



**UNIVERZITET U NIŠU
TEHNOLOŠKI FAKULTET U LESKOVCU**



Katedra za hemijske nauke

Sanja M. Petrović

**STABILNOST HLOOROFILA NA OKSIDACIONI
STRES U VODENOM MEDIJUMU I U LIPOZOMIMA**

doktorska disertacija

Leskovac, 2016.



**UNIVERSITY OF NIS
FACULTY OF TECHNOLOGY IN LESKOVAC**



Department of chemical sciences

Sanja M. Petrović

**STABILITY OF CHLOROPHYLL ON OXIDATIVE
STRESS IN WATER MEDIUM AND IN LIPOSOMES**

doctoral thesis

Leskovac, 2016.

Podaci o mentoru i članovima komisije

Mentor:

dr Jelena Zvezdanović, docent, Tehnološki fakultet u Leskovcu, Univerzitet u Nišu, Srbija

Članovi komisije:

dr Tatjana Anđelković, redovni profesor, predsednik, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Nišu, Srbija

dr Dragan Cvetković, docent, član, Tehnološki fakultet u Leskovcu, Univerzitet u Nišu, Srbija

Datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija je rađena na katedri za hemijske nauke Tehnološkog fakulteta u Leskovcu Univerziteta u Nišu. Obradivana problematika u ovoj tezi predstavlja deo istraživanja projekta TR-34012 koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Izradom rada rukovala je dr Jelena Zvezdanović, docent Tehnološkog fakulteta Univerziteta u Nišu, kojoj ovim putem izražavam iskrenu zahvalnost za svu pomoć, vreme, strpljenje, podršku i prijateljstvo.

Posebno se zahvaljujem prof. Tatjani Anđelković, redovnom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu i dr Draganu Cvetkoviću, docentu Tehnološkog fakulteta Univerziteta u Nišu, na velikom interesovanju, korisnim savetima i sugestijama pri izradi doktorske disertacije.

Iskrenu i najtopliju zahvalnost dugujem prof. Dejanu Markoviću[†], idejnom tvorcu ovog rada, koji mi je svojim savetima pomagao u svim fazama izrade rada. Takođe, veliku zahvalnost dugujem prof. Laura Tugulea[†], sa fakulteta za Fiziku, Univerziteta u Bukureštu, na ukazanom gostoprimstvu i pomoći u izradi eksperimentalnih podataka.

Zahvaljujem svojoj porodici na neizmernoj podršci, razumevanju i ljubavi koju mi pružaju.

SADRŽAJ

REZIME	xi
ABSTRACT	xiii
1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO	4
2.1. HLOOROFIL	4
2.2. Derivati hlorofila	5
2.2.1. Hlorofilin	6
2.3. Apsorpcioni i emisioni spektri hlorofila	7
2.4. STABILNOST HLOOROFILA	12
2.5. Agregacija hlorofila	13
2.6. DEGRADACIJA HLOOROFILA	16
2.7. OKSIDACIONI STRES	21
2.7.1. Mehanizam nastanka ROS-a	21
2.7.2. Oksidacioni stres izazvan dejstvom enzima	23
2.7.3. Oksidacioni stres hlorofila izazvan elektromagnetnim zračenjem	23
2.7.4. Oksidacioni stres izazvan dejstvom hemijskih agenasa	25
2.7.4.1. Oksidacioni stres hlorofila izazvan Fentonovom reakcijom	25
2.8. BIOLOŠKI MODELI MEMBRANA	29
2.9. LIPOZOMI I NJIHOVA STRUKTURA	30
2.9.1. Lipidi – osnovni sastojci lipozoma	31
2.9.2. Klasifikacija lipozoma	32
2.9.3. Inkapsuliranje supstanci u lipozome	35
2.9.4. Lipidna peroksidacija	36
2.10. PRIMENA HLOOROFILA I NJEGOVIH DERIVATA U INDUSTRIJI	41
2.10.1. Upotreba hlorofila i njegovih derivata u medicini	41
2.10.2. Upotreba hlorofila i njegovih derivata u kozmetici na bazi lipozomskih preparata	42
MOTIV RADA	44
CILJ DISERTACIJE	45
3. EKSPERIMENTALNI DEO	46
3.1. Ekstrakcija pigmenata iz listova spanaća	46
3.1.1. Kolonsko razdvajanje pigmentnog ekstrakta	46
3.2. Ekstrakcija pigmenata iz sušenog spanaća	48
3.2.1. Kolonsko razdvajanje pigmentnog ekstrakta hlorofilida	48
3.3. HPLC hromatografija	49
3.3.1. Ispitivanje čistoće izolovanih pigmetnih frakcija	50
3.4. Određivanje koncentracije Chla i Chlb	51
3.5. Sirovine za pripremanje lipozoma	52
3.6. Priprema lipozoma metodom tankog filma sonifikacijom i ekstrudiranjem	53
3.6.1. Ekstrakcija hlorofila iz lipozoma	55
3.7. Ozračivanje hlorofila	55
3.7.1. UV-B ozračivanje hlorofila	55
3.7.2. Ozračivanje hlorofila vidljivom svetlošću	56
3.8. Enzimska oksidacija hlorofila	56
3.9. Fentonova reakcija sa hlorofilom	57
3.10. Reakcija hlorofila sa termalnim inicijatorom	58

3.11. Određivanje stepena degradacije hlorofila nakon izlaganja hlorofila oksidacionom stresu u vodenom medijumu i u lipozomima	59
3.12. KORIŠĆENE METODE ISPITIVANJA	60
3.12.1. VIS apsorpciona spektrofotometrija	60
3.12.2. Fluorescentna spektroskopija	60
3.12.3. LC-MS spekrometrija	61
3.12.4. Spektrofotometrija konjugovanih diena	63
3.12.5. TBA-MDA test lipozomske disperzije	64
3.12.6. Određivanje srednjeg prečnika čestica i indeksa polidisperziteta lipozomske disperzije.....	65
4. REZULTATI I DISKUSIJA	67
4.1. Provera agregacije hlorofila pri različitim koncentracijama u vodi.....	67
4.2. Ispitivanje vremenske stabilnosti hlorofila u vodenom medijumu apsorpcionom spektroskopijom.....	68
4.3. ANALIZA DEJSTAVA OKSIDACIONIH STRESOVA NA HLOROFIL U VODENOM MEDIJUMU.....	70
4.3.1. Promene hlorofila u vodi nakon dejstva Fentonovog reagensa. Analiza apsorpcionih spektara. UHPLC/MS analiza	71
4.3.2. Promene hlorofila u vodi nakon dejstva termalnog inicijatora. Analiza apsorpcionih spektara. UHPLC/MS analiza	81
4.3.3. HPLC analiza hlorofila nakon primene oksidacionog stresa izazvanog dejstvom enzima.....	88
4.3.4. Promene hlorofila u vodi nakon izlaganja vidljivoj svetlosti. Analiza apsorpcionih spektara. UHPLC/MS analiza	92
4.3.5. Promene hlorofila u vodi nakon izlaganja UV-B zračenju. Analiza apsorpcionih spektara. UHPLC/MS analiza	99
4.3.6. KOMPARATIVNI PREGLED REZULTATA OKSIDACIONIH STRESOVA NA HLOROFIL / HLOROFILIN U VODENOM MEDIJUMU	105
4.4. OSOBINE I STABILNOST LIPOZOMNIH DISPERZIJA SA INKORPORISANIM HLOROFILOM.....	107
4.4.1. Određivanje veličine lipozoma, homogenosti i stabilnosti lipozomnih disperzija..	107
4.4.2. Metoda normalizacije apsorpcionih spektara lipozomnih disperzija i provera njene validnosti.....	108
4.4.3. Komparativna spektroskopska ispitivanja na sistemima lipozoma sa inkorporisanim hlorofilom i njegovim derivatom hlorofilidom.....	110
4.4.4. Ispitivanje uticaja strukture lipida na mikrookruženje inkorporisanog hlorofila /hlorofilida	117
4.5. Ispitivanje vremenske stabilnosti hlorofila u lipozomima apsorpcionom VIS spektroskopijom	121
4.6. ANALIZA DEJSTVA OKSIDACIONIH STRESOVA NA HLOROFIL INKORPORISAN U LIPOZOME	123
4.6.1. Analiza apsorpcionih spektara hlorofila inkorporisanog u lipozome nakon UV-B oksidacionog stresa.....	123
4.6.2. Analiza apsorpcionih spektara hlorofila inkorporisanog u lipozome nakon izlaganja vidljivoj svetlosti.....	127
4.6.3. Analiza apsorpcionih spektara hlorofila inkorporisanog u lipozome nakon oksidacionog stresa izazvanog upotrebom AAPH, vodorastvornog termalnog inicijatora	132
4.6.4. Analiza apsorpcionih spektara hlorofila inkorporisanog u lipozome nakon oksidacionog stresa izazvanog AMVN, lipoidalnim termalnim inicijatom	136

4.6.5. Analiza apsorpcionih spektara hlorofila inkorporisanog u lipozome nakon oksidacionog stresa izazvanog Fentonovom reakcijom	139
4.6.6. Fluorescentna anizotropija u sistemima Chl-SUV-DPPC lipozoma nakon oksidacionog stresa izazvanog dejstvom Fentonovog reagensa i dejstvom vodorastvornog AAPH	142
5. ZAKLJUČCI	146
ZAVRŠNI ZAKLJUČAK	149
6. LITERATURA	150
<i>ANEX</i>	170
OPŠTI BIOGRAFSKI PODACI	174
BIBLIOGRAFIJA	175

LISTA RELEVANTNIH SKRAĆENICA I SIMBOLA

A	apsorbancija
A ₀	maksimum apsorpcije Q _y -trake pre oksidacionog stresa
A ₁	maksimum apsorpcije Q _y -trake nakon određenog vremena izlaganja oksidacionom stresu
AAPH	2,2- azobis (2-metilpropionamidin) dihidrohlorid
A _{max}	maksimalna vrednost apsorbcije
AMVN	2,2'-azobis (2,4- dimetilvaleronitril)
A _{Q,max}	vrednost apsorbcije maksimuma Q _y -trake VIS spektra hlorofila
b	debljina sloja kroz koji svetlost prolazi
BHT	butilovani hidroksi toluen
c	koncentracija apsorbujuće vrste
C _{a+b}	ukupna koncentracija Chl <i>a</i> i Chl <i>b</i> (C _a + C _b)
Chl/Chl <i>a</i> , Chl <i>b</i> , Chl <i>c</i> ,	
Chl <i>d</i> , Chl <i>e</i> , Chl <i>f</i>	hlorofil-chlorophyll / hlorofil <i>a,b,c,d,e</i> i <i>f</i> respektivno
Chl <i>a</i> '	epimer hlorofila <i>a</i>
Chl ^{+•}	katjon-radikal hlorofila
Chlid	hlorofilid, <i>Chlorophyllide</i>
CI	hemijska jonizacija, <i>Chemical Ionization</i>
CMC	kritična micelarna koncentracija, <i>Critical Micelar Concentration</i>
D.R. _{chl}	vrednost degradacije hlorofila, (%)

DMPC	dimiristoilfosfatilholin, <i>1,2-DiMyristoylPhosphatidylCholine</i>
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
DOPC	diolailfosfatidilholin
DOPG	diolailfosfatidil glicerol
DPPA	dipalmitoil fosfatidna kiselina
DPPC	dipalmitoilfosfatidilholin, <i>DiPalmitoylPhosphatidylCholine</i>
DPPE	dipalmitoilfosfatidiletanolamin
DPPS	dipalmitoilfosfatidilserin
ESR (EPR)	elektron-spin rezonancija, elektron-paramagnetna rezonancija
F	fluorescencija
F_{\max}	maksimum fluorescencije hlorofila
GUV	unilamelarne vezikule izuzetno velikih dimenzija, <i>Giant Unilamellar Vesicles</i>
HO_2^{\bullet}	hidroperoksilni radikal
HPLC	tečna hromatografija pod visokim pritiskom, <i>High Pressure / Performance Liquid Chromatography</i>
I	vrednost intenziteta fluorescencije u prisustvu quencher-a
I_{\perp}	intenzitet emisije fluorescencije normalan na pravac ekcitovanog polarizovanog zraka
I_0	vrednost intenziteta fluorescencije u odstustvu quencher-a
I_c	interna konverzija, <i>internal conversion</i>
IH	antioksidant
I_{\parallel}	intenzitet emisije fluorescencije paralelan sa pravcem ekcitovanog polarizovanog zraka

isc	intersistenski prelaz, <i>intersystem crossing</i>
K _q	bimolekularna quenching konstanta
K _{SV}	Stern-Volmer-ova konstanta
LED	svetleća dioda, <i>Light Emitted Diodes</i>
LHC	svetlosno-sakupljajući kompleks, <i>Light Harvesting Complex</i>
LOOH / LO [•]	lipidni peroksidi /peroksi- radikal
LP	lipidna peroksidacija
LUV	velike unilamelarne vezikule, <i>Large Unilamellar Vesicles</i>
MDA	malondialdehid
MLV	multilamelarne vezikule, <i>MultiLamellar Vesicles</i>
MLV-REV	reverzno-fazna evaporacija, <i>Reverse-Evaporation Vesicles</i>
MS / ESI/MS	masena spektrometrija, <i>Electro Spray Ionization Mass Spectrometry</i>
MVV	multivezikularne vezikule, <i>Multivesicular Vesicles</i>
NMR	nuklearna magnetna rezonanca, <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
¹ O ₂	singletno stanje molekula kiseonika
³ O ₂	tripletno stanje molekula kiseonika
O ₂ ^{-•} / [•] OOH	superoksidni anjon-radikal / njegova protonizovana forma
OH [•]	hidroksilni slobodni radikal
PC	fosfatidilholin, smeša lipida različite zasićenosti, <i>1,2-Diacyl-sn-glycero-3-phosphocholine</i>
PDT	foto-dinamička terapija, <i>PhotoDynamic Therapy</i>
Pheid	feoforbid, <i>Pheophorbide</i>

Pheo	feofitin, <i>Pheophytin</i>
PI	indeks polidisperziteta
PL-90	PHOSPHOLIPON 90 [®] , lipidna smeša
PSI i PSII	fotosistem I i II, respektivno, <i>Photosystem I & II</i>
[Q]	koncentracija quencher-a
QCT	kvercetin
r	anizotropija (fluorescentne emisije)
R-C [·]	ugljenikov radikal
RO [·]	alkoksilni radikal
ROO [·]	peroksidni radikal
ROS	reaktivne kiseonične vrste, <i>Reactive Oxygen Species</i>
S ₀ , S ₁ , S ₂	osnovno, prvo i drugo ekscitovano stanje (hlorofila i uopšte)
SUV	male unilamelarne vezikule, <i>Small Unilamellar Vesicles</i>
T	tripletno stanje
TBA	tiobarbiturna kiselina
T _C	kritična temperatura lipida
TCA	trihlorsirćetna kiselina
t _{ink.}	vreme inkubacije (min)
t _{irr.}	period UV-ozračivanja (min)
t _{ret.}	retenciono vreme (min)
t _{reak.}	reakciono vreme (min)
UHPLC	tačno-hromatografski sistem izuzetnih performansi, <i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>

ULV	unilamelarne vezikule, <i>Unilamellar Vesicles</i>
UV	ultraljubičasto (ultravioletno) zračenje
UV-A	ultraljubičasto-A zračenje (320 – 400 nm)
UV-B	ultraljubičasto-B zračenje (280 – 320 nm)
UV-C	ultraljubičasto-C zračenje (200 – 280 nm)
UV-VIS	spektroskopija u ultravioletnoj i vidljivoj oblasti
VIS	vidljiva svetlost, 400-800 nm
$\lambda_{em.} / \lambda_{exc.}$	talasna dužina emitovanog / ekscitovanog zraka
$\lambda_{Qy,max}$	talasna dužina maksimalne apsorpcije Q_y -trake u VIS spektru hlorofila
τ_0	vreme života (trajanja) fluorescencije u odsustvu quencher-a

STABILNOST HLOROFILA NA OKSIDACIONI STRES U VODENOM MEDIJUMU I U LIPOZOMIMA

REZIME

Stabilnost hlorofila na dejstvo izabranih oksidacionih stresova u homogenom neuređenom vodenom medijumu i u uređenim lipozomnim strukturama tema je ove doktorske disertacije. Naime, jedinstvena uloga hlorofila zasnovana na njegovoj specifičnoj i vrlo raznovrsnoj hemijskoj reaktivnosti opravdava njegovu primenu u industrijskim tehnologijama, prehrambenoj i farmaceutsko-kozmetičkoj industriji, ali i u medicini. Pitanje stabilnosti hlorofila postavlja se kao jedan od preduslova njegove potencijalne primene u raznim oblastima nauke i tehnologije. Oksidacioni stresovi primenjeni na hlorofil *in vitro* su: hemijska oksidacija Fentonovim reagensom i termalnim inicijatorom, enzimski katalizovana oksidacija, kao i fotooksidacija vidljivim i UV-B zračenjem. Stabilnost hlorofila u vodenom medijumu nakon oksidacionih stresova, ispitivana je primenom apsorpcione spektrofotometrije, dok su odgovarajuće promene u strukturi Chl-molekula praćene elektro-sprej masenom spektrometrijom kombinovanom sa UHPLC hromatografijom, sa ciljem mogućeg uvida u mehanizme tih promena. Fizička stanja unutrašnjosti lipozoma uslovljena strukturom lipida, a koja utiču na penetraciju i ponašanje inkorporisanih hlorofila, samim tim i na drugačiji stepen njegove degradacije, ispitana su primenom apsorpcione i fluorescentne spektroskopije. Sa ciljem procene nekih mogućih mehanizama uključenih u date oksidacione stresove, pored već predstavljenih metoda, rađeni su tzv. peroksidni testovi: test konjugovanih diena i TBA-MDA test.

Dobijeni rezultati pokazuju da je stabilnost hlorofila zavisna ne samo od koncentracije hlorofila već i prirode primenjenog oksidacionog stresa. Generalno, hlorofil i u lipozomima, a posebno u vodenom medijumu pokazuje nizak stepen stabilnosti, što je rezultiralo njegovim modifikacijama, stvaranjem oksidacionih-degradacionih produkata. Destruktivnost primenjenih oksidacionih stresova na hlorofil mogla bi se gradacijski prikazati na sledeći način: dejstvo Fentonovog reagensa < dejstvo termalnog inicijatora < VIS < UV-B ozračivanje, pri čemu treba uzeti u obzir da je ovakav redosled dobijen primenom tačno definisanih uslova.

Na osnovu iznetih rezultata može se zaključiti da je poznavanje što tačnijeg mehanizma ponašanja hlorofila pod dejstvom oksidacionih stresova, kao i njegove optimalne koncentracije i stabilnosti u potencijalnim formulacijama, od krucijalnog značaja za njegovu dalju upotrebu.

Ključne reči: Hlorofil; Stres; Oksidacija; Stabilnost

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Hemija i hemijske tehnologije

UDK: 547.979.7+547.953:543.422

STABILITY OF CHLOROPHYLL ON OXIDATIVE STRESS IN WATER MEDIUM AND IN LIPOSOMES

ABSTRACT

The stability of chlorophyll on chosen oxidative stresses in disorganized aqueous medium and more organized liposomal structures is a topic of this doctoral thesis. The unique role of chlorophyll, based on its specific and very diverse chemical reactivity justifies its application in industrial technologies, food processing and pharmaceutical and cosmetic industry as well as in medicine. The question about chlorophyll stability is set as one of the preconditions for its potential applications in various areas of science and technology. *In vitro* oxidative stresses applied to the chlorophyll are: chemical oxidation by Fenton reagent and thermal initiator, enzyme catalyzed oxidation and photo-oxidation by continuous visible and UV-B irradiation. The stability of chlorophyll in the aqueous medium after oxidative stress was studied using absorption spectroscopy while the corresponding changes in the structure of Chl-molecules was followed by electro-spray mass spectrometry combined with UHPLC chromatography, in order to get the possible insight into the degradation-oxidation mechanisms. Changes in the physical conditions of the liposome interior (organized lipid structures), which affect the behavior of incorporated chlorophyll penetration and therefore a different degradation degree, were investigated using absorption and fluorescence spectroscopy. In addition to the presented methods, in order to evaluate some of the possible mechanisms involved in oxidative stress, two peroxide tests were performed: test of conjugated dienes and TBA-MDA test.

The results show that the stability of chlorophyll depends not only on chlorophyll concentration but also the nature of the applied oxidative stress. Generally, the chlorophyll in liposomes, the same as in the aqueous medium, shows a low stability degree, which resulted in its modifications, creating oxidation-degradation products. The destructiveness of the applied oxidative stresses on chlorophyll could be ranked as follows: the effect of Fenton reagent < effect of the thermal initiator < VIS < UV-B radiation, at precisely defined conditions. Chlorophyll is more stable in liposome dispersions, which supports the conclusion that it is better to keep it in liposomes than in water.

Based on these results it can be concluded that the more accurate knowledge of the chlorophyll behavior under the oxidative stress, as well as its optimal concentration and stability in the potential formulations, is crucial to its further use.

Keywords: Chlorophyll; Stress; Oxidation; Stability

Scientific field: Technological engineering

Scientific Area: Chemistry and chemical technology

UDC: 547.979.7+547.953:543.422

1. UVOD

Po svom značaju, hlorofil spada u jedno od najvažnijih bio-organskih jedinjenja pre svega zbog njegove centralne uloge koju ima u procesu fotosinteze, najvažnijem globalnom fizičko-hemijskom procesu na našoj planeti. Hlorofil je samo jedno jedinjenje u beskrajnom nizu hemijskih jedinjenja slične strukture, koja obavljaju druge izuzetno važne biološke funkcije (npr. hem-komponenta nekih krucijalnih proteina kao što su mioglobin ili hemoglobin takođe je porfirinske strukture kao i hlorofil). Ipak, do danas nije sintetizovan nijedan „surogat” hlorofila koji može obavljati njegovu centralnu ulogu u fotosintezi, čak i uprkos tome što se, puno radi na tzv.veštačkim modelima fotosinteze, gde se složena struktura fotosintetskog aparata, rekonstruiše na molekularnom nivou. Ova jedinstvena uloga hlorofila zasniva se i na njegovoj specifičnoj i vrlo raznovrsnoj hemijskoj reaktivnosti zbog koje je hlorofil našao svoje mesto i u nekim industrijskim tehnologijama (npr. u prehrambenoj i farmaceutsko-kozmetičkoj industriji), ali i u medicini: tzv.modifikovani proteini, koji nastaju zamenom originalnog hema hlorofilom, ili njegovim derivatima, koji se koriste kao lekovi u tzv.foto-dinamičkoj terapiji (PhotoDynamic Therapy, PDT) za lečenje pojedinih tipova kancera. Upravo iz ovih razloga pitanje stabilnosti hlorofila predstavlja jedan od preduslova njegove potencijalne primene u raznim oblastima nauke i tehnologije.

Hlorofil se smatra relativno nestabilnim jedinjenjem, posebno u prisustvu svetlosti i kiseonika. Takođe je dokazano da kiseline, temperatura, razni zagađivači, način skladištenja, ili razni enzimi mogu dovesti do degradacije (destrukcije) hlorofila, pod kojom se podrazumeva promena njegove hemijske strukture. Upravo iz ovih razloga kontrola faktora koji utiču na stabilnost hlorofila je neophodan preduslov mogućnosti kontrole njegove funkcije i aktivnosti, i njegove potencijalne upotrebe. Postoje brojni dokazi da je stabilnost hlorofila u vezi sa njegovom molekularnom organizacijom, tj. da zavisi od interakcija sa okolnim molekulima. Pri *in vitro* uslovima na stabilnost hlorofila uglavnom utiču interakcije sa molekulima rastvarača ali i međusobne Chl-Chl interakcije (pri većim koncentracijama), pa se stanje stabilnosti koje postoji u nekoj formi dinamičke (steady-state) ravnoteže može narušiti samo dejstvom eksternih stresova, uglavnom oksidacionog tipa.

U ovoj tezi je praćena stabilnost hlorofila na oksidacione stresove nastale dejstvom vidljive svetlosti, UV-B-zračenja, enzima, hemijskom oksido-redukcionom reakcijom (tzv.Fentonov sistem) kao i termalnim inicijatorom, i to kako u vodenom medijumu tako i u

lipozomima. Korišćenje tzv. lipidnih membranskih modela, lipozoma, pruža dosta potencijalnih prednosti u pogledu prenosa i dostave bioaktivnih komponenti inkorporisanih u lipozome do ciljnog mesta. Lipozomi su dosta čest sastojak raznih farmaceutsko-kozmetičkih formulacija u kojima igraju uloga tzv. „nosača” (eng. *carrier*) raznih bioaktivnih supstanci što je od posebnog značaja za njihov transport kroz biomembrane do željene „mete”. Proučavanja stabilnosti hlorofila na odabrani oksidacioni stres pored nesumnjivog čisto naučnog značaja ima i potencijalni tehnološki značaj u oblasti tehnologije farmaceutsko-kozmetičkih preparata, u kojima hlorofil može imati važnu ulogu bioaktivnog sastojka.

Eksperimenti urađeni u ovoj disertaciji su podeljeni na one urađene u (homogenom, neuređenom) vodenom medijumu i one urađene u organizovanim formama lipozoma, kako bi se dobio uvid o stabilnosti hlorofila na primenjene oksidacione stresove pri različitoj molekularnoj organizaciji hlorofila, kao i o eventualnoj zaštitnoj ulozi lipozoma kao nosača hlorofila. Stabilnost hlorofila u vodenom medijumu pri različitim koncentracijama hlorofila ispitivana je metodama VIS-spektrofotometrije i LC-MS spektrometrije radi detaljnije analize formiranih degradacionih produkata hlorofila nakon dejstva različitih oksidacionih stresova. Nakon eksperimenata urađenim u vodenom medijumu isti oksidacioni stresovi primenjeni su u lipozomima sa inkorporisanim hlorofilom. Hlorofili kao amfifilna jedinjenja, predstavljaju poseban izazov za samu inkorporaciju unutar fosfolidnog dvosloja lipozoma, te je stoga spektroskopsko dokazivanje njihovog prisustva unutar lipozoma bio izazov sam po sebi. Radi toga je metodom VIS-spektrofotometrije i polarizovane fluorescentne spektroskopije praćeno ponašanje inkorporisanog hlorofila i njegovog derivata hlorofilida, koji zbog razlike u strukturi u odnosu na hlorofil zauzima različitu orijentaciju u lipidnom dvosloju. Detekciji i karakterisanju efekata izabranih oksidacionih stresova na inkorporisane hlorofile u lipozomima prethodilo je praćenje vremenske stabilnosti hlorofila pri uslovima čuvanja. Radi ispitivanja uticaja strukture lipida na stabilnost lipozoma i inkorporisanih hlorofila korišćeni su različiti lipidi koji svojim strukturnim razlikama mogu indukovati različite odgovore na primenjene oksidacione stresove. Stepem indukovane peroksidacije lipozomnih lipida koji se nesumnjivo odvija uz učešće prisutnih ili stvorenih slobodnih radikala, kao rezultat primenjenih oksidacionih stresova, praćen je tzv. testom „konjugovanih diena” i TBA-MDA testom.

Na kraju je izvršena evaluacija i komparacija rezultata dobijenih u dva različita sistema (vodeni medijum, lipozomi) nakon čega su sistematizovani i diskutovani svi

detektovani faktori i parametri koji utiču na stabilnost hlorofila u datim uslovima. Na osnovu toga izvedeni su zaključci na tehnološku aplikativnost hlorofila, kao i na potencijalnu primenu dobijenih rezultata na već postojeće farmaceutske-kozmetičke formulacije u kojima hlorofil igra ulogu bioaktivne supstance, u smislu njihovog poboljšavanja ili inoviranja.

2. OPŠTI DEO

2.1. HLOROFIL

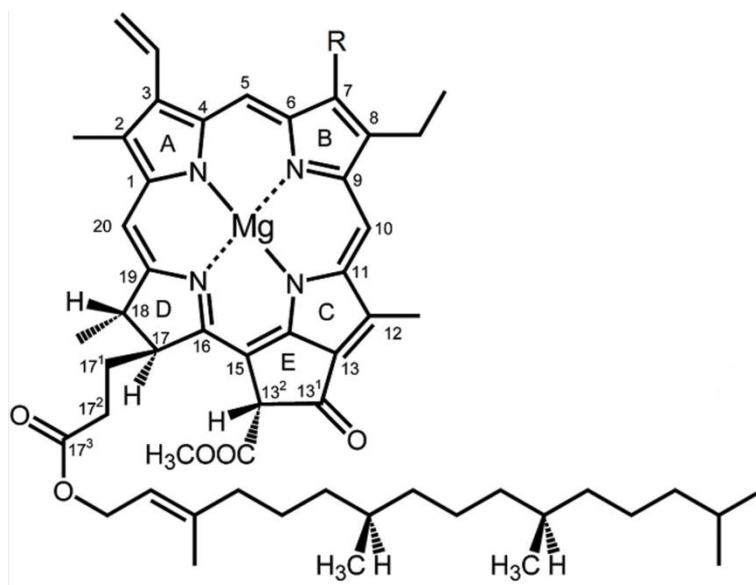
Hlorofil (Chl) je glavni fotosintetski pigment prisutan u svim fotosintetskim organizmima. Predstavlja jedno od najvažnijih bio-organskih jedinjenja uopšte, pre svega zbog centralne uloge koju ima u procesu fotosinteze, najvažnijem globalnom fizičko-hemijskom procesu na našoj planeti u kome dolazi do pretvaranja svetlosne energije u hemijsku energiju u cilju korišćenja za krajnji rezultat - sintezu organskih šećera.

Godine 1915. Dr Richard Willstatter je dobio Nobelovu nagradu za otkrivanje hemijske strukture hlorofila u formi „mreže” atoma ugljenika, vodonika, azota i kiseonika koji okružuju jedan atom magnezijuma. Petnaest godina kasnije (1930.) Dr Hans Fisher je dobio Nobelovu nagradu za otkriće hemijske strukture hemoglobina, uz zapažanje da je ona u jednom svom delu veoma slična strukturi hlorofila. Totalnu sintezu hlorofila izvršio je R.B. Woodward 1960. godine (Woodward *et al.* 1960), potvrdivši strukturu porfirinskog tipa: 4-pirolna prstena koordinisana centralnim Mg-atomom u sredini (**Sl.1**). Raspored dvostrukih veza po spoljašnjem obodu porfirinske strukture je konjugacioni (naizmenični raspored jednostrukih i dvostrukih veza), što je od presudnog značaja za ulogu koju ima u fotosintezi, jer pomera apsorpcioni maksimum ka većim talasnim dužinama, u vidljivu oblast sunčevog spektra.

Danas je poznato da postoji više vrsta hlorofila, od kojih je najvažniji i najzastupljeniji hlorofil *a* (Chl*a*). Sve biljke, alge i cijanobakterije koje vrše fotosintezu, sadrže hlorofil *a*. Druga najčešće zastupljena vrsta hlorofila je hlorofil *b* (Chl*b*), koji se nalazi samo u zelenim algama i biljkama. Ova dva tipa hlorofila se veoma malo razlikuju - u sastavu bočnih lanaca, kod Chl*a* u poziciji C-7 vezana je metil (-CH₃), a kod Chl*b* aldehidna (-CHO) grupa. Kao i sve ostale forme hlorofila (Scheer, 2007), i Chl*a* i Chl*b* su vrlo efikasni fotoreceptori zbog svoje ciklične, konjugovane strukture porfirinskog tipa.

Po svojoj hemijskoj strukturi Chl*a* je (kao i Chl*b*) hlorin, pod-derivat porfirina, sa delimično zasićenom strukturom u pirolnom prstenu D – **Sl.1** (za razliku od potpuno nezasićenih porfirina). Centralni Mg-atom je vezan za azotove atome pirolnih prstenova (A-D) sa dve kovalentne i dve koordinativne veze. Petočlani izociklični prsten (E) je vezan za porfirin u „desnom uglu” porfirinske strukture, u položaju C-(13-15), a ostatak propanske

kiseline, esterifikovane fitolom ($C_{20}H_{39}OH$), vezan je za položaj C-17³ hlorinskog prstena (Sl.1).



Slika 1. Struktura hlorofila sa numerisanim C-atomima (R: $-CH_3$ –hlorofil *a*; $-CHO$ –hlorofil *b*).

2.2. Derivati hlorofila

Najčešće prisutni derivati hlorofila su feofitini, feoforbidi i hlorofilidi. Ovo se tiče svih prisutnih formi hlorofila, dakle ne samo Chl*a* i Chl*b*, nego i ređe zastupljenijih formi (Chl *c*, *d*, *e*, *f* – Scheer, 2007).

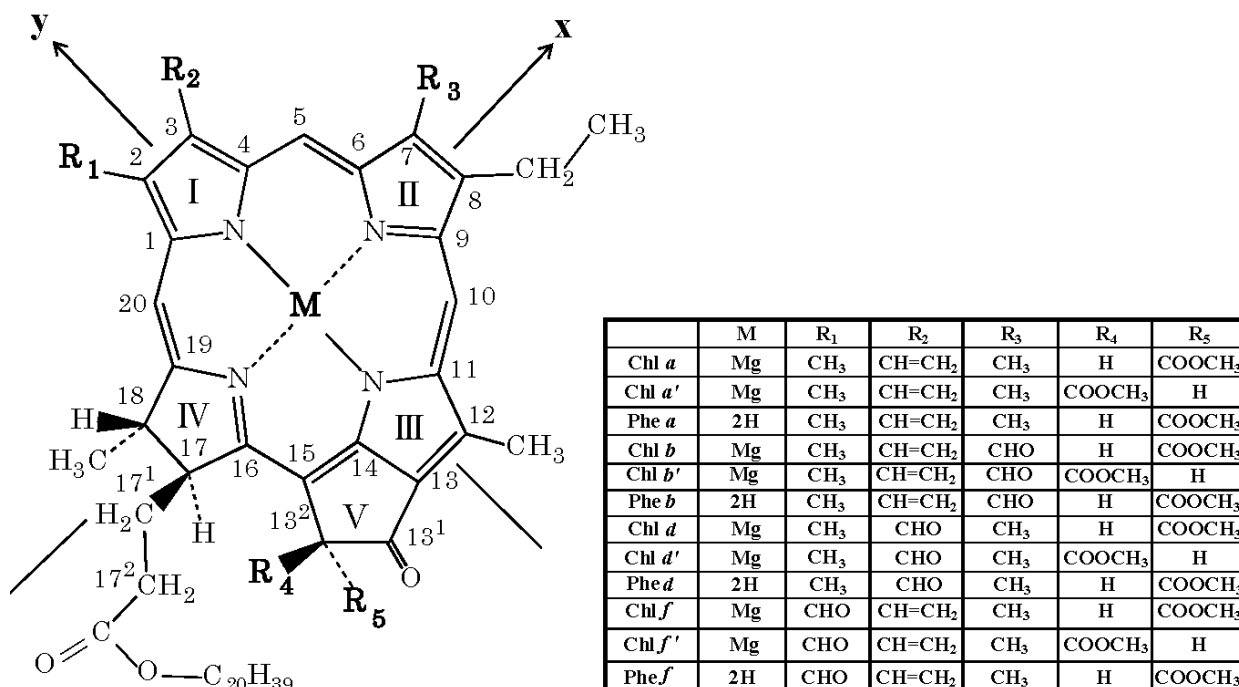
Feofitini (Pheophytins, Pheo) su derivati hlorofila kod kojih je centralni metalni atom Mg, supstituisan sa dva atoma vodonika (hlorofili bez centralnog Mg).

Feoforbidi (Pheophorbides, Pheid) su derivati hlorofila bez Mg atoma i bez fitilnog ostatka u položaju C-17³ (feofitini bez ostatka fitola) (Walker *et al.* 1987).

Hlorofilidi (Chlorophyllides, Chlid), derivati hlorofila, formiraju se u poslednjim koracima biosinteze hlorofila iz protohlorofilida (Rudiger *et al.* 2006; Scheer, 2003a&b), u degradacionim procesima kao što je starenje listova (Brown *et al.* 1991) ili u toku normalnog metabolizma pigmentno-proteinskih kompleksa (Almela *et al.* 2000). Degradacioni proces kojim nastaju obuhvata gubitak fitila (ili tzv. fitolnog „repa“) hlorofila i modifikaciju bočnih lanaca na izocikličnom prstenu u reakciji koja je katalizovana uz pomoć nekoliko enzima (Yuzo *et al.* 1996).

Epimer hlorofila *a*, *Chl a'*, je još ranije pronađen kao sastojak ekstrakta hlorofila i on se reverzibilno može konvertovati u *Chl a*.

Svi derivati hlorofila vrlo lako nastaju u samim biljkama *in vivo*, ali i u *in vitro* uslovima, zavisno od načina ekstrakcije i obrade pigmentnog materijala. Strukture gore probrojanih ali i ostalih najčešće prisutnih hlorofilnih derivata prikazane su na **Slici 2**.

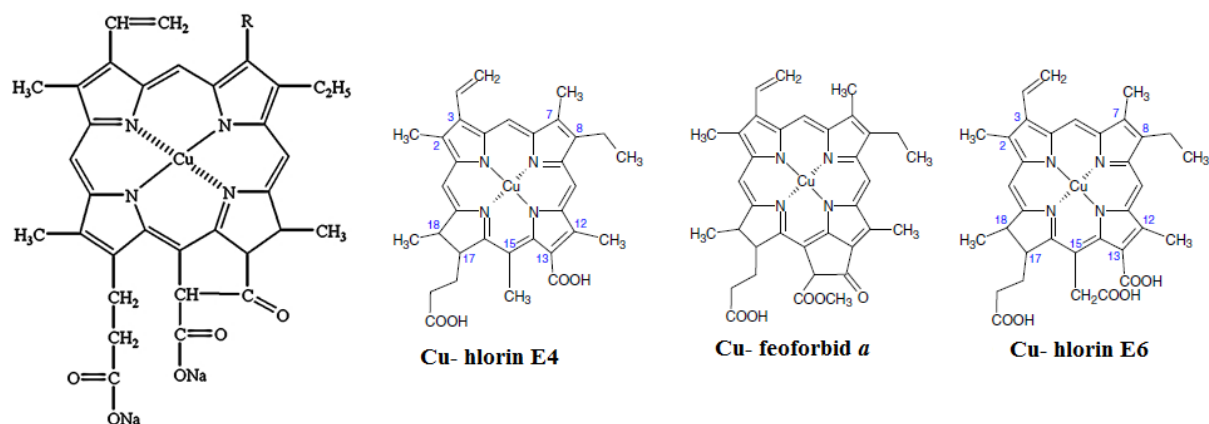


Slika 2. Derivati hlorofila, reprodukovano iz Kobayashi *et al.* 2013.

2.2.1. Hlorofilin

Hlorofilin (Chlorophyllin) je derivat hlorofila koji se od hlorofila razlikuje po tome što ne poseduje fitilni lanac (C₂₀H₃₉O- u poziciji C-17³) zbog čega je hidrofilan (**Sl.3**) (Egner *et al.* 2000).

Hlorofilin se dobija u reakciji saponifikacije hlorofila *a*, u baznoj sredini, u prisustvu Na-metanolata koji „otvara” izociklični prsten, uklanja fitilni lanac i Mg iz porfirinske strukture (Itoh *et al.* 1996). Magnezijum se iz strukture hlorofila može ukloniti i dejstvom bakar-sulfata u kiselj sredini, pri čemu se ujedno povećava hemijska stabilnost formiranog hlorofilina (Tumolo & Lanfer-Marquez, 2012). Hemijskim reakcijama koje su uključene u sintezu hlorofilina formira se mešavina više jedinjenja, hlorina, koji se u literaturi navode kao: Cu-hlorin E4, E6 i često Cu- feoforbid *a* (**Sl.3**).



Slika 3. Struktura hlorofilina (R: -CH₃- hlorofilin *a*; -CHO- hlorofilin *b*) i njegovih derivata.

Hlorofilini su jedni od najmoćnijih antioksidanata ikada proučavanih. Dokazano je da hlorofilini mogu da neutrališu nekoliko relevantnih oksidanata *in vitro*, a ograničeni podaci iz studija urađenih na životinjama ukazuju na to da suplementacija hlorofilinom može da smanji nanešenu štetu od hemijskih kancerogena i radijacije (Dashwood, 1997; Dashwood & Liew, 1992).

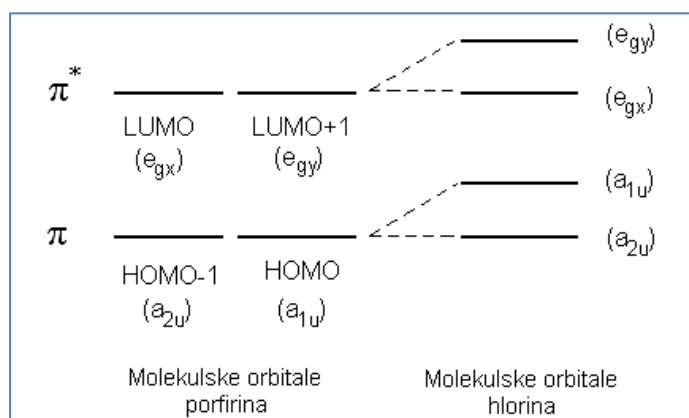
Dakle, eksperimentalne studije pokazuju da hlorofilin ima i antikancerogeno dejstvo. Hlorofilini su pokazali izuzetnu sposobnost da se kompleksiraju sa toksinima i kancerogenim policikličnim aromatičnim ugljovodonicima (Egner *et al.* 2003; Mata *et al.* 2004; Simonich *et al.* 2008). Oni imaju veoma važnu ulogu u unutrašnjoj detoksikaciji tela; unutrašnja detoksikacija podrazumeva skup procesa kojima se toksini iz organizma neutrališu, transformišu ili eliminišu.

Za razliku od hlorofila, hlorofilini su jedinjenja rastvorljiva u vodi, zbog čega se koriste kao koloranti u prehrambenoj industriji, aktivne komponente lekova (DerifilTM[®]), kao i katalizatori za zarastanje rana (PanafilTM[®]), (Kephart, 1955; Tumolo & Lanfer-Marquez, 2012).

2.3. Apsorpcioni i emisioni spektri hlorofila

Hlorofili i njegovi derivati su obojena organska jedinjenja, pa apsorbuju u vidljivoj, VIS oblasti spektra, a sve to zahvaljujući visokoj delokalizaciji π -molekulskih orbitala po obodu porfirinske strukture koja im to omogućava.

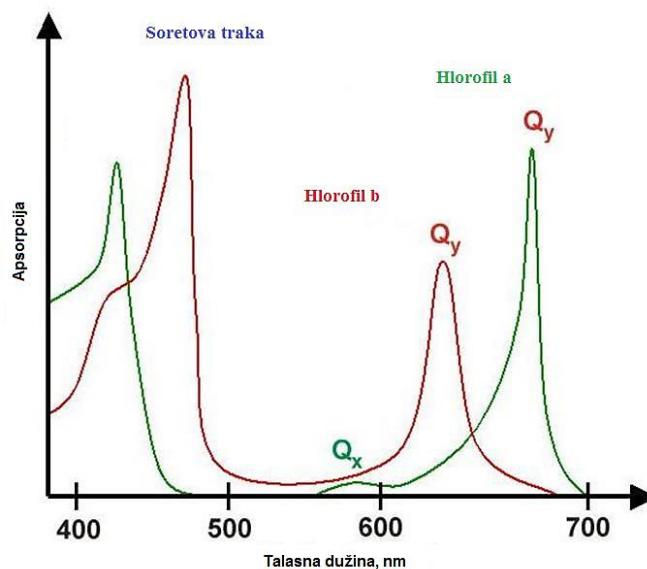
Budući da su hlorofili derivati porfirina, mogu se očekivati sličnosti njihovih optičkih spektara (Hoff & Ames, 1991). Realativno jednostavan model koji se pokazao jako uspešnim je model Gouterman-a (1978). Po Gouterman-u, spektri porfirina su rezultat linearne kombinacije jednoelektronskog prelaza između dve najviše popunjene i dve najniže nepopunjene molekulske π -orbitale: HOMO i HOMO-1 odgovaraju a_{1u} i a_{2u} (π) vezujućim orbitalama, a LUMO i LUMO+1 odgovaraju e_{gx} i e_{gy} (π^*) antivezujućim orbitalama, respektivno (SI.4). U „crvenoj” VIS oblasti se javljaju tzv. Q-trake koje potiču od oduzimajuće kombinacije dve orbitale, a u „plavoj” VIS oblasti su tzv. B- ili Soret-ove trake koje potiču od sabiranja dve orbitale.



Slika 4. Energetski raspored π -molekulskih orbitala nesupstituisanih porfirina (levo) i njegovih derivata, hlorina, gde spada i hlorofil (desno), između kojih postoje elektronski prelazi, nastali apsorpcijom fotona u VIS oblasti. π – Vezujuće molekulske orbitale najvišeg popunjenog energetskog nivoa porfirinskog i hlorinskog prstena; π^* - antivezujuće molekulske orbitale najnižeg nepopunjenog energetskog nivoa porfirinskog i hlorinskog prstena.

Apsorpcioni spektar Chla u etru karakteriše jaka „plava” Soret-ova traka sa maksimumom apsorpcije (A_{max}) na $\lambda_{Soret,max} \sim 430$ nm i relativno jaka „crvena” Q_y -traka na $\lambda_{Q_y,max} \sim 662$ nm (SI.5 - zeleno). Slaba traka u obliku ramena na kraćim talasnim dužinama u odnosu na Q_y -traku (615 nm) je verovatno kombinacija viših tonova O_y prelaza. Slaba traka na 578 nm je verovatno Q_x -prelaz. Apsorpcioni spektri hlorofila *a* i *b* prikazani su zajedno na **Slici 5**. Chla je hlorin kod koga je delokalizacija narušena kod pirolnog prstena D, pa se i očekuje da $a_{1u}(\pi)$ i $e_{gy}(\pi^*)$ molekulskim orbitalama raste energija, dok $a_{2u}(\pi)$ i $e_{gx}(\pi^*)$ ostaju

nepromenjene. Zato se i očekuje da Q_y -traka bude pomerena „crveno” i slabijeg intenziteta u odnosu na nenarušenu porfinsku strukturu. Chla se može naći u dve epimerne forme sa različitim hromatografskim ponašanjem, ali identičnim VIS spektrima.



Slika 5. Apsorpcioni spektri hlorofila *a* i *b*.

Apsorpcioni spektar Chlb u etru (**Sl.5-** crveno), pokazuje značajnije razlike u odnosu na Chla. Soret-ova traka je „crveno pomerena”na oko 455 nm (batohromni efekat), a Q_y prelaz je „plavo” pomeren na oko 644 nm (hipsohromni efekat). Ovo je posledica zamene metil-grupe kod Chla na poziciji C-7, aldehidnom grupom kod Chlb, što stvara konjugovani sistem dvostrukih veza koji kompenzuje „narušeni” prsten D.

Presudan uticaj na intenzitet i položaj apsorpcionih traka hlorofila u VIS spektrima ima raspodela π -elektronske gustine, na koju utiču faktori kao što su: supstitucija, aksijalni ligandi, vodonično vezivanje i naelektrisane grupe, kao i uticaj okoline. Takođe, preklapanja π -orbitala u dimerima ili oligomerima Chl, dovode do daljeg batohromnog pomeranja apsorpcionih maksimuma za desetak nanometara. Vodonično vezivanje molekula rastvarača sa molekulima hlorofila kao i vezivanje aksijalnih liganada imaju malog uticaja na pomeranje maksimuma apsorpcije.

Apsorpcija u VIS oblasti se može koristiti i kao odlična osnova za proučavanje donor-akceptorskih interakcija Chla. U monomernoj formi, u kojoj molekuli rastvarača okružuju Chl molekul, Mg-atom se ponaša kao akceptor elektrona, npr. u slučaju acetona. U oligomerima, u kojima se jedan molekul hlorofila povezuje sa drugim molekulom hlorofila,

Mg-atom iz jednog molekula hlorofila igra ulogu akceptora i veže se za karbonilnu grupu drugog molekula hlorofila (položaj 13^1 , 13^2 , 17^3 - **Sl.1**), koji tom prilikom ima ulogu elektron-donora. Sa povećanjem broja agregiranih molekula u Chl-oligomeru, apsorpcioni maksimum njegovog VIS spektra se pomera ka dužim talasima kao posledica dodatnog preklapanja π -orbitala makrocikličnog sistema (Katz *et al.* 1978).

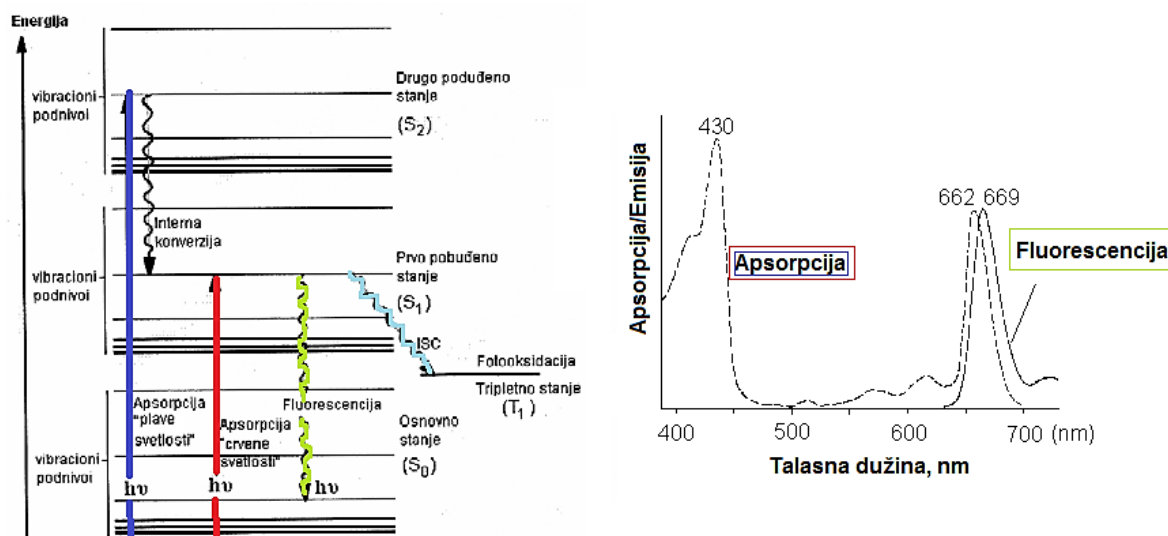
Fluorescencija je rezultat relaksacije pobuđenog molekula, jednim od više mogućih mehanizama, pri čemu on, vraćajući se na osnovni energetska nivo emituje odgovarajući eksciton („fluorescentni foton”). Molekuli koji imaju mogućnost da fluoresciraju se konvencionalno nazivaju fluorofore ili fluorohrome ili fluorescentne boje (Lakowicz, 2006).

Fluorescirajući molekul može imati dva karakteristična spektra – ekscitacioni i emisioni spektar. Ekscitacioni spektar je pokazatelj verovatnoće da fluorohroma bude ekscitovana svetlošću određene talasne dužine, pri čemu je veoma sličan apsorpcionom spektru. Teoretski, fluorohroma je najefikasnije ekscitovana talasnim dužinama koje odgovaraju vrhu pika u ekscitacionom spektru. Međutim, u praksi veoma često hemijska okolina fluorohrome, snaga upotrebljenog izvora ekscitacije i niz drugih faktora određuju tačnu ekscitacionu talasnu dužinu (Lakowicz, 2006).

Maksimum pika u fluorescentnom spektru odgovara energetskaoj razlici između vibracionog nivoa najnižeg ekscitovanog energetskaog stanja, S_1 , i odgovarajućeg vibracionog podnivoa osnovnog (nepobuđenog) energetskaog stanja (S_0) fluorescentnog molekula, iznad nultog (vibracionog) nivoa. Zbog toga je maksimum fluorescentnog spektra (F_{max}) uvek pomeren prema nešto većim talasnim dužinama (nižoj energiji) u odnosu na ekscitacioni spektar (batohromni pomeraj). Razlika između maksimuma emisionog i ekscitacionog pika se naziva Štoksovo pomeranje (Stokes shift). Pošto su vrhovi maksimuma u ekscitacionim i emisionim spektrima razdvojeni, interferencija ekscitacionih i emisionih fotona može biti izbegnuta upotrebom odgovarajuće optike koja umanjuje smetnje i šumove i na taj način poboljšava osetljivost fluorescentne tehnike (Lakowicz, 2006).

Na **Slici 6** prikazani su zajedno apsorpcioni i fluorescentni spektar hlorofila kao i mehanizmi kojim nastaju nakon ekscitacije. Uzevši u obzir mali batohromni pomeraj u položaju fluorescentnog maksimuma (F_{max}) u odnosu na apsorpcioni maksimum (A_{max}), može se reći da se fluorescentni i apsorpcioni spektar hlorofila odnose kao predmet i lik u ogledalu

(SI.6, desno). Profil fluorescentnog spektra hlorofila varira zavisno od forme hlorofila i njegovog okruženja.



Slika 6. Mehanizmi rasipanja energije (disipacije, dezaktivacije) pobuđenog molekula hlorofila (levo); Elektronski prelazi $S_0 \rightarrow S_1$, $S_0 \rightarrow S_2$ nastaju apsorpcijom (\uparrow) „crvenog”, odnosno „plavog” fotona, respektivno. Neradijaciona disipacija: interna konverzija (interval conversion, *ic*), $S_2 \rightarrow S_1$, i intersistemski prelaz (*isc* – intersystemcrossing), $S_1 \rightarrow T_1$. Radijaciona disipacija (emisija), fluorescencija, $S_1 \rightarrow S_0$, sa odgovarajućim pratećim apsorpcionim spektrom (desno).

Fluorescencija daje informacije ne samo o strukturnim detaljima fluorohromnog molekula, već i o dinamici procesa njegove dezaktivacije unutar date okoline (*in vitro*, *in vivo*, *in situ*). Ova metoda se danas ubraja u red najpogodnijih, neinvazivnih, visoko senzitivnih, brzih, direktnih, jeftinih i kvantitativnih metoda (Maxwell & Johnson, 2000).

2.4. STABILNOST HLOROFILA

Za hlorofil se generalno može reći da je nestabilan, i to pre svega na svetlosti (Llewellyn, 1990 a&b), ali i u „mraku” (proces metalacije i de-metalacije, kao i brojne reakcije koje se dešavaju po „obodu” skeleta porfirinske strukture: enolizacija, alomerizacija itd. (Hynninen, 1991). Upravo iz ovih razloga kontrola faktora koji utiču na stabilnost hlorofila je neophodan preduslov mogućnosti kontrole njegove funkcije i aktivnosti.

Postoje brojni dokazi da je stabilnost hlorofila u vezi sa njegovom molekularnom organizacijom, koja direktno zavisi od interakcija sa okolnim molekulima. U rastvoru je stabilnost hlorofila pre svega određena interakcijama sa rastvaračem, njegovom polarnošću, pH vrednošću itd. Poznato je da u polarnim rastvaračima Chl egzistira u „monomernoj” a u nepolarnim rastvaračima u „dimernoj” ili čak „oligomernoj” formi (Katz *et al.* 1978; Zvezdanović *et al.* 2009). Međutim upravo sa tačke gledišta funkcionisanja hlorofila *in situ* (npr. unutar fotosintetskog aparata), ali i njegove upotrebe u raznim tehnologijama, posebno je važno pitanje stabilnosti hlorofila u vodenom medijumu koji predstavlja prirodno okruženje u kome se odvijaju najvažniji biohemijski i fiziološki procesi.

Faktori koji utiču na stabilnost hlorofila mogu biti interni, tj. inherentni samom sistemu u kome se nalazi Chl, ali i eksterni. U *in vitro* uslovima na stabilnost hlorofila uglavnom utiču interakcije sa molekulima rastvarača ali i međusobne Chl-Chl interakcije (pri većim koncentracijama), pa se stanje stabilnosti koje postoji u nekoj formi dinamičke (steady-state) ravnoteže može narušiti samo eksternim putem. S druge strane, u *in vivo* uslovima stabilnost hlorofila određena je sinergetičnim dejstvom obe grupe faktora. Tipičan primer za to je oksidacija lipidnih komponenata biomembrana (tkiva i organa) - poznata i pod nazivom lipidna peroksidacija - koja može biti interno, ali i eksterno indukovana. U prvom slučaju ona može biti indukovana raznim endogenim faktorima koji dovode do produkcije tzv. reaktivnih kiseoničnih vrsta (*Reactive Oxygen Species* – ROS), odnosno kiseoničnih radikala koji su zapravo glavni inicijatori i propagatori ovog procesa, a u drugom slučaju kao inicijalni faktor se često javlja eksterna radijacija, poput npr. UV-zračenja (Cvetković & Marković, 2008).

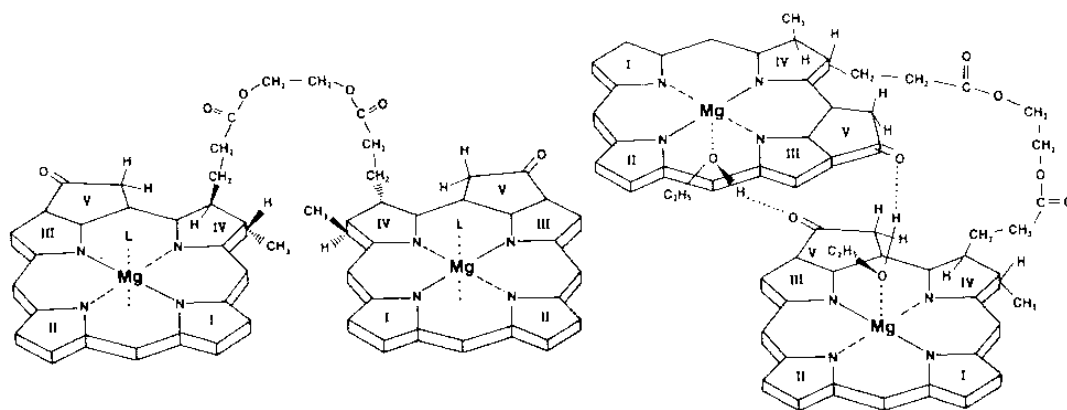
Stabilnost hlorofila na eksterne faktore tj. stresove, poput UV-B iradijacije, vidljivog zračenja, dejstva hemijskih agenasa, koji se u manjoj ili većoj meri mogu smatrati oksidacionim stresovima, je uslovljena brojnim faktorima, između ostalih i molekularnom organizacijom molekula hlorofila u posmatranom medijumu. Efekat agregacije koji zavisi,

kako od koncentracije hlorofila tako i od medijuma u kome se hlorofil nalazi, utiče na stabilnost hlorofila, odnosno mogućnost njegove eventualne degradacije i formiranje degradacionih produkata.

2.5. Agregacija hlorofila

Ključno u sposobnosti hlorofila da gradi agregate (*in vitro* i *in vivo*) je njegovo elektron-donor-akceptorsko svojstvo (Katz *et al.* 1978). Mada je koordinacioni broj Mg-atoma 4 (dve veze su kovalentnog, a dve koordinativnog karaktera), većina spektralnih podataka ukazuje na to da je u molekulu Chl koordinacioni broj Mg-atoma veći od 4. Objašnjenje je u tome što jedna ili obe aksijalne pozicije Mg-atoma mogu biti zauzete molekulima koji poseduju slobodan elektronski par, sposoban da učestvuje kao elektron-donor tetra-koordinisanom atomu Mg. Sudeći po hemijskoj strukturi hlorofila, elektron-donor može biti i sam Chl, jer ima karbonilne grupe sa kiseonikom kao donatorom elektrona (u Chl: jedna C=O grupa u poziciji C-13¹ i dve estarske C=O grupe u pozicijama C-13³ i C-17³). Tako Chl igra i ulogu akceptora, i ulogu donora elektrona.

Kada je Chl rastvoren u polarnom rastvaraču (nukleofilni, Luisova baza) kao što je aceton, dietiletar, tetrahidrofuran ili piridin, rastvarač je donor elektrona za Mg iz hlorofila, pa se Chl tada nalazi u obliku monomera koji može biti penta- ili hekza koordinisan. Postoje rastvarači koji su bifunkcionalni, sa dva elektron-donorska mesta, poput pirazina ili dioksana, koji poseduju dve funkcionalne grupe. U takvim uslovima, Chl se može naći u agregisanom stanju, pri čemu bifunkcionalni ligand služi kao spona između dva molekula hlorofila, sa svoja dva elektron-donorska mesta: Chl···ligand···Chl (dva molekula hlorofila vezana za molekul rastvarača preko njegovih funkcionalnih grupa). Ovakav tip agregacije naziva se egzogamni (gr. *exogamous*), mada se stvoreni agregati nazivaju i Chl-adiukti (Chl-adducts – Katz *et al.* 1978). Zahvaljujući donorsko-akceptorskoj osobini molekula Chl, postoji i endogamna interakcija (gr. *endogamous*), ili tzv. auto-agregacija hlorofila (*self-aggregation* – Katz *et al.* 1978), kada se dva ili više molekula Chl međusobno agregišu i grade dimere, (Chl)₂ ili oligomere hlorofila, (Chl)_n. Slikoviti prikaz agregisanih molekula hlorofila dat je na **Slici 7**.



Slika 7. Agregacija hlorofila, adaptirano iz (Мосин, 2006).

Tada je Mg-atom jednog Chl molekula akceptor elektrona, dok je karbonylna grupa drugog Chl-molekula donor elektrona, $Mg \cdots O=C \approx$. Ovakav tip interakcije je prisutan u nepolarnim rastvaračima kao što su ugljen-tetrahlorid (CCl_4), benzen, ciklični i aciklični alifatični ugljovodonici (kao *n*-heksan – Zvezdanović *et al.* 2009). Kao „konkurenti” za koordinaciono mesto centralnog Mg-atoma u Chl-molekulu tokom postupka prerade biljnog materijala (ekstrakcije i izolacije frakcija radi dobijanja što čistije Chl-frakcije) mogu da učestvuju sledeći elektron-donori (nukleofili): lipidi zaostali prilikom prečišćavanja hlorofila, nukleofilni agensi iz acetona, petrol-etra, metanola koji su korišćeni prilikom obrade hlorofila, kao i nukleofilne nečistoće iz adsorbenasa kod hromatografisanja hlorofilnih uzoraka. Od svih nukleofila, voda je najvažniji i najjači nukleofil (Katz *et al.* 1978).

U nepolarnim rastvaračima kao što su alifatični ciklični i aciklični ugljovodonici, hlorofil egzistira kao oligomer u koncentracijama većim od 0.1 M. Ovakvi rastvarači su nepolarizabilni pa se više molekula Chl grupiše tako da se svojim alifatičnim krajevima (kao što je fitilni „rep” iz esterifikovanog alkohola fitola u poziciji C-17³), orijentiše ka molekulima okolnog rastvarača. Malim dodatkom nekog nukleofilnog agensa rastvorima agregisanog Chl, agregati se raskidaju. Takođe, sa porastom temperature medijuma agregacija se postepeno narušava. Eksperimentalno je utvrđeno da se oblast agregacije hlorofila, u rastvaračima poput metanola i vode kreće u opsegu koncentracije 10^{-5} - 10^{-2} M (Ballschmiter & Katz, 1969).

Najbolji eksperimentalni rezultati koji se tiču degradacionih produkata hlorofila kao posledici alomerizacije u rastvoru, mogu se dobiti HPLC-MS analizom (Woolley *et al.* 1998). Eksperimentalno je utvrđeno da u vodenim ili metanolnim rastvorima dolazi do stvaranja

alomerizacionih produkata hlorofila poput hidroksi-hlorofila *a* (m/z 909), metoksi hlorofila *a* (m/z 923) i metoksilakton hlorofila *a* (m/z 939) (Woolley *et al.* 1998).

S obzirom na nerastvorljivost hlorofila u vodi, njegovo rastvaranje u vodenom medijumu uslovljeno je prethodnim rastvaranjem u rastvaračima poput metanola, acetona i sličnih (Agostiano *et al.* 2002). Različita priroda nepolarnih rastvarača u kojima je hlorofil najpre rastvoren pre dodavanja vodenog medijuma, utiče na formiranje dva moguća tipa Chl-agregata, onih koji apsorbuju u oblasti od 740-760 nm (metanol, etanol, acetonitril, aceton), i koji apsorbuju u oblasti 667-670 nm (piridin, tetrahidrofuran) (Vladkova, 2000). Dakle, organizacija hlorofila zavisi od polarnosti i koordinacione sposobnosti organskih rastvarača.

Agregacija hlorofila može se sprečiti smanjenjem koncentracije hlorofila ispod granice u kojoj nastaju agregati, ali je takođe moguće sprečiti agregaciju molekula njihovom inkorporacijom u organizovane strukture poput lipozoma (Hongying *et al.* 1999). U takvim sistemima raspored molekula hlorofila između molekula lipida može omogućiti disagregaciju pigmenta čime povećava i njegovu fotoaktivnost (Hongying *et al.* 1999; Agostiano *et al.* 1996). Na osnovu navedenih podataka, može se pretpostaviti da agregacija hlorofila u vodenom medijumu (*in vitro*) može usloviti različit odgovor hlorofila na dejstvo oksidacionih stresova.

2.6. DEGRADACIJA HLOROFILA

Degradacija hlorofila, pod kojom se podrazumeva promena hemijske strukture hlorofila, dešava se u toku svih faza životnog ciklusa biljaka, kao i usled dejstva različitih ekoloških faktora (George *et al.* 1987; Mangosá & Berger, 1997). Nestanak hlorofila se pre svega manifestuje gubitkom zelene boje u lišću biljaka. Kiseline, temperatura, svetlost, kiseonik, zagađenje, fizički stres i enzimi mogu dovesti do destrukcije hlorofila (Hortensteiner, 1999). Zbog toga uslove skladištenja (temperatura, svetlo, kiselost) kao i procese obrade biljnog materijala treba kontrolisati kako bi se stabilnost hlorofila održala u mogućoj meri (Heaton *et al.* 1996). Dokazano je da temperatura ima veliki uticaj na formiranje degradacionih produkata i to tako da na nižim temperaturama u mraku nastaju feofitini, feoforbidi, i hidroksi – Chl-derivati, dok na višim nastaju pirofeofitini. Svetlost takođe utiče na hlorofil stvarajući pretežno feofitine. Zagađenje sredine inicira degradaciju kiseoničnim radikalom; SO₂ utiče na stvaranje C-13 radikala koji formiraju hidroksi hlorofilne derivate (Kunert *et al.* 1985). Degradacija zavisi i od pH vrednosti. Eksperimentalno je utvrđeno da je najveći procenat degradacije Chl_a postignut pri niskim vrednostima pH, dok se u neutralnoj sredini hlorofil pokazao najstabilnijim. Na **Slici 8** šematski je prikazan mogući degradacioni put hlorofila.

Reakcije degradacije hlorofila mogu se svrstati u dva tipa reakcija. Prvi tip (Tip I), podrazumeva gubitak magnezijumovog atoma, fitilnog lanca i modifikaciju izocikličnog prstena ali ne i degradaciju samog tetrapirolnog jezgra. Drugi tip degradacionih reakcija (Tip II), podrazumeva „cepanje” cikličnog (porfirinsko/hlorinskog) prstena i naknadno kidanje C- i N-fragmenata. Oba tipa reakcija su prisutna u biološkim sistemima. Degradacioni produkti Tipa II, za razliku od degradacionih produkata Tipa I, nisu potpuno identifikovani, i sa jako malo izuzetaka vode formiranju produkata male molekulske mase i nebojenih fragmenata.

Degradacione reakcije Tipa I

1. Gubitak magnezijuma

U kiseljoj sredini hlorofil podleže gubitku magnezijuma pri čemu formira degradacioni produkt zeleno-braon boje poznatiji kao feofitin, koji se od hlorofila razlikuje po veoma promenjenom apsorpcionom spektru. Za razliku od apsorpcionih karakteristika Chl_a, crveni apsorpcioni maksimum feofitina *a* (Pheo_a) u acetonu je pomeren batohromno (λ_{\max} =665 nm), dok je maksimum plave trake spektra pomeren hipsokromno (λ_{\max} =410 nm). Ova reakcija je

jako česta čak i za hlorofilide kod kojih tom prilikom dolazi do formiranja feoforbida (tj. feofitina hlorofilida). Magnezijum može biti „regenerisan” i vraćen u strukturu hlorofila putem Grignardove reakcije ali je za dati postupak neophodno obezbediti inertnu sredinu kako bi se sprečila oksidacija (Jackson, 1976).

