

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO



SARA ISLAMOVIC

**VREDNOTENJE STRUKTURE LIOTROPNIH  
TEKOČIH KRISTALOV Z ELEKTRONSKO  
PARAMAGNETNO REZONANCO**

**STRUCTURAL EVALUATION OF LYOTROPIC LIQUID  
CRYSTALS USING ELECTRON PARAMAGNETIC  
RESONANCE**

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2017

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko kemijo, pod mentorstvomizr. prof. dr. Janeza Mravljaka, mag. farm. in na Katedri za farmacevtsko tehnologijo, pod somentorstvom doc. dr. Mirjam Gosenca Matjaž, mag. farm. Analizo tekočih kristalov z elektronsko paramagnetno resonanco sem opravljala na Institutu Jožef Stefan, pod vodstvom dr. Marjete Šentjurg.

Iskreno se zahvaljujem mentorjuizr. prof. dr. Janezu Mravljaku in somentorici doc. dr. Mirjam Gosenca Matjaž za njuno dostopnost, vsestransko pomoč in strokovne nasvete, tako v laboratoriju kot pri pisanju diplome.

Najlepše se zahvaljujem dr. Marjeti Šentjurg za pomoč pri izvedbi in interpretaciji rezultatov EPR analize.

Želela bi se zahvaliti tudi staršem, sestri Taji in fantu Roku za vzpodbudo, podporo in razumevanje skozi celoten študij.

## **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvomizr. prof. dr. Janeza Mravljaka, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Mirjam Gosenca Matjaž, mag. farm.

Sara Islamović

Ljubljana, 2017

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Samo Kreft, mag. farm.

Član diplomske komisije: asist. dr. Janja Zupan, mag. farm.

# VSEBINA

<b>POVZETEK</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>v</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV</b> .....	<b>vi</b>
<b>1 UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 TEKOČI KRISTALI</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 LIOTROPNI TEKOČI KRISTALI .....	<b>2</b>
1.1.1.1 Faze liotropnih TK.....	<b>3</b>
<b>1.2 METODE ZA DOLOČANJE FIZIKALNO-KEMIJSKIH LASTNOSTI</b> <b>TEKOČIH KRISTALOV</b> .....	<b>5</b>
1.2.1 OPTIČNA POLARIZACIJSKA MIKROSKOPIJA .....	<b>6</b>
1.2.2 DIFERENČA DINAMIČNA KALORIMetriJA (DSC).....	<b>6</b>
1.2.3 OZKOKOTNO RENTGENSKO SIPANJE (SAXS).....	<b>7</b>
1.2.4 REOLOGIJA .....	<b>7</b>
<b>1.3 ELEKTRONSKA PARAMAGNETNA REZONANCA</b> .....	<b>9</b>
<b>2 NAMEN DELA</b> .....	<b>16</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>17</b>
<b>3.1 MATERIALI</b> .....	<b>17</b>
3.1.1 SESTAVINE ZA IZDELAVO TEKOČIH KRISTALOV.....	<b>17</b>
3.1.2 RAZTOPINE SPINSKIH OZNAČEVALCEV.....	<b>19</b>
<b>3.2 PRIPRAVA TEKOČIH KRISTALOV S SPINSKIMI OZNAČEVALCI</b> .....	<b>21</b>
<b>3.3 METODE ZA VREDNOTENJE TK Z EPR</b> .....	<b>22</b>
3.3.1 MERITVE DINAMIKE SPINSKIH OZNAČEVALCEV.....	<b>22</b>
3.3.2 ANALIZA EPR SPEKTROV .....	<b>24</b>
<b>4 REZULTATI IN RAZPRAVA</b> .....	<b>26</b>
<b>4.1 IZBIRA SPINSKIH OZNAČEVALCEV</b> .....	<b>26</b>
<b>4.2 VREDNOTENJE MAKSIMALNEGA HIPERFINEGA RAZCEPA</b> .....	<b>29</b>
<b>4.3 SIMULACIJE EPR SPEKTROV</b> .....	<b>33</b>
4.3.1 ANALIZA TK OZNAČENIH S SO 5P .....	<b>33</b>
4.3.2 ANALIZA TK OZNAČENIH S SO 10P .....	<b>38</b>
<b>5 SKLEPI</b> .....	<b>50</b>
<b>6 VIRI IN LITERATURA</b> .....	<b>52</b>
<b>7 PRILOGE</b> .....	<b>56</b>

## POVZETEK

Liotropni tekoči kristali so kot nosilni sistemi zdravilnih učinkovin za dermalno, parenteralno in oralno dostavo v današnjem času pogost predmet znanstvenega raziskovanja. Nastajajo spontano z dodajanjem topila (voda/olje) amfifilnim molekulam. Mezofaze, ki jih tvorijo, ločimo glede na razporeditev molekul v topilu in jih delimo na heksagonalne, kubične in lamelarne faze. Vsaka faza ima značilne fizikalno-kemijske lastnosti, ki jih proučujemo z različnimi analiznimi metodami. Najpogosteje se uporablja kombinacija več različnih tehnik, katerih rezultati se med seboj dopolnjujejo in so zato bolj zanesljivi.

V okviru magistrske naloge smo proučevali supramolekularno strukturo tekočih kristalov, sestavljenih iz emulgatorske zmesi lecitina in Tweena 80<sup>®</sup>, oljne faze izopropilmiristata in vode, z metodo elektronske paramagnetne resonance. V sisteme smo vgradili različne spinske označevalce, ki poročajo o dogajanju v specifičnem lokalnem okolju supramolekularnih struktur v katerem se nahajajo. Spektre vzorcev smo posneli pri temperaturah v območju med 22 °C in 62 °C. Ugotovili smo, da so v lipidnem dvosloju območja alkilnih verig blizu polarnih glav bolj urejena, so zelo viskozna in dajejo izrazito anizotropne spektre, medtem ko so območja v notranjosti supramolekularnih struktur bolj fluidna, gibljivost molekul je večja. Urejenost lipidne faze se je manjšala tako s povečanjem deleža vode kot tudi z naraščanjem temperature. Razlike v urejenosti lokalnega okolja med posameznimi sistemi tekočih kristalov pa so se z višanjem temperature manjšale. Glede na delež vodne komponente se sistem z najmanjšim deležem vode izoblikuje v heksagonalno fazo, sistem z najvišjim deležem vode predstavlja prehodno stanje med lamelarno in micelno fazo, vmesni sistemi pa so urejeni v lamelarne faze z možnostjo obstoja paličastih micelov. Ti rezultati so v skladu z rezultati, ki so jih pridobili z drugimi analiznimi metodami na istih sistemih. S simulacijami EPR spektrov smo ugotovili, da je vsak spekter sestavljen iz treh spektralnih komponent, ki ponazarjajo določen tip domene z zanjo značilnimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi. Pri višjih temperaturah smo opazili združevanje domen. S počasnim segrevanjem vzorcev faznih prehodov nismo odkrili, kar pa je zaželeno v primeru tekočih kristalov, z namenom uporabe kot nosilnih sistemov za različne načine dostave.

**Ključne besede:** liotropni tekoči kristali, elektronska paramagnetna resonanca (EPR), spinski označevalec (SO), lamelarna faza, ureditveni parameter

## ABSTRACT

Lyotropic liquid crystals are extensively studied as drug delivery systems for dermal and parental applications and for applications in oral cavity. They are formed spontaneously, by addition of the solvent (water/oil) to amphiphilic molecules. Various mesophases formed can be divided by their arrangement in the solvents to hexagonal, cubic and lamellar phases. Each phase has its unique physio-chemical features. Various analytical methods are used for their investigation, however in many cases a combination of techniques is used in order to obtain complementary and more reliable data.

In the thesis, the supramolecular structure of liquid crystals based on lecithin and Tween 80<sup>®</sup> as surfactant mixture, oil phase isopropyl myristate and water was evaluated using electron paramagnetic resonance. Different spin probes, which report about actions in a specific local environment of supramolecular structures in which they are located, were built into the systems. Samples spectra were recorded at temperatures between 22 °C and 62 °C. Regions near water-lipid layer have a high order parameter, are very viscous and give anisotropic spectra, while the areas in the inner part of the membrane are highly fluid; mobility of the molecules is high. Order of phases was lowered by enlargement of water content as well as with higher temperatures. On the other hand, minimal differences between samples were observed with increasing temperature. Based on the water component content, the system with the lowest water content had hexagonal structure, the system with the highest water content was identified as phase transition system between lamellar and micellar phase, while the systems in between had lamellar structure with the possibility of presence of rod-like micelles. Similar conclusions have been made for these systems based on other analytical techniques as well. Composition of each spectrum from three different components, representing a defined type of domain with its distinguished physio-chemical properties, was shown with EPR spectra simulations. Association of domains was observed at higher temperatures. We were keen to investigate the potential of phase transition between different phases as well. This phenomenon was evaluated by slowly heating the samples and was not observed for liquid crystals systems tested. The phase transition is not a desired property of liquid crystals, which are used as carriers for various routs of applications.

**Key words:** lyotropic liquid crystals, electron paramagnetic resonance (EPR), spin label, lamellar phase, order parameter

## SEZNAM OKRAJŠAV

AP	askorbilpalmitat
D	domena
DSC	diferenčna dinamična kalorimetrija ( <i>ang.: Differential Scanning Calorimetry</i> )
EPR	elektronska paramagnetna resonanca ( <i>ang.: Electron Paramagnetic Resonance</i> )
IPM	izopropilmiristat
KMK	kritična micelarna koncentracija
PAS	površinsko aktivna snov
TK	tekoči kristal(i)
SAXS	ozkokotno rentgensko sipanje ( <i>ang.: Small Angle X-ray Scattering</i> )
SO	spinski označevalec
WAXS	širokokotno rentgensko sipanje ( <i>ang.: Wide Angle X-ray Scattering</i> )

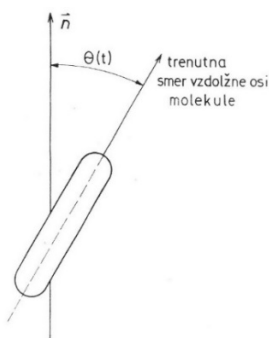
# 1 UVOD

## 1.1 TEKOČI KRISTALI

Tekoči kristali (TK) so snovi, ki predstavljajo vmesno stanje med kristalom in kapljevino. TK tvorijo različne faze, imenujemo jih mezofaze, glede na molekulsko urejenost. TK se lahko pojavljajo med popolno (tridimenzionalno) urejenostjo, značilno za trdne kristale na eni strani in pomanjkanjem orientacijske ureditve na dolge razdalje, ki je značilna za izotropne tekočine. Izraza tekoči kristal in mezogen sta pogosto uporabljena kot sopomenki. Tekoče-kristalna faza je stanje snovi z lastnostmi trdne snovi (anizotropnost, urejenost, dvolomnost, mehanska stabilnost) in tekočine (pretok) (1 – 5). Za kristalinične snovi je značilna pozicijska (pravilen razpored molekul v prostoru) in orientacijska (molekule so obrnjene v isto smer) urejenost tako na kratke (za bližnje molekule), kot tudi na dolge razdalje (za velike gruče več milijard molekul). Tekočine imajo le še delno orientacijsko in/ali pozicijsko urejenost na kratke razdalje, na dolge razdalje pa urejenosti ni. V primeru TK pa se orientacijska urejenost ohrani, medtem ko pozicijska delno ali v celoti izgine. Orientacijsko urejenost molekul v nematični fazi (najpreprostejši in najbolj uporabni fazi TK) opišemo z ureditvenim parametrom  $S$  in enotskim vektorjem  $\vec{n}$ . Ta podaja smer urejenosti, zato ga lahko imenujemo ureditveni vektor. Med stanjema, ki ju določata ureditvena vektorja  $\vec{n}$  in  $-\vec{n}$ , ni v nematični fazi nobene razlike (2, 6). Ureditveni parameter  $S$  je število, ki nam pove stopnjo urejenosti molekul. Definiran je kot:

$$S = \frac{1}{2} \langle 3 \cos^2 \theta(t) - 1 \rangle, \quad (1)$$

kjer je  $\theta(t)$  kot med trenutno smerjo vzdolžne osi molekule in njeno povprečno smerjo, ki sovpada z ureditvenim vektorjem  $\vec{n}$  (slika 1) (4, 7).



**Slika 1:** Smer urejenosti je podana z ureditvenim vektorjem  $\vec{n}$ .  $\theta$  je kot med trenutno smerjo posamezne molekule in ureditvenim vektorjem  $\vec{n}$  (2).

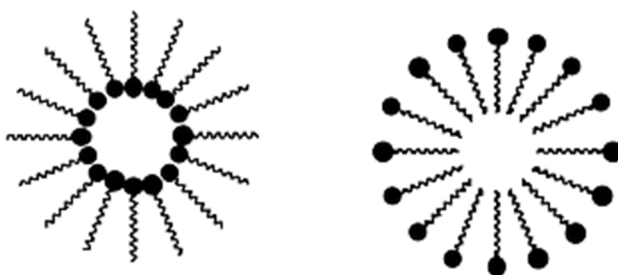
Vrednost ureditvenega parametra  $S$  je lahko največ 1. To se zgodi pri popolno orientiranem sistemu, ko je  $\theta$  za vse molekule enak  $0^\circ$  in so te med seboj vzporedne. V trdnem kristalu je vrednost  $S$  blizu 1. Nasprotje temu je izotropna kapljevina, kjer ni orientacijske urejenosti in je  $S$  enak 0. V tipičnem (nematičnem) tekočem kristalu se  $S$  manjša z naraščanjem temperature in zavzame vrednosti med 0,3 in 0,8 (6). Smerna urejenost  $\vec{n}$  je enaka v enotno urejenem območju, to pa je veliko le nekaj mikrometrov. Območja se med seboj združujejo. Na ureditveni vektor  $\vec{n}$  lahko vplivamo tudi z zunanjim električnim in magnetnim poljem ali pa z urejanjem na površini. Če je prehod med dvema območjema nezvezen, ne moremo definirati smeri urejenosti na meji med obema območjema, in govorimo o defektu ali strukturni napaki v TK (2). Glede na fizikalno-kemijske parametre odgovorne za fazne prehode, delimo TK na termotropne in liotropne. Termotropne TK večinoma gradijo čiste in umetno pridobljene snovi, ki tvorijo različne faze TK že samo s segrevanjem ali s spremembo tlaka. Za razliko od termotropnih TK, liotropni TK nastanejo, če trdno snov, tj. površinsko aktivno snov (PAS), pomešamo s topilom (vodo in/ali oljem) (8).

### 1.1.1 LIOTROPNI TEKOČI KRISTALI

Liotropne TK običajno tvorijo PAS in vodna ter oljna faza, v ustrezni koncentraciji in pri dani temperaturi in tlaku. Asociacijske strukture, ki nastajajo pri različnih razmerjih posameznih komponent, najlažje prikažemo s (psevdo)trikomponentnim faznim diagramom (9). Tipične molekule, ki gradijo liotropne TK, so podolgovate in amfifilne, sestavljene iz polarne (hidrofilne) glave, ki je lahko neionska ali ionska, in teži k temu, da je v stiku z vodo, ter nepolarne repa, ki se vodi izmika. Primeri takšnih molekul so soli višjih maščobnih kislin (mila), fosfolipidi ali glikolipidi. Če majhno koncentracijo teh molekul raztopimo v polarnem topilu (voda), plavajo amfifilne molekule v množici molekul vode. Pri višji koncentraciji se hidrofobne verige združijo tesno skupaj in nimajo stika s topilom, hidrofilne glave pa so na meji s topilom. Izoblikujejo se okrogle strukture, ki jih imenujemo miceli in vezikli. To koncentracijo imenujemo kritična micelarna koncentracija (KMK). Nasprotno nastanejo reverzni miceli, če amfifilne molekule zmešamo z nepolarnim topilom (npr. heksan). Polarne glave se pri tem združijo tesno skupaj, nepolarne verige pa so na meji s topilom (slika 2). Če koncentracijo PAS še povečujemo, postanejo miceli sprva podolgovate ali ploščate oblike in vedno večji, nato pa pri določeni koncentraciji nastanejo TK. Mezomorfne lastnosti se ne spreminjajo le z relativno koncentracijo različnih komponent v



mešanici, temveč tudi s temperaturo in tlakom (2, 5, 6, 10). Liotropni TK se pojavljajo tudi v bioloških membranah, saj membrane celic v telesu tvorijo v vodi raztopljeni fosfolipidi.



**Slika 2:** Prečni prerez reverznega micela (levo) in micela (desno).

Poznamo različne faze liotropnih TK, ki se ločijo po različnem tipu molekulske razporeditve v topilu. Heksagonalno ali srednjo milno fazo sestavljajo stožčaste amfifilne molekule, ki se uredijo v šesterokotno stebričasto strukturo. V lamelarni fazi se amfifilne molekule, ki so v obliki valja, združujejo v dvosloje, ki so ločeni s plastmi vode. Kubična faza lahko nastane pri določenih sistemih med heksagonalno in lamelarno fazo. Za kubično fazo je značilno, da se amfifilne molekule uredijo v sfere, ki gradijo kubično rešetko. V nekaterih sistemih opazimo tudi inverzne faze (6).

#### **1.1.1.1 Faze liotropnih TK**

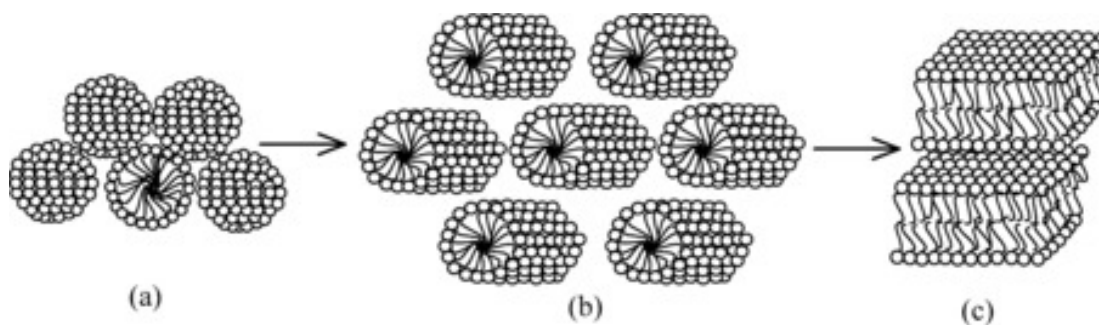
Glede na notranjo strukturo ločimo različne faze liotropnih TK. Struktura liotropnih TK je odvisna od deleža in tipa površinsko aktivnih snovi ter lipofilne komponente kakor tudi hidrofilne komponente. Spreminjanje deleža slednje je navadno glavno gonilo za fazne pretvorbe, ki potekajo.

Značilnost *lamelarne faze* je večplastna ureditev amfifilnih molekul, ki se s prepletanjem nepolarnih verig nasprotno usmerjenih molekul uredijo v dvoplastno strukturo (slika 3). Skupine polarnih glav so ločene s plastmi vode. Običajno lamelarna faza nastane, če je delež PAS večji od 50%. Pod 50% PAS se izoblikujejo heksagonalne faze ali pa nastane izotropna micelarna raztopina. Lamelarna faza je manj viskozna od heksagonalne, kljub dejstvu, da vsebuje manj vode. Vzrok temu je, da vzporedne plasti pri strigu drsijo z relativno lahkoto druga ob drugi (6). Biološko najpomembnejša je tekoča lamelarna ( $L_{\alpha}$ ) faza, ki je najmanj urejena oz. gibanje med plastmi ni omejeno (11). Poznamo še gelsko lamelarno ( $L_{\beta}$ ) in kristalinično lamelarno ( $L_C$ ) fazo, ki nastaneta pod temperaturo »taljenja«, ko je gibljivost

lipofilnih verig omejena.  $L_C$  je med naštetimi najbolj urejena, saj ima verige zamrznjene v rešetko (3, 4).

Kubična in heksagonalna faza imata zelo urejeno notranjo strukturo. Zagotavljata podaljšano sproščanje zdravilne učinkovine iz dostavnega sistema, obenem pa ščitita peptide, proteine in nukleinske kisline pred kemijsko in fizikalno razgradnjo. V *kubični fazi* se amfifilne molekule urejajo v sferično ali paličasto obliko (slika 3), in gradijo kubično rešetko. Kubične faze se uporabljajo kot nosilni sistemi hidrofilnih, lipofilnih in amfifilnih zdravilnih učinkovin. Hidrofilne molekule se zadržujejo blizu polarnih glav lipidov ali v vodnih kanalih, lipofilne molekule v lipidnih dvoslojih in amfifilne molekule med lipidno in vodno fazo (12). Kubične liotropne faze se lahko pojavijo v različnih delih faznega diagrama. Poznamo dve vrsti kubičnih faz, vsaka od njiju se lahko oblikuje v normalen in reverzni tip, torej skupaj štiri različne fazne tipe. Najbolj poznani kubični fazi imata molekule urejene ali v micela ( $I_1$  faza) ali pa reverzne micela ( $I_2$  faza). Nekatere študije pravijo, da so molekule  $I_1$  faze urejene sferično, druge pa trdijo, da so cilindrične ali elipsoidne. Druga vrsta kubičnih faz se nahaja med heksagonalno ( $H_1$ ) in lamelarno ( $L_\alpha$ ) fazo. Glede na urejenost molekul jo razdelimo na normalen ( $V_1$ ) in reverzni ( $V_2$ ) tip. Obe fazi sta sestavljeni iz velikih neprekinjenih in usmerjenih mrež. Te faze običajno poimenujemo bikontinuirane kubične faze. Kubične faze so izredno viskozne, celo bolj od heksagonalnih faz. Visoka viskoznost je posledica pomanjkanja strižnih ploskev v strukturi, ki bi omogočale lažje drsenje. Pogosto zasledimo, da kubično fazo poimenujejo kar viskozna izotropna faza. Optična izotropnost pa je razlog, da kubičnih faz ne moremo preučevati z optično polarizacijsko mikroskopijo, saj ne izkazujejo dvolomnosti (4, 6).

**Heksagonalno fazo** sestavljajo cilindrični miceli razporejeni v heksagonalni vzorec (slika 3). Za razliko od kubične faze so pri heksagonalni vodni kanali zaprti. Porazdelitev nosilnih molekul je podobna kot pri kubični fazi (12). Heksagonale faze običajno vsebujejo 30 – 50% PAS in 30 – 60% vode glede na maso, kljub visokemu deležu vodne komponente pa je faza zelo viskozna. Ločimo dva tipa heksagonalnih faz: heksagonalno fazo ( $H_1$ ) in reverzno heksagonalno fazo ( $H_2$ ). Struktura reverzne heksagonalne faze je enaka heksagonalni, le da so cilindrični miceli obrnjeni z nepolarnimi verigami navzven, voda pa se nahaja v notranjosti micela. Preostali prostor zavzemajo hidrofobne verige, ki omogočajo, da so cilindri veliko bolj skupaj kot v  $H_1$ .  $H_2$  v primerjavi s  $H_1$  fazo zavzema veliko manjše območje v faznem diagramu in je veliko bolj redka (6).



**Slika 3:** Struktura kubične faze (a), heksagonalne faze (b) in lamelarne faze (c). Puščica prikazuje naraščanje koncentracije amfifilnih molekul (5).

Bikontinuirana kubična faza, reverzna heksagonalna faza in reverzna micelarna kubična faza spadajo med biološko najpomembnejše nelamelarne mezofaze. Te mezofaze se uprejo presežku vode in so stabilne v določenih pogojih v bioloških sistemih, kot na primer pri visoki temperaturi, opazimo pa jih lahko tudi v plazemski membrani bakterije. Predmet zanimanja pa niso le zaradi pomembnosti za živeče organizme, ampak tudi zaradi možne uporabe kot dostavni sistem za zdravilne učinkovine, na področju genskega transporta in nanotehnologije (11). Lamelarna faza je še posebej primerna za dermalno in transdermalno uporabo. Struktura lamelarne faze, tj. izredna podobnost z intercelularnimi lipidi rožene plasti povrhnjice kože, je odgovorna za njene glavne prednosti: povečano hidratacijo kože po nanosu, ustrezne reološke lastnosti, optimalno konsistenco in termodinamsko stabilnostjo skupaj s povišano solubilizacijsko kapaciteto ter možnostjo nadzorovanega sproščanja (13).

