



OSNOVNA ŠOLA
PRIMOŽA TRUBARJA LAŠKO



Univerza v Ljubljani

ZDRAVSTVENA FAKULTETA
FAKULTETA ZA ELEKTROTEHNIKO

NAVADNA SMREKA (*PICEA ABIES*) KOT VIR BIOLOŠKO AKTIVNIH MACERATOV IN HOMOGENATOV

RAZISKOVALNO DELO
PODROČJE: KEMIJA IN KEMIJSKA TEHNOLOGIJA

Niki Čater, učenec 9. razreda

MENTORJI:

strok. sod. Marko Jeran, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena fakulteta in
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko

doc. dr. Samo Penič, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko

Milena Žohar, prof., OŠ Primoža Trubarja Laško

LAŠKO, 2022

Science is the attempt to make the chaotic diversity of our sense-experiments correspond to a logically uniform system of thought.
-Albert Einstein

Z A H V A I A

Spoštovani mentorji, najlepša hvala za vso pomoč. Brez vaše pomoči mi ne bi uspelo.

Najprej iskreno zahvalo namenjam gospodu **Marku Jeranu**, strokovnemu sodelavcu Zdravstvene fakultete in Fakultete za elektrotehniko Univerze v Ljubljani, ki je raziskovalno delo koordiniral, prevzel vlogo glavnega mentorja in z budnim očesom vse detajle tega dela tudi spremljal. Hvala Vam za vzpodbudne besede, dobre nasvete in tudi konstruktivne kritike, s katerimi sem se učil in razvijal skozi celotno nalogo. Brez Vas in Vašega prostega časa moja nepozabna izkušnja in prvo raziskovalno delo ne bi uspela tako, kot sta.

Iskreno se zahvaljujem tudi *doc. dr. Samu Peniču* iz Fakultete za elektrotehniko Univerze v Ljubljani. Hvala za vso ponujeno pomoč in velikodušno usmerjanje pri uporabi računalniških programov za pridobitev rezultatov. Vaš prispevek je pomembno pripomogel h končni obliki tega dela.

Hvala tudi učiteljici **Mileni Žohar** za besede spodbude in pomoč pri delu v šoli. Vesel sem, da sva lahko del poskusov izvajala skupaj.

... Tudi Vi ste del moje poti.

Hvala učiteljici slovenskega jezika in književnosti, gospe **Lidiji Toplišek** za lektorski pregled naloge in ideje o tem in onem tekstu.

Hvala *Laboratoriju za fiziko* Fakultete za elektrotehniko in *Laboratoriju za klinično biofiziko* Zdravstvene fakultete Univerze v Ljubljani za lep sprejem med že uveljavljene raziskovalce ter vsa delovna sredstva in aparature, ki smo jih med delom potrebovali.

Na koncu mi vse to ne bi bilo omogočeno brez moje **osnovne celice – staršev**. Dragi starši, iskrena hvala za vašo spodbudo in motivacijo, ki mi ju vedno velikodušno izkazujete, ne samo takrat, kadar sem “raziskovalec”.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD.....	8
1.1	METODOLOGIJA RAZISKOVALNEGA DELA.....	8
2	TEORETIČNI DEL.....	10
2.1	NAVADNA SMREKA (lat. <i>PICEA ABIES</i>).....	10
2.2	BIOLOŠKO AKTIVNE UČINKOVINE V NAVADNI SMREKI.....	12
2.3	IZOLACIJE AKTIVNIH UČINKOVIN IZ NAVADNE SMREKE.....	14
2.4	MODEL CELIČNE MEMBRANE IN NJEGOVO FORMIRANJE V VODNEM MEDIJU (ELEKTROFORMACIJA)	16
2.5	SPEKTROFOTOMETRIJA	19
2.6	CILJ RAZISKOVALNEGA DELA	21
2.7	HIPOTEZA.....	22
3	EKSPERIMENTALNI DEL	23
3.1	UVOD V EKSPERIMENTALNO DELO.....	23
3.2	REAGENTI IN RAZTOPINE	24
3.3	DELOVNI PRIPOMOČKI	25
3.4	PRIPRAVA IGLIC NAVADNE SMREKE	27
3.5	PRIPRAVA MACERATOV IGLIC NAVADNE SMREKE	27
3.6	PRIPRAVA LIPIDNIH VEZIKLOV IZ MACERATOV IGLIC NAVADNE SMREKE 28	
3.7	DOLOČANJE POLMEROV LIPIDNIH VEZIKLOV IN IZRAČUN NJIHOVIH PORAZDELITEV	28
3.8	PRIPRAVA HOMOGENATOV NAVADNE SMREKE.....	29
3.9	KVANTITATIVNO DOLOČANJE SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN V HOMOGENATIH NAVADNE SMREKE	30
4	REZULTATI IN DISKUSIJA	33

4.1	PRIPRAVA MACERATOV IGLIC NAVADNE SMREKE	33
4.2	PRIPRAVA LIPIDNIH VEZIKLOV IZ MACERATOV NAVADNE SMREKE.....	34
4.3	DOLOČANJE POLMEROV LIPIDNIH VEZIKLOV IN IZRAČUN NJIHOVIH PORAZDELITEV	36
4.4	PRIPRAVA HOMOGENATOV NAVADNE SMREKE.....	37
4.5	KVANTITATIVNO DOLOČANJE SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN V HOMOGENATIH IGLIC NAVADNE SMREKE.....	38
5	ZAKLJUČEK.....	41
6	LITERATURA.....	44
7	DODATEK.....	49
7.1	KVANTITATIVNO DOLOČANJE SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN V HOMOGENATIH IGLIC NAVADNE SMREKE.....	49
7.2	VARNOSTNA OPOZORILA KEMIČALIJ	49

