

Utjecaj radikala sumpora na procese u modelnim lipidnim sustavima

Kranjčec, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:699982>

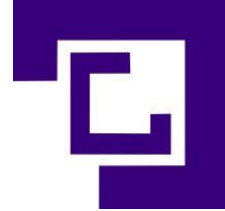
Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-11**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)





SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U
OSIJEKU

Odjel za kemiju

Diplomski sveučilišni studij Kemija; istraživački smjer

Lucija Kranjčec

**Utjecaj radikala sumpora na
processe u modelnim lipidnim
sustavima**

Diplomski rad

Osijek, 2021.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U
OSIJEKU

Odjel za kemiju

Diplomski sveučilišni studij Kemija; istraživački smjer

Lucija Kranjčec

**Utjecaj radikala sumpora na
processe u modelnim lipidnim
sustavima**

Diplomski rad

Mentor: doc. dr. sc. Brunislav Matasović

Komentorica: dr. sc. Ivana Tartaro Bujak

Osijek, 2021.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Diplomski sveučilišni studij Kemija; istraživački smjer
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija

UTJECAJ RADIKALA SUMPORA NA PROCESE U MODELNIM LIPIDNIM SUSTAVIMA

Lucija Kranjčec

Rad je izrađen na: Institutu Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska

Mentor: doc. dr. sc. Brunislav Matasović

Komentor: dr. sc. Ivana Tartaro Bujak

Sažetak:

Lipidna peroksidacija i geometrijska izomerizacija su biološki važni procesi koji mogu imati štetan utjecaj na organizme. Cilj ovog rada bio je ispitati produkte lipidne peroksidacije i *cis*, *trans*-izomerizacije u modelnom sustavu micela, priređenom iz linolne kiseline (LH) i tenzida, uz inicijaciju γ -zračenjem u različitim eksperimentalnim uvjetima. U radu je korišten Na_2S kao prekursor za generiranje H_2S odnosno HS^- u modelnim sustavima LH. Ispitani su utjecaj pH, brzina doze zračenja, koncentracija Na_2S u uvjetima ravnoteže sa zrakom te u anaerobnim uvjetima. Pokazano je da hidroperoksidi i *trans*-izomeri LH nastaju i u oksidacijskim uvjetima. U anaerobnim uvjetima izomerizacija je dominantan proces pri čemu uz nestajanje *cis*-konfiguracije dvostruke veze, istovremeno nastaju i dva mono *trans*- i di *trans*-izomera. Izmjeren je hidrodinamički promjer micela koji se smanjuje s porastom pH, a zeta potencijal ima sve negativniji naboj.

Diplomski rad obuhvaća: 56 stranica, 38 slika, 1 tablicu, 3 sheme i 30 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: lipidna peroksidacija / geometrijska izomerizacija / micelle / linolna kiselina / γ -zračenje / sumporovodik

Rad prihvaćen:

Stručno povjerenstvo za ocjenu:

1. doc. dr. sc. Marija Jozanović, predsjednica povjerenstva
2. doc. dr. sc. Brunislav Matasović, mentor i član
3. izv. prof. dr. sc. Mirela Samardžić, članica
4. doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik, zamjenska članica povjerenstva

Rad je pohranjen u: Knjižnici Odjela za Kemiju, Franje Kuhača 20, 31000 Osijek

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Department of Chemistry
Graduate University Study of Chemistry; Research study
Scientific Area: Natural Sciences
Scientific Field: Chemistry

**THE INFLUENCE OF SULFUR CENTERED RADICALS ON PROCESSES IN
MODEL LIPID SYSTEMS**

Lucija Kranjčec

Thesis completed at: The Ruđer Bošković Institute, Zagreb, Croatia
Supervisor: Brunislav Matasović, PhD, assistant prof.
Cosupervisor: Ivana Tartaro Bujak, PhD

Abstract:

Lipid peroxidation and *cis*, *trans*-isomerization are biologically important processes that can have deleterious effects on organisms. The aim of this study was to investigate the products of lipid peroxidation and *cis*, *trans*-isomerization in a model system of micelles prepared from linoleic acid (LH) and surfactant, induced by gamma radiation under different experimental conditions. Na₂S was used as a precursor for the generation of H₂S/HS⁻ in the model LH system. The influence of pH, radiation dose rate, Na₂S concentration under air equilibrium conditions and under anaerobic conditions were investigated. It has been shown that under oxidative conditions hydroperoxides and *trans*-isomers of LH are also formed. Under anaerobic conditions, isomerization is the predominant process with the disappearance of the *cis*-configuration of the double bond and the simultaneous formation of two mono *trans* and di *trans*-isomers. It has been measured that the hydrodynamic diameter of the micelle decreases with increasing pH and the zeta potential becomes increasingly negatively charged.

Thesis includes: 56 pages, 38 figures, 1 table, 3 schemes and 30 references

Original in: Croatian

Keywords: lipid peroxidation / geometric isomerization / micelles / linoleic acid / γ -radiation / hydrogen sulfide

Thesis accepted:

Reviewers:

1. Marija Jozanović, PhD, assistant prof.
2. Brunislav Matasović, PhD, assistant prof.
3. Mirela Samardžić, PhD, associate prof.
4. Martina Šrajer Gajdošik, PhD, assistant prof., alternate member of the committee

Thesis deposited in: Library of Department of Chemistry, Franje Kuhača 20, 31000 Osijek

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED.....	3
2.1. Lipidi	3
2.1.1. Masne kiseline	4
2.1.2. Fosfolipidi	6
2.1.3. Linolna kiselina	7
2.2. Lipidna peroksidacija	8
2.2.1. Ionizirajuće zračenje u inicijaciji lipidne peroksidacije	10
2.2.2. Metode određivanja lipidnih hidroperoksida	12
2.3. Geometrijska izomerizacija	14
2.3.1. Mehanizmi izomerizacije masnih kiselina	15
2.3.2. Sumporovodik u biološkim sustavima	18
2.3.3. Analitičke metode identifikacije <i>trans</i> –nezasićenih masnih kiselina	19
2.4. Modelni sustavi za istraživanje procesa lipidne peroksidacije i geometrijske izomerizacije	20
3. EKSPERIMENTALNI DIO	23
3.1. Materijali	23
3.1.1. Reagensi i soli	23
3.1.2. Otapala	24
3.2. Metode	25
3.2.1. Priprema micela linolne kiseline	25
3.2.2. Peroksidacija linolne kiseline γ -zračenjem	25
3.2.3. Analiza metilnih estera linolne kiseline plinskom kromatografijom	26
3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije hidroperoksida linolne kiseline	28
3.2.5. Karakterizacija modelnog sustava linolne kiseline	29
3.2.6. Instrumentacija	30
4. REZULTATI I RASPRAVA	31
4.1. Lipidna peroksidacija i geometrijska izomerizacija u modelnom sustavu	31
4.1.1. Utjecaj doze zračenja na procese lipidne peroksidacije i geometrijske izomerizacije u modelnom sustavu LH	31
4.1.2. Utjecaj brzine doze zračenja na procese lipidne peroksidacije i geometrijske izomerizacije u modelnom sustavu LH	36
4.1.3. Utjecaj koncentracije Na_2S na procese lipidne peroksidacije i geometrijske izomerizacije u modelnom sustavu LH	40
4.2. Veličina čestica i Zeta potencijal	43
4.2.1. Veličine čestica micela sa promjenom pH otopina	43

4.2.2. Zeta potencijal pri promjeni pH otopina	45
4.2.3. Utjecaj pH na procese lipidne peroksidacije i geometrijske izomerizacije u modelnom sustavu LH.....	46
5. ZAKLJUČAK	51
6. LITERATURA.....	53
7. PRILOZI	55

1. UVOD

Lipidi su biološki važne molekule jer izgrađuju staničnu membranu svih živih organizama. Osim izgradnje stanične membrane, imaju ulogu skladištenja energije te sudjeluju u staničnim procesima kao što su sinteza, transport lipida i proteina te u prijenosu signala u stanicama. Lipidi se mogu podijeliti na kompleksne i jednostavne lipide. Kompleksni lipidi mogu se hidrolizirati na jednostavnije molekule, kao što su voskovi i gliceridi. Jednostavni lipidi, iako su molekule složene strukture, ne mogu se kiselinom ili bazom hidrolizirati na jednostavnije sastavnice te se dijele na steroide, prostaglandine, terpene i terpenoide [1].

Lipidi su podložni reakcijama s različitim reaktivnim sumporovim vrstama (eng. *Reactive Sulfur Species*, RSS), dušikovim vrstama (eng. *Reactive Nitrogen Species*, RNS) i kisikovim vrstama (eng. *Reactive Oxygen Species*, ROS). Svi lipidi koji sadrže višenezasićene masne kiseline (eng. *Polyunsaturated Fatty Acids*, PUFA) pri uvjetima gdje je prisutan molekularni kisik, podložni su oksidaciji, procesu koji je poznat kao lipidna peroksidacija. Lipidna peroksidacija štetan je proces za organizam u kojem primarno dolazi do vezanja PUFA s kisikom. Pri višim temperaturama, lipidni hidroperoksidi se raspadaju stvarajući produkte neugodnih mirisa kao što su epoksidi, ketoni, aldehidi i dr. Proučavanje lipidne peroksidacije započelo je još u 20. stoljeću kada je počela rasti zabrinutost zbog mogućih štetnih učinaka peroksidacije lipida u staničnim membranama. Proučavanje procesa potaknulo je znanstvenike na daljnja istraživanja kako bi se bolje razumjela uloga radikala i radikalskih procesa u patološkim stanjima i razvoju različitih bolesti kod ljudi [2, 3].

Uz istraživanja peroksidacije lipida, uslijedila su i istraživanja procesa geometrijske izomerizacije lipida u biološkim sustavima. Geometrijska izomerizacija je proces u kojem dolazi do pretvorbe *cis*-masnih kiselina u *trans*-masne kiseline uzrokujući promjene u strukturi i funkciji membrana. *Trans*-masne kiseline mogu nastati endogenom transformacijom prirodno prisutnih *cis*-strukture, a njihova prisutnost veže se s radikalskim stresom tijekom fizioloških i patoloških procesa [4].

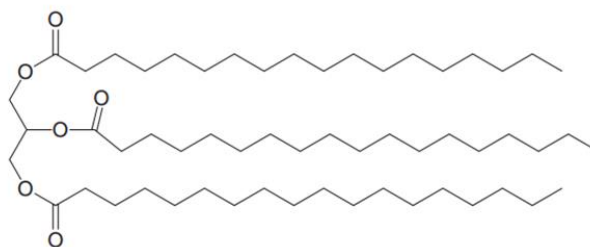
Osnovni cilj ovog diplomskog rada je proučavanje utjecaja radikala sumpora generiranih iz Na₂S pod djelovanjem γ -zračenja na lipidnu peroksidaciju i geometrijsku izomerizaciju. Kao jednostavni modelni lipidni sustav koristio se sustav micela priređen iz linolne kiseline i tenzida. Ispitan je utjecaj pH, brzine doze zračenja, koncentracije Na₂S u

uvjetima ravnoteže sa zrakom te u anaerobnim uvjetima. Koncentracija lipidnih hidroperoksida utvrđena je feritiocijanatnom metodom, a analiza geometrijskih izomera provedena je plinskom kromatografijom.

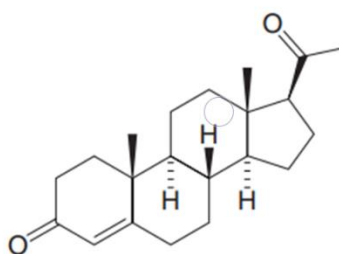
2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Lipidi

Lipidi su biomolekule topljive u organskim otapalima poput acetona, etera ili alkohola, a relativno su netopljive u vodi zbog velikog broja nepolarnih ugljik–ugljik i ugljik–vodik veza. Riječ lipid dolazi od grčke riječi *lipos* što znači mast. Za lipide se može reći da su specifični organski spojevi jer nisu definirani prema prisutnosti funkcionalne skupine, već prema njihovim fizikalnim svojstvima. Pojavljuju se u obliku tekućina ili nekristalizirajućih krutina te sadržavaju veliku količinu energije. Njihovim metabolizmom u stanicama oslobađa se mnogo energije te su zbog toga najučinkovitije biomolekule za skladištenje energije [1, 5]. Neki primjeri poznatih lipida prikazani su na slikama 1. i 2.



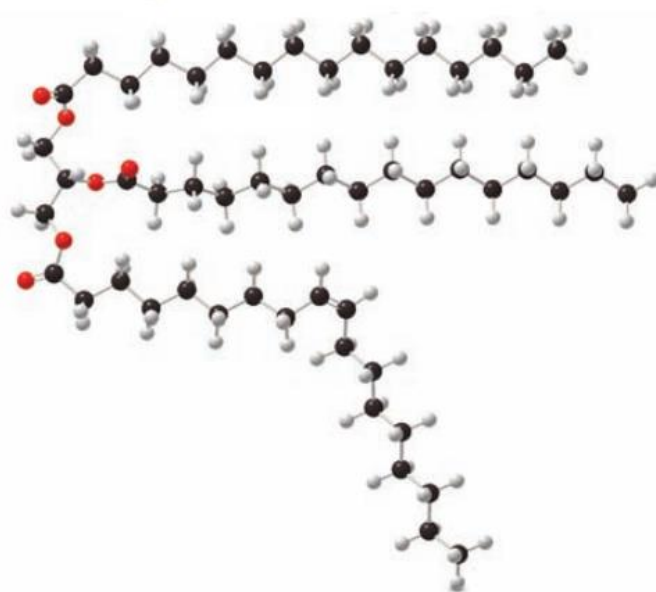
Slika 1. Triacilglicerol



Slika 2. Steroid progesteron

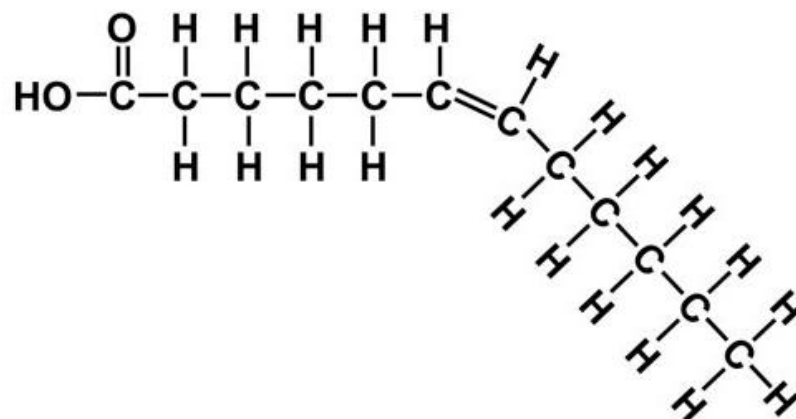
2.1.1. Masne kiseline

Fiziološki važni lipidi su masne kiseline, odnosno njihovi esteri jer izgrađuju staničnu membranu zajedno s drugim organskim važnim molekulama, kao što su kolesterol i proteini. Jednostavni lipidi su esteri masnih kiselina i alkohola glicerola. Glicerol je trovalentni alkohol, u kojem hidroksilne skupine mogu biti zamijenjene s molekulom masne kiseline tvoreći mono-, di- i tri-gliceride [1, 6]. Masne kiseline mogu biti zasićene (eng. *Saturated Fatty Acids*, SFA), mononezasićene (eng. *Monounsaturated Fatty Acids*, MUFA) i PUFA [6]. Najpoznatije SFA su palmitinska kiselina, laurinska kiselina, arahidinska i stearinska kiselina koje u svojoj strukturi nemaju dvostrukih veza. MUFA imaju jednu dvostruku vezu, dok PUFA imaju dvije ili više dvostrukih veza. Najpoznatije nezasićene masne kiseline su oleinska i arahidonska kiselina te linolna i linolenska koje su esencijalne masne kiseline što znači da ih ljudsko tijelo ne sintetizira samostalno, već se u organizam unose hranom. Nezasićene masne kiseline su tekućine zbog dvostrukih veza u svojoj strukturi i uglavnom imaju *cis*-konfiguraciju prikazanu na slici 3.



Slika 3. Prikaz *cis*-konfiguracije kod triacilglicerola

Svi dugi ugljikovodični lanci masnih kiselina su nerazgranati u prirodi. Imaju paran broj atoma ugljika, a tališta im ovise o stupnju nezasićenosti. Postoje masne kiseline različitog broja C atoma (od C_{14} do C_{24}), a najčešće su C_{16} , C_{18} , C_{20} i C_{22} [6]. MUFA i PUFA u prirodnom obliku imaju *cis*-konfiguriranu dvostruku vezu što je prikazano na slici 4.



Slika 4. Cis-masna kiselina

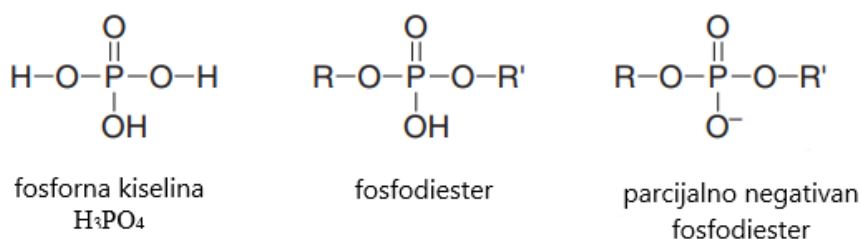
PUFA mogu sadržavati više dvostrukih veza (od 2 – 6) međusobno razdvojenih metilenskom skupinom ($-\text{CH}_2-$), a po nomenklaturi se prikazuju kao ω masne kiseline ili $n-$, tj. delta (Δ). Δ prikazuje dvostruku vezu u lancu masne kiseline brojanjem od karboksilne kiseline. ω prikazuje smještaj prve dvostruke veze od metilnog kraja acilnog lanca, što znači da $\omega-3$ masne kiseline imaju dvostruku vezu na trećem ugljiku od metilne skupine, a $\omega-6$ na šestom ugljiku. Najviše su zastupljene u biljkama, ribi i ribljem ulju [1, 7].

SFA nemaju dvostruke veze, nerazgranati ravni lanci u spoju s glicerolom položeni su paralelno jedan pokraj drugoga što im omogućuje lakše „pakiranje“ u kristalnu rešetku. Na taj način njihovo talište je veće što ih čini krutinama. Masti imaju visok postotak SFA i životinjskog su podrijetla. Nezasićene masne kiseline (bilo MUFA ili PUFA) imaju dvostruku vezu ili više njih, lanci nemaju mogućnost „pakiranja“ u kristalnu rešetku pa su one tekućine, a talište im je niže. Ulja imaju viši postotak nezasićenih masnih kiselina i uglavnom su biljnog podrijetla. Postoje i biljna ulja bogata SFA, a primjer za to su ulja palme i kokosa [1].

SFA su stabilnije od nezasićenih masnih kiselina i zbog toga manje izložene kemijskim reakcijama. Nezasićene masne kiseline su reaktivnije, a podložnost reakcijama s kisikom raste što je veći broj dvostrukih veza [1].

