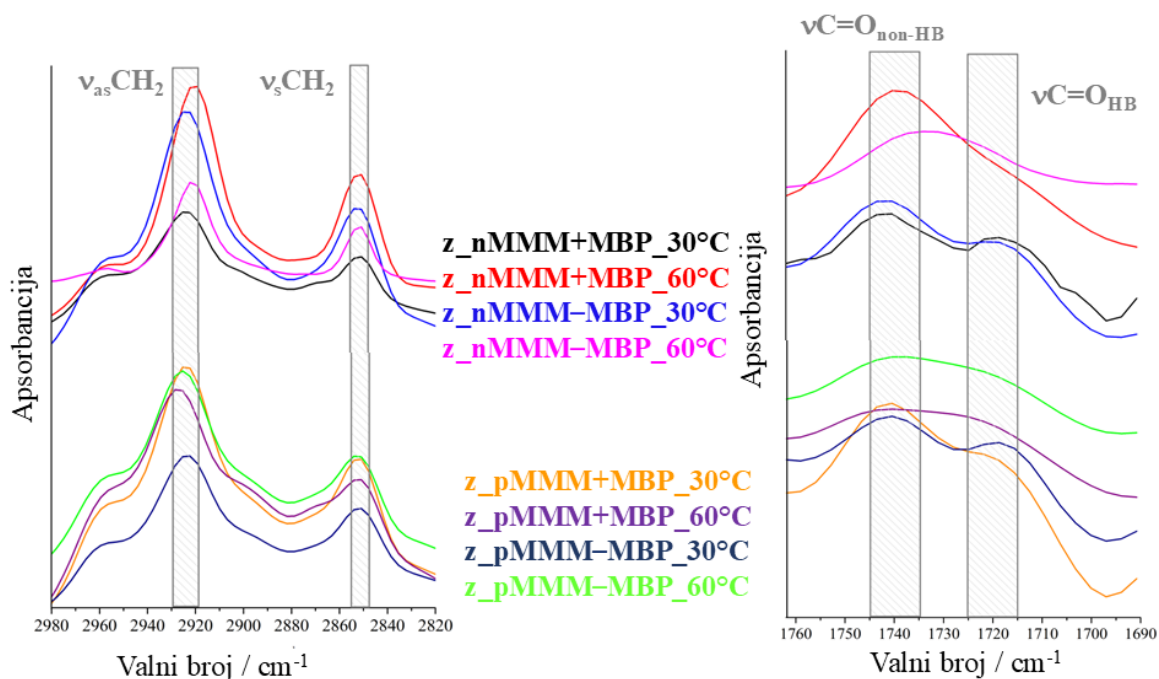
iii) 1485–1430 cm^{-1} obuhvaća γCH_2 vrpce te pruža informacije o lateralnom slaganju ugljikovodičnih lanaca i stupnju njihove uređenosti u membrane. Dodatno, u ovom području se prate svijanja protonirane amino-skupine ($-\text{NH}_3^+$; δNH_3^+) MBP-a i DPPE.¹⁹⁴

iv) 1275–1190 cm^{-1} u kojem se nalaze $\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-$ vrpce, koje, analogno karbonilnim skupinama, mogu biti isključene iz HB mreže ili uključene u nju ($\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-_{\text{non-HB}}$ i $\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-_{\text{HB}}$). Osim toga, u ovom području pojavljuju se i vrpce koje potječu od simetričnog i antisimetričnog istezanja C–O skupina ($\nu_{\text{s}}\text{C}=\text{O}$ i $\nu_{\text{as}}\text{C}=\text{O}$). Promjene u ovom spektralnom području osjetljivo odražavaju hidrataciju i elektrostatsko okruženje polarnih glavnih skupina lipida te interakcije s proteinima ili peptidima.^{195,196}

U nastavku su objašnjenja za svako navedeno spektralno područje svih modelnih membrana: sa s/bez kolesterola, u prisutstvu/odsutstvu MBP-a te pripravljenih od lipida koji imaju zasićene i nezasićene ugljikovodične lance. Cilj FTIR analize je na molekularnoj razini pratiti promjene u organizaciji, hidrataciji i interakciji lipidnih i proteinskih komponenti modelnih membrana, kao i eventualne promjene u ionizacijskim stanjima polarnih skupina lipida i/ili MBP-a. Budući da je MBP intrinzično neuređen protein čija konformacija znatno ovisi o membranskom okolišu, FTIR-ATR spektroskopija omogućuje detekciju promjena njegove sekundarne strukture analizom područja amidnih vrpce, u korelaciji s faznim stanjem membrane, drugim riječima, u odsutstvu lipida, pri temperaturama pri kojima su mjereni i FTIR-ATR spektri MMM(“)-ova. FTIR-ATR spektar MBP-a nalazi se u Dodatku 8.3.

4.3.1. Molekulske značajke MMM-ova sa zasićenim lipidima s kolesterolom

FTIR analiza spektralnog područja $2980\text{--}2820\text{ cm}^{-1}$, koje obuhvaća vrpce vibracija istezanja CH_2 skupine lipidnih lanaca, uobičajeno pokazuje pomak maksimuma vrpce prema višim valnim brojevima ($\sim 3\text{ cm}^{-1}$) pri prijelazu iz gel-faze u fluidnu fazu, što se pripisuje slabljenju van der Waalsovih interakcija između ugljikovodičnih lanaca.^{19,119} Međutim, kod MMM-ova pri fiziološkim uvjetima i u prisustvu MBP-a ($z_n\text{MMM}+\text{MBP}$) opažen je neuobičajen pomak maksimuma $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ vrpce prema nižim valnim brojevima s porastom temperature (s 30 na 60°C), dok položaj $\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$ vrpce ostaje nepromijenjen (slika 29., lijevo). Takvo obilježje ukazuje na gotovo nepromijenjene interakcije s povišenjem temperature (odnosno eventualno jačanje van der Waalsovih interakcija očitovano kroz niskofrekventni pomak $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ vrpce, s time da je položaj maksimuma spomenute vrpce i dalje karakterističan za lipide u fluidnoj fazi), što je u skladu s DSC rezultatima koji ne pokazuju fazni prijelaz u ovom sustavu (slika 27.). Sličan, ali ipak slabije izražen trend uočen je i kod uzoraka bez MBP-a ($z_n\text{MMM}-\text{MBP}$) kod kojih DSC krivulja potvrđuje prisutnost glavnog faznog prijelaza (slika 27.), a što sugerira da na (neznatne) promjene maksimuma vrpce ne utječe samo prisustvo MBP-a već i udjeli različitih lipida. Suprotno tome, MMM-ovi pri patološkim uvjetima, neovisno o prisutnosti MBP-a ($z_p\text{MMM} \pm \text{MBP}$), pokazuju očekivani visokofrekventni pomak $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ vrpce pri zagrijavanju, što jasno odražava fazni prijelaz iz faze gela u fluidnu fazu, dok položaj maksimuma $\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$ vrpce u tim sustavima ostaje nepromijenjen.

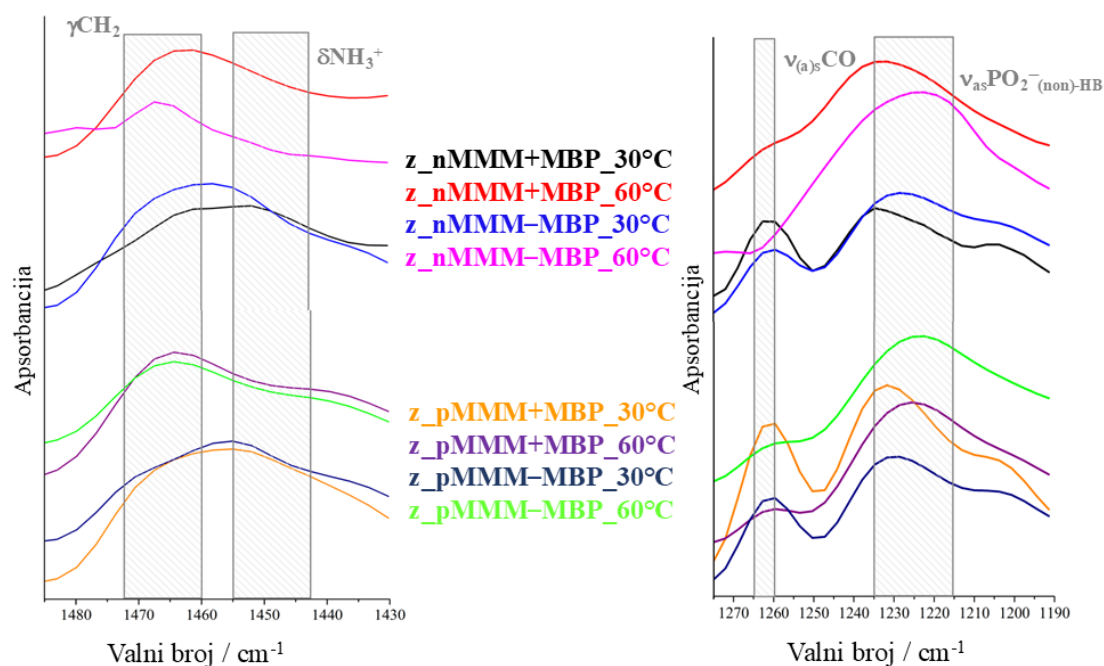


Slika 29. FTIR-ATR spektri vibracijskih područja 2980–2820 cm^{-1} i 1762–1690 cm^{-1} MMM-ova $\pm$ MBP pri 30 i 60 °C.

Analiza karbonilnog područja (1762–1690 cm^{-1} , slika 29., desno), koje odražava hidrataciju karbonilnih skupina glicerolne okosnice, pokazuje da su pri 30 °C vrpce MMM-ova pri fiziološkim i patološkim uvjetima kvalitativno slične, neovisno o prisutnosti MBP-a. S obzirom na to, položaji maksimuma vrpce ukazuju na usporediv stupanj hidratacije međupovršinskog sloja. Kod MMM-ova pri fiziološkim uvjetima na 60 °C, dodatak MBP-a (**z_nMMM+MBP_60°C**) pomiče maksimum $\nu\text{C}=\text{O}_{\text{non-HB}}$ prema manjim valnim brojevima u odnosu na uzorak pri 30 °C, što je slučaj i kod uzorka bez MBP-a (**z_nMMM-MBP_60°C** u odnosu na uzorak pri 30 °C, ali je vrpca znatno šira. Ta činjenica može implicirati da MBP zasigurno mijenja svoju strukturu, odnosno postaje drugačije nestrukturiran (vidjeti sekciju 4.4.1.).

Treće spektralno područje (1485–1430 cm^{-1}), osjetljivo na promjene u lateralnom slaganju molekula lipida, otkriva jasne razlike između sustava. Pri 30 °C, MMM pri fiziološkim uvjetima pokazuje slabije uređeno slaganje u odnosu na ono bez MBP-a, dok MMM-ovi pri patološkim uvjetima, neovisno o MBP-u, pokazuju sličan stupanj promjene (slika 30., lijevo). Ovo obilježja γCH_2 vrpce kod **z_nMMM+MBP** može se povezati i s većim udjelom bSM-a i mogućom interdigitacijom dužih ugljikovodičnih lanaca u susjedne lance, dok prisutnost MBP-a nedvojbeno dodatno modulira slaganje molekula lipida. Pri 60 °C opaženi pomaci

maksimuma vrpce u većini sustava u skladu su s DSC podacima i očekivanim smanjenjem stupnja lateralnog uređenja. Na višoj temperaturi, kod promijenjenih MMM-ova, interpretacija ovog spektralnog područja dodatno je otežana zbog preklapanja s δNH_3^+ vrpce DPPE/DPPS lipida i lizinskih ostataka MBP-a. Poznato je da su vrpce koje potječu od lizina izrazito osjetljive na fazu lipidnih dvosloja i udio anionskih lipida, osobito PS-a, koji je zastupljeniji u patološkim uvjetima.⁵⁶



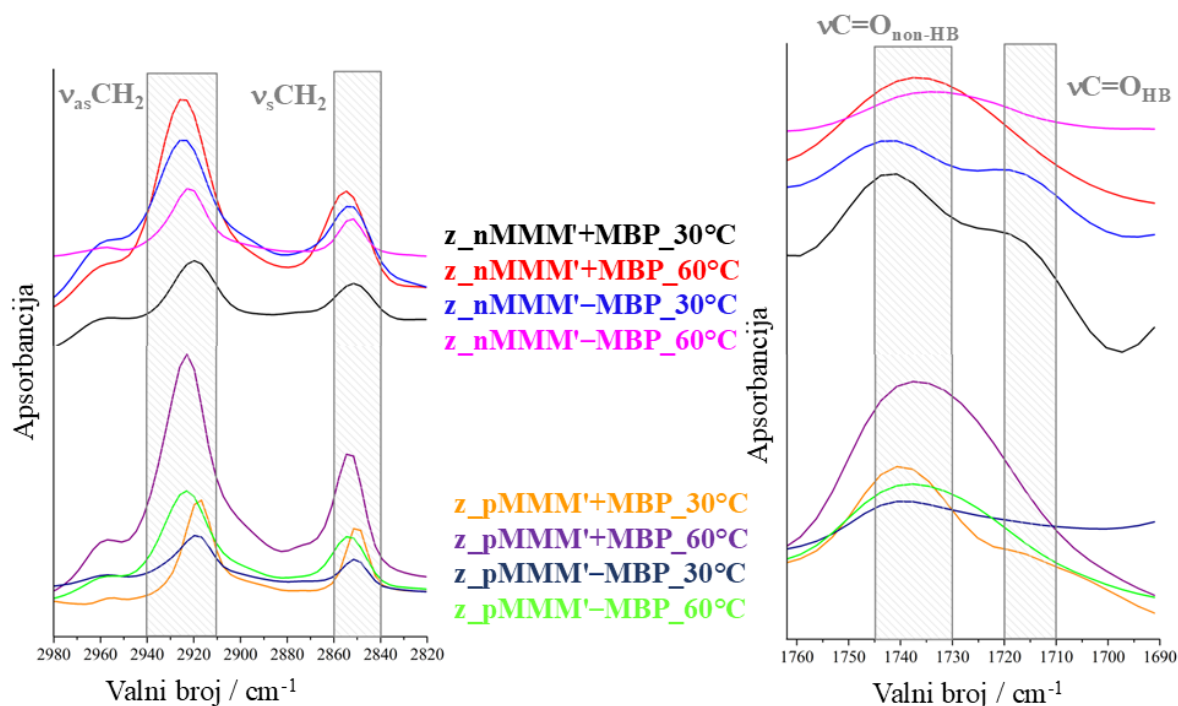
Slika 30. FTIR-ATR spektri vibracijskih područja $1485\text{--}1430\text{ cm}^{-1}$ i $1275\text{--}1190\text{ cm}^{-1}$ MMM-ova sa zasićenim lipidima $\pm$ MBP pri 30 i 60°C.

Spektralno područje $1275\text{--}1190\text{ cm}^{-1}$, u kojem se javlja $\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^- (\text{non})\text{-HB}$ vrpca, ukazuje da je hidratacija polarnih skupina ovisna o lipidnom sastavu i prisutnosti MBP-a (slika 30., desno). U MMM-ovima, pri fiziološkim uvjetima bez MBP-a ($z_n\text{MMM-MBP}$, $z_n\text{MMM-MBP}$), zagrijavanje dovodi do blagog pomaka k nižim valnim brojevima te pomjene u obliku vrpce, što upućuje na promjene u hidratacijskom obrascu. Nasuprot tome, adsorpcija MBP-a kod $z_n\text{MMM+MBP}$, uzrokuje mali niskofrekventni pomak maksimuma analizirane vrpce, što sugerira malu promjenu u hidrataciji fosfatnih skupina uslijed elektrostatskih interakcija

pozitivno nabijenih aminokiselinskih ostataka MBP-a. U MMM-ovima pri patološkim uvjetima, s ili bez MBP-a, uslijed promjene faze lipidnih dvoslojeva dolazi do izraženog niskofrekventnog pomaka maksimuma vrpce, pri čemu su spektralne ovojnice međusobno vrlo slične neovisno o prisustvu/odsustvu MBP-a. Ovi rezultati upućuju na to da je hidratacija fosfatnih skupina prvenstveno određena ukupnim nabojem i raspodjelom lipida, dok MBP, ovisno o sastavu membrane, može dodatno modulirati hidrataciju elektrostatskim interakcijama.

4.3.2. Molekulske značajke MMM'-ova sa zasićenim lipidima bez kolesterola

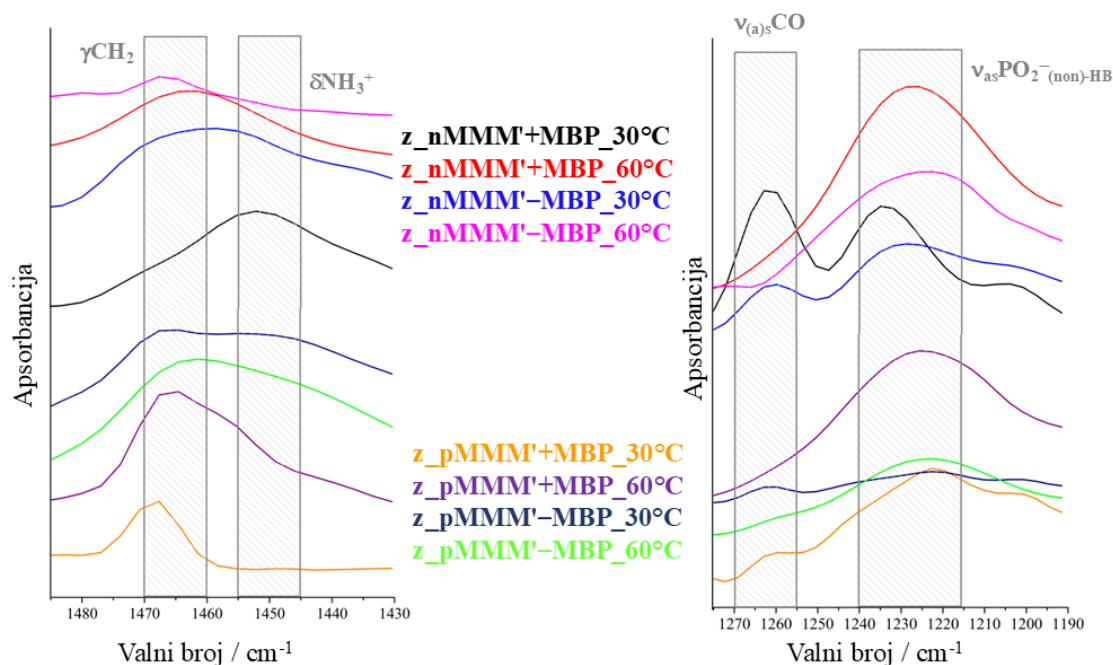
U spektralnom području u kojem se javljaju $\nu_{as}CH_2$ i ν_sCH_2 vrpce ($2980\text{--}2820\text{ cm}^{-1}$) uočavaju se izražene razlike između sustava s i bez MBP-a, kao i temperaturno-ovisne promjene. Pri prijelazu iz gel-faze ($L_{\beta'}$) u fluidnu (L_{α}) fazu, u MMM' sustavima bez MBP-a pri fiziološkim i patološkim uvjetima, dolazi do blagog visokofrekventnog pomaka $\nu_{as}CH_2$ vrpce (slika 31., lijevo), što je u skladu s očekivanim termotropnim ponašanjem lipidnih dvoslojeva. Suprotno tome, u prisutnosti MBP-a uočava se znatno slabiji ili gotovo zanemariv pomak maksimuma ν_sCH_2 , uz istodobno povećanje intenziteta vrpce. Takva pojava upućuje na to da MBP stabilizira van der Waalove interakcije između ugljikovodičnih lanaca i ograničava njihovu konformacijsku slobodu bez Chol, čak i pri povišenoj temperaturi. Ovaj efekt može se objasniti adsorpcijom MBP-a na membranu i njegovim djelovanjem kao „molekulskog ljepila”, koje smanjuje lateralnu pokretljivost lipida i povećava koheziju dvosloja.^{12,190}



Slika 31. FTIR-ATR spektri vibracijskih područja 2980–2820 cm^{-1} i 1762–1690 cm^{-1} MMM'-ova sa zasićenim lipidima $\pm$ MBP pri 30 i 60°C.