## 1.2 METODE ZA DOLOČANJE FIZIKALNO-KEMIJSKIH LASTNOSTI TEKOČIH KRISTALOV

Za boljše razumevanje fizikalno-kemijskih lastnosti TK obstajajo različne analize metode. Sicer lahko v določenih primerih liotropne faze TK identificiramo že z eno metodo, vendar najpogosteje uporabimo kombinacijo različnih tehnik, katerih rezultati so medsebojno komplementarni in tako bolj zanesljivi. Neposredne metode za analizo strukture TK so optična polarizacijska mikroskopija, ozkokotno rentgensko sipanje, presečna elektronska mikroskopija, jedrska magnetna resonanca in mikroskopija na atomsko silo, posredni metodi pa sta reologija in diferenčna dinamična kalorimetrija. Ena izmed možnih metod je tudi elektronska paramagnetna resonanca (EPR), ki je bila desetletja nazaj celo temeljna metoda za proučevanje strukture TK, dandanes pa so jo nadomestile druge, predhodno našteje

metode. Ključna prednost EPR je predvsem v tem, da prispeva k boljši interpretaciji supramolekularne strukture TK z identifikacijo dogajanja med spinskim označevalcem (SO) in okoljem in se zato ponovno vedno bolj uveljavlja kot metoda izbire (4, 14).

### **1.2.1 OPTIČNA POLARIZACIJSKA MIKROSKOPIJA**

Optična polarizacijska mikroskopija je dobro uveljavljena metoda za raziskovanje lastnosti anizotropnih snovi. Anizotropija in posledično dvolomnost je značilna tudi za TK, izjema je le kubična faza. Ta metoda omogoča identifikacijo specifične faze TK in ostalih mezofaz iz optične teksture. Tanko plast preiskovanega vzorca vstavimo med dva pravokotna polarizatorja. Dvolomnost vzorca omogoči, da analizni polarizator prepusti obrnjeno polarizacijo, kar vidimo kot tipično črno-belo teksturo. Ta omogoča določitev strukture TK, saj so posamezne teksture specifične za nekatere termotropne in liotropne TK. Pri opazovanju optično izotropnega vzorca se polarizacija ne spremeni in zato ne vidimo svetlobe, ampak samo črno. Heksagonalno fazo prepoznamo po pahljačasti teksturi, lamelarno fazo pa po značilnih oljnih črtah z malteškimi križi (3, 4, 6, 15).

### **1.2.2 DIFERENČA DINAMIČNA KALORIMETRIJA (DSC)**

DSC se skoraj vedno uporablja kot dopolnilna metoda optični polarizacijski mikroskopiji. Z uporabo DSC metode lahko spremljamo fazne prehode, ki so tesno povezani z entalpijskimi in entropijskimi prispevki. S segrevanjem vzorca pride do spremembe stanja iz trdnega v tekoče, ta proces pa zahteva energijo iz okolice (endotermni proces). Naknadno hlajenje vzorca prikazuje eksotermni proces, kjer se energija sprosti v okolico. V primerih, ko fazni prehodi ne povzročijo sprememb v entalpiji (ali so le-te zelo majhne), ne opazimo vrha na DSC termogramu. Razlog za relativno majhne entalpijske prispevke pri faznih prehodih je dejstvo, da prehodi lamelarnih v nelamelarne faze običajno potekajo v okviru različnih faz TK in jih zato težko zaznamo z DSC, v nasprotju z npr. metodo ozkokotnega rentgenskega sipanja (SAXS) (*poglavje 1.2.3*). Entropijski prispevki povzročijo fazni prehod s spremembo specifične toplotne kapacitete, ki jo opazimo kot spremembo naklona bazne linije (3, 4).

### **1.2.3 OZKOKOTNO RENTGENSKO SIPANJE (SAXS)**

SAXS spada med rentgenske metode sipanja, ki so ene izmed najpogosteje uporabljenih metod za določanje strukture sistemov, kjer so specifične strukture odgovorne za sipanje svetlobe. Z rezultati največkrat nadgradimo informacije pridobljene z ostalimi metodami. Teoretično podlago sipanja rentgenskih žarkov daje Braggov zakon. Rentgenski žarek, s tipično valovno dolžino okoli 0,1 nm, posveti na vzorec, kjer se svetloba razprši in nato beleži na detektorju. Merimo kotno odvisnost intenzitete sipane svetlobe. Meritve SAXS se nahajajo zelo blizu primarnega žarka, saj so koti majhni. Z metodo SAXS tako zaznamo urejenost na dolge razdalje, medtem ko metoda WAXS zazna urejenost bližnjih molekul. SAXS metoda zazna interference značilne za TK, ki nam omogočajo izračun razdalj med plastmi in določitev tipa TK. Razdalja med posameznimi plastmi v lamelarni fazi je približno 3-4 nm, širina vrinjenih plasti vode pa 2 nm. Obe vrednosti se lahko s temperaturo in koncentracijo spreminjata. Širokokotno rentgensko sipanje (WAXS) in SAXS se razlikujeta le v razdalji med vzorcem in detektorjem (3, 4). Cohen-Avrahami in sodelavci so raziskovali vpliv dveh nesteroidnih protivnetnih učinkovin (natrijev diklofenak in celekoksib) na kubično in lamelarno mezofazo iz glicerol monooleata, etanola in vode, ki sta bili razviti kot nosilna sistema za transdermalno aplikacijo. Rezultati SAXS so pokazali, da je celekoksib povzročil v obeh mezofazah povečanje razdalj med lipidnimi plastmi in domenami ter s tem večjo neurejenost mezofaze, ki se je z višanjem koncentracije vgrajenega celekoksiba samo še povečevala. Amfifilen natrijev diklofenak, ki se nahaja v bližini vodnih kanalov, je v kubični fazi povzročil povečanje urejenosti in viskoznosti sistema ter izboljšal interakcije med molekulami znotraj mezofaze (16).

### **1.2.4 REOLOGIJA**

Beseda »rheos« v grškem jeziku pomeni tok, zato lahko hitro sklepamo, da gre za vedo, ki proučuje pretočne lastnosti snovi. Te snovi niso samo kapljive, ampak so lahko tudi poltrdne in trdne snovi. V farmaciji in kozmetiki je ta veda pomembna predvsem zaradi razjasnitve notranje strukture dostavnih sistemov in spremljanja fizikalne ter temperaturne stabilnosti. Glede na reološko delitev sistemov, TK uvrščamo med realne ali ne-Newtonske sisteme. Njihova viskoznost je odvisna od delovanja mehanske sile, za nekatere sisteme pa tudi od njenega časovnega delovanja. Različne liotropne faze TK izkazujejo različne reološke lastnosti. Viskoznost vzorca se večja z naraščanjem urejenosti strukture TK. Kubične in

heksagonalne faze, ki jih uvrščamo med plastične ne-Newtonske sisteme, imajo velik koeficient dinamične viskoznosti ( $\eta$ ), saj je viskoznost zaradi tridimenzionalne in dvodimenzionalne strukture velika. Lamelarne faze spadajo med psevdoplastične ne-Newtonske sisteme in je zaradi enodimenzionalne strukture njihova viskoznost in posledično koeficient dinamične viskoznosti nižji (4, 17). Rodriguez in sodelavci so delali študije na O/I<sub>1</sub> emulzijah (olje je dispergirano v zunanji kubični I<sub>1</sub> fazi). Reološke študije so pokazale, da viskoznost teh sistemov pada z naraščanjem volumna dispergirane komponente, kar je ravno obratno od klasičnih visoko koncentriranih emulzij. Padec viskoznosti so pripisali manjšemu volumnu komponente v zunanji fazi (kubična I<sub>1</sub> faza) (18).

Zanimiv je primer uporabe različnih komplementarnih metod za ovrednotenje strukture TK, s sestavo lecitin/Tween 80/izopropilmiristat/voda. Preučevali so TK, kjer delež vode narašča tekom razredčitvene premice (TK1 – TK8 vsebujejo 20 – 55% vode, sestava TK je podana v *Preglednici I*). Z optično polarizacijsko mikroskopijo so za TK1, ki vsebuje 20% vode in 56% PAS, na podlagi pahljačaste teksture določili heksagonalno strukturo. Ta se običajno tvori pri nižjih koncentracijah PAS (pod 50%) in pri višji vsebnosti vode (30 - 60%), vendar bistveno nižja vrednost kritičnega ureditvenega parametra Tweena 80, v primerjavi z lecitinom, favorizira nastanek heksagonalne faze. Za vse ostale sisteme (TK2 – TK8) so, zaradi prisotnosti za lamelarne strukture značilnih malteških križev, potrdili lamelarno strukturo. Število malteških križev je sicer z naraščanjem vsebnosti vode padalo, vendar so jih opazili tudi v najbolj razredčenem sistemu, tj. TK8. Na podlagi DSC ohlajevalnih krivulj so ugotovili, da delež zmrzljive vode narašča od TK1 proti TK8, ki vsebujejo največji delež vodne komponente. Pri vzorcu TK1 ni bilo mogoče opaziti eksotermnega vrha kristalizacije vode, zato so predvidevali, da je voda verjetno močno vezana na polarne glave PAS, da med ohlajanjem ne kristalizira. Rezultati DSC analize se ujemajo tudi z rezultati drugih metod (polarizacijska mikroskopija, SAXS, reologija), ki navajajo posebne strukturne lastnosti TK1 in TK8, v primerjavi s TK2 – TK7. Z metodo SAXS so pri 25 °C na podlagi prisotnosti dveh intenzivnih in ostrih vrhov v razmerju 1 : 2 določili TK2 – TK8 lamelarno strukturo. Ta se ohranja tudi pri višjih temperaturah; in sicer pri 32 °C, tj. temperaturi na površini kože, kot tudi pri 37°C, tj. fiziološki temperaturi. Ta podatek je pomemben predvsem pri načrtovanju TK kot dermalnih nosilnih sistemov. Izjema je le sistem TK1, ki imajo na difraktogramu prisotne tri ostre vrhove, kar nakazuje na prisotnost kubične ali heksagonalne faze. TK8, ki vsebujejo največji delež vode, so prepoznali kot prehodni sistem med lamelarno in micelno fazo. Reološke študije so pokazale, da je opazen močan upad

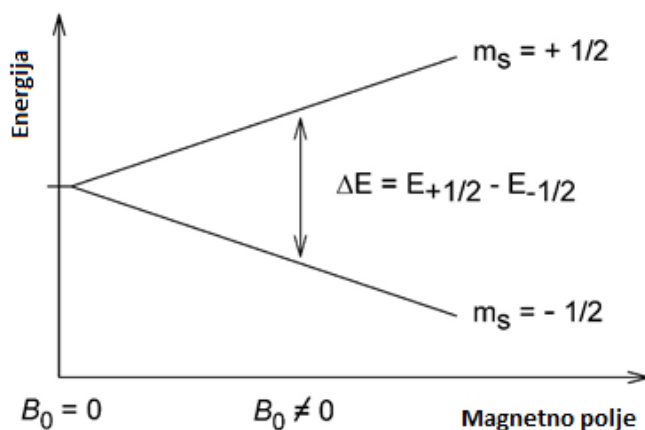
viskoznosti z naraščajočo strižno hitrostjo pri vseh izmerjenih temperaturah. Pri strižni napetosti ( $2 \text{ s}^{-1}$ ) je viskoznost TK ob naraščanju temperature padala, z izjemo TK1, ki so bili najbolj viskozni pri  $32 \text{ }^\circ\text{C}$ . Z večanjem deleža vode vzdolž razredčitvene premice se viskoznost poveča (pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Izjema je le sistem TK8, kar razložimo s prehodom v micelarno fazo. Reološko obnašanje sistemov TK2 – TK8 je značilno za lamelarne liotropne tekoče kristale. Povsem drugačno obnašanje je vidno pri TK1, kjer so opazili obnašanje značilno za heksagonalne sisteme. Oboje so potrdili tudi s SAXS metodo (19 – 21).

### 1.3 ELEKTRONSKA PARAMAGNETNA REZONANCA

Elektronska paramagnetna resonanca (EPR) ali elektronska spinska resonanca (ESR) je spektroskopska metoda za določanje strukture, dinamike in prostorske razporeditve paramagnetnih snovi. To so snovi, ki vsebujejo vsaj en nesparjen elektron (radikali, spojine z elementi prehodnih kovin, defekti v kristalnih rešetkah) in so pogosto kemijsko reaktivne (22). EPR temelji na interakciji med elektromagnetnim valovanjem (mikrovalovi) in magnetnim momentom, ki izhaja iz elektrona. Elektron ima spin, saj precesira okoli svoje osi, njegova vrtilna količina pa ustvarja magnetni moment. To pomeni, da se elektron v določeni meri obnaša kot majhen magnet z energijo, ki je odvisna od njegove usmerjenosti v zunanjem magnetnem polju. Magnetni moment elektrona ima spinsko kvantno število  $S = \frac{1}{2}$  in je sorazmeren z njegovo vrtilno količino. Larmorjeva frekvenca je frekvenca, s katero magnetni momenti elektronov precesirajo okoli smeri zunanjega magnetnega polja. Ta narašča z jakostjo magnetnega polja. Magnetni momenti elektronov se lahko v zunanjem magnetnem polju usmerijo v vsaj dva položaja oz. v dva energijska nivoja. Nesparjeni elektroni v vzorcu se razdelijo na nivo z višjo energijo -  $m_s = +\frac{1}{2}$  in nivo z nižjo energijo -  $m_s = -\frac{1}{2}$  (slika 4). To imenujemo Zeemanov efekt. Večje, kot je zunanje magnetno polje, večji je razcep med energijskima nivojema. Razliko med energijskima nivojema ( $\Delta E$ ) definiramo kot:

$$\Delta E = E_{1/2} - E_{-1/2} = \frac{1}{2} g \cdot \beta \cdot B_0 - \left( -\frac{1}{2} g \cdot \beta \cdot B_0 \right) = g \cdot \beta \cdot B_0, \quad (2)$$

kjer je  $g$  Zeemanov sklopitveni faktor,  $\beta$  je Bohrov magneton ( $9,274 \times 10^{-24} \text{ J/T}$ ),  $B_0$  je jakost magnetnega polja in  $m_s$  je elektronsko spinsko kvantno število ( $\pm \frac{1}{2}$ ) (23).



**Slika 4:** Razcep magnetnih momentov v dva energijska nivoja (24).

Za prehod med energijskimi nivoji je potrebna energija mikrovalov. Resonančni pogoj je izpolnjen, ko je energija mikrovalov enaka razliki med energijskima nivojema.

$$h\nu = g \cdot \beta \cdot B_0 \quad (3)$$

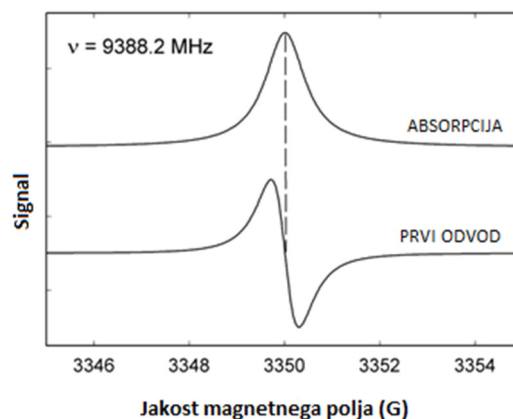
$\nu$  je frekvenca vpadnega elektromagnetnega valovanja,  $h$  je Planckova konstanta in znaša  $6,626 \cdot 10^{-34}$  Js.

Pri določeni jakosti zunanega magnetnega polja, pride do absorpcije elektromagnetnega valovanja in prehoda na višji energijski nivo, kar zaznamo z EPR spektrometrom. Nato sledi relaksacija, ko se elektronski spini vračajo na začetni energijski nivo in obenem oddajo energijo v obliki toplote.

Značilnost EPR spektrometra z izvorom mikrovalov v kontinuiranem načinu delovanja (*continuous wave, CW*) je, da se jakost magnetnega polja spreminja, medtem ko je frekvenca elektromagnetnih valov konstantna. Magnetno polje v velikosti 0,3 T (= 3000 G) ustreza resonanci elektromagnetne frekvence 10 GHz in valovni dolžini 3 cm. Območje mikrovalov je med 1 – 100 GHz.

EPR spektrometer je sestavljen iz mikrovalovnega mostu, resonatorja, v katerega vstavimo vzorec v stekleni cevki, detektorja in elektromagneta. Vzorec je lahko v tekočem, trdnem ali plinastem stanju, čeprav slednji zaradi proste rotacije molekul povzroča zaplete. EPR spekter dobimo s spremljanjem absorpcije mikrovalov v odvisnosti od spreminjanja magnetnega polja. Svojevrsten izgled daje EPR spektru prvi odvod absorpcijskega spektra (slika 5) (23).





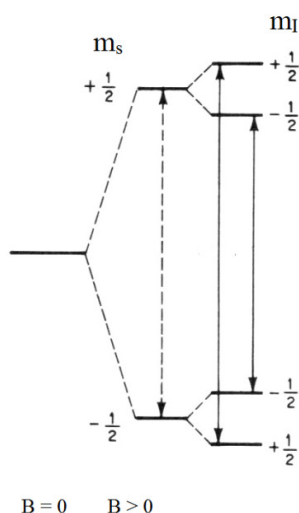
**Slika 5:** Absorpcijski spekter (zgoraj) in EPR spekter, ki je prvi odvod absorpcijskega spektra (spodaj) (25).

Površina pod krivuljo, ki jo dobimo, ko integriramo absorpcijski spekter, je sorazmerna številu paramagnetnih centrov. Če naš signal vsebuje le en vrh, to pomeni, da gre za en sam elektron, ki ne reagira z nobenim drugim jedrom. Iz sredine signala dobimo vrednost g faktorja. Za prosti elektron ta vrednost znaša približno 2,0023. Magnetni moment nesparjenega elektrona radikala ali spojine z elementi prehodnih kovin prav tako reagira z zunanjim magnetnim poljem, vendar je vrednost g faktorja različna od vrednosti za prosti elektron, saj reagira tudi z lokalnim magnetnim poljem atomov oz. molekul. Razlikuje se za vrednost  $\xi/\Delta E$ .  $\xi$  je konstanta sklapljanja spinskih orbital, ki je sorazmerna jakosti lokalnega magnetnega polja. Organski radikali imajo g faktor blizu vrednosti za prosti elektron (2,0027), pri anorganskih radikalih pa je v območju 1,9 – 2,1. g faktor spojin z elementi prehodnih kovin variira v območju 0 – 6, ker imajo majhno  $\Delta E$ , na račun delitve orbital zaradi interakcij z ligandi (23).

Izgled EPR spektra pa ni odvisen samo od števila nesparjenih elektronov, ampak tudi od hiperfine interakcije. Gre za interakcijo nesparjenega elektrona z jedri atomov, ki se nahajajo v njegovi bližini. V bistvu gre za dipol-dipol interakcijo med magnetnim momentom nesparjenega elektrona in atomskega jedra. Nadaljnje cepljenje energijskih nivojev dobimo pri jedrih, ki imajo jedrski spin različen od nič (slika 6). Skupno jedrsko spinsko kvantno število ( $I$ ) je odvisno od števila protonov ( $Z$ ) in nevtronov ( $N$ ) iz katerih je jedro sestavljeno. Če je:

- sodo  $Z$  in sodo  $N$ , potem je  $I = 0$ ;
- sodo  $Z$  in liho  $N$  ali liho  $Z$  in sodo  $N$ :  $I = \frac{1}{2}, \frac{3}{2}, \frac{5}{2}, \dots$ ;
- liho  $Z$  in liho  $N$ :  $I = 1$ .

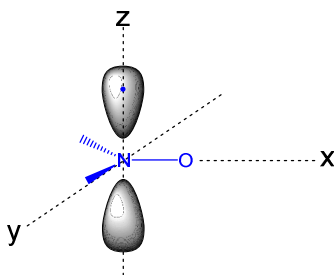
V primeru nitroksida imamo interakcijo nesparjenega elektrona z zunanjim magnetnim poljem, prisotna pa je še interakcija sklopitve z magnetnim momentom jedra atoma dušika. Jedro dušika vsebuje 7 protonov in 7 nevtronov, zato je njegovo jedrsko spinsko kvantno število  $I = 1$ . Z enačbo  $2I + 1$  lahko hitro izračunamo, da ima spekter nitroksida tri črte, ki so enake intenzitete, saj je prisotno eno samo jedro. V prisotnosti več ekvivalentnih jeter uporabimo enačbo  $2NI + 1$ , kjer je  $N$  število ekvivalentnih jeter (26). Intenziteto posameznih črt določimo s pomočjo členov binomske ( $I = \frac{1}{2}$ ) ali trinomske ( $I = 1$ ) porazdelitve (Pascalov trikotnik ali piramida).



**Slika 6:** Levi del slike prikazuje stanje, ko je  $B_0 = 0$ . V srednjem delu, kjer je  $B_0 > 0$  pride do razcepa energijskih nivojev elektronskega spina ( $S = \frac{1}{2}$ ). Desni del slike prikazuje hiperfinski razcep energijskih nivojev elektrona zaradi sklopitve s spinom jedra z  $I = \frac{1}{2}$ .

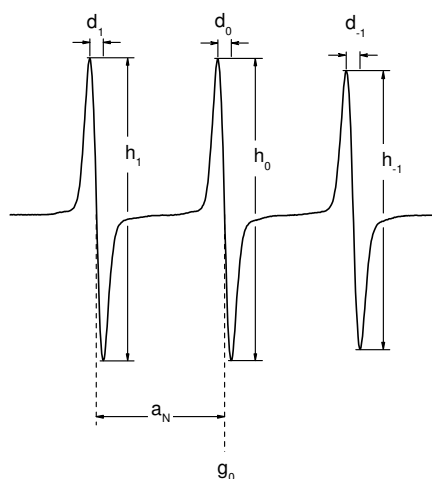
EPR deluje v nanosekundnem časovnem območju. Spremembe konformacij kratkih verig (npr. pri lipidih) so ravno v časovnem oknu EPR, zato je EPR tako občutljiv na anizotropijo njihovega opletanja. Sistemi, ki vsebujejo dolgožive nesparjene elektrone oz. radikale, ne potrebujejo dodatnega spinskega označevanja. Ostale sisteme moramo ali spremeniti iz kratkoživih v dolgožive radikale s spinskim lovljenjem ali pa spinsko označiti. V te namene uporabljamo spinske označevalce, ki se vežejo kovalentno, in spinske sonde, ki nekovalentno interagirajo z vzorcem. S spinskimi označevalci in sondami proučujemo njihovo neposredno okolico. Dajejo nam informacije o polarnosti, pH, kisiku, viskoznosti in urejenosti. Pogosto uporabljeni paramagnetni centri za označevanje bioloških sistemov so nitroksidni radikali (27, 28). Gre za stabilne radikale, saj štiri metilne ( $-\text{CH}_3$ ) skupine na  $\alpha$

položaju glede na dušik sterično ovirajo dostop do neparjenega elektrona ter tako omogočajo daljše preživetje radikala. Na ostalih mestih v molekuli nitroksida je možnost zamenjave različnih skupin in s tem posledično velika raznolikost v kemijskih lastnostih (26). Neparjen elektron nitroksida se nahaja v  $\pi^*$  orbitali dušika (slika 7), ki je preko dveh C-atomov najpogosteje povezan v heterociklični obroč. Najpogostejši so nitroksidni radikali pirolinskega, pirolidinskega, piperidinskega, oksazolidinskega (doksilnega) in imidazolidinskega tipa.