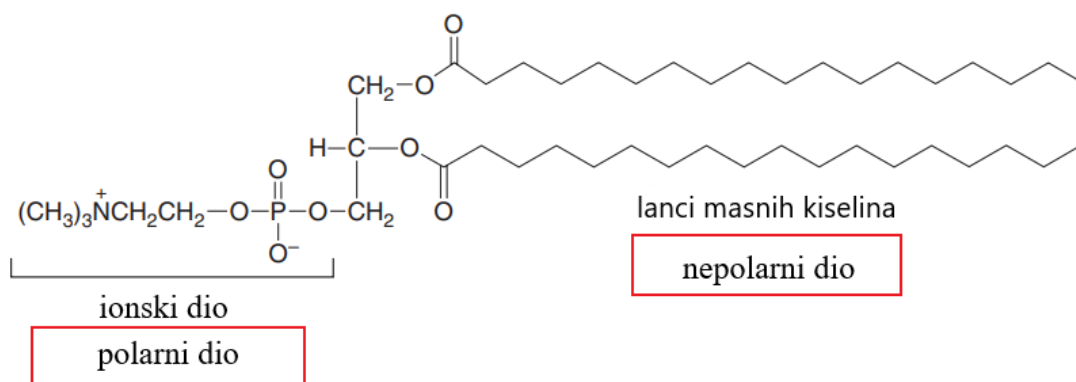
2.1.2. Fosfolipidi

Fosfolipidi su skupina lipida koja se može hidrolizirati, a sadrži atom fosfora. Postoje dvije vrste fosfolipida – fosfoacilgliceroli i sfingomijelini. Organski su derivati fosforne kiseline gdje su dva atoma vodika zamijenjena R skupinama, a takva vrsta funkcionalne skupine naziva se fosfodiester. Fosfolipidi su fosforni analozi karboksilnih estera. U stanicama, preostala –OH skupina na fosforu gubi proton što daje fosfodiesteru parcijalno negativan naboj (Slika 5.) [1].



Slika 5. Prikaz fosforne kiseline, fosfodiestera te parcijalno negativnog fosfodiestera koji postoji samo u stanicama

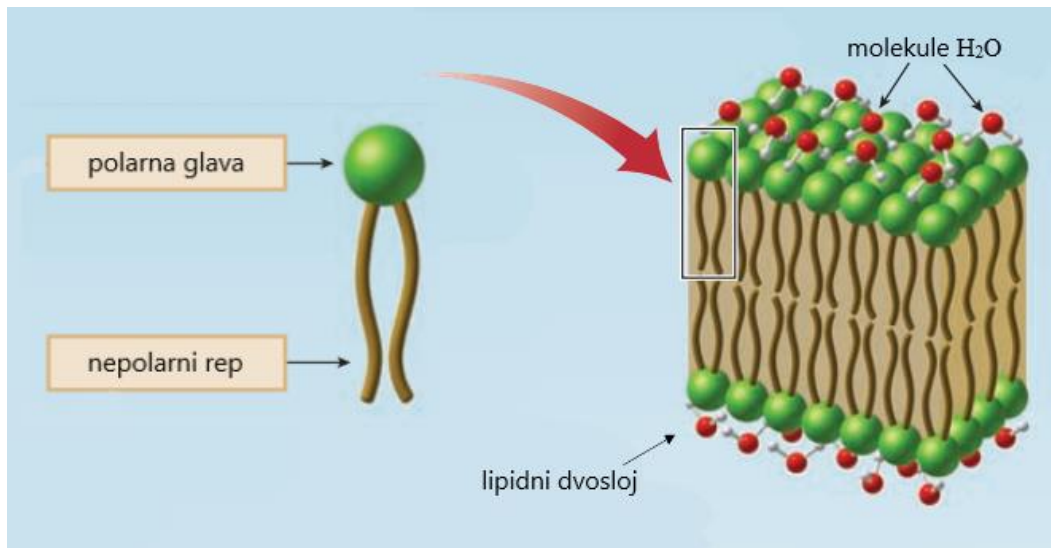
Stanična membrana ima dvije glavne funkcije. Prva je da djeluje kao prepreka za prolazak iona, vode i drugih molekula u stanicu i iz nje, a druga da je selektivno propusna što znači da propušta hranjive tvari. Fosfolipidi su glavna komponenta staničnih membrana biljaka, životinja i ljudi. Sastoje se od ionskog, hidrofilnog dijela te hidrofobnog, ugljikovodičnog dijela (Slika 6.) [1].



Slika 6. Struktura fosfolipida

Miješanje fosfolipida s vodom omogućuje njihova struktura koja sadrži ionske glave i nepolarne repove. Formira se lipidni dvosloj gdje su ionske glave okrenute prema van, a

repovi prema unutra. Polarne glave elektrostatički stupaju u interakciju s vodom, a nepolarni repovi drže se jedan blizu drugoga van der Waalsovima silama (Slika 7.) [1].

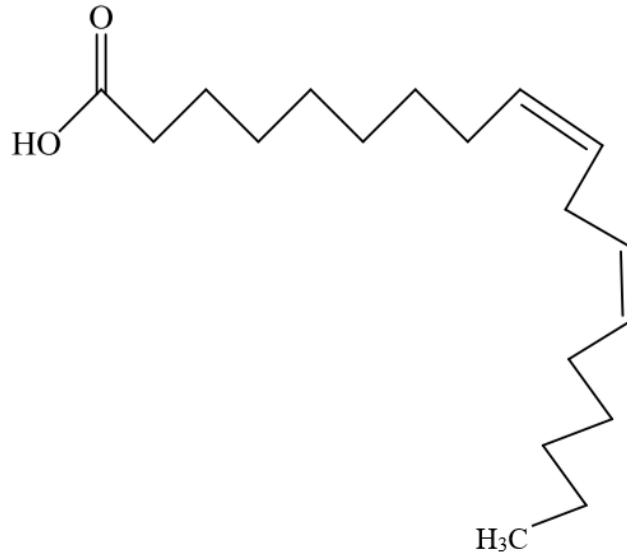


Slika 7. Lipidni dvosloj

Sve masne kiseline, bilo zasićene ili nezasićene, glavne su komponente fosfolipida. Promjenama u njihovoj strukturi, mijenja se i funkcija membrane i njezina svojstva bitna za svaki živi organizam. Membrana može imati dva oblika, uređen (rigidan) i neuređen (fluidan) oblik. Rigidnost membrane mijenja se prvenstveno zbog SFA te njihove rotacije oko jednostruke veze što joj daje rigidnost ili fleksibilnost. Rigidnost membrane smanjuje se prisutnošću nezasićenih masnih kiselina, bile one MUFA ili PUFA. Prisutnost većeg broja dvostrukih veza uzrokuje veću zakrivljenost lanaca i smanjenje uređenosti strukture.

2.1.3. Linolna kiselina

Linolna kiselina (LH), prikazana na slici 8., masna je kiselina s 18 C atoma. Nezasićena je masna kiselina s dvije dvostruke *cis*-veze i označava se s 18:2. Esencijalna je masna kiselina, ω -6 i u organizam se unosi hranom, a najviše je ima u mliječnim proizvodima, mesu i sjemenkama uljarica [8].



Slika 8. Struktura prirodne cis– konfiguracije linolne kiseline, 9–cis, 12–cis–18:2

LH je bitna za različite fiziološke funkcije. Kao i sve masne kiseline, izvor je energije. Može se esterificirati u neutralne i polarne lipide kao što su fosfolipidi, triacilgliceroli i esteri kolesterola. Sastavni je dio membranskih fosfolipida i utječe na fluidnost membrane. Također, može se enzimatski oksidirati u različite derivate kao što je 13–hidroksi ili 13–hidroperoksi oktadekadienska kiselina [9, 10].

2.2. Lipidna peroksidacija

U normalnim uvjetima, niska razina peroksidacije lipida prirodan je metabolički proces. Nezasićene masne kiseline podložne su peroksidaciji, procesu koji je zajednički naziv za niz radikalnih reakcija u kojima je kisik jedan od reaktanata [11]. Kisik u ovom slučaju ima toksično djelovanje. Općeniti prikaz reakcije lipida LH i kisika prikazan je jednadžbom 1.



Zbog velike energije aktivacije navedena reakcija ne događa se spontano. Sve vrste koje u svojoj zadnjoj orbitali imaju nespareni elektron nazivaju se radikalima. Molekula kisika u svom osnovnom stanju ima 16 elektrona pri čemu u protuveznoj orbitali ima dva nesparena elektrona paralelnih spinova pa se sama po sebi naziva radikalom. Paralelni spinovi sprječavaju molekulu kisika u reakciji s drugim vrstama koje sadržavaju elektrone sparenih spinova zbog načela o očuvanju spinova. Inverzija spina je spora reakcija u

usporedbi s vremenom života prijelaznog stanja što rezultira manjom reaktivnošću molekuskog kisika [3, 12]. Na temelju toga, molekulski kisik može reagirati s radikalom jer slobodno raspoložuje nesparenim elektronom radikala. Reakcija lipida i kisika je termodinamički nepovoljna zbog narušavanja načela o održavanju energije ili narušavanja spinskih zakona. Takva reakcija moguća je uz pomoć radikalskog mehanizma.

Lipidna peroksidacija bioloških membrana smatra se nepopravljivim događajem u životu stanice i može se podijeliti na tri procesa: inicijaciju, propagaciju i terminaciju [3]. Proces se odvija mehanizmom lančanih reakcija i može započeti djelovanjem ionizirajućeg zračenja, topline, svjetlosti, kemijskih inicijatora i iona prijelaznih metala. Inicijacija započinje apstrakcijom vodika s reaktivnim inicijatorom pri čemu nastaje bis-alilni ili pentadienilni radikal, L^{\bullet} što je prikazano jednadžbom 2.



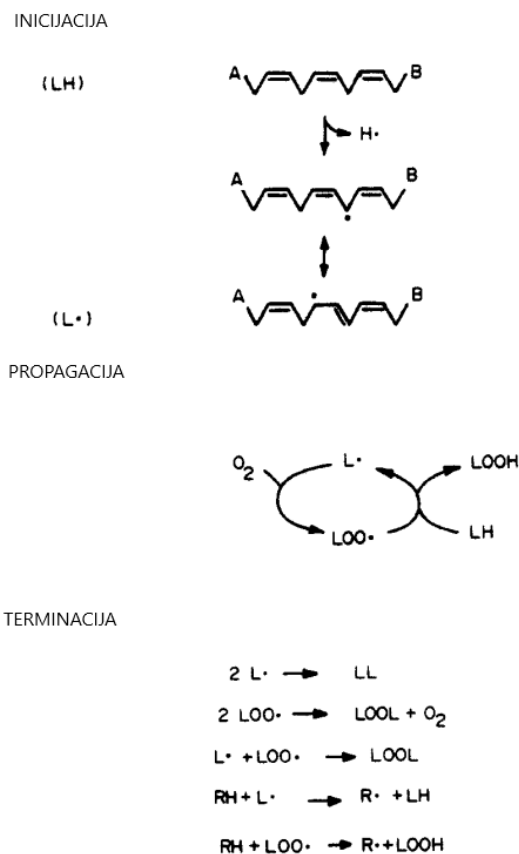
U propagaciji dolazi do adicije molekule kisika na L^{\bullet} te se formira konjugirani peroksilni radikal, LOO^{\bullet} . Apstrakcijom vodika iz druge molekule nezasićene masne kiseline nastaje produkt, lipidni hidroperoksid, $LOOH$ i alkilni radikal, L^{\bullet} , što je prikazano jednadžbama 3 i 4.



$LOOH$ su relativno stabilni spojevi pri niskim temperaturama, razrijeđenim otopinama i bez prisutnosti katalizatora. U prisutnosti katalizatora, dolazi do razgradnje $LOOH$ na dva radikala LO^{\bullet} i HO^{\bullet} (jednadžba 5), koji promiču daljnju lančanu reakciju prikazano jednadžbama 6 i 7 [3].



Na shemi 1. prikazan je lančani proces lipidne peroksidacije mehanizmom slobodnih radikala.



Shema 1. Lipidna peroksidacija mehanizmom slobodnih radikala [13]

Oksidativni stres u stanicama dovodi do unutarstanične neravnoteže prooksidansa/antioksidansa što rezultira peroksidacijom lipida. Uslijed lipidne peroksidacije nastaju produkti koji mogu pokrenuti nespecifične reakcije radikala koje dovode do oštećenja membrane i smrti stanica [3]. Lipidni hidroperoksidi mogu se također razgraditi u prisutnosti prijelaznih metala kao što je Fe^{2+} [2, 12].

2.2.1. Ionizirajuće zračenje u inicijaciji lipidne peroksidacije

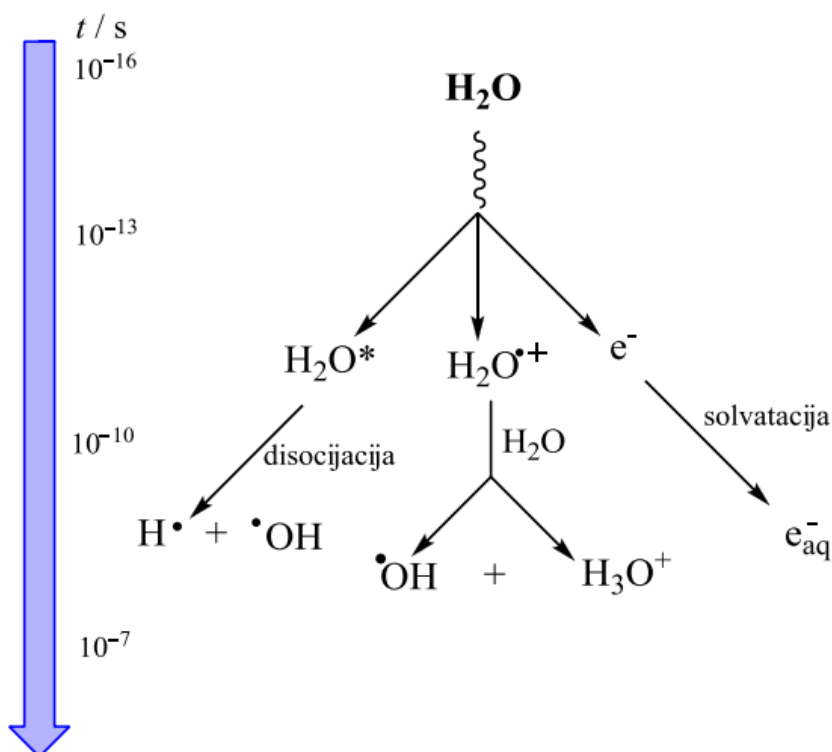
Radijacijska kemija je grana kemije koja se bavi istraživanjima fizikalno–kemijskih promjena nastalih kao posljedica apsorpcije visokoenergetskog, ionizirajućeg zračenja u tvarima. Najčešće korišteni izvori ionizirajućeg zračenja su γ -zrake ^{60}Co . Ionizirajuće zračenje jedan je od postupaka kojim se može inicirati lipidna peroksidacija [14].

Postojanjem različitih tipova zračenja uzrokuju se različiti učinci čime nastaju određene kemijske vrste i koncentracije produkata u ozračenoj sredini. Ionizacijska energija

molekula mnogo je manja od energije zračenja u radijacijskoj kemiji. Izbačeni elektroni u procesu ionizacije imaju sposobnost daljnje ionizacije i ekscitacije molekula. Sama radijacijska kemija ima mnoge specifičnosti koje se javljaju zbog ionskog karaktera produkata, visoke energije i početne visoke lokalne koncentracije. Pri ozračivanju vodenih otopina ionizirajućim zračenjem, dolazi do generiranja reaktivnih vrsta. Takvim interakcijama postiže se ekscitacija i ionizacija molekula vode iz kojih je dalje moguće stvaranje radikala i drugih molekulskih vrsta (Shema 2.) [14]. Tijekom predaje i apsorpcije energije ionizirajućeg zračenja s tvari, energija zračenja koja se u sustavu apsorbira proporcionalna je veličini kemijskih promjena u njemu, a konstanta te proporcionalnosti naziva se radijacijsko – kemijski prinos (G), a jedinica mu je mol J^{-1} .

$$G(X) = \frac{n(x)}{E} \quad (8)$$

gdje je $n(x)$ množina tvari koja nastaje, nestaje ili se kemijski mijenja apsorpcijom 1 džula energije (E) u ozračenoj vrsti (jednadžba 8).



Shema 2. Radioliza vode ionizirajućim zračenjem [14]

Reakcije radiolize vode ionizirajućim zračenjem su brze reakcije pri čemu nastaju primarne reaktivne čestice e_{sol}^- , H^\bullet , koje su reducirajuće i OH^\bullet kao oksidirajuće čestice. Primarne radikale moguće je prevesti u nove radikale korištenjem različitih anorganskih soli,

aditiva i otopljenih plinova. Sve promjene inducirane tijekom ionizirajućeg zračenja, pa time i oksidacija, ovise primarno o brzini i dozi zračenja. Međutim, postoje i drugi čimbenici specifični za oksidaciju bez djelovanja zračenja koji se također moraju uzeti u obzir, a to su temperatura, koncentracija kisika, sastav lipida i dr. γ -zračenjem postiže se kontrolirano generiranje radikalskih vrsta. Generiraju se radikali koji u doticaju s kisikom stvaraju lipidne hidroperoksidi te pospješuju proces lipidne peroksidacije [14].

2.2.2. Metode određivanja lipidnih hidroperoksida

Različite su tehnike i metode proučavanja produkata lipidne peroksidacije. Postoje tehnike bazirane na mjerenju nestajanja jednog od reaktanta (npr. kisik, lipidi, hidroperoksidi i dr.), zatim tehnike bazirane na mjerenju stvaranja intermedijera (konjugirani dieni) te tehnike mjerenja nastajanja konačnih produkata (kao što su alkoholi i ketoni). Kako su hidroperoksidi prvi stabilni produkti peroksidacije lipida, njihovom analizom određuje se rani stadij oksidacije. Metode određivanja lipidnih hidroperoksida dijele se na spektrofotometrijske metode – metoda određivanja konjugiranih diena te feritiocijanatna metoda i kromatografske te spektroskopske metode.

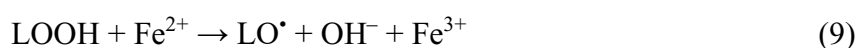
2.2.2.1. Metoda određivanja konjugiranih diena

Metoda određivanja konjugiranih diena jedna je od izravnih metoda određivanja hidroperoksida kojom se mjere konjugirani dieni nastali u propagacijskoj fazi nakon stabilizacije alil-radikala nezasićenih masnih kiselina. Autooksidirani 1,4-nekonjugirani dieni imaju karakteristično svojstvo apsorpcije diena u UV dijelu spektra s mjerljivom razlikom u apsorpciji para pozicijskih *cis*, *trans*- i para pozicijskih *trans*, *trans*- izomera konjugiranih LOOH. Apsorpcijski maksimum geometrijskih izomera konjugiranih LOOH je pri valnoj duljini od 234 nm. Metoda se najčešće koristi za uspoređivanje s drugim izravnim ili neizravnim metodama, ali ne može analizirati ukupne lipide, već samo one koji sadrže PUFA s dvije ili više dvostrukih veza [15].

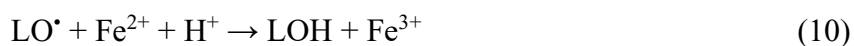
2.2.2.2. Feritiocijanatna metoda

Feritiocijanatna metoda bazira se na oksidaciji Fe^{2+} iona u Fe^{3+} ion u otopinama hidroperoksida te spektrofotometrijskom mjerenju feritiocijanatnog kompleksa i specifična je metoda za određivanje hidroperoksida lipida. Metoda pruža jednostavno i brzo mjerenje hidroperoksida u uzorcima raznolikog podrijetla.