2. Otkidanje fitilnog lanca - hidroliza i alkoholiza

Jedna od najčešćih degradacionih reakcija je otkidanje fitilnog lanca reakcijama hidrolize i alkoholize. Tom prilikom nastaju hlorofilidi u obliku kiselina ili njihovih estara. Hlorofili takođe mogu biti hidrolizovani u blago kiselim ili alkalnim uslovima bez istovetne hidrolize C-13² metoksikarbonilne grupe, pri čemu će svakako doći do formiranja feoforbida zbog gubitka magnezijuma u kiselim uslovima. Ukoliko se hidroliza vrši dejstvom hlorofilaze ili kiseline u prisustvu alifatičnih alkohola poput etanola ili metanola, onda je izvesno da dođe do alkoholize i produkcije estara hlorofilida (Hendry *et al.* 1987).

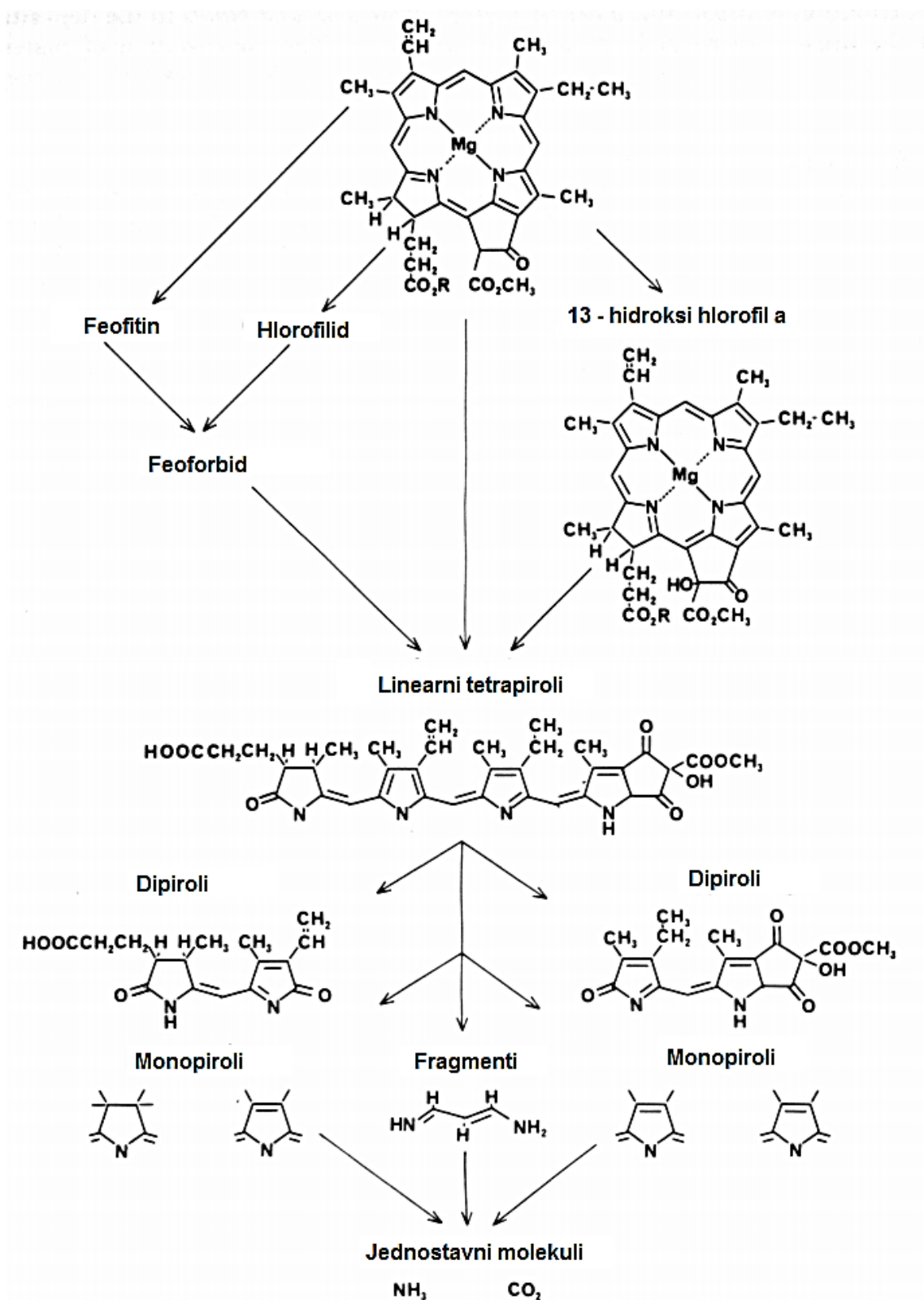
3. Reakcije na izocikličnom prstenu

Neki hlorofili i derivati hlorofila sadrže izociklični petočlani prsten bez metoksikarbonilne grupe u C-13² položaju (tzv. pirohlorofili¹). Metoksikarbonilna grupa u C-13² položaju može biti uklonjena ili modifikovana na različite načine. Pirohlorofili se mogu dobiti zagrevanjem hlorofila u piridinu na 100°C u toku 48 h. Reakcije oksidacije hlorofila u položaju C-13 su poznatije kao reakcije alomerizacije (Pennington *et al.* 1963). One se uglavnom dešavaju u hlorofilnim rastvorima etanola ili metanola u prisustvu kiseonika. Reakcije koje se tada dešavaju smatraju se kompleksnim i formiranje produkata zavisi od uslova pri kojima se odvijaju, ali se svakako kao produkti degradacije mogu detektovati C-13² metoksi i hidroksi derivati hlorofila (Brown *et al.* 1991).

4. Reakcije vinil grupe

Vinil grupa u C-3 položaju hlorofila može biti lako redukovana do etil grupe ali je mogućnost dešavanja te reakcije u biološkim sistemima mala. Mnogo izvesnija reakcija je reverzibilna hidratacija vinil grupe pri čemu se formira hidroksietil derivat. Ova reakcija je moguća u slabo kiselim sredinama poput razbaženog rastvora hlorovodonične kiseline (Brown *et al.* 1991).

¹Hlorofili i njegovi derivati koji u svom nazivu sadrže prefiks –piro, u prstenu E nemaju metoksi karbonilnu grupu.



Slika 8. Model mogućih reakcija degradacije hlorofila, R-fitilni lanac (Hendry *et al.* 1987). U gornjem delu slike preovlađuju reakcije Tipa I, a u donjem delu reakcije Tipa II.

Degradacione reakcije Tipa II

1. Fotohemijska degradacija

Odavno je poznato da izlaganje svetlosti dovodi do degradacije hlorofila odnosno do njegovog obezbojavanja (bleaching). U *in vivo* sistemima, unutar pigmentno-proteinskih kompleksa hlorofili su od „viška svetlosti” zaštićeni pomoćnim pigmentima, karotenoidima (Ruban *et al.* 2002; Ruban, 2010; Scheer, 2003a; Frank *et al.* 1991). Hlorofili su podložni i fotoksidaciji u *in vivo* sistemima kao npr. u procesu starenja biljaka. Fotooksidacione reakcije se dešavaju brzo bez akumulacije obojenih produkata (Hendry *et al.* 1987). Harbour and Bolton (1978) su svojim ESR istraživanjima dokazali da usled degradacije hlorofila *in vivo*, ili u micelarnim vodenim sistemima pri fotooksidaciji na vazduhu, dolazi do formiranja hidroksi radikala koji utiču na bleaching hlorofila.

2. Nefotohemijska degradacija aktivnim kiseonikom ili snažnim oksidansom

Reaktivne kiseonične (ROS) vrste, kao što su peroksidi, superoksidni-anjon i hidroksilni radikali, mogu biti formirani i u nefotohemijskim reakcijama, a hlorofil može reagovati sa njima stvarajući brojne degradacione produkte. Takođe, jedan od najreaktivnijih ROS agenasa, singletni kiseonik ($^1\text{O}_2$), koji nastaje dejstvom svetlosti u prisustvu tzv. fotosenzibilizatora (Girotti, 2001), može bitno uticati na degradaciju hlorofila. Smatra se da se ovakav vid reakcija odvija po neenzimskom mehanizmu direktnim delovanjem aktivnih kiseoničnih vrsta na strukturu porfirina (Dupont & Siegenthaler, 1986).

Ostali tipovi degradacija

Pored gore navedenih tipova hemijskih promena (degradacija) hlorofila, postoji još nekoliko tipova degradacija koje se dešavaju i *in vivo* i *in vitro*, a koje se ne mogu striktno uklopiti u datu podelu. Takve degradacije su:

Enzimaska degradacija hlorofila (*in vivo*) može voditi ka gubitku magnezijuma ili fitilnog lanca što predstavlja Tip I degradacije, ali je moguć i Tip II degradacije. Ovo drugo se dešava u prisustvu svetlosti i kiseonika (George, 1987).

Degradacija hlorofila usled procesa starenja (Senescence). Proces prirodnog starenja biljaka dešava se u periodu jeseni, pri čemu u toku 7-15 dana biva degradirano 90-98% pigmenta, dolazi do opadanja listova i gubitka boje. S druge strane, degradacija hlorofila koja

je posledica zagađenja ili izvesnih oboljenja biljaka je proces koji traje znatno sporije i vrlo često ne teče do kraja. Studije o degradacionim produktima koji su posledica starenja biljaka govore o postojanju dva mehanizma Tipa I. Jedan mehanizam vodi formiranju hlorofilida koji je često praćen prisustvom feoforbida, dejstvom hlorofilaze (Amir-Shapira *et al.* 1987; Muhlecker *et al.* 1993). Drugi mehanizam podrazumeva demetalaciju koja vodi formiranju feofitina sa ili bez prisustva feoforbida, i pirofeofitina (feofitin koji u položaju C-13² umesto -COOCH₃ ima -H atom) (Schoch *et al.* 1981). Sa druge strane identifikovani degradacioni produkti Tipa II su najčešće nebojene komponente manjih molekulskih masa. Neki od datih identifikovanih produkata su ružičasti i žuti vodorastvorni derivati sa maksimumom apsorpcije na oko 526 nm (Matile *et al.* 1987).

Jedan od mogućih procesa degradacije hlorofila je i autooksidacija. Oksidacija izocikličnog prstena E u strukturi hlorofila u toku ranog stadijuma degradacije Chla je reakcija koja se smatra najverovatnijom pri čemu dolazi do formiranja različitih porfirinskih derivata (Walker & Keely, 2004; Walker *et al.* 2002). Produkte nastale oksidacijom Chla na centrima prstena E moguće je identifikovati HPLC i MS analizom (Lim, 2009). Glavni uzročnik nastajanja hlorofilnih derivata i autooksidacije je molekularni kiseonik i sa njim povezane ROS vrste.

2.7. OKSIDACIONI STRES

Oksidacioni stres se definiše kao „oštećenje” koje nastaje usled neravnoteže između prevelike produkcije ROS vrsta i nedovoljne aktivnosti antioksidacionih odbrambenih mehanizama (McKersie, 1990, 1996). Prva publikacija na temu toksičnog efekta slobodnih kiseoničnih radikala, u kome je iznešena studija o toksičnosti kiseonika objavljena je pre 60 godina (Gerschman *et al.* 1954). Dve godine kasnije Harman i sar. (1956) izneli su tezu prema kojoj oksidacioni stres predstavlja osnovni mehanizam procesa starenja i time pokrenuli opsežna istraživanja slobodnih radikala, inspirisana idejama „večite mladosti”. ROS vrste reaguju sa lipidima ćelijskih membrana, proteinima tkiva, enzimima, ugljenim hidratima i DNK, izazivajući oštećenja ćelijskih membrana, modifikaciju proteina i enzima, oksidaciju ugljenih hidrata i sl. Velika produkcija ROS-a je opažena u inflamatornim procesima (Halliwell & Gutteridge, 2007), kod koronarnih bolesti i malignih oboljenja.

Potrebno je istaći da je oksidacioni stres univerzalni fenomen, da ne pogađa samo metabolizam ljudi već i biljni svet, čak se može konstatovati da su biljke daleko više izložene oksidacionom stresu zbog čestih promena u okruženju. Jedna od posledica datog procesa je i degradacija hlorofila.

2.7.1. Mehanizam nastanka ROS-a

Proizvodnju slobodnih radikala podstiču egzogeni i endogeni oksidacioni agensi čijem dejstvu je organizam konstantno izložen. Egzogeni oksidansi su: ozon, smog, jonizujuće zračenje (Stevanović *et al.* 2005, 2011), joni prelaznih metala – u višku (Pryor, 1976), toksična jedinjenja i lekovi, ksenobiotici, kiseonik pri povećanoj koncentraciji itd. (Pryor, 1976; Halliwell & Gutteridge, 2007). Pretežno nastaju u mitohondrijama, mikrozomima, citosolu i endoplazmatičnom retikulumu, mada se mogu naći i u ćelijskim membranama (plazma membrana, jedrova membrana, membrana mitohondrija i sl.), zatim u peroksizomima, lizozomima i dr. O intenzitetu proizvodnje slobodnih radikala odlično govori podatak da se od ukupno oko 250 g kiseonika koga zdrav čovek dnevno udahne 2-5% prevede u toksični superoksid-anjon radikal, a gotovo 5% ukupne normalne mitohondrijalne potrošnje kiseonika odlazi na singletni kiseonik (Kehrer, 1993).

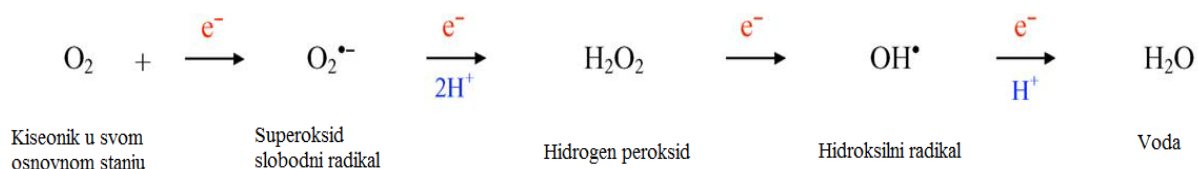
Slobodni radikali su nestabilni jer imaju nesporen slobodan elektron što ih čini jakim oksidansima i visoko reaktivnim vrstama. Slobodni radikali sa svojim nesporenim elektronima u orbitalama lako mogu formirati elektronski par sa elektronima antiparalelnog

spina. U reakciji sa dostupnim supstratima stvaraju nove radikale, inicirajući lančane slobodno radikalske reakcije (Edreva, 2005). Reaktivne kiseonične vrste u koje spadaju slobodni radikali ali i neradikalske vrste prikazani su u **Tabeli 1**.

Tabela 1. Neke od najčešće prisutnih ROS vrsta.

Slobodni radikali		Neradikalske ROS vrste	
superoksid,	$O_2^{\cdot -}$	vodonik-peroksid,	H_2O_2
hidroksilni radikal,	OH^{\cdot}	hipohlorna kiselina,	$HClO$
peroksidni radikal,	ROO^{\cdot}	singletni kiseonik,	1O_2
alkoksilni radikal,	RO^{\cdot}	ozon,	O_3
hidroperoksilni radikal,	HO_2^{\cdot}		

Najpoznatiji redukovani oblici kiseonika su superoksid-anjon radikal, hidroksilni radikal i peroksidni radikal.



Superoksid anjon radikal ($O_2^{\cdot -}$), nastaje redukcijom molekuskog kiseonika, a višak negativnog naelektrisanja koje potiče od jednog ekstra-elektrona obeležen je znakom minus. Nastaje u katalitičkim reakcijama kiseonika sa prelaznim metalima (kada nastaje i vodonik peroksid, H_2O_2), za vreme enzimskih hidrosilacija, razgradnjom oksihemoglobina i dejstvom herbicida. Njegova protonizovana forma HO_2^{\cdot} je mnogo reaktivnija i opasnija od samog $O_2^{\cdot -}$ (Halliwell & Chirico, 1993). U prisustvu H^+ jona $O_2^{\cdot -}$ daje vodonik peroksid (H_2O_2) koji se, uz prisustvo Fe^{2+} jona kao katalizatora, razlaže na veoma reaktivan hidroksilni radikal, OH^{\cdot} . Hidroksilni radikal (OH^{\cdot}), je najreaktivniji i najopasniji kiseonični radikal; može nastati Haber-Weissovom reakcijom ($O_2^{\cdot -} + H_2O_2 \rightarrow OH^{\cdot} + O_2 + HO^-$ (Kehrer, 2000)).

Značaj ROS-vrsta ogleda se u njihovom najverovatnijem učešću u UV i VIS - indukovanom bleaching-u hlorofila ali i u bleaching-u hlorofila izazvanom hemijskim stresom (Alcher *et al.* 1997; Falleret *et al.* 2001; Halliwell, 1987; Caspi *et al.* 2000).

2.7.2. Oksidacioni stres izazvan dejstvom enzima

Različite vrste enzima mogu učestvovati u degradaciji hlorofila (lipoksigenaza, peroksidaza, hlorofilaza), a u zavisnosti od degradacionog (Tip I i II) puta reakcije su svrstane u dve grupe (Yamauchi & Minamide, 1985). Degradacija hlorofila dejstvom enzima, uglavnom vodi ka gubitku magnezijuma ili fitilnog lanca (Tip I - nastaju hlorofilid, feofitin, feoforbid), a dešava se i Tip II degradacije koji podrazumeva razaranje porfirinskog jezgra do manjih fragmenata.

Uloga hlorofilaze je u uklanjanju fitilnog „repa” iz strukture hlorofila i formiranje hlorofilida. Mg-dehelataza pored toga uklanja i Mg-atom iz centralnog polazaja porfirinsko/hlorinske stukture. Chl-oksidaza i -peroksidaza su direktno uključeni u degradacioni proces hlorofila, ali je njihovo reagovanje uslovljeno prisustvom nekog fenolnog jedinjenja (Petrović *et al.* 2014). Yamauchi & saradnici (2004) su dokazali da su sva fenolna jedinjenja koja imaju grupe u para položaju poput, *p*-kumarinske kiseline, apigenina, apigetrina, naringenina, jako reaktivna jedinjenja u čijem prisustvu je moguće uz pomoć enzima degradirati porfirinska jedinjenja poput hlorofila (Mangosa & Berger, 1997; Canjura *et al.* 1991). Oba, peroksidaza i Chl-oksidaza, kao produkt degradacije daju C¹³-hidroksihlorofil (Funamoto *et al.* 2002; Kaewsuksaeng *et al.* 2007). U nekim biljkama, porast aktivnosti peroksidaze ili aktivnosti oksidaze dovode, ali retko, do cepanja makrocikličnog prstena hlorofila.

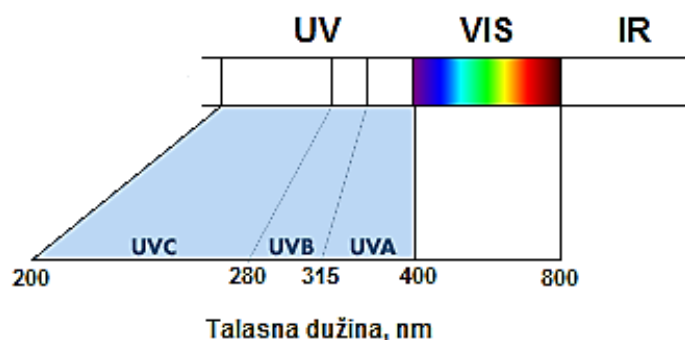
Postoji nekoliko izveštaja da degradacija hlorofila u hloroplastima može biti indukovana unutrašnjom (per)oksidacijom sa fenolnim jedinjenjem i vodonik peroksidom, što rezultira bleaching-om hlorofila (Janave, 1997).

2.7.3. Oksidacioni stres hlorofila izazvan elektromagnetnim zračenjem

Elektromagnetno zračenje koje dolazi do zemljine atmosfere sastoji se pre svega od vidljive, infracrvene i ultraljubičaste svetlosti. Ipak, najveći deo sunčevog spektra zračenja koji dopire do površine Zemlje pripada vidljivoj svetlosti (oko 90%), i ona je odgovorna za

zagrevanje zemljine površine i život na njoj. Ostale delove spektra apsorbuje atmosfera, tako da ultravioletna svetlost učestvuje sa svega 8% u ukupnoj energiji koja dolazi do zemljine površine (Moan, 2001).

Ultravioletna oblast od 200-400 nm se deli na tri pod-opsega: UV-A (320 – 400 nm), UV-B (290 – 320 nm) i UV-C (<290 nm). UV-B i UV-C zračenja mogu negativno da utiču na živi svet (biosferu). Energetski najjače i najopasnije UV-C zračenje ne dospeva do površine Zemlje jer biva filtrirano od strane atmosfere. UV-B svetlost je delimično apsorbovana od strane ozonskog omotača, tako da ona učestvuje sa 1.5% u ukupnom sunčevom zračenju koje pada na Zemlju. Stoga, potencijalno najopasnija za biološke organizme i njihovu funkciju je UV-A svetlost, koja učestvuje sa oko 6% u ukupnoj raspodeli sunčevog spektra, budući da je ozon ne apsorbuje. Raspodela zračenja UV i vidljivog (VIS) dela elektromagnetnog spektra, prikazana je na **Slici 9**.



Slika 9. Elektromagnetni spektar zračenja u UV-VIS i IR oblasti.

Pri višim intenzitetima VIS svetlosti može doći do oštećenja fotosintetskog aparata (Ramirez-Niño *et al.* 1998) što može dovesti do značajnog smanjenja sadržaja hlorofila u biljkama (Garrard *et al.* 1976; Tevini *et al.* 1981; Vu *et al.* 1984). Sa druge strane, uporednim studijama uticaja UV-A i UV-B zračenja na hlorofil, došlo se do zaključka da oba zračenja deluju sličnim mehanizmima inhibicije (Renger *et al.* 1989; Turcsányi & Vass, 2000; Vass *et al.* 2002; Larkum *et al.* 2001).

2.7.4. Oksidacioni stres izazvan dejstvom hemijskih agenasa

2.7.4.1. Oksidacioni stres hlorofila izazvan Fentonovom reakcijom

Fentonovu reakciju je prvi put otkrio H. J. Horstman proučavajući oksidaciju organskih supstrata. Zbog svog razarajućeg oksidacionog efekta Fentonova reakcija našla je brojnu primenu: u tretmanu otpadnih voda, tretmanu pesticida, u tekstilnoj industriji i za različite biološke tretmane.

Fentonova reakcija se u biološkim sistemima prvenstveno odvija u mitohondrijama, mikrozmomima i peroksizomima. Inicijatori i agensi lipidne peroksidacije biomembrana *in vivo* su najčešće slobodno-radikalske ($O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot}) ili neradikalske kiseonične vrste (1O_2 , O_3), koje mogu nastati različitim hemijskim reakcijama (Fentonova i Haber-Weissova reakcija) ili kao posledica raznih eksternih stresova.

Soli prelaznih metala u kombinaciji sa vodonik peroksidom čine Fentonov sistem. Direktni uzročnici produkcije slobodnih radikala i oksidacionog stresa su metali sa promenljivom valencom: Fe, Cu, Cr. Prelazni metali u prisustvu H_2O_2 stvaraju veoma reaktivne hidroksilne radikale koji započinju lanac lipidne peroksidacije. Od prelaznih metala daleko najčešće se koristi Fe^{2+} (Halliwell & Chirico, 1993; Deng *et al.* 1997; Tang *et al.* 2000; Tian *et al.* 2000), ali se vrlo često koristi i Cu^{2+} (Rengel *et al.* 2000).

Elektronska struktura metala omogućava davanje jednog elektrona i čini ga važnom komponentom u produkciji i metabolizmu slobodnih radikala u biološkim sistemima. U organizmu se gvožđe nalazi u tri oksidaciona stanja: Fe(II), Fe(III) i malim delom kao Fe(IV). Pri fiziološkoj pH vrednosti Fe(II) je nestabilno u vodenoj sredini, reaguje sa molekulskim kiseonikom i gradi Fe(III) i superoksidni-anjon radikal (Arora, 2002). Katalitički aktivno gvožđe katalizuje redoks reakcije između kiseonika i bioloških makromolekula. Ispitivanja Halliwell & Gutteridge-a (2007), ukazuju da helatirano gvožđe deluje kao katalizator Fentonove reakcije, olakšavajući konverziju superoksid anjona i vodonik peroksida u vrlo reaktivni hidroksilni radikal, koji može da reaguje sa različitim biomolekulima, poput lipida, lipozoma, proteina i DNK (McKersie, 1996).



Brojna istraživanja su pokazala da se Fentonova reakcija može odvijati po dva različita mehanizma:

- radikalski mehanizam,
- ne-radikalski mehanizam.

Radikalski mehanizam opisan je prvi put 1932. godine po kome su produkovani OH[•] radikali mogli dalje da apstrahuju vodonikove atome iz C-H veze otpočinjajući lančane reakcije oksidacije. Po ovom klasičnom tumačenju Fentonove reakcije produkcija radikalskih vrsta se završava pretežno produkcijom OH[•] i HO₂[•]. Radikalski mehanizam se može demonstrirati sledećim jednačinama:



U Fentonovoj reakciji proizvodnja OH[•] radikala zavisi od nekoliko faktora, kao što su vrednost pH, koncentracija H₂O₂ i Fe²⁺ jona, temperatura i vreme trajanja reakcije. Povećanje koncentracije H₂O₂ može promovisati inhibitoryni efekat hidrosilnih radikala i formiranje drugog radikala (HO₂[•]), koji ima znatno manji oksidacioni efekat u poređenju sa OH[•] (Homem *et al.* 2010). Povećanje koncentracije Fe²⁺ jona, takođe utiče na povećan nivo oksidacije. Odnos između koncentracije H₂O₂ i Fe²⁺, takođe može odigrati presudnu ulogu u efikasnosti Fentonove reakcije.

Fentonova reakcija se može odvijati kako u biološkim sistemima (može započeti lipidnu oksidaciju ili oksidisati skoro bilo koji molekul razgradnjom peroksida), tako i u sistemima poput lipozoma (McKersie, 1996; Artem & Fredric, 2006). Procenat degradacije, pored ostalih faktora koji utiču na Fentonovu reakciju, zavisi i od sastava lipida.

U lipidnim sistemima, u prisustvu H₂O₂ i Fe²⁺ jona, pored gore navedenih reakcija mogu se odigrati i sledeće reakcije (Barbusiński, 2009):

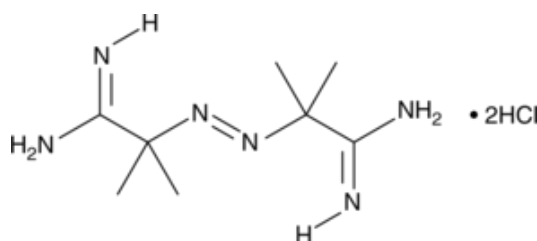


U jednačini (8), LOOH predstavlja lipidne perokside – glavni proizvod procesa lipidne peroksidacije (LP); to su nestabilni proizvodi koji svojim raspadom mogu „nagraditi” peroksi- radikale ($LO\cdot$), ali i druge radikale i proizvode. Uticaj Fentonovog reagensa na hlorofil ispitan je *in vitro*, pri čemu je zaključeno da koncentracija Fe^{2+} jona mora biti dovoljna kako bi sama reakcija u kojoj se generisu hidroksilni radikali mogla imati degradirajući efekat na hlorofil (Shen, 1997).

2.7.4.2. Oksidacioni stres hlorofila izazvan dejstvom termalnog inicijatora

2,2'-azobis (2-metilpropionamidin) dihidrohlorid (AAPH) je u vodi rastvoran slobodno- radikalski inicijator, koji pokreće oksidacione procese na temperaturama većim od $37^{\circ}C$. U toku njegovog reagovanja dolazi do formiranja brojnih radikala: $OH\cdot$, $OOH\cdot$, kao i keto radikala koji dalje nastavljaju lančane oksidacione reakcije. Hidrofilni AAPH inicijator se široko koristi za kvantitativna istraživanja kinetike oksidacije (Betigeri *et al.* 2005). Efikasnost inicijatora u velikoj meri zavisi od izbora sistema rastvarača i viskoznosti (Laguerre *et al.* 2007). Sa druge strane, 2,2'-azobis (2,4-dimetilvaleronitril) (AMNV) je termalni slobodno-radikalski inicijator rastvoran u lipidima, što je od značaja kod proučavanja oksidacionog stresa na hlorofil inkorporisan u lipozome.

Dodatak AAPH u jedan biljni ekstrakt (*in vitro*) inicira aktivaciju fenolnog jedinjenja prisutnog u ekstraktu čime bi se pak u *in vivo* uslovima, aktivirao sekundarni odbrambeni metabolizam biljke (Ohlsson *et al.* 1995). Diazo inicijatori poput AAPH, proizvode veliki broj peroksilnih radikala (Werber *et al.* 2011).

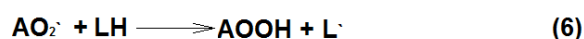
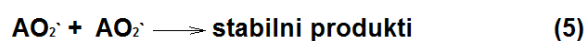
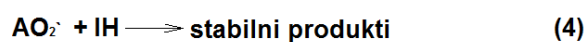
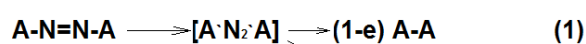


Slika 10. Hemijska struktura termalnog inicijatora, 2,2'-azobis (2-metilpropionamidin) dihidrohlorida - (AAPH).

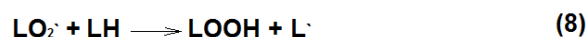
Azo inicijatori promovišu oksidaciju lipida i minimiziraju dekompoziciju hidroperoksida, što je značajno za polinezasićene masne kiseline koje sadrže tri ili više dvostrukih veza (Hosseinian, 2006). Struktura AAPH prikazana je na **Slici 10**.

Vodorastvorni AAPH generiše slobodne radikale termalnom dekompozicijom (1-2), što je prokazano šemom na **Slici 11**. Oni brzo reaguju sa kiseonikom stvarajući peroksidne radikale (3). Peroksidni radikali se ili gube usled reagovanja sa nekim antioksidantom iz rastvarača tj. vodene faze (4), ili reaguje sa drugim slobodnim radikalom stvarajući stabilni produkt (5), ili, u prisustvu lipida napada njihove dvostruko-alilne H-atome (6), čime dovodi do daljeg širenja (propagacije) mehanizma (7 i 8).

Inicijacija



Propagacija



Terminacija

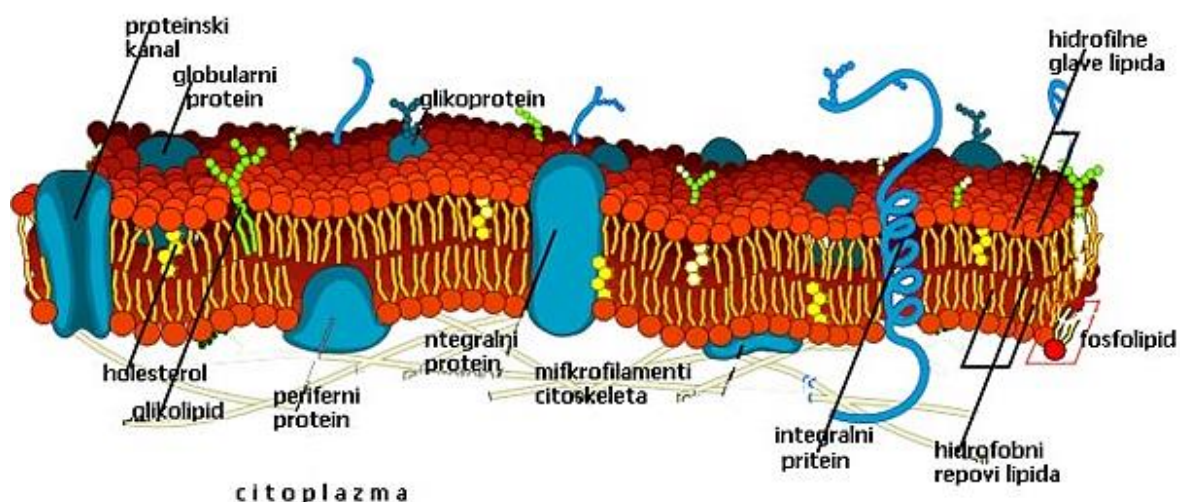


Slika 11. Šema mehanizma lipidne peroksidacije, inicirane od strane termalnog azo-inicijatora. LH – lipid, L \cdot – lipidni radikal; LO $_2$ \cdot – peroksi(-lipidni)-radikal; LOOH – lipidni peroksidi; IH - antioksidant.

Upotreba termalnog inicijatora potiče upravo iz potrebe generisanja LOO \cdot radikala, čija difuzija *in vivo* zavisi između ostalog i od dvosloja membrane, tj. njene viskoznosti (Laguerre *et al.* 2007). Kad je reč o lipidnim modelima ima izveštaja da je difuzija peroksilnih radikala veća u micelama nego kod lipozoma (Barclay *et al.* 1984). Takođe je utvrđeno da je oksidacija lipida u lipozomima zavisna od pH vrednosti sredine i da je generalno manja pri većim vrednostima pH (Hanlon & Seybert, 1997). Termalni inicijator AAPH često nalazi primenu i pri ispitivanju stabilnosti lekova na oksidacioni stres (Betigeri *et al.* 2005).

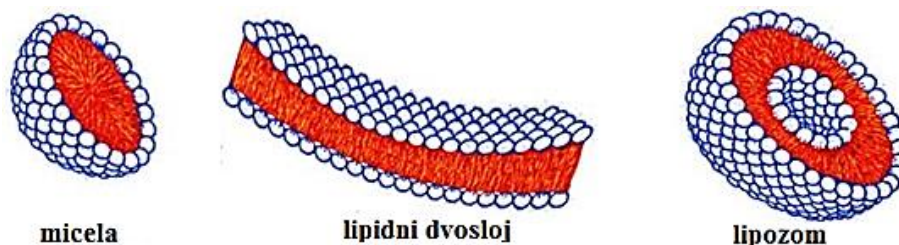
2.8. BIOLOŠKI MODELI MEMBRANA

Biološke membrane su lipo-proteinskog sastava, tj. sastavljene su od dvosloja lipida u kojima su smešteni proteini (SI.12), dok je sam lipidni matriks uglavnom fosfolipidnog sastava. Sve biološke membrane imaju sličnu strukturnu organizaciju, kao i veliki broj drugih zajedničkih osobina.



Slika 12. Šematski prikaz biološke membrane, (http://www.bionetskola.com/w/%C4%86elijska_membrana).

Glavne klase lipida koje ulaze u sastav membrane su fosfolipidi, sfingolipidi i holesterol, a u malim količinama se nalaze i glikolipidi i kardiolipini. Različite membrane sadrže različite količine pojedinih klasa lipida. Lipidi utiču na fizičke osobine membrane kao što su viskoznost i propustljivost. Najčešće korišćeni modeli biomembrana – koji se formiraju u vodenom medijumu - su micela, monomolekulski slojevi, dvoslojevi, lipozomi itd. (SI.13).

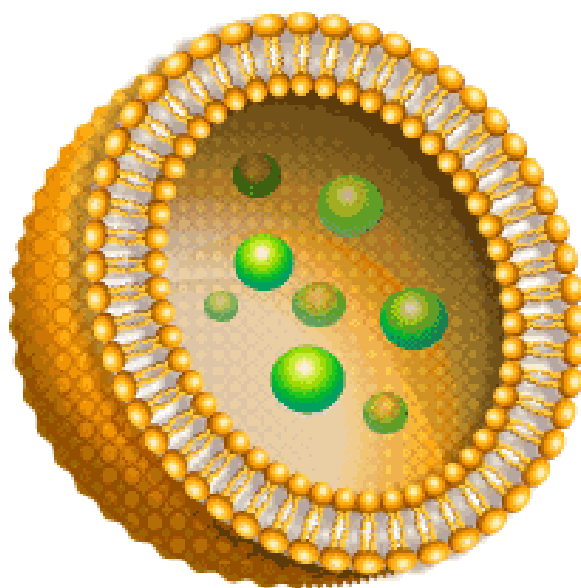


Slika 13. Organizovane lipidne strukture.

Micele su stabilne strukture zahvaljujući interakciji polarnih grupa sa vodom i silama atrakcije između ugljovodoničnih lanaca u unutrašnjosti micela. Do formiranja micela dolazi tek pri datoj koncentraciji; to je tzv. kritična micelarna koncentracija (critical micelar concentration – CMC). S druge strane, veliki molekuli lipida u vodenim rastvorima mogu se organizovati i u dvoslojne strukture: polarne „glave” ka spolja, a hidrofobni „repovi” ka unutrašnjosti. Ove dvoslojne strukture mogu stvarati i zatvorene sferne oblike, koji potpuno razdvajaju spoljašnji od unutrašnjeg prostora, poznatije kao lipozomi.

2.9. LIPOZOMI I NJIHOVA STRUKTURA

Lipozomi predstavljaju mikroskopske sferne čestice čije membrane, koje se sastoje od jednog ili više lipidnih dvoslojeva (bilayers) „zatvaraju” deo vodene faze u kojoj su lipozomi suspendovani. Još je engleski naučnik Alec D. Bangham šezdesetih godina prošlog veka prvi napravio formulaciju na bazi lipozoma. Lipidni dvoslojevi lipozoma su sastavljeni od lipida čiji se hidrofilni delovi usmeravaju prema vodenoj sredini („glave”), dok se lipofilni delovi molekula okreću jedni prema drugima i formiraju hidrofobni unutrašnji prostor lipozoma (Vemuri & Rhodes, 1994). Na **Slici 14** je dat slikoviti prikaz strukture lipozoma. Lipozomi se najčešće koriste kao „nosači” za „dostavu” (delivery) lekovitih supstanci, koje se mogu inkorporisati u lipidnom dvosloju (ako su lipofilne), ali i u vodeno „jezgro” (ako su hidrofilne) (Vuleta *et al.* 2003).



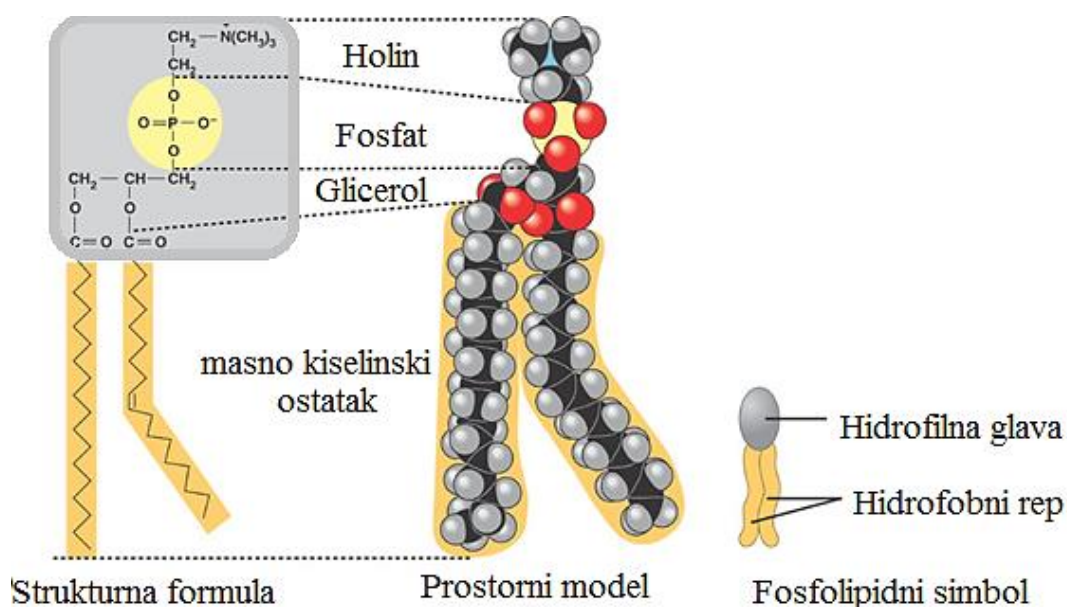
Slika 14. Poprečni presek sfera lipozoma, (<http://www.myvisiontest.com/newsarchive.php?id=816>).

Naime, inkapsulacijom lekovite bioaktivne supstance u lipozome može se povećati njena penetracija u dublje slojeve kože, pri čemu može doći do akumulacije i formiranja „depoa” lekovite supstance koji obezbeđuje produženo oslobađanje uz istovremeno smanjenje sistemske resorpcije i neželjenih efekta. Inkapsulacija lekovitih supstanci u lipozome takođe povećava i stabilnost a time produžava i njihov rok upotrebe (Stuchlík & Žák, 2001).

2.9.1. Lipidi – osnovni sastojci lipozoma

Fosfolipidi predstavljaju prirodne sastojke ćelijskih membrana što ih čini biorazgradivim, netoksičnim i neimunogenim, zbog čega se smatraju idealnim „nosačima” bioaktivnih supstanci. Fosfolipidi predstavljaju jednu od glavnih grupa lipida u životinjskim, biljnim i bakterijskim membranama. Fosfatni deo strukture predstavlja polarni (hidrofilni) deo fosfolipida – polarnu „glavu” molekula. Dugački lanci nezasićenih i/ili zasićenih masnih kiselina predstavljaju nepolarne (hidrofobne) delove fosfolipidnog molekula (SI.15).

U zavisnosti od toga da li u sintezi fosfolipidnog molekula učestvuje glicerol ili sfingozin, fosfolipidi se dele na glicerofosfolipide ili sfingofosfolipide.



Slika 15. Struktura fosfolipida.

Fosfolipidi se rastvaraju u organskim rastvaračima ili njihovim smešama. Zbog svoje amfilne prirode, kada su u vodenom medijumu prisutni iznad kritične micelarne koncentracije (CMC je približno 10^{-8} M) tada formiraju agregate. Struktura agregata zavisi od

hemijske strukture polarne „glave”, dužine i stepena zasićenosti lanca masnih kiselina, kao i pH vrednosti i jonske jačine vodenog rastvora. Agregati najčešće formiraju lamelarne strukture, ali pod određenim uslovima mogu da formiraju i kubične i heksagonalne strukture (Blume, 1992). Fazno stanje membrana utiče na fizičke osobine lipozoma. Permeabilnost i fluidnost tečno kristalnih slojeva lipida je veća od permeabilnosti i fluidnosti slojeva u gel stanju. Prelaz iz jedne faze u drugu je reverzibilan i zavistan od temperature.

Najznačajnija vrsta fosfolipida važna za formiranje lipozoma je fosfatidiholin (PC). On se može dobiti iz sirovina biljnog (seme soje, kukuruz, repa), ili životinjskog porekla (jetra životinja i žumance jajeta). Esterifikovane masne kiseline se razlikuju po broju ugljenikovih atoma i stepenu nezasićenosti. Najčešće masne kiseline koje ulaze u sastav fosfolipida su palmitinska (16:0), stearinska (18:0), oleinska (18:1), linoleinska (18:2), linolenska (18:3) i arahidonska (20:4). Pored nezasićenih fosfolipida za formiranje lipozoma koriste se i zasićeni fosfolipidi dobijeni katalitičkom hidrogenizacijom fosfolipida, kao i oni dobijeni izolacijom iz prirodnih izvora. Ovi fosfolipidi poseduju veću stabilnost, jer je mogućnost peroksidacije daleko manja pošto nema dvostrukih veza u njihovim strukturama (Dragičević *et al.* 2005). Od zasićenih fosfolipida najčešće prisutni su dipalmitoilfosfatidiholin (DPPC), dipalmitoilfosfatidilserin (DPPS), dipalmitoil fosfatidiletanolamin (DPPE), dipalmitoil fosfatidna kiselina (DPPA), a od nezasićenih fosfolipida, dioleilfosfatidilholin (DOPC) i dioleil-fosfatidilglicerol (DOPG) – sa po jednom nezasićenom vezom u masnokiselinskim granama. Zasićeni fosfolipidi sa dugim masnokiselinskim lancima se koriste za dobijanje lipozoma rigidnih, nepermeabilnih membrana.

2.9.2. Klasifikacija lipozoma

Lipozomi se mogu klasifikovati po metodi kojom su dobijeni, po broju slojeva u svojoj strukturi ili po veličini, ali se najčešće klasifikuju na osnovu slojevitosti njihove strukture i veličine, dok je klasifikacija po metodi kojom su dobijeni vrlo retko u upotrebi. Postoje razne pripremne metode za sintezu lipozoma različitih veličina i lamelarnosti. Priprema lipozoma upotrebom ultrazvuka ili metoda istiskivanja iz membrana, uobičajene su metode za pripremu unilamelarnih vezikula. Visoke energije sonifikacije se obično koriste za sintezu malih lipozoma, tzv. malih unilamelarnih vezikula (Small Unilamellar Vesicles, SUV), gde je veličina dobijenih lipozoma zavisna od frekvencije i snage ultrazvuka, kao i vremena sonifikacije (Cheng & Gang, 2011). Takozvane ekstruzione metode, ili metode istiskivanjem

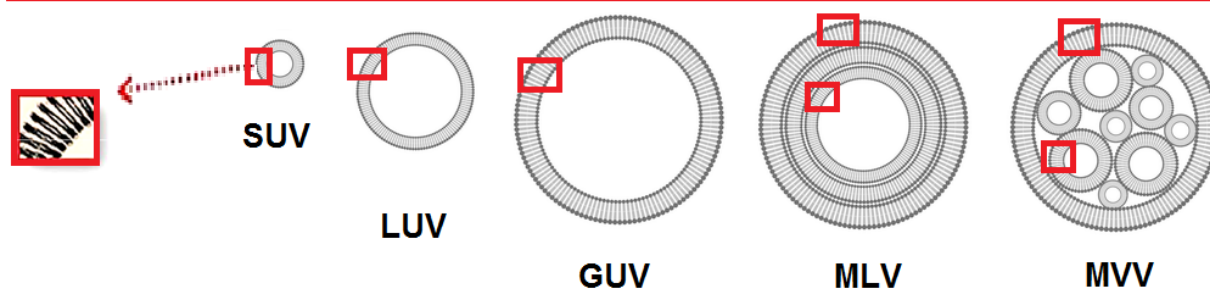
(uz upotrebu ekstrudera) mogu se koristiti za generisanje SUV ili velikih unilamelarnih vezikula (Large Unilamellar Vesicles, LUV). Po ovim metodama priprema lipozoma počinje od suvog lipidnog filma koji je hidratisan u vodenom rastvoru i podvrgnut sukcesivnim postupcima zamrzavanja i odmrzavanja sve do formiranja multilamelarnih vezikula (MultiLamellar Vesicles, MLV) (Cheng & Gang, 2011). Suspenzija se zatim sonifikuje visokofrekventnim ultrazvukom ili ekstrudira kroz polikarbonatne membrane sa nano-porama (Cheng & Gang, 2011). Metode za pripremu lipozoma mogu biti i modifikovane na osnovu osobina, hidrofobnosti i željene veličine čestica. Kada se lipozomi koriste za transport bioaktivnih lekovitih supstanci, tada je njihova veličina važan faktor za farmakokinetiku i biodistribuciona svojstva; ovo npr. može da utiče na efikasnost „isporuke” posebne vrste bioaktivnih supstanci, tzv. fotosenzibilizatora u okviru metode fotodinamičke, ili PDT terapije (Photo Dynamic Therapy, PDT²); jedan od korišćenih fotosenzibilizatora je i hlorofil (Moser, 1998; Markovic & Zvezdanovic, 2012). Najčešći način klasifikacije lipozoma prikazan je u **Tabeli 2**.

Kontrola veličine formiranih lipozoma je važan faktor u formulacijama lekovitih preparata i treba da bude optimizovana u cilju poboljšanja farmakoloških svojstava medikamenata. SUV-lipozomi se razlikuju od ostalih vrsta lipozoma po velikoj zakrivljenosti, što za posledicu ima veliki membranski potencijal, pa prema tome i povećanu (unutrašnju) propustljivost i termodinamičku nestabilnost sistema, sa težnjom ka agregaciji i fuziji, naročito ispod temperature faznog prelaza. SUV-lipozomi pokazuju i druge nedostatke, kao što je neophodnost primene velike energije (visoke frekvencije) za njihovo dobijanje, što može dovesti do oksidacije i hidrolize lipida. Karakteristično za SUV je veća permeabilnost za hidrofilne molekule. Najmanje SUV, dobijene ultrazvukom, imaju prečnik oko 23 nm i karakterišu se zapreminom hidratisanog dvosloja 4.5 puta većom od zapremine unutrašnjeg vodenog prostora, inače nepodesnom za efikasnu inkapsulaciju hidrofilnih molekula. Sa druge strane, prednost male veličine SUV-a je bolja raspodela u organizmu nakon intravenske inkapsulacije (Dragičević, 2005).

²PDT terapija temelji se na fotosenzibilizaciji (Tip I i II) pri čemu nastaje singletni kiseonik koji izaziva oštećenje tretiranih ćelija (Allison & Sibat, 2010). Prvi mehanizam fotosenzibiliziranih reakcija (Tip I) je slobodno-radikalni mehanizam koji može biti praćen prenosom protona (npr. vodonika) ili transferom elektrona. Drugi mehanizam fotooksidativnih reakcija je ne-radikalni mehanizam (Tip II), koji podrazumeva prenos energije sa T₁ stanja fotosenzibilizatora na osnovno tripletno stanje kiseonika ³O₂, dajući visoko reaktivni singletni kiseonik, ¹O₂: ³Senz. + ³O₂ → ¹Senz. + ¹O₂. Obe reakcije su konkurentne i zavise od okruženja i prirode molekula supstrata (Markovic & Zvezdanovic, 2012). Svrha fotodinamičke terapije je selektivno uništenje abnormalnih ćelija.

Tabela 2. Nomenklatura i približna veličina različitih vrsta lipozoma (Vemuri & Rhodes, 1995).

Klasifikacija		Skraćenica	Približna veličina (μm)
Po veličini	Male jednoslojne vezikule (<i>Small Unilamellar Vesicles</i>)	(SUV)	0,025-0,05
	Velike jednoslojne vezikule (<i>Large Unilamellar Vesicles</i>)	(LUV)	>0,1
	Unilamelarne vezikule izuzetno velikih dimenzija (<i>Giant Unilamellar Vesicles</i>)	(GUV)	>1
Po slojevitosti	Multilamelarne vezikule (<i>Multilamellar Vesicles</i>)	(MLV)	0,05-10
	Unilamelarne vezikule (<i>Unilamellar Vesicles</i>)	(ULV)	0,0225-0,1
	Multivezikularne vezikule (<i>Multivesicular Vesicles</i>)	(MVV)	~ 0,4-10



Slika 16. Prikaz različitih formi lipozoma koji se razlikuju po veličini.

LUV-lipozomi imaju zanemarljiv napon membrane, što kao posledicu ima veću stabilnost u poređenju sa SUV. S druge strane, zahvaljujući velikom unutrašnjem volumenu LUV, koje se po veličini nalaze između SUV i GUV, moguće je postići visoku efikasnost inkapsulacije hidrofilne supstance i to posebno primenom metoda reversno-fazne evaporacije (isparavanja) i dvostrukog emulgovanja. Ipak, njihovomehanička stabilnost i sposobnost zadržavanja inkapsulirane supstance, zbog prisustva samo jednog lipidnog dvosloja, nisu velike kao kod multilamelarnih vezikula (MLV) ili multilamelarnih velikih vezikula dobijenih reversno-faznom evaporacijom (MLV-REV, Reverse-Evaporation Vesicles).

Lipozomi kod kojih su dve ili više vezikula, a koje se nalaze jedna pored druge inkapsulirane u jednu veću vezikulu su MVV lipozomi. Ovakve strukture se često sreću

prilikom izrade MLV lipozoma. Prečnik ovih lipozoma najčešće je veći od 1 μm .

MLV-lipozomi su veličine u rasponu od 100 nm do nekoliko mikrona i poseduju veliki broj koncentričnih dvoslojeva. Strukturu ovih lipozoma objasnili su Bangham i njegovi saradnici (1965). Karakteristika ovih lipozoma je usporeno oslobađanje inkapsulirane hidrofilne supstance zbog velikog broja lamela, što se može iskoristiti za postizanje „depo efekta” (Mravec *et al.* 2011). Zahvaljajući velikom broju lipidnih membrana, ovi lipozomi predstavljaju idealne nosače lipofilnih supstanci, dok je s druge strane efikasnost inkapsulacije hidrofilnih supstanci niska ukoliko se koriste konvencionalne metode dispergovanja.

Površinsko naelektrisanje lipozoma, određeno vrstom i osobinama upotrebljenih fosfolipida, predstavlja veoma važan parametar koji definiše agregaciju i sedimentaciju lipozoma, kao i interakciju lipozoma i ćelija (fuziju ili endocitozu). Površinsko naelektrisanje čestica kvantifikuje tzv. zeta-potencijal i koristi se kao merilo odbijanja među česticama. Što je zeta-potencijal veći, jače su i sile odbijanja i veća je stabilnost disperzije. Zeta-potencijal zavisi od stepena jonizacije molekula fosfolipida, a stepen jonizacije zavisi od pH vrednosti disperzije (Dragičević, 2005).

2.9.3. Inkapsuliranje supstanci u lipozome

Zahvaljujući svojoj strukturi lipozomi mogu da služe kao „nosači” hidrofilnih i lipofilnih supstanci. U zavisnosti od rastvorljivosti bioaktivne supstance i njenog koeficijenta raspodele unutar lipidnog dvosloja lokalizacija supstanci unutar lipozoma je različita, što kao posledicu ima i različitu efikasnost inkapsulacije i različitu brzinu oslobađanja bioaktivne supstance. Inkapsulacijom aktivne supstance lipozom postaje transportno sredstvo, a za hidrofilne bioaktivne supstance i permeaciona barijera, što može da ima kao posledicu „depo efekat”. Brzina permeacije, tj. propustljivosti aktivne supstance, sa jedne strane zavisi od osobina lipoidalne lipozomske membrane, a sa druge strane od lipofilnosti i veličine molekula aktivne supstance.

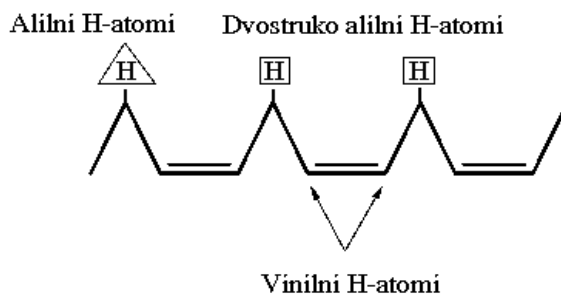
Bioaktivne supstance su prema particionim (podeonim) karakteristikama svrstane među hidrofilne, lipofilne, amfifilne (dobre bifazne rastvorljivosti između unutrašnje vodene i lipidne faze), i one koje su potpuno bifazno nerastvorne (u obe faze - zbog čega predstavljaju najproblematičnije kandidate za inkorporisanje u lipozome, i za njihovu primenu sa

lipozomima). Od svih, lipofilne supstance predstavljaju najbolje kandidate za inkorporisanje u lipozome u pogledu stabilnosti, ekonomičnosti i korisnosti. S toga je veliki broj lekovitih supstanci različite rastvorljivosti strukturno izmenjen u cilju dobijanja lipofilnih jedinjenja i optimalnih lipozomskih formulacija. Lipofilna unutrašnjost dvoslojnih membrana lipozoma omogućava inkorporisanje lipofilnih supstanci, pri čemu će odnos koncentracije fosfolipida i lipofilne supstance zavisiti od osobina supstance i fosfolipida, kao i postupka korišćenog za dobijanje lipozoma. Efikasnost inkapsulacije za lipofilne supstance često iznosi oko 100% pod uslovom da se supstanca ne koristi u koncentraciji većoj od njene rastvorljivosti u lipozomskim lipidima. Efikasnost inkapsulacije zavisi i od lamelarnosti lipozoma tj. multilamelarni lipozomi imaju znatno veći kapacitet za lipofilne supstance od unilamelarnih. Kad je reč o amfifilnim supstancama one teže da se adsorbuju na površini lipozoma.

2.9.4. Lipidna peroksidacija

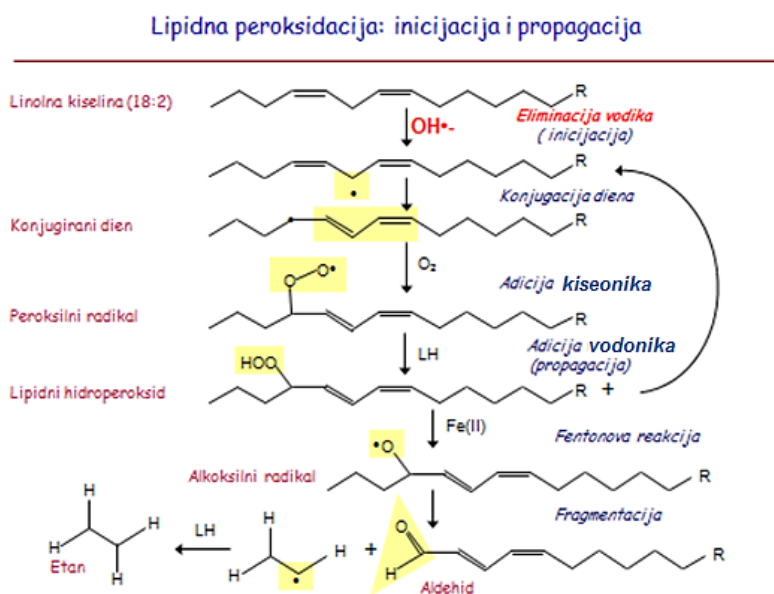
Oksidacioni stres koji se dešava u ćelijskim membranama, ili se može indukovati u biomembranskim modelima (npr. lipozomima) između ostalih, može kao jednu od mogućih posledica imati i tzv. lipidnu peroksidaciju (LP), tj. oksidaciju lipidnih komponenti biomembrana koja dovodi do stvaranja peroksidnih struktura. Inicijatori i promoteri (agensi) lipidne peroksidacije biomembrana i *in vivo* i *in vitro* su najčešće slobodno-radikalske ($O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot}) ili neradikalske kiseonične ROS vrste (1O_2 , O_3), koje mogu nastati interno ili eksterno u datom sistemu.

Za iniciranje procesa lipidne peroksidacije su posebno značajni hidrofobni konstituenti lipida, tj. zasićene i (naročito) nezasićene masne kiseline i njihovi dugi ugljovodonični lanci, sa antikongjugovanim tipom strukture. Ako su masne kiseline polinezasićene (najmanje dve ili više dvostrukih veza) one u svojoj strukturi imaju tri tipa vodonikovih atoma – vinilne, alilne i dvostruko alilne (SI.17). Vinilni H-atomi, vezani za C-atome koji grade dvostruku vezu, se veoma teško otkidaju. Međutim, prisustvo dvostruke veze slabi C–H vezu na susednom C-atomu, kod alilnih H-atoma, odnosno dvostruko alilnih H-atoma (ako se nalaze između dve nezasićene veze – SI.17). Upravo ovi H-atomi su veoma podložni otkidanju čime dovode do stvaranja lipidnog radikala (L^{\cdot}).



Slika 17. Raspored vinilnih, alilnih (trougao) i dvostruko alilnih (kvadrat) H-atoma u antikongjugovanoj strukturi nezasićene masne kiseline.

Nastajanje ovog radikala je upravo prvi korak, tj. iniciranje lančane slobodno-radikalske reakcije lipidne peroksidacije. Intramolekulskim premeštanjem dvostruke veze ovaj radikal prelazi u kongjugovani dien koji lako reaguje sa molekulskim kiseonikom i gradi peroksil-radikal (LOO^\bullet), koji produžuje („širi”) reakciju peroksidacije „oduzimanjem”, tj. otkidanjem H-atoma metilenske grupe susedne nezasićene masne kiseline pri čemu nastaje hidroperoksid (LOOH) i novi alkil radikal L^\bullet koji nastavlja, obnavlja (regeneriše) lančani LP-mehanizam. Propagacija (ili „širenje”) lipidne peroksidacije se nastavlja i razgradnjom LOOH čime raste broj slobodnih radikala koji deluju na nezasićene lance susednih masno-kiselinskih komponenti lipida. Dakle, lančani LP-proces ima samoregenerativni mehanizam. Šema lančane reakcije lipidne peroksidacije sa fazom inicijacije i propagacije može se predstaviti na sledeći način:



Slika 18. Šematski prikaz mehanizma lipidne peroksidacije.

Lipidni hidroperoksidi (LOOH) su pri normalnim uslovima relativno (ne)stabilni, ali na nešto višim temperaturama ili u prisustvu jona prelaznih metala (gvožđe i bakar), vrlo brzo se razgrađuje dajući nove slobodne radikale (Mimica-Dukić, 1997; Wheatley, 2000; Sodergren, 2000):



Krajnji rezultati razgradnje LOOH su tzv. sekundarni produkti lipidne peroksidacije kao što su aldehidi, ketoni, masne kiseline manjih molekulskih masa itd. Do prekida LP-lanca može doći i međusobnim reagovanjem stvorenih slobodnih radikala pri čemu nastaju produkti koji su stabilni i neaktivni.

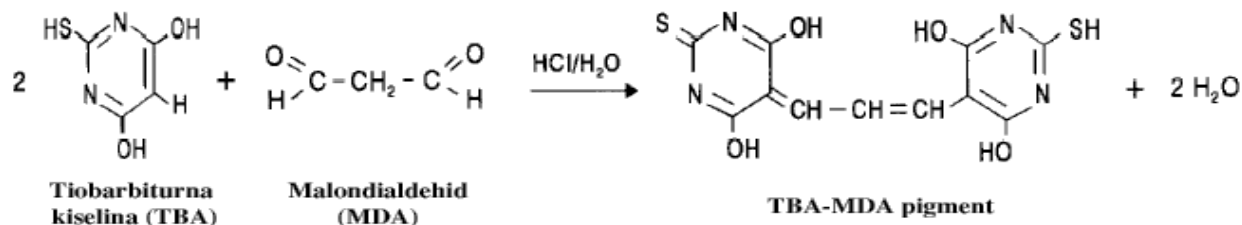
Lipidna peroksidacija se može inicirati i fotohemijski, pomoću fotosenzibilizatora, pri čemu neki od njih (poput benzofenona) pokazuju izrazitu selektivnost u odnosu na antikongugovanu strukturu lipida i neku vrstu „strukturne kontrole” kad je u pitanju mesto i pogodnost formiranja lipidnih radikala, i to kako u rastvoru (Marković & Patterson, 1989), tako i u organizovanim sistemima, micelama (Marković *et al.* 1990; Marković & Patterson, 1993), ili sabijenim monomolekulskim slojevima (Marković, 2001). S druge strane, i hlorofil može funkcionisati kao fotosenzibilizator – i to tipa II (Halliwell & Chirico, 1993; Girotti, 2001), što može biti iskorišćeno u PDT terapiji za suzbijanje malignih tumora (Moser, 1998).

Sadržaj lipidne peroksidacije se može kvantitativno ocenjivati putem testova, kao što su metoda konjugovanih diena i TBA-MDA test.

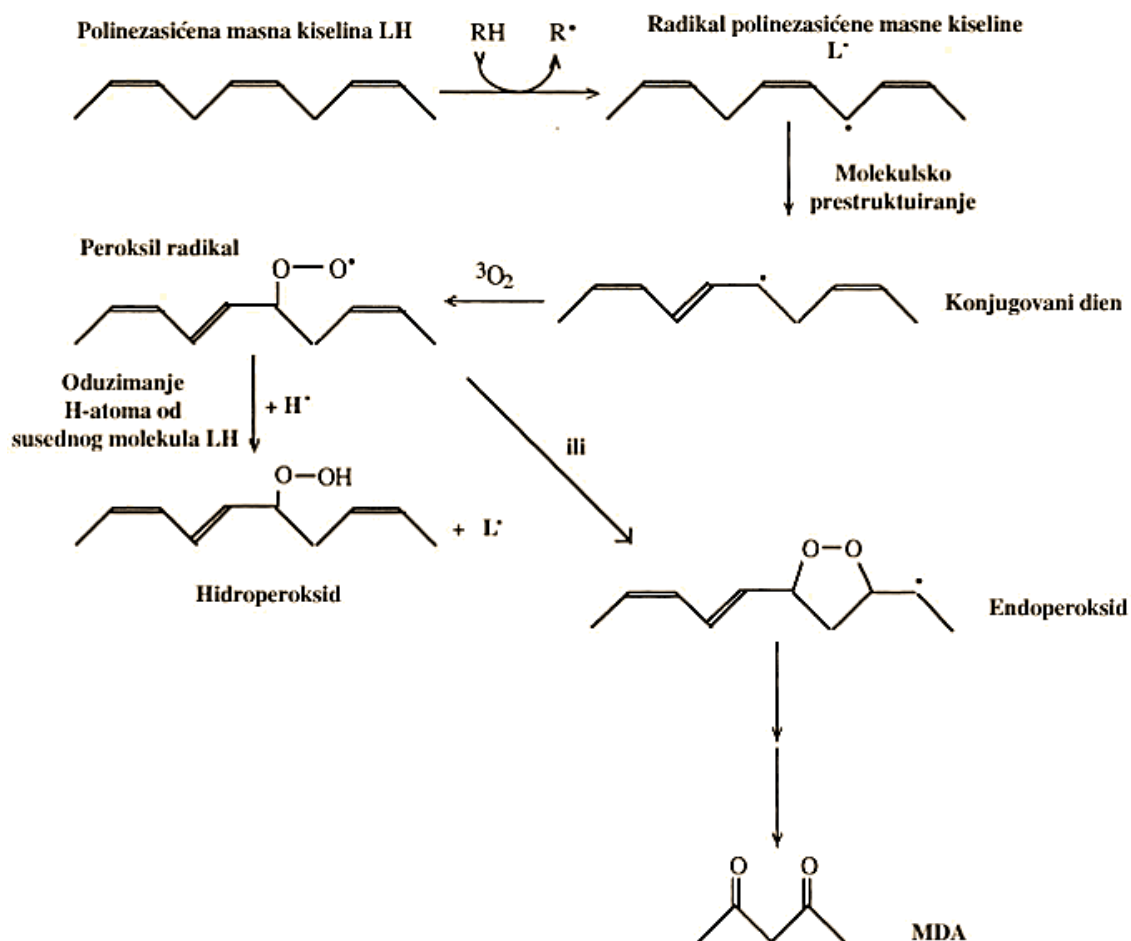
Metoda konjugovanih diena je spektrofotometrijska metoda i zasniva se na apsorpciji UV zračenja u oblasti 230–235 nm, u kojoj apsorbuju konjugovane dienske strukture sa naizmeničnim rasporedom jednostrukih i dvostrukih veza (–C=C–C=C–) (Halliwell & Chirico, 1993; Wheatley, 2000). Neki autori koriste i odnos apsorbanacija na 234 nm i 215 nm, tzv. indeks peroksidacije (Gregoriadis, 1984; Gregoriadis, 2007; Torchilin & Weissig, 2003). Generalni nedostatak metode je što se pri niskim koncentracijama diena maksimum na 234 nm slabo ispoljava (Mimica-Dukić, 1997).

TBA-MDA test. Ova metoda je brza, jednostavna i osetljiva, a koristi se za merenje količine malondialdehida (MDA) prisutnog u uzorku. Malondialdehid je sekundarni produkt, nastaje kao degradacioni proizvod peroksida masnih kiselina koje sadrže najmanje tri

nezasićene dvostruke veze između kojih je metilenska grupa. Osnova TBA-MDA testa leži u reakciji malondialdehida sa tiobarbiturnom kiselinom na povišenoj temperaturi i niskim pH vrednostima:



Rezultat reakcije je TBA-MDA kompleks ružičaste boje čiji maksimum apsorpcije leži u oblasti od 532–535 nm i 245–305 nm. Meri se apsorbanacija prvog maksimuma ($\epsilon_{(532)}=1.56 \times 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), a moguće je meriti i fluorescenciju ovog kompleksa na 553 nm. Brzina reakcije zavisi od koncentracije TBA i temperature (Wheatley, 2000).



Slika 19. Mehanizam formiranja malondialdehida (MDA) slobodno-radikalskom peroksidacijom polinezasićene masne kiseline.