**Slika 7:**  $\pi^*$  orbitala nitroksida z neparjenim elektronom v koordinatnem sistemu.

Z analizo spektra dobimo podatke o različnih parametrih (slika 8). Višina črte –  $h$  nam daje podatke o intenziteti signala, širino posameznih črt označimo z  $d$ ,  $g_0$  pa je vrednost faktorja  $g$ , ki označuje sredino signala.  $a_N$  je razdalja med posameznima sosednjima črtama in označuje izotropno konstanto hiperfinega razcepa zaradi sklopitve neparjenega elektrona z dušikovim jedrom. Daje nam informacijo o mikropolarnosti okolja SO. Pri organskih topilih bo  $a_N$  manjši, pri bolj polarnih topilih (voda) pa se bo  $a_N$  povečal.



**Slika 8:** EPR spekter z označenimi parametri:  $h_{1,0,-1}$  – višine posameznih linij,  $d_{1,0,-1}$  – širine posameznih linij,  $g_0$  – vrednost, ki označuje sredino signala in  $a_N$  – izotropna konstanta hiperfinega razcepa.

Širino spektra označimo z  $2A_{\parallel}$  ali  $2A_{\max}$ . Ta se z naraščanjem temperature manjša, kar pomeni, da postanejo lipidni dvosloji z višjo temperaturo manj urejeni in s tem bolj fluidni. Ta lastnost je zelo pomembna v naravnih bioloških sistemih, saj ima holesterol sposobnost reguliranja fluidnosti celične membrane. V manj urejenih membranah tako poveča urejenost alkilnih verig, v visoko urejenih gel fazah pa zniža fluidnost (29).

Ureditveni parameter izračunamo po spodaj zapisani enačbi.

$$S = \frac{A_{\parallel} - A_{\perp}}{A_{zz} - \frac{A_{xx} + A_{yy}}{2}}, \quad (4)$$

kjer je  $A_{\parallel}$  enak  $A_{\max}$  in predstavlja polovico zunanjega hiperfinega razcepa.  $A_{\perp}$  dobimo iz  $A_{\min}$  in je enak polovici notranjega hiperfinega razcepa.  $A_{xx}$ ,  $A_{zz}$  in  $A_{yy}$  so osnovne vrednosti hiperfinega sklopitvenega tenzorja SO v kristalu (27).

Na obliko EPR spektra pa vpliva tudi viskoznost vzorca. V nevizkoznih raztopinah z nitroksidom dobimo popolnoma izotropen spekter, saj se molekule gibljejo izredno hitro. V viskoznih raztopinah je gibanje omejeno oz. omogočeno je le toliko, kolikor mu lipidi dovolijo. Rezultat je veliko bolj anizotropen spekter. Kristali dajejo najbolj anizotropen spekter, gibanje je najbolj omejeno in ureditveni parameter je največji ( $S = 1$ ).

Empirični korelacijski čas ( $\tau_{\text{emp}}$ ) lahko izračunamo iz spektra z naslednjo enačbo:

$$\tau_{\text{emp}} = k \cdot \Delta H \left[ \left( \frac{h_0}{h_{-1}} \right)^{-\frac{1}{2}} - 1 \right], \quad (5)$$

kjer je  $k$  konstanta značilna za posamezen spinski označevalec. Širino srednje linije ( $\Delta H$ ) in višini srednje črte ( $h_0$ ) in črte pri višjem magnetnem polju ( $h_{-1}$ ) odčitamo iz EPR spektra (slika 7). S tem dobimo grobo oceno urejenosti in dinamičnosti SO. V primeru kratkega empiričnega korelacijskega časa imamo slabšo urejenost fosfolipidnih acilnih verig, zato se nitroksidna skupina SO hitro giblje in s tem kaže na veliko fluidnost membrane. Obratno velja za dolg empirični korelacijski čas.

Upoštevati moramo, da nam podatki, izmerjeni direktno iz EPR spektra, dajejo informacijo o povprečni fluidnosti membrane le za bližino SO. Dejstvo, da je membrana heterogena in sestavljena iz območij (domen) z različno fluidnostjo, lahko potrdimo z računalniško obdelavo spektrov s programom EPRSIM WIZ 6.2.2. (30).

EPR študije interakcij dveh flavonoidov (kempferol in kvercetin), ki se razlikujeta le v številu OH skupin, z dvema različnima modeloma lipidne membrane (brez holesterola) nam

povedo, da se fluidnost zmanjša bolj pri vzorcih s kvercetinom kot kempferolom. To so potrdili tudi s fluorescenčno spektroskopijo. Ta učinek je bil bolj izražen v notranjosti membrane kot v bližini vodno-lipidnega dvosloja. S simulacijami spektrov so določili, da je membrana sestavljena iz dveh/treh domen z različno karakteristiko fluidnosti. Z naraščanjem temperature pa so opazili le še eno domeno. Pod temperaturo faznega prehoda se je polarnost najbolj urejene domene povišala v prisotnosti kempferola in kvercetina, kar pomeni, da oba olajšata penetracijo vodnih molekul v membrano (31).

Rezultati EPR meritev s spinskima označevalcema MeFASL (10,3) in MeFASL (2,11) so pokazali, da lipidne membrane z vključenim CoQ10, ki je lipidno topna struktura, povzročijo padec dinamike oz. porast urejenosti tako v notranjosti kot tudi na površini membrane. V prisotnosti CoQ10 opazimo rahel porast empiričnega korelacijskega časa na površini vodno-lipidnega dvosloja v območju med 15 °C in 35 °C, pri 45 °C pa prisotnost CoQ10 povzroči v primerjavi s kontrolo padec empiričnega korelacijskega časa. Porast korelacijskega časa membrane s CoQ10 je bolj izražen v notranjosti membrane, kjer je le-ta povišan skozi celotno temperaturo območje. Na podlagi teh rezultatov lahko sklepamo, da prisotnost CoQ10 povzroči zmanjšanje dinamičnosti lipidnih acilnih verig oz. povečanje urejenosti notranjosti membrane (32).

## 2 NAMEN DELA

Liotropni tekoči kristali so zaradi svojih značilnih strukturnih in fizikalno-kemijskih lastnosti zelo zanimivi za raziskovanje, in sicer kot moderni dostavni sistemi za dermalno, parenteralno, oralno in tudi ostale aplikacije. Namen magistrskega dela je ovrednotiti strukturo tekočih kristalov, ki so bili že predhodno razviti in raziskovani na Katedri za farmacevtsko tehnologijo. Sestavljeni so iz lecitina in Tweena 80 (v razmerju 1:1) ter izopropilmiristata in bidestilirane vode. Njihova notranja struktura je bila že ovrednotena z različnimi uveljavljenimi komplementarnimi tehnikami. Raziskovanje bomo nadaljevali z elektronsko paramagnetno resonanco (EPR) kot uveljavljeno metodo za vrednotenje njihove supramolekularne strukture.

Najprej bomo optimizirali postopek izdelave tekočih kristalov z vgrajenim spinskim označevalcem. SO nam daje informacije o območju, v katerem se nahaja nitroksidni radikal. Položaj nitroksidnega radikala v membrani je pogojen s fizikalno-kemijskimi lastnostmi SO oz. natančneje z lego nitroksida na alkilni verigi SO. Na podlagi EPR spektrov bomo izbrali najbolj primerne spinske označevalce za vrednotenje supramolekularne strukture. Nato bomo naše vzorce podrobno analizirali glede na spreminjanje odziva s temperaturno odvisnostjo. Zanimali nas bodo tudi morebitni fazni prehodi. Z računalniškim programom EPRSIM 6.2.2. bomo eksperimentalne podatke ovrednotili s pomočjo prileganja simuliranih EPR spektrov. Predvidevamo, da se znotraj TK izoblikujejo območja z različno sestavo in fluidnostjo – domene. Naše rezultate bomo primerjali z na enakih sistemih (lecitin/Tween 80/izopropilmiristat/voda) dobljenimi rezultati, ki so jih dobili v okviru predhodnih raziskav z drugimi analiznimi tehnikami (polarizacijska mikroskopija, DSC, SAXS, reologija). Spremljali bomo spreminjanje oblike EPR spektra, fizikalno-kemijskih lastnosti in obnašanja vzorcev z dodajanjem vode vzdolž razredčitvene premice. Zanima nas, ali bodo rezultati EPR meritev komplementarni z rezultati pridobljenimi z ostalimi tehnikami.

## 3 MATERIALI IN METODE

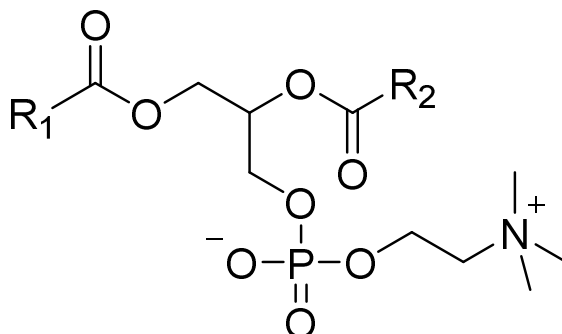
### 3.1 MATERIALI

#### 3.1.1 SESTAVINE ZA IZDELAVO TEKOČIH KRISTALOV

##### Lipoid S-100® (Lipoid GmbH, Nemčija)

Lecitin je naravna zmes fosfatidov (v glavnem fosfatidilholina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina in fosfatidilinozitola) ter ostalih snovi, kot so na primer maščobne kisline in ogljikovi hidrati. Lecitin vsebuje tudi fosforjeve in dušikove spojine (33). Lahko variira v barvi (od svetlih odtenkov do temno rdeče-rjave) in konsistenci (od tekoče oblike do trdne plastike). Najpomembnejši vir pridobivanja lecitina so sojina semena, najdemo pa ga tudi v jajčnem rumenjaku, arašidih, telečjih jetrih in žitaricah. Nahaja se tudi v celičnih membranah človeških celic. Sojino olje ima najvišje vrednosti lecitina in fosfatidov v primerjavi z ostalimi olji. Ima številne aplikacije: prehrabna industrija (margarina, čokolada, žvečilni gumi...), terapevtska uporaba (preprečevanje in zdravljenje nevroloških in kardiovaskularnih obolenj), ostala industrija (kozmetika, farmacija, izdelava plastike, gume in usnja...). Pogosto se izraz »lecitin« enači s kemično čistim fosfatidilholinom (slika 9). V farmaciji se največ uporablja kot emulgator in stabilizator. Zaradi njegove tehnične vsestranskosti, nizke toksičnosti in biokompatibilnosti je primeren za vse farmacevtske oblike (34, 35).

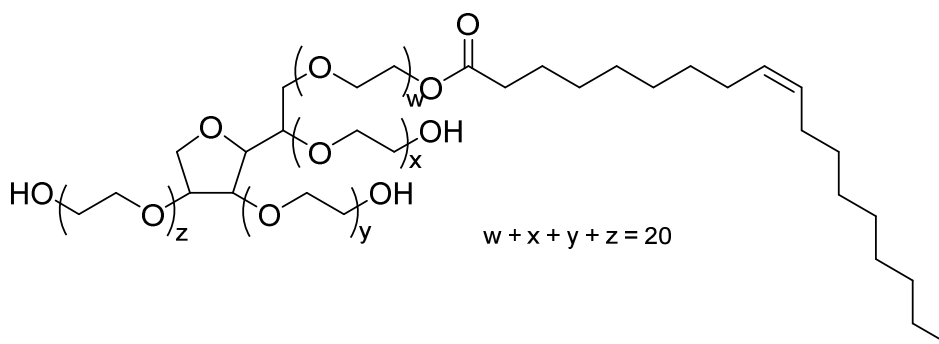
Lipoid S-100® je vrsta sojinega lecitina, ki vsebuje vsaj 94% fosfatidilholina. V manjših količinah pa vsebuje tudi lizofosfatidilholin, fosfatidiletanolamin, trigliceride, proste maščobne kisline,  $\alpha$ -tokoferol in vodo. Je svetlo rumene barve, voskaste konsistence, oblikovan v grobe aglomerate z blagim vonjem (35, 36).



**Slika 9:** Strukturna formula fosfatidilholina; R<sub>1</sub> in R<sub>2</sub> sta maščobni kislini. V Lipoidu S-100® prevladuje linolna kislina (59-70%).

### Tween<sup>®</sup> 80 (Sigma-Aldrich, Nemčija)

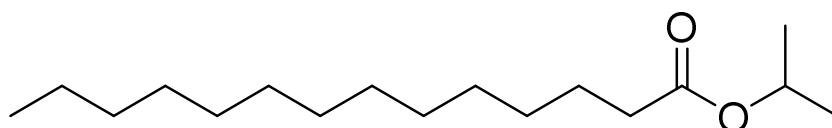
Tween<sup>®</sup> 80 imenujemo tudi polisorbat 80 in je kemijsko polioksietilen-20-sorbitan monooleat (slika 10). Je svetlo rumene barve in viskozne konsistence. Dobro je topen v vodi, alkoholu, olju bombažnih semen, koruznem olju, etil acetatu in toluenu. Netopen je v mineralnih oljih. Je hidrofilni neionski emulgator s HLB (hidrofilno-lipofilno ravnotežje) vrednostjo 15 in se uporablja za izdelavo emulzij olje v vodi (v/o) (37). V farmaciji in kozmetologiji se najpogosteje uporablja kot emulgator, solubilizator in močljivec v dermalnih in parenteralnih farmacevtskih oblikah, v kozmetičnih pripravkih in v nizkih koncentracijah v izdelkih za oči, pogost pa je tudi v prehrambeni industriji, kjer se uporablja kot aditiv živilom (38).



**Slika 10:** Strukturna formula Twena<sup>®</sup> 80.

### Izopropilmiristat (Sigma-Aldrich, Nemčija)

Izopropilmiristat (IPM, slika 11) je ester propan-2-ola in miristinske kisline. Je bistra, tekoča, brezbarvna snov z nizko viskoznostjo. Topen je v alkoholu, acetonu, kloroformu, etil acetatu, toluenu in mineralnih oljih. Netopen je v vodi in glicerolu. Odporen je na oksidacijo in hidrolizo (39). Pogosto se uporablja v farmacevtskih izdelkih za izboljšanje topnosti in povečanje dermalne absorpcije zdravilnih učinkovin. Na koži deluje emolientno. Njegova slabost je, da maši pore, vendar je kljub temu najpomembnejši sintetični ester za uporabo v kozmetičnih pripravkih (40, 41).



**Slika 11:** Strukturna formula izopropilmiristata.



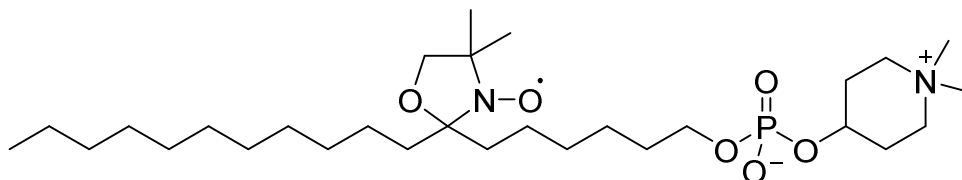
## Bidestilirana voda

Mili-Q deionizirano vodo smo pripravili na Fakulteti za farmacijo z aparaturo za pripravo bidestilirane vode Mili-Q Advantage A10, Millipore.

### 3.1.2 RAZTOPINE SPINSKIH OZNAČEVALCEV

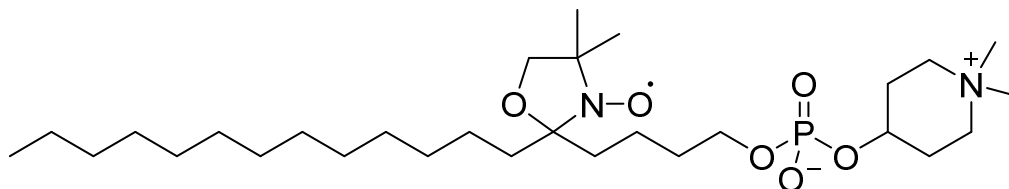
Za EPR meritve smo uporabili spinske označevalce z nitroksidnim paramagnetnim centrom, ki je vezan na različne maščobne kisline. Ti bi naj odsevali ureditev in dinamiko lipidov v vzorcu (7). Spinske označevalce, ki smo jih uporabljali, je sintetiziral izr. prof. dr. Janez Mravljak, mag. farm. na Fakulteti za farmacijo.

#### • 0,01 M raztopina 7P v absolutnem etanolu



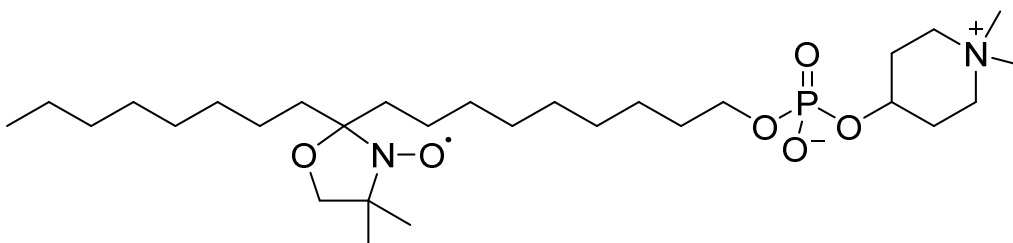
Slika 12: Kemijska struktura 7P ( $C_{29}H_{58}N_2O_6P^*$ ).

#### • 0,01 M raztopina 5P v absolutnem etanolu



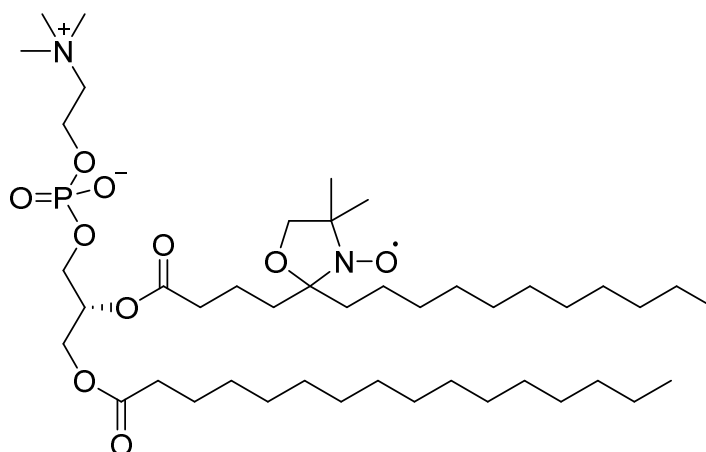
Slika 13: Kemijska struktura 5P ( $C_{29}H_{58}N_2O_6P^*$ ).

#### • 0,01 M raztopina 10P v absolutnem etanolu



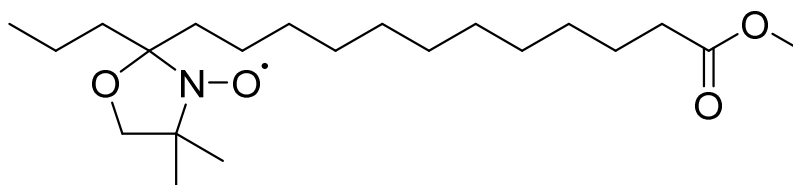
Slika 14: Kemijska struktura 10P ( $C_{29}H_{58}N_2O_6P^*$ ).

- 0,01 M raztopina SO-PC v absolutnem etanolu



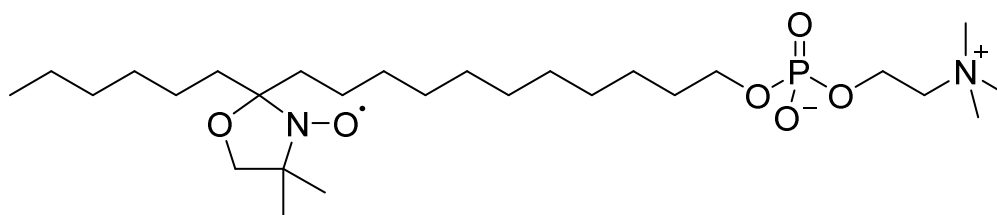
Slika 15: Kemijska struktura SO-PC ( $C_{44}H_{86}N_2O_{10}P^+$ ).

- 0,01 M raztopina MeFASL (2,11) v absolutnem etanolu



Slika 16: Kemijska struktura MeFASL-a (2,11) ( $C_{21}H_{40}NO_4^+$ ).

- 0,01 M raztopina 12C v absolutnem etanolu



Slika 17: Kemijska struktura 12C ( $C_{27}H_{56}N_2O_6P^+$ ).

### 3.2 PRIPRAVA TEKOČIH KRISTALOV S SPINSKIMI OZNAČEVALCI

TK smo pripravili tako, da smo v stekleno erlenmajerico z obrusom na analitski tehtnici natančno natehtali lecitin, IPM in Tween 80, ter pustili mešati čez noč (slika 18) do nastanka rumene homogene zmesi (v nadaljevanju *lipofilna zmes*). Nato smo zmesi dodali bidestilirano vodo in ponovno mešali na magnetnem mešalu do nastanka homogene zmesi oziroma TK. Natančna sestava izdelanih TK (TK1-TK8) je podana v *Preglednici I*. Sistemi TK1-TK8 se nahajajo na razredčitveni premici z razmerjem emulgatorska zmes (lecitin/Tween 80 = 1/1) / IPM = 7/3. Začetni zmesi emulgatorske zmesi in oljne faze dodajamo različen delež vode za nastanek TK1-TK8.

Za vrednotenje TK1-TK8 z EPR metodo smo vanje vgradili različne SO brez organskega topila. V ta namen smo splošen postopek priprave TK prilagodili. Natančneje, v epruveto smo odpipetirali 44  $\mu\text{L}$   $10^{-2}$  M raztopine SO v etanolu. Topilo smo odparili na rotacijskem vakuumskem uparjevalniku (rotavaporju) pod znižanim tlakom, nato pa še na membranski vakuumski črpalki (slika 18). Na steni epruvete je nastal film SO, ki smo mu dodali 1 mL lipofilne zmesi (razmerja molekul SO : lipofilna zmes za sisteme TK so podana v *Preglednici II*), in nato na vodni kopeli s 60 °C mešali približno 10 minut. Tako pripravljene zmesi smo dodali določeno maso bidestilirane vode, ki smo jo predhodno izračunali iz predpisanega masnega deleža za določen vzorec TK in premešali na magnetnem mešalu do nastanka homogene zmesi oziroma TK z vgrajenim SO.

**Preglednica I:** Sestava posameznih TK (TK1-TK8) brez vgrajenih SO (m/m (%)).

TK	lecitin	Tween 80	IPM	bidestilirana voda
1	28,0	28,0	24,0	20,0
2	26,0	26,0	23,0	25,0
3	24,5	24,5	21,0	30,0
4	22,5	22,5	20,0	35,0
5	21,0	21,0	18,0	40,0
6	19,0	19,0	17,0	45,0
7	17,5	17,5	15,0	50,0
8	15,5	15,5	14,0	55,0

**Preglednica II:** Razmerja molekul SO : lipofilna zmes\* za vzorce TK1-TK8 označene s 5P, SO-PC, 10P.

<b>TK</b>	<b>5P</b>	<b>SO-PC</b>	<b>10P</b>
<b>1</b>	1 : 882	1 : 840	1 : 886
<b>2</b>	1 : 832	1 : 930	1 : 779
<b>3</b>	1 : 858	1 : 856	1 : 837
<b>4</b>	1 : 869	1 : 861	1 : 852
<b>5</b>	1 : 908	1 : 880	1 : 785
<b>6</b>	1 : 917	1 : 784	1 : 779
<b>7</b>	1 : 954	1 : 799	1 : 803
<b>8</b>	1 : 865	1 : 853	1 : 747

\* Za izračun množine snovi lipofilne zmesi smo za lecitin uporabili povprečno molekulsko maso ( $M = 767,34 \text{ g/mol}$ ).