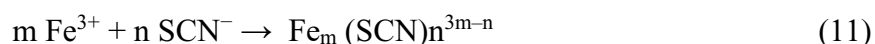
Kako su hidroperoksidi relativno stabilni, u prisustvu iona Fe(II) u kiselom mediju, katalitički se razgrađuju što je prikazano jednadžbom 9 te nastaje alkoksilni radikal koji zatim sudjeluje u nizu drugih reakcija.



Svaka molekula LOOH oksidirana je s 2 Fe^{2+} iona, pod uvjetom da jednadžba 10 konkurira drugim mogućim reakcijama u otopinama.



Oksidirani Fe^{3+} ion kompleksira se s tiocijanatom te se feritiocijanatni ion mjeri spektrofotometrijski na valnoj duljini od 500 nm [16].



U kolorimetrijskom određivanju željeza mora se koristiti suvišak reagensa jer se ravnoteža pomiče u smjeru nastajanja kompleksa povećanjem koncentracije tiocijanata. Lambert–Beerov zakon vrijedi u širim područjima koncentracije željeza u takvim uvjetima, a boja otopine koja se mjeri je vrlo postojana za razliku od one nastale korištenjem malih koncentracija tiocijanata [16].

Nije potrebna velika količina uzoraka za analizu hidroperoksida feritiocijanatnom metodom, a minimalne koncentracije koje se mogu detektirati su 170 pmol mL^{-1} što odgovara 50 μmol LOOH/kg lipida u kompleksnim prirodnim uzorcima [17].

2.2.2.3. Kromatografske i spektroskopske metode

U izravne metode određivanja lipidnih hidroperoksida ubrajaju se kromatografske i spektroskopske metode kojim se mogu objasniti reakcijski mehanizmi oksidacije. Infracrvenom spektroskopijom (IR) određuje se geometrijska izomerizacija masnih kiselina,

a specifična je jer se mogu odrediti i funkcionalne skupine. Na postojanje hidroperoksida u uzorku ukazuje prisutnost apsorpcijske vrpce oko 3413 cm^{-1} što odgovara vibracijama istezanja O-H skupine, a *cis*, *trans*- izomeri mogu se identificirati u području otiska prsta (eng. *finger print*) od 900 do 1000 cm^{-1} .

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) također je pogodna za identifikaciju lipidnih hidroperoksida. Metoda je osjetljiva i reproducibilna te ima mogućnost detekcije niskih koncentracija LOOH. Metode plinske kromatografije spregnute s masenom spektrometrijom (GC-MS) i tekućinske kromatografije (LC-MS/MS) imaju mogućnost izravnog detektiranja produkata peroksidacije lipida te su visoko osjetljive i specifične [18].

2.3. Geometrijska izomerizacija

Geometrijska izomerizacija pojavljuje se u kemijskim spojevima s dvostrukom vezom kao posljedica ograničene rotacije oko tih veza. Geometrijski izomeri masnih kiselina su stereoizomeri određeni samom orijentacijom funkcionalnih grupa na dvostrukoj vezi lanca PUFA. Razlikuju se *cis*- i *trans*-geometrijski izomeri. Ukoliko se supstituenti nalaze na istoj strani dvostruke veze tada se radi o *cis*-izomerima, a kod *trans*-izomera se supstituenti nalaze na suprotnim stranama u odnosu na dvostruku vezu. Najveći mogući broj izomera za pojedinu masnu kiselinu iznosi 2^n , pri čemu n označava broj prisutnih dvostrukih veza [19].

Nezasićene masne kiseline prirodno se pojavljuju u *cis*-konfiguraciji što strogo kontrolira stereoselektivnost enzima desaturaze, dok većina *trans*-masnih kiselina dolazi iz hidrogeniranih ulja. Dugotrajna konzumacija *trans*-masnih kiselina može uzrokovati više štetnih učinaka na zdravlje čovjeka poput dijabetesa, kardiovaskularnih bolesti, pretilosti, raka dojke i drugih [19–21]. Međutim, hrana nije jedini izvor *trans*-masnih kiselina već se one mogu stvoriti endogeno radikalskim procesima iz tiola ili amina čime dolazi do transformacije *cis*- u *trans*-masne kiseline. U stanicama prokariota postoji mogućnost stvaranja odgovarajućih *trans*-izomera. Proces *cis*, *trans*- izomerizacije je prilagodba prokariota na nepovoljne uvjete u okolišu u kojem živi. Kada se nepovoljni uvjeti vrate u normalne, pokreće se reverzibilan proces vraćanja *trans*- u *cis*- izomere *cis*, *trans*- izomerazom što omogućuje prokariotima dobru prilagodbu. Takav mehanizam enzimatske

izomerizacije ne postoji kod eukariota pa se zbog toga sve promjene iz *cis*- u *trans*- izomere smatraju ireverzibilnima i štetnima za stanice [20].

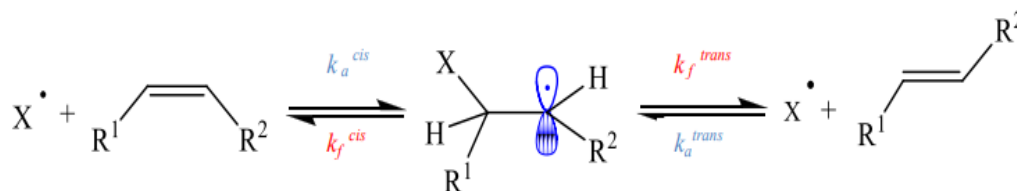
2.3.1. *Mehanizmi izomerizacije masnih kiselina*

U samim lipidima vrlo je važna geometrija dvostruke veze MUFA i PUFA. *Cis*-geometrija je kontrolirana aktivnošću enzima desaturaze, ali *trans*-izomeri su termodinamički stabilniji od pripadajućih *cis*-izomera. Ukoliko je acilni lanac ravniji, međumolekulske sile su snažnije te doprinose većoj stabilnosti *trans*-izomera. Veća je vjerojatnost nastanka *trans*-izomera u odnosu na *cis*-izomer zbog razlika u energetske barijeri tijekom nastajanja dva prijelazna stanja.

Iako su *trans*-izomeri masnih kiselina stabilniji, MUFA i PUFA se pojavljuju uglavnom u *cis*-obliku, a svojstva membrane ovise o prisutnosti jednih tj. drugih. Fizikalna svojstva *trans*- masnih kiselina sličnija su SFA te njihova prisutnost u fosfolipidima smanjuje fluidnost membrane, a povećanjem broja dvostrukih veza povećava se i podložnost procesima oksidacije [20].

Trans-lipidi također mogu sudjelovati u staničnom metabolizmu na dva načina. Prvi način je ugrađivanjem u membranu pri čemu nastaju različite strukture koje potom mogu utjecati na funkciju i svojstva same stanice. Drugi način je inhibicija sinteze PUFA što može utjecati na metabolički ciklus LH te dovesti do inhibicije sinteze esencijalnih ω -6 nezasićenih masnih kiselina [21].

Osim uloge koju radikali imaju u procesima lipidne peroksidacije također mogu i katalizirati *cis-trans* izomerizaciju *in vivo* adicijsko-eliminacijskim reakcijama. Radikali koji mogu inicirati reakciju geometrijske izomerizacije su RS^{\bullet} , RSe^{\bullet} , RSO_2^{\bullet} , NO_2^{\bullet} te radikali atoma Br^{\bullet} i I^{\bullet} . Sama učinkovitost procesa ovisi o karakteristikama radikala pa su tako najznačajnije vrste tiilni radikali (RS^{\bullet}) i dušikov dioksid (NO_2^{\bullet}) [22]. Kod procesa geometrijske izomerizacije na dvostrukoj vezi PUFA važni su elektroni lokalizirani na atomu sumpora. Sami procesi pokreću se djelovanjem radikala sumpora. Na slici 9. prikazan je mehanizam procesa geometrijske izomerizacije. Proces je katalitički i temelji se na reverzibilnoj adiciji radikala X^{\bullet} na *cis*-dvostruku vezu uz nastajanje radikalskog adukta kao međuprodukta. Nakon β -eliminacije X^{\bullet} radikala, nastaje termodinamički povoljan *trans*-izomer.

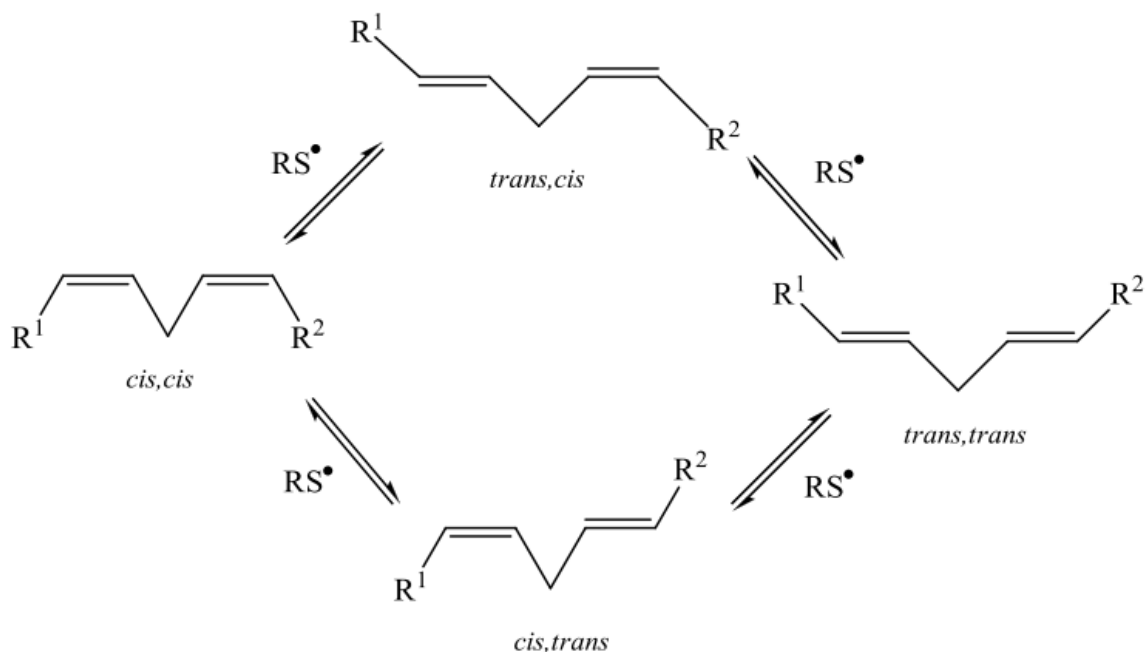


Slika 9. Mehanizam reakcije *cis,trans*-izomerizacije kataliziran radikalima

Radikal X^\bullet ima ulogu katalizatora, tj. dobro je poznati izomerizirajući agens *cis,trans*-izomerizacije dvostruke veze.

RS^\bullet radikali su najpoznatiji biološki izomerizirajući agensi, a njihova reaktivnost izraženija je u reakcijama s PUFA zbog niže energije C–H veze. Veću reaktivnost imaju RS^\bullet radikali generirani iz hidrofilnih tiola ili amfifilnih tiolnih spojeva, dok sterički zaklonjeni RS^\bullet radikali imaju najmanju reaktivnost [21].

Proces geometrijske izomerizacije pokrenut djelovanjem radikala ima dvije glavne karakteristike. Najprije, proces je katalitički i reverzibilan samo ako adukt radikala ne bude uhvaćen prije nego što dođe do β -eliminacije. Tako jedan radikal može održavati katalitički lanac te izomerizirati veći broj molekula prije terminacije. Rezultat navedenog procesa je oštećenje biomembrana već pri jako malim koncentracijama prisutnih radikala. Drugo, u procesu geometrijske izomerizacije ne nastaju pozicijski izomeri zbog njihovog adicijsko-eliminacijskog mehanizma koji ne dopušta pomak pozicije dvostruke veze. Mehanizam izomerizacije PUFA odvija se po stupnjevima, a svaka dvostruka veza reagira neovisno o drugoj (Slika 10.) [21].



Slika 10. Prikaz *cis,trans*-izomerizacije LH katalizirane radikalima tiola [22]

Sami tioli, organski su sumporovi spojevi analogni alkoholima. Hlapljive su tekućine te imaju intenzivan miris. Tioli lako oksidiraju u disulfide te sulfonske kiseline. Važan čimbenik kod proučavanja procesa radikala u modelnim sustavima je prisutnost kisika. Spojevi tiola imaju antioksidacijsku ulogu u procesima lipidne peroksidacije zbog sposobnosti doniranja atoma vodika peroksilnom radikalima, a također mogu reagirati i s primarnim česticama, hidroksilnim radikalima [7]. U reakcijama 12 i 13, RS^\bullet radikal se generira te može pokrenuti oba procesa, i peroksidaciju lipida i katalitički ciklus izomerizacije dvostruke veze [23].



Koji od ovih dva procesa će prevladavati ovisi o uvjetima reakcije, kao što su koncentracija kisika i tiola, generiranje RS^\bullet radikala i dr.

2.3.2. Sumporovodik u biološkim sustavima

Sumporovodik (H_2S) je molekula koja se sastoji od atoma sumpora i dva atoma vodika. Pri standardnim uvjetima, molekula je otrovan, bezbojan plin, gušći od zraka s karakterističnim mirisom trulih jaja. Zapaljiv je i topiv u vodi. Prvi opis sumporovodika pojavljuje se u 15. stoljeću kada je dobio naziv „hepatični zrak“. Njegovu sintezu prvi je napravio Carl Wilhelm Scheele 1777. godine, a kemijski sastav odredio Claude Louis Berthollet 1796. godine [24]. Spoj je s najnižim oksidacijskim stanjom sumpora: -2 [23]. Sumporovodik se smatra analogom vode zbog samog izgleda, ali ipak postoje bitne razlike – ima manji kut vezanja (92° i 104°). Također, elektronegativnost sumpora manja je od kisikove, a sličnija vodikovoj. Ima manji dipolni moment pa ne stvara vodikove veze te se ponaša kao hidrofobna otopina okružena molekulama vode što rezultira da je pri atmosferskoj temperaturi i tlaku plin [23].

H_2S je plin koji se endogeno generira u živim organizmima te je izvor jednostavnog radikala sumpora. Važnu ulogu ima u živčanom i kardiovaskularnom sustavu te patološkim stanjima kao što su upalni procesi. Fiziološke koncentracije H_2S u mozgu sisavaca su u rasponu $50\text{--}160\ \mu\text{M}$, a u ljudskoj plazmi $10\text{--}100\ \mu\text{M}$. H_2S reagira s oksidansima koji nastaju djelomičnom redukcijom kisika. H_2S je plinska signalna molekula (eng. *gasotransmitter*), što znači da bi zbog svoje visoke topljivosti u lipidima mogao lako prodrijeti kroz staničnu membranu bez upotrebe transportera ili receptora te tako izazvati reakcije u stanicama [23, 25, 26].

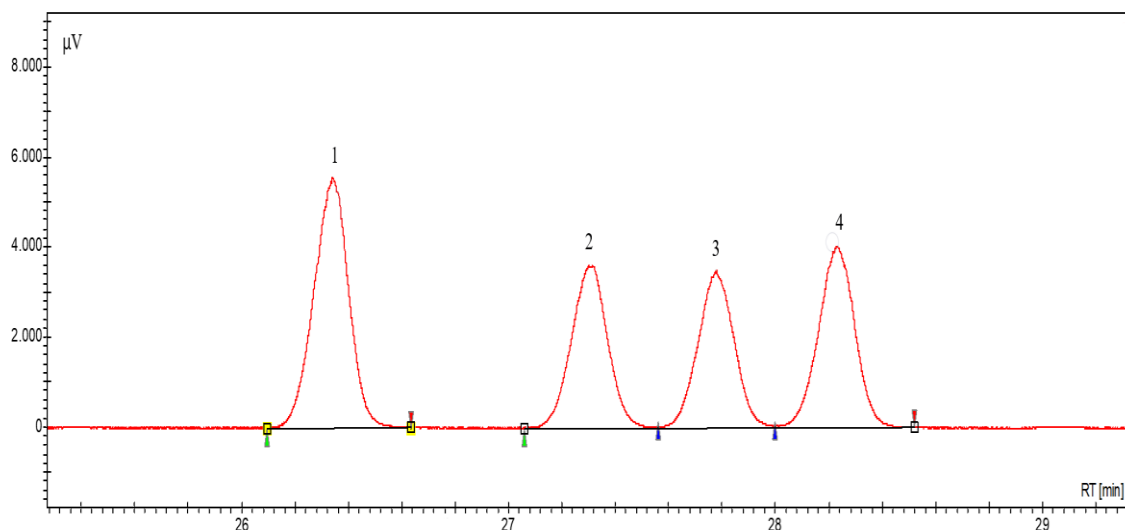
Bitan parametar koji objašnjava propusnost membrane za otopljene tvari je koeficijent raspodjele, tj. topljivost u membranama u usporedbi s vodom. Sama molekula je blago hidrofobna i topljivija je u membranama nego u vodi. Iako je topljivija, brzine reakcija u membranama se ne povećavaju zbog nereaktivnosti H_2S , a sama molekula se mora disocirati u HS^- što je energetski nepovoljan proces u membranama [23].

Endogeni se H_2S kod sisavaca proizvodi iz homocisteina i cisteina kroz enzime transsulfuracijskog puta, cistationin- β sintaze (CBS) i cistationin γ -liaze (CGL). CBS i CGL su enzimi koji sintetiziraju metionin i serin, a također mogu sintetizirati H_2S . Sama sinteza H_2S ovisi o tkivu – CBS je glavni izvor H_2S u živčanom sustavu, a CGL u kardiovaskularnim tkivima [23, 26].

H₂S je prekursor lako difundirajućeg HS[•] u živim organizmima. Reakcije najjednostavnijih radikala lokaliziranih na sumporovom atomu HS[•] nisu toliko poznate kao kod ostalih tiilnih radikala, RS[•]. Općenito, tioli sadrže sulfhidrilne skupine te mogu imati antioksidativnu ulogu, a istovremeno nastali radikali lokalizirani na atomu sumpora mogu oštetiti biomolekule poput lipida stvaranjem *trans*-masnih kiselina [20].