Na slici 31. (desno) prikazano je spektralno područje istezanja karbonilne skupine), u kojem se maksimumi vrpce pri oko $\sim 1740 \text{ cm}^{-1}$ pripisuju karbonilnim skupinama koje nisu uključene u HB ($\nu\text{C}=\text{O}_{\text{nonHB}}$), dok maksimumi pri nižoj frekvenciji ($\sim 1720 \text{ cm}^{-1}$) odgovaraju karbonilnim skupinama koje tvore HB ($\nu\text{C}=\text{O}_{\text{HB}}$).¹²² U MMM'-ovima bez MBP-a ($z_{\text{nMMM'}}\text{--MBP}$, $z_{\text{pMMM'}}\text{--MBP}$) zagrijavanje dovodi do promjene oblika i relativnog povećanja udjela $\nu\text{C}=\text{O}_{\text{non-HB}}$ vrpce, što upućuje na smanjenje hidratacije karbonilnih skupina pri prijelazu u fluidnu fazu. Takav trend je u skladu s literaturnim podacima koji pokazuju reorganizaciju međupovršinskog sloja u fluidnoj (L_{α}) fazi.³⁵ Nasuprot tome, kod MMM'-ova u prisustvu MBP-a, vrpce u ovom području pokazuju manju temperaturnu ovisnost, uz zadržavanje značajnog doprinosa $\nu\text{C}=\text{O}_{\text{non-HB}}$ vrpci, što sugerira da vezanje MBP-a stabilizira hidratacijski omotač karbonilnih skupina, vjerojatno posredstvom elektrostatskih interakcija i posrednog „zarobljavanja” molekula vode u međupovršinskom sloju.¹² Time MBP ne djeluje samo na hidrofobnu regiju membrane, već značajno modulira i polarno područje oko hidrofilnih glava lipida membrane. Također, kod $\nu\text{C}=\text{O}$ vrpce i u prisustvu MBP-a, MMM'-ovi pokazuju trend promjene oblika vrpce i minimalni pomak maksimuma povećanjem temperature.

Spektralno područje 1485–1430 cm^{-1} obuhvaća γCH_2 vrpce osjetljive na lateralno slaganje i stupanj uređenosti lipida u dvosloju (slika 32., lijevo).



Slika 32. FTIR-ATR spektri vibracijskih područja 1485–1430 cm^{-1} i 1275–1190 cm^{-1} MMM'-ova sa zasićenim lipidima $\pm$ MBP pri 30 i 60 °C.

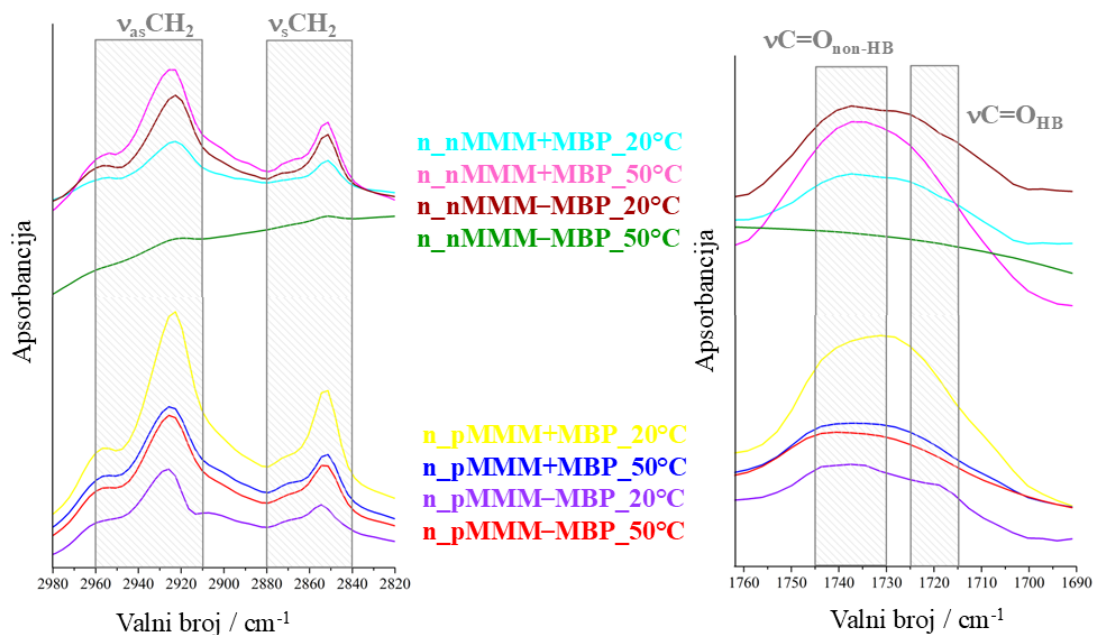
Kod MMM'-ova bez MBP-a pri fiziološkim i patološkim uvjetima, zagrijavanje s 30 °C na 60 °C rezultira pomakom maksimuma γCH_2 vrpce prema nižim valnim brojevima, što je u skladu s prethodno navedenim spektralnim područjima te odražava očekivano povećanje fluidnosti. Suprotno tome, položaj i oblik γCH_2 vrpce MMM'-ova u prisutnosti MBP-a pokazuje znatno slabiju temperaturnu ovisnost, što upućuje na stabilizaciju lateralnog slaganja ugljikovodičnih lanaca. Dodatno, u ovom području uočava se preklapanje s δNH_3^+ vrpce koje potječu od lizinskih ostataka MBP-a iaminskih skupina kationskih lipida. Poznato je da su ove vrpce izrazito osjetljive na fazu membrane i na udio anionskih lipida, pri čemu se njihov doprinos pojačava u sustavima bogatim PS (DPPS).¹¹

Spektralno područje 1275–1190 cm^{-1} obuhvaća antisimetrično istežanje fosfatnih skupina ($\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-$) te doprinos antisimetričnog istežanja C–O skupina ($\nu_{\text{as}}\text{C–O}$) (slika 32., desno). Fosfatne skupine mogu sudjelovati u stvaranju vodikovih veza, pri čemu pomaci maksimuma prema nižim valnim brojevima ukazuju na jače vodikove veze i povećanu

hidrataciju. S obzirom na to da fosfatne skupine mogu biti non-HB ili HB, kod MMM'-ova bez MBP-a ($z_n\text{MMM}'\text{-MBP}$ i $z_p\text{MMM}'\text{-MBP}$) pomak maksimuma $\nu_{\text{asPO}_2^-}$ vrpce prema nižim valnim brojevima uslijed porasta temperature upućuje na povećanu hidrataciju fosfatnih skupina i reorganizaciju međupovršinskog sloja u fluidnoj fazi u odnosu na (dominantno) gel-fazu. S druge strane, vrpce istih MMM'-ova u prisustvu MBP-a ($z_n\text{MMM}'+\text{MBP}$ i $z_p\text{MMM}'+\text{MBP}$), pokazuju smanjenu temperaturnu ovisnost i pomak maksimuma prema nižim valnim brojevima u odnosu na sustave bez MBP-a. Ovi rezultati upućuju na smanjenu hidrataciju fosfatnih skupina uslijed elektrostatskog vezanja pozitivno nabijenih lizinskih ostataka MBP-a, koji kompetitivno istiskuju molekule vode iz međupovršinskog sloja. Time MBP izravno modulira hidratacijski i elektrostatski profil membrane, što je u skladu s njegovom poznatom ulogom u stabilizaciji mijelinskih membrana.

4.3.3. Molekulske značajke MMM-ova s nezasićenim lancima s kolesterolom

U sustavima s nezasićenim ugljikovodičnim lancima, $\nu_{as}CH_2$ i ν_sCH_2 vrpce (slika 33.) se pojavljuju pri višim valnim brojevima u usporedbi sa sustavima sa zasićenim lancima, što je u skladu s većim stupnjem neuređenosti ugljikovodičnih lanaca uzrokovane prisutnošću *cis*-dvostrukih veza (slika 33., lijevo).



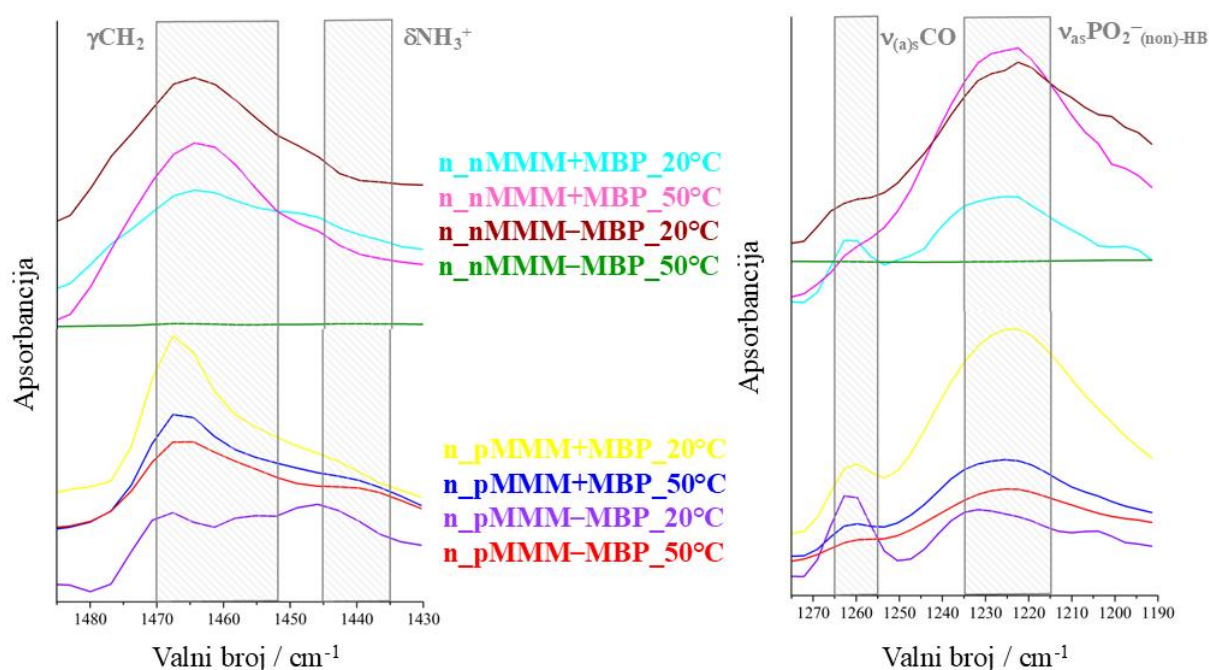
Slika 33. FTIR-ATR spektri vibracijskih područja 2980–2820 cm^{-1} i 1762–1690 cm^{-1} MMM-ova s nezasićenim lancima + Chol $\pm$ MBP pri 20 i 50°C.

Nezasićenost onemogućuje gusto pakiranje lanaca te uzrokuje pojavu fluidne (L_α) faze i pri nižim temperaturama. Povišenje temperature s 20 °C na 50 °C rezultira pomakom $\nu_{as}CH_2$ prema višim valnim brojevima i porastom intenziteta, što upućuje na dodatno smanjenje van der Waalsovih interakcija između ugljikovodičnih lanaca. U prisutnosti MBP-a promjene položaja maksimuma vrpce su manje izražene, što sugerira da interakcije MBP-a s polarnim glavama lipida djelomično ograničavaju termički induciranu reorganizaciju hidrofobne sredine membrane.

$\nu C=O$ vrpce u nezasićenim sustavima i za normalne i promijenjene MMM-ove su šire i manje razlučive u odnosu na vrpce kod zasićenih, što odražava heterogenije mikrokruženje glicerolne okosnice (slika 33., desno). Dominacija nižih valnih brojeva ukazuje na veći udio $C=O$ skupina u HB, što je posljedica povećane hidratacije međupovršinskog područja

membrane. Porast temperature uzrokuje daljnje širenje vrpce i pomake maksimuma, u skladu s povećanim prodorom vode uslijed veće fluidnosti molekula lipida. U uzorcima s MBP-om uočava se preraspodjela intenziteta vrpce, kako $\nu\text{C}=\text{O}_{\text{non-HB}}$ tako i $\nu\text{C}=\text{O}_{\text{HB}}$, što upućuje na elektrostatske interakcije i HB između pozitivno nabijenih ostataka MBP-a i lipidnih karbonilnih skupina.

U spektrima MMM-ova s nezasićenim lancima, γCH_2 vrpce su šire i pomaknute prema nižim valnim brojevima u odnosu na zasićene sustave, što je posljedica povećane konformacijske neuređenosti ugljikovodičnih lanaca uzrokovane *cis*-dvostrukim vezama (slika 34., lijevo). Porast temperature dodatno pojačava ovaj efekt, osobito u sustavima bez MBP-a ($n_n\text{MMM-MBP}$ i $n_p\text{MMM-MBP}$). U prisutnosti MBP-a uočava se porast intenziteta i jasnije definiranje signala u području δNH_3^+ vrpce ($\sim 1480\text{--}1450\text{ cm}^{-1}$), što se pripisuje vibracijama protoniranih amino-skupina bočnih lanaca MBP-a. Ovi rezultati upućuju na snažne elektrostatske interakcije MBP-a s polarnim glavama lipida, koje su izraženije u nezasićenim, slabije uređenim modelnim membranama.

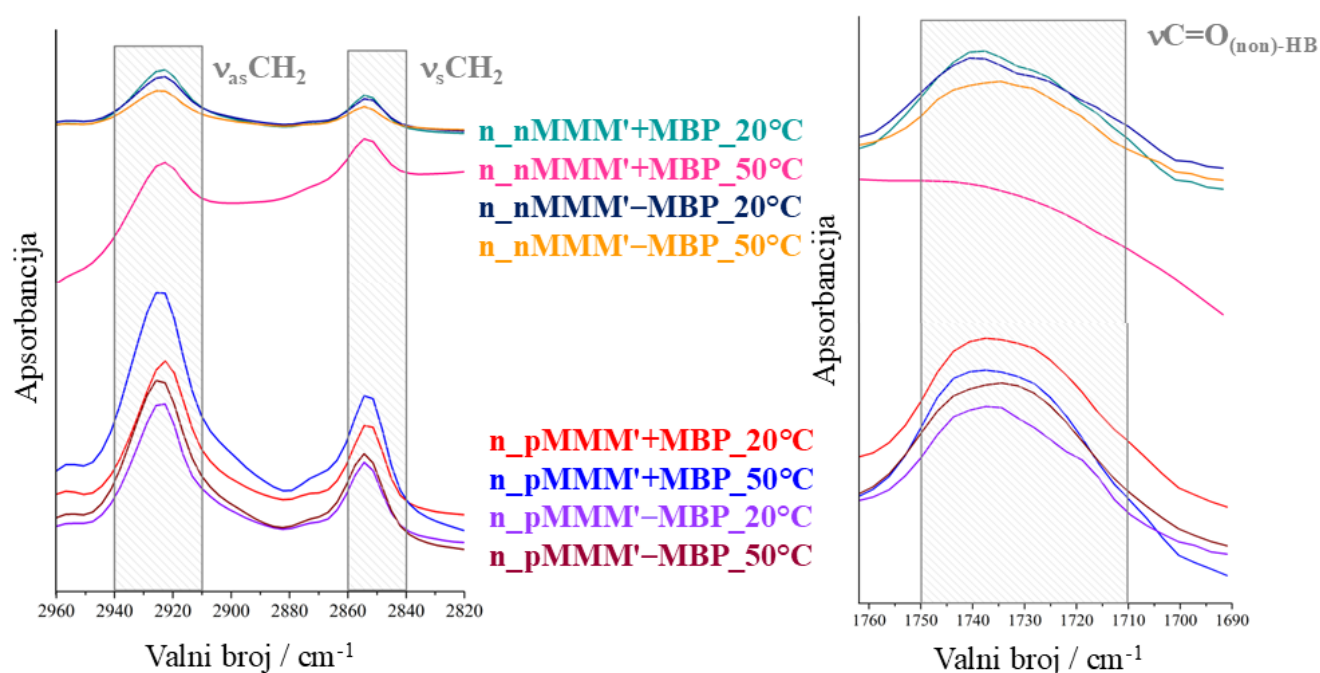


Slika 34. FTIR-ATR spektri vibracijskih područja $1485\text{--}1430\text{ cm}^{-1}$ i $1275\text{--}1190\text{ cm}^{-1}$ MMM-ova s nezasićenim lancima + Chol $\pm$ MBP pri 20 i 50°C.

$\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-$ vrpce vidljive na slici 34., desno, u nezasićenim sustavima pokazuju znatno proširenje i porast intenziteta, što ukazuje na povećanu hidrataciju i heterogenost elektrostatskog okruženja fosfatnih glava. U uzorcima s MBP-om ($n_{\text{nMMM}} + \text{MBP}$ i $n_{\text{pMMM}} + \text{MBP}$), maksimumi $\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-_{(\text{non})\text{-HB}}$ su blago pomaknuti prema nižim valnim brojevima. Ti pomaci su karakteristični za fosfatne skupine uključene u HB-e i ionske interakcije, što upućuje na njihovu interakciju s pozitivno nabijenim proteinskim ostatcima.¹⁹⁰ Paralelno se u području $\nu_{\text{as}}\text{CO}$ bilježe promjene u obliku i intenzitetu vrpce, što dodatno potvrđuje redistribuciju HB u međupovršinskom sloju membrane. Ovi učinci su izraženiji pri višoj temperaturi, što sugerira da u fluidnoj membrane pri povišenoj temperature membrane MBP učinkovitije reorganizira polarnu površinu nego hidrofobnu regiju membrane.

4.3.4. Molekulske značajke MMM'-ova s nezasićenim lancima bez kolesterola

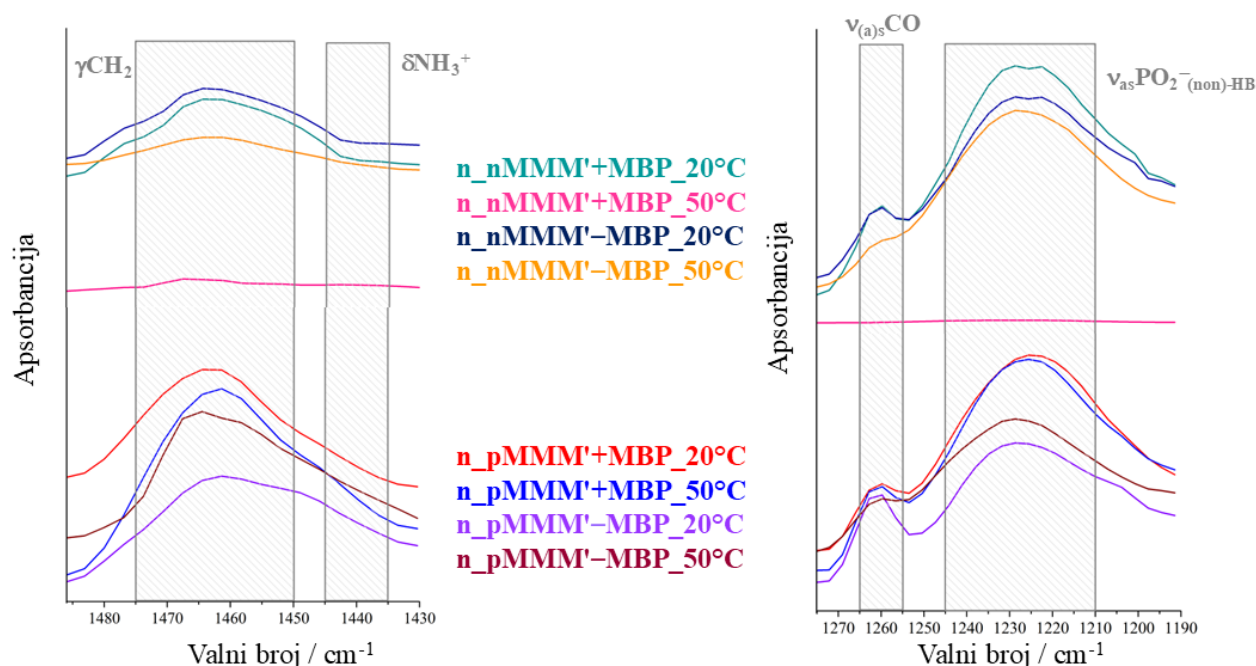
U MMM'-ovima s nezasićenim ugljikovodičnim lancima, vrpce $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ i $\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$ se pojavljuju očekivano pri visokim valnim brojevima, što odražava povećanu konformacijsku neuređenost ugljikovodičnih lanaca uzrokovanu *cis*-dvostrukim vezama (slika 35., lijevo). U odnosu na analogne MMM-sustave, ovi spektri ukazuju na izraženiju fluidnost membrane. Povišenje temperature s 20 °C na 50 °C rezultira dodatnim pomakom $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ prema višim valnim brojevima te smanjenjem razlučivosti vrpce. Prisutnost MBP-a ne uzrokuje značajne pomake položaja vrpce, no uočava se smanjenje temperaturno-uzrokovanih promjena intenziteta, što sugerira da MBP djelomično ograničava termičku reorganizaciju lipidnih lanaca, iako ne dovodi nužno do njihovog zbijanja.



Slika 35. FTIR-ATR spektri vibracijskih područja 2980–2820 cm^{-1} i 1762–1690 cm^{-1} MMM'-ova s nezasićenim lancima $\pm$ MBP pri 20 i 50°C.

Na slici 35. (desno) je vidljivo da su $\nu\text{C}=\text{O}$ vrpce navedenih sustava široke i asimetrične, što upućuje na nehomogeno mikrokruženje glicerolne okosnice i visok stupanj hidratacije membrane. Dominantni doprinos vrpci pri nižim valnim brojevima (manjim od 1730 cm^{-1}) ukazuje na moguć znatan udio HB $\text{C}=\text{O}$ skupina. Povišenje temperature dodatno povećava širinu vrpce i smanjuje njihov intenzitet, što se može pripisati povećanoj dinamičnosti međupovršinskog područja i preraspodjeli HB uslijed hidratacije. U sustavima s MBP-om uočena je umjerena preraspodjela intenziteta unutar područja u kojem se javlja $\nu\text{C}=\text{O}$ vrpca, bez jasne identifikacije $\text{C}=\text{O}$ skupina koje (ne) formiraju HB, što sugerira da MBP u odsutnosti kolesterola i pri visokoj fluidnosti membrane prvenstveno djeluje na razini elektrostatskih interakcija s polarnim glavama, a manje na interakcije i hidrataciju glicerolne okosnice.