### **3.3 METODE ZA VREDNOTENJE TK Z EPR**

#### **3.3.1 MERITVE DINAMIKE SPINSKIH OZNAČEVALCEV**

Za snemanje spektrov pri sobni temperaturi smo uporabili EPR spektrometer MiniScope MS400 (Magnettech) (slika 18). Vzorce pripravljene po zgoraj napisanem postopku smo z brizgo (slika 18) polnili v steklene kapilare. Te smo obrisali in zamašili s plastelinom tako, da ni bil v stiku z vzorcem. Spektre smo posneli s pomočjo računalniškega programa Miniscope Control 6.51 (Magnettech).

Parametri meritev na EPR spektrometru MiniScope MS400:

- središčna jakost magnetnega polja ( $B_0$ -field): 3344 G,
- obseg meritve (Sweep): 100 G,
- časovni obseg meritve (Sweep time): 60 s,
- število ponovitev (Number (pass)): 1, v primeru zašumljenega spektra povečamo do 4,
- modulacijska amplituda (Modulation): 1000 mG,
- atenuacija mikrovalov (MW atten): 10 dB,
- ojačenje (Gain):  $1 \times 10^2$  (1 E 2) oz. prilagodimo tako, da spekter sega do roba okna.

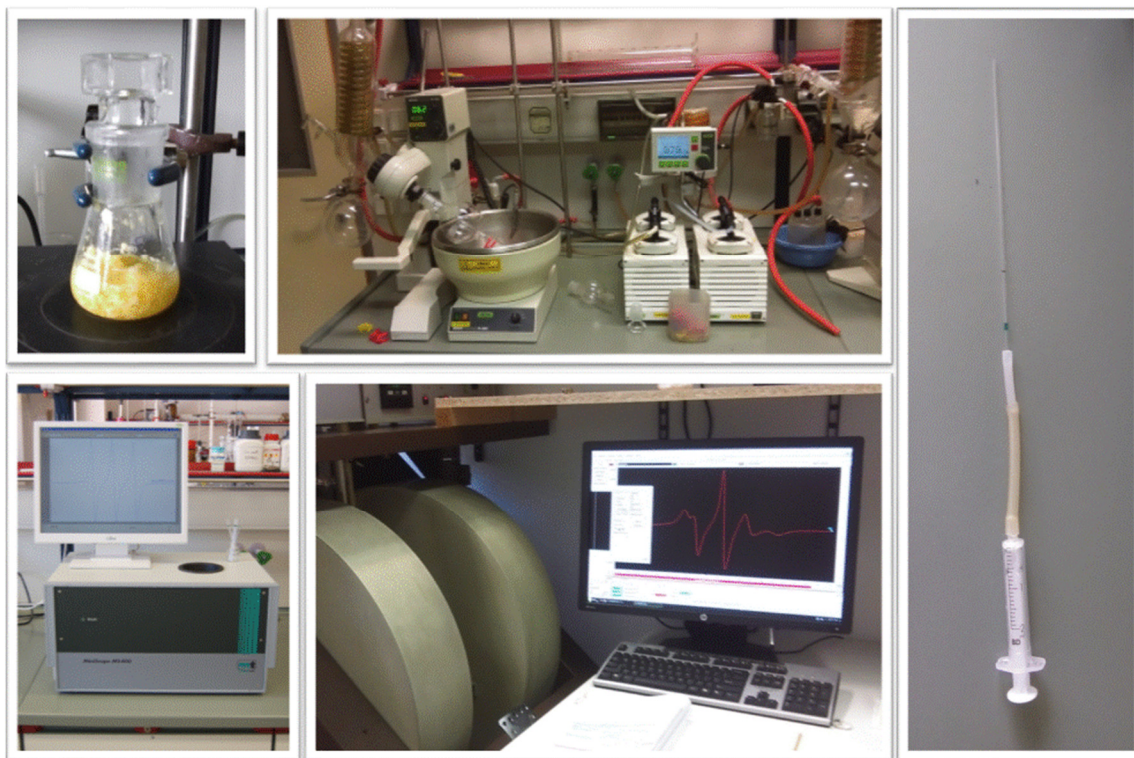
Po prilagoditvi vseh parametrov smo vstavili kapilaro v resonator EPR naprave in posneli EPR spekter. EPR spektre smo analizirali ali s programom Analysis (Magnettech) ali pa s programom Multiplot (Magnettech). Slednji omogoča primerjavo več istočasno naloženih spektrov.

EPR spektre smo posneli tudi na Institutu Jožef Stefan, v Laboratoriju za biofiziko. EPR spektrometer ELEXSYS E500 (Bruker) (slika 18) omogoča merjenje pri točno določeni temperaturi. V tem primeru smo kapilare zatalili, saj se sicer plastelin z naraščanjem temperature stopi in vzorec steče iz kapilare. Ta spektrometer ima za razliko od MiniScope MS400 termostatiran resonator, s katerim lahko segrevamo ali ohlajamo vzorec. Termostatiranje vzorca poteka s prepihanjem resonatorja z ogretim tokom dušika. Vzorce smo segrevali od 22 °C do 62 °C, v intervalih po 5 °C na  $\pm 0,5$  °C natančno.

Parametri meritev na EPR spektrometru ELEXSYS E500:

- središčna jakost magnetnega polja ( $B_0$ -field): 3320 G,
- obseg meritve (Sweep): 100 G,
- časovni obseg meritve (Sweep time): 41,94 s,
- število ponovitev (Number (pass)): 1,
- modulacijska amplituda (Modulation): 1000 mG,
- atenuacija mikrovalov (MW atten): 10 dB,
- ojačenje (Receiver gain): 50 dB,
- konverzijski čas (Conversion time): 40,96 ms,
- časovna konstanta (Time constant): 40,96 ms.

Pred začetkom meritve sklopimo instrument in vklopimo parametre, nato pa zaženemo meritve. Vsak vzorec smo pomerili pri 9 različnih temperaturah (295 – 335 K, v intervalih po 5 K). Za vsako posamezno meritev smo neposredno iz EPR spektra odčitali širino spektra oz. maksimalni hiperfinski razcep ( $2A_{\max}$ ). Simulacije izmerjenih spektrov smo naredili s pomočjo programa EPRSIM WIZ 6.2.2.



**Slika 18:** V zgornjem levem kotu vidimo lipofilno zmes, ki se meša na magnetnem mešalu, zgornja srednja fotografija prikazuje odparevanje topila iz raztopine SO na rotavaporju (levo) in membranski vakuumski črpalci (desno). Na spodnji levi fotografiji je EPR spektrometer MiniScope MS400, na srednji pa EPR spektrometer ELEXSYS E500. Skrajna desna fotografija prikazuje brizgo, s katero smo polnili vzorce v kapilare.

### 3.3.2 ANALIZA EPR SPEKTROV

Za simulacijo EPR spektrov smo uporabili program EPRSIM WIZ 6.2.2. (© Janez Štrancar), ki je bil razvit v Laboratoriju za biofiziko, na Institutu Jožefa Stefana (42, 43). Eksperimentalni spekter je superpozicija spektralnih komponent z različnimi lastnostmi, ki ustrezajo obnašanju SO v posameznem območju vzorca z različno fluidnostjo. Skupina območij s podobnimi fluidnimi lastnostmi predstavlja posamezen domenski tip. Vsak domenski tip je določen s setom spektralnih parametrov, ki nam dajo podrobnejše informacije o supramolekularni strukturi TK. Parametra, ki odražata fluidnost membrane v domeni, sta ureditveni parameter ( $S$ ) in rotacijski korelacijski čas ( $\tau_c$ ), ki opisuje gibanje SO v domeni (29). Ostali parametri so: širina črte ( $W$ ), korekcijski faktor polarnosti hiperfine sklopitve ( $P_A$ ) in  $g$  faktorja ( $P_G$ ) ter delež vsake spektralne komponente – domene ( $d$ ). Ureditveni parameter opisuje orientacijsko urejenost doksilne skupine (z nitroksidom) SO

in je odvisen od urejenosti okoliških acilnih verig. Le ta lahko variira od  $S = 1$  za popolno urejene membrane do  $S = 0$  za izotropno porazdeljene molekule. Dinamiko gibanja spinskega označevalca opisuje rotacijski korelacijski čas. Kratek je za hitra gibanja SO, dolg pa za počasna gibanja kot so v viskozni tekočini. Širina črte ( $W$ ) nam podaja informacijo o interakcijah med SO in prispevki ostalih paramagnetnih nečistot (kisik, nehomogeno zunanjo magnetno polje). Oba korekcijska faktorja polarnosti ( $P_A$  in  $P_G$ ) izhajata iz polarnosti okolice nitroksidne skupine. Za nepolarno okolje se vrednosti nahajajo pod 1 in za zelo polarno okolje nad 1. Delež posamezne domene ( $d$ ) opisuje relativno vrednost SO z določenim načinom gibanja. Odvisen je od porazdelitve molekul SO med območji z različnimi pretočnimi karakteristikami. Vsaka spektralna komponenta ima lastnosti le najbližje okolice doksilne skupine SO na nanometrski skali in ima podobno gibanje spinskega označevalca v nekem določenem območju membrane (30, 44, 45).

Za zagotovitev najboljšega ujemanja EPR spektra z eksperimentalnim smo uporabili EPRSIM WIZ 6.2.2. skupaj s kondenzacijsko metodo GHOST. Program simulira EPR spektre in jih prilega izmerjenemu spektru. S pomočjo genetskega algoritma izbere 10 najboljših prileganj. GHOST se uporablja za samodejno detekcijo in karakterizacijo kompleksnosti sistema. Rezultati so v obliki dvodimenzionalnih diagramov in nam dajejo informacije o povprečnih spektralnih komponentah in prispevkih posamezne domene; velikost, število, gibanje in ureditev. Upoštevati moramo dejstvo, da je spekter sestavljen iz vsaj treh spektralnih komponent z različnim gibanjem SO. Delež najbolj urejene domene (D1) z naraščanjem temperature pada, medtem ko se delež najmanj urejene domene (D3) veča (29, 42, 44).

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 IZBIRA SPINSKIH OZNAČEVALCEV

Za preučevanje bioloških membran vedno izberemo tak SO, ki je po zgradbi in kemičnih lastnostih najbolj podoben gradnikom proučevanega vzorca. Tako najbolje odraža dogajanje v lipidnem dvosloju (46). MeFASL je eden izmed najpogosteje uporabljenih SO za preučevanje bioloških membran. Uporabili smo MeFASL (2,11). Gre za metilni ester palmitinske kisline, ki ima doksilno skupino na trinajstem C-atomu maščobne kisline (slika 16). Daje nam informacije o gibanju v notranjosti membrane. MeFASL (2,11) v TK daje izotropen EPR spekter (slika 19). To nam pove, da so za območja v bližini nitroksidnega radikala značilna hitra gibanja lipidov, posledično nizka urejenost in nizek ureditveni parameter (S) ter velika fluidnost. Spinski označevalec MeFASL (2,11) nima polarne glave, ki bi ga lahko umestila v medfazni prostor med vodo in lipidi - v območje največje urejenosti, zato je najverjetneje nekje v notranjosti lipidne faze med neurejenimi lipidnimi verigami. Možno je tudi, da se razporedi prečno na lipidni dvosloj.

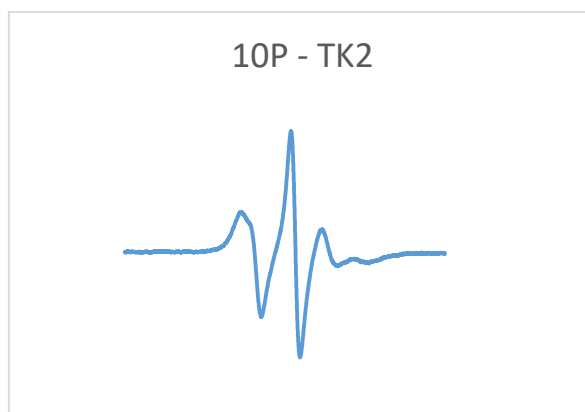


**Slika 19:** Levo: EPR spekter MeFASL-a (2, 11) v TK2. Desno: EPR spekter 12C v TK2.

EPR spekter SO 12C v TK2 je tipičen membranski spekter (slika 19). SO 12C ima polarno glavo s holinom in fosfatom, doksilna skupina pa se nahaja na dvanajstem C-atomu (slika 17). Predvidevamo, da se polarna glava SO nahaja na stiku med hidrofilno in lipofilno fazo, lipofilna veriga z nitroksidnim radikalom pa se nahaja v notranjosti med lipidi. Ker je doksil skoraj na koncu dolge alkilne verige, se najverjetneje nahaja na sredini fosfolipidnega dvosloja, kjer prevladuje živahno gibanje lipidnih molekul. To se odraža v majhnem ureditvenem parametru (S).



EPR spekter SO 10P (slika 20) izkazuje večjo urejenost okolice nitroksidnega radikala. 10P je zgrajen iz polarne glave in osemnajst C-atomov dolge lipidne verige (slika 14). Doksilna skupina se nahaja na desetem C-atomu in daje informacije o urejenosti in dinamiki lipofilnih območij lamelarne faze. Gibanje doksilne skupine je bolj omejeno kot pri MeFASL (2,11) in 12C v TK2.  $2A_{\max}$  znaša 43 G, zato je EPR spekter širši kot pri MeFASL (2,11) in 12C.



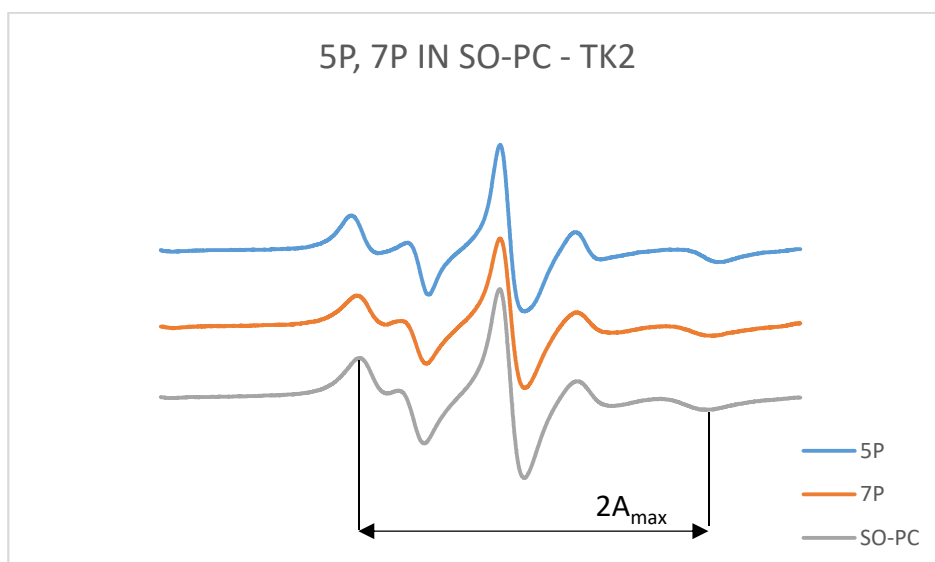
**Slika 20:** Membranski spekter SO 10P v TK2.

Bolj kot spremembe v neurejeni in dinamično živahni notranjosti membrane nas zanimajo spremembe gibanja v bolj urejenih območjih blizu hidrofilno-lipofilne medfaze. Uporabili smo tri različne SO. Vse meritve so bile izvedene na TK2, saj vemo iz preteklih študij, da se amfifilne molekule v tem vzorcu uredijo v značilno lamelarno strukturo.

SO 7P ima polarno glavo, doksilna skupina z nitroksidom pa leži na sedmem C-atomu (slika 12). Daje nam informacije o urejenosti neposredne okolice doksilne skupine. EPR spekter 7P v TK2 (slika 21) je anizotropen, kar pomeni, da je gibanje v okolici doksilne skupine zelo omejeno oz. doksilna skupina se lahko giba le tako, kot ji dopuščajo alkilne verige maščobnih kislin lipidov. Urejenost je velika, prav tako tudi ureditveni paramater ( $S$ ) in viskoznost vzorca.

SO 5P ima enako molekulsko maso kot 7P in 10P, saj sta polarna glava in osemnajst C-atomov dolga lipofilna veriga enaki (slika 13). Edina razlika je v položaju doksilne skupine, ki se v tem primeru nahaja na petem C-atomu od polarne glave. Iz slike 21 opazimo, da je EPR spekter 5P v TK2 še nekoliko širši, saj se doksilna skupina nahaja za dva C-atoma bližje polarnim glavam kot pri 7P. Posledično je tudi urejenost okolice večja.

SO-PC smo izbrali na podlagi njegove strukture, saj je ta najbolj podobna fosfolipidom v lecitinu. Polarni del predstavlja fosfatidilholin, ki je preko fosfatnega estra pripet na gliceril, ta pa je zaestren s še dvema palmitinskima maščobnima kislinama (slika 15). Maščobna kislina, ki je pripeta na drugi –OH skupini glicerola, je spinsko označena. Doksilna skupina se nahaja na petem C-atomu palmitinske kisline. EPR spekter SO-PC v TK2 je izrazito anizotropen membranski spekter (slika 21).



**Slika 21:** Membranski spektri SO 7P (moder), 5P (oranžen) in SO-PC (siv) v TK2 z označeno širino  $2A_{\max}$ .

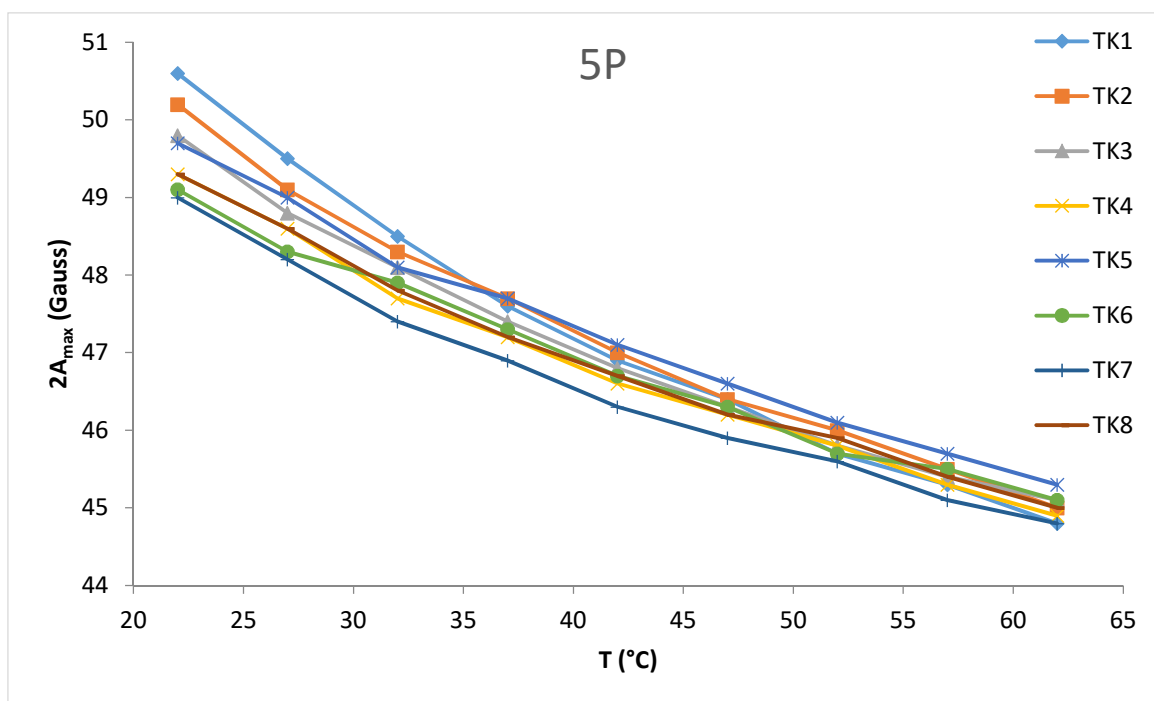
Vsi trije SO (5P, 7P in SO-PC) se v lipidih orientirajo tako, da imajo doksilno skupino blizu stika lipofilne in hidrofilne faze, kjer je biološka membrana najbolj urejena, zato je EPR spekter širok. Širina spektra nam daje informacijo o urejenosti oziroma viskoznosti neposredne okolice nitroksida.

Za nadaljnja snemanja spektrov TK smo za preučevanje urejenosti in dinamike v notranjosti membrane izbrali SO 10P. Ta je dal v primerjavi s SO MeFASL (2,11) in 12C širši EPR spekter. Za preučevanje območij v bližini vodno-lipidnega stika smo uporabljali SO 5P in SO-PC. 5P ima doksilno skupino najbližje polarni glavi, zato je njegov spekter najširši. Za SO-PC smo se odločili na podlagi njegovih strukturnih lastnosti, saj so te najbolj podobne fosfolipidom v lecitinu.

## 4.2 VREDNOTENJE MAKSIMALNEGA HIPERFINEGA RAZCEPA

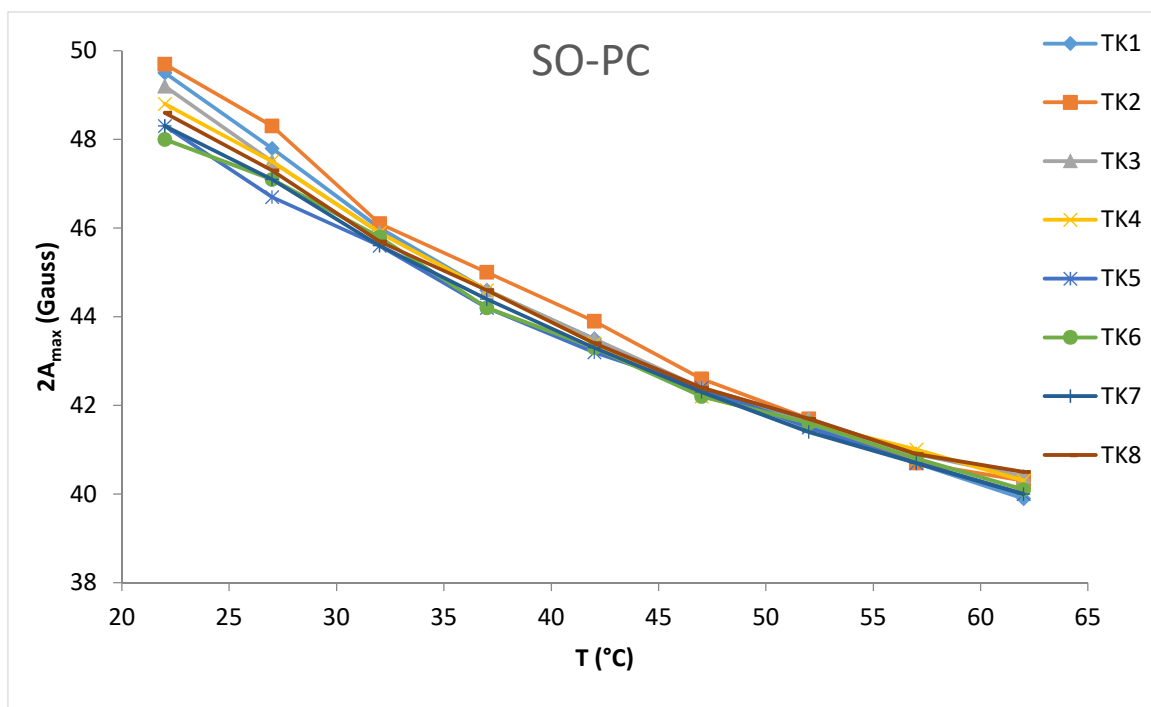
Na EPR spektrometru ELEXSYS E500 (Bruker) smo posneli EPR spektre 5P, 10P in SO-PC v TK1 – TK8; skupaj torej štiriindvajset vzorcev. Vsak vzorec je bil pomejen pri devetih različnih temperaturah v razponu od 22 do 62 °C (z dovoljenim temperaturnim odstopanjem +/- 0,5 °C), v intervalih po 5 °C. Za vsako posamezno meritev smo izmerili širino spektra oz. maksimalni hiperfinski razcep ( $2A_{\parallel}$  oz.  $2A_{\max}$ ), ki je sorazmeren s povprečno urejenostjo neposredne okolice radikala v lipidnem dvosloju.  $2A_{\max}$  določa povprečno fluidnost membrane v bližnjem območju SO. Za vsako serijo meritev TK označenih s posameznim SO smo narisali graf. Na x-os smo nanegli temperaturo v °C, na y-os pa v Gaussih izmerjeno širino spektra oz.  $2A_{\max}$ , za vsak posnet spekter.