Metoda daje dobre rezultate u rastvorima lipida i u definisanim membranskim modelima (mikrozomi i lipozomi). Lipidna peroksidacija u rastvoru i u modelima bioloških membrana može biti indukovana različitim mehanizmima, („stresovima“). Lipidna peroksidacija se može inicirati solima prelaznih metala u kombinaciji sa vodonik peroksidom (Fentonov sistem), ali i UV-zračenjem. Fotoni UV-svetlosti imaju dovoljnu energiju da započnu lanac lipidne peroksidacije (Lasch *et al.* 1997). Mehanizam ovakvog načina iniciranja lipidne peroksidacije nije u potpunosti razjašnjen. Neki autori smatraju da i singletni kiseonik uzima učešće u ovoj reakciji (Bose *et al.* 1990; Xia *et al.* 2006). S obzirom na to da Chl može pod nekim okolnostima reagovati kao fotosenzibilizator tipa II (Marković & Zvezdanović, 2012) ova se mogućnost ne može u potpunosti isključiti. Međutim, nedvosmisleno je dokazano da UV-svetlost može proizvoditi i superoksid anjon radikal ($O_2^{\cdot-}$), koji takođe može biti odgovoran za fotoindukovanu lipidnu peroksidaciju (Xia *et al.* 2006) tako što inicira slobodno-radikalni lančani mehanizam. UV-zračenje može direktno da utiče i na propagaciju i terminaciju lanca lipidne peroksidacije. Naime, sami hidroperoksidi (LOOH) apsorbuju UV-svetlost i raspadaju se na alkoksilni radikal ($LO\cdot$) i veoma reaktivan hidroksilni radikal ($OH\cdot$) koji odmah „oduzima” atom vodonika od najbližeg lipidnog molekula (LH), stvarajući nov alkil radikal ($L\cdot$), i na taj način regeneriše lanac radikalne reakcije (Lasch *et al.* 1997).

2.10. PRIMENA HLOROFILA I NJEGOVIH DERIVATA U INDUSTRIJI

Jedinstvena uloga hlorofila zasniva se na njegovoj specifičnoj i vrlo raznovrsnoj hemijskoj reaktivnosti zbog koje je hlorofil našao svoje mesto u nekim industrijskim tehnologijama (npr. u prehrambenoj i farmaceutsko-kozmetičkoj industriji), ali i u medicini (Moser, 1998; Marković & Zvezdanović, 2012). Upravo iz ovih razloga pitanje stabilnosti hlorofila se postavlja kao jedan od preduslova njegove potencijalne primene u raznim oblastima nauke i tehnologije.

2.10.1. Upotreba hlorofila i njegovih derivata u medicini

Možda je jedan od najvećih potencijala hlorofila, s obzirom na njegovu nisku toksičnost, u prevenciji raka. Biološka aktivnost hlorofila i derivata hlorofila uključuje pre svega antioksidantnu i antimutagenu aktivnost, mogućnost modulacije ksenobiotičkog metabolizma³ i indukcije apoptoze⁴ (Dingley, 2003; Diaz *et al.* 2003; Chan, 2006; Chiu, 2005).

Iako antioksidaciona aktivnost nije jako izražena, Chla je u odnosu na ostale hlorofilne derivate pokazao najveću antioksidacionu aktivnost (Lanfer-Marquez *et al.* 2005). Mada je prisustvo prelaznog metala u tetrapirolnoj strukturi uticalo na antimutagenu aktivnost (Odin *et al.* 1997), smanjena mutagena aktivnost bezmetalnih hlorofilnih derivata je slična drugim metalporfirinima uključujući Mg^{2+} , Zn^{2+} i Cu^{2+} derivate (Ferruzzi & Blakeslee, 2007).

Iako je većina istraživanja fokusirana na komercijalni Chl-derivat, hlorofilin ($C_{34}H_{31}CuN_4Na_3O_6$), u velikoj meri se istražuju i prirodni derivati hlorofila kao modela biomarkera (Ferruzzi & Blakeslee, 2007; Pub. broj: US 2008/0139524 A1.). Derivati hlorofila, kao što su feofitini i feoforbidi su pokazali aktivnost u suzbijanju *Salmonella tiphimurium* i *Escherichia coli* bakterija (Okai & Higashi-Okai, 1997). Hlorofili i hlorofilin se takođe koriste u ljudskoj ishrani i pokazuju *in vivo* efekte u zaštiti od raka (Dashwood &

³Ksenobiotik je hemijska supstanca koja je prisutna u organizmu, ali se u njemu ne proizvodi niti se očekuje da bude prisutna. U ksenobiotike se mogu svrstati i supstance koje su u organizmu prisutne u mnogo većoj koncentraciji od uobičajene. Toksični efekti mogu biti lokalni i opšti nakon apsorpcije i distribucije ksenobiotika cirkulacijom do tkiva i ćelija.

⁴Apoptoza je programirana ćelijska smrt koja se odlikuje specifičnim funkcionalnim promenama koje su u korelaciji sa morfološkim promenama u jedru i citoplazmi.

Liew, 1992; Dashwood, 1997; Egner *et al.* 2000). Studije o efikasnosti hlorofilina kao medicinskog sredstva su potvrđene brojnim patentima (Pub.broj: SAD 2008/ 0139524 AI; US 2011/0273705 AI; US 2010/0255045 AI; US 2010/0247591 AI).

2.10.2. Upotreba hlorofila i njegovih derivata u kozmetici na bazi lipozomskih preparata

Hlorofil se u kozmetičkoj indistriji upotrebljava za bojenje sapuna, ulja, masti, voskova, konfekcije, kože, konzervirane tečnosti i kao dezodorans. Za proizvodnju ovih proizvoda hlorofil se najčešće upotrebljava inkorporisan u lipozome.

Preparati za tretman kože, koji sadrže hlorofil, kao i njegove derivate poput hlorofilina, najčešći su hlorofilni preparati u kozmetičkoj indistriji. Komercijalni hlorofilin, derivat hlorofila, koristi se u lečenju akni, masne kože, uvećanih pora i u olakšavanju upalnih procesa na koži (Dragičević *et al.* 2005; 2009). Prednosti su takođe zapažene i u lečenju prevremenog starenja kože (ublažavanjem tankih linija i bora lica), povećanoj čvrstoći kože i zaštiti od sunčeve svetlosti smanjenjem nivoa melanina. Terapijski rezultati su poboljšani kod preparata kod kojih je hlorofilin inkorporisan u lipozome najmanjih veličina čestica (SUV lipozomi). Takođe je dokazano da se preparati na bazi hlorofila i hlorofilina nakon tretiranja veštačkim svetlom, uspešno mogu primeniti za lečenje akni i drugih upalnih procesa na koži.

U tretmanu akni, hlorofilin se može kombinovati sa jednim ili više drugih jedinjenja koja sadrže salicilnu kiselinu, retinoide, benzoil-peroksid, azelainsku kiselinu, tetracikline, klindamicin, eritromicin, adapalen, rezorcinol, koloidni sumpor, alfa-hidroksi kiseline ili druge komponente koje pomažu u borbi protiv akni. Za „usporavanje starenja”, hlorofilin se najčešće kombinuje sa jednim ili više jedinjenja koja uključuju alfa- i beta-hidroksi kiseline, peptide, alfa i beta-keto kiseline, linolnu kiselinu, inhibitore enzima i antioksidativne komponente (Pub.No.: US 2010/0247591 AI.).

Gel na bazi lipozoma, čestica veličina (150-350 nanometara) od Phospholipona 85G (American Lecthin Company) sa inkorporisanim hlorofilinom pokazao se delotvornim u ublaživanju znakova starenja kao i za regeneraciju kože u slučaju brojnih ispitanika (Pub.No: US 2010/0255045 AI; Pub. No: US 2011/ 0273705 AI). Jedna od formulacija na bazi lipozoma sa inkorporisanim hlorofilinom prikazana je u **Tabeli 3**.

Tabela 3. Formulacija na bazi lipozoma sa inkorporisanim hlorofilinom.

Sirovina	% w/w
Karbopol 940, 2%	55
1,3- Butilen-glikol	4
Na-laktat, 60%	1.6
Pentilen-glikol	4.00
r-r NaOH, 25%	1.5
Hlorofilin lipozomna disperzija	2.00
Dejonizovana voda	do 100

*Hlorofilin lipozomna disperzija: 5% hlorofilina u lipozomima (Phospholipon 85G).

MOTIV RADA

S obzirom na značaj hlorofila, na njegovu široku upotrebu u farmaceutskoj, kozmetičkoj industriji i u medicini, nameće se pitanje njegove stabilnosti generalno, kao i stabilnosti preparata na bazi hlorofila. Degradacija u preparatima gde je hlorofil primenjen kao rastvor ili inkorporisan u liposome, svakako smanjuje njegovu potencijalnu upotrebu. U kojoj meri nestabilnost hlorofila na brojne faktore i osetljivost na oksidacione stresove može negativno uticati na postojeću ali i potencijalnu primenu? Potreba za većim brojem informacija vezanih za njegovu (ne)stabilnost posebno u odnosu na oksidacione stresove i u periodu njegove izolacije, ali i skladištenja - do upotrebe za dobijanje željenih formulacija, kao i tokom (bar) garantovanog roka trajanja datih preparata, direktan je je motiv za rad na ovoj disertaciji.

CILJ DISERTACIJE

Bez obzira na široku upotrebu koju hlorofil ima u medicini, farmaceutsko-kozmetičkoj i prehrambenoj industriji, pitanje njegove (ne)stabilnosti, uticaja različitih formi oksidacionih stresova, i dalje je predmet izučavanja, te je na osnovu literaturnog pregleda o ovoj studiji definisan cilj disertacije.

Cilj rada ogleda se u ispitivanju delovanja nekoliko tipova različitih oksidacionih stresova na hlorofil, i to u dva slučaja: (I) kada je rastvoren u vodenom medijumu i (II) kada je inkorporisan u liposome. U tu svrhu izabrano je nekoliko tipa stresova koji su inicirani (A) hemijskim putem, kroz oksido-redukcionu reakciju, (B) enzimskom reakcijom, (C) termalnom inicijacijom, (D) fotohemijskim putem, kontinualnim UV-B i VIS-ozračivanjem. Poređenjem dobijenih rezultata trebalo bi proceniti potencijalni efekat molekularne organizacije hlorofila na njegovu stabilnost u dva različita sistema (vodeni medijum, lipozomi) izložena dejstvu kontinualnog oksidacionog stresa, kao i mogući efekat „zaštite” lipozoma. Uticaj hemijskog stresa na degradaciju hlorofila (A) ispitan je posredstvom tzv. Fentonove reakcije (katalizovana redukcija vodonik peroksida Fe^{2+} jonima koja dovodi do stvaranja $OH\cdot$ radikala), za termalnu inicijaciju (C) korišćen je azo-inicijator, 2,2'-azobis (2-metilpropionamidin) dihidrohlorid, koji generiše slobodne radikale. Ispitivanje enzimske reakcije degradacije hlorofila (B) vršeno je po metodi Yamauchi & Minamide (1985) sa manjim korekcijama. Fotooksidacioni stres izazvan je kontinualnim ozračivanjem hlorofila u ispitivanim medijumima vidljivim (VIS) i UV-B zračenjem, za različite rastuće periode ozračivanja (pojačavanje uslova oksidacionog stresa). Na osnovu komparacije i evaluacije rezultata dobijenih u dva različita sistema, biće sistematizovani i diskutovani faktori i parametri koji utiču na stabilnost hlorofila u datim uslovima. Na osnovu toga biće izvedene odgovarajuće tehnološke implikacije, tj. razmatraće se potencijalna upotreba dobijenih rezultata u već postojećim farmaceutsko-kozmetičkim formulacijama u kojima hlorofil igra ulogu bioaktivne supstance. Cilj ispitivanja je da se eventualno konstatuju i bliže definišu bitne razlike u stabilnosti hlorofila na oksidacioni stres u dva različita medijuma, kako bi one bile diskutovane u svetlu činjenice da se lipozomi sa inkorporisanim hlorofilima već koriste kao ingredientu u brojnim formulacijama. U tom smislu dobijeni rezultati mogli bi poslužiti poboljšanju već postojećih tehnologija.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Ekstrakcija pigmenata iz listova spanaća

Materijal i pribor: Svež spanać (*Spinacia oleracea*); Metanol; Petrol-etar (40-75°C); Dietil-etar; Vodeni rastvor NaCl- 30%; Destilovana voda; Čaše od 100 cm³; Staklena menzura; Levak za odvajanje; Pribor za filtriranje; Tamna bočica od 100 cm³ za ekstrakt.

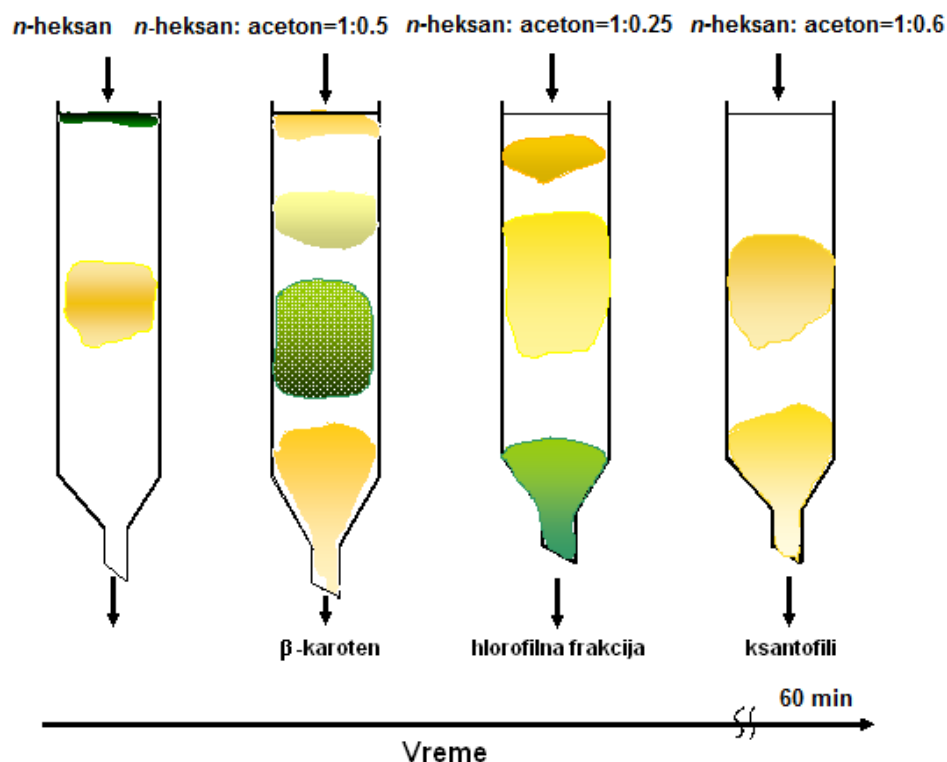
Oko 0.03 kg svežih listova spanaća (očišćenih od žila), tretirano je ključalom vodom oko 1 minut. Iz listova je voda uklonjena ceđenjem i sušenjem. Spanać se nakon usitnjenja podvrgava ekstrakciji prema prihvaćenoj proceduri (Svec, 1978). Za ekstrakciju ove količine uzorka, korišćena je smeša rastvarača, 30 cm³ metanola i 15 cm³ petrol-etra (visokoključajuća frakcija, 40-75°C). Ekstrakcija traje 30 minuta. U levak za odvajanje je pored smeše za ekstrakciju i ekstrakcionog materijala dodato 60 cm³ 30% rastvora NaCl. Donja, vodeno-metanolna faza podvrgnuta je reekstrakciji, a gornja, petrol-etarska faza, je sakupljana. Reekstrakcija je vršena dodavanjem smeše od 9 cm³ petrol-etra i 9 cm³ dietil-etra. Gornja faza se spaja sa petrol-etarskom fazom, dok je donja vodeno-metanolna faza odbačena. Ostatak spanaća se ponovo podvrgava ekstrakciji i ceo postupak se ponavlja ukupno tri puta. Ovim postupkom dobijen je ekstrakt tamnozeleno boje, koji je čuvan u tamnim bočicama, na temperaturi od oko 4°C.

3.1.1. Kolonsko razdvajanje pigmentnog ekstrakta

Nakon ekstrakcije radi oslobađanja hlorofilne frakcije od ostalih pigmenata (karotenoida) kao i drugih „primesa” koje su takođe ekstrahovane iz listova spanaća (lipidi, proteini itd.) vršeno je kolonsko razdvajanje. Pigmentni ekstrakt dobijen ekstrakcijom iz listova spanaća podvrgava se kolonskom hromatografisanju da bi se dobila frakcija koja u sebi sadrži samo hlorofile. Pošto su hlorofili podložni promenama hromatografisanje je vršeno što je brže moguće. Kao adsorbens korišćen je silika gel i smeša rastvarača, *n*-heksan:acetone u odnosu, 1:(0-0.6), kao eluent (Svec, 1978).

Materijal i pribor: Pigmentni ekstrakt iz spanaća; Silika gel (Silica gel 60, Merck, 0.063-0.2 mm); *n*-heksan; Aceton; Staklena kolona (1.5×12 cm); Špric za ubacivanje uzorka; Staklene čaše za eluent; Pipete od 10 cm³; Propipeta; Tamne bočice za kolonske frakcije; Sušnica.

Oko 30 g silika gela najpre je sušeno u sušnici 1.5 h na 150°C. Nakon toga izvršeno je punjenje kolone postupkom „mokrog punjenja”, smešom silika gela i *n*-heksana u obliku gela. Tom prilikom vođeno je računa da u koloni ne zaostanu mehurići vazduha koji bi uticali na protok u koloni ali i na kompaktnost adsorbensa. Protok u koloni je održavan na oko 1.5 cm³/min. Odnos *n*-heksan:aceton (*v/v*) menjan je od početnog 1:0 do konačnog 1:0.6. Povećanjem udela acetona u sistemu za eluiranje povećavana je polarnost mobilne faze, čime su postepeno eluirane polarnije supstance iz pigmentnog ekstrakta (SI.20).



Slika 20. Kolonsko razdvajanje pigmentnog ekstrakta iz listova spanaća. Na samom početku se eluira karotenska frakcija (β -karoten), zatim hlorofilna frakcija (pri odnosu *n*-heksan:aceton=1:0.25), a nakon toga i dve ksantofilske frakcije.

Za jedno kolonsko razdvajanje uzimano je 0.2 cm³ uzorka ekstrakta. Kolonskim razdvajanjem najpre je došlo do izdvajanja najnepolarnije komponente, β -karotena (žuta frakcija). Druga po redu, pri odnosu *n*-heksan:aceton=1:0.25, izdvajana je zelena frakcija, smeša hlorofila (*Chla* i *Chlb*, i eventualno derivata i oksidacionih proizvoda *Chla/b*, prirodno

prisutnih u uzorku, ali i nagrađenih tokom postupka obrade biljnog materijala i hromatografisanja). Poslednji razdvojeni pigmenti iz kolone su ksantofili, najpolarniji u pigmentnom ekstraktu. Pri jednom kolonskom razdvajanju, dobijano je oko 15 cm³ hlorofilne frakcije.

3.2. Ekstrakcija pigmenata iz sušenog spanaća

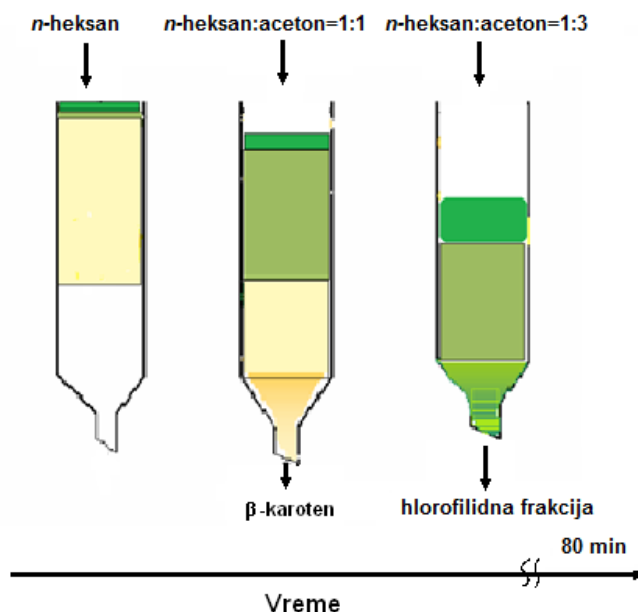
Materijal i pribor: Suvi spanać (*Spinacia oleracea*); Tris- HCl pufer, pH 6; Aceton; Destilovana voda; Čaše od 100 cm³; Staklena menzura; Levak za odvajanje; Pribor za filtriranje; Tamna bočica od 100 cm³ za ekstrakt; Termostatirano vodeno kupatilo.

Za dobijanje hlorofilida koristi se ekstrakt dobijen iz sušenog spanaća. Tačno odmerenih 5 g osušenog spanaća se inkubira sa 100 cm³ smeše, aceton:Tris-HCl pufer (pri odnosu 1:1v/v). Inkubacija traje 2 h na temperaturi od 40°C, u potpunom mraku. Rastvor je potom proceden kroz filter papir, uparen do suva i rastvoren u acetonu. Ovako dobijeni ekstrakt korišćen je dalje za dobijanje hlorofilida i to metodom kolonskog razdvajanja.

3.2.1. Kolonsko razdvajanje pigmentnog ekstrakta hlorofilida

Materijal i pribor: Pigmentni ekstrakt iz suvog spanaća; Silika gel (Silica gel 60, Merck, 0.063-0.2 mm); *n*-heksan; Aceton; Staklena kolona (1.5×12 cm); Špric za ubacivanje uzorka; Staklene čaše za eluent; Pipete od 10 cm³; Propipeta; Tamne bočice za kolonske frakcije; Sušnica.

Oko 30 g silika gela najpre je sušeno u sušnici 1.5 h na 150°C. Nakon toga je napunjena kolona postupkom „mokrog punjenja”, smešom silika gela i *n*-heksana u obliku gela. Prilikom punjenja kolone vođeno je računa da ne dođe do stvaranja mehurića vazduha u koloni. Odnos u smeši rastvarača za eluiranje (*n*-heksan:aceton) je menjan je početnog 1:1 do konačnog 1:3 v/v (SI.21). Povećanjem udela acetona u sistemu za eluiranje povećavana je polarnost mobilne faze čime su postepeno najpre eluirane polarnije supstance iz pigmentnog ekstrakta. Za jedno kolonsko razdvajanje, uziman je uzorak od 0.5 cm³ ekstrakta. Kolonskim razdvajanjem najpre je eluirana najnepolarnija supstanca, β -karoten (žuta frakcija). Druga, tamno zelena frakcija – koja pre svega sadrži hlorofilid *a* i *b* - eluirana je iz kolone pri odnosu rastvarača za eluiranje 1:2. Pri jednom kolonskom razdvajanju dobijeno je oko 10 cm³ hlorofilidne frakcije.



Slika 21. Kolonsko razdvajanje pigmentnog ekstrakta iz listova sušenog spanaća. Na samom početku se eluira karotenska frakcija (β -karoten), a zatim hlorofilidna frakcija (pri odnosu *n*-heksan:aceton=1:1), smeša hlorofilida *a* i *b*.

3.3. HPLC hromatografija

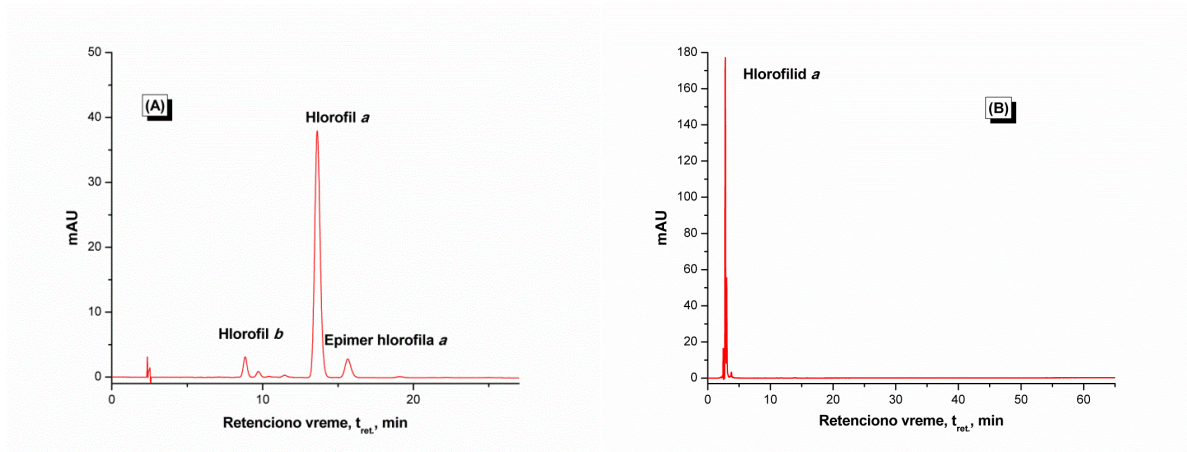
HPLC (High Performance / Pressure Liquid Chromatography– Tečna hromatografija visokih mogućnosti / pod visokim pritiskom) je često korišćena hromatografska metoda za analizu biljnih fotosintetskih pigmentata, odnosno njihovih smeša. U literaturi se može naći veliki broj radova koji se tiču različitih uslova za HPLC razdvajanje biljnih fotosintetskih pigmentata (Lim, 2009; Daood *et al.* 1989; Shioi, 1991; Garrido & Zapata, 1998; Kimura & Rodriguez-Amaya, 2002). Za detekciju je korišćen UV-VIS DAD detector (Diode-Array Detector, sa sistemom umreženih foto-dioda) sa mogućnošću primene spektralne analize razdvojenih komponenti pigmentnih smeša.

Izdvojene frakcije dobijene kolonskim razdvajanjem podvrgnute su HPLC analizi, po modifikovanoj metodi Scholz-a & Ballschmiter-a (1981).

Materijal i pribor: Uzorak Chl-frakcije, rastvoren u acetonitrilu; Acetonitril (100%); HPLC Agilent sistem; Kolona: Lichrosorb RP-18; Mobilna faza: acetonitril/etil-acetat/metanol= 60/20/20; Protok: 0.5 i 1 cm³/min; Detekcija: λ =430 i 660 nm.

3.3.1. Ispitivanje čistoće izolovanih pigmentnih frakcija

Analizom HPLC-hromatograma potvrđena je čistoća Chl frakcije koja u sebi sadrži u najvećoj meri Chla. Na **Slici 22-A** je prikazan HPLC hromatogram Chl frakcije sa koga se može uočiti da u hlorofilnoj frakciji ima najviše Chla, uz značajno prisustvo Chlb. Frakcija sadrži i druge forme hlorofila, ali u zanemarljivom prinosu. Budući da je Chlb polarniji od Chla, to se on javlja na kraćem retencionom vremenu.



Slika 22. HPLC hromatogram hlorofilne frakcije (A), talasna dužina detekcije (λ_{det}) 660 nm. Retenciono vreme za hlorofil *a* – t_{ret} . (Chla) ~ 14 min, za hlorofil *b* – t_{ret} . (Chlb) ~ 9 min; HPLC hromatogram hlorofilidne frakcije (B), za talasnu dužinu detekcije (λ_{det}) 660 nm. Retenciono vreme za hlorofilid *a* – t_{ret} . (Chlida) ~ 3 min.

Dobijeni rezultati ovom HPLC metodom potvrđuju one (Watanabe *et al.* 1984) koji takođe koriste izokratski režim eluiranja za separaciju i identifikaciju derivata hlorofila. Apsorpcioni VIS spektri snimani na UV-VIS spektrofotometru kao i sami VIS spektri dobijeni sa HPLC-a, pokazuju iste apsorpcione spektre (Jeffrey, 1997), potvrđujući identifikaciju hlorofila. Osim slaganja u odgovarajućim položajima maksimuma apsorpcionih traka (Soret-ova ili *B*-traka na ~430.0 nm, *Q_y*-trake na ~662.0 i ~616.5 nm, i *Q_x*-traka na ~575.0 nm; Jeffrey, 1997), odnos maksimuma apsorpcija pikova $A_{\text{Soret,max}}/A_{\text{Qy,max}}$ koji isto kao kod Chla-standarda iznosi ~1.29, odlično se slaže sa literaturnom vrednošću od ~1.31 (Boucher & Katz, 1967). Kolonskim odvajanjem komponenti iz ekstrakta sušenog spanaća, dobijen je gotovo potpuno čist rastvor hlorofilida. Hromatogram rastvora hlorofilida, pokazuje da u hlorofilidnoj frakciji dominira hlorofilid *a*, što potvrđuje intenzivni pik $t_{\text{ret}} \approx 3$ min (**Sl.22-B**). S obzirom na čistoću dobijenog rastvora hlorofilida možemo zaključiti da je

postignuta potpuna konverzija ovog derivata hlorofila u toku enzimske reakcije u acetonu (pri ekstraktovanju).

3.4. Određivanje koncentracije Chla i Chlb

Koncentracije Chla i Chlb (C_a i C_b , respektivno) u hlorofilnoj frakciji određene su spektrofotometrijski, u 100% acetonu ili metanolu kao rastvaraču (Lichtenthaler, 1987). U acetonu sumerene vrednosti apsorpcionih maksimuma (A_{\max}) na dvema talasnim dužinama ($A_{644.8}$ i $A_{661.6}$) a zatim su koncentracije C_a i C_b izračunate upotrebom sledećih jednačina:

$$C_a = 11.24 \times A_{661.6} - 2.04 \times A_{644.8} \quad (11)$$

$$C_b = 20.13 \times A_{644.8} - 4.19 \times A_{661.6} \quad (12)$$

$$C_{a+b} = 7.05 \times A_{661.6} + 18.9 \times A_{644.8} \quad (13)$$

U metanolu su merene vrednosti apsorpcionih maksimuma (A_{\max}) na dvema talasnim dužinama (A_{666} i A_{653}):

$$C_a = 15.65 \times A_{666} - 7.34 \times A_{653} \quad (14)$$

$$C_b = 27.05 \times A_{653} - 11.21 \times A_{666} \quad (15)$$

$$C_{a+b} = 4.43 \times A_{666} + 19.71 \times A_{653} \quad (16)$$

„Ukupna koncentracija” $C_{a+b} = C_a + C_b$, data je zbirnim jednačinama. Dobijene koncentracije hlorofila računata su u $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. Odnos Chla/Chlb u hlorofilnoj frakciji je približno iznosio ~3:1. Koncentracija Chla u vodenom medijumu je podešena u opsegu 10^{-6} - 10^{-4} M.

3.5. Sirovine za pripremanje lipozoma

- Dipalmitoilfosfatidilholin, (DiPalmitoylPhosphatidylCholine, DPPC; $M_r=734.05$ g/mol, Sigma Aldrich (Nemačka)) je korišćen za pripremu lipozoma. Svi rastvori su pripremljeni upotrebom supstanci analitičke čistoće i prečišćene vode, provodljivosti $\leq 0.1 \mu\text{s cm}^{-1}$ (Millipore Milli K-sistem Billerica, Massachusetts, SAD). Temperatura faznog prelaza DPPC lipida iznosi 41-42°C.

- Dimiristoilfosfatidilholin, (1.2-DiMyristoylPhosphatidylCholine, DMPC, $M_r=677.93$ g/mol, Sigma Aldrich (Nemačka)), je korišćen za pripremu lipozoma. Svi uzorci su pripremljeni iz supstanci analitičke čistoće i prečišćene vode. Temperatura faznog prelaza DMPC lipida iznosi 24°C.

- Kao uzorak za pripremu lipozoma je korišćen i 1.2-Diacyl-sn-glycero-3-phosphocholine koji predstavlja smešu lipida različite zasićenosti (u daljem tekstu: „PC smeša”). Prema deklaraciji proizvođača ova smeša je sledećeg masnokiselinskog sastava: 33% 16:0 (palmitinske kiseline), 13% 18:0 (stearinske), 31% 18:1(oleinske), i 15% 18:2 (linoleinske) (ostale masne kiseline su prisutne u zanemarljivoj količini), sa prosečnom molekulskom masom od 768 g/mol. Temperatura faznog prelaza ove smeše iz gel faze u tečnu fazu iznosi - 15°C za krivu zagrevanja i -7°C za krivu hlađenja.

- PHOSPHOLIPON 90[®] (PL-90, $M_r = 760$ g/mol, Nattermann Phospholipid GMBH, Nemačka) je žuto-bela, voskasta supstanca dobijena prečišćavanjem lecitina soje. Predstavlja lipidnu smešu sledećeg sastava: fosfatidilholin 98%, lizofosfatidilholin 2.1%, tokoferol 0.17%. Masnokiselinski sastav lipida je sledeći: palmitinska kiselina 12%, stearinska 3%, oleinska 3%, linolenska 5%, linoleinska 66%. Fizičko-hemijske osobine smeše: peroksidni broj - 1.3; kiselinski broj - 0.3; sadržaj etanola - 0%; sadržaj vode 0.3%.

Fosfatni pufer za pripremu lipozoma (hidratacionom metodom) pripremljen je mešanjem rastvora $\text{Na}_2\text{KPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ i KH_2PO_4 . Rastvor $\text{Na}_2\text{KPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (5.5×10^{-2} M) i rastvor KH_2PO_4 (6.6×10^{-2} M) su pomešani u odnosu 9:2. Konačna vrednost pH od 7.4 podešena je konstantnim mešanjem puferskog rastvora na magnetnoj mešalici.

3.6. Priprema lipozoma metodom tankog filma sonifikacijom i ekstrudiranjem

Materijal i pribor: DPPC, DMPC, PC smeša, PL-90 lipidna smeša; Hloroform, *p.a.*; Fosfatni pufer, pH 7.4; Epruvete; Vakuum uparivač Heildolph 94200, Bioblock, Illkirch Cedex, Francuska; Vibrak mešalica.

Lipozomi su pripremljeni po metodi tankog filma (New, 1990), sa malim modifikacijama. Izabrani lipidi (DPPC, DMPC, PC, PL-90), su rastvoreni u hloroformu zajedno sa Chla (ili Chlida), pri čemu je molarni odnos (pigment/lipid) podešen na 1/100. Koncentracija lipida je podešena na 5×10^{-4} M.

Hloroform je uklonjen pomoću rotacionog vakuum uparivača, u periodu od 60-90 min. Nakon toga izvršena je hidratacija (lipidnog sistema sa pigmentima) fosfatnim puferom. Hidratacija lipidnog sistema je vršena 60 min uz konstantno mešanje, na 120 obr/min. Dobijeni sistem lipozoma se sastojao uglavnom od multilamelarnih vezikula (MLV). U cilju dobijanja malih unilamelarnih vezikula (SUV), vršeno je mehaničko mešanje na Vibrak mešalici, pri brzini 500 rpm, ili je korišćen ekstruder sa filterima odgovarajućih promera.

Metoda sonifikacije

Materijal i pribor: Ultracentrifuga SIGMA 2-16 K SciKuip doo Merrington, Shrevsburi Shropshire, Velika Britanija; UV-VIS spektrofotometar VARIAN Cary -100 Conc.; Titanijuma sonicator Hielscher, UP-100H (Hielscher Ultrasonics GmbH Teltov, Nemačka).

Nakon pripreme lipozoma suspenzija je najpre centrifugirana a zatim je izvršena sonifikacija supernatanta u trajanju od 15 min, pomoću sonde (MS-3) (New, 1990).

Provera dimenzija i lamernosti dobijenih sistema lipozoma sa hlorofilnim pigmentima, izvršena je snimanjem spektara u opsegu 200-800 nm (Patrascu *et al.* 2008). Sva snimanja spektara izvedena su iznad kritične temperature lipida (T_C) (lipidi su tada prisutni u tečnoj kristalnoj formi).

Lipozomske suspenzije su u poslednjoj fazi pripreme centrifugirane, 45 min na 20 000×g, kako bi se uklonili tragovi titanijuma i postigle homogene populacije vezikula, tj. lipozoma. Merenja su vršena korišćenjem supernatanata.



A

B

Slika 23. Centrifuga, SIGMA 2-16 K centrifugi, SciKuip doo Merrington, Shrevsburi Shropshire, Velika Britanija (A); Sonikator Hielscher, UP-100H (Hielscher Ultrasonics GmbH Teltov, Nemačka), (B).

Metoda ekstrudiranja

Materijal i pribor: Ekstruder „AVESTIN”- Avestin. Inc. sa membranskim filterima prečnika pora 100 i 400 nm; UV-VIS spektrofotometar VARIAN Cary -100 Conc; Tamne bočice.

Multilamelarni, neuniformni lipozomi, dobijeni na opisan način (3.6.), ekstrudiraju se kroz membranske filtere sa definisanim prečnikom pora od 100 i 400 nm, radi dobijanja unilamelarnih lipozoma definisanih dimenzija. Ekstrudiranje se vrši tako što se u jedan od injektora ekstrudera (**Sl.24**) ubaci 0.5 cm^3 uzorka lipozoma, i laganim pritiskom na klip celokupna zapremina prebaci u drugi injektor kroz cilindar u čijem se središtu nalazi membranski filter određenih dimenzija. Ovaj postupak se ponovi neparan broj puta, najčešće 15 ili 17 puta, što se smatra dovoljnim da najveći broj lipozoma bude približno istog prečnika kao i pore korišćenog filtera. Razlog neparanom broju ponavljanja je da bi se ekstrudirani lipozomi sakupili na suprotnom kraju od onoga gde je početna zapremina unešena, čime se obezbeđuje da se najvećim agregatima ili eventualnim nečistoćama, ne kontaminira finalna zapremina ekstrudiranih lipozoma. Nakon ekstrudiranja lipozomi se sakupljaju u tamnim bočicama i čuvaju u frižideru na 10°C . Provera dimenzija i unilamernosti dobijenih sistema lipozoma sa hlorofilnim pigmentima, izvršena je snimanjem spektara u opsegu 200-800 nm (Patrascu *et al.* 2008).



Slika 24. Ekstruder „AVESTIN”, Avestin, Inc.

3.6.1. Ekstrakcija hlorofila iz lipozoma

Materijal i pribor: Lipozomi sa inkorporisanim hlorofilom; Izopropanol; *n*-heksan; Levak za odvajanje; Vorteks.

Ekstrakcija hlorofila iz lipozoma izvršena je dodavanjem smeše izopropanol:*n*-heksan, u odnosu 1:2 v/v. Smeša je dodata u levak za odvajanje zajedno sa lipozomima sa inkorporisanim hlorofilom. Nakon mućkanja dvofazni sistem se ostavi da odstoji 5 min radi jasnog razdvajanja faza. Izopropanol „rastura” liposome dok *n*-heksan vrši ekstraktovanje hlorofila iz tako rasturenih lipozoma. Nakon toga je vršeno snimanje spektara ekstraktovanog hlorofila.

3.7. Ozračivanje hlorofila

3.7.1. UV-B ozračivanje hlorofila

Materijal i pribor: Izolovana hlorofilna frakcija u vodenom medijumu; Lipozomi sa inkorporisanim hlorofilom; Destilovana voda; Metanol; Kvarcne kivete; Fotohemijski reaktor.

Ozračivanje pomoću UV-B je vršeno kontinualno u cilindričnom fotohemijskom reaktoru „Rayonet” sa 10 simetrično postavljenih lampi. Uzorci (hlorofili u vodenom medijumu, ili u lipozomima) su zračeni pod istim uslovima pomoću lampi sa emisionim maksimumima na 300 nm (UV-B), za različite vremenske periode. Zračenje uzoraka je vršeno u alikvotima od 2.5 cm³ u kvarcnim kivetama dimenzija 1×1×4.5 cm, koje su smeštene u rotacioni držač za kivete. Za potrebe zračenja korišćene su kvarcne a ne staklene kivete jer i

samo staklo apsorbuje u bliskoj UV-oblasti (200-300 nm). Držač je pozicioniran vertikalno u osu reaktora, rotira brzinom od 5 obrtaja/min i na taj način obezbeđuje ravnomerno ozračivanje svih uzoraka. Ukupni izmereni energetska fluks koji uzorci primaju na ovaj način je oko 15 W/m^2 na 300 nm ($30\text{-}37.13 \text{ } \mu\text{mol fotona/m}^2\text{s}$). Merenje energetskog fluksa je izvršeno pomoću UV-metra SOLARMETER SM 8.0 UVC, „Solartech” Inc.

3.7.2. Ozračivanje hlorofila vidljivom svetlošću

Materijal i pribor: Izolovana hlorofilna frakcija u vodenom medijumu; Lipozomi sa inkorporisanim hlorofilom; Destilovana voda; Metanol; Kvarcne kivete; Improvizovani fotohemijski reaktor.

Tretman vidljivom svetlošću vršen je kontinualno u improvizovanom cilindričnom fotohemijskom reaktoru sa LED lampama (Light Emitted Diodes) koje su simetrično postavljene u odnosu na centar reaktora na kome se smešta kiveta sa uzorkom. Zračenje uzoraka (hlorofili u vodenom medijumu, ili u lipozomima) vršeno je u alikvotima od 2.5 cm^3 u kvarcnim kivetama dimenzija $1 \times 1 \times 4.5 \text{ cm}$, koje se smeštaju u držač za kivete. Ukupni izmereni energetska fluks koji su uzorci primali na ovaj način je oko 14 W/m^2 . Merenje energetskog fluksa je izvršeno pomoću uređaja VICTOR 1010A- Digital Lux Meter.

3.8. Enzimaska oksidacija hlorofila

Materijal i pribor: Izolovana hlorofilna frakcija; 95% etanol; Peroksidaza iz rena; Fosfatni pufer pH=6; Triton X-100; Hidrogen-peroksid; Rezorcinol; *n*-heksan; Vorteks; Epruvete; Levak za ekstrakciju.

Za izvođenje enzimske reakcije sa hlorofilom korišćena je proksidaza iz rena (298 U/mg^5). Rastvor peroksidaze ($2 \text{ } \mu\text{M}$), je pripremljen rastvaranjem 0.34 mg peroksidaze u 10 ml hladnog 50 mM fosfatnog pufera, pH 6.0. Koncentracija enzima je proračunata na osnovu ekstinkcionog koeficijenta $\epsilon_{403} = 102.0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Hlorofilna frakcija koja je prethodno izolovana gore opisanim metodama je uparena do suva i rastvorena u 95% etanolu. Konačna koncentracija hlorofila u ukupnoj zapremini reakcione smeše iznosila je $5 \text{ } \mu\text{M}$.

⁵U/mg- specifična aktivnost enzima; U-ona količina enzima neophodna za katalizu reakcije transformacije 1 mikromola supstrata po minuti pri standardnim uslovima.

Reakciona smeša sadržala je 0.2 ml hlorofilne frakcije u etanolu, 50 μ l etanolnog rastvora rezorcinola, 0.1 ml 1% Triton X-100, 0.1 ml 0.3% hidrogen-peroksida, 40 μ l rastvora peroksidaze iz rena i 2.0 ml 100 mM fosfatnog pufera (pH 6.0) u konačnoj zapremini od 2.5 ml. Reakcija je ostavljena da teče u mraku u periodu od 10 min, pri definisanoj temperaturi i pH vrednosti reakcione smeše. Nakon isteka 10 minuta reakcija je prekinuta dodavanjem 2.5 ml etanola. Potom je izvršena ekstrakcija svih hlorofilnih pigmenata iz reakcione smeše dodavanjem 5.0 ml *n*-heksana.

3.9. Fentonova reakcija sa hlorofilom

Oksidacija hlorofila Fentonovim reagensom u vodenom medijumu

Materijal i pribor: Hlorofilna frakcija u vodi; Vodeni rastvor $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; Vodonik peroksid; Destilovana voda; Epruvete; Vorteks.

Hlorofilna frakcija izolovana nakon kolonskog razdvajanja je uparena do suva i rastvorena u smeši metanola i vode (1/20 *v/v*). Osnovni rastvor $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ je dobijen rastvaranjem 0.0834 g $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ u 200 ml destilovane vode. Osnovni rastvor vodonik-peroksida je dobijen rastvaranjem 0.85 cm^3 30% H_2O_2 u 100 cm^3 destilovane vode. Reakciona smeša sadržala je 1 cm^3 osnovnog rastvora $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 1 cm^3 osnovnog rastvora H_2O_2 , kao i 1 cm^3 hlorofilne frakcije određene koncentracije. Konačni odnos molova Fe^{2+} i H_2O_2 u reakcionoj smeši od 3 cm^3 , podešen je na 1:250. Reakcija je praćena u periodu od 0-300 min snimanjima na UV-VIS spektrofotometru.

Lipozomi sa inkorporisanim hlorofilom i Fentonovim reagensom

Materijal i pribor: Hlorofilna frakcija; Fosfatni pufer pH 7,4; rastvor $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; Vodonik-peroksid; DPPC lipid; PL-90 lipidna smeša; Hloroform, *p.a.*; Vakuum uparivač; Vorteks; Ekstruder sa membranskim filterima prečnika pora 100 nm; UV-VIS spektrofotometar.

Izabrani lipid (DPPC ili PL-90) je rastvoren u hloroformu zajedno sa pigmentima (Chla ili Chlida), pri čemu je molarni odnos Chla ili Chlida prema lipidu podešen na vrednost 1/100. Koncentracija lipida je podešena na 5×10^{-4} M. Hloroform je uklonjen pomoću rotacionog vakuum uparivača u periodu od 60-90 min. Nakon toga izvršena je hidratacija lipidnih sistema sa pigmentima fosfatnim puferom. Hidratacija lipidnih sistema je vršena u toku 60 min, uz konstantno mešanje na 120 obr/min. Lipozomski uzorak je sadržao uglavnom

multilamelarne vezikule (MLV). U cilju dobijanja malih unilamelarnih vezikula (SUV), izvršeno je ekstrudiranje kroz filtere od 100 nm opisanim postupkom (poglavlje 3.6.). Reakcija Fentonovog reagensa sa Chl-lipozomima je nakon procesuiranja praćena pomoću UV-VIS spektrofotometra.

3.10. Reakcija hlorofila sa termalnim inicijatorom

Reakcija hlorofila sa termalnim inicijatorom u vodenom medijumu

Materijal i pribor: Hlorofilna frakcija u vodenom medijumu; Vodeni rastvor termalnog inicijatora 2.2-azobis(2-metilpropionamidin)dihidrochlorid (AAPH); Destilovana voda; Epruvete; Vorteks; Termostatirano vodeno kupatilo.

Hlorofilna frakcija izolovana nakon kolonskog razdvajanja je uparena do suva i rastvorena u smeši metanola i vode (1/20 v/v). Osnovni rastvor AAPH dobijen je rastvaranjem 0.1 g AAPH u 30 ml destilovane vode. U konačnu zapreminu reakcione smeše, 3 cm³, dodat je vodeni rastvor hlorofilne frakcije precizno podešene koncentracije i vodeni rastvor AAPH. Konačna koncentracija termalnog inicijatora u reakcionoj smeši podešena je na 1.6×10⁻³ M i 3.2×10⁻³M, respektivno. Nakon mešanja sadržaja na vorteksu, reakciona smeša je inkubirana u termostatirano vodeno kupatilo na temperaturi od 40°C. Reakcija termalnog inicijatora sa hlorofilom praćena je na UV –VIS spektrofotometru za periode inkubacije od 0-300 min.

Lipozomi sa inkorporisanim hlorofilom i termalnim inicijatorom

Materijal i pribor: Hlorofilna frakcija; DPPC lipid; PL-90 lipidna smeša; Hloroform, *p.a.*; Fosfatni pufer, pH 7.4; 2.2-azobis(2-metilpropionamidin)dihidrochlorid (AAPH); 2.2'-azobis(2.4-dimetilvaleronitril)-(AMVN); Vakuum uparivač; Vorteks; Ekstruder sa membranskim filterima prečnika pora 100 nm; UV-VIS spektrofotometar; Termostatirano vodeno kupatilo.

Izabrani lipid (DPPC ili PL-90), je rastvoren u hloroformu zajedno sa pigmentima Chla (ili Chlida), pri čemu je molarni odnos Chla ili Chlida prema lipidu podešen na 1/100. Koncentracija lipida je podešena na 5×10⁻⁴M. Hloroform je uklonjen pomoću rotacionog vakuuma uparivača u periodu od 60-90 min. Nakon toga izvršena je hidratacija lipidnih sistema sa pigmentima dodatkom AAPH u fosfatnom puferu pH 7.4, koncentracije 3.2×10⁻³

³M. Hidratacija lipidnih sistema je vršena 60 min uz konstantno mešanje, na 120 obr/min, na temperaturi većoj od temperature faznog prelaza lipida. Dobijeni sistem lipozoma se sastojao od multilamelarnih vezikula (MLV). U cilju dobijanja SUV lipozoma, izvršeno je ekstrudiranje kroz filtere od 100 nm. Lipozomski uzorak sa hlorofilom i AAPH je potom inkubiran u vodenom kupatilu na temperaturi od 40°C. Reakcija termalnog inicijatora, AAPH, sa Chl-lipozomima je praćena na UV-VIS spektrofotometru. Prilikom ispitivanja stabilnosti hlorofila na dejstvo lipidnog AMVN termalnog inicijatora, priprema lipozomnih disperzija od DPPC i PL-90 lipida je analogno prethodnom postupku ponovljena, s tim što je sam termalni inicijator dodat zajedno sa lipidom u postupku izrade. Konačna koncentracija AMVN u sistem Chl-lipozoma je podešena na 1×10^{-3} M.

3.11. Određivanje stepena degradacije hlorofila nakon izlaganja hlorofila oksidacionom stresu u vodenom medijumu i u lipozomima

Degradacija ili bleaching Chl (%) predstavlja kvantitativni izraz „izbeljivanja”–destrukcije hlorofila izražene procentualno. Vrednost degradacije ($D.R._{Chl}$, %) određena je jednačinom:

$$D.R._{Chl} = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100 \quad (17)$$

pri čemu je:

A_0 – maksimum apsorpcije Q_y -trake pre oksidacionog stresa,

A_1 – maksimum apsorpcije Q_y -trake nakon određenog vremena izlaganja oksidacionom stresu.

3.12. KORIŠĆENE METODE ISPITIVANJA

3.12.1. VIS apsorpciona spektrofotometrija

Svi VIS spektri su snimani na spektrofotometru tipa VARIAN Cary-100 Conc. Spectrophotometer, u kvarcnim ćelijama. Opseg talasnih dužina merenja apsorpcije svih uzoraka je 200-800 nm.

3.12.2. Fluorescentna spektroskopija

Merenja emisije fluorescentne polarizacije ili anizotropije, kojima su dobijeni spektri hlorofila inkorporisanih unutar lipozoma, izvršena su na fluorescentnom spektrometru Perkin Elmer LS 55 (Valtham, Massachusetts - **Sl.25**), koji je opremljen dodatnom opremom za kontinuirano praćenje promena temperature u mernim kivetama uz istovremeno mešanje. Spektrometar je opremljen R928 fotomultiplikatorom. Veličina proreza, kako za eksitacioni, tako i za emisioni zrak iznosila je 5 nm. Tačnost talasne dužine instrumenta je ± 1.0 nm a reproduktivnost talasnih dužina je ± 0.5 nm. Termostatiranim vodenim kupatilom, Julabo ED 5 (Julabo Labortechnik GmbH 77960 Seelbach / Nemačka), sa tačnošću od ± 0.3 K, obezbeđena je konstantna temperatura u kiveti tokom svih merenja fluorescencije.

Polarizacija ili anizotropija fluorescentne emisije daju podatke o prosečnom ugaonom pomeraju fluorofore koja se javlja između apsorpcije i zakasnele emisije fotona. Vrednost anizotropije je računata po jednačini:

$$r = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + 2 I_{\perp}) \quad (18)$$

gde je :

r -anizotropija (fluorescentne emisije),

I_{\parallel} -intenzitet emisije fluorescencije paralelan sa pravcem ekcitanog polarizovanog zraka,

I_{\perp} - intenzitet emisije fluorescencije normalan na pravac ekcitanog polarizovanog zraka.

Fluorescentna anizotropija je pogodna za ispitivanja medijuma kao što su lipozomski sistemi. Lipozomi u vodenoj sredini kao heterogeni sistemi pokazuju različite anizotropne optičke karakteristike, u svojim različitim delovima („fazama”) te je emisiona fluorescencija,

emitovana od strane hlorofilnih molekula direkno zavisna od medijuma u kome se molekuli nalaze.



Slika 25. Fluorescentni spektrometar, Perkin Elmer LS 55 (Valtham, Massachusetts, SAD).

3.12.3. LC-MS spektrometrija

Masena spektrometrija je fizičko-hemijska metoda koja se zasniva na jonizaciji ispitivanog uzorka, kao i razlaganju nastalog jonskog snopa na jone različitog odnosa masa-naelektrisanje (m/e). Kao rezultat dobija se grafik zavisnosti relativne količine jona od odgovarajućih m/e vrednosti, odnosno – maseni spektar.

Masena spektrometrija (MS) se razlikuje od ostalih spektralnih metoda analize organskih jedinjenja (UV, IC i NMR) po tome što se radi, bar formalno o destruktivnoj metodi analize – nakon snimanja masenog spektra nemoguće je nadoknaditi uzorak. Ne sme se pri tom zaboraviti da fragmentisanje jona – koje je ključ za rešavanje strukture ispitivanog molekula – nije haotičan nego reproduktivan proces, zasnovan na pravilima fragmentacije. Sa druge strane, MS kao analitička tehnika je posebno pogodna zbog izvanredne osetljivosti; potrebne su količine manje nego kod IC i NMR-a, a najčešće je dovoljno 1 μg (10^{-6} g) uzorka za analizu.

Posebna prednost MS-metode je široka dinamička oblast koncentracija, tako da se mogu analizirati i uzorci prisutni u ppm količinama. Danas, uobičajeni MS-instrumenti sa niskom rezolucijom razdvajaju mase do vrednosti m/e 2000, a MS-instrumenti sa visokom rezolucijom mogu da razdvoje jone mase od 10.000 do 15.000 m/e jedinica.

Jonizacija, odnosno formiranje jona u jonskom izvoru MS-spektrometra, može se ostvariti na više načina: bombardovanjem visokoenergetičnim elektronima (pri čemu ta energija uvek nadmašuje energiju jonizacije ispitivanog jedinjenja), u tzv. „spreju” elektrona niže energije (Electro Spray Ionization Mass Spectrometry – ESI MS), hemijskom jonizacijom (Chemical Ionization – CI) – najčešće na atmosferskom pritisku (Atmospheric Pressure Chemical Ionization – APCI), foto-disocijacijom (Photo Dissociation MS). Obrazovani pozitivno naelektrisani joni se razdvajaju pod dejstvom kombinovanih elektromagnetnih polja (tzv. Kvadropolni – Quadropole - i „viši” analizatori) i registruju proporcionalno svojoj masi, ili odnosu m/e .

Pošto se procesi stvaranja i razdvajanja jona odigravaju u uslovima visokog vakuuma, neophodne su pumpe koje ostvaruju visoki vakuum ($10^{-4} - 10^{-8}$ torr-a⁶) unutar MS-sistema, a posebno u jonskom izvoru, analizatoru i detektoru. Visoki vakuum je potreban da bi se sprečili sudari dva jona, tj. da ne bi dolazilo do reakcija između dva jona, ili jona i neutralnog molekula.

LC-MS metoda za identifikaciju hlorofila

Identifikacija i analiza hlorofila (u različitim formama, Chla, Chlb, itd.), njegovih derivata, kao i produkata nastalih kao rezultat različitih oksidacionih stresova, korišćen je *Dionex Ultimate 3000* tečno-hromatografski sistem visokih performansi (Ultra High Performance Liquid Chromatography - UHPLC) sastavljen od kvaternarne pumpe sa degaserom, termostatirajuće kolone, autosemplera i DAD detektora. UHPLC sistem je povezan sa *LCQ Fleet Ion Trap* masenim spektrometrom (Thermo Fisher Scientific, San Jose, California, USA). Softveri *Xcalibur* (verzija 2.2 SP1.48) i *LTQ Fleet* (verzija 2.7.0.1103 SP1) su korišćeni za kontrolu, obradu i analizu podataka. Razdvajanje hlorofila i nastalih produkata je vršeno na *Hypersil gold C18* (50×2.1 mm, 1.9 μm) koloni proizvedenoj od strane *Thermo Fisher Scientific*.

Mobilna faza se sastojala od (A) metanola i (B) acetonitrila. Za hromatografsko razdvajanje korišćen je linearni gradijent mobilne faze na način koji je opisan u **Tabeli 4**. Zapremina injektiranja je bila 5 μL, a protok mobilne faze 0.20 ml/min. DAD detekcija je praćena na talasnim dužinama od 430 i 660 nm.

⁶1 torr = 1 mm Hg, i ekvivalentan je $\cong 133.33$ Pa.

Tabela 4. Gradijentni režim mobilne faze za analizu hlorofila i nastalih produkata.

Vreme, min	Mobilna faza (A)	Mobilna faza (B)
0	90	10
0.75	60	40
1.5	50	50
5.0	60	40
6.0	80	20
10	90	10

Korišćena metoda analize bila je zasnovana na elektrosprej jonizaciji (ESI) ispitivanog uzorka (hlorofilna frakcija), pri atmosferskom pritisku u pozitivnom modu. Parametri ESI-izvora su bili sledeći: napon izvora 4 kV, napon kapilare 37 V, napon tube 110 V, temperatura kapilare 200°C, protok glavnog (*sheath*) i pomoćnog (*auxiliary*) gasa je bio 18 i 8 *au*, respektivno. Normalizovana koliziona energija iznosila je 35 eV. Identifikacija hlorofila i ostalih derivata izvršena je na osnovu spektralnih karakteristika: PDA spektra, masenog spektra (MS) i MS fragmentacije (MS/MS). Svi rastvarači korišćeni pri analizi bili su LC-MS stepena čistoće.

3.12.4. Spektrofotometrija konjugovanih diena

Konjugovani dieni se prate merenjem apsorpcije na 234 nm (Bittner *et al.* 2002). Hlorofili su inkorporisani u liposome, različitih veličina i lipidnog sastava. Finalna koncentracija hlorofila u lipozomnoj disperziji iznosila je 5×10^{-6} M, a fosfolipida 5×10^{-4} M. Peroksidacija fosfolipida je inicirana dejstvom više oksidacionih stresova, počev od VIS i UV-B-ozračivanja, do oksidacionog stresa izazvanog dejstvom hemijskih agenasa, Fentonovog reagensa i termalnog inicijatora. Povećanje apsorpcije na 234 nm, što je posledica stvaranja konjugovanih diena, praćeno je UV-spektrofotometrijski. Promena intenziteta apsorpcije hlorofila na njegovim maksimumima apsorpcije (A_{\max}), praćeno je u

funkciji vremena izlaganja oksidacionom stresu, i na taj način je praćena kinetika njihove fotodestrukcije, tj. bleaching-a.

UV-VIS spektrofotometrijska merenja uzoraka su vršena na UV-VIS spektrofotometru VARIAN Cary-100. Svi spektri su snimani od 200 do 800 nm, u kivetama sa dužinom optičkog puta od 1 cm.

3.12.5. TBA-MDA test lipozomske disperzije

Materijal i pribor: Lipozomi sa inkorporisanim hlorofilom (razlićitih velićina i lipidnog sastava- smeša fosfolipida PL-90, DPPC); Tiobarbiturna kiselina, TBA, $4.2 \times 10^{-2} \text{M}$ rastvoru $5 \times 10^{-2} \text{M}$ NaOH; Butilovani hidroksi toluen, BHT, metanolni rasvor koncentracije $1 \times 10^{-3} \text{M}$; Natrijum-hidroksid, vodeni rastvor koncentracije $5 \times 10^{-3} \text{M}$; Trihlorsirćetna kiselina, TCA, 5.5% vodeni rastvor; Metanol; Epruvete; Kvarcne kivete; Termostatirano vodeno kupatilo sa držaćem za epruvete; Centrifuga; Vorteks; Ultrazvućno vodeno kupatilo.

Sadržaj peroksidacije fosfolipida od kojih su dobijeni SUV lipozomi sa inkorporisanim hlorofilima određuje se TBA-MDA testom. Lipozomi su dobijeni po opisanoj metodi (3.6). Paralelno sa „uzorkom” (lipozoma) uporedo se pripremaju i prazni, „kontrolni” lipozomi po istoj metodi: potrebno je po 15 cm^3 „uzorka” i „kontrola”.

TBA-MDA test se izvodi u ćetiri kivete istovremeno na sledeći naćin: u kivete „uzorak” i „kontrola” stavi se po 0.5 cm^3 lipozoma sa inkorporisanim hlorofilima. U kivetu „blank” stavi se 0.5 cm^3 „praznih” lipozoma. Iniciranje lipidne peroksidacije se vrši izlaganjem oksidacionom stresu: VIS, UV-B zraćenje, Fentonova reakcija i oksidacija termalnim inicijatorom. Kiveta „uzorak”, se izlaže oksidacionom stresu. Nakon toga se u kivete „uzorak”, „blank” i „kontrola” doda po 1 cm^3 vodenog rastvora TCA (5.5%) i po 0.5 cm^3 metanolnog rastvora BHT da bi se prekinula dalja peroksidacija. Zatim se u kivete „uzorak” „blank” i „kontrola” doda po 0.5 cm^3 rastvora TBA ($4.2 \times 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$ rastvor u $5 \times 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$ NaOH). Sve tri kivete se inkubiraju 10 min na 50°C u mraku, a zatim se centrifugiraju 5 min na 13 000 obr/min. Apsorpcioni spektri se snimaju u odnosu na „blank” i prati se porast apsorbancije na 532 nm za „uzorak” i „kontrolu”, što predstavlja apsorpcioni maksimum stvorenog TBA-MDA kompleksa.

3.12.6. Određivanje srednjeg prečnika čestica i indeksa polidisperziteta lipozomske disperzije

Srednji prečnik lipozoma kao i indeks polidisperziteta uzoraka, određivani su metodom dinamičkog rasipanja laserske svetlosti korišćenjem Zetamaster S uređaja (Malvern Instruments, Velika Britanija).

Uzorci su pre merenja razblaživani destilovanom vodom (1:10). Srednji prečnik lipozoma računat je autokorelacijom intenziteta svetlosti reflektovane od čestica, polazeći od toga da su čestice sfernog oblika. Indeks polidisperziteta (PI) predstavlja meru unimodalne distribucije veličine lipozoma i kreće se u opsegu vrednosti od 0 (izrazito homogena disperzija) do 1 (izrazito nehomogena disperzija). Ovi parametri određivani su u slučaju uzoraka inkorporisanog hlorofila u SUV lipozome neposredno nakon pripreme uzorka, kao i nakon 9 meseci čuvanja na temperaturi od $(4\pm 2^\circ\text{C})$, u tamnim bočicama kako bi se izbegao uticaj svetlosti.

Određivanje Zeta potencijala

Oprema: Zetamaster S (Malvern Instruments, Velika Britanija)

Zeta-potencijal (ZP) je od velikog značaja, budući da predstavlja meru Nernstovog potencijala, kao i meru debljine difuzionog sloja, te od njega zavisi fizička stabilnost lipozomskih disperzija (tj. elektrostatička stabilizacija disperzije). Postoji pravilo da fizička stabilnost disperzija raste sa porastom zeta-potencijala (Müller, 1996).

Zeta-potencijal lipozomskih disperzija nakon izrade određen je primenom Zetamaster S uređaja (**SI.26**). Ovaj uređaj na osnovu rasipanja svetlosti meri elektroforetsku pokretljivost naelektrisanih čestica u električnom polju, kao i zeta-potencijal. Kao dodatna metoda karakterizacije primenjena je tehnika statičkog rasipanja svetlosti (Static Light Scattering, SLS), poznata i kao laserska difrakcija (Laser Diffraction, LD). Probe su pre merenja razblaživane destilovanom vodom kako bi se izbegao efekat višestrukog rasipanja svetlosti.

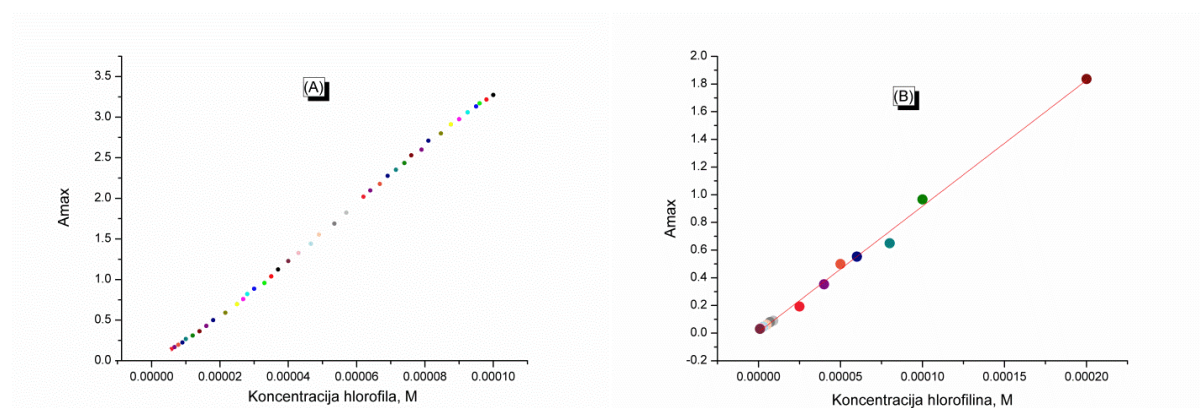


Slika 26: Zetamaster uređaj, (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Velika Britanija).

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Provera agregacije hlorofila pri različitim koncentracijama u vodi

U cilju utvrđivanja oblasti koncentracije hlorofila u vodi pri kojoj dolazi do „asociacije” Chl-molekula (Katz *et al.* 1978; Kano *et al.* 2000) ili hlorofilina u agregate, predstavljeni su Beer-ovi dijagrami, A_{\max} u funkciji koncentracije hlorofila (SI.27-A), odnosno hlorofilina (SI.27-B). Beer-ov zakon je osnov kvantitativne analize, jer se merenjem apsorpcije na datoj talasnoj dužini može odrediti koncentracija apsorbujuće vrste. Pri tome, odnos intenziteta svetlosti koju je rastvor propustio (I) i intenziteta upadne svetlosti (I_0), zavisi od prirode rastvorene supstance – apsorbujuće vrste (a), njene koncentracije (c) i debljine sloja kroz koji svetlost prolazi (b) ($\log(I_0/I)=A=abc$). Lambert-Beer-ov (LB) zakon pre svega važi za jako razblažene rastvore zbog odsustva jakih međumolekularnih interakcija koje sprečava promenu homogenosti medijuma (Baldini & Giannetti, 2005). Pri visokim koncentracijama može doći do promena apsorpcionih svojstava medijuma zbog formiranja agregata čije su osobine i ponašanje bitno drugačiji u odnosu na individualne molekule u razblaženim rastvorima, pa i kad je u pitanju njihovo optičko ponašanje (Baldini & Giannetti, 2005). U onim oblastima koncentracije u kojima se uočava odsustvo linearnosti na LB-dijagramima, može se zaključiti da je došlo do formiranja agregata (Baldini & Giannetti, 2005; Kano *et al.* 2000).



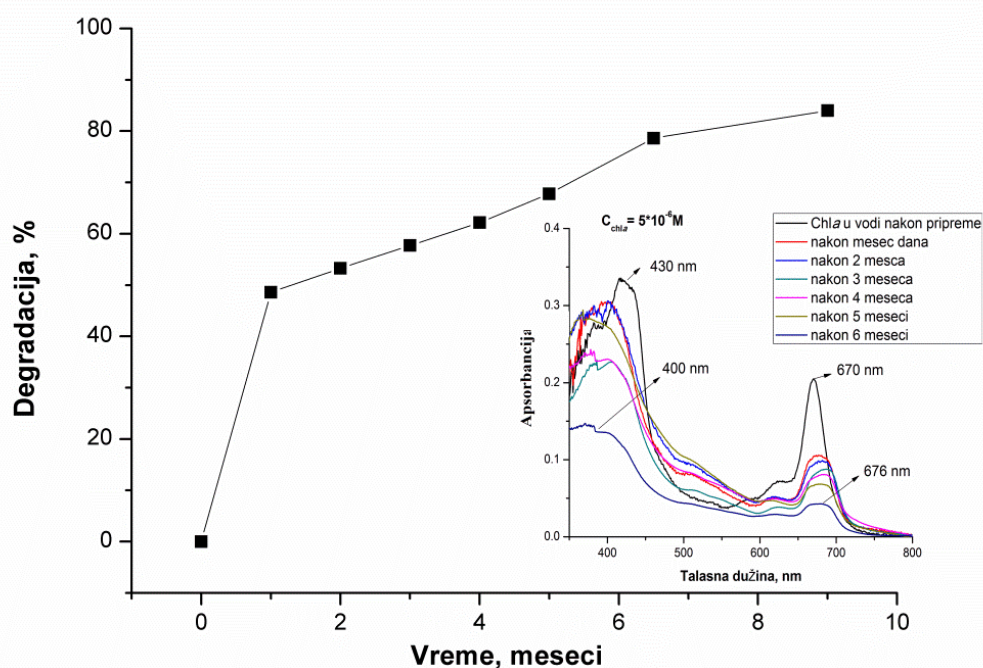
Slika 27. Provera Lambert–Beer-ovog zakona za vodene rastvore ispitivanih pigmenta pri različitim koncentracijama, hlorofila (A), hlorofilina (B). Opseg koncentracije hlorofila u vodi kretao se od 1×10^{-7} do 1×10^{-4} M, a hlorofilina od 9×10^{-7} do 3×10^{-4} M.

