



OSNOVNA ŠOLA
PRIMOŽA TRUBARJA LAŠKO



Univerza v Ljubljani

ZDRAVSTVENA FAKULTETA
FAKULTETA ZA ELEKTROTEHNIKO

Stabilnost membrane orjaških fosfolipidnih mehurčkov, pripravljenih z metodo elektroformacije

RAZISKOVALNO DELO, PODROČJE: KEMIJA IN KEMIJSKA TEHNOLOGIJA

AVTORICA:

Tia KLENOVŠEK, učenka 9. razreda

MENTORJI:

Marko JERAN, *strok. sod., Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani*
Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani

Niharika RAWAT, *Msc, Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani*

Milena ŽOHAR, *prof., OŠ Primoža Trubarja Laško*

LAŠKO, 2021

Zahvala

Spoštovani mentorji in vsi sodelujoči pri raziskovalni nalogi, vsem najlepša hvala za vso pomoč.

Zahvaljujem se učiteljici, gospe **Mileni Žohar**, za vso pomoč pri nalogi ter za vse prijazne in spodbudne besede. Najlepša hvala, ker ste bili na voljo ne glede na to, ali so bile pozne ure ali pa je bilo izven vašega delovnega časa.

∞ ∞ ∞

Veliko zahvalo namenjam gospodu **Marku Jeranu**, *raziskovalcu in strokovnemu sodelavcu* Zdravstvene fakultete in Fakultete za elektrotehniko Univerze v Ljubljani. Zahvaljujem se Vam za vse odlične nasvete, vzpodbudne besede ter seveda tudi konstruktivne kritike, katere so mi omogočale rast in razvoj skozi celotno delo. Veliko sem se naučila. Hvala tudi, ker ste verjeli, ne glede na vzpone in padce, ki so se pojavili. Predvsem sem Vam hvaležna, da ste si kljub natrpanemu urniku in trenutni situaciji z epidemijo koronavirusa vzeli čas zame in mi omogočili nepozabno življenjsko izkušnjo.

∞ ∞ ∞

I would also like to sincerely thank Ms. **Niharika Rawat**, *young researcher* from the Faculty of Electrical Engineering at University of Ljubljana. Thank You so much for the professional help and for the time you have given this assignment.

∞ ∞ ∞

Iskrena hvala osebju in predstojnikoma *Laboratorija za fiziko* na Fakulteti za elektrotehniko in *Laboratorija za klinično biofiziko* Zdravstvene fakultete Univerze v Ljubljani za lep sprejem ne glede na okoliščine. Delo je bilo opravljeno v okviru aktivnosti raziskovalnega programa P3-0388, Javne agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije. Hvala za to priložnost.

∞ ∞ ∞

Iskrena hvala gospe **Lidiji Toplišek**, učiteljici slovenščine, za temeljit lektorski pregled naloge.

∞ ∞ ∞

Iz srca se zahvaljujem tudi **staršema**. Hvala vama za vsestransko pomoč, spodbudne besede in vso podporo.

*An experiment is a question which science poses to Nature,
and a measurement is the recording of Nature's answer.
Max Planck, Theoretical Physicist (from 1858 to 1947)*

KAZALO VSEBINE

POVZETEK.....	v
ABSTRACT.....	vi
1 UVOD.....	7
1.1 PRISTOP K DELU IN POTEK DELA.....	7
2 TEORETIČNI DEL.....	9
2.1 CELIČNA MEMBRANA.....	9
2.2 FOSFOLIPIDNI DVOSLOJ.....	11
2.3 MEMBRANSKI LIPIDI.....	12
2.4 HOLESTEROL.....	13
2.5 FOSFOLIPIDNI MEHURČKI KOT MODEL CELIČNE MEMBRANE.....	14
2.6 ELEKTROFORMACIJA KOT METODA NASTANKA MODELNIH CELIČNIH MEMBRAN.....	15
2.7 CILJ RAZISKOVALNEGA DELA.....	16
2.8 HIPOTEZA.....	17
3 EKSPERIMENTALNI DEL.....	18
3.1 UVOD V EKSPERIMENTALNO DELO.....	18
3.2 REAGENTI IN RAZTOPINE.....	18
3.3 DELOVNI PRIPOMOČKI.....	19
3.4 PRIPRAVA ORJAŠKIH FOSFOLIPIDNIH MEHURČKOV Z METODO ELEKTROFORMACIJE.....	19
3.5 OPAZOVANJE ORJAŠKIH FOSFOLIPIDNIH MEHURČKOV.....	21
3.6 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV.....	21
3.7 DELOVANJE DETERGENTA TRITON-X-100 NA MEMBRANE ORJAŠKIH FOSFOLIPIDNIH MEHURČKOV IN NA MEBRANE KRVNIH ERITROCITOV.....	22
4 REZULTATI IN DISKUSIJA.....	23
4.1 REZULTATI STABILNOSTI ORJAŠKIH FOSFOLIPIDNIH MEHURČKOV.....	23
4.2 REZULTATI OPAZOVANJA ORJAŠKIH FOSFOLIPIDNIH MEHURČKOV IN KRVNIH ERITROCITOV S SURFAKTANTOM TRITON-X-100.....	25
5 ZAKLJUČEK.....	28
6 LITERATURA.....	31
7 DODATEK.....	34
7.1 STATISTIČNA ANALIZA ORJAŠKIH FOSFOLIPIDNIH MEHURČKOV, PRIPRAVLJENIH IZ POPC-a.....	34
7.2 STATISTIČNA ANALIZA ORJAŠKIH FOSFOLIPIDNIH MEHURČKOV, PRIPRAVLJENIH IZ MEŠANICE POPC/HOLESTEROL (4:1).....	35
7.3 VARNOSTNA OPOZORILA KEMIKALIJ.....	36

KAZALO SLIK

Slika 1: Vrste celic (Godec idr., 2015).....	9
Slika 2: Celična membrana (Godec idr., 2015).....	10
Slika 3: Prepustnost biološke membrane (Amon in Lapajne-Kajtna, ni leta)	11
Slika 4: Primer fosfolipida (Vrtačnik idr., 2014)	12
Slika 5: Sfingozin (Vrtačnik idr., 2014)	13
Slika 6: Holesterol (Sigma-Aldrich, 2021).....	13
Slika 7: (A) Skupina orjaških fosfolipidnih mehurčkov. (B) Osamljen mehurček (Vir: last avtorjev in mentorjev).	15
Slika 8: Elektroformacija v navpični viali (Vir: last avtorjev in mentorjev).	16
Slika 9: Struktura 1-Palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholina (POPC) (Avanti polar lipids, 2021)	18
Slika 10: (A) Prikaz Pt-elektrod z nanosom lipidnih komponent za postopek elektroformacije. (B) Sušenje elektrod z lipidnimi komponentami v eksikatorju pod konstantnim vakuumom. (C) Elektroformacijska tvorba orjaških fosfolipidnih mehurčkov na elektrodah. (D) Osnovna delovna enota elektroformacijske celice: generator izmeničnega električnega polja (Vir: last avtorjev in mentorjev).	20
Slika 11: (A) Prikaz vzorčenja v stekleni viali za opazovanje pod mikroskopom. Modre zvezdice na dnu vial prikazujejo točke odvzema vzorca po homogenizaciji. (B) Prikaz eksperimentalne kamrice, fiksirane na urnem steklu, za opazovanje preparata pod mikroskopom. (C) Prikaz pozicij točk pri zajemu slike in štetju (Vir: last avtorjev in mentorjev).	21
Slika 12: Primerjava pregleda vzorca orjaških fosfolipidnih mehurčkov POPC-a prvi dan, takoj po pripravi (A), in vzorca po 72-ih urah (B) (Vir: last avtorjev in mentorjev).	24
Slika 13: Primerjava pregleda vzorca orjaških fosfolipidnih mehurčkov mešanice POPC/holesterol (4:1) prvi dan, takoj po pripravi (A), in vzorca po 72-ih urah (B) (Vir: last avtorjev in mentorjev).	25
Slika 14: Spremljanje morfoloških sprememb orjaškega fosfolipidnega mehurčka (iz mešanice POPC/holesterol, 4:1) ob dodatku detergenta Triton-X-100.	26
Slika 15: Spremljanje oblik fosfolipidnega mehurčka mešanice POPC/holesterol (4:1) (Vir: last avtorjev in mentorjev).	26
Slika 16: Spremljanje delovanja detergenta Tritona-X-100 na membrane eritrocitov (Vir: last avtorjev in mentorjev).	27

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Spreminjanje števila orjaških fosfolipidnih mehurčkov glede na časovno komponento..	23
Graf 2: Povprečno število orjaških fosfolipidnih mehurčkov iz POPC-a.....	34
Graf 3: Povprečno število orjaških fosfolipidnih mehurčkov iz mešanice POPC/holesterol (4:1).	35

KAZALO TABEL

Tabela 1: Prikaz meritev paralelk in izračunane povprečne vrednosti ter standardnega odklona za orjaške fosfolipidne mehurčke, pripravljene iz POPC-a	23
Tabela 2: Prikaz meritev paralelk in izračunane povprečne vrednosti ter standardnega odklona za orjaške fosfolipidne mehurčke, pripravljene iz mešanice POPC/holesterol (4:1).	23
Tabela 3: Statistična obravnava orjaških fosfolipidnih mehurčkov iz POPC-a.	34
Tabela 4: Statistična obravnava orjaških fosfolipidnih mehurčkov iz mešanice POPC/holesterol (4:1).	35
Tabela 5: Varnostna opozorila kemikalij.	36

POVZETEK

Fosfolipidne molekule se lahko v vodnih raztopinah organizirajo v fosfolipidne mehurčke oz. liposome. Ker je zgradba membrane liposomov podobna zgradbi celične membrane, lahko na liposomih preučujemo nekatere lastnosti celične membrane in membrane celičnih organel. V raziskovalnem delu smo se ukvarjali s stabilnostjo orjaških fosfolipidnih mehurčkov (GUV) iz 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoholina (POPC) in njegove mešanice s holesterolom (4:1), pripravljenih z metodo elektroformacije na Pt-elektrodah. Rezultati eksperimentalnega dela kažejo, da je stabilnost umetnih celic oz. orjaških fosfolipidnih mehurčkov pogojena s časom. S staranjem pri sobni temperaturi mehurčki postanejo ohlapni in zelo dovzetni za efekte v suspenziji, kar privede do pokanja. Ugotovljeno je bilo, da imajo fosfolipidni mehurčki, tvorjeni iz mešanice POPC/holesterol (4:1), najverjetneje zaradi holesterolne komponente bolj ojačano membrano in so na dražljaje iz okoliške raztopine manj odporni, zato pokajo počasneje. Pod invertnim svetlobnim mikroskopom viden efekt na membranah orjaških fosfolipidnih mehurčkov in membranah eritrocitov človeške krvi kaže tudi detergent Triton-X-100. Delovanje je mogoče zaznati v spremembah oblik membran. Ker so orjaški fosfolipidni mehurčki lahko uporabni kot modeli celic, bi lahko z njihovo pomočjo na njih študirali lastnosti novega koronavirusa SARS-Cov-2.

KLJUČNE BESEDE:

Fosfolipidi, POPC, holesterol, liposomi, orjaški fosfolipidni mehurčki (GUV), detergent, elektroformacija, koronavirus, SARS-Cov-2

ABSTRACT

Stability of membrane giant unilamellar vesicles, prepared through electroformation method

Phospholipid molecules can be organized in aqueous solutions into phospholipid vesicles or liposomes. Since the liposome membrane structure is similar to the structure of the cell membrane, some properties of the cell membrane and cell organelles membrane can be studied on liposomes. In this research work we dealt with the stability of giant unilamellar vesicles (GUV) from 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) and its mixture with cholesterol (4:1), prepared by the method of electroformation on Pt-electrodes. The results of the experimental work show the stability of artificial cells of giant unilamellar vesicles conditioned by time. As we examine the effect at room temperature, the vesicles become weak and susceptible to the effects in suspension, leading to bursting. Phospholipid vesicles formed from the POPC/cholesterol mixture (4:1) were found to have a more stronger membrane, most likely due to the cholesterol component, and are less resistant to stimuli from the surrounding solution, so they burst more slowly. Under the inverted light microscope, the detergent Triton-X-100 also shows a visible effect on the membranes of giant unilamellar vesicles and the membranes of human blood erythrocytes. The action can be detected in changes in membrane shapes. Since giant unilamellar vesicles can be useful as cell models, they could be used to study the properties of the new SARS-Cov-2 coronavirus.

KEY WORDS:

Phospholipids, POPC, cholesterol, liposomes, giant unilamellar vesicles (GUV), detergent, electroformation, coronavirus, SARS-Cov-2

1 UVOD

Prispevek kemije, biologije in fizike k razumevanju ved o življenju danes ustvarja veliko stičišče, ki ga spoznavamo tako na osnovnošolski kot na srednješolski stopnji izobraževanja. Ker se znanost vse bolj razvija, v ospredje prihajajo mnoge discipline, kot so mikrobiologija, biokemija, biofizika, biotehnologija in podobne. Osnovni prispevek ved o življenju temelji na preučevanju različnih bioloških sistemov in njihovih osnovnih gradnikov.