2.3.3. Analitičke metode identifikacije *trans*-nezasićenih masnih kiselina

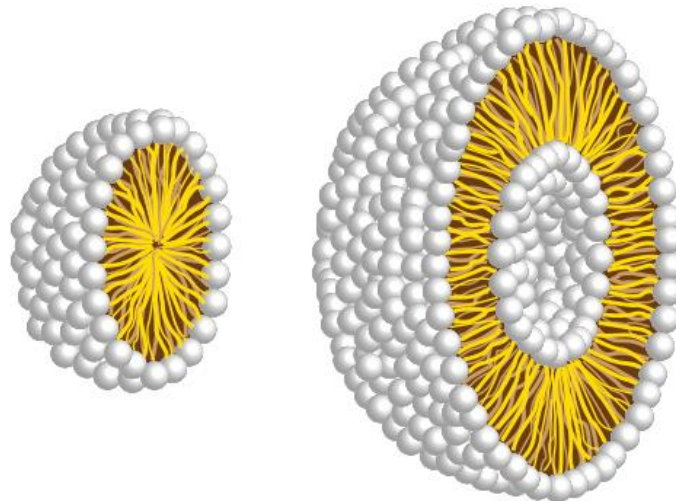
Postoje različite metode identifikacije geometrijskih izomera u biološkim uzorcima. Neke od poznatijih metoda koje se koriste su tankoslojna kromatografija (*eng. Thin Layer Chromatography*, TLC), tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (*eng. High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), spektroskopske metode (infracrvena spektroskopija) te plinska kromatografija. Plinska kromatografija je kromatografska tehnika koja služi za analizu masnih kiselina te je široko rasprostranjena. Kako bi se masne kiseline mogle detektirati i analizirati, potrebno ih je prevesti u nepolarnije derivate masnih kiselina, a to su najčešće metilni esteri koji su hlapljiviji od slobodnih masnih kiselina. Tako prevedene masne kiseline mogu se lako, brzo i efikasno razdvojiti na polarnoj stacionarnoj fazi kapilarnih kolona. Plinska kromatografija omogućuje visoko razlučivanje lipidnih komponenata te se na taj način omogućava određivanje sastava i količine masnih kiselina i pripadajućih izomera u uzorcima lipida. Kao detektor se najčešće koriste plameno-ionizacijski detektor (*engl. Flame Ionization Detector*, FID) koji je jedan od najosjetljivijih i najpouzdanijih detektora. Uz odabir odgovarajuće kolone, bitno je i podešavanje temperaturnog programa, protoka plina nosioca i tlaka čime je moguće razlučiti sve *cis*- i *trans*-izomere masnih kiselina. *Trans*-izomeri prvi se eluiraju, dok se pripadajući *cis*-izomeri eluiraju kasnije. Na slici 11. je prikazan primjer kromatograma LH i njezinih geometrijskih izomera nastalih izlaganjem γ -zračenju analiziranih metodom GC/FID [27].



*Slika 11. Kromatogram LH i njezinih geometrijskih izomera. (1) 9*t*,12*t*-18:2, metil linolelaidat; (2) 9*t*,12*c*-18:2, metil linoleat; (3) 9*c*,12*t*-18:2 metil linoleat; (4) 9*c*,12*c*-18:2 metil linoleat*

2.4. Modelni sustavi za istraživanje procesa lipidne peroksidacije i geometrijske izomerizacije

Različiti modelni sustavi koriste se u istraživanjima reakcija lipida jer simuliraju jednostavniju okolinu kod koje se mogu istraživati kemijski mehanizmi i nastajanje produkata lipida. Takvi rezultati omogućuju znanstvenicima jasnije i kvalitetnije razumijevanje bioloških sustava, od najjednostavnijih do složenijih. Reaktivnost masnih kiselina može se istraživati u homogenim otapalima kao što su organska otapala kloroform, eter i alkoholi uzimajući u obzir hidrofobna svojstva lipida. Također, može se istraživati u heterogenim sustavima kao npr. u vodenim okruženjima gdje se lipidne molekule mogu spontano organizirati. Masne kiseline spontano formiraju micelle, a fosfolipidi se ugrađuju u liposome (Slika 12.). Liposomi su sličniji biološkim sustavima zbog karakterističnog lipidnog dvosloja pa su dobri modeli za istraživanje procesa na staničnim membranama [28].



Slika 12. Primjer micelle i liposoma

Slobodne masne kiseline, u doticaju s vodenim medijem, samoorganiziraju se u micelle tako da su hidrofobni dijelovi masnih kiselina – acilni lanci, okrenuti prema unutrašnjosti micelle, dok hidrofilni dijelovi ostaju okrenuti prema vanjskom dijelu – prema vodenoj površini. LH je najzastupljenija masna kiselina u organizmima i najčešća je modelna PUFA [2]. Sama oksidacija PUFA u micelama ili liposomima ovisi o njihovim kemijskim svojstvima. Radikali i/ili kisik reagiraju s PUFA selektivno, ovisno o broju i položaju dvostruke veze što rezultira razlikom u raspodjeli pozicijskih izomera LOOH [2]. Kako su PUFA spojevi netopljivi u vodi, dodavanjem tenzida njihova se topljivost povećava. Tenzidi ili površinski aktivne tvari su spojevi sa svojstvom samoudruživanja pri čemu stvaraju micelle i time pojačavaju topljivost nepolarnih organskih spojeva u vodi. Samim otapanjem PUFA u tenzidima formiraju se miješane micelle koje se dalje koriste u istraživanjima oksidacijskih procesa. Prisutnost tenzida u takvim sustavima omogućuje istraživanja i kod nižih pH što je zanimljivo s aspekta proučavanja bioloških procesa u tumorskim tkivima. Važno je pritom znati da sam tenzid može utjecati na kinetiku procesa peroksidacije [2].

Navedeni primjeri modelnih sustava poznati su u proučavanju pojedinačnih procesa peroksidacije lipida odnosno geometrijske izomerizacije, ali i za njihovo istovremeno praćenje. Zajednička veza između ta dva procesa su reaktivni tiolni radikali. Zbog sposobnosti doniranja H atoma, tioli inhibiraju peroksidaciju lipida, dok istovremeno radikali lokalizirani na atomu sumpora mogu katalizirati proces geometrijske izomerizacije. Uređenost hidrofobnog i hidrofilnog dijela, pozicija dvostruke veze i amfifilnost

upotrebljenog tiola u modelnim sustavima utjecati će na brzinu radikalskih reakcija s masnim kiselinama [2].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

Sva upotrebljena otapala i soli bili su analitičke čistoće. Svaka otopina deaerirana je dušikom prije upotrebe, a za pripremu je upotrijebljena ultračista voda. Svo korišteno suđe oprano je ultračistom vodom te nakon toga i otapalom.

3.1.1. Reagensi i soli

U radu su korištene navedene soli:

- $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck, p.a.)
- KSCN (Sigma–Aldrich)
- $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$ (Aldrich)
- NaH_2PO_4 (Sigma).

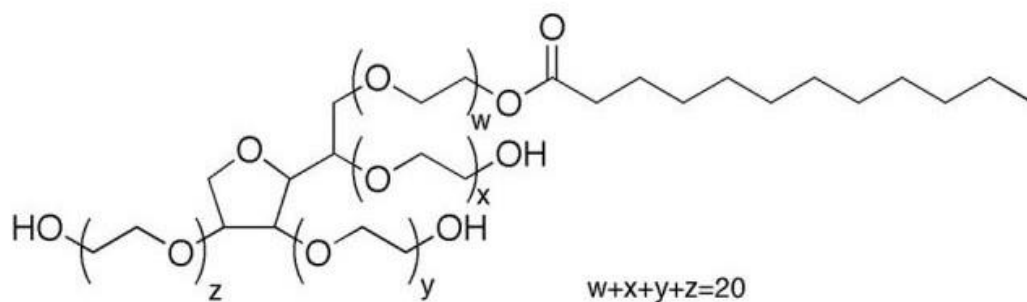
U pripremi otopina micela korištena je LH (Sigma) te neionska površinski aktivna tvar, polioksietilensorbitan monolaureat (Tween[®]–20, Sigma). Otopina Tween[®]–20 (Slika 13.) priređena je miješanjem s vodom, koncentracije $c = 9,0262 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.

Fosfatni pufer, natrijev dihidrogen fosfat (NaH_2PO_4), koncentracije $c = 2,7 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ priređen je otapanjem 0,161973 g NaH_2PO_4 u 50 mL H_2O , a fosfatni pufer koncentracije $c = 5,0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ priređen je otapanjem 0,29995 g NaH_2PO_4 u 500 mL H_2O .

Otopina Na_2S pripremana je sviježe svaki dan. Otopina koncentracije $c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$ priređena je otapanjem 1,2009 g Na_2S u 5 mL H_2O . 1 μL osnovne otopine otpipetiralo se u 5 mL te je konačna koncentracija $c = 0,2 \text{ mmol dm}^{-3}$. Pri variranju koncentracija Na_2S , koristile su se koncentracije:

- $c_1 = 0,02 \text{ mmol dm}^{-3}$
- $c_2 = 0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$
- $c_3 = 0,4 \text{ mmol dm}^{-3}$
- $c_4 = 0,8 \text{ mmol dm}^{-3}$

koje su bile priređene iz osnovne otopine.



Slika 13. Tween[®]-20

Za sintezu diazometana (CH₂N₂) korišteno je:

- *N*-metil-*N*-nitrozo-*p*-toluenesulfonamid (Sigma–Aldrich)
- KOH (Kemika).

Kao unutarnji standard kod plinske kromatografije, korištena je stearinska kiselina (Sigma–Aldrich).

3.1.2. Otapala

Korištena otapala su:

- diklormetan (CH₂Cl₂) (Kemika, p.a.)
- metanol (MeOH) (Kemika, p.a.)
- klorovodična kiselina (HCl, <37%) (Kemika, p.a.)
- dietil-eter (Et₂O) (Sigma)
- 2-metoksietanol (Aldrich).

Za plinsku kromatografiju, kao otapalo je korišten heksan (Fluka, p.a.).

3.2. Metode

3.2.1. Priprema micela linolne kiseline

Modelni lipidni sustav micela priređivan je u čašici od 100 mL miješanjem 2,5 mL Tween[®]-20 i 1,25 mL fosfatnog pufera koncentracije $c = 2,7 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$. Na taj način su pripremljene micelle tenzida u koje se dodalo 0,0125 mL LH. Nakon miješanja otopine 20 minuta na magnetskoj miješalici dodano je oko 0,5 g KOH i 4,24 mL ultračiste vode. Tako dobivena otopina razrijeđena je fosfatnim puferom ($c = 5,0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) do ukupnog volumena od 80 mL. pH je podešen na 5 dodavanjem nekoliko kapi HCl ($c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$) ili NaOH ($c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$). Konačna koncentracija LH iznosila je $c = 5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, Tween[®]-20 $c = 2,8 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, a fosfatnog pufera $c = 5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.

Svi sustavi koji su pripremljeni, bili su ili u ravnoteži s kisikom iz zraka, ili bez prisustva kisika iz zraka što se postiglo propuhivanjem s N₂O 15 minuta.

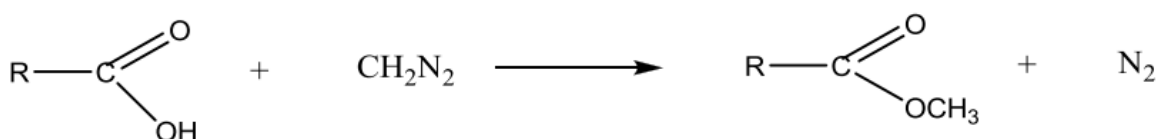
3.2.2. Peroksidacija linolne kiseline γ -zračenjem

Procesi lipidne peroksidacije i geometrijske izomerizacije, u otopinama prethodno priređenih micela, provedeni su uz inicijaciju γ -zračenjem. Neposredno prije ozračivanja otopina, dodavan je alikvot Na₂S \times 9H₂O nakon čega se u sustav dodavala smjesa CH₂Cl₂ : MeOH = 2 : 1 za ekstrakciju masnih kiselina. Procesi su se promatrali na različite načine – promjenom pH sustava, promjenom brzine doze, promjenom koncentracije Na₂S, u ravnoteži sa zrakom ili u N₂O zasićenim otopinama.

γ -zračenje provođeno je na panoramskom izvoru ⁶⁰Co. Sam izvor zračenja načinjen je od vertikalnog cilindričnog sklopa sastavljenog od 24 nosača sa šipkama punjenim kapsulama ⁶⁰Co. Izvor se nalazi u sigurnom položaju u podzemnom spremištu te se iz njega dovodi u radni položaj pomoću elektromotornog pogona gdje se nosači ⁶⁰Co dižu do prostorije za ozračivanje. Uzorci su zračeni u centru izvora gdje je najveća brzina doze bila $P = 0,5 \text{ Gy/s}$ i na udaljenosti od centra pri brzini doze $P = 0,128 \text{ Gy/s}$. Brzina doze na panoramskom izvoru određena je ionizacijskom komorom i Monte Carlo simulacijama [29].

3.2.3. Analiza metilnih estera linolne kiseline plinskom kromatografijom

Neposredno poslije ozračivanja micela, LH ekstrahirana je smjesom otapala CH_2Cl_2 : $\text{MeOH} = 2 : 1$. U ekstrakt je dodana stearinska kiselina kao unutarnji standard te se sve skupa sušilo s Na_2SO_4 . Nakon sušenja, uzorak se filtrirao i prebacio u bočice za uparavanje na rotacijskom uparivaču. Potom se u svaki uzorak dodalo 0,5 mL dietil–etera, nekoliko kapi metanola za dodatno ubrzavanje reakcije metiliranja i 10–ak kapi diazometana. Nakon završetka reakcije metiliranja, uzorci su upareni na rotacijskom uparivaču. Dodavanjem diazometana u uzorke, dobiva se metilni ester linolne kiseline (MeLi) što je prikazano na slici 14.



Slika 14. Metiliranje masnih kiselina diazometanom

Nakon uparavanja do suha, uzorci su razrijeđeni sa 150 μL heksana. Analiza estera masnih kiselina i njihovih pripadajućih geometrijskih izomera provedena je injektiranjem 1 μL MeLi u plinski kromatograf Varian 450–GC s plameno–ionizacijskim detektorom i kapilarnom kolonom Rtx–2330 (90% biscijanopropil / 10% fenilcijanopropil polisiloksan; 105 m \times 0.25 mm). Temperaturni režim počinjao je na 180 $^\circ\text{C}$ (u trajanju od 35 min) do 250 $^\circ\text{C}$ (u trajanju od 5 min) s brzinom porasta temperature 10 $^\circ\text{C min}^{-1}$. Temperatura injektora iznosila je 250 $^\circ\text{C}$, a temperatura detektora 270 $^\circ\text{C}$ protoka 1,5 mL min^{-1} . Metilni esteri i pripadajući geometrijski izomeri identificirani su usporedbom s prethodno utvrđenim vremenima zadržavanja komercijalno dostupnih standarda.

3.2.3.1. Sinteza diazometana

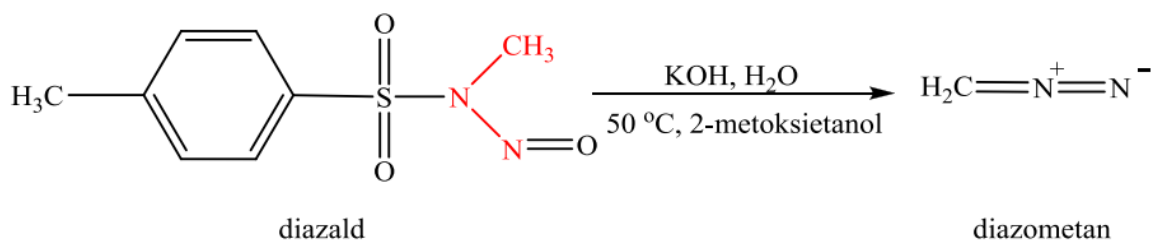
Reagensi:

- diazald, $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{NO}$
- pastile KOH.

Otapala:

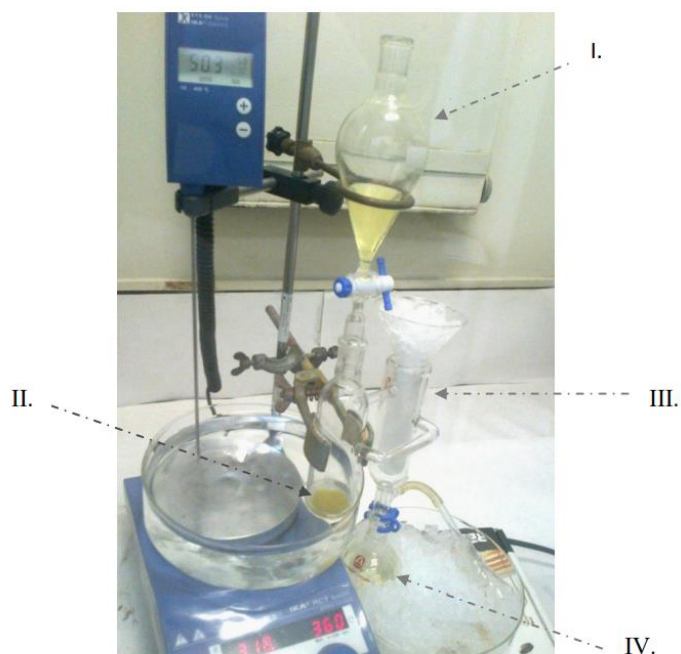
- 2–metoksietanol
- suhi Et₂O.

Sinteza diazometana prikazana je na slici 15. [30].



Slika 15. Sinteza diazometana

Sinteza diazometana provodi se u digestoru jer je spoj toksičan i eksplozivan. Aparatura potrebna za sintezu, prikazana na slici 16., sastoji se od lijevka za dokapavanje, okrugle tikvice u kojoj se reakcija događa, hladila i okrugle tikvice u kojoj se sakuplja diazometan u Et₂O.



Slika 16. Aparatura za sintezu diazometana

Kako je prikazano na slici 16., u lijevku za dokapavanje miješaju se 2,5 g diazalda i 22,5 mL Et₂O (I). Zatim se u tikvicu pomiješa vodena otopina KOH, dobivena otapanjem 4

g KOH u 1,5 mL H₂O te 5 mL 2–metoksietanola (II). U hladilo (III) se pomiješa usitnjeni led s NaCl u omjeru 3 : 1. U okruglu tikvicu koja služi za skupljanje diazometana dodaju se pastile KOH te se pazi kako bi dno tikvice bilo sasvim pokriveno i 50 mL osušenog Et₂O. Na izlazu iz hladila postavlja se pasteur pipeta, čiji vrh je blago zataljen te se uroni u Et₂O s otopljenim KOH što služi kao stupica za eventualni gubitak diazometana (IV). Aparatura za sintezu je djelomično u ledu.

Prvi dio aparature prikazane na slici 16. uronjen je u vodenu kupelj i postavljen na magnetskoj miješalici te se uz miješanje zagrijava na 50 °C. Drugi dio, tikvica u koju se skuplja diazometan, postavljena je u posudu s ledom. Otopina iz lijevka za dokapavanje (I) postupno se dodaje u reakcijsku smjesu (II). Reakcijska smjesa mora biti potpuno uronjena u kupelj jer u suprotnom nastaju dva sloja i destilacija je nepotpuna. Sinteza traje dok se u tikvici (IV) ne pojavi otopina intenzivno žute boje. Nakon što se sva otopina iz lijevka za dokapavanje doda u smjesu, lijevak se ispire s Et₂O čime sinteza završava. Tako priređen diazometan može se čuvati nekoliko mjeseci na –30 °C.

3.2.4. *Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije hidroperoksida linolne kiseline*

3.2.4.1. *Feritiocijanatna metoda*

Reagensi:

- Fe–reagens: deaerirane otopine 0,0045 mol dm⁻³ FeSO₄ × 7H₂O u 0,04 mol dm⁻³ HCl i 3% KSCN u MeOH pomiješane u omjeru 1 : 1. Reagens se priprema svaki dan sviježi i čuva na tamnom mjestu.

