Radikalima potaknute peroksidacije i izomerizacije nezasićenih masnih kiselina

Tartaro Bujak, Ivana

Doctoral thesis / Disertacija

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:497198

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb







Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Ivana Tartaro Bujak

RADIKALIMA POTAKNUTE PEROKSIDACIJE I IZOMERIZACIJE NEZASIĆENIH MASNIH KISELINA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2015.

University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Ivana Tartaro Bujak

FREE RADICALS INDUCED PEROXIDATIONS AND ISOMERIZATIONS OF UNSATURATED FATTY ACIDS

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2015.



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Ivana Tartaro Bujak

RADIKALIMA POTAKNUTE PEROKSIDACIJE I IZOMERIZACIJE NEZASIĆENIH MASNIH KISELINA

DOKTORSKI RAD

Mentor: dr. sc. Branka Mihaljević

Zagreb, 2015.

University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Ivana Tartaro Bujak

FREE RADICALS INDUCED PEROXIDATIONS AND ISOMERIZATIONS OF UNSATURATED FATTY ACIDS

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Dr. Branka Mihaljević

Zagreb, 2015.

Ova doktorska disertacija izrađena je u Laboratoriju za radijacijsku kemiju i dozimetriju Zavoda za kemiju materijala Instituta Ruđer Bošković pod vodstvom dr. sc. Branke Mihaljević.

"It is only with the heart that one can see rightly;
what is essential is invisible to the eye."

Antoine de Saint-Exupery

Najtoplije zahvaljujem mentorici dr. sc. Branki Mihaljević na odabiru teme, stručnom vodstvu i strpljenju tijekom izrade i pisanja disertacije. Također, zhvaljujem joj na korisnim savjetima i primjedbama tijekom izrade eksperimentalnog dijela te prijateljstvu kojim je uljepšala moj rad u LRKD-u.

Zahvaljujem kolegama Milanu, Ružici i Silvanu na pomoći prilikom ozračivanja i eksperimatalnog rada.

Veliko hvala svim kolegicama i kolegama iz Laboratorija za radijacijsku kemiju i dozimetriju na bezrezervnoj pomoći u svakom trenutku, savjetima te prijateljskoj atmosferi.

Zahvaljujem dr. sc. N. Filipović-Vinceković, dr. sc. Maji Dutour-Sikirić i dr. sc. Dariji Jurašin na pomoći pri DLS-mjerenjima.

Hvala svim prijateljima koji su na bilo koji način bili uz mene.

Posebna zahvala Maru i mojoj princezi na bezuvjetnoj ljubavi i strpljenju.

Najviše od svega zahvaljujem svojim roditeljima i sestrama na ljubavi, razumijevanju i nesebičnoj podršci tijekom cijelog mog školovanja. Ovaj doktorat posvećujem svojim roditeljima.

Sadržaj

SAŽETAK X
ABSTRACT XI
§ 1. UVOD 1
§ 2. LITERATURNI PREGLED 4
2.1. **Fizikalna i kemijska svojstva lipida** 4
2.2. **Reakcijski mehanizmi peroksidacije lipida** 7
2.2.1. Peroksidacija lipida radikalskim mehanizmom 7
2.2.2. Inicijacija peroksidacije lipida ionizirajućim zračenjem 12
2.2.3. Uloga prijelaznih metala u procesu peroksidacije lipida 14
2.2.4. Metode određivanja lipidnih hidroperoksida 16
2.2.4.1. Spektrofotometrijske metode 16
2.2.4.1.1. Metoda određivanja konjugiranih diena 16
2.2.4.1.2. Feritiocijanatna metoda 17
2.2.4.2. Kromatografske i spektroskopske metode 18
2.3. Biomimetski modeli u istraživanjima procesa peroksidacije lipida 19
2.4. Geometrijska izomerizacija masnih kiselina 22
2.4.1. Mehanizmi izomerizacije mono- i višenezasićenih masnih kiselina 23
2.4.2. Geometrijska izomerizacija masnih kiselina u biomimetskoj radikalskoj kemiji lipida 29
2.4.3. Analitičke metode identifikacije *trans*-nezasićenih masnih kiselina 30
2.4.3.1. Plinska kromatografija 33
2.4.3.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti 35
2.4.3.3. Spektroskopske metode 37
2.5. Uloga antioksidansa u radikalskim reakcijama 38
2.6. Metabolizam masnih kiselina u živim organizmima 44
§ 2. EKSPERIMENTALNI DIO 48
3.1. Materijali 48
3.1.1. Reagensi i soli 48
3.1.2. Otapala 50
3.2. Metode 51
3.2.1. Priprema miješanih micela linolne kiseline 51

3.2.2. Metode inicijacije peroksidacije linolne kiseline 52
3.2.2.1. Peroksidacija linolne kiseline ionima željeza(II) 52
3.2.2.2. Peroksidacija linolne kiseline γ-zračenjem 52
3.2.3. Analiza metilnih estera linolne kiseline plinskom kromatografijom 53
3.2.3.1. Sinteza diazometana 54
3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije hidroperoksida linolne kiseline 56
3.2.4.1. Spektrofotometrijsko mjerenje UV-diena 56
3.2.4.2. Feritiocijanatna metoda 57
3.2.5. Karakterizacija modelnog sustava linolne kiseline 57
3.2.6. Instrumentacija 58
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA 59
4.1.Vrednovanje modelnog lipidnog sustava 59
4.1.1. Analize podsustava 59
4.1.1.1. Utjecaj vrste puferske soli na autooksidaciju Fe(II) iona 59
4.1.1.2. Utjecaj sastava otopine na veličinu micela 60
4.1.1.3. Utjecaj koncentracije linolne kiseline na veličinu micela 62
4.1.1.4. Utjecaj koncentracije Tween®-20 na oksidaciju linolne kiseline 65
4.1.2. Analiza modelnog sustava 67
4.1.2.1. Utjecaj pH na oksidaciju linolne kiseline 67
4.1.2.2. Utjecaj koncentracije Fe^{2+} na oksidaciju linolne kiseline 69
4.2. Peroksidacija i geometrijska izomerizacija u modelnom lipidnom sustavu 74
4.2.1. Utjecaj koncentracije tiola na peroksidaciju i izomerizaciju linolne kiseline 75
4.2.2. Stabilnost modelnih sustava linolne kiseline 80
4.2.3. Peroksidacija i izomerizacija u pravim otopinama linolne kiseline u prisustvu tiola 80
4.2.4. Peroksidacija linolne kiseline u modelnom sustavu u prisustvu tiola 84
4.2.5. Izomerizacija i peroksidacija linolne kiseline u modelnom sustavu 90
4.2.5.1. Izomerizacija i peroksidacija linolne kiseline u anaerobnim uvjetima 91
4.2.5.2. Izomerizacija i peroksidacija linolne kiseline u aerobnim uvjetima 95
4.2.6. Utjecaj veličine micela linolne kiseline na lipidnu peroksidaciju i izomerizaciju 101
4.2.7. Stabilnost modelnih sustava linolne kiseline nakon γ-zračenja 105
4.2.8. Utjecaj visokih doza zračenja na procese peroksidacije i izomerizacije linolne kiseline 110
4.3. Antioksidansi u modelnom sustavu linolne kiseline 113
§ 5. ZAKLJUČAK 130
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA 133
§ 7. LITERATURNI IZVORI 135
§ 8. ŽIVOTOPIS X

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

RADIKALIMA POTAKNUTE PEROKSIDACIJE I IZOMERIZACIJE NEZASIĆENIH MASNIH KISELINA

Ivana Tartaro Bujak
Institut Ruđer Bošković, Laboratorij za radijacijsku kemiju i dozimetriju, Zagreb, Hrvatska

Uzročno-posljedične veze između slobodnih radikala u biološkim sustavima i različitih patoloških stanja omogućavaju da se radijacijsko-kemijske metode koriste za pripravu i praćenje njihovih reakcija u kontroliranim uvjetima. U ovom su radu istraživani radikali višenezasićene masne kiseline, prekursori za dvije vrste procesa, peroksidaciju i, posebno u prisustvu biološki važnih tiola, *cis*, *trans*-izomerizaciju na dvostrukoj vezi linolne kiseline, LiH. Pritom je razvijen modelni sustav micela LiH u kojemu se radikalski procesi mogu selektivno pratiti u uvjetima koji se, za razliku od fizioloških uvjeta, mogu prilagođavati potrebama eksperimentiranja. Prvi put se istražila povezanost tih dvaju radikalima induciranih procesa u biomimetičkim uvjetima te je pokazano da hidroperoksidi (LiOOH) i *trans*-konfiguracija LiH nastaju i u oksidacijskim uvjetima. Biomimetički model priređen je s dodatkom 2-merkaptoetanola kao amfifilnog tiola, a inicijacija radikalskih procesa provedena gama zračenjem s dozama zračenja do 400 Gy u različitim uvjetima. U uvjetima ravnoteže sa zrakom uz značajnu koncentraciju LiOOH (~10^{-5} mol dm^{-3}) odvijao se i proces *cis*, *trans*-izomerizacije s katalitičkim ciklusom 370. Kako bi se predvidio utjecaj samoorganiziranih supramolekulskih struktura LiH na ispitivane procese istražen je i utjecaj veličine micela te prisutnost prirodnih antioksidansa.

(141 stranica, 48 slika, 13 tablica, 139 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: geometrijska izomerizacija/γ-zračenje/lipidni hidroperoksidi/nezasićene masne kiseline/oksidacijski stres/peroksidacija lipida/slobodni radikali/željezo(II)

Mentor: dr. sc. Branka Mihaljević, v. zn. sur.

Ocjenitelji: dr. sc. Hrvoj Vančik, red. prof.
dr. sc. Branka Mihaljević, v. zn. sur.
dr. sc. Nives Galić, izv. prof.

Rad prihvaćen: 12.01.2015.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

FREE RADICALS INDUCED PEROXIDATIONS AND ISOMERIZATIONS OF UNSATURATED FATTY ACIDS

Ivana Tartaro Bujak
Ruđer Bošković Institute, Radiation Chemistry and Dosimetry Laboratory , Zagreb, Croatia

The cause-effect relationship between free radicals in biological systems and the various pathological conditions enable us to use the radiation-chemical methods for preparation and determination these reactions under controlled conditions. In this paper we investigated polyunsaturated fatty acid radicals which are precursors for the two types of processes, peroxidation and, especially in the presence of biologically relevant thiol, *cis*, *trans*-isomerization of linoleic acid (LiH). A model micellar system was developed in which radical processes of LiH were selectively determined under conditions that, in contrast to the physiological, could be adapted to the experiments requirements. These two radical-induced processes were compared for the first time under biomimetic conditions demonstrating that hydroperoxides (LiOOH) and *trans*-lipids can be formed under oxidizing conditions. Biomimetic model was prepared with the addition of 2-mercaptoethanol as amphiphilic thiol, and radical processes initiation was performed by γ-radiation up to 400 Gy under different conditions. In air-equilibrated solutions, together with substantial amount of LiOOH (~10^{-5} mol dm^{-3}), the *cis*, *trans*-isomerization process was also observed with a catalytic cycle of 370. In order to envisage the impact of self-organized supramolecular organization of LiH on the outcome of lipid peroxidation and *cis*, *trans*-isomerization processes, the influence of the micelle size and the presence of natural antioxidants were also studied.

(141 pages, 48 figures, 13 tables, 139 references, original in Croatian)

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

Keywords: geometrical isomerization/ferrous (II)/free radicals/γ-radiation/lipid peroxidation/lipid hydroperoxide/oxidative stress/unsaturated fatty acids

Supervisor: Dr. Branka Mihaljević, Senior Research Associate

Reviewers: Dr. Hrvoj Vančik, Professor
Dr. Branka Mihaljević, Senior Research Associate
Dr. Nives Galić, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 12.01.2015.

§ 1. UVOD

Masne kiseline, odnosno njihovi esteri, te kolesterol su fiziološki važni lipidi jer izgrađuju staničnu membranu. Poput proteina, ugljikohidrata i nukleinskih kiselina lipidi su mete za različite reaktivne kisikove (ROS), dušikove (RNS) i sumporne vrste (RSS). Lipidi koji sadrže višenezasićene masne kiseline (*engl.* Polyunsaturated Fatty Acids, PUFA), uz prisutnost molekulskog kisika u normalnim uvjetima podložni su oksidaciji za koju je pokazano da je štetna, a u nekim slučajevima čak i letalna.[1,2] Općenito, proces u kojem se odvijaju reakcije vezanja kisika s PUFA naziva se lipidna peroksidacija. Procesi lipidne peroksidacije su se počeli proučavati još u prvoj polovici XX. stoljeća kada je utvrđeno da autooksidacija lipidnih komponenata u hrani uzrokuje užeglost i kvarenje hrane. Međutim, u posljednje vrijeme, zbog dokaza da slobodni radikali imaju važnu ulogu u procesu starenja, patološkim stanjima te u razvoju različitih bolesti (ateroskleroze, neurodegenerativnih bolesti, raka itd.) povećao se interes za istraživanja ovih procesa s različitih stanovišta kemije, biokemije, biologije, farmakologije i medicine.

S razvojem kemijske biologije bio je sve izraženiji interes za istraživanja reaktivnosti slobodnih radikala u sustavima koji su sadržavali PUFA te su se od tada uz procese peroksidacije počeli intenzivnije proučavati i procesi lipidne izomerizacije. Iako su početkom šezdesetih godina procesi *cis*, *trans*-izomerizacije dvostruke veze PUFA već bili poznati i tumačeni poznavanjem kemije radikala PUFA u organskim otapalima, do tada nisu bili proučavani u vodenim medijima u kojima PUFA nisu topljivi spojevi.[3,4] Istraživanja koja su slijedila pokazala su biološku važnost poznavanja procesa geometrijske izomerizacije nezasićenih lipida jer su rezultat tog procesa trajne promjene strukture, a time i funkcije stanične membrane kao što su propusnost i fluidnost.[5]

Koja je veza između procesa peroksidacije i izomerizacije lipida i koji su mehanizmi ovih procesa koji dovode do štetnih posljedica u organizmu još nije poznato.[6] Neistraženi mehanizmi obaju procesa koji se paralelno odvijaju u živim organizmima predstavljaju znanstveni izazov za posve nova istraživanja koja se mogu provesti primjenom principa i načela radijacijske kemije.

Suvremena radijacijska kemija sve se više koristi za rješavanje problema u onim područjima u kojima sudjeluju iste reaktivne vrste koje se mogu proizvesti i ozračivanjem. Uzročno-posljedična povezanost između radikala u biološkim sustavima i različitih patoloških stanja omogućavaju da se radijacijsko-kemijske metode koriste za pripravu sustava i praćenje reakcija radikala pod kontroliranim uvjetima.

Polazna hipoteza ove doktorske disertacije jest da se procesi peroksidacije i geometrijske izomerizacije lipida paralelno odvijaju u oksidacijskim uvjetima djelovanjem radikala. Osnovni cilj ovog rada je pronalaženje optimalnih uvjeta u kojima se procesi lipidne peroksidacije i geometrijske izomerizacije mogu paralelno pratiti i u kojima jedan proces prevladava drugi, u pravim otopinama i miješanim micelama odabranim kao modelnim lipidnim sustavima. U dobro definiranom sustavu pratit će se kinetika usporavanja navedenih procesa u prisutnosti prirodnih antioksidansa kao što su askorbinska kiselina (AscH), α-tokoferol (α-TOH) i resveratrol (ResOH).

U prvom dijelu disertacije prikazani su rezultati istraživanja modelnog sustava, koji je sadržavao linolnu kiselinu (LiH). Svojstva modelnog sustava s aspekta istraživanja podložnosti linolne kiseline oksidaciji ispitana su nakon inicijacije s Fe(II) ionom. Koncentracija lipidnih hidroperoksida (LiOOH) kao prvih stabilnih produkata lipidne peroksidacije određena je izravno UV-spektrofotometrijom konjugiranih diena i neizravno spektrofotometrijskom feritiocijanatnom metodom. Također je ispitan utjecaj pH, vrsta pufera, koncentracije PUFA i površinski aktivne tvari na stupanj lipidne peroksidacije odnosno veličinu nastalih micela. Veličina micela određena je mjerenjem dinamičkog raspršenja svjetlosti. Navedena istraživanja doprinos su boljem razumijevanju svojstava micela LiH u uvjetima oksidacije u kiselom mediju.

U drugom dijelu istraživanja paralelno su proučavani produkti lipidne peroksidacije i geometrijske izomerizacije u prethodno definiranom modelnom sustavu LiH, koristeći γ-zračenje za inicijaciju reaktivnih vrsta. Za analizu estera masnih kiselina i pripadajućih geometrijskih izomera upotrebljena je plinska kromatografija, a za kvantitativno određivanje LiOOH korištene su spektrofotometrijske metode.

Rezultati ove doktorske disertacije upućuju na važnost paralelnog proučavanja dvaju kompetitivnih procesa, lipidne peroksidacije i izomerizacije te na pronalaženje odnosa između *trans*-izomera i lipidnih hidroperoksida masnih kiselina. Istraživanja prirodnih antioksidansa

doprinose boljem razumijevanju njihovih reakcija i mehanizama djelovanja i zaštite stanica u živim organizmima od štetnog djelovanja radikala koji nastaju u uvjetima oksidacijskog/radikalskog stresa. Nadalje, uz literaturno poznate konstante brzina reakcija i stečena znanja moguće je predvidjeti posljedice reakcija radikala u živim organizmima.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Fizikalna i kemijska svojstva lipida

Riječ lipidi potječe od grčke riječi za mast, *lipos*. U literaturi se naziv lipidi često upotrebljavao za skupinu prirodnih spojeva koji su topljivi u organskim otapalima kao što su kloroform, benzen, eteri i alkoholi.[7] Bolja definicija, prema kojoj je izvedena i kemijska klasifikacija lipida, odnosi se na lipide kao skupinu spojeva sličnih kemijskih struktura. U tu skupinu ubrajaju se masne kiseline i njihovi derivati, karotenoidi, terpeni i steroidi. Međutim, većina znanstvenika koji se bave istraživanjima lipida pod lipidima smatraju masne kiseline i njihove prirodne derivate (estere i amide) te spojeve koji su biosintetski i funkcionalno vezani u njihovoj stukturi.[8]

Lipidi najčešće ulaze u skupinu spojeva koja pripada esterima. Esteri masnih kiselina i glicerola su jednostavni lipidi te se za ovu skupinu spojeva u literaturi koristi izraz neutralne masti ili gliceridi. Hidroksilne skupine u molekuli glicerola mogu biti zamijenjene s molekulom masne kiseline tvoreći mono-, di- ili tri-gliceride.

Prirodne masne kiseline su najzastupljenije kiseline, bilo zasićene ili nezasićene, a sastoje se od dugolančanog ugljikovodičnog lanca koji sadrži najčešće paran broj ugljikovih atoma (C_{14} do C_{24}). Iako je područje dužine lanca veliko (C_2 do C_{80}), najuobičajenije su kiseline C_{16}, C_{18}, C_{20} i C_{22}. Zasićeni ugljikovodični lanci (s parnim brojem C atoma) sačinjavaju 10 % do 40 % ukupnih masnih kiselina u većini prirodnih lipida. Većina mononezasićenih masnih kiselina (*engl.* Monounsaturated Fatty Acids, MUFA) i PUFA u prirodi ima *cis*-konfiguraciju dvostruke veze. PUFA koje sadrže 2 – 6 dvostrukih veza su uređene tako da su međusobno odvojene metilenskim ($-CH_2-$) skupinama, premda mogu imati i konjugiranu dvostruku vezu.[9] Prema nomenklaturi masne se kiseline klasificiraju kao omega (ω) ili n nomenklatura, odnosno kao delta (Δ). Delta (Δ) označava poziciju dvostruke veze u lancu masne kiseline određene brojanjem veza počevši od karboskilne skupine. Omega (ω) označava položaj prve dvostruke veze od metilnog kraja acilnog lanca.

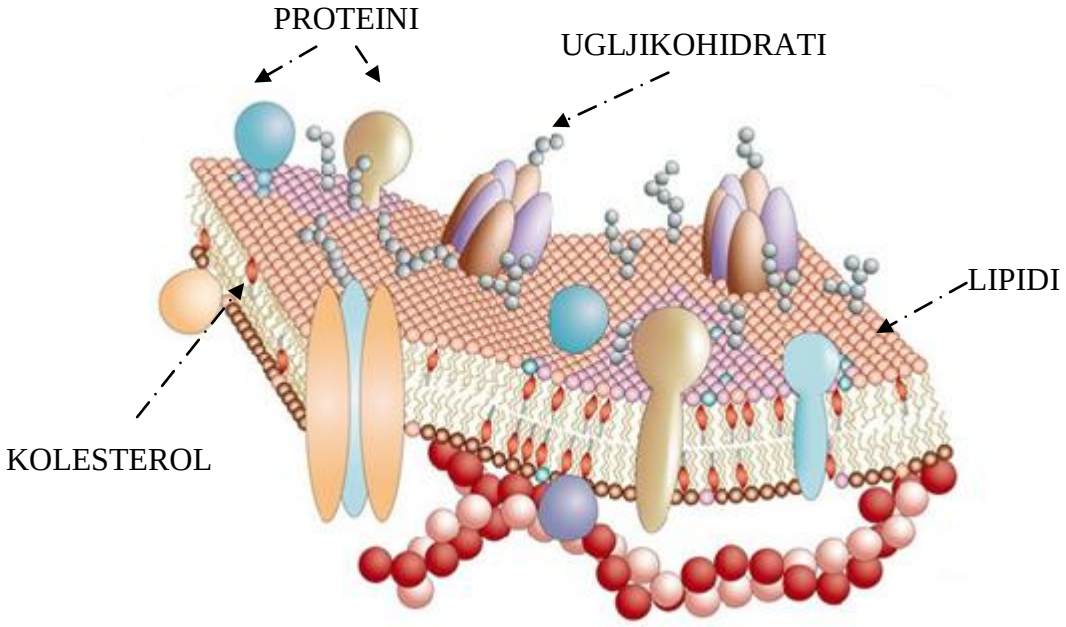
Zasićene masne kiseline su stabilnije i manje podložne kemijskim reakcijama od PUFA. Nezasićene masne kiseline podložne su oksidaciji s kisikom, te je podložnost oksidaciji to veća što je veći broj dvostrukih veza. Fizikalna svojstva masnih kiselina ovise o

dužini lanca, stupnju nezasićenosti i razgranatosti lanca. Nezasićene masne kiseline te osobito PUFA imaju nižu točku taljenja od zasićenih masnih kiselina iste dužine lanca. Generalno vrijedi, što je kraći lanac i što je veća nezasićenost PUFA to je veća žitkost masnih kiselina i njihovih derivata.

Esteri koji pored alkohola i dugolančanih masnih kiselina sadrže fosfor, dušikove baze ili šećere spadaju u skupinu složenih lipida. Složeni lipidi su fosfolipidi i sfingolipidi. Po svojoj topljivosti ponašaju se kao neutralne masti i često se za ovu skupinu spojeva koristi naziv lipoidi. Fosfolipidi su po kemijskom sastavu diesteri fosforne kiseline te su stoga dipolarni spojevi. Fosforna kiselina esterificirana je derivatom glicerola (najčešće diacilglicerolom), ali i s kolinom, etanolaminom ili serinom.

Jedan od važnijih alkohola u tijelu sisavaca jest kolesterol koji se nalazi u esterificiranom ili neesterificiranom obliku i jedini je sterol koji se esterificira s dugolančanim masnim kiselinama.

Posljednjih godina predmet intenzivnih istraživanja su struktura i funkcija bioloških membrana. Sve membrane su izgrađene od proteina i lipida, a najvažniji lipidi su fosfolipidi i kolesterol (Slika 1).[10]



Slika 1. Struktura staničnih membrana

Fosfolipidi su amfifilne molekule te se u vodenom mediju agregiraju formirajući dvosloj. Velik dio fosfolipida asociran je s proteinima, glikoproteinima i glikolipidima

stvarajući funkcionalne stanične sustave. Ti sustavi su metabolički najaktivnija mjesta u stanici na kojima se odvijaju esencijalni stanični procesi kao što su selektivna propusnost, prijenos signala, sinteze i transport lipida i proteina, proizvodnja energije itd. Zbog svojih brojnih funkcija membrane moraju imati svojstvo dinamičnosti i prema modelu "tekućeg mozaika" one predstavljaju dvodimenzionalni tekući matriks koji ima svojstvo lateralnog pokretanja svih sastavnih dijelova membrane u njezinoj ravnini.[10] Međutim, biološke membrane nisu homogene u svom kemijskom sastavu te su lipidi i proteini nejednako raspodjeljeni kako unutar jednog sloja tako i između membranskih dvosloja.

Zasićene masne kiseline, MUFA i PUFA, važne su komponente fosfolipida, te svaka strukturna promjena masnih kiselina utječe na svojstva i funkciju membrana. Strukturalna uređenost masnih kiselina određuje hoće li prevladavati uređen (rigidni) oblik ili neuređen (fluidni) oblik. Višenezasićene masne kiseline i MUFA smanjuju rigidnost membrane, a o prisutnosti zasićenih kiselina ovisit će hoće li membrana biti više rigidna ili fleksibilna. S prisutnošću zasićenih kiselina omogućuje se slobodna rotacija oko jednostruke C–C veze, a međudjelovanjem nerazgranatog ugljikovodičnog lanca povećava rigidnost strukture. Nasuprot tomu, već prisutnost jedne *cis*-dvostruke veze uzrokuje zakrivljenost ugljikovodičnog lanca čime je smanjena uređenost strukture. Uređenost lipidnih agregata se smanjuje u nizu zasićene > *trans*-mononezasićene > *cis*-mononezasićene masne kiseline.[9] Za postizanje optimalne fluidnosti membrana, pri temperaturama koje su tipične za većinu organizama na zemlji, dovoljna je prisutnost MUFA. Uvođenje prve dvostruke veze najviše utječe na temperaturu prijelaza membrana iz faze čvrstog gela u stanje fluidne neuređenosti. S uvođenjem druge dvostruke veze temperatura prijelaza se smanjuje, međutim dodatne dvostruke veze ne utječu dalje na njezino snižavanje i stoga ne povećavaju fluidnost membrane. Biološko značenje PUFA s većim brojem dvostrukih veza odražava se kroz pozitivan utjecaj na svojstva poput veće propusnosti membrane u odnosu na molekule vode i biološki važnih iona. To se svojstvo može tumačiti rjeđim pakiranjem PUFA u membranskom sloju. Osim toga, budući acilni lanci kompleksih PUFA imaju visoki stupanj konformacijske fleksibilnosti, oni mogu brzo prelaziti između različitih konformacijskih stanja što se neposredno odražava na biološku važnu elastičnost membrane nužnu za funkciju proteina.

2.2. Reakcijski mehanizmi peroksidacije lipida

2.2.1. Peroksidacija lipida radikalskim mehanizmom

Zemljina atmosfera sadrži 21 % kisika, a život u takvim uvjetima ima svoje prednosti i nedostatke. Prednost aerobnih organizama sastoji se u većoj količini energije za obavljanje životnih funkcija. Nasuprot tomu, mnogi organski spojevi koji su prisutni u živim stanicama, pa tako i lipidi, podložni su oksidaciji koja je štetna. Uzrok toksičnog djelovanja kisika pripisuje se njegovom promotorskom djelovanju na reakcije radikala.[11]

Neposredna reakcija kisika i lipida

$$LH + O_2 \longrightarrow LOOH + L^{\bullet} \qquad (1)$$

ne događa se spontano zbog visoke energije aktivacije (150 – 270 kJ mol^{-1}).[12] Objašnjenje se nalazi u elektronskoj konfiguraciji molekule kisika:

$$\mathbf{O_2}\text{: } (\sigma_g 1s)^2\ (\sigma_u{}^* 1s)^2\ (\sigma_g 2s)^2\ (\sigma_u{}^* 2s)^2\ (\sigma_g 2p)^2\ (\pi_u 2p)^4\ (\pi_g{}^* 2p)^2$$

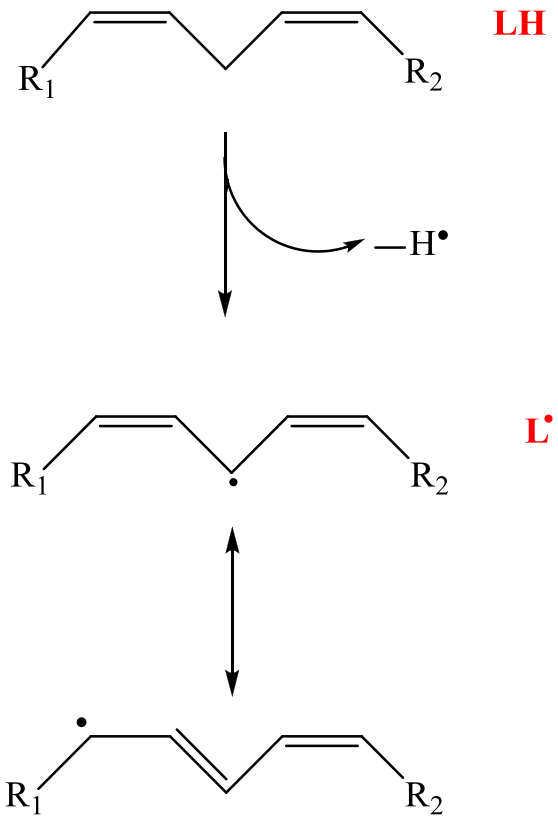
Slobodni radikali (u daljnjem tekstu radikali) su one vrste koje u svojoj zadnjoj orbitali sadrže nespareni elektron. U osnovnom stanju molekula kisika ima 16 elektrona koji su raspoređeni u molekulskim orbitalama pri čemu se u $\pi_g{}^* 2p$ protuveznoj orbitali nalaze dva nesparena elektrona paralelnih spinova ($^3\sum_g O_2$, triplet) te je prema definiciji, molekula kisika sama po sebi radikal. Paralelni spinovi spriječavaju da dođe do izravne reakcije kisika s molekulama ili atomima koji sadrže elektrone sparenih spinova (singletno stanje) jer bi na taj način došlo do narušavanja načela o očuvanju spinova. Da bi se to spriječilo, potrebno je da se jedan spin promjeni čime bi se izbjeglo smještanje dvaju paralelnih spinova u istu orbitalu (Paulijevo načelo). Inverzija spina je spor proces u odnosu na vrijeme života prijelaznog stanja što rezultira smanjenom reaktivnošću molekulskog kisika. Za inverziju spina potrebna je određeni iznos apsorbirane energije pri čemu nastaje reaktivni singletni kisik, $^1\sum_g O_2$.

Na temelju svojstva molekulskog kisika u osnovnom stanju, kisik je reaktivan s radikalskom česticom budući da slobodno raspolaže nesparenim elektronom radikala. Savladavanje spinskog ograničenja ostvaruje se i u reakcijama kisika s prijelaznim metalima zbog njihove sposobnosti davanja ili primanja elektrona. Iz navedenog slijedi da je neposredna reakcija kisika i lipida termodinamički nevjerojatna zbog narušavanja spinskih zakona i (ili) načela o održavanju energije.

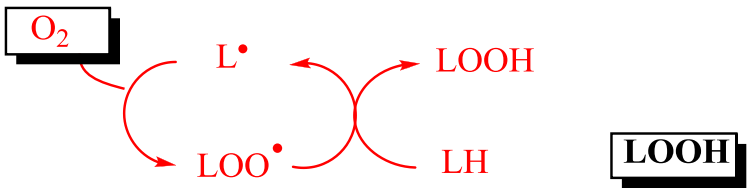
Reakcija je moguća ili s pomoću radikalskog mehanizma ili s pomoću specifičnog aktivacijskog mehanizma.

Lipidna peroksidacija koja se odvija mehanizmom lančanih reakcija radikala je spontani proces, a sastoji se od tri faze: inicijacije, propagacije i terminacije. Proces mogu započeti: toplina, svjetlo, ionizirajuće zračenje, kemijski inicijatori i ioni prijelaznih metala.
Inicijacija započinje apstrakcijom vodika bilo kojim dovoljno reaktivnim inicijatorom pri čemu nastaje bis-alilni (ili pentadienilni) radikal, $L^{\bullet}$. U nezasićenim masnim kiselinama dvostruka veza na susjednom α–C atomu prema metilenskoj skupini slabi C–H vezu, čime se olakšava uklanjanje H-atoma. Homolitičko cijepanje C–H veze je karakteristično za većinu prirodnih nezasićenih masnih kiselina zbog svoje strukture u kojima se ($–CH_2–$) skupina nalazi između dvije dvostruke veze u alifatskom lancu (shema 1). Nastali alil-radikal rezonancijski je stabiliziran i daje konjugirani dien $L^{\bullet}$, koji lako reagira s molekulom kisika.
U propagacijskoj fazi adicijom molekulskog kisika na radikal $L^{\bullet}$ nastaje peroksilni radikal ($LOO^{\bullet}$) koji apstrakcijom H-atoma iz druge molekule nezasićene kiseline daje prvi stabilni produkt, lipidni hidroperoksid (LOOH) i novi alkilni radikal ($L^{\bullet}$) koji nastavlja lančane reakcije. Brzina reakcija $L^{\bullet}$ s kisikom je kontrolirana difuzijom.

INICIJACIJA I:



PROPAGACIJA:



TERMINACIJA:

$$L^{\bullet} + L^{\bullet} \longrightarrow L_2$$

$$LOO^{\bullet} + LOO^{\bullet} \longrightarrow LOOL + O_2$$

$$L^{\bullet} + LOO^{\bullet} \longrightarrow LOOL$$

$$RH + L^{\bullet} \longrightarrow R^{\bullet} + LH$$

$$RH + LOO^{\bullet} \longrightarrow R^{\bullet} + LOOH$$

Shema 1. Peroksidacija lipida mehanizmom slobodnih radikala.

Uz dovoljnu prisutnost kisika i raspoloživost neoksidiranih lipida, mala količina slobodnih radikala nastala u fazi inicijacije dovest će do stvaranja dovoljne količine lipidnih hidroperoksida. Koncentracija nastalih LOOH ovisit će o djelotvornosti i koncentraciji prisutnog donora vodikovog atoma.

LOOH su relativno stabilni spojevi kod niskih temperatura, u razrjeđenijim otopinama, u prisutnosti antioksidansa i bez prisutnosti katalizatora.[13] Međutim, u prisutnosti katalizatora LOOH se homolitički razgrađuju na dva radikala (2) koji promiču daljnju lančanu reakciju oksidacije (3, 4).

INICIJACIJA II: $LOOH \longrightarrow LO^{\bullet} + HO^{\bullet}$ (2)

$HO^{\bullet} + LH \longrightarrow L^{\bullet} + H_2O$ (3)

$LO^{\bullet} + LH \longrightarrow LOH + L^{\bullet}$ (4)

PROPAGACIJA: $L^{\bullet} + O_2 \longrightarrow LOO^{\bullet}$ (5)

U fazi terminacije lančana reakcija stvaranja slobodnih radikala prestaje stvaranjem neradikalskih produkata nastalih reakcijama rekombinacija radikala ili reakcijama drugih molekula, kao što su antioksidansi ili proteini.

U peroksidaciji lipida koja prolazi kroz faze inicijacije, propagacije i terminacije na svaku od tih faza može se utjecati različitim čimbenicima, kao što su struktura lipida, nazočnost oksidansa, antioksidansa itd.

Lipidna peroksidacija je u osnovama oksidacijskog stresa u živim organizmima. Rani produkti lipidne oksidacije su lipidni hidroperoksidi, mono *trans*-konjugirani dieni[14], koji se razgrađuju najčešće u prisustvu prijelaznih metala (npr. Fe^{2+}) do aldehida i alkana kao konačnih produkata. Određivanjem produkata može se utvrditi stanje oksidacijskog stresa.[15] U mnogim istraživanjima je pokazano da su u usporedbi sa zdravim ljudima, koncentracije produkata lipidne peroksidacije povećane kod pacijenata oboljelih od ateroskleroze, dijabetesa, multiple skleroze te kod alkoholičara.[1] Uz nekoliko metoda, LOOH se jednostavno i kvantitativno određuju pomoću spektrofotometrijskih metoda.[16]

Većina produkata lipidne peroksidacije nije stabilna jer sudjeluje u sekundarnim reakcijama s proteinima i bazama DNA. Tako se npr. LOOH razgrađuju u prisutnosti prijelaznih metalnih iona i modificiraju protein u reakciji s lizinom.[17] *α, β*-nezasićeni aldehidi kao što je 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) su jako reaktivni te brzo reagiraju s proteinima, DNA i fosfolipidima tako uzrokujući štetne posljedice. Važno je napomenuti da su aldehidi toksični produkti lipidne peroksidacije i drže se signalnim molekulama oksidacijskog stresa.

Prva istraživanja oksidacije bioloških membrana u nazočnosti radikala datiraju iz ranih osamdesetih godina. Stalna izloženost bioloških sustava djelovanju reaktivnih kisikovih vrsta uzrokuje degeneraciju bioloških membrana čime dolazi do smanjenja njezine aktivnosti. Pretpostavljalo se da se oksidacija lipida u staničnim membranama i lipoproteinima odvijaju istim mehanizmima *in vivo* kao i oksidacija lipida u homogenim organskim otopinama. Utvrđena je sličnost u odvijanju procesa lipidne peroksidacije u izoliranim lipoproteinima male gustoće (LDL, *engl.* Low Density Lipoprotein),[19] eritrocitima[20] te u tkivima ljudi.[21]

Produkti lipidne peroksidacije uzrokuju različite biološke efekte ili izravno reagirajući s proteinima, enzimima i nukleinskim kiselinama ili neizravno preko putova posredovanih receptorom. Promjene u kemijskim svojstvima i organizaciji strukture stanične membrane dovode do gubitka funkcije s modifikacijom lipoproteina te stvaranja upalnih procesa u stanici. Nasuprot tomu pokazalo se da male koncentracije produkata lipidne peroksidacije aktiviraju zaštitne signalne puteve unutar stanice, povećavaju antioksidacijski kapacitet[22] i otpornost stanice na oksidacijski stres.[23] Takav odgovor prilagodbe razvijen je tijekom evolucije aerobnih organizama radi održavanja homeostaze u stanici. Iz tih rezultata može se pretpostaviti da produkti lipidne peroksidacije imaju dvojnu funkciju pri čemu je važan čimbenik njihova koncentracija koja i određuje kakav će utjecaj imati na organizam.

U biološkim membranama rezultat oksidacijskog stresa je progresivna degeneracija strukture membrane i posljedično smanjenje aktivnosti stanice koje doprinosi razvoju patoloških stanja, bolesti i organskih poremećaja. Aerobni organizmi se štite od oksidacijskog stresa pomoću zaštitnog sustava koji se sastoji od antioksidacijskih spojeva i antioksidacijskih enzima koji svojim različitim mehanizmima popravljaju nastalu štetu. Važno je naglasiti da se oksidacijske promjene odvijaju različitim mehanizmima te ne postoji jedinstven antioksidans koji bi mogao inhibirati sve oksidacijske procese.

2.2.2. Inicijacija peroksidacije lipida ionizirajućim zračenjem

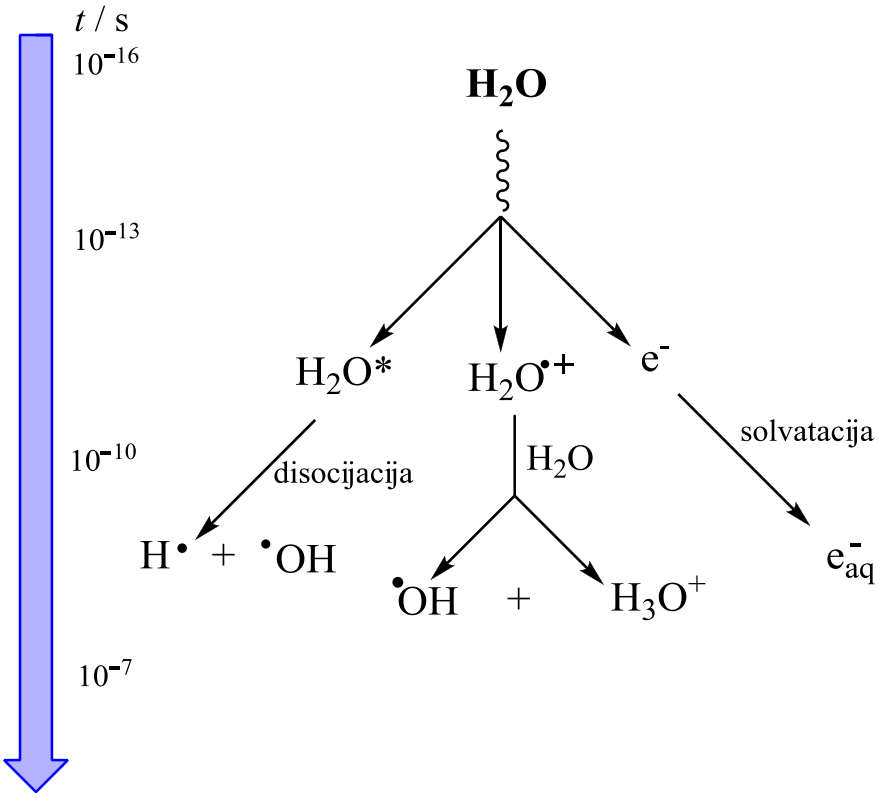
Različite vrste zračenja uzrokuju različite kemijske učinke dajući određene vrste i koncentracije produkata, zbog razlike u prostornoj raspodjeli reaktivnih vrsta u ozračenoj sredini. Tako u plinovima različite vrste zračenja daju slične produkte. U tekućinama nastale reaktivne vrste nalaze se u nekoj vrsti kaveza otapala zbog čega se povećava vjerojatnost međusobnih sudara.

Energija zračenja koja se primjenjuje u radijacijskoj kemiji mnogo je veća od ionizacijske energije molekula sredine pa je i rezultat svake interakcije zračenja i tvari ionizacija sredine. U procesu ionizacije izbačeni elektroni imaju sposobnost daljnje ionizacije i ekscitacije molekula sredine duž traga svoje putanje, a nastali produkti su pritom nehomogeno raspodjeljeni duž traga putanje. Sve specifičnosti radijacijske kemije potječu od ionskog karaktera produkata, njihove visoke energije i početno visoke lokalne koncentracije.

Ozračivanje vodenih otopina ionizirajućim zračenjem predstavlja važnu i selektivnu metodu za generiranje reaktivnih vrsta. Interakcijom ionizirajućeg zračenja s razrijeđenim vodenim otopinama dolazi do ekscitacije i ionizacije molekula vode iz koje se potom zbog ion-molekulskih reakcija, reakcija disocijacije i solvatacije stvaraju radikali i različite molekulske vrste (Shema 2).[24] Prilikom predaje i apsorpcije energije ionizirajućeg zračenja s tvari, veličina kemijskih promjena u sustavu proporcionalna je energiji zračenja koja se u njemu apsorbira. Konstanta te proporcionalnosti naziva se radijacijsko-kemijski prinos.

$$G(\mathrm{x}) = \frac{n(\mathrm{x})}{E} \qquad (6)$$

gdje je n(x) množina tvari koja nastaje, nestaje ili se kemijski mijenja apsorpcijom 1 Joula energije (E) u ozračenoj tvari. Jedinica radijacijsko-kemijskog prinosa je mol J^{-1}.



Shema 2. Radioliza vode ionizirajućim zračenjem[24]

Reakcije radiolize vode su brze. Ekscitacija se odvija u vremenima reda veličine ps, dok se nastajanje primarnih reaktivnih vrsta odvija u vremenima reda veličine ns i μs. Od nastalih primarnih vrsta, $H^{\bullet}$ i e_{aq}^{-} su reducirajuće, a $OH^{\bullet}$ su oksidirajuće vrste. Korištenjem različitih aditiva, anorganskih soli ili otopljenih plinova moguće je primarne radikale nastale radiolizom vode prevesti u nove radikale.

Oksidacijske promjene inducirane ionizirajućim zračenjem ovise o dozi i brzini zračenja, ali i o čimbenicima koji su karakteristični za oksidaciju bez zračenja kao što su temperatura, koncentracija kisika, sastav lipida, prisustvo antioksidansa odnosno metala, svjetlo itd.

Osnovno i neposredno djelovanje γ-zračenja na organske spojeve je kontrolirano generiranje radikalskih vrsta pri čemu zračenje može ili direktno djelovati na materiju ili indirektno preko stvaranja produkata nastalih ozračivanjem molekula otapala. U oba slučaja pa tako i ako se koriste lipidi kao biološki važni organski spojevi stvaraju se slobodni radikali koji s kisikom daju lipidne hidroperokside.[12]

2.2.3. Uloga prijelaznih metala u procesu peroksidacije lipida

Prijelazni metali imaju elektronima nepopunjene ili djelomično popunjene 3-d orbitale. Specifična elektronska konfiguracija odgovorna je za sposobnost davanja ili primanja pojedinačnih elektrona, poštivajući Hundovo pravilo. Biološki redoks-sustavi kojima je osnovna funkcija prijenos elektrona ili reakcija s kisikom temelje se na ovom svojstvu željeza.

Među prijelaznim metalima koji se najčešće koriste u istraživanjima oksidacije nezasićenih lipida, ističe se Fe(II) ion koji je ujedno i biološki najznačajniji inicijator peroksidacije koja se odvija mehanizmom slobodnih radikala. Željezo ima važnu ulogu kako u pojavi tako i u brzini induciranja i/ili kataliziranja lipidne peroksidacije ovisno o uvjetima reakcijske sredine (pH, utjecaji kelata, prisutnosti drugih oksidansa).[25]

Iako ima mnogo znanstvenih radova iz područja peroksidacije lipida, još uvijek se ne zna točan mehanizam željezom inicirane peroksidacije. U posljednjem desetljeću mnogi znanstvenici su pokušali razjasniti stupnjeve koji obuhvaćaju proces peroksidacije. Željezo ima dvostruku ulogu u inicijaciji peroksidacije. U sustavima koji ne sadrže hidroperokside ili ih je tako malo da ne konkuriraju reakcijama s H_2O_2, željezo ima ulogu inicijatora procesa peroksidacije, preko inicijalnog intermedijarnog kompleksa perferil-iona[26]:

$$Fe^{2+} + O_2 \longrightarrow (Fe^{3+}...O_2^{\bullet -}) \qquad (7)$$

Željezo može imati i ulogu katalizatora, u stvaranju visoko reaktivnih hidroksilnih radikala koji mogu započinjati peroksidaciju:

$$Fe^{2+} + O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + O_2^{\bullet -} \qquad (8)$$

$$\longrightarrow (HO_2)^{\bullet}$$

$$O_2^{\bullet -} / (HO_2)^{\bullet} \xrightarrow{H^+} O_2 + H_2O_2 \qquad (9)$$

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow {}^{\bullet}OH + OH^- + Fe^{3+} \qquad (10)$$

$${}^{\bullet}OH + LH \longrightarrow L^{\bullet} + H_2O \qquad (11)$$

Stvoreni hidroksilni radikali u reakciji (10) poznatoj kao Fentonova reakcija, reaktivne su čestice koje istovremeno mogu reagirati s bilo kojom dostupnom molekulom stvarajući sekundarne radikale različite reaktivnosti.

Ako sustavi na početku sadrže izvjesnu količinu već prethodno stvorenih hidroperoksida, hidroperoksidi se katalitički ragrađuju metalom, čime je omogućen ponovni ciklus reakcija slobodnih radikala. Ovisno o reakcijskim uvjetima moguće su slijedeće reakcije razgradnje LOOH:

- *oksidacija LOOH s Fe^{3+}:*

$$LOOH + Fe^{3+} \longrightarrow LOO^{\bullet} + H^{+} + Fe^{2+} \qquad (12)$$

$$LOO^{\bullet} + LH \longrightarrow LOOH + L^{\bullet} \qquad (13)$$

- *redukcija LOOH s Fe^{2+}:*

$$LOOH + Fe^{2+} \longrightarrow LO^{\bullet} + OH^{-} + Fe^{3+} \qquad (14)$$

$$LO^{\bullet} + LH \longrightarrow LOH + L^{\bullet} \qquad (4)$$

Obje vrste reakcija imaju optimalni pH.

Dokazano je da se procesi redukcije Fe^{3+} i oksidacije LOOH događaju u biološkim sustavima.[27] Brzina redukcije (14) puno je veća od brzine oksidacije LOOH željezom (12),[28] a apstrakcija H atoma alkoksilnim radikalom je predominantna u usporedbi s apstrakcijom peroksilnim radikalom. Stoga se može očekivati da je u kiselom mediju reakcija redukcije LOOH s Fe^{2+} vjerojatnija od njegove oksidacije.

2.2.4. Metode određivanja lipidnih hidroperoksida

Procesi oksidacije lipida prate se različitim metodama i mjernim tehnikama. Pojedine tehnike baziraju se na mjerenju nestajanja jednog od reaktanata (kao što su kisik, lipidi, hidroperoksidi, prijelazni metali i antioksidansi), druge mjere stvaranje intermedijera ili primarnih stabilnih produkata (hidroperoksidi ili konjugirani dieni), a neke mjere nastajanje konačnih razgradnih produkata (alkoholi, ugljikovodici, ketoni i aldehidi). Budući da su hidroperoksidi prvi stabilni produkti peroksidacije lipida njihovom analizom se može odrediti rani stupanj oksidacije. S obzirom na složenost mehanizama i kinetike procesa oksidacije, poželjno je koristiti dvije ili više analitičkih metoda kako bi se što bliže odredili stupnjevi oksidacije te što bolje razumio sam proces.

2.2.4.1. Spektrofotometrijske metode

2.2.4.1.1. Metoda određivanja konjugiranih diena

Spektrofotometrijsko mjerenje konjugiranih UV diena je jedna od izravnih metoda određivanja hidroperoksida.[29] Temelji se na mjerenju konjugiranih diena nastalih u fazi propagacije nakon stabiliziranja alil-radikala nezasićenih masnih kiselina (shema 1).

Specifično svojstvo autooksidiranog 1,4-nekonjugiranog diena je apsorpcija diena u UV-području elektromagnetskog zračenja s mjerljivom razlikom u apsorpciji para pozicijskih *cis*, *trans* i para pozicijskih *trans, trans*-izomera konjugiranih LOOH.[30]

Valna duljina 234 nm uzima se kao srednja vrijednost apsorpcijskih maksimuma geometrijskih izomera konjugiranih LOOH. Ta osjetljiva spektrofotometrijska metoda nalazi primjenu u biološkim sustavima *in vivo* i *in vitro*. Hidroperoksidi i izmjereni konjugirani dieni nisu striktno proporcionalni (1:1). Osobito to vrijedi u oksidaciji neradikalskim putem. Međutim, u ranijim stadijima oksidacije izmjereni dieni proporcionalni su koncentraciji LOOH.[31] Metoda mjerenja konjugiranih diena često se koristi za usporedbu s ostalim izravnim ili neizravnim metodama. Nedostatak te metode jest što se njome ne mogu analizirati ukupni lipidi, odnosno mogu se analizirati samo oni lipidi koji sadrže PUFA s dvije i više dvostrukih veza.