Sa **Slike 27-A**, može se uočiti da do mogućeg formiranja Chl-agregata (tj. nekog vida asocijata) dolazi pri koncentracijama većim od 6×10^{-5} M. Inače, formiranje agregata hlorofila pri koncentracijama većim od 10^{-5} M dokazano je ranijim istraživanjima (Kano *et al.* 2000; Katz *et al.* 1978). Sa druge strane, sa porastom koncentracije, apsorbanacija vodenog rastvora hlorofilina linearno raste, što bi značilo da ne dolazi do promena u homogenosti ispitivanog vodenog rastvora pigmenta, pri datim koncentracijama (**Sl.27-B**). Ovo se može objasniti i hemijskom prirodom hlorofilina: s obzirom na to da je hlorofilin natrijumova so (**Sl.3**), njegova rastvorljivost u vodi u poređenju sa hlorofilom je znatno bolja. Mogućnost građenja agregata hlorofilina u vodenom medijumu nije bila predmet ranijih istraživanja, što ne isključuje mogućnost postojanja agregata hlorofilina pri koncentracijama većim od ispitivanih ($>10^{-4}$ M).

4.2. Ispitivanje vremenske stabilnosti hlorofila u vodenom medijumu apsorpcionom spektroskopijom

Na **Slici 28** prikazan je procenat degradacije hlorofila u toku 9 meseci od momenta pripreme uzoraka što reflektuje njihovu vremensku (ne)stabilnost pre primene konkretnih *in vitro* oksidacionih stresova. U inkrementu slike su prikazane promene apsorpcionih spektara Chl-a snimanih u VIS oblasti, u zadatim vremenskim intervalima. Vodeni rastvor Chl-a je čuvan u frižideru na temperaturi od 4°C, zaštićen od uticaja svetlosti. Kao što se može videti sa **Slike 28** u toku vremenskog perioda od 9 meseci, Chl-a je pokazao visok stepen degradacije (~80%).

Snimljeni VIS spektri pokazuju razliku u organizaciji molekula Chl-a u vodi nakon pripreme i tokom čuvanja. Inače, pozicija „crvene” (Q_y) i „plave” (Soret) trake spektra Chl-a u vodi je na 670 i 436 nm, respektivno (Vladkova, 2000). Već nakon mesec dana Chl je u vodenom rastvoru pokazao batohromno pomeranje „crvenog” apsorpcionog maksimuma (A_{max} – inkrement **Sl.28**) što može ukazivati na agregaciju Chl molekula (pomeranje Q_y maksimuma - 6 nm u slučaju Chl-a) (Katz *et al.* 1978; Ballschmiter & Katz, 1969).



Slika 28. Degradacija hlorofila u vodenom medijumu tokom 9 meseci stajanja sa odgovarajućim apsorpcionim spektrima datim u inkrementu slike. Koncentracija hlorofila je podešena na $5 \times 10^{-6} M$, pri kojoj su Chl-molekuli prisutni u vidu „monomera”.

S obzirom na to da sama voda reaguje kao nukleofil vrlo je verovatno da hlorofilu vodenoj sredini grade adukte koloidnih dimenzija (Ballschmiter & Katz, 1969). Bezobzira na to što su eksperimenti rađeni u oblasti koncentracijau kojima agregacija nije detektovana, što ranija istraživanja potvrđuju (konc. ispod $10^{-5} M$ Katz *et al.* 1978), već nakon mesec dana stajanja primećeno je pomeranje apsorpcionog maksimuma Q_y trake na vrednosti talasnih dužina od 676 nm (inkrement **Sl.28**), koje mogu biti karakteristika nekog vida agregacionih formi (Agostiano *et al.* 2002). Međutim, agregati Chl-a koji nastaju stvaranjem veza između magnezijuma (verovatno jednog „monomera”) i C=O grupe (verovatno drugog „monomera”), imaju A_{max} vrednostina 713 nm i 745 nm (Agostiano *et al.* 1996; 2002), što u slučaju ovog eksperimenta nije zapaženo.

Stajanjem Chl-frakcije došlo je do promene u spektrima (**Sl.28** - inkrement) i to: hipohromno uz batohromno pomeranje položaja „crvene” trake („crveno” pomeranje od 670 nm na 676 nm), ali takođe i hipsokromno pomeranje „plave” trake spektra („plavo”pomeranje od 436 nm na 419 nm), što može biti posledica feofitinizacije. Odnos između apsorbcija traka na 436 i 419 nm ujedno može pokazati stepen degradacije uzorka

– što je odnos između datih spektralnih traka manji to je degradacija hlorofila veća (Barbinta-Patrascu *et al.* 2009). Degradacija hlorofila u vodenom medijumu je zapažena i tokom ranijih istraživanja, pri čemu je nakon stajanja Chla u frižideru (24 dana na temperaturi od 4°C), detektovan feofitin kao glavni produkt degradacije (Lopez-Ayerra *et al.* 1998). Sa druge strane, gubitak magnezijuma iz Chl-molekula smanjuje mogućnost njihovog međusobnog vezivanja (Chl-Chl) iz vodene sredine. Vezivanje koje je tada moguće između samih Chl-molekula može se smatrati agregacijom koja potiče od grupisanja preko fitilnih lanaca na bazi hidrofobnog efekta (Agostiano *et al.* 2002).

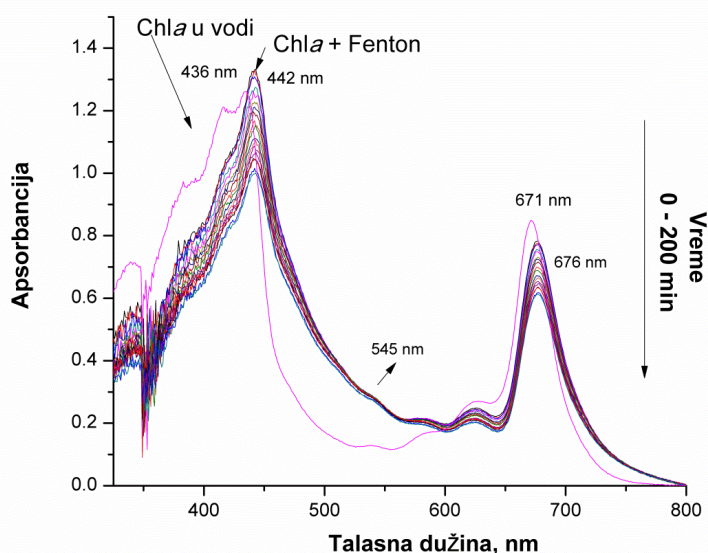
Na osnovu izgleda spektara snimanih nakon pripreme i nakon vremenskog perioda od 9 meseci, može se zaključiti da Chl-frakcija stajanjem trpi promene koje rezultiraju značajnim nepovratnim promenama što potvrđuje veliku nestabilnost hlorofila u vodenom medijumu.

4.3. ANALIZA DEJSTAVA OKSIDACIONIH STRESOVA NA HLOROFIL U VODENOM MEDIJUMU

Stabilnost Chla tj. tačnije, Chl-frakcije rastvorene u vodi, prema dejstvu oksidacionih stresova, ispitivana je primenom apsorpcione spektroskopije. U cilju poređenja uticaja hemijske strukture hlorofila, a pre svega Chla na njegovu stabilnost prema *in vitro* oksidacionim stresovima, ispitana je i stabilnost hlorofilina kao derivata hlorofila, pri istim uslovima izlaganja stresu kao u slučaju Chl-frakcije. Odgovarajuće promene u strukturi Chl-molekula nakon oksidacionih stresova su dalje praćene elektro-sprej masenom spektrometrijom kombinovanom sa UHPLC hromatografijom (ESI-MS – UHPLC) sa ciljem dobijanja boljeg uvida u mehanizme tih promena. Oksidacioni stresovi primenjeni na Chl-frakciju i hlorofilin su: hemijska oksidacija Fentonovim reagensom i termalnim inicijatorom (AAPH), enzimska oksidacija i fotooksidacija vidljivom svetlošću i UV-B zračenjem.

4.3.1. Promene hlorofila u vodi nakon dejstva Fentonovog reagensa. Analiza apsorpcionih spektara. UHPLC/MS analiza

Promene u apsorpcionim spektrima hlorofila (sa dominacijom Chl*a*) nakon dejstva Fentonovog reagensa prikazane su na **Slici 29**. Odgovor hlorofila i hlorofilina na primenjeni oksidacioni stres (degradacija u funkciji vremena reakcije) za više različitih koncentracija pigmentata prikazan je na **Slici 30**, pri čemu je na **Slici 30-A** prikazan procenat degradacije hlorofila, a na **Slici 30-B** procenat degradacije hlorofilina. Koncentracije hlorofila u vodi su u opsegu od 3×10^{-6} do 5×10^{-5} M, kako bi se ispitaio eventualni uticaj koncentracije pigmenta na dejstvo oksidacionog stresa.



Slika 29. Apsorpcioni VIS spektri hlorofila i dejstvo Fentonovog reagensa. Koncentracija hlorofila u vodi iznosila je 2.5×10^{-5} M, dok je reakcija praćena u periodu od 0 do 200 min.

Nakon dejstva Fentonovog reagensa primećene su promene u intenzitetu i položaju Q_y -trake (**Sl.29**). Dejstvo Fentonovog reagensa kao oksidacioni stres utiče na opadanje intenziteta Q_y -trake sa vremenom (0-200 min), tj. hipohromnog efekta; dodatak Fentonovog reagensa dovodi i do batohromnog pomeranja (reda veličine 5 nm), što je verovatno posledica ne samo degradacije hlorofila pod dejstvom stresa već i promene mikrokruženja pigmenta dodatkom sistema Fe^{2+} i H_2O_2 . Takođe se mogu uočiti dve prevojne tačke u oblasti između 530 i 550 nm –**Slika 29**. Porast apsorbcije u ovoj oblasti (530-550 nm), implicira moguće postojanje nekih degradacionih produkata. Eventualno prisustvo degradacionih produkata hlorofila koji apsorbuju u ovoj oblasti moglo bi se objasniti samo kao posledica prekida

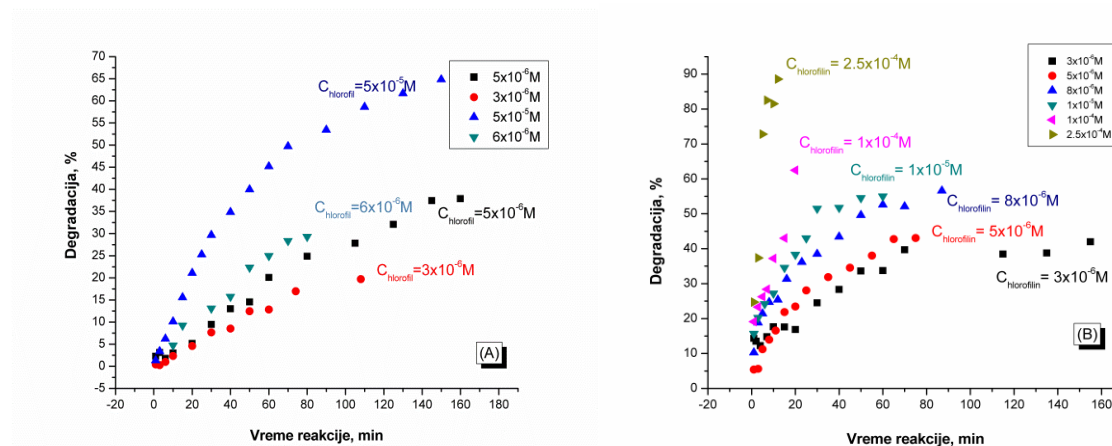
konjugovanog sistema dvostrukih veza, što može uključiti destrukciju porfirinskog „jezgra” (Hendry *et al.* 1987). Ali, u ovom radu, ovi indicirani produkti nisu dokazani drugim metodama.

Fentonova reakcija smatra se jako destruktivnom zbog velike koncentracije formiranih ROS vrsta, koje u kratkom vremenskom periodu mogu delovati tj. oksidovati datu supstancu, što opravdava upotrebu ove reakcije u procesima prečišćavanja otpadnih voda, tretmana pesticida i sl. U Fentonovoj reakciji proizvodnja OH[•] radikala (jednog od najreaktivnijih kiseoničnih radikala i ROS vrsta uopšte) zavisi od nekoliko faktora, kao što su vrednost pH, koncentracija H₂O₂ i Fe²⁺ jona, temperature i vremena trajanja reakcije (Winterbourn, 1995). Na primer, povećanje koncentracije Fe²⁺ jona u listovima biljaka dovodi do linearnog povećanja degradacije hlorofila (Guang *et al.* 2009; Bode *et al.* 1995), pri čemu sam Fe²⁺ jon deluje kao katalitički agens razlaganja H₂O₂ (Homem *et al.* 2010). Sa druge strane, povećanje koncentracije H₂O₂ može promovisati inhibitorni efekat hidroksilnih radikala (2.7.4.1, j-na.(2)), kao i formiranje drugog radikala (HO₂[•]), koji ima znatno manji oksidacioni efekat u poređenju sa OH[•] (Homem *et al.* 2010). Dejstvo Fentonovog reagensa zavisi i od medijuma u kome se reakcija odvija, tako je u acetonu reakcija degradacije pigmentata intenzivnija u odnosu na istu u etanolu ili metanolu (Comfort *et al.* 2011).

Generalno, Fe²⁺ jon učestvuje u reakcijama prenosa elektrona koje generišu slobodne radikale. Jednoelektronski transfer dalje vodi do oksidacije sa H₂O₂ u prisustvu O₂ pri čemu se generišu OH[•] radikali (Michalak, 2006). Oni dalje mogu delovati na molekule tipa hlorofila ili hlorofilina, razarajući pigmente i stvarajući pritom degradacione intermedijere i finalne produkte. Na osnovu dosadašnjih ispitivanja smatra se da mehanizmi odvijanja Fentonove reakcije zavise od reakcionih uslova (Barbusiński, 2009). Odabrane koncentracije u toku ovog eksperimentalnog istraživanja, kako Fe²⁺ jona tako i H₂O₂, manjih su vrednosti, kako bi formirane ROS vrste bile manje koncentracije, što bi pomoglo boljem praćenju dinamike promena – degradacije hlorofila tokom vremena od nekoliko sati (200 min).

Sa **Slike 30** se može uočiti da je degradacija hlorofila u poređenju sa degradacijom hlorofilina manja, za isto vreme trajanja reakcije i za sve ispitivane vrednosti koncentracija pigmentata. Degradacija pigmentata je intenzivnija u toku prvih 80 min izvođenja reakcije (za hlorofil – A), odnosno nakon prvih 40 min (za hlorofilin – B), nakon čega se usporava i konačno dostiže konstantne vrednosti nakon otprilike 200 min, što je u saglasnosti sa citiranim podacima (Allan & Fluhr, 1997). Nakon 200 min reakcija je praktično završena, što

se primećuje formiranjem platoa na graficima (SI.30-A-B), kada dalje povećanje vremena inkubacije pigmentata stvorenim ROS-vrstama ne povećava procenat degradacije. Najveći stepen degradacije hlorofila uočen je pri najvećoj Chl-koncentraciji što je zapaženo i kod hlorofilina pri istim uslovima odvijanja Fentonove reakcije (SI.30).



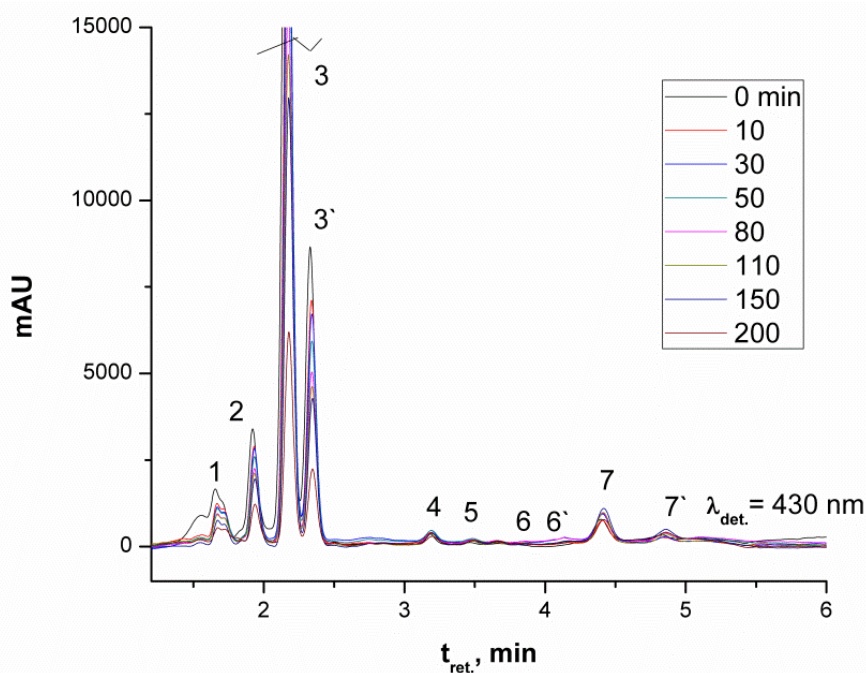
Slika 30. Degradacija hlorofila (A) i hlorofilina (B) u vodenom medijumu dejstvom Fentonovog reagensa, pri različitim koncentracijama pigmentata.

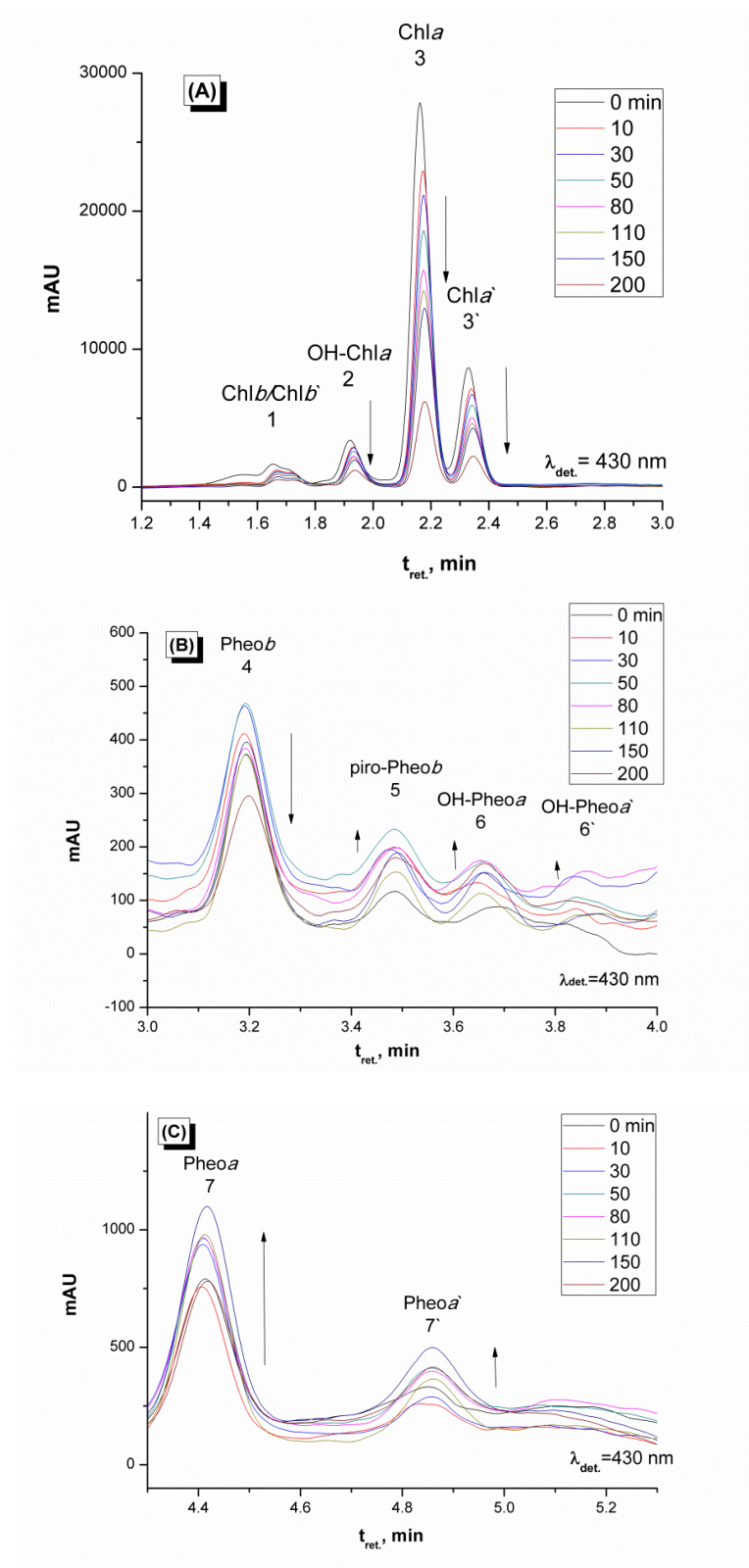
U ranijim istraživanjima je nađeno da količina generisanih ROS vrsta, prevashodno OH[•] radikala, raste sa porastom koncentracije, kako Chla tako i hlorofilina (Wang *et al.* 2011). U prezentovanim eksperimentima je pri koncentracijama hlorofila većim od $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ i istim uslovima izvođenja Fentonove reakcije dolazilo do potpune destrukcije pigmentata u prvih 5 minuta reakcije, formiranja nehomogenog sistema uz izdvajanje taloga crvene boje i oslobađanja gasova. S obzirom na to da citirane vrednosti koncentracije hlorofila pripadaju „agregacionoj” oblasti (Katz *et al.* 1978), a da sa povećanjem koncentracije i u „monomernoj” oblasti njegova degradacija raste (SI.30-A), izgleda da formiranje agregata tj. formi asocijata hlorofila ne inhibira njegovu degradaciju.

Hromatografskom UHPLC/DAD/MS analizom je ispitivan sadržaj reakcione smeše u vodenom medijumu (pigmenti + Fentonov sistem) pre i nakon dejstva Fentonovog reagensa. Hromatogrami su snimani na talasnoj dužini detekcije od $\lambda_{\text{det.}}=430 \text{ nm}$, pre i za vreme trajanja Fentonove reakcije ($t_{\text{reak.}}=0-200 \text{ min}$), i prikazani su na Slici 31. Promene na hromatogramima pri retencionim vremenima analize do 3.0 min, od 3.0-4.3 min, i od 4.3-5.3 min, prikazane su na Slici 31-A,B i C, respektivno. Detektovani pikovi numerisani su brojevima od 1 do 7. Prva četiri pika označena brojevima 1, 2, 3 i 3', na $t_{\text{ret.}}=1.66, 1.93, 2.16$ i 2.33 min , potiču od jedinjenja koja su u Chl-frakciji egzistirala i pre oksidacionog stresa. Komponente na 1.66 min (dva nerazdvojena pika) su identifikovane kao hlorofil *b* i njegov

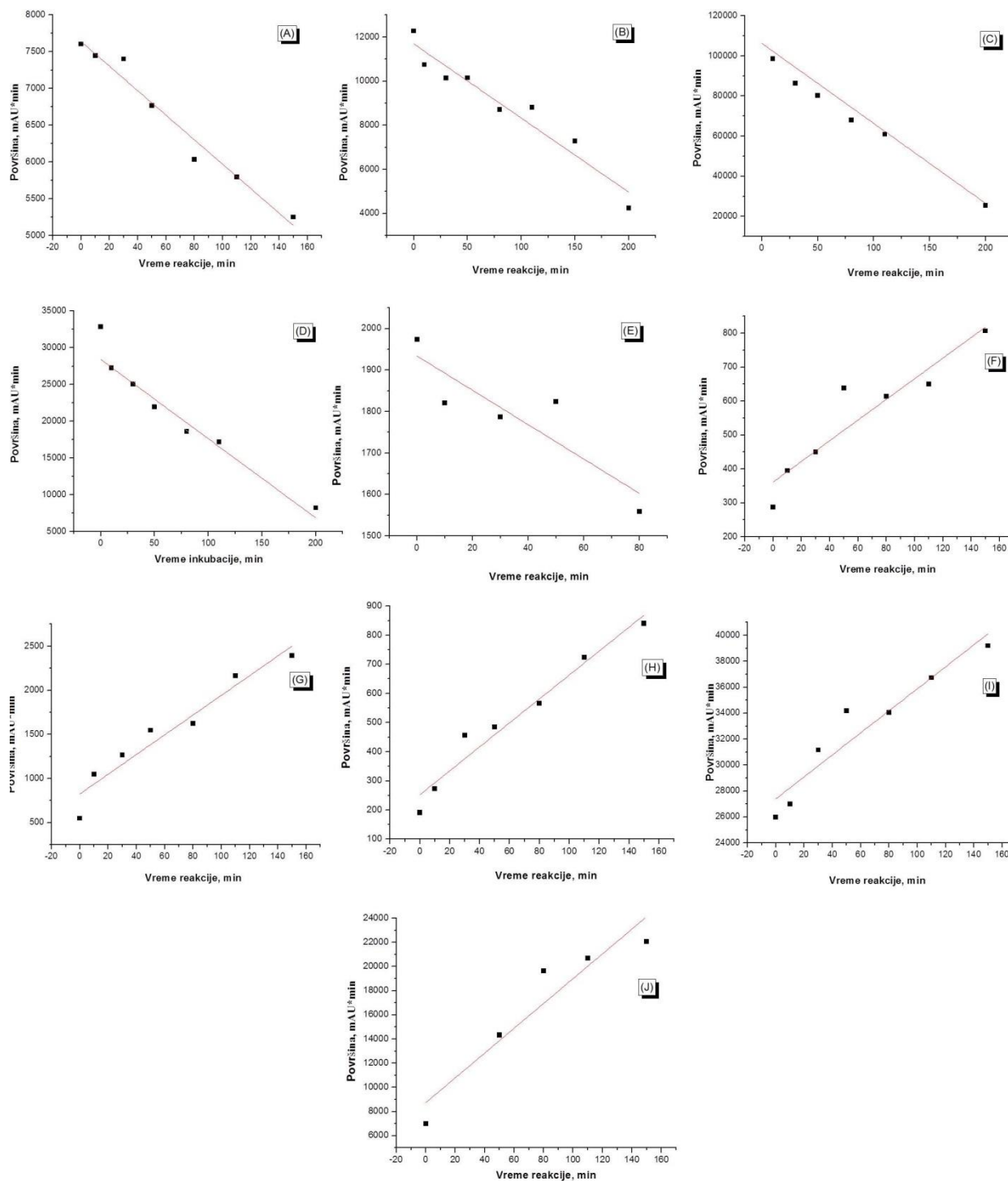
epimer (Chlb i Chlb'), dok su tri preostale komponente identifikovane kao OH-Chla, Chla & Chla', respektivno (SI.31). Dva pika označena brojevima 7 & 7' ($t_{ret.} = 4.4$ & 4.84 min), takođe su prisutna u Chl-frakciji koja nije izlagana oksidacionom stresu. Date komponente pripadaju derivatima Chla koji u svojoj strukturi nemaju magnezijum u centralnoj poziciji molekula (SI.1), poznatijim kao feofitin *a* (Pheoa) & feofitin *a'* (Pheoa'), respektivno. Na retencionom vremenu 3.18 min, detektovan je feofitin*b* (Pheob), koji je takođe prisutan u hlorofilnoj frakciji pre primene oksidacionog stresa, daleko manje u poređenju sa Chla. Na retencionoj skali od 3.0 do 4.0 min, identifikovano je nekoliko produkata oksidacije dejstvom Fentonovog reagensa ($t_{ret.} = 3.47, 3.66$ & 3.86 min), pikovi pod rednim brojem 5, 6 & 6', respektivno. Date komponente su na osnovu karakteristika svojih VIS spektara i načina fragmentisanja identifikovane kao piro-Pheob, OH-Pheoa i OH-Pheoa' (šematske reakcije formiranja pomenutih degradacionih produkata date su u ANEX-u).

Prikaz dinamike degradacije hlorofila dejstvom Fentonovog reagensa dobijen je kao zavisnost integrisane površine pika date identifikovane komponente u funkciji vremena inkubacije Fentonovim reagensom ($t_{reak.}$), (SI.32-A-J), korišćenjem podataka sa odgovarajućih UHPLC/DAD-hromatograma. Grafici Chla i Chla' degradacije dobijeni su za retenciona vremena $t_{ret.} = 2.16$ min (Chla), i $t_{ret.} = 2.33$ min (Chla') (SI.32-C-D, respektivno).





Slika 31. UHPLC/DAD-hromatogrami Chl-frakcije pre i nakon dejstva Fentonovog reagensa; talasna dužina detekcije je $\lambda_{det}=430$ nm (A_{max} Soret-ove trake). Prikaz potpunog hromatograma (na vrhu), saporcijalnim i uvećanim prikazom, do 3.0 min analize (A), od 3.0 do 4.3 min analize (B) i od 4.3 do 5.3 min analize (C).



Slika 32. Dinamika promene površine pikova sa hromatograma prikazanog na Sl.31 (A): $t_{ret.}=1.66$ min, Chlb+Chlb', (B) $t_{ret.}=1.93$ min, OH-Chla, (C) $t_{ret.}=2.16$ min, Chla, (D) $t_{ret.}=2.33$ min, Chla', (E) $t_{ret.}=3.18$ min, Pheob, (F) $t_{ret.}=3.47$ min, piro-Pheob, (G) $t_{ret.}=3.66$ min, OH-Pheoa, (H) $t_{ret.}=3.86$ min, OH-Pheoa', (I) $t_{ret.}=4.40$ min, Pheoa, (J) $t_{ret.}=4.84$ min, Pheoa'.

Trend rasta pod dejstvom Fentonovog reagensa primećen je kod Chl-derivata: OH-Pheoa, Pheoa i piro-Pheob (korišćenjem integrisanih površina odgovarajućih pikova na hromatogramima dobijenim za sledeće apsorpcione maksimume Soret-ove trake koršćene za detekciju, $\lambda_{\text{det.}}=407, 409$ i 434 nm) (**Sl.32-G, I, F**), respektivno; time su ovi derivati istovremeno detektovani i potvrđeni kao degradacioni produkti. Grafici odgovarajućih Chl-epimera (OH-Pheoa' i Pheoa' na $t_{\text{ret.}}=3.86$ i 4.84 min, respektivno), pokazuju slično ponašanje, tj. takođe trend rasta (**Sl.32– J, H**).

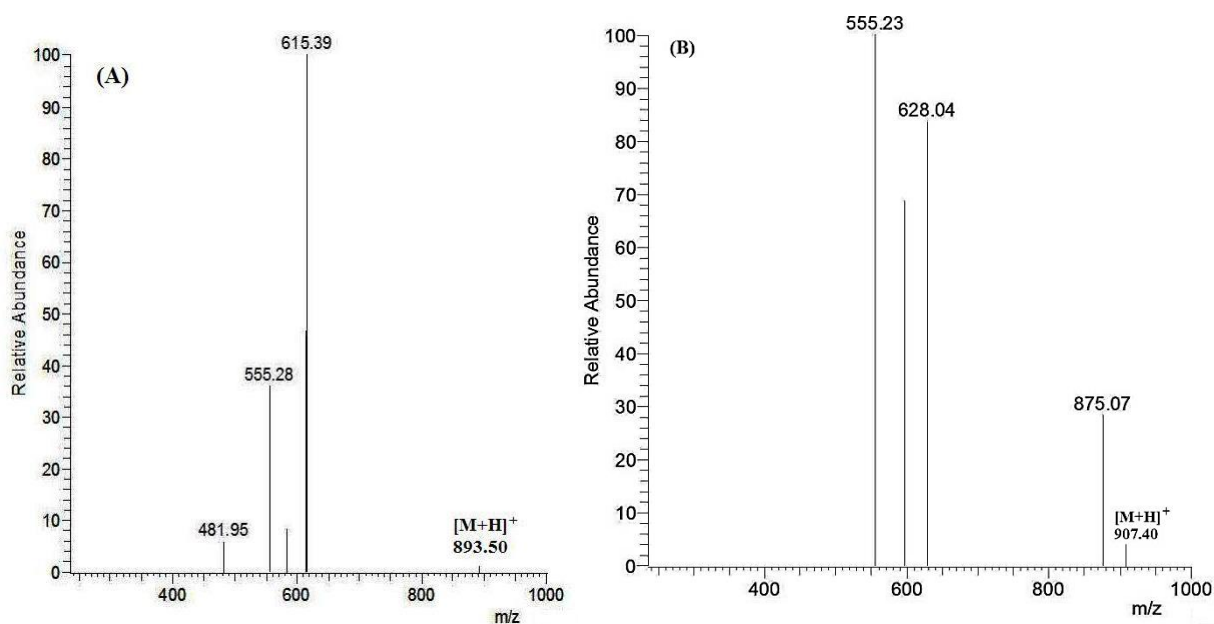
Još jedan od derivata hlorofila koji je prisutan u Chl-frakciji i pre primene stresa, a koji se smatra produktom alomerizacije (Pennington *et al.* 1963), je OH-Chla. Za ovaj derivat je primećen trend opadanja (**Sl.32-B**) sličan slučaju Chla i Chla' (**Sl.32-C, D**). Za sve detektovane derivate hlorofila može se reći da njihove koncentracije linearno opadaju ili rastu sa vremenom dejstva Fentonovog sistema.

Identifikacija hlorofila i njegovih derivata razdvojenih na hromatogramu (**Sl.31**) izvršena je na osnovu dobijenih VIS, MS i MS/MS spektara. Fragmentacioni pikovi hlorofila dobijeni u pozitivnom MS/MS modu najčešće nastaju kao posledica fragmentacije protonovanog molekula ($[M+H]^+$) u pozicijama C-17 i C-13 (**Sl.1**). Sa C-17 pozicije moguće je gubitak fitilnog lanca u vidu fitadiena ($C_{20}H_{38}$) ili gubitak cele $C_{20}H_{39}CO_2CH_3$ grupe, koji se javljaju u većini snimljenih MS/MS-spektara, a koji odgovaraju vrednostima m/z $[MH-C_{20}H_{38}]^+ = [MH-278]^+$ i $[MH-C_{20}H_{39}CO_2CH_3]^+ = [MH-338]^+$, respektivno. Za C-13 poziciju je takođe karakterističan gubitak CH_3OH (u položaju C-13³) ili, gubitak estarske grupe ($COOCH_3$ u C-13² položaju, **Sl.1**) – m/z vrednosti $[MH-CH_3OH]^+ = [MH-32]^+$ i $[MH-COOCH_3]^+ = [MH-59]^+$, respektivno (**Tabela 5**).

U masenom spektru hlorofilne frakcije (nije prikazano), pik na m/z 893.50 predstavlja molekularni pik Chla, $[M+H]^+$, koji je ujedno i najintenzivniji. Dejstvo oksidacionog stresa menja izgled MS-spektra pri čemu se intenzitet molekulskog pika Chla proporcionalno smanjuje na račun povećanja intenziteta pikova derivata Chla, produkata dejstva oksidacionog stresa, Fentonovog reagensa – Pheoa, OH-Pheoa, piro-Pheob.

Fragmentacijom pika m/z 893.50 dobijen je MS/MS spektar sa dva najintenzivnija pika na m/z 555.28 i 615.39 (**Sl.33-A**). Pik na m/z 555.28 odgovara fragmentaciji Chla u položaju C-17 (**Sl.1**) i predstavlja gubitak $CH_3COOC_{20}H_{39}$ ($[MH-338]^+$).

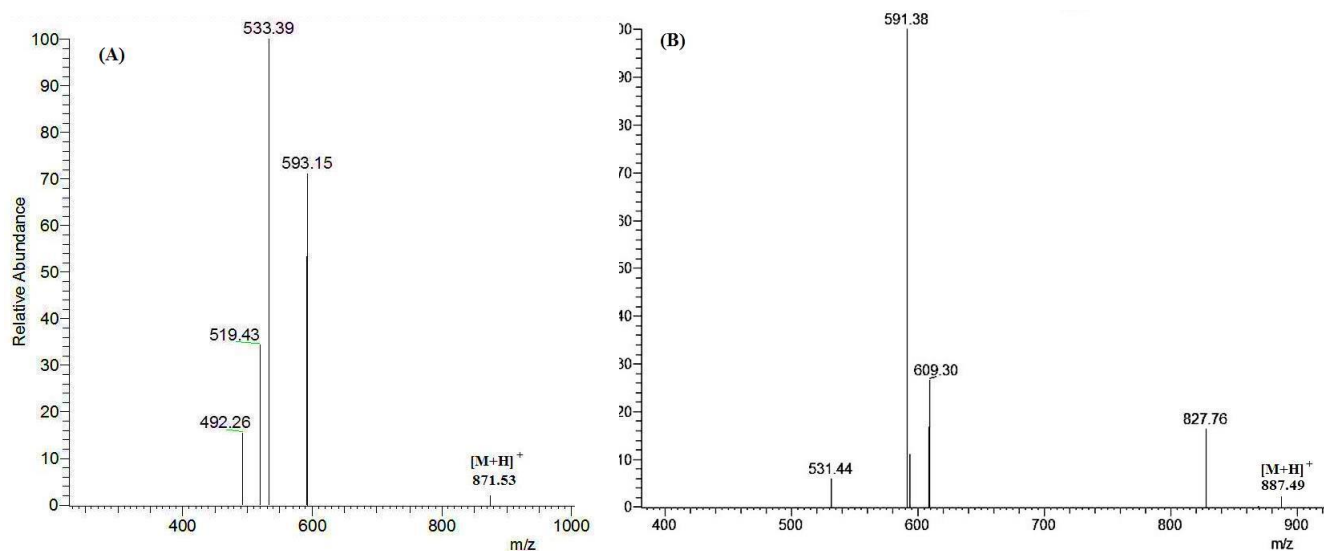
Drugi, izraženiji fragmentacioni pik odgovara m/z 615.39, što je posledica gubitka $C_{20}H_{38}$ $[MH-278]^+$.



Slika 33. ESI-MS/MS spektar Chla (A) i Chlb (B), u pozitivnom jonizacionom modu.

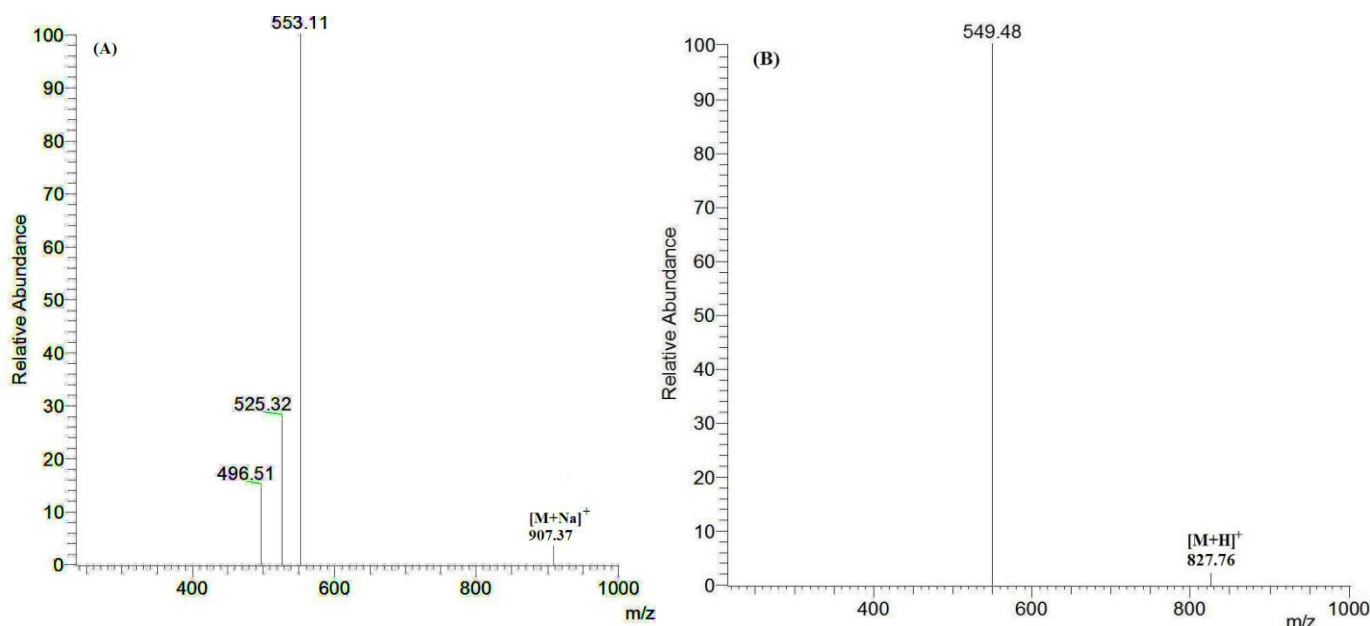
Derivat Chla koji se smatra produktom alomerizacije, OH-Chla, sa molekulskim jonom na m/z 909.31 ($[M+H]^+$), daljom fragmentacijom daje pikove na m/z 891 $[MH-18]^+$ i 613 $[MH-296]^+$ (bez prikaza), a koji su rezultat uklanjanja hidroksilne grupe iz položaja C-13² i H-atoma, $[MH-H_2O]^+$ i fitilnog lanca iz položaja C-17³ u vidu $C_{20}H_{39}OH$, $[MH-C_{20}H_{39}OH]^+$. Kompletno uklanjanje magnezijuma iz strukture Chla rezultira formiranjem feofitina *a*, Pheoa, što je u MS-spektu potvrđeno pojavom molekulskog pika, m/z 871.53 ($[M+H]^+$). Cepanje molekulskog pika 871.53 dalo je dva najintenzivnija fragmentaciona pika na m/z 533.39 (što odgovara $[MH-CH_3COOC_{20}H_{39}]^+ = [MH-338]^+$) i 593.15 $[MH-C_{20}H_{38}]^+ = [MH-278]^+$ -**SI.34-A**). Strukture predloženih fragmenata su literaturno potvrđene (Woolley *et al.* 1998, Lim, 2009). Dejstvom oksidacionog stresa pored Pheoa dolazi do formiranja OH-Pheoa sa pratećim epimerom. Molekulski pik OH-Pheoa u MS spektru na m/z 887.49 $[M+H]^+$, cepanjem formira nekoliko fragmenata u MS/MS spektru i to: 827.76 $[MH-60]^+$, 609.30 $[MH-278]^+$ i 591.38 $[MH-296]^+$ koji odgovaraju $[MH-CO_2CH_3-H]^+$, $[MH-C_{20}H_{38}]^+$ i $[MH-C_{20}H_{39}OH]^+$, respektivno (**SI.34-B**).

Feofitin *b* se nalazi u Chl-frakciji i pre dejsva oksidacionog stresa. Registrovani jon na m/z 907.37 je katjonizovani molekulski jon sa Na^+ -jonom, $[M+Na]^+$. Njegovom fragmentacijom dobija se MS/MS spektar (**SI.35-A**), sa najintenzivnijim fragmentacionim jonom na vrednosti m/z 553.11, što može odgovarati jonu $[M-C_{20}H_{39}CO_2CH_3-CH_3-H+Na]^+$.



Slika 34. ESI-MS/MS spektar Pheoa (A) i OH-Pheoa (B), u pozitivnom jonizacionom modu.

Jedan od produkata koji nije registrovan u hlorofilnoj frakciji pre dejstva oksidacionog stresa je piro-Pheob, sa molekulskim pikom m/z 827.76[M+H]⁺. Njegovom fragmentacijom dolazi do formiranja fragmenta m/z 549.48 [MH-278]⁺ što predstavlja gubitak fitilnog lanca, [MH-C₂₀H₃₈]⁺, (SI.35-B).



Slika 35. ESI-MS/MS spektar Pheob(A) i piro-Pheob(B), u pozitivnom jonizacionom modu.

Rezultati dobijeni UHPLC-hromatografskom analizom nakon dejstva Fentonovog reagensa, kao i podaci masene detekcije komponenti u uzorcima, zajedno sa karakterističnim fragmentacionim pikovima prikazani su u **Tabeli 5**, dok su reakcione šeme nastanka nekih od derivata, prikazane u ANEX-u.

Tabela 5. Rezultati hromatografske analize (DAD- u VIS oblasti i MS-detekcijom) ispitivanih uzoraka (“čiste” Chl-frakcije u vodi i Chl-frakcije u vodenom rastvoru sa Fentonovim reagensom) kao i analize glavnih fragmentacionih jona u MS/MS spektrima.

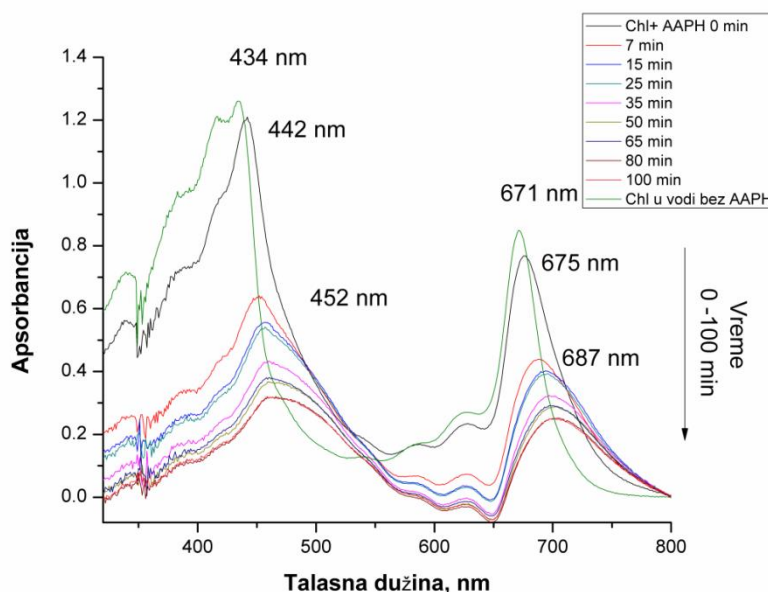
Komponenta	$t_{ret.}$ min	Apsorpcioni maksimumi u mobilnoj fazi/nm			Glavni fragmentacioni joni u MS/MS spektru			
		Soret	Q_y	$[M+H]^+$	$[M+H]^+$	m/z	^a Predložene strukture fragmentacionih jona	
				m/z	m/z			
				izračunato				
1 Chlb+Chlb'	1.66	466	651	907.40	907.52	875 [MH-32] ⁺	[MH-CH ₃ OH] ⁺	
						628 [MH-279] ⁺	[MH-C ₂₀ H ₃₈] ⁺	
						597 [MH-310] ⁺	[MH-C ₂₀ H ₃₈ -CH ₃ OH] ⁺	
						555 [MH-352] ⁺ (100%)	[MH-C ₂₀ H ₃₈ -CH ₃ CH ₂ COOH] ⁺	
2 OH-hlorofil a	1.92	430	665	909.31	909.53	891 [MH-18] ⁺	[MH-H ₂ O] ⁺	
						613 [MH-296] ⁺ (100%)	[MH-C ₂₀ H ₃₉ OH] ⁺	
3 Hlorofil a	2.16	411	431	665	893.50	893.54	615 [MH-278] ⁺ (100%)	[MH-C ₂₀ H ₃₈] ⁺
3' Hlorofil a'	2.33							
						555 [MH-338] ⁺	[MH-C ₂₀ H ₃₉ CO ₂ CH ₃] ⁺	
4 Feofitinb	3.18	435	654	907.37	907.52	553		
				[M+Na] ⁺	[M+Na] ⁺	[M-354+Na] ⁺ (100%)	[M-C ₂₀ H ₃₉ CO ₂ CH ₃ -CH ₃ -H+Na] ⁺	
5 Piro-Pheob	3.47	434	655	827.76	827.55	549 [MH-278] ⁺ (100%)	[MH-C ₂₀ H ₃₈] ⁺	
6 OH-Feofitin a	3.66	407	666	887.49	887.53	827 [MH-60] ⁺	[MH-CO ₂ CH ₃ -H] ⁺	
6' OH-Feofitin a'	3.86					609 [MH-278] ⁺	[MH-C ₂₀ H ₃₈] ⁺	
						591 [MH-296] ⁺ (100%)	[MH-C ₂₀ H ₃₉ O] ⁺	
7 Feofitin a	4.40	408	666	871.53	871.57	839 [MH-32] ⁺	[MH-CH ₃ OH] ⁺	
7' Feofitin a'	4.84					811 [MH-60] ⁺	[MH-CO ₂ CH ₃ -H] ⁺	
						593 [MH-278] ⁺	[MH-C ₂₀ H ₃₈] ⁺	
						533 [MH-338] ⁺ (100%)	[MH-C ₂₀ H ₃₉ CO ₂ CH ₃] ⁺	
						460 [MH-411] ⁺	[MH-C ₂₀ H ₃₉ CO ₂ CH ₂ CH ₂ -CO-HOCH ₃] ⁺	

a – Strukture predloženih fragmenata su literaturno podržane referencama Woolley *et al.* 1998, Lim, 2009; Hendry *et al.* 1987; Walker & Keely, 2004; Walker *et al.* 2002; Yoshitaka & Tamiaki, 2012.

Nakon izlaganja Chl-frakcije dejstvu Fentonovog reagensa može se reći da dolazi do degradacije hlorofila Tipa I („Opšti deo, str.15”), uz formiranje degradacionih produkata, piro-feofitina, hidroksi-feofitina i feofitina, zajedno sa epimernim formama istih. Hidroksilni (OH[•]) radikali koji se generišu tokom vremena, pre svega napadaju Chl u poziciji C-13, E-prstena (Sl.1), stvarajući gore pomenute derivate.

4.3.2. Promene hlorofila u vodi nakon dejstva termalnog inicijatora. Analiza apsorpcionih spektara. UHPLC/MS analiza

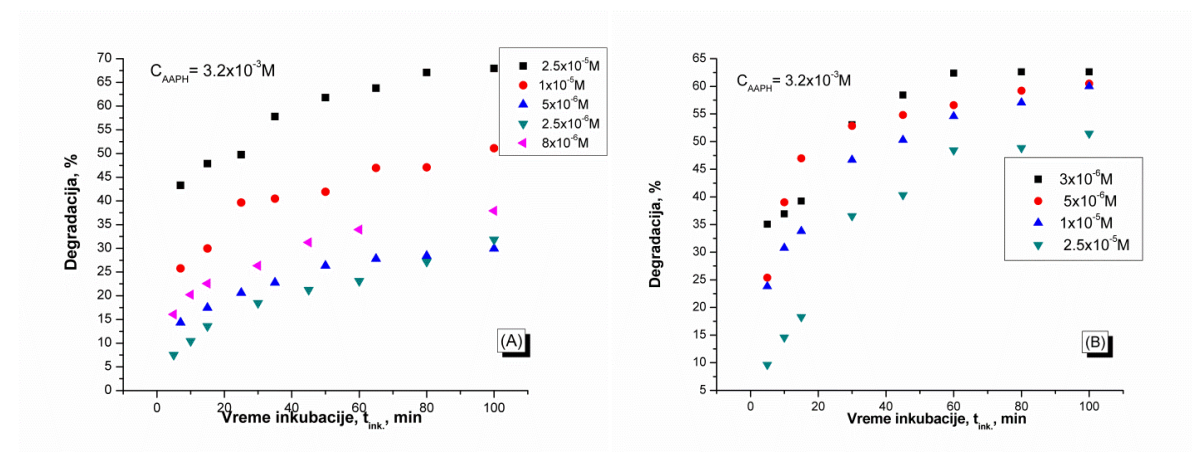
Promene u apsorpcionim spektrima Chl-frakcije nakon dejstva vodorastvornog termalnog inicijatora (AAPH) pri koncentraciji od $3.2 \times 10^{-3} \text{M}$, i temperaturi inkubacije od 40°C , prikazane su na Slici 36. Korišćene Chl-koncentracije u vodi su u opsegu od 2.5×10^{-6} do $2.5 \times 10^{-5} \text{M}$. Odgovor hlorofila i hlorofilina na primenjeni oksidacioni stres (degradacija pigmenta, %, u funkciji vremena inkubacije sa AAPH) za više različitih koncentracija pigmentata – hlorofila i hlorofilina - prikazan je na Slici 37-A i B, respektivno.



Slika 36. Apsorpcioni spektri hlorofila pre i nakon dejstva termalnog inicijatora-AAPH. Koncentracija hlorofila u vodi iznosila je $2.5 \times 10^{-5} \text{M}$, koncentracija AAPH $3.2 \times 10^{-3} \text{M}$, dok je reakcija praćena u periodu od 0 do 100 min.

Nakon dodavanja AAPH uočeno je pomeranje položaja apsorpcionih maksimuma hlorofila (Sl.36). Dejstvo AAPH rezultiralo je batohromnim pomeranjem i hipohromnim promenama Q_y -trake sa vremenom inkubacije (0-100 min). Degradacija zavisi, kako od

vremena inkubacije i koncentracije hlorofila, tako i od koncentracije termalnog inicijatora. Pri duplo manjoj koncentraciji AAPH ($1.6 \times 10^{-3} \text{M}$), degradacija hlorofila je za sve ispitivane vrednosti koncentracija imala manju vrednost (**4.3.6.–Tabela 9**).

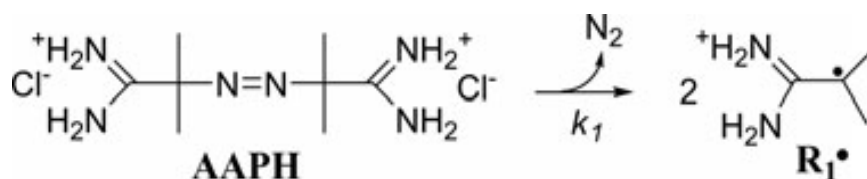


Slika 37. Degradacija hlorofila (A) i hlorofilina (B) u vodenom medijumu dejstvom termalnog inicijatora-AAPH, pri različitim koncentracijama pigmenata i konstantnoj koncentraciji termalnog inicijatora, na temperaturi od 40°C .

Sa **Slike 37-A,B** se može uočiti da je degradacija hlorofilina u poređenju sa degradacijom hlorofila slabija, za isto vreme trajanja reakcije i za iste vrednosti ispitivanih koncentracija pigmenata. Degradacija je intenzivnija u toku prvih 40 min izvođenja reakcije, nakon čega se usporava i konačno dostiže konstantne vrednosti nakon otprilike 100 min trajanja reakcije. Najveći stepen degradacije uočen je pri najvećim koncentracijama hlorofila što je suprotno od rezultata dobijenih praćenjem dinamike degradacije hlorofilina (**Sl.37**). Sa druge strane, pri najnižoj koncentraciji ($2.5 \times 10^{-6} \text{M}$), degradacija hlorofila je više nego duplo manja ($\approx 30\%$) u odnosu na hlorofilin ($\approx 63\%$), za isto vreme trajanja reakcije. To bi moglo da znači da se količina ROS-vrsta koje se mogu formirati dejstvom AAPH u datim uslovima, povećava sa porastom koncentracije hlorofila, a što je takođe uočeno tokom ranijih istraživanja (Kamat *et al.* 2000). Kod hlorofilina takav efekat nije zapažen, već je procenat degradacije za sve ispitivane koncentracije nakon 100 min trajanja reakcije (plato – **Sl.37-B**), bio u uskom opsegu (51-62 %), može se reći, nezavistan od koncentracije (videti **Tabelu 9**).

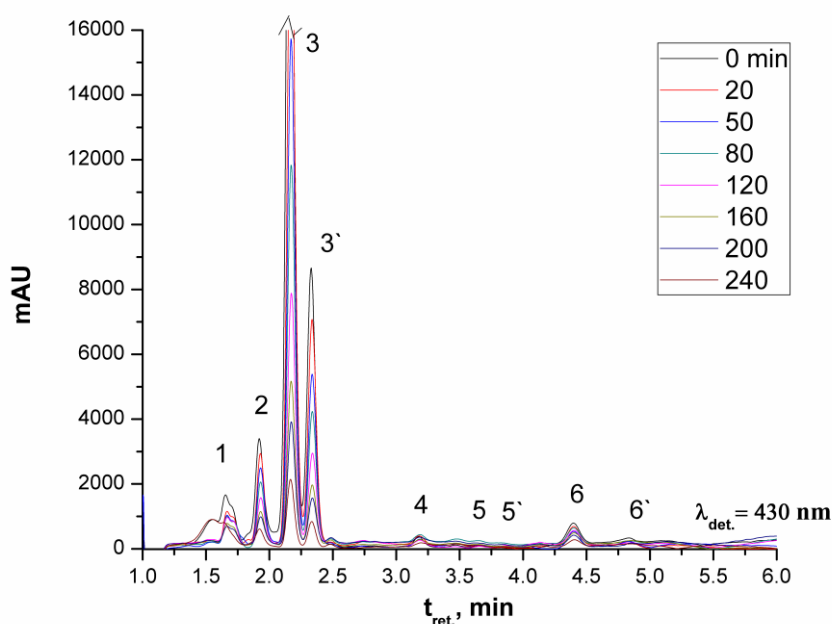
Dejstvom AAPH na temperaturama višim od 37°C dolazi do formiranja brojnih radikala: OH^\cdot , OOH^\cdot , alkil i keto radikala koji dalje nastavljaju lančane oksidacione reakcije (Betigeri *et al.* 2005). Pri tome efikasnost oksidacije u velikoj meri zavisi od izbora sistema

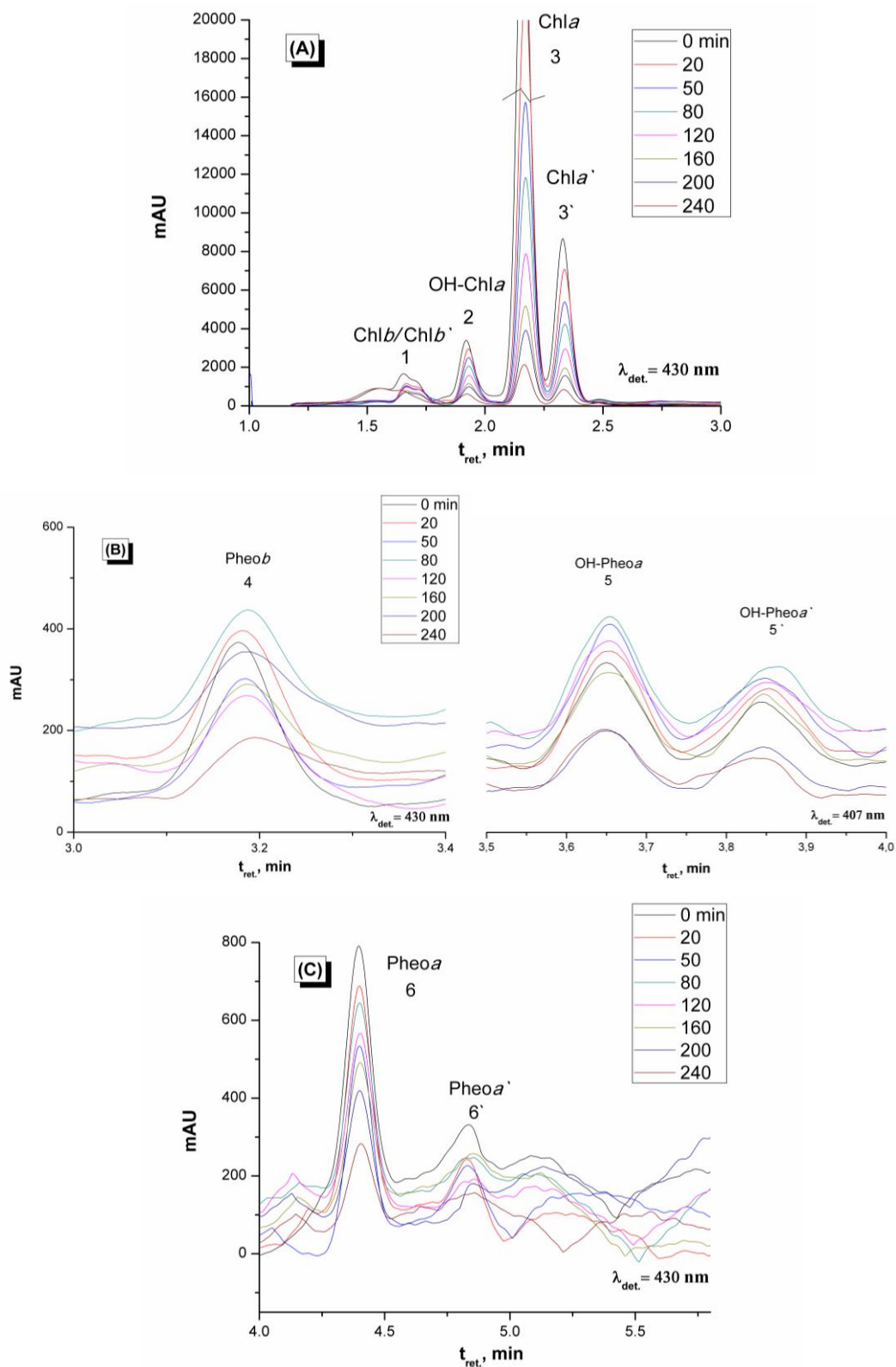
rastvarača, pH, i viskoznosti (Laguerre *et al.* 2007). Termalnom dekompozicijom AAPH u vodi formira se R_1' radikal:



koji dalje može formirati alkoksilne i peroksidne radikale odgovorne za nastavak lančanih reakcija oksidacije. Eksperimentalni podaci dosadašnjih istraživanja su pokazali da u reakcijama u kojima učestvuje termalni inicijator AAPH, oksidaciju vrše pretežno alkoksilni radikali (Werber *et al.* 2011, Betigeri *et al.* 2005), ali da je mogu nastaviti i drugi novonastali intermedijeri.

Hromatografskom UHPLC/MS analizom je ispitan sadržaj reakcione smeše pre i nakon dejstva termalnog inicijatora. UHPLC/DAD-hromatogram Chl-frakcije sniman na talasnoj dužini detekcije $\lambda_{\text{det.}} = 430 \text{ nm}$, pre i za vreme delovanja AAPH-inicijatora ($t_{\text{ink.}} = 0 - 240 \text{ min}$), prikazan je na **Slici 38**; uvećane promene pri retencionim vremenima analize do 3.0 min, od 3.0 – 4.0 min, i od 4.0 – 6.0 min prikazane su pod (A), (B) i (C), respektivno. Detektovani pikovi numerisani su brojevima od 1 do 6.





Slika 38. UHPLC/DAD-hromatogrami Chl-frakcije pre i nakon dejstva vodorastvornog termalnog inicijatora (AAPH). Prikaz potpunog hromatograma (na vrhu) sa uvećanim prikazom do 3.0 min analize (A) od 3.0 do 4.0 min analize (B) i od 4.0 do 6.0 min analize

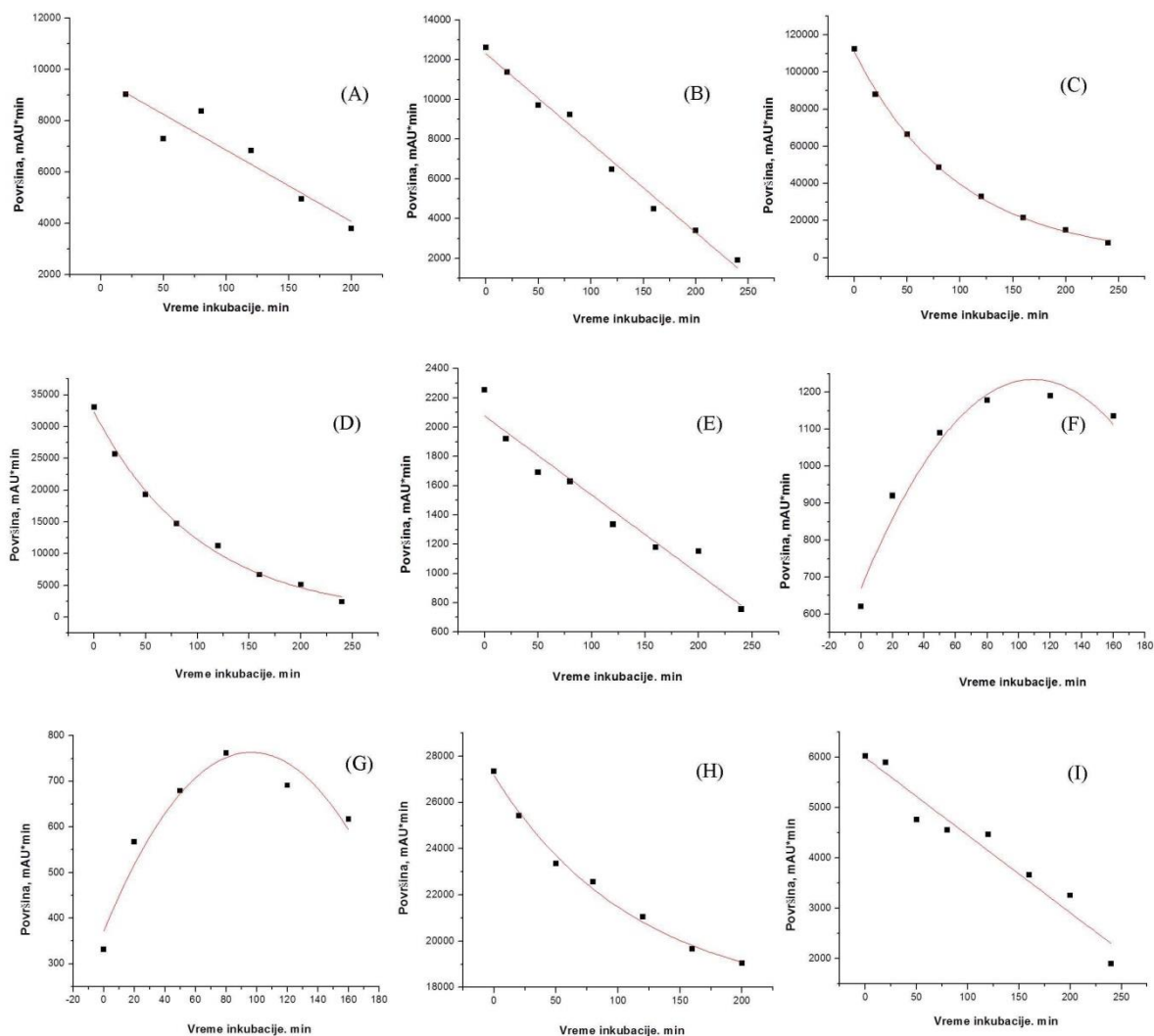
(C). Talasna dužina detekcije je 430 nm u svim prikazima, osim pod B, desni deo prikaza - pikovi br. 5 i 5', $\lambda_{\text{det.}} = 407 \text{ nm}$ – maksimum Soret-ove trake OH-Pheoa i OH-Pheoa'.

Analogno rezultatima analize hlorofilne frakcije nakon oksidacionog stresa izazvanog dejstvom Fentonovog reagensa, komponente označene bojevima 1, 2, 3 i 3' ($t_{\text{ret.}} = 1.67, 1.92, 2.17$ i 2.32 min), kao i komponente 6 & 6' ($t_{\text{ret.}} = 4.4$ & 4.84 min), pripadaju jedinjenjima koja su u samoj frakciji i pre početka oksidacionog stresa. Komponente čiji je rast koncentracije sa vremenom dejstva AAPH detektovan ($t_{\text{ret.}} = 3.65$ & 3.85 min , pikovi pod rednim brojem 5 & 5', **SI.38-B-desno**), identifikovane su na osnovu karakteristika svojih apsorpcionih VIS spektara i načina fragmentisanja kao OH-Pheoa i OH-Pheoa', respektivno.

Grafici dinamike degradacije Chl-frakcije tokom dejstva AAPH dobijeni kao zavisnost integrisane površine odgovarajućih pikova na hromatogramu od vremena inkubacije, su prikazani na **Slici 39-A&I**, dok su rezultati UHPLC-hromatografske analize nakon dejstva AAPH, kao i podaci masene detekcije komponenti u uzorcima, zajedno sa karakterističnim fragmentacionim pikovima prikazani u **Tabeli 6**.

Trend linernog opadanja primećen je kod detektovanih komponenti (Chlb, OH-Chla, Pheob i Pheoa' - **SI.39-A,B,E,I**, respektivno). Trend rasta do $t_{\text{ink}} = 100 \text{ min}$ a potom trend opadanja primećen je kod produkata OH-Pheoa i OH-Pheoa', pri čemu je detekcija vršena na odgovarajućim A_{max} vrednostima Soret-ove trake (**SI.39-Fi G**, respektivno). Trend opadanja takođe je primećen kod Chla i Chla' (**SI.39-Ci D**). Rezultati hromatografske analize nakon dejstva AAPH, kao i MS analiza svih komponenti detektovanih u uzorcima, zajedno sa karakterističnim fragmentacionim pikovima, prikazani su u **Tabeli 8**, dok su reakcione šeme nastanka produkata prikazane u **ANEX-u**.

