



Doctoral Thesis

## Regulation of size distribution in fatty acid and mixed phospholipid/fatty acid vesicles

**Author(s):**

Rasi, Silvia

**Publication Date:**

2003

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004636507> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 15219

**Regulation of Size Distribution in Fatty Acid and  
Mixed Phospholipid/Fatty Acid Vesicles**

A dissertation submitted to the  
Swiss Federal Institute of Technology Zurich

for the degree of  
Doctor of Natural Sciences

presented by

Silvia Rasi

Dipl. Pharm. Chem. and Techn. University of Ferrara

born September 22, 1974

Citizen of Comacchio (Ferrara), Italy

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Pier Luigi Luisi, examiner  
Prof. Dr. Reinhard Nesper, co-examiner

Zurich 2003

---

## **B. ABSTRACT AND ZUSAMMENFASSUNG**

### **Abstract**

---

The present research is a study of the formation of vesicles and their size distribution in the case of oleate-oleic vesicles and mixed phospholipid/oleic vesicles, focusing on the autocatalytic behavior in the fatty acid vesicle formation and on the “Matrix Effect”, namely the influence of pre-existing vesicles on the formation of new ones.

This study can be divided into three main parts: the first part deals with the influence of various physical parameters on the process of oleic-oleate vesicle formation. In previous studies it has been verified that oleic acid molecules, in aqueous solution and under certain conditions, tend to form vesicles spontaneously, and that the associated time progress is clearly sigmoidal. This finding raised the interest for further investigations into the mechanism underlying the formation of fatty acid vesicles. In particular, in order to explain the observed sigmoidal behaviour, the so-called ‘cooperative autocatalytic model’ was proposed. The main idea behind this was that the first-formed vesicles would interact with the monomer by hydrophobic forces, thus growing in size and triggering a subsequent division process that would lead to the formation of more vesicles which, in turn, would take up other monomers, grow and generate more and more aggregates. According to this mechanism the formation of fatty acid vesicles should first show a slow phase, called lag phase, corresponding to the formation of the first vesicles, and a faster second phase in which the formed aggregates contribute to the generation of more and more vesicles. The first part of this study is devoted to gaining a better understanding of this kind of process: in particular, it investigates the effects of pH, temperature, ionic strength and type of buffer on the formation of vesicles resulting from the injection of an oleate micellar solution. The spectrophotometric studies carried out show that all these parameters affect not only the kinetics of fatty acid vesicle formation but also the final size of the aggregates.

---

The second part concerns the so-called “Matrix Effect”, a catchy term used to indicate the influence of pre-existing vesicles on the kinetics of fatty acid vesicle formation and their final size distribution. The Matrix Effect has been investigated here by adding fresh oleate surfactant to pre-formed, extruded (50 nm and 100 nm) oleic-oleate vesicles, as well as to (50 and 100 nm extruded) POPC liposomes. Through DLS measurements it was possible to accurately evaluate the mean radius and the size distribution before and after addition of fresh surfactant. In the case of oleate added to oleate vesicles a slight increase of the average dimensions was observed, whereas in the case of oleate added to POPC liposomes, the final radius was actually smaller than the initial one. The latter finding provides support for the hypothesis that the new vesicles may be generated by fission of the pre-existing ones, something that was already hinted at from previous Cryo-TEM studies. Furthermore, it was shown that, both when oleate and POPC are present as pre-existing vesicles, the rate of vesicle formation was remarkably accelerated by comparison to the process of addition of micelles to plain buffer (control experiment); and the final size distribution was very close to the narrow distribution curve of the pre-formed vesicles, whereas in the control experiment (no pre-added vesicles) a very broad size distribution with larger aggregates was obtained.

The third and last part of this work was a further development of this approach but involving a new type of component: *trans*-phospholipids. As is well known, phospholipids constitute the main components of biological membranes. Normally they are made of saturated and unsaturated long hydrocarbon chains, and it has been observed that the unsaturated tails are present mostly in the *cis*-configuration. Such an observation was totally unexpected since, in principle, the *trans*-isomer is chemically favored (compared to the *cis*-one). Thus, several studies have tackled the question of why Nature has preferred the *cis*-isomer to the *trans*-isomer in the constitution of living organisms. As a result, it has been found that phospholipids containing *trans*-unsaturated alkyl chains form vesicles with quite different physical properties; most remarkably, a higher phase transition temperature and a lower fluidity (with an accordingly lower permeability), by comparison to vesicles made of

---

the analogous *cis*-unsaturated lipid. In this context, the last section tries to determine what the effects could be of using vesicles of *trans*-unsaturated lipids. The *trans*-isomer of POPC, which we call PEPC, was firstly synthesized by thiyl radical-mediated isomerization of the corresponding *cis*-monounsaturated phospholipid, obtaining a final *trans*- and *cis*- phospholipid mixture with a very low contamination of the *cis*-isomer. Afterwards, the main physical properties of vesicles made out of the mixture were analyzed: both the phase transition temperature and the critical aggregation concentration were higher compared to the values found for liposomes formed from pure POPC. Finally, the influence of mixed *trans*- and *cis*-monounsaturated liposomes on the formation of oleic-oleate vesicle formation was also analyzed. The study of the Matrix Effect in this case showed that there were no substantial differences between pure POPC vesicles and those formed from the 'trans-isomer-rich' mixture.

---

## Zusammenfassung

---

In dieser Arbeit wird der Einfluss von Aggregaten aus Fettsäuren und Phospholipiden auf die Bildung und Grössenverteilung von Oelsäure/Oleat-Vesikeln untersucht.