Temeljni gradnik vsakega življenja je celica, ki kot nekakšna tovarna opravlja temeljne življenjske funkcije. Zaradi kompleksnosti celičnih procesov se tudi v današnjem razvitem svetu pojavljajo številna vprašanja, na katera znanstveniki številnih področij iščejo odgovore. Vse več se pojavlja različnih obolenj, za katera ves svet išče metode in tehnike za diagnostiko in zdravljenje. V trenutnem času smo priče izbruha korona virusa (Sars-Cov-2) in bolezni COVID-19. Cel svet je zajela epidemija in praktično čez noč ustavila življenje. Raziskovalci so svoja znanja povezali v razvoj cepiv. Da lahko razumemo delovanje virusa, moramo poseči v osnove bioloških procesov in delovanja različnih mehanizmov na celični ravni.

Pričujoče raziskovalno delo je nastalo v poletnem času šolskih počitnic, ko je bilo v laboratoriju možno opravljati nekatere postopke. Raziskovanja smo se lotili z motivacijo razumevanja temeljnih procesov na celični ravni. Usmerili smo se v pripravo/sintezo umetnih celic, ki jih imenujemo liposomi ali orjaški fosfolipidni mehurčki (GUVs, angl. *Giant Unilamellar Vesicles*), ki služijo kot model za študije vpliva različnih fizikalnih in kemijskih dejavnikov na celično membrano in študij različnih celičnih procesov. En takšen lipidni mehurček bi lahko obravnavali tudi kot virus in na njem preučevali delovanja različnih učinkovin. V prvem delu smo testirali vpliv časovne komponente na stabilnost orjaških fosfolipidnih mehurčkov in v drugem vpliv detergenta Triton-X-100 na njihovo membrano. Vzporedno študijo v drugem delu smo opravili še na eritrocitih, ki smo jih obravnavali kot realni sistem celic z lipidnim dvoslojem. Za njih velja, da krvi dajejo značilno rdečo barvo, ki izhaja iz barvila hemoglobina. Rezultate dela smo skrbno beležili s fotografijami in na mikroskopu posnetimi filmi.

1.1 PRISTOP K DELU IN POTEK DELA

Temeljni praktični del smo opravili v *Laboratoriju za fiziko* Fakultete za elektrotehniko in *Laboratoriju za klinično biofiziko* Zdravstvene fakultete Univerze v Ljubljani. Rokovali smo s posebno opremo, ki velja za temelj biofizike, zato je bilo sodelovanje še bolj dragocenega pomena. Delo v tem laboratoriju je nadzorovalo tehnično usposobljeno osebje v sodelovanju z mentorji. Vso potrebno

opremo nam je zagotovila fakulteta in pripadajoči laboratorij. Pred opravljanjem eksperimentalnega dela smo bili seznanjeni s temeljnimi varnostnimi predpisi laboratorija, z delovnimi aparaturami in eksperimentalno strategijo. Pred začetkom dela smo opravili tudi test iz varstva pri delu.

Rokovanje z reagenti in vzorci je bilo izvedeno v skladu z uveljavljeno zakonodajo varnostne kulture. Kemikalije in delovne raztopine, ki so bile opremljene z oznakami za nevarne snovi, smo obravnavali v skladu s predpisi o nevarnih snoveh. Skozi celoten proces smo imeli na voljo zaščitna sredstva (rokavice, zaščitna očala in haljo) in sledili smernicam za varno in učinkovito delo.

Odvzem krvi je potekal po standardnem protokolu za odvzeme. Kri je darovala zdrava odrasla oseba, ki je del tega projekta (mentor). Odvzem je potekal na tešče ob 7.30. uri. Za študije na krvnih vzorcih je bilo izdano tudi soglasje Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko s številko 0120-146/2019/5.

2 TEORETIČNI DEL

2.1 CELIČNA MEMBRANA

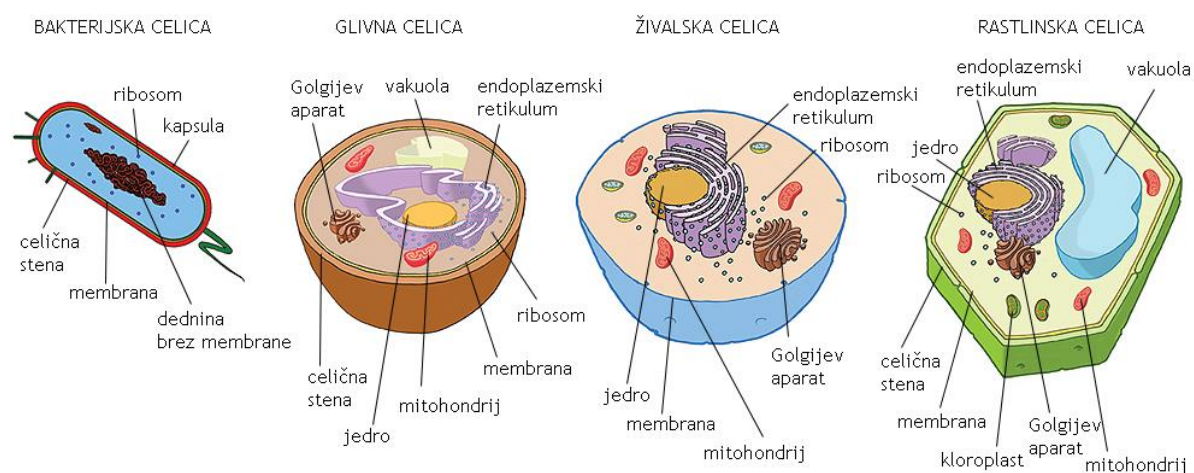
Celica je strukturna in funkcionalna enota vseh organizmov. Organizme, ki jih gradi ena celica, imenujemo enoceličarji, tiste iz več celic pa mnogoceličarji. V živih celicah potekajo življenjski procesi, ki se nenehno odvijajo. Celice se prehranjujejo, rastejo in se delijo, zato potrebujejo energijo. Pri tem nerabne snovi izločijo.

Ločimo dve vrsti osnovnih celic:

- prokariotske celice (bakterijske celice) in
- evkariotske celice (glivne, rastlinske in živalske celice).

V prokariotskih celicah je dedni material prisoten prosto v citoplazmi, v evkariotskih celicah pa je shranjen v celičnem jedru. Evkariotske celice imajo organele, prokariotske le-teh ne vsebujejo (Kreft idr., 2010).

Slikovno predstavimo štiri predstavnike celic: bakterijsko, glivno, rastlinsko in živalsko celico.



Slika 1: Vrste celic (Godec idr., 2015)

Celice delujejo kot odprti sistemi. Preko celične membrane snovi nenehno prehajajo v in izven celice. Že v 19. stoletju so ugotovili, da celična membrana snovi ne prepušča enako. Membrana je prepustna (permeabilna) samo za nekatere snovi, za druge je neprepustna. Prepustnost je odvisna od velikosti in naboja molekul oziroma ionov. Skozi lipidni dvosloj celične membrane, kjer so drobne vrzeli med fosfolipidnimi molekulami, se prebijejo majhne molekule kisika, ogljikovega dioksida, dušika, glicerola in sečnine. Od večjih molekul brez težav prehajajo le tiste, ki se

raztapljajo v lipidih. Najtežje prehajajo skozi membrane večje polarne molekule (monosaharidi, disaharidi in aminokisliline). Celična membrana za prehod snovi uporablja beljakovinske molekule. Prepustnost membran se nenehno spreminja tudi glede na vrsto delcev (ionov, atomov, molekul). Skozi celično membrano lahko snovi prehajajo na dva načina.

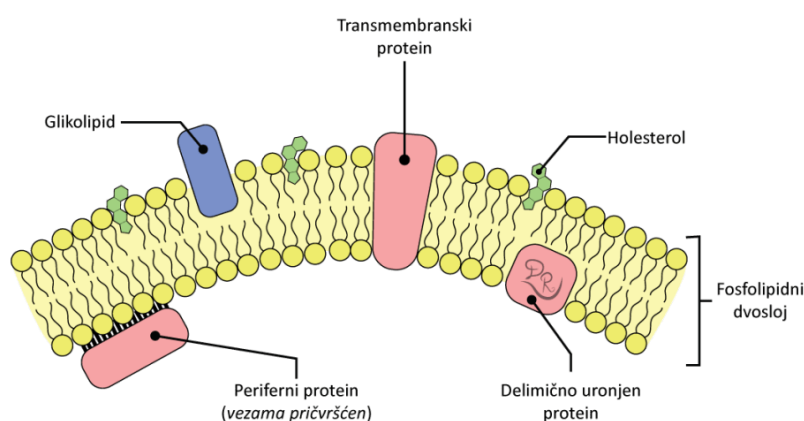
1. Pasivno

- neposredno skozi lipidni dvosloj,
- skozi pore v beljakovinah in
- s pomočjo prenašalcev, na katere se začasno vežejo.

Pri tem dodatna energija ni potrebna.

2. Aktivno

Delci iz območja z nižjo koncentracijo se gibljejo proti območju z višjo, zato je potrebna energija, ki se sprošča med celičnim metabolizmom (Stušek idr., 1997).



Slika 2: Celična membrana (Godec idr., 2015)

Osnovno strukturno ogrodje celičnih membran predstavlja dvojna plast lipidov, ki jo imenujemo fosfolipidni dvosloj. Fosfolipidne molekule so po strukturi podobne trigliceridom, le da sta v tem primeru dve hidroksilni skupini glicerola zaestreni z maščobnima kislinama, tretja pa je zaestrena s fosforjevo(V) kislino. Na fosfatno skupino je s še eno estrsko vezjo vezan alkohol, ki je običajno aminoalkohol (Vokič, 2019).

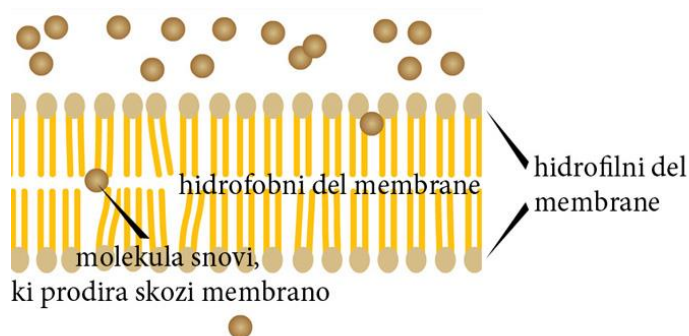
Celično membrano pogosto opišemo kot t.i. model »tekočega mozaika«. Sestavljen je iz dvodimenzionalne tekočine lipidov, ki imajo vključene proteine. Z modelom tekočega mozaika pojasnimo prepustnost in fluidnost celične membrane. Skozi lipidni dvosloj s pomočjo pasivne difuzije in filtracije vstopajo molekule vode in nepolarne molekule, medtem ko je prehajanje za polarne molekule (npr. glukozo) in ione veliko težje. Kadar morajo membrano preiti večje polarne

molekule, kot so aminokisliline in saharidi, je neposreden prehod zelo omejen, zato mora celica vsebovati posebne membranske strukture – kanalčke, prenašalce in črpalke (Vokič, 2019).

Na fluidnost celične membrane vplivajo dolžina alkilnih verig, število dvojnih vezi, vpliv transmembranskih proteinov, vsebnost holesterola in temperatura. Pri višjih temperaturah imajo fosfolipidne molekule več kinetične energije, zato so bolj gibljive, membrana pa je bolj fluidna. Nasprotno pa z zniževanjem temperature kinetična energija molekul upada, kar poveča membransko rigidnost (Vokič, 2019).

2.2 FOSFOLIPIDNI DVOSLOJ

Fosfolipidni dvosloj je osnovna struktura vseh bioloških membran. To je dvodimenzionalni lipidni dvosloj, ki je sestavljen iz dveh zunanjih hidrofilnih stranic in hidrofobne notranjosti. Čisti lipidni dvoplast je slabo prepusten za v vodi topne snovi in ione (Midner, ni leta).



Slika 3: Prepustnost biološke membrane (Amon in Lapajne-Kajtna, ni leta)

Dvoslojna membrana lipidov je topološko usmerjena. Plazemska membrana ločuje celico od citoplazme in zunajcelična z okolico (zunajcelični sloj). Del membrane je usmerjen proti citoplazmi. Organeli in vakuole, ki so vedno obdani z eno samo membrano, imajo eno lipidno plast, ki je obrnjena k citoplazmi, druga pa je obrnjena k notranjosti organel in je topološko enaka zunanji (eksoplazmatski) plasti plazemske membrane. Tri organele, jedro, mitohondriji in kloroplasti obdajajo dvojne membrane, med katerimi je tanek medmembranski prostor. Eksoplazmatske strani notranje in zunanje membrane omenjenih organelov pa so usmerjene v medmembranski prostor (Midner, ni leta).

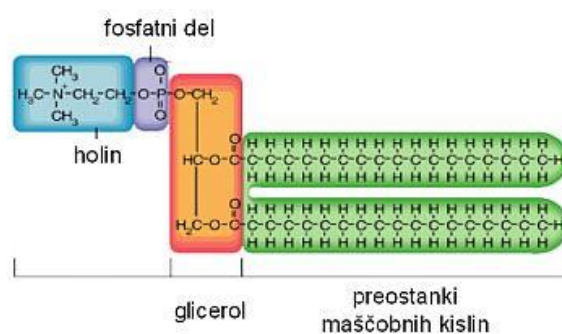
Fosfolipidna dvojna plast sestavlja membrano orjaških fosfolipidnih mehurčkov. Zgradba membrane liposomov je podobna celični membrani. Liposome ustvarjamo pri peki palačink, s

stepanjem jajca v vodi, pri umivanju las z naravnim šamponom, narejenim iz pepela in jajc. Jajčni rumenjaki vsebuje fosfolipid lecitin. Lecitin so sredi 19. stoletja izolirali iz možganov in jajčnega rumenjaka. Leta 1854 so liposome opazili pod mikroskopom in jih poimenovali »umetne celice« (Kralj-Iglič in Iglič, 2003).