Otapala:

- Deaerirana smjesa CH₂Cl₂ : MeOH = 2 : 1

Postupak:

U odmjernoj tikvici od 10 mL deaerira se smjesa otapala kojoj se dodaje deaeriran alikvot ekstrahiranih hidroperoksida (u CH₂Cl₂ : MeOH = 2 : 1) te se dodaje 0,4 mL Fe–reagensa. Nakon deaeriranja otopine se čuvaju u tami do završetka reakcije. Dobivene otopine su crveno–roze boje različitih intenziteta. Otopine su snimljene na spektrofotometru u području valnih duljina od 700 do 400 nm u 1 cm kiveti na sobnoj temperaturi. Snimanje

se obavlja 30 minuta nakon postizanja kvantitativnosti reakcije Fe–reagensa i ispitivanih otopina hidroperoksida. Ferikompleks je očitao na λ_{\max} 500 nm, a za samu identifikaciju ferikompleksa pripremljene su dvije otopine reagensa u otapalu (slijepe probe). Koncentracije hidroperoksida izračunate su iz vrijednosti apsorbancije mjernih uzoraka oduzetih od aritmetičke sredine slijepih proba te molarne apsorbivnosti feritiocijanatnog kompleksa dobivenog u otopini standarda hidroperoksida metilnog estera LH ($\epsilon = 58\,440\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) [15].

3.2.5. Karakterizacija modelnog sustava linolne kiseline

Dinamičko raspršenje svjetlosti mjereno je na foton korelacijskom spektrofotometru, Zetasizer Ultra, Malvern Panalytical opremljenom s crvenim laserom ($\lambda = 632,8\text{ nm}$) u termostatiranim uvjetima. Korelacijske funkcije analizirane su pomoću programa ZS XPLORER. Kod mjerenja dinamičkog raspršenja svjetla (DLS) određuju se difuzijski koeficijent, a ne veličina čestice. Veličina čestice dobiva se korištenjem Stokes–Einsteinove relacije koja povezuje veličinu čestice s difuzijskim koeficijentom prikazanom jednadžbom 14,

$$D = \frac{k_b T}{3\pi\eta d_h} \quad (14)$$

gdje je k_b Boltzmanova konstanta, T apsolutna temperatura, η viskoznost otapala, a d_h hidrodinamički promjer čestice. Jednadžba vrijedi samo u slučajevima beskonačnog razrijeđenja gdje je vrijednost difuzijskog koeficijenta u cijelosti neovisna o koncentraciji, što znači da su vrijednosti DLS mjerenja apsolutne samo kad su čestice sferične, monodisperzne i bez međudjelovanja uz pretpostavku da se javlja jedino Brownovo gibanje. Veličina čestica dobiva se prilagodbom autokorelacijske funkcije, a rezultati su prikazani kao distribucije (raspodjele) veličina po volumenu. Mjerenja su prikupljena pri tri kuta detekcije (173° , 90° i 13°) i prikazana su kao jedno integrirano mjerenje MADLS (engl. *multiple angle dynamic light scattering*) tehnologijom.

Elektroforetska pokretljivost također je mjerena na foton korelacijskom spektrofotometru, a dobiveni rezultati izražavaju se kao srednje vrijednosti tri mjerenja. Zeta potencijal (ζ/mV) utvrđen je pomoću Henryeve jednadžbe (jednadžba 15),

$$U_e = \frac{2\varepsilon\zeta f(K_a)}{3\eta} \quad (15)$$

gdje je ε dielektrična konstanta, U_e elektroforetska pokretljivost, a η viskoznost.

Zeta potencijali su izračunati iz elektroforetske pokretljivosti Henryjevom jednadžbom uz Smoluchowskijevu aproksimaciju Henryjeve funkcije, tj. $F(\kappa a) = 1,5$.

3.2.6. Instrumentacija

Sva spektrofotometrijska mjerenja izvođena su na UV/VIS spektrofotometru Cary 4000.

Analiza estera masnih kiselina i njihovih geometrijskih izomera vršila su se na plinskom kromatografu Varian 450–GC s plameno-ionizacijskim detektorom i kapilarnom kolonom.

Hidrodinamički dijametar miješanih micela metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti odrađen je na Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical).

4. REZULTATI I RASPRAVA

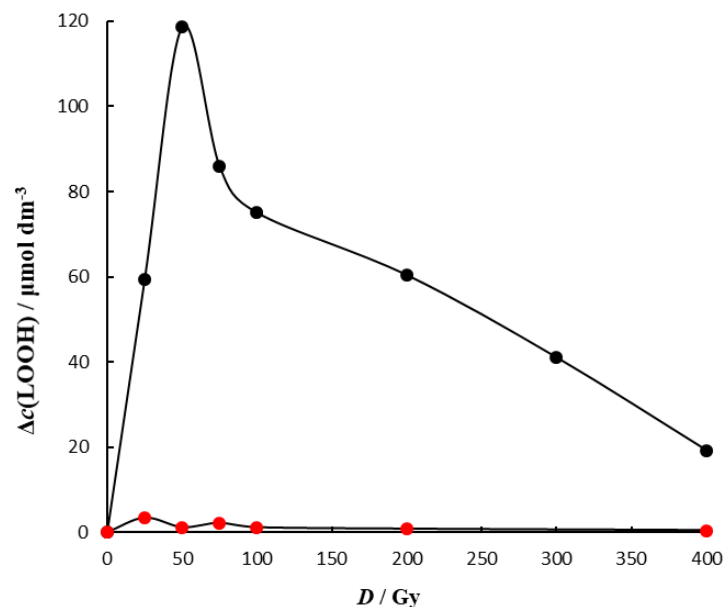
4.1. Lipidna peroksidacija i geometrijska izomerizacija u modelnom sustavu

Kao što je već navedeno u literaturnom pregledu, procesi lipidne peroksidacije i geometrijske izomerizacije, biološki su važni procesi te su zanimljivi za istraživanja zbog njihovog štetnog utjecaja na organizam. Navedeni procesi istovremeno konkuriraju jedan drugome pa je cilj ovog rada bio usporedno ispitati produkte lipidne peroksidacije i geometrijske izomerizacije u modelnom sustavu micela uz inicijaciju γ -zračenjem. Izvor radikala bio je najjednostavniji radikal sumpora (HS^\bullet) čiji utjecaj nije toliko istražen kao drugih tiilnih radikala. Uloga H_2S kao prekursorne molekule za nastanak radikala lokaliziranog na atomu sumpora i njegova uloga izomerizirajućeg agensa do sada je proučavana samo u modelima liposoma [4], ali nije ispitana paralelno i njegova sposobnost usporavanja lipidne peroksidacije.

U ovom radu korišten je Na_2S koji se često koristi u eksperimentalnom radu za generiranje H_2S , odnosno HS^- u vodenim otopinama. Koncentracije upotrebljenih Na_2S odgovarale su biološkim koncentracijama H_2S . Modelni sustavi micela pripremali su se prema uputama opisanima u poglavlju 3.2.1. te su proučavani u različitim eksperimentalnim uvjetima. Utjecaj doze, brzine doze i koncentracije Na_2S ispitan je u modelnom sustavu LH pri pH 5. Gavnina istraživanja u ovom radu napravljena je pri pH 5 kako bi se istražili procesi lipidne peroksidacije i geometrijske izomerizacije s aspekta tumorskih tkiva za koje je potvrđeno da imaju niži pH od zdravih tkiva.

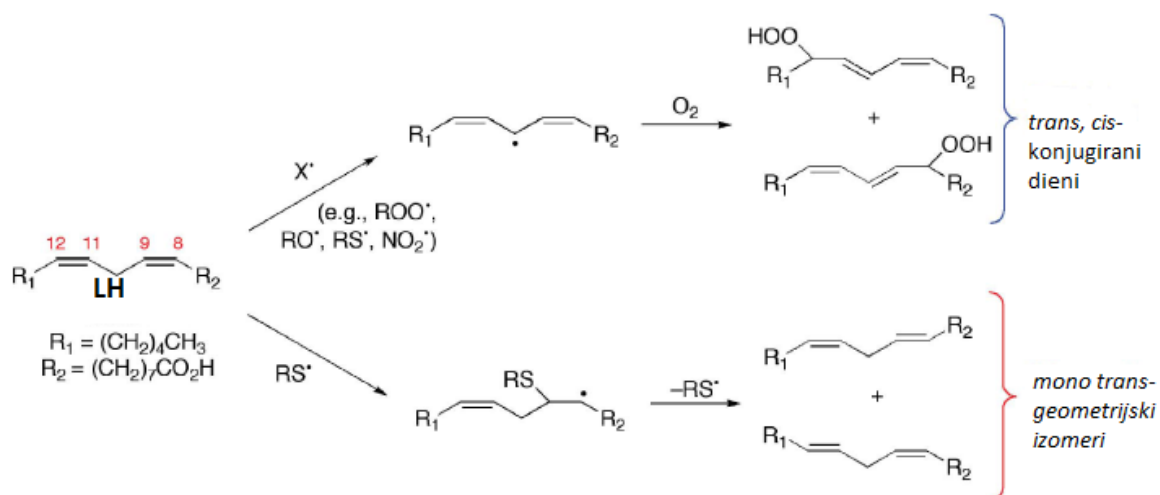
4.1.1. Utjecaj doze zračenja na procese lipidne peroksidacije i geometrijske izomerizacije u modelnom sustavu LH

Utjecaj promjene doze na nastajanje LOOH u aerobnim i anaerobnim uvjetima prikazan je na slici 17. U modelnom sustavu koji je u ravnoteži sa zrakom vidljivo je da je proces lipidne peroksidacije primarni proces, za razliku od anaerobnih uvjeta gdje prevladava proces geometrijske izomerizacije. Primijenom doza zračenja do 50 Gy u aerobnim uvjetima izmjerena je visoka koncentracija LOOH ($118,54 \mu\text{mol dm}^{-3}$), dok u anaerobnim uvjetima nastaju vrlo male koncentracije LOOH što je blizu donje granice detekcije LOOH primijenjene feritiocijanatne metode.



Slika 17. Utjecaj doze zračenja na formiranje LOOH (•) aerobni uvjeti, (•) anaerobni uvjeti, pri $pH = 5$, $P = 0,5 \text{ Gy/s}$, $c(\text{Na}_2\text{S}) = 0,2 \text{ mmol dm}^{-3}$,

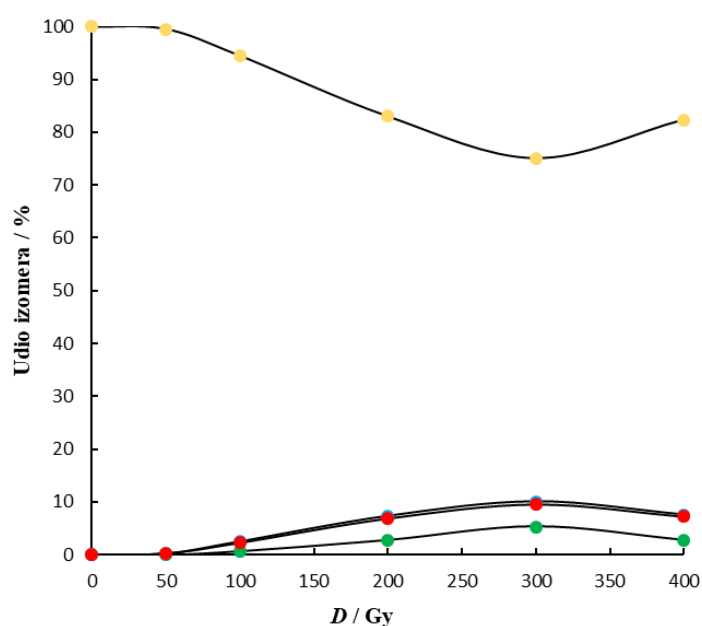
Utjecaj promjene doze na raspodjelu geometrijskih izomera u ravnoteži sa zrakom te u anaerobnim uvjetima prikazan je na slikama 18. i 19. U aerobnim uvjetima, iako je lipidna peroksidacija predominantan proces, može se pratiti i proces izomerizacije. Mehanizam peroksidacije i geometrijske izomerizacije prikazan je na shemi 3. Radikali lokalizirani na sumporu imaju mogućnost apstrakcije vodika stvarajući pentadienilni radikal koji dalje sudjeluje u procesu lipidne peroksidacije. Istovremeno tiilni radikal se može adirati na dvostruku vezu masne kiseline te β -eliminacijom RS^\bullet nastaju mono *trans*-izomeri.



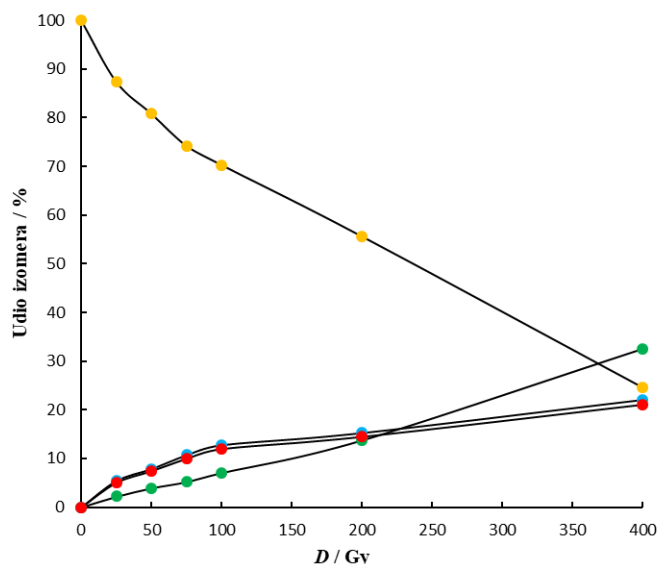
Shema 3. Mehanizmi lipidne peroksidacije i geometrijske izomerizacije LH.

Variranjem doze zračenja mijenja se koncentracija nastalih LOOH te udio nastalih geometrijskih izomera LH. U aerobnim uvjetima prevladava proces lipidne peroksidacije te je koncentracija nastalih hidroperoksida visoka već pri malim dozama zračenja, a s povećanjem doza zračenja potom dolazi do terminacije procesa peroksidacije. Međutim primjetno je da se odvija i proces izomerizacije, osobito pri većim dozama. Udio nastalih izomera mono i di *trans*-izomera je oko 25 % (Slika 18.)

Rezultati u anaerobnim uvjetima ukazuju da je geometrijska izomerizacija dominantan proces te uz nestajanje *cis*-konfiguracije dvostruke veze istovremeno nastaju i dva mono *trans*-izomera i di *trans*-izomeri.

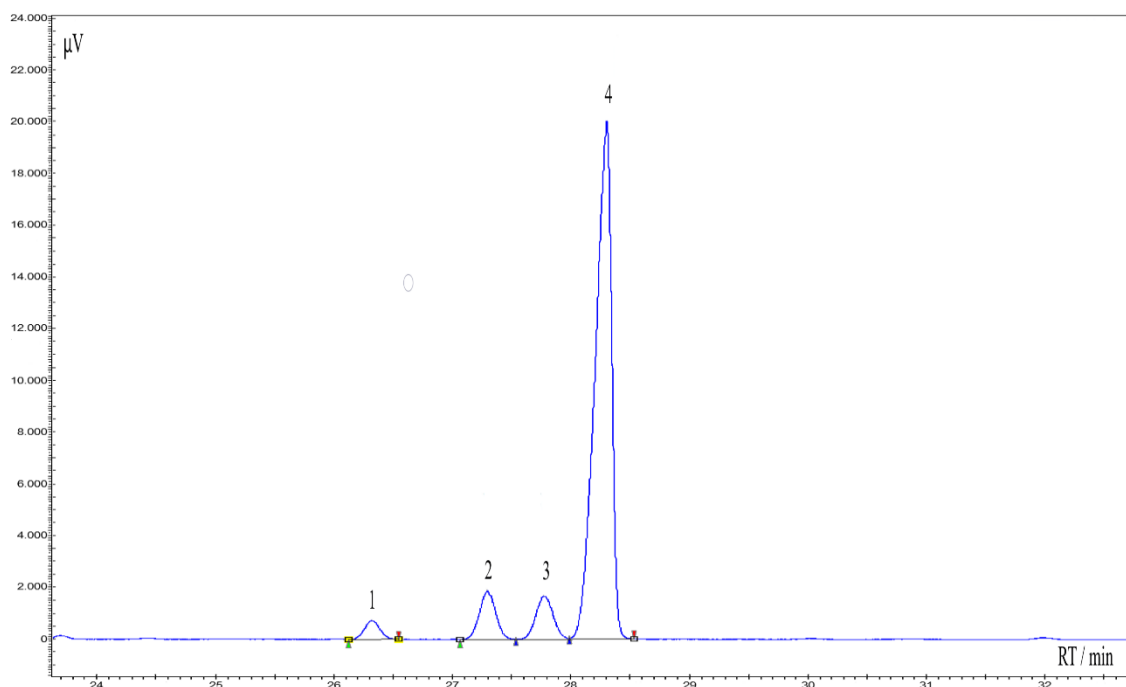


Slika 18. Raspodjela geometrijskih izomera LH u ovisnosti o dozi zračenja pri aerobnim uvjetima, $pH = 5$, $P = 0,5 \text{ Gy/s}$, $c(\text{Na}_2\text{S}) = 0,2 \text{ mmol dm}^{-3}$, (●) $9c,12c-18:2$ metil linoleat, (●) $9t,12c-18:2$, metil linoleat, (●) $9c,12t-18:2$ metil linoleat, (●) $9t,12t-18:2$, metil linolelaidat

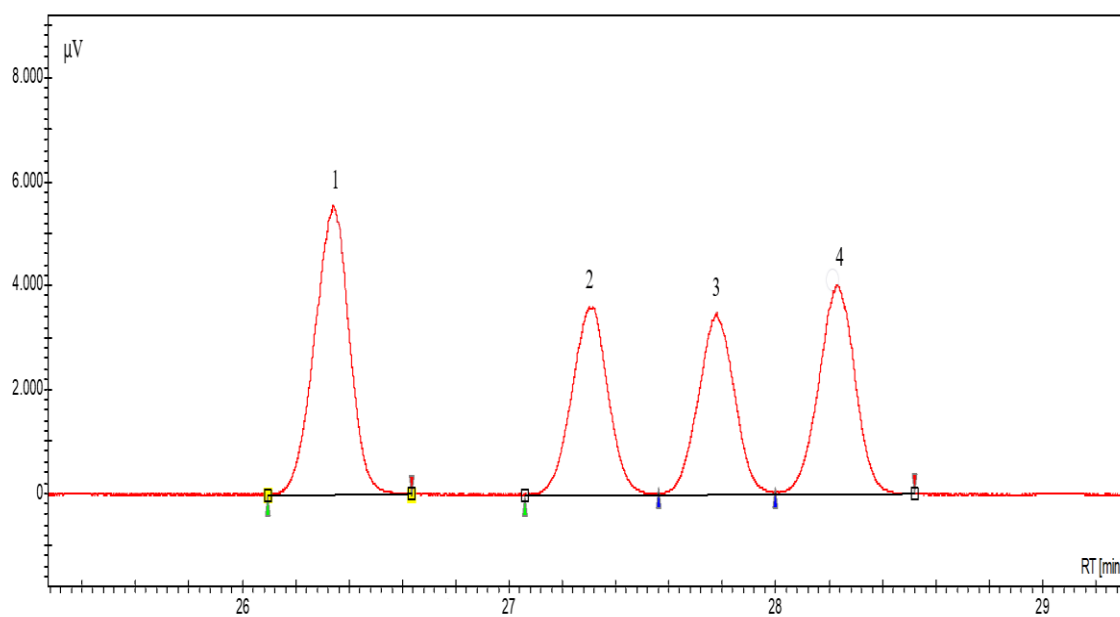


Slika 19. Raspodjela geometrijskih izomera LH u ovisnosti o dozi zračenja pri anaerobnim uvjetima, $pH = 5$, $P = 0,5 \text{ Gy/s}$, $c(\text{Na}_2\text{S}) = 0,2 \text{ mmol dm}^{-3}$, (●) $9c,12c-18:2$ metil linoleat, (●) $9t,12c-18:2$, metil linoleat, (●) $9c,12t-18:2$ metil linoleat, (●) $9t,12t-18:2$, metil linolelaidat

Zračenjem modelnog sustava u rasponu doza do 400 Gy izmjerene su vrlo male koncentracije LOOH u anaerobnim uvjetima, a geometrijska izomerizacija je prevladavajući proces. Udio nastalih izomera LH (slika 19.) značajno se mijenja s porastom doze zračenja. U neozračenom uzorku prisutna je samo *cis*-konfiguracija LH, $9c,12c-18:2$, a s porastom doze udio *cis*-izomera se smanjuje. Pri najvećoj dozi, od 400 Gy, u sustavu postoji značajan udio di *trans*-izomera, $9t,12t-18:2$. Istovremeno, nastaju dva mono *trans*-izomera, $9t,12c-18:2$ i $9c,12t-18:2$ kojih u sustavu ima u gotovo jednakim količinama.