U MMM'-ovima s nezasićenim lipidima i bez Chol, γCH_2 vrpce se pojavljuju pri relativno višim valnim brojevima i s izraženom širinom, što odražava lateralno (ne)uređenje, koja koje je korelirano s visokom konformacijskom neuređenošću ugljikovodičnih lanaca (slika 36., lijevo).



Slika 36. FTIR-ATR spektri vibracijskih područja 1485–1430 cm^{-1} i 1275–1190 cm^{-1} MMM'-ova s nezasićenim lancima $\pm$ MBP pri 20 i 50 °C.

Povišenje temperature s 20 °C na 50 °C rezultira blagim smanjenjem intenziteta i dodatnim širenjem vrpce, posebice **n_nMMM'-MBP_50 °C**, u skladu s daljnjim porastom fluidnosti membrane. U prisutnosti MBP-a u ovom se području javlja dodatni doprinos δNH_3^+ vrpce od protoniranih lizinskih ostataka MBP-a. Preklapanje γCH_2 i δNH_3^+ vrpce osobito je izraženo kod promijenjenih MMM'-ova zbog većeg udjela anionskih lipida, što ukazuje na adsorpciju MBP-a na površinu membrane dominantno elektrostatskog karaktera. Međutim, izostanak jasnog temperaturno-izazvanog pomaka maksimuma vrpce sugerira da MBP u ovim MMM'-ovima ne inducira značajno povećanje lateralnog slaganja lipida, već ostaje dominantno vezan uz polarnu površinsku regiju.

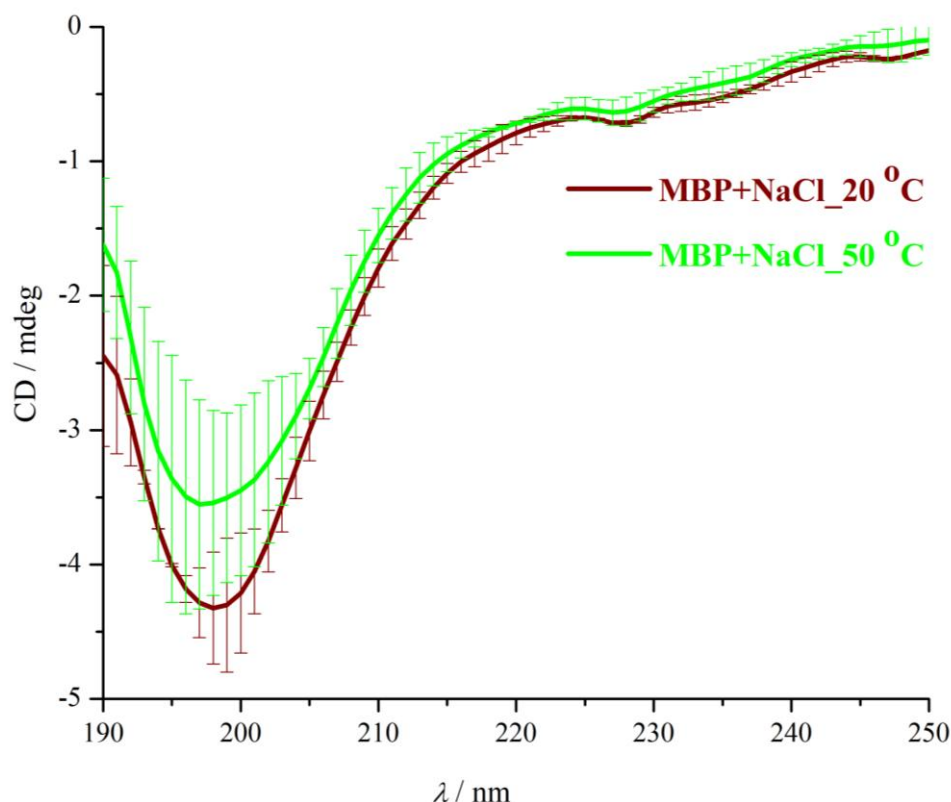
Kad je riječ o vrpcama $\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-(\text{non})\text{-HB}$, jasnije se vidi da povišenje temperature kod MMM'-ova pri patološkim uvjetima dovodi do blagog pomaka maksimuma prema nižim valnim brojevima i smanjenja intenziteta, što se može pripisati povećanoj fleksibilnosti polarnih skupina i reorganizaciji HB s molekulama vode (slika 36., desno). Prisutnost MBP-a rezultira umjerenom preraspodjelom intenziteta unutar $\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-(\text{non})\text{-HB}$ vrpce, bez jasnog odvajanja signala fosfatnih skupina koje (ne) sudjeluju u HB mreži. Takav odziv upućuje na to da MBP,

u odsutnosti kolesterola, djeluje prvenstveno elektrostatski, neutralizirajući dio negativnog naboja fosfatnih skupina, ali bez značajnijeg utjecaja na rigidnost membranskih dvosloja.

4.4. CD spektroskopija modelnih membrana

CD spektroskopija u ovom istraživanju primijenjena je za praćenje promjena sekundarne strukture MBP-a, što je osobito prikladno jer je riječ o intrinzično neuređenom proteinu (IDP), čija je konformacija izrazito osjetljiva na medij, temperaturu, fazu i interakcije s lipidnim membranama.^{17,192} Adsorpcija MBP-a na MMM-ove može uzrokovati preraspodjelu sekundarnih strukturnih elemenata, što se pouzdano očituje u promjenama CD spektra u dalekom UV području (od 190 do 250 nm). S obzirom da su analizirani CD spektri rezultat razlike spektara normalnih odnosno promijenjenih MMM-ova (pri fiziološkim odnosno patološkim uvjetima) u prisutstvu/odsustvu MBP-a, može se komentirati i raspravljati o promjenama MBP-a u različitim okruženjima pri različitim temperaturama.

Važno je istaknuti da su eksperimenti provedeni pri temperaturama višima od fizioloških, što je uvjetovano visokim temperaturama faznog prijelaza korištenih lipida. Međutim, prema dosadašnjim literaturnim navodima, povišena temperatura ne dovodi do denaturacije IDP-ova (MBP-a u ovom radu), već uzrokuje preraspodjelu sekundarnih strukturnih populacija unutar proteina.¹⁹³ Također, CD spektar MBP-a u NaCl(aq), koji pokazuje dominantan signal s maksimumom pri oko 195 nm (slika 37.), potvrđuje da se promjenom temperature ne inducira potpuno nova struktura, već se modulira postojeća na način da dolazi do preraspodjele sekundarnih struktura, ovisno o lipidnom sastavu membrane (u prilog tome i FTIR-ATR spektri MBP-a u Dodatku 8.3, slika D7.).¹⁷ Temperature mjerenja su odabrane sukladno temperaturama mjerenja MMM-ova s (ne)zasićenim ugljikovodičnim lancima.

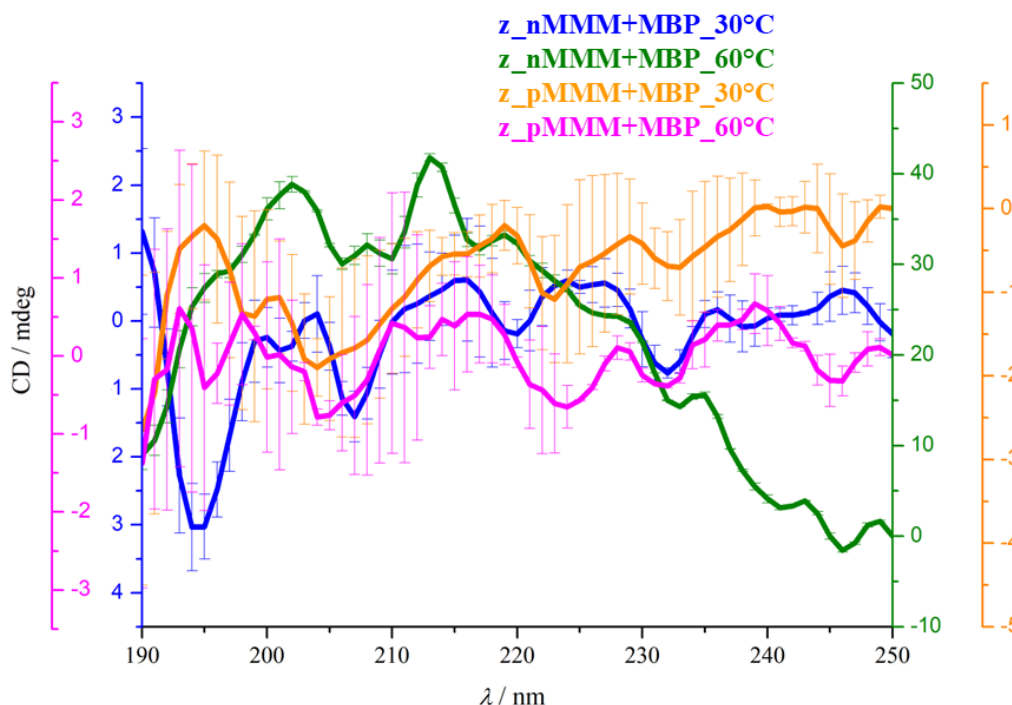


Slika 37. CD spektar MBP-a u dalekom UV području pri 20 °i 50 °C.

4.4.1. Sekundarne strukture MBP-a kod MMM-ova sa zasićenim lancima i kolesterolom

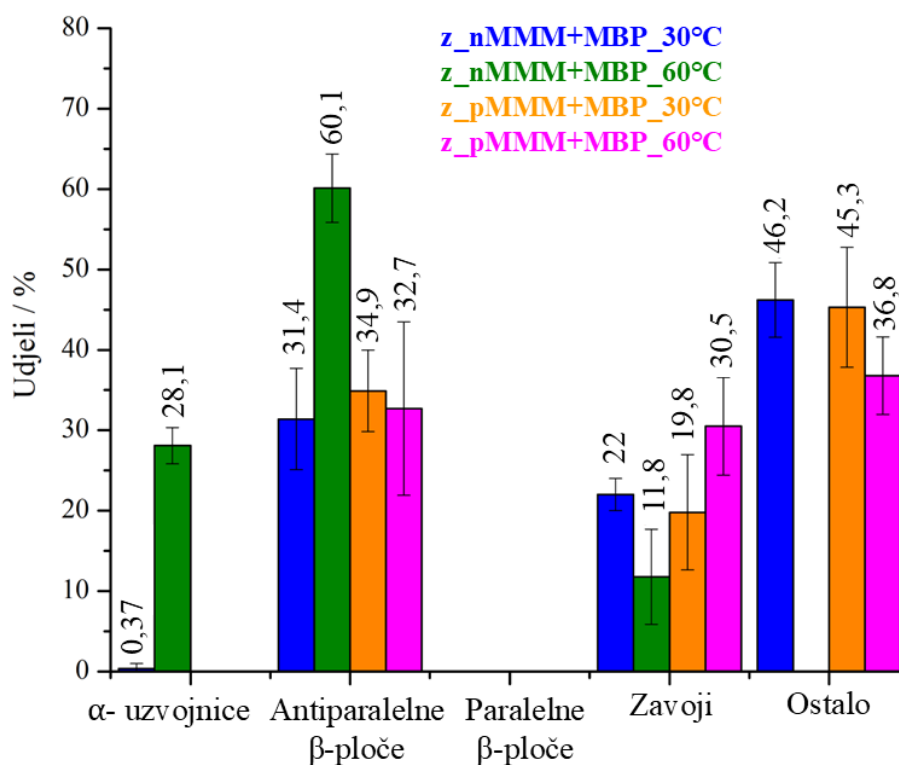
Analiza CD spektara normalnih i promijenjenih MMM-ova s Chol (slika 38.) pokazuje da samo sustav $z_n\text{MMM}+\text{MBP}_{30^\circ\text{C}}$ daje spektar karakterističan za IDP, s izraženim pozitivnim maksimumom oko 190 nm. Za taj isti uzorak se uočava da povišenje temperature na 60 °C ($z_n\text{MMM}+\text{MBP}_{60^\circ\text{C}}$) rezultira gubitkom slabo definiranih minimuma i pomakom spektra prema pozitivnim vrijednostima, što upućuje na pojavu uređenijih struktura, ponajprije α -uzvojnica. Nasuprot tome, pri patološkim uvjetima CD spektri pri obje temperature međusobno su vrlo slični te pokazuju minimume oko 203 nm ($z_p\text{MMM}+\text{MBP}_{30^\circ\text{C}}$) i 204 nm ($z_p\text{MMM}+\text{MBP}_{60^\circ\text{C}}$), tipične za prisutnost α -uzvojnica. To se može povezati s povećanim udjelom anionskih (DPPS) lipida u patološkim uvjetima, koji pojačavaju elektrostatske interakcije s pozitivno nabijenim aminokiselinskim ostatcima MBP-a, a ujedno stabiliziraju pojedine sekundarne strukturne konformacije proteina. Međutim, pri 60 °C dolazi do slabljenja

i izravnavanja CD signala, što upućuje na djelomičnu destabilizaciju interakcija između normalnih MMM-ova i MBP-a uslijed povećane fluidnosti i zagrijavanja lipidnog dvosloja.



Slika 38. CD spektri MMM-ova sa zasićenim lancima + MBP pri 30°C i 60 °C.

Dodatnom BeStSel analizom¹⁹⁴, pokazalo se da vrijedi teza o nestrukturiranosti MBP proteina ovisno o okruženju i temperaturi sustava (slika 39.). U *z_nMMM+MBP_30°C* uočava se zanemariv udio α -uzvojnica ($0,4 \pm 0,6$ %) te visok udio “ostalih” struktura (46 ± 5 %) karakterističnih po dominantnom maksimumu pri oko 190 nm. Povišenje temperature na 60 °C dovodi do izraženog porasta antiparalelnih β -ploča (60 ± 4 %) te pojave α -uzvojnica (28 ± 2 %), uz istodobno smanjenje udjela neuređenih konformacija. Ova promjena odražava temperaturno-uzrokovanu preraspodjelu sekundarnih struktura MBP-a, pri čemu je zanimljivo da ne predviđa mjerljiv udio “ostalih” sekundarnih struktura.

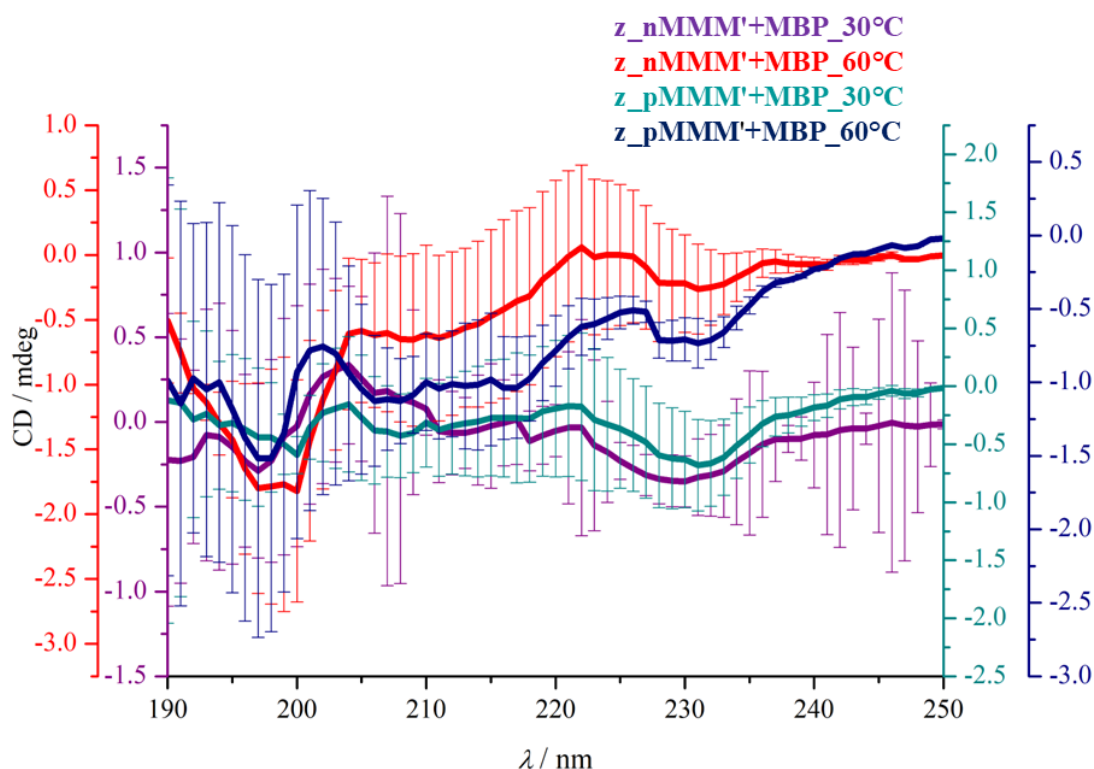


Slika 39. Histogrami raspodjela sekundarnih struktura MMM-ova sa zasićenim lancima + MBP pri 30°C i 60 °C dobiveni BeStSel analizom.

Za razliku od toga, promijenjeni MMM-ovi pri patološkim uvjetima imaju slične udjele sekundarnih struktura pri obje temperature, s dominantnim antiparalelnim β-pločama (~ 33–35%) i značajnim udjelom zavoja (~ 20–30%). Ovi rezultati, proizašli iz CD spektara, upućuju na prisutnost djelomično formiranih sekundarnih elemenata. Takav odziv sugerira da interakcije MBP-a s lipidnim glavama i promijenjenim elektrostatskim okruženjem u ovim MMM-ovima, stabiliziraju određene konformacije proteina, neovisno o globalnoj fazi lipidnog dvosloja.

4.4.2. Sekundarne strukture MBP-a kod MMM'-ova sa zasićenim lancima bez kolesterola

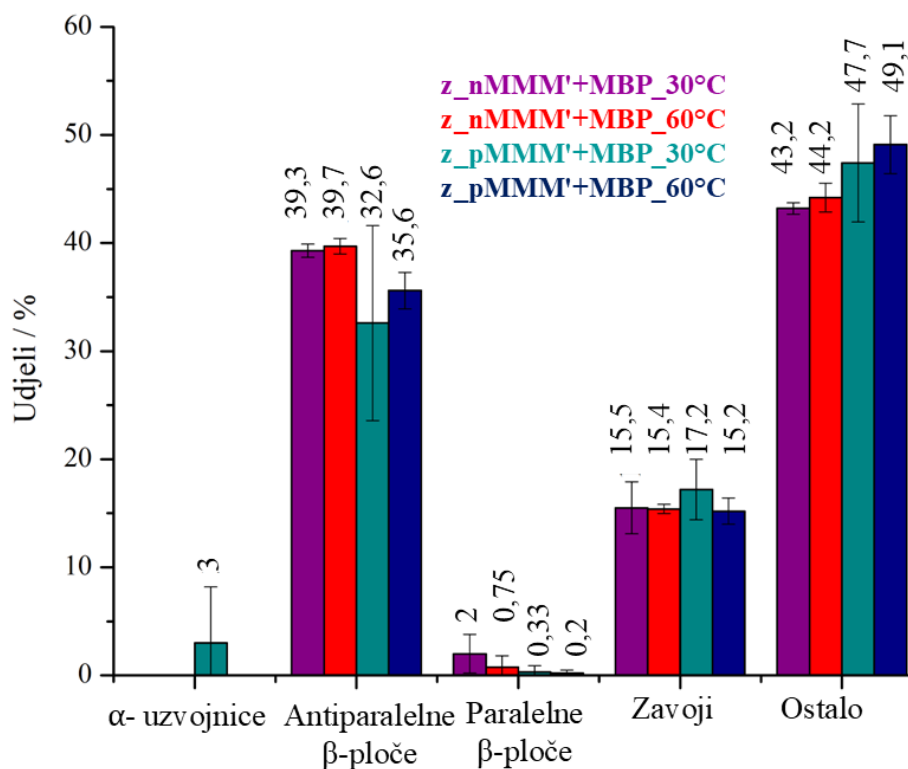
CD spektri MBP-a adsorbiranog na MMM'-ove (normalni i promijenjeni mijelin) pokazuju obilježja tipična za IDP-ove, uz jasnu ovisnost o temperaturi i lipidnom sastavu membrane (slika 40.).



Slika 40. CD spektri MMM'-ova sa zasićenim lancima + MBP pri 30 °C i 60 °C.

Pri 30 °C svi sustavi pokazuju slab, negativan signal u području 190–200 nm, bez izraženih minimuma na 208 i 222 nm karakterističnih za α -uzvojnice, što ukazuje da MBP zadržava visoki stupanj konformacijske neuređenosti. Povišenje temperature na 60 °C dovodi do uočljivih, ali umjerenih promjena u spektrima. Kod *z_nMMM'*–MBP_60°C javlja se blagi porast pozitivnog signala u području oko 220–230 nm, što sugerira djelomičnu redistribuciju sekundarnih struktura prema zavojima i β -strukturnim elementima, ali bez jasne stabilizacije α -uzvojnica. Suprotno tome, promijenjeni MMM'-ovi pokazuju slabije temperaturno-inducirane promjene što upućuje na smanjenu sposobnost takvih membrana na strukturiranje MBP-a.