Die Arbeit besteht aus drei Teilen und ist folgendermassen gegliedert: Im ersten Teil wird der Einfluss verschiedener physikalischer Parameter auf die Bildung von Oelsäure/Oleat-Vesikeln untersucht. In vorhergegangenen Studien wurde gezeigt, dass Oelsäure-moleküle in wässriger Lösung und unter bestimmten Bedingungen zu spontaner Vesikelbildung neigen. Der Zeitverlauf dieses Prozesses ist sigmoidal. Diese Feststellung weckte das Interesse für weitere Untersuchungen am Mechanismus der Bildung von Fettsäurevesikeln, im speziellen für das beobachtete sigmoidale Verhalten. Das sogenannte „Kooperative Modell“ wurde vorgeschlagen. Die Idee dahinter ist, dass die zuerst gebildeten Vesikel mit den Monomeren in der Lösung durch hydrophobe Kräfte interagieren. Sie nehmen an Grösse zu und teilen sich, was zur Bildung von immer mehr Vesikeln führt. Angelehnt an diesen hypothetischen Mechanismus sollte die Bildung erster Vesikel in einer sogenannten „lag phase“ langsam beginnen und in eine schnelle, zweite Phase übergehen. In dieser Phase produzierten die zuerst gebildeten Vesikel mehr und mehr identische vesikel. Der erste Teil der Arbeit ist dem besseren Verständnis dieses Prozesses gewidmet. Untersucht wurde der Einfluss von pH, Temperatur, Ionenstärke und Puffer auf die Bildung von Vesikeln, die durch Einspritzen einer Lösung von Oleat-Mizellen entstanden sind. Spektrometrische Messungen zeigten, dass diese Parameter nicht nur die Kinetik der Fettsäurevesikeln beeinflussen sondern auch deren Grösse.

Der zweite Teil behandelt den sogenannten „Matrix Effect“. Dieser bezeichnet den Einfluss von bereits existierenden Vesikeln auf die Kinetik der Bildung von Fettsäurevesikeln und ihre Grössenverteilung. Der „Matrix Effect“ wurde untersucht, indem frischer Oleat-Surfactant zu Oleat-Vesikeln (auf 50 und 100nm extrudiert),

---

sowie zu POPC Liposomen (auf 50 und 100 nm extrudiert) zugegeben wurde. Durch DLS Messungen war es möglich präzise den mittleren Radius und die Grössenverteilung vor und nach der Zugabe von frischem Surfactant zu bestimmen. Bei der Zugabe von Oleat-Mizellen zu Oleat-Vesikeln wurde ein schwaches Ansteigen der mittleren Grösse beobachtet. Bei der Zugabe von Oleat-Mizellen zu POPC Liposomen wurde jedoch der mittlere Radius kleiner. Der Befund stützt die Hypothese, dass neue Vesikel durch Fission bereits existierender Vesikel gebildet werden können, worauf vorhergegangene Cryo-TEM Studien bereits hingewiesen haben. Überdies wurde gezeigt, dass wenn Oleat und POPC als bereits existierende Vesikel vorhanden sind, die Bildungsgeschwindigkeit der Vesikel beachtlich ansteigt. Die Grössenverteilung ist hierbei eng und sehr ähnlich der Verteilung vorher dagewesenen Vesikeln. Das Kontrollexperiment wo Mizellen in reinen Puffer injiziert wurden, zeigt eine sehr weite Verteilung der Grösse mit grösseren Aggregaten.

Der dritte und letzte Teil dieser Arbeit ist eine Weiterentwicklung mit einer neuen Komponente: *trans*-Phospholipide. Phospholipide bilden den Hauptteil aller Komponenten einer Biomembran. Normalerweise bestehen sie aus gesättigten und ungesättigten langen Alkylketten. Es wurde beobachtet, dass die ungesättigten Schwänze dieser Moleküle meistens in der *cis*-Konfiguration vorliegen. Diese Beobachtung war völlig unerwartet, da im Prinzip die *trans*-Isomerisierung, verglichen mit der *cis*-Isomerisierung chemisch bevorzugt wird. Viele Studien haben deshalb die Frage, weshalb die Natur das *cis*-Isomer anstelle des *trans*-Isomers in der Konstitution lebender Organismen vorzieht, in Angriff genommen. Es wurde herausgefunden, dass Phospholipide mit *trans*-ungesättigten Alkylketten, Vesikel mit anderen physikalischen Eigenschaften bilden. Aussergewöhnlich ist, verglichen mit Vesikeln aus analogen *cis*-ungesättigten Lipiden, die höhere Phasenumwandlungstemperatur und die grössere Beweglichkeit der Moleküle innerhalb der Membran, verbunden mit einer grösseren Permeabilität. In diesem dritten Teil der Arbeit wurde versucht herauszufinden, welche Effekte auftreten, wenn *trans*-ungesättigte Lipide verwendet werden. Das *trans*-Isomer von POPC, welches wir PEPC nennen, wurde durch thiyl radikal-vermittelte Isomerisierung des

---

korrespondierenden *cis*-einfachungesättigten Phospholipids synthetisiert. Die erhaltene *trans*- und *cis*-Phospholipid Mischung hatte nur eine sehr kleine Kontamination des *cis*-Isomeres. Die physikalischen Eigenschaften der Vesikel aus dieser Mischung wurden anschliessend bestimmt. Die Phasenumwandlungstemperatur und kritische Aggregations-Konzentration waren höher, verglichen mit den Werten von Liposomen aus reinem POPC. Schliesslich wurde der Einfluss von gemischten *trans*- und *cis*-einfachungesättigten Liposomen auf die Bildung von Oelsäure/Oleat-Vesikeln analysiert. Die Messung des Matrix Effektes hat in diesem Fall gezeigt, dass es keine substanziellen Differenzen zwischen reinem POPC Vesikeln und denjenigen aus der „*trans*-isomer-reichen“ Mischung gibt.