2.2.4.1.2. Feritiocijanatna metoda

Feritiocijanatna metoda temelji se na oksidaciji Fe^{2+} u Fe^{3+} u otopinama hidroperoksida i spektrofotometrijskom mjerenju feriticijanatnog kompleksa. Pogodnost te neizravne metode karakterizira njezina specifičnost i reproducibilnost u usporedbi s primjerice često upotrebljavanom jodimetrijskom spektrofotometrijskom metodom.

Feritiocijanatna metoda je specifična metoda kojom se određuju hidroperoksidi lipida. Relativno stabilni u vodenom mediju, hidroperoksidi se katalitički razgrađuju u prisustvu iona željeza(II) u kiselom mediju:

$$LOOH + Fe^{2+} \longrightarrow LO^{\bullet} + OH^{-} + Fe^{3+} \quad (14)$$

Nastali alkoksilni radikal potom može sudjelovati u nizu drugih reakcija. Pretpostavljajući da reakcija:

$$LO^{\bullet} + Fe^{2+} + H^{+} \longrightarrow LOH + Fe^{3+} \quad (15)$$

uspješno konkurira drugim mogućim reakcijama u otopini, proizlazi stehiometrija da se svaka molekula LOOH oksidira s 2 iona Fe^{2+}.

Oksidirani ioni Fe^{3+} kompleksiraju se s tiocijanatom te se nastali feritiocijanatni kompleks mjeri spektrofotometrijski na valnoj duljini oko 500 nm.[32]

$$m\ Fe^{3+} + n\ SCN^{-} \longrightarrow Fe_m(SCN)n^{3m-n} \quad (16)$$

Povećanjem koncentracije tiocijanata ravnoteža se pomiče u smjeru nastajanja kompleksa te se u kolorimetrijskom određivanju željeza treba koristiti suvišak reagensa. U takvim uvjetima Lambert-Beerov zakon vrijedi u širem koncentracijskom području željeza, a boja mjerne otopine je postojanija nego pri manjim koncentracijama tiocijanata.[33]

U analitičkom određivanju hidroperoksida u smjesi otapala ψ (diklormetan, metanol) = 2:1 u kojima je koncentracija Fe^{3+} reda veličine 10^{-6} mol dm^{-3}, koncentracija tiocijanata za oko tri reda veličine veća od koncentracije Fe^{3+} i koncentracija klorovodične kiseline 4×10^{-3} mol dm^{-3} utvrđeno je da maksimum apsorbancije kompleksa na 500 nm pripada kompleksu monotiocijanato željeza(III), $[FeNCS]^{2+}$.[33]

Za analizu hidroperoksida feritiocijanatnom metodom potrebna je mala količina uzorka, a minimalne koncentracije hidroperoksida koje se tom metodom mogu odrediti jesu 170 pmol/ml koji odgovaraju 50 μmol LOOH/kg lipida u kompleksnim prirodnim uzorcima.

Navedena metoda omogućuje brzo, jednostavno, osjetljivo i potpuno mjerenje hidroperoksida u uzorcima različitog porijekla.[34]

2.2.4.2. Kromatografske i spektroskopske metode

Od ostalih izravnih metoda pogodne su kromatografske i spektroskopske metode čijom se primjenom mogu tumačiti reakcijski mehanizmi oksidacije. IR spektroskopijom mogu se odrediti specifične funkcionalne skupine i geometrijska izomerizacija masnih kiselina. Postojanje apsorpcijske vrpce oko 3413 cm^{-1} odgovara vibracijama istezanja –O–H skupine te upućuje na postojanje hidroperoksida. U području otiska prsta (*engl.* finger print) od 900 do 1000 cm^{-1} najčešće se identificiraju *cis, trans*-izomeri masnih kiselina. S obzirom na to da su hidroperoksidi podložni razgradnji pri čemu mogu nastati različiti karbonilni alkilni i hidroksilni spojevi, IR je dobra kvalitativna metoda za određivanje produkata u ranim stupnjevima oksidacije.[35]

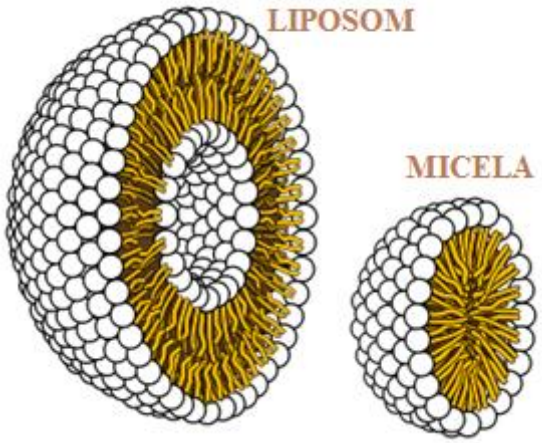
Hidroperoksidi lipida se mogu određivati i tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC). Prednost te metode u odnosu na ostale jest visoka reproducibilnost i osjetljivost. Primjenom različitih detektora, kao što su elektrokemijski, kemoluminiscentni ili UV detektor moguće je detektirati vrlo male koncentracije LOOH. U novijim istraživanjima produkti lipidne peroksidacije određuju se izravno plinskom kromatografijom spregnutom s masenom spektrometrijom (GC-MS) i tekućinskom kromatografijom (LC-MS/MS), a široku primjenu nalaze zbog visoke osjetljivosti i specifičnosti. Jedna od prednosti LC-MS/MS u odnosu na GC-MS je jednostavnost izvođenja analize jer ne zahtijeva prethodnu derivatizaciju.

2.3. Biomimetski modeli u istraživanjima procesa peroksidacije lipida

Biomimetski modeli su korisni pri istraživanju reakcija lipida jer predstavljaju pojednostavljeno okruženje u kojem se mogu ispitivati kemijski mehanizmi i nastajanje različitih lipidnih produkata. Dobiveni rezultati nam omogućuju bolje razumijevanje kompleksnijih bioloških sustava, počevši od staničnih kultura do živih organizama.

Istraživanja reaktivnosti lipida odnosno masnih kiselina mogu se provesti u:

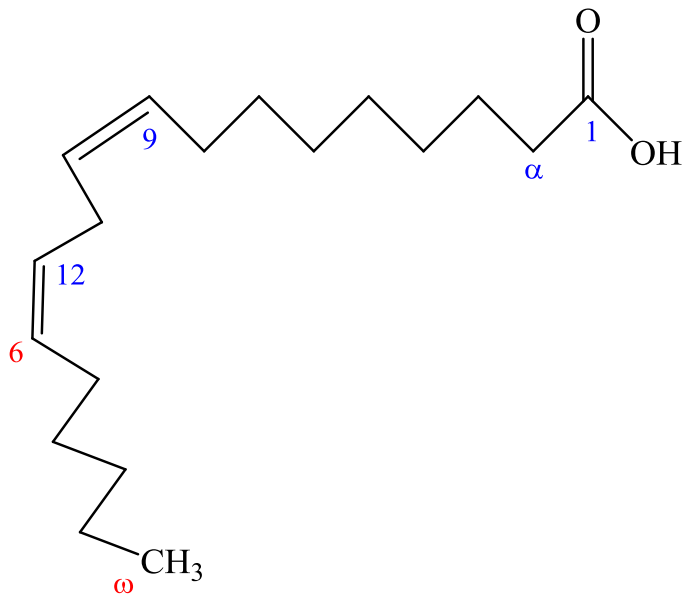
- homogenim otopinama, uzimajući u obzir hidrofobna svojstva lipida i topljivost u organskim otapalima kao što su kloroform, alkoholi, heksan itd.
- heterogenim sustavima, u vodenom okruženju gdje se lipidne molekule spontano organiziraju. Primjeri modelnih sistema, agregata masnih kiselina u vodenom mediju su micele i liposomi te kompleksi lipida i proteina. Slobodne masne kiseline stvaraju micele spontano. Fosfolipidi ugrađuju se u liposome čija je karakteristika lipidni dvosloj i šupljina u kojoj se nalazi voda (Slika 2). Za razliku od micela liposomi su sličniji biološkim sustavima pa se smatraju dobrim modelom za istraživanja procesa koji se odvijaju na staničnim membranama.



Slika 2. Primjer agregata lipida: micele i liposomi.

Nađu li se slobodne masne kiseline u vodenom mediju, približavanjem njihovoj kritičnoj micelizacijskoj koncentraciji one se samoorganiziraju u micele tako da su acilni lanci, hidrofobni dijelovi masne kiseline, usmjereni prema unutrašnjosti micele, a hidrofilni

dijelovi ostaju na vanjskoj površini okrenute prema vodenoj fazi.[36] Od svih PUFA linolna kiselina se najčešće koristi kao modelna PUFA, budući da je najzastupljenija masna kiselina u živim organizmima (Slika 3). Rjeđe se koristi arahidonska kiselina kao signalna molekula u istraživanjima procesa povezanih s poremećajima metabolizma lipida. Na primjeru linolne kiseline čija je struktura prikazana na slici 3 je vidljivo da dvostruke veze u *cis*-konfiguraciji uzrokuje zakrivljenost lanaca nezasićenih masnih kiselina.



Slika 3. Struktura linolne kiseline *cis*-Δ^9, *cis*-Δ^{12}-18:2, ω-6.

U samoorganiziranim sustavima, kao što su micele ili liposomi, podložnost oksidaciji PUFA ovisi o njihovim kemijskim svojstvima. Radikali i/ili kisik selektivno reagiraju s PUFA u odnosu na broj i položaj dvostruke veze. Kao posljedica tih reakcija radikala može se očekivati razlika u raspodjeli pozicijskih izomera LOOH u procesima peroksidacije lipida u vodenim, odnosno micelama PUFA i pravim otopinama lipida, odnosno lipidima u čistom stanju (*engl.* bulk).[37,38,39] Najviše spoznaja o reakcijskoj kinetici i mehanizmima oksidacije lipida dobiveno je istraživanjima lipida u čistom stanju.[40,41] U micelama ili liposomima očekivana kemija procesa oksidacije lipida različita je od one u čistom stanju ili u homogenim otopinama lipida zbog postojanja specifičnih reakcijskih mehanizama koji se odvijaju na dodirnoj međupovršini micela/voda.

PUFA nisu topljivi spojevi u vodi, no njihova se topljivost može postići dodatkom površinski aktivne tvari što omogućuje istraživanja lipida u vodenoj sredini. Surfaktanti ili

površinski aktivne tvari su amfifilni spojevi koji se samoudružuju stvarajući micele i time povećavaju topljivost organskih spojeva u vodi. Otapanjem PUFA u micelama surfaktanta nastaju miješane micele koje se koriste u istraživanjima oksidacijskih procesa i sustava podložnih oksidaciji s kisikom iz zraka te za istraživanje utjecaja surfaktanta ili pak za utjecaj antioksidansa dodanih u istraživani medij.[42] Prednost uporabe surfaktanta koji izgrađuje sustav je i u tome što se u takvim sustavima mogu provesti istraživanja kod nižih pH. Mnogo je istraživanja vezanih za lipidnu peroksidaciju napravljeno u fiziološkim uvjetima i u lužnatom mediju u kojem su PUFA potpuno otopljene. No, istraživanja u kiselim uvjetima su posebno zanimljiva s aspekta procesa koji se odvijaju u nekim tkivima živih organizama, kao npr. u tumorima, za koje je poznato da imaju niži pH u odnosu na normalna, zdrava tkiva. Topljivost masnih kiselina u kiselim uvjetima može se povećati jedino otapanjem PUFA u prisutnosti surfaktanta. Važno je pri tom naglasiti da surfaktant može utjecati na kinetiku procesa peroksidacije[43] te je stoga nužno istražiti njegova moguća međudjelovanja s PUFA u miceli i s ostalim komponentama u reakcijskoj sredini. Bez obzira na spoznaje posljednjih godina vezane uz procese oksidacije lipida još uvijek nije razjašnjen utjecaj surfaktanta na proces lipidne peroksidacije praćenog u modelnim sustavima.

2.4. Geometrijska izomerizacija masnih kiselina

Kao posljedica ograničene rotacije oko dvostrukih veza u kemijskim spojevima pojavljuje se geometrijska izomerizacija. Geometrijski izomeri masnih kiselina su stereoizomeri koji su određeni orijentacijom funkcionalnih skupina na dvostrukoj vezi acilnog lanca PUFA: ako se skupine supstituenata nalaze na istoj strani dvostruke veze tada govorimo o *cis*-izomerima, dok se kod *trans*-izomera one nalaze na suprotnim stranama dvostruke veze. Broj mogućih izomera za pojedinu masnu kiselinu iznosi 2^n, gdje n označava broj dvostrukih veza. Taj broj može biti vrlo velik, tako npr. kod *all-cis*-4,7,10,13,16,19-dokozaheksaenske kiseline, C-22:6 ($2^6 = 64$), mogu nastati čak 64 geometrijska izomera.

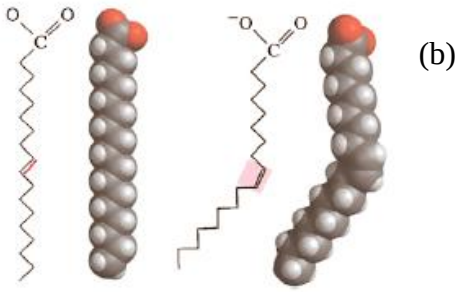
Jedinstveno svojstvo prirodnih PUFA sadržanih u eukariota je posjedovanje dvostrukih veza isključivo *cis*-konfiguracije, a samo rijetke masne kiseline imaju *trans*-konfiguraciju. Međutim, prije nekoliko godina opaženo je da neke bakterije imaju sposobnost stvaranja odgovarajućih *trans*-izomera. Do sada je pronađeno da se proces *cis*, *trans*-izomerizacije događa u bakterijama roda *Pseudomonas*, a glavni predstavnici su *P. putida* i *P. aeriginosa*. Pretvorba izomera posredstvom enzima u nekim bakterijama bazirana je na mehanizmu adaptacije organizma u nepovoljnim uvjetima u okolišu u kojem živi, kao npr. u prisutnosti toksičnih tvari, pri povećanju okolišne temperature ili u opstanku u hipoosmotičkom šoku. Vraćanjem u normalne uvjete isti enzim, *cis, trans*-izomeraza, može pokrenuti popravak pretvorbe u suprotnom smjeru, odnosno stvorena *trans*-geometrija dvostruke veze masnih kiselina u membrani može se regenerirati u početnu *cis*-geometriju dvostruke veze. Ovo je jedan od kratkih odgovora prilagodbe bakterije koja se očitovala i kroz izravan utjecaj na fluidnost i permeabilnost staničnih membrana.[44,45,46] Mehanizam enzimatske izomerizacije koji je aktivan kod stanica prokariota nije djelatan kod eukariota i stoga glavnina PUFA u eukariota imaju dvostruke veze *cis*-konfiguracije. Sve PUFA u prirodi imaju *cis, cis*-konfiguraciju dvostruke veze. Međutim, u stanjima radikalskog stresa odnosno kad se postignu uvjeti generiranja radikala npr. iz spojeva tiola ili amina, pokazano je da se i u membranama eukariotskih stanica može inicirati *cis, trans*-izomerizacija.[45,46]

Također, eukariotski organizmi ne posjeduju takav enzimatski sustav koji bi imao sposobnost prepoznavanja nastalih *trans*-masnih kiselina u strukturi stanične membrane i

njezina popravka s vraćanjem *trans*- u prirodnu *cis*-konformaciju ili eliminacije *trans*-geometrije na bilo koji način.

2.4.1. Mehanizmi izomerizacije mono- i višenezasićenih masnih kiselina

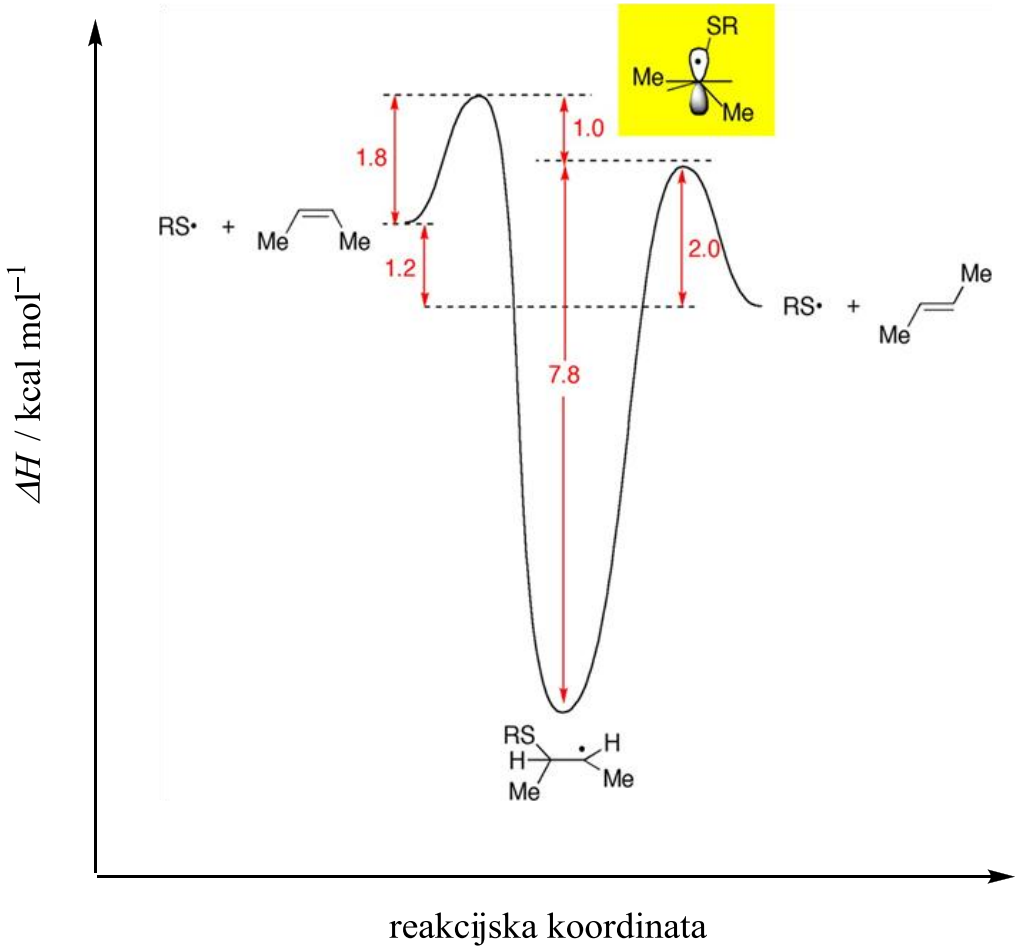
Geometrija dvostruke veze MUFA i PUFA u lipidima je izuzetno važna te je stoga njihovo istraživanje u živim sustavima zanimljivo s kemijskog i biološkog aspekta. *Cis*-geometrija je strogo kontrolirana regiospecifičnom i regioselektivnom aktivnošću enzima desaturaze tijekom biosinteze MUFA i PUFA.[47] Međutim, ovdje se odmah mora istaknuti svojevrsno svojstvo *trans*-izomera da su oni termodinamički stabilniji od pripadajućeg *cis*-izomera. Što je acilni lanac ravniji, to su jače međumolekulske sile koje doprinose stabilnosti *trans*-izomera (Slika 4).[48]

(a)  (b)

Slika 4. Oleinska kiselina: *trans*- (a) i *cis*- (b) mononezasićena masna kiselina

Razlog veće vjerojatnosti nastanka *trans*-izomera u odnosu na *cis*-izomer pripisuje se razlici u energetskoj barijeri tijekom nastajanja dva prijelazna stanja. Razlika u entalpijskoj barijeri između *cis*- i *trans*-izomera je mala.

Entalpija *trans*-izomera je za svega 1,0 kcal mol^{-1} niža od energije *cis*-izomera (Shema 2).



Shema 2. Energetski profil za reakciju *cis*, *trans*-izomerizacije 2-butena s tiilnim radikalima.[49]

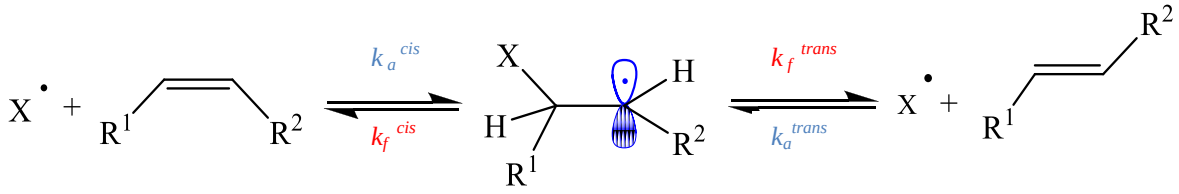
Unatoč većoj stabilnosti *trans*-izomera, masne kiseline se uglavnom pojavljuju u *cis*-obliku te ovisno o prisutnosti jednih odnosno drugih se mijenjaju svojstva membrane. Na primjer, temperatura taljenja stearinske kiseline (C-18:0) je 69,6 ºC, a stvaranjem jedne *cis* dvostruke veze na devetom C-atomu (od karboksilne skupine) nastaje oleinska kiselina, čija je temperatura taljenja puno manja od stearinske kiseline, i iznosi 15 ºC. Stvaranjem *trans*-izomera oleinske kiseline temperatura taljenja veća je od oleinske, a manja u odnosu na stearinsku kiselinu i iznosi samo 46,5 ºC. Uvođenje prve dvostruke veze na zasićeni lanac najviše utječe na temperaturu taljenja, a s dodatnom dvostrukom vezom dolazi do smanjenja temperature taljenja i povećanja fluidnosti membrane. Sa svakom daljnjom dvostrukom vezom efekt na fluidnost membrana je sve manji. S obzirom da su fizikalna svojstva *trans*-

masnih kiselina sličnija onima u zasićenim masnim kiselinama, može se očekivati da se u njihovoj prisutnosti u fosfolipidima smanjuje fluidnost same membrane. Također, utvrđeno je da se s povećanjem broja dvostrukih veza masnih kiselina povećava i podložnost oksidaciji.[50] Istovremeno su neka istraživanja pokazala da su *trans*-izomeri manje podložni oksidaciji od *cis*-izomera PUFA.[51] Osim toga, proučavanjem utjecaja prisutnosti kolesterola u modelnim membranama koje sadrže različite *trans*-mononezasićene masne kiseline (C-14:1, C-16:1 i C-18:1) utvrđeno je da dolazi do bolje interakcije između molekule kolesterola i acilnog lanca s dvostrukom vezom *trans*-konfiguracije nego one koje posjeduje *cis*-konfiguraciju.[9]

Dva su moguća načina u kojima *trans*-lipidi mogu sudjelovati u staničnom metabolizmu:

1) *trans*-lipidi se mogu ugrađivati u membranu dajući različite strukture koje utječu na funkciju i svojstva stanice.
2) *trans*-lipidi mogu inhibirati sinteze PUFA. Npr. u prehrani životinja, s dodatkom dehidrogenizirane masnoće koja obiluje *trans*-kiselinama može se utjecati na metabolički ciklus linolne kiseline neposrednom inhibicijom ω-6 desaturaze te tako inhibirati sinteza arahidonske kiseline i drugih esencijalnih ω-6 nezasićenih masnih kiselina.[9]

Procesi geometrijske izomerizacije na dvostrukoj vezi PUFA pokreću se djelovanjem radikala od kojih su vrlo efikasni oni elektroni lokalizirani na atomu sumpora.[52] U shemi 3 prikazan je reakcijski mehanizam procesa geometrijske izomerizacije na monoenu.[49] Taj se katalitički proces temelji na reverzibilnoj adiciji radikala $X^{\bullet}$ na *cis*-dvostruku vezu PUFA uz nastajanje radikalskog adukta kao međuprodukta te β-eliminaciji radikala $X^{\bullet}$ iz adukta uz stvaranje PUFA s dvostrukom vezom *trans*-konfiguracije. Konstante brzine reakcija adicije tiilnog radikala na *trans*-dvostruku vezu monoena je približno dvostruko veća od konstante brzine adicije na *cis*-dvostrukoj vezi (k_a^{trans}/k_a^{cis} = 1,8) dok je omjer konstanti brzina fragmentacije adukta radikala značajno veći (k_f^{trans}/k_f^{cis}) = 9,4).



Shema 3. Adicijsko-eliminacijski mehanizam reakcije za proces *cis,trans*-izomerizacije kataliziran slobodnim radikalima ($k_f^{cis} = 1{,}7\times10^7$ s^{-1}, $k_f^{trans} = 1{,}6\times10^8$ s^{-1}).[49]

Radikal X$^\bullet$ u shemi 3 ima ulogu katalizatora *cis,trans*-izomerizacije. Neki radikali kao što su RS$^\bullet$, RSe$^\bullet$, $RSO_2^\bullet$, $NO_2^\bullet$ ili radikali atoma Br$^\bullet$ i I$^\bullet$ su dobro poznati izomerizirajući agensi, odnosno inicijatori *cis, trans*-izomerizacije dvostruke veze.

RS$^\bullet$ su najpoznatiji biološki izomerizirajući agensi. Reaktivnost RS$^\bullet$ je izraženija u reakcijama s PUFA nego s alkoholima i eterima zbog niže energije C–H veze *bis*-alilne metilenske skupine u PUFA.[53] Najmanju reaktivnost imaju sterički zaklonjeni RS$^\bullet$ radikali (npr. iz penicilamina), a veću oni generirani iz hidrofilnih tiola, te amfifilnih tiolnih spojeva. Reaktivnosti RS$^\bullet$ radikala se mogu usporediti na osnovu poznate kinetike apstrakcije H-atoma različitim RS$^\bullet$ radikalima. Konstante brzina reakcija apstrakcije H-atoma iz PUFA nekim RS$^\bullet$ radikalima prikazane su u tablici 1.

Tablica 1. Konstante brzina reakcija apstrakcije vodikovog atoma iz PUFA različitim RS$^\bullet$ radikalima u N_2O zasićenoj otopini ψ (etanol, voda) = 1:1; pH 5,1, c(RSH) = 10^{-2} mol dm^{-3}.[53]

RSH	k / 10^{-7} dm^3 mol^{-1} s^{-1} u reakciji RS$^\bullet$ + PUFA		
	C-18:2	**C-18:3**	**C-20:4**
CysSH	0,6	0,9	1,6
GSH	0,8	1,9	3,1
PenSH	0,3	0,4	0,5
$HO(CH_2)_2SH$	3,1	4,5	6,8

Jedan od važnih čimbenika koji određuje reaktivnost $RS^{\bullet}$ radikala u reakcijama apstrakcije vodikovog atoma iz PUFA je udaljenost radikala lokaliziranog na S-atomu od ionske skupine u molekuli. Ako se radikal lokaliziran na S-atomu nalazi na većoj udaljenosti od ionskih skupina kao što je to slučaj kod $RS^{\bullet}$ radikala generiranog iz glutationa, takav radikal je reaktivniji od jednostavnog $RS^{\bullet}$ radikala iz cisteina ($CysS^{\bullet}$). S povećanjem lipofilnosti, $RS^{\bullet}$ radikal ima bolji pristup *bis*-alilnoj metilenskoj skupini PUFA zbog kojeg dolazi do brže interakcije s acilnim lancem masne kiseline i nastajanja prijelaznog stanja niže energije.[53]

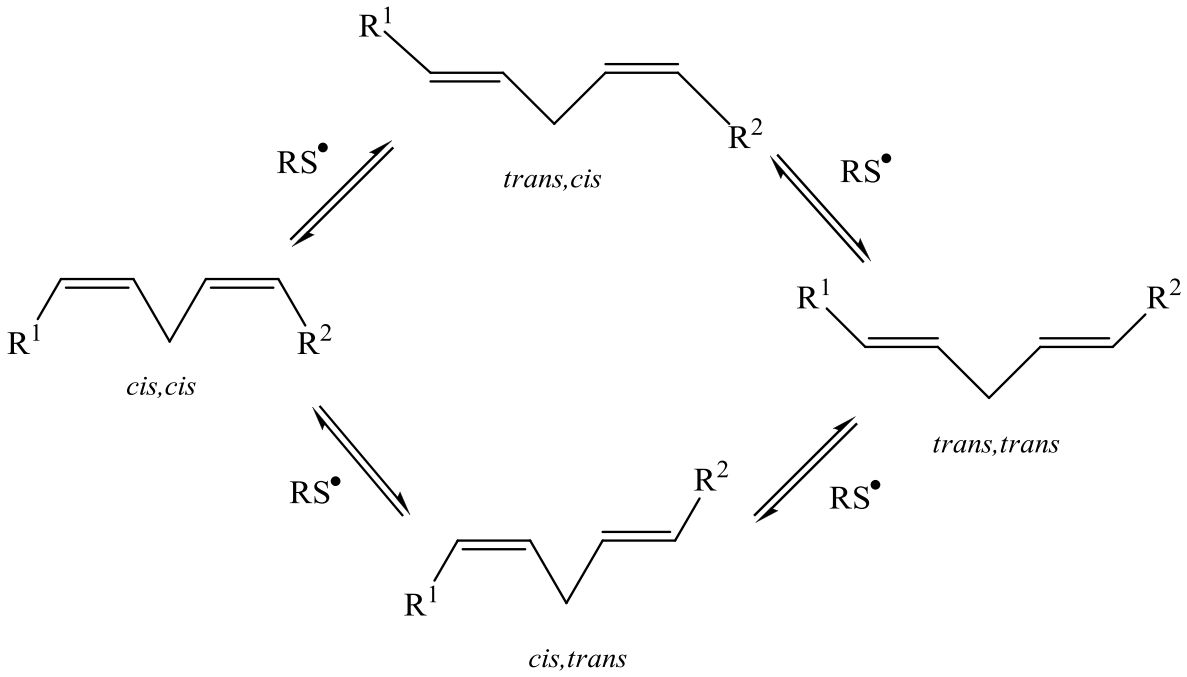
Istraživanja reakcije $RS^{\bullet}$ i PUFA pokazala su da polarnost otapala ima značajan utjecaj na njezinu brzinu. U reakciji $CysS^{\bullet}$ s linolenskom kiselinom (C-18:3) otopljenih u smjesi voda/alkohol/aceton s dodavanjem različitih alkohola (etanol, metanol, *tert*-butanol) praćen je utjecaj vrste alkohola na brzinu reakcije te je utvrđen porast reaktivnosti $CysS^{\bullet}$ s linolenskom kiselinom s povećanjem dielektrične konstante otopine. Kod jako polarnih otapala dolazi do izražaja reakcijski mehanizam u kojem u prijelaznom stanju dolazi do karakterističnog razdvajanja naboja i prijenosa vodika pomoću slabo elektrofilnih radikala kao što je $Br^{\bullet}$ i $RS^{\bullet}$.[54]

Dvije su glavne karakteristike procesa geometrijske izomerizacije pokrenute djelovanjem slobodnih radikala:

(1) proces izomerizacije je katalitički i reverzibilan, pod uvjetom da adukt radikala ne bude uhvaćen (npr. u reakciji s O_2) prije nego što dođe do β-eliminacije. Jedan radikal može održavati katalitički lanac, izomerizirajući velik broj molekula prije nego što dođe do terminacije. Konačni rezultat su oštećenja biomembrana već pri malim količinama stvorenih radikala.

(2) u procesu izomerizacije ne mogu nastati pozicijski izomeri jer njegov adicijsko-eliminacijski mehanizam ne dopušta pomak pozicije dvostruke veze.

Proces izomerizacije MUFA neovisan je o poziciji dvostruke veze i jednako je efikasan bez obzira na veličinu lanca MUFA. U sustavima koji sadrže PUFA, mehanizam izomerizacije PUFA se događa stupanj po stupanj i svaka se dvostruka veza ponaša neovisno jedna o drugoj kao što je prikazano na shemi 4.[55]



Shema 4. *Cis, trans*-izomerizacija linolne kiseline katalizirana radikalima tiola.

Prvi produkti koji nastaju su mono *trans*-izomeri, a u sljedećem stupnju nakon određenog povećanja koncentracije mono *trans*-izomera u mediju dolazi do stvaranja di *trans*-izomera. S poznavanjem ovog mehanizma moguće je izolirati pojedinačni izomer i sintetizirati geometrijske izomere koji se potom koriste kao referentni spojevi za prepoznavanje i identifikaciju *trans*-izomera u prirodnim materijalima. Druge metode, kao što su zagrijavanje, upotreba kiseline/lužine mogu osim geometrijskih izomera dovesti do stvaranja i pozicijskih izomera što dodatno komplicira njihovo razdvajanje. Kvantitativnom analizom produkata izomerizacije izolirani su i nusprodukti kao pokazatelji sporednih reakcija. Nusprodukti, koji u svojoj strukturi sadrže konjugirane diene mogu djelovati kao inhibitori radikalima pokrenute *cis, trans*-izomerizacije PUFA.[55]

Prisutnost kisika je važan čimbenik u proučavanju radikalskih procesa u modelnim sustavima. U procesima lipidne peroksidacije spojevi tiola imaju antioksidacijsku ulogu zbog sposobnosti doniranja atoma vodika peroksilnom radikalu (17) ($k = 5{,}1 \times 10^3$ dm^3 mol^{-1} s^{-1}),[56] a isto tako mogu vrlo brzo reagirati s primarnim česticama, hidroksilnim radikalima (18)

($k = 1{,}4 \times 10^9$ dm^3 mol^{-1} s^{-1}).[57] U spomenutim reakcijama generira se RS$^\bullet$ radikal koji može pokrenuti oba procesa, lipidnu peroksidaciju i katalitički ciklus izomerizacije dvostruke veze.

$$LOO^\bullet + RSH \longrightarrow LOOH + RS^\bullet \quad (17)$$

$$^\bullet OH + RSH \longrightarrow H_2O + RS^\bullet \quad (18)$$

Koji će od ta dva procesa prevladati ovisit će o reakcijskim uvjetima, tj. o koncentraciji kisika, koncentraciji tiola i generiranih RS$^\bullet$, prisutnosti antioksidansa itd.

2.4.2. Geometrijska izomerizacija masnih kiselina u biomimetskoj radikalskoj kemiji lipida

Masne kiseline se često koriste u biomimetskim istraživanjima jer jednostavni modeli masnih kiselina oponašaju kemijske procese koji se događaju u biološkim materijalima.[58] Tako se za oponašanje organiziranih struktura lipida koje se nalaze u tkivima i stanicama u probavnom i plućnom traktu koriste modelni micelarni sustavi masnih kiselina, dok vezikule imitiraju supramolekularnu organizaciju lipida u staničnim membranama u većini ostalih bioloških tkiva. Približavanjem različitim fiziološkim te patološkim uvjetima, s dodatkom različitih proteina, antioksidansa i drugih elemenata u ovim modelnim sustavima lipida te variranjem eksperimentalnih uvjeta može se dobiti cjelovitiji uvid o nekom određenom procesu koji se može pojaviti *in vivo*.

Konstante brzina reakcija oksidacijskih procesa i njihovi produkti iscrpno su ispitivana na micelama slobodnih masnih kiselina dispergiranih u vodenom mediju sa surfaktantom i inicijatorom,[59] dok vezikule, koje mogu biti unilamelarnih i multilamelarnih oblika, su često korištene u istraživanjima procesa izomerizacije. Organiziranost hidrofobnog i hidrofilnog dijela u ovim sustavima može utjecati na izloženost dvostruke veze napadu radikala te stoga na ukupnu brzinu reakcije masne kiseline s radikalom. Upotrebom amfifilnog spoja kao što su npr. tioli, tiilni radikali koji se generiraju iz ovih spojeva u vodi mogu slobodno difundirati iz vodenog u lipidni sloj i *vice versa* pa je ona dvostruka veza masne kiseline koja je smještena bliže vodenoj fazi izloženija napadu difundirajućeg tiilnog radikala od ostalih udaljenijih

dvostrukih veza.[55] Tako je na primjer, pokazano da u modelnim sustavima koji sadrže linolnu kiselinu dvostruka veza na poziciji 9 reaktivnija nego ona na poziciji 12. Brzina izomerizacije raste s porastom broja dvostrukih veza pa je tako arahidonska kiselina puno reaktivnija od linolne i oleinske kiseline. Dvostruke veze arahidonske kiseline (*cis*-Δ^5, *cis*-Δ^8, *cis*-Δ^{11}, *cis*-Δ^{14}-C-20:4, ω-6) na poziciji 5 i 8 se prve transformiraju u *trans*-konfiguraciju u odnosu na ostale dvije pozicije udaljenije od polarne regije modelnog sustava.

Rezultati novijih istraživanja *cis, trans*-izomerizacije radikalima tiola u stanicama i tkivima,[60,61] te različite spoznaje o mehanizmima generiranja radikala tiola u biosustavima upućuju da uz unošenje *trans*-izomera u organizam egzogenim putem tj. putem prehrane, značajan doprinos *trans*-izomerizaciji potječe od radikala generiranih iz stanja radikalskog stresa u organizmu. Da radikali mogu inducirati *trans*-izomerizaciju pokazano je mjerenjem sastava lipida i *trans*-izomera pojedinačnih PUFA u tkivima i eritrocitima krvi štakora koji je kontrolirano hranjen lipidima bogatom hranom koja ne sadrži *trans*-izomere.[61] Nadalje, u prisutnosti tiola izmjereni su *trans*-izomeri PUFA u fosfolipidima izoliranim iz membrana stanične linije čovjeka oboljelog od leukemije.[60] Sve je više dokaza da se geometrijska izomerizacija nezasićenih masnih kiselina lipida odvija u stanjima radikalskog stresa, te bi se *trans*-izomeri mogli smatrati markerima radikalskog stresa s posljedicama trajnih oštećenja staničnih biomembrana.

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

Zadnjih desetak godina razvijene su različite metode u svrhu identifikacije geometrijskih i pozicijskih izomera u biološkim uzorcima.

Masne kiseline i njihove koncentracije u biološkim sustavima određuju se prema proceduri koja se sastoji redom:[62]

1. ekstrakcija lipida iz uzorka,
2. izolacija slobodnih masnih kiselina tankoslojnom kromatografijom (*engl.* thin layer chromatography, TLC) ili ekstrakcijom na čvrstoj fazi,
3. derivatizacija slobodnih masnih kiselina u odgovarajuće estere,
4. ekstrakcija estera masnih kiselina za kromatografsko određivanje.

Budući da broj mogućih geometrijskih izomera može biti jako velik, izdvajanje i identifikacija svih mogućih izomera je izazov za pronalaženje novih tehnika i razvoj analitičkih metoda.

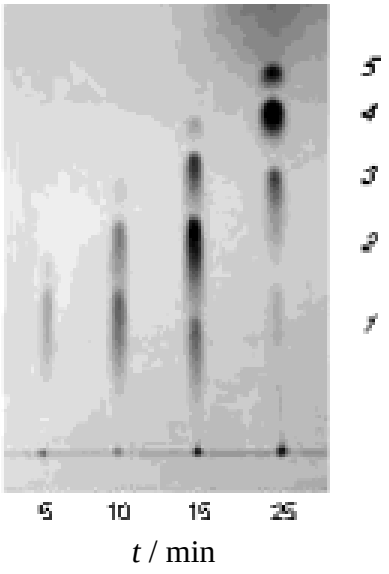
Jednostavne lipide često nalazimo u masnim tkivima iz kojih se oni mogu lako izdvojiti. Nasuprot tomu složeni lipidi su vezani s proteinima i polisaharidima i sastavni dio membrana i zbog toga se teže ekstrahiraju.[8] Za učinkovitu ekstrakciju lipida iz tkiva potrebno je naći prikladno otapalo koje će svladati interakcije između lipida i proteina i otopiti lipide. Točno određivanje sastava masnih kiselina u uzorcima lipida različitog podrijetla je glavni problem u ekstrakciji ukupnih lipida. Postoji velik broj ekstrakcijskih tehnika. Među njima se ističe postupak po Folchu koji uključuje smjesu otapala ψ (kloroform, metanol) = 2:1 ili metode po Blighu i Dyeru kod koje se koristi smjesa kloroforma, metanola i vode za odvajanje lipida od nelipidnih komponenti. Smatra se da je ovaj postupak najučinkovitiji za ekstrakciju lipida iz bioloških uzoraka.[63] Jedna od novijih ekstrakcijskih tehnika je tekuća ekstrakcija pod tlakom (*engl.* pressurized liquid extraction) koja se odvija pri povišenim tlakom (3,5 MPa do 20 MPa) i temperaturom (iznad točke vrelišta, 60 ºC – 200 ºC). Ova ekstrakcijska tehnika spada u jednu od boljih metoda za rutinsku analizu lipida odnosno masnih kiselina u biološkim uzorcima. Prednosti ove tehnike su: kratko vrijeme ekstrakcije, visoki prinos i potpuna automatizacija čime je smanjen kontakt čovjeka s parama otapala, a smanjen je i volumen korištenog otapala.

Višenezasićene masne kiseline brzo autooksidiraju na zraku što utječe na točnost analize te stoga s lipidima treba raditi u atmosferi dušika. Koncentracija lipidnog ekstrakta može se povećati uparavanjem otapala na temperaturi ne većoj od 40 ºC, kako bi se spriječila autooksidacija lipida te gubitak hlapljivih derivata masnih kiselina, uključujući i estera masnih kiselina.[64]

Analiza lipida plinskom kromatografijom omogućuje identifikaciju masnih kiselina predhodnim frakcioniranjem prema njihovoj klasifikaciji (npr. fosfolipidima, acilglicerolima).[62] Odvajanje lipidnih skupina se provodi kolonskom kromatografijom ili TLC-om. Tankoslojna kromatografija na silikagelu uz odgovarajuće smjese otapala klorofom, metanol i aceton kao eluens je najčešća metoda za frakcioniranje lipidnih skupina. Iako HPLC omogućuje efikasnije razdvajanje, TLC ima nekoliko prednosti: jeftinija je, manje je složena priprava uzorka te se može analizirati više uzoraka istovremeno, a lako se vizualizira. Nakon

frakcioniranja TLC-om slijedi analiza masnih kiselina plinskom kromatografijom, koja će biti predmet poglavlja 2.4.3.1.

Ako se žele odvojiti masne kiseline prema broju i konfiguraciji dvostruke veze koristi se TLC na silikagelu impregniran sa srebrovim nitratom (skraćeno se naziva Ag^+-TLC). Tehnika se zasniva na reverzibilnom stvaranju polarnih kompleksa iona srebra (akceptor elektrona) na alkilnoj dvostrukoj vezi (donor elektrona).[8] Odvajanje *cis*- od *trans*-masne kiseline temelji se na jačem kompleksiranju *cis*-masne kiseline od odgovarajuće *trans*-masne kiseline, dok zasićeni lipidi ne stvaraju komplekse i migriraju prema vrhu pločice (Slika 4). Stoga se ovom tehnikom mogu kvalitativno i kvantitativno odvojiti lipidni geometrijski izomeri.



Slika 5. Praćenje izomerizacije 1-stearoil-2-arahidonoil-L-α-fosfatidilkolina Ag/TLC tehnikom. Za eluiranje je korištena smjesa ψ (heksan,dietileter) = 7:3.[65] 1: *all cis*-izomere; 2: mono *trans*-izomere; 3: di *trans*-izomere; 4: tri *trans*-izomere i 5 *all trans*-izomere.

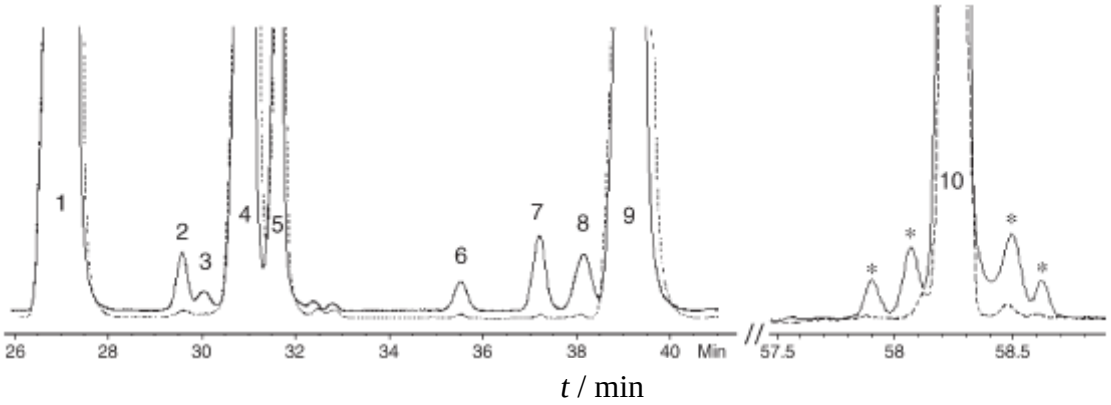
Nakon razvijanja kromatograma na pločicama silikagela impregniranim s otopinom $AgNO_3$ frakcije geometrijskih izomera se vizualiziraju reagensom, 50 % -tnom alkoholnom otopinom sumporne kiseline ili fosfomolibdenske kiseline, skidaju se sa pločice, dodavanjem 1 % -tne otopine NaCl ψ (metanol, voda) = 90:10 razori se kompleks sa srebrom te se potom oslobođene PUFA ekstrahiraju s heksanom.

Modernije metode se zasnivaju na ekstrakciji lipida na čvrstoj fazi pri čemu se koriste sorbensi s amino-vezanim skupinama i C18-vezanim fazama.[66] Ta tehnika je brza, reproducibilna, koristi minimalne količine organskog otapala te stoga ima široku primjenu u biološkim uzorcima.

2.4.3.1. Plinska kromatografija

U različitim područjima istraživanja, plinska kromatografija (*engl*. Gas Chromatography, GC) je široko primjenjiva kromatografska tehnika za analizu masnih kiselina. Višenezasićene masne kiseline se prevode u nepolarnije derivate masnih kiselina, najčešće metilne estere koji su hlapljiviji od slobodnih masnih kiselina,[62] te se lako i djelotvorno razdvajaju na polarnoj stacionarnoj fazi kapilarnih kolona. Prve korištene metode esterifikacije masnih kiselina su saponifikacija koju slijedi acidifikacija i derivatizacija s diazometanom u eteru ili još brža esterifikacija uz natrijev-metoksid (NaOMe) kao katalizator. Koja metoda esterifikacije će se primijeniti ovisi o vrsti uzorka. Metode derivatizacije se mogu provesti neposredno (HCl ili H_2SO_4/MeOH ili BF_3/MeOH) ili posredno, saponifikacija-esterifikacija (kalijev hidroksid, HCl/MeOH).[67]

GC osigurava visoko razlučivanje lipidnih komponenata što omogućuje određivanje sastava i količine mnogih masnih kiselina i njihovih izomera u kompleksnijim uzorcima lipida. Kapilarne duge kolone koje se pri tom koriste su vrlo učinkovite jer sadrže selektivne polarne stacionarne faze (npr. cijanopolisiloksani), a kao detektor se najčešće koristi plameno-ionizacijski detektor (*engl.* Flame Ionization Detector, FID).[68,69]



Slika 6. Kromatogram estera masnih kiselina ekstrahiranih iz homogenata jetre štakora prije (točkasta linija) i poslije (puna linija) γ-ozračivanja (korištena je kapilarna kolona Chrompack CP-Sil 88, 50 m × 0,25 mm × 0.20 μm); (1) C-18:0, (2) 9*t*-C18:1, (3) 11*t*-C18:1, (4) 9*c*-C-18:1, (5) 11*c*-C18:1; (6) 9*t*,12*t*-C-18:2, (7) 9*c*,12*t*-C18:2, (8) 9*t*,12-C-18:2, (9) 9c,12c-C18:2, (10) 5*c*,8*c*,11*c*,14*c*-C-20:4, * predstavlja geometrijske izomere metilnog arahidonata.[61]

Analiza *trans*-masnih kiselina je kompleksna zbog širokog područja pozicijskih monoen-, dien- i trien-izomera. Polarne kapilarne kolone omogućuju analitičarima odvajanje pozicijskih i geometrijskih izomera estera masnih kiselina koje se ne mogu razlučiti korištenjem kolona s nepolarnom ili djelomično polarnom fazom. Uz odabir odgovarajuće kolone važno je podešavanje temperaturnog programa, protoka plina nosioca i tlaka, pa je uz optimalno postavljene navedene parametre moguće razlučiti sve *cis*- i *trans*-izomere estera masnih kiselina. Korištenjem kapilarne kolone s polarnom stacionarnom fazom *trans*-izomeri će se eluirati prije pripadajućih *cis*-izomera, te će se najprije odvajati esteri zasićenih masnih kiselina, a potom masne kiseline sa sve većim brojem dvostrukih veza. Na slici 6 prikazan je tipični kromatogram estera masnih kiselina i njihovih geometrijskih izomera nastalih tijekom γ-zračenja te analiziranih metodom GC/FID.

Općenito se može zaključiti da se analiza masnih kiselina odvija u više složenih faza koji zahtijevaju dosta vremena. Međutim, potreba za brzom analizom npr. u gospodarstvu, dovela je do razvoja izravne metode pripreme estera masnih kiselina iz uzoraka hrane bez prethodne ekstrakcije, koristeći GC visoke rezolucije, primjenom izrazito polarne, kapilarne kolone.[68] Alternativni načini za izbjegavanje koeluiranja više komponenata i povećanja rezolucije su korištenje temperaturnih programa i tlakova na jednoj koloni (polarnoj ili

srednje polarnoj) ili primjenom dvodimenzijske plinske kromatografije (GCxGC), serijskim spajanjem dviju kapilarnih kolona. Prednost tehnike GCxGC je veći kapacitet kolona u odnosu na broj pikova i odatle povećana rezolucija. Primjenom ove dvije tehnike, GC/FID i GCxGC moguće je identificirati i kvantitativno odrediti sastojke kompleksne smjese *cis*- i *trans*-izomera PUFA.[70] GCxGC-separacija je istražena uz različite kombinacije kolona, a optimalna separacija postignuta je s polarnom ionskom nepokretnom fazom u prvoj dimenziji i polifenilsiloksanskom kolonom u drugoj dimenziji. Inače tehnika GCxGC nalazi svoju primjenu u selektivnoj analizi kompleksnih smjesa masnih kiselina ekstrahiranih iz životinjskih lipida. Dobiveni 2-D kromatogrami omogućuju brzu analizu lipida metodom "otiska prsta". Nedostatak ove metode je količina injektiranog uzorka koja je ograničena kapacitetom GC-kolone. Mondello i suradnici[71] su ovom metodom grupirali metilne estere masnih kiselina na temelju jednakog broja dvostrukih veza.

U analizi kompleksnih bioloških uzoraka često se kao detektor koristi spektrometar masa (MS) zbog svoje osjetljivosti i selektivnosti. Na ovaj način omogućena je sigurnija identifikacija odvojenih komponenata na temelju pripadnih spektara masa.[72]

Sanchez-Avila i suradnici[73] razvili su metodu GC/MS za analizu seruma, kojom su također uspjeli odvojiti *cis*- i *trans*-izomere masnih kiselina. Procesi ekstrakcije i derivatizacije su ubrzani pomoću ultrazvuka koji omogućuje određivanje esterificirane i neesterificirane masne kiseline i ujedno skraćuje proces derivatizacije. Granice detekcije i kvantifikacije bile su 0,002 μg ml^{-1} i 0,006 μg ml^{-1}. Metoda se može primijeniti na nutricionističke i epidemiološke studije u vrednovanju utjecaja profila masnih kiselina na razvoj i različite stupnjeve bolesti ljudi.