Nakon analize BestSel programom, za MMM'-ove je dobiven dominantan udio antiparalelnih β -struktura, zavoja i „ostalih“ struktura, uz zanemariv udio α -uzvojnica (slika 41.).



Slika 41. Histogrami distribucija sekundarnih struktura MMM'-ova sa zasićenim lancima + MBP pri 30°C i 60 °C dobiveni BeStSel analizom.

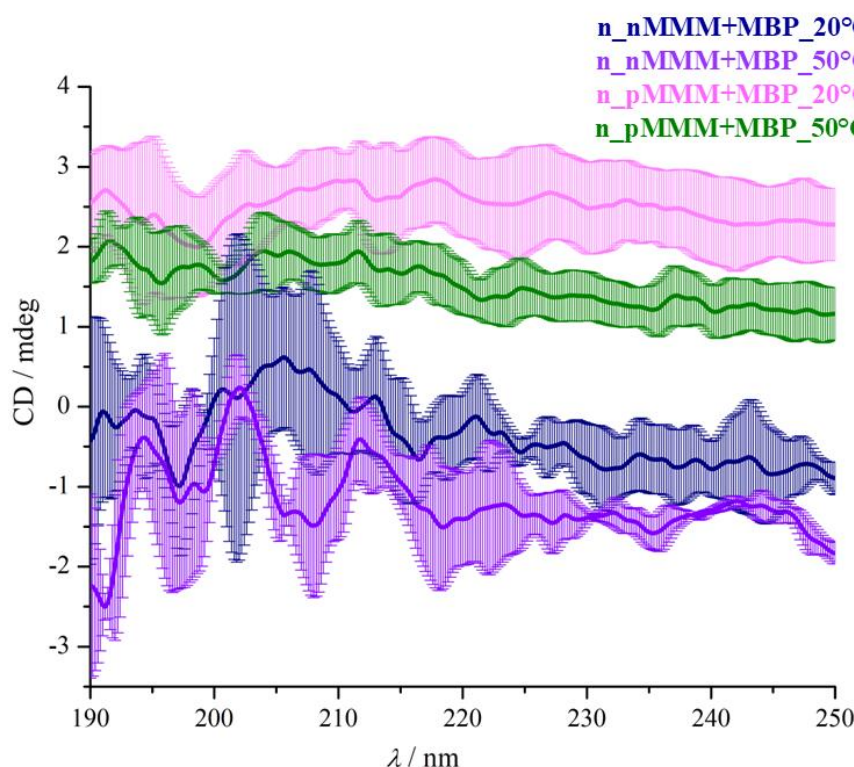
Za MMM'-ove pri normalnim uvjetima, udio antiparalelnih β -ploča iznosi približno 40 % pri obje temperature, uz vrlo mali udio paralelnih β -ploča (do ~2 %). Povišenje temperature s 30 °C na 60 °C ne dovodi do značajne redistribucije sekundarnih struktura. Kod MMM'-ova pri promijenjenim uvjetima uočava se blago smanjenje udjela antiparalelnih β -ploča s povišenjem temperature, te istodobno povećanje kategorije struktura „ostalo“, osobito pri 60 °C (slika 41.). Takva raspodjela sugerira još izraženiju strukturnu heterogenost MBP-a, što je u skladu sa slabim i širokim CD signalima bez jasnih obilježja stabilnih sekundarnih motiva. Minimalan, ali mjerljiv udio α -uzvojnica (~3 %) pojavljuje se samo kod **z_pMMM'+MBP_30°C**, no nestaje pri višoj temperaturi, što upućuje na prolaznu i nestabilnu organizaciju.

Usporedba s prethodnim CD spektrima MMM sustava (koji sadrže Chol) jasno pokazuje da odsutnost Chol rezultira znatno manjim stupnjem strukturne organizacije MBP-a. Dok je u

MMM-ovima (koji sadrže Chol) uočen razvoj izraženijih negativnih minimuma karakterističnih za α -uzvojnice, ovdje takvi signali izostaju ili su vrlo slabi. To potvrđuje da Chol ima ključnu ulogu u modulaciji i interakciji između molekula lipida i proteinsko-lipidnih interakcija.

4.4.3. Sekundarne strukture MBP-a kod MMM-ova s nezasićenim lancima s kolesterolom

Dobiveni CD spektri MMM-ova s nezasićenim lancima u području 190–250 nm okarakterizirani su relativno niskim amplitudama signala i izraženim oscilacijama, bez jasno definiranih minimuma tipičnih za potpuno formiranu α -helikalnu strukturu pri približno 208 i 222 nm (slika 42.). Ovakav spektralni oblik upućuje na to da MBP, iako vezan uz membranu, zadržava visok stupanj konformacijske heterogenosti te ne prelazi u jedinstveno strukturirano stanje. Prisutnost slabih negativnih doprinosa u području 215–225 nm može se povezati s formiranjem kratkih β -strukturnih konformacija, koje su prethodno opisane za MBP u membranskom okruženju i smatraju se važnima za njegovo bočno vezanje uz lipidni dvosloj.¹⁸¹

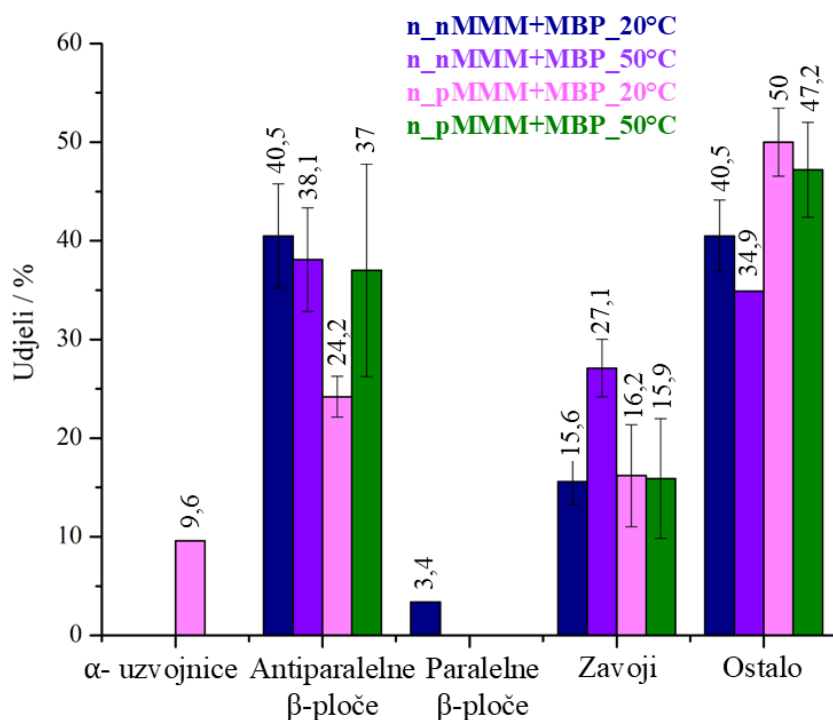


Slika 42. CD spektri MMM-ova s nezasićenim lancima + MBP pri 20 °C i 50 °C.

Dvostruke veze u ugljikovodičnim lancima smanjuju stupanj slaganja lipida i povećavaju lateralnu fluidnost membrane, čime se olakšava elektrostatsko i hidrofobno sidrenje MBP-a na površinu membrane.⁵⁶ U takvim uvjetima MBP može istodobno ostvarivati višestruke, ali strukturno različite kontakte s lipidima, što se u CD spektrima očituje kao pojačana oscilatornost i povećana varijabilnost signala, osobito u području kraćih valnih duljina. Temperatura dodatno modulira opažene konformacijske promjene. Pri 20 °C CD spektri pokazuju veće amplitude i izraženije oscilacije, što sugerira jače, ali konformacijski raznolikije interakcije MBP-a s relativno manje fluidnom membranom. Povišenje temperature na 50 °C rezultira smanjenjem intenziteta CD signala i njihovim zaglađivanjem, što se može pripisati povećanoj fluidnosti membrane i relaksaciji induciranih strukturnih elemenata MBP-a. Za IDP poput MBP-a, ovakav temperaturni odgovor ne predstavlja klasičnu termičku denaturaciju, već pomak ravnoteže između različitih induciranih konformacija, pri čemu protein ostaje vezan uz membranu, ali u fleksibilnijem i dinamičnijem stanju.¹⁹⁵

Ono što je neophodno istaknuti je da interpretaciju CD spektara dodatno otežava zamućenje (turbiditet) uzoraka, koje je neizbježno prisutno u sustavima koji sadrže lipidne vezikule i membranski vezane proteine. Raspršenje svjetlosti, osobito pri valnim duljinama ispod 210 nm, može dovesti do smanjenja efektivne eliptičnosti, povećanja šuma i distorzije spektralnog oblika.¹⁹⁶ U promatranim sustavima zamućenje je vjerojatno posljedica MBP-inducirane agregacije ili međusobnog približavanja lipidnih vezikula građenih od 5 različitih lipida. Unatoč prisutnosti turbiditeta, uočeni trendovi u CD spektrima dosljedni su između mjerenja i temperaturnih uvjeta, što ukazuje na to da promjene nisu isključivo posljedica eksperimentalnih artefakata, već odražavaju stvarne konformacijske prilagodbe MBP-a u membranskom okruženju. Stoga se dobiveni CD podaci interpretiraju prvenstveno kvalitativno, s naglaskom na usporedne razlike između sustava različitog lipidnog sastava i temperature, a ne na apsolutne vrijednosti eliptičnosti. Sveukupno, rezultati potvrđuju da nezasićeni lanci lipida omogućuju formiranje dinamičnog proteinsko-lipidnog sklopa u kojem MBP zadržava djelomično neuređenu, ali funkcionalno relevantnu konformaciju.

Analiza sekundarne strukture MBP-a provedena je metodom BeStSel na temelju CD spektara MBP-a (slika 43.). U svim promatranim sustavima dominantan doprinos sekundarnoj strukturi MBP-a čine antiparalelne β -ploče i kategorija „ostalo“, koja obuhvaća neuređene segmente i produžene konformacije.



Slika 43. Histogrami distribucija sekundarnih struktura MMM-ova s nezasićenim lancima + MBP pri 20°C i 50 °C dobiveni BeStSel analizom.

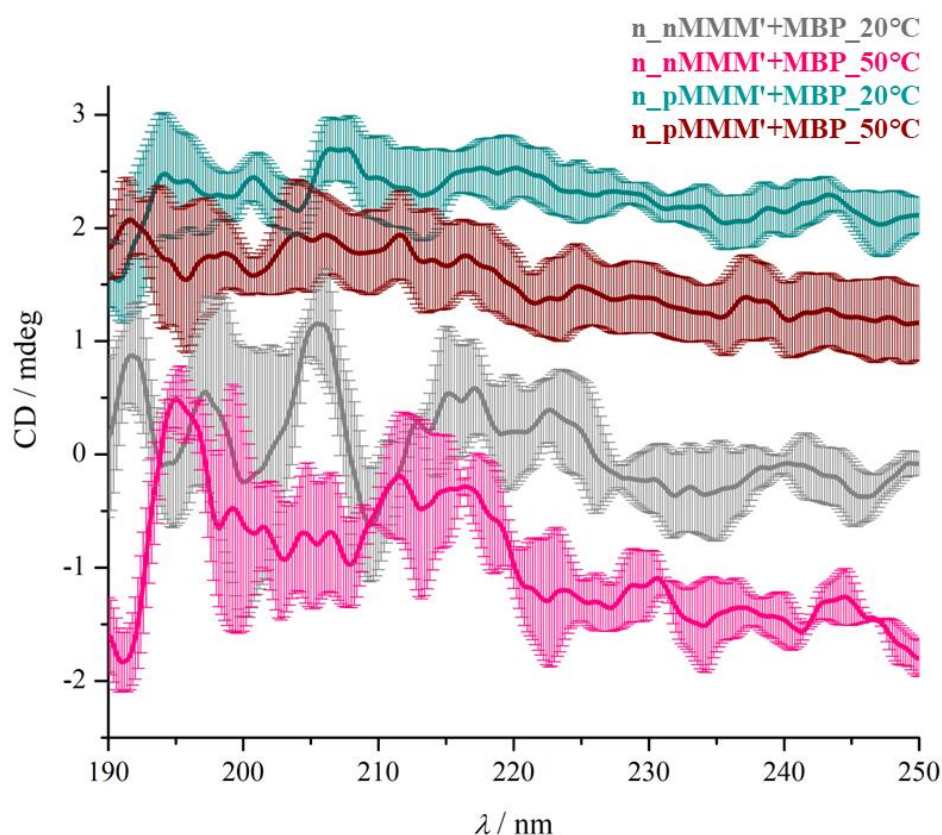
Udio antiparalelnih β -struktura kreće se između približno 24 i 41 %, pri čemu su najveće vrijednosti zabilježene u $n_n\text{MMM}+\text{MBP}_{20^\circ\text{C}}$ (~ 41 %) te u $n_n\text{MMM}+\text{MBP}_{50^\circ\text{C}}$ (~ 38 %). Ovi rezultati upućuju na to da prisutnost Chol u kombinaciji s nezasićenim lancima omogućuje stabilizaciju β -strukturnih elemenata MBP-a, koji su prethodno opisani kao važni za njegovo bočno vezanje uz membranu i sudjelovanje u zbijanju mijelinskih slojeva. Udio α -uzvojnica u svim sustavima ostaje nizak, pri čemu je značajniji α -helikalni doprinos uočen jedino u $n_p\text{MMM}+\text{MBP}_{20^\circ\text{C}}$ (~ 10 %). Ovakvi rezultati su u skladu s literaturom koja navodi da MBP stvara kratke amfifilne α -uzvojnice uglavnom u regijama izravnog kontakta s lipidnom glavom, dok ostatak molekule ostaje neuređen.¹⁹⁶ Paralelne β -ploče zastupljene su u zanemarivom udjelu, pri čemu se mali doprinos (~ 3 %) pojavljuje isključivo kod $n_n\text{MMM}+\text{MBP}_{20^\circ\text{C}}$. Zavoji čine umjeren, ali značajan udio ukupne sekundarne strukture, s vrijednostima između približno 15 i 27 %. Najveći udio zavoja zabilježen je $n_n\text{MMM}+\text{MBP}_{50^\circ\text{C}}$ (~ 27 %), što upućuje na povećanu fleksibilnost i dinamičnost MBP-a

pri povišenoj temperaturi. Kategorija „ostalo“, koja uključuje neuređene strukture i produžene konformacije, čini najveći pojedinačni udio u svim analiziranim sustavima (~ 35–50 %). Najviši udio zabilježen je u **n_pMMM+MBP_20°C** (~ 50 %), dok se pri 50 °C bilježi blago smanjenje tog udjela uz istodobno povećanje antiparalelnih β -struktura. Ovi rezultati potvrđuju da Chol, u sinergiji s nezasićenim lancima, doprinosi stabilizaciji djelomično uređenih konformacija MBP-a, ali ne narušava njegovu ključnu strukturnu fleksibilnost.

Usporedba temperaturnih uvjeta pokazuje da povišenje temperature ne dovodi do gubitka sekundarne strukture u klasičnom smislu, već do preraspodjele između β -struktura, zavoja i neuređenih segmenata. Takvo ponašanje tipično je za IDP-ove i dodatno potvrđuje da MBP ne funkcionira kao statični strukturni element.¹⁹⁷

4.4.4. Sekundarne strukture MBP-a kod MMM'-ova s nezasićenim lancima bez kolesterola

CD spektri MMM'-ova (bez Chol) s MBP-om pokazuju izraženu konformacijsku heterogenost i snažnu ovisnost o temperaturi i lipidnom sastavu membrane (slika 44.). U usporedbi sa sustavima koji sadrže Chol (normalni i promijenjeni MMM-ovi), spektri su obilježeni većim oscilacijama signala, slabijom definicijom sekundarne strukture i povećanim doprinosom eksperimentalnog šuma, što zajedno upućuje na fundamentalno drugačiji način interakcije MBP-a s membranom u odsutnosti Chol. U svim analiziranim uzorcima, CD signal u području 190–220 nm ne pokazuje jasno definirane minimume karakteristične za stabilnu α -helikalnu strukturu, što potvrđuje da MBP u membranama bez Chol ne poprima dugotrajno stabiliziranu sekundarnu strukturu.



Slika 44. CD spektri MMM'-ova s nezasićenim lancima + MBP pri 20 °C i 50 °C.

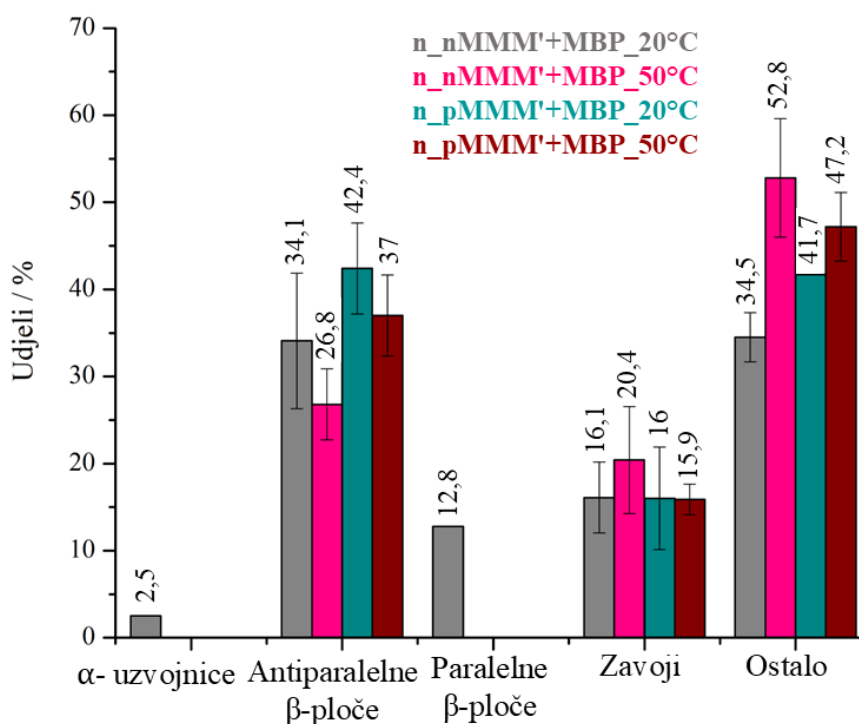
Odsustvo Chol značajno povećava lateralnu fluidnost lipidnog dvosloja i smanjuje njegovu mehaničku koheziju.¹⁵ Posljedično, membrana postaje manje sposobna stabilizirati inducirane konformacije MBP-a. To se jasno očituje u CD spektrima, osobito $n_n\text{MMM}' + \text{MBP}_{20^\circ\text{C}}$, gdje su oscilacije signala najizraženije, a amplituda CD vrijednosti najveća. Povišenje temperature na 50 °C dovodi do djelomičnog zaglađivanja CD spektara u oba tipa MMM' membrana, uz smanjenje amplituda signala i ublažavanje oscilacija. Ovaj efekt može se pripisati dodatnom povećanju fluidnosti membrane i ubrzanoj dinamici lipid–protein interakcija, čime se smanjuje vjerojatnost stabilizacije čak i kratkotrajnih sekundarnih strukturnih elemenata MBP-a. Stoga je razumno pretpostaviti da se ovdje ne radi o klasičnoj termičkoj denaturaciji proteina, već o pomaku konformacijske ravnoteže prema još fleksibilnijem i dinamičnijem stanju, tipičnom za IDP-ove u slabije organiziranom, vrlo dinamičnom membranskom okruženju.

Kao i kod MMM-ova, značajan čimbenik u interpretaciji dobivenih CD spektara predstavlja povećano zamućenje (turbiditet) uzoraka. U odsutnosti Chol, koji inače doprinosi

mehaničkoj stabilnosti i otpornosti membrane na deformacije, takvi procesi su dodatno naglašeni.¹⁹⁸

Unatoč navedenim ograničenjima, usporedna analiza pokazuje dosljedne trendove između uzoraka, što omogućuje pouzdanu kvalitativnu interpretaciju. Usporedbom s modelnim membranama koje sadrže Chol (MMM-ovi), jasno je da on ima ključnu ulogu u stabilizaciji MBP-inducirane organizacije membrane. Njegov izostanak dovodi do povećane konformacijske nestabilnosti MBP-a, slabije definiranih sekundarnih strukturnih elemenata i izraženije agregacije membranskih struktura.

Analiza provedena metodom BeStSel pruža detaljan uvid u utjecaj izostanka Chol na konformacijsko ponašanje MBP-a. Dobiveni histogrami na slici 45. pokazuju izraženu redistribuciju sekundarnih strukturnih elemenata u usporedbi sa sustavima koji sadrže kolesterol, što potvrđuje ključnu ulogu kolesterola u stabilizaciji proteinsko-lipidnih interakcija u MMM'-ovima.



Slika 45. Histogrami distribucija sekundarnih struktura MMM'-ova s nezasićenim lancima + MBP pri 20°C i 50 °C dobiveni BeStSel analizom.