Slika 20. Kromatogram izomera LH nastalih pri dozi od 400 Gy u aerobnim uvjetima, (1) 9*t*,12*t*-18:2, metil linolelaidat; (2) 9*t*,12*c*-18:2, metil linoleat; (3) 9*c*,12*t*-18:2 metil linoleat; (4) 9*c*,12*c*-18:2 metil linoleat

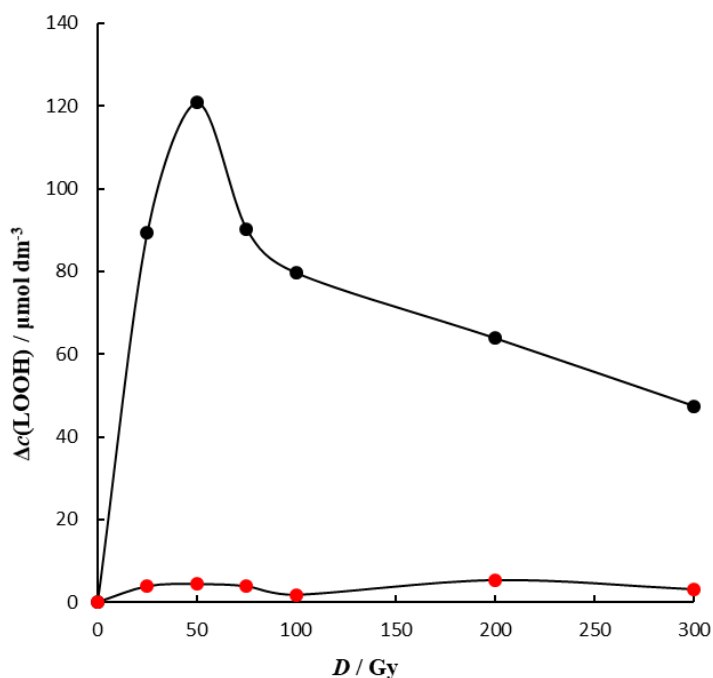


Slika 21. Kromatogram izomera LH nastalih pri dozi od 400 Gy u anaerobnim uvjetima, (1) 9*t*,12*t*-18:2, metil linolelaidat; (2) 9*t*,12*c*-18:2, metil linoleat; (3) 9*c*,12*t*-18:2 metil linoleat; (4) 9*c*,12*c*-18:2 metil linoleat

Na slikama 20. i 21. prikazani su kromatogrami geometrijskih izomera LH pri dozama od 400 Gy, u aerobnim i anaerobnim uvjetima. Na slici 20. vidi se kako prevladava *cis*-izomer, dok promjenom uvjeta u anaerobne (slika 21.), dominira nastanak *trans*-izomera.

4.1.2. Utjecaj brzine doze zračenja na procese lipidne peroksidacije i geometrijske izomerizacije u modelnom sustavu LH

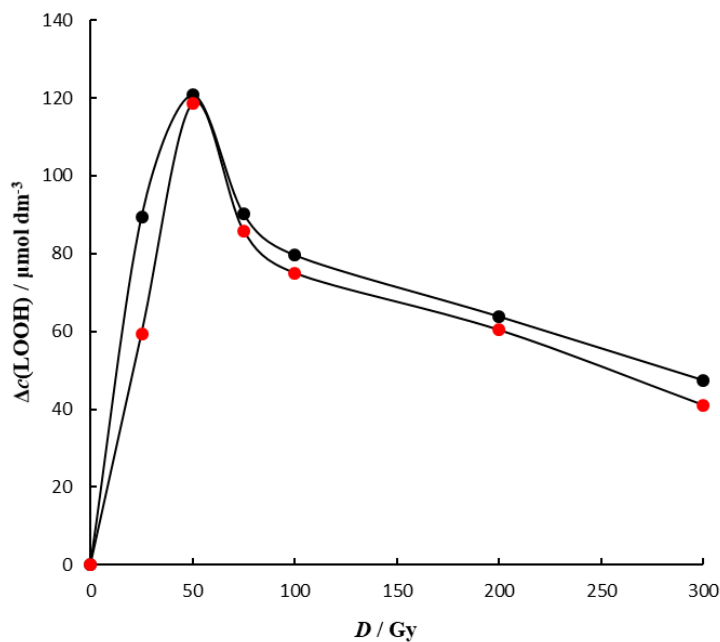
Na slici 22. vidljiv je utjecaj brzine doze na nastajanje LOOH u aerobnim i anaerobnim uvjetima. U aerobnim uvjetima, vidljivo je kako je proces lipidne peroksidacije primaran proces, dok promjenom uvjeta u anaerobne, nastaje značajno manja koncentracija LOOH. Promjenom brzine zračenja, najveća koncentracija LOOH nastaje ozračivanjem modelnog sustava LH dozom od 50 Gy, $120,77 \mu\text{mol dm}^{-3}$.



Slika 22. Utjecaj brzine doze zračenja na koncentraciju LOOH pri $pH = 5$, $P = 0,128 \text{ Gy/s}$, $c(\text{Na}_2\text{S}) = 0,2 \text{ mmol dm}^{-3}$, (•) aerobni uvjeti, (◦) anaerobni uvjeti

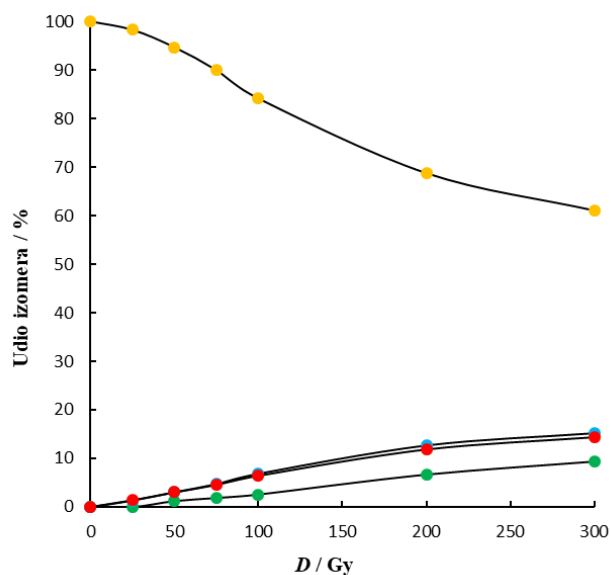
Na slici 23. uspoređeni su rezultati koncentracija nastalih LOOH pri dvije brzine doze 0,5 Gy/s i 0,128 Gy/s. Iz prikazanih krivulja vidljivo je da smanjenje brzine doze utječe na proces lipidne peroksidacije. Efikasnost stvaranja LOOH je veća kod manje brzine doze zračenja tj. kod istih doza zračenja, nastaju niže koncentracije LOOH uz veću brzinu doze.

U aerobnim uvjetima, prevladava lipidna peroksidacija, a koncentracija LOOH opada pri većim dozama zračenja.

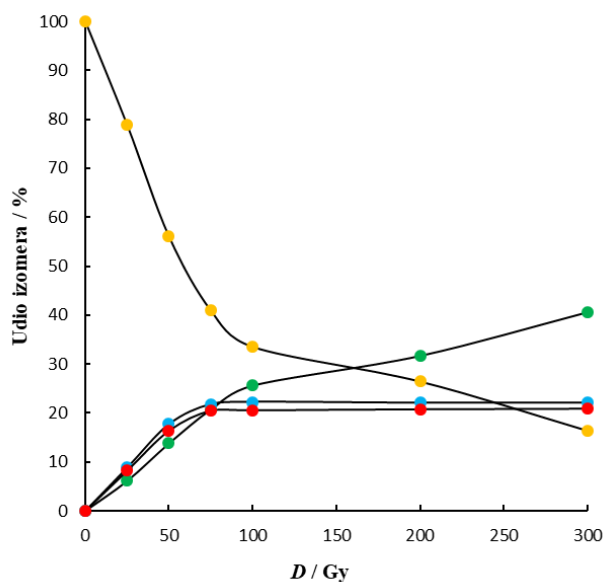


Slika 23. Utjecaj brzine doze zračenja na koncentraciju LOOH pri $pH = 5$, $c(Na_2S) = 0,2 \text{ mmol dm}^{-3}$, (\bullet) $P = 0,128 \text{ Gy/s}$, ($\color{red}\bullet$) $P = 0,5 \text{ Gy/s}$

Na slikama 24. i 25. prikazan je utjecaj brzine doze zračenja na raspodjelu geometrijskih izomera u aerobnim i anaerobnim uvjetima. U ravnoteži s kisikom iz zraka, u rasponu doze do 300 Gy, polako nestaje *cis*-konfiguracija dvostruke veze uz istovremeno nastajanje dva mono *trans*- i di *trans*- izomera. Geometrijska izomerizacija odvija se i u aerobnim i u anaerobnim uvjetima te je efikasnost izomerizacija približno 3 puta veća u uvjetima bez prisutnosti kisika.



Slika 24. Raspodjela geometrijskih izomera LH u ovisnosti o brzini zračenja pri aerobnim uvjetima, $pH = 5$, $P = 0,128 \text{ Gy/s}$, $c(\text{Na}_2\text{S}) = 0,2 \text{ mmol dm}^{-3}$, (●) 9c,12c-18:2 metil linoleat, (●) 9t,12c-18:2, metil linoleat, (●) 9c,12t-18:2 metil linoleat, (●) 9t,12t-18:2, metil linolelaidat

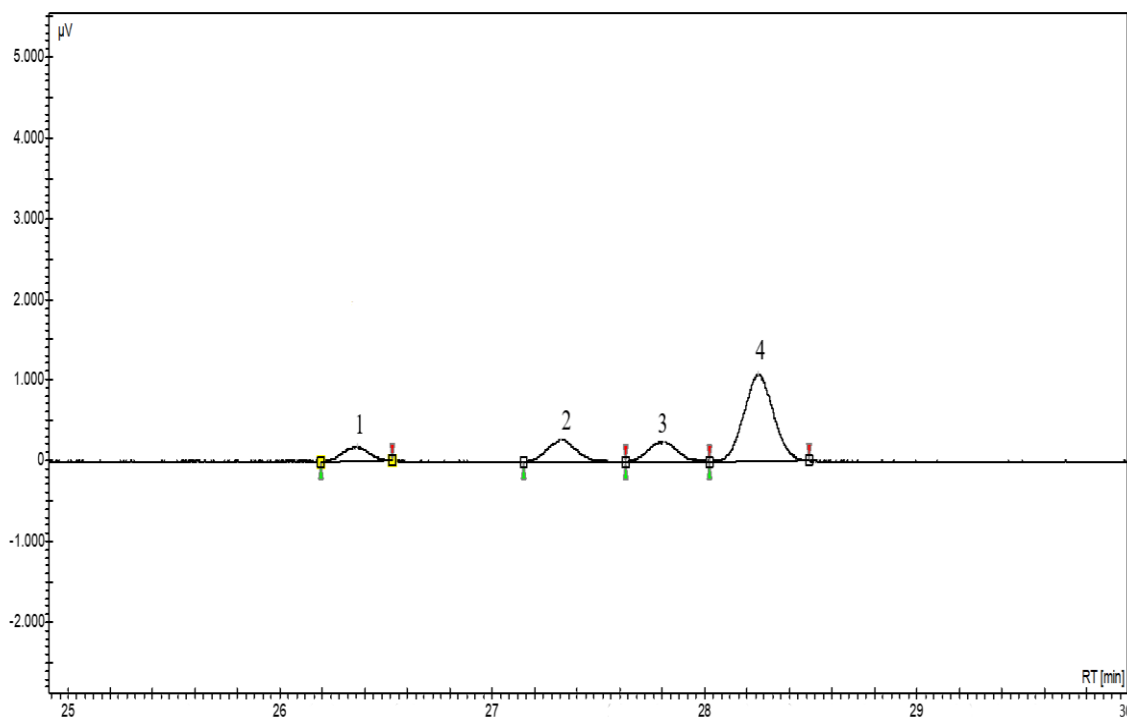


Slika 25. Raspodjela geometrijskih izomera LH u ovisnosti o brzini zračenja pri anaerobnim uvjetima, $pH = 5$, $P = 0,128 \text{ Gy/s}$, $c(\text{Na}_2\text{S}) = 0,2 \text{ mmol dm}^{-3}$, (●) 9c,12c-18:2 metil linoleat, (●) 9t,12c-18:2, metil linoleat, (●) 9c,12t-18:2 metil linoleat, (●) 9t,12t-18:2, metil linolelaidat

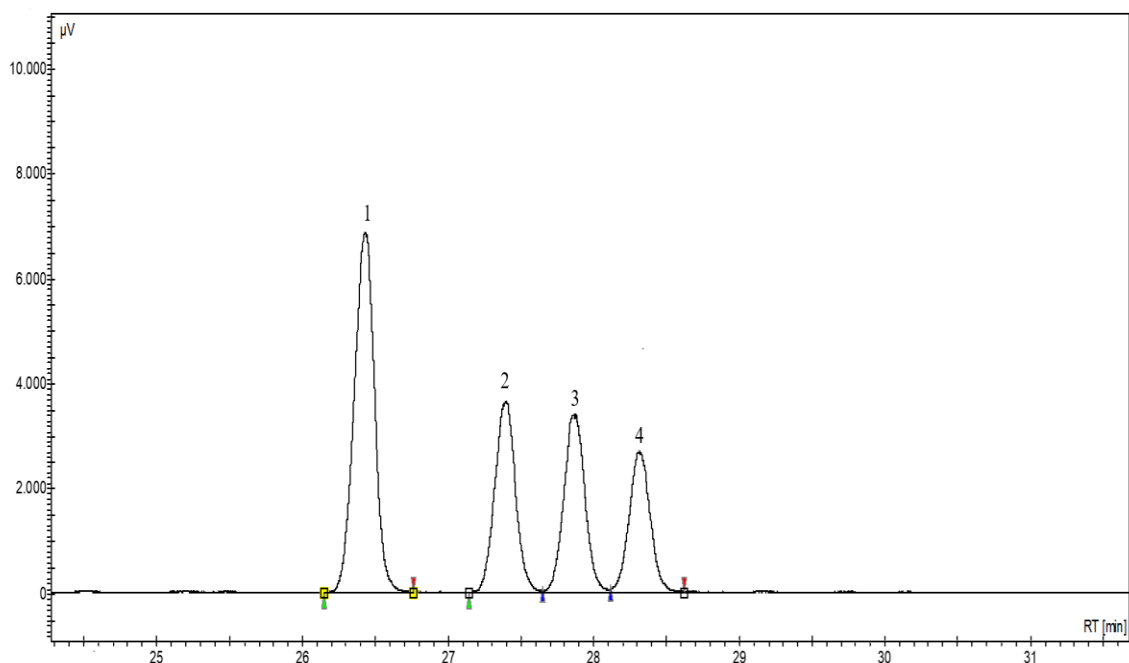
U aerobnim uvjetima, geometrijska izomerizacija nije dominantan proces pri zračenju manjim dozama. Do 50 Gy, gdje prevladava proces lipidne peroksidacije, proces

izomerizacije je potpuno inhibiran nakon čega dolazi do porasta mono *trans* i di *trans*-izomera. Najveći udio sume mono *trans*- i di *trans*-izomera je oko 35 % pri dozi od 300 Gy. Navedeni rezultat potvrđuje činjenicu da tioli imaju protektivnu ulogu jer mogu inhibirati lipidnu peroksidaciju stvarajući tiilne radikale, koji potom uzrokuju trajnu promjenu u strukturi izomerizirajući dvostruku vezu LH.

U uvjetima odsutnosti kisika u modelnom sustavu LH, pojavljuje se značajna geometrijska izomerizacija. Pri tim uvjetima, koncentracija LOOH je zanemarivo mala. S porastom doze nastaje sve više izomera di *trans*-konfiguracije. Pri najvišoj dozi, od 300 Gy, postotak di *trans*-izomera – 9*t*,12*t*-18:2 je najveći i iznosi 40,59 %, dok *cis*-izomera ima 16,44 %. Istovremeno nastaju i mono *trans*-izomeri kojih i u ovom slučaju ima u gotovo jednakim količinama, oko 21 %. Uspoređujući rezultate dobivene pri različitim brzinama doze, u anaerobnim uvjetima vidljivo je da je kod iste doze proces izomerizacije efikasniji kod manje brzine doze (Slika 19. i 25.).



Slika 26. Kromatogram izomera LH nastalih pri dozi od 300 Gy u aerobnim uvjetima, (1) 9*t*,12*t*-18:2, metil linolelaidat; (2) 9*t*,12*c*-18:2, metil linoleat; (3) 9*c*,12*t*-18:2 metil linoleat; (4) 9*c*,12*c*-18:2 metil linoleat

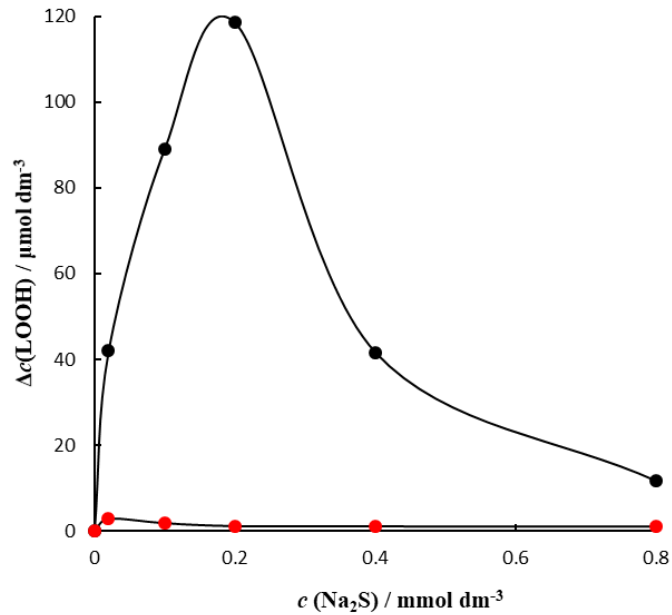


Slika 27. Kromatogram izomera LH nastalih pri dozi od 300 Gy u anaerobnim uvjetima, (1) 9*t*,12*t*-18:2, metil linoleaidat; (2) 9*t*,12*c*-18:2, metil linoleat; (3) 9*c*,12*t*-18:2 metil linoleat; (4) 9*c*,12*c*-18:2 metil linoleat

Na slikama 26. i 27. prikazani su kromatogrami nastalih izomera LH u aerobnim i anaerobnim uvjetima ozračivanjem modelnog sustava dozom od 300 Gy. Pri aerobnim uvjetima nastaje najveći udio *cis*- izomera te je lipidna peroksidacija predominantan proces, dok promjenom uvjeta u anaerobne nastaje najveći udio *trans*- izomera što geometrijsku izomerizaciju čini primarnim procesom.