2.4.3.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Osim GC različiti tipovi HPLC (*engl.* High Performance Liquid Chromatography) obrnutih odnosno normalnih faza se koriste u analizi i separaciji masnih kiselina. Prednosti HPLC-tehnike u odnosu na GC su bolja osjetljivost i selektivnost te niže temperature tijekom analize čime se smanjuje rizik od izomerizacije dvostruke veze.[74] Kromatografija obrnutih faza obično se koristi u analizi organskih kiselina, hidroksi-višenezasićenih masnih kiselina, prostaglandina i drugih polarnih lipida. HPLC obrnutih faza uz UV/Vis ili fluorescencijski detektor je jedina tehnika koja se može usporediti s GC-om u analizi derivata masnih kiselina.

Za razliku od toga HPLC normalnih faza je učinkovitija tehnika u separaciji izomera Ag^+-kromatografijom gdje se razdvajanje događa prema stupnju nezasićenosti kiselina. Masne kiseline nemaju kromofore ili fluorofore koji jako apsorbiraju u UV/Vis području, pa se za HPLC-analizu masne kiseline prevode u veliki broj derivata. Nekoliko HPLC-metoda razvijeno je za analizu zasićenih i nezasićenih masnih kiselina uz predkolonsku derivatizaciju kojom se povećava osjetljivost i selektivnost detekcije. Procesom derivatizacije nastaju manje polarni spojevi čime se mogu prevladati problemi kao što su razvlačenje pikova ili niska osjetljivost detektora. Jedan od poznatih derivatizacijskih reagensa je 2-nitrofenilhidrazin hidroklorid (2-NPH HCl) s kojim reagiraju zasićene, MUFA i PUFA praveći spoj (hidrazid) koji jako apsorbira pri valnoj duljini od oko 230 nm te se može pratiti primjenom UV-detektora. Isto tako spoj u kiselom mediju ima apsorpcijski maksimum pri 400 nm pa ga se može pratiti fotometrijski pri toj valnoj duljini.[75] Prednost ovog derivatizacijskog reagensa mogućnost je direktne derivatizacije bez prethodnih koraka ekstrakcije, a višak reagensa i reakcijski nusprodukti ne interferiraju s analitom pri HPLC-analizi uz detekciju u vidljivom području i eluiraju se prije analiziranog spoja. Osim toga, detekcijom analita u vidljivom području kromatogrami su jednostavniji i selektivniji, unatoč 4 puta nižoj osjetljivosti u usporedbi s UV-detekcijom.[75] Ovom metodom uspješno se mogu odvojiti smjese zasićenih, MUFA i PUFA te njihove geometrijske i pozicijske izomere.

Ag^+-HPLC je kromatografska metoda koja se uspješno koristi u analizi svih lipidnih klasa i u svim područjima istraživanja uključujući lipidnu kemiju, prehrambenu industriju, farmaciju i medicinu. Ova tehnika zahtijeva kolonu u kojoj su srebrovi ioni vezani na silicijev dioksid ili neki drugi supstrat, a primjenjiva je u separaciji i kvantifikaciji *cis*, *trans*-masnih kiselina te pozicijskih izomera estera masnih kiselina u djelomično hidrogeniziranom biljnom ulju.[62,70,76] Kao i kod TLC, odvajanje se temelji na reverzibilnom formiranju kompleksa sa slabim prijenosom naboja između Ag^+ i dvostruke veze masne kiseline.

Nova tehnika koja se uspješno koristi u analizi masnih kiselina je i LC spregnuta s MS. Iako MS nije najosjetljiviji detektor kod HPLC-a, ipak omogućuje dobivanje dovoljno podataka da bi se odredila struktura i količina masnih kiselina u kompleksnim biološkim uzorcima. Prednost sustava LC-MS u odnosu na GC-MS je što se separacija i struktura komponenata može provesti kontinuirano bez predhodnih koraka pročišćavanja ili derivatizacije omogućujući brzu i efikasnu analizu. Mogu se analizirati i nehlapljive i/ili

termolabilne supstancije njihovim uvođenjem direktno u ionski izvor spektrometra masa bez mogućnosti termičke degradacije.

Ako se LC spregne s tandemnom spektrometrijom masa (MS/MS) moguće je utvrditi poziciju dvostruke veze ili mjesto grananja u lancu masne kiseline.[77]

2.4.3.3. Spektroskopske metode

Infracrvena spektroskopija (IR) je vrlo korisna metoda za utvrđivanje molekulske strukture lipida, no vrlo je učinkovita za određivanje udjela *trans*-izomera u ukupnom sastavu izoliranih lipida. Poznato je da IR spektar organske molekule jedinstvenim otiskom prsta daje detaljnu informaciju o molekulskoj strukturi. Međutim taj otisak postaje nejasan ako su prisutne strukturno slične molekule kao što je to slučaj u prirodnim mastima i uljima. *Trans*-dvostruka veza apsorbira karakteristično u IR području, na 967 cm^{-1}, a rezultat je promjena kuta C–H veze. U slučaju kad je *trans*-dvostruka veza dio konjugiranog sustava pojavljuje se pomak valnog broja prema većim vrijednostima, 983 cm^{-1} u slučaju *cis*,*trans*-diena, i 994 cm^{-1} kod *trans*, *trans*, *trans*-triena. Novija, Fourier-transformirana infracrvena spektroskopija je izvrsna tehnika koja omogućuje određivanje izoliranih *trans*-dvostrukih veza u prirodnim lipidima s većom točnošću i jednostavnošću jer spojeve nije potrebno derivatizirati ili otapati prije analize. Prednost je i mogućnost kontrole uz pomoć računala, a točni rezultati mogu se dobiti i kad je prisutno manje od 2 % *trans*-monoena.[2] Nedostatak metode je što se ovom metodom mogu mjeriti samo ukupni *trans*-izomeri.[78]

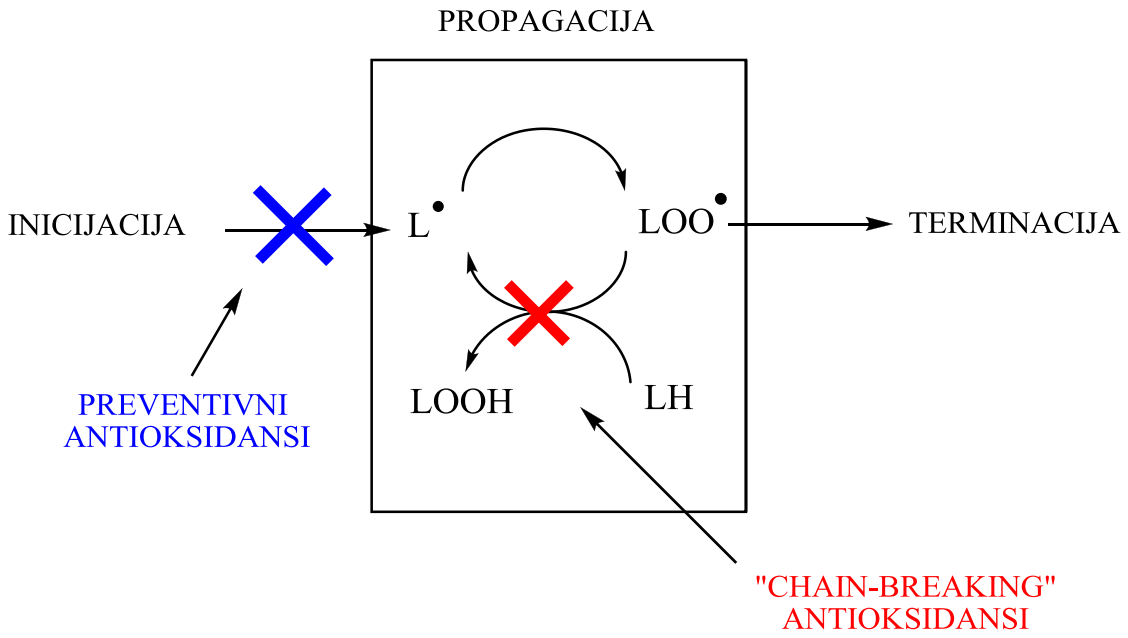
Masne kiseline s konjugiranim dvostrukim vezama moguće je detektirati i potvrditi UV spektroskopijom. Izolirana *cis*-dvostruka veza apsorbira kod 206 nm ali s malim ekstinkcijskim koeficijentom. Međutim, u sustavima u kojima se pojavljuju konjugirane dvostruke veze ova metoda može biti korisna jer se pojavljuju karakteristične široke vrpce kod većih valnih duljina čiji intenzitet raste s brojem dvostrukih veza.[79] Različiti geometrijski izomeri imaju nešto drugačiji spektar. S povećanjem broja *trans*-dvostrukih veza ekstinkcijski koeficijent se povećava, a valne duljine apsorpcijskog maksimuma su kraće. Međutim, razlika u apsorpcijskim maksimumima za različite geometrijske izomere je mala te se najvjerojatnije ne bi razlikovali u biološkim ili kemijski formiranim smjesama izomera masnih kiselina. Osim toga, u ovom području apsorpcije moguća su međudjelovanja stranih komponenta na dvostruku vezu alkilnog lanca što dodatno otežava interpretaciju rezultata.

2.5. Uloga antioksidansa u radikalskim reakcijama

Šira definicija antioksidansa podrazumijeva sve tvari koje su sposobne smanjiti ukupnu brzinu oksidacije supstrata. Antioksidansi spadaju u heterogenu skupinu spojeva koja se sastoji od malih organskih i anorganskih molekula, makromolekula i enzima. Karakteristike dobrog antioksidansa su: specifična hvatanja radikala, mogućnost stvaranja kelata s metalima, reakcija s drugim antioksidansima, djelovanje kod fiziološke koncentracije u tkivima i biološkim tekućinama, sposobnost djelovanja i u hidrofilnim i hidrofobnim dijelovima membrane.[80]

Tijekom evolucije živi organizmi razvili su različite mehanizme zaštite od djelovanja radikala koji nastaju u stanjima oksidacijskog/radikalskog stresa. Mehanizam djelovanja antioksidansa temelji se na mehanizmu zaustavljanja lančanih radikalskih reakcija. Antioksidansi sudjeluju u usporavanju ili potpunom zaustavljanju procesa lipidne peroksidacije, najčešće reakcijom s propagatorima lipidne peroksidacije, peroksilnim radikalima (*engl.* Chain-breaking antioxidants). Ova se reakcija odvija brže od reakcije peroksilnog radikala s lipidima (reakcija 13), pri čemu nastaju stabilni produkti koji ne propagiraju daljnje lančane reakcije (Shema 5).[81] Važno je pri tome napomenuti da pojedini antioksidansi mogu djelovati s više različitih mehanizama koji se nadopunjuju, a radikali koji pritom nastaju u reakcijama s antioksidansima su slabo reaktivni.

U živim organizmima opisanim mehanizmima djeluju enzimski antioksidansi poput superoksid dismutaze, katalaze i glutation peroksidaze. U fiziološkim uvjetima ti enzimi zadržavaju nisku koncentraciju radikala u stanici, a njihova aktivnost je regulirana mehanizmima na molekularnom nivou te su bitni za održavanje ravnoteže između oksidacijskog i antioksidacijskog stanja.

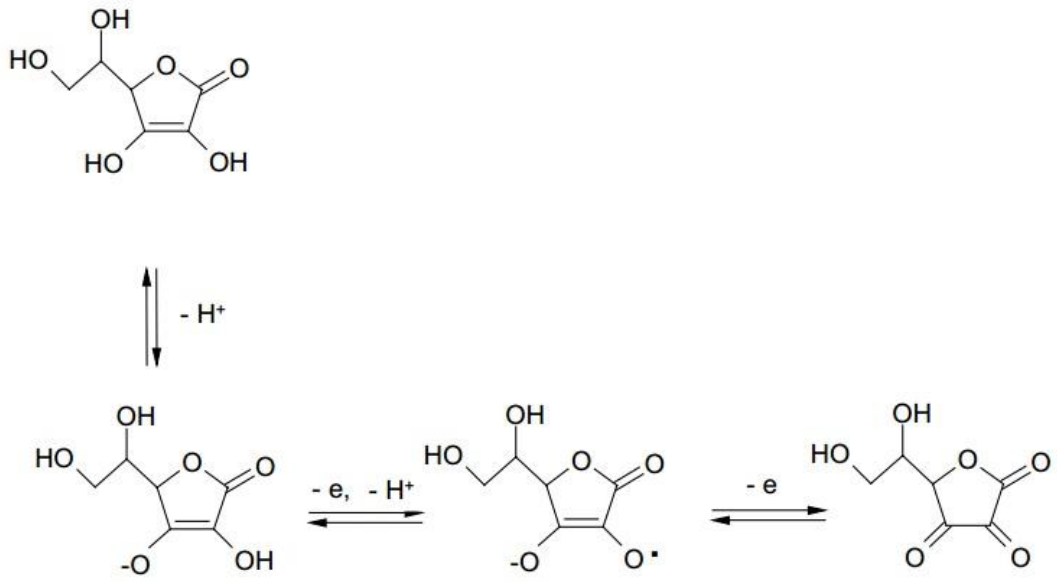


Shema 5. Mehanizmi interferencije lipidne peroksidacije pod djelovanjem antioksidansa

Neenzimski antioksidansi su spojevi koji su prisutni u stanici ili se mogu unijeti putem prehrane. Među neenzimskim antioksidansima ističu se askorbinska kiselina, α–tokoferol, glutation, flavonoidi i karotenoidi koji se razlikuju po svojoj strukturi i afinitetu za različite molekule te stoga sudjeluju u različitim mehanizmima djelovanja antioksidacijske zaštite.

Askorbinska kiselina je važan antioksidans koji djeluje u vodenoj sredini tako da spriječava lančane reakcije hvatajući peroksilne i hidroksilne radikale unutar i izvan stanične sredine mehanizmom apstrakcije atoma vodika iz hidroksilnih skupina kiseline radikalima. Askorbinska kiselina je po kemijskom sastavu ketolakton sa šest ugljikovih atoma pa je po strukturi vrlo slična glukozi. Slaba je dibazična kiselina s p*Ka* vrijednostima 4,2 i 11,4. U vodenim fiziološkim uvjetima askorbinska kiselina egzistira u obliku aniona askorbata. Pretpostavlja se da je u anionskom obliku jači antioksidans nego u protoniranom obliku.[82] Askorbat je izvrstan reducirajući agens i podložan je reverzibilnoj oksidaciji u dva stupnja pri

čemu nastaje dehidroaskorbinska kiselina uz nastajanje askorbilnog radikala kao međuprodukta (Shema 6).[82]



Shema 6. Oksidacija askorbinske kiseline

Nespareni elektron askorbilnog radikala je delokaliziran. On može sudjelovati u reakcijama disproporcioniranja ili može reagirati s drugim radikalima pri čemu efikasno terminira reakcije propagacije. Rezultati istraživanja ovog u vodi topljivog spoja upućuju da je antioksidacijska aktivnost AscH posljedica prijenosa vodika s hidroksilnih grupa, a ne prijenosa elektrona.[83] Redukcijski potencijal askorbata iznosi + 0,28 V te svi oksidirajući radikali s višim redukcijskim potencijalom (X = $HO^{\bullet}$, $RO^{\bullet}$ $LOO^{\bullet}$, $RS^{\bullet}$ ($GS^{\bullet}$) i radikal tokoferola, α-$TO^{\bullet}$) reagirat će s askorbatom:

$$AscH^{-} + X^{\bullet} \longrightarrow Asc^{\bullet -} + XH \qquad (19)$$

AscH donira atom vodika u brzoj reakciji s tiilnim radikalima pri čemu se tiol s lakoćom regenerira. Konstante brzine reakcije α-TOH i $AscH^{-}$ s cisteintiilnim radikalom su velike, one su reda veličine 10^8 i 10^9 $dm^3\,mol^{-1}\,s^{-1}$.[82]

Za razliku od askorbinske kiseline, α-tokoferol je topljiv u lipidima i s aspekta strukture biomembrana važan je biološki antioksidans. Zbog svoje lokalizacije u hidrofobnom dijelu membrana, glavna antioksidacijska funkcija mu je zaštita od lipidne peroksidacije. Tokoferoli su važni fiziološki hvatači slobodnih radikala ($E^{\circ\prime}$ = + 0,48 V). Poznato je da α-TOH inhibira lipidnu peroksidaciju i druge reakcije slobodnih radikala u biološkim sustavima. Sposobnost hvatanja reaktivnih kisikovih vrsta preko njegovih fenolnih skupina čini α-TOH dobrim antioksidansom, odnosno radioprotektorom. Utvrđeno je da je antioksidacijska aktivnost α-TOH niža u membranama nego u homogenim otopinama.[84] Omjer konstanta brzina k_{inh}/k_p za α-TOH u membranama je za oko dva reda veličine manji nego u homogenim otopinama. Objašnjenje ovoj smanjenoj reaktivnosti α-TOH u membranama i micelama u odnosu na prave otopine može se naći u činjenici da dolazi do stvaranja vodikovih veza s fenilnim –OH skupinama i eterskim kisikovim atomom te na taj način dolazi do sprječavanja radikalskih reakcija. Osim toga, Niki i suradnici[85] su u svojim istraživanjima pokazali da je mobilnost radikala generiranih α-tokoferolom važan čimbenik u utvrđivanju antioksidacijske aktivnosti u heterogenim sustavima kao što su membrane, liposomi ili najjednostavniji modelni sustavi, micele.

Ako je askorbinska kiselina koja se nalazi u vodenoj fazi u interakciji s α-TOH, ona može reducirati radikal tokoferola te ga na taj način regenerirati u početni oblik. Antioksidacijska aktivnost smjese askorbinske kiseline i α-tokoferola u heterogenim sustavima je veća od sume aktivnosti pojedine komponente.[82] Stoga su ta dva antioksidansa dobro poznati primjer sinergističkog djelovanja dva antioksidansa koja se odvijaju na granici faza voda/lipid.

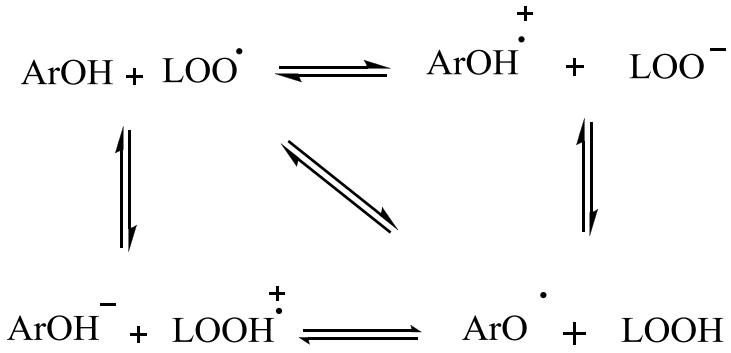
Fenolni spojevi koji su najvećim dijelom izolirani iz prirodnih izvora su grupa spojeva čija su antioksidacijska svojstva najviše istraživana. Više od 60 godina se smatralo da je antioksidacijska aktivnost fenola rezultat njihove brze reakcije s peroksilnim radikalima u kojoj peroksilni radikali apstrahiraju H-atom iz fenola. Ta reakcija u kojoj nastaje ariloksil ili fenoksil radikal ($ArO^{\bullet}$) je daleko brža od reakcije propagacije peroksilnih radikala.

$$LOO^{\bullet} + ArOH \longrightarrow LOOH + ArO^{\bullet} \qquad k = 10^4 - 10^6\ dm^3\ mol^{-1}\ s^{-1}\ (81) \qquad (20)$$

$$LOO^{\bullet} + LH \longrightarrow LOOH + L^{\bullet} \qquad k_p = 36\ dm^3\ mol^{-1}\ s^{-1}\ (81) \qquad (13)$$

$$LOO^{\bullet} + ArO^{\bullet} \longrightarrow \text{neradikalski produkti} \qquad k = 4 \times 10^8\ dm^3\ mol^{-1}\ s^{-1}\ (81) \qquad (21)$$

$ArO^{\bullet}$ je relativno stabilan radikal i ne uzrokuje daljnju propagaciju lančane reakcije te brzo reagira s drugim peroksilnim radikalom pri čemu nastaju neradikalski produkti.
Međutim, postoje još dva moguća načina kojima fenoli mogu sudjelovati u reakcijama s peroksilnim radikalima: u jednom dolazi do prijenosa protona u jednom koraku, a potom do prijelaza elektrona u drugom koraku i obrnuto (Shema 7).



Shema 7. Mogući mehanizmi prijenosa H-atoma između fenola i peroksilnih radikala.[81]

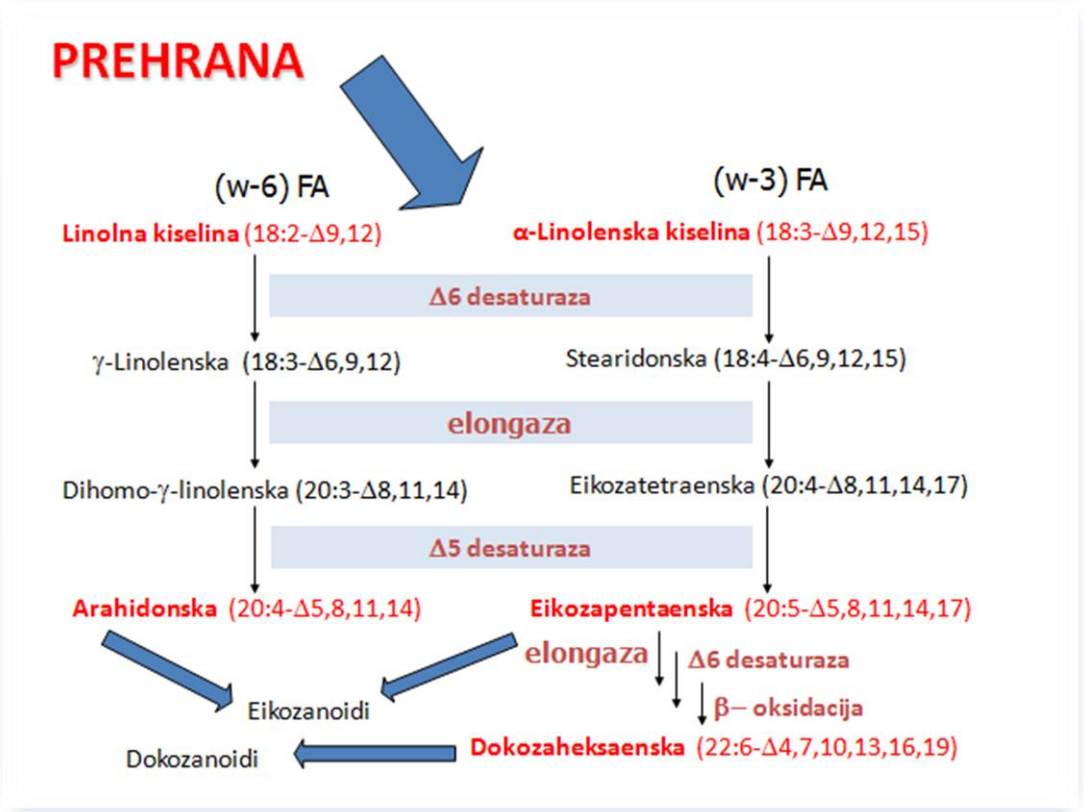
Koji od navedenih mehanizam prijenosa vodika će se odvijati ovisi o reakcijskoj sredini, odnosno prisustvu kiseline ili baze.

Glutation je jedan od glavnih predstavnika biološki važnih antioksidansa. Njegov snažan antioksidacijski kapacitet posljedica je labilnog H-atoma te u reakcijama s mnogim radikalima odvijaju se reakcije prijenosa H-atoma. Brzina reakcija peroksilnih radikala s tiolima je reda veličine 10^3–10^5 $dm^3\,mol^{-1}\,s^{-1}$, te kinetika ovisi o mediju u kojem se reakcija odvija.[81] Generirani radikal centriran na atomu sumpora ima vrijeme poluživota duže nego većina radikala koja nastaju za vrijeme oksidacijskog stresa.
Postoje i spojevi koji nemaju antioksidacijsku aktivnost, ali mogu povećavati efikasnost antioksidacijske zaštite u biološkim sustavima. Primjer takvih indirektnih antioksidansa je glutation reduktaza koji sudjeluju u regeneraciji glutationa.

U fokusu mnogih današnjih istraživanja su proučavanja utjecaja različitih spojeva u procesima geometrijske izomerizacije i njihove uloge u održavanju integriteta *cis*-geometrije u eukariotskim stanicama. Pri tom treba imati na umu da se jednostavna kemijska inhibicija peroksidacije ili izomerizacije može razlikovati od aktivnosti istih spojeva u biološkim sustavima pa je važno raditi na modelima i sustavima što jednostavnijim, a bliskijim pravim organizmima.

2.6. Metabolizam masnih kiselina u živim organizmima

Poznato je da zbog nepostojanja potrebnih enzima, čovjek i drugi sisavci ne mogu sintetizirati linolnu (C-18:2) i α-linolensku kiselinu (C-18:3) već ih moraju unositi putem hrane. Stoga su ove kiseline esencijalne (Slika 7). C-18:2 i C-18:3 prekursori su ω-3 i ω-6 masnih kiselina, a međudjelovanjem enzima desaturaze i elongaze u biosintezi lipida dolazi do njihove pretvorbe. U posljednje vrijeme povećan interes za istraživanjem ω-3 masnih kiselina povezan je s njihovom ulogom u nastajanju i rastu stanica u eukariota. Bitno je pri tome naglasiti da su ω-3 masne kiseline važne kao pojedinačne skupine spojeva, ali i u kombinaciji s drugim esencijalnim ω-6 masnim kiselinama. Ove dvije skupine PUFA povezane su nizom kaskadnih i enzimatskih transformacija.



Slika 7. Biosinteza višenezasićenih masnih kiselina.

Desaturacijski enzimi djeluju na zasićenost uvodeći novu dvostruku vezu u ugljikovodični lanac dok elongacijski enzimi produžuju lanac dodajući dva nova ugljikova atoma. Kao što je vidljivo iz slike 7 metabolički put ω-6 i ω-3 višenezasićenih masnih kiselina sastoji se od niza naizmjeničnih desaturacija i elongacija pri čemu već u prvom stupnju pretvorbe između ω-6 i ω-3 kiselina postoji konkurencija za Δ6-desaturazom. Prvi korak u sintezi arahidonske kiseline iz esencijalne linolne kiseline i eikozapentaenske kiseline iz esencijalne α-linolenske kiseline je Δ6-desaturacija, a nastavak sinteze ovisi o aktivnosti Δ6-desaturaze.[86] Ključni korak u metabolizmima lipida je neposredna kompeticija linolne kiseline i α-linolenske kiseline za Δ6-desaturazom, te nastajanje dugolančanih masnih kiselina za stvaranje eikozanoida i dokozanoida, važnim u posredovanju signalnih puteva i funkcijama u stanici.[87] Enzimi koji sudjeluju u procesima sinteze membranskih lipida ne razlikuju ω-3 od ω-6 masnih kiselina pri čemu dolazi do neravnoteže u stvaranju navedenih PUFA i poremećaja važnih fizioloških procesa u stanicama. Ovaj efekt direktne kompeticije ω-3 i ω-6 masnih kiselinama za enzimima koji sudjeluju u biosintezi lipida je pod utjecajem prehrane, gdje prevladavanje ω-6 masnih kiselina nad ostalim dovodi do potiskivanja ω-3 biosinteze. Ako se smanji unos ω-6 PUFA, primjerice linolne kiseline, tada se indirektno može stimulirati veće stvaranje ω-3 PUFA.[88] Važno je napomenuti da se aktivnost desaturaze može inhibirati npr. zasićenim masnim kiselina, ugljikohidratima i inzulinom, alkoholom. Ovdje posebno treba naglasiti da se biosinteza PUFA također može efikasno inhibirati u prisustvu *trans*-masnih kiselina, koje su od znanstvenog interesa i predmet ove disertacije.[89,90]

Gradivne komponente fosfolipida u staničnim membranama su ω-3 i ω-6 PUFA, one utječu na membransku fluidnost i time na vezivanje enzima i receptora. Strukturni lipidi mozga, moždana opna, retina oka, tkivo testisa i sperma također sadrže PUFA, posebno dokozaheksaensku kiselinu (*engl.* Docosahexaenoic acid, DHA, C-22:6). U nedostatku PUFA u membrane se ugrađuje veća količina zasićenih masnih kiselina čime se smanjuje fluidnost i narušava funkcionalnost membrana kao što je opisano u poglavlju 2.1. Eikozapentaenska kiselina (*engl.* Eicosapentaenoic acid, EPA, C-20:5) i DHA su prekursori signalnih molekula (eikozanoida) koje imaju protuupalna i zaštitna svojstva dok iz arahidonske kiseline (C-20:4) nastaju molekule koje su odgovorne za različita patološka stanja organizma.[91,92,93]

U višestaničnim organizmima postoji velika razlika u sastavu PUFA ovisno o vrsti stanica, odnosno tkiva i organa. U tablici 2 prikazan je sastav PUFA u tkivima ljudi koji žive u razvijenim zemljama.

Tablica 2. Sastav masnih kiselina u različitim tkivima ljudi.[94]

Masne kiseline	Masno tkivo	Placenta	Jetra	Testisi	Mozak	Retina
C-18:2	10,5	9,5	17,5	5,6	0,6	1,4
C-18:3	0,8	-	0,3	0,7	Tragovi	
C-20:3	0,2	4,3	1,6	6,7	1,2	2,1
C-20:4	0,3	21,2	7,7	13,4	7,7	9,6
C-22:6	0,3	4,8	3,4	8,5	7,2	19,7
Ukupne SFA	27,2	39,4	42,0	39,6	45,9	48,2
Ukupne MUFA	59,7	11,6	23,8	20,0	29,7	14,2
Ukupne PUFA	13,1	44,4	32,0	30,7	23,4	37,2
ω-3/ω-6	0,17	0,16	0,17	0,33	0,46	1,32

Ovakva raznolikost u sastavu različitih vrsta PUFA upućuje na njihovu specifičnu biološku ulogu u staničnim mehanizmima u određenim tipovima stanica odnosno tkiva. Unosom hrane PUFA se raspoređuju u stanicama. Međutim, moždane stanice i stanice mrežnice oka bogate su dugolančanim PUFA, posebno DHA, koje su odgovorne za održavanje specifičnih membranskih procesa, a čiji mehanizmi još nisu do kraja razjašnjeni. Pretpostavlja se da je visok udio PUFA u navedenim stanicama većinom reguliran na razini gena uz uvjet da je zadovoljena minimalna potreba za esencijalnim masnim kiselinama unesenim hranom.[95,96] Većina ostalih stanica ljudskog organizma tolerantnija je u odnosu na promjene sastava

membranskih lipida te prehrana može minimalno djelovati na ukupni udio PUFA. Međutim, pokazano je da prehrana može imati velik utjecaj na promjenu udjela ω-3 i ω-6 masnih kiselina u membranama.[96] Gubitak ravnoteže konzumiranih ω-6 i ω-3 kiselina putem ljudske prehrane povezuje se s uzrokom pojave različitih bolesti moderne civilizacije koje su u stalnom porastu. Unatoč opsežim spoznajama o utjecaju PUFA na poremećaje zdravlja čovjeka kao jedne od konačnih posljedica strukturalnih promjena staničnih membrana, još uvijek se ne poznaju mehanizmi i uloga PUFA u patofiziološkim procesima mnogih bolesti, uključujući i pojave tumora. Trenutne smjernice svjetske zdravstvene organizacije potiču na veću konzumaciju ω-3 PUFA zbog njihove dokazane terapijske uloge u snižavanju kolesterola, reguliranju rada srca i krvnog tlaka, smanjivanju ateroskleroze, prevenciji nastanka tumora i poboljšavanju kognitivnih sposobnosti. S druge strane ω-6 PUFA, od kojih su neke esencijalne kiseline, čak se smatraju prokancerogenim, no jednako tako se zna da njihov nedostatak može biti uzrok nekih bolesti.[97]

Iako su PUFA važne za normalno funkcioniranje stanice i membranskih procesa, produkti različitih procesa s PUFA koji nastaju u određenim uvjetima mogu biti štetni za stanicu, ali i za organizam. Tri su aspekta koja treba uzeti u obzir prilikom istraživanja potencijalno štetnog utjecaja PUFA na zdravlje čovjeka. Jedna je njihova podložnost lipidnoj peroksidaciji. S druge strane, od velike je važnosti utvrditi i utjecaj oksidacijskog/radikalskog stresa na normalno funkcioniranje stanice i relaciju između *trans*-kiselina i LOOH.

Jedan od ciljeva istraživanja radikalima potaknutih procesa lipida trebao bi biti utvrđivanje obilježivača, tj. biomarkernih molekula oksidacijskog/radikalskog stresa neophodno je u istraživanjima reakcijskih mehanizama i puteva u metabolizmima lipida potaknutih različitim inicijatorima, u različitim uvjetima u živim organizmima.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

Soli i otapala bili su analitičke čistoće. Sve otopine su dearirane sa čistim dušikom, a upotrebljena voda je četiri puta destilirana: destilirana voda destilirana je još iz alkalnog permanganata, kiselog bikromata i četvrti put bez dodataka.

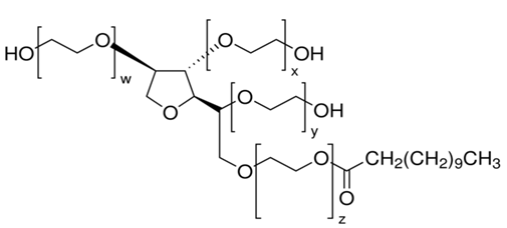
Stakleno posuđe isprano je redestiliranom vodom i otapalom.

3.1.1. Reagensi i soli

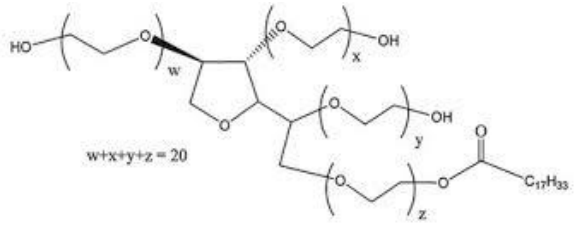
U primjeni feritiocijanatne metode upotrebljene su slijedeće soli:

- $FeSO_4 \times 7H_2O$ ("Merck", p.a.)
- KSCN (Sigma Ultra, min 99,0%; "Sigma-Aldrich")

Za pripremu otopina miješanih micela korišteni su linolna kiselina (LiH), neionska površinski aktivna tvar, polioksietilensorbitan monolaureat (Tween®-20) odnosno polietilenglikol dodecil eter (Brij 35®) (Slika 8). Od puferskih soli korišteni su natrijev dihidrogen fosfat (NaH_2PO_4) i fosforna kiselina (H_3PO_4) odnosno 2-(N-morfolinoetan sulfonska kiselina) (MES), polietilenglikol dodecil eter (Brij 35®) (sve "Sigma-Aldrich"). Neposredno prije izlaganja γ-zračenju u priređene otopine dodavan je odgovarajući alikvot 2-merkaptoetanola ($OHCH_2CH_2SH$, 2–ME) ("Sigma-Aldrich").

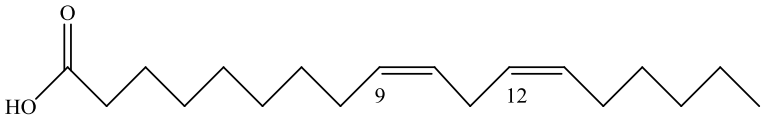


Tween®-20



Brij 35®

Slika 8. Molekulske strukture neionskih površinski aktivnih tvari.



***9cis*, 12cis-oktadekadienske kiseline (LiH, C-18:2)**

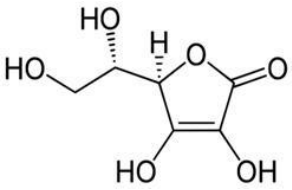


Oktadekanska kiselina (StH, C-18:0)

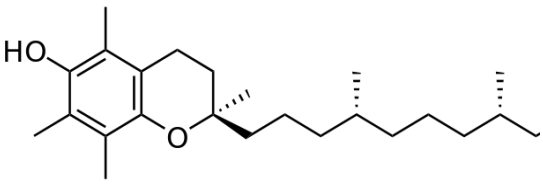
Slika 9. Molekulske strukture masnih kiselina.

Za istraživanje djelovanja antioksidansa na lipidne procese promatrane u ovom radu korišteni su slijedeći antioksidansi:

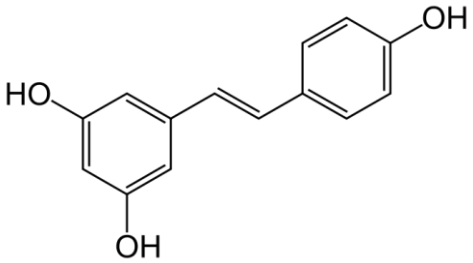
- DL-α-tokoferol (α-TOH) (97%, "Alfa Aesar")
- L-(+) askorbinska kiselina (AscH) (98%, "Alfa Aesar")
- Resveratrol (Res) (> 99%, "Sigma-Aldrich")



AscH



α-TOH



ResOH

Slika 10. Molekulske strukture antioksidansa.

Za sintezu diazometana (CH_2N_2) korišteni su :

- N-methyl-N-nitrozo-p-toluenesulfonamid (diazald®) (> 99%, "Sigma-Aldrich")
- KOH ("Kemika")

Stearinska kiselina (StH) ("Aldrich") je dodavana kao unutarnji standard u plinskoj kromatografiji.

3.1.2. Otapala

Za feritiocijanatnu metodu upotrebljena su slijedeća otapala:

- diklormetan (CH_2Cl_2) ("Kemika" p.a.)
- metanol (MeOH) ("Kemika" p.a.)
- klorovodična kiselina (HCl) ("Kemika", <37%, p.a.)

Za spektrofotometrijsko mjerenje UV-diena upotrebljen je:

- metanol (MeOH) ("Kemika" p.a.)

Za sintezu CH_2N_2 korišena su slijedeća otapala:

- dietil-eter (Et_2O) (sušen preko molekulskih sita, "Fluka")
- 2-metoksietanol ("Aldrich")

Za plinsku kromatografiju metilnih estera masnih kiselina korišten je heksan ("Fluka"p.a.).

3.2. Metode

3.2.1. Priprema miješanih micela linolne kiseline

Modelni lipidni sustav priređivan je miješanjem LiH, tipično 0,0125 ml LiH i predhodno priređenih micela surfaktanta nastalih miješanjem 0,050 ml Tween®-20 u 1,25 ml fosfatnog pufera pH 6,5. Uz intenzivno miješanje na magnetskoj miješalici dodano je približno 0,05 g KOH i 4,22 ml redestilirane vode. Nastala otopina se razrijeđuje s $5{,}0 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3} NaH_2PO_4 na ukupni volume od 80 ml, a pH je podešen dodavanjem nekoliko kapi 1 mol dm^{-3} HCl ili 1 mol dm^{-3} KOH. Tipični sastav istraživanog sustava je bio: 5×10^{-4} mol dm^{-3} LH, $2{,}8 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3} Tween®-20 i $5{,}0 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3} NaH_2PO_4. Na isti način priređeni su modelni sustavi uz ostale upotrebljene pufere i uz Brij 35® kao drugi neionski surfaktant.

Za eksperimente u kojima se proučavao utjecaj antioksidansa na procese lipidne peroksidacije i geometrijske izomerizacije u toku priprave otopina miješanih micela dodavala se odgovarajuća koncentracija otopine pojedinog antioksidansa (ResOH i AscH) u vodi. U slučaju α-TOH modelni sustav je pripreman najprije njegovim vaganjem u Erlenmeyerovoj tikvici u kojoj su se potom dodavale pojedine komponente za pripremu miješanih micela.

Svi sustavi pripremljeni su ili u ravnoteži sa zrakom ili bez prisustva kisika iz zraka što se postiglo 10-minutnim propuhivanjem s N_2O.

Sve vrijednosti prikazane u ovom radu, ako nije posebno označeno, predstavljaju srednje vrijednosti tri ili više neovisnih mjerenja ($p < 0{,}05$) uz pogrešku ± 5%.

Za izradu krivulja u grafičkim prikazima dobivenih rezultata u ovom radu nisu korišteni računalni matematički programi.

3.2.2. Metode inicijacije peroksidacije linolne kiseline

3.2.2.1. Peroksidacija linolne kiseline ionima željeza(II)

Karakterizacija modelnog sustava provedena je praćenjem lipidne peroksidacije inicirane ionima Fe(II) pri povišenoj temperaturi. Oksidacija LiH provedena je dodavanjem odgovarajuće koncentracije otopine $FeSO_4$ u otopine miješanih micela LiH uz inkubaciju na 38°C i u ravnoteži sa zrakom. U različitim vremenskim intervalima nakon dodavanja Fe(II), izuzimani su alikvoti od 5 ml otopine micela i LiH je ekstrahirana s dodatkom 5 ml deaerirane smjese otapala ψ (metanol/cikloheksan) = 1:1 u frakciji odvojenoj nakon centrifugiranja 10 min na 5000×*g*. Koncentracija LiOOH određena je spektrofotometrijskim mjerenjem konjugiranih diena i feritiocijanatnom spektrofotometrijskom metodom prema proceduri opisanoj u poglavlju 3.2.4.1. i 3.2.4.2.

3.2.2.2. Peroksidacija linolne kiseline γ-zračenjem

Procesi lipidne peroksidacije i geometrijske izomerizacije u homogenim otopinama i miješanim micelama provedeno je uz inicijaciju γ-zračenjem. Homogene otopine pripremane su otapanjem LiH, Tween®-20, sa i bez dodavanja 2–ME u smjesi otapala ψ ($EtOH:H_2O$) = 1:1. Eksperimenti sa miješanim micelama LiH su se provodili pripremanjem dva različita modelna sustava: (*sustav A)* u kojem se 2–ME dodavao u otopinu micela neposredno prije zračenja i *(sustav B)* koji se priređivao s 2–ME ugrađenim tijekom pripreme miješanih micela. γ-radioliza micela i homogenih otopina provedena je pri sobnoj temperaturi, kod različitih doza, brzina doze, u ravnoteži sa zrakom ili u N_2O zasićenim otopinama.

γ-zračenje se provodilo na panoramskom izvoru ^{60}Co i Gammacell Model 220. Panoramski izvor ^{60}Co izrađen je u Laboratoriju za radijacijsku kemiju i dozimetriju u Institutu Ruđer Bošković. Izvor zračenja sastoji se od vertikalnog cilindričnog sklopa sastavljenog od 24 nosača sa šipkama punjenim kapsulama ^{60}Co. Izvor se iz svog sigurnog položaja iz podzemnog spremišta dovodi u radni položaj pomoću elektromotornog pogona pri čemu se nosači ^{60}Co podižu u prostoriju za ozračivanje uzoraka. Uzorci su zračeni u centru izvora gdje je postignuta najveća brzina doze oko 274,8 Gy/min, te na različitim udaljenostima od centra određenim prema eksperimentalno potvrđenom pravilu prema kojem brzina doze pada s kvadratom udaljenosti.

Zračenje je provedeno i na izvoru zračenja ^{60}Co zatvorenog tipa, koji je konstruiran tako da se njime može postići vrlo homogeno i definirano polje zračenja s brzinom doze oko 1,31 Gy/min. Uzorci koji se ozračuju unose se u prostor za ozračivanje unutar cilindra.

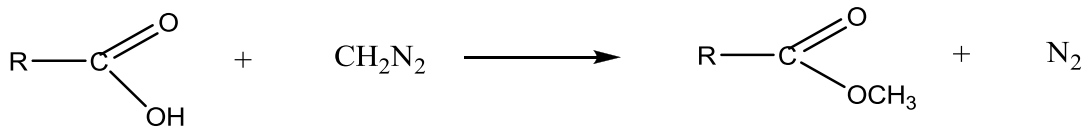
Gammacell Model 220 (Atomic Energy of Canada) je uređaj za ozračivanje uzoraka pri najmanjim brzinama doze. Sastoji se od 48 štapova ^{60}Co koji su kružno smješteni oko cilindrične šupljine. Valjak s komorom, u koji se postavljaju uzorci, pokreće se na električni pogon vertikalno unutar cilindrične šupljine spuštajući i uzdižući uzorke u i iz polja zračenja. Brzina doze bila je oko 0,15 Gy/min.

Brzina doze na panoramskom izvoru određena je ionizacijskom komorom tip 2581 uz pripadajući Farmer dozimetar 2570. Za određivanje doze na svim upotrebljenim izvorima zračenja korišten je etanol klorbenzenski dozimetar.[98,99]

Pri izvođenju eksperimenata vrijednosti brzine doze preračunavane su dnevno uzimajući u obzir radioaktivni raspad ^{60}Co.

3.2.3. Analiza metilnih estera linolne kiseline plinskom kromatografijom

Nakon ozračivanja modelnih sustava LiH je ekstrahirana sa smjesom otapala ψ (CH_2Cl_2:MeOH) = 2:1. U ekstrakt LiH dodana je stearinska kiselina kao unutarnji standard, a sušenje se provelo s Na_2SO_4. Nakon filtriranja i uparavanju otapala na rotacijskom evaporatoru, s dodavanjem nekoliko kapi eterske otopine diazometana u suhi ekstrakt priređen je metilni ester linolne kiseline (MeLi) (Shema 8).



Shema 8. Metiliranje masnih kiselina s diazometanom.

Reakcija je dodatno ubrzana uz dodatak nekoliko kapi MeOH. Uzorak metilnog estera uparen je do suha i razrijeđen sa 150 μl heksana. Analiza estera masnih kiselina i pripadajućih

geometrijskih izomera provedena je injektiranjem 1 µl MeLi u plinski kromatograf Varian 450–GC s plameno-ionizacijskim detektorom i kapilarnom kolonom Rtx-2330 (90 % biscyanopropyl/10 % phenylcyanopropyl polysiloxane; 105 m × 0.25 mm). Temperaturni režim je počinjao od 180 ºC (u trajanju od 35 minuta) do 250 ºC (5 minuta) s brzinom porasta temperature 10 ºC min^{-1}. Temperatura injektora bila je 250 ºC, a temperatura detektora 270 ºC uz plin nosilac He protoka 1,5 ml min^{-1}. Metilni esteri i geometrijski izomeri identificirani su usporedbom s predhodno utvrđenim vremenima zadržavanja komercijalno dostupnih standarda.

3.2.3.1. Sinteza diazometana

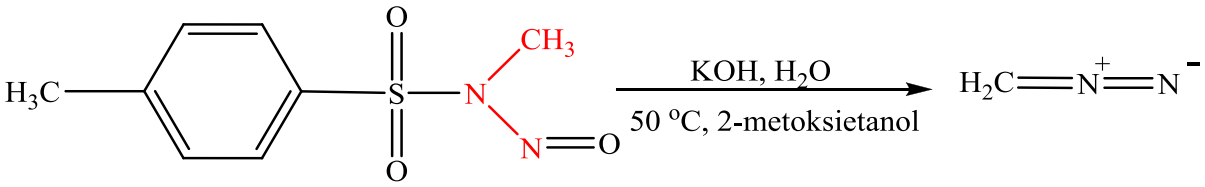
Reagensi:

- Diazald, $CH_3C_6H_4SO_2N(CH_3)NO$
- pastile KOH

Otapala:

- 2-metoksietanol
- suhi Et_2O

Sinteza diazometana priređena je u skladu s literaturom uz manje modifikacije opisane kako slijedi (Shema 9).[100,101]



diazald diazometan

Shema 9. Sinteza diazometana.

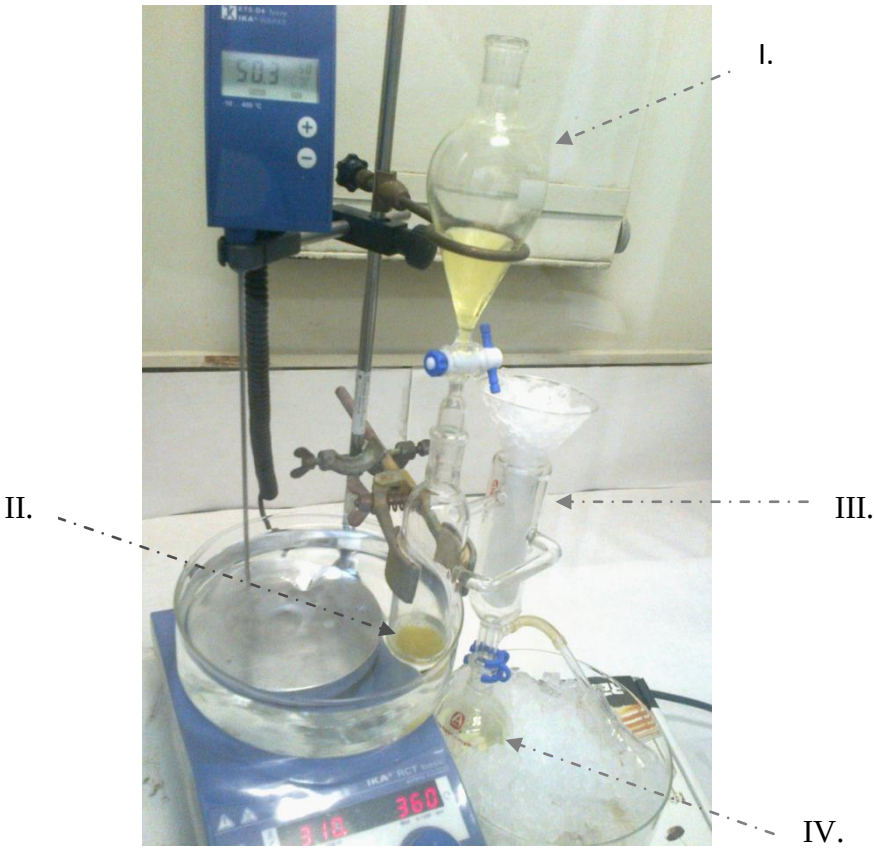
Diazometan je toksičan i potencijalno eksplozivan te se sinteza provodi u digestoru s iznimnom pažnjom. Aparatura se sastoji od lijevka za dokapavanje, okrugle tikvice u kojoj se događa reakcija, hladila i okrugla tikvica u kojoj se skuplja diazometan u Et_2O (Slika 11).

I. U lijevak za dokapavanje pomiješaju se:
   2,5 g diazalda
   22,5 ml Et_2O.

II. U tikvicu pomiješaju se:
   vodena otopina KOH (4 g KOH/1,5 ml H_2O)
   2-metoksietanol (5 ml).

III. Pomiješa se usitnjeni led sa NaCl (u omjeru 3:1) te se napuni hladilo.

IV. U okruglu tikvicu u koju se destilira diazometan stave se pastile KOH da se pokrije dno tikvice i osušeni Et_2O (50 ml). Na drugom izlazu hladila postavi se pasteur pipeta blago zataljenog vrha te se uroni u malo Et_2O s otopljenim KOH koja služi kao stupica za eventualni gubitak diazometana. Dio aparature u kojoj se destilira diazometan mora biti u ledu.