2.3 MEMBRANSKI LIPIDI

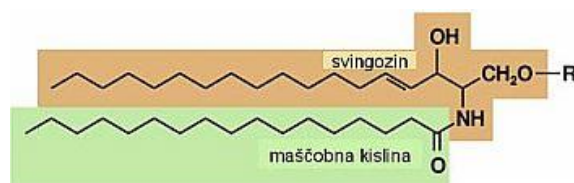
Lipidi spadajo med najpomembnejše organske molekule in so zaradi pestrosti struktur znani kot nosilci različnih bioloških funkcij. Zaradi svoje vloge v energijskem metabolizmu so najbolj poznani nepolarni lipidi. Polarni lipidi predstavljajo pomembne gradnike bioloških membran. Od teh prevladujejo fosfolipidi, ki so po zgradbi še najbolj podobni trigliceridom. Kot druga skupina sfingolipidi polarnih membranskih lipidov namesto osnovne molekule glicerola vsebujejo sfingozin z amsko in hidroksilno funkcionalno skupino. Ti lipidi so pomembne komponente lipidnih raftov, tj. posebnih mikrodomen celične membrane (Vokič, 2019).

Lipidi, še posebno triacilgliceroli oz. maščobe, so pri živalih zaloga hranilnih snovi, t.i. »metabolna energija«. Rastline skladiščijo hranilne snovi kot škrob, živali pa predvsem kot maščobe, čeprav malo hranilnih snovi tudi živali skladiščijo v obliki polisaharida glikogena (Vrtačnik idr., 2014). Fosfolipidi so sestavljeni lipidi, v njih je glicerol zaestren z dvema maščobnima kislinama, v molekuli pa nastopa še estrska vez glicerola s fosforjevo kislino, ki je zaestrena še z aminoalkoholom holinom. Fosfolipidi skupaj s sfingolipidi sestavljajo celične membrane (Vrtačnik idr., 2014).



Slika 4: Primer fosfolipida (Vrtačnik idr., 2014)

Sfingolipidi sestavljajo mielin, ta pa kot ovojnica obdaja nevrite živčnih celic. Alkohol svingozin je z amidno vezjo vezan na maščobno kislino.

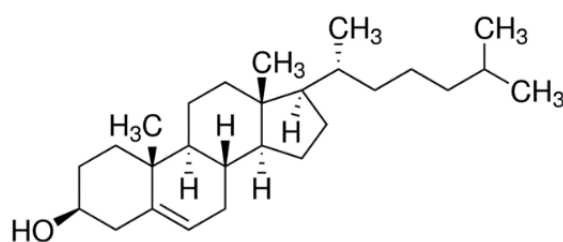


Slika 5: Sfingozin (Vrtačnik idr., 2014)

Ključna komponenta celične membrane je poleg fosfolipidov in sfingolipidov tudi skupina sterolov. Med seboj se razlikujejo po položaju dvojnih vezi in po stranski verigi. Kemijsko najbolj reaktiven del sterolov predstavlja hidroksilna skupina, vendar je v fizioloških razmerah običajno zaestrena z maščobno kislino. Ugotovili so, da ima prisotnost sterolov v membranah vpliv na mnoge celične funkcije, kot sta adhezija celic v zunajcelični matriks in agregacija trombocitov, prav tako naj bi vplivali tudi na delovanje nekaterih membranskih beljakovin. Dokazali so tudi, da je njihova prisotnost povezana tudi z delovanjem porotvornih snovi, na osnovi česar velja, da je funkcija sterolov tesno povezana tudi z mehanizmom delovanja nekaterih učinkovin (Vokič, 2019).

2.4 HOLESTEROL

Holesterol uvrščamo v skupino sterolov, lipidnih derivatov. Njegovo kemijsko ime je holest-5-en-3-ol. Chevrene je leta 1816 za v etanolu topne snovi, izolirane iz žolčnih kamnov, vpeljal pojem holesterin (»chole« gr. žolč, »steros« gr. trdna snov). Nadaljnje študije različnih raziskovalcev so leta 1932 oblikovale celovito strukturno formulo molekule holesterola, kot ga poznamo danes. Njegova empirična formula ima obliko $C_{27}H_{46}O$ (Intihar, 2006).



Slika 6: Holesterol (Sigma-Aldrich, 2021)

Holesterol je sestavljen iz sterolnega jedra z eno samo dvojno vezjo, z eno hidroksi skupino ter stransko verigo z osmimi ogljikovimi atomi. Kot substanca je prisoten v obliki belobarvnih kristalov, ki je netopna v vodi, zelo slabo topna v alkoholu ter dobro topna v nepolarnih topilih, kot so na primer: benzen, heksan, kloroform, petroleter. Raztaplja se tudi v vodnih raztopinah žolčnih soli in maščobah (Intihar, 2006).

Holesterol najdemo v žolču, maščobah živalskega izvora, živčnih tkivih, možganih, krvi, plazmi in jajčnem rumenjaku. V manjših oblikah oz. sledovih je prisoten tudi v rastlinskih oljih ter v morskih algah. Določitev holesterola v živilih in serumu je pomembna zaradi vpletenosti v etiologijo ateroskleroze ter bolezni srca in ožilja (Intihar, 2006).

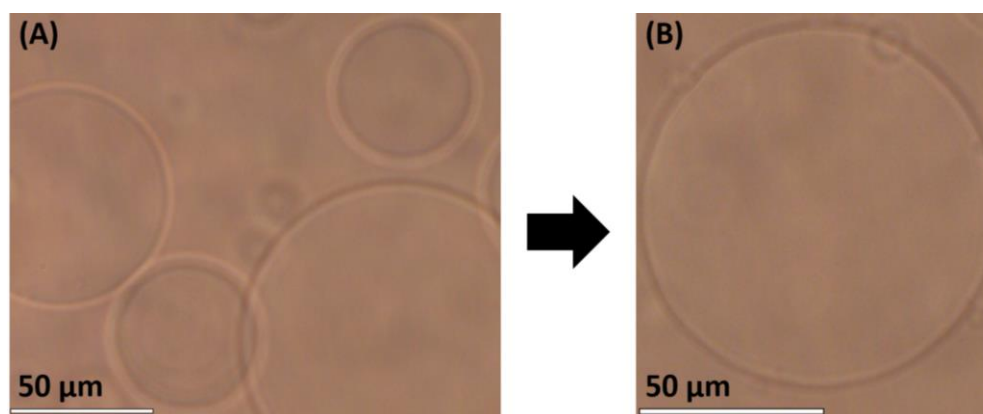
Na kilogram telesne mase je povprečno prisotnega 1,5 g holesterola. Holesterol je tudi zelo pomembna komponenta plazemske membrane in drugih celičnih organelov. Največ holesterola najdemo v celicah, le 7 % ga najdemo v krvnem obtoku. V jetrih se dnevno sintetizira od 800 do 1000 mg te nepolarne molekule. Dodatno ga v telo doprinesemo s hrano in tako zmanjšamo hitrost sinteze v jetrih. Koncentracija v krvi je večinoma odvisna od metabolizma endogenega in eksogenega vira holesterola. Previsoka koncentracija holesterola v krvi je razlog za aterosklerozo in povzroča bolezni srca in ožilja (Tavčar, 2009).

2.5 FOSFOLIPIDNI MEHURČKI KOT MODEL CELIČNE MEMBRANE

Prisotnost aktivnih celičnih mehanizmov in zapletena zgradba bioloških membran sta glavna razloga, da so za proučevanje in opazovanje vloge fosfolipidnega dvosloja razvili številne modelne sisteme. Ti sistemi na poenostavljen način simulirajo fosfolipidno strukturo in se omenjenim mehanizmom izognejo (Vokič, 2019).

Mehurčke sestavljajo različni fosfolipidi, ki se pod vplivom hidrofobnih interakcij pri določeni koncentraciji (CVC) začnejo združevati v lipidne dvosloje. Katera od oblik se bo oblikovala, je odvisno od zgradbe in postavitve posamezne fosfolipidne molekule (Vokič, 2019).

Fosfolipidne molekule se lahko v vodni raztopini organizirajo v fosfolipidne mehurčke oz. liposome, katerih membrano sestavlja dvojna plast fosfolipidnih molekul. Ker je zgradba membrane liposomov podobna zgradbi celične membrane, na liposomih znanstveniki preučujejo tudi nekatere lastnosti celične membrane in membrane celičnih organel (Kralj-Iglič in Iglič, 2003). V raziskavah in aplikacijah so fosfolipidni mehurčki pogosto uporabljeni kot poenostavljeni modeli celic. Na širokem področju raziskav celičnih membran, izpostavljenih različnim pogojem, postajajo zelo priljubljen nadomestek celic. Zaradi ustrezne velikosti jih lahko neposredno opazujemo pod svetlobnim mikroskopom. Običajno raziskovalci osamijo mehurček ali manjšo skupino, jo izpostavijo spremembi okolice ter skozi daljše časovno obdobje spremljajo spremembe (Zupanc in Drobne, 2011).



Slika 7: (A) Skupina orjaških fosfolipidnih mehurčkov. (B) Osamljen mehurček (Vir: last avtorjev in mentorjev).

2.6 ELEKTROFORMACIJA KOT METODA NASTANKA MODELNIH CELIČNIH MEMBRAN

Med metodami in tehnikami priprave liposomov velja elektroformacija za eno izmed osrednjih. Prvo uporabo električnega polja pri sintezi orjaških fosfolipidnih mehurčkov sta prva leta 1986 predlagala Angela in Dimitrov. Njuna osrednja ideja je bila ločitev dvosloja in nadaljnja tvorba mehurčkov, kjer zunanje električno polje ustreza potrebam, ko se zmanjša privlačnost med plastmi in pomaga pri destabilizaciji dvosloja ter posledično sodeluje pri njegovem upogibanju (Saremi, 2010).

V prvem nizu poskusov so uporabili mešanico lipidov, kjer je največjo vsebnost le-teh predstavljal prav jajčni lecitin. Lipidi so bili raztopljeni v mešanici kloroforma in metanola (CCl_4/MeOH , 9/1) in v obliki tanke plasti filma nanoseni na platinasti (Pt) elektrodi na razmiku 0,5 mm. Sledilo je uparjevanje topil v toku dušika. Na suhi elektrodi sta nanosila destilirano vodo ali vodne raztopine različnih snovi ter aktivirala enosmerno napetost ($< 3 \text{ V}$). Nastale mehurčke s povprečnim premerom $30 \mu\text{m}$ (debeline pod 10 dvoslojev) sta si ogledala pod fazno-kontrastnim mikroskopom (Saremi, 2010).

V današnjem času se postopek običajno izvaja v navpičnih vialah iz teflona ali polivinilklorida (PVC), kjer se nahaja raztopina sladkorja (saharoze), v katero postavimo dve vzporedni platinasti elektrodi z nanosom suhega filma lipidov. Z zmanjševanjem frekvence izmeničnega polja nabrekli liposomom sledi enakomerno zmanjšanje spremembe polja, da se le-ti odlepijo od površine elektrode in tvorijo prosto plavajoče mehurčke. Poskusi so pokazali, da se zaprti in odlepljeni mehurčki med postopkom elektroformacije ne zlijejo (Stein idr., 2017).



Slika 8: Elektroformacija v navpični viali (Vir: last avtorjev in mentorjev).

2.7 CILJ RAZISKOVALNEGA DELA

Raziskovalno delo, ki obravnava orjaške fosfolipidne mehurčke, predstavlja stičišče mnogih naravoslovnih znanosti. Zaradi razvoja medicinske znanosti so svoj sloves dosegle tudi eksperimentalne metode biofizike, ki zaradi svoje učinkovitosti omogočajo učinkovito reševanje problemov in ponujajo vpogled na celično raven tako s praktičnega kot s teoretičnega vidika. Mnoge študije poročajo o učinkoviti uporabi orjaških fosfolipidnih mehurčkov kot modelov za študij in aplikacijo uničevanja tumorskih celic (Goršak idr., 2020), zato je še toliko bolj dobro poznati tovrstne sisteme.

V delu bomo na Pt-elektrodi z metodo elektroformacije pripravili orjaške fosfolipidne mehurčke iz fosfolipida 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicerol-3-fosfoholina (POPC) ter mešanice omenjenega s holesterolom (4:1) in proučili njihovo stabilnost skozi zastavljeno časovno obdobje. Ta podatek bi raziskovalcem izjemno koristil, ko bodo izvajali aplikativne študije; predvsem takrat, ko jih bo zanimalo, kdaj so celice primerne za delo in koliko časa so stabilne pri sobni temperaturi.

Ker je čas korona virusnih okužb, smo imeli po medijih velikokrat možnost zaslediti nasvete strokovnjakov, kako pomembna je higiena v tem času – predvsem higiena rok in ohranjanje razdalje. Ideja, ki se nam je ob tem porodila, je zajemala preizkuse delovanja detergentov na orjaške fosfolipidne mehurčke. S tem poskusom bomo prikazali primer delovanja detergenta na mehurček in podali razlago na nivoju celic, zakaj so detergenti res učinkoviti in kakšen vpliv imajo lahko na celice. Kot detergent bomo uporabili kemijsko čist Triton-X-100.