Najvišje vrednosti  $2A_{\max}$  smo opazili pri TK označenih s 5P (slika 22), saj leži nitroksidna skupina v lipidnem dvosloju najbližje območju s polarnimi glavami. To je območje, kjer so molekule najbolj urejene in ureditveni parameter (S) najvišji. Značilnost teh vzorcev je nizka fluidnost. Razlike v širini spektrov med TK z različnim deležem vode so dobro vidne pri nižjih temperaturah, nad 37 °C pa postanejo manj izrazite. Z naraščanjem temperature se širine spektrov postopoma zmanjšujejo za vse TK. Najhitrejši padec  $2A_{\max}$  opazimo pri TK1 (slika 22).



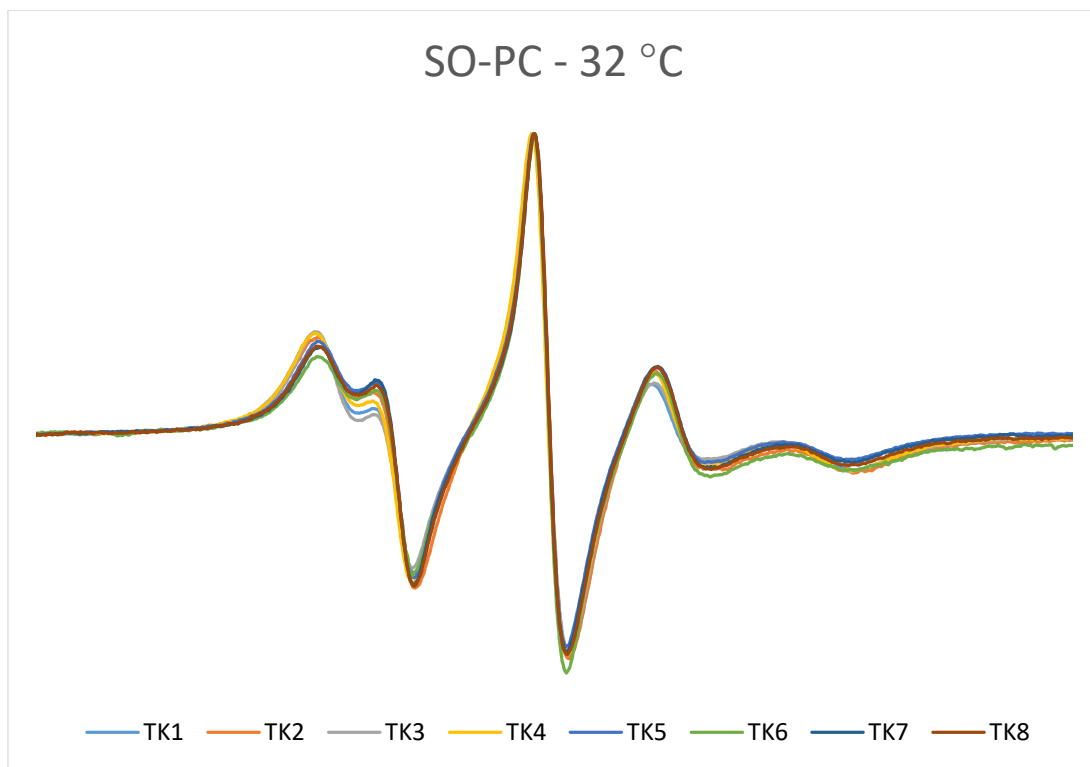
**Slika 22:** Graf prikazuje manjšanje širine EPR spektra ( $2A_{\max}$ ) z naraščanjem temperature za vzorce TK1 – TK8 označene s 5P.

TK označeni s SO-PC imajo rahlo nižje vrednosti  $2A_{\max}$  (slika 23) v primerjavi s SO 5P. Doksilna skupina SO-PC leži na petem C-atomu alkilne verige maščobne kisline, in sega globlje v lipidni dvosloj kot pri 5P. Podobno kot na zgornjem grafu SO 5P (slika 22) opazimo pri vzorcu TK1 najhitrejši padec  $2A_{\max}$  z naraščanjem temperature. Širina spektra, s tem pa tudi urejenost in viskoznost, padajo z naraščanjem temperature. Razlike v  $2A_{\max}$  za vzorce TK1 – TK8, ki se razlikujejo v deležu dodane vode, so še manjše, kot so pri TK označenih s 5P. Pri meritvah nad 32 °C ni bistvenih razlik med TK.



**Slika 23:** Graf prikazuje manjšanje širine spektra ( $2A_{\max}$ ) z naraščanjem temperature za TK1 – TK8 označene s SO-PC.

Na sliki 24 opazimo, da so razlike med EPR spektri s SO-PC označenih TK, ki se razlikujejo le v deležu vode, že pri 32 °C tako majhne, da se normalizirni spektri, skoraj popolnoma prekrivajo. Te razlike se z naraščanjem temperature samo še manjšajo. Nad temperaturo 32 °C so razlike v okviru eksperimentalne napake, ki znaša približno 0,2 G.

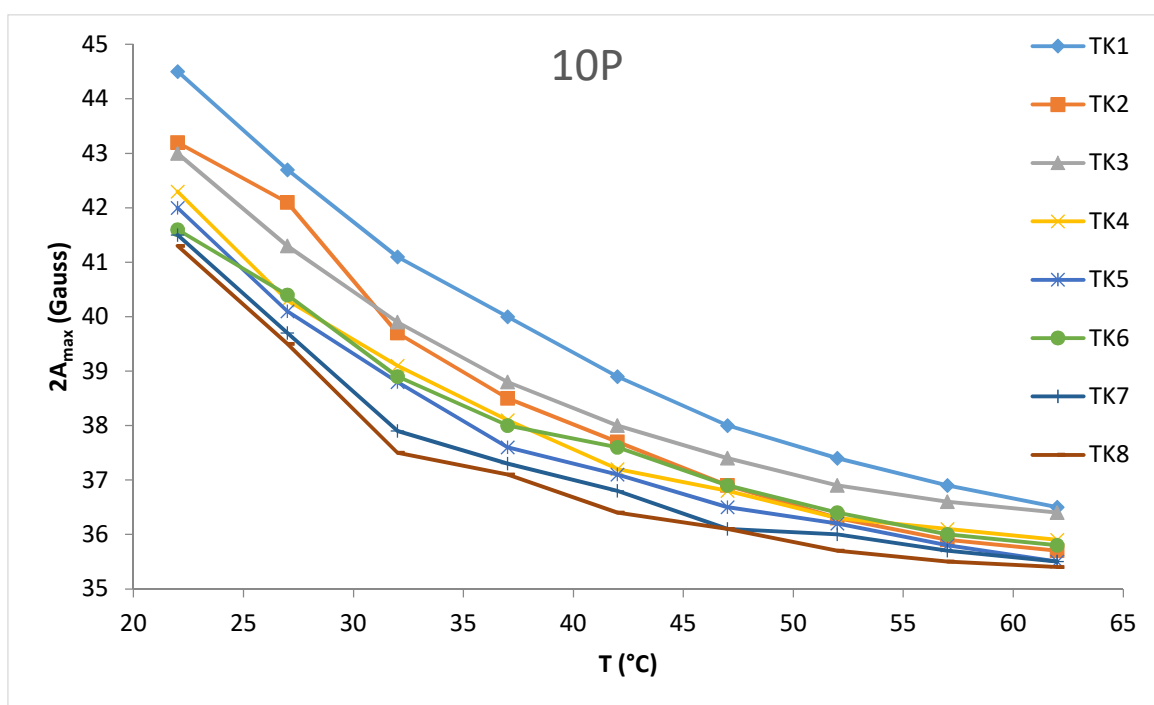


**Slika 24:** Normalizirani EPR spektri SO-PC v TK1 – TK8 pri 32 °C.

Zanimalo nas je, če bomo vzorcem s počasnim segrevanjem določili fazni prehod med posameznimi fazami. Iz EPR spektrov TK v celotnem temperaturnem območju in grafa (slika 23) ne moremo dobiti nobenih konkretnih podatkov o morebitnih faznih prehodih, ker se  $2A_{\max}$  spreminja enakomerno brez izrazitih skokov. Na podlagi grafov odvisnosti širine spektra od temperature smo za vsak posamezen vzorec določili območje, kjer bi se lahko pojavil fazni prehod. V tem območju smo vzorce segrevali z intervalom 1 °C. Iz meritev  $2A_{\max}$  smo ponovno narisali grafe, ki niso pokazali nobenih izrazitih preskokov. Zato sklepamo, da do faznih prehodov sploh ne pride.

Pri TK označenih z 10P (slika 25) so bile spremembe maksimalnega hiperfinega razcepa najbolj izrazite. Opazen je največji razcep med posameznimi TK z različnim deležem vode, pri enaki temperaturi. Pri 22 °C je širina spektra TK1, ki vsebujejo 20 % vode, 44,5 G, medtem ko je širina spektra TK8, ki vsebujejo 55 % vode, le 41,3 G. Največja razlika med TK1 in TK8 je opazna pri 32 °C, saj znaša skoraj 4 G. Meritve z 10P nam povedo, da se glavne spremembe zaradi naraščanja koncentracije vode dogajajo globlje v lipofilnih območjih membrane, kjer se pretežno nahaja doksilna skupina 10P.

Iz slike 25 je dobro razvidno, da so največje izmerjene širine spektrov precej manjše od največjih izmerjenih širin spektrov pri ostalih dveh označevalcih (5P in SO-PC). Potrdimo lahko, da se doksilna skupina SO 10P nahaja v veliko manj urejenem območju, molekule se tukaj veliko bolj živahno gibljejo in fluidnost je večja, v primerjavi s TK označenimi s 5P in SO-PC. Presenetljivo pa ima delež vode večji vpliv na urejenost tega dela fosfolipidnega dvosloja, kot na urejenost molekul v višje ležečih predelih fosfolipidnega dvosloja, ki ga tipamo s 5P in SO-PC. Razlike med  $2A_{\max}$  vzorcev so tukaj največje. Z naraščanjem temperature se  $2A_{\max}$  manjša pri vseh osmih vzorcih, kar pomeni, da se tudi urejenost med molekulami manjša. Razlike med vzorci z višjo temperaturo postanejo sicer manjše, so pa še vedno signifikantne. Izstopa vzorec TK1, ki ima vzdolž naraščanja temperature precej višjo  $2A_{\max}$  kot vsi ostali TK.



**Slika 25:** Graf prikazuje manjšanje širine spektra ( $2A_{\max}$ ) z naraščanjem temperature za TK1 – TK8 označene s SO 10P.

Sklepamo lahko, da se s povečevanjem deleža vode v sistemih TK urejenost lamelarnih faz manjša. To se najlepše vidi na grafu TK označenih z 10P (slika 25). V vseh treh grafih izstopajo TK1, ki dajejo v primerjavi z ostalimi TK višje vrednosti maksimalnega hiperfinega razcepa, hitrejši je tudi padec  $2A_{\max}$  z naraščajočo temperaturo. Predvidevamo, da je struktura TK1 drugačna v primerjavi s strukturo TK ostalih vzorcev, kar so potrdili tudi

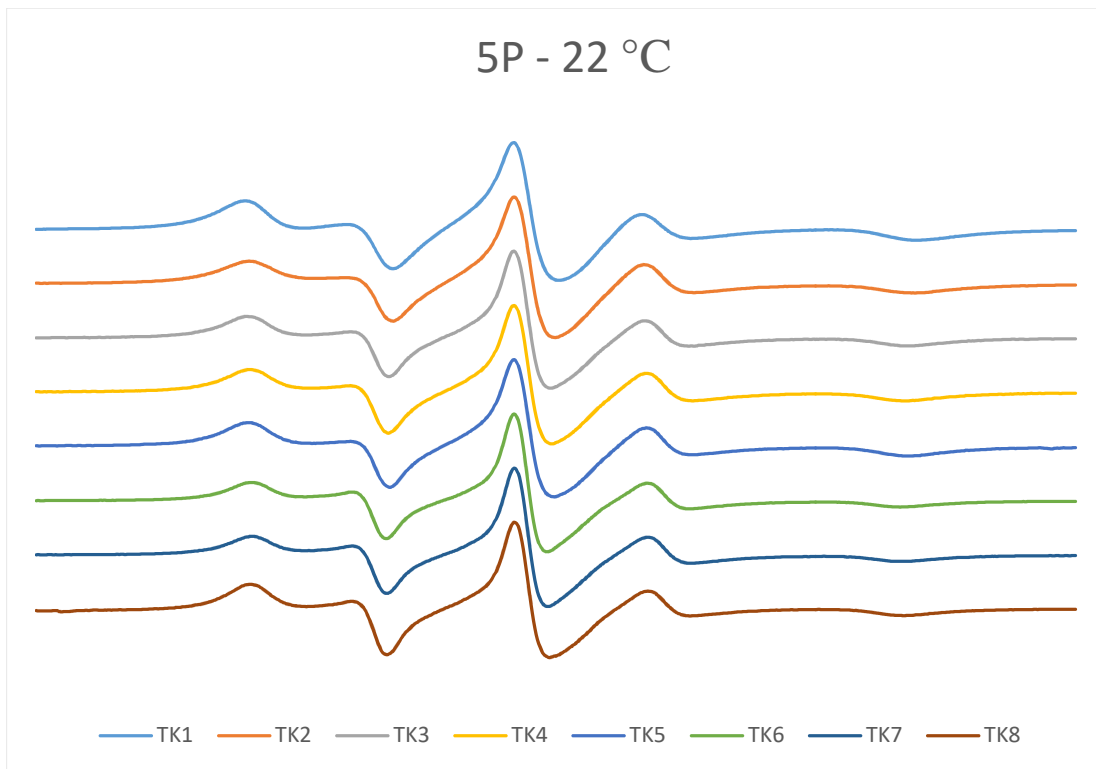
s predhodno narejeno optično polarizacijsko mikroskopijo in DSC analizo. Najvišje vrednosti  $2A_{\max}$  smo izmerili v sistemih TK označenih s 5P, ki nam dajejo informacije o urejenem območju v bližini polarnih glav. Najnižje vrednosti  $2A_{\max}$  pa smo izmerili za sistem TK označenih z 10P, ki poročajo o gibljivosti molekul in fluidnosti globlje v lipofilnih delih membrane. Z naraščanjem temperature se je vsem štiriindvajsetim vzorcem urejenost med molekulami zmanjševala, razlike med posameznimi vzorci pa so se z višanjem temperature manjšale. To najbolj opazimo pri TK označenih s SO-PC, kjer so razlike med TK nad 32 °C tako majhne, da jih težko ločimo, saj so v okviru eksperimentalnih napak.

### **4.3 SIMULACIJE EPR SPEKTROV**

Da bi dobili boljši vpogled v spremembe, ki se dogajajo v strukturi TK z naraščanjem temperature in spreminjanjem deleža vode, smo zagnali računalniško simulacijo EPR spektrov. Analizo smo izvedli s SO 5P in 10P. Za TK označene s SO-PC smo opazili zelo majhne razlike med oblikami EPR spektrov (slika 24), zato nam računalniške simulacije ne bi dale dovolj zanesljivih rezultatov.

#### **4.3.1 ANALIZA TK OZNAČENIH S SO 5P**

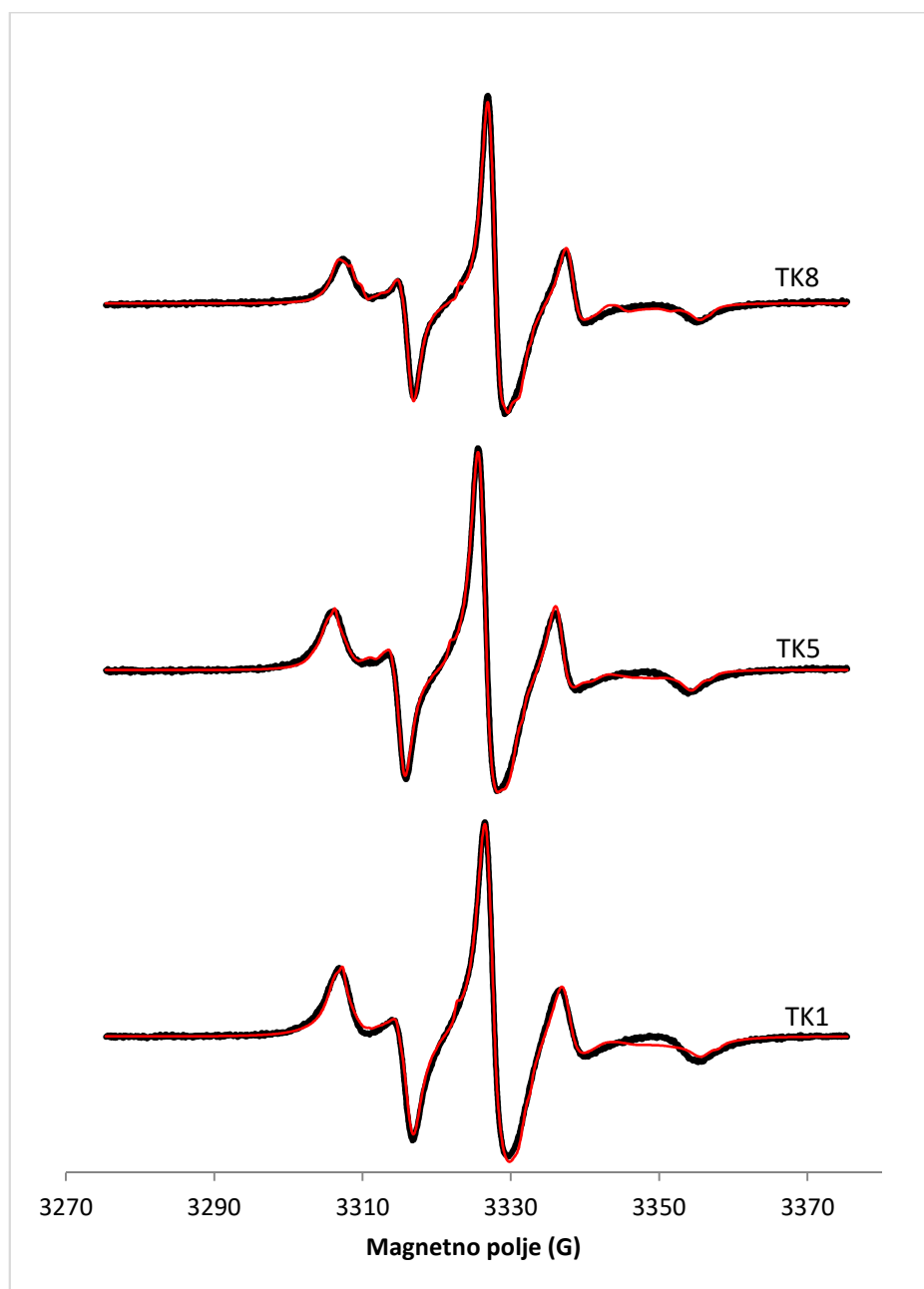
Spektri na sliki 26 so bili posneti pri temperaturi 22 °C. Vidimo, da TK označeni s 5P dajejo najširše EPR spektre, saj se doksilna skupina nahaja znotraj lipidnega dvosloja v najbolj urejenem območju. Razlike med EPR spektri 5P v TK1 – TK8, ki se razlikujejo v deležu vode, so zelo majhne.



**Slika 26:** EPR spektri TK1 – TK8 označenih s SO 5P pri temperaturi 22 °C.

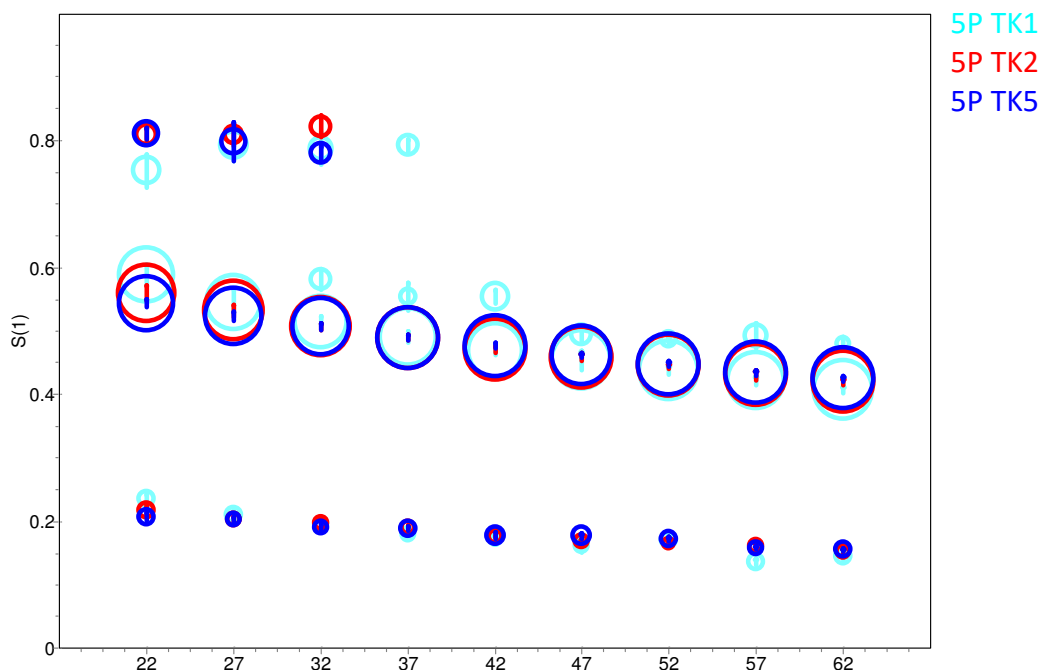


S simulacijami smo iskali najboljši približek k eksperimentalno dobljenim spektrom, ki so označeni s črno črto. Izračunan spekter pridobljen z metodo EPRSIM WIZ 6.2.2. je na spodnji sliki označen z rdečo barvo. Spodnji EPR spektri (slika 27) so bili posneti pri temperaturi površine kože (32 °C).

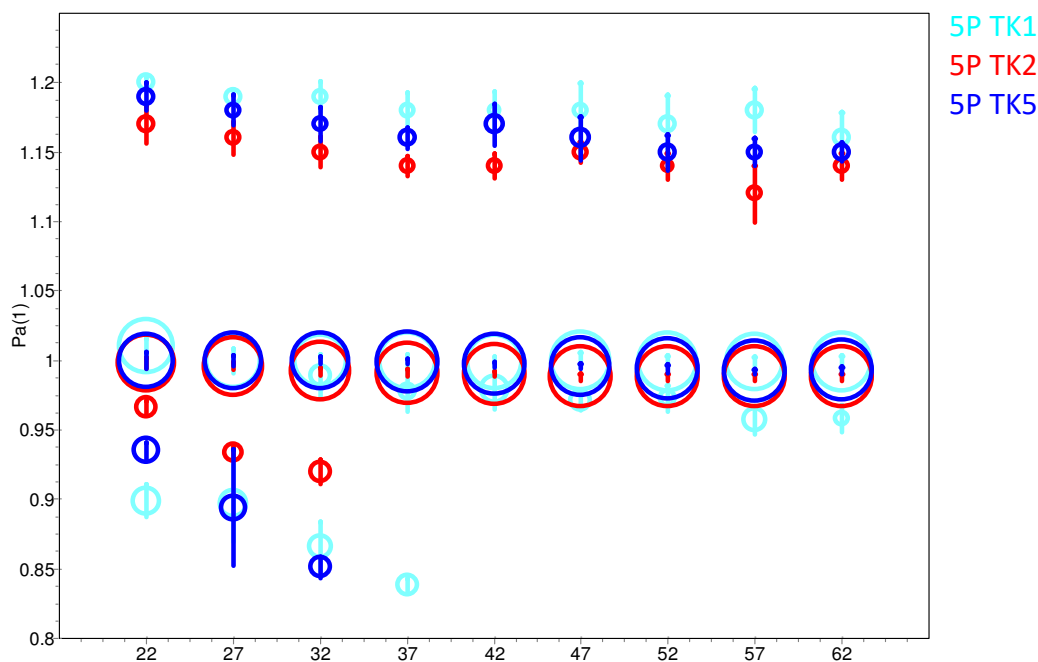


**Slika 27:** Eksperimentalni (črna črta) in izračunani (rdeča črta) spektri za TK1, TK5 in TK8 označene s 5P pri temperaturi površine kože (32 °C).