U svim analiziranim MMM'-sustavima dominantne komponente sekundarne strukture MBP-a čine antiparalelne β -ploče i kategorija „ostalo“, koja obuhvaća neuređene i produžene konformacije. Udio antiparalelnih β -strukture kreće se u rasponu od približno 27 % do 42 %, pri čemu se najveće vrijednosti bilježe u $n_pMMM'+MBP_20^{\circ}C$ (~ 42 %) te u $n_pMMM'+MBP_50^{\circ}C$ (~ 37 %). Međutim, u usporedbi s MMM-sustavima koji sadrže Chol, antiparalelne β -strukture u membranama bez Chol pokazuju veću varijabilnost, što upućuje na prolazniji i manje kooperativan karakter tih struktura. Udio α -uzvojnica u svim MMM'-sustavima iznimno je nizak. Detektabilan α -helikalni doprinos (~ 3 %) uočen je samo u $n_nMMM'+MBP_20^{\circ}C$, dok u ostalim uzorcima α -helikalna struktura praktički izostaje. Ovakav rezultat jasno pokazuje da odsustvo Chol onemogućuje stabilizaciju α -zavojnica MBP-a na membranskoj površini, što je u skladu s literaturom koja navodi da kolesterol doprinosi povećanju debljine i mehaničke stabilnosti membrane, čime se olakšava trajno sidrenje helikalnih segmenata proteina.¹¹ Paralelne β -ploče pojavljuju se isključivo u $n_nMMM'+MBP_20^{\circ}C$, s udjelom od približno 13 %. Ova pojava ukazuje na povećanu konformacijsku heterogenost MBP-a u odsutnosti Chol, osobito pri nižoj temperaturi, kada je membrana manje fluidna i istodobno strukturno slabije organizirana. Zavoji čine umjeren udio ukupne sekundarne strukture MBP-a u svim MMM'-uzorcima, s vrijednostima između približno 16 % i 20 %. Najveći udio zavoja zabilježen je u $n_nMMM'+MBP_50^{\circ}C$ (~ 20 %), što ukazuje na povećanu fleksibilnost i dinamičnost proteinske strukture pri povišenoj temperaturi. Povećanje udjela zavoja, uz istodobno povećanje neuređenih segmenata, sugerira da povišenje temperature dodatno destabilizira inducirane sekundarne strukture MBP-a u MMM'-membranama. Kategorija „ostalo“ čini najveći pojedinačni udio sekundarne strukture MBP-a u svim promatranim sustavima, s vrijednostima koje se kreću od približno 35 % do 53 %. U usporedbi sa sustavima koji sadrže Chol (MMM-ovi), udio kategorije „ostalo“ u membranama bez Chol (MMM'-ovima) znatno je veći, što potvrđuje da Chol ima stabilizirajući učinak na inducirane sekundarne strukture MBP-a. Temperaturni učinak u MMM'-sustavima izraženiji je nego u MMM-sustavima. Povišenje temperature dovodi do smanjenja udjela β -strukture i povećanja zavoja i neuređenih segmenata, što je tipično ponašanje IDP proteina u slabije organiziranom lipidnom okolišu.

Bitno je naglasiti da se CD spektroskopijom MMM-ova s nezasićenim ugljikovodičnim lancima dobivaju rezultati slični onima sa zasićenim lancima, što sugerira da MBP bez obzira na zasićenost lipidnih lanaca (odnosno temperature zagrijavanja) ostaje jednako nestrukturiran.

§ 5. ZAKLJUČAK

U ovoj doktorskoj disertaciji provedena je detaljna i višestruka analiza interakcija mijelinskog bazičnog proteina (MBP) s modelnim mijelinskim membranama (MMM) različitog lipidnog sastava, s ciljem razumijevanja kako promjene u omjeru lipida, prisutnost kolesterola, zasićenost (nezasićenost) ugljikovodičnih lanaca lipida i faza membrane utječu na termotropna i molekulska svojstva membrana. Primjenom kalorimetrijskih, spektroskopskih i mikroskopskih tehnika dobiven je jedinstven uvid u mozaik koji čine reprezentativni lipidi mijelina i MBP.

Pripravom MMM-ova od istih lipida u različitoj količini pokazano je da je njihov omjer ključan za regulaciju jačine van der Waalsovih interakcija između ugljikovodičnih lanaca u prisustvu MBP-a. Rezultati jasno ukazuju da su te interakcije znatno slabije u membranama koji oponašaju normalni mijelin (normalni MMM-ovi) u usporedbi s onima koji oponašaju promijenjen mijelin. Razlikovno-pretražna kalorimetrija (DSC) potvrdila je izostanak termotropnih događaja u normalnim MMM-ovima u prisutnosti MBP-a, za razliku od promijenjenih MMM-ova, što upućuje na to da MBP samom adsorpcijom na površinu MMM-ova uzrokuje slabljenje van der Waalsovih interakcija između ugljikovodičnih lanaca. To je dodatno potvrđeno FTIR-ATR spektroskopijom; analiza vrpci $\nu_{(a)s}CH_2$ pokazala je da u normalnim MMM-ovima prisutnost MBP-a ne uzrokuje značajne promjene u pakiranju lipidnih lanaca ni u lateralnom uređenju molekula lipida, kako pri 30 °C tako i pri 60 °C. Ovi rezultati dodatno potvrđuju slabljenje van der Waalsovih interakcija u sustavima koji oponašaju stanje mijelina pri fiziološkim uvjetima. Istodobno su uočene značajne razlike u hidrataciji fosfatnih skupina ($\nu_{as}PO_2^-(non)-HB$ vrpce) između normalnih i promijenjenih MMM-ova, što naglašava osjetljivost polarnih dijelova lipida, odnosno membrane, na promjene u lipidnom omjeru.

CD spektroskopija pokazala je da MBP, kao IDP, zadržava svojstvo konformacijske prilagodljivosti te poprima različite strukturne karakteristike ovisno o vrsti membrane na koju se adsorbira. Posebice je zanimljiva razlika između MMM-ova građenih od lipida sa zasićenim i nezasićenim ugljikovodičnim lancima. U MMM-ovima sa zasićenim lancima porast temperature rezultira tek umjerenim promjenama u raspodjeli sekundarnih struktura, dok u sustavima s nezasićenim lancima povećanje temperature dovodi do izraženijeg porasta

neuređenih struktura i smanjenja β -ploča. Dobiveni rezultati ukazuju na veću osjetljivost MBP-a u fluidnijem, tj. manje uređenom i rjeđe pakiranom (slabije van der Waalsove interakcije) lipidnom okruženju.

Posebno važan doprinos ovog rada odnosi se na razjašnjavanje uloge kolesterola u modelnim mijelinskim membranama. Pokazano je da prisutnost kolesterola modulira fizikalna svojstva membrane djelujući kao regulator fluidnosti i pakiranja lipidnih lanaca. U ovom slučaju, kolesterol u sprezi s MBP-om (i u prisustvu ostalih lipida ovisno o njihovom omjeru) izrazito utječe na jačinu van der Waalsovih interakcija između ugljikovodičnih lanaca. Posljedično, adsorpcija MBP-a u sustavima koji sadrže kolesterol (MMM-ovi) je kvalitativno drugačija nego u sustavima u kojima ga nema (MMM'-ovi), što se vjerojatno odražava na fleksibilnost mijelinske membrane. Rezultati mjerenja CD-a dodatno potvrđuju da je zastupljenost pojedinih sekundarnih struktura MBP-a izrazito osjetljiva na prisutnost kolesterola. U membranama koje sadrže kolesterol, MBP zadržava viši stupanj neuređenosti, dok se u njegovoj odsutnosti lakše induciraju elementi sekundarne strukture, osobito pri povišenim temperaturama.

Dobiveni rezultati potvrđuju postavljene hipoteze da se adsorpcija MBP-a na MMM-ove razlikuje se u fiziološkom i patološkom stanju, da prisutnost kolesterola smanjuje interakciju MBP-a s MMM-ovima te da MMM-ovi u fluidnoj fazi jače intereagiraju s MBP-om nego kada su u fazi gela. Time se postigao prvi sustavni uvid na molekulskoj razini gdje promjene u omjerima lipida i prisutnost kolesterola zajednički reguliraju van der Waalsove interakcije, fluidnost membrane i adsorpciju MBP-a, koji odražavaju stabilnost i funkcionalnost mijelinske membrane. Ovo istraživanje doprinosi razumijevanju utjecaja suptilnih promjena u lipidnom sastavu na strukturnu i funkcionalnu stabilnost mijelina.

Značaj ovog istraživanja posebno dolazi do izražaja u kontekstu demijelinizacijskih bolesti. Budući da je u patološkim stanjima često narušen lipidni sastav mijelinske membrane (navedeni promijenjeni sastav), rezultati ove disertacije sugeriraju da promjene u omjerima lipida mogu povećati osjetljivost membrane na interakcije s MBP-om, potencijalno potičući strukturne poremećaje i destabilizaciju mijelina. Ovi uvidi mogu pružiti temelj za buduća istraživanja mehanizama demijelinizacije, razvoj preciznijih modelnih sustava te identifikaciju lipidno-proteinskih parametara koji bi mogli predstavljati potencijalne ciljeve u terapijskim pristupima.

§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ (PREMA POTREBI)

AFM	mikroskopija atomskih sila (engl. <i>atomic force microscopy</i>)
ATR	prigušena totalna refleksija (engl. <i>attenuated total reflection</i>)
bSM	sfingomijelin iz mozga (engl. <i>brain sphingomyelin</i>)
CD	cirkularni dikroizam (engl. <i>circular dichroism</i>)
CH ₂	metilenska skupina
CH ₃	metilna skupina
Chol	kolesterol (engl. <i>cholesterol</i>)
CMC	kritična micelarna koncentracija (engl. <i>critical micelle concentration</i>)
CLSM	konfokalna laserska skenirajuća mikroskopija (engl. <i>confocal laser scanning microscopy</i>)
D _H	hidrodinamički promjer
DLS	dinamičko raspršenje svjetlosti (engl. <i>dynamic light scattering</i>)
DMPG	1,2-dimiristoil- <i>sn</i> - glicero-3-fosfoglicerol
DOPC	1,2-dioleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilkolin
DOPG	1,2-dioleil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoglicerol
DPPC	1,2-palmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilkolin
DPPE	1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidiletanolamin
DPPG	1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoglicerol
DPPS	1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfo-L-serin
DSC	razlikovno-pretražna kalorimetrija (engl. <i>differential scanning calorimetry</i>)
DSPC	1,2-distearoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilkolin
EAE	eksperimentalni autoimuni encefalomijelitis
EFA	analiza promjenjivih faktora (engl. <i>evolving factor analysis</i>)
ELS	elektroforetsko raspršenje svjetlosti (engl. <i>electrophoretic light scattering</i>)
GUV	gigantski liposomi (engl. <i>giant unilamellar vesicles</i>)
LUV	veliki liposomi (engl. <i>large unilamellar vesicles</i>)
L _α	fluidna faza
L _β	gel-faza

IDP	intrinzično neuređeni protein (engl. <i>intrinsically disordered protein</i>)
MBP	mijelinski bazični protein (engl. <i>myelin basic protein</i>)
MCA	višedimenzionalna analiza krivulja (eng. <i>multivariate curve analysi</i>)
MCR-ALS	multivarijantna analiza metodom izmjeničnih najmanjih kvadrata (engl. <i>multivariate curve resolution with alternating least squares</i>)
MM	modelna membrana
MMM	modelna membrana mijelina s kolesterolom
MMM'	modelna membrana mijelina bez kolesterola
MS	multipla skleroza
N (n)	oznaka za nezasićene lipide (građeni od nezasićenih ugljikovodičnih lanaca)
NMR	nuklearna magnetska rezonancija
PC	fosfatidilkolin
PE	fosfatidiletanolamin
PG	fosfatidilglicerol
PLP	(engl. <i>proteolipid protein</i>)
PS	fosfatidilserin
POPC	1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilkolin
POPE	1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidiletanolamin
POPS	1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-L-fosfoserin
P0	(engl. <i>myelin protein zero</i>)
SLB	lipidni dvosloj vezan na čvrsti nosač (engl. <i>supported lipid bilayer</i>)
SEM	skenirajuća elektronska mikroskopija
SUV	mali liposomi (engl. <i>small unilamellar vesicles</i>)
<i>T</i>	apsolutna temperatura
TEM	transmisijska elektronska mikroskopija
<i>T_m</i>	temperatura taljenja ili mekšanja
<i>T_p</i>	temperatura pretprijelaza
UV	ultraljubičasto (engl. <i>ultraviolet</i>)
Vis	vidljivo (engl. <i>visible</i>)
Z (z)	oznaka za zasićene lipide (građeni od zasićenih ugljikovodičnih lanaca)
ζ	zeta-potencijal
$\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$	antisimetrično istezanje CH ₂ skupine

$\nu_s\text{CH}_2$	simetrično istežanje CH_2 skupine
$\nu\text{C=O}$	istežanje karbonilne skupine
γCH_2	strižna vibracija metilenske skupine
$\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-$	antisimetrično istežanje fosfatnih skupina

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. L. Yurlova, N. Kahya, S. Aggarwal, H. J. Kaiser, S. Chiantia, M. Bakhti, Y. P.-Jung, O. B. David, A. H. Futerman, B. Brügger, M. Simons, *Biophys. J.* **101** (2011) 2713–2720.
2. K. A. Nave, M. Simons, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **30** (2014) 503–533.
3. J. S. O'Brien, E.L. Sampson, *J Lipid Res.* **6** (1965) 537–544.
4. S. Schmitt, L. C. Castelvetti, M. Simons, *BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1851** (2015) 999–1005.
5. P. R. Cullis, B. de Kruijff, *Biochim Biophys Acta.* **559** (1979) 399–420.
6. R. M. Epand, *Biochim. Biophys. Acta.* **1376** (1998) 353–368.
7. H. J. Dyson, P. E. Wright, *Nat Rev Mol Cell Biol.* **6** (2005) 197–208.
8. L. Homchaudhuri, E. Polverini, W. Gao, G. Harauz, J. M. Boggs, *Biochemistry* **48**(11) (2009) 2385–2393.
9. N. Ghasemi, S. Razavi, E. Nikzad, *Cell J.* **19**(1) (2017) 1–10.
10. R. Shaharabani, M. Ram-On, Y. Talmon, R. Beck, *PNAS* **115** (2018) 11156–11161.
11. J. M. Boggs, *Cell Mol Life Sci.* **63**(17) (2006) 1945–1961.
12. G. Harauz, N. Ishiyama, C. M. Hill, I. R. Bates, D. S. Libich, C. Farès, *Biochemistry* **48** (2009) 8094–8104.
13. R. Shaharabani, M. Ram-On, R. Avinery, R. Aharoni, R. Arnon, Y. Talmon, R. Beck, *J. Am. Chem. Soc.* **138** (2016) 12159–12165.
14. P. Maleš, B. Pem, D. Petrov, A. Mangiarotti, R. Dimova, D. Bakarić, *Membranes* **15** (2025) 279.
15. D. Marsh, *Biochim. Biophys. Acta.* **1798** (2010) 688–699.
16. R. N. A. H. Lewis, R. N. McElhaney, *Chem. Phys. Lipids* **148** (2007) 1–15.

17. P. Maleš, Z. Brkljača, I. Crnolatac, D. Petrov, D. Bakarić, *Membranes* **14** (2024), 1.
18. P. Maleš, Z. Brkljača, D. Domazet Jurašin, D. Bakarić, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **272** (2022) 121013.
19. R. N. A. H. Lewis, R.N. McElhaney, *Biochim. Biophys. Acta* **1828** (10) (2013) 2347–2358.
20. L. K. Tamm, S. A. Tatulian, *Q. Rev. Biophys.* **30** (1997) 365–429.
21. A. J. Miles, R. W. Janes, B. A. Wallace, *Chem Soc Rev.* **50**(15) (2021) 8400–8413.
22. A. Micsonai, F. Wien, É. Bulyáki, J. Kun, É. Moussong, Y. H. Lee, Y. Goto, M. Réfrégiers, J. Kardos, *Nucleic Acids Res* **46**(W1) (2018) W315–W322.
23. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, W. H. Freeman, New York, 2007, str. 326–345.
24. G. M. Cooper, R. E. Hausman, *Stanica*, Medicinska naklada, Zagreb, 2014, str. 79–82, 483–490.
25. N. D. Ridgway, R. S. McLeod, *Biochemistry Of Lipids, Lipoproteins And Membranes*, Elsevier, Halifax, 2015, str. 1–38.
26. S. J. Singer, G. L. Nicolson, *Science* **175** (1972) 720–731.
27. P. F. Devaux, *Biochemistry* **30** (1991) 1163–1173.
28. D. L. Daleke, *J. Lipid Res.* **44** (2003) 233–242.
29. K. Simons, E. Ikonen, *Nature* **387** (1997) 569–572.
30. <https://microbenotes.com/phospholipid-bilayer-structure-types-properties-functions/#structure-of-phospholipid-bilayer> (datum pristupa 23.12.2025.)
31. A. Varki, *Glycobiology* **27** (2017) 3–49.
32. G. van Meer, D.R. Voelker, G. W. Feigenson, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**(2), (2008) 112–124.
33. D. Marsh, *Handbook of Lipid Bilayers*, 2. izd., CRC Press., Boca Raton, 2013, str. 1–42.
34. E. Fahy, S. Subramaniam, H. A. Brown, C. K. Glass, A. H. Jr. Merrill, R. C. Murphy, C. R. Raetz, D. W. Russell, Y. Seyama, W. Shaw, T. Shimizu, F. Spener, G. van Meer, M. S. Van Nieuwenhze, S. H. White, J. L. Witztum, E. A. Dennis, *J. Lipid Res.* **46**(5) (2005) 839–861.
35. T. Heimburg, *Thermal Biophysics of Membranes*, Wiley-VCH, Berlin, 2007, str. 1–41, 75–99, 173–189.

36. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry* 5. izd., Worth Publishers, New York, 2008, str. 349–355.
37. T. P. W. McMullen, R. N. McElhaney, *Biochim. Biophys. Acta* **1234**(1) (1995) 90–98.
38. P. L. Yeagle, *Biochim. Biophys. Acta* **822**(3-4) (1985) 267–287.
39. P. L. Yeagle, *FASEB J* **3**(7) (1989) 1833–1842.
40. J. M. Crane, L. K. Tamm, *Biophys J.* **86**(5) (2004) 2965–79.
41. I. Levitan, Y. Fang, A. Rosenhouse-Dantsker, V. Romanenko, *Subcell Biochem* **51** (2010) 509–549.
42. G. Saher, B. Brügger, C. Lappe-Siefke, W. Möbius, R. Tozawa, M. C. Wehr, F. Wieland, S. Ishibashi, K. A. Nave, *Nat. Neurosci.* **8**(4) (2005) 468–475.
43. B. Vurusaner, P. Gamba, G. Testa, S. Gargiulo, F. Biasi, G. Poli, *Antioxid Redox Signal* **25**(10) (2016) 593–605.
44. F. R. Maxfield, I. Tabas, *Nature* **438**(7068) (2005) 612–621.
45. M. Schlame, *BBA – Bioenergetics* **1862**(1) (2021) 148305.
46. H. Lodish, A. Berk, P. Matsudaira, C. Kaiser, M. Krieger, M. Scott, L. Zipursky, J. Darnell, *Molecular cell biology*, W. H. Freeman and Company, New York, 2003, str. 148.
47. D. M. Engelman, *Nature*, **438**(7068) (2005) 578–580.
48. T. Pawson, J. D. Scott, *Science* **278**(5346) (1997) 2075–2080.
49. M. G. Hinds, R. S. Norton, *Mol. Biotechnol.* **7**(3) (1997) 315–331.
50. S. H. White, W. C. Wimley, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **28** (1999) 319–365.
51. G. Van Meer, D. R. Voelker, G. W. Feigenson, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9** (2008) 112–124.
52. A. Tukova, A. Rodger, *Emerg Top Life Sci* **5**(1) (2021) 61–75.
53. R. H. Quarles, W. B. Macklin, P. Morell, *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*, 2006, Burlington, str. 51–71.
54. G. F. Piredda, T. Hilbert, J. P. Thiran, T. Kober, *Magn. Reson. Med.* **85**(2) (2021) 627–652.
55. L. Shapiro, J. P. Doyle, P. Hensley, D. R. Colman, W. A. Hendrickson, *Neuron* **17**(3) (1996) 435–449.
56. Y. Min, K. Kristiansen, J. M. Boggs, *PNAS* **106**(9) (2009), 3154–3159.
57. K. A. Nave, H. B. Werner, *Annu Rev Cell Dev Biol* **30** (2014) 503–533.