2.8 HIPOTEZA

Po skrbno prebrani literaturi in izoblikovanem cilju smo si zastavili hipotezo, ki nas je vodila skozi celotno eksperimentalno delo.

Predvidevamo, da orjaški fosfolipidni mehurčki, pripravljene iz mešanice 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoholina (POPC) in holesterola (4:1), izkazujejo večjo stabilnost v primerjavi s tistimi, ki vsebujejo zgolj POPC. Skozi 72-urno opazovanje, z vzorčenjem na vsake 24 ur, predvidevamo, da bodo mehurčki obeh vrst takoj po pripravi in en dan po njej najbolj številčni. Predvidevamo, da se bo največji upad števila mehurčkov zgodil 48 ur po njihovi pripravi. Potencialni razlog vidimo v tem, da mehurčki pokajo ali pa se združujejo v skupke. Iz omenjenega predvidevamo, da so tovrstni sistemi primerni za uporabo takoj po pripravi oz. po 24-tih urah.

V drugem sklopu eksperimentov predvidevamo, da bomo lahko z opazovanjem pod mikroskopom opazili vpliv delovanja detergenta Triton-X-100 na membrane orjaških fosfolipidnih mehurčkov iz mešanice POPC/holesterol (4:1) in eritrocitov. Predvsem pričakujemo, da ima detergent tako na membrane eritrocitov kot na membrane fosfolipidnih mehurčkov viden učinek, ki se odraža v preoblikovanju ali deformaciji osnovne celice.

3 EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 UVOD V EKSPERIMENTALNO DELO

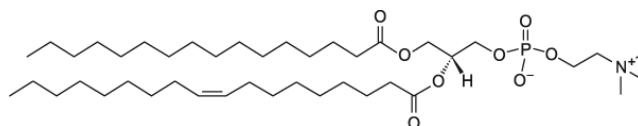
Pri izvajanju eksperimentov je pomembno, da uporabljamo čiste reagente, delovne aparature, inventar in delovni prostor. Uporabljamo zaščitna sredstva. Vseskozi nosimo zaščitno opremo – haljo, očala in rokavice. Nekateri reagenti so zdravju škodljivi in nevarni, zato je potrebno z njimi ravnati v skladu s priloženimi varnostnimi navodili. S škodljivimi hlapljivimi snovmi delamo v digestoriju s stalnim odsesavanjem. Pri delu potrebujemo poleg steklenih posod in aparatov tudi droben stekleni inventar.

Platinasti elektrodi za elektroformacijo morata biti čisti, sicer pride do napačnih rezultatov (prenos nečistoč z blazinic prstov ali iz okolice). Operemo ju z destilirano vodo, nato z »absolutnim« etanolom ter na koncu s kloroformom ali triklorometanom in ju osušimo. Med procesom nastanka orjaških fosfolipidnih mehurčkov mora sistem popolnoma mirovati, pred pričetkom in po koncu postopka moramo platinasti elektrodi previdno namestiti v raztopino in/ali iz nje. Z vsebino, v kateri se po koncu elektroformacije nahajajo mehurčki, ravnamo previdno; ni priporočljivo intenzivno mešanje.

Vse podrobnosti o uporabljenih kemikalijah so predstavljene v dodatku.

3.2 REAGENTI IN RAZTOPINE

- 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoholin (POPC) (> 99 %, Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, Alabama, ZDA)
- holesterol (> 98 %, rastlinski izolat, Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, Alabama, ZDA)
Lipida sta bila raztopljena v mešanici kloroforma in metanola (v volumskem razmerju 2:1) s koncentracijo 1 mg/mL.



Slika 9: Struktura 1-Palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoholina (POPC) (Avanti polar lipids, 2021)

- etanol (C₂H₅OH, absolutni, Sigma-Aldrich)
- triklorometan (CHCl₃, ≥ 99 %, Sigma-Aldrich)
- metanol (CH₃OH, brezvodni; 99,8 %, Sigma-Aldrich)
- 0,3 M raztopina glukoze – pripravljena iz D-(+)-glukoze (C₆H₁₂O₆, ≥ 99,5 %, BioReagent, Sigma-Aldrich) v deionizirani vodi (dH₂O, Sistem za pripravo ultra čiste deionizirane vode, Werner GmbH)

- 0,3 M raztopina saharoze – pripravljena iz D(+)-saharoze ($C_{12}H_{22}O_{11}$, $\geq 99,5\%$, za molekularno biologijo, Sigma-Aldrich) v deionizirani vodi (dH_2O , Sistem za pripravo ultra čiste deionizirane vode, Werner GmbH)
- Triton-X-100 ($t\text{-Okt-C}_6\text{H}_4\text{-(OCH}_2\text{CH}_2)_x\text{OH}$, $x = 9\text{-}10$, za mikrobiologijo, Sigma-Aldrich)
- fosfatno-citratni pufer (PBS) s pH vrednostjo 7,4, je bil pripravljen iz:
 - o 137 mM natrijevega klorida (NaCl, *p. a.* trdni reagent Sigma-Aldrich),
 - o 2,68 mM kalijevega klorida (KCl, *p. a.* trdni reagent, Sigma-Aldrich),
 - o 10,14 mM natrijevega hidrogenfosfata(V) (pripravljenega iz kristalohidrata $Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$, *p. a.* reagenta, Sigma-Aldrich),
 - o 1,84 mM kalijevega dihidrogenfosfata(V) (KH_2PO_4 , brezvodni, *p. a.* reagent s kemijsko čistostjo $\geq 99,0\%$, Sigma-Aldrich),
 - o 10,9 mM natrijev citrat (pripravljen iz kristalohidrata $Na_3C_6H_5O_7 \times 2 H_2O$, reagent *analitske kakovosti*, Carlo Erba Reagents),in nato filtriran skozi filtre s prepustnostjo do 0,2 mikrona Chromafil RC-20/25 (Macherey-Nagel GmbH, Nemčija).
- imerzijsko olje za mikroskopijo (Nikon, tip N, 50 cc)
- Priprava krvi za študij delovanja surfaktanta na membrane eritrocitov. V 10 mL pufra PBS smo suspendirali 10 μL krvi in vsebino skrbno premešali. Končni mešanici nismo posebej določali števila celic (eritrocitov), saj nas je na tem mestu zanimal zgolj kvalitativni učinek. Za kvantitativno analizo bi morali uporabiti metodo pretočne citometrije, ki šteje populacije celic, kar pa je za naš nivo zahtevno.

3.3 DELOVNI PRIPOMOČKI

- precizna laboratorijska tehtnica Kern 440-47
- analizna tehtnica Kern & Sohn GmbH, ABJ 120-4M
- invertni svetlobni mikroskop Eclipse TE2000-S (Nikon EM CCD), Tokio, Japonska, sklopljen s sistemom digitalnih kamer Spot boost (Visitron Systems)
- objektna stekla (Brand)
- štiri-prekatne eksperimentalne kamrice za mikroskopijo (26 mm \times 43 mm, CoverWell™ perfusion chambers, PC4L-0.5, Grace Bio-Labs, Sigma-Aldrich)
- avtomatske pipete (20, 100, 1000 μL ; Eppendorf Research)
- konice za pipete (100, 1000 μL ; Merck)
- laboratorijski eksikator s pokrovom in ventilom za odsesavanje (Brand)
- vakuumska črpalka (MVP 015-2, Diaphragm Pumps, Pfeifer Vacuum)
- plastična viala s pokrovom, 1,80 mL
- platinasti elektrodi, v razmiku 0,5 mm, pritrjeni na pokrovu za vialo
- steklena viala s plastičnim pokrovom, 5 mL
- priprava za sintezo oz. elektroformacijo orjaških fosfolipidnih mehurčkov (GUV), glavna enota: sistem Pt-elektrod, s krokodilčki povezanih na generator izmeničnega električnega polja (Hameg Instruments)

3.4 PRIPRAVA ORJAŠKIH FOSFOLIPIDNIH MEHURČKOV Z METODO ELEKTROFORMACIJE

Na par platinastih elektrod smo previdno, s polzenjem kapljice, nanесли 10 μL delovne raztopine. Prvo delovno raztopino za prvi par elektrod je predstavljal lipid POPC s koncentracijo 1 mg/mL, za drugi par elektrod pa mešanica POPC/holesterol (4:1) s koncentracijo prav tako 1 mg/mL.

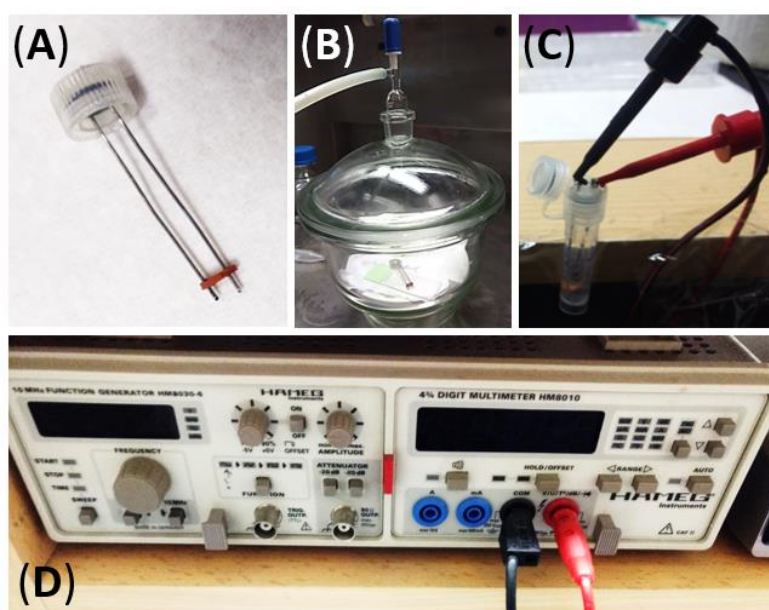
S počasnim premikanjem kapljice po elektrodi smo ustvarili homogen nanos. Ob tem je kloroform izparel. Vsebino na elektrodah smo previdno postavili na sterilno objektno steklo, ki se je nahajalo v eksikatorju. S pomočjo vakuumske črpalke v konstantnem vakuumu smo elektrodi z nanosom sušili 45 minut.

Platinasti elektrodi z nanosom smo po sušenju vstavili v 1,80 mL plastično vialo, v kateri je bilo 1,80 mL 0,3 M raztopine saharoze. Vialo smo previdno zaprli in postavili na stabilno podlago (z lepilnim trakom pritrdimo ob rob mize/delovne površine). Elektrodi smo povezali s krokodilčkoma, nato le-ta v omrežje. Na sistemu v časovnih intervalih spreminjamo napetost in frekvenco.

V začetnem koraku je elektroformacija tekla 2 uri pri frekvenci 10,0 Hz in napetosti na 5,0 V. Po pretečenem času so sledili 15-minutni intervali zmanjševanja parametrov omrežja. Najprej na 5 Hz in 2,5 V, nato 2,5 Hz in 2,5 V ter v zadnjem delu še 1,0 Hz in 1,0 V. Aparaturo smo po pretečenem času izklopili in iz elektrod odstranili krokodilčka.

Nastalo vsebino smo po elektroformaciji v plastični viali nežno in počasi odpipetirali v stekleno vialo, v kateri je bilo predhodno že 3,6 mL 0,3 M raztopine glukoze. Volumsko razmerje med raztopinama saharoze in glukoze je v končni mešanici znašalo 1:2.

Pred opazovanjem orjaških fosfolipidnih mehurčkov pod mikroskopom smo vsebino v viali z enakomernimi obrati rahlo premešali.

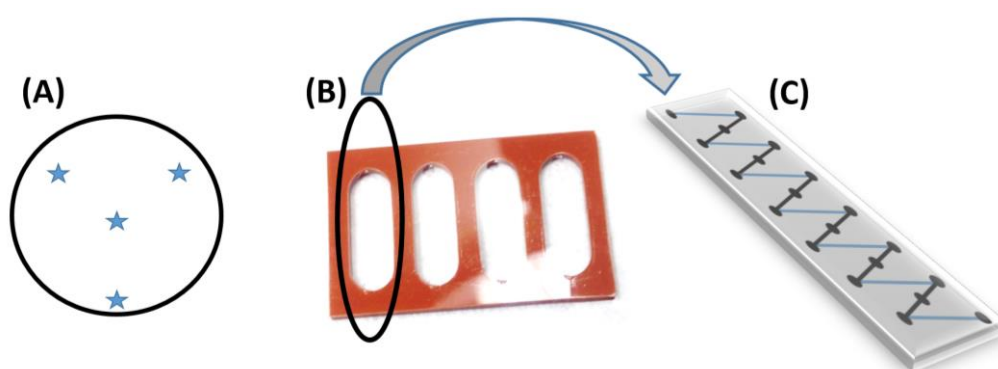


Slika 10: (A) Prikaz Pt-elektrod z nanosom lipidnih komponent za postopek elektroformacije. (B) Sušenje elektrod z lipidnimi komponentami v eksikatorju pod konstantnim vakuumom. (C) Elektroformacijska tvorba orjaških fosfolipidnih mehurčkov na elektrodah. (D) Osnovna delovna enota elektroformacijske celice: generator izmeničnega električnega polja (Vir: last avtorjev in mentorjev).

3.5 OPAZOVANJE ORJAŠKIH FOSFOLIPIDNIH MEHURČKOV

Z elektroformacijo nastale orjaške fosfolipidne mehurčke, obdelane z raztopino glukoze, previdno homogeniziramo in pričnemo z vzorčenjem.