Slika 28 predstavlja mehurčni diagram temperaturne odvisnosti ureditvenega parametra ( $S$ ) za vzorce TK1, TK2 in TK5 označene s 5P. Premer mehurčka je sorazmeren deležu SO v posamezni domeni in prikazuje delež posamezne domene. Navpične črte opisujejo porazdelitev posameznega vzorca gibanja po faznem prostoru. Opazimo, da so naši vzorci sestavljeni iz treh spektralnih komponent; najbolj urejene domene ( $S = 0,8$ ), največje domene ( $S = 0,6$  za TK1) in najmanjše ter najmanj urejene domene ( $S \leq 0,2$ ). Ureditveni parameter ( $S$ ) največje domene počasi pada z naraščanjem deleža vode v TK (TK1 imajo najvišji  $S$ , TK5 pa najmanjši  $S$ ) pri 22 – 32 °C. Ureditveni parameter te domene se znižuje tekom celotnega temperaturnega območja, korekcijski faktor polarnosti pa se kljub naraščanju temperature ohranja in je enak 1. Najmanj urejena domena ima visoke vrednosti korekcijskega faktorja polarnosti ( $P_A = 1,13 - 1,2$ ) za vse prikazane TK (slika 29) in se ohranja z naraščanjem temperature. Opazimo tudi, da je vrednost  $P_A$  najmanj urejene domene za TK1 (20% vode) najvišja, nato sledijo TK5 (40% vode), TK2 (25% vode) pa imajo najnižjo vrednost  $P_A$ . Takšne spremembe glede na delež dodane vode smo opazili tudi za največjo domeno. Najbolj urejena domena se nahaja v zelo nepolarnem območju in izgine pri 42 °C .



**Slika 28:** Grafični prikaz temperaturne odvisnosti ureditvenega parametra ( $S$ ) ter deleža domen (velikost mehurčka) TK1, TK2 in TK5 označenih s 5P.



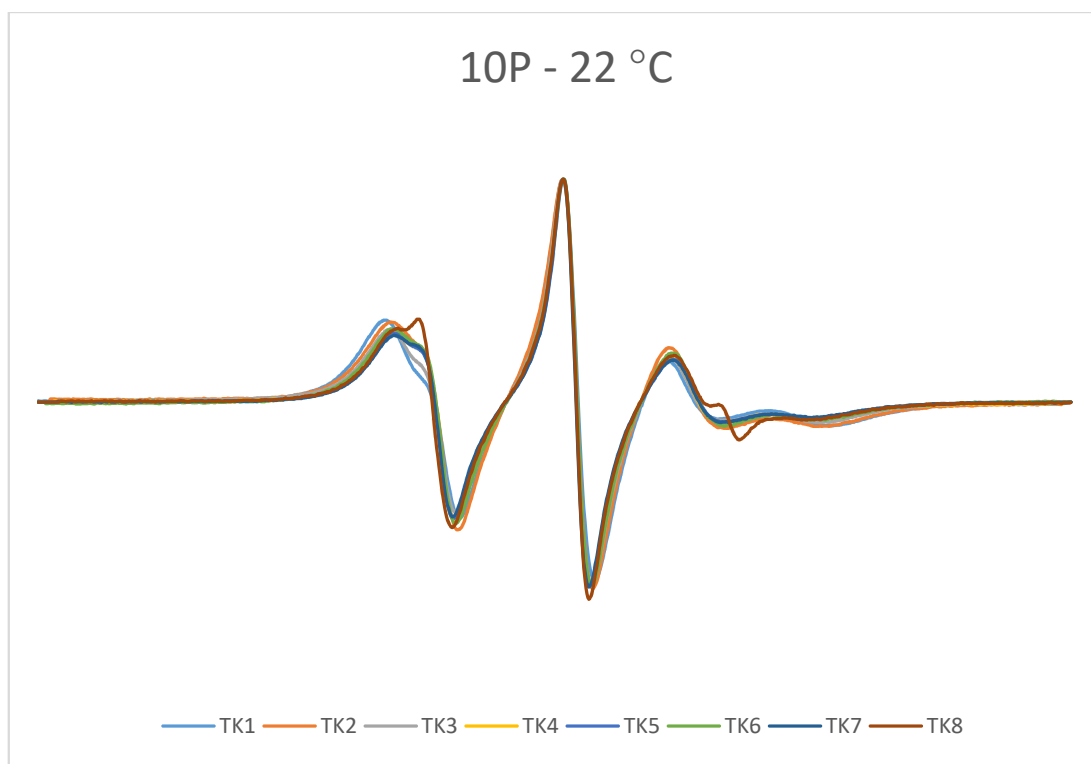
**Slika 29:** Grafični prikaz temperaturne odvisnosti korekcijskega faktorja polarnosti ( $P_A$ ) ter deleža domen (velikost mehurčka) TK1, TK2 in TK5 označenih s 5P.

Doksilna skupina se pri teh vzorcih nahaja v fosfolipidnem dvosloju blizu polarnih glav, zato bodo molekule SO 5P, ki se nahajajo v micelih, imele visoke vrednosti korekcijskega faktorja polarnosti, podobno kot proste molekule. Posledično bosta spektra micelnih struktur in prostih molekul med polietilen glikolnimi verigami Tweena 80 zelo podobna. To je tudi razlog, zakaj ima najmanj urejena domena najvišje vrednosti  $P_A$  (slika 29). TK1 se razlikujejo od vzorcev TK2 – TK8, saj smo edino pri tem vzorcu opazili, da pri temperaturi nad 27 °C obstaja dodatna spektralna komponenta, ki ima rahlo višji ureditveni parameter in rahlo nižjo polarnost v primerjavi z osrednjo komponento. Če upoštevamo, da so z reološkimi tehnikami in metodo SAXS ugotovili, da je za TK1 značilna heksagonalna faza, ki je sestavljena iz cilindričnih struktur, potem lahko to komponento pripišemo SO, ki je ujet v notranjosti cilindrov heksagonalne faze. Predhodno so že dokazali, da se urejenost nepolarnih verig v liotropnih TK bistveno ne spremeni s faznim prehodom med različnimi TK fazami, čeprav so razlike med strukturno ureditvijo molekul v TK velike. Tudi na podlagi rotacijskega gibanja molekul okoli osi cilindra v heksagonalni strukturi le-te ne moremo ločiti od lamelarne strukture (13). Zato nas ne preseneča, da smo med TK1 in ostalimi vzorci opazili le manjše spremembe.

Za TK označene s 5P, ki poročajo o visoki urejenosti fosfolipidnega dvosloja v bližini polarnih glav, nismo opazili izrazitih sprememb z naraščanjem temperature in deleža vode med oblikami EPR spektrov, z izjemo vzorca TK1. Sklepamo lahko, da koncentracija vode ne odigra tako pomembne vloge pri urejanju območja v bližini polarnih glav, kot jo pri urejanju v globljih plasteh membrane (TK označeni s SO 10P).

#### 4.3.2 ANALIZA TK OZNAČENIH S SO 10P

S SO 10P smo dobili informacije o dinamično aktivnem območju znotraj lipidnega dvosloja. Iz normaliziranih spektrov pri 22 °C (slika 30) težko opazimo kakšne večje razlike med TK1 in TK7, ki se razlikujejo v deležu dodane vode, izstopa pa vzorec TK8, ki nakazuje prehod v izotropen spekter. Glede na majhen delež PAS (31%) in zelo velik delež vode (55%) v vzorcu TK8, sklepamo, da pride do nastanka ali heksagonalne faze ali pa izotropne micelarne raztopine. Glede na obliko spektra sklepamo bolj na micelarno raztopino, ki so jo tudi dokazali s predhodno izvedeno analizo z metodo SAXS in reologijo.



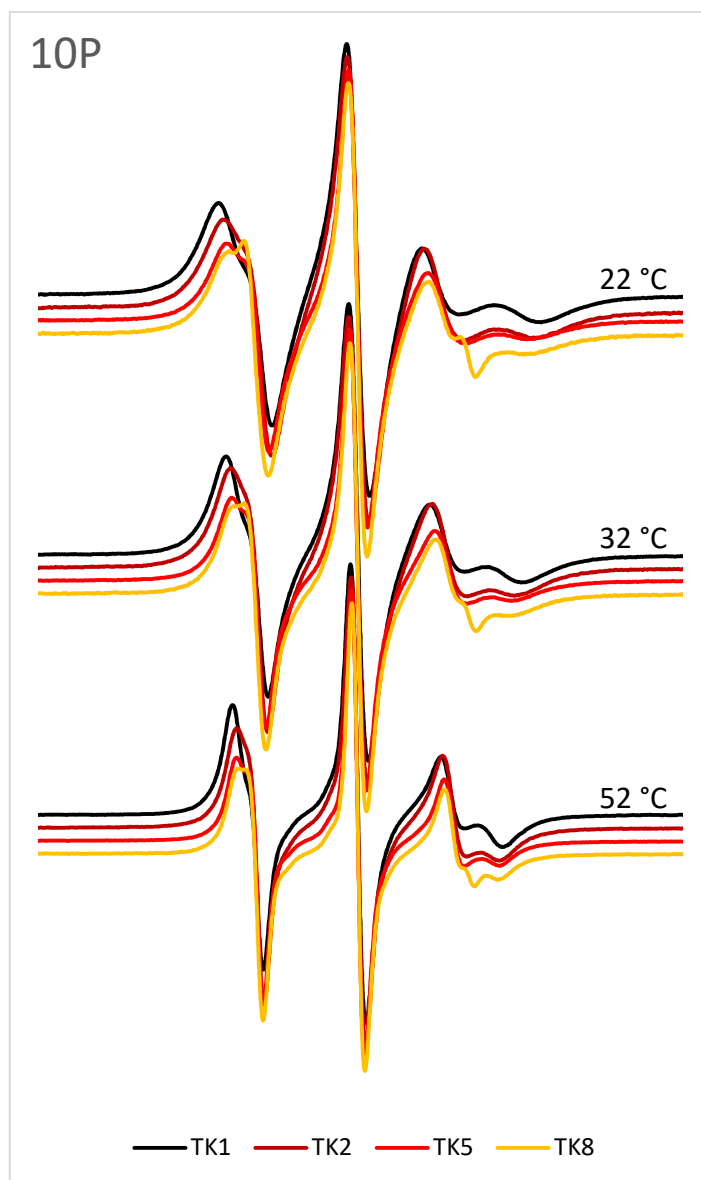
**Slika 30:** Normalizirani spektri TK1 – TK8 označeni s SO 10P pri 22 °C.

Na sliki 31 so prikazani spektri TK1, TK5 in TK8 označenih s 10P pri temperaturi površine kože (32 °C). Črna črta prikazuje eksperimentalno pridobljen spekter, medtem ko rdeča linija prikazuje simuliran spekter, ki je najboljši približek prvemu. Opazimo lahko, da ima delež vode velik vpliv na urejenost lipidnih plasti v strukturi TK. Širina spektra in s tem posledično tudi urejenost membrane se manjšata z naraščanjem deleža vodne komponente. TK1 (20% vode) predstavljajo najbolj urejen spekter, TK8 (55% vode) pa najmanj urejenega.



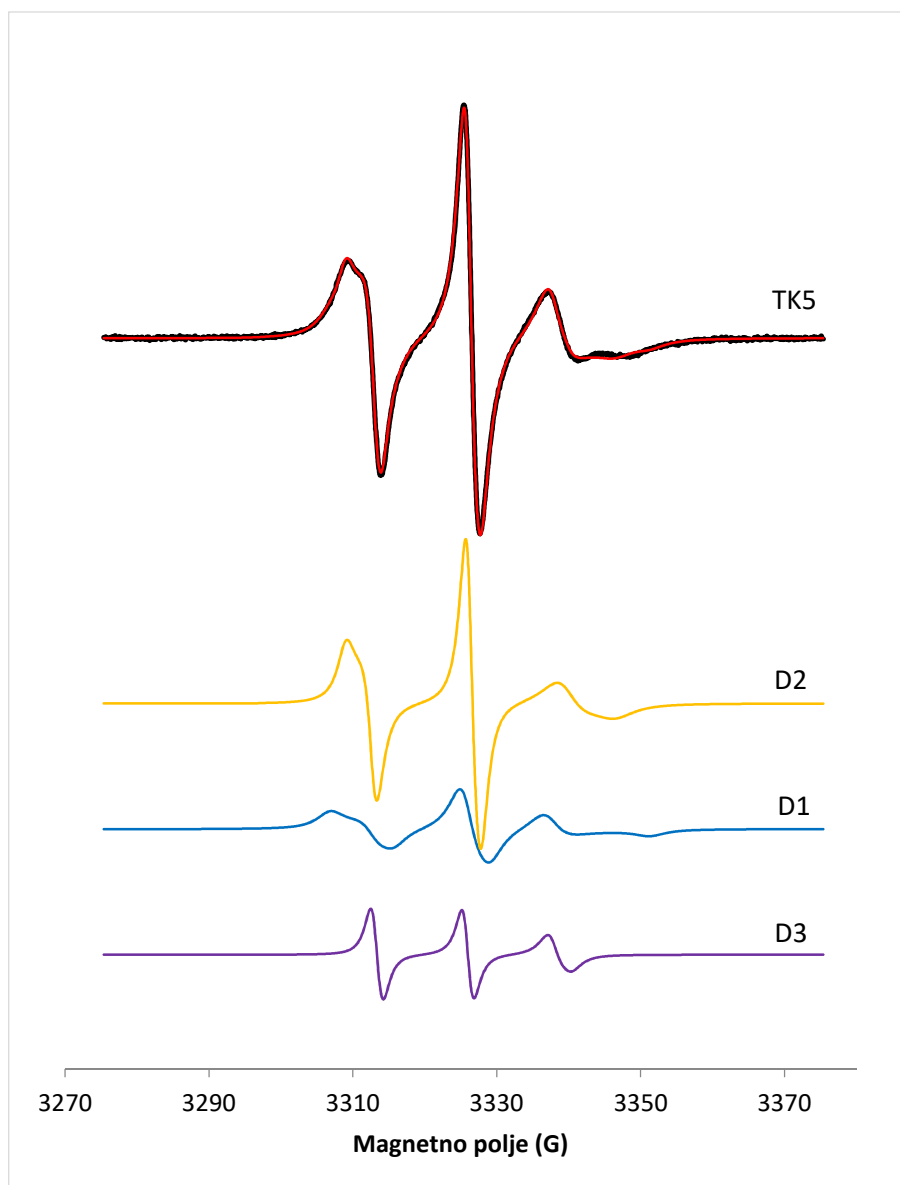
**Slika 31:** Eksperimentalni in simulirani spektri TK1, TK5 in TK8 označenih s SO 10P pri 32 °C.

Slika 32 prikazuje EPR spektre TK1, TK2, TK5 in TK8 označenih z 10P pri temperaturah 22 °C, 32 °C in 52 °C. Opazimo, da se širina spektra manjša z naraščanjem deleža vode (od TK1 proti TK8). Glede na obliko spektra izstopa vzorec TK8, ki nakazuje prehod v izotropno micelarno fazo.  $2A_{\max}$  se manjša tudi z naraščanjem temperature, zato lahko opazimo na sliki 32, da so TK8 pri 52 °C najmanj urejen sistem.



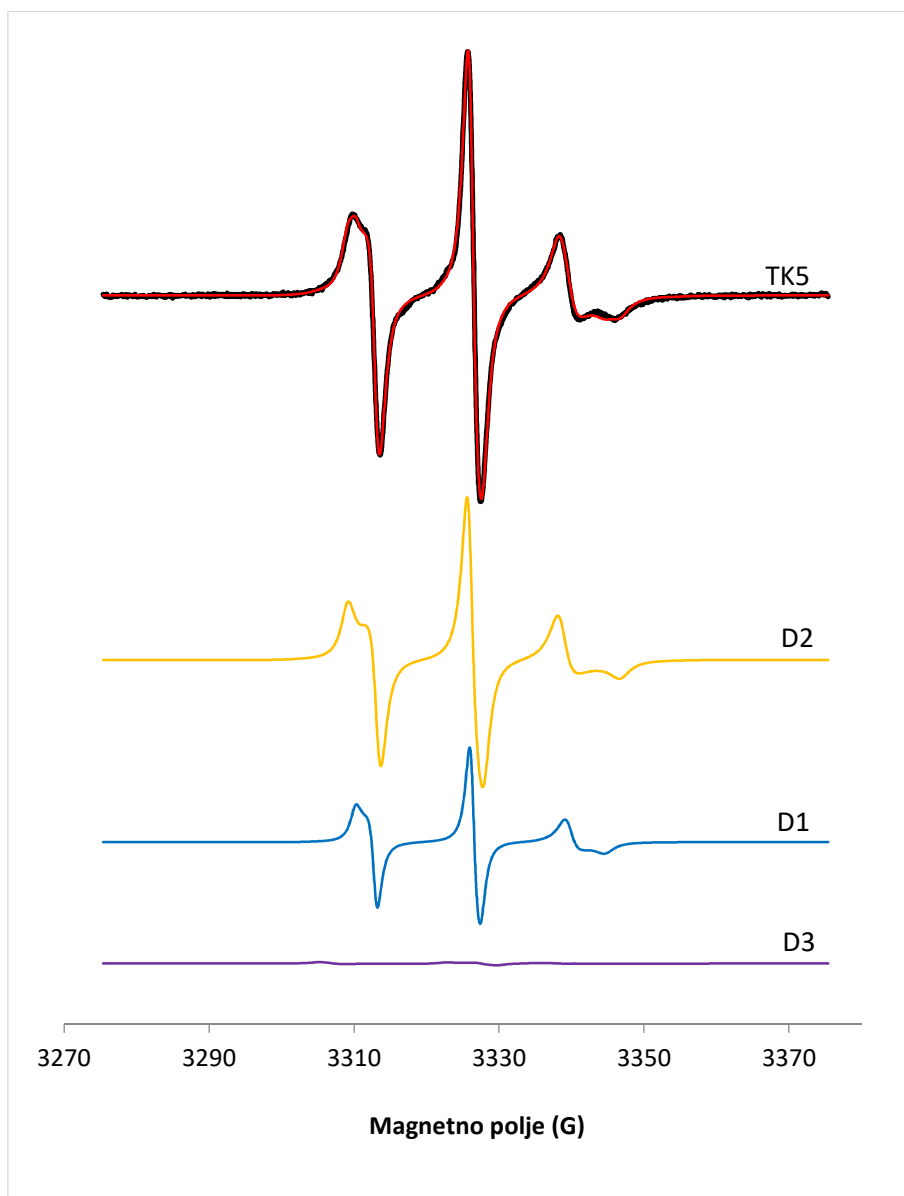
**Slika 32:** Spektri TK1, TK2, TK5 in TK8 označenih z 10P posneti pri temperaturah 22 °C, 32 °C in 52 °C.

Računalniške simulacije so pokazale, da je vsak spekter sestavljen iz treh spektralnih komponent. Vsaka komponenta predstavlja določen tip membranske domene z značilnimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi in odraža gibanje doksilne skupine SO znotraj tega območja. S tem potrdimo, da je membrana heterogena. D1 predstavlja najbolj urejeno domeno, D2 srednje urejeno domeno in D3 najmanj urejeno domeno. Opazimo lahko (slika 33), da je pri 32 °C izračunan spekter TK5 seštevek (superpozicija) treh spektralnih komponent z različno urejenostjo.



**Slika 33:** Zgoraj: eksperimentalni (črn) in simulirani (rdeč) spekter TK5 označenih z 10P, pri 32 °C. Spodaj: membranske domene z različno urejenostjo; D1 – najbolj urejena domena, D2 – srednje urejena domena in D3 – najmanj urejena domena.

Pri 52 °C je simuliran spekter TK5 še vedno sestavljen iz treh domen (slika 34), vendar je prispevek D3 zelo majhen. D2 se v primerjavi z meritvijo pri 32 °C urejenost poveča in je pri 52 °C bolj urejena od D1.



**Slika 34:** Zgoraj: eksperimentalni (črn) in simulirani (rdeč) spekter TK5 označenih z 10P, pri 52 °C. Spodaj: membranske domene z različno urejenostjo; D1 – najbolj urejena domena, D2 – srednje urejena domena in D3 – najmanj urejena domena.

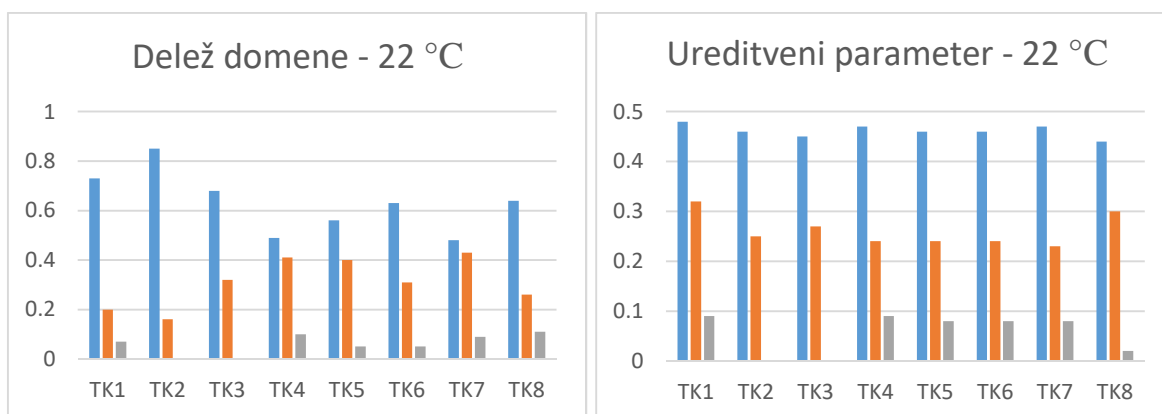


**Preglednica III:** EPR parametri pridobljeni z računalniško simulacijo spektrov TK1 – TK8 označenih s SO 10P pri temperaturah 22 °C, 32 °C in 52 °C. *W* nam pove delež posamezne domene (1, 2 in 3), ki se razlikujejo v fizikalnih lastnostih. *S* je ureditveni parameter,  $\tau_c$  rotacijski korelacijski čas, ki je podan v nanosekundah in  $P_A$  korekcijski faktor polarnosti.