Uticaj AAPH radikala na hlorofilnu frakciju očito je rezultirao nepovratnom degradacijom Chla i Chlb kao i Chl-derivata, pri čemu se kao jedini produkt dejstva ovog stresa može predstaviti OH-Pheoa, zajedno sa svojom epimernom formom i pokazao rast u prvih 100 minuta stresa, nakon čega je primećena i njegova degradacija (**SI.39-F,G**).



Slika 39. Dinamika promene površine pikova sa hromatograma prikazanog na Sl.38: (A) $t_{ret.}=1.67$ min, Chlb, (B) $t_{ret.}=1.92$ min, OH-Chla, (C) $t_{ret.}=2.17$ min, Chla, (D) $t_{ret.}=2.32$ min, Chla`, (E) $t_{ret.}=3.19$ min, Pheob, (F) $t_{ret.}=3.65$ min, OH-Pheoa, (G) $t_{ret.}=3.84$ min, OH-Pheoa`, (H) $t_{ret.}=4.40$ min, Pheoa, (I) $t_{ret.}=4.84$ min, Pheoa`.

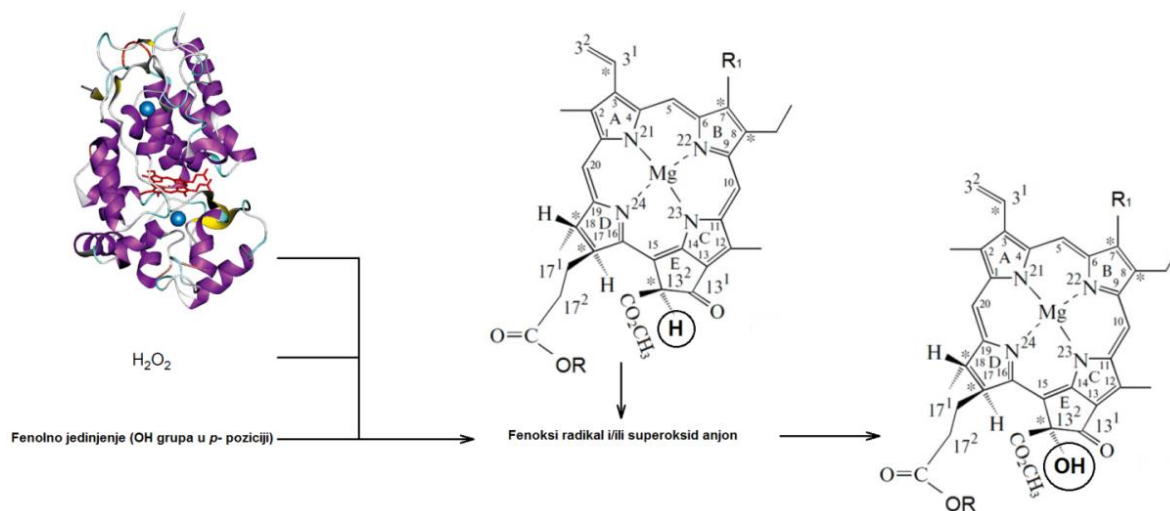
Tabela 6. Rezultati hromatografske analize (DAD – u VIS oblasti i MS-detekcijom) ispitivanih uzoraka: „čiste” Chl-frakcije u vodi Chl-frakcije u vodenom rastvoru sa termalnim inicijatorom-AAPH, kao i MS analize glavnih fragmentacionih jona u MS/MS spektrima.

Komponenta	$t_{ret.}$ min	Apsorpcioni maksimumi u mobilnoj fazi/nm			Glavni fragmentacioni joni u MS/MS spektru			
		Soret	Q_y	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	m/z	^a Predložena struktura fragmentacionog jona	
				m/z	m/z izračunato			
2 OH-hlorofil <i>a</i>	1.92	430	665	909.31	909.53	891 [MH-18] ⁺ 613 [MH-296] ⁺ (100%)	[MH-H ₂ O] ⁺ [MH-C ₂₀ H ₃₉ OH] ⁺	
3 Hlorofil <i>a</i>	2.17	411	431	665	893.47	893.54	615 [MH-278] ⁺ (100%)	[MH-C ₂₀ H ₃₈] ⁺
3' Hlorofil <i>a</i> '	2.32						555 [MH-338] ⁺	[MH-C ₂₀ H ₃₉ CO ₂ CH ₃] ⁺
4 Feofitin <i>b</i>	3.19	435	654	907.37	907.52	553 [M-354+Na] ⁺ (100%)	[M-C ₂₀ H ₃₉ CO ₂ CH ₃ -CH ₃ -H+Na] ⁺	
5 OH-Feofitin <i>a</i>	3.65	407	666	887.49	887.53	839 [MH-32] ⁺	[MH-CH ₃ OH] ⁺	
5' OH-Feofitin <i>a</i> '	3.84					827 [MH-60] ⁺ 609 [MH-278] ⁺ 591 [MH-296] ⁺ (100%)	[MH-CO ₂ CH ₃ -H] ⁺ [MH-C ₂₀ H ₃₈] ⁺ [MH-C ₂₀ H ₃₉ O] ⁺	
6 Feofitin <i>a</i>	4.40	408	666	871.53	871.57	839 [MH-32] ⁺	[MH-CH ₃ OH] ⁺	
6' Feofitin <i>a</i> '	4.84					811 [MH-60] ⁺ 593 [MH-278] ⁺ (100%) 533 [MH-338] ⁺ 460 [MH-411] ⁺	[MH-CO ₂ CH ₃ -H] ⁺ [MH-C ₂₀ H ₃₈] ⁺ [MH-C ₂₀ H ₃₉ CO ₂ CH ₃] ⁺ [MH-C ₂₀ H ₃₉ CO ₂ CH ₂ CH ₂ -CO-HOCH ₃] ⁺	

a – Strukture predloženih fragmenata su literaturno podržane referencama Woolley *et al.* 1998, Lim, 2009; Hendry *et al.* 1987; Walker & Keely, 2004; Walker *et al.* 2002; Yoshitaka & Tamiaki, 2012.

4.3.3. HPLC analiza hlorofila nakon primene oksidacionog stresa izazvanog dejstvom enzima

Stabilnost Chla prema dejstvu enzima ispitana je na primeru peroksidaze iz rena. Degradacija Chla dejstvom peroksidaze uslovljena je prisustvom fenolnog jedinjenja. Način delovanja peroksidaze na sam degradacioni mehanizam Chla nije potpuno objašnjen. Prethodna istraživanja pokazala su da je prisustvom fenola, 2,4-dihlorofenola ili *p*-kumarinske kiseline, degradacija hlorofila učinjena efikasnijom (Yamauchi & Watada, 1994). Fenolno jedinjenje rezorcinol (a koje je korišćeno u ovom radu – Eksperimentalni deo, 3.8.), takođe se smatra veoma važnim za efikasnost dejstva enzima peroksidaze na hlorofil (Yamauchi *et al.* 2004).

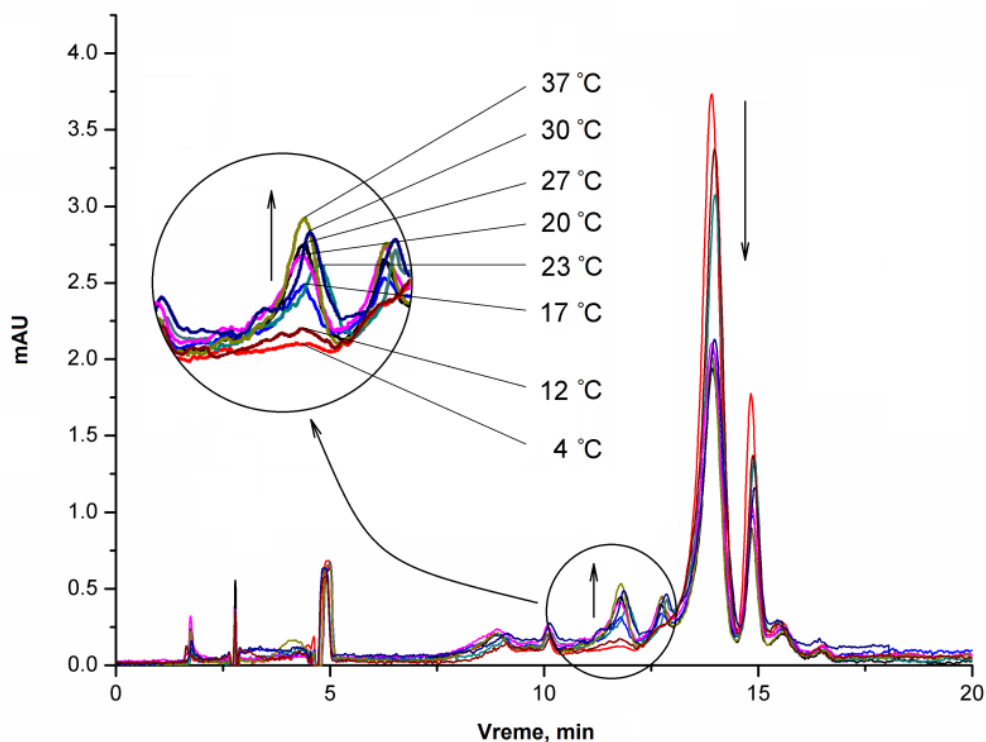


Slika 40. Šematski prikaz konverzije Chla dejstvom enzima u prisustvu fenolnog jedinjenja – u njegov OH-derivat; R- fitilni lanac, R₁- CH₃ grupa.

Poznato je da u procesu enzimske degradacije Chla, peroksidaza najpre oksiduje fenolno jedinjenje koje ima hidroksilnu grupu u *p*-položaju, stvarajući fenoksi i/ili superoksidni anjon radikal (Yamauchi *et al.* 2004, Funamoto *et al.* 2003). Dejstvom tako stvorenih radikala na Chla formira se hidroksi hlorofil *a* (derivat hlorofila sa hidroksilnom grupom umesto vodonika u poziciji C-13² - **Sl.1** – OH-Chla). Aktivnost fenolnog jedinjenja u sistemu peroksidaza-vodonik peroksid može poticati od elektrona slobodnih supstituenata u para poziciji (Funamoto *et al.* 2003); fenolna jedinjenja tog tipa, fenoli sa OH-grupom u para poziciji su *p*-kumarinska kiselina, apigenin, naringenin i sl. Postoje i ispitivanja u kojima druga fenolna jedinjenja poput katehola, ferulinske, kafeinske i hlorogene kiseline nisu pokazala aktivnost u procesu enzimskog delovanja na Chla (Lichtenthaler, 1987).

Pored identifikacije produkta dejstva enzima, ispitan je i uticaj pH vrednosti i temperature na ovu reakciju, primenom apsorpcione spektroskopije i HPLC hromatografije.

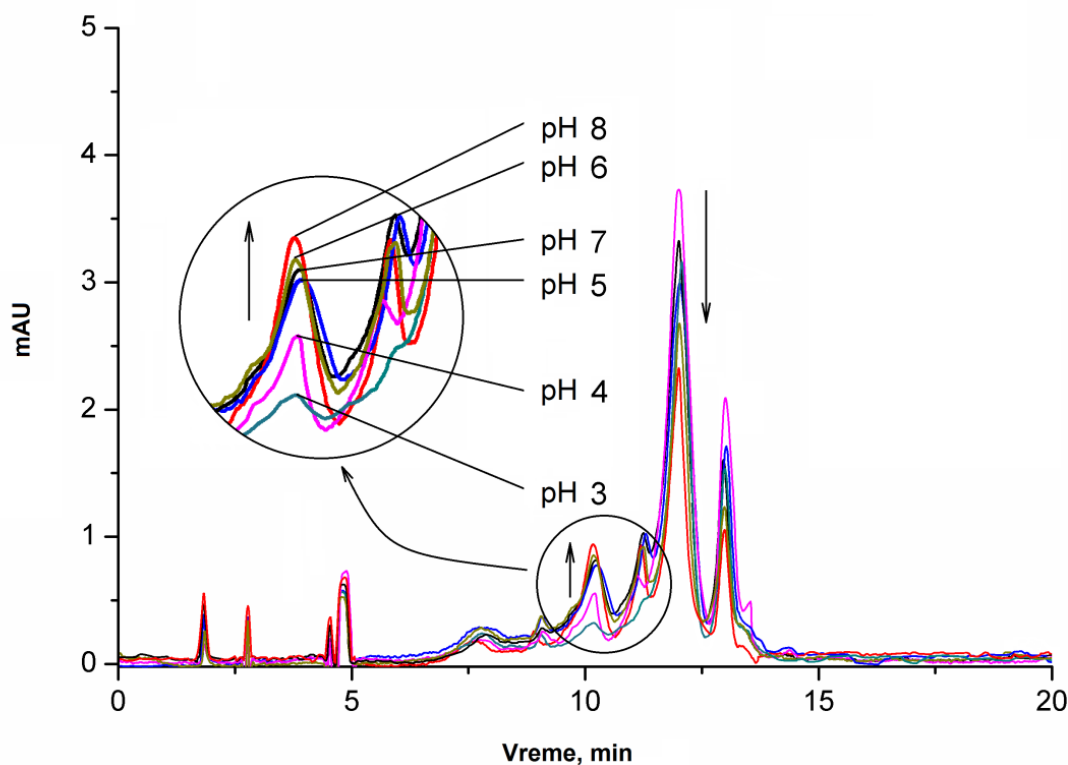
HPLC-hromatogrami hlorofila ekstrahovanih iz reakcione smeše nakon dejstva enzima peroksidaze, pri različitim temperaturama inkubacije, prikazani su na **Slici 41**.



Slika 41. HPLC-hromatogrami Chl-frakcije tretirane peroksidazom u prisustvu rezorcinola pri različitim temperaturama inkubacije. Talasna dužina detekcije je 660 nm. Glavne komponente sa hromatograma su na $t_{ret.} = 13$ min – Chla i $t_{ret.} = 12$ min - OH-Chla.

HPLC-hromatogrami hlorofila ekstrahovanih iz reakcione smeše nakon dejstva enzima pri različitim pH vrednostima reakcione smeše, prikazani su na **Slici 42**.

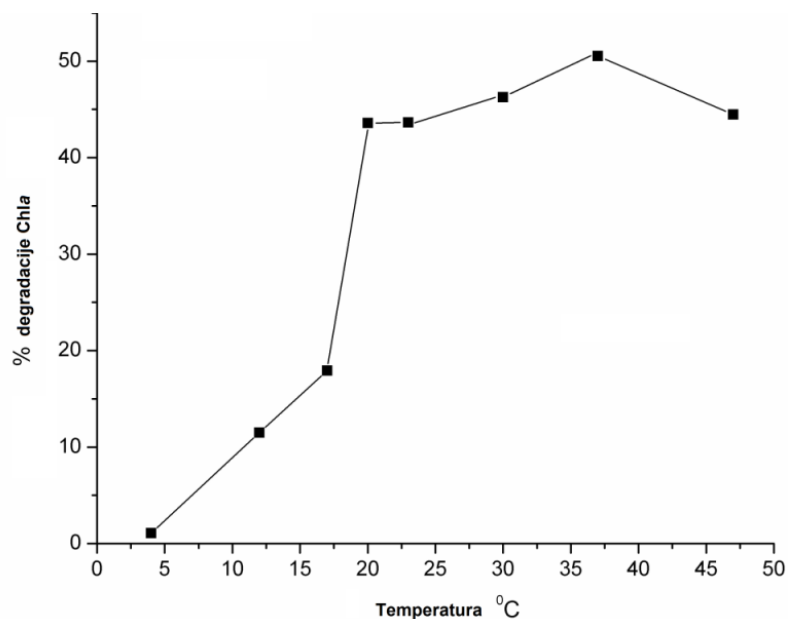
Mogućnost apstrakcije labilnog H-atoma iz fenolnog supstrata dejstvom peroksidaze (Yamauchi *et al.* 2004), ukazuje na to da je detektovana produkcija OH-Chla ($t_{ret.} = 12$ min- **SI.41-42**) posledica dejstva enzima. Apsorpcioni spektri izdvojenih komponenti na hromatogramu su u saglasnosti sa literaturnim podacima (662 nm - „crvena traka” i 430 nm - „plava traka”, u acetonitrilu), i pokazuju jaku sličnost, s obzirom na to da oba jedinjenja - i Chla i OH-Chla- pripadaju „hlorinskom” tipu jedinjenja čija je osnovna razlika u supstituentu na C-13² poziciji (**SI.1**).



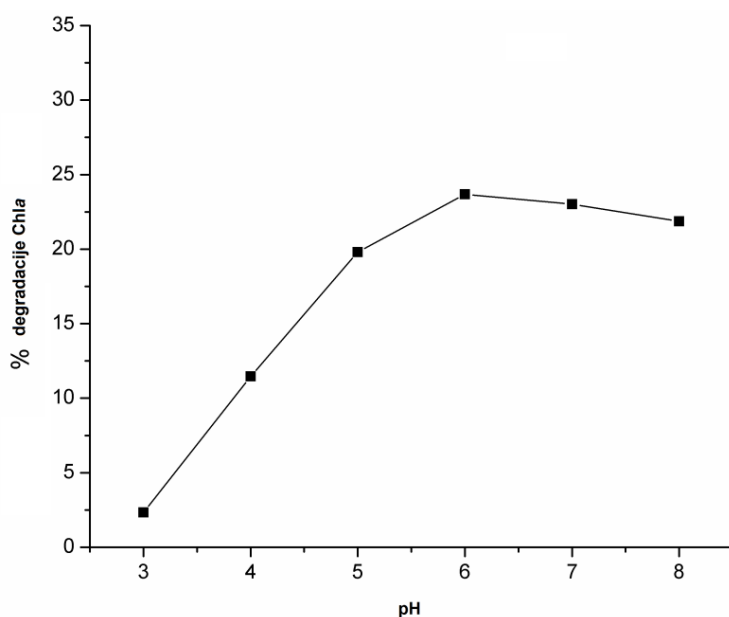
Slika 42. HPLC-hromatogrami Chl-frakcije tretirane peroksidazom u prisustvu rezorcinola pri različitim pH vrednostima reakcione smeše. Talasna dužina detekcije je 660 nm. Glavne komponente sa hromatograma su na $t_{ret.} = 13$ min – Chla, $t_{ret.} = 12$ min - OH-Chla.

Pošto se za analizu ovakvih tipova jedinjenja najčešće koristi C-18 kolona, retenciona vremena analiziranih komponenti uvek opadaju istim redosledom Chla>OH-Chla>Chlb, i pretežno zavise od polarosti kako jedinjenja tako i mobilne faze. HPLC-hromatogrami dobijeni pri različitim temperaturama inkubacije pokazuju opadanje sadržaja Chla usled porasta temperature od 4°C do 47°C (SI.43). Takođe, pri konstantnoj temperaturi, a pri različitim vrednostima pH, zapaženo je opadanje sadržaja Chla sa porastom vrednosti pH (SI.44). Količina nastalog OH-Chla raste na račun smanjenja količine Chla.

Degradacija Chla dejstvom peroksidaze u prisustvu rezorcinola usled porasta temperature raste, ali ne linearno u odnosu na rastući temperaturni režim. Porast Chla-degradacije zapažen je u temperaturnom opsegu 4-17°C, s tim što do naglog porasta degradacije dolazi u oblasti 17-20°C nakon čega procenat degradacije sporije raste, u oblasti 20-37°C (SI.43). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima degradacije Chla dejstvom peroksidaze ali u prisustvu *p*-kumarinske kiseline (Martínez *et al.* 2001).



Slika 43. Degradacija Chla dejstvom peroksidaze u prisustvu rezorcinola, pri pH 6 za različite vrednosti temperature.



Slika 44. Degradacija Chla dejstvom peroksidaze u prisustvu rezorcinola, pri konstantnoj temperaturi od 25°C i pri različitim vrednostima pH.

Rezultati koji se tiču uticaja pH vrednosti na Chla-degradaciju dejstvom peroksidaze u prisustvu rezorcinola dati su na **Slici 44**. Mogu se primetiti dva segmenta sa grafika: prvi u oblasti pH 3-6 koji je praćen porastom degradacije Chla i drugi u oblasti pH 6-8 praćen blagim padom stepena degradacije Chla. Dobijeni rezultati su takođe u saglasnosti sa literaturnim, gde je kao fenolno jedinjenje pri degradaciji Chla posredstvom peroksidaze

upotrebljena *p*-kumarinska kiselina (Martínez *et al.* 2001).

Imajući u vidu optimalne vrednosti temperature i pH pri kojima je peroksidaza najaktivnija (30-40°C, pH 6-8, zavisno od medijuma), dobijeni rezultati su očekivani (Watanabe *et al.* 1984). Degradacija hlorofila u najvećoj meri zavisi od vrednosti pH i temperature, što ukazuje na činjenicu da u tom pogledu presudan uticaj ima peroksidaza, jer se sa povećanjem temperature i pH vrednosti istovremeno približavamo optimalnim vrednostima koji su inače neophodni za dejstvo peroksidaze iz rena. Ovaj vid degradacije može se svrstati u biodegradaciju Tipa I (Uvodni deo 2.7.2.).

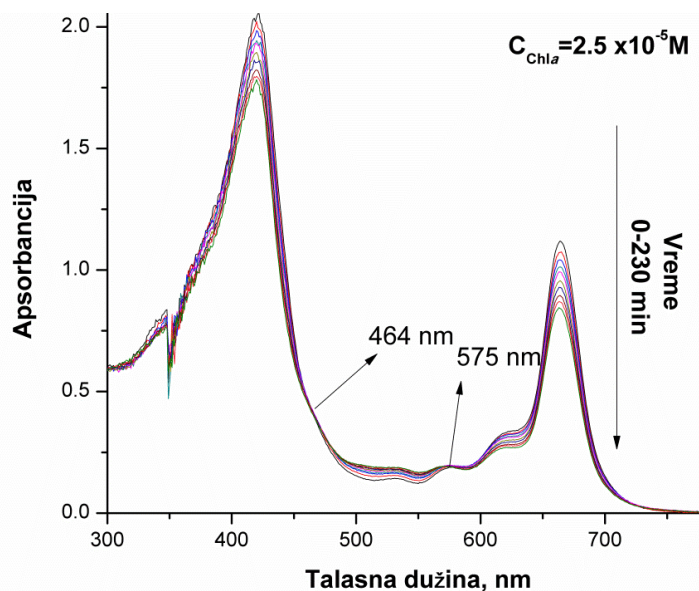
4.3.4. Promene hlorofila u vodi nakon izlaganja vidljivoj svetlosti. Analiza apsorpcionih spektara. UHPLC/MS analiza

U biljkama hlorofil je od jake svetlosti zaštićen, između ostalog i protektivnom ulogom karotenoida. Međutim, ta vrsta zaštite je ograničenog karaktera. Pri ekstremnim uslovima, tj. visokim intenzitetima svetlosti može doći do fotodestrukcije karotenoida, pa Chl-molekuli postaju izloženi oksidativnom stresu i dejstvu pre svega peroksidnih i hidroksilnih slobodnih radikala, koji tom prilikom mogu „napadati” kako tetrapirolnu strukturu, tako i fitilni lanac (Rontani & Aubert, 1994).

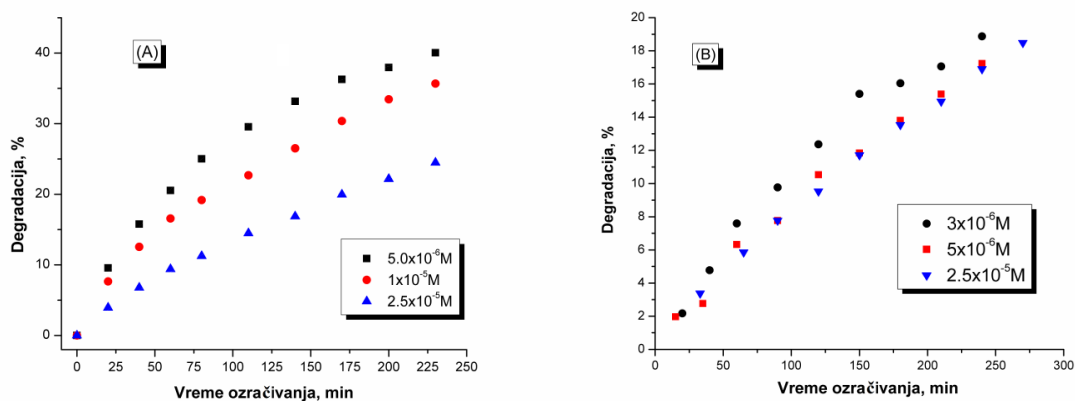
Efikasnost stresa izazvanog sunčevim zračenjem se generalno povećava sa opadanjem talasne dužine svetlosti. Od ukupnog spektra sunčevog zračenja koje dolazi do Zemlje, najjači degradirajući efekat ima spektralna oblast od 280-315 nm, što odgovara oblasti tzv. UV-B zračenja. Ipak, kako hlorofili kao fotosintetski pigmenti apsorbuju pre svega u vidljivoj (VIS) oblasti sunčevog spektra koje čini oko 90% ukupne sunčeve energije koja padne na površinu Zemlje, to je njihova struktura značajno ugrožena usled izlaganja ne samo UV zračenju (UV-B, ali i UV-A, 315-400 nm), već i vidljivoj svetlosti, posebno u *in vitro* uslovima kada za razliku od *in vivo* uslova u biljkama, nije pokrenut nijedan od više različitih mehanizama zaštite hlorofila od degradacije.

Promene u apsorpcionim spektrima hlorofila tokom kontinualnog dejstva vidljive svetlosti prikazane su na **Slici 45**, dok je odgovarajući grafik degradacije hlorofila, odnosno hlorofilina, u funkciji vremena zračenja i za različite koncentracije pigmenata, dat na **Slici 46-A**, odnosno **46-B**, respektivno.

Sa **Slike 45** može se primetiti da vidljiva svetlost utiče na opadanje intenziteta Q_y -trake, tj. hipohromnog efekta. Takođe se mogu uočiti dve prevojne tačke (464 i 575 nm – **Sl.45**). Porast apsorpcije u ovoj oblasti (464-575 nm) implicira mogućnost formiranja nekih produkata koji u toj oblasti apsorbuju.



Slika 45. Apsorpcioni spektri hlorofila nakon oksidacionog stresa izazvanog vidljivom (VIS) svetlošću. Koncentracija hlorofila u vodi iznosila je $2.5 \times 10^{-5} M$, dok je ozračivanje vršeno u periodu od 0-230 min.



Slika 46. Degradacija hlorofila (A) i hlorofilina (B) u vodenom medijumu izazvana kontinualnim dejstvom vidljive svetlosti, pri različitim koncentracijama ispitivanih pigmentata. Jačina vidljive svetlosti bila je konstantna sve vreme zračenja i iznosila je $14 W/m^2$.

Sa **Slike 46-A** se vidi da sa porastom nivoa molekularne organizacije hlorofila (što je pre svega uslovljeno rastućom koncentracijom pigmenta), raste njegova stabilnost prema dejstvu VIS-zračenja. Najveća degradacija hlorofila, 40%, zapažena je pri najnižoj koncentraciji od 5×10^{-6} M, nakon perioda ozračivanja od 220 min (**Sl.46-A**). Za istu koncentraciju i isto vreme dejstva, degradacija hlorofilina u vodi iznosi 17.2 % (**Sl.46-B**). Pri dvostruko većoj vrednosti koncentracije hlorofila degradacija se neznatno smanjuje. Dalje povećanje koncentracije na vrednost od 2.5×10^{-5} M, kada hlorofili počinju da pokazuju „asocijativno ponašanje”, smanjuje vrednosti degradacije na upola manju vrednost za isto vreme izlaganja ovom stresu; to bi mogla biti indikacija za neku vrstu asocijativnog ponašanja Chl-molekula. Kod hlorofilina nije uočen isti efekat kao kod hlorofila pa su vrednosti degradacije za sve tri koncentracije hlorofilina bile približne. Ispitivanja su pokazala da i pri jako malim koncentracijama od 5×10^{-6} M hlorofilin ima „scavenging” efekat, dok je povećanje koncentracije hlorofilina na 5×10^{-4} M redukovalo procenat efekta radijacije na DNA na 90% (Tumolo *et al.* 2012). Time je ukazano na to da povećanje koncentracije hlorofilina povećava njegovu degradaciju (Tumolo & Marquez, 2012), što je suprotno od ponašanja hlorofila uočenog u ovom radu.

Generalno, vidljiva svetlost bilo u *in vivo* sistemima ili *in vitro* vodenim sistemima sa hlorofilom, rezultira nastankom pretežno OH[•] radikala onda kada se ozračivanje odvija u prisustvu kiseonika što je slučaj i sa eksperimentima prikazanim u ovom radu. Eksperiment ozračivanja Chl_a crvenim svetlom sproveden u prisustvu vazduha ili kiseonika, zabeležio je nastanak OH[•] radikala pri čemu je takođe primećena veća degradacija Chl_a u prisustvu vazduha, nego samo u prisustvu kiseonika (Harbou & Bolton, 1978). Wang i saradnici (2011) takođe ističu ulogu OH[•] radikala, ali u degradaciji hlorofila izazvanoj VIS svetlošću. Ima i drugih istraživanja koja su pokazala da je dejstvo vidljive svetlosti na Chl_a u vodenom medijumu rezultiralo ireverzibilnom degradacijom praćenom nastankom degradacionih produkata, intermedijera i finalnim produktima degradacije (Hynninen, 1991). Hemijska struktura ovih produkata je mahom nepoznata, pretežno zbog mogućih različitih puteva degradacije i labilnosti stvorenih foto-produkata (Hendry, 1987). Foto-degradacija u rastvorima može se odvijati i bez procesa feofitinizacije (koji je inače najprisutniji), već otvaranjem porfirinskog jezgra (Jen & MacKinney, 1970), ili stvaranjem manjeg broja alomerizacionih produkata (Llewellyn *et al.* 1990a).

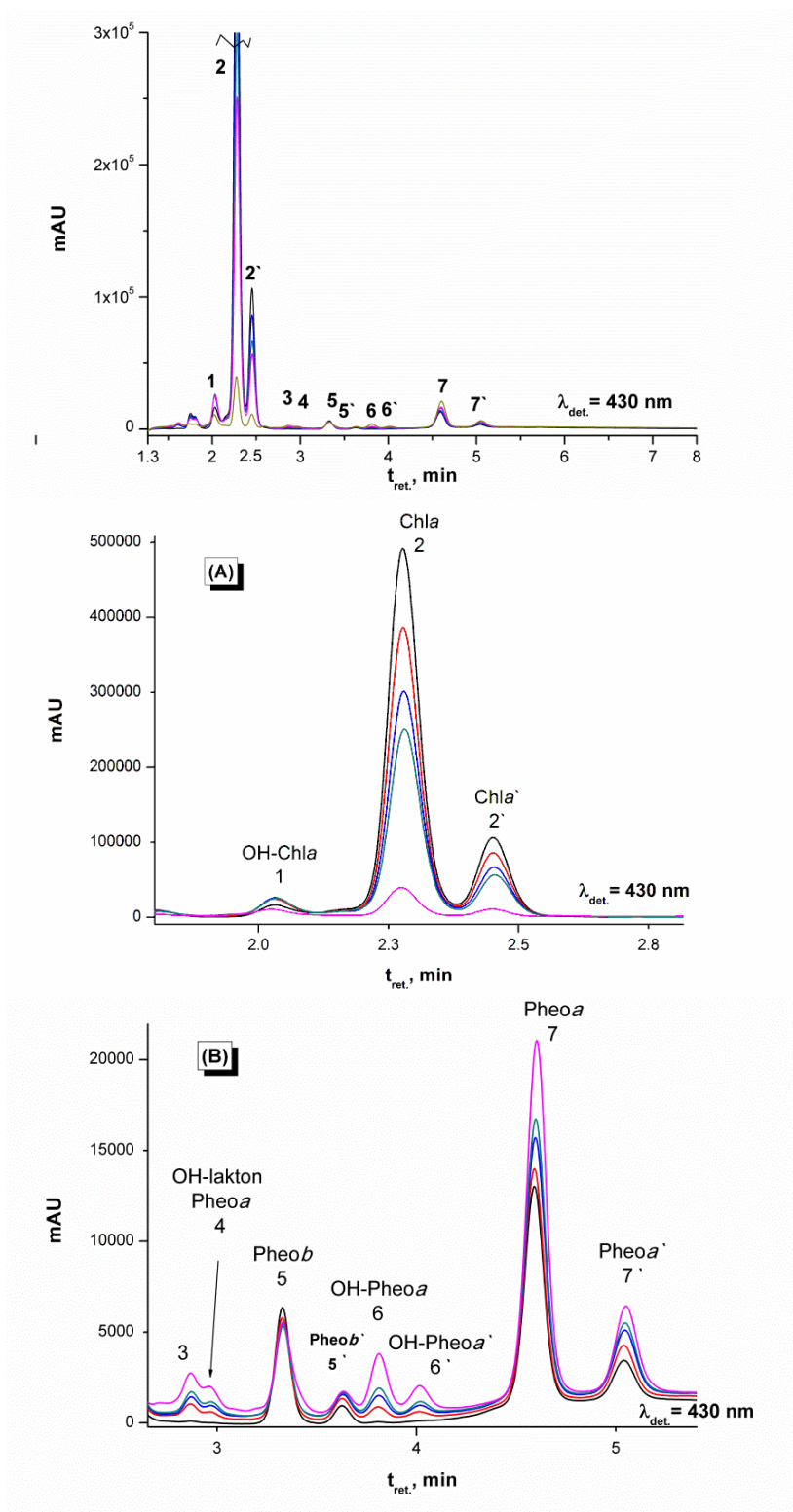
UHPLC/DAD-hromatogrami Chl-frakcije u vodi snimani na talasnoj dužini detekcije od $\lambda_{\text{det.}}=430$ nm, pre i za vreme kontinualnog dejstva vidljive svetlosti ($t_{\text{irr.}}=0-710$ min), prikazani su na **Slici 47**. Neki od detektovanih pikova numerisani su brojevima od 1 do 6.

Slično kao i pri analizi dejstava Fentonovog reagensa i termalnog inicijatora, detektovane komponente u hlorofilnoj frakciji označene brojevima 1, 2 i 2', na $t_{\text{ret.}}=2.03, 2.28$ i 2.45 min, respektivno, pripadaju jedinjenjima koja su u samoj frakciji egzistirala i pre ozračivanja tj. oksidacionog stresa. Identifikovane komponente su: OH-Chla, Chla i Chla', respektivno. Pikovi označeni brojevima 5, 5', 7 i 7' ($t_{\text{ret.}}= 3.33, 3.60, 4.60$ i 5.06 min: feofitin *b*, feofitin *b'*, feofitin *a* i feofitin *a'*, respektivno), odgovaraju jedinjenjima prisutnim u Chl-frakciji koja nije izlagana oksidacionom stresu. Na retencionoj skali od 2.5 do 4.1 min, vidljivo je nekoliko produkata dejstva VIS svetlosti ($t_{\text{ret.}}= 2.86, 2.96, 3.82$ i 4.02 min), pikovi pod rednim brojem 3, 4, 6 i 6', respektivno. Promene na hromatogramima pri retencionim vremenima do 6.0 min prikazane su na **Slici 47- A i B**.

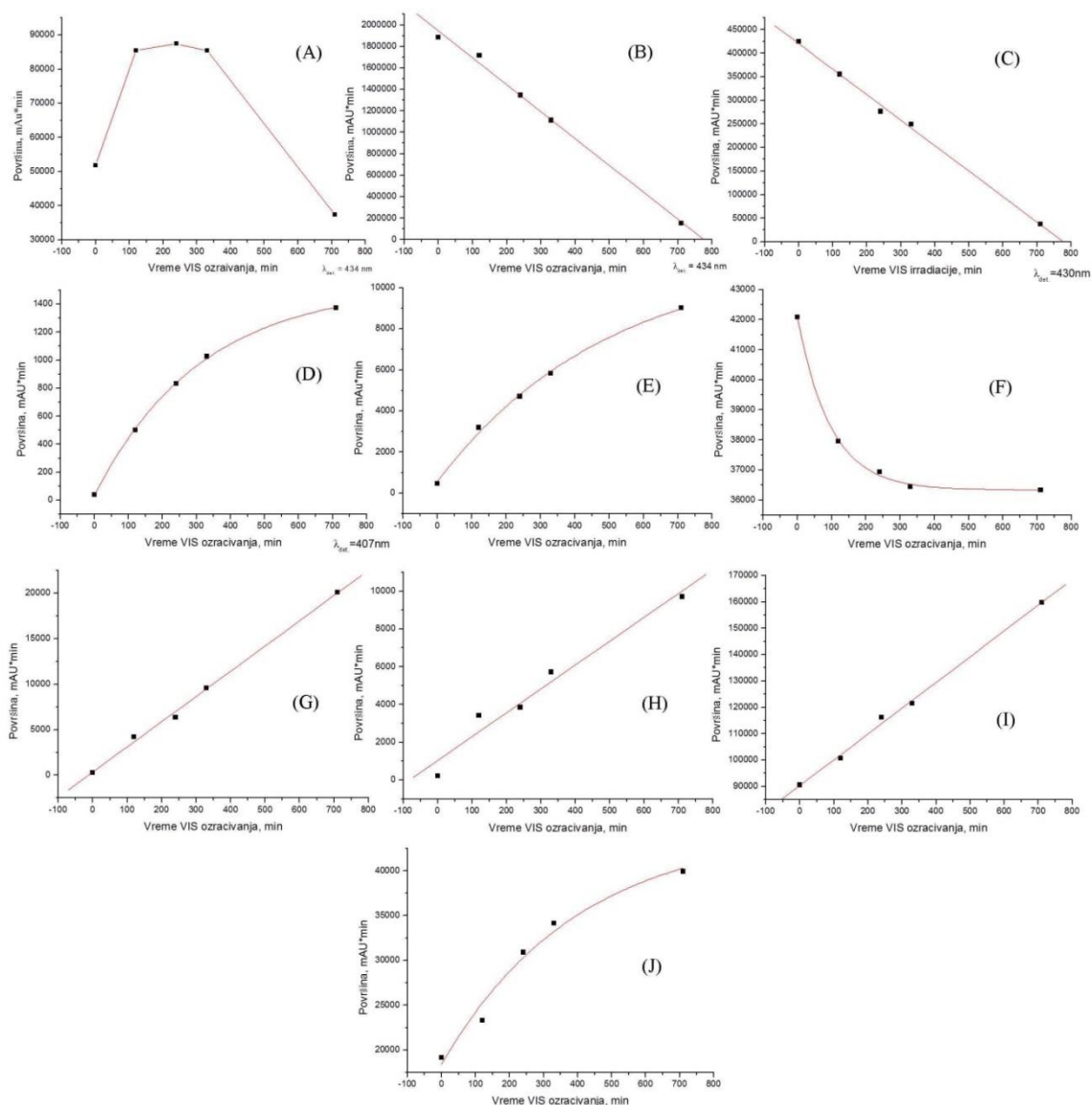
Linearno opadajući grafici degradacije Chla i Chla' za vreme kontinualnog dejstva vidljive svetlosti, dobijeni su za pikove sa retencionim vremenima $t_{\text{ret.}}$ 2.28 i 2.45 min, sa hromatograma snimljenih na $\lambda_{\text{det.}}=430$ nm (**Sl.48-B i C**, respektivno).

Trend rasta usled kontinuiranog dejstva VIS svetlosti primećen je kod OH-Pheoa, Pheoa i OH-lakton Pheoa, korišćenjem hromatograma sa $\lambda_{\text{det.}}$ odgovarajućih apsorpcionih maksimuma Soret-ovih traka – 407, 409 i 434 nm, respektivno (**Sl.48- G, I, E**); grafici odgovarajućih Chl-epimera (OH-Pheoa' i Pheoa' na 4.02 i 5.06 min, respektivno), pokazuju slično ponašanje sa istim trendom rasta (**Sl.48-H i J**). Pik na $t_{\text{ret.}}= 2.86$ min (takođe mogući degradacioni produkt), nije potpuno identifikovan na osnovu raspoloživih podataka, ali je na osnovu apsorpcionih spektara moguće pretpostaviti da je u pitanju derivat feofitina ili feoforbida (**Sl.48-D**). Za OH-Chla (prisutan u frakciji i pre zračenja) potvrđen je neujednačen rast za period zračenja do 240 min, i kontinualni pad počev od 330 min (**Sl.48-A**).

Rezultati hromatografske analize sa UV-VIS rezultatima, kao i masena detekcija svih komponenti detektovanih u uzorcima, zajedno sa karakterističnim fragmentacionim pikovima (prikaz većine MS/MS spektara je dat u delu 4.3.1), prikazani su u **Tabeli 7**.



Slika 47. UHPLC/DAD hromatogrami Chl-frakcije pre i nakon kontinualnog dejstva VIS svetlosti; talasna dužina detekcije je 430 nm; jačina ozračivanja 14 W/m^2 . Prikaz potpunog hromatograma sa uvećanim prikazom do 2.8 min analize (A) i od 2.8 do 6.0 min analize (B).



Slika 48. Dinamika promene površine pikova sa hromatograma prikazanog na Sl.47 (A) $t_{ret.}=2.03$ OH-Chla, (B) $t_{ret.}=2.28$ min, Chla, (C) $t_{ret.}=2.45$ min, Chla', (D) $t_{ret.}=2.87$ min, nepoznata komponenta, (E) $t_{ret.}=2.96$ min, OH-lakton Pheoa, (F) $t_{ret.}=3.36$ min, Pheob, (G) $t_{ret.}=3.82$ min, OH-Pheoa, (H) $t_{ret.}=4.02$ min, OH-Pheoa', (I) $t_{ret.}=4.60$ min, Pheoa, (J) $t_{ret.}=5.06$ min, Pheoa'.

Dejstvom vidljive svetlosti na Chl-frakciju u vodi došlo je do formiranja produkata OH-Pheoa i OH-laktona Pheoa, dok je koncentracija Pheoa i OH-Chla porasla nakon ozračivanja, implicirajući promene na E prstenu hlorofila (SI.1). Datom analizom nisu identifikovani produkti degradacije otvorenog porfirinskog jezgra. To može biti u saglasnosti sa tvrdnjom da se fotooksidacione reakcije dešavaju brzo bez akumulacije tzv. „obojenih produkata”, koji ukazuju na produkte otvaranja porfirinskog jezgra (Hörtensteiner &

Kräutler, 2011). Na osnovu izvršene analize može se zaključiti da se Chl-degradacija dejstvom vidljive svetlosti odvija po mehanizmu Tipa I, ali se ne isključuje mogućnost formiranja i drugih produkata manjih molekulske masa (mehanizam Tipa II) koji ovom metodom nisu identifikovani.

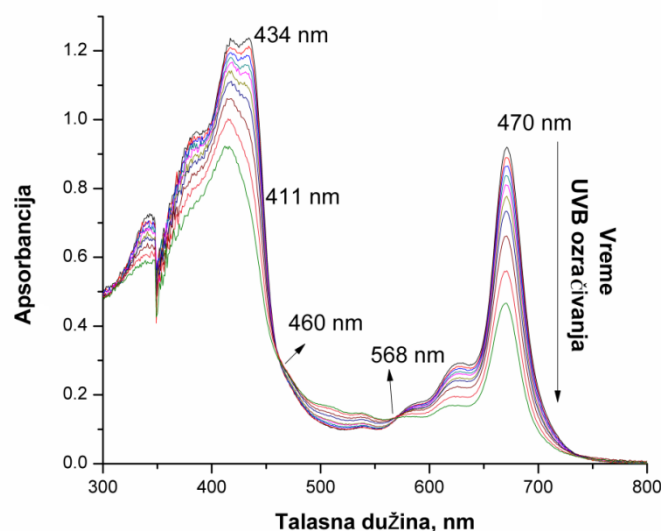
Tabela 7. Rezultati hromatografske analize (DAD- u VIS oblasti i MS-detekcijom) ispitivanih uzoraka (nezračene i zračene Chl-frakcije u vodenom rastvoru), kao i MS analize glavnih fragmentacionih jona u MS/MS spektrima.

Komponenta	$t_{ret.}$ min	Apsorpcioni maksimumi u mobilnoj fazi/nm			Glavni fragmentacioni joni u MS/MS spektru			
		Soret	Q_y	$[M+H]^+$ m/z	$[M+H]^+$ m/z izračunato	m/z	^a Predložena struktura fragmentacionog jona	
1 OH-hlorofil <i>a</i>	2.03	431	665	909.31	909.53	891 [MH-18] ⁺ 613 [MH-296] ⁺ (100%)	[MH-H ₂ O] ⁺ [MH-C ₂₀ H ₃₉ OH] ⁺	
2 Hlorofil <i>a</i>	2.28	411	431	665	893.47	893.54	615 [MH-278] ⁺ (100%)	[MH-C ₂₀ H ₃₈] ⁺
2' Hlorofil <i>a'</i>	2.45						555 [MH-338] ⁺ [MH-C ₂₀ H ₃₉ CO ₂ CH ₃] ⁺	
3 Nepoznata	2.86	435	652	615.39	-	303 [MH-312] ⁺ 359[MH-256] ⁺	-	
4 OH-laktonPheoa	2.96	410	667	903.00	903.00	565 [MH-338] ⁺	[MH-C ₂₀ H ₃₉ CO ₂ CH ₃] ⁺	
5 Feofitin <i>b</i>	3.33	435	654	907.37	907.52	553 [M-354+Na] ⁺ (100%)	[M-C ₂₀ H ₃₉ CO ₂ CH ₃ -CH ₃ -H+Na] ⁺	
5' Feofitin <i>b'</i>	3.60			[M+Na] ⁺	[M+Na] ⁺			
6 OH-Feofitin <i>a</i>	3.82	407	666	887.49	887.53	827 [MH-60] ⁺ 609 [MH-278] ⁺ 591 [MH-296] ⁺ 100%	[MH-CO ₂ CH ₃ -H] ⁺ [MH-C ₂₀ H ₃₈] ⁺ [MH-C ₂₀ H ₃₉ O] ⁺	
6' OH-Feofitin <i>a'</i>	4.02							
7 Feofitin <i>a</i>	4.60	408	666	871.53	871.57	839 [MH-32] ⁺ 811 [MH-60] ⁺ 593 [MH-278] ⁺ 533 [MH-338] ⁺ 460 [MH-411] ⁺	[MH-CH ₃ OH] ⁺ [MH-CO ₂ CH ₃ -H] ⁺ [MH-C ₂₀ H ₃₈] ⁺ [MH-C ₂₀ H ₃₉ CO ₂ CH ₃] ⁺ [MH-C ₂₀ H ₃₉ CO ₂ CH ₂ CH ₂ -CO-HOCH ₃] ⁺	
7 Feofitin <i>a'</i>	5.06							

^a – Strukture predloženih fragmenata su literaturno podržane referencama Woolley *et al.* 1998, Lim, 2009; Hendry *et al.* 1987; Walker & Keely, 2004; Walker *et al.* 2002; Yoshitaka & Tamiaki, 2012.

4.3.5. Promene hlorofila u vodi nakon izlaganja UV-B zračenju. Analiza apsorpcionih spektara. UHPLC/MS analiza

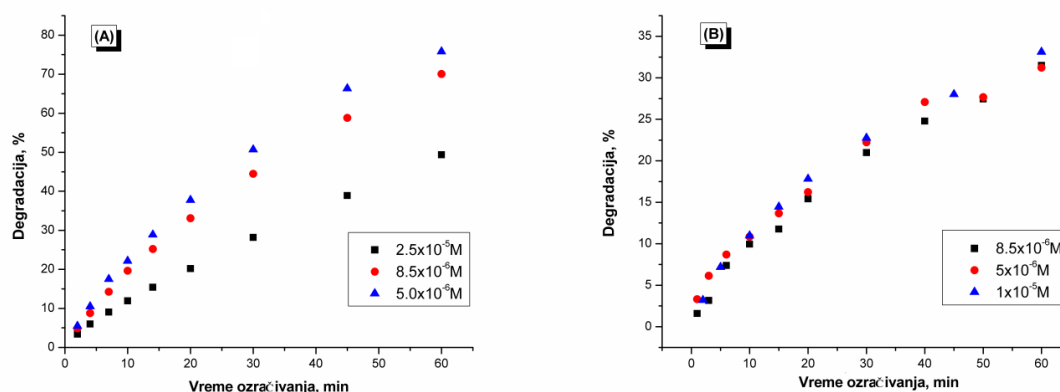
Analogno prethodnom, fotooksidacionom stresu, ispitan je uticaj kontinualnog UV-B ozračivanja na hlorofilnu frakciju u vodenom medijumu, a odgovarajuće promene u apsorpcionim spektrima hlorofila prikazane su na **Slici 49**. Ispitivane Chl-koncentracije su u opsegu od 5×10^{-6} do 2.5×10^{-5} M. Odgovarajući fotodegradacioni efekat UV-B zračenja za tri različite koncentracije pigmenta prikazan je na **Slici 50**, pri čemu je na **Slici 50-A** prikazan procenat degradacije hlorofila, a na **Slici 50-B** procenat degradacije hlorofilina.



Slika 49. Apsorpcioni spektri hlorofila nakon kontinualnog UV-B ozračivanja za period od 0-60 min. Koncentracija hlorofila u vodi iznosila je 2.5×10^{-5} M.

Upoređivanjem uticaja vidljive svetlosti i UV-B zračenja na fotosintetske organele ili cele organizme (Renger *et al.* 1989; Turcsányi & Vass 2000; Vass *et al.* 2002; Larkum *et al.* 2001), došlo se do zaključka da oba tretmana deluju sličnim mehanizmima i na sam hlorofil *in vivo*. Rezultati prikazani u ovom radu, u vodenom medijumu – dakle *in vitro* – ukazuju na rast stabilnosti hlorofila prema UV-B zračenju sa porastom uređenosti njegovih molekula. Naime, kada je koncentracija hlorofila reda veličine $\sim 10^{-6}$ M, Chl je u „monomernom” obliku, što potvrđuje grafik provere Lambert–Beer-ovog zakona (**SI.27-A**), i tada je degradacija hlorofila imala najveću vrednost. Kada je Chl-koncentracija reda veličine 10^{-5} M, apsorpcioni maksimum Q_y -trake hlorofila je već neznatno pomeren na 672 nm – što je

indikacija asocijativnog ponašanja hlorofila, a vrednosti degradacije su bile manje, tj. njegova otpornost prema dejstvu UV-B zračenja je još veća (SI.50-A).



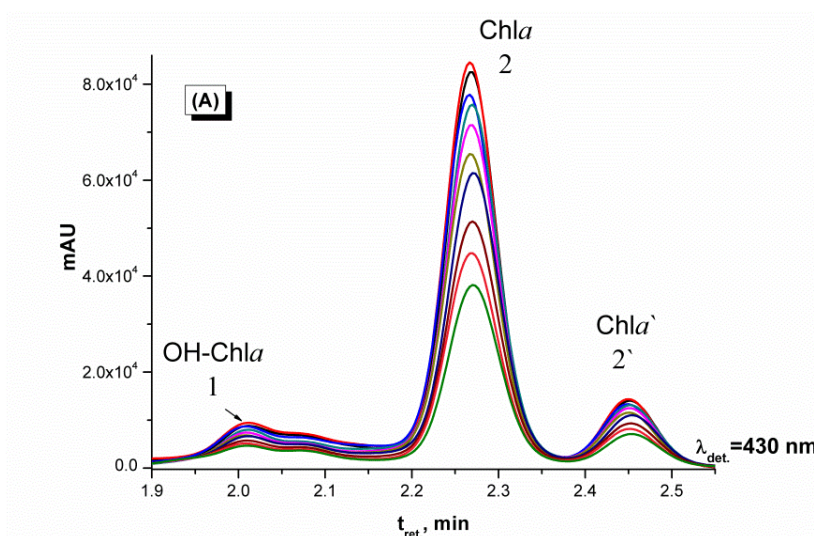
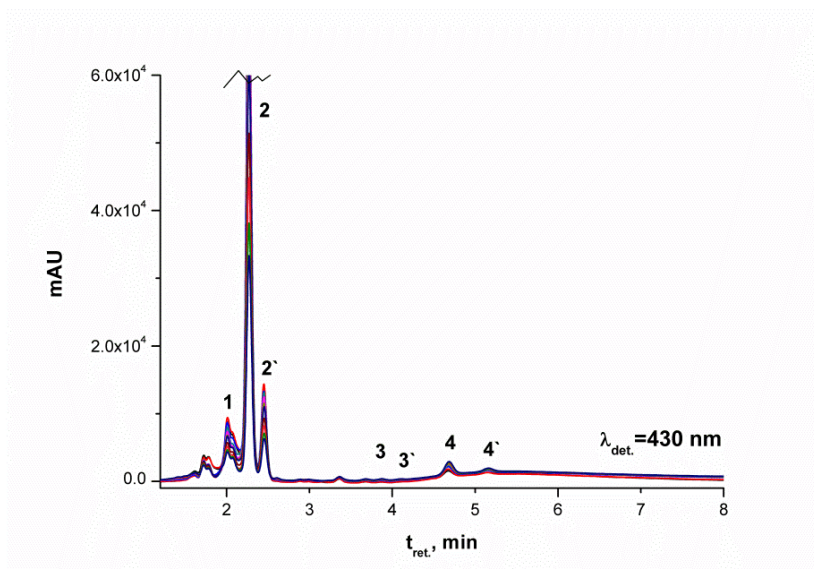
Slika 50. Degradacija hlorofila (A) i hlorofilina (B) u vodenom medijumu, pri različitim koncentracijama. Jačina UV-B zračenja bila je konstantna i iznosila je 15 W/m².

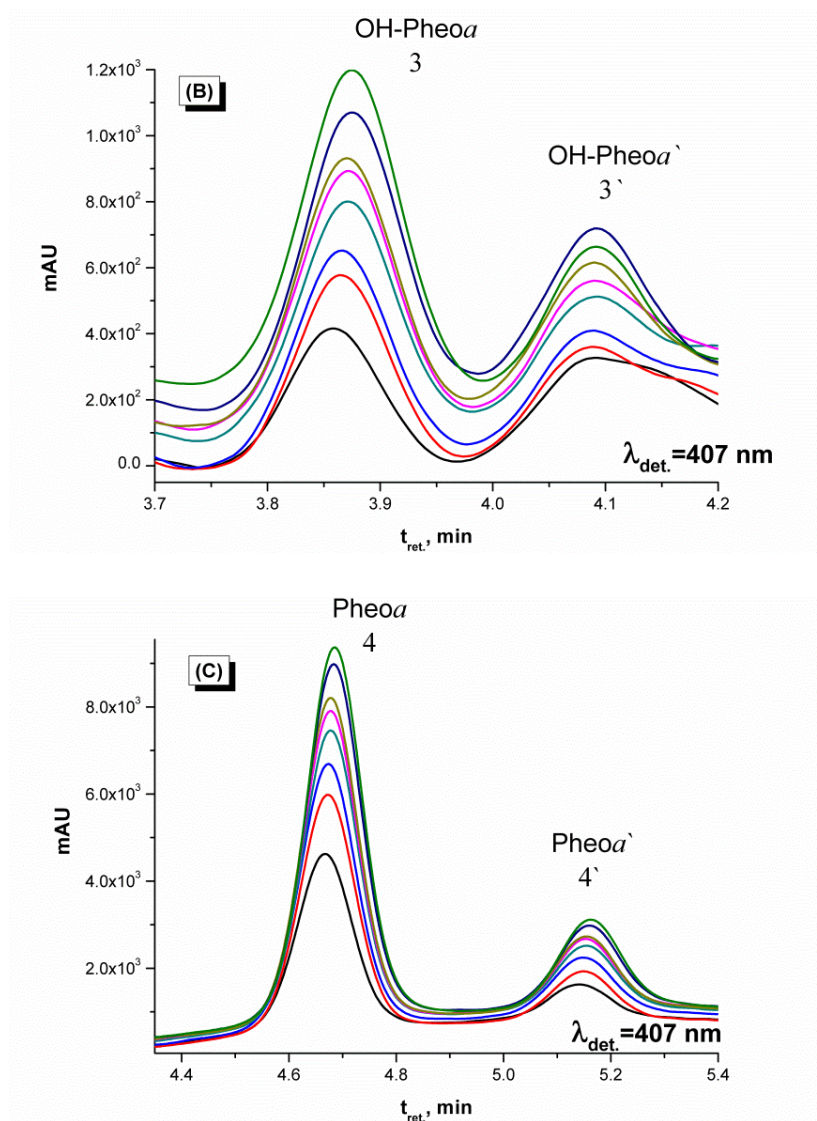
U prilog tome da su asocijativni Chl-molekuli stabilniji prema dejstvu UV-B-zračenja ide već poznata pojava da su „agregisani” hlorofili odlični „quencher”-i (quencher-gasilac) destruktivnog pobuđenog tripletnog stanja hlorofila, drastično skraćujući njegovo vreme života (Katz *et al.* 1978), samim tim, smanjujući efikasnost UV-B indukovano bleaching-a hlorofila. Literaturno je potvrđeno da u izolovanim fotosintetskim organelama i suborganelama – gde su hlorofili visoko „umreženi”, tj. agregisani u okviru tzv. „antenskih kompleksa” – pod dejstvom UV-zračenja (isto kao i pod dejstvom vidljive svetlosti) dolazi do formiranja hidroksilnih slobodnih radikala (Hideg & Vass, 1996; Vass *et al.* 2007). U UV-B ozračivanim vodenim suspenzijama hlorofila se formiraju visoko reaktivne ROS vrste kao što su, pre svega OH[•] (kao dominirajuća slobodno-radikalna vrsta), [•]O²⁻ (čiji je protonizovani, još reaktivniji oblik HO₂[•]); a postoje i indicacije o formiranju vodonik-peroksida (Hideg & Vass, 1996; Vass, 2007). Nezavisno od mehanizma formiranja ovih ROS vrsta, one su slobodne da „napadaju” molekule hlorofila.

Na osnovu dobijenih rezultata nakon vidljivog i UV-B ozračivanja ne može se isključiti pretpostavka o sličnosti dva mehanizma, kako za Chl molekule tako i za hlorofilin, s tim što je pri sličnim vrednostima energetskega fluksa (14 W/m²-VIS i 15 W/m²-UV-B) daleko veći procenat degradacije zapažen u slučaju kontinualnog UV-B ozračivanja. Potpuna degradacija hlorofila postignuta je nakon sat vremena UV-B ozračivanja što je potvrđeno i ranijim ispitivanjima (Scheepers *et al.* 2011). Kao i u slučaju dejstva vidljive svetlosti na

hlorofilin, promena koncentracije hlorofilina nije bitno uticala na promenu stepena njegove degradacije (S1.50–B).

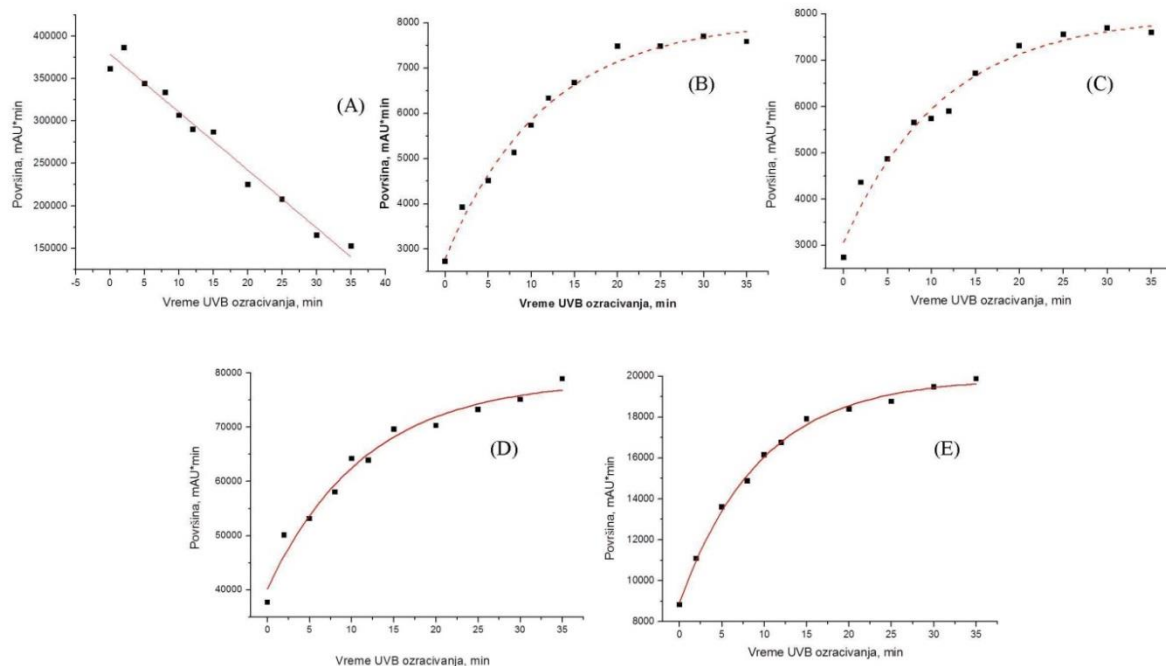
UHPLC/DAD-hromatogrami Chl-frakcije u vodi snimani na $\lambda_{det.} = 430$ nm, pre i za vreme kontinualnog UV-B ozračivanja ($t_{irr.}=0-35$ min), prikazani su na Slici 51. Prve tri detektovane komponente označene bojevima 1, 2 i 2', na $t_{ret.}=2.02, 2.22$ i 2.44 min, pripadaju jedinjenjima koja su u samoj frakciji egzistirala i pre primene UV-B zračenja. Identifikovane komponente su: OH-Chl a , Chl a i Chl a' , respektivno. Dva pika označena brojevima 4 i 4' ($t_{ret.}= 4.67$ i 5.14 min), takode su prisutna u Chl-frakciji koja nije izlagana dejstvu zračenja. Komponente koje nisu zapažene u hlorofilnoj frakciji pre izlaganja UV-B zračenju na $t_{ret.}$ 3.86 i 4.09 min su pikovi pod rednim brojem 3 i 3', respektivno. Promene na hromatogramima pri retencionim vremenima do 6.0 min prikazane su na Slici 51-A, B i C.





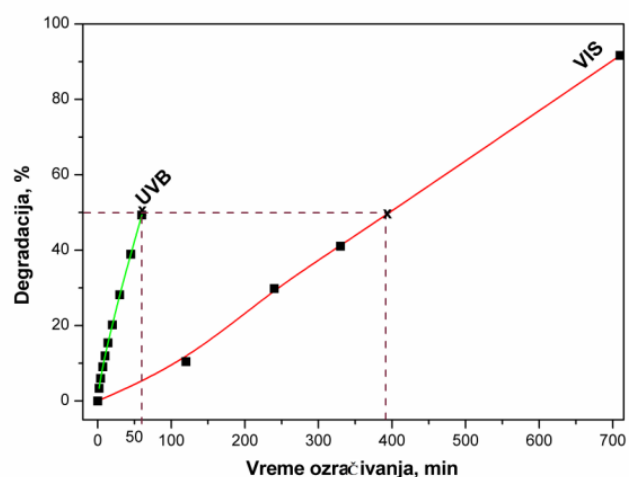
Slika 51. UHPLC/DAD hromatogrami Chl-frakcije pre i nakon primenjenog UV-B zračenja; $\lambda_{det.} = 430$ i 407 nm, snaga zračenja od 14 W/m^2 . Prikaz potpunog hromatograma sa uvećanim prikazom do 2.6 min (A), od 3.7 do 4.2 min (B) i od 4.2 do 5.4 min (C).

Trend rasta usled kontinuiranog UV-B ozračivanja primećen je kod OH-Pheoa i Pheoa (pri A_{max} Soret-ove trake od 409 i 407 nm, respektivno) (SI.52-B i D). Grafici odgovarajućih Chl-epimera (OH-Pheoa' i Pheoa' na $t_{ret.} = 4.09$ i 5.14 min, respektivno), pokazuju slično ponašanje sa trendom rasta (SI.52-C i E), dok Chla pokazuje očekivani trend opadanja usled porasta vremena ozračivanja (SI.52-A).



Slika 52. Dinamika promene površine pikova sa hromatograma prikazanog na Sl.51 (A) $t_{ret.}=2.22$ min Chla, (B) $t_{ret.}=3.86$ min, OH-Pheoa (C) $t_{ret.}=4.09$ min, OH-Pheoa', (D) $t_{ret.}=4.67$ min, Pheoa, (E) $t_{ret.}=5.14$ min, Pheoa'.

Dobijeni rezultati veoma su slični sa onima dobijenim nakon izlaganja vidljivoj svetlosti, s tim što je u slučaju ovog stresa opseg degradacije znatno veći, što se može videti sa **Slike 53**.



Slika 53. Degradacija Chla u vodi u funkciji perioda izlaganja kontinualnom dejstvu približno iste jačine vidljive svetlosti i UV-B zračenja (oko 14 W/m^2). Podaci su dobijeni sa UHPLC/DAD- hromatograma.

Rezultati hromatografske analize dobijeni nakon kontinualnog UV-B ozračivanja sa DAD-detekcijom, kao i MS-spektrometrijska analiza svih detektovanih komponenti u uzorcima, zajedno sa karakterističnim fragmentacionim pikovima (SI.33-34), prikazani su u **Tabeli 8.**

Tabela 8. Rezultati hromatografske analize ne- i UV-B ozračivane Chl-frakcije (DAD- u VIS oblasti i MS-detekcijom), kao i MS-detekcija ispitivanih uzoraka sa glavnim fragmentacionim pikovima u MS/MS spektrima.

Komponenta	$t_{ret.}$, min	Apsorpcioni maksimumi u mobilnoj fazi/ nm			Glavni fragmentacioni joni u MS/MS spektru			
		Soret	Q_y	$[M+H]^+$		m/z	^a Predložena struktura fragmentacionog jona	
				m/z	m/z izračunato			
2 Hlorofil <i>a</i> 2' Hlorofil <i>a'</i>	2.26 2.44	411	431	665	893.47	893.54	615 [MH-278] ⁺ (100%) 555 [MH-338] ⁺	[MH-C ₂₀ H ₃₈] ⁺ [MH-C ₂₀ H ₃₉ CO ₂ CH ₃] ⁺
3 OH- Feofitin <i>a</i> 3' OH- Feofitin <i>a'</i>	3.86 4.09	407	666	666	887.49	887.53	827 [MH-60] ⁺ 609 [MH-278] ⁺ 591,38 [MH-296] ⁺ 100%	[MH-CO ₂ CH ₃ -H] ⁺ [MH-C ₂₀ H ₃₈] ⁺ [MH- C ₂₀ H ₃₉ O] ⁺
4 Feofitin <i>a</i> 4' Feofitin <i>a'</i>	4.67 5.14	408	666	666	871.53	871.57	839 [MH-32] ⁺ 811 [MH-60] ⁺ 593 [MH- 278] ⁺ (100%) 533 [MH-338] ⁺ 460 [MH-411] ⁺	[MH-CH ₃ OH] ⁺ [MH-CO ₂ CH ₃ -H] ⁺ [MH-C ₂₀ H ₃₈] ⁺ [MH-C ₂₀ H ₃₉ CO ₂ CH ₃] ⁺ [MH-C ₂₀ H ₃₉ CO ₂ CH ₂ CH ₂ -CO- HOCH ₃] ⁺

a – Strukture predloženih fragmenata su literaturno podržane referencama Woolley *et al.* 1998, Lim, 2009; Hendry *et al.* 1987; Walker & Keely, 2004; Walker *et al.* 2002; Yoshitaka & Tamiaki, 2012.

4.3.6. KOMPARATIVNI PREGLED REZULTATA OKSIDACIONIH STRESOVA NA HLOROFIL / HLOROFILIN U VODENOM MEDIJUMU

Rezultati procenta degradacije hlorofila i hlorofilina u vodenom medijumu pri različitim koncentracijama i dejstvu primenjenih oksidacionih stresova prikazani su u **Tabeli 9**. Promena koncentracije hlorofilina nije bitno uticala na promenu njegove degradacije nakon dejstva oksidacionih stresova. Koncentracioni efekat je mnogo izraženiji kod hlorofila, pri čemu je pri većim koncentracijama (kada je mogućnost asocijativnog ponašanja Chl-molekula i formiranja agregata veća) ispoljen veći otpor prema fotooksidaciji (tj. fotodegradaciji i to, i u slučaju VIS i u slučaju UV-B kontinualnog ozračivanja); istovremeno je primećen manji otpor na hemijski oksidacioni stres (Fentonov sistem) i termalno inicirani stres (AAPH). Time se uočava da je mehanizam oksidacije ozračivanjem i delovanjem hemijskih agenasa drugačiji.