Po 200 μL suspenzije odpipetiramo v eksperimentalne kamrice, ki omogočajo kvantitativno analizo polj in enakomeren zajem slike pod mikroskopom. Vsebino v kamricah postavimo pod mikroskop in počakamo 30 minut, da se vsebina popolnoma posede na dno. Pregled in štetje opravimo s pomočjo imerzijskega olja pod 100-kratno povečavo. Prvi set meritev (štetja) smo opravili takoj po sintezi mehurčkov, nadaljnje pa natančno v 24-urnih intervalih. Vsaka meritev je bila sestavljena iz štirih paralelnih določitev, vsaka paralelka pa je zajemala prešteti 20 polj. Podatke smo vnesli v tabelo in s pomočjo programskega paketa *Microsoft Excell 2013* opravili izračun povprečne vrednosti in standardne deviacije ter rezultate prikazali z grafi.



Slika 11: (A) Prikaz vzorčenja v stekleni viali za opazovanje pod mikroskopom. Modre zvezdice na dnu vial prikazujejo točke odvzema vzorca po homogenizaciji. (B) Prikaz eksperimentalne kamrice, fiksirane na urnem steklu, za opazovanje preparata pod mikroskopom. (C) Prikaz pozicij točk pri zajemu slike in štetju (Vir: last avtorjev in mentorjev).

3.6 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Po kvantitativnem zajemu slik pod mikroskopom smo vsebine paralelk posameznik slik skrbno prešteli in številčne vrednosti vnesli v tabelo paketa *Microsoft Excell 2013*. V programu so na voljo različne funkcije in operacije, zato smo obdelavo podatkov opravili kar z omenjenimi. Pred izvedbo statistične analize smo se naučili osnov statističnih prijemov – vzorec, povprečna vrednost, standardni odklon/deviacija, napaka (Rožič idr., 2007) in dobro proučili ukaze in funkcije v programskem paketu *Excell*.

V prvem delu smo opravili seštevek vseh celic, ki jih je vseboval vzorec v 20 slikah (funkcija ukaza: vsota, *summa*, *sum*), sledil je izračun povprečne vrednosti 4 paralelk vzorca (funkcija ukaza: povprečje, *average*). Po odčitani povprečni vrednosti smo izračunali še standardni odklon vzorčenja

po celotni populaciji vzorca (funkcija ukaza: standardna deviacija, *stdev.s*), slednji podatek smo vnesli tudi v stolpčni diagram (*error bar*).

3.7 DELOVANJE DETERGENTA TRITON-X-100 NA MEMBRANE ORJAŠKIH FOSFOLIPIDNIH MEHURČKOV IN NA MEMBRANE KRVNIH ERITROCITOV

Za proučevanje interakcije delovanja detergenta (surfaktanta) Triton-X-100 na membrane orjaških fosfolipidnih mehurčkov (GUV) in na membrane eritrocitov smo v eksperimentalno kamrico odpipetirali:

- a) 30 μ L suspenzije GUV iz lipidov POPC/holesterol (4:1, 1 mg/mL) in jima dodali 50 μ L detergenta Triton-X-100.
- b) 30 μ L razredčene krvi v pufru PBS in ji dodali 50 μ L detergenta Triton-X-100.

Vsebino smo postavili pod mikroskop, kjer smo pod 100-kratno povečavo opazovali delovanje detergenta na membrane. Za vsakega izmed vzorcev smo posneli 15-minutni video in rezultate predstavili v obliki slikovnega sosledja, ki prikaže dogajanje v raztopini. Zaradi večje preglednosti smo kamero fokusirali v en GUV ali eritrocit oz. manjšo populacijo le-teh.

4 REZULTATI IN DISKUSIJA

4.1 REZULTATI STABILNOSTI ORJAŠKIH FOSFOLIPIDNIH MEHURČKOV

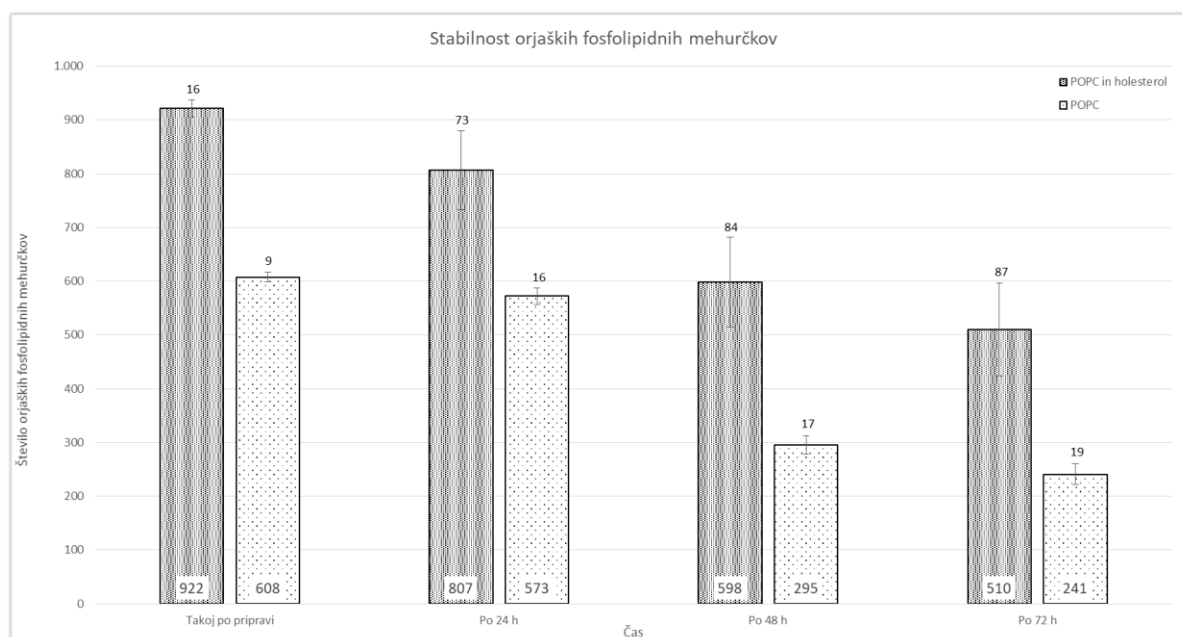
Tabela 1: Prikaz meritev paralelk in izračunane povprečne vrednosti ter standardnega odklona za orjaške fosfolipidne mehurčke, pripravljene iz POPC-a.

ČAS	I. MERITEV	II. MERITEV	III. MERITEV	IV. MERITEV	POVPREČNA VREDNOST	STANDARDNI ODKLON
Takoj po pripravi	603	608	600	620	608	9
Po 24 h	575	576	588	551	573	16
Po 48 h	270	305	307	299	295	17
Po 72 h	223	229	245	266	241	19

Tabela 2: Prikaz meritev paralelk in izračunane povprečne vrednosti ter standardnega odklona za orjaške fosfolipidne mehurčke, pripravljene iz mešanice POPC/holesterol (4:1).

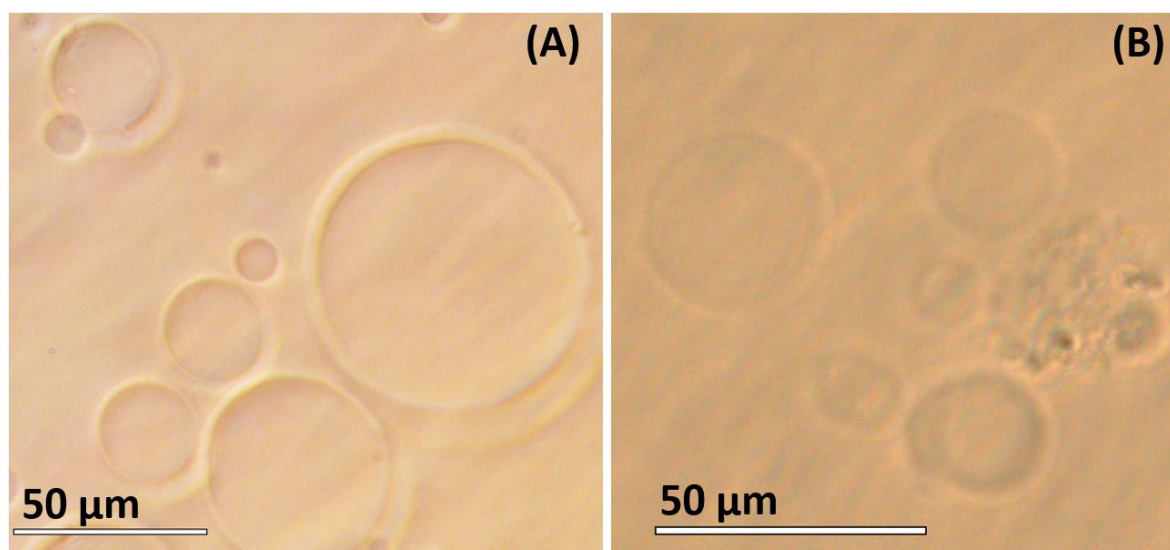
ČAS	I. MERITEV	II. MERITEV	III. MERITEV	IV. MERITEV	POVPREČNA VREDNOST	STANDARDNI ODKLON
Takoj po pripravi	919	905	919	943	922	16
Po 24 h	705	808	836	877	807	73
Po 48 h	718	574	575	524	598	84
Po 72 h	472	434	500	633	510	87

Graf 1: Spreminjanje števila orjaških fosfolipidnih mehurčkov glede na časovno komponento.

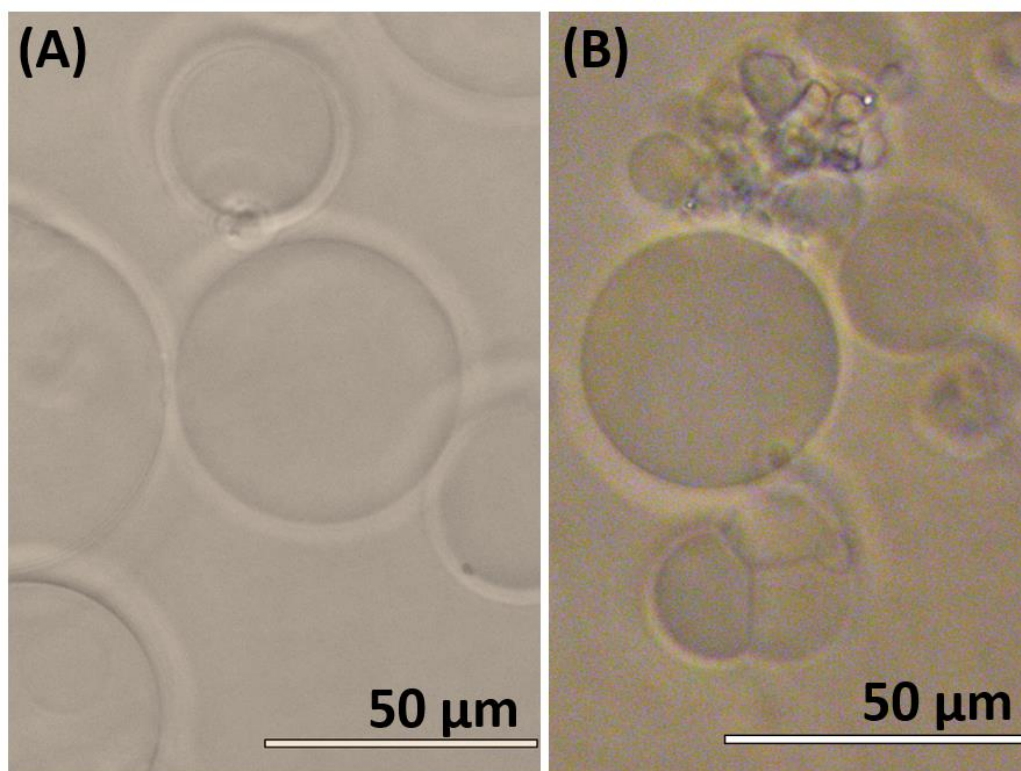


Rezultati, zbrani v zgornjih tabelah in grafu 2, prikazujejo trend padanja števila orjaških fosfolipidnih mehurčkov glede na čas opazovanja. Znotraj 24-urnega intervala sicer opazimo njihovo padanje, vendar ni zaznanega ekstremnega padca v primerjavi s časom po 48-ih urah. Največji padec se pojavi sicer pri mešanici POPC/holesterol, medtem ko celice iz POPC-a ostajajo znotraj srednje vrednosti. Po 48-ih urah v obeh lipidnih sistemih zaznamo intenzivno padanje, in sicer 51 % za POPC in 35 % za POPC/holesterol (4:1). Zadnji dan opazovanja (po 72-ih urah) je glede na začetno stanje razpadlo 60 % POPC-evih in 45 % POPC/holesterol-nih fosfolipidnih mehurčkov.

Morfološki pregled posameznih vzorcev je razkril, da so se skozi opazovano časovno skalo v vzorcu pojavili tudi skupki zbranih celic ali t.i. aglomerati mehurčkov, ki niso številni in otežujejo karakterizacijo. Vsekakor tovrstni mehurčki niso primerni za nadaljnje delo. Znotraj 24-urnega intervala po pripravi (Slika 12 (A) in Slika 13 (A)) opazimo pravilne oblike in enoten videz po celotni površini, pravimo jim unilamelarni mehurčki. Po 72-ih urah (Slika 12 (B) in Slika 13 (B)) opažamo poleg razpada mehurčkov še njihovo deformacijo in združitev v skupke ter v nastanek multilamelarnih struktur, t.i. večplastnih oblik.