T (°C)	Vzorec		TK1	TK2	TK3	TK4	TK5	TK6	TK7	TK8	
22	<i>W</i>	1	0.73	0.85	0.68	0.49	0.56	0.63	0.48	0.64	
		2	0.2	0.16	0.32	0.41	0.40	0.31	0.43	0.26	
		3	0.07			0.1	0.05	0.05	0.09	0.11	
	<i>S</i>	1	0.48	0.46	0.45	0.47	0.46	0.46	0.46	0.47	0.44
		2	0.32	0.25	0.27	0.24	0.24	0.24	0.24	0.23	0.30
		3	0.09			0.09	0.08	0.08	0.08	0.08	0.02
	$\tau_c$ (ns)	1	0.25	0.17	0.29	0.18	0.20	0.18	0.18	0.18	0.20
		2	1.44	1.52	1.96	2.04	1.87	1.74	2.03	0.75	0.75
		3	2.23			0.36	0.38	0.46	0.4	0.90	0.90
	$P_A$	1	0.98	0.97	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.97
		2	0.99	0.98	0.99	1.0	0.99	0.99	0.99	1.0	0.96
		3	1.12			0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	0.96
32	<i>W</i>	1	0.54	0.71	0.51	0.34	0.37	0.57	0.33	0.42	
		2	0.38	0.29	0.49	0.56	0.52	0.42	0.56	0.39	
		3	0.08			0.10	0.12	0.02	0.11	0.19	
	<i>S</i>	1	0.40	0.38	0.39	0.39	0.38	0.37	0.39	0.39	0.38
		2	0.27	0.22	0.24	0.21	0.22	0.22	0.21	0.21	0.18
		3	0.06			0.08	0.08	0.11	0.08	0.14	
	$\tau_c$ (ns)	1	0.18	0.17	0.16	0.22	0.25	0.22	0.19	0.18	
		2	1.4	1.03	1.38	1.51	1.51	1.15	1.59	1.29	
		3	3.09			0.34	0.31	0.40	0.44	0.49	
	$P_A$	1	0.98	0.97	0.98	0.98	0.98	0.97	0.98	0.97	
		2	0.98	0.97	0.98	0.98	0.98	0.97	0.99	1.02	
		3	1.1			0.83	0.83	0.87	0.84	0.87	
52	<i>W</i>	1	0.86	1	0.85	0.99	0.63	1	0.91	0.87	
		2			0.15		0.26			0.09	
		3	0.13			0.01	0.11		0.09	0.04	
	<i>S</i>	1	0.22	0.21	0.22	0.20	0.20	0.21	0.18	0.19	
		2			0.13		0.15			0.01	
		3	0.05			0.06	0.07		0.05	0.11	
	$\tau_c$ (ns)	1	0.53	0.43	0.47	0.51	0.47	0.41	0.74	0.48	
		2			0.91		0.95			1.02	
		3	1.19			0.27	0.38		0.2	0.31	
	$P_A$	1	0.97	0.96	0.97	0.97	0.97	0.96	0.97	0.97	
		2			1.05		1.01			0.95	
		3	1.07			0.86	0.88		0.87	0.89	

Pri nekaterih meritvah opazimo, da v preglednici III ni podatkov za D2 in/ali D3. To pomeni, da se ta domena ne pojavlja pri dani temperaturi, kar je predvsem opazno pri višjih temperaturah, ko se domene med seboj združujejo.

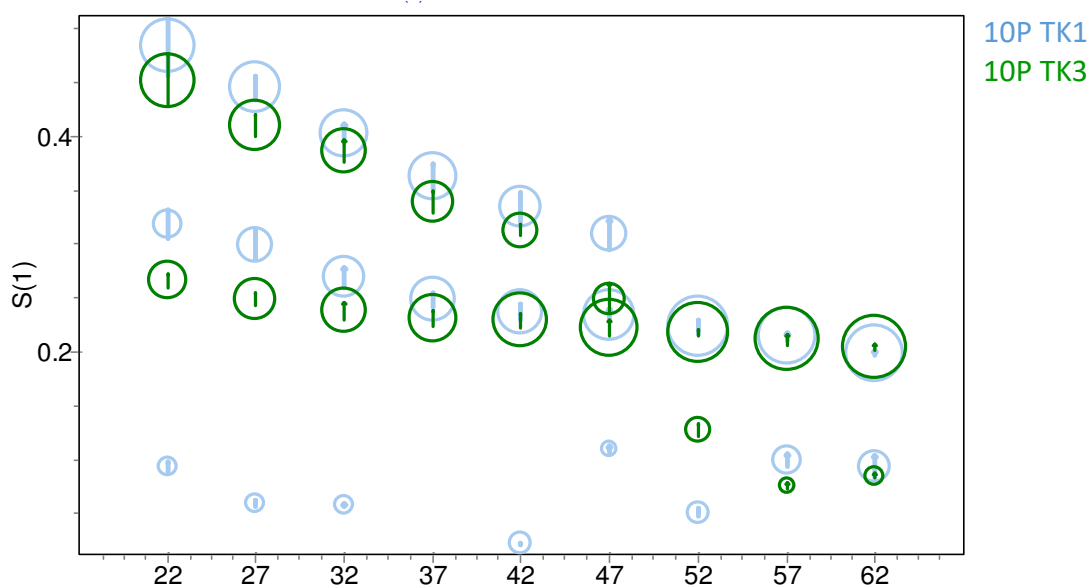
Spodnji levi graf (slika 35) prikazuje deleže posameznih domen pri 22 °C. D1 je označena z modro, D2 z oranžno in D3 s sivo barvo. Vidimo, da v vseh osmih vzorcih največji delež predstavlja najbolj urejena domena, D1. Opazimo lahko, da vzorca TK2 in TK3 pri 22 °C ne vsebujeta najmanj urejene domene. V vzorcih TK5 – TK8 delež najmanj urejene domene narašča. TK8 imajo tako največji delež domene D3, ki pa ima izmed vseh vzorcev najnižjo vrednost ureditvenega parametra ( $S = 0,02$ ).



**Slika 35:** Primerjava deležev posameznih domen (levo), ki se izoblikujejo znotraj TK označenih z 10P in njihovih ureditvenih parametrov (desno) pri temperaturi 22 °C.

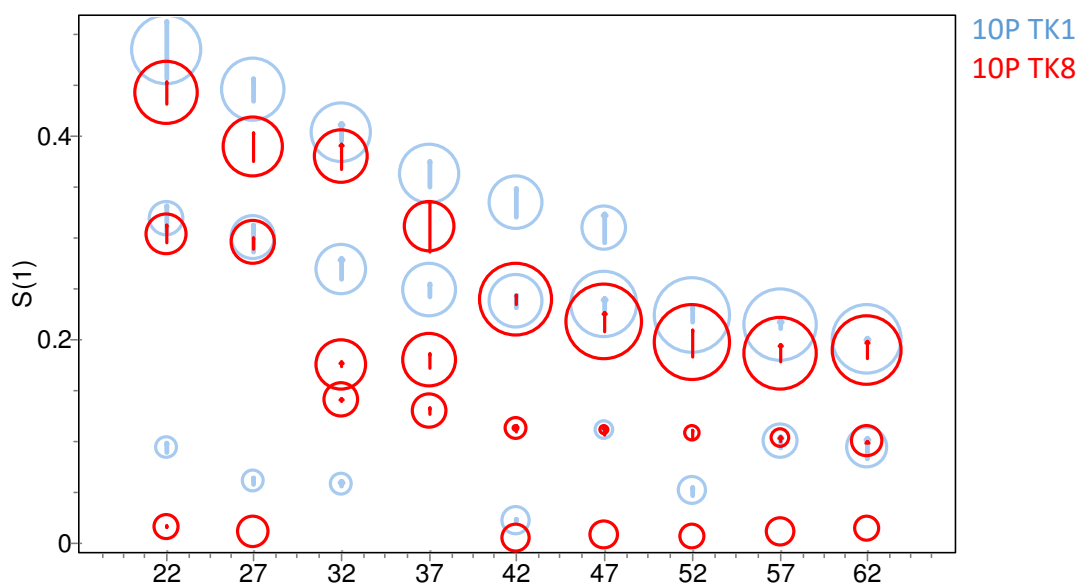
Območji z najvišjima ureditvenima parametroma pri 22 °C ( $S1 = 0,48$  in  $S2 = 0,32$  za TK1) se pri višjih temperaturah združita v eno domeno. To se zgodi pri temperaturah nad 42 °C (slika 36). Izjema je le vzorec TK1, pri katerem smo opazili združitev D1 in D2 šele pri temperaturah višjih od 47 °C. TK1 imajo majhen delež D3, ki ima ureditveni parameter pod 0,1. Ta domena se pojavlja tudi v vzorcih TK z vsaj 35% deležem vode (TK4 – TK8), pri nižjih koncentracijah vode pa ni bila vidna (slika 35). Za SO, z doksilno skupino globoko v notranjosti lipidnega dvosloja, lahko pričakujemo majhno urejenost, nizko polarnost in živahno gibanje lipidnih verig. Zato domnevamo, da bi lahko ta spektralna komponenta ustrezala micelarni strukturi, ki so jo zaznali tudi z metodo SAXS. Pojav dveh visoko urejenih domen v TK2 in TK3 pri 22 °C lahko pripišemo dvema različnima konformacijama SO 10P v območju lipidnih verig. Del alkilne verige, ki se nahaja med polarno glavo in doksilno skupino, se lahko izravna ali bolj zvije, kot so to napovedali s simulacijami molekulske dinamike (28).

Slika 36 predstavlja mehurčni diagram temperaturne odvisnosti ureditvenega parametra ( $S$ ) za vzorce TK1 in TK3 označenih z 10P. Premer mehurčka je sorazmeren deležu SO v posamezni domeni in prikazuje delež posamezne domene. Navpične črte opisujejo porazdelitev posameznega vzorca gibanja po faznem prostoru. Opazimo, da se ureditveni parameter najbolj urejenih domen (D1 in D2) manjša z naraščanjem temperature. D1 in D2 v TK1 se združita pri temperaturah nad 47 °C, medtem ko imajo TK3 samo dve domeni.



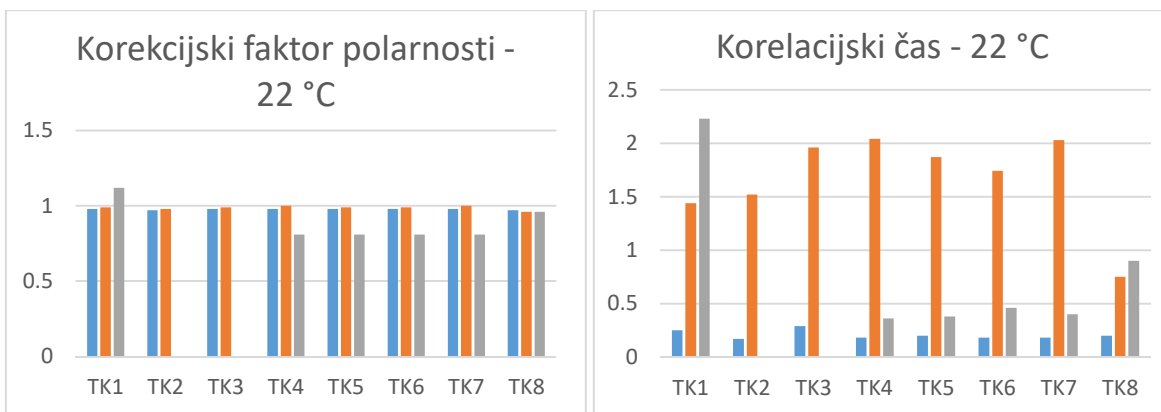
**Slika 36:** Grafični prikaz temperaturne odvisnosti ureditvenega parametra ( $S$ ) ter deleža domen (velikost mehurčka) TK1 in TK3 označenih z 10P.

V primeru TK8 se spektralne komponente ne združijo med seboj (slika 37), saj so pri 62 °C prisotne še vedno tri domene. Ureditveni parameter se z naraščanjem temperature za najbolj urejeni domeni manjša, najmanj urejeni domeni pa se le-ta tekom naraščanja temperature ne spreminja ( $S = 0,02$ ). Iz *Preglednice III* lahko razberemo, da enako velja tudi za TK5. D1 in D2 se urejenost manjša z naraščanjem temperature, medtem ko ima D3 pri 22, 32 in 52 °C enak ureditveni parameter.



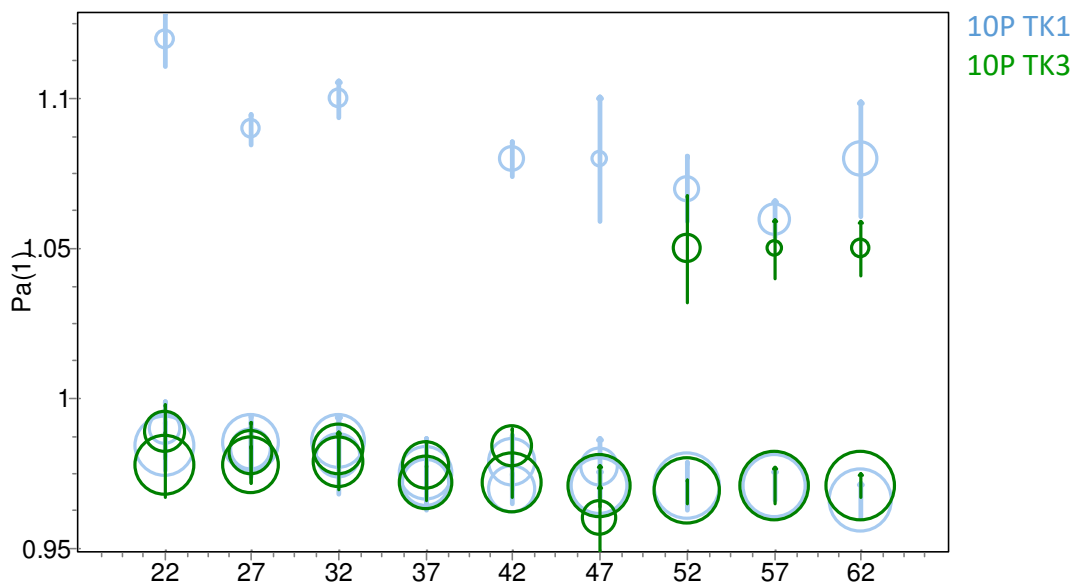
**Slika 37:** Grafični prikaz temperaturne odvisnosti ureditvenega parametra ( $S$ ) ter deleža domen (velikost mehurčka) TK1 in TK8 označenih z 10P.

S primerjavo korekcijskih faktorjev polarnosti hiperfinega razcepa ( $P_A$ ) smo dobili podatke o polarnosti okolja v katerem se nahaja SO. Opazimo (slika 38), da ima najmanj urejena domena TK1 edina vrednost  $P_A$  nad 1, kar je značilno za zelo polarna območja. Glede na zelo visok korelacijski čas ( $> 2$  ns) in visoko polarnost, ki sta značilna za počasna gibanja molekul ter nizek ureditveni parameter, smo predvidevali, da verjetno zaradi tesnega urejanja acilnih verig v heksagonalni strukturi in visoke vrednosti KMK SO 10P (116,46  $\mu\text{M}$ ) (47), heksagonalni cilindri iztisnejo 10P, ki se nato ujame znotraj polietilenglikolnih verig Tweena 80. V lamelarnih fazah je tesno nalaganje acilnih verig manj zgoščeno in zato verjetno ves 10P ostane znotraj fosfolipidnih lamel.



**Slika 38:** Graf korekcijskega faktorja polarnosti hiperfinega razcepa (levo) in korelacijskega časa (desno) za posamezne domene vzorcev TK1 – TK8, pri 22 °C.

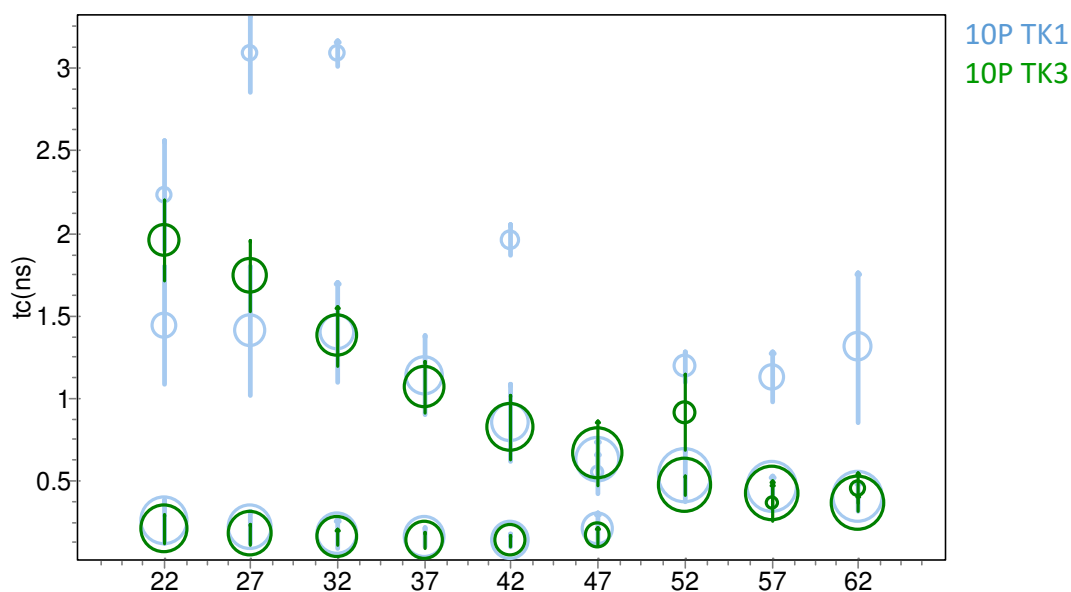
Na grafu temperaturne odvisnosti korekcijskega faktorja polarnosti ( $P_A$ ) za TK1 in TK3 označenih z 10P (slika 39) opazimo, da je faktor polarnosti za D1 in D2 obeh vzorcev v celotnem temperaturnem območju pod 1, kar pomeni, da se nitroksidni radikal nahaja v nepolarnem območju. D3 vzorca TK1 predstavlja polarno območje, saj je njegova vrednost  $P_A$  skozi celotno temperaturno območje nad vrednostjo 1. D2 TK3 se pri temperaturah višjih od 47 °C nahaja v polarnem območju, saj se vrednosti  $P_A$  povzpnejo nad 1.



**Slika 39:** Grafični prikaz temperaturne odvisnosti korekcijskega faktorja polarnosti ( $P_A$ ) ter deleža domen (velikost mehurčka) TK1 in TK3 označenih z 10P.

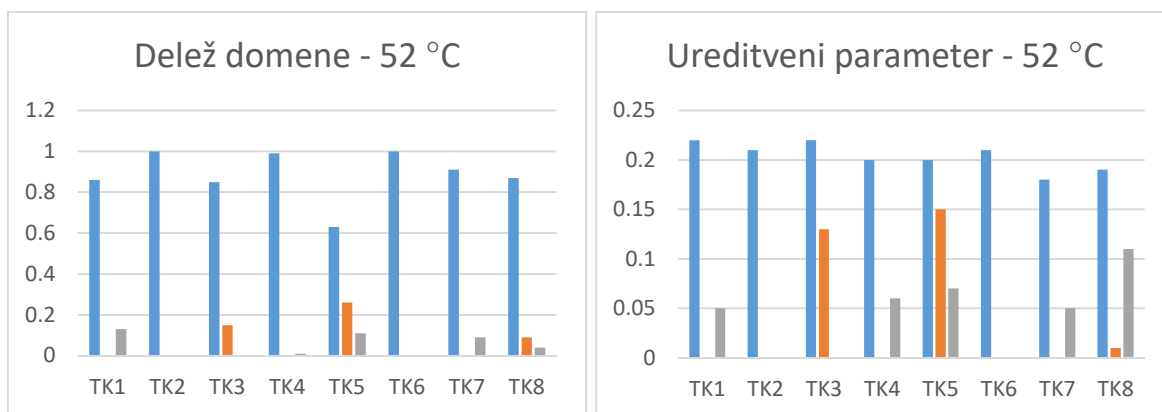
Rotacijski korelacijski čas manjše spektralne komponente TK3 z naraščanjem temperature pada (slika 40), kar pomeni, da fluidnost membrane narašča. Večja spektralna komponenta TK3 ima v primerjavi z manjšo domeno tekom celotnega naraščanja temperature nižje vrednosti korelacijskega časa ( $\leq 0,5$  ns), kar pomeni, da je manj urejena oz. bolj fluidna. Edino pri 52 °C je vrednost  $\tau_c$  višja in znaša približno 1 ns.

Opazimo lahko, da je najvišja vrednost rotacijskega korelacijskega časa za TK3 približno 2 ns, medtem ko je za TK1 ta vrednost nad 3 ns. V primerjavi z mehurčnim diagramom temperature odvisnosti korelacijskega časa za TK označene s 5P (*Priloga IV*), kjer najvišja vrednost  $\tau_c$  ne presega 0,5 ns, so dobljeni rezultati ravno nasprotni temu kar smo pričakovali. Predvidevali smo, da imajo območja z visokim ureditvenim parametrom (TK označeni s 5P), visoke vrednosti  $\tau_c$ , območja z nizkim ureditvenim parametrom (TK označeni s 10P) pa majhne vrednosti  $\tau_c$ . Domnevamo, da je v območjih, kjer se nitroksidna skupina nahaja v bližini polarnih glav, dobljen rezultat posledica trkov doksilne skupine v dve sosednji fosfolipidni molekuli, zato imamo kljub visokemu S nizke vrednosti  $\tau_c$ . V notranjosti fosfolipidnega sloja pa nitroksidna skupina SO niha skupaj s sosednjimi fosfolipidnimi molekulami, to gibanje je počasno, zato imamo visok  $\tau_c$ , čeprav je S majhen.



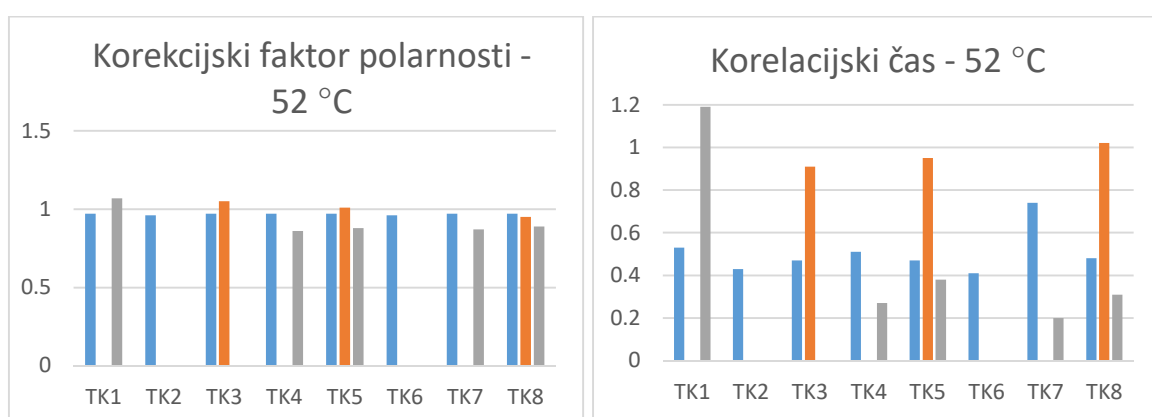
**Slika 40:** Grafični prikaz temperature odvisnosti korelacijskega časa ( $\tau_c$ ) ter deleža domen (velikost mehurčka) TK1 in TK3 označenih z 10P.

Iz spodnjih grafov (slika 41) pri 52 °C lahko opazimo, da membrana postane bolj homogena in jo lahko opišemo le z eno spektralno komponento (TK2 in TK6). Domene so tudi v ostalih vzorcih združene skupaj (TK1, TK2, TK4, TK6 in TK7) in ureditveni parameter najbolj urejene domene je za več kot pol nižji kot pri 22 °C (slika 35). V primeru TK5 in TK8 opazimo še vse tri domene.



**Slika 41:** Primerjava deležev posameznih domen (levo), ki se izoblikujejo znotraj TK označenih z 10P in njihovih ureditvenih parametrov (desno) pri temperaturi 52 °C.

Rotacijski korelacijski čas se v primerjavi s tistim pri 22 °C zniža (slika 42). Zgoraj opisane značilnosti TK1 glede visoke vrednosti  $P_A$  in  $\tau_c$  v D3 pri 22 °C, se pojavijo tudi pri 52 °C. Ta ima od vseh vzorcev najvišjo vrednost korekcijskega faktorja polarnosti ( $> 1$ ) in korelacijskega časa (1,2 ns). To smo razložili z izgonom molekul 10P iz heksagonalnih cilindrov in zajetjem le-teh znotraj polietilenglikolnih verig Tweena 80.