58. K. Ainger, D. Avossa, F. Morgan, S. J. Hill, C. Barry, E. Barbarese, J. H. Carson, *J. Cell Biol.* **123**(2) (1993) 431–441.
59. G. Harauz, J. M. Boggs, *Brain Res.* **1489** (2013) 20–33.
60. J. M. Boggs, G. Rangaraj, *Biochemistry* **39**(26) (2000) 7799–7806.
61. <https://www.biorender.com/> (datum pristupa 23.12.2025.)
62. J. M. Boggs, G. Rangaraj, *Biochemistry*, **39**(26) (2000) 7799–7806.
63. G. Harauz, J. M. Boggs, *J Neurochem* **125**(3) (2013) 334–361.
64. A. A. Musse, J. M. Boggs, G. Harauz, *PNAS* **103**(12) (2006) 4422–4427.
65. S. G. Waxman, *Nat. Rev. Neurosci.* **7**(12) (2006) 932–941.
66. <https://jascoinc.com/learning-center/theory/spectroscopy/circular-dichroism-spectroscopy/> (datum pristupa 5.11.2025.)
67. E. Traiffort, S. Morisset-Lopez, M. Moussaed, A. Zahaf, *Int. J. Mol. Sci.* **22**(7) (2021) 3426.
68. M. A. Moscarello, F. G. Mastronardi, D. D. Wood, *Neurochem. Res.* **32**(2), (2007) 251–256.
69. B. D. Trapp, K. A. Nave, *Annu. Rev. Neurosci.* **31**(2008) 247–269.
70. N. F. Halliwell, K. R. Kumar, K. Ng, *Muscle & Nerve* **68**(3) (2023) E34–E36.
71. H. J. Willison, B. C. Jacobs, P. A. van Doorn, *Lancet* **388**(10045) (2016) 717–727.
72. K. A. Nave, *Nature* **468**(7321) (2010) 244–252.
73. M. Gharagozloo, R. Bannon, P. A. Calabresi, *Curr Opin Pharmacol* **63** (2022) 102194.
74. E. Sackmann, *Science* **271**(5245) (1996) 43–48.
75. L. K. Tamm, H. M. McConnell, *Biophys. J.* **47**(1) (1985) 105–113.
76. C. Isalomboto Nkanga, A. Murhimalika Bapolisi, N. Ikemefuna Okafor, R. Werner Maçedo Krause u A. Catala (ur.) *Liposomes - Adv. Perspect.*, InTech, London, 2019, str. 3–7.
77. R. P. Richter, R. Bérat, A. R. Brisson, *Langmuir* **22**(8) (2006) 3497–3505.
78. E. T. Castellana, P. S Cremer, *Surf. Sci. Rep.* **61**(10) (2006) 429–444.
79. CA Keller, B. Kasemo, *Biophys J.* **75**(3) (1998) 1397–1402.
80. M. M. Velázquez, T. Alejo, D. López-Díaz, B. Martín-García, M. D. Merchán u Kumar Nayak (ur.), *Two-dimensional Mater. - Synth. Charact. Potential Appl.*, InTech, London, 2016, str. 21–25.
81. K. B. Blodgett, *J. Am. Chem. Soc.* **57**(6) (1935) 1007–1022.

82. C. Tanford, *Science* **200**(4345) (1978) 1012–1018.
83. E. Rideau, R. Dimova, P. Schwille, F. R. Wurm, K. Landfester, *Chem Soc Rev* **47** (2018) 8572–8610.
84. G. F. Bofo, K. T. Magar, M. D. Ekpo, W. Qian, S. Tan, C. Chen, *Int. J. Mol. Sci.* **23** (2022) 12487.
85. P. R. Cullis, M. J. Hope, C. P. Tilcock, *Chem. Phys. Lipids* **40**(2-4) (1986) 127–144.
86. R. Koynova, M. Caffrey, *Biochim. Biophys. Acta* **1376**(1) (1998) 91–145.
87. G. Harauz, A. A. Musse, *Neurochemical research* **32**(2) (2007) 137–158.
88. T. Heimburg, D. Marsh, *Biophys. J.* **68**(2) (1995) 536–546.
89. G. Cevc, *Biochim. Biophys. Acta* **1031**(3) (1990) 311–382.
90. D. Marsh, *Chem. Phys. Lipids* **144**(2) (2006) 146–159.
91. R. M. Epand, R. F. Epand, *Biochim. Biophys. Acta* **1788**(1) (2009) 289–294.
92. A. D. Bangham, M. M. Standish, J. C. Watkins, *J. Mol. Biol.* **13**(1) (1965) 238–252.
93. S. Marcelja, *Biophys. J.* **76**(1999) 593–594.
94. T. Okazaki, T. Inaba, Y. Tatsu, R. Tero, T. Urisu, K. Morigaki, *Langmuir* **25** (2009) 345–351.
95. S. J. Johnson, T. M. Bayerl, D. C. McDermott, G. W. Adam, A. R. Rennie, R. K. Thomas, E. Sackmann, *Biophys. J.* **59** (1991) 289–294.
96. T. Shoaib, P. C. Nalam, Y. He, Y. Chen, R. M. Espinosa-Marzal, *Langmuir* **33** (2017) 7105–7117.
97. M. Stepniewski, A. Bunker, M. Pasenkiewicz-Gierula, M. Karttunen, T. Ro’G, *J. Phys. Chem. B* **114** (2010), 11784–11792.
98. M. Baginski, J. Czub, K. Sternal, *Chem. Rec.* **6** (2006) 320–332.
99. C. Peetla, A. Stine, V. Labhasetwar, *Mol. Pharm.* **6** (2009) 1264–1276.
100. M. G. K. Benesch, D. A. Mannock, R. N. A. H. Lewis, R. N. McElhaney, *Biochemistry* **50** (46) (2011), 9982–9997.
101. J. L. Thewalt, M. Bloom, *Biophys. J.* **63** (1992), 1176–1181.
102. R. N. McElhaney, *Chem. Phys. Lipids* **30** (1982), 229–259.
103. T. P. W. McMullen, R. N. A. H. Lewis, R. N. McElhaney, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **8** (2004), 459–468.
104. A. Kirsch, R. A. Böckmann, *Biophys. J.* **116** (2019) 2131–2148.
105. K. Sengupta, V. A. Raghunathan, *Europhys. Lett.* **49** (2000) 722–728.

106. K. Akabori, J. F. Nagle, *Soft Matter* **11** (2015) 918–926.
107. K. Sengupta, V. A. Raghunathan, J. Katsaras, *Phys. Rev. E* **68** (2003) 031710.
108. R. A. Parente, B. R. Lentz, *Biochemistry* **23** (1986) 2353–2362.
109. P. C. Mason, B. D. Gaulin, R. M. Epand, G. D. Wignall, J. S. Lin, *Phys. Rev. E* **59** (1999) 3361–3367.
110. R. N. A. H. Lewis, D. A. Mannoek, R. N. McElhaney, u A. M. Dopico (ur.), *Methods in Molecular Biology: Methods in Membrane Lipids*, Humana Press, 2007, str. 171–195, 207–223.
111. C. H. Spink, *Methods Cell Biol.* **84** (2008) 115–141. 1982
112. T. M. Mavromoustakos, u A. M. Dopico (ur.), *Methods in Membrane Lipids*, Humana Press, Totowa, New Jersey, 2007, str. 587–599.
113. D. A. Skoog, J. F. Holler, S. R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*, Cengage Learning, Boston, 2018, str. 303–361, 824–831.
114. H. H. Perkampus, *UV Spectroscopy and Its Applications*, Springer-Verlag, Berlin, 1992.
115. E. Generalić, "Spektar elektromagnetskog zračenja." *Englesko-hrvatski kemijski rječnik & glosar*. 29.6.2022. KTF-Split (datum preuzimanja 27.12.2025.)
116. H. G. Pfeiffer, H. A. Liebhafsky, *J. Chem. Educ.* **28**(3) (1951) 123–125.
117. G. Cevc, J. M. Seddon, R. Hartung, W. Eggert, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **940** (1988) 219–240.
118. L. Pašalić, B. Pem, D. Bakarić, *Membranes* **13** (2023) 12.
119. P. Maleš, Z. Brkljača, I. Crnolatac, D. Bakarić, *Colloids Surf., B* **201** (2021) 111645, 8.
120. P. Maleš, B. Pem, D. Petrov, D. Domazet Jurašin, D. Bakarić, *Soft Matter* **18**(2022) 6703–6715.
121. B. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals And Applications*, John Wiley & Sons, West Sussex, 2004, str. 5–15.
122. H. Kavak, S. Eker, A. Mamedov, *J Quant Spectrosc Radiat Transf* **86**(2004) 223–229.
123. H. Günzler, H. U. Gremlich, Uvod u infracrvenu spektroskopiju, Školska knjiga, Zagreb, 2006, str. 23–59.
124. E. Mendes, N. Duarte, *Foods* **10**(2) (2021) 477.

125. <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/infrared-and-raman/ft-ir-routine-spectrometer/what-is-ft-ir-spectroscopy.html> (datum preuzimanja 27.12.2025.)
126. A. M. Bouchet, M. A. Frías, F. Lairion, F. Martini, H. Almaleck, G. Gordillo, E. A. Disalvo, *Biochim. Biophys. Acta* **1788** (2009) 918–925.
127. K. A. Riske, R. P. Barroso, C. C. Vequi-Suplicy, R. Germano, V. B. Henriques, M. T. Lamy, *Biochim. Biophys. Acta* **1788** (2009) 954–963.
128. Z. D. Schultz, I. W. Levin, *Annual Review of Analytical Chemistry* **4** (2011) 343–366.
129. C. Paré, M. Lafleur, F. Liu, R. N. A. H. Lewis, R. N. McElhaney, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1511** (2001) 60–73.
130. R. N. Lewis, E. J. Prenner, L. H. Kondejewski, C. R. Flach, R. Mendelsohn, R. S. Hodges, R. N. McElhaney, *Biochemistry* **38**(46) (1999) 15193–15203.
131. R. G. Snyder, H. L. Strauss, C. A. Elliger, *J. Phys. Chem.* **86**(26) (1982) 5145–5150.
132. M. Falk, T. A. Ford, *Can. J. Chem.* **44** (1966) 1699–1707.
133. N. J. Harrick, *Internal Reflection Spectroscopy*. Wiley-Interscience, New York, 1967.
134. <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/infrared-and-raman/ft-ir-routine-spectrometer/what-is-ft-ir-spectroscopy/atr-attenuated-total-reflectance.html> (datum preuzimanja 27.12.2025.)
135. M. Milosevic, *Internal Reflection and ATR Spectroscopy*. John Wiley & Sons, New York, 2012, str. 365–384
136. B. C. Smith, *Infrared Spectral Interpretation: A Systematic Approach*. CRC Press, Boca Raton, 2018.
137. T. G. Mayerhöfer, A. Dabrowska, A. Schwaighofer, B. Lendl, J. Popp, *Chem. Phys. Chem.* **21** (2020) 707–711.
138. T. G. Mayerhöfer, W. D. P. Costa, J. Popp, *Spectrochim. Acta Part Mol. Biomol. Spectrosc.* **341** (2025) 126425.
139. H. Tiernan, B. Byrne, S. G. Kazarian, *Spectrochim. Acta Part Mol. Biomol. Spectrosc.* **241** (2020) 118636.
140. M. Krishnan, D. R. Flanagan, *J Control Release* **69**(2) (2000) 273–281.
141. S. A. Tatulian, *Biochemistry* **42** (2003) 11898–11907.
142. L. Pašalić, P. Maleš, A. Čikoš, B. Pem, D. Bakarić, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **305** (2024), 123488.

143. A. V. Ewing, G. D. Biggart, C. R. Hale, G. S. Clarke, S. G. Kazarian, *Int. J. Pharm.* **495**(1) (2015) 112–121.
144. M. Kaszuba, D. McKnight, M. T. Connah, F. K. McNeil-Watson, U. Nobbmann, *J. Nanopart. Research* **10** (2007) 823–829.
145. P. A. Hassan, S. Rana, G. Verma, *Langmuir* **31** (2015) 3–12.
146. C. M. Hoo, N. Starostin, P. West, M. L. Mecartney, *J. Nanopart. Res.* **10** (2008) 89–96.
147. J. Stetefeld, S. A. McKenna, T. R. Patel, *Biophys. Rev.* **8** (2016) 409–427.
148. R. J. Hunter, *Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications*; Academic Press, London, 1981, 11–31.
149. J. N. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces*, 3. izd., Academic Press, San Diego, 2011, 535–579.
150. S. Bhattacharjee, *J. Control. Release* **235** (2016) 337–351.
151. G. Gregoriadis, *Trends Biotechnol.* **13**(12) (1995) 527–537.
152. L. Sercombe, T. Veerati, F. Moheimani, S. Y. Wu, A. K. Sood, S. Hua, *Front. Pharmacol.* **6** (2015) 286.
153. J. Pawley, 3. izd., *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Springer, New York, 2006.
154. T. Wilson, *J. microsc.* **244**(2) (2011) 113–121.
155. A. Alva, E. Brito-Alarcón, A. Linares, E. Torres-García, H. O' Hernández, R. Pinto-Cámara, D. Martínez, P. Hernández-Herrera, R. D'Antuono, C. Wood, A. Guerrero, *J. Microsc.* **288**(3) (2022) 218–241.
156. O. Wesołowska, K. Michalak, J. Maniewska, A. B. Hendrich, *Acta Biochim. Pol.* **56**(1) (2009) 33–39.
157. L. A. Bagatolli, E. Gratton, *Biophys. J.* **77**(4) (1999) 2090–2101.
158. T. Bhatia, T. Robinson, R. Dimova, *Soft Matter* **16** (2020) 7359–7369.
159. P. Maleš, J. Munivra, L. Pašalić, B. Pem, D. Bakarić, *Chem. Phys. Lipids* **264** (2024) 105434.
160. Z. Brkljača, M. Čehić, T. Portada, M. Butumović, D. Bakarić, I. Crnolatac, *Dyes Pigm.* **206** (2022) 110621.
161. K. A. Riske, R. Dimova, *Biophys. J.* **88**(2) (2005) 1143–1155.
162. N. J. Greenfield, *Nature protocols*, **1**(6) (2006) 2876–2890.

163. N. Sreerama, R. W. Woody, *Anal. Biochem.* **287**(2) (2000) 252–260.
164. B. A. Wallace, J. Lees, A. J. W. Orry, A. Lobley, R. W. Janes, *Protein Sci.* **12** (2003) 875–884.
165. G. F. Piredda, T. Hilbert, J. P. Thiran, T. Kober, *Magn. Reson. Med.* **85** (2021) 627–652.
166. https://www.rcsb.org/structure/AF_AFP02687F1 (datum pristupa 24.12.2025.)
167. <https://www.avantiresearch.com/en-gb> (datum pristupa: 5.11.2025.)
168. R. Koynova, M. Caffrey, *Biochim. Biophys. Acta* **1255** (1995), 213–236.
169. P. Maleš, I. Nikšić-Franjić, A. Wang, B. Pem, D. Bakarić, *Spectrochim. Acta A* **317** (2024) 124462.
170. P. Maleš, M. Butumović, I. Erceg, Z. Brkljača, D. Bakarić, *BBA Biomembranes* **1865** (1) (2023) 184072.
171. P. Maleš, B. Pem, D. Bakarić, Modulacija termotropnih svojstava modelnih mijelinskih membrana bez kolesterola pomoću mijelinskog bazičnog proteina, 3. Međunarodna konferencija kemo- i bioinformatike, Kragujevac, 2025, Zbornik radova str. 48–52.
172. D. Lombardo, M. A. Kiselev, *Pharmaceutics* **14** (2022) 543.
173. Y. Barenholz, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **55**(2003) 127–148.
174. M. I. Angelova, D. S. Dimitrov, *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **81** (1986) 303–311
175. A. Micsonai, F. Wien, É. Bulyáki, J. Kun, É. Moussong, Y. H. Lee, Y. Goto, M. Réfrégiers, J. Kardos, *Nucleic Acids Res.* **46** (2018) W315–W322.
176. L. M. Loura, M. Prieto, *Front. Physiol.* **2**(2011) 82.
177. <https://www.leica-microsystems.com/products/microscope-software/p/leica-las-x-ls/> (datum pristupa 19.8.2025.)
178. C. Chen, D. Han, C. Cai, X. Tang, *J. Control. Release* **142**(3) (2010) 299–311.
179. F. Menges. Spectragryph - optical spectroscopy software. Preuzeta online verzija 1.2 (od 2024.)
180. B. A. Wallace, R. W. Janes, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**(5) (2001) 567–571.
181. A. Raasakka, S. Ruskamo, J. Kowal, R. Barker, A. Baumann, A. Martel, J. Tuusa, M. Myllykoski, J. Bürck, A.S. Ulrich, H. Stahlberg, P. Kursula, *Scientific reports*, **7**(1) (2017) 4974.

182. A. H. De Vries, S. Yefimov, A. E. Mark, S. J. Marrink, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102** (2005) 5392–5396.
183. G. Cevc, *Biochim. Biophys. Acta* **1062**(1) (1991) 59–69.
184. J. M. Seddo, *Biochim. Biophys. Acta* **1031**(1) (1990) 1–69.
185. P. J. Quinn, *Langmuir* **29**(30) (2013) 9447–9456.
186. J. H. Davis, J. J. Clair, J. Juhasz, *Biophys. J.* **96**(2) (2009) 521–539.
187. A. Radhakrishnan, H. McConnell, *Biophysical journal*, **77**(3) (1999) 1507–1517.
188. R. N. A. H Lewis, R. N. McElhaney, *Chem. Phys. Lipids* **96**(1–2)(1998) 9–21.
189. P. F. Almeida, *Biochim. Biophys. Acta* **1788**(1) (2009) 72–85.
190. R. N. Lewis, R. N. McElhaney, *Methods Mol. Biol.* **400**(2007) 207–226.
191. H. H. Mantsch, R. N. McElhaney, *Chem. Phys. Lipids* **57**(2-3) (1991) 213–226.
192. K. Widder, G. Harauz, D. Hinderberger, *BBA Biomembranes* **1862**(2) (2020) 183077.
193. V. N. Uversky, *Intrinsically disordered proteins* **5**(1) (2017) e1327757.
194. <https://bestsel.elte.hu/index.php> (datum pristupa 3.12.2025.)
195. A. J. Miles, B. A. Wallace, *Chem. Soc. Rev.* **45**(18) (2016) 4859–4872.
196. D. S. Libich, G. Harauz, *Eur. Biophys. J.* **37**(6) (2008) 1015–1029.
197. V. Receveur-Brechot, D. Durand, *Curr. Protein Pept. Sci.* **13**(1) (2012) 55–75.
198. B. A. Wallace, R. W. Janes, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**(5) (2001) 567–571.

§ 8. DODATAK

8.1. DLS, ELS i konfokalna mjerenja (Dodatak poglavlju 4.1.)

8.1.1. Tablice DLS i ELS mjerenja MMM i MMM' sa zasićenim lancima

Tablica D1. z_nMMM+MBP

Mjerenje	Promjer / nm	% V	PdI	ζ / mV
1	1353	100	0,367	0,25
2	1281	100	0,420	-0,01
3	1228	100	0,398	-0,96
4	1190	100	0,361	
5	1438	100	0,309	
6	1663	100	0,414	
Srednja vrijednost $\pm$ nesigurnost	1359 $\pm$ 174	100 $\pm$ 0	0,38 $\pm$ 0,04	-0,2 $\pm$ 0,6

Tablica D2. z_nMMM–MBP

Mjerenje	Promjer / nm	% V	PdI	ζ / mV
1	1389	100	0,086	-3,62
2	853,3	100	0,125	-2,76
3	1068	100	0,127	-4,22
4	1077	100	0,136	
5	841,1	100	0,140	
6	892,9	100	0,152	
Srednja vrijednost $\pm$ nesigurnost	1020 $\pm$ 209	100 $\pm$ 0	0,13 $\pm$ 0,02	-3,5 $\pm$ 0,7

Tablica D3. z_pMMM+MBP

Mjerenje	Promjer / nm	% V	PdI	ζ / mV
1	414,8	100	0,437	0,20
2	386,1	100	0,489	-0,13
3	423,1	100	0,397	-1,52
4	388,8	100	0,356	
5	404,6	100	0,323	
6	420,6	100	0,362	
Srednja vrijednost $\pm$ nesigurnost	406 $\pm$ 16	100 $\pm$ 0	0,39 $\pm$ 0,06	-0,5 $\pm$ 0,9

Tablica D4. z_pMMM+MBP

Mjerenje	Promjer / nm	% V	PdI	ζ / mV
1	952,4	100	0,345	-3,64
2	1099	100	0,333	-4,24
3	1004	100	0,354	-5,39
4	1068	100	0,357	
5	827,4	100	0,359	
6	774,7	100	0,400	
Srednja vrijednost $\pm$ nesigurnost	954 $\pm$ 130	100 $\pm$ 0	0,36 $\pm$ 0,02	-4,4 $\pm$ 0,9

Tablica D5. z_nMMM'+MBP

Mjerenje	Promjer / nm	% V	PdI	ζ / mV
1	545,0	100	0,142	-0,07
2	524,5	100	0,137	0,02
3	551,7	100	0,140	-0,47
4	453,3	100	0,154	
5	438,8	100	0,161	
6	575,5	100	0,168	
Srednja vrijednost $\pm$ nesigurnost	515 $\pm$ 56	100 $\pm$ 0	0,15 $\pm$ 0,02	-0,2 $\pm$ 0,3

Tablica D6. z_nMMM'-MBP

Mjerenje	Promjer / nm	% V	PdI	ζ / mV
1	445,0	100	0,097	-12,2
2	536,6	100	0,111	-13,6

3	516,7	100	0,120	-12,1
4	418,7	100	0,125	
5	382,1	100	0,111	
6	376,9	100	0,120	
Srednja vrijednost $\pm$ nesigurnost	446 $\pm$ 68	100 $\pm$ 0	0,12 $\pm$ 0,08	-12,6 $\pm$ 0,8