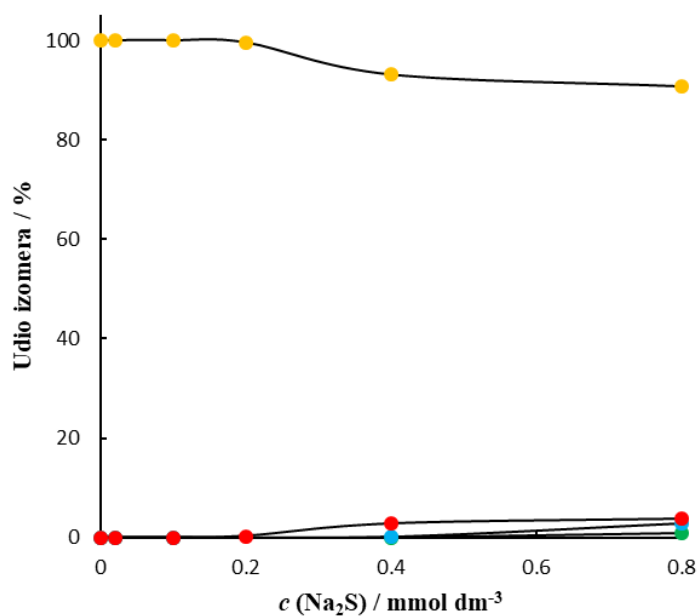
4.1.3. Utjecaj koncentracije Na₂S na procese lipidne peroksidacije i geometrijske izomerizacije u modelnom sustavu LH

Ispitan je utjecaj koncentracije Na₂S u modelnom sustavu LH koji je ozračen dozom od 50 Gy.

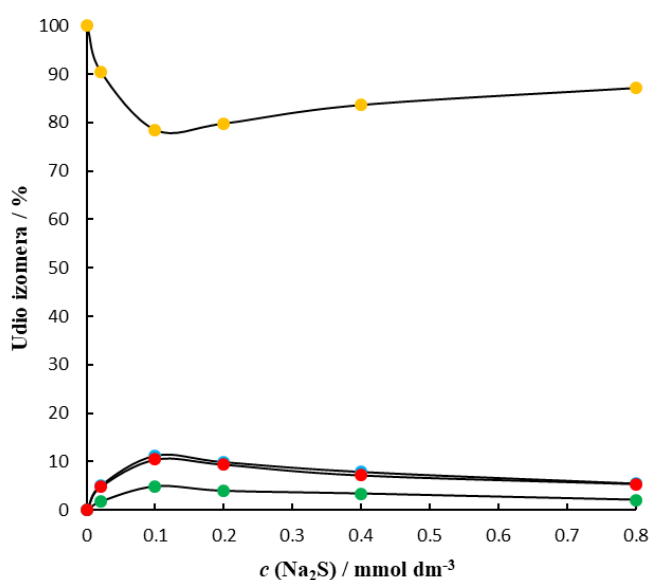


Slika 28. Utjecaj koncentracije Na_2S na nastajanje LOOH ozračivanjem dozom od 50 Gy pri $\text{pH} = 5$, $P = 0,5 \text{ Gy/s}$, (•) aerobni uvjeti, (•) anaerobni uvjeti

Slika 28. prikazuje ovisnost nastalih LOOH s variranjem koncentracije Na_2S u aerobnim i anaerobnim uvjetima. Kad je sustav u ravnoteži s kisikom iz zraka dolazi do porasta koncentracija LOOH u koncentracijskom rasponu do $0,2 \text{ mmol dm}^{-3}$ Na_2S , a s daljnjim povećavanjem koncentracije Na_2S nastaje sve manje LOOH te je vidljiva njegova protektivna uloga u procesu oksidacije. Visoke koncentracije Na_2S spriječavaju propagaciju procesa peroksidacije odnosno hvataju radikale koji mogu nastati razgradnjom LOOH. U anaerobnim uvjetima koncentracije LOOH su znatno manje.



Slika 29. Raspodjela geometrijskih izomera LH u ovisnosti o koncentraciji Na_2S pri aerobnim uvjetima, $D = 50 \text{ Gy}$, $\text{pH} = 5$, $P = 0,5 \text{ Gy/s}$, (●) 9c,12c-18:2 metil linoleat, (●) 9t,12c-18:2, metil linoleat, (●) 9c,12t-18:2 metil linoleat, (●) 9t,12t-18:2, metil linoleleaidat



Slika 30. Raspodjela geometrijskih izomera LH u ovisnosti o koncentraciji Na_2S pri anaerobnim uvjetima, $D = 50 \text{ Gy}$, $\text{pH} = 5$, $P = 0,5 \text{ Gy/s}$, (●) 9c,12c-18:2 metil linoleat, (●) 9t,12c-18:2, metil linoleat, (●) 9c,12t-18:2 metil linoleat, (●) 9t,12t-18:2, metil linoleleaidat

Na slikama 29. i 30. prikazana je raspodjela geometrijskih izomera LH ovisno o promjeni koncentracije Na_2S u aerobnim i anaerobnim uvjetima. U ravnoteži sustava s kisikom iz zraka proces geometrijske izomerizacije se odvija sporo te kod najveće

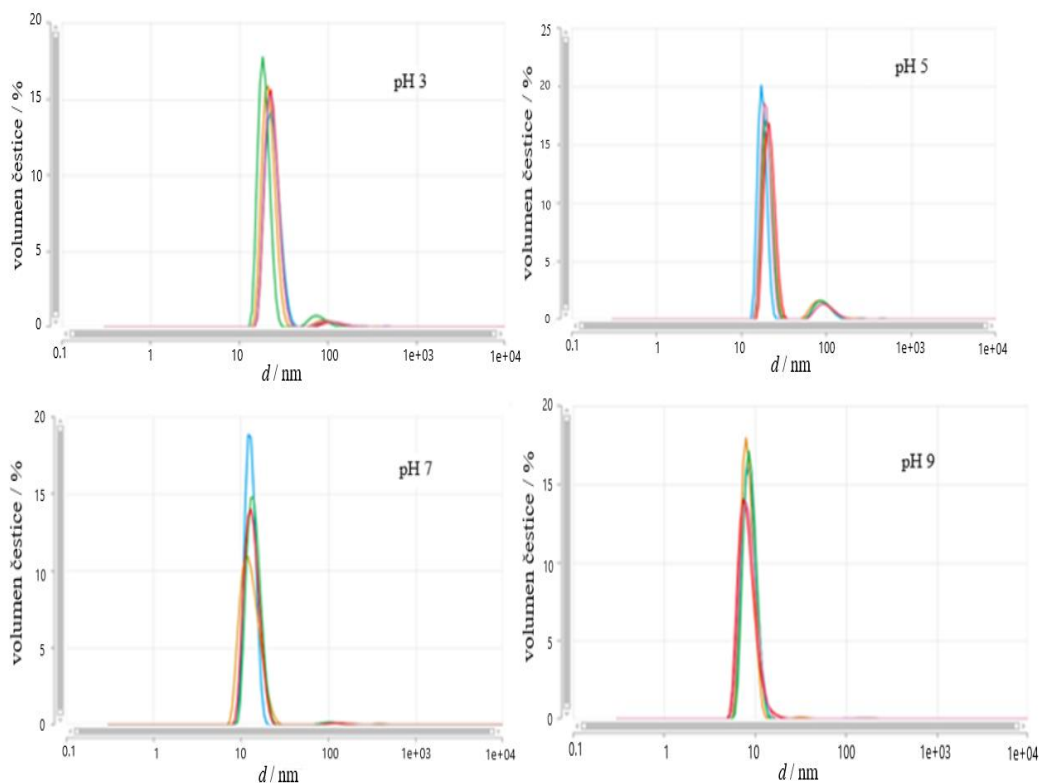
upotrebljene koncentracije Na₂S nastaje samo 10 % svih *trans*-izomera (di *trans* i mono *trans*-izomera). Promjenom uvjeta u anaerobne, raspodjela geometrijskih izomera LH varira s promjenom koncentracije Na₂S. Vidljivo je da i male koncentracije Na₂S djelotvorno iniciraju *cis*, *trans*-izomerizaciju. Najviše *trans*-izomera ima pri 0,1 mmol dm⁻³ koncentraciji Na₂S, dok daljnjim porastom koncentracije, njegov udio opada.

4.2. Veličina čestica i Zeta potencijal

Tween[®] -20 (slika 13.) je neionski tenzid te u vodi stvara micelle. Unutar micelle Tween[®] -20 nalaze se hidrofobni lanci, a na vanjskom hidrofilnom dijelu nalaze se oksietilenske skupine. Otapanjem masne kiseline u micelama površinski aktivne tvari hidrofobni dio masne kiseline se smješta u unutrašnjosti micelle, a hidrofilni dio prema vanjskom vodenom sloju.

4.2.1. Veličine čestica micela pri različitim pH vrijednostima otopina

Pripremljena su četiri modelna sustava konstantnih koncentracija LH ($c = 5 \times 10^{-4}$ mol dm⁻³) i Tween[®] -20 ($c = 2,8 \times 10^{-4}$ mol dm⁻³) pri pH 3, 5, 7 i 9 te je izmjerena veličina čestica. Na slici 31. prikazan je hidrodinamički promjer modelnog sustava LH.



Slika 31. Prikaz raspodjele veličine čestice po volumenu pri različitom pH modelnog sustava LH

Rezultati dobiveni DLS mjerenjem pokazuju promjenu veličine micela s promjenom pH otopine. Hidrodinamički promjer miješanih micela pri pH 3 i 5 je približno jednak (Tablica 1).

Tablica 1. Utjecaj pH na veličinu micela

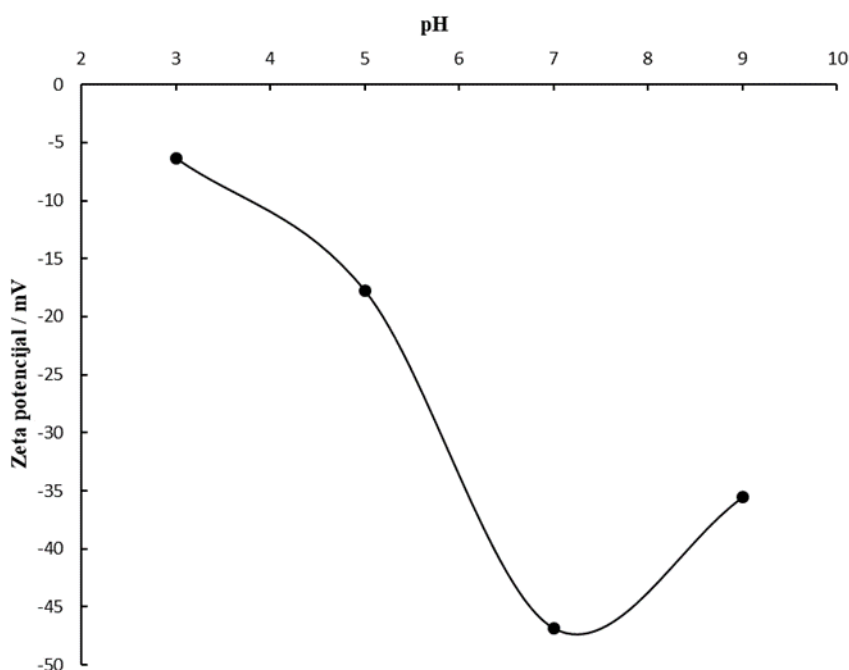
pH	d / nm
3	$22,50 \pm 2,04$
5	$20,02 \pm 1,49$
7	$13,52 \pm 0,57$
9	$8,65 \pm 0,26$

Porastom pH vrijednosti na 5 pojavljuju se dvije vrste čestica, jedna čiji je promjer približno jednak veličini micela pri pH 3, $d = (20,02 \pm 1,49)$ nm i nešto veće čestice veličine $(96,51 \pm 3,66)$ nm. Treba napomenuti da udio čestica većeg promjera nije velik i iznosi oko 13 %. Daljnjim porastom pH vrijednosti veličina čestica se značajno smanjuje, pri pH 9

hidrodinamički promjer iznosi oko 9 nm. Dobivena vrijednost odgovara promjeru micela Tween–20 jer je pri visokim pH vrijednostima masna kiselina potpuno disocirana. Kod nižih pH vrijednosti LH se otapa u micelama Tween–20 pri čemu nastaju miješane micelle čija je veličina očekivano veća od micela samog tenzida.

4.2.2. Zeta potencijal pri promjeni pH otopina

U pripremljenim modelnim sustavima LH različitih pH vrijednosti izmjeren je i zeta potencijal. Na slici 32. vidljiv je utjecaj pH modelnog sustava LH na vrijednosti zeta potencijala. Modelni sustav LH je blago negativnog naboja do pH 5 zbog prisutnosti deprotoniranih karboksilnih skupina u hidrofilnom sloju. Povećanjem pH otopine dolazi do disocijacije LH u modelnom sustavu micela.

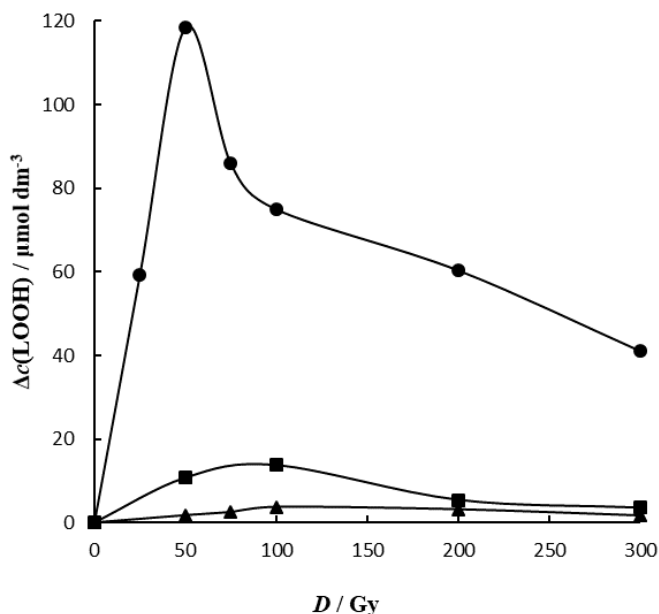


Slika 32. Utjecaj pH na zeta potencijal miješanih micela

Zeta potencijal ima sve negativniji naboj s porastom pH otopina. Tako pri pH 9, on iznosi – 35,56 mV, što se može pripisati i promjeni u ionskoj jakosti otopine prilikom podešavanja pH otopine dodatkom NaOH. Iz navedenih rezultata se može zaključiti da je modelni sustav LH stabilan u blago kiselim i kiselim uvjetima.

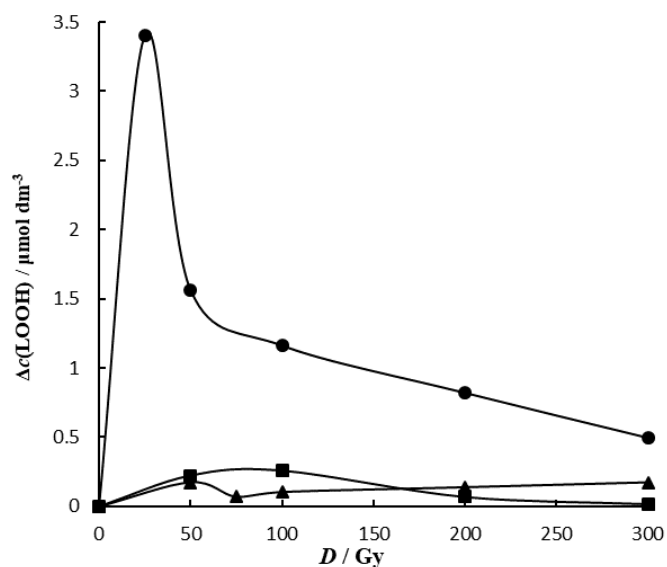
4.2.3. Utjecaj pH na procese lipidne peroksidacije i geometrijske izomerizacije u modelnom sustavu LH

U navedenim sustavima LH ispitan je utjecaj pH na procese lipidne peroksidacije i geometrijske izomerizacije.



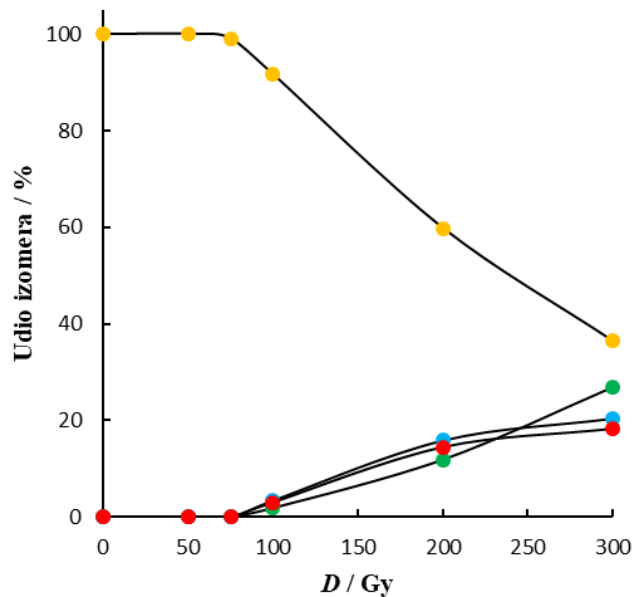
Slika 33. Promjena koncentracije LOOH nastalih promjenom pH u aerobnim uvjetima, $P = 0,5 \text{ Gy/s}$, $c(\text{Na}_2\text{S}) = 0,2 \text{ mmol dm}^{-3}$, (●) pH = 5, (■) pH = 3, (▲) pH = 7

Rezultati prikazani na slikama 33. i 34. prikazuju koncentracije LOOH ovisno o promjeni pH u modelnom sustavu LH, u aerobnim i anaerobnim uvjetima. Zračenjem modelnog sustava pri pH 3, 5 i 7 očekivano nastaju zanemarive koncentracije LOOH u anaerobnim uvjetima dok se u ravnoteži sa zrakom može pratiti proces peroksidacije. Podložnost oksidaciji modelnog sustava LH ovisi o pH sustava. Manja koncentracija LOOH nastaje u jako kiselim i neutralnim otopinama u usporedbi s pH 5 gdje nastaju mikromolarne koncentracije LOOH. Prema dobivenim rezultatima promjenom pH, koncentracija nastalih LOOH smanjuje se u nizu: pH 5 > pH 3 > pH 7.