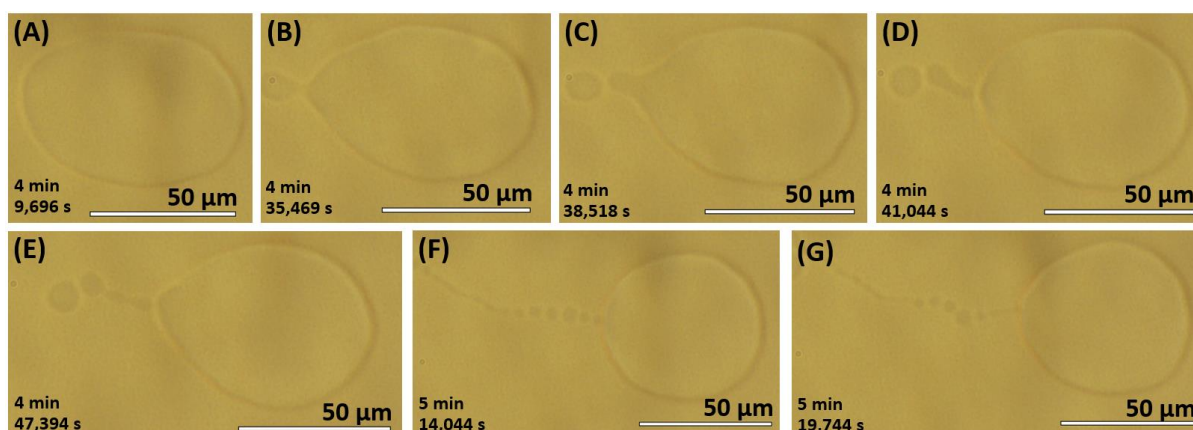
Slika 12: Primerjava pregleda vzorca orjaških fosfolipidnih mehurčkov POPC-a prvi dan, takoj po pripravi (A), in vzorca po 72-ih urah (B) (Vir: last avtorjev in mentorjev).



Slika 13: Primerjava pregleda vzorca orjaških fosfolipidnih mehurčkov mešanice POPC/holesterol (4:1) prvi dan, takoj po pripravi (A), in vzorca po 72-ih urah (B) (Vir: last avtorjev in mentorjev).

4.2 REZULTATI OPAZOVANJA ORJAŠKIH FOSFOLIPIDNIH MEHURČKOV IN KRVNIH ERITROCITOV S SURFAKTANTOM TRITON-X-100

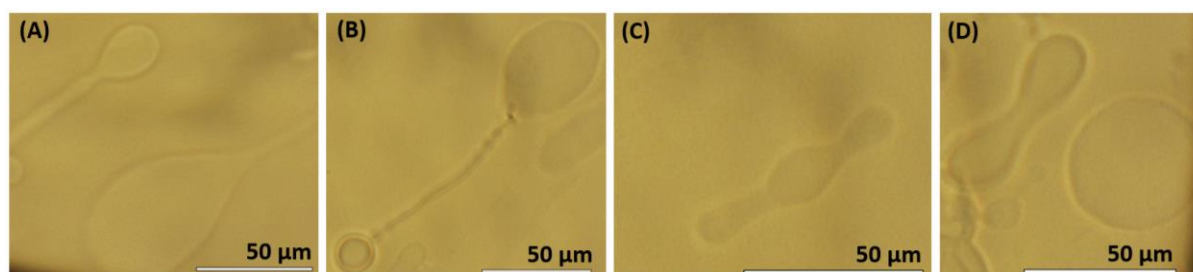
Po izpostavitvi orjaških fosfolipidnih mehurčkov surfaktantu (detergentu) Tritonu-X-100 smo opazovali spreminjanje oblike mehurčka. Mehurček se glede na začetno obliko skozi opazovano obdobje spreminja in preoblikuje. Skozi opazovano časovno skalo je moč zaznati odtapljanje membrane in opaziti prvi brst, ki se fragmentira v več manjših mehurčkov, ki ostanejo povezani (Slika 14 (G)). Manjši fragmentirani mehurčki skupaj z izhodnim tvorijo navidezno povezavo in potujejo po suspenziji.



Slika 14: Spremljanje morfoloških sprememb orjaškega fosfolipidnega mehurčka (iz mešanice POPC/holesterol, 4:1) ob dodatku detergenta Triton-X-100.

Slika 15 prikazuje heterogene oblike fosfolipidnih mehurčkov, ki se pojavijo v suspenziji po dodatku detergenta. Opazimo značilne oblike, ki so jih fiziki na tem področju tudi fizikalno in matematično opisali. Sile zaradi surfaktanta delujejo na membrano in jo raztegujejo ter povzročijo različne oblike. Zanimivi sta t.i. hruškasta oblika (A) in diskocitna oblika (D), ki predstavljata dve tovrstni energijsko ugodni stanji. Vmesno stanje (C) je verjetno sčasoma prešlo v obliko (D).

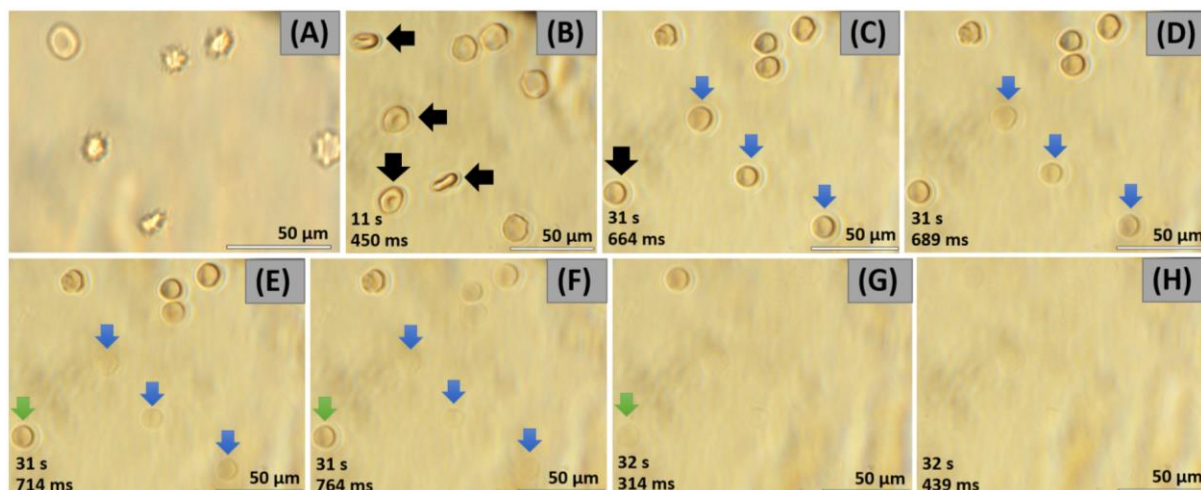
V primeru B lahko vidimo tubularno povezavo med dvema mehurčkoma. Podobne omogočajo neposredno izmenjavo snovi med celicami (angl. *tunnelling nanotubes*) (Drab idr., 2019).



Slika 15: Spremljanje oblik fosfolipidnega mehurčka mešanice POPC/holesterol (4:1) (Vir: last avtorjev in mentorjev).

Drugi del poskusa je zajemal opazovanje eritrocitov v kombinaciji z omenjenim detergentom (Slika 16). Glede na kontrolni vzorec – kri (razdelek A) v nadaljnjih opazovanjih (od B do H) opazimo spreminjanje oblike membrane eritrocita in nazadnje njegov razpad. V kontrolnem vzorcu smo zasledili večinoma ehinocitno obliko celic (t.i. »ježkasta« struktura). Ehinociti se največkrat pojavijo pri interakciji krvi z neobdelanim steklom (objektno/krovno stekelce), saj to sproži njihovo aktivacijo. Ob dodatku Tritona-X-100 eritrocit iz ehinocitne strukture spremeni obliko v diskocit (črne puščice, B). Membrana iz nagubanega stanja preide v sploščeno in zaobljeno. V primeru nadaljnjega opazovanja pride do pokanja eritrocitnih membran (od C do F, označeno z modro

puščico, in od E do G z zeleno puščico). Detergent najverjetneje otopi membrano, katera postopoma izgine (v času nekaj milisekund) in ostane eritrocitni »duhec« kot posebna oblika celic. Opazili smo, da pred pokom eritrocita na njegovem mestu za hip ostane skoncentriran hemoglobin, ki nato difundira v medij. Po dobrih 32 s so popokale vse celice v vidnem polju (H). Imena oblik eritrocitov uporabljena po Vehovar (2018).



Slika 16: Spremljanje delovanja detergenta Tritona-X-100 na membrane eritrocitov (Vir: last avtorjev in mentorjev).

5 ZAKLJUČEK

Ob zasnovi raziskovalnega dela smo preučili veliko literature in opravili nešteto diskusij z mentorji. Po zastavljeni hipotezi smo se posvetili eksperimentalnim vsebinam, ki so nam prinesle zanimive rezultate. *Hipotezo lahko v celoti potrdimo.*

Predvidevali smo, da orjaški fosfolipidni mehurčki, pripravljene iz mešanice 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoholina (POPC) in holesterola (4:1) izkazujejo večjo stabilnosti v primerjavi s tistimi, ki vsebujejo zgolj POPC. Rezultati kažejo, da mehurčki znotraj 24-ih ur ostajajo primerljivo stabilni, saj je razlika med tistimi, ki so bili štet takoj po pripravi, in tistimi po 24-ih urah znotraj istega ranga. Čeprav je opaziti, da je pri mešanici POPC/holesterol (4:1) znotraj 24-ih ur zaznati nekakšen upad, bi lahko omenjeno pripisali vzorčenju, pipetiranju ali posedanju pod mikroskopom, saj je znotraj istega časovnega ranga pri mehurčkih iz POPC-a moč opaziti manjše odstopanje. Membrani obeh vrst mehurčkov sta znotraj 24-ih ur pod mikroskopom delovali identične sestave ter dovolj stabilni in unilamelarni, da je bilo pokanje oteženo. Večji upad mehurčkov v obeh sistemih se izkaže po 48-ih urah, saj mehurčki začnejo pokati ali se transformirati v manjše (še vedno unilamelarne), v nekaterih primerih se začnejo združevati v skupke ali t.i. aglomerate, kar oteži analizo štetja pod mikroskopom (in posledično na ta račun zmanjša njihovo populacijo). Še posebej lahko omenjeni izraziti efekt opazimo ob nihanju števila mehurčkov pri mehurčkih, ki jih je sestavljal zgolj POPC. V skladu z začetnimi predvidevanji smo ugotovili, da so mehurčki po 72-ih urah na sobni temperaturi najmanj stabilni in najmanj števn, prav tako je njihova membrana zelo šibka in počijo. Po 72-ih urah smo v obeh vzorcih, še zlasti v tistih s POPC-em, opazili največ deformiranih mehurčkov, verjetno zaradi šibke membrane in velike tendence po pokanju. Trenutni rezultati kažejo, da so orjaški fosfolipidni mehurčki za uporabo v različnih aplikacijah uporabni znotraj 24-ih ur po pripravi, najbolje seveda takoj po pripravi. Membrane orjaških fosfolipidnih mehurčkov, pripravljene iz mešanice POPC/holesterol (4:1), kažejo v primerjavi z membranami iz POPC-a večjo stabilnost, saj holesterolna komponenta še dodatno ojača lipidno plast in pripomore k večji stabilnosti. Predvidevanja se skladajo z opazovanjem in štetjem celic pod mikroskopom.

V drugem sklopu eksperimentov smo se posvečali opazovanju delovanja detergenta Triton-X-100 na membrane orjaških fosfolipidnih mehurčkov iz mešanice POPC/holesterol (4:1) in eritrocitov. Predvidevali smo, da bomo pod mikroskopom zaznali viden učinek, ki se odraža v preoblikovanju

ali deformaciji osnovne celice. Uspeli smo zaznati efekte v suspenziji tako pri orjaških fosfolipidnih mehurčkih kot tudi pri eritrocitih človeške krvi.

Mehurček se je med potovanjem po suspenziji skozi obdobje opazovanja preoblikoval in spreminjal oblike. Skozi proces odtapljanja membrane se je pojavil brst, ki se je fragmentiral v več manjših mehurčkov. Manjši fragmentirani mehurčki so skupaj z začetnim tvorili navidezno povezavo in skupaj potovali po suspenziji. Ob dodatku detergenta je v suspenziji mogoče zaznati tudi heterogene oblike mehurčkov. Različne strukturne oblike verjetno nastanejo zaradi sil v suspenziji, ki se vzpostavijo, ko detergent prodre do vsebine mehurčka. Obstojna ostane tista oblika, ki je energijsko za to dovzetna. Po zgledu sodobnih trendov na tem področju, ki uspešno kombinirajo teoretične pristope (računanje oblik in simulacije) z eksperimentalnimi, oblike in njihov obstoj opisujejo z matematičnimi in s fizikalnimi enačbami. Teoretični in eksperimentalni pristopi skupaj ustvarjajo razlage mehanizmov, ki so še kako pomembni pri razlagi realnih procesov na ravni celic, na primer izmenjave snovi med celicami preko t.i. tubularnih povezav.