Tablica D7. z_pMMM'+MBP

Mjerenje	Promjer / nm	% V	PdI	ζ / mV
1	303,4	100	0,301	-10,5
2	328,2	100	0,322	-9,77
3	272,4	100	0,355	-10,9
4	236,7	100	0,354	
5	359,3	100	0,356	
6	352,4	100	0,412	
Srednja vrijednost $\pm$ nesigurnost	309 $\pm$ 48	100 $\pm$ 0	0,35 $\pm$ 0,03	-10,4 $\pm$ 0,6

Tablica D8. z_pMMM'-MBP

Mjerenje	Promjer / nm	% V	PdI	ζ / mV
1	293,1	100	1,001	-13,4
2	277,6	100	0,966	-12,9
3	349,8	100	0,301	-14,2
4	375,0	100	0,241	
5	484,8	100	0,222	
6	373,2	100	0,232	
Srednja vrijednost $\pm$ nesigurnost	359 $\pm$ 74	100 $\pm$ 0	0,47 $\pm$ 0,42	-13,5 $\pm$ 0,6

8.1.2. DLS i ELS mjerenja MMM i MMM' s nezasićenim lancima

Tablica D9. n_nMMM+MBP

Mjerenje	Promjer / nm	% V	PdI	ζ / mV
1	632,1	100	0,140	0,10
2	545,7	100	0,135	-0,22
3	609,5	100	0,143	0,21
4	578,8	100	0,152	
5	777,2	100	0,158	
6	880,1	100	0,156	
Srednja vrijednost $\pm$ nesigurnost	671 $\pm$ 130	100 $\pm$ 0	0,15 $\pm$ 0,01	0,2 $\pm$ 0,2

Tablica D10. n_nMMM-MBP

Mjerenje	Promjer / nm	% V	PdI	ζ / mV
1	142,0	100	0,066	-8,41
2	115,3	100	0,071	-9,70
3	50,92	100	0,100	-10,6
4	44,95	100	0,098	
5	16,91	100	0,100	
6	41,49	100	0,095	
Srednja vrijednost $\pm$ nesigurnost	69 $\pm$ 48	100 $\pm$ 0	0,09 $\pm$ 0,02	-9,6 $\pm$ 1,1

Tablica D11. n_pMMM+MBP

Mjerenje	Promjer / nm	% V	PdI	ζ / mV
----------	--------------	-----	-----	--------------

1	418.4	100	0.352	-13.2
2	427.0	100	0.346	-14.9
3	410.4	100	0.349	-13.1
4	453.8	100	0.358	
5	322.2	100	0.311	
6	408.7	100	0.342	
Srednja vrijednost $\pm$ nesigurnost	409 $\pm$ 45	100 $\pm$ 0	0.35 $\pm$ 0.01	-13.7 $\pm$ 1.0

Tablica D12. n_pMMM-MBP

Mjerenje	Promjer / nm	% V	PdI	ζ / mV
1	1212	100	0,097	-16,4
2	1222	100	0,092	-15,7
3	1125	100	0,084	-16,8
4	1152	100	0,097	
5	1079	100	0,083	
6	1027	100	0,105	
Srednja vrijednost $\pm$ nesigurnost	1136 $\pm$ 76	100 $\pm$ 0	0,09 $\pm$ 0,01	-16,3 $\pm$ 0,6

Tablica D13. n_nMMM'+MBP

Mjerenje	Promjer / nm	% V	PdI	ζ / mV
1	325,9	100	0,355	-0,188
2	332,5	100	0,349	0,177
3	305,8	100	0,344	-0,172
4	355,1	100	0,361	
5	361,2	100	0,319	
6	376,6	100	0,346	
Srednja vrijednost $\pm$ nesigurnost	343 $\pm$ 26	100 $\pm$ 0	0,34 $\pm$ 0,03	-0,1 $\pm$ 0,2

Tablica D14. n_nMMM'-MBP

Mjerenje	Promjer / nm	% V	PdI	ζ / mV
1	593,3	100	0,084	-8,00

2	568,5	100	0,074	-7,51
3	415,8	100	0,088	-8,64
4	455,3	100	0,074	
5	355,5	100	0,058	
6	487,7	100	0,079	
Srednja vrijednost $\pm$ nesigurnost	479 $\pm$ 90	100 $\pm$ 0	0,08 $\pm$ 0,02	-8,0 $\pm$ 0,6

Tablica D15. n_pMMM'+MBP

Mjerenje	Promjer / nm	% V	PdI	ζ / mV
1	524,7	100	0,128	-22,0
2	469,6	100	0,120	-23,1
3	343,4	100	0,151	-21,8
4	391,0	100	0,123	
5	367,2	100	0,126	
6	323,7	100	0,124	
Srednja vrijednost $\pm$ nesigurnost	403 $\pm$ 78	100 $\pm$ 0	0,13 $\pm$ 0,01	-22,3 $\pm$ 0,7

Tablica D16. n_pMMM'-MBP

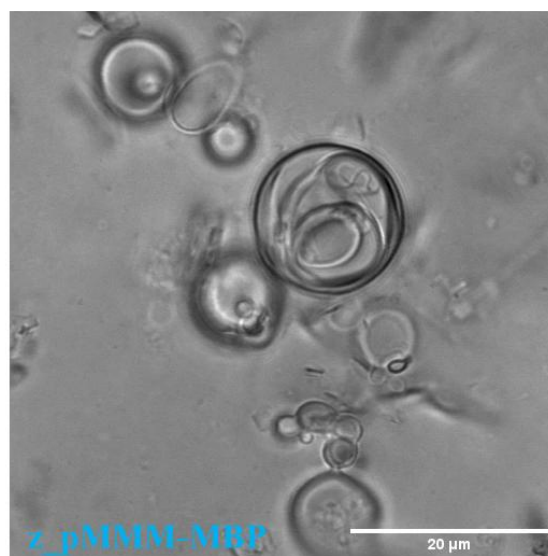
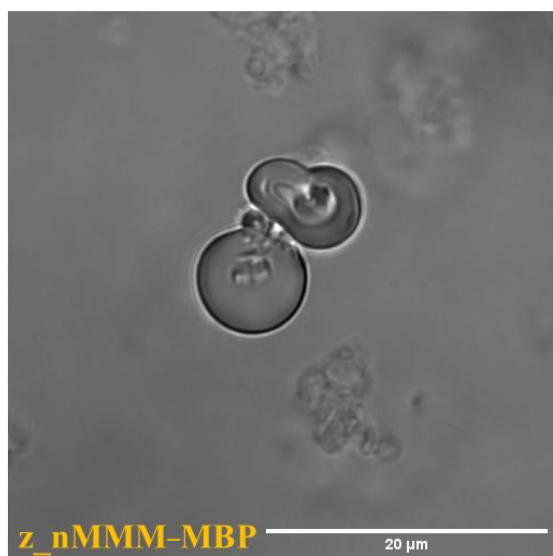
Mjerenje	Promjer / nm	% V	PdI	ζ / mV
1	278,6	100	0,072	-22,8
2	281,5	100	0,061	-23,1
3	279,4	100	0,076	-23,5
4	294,8	100	0,085	
5	268,6	100	0,067	
6	269,6	100	0,081	
Srednja vrijednost $\pm$ nesigurnost	279 $\pm$ 10	100 $\pm$ 0	0,08 $\pm$ 0,02	-23,1 $\pm$ 0,3

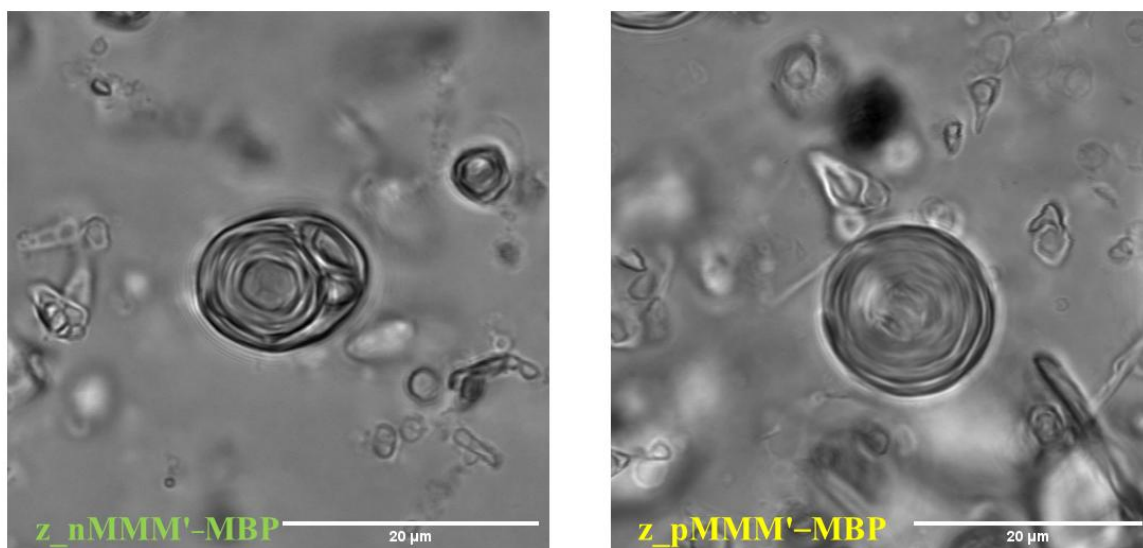
Tablica D17. MBP+NaCl

Mjerenje	Promjer / nm	% V	PdI	ζ / mV
----------	--------------	-----	-----	--------------

1	753,8	100	0,076	-0,36
2	620,1	100	0,079	-0,28
3	706,1	100	0,092	-0,33
4	654,2	100	0,086	
5	714,9	100	0,102	
6	723,5	100	0,104	
Srednja vrijednost $\pm$ nesigurnost	695 ± 49	100 ± 0	$0,09 \pm 0,02$	$-0,3 \pm 0,1$

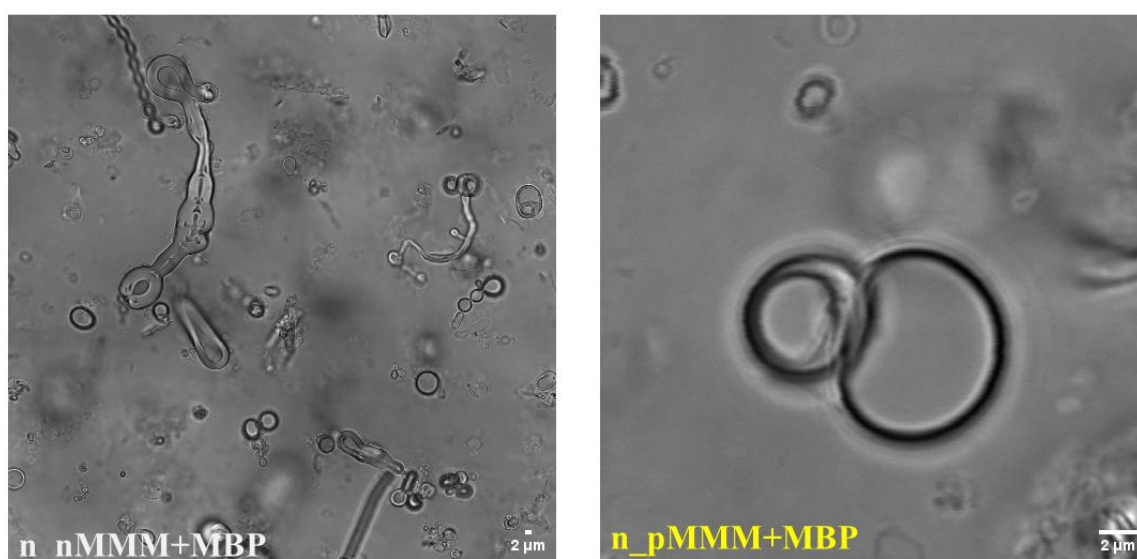
8.1.3. Konfokalna mikroskopija uzoraka sa zasićenim lancima

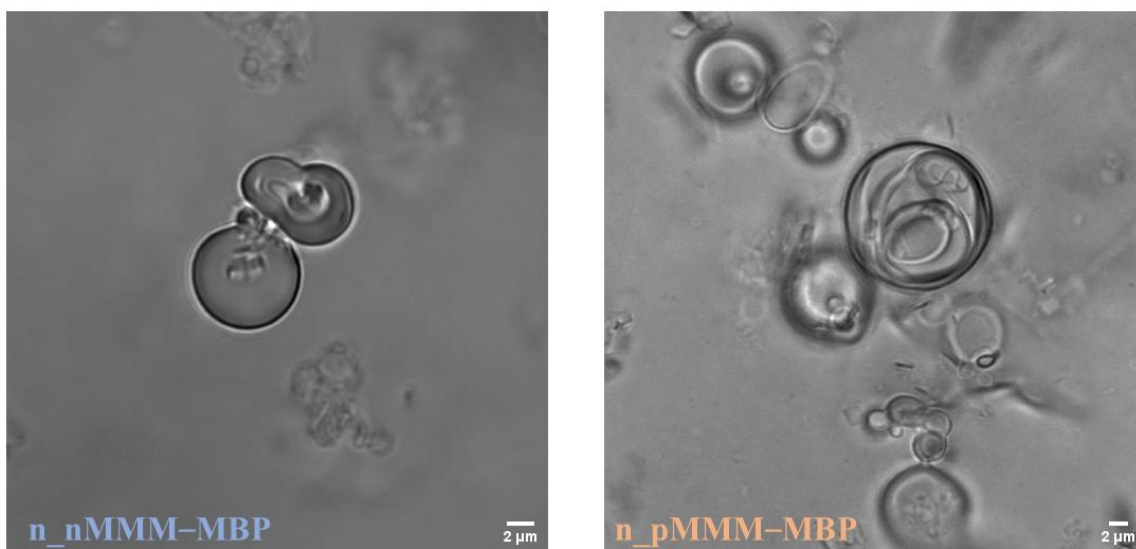




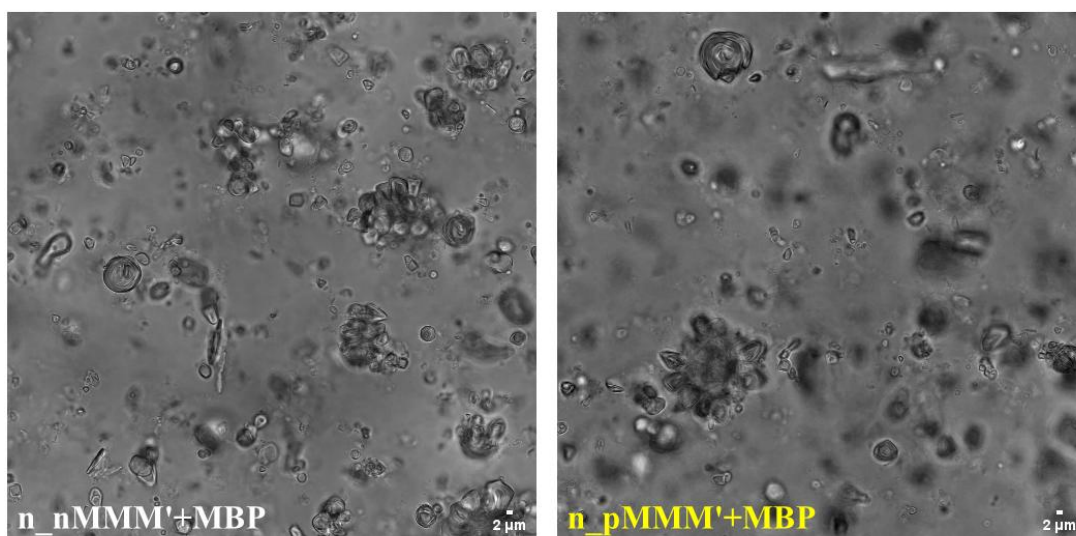
Slika D1. Snimke MMM i MMM'-ova sa zasićenim lancima bez MBP-a snimljene pri sobnoj temperaturi (25 °C).

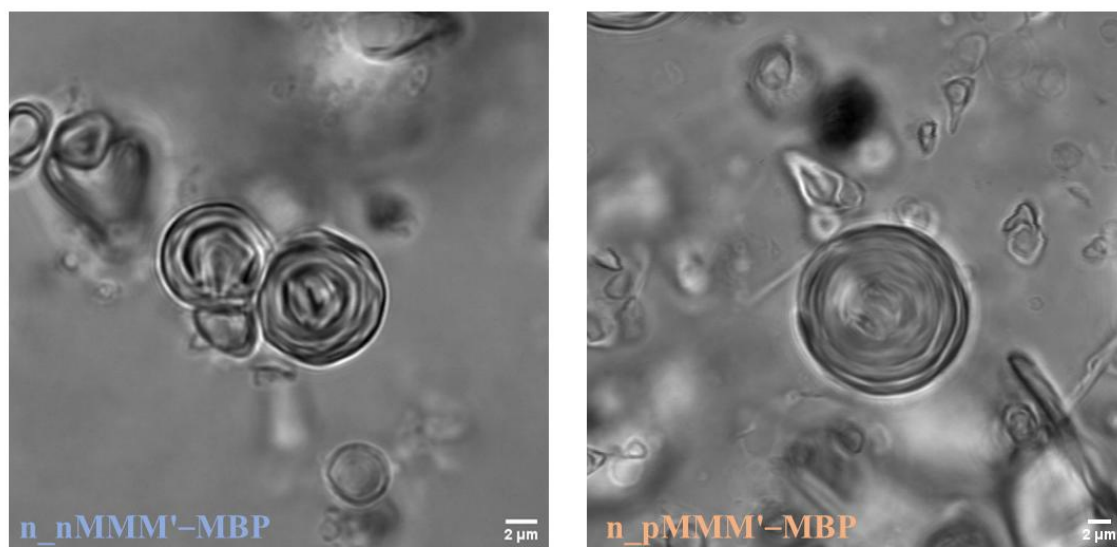
8.1.4. Konfokalna mikroskopija uzoraka s nezasićenim lancima





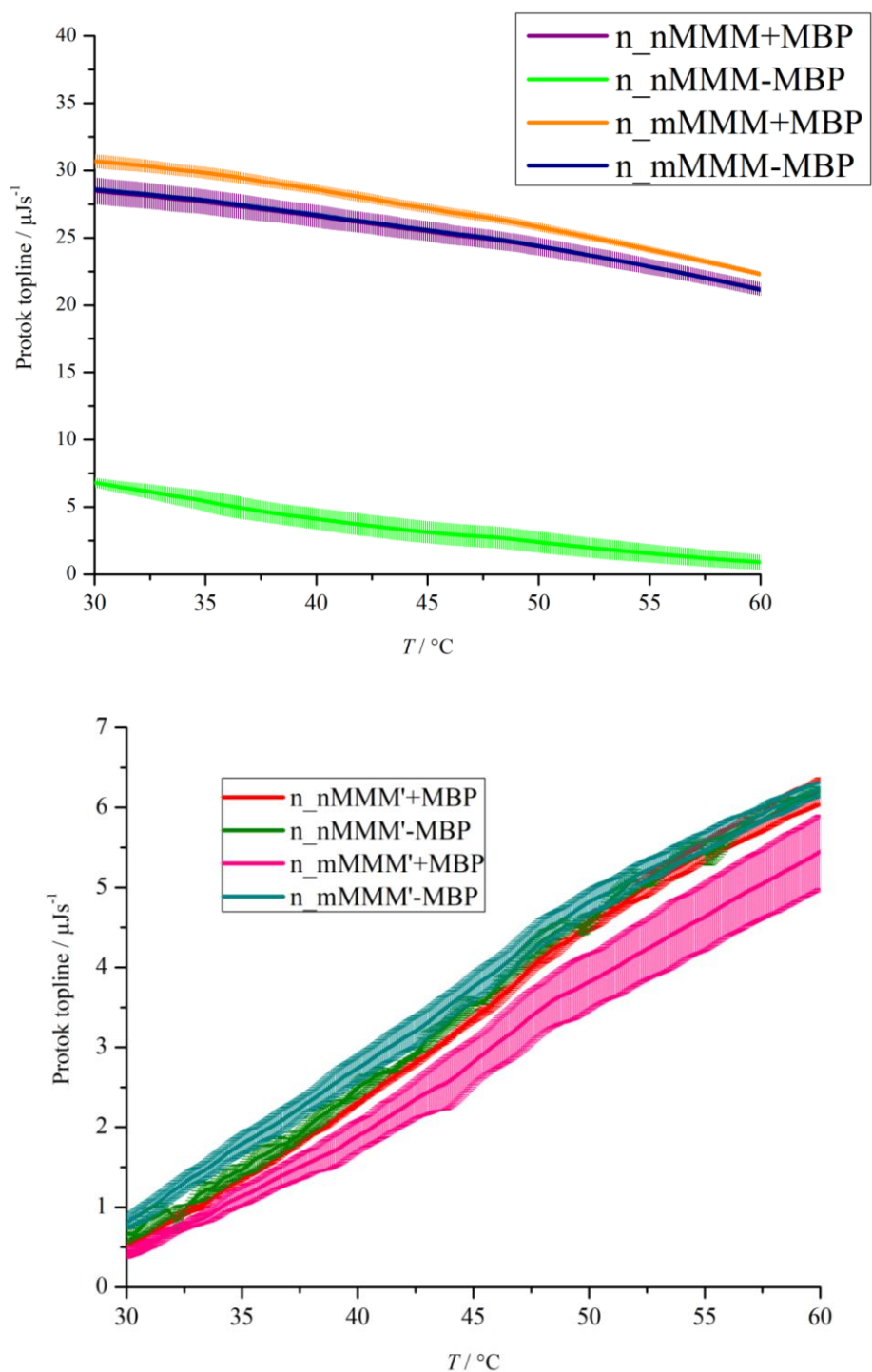
Slika D2. Snimke MMM-ova s nezasićenim lancima ± MBP-a snimljene pri sobnoj temperaturi (25 °C).