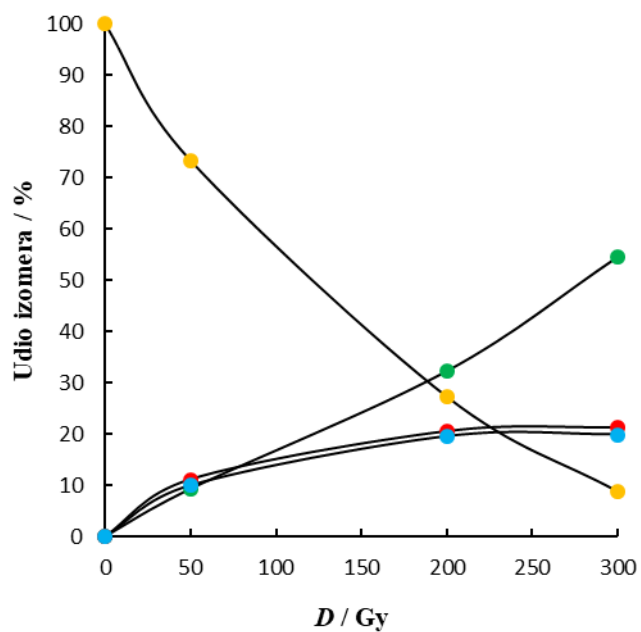


Slika 34. Promjena koncentracije LOOH nastalih promjenom pH u anaerobnim uvjetima, $P = 0,5 \text{ Gy/s}$, $c(\text{Na}_2\text{S}) = 0,2 \text{ mmol dm}^{-3}$, (●) pH = 5, (■) pH = 3, (▲) pH = 7

Na slikama 35. i 36. prikazana je raspodjela geometrijskih izomera LH kod pH 3 u aerobnim i anaerobnim uvjetima.

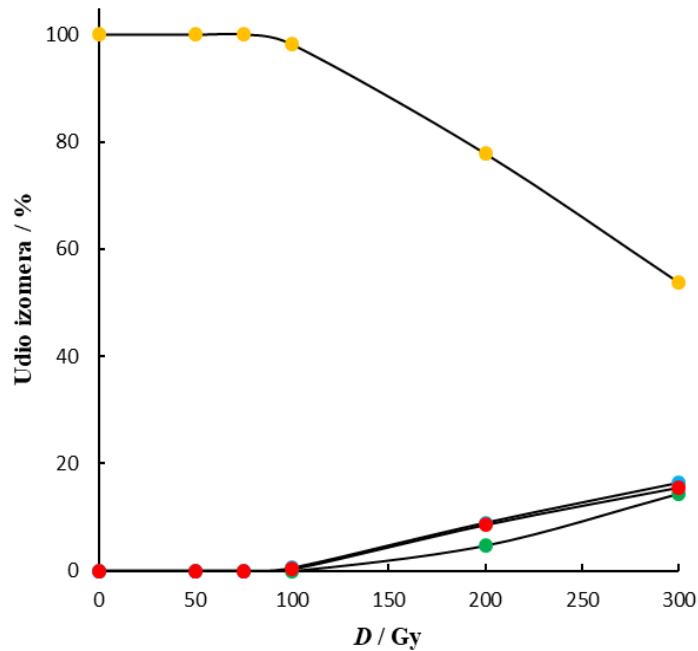


Slika 35. Raspodjela geometrijskih izomera LH pri pH = 3 u aerobnim uvjetima, $P = 0,5 \text{ Gy/s}$, $c(\text{Na}_2\text{S}) = 0,2 \text{ mmol dm}^{-3}$ (●) 9c,12c-18:2 metil linoleat, (●) 9t,12c-18:2, metil linoleat, (●) 9c,12t-18:2 metil linoleat, (●) 9t,12t-18:2, metil linolealaidat

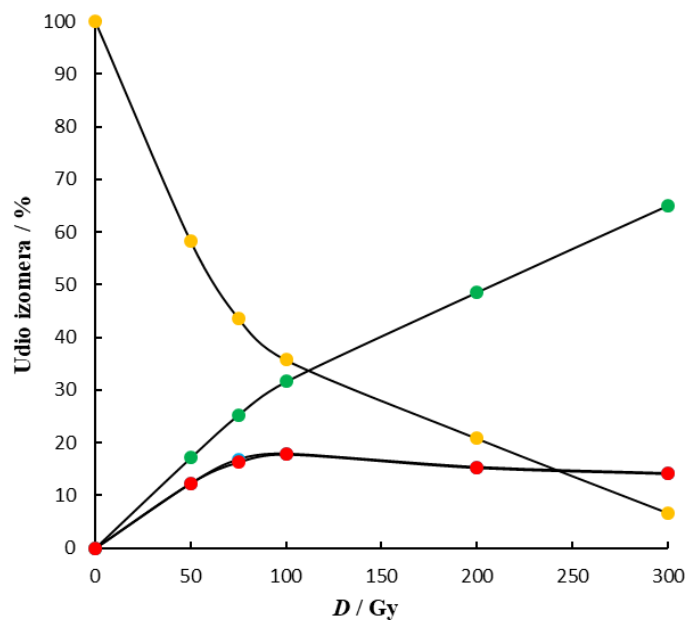


Slika 36. Raspodjela geometrijskih izomera LH pri pH = 3 u anaerobnim uvjetima, $P = 0,5$ Gy/s, $c(\text{Na}_2\text{S}) = 0,2 \text{ mmol dm}^{-3}$ (•) 9c,12c-18:2 metil linoleat, (•) 9t,12c-18:2, metil linoleat, (•) 9c,12t-18:2 metil linoleat, (•) 9t,12t-18:2, metil linolelaidat

Na slikama 37. i 38. prikazana je raspodjela geometrijskih izomera LH pri pH 7 u aerobnim i anaerobnim uvjetima.



Slika 37. Raspodjela geometrijskih izomera LH pri pH = 7 u aerobnim uvjetima, $P = 0,5$ Gy/s, $c(\text{Na}_2\text{S}) = 0,2 \text{ mmol dm}^{-3}$ (●) 9c,12c-18:2 metil linoleat, (●) 9t,12c-18:2, metil linoleat, (●) 9c,12t-18:2 metil linoleat, (●) 9t,12t-18:2, metil linolelaidat



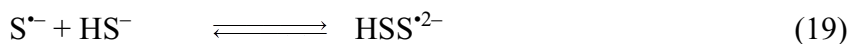
Slika 38. Raspodjela geometrijskih izomera LH pri pH = 7 pri anaerobnim uvjetima, $P = 0,5$ Gy/s, $c(\text{Na}_2\text{S}) = 0,2 \text{ mmol dm}^{-3}$ (●) 9c,12c-18:2 metil linoleat, (●) 9t,12c-18:2, metil linoleat, (●) 9c,12t-18:2 metil linoleat, (●) 9t,12t-18:2, metil linolelaidat

Efikasnost izomerizacije ovisi o pH vrijednosti modelnog sustava LH. Kod pH 3 u aerobnim uvjetima prevladava *cis*-izomer (Slika 35.) i proces izomerizacije je inhibiran do 100 Gy. S daljnjim povećanjem doze zračenja, udio *cis*-izomera se smanjuje, a istovremeno nastaju mono *trans*- i di *trans*-izomeri, što nije prisutno pri pH 5 gdje prevladava *cis*-konfiguracija. Približavanjem neutralnim uvjetima, vidljiv je sličan trend kao pri pH 3. Prema rezultatima, udio *cis*-geometrijskih izomera smanjuje se redom: pH 5 > pH 7 > pH 3, dok obrnutim redoslijedom di *trans*- izomera ima sve više u uvjetima ravnoteže sa zrakom.

Promjenom uvjeta u anaerobne, očekivano se odvija geometrijska izomerizacija koji je predominantan proces. γ -radiolizom u N₂O zasićenim otopinama prevladavaju reaktivne vrste, H[•] i [•]OH koji potom stupaju u reakciju s H₂S/HS⁻ s konstantama brzina reakcija 10¹⁰ M⁻¹ s⁻¹.



pK_a vrijednost HS[•] nije poznat, iako je poznato da u neutralnim otopinama prevladava S^{•-} te se reverzibilno adira na HS⁻ stvarajući dimer radikala HS[•]/S^{•-}.



Slično ponašanje modelnih LH sustava pri pH 3 i 7 se može pripisati nastajanju sulfhidrilnog radikala koji ima mogućnost migriranja u hidrofobni dio micela, u blizini dvostruke veze LH uzrokujući efikasnu izomerizaciju.

Pri pH 3 i 7, povećavanjem doze zračenja, udio di *trans*-izomera raste, dok istovremeno udio *cis*-izomera opada. U oba slučaja, nastaju gotovo jednaki udjeli dva mono *trans*-izomera (oko 20 % za pH 3 i oko 14 % za pH 7). Navedeni rezultat predstavlja postojanje supramolekulske organizacije masne kiseline u micelama.

5. ZAKLJUČAK

Lipidi su važne biomolekule koje izgrađuju staničnu membranu svih živih bića. Stanična membrana ima dvije vrlo važne funkcije, prva je da djeluje kao prepreka za prolazak iona, vode i drugih molekula u stanicu i iz nje, a druga da je selektivno propusna što znači da propušta hranjive tvari pa tako svaka promjena u njenom sastavu i strukturi može utjecati na organizam. Masne kiseline, odnosno njihovi esteri izgrađuju staničnu membranu kao glavne komponente fosfolipida. Promjene u njihovim strukturama dovode do promjena u funkciji membrane i njezinim svojstvima bitnima za sve organizme.

Nezasićene masne kiseline podložne su peroksidaciji, procesu koji je zajednički naziv za niz radikalskih reakcija u kojima je kisik reaktant. Uslijed oksidativnog stresa dolazi do unutarstanične neravnoteže prooksidansa/antioksidansa što rezultira peroksidacijom lipida. Tim procesom nastaju produkti koji dovode do oštećenja biomembrana i stanične smrti.

Istovremeno, nezasićene masne kiseline podložne su geometrijskoj izomerizaciji zbog dvostrukih veza pri čemu prirodna *cis*-konfiguracija dvostruke veze izomerizira u *trans*-konfiguraciju. Proces je ireverzibilan i štetan za stanice.

U ovom diplomskom radu, usporedno se proučavao utjecaj radikala sumpora na procese lipidne peroksidacije i geometrijske izomerizacije u modelnom lipidnom sustavu micela. Modelni sustav priređen je iz linolne kiseline i neionskog tenzida Tween-20, uz inicijaciju γ -zračenjem pri različitim eksperimentalnim uvjetima. Na₂S je služio kao izvor radikala sumpora u vodenim otopinama.

Oba procesa proučavala su se u aerobnim i anaerobnim uvjetima s promjenom pH, brzine doze zračenja i koncentracije Na₂S. Lipidna peroksidacija je dominantan proces u aerobnim uvjetima, a koncentracija nastalih LOOH ovisi o pH modelnog sustava. Najviša koncentracija LOOH nastaje pri pH 5. Istovremeno, pri većim dozama zračenja – od 100 do 400 Gy, dolazi do terminacije peroksidacije i vidljiv je nastanak mono *trans*- i di *trans*-izomera. Promjenom uvjeta u anaerobne, koncentracije LOOH su na granici detekcije feritiocijanatnom metodom. Anaerobni uvjeti pogoduje nastanku pripadajućih geometrijskih izomera LH pri svim ispitanim pH vrijednostima modelnog sustava.

Brzina doze zračenja utječe na proces lipidne peroksidacije i to tako da primjenom manje brzine doze nastaju veće koncentracije LOOH u aerobnim uvjetima. U anaerobnim uvjetima je geometrijska izomerizacija efikasnija kod manje brzine doze zračenja.

Variranjem koncentracije Na₂S do 0,2 mmol dm⁻³, u aerobnim uvjetima, prevladava propagacija lipidne peroksidacije, a inicijacija *trans*-izomerizacije s porastom koncentracije Na₂S se odvija sporo. U anaerobnim uvjetima nastaje zanemariva koncentracija LOOH, a geometrijska izomerizacija je dominantan proces.

Veličina čestica se smanjuje s porastom pH vrijednosti modelnog sustava. U kiselim i blago kiselim otopinama, LH je otopljena u micelama tenzida te se formiraju miješane micelle veličine oko 20 nm. S porastom pH veličina micela se smanjuje te pri pH 9 prevladavaju čestice promjera 9 nm. Također, promjenom pH otopina, mijenja se i zeta potencijal čestica. Modelni sustav je blago negativan pri nižim pH, a porastom pH sustav ima sve negativniji naboj.

Navedena istraživanja lipidne peroksidacije i geometrijske izomerizacije ukazuju na važnost proučavanja i razmatranja oba procesa u jednostavnim i složenijim modelnim sustavima kako bi se bolje razumijeli procesi na staničnoj razini.

6. LITERATURA

1. J. Gorzynski Smith, *Organic Chemistry*, McGraw-Hill, New York, Third Edition, 2011.
2. B. Mihaljevic, I. Tartaro, C. Ferreri, C. Chatgililoglu, *Organic & Biomolecular Chemistry*, **9** (2011) 3541.
3. S. N. Desai, F. F. Farris, S. D. Ray, *Encyclopedia of Toxicology*, **3** (2014) 89-93.
4. I. N. Lykakis, C. Ferreri, C. Chatgililoglu, *Chemie International Edition*, **46** (2007) 1914-1916.
5. H. Yoon, J. L. Shaw, M. C. Haigis, A. Greka, *Molecular Cell*, **81** (2021) 3708-3730.
6. J. W. Fuquay, P. L. H. McSweeney, P. F. Fox, *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Academic Press, Second Edition, 2011.
7. F. Shahidi, P. Ambigaipalan, *Annual Review of Food Science and Technology*, **9** (2018) 345-381.
8. M. Gong, W. Wei, Y. Hu, Q. Jin, X. Wang, *Journal of Chromatography B*, **1153** (2020) 122292.
9. W. Zhang, F. Zhou, H. Huang, Y. Mao, D. Ye, *Nutrition*, **79-80** (2020) 110953.
10. J. Whelan, K. Fritsche, *Advances in Nutrition*, **4** (2013) 3
11. B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, *Free radicals in biology & medicine*, Oxford University Press, New York, Fifth Edition, 2015.
12. L. Štefan, T. Tepšić, T. Zavidčić, M. Urukalo, D. Tota, R. Domitrović, *Medicina*, **43** (2007) 84-93
13. A. W. Girotti, *Journal of Free Radicals in Biology and Medicine*, **1** (1985) 87-95.
14. G. W. Buxton, u P. Rigny (ur.), *Radiation Chemistry*, EDP Sciences, 2008, str 3–17.
15. N. A. Porter, B. A. Weber, H. Weenen, J. A. Khan, *Journal of American Chemical Society*, **102** (1980) 5597– 5601.
16. B. Mihaljević, D. Ražem, *Croatica Chemica Acta*, **76** (2003) 249-255.
17. B. Mihaljević, B. Katušin-Ražem, D. Ražem, *Free Radical Biology & Medicine*, **21** (1996) 53-63.
18. R. Chekin, D. Rengel, J. C. G. Milicua, F. M. Goni, J. L Arrondo, G. Pifat, *Journal of Lipid Research*, **42** (2001) 778–782.
19. C. Ferreri, C. Constantino, L. Perrotta, L. Landi, Q. G. Mulazzani, C. Chatgililoglu, *Journal of American Chemical Society*, **123** (2001) 4459–4468.

20. W-L. Hung, L. S. Hwang, F. Shahidi, M-H. Pan, Y. Wang, C-T. Ho, *Journal of Functional Foods*, **25** (2016) 14-24.
21. Y. A. A. El-Aal, D. M. Abdel-Fattah, K. E-D. Ahmed, *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, **13** (2019) 1753-1757.
22. C. Ferreri, C. Chatgililoglu, *Chem. Bio. Chem.*, **6** (2005) 1722-1734.
23. E. Cuevasanta, M.N. Möller, B. Alvarez, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **617** (2016) 9-25.
24. R.O. Beauchamp, J.S. Bus, J.A. Popp, C.J. Boreiko, D.A. Andjelkovich, *Critical Reviews in Toxicology*, **13** (1984) 25–97.
25. S. M. Schreier, M. K. Muellner, H. Steinkellner, M. Hermann, H. Esterbauer, M. Exner, B. M. K. Gmeiner, S. Kapiotis, H. Laggner, *Springer Science+Business Media*, **17** (2009) 249-256.
26. S. Longen, K. F. Beck, J. Pfeilschifter, *Pharmacological Research*, **111** (2016) 642-651.
27. D. Harvey, *Modern Analytical Chemistry*, McGraw-Hill, New York, 2000.
28. E. M. Pliss, M. E. Soloviev, D. V. Loshadkin, S. V. Molodochkina, O. T. Kasaikina, *Chemistry and Physics of Lipids*, **237** (2021) 105089.
29. M. Majer, M. Roguljić, Ž. Knežević, A. Starodumov, D. Ferenček, V. Brigljević, B. Mihaljević, *Applied radiation and isotopes*, **154** (2019) 108824.
30. Diazald, MNNG, and Diazomethane Generators, Aldrich Technical Bulletin No. AL-180, Aldrich, Milwaukee, WI, 1993.

7. PRILOZI

1. ^{60}Co – radioizotop kobalt–60
2. c – koncentracija
3. CBS – cistationin– β sintaza
4. CGL – cistationin γ –liaza
5. D – difuzijski koeficijent
6. d_h – hidrodinamički promjer čestice
7. DLS – dinamičko raspršenje svjetla (*Dynamic Light Scattering*)
8. E – energija
9. FID – plameno–ionizacijski detektor (*Flame Ionization Detector*)
10. G – vrijednost, radijacijsko – kemijski prinos
11. GC – plinska kromatografija (*Gas Chromatography*)
12. GC–MS – plinska kromatografija spregnuta s masenom spektrometrijom (*Gas Chromatography – Mass Spectrometry*)
13. Gy – grej (*Gray*), mjerna jedinica za apsorbiranu dozu zračenja
14. Gy/s – mjerna jedinica za brzinu apsorbirane doze ionizirajućeg zračenja
15. H_2S – sumporovodik (*Hydrogen Sulfide*)
16. HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (*High Performance Liquid Chromatography*)
17. IR – infracrvena spektroskopija (*Infrared spectroscopy*)
18. k_b – Boltzmanova konstanta
19. L^\bullet – bis–alilni ili pentadienilni radikal
20. LC–MS/MS – tekućinska kromatografija spregnuta s tandemskom masenom spektrometrijom (*Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry*)
21. LH – linolna kiselina
22. LOO^\bullet – konjugirani peroksilni radikal
23. LOOH – lipidni hidroperoksid
24. MADLS – (*Multiple Angle Dynamic Light Scattering*)
25. MeLi – metilni ester linolne kiseline
26. mol J^{-1} – mjerna jedinicu za radijacijsko – kemijski prinos
27. MUFA – mononezasićene masne kiseline (*Monounsaturated Fatty Acids*)
28. n – broj prisutnih dvostrukih veza
29. $n(x)$ – množina tvari koja nastaje, nestaje ili se kemijski mijenja apsorpcijom

30. P – brzina doze zračenja
31. PUFA – višenezasićene masne kiseline (*Polyunsaturated Fatty Acids*)
32. R – organska skupina
33. RSS – reaktivne sumporove vrste (*Reactive Sulfur Species*)
34. RNS – reaktivne dušikove vrste (*Reactive Nitrogen Species*)
35. ROS – reaktivne kisikove vrste (*Reactive Oxygen Species*)
36. SFA – zasićene masne kiseline (*Saturated Fatty Acids*)
37. T – apsolutna temperatura
38. TLC – kolonska kromatografija (*Thin Layer Chromatography*)
39. U_e – elektroforetska pokretljivost
40. UV/VIS – ultraljubičasta–vidljiva spektroskopija (*Ultraviolet–visible spectroscopy*)
41. ZS – ZetaSizer
42. γ – gama zračenje
43. Δ – delta, dvostruka veza u lancu masne kiseline brojanjem od karboksilne kiseline
44. ε – dielektrična konstanta
45. ζ – zeta potencijal
46. η – viskoznost otapala
47. λ – valna duljina
48. ω – omega, položaj prve dvostruke veze od metilnog kraja acilnog lanca