**Slika 42:** Graf korekcijskega faktorja polarnosti hiperfinega razcepa (levo) in korelacijskega časa (desno) za posamezne domene vzorcev TK1 – TK8, pri 52 °C.

## 5 SKLEPI

V magistrski nalogi smo vrednotili supramolekularno strukturo TK, sestavljenih iz emulgatorske zmesi lecitina in Tweena 80<sup>®</sup>, izopropilmiristata ter bidestilirane vode.

Z metodo EPR smo s SO 5P, 7P in SO-PC preučevali urejena območja v bližini vodno-lipidnega dvosloja, saj se pri vseh treh SO doksilna skupina nahaja blizu polarne glave, zato so njihovi EPR spektri izrazito anizotropni. Urejenost in dinamiko v notranjosti membrane smo vrednotili s SO 10P, ki daje informacije o veliko bolj fluidnem in dinamično živahnem območju. SO MeFASL (2,11) v TK daje izotropni EPR spekter, medtem ko smo pri TK označenih z 12C opazili tipičen membranski spekter.

Spektre TK označenih s 5P, 10P in SO-PC smo posneli pri temperaturah v območju med 22 in 62 °C. Zanimalo nas je, kako se širina spektra oz. urejenost supramolekularne strukture spreminja glede na delež vodne komponente in spremembo temperature. Urejenost sistemov TK se je manjšala tako s povečanjem deleža vode kot tudi z naraščanjem temperature. Najbolj izrazite spremembe smo opazili za TK označene z 10P, kjer je bil razcep širine spektra glede na delež dodane vode največji. Razlike v urejenosti lokalnega okolja med posameznimi sistemi tekočih kristalov so se z višanjem temperature manjšale, najmanjše pa smo opazili pri sistemih označenih s SO-PC. Potrdili smo, da ima delež vode večji vpliv na urejanje molekul v notranjosti fosfolipidnega dvosloja, kot pa v višje ležečih predelih fosfolipidnega dvosloja.

S simulacijami smo ugotovili, da je vsak EPR spekter sestavljen iz treh spektralnih komponent, ki ponazarjajo določen tip domene z zanjo značilnimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi in se pri višjih temperaturah združujejo. Potrdili smo, da se strukturne lastnosti TK1 in TK8 razlikujejo v primerjavi s TK2-TK7. Za TK1, ki vsebujejo najmanjši delež vodne komponente, smo na podlagi dodatne spektralne komponente (edini imajo štiri) in predhodnih rezultatov optične polarizacije, reologije in SAXS metode, sklepali na heksagonalno fazo. TK8 imajo najvišji delež vode in predstavljajo prehodni sistem med lamelarno in izotropno micelno fazo, kar nakazuje tudi oblika spektra. Vmesni sistemi (TK2-TK7) pa so urejeni v lamelarne faze, ki se lahko pri vzorcih TK4-TK7 pojavljajo skupaj s paličastimi miceli. Ti rezultati so v skladu z rezultati, ki so jih pridobili z drugimi analiznimi metodami na istih sistemih.

Zanimalo nas je tudi, če pride s počasnim segrevanjem vzorcev do faznih prehodov. Le-teh nismo odkrili, kar je bilo tudi pričakovano glede na kompleksno mešanico lipidov, ki



sestavljajo TK in tudi zaželeno za TK z namenom uporabe kot nosilnih sistemov za različne načine dostave.

Rezultati magistrskega dela nakazujejo, da bi bili sistemi TK2-TK7 zaradi številnih prednosti lamelarne strukture, najbolj primerni kot nosilni sistemi za dermalno uporabo. V nadaljnjih raziskavah bi bilo smiselno izvesti in preučiti vključitev amfifilnih zdravilnih učinkovin v omenjene sisteme. Ena izmed idej je, da bi vgradili antioksidativne molekule in s tem omejili pospešeno staranje kože.

## 6 VIRI IN LITERATURA

1. Chandrasekhar S: Liquid crystals, 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge, 1992: 1-16.
2. Vilfan M, Muševič I: Tekoči kristali. DMFA – založništvo, Ljubljana, 2002: 10-21, 25-34.
3. Garidel P, Kaconis Y, Heinbockel L, Wulf M, Gerber S, Munk A, Vill V, Brandenburg K: Self-Organisation, Thermotropic and Lyotropic Properties of Glycolipids Related to their Biological Implications. *The Open Biochemistry Journal* 2015; 9: 49-72.
4. Gosenca M, Gašperlin M: Tekoči kristali v farmaciji: struktura in metode za vrednotenje fizikalno-kemijskih lastnosti. *Farmacevtski vestnik* 2011; 62: 15-25.
5. Otto A, Wiechers JW, Du Plessis J: Formulation effects of topical emulsions on transdermal and dermal delivery. *International Journal of Cosmetic Science* 2009; 31: 1-19.
6. Collings H: Introduction to Liquid Crystals. Taylor & Francis Ltd, London, 1997: 1-14, 136-140, 177-194.
7. Schara M, Pušnik F, Šentjerc M: EPR of the Sodium Laurate-Water Lyotropic Mesophases and Micellar Solution. *Croatica Chemica Acta*, 1975.
8. Figueiredo Neto S: The Physics of Lyotropic Liquid Crystals: Phase Transitions and Structural. Oxford University Press, Oxford, 2005.
9. Kralj L: Kvarterni sistemi z lecitinom: opredelitev fizikalno-kemijskih lastnosti in izdelava faznega diagrama. Diplomaska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010.
10. Nesrullajev A, Panatta A: Electron Paramagnetic Resonance Investigations of a Lyotropic Liquid Crystals. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 1988; 159.
11. Perutkova Š, Igljč A: Simulations of Inverted Hexagonal Lipid Structures. *Elektrotehniški vestnik* 2009; 76: 92-96.
12. Yulin C, Ping M, Shuangying G: Cubic and Hexagonal Liquid Crystals as Drug Delivery Systems. *BioMed Research International*, 2014.
13. Gosenca Matjaž M, Mravljak J, Bešter Rogač M, Šentjerc M, Gašperlin M, Zvonar Pobirk A: Microstructure evaluation of dermally applicable liquid crystals as a

- function of water content and temperature: can electron paramagnetic resonance provide complementary data? Članek poslan v objavo v Pharm Int 2017.
14. Muller-Goymann CC: Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administrations. Eur. J. Pharm. and Biopharm 2004; 58: 343-356.
  15. Xiang C, Barron AR: The Analysis of Liquid Crystal Phases using Polarized Optical Microscopy. OpenStax-CNX.
  16. Cohen-Avrahami M, Shames AI, Ottaviani MF, Aserin A, Garti N: On the correlation between the structure of lyotropic carriers and the delivery profiles of two common NSAIDs. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2014; 122.
  17. Planinšek O, Srčič S: Navodila za vaje pri predmetu fizikalna farmacija. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2012.
  18. Mydul Alam M, Aramaki K: Liquid Crystal-Based Emulsions: Progress and Prospects. Journal of Oleo Science 2014; 63: 97-108.
  19. Kos S: Vrednotenje vpliva deleža vodne faze in vgradnje askorbilpalmitata na strukturo tekočih kristalov za dermalno dostavo učinkovin. Diplomaska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2011.
  20. Zupančič Biber K: Vpliv strukture tekočih kristalov za dermalno uporabo na sproščanje askorbilpalmitata. Diplomaska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2015.
  21. Caf N: Vrednotenje reoloških lastnosti liotropnih tekočih kristalov na osnovi lecitina. Diplomaska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2011.
  22. Jeschke G, Schweiger A: Principles of pulse electron paramagnetic resonance. Oxford University Press, Oxford, 2001.
  23. Atkins PW, De Paula J: Atkins' physical chemistry. Oxford University Press, Oxford, 2010: 520-558.
  24. Spletni vir: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:EPR\\_splitting.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:EPR_splitting.jpg). Dostop: 8.3.2017.
  25. Spletni vir: <https://www.theresonance.com/epr-101/>. Dostop: 12.3.2017.
  26. Opšta teorija elektronske paramagnetne rezonancije. Univerzitet u Beogradu, Fakultet za fizičku hemiju, Beograd, 2006.
  27. Mravljak J: Reaktivni kisikovi in dušikovi intermediati, demonstracijske vaje. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2015.

28. Mravljak J, Konc J, Hodošček M, Šolmajer T, Pečar S: Spin-Labeled Alkylphospholipids in a Dipalmitoylphosphatidylcholine Bilayer: Molecular Dynamics Simulations. *The Journal of Physical Chemistry B* 2006; 51: 25559-25561.
29. Poklar Ulrih N, Ota A, Šentjerc M, Kure S, Abram V: Flavonoids and cell membrane fluidity. *Food Chemistry* 2009: 78-84.
30. Ota A, Šentjerc M, Bele M, Ahlin Grabnar P, Poklar Ulrih N: Impact of Carrier Systems on the Interactions of Coenzyme Q10 with Model Lipid Membranes. Springer Science+Business Media New York 2015, 2015.
31. Poklar Ulrih N, Maričić M, Ota A, Šentjerc M, Abram V: Kaempferol and quercetin interactions with model lipid membranes. *Food Research International* 2005; 71.
32. Ota A, Šentjerc M, Poklar Ulrih N: Impact of Coenzyme Q10 on the Physical Properties of Model Lipid Membranes. *International Journal of Membrane Science and Technology* 2 2015.
33. Spletni vir: <https://www.drugs.com/npc/lecithin.html>. Dostopno: 15.08.2016.
34. Shurtleff A: History of Lecithin and Phospholipids (1850 to 2016). Soyinfo Center, Lafayette, 2016; 5-7.
35. Lipoid Catalog Product. Lipoid, Nemčija.
36. Lipoid S-100 specifikacija. Lipoid, Nemčija.
37. Tween<sup>®</sup> 80 (P4780) Product Information. Sigma-Aldrich®, ZDA.
38. Smolinske SC: Handbook of Food, Drug and Cosmetic Excipients. CRC Press LLC, Florida, 1992: 295-300.
39. Remington JP, Beringer P: The Science and Practice of Pharmacy, 21st ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2006: 1086.
40. Opdyke: Monographs on Fragrance Raw Materials. Pergamon Press Ltd, Oxford, 1979: 470.
41. Williams: Chemistry and Technology of the Cosmetics and Toiletries Industry, 2nd ed. Blackie Academic & Professional, London, 1996: 24-25.
42. Štrancar J, Koklič T, Arsov Z, Filipič B, Stropar D, Hemminga AM: Spin Label EPR-Based Characterization of Biosystem Complexity. *J. Chem. Inf. Model*, American Chemical Society 2005: 394-406.
43. Štrancar J, Koklič T, Arsov Z: Soft picture of lateral heterogeneity in biomembranes. *Journal of Membrane Biology* 2003; 196: 135-146.

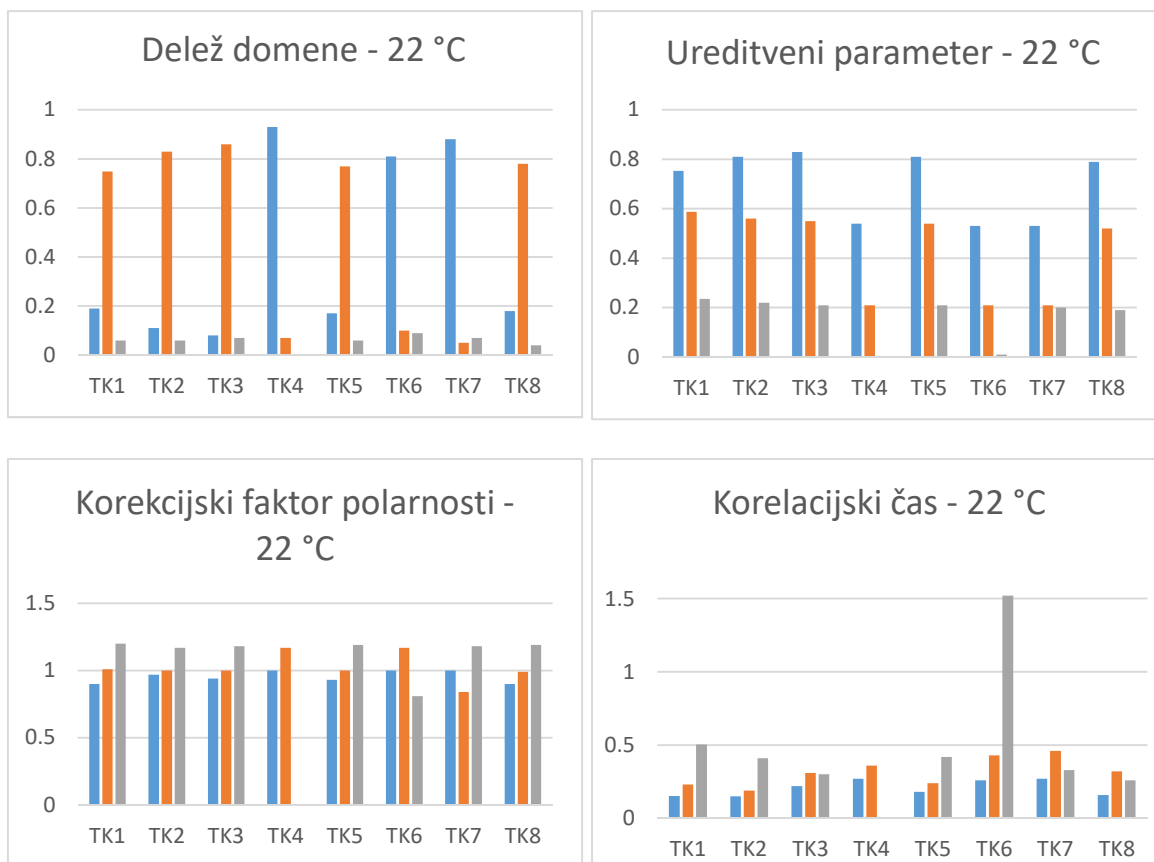
44. Podlipec R, Koklič T, Štrancar J, Mravljak J, Šentjurc M: Influence of cancerostatic perifosine on membrane fluidity of liposomes and different cell lines as measured by electron paramagnetic resonance. *Croat Med J, Medical research in biophysics*, 2012.
45. Gmajner D, Ota A, Šentjurc M, Poklar Ulrih N: Stability of diether C25,25 liposomes from the hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* K1. *Chemistry and Physics of Lipids* 2011, 164.
46. Živec K, Zihel K: Fluidnost eritrocitnih membran pri rakavih bolnikih - študija z elektronsko paramagnetno resonanco. *MED RAZGL*, 2006.
47. Mravljak J, Zeisig R, Pečar S: Synthesis and Biological Evaluation of Spin-Labeled Alkylphospholipid Analogs. *The Journal of Physical Chemistry B* 2005; 48: 6393-6399.

## 7 PRILOGE

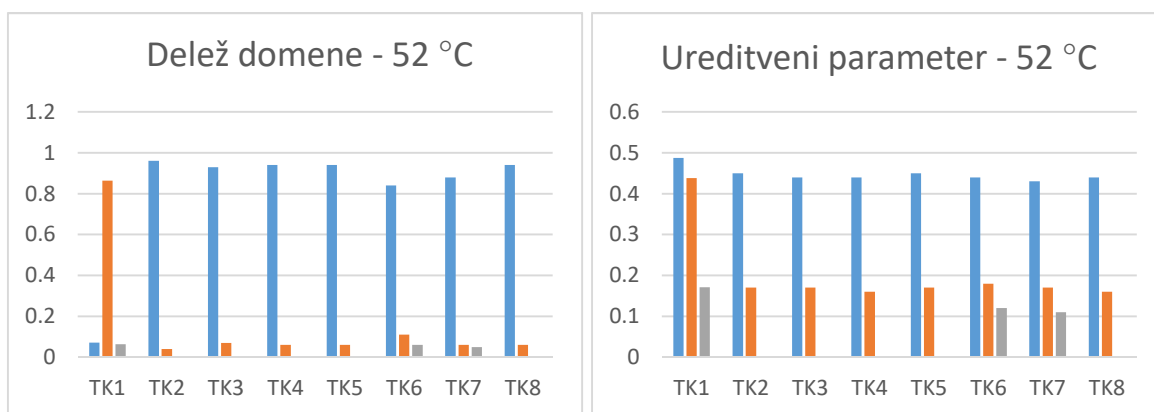
**Priloga I:** Preglednica EPR parametrov pridobljenih z računalniško simulacijo spektrov TK1 – TK8 označenih s SO 5P pri temperaturah 22 °C, 32 °C in 52 °C.

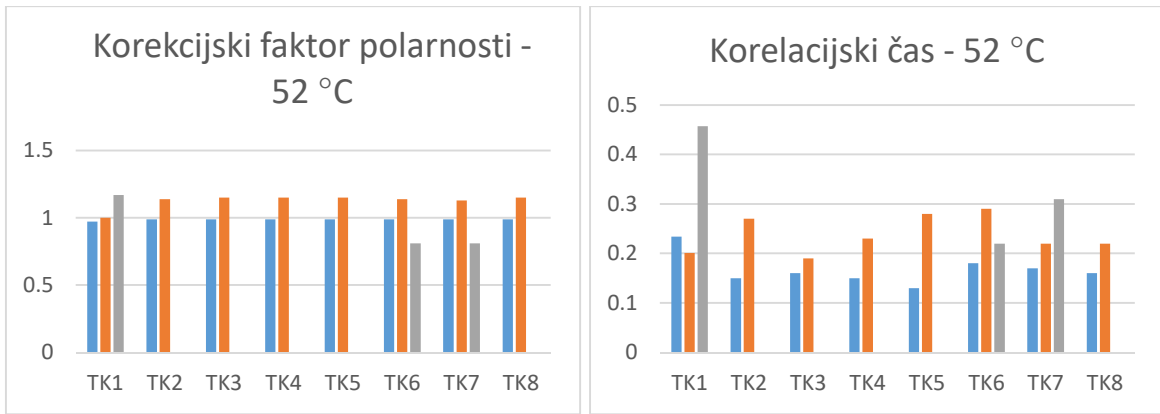
T (°C)	Vzorec		TK1	TK2	TK3	TK4	TK5	TK6	TK7	TK8
22	W	1	0.19	0.11	0.08	0.93	0.17	0.81	0.88	0.18
		2	0.75	0.83	0.86	0.07	0.77	0.1	0.05	0.78
		3	0.06	0.06	0.07		0.06	0.09	0.07	0.04
	S	1	0.75	0.8	0.83	0.54	0.81	0.53	0.53	0.79
		2	0.59	0.56	0.55	0.21	0.54	0.21	0.21	0.52
		3	0.24	0.22	0.21		0.21	0.01	0.2	0.19
	$\tau_c$ (ns)	1	0.15	0.15	0.22	0.27	0.18	0.26	0.27	0.16
		2	0.23	0.19	0.31	0.36	0.24	0.43	0.46	0.32
		3	0.5	0.41	0.3		0.42	1.52	0.33	0.26
	$P_A$	1	0.9	0.97	0.94	1	0.93	1	1	0.9
		2	1.01	1	1	1.17	1	1.17	0.84	0.99
		3	1.2	1.17	1.18		1.19	0.81	1.18	1.19
32	W	1	0.12	0.1	0.1	0.95	0.12	0.93	0.85	0.94
		2	0.11	0.86	0.85	0.05	0.83	0.07	0.1	0.06
		3	0.72	0.04	0.06		0.06		0.05	
		4	0.05							
	S	1	0.79	0.82	0.79	0.5	0.78	0.5	0.49	0.5
		2	0.58	0.51	0.5	0.19	0.51	0.19	0.19	0.19
		3	0.52	0.2	0.19		0.19		0.14	
		4	0.2							
	$\tau_c$ (ns)	1	0.25	0.19	0.17	0.23	0.24	0.25	0.21	0.22
		2	0.32	0.2	0.24	0.26	0.21	0.36	0.38	0.27
		3	0.32	0.36	0.34		0.34		0.31	
		4	0.4							
$P_A$	1	0.87	0.92	0.85	1	0.85	1	0.99	1	
	2	0.99	0.99	1	1.16	1	1.16	1.16	1.16	
	3	1	1.15	1.17		1.17		0.82		
	4	1.19								
52	W	1	0.07	0.96	0.93	0.94	0.94	0.84	0.88	0.94
		2	0.86	0.04	0.07	0.06	0.06	0.11	0.06	0.06
		3	0.06					0.06	0.05	
	S	1	0.49	0.45	0.44	0.44	0.45	0.44	0.43	0.44
		2	0.44	0.17	0.17	0.16	0.17	0.18	0.17	0.16
		3	0.17					0.12	0.11	
	$\tau_c$ (ns)	1	0.23	0.15	0.16	0.15	0.13	0.18	0.17	0.16
		2	0.2	0.27	0.19	0.23	0.28	0.29	0.22	0.22
		3	0.46					0.22	0.31	
	$P_A$	1	0.97	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99
		2	1	1.14	1.15	1.15	1.15	1.14	1.13	1.15
		3	1.17					0.81	0.81	

**Priloga II:** Primerjava deležev posameznih domen (zgoraj levo), ki se izoblikujejo znotraj TK označenih s 5P, njihovih ureditvenih parametrov (zgoraj desno), korekcijskih faktorjev polarnosti (spodaj levo) in korelacijskih časov (spodaj desno) pri temperaturi 22 °C.

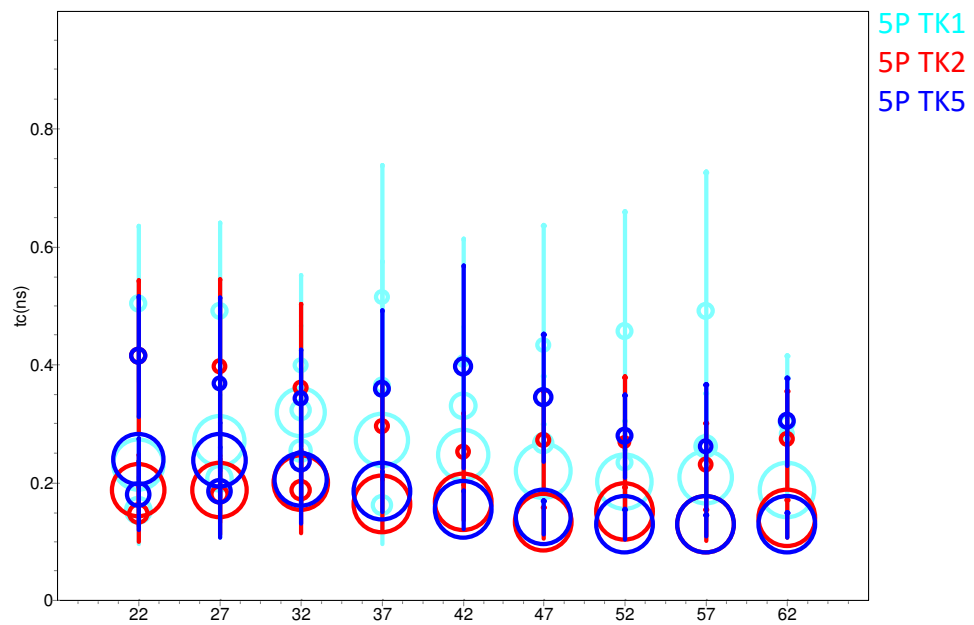


**Priloga III:** Primerjava deležev posameznih domen (zgoraj levo), ki se izoblikujejo znotraj TK označenih s 5P, njihovih ureditvenih parametrov (zgoraj desno), korekcijskih faktorjev polarnosti (spodaj levo) in korelacijskih časov (spodaj desno) pri temperaturi 52 °C.





**Priloga IV:** Grafični prikaz temperaturne odvisnosti korelacijskega časa ( $\tau_c$ ) ter deleža domen (velikost mehurčka) TK1, TK2 in TK5 označenih z 5P.





**Priloga V:** Grafični prikaz temperaturne odvisnosti korekcijskega faktorja polarnosti ( $P_A$ ) in korelacijskega časa ( $\tau_c$ ) ter deleža domen (velikost mehurčka) TK1 in TK8 označenih z 10P.