Slika 11. Aparatura za sintezu diazometana.

Prvi dio aparature prikazane na slici 11 uronjen je u vodenu kupelj uz miješanje na magnetskoj miješalici i zagrijavanje na temperaturu do 50 ºC, a drugi dio, tikvica u koju će se destilirati diazometan, je postavljen u posudu s ledom. Otopina iz lijevka za dokapavanje (I) se postupno dodaje u reakcijsku smjesu (II). Važno je da je reakcijska smjesa potpuno uronjena u kupelj jer u suprotnom nastaju dva sloja i destilacija nije potpuna. Sinteza se provodi dok se u tikvici IV ne pojavi intenzivna žuta boja otopine. Nakon što se sva otopina doda iz lijevka za dokapavanje, sinteza se završi ispiranjem lijevka s Et_2O. Tako pripređena otopina diazometana stabilna je nekoliko mjeseci uz čuvanje u hladnjaku na – 30 ºC.

3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije hidroperoksida linolne kiseline

3.2.4.1. Spektrofotometrijsko mjerenje UV-diena

Reagensi:

- alikvot peroksidirane LiH

Otapalo:

- MeOH

Postupak:

U odmjerne tikvice od 10 ml pipetira se alikvot od 2,0 ml gornjeg lipidnog sloja te se nadopune s MeOH do oznake. Tako priređene mjerne otopine snimljene su u području valnih duljina od 550 do 200 nm prema otapalu. Koncentracije hidroperoksida izračunate su iz vrijednosti apsorbancije na valnoj duljini od 232 nm, na kojoj konjugirani dieni maksimalno apsorbiraju, i molarne apsorptivnosti standarda metilnog estera 13-hidroperoksi-linolne kiseline u metanolu, $\varepsilon = 28\ 950 \pm 1300\ dm^3\ mol^{-1}\ cm^{-1}$.[102] Razlika apsorbancije peroksidirane otopine LiH na 232 nm i odgovarajuće neperoksidirane otopine uzeta je kao mjera novo nastalih konjugiranih diena.

3.2.4.2. Feritiocijanatna metoda

Reagensi:

- Fe-reagens: deaerirane otopine 0,0045 mol dm^{-3} $FeSO_4 \times 7H_2O$ u 0,04 mol dm^{-3} HCl i 3 % KSCN u MeOH pomiješane su u omjeru 1:1. Fe-reagens je svakodnevno svježe pripremljen i čuvan u tami.

Otapalo:

- deaerirana smjesa CH_2Cl_2:MeOH (2:1)

Postupak:

U odmjernim tikvicama od 10 ml deaerira se smjesa otapala kojem je dodan deaeriran alikvot ekstrahiranih hidroperoksida (u CH_2Cl_2:MeOH (2:1)), te 0,4 ml Fe-reagensa. Nakon deaeriranja otopine su čuvane u tami do kompletiranja reakcije. Crvenoobojene mjerne otopine snimljene su na spektrofotometru u području valnih duljina od 750 do 350 nm prema otapalu, u 1 cm kiveti na sobnoj temperaturi. Snimanje je obavljeno 30–40 minuta nakon vremena postizanja kvantitativnosti reakcije Fe–reagensa i ispitivanih otopina hidroperoksida. Ferikompleks je očitavan na λ_{max} 500 nm, a za detekciju ferikompleksa koji potječe od samog reagensa pripremljena je i paralelno snimljena otopina koja sadrži samo alikvot Fe-reagensa (slijepa proba reagensa). Koncentracije hidroperoksida izračunate su iz vrijednosti apsorbancije mjernih otopina umanjenih za vrijednost slijepe probe, te vrijednosti molarne apsorptivnosti feritiocijanatnog kompleksa dobivenog u otopini standarda hidroperoksida metilnog estera linolne kiseline (ε = 58 440 $dm^3\,mol^{-1}cm^{-1}$). Standard je priređen γ-zračenjem LiH nanošene na silikagelu metiliranjem, čišćenjem i identificiranjem služeći se metodama TLC, IR, UV/VIS i GC/MS. Dobivena otopina MeLiOOH je standardizirana pomoću spektrofotometrijske jodimetrijske metode poznate stehiometrije i molarne apsorptivnosti iona I_3^-.[16]

3.2.5. Karakterizacija modelnog sustava linolne kiseline

Dinamičko raspršenje svjetlosti mjereno je na foton korelacijskom spektrofotometru, Zetasizer Nano ZS, Malvern opremljen sa "zelenim" laserom (λ = 532 nm) u termostatiranim uvjetima, kod sobne temperature i 38 °C. Intenzitet raspršene svjetlosti mjeren je pri kutu od 173°. Korelacijske funkcije analizirane su uz pomoć programskog paketa CONTIN.[103] U

mjerenjima dinamičkog raspršenja svjetla (DLS) određuje se difuzijski koeficijent, a ne veličina čestice. Veličina čestice dobiva se iz najčešće korištene Stokes-Einstenove relacije koja povezuje veličinu čestice s difuzijskim koeficijentom:

$$D = \frac{k_b T}{3\pi\eta d_h} \tag{22}$$

gdje je k_b Boltzmanova konstanta, T apsolutna temperature, η viskoznost otapala, d_h hidrodinamički promjer čestice. Ova jednadžba valjana je jedino u slučaju beskonačnog razrijeđenja kada je vrijednost difuzijskog koeficijenta u potpunosti neovisna o koncentraciji. Drugim riječima, vrijednosti dobivene DLS mjerenjima su apsolutna u slučaju kad su čestice sferične, monodisperzne i bez međudjelovanja te uz pretpostavku da se javlja samo Brownovo gibanje. Veličina čestice je dobivena iz raspodjele po volumenu i dobiveni rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri do šest mjerenja.

Elektroforetska pokretljivost također je mjerena na instrumentu Zetasizer Nano ZS, Malvern, a dobivene vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost tri do šest mjerenja. Zeta potencijal (ζ/mV) je utvrđen pomoću Henryeve jednadžbe:

$$U_e = \frac{2\varepsilon\zeta f(K_a)}{3\eta} \tag{23}$$

gdje je ε dielektrična konstanta, U_e elektroforetska pokretljivost, a η viskoznost.
Uz aproksimaciju Smoluchowskog za polarna otapala Henryjeva funkcija, f(K_a) iznosi 1,5. Raspon odstupanja rezultata iznosio je ± 1 mV.

3.2.6. Instrumentacija

Spektroskopska mjerenja su izvedena na UV/VIS spektrofotometru Cary 4000.

Analiza estera masnih kiselina i pripadajućih geometrijskih izomera izvršena je na plinskom kromatografu Varian 450–GC s plameno-ionizacijskim detektorom i kapilarnom kolonom.

Hidrodinamički dijametar miješanih micela metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti određen je na Zetasizer Nano ZS (Malvern).

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

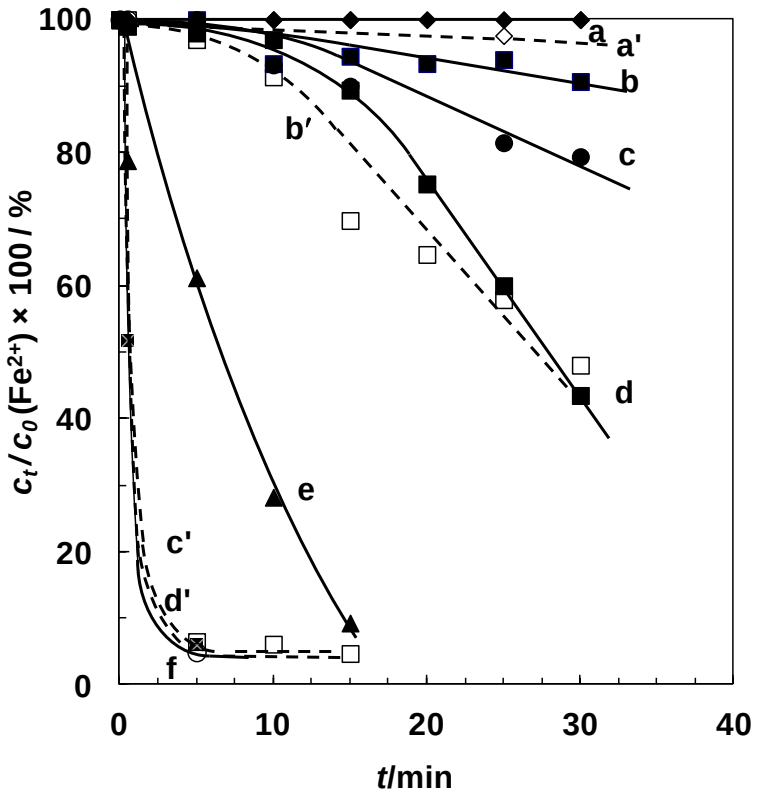
4.1. Vrednovanje modelnog lipidnog sustava

Predloženi modelni sustav LiH vrednovan je u uvjetima procesa peroksidacije inicirane ionima Fe(II), koji su sposobni potaknuti proces lipidne peroksidacije bilo putem autooksidacije Fe(II) iona (reakcije 7-9) bilo putem razgradnje već stvorenih LiOOH (reakcija 14). Proces lipidne peroksidacije jako ovisi o molekulskoj sredini te je nužno ispitati utjecaj svake pojedine komponente na kinetiku i mehanizam navedenog procesa. Budući da je proces peroksidacije jedan od predmeta u ovom radu, u sljedećim poglavljima su sistematki prikazani rezultati istraživanja procesa peroksidacije LiH inducirana Fe(II) ionima.

4.1.1. Analize podsustava

4.1.1.1. Utjecaj vrste puferske soli na autooksidaciju Fe(II) iona

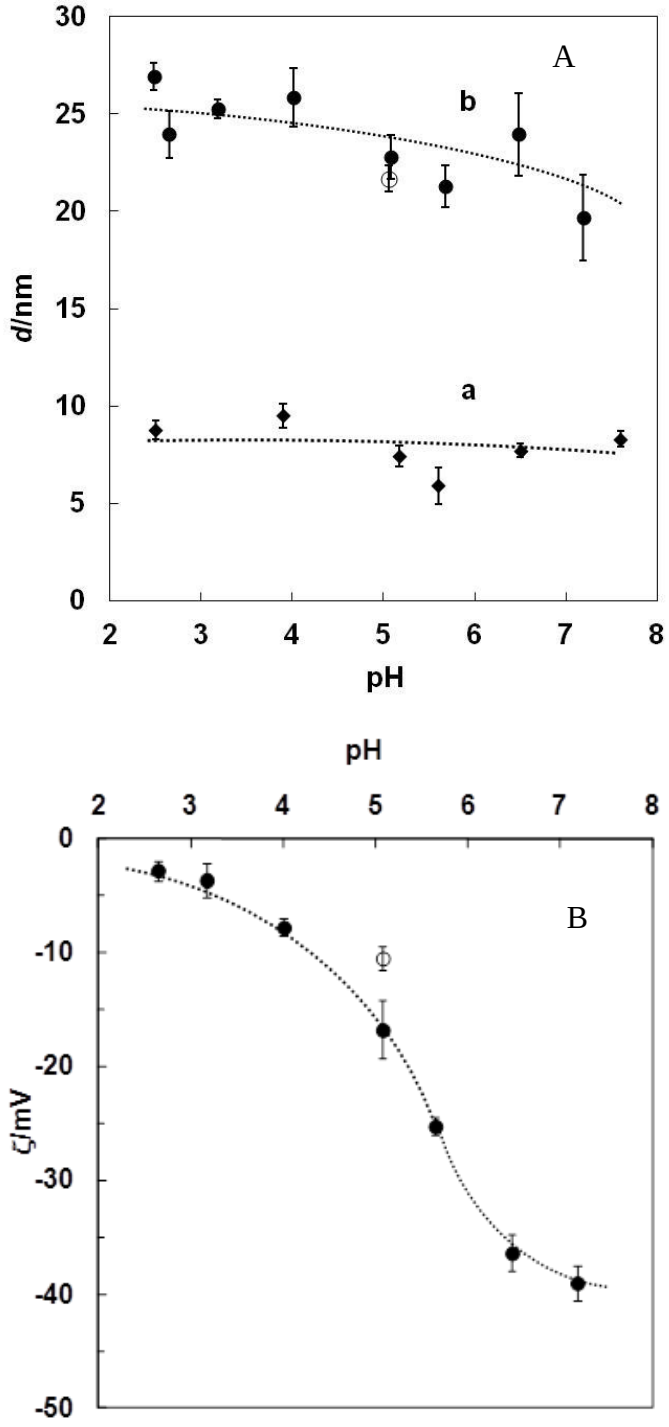
Kako bi se istražio utjecaj puferske soli (NaH_2PO_4 ili MES) na stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta zbog autooksidacije Fe(II) (reakcije 7-8) priređene su kontrolne otopine koje su sadržavale $1{,}0 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3} Fe^{2+} i po $5{,}0 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3} MES, odnosno NaH_2PO_4, variranjem koncentracije H^+ kod vrijednosti $2{,}5 < pH < 9{,}0$. Na slici 12 je vidljivo da brzina autooksidacije Fe(II) značajno ovisi o pH otopine priređene s pojedinačnom puferskom soli. Osim u otopinama najveće kiselosti (krivulje a, a') u svim ostalim otopinama kod približno istih pH vrijednosti je brzina autooksidacije puno manja u onim priređenim s MES nego u otopinama koje sadrže fosfatnu sol. U području nižih pH vrijednosti je vidljivo da je autooksidacija Fe(II) inhibirana te su time svi Fe(II) ioni raspoloživi za reakciju s LiOOH (reakcija 14). Budući da se stabilnost Fe(II) iona održavala u otopinama MES u području koncentracija H^+ i kroz nekoliko redova veličine, karakterizacija modelnog sustava je provedena u otopinama ove puferske soli kod pH oko 5.



Slika 12. Utjecaj pufera i pH otopina Fe(II) iona na autooksidaciju Fe(II) pri temperaturi 38°C u *c*(MES) = 5,0 × 10^{-3} mol dm^{-3} NaH_2PO_4 (prazni simboli); *c*(Fe^{2+}) = 1,0 × 10^{-4} mol dm^{-3}; pH: (a,a') 2,5 (b, b') 5,1 (c,c') 6,1 (d,d') 6,5 (e) 7,5 (f) 9,0.

4.1.1.2. Utjecaj sastava otopine na veličinu micela

Proces otapanja masnih kiselina u vodi provodi se disocijacijom njihovih molekula u ione kod visokih vrijednosti pH. Kod pH vrijednosti bliskih fiziološkoj ili kod niskih vrijednosti u vodi masne kiseline su netopljive. Međutim, u ovim uvjetima moguće ih je otopiti u prisutnosti surfaktanta. Tween®-20 je neionski surfaktant koji u vodi stvara micele pri nižim koncentracijama; literaturna vrijednost kritične micelizacijske koncentracije (*cmc*) iznosi 4,1 × 10^{-5} mol dm^{-3}.[104] Unutar micele Tween®-20 smješteni su hidrofobni lanci dok je vanjski, hidrofilni dio sastavljen od oksietilenskih skupina (Slika 8). Otapanjem molekula masnih kiselina u micelama surfaktanta hidrofobna područja masnih kiselina smještaju se prema unutrašnjosti micela, a hidrofilni dio prema vanjskom vodenom sloju stvarajući miješanu micelu. Na slici 13 A prikazan je utjecaj pH otopina na veličinu micela sastavljenih samo od Tween®-20 (krivulja a) i miješanih micela Tween®-20 / LiH (krivulja b).



Slika 13. Utjecaj pH na fizikalne veličine micele:

A) srednji hidrodinamički promjer; (a) c(Tween®-20) = 2,0 × 10^{-4} mol dm^{-3}, (b) c(Tween®-20) = 2,0 × 10^{-4} mol dm^{-3}, c(LiH) = 5,0 × 10^{-4} mol dm^{-3}.

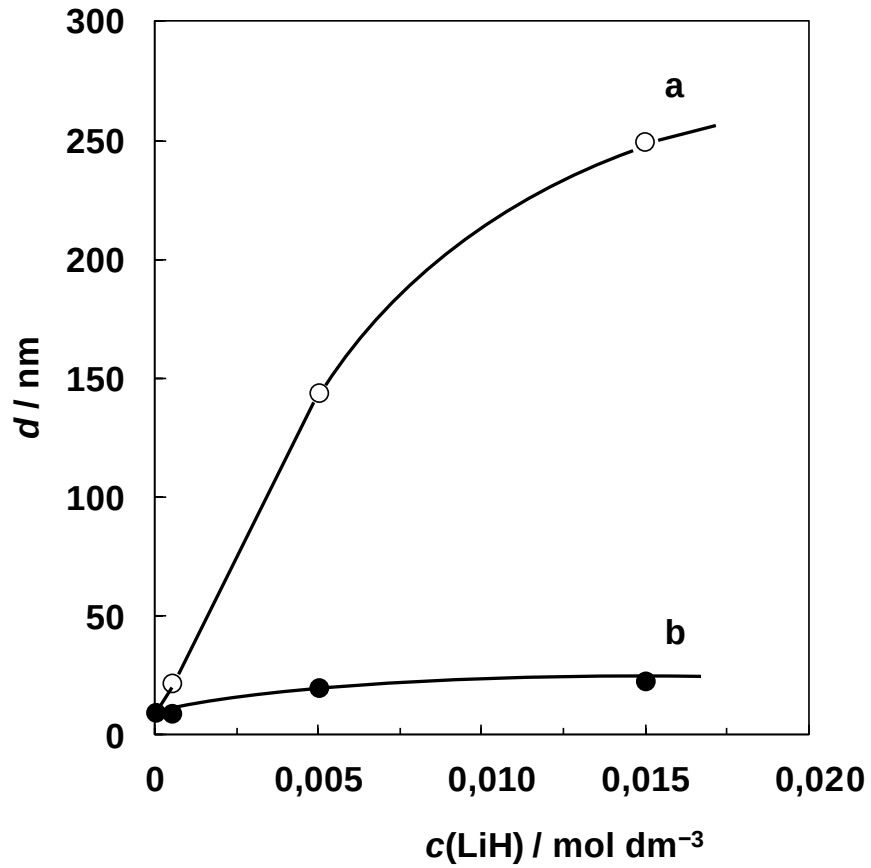
B) ζ-potencijal miješanih micela; c(Tween®-20) = 2,0 × 10^{-4} mol dm^{-3}, c(LiH) = 3,5 × 10^{-4} mol dm^{-3}, pri temperaturi 38°C.

DLS mjerenja pokazala su stvaranje micela Tween®-20 te je određena njihova veličina; hidrodinamički promjer je iznosio d = 7,9 ± 1,2 nm (Slika 13 A, krivulja a). Ova je vrijednost u dobrom slaganju s literaturnim podacima dobivenim istom DLS tehnikom.[105,106] Porast pH vrijednosti nije značajno utjecao na veličinu micela te je vrijednost ostala konstantna u širokom rasponu pH. Otapanjem LiH u micelama Tween®-20 nastaju miješane micele čija je veličina očekivano veća od micele samog surfaktanta. Miješane micele su blago negativno nabijene do pH oko 5 (Slika 13 B) zbog prisutnosti deprotoniranih karboksilnih skupina u hidrofilnom sloju što je povezano s većim stupnjem disocijacije LiH u micelama surfaktanta s povećanjem pH. Povećanjem pH dolazi do porasta broja karboksilatnih aniona, a postojanje odbojnih elektrostatskih interakcija među njima u hidrofilnom sloju dovodi do neznatnog smanjenja veličine miješanih micela (Slika 13, krivulja b). Ovu činjenicu je važno istaći jer je poznato da naboj micele može utjecati na brzinu lipidne peroksidacije, posebno ako je stvoren od ionskih površinski aktivnih tvari.[107]

Unatoč neionskom karakteru polioksietiliranih surfaktanata dodatak nekog elektrolita može utjecati na njegovu topljivost i veličinu micela. DLS mjerenja veličine miješanih micela nisu pokazala značajnu promjenu dodavanjem različitih koncentracija MES ($5{,}0 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3} i $5{,}0 \times 10^{-2}$ mol dm^{-3}) u usporedbi s mjerenjima veličine micela u vodi, a nije bilo značajne razlike ni pripremom 10 puta razrijeđenijih otopina. Nadalje, dodatak Fe^{2+} iona nije utjecao na veličinu miješane micele (Slika 13 A, prazni kružić), dok je malo sniženje ζ-potencijala (Slika 13 B, prazni kružić) povezano s ostvarenim međudjelovanjem Fe(II) iona i površine micele kao rezultat elektrostatskog vezanja Fe(II) iona.

4.1.1.3. Utjecaj koncentracije linolne kiseline na veličinu micela

Za očekivati je da se strukture neionskih/anionskih miješanih micela razlikuju od micela Tween®-20. Promjene u veličini miješanih micela, obliku i naboju ovisno je o koncentraciji surfaktanta i omjerima koncentracija LiH i Tween®-20, što svakako utječe na brzine procesa koji se odvijaju u miješanim micelama. Utjecaj koncentracije LiH na veličinu micela prikazan je na slici 14.



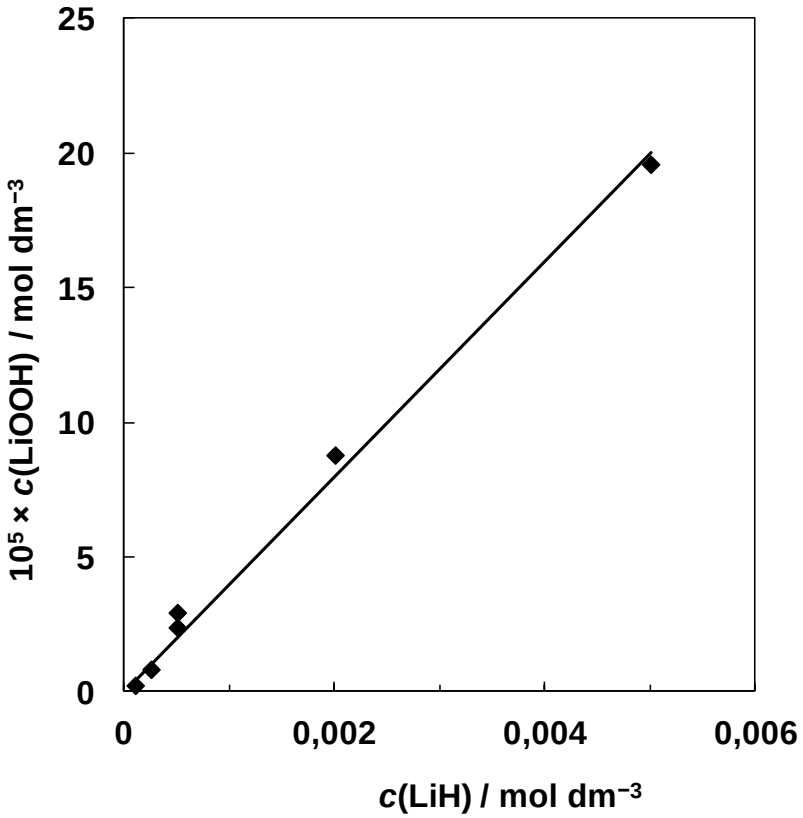
Slika 14. Utjecaj koncentracije LiH na srednji hidrodinamički promjer micela u modelnom sistemu c(MES) = 5,0 × 10^{-3} mol dm^{-3}, pH = 5; a) c(Tween®-20) = 2,8×10^{-4} mol dm^{-3}; b) c(Tween®-20) = 2,2×10^{-3} mol dm^{-3}.

Kako se povećavala koncentracija LiH, tako se ona ugrađivala u micele Tween®-20 stvarajući sve veće miješane micele. U koncentracijskom području do 5 × 10^{-3} mol dm^{-3} LiH linearna ovisnost veličine micele s koncentracijom LiH može se prikazati relacijom: d(nm) = 2,7 × 10^4 c(LiH) + 9.8 (r^2 = 0.99), dok s daljnjim povećanjem koncentracije masne kiseline slijedi zasićivanje (Slika 14, krivulja a). Nasuprot tomu, kod desetorostruko veće koncentracije Tween®-20 nastaju puno manje micele (Slika 14, krivulja b), te se i u ovim sistemima pokazuje tendecija zasićivanja već kod koncentracija većih od 5 × 10^{-3} mol dm^{-3} LiH. Ovisnost veličine čestica o koncentraciji LiH može se objasniti činjenicom da se pri nižim koncentracijama surfaktanta molekule LiH raspodjeljuju između manjeg broja micela i obratno.

Utjecaj koncentracije LiH na proces oksidacije izmjeren preko koncentracije LiOOH, uz dodavanje Fe^{2+} u micelarnu otopinu pri konstantnoj koncentraciji Tween®-20, prikazan je na slici 15. Količina nastalih LiOOH određena je mjerenjem apsorbancije UV-diena nakon 60 minuta inkubacije bez i sa dodanim Fe^{2+} u koncentraciji od 1×10^{-4} mol dm^{-3} u modelni sustav. Iz dobivenih rezultata utvrđena je ovisnost koncentracije LiOOH o koncentraciji LiH, te je metodom najmanjih kvadrata prikazana kao:

$$10^{-5} \times c(\text{LiOOH}) / \text{mol dm}^{-3} = 0{,}044\ c(\text{LiH}) \quad (r^2 = 0{,}97)$$

Iz koje proizlazi da na svaki mol LiH nastaje 227 μmol LiOOH.



Slika 15. Utjecaj koncentracije LiH na koncentraciju nastalih LiOOH uz $1{,}0 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3} Fe^{2+} nakon 60 min pri 38 °C; c(Tween®-20) = $2{,}8 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3}, c(MES) = $5{,}0 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3}, pH= 5. Prikazane vrijednosti predstavljaju srednju vrijednost tri neovisna mjerenja ± 2%.

4.1.1.4. Utjecaj koncentracije Tween®-20 na oksidaciju linolne kiseline

U tablici 3 prikazan je utjecaj koncentracije surfaktanta na veličinu miješanih micela.

Tablica 3. Utjecaj koncentracije Tween®-20 na srednji hidrodinamički promjer miješanih micela kod konstante koncentracije LiH ($5{,}0 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3}) u $5{,}0 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3} MES, pH = 5 pri 38°C.

c(Tween®-20)/μmol dm^{-3}	d/nm
0,28	22
0,55	20
1,20	13
2,8	9

Otopine su priređene razrjeđivanjem originalnih otopina micela s vodenim otopinama surfaktanta u $5{,}0 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3} MES. Osim kod visoke koncentracije Tween®-20 ($1{,}0 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3}) gdje je slabo inhibirano nastajanje LiOOH, nije utvrđena značajnija razlika u brzini nastajanja LiOOH u području koncentracija Tween®-20 od $1{,}0 – 4{,}8 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3}. Prosječna koncentracija nastalih LiOOH iznosila je (0,52 ± 0,05) mmol LiOOH / g LiH.

Tablica 4. Utjecaj koncentracije Tween®-20 na oksidaciju LiH nakon 60 min inkubacije na 38°C u $5{,}0 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3} MES, pH = 5; c(LiH) = 5×10^{-4} mol dm^{-3}, c(Fe^{2+}) = 1×10^{-4} mol dm^{-3}; ΔLiOOH izračunato je iz razlike mmol LiOOH/g LiH sa i bez dodatka Fe^{2+}.

c(Tween®-20)/ μmol dm^{-3}	Δn(LiOOH)/m(LiH)/ mmol g^{-1}
1,0	0,37 ± 0,04
100	0,49 ± 0,04
280	0,59 ± 0,05
480	0,48 ± 0,04

Ispitivanjem kinetike nastajanja LiOOH u micelama kod konstantnih molarnih omjera *c*(LiH)/*c*(Tween®-20) = 1,8 i 0,4 utvrđeno je da se nakon sat vremena oksidacije kod istog molarnog odnosa koncentracije surfaktanta i masne kiseline, kako raste koncentracija LiH tako se smanjuje koncentracija LiOOH (Tablica 5). Isti rezultat je dobiven i u kontrolnim sustavima, bez dodanog Fe(II) iona.

Tablica 5. Utjecaj sastava otopine na oksidaciju LiH kod konstantog omjera *c*(LiH)/*c*(Tween®–20) nakon 60 min inkubacije pri 38 °C, $c(Fe^{2+}) = 1 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3}, c(MES) = $5{,}0 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3}, pH = 5.

c(LiH)/ mmol dm^{-3}	*c*(Tween®-20)/ mmol dm^{-3}	*c*(LiH)/*c*(Tween®-20)	Δ*n*(LiOOH)/*m*(LiH)/ mmol g^{-1}
0,5	0,28	1,8	0,60 ± 0,06
5,0	2,80		0,17 ± 0,01
0,1	0,28	0,4	0,09 ± 0,007
1,0	2,80		0,03 ± 0,005

Brzina lipidne peroksidacije ovisi kako o koncentraciji LiH tako i o molarnom omjeru *c*(LiH)/*c*(Tween®-20). U sustavu s konstantnim molarnim omjerima *c*(LiH)/*c*(Tween®-20) koncentracija LiOOH se smanjuje s porastom koncentracije LiH, iako ne linearno. S obzirom da je koncentracija Tween®-20 uvijek iznad kritične micelizacijske koncentracije, ovaj bi se rezultat mogao objasniti inhibicijom oksidacije LiH zbog kompeticije molekule surfaktanta i LiH za peroksilnim radikalima.

S druge strane, kada se koncentracija surfaktanta drži konstantnom tada s povećanjem koncentracije LiH raste i njezina oksidacija (Slika 15). Ova linearna ovisnost koncentracije LiOOH o koncentraciji LiH je u potpunom slaganju s klasičnim zakonom brzine autooksidacije u homogenim otopinama, međutim pokazano je da može vrijediti i u micelama pa i u lipidnom dvosloju.[108,109] Dobiveni rezultati upućuju na postojanje mikrostrukturne organizacije lipida koja pogoduje stvaranju LiOOH. Nedvojbeno je da brzina propagacije ovisi o koncentraciji LiH dok god je LiH inkorporirana u micelama. Jedino u slučaju kad lipidni radikali pobjegnu iz "kaveza micele" dolazi do propagacije koja završava terminacijom lančanog mehanizma u okolini vodene faze.

4.1.2. Analiza modelnog sustava

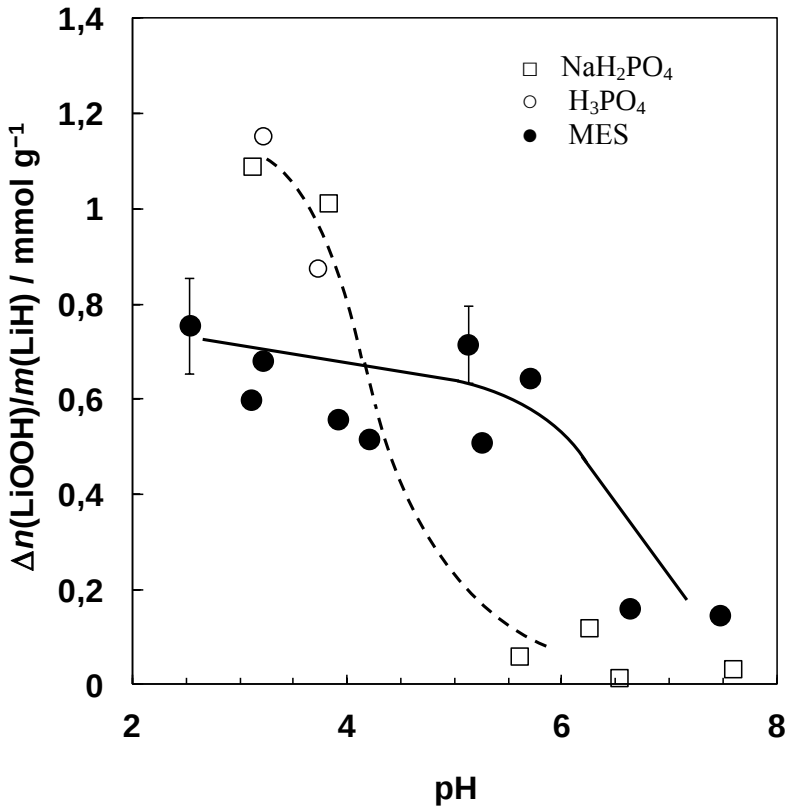
Za razliku od dosadašnjih istraživanja procesa lipidne peroksidacije iniciranih hidroksilnim radikalima (reakcija 11), u ovom radu istraživana je peroksidacija PUFA inicirana jedino alkoksilnim radikalima lipida ($LO^{\bullet}$) generiranim procesom razgradnje početno stvorenih LOOH s Fe(II) (reakcija 14). Za ova istraživanja u lipidnom modelnom sustavu moraju biti zadovoljeni slijedeći kriteriji:

- autooksidacija Fe^{2+} (reakcije 7-10) mora biti inhibirana;
- surfaktant ne utječe na oksidaciju PUFA;
- pH ne utječe na veličinu micele.

Na temelju analiza opisanih u predhodnim poglavljima odabran je lipidni modelni sustav. Optimalni eksperimentalni uvjeti su u odabranom sustavu određeni ispitivanjem ovisnosti koncentracije LiOOH (kao mjere oksidacije LiH) o pH, strukturi i koncentraciji Fe^{2+}. Rezultati su pokazali da je optimalan sastav modelnog sustava za istraživanje: $5{,}0 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3} LiH, $2{,}8 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3} Tween®-20 i $5{,}0 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3} MES.

4.1.2.1. Utjecaj pH na oksidaciju linolne kiseline

Utjecaj pH na koncentraciju LiOOH nastalih 30 min nakon dodatka 1×10^{-4} mol dm^{-3} Fe^{2+} u optimalnom modelnom sustavu prikazan je na slici 16. Rezultati pokazuju da podložnost oksidaciji LiH ovisi o izboru pufera. U otopinama u kojima je pH podešen s MES, u procesu oksidacije 30 min nakon dodatka Fe^{2+} kod pH 2,5 nastaje oko 7×10^{-4} mol LiOOH/g LiH, te se ova koncentracija neznatno smanjuje do pH 5,5. Nasuprot tome, u otopinama s fosfatima kao puferskim solima pri nižim pH vrijednostima nastaju visoke koncentracije LiOOH, dok je kod vrijednosti pH većih od 4 nastajanje LiOOH ili inhibirano ili dolazi do njihove degradacije. Poznato je da se sa smanjenjem kiselosti otopine inducira razgradnja LiOOH. Ovaj rezultat je usporediv s rezultatima razgradnje *tert*-butil hidroperoksida sa Fe^{2+} dobivenim u otopini voda/metanol, u kojoj je određena mala brzina razgradnje u kiselom mediju (20 mol dm^{-3} s^{-1}, $2 < pH < 4$), i koja raste sa smanjenjem kiselosti, pa tako približavanjem neutralnim uvjetima konstanta brzine razgradnje iznosi 200 mol dm^{-3} s^{-1}.[76]



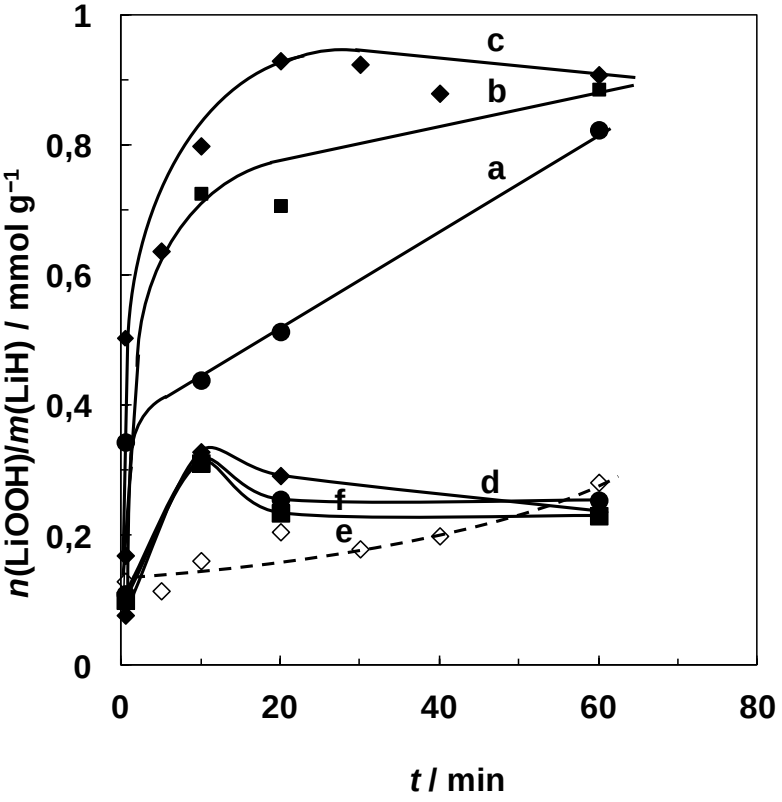
Slika 16. Grafički prikaz ovisnosti pH o koncentraciji LiOOH nastalih 30 min nakon dodatka $1{,}0 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3} Fe^{2+} pri 38 °C u $5{,}0 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3} MES.

Mala promjena u oksidaciji LiH u ovisnosti o pH može se pripisati neznatnoj promjeni u veličini miješane micele u širokom pH području (Slika 13 A). Smanjenje koncentracije LiOOH nastale u otopinama kojima su s upotrebljenim puferskim solima prilagođene vrijednosti pH > 6, upućuje na smanjeni doprinos reakcija peroksilnih radikala ovisnih o koncentraciji H^+.[110,111]

Na temelju ovih rezultata utjecaja pH i vrste puferske soli na oksidaciju LiH, sva daljnja istraživanja procesa peroksidacije u prisutnosti Fe^{2+} iona kao inicijatora i propagatora provedena su u miješanim micelama LiH kojima je kiselost otopina podešena korištenjem MES, a pH je iznosio oko 5.

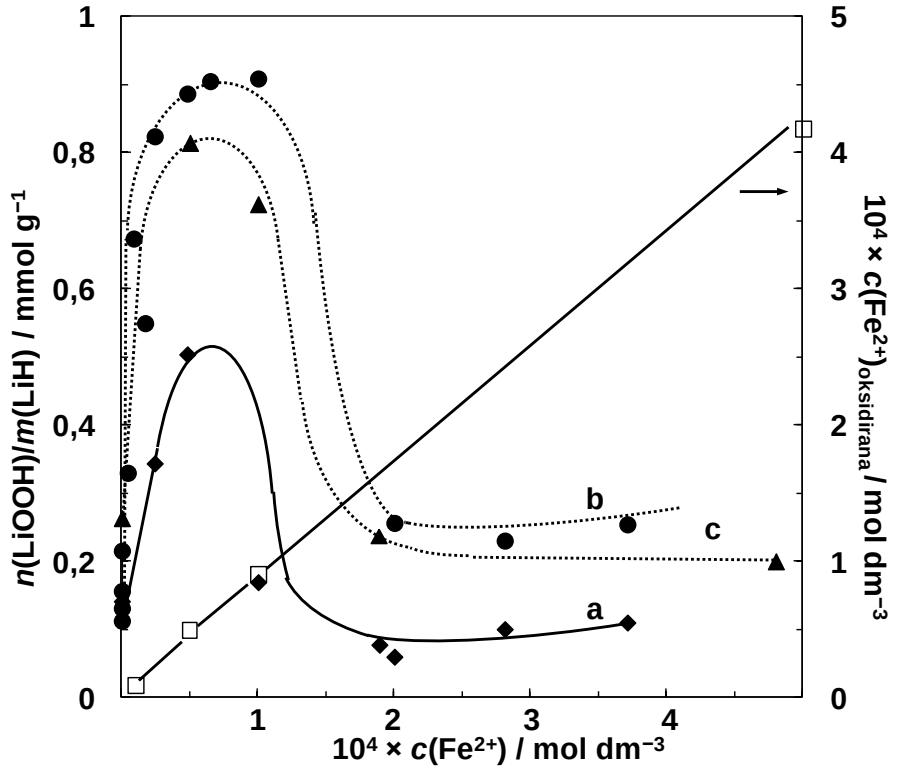
4.1.2.2. Utjecaj koncentracije Fe^{2+}na oksidaciju linolne kiseline

Utjecaj koncentracije Fe(II) iona na brzinu oksidacije određen je spektrofotometrijskim mjerenjem koncentracije LiOOH nastale u određenom vremenu nakon dodavanja otopine Fe(II) različitih koncentracija Fe(II) iona. Promatrajući brzinu nastajanja LiOOH može se vidjeti da ona raste s porastom koncentracije Fe^{2+} sve do $1{,}0 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3} kod koje je brzina nastajanja LiOOH iznosila 10 μmol/s po gramu LiH (Slika 17, krivulja c). S daljnjim dodavanjem koncentracija Fe^{2+} u modelni sustav nastajale su niže koncentracije LiOOH od prethodnih (krivulje d-f), brzina nastajanja LiOOH iznosila je oko 0,40 μmol/s po gramu LiH. S povećanjem koncentracije Fe^{2+} iona sve do $4{,}0 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3} nije bilo značajnije promjene brzine nastajanja LiOOH.



Slika 17. Oksidacija LiH u miješanim micelama u prisustvu različitih koncentracija Fe^{2+}: a) $2{,}4 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3}, b) $4{,}8 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3}, c) $1{,}0 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3}, d) $1{,}9 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3} e) $2{,}8 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3}, f) $3{,}7 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3}; *c*(Tween®–20) = $2{,}8 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3}, *c*(LiH) = $5{,}0 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3}; *c*(MES) = $5{,}0 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3}, pH = 5. Crtkanom linijom označena je kontrolna otopina LiH, bez dodatka Fe^{2+}.

Utjecaj koncentracije Fe^{2+} iona na oksidaciju LiH prikazanu u obliku koncentracije LiOOH nastale u optimalnim uvjetima, prikazan je na slici 18. Iz grafičkog prikaza je vidljivo da s povećanjem koncentracije Fe(II) iona oksidacija LiH dostiže maksimum kod $7{,}5 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3} Fe^{2+}, s daljnjim povećanjem koncentracija LiOOH opada, a kod koncentracija Fe^{2+} većih od 2×10^{-4} mol dm^{-3} nije vidljivo značajnije nastajanje LiOOH.

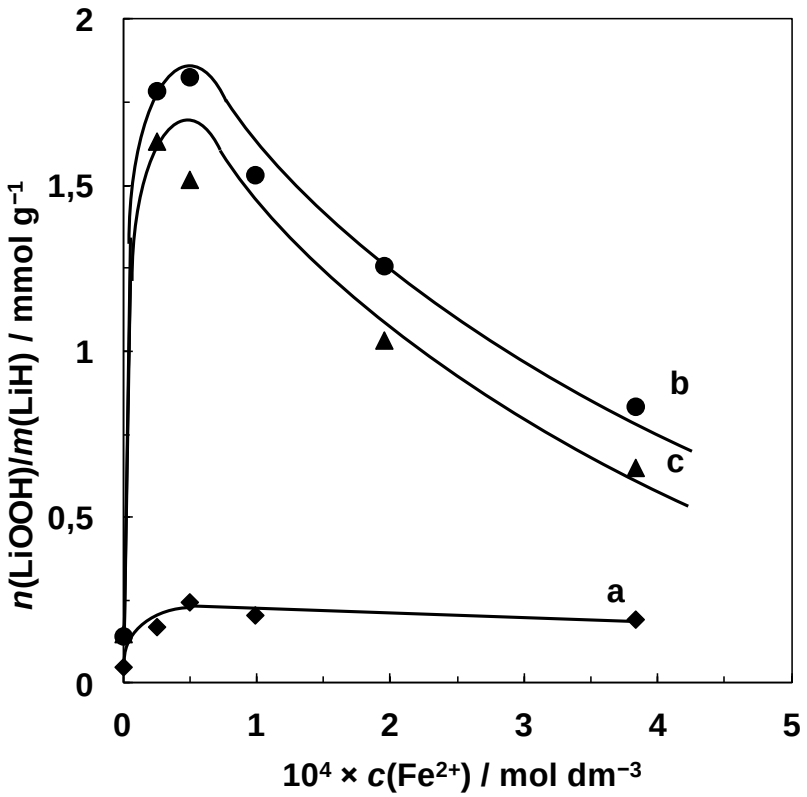


Slika 18. Utjecaj koncentracije Fe^{2+} na nastajanje LiOOH u modelnom sustavu u različitim vremenima. Ovisnost oksidacije LiH o koncentraciji dodanog Fe^{2+} prikazan kao koncentracija oksidiranog Fe^{2+} u jednakim eksperimentalnim uvjetima nakon prve minute od dodavanja Fe^{2+} u micelarnu otopinu. c(Tween®-20) = $2{,}8 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3}, c(LiH) = $5{,}0 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3}, c(MES) = $5{,}0 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3}, pH = 5.

Primjena spektrofotometrijske analize Fe(II) iona njegovim kompleksiranjem s *orto*-fenantrolinom pokazala je da je oksidacija željeza u eksperimentalnim uvjetima opisanim u ovom radu brzi proces. Mjerenjem koncentracije Fe(II) iona preostale nakon oksidacije određeno je da se unutar 1. minute nakon dodatka Fe^{2+} u modelni sustav gotovo svo dodano željezo potroši za reakciju. Iz apsorbancije kompleksa *orto*-fenantrolin-željezovog kompleksa stvorenog u analiziranoj otopini utvrđeno je da je u tom vremenu samo 10 % neoksidiranih Fe^{2+} iona prisutno u otopini. Uz mjerenje nestajanja izreagiranog Fe^{2+} iona

spektrofotometrijski je izmjereno i nastajanje oksidiranog oblika, Fe^{3+} iona, te je utvrđeno da oni nastaju u ekvimolarnim koncentracijama (Slika 18, desna os). Istovremeno, na slici 18 je vidljivo da se maksimalna koncentracija LiOOH u određenom vremenu postiže kod 1×10^{-4} mol dm^{-3} Fe^{2+}, dok daljnjim povećanjem Fe^{2+} dolazi do njezina smanjenja.

Slični rezultati dobiveni su u modelnom sustavu koji sadrži fosfatni pufer (Slika 19), ali pri nižem pH što je bilo u skladu s prethodnim rezultatima utjecaja fosfata kao pufera na autooksidaciju Fe(II) i oksidaciju LiH (slika 12 i 16).



Slika 19. Utjecaj koncentracije Fe^{2+} iona na oksidaciju LiH kod 38 °C određen nakon: (a) 1 min, (b) 60 min i (c) 120 min, c(Tween®-20) = $2{,}8\times 10^{-4}$ mol dm^{-3}, c(LiH) = $5{,}0\times 10^{-4}$ mol dm^{-3}, $c(NaH_2PO_4) = 5{,}0\times 10^{-3}$ mol dm^{-3}, pH = 2,5.

Proučavanje kemijskih procesa lipida koji se odvijaju u biološkim membranama ne može se ostvariti bez karakterizacije modelnog lipidnog sustava. U ovom doktorskom radu je korišten modelni sustav čija su svojstva prethodno istražena, s posebnim naglaskom na svojstvo podložnosti PUFA na peroksidaciju pokrenutu jednostavno pomoću iona Fe(II).

Modelni sustav LiH ispunjava zahtjeve da je:

- dobro karakteriziran s obzirom na raspodjelu i veličinu čestica agregiranih u određenim uvjetima eksperimenta,
- promjena pH ne utječe na promjenu veličine čestice,
- surfaktant ne utječe na oksidaciju LiH,
- pogodnim izborom pufera moguće je inhibirati autooksidaciju Fe^{2+} te pratiti propagaciju LiH koju ne pokreću $^{\bullet}OH$ nego samo alkoksil $LO^{\bullet}$ radikali nastali razgradnjom prethodno stvorenih LOOH.

Na taj način praćen je proces lipidne peroksidacije samo s onim radikalima nastalim tijekom procesa iz LiH, sa svojim mehanizmima i odgovarajućim brzinama reakcija.

U optimalnim eksperimentalnim uvjetima u kojima se istražuju svojstva modelnog sustava utvrđeno je da brzina oksidacije LiH ovisi o koncentraciji Fe^{2+}. Pokazano je da se nastajanje novih LiOOH odvija brzom reakcijom, bez latentnog ili indukcijskog perioda. Postojanje latentnog perioda se uobičajeno koristi kao kriterij za određivanje mehanizma oksidacije PUFA ili molekule lipida.[112] Ranije su Minotti i Aust demonstrirali da je prisutnost omjera iona Fe(II)/Fe(III) neophodan za inicijaciju procesa oksidacije lipida. Međutim, u literaturi postoje kontradiktorni podaci o Fe(II)-Fe(III) kompleksu i optimalnom Fe(II)/Fe(III) omjeru, te unatoč tome što se u ovom radu nije proučavao utjecaj Fe(II)/Fe(III) omjera na brzinu oksidacije, dobiveni rezultati pokazuju da za inicijaciju oksidacije optimalni omjer iona Fe(II)/Fe(III) nije neophodan. U opisanim eksperimentalnim uvjetima odsutnost latentnog perioda upućuje da je oksidacija Fe^{2+} iona bila brza i potpuna. Koncentracija generiranog peroksilnog radikala lipida ($LOO^{\bullet}$) je bila dovoljno velika da njihova reakcija s masnom kiselinom (reakcija 13) bude predominantna uz druge reakcije koje mogu konkurirati za $LOO^{\bullet}$ radikalima.

$$Fe^{2+} + LOOH \longrightarrow LO^{\bullet} + OH^{-} + Fe^{3+} \quad (14)$$

$$LO^{\bullet} + LH \longrightarrow LOH + L^{\bullet} \quad (4)$$

$$L^{\bullet} + O_2 \longrightarrow LOO^{\bullet} \quad (5)$$

$$LOO^{\bullet} + LH \longrightarrow LOOH + L^{\bullet} \quad (13)$$

U modelnom sustavu s optimalnim koncentracijama od $5{,}0 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3} LiH i $2{,}8 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3} Tween®-20 kod 2,5< pH < 5,5, kod koncentracija do 100 μmol dm^{-3} Fe(II) iona kao inicijatora peroksidacije lipida, prevladava faza propagacije te se u ovim uvjetima proces peroksidacije lipida može selektivno i kontrolirano pratiti, bez obzira na vrstu puferske soli. Primjenom većih koncentracija Fe(II) iona nad propagacijom prevladava terminacija (Slika 18). U fazi terminacije odvijaju se reakcije hvatanja alkoksil (reakcija 15) odnosno peroksil radikala LiH s Fe(II) ionom (reakcija 24). Obje reakcije imaju svoj pH optimum.

$$Fe^{2+} + LO^{\bullet} + H^{+} \longrightarrow Fe^{3+} + LOH \qquad (15)$$

$$Fe^{2+} + LOO^{\bullet} + H^{+} \longrightarrow Fe^{3+} + LOOH \qquad (24)$$

Potrebno je naglasiti da je poznato da Fe^{3+} ioni nisu djelotvorni katalizatori razgradnje LiOOH, osobito u kiselom mediju (reakcija 14), pa se stoga njihov utjecaj u našem modelnom sustavu ne treba razmatrati.[112]

4.2. Peroksidacija i geometrijska izomerizacija u modelnom lipidnom sustavu

U literaturnom pregledu već je istaknuta važnost poznavanja biološki važnih procesa, lipidne peroksidacije i geometrijske izomerizacije, zbog njihovih štetnih utjecaja na žive organizme. Stoga je cilj ovog rada bio paralelno ispitati produkte peroksidacije i izomerizacije u prethodno dobro definiranom modelnom sustavu miješanih micela LiH. Procesi su inducirani radikalima generiranim ionizirajućim zračenjem u sustavima u kojima je kao izvor radikala upotrebljen amfifilan tiol, merkaptoetanol (2–ME). Procesi peroksidacije i izomerizacije se do sada nisu istraživali na ovaj način, ova istraživanja su provedena po prvi put.