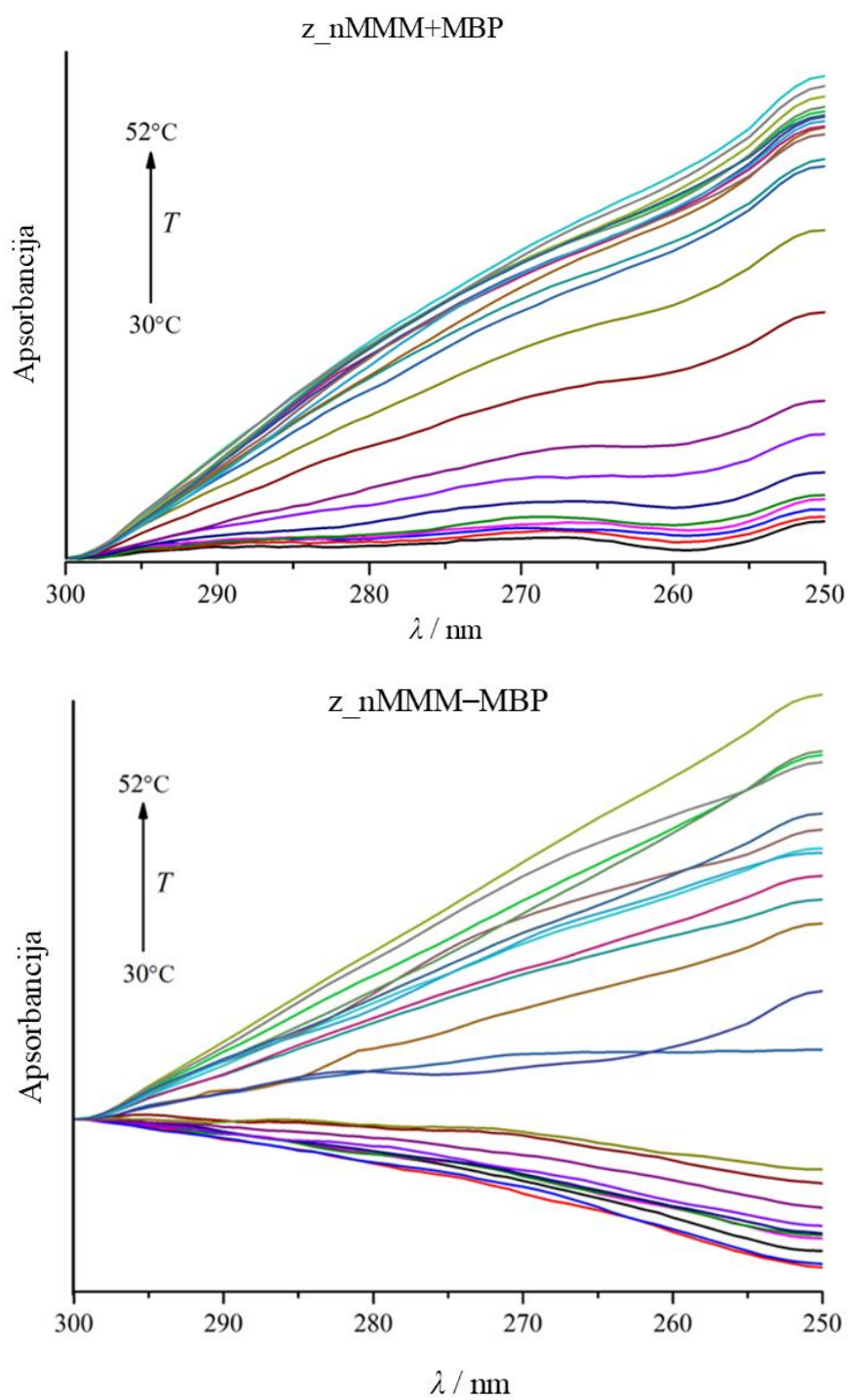


Slika D3. Snimke MMM'-ova s nezasićenim lancima $\pm$ MBP-a snimljene pri sobnoj temperaturi (25 °C).

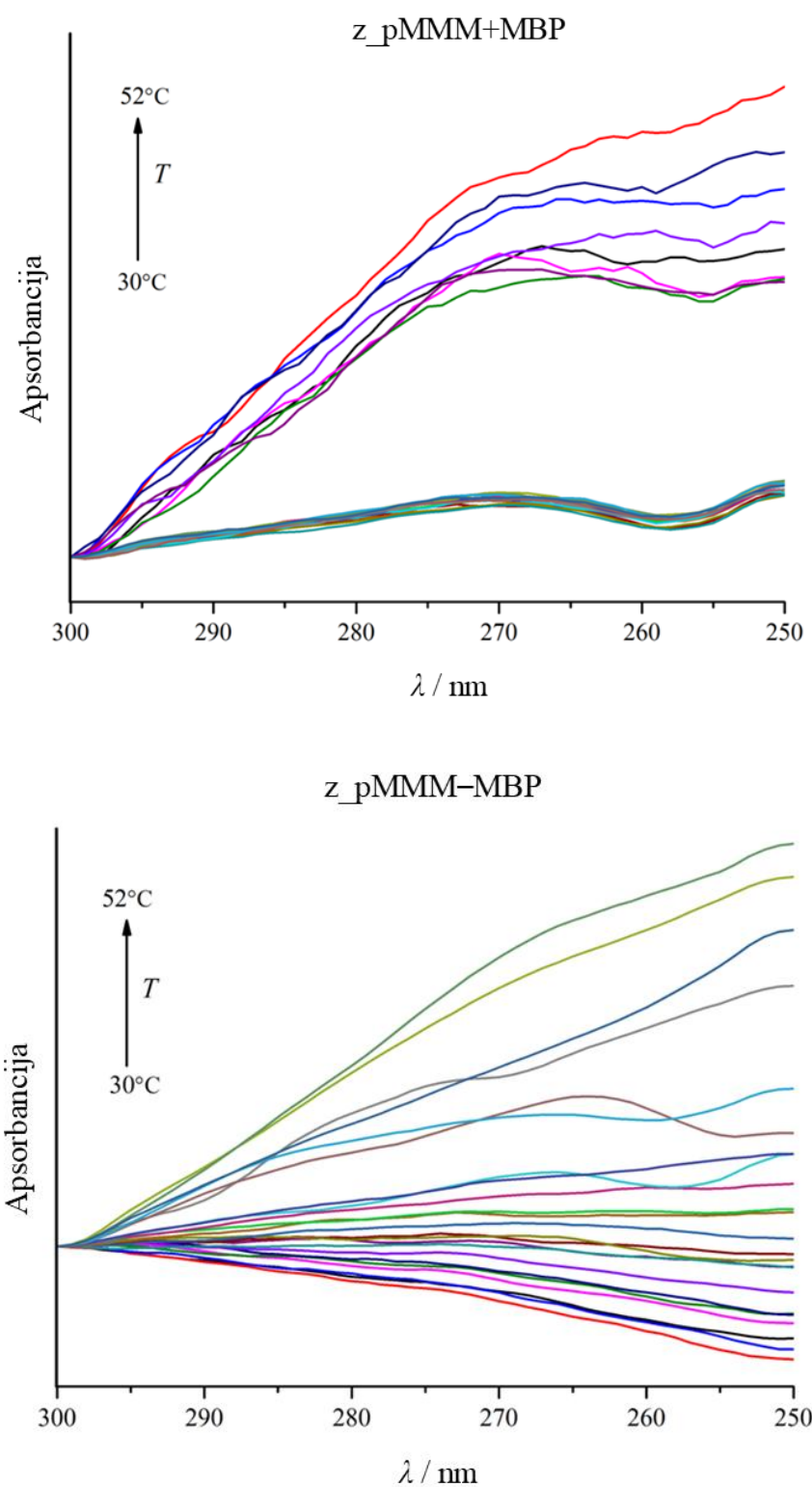
8.2. DSC krivulje i UV-Vis spektri (Dodatak poglavlju 4.2.)



Slika D4. DSC krivulje MMM-ova i MMM'-ova s nezasićenim lancima $\pm$ MBP-a s pripadajućim nesigurnostima (gore: $\text{MMM} \pm \text{MBP}$ u temperaturnom rasponu od 30 do 60 $^{\circ}\text{C}$; dolje: $\text{MMM}' \pm \text{MBP}$ u temperaturnom rasponu od 30 do 60 $^{\circ}\text{C}$).

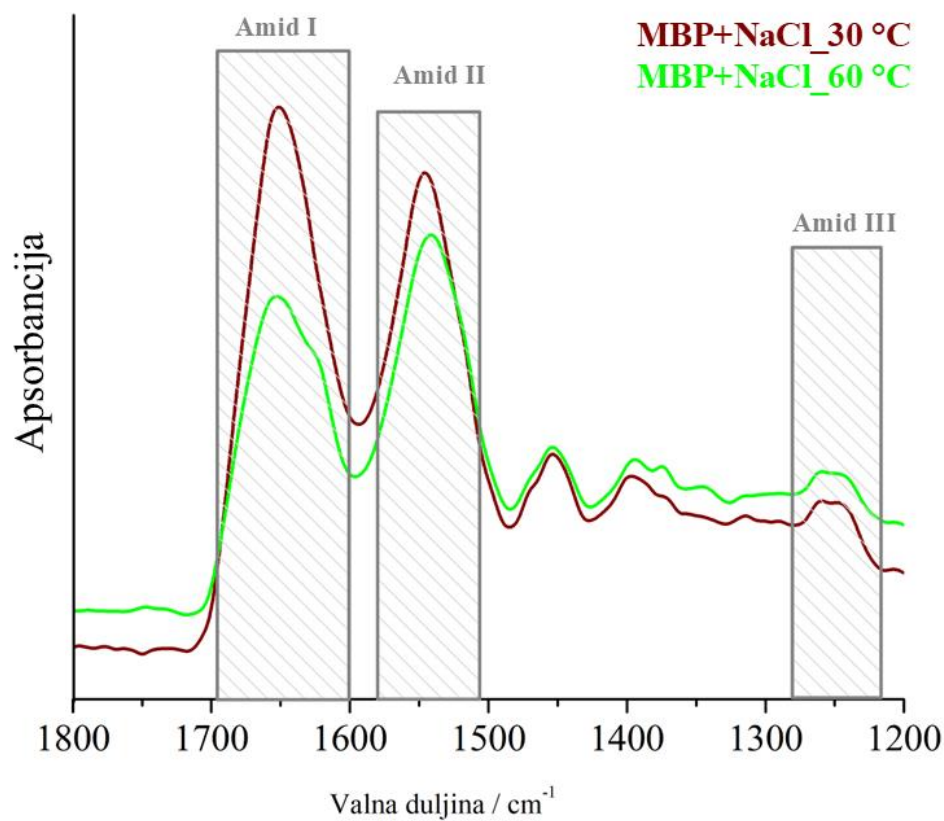


Slika D5. Temperaturno-ovisni UV-Vis spektri normalnih MMM-ova sa zasićenim lancima $\pm$ MBP (gore: MMM + MBP u rasponu od 30 do 52 °C; dolje: MMM–MBP u rasponu od 30 do 52 °C).



Slika D6. Temperaturno-ovisni UV-Vis spektri promijenjenih MMM-ova sa zasićenim lancima $\pm$ MBP (gore: MMM + MBP u rasponu od 30 do 52 °C; dolje: MMM–MBP u rasponu od 30 do 52 °C).

8.3. FTIR-ATR spektari (Dodatak poglavlju 4.3.)



Slika D7. FTIR-ATR spektri MBP-a u NaCl(aq) u području amidnih vrpce pri 30 °C i 60 °C.

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i prezime: Petra Maleš

Datum rođenja: 12.4.1994.

Mjesto rođenja: Šibenik

Obrazovanje:

2021.– Poslijediplomski studij kemije-smjer fizikalna kemija, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2017.–2020. Diplomski studij kemije-smjer analitička kemija i biokemija, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2016.–2017. Razlikovni studij istraživačke kemije, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2013.–2016. Preddiplomski studij biologije i kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Splitu

Zaposlenje:

2021.–2025. Asistent, Zavod za organsku kemiju i biokemiju, Institut Ruđer Bošković

Dodatna usavršavanja:

2025. Institut Jožef Stefan, Ljubljana, Slovenija (Mobilnost mladih istraživača Instituta Ruđer Bošković) (4 tjedna)

2024. Institut za molekularne simulacije i modeliranje BOKU Sveučilišta, Beč, Austrija (OeAD-MZO program) (1 tjedan)

2024. Institut za molekularne bioznanosti Sveučilišta u Grazu, Graz, Austrija (MOBDOK 2023.) (3 mjeseca)

2024. Max Planck institut za koloide i međupovršine, Potsdam, Njemačka (DAAD-MZO program) (3 tjedna)
2023. Max Planck institut za koloide i međupovršine, Potsdam, Njemačka (DAAD-MZO program) (3 tjedna)
2021. Institut za molekularne bioznanosti Sveučilišta u Grazu, Graz, Austrija (Mobilnost mladih istraživača Instituta Ruđer Bošković) (4 tjedna)

Objavljeni znanstveni radovi:

1. **Maleš, P.**, Pem, B., Bakarić, D., (2025) Modulation of thermotropic properties of cholesterol-free model myelin membranes by myelin basic protein, Book of Proceedings, 3rd International Conference on Chemo and BioInformatics, ICCBIKG 2025, str. 48–52.
2. Serdar Gazdek, N., Pospisil, T., Šišić, M., Crnolatac, I., **Maleš, P.**, Frkanec, R. & Frkanec, L. (2025) Self-assembled Ac-FFA-NH₂ based hydrogels with strong immunostimulating activity for vaccine delivery, *Nanoscale Advances*, 7, 4660–4672.
3. **Maleš, P.**, Brkljača, Z., Portada, T., Bakarić, D. & Crnolatac, I. (2025) 9,10-Diphenylanthracene based fluorescent probes as reporters of lipid membrane phase transitions, *Dyes and pigments*, **235**, 112608, 13.
4. **Maleš, P.**, Pem, B., Petrov, D., Mangiarotti, A., Dimova, R., Bakarić, D., (2025) Adsorption of myelin basic protein on model myelin membranes reveals weakening of van der Waals interactions in a lipid ratio-dependent manner, *Membranes*, **15** (9) 279, 17.
5. **Maleš, P.**, Munivrana, J., Pašalić, L., Pem, B. & Bakarić, D. (2024) Reorientation of interfacial water molecules during melting of brain sphingomyelin is associated with the phase transition of its C24:1 sphingomyelin lipids, *Chemistry and physics of lipids*, **264**, 105434, 10.
6. **Maleš, P.**, Brkljača, Z., Crnolatac, I., Petrov, D. & Bakarić, D. (2024) Phase-Dependent Adsorption of Myelin Basic Protein to Phosphatidylcholine Lipid Bilayers, *Membranes*, **14**, 1; 15, 20.
7. **Maleš, P.**, Nikšić-Franjić, I., Wang, A., Pem, B. & Bakarić, D. (2024) Optical and molecular features of negatively curved surfaces created by POPE lipids: A crucial role of

- the initial conditions. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, **317**, 124462, 12.
8. Pašalić, L., **Maleš, P.**, Čikoš, A., Pem, B. & Bakarić, D. (2024) The rise of FTIR spectroscopy in the characterization of asymmetric lipid membranes, *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, **305**, 123488, 13.
 9. **Maleš, P.**, Butumović, M., Erceg, I., Brkljača, Z. & Bakarić, D. (2023) Influence of DPPE surface undulations on melting temperature determination: UV/Vis spectroscopic and MD study. *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes*, **1865**, 1, 184072, 9.
 10. **Maleš, P.**, Pem, B., Petrov, D., Domazet Jurašin, D. & Bakarić, D. (2022) Deciphering the origin of the melting profile of unilamellar phosphatidylcholine liposomes by measuring the turbidity of its suspensions. *Soft matter* **18**, 6703–6715.
 11. **Maleš, P.**, Brkljača, Z., Domazet Jurašin, D. & Bakarić, D. (2022) New spirit of an old technique: Characterization of lipid phase transitions via UV/Vis spectroscopy. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy* **272**, 121013, 7.
 12. **Maleš, P.**, Brkljača, Z., Crnolatac, I. & Bakarić, D. (2021) Application of MCR-ALS with EFA on FT-IR Spectra of Lipid Bilayers in the Assessment of Phase Transition Temperatures: Potential for Discernment of Coupled Events. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, **201**, 111645, 8.

Sudjelovanje na znanstvenim skupovima:

1. **P. Maleš**, D. Bakarić, G. Pabst: “The Structural Insights Into The Myelin Model Membranes”, 27th Congress of the Society of Chemists and Technologists of Macedonia (SCTM), Ohrid, Sjeverna Makedonija, 2024.; Poster
2. **P. Maleš**, D. Bakarić: “The significance of cholesterol for myelin lipid phases”, XV Meeting Of Young Chemical Engineers, Zagreb, Hrvatska, 2024.; Usmeno prezentiranje
3. **P. Maleš**, A. Mangiarotti, D. Bakarić: “What to say about the structural integrity of myelin?”, Peptide Chemistry Day, Zagreb, Hrvatska, 2023.; Poster
4. **P. Maleš**, D. Bakarić: “The revelation of interactions in model myelin with FTIR spectroscopy”, ICAVS12: International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy, Krakov, Poljska, 2023.; Poster i flash prezentiranje

5. **P. Maleš**, D. Bakarić: “The signature of inverse hexagonal phase of phosphoethanolamine lipids”, 28th Croatian Meeting of Chemists and Chemical Engineers, Rovinj, Hrvatska, 2023.; Poster
6. **P. Maleš**, Z. Brkljača, D. Bakarić: “Love or compulsion relationship between myelin basic protein and phosphatidylcholine lipids”, XIV Meeting of Young Chemical Engineers, Zagreb, Hrvatska, 2022.; Poster
7. **P. Maleš**, J. Munivrana, L. Pašalić, D. Bakarić: “The complexity of brain sphingomyelin”, V. symposium of supramolecular chemistry, Zagreb, Hrvatska, 2022.; Poster
8. **P. Maleš**, J. Munivrana, L. Pašalić, D. Bakarić:” Zoom in the brain sphingomyelin”, Chemistry Towards Biology 10, Bratislava, Slovačka, 2022.; Poster
9. **P. Maleš**, Z. Brkljača, D. Bakarić: “Do the myelin basic protein and phosphatidylcholine lipids like to dance together?”, 6th Symposium of doctoral students of the Faculty of Science, PMF, Zagreb, Hrvatska, 2022.; Poster i mikro prezentiranje
10. **P. Maleš**, Z. Brkljača, D. Bakarić: “Love or compulsion relationship between myelin basic protein and phosphatidylcholine lipids”, 14th Meeting of young chemical engineers, Zagreb, Hrvatska, 2022.; Poster
11. **P. Maleš**, Z. Brkljača, D. Domazet Jurašin, D. Bakarić: “Ion influence on pretransition of multilamellar phosphatidylcholine liposomes”, 27th Croatian Meeting of Chemists and Chemical Engineers (27. HSKIKI) Veli Lošinj, Hrvatska, 2021.; Poster

Sudjelovanje u znanstvenim školama:

Interdisciplinary digital PhD school on mining of biological data, BioSpec Norveška
istraživačka grupa Fakulteta za znanost i tehnologiju, NMBU (lipanj 2022.)

Sudjelovanje u popularizaciji znanosti:

Radionica kemije za djecu na 62. Međunarodnom dječjem festivalu u Šibeniku (lipanj 2022.)
Otvoreni dan Kemijskog odsjeka PMF-a (svibanj 2019.)
Festival znanosti u Splitu (travanj 2015.)

Projekti, nagrade i članstva u društvima

Dobitnica priznanja Nacionalnog programa L'Oréal-UNESCO „Za žene u znanosti 2025.“

Nagrada Instituta Ruđer Bošković za najbolju znanstvenu publikaciju u 2022.godini (2024.)

Stipendija za doktorande grada Zagreba (2023.)

Francis Dunstan nagrada za najbolju postersku prezentaciju na međunarodnom 12. ICAVS-u u Krakovu u Poljskoj (2023.)

Financirani jednogodišnji projekt Hrvatske akademije za znanost i umjetnost (2022.)

Dekanova nagrada Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Splitu za uspjeh na preddiplomskom studiju (2016.)

Predstavница asistenata na Vijeću zavoda i Vijeću asistenata IRB-a (2022.–2025.)

Članica Hrvatskog kemijskog društva (2020.–2025.)

Članica Hrvatskog biofizičkog društva (2023.–2025.)