Procenat degradacije hlorofila koji se menja sa promenom koncentracije može biti dakle posledica asocijacije molekula. Apsorpcioni spektri hlorofila pokazuju „crveno pomeranje” u slučaju agregacije, što je fenomen karakterističan tek pri koncentracijama većim od 10^{-5} M (Kano *et al.* 2000; Katz *et al.* 1978). Pri ovim koncentracijama može doći do manjeg, dodatnog konjugacionog efekta. Kod hlorofilina povećanje koncentracije čak do 10^{-4} M nije uticalo na promenu položaja „crvene trake” spektra, što može ukazivati na to da do same agregacije molekula nije došlo, ili da se bar taj fenomen agregisanja molekula ne odvija kao u slučaju hlorofila. Hlorofilin ne poseduje fitilni lanac u svojoj strukturi što je jedan od mogućih razloga da do same agregacije ne dolazi s obzirom da je kod hlorofila agregisanje molekula npr. u nepolarnim rastvaračima posledica koordinacije između Mg-atoma jednog i karboksilne grupe iz položaja C-13³ i C-17³ drugog Chl-molekula, što je omogućeno odgovarajućom orijentacijom fitilnih lanaca ka molekulima rastvarača. Takođe, u slučaju hlorofilina ne dolazi do promene homogenosti ispitivanog vodenog medijuma pigmenta, što je posledica toga da je hlorofilin natrijumova so (**Sl.3**), te je njegova rastvorljivost u vodi u poređenju sa hlorofilom znatno bolja.

Najveća degradacija hlorofila nakon primene odabranih oksidacionih stresova u vodenom medijumu, primećena je nakon UV-B ozračivanja. Uticaj koncentracije na fotooksidacioni stres primećen kod hlorofila, nije primećen u slučaju hlorofilina, ukazujujući na to da se hlorofilin ne ponaša asocijativno poput hlorofila u vodenom medijumu, u istom opsegu koncentracija. Suprotno fotooksidaciji, stres izazvan Fentonovim reagensom i

termalnim inicijatorom pokazao je koncentracijski efekat; bar u prvom slučaju (Fentonov sistem) taj efekat podrazumeva verovatno povećanu aktivnost prisutnih ROS vrsta stvorenih u Fentonovoj reakciji.

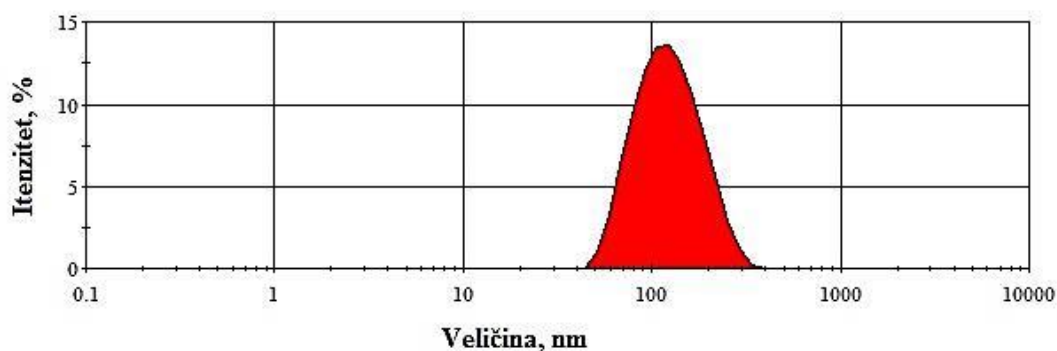
Tabela 9. Degradacija hlorofila i hlorofilina, (%), pri različitim koncentracijama u vodenoj sredini izazvana različitim oksidacionim stresovima.

Oksidacioni stres	Hlorofil			Hlorofilin		
	Koncentracija Chl, M	Degradacija pigmenta, (%), nakon 250 min Jačina zračenja, 14 W/m ²		Koncentracija Chlin, M	Degradacija pigmenta (%), nakon 250 min Jačina zračenja, 14 W/m ²	
VIS zračenje	5×10 ⁻⁶	40.00	17.56W/m ²	3×10 ⁻⁶	19.00	12.86W/m ²
	1×10 ⁻⁵	36.50		5×10 ⁻⁶	17.20	
	2.5×10 ⁻⁵	25.00		2.5×10 ⁻⁵	17.10	
UV-B zračenje	Koncentracija Chl, M	Degradacija pigmenta (%), nakon 60 min Jačina zračenja, 15W/m ²		Koncentracija Chlin, M	Degradacija pigmenta (%), nakon 60 min Jačina zračenja, 15 W/m ² .	
	5×10 ⁻⁶	75.81		5×10 ⁻⁶	31.59	
	8.5×10 ⁻⁶	70.04		8.5×10 ⁻⁶	31.23	
	2.5×10 ⁻⁵	49.33		1×10 ⁻⁵	31.10	
AAPH	Koncentracija Chl, M	Degradacija (%), nakon 100 min inkubacije		Koncentracija Chlin, M	Degradacija (%), nakon 100 min inkubacije	
		Koncentracija AAPH 1.6×10 ⁻³ M	Koncentracija AAPH 3.2×10 ⁻³ M		Koncentracija AAPH 1.6×10 ⁻³ M	Koncentracija AAPH 3.2×10 ⁻³ M
	2.5×10 ⁻⁶	24.30	31.81	3×10 ⁻⁶	/	62.62
	8×10 ⁻⁶	28.36	37.93	5×10 ⁻⁶	60.06	60.49
	1×10 ⁻⁵	34.99	51.09	1×10 ⁻⁵	55.59	60.16
	2.5×10 ⁻⁵	/	67.95	2.5×10 ⁻⁵	45.12	51.45
Fentonova reakcija	Koncentracija Chl, M		Degradacija (%), nakon 60 min reakcije	Koncentracija Chlin, M		Degradacija (%), nakon 60 min reakcije
	3×10 ⁻⁶		12.50	3×10 ⁻⁶		33.50
	5×10 ⁻⁶		18.70	5×10 ⁻⁶		42.00
	6×10 ⁻⁶		24.00	8×10 ⁻⁶		51.40
	5×10 ⁻⁵		45.00	1×10 ⁻⁵		55.07

4.4. OSOBINE I STABILNOST LIPOZOMNIH DISPERZIJA SA INKORPORISANIM HLOOROFILOM

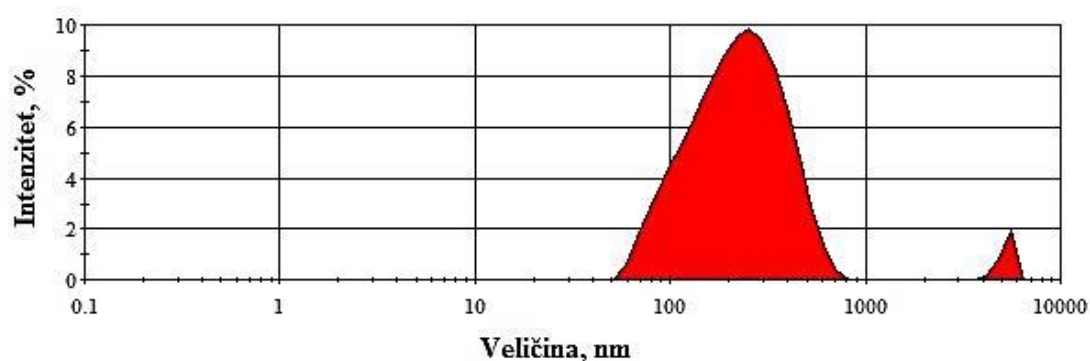
4.4.1. Određivanje veličine lipozoma, homogenosti i stabilnosti lipozomnih disperzija

Na **Slici 54** prikazan je raspored veličine čestica lipozoma u svežoj lipozomnoj disperziji nakon pripreme, dok je na **Slici 55** prikazan raspored veličine čestica lipozoma nakon 9 meseci čuvanja.



Slika 54. Raspored veličine čestica lipozoma nakon pripreme lipozomne disperzije.

Prosečna vrednost veličine kapi svežih lipozomnih disperzija, dobijena nakon tri uzastopna merenja iznosila je 110 nm (**Sl.54**), a nakon stajanja 213 nm, što ukazuje na efekat agregacije lipozoma u krupnije čestice usled stajanja lipozomne disperzije (**Sl.55**).



Slika 55. Raspored veličine čestica lipozoma nakon 9 meseci čuvanja lipozomne disperzije.

Merenja su pokazala da SUV lipozomne disperzije spadaju u monodisperzne. Poludisperzni indeks kod tek pripremljenih lipozoma iznosio je 0.11 (velika stabilnost), dok je kod istih lipozoma nakon 9 meseci stajanja iznosio 0.34. Niske vrednosti indeksa polidisperziteta potvrđuju veliku homogenost uzoraka.

Vrednosti izmerenog Zeta potencijala (-41,1 mV) za sveže uzorke svrstavaju lipozomne disperzije u stabilne, dok je kod disperzije čuvane 9 meseci (-24,9 mV), izmereni Zeta potencijal potvrdio blagu aglomeraciju.

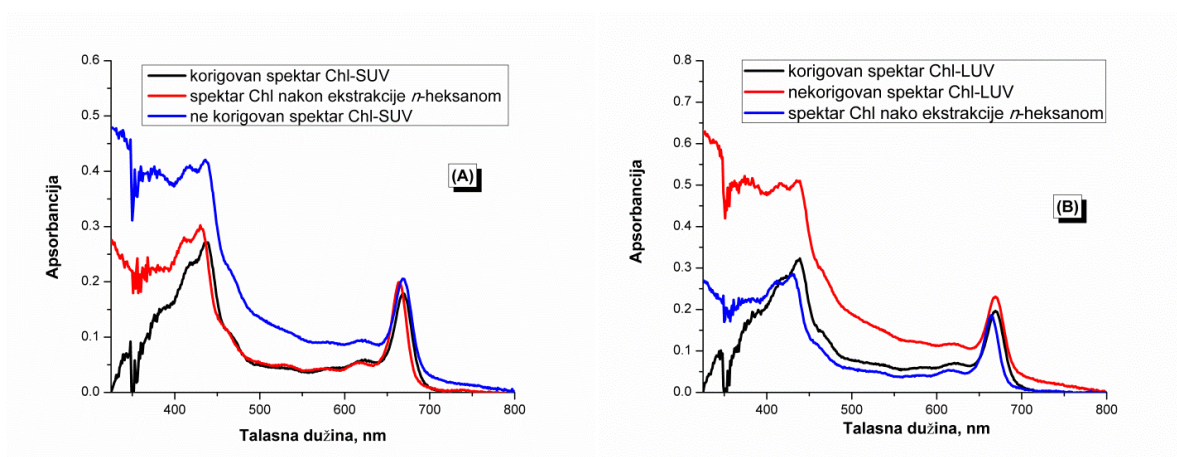
Metoda ekstrudiranja koja je primenjena za dobijanje lipozoma definisanih veličina na osnovu prikazanih merenja može se smatrati efikasnom metodom.

4.4.2. Metoda normalizacije apsorpcionih spektara lipozomnih disperzija i provera njene validnosti

Korekcija bazne linije je urađena kod svih snimljenih UV-VIS spektara lipozomnih disperzija (sa i bez inkorporisanih hlorofila) zbog rasipanja svetlosti koje je karakteristika nehomogenih, ili heterogenih sistema. Korekcija vrednosti apsorpcije je izvršena primenom jednačine (Dragusin *et al.* 2010; Moore, 1962):

$$(AB_{\lambda})_{korigovana} = (AB_{\lambda})_{izmerene} - (AB_{325})_{izmerene} \times (325/\lambda)^4 \quad (19)$$

Bazna linija je zbog rasipanja svetlosti drugačija u slučaju MLV, LUV i SUV lipozoma i ta razlika je reda veličine od 50-70 nm. Razlike u izgledu bazne linije takođe potvrđuju i razlike u veličini obrazovanih lipozoma u toku njihove pripreme (Barbinta-Patrascu & Tugulea, 2005). Radi provere ispravnosti primenjenih korekcionih jednačina izvršeno je ekstrahovanje sadržaja iz lipozoma sa inkorporisanim hlorofilima. Ekstrakcija je izvršena sistemom organskih rastarača (*n*-heksan/izopropanol) nakon razaranja lipozoma. Razaranje lipozoma je postignuto izopropanolom dok je ekstrakcija hlorofila vršena *n*-heksanom. Spektri lipozoma sa inkorporisanim hlorofilima u slučaju SUV- & LUV-DPPC lipozoma bez primenjene korekcije, nakon izvršene korekcije i nakon ekstrakcije hlorofila (spektar snimljen u odnosu na blank, tj. *n*-heksan), su prikazani na **Slici 56-A i B**, respektivno.



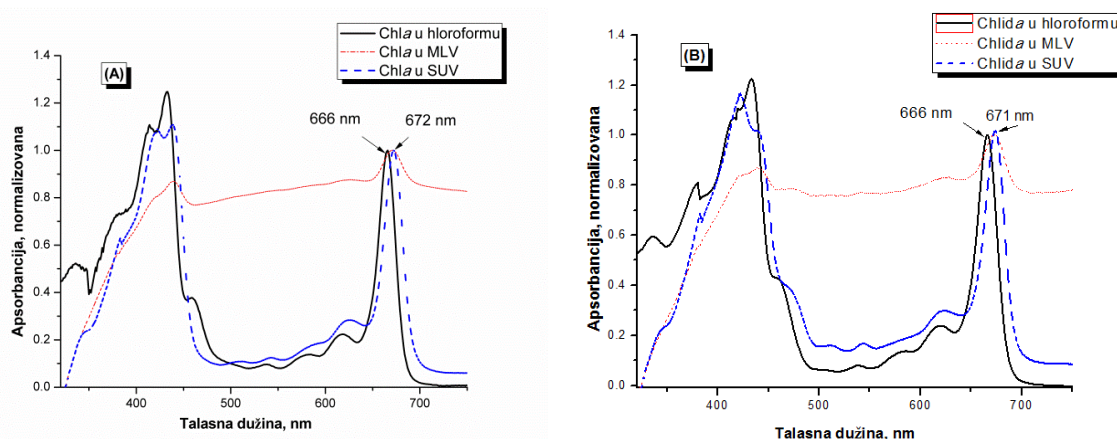
Slika 56. UV-VIS spektri SUV (A) i LUV (B) -DPPC lipozoma sa inkorporisanim hlorofilom bez primenjene korekcije, nakon izvršene korekcije i nakon ekstrakcije hlorofila iz lipozoma.

Na osnovu snimljenih UV-VIS spektara, uočena je neznatna razlika u intenzitetu „crvene trake” spektra (Q_y - traka) snimljenog u *n*-heksanu i u lipozomnom medijumu nakon izvršene korekcije, (<10%), što datu korekcionu metodu opravdava u daljem korišćenju.

4.4.3. Komparativna spektroskopska ispitivanja na sistemima lipozoma sa inkorporisanim hlorofilom i njegovim derivatom hlorofilidom

Kako bi se utvrdila preciznija pozicija hlorofila u lipozomima, izvršeno je međusobno poređenje *Chla* i *Chlida* koji su inkorporisani u lipidni dvosloj dva različita tipa lipozoma, SUV i MLV. Pri tom treba imati u vidu da ove frakcije pored *Chla* i *Chlida* sadrže i druge *Chl*-derivate, ali u manjoj meri. Prisustvo ili odsustvo fitilnog repa koji je prisutan u strukturi hlorofila (**Sl.1**) predstavlja glavni strukturni faktor koji je odgovoran za ponašanje dva posmatrana pigmenta u lipozomima. Spektralne karakteristike i inteziteti posmatranih traka (apsorpcionih i fluorescentnih), pokazuju varijacije u zavisnosti od tipa lipozoma i inkorporisanih pigmenata, *Chla* i *Chlida*. Ovo ukazuje na uticaj različitih lokacija inkorporisanih pigmenata i njihovih sastavnih delova u lipozomima na njihovo spektralno ponašanje.

Apsorpcioni VIS spektri *Chla* (A) i *Chlida* (B), inkorporisanih u DPPC lipozome (MLV i SUV lipozome), prikazani su na **Slici 57**.

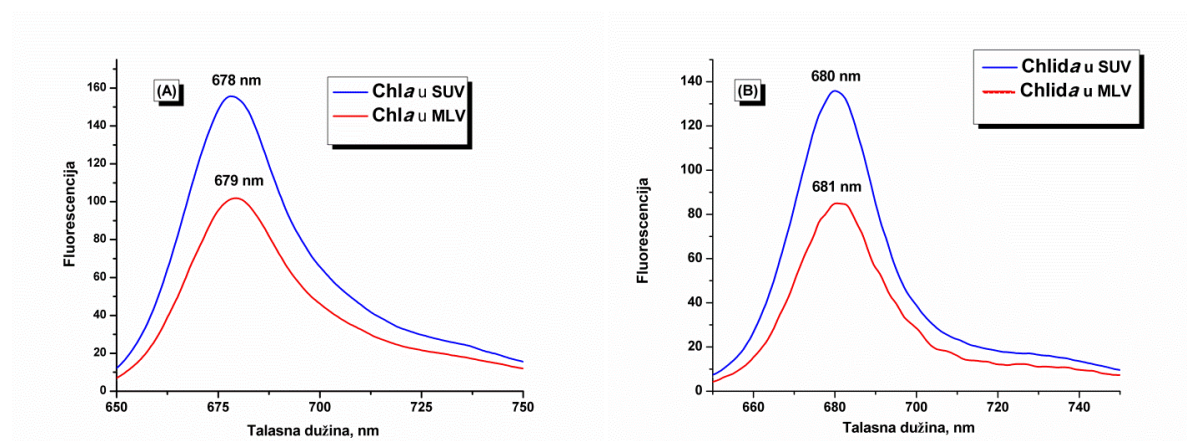


Slika 57. VIS apsorpcioni spektar *Chla* (A) i *Chlida* (B), inkorporisanog u DPPC lipozome (pigment/lipid=1/100). Spektri su korigovani zbog rasipanja svetlosti upotrebom jednačine iz poglavlja 4.4.2.–j-na 19, a vrednosti apsorpcije su normalizovane prema maksimumu apsorpcije „crvene trake”.

Sa **Slike 57** može se primetiti da je apsorpcioni maksimum Q_y traka *Chla* i *Chlida* inkorporisanih u SUV i MLV lipozome, pomeren batohromno u odnosu na maksimum Q_y trake u hloroformu (666-672 nm za *Chla*, tj. 666-671 nm za *Chlida*). Dato pomeranje u spektrima pigmenata inkorporisanih u lipozome je verovatnije posledica promene okruženja pigmenata u kojem su porfirinska jezgra locirana između polarnih glava lipida na površini

lipid-voda, pre nego formiranja njihovih agregatnih formi. Koncentracija inkorporisanih pigmentata je reda veličine 10^{-6} M, pri kojoj su pigmenti prisutni u „monomernom” obliku, ne samo u polarnim rastvaračima poput vode već i u nepolarnim, poput *n*-heksana (Zvezdanović *et al.* 2009). Apsorpcioni maksimum Q_y trake hlorofila je batohromno pomeren u vodenom medijumu ili visoko organizovanim strukturama poput pigment-proteinskih kompleksa tilakoida gde hlorofili egzistiraju u vidu agregata – 679 nm (Santabarbara, 2006; Cherry *et al.* 1971). Tako se može smatrati da je promena A_{max} vrednosti posledica inkorporacije pigmentata unutar lipozoma (SI.57).

Fluorescentni spektri Chla i Chlida, inkorporisanih u MLV i SUV-DPPC lipozome su prikazani na Slici 58. Fluorescencija Chla i Chlida u lipozomnim disperzijama je merena pri istim uslovima. Maksimalna talasna dužina Soret-ove trake je korišćena kao ekscitaciona talasna dužina za sve fluorescentne spektre. Chla i Chlida su upotrebljeni kao molekularni senzori u svim fluorescentnim eksperimentima.

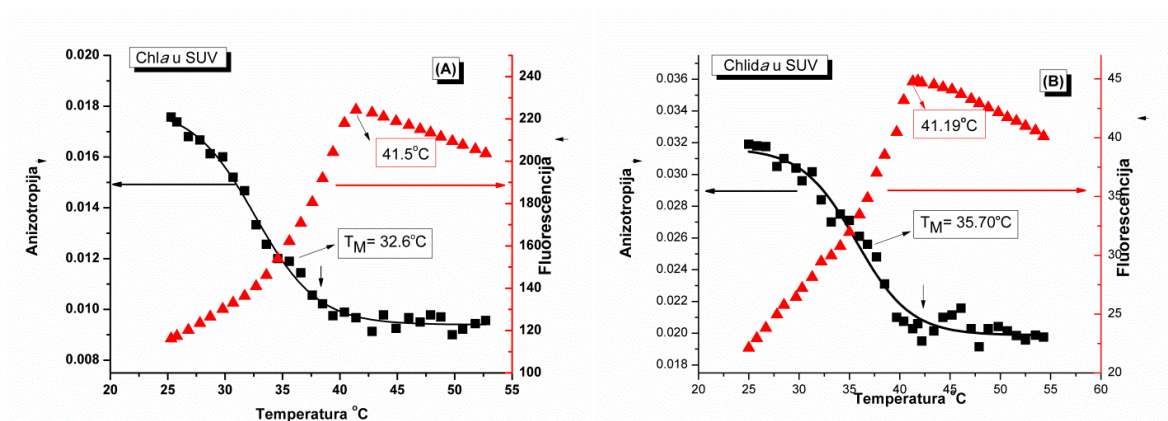


Slika 58. Fluorescentni spektri Chla (A) i Chlida (B), inkorporisanih u MLV i SUV-DPPC lipozome.

Pomeranje fluorescentnih maksimuma (F_{max}) ka „crvenoj” oblasti spektra primećeno jenakon inkorporacije pigmentata u lipozome u poređenju sa spektrima koje dati pigmenti imaju u rastvoru (u hloroformu pri koncentraciji 10^{-6} M). „Crveno pomeranje” kod fluorescentnih spektara može biti objašnjeno time da same fluorofore (porfirinska „jezgra” Chla i Chlida) „osećaju” polarniju sredinu i time doprinose pomeranjima u spektru ka većim talasnim dužinama (Țugulea & Pascanu, 1996). Poznato je da je Chla u lipozomima prisutan i na površini lipozomne strukture, sa vodenom fazom u blizini polarnih glava, kao i u hidrofobnom lipidnom regionu sastavljenom od lipidnih lanaca, unutar koga je inkorporisan fitilni lanac (Patrascuet *al.*2010). „Crveno pomeranje” u fluorescentnom spektru je izraženije

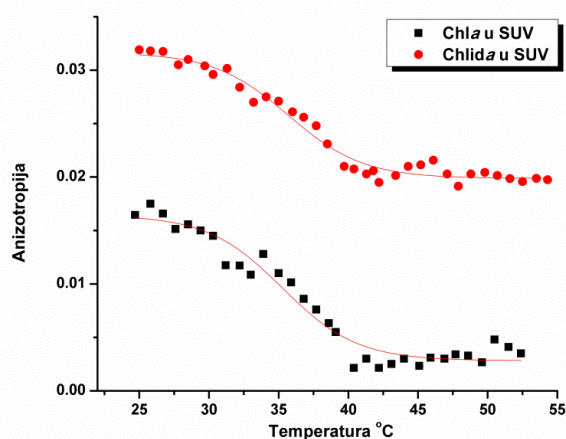
u slučaju Chlida, što potvrđuje da Chlida bolje „prepoznaje” polarni deo lipidnog dvosloja u poređenju sa Chla koji penetrira dublje u lipidni dvosloj zahvaljujući svom hidrofobnom lipidnom fitilnom lancu.

Fazni prelazi u Chla-SUV-DPPC i Chlida-SUV-DPPC lipozomima, su prikazani na Slici 59, kao odnos fluorescentne anizotropije i fluorescencije prema temperaturi.



Slika 59. Fazni prelazi u Chla-SUV-DPPC (A) i Chlida-SUV-DPPC (B) lipozomima.

Vrednosti fluorescentne anizotropije za Chla u lipozomima su snimane na $\lambda_{em.} = 678$ nm, korišćenjem ekcitacionog zraka od 430 nm ($\lambda_{exc.} = 430$ nm). Odgovarajuće vrednosti za Chlida u lipozomima su: $\lambda_{em.} = 680$ nm i $\lambda_{exc.} = 436$ nm. Za svako pojedinačno merenje je računat G-faktor (odnos između senzitivnosti detekcionog sistema za horizontalnu i vertikalnu polarizovanu svetlost).



Slika 60. Uporedni prikaz zavisnosti fluorescentne anizotropije u odnosu na promenu temperature za Chla/Chlida SUV lipozome.

Uporedni prikaz vrednosti fluorescentne anizotropije u zavisnosti od promene temperature za Chla-SUV liposome i Chlida-SUV liposome, prikazan je na **Slici 60**. Hlorofil *a* koji je inkorporisan u liposome pokazuje manji stepen fluorescentne anizotropije u poređenju sa izmerenim podacima dobijenim za Chlida (**Sl.60**). Ova činjenica ukazuje na to da Chla bolje „oseća” fleksibilno mikrokruženje unutar lipidnog dvosloja lipozoma preko inkorporisanog fitilnog lanca. Sa druge strane, Chlida koji je pretežno lociran u blizini polarnih glava lipozoma, „oseća” rigidnije okruženje.

Varijacije fluorescentne anizotropije pigmenata inkorporisanih u DPPC dvoslojeve lipozoma mogu se podeliti u tri regiona ili oblasti:

- ❖ region sa višim vrednostima fluorescentne anizotropije pri temperaturama nižim od 28°C. Na datim temperaturama ispod navedene su DPPC lipidni dvoslojevi prisutni u gel-fazi koja je kompaktnija i rigidnija.
- ❖ region sa opadajućim vrednostima fluorescentne anizotropije u temperaturnom intervalu između 28-40°C, gde pigmenti „osećaju” obe lipidne faze, gel fazu i fazu tečnog kristala. Ponašanje u oba slučaja teži ka kooperativnosti u tranziciji iz jedne faze u drugu.
- ❖ region sa manjim vrednostima fluorescentne anizotropije, počev od temperature veće od 41°C. Temperatura faznog prelaza DPPC lipida je u intervalu od 41-42°C (Hoshina, 1981).

Slika 59 takođe pokazuje sličnu zavisnost fluorescencije od temperature u slučaju oba pigmenta. Porast fluorescencije pigmenata u temperaturnom opsegu 28-41°C, može se objasniti smanjenjem fluorescentnog „gašenja” (quenching-a): fluorofore, tj. pigmenti mogu mnogo lakše promeniti njihov položaj ukoliko su u fleksibilnoj sredini, a posledica toga je smanjenje efikasnosti „gašenja” fluorescencije. Koncentracija pigmenata nije dovoljno visoka kako bi se mogao objasniti uticaj koncentracije na proces „gašenja” fluorescencije, ali rigidna okolina može uticati na transfer energije između molekula Chla, tj. molekula Chlida. Slab porast fluorescencije nakon temperature faznog prelaza lipida (41-42°C), označava novu uređenost pigmenata usled pojave nove faze u lipidnom dvosloju.

Efekat kvercetina

Fluorescencija Chla u lipozomnim sistemima je merena i u prisustvu kvercetina u koncentracionom opsegu 0-100 µmol (**Sl.61**). Kvercetin, QCT, predstavnik klase flavonoida

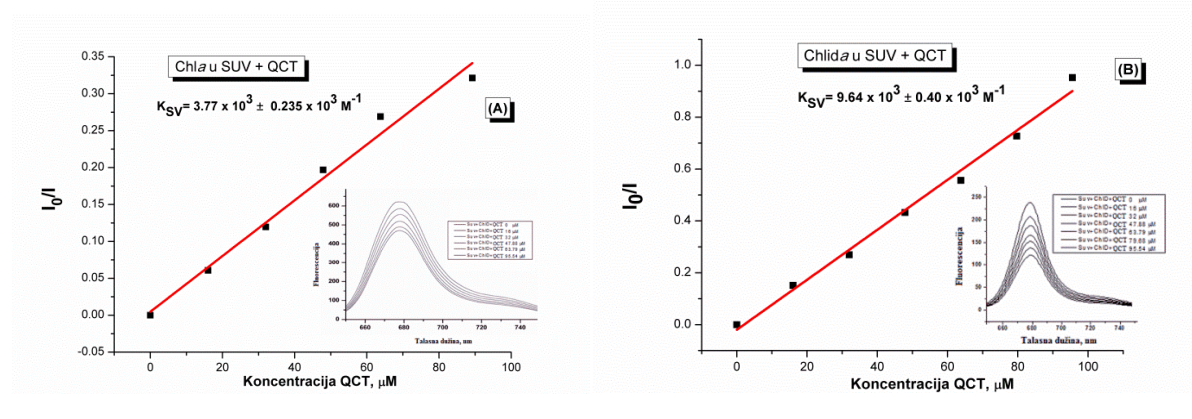
(3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon) je dobro poznat po svojim antioksidativnim aktivnostima (Cvetkovic & Markovic, 2011), ali je za svrhu ovih ispitivanja izabran zbog svoje sposobnosti quenching-a fluorescentne emisije hlorofila. Poznato je da se molekul flavonoida locira, bilo u hidrofobnoj sredini ili u polarnom regionu lipidnog dvosloja, u zavisnosti od vodonične veze hidroksilnih grupa. Podaci o fluorescenciji, anizotropiji i dinamici procesa quenching-a daju dublji uvid o lokalizaci QCT u lipidnim membranama, kao i stepenu rigidnosti / fluidnosti njegovog okruženja. Generalno, dodatak QCT dovodi do quenching-efekta pigmentne fluorescencije. U oba slučaja je Stern-Volmer-ov grafik potvrđivao linearnost.

Efekat quenching-a kvercetina (QCT), na fluorescenciju Chla ili Chlida se odvija prema Stern-Volmer-ovoj jednačini (Lakowicz *et al.* 1983):

$$\Phi_0/\Phi = I_0/I = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (20)$$

Gde su:

- I_0 , vrednost intenziteta fluorescencije u odstustvu quencher-a,
- I , vrednost intenziteta fluorescencije u prisustvu quencher-a,
- $K_{SV} = K_q \tau_0$, Stern-Volmer-ova konstanta;
- τ_0 , vreme života (trajanja) fluorescencije u odsustvu quencher-a (QCT);
- $[Q]$, koncentracija quencher-a (QCT);
- K_q , bimolekularna quenching konstanta.



Slika 61. Stern-Volmer-ovi grafici za Chla (A) i Chlida (B), inkorporisane u SUV lipozome. Fluorescentni spektri hlorofila i hlorofilida u funkciji koncentracije QCT kao quencher-a prikazani su u inkrementu slike.

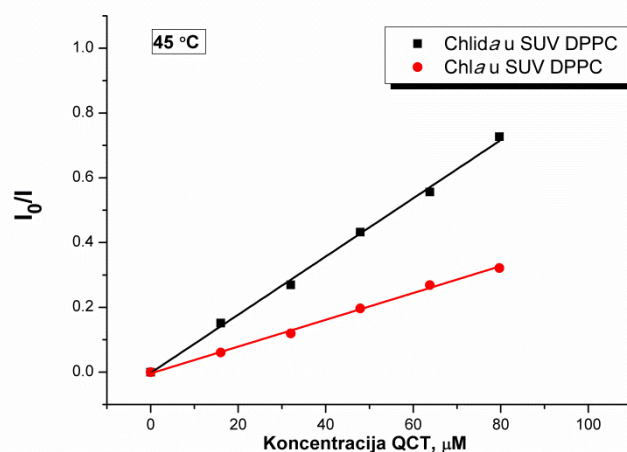
Linernost Stern-Volmer-ovog grafika pokazuje da su sve fluorofore podjednako dostupne kvercetin u kao quencher-u. Ukoliko su prisutne dve različite fluorofore i jedna nije dostupna quencher-u, Stern Volmer-ovi grafici bi odstupali od linearnosti prema x-osi.

Izračunate vrednosti Stern-Volmer-ovih konstanti, prikazane su u **Tabeli 10**. Ukoliko uzmemo u obzir vrednost od 5.7 ns za τ_0 (Sterpone *et al.* 2009), izračunate vrednosti bimolekularnih quenching-konstanti su:

Tabela 10. Vrednosti Stern-Volmer-ovih konstanti za Chla i Chlida u SUV lipozomima.

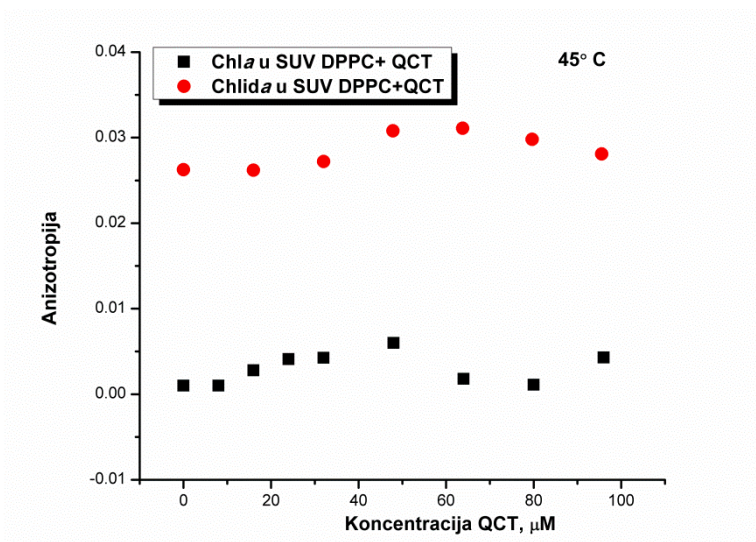
	Chla-SUV	Chlida-SUV
K_{SV}	$3.77 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$	$9.64 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$
$K_q (K_{SV}/\tau_0)$	$6.61 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$1.69 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

Obe proračunate vrednosti quenching konstanti su veće za Chlida u poređenju sa Chla. Obe K_q su istog reda veličine kao što je literaturom navedeno za porfirine koji su u vodenim rastvorima: $K_q = (2.3-2.6) \times 10^{11} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Ricchelli, 1991). Ova činjenica govori o tome da su pigmenti, dostupni quencher-u (tj. kvercetin u), lokalizovani u spoljašnjem regionu lipidnih dvoslojeva. Promene u apsorpcionim i fluorescentnim spektrima Chla ili Chlida nisu primećene u lipozomima u odnosu na koncentraciju QCT.



Slika 62. Komparativni prikaz Stern-Volmer-ovih grafika za Chla i Chlida, inkorporisane u SUV lipozome.

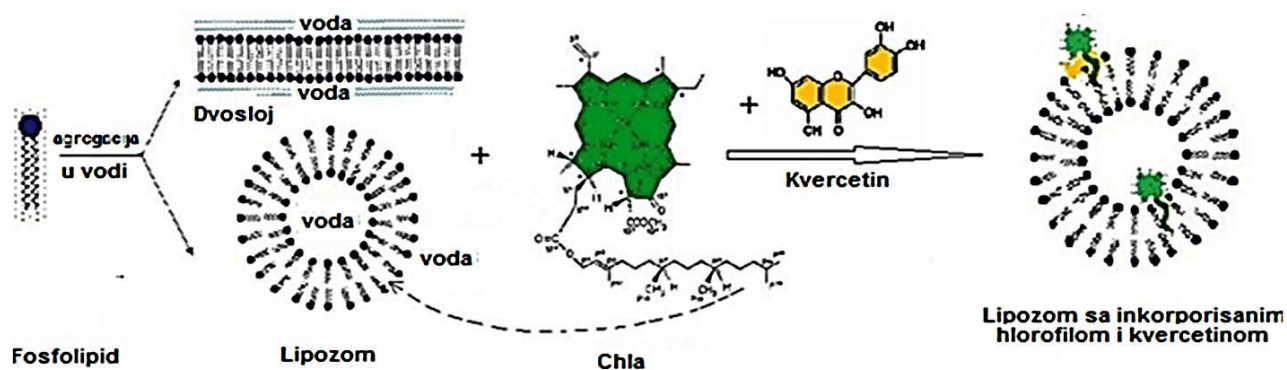
Uporedni prikaz Stern-Volmer-ovih grafika za Chla i Chlida, u SUV lipozomima je dat na **Slici 62**.



Slika 63. Zavisnost fluorescentne anizotropije u Chla/Chlida-SUV lipozomima od koncentracije kvercetina.

Dodatak QCT u oba tipa lipozomnih sistema (SUV-DPPC sa Chla ili Chlida) rezultira porastom fluorescentne anizotropije u koncentracionom rasponu 0-50 μM . Vrednost od ~50 μM na neki naćin predstavlja kritiĉnu koncentraciju QCT za lipidne dvoslojeve u lipozomnim sistemima (Dragusin *et al.* 2010).

Na osnovu svih rezultata dobijenih za sisteme lipozoma sa Chla, moŹe se predvideti i Źematski ilustrovati pozicija Chla i kvercetina u lipozomima (**Źema 1**).

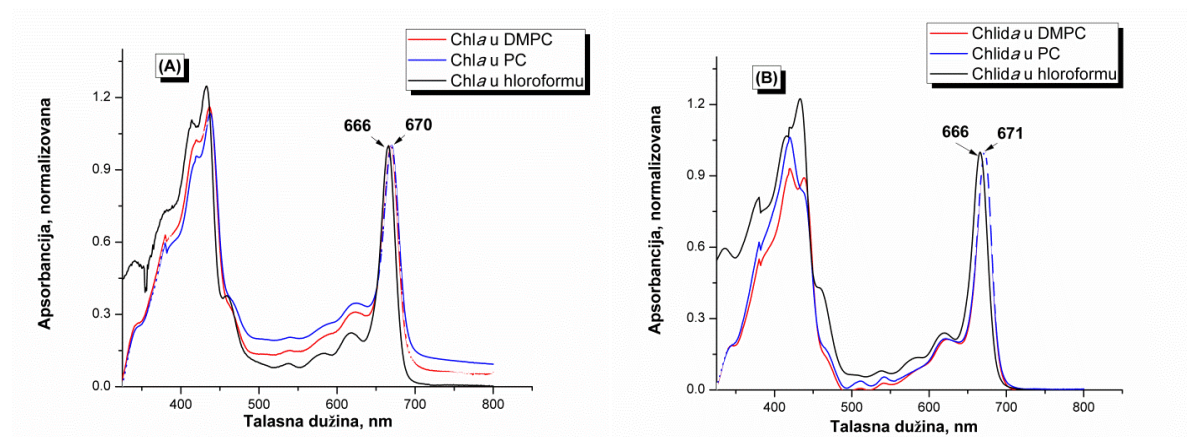


Źema 1: Inkorporacija Chla i kvercetina u lipidni dvosloj membrana lipozoma.

4.4.4. Ispitivanje uticaja strukture lipida na mikrookruženje inkorporisanog hlorofila/hlorofilida

U cilju ispitivanja mogućeg uticaja mikrookruženja lipozoma, koje prvenstveno zavisi od hemijskog sastava lipida tj. masnokiselinskih grana lipida (**ANEX**), praćene su promene u spektralnim karakteristikama (apsorpcija i fluorescencija) inkorporisanih Chla i Chlida u SUV lipozomima različitog hemijskog sastava. Odabrana dva strukturno različita lipida jesu zasićeni DMPC lipid i PC smeša lipida koja u svom sastavu sadrži pored zasićenih i nezasićene lipide.

Apsorpcioni VIS spektri SUV lipozoma napravljenih od DMPC i PC smeše lipida sa inkorporisanim Chla odnosno Chlida prikazani su na **Slici 64-A i B**, respektivno. Na osnovu apsorpcionih i fluorecentnih spektara DPPC lipozoma sa inkorporisanim Chla i Chlida (Milenkovic *et al.* 2013), dokazana je lokalizacija porfirinskog jezgra pigmenta na površini lipid-voda u blizini polarnih glava. Ovakav zaključak je potvrđen i u slučaju lipozoma napravljenih od DMPC i PC smeše lipida za oba pigmentna jedinjenja, s obzirom na to da je pomeranje od 4 i 5 nm u odnosu na spektar pigmenta u hloroformu zapaženo u oba slučaja (**Sl.64, Tabela 11**).

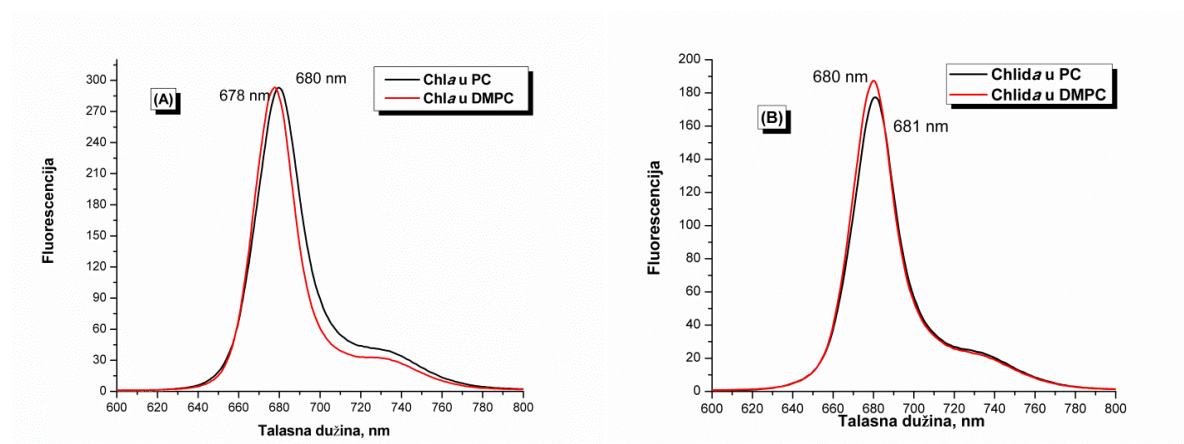


Slika 64. VIS apsorpcioni spektar Chla (A) i Chlida (B), inkorporisanih u DMPC i PC lipozome (pigment/lipid=1/100). Spektri su korigovani zbog rasipanja svetlosti upotrebom jednačine iz poglavlja 4.4.2., j-na 19, a vrednosti apsorpcije su normalizovane prema maksimumu apsorpcije „crvene trake”.

Inkorporacija Chla i Chlida u DMPC i PC lipozome nije dala značajnije razlike u odnosu na one dobijene za DPPC lipozome. Promene u hemijskom sastavu lipida nisu uticale na promenu A_{max} vrednosti za oba pigmenta Chla i Chlida (670 nm i 671 nm – **Sl.64-A i B**,

respektivno). Očito je da je promena molekularnog okruženja od neorganizovanog rastvora do organizovanih struktura lipozoma imala veći uticaj u odnosu na promene u hemijskom sastavu lipida. Drugim rečima, promene fizičkog stanja unutrašnjosti lipozoma, odnosno razlike u fluidnosti uslovljene prisustvom zasićenog DMPC ili delom nezasićene PC lipidne smeše, nisu uticale na promene u vrednostima A_{max} oba inkorporisana pigmenta.

Fluorescentni spektri Chla i Chlida, inkorporisanih u SUV lipozome napravljene od DMPC i PC smeše prikazani su na **Slici 65**. Može se uočiti mali, ali ipak značajan pomeraj F_{max} vrednosti u slučaju oba tipa lipozoma – DMPC i PC – dok su intenziteti traka ostali gotovo isti (678 / 680 nm za Chla u DMPC i PC – **Sl.65-A**; 680/681 nm za Chlida u DMPC i PC – **Sl.65-B**).



Slika 65. Fluorescencija Chla (A) i Chlida (B), inkorporisanih u SUV-DMPC i -PC lipozomima.

Objašnjenje za ovakvo ponašanje je između ostalog i u razlikama hemijskih struktura dva inkorporisana pigmenta. Dok su oba porfirinska prstena locirana na površini lipid-voda u blizini polarnih glava lipida, fitilni lanac Chla je lociran u hidrofobnom regionu lipidnih lanaca što čini bitnu razliku u poređenju sa Chlida koji je lociran jedino u polarnom regionu lipidnog sloja. Hlorofil *a* preko svog fitilnog lanca bolje „oseća” promene u unutrašnjosti lipidnog dvosloja lipozoma, a posebno one uslovljene razlikama u hemijskoj strukturi lipida, u odnosu na Chlida, koji nema taj „senzor”. S druge strane iako je uticaj molekularnog okruženja potvrđen, promena hemijske strukture lipida utiče na izvesne promene koje nisu tako izražene. Za razliku od apsorpcionih merenja, jasni pomeraj F_{max} vrednosti je zabeležen kod oba inkorporisana pigmenta: u slučaju Chla, 678 nm u DMPC i 680 nm u PC-lipozomima; u slučaju Chlida, 680 nm u DMPC-i 681 nm u PC-lipozomima (**Sl.65-A** i **B**,

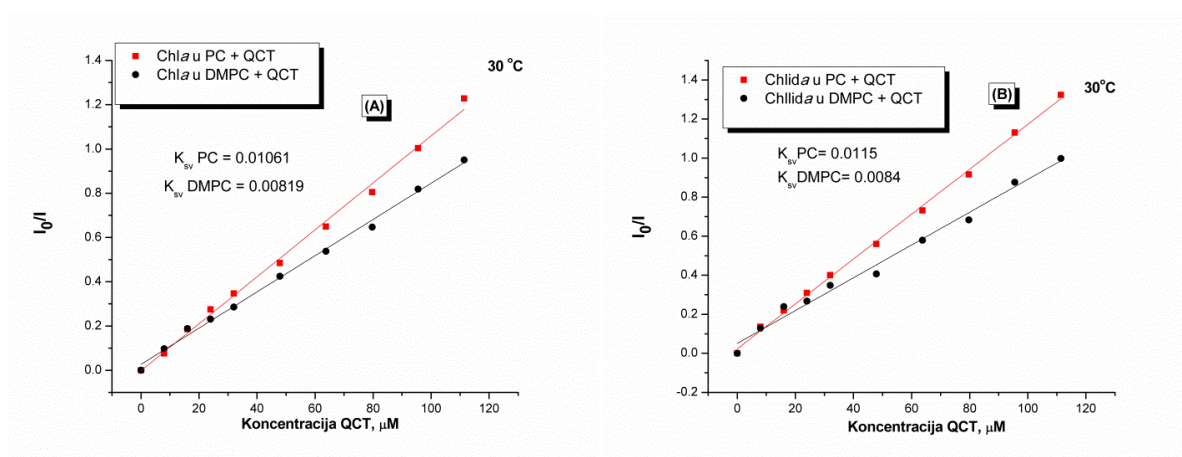
Tabela 11). Postavlja se pitanje da li je ovo pomeranje F_{\max} posledica promene hemijske strukture lipida.

Tabela 11. Vrednosti apsorpcionih i fluorescentnih maksimuma *Chla* i *Chlida* u lipozomima.

Lipid	ABS (A_{\max})		FL (F_{\max})	
	<i>Chla</i>	<i>Chlida</i>	<i>Chla</i>	<i>Chlida</i>
DMPC	670 nm	671 nm	678 nm	680 nm
PC	670 nm	671 nm	680 nm	681 nm

Generalno je poznato da veći procenat nezasićenih lipida utiče na bolju fluidnost lipidnog dvosloja, drugim rečima, promena hemijskog sastava lipida menja fizičko stanje lipidne okoline (Borstet *al.*2000; Rawicz *et al.* 2000). U slučaju smeše zasićenih i nezasićenih lipida, kao što je to slučaj sa smešom PC lipida, situacija je komplikovanija: lipidi u tom slučaju mogu biti organizovani u domene na bazi mogućnosti asocijacije (analogno domenima prisutnim u pojedinim ćelijskim membranama sfingofosfolipida i holesterola- (Lingwood & Simons, 2009; London, 2002). Ovo onda može uticati i na samu distribuciju pigmentata inkorporisanih u lipozome datih lipida. Na primer, u slučaju karotenoida (dobro poznatih antioksidanata i fotosintetskih pigmentata), polarni ksantofili su parcijalno isključeni iz pomenutih domena sastavljenih od zasićenih lipida, a uključeni u domene sastavljene od nezasićenih lipida (Wisniewska & Subczynski, 2006 a&b), dok je s druge strane nepolarni β -karoten distribuiran uniformno među domenima (Subczynski & Widomska, 2010). Tako i u slučaju različite strukture zasićenog DMPC u poređenju sa PC smešom kod koje pored zasićenih znatan udeo imaju i nezasićeni lipidi, pigmenti mogu biti selektivno raspoređeni u domenima PC-lipozoma (za razliku od DMPC-lipozoma).

Fluorescencija *Chla* i *Chlida* je praćena u DMPC- i PC-lipozomima u prisustvu QCT u koncentracionom opsegu 0-100 μ M (**SI.66-A i B**) na 30°C, kada su oba lipida u tečnoj fazi. Generalno, dodatak QCT dovodi do „quenching”-a pigmentne fluorescencije (Lakowicz, 1983). Kao sto se može videti na **SI.66**, u slučaju oba pigmenta zabeležena je linearnost Stern-Volmer-ovog grafika. Linearnost Stern-Volmer-ovog grafika ukazuje na to da su obe fluorofore (pigmenti) podjednako dostupne quencher-u, tj. kvercetinu.



Slika 66. Stern-Volmer-ovi grafici Chla (A) i Chlida (B) inkorporisanih u SUV-DMPC i -PC lipozomima.

Izračunate vrednosti Stern-Volmer-ovih konstanti su prikazane u **Tabeli 12**. Ukoliko uzmemo u obzir vrednost od 5.7 ns za τ_0 (Sterponeet *al.* 2009), izračunate vrednosti bimolekularnih quenching-konstanti su:

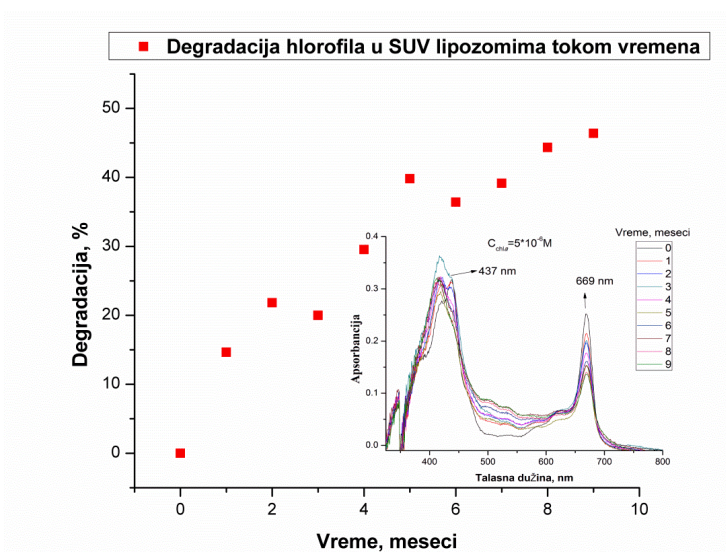
Tabela 12. Vrednosti Stern-Volmer-ovih konstanti za Chla i Chlida inkorporisane u lipozome.

30°C	SUV- PC		SUV- DMPC	
	Chla	Chlida	Chla	Chlida
K_{SV}	$10.61 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$	$11.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$	$8.19 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$	$8.40 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$
$K_q (K_{SV}/\tau_0)$	$2.16 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$	$2.35 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$	$1.67 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$	$1.71 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$

Konstante quenching-a, tj. „gašenja” fluorescencije su za nijansu veće za Chlida. Konstante K_q su najveće u PC smeši lipozoma, u odnosu na DMPC i DPPC lipozome (Milenkovic *et al.* 2013). Ovakav efekat može biti posledica veće penetracije pigmentata ali i kvercetina u dvosloj lipozoma. Ovaj efekat je takođe izraženiji kod DPPC lipozoma sa inkorporisanim pigmentima u odnosu na DMPC (Milenkovic *et al.* 2013) što može biti posledica različite dužine lanca lipida; lanci DPPC-lipida su duži u odnosu na DMPC-lipide što utiče i na drugačiju zakrivljenost sfere lipozoma. Ostaje nedoumica da li se proces quenching-a odvija na spoljašnjoj površini dvosloja, ili se energetski transfer može delimično dogoditi i u samom dvosloju lipozoma, što zavisi od fluidnosti dvosloja koja je najveća kod lipozoma PC-lipidne smeše.

4.5. Ispitivanje vremenske stabilnosti hlorofila u lipozomima apsorpcionom VIS spektroskopijom

Na **Slici 67** su prikazani apsorpcioni spektri Chl-frakcije inkorporisane u SUV-DPPC lipozome, snimani u periodu od 9 meseci, što reflektuje vremensku stabilnost datih uzoraka. U toku tog perioda zabeležen je manji procenat degradacije hlorofila u odnosu na degradaciju hlorofila u vodenoj sredini (**Sl.28**). Na osnovu vrednosti apsorpcionih maksimuma „plave” i „crvene” trake spektra nije uočen efekat „asocijativnog” ponašanja hlorofila pri koncentraciji od $5 \times 10^{-6} \text{M}$. Pojava agregata u sistemima lipozoma detektovana je pri većim koncentracijama Chla, tj. pri manjem odnosu lipida prema hlorofilu (Hoshina, 1981). U ovom slučaju Chl-molekuli se bliže orijentišu jedni prema drugima stvarajući agregate, što se primećuje kroz formiranje trake u oblasti od 684–686 nm (Lee, 1975; Murata & Sato, 1978). Stvaranje agregata Chla u vidu dihidrata, karakterističnim za vodene sisteme, takođe nije detektovano u Triton-X micelarnim sistemima, onda kada je koncentracija triton-X-a prelazila kritičnu micelarnu koncentraciju – CMC koncentraciju (Chibisov *et al.* 2003).



Slika 67. Degradacija hlorofila inkorporisanog u SUV-lipozome u periodu od 9 meseci sa odgovarajućim apsorpcionim spektrima prikazanim u inkrementu slike.

„Zaštitni efekat” koji lipozomi pružaju inkorporisanim bioaktivnim jedinjenjima poput hlorofila (Tollin, 1991) primećen je i u ovoj studiji, čime je dokazana veća stabilnost Chla (manji stepen degradacije) kada je inkorporisan u lipozome, u odnosu na vodeni medijum. Ova konstatacija je pogotovo od značaja za kozmetičko-farmaceutske preparate sa hlorofilom kao bioaktivnim sastojkom, u kojima stabilnost hlorofila kao i njegovih derivata,

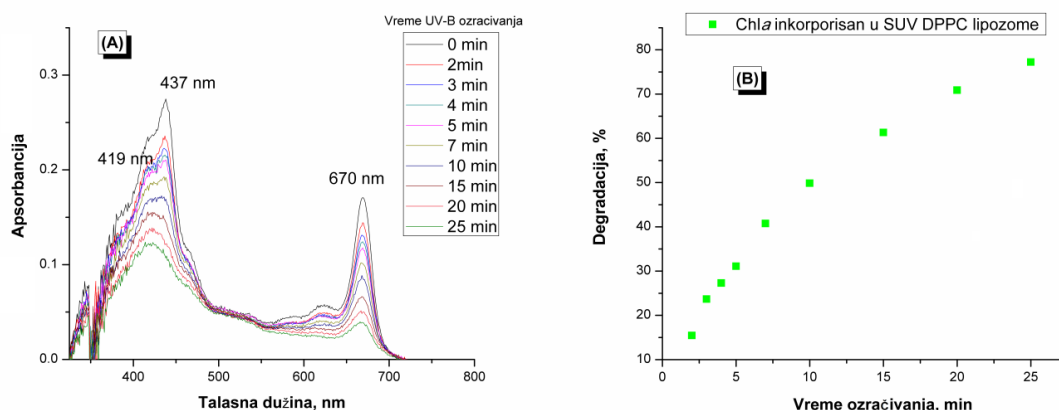
treba biti očuvana tokom dužeg vremenskog perioda. Degradacija hlorofila koja se tokom vremena dešava manifestuje se prvenstveno hipohromnim opadanjem Q_y trake, kao i smanjenjem odnosa apsorbancija na 437 i 419 nm u „plavom” delu spektra.

4.6. ANALIZA DEJSTVA OKSIDACIONIH STRESOVA NA HLOROFIL INKORPORISAN U LIPOZOME

U cilju procene nekih mogućih mehanizama uključenih u dati oksidacioni stres, pored već predstavljenih metoda, rađeni su tzv. peroksidni testovi: test konjugovanih diena i TBA-MDA test. Oba testa zasnivaju se na kvantitativnoj detekciji stvorenih lipidnih peroksida (tokom datog oksidacionog stresa).

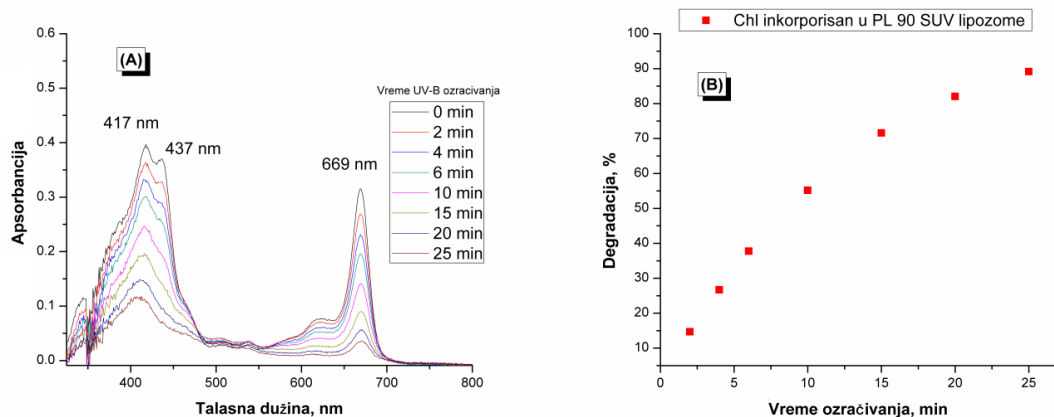
4.6.1. Analiza apsorpcionih spektara hlorofila inkorporisanog u lipozome nakon UV-B oksidacionog stresa

Na Slikama 68-A i 69-A prikazane su promene apsorpcionih spektara Chl-frakcije inkorporisane u SUV-DPPC lipozome i SUV-PL-90 lipozome, respektivno, prilikom kontinualnog UV-B (300 nm) ozračivanja u toku različitih, rastućih vremenskih perioda.



Slika 68. Apsorpcioni spektri SUV lipozoma dobijenih od DPPC fosfolipida sa inkorporisanim hlorofilima pri različitim vremenima UV-B ozračivanja (A), i degradacija hlorofila u SUV-DPPC lipozomima u odnosu na vreme UV-B ozračivanja (B). Lipozomi odgovarajuće veličine su dobijeni metodom tankog filma ekstrudiranjem. Koncentracija lipida bila je 5×10^{-4} M. Koncentracija hlorofila u konačnoj zapremini lipozomne disperzije bila je 5×10^{-6} M.

Procenat bleaching-a, tj.degradacije hlorofila inkorporisanog u lipozome računat je, kao i kod ocene bleaching-a u vodenom medijumu, upotrebom maksimuma apsorpcije Q_y -trake ($A_{Q_y, \max}$).



Slika 69. Apsorpcioni spektri SUV lipozoma dobijenih od PL-90 fosfolipida sa inkorporisanim hlorofilima pri različitim vremenima UV-B ozračivanja (A), i rast procenta degradacije hlorofila u SUV-PL-90 lipozomima u odnosu na vreme UV-B ozračivanja (B). Lipozomi su dobijeni metodom tankog filma (ekstrudiranjem). Koncentracija lipida bila je 5×10^{-4} M. Koncentracija hlorofila u konačnoj zapremini lipozomne disperzije bila je 5×10^{-6} M.

Procenat degradacije je predstavljen u funkciji vremena ozračivanja ($t_{irr.}$) pri konstantnim vrednostima koncentracije hlorofila inkorporisanog u lipozome kao i pri konstantnoj koncentraciji lipida. Grafici degradacije hlorofila u SUV-DPPC i SUV-PL-90 lipozomima, prikazani su na **Slikama 68-B i 69-B**, respektivno. Na osnovu **Slike 68-A** može se zapaziti da je degradacija hlorofila dejstvom UV-B zračenja veća u lipozomima nego u vodenom medijumu (**Sl.50-A**) za istu koncentraciju pigmenta. Prilikom ispitivanja degradacije inkorporisanog hlorofila u LUV-DPPC lipozome (veličine 400 nm), pri istim uslovima stresa, dobijeni su slični rezultati (bez prikaza), pri čemu se može konstatovati da promena u veličini lipozoma od 100 na 400 nm nije bitno uticala na degradaciju hlorofila izazvanu UV-B zračenjem, što indirekto može ukazivati na sličnu lokaciju hlorofila u lipozomim vezikulama. Sa **Slika 68-A i 69-A**, mogu se uočiti promene u izgledu „plave trake” spektara, konkretno, odnosa apsorbancija na vrednostima 437/417 nm, koji je primetno manji u slučaju PL-90 lipozoma sa inkorporisanim hlorofilima (**Sl.69-A**), što bi ukazivalo da je proces oksidacije smeše lipida tj. nezasićenih lipida možda trajao i tokom pripreme lipozomne disperzije; ovaj efekat je manje primetan kod „zasićenih lipozoma”, pripremljenih od DPPC lipida (**Sl.68-A**).

U cilju poređenja stabilnosti inkorporisanih hlorofila u lipozome, odabrani su različiti lipidi, DPPC/PL-90, čija je osnovna razlika u stukturi tj. prisustvu/odsustvu dvostrukih veza.

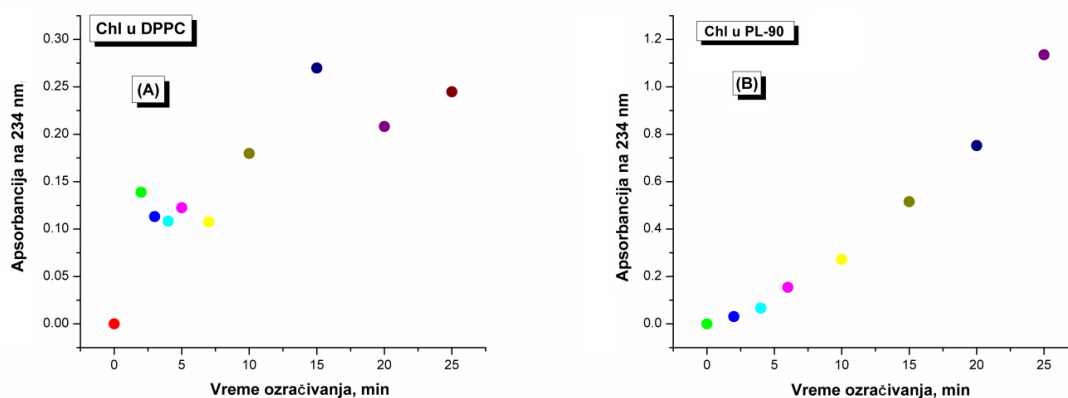
Veći broj dvostrukih veza prisutnih u PL-90 fosfolipidima povećava mogućnost oksidacije inkorporisanog hlorofila (**Tabela 13**); veća degradacija u PL-90 lipozomima u poređenju sa DPPC lipozomima je u skladu sa očekivanim.

Tabela 13. Degradacija hlorofila u lipozomima i vodenom medijumu nakon UV-B oksidacionog stresa.

UV-B ozračivanje, $C_{Chl}=5 \times 10^{-6} M$, $t_{irr.}= 25 \text{ min}$	Degradacija hlorofila, %
Vodeni medijum	31.58
SUV-DPPC lipozomi	76.00
SUV-PL-90 lipozomi	89.18

Testom konjugovanih diena utvrđena je produkcija lipidnih peroksida u DPPC i PL-90 lipozomima sa inkorporisanim hlorofilima pri istim uslovima UV-B ozračivanja: promena apsorbancije na 234 nm u funkciji vremena UV-B ozračivanja (**SI.70**). Talasna dužina od 234 nm predstavlja maksimum apsorpcije stvorenih lipidnih peroksida. Apsorbancija na 234 nm korigovana je primenom jednačine koja važi za lipozomne sisteme SUV dimenzija (Bittner *et al.* 2002):

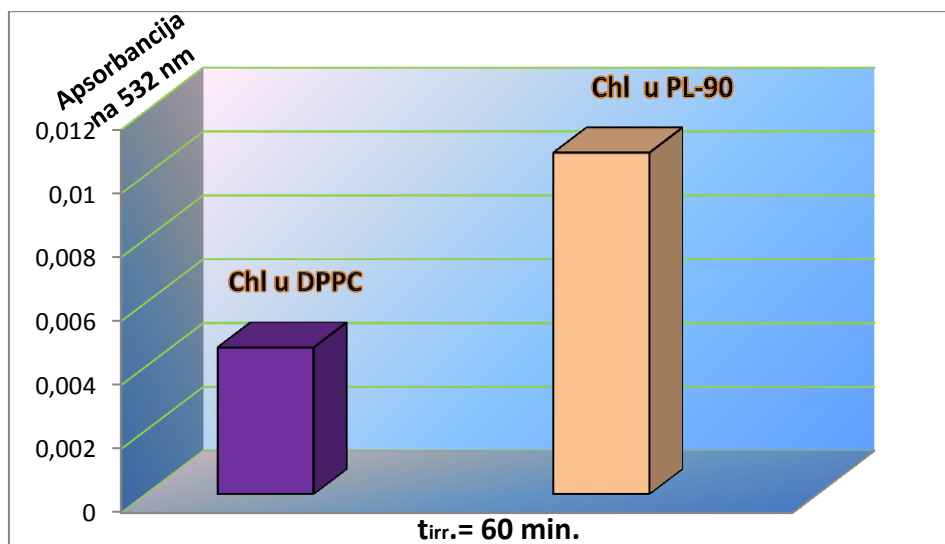
$$(A_{234 \text{ nm}})_{korigovana} = (A_{234 \text{ nm}})_{merena} - (A_{325 \text{ nm}})_{merena} \times 3.72 \quad (21)$$



Slika 70. Produkcija lipidnih peroksida u SUV-DPPC lipozomima (A) i SUV-PL-90 lipozomima (B) sa inkorporisanim hlorofilima tokom kontinualnog UV-B ozračivanja. Apsorbancija se prati na 234 nm (maksimum apsorpcije stvorenih peroksida) nakon korekcije apsorpcionih spektara.

Sa **Slike 70-A i B** može se zapaziti da se vrednost apsorbancije na 234 nm povećava sa povećanjem vremena izlaganja UV-B zračenju i da je ta vrednost posle 25 min zračenja mnogo veća kod PL-90-Chl-lipozoma nego kod DPPC-Chl-lipozoma. Vrlo je verovatno da su razlog tome prisutne dvostruke veze u prvom slučaju koje zbog strukturnih razloga favorizuju produkciju slobodnih radikala (Bittner *et al.* 2002).

Na **Slici 71** su prikazani rezultati TBA-MDA testa, odnosno promena apsorbancije „kontrolne” i uzorka na 532 nm, koja potiče od nastalog TBA-MDA kompleksa. Iniciranje lipidne peroksidacije je vršeno kontinualnim UV-B ozračivanjem SUV-DPPC i SUV-PL-90 lipozoma, u trajanju od 60 minuta. Za odvijanje lipidne peroksidacije su bitni dugi ugljovodonični lanci u molekulima lipida, dok su njihove polarne „glave” potpuno irelevantne. S obzirom na to da UV-B zračenje deluje kako na Chl-molekule, tako i na lipide, uporedo je merena apsorbancija na 532 nm za liposome sa hlorofilima koji nisu izlagani zračenju (kontrola) i one koji su UV-B ozračivani (uzorak). Na taj način je izvršena procena stabilnosti hlorofila isključivo na izabrani oksidacioni stres (UV-B ozračivanje), bez obzira na lipidnu (per)oksidaciju koja se može odvijati i u toku same pripreme lipozomnih disperzija sa Chl-om autooksidativnim putem.



Slika 71. Razlika apsorbancije „kontrolne” i „uzorka” na 532 nm, dobijene TBA-MDA-testom za Chl-a-SUV-liposome pripremljene od DPPC-(levo) i PL-90-(desno) lipida. Iniciranje lipidne peroksidacije je vršeno (UV-B) ozračivanjem uzoraka u periodu od 60 min.