Modelni sustav miješanih micela kod pH 5 svježe je pripreman prema uputama opisanim u poglavlju 3.2.1. Zbog svog fiziološkog značenja u ovim eksperimentima MES je zamijenjen s fosfatnim puferom. Priređena su dva modelna sustava:

Sustav A, u kojem je 2–ME dodan neposredno prije ozračivanja micela,

Sustav B, u kojem je 2–ME dodan u toku pripreme micela (inkorporirana micela).

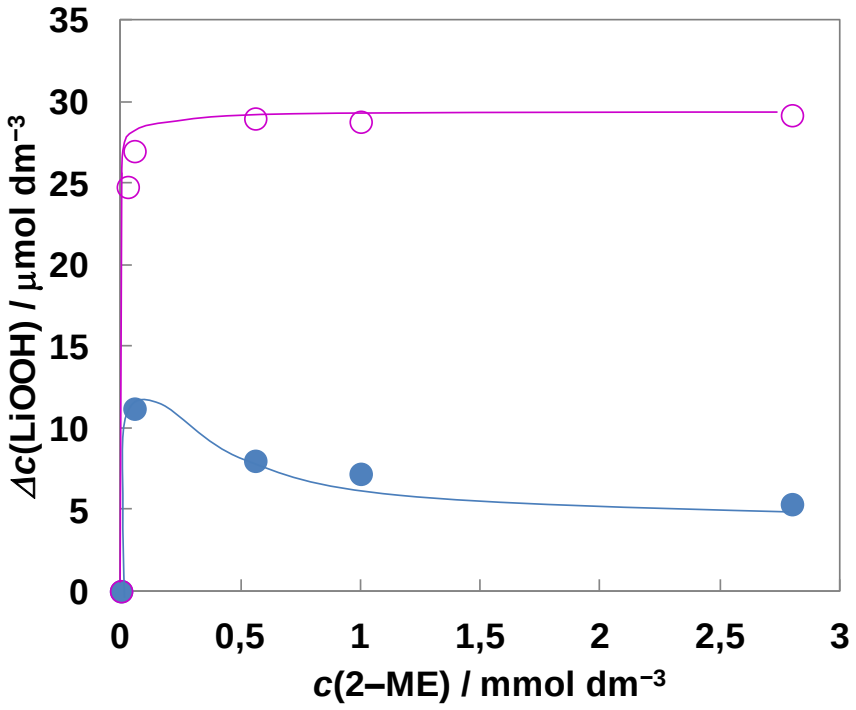
U cilju usporedbe procesa istraživanja su provedena koristeći oba sustava, a zbog jednostavnosti pojedinačni eksperimenti su provedeni u jednom od sustava, kako će biti naznačeno u njegovom opisu u daljnjem tekstu. Najprije je istražen modelni sustav miješanih micela LiH opisanog u predhodnom poglavlju, koji je sadržavao i 2–ME kod pH 5. Ispitan je utjecaj koncentracije tiola na procese u modelu, te kinetička stabilnost uz povišenu temperaturu u odnosu na sobnu. Kako bi se dobili podaci o pojedinačnim procesima lipidne peroksidacije i izomerizacije i u uvjetima u kojima oba procesa jedan drugom konkuriraju, najprije je istražen modelni sustav u pravim otopinama u smjesi otapala alkohol:voda, koje su sadržavale LiH, Tween®-20 i 2–ME. Potom su istraženi procesi u modelnim lipidnim sustavima miješanih micela LiH (*sustav A i B*).

γ–radioliza provedena je kod sobne temperature, a uzorci su ozračeni u području malih doza do 400 Gy, ali i u području velikih doza do 10 kGy, u ravnoteži sa zrakom ili u anaerobnim uvjetima. Ispitan je i utjecaj brzine doze zračenja (1,31 Gy/min i 274,8 Gy/min) na nastajanje LiOOH i stvaranje geometrijskih izomera. Nakon zračenja otopina micela lipidne komponente su ekstrahirane smjesom CH_2Cl_2:MeOH, ekstrahirani LiOOH su analizirani

spektrofotometrijskom feritiocijanatnom metodom, a iz ostatka ekstrakta plinskom kromatografijom određeni su geometrijski izomeri.

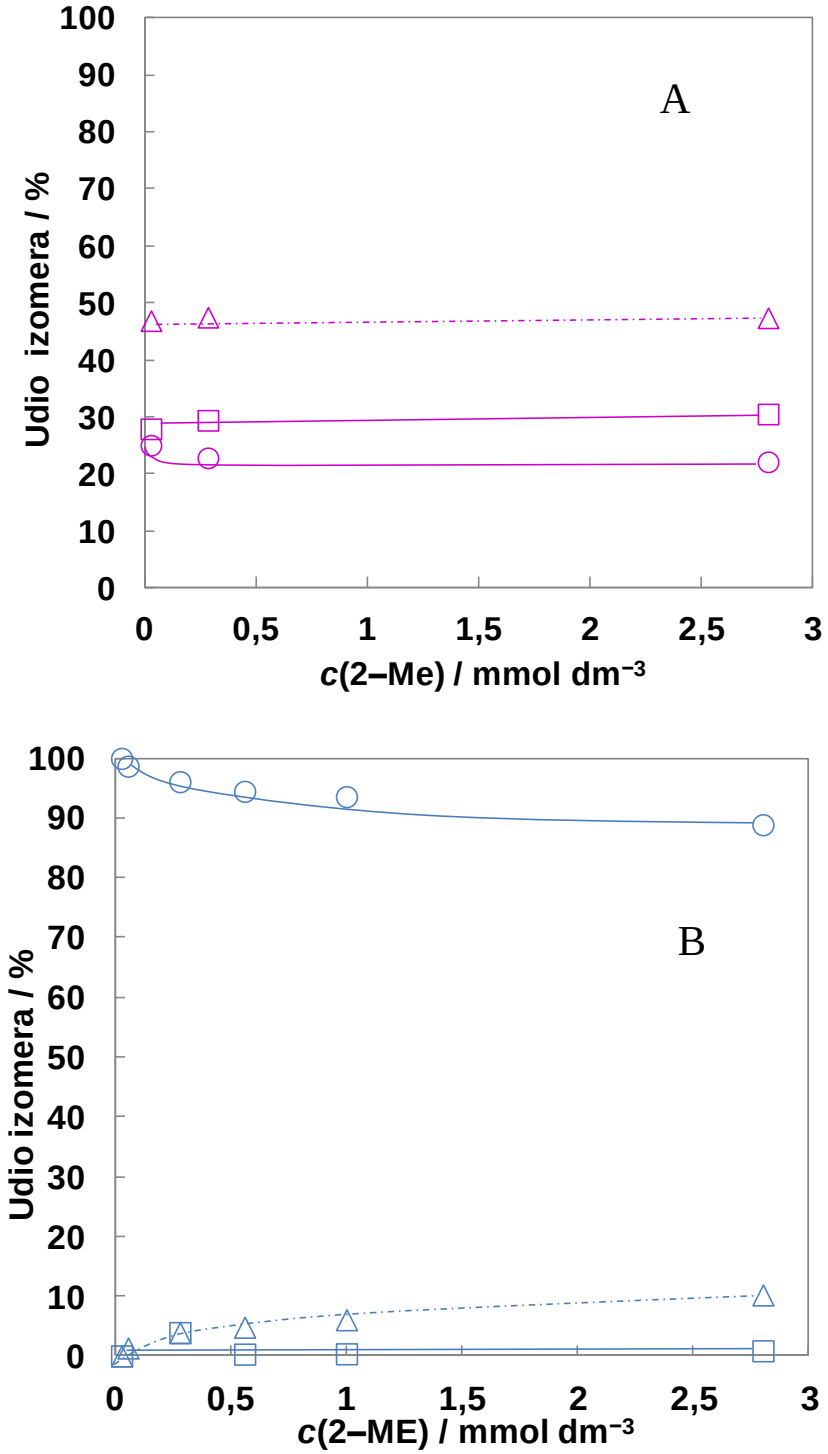
4.2.1. Utjecaj koncentracije tiola na peroksidaciju i izomerizaciju linolne kiseline

U ovom radu korištena je otopina 2,8 × 10^{-3} mol dm^{-3} 2–ME kod koncentracije koja je reda veličine koncentracija biološki važnih tiola. Tako npr. koncentracija međustaničnog neproteinskog tiola, prvenstveno glutationa, su reda veličine 5 × 10^{-3} mol dm^{-3}, premda se spominju i veće koncentracije do 1 × 10^{-2} mol dm^{-3}.[113] Zbog njegove sposobnosti apstrakcije H-atoma nužno je ispitati utjecaj tiola na inicijaciju peroksidacije i nastajanje LiOOH. Odabran je *sustav A* koji je ozračen dozom od 200 Gy. Rezultati prikazani na slici 22 pokazuju da su u neozračenim micelama mikromolarne koncentracije 2–ME inducirale nastajanje LiOOH, dok je s daljnim povećanjem do milimolarnih koncentracija tiola došla do izražaja njegova protektivna uloga u procesu oksidacije. Kao što je bilo očekivano, zračenjem modelnog sustava nastaju veće koncentracije LiOOH nego u neozračenim uzorcima. Kod milimolarnih koncentracija 2–ME postiže se zasićenje u LiOOH koje pokazuje da je peroksidacija kompletna, te da ove visoke koncentracije 2–ME sudjeluju u spriječavanju propagacije u procesu peroksidacije odnosno hvatanju radikala koji se mogu stvarati degradacijom LiOOH (slika 20).



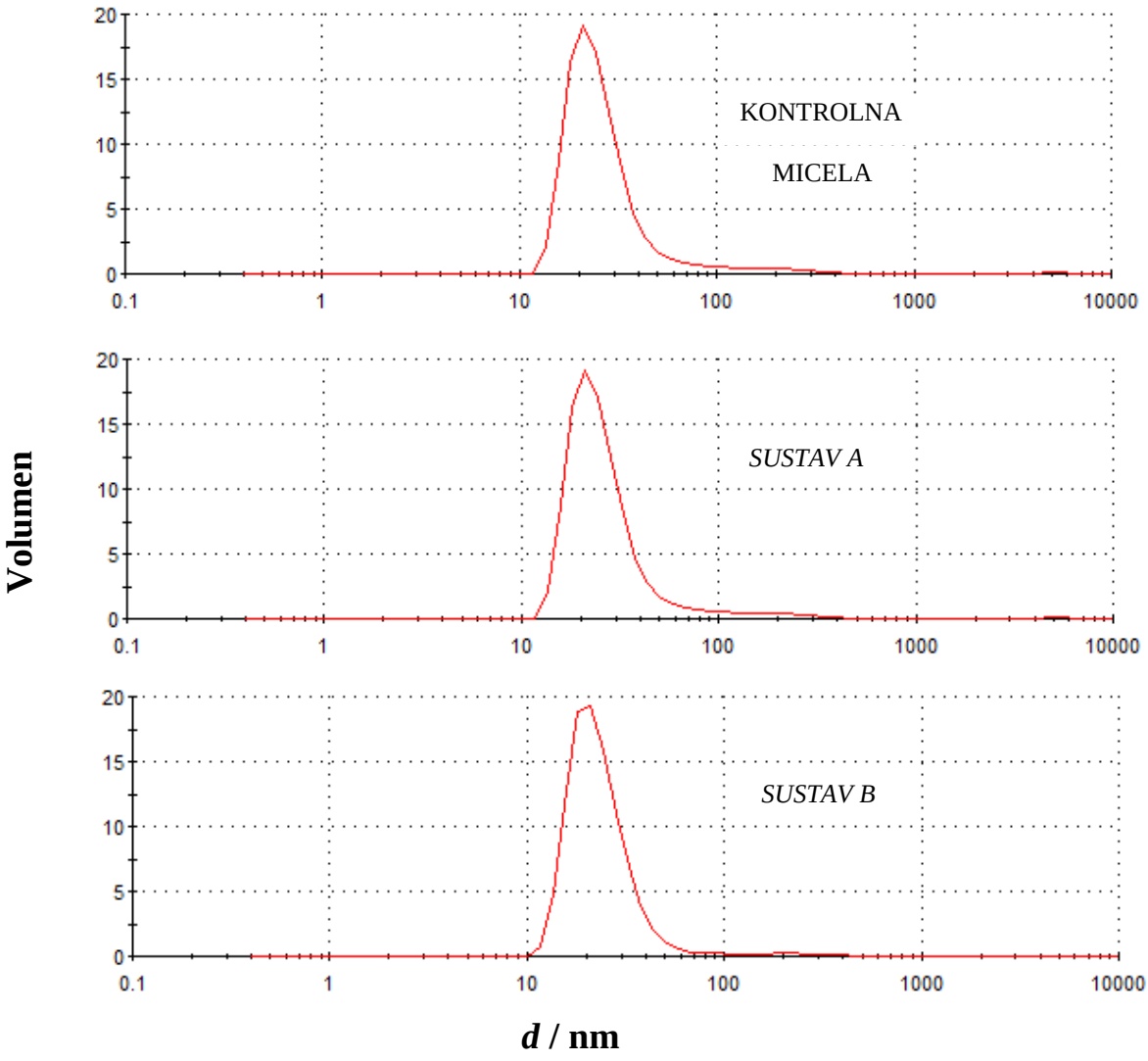
Slika 20. Utjecaj koncentracije 2–ME na nastajanje LiOOH ozračivanjem dozom od 200 Gy *sustava A* u aerobnim uvjetima (*P* = 274, 8 Gy/min).
(○) *sustav A* (ozračen dozom od 200 Gy); (●) kontrola LiH (bez zračenja)
Micele LiH: *c*(Tween®-20) = 2,8 × 10^{-4} mol dm^{-3}, *c*(LiH) = 5,0 × 10^{-4} mol dm^{-3}, *c*(NaH_2PO_4) = 5,0 × 10^{-3} mol dm^{-3}, pH = 5.

Ispitivanjem utjecaja koncentracije tiola na nastajanje geometrijskih izomera u miješanim micelama LiH u anaerobnim uvjetima vidljivo je da i male koncentracije 2–ME (5,6 × 10^{-5} mol dm^{-3}) djelotvorno iniciraju *cis, trans*-izomerizaciju. Neovisno o daljnjem povećanju koncentracije 2–ME prevladavaju reakcije geometrijske izomerizacije, te je udio ukupnih *trans*-izomera konstantan; suma mono *trans*- i di *trans*-izomera iznosi do oko 80 % u širokom području koncentracija tiola (Slika 21 A). U aerobnim uvjetima vidljiva je sporija inicijacija *trans*-izomerizacije s porastom koncentracije upotrebljenog tiola (Slika 21 B) s tendencijom zasićenja približavanjem koncentraciji do oko 3 × 10^{-3} mol dm^{-3} 2–ME i postizanjem učinka *cis, trans*-izomerizacije do oko 10 %.



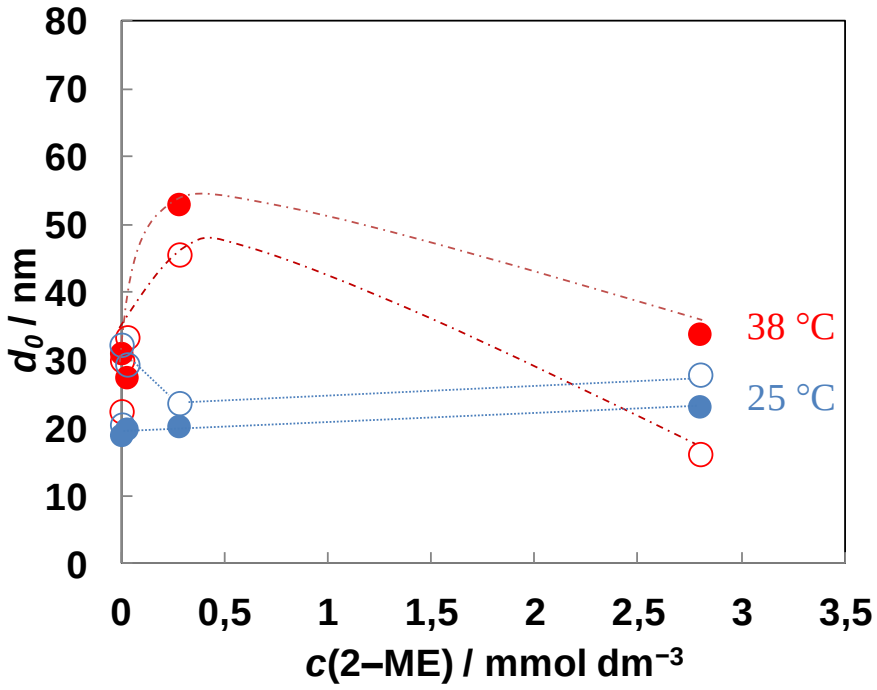
Slika 21. Utjecaj koncentracije 2–ME na nastajanje geometrijskih izomera u *sustavu A* (*D* = 200 Gy), u (A) anaerobnim i (B) aerobnim uvjetima. Nestajanje 9*c*,12*c*-18:2 (○,○), nastajanje 9*t*,12*c*-18:2 + 9*c*,12*t*-18:2 (Δ,Δ), nastajanje 9*t*,12*t*-18:2 (□,□).
Micele LiH: *c*(Tween®-20) = 2,8 × 10^{-4} mol dm^{-3}, *c*(LiH) = 5,0 × 10^{-4} mol dm^{-3}, *c*(NaH_2PO_4) = 5,0 × 10^{-3} mol dm^{-3}, pH = 5.

Prilikom istraživanja modelnih lipidnih sustava kao važan parametar u karakterizaciji sustava je veličina čestice. Iz tog razloga izmjerena je veličina čestice miješanih micela LiH (*sustav A i B*) pri sobnoj i povišenoj temperaturi uz variranje koncentracije 2–ME. Na slici 22 prikazani su rezultati dobiveni DLS metodom sustava koji su se koristili u ovom radu, na sobnoj temperaturi. Kao što je vidljivo iz prikazanih tipičnih krivulja raspodjele, ugradnja 2–Me nije značajno utjecala na veličinu miješane micele LiH bez obzira na način pripreme sustava micele. Ovisnost veličine miješane micele LiH o koncentraciji 2–ME prikazana je na slici 23.



Slika 22. Raspodjela veličine čestica po volumenu u kontrolnoj miceli (bez 2–Me), sustavu A (dodan 2–Me) i sustavu B (inkorporiran 2–ME) pri sobnoj temperaturi.
c(Tween®-20) = 2,8 × 10^{-4} mol dm^{-3}, c(LiH) = 5,0 × 10^{-4} mol dm^{-3}, c(NaH_2PO_4) = 5,0 × 10^{-3} mol dm^{-3}, c(2–ME) = 2,8 × 10^{-3} mol dm^{-3}, pH = 5

Rezultati su pokazali da se na sobnoj temperature veličina miješanih micela LiH značajno ne mijenja s porastom koncentracije tiola. Međutim, s većom temperaturom pri koncentraciji 2–ME manjom od 1×10^{-3} mol dm^{-3} stvaraju se gotovo dvostruko veći agregati. Važan rezultat u ovom eksperimentu je da se i kod povišene temperature u odnosu na sobnu održava stabilnost miješane micele LiH kod koncentracije 2–ME $2{,}8 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3}. Rezultati dobiveni za veličinu micele pri sobnoj temperaturi, ali uz dodatak relativno velikih koncentracija 2–ME ($2{,}8 \times 10^{-2}$ mol dm^{-3}) pokazali su da u ovim uvjetima koncentracija dolazi do raspadanja micele.



Slika 23. Utjecaj koncentracije 2–ME na veličinu miješanih micela kod 25 °C i 38 °C u svježe pripremljenim otopinama micela.
(○,○) *sustav A;* (●,●) *sustav B* (inkorporiran 2–ME)
c(Tween®-20) = $2{,}8 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3}, c(LiH) = $5{,}0 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3}, c(NaH_2PO_4) = $5{,}0 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3}, pH = 5.

4.2.2. Stabilnost modelnih sustava linolne kiseline

Uz pronalaženje optimalnih uvjeta za istraživanje procesa u modelnom lipidnom sustavu važno je poznavati stabilnost priređenih miješanih micela LiH, kako u odnosu na temperaturu tako i na starenje micela koje se može odrediti mjerenjima veličine micela. Kontrolna micela LiH, *sustav A i B* čuvani na temperaturi od +4 °C stabilni su i drugi dan nakon pripreme uzoraka. Rezultati u tablici 6 pokazuju da u slučaju čuvanja uzoraka pri 25 °C, odnosno 38 °C, dolazi do porasta hidrodinamičkog promjera u svim uzorcima miješanih micela s porastom temperature.

Tablica 6. Utjecaj temperature na veličinu micela.
Micele LiH: c(Tween®-20) = 2,8 × 10^{-4} mol dm^{-3}, c(LiH) = 5,0 × 10^{-4} mol dm^{-3}, c(NaH_2PO_4) = 5,0×10^{-3} mol dm^{-3}, pH = 5; c(2–ME) = 2,8 × 10^{-3} mol dm^{-3}; d_0 veličina micele nakon pripreme, d_1 veličina micele drugi dan nakon pripreme.

	***c*(LiH)/ mol dm^{-3}**	***c*(Tween-20)/ mol dm^{-3}**	***c*(2–ME)/ mol dm^{-3}**	***T*/ºC**	***d_0*/nm**	***d_1*/nm**
kontrola	5,0 × 10^{-4}	2,8 × 10^{-4}	/	25	20,25 ± 1,25	23,18 ± 1,08
				38	20,98 ± 0,98	49,96 ± 1,24
				4	19,02 ± 1,59	
Sustav A	5,0 × 10^{-4}	2,8 × 10^{-4}	2.8 ×10^{-3}	25	20,54 ± 1,43	25,17 ± 0,59
				38	30,01 ± 1,39	137,0 ± 2,34
Sustav B	5,0 × 10^{-4}	2,8 × 10^{-4}	2.8 ×10^{-3}	25	18,90 ± 0,47	26,49 ± 0,53
				38	30,95 ± 0,89	41,72 ± 4,02
				4	19,63 ± 0,72	

4.2.3. Peroksidacija i izomerizacija u pravim otopinama linolne kiseline u prisustvu tiola

Kako bi se dobili podaci o peroksidaciji i *cis*, *trans*-izomerizaciji i u uvjetima u kojima je dan proces može prevladati drugi, najprije su oni istraženi u pravim otopinama koje su sadržavale LiH, Tween®-20 i 2–ME priređenim u smjesi otapala EtOH:H_2O.

Nakon zračenja pravih otopina LiH je ekstrahirana smjesom CH_2Cl_2:MeOH, novonastali LiOOH su analizirani spektrofotometrijskom feritiocijanatnom metodom, a

geometrijski izomeri plinskom kromatografijom. Za određivanje koncentracije LiOOH odabrana je feritiocijanatna metoda jer je specifična, osjetljiva i jednostavna metoda. Apsorpcijski maksimum feritiocijanatnog kompleksa nalazi se kod 500 nm odnosno u području apsorpcije u kojem nema interferencije komponenti u kompleksnom sustavu miješanih micela. Metodu mjerenja UV-konjugiranih diena nije moguće koristiti u sustavima koji sadrže tiole jer njihova apsorpcija interferira s apsorpcijom UV-diena u području oko 232 nm.

U homogenim otopinama (EtOH:H_2O) ispitan je utjecaj pojedinačnih komponenti (LiH, 2–ME, Tween®-20) na procese lipidne peroksidacije i izomerizacije. Primarne visokoreaktivne čestice generirane su γ-radiolizom pri sobnoj temperaturi, kako je opisano u poglavlju 2.2.2.

LiH je topljiva u smjesi otapala ψ (EtOH:H_2O) = 1:1. γ-radiolizom sustava EtOH/H_2O nastaju primarne radikalske vrste prikazane jednadžbama 25 i 26, gdje $R^\bullet$ označava nastale radikale alkohola centriranih na C- odnosno O-atomu, kao što su npr: $^\bullet CH_2CH_2OH$, $CH_3{}^\bullet CHOH$, $CH_3CH_2O^\bullet$.

U otopinama zasićenim s N_2O solvatizirani elektroni reagiraju s N_2O (reakcija 26) s nastajanjem $OH^\bullet$ radikala. Apstrakcijom vodika iz molekule EtOH, $OH^\bullet$ i $H^\bullet$ radikali doprinose nastajanju alkilnih radikala (reakcija 28), koji potom reagiraju s 2–ME davajući tiilne radikale (reakcija 29).

$$CH_3CH_2OH \xrightarrow{\sim} e_{sol}^- \; R^\bullet \qquad (25)$$

$$H_2O \xrightarrow{\sim} e_{aq}^- \; OH^\bullet \; H^\bullet \qquad (26)$$

$$e_{aq}^- + N_2O \longrightarrow N_2 + OH^- + OH^\bullet \qquad (27)$$

$$^\bullet OH/H^\bullet + CH_3CH_2OH \longrightarrow H_2O/H_2 + R^\bullet \qquad (28)$$

$$R^\bullet + HOCH_2CH_2SH \longrightarrow RH + HOCH_2CH_2S^\bullet \qquad (29)$$

Otopine EtOH/H_2O koje su sadržavale tipično 5×10^{-4} mol dm^{-3} LiH i $2{,}8 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3} Tween®-20 i $2{,}8 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3} 2–ME ozračene su dozom od 100 Gy, u prisutnosti kisika iz zraka, odnosno bez kisika zasićivanjem otopina s N_2O. Nakon zračenja priređenih otopina lipidne komponente su ekstrahirane s CH_2Cl_2, te su iz dijela ekstrakta LiOOH kvantitativno određeni feritiocijanatnom metodom. U otopinama priređenim u ravnoteži sa zrakom

(kontrolne otopine) koncentracija LiOOH je iznosila 1,52 × 10^{-5} mol dm^{-3}, a u uvjetima bez zraka bila je 1,40 × 10^{-5} mol dm^{-3}. Od ostatka ekstrakta provedena je esterifikacija LiH eterskom otopinom CH_2N_2. Primjenom GC kvantitativno su određeni geometrijski izomeri metilnog estera LiH.

Tween®-20 sadrži polieterske skupine i stoga je potencijalno podložan oksidaciji s kisikom u zraku i stvaranju njegovih hidroperoksida i razgradnih produkata. Iz tog razloga je bilo potrebno istražiti i doprinos Tween®-20 indukciji peroksidacije LiH s γ-zračenjem, te su se mjerili LiOOH bez 2–ME i u prisutnosti 2–ME (Tablica 7). Ozračivanjem dozom od 100 Gy u ravnotežnim uvjetima sa kisikom iz zraka, dobivena je gotovo jednaka koncentracija LiOOH kao i ona koja je dobivena u kontrolnoj otopini, 1,52 × 10^{-5} mol dm^{-3}. Upotreba deset puta veće koncentracije surfaktanta nije utjecala na porast koncentracije LiOOH. Međutim, u slučaju kad je dodan 2–ME, uzrokovano je smanjenje koncentracije LiOOH i u aerobnim i u anaerobnim uvjetima što pokazuje inhibiciju peroksidacije s 2–ME. GC analizom ozračenih otopina uočeno je stvaranje *trans*-izomera LiH posebno u uvjetima bez prisustva kisika iz zraka. Nasuprot tomu, *cis*-izomeri su bili predominantni u aerobnim uvjetima. Ono što ovdje posebno treba naglasiti je da je količina nastalih mono *trans*-izomera bila približno jednaka u svim eksperimentima.

Tablica 7. γ-ozračivanje homogenih otopina LiH (5,0 × 10^{-4} mol dm^{-3}) i Tween®-20 uz i bez dodatka 2–ME u ravnoteži sa zrakom i N_2O zasićenim otopinama s dozom od 100 Gy. Brzina doze = 274.8 Gy min^{-1}, *c* (NaH_2PO_4) = 5,0 × 10^{-3} mol dm^{-3}, pH 5.

c(Tween®-20)/ mol dm^{-3}		*c*(LiOOH)/10^{-5} mol dm^{-3}		Udio izomera/% 9*c*,12*c*/9*c*,12*t*/9*t*,12*c*/9*t*,12*t*
		bez 2–ME	**2–ME**	**2–ME**
2,8 × 10^{-4}	zrak	1,50 ± 0,02	1,18 ± 0,09	84,6/7,2/6,9/1,3
	N_2O	1,30 ± 0,08	0,43 ± 0,00	19,4/23,8/22,9/33,9
2,8 × 10^{-3}	zrak	1,58 ± 0,02	1,16 ± 0,07	88,8/5,0/4,8/1,4
	N_2O	1,19 ± 0,03	0,55 ± 0,02	25,7/24,0/23,3/27,0

Utjecaj vrste surfaktanta na procese lipidne peroksidacije i izomerizacije ispitan je korištenjem i drugog neionskog surfaktanta, Brij 35®. Brij 35® u svojoj strukturi također sadrži polioksietilenske lance kao i Tween®-20 i vrlo se često koristi u znanstvenim istraživanjima koji uključuju neionske površinski aktivne tvari. Rezultati dobiveni u otopinama koje su sadržavale Brij® 35 su u skladu s rezultatima dobiveni u sustavu koji sadrži Tween®-20 (Tablica 8). Iz dobivenih rezultata se može zaključiti da se prisustvo Tween®-20 u istraživanim sustavima i njegov potencijalni utjecaj na kinetiku i mehanizam istraživanih procesa može zanemariti u analizi rezultata koji slijede.

Tablica 8. γ-ozračivanje homogenih otopina LiH ($5{,}0 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3}) i Brij 35® uz i bez dodatka 2–ME u ravnoteži sa zrakom i N_2O zasićenim otopinama s dozom od 100 Gy. Brzina doze = 274.8 Gy min^{-1}, *c* (NaH_2PO_4) = $5{,}0 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3}, pH 5.

c(Brij 35®) / mol dm^{-3}		*c*(LiOOH)/10^{-5} mol dm^{-3}		Udio izomera/% 9*c*,12*c*/9*c*,12*t*/9*t*,12*c*/9*t*,12*t*
		bez 2–ME	**2–ME**	**2–ME**
$2{,}8 \times 10^{-4}$	zrak	1,08 ± 0,02	0,62 ± 0,00	87,1/6,03/5,8/1,06
	N_2O	0,93 ± 0,05	0,54 ± 0,15	28,3/23,9/22,8/25,0
$2{,}8 \times 10^{-3}$	zrak	1,69 ± 0,09	1,58 ± 0,02	87,2/5,9/5,8/0,9
	N_2O	1,37 ± 0,12	1,04 ± 0,09	24,4/24,3/23,1/28,1

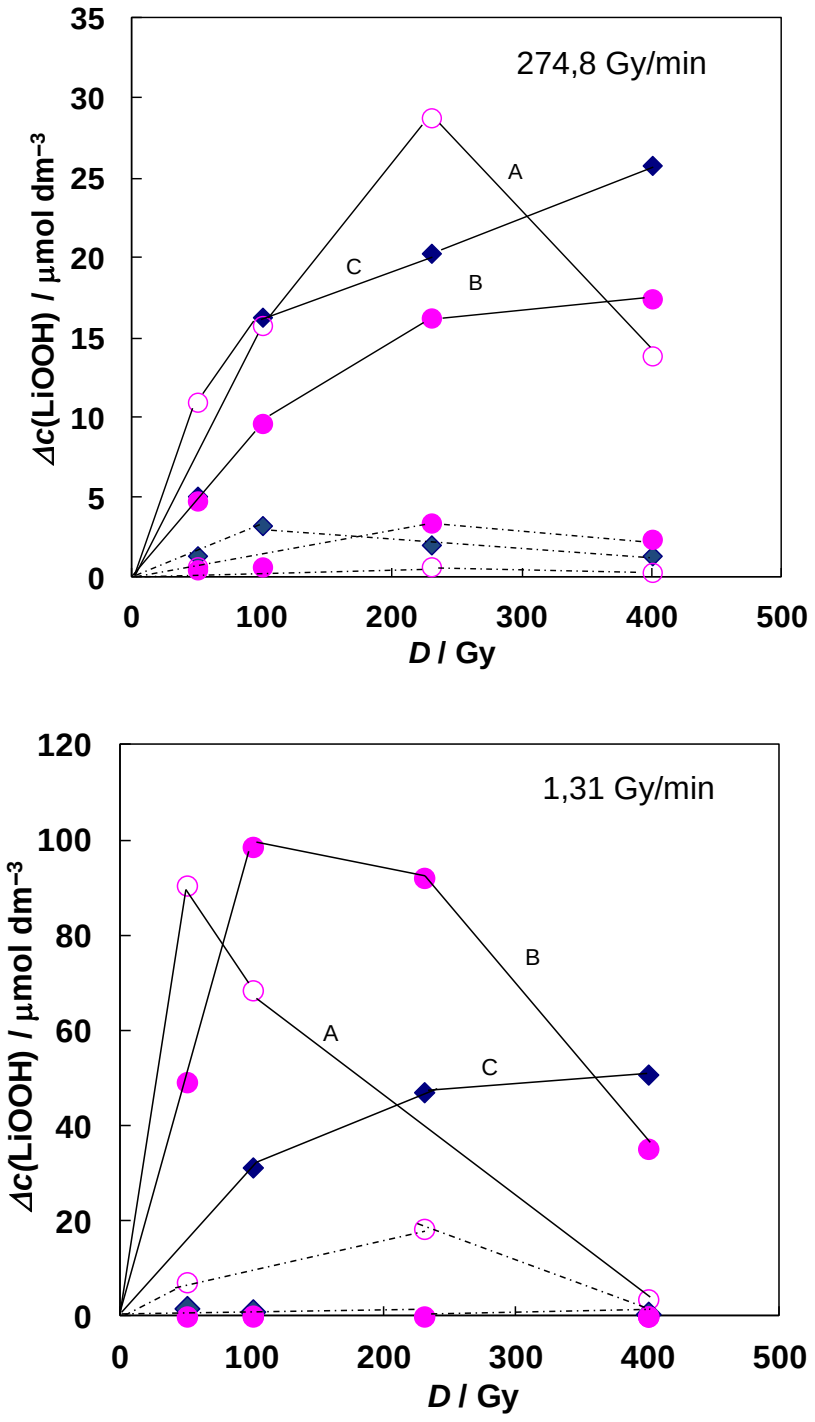
4.2.4. Peroksidacija linolne kiseline u modelnom sustavu u prisustvu tiola

Modelni sustav miješanih micela, *sustav A* i *sustav B*, kod pH 5 svježe je pripreman prema uputama opisanim u poglavlju 3.2.1.

Najprije je istraženo kako način pripreme micela utječe na procese peroksidacije i izomerizacije korištenjem *sustava A, odnosno B.*

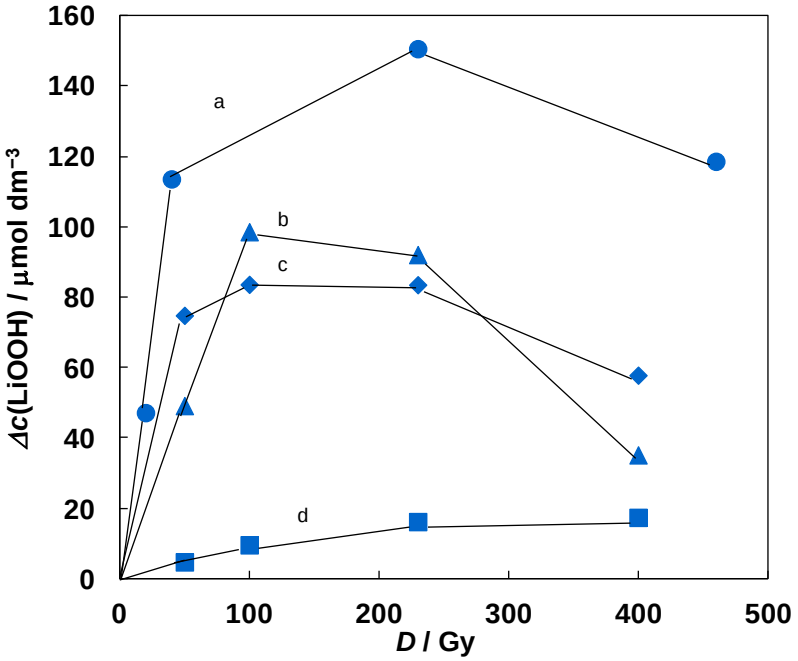
Slika 24 prikazuje utjecaj doze i brzine doze zračenja na koncentraciju LiOOH. U aerobnim uvjetima dolazi do stvaranja LiOOH u oba sustava *A i B* dok je u anaerobnim uvjetima očekivano, taj proces zanemariv.

Sustav *B* pokazao se otpornijim na oksidaciju od *sustava A,* tj. sustava u koje je tiol dodan neposredno prije ozračivanja. Ovaj rezultat pokazuje da je u sustavu B postignuto da se 2–ME ugradio dublje unutar micele tijekom njihove pripreme. Kao što je već istaknuto, DLS mjerenjima je potvrđeno da se bez obzira na način pripreme veličina micele nije značajno mijenjala s dodatkom tiola. Razlika u podložnosti oksidacije LiH određene u *sustavima A* i *B* u jednakim oksidacijskim uvjetima može se objasniti različitom raspodjelom tiola između vodene faze i unutrašnjosti micela u ovisnosti o načinu pripreme. Ovime je pokazano da tiol sudjeluje u reakcijama sa slobodnim radikalima odnosno on djeluje kao antioksidans ako se nalazi u unutrašnjosti micele odnosno u blizini acilnih lanaca masne kiseline tijekom propagacije lipidne peroksidacije.[114]



Slika 24. Grafički prikaz ovisnosti LiOOH o dozi zračenja pri pri brzini doze 274,8 Gy/min i 1,31 Gy/min u aerobnim (puna linija) i anaerobnim uvjetima (isprekidana linija).
(♦) kontrolne otopine C; (○) *sustav A* (dodan 2–ME); (●) *sustav B* (inkorporiran 2–ME)
c(Tween®-20) = 2,8 × 10^{-4} mol dm^{-3}, c(LiH) = 5,0 × 10^{-4} mol dm^{-3}, c(NaH_2PO_4) = 5,0 × 10^{-3} mol dm^{-3}, pH = 5.

U cilju daljnjih istraživanja procesa koji su predmet ove disertacije koristio se sustav *B*. Brzina doze bi trebala biti jedna od važnih parametera učinkovitosti ionizirajućeg zračenja za generiranje radikala. U sljedećem stupnju istraživan je utjecaj brzine doze zračenja na koncentraciju novonastalih LiOOH.



Slika 25. Grafički prikaz utjecaja doza i brzine doze zračenja na formiranje LiOOH u *sustavu B* (inkorporiran 2–Me) u aerobnim uvjetima.
brzine doze: a) 0,15 Gy/min, b) 1,31 Gy/min, c) 6,8 Gy/min, d) 274,8 Gy/min. Micele LiH: c(Tween®-20) = 2,8 × 10^{-4} mol dm^{-3}, c(LiH) = 5,0 × 10^{-4} mol dm^{-3}, c(2–ME) = 2,8 × 10^{-3} mol dm^{-3}, c(NaH_2PO_4) = 5,0 × 10^{-3} mol dm^{-3}, pH = 5.

Iz krivulja prikazanih na slici 25 je vidljivo da koncentracija LiOOH ovisi o brzini doze, tj. zračenjem kod iste doze zračenja nastaju niže koncentracije LiOOH uz veću brzinu doze. Tako na primjer, ozračivanjem dozom od 230 Gy kako se povećava brzina doze od 0,15 Gy/min do 274,8 Gy/min, koncentracija LiOOH pada od 1,5 × 10^{-4} (krivulja a) do 2 × 10^{-5} mol dm^{-3} (krivulja d). Kao što je bilo očekivano, u anaerobnim uvjetima nastaju zanemarivo male koncentracije LiOOH, c(LiOOH) ≤ 1 × 10^{-6} mol dm^{-3}, vrlo blizu donje granice detekcije LOOH primjenjene feritiocijanatne metode.

Inicijacija

$H_2O \rightsquigarrow e_{aq}^-(0,27), HO^\bullet(0,28), H^\bullet(0,062)$ (30)

$HO^\bullet/H^\bullet + HOCH_2CH_2SH \rightarrow H_2O/H_2 + HOCH_2CH_2S^\bullet$ $k_{(OH\bullet)} = 6{,}8 \times 10^9\ dm^3\ mol^{-1}\ s^{-1}$ (115) (31)

$HO^\bullet/H^\bullet + \text{Tween}^{®}\text{-20/LiH} \rightarrow H_2O/H_2 + R^\bullet$ (32)

$H^\bullet/e_{aq}^- + O_2 \rightarrow H^+/ O_2^{\bullet-}$ (33)

$e_{aq}^- + HOCH_2CH_2SH \rightarrow HOCH_2CH_2^\bullet + HS^-$ $k = 1{,}2 \times 10^{10}\ dm^3\ mol^{-1}\ s^{-1}$ (115) (34)

$R^\bullet + O_2 \rightarrow ROO^\bullet$ (35)

$ROO^\bullet/HOCH_2CH_2S^\bullet/O_2^{\bullet-} + LiH \rightarrow Li^\bullet$ $k_{(RS\bullet)} = 3{,}1 \times 10^7\ dm^3\ mol^{-1}\ s^{-1}$ (52) (36)

Propagacija

$Li^\bullet + O_2 \rightarrow LiOO^\bullet$ $k = 5{,}4 \times 10^8\ dm^3\ mol^{-1}\ s^{-1}$ (52) (5)

$LiOO^\bullet + LiH \xrightarrow{k_p} LiOOH + Li^\bullet$ $k_p = 26{,}9\ dm^3\ mol^{-1}\ s^{-1}$ (116) (13)

Terminacija

$Li^\bullet + Li^\bullet \rightarrow$ neradikalski produkti (37)

$Li^\bullet + LiOO^\bullet \rightarrow$ neradikalski produkti (38)

$LiOO^\bullet + LiOO^\bullet \xrightarrow{2k_t}$ neradikalski produkti (39)

Shema 10. γ-radioliza vode koja svojim primarnim radiolitičkim produktima pokreće proces peroksidacije LiH mehanizmom lančanih reakcija radikala.

Shema 10 prikazuje niz kemijskih reakcije koje su inicirane γ-zračenjem. Već je objašnjeno u 2.2.2. da u procesu radiolize vode nastaju primarne radikalske vrste.

Vrijednosti radijacijsko-kemijskih prinosa (*G*-vrijednosti/μmol J^{-1}) za primarne radikalske vrste prikazuju se u zagradama kao u jednadžbi 30.

Odvijanje reakcija u istraživanom modelnom sustavu miješanih micela LiH može se predvidjeti na osnovu podataka odgovarajućih konstanti brzina reakcija poznatih iz literature.[115] Prema shemi 10 primarne čestice $HO^{\bullet}$ i $H^{\bullet}$ sudjeluju u reakcijama s tiolima i LiH/Tween®-20 stvarajući tiilne i alkilne radikale (reakcije 31 i 32).[118,119] Atom $H^{\bullet}$ reagira s kisikom (reakcija 33), a e_{aq}^{-} s kisikom odnosno tiolom (reakcije 33 i 34). Uz pretpostavku da je koncentracija kisika u otopinama koje su u ravnoteži sa zrakom manje ili približno 2,66 × 10^{-4} mol dm^{-3},[120] te uzimajući u obzir vrijednosti konstante brzine reakcija i upotrebljenu koncentraciju tiola, 2,8 × 10^{-3} mol dm^{-3} 2–ME, u fazi inicijacije nastaju predominantno $RS^{\bullet}$ radikali, peroksilni radikali (reakcija 35), superoksidni radikal anioni (reakcija 33) ili njegov protoniran oblik.[121] Prema shemi 10 (reakcije 30-36), nastaje oko 85 % tiilnih radikala koji u reakciji s LiH generiraju alkilne radikale (reakcija 36) i tako započinju propagaciju (reakcija 5). $LOO^{\bullet}$ radikali apstrahiraju atom vodika na bis-alilnoj poziciji LiH s konstantom brzine propagacije k_p, formirajući novi lipidni radikal $L^{\bullet}$ (reakcija 13).[122]

Slijedeći reakcije iz sheme 10, brzina nastajanja LiOOH induciranih γ-zračenjem u homogenim sustavima može se prikazati izrazom:

$$d[\mathrm{LiOOH}]/d\mathrm{t} = G(\mathrm{LiOOH}) \cdot \rho \cdot P = k_{\mathrm{p}}\,[\mathrm{LiH}][\mathrm{LiOO}^{\bullet}] \qquad (40)$$

gdje je G/mol J^{-1} radijacijsko-kemijski prinos, ρ/kg dm^{-3} gustoća, a P/J s^{-1} brzina doze. Primjenom aproksimacije ustaljenog stanja na nastajanje slobodnih radikala $LiOO^{\bullet}$ i $L^{\bullet}$ uzimanjem u obzir jednadžbe 40, te uz pretpostavku visoke koncentracije kisika,[123] konačni izraz za G(LiOOH) je:

$$G(\mathrm{LiOOH}) = \frac{k_p}{\sqrt{k_t}}[\mathrm{LiH}]\sqrt{G(\mathrm{Li}^{\bullet})/\rho P} = G_0(\mathrm{LiOOH})\frac{1}{\sqrt{P}} \qquad (41)$$

Logaritmiranjem jednadžbe 40 dobije se izraz koji pokazuje odnos između G(LiOOH) i brzine doze:

$$\log G(\mathrm{LiOOH}) = \log G_0(\mathrm{LiOOH}) - a \log P \qquad (42)$$

Izrazimo li log G(LiOOH) u ovisnosti o log P, prema jednadžbi 41 dobije se pravac, a iz sjecišta i nagiba mogu se izračunati vrijednosti G_0(LiOOH) odnosno a. Vrijednost G_0(LiOOH) predstavlja početni radijacijsko-kemijski prinos LiOOH, a oznaka a potenciju iz

koje se može neposredno odrediti ovisnost radijacijsko-kemijskog prinosa LiOOH o brzini doze.

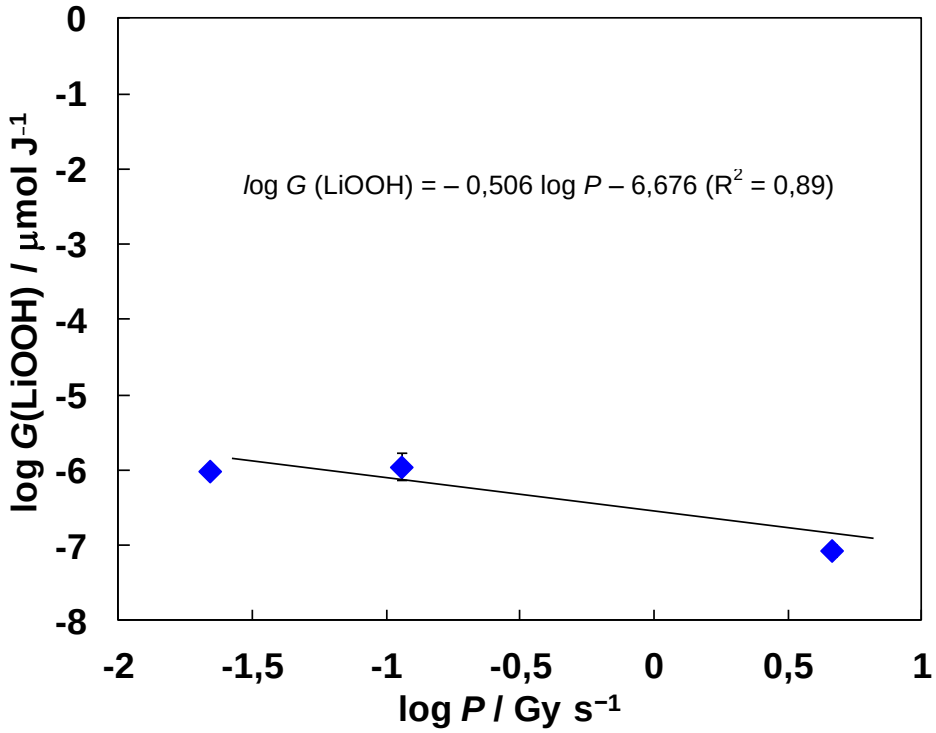
Na slici 26 prikazani su rezultati ovisnosti radijacijsko-kemijskog prinosa LiOOH o brzini doze zračenja u modelnim sustavima LiH u prisustvu kisika. Iz jednadžbe pravca: $\log G(\mathrm{LiOOH}) = -0{,}506 \log P - 6{,}676$ ($R^2 = 0{,}89$), izračunate su vrijednosti $G_0(\mathrm{LiOOH}) = 1{,}7\ \mu\mathrm{mol\ J^{-1}}$, odnosno $a = 0{,}51$.

Vrijednost nagiba pravca pokazuje inverznu ovisnost G(LiOOH) o drugom korijenu brzine doze. Ovaj rezultat je potvrdio da kinetika oksidacije LiH u miješanim micelama LiH slijedi kinetiku oksidaciju lipida u pravim otopinama lipida te da se mehanizmi u miješanim micelama LiH mogu tumačiti poznatim mehanizmima koji se odvijaju u homogenim sustavima.

Lipidna peroksidacija je učinkovitija kod manjih brzina doze u modelnim sustavima. Uz pretpostavku da je radijacijsko-kemijski prinos radikala koji apstrahiraju vodik uz generiranje *bis*-alilnog radikala 0,09 μmol J^{-1} (reakcija 32, 28) što odgovara približno 15 % početnih radikalskih čestica (jednadžba 30), te se iz G_0(LOOH) = 1,7 μmol J^{-1} može izračunati propagacijska duljina lanca (ν). To je veličina koja pokazuje koliko puta primarni radikal $Li^{\bullet}$ proizvede produkt LiOOH:

$$\nu = \frac{\text{brzina propagacije}}{\text{brzina inicijacije}} = \frac{G(\mathrm{LiOOH})}{G(\mathrm{Li^{\bullet}})} \qquad (43)$$

Iz rezultata dobivenih u modelnom sustavu LiH izračunato je da je ν = 19 tj. na svaki proizveden radikal $Li^{\bullet}$ nastaje 19 molekula LiOOH.