V zadnjem delu preučevanja delovanja detergenta Triton-X-100 smo opazovali še interakcijo z eritrociti. Kot v lipidnih mehurčkih smo tudi tukaj opazili spreminjanje oblik membrane eritrocita in na koncu njegov razpad. Z dodatkom detergenta smo opazili spreminjanje oblike osnovnega eritrocita (iz ehinocitne oblike v diskocitno). Membrana je očitno iz nagubanega stanja prešla v sploščeno in zaobljeno. Z nadaljno časovno vzpostavitvijo smo zaznali pokanje membran eritrocita. Očitno je bilo opaziti, da je detergent odtopil membrano, ta je izginila in na koncu je ostal eritrocitni »duhec«, ki prav tako predstavlja eno izmed mnogih oblik eritrocita. Pred pokom eritrocita smo za hip (nekaj milisekund) opazili na izvornem mestu skoncentriran hemoglobin, ki je kasneje difundiral v medij (pufer) in se pomešal z njim. Po popokanih celicah v vidnem polju nismo opazili ničesar več.

Rezultati eksperimentalnega dela nas učijo, da je stabilnost umetnih celic oz. orjaških fosfolipidnih mehurčkov pogojena s časom. S staranjem pri sobni temperaturi mehurčki postanejo ohlapni in zelo dovzetni za efekte v suspenziji, kar privede do pokanja. Mehurčki, tvorjeni iz mešanice POPC/holesterol (4:1), imajo najverjetneje zaradi holesterola bolj ojačano membrano in so na dražljaje iz okoliške raztopine manj odporni in pokajo počasneje. Pod invertnim svetlobnim mikroskopom viden efekt na membranah orjaških fosfolipidnih mehurčkov in membranah eritrocitov človeške krvi kaže tudi detergent Triton-X-100. Delovanje je mogoče zaznati v spremembah oblik membran. Če bi orjaški fosfolipidni mehurček obravnavali kot virus, ki vsebuje lipidno membrano, lahko s higieno rok privedemo do trganja njegove membrane in posledično do njegovega propada. Modelni primer za higieno rok je v našem primeru igral detergent Triton-X-

100, ki je povzročil spremembe na membrani. S simulacijo delovanja detergenta na celično membrano bi spremembe na virusni membrani vodile v njegov propad, kar je seveda odvisno od vrste detergenta. Večjo učinkovitost pokanja membrane dosežemo z alkoholom, zato se v tem času toliko poudarja, da je primarna dezinfekcija nujna in tako učinkovita (seveda skupaj z upoštevanjem varnostne razdalje in zračenja prostorov).

Večina antiseptikov na osnovi alkohola vsebuje etanol, izopropanol ali njuno kombinacijo, ki sta raztopljena v vodi. Izdelki na osnovi alkohola inaktivirajo delce virusa SARS-CoV-2 tako, da porušijo strukturo beljakovin (postopek, imenovan denaturacija) na površini virusa. Ko alkohol naneseemo na virus, povzročimo izpodrivanje vodikovih vezi med aminokislinami, ki držijo virusne beljakovine v formi. Proteini posledično izgubijo strukturo in delovanje, s čimer virus inaktivirajo. Poskusi so pokazali, da igra voda v antiseptiku ključno vlogo, saj lahko z njeno pomočjo pride do razgradnje beljakovin. Če vode ni, se omenjeno ne more zgoditi. To pomeni, da so alkoholne raztopine najučinkovitejše, če vsebujejo 60–80 % alkohola in ne 100 %. Dokazano je bilo, da alkoholi ovirajo tudi lipidno membrano virusa. Višja, kot je vsebnost lipidov, in večji, kot je virusni delec, bolj je virus dovzeten za delovanje alkohola. Alkoholi, ki se uporabljajo v antiseptikih, so majhne polarne molekule, ki lahko povzročijo interakcijo s površino lipidne membrane. Ko so alkoholi prisotni v zadostnih koncentracijah, ovirajo urejeno strukturo membrane in virus razbijejo. V nedavni študiji so na SARS-CoV-2 preizkusili protivirusno delovanje pripravkov na osnovi alkohola in komercialnih alkoholov (etanol in izopropanol), ki jih priporoča Svetovna zdravstvena organizacija (WHO). Študija je pokazala, da sta omenjena alkohola učinkovita pri deaktiviranju virusa po 30 sekundah (UK Research and Innovation, 2020).

Raziskovalno delo je zajemalo preplet naravoslovnih disciplin, za katere velja uporaba rezultatov na širšem področju ved o življenju, saj orjaški fosfolipidni mehurčki ustvarjajo pomemben model pri preučevanju procesov na nivoju celice. Skozi različne trenutne raziskave in veliko strokovne literature smo z zanimanjem brali, kje vse so uporabni in kaj so znanstveniki še dognali. Pritegnil nas je ta preplet različnih strok v celoto in kako vsaka izmed omenjenih pride do enakega zaključka, bodisi skozi razvoj teoretičnih metod ali eksperimentalnega dela. Ob nenehnem zastavljanju vprašanj mentorjem smo področje dobro spoznali, vendar pa nas na tej točki čaka še ogromno dela in učenja (tudi na osnovnem nivoju), da bomo lahko v celoti razumeli vsaj en segment dogajanja. Raziskovalno delo nam je odprlo mnogo novih vprašanj in zanetilo veliko iskrice, saj smo bili nadvse hvaležni, da smo lahko sodelovali pri tovrstnem procesu in pobližje opazovali dogajanje.

6 LITERATURA

- Amon, T., Lampe-Kajtna, M. (ni leta). *Propustnost biološke membrane – risbe* (Strokovno gradivo, Prostorske animacije bioloških procesov, Vedež DZS). Pridobljeno s http://vedez.dzs.si/datoteke/bio-procesi/1_zgradba-in-delovanje-celice/1_prepustnost_membrane/5_pasivni-transport/1_enostavna-difuzija-skozi-membrano/2_risbe/index.html
- Avati polar lipids (2017). *Varnostni list za holesterol*. Pridobljeno s https://avantilipids.com/assets/products/attachments/700100P_E_7950_US.pdf
- Avati polar lipids (2018). *Varnostni list za 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoholin*. Pridobljeno s https://avantilipids.com/assets/products/attachments/850457C_E_7950_US.pdf
- Avanti polar lipids (2021). *16:0-18:1 PC (POPC)* (Produktni program). Pridobljeno s <https://avantilipids.com/product/850457>
- Bavec, A. in Veranič, P. (2012). *Spoznajmo zgradbo in delovanje celice*. Ljubljana: Modrijan.
- Drab, M., Stopar, D., Kralj-Iglič, V., Iglič, A. (2019). Inception mechanisms of tunneling nanotubes. *Cells*, 8(6), 626.
- Fagron (2016). *Varnostni list za metanol*. Pridobljeno s [https://fagron.com/sites/default/files/document/msds_coa/67-56-1_\(SL\).pdf](https://fagron.com/sites/default/files/document/msds_coa/67-56-1_(SL).pdf)
- Fagron (2019). *Varnostni list za triklorometan*. Pridobljeno s [https://fagron.com/sites/default/files/document/msds_coa/67-66-3_\(SL\).pdf](https://fagron.com/sites/default/files/document/msds_coa/67-66-3_(SL).pdf)
- Godec, G., Glažar, A. S., Grubelnik, L. (215). *Naravoslovje 6: i-učbenik za naravoslovje v 6. razredu osnovne šole*. Ljubljana: Zavod RS za Šolstvo. Pridobljeno s <https://eucbeniki.sio.si/nar6/1500/index4.html>
- Godec, G., Glažar, A. S., Grubelnik, L., Jamšek, S., Zmazek, B. (2015). *Naravoslovje 7: i-učbenik za naravoslovje v 7. razredu osnovne šole*, Ljubljana: Zavod RS za Šolstvo, Pridobljeno s <https://eucbeniki.sio.si/nar7/1810/index1.html>
- Goršak, T., Drab, M., Križaj, D., Jeran, M., Genova, J., Kralj, S., idr. (2020). Magneto-mechanical actuation of barium hexaferrite nano platelets fort the disruption of pfosholipid membranes, *Journal of Colloid and Interface Science*, 579, 508-519. Pridobljeno s <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979720308249>
- Intihar, A. (2006). *Vsebnost holesterola v jajcih treh linij kokoši* (Diplomsko delo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani). Pridobljeno s http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn_intihar_andreja.pdf
- Karmin N. (2016). *Vpliv mikrokapsul fotokromnega barvila in klasičnega pigmenta na krvne celice* (Diplomsko delo, Naravoslovnotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani). Pridobljeno s <https://repozitorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=91843&lang=eng>
- Kemika (2004). *Varnostni list za D-(+)-glukožo*. Pridobljeno s https://www.zd-lj.si/zdlj/skripte/varnostne_liste/pdf/K_glukoza.pdf
- Kemika (2004). *Varnostni list za saharozo*. Pridobljeno s https://www.zd-lj.si/zdlj/skripte/varnostne_liste/pdf/K_saharoz.pdf
- Kralj-Iglič, V., Iglič, A. (2003). Organske mikro- in nanocevke, *Proteus*, 66(3), 106-111. Pridobljeno s <http://physics.fe.uni-lj.si/publications/pdf/Proteus2003.pdf>
- Kralj-Iglič, V., Iglič, A., Hägerstrand, H., Borowska-Hägerstrand, M. (2005). Hipoteza o nanostukturah celičnih in fosfolipidnih membran kot infastruktura celice, *Medicinski razgledi*, 44, 155-169. Pridobljeno s: <https://www.dlib.si/details/URN:NBN:SI:DOC-2YO3KIDG>
- Kreft, M., Stojan-Dolar, M., Fon, D. (2010). *Človeško telo učbenik za biologijo v 8. razredu osnovne šole*. Ljubljana: Rokus Klett.
- Kreft, S., Krapež, S. (2012). *Spoznajmo gene in dedovanje*. 2. izdaja, Ljubljana: Modrijan.

- Kure S. (2006). *Fenolne spojine in fluidnost celičnih membran* (Diplomsko delo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani). Pridobljeno s <https://repozitorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=133643&lang=slv>
- Lipovšek, S. (2015). Lipidi v celicah, *Življenje in tehnika*, Ljubljana, 60(8), 65-72. Pridobljeno s: <http://www.galenia.si/files/Lipidi%20v%20celicah-ilovepdf-compressed.pdf>
- Midner, B. (ni leta). *Biološke membrane, struktura i dinamika* (Prosojnice predavanja). Pridobljeno s https://www.pmf.unizg.hr/download/repository/14obk-p13-bioloske_membrane.pdf
- Paraskevi, G. (2010). *Molecular dynamics studies of peptide-membrane interactions: insights from coarse-grained models* (Doktorsko delo, The University of Edinburgh). Pridobljeno s: <https://era.ed.ac.uk/handle/1842/4652>
- Pharmachem (2016). *Varnostni list za etanol*. Pridobljeno s https://market.mikropolo.si/files/mikropolo/dodatno/varnostni_listi/MP-60104-1L%2064-17-5.pdf
- Rozman, D. (2013). *Lipidi*, Prosojnice predavanja (Biokemija I, 18. predavanje, 27. 3. 2013). Pridobljeno s <http://ibk.mf.uni-lj.si/teaching/biokemija1/predavanja/predavanje18R13.pdf>
- Rožič, M., Lipič, N., Ostrež Voh, F. (2007). *Statistika* (Interno gradivo, Srednja poklicna in strokovna šola Bežigrad, Ljubljana). Pridobljeno s <https://mat.siclj.si/wp-content/uploads/sites/2/2017/09/statistika.pdf>
- Saremi, B. (2010). *Synthesis of giant unilamellar vesicles (GUV) from RSE liposomes in high and low ionic strength buffers* (Magistersko delo, Texas Tech University). Pridobljeno s: https://ttu-ir.tdl.org/bitstream/handle/2346/45531/Saremi_Bahar_Thesis.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Scitable by nature education (2014). *Cell Membranes* (Spletni portal za učenje/poučevanje). Pridobljeno s <https://www.nature.com/scitable/topicpage/cell-membranes-14052567>
- NeuModx molecular (ni leta). *Varnostni list za Triton-X-100*. Pridobljeno s https://www.neumodx.com/wp-content/uploads/2020/01/40600112-SDS-400700-vC_SL.pdf
- Sigma-Aldrich (2021). *Cholesterol* (Produktni program). Pridobljeno s https://www.sigmaldrich.com/catalog/product/sigma/c8667?lang=en®ion=SI&gclid=EAIaIQobChMIuZPi4Yn-7gIVSkeRBR3oRQBwEAAAYASAAEgJRwfD_BwE
- Stein, H., Spindler, S., Bonakdar, N., Wang, C., Sandoghdar, V. (2017). Production of isolated giant unilamellar vesicles under high salt concentrations. *Frontiers in Physiology*, 63, 8. Pridobljeno s <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2017.00063/full>
- Stušek, P., Podobnik, A., Gogala, N. (1997). *Biologija 1: Celica*. Ljubljana: DZS.
- Tavčar T., *Vsebnost holesterola v jajcih slovenskih lokalnih pasem kokoši* (Diplomsko delo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani). Pridobljeno s http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn_tavcar_tina.pdf
- UK Research and Innovation (2020). *Disinfecting surfaces for coronavirus: Does it reduce infection?* (Spletno mesto o dokazih in dejstvih o virusu, bolezni, epidemiji ter nadzoru nad njo). Pridobljeno s: <https://coronavirusexplained.ukri.org/en/article/pub0006/>
- Vehovar, U. (2018). *Merjenje vpliva učinkovin na obliko eritrocitov s primerjavo reprezentativnih populacij* (Diplomsko delo 1. stopnje, Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani). Pridobljeno s <https://repozitorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=111168&lang=eng>
- Vokič, N. (2019). *Vpliv izbranih tripanocidnih učinkovin na membrane z različnimi steroli* (Magistersko delo, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani). Pridobljeno s <https://core.ac.uk/download/pdf/186509194.pdf>
- Vrtačnik, M., Zmazek, B., Boh, B. (2014). *Kemija 3: i-učbenik za kemijo v 3. letniku gimnazije*. Ljubljana: Zavod RS za Šolstvo. Pridobljeno s <https://eucbeniki.sio.si/kemija3/1279/index10.html>
- Zupanc, J., Drobne, D. (2011). Populacije orjaških lipidnih veziklov kot model za študij bio-nano interakcij. *Informatica Medica Slovenica*, 16(1); 106-111. Pridobljeno s <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?id=16007&lang=eng&prip=dkum:12477:d1>