Velika količina ROS vrsta koje se usled kontinualnog UV-B-ozračivanja formira u lipozomima (uključujući i lipidne radikale) u neospornoj je vezi sa povećanjem procenta Chl-

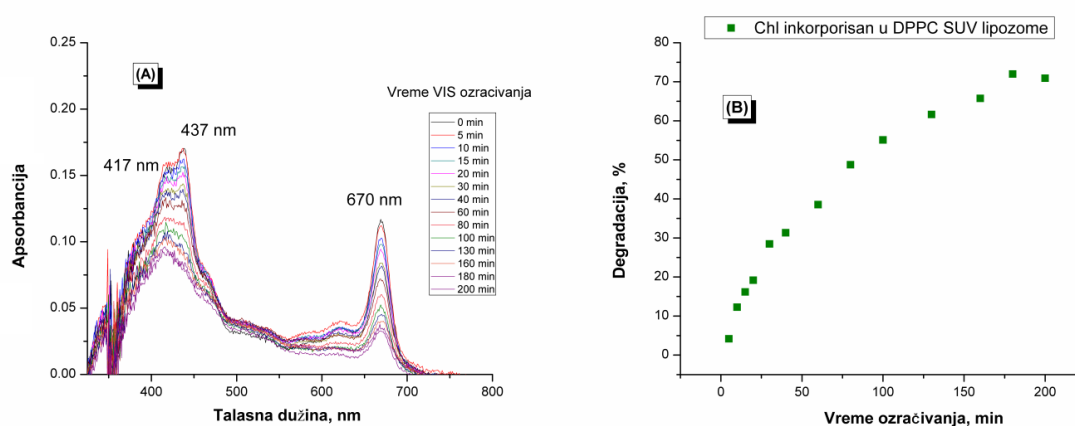
degradacije. Degradacija hlorofila u „zasićenim lipozomima” (DPPC) je manja u poređenju sa lipozomima izrađenim od PL-90 lipida koji u sastavu sadrži i nezasićene lipide (**SI.68** i **69**, respektivno); u ovom drugom slučaju manji je i prinos nastalog TBA-MDA kompleksa (**SI.71**).

Promena u količini nastalog TBA-MDA kompleksa direktna je posledica promene u strukturi lipida korišćenog za izradu lipozoma. Dokazano je da povećanje broja dvostrukih veza u masnokiselinskim lancima lipida dovodi do proporcionalnog povećanja lipidnih radikala kada se za njihovo formiranje koristi izabrani fotosenzibilizator; ovo pravilo, u prisustvu benzofenona kao fotosenzibilizatora, važi u rastvorima (Markovic & Patterson, 1989; Markovic *et al.* 1990) ali i u micelama (Markovic *et al.* 1990; Markovic & Patterson 1993). Mada se u eksperimentima sa UV-B ozračivanim hlorofilima u lipozomima ne koristi nikakav fotosenzibilizator, pa je iniciranje peroksidacionog mehanizma (kroz formiranje lipidnih radikala) manje selektivno i efikasno, odlučujući doprinos dvostrukih veza (u slučaju PL-90 lipidne smeše) svakako ostaje.

TBA-MDA test kao i test konjugovanih diena direktan su dokaz o oksidaciji koja se odvijala u ispitivanim uzorcima. Ukoliko uzmemo u obzir sve dobijene rezultate, zaštitni efekat koji je očekivan od strane lipida prema inkorporisanom Chl-u, u pogledu fotooksidacionog stresa izazvanog UV-B zračenjem, nije primećen. Nasuprot ovoj tvrdnji, Chl inkorporisan u lipozome pokazuje mnogo veći stepen degradacije.

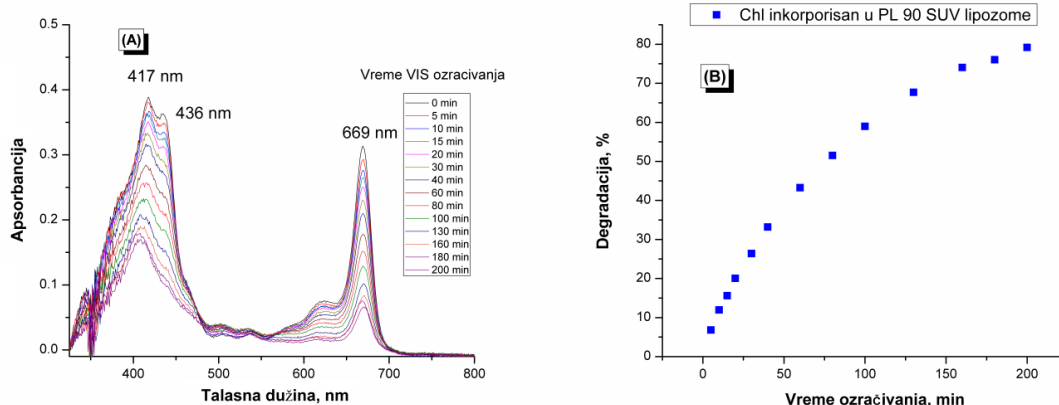
4.6.2. Analiza apsorpcionih spektara hlorofila inkorporisanog u liposome nakon izlaganja vidljivoj svetlosti

Na Slikama 72-A i 73-A su prikazane promene apsorpcionih spektara Chl-frakcije inkorporisane u SUV-DPPC i SUV-PL-90 liposome, respektivno, prilikom kontinualnog dejstva vidljive svetlosti, u periodu od 0-200 min. Analogno dobijenim rezultatima računat je procenat degradacije Chl inkorporisanog u SUV-DPPC i SUV-PL-90 liposome, pri različitim vremenima izlaganja zračenju (SI.72-B i 73-B, respektivno).



Slika 72. Apsorpcioni spektri hlorofila inkorporisanih u SUV-liposome dobijenih od DPPC-fosfolipida za različita vremena ozračivanja VIS svetlošću (A), Chl-degradacija u SUV-DPPC-lipozomima u odnosu na vreme dejstva VIS svetlosti (B). Lipozomi odgovarajuće veličine su dobijeni metodom tankog filma ekstrudiranjem. Koncentracija lipida bila je 5×10^{-4} M. Koncentracija hlorofila u konačnoj zapremini lipozomne disperzije bila je 5×10^{-6} M.

Analogno dobijenim rezultatima nakon izlaganja lipozomnih disperzija (sa inkorporisanim hlorofilima) UV-B zračenju, dobijeni grafici degradacije hlorofila dejstvom vidljive svetlosti u DPPC-lipozomima pokazuju veće vrednosti u lipozomima nego u vodenom medijumu, za istu koncentraciju hlorofila. Za hlorofile inkorporisane u SUV-DPPC-liposome (veličine 400 nm) - pri istim uslovima stresa - dobijeni su slični rezultati (bez prikaza), što je identično zapažanjima prilikom ispitivanja stabilnosti na UV-B oksidacioni stres.



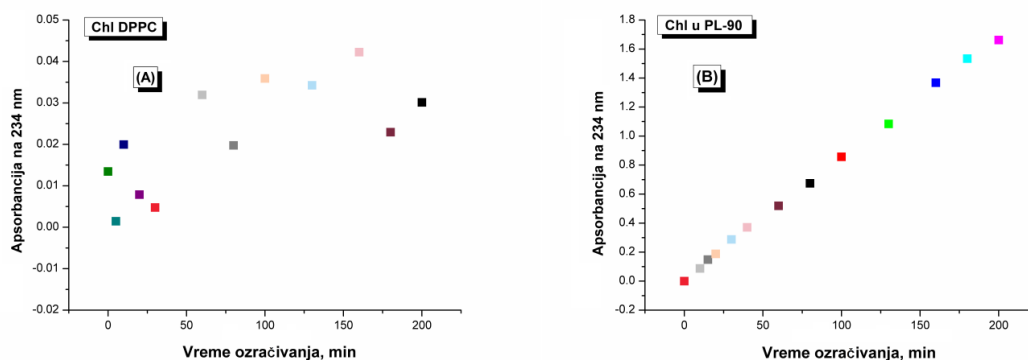
Slika 73. ApSORPCIONI SPEKTRI hlorofila inkORPORISANIH u SUV lipozome dobijenih od PL-90 smeše fosfolipida pri različitim vremenima ozračivanja VIS svetlošću (A), degradacija Chl u SUV-PL-90 lipozomima u odnosu na vreme VIS zračenja (B). Lipozomi odgovarajuće veličine su dobijeni metodom tankog filma ekstrudiranjem. Koncentracija lipida bila je 5×10^{-4} M. Koncentracija hlorofila u konačnoj zapremini lipozomne disperzije bila je 5×10^{-6} M.

Takođe se sa **Slika 72-A** i **73-A** mogu uvideti promene u vrednostima odnosa apsorbanacija na 437 i 419 nm „plave trake” spektra, što ukazuje na moguće odvijanje degradacije u samom postupku izrade PL-90 lipozoma. S obzirom na dobijene rezultate može se zaključiti da mehanizam degradacije hlorofila u lipozomima dejstvom vidljive svetlosti može biti sličan mehanizmu degradacije dejstvom UV-B zračenja na ispitivane uzorke. U **Tabeli 14** date su vrednosti degradacije hlorofila u SUV-DPPC i SUV-PL-90 lipozomima, kao i u vodenom medijumu, pri istim vrednostima koncentracije pigmenta.

Tabela 14. Degradacija hlorofila u lipozomima i vodenom medijumu nakon oksidacionog stresa izazvanog dejstvom vidljive svetlosti.

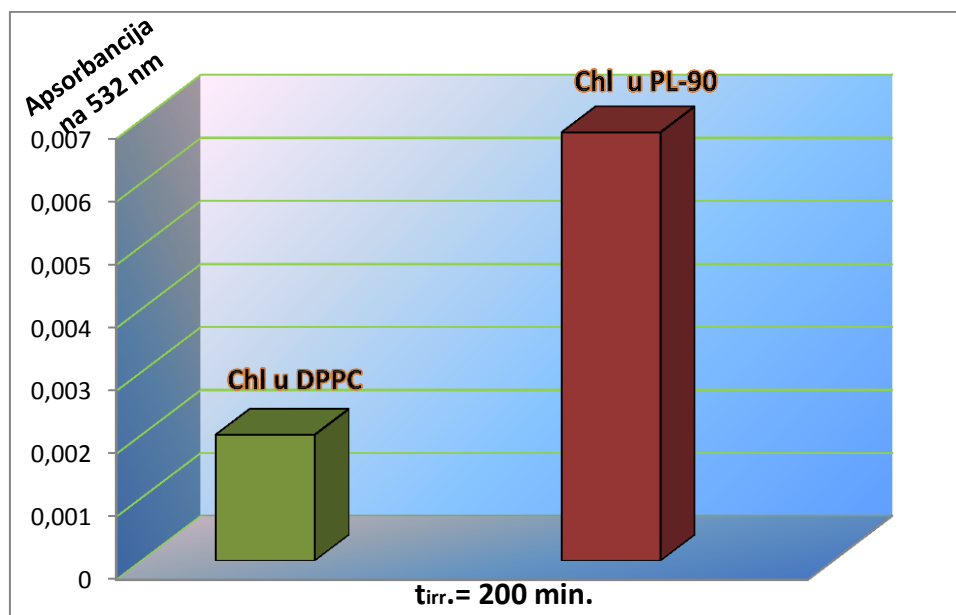
VIS ozračivanje, $C_{chl}=5 \times 10^{-6}$ M, $t_{irr.}=200$ min	Degradacija hlorofila, %
Vodeni medijum	32.00
SUV-DPPC lipozomi	70.90
SUV-PL-90 lipozomi	79.16

Na **Slici 74** su prikazani rezultati testa konjugovanih diena tj. produkcije lipidnih peroksida u SUV-DPPC i SUV-PL-90 lipozomima sa inkorporisanim hlorofilima pri istim uslovima ozračivanja vidljivom svetlošću [$A_{234\text{ nm}} = f(\text{vreme ozračivanja})$].



Slika 74. Produkcija lipidnih peroksida u SUV-DPPC (A) i SUV-PL-90 lipozomima (B) sa inkorporisanim hlorofilima nakon dejstva vidljive svetlosti. Apsorbancija se prati na 234 nm (maksimum apsorpcije stvorenih peroksida), nakon korekcije apsorpcionih spektara.

Na **Slici 75** je dat uporedni prikaz rezultata TBA-MDA testa tj. razlike apsorbancije „kontrolne” i uzorka na 532 nm koja je posledica oksidacionog stresa dejstvom vidljive svetlosti. Uzorak lipozoma sa hlorofilima koji nisu izlagani zračenju predstavlja „kontrolu”, dok onaj koji je izlagan vidljivoj svetlosti predstavlja uzorak.

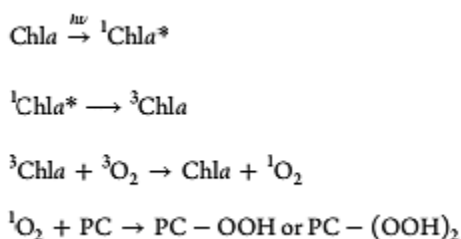


Slika 75. Promene apsorbancije „kontrolne” i uzorka (na 532 nm) dobijene TBA-MDA testom za hlorofile inkorporisane unutar SUV-DPPC i SUV-PL-90 lipozoma. Iniciranje lipidne peroksidacije je vršeno dejstvom vidljive svetlosti na uzorke, u trajanju od 200 min.

Rezultati peroksidnih testova nakon VIS ozračivanja hlorofila inkorporisanih u SUV-DPPC i SUV-PL-90 lipozome, jako su slični onima dobijenim nakon oksidativnog stresa izazvanim UV-B ozračivanjem. Kao i kod UV-B ozračivanih hlorofila, može se videti da je

kod VIS ozračivanih PL-90 lipozoma peroksidacija veća, i da je i degradacija hlorofila veća, u odnosu na hlorofile inkorporisane u DPPC-lipozome (Sl.72-73, Tabela14). Nakon 200 minuta ozračivanja vidljivom svetlošću postignut je približno isti procenat degradacije hlorofila u lipozomima koji je dobijen nakon 25 minuta UV-B ozračivanja.

Lipozomi veličine 5-25 μm , pripremljeni bez inkorporisanih hlorofila, snimani su nakon izlaganja svetlosti talasne dužine od 400-440 nm, nakon čega nisu uočene promene u izgledu samih lipozoma tj. njihovoj morfologiji (Liang *et al.* 2012). Nakon inkorporisanja hlorofila došlo je do promene u morfologiji lipozoma, što se objašnjava delovanjem nastalih hidroperoksida, pri čemu autori predlažu reakciju sa singletnim kiseonikom kao uzrokom peroksidacije ($^1\text{O}_2 + \text{PC (lipozomi)} \rightarrow \text{PC-OOH}$ ili PC-(OOH)_2 - Liang *et al.* 2012). Ovakav vid nestabilnosti lipozomnih disperzija sa inkorporisanim Chla, prema zračenju čak i pri malim koncentracijama pigmenta kakve su i u slučaju ove studije, ukazuje na njihovu ograničenu mogućnost upotrebe. Reakcije koje se prilikom dejstva vidljive svetlosti dešavaju u sistemima lipozoma sa hlorofilima mogu se demonstrirati kroz sledeće jednačine:

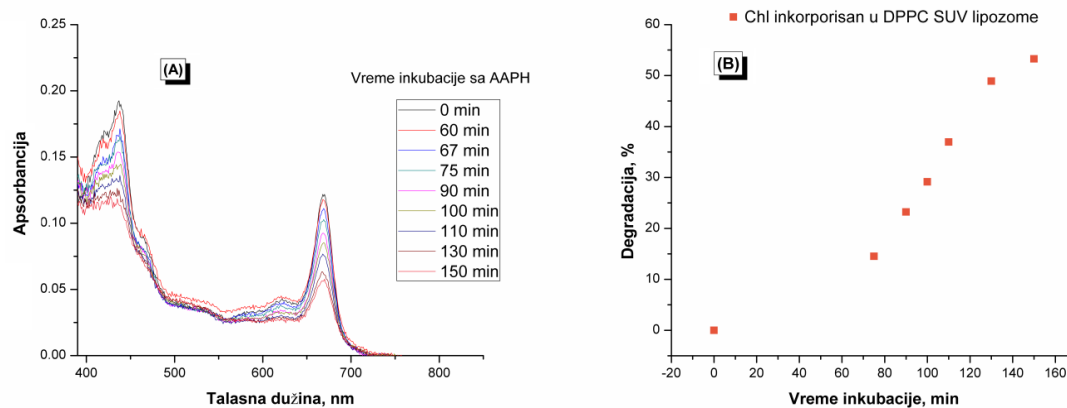


U ovako predloženoj šemi hlorofil igra ulogu fotosenzibilizatora preko svog tripletnog stanja, ^3Chl , koje transferom energije senzibiliše normalni, tripletni kiseonik ($^3\text{O}_2$) stvarajući vrlo reaktivni singletni kiseonik ($^1\text{O}_2$); onda on u poslednjoj reakciji predložene šeme reaguje sa (fosfo)lipidom (PC) gradeći perokside (PC-OOH). Budući da su oni nestabilni lako se raspadaju dajući reaktivne peroksi-radikale ($\cdot\text{OOH}$) koji povratno mogu doprineti degradaciji hlorofila. Dakle, putem ovog složenog mehanizma hlorofil senzibiliše i svoju destrukciju. Ovo je sasvim realna hipoteza, mada prisustvo singletnog kiseonika u ovom radu nije dokazivano, ni u vodenom medijumu, ni u lipozomima. Dejstvo vidljive svetlosti u ovakvim i sličnim sistemima (emulzija ulje/voda), svakako ima destruktivni uticaj na inkorporisani Chla i to na taj način da sadržaj Chla opada srazmerno povećanju vremena zračenja (Kim *et al.* 2013). Tako i u slučaju našeg istraživanja dinamika Chl degradacije raste proporcionalno sa povećanjem vremena izlaganja zračenju, u slučaju obe fotodegradacije (UV-B i VIS). Nakon

200 minuta kontinualnog dejstva vidljive svetlosti postignut je približno isti procenat degradacije hlorofila u lipozomima koji je dobijen nakon 25 minuta UV-B ozračivanja.

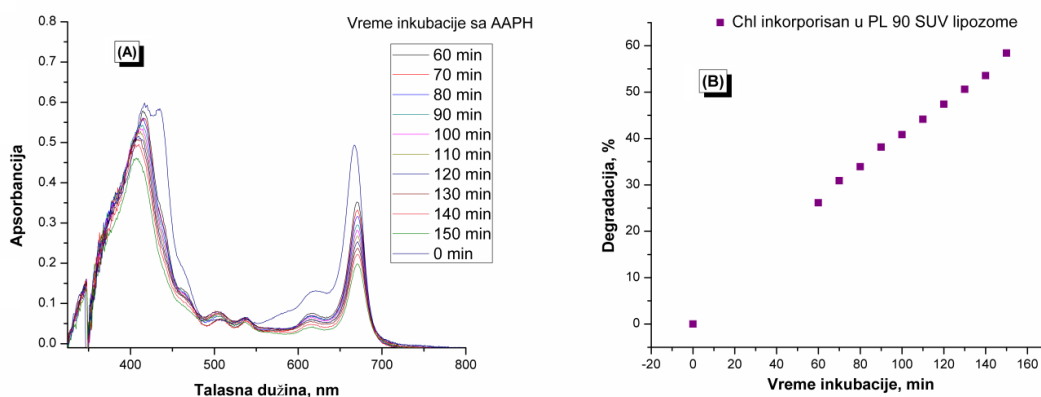
4.6.3. Analiza apsorpcionih spektara hlorofila inkorporisanog u liposome nakon oksidacionog stresa izazvanog upotrebom AAPH, vodorastvornog termalnog inicijatora

Stabilnost hlorofila inkorporisanog u liposome na oksidacioni stres dejstvom AAPH praćena je u SUV-DPPC i PL-90 lipozomima. Odgovarajući apsorpcioni spektri hlorofila u lipozomima prikazani su na **Slikama 76-A i 77-A**, respektivno – očigledno dominira Chl_a. Na osnovu apsorpcionih spektara snimljenih pri različitim vremenima inkubacije dobijeni su grafici degradacije (**Sl.76-B i 77-B**).



Slika 76. Apсорpcioni spektri hlorofila inkorporisanog u SUV-DPPC liposome pre i nakon inkubacije sa AAPH, vodorastvornim termalnim inicijatorom (A), degradacija hlorofila u SUV-DPPC lipozomima u odnosu na vreme inkubacije sa AAPH (B). Lipozomi odgovarajuće veličine su dobijeni metodom tankog filma ekstrudiranjem. Koncentracija lipida bila je 5×10^{-4} M. Koncentracija hlorofila u konačnoj zapremini lipozomne disperzije bila je 5×10^{-6} M. Koncentracija AAPH je 3.2×10^{-3} M.

Generalno, azo-termalni inicijatori stvaraju ugljenikove radikale koji u reakciji sa kiseonikom daju peroksidne radikale. Peroksidni radikali dalje oduzimaju („apstrahuju”) atom vodonika sa antikonjugovane strukture lipida (naročito su laki za otkidanje tzv. alilni i dvostruko-alilni H-atomi – **Sl.17**) i na taj način iniciraju lančanu reakciju lipidne peroksidacije (Woodall & Britton, 1997; Yoshida *et al.* 2004). Elektron spin rezonantnom (ESR) spektroskopijom je potvrđeno da dejstvom AAPH u lipozomima pretežno dolazi do formiranja peroksi- i alkoksilnih radikala (Hovorka & Schoneich, 2001).



Slika 77. Apsoptionski spektri hlorofila inkorporiranih u SUV-PL-90 lipozome pre i nakon inkubacije sa AAPH (A), degradacija hlorofila u SUV-PL-90 lipozomima u odnosu na vreme inkubacije sa AAPH (B). Lipozomi odgovarajuće veličine su dobijeni metodom tankog filma ekstrudiranjem. Koncentracija lipida bila je 5×10^{-4} M. Koncentracija hlorofila u konačnoj zapremini lipozomne disperzije bila je 5×10^{-6} M. Koncentracija AAPH je 3.2×10^{-3} M.

Degradacija hlorofila u lipozomima može biti direktna posledica reakcija sa peroksi-radikalima tipa 'OOR. S obzirom na to da je AAPH hidrofilnog karaktera, njegovo delovanje može biti ostvareno samo u vodenom medijumu van lipozoma ili unutar vode zarobljene u strukturi lipozoma (tzv. „unutrašnja voda”). Woodall i saradnici sugerišu da se delovanje slobodnih radikala AAPH najpre odigrava na površini lipozoma, tj. graničnoj dodirnoj površini između hidrofobnih glava lipida i vode (Woodall & Britton, 1997).

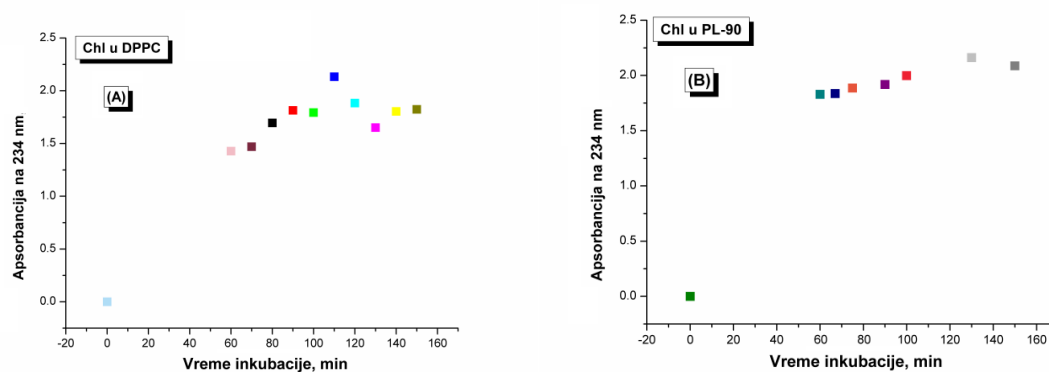
U **Tabeli 15** prikazani su rezultati degradacije Chl-a u dva tipa SUV-lipozoma (SUV-DPPC i PL-90) i u vodi, u prisustvu AAPH. Rezultati dobijeni inkubacijom sa termalnim inicijatorom pokazuju da procenat degradacije hlorofila u DPPC-lipozomima ima približno istu vrednost sa onom u vodenom medijumu, dok je sa druge strane ta vrednost neznatno veća kod lipozoma dobijenih od PL-90 lipida. Izgleda da inkorporacijom Chl u lipozome nije postignuta bitnija zaštita tog pigmenta od stresa izazvanog dejstvom AAPH. Dekompozicija AAPH radikala dešava se po kinetici prvog reda (Ioannis *et al.* 2010), što može biti u vezi sa linearnom degradacijom hlorofila u slučaju oba tipa lipozoma; degradacija pigmenta je linearno rasla sa porastom vremena inkubacije (**Sl.76-B** i **77-B**).

Tabela 15. Degradacija hlorofila u vodi i inkorporisanog u SUV-DPPC i SUV-PL-90 lipozome, nakon inkubacije sa AAPH na temperaturi od 40°C.

Dejstvo AAPH, $C_{AAPH}=3.2 \times 10^{-3}$ M, $C_{chl}=5 \times 10^{-6}$ M, $t_{ink.}=100$ min	Degradacija, %
Vodeni medijum	30.50
SUV-DPPC lipozomi	29.15
SUV-PL-90 lipozomi	40.50

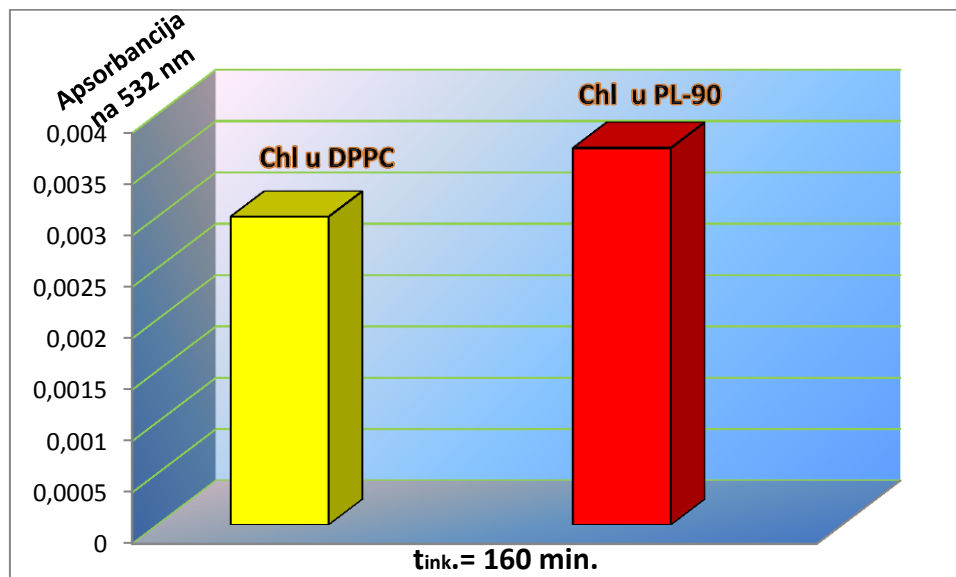
Peroksidni testovi, test konjugovanih diena (SI.78) i TBA-MDA test (SI.79), dokazuju da dejstvo vodorastvornog inicijatora deluje na lipozome, a moguće i na Chl-molekule insertovane u lipozome. Prisutnost nezasićenih veza kod PL-90-lipozoma generalno bi trebalo da doprinosi povećavanju broja ROS vrsta, a onda moguće i povećanoj degradaciji hlorofila. Međutim, dobijeni rezultati to ne potvrđuju u potpunosti.

Transport AAPH radikala iz vode u lipozome zavisi od transportnog mehanizma, što pre svega zavisi od sastava lipida. Pošto fizičke osobine lipozoma zavise od sastava lipida, to i rigidnost lipozoma koja se povećava većim udelom zasićenih lipida utiče na pokretljivost AAPH radikala (Soto-Arriaza *et al.* 2008). Povećan procenat DPPC-lipida nije bitno uticao na smanjenje oksidacije dejstvom AAPH, tj. na smanjenje produkcije ROS vrsta u poređenju sa lipozomima koji u sastavu imaju manji procenat zasićenih lipida poput PC smeše, što je očekivano (Soto-Arriaza *et al.* 2008).



Slika 78. Produkcija peroksida u SUV-DPPC (A) i SUV-PL-90 lipozomima (B) sa inkorporisanim hlorofilima nakon inkubacije sa vodorastvornim termalnim inicijatorom (AAPH). Apsorbancija se prati na 234 nm (maksimum apsorpcije stvorenih lipidnih peroksida), nakon korekcije apsorpcionih spektara.

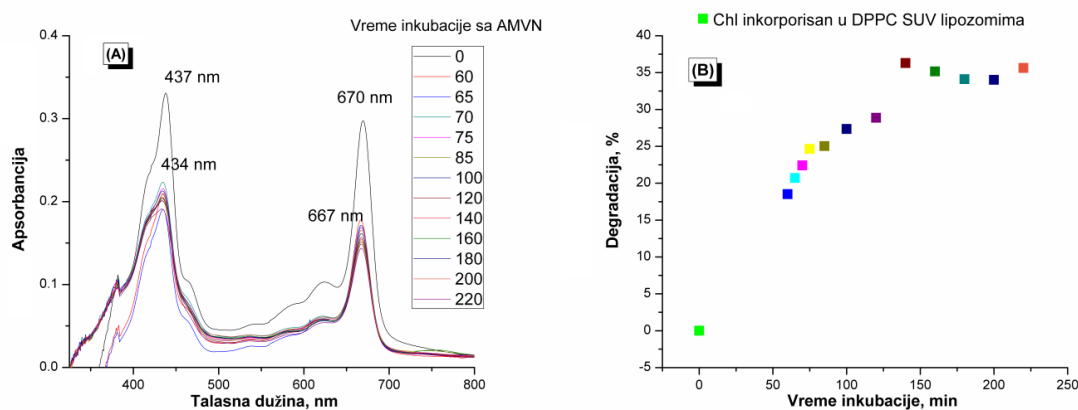
Na osnovu testa konjugovanih diena (**Sl.78-A i B**) ne može se tvrditi da je produkcija peroksida veća u SUV-PL-90 lipozomima. Produkcija peroksida nakon 180 minuta inkubacije sa AAPH u DPPC i PL-90 lipozomima bila je približno ista.



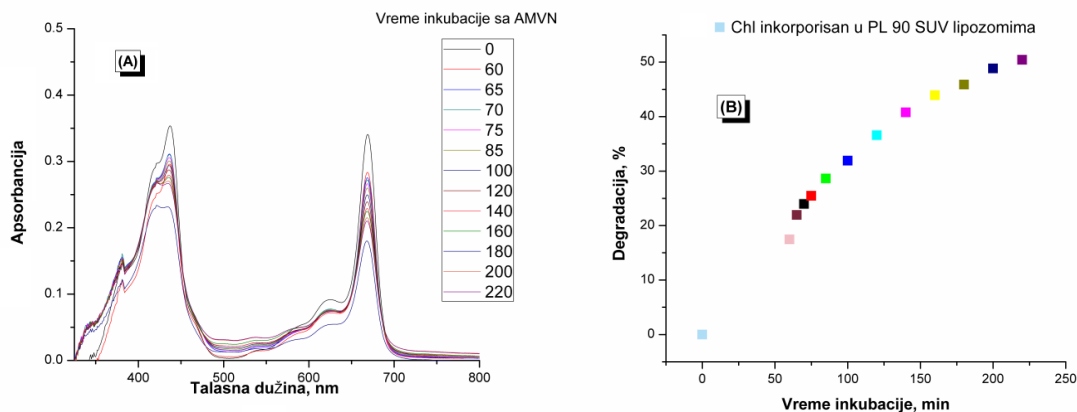
Slika 79. Razlika apsorbancije „kontrolne” i uzorka (na 532 nm) dobijene TBA-MDA testom za hlorofile inkorporisane unutar SUV-DPPC (levo) i SUV-PL-90 (desno) lipozoma. Iniciranje lipidne peroksidacije je vršeno inkubacijom uzoraka na 40°C sa vodorastvornim termalnim inicijatorom.

4.6.4. Analiza apsorpcionih spektara hlorofila inkorporisanog u lipozome nakon oksidacionog stresa izazvanog AMVN, lipoidalnim termalnim inicijatom

U cilju poređenja stabilnosti hlorofila na oksidacioni stres izazvan termalnim inicijatorom lipoidnog karaktera ispitan je uticaj AMVN (2,2'-azobis(2,4-dimetilvaleronitril) na hlorofile inkorporisane u SUV-DPPC i SUV-PL-90 lipozome. Pozicija inkorporisanog AMVN inicijatora u strukturi lipozoma je različita (svakako drugačija u odnosu na AAPH termalni inicijator) pa se očekuje i drugačiji mehanizam njegovog delovanja. Prilikom ispitivanja dejstva AMVN pri koncentraciji jednakoj koncentraciji AAPH, zapažen je potpuni destruktivni efekat AMVN na hlorofile u samom procesu izrade lipozoma, tako da je odabrana koncentracija AMVN tri puta manje vrednosti u odnosu na koncentraciju vodoratsvornog AAPH ($C_{AAPH}=3.2 \times 10^{-3} M$, $C_{AMVN}=1 \times 10^{-3} M$). Ranija istraživanja su takođe pokazala da prilikom iniciranja oksidacije lipida dejstvom AMVN treba upotrebljavati niže koncentracije jer pri većim koncentracijama jedan deo ostaje neinkorporisan u lipidni dvosloj lipozoma (Noguchi *et al.* 1998). Odgovarajući apsorpcioni spektri hlorofila u lipozomima pre i nakon dejstva AMVN prikazani su na **Slikama 80-A** i **81-A**, respektivno. Na osnovu apsorpcionih spektara snimljenih pri različitim vremenima inkubacije sa lipoidnim termalnim inicijatorom formirani su grafici zavisnosti procenta degradacije hlorofila u lipozomima napravljenim od DPPC- i PL-90-lipida respektivno (**Sl.80-B** i **81-B**).



Slika 80. Apsorpcioni spektri hlorofila inkorporisanog u SUV-DPPC lipozome pre i nakon inkubacije sa AMVN, lipoidnim termalnim inicijatorom (A), i degradacija hlorofila u SUV-DPPC lipozomima u odnosu na vreme inkubacije sa AMVN (B). Lipozomi odgovarajuće veličine su dobijeni metodom tankog filma ekstrudiranjem. Koncentracija lipida bila je 5×10^{-4} M. Koncentracija hlorofila u konačnoj zapremini lipozomne disperzije bila je 5×10^{-6} M.



Slika 81. Apsorpcioni spektri hlorofila inkorporisanih u SUV-PL-90 lipozome pre i nakon inkubacije sa AMVN (A), i degradacija hlorofila u SUV-PL-90 lipozomima u odnosu na vreme inkubacije sa AMVN (B). Lipozomi odgovarajuće veličine su dobijeni metodom tankog filma ekstrudiranjem. Koncentracija lipida bila je 5×10^{-4} M. Koncentracija hlorofila u konačnoj zapremini lipozomne disperzije bila je 5×10^{-6} .

Dobijeni rezultati pokazali su približno iste vrednosti degradacije hlorofila (**Tabela 16**), pri tri puta manjim vrednostima koncentracije lipidnog termalnog inicijatora u odnosu na hidrofilni AAPH inicijator (**Tabela 15**).

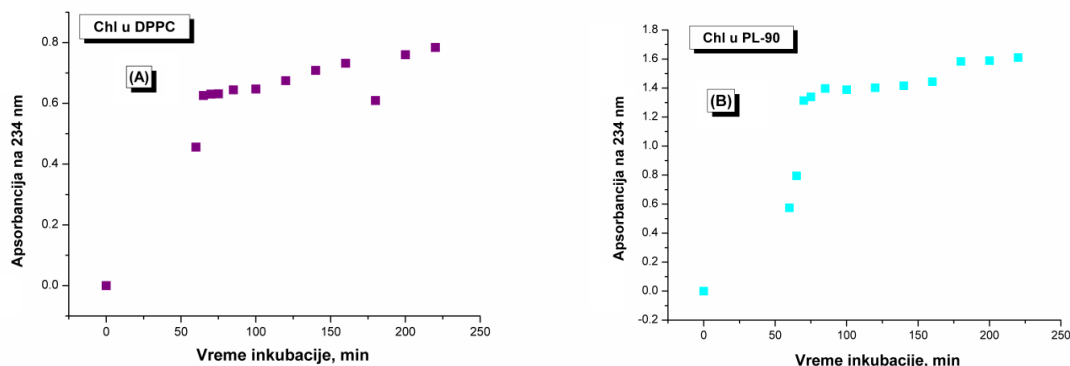
Tabela 16. Degradacija hlorofila u lipozomima nakon inkubacije sa AMVN na temperaturi od 40°C.

Dejstvo AMVN, $C_{AMVN}=1 \times 10^{-3}$ M, $C_{chl}=5 \times 10^{-6}$ M, $t_{ink.}= 100$ min	Degradacija, %
DPPC lipozomi	27.40
PL-90 lipozomi	32.00

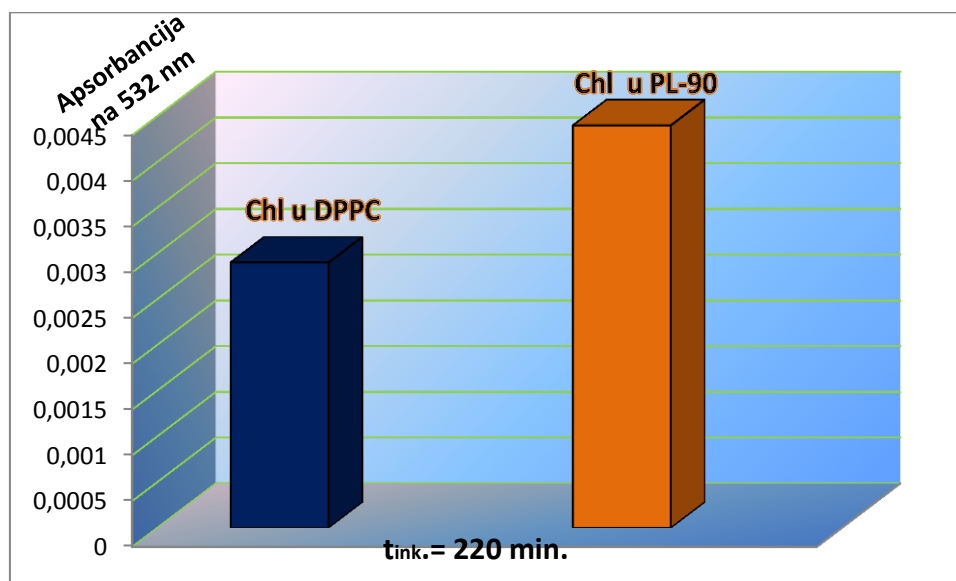
Očekivano veća vrednost degradacije zapažena je u lipozomnim sistemima nezasićenih PL-90-lipida. Za razliku od AAPH kod koga bi se očekivalo da se dejstvo peroksidnih, alkoksilnih i ostalih ROS vrsta događa na površini membrane, izvan samog dvosloja lipida, AMVN generiše ROS vrste (peroksidni radikali) u samom lipidnom dvosloju (Yamamoto *et al.* 2001). Samim tim što je pozicija Chl-a u lipozomima takva da fitilnim lancem on biva „usisan” u lipidni dvosloj, dejstvo AMVN se manifestuje, ne samo na lipidni dvosloj već i na insertovani Chla i ostale derivate Chla i Chlb sa fitilnim „repom”.

Produkcija peroksidnih vrsta je dokazana preko testa konjugovanih diena (**Sl.82-A i B**) i TBA-MDA testom (**Sl.83**). Dobijeni rezultati dokazuju da inkubacijom hlorofila inkorporisanog u lipozome sa AMVN dolazi do oksidacije lipida koja je svakako veća kod

lipozoma nezasićenih lipida, što se može dovesti u vezu i sa povećanom degradacijom hlorofila.



Slika 82. Produkcija peroksida sa inkorporisanim hlorofilima u SUV-DPPC (A) i SUV-PL-90 lipozome (B) nakon inkubacije sa lipidnim termalnim inicijatorom (AMVN). Apsorbancija se prati na 234 nm (maksimum apsorpcije stvorenih peroksida), nakon korekcije apsorpcionih spektara.



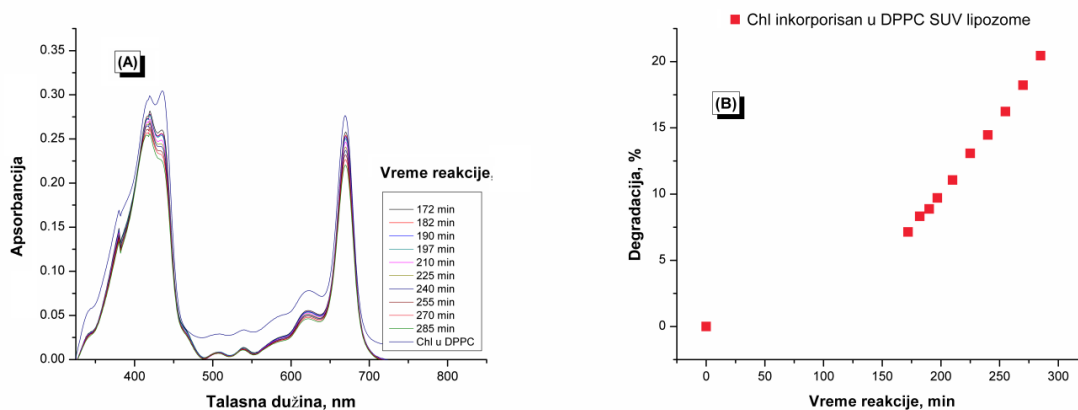
Slika 83. Razlika apsorbcije „kontrolne” i uzorka (na 532 nm) dobijene TBA-MDA-testom za hlorofil unutar DPPC-(levo) i PL-90-(desno) SUV lipozoma. Iniciranje lipidne peroksidacije je vršeno inkubacijom uzoraka na 40°C sa lipidnim termalnim inicijatorom, AMVN.

Analizom dobijenih rezultata, može se zaključiti da je nestabilnost hlorofila na dejstvo lipidnog termalnog inicijatora (AMVN) veća u odnosu na dejstvo vodoravnog lipidnog

inicijatora (AAPH), što može biti direktna posledica pozicije koju lipoidni inicijator i hlorofili imaju u lipozomima.

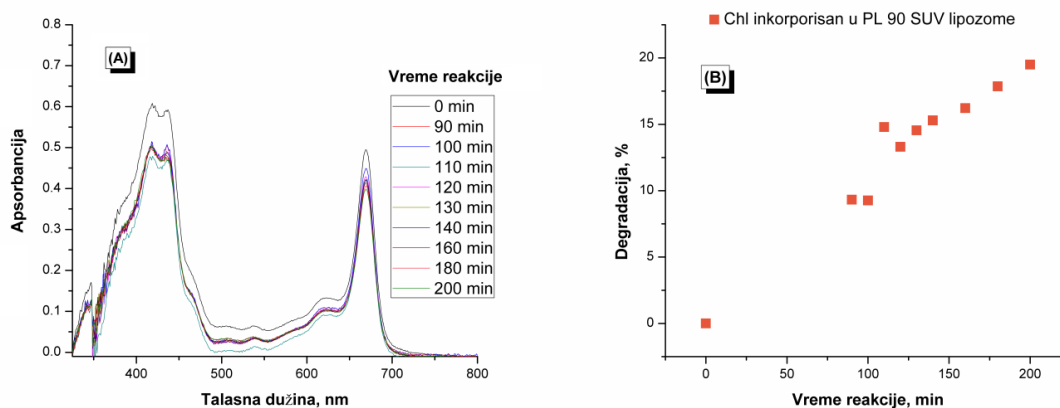
4.6.5. Analiza apsorpcionih spektara hlorofila inkorporisanog u lipozome nakon oksidacionog stresa izazvanog Fentonovom reakcijom

Na Slikama 84-A i 85-A su prikazani apsorpcioni spektri hlorofila inkorporisanih u SUV-DPPC i SUV-PL-90 lipozome, respektivno, pre i nakon dejstva Fentonovog reagensa u toku perioda inkubacije od nekoliko sati. Na osnovu apsorpcionih spektara, dobijeni su grafici zavisnosti procenta degradacije hlorofila u lipozomima (DPPC i PL-90) sa vremenom inkubacije (SI.84-B i 85-B).



Slika 84. Apсорpcioni spektri hlorofila inkorporisanih u SUV-DPPC lipozome pre i nakon inkubacije sa Fentonovim reagensom (A), i degradacija hlorofila u SUV-DPPC lipozomima u odnosu na vreme inkubacije sa Fentonovim reagensom (B). Lipozomi odgovarajuće veličine su dobijeni metodom tankog filma ekstrudiranjem. Koncentracija lipida bila je 5×10^{-4} M. Koncentracija hlorofila u konačnoj zapremini lipozomne disperzije bila je 5×10^{-6} M.

U reakciji Fentonovog reagensa sa Chl-lipozomima, zapažen je zaštitni efekat lipozoma, tj. poređenjem degradacije hlorofila u vodenom medijumu sa degradacijom u lipozomima (pri istoj koncentraciji Fentonovog reagensa i Chl-a u smeši), može se primetiti daleko manji stepen degradacije hlorofila u SUV-DPPC lipozomima (SI.84-B, Tabela 17). Iako mali, procenat degradacije koji je zapažen u lipozomima ukazuje na oksidaciju koja se odvija, što se sa spektara može videti na osnovu odnosa apsorbancija u „plavom” delu spektra, 436/419 nm (SI.84-A i 85-A).



Slika 85. Apsorpcioni spektri hlorofila inkorporisanih u SUV-PL-90 lipozome pre i nakon inkubacije sa Fentonovim reagensom (A), i degradacija hlorofila u SUV-PL-90 lipozomima u odnosu na vreme inkubacije sa Fentonovim reagensom (B). Lipozomi odgovarajuće veličine su dobijeni metodom tankog filma ekstrudiranjem. Koncentracija lipida bila je 5×10^{-4} M. Koncentracija hlorofila u konačnoj zapremini lipozomne disperzije bila je 5×10^{-6} M.

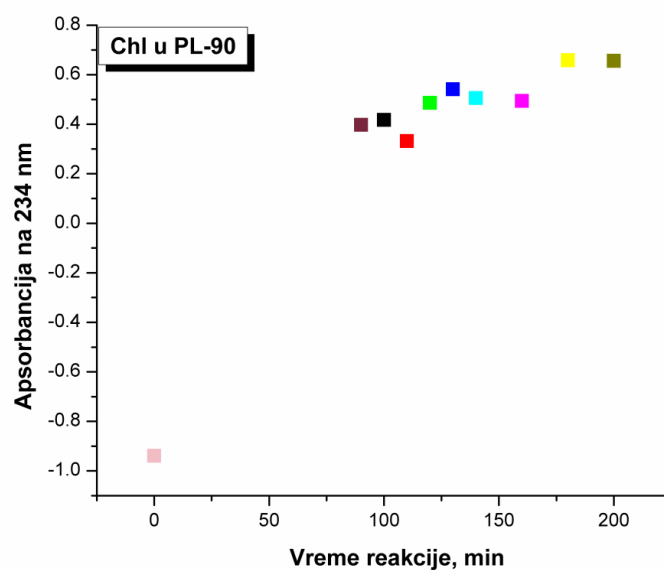
Generalno, u reakciji Fentonovog reagensa sa lipozomima tj. lipidima, OH^\cdot radikali formirani u Fentonovoj reakciji, apstrahuju H-atom iz metilen grupe poli(ne)zasićenih masnih kiselina formirajući R-C^\cdot tj. ugljenikov radikal, koji u reakciji sa kiseonikom može formirati peroksidne radikale (Agil *et al.* 1995). Na taj način bi jednom započeta lančana reakcija peroksidacije mogla doprineti degradaciji kako lipozoma tako i hlorofila inkorporisanog u lipozome. S druge strane, može se desiti apstrakovanje alilnih H-atoma fitilnog lanca hlorofila čime se stvaraju novi radikali (Rontani & Aubert, 1994). Međutim, u svetlu dobijenih rezultata može se postaviti pitanje: koliko formirane ROS vrste zaista mogu doći do hlorofila inkorporisanih u lipidni dvosloj, a pre svega Chla? Formiranje OH^\cdot radikala Fentonovom reakcijom se odvija pre svega na graničnoj površini lipozoma sa vodenom fazom (i u samoj vodenoj fazi). S obzirom na kratko vreme poluživota formiranih radikala i sposobnost difundovanja kroz membranu diskutabilan je proces degradacije inkorporisanih hlorofila. Ispitivanja su pokazala da je difuzija OH^\cdot radikala kroz membranu lipozoma u lipidni dvosloj moguća, kao i da u datom procesu peroksidacije učestvuju jedino OH^\cdot radikali, tj. da ne dolazi do formiranja drugih ROS vrsta (Fortier *et al.* 2009). Mogućnost penetracije radikala kroz membranu zavisi od lipofilnosti radikala i po pojedinim istraživanjima najdublje mogu doći do neke gornje granice lipidne ploče, odakle je moguće otkidanje H atoma iz lipidnih lanaca čime otpočinju proces peroksidacije (Gamliel *et al.*

2008). Hlorofil je međutim inkorporisam dublje u liposome, gde OH[•] radikali teže prodiru, te ga to delimično štiti od oksidacije.

Tabela 17. Degradacija hlorofila nakon inkubacije Chl-lipozomnih disperzija sa Fentonovim reagensom.

Dejstvo Fentonovog reagensa, $C_{chl}=5 \times 10^{-6}$ M, $t_{reak.}= 180$ min	Degradacija, %
Vodeni medijum	39.90
SUV-DPPC lipozomi	8.10
SUV-PL-90 lipozomi	17.85

Na **Slici 86** je prikazana produkcija lipidnih peroksida u PL-90 lipozomima sa inkorporisanim hlorofilima tokom različitih perioda trajanja reakcije sa Fentonovim reagensom [Apsorbancija na 234 nm = f (vreme reakcije)].



Slika 86. Produkcija peroksida u SUV-PL-90 lipozomima sa inkorporisanim hlorofilom tokom oksidacije Fentonovim reagensom. Apsorpcija se prati na 234 nm (maksimum apsorpcije stvorenih peroksida), nakon normalizacije apsorpcionih spektara.

Inkorporacijom Chla i srodnih „fitalnih” hlorofila u PL-90 liposome koji u svom sastavu sadrže više od 50 % nezasićenih lipida, procenat degradacije hlorofila je povećan u

odnosu na degradaciju dobijenu u SUV-DPPC lipozomima. Da u samom sistemu dolazi do peroksidacije dejstvom Fentonovog reagensa dokazano je testom konjugovanih diena (**Sl.86**). Uticaj dvostrukih veza iz strukture nezasićenih lipida je pre svega doprineo ovakvom rezultatu.

Za odvijanje lipidne peroksidacije dejstvom Fentonovog sistema moraju biti ispunjeni pojedini uslovi. Naime, lipidna peroksidacija u sistemima lipozoma nije zapažena u prisustvu samo Fe^{2+} jona. Vodonik peroksid takođe ne reaguje sa fosfolipidima kada je samostalno prisutan u smeši. Takođe, lipidna peroksidacija nije zapažena nakon potpunog reagovanja Fe^{2+} jona i H_2O_2 pri čemu dolazi do prelaza u Fe^{3+} , ukoliko je takva smeša dodata u lipozomnu disperziju po završetku reagovanja (Minotti & Aust, 1987). Ovo bi značilo da je za odvijanje lipidne peroksidacije neophodno istovremeno prisustvo Fe^{2+} jona i H_2O_2 u lipozomima. Ispitivanjima je dalje dokazano da je za odvijanje Fentonove reakcije u lipozomima potrebno prisustvo Fe^{2+} ali i Fe^{3+} jona u odnosu 1:1 (Minotti & Aust, 1987). S obzirom na to da dobijeni rezultati pokazuju daleko manju degradaciju hlorofila kada je inkorporisan u lipozome u odnosu na degradaciju u vodenom medijumu, može se zaključiti da su rezultati u saglasnosti sa literaturnim podacima.

4.6.6. Fluorescentna anizotropija u sistemima Chl-SUV-DPPC lipozoma nakon oksidacionog stresa izazvanog dejstvom Fentonovog reagensa i dejstvom vodorastvornog AAPH

Nakon merenja fluorescentne anizotropije za Chl a u SUV-DPPC lipozomima, na $\lambda_{em.} = 678$ nm, korišćenjem ekcitacionog zraka od 430 nm ($\lambda_{exc.} = 430$ nm), dobijeni su podaci o promeni u vrednostima anizotropije sistema na koji je primenjen oksidacioni stres, u poređenju sa onim na kome nije primenjen, pri temperaturi od 25°C. Za svako merenje je računat G-faktor (odnos između senzitivnosti detekcionog sistema za horizontalnu i vertikalnu polarizovanu svetlost). Na temperaturi od 25°C, SUV-DPPC lipozomi su prisutni u gel fazi koja se smatra rigidnom tj. „kompaktnijom”. Vrednosti fluorescentne anizotropije nakon primenjenih stresova prikazane su u **Tabeli 18**.

Tabela 18. Vrednosti fluorescentne anizotropije Chl-SUV-DPPC lipozoma nakon hemijskog oksidacionog stresa.

Fluorescentna anizotropija		
Chl-SUV-DPPC lipozomi	Chl-SUV-DPPC lipozomi + AAPH	Chl-SUV-DPPC lipozomi + Fentonov reagens
0.01757	0.108267	0.09812

Promene u vrednostima fluorescentne anizotropije ukazuju na promene u sredini koju Chl-molekuli osećaju (Lakowicz, 1983). Pri istim vrednostima temperature, anizotropija Chl-DPPC lipozomnog sistema je nakon primenjenog oksidacionog stresa imala veću vrednost u slučaju oba oksidaciona stresa (dejstvo Fentonovog reagensa i termalnog inicijatora – AAPH), što se može objasniti smanjenjem fleksibilnosti sredine koju sami Chl-molekuli osećaju, tj. sredina postaje rigidnija dejstvom oksidacionog stresa (Niki *et al.* 1991). Nakon primenjenih oksidacionih stresova, nesumnjivo dolazi i do promene tj. degradacije i samih lipozoma. Promene u vrednostima anizotropije koje se mogu zabeležiti nakon oksidacionih stresova mogu se pripisati promenama samih lipozoma koje mogu biti povezane sa promenama hemijske strukture inkorporisanih hlorofila. Npr. porast anizotropije kod Chl a -DPPC sistema u odnosu na Chl a -DPPC-lipozomne sisteme objašnjen je manjom penetracijom hlorofilida u lipidni dvosloj lipozoma tj. Chl a oseća rigidniju sredinu u

poređenju sa Chla-om (poglavlje 4.4.3.). Ta promena mikrookruženja Chla/Chlida koja utiče na same vrednosti anizotropije, indirektno može objasniti i promene anizotropije koje su posledica dejstva Fentonovog reagensa ili termalnog inicijatora.

KOMPARACIJA DOBIJENIH REZULTATA

Nakon analiza stabilnosti hlorofila u vodenoj sredini i lipozomima, dobijeni podaci o degradaciji hlorofila nakon 100 min delovanja stresa pri koncentraciji pigmenta od 5×10^{-6} M, pokazuju da je najdestruktivniji primenjeni oksidacioni stres –UV-B zračenje. Destruktivnost stresa mogla bi se klasifikovati na sledeći način: UV-B > VIS > termalni inicijator > Fentonov reagens, pri čemu treba uzeti u obzir da su podaci dobijeni primenom tačno definisanih uslova kao što su koncentracije hemijskih agenasa i jačine zračenja.

Tabela 19. Komparativni prikaz degradacije hlorofila nakon 100 min oksidacionog stresa.

Degradacija hlorofila, %, nakon 100 min delovanja:					
$C_{chl}=5 \times 10^{-6} M$	VIS ozračivanja	UV-B ozračivanja	AAPH inicijatora	AMVN inicijatora	Fentonovog reagensa
U vodenom medijumu	29.50	93.00	30.50	/	27.00
U DPPC lipozomima	52.00	100.00	29.15	27.40	5.00
U PL-90 lipozomima	60.00	100.00	40.50	32.00	9.92

5. ZAKLJUČCI

- ❖ Na osnovu rezultata dobijenih apsorpcionom VIS spektrofotometrijom konstatovana je veća vremenska stabilnost hlorofila u lipozomima nego u vodenoj sredini. Takođe je primećena razlika u organizaciji Chl-molekula u vodi, kao i lipozomima. Nakon mesec dana stajanja, hlorofil je u vodenom rastvoru pokazao batohromno pomeranje apsorpcionog maksimuma (A_{\max} od 670 na 676 nm) što ukazuje na asocijativno ponašanje i moguću agregaciju, dok u lipozomima taj efekat nije zapažen čak i nakon 9 meseci.
- ❖ Nakon inkorporacije Chla i Chlida u lipozome ispitana je lokacija Chl-molekula primenom apsorpcione VIS spektrofotometrije i fluorescencije. Strukturna razlika Chla i Chlida utiče na različito inkorporisanje pigmenata u lipidnu membranu. Nedostatak fitilnog lanca onemogućava Chlida da dublje penetrira u lipozome. Svojim porfirinskim jezgrom Chla i Chlida su locirani između polarnih glava lipida, dok je fitilni lanac Chla lociran u hidrofobnoj unutrašnjosti lipozoma.
- ❖ Promene fizičkog stanja unutrašnjosti lipozoma koje su uslovljene strukturom lipida utiču na penetraciju i ponašanje inkorporisanih hlorofila. Zasićeni DMPC ili nezasićeni PC sastav lipida „definišu” različite fluidnosti lipozoma što se manifestuje kroz promene fluorescencije inkorporisanih Chla i Chlida. Poređenjem karakterističnih parametara anizotropne fluorescencije inkorporisanih pigmenata u DPPC, DMPC i PC lipozome uočena je razlika koja je posledica zasićenosti tj. nezasićenosti lipida ali i dužine lipidnih lanaca zasićenih DPPC / DMPC lipida. Polarni kvercetin lociran između glava lipida vrši tzv. quenching inkorporisanih hlorofila. U zavisnosti od dužine lipidnih lanaca (DMPC/DPPC) ali i (ne)zasićenosti strukture lipida (DMPC, DPPC/PC), quenching pigmenata je različito izražen. Najveći quenching je primećen u slučaju Chlida-PC lipozoma, zbog bliske pozicije insertovanog pigmenta i quencher-a između polarnih glava lipida.
- ❖ Foto(ne)stabilnost hlorofila na VIS i UV-B zračenje uslovljena je jačinom energije zračenja, medijumom u kome se hlorofili nalaze i koncentracijom pigmenata. Stres izazvan UV-B zračenjem, destruktivniji je u odnosu na VIS oksidacionim stres. Rezultati su takođe pokazali da osim nepovratne degradacije Chla dolazi do nastajanja degradacionih-oksidacionih produkata dejstvom slobodnih radikala pretežno na E prstenu Chla. Sistemi lipozoma sa inkorporisanim hlorofilima pokazali su se nestabilnijim prema

- fotooksidaciji u odnosu na vodeni medijum, što bi moglo da znači da je količina generisanih ROS vrsta dejstvom zračenja veća u lipozomima nego u vodenom medijumu.
- ❖ Enzimskom degradacijom hlorofila kao glavni produkt identifikovan je OH-Chl_a, čija se koncentracija proporcionalno povećava na račun smanjenja koncentracije hlorofila u smeši. Degradacija hlorofila zavisi od vrednosti pH i temperature, što ukazuje na činjenicu da je za degradaciju najodgovornija peroksidaza; povećanje temperature i pH vrednosti istovremeno dovodi do približavanja optimalnim vrednostima koje su neophodne za dejstvo peroksidaze iz rena.
 - ❖ Ispitivanjem stabilnosti hlorofila na dejstvo Fentonovog reagensa u vodenom medijumu primećen je veći stepen degradacije pri većim koncentracijama pigmenta. U vodenom medijumu procenat degradacije hlorofila je veći nego u lipozomima. S obzirom na to da su OH[•] radikali generisani kroz Fentonovu reakciju verovatno odgovorni za oksidaciju hlorofila, a da njihovo učešće u lipidnoj peroksidaciji (unutar lipozoma) verovatno nije dominantno, manji stepen degradacije hlorofila primećen u lipozomima u slučaju ovog hemijskog stresa vodi ka zaključku da su hlorofili inkorporisani u liposome zaštićeni i manje dostupni slobodnim radikalima.
 - ❖ Degradacija hlorofila dejstvom termalnog inicijatora u vodi zavisna je od koncentracije inicijatora i hlorofila. Sa povećanjem koncentracije hlorofila raste i stepen njegove degradacije. U lipozomima nije uočena bitnija razlika u pogledu stepena degradacije dejstvom AAPH radikala u odnosu na vodeni medijum. Sa druge strane, za razliku od vodorastvornog AAPH, lipoidni termalni inicijator, AMVN, generiše peroksidne radikale u samom lipidnom dvosloju što vrednosti degradacije hlorofila znatno povećava. Može se reći da lipoidni AMVN delovanjem i na same lipide lipidnog dvosloja, i na Chl-molekule inkorporisane u lipidni dvosloj, nesumnjivo doprinosi većoj degradaciji hlorofila.
 - ❖ Promene u vrednostima fluorescentne anizotropije nakon izlaganja dejstvu termalnog inicijatora i Fentonovog reagensa podržavaju činjenicu da Chl_a fluorofore bolje „osećaju” fleksibilnu unutrašnjost lipozoma zbog mogućnosti penetracije fitilnog lanca u hidrofobni dvosloj; nakon primenjenog oksidacionog stresa dolazi do promene sredine, što može biti posledica formiranja degradacionih produkata hlorofila čime dolazi i do promena u vrednostima anizotropije.
 - ❖ Na osnovu urađenih peroksidnih testova, za sisteme lipozoma sa inkorporisanim hlorofilom pre i posle dejstva svih oksidacionih stresova primenjenih u ovom radu, može se uočiti veći procenat nagrađenih peroksida u lipozomima koji u sastavu sadrže više od

50 % nezasićenih lipida (PL-90 smeša lipida) u odnosu na lipozome napravljene od zasićenih lipida (DPPC). Dva glavna faktora koja „proizvode” ovaj efekat su ROS vrste – i uopšte prisustvo kiseonika u lipozomima – kao i sama struktura lipida, odnosno prisustvo dvostrukih veza u njima, jer one presudno doprinose lakšem stvaranju lipidnih radikala, tj. iniciranju lančanog mehanizma lipidne peroksidacije.

ZAVRŠNI ZAKLJUČAK

Stabilnost hlorofila u vodenom medijumu i lipozomima ispitana je primenom različitih oksidacionih stresova *in vitro*. Generalno uzevši, vremenska stabilnost hlorofila manja je u vodenom medijumu u poređenju sa lipozomnim disperzijama kod kojih su hlorofili sa fitilnim lancem (a pre svega Chla) inkorporisani u lipidni dvosloj. Zaštitni efekat lipozoma koji je ovde zapažen podržava konstataciju da je za očuvanje stabilnosti hlorofila u dužem vremenskom periodu (od bar nekoliko meseci) bolji lipozomni od vodenog medijuma. Nakon primene oksidacionih stresova dobijeni rezultati su pokazali da je stabilnost hlorofila zavisna od koncentracije ali i prirode stresa. Za svaki od primenjenih oksidacionih stresova stabilnost hlorofila je zavisila od više faktora ali se generalno može reći da je hlorofil i u lipozomima, a posebno u vodenom medijumu pokazao mali stepen stabilnosti, što je rezultiralo stvaranjem degradacionih produkata. Detektovani degradacioni produkti su pre svega vezani za raskidanje fitilnog lanca, i uopšte za hemijske promene po donjem obodu hlorinske strukture (D i E pirol); destrukcione reakcije otvaranja porfirinsko-hlorinskog jezgra nisu zapažene. To bi značilo da se primenjeni oksidacioni stresovi – tj. uslovi pri kojima su primenjeni - mogu smatrati „neinvazivnim” u poređenju sa npr. reakcijama biodegradacije hlorofila u periodu starenja listova. Ipak, nestabilnost hlorofila na primenjene oksidacione stresove, kao i sama vremenska nestabilnost („autooksidacija”) nesumnjivo ograničava upotrebu hlorofila u farmaceutskim, kozmetičkim i dijetetskim formulacijama. Sa druge strane, vremenska nestabilnost hlorofila je veća u vodenom medijumu pa je poželjno koristiti lipozome – u različitim formama - kao „nosače” hlorofila. Hlorofil inkorporisan u lipozome nije bezuslovno zaštićen od degradacije što je primenom *in vitro* stresova i dokazano, pa je poželjno takve sisteme čuvati u mraku, zaštićene od svetlosti (jer se pokazalo da su hlorofili posebno osetljivi na fotooksidaciju, i to i kad je u pitanju ozračivanje vidljivom svetlošću i UV-B ozračivanje). Formulacije na bazi lipozoma sa inkorporisanim hlorofilima prodiru do dubljih slojeva kože što uz već opisanu veliku reaktivnost opravdava mogućnost upotrebe ovakvih sistema u PDT terapiji. Na osnovu iznetih rezultata može se zaključiti da je poznavanje što tačnijeg mehanizma ponašanja hlorofila pod dejstvom oksidacionih stresova, kao i njegove optimalne koncentracije i stabilnosti u potencijalnim formulacijama, od krucijalnog značaja za njegovu dalju upotrebu.

6. LITERATURA

- Agil A., Fuller C.J. & Jialal I. (1995): *Susceptibility of Plasma to Ferrous Iron/Hydrogen Peroxide-Mediated Oxidation: Demonstration of a Possible Fenton Reaction*, *Clinical Chemistry*, 41, 2, 220-225.
- Agostiano A., Catucci L., Colafemmina G., Della Monica M. (1996): *Chlorophyll a self-organization in microheterogeneous surfactant systems*, *Biophysical Chemistry*, 60, 17-27.
- Agostiano A., Cosma P., Trotta M., Monsù-Scolaro L., Micali N. (2002): *Chlorophyll a Behavior in Aqueous Solvents: Formation of Nanoscale Self-Assembled Complexes*, *J. Phys. Chem.*, 106, 49, 12820–12829.
- Alcher R.G., Donahue J.L., Cramer C.L. (1997): *Reactive oxygen species and antioxidants: Relationship in green cells*, *Physiologia Plantarum*, 100, 2, 224-233.
- Allan A. C. & Fluhr R. (1997): *Two Distinct Sources of Elicited Reactive Oxygen Species in Tobacco Epidermal Cells*, *The Plant Cell*, 9, 9, 1559-1572.
- Allison R. R., Sibat C.H. (2010): *Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review*, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 7, 61-75.
- Almela L., Fernandez-Lopez J.A., Roca M.J., (2000): *High-performance liquid chromatographic screening of chlorophyll derivatives produced during fruit storage*, *Journal of Chromatography A*, 870, 483–489.
- Amir-Shapira D., Goldschmit E., Altman A., (1987): *Chlorophyll catabolism in senescing plant tissues: in vivo breakdown intermediates suggest different degradative pathways for citrus fruit and parsley leaves*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 1901.
- Arora A., Sairam R.K. & Srivastava G.C. (2002): *Oxidative stress and antioxidative system in plants*, *Current Science*, 82, 10.
- Artem G. A. & Fredric S.C. (2006): *Lipid Peroxides Promote Large Rafts: Effects of Excitation of Probes in Fluorescence Microscopy and Electrochemical Reactions during Vesicle Formation*, *Biophysical Journal*, 91, 2172-2183.
- Baldini F. & Giannetti A. (2005): *Optical chemical and biochemical sensors: new trends*, *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, 5826, 485–499.

- Ballschmiter K. & Katz J.J. (1969): *Infrared study of chlorophyll-chlorophyll and chlorophyll-water interactions*, J. Am. Chem. Soc., 91, 10, 2661–2677.
- Bangham A. D., Standish M. M., and Watkins J. C. (1965): *Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids*, J. Mol. Biol., 13, 238-252.
- Barbinta-Patrascu M. E., Tugulea L. (2005): *Oxidative Stress Studies On Lipid Model Membranes*, Rom. Journ. Phys., 50, 1171–1178.
- Barbinta-Patrascu M. E., Tugulea L., Meghea A.(2009): *Procaine effects on model membranes with chlorophyll a*, Revista de Chimie, 60, 337-341.
- Barbusiński K. (2009): *Fenton reaction - controversy concerning the chemistry*, Ecological chemistry and engineering, 16, 3, 347-358.
- Barclay L.R.C., Locke S.J., MacNeil J.M., VanKessel J., Burton G.W., Ingold K.U. (1984): *Autoxidation of micelles and model membranes. Quantitative kinetic measurements can be made by using either water-soluble or lipid-soluble initiators with water-soluble or lipid-soluble chain-breaking antioxidants*, J. Am. Chem. Soc., 106, 2479–2481.
- Betigeri S., Thakur A., Raghavan K. (2005): *Use of 2,2 -Azobis(2-Amidinopropane) Dihydrochloride as a Reagent Tool for Evaluation of Oxidative Stability of Drugs*, Pharmaceutical Research, 22, 2, 310-317.
- Bittner O., Gal S., Pinchuk I., Danino D., Shinar H., Lichtenberg D. (2002): *Copper-induced peroxidation of liposomal palmitoyllinoleoylphosphatidylcholine (PLPC), effect of antioxidants and its dependence on the oxidative stress*, Chemistry and Physics of Lipids, 114, 81–98.
- Blume A. (1992): *Phospholipids as Basic Ingredients*, Liposome Dermatics, Griesbach Conference, pp 29-37.
- Bode K., Doring O., Liithje S., Neue H.-U., Bottger M. (1995): *The role of active oxygen in iron tolerance of rice (Oryza sativa L.)*, Protoplasma, 184, 249-255.
- Borst J.W., Visser N.V., Kouptsova O., Visser A.J.W.G. (2000): *Oxidation of unsaturated phospholipids in membrane bilayer mixtures is accompanied by membrane fluidity changes*, Biochim. Biophys. Acta., 1487, 61-73.