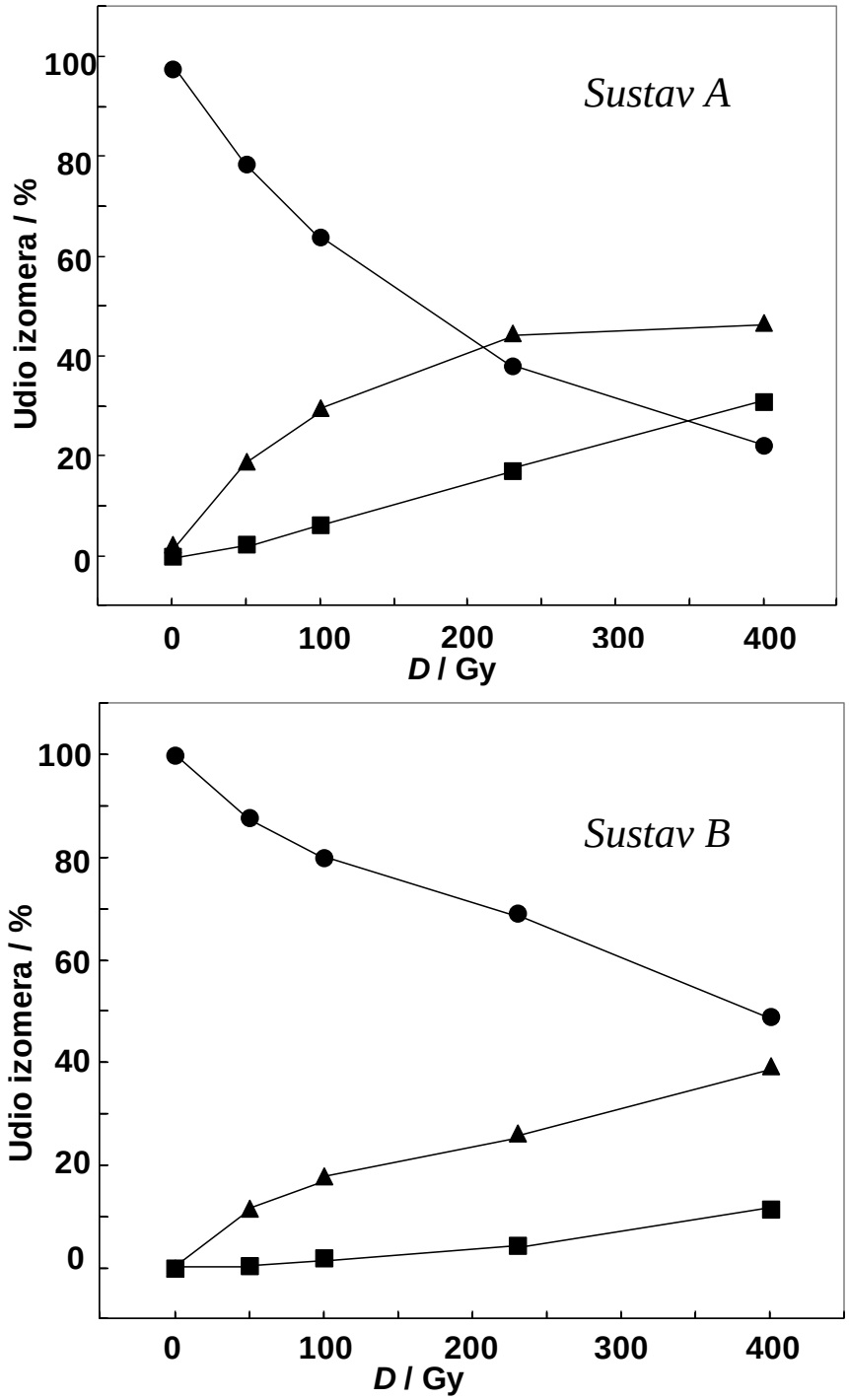
Slika 26. Grafički prikaz ovisnosti radijacijsko-kemijskog prinosa LiOOH o brzini doze zračenja u prisustvu kisika u *sustavu B*. Micele LiH: c(Tween®-20) = 2,8 × 10^{-4} mol dm^{-3}, c(LiH) = 5,0 × 10^{-4} mol dm^{-3}, c(2–ME) = 2,8 × 10^{-3} mol dm^{-3}, c(NaH_2PO_4) = 5,0 × 10^{-3} mol dm^{-3}, pH = 5.

4.2.5. Izomerizacija i peroksidacija linolne kiseline u modelnom sustavu

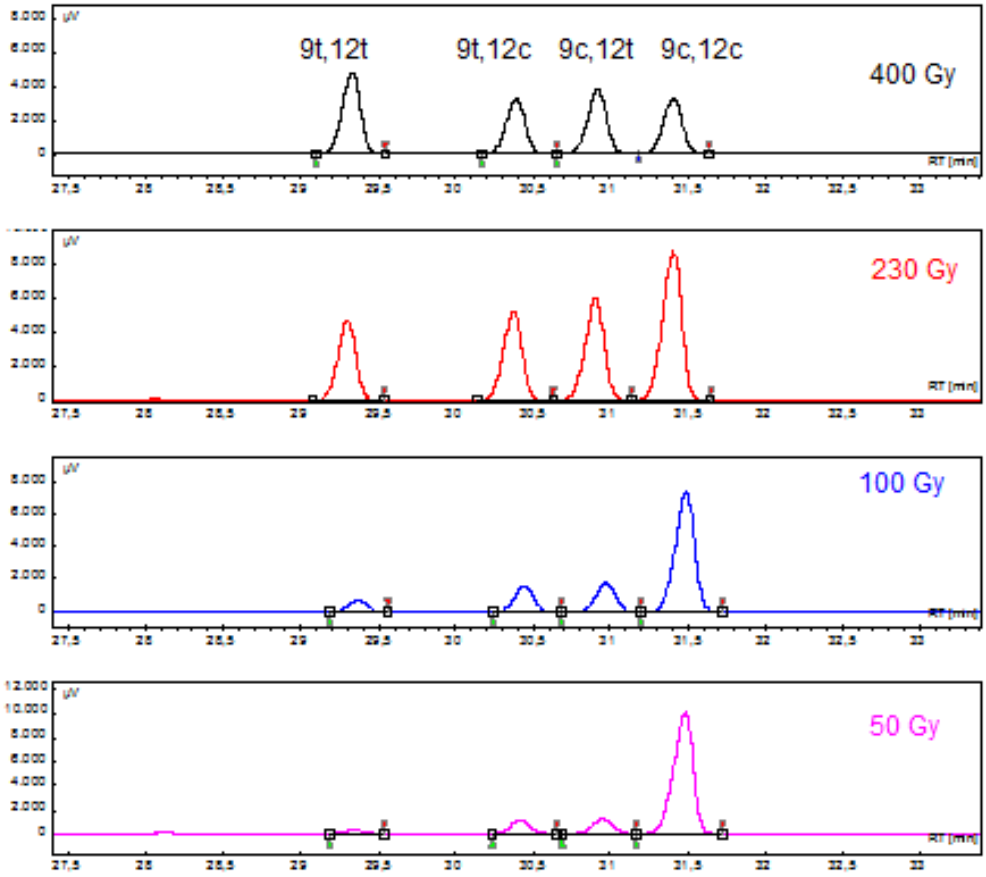
Već je spomenuto u poglavlju 2.4.1. da su tioli kao djelotvorni H-donori sposobni usporavati procese lipidne peroksidacije uz stvaranje tiilnih radikala, radikala lokaliziranih na S-atomu. Također, istaknuto je da tiilni radikali s lakoćom adiraju dvostruku vezu te su stoga potencijalni izomerizirajući agensi koji djeluju mehanizmom adicije i eliminacije radikala na dvostrukoj vezi PUFA (Shema 3). Analize geometrijskih izomera nastalih u anaerobnim i aerobnim uvjetima provodile su se istovremeno s analizama peroksidacije LiH u modelnom sustavu miješanih micela, kako je opisano u eksperimentalnom dijelu ovog rada.

4.2.5.1. Izomerizacija i peroksidacija linolne kiseline u anaerobnim uvjetima

Utjecaj doze zračenja na raspodjelu geometrijskih izomera u *sustavima A* (2–ME dodan neposredno prije zračenja) i *B* (2–ME inkorporiran), u anaerobnim uvjetima prikazani su na slici 27. Zračenjem *sustava A* odnosno *B* u području doza do 400 Gy, nisu izmjereni nastali LiOOH. Međutim, u ovim uvjetima pojavljuje se značajna geometrijska izomerizacija. Kao što je vidljivo iz slike 27, uz nestajanje LiH *cis*-konfiguracije dvostruke veze, 9*c*,12*c*-18:2, istovremeno nastaju dva mono *trans*-izomera LiH, 9*t*,12*c*-18:2 i 9*c*,12*t* -18:2, te di *trans*-izomer, 9*t*,12*t*-18:2. Mono *trans*-izomeri nastaju u gotovo jednakim količinama, a na slici je prikazana njihova suma. Na slici 28 prikazani su tipični GC-kromatogrami dobiveni kod četiri doze zračenja u *sustavu A* u anaerobnim uvjetima.



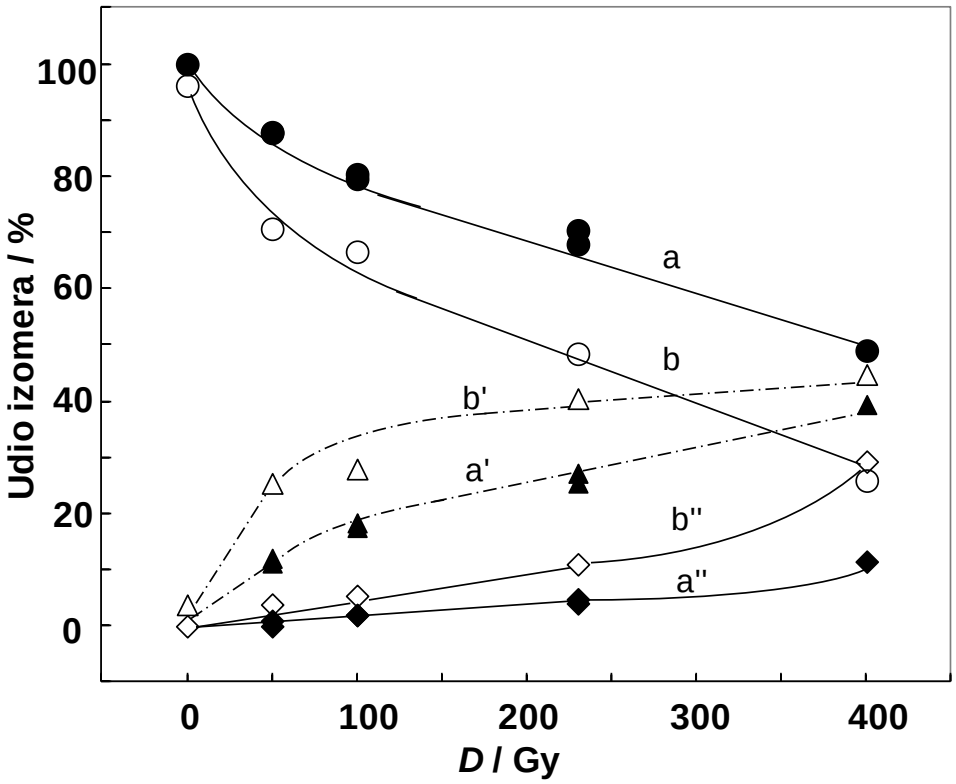
Slika 27. Raspodjela geometrijskih izomera LiH u ovisnosti o dozi zračenja (274,8 Gy/min, u *sustavu A* i *sustavu B*, u anaerobnim uvjetima. (●) nestajanje 9*c*,12*c*-18:2, (▲) nastajanje 9*t*,12*c*-18:2 + 9*c*,12*t*-18:2, (■) nastajanje 9*t*,12*t*-18:2.
Micele LiH: *c*(Tween®-20) = 2,8 × 10^{-4} mol dm^{-3}, *c*(2–ME) = 2,8 × 10^{-3} mol dm^{-3}*c*(LiH) = 5,0 × 10^{-4} mol dm^{-3}, *c*(NaH_2PO_4) = 5,0 × 10^{-3} mol dm^{-3}, pH = 5.



Slika 28. Kromatogrami dobiveni GC analizom *sustava A* ozračenog različitim dozama do 400 Gy, u anaerobnim uvjetima.

Dosadašnji rezultati dobiveni u miješanim micelama LiH već su uputili na zanimljiv utjecaj same pripreme miješanih micela *(sustav A* i *sustav B*) na učinkovitost procesa geometrijske izomerizacije LiH. Uzimajući nestajanje prirodne konfiguracije dvostruke veze LiH (9*c*, 12*c*-18:2) kao mjeru efikasnosti izomerizacije, utvrđeno je da je proces izomerizacije u anaerobnim uvjetima u *sustavu A* oko dva puta efikasniji nego u sustavu *B*. Kao i u procesu peroksidacije LiH, micele LiH u kojima je 2–ME inkorporiran dublje u micelu tijekom same pripreme modelnog sustava (*sustav B*) su se pokazale otpornijima na izomerizaciju u usporedbi sa procesima praćenim u *sustavu A*. Dobiveni rezultati upućuju na važnost strukture samooorganiziranog u sustavu LiH/Tween®-20/2–ME u vodi, odnosno važno je poznavati koliko je predominantno generiranih tiilnih radikala dostupno za reakciju na dvostrukoj vezi LiH. Specifična raspodjela molekulskih tvari u sustavu miješanih micela određuje mehanizam i kinetiku geometrijske izomerizacije.

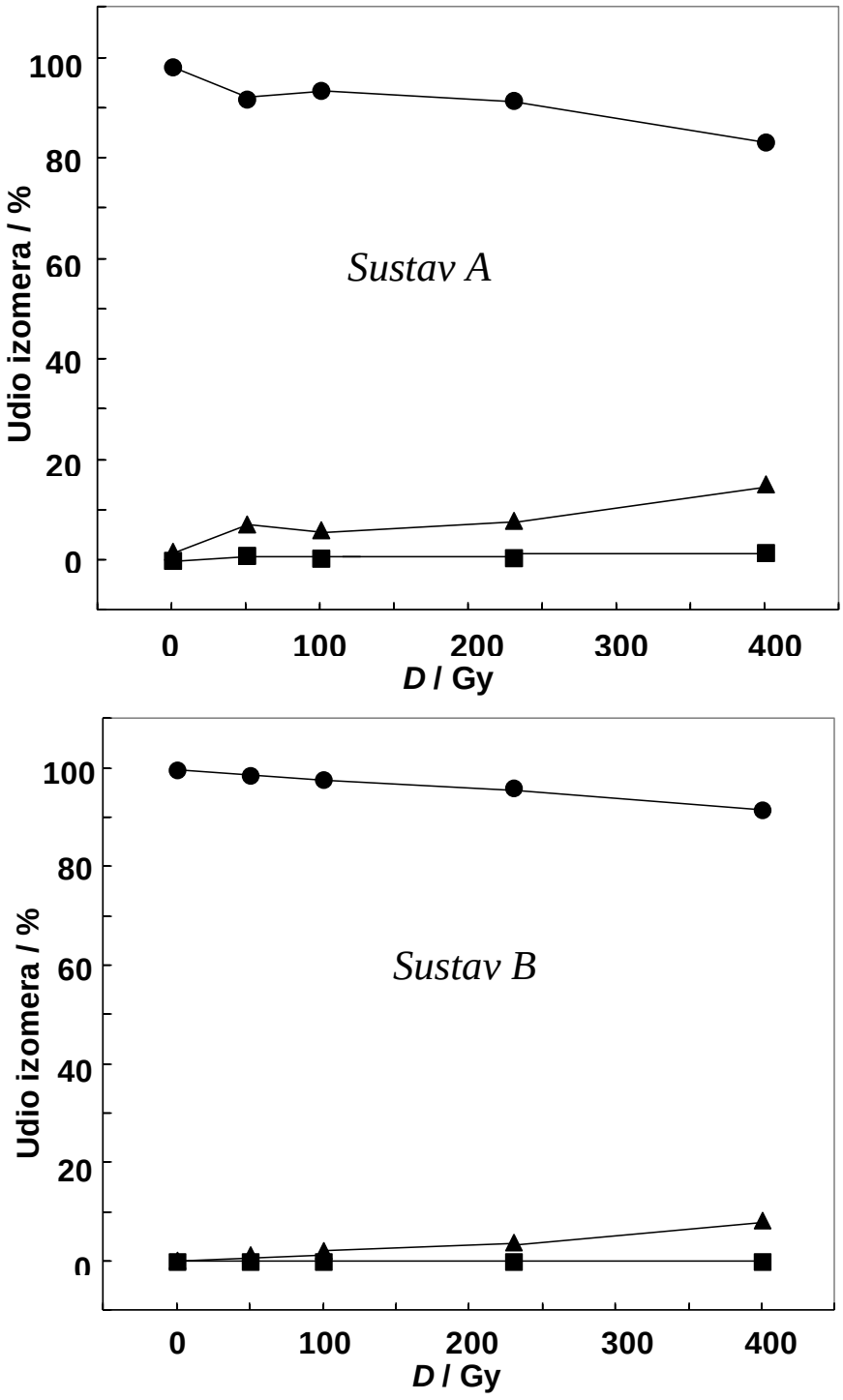
Utjecaj brzine doze zračenja na djelotvornost procesa izomerizacije istražen je u otopinama micela u anaerobnim uvjetima (Slika 29). Vidljivo je da je zračenjem sustava kod iste doze proces izomerizacije efikasniji kod manje brzine doze zračenja.



Slika 29. Utjecaj brzine doze zračenja na raspodjelu geometrijskih izomera u N_2O zasićenim otopinama u *sustavu B.* Nestajanje 9*c*,12*c*-18:2 (●,○), nastajanje 9*t*,12*c*-18:2 + 9*c*,12*t*-18:2 (▲, Δ), nastajanje 9*t*,12*t*-18:2 (♦, ◊) u ovisnosti o brzini doze 274,80 Gy/min (krivulje a, a', a'') i 1,31 Gy/min (krivulje b, b', b'').
Micele LiH: *c*(Tween®-20) = 2,8 × 10^{-4} mol dm^{-3}, *c*(LiH) = 5,0 × 10^{-4} mol dm^{-3}, *c*(2–ME) = 2,8 × 10^{-3} mol dm^{-3}, *c*(NaH_2PO_4) = 5,0 × 10^{-3} mol dm^{-3}, pH = 5.

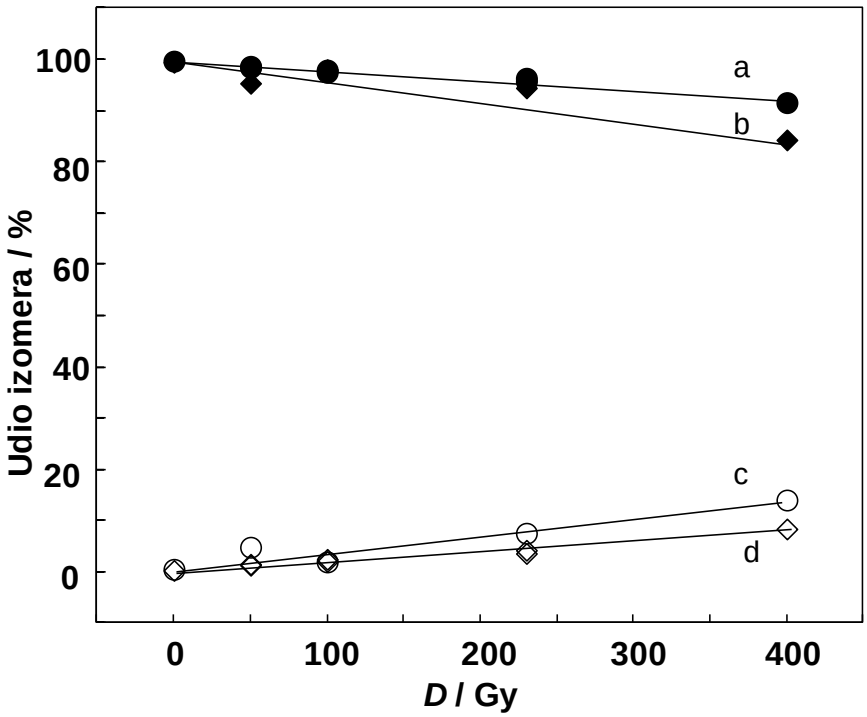
4.2.5.2. Izomerizacija i peroksidacija linolne kiseline u aerobnim uvjetima

U lipidnim sustavima koji su u ravnoteži sa zrakom bilo je za očekivati da će proces lipidne peroksidacije biti predominantan proces. Međutim, čak i u uvjetima kad su micele u ravnoteži sa zrakom, *cis, trans*-izomerizacija se može paralelno pratiti s procesom peroksidacije. Na slici 30 prikazan je utjecaj doze zračenja na nastajanje različitih geometrijskih izomera u *sustavima A* i *B.* U ovakvim uvjetima izmjerena je očekivano visoka koncentracija LiOOH (Slika 24). Pritom je vidljivo da nestajanje izomera 9*c*,12*c*-18:2 prati nastajanje dva mono *trans*-izomera, dok se *trans*-izomeri 9*t*,12*t*-18:2 nisu detektirali. U anaerobnim uvjetima, gdje je proces geometrijske izomerizacije dominantan, pronađene su razlike u djelotvornosti izomerizacije između *sustava A* i *sustava B.* I u aerobnim uvjetima je opaženo da je efikasnost izomerizacije oko dva puta veća u *sustavu A* nego u *sustavu B,* kao što je to izraženo u anaerobnim uvjetima.



Slika 30. Raspodjela geometrijskih izomera u ovisnosti o dozi zračenja (274,80 Gy/min) u *sustavu A i B*, u ravnoteži sa zrakom. Nestajanje 9*c*,12*c*- 18:2 (●), nastajanje 9*t*,12*c*-18:2 + 9*c*,12*t* -18:2 (▲), nastajanje 9*t*,12*t*-18:2 (■).
Micele LiH: c(Tween®-20) = 2,8 × 10^{-4} mol dm^{-3}, c(LiH) = 5,0 × 10^{-4} mol dm^{-3}, c(2–ME) = 2,8 × 10^{-3} mol dm^{-3}, c(NaH_2PO_4) = 5,0 × 10^{-3} mol dm^{-3}, pH = 5.

Kao što je bilo određeno kod peroksidacije, proces izomerizacije se pokazao djelotvornijim pri zračenju sustava kod manje brzine doze kod iste doze zračenja (Slika 31).

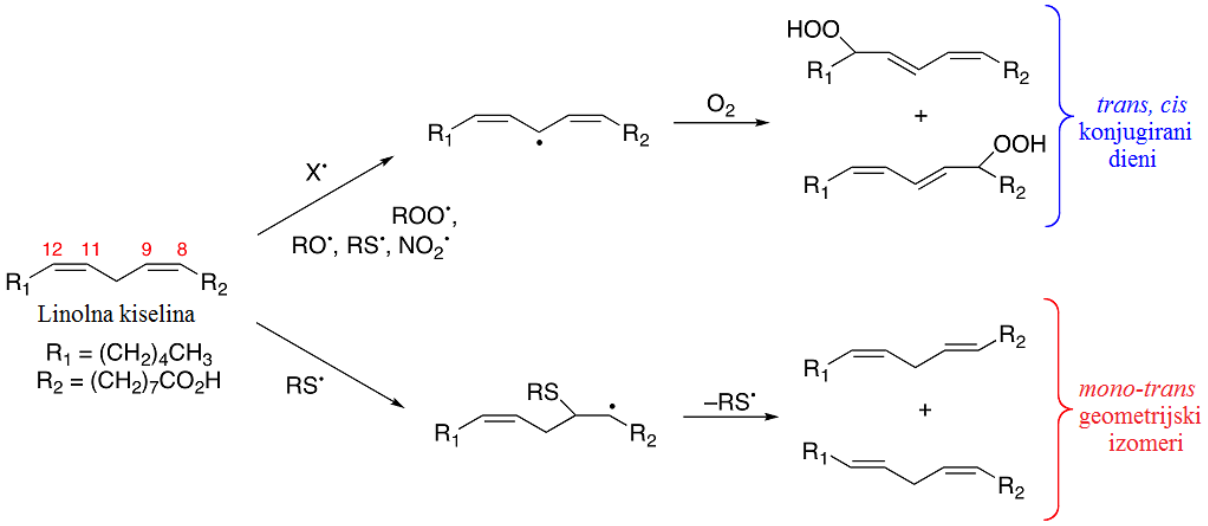


Slika 31. Utjecaj brzine doze zračenja na raspodjelu geometrijskih izomera u *sustavu B*, u ravnoteži sa zrakom. Nestajanje 9*c*,12*c*-18:2 (●,♦), all *trans* (mono *trans* i di *trans*) (○,◊) izomera u ovisnosti o brzini doze 274.80 Gy/min (krivulje a i d) i 1,31 Gy/min (krivulje b i c). Micele LiH: c(Tween®-20) = 2,8 × 10^{-4} mol dm^{-3}, c(LiH) = 5,0 × 10^{-4} mol dm^{-3}, c(2–ME) = 2,8 × 10^{-3} mol dm^{-3}, c(NaH_2PO_4) = 5,0 × 10^{-3} mol dm^{-3}, pH = 5.

Do sada potpuno nepoznat i neistražen odnos procesa peroksidacije i izomerizacije osvjetlio je zanimljiv rezultat dobiven u ovom radu, a to je da se tijekom procesa peroksidacije lipida u ravnoteži sa kisikom iz zraka i u prisutnosti tiola fiziološke koncentracije, ovdje 2,8 × 10^{-3} mol dm^{-3} 2–ME, odvija i *cis, trans*-izomerizacija. Tako je generiranjem radikala zračenjem do 400 Gy *sustava B* koji sadrži 5,0 × 10^{-4} mol dm^{-3} LiH, proizvedeno 2,0 × 10^{-5} mol dm^{-3} LiOOH i oko 10 % LiH je promijenilo svoju *cis, cis*-konfiguraciju u njezine mono *trans*-izomere.

Zasićivanjem *sustava A* propuhivanjem 10 minuta s čistim kisikom i ozračivanjem različitim dozama do 750 Gy izmjereno je također 10 % mono *trans*-izomera što je usporedivo sa rezultatima dobivenim u uvjetima ravnoteže sa kisikom iz zraka.

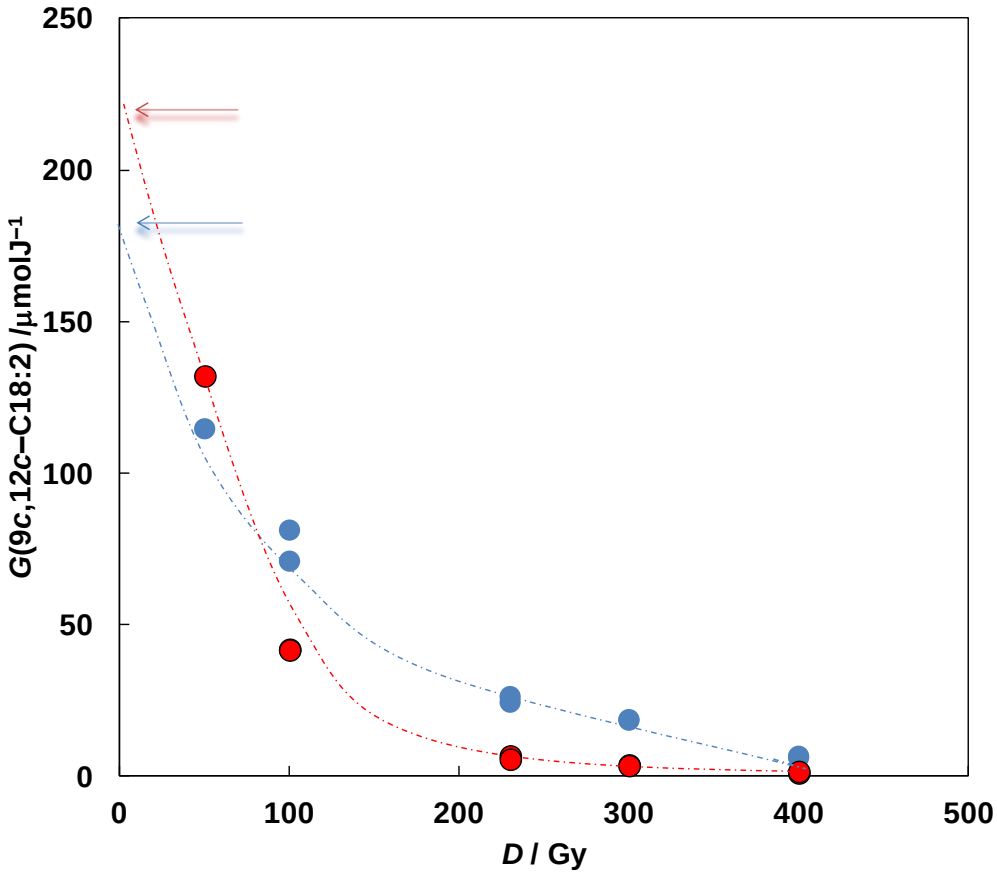
Pri praćenju *cis, trans*-izomerizacije koji je katalitički proces (Shema 11), nužno je eliminirati mogućnost nastajanja drugih produkata nekim drugim procesima. Jedna od potencijalnih i najvjerojatnijih je terminacija sekundarnih radikala. Da bismo bili potpuno sigurni da se radi o katalitičkom procesu, nužno je znati početnu količinu LiH i količinu LiH nakon procesa. Računanjem balansa materijala, korištenjem metil stearata kao unutarnjeg standarda, pronađeno je da suma svih geometrijskih izomera opada s vremenom reakcije što upućuje na stvaranje najvjerojatnije dimera kao i drugih produkata tijekom procesa.



Shema 11. Mehanizmi peroksidacije i izomerizacije linolne kiseline pod djelovanjem radikala.

U prilog tome govore i literaturni podaci u kojima je ispitivanjem produkata u reakcijama metil linoleata s tiilnim radikalima u anaerobnim uvjetima pokazano da glavninom nastaju geometrijski izomeri (93 %), te pentadienilni radikal koji potom dimerizira (4 %), a ako je prisutan kisik stvaraju se *trans, cis*-konjugirani dieni, hidroperoksi-metil linoleat (shema 11).[55]

Zračenjem kod doze od 100 Gy izračunato je da više od 95 % početnog materijala LiH sudjeluje u nastajanju geometrijskih izomera, međutim već zračenjem kod doza većih od 400 Gy 60 % odnosno 71 % početne količine LiH sudjeluje u izomerizaciji u uvjetima bez kisika odnosno u otopinama koje su bile u ravnoteži sa zrakom.



Slika 32. Radijacijsko-kemijski prinosi (*G*-vrijednosti) nestajanja 9*c*,12*c*-18:2 u ovisnosti o dozi zračenja, u *sustavu A* u (●) anaerobnim i (●) aerobnim uvjetima.
micele LiH: c(Tween®-20) = 2,8 × 10^{-4} mol dm^{-3}, c(LiH) = 5,0 × 10^{-4} mol dm^{-3}, c(2–ME) = 2,8 × 10^{-3} mol dm^{-3}, $c(NaH_2PO_4)$ = 5,0 × 10^{-3} mol dm^{-3}, pH = 5.

Slika 32 predstavlja utjecaj doze zračenja na *G*-vrijednosti nestajanja izomera 9*c*,12*c*-18:2 u aerobnim i anaerobnim uvjetima.

Za kvantitativno određivanje nestajanja linolne kiseline, *n*(9*c*,12*c*-18:2) kod određene doze zračenja, korištena je metoda unutarnjeg standarda. Koncentracija standarda metil stearata u

svim uzorcima bila je održavana konstantnom te je njegova koncentracija u 1 μl koji je injektiran za GC iznosila 1,05 g/dm^{-3}. Nakon integriranja površine analita i standarda određena je količina pojedinačnog izomera prema relaciji:

$$n(\,9c,12c\text{–}18{:}2),\ (\mathrm{mol\,kg^{-1}}) = \frac{P_{izomera} \times 1{,}05\ (\mathrm{g/dm^{-3}})}{P_{standarda} \times 0{,}926 \times M_{(metil\ linoleta)}(\mathrm{g\ /\ mol}) \times 10^3\ (\frac{g}{dm^3})} \quad (44)$$

gdje je P_{izomera} – površina pika 9*c*,12*c*-18:2 u kromatogramu dobiven GC analizom, $P_{\text{standarda}}$ – površina pika unutarnjeg standarda, a 0,926 je korekcijski faktor. Korekcijski faktor određen je iz kalibracijske krivulje dobivene ispitivanjem odnosa površina GC pikova analita/standarda prema prema poznatim masama analita/standarda.

Radijacijsko-kemijski prinosi *G*(9*c*,12*c*-18:2) izračunati su iz relacije :

$$G(9c,12c-C18{:}2)(mol\,J^{-1}) = \frac{n\ (9c,12c\text{ – }18{:}2)/(mol\ kg^{-1})}{D\ (J/kg)} \quad (45)$$

Ekstrapolacijom vrijednosti na nultu dozu (na slici 31) dobivaju se vrijednosti G_0 = 220 μmol J^{-1} u uvjetima u odsutnosti kisika, odnosno G_0 = 190 μmol J^{-1} u prisustvu kisika. Prema jednadžbi 29 ukupan radijacijsko-kemijski prinos (G_{uk}) primarnih čestica nastalih radiolizom vode iznosi: G_{uk} = (0,27 + 0,28 + 0,062) μmol J^{-1} = 0,612 μmol J^{-1}). Prema shemi 10, prema kojoj se pretpostavlja da navedene reakcije doprinose u stvaranju tiilnih radikala može se izračunati da je $G(\mathrm{RS^{\bullet}})$ = 0,52 μmol J^{-1} što odgovara oko 85 % početnih radikalskih vrsta (e_{aq}^{-}, $\mathrm{HO^{\bullet}}$). Iz dobivenih podataka izračunat je katalitički ciklus (κ) koji je u početnoj fazi u anaerobnim uvjetima iznosio 420, a u aerobnim uvjetima 370. Ovaj broj predstavlja broj molekula LiH u kojima je na svaki generirani $\mathrm{RS^{\bullet}}$ radikal nastala pretvorba iz *cis*- u *trans*-izomer LiH.

$$\kappa = \frac{G_0\ (\mu mol/J)}{G(RS^{\bullet})(\mu mol/J)} \quad (46)$$

Različiti faktori mogu utjecati na smanjenje G_0-vrijednosti u aerobnim uvjetima, a jedan od njih je između ostalog nastajanje *trans, cis*-konjugiranih diena koji imogu inhibirati

proces geometrijske izomerizacije (Shema 11). Naime, poznato je da je konstanta brzine adicije tiilnih radikala na dvostruku vezu konjugiranih diena za dva reda veličine veća od adicije na izoliranu dvostruku vezu.[124,125] Autori su proučavanjem geometrijske izomerizacije metil linoleata i oleata u *tert*-BuOH pojedinačno i u smjesi pronašli da se izomerizacija samog linoleata odvijala jednako efikasno kao kad je bio u smjesi s oleatom. Nasuprot tomu, izomerizacija oleata je bila drastično smanjena kad je bio u smjesi s linoleatom što je protumačeno nastajanjem produkata konjugiranih diena koje su tiilni radikali preferirali te tako usporavali proces izomerizacije oleata.

Ako se usporede G_0-vrijednosti dobivene u modelnim sustavima miješanih micela LiH s literaturno poznatim G_0-vrijednostima u odsutnosti kisika: G_0 = 230 μmol J^{-1} za izomerizaciju metilnog oleata u *t*-BuOH, G_0 = 120 μmol J^{-1} za izomerizaciju oleata u POPC-LUVET (*engl.* 1-palmitoyl-2-oleoyl phosphatidylcholine, large unilamellar vesicles),[126] i G_0 = 20 μmol J^{-1} za izomerizaciju 0,15 mol dm^{-3} metilnog linoleata u *t*–BuOH,[55] može se zaključiti da je *cis, trans*-izomerizacija u micelama LiH u ovom radu po svom učinku sličnija *cis, trans*-izomerizaciji metilnog oleata u otopini.

4.2.6. Utjecaj veličine micela linolne kiseline na lipidnu peroksidaciju i izomerizaciju

Mijenjanjem koncentracije LiH ili Tween®-20, ispitan je utjecaj veličine micele na procese lipidne peroksidacije i geometrijske izomerizacije. Hidrodinamički promjer miješanih micela određen je mjerenjem dinamičkog raspršenja svjetla. U tablicima 9 i 10 prikazana je veličina čestica u *sustavima A* (Tablica 9) i *B* (Tablica 10) koja je s porastom koncentracija LiH kod konstante koncentracije Tween®-20 od početne veličine (22,5 ± 0,8) nm porasla do (92,2 ± 2,9) nm. Nasuprot tomu, kod konstantne koncentracije LiH povećanje koncentracije Tween®-20 i do deset puta od tipične koncentracije uzrokovalo je smanjenje čestice na 9,1 nm.

Tablica 9. Ovisnost veličine micele o koncentracijama Tween®-20 i LiH te utjecaj veličine micele na nastajanje LiOOH i geometrijskih izomera kod doze zračenja od 100 Gy u ravnoteži sa zrakom i otopinama zasićenim s N_2O.
Sustav B; P = 274,8 Gy/min; c(2–ME) = 2,8 × 10^{-3} mol dm^{-3}, $c(NaH_2PO_4)$ = 5,0 × 10^{-3} mol dm^{-3}, pH = 5,5.

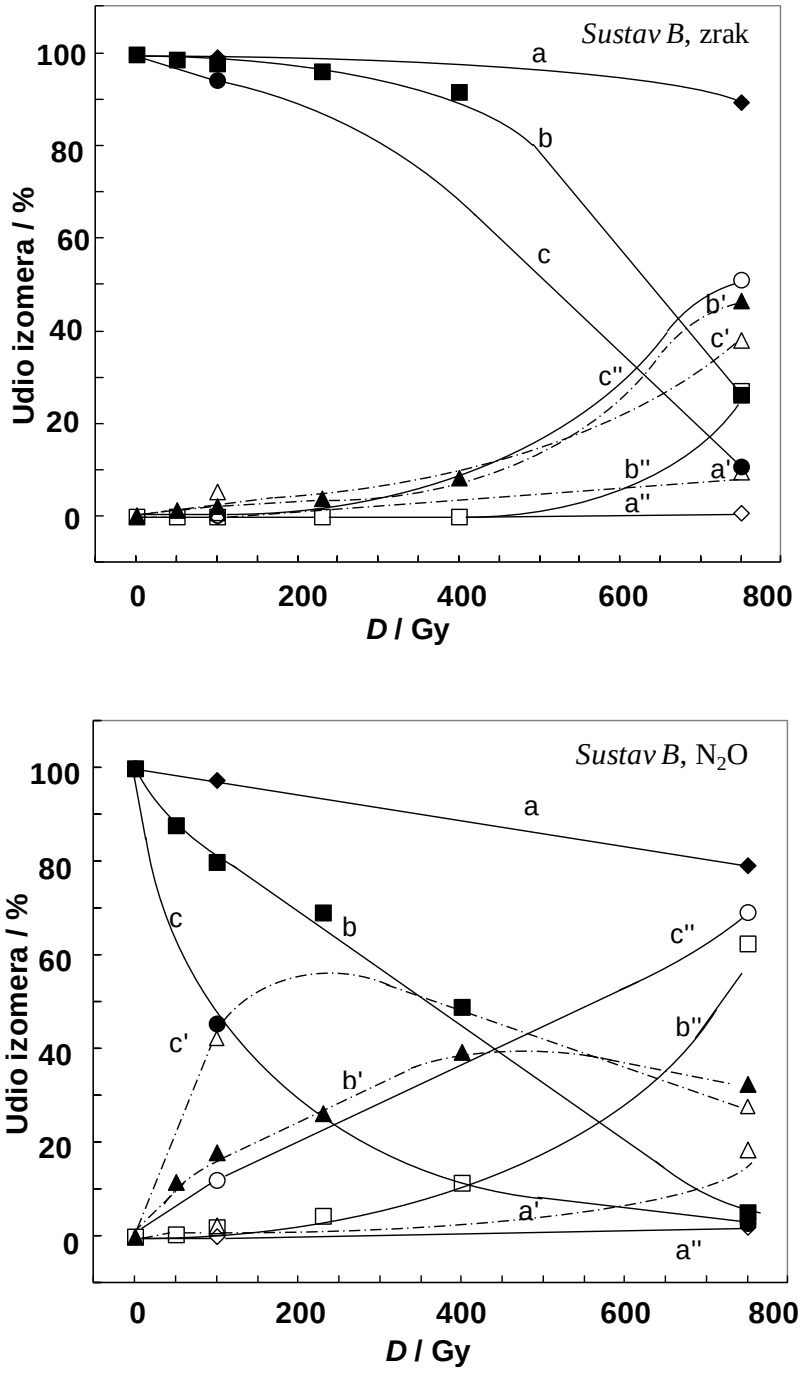
			Zrak		N_2O
d_0 / nm	c(Tween®-20)/ mol dm^{-3}	c(LiH)/ mol dm^{-3}	Δc(LiOOH)/ μmol dm^{-3}	Udio izomera/% 9*c*,12*c*/9*c*,12*t*/9*t*,12*c*/9*t*,12*t*	Udio izomera/% 9*c*,12*c*/9*c*,12*t*/9*t*,12*c*/9*t*,12*t*
92,2±2,9	2,8×10^{-4}	4,8×10^{-3}	35,5±5,0	99,1/0,5/0,4/0	97,5/1,2/1,2/0,1
22,5±0,8	2,8×10^{-4}	5,0×10^{-4}	9,7±0,4	97,7/1,1/1,2/0	80,0/8,3/9,7/2,0
9,1±0,7	2,8×10^{-3}	5,0×10^{-4}	13,0±0,8	94,2/2,5/2,9/0,4	45,5/18,9/23,5/12,1

Tablica 10. Ovisnost veličine micele o koncentracijama Tween®-20 i LiH te utjecaj veličine micele na nastajanje LiOOH i geometrijskih izomera kod doze zračenja od 100 Gy u ravnoteži sa zrakom i otopinama zasićenim s N_2O.
Sustav A; P = 274,8 Gy/min; c(2–ME) = 2,8 × 10^{-3} mol dm^{-3}, $c(NaH_2PO_4)$ = 5,0 × 10^{-3} mol dm^{-3}, pH = 5,5.

			Zrak		N_2O
d_0 / nm	c(Tween®-20) mol dm^{-3}	c(LiH)/ mol dm^{-3}	Δc(LiOOH)/ μmol dm^{-3}	Udio izomera/% 9*c*,12*c*/9*c*,12*t*/9*t*,12*c*/9*t*,12*t*	Udio izomera/% 9*c*,12*c*/9*c*,12*t*/9*t*,12*c*/9*t*,12*t*
92,2±2,9	2,8×10^{-4}	4,8×10^{-3}	16,0±0,3	96,3/1,8/1,7/0,4	97,8/1,1/1,1/0,1
22,5±0,8	2,8×10^{-4}	5,0×10^{-4}	15,8±0,1	93,5/2,9/3,1/0,4	62,9/14,1/16,7/6,3
9,1±0,7	2,8×10^{-3}	5,0×10^{-4}	14,1±0,5	94,6/18,5/22,6/0,	47,9/18,5/22,6/10,9

Micele različitih veličina ozračene su dozom od 100 Gy u aerobnim i anaerobnim uvjetima. U tablicama 9 i 10 u anaerobnim uvjetima očekivana je učinkovitost procesa *trans*-izomerizacije no ovdje je vidljivo da ona ovisi o veličini micela. Proces *cis, trans*-izomerizacije raste sa smanjivanjem veličine micele. Posebno treba istaknuti važan rezultat dobiven određivanjem raspodjele mono *trans*-izomera: dva mono *trans*-izomera (9*c*,12*t* i 9*t*,12*c*) su generirani u različitim omjerima te je razlika među njima sve veća što je manja veličina micele. Ovakav rezultat nedvojbeno pokazuje postojanje supramolekulske organizacije masne kiseline u micelama. Ugljikovodični lanci LiH se pakiraju po određenom redu prema unutrašnjosti micele tako da se u najmanjoj miceli pokazuju različite reaktivnosti $RS^{\bullet}$ radikala na dvostrukoj vezi LiH na poziciji 9 (22,6 % u *sustavu A*, 23,5 % u *sustavu B*) u odnosu na dvostruku vezu na poziciji 12 (18,5 % u *sustavu A*, 18,9 % u *sustavu B*).[48,49]

U anaerobnim uvjetima izostaje pouzdanost mjerenja LiOOH, međutim, u ravnoteži sa zrakom u opisanim eksperimentalnim uvjetima izmjerene su mikromolarne koncentracije LiOOH koje su se relativno malo razlikovale u ovisnosti o veličini micela. U aerobnim uvjetima nije učinkovita *cis, trans*-izomerizacija, ali i ta mala učinkovitost je značajna. Kod iste koncentracije tiola i LiH zračenjem sustava micela najmanje veličine kod doze 100 Gy nastalo je $1{,}3 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3} LiOOH i 6 % LiH pretvoreno je u mono *trans*-izomere (oko 3×10^{-5} mol dm^{-3}). Kod ovih malih micela dva mono *trans*-izomera (9*c*,12*t* i 9*t*,12*c*) su nastala u različitim koncentracijama pokazujući da u organiziranom sustavu, kao što je ovaj miješanih micela, pozicije dviju dvostrukih veza LiH nisu ekvivalentne s obzirom na njihovu izloženost napadu radikala tiola.



Slika 33. Utjecaj doze zračenja na raspodjelu izomera u *sustavu B* u ovisnosti o veličini micele u aerobnim i anaerobnim uvjetima (P = 274, 8 Gy/min).
krivulje (a, a', a'') = 92,2 nm; (b, b', b'') = 22,5 nm (c, c', c'') = 9,1 nm.
Nestajanje 9*c*,12*c*-18:2 (a,b,c,), nastajanje mono *trans*-izomera (a',b',c') nastajanje 9*t*,12*t*-18:2 (a'', b'',c'').
Micele LiH: c(Tween®-20) = 2,8 × 10^{-4} mol dm^{-3}, c(LiH) = 5,0×10^{-4} mol dm^{-3}, c(2–ME) = 2,8 × 10^{-3} mol dm^{-3}, c(NaH_2PO_4) = 5,0×10^{-3} mol dm^{-3}, pH = 5.

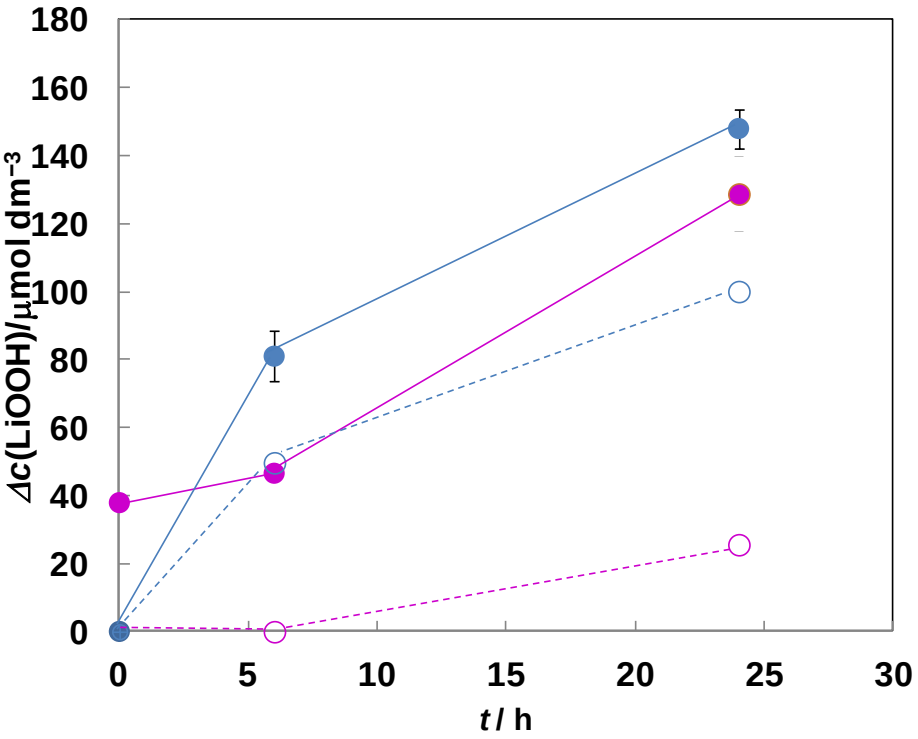
4.2.7. Stabilnost modelnih sustava linolne kiseline nakon γ- zračenja

Stabilnosti modelnih lipidnih sustava praćena nakon zračenja ispitane su u *sustavima A i B,* koji sadrže konstantne koncentracije c(Tween®-20) = 2,8 × 10^{-4} mol dm^{-3}, c(LiH) = 5,0 × 10^{-4} mol dm^{-3}, c(2–Me) = 2,8 × 10^{-3} mol dm^{-3} i c(NaH_2PO_4) = 5,0 × 10^{-3} mol dm^{-3}, pri pH = 5, u aerobnim i anaerobnim uvjetima. U tablici 11 su prikazani rezultati dobiveni nakon ozračivanja uzoraka dozom od 200 Gy u ravnoteži sa zrakom. Vidljivo je da je veličina micela ostala gotovo nepromijenjena kao i u uvjetima bez djelovanja γ-zračenja.

Tablica 11. Utjecaj doze zračenja od 200 Gy na veličinu micela pri sobnoj temperaturi. Micele LiH: c(Tween®–20) = 2,8 × 10^{-4} mol dm^{-3}, c(LiH) = 5,0 × 10^{-4} mol dm^{-3}, c(NaH_2PO_4) = 5,0 × 10^{-3} mol dm^{-3}, pH = 5; c(2–ME) = 2,8 × 10^{-3} mol dm^{-3}.