Živec, K., Ziherl, K. (2006). Fluidnost eritrocitnih membran pri rakavih bolnikih – študija z elektronsko paramagnetno resonanco. *Medicinski razgledi*, 45, 4-7. Pridobljeno s <https://medrazgl.si/fluidnost-eritrocitnih-membran-pri-rakavih-bolnikih-%E2%88%92-studija-z-elektronsko-paramagnetno-resonanco/>

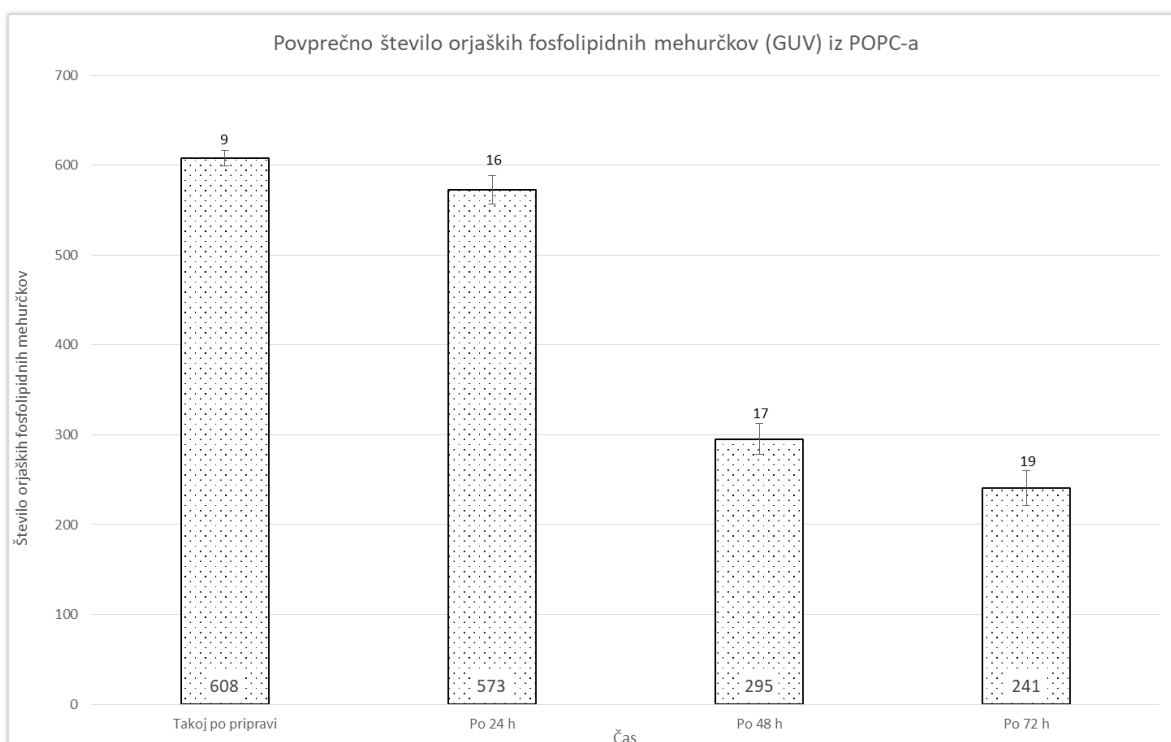
7 DODATEK

7.1 STATISTIČNA ANALIZA ORJAŠKIH FOSFOLIPIDNIH MEHURČKOV, PRIPRAVLJENIH IZ POPC-a

Tabela 3: Statistična obravnava orjaških fosfolipidnih mehurčkov iz POPC-a.

Vzorec	Takoj po pripravi				Po 24 h				Po 48 h				Po 72 h			
	I. paralelka	II. paralelka	III. paralelka	IV. paralelka	I. paralelka	II. paralelka	III. paralelka	IV. paralelka	I. paralelka	II. paralelka	III. paralelka	IV. paralelka	I. paralelka	II. paralelka	III. paralelka	IV. paralelka
1	20	16	61	29	44	32	21	29	13	13	13	19	13	15	13	14
2	26	22	52	21	68	49	20	38	10	19	13	13	11	9	11	15
3	19	22	35	17	49	30	40	27	15	10	15	12	12	8	12	14
4	20	37	26	43	28	28	23	27	16	12	12	12	13	15	15	11
5	20	36	38	33	41	19	27	29	16	16	18	13	7	9	17	16
6	24	39	55	56	32	11	41	21	13	15	16	14	10	10	4	6
7	46	33	34	19	19	24	33	30	7	17	24	14	6	12	9	13
8	22	25	36	29	24	35	30	28	12	15	12	13	11	16	9	16
9	26	28	31	42	17	48	31	24	8	9	20	7	7	10	11	15
10	29	39	25	40	28	24	32	25	20	21	15	18	5	10	9	14
11	26	33	22	38	30	24	28	32	14	17	19	14	13	16	13	11
12	44	42	43	41	24	22	33	37	12	14	22	13	8	9	12	16
13	34	27	38	40	27	26	30	38	15	11	14	15	13	9	17	13
14	26	35	23	28	16	26	29	31	11	24	13	18	10	14	8	15
15	30	30	26	56	25	37	36	26	13	23	20	19	7	11	18	10
16	35	25	16	54	33	37	27	22	17	13	18	19	16	12	10	12
17	36	28	22	4	20	32	38	27	12	12	11	20	15	12	14	15
18	33	26	34	4	17	16	26	24	18	13	16	16	14	11	13	16
19	44	32	24	6	16	23	25	16	10	13	9	21	17	8	17	14
20	43	33	23	20	17	33	18	20	18	18	7	9	15	13	13	10
VSOTA	603	608	600	620	575	576	588	551	270	305	307	299	223	229	245	266
POVPREČJE	608				573				295				241			
STD	9				16				17				19			
Napaka STD	9				16				17				19			

Graf 2: Povprečno število orjaških fosfolipidnih mehurčkov iz POPC-a.

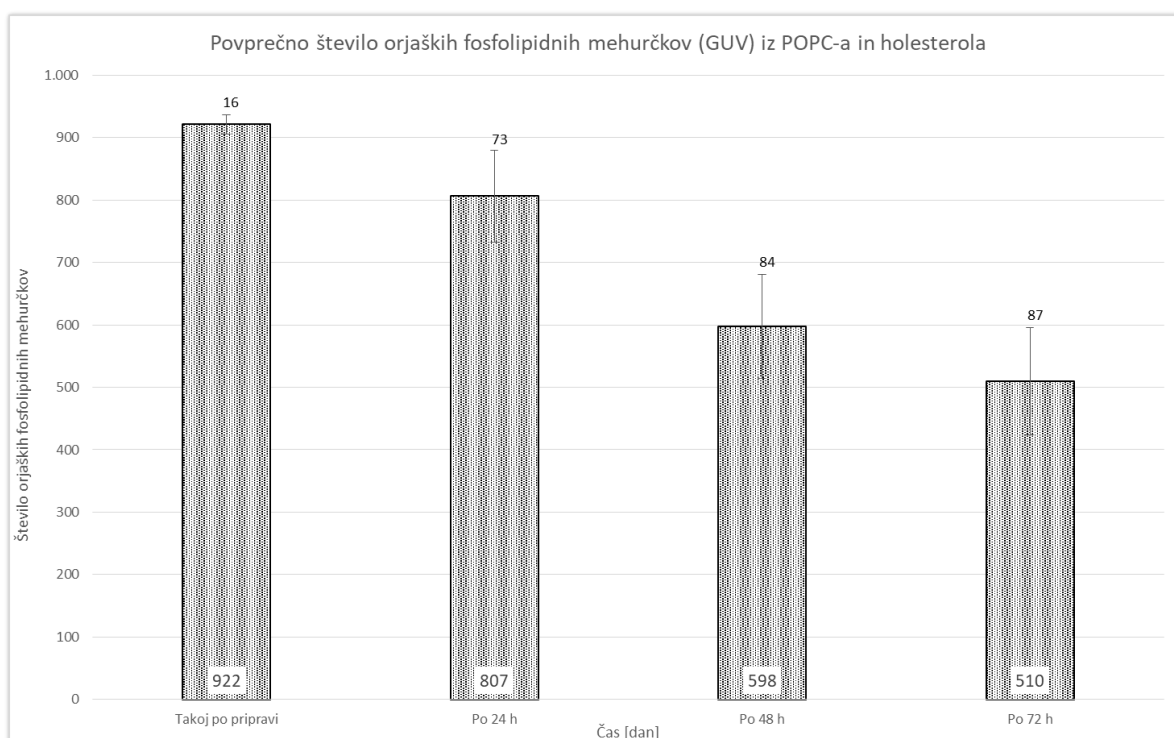


7.2 STATISTIČNA ANALIZA ORJAŠKIH FOSFOLIPIDNIH MEHURČKOV, PRIPRAVLJENIH IZ MEŠANICE POPC/HOLESTEROL (4:1)

Tabela 4: Statistična obravnava orjaških fosfolipidnih mehurčkov iz mešanice POPC/holesterol (4:1).








Vzorec	Takoj po pripravi				Po 24 h				Po 48 h				Po 72 h			
	I. paralela	II. paralela	III. paralela	IV. paralela	I. paralela	II. paralela	III. paralela	IV. paralela	I. paralela	II. paralela	III. paralela	IV. paralela	I. paralela	II. paralela	III. paralela	IV. paralela
1	50	38	36	23	37	32	54	54	42	26	27	16	14	9	22	36
2	58	48	31	48	33	20	54	37	36	36	36	15	27	11	30	18
3	32	40	48	43	36	71	29	19	38	43	29	23	14	23	27	32
4	29	44	41	52	33	35	40	46	34	32	38	30	13	16	27	16
5	43	51	58	53	31	45	32	48	43	27	26	36	14	21	33	34
6	88	40	60	59	50	43	48	40	36	19	16	24	10	20	18	48
7	45	58	49	34	28	30	55	59	45	32	25	34	11	24	22	17
8	46	45	36	42	32	49	49	66	28	41	32	42	25	16	21	23
9	44	24	46	46	41	33	40	16	35	21	22	35	18	30	24	16
10	67	48	72	45	37	40	42	32	45	23	25	40	51	25	18	43
11	32	45	91	43	39	55	41	31	39	25	24	45	24	19	30	32
12	40	40	36	52	23	29	37	40	38	13	18	34	29	26	13	48
13	72	39	42	48	42	32	42	65	31	15	28	14	25	27	25	24
14	37	45	43	50	31	53	28	42	26	31	25	12	15	21	36	45
15	40	52	31	45	37	44	54	41	30	39	28	12	27	34	26	31
16	36	44	36	55	39	40	29	36	38	38	48	20	49	15	34	25
17	50	50	49	58	29	42	64	41	32	47	21	16	15	27	21	47
18	39	49	30	63	24	24	22	36	28	41	45	31	41	18	23	38
19	26	53	47	57	36	61	47	63	27	15	30	15	24	25	25	39
20	45	52	37	27	47	30	29	65	47	10	32	30	26	27	25	21
VSOTA	919,0	905,0	919,0	943,0	705,0	808,0	836,0	877,0	718,0	574,0	575,0	524,0	472,0	434,0	500,0	633,0
POVPREČJE	922				807				598				510			
STD	16				73				84				87			
Napaka STD	16				73				84				87			

Graf 3: Povprečno število orjaških fosfolipidnih mehurčkov iz mešanice POPC/holesterol (4:1).



7.3 VARNOSTNA OPOZORILA KEMIKALIJ

Tabela 5: Varnostna opozorila kemikalij.

Ime kemikalije	Formula	M (g/mol)	Piktogram	H-stavki	P-stavki	CAS
Etanol	C ₂ H ₆ O	46,07		H225	P102 P103 P210 P233	64-17-5
Triklorometan	CHCl ₃	119,38	 	H302 H315 H319 H331 H351 H361d H372	P302+P352 P304+P340 P305+P351+P338 P308+P310	67-66-3
Metanol	CH ₄ O	32,04	  	H225- H301- H331- H370- H311	P280-P233-P310-P309- P302+P352-P210	67-56-1
Holesterol, 3β-hidroksi-5- holesten, 5- holesten-3β-ol	C ₂₇ H ₄₆ O	386,65	/	/	/	57-88-5
POPC, 1-palmitoil-2- oleoil- <i>sn</i> - glicero-3- fosfoholin	C ₄₂ H ₈₂ NO ₈ P	760,08	/	/	/	26853- -31-6
Saharoza	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342,30	/	/	/	57-50-1
D-(+)-glukoza	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,16	/	/	/	50-99-7
Triton-X-100	/	/		H319 H402	P264 P280 P305+P351+P338 P337+P313 P273	9002-93-1