- Bose B., Agarwal S., Chatterjee S. N. (1990): *Membrane lipid peroxidation by UV-A: mechanism and implications*, Biotechnology and Applied Biochemistry, 12, 557 – 561.
- Boucher L.J. & Katz J.J. (1967): *Aggregation of Metallochlorophylls*, Journal of American Chemical Society 89, 4703-4708.
- Brown S.B., Houghton J.D., Hendry G.A.F. (1991): *Chlorophyll Breakdown*, In: CHLOROPHYLLS, (Eds. H. Scheer), Boca Raton, FL: CRC Press., pp.465-489.
- Canjura J.S., Schwartz B.R. van Breemen L., Fatima F. (1991): *Identification of chlorophyll derivatives by mass spectrometry*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 39, 1452-1456.
- Caspi V., Malkin S., Marder J.B. (2000): *Oxygen uptake photosensitized by disorganized chlorophyll in model systems and thylakoids of greening barley*, Photochemistry and Photobiology, 71, 4, 441-446.
- Chan J.Y., Tang P.M., Hon P.M., Au S.W., Tsui S.K., Waye M.M. (2006): *Pheophorbide a, a major antitumor component purified from Scutellaria barbata, induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell*, Planta Med, 72, 1, 28 - 33.
- Cheng S.J. & Gang Z. (2011): *Liposomal Nanostructures for Photosensitizer Delivery*, Lasers in Surgery and Medicine, 43, 734–748.
- Cherry R. J., Hsu K. & Chapman D. (1971): *Absorption spectroscopy of chlorophyll in bimolecular lipid membranes*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 43, 351-35.
- Chibisov A.K., Slavnova T.D., Georner H. (2003): *Effect of macromolecules and triton X-100 on the triplet of aggregated chlorophyll in aqueous solution*, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 72, 11–16.
- Chiu L.C., Kong C.K., Ooi V.E. (2005): *The chlorophyllin-induced cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells is associated with ERK deactivation and cyclin D1 depletion*, Int J Mol Med, 16, 4, 735 - 40.
- Comfort F.F., Chibuike C.U., Rotimi E.A. (2011): *Antioxidant properties of chlorophyll-enriched and chlorophyll-depleted polyphenolic fractions from leaves of Vernonia*

- amygdalina and Gongronema latifolium*, Food Research International, 44, 2435–2441.
- Cvetkovic D. & Markovic D. (2011): *Beta-carotene suppression of benzophenone-sensitized lipid peroxidation in hexane through additional chain-breaking activities*, Radiation Physics and Chemistry, 80, 1, 76-84.
- Cvetković D. & Marković D. (2008): *UV-induced changes in antioxidant capacities of selected carotenoids toward lecithin in aqueous solution*, Radiation Physics and Chemistry, 77, 34-41.
- Daood G.H., Czinkotai B., Hoschke A., Biacs P. (1989): *High-performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids from vegetables*, Journal of Chromatography, 472, 296 – 302.
- Dashwood R. H. (1997): *The importance of using pure chemicals in (anti)mutagenicity studies: Chlorophyllin as a case in point*, Mutation Research, 381, 283–286.
- Dashwood R., & Liew C. (1992): *Chlorophyllin-enhanced excretion of urinary and fecal mutagens in rats given 2-amino-3-methylimidazo [4, 5-f]quinoline*, Environmental and Molecular Mutagenesis, 20, 199–205.
- Deng W., Fang X., Wu J. (1997): *Flavonoids function as antioxidants: by scavenging reactive oxygen species or by chelating iron*, Radiation Physics and Chemistry, 50, 3, 271- 276.
- Diaz G.D, Li Q., Dashwood R.H. (2003): *Caspase-8 and apoptosis-inducing factor mediate a cytochrome c-independent pathway of apoptosis in human colon cancer cells induced by the dietary phytochemical chlorophyllin*, Cancer Res, 63, 6, 1254- 61.
- Dingley K.H., Ubick E.A., Chiarappa-Zucca M.L., Nowell S., Abel S., Ebeler S.E. (2003): *Effect of dietary constituents with chemopreventive potential on adduct formation of a low dose of the Heterocyclic Amines PhIP and IQ and Phase II Hepatic Enzymes*, Nutr. Cancer., 46, 2, 212-21.
- Dragičević- Ćurić N., Scheglmann D., Albrecht V., Fahr A. (2009): *Development of liposomes containing ethanol for skin delivery of temoporfin: Characterization and in vitro penetration studies*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 74, 114–122.

- Dragičević-Čurić N., Stupar M., Milić J., Zorić T., Krajišnik D., Vasiljević D. (2005): *Hydrophilic gels containing chlorophyllin-loaded liposomes: development and stability evaluation*, *Pharmazie* 60, 8, 588-592.
- Dragusin M., Tugulea L., Ganea C. (2010): *The effects of the natural antioxidant quercetin and anions of the Hofmeister series on liposomes marked with chlorophyll a*, *Gen. Physiol. Biophys.*, 29, 41-49.
- Dupont J. & Siegenthaler P.A. (1986): *A parallel study of pigment bleaching and cytochrome breakdown during ageing of thylakoid membranes*, *Plant Cell Physiol.*, 27, 473.
- Edreva A. (2005): *Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach*, *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 106, 119–133.
- Egner P.A., Muñoz A., Kensler T.W. (2003): *Chemoprevention with chlorophyllin in individuals exposed to dietary aflatoxin*, *Mutation Research*, 523–524, 209–216.
- Egner P.A., Stansbury K. H., Snyder E. P., Rogers, M. E., Hintz, P.A., & Kensler, T.W. (2000): *Identification and characterization of chlorin e4 ethyl ester in sera of individuals participating in the chlorophyllin chemoprevention trial*, *Chemical Research in Toxicology*, 13, 900–906.
- Faller P., Maly T., Rutherford A.W., Macmillan F. (2001): *Chlorophyll and carotenoid radicals in photosystem II studied by pulsed ENDOR*, *Article de revue, PubliCEA*, 9, 320–326.
- Ferruzzi M.G. & Blakeslee J. (2007): *Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives*, *Nutrition Research*, 27, 1– 12.
- Fortier A. Chanel., Guan Bing, Cole B. Richard, Tarr A. Matthew (2009): *Covalently bound fluorescent probes as reporters for hydroxyl radical penetration into liposomal membranes*, *Free Radical Biology & Medicine*, 46, 1376–1385.
- Frank A. H., Violette A. C., Trautman K. J., Shreve P. A., Owens G. T., Albrecht C. A. (1991): *Carotenoids in photosynthesis: structure and photochemistry*, *Pure and Applied Chemistry*, 63, 1, 109 – 114.

- Funamoto N., Yamauchi T., Shigenaga M., Shigyo, (2002): *Effects of heat treatment on chlorophyll degrading enzymes in stored broccoli (Brassica oleracea L.)*, Postharvest Biol. Tec. 24, 163–170.
- Funamoto Y., Yamauchi N., Shigyo M. (2003): *Involvement of peroxidase in chlorophyll degradation in stored broccoli (Brassica oleracea L.) and inhibition of the activity by heat treatment*, Postharvest Biol. Tec. 28, 39–46.
- Gamliel A., Afri M., Frime A.A. (2008): *Determining radical penetration of lipid bilayers with new lipophilic spin traps*, Free Radical Biology and Medicine, 44, 7, 1394–1405.
- Garrard L.A., Van T.K., West S.H. (1976): *Plant response to middle ultraviolet (UV-B) radiation: carbohydrate level and chloroplast reactions*, Soil and Crop Science Society of Florida, Proceedings, 36, 184–188.
- Garrido L.J. & Zapata M. (1998): *Detection of new pigments from Emiliana Huxleyi (Prymnesiophyceae) by High-Performance Liquid Chromatography, Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, Visible Spectrometry, and Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry*, Journal of Phycology, 34, 70 – 78.
- George A.F.H, Jennifer D.H., Stanley B.B. (1987): *The Degradation of Chlorophyll-A Biological Enigma*, New Phytologist, 107, 2, 255-302.
- Gerschman R., Gilbert D.L., Nye S.W., Dwyer P., Fenn F.O. (1954): *Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common*, Science, 119, 3097, 623–6.
- Girotti W.A. (2001): *Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms*, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 63, 103-113.
- Gouterman M. (1978): *Electronic Spectra*, In: THE PORPHYRINS, (Eds. D. Dolphin), Academic Press, pp. 1.
- Gregoriadis G. (1984): LIPOSOME TECHNOLOGY, Volume I, *Preparation of Liposomes*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Gregoriadis G. (2007): LIPOSOME TECHNOLOGY, Third Edition, *Liposome Preparation and Related Techniques*, Informa Healthcare USA, Inc., New York.

- Guang Y.C., Xin C., Yi S. & Xin H.L. (2009): *Spectral response of rice (Oryza sativa L.) leaves to Fe²⁺ stress*, Science in China Series C: Life Sciences, 52, 8, 747-753.
- Halliwell B. & Gutteridge J.M.C. (2007): *FREE RADICALS IN BIOLOGY AND MEDICINE*, Oxford University press, USA.
- Halliwell B., Chirico S. (1993): *Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significanc*, The American Journal of Clinical Nutrition, 57, 5, 715-725.
- Hanlon C.M. & Seybert W.D. (1997): *The pH dependence of lipid peroxidation using water-soluble azo initiators*, Free Radical Biology & Medicine, 23, 5, 712–719.
- Harbour J.R. & Bolton J.R (1978): *The involmment of the hydroxyl radical in the structive photooxidation of chlorophylls in vivo and in vitro*, Photochem. And Photobiol., 28, 231.
- Harman D. (1956): *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry*, J. Geront., 11, 298–300.
- Heaton J.W., Yada R.Y., Marangoni A.G. (1996): *Discoloration of Coleslaw Is Caused by Chlorophyll Degradation*, J. Agric. Food Chem., 44, 2, 395-398.
- Hendry G.A, Houghton D., Brown S.B (1987): *Degradation of chlorophyll 'a' biological enigma*, New Phytol., 107, 255-302.
- Hideg, É. & Vass, I. (1996): *UV-B induced free radical production in plant leaves and isolated thylakoid membranes*, Plant Science 115, 251–260.
- Hoff A.J., Amesz J. (1991): *Visible Absorption Spectroscopy of Chlorophylls*, In: CHLOROPHYLLS, (Eds. H. Scheer), CRC Press, pp. 723-738.
- Homem V., Alves A., Santos L. (2010): *Amoxicillin degradation at ppb levels by Fenton's oxidation using design of experiments*, Science of The Total Environment, 408, 24, 6272-80.
- Hongying Y., Meifen L., Wengeng Z., Hongia Z., Zhiyi Z. (1999): *Characteristics of photosensitization of Pheophorbide a in liposomal media*, Science in China, 42, 471-480.
- Hörtensteiner S. & Kräutler B. (2011): *Chlorophyll breakdown in higher plants*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics, 1807, 8, 977–988.

- Hortensteiner S. (1999): *Chlorophyll breakdown in higher plants and algae*, CMLS, Cell. Mol. Life Sci., 56, 330-347.
- Hoshina S. (1981): *Temperature dependence of optical properties of chlorophyll a incorporated into phosphatidylcholine liposomes*, Biochim. Biophys. A. 638, 334-340.
- Hovorka S.W. & Schoneich N.C. (2001): *Oxidative Degradation of Pharmaceuticals: Theory, Mechanisms and Inhibition*, Journal of Pharmaceutical Sciences, 90, 253-269.
- Hynninen P.H. (1991): *Modifications*, In: CHLOROPHYLLS (Eds. H. Scheer), CRC-Press, pp. 145-209.
- Ioannis S. A., Theodoros H. V., Sotirios K., & Athanasios E. L. (2010): *Lipids, Fats, and Oils*, In: ADVANCES IN FOOD BIOCHEMISTRY (Eds. Fatih Yildiz), CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 131-203.
- Itoh T., Ishii A., Kodera Y., Hiroto M., Matsushima A., Nishimura H., Inada Y. (1996): *Chlorophyllin coupled with polyethylene glycol: A potent photosensitizer*, Research on Chemical Intermediates, 22, 2, 129-136.
- Jackson A.H. (1976): *Structure, properties and distribution of chlorophylls*, In: CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF PLANT PIGMENTS, (2nd Eds. T.W. Goodwin), London, Academic press, pp 1-63.
- Janave M.T. (1997): *Enzymatic degradation of chlorophyll in Cavendish bananas: in vitro evidence for two independent degradative pathways*, Plant Physiol. Biochem., 35, 837-846.
- Jeffrey S.W. (1997): *Application of pigment methods to oceanography*. In: PHYTOPLANKTON PIGMENTS IN OCEANOGRAPHY: GUIDELINES TO MODERN METHODS, (Eds. S.W. Jeffrey, R.F. C. Mantoura, S.W. Wright), UNESCO, Paris pp. 127-166.
- Jen J.J. & MacKinney G. (1970): *On the photodecomposition of chlorophyll in vitro. ii. intermediates and breakdown products*, Photochemistry and Photobiology, 11, 5, 303-308.

- Kaewsuksaeng S., Yamauchi N., Funamoto Y., Mori T., Shigyo M., Kanlayanarat S. (2007): *Effect of heat treatment on catabolites formation in relation to chlorophyll degradation during storage of Broccoli (Brassica olearacea L. Italica Group) Florets*, J. Japan. Soc. Hort. Sci., 76, 338–344.
- Kamat J.P., Bloor K.K., Devasagayam T.P.A. (2000): *Chlorophyllin as an effective antioxidant against membrane damage in vitro and ex vivo*, Biochimica et Biophysica Acta, 1487, 113-127.
- Kano K., Fukuda K., Wakami H., Nishiyabu R., and Pasternack R.F. (2000): *Factors Influencing Self-Aggregation Tendencies of Cationic Porphyrins in Aqueous Solution*, J. Am. Chem. Soc., 122, 7494-7502.
- Katz J.J., Shipman L.L., Cotton T.M. & Janson T.R. (1978): *Chlorophyll Aggregation: Coordination Interactions in Chlorophyll Monomers, Dimers and Oligomers*, In: THE PORPHYRINS, (Eds. D. Dolphin), Academic Press, pp 401-458.
- Kehrer J.P. (1993): *Free radicals as mediators of tissue injury and disease*, Crit Rev Toxicol, 23, 1, 21-48.
- Kehrer J.P. (2000): *The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity*, Toxicology, 149, 43–50.
- Kephart J.C. (1955): *Chlorophyll derivatives—their chemistry, commercial preparations and uses*, Econ. Bot., 9, 3-38.
- Kim T.S., Park J.W., Kim M. & Lee J. (2013): *Effects of Lipophilic and Hydrophilic Antioxidants in oil-in-water Emulsions under Chlorophyll Photosensitization*, Food Sci. Biotechnol, 22, 1, 125-130.
- Kimura M., Rodriguez-Amaya B.D. (2002): *A scheme for obtaining standards and HPLC quantification of leafy vegetable carotenoids*, Food Chemistry, 78, 389 – 398.
- Kobayashi M., Akutsu S., Fujinuma D., Furukawa H., Komatsu H., Hotota Y., Kato Y., Kuroiwa Y., Watanabe T., Ohnishi-Kameyama M., Ono H., Ohkubo S., Miyashita H. (2013): *Physicochemical Properties of Chlorophylls in Oxygenic Photosynthesis*, In: PHOTOSYNTHESIS, (Eds. Z. Dubinsky), DOI: 10.5772/55460.

- Kunert K.J., Hornrighausen C., Bohme A., Boger P. (1985): *Oxyfluorfen and lipid peroxidation protein damage as a phytotoxic consequence*, Weed Science, 33, 766-770.
- Laguerre M., Lecomte J., Villeneuve P. (2007): *Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges*, Progress in Lipid Research, 46, 244–282.
- Lakowicz J.R. (1983): PRINCIPLES OF FLUORESCENCE SPECTROSCOPY, First Edition, Plenum press, New York.
- Lakowicz J.R. (2006): PRINCIPLES OF FLUORESCENCE SPECTROSCOPY, Third Edition, Springer, New York.
- Lanfer-Marquez U.M., Barros R.M.C., Sinnecker P. (2005): *Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives*, Food Research International, 38, 885–891.
- Larkum A.W.D., Karge M., Reifarth F., Eckert H.-J., Post A., Renger G. (2001): *Effect of monochromatic UV-B radiation on electron transfer reactions of photosystem II*, Photosynthesis Research, 68, 49–60.
- Lasch J., Schonfelder U., Walke M., Zellmer S., Beckert D. (1997): *Oxidative damage of human skin lipids. Dependence of lipid peroxidation on sterol concentration*, Biochimica et Biophysica Acta, 1349, 171-181.
- Lee A. G. (1975): *Segregation of chlorophyll a incorporated into lipid bilayers*, Biochemistry, 14, 4397-4402.
- Liang R., Liu Y., Fu L., Ai X., Zhang J., & Skibsted L.H. (2012): *Antioxidants and Physical Integrity of Lipid Bilayers under Oxidative Stress*, J. Agric. Food Chem, 60, 10331–10336.
- Lichtenthaler H.K. (1987): *Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes*, Methods in Enzymology, 148, 350-382.
- Lim C.K. (2009): *High-Performance Liquid Chromatography And Mass Spectrometry Of Porphyrins, Chlorophylls And Bilins*, Vol. 2, SGP: World Scientific Publishing Co. London. UK.
- Lingwood D. & Simons K. (2009): *Lipid rafts as a membrane-organizing principle*, Science, 327, 46 – 50.

- Llewellyn C.A., Fauzi R., Mantouro C. & Brereton R.G. (1990a): *Products of Chlorophyll Photodegradation - 1. Detection and Separation*, Photochemistry and Photobiology, 52, 1037-1041.
- Llewellyn C.A., Fauzi R., Mantouro C. & Brereton R.G. (1990b): *Products of Chlorophyll Photodegradation - 2. Structural Identification*, Photochemistry and Photobiology, 52, 1043-1047.
- London E. (2002): *Insights into lipid rafts structure and formation from experiments in model membranes*, Current Opinion in Structural Biology., 12, 480-486.
- Lopez-Ayerra B., Murciaa M. A. & Carmona F. G. (1998): *Lipid peroxidation and chlorophyll levels in spinach during refrigerated storage and after industrial processing*, Food Chemistry, 61, 113-118.
- Mangosá T.J. & Berger R.G. (1997): *Determination of major chlorophyll degradation products*, Z Lebensm Unters Forsch A., 204, 345-350.
- Markovic D.Z. & Zvezdanovic J.B. (2012): *Impact of molecular organization on UV-irradiation effects to chlorophyll stability: a base to understand biomedical applications*, In: CHLOROPHYLL: STRUCTURE, PRODUCTION AND MEDICINAL USES (Eds.H.Lee & E.Salcedo), Nova Science Publishers Inc., New York, pp.1-42.
- Marković D.Z. & Patterson L.K. (1989): *Radical processes in lipids. Selectivity of hydrogen abstraction from lipids by benzophenone triplet*, Photochem Photobiol., 49, 5, 531-5.
- Marković D.Z. (2001): *Benzophenone-sensitized peroxidation in compressed lipid monolayers at airwater interface*, Collect.Czech.Chem.Comm., 66, 1603-1614.
- Marković D.Z., Durand T., Patterson L.K. (1990): *Hydrogen abstraction from lipids by triplet states of derivatized benzophenone photosensitizers*, Photochem. Photobiol, 51 389-394.
- Marković D.Z. & Patterson L.K. (1993): *Benzophenone-sensitized lipid peroxidation in linoleate micelles*, Photochem.Photobiol, 58, 329-334.

- Martínez G.A., Civello P.M., Chaves A.R., Añón M.C. (2001): *Characterization of peroxidase-mediated chlorophyll bleaching in strawberry fruit*, *Phytochemistry*, 58, 379–387.
- Mata J.E., Yu Z., Gray J.E., Williams D.E., Rodriguez-Proteau R. (2004): *Effects of chlorophyllin on transport of dibenzo (a-l)pyrene, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-b]pyridine, and aflatoxin B1 across Caco-2 cell monolayers*, *Toxicology*, 196, 117–125.
- Matile P., Ginsberg S., Schellenberg M., Thomson H. (1987): *Catabolites of chlorophyll in senescent leaves*, *J. Plant Physiol.*, 129, 219.
- Maxwell K. & Johnson G.N. (2000): *Chlorophyll fluorescence—a practical guide*, *Journal of Experimental Botany*, 51, 345, 659-668.
- McKersie B.D. (1996): *OXIDATIVE STRESS*, University of Guelph, <http://www.plantstress.com/articles/oxidative%20stress.htm>
- McKersie, B.D., Hoekstra, F., and Krieg, L. (1990): *Differences in the susceptibility of plant membrane lipids to peroxidation*, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1030, 119-126.
- Michalak A. (2006): *Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress*, *Polish J. of Environ. Stud.*, 15, 4, 523-530.
- Milenkovic S., Barbanta- Patrascu M., Baranga G., Markovic D., Tugulea L. (2013): *Comparative spectroscopic studies on liposomes containing chlorophyll a and chlorophyllide a*, *General Physiology and Biophysics*, 32, 559–567.
- Mimica-Dukić N. (1997): *In Vivo i In Vitro ispitivanja antioksidantnih svojstava biljnih ekstrakata*, *Archives of Pharmacy*, 5, 7, 475-493.
- Minotti G. & Aust S.D. (1987): *The Requirement for Iron(III) in the Initiation of Lipid Peroxidation by Iron(II) and Hydrogen Peroxide*, *The Journal Of Biological Chemistry*, 262, 3, 1098-1104.
- Moan J. (2001): *Visible light and UV radiation*, In: *RADIATION AT HOME, OUTDOORS AND IN THE WORKPLACE*, (Eds. D. Brune, R. Helborg, B. R. R. Persson and R. Paakkonen), Scandinavian Science Publishers, Oslo, Norway.

- Moore W.J. (1962): PHYSICAL CHEMISTRY, Fourth ed. Longmans Green and Co Ltd, London, pp. 761–763.
- Moser J.G. (1998): *Definitions and general properties of 2nd and 3rd generation photosensitizers*, In: PHOTODYNAMIC TUMOR THERAPY. 2ND AND 3RD GENERATION PHOTSENSITIZERS, (Eds. J. G. Moser), Harwood Academic Publishers, pp.3-7.
- Мосин О.В. (2006): *The Function And The Structure Of Porphyrin Molecules*, Журнал Самиздат.
- Mravec F., Klucakova M., Pekar M. (2011): *Fluorescence Spectroscopy Study of Hyaluronan–Phospholipid Interactions*, In: ADVANCES IN PLANAR LIPID BILAYERS AND LIPOSOMES, (Eds. Ales Iglic), Vol.14,. Academic press USA, 235-254.
- Muhlecker W., Krautler B., Ginsberg S., Matile P. (1993): *Breakdown of chlorophyll: a tetrapyrrolic chlorophyll catabolite from senescent rape leaves*, Helvetica Chimica Acta, 76, 2976–2980.
- Müller R.H. (1996): *Zetapotential-Theorie*, In: ZETAPOTENTIAL UND PARTIKELLADUNG IN DER LABERPRAXIS, (Eds. R.H. Müller), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, pp. 19-99.
- Murata N. & Sato N. (1978): *Studies on the absorption spectra of chlorophyll a in aqueous dispersions of lipids from the photosynthetic membranes*, Plant & Cell Physiol, 19, 401-410.
- New R.R.C. (1990): LIPOSOMES A PRACTICAL APPROACH, (Eds. New R.R.C.), IRL press, Oxford University.
- Niki E., Yamamoto Y., Komuro E., & Sato K. (1991): *Membrane damage due to lipid oxidation*, Am J. Clin Nutr, 53, 201S-5S.
- Noguchi N., Yamashita H., Gotoh N., Yamamoto Y., Numano R., & Niki E. (1998): *2,2'-azobis (4-methoxy-2,4 dimethylvaleronitrile) , a new lipidsoluble azo initiator: application to oxidations of lipids and low-density lipoprotein in solution and in aqueous dispersions*, Free Radical Biology & Medicine, 24, 2, 259–268.

- Odin A.P. (1997): *Antimutagenicity of the porphyrins and non-enzyme*, Mutat. Res., 387, 55 - 68.
- Ohlsson A.B., Berglund T., Komlos P., Rydström J. (1995): *Plant defense metabolism is increased by the free radical-generating compound AAPH*, Free Radic Biol Med., 19, 3, 319 -27.
- Okai Y., Higashi-Okai K. (1997): *Potent suppressing activity of the non-polyphenolic fraction of green tea (Camellia sinensis) against genotoxin-induced umu C gene expression in Salmonella typhimurium (TA 1535/pSK 1002)-association with pheophytins a and b*, Cancer Lett., 120, 1, 117-23.
- Patrascu M. E., Tugulea L., Lacatusu I., Meghea A. (2010): *Spectroscopic characterization of model systems with lipids and chlorophyll*, Mol.Cryst.Liq.Cryst. (U.S.A.), 522, 448-458.
- Patrascu M.E., Tugulea L., Meghea A., Popescu A. (2008): *Oxidative stress on liposomes with chlorophyll a monitored by spectral studies*, Optoelectronics and Advanced Materials 2, 113–116.
- Pennington F.C., Strain H.H., Svec W.A., Katz J.J. (1963): *Preparation and properties of pyrochlorophyll a, methyl pyrochlorophyllide a, pyropheophytin a, and methyl pyropheophorbide a derived from chlorophyll by decarbomethoxylation, contribution from the chemistry division, argonne national laboratory argonne*, J. Am. Chem. Soc., 86, 7, 1418-1426.
- Petrović S., Savić S., Marković D., Petronijević Ž. (2014): *In vitro studies of temperature and pH influence on chlorophyll degradation by horseradish peroxidase: Spectroscopic and HPLC studies*, Chemical industry, 68, 2, 233-239.
- Pryor W.A. (1976): *FREE RADICALS IN BIOLOGY*, Volume 2, Academic press, Inc. New York.
- Ramirez-Niño J., Mendoza D., Castaño V.M. (1998): *A comparative study on the effect of gamma and UV irradiation on the optical properties of chlorophyll and carotene*, Radiation Measurements, 29, 2, 195-202.
- Rawicz W., Oldrich K.C., McIntosh T., Needham D., Evans E. (2000): *Effects of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers*, Biophys. J., 79, 328-339.

- Rengel D., Diez-Navajas A., Serna-Roco A., Veiga P., Muga A., Milicua J.C.G. (2000): *Exogenously incorporated ketocarotenoids in large unilamellar vesicles. Protective activity against peroxidation*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1463, 179-187.
- Renger G., Völker M., Eckert H.J., Fromme R., Hohm-Veit S., Graber P. (1989): *On the mechanism of photosystem II deterioration by UV-B irradiation*, *Photochemistry and Photobiology*, 49, 97–105.
- Ricchelli F. (1991): *Liposomes as models to study distribution of porphyrins in cell membranes*, *Biochimica et Biophysica Acta (Netherlands)* 1065, 42-48
- Rontani J.F. and Aubert C. (1994): *Effect of oxy-free radicals upon the phytyl chain during chlorophyll a photodegradation*, *I. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 79, 167-172.
- Ruban A. (2010): *Identification of Peripheral Xanthophylls: The Xanthophylls Cycle*, In: CAROTENOIDS, PHYSICAL, CHEMICAL, AND BIOLOGICAL FUNCTIONS AND PROPERTIES, (Eds. J.T. Landrum), CRC Press, Taylor & Francis Group: Boca Raton, pp. 127-130.
- Ruban A.V., Pascal A., Lee P.J., Robert B., Horton P. (2002): *Molecular configuration of xanthophyll cycle carotenoids in photosystem II antenna complexes*, *Journal of Biological Chemistry*, 277, 45, 42937-42942.
- Rudiger W., (2006): *Biosynthesis of chlorophylls a and b: the last steps*, In: CHLOROPHYLLS AND BACTERIOPHYLLS. BIOCHEMISTRY, BIOPHYSICS, BIOCHEMISTRY, BIOPHYSIC, FUNCTIONS AND APPLICATIONS, (Eds. B. Grimm, R.J. Porra, W. Rudiger & H. Scheer), Series „Advances in Photosynthesis and Respiration” (Eds. Govindjee), Dordrecht, The Netherlands: Springer, 25, 189-200.
- Santabarbara S. (2006): *Limited sensitivity of pigment photo-oxidation in isolated thylakoids to singlet excited state quenching in photosystem II antenna*, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 455, 77-88.
- Scheepers J.C., Malan S.F., Du Preez J.L. & Van Dyk S. (2011): *The high performance liquid chromatography (HPLC) analysis of ultraviolet (UV) irradiated chlorophyll a and secondary plant compounds*, *African Journal of Biotechnology*, 10, 74, 16976-16985.
- Scheer H. (2003a): *The Pigments*, In: LIGHT HARVESTING ANTENNAS IN PHOTOSYNTHESIS, (Eds. B. R. Green, W. Parson), Kluwer Academic Publishers, p. 29–81.

- Scheer H., (2003b): *Chemistry and Spectroscopy of Chlorophylls*, In: CRC HANDBOOK OF "ORGANIC PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY, (2nd Eds. W. Horspool, F. Lenci), CRC Press, 117-1 – 117-16.
- Scheer H., (2007): *An overview of chlorophylls and bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysic, Functions and applications*, In: CHLOROPHYLLS AND BACTERIOCHLOROPHYLLS, (Eds. B. Grimm and R. Porra) Springer, The Netherlands, 1-26.
- Schoch S., Scheer H., Schiff J. A., Rudiger W., Siegelman H.W. (1981): *Phyropheophytin a accompanies Pheophytin a in darkened light-grown cell of Euglena*, Z. Naturforsch, 36c, 827.
- Scholz B. & Ballschmiter K. (1981): *Preparation and reversed-phase HPLC of Chlorophylls*, Journal of Chromatography, 208, 148-155.
- Shen B., Jensen R. & Bohnert H. (1997): *Mannitol protects against Oxidation by Hydroxyl Radicals*, Plant Physiol., 115, 527-532.
- Simonich M. T., McQuistan T., Jubert C., Pereira C., Hendricks J.D., Schimerlik M., (2008): *Low-dose dietary chlorophyll inhibits multi-organ carcinogenesis in the rainbow trout*, Food and Chemical Toxicology, 46, 1014–1024.
- Sodergren E. (2000): *„Lipid peroxidation in vivo”*, Dissertation, Acta Universitatis Upsaliensis, Uppsala, pp. 10-30.
- Soto-Arriaza M.A., Sotomayor C.P., Lissi E.A. (2008): *Relationship between lipid peroxidation and rigidity in L- α -phosphatidylcholine-DPPC vesicles*, Journal of Colloid and Interface Science, 323, 70–74.
- Sterpone F., Bedard-Hearn M.J., Rossky P.J. (2009): *Nonadiabatic Mixed Quantum-Classical Dynamic Simulation of π -Stacked Oligophenylenevinylenes*, J. Phys. Chem. A., 113, 3427-30.
- Stevanović J., Borozan S., Jović S., Ignjatović I. (2011): *Physiology Of Free Radicals*, Vet. Glasnik, 65, 95 – 107.

- Stevanović J., Kovačević-Filipović M., Vlački M., Popović D., Borozan S., Jović S., Božić T. (2005): *A study on oxidative stress and peripheral blood parameters of cows bred in the area exposed to depleted uranium ammunition*, Acta Veterinaria, 55, 4, 269-78.
- Stuchlík M. & Žák S. (2001): *Lipid-based vehicle for oral drug delivery*, Biomed. Papers, 145, 2, 17–26.
- Subczynski W.K. & Widomska J. (2010): *EPR Spin Labeling in Carotenoid–Membrane Interactions*, In: CAROTENOIDS: PHYSICAL, CHEMICAL, AND BIOLOGICAL FUNCTIONS AND PROPERTIES, (Eds. J. Landrum), CRC Press, Boca Raton, pp. 189-212.
- Svec W. A. (1978): *The isolation, preparation, characterization and estimation of the chlorophylls and the bacteriochlorophylls*, In: THE PORPHYRINS, (Eds. D. Dolphin), Academic Press, pp. 341-399.
- Tang L., Zhang Y., Qian Z., Shen X. (2000): *The mechanism of Fe²⁺-initiated lipid peroxidation in liposomes: the dual function of ferrous ions, the roles of the pre-existing lipid peroxides and the lipid peroxy radical*, Biochemical Journal, 352, 27-36.
- Tevini M., Iwanzik W., Thoma U. (1981): *Some effects of enhanced UV-B irradiation on the growth and composition of plants*, Planta, 153, 388-394.
- Tian L.Q.M., Huang Y.M., Kheng T.B. (2000): *Lipid peroxidation in small and large phospholipid unilamellar vesicles induced by water-soluble free radical sources*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 273, 72-76.
- Tollin G. (1991): *Chlorophyll photochemistry in microheterogeneous media*, In: CHLOROPHYLLS (Eds. H. Scheer), CRC Press, Boca Raton, FL, 317-337.
- Torchilin V., Weissig V. (2003): LIPOSOMES, Second Edition, A Practical Approach, Oxford University Press Inc., New York.
- Țugulea L., Pașcanu S. (1996): *Chlorophyll a - molecular sensor in model lipid membranes*, Rom. J. Biophys., 6, 1–10.
- Tumolo T. & Lanfer-Marquez M.U. (2012): *Copper chlorophyllin: A food colorant with bioactive properties?*, Food Research International, 46, 451–459.

- Turcsányi E. & Vass I. (2000): *Inhibition of photosynthetic electron transport by UVA radiation targets the photosystem II complex*, Photochemistry and Photobiology, 72, 513–520.
- Vass I., Cser K., Cheregi O. (2007): *Molecular mechanisms of light stress of photosynthesis*, Annual New York Academy of Sciences, 1113, 114–122.
- Vass I., Turcsányi E., Touloupakis E., Ghanotakis D., Petroluleas V. (2002): *The mechanism of UV-A radiation-induced inhibition of photosystem II electron transport studied by EPR and chlorophyll fluorescence*, Biochemistry, 41, 10200–10208.
- Vemuri S. & Rhodes C.T. (1994): *Development and Characterization of a Liposome Preparation by a pH-Gradient Method*, Journal of Pharmacy and Pharmacology, 46, 778–783.
- Vladkova R. (2000): *Chlorophyll a Self-assembly in Polar Solvent - Water Mixtures*, Photochemistry and Photobiology, 71, 1, 71-83.
- Vu C.V., Allen Jr.L.H., Garrard L.A. (1984): *Effects of UV-B radiation (280–320 nm) on ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase in pea and soybean*, Environmental and experimental botany, 24, 131–143.
- Vuleta G., Milić J., Cekić N. (2003): *Savremeni kozmetički proizvodi za negu kože-formulacije i zahtevi za kvalitet*, Hem. Ind, 57, 10, 463-470.
- Walker D.A, Cerović Z.G. & Robinson S.P. (1987): *Isolation of Intact Chloroplasts: General Principles and Criteria of Integrity*, Methods in Enzimology, 148, 145-157.
- Walker J.S. & Kelly J.B. (2004): *Distribution and significance of chlorophyll derivatives and oxidation products during the spring phytoplankton bloom in the Celtic Sea April 2002*, Organic Geochemistry, 35, 1289–1298.
- Walker J.S., Squier A.H., Hodgson D.A., Keely B.J. (2002): *Origin and significance of 13²-hydroxychlorophyll derivative in sediments*, Organic Geo chemistry 33, 1667–1674.
- Wang J., Guo Y., Gao J., Jin X., Wang Z., Wang B., Li K., Li Y. (2011): *Detection and comparison of reactive oxygen species (ROS) generated by chlorophyllin metal (Fe, Mg and Cu) complexes under ultrasonic and visible-light irradiation*, Ultrason Sonochem., 5, 1028-34.

- Watanabe T., Hongu A., Honda K., Nakazato M., Konno M., Saitoh S. (1984): *Preparation of chlorophylls and pheophytins by isocratic liquid chromatography*, Anal. Chem., 56, 2, 251–256.
- Werber J., Wang Y.J., Milligan M., Li X., Ji J.A. (2011): *Analysis of 2,2-Azobis (2-Amidinopropane) Dihydrochloride Degradation and Hydrolysis in Aqueous Solutions*, Journal of Pharmaceutical Sciences, 100, 3307–3315.
- Wheatley R. (2000): *Some recent trends in the analytical chemistry of lipid peroxidation*, Trends in Analytical Chemistry, 19, 10, 617-628.
- Winterbourn C.C. (1995): *Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction*, Toxicology Letters, 82/83, 969-974.
- Wisniewska A. & Subczynski W.K. (2006a): *Distribution of macular xanthophylls between domains in a model of photoreceptor outer segment membranes*, Free Radical. Biol. Med., 41, 1257-1265.
- Wisniewska A. & Subczynski W.K. (2006b): *Accumulation of macular xanthophylls in unsaturated membrane domains*, Free Radical. Biol. Med., 40, 1820-1826.
- Woodall A. Alan and Britton George (1997): *Carotenoids and protection of phospholipids in solution or in liposomes against oxidation by peroxy radicals: Relationship between carotenoid structure and protective ability*, Biochimica et Biophysica Acta, 1336, 575–586.
- Woodward R.B., Ayer W.A., Beaton J.M., Bickelhaupt F., Bonnett R., Buchschacher P., Closs G. L., Dutler H., Hannah J., Hauck F. P., Itô S., Langemann A., Le Goff E., Leimgruber W., Lwowski W., Sauer J.,Valenta Z., Volz H. (1960): *The total synthesis of chlorophyll*, J. Amer. Chem. Soc., 82, 3800-3802.
- Woolley P.S., Keely B.J., Hester R.E. (1998): *Chlorophyll and pheophytin derivatives in geochemical transformation pathways: A surface-enhanced resonance Raman spectroscopic study*, Biospectroscopy, 4, 147-159.
- Xia Q., Yin J.J., Chreng S. Wamer G.W., Boudreau M., Howard C.P., Fu P.P. (2006): *UVA photoirradiation of retinyl palmitate – formation of singlet oxygen and superoxide, and role in induction of lipid peroxidation*, Toxicology Letters, 163, 1, 30-43.

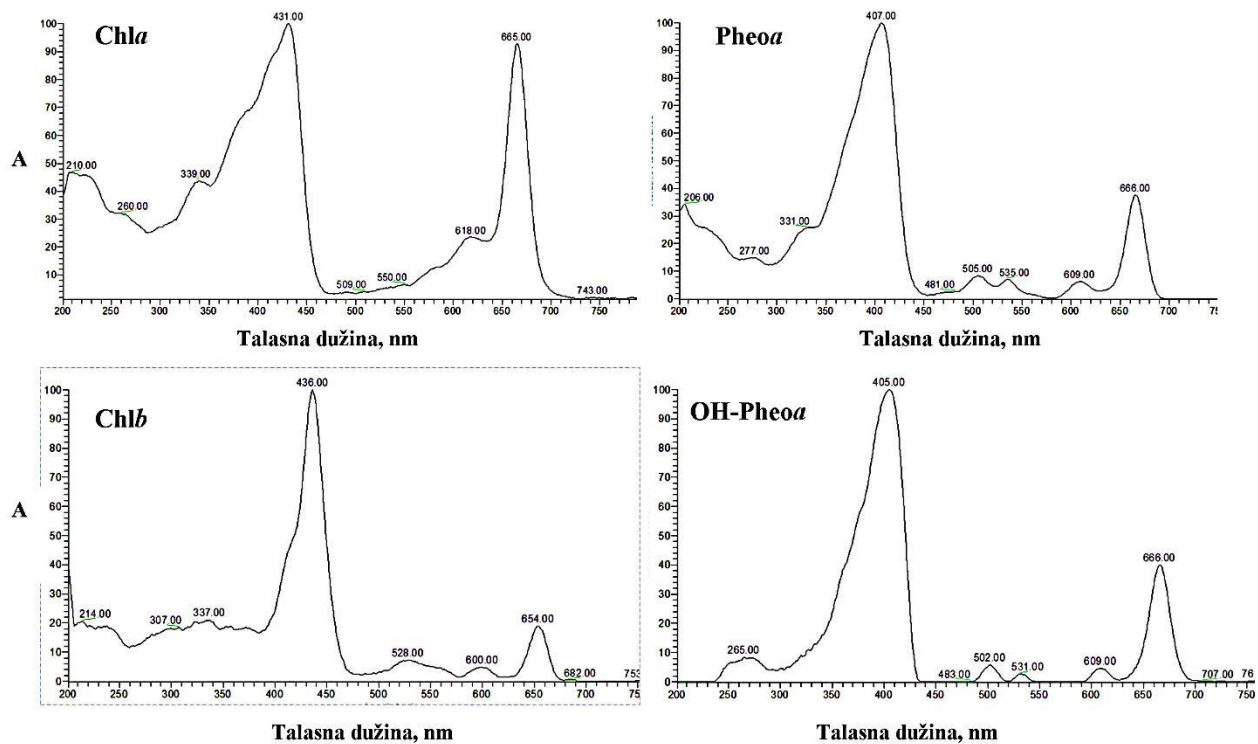
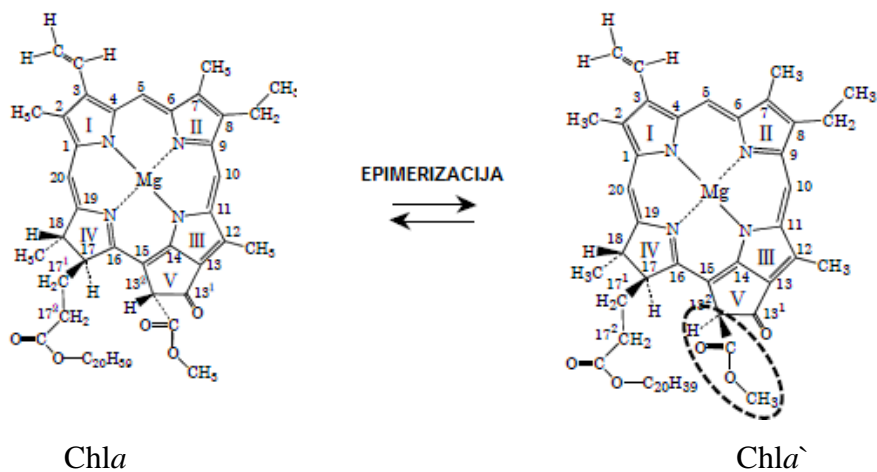
- Yamamoto A., Ichihara K. & Hoshi K. (2001): *Antioxidative effect of uvastatin, an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, on peroxidation of phospholipid liposomes*, Journal of Pharmacy and Pharmacology, 53, 227-232.
- Yamauchi N. & Minamide T. (1985): *Chlorophyll degradation by peroxidase in parsley leaves*, J. Japan. Soc. Hort. Sci., 54, 265-271.
- Yamauchi N. & Watada A.E. (1994): *Effectiveness of various phenolic compounds in degradation of chlorophyll by in vitro peroxidase-hydrogen peroxide system*, J. Japan. Soc. Hort. Sci., 63, 439-444.
- Yamauchi N., Funamoto Y., Shigyo M. (2004): *Peroxidase-mediated chlorophyll degradation in horticultural crops*, Phytochemistry Rev., 3, 221-228.
- Yoshida Y., Itoh N., Saito Y., Hayakawa M. & Niki E. (2004): *Application of Water-Soluble Radical Initiator, 2,20-Azobis- [2-(2-imidazolin-2-yl)propane] Dihydrochloride, to a Study of Oxidative Stress*, Free Radical Research, 38, 375-384.
- Yoshitaka S. & Tamiaki H. (2012): *Demetalation of Chlorophyll Pigments*, Chemistry & Biodiversity, 9, 1659-1682.
- Yuzo S., Kenji W., Kenichiro T. (1996): *Enzymatic Conversion of Pheophorbide a to the Precursor of Pyropheophorbide a in Leaves of Chenopodium album*, Plant Cell Physiol. 37, 8, 1143-1149.
- Zvezdanović J., Cvetić T., Veljović-Jovanović S. & Marković D., (2009): *Chlorophyll bleaching by UV-irradiation in vitro and in situ: Absorption and fluorescence studies*, Radiation Physics and Chemistry, 78, 25-32.

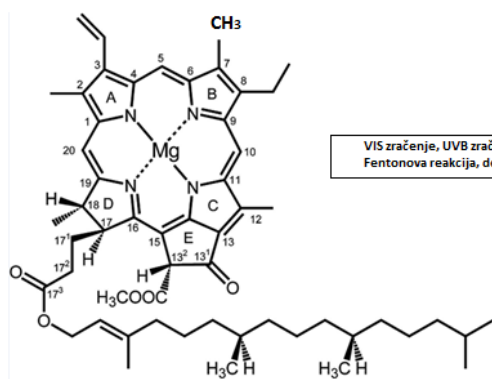
Patenti

- George S. Bailey, Corvallis, OR(US); Carole Jubert, Corvallis, OR (US); John E. Mata, Corvallis, OR (US); Scott Gustafson, Corvallis, OR (US); J. S. Dunfield, Corvallis, OR (US): *Pharmaceutical formulation comprising a metaloporphyrin and method for its purification and use*, Pub. No.: US 2008/0139524 A1.
- Govind Rao, Ellicott City, MD: *Chlorophyll and turbidity sensor system*, Pub. No.: US 2011/0273705 A1
- Michèle Eymard Du Vernet, Paris: *Composition for photodynamic skin treatment*, Pub. No.: US 2010/0255045 A1.

Peter Ladislaus Dorogi, Easton, PA (US); David Bruce Vasily, Bethlehem, PA (US); John Patrick McCook, Frisco, TX (US): *Skin treatment compositions containing copper-pigment complexes*, Pub. No.: US 2010/0247591 A1.

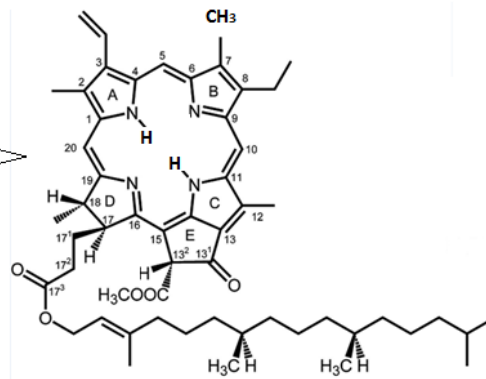
ANEX

Apsorpcioni spektri hlorofila i hlorofilnih derivata.*Formiranja degradacionih produkata nakon izlaganja oksidacionim stresovima.*

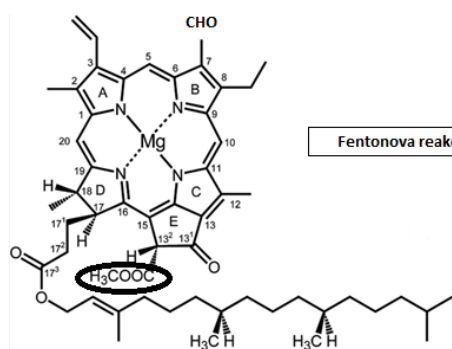


Chla

VIS zračenje, UVB zračenje,
Fentonova reakcija, dejstvo AAPH

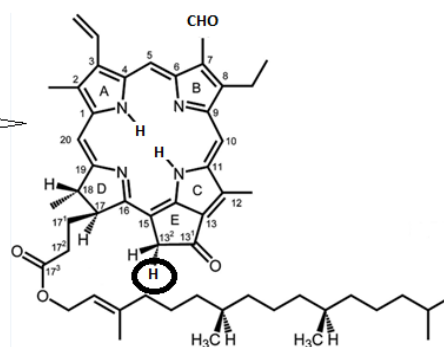


Pheoa

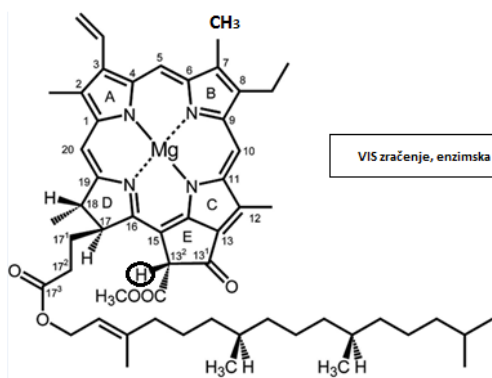


Pheob

Fentonova reakcija, dejstvo AAPH

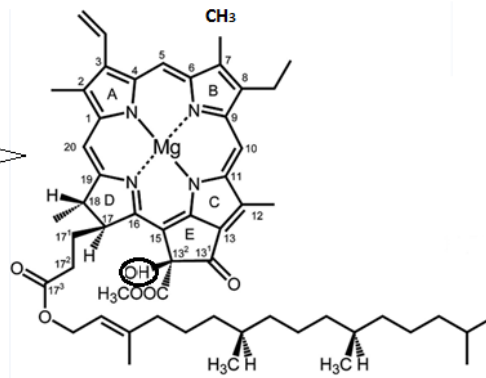


piroPheob

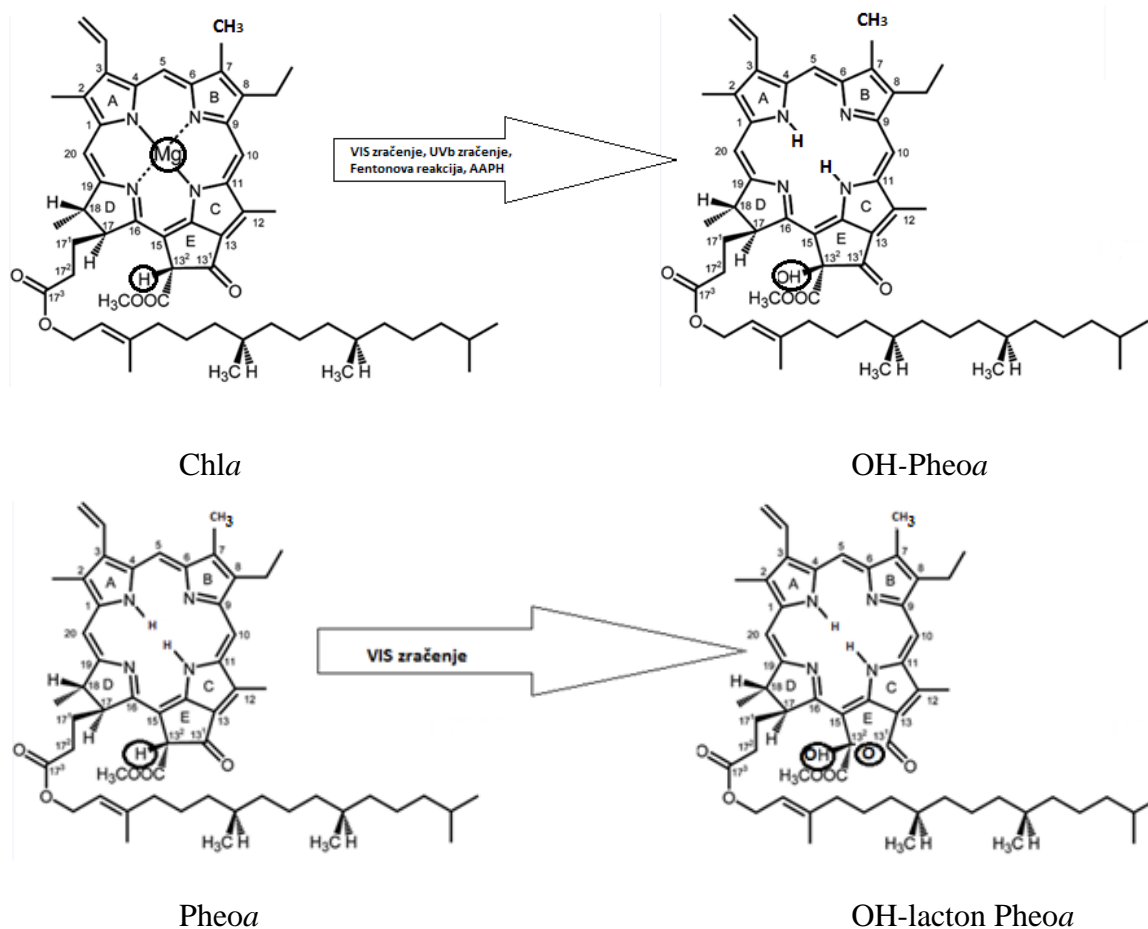


Chla

VIS zračenje, enzimski oksidacija



OH-Chla



Lipidi i njihove karakteristike

Naziv lipida-eng.	Skraćenica	Mol. Masa (g/mol)	Temperatura faznog prelaza (°C)	Hemijska strukturna formula
DiMyristoylPhosphatidylCholine	DMPC	678	23	
DiPalmitoylPhosphatidylCholine	DPPC	734	41	
1,2-Diacyl-sn-glycero-3-phosphocholine	PC	768	-15	/
PHOSPHOLIPON 90®	PL-90	760	/	/

OPŠTI BIOGRAFSKI PODACI



Sanja M. Petrović (r. Milenković) rođena je 17.02.1985. godine u Leskovcu. Osnovnu školu završila je sa odličnim uspehom i nosilac je Vukove diplome. Srednju, Hemijsko tehnološku školu „Božidar Đorđević - Kukar”, završila je kao đak generacije. Upisala je Tehnološki fakultet u Leskovcu 2003. godine, na smeru Farmaceutsko-kozmetičko inženjerstvo. Studije je završila 2009. godine odbranom diplomskog rada na temu: „Praćenje stabilnosti kompleksa hlorofila sa teškim metalima VIS spektrofotometrijom”. Po završetku osnovnih studija nastavila je usavršavanje. Nakon diplomiranja, u toku 2009. godine, obavila je stručnu praksu u kompaniji „Zdravlje-Aktavis” iz oblasti: Instrumentalne tehnike u fizičko-hemijskim laboratorijama Sektora Kvaliteta. Doktorske studije na Tehnološkom fakultetu u Leskovcu upisala je 2010. godine na smeru Tehnološko inženjerstvo. Položila je sve ispite predviđene planom i programom sa prosečnom ocenom 10. Aprila 2015. godine izabrana je u zvanje asistent, na katedri za Organsko-tehnološke nauke Tehnološkog fakulteta u Leskovcu. Od školske 2011/2012. godine, kao Stipendista, angažovana je na izvođenju vežbi iz predmeta Hromatografske metode u organskoj analizi, Kontrola i sistemi kvaliteta, Tehnologija vode, Obrada otpadnih voda i Adsorpcioni procesi na Tehnološkom fakultetu u Leskovcu. Takođe je angažovana u realizaciji projekta „Biljni i sintetički bioaktivni proizvodi novije generacije” (Ev. br. TR-34012), finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (od 2011. god). U periodu od 2012. do 2013. god. bila je član Saveta Tehnološkog fakulteta kao predstavnik studenata. Aktivno učestvuje u rešavanju zadataka u razvoju novih tehnologija. Kao rezultat tog rada razvijeni su laboratorijski postupci i idejna tehnološka rešenja za potrebe „DIAPHARM DOO” Niš. Uspešno je završila obuku za rad na gasnomasenom spektrometru (GC-MS), diferencijalno skenirajućem kalorimetru (DSC) i atomskom emisionom spektrometru sa induktivno kuplovanom plazmom (ICP-AES). Takođe je pohađala letnju školu masene spektrometrije: „9th Mass Spectrometry School, The Mass Spectrometry in Environmental and Biochemical Analysis”, Univerziteta u Nišu i Univerziteta Pierre et Marie Curie, Pariz, Francuska. Sanja Petrović je boravila na stručnom usavršavanju na Fakultetu za Fiziku Univerziteta u Bukureštu (Faculty of Physics, Department of Electricity and Biophysics, University of Bucharest, Bucharest - Magurele) tokom oktobra 2011. godine, maja-juna 2012. godine i septembra 2013. godine (saradnja sa prof. Laura-om Tugulea-om).

BIBLIOGRAFIJA

Radovi kandidata u vezi sa doktorskom disertacijom

Rad u časopisu međunarodnog značaja (M23)

1. **Sanja M. Petrović**, Saša Savić, Dejan Marković, Živomir Petronijević (2014): *In vitro studies of temperature and pH influence on chlorophyll degradation by horseradish peroxidase: Spectroscopic and HPLC studies*, Chemical Industry, 68(2), 233-239.
2. **Sanja M. Milenkovic**, Marcela Barbanta-Patrascu, Gabriel Baranga, Dejan Markovic, Laura Tugulea (2013): *Comparative spectroscopic studies on liposomes containing chlorophyll a and chlorophyllide a*, General Physiology and Biophysics, 32, 559–567.
3. Jelena Zvezdanović, Dejan Marković, **Sanja M. Milenković** (2012): *Zinc (II) and copper (II) complexes with pheophytin and mesoporphyrin and their stability to UV-B irradiation: VIS spectroscopy studies*, Journal of the Serbian Chemical Society, 77(2), 187-199.
4. Jelena Zvezdanović, **Sanja M. Petrović**, Dejan Marković, Tatjana Andjelković, Darko Andjelković (2014): *Electrospray ionization mass spectrometry combined with ultra high performance liquid chromatography in the analysis of in vitro formation of chlorophyll complexes with copper and zinc*, Journal of the Serbian Chemical Society, 79(6), 689–706.

Rad u časopisu međunarodnog značaja verifikovan posebnom odlukom (M24=3)

1. **Sanja M. Petrović**, Laura Tugulea, Dejan Z. Marković, Marcela Barbinta-Patrascu: *Chlorophyll a and chlorophyllide a inside liposomes made of saturated and unsaturated lipids: a possible impact of the lipids microenvironment*, Acta Periodica Technologica, 45, 215-227.

Predavanje po pozivu sa međunarodnog skupa štampano u izvodu (M32)

1. Dragan Cvetković, **Sanja M. Milenković**: *Investigation of carotenoids and chlorophylls incorporation inside liposomes*, Advanced Workshop: New Trends in Nanophysics and Solar Energy Conversion, Faculty of Physics, University of Bucharest-Magurele, Romania, p. 18, 23-25. September (2013).

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu (M34)

1. **Sanja M. Milenkovic**, L. Tugulea, M. Barbanta-Patrascu, G. Baranga, D. Markovic: *Spectroscopic studies on liposome containing chlorophyll a and chlorophyllide a*, 2012 Annual Scientific Conference, Bucharest, Romania, 3.17, p.64, 22-23. June (2012).
2. **Sanja M. Milenkovic**, L. Tugulea, M. Barbanta-Patrascu, G. Baranga, D. Markovic: *Quercetin Effects on Model lipid Membranes monitored by Chlorophyll Derivatives*, 12th Eurasia Conference on Chemical Sciences Corfu, Greece, S2-OP11, p.45, 16-21. April (2012).
3. Laura Tugulea, Marcela Elisabeta Barbinta-Patrascu, Gabriel Baranga, **Sanja M. Milenkovic**, Dejan Z. Markovic: *Spectroscopic studies on liposomes containing Chlorophyll a and Chlorophyllide a*, IUPAC 2013 & Solar Energy for World Peace, International Union of pure and applied chemistry, Istanbul, PC-O-09, 17-19. August (2013).
4. Jelena Zvezdanović, Dragan Cvetković, **Sanja M. Petrović**, Jelena Stanojević, Dejan Marković: *Plant pigments interaction with UV-light: In vivo and in vitro approach*, Third International Conference on Radiation and Applications in Various Fields of Research (RAD 2015), Book of Abstracts, Ed. G. Ristić, p. 505. Montenegro, 8-12. Jun (2015).
5. **Sanja M. Petrović**, Jelena Zvezdanović, Dejan Marković: *“Chlorophyll and chlorophyllin degradation induced by AAPH”*, Third Congress Redox Medicine: Reactive species signaling, analytical methods, phytopharmacy, molecular mechanisms of disease, September 25-26, 2015, Belgrade, Serbia, Book of Abstracts, Eds. B. Korać, A. Stančić p. 82.

Rad u časopisu nacionalnog značaja (M52)

1. **Sanja M. Milenković**, Jelena Zvezdanović, Tatjana Anđelković, Dejan Marković (2012): *The identification of chlorophyll and its derivatives in the pigment mixtures: HPLC-chromatography, visible and mass spectroscopy studies*, Advanced technologies, 1(1), 16-24.

Predavanje po pozivu sa skupa nacionalnog značaja štampano u celini (M61)

1. Dragan Cvetković, Jelena Zvezdanović, **Sanja M. Milenković**, Jelena Stanojević, Dejan Marković: *Fotoaktivni biljni pigmenti – ingredientni u fotoprotektivnim farmaceutsko-kozmetičkim formulacijama*, VI simpozijum, Promocija zaštite od sunca kao doprinos javnom zdravlju, Medicinski fakultet u Nišu, 02. Jun (2012).

Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu (M64)

1. **Sanja M. Milenković**, Jelena B. Zvezdanović, Dejan Z. Marković: *Stability studies of pheophytin and its zinc (II) and copper (II) complexes to UV-B irradiation by VIS spectroscopy*, 22nd Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, Ohrid, A-25, p.80, 05-09 September (2012).
2. **Sanja M. Milenković**, Jelena B. Zvezdanović, Dejan Z. Marković: *The stability of mesoporphyrin IX and its zinc (II) and copper (II) complexes to UV-B irradiation: VIS spectroscopy studies*, IX Simpozijum - Savremene tehnologije i privredni razvoj, sa međunarodnim učešćem, rad: OHT-11/OCT-11, str. 87, Tehnološki fakultet Leskovac, 21-22. Oktobar (2011).
3. **Sanja M. Petrović**, Jelena B. Zvezdanović, Tatjana D. Anđelković, Dejan Z. Marković: *The identification of pheophytin obtained from a plant material by HPLC-chromatography, visible and mass spectroscopy*, X Simpozijum -Savremene tehnologije i privredni razvoj, sa međunarodnim učešćem (Zbornik izvoda radova, rad: OHT-2/OCT-2, str. 100, Tehnološki fakultet Leskovac, Leskovac 22-23. Oktobar (2013).
4. **Sanja M. Petrović**, Saša R. Savić, Dejan Z. Marković, Živomir B. Petronijević: *Degradation of chlorophyll a by horseradish peroxidase: identification of product and temperature influence*, X Simpozijum-Savremene tehnologije i privredni razvoj,

- sa međunarodnim učešćem (Zbornik izvoda radova, rad: OHT–1/OCT–1, str. 99, Tehnološki fakultet Leskovac, Leskovac 22-23. Oktobar (2013).
5. **Sanja M. Petrović**, Jelena B. Zvezdanović, Dejan Z. Marković: *Degradacija hlorofila pod dejstvom vidljive svetlosti i uvb zračenja u vodenim sistemima in vitro i in situ-osvrt na učešće kiseoničnih slobodnih radikala*, Drugi kongres- život sa slobodnim radikalima, Niš, 28. Septembar (2013).
 6. **Sanja M. Petrović**, Jelena B. Zvezdanović, Dejan Z. Marković: *Electrospray ionization mass spectrometry in the analysis of in vitro formation of chlorophyll complex with copper*, 23rd Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, Ohrid, CE01, p.84, 08-11 Oktobar (2014).
 7. Jelena Zvezdanović, **Sanja M. Petrović**, Dejan Marković: *The analysis of the chlorophyll complex with zinc by electrospray ionization mass spectrometry*, XI Simpozijum - Savremene tehnologije i privredni razvoj, sa međunarodnim učešćem, p. 116, Tehnološki fakultet Leskovac, 23-24. Oktobar (2015).
 8. **Sanja M. Petrović**, Saša Savic, Živomir Petronijević, Dejan Marković: *Enzymatic degradation of chlorophyll a; Product identification and pH influence*, XI Simpozijum - Savremene tehnologije i privredni razvoj, sa međunarodnim učešćem, p. 64, Tehnološki fakultet Leskovac, 23-24. Oktobar (2015).

Tehnička i razvojna rešenja - Novi tehnološki postupak (M83)

1. **Sanja M. Petrović**, Dejan Z. Marković: *Laboratorijski tehnološki postupak za produkciju lipozoma sa inkorporisanim hlorofilom*, ev. br. 06-2178/1, Univerzitet u Nišu, Tehnološki fakultet u Leskovcu, 27. Decembar (2012).
2. Jelena B. Zvezdanović, **Sanja M. Petrović**, Dejan Z. Marković: *Laboratorijski tehnološki postupak izolacije hlorofila iz biljnog materijala*, ev. br. 06-2185/1, Univerzitet u Nišu, Tehnološki fakultet u Leskovcu, 28. Decembar (2012).
3. **Sanja M. Petrović**, Jelena B. Zvezdanović: *Laboratorijski tehnološki postupak za inkorporaciju izolovanog hlorofilida u liposome*, pp. 1-18, Tehnološki Fakultet Leskovac, ev. br. 06-2365/1, 20. Decembar (2013). DIAPHARM DOO Niš
4. **Sanja M. Petrović**, Dragan J. Cvetković, Sanela Đorđević: *Laboratorijski tehnološki postupak za produkciju lipozoma definisanih veličina postupkom ekstrudiranja*, pp. 1-

17, Tehnološki Fakultet Leskovac, ev. br. 06-1153/1, 02. Jun (2014). DIAPHARM DOO Niš.

Tehnička i razvojna rešenja – Nova metoda (M85)

1. **Sanja M. Petrović**, Jelena B. Zvezdanović, Dejan Z. Marković: *Izolovanje i identifikacija hlorofilida iz spanaća HPLC metodom*, ev. br. 06-2179/1, Univerzitet u Nišu, Tehnološki fakultet u Leskovcu, 27. Decembar (2012).
2. Jelena B. Zvezdanović, **Sanja M. Petrović**: *Metoda kompleksiranja hlorofila sa bakrom – identifikacija i stabilnost prema UVB zračenju*, pp.1-13, Tehnološki Fakultet Leskovac, ev. br. 06-2366/1, 20. Decembar (2013). DIAPHARM DOO Niš.
3. **Sanja M. Petrović**, Jelena B. Zvezdanović: *LC-MS metoda za identifikaciju hlorofilina*, pp.1-15, Tehnološki Fakultet Leskovac, ev. br. 06-1156/1, 02. Jun (2014). DIAPHARM DOO Niš.



Универзитет у Нишу

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да, у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

СТАБИЛНОСТ ХЛОРОФИЛА НА ОКСИДАЦИОНИ СТРЕС У ВОДЕНОМ МЕДИЈУМУ И У ЛИПОЗОМИМА

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство **(CC BY)**
2. Ауторство – некомерцијално **(CC BY-NC)**
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде **(CC BY-NC-ND)**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима **(CC BY-NC-SA)**
5. Ауторство – без прераде **(CC BY-ND)**
6. Ауторство – делити под истим условима **(CC BY-SA)**

(Молимо да подвучете само једну од шест понуђених лиценци; опис лиценци дат је у Упутству).

У Лесковцу, 30.11.2015.

Аутор дисертације: Сања М. Петровић

Потпис аутора дисертације:

Сања Петровић



Универзитет у Нишу

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНОГ И ЕЛЕКТРОНСКОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Име и презиме аутора: Сања М. Петровић

Наслов дисертације: СТАБИЛНОСТ ХЛОРОФИЛА НА ОКСИДАЦИОНИ СТРЕС У ВОДЕНОМ
МЕДИЈУМУ И У ЛИПОЗОМИМА

Ментор: др Јелена Звездановић, доцент

Изјављујем да је штампани облик моје докторске дисертације истоветан електронском облику, који сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**.

У Лесковцу, 30.11.2015.

Потпис аутора дисертације:

Сања Петровић



Универзитет у Нишу

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом:

СТАБИЛНОСТ ХЛОРОФИЛА НА ОКСИДАЦИОНИ СТРЕС У ВОДЕНОМ МЕДИЈУМУ И У
ЛИПОЗОМИМА

која је одбрањена на Технолошком факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Лесковцу, 30.11.2015.

Аутор дисертације: Сања М.Петровић

Потпис аутора дисертације:

Сања Петровић