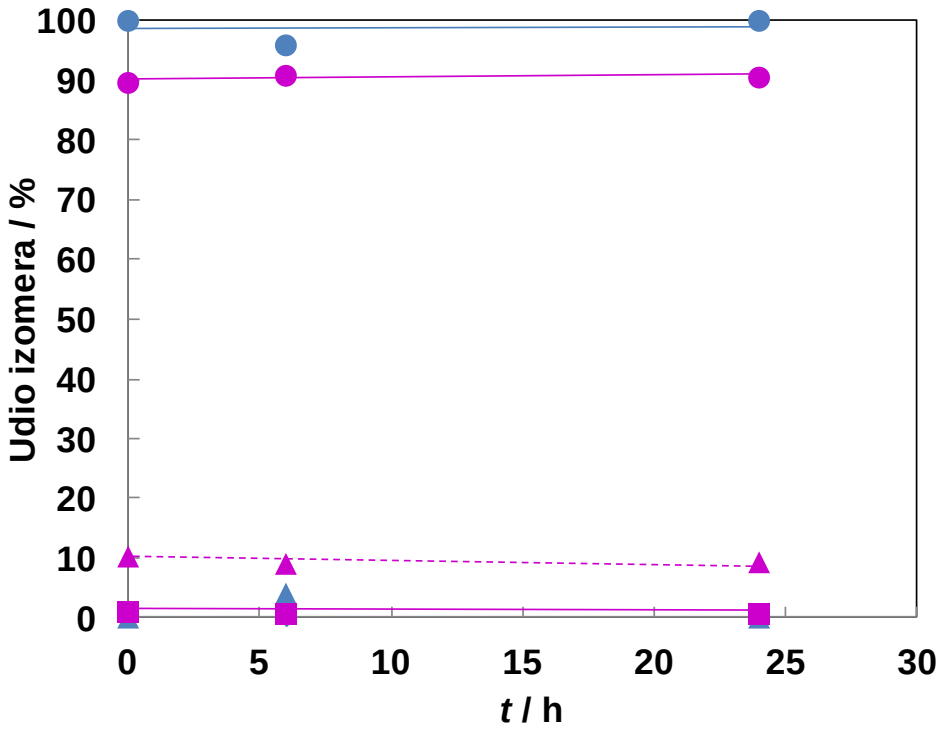
	d_0**(0 Gy) / nm**	d_0**(200 Gy) / nm**
Kontrola	20,25±1,25	18,92±0,76
Sustav A	20,54±1,43	19,75±0,71
Sustav B	18,90±0,47	18,05±0,72

Eksperimenti su provedeni i tako da su lipidi u *sustavu B* u neozračenim i ozračenim uzorcima (dozom od 200 Gy) ekstrahirani u nultom vremenu, odnosno u vremenu netom poslije zračenja, nakon 6 sati, odnosno 24 sata nakon zračenja. U ekstrahiranim uzorcima paralelno su ispitivani LiOOH i geometrijski izomeri kako je opisano u eksperimentalnom dijelu 3.2.3. i 3.2.4.2. Rezultati mjerenja u aerobnim uvjetima pokazuju da je zračenjem inicirana lipidna peroksidacija te je 24 sata nakon zračenja generirano 1,2 × 10^{-4} mol dm^{-3} LiOOH u ozračenim uzorcima. Izmjerena manja koncentracija u odnosu na 1,4 × 10^{-4} mol dm^{-3} LiOOH u neozračenim uzorcima objašnjava se ulogom 2–ME kao hvatača radikala nastalih tijekom γ-zračenjem inducirane peroksidacije. U N_2O zasićenim otopinama vidljiv je sličan trend u nastajanju LiOOH u neozračenim uzorcima, dok u ozračenim nastaje peterostruko manja koncentracija LiOOH u odnosu na neozračene (Slika 34) upućujući na djelotvoran konkurentni proces koji se odvija paralelno s peroksidacijom.

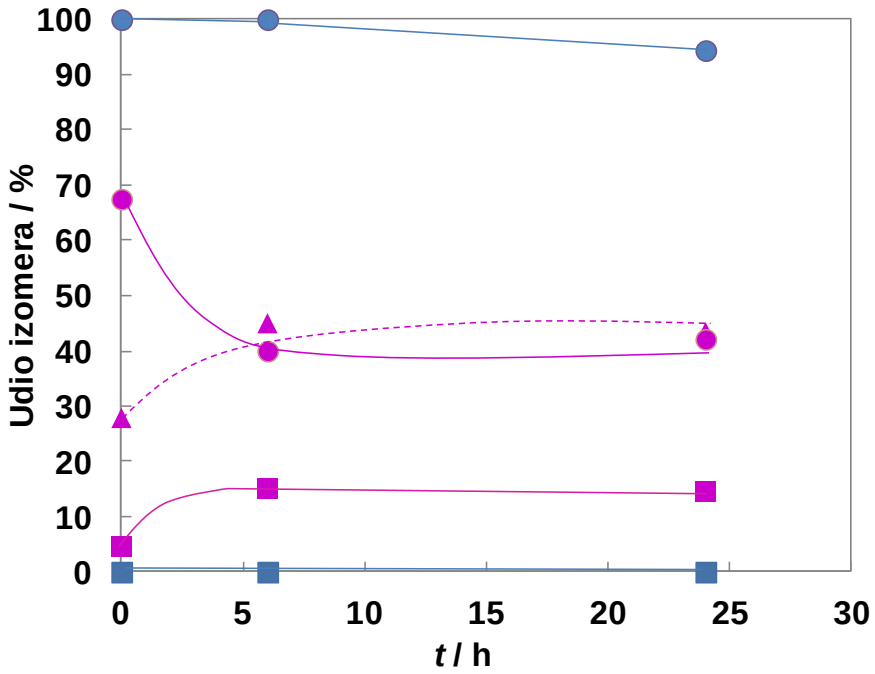


Slika 34. Kinetička stabilnost micela (*sustav B*) i postiradijacijski efekt na formiranje LiOOH u aerobnim (puna linija) i anaerobnim uvjetima (isprekidana linija) (P = 274,8 Gy/min).
(●,○) *sustav B* (ozračen dozom od 200 Gy); (●,○) *sustav B* (bez zračenja)
Micele LiH: c(Tween®-20) = 2,8 × 10^{-4} mol dm^{-3}, c(LiH) = 5,0 × 10^{-4} mol dm^{-3}, c(2–ME) = 2,8 × 10^{-3} mol dm^{-3}, $c(NaH_2PO_4)$ = 5,0 × 10^{-3} mol dm^{-3}, pH = 5.

Udio geometrijskih izomera koji su izmjereni u nultom vremenu u aerobnim uvjetima u *sustavu B* je ostao jednak i nakon 24 sata, što dokazuje da se proces *cis, trans*-izomerizacije odvijao kvantitativno ili da razgradni sekundarni produkti nastali nakon zračenja ne ometaju kinetiku izomerizacije dvostruke veze (Slika 35). Ovo se prvenstveno odnosi na utjecaj konjugiranih LiOOH nastalih u kasnijim vremenima koji bi mogli inhibirati izomerizaciju.



Slika 35. Kinetička stabilnost micele (*sustav B*) i postiradijacijski efekt na formiranje geometrijskih izomera u aerobnim uvjetima (P = 274,8 Gy/min).
(●,▲,■) *sustav B* (ozračen dozom od 200 Gy); (●,▲,■) *sustav B* (bez zračenja)
Nestajanje 9*c*,12*c*-18:2 (●,●), nastajanje 9*t*,12*c*-18:2 + 9*c*,12*t*-18:2 (▲,▲), nastajanje 9*t*,12*t*-18:2 (■,■)
Micele LiH: c(Tween®-20) = 2,8 × 10^{-4} mol dm^{-3}, c(LiH) = 5,0 × 10^{-4} mol dm^{-3}, c(2–ME) = 2,8 × 10^{-3} mol dm^{-3}, c(NaH_2PO_4) = 5,0 × 10^{-3} mol dm^{-3}, pH = 5.

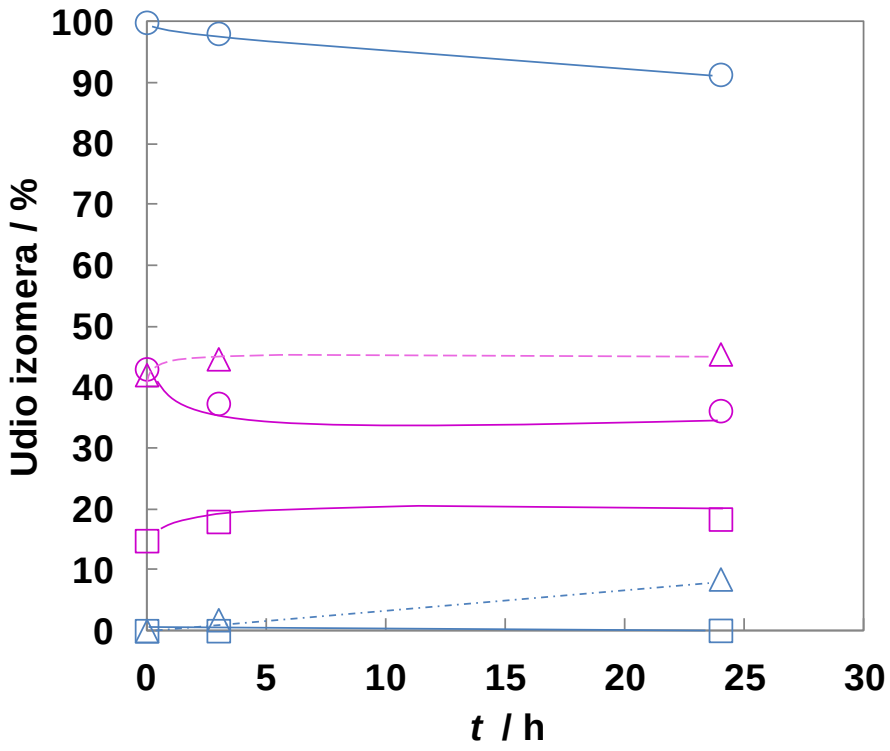


Slika 36. Kinetička stabilnost micele (*sustav B*) i postiradijacijski efekt na formiranje geometrijskih izomera u anaerobnim uvjetima (P = 274,8 Gy/min).
(●,▲,■) *sustav B* (ozračen dozom od 200 Gy); (●,▲,■) *sustav B* (bez zračenja)
Nestajanje 9*c*,12*c*-18:2 (●,●), nastajanje 9*t*,12*c*-18:2 + 9*c*,12*t*-18:2 (▲,▲), nastajanje 9*t*,12*t*-18:2 (■,■)
Micele LiH: c(Tween®-20) = 2,8 × 10^{-4} mol dm^{-3}, c(LiH) = 5,0 × 10^{-4} mol dm^{-3}, c(2–ME) = 2,8 × 10^{-3} mol dm^{-3}, c(NaH_2PO_4) = 5,0 × 10^{-3} mol dm^{-3}, pH = 5.

U anaerobnim uvjetima, u *sustavu B* vidljivo je da početni udio *cis*-izomera od oko 70 % nastalih netom nakon zračenja opada unutar 6 sati od ozračivanja uzoraka te se s daljnim stajanjem uzoraka (unutar 24 sata) dostiže konstantna vrijednost izomera u micelama (Slika 36). Dobiveni rezultati pokazuju da je u navedenim uvjetima nakon zračenja postignuta ravnoteža s generiranjem tiilnih radikala. Međutim, zanimljivo je da u *sustavu A* neposredno nakon zračenja nastaje 3 puta više 9*t*,12*t*-18:2 izomera nego u *sustavu B*, pri istim uvjetima. U vremenu 24 sata nakon zračenja udio *trans*-izomera se gotovo izjednačio u oba sustava. Ovaj rezultat potvrđuje da procesi praćeni u istim oksidacijskim uvjetima, za koje je pokazano da su brzi u početnim vremenima ovise o strukturi micele tj. načinu pripreme sustava micela koji uvjetuje raspodjelu tiola između vodene faze i micele. Micele *sustava B* otpornije su na izomerizaciju netom poslije zračenja. To ponovno pokazuje da je tiol djelotvorniji hvatač slobodnih radikala kad njegove molekule dosegnu jezgru micele, bliže acilnim lancima masne

kiseline i u ovim početnim vremenima lakše postignu prijelazna energetska stanja pogodna za apstrakciju H-atoma, dok se u *sustavu A* raspodjela i pozicija tiola ne odvija u istoj mjeri. Još jednom je potvrđeno da način pripreme micela i pozicija tiola u odnosu na dvostruku vezu masne kiseline utječe na efikasnost geometrijske izomerizacije.

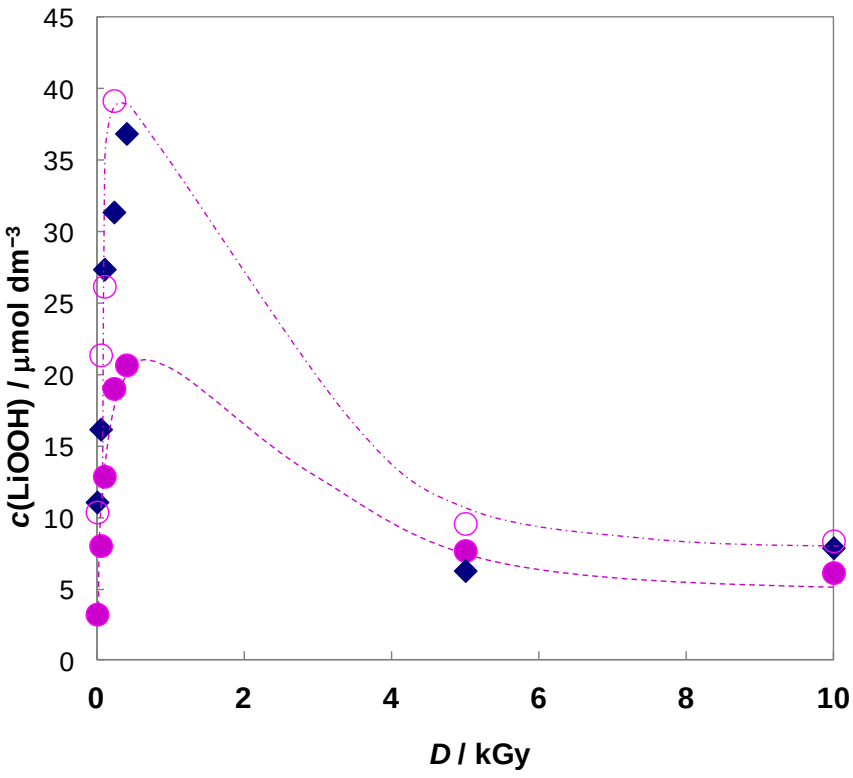
Zanimljivo je da u neozračenim uzorcima LiH *sustava A* (Slika 37) jednodnevnim stajanjem nastaje oko 10 % mono *trans*-izomera. Ovaj rezultat pokazuje da i kad se za pobudu nastajanja tiilnih radikala ne primjenjuje zračenje, starenjem miješane micele LiH u prisustvu 2–ME može se također inicirati proces *trans*-izomerizacije.



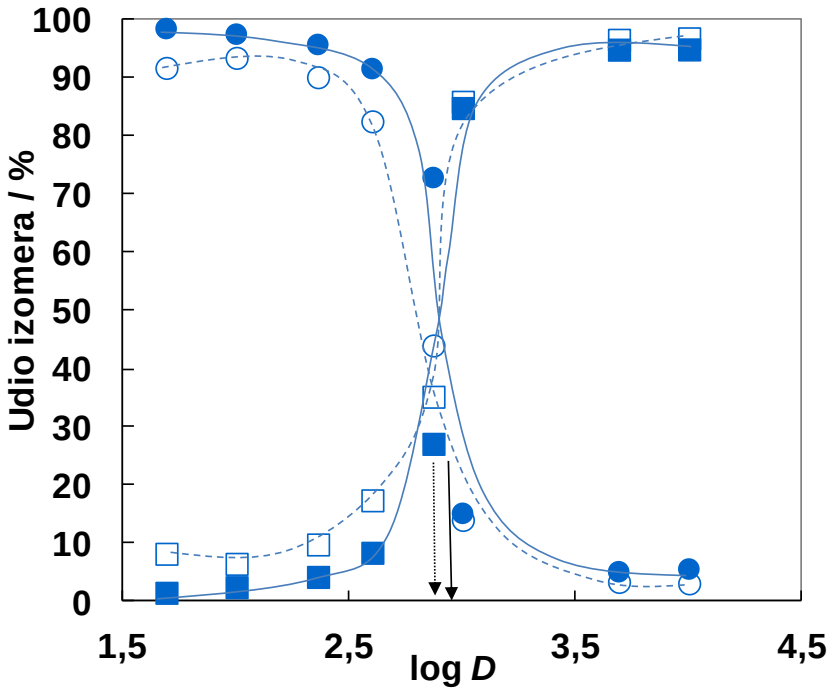
Slika 37. Kinetička stabilnost micele (*sustav A*) i postiradijacijski efekt na formiranje geometrijskih izomera u anaerobnim uvjetima (P = 274,8 Gy/min).
(○,Δ,□) *sustav A* (ozračen dozom od 200 Gy); (○,Δ,□) *sustav A* (bez zračenja)
Nestajanje 9*c*,12*c*-18:2 (○,○), nastajanje 9*t*,12*c*-18:2 + 9*c*,12*t*-18:2 (Δ,Δ), nastajanje 9*t*,12*t*-18:2 (□,□).
Micele LiH: c(Tween®-20) = 2,8 × 10^{-4} mol dm^{-3}, c(LiH) = 5,0 × 10^{-4} mol dm^{-3}, c(2–ME) = 2,8 × 10^{-3} mol dm^{-3}, c(NaH_2PO_4) = 5,0 × 10^{-3} mol dm^{-3}, pH = 5.

4.2.8. Utjecaj visokih doza zračenja na procese peroksidacije i izomerizacije linolne kiseline

Premda nemaju biološki značaj za žive organizme, procesi lipidne peroksidacije i geometrijske izomerizacije u *sustavima A* i *B* su istraženi primjenom većih doza i do 10 kGy kod brzine doze od 274,8 Gy/min. I u kontrolnoj miceli i *sustavu B* u anaerobnim uvjetima propagacija lipidne peroksidacije se odvija brzo do 400 Gy (Slika 38). Daljnjim povećanjem doze zračenja do 10 kGy počinje prevladavati faza terminacije. Istovremeno, proces izomerizacije inhibiran je u oba sustava do 400 Gy. Nestajanje *cis*-izomera praćeno je uz nastajanje *trans*-izomera pri čemu su *trans*-izomeri dosegli maksimum iznad 1 kGy (Slika 39).

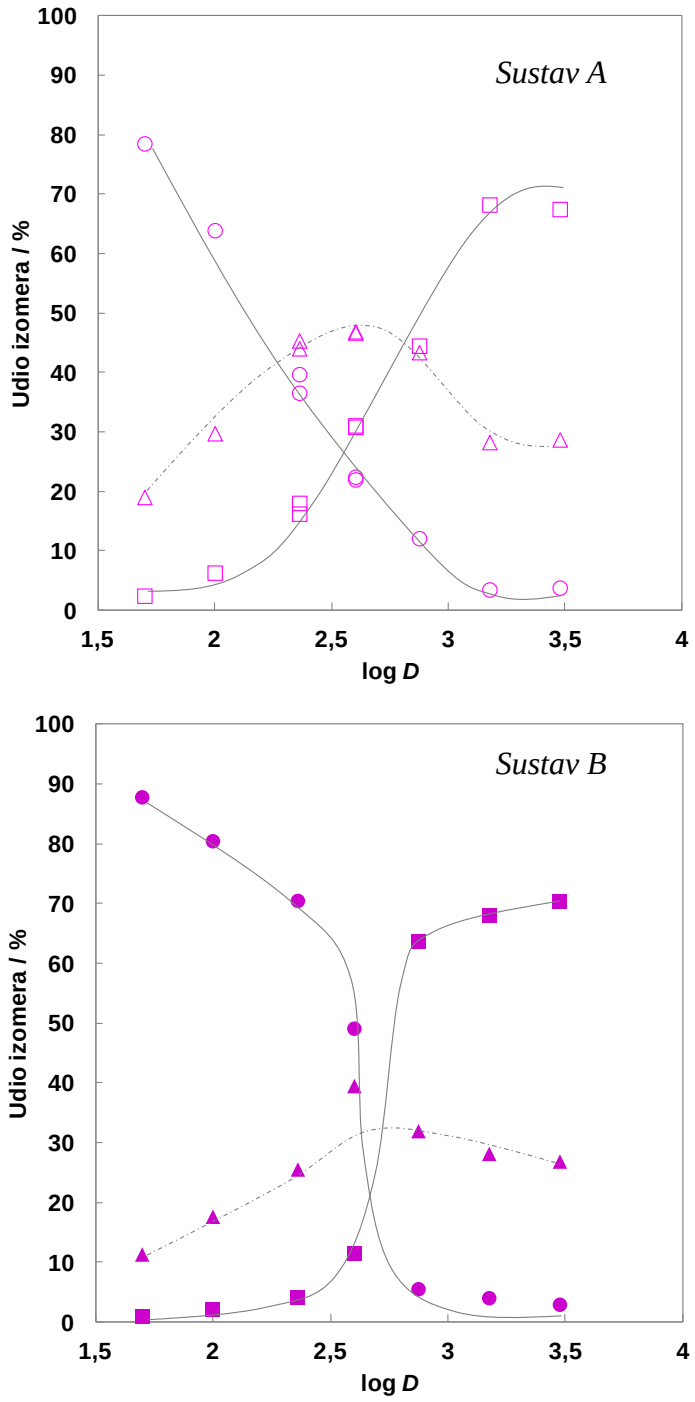


Slika 38. Utjecaj visokih doza zračenja na formiranje LiOOH u *sustavu A* i *sustavu B*, u aerobnim uvjetima (P = 274, 8 Gy/min).
(○) *sustav A*; (●) *sustav B*; (♦) kontrola LiH (bez 2–ME)
Micele LiH: c(Tween®-20) = 2,8 × 10^{-4} mol dm^{-3}, c(LiH) = 5,0 × 10^{-4} mol dm^{-3}, c(2–ME) = 2,8 × 10^{-3} mol dm^{-3}, c(NaH_2PO_4) = 5,0 × 10^{-3} mol dm^{-3}, pH = 5.



Slika 39. Utjecaj visokih doza zračenja na raspodjelu izomera u *sustavu A* (prazni simoli) i *B* (puni simboli) u aerobnim uvjetima (*P* = 274, 8 Gy/min).
Nestajanje 9*c*,12*c*-18:2 (○,●), nastajanje 9*t*,12*c* -18:2 + 9*c*,12*t* + 9*t*,12*t*-18:2 (□,■).
Micele LiH: *c*(Tween®-20) = 2,8 × 10^{-4} mol dm^{-3}, *c*(LiH) = 5,0 × 10^{-4} mol dm^{-3}, *c*(2–ME) = 2,8 × 10^{-3} mol dm^{-3}, *c*(NaH_2PO_4) = 5,0 × 10^{-3} mol dm^{-3}, pH = 5.

Očekivano, inducirana peroksidacija LiH, u anaerobnim uvjetima do 3 kGy je bila ispod granice detekcije. Međutim, u navedenim eksperimentalnim uvjetima izomerizacija je bila predominantan proces u oba sustava (Slika 40). U *sustavu B*, gdje je 2–ME inkorporiran u micelu, vidljivo je da u usporedbi sa *sustavom A* dolazi do inhibicije radikalima-inducirane izomerizacije (Slika 40). Dobiveni rezultati se mogu protumačiti s hvatanjem tiilnih radikala u unutrašnjosti micele čime je onemogućena njihova adicija na dvostruku vezu masne kiseline. Drugi mogući razlog je i to da i ako dođe do stvaranja adukta radikala u adicijsko-eliminacijskom procesu, proces rotacije adukta u unutrašnjosti micele može biti ograničen.



Slika 40. Utjecaj visokih doza zračenja na raspodjelu izomera u *sustavu A* i *B* u anaerobnim uvjetima (*P* = 274, 8 Gy/min).
Nestajanje 9*c*,12*c*-18:2 (●,○), nastajanje 9*t*,12*c*-18:2 + 9*c*,12*t*-18:2 (▲,Δ), nastajanje 9*t*,12*t*-18:2 (■,□)
Micele LiH: *c*(Tween®-20) = 2,8 × 10^{-4} mol dm^{-3}, *c*(LiH) = 5,0 × 10^{-4} mol dm^{-3}, *c*(2–ME) = 2,8 × 10^{-3} mol dm^{-3}, *c*(NaH_2PO_4) = 5,0 × 10^{-3} mol dm^{-3}, pH = 5.

4.3. Antioksidansi u modelnom sustavu linolne kiseline

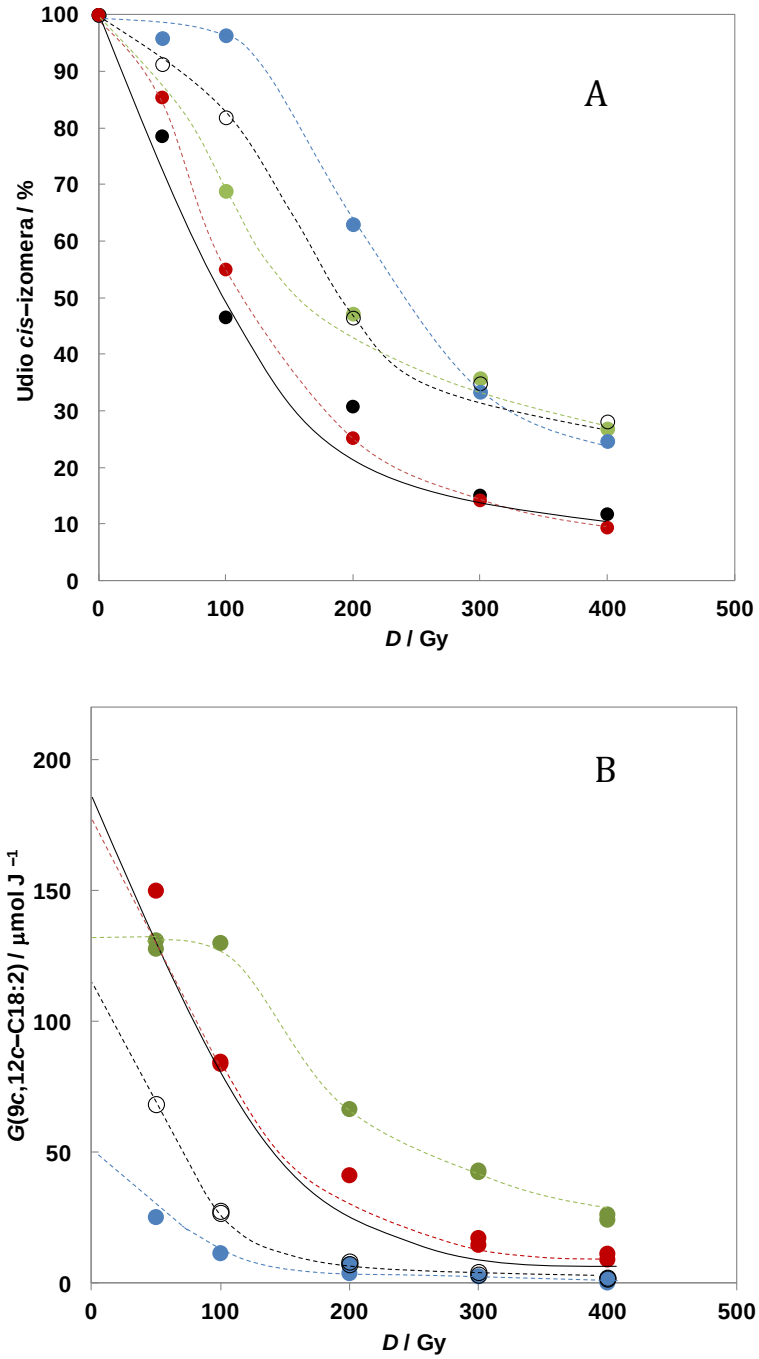
Antioksidacijska svojstva različitih prirodnih i sintetiziranih spojeva bila su predmet mnogih istraživanja zbog svoje važne uloge u radikalskim procesima. Djelovanja antioksidansa ispitivana su prvenstveno u homogenim otopinama, kako u vodenim tako i organskim otapalima.[127,128] Međutim, za očekivati je da je djelotvornost pojedinog antioksidansa odnosno da se mehanizmi reakcija s radikalima u homogenim otopinama razlikuju od onih u složenijim sustavima, micelama i liposomima te biološkim sustavima.[129]

U ovom radu modelni lipidni sustav je istražen u prisustvu spojeva za koje je poznato da posjeduju antioksidacijska svojstva. Cilj ovog dijela rada bio je pratiti procese peroksidacije i *cis, trans*-izomerizacije LiH u sustavima opisanim u prethodnom poglavlju 4.2. U živim organizmima, koncentracije antioksidansa su obično puno niže od koncentracija supstrata, međutim značajno mogu odgoditi ili usporiti njegovu oksidaciju. Kako bi se što više približili biološkim sustavima upotrebljeni su askorbinska kiselina (AscH), α-tokoferol (α-TOH) i resveratrol (ResOH) u svojim biološki relevantnim koncentracijama reda veličine 10^{-5} mol dm^{-3}. Istražen je utjecaj dodatka pojedinačnog antioksidansa na procese lipidne peroksidacije, s posebnom pažnjom usmjerenom i na pojavu procesa geometrijske izomerizacije koja do sada nije bila praćena paralelno s peroksidacijom lipida.

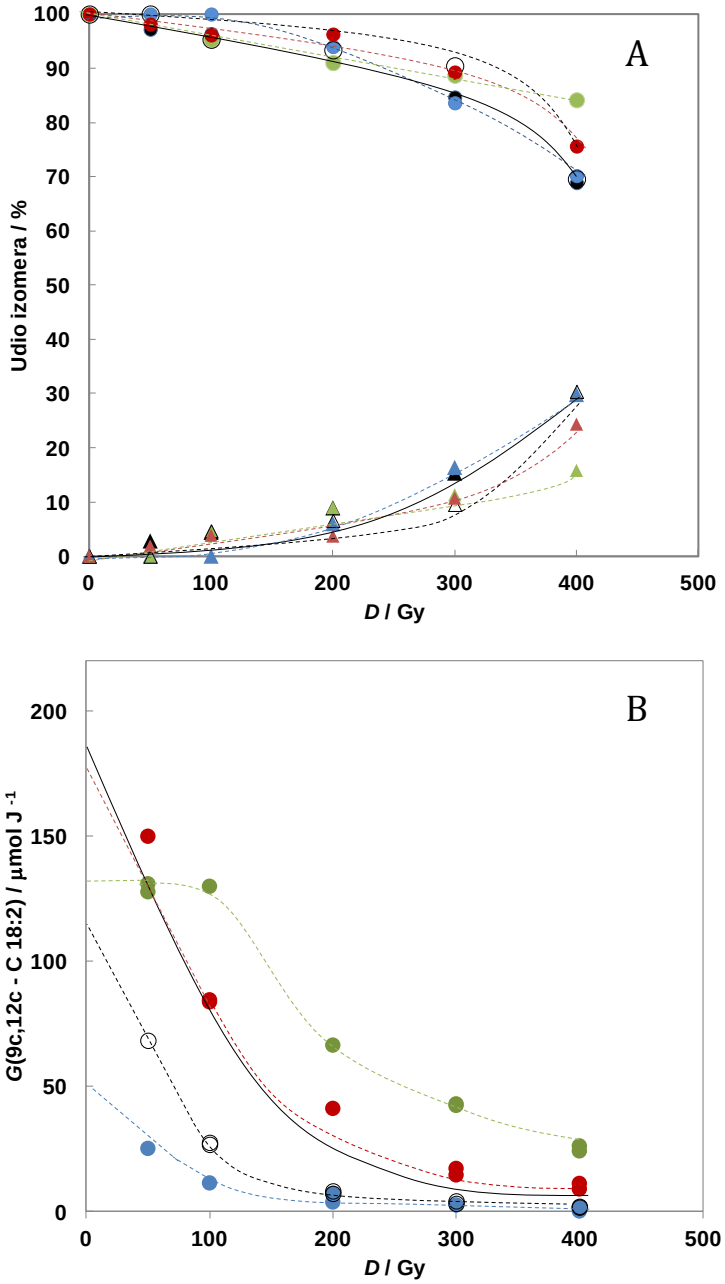
U odabiru vrste antioksidansa za rad u miješanim micelama posebna pažnja je posvećena svojstvu topljivosti antioksidansa u vodi odnosno u lipidima, važnim glavnim gradivnim spojevima bioloških membrana. Poznato je da AscH ima hidrofilni karakter, α-TOH hidrofobni, a ResOH je posebno zanimljiv zbog svog amfifilnog karaktera.

Kao i u prethodnim istraživanjima procesa *cis, trans*-izomerizacije u modelnim lipidnim sustavima kao mjera njezine učinkovitosti na dvostruku vezu LiH odabrano je mjerenje nestajanja prirodne 9*c*, 12*c*-konfiguracije LiH. Na slici 41 prikazana je dozna ovisnost nestajanja LiH uz AscH, α–TOH i ResOH o dozi zračenja, u anaerobnim uvjetima. Od upotrebljenih antioksidansa AscH se pokazala kao najdjelotvorniji inhibitor radijacijski inducirane *trans*-izomerizacije inicirane u prisustvu 2–ME. Nešto slabiji efekt je primjećen dodatkom smjese AscH i α-TOH dok je u slučaju dodavanja ResOH djelotvornost izomerizacije gotovo jednaka kao i u kontrolnoj miceli.

I u uvjetima u kojima su uzorci bili u ravnoteži sa zrakom (Slika 42) AscH se također pokazala kao najefikasniji anti-izomerizirajući agens. Iz ovisnosti radijacijsko-kemijskog prinosa nestajanja 9*c*,12*c*-C18:2 u ovisnosti o dozi zračenja u *sustavu A* pokazala se mjera učinkovitosti pojedinačnog antioksidansa. Ekstrapolacijom vrijednosti na nultu dozu dobivena je G_0-vrijednost AscH koja je dva puta niža od vrijednosti dobivene u sustavu bez antioksidansa, u kontrolnoj miceli LiH. Ekstrapolirane *G*-vrijednosti dobivene za ostale antioksidanse su još veće nego za AscH. Nastajanje geometrijskih izomera s dodatkom ResOH je bilo zanemarivo malo. Dobiveni rezultati su pokazali da su $RS^{\bullet}$ radikali koji su kontrolirano generirani u modelnom lipidnom sustavu inicirali izomerizaciju na dvostrukoj vezi LiH u navedenim eksperimentalnim uvjetima, AscH nije najefikasniji anti-izomerizirajući u hvatanju tiilnih radikala, ali je djelotvorniji od TOH, ResOH te smjese AscH i α-TOH.



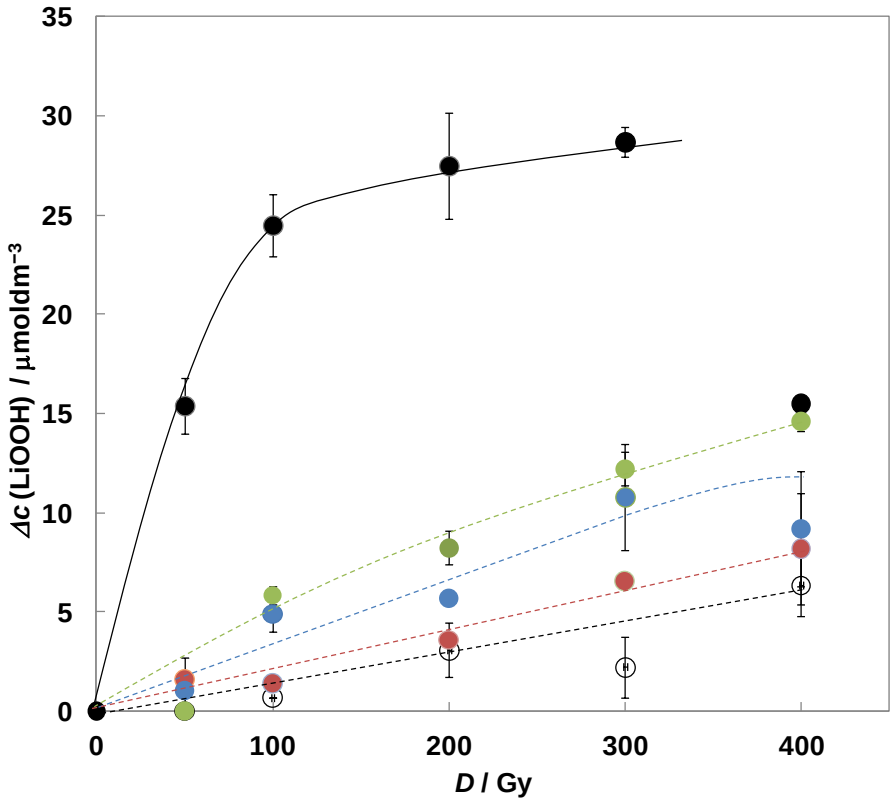
Slika 41. (A) Utjecaj doze zračenja na nestajanje *cis*-izomera LiH u *sustavu A* u anaerobnim uvjetima uz dodatak antioksidansa (P = 274,8 Gy/min).
(B) Radijacijsko-kemijski prinos nestajanja 9*c*,12*c*-C18:2 u ovisnosti o dozi zračenja.
(—●—) kontrola (micela LiH) bez dodatka antioksidansa, (●) c(AscH) = 60 μmol dm^{-3};
(●) c(ResOH) = 80 μmol dm^{-3}; (●) c(α-TOH) = 50 μmol dm^{-3}; (○) c(α-TOH) = 50 μmol dm^{-3} + c(AscH) = 60 μmol dm^{-3}.
Micele LiH: c(Tween®-20) = 2,8 × 10^{-4} mol dm^{-3}, c(LiH) = 5,0 × 10^{-4} mol dm^{-3}, c(2–ME) = 2,8 × 10^{-3} mol dm^{-3}, c(NaH_2PO_4) = 5,0 × 10^{-3} mol dm^{-3}, pH = 5.



Slika 42. (A) Utjecaj doze zračenja na nestajanje *cis*-izomera (gornje krivulje odgovarajuće boje simbola) i nastajanje svih *trans*-izomera (donje krivulje odgovarajuće boje simbola) u aerobnim uvjetima uz dodatak antioksidansa u *sustav A;*
(B) Radijacijsko-kemijski prinos nestajanja 9*c*,12*c*-C18:2 u ovisnosti o dozi zračenja.
(—●) kontrola (micela LiH) bez dodatka antioksidansa (●) *c*(AscH) = 60 µmol dm^{-3};
(●) *c*(ResOH) = 80 µmol dm^{-3}; (●) *c*(α-TOH) = 50 µmol dm^{-3};
(○) *c*(α-TOH) = 60 µmol dm^{-3} + *c*(AscH) = 50 µmol dm^{-3}.
Micele LiH: *c*(Tween®-20) = 2,8 × 10^{-4} mol dm^{-3}, *c*(LiH) = 5,0 × 10^{-4} mol dm^{-3}, *c*(2–ME) = 2,8 × 10^{-3} mol dm^{-3}, *c*(NaH_2PO_4) = 5,0 × 10^{-3} mol dm^{-3}, pH = 5; *P* = 274,8 Gy/min.

Ispitivanjem utjecaja antioksidansa na nastajanje LiOOH potvrđena su dobro znana antioksidacijska svojstva svih upotrebljenih spojeva.[81] Dodavanjem pojedinačnog antioksidansa u sustav kontrolne micele LiH (bez 2–ME) inhibicija lipidne peroksidacije je učinkovita, a s dodatkom 2–ME je inhibicija još izrazitija.

Praćenjem nastajanja LiOOH u micelama LiH potvrđen je antioksidacijski karakter α-TOH, a u prisutnosti smjese α-TOH i AscH inhibicija oksidacije LiH je bila još izraženija (Slika 43). Unatoč njegovom snažnom antioksidacijskom djelovanju i biološkom značaju ovog djelovanja opisanog u brojnoj literaturi, nalaze se i rezultati koji pokazuju antioksidacijsku aktivnost α-TOH manju u odnosu na ostale prirodne antioksidanse.[129,130,131]

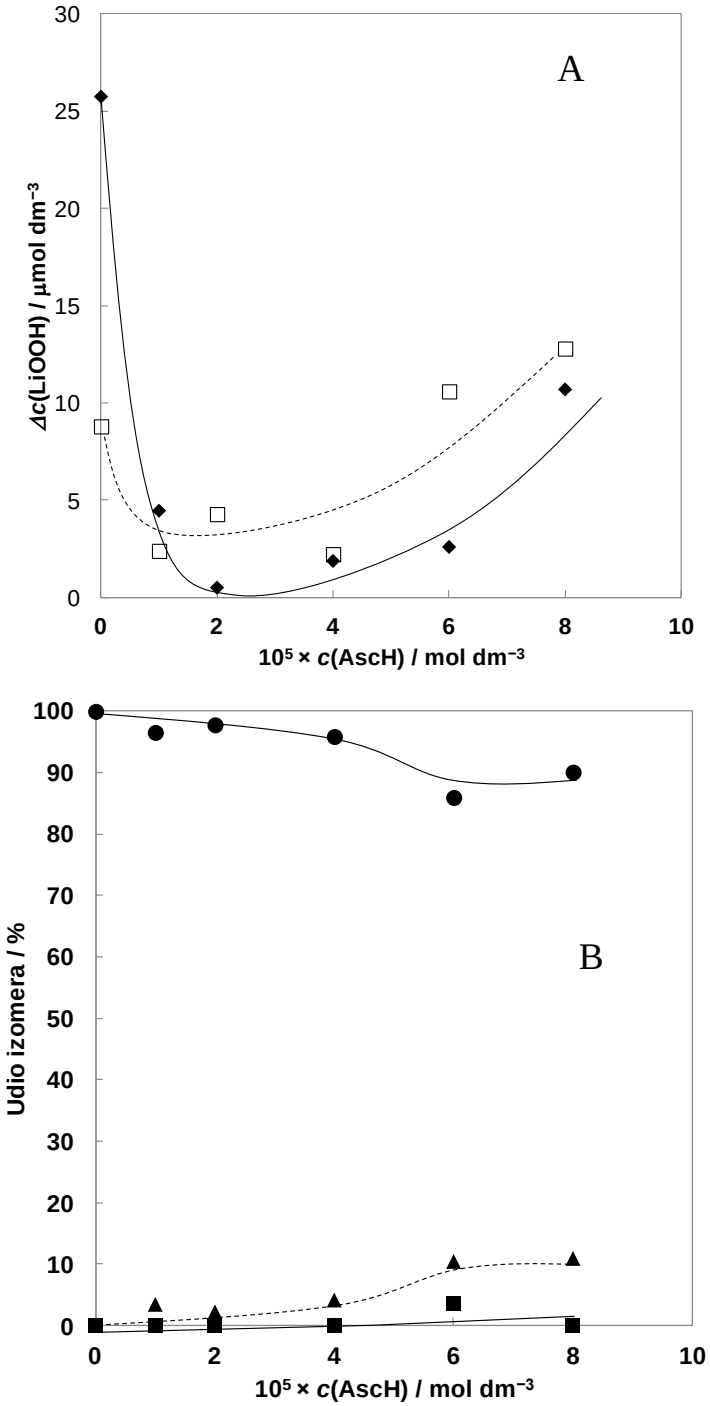


Slika 43. Utjecaj doze zračenja na formiranje LiOOH u *sustavu A*, u aerobnim uvjetima uz dodatak prirodnih antioksidansa (*P* = 274, 8 Gy/min).
(●) kontrola (micela LiH) bez dodatka antioksidansa (●) *c*(AscH) = 60 μmol dm^{-3};
(●) *c*(ResOH) = 80 μmol dm^{-3}; (●) *c*(α-TOH) = 50 μmol dm^{-3};
(○) *c*(α-TOH) = 50 μmol dm^{-3} + *c*(AscH) = 60 μmol dm^{-3}.
Micele LiH: *c*(Tween®-20) = 2,8 × 10^{-4} mol dm^{-3}, *c*(LiH) = 5,0 × 10^{-4} mol dm^{-3}, *c*(2–ME) = 2,8 × 10^{-3} mol dm^{-3}, *c*(NaH_2PO_4) = 5,0 × 10^{-3} mol dm^{-3}, pH = 5.

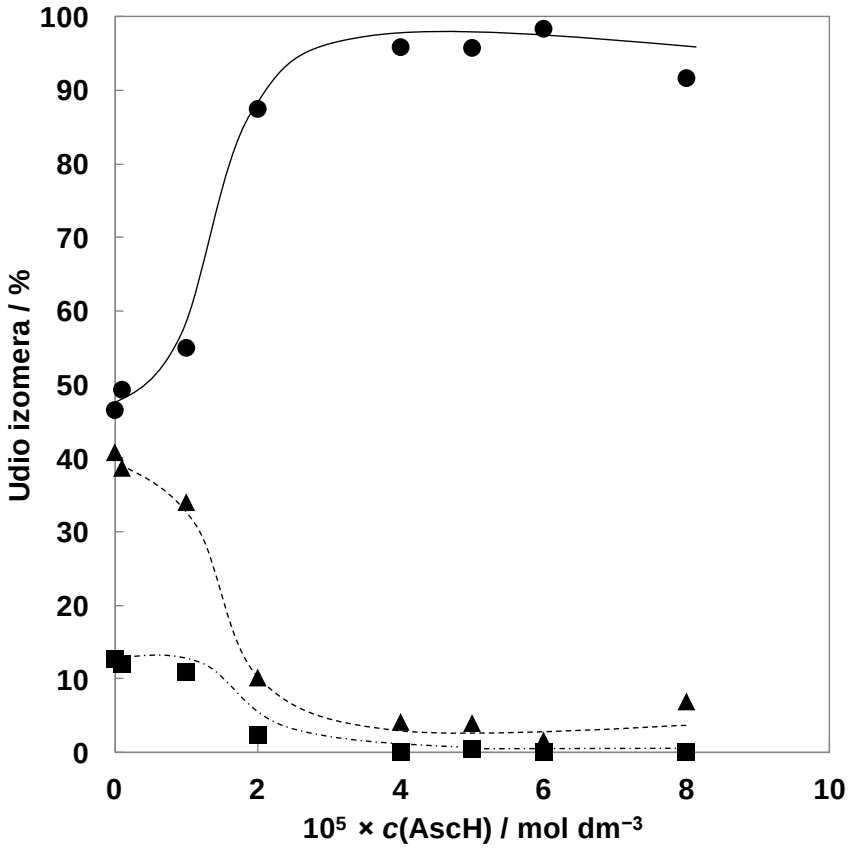
Upotrebom smjese α-TOH i AscH potvrđen je sinergistički efekt koji je već dobro poznat i razjašnjen u biološkim sustavima.[132,133] Poznavajući različite afinitete AscH i α-TOH prema vodi, očekivalo bi se da u biološkim uvjetima neće doći do interakcije između ovih spojeva. Međutim, fenolna skupina u α-TOH u biološkim membranama smješta se na međupovršini voda/lipid pri čemu je olakšana reakcija tokoferoloksil radikala α-TO$^{\bullet}$ i askorbata. S jedne strane α-TOH pomaže terminaciji lipidnih peroksilnih radikala, dok s druge strane ion askorbata štiti membrane od prooksidativnog djelovanja novonastalih α-TO$^{\bullet}$ ponovno stvarajući α-TOH. Iako su izvedena mnoga mjerenja konstante brzine ove reakcije u različitim uvjetima i sustavima otapala, procjenjuje se da je $k = 2 \times 10^5$ dm^3 mol^{-1} s^{-1} najbliža za reakciju α-TO$^{\bullet}$ s AscH u biološkim membranama. Ovakvo zajedničko djelovanje TOH i AscH na inhibiciju propagacije radikala pronađeno je u liposomima,[82,85,133] a rezultati u našim micelama LiH dodatno potvrđuju ovaj efekt.

Variranjem koncentracije AscH u micelama utvrđen je njegov antioksidacijski efekt u koncentracijskom području od 1×10^{-5} do 3×10^{-5} mol dm^{-3}. Međutim, s daljnjim porastom koncentracija AscH postiže se obrnuti, prooksidativni efekt (Slika 44 A). Antioksidacijski efekt je pojačan s dodanim 2–ME, u čijem prisustvu je nastajanje LiOOH inducirano kod koncentracije do 5×10^{-5} mol dm^{-3} AscH, nakon koje se ponovo uočava propagacija. Analizom geometrijskih izomera uočena je inhibicija izomerizacije u širokom području koncentracija AscH do 5×10^{-5} mol dm^{-3} (Slika 44 B). U anaerobnim uvjetima (Slika 45), gdje znamo da se proces lipidne peroksidacije ne odvija, a geometrijska izomerizacija je dominantna, mala koncentracija AscH (1×10^{-5} mol dm^{-3}) efikasno inhibira nastajanje geometrijskih izomera. Na temelju literaturnih podataka o vrijednostima konstanti brzina, reakcija AscH s radikalima je brza.[82] Konstante brzine reakcije RS$^{\bullet}$ (dobiven iz cisteamina, cisteina i glutationa) i askorbata izmjerene su pulsnom radiolizom direktnim praćenjem nastajanja askorbil radikala i iznose $\approx 10^9$ dm^3 mol^{-1} s^{-1}. [134] Također je poznato da su RS$^{\bullet}$ umjereni oksidansi (npr. E ($HOCH_2CH_2S^{\bullet}$, H^+ / $HOCH_2CH_2SH$) = 1,3 V) i oksidiraju askorbat u askorbil radikal koji potom terminira reakcijom disproporcioniranja ($k = 10^6$ dm^3 mol^{-1} s^{-1}). S obzirom na dobru topljivost AscH u vodenoj fazi, te na osnovu ovih rezultata može se pretpostaviti da u modelnom sustavu LiH koji se rabi u ovom radu dolazi do brze reakcije između AscH i RS$^{\bullet}$ u hidrofilnom dijelu micele pri čemu je većini RS$^{\bullet}$ onemogućena difuzija

do dvostruke veze u hidrofobnom dijelu micele te se time proces izomerizacije ne može pokrenuti.



Slika 44. Utjecaj koncentracije AscH na nastajanje LiOOH i geometrijskih izomera u *sustavu A*, ozračivanjem dozom od 100 Gy u aerobnim uvjetima (P = 274, 8 Gy/min).
A) LiOOH: (□) LiH + AscH; (♦) LiH + AscH +2–ME
B) geometrijskih izomera-18:2: (●) 9*c*,12*c*, (▲) 9*t*,12*c* + 9*c*,12*t*, (■) 9*t*,12*t*,
Micele LiH: c(Tween®-20) = 2,8 × 10^{-4} mol dm^{-3}, c(LiH) = 5,0 × 10^{-4} mol dm^{-3}, c(2–ME) = 2,8 × 10^{-3} mol dm^{-3}, c(NaH_2PO_4) = 5,0 × 10^{-3} mol dm^{-3}, pH = 5.

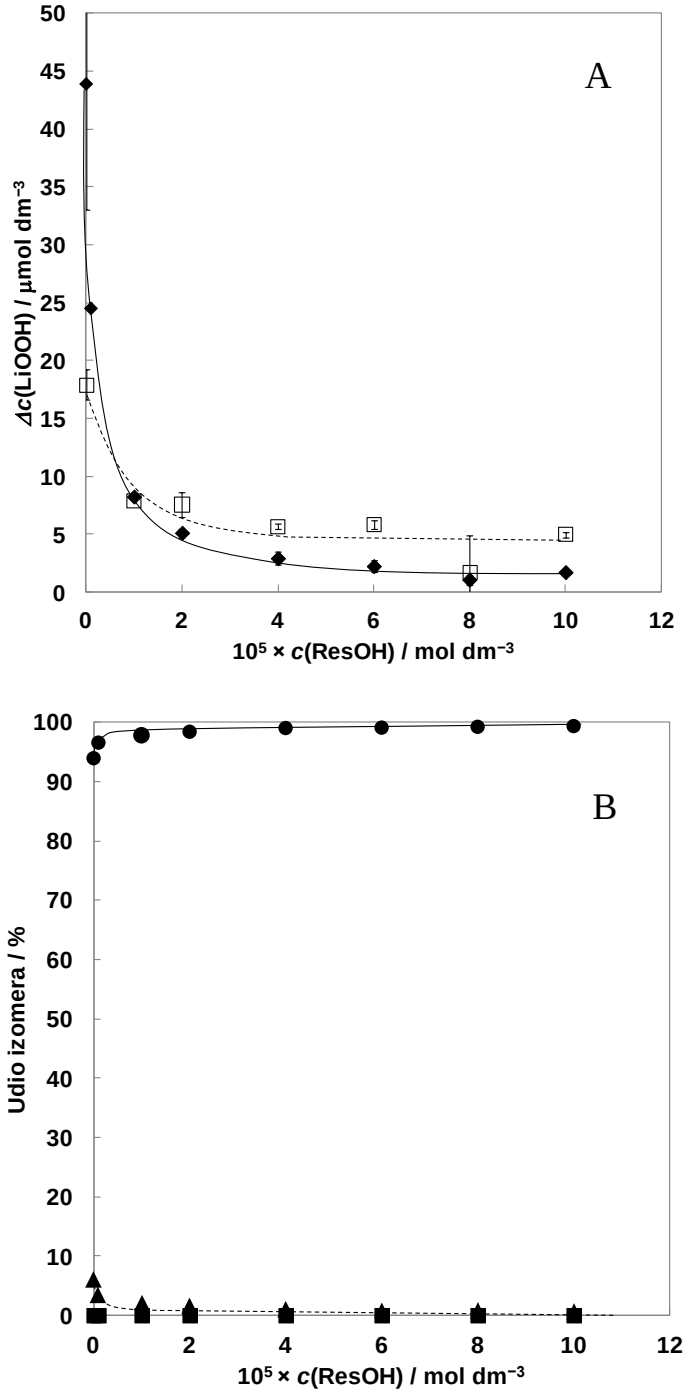


Slika 45. Utjecaj koncentracije AscH na nastajanje geometrijskih izomera u *sustavu A,* ozračivanjem dozom od 100 Gy u anaerobnim uvjetima (*P* = 274, 8 Gy/min).
(●) 9*c*,12*c*-18:2, (▲) 9*t*,12*c*-18:2 + 9*c*,12*t*-18:2, (■) 9*t*,12*t*-18:2 ,
Micele LiH: *c*(Tween®-20) = 2,8 × 10^{-4} mol dm^{-3}, *c*(LiH) = 5,0 × 10^{-4} mol dm^{-3}, *c*(2–ME) = 2,8 × 10^{-3} mol dm^{-3}, *c*(NaH_2PO_4) = 5,0 × 10^{-3} mol dm^{-3}, pH = 5.

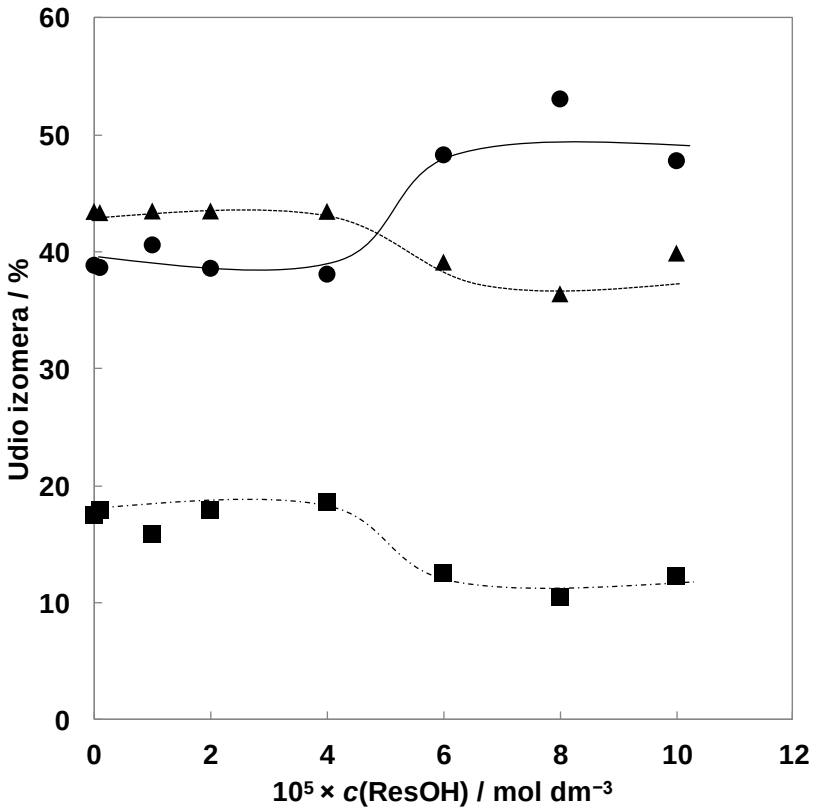
Mehanizam djelovanja prirodnih polifenola ovisi o strukturi, ali i o njihovom međudjelovanju s lipidima. Zahvaljujući kemijskoj strukturi polifenolima je olakšan ulazak u međumembranski prostor gdje imaju ulogu hvatača radikala i na taj način štite stanicu od radikalskog stresa. Za stilbene, kao što je ResOH, karakteristično je da se povezuje s polarnim glavama lipida dok je za njegove glikozilirane derivate utvrđeno da imaju sposobnost difuzije prema unutrašnjosti membrane.[135] Iz literature je poznato da se njegova potencijalna antioksidacijska aktivnost osniva na mehanizmu apstrakcije H-atoma iz –OH skupina slobodnim radikalom; za razliku od meta–OH skupina, najreaktivnija je ona u para- odnosno

4'-poziciji (Slika 9).[136] Resveratrol je posebno zanimljiv zbog svoje stilbenske strukture, odnosno prisutne dvostruke veze između dva fenola koja je podložna izomerizaciji.

U našem modelnom sustavu utvrđeno je da ResOH djelotvorno inhibira proces lipidne peroksidacije; već kod najmanje koncentracije od 5 μmol dm^{-3} je izražen snažan antioksidacijski karakter ResOH (Slika 46 A). Također, iako je u aerobnim uvjetima *cis, trans*-izomerizacija mala, opažena je njezina sve manja zastupljenost s povećanjem koncentracije ResOH. U uvjetima bez kisika anti-izomerizirajući efekt počinje biti izražen u području $5 \times 10^{-5} – 1 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3} ResOH (Slika 47).



Slika 46. Utjecaj koncentracije resveratrola na nastajanje:
A) LiOOH
(□) micela LiH + ResOH; (♦) micela LiH + ResOH +2–ME
B) geometrijskih izomera
(●) 9*c*,12*c*-18:2, (▲) 9*t*,12*c*-18:2 + 9*c*,12*t*-18:2, (■) 9*t*,12*t*-18:2 ,
u *sustavu A,* ozračivanjem dozom od 100 Gy u aerobnim uvjetima, (*P* = 274, 8 Gy/min). Micele LiH: *c*(Tween®-20) = 2,8 × 10^{-4} mol dm^{-3}, *c*(LiH) = 5,0 × 10^{-4} mol dm^{-3}, *c*(2–ME) = 2,8 × 10^{-3} mol dm^{-3}, *c*(NaH_2PO_4) = 5,0 × 10^{-3} mol dm^{-3}, pH = 5.



Slika 47. Utjecaj koncentracije resveratrola na nastajanje geometrijskih izomera u *sustavu A*, ozračivanjem dozom od 100 Gy u anaerobnim uvjetima (P = 274, 8 Gy/min).
(●) 9*c*,12*c*-18:2, (▲) 9*t*,12*c*-18:2 + 9*c*,12*t*-18:2, (■) 9*t*,12*t*-18:2 ,
Micele LiH: c(Tween®-20) = 2,8 × 10^{-4} mol dm^{-3}, c(LiH) = 5,0 × 10^{-4} mol dm^{-3}, c(2–Me) = 2,8 × 10^{-3} mol dm^{-3}, c(NaH_2PO_4) = 5,0 × 10^{-3} mol dm^{-3}, pH = 5.

U tablici 12 prikazani su rezultati mjerenja geometrijskih izomera u prisustvu 2–ME u anaerobnim uvjetima uz inicijaciju dozom zračenja od 100 Gy. Vidljivo je da ResOH usporava reakciju izomerizacije dvostruke veze, ali ne tako djelotvorno kao AscH. Upotrebom smjese navedenih antioksidansa učinkovito je inhibiran proces izomerizacije, ali s neznatno manjom efikasnošću od djelovanja same AscH.

Tablica 12. Učinkovitost antioksidansa na raspodjelu geometrijskih izomera (%, u anaerobnim uvjetima) inicijacijom procesa kod doze 100 Gy, P = 274,8 Gy/min. Micele LiH: c(Tween®-20) = 2,8 × 10^{-4} mol dm^{-3}, c(LiH) = 5,0 × 10^{-4} mol dm^{-3}, c(2–ME) = 2,8 × 10^{-3} mol dm^{-3}, c(NaH_2PO_4) = 5,0 × 10^{-3} mol dm^{-3}, pH = 5.

100 Gy, Anaerobni uvjeti	**Udio izomera/%**		
	9*t*,12*t*	**9*c*,12*t*+9*t*,12*c***	**9*c*,12*c***
LiH	17,5	43,5	38,9
LiH + 100 μmol dm^{-3} ResOH	12,3	39,9	47,8
LiH + 60 μmol dm^{-3} AscH	0	1,6	98,4
LiH + 100 μmol dm^{-3} ResOH + 60 μmol dm^{-3} AscH	1,7	10,9	88,2

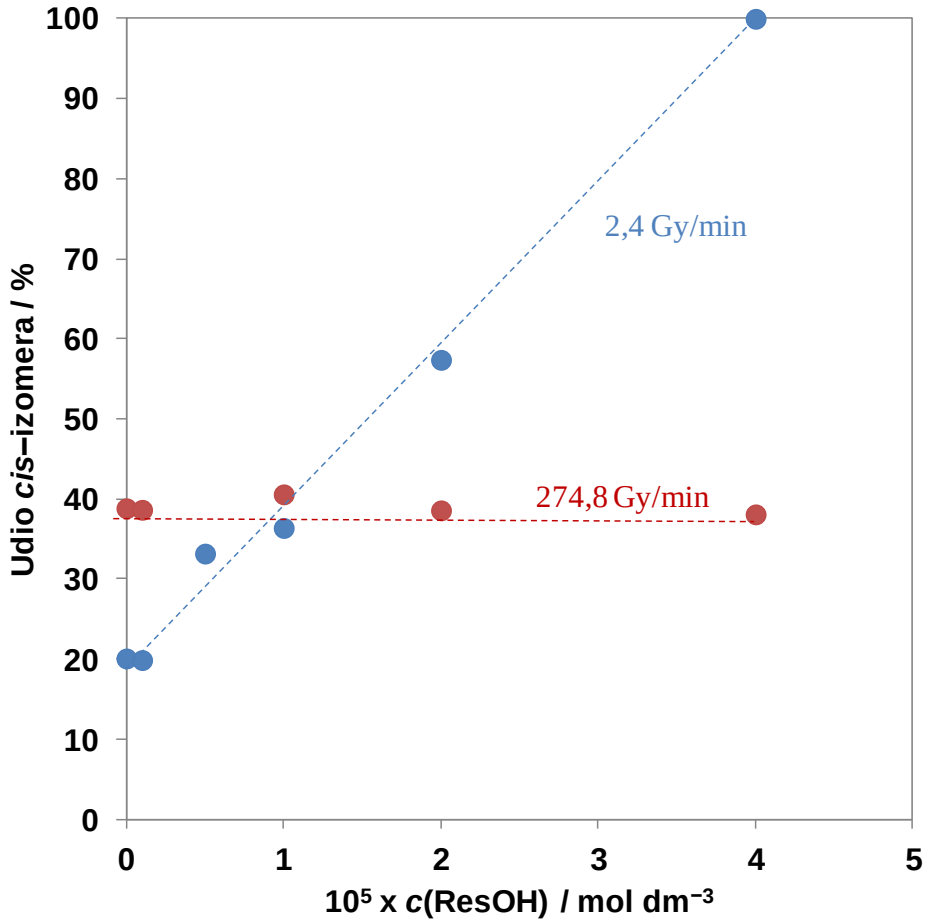
U opisanim optimalnim eksperimentalnim uvjetima primjenom ionizirajućeg zračenja kod najveće moguće brzine doze od 274,8 Gy/min ResOH nije značajnije utjecao na usporavanje procesa izomerizacije, kako u aerobnim tako i anaerobnim uvjetima. Međutim, promjenom brzine doze zračenja dobiveni su značajno drugačiji rezultati (Slika 50).

Na slici 48 je vidljiv linearan porast nastajanja *cis, cis*-izomera s porastom koncentracije ResOH u modelnom sustavu micela LiH u anaerobnim uvjetima i kod manje doze od 2,4 Gy/min, dok je kod stostruko veće brzine doze udio *cis*-izomera gotovo nepromijenjen u širokom području upotrebljenih koncentracija ResOH. Ovaj rezultat pokazuje da se zračenjem kod manje brzine doze generiraju predominantni $RS^{\bullet}$ radikali sposobni za inicijaciju *cis, trans*-izomerizacije i reakciju s ResOH koji ih sa svojom sve većom koncentracijom efikasno hvata sprječavajući njihov napad na dvostruku vezu LiH. Kod velike brzine doze velika koncentracija radikala nastala u kratkom vremenu sudjeluje učinkovito u *cis, trans*-izomerizaciji, te moguće terminiraju bez utjecaja promjene koncentracije ResOH na njihovo nestajanje.

U aerobnim uvjetima sam ResOH efikasno usporava nastajanje LiOOH kod manje brzine doze. Međutim, kad su prisutni i ResOH i 2–ME u micelama LiH antioksidacijsko djelovanje ResOH je smanjeno (Tablica 13), što upućuje na moguće kompeticijske radikalske reakcije kad je u sustavu nazočan 2–ME.

Ovakvi podaci potvrđuju da ResOH, osim što ima antioksidacijski karakter može i spriječavati proces izomerizacije masnih kiselina.

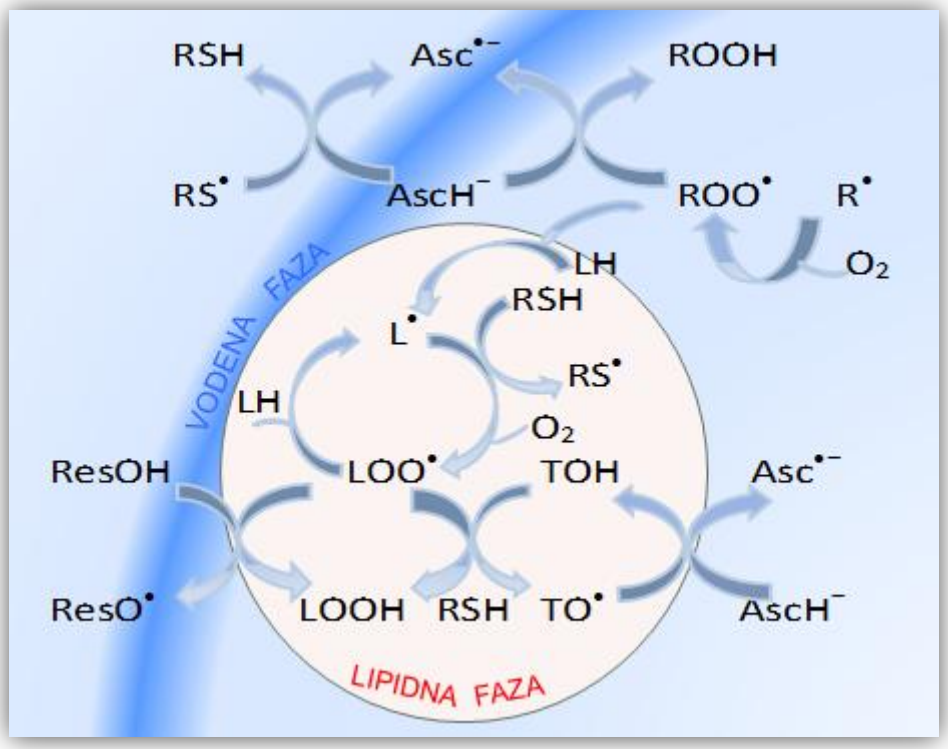
Rezultati dobiveni kod dvije različite brzine doze su vrlo korisni. Općenito, s primjenom različitih brzina doze u istraživanjima zračenjem-induciranih procesa postiže se smanjenje brzine inicijacije koja je jedino mogući kontrolirani parameter kod praćenja procesa. U slučaju zračenjem-inducirane lipidne peroksidacije ovaj je parameter lako postići budući da je dužina kinetičkog lanca inverzno proporcionalna s $\sqrt{P}$ (jednadžba 40). U skladu s ovom relacijom moglo se očekivati da je kod iste doze zračenja koncentracija LiOOH nastalih kod manje brzine za red veličine veća od koncentracije LiOOH nastale kod veće brzine doze. Rezultati prikazani u tablici 13 potvrđuju da je iznos lipidne peroksidacije u skladu s jednadžbom 40. Brzina doze nije značajno utjecala na peroksidaciju LiH uz ResOH. Međutim, rezultati dobiveni s dodatkom 2–ME u sustavu s ResOH pokazuju na značajni udio reakcija tiilnih radikala i njihov doprinos kinetičkoj duljini lanca kod manje brzine doze zračenja. Premda je u aerobnim uvjetima proces *cis, trans*-izomerizacije potisnut, ipak je izmjeren utjecaj male koncentracije ResOH na inhibiranje *cis, trans*-izomerizacije.



Slika 48. Utjecaj koncentracije resveratrola na nastajanje *cis*-izomera u *sustavu A*, kod doze od 100 Gy u **anaerobnim** uvjetima, pri dvije brzine doze.
Micele LiH: c(Tween®-20) = 2,8 × 10^{-4} mol dm^{-3}, c(LiH) = 5,0 × 10^{-4} mol dm^{-3}, c(2–ME) = 2,8 × 10^{-3} mol dm^{-3}, $c(NaH_2PO_4)$ = 5,0 × 10^{-3} mol dm^{-3}, pH = 5.

Tablica 13. Utjecaj brzine doze zračenja na nastajanje LiOOH i geometrijskih izomera u sustavu A, uz dodatak 1×10^{-5} mol dm^{-3} resveratrola, u **aerobnim uvjetima**.
Micele LiH: c(Tween®-20) = $2{,}8 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3}, c(LiH) = $5{,}0 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3}, c(2–ME) = $2{,}8 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3}, c(NaH_2PO_4) = $5{,}0 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3}, pH = 5.

100 Gy; aerobni uvjeti	***P*/Gy min^{-1}**	**Δc(LiOOH)/ μmol dm^{-3}**	**Udio izomera/% 9*c*,12*c*/9*c*,12*t*+9*t*,12*c*/9*t*,12*t***
LiH	2,4	64,8 ± 5,8	100/0/0
LiH + 2–ME		125,0 ± 4,2	100/0/0
LiH + ResOH		9,9 ± 2,1	100/0/0
LiH + ResOH + 2–ME		70,0 ± 10,3	100/0/0
LiH	274,8	16,3 ± 0,8	100/0/0
LiH + 2–ME		24,5 ± 1,7	93,5/6,1/0,4
LiH + ResOH		7,9 ± 0,9	100/0/0
LiH + ResOH + 2–ME		8,2 ± 0,4	97,8/2,2/0



Shema 12. Shematski prikaz djelovanja različitih antioksidansa u miješanim micelama

Vodena i lipidna faza u micelama predstavljaju dva različita reakcijska odjeljka u nehomogenim sustavima (Shema 12). Postoji nekoliko čimbenika o kojima treba voditi računa prilikom istraživanja reaktivnosti slobodnih radikala. Vrlo je važno područje u kojem dolazi do inicijacije, odnosno reakcijsko mjesto na kojem započinje stvaranje početnih radikalskih vrsta. U ovom radu je upotrebljena metoda inicijacije γ-zračenjem za koju je poznato da se generiraju primarne vrste u radiolizi vode. Drugi važan čimbenik je položaj dvostrukih veza masnih kiselina, položaj tiola i antioksidansa u miješanim micelama.

Ispitivanjem utjecaja različitih antioksidansa može se zaključiti da u aerobnim uvjetima antioksidansi s većim afinitetom prema vodi učinkovito hvataju peroksilne radikale nastale u lančanom procesu lipidne peroksidacije, ali i da sudjeluju u reakciji s tiilnim radikalima te na taj način istovremeno imaju i anti-izomerizirajuće svojstvo. 2–ME je amfifilan tiol koji ima veću sposobnost difuzije iz vodene faze u lipidnu i obrnuto. AscH se u miješanim micelama pokazala kao dobar antioksidans, ali i da efikasno hvata nastale tiilne radikale. Sinergistički efekt u inhibiciji lipidne peroksidacije izražen je u opisanom modelnom

lipidnom sustavu uz AscH i α-TOH, ali pri istim uvjetima inhibicija izomerizacije je manje djelotvorna nego kad je prisutna samo AscH. Između ispitivanih spojeva amfifilni ResOH se pokazao kao najdjelotvorniji antioksidans, ali bez značajnog utjecaja na usporavanje procesa izomerizacije pri istim eksperimentalnim uvjetima.

U uvjetima ravnoteže sa zrakom antioksidacijski efekt ispitivanih spojeva raste kako prikazuje niz:

$$\alpha\text{-TOH} < \text{AscH} < \text{ResOH} \cong \text{smjesa AscH i TOH.}$$

U uvjetima bez zraka proces *trans*-izomerizacije dvostruke veze LiH smanjuje se u nizu:

$$\text{ResOH} < \alpha\text{–TOH} < \text{smjesa AscH i } \alpha\text{-TOH} < \text{AscH.}$$

U ovom radu značajan je rezultat kojim je pokazano da je ResOH snažan anti-izomerizirajući agens u modelnom sustavu LiH kod male brzine doze zračenja. Ovime su se istraživanja utjecaja ResOH na procese peroksidacije i geometrijske izomerizacije u modelnim lipidnim sustavima približila biološkim sustavima i uvjetima u kojima se oni nalaze u stanjima radikalskog stresa.

Iz literature je poznato da je antioksidacijska aktivnost prirodnih antioksidansa smanjena u micelama i liposomima u odnosu na homogene otopine.[137,138,139] Rezultati istraživanja lipidne peroksidacije i geometrijske izomerizacije u micelama kao najjednostavnijim modelima nam daju uvid u procese koji se odvijaju *in vivo*. Predmet daljnjih istraživanja bit će vrednovanje ovih procesa u složenijim modelnim sustavima bližim biološkim membranama kao npr. liposomima.

§ 5. ZAKLJUČAK

Višenezasićene masne kiseline podložne su specifičnim promjenama strukture izazvane procesima koji teku mehanizmima lančanih reakcija radikala. Glavni zadatak ovog doktorskog rada bio je praćenje procesa nastajanjem njihovih produkata pokrenutih kontrolirano generiranim radikalima u jednostavnim modelnim sustavima lipida. U prisustvu kisika neophodnog za život živih organizama peroksidacija lipida je glavni proces koji se odvija u membranama stanica koje su izgrađene od fosfolipida, složenih struktura koje sadržavaju nezasićene masne kiseline. Budući da je lipidna peroksidacija u osnovama oksidacijskog stresa, radikali koji sudjeluju u lančanim reakcijama s nezasićenim masnim kiselinama imaju sposobnost izmjeniti strukturu lipida, pa time i fizičko-kemijska svojstva biomembrane koje prate svaku promjenu strukture. Pritom se uz taj proces mogu pojaviti i drugi procesi koji se također pokreću radikalima te tako kompetirajući jedan drugom za radikale dovesti do trajnih promjena na strukturama biomembrana.

U prvom dijelu ovog doktorskog rada definiran je modelni sustav miješanih micela LiH u kojem se selektivno može pratiti faza propagacije u procesu lipidne peroksidacije PUFA uz inicijaciju Fe(II) ionom. Utjecaji pH medija, koncentracije Fe(II) i veličina micele na oksidaciju LiH ispitivani su u otopinama miješanih micela LiH. Promjena pH otopina nije utjecala na promjenu veličine miješanih micela LiH, a upotrebljena neionska površinski aktivna tvar nije utjecala na oksidaciju LiH. Ti su rezultati omogućili utvrđivanje jednostavnog modela lipida u kojem su se mogli pratiti procesi lipida u uvjetima niskih pH vrijednosti i onim bliskim fiziološkim. Na osnovu sistematskog istraživanja podsustava koji su se bazirali na najzastupljeniju masnu kiselinu u živim organizmima, LiH, utvrđen je optimalan sastav modelnog lipidnog sustava ($5{,}0 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3} LiH, $2{,}8 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3} Tween®-20, $5{,}0 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3}MES/NaH_2PO_4) u kojem je podložnost oksidaciji istražena pomoću biološki važnog Fe(II) iona. Ispitivanjem ovisnosti nastalih LiOOH i koncentracije Fe(II) iona utvrđeni su uvjeti u kojima je moguće selektivno pratiti propagaciju odnosno terminaciju procesa peroksidacije. Utvrđeno je da u kiselom mediju proces propagacije prevladava terminaciju kod optimalnih koncentracija LiH, Tween®-20 i nižih koncentracija Fe(II) do $7{,}5 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3}, dok se faza terminacija odvija kod viših koncentracija Fe(II)

iona neovisno o upotrebljenom puferu. Posebnost ovog dijela istraživanja bila je karakterizacija modelnog lipidnog sustava, micele kao specifične samoorganizirane strukture LiH u vodenoj otopini koja je poslužila kao „nanoreaktor“ za praćenje radikalima induciranih procesa modifikacije strukture LiH u određenim uvjetima generiranja radikala bliskim onim u stanjima oksidacijskog odnosno radikalskog stresa u živim organizmima.

Osim lipidne peroksidacije, u biološkim sustavima se zbog djelovanja radikala može odvijati i geometrijska izomerizacija dvostruke veze masnih kiselina. Važna molekula koja može sudjelovati u oba procesa su tioli, a koji u biološkom okruženju mogu biti prisutni u relativno velikim koncentracija (do 1×10^{-2} mol dm^{-3}). Poznato je da tioli inhibiraju lipidnu peroksidaciju doniranjem atoma vodika, ali istovremenim nastajanjem RS$^{\bullet}$ katalitičkom adicijsko-eliminacijskom reakcijom djelotvorno izomeriziraju dvostruku vezu masnih kiselina. U drugom dijelu doktorskog rada po prvi put su opisani i paralelno proučavani procesi peroksidacije i geometrijske izomerizacije koristeći vrednovani modelni lipidni sustav, otopine miješanih micela LiH, uz inicijaciju radikalima kontrolirano generiranim γ-zračenjem. Definirani su optimalni uvjeti u kojima se navedeni procesi mogu kvantitativno odrediti. Utvrđeno je da je u anaerobnim uvjetima u miješanim micelama LiH u prisustvu tiola potisnuta peroksidacija, a dominirala geometrijska izomerizacija RS$^{\bullet}$ radikalima na dvostrukoj vezi LiH. Katalitički ciklus je iznosio 420. Čak u uvjetima ravnoteže sa zrakom utvrđeno je da se izomerizacija još uvijek odvija, katalitički ciklus je iznosio 370, uz značajnu koncentraciju proizvedenih hidroperoksida, 10^{-5} mol dm^{-3} LiOOH.

Na temelju rezultata ispitivanja utjecaja zračenja kao inicijatora, brzine doze i doze zračenja na lipidnu peroksidaciju i geometrijsku izomerizaciju u modelnom sustavu i homogenim otopinama u aerobnim i anaerobnim uvjetima, došlo se do zaključka da učinkovitost izomerizacije i peroksidacije ovise o koncentraciji i difuziji radikala te da je to veća što je manja brzina doze zračenja. U homogenim deaeriranim otopinama u uvjetima u kojima dominira izomerizacija mono *trans*-izomeri nastaju u gotovo jednakim količinama.

Rezultati mjerenja utjecaja veličine miješanih micela LiH na pojavu istraživanih procesa pokazuju razlike u raspodjeli nastalih mono *trans*-izomera na položaju 9- i 12-dvostruke veze. Ovim rezultatom je potvrđeno postojanje supramolekulske organizacije u ispitivanom modelnom sustavu miješanih micela u kojem se molekula LiH specifično smješta u odnosu na granici faza i dostupnost dvostruke veze reakciji s RS$^{\bullet}$ radikalima. Ovaj rezultat do sada neistražene specifične raspodjele mono *trans*-izomera upućuje na korištenje ovih

molekula kao obilježivača ili biomarkera koji bi svojom identifikacijom i koncentracijama upućivali na postojanje radikalskog stresa i mogućnost određivanja veličine njegovog stanja. Uz identifikaciju mono *trans*-izomera PUFA, analiza lipida ekstrahiranih iz biomembrana različitih tkiva može pokazati stanje u kojem se stanica, a i organizam nalazi. Na temelju ove analize moguće je utvrditi poremećaj u metabolizmu lipida koji dovodi do radikalima induciranih promjena strukture membrane te predvidjeti njezine popravke uz dodavanje odgovarajućih PUFA egzogenim putem.

Ispitivanja svojstva prirodnih antioksidansa u definiranom sustavu miješanih micela LiH i kontroliranom generiranju radikala γ-zračenjem kod velike brzine doze, u aerobnim uvjetima pokazala su da antioksidansi usporavaju proces peroksidacije u seriji: α-TOH < AscH < ResOH ≅ smjesa AscH i α-TOH. Dobiveni sinergistički efekt AscH i α-TOH u skladu je s literaturno poznatim podacima dobivenim u pravim otopinama antioksidansa. Prisutnost antioksidansa u anaerobnim uvjetima u kojima prevladavaju pocesi geometrijske izomerizacije utjecala je na smanjenje nastalih izomera i to tako da je njihov udio opadao u seriji: ResOH < α-TOH < smjesa AscH i α-TOH < AscH. Dobiveni rezultati se osnivaju na različitim lokalizacijama antioksidansa u odnosu na granicu faza voda/lipid u heterogenom sustavu.

Sustavna ispitivanja utjecaja različitih prirodnih antioksidansa na procese peroksidacije i geometrijske izomerizacije u miješanim micelama LiH doprinijeli su razjašnjavanju uloge antioksidansa u zaštiti strukture lipida od štetnog djelovanja radikala, napose $RS^{\bullet}$ radikala koji se mogu generirati iz biološki važnih tiolnih spojeva u živim organizmima.

S obzirom da su lipidna peroksidacija i geometrijska izomerizacija u osnovama oksidacijskog odnosno radikalskog stresa s poznatim štetnim posljedicama u živim organizmima, integralno razmatranje oba procesa u jednostavnijim sustavima svakako ima važnu ulogu u razumijevanju degradativnih promjena koje se događaju u složenijim sustavima kao što su stanične membrane.

§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

ArO$^{\bullet}$ – fenoksil radikal

AscH – askorbinska kiselina

α-TOH – α-tokoferol

D – doza zračenja (Gy = 1 J/kg)

2–ME – merkaptoetanol

DHA – dokozapentaenska kiselina

EtOH – etanol

EPA – eikozapentaenska kiselina

G – vrijednost, radijacijsko-kemijski prinos (μmol/J)

G(9*c*,12*c*-18:2) – radijacijsko-kemijski prinos nestajanja *cis*-izomera linolne kiseline (μmol/J)

κ – katalitički ciklus

L$^{\bullet}$ – alkilni radikal

LH – lipid

LiH – linolna kiselina

LOOH – hidroperoksid lipida

LiOOH – hidroperoksid linolne kiseline

LiOO$^{\bullet}$ – peroksilni radikal linolne kiseline

MeOH – metanol

MUFA – mononezasićene masne kiseline

v – propagacijska duljina lanca

P – brzina doze zračenja (Gy/s)

PUFA – višenezasićene masne kiseline

ResOH – resveratrol

ROS – reaktivne kisikove vrste

RSS – reaktivne sumporove vrste

RS$^{\bullet}$ – tiilni radikali

RSH – tiol

ρ – gustoća tvari (g/cm^3)

SFA – zasićene masne kiseline

Sustav A – 2–Me dodan u micele neposredno prije ozračivanja micela

Sustav B – 2–Me dodan u toku pripreme micela (inkorporirana micela)

ζ- potencijal – zeta-potencijal površine micele (mV)

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. E. Niki, *u* C, Chatgilialoglu, A. Studer (ur.), *Encyclopedia of Radical Chemistry, Biology and Materials, Vol. 3: Chemical Biology*, John Wiley& Sons, 2012, str.1577.
2. F. R. Mayo, *Acc. Chem. Res*. **1** (1968) 193–201.
3. D. S. Sgoutas, F.A. Kummerow, *Lipids* **4** (1969) 283–287.
4. C. Chatgilialoglu, M. P. Bertrand, C. Ferreri, u Z.B. Alfassi (ur.), *S–centered radicals*, John Wiley & Sons Ltd.: Chichester, U.K., 1999, str.311–354.
5. C. Chatgilialoglu, C. Ferreri, *Acc. Chem. Res*. **38** (2005) 441–448.
6. R. M. Sargis, P. V. Subbaiah, *Biochemistry* **42** (2003) 1153–1154.
7. J. F. Mead, R. B. Alfin-Slater, D. R. Howton, G. Popiak, *LIPIDS, Chemistry, Biochemisty, Nutrition*, Plenum Press, New York, 1986, str. 23.
8. http://lipidlibrary.aocs.org/lipids (preuzeto 18. veljače 2014. god.)
9. C. Ferreri, C. Chatgilialoglu, *Chem. Bio. Chem*. **6** (2005) 1722–1734.
10. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry 5th Ed.*, W.H.Freeman and Company, New York, 2002, str. 319–341.
11. R. A. Floyd, *FASEB J.* **4** (1990) 2587–2597.
12. K. M. Schaich, *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutrit.* **13** (1980) 189–245.
13. I. F. F. Benzie, *Int. J. Food Sci. Nutr.* **47** (1996) 233–261.
14. H. Esterbauer, G. Striegl, H. Puhl, M. Rotheneder, *Free Rad. Res. Commun*. **6** (1989) 67–75.
15. H. C. Yeo, J. Liu, H. J. Helbock, B. N. Ames, *Methods Enzymol.* **300** (1999) 70–78.
16. B. Mihaljević, B. Katušin-Ražem, D. Ražem, *Free Rad Biol. Med.* **21** (1996) 53–63.
17. Y. Kawai, H. Fujii, Y. Kato, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **213** (2001) 271–276.
18. N. A. Porter, S. E. Caldwell, K. A. Mills, *Lipids* **30** (1995) 277–290.
19. N. Noguchi, R. Numano, H. Kaneda, E. Niki, *Free Rad. Res.* **29** (1998) 43–52.
20. M. Miki, H. Tamai, M. Mino, Y. Yamamoto, E. Niki, *Arch. Biochem. Biophys*. **258** (1987) 373–380.
21. Y. Yoshida, N. Itoh, Y. Saito, M. Hayakawa, E. Niki, *Free Rad. Res.* **38** (2004) 375–384.

22. S. Garcia-Cruser, K. L. H. Carpenter, F. Guardiola, B. K. Stein, M. J. Mitchinson, *Free Rad. Res.* **35** (2001) 31–41.
23. J. Gutierrez, S. W. Ballinger, V. M. Darley–Usmar, A. Landar, *Circ. Res.* **99** (2006) 924–932.
24. G. W. Buxton, u P. Rigny (ur.), *Radiation Chemistry,* EDP Sciences, 2008, str 3–17.
25. Z. Cheng, Y. Li, *Chem. Rev.* **107** (2007) 748–766.
26. S. D. Aust, B. A. Svingen, u W.A. Pryor (ur.), *Free radicals in Biology,* Accademic Press Inc., New York, 1982, str. 6–25.
27. J. K. Kochi, *Free Radicals*, Vol. 1, Wiley–Interscience, New York, 1973, str. 591–683.
28. S. D. Aust, L. A Morehouse, C. E. Thomas, *Free. Rad. Biol. Med*. **1** (1985) 3–24.
29. R. O. Recknagel, E. A. Glende, *Methods Enzymol.* **105** (1984) 331–337.
30. N. A. Porter, B. A. Weber, H. Weenen, J. A. Khan, *J. Am. Chem. Soc.* **102** (1980) 5597–5601.
31. J. A. Buege, S. T. Aust, *Methods in Enzymol.* **52** (1978) 302–310.
32. B. Tsoukalas, W. Grosch, *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **54** (1977) 490–494.
33. B. Mihaljević, D. Ražem, *Croat. Chem. Acta* **76** (2003) 249–255.
34. B. Mihaljević, B. Katušin-Ražem, D Ražem, *Free Rad. Biol. Med.* **21** (1996) 53–63.
35. R. Chekin, D. Rengel, J. C. G. Milicua, F. M. Goni, J. L Arrondo, G. Pifat, *J. Lipid Res.* **42** (2001) 778–782.
36. D. Meyers, *Surfactant Science and Technology*, VCH Publisher, New York, 1988.
37. Y. Yamamaoto, E. Niki, Y. Kamiya *Lipids* **17** (1982) 870–877.
38. K. Yamamoto, M. Takahashi, E. Niki, *Chem. Letters* 6 (1987) 1149–1152.
39. L. R. C. Barclay, *Can. J. Chem.* **71** (1993) 1–16.
40. E. N. Frankel, S. W. Huang, J. Kanner, J. B. German, *J. Agric. Food Chem.* **42** (1994) 1054–1059.
41. E. A. Frankel, T. Satue-Gracia, A. S Mayer, J. B. German, *J. Agric. Food Chem*. **50** (2002) 2094–2099.
42. D. J. Mc Clements, E. A. Decker, *J. Food Sci*. **65** (2000) 1270–1282.
43. J. H. Fendler, *Membrane Mimetic Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc, New York (USA), 1981.
44. J. H. Heipieper, F. Meinhardt, A. Segura, *FEMS Microbiol. Lett.* **229** (2003) 1–7.

45. J. L. Ramos, E. Duque, J. J. Rodriguez-Herva, P. Godoy, A. Haidour, F. Reyes, A. Fernandez-Barrero, *J. Biol. Chem*. **272** (1997) 3887–3890.
46. H. Keweloh, H. J. Heipieper, *Lipids* **31** (1996) 129–137.
47. B. G. Fox, K. S. Lyle, C. E. Rogge, *Acc. Chem. Res*. 37 (2004) 421–429.
48. C. Ferreri, S. Kratzsch, L. Landi, O. Brede, *Cell. Mol. Life Sci*. **62** (2005) 834–873.
49. C. Chatgilialoglu, C. Ferreri, M. Melchiorre, A Sansone, A. Torreggiani, *Chem. Rev*. **114** (2014) 255–284.
50. E. N. Frankel, *Lipid Oxidation*, The Oily Press, Dundee, Scotland, 1998, str. 18–19.
51. R. M. Sargis, P. V. Subbaiah, *Biochem.* **42** (2003) 11533–11543.
52. C. Schoneich, U. Dillinger, F. Von Bruchhausen, K. D. Asmus, *Arch. Biochem. Biophys.* **292** (1992) 456–467.
53. C. Von Sonntag, *The chemical basis of radiation in biology*, Taylor and Francis, London, 1987.
54. G. A. Russell, u J. K. Kochi (ur.), *Free Radicals*, Vol. 1, Wiley & Sons, New York, 1973, str. 275–331.
55. C. Ferreri, C. Constantino, L. Perrotta, L. Landi, Q. G. Mulazzani, C. Chatgilialoglu, *J. Am. Chem. Soc.* **123** (2001) 4459–4468.
56. J. H. B. Chenier, E. Furimsky, J. A. Howard, *Can. Chem. J.* **52** (1974) 3682–3688.
57. G.V. Buxton, C. L. Greenstock, W P. Helman, A. B. Ross, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **17** (1988) 513–886.
58. R. Breslow, *Chem. Biol.* **5** (1998), R27-R28.
59. V. D. Kancheva, O. T. Kasaikina, *u* A. Catala (ur.), *Lipid Peroxidation*, In Tech. Open Access 2012, str. 31–62.
60. C. Ferreri, S. Kratzsch, O. Brede, B. Marciniak, C. Chatgilialoglu, *Free Rad. Biol. Med.* **38** (2005) 1180–1187.
61. L. Zambonin, C. Ferreri, L. Cabrini, C. Prata, C. Chatgilialoglu, L. Landi, *Free Rad. Biol. Med.* **40** (2006) 1549–1556.
62. A. Ruiz-Rodriguez, G. Reglero, E. Ibanez, *J. Pharm. Biomed. Anal*. ***51*** (2010) 305–326.
63. J. Schwinn, H. Sprinz, K. Dröβler, S. Leistner, O. Brede, *Int. J. Rad. Biol.* **74** (1998) 359–365.
64. W. W. Christie, X. Han, *Lipid Analysis, Isolation, Separation, Identification and Lipidomic Analysis*, The Oily Press, Bridgwater, 2010.

65. C. Ferreri, A. Samadi, F. Sassatelli, L. Landi, C. Chatgilialoglu, *J. Am. Chem. Soc.* **126** (2004) 1063–1072.
66. F. Battistutta, S. Buiatti, C. Zenarola, R. Zironi, *J. High. Resolut. Chromatogr.* **17** (1994) 662–664.
67. T. Seppanem-Laakso, I. Laakso, R. Hiltunen, *Anal. Chim. Acta* **465** (2002) 39–62.
68. P. A. Golay, F. Giuffrida, F. Dionisi, F. Destaillats, *J. AOAC Int.* **92** (2009) 1301–1309.
69. G. Gutnikov, *J. Chromatogr. B* **671** (1996) 71–89.
70. C. Villegas,Y. Zhao, J. M. Curtis, *J. Chromatogr. A* **1217** (2010) 775–784.
71. L. Mondello, A. Casilli, P. Q. Tranchida, P. Dugo, G. Dugo, *J. Chromatogr. A* **1019** (2003) 187–196.
72. H. Devle, E. O. Rukke, C. F. Naess-Andresen, *J. Sep. Sci.* **32** (2009) 3738–3745.
73. N. Sanchez–Avila, J. M. Mata–Granados, J. Ruiz–Jimenez, M. D. Luque de Castro, *J. Chromatogr. A* **1216** (2009) 3738–3745.
74. M. Czauderna, J. Kowalczyk, *J. Chromatogr. B* **760** (2001) 165–178.
75. H. Miwa, *Anal. Chim. Acta* **465** (2002) 237–255.
76. B. Nikolova–Damyanova, *J. Chromatogr. A* **1216** (2009) 1815–1824.
77. W. J. Griffiths, A.P. Jonsson, S. Liu, D. K. Rai, Y. Wang, *Biochem. J.* **31** (2001) 545–661.
78. M. Cetin, A. Yildirim, A. M. Sahin, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **105** (2003) 683–687.
79. F. P. Corongiu, S. Banni, *Methods Enzymol.* **233** (1994) 303.
80. M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, *Chemico-Biological Interactions* **160** (2006) 1–40.
81. L. Valgimigli, D. A. Pratt, u C. Chatgilialoglu, A. Studer (ur.), *Encyclopedia of Radical Chemistry, Biology and Materials, Vol. 3: Chemical Biology*, John Wiley& Sons, 2012, str. 1623–1677.
82. E. Cadenas, L. Packer, *Handbook of antioxidants*, Mercel Dekker Inc. New York, 1996, str 91–103.
83. M. Drach, J. Narkiewicz-Michalek, A. Sienkiewicz, M. Szymula, C. Bravo–Diaz, *Colloids and Surface A Physicochem. Eng. Aspects* **379** (2011) 79–85.
84. S. M. Cullbertson, F. Antunes, C. M. Havrilla, G. L. Mione, N. A. Porter, *Chem. Res. Toxicol.* **15** (2002) 870–876.
85. E. Niki, N. Noguchi, *Acc. Chem. Res.* **37** (2004) 45–51.

86. Y. E. Dommels, G. M. Alink, P. J. van Bladern, B. Van Ommen, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **12** (2002) 233–244.
87. D. F. Horrobin, *Am. J. Clin. Nutr.* **57** (1993) 732S–737S.
88. Y. A. Liou, D. J. King. D. Zibrik, S. M. Innis, *J. Nutr.* **137** (2007) 945–952.
89. C. Ferreri, u R.R: Watson, V. R. Preedy (ur.), *Bioactive Food as Dietary Interventions for Liver and Gastrointestinal Disease*, Elsevier, **26** (2013) 401–419.
90. G. Cohen, Y. Riahi, V. Sunda, S. Deplano, C. Chatgilialoglu, C. Ferreri, N. Kaiser, S. Sasson *Free Rad. Biol. Med.* **65** (2013) 978–987.
91. S. R. Shaikh, M. Edidin, *Am. J. Clin. Nutr.* **84 (**2006) 1277–1289.
92. R. A. Siddiqui, S. R. Shaikh, L. A. Sech, R. Heidi, W. Stillwell, G. P. Zaloga, *Mini. Rev. Med. Chem.* **4 (**2004) 859–871.
93. A. P. Simopoulos, *J .Am. Coll. Nutr.* **21 (**2002) 495–505.
94. Lauritzen, *Progr. Lipid Res.* **40** (2001)1–94.
95. A. J. Hulbert, *Integr. Comp. Biol.* **50** (2010) 808–817.
96. S. K. Abbott, P. L. Else, A. J. Hulbert, *Br. J. Nutr.* **103** (2010) 522–529.
97. A. A. Puca, C. Chatgilialoglu, C. Ferreri, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40** (2008) 324–333.
98. ASTM ISO/ASTM51538-09, Standard Practice for Use of the Ethanol-Chlorobenzene Dosimetry System, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2006, www.astm.org;
99. ICRU Report 80, Dosimetry Systems for Use in Radiation Processing, *J.ICRU* 8 (2008) 29–70.
100. Diazald, MNNG, and Diazomethane Generators, AldrichTechnical Bulletin No. AL–180, Aldrich, Milwaukee, WI, 1993.
101. F. Ngan, M. Toofan, *J. Chromatogr. Sci.* **29** (1991) 8–10.
102. R. O. Recknagel, E. A. Glende, *Methods Enzymol*. **105** (1984) 331–337.
103. S. W. Provencher, *Comp. Phys. Commun.* **27**(1982) 229–242.
104. C. Carnero Ruiz, J. A. Molina-Bolivar, J. Aguiar, G. MacIsaac, S. Moroze, R. Palepu, *Colloid Polym. Sci.* **281** (2003) 531–541.
105. A. B. Mandal, S. Gupta, S. P. Moulik, *Indian J. Chem.* **24A** (1985) 670–673.
106. F. Luschtinetz, C. Dosche, *J. Colloids Interface Sci.* **338** (2009) 312–315.
107. J. Y. Cho, D. J. McClements, E. A. Decker, *J. Agric. Food Chem.* **50** (2002) 5704–5710.
108. Y. Chevalier, T. Zemb, *Rep. Prog. Phys.* **53** (1990) 279–371.
109. B. Mihaljević, D. Ražem, *Chem. Pap.* **60** (2006) 253–267.

110. X. Huang, J. Dai, J. Fournier, A. M. Ali, K. Zhang, K. Frenkel, *Free Rad. Biol. Med.* **32** (2002) 84–92.
111. J. R. Bucher, M. Tien, S. D. Aust, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **111** (1983) 777–784.
112. G Minotti, S. D. Aust, *J. Biol. Chem.* **262** (1987) 1098–1104.
113. C.V. Smith, D. P. Jones, T. M. Guetner, L. H. Lash, B. H. Lanterburg, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **140** (1996) 1–12.
114. R. Fornasier, U. Tonellato, *Bioorg. Chem.* **11** (1982) 428–435.
115. G. G. Jason, D. A. Stirling, A. J. Swallow, *Int. J. Radiat. Biol. Rel. Stud. Phys. Chem. Med.* **19** (1971) 143–156.
116. B. K. Ražem, D. Ražem, *J. Phys. Chem.* **104** (2000) 1482–1494.
117. A. B. Ross, W. G. Mallard, W. P. Helman, G. V. Buxton, R. E. Huie, P. Neta, *NDRL-NIST Solution Kinetic Database – Ver. 3*, Notre Dame Radiation Laboratory, Notre Dame, IN and NIST Standard Reference Data, Gaithersburg, MD (1998).
118. M. Al-Sheikhly, J. Silverman, M. Simic, B. Michael, *J. Phys. Chem. B* **108** (2004) 17618–17627.
119. L. K. Patterson, K. Hasegawa, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **82 (1978)** 951– 956.
120. S. L. Murov, I. Carmichael , G. L. Hug, *Handbook of Photochemistry 2nd ed.* Marcel Dekker, Inc., New York, USA, 1993.
121. B. H. Bielski, D. E. Cabelli, R. L. Arudi, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **14** (1985) 1041.
122. N. A. Porter, *Acc. Chem. Res.* **19** (1986) 262–268.
123. B. Katušin-Ražem, D. Ražem, *J. Phys. Chem. A* **104** (2000) 1482–1494.
124. C. Chatgilialoglu, L. Zambonin, A. Altieri, C. Ferreri, Q. G Mulazzani, L. Landi, *Free Rad. Biol. Med.* **33** (2002) 1681–1692.
125. M. D'Aquino, C. Dunster, R. L. Willson, *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **161** (1989), 1199–1203.
126. C. Chatgilialoglu, C. Ferreri, M. Ballestri, Q. G. Mulazzani, L. Landi, *J. Am. Chem. Soc.* **122** (2000) 4593–4601.
127. R. Amorati, M. Lucarini, V. Mugnaini, G. F. Pedulli, *J. Org. Chem.* **69** (2004) 7101–7107.
128. A. S. Yalcin, N. Sbuncu, K. Emerk, *Int. J. Biochem.* **24** (1992) 499–502.
129. L. R. C. Barclay, *Can. J. Chem.* **71** (1993) 1–16.

130. L. Castle, M. J. Perkins, *J. Am Chem. Soc.* **108** (1986) 6381–6382.
131. B. Zhou Q Miao, L. Yang, Z. L. Liu, *Chem. Eu. J.* **11** (2005) 680–691.
132. L. R. C. Barclay, S. J. Locke, J. M. MacNeil, *Can. J. Chem.* **63** (1985) 366–374.
133. M. Drach, J. Narkiewicz-Michałek, A. Sienkiewicz, M. Szymula, C. Bravo–Díaz, *Colloids and Surfaces A Physicochem. Eng. Aspects* **379** (2011) 79–85.
134. M. J. Davies, L. G. Forni, R. L. Willson, *Biochem. J.* **255** (1988) 961–965.
135. S. Fabris, F. Momo, G Ravagnan, R. Stevanato, *Biophys. Chem.* **135** (2008) 76–83.
136. S. S. Leonard, C. Xia, B. H Jiang, B. Stinefelt, H. Klandorf, G. K. Harris, X. Shi, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **309** (2003) 1017–1026.
137. B. Zhou, Q. Miao, L. Yang, Z. L. Liu, *Chem Eur. J.* **11** (2005) 680–691.
138. S. Fabris F. Momo, G. Ravagnan, R. Stevanato, *Biophys. Chem.* **135** (2008) 76–93.
139. S. Stojanović, H. Sprinz, O. Brede, *Arch. Biochem. Biophys.* **391** (2001) 79–89.