KAZALO SLIK

Slika 1:	Navadna smreka (Fotografija last avtorjev in mentorjev).....	10
Slika 2:	Storži navadne smreke (Urbanatura, 2017).	11
Slika 3:	Biološko aktivne spojine v naravni smreki (Jeran idr., 2022).....	13
Slika 4:	Organeli živalske in rastlinske celice (Godec idr., 2015).	17
Slika 5:	(a) Fosfolipidni dvosloj in (b) liposom (Wikipedia, 2021).....	18
Slika 6:	Praktični prikaz elektroformacije v navpični viali (Fotografija last avtorjev in mentorjev).....	19
Slika 7:	Aparatura <i>NanoDrop One</i> . (a) Aparatura v mirovanju, pred izvedbo analize, (b) ključna enota instrumenta, imenovana podstavek (angl. <i>pedestal</i>), pripravljena za nanos vzorca, (c) nanos 1–2 μL vzorca na režo podstavka in (d) po nanosu vzorca zaprt podstavek. Ko podstavek zapremo, počakamo na izpis vrednosti, ki jo sistem izpiše na zaslonu.	20
Slika 8:	Struktura 1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholina (POPC) (Avanti polar lipids, 2021). .	25
Slika 9:	Sušenje iglic navadne smreke v sušilniku (Fotografija last avtorja in mentorjev).	27
Slika 10:	Shematski prikaz prereza krogle, kjer r označuje njen polmer in S njeno ploščino.	29

Slika 11: Eksperimentalni načrt priprave homogenatov za določanje skupnih fenolnih spojin.....	30
Slika 12: Umeritvena krivulja za določitev skupnih fenolnih spojin v homogenatih iglic navadne smreke.....	31
Slika 13: Pod svetlobnim mikroskopom vidni z elektroformacijo nastali lipidni vezikli iz: (a) lipida POPC, ki velja kot modelni/standardni lipid, iz katerega pripravljajo modelne vezikle. Polja od (b) do (f) predstavljajo vezikle, nastale iz maceratom iglic navadne smreke v: (b) in (c) etanolu, (d) heksanu ter (e) in (f) kloroformu.	34
Slika 14: Prikaz porazdelitve polimerov lipidnih veziklov, formiranih iz macerata heksana in kloroforma.	36
Slika 15: Svetlobna mikroskopija homogenatov iglic navadne smreke: (a) in (b) v fiziološki raztopini ter (c) v destilirani vodi.....	37
Slika 16: Rezultati kvantitativnih določanj skupnih fenolnih spojin v homogenatih iglic navadne smreke.....	38
Slika 17: Eksperimentalne meritve določanj skupnih fenolnih spojin v vzorcih homogenatov navadne smreke v dveh različnih medijih: (a) v destilirani vodi in (b) v fiziološki raztopini.....	49

KAZALO TABEL

Tabela 1: Vpliv topila na izolirano maso in izkoristek maceracije.....	33
Tabela 2: Varnostna opozorila uporabljenih kemikalij.....	49

POVZETEK

Množico delcev s samostojno strukturo, obdano z zunanjo membrano, imenovano lipidni dvosloj, ki jih v zunajcelični prostor izločajo celice, imenujemo zunajcelični vezikli. Da omenjene delce najdemo tudi v vzorcih naravnega izvora, pričajo že zametki raziskav iz leta 1960. Dognano je bilo, da veljajo rastline kot “zeleni” vir teh medicinsko pomembnih delcev.

V etanolu, kloroformu in heksanu pripravljene macerate iglic navadne smreke (*Picea abies*) smo pri nizkih tokovih in frekvencah elektroformirali ter nastale vezikle s svetlobno mikroskopijo in meritvami polmerov tudi karakterizirali. Velik potencial zamenjave komercialnega lipida 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoholin (POPC) kažeta macerata heksana in kloroforma. V maceratu polarnega etanola so vezikularne strukture sicer nastale, vendar v izrazito manjših velikostih. Na podlagi lastnosti nastalih veziklov je tako mogoče sklepati na vsebnost lipidnih (nepolarnih) komponent, ki jih vsebuje izhodni macerat, in preko le-teh na polmer nastalih vezikularnih struktur.

Stabilne vezikularne strukture v maceratu heksana prevladujejo v dveh velikostnih redih: prvi z velikostjo okvirno 2,2 μm in drugi 3,8 μm . Preostalih populacij je zaznati manj, a so do polmera 6 μm zastopane enakomerno. Z vezikli najbolj bogat macerat kloroforma je pokazal največjo prisotnost vezikularnih struktur v območju od 3,8 do 4,2 μm . Macerat iglic v kloroformu je med drugim omogočil nastanek veziklov, ki v polmer merijo celo do 18 μm . Rezultati poskusov in analize velikosti delcev nakazujejo na stabilnost formiranih vezikularnih struktur. Vezikli manjših dimenzij so v primerjavi z večjimi tudi bolj obstojni.

Poskusi kvantitativne določitve skupnih fenolnih spojin z reagentom Folin-Ciocalteu so pokazali, da imajo eksperimentalni faktorji, kot so temperatura, čas in izbira homogenizacijskega medija, pomemben vpliv na izluževanje in karakteristike ter kvantitativno vsebnost skupnih fenolnih spojin. Največ se jih v primerjavi z nizko temperaturo izloči ob direktnem obdelovanju z mikrovalovi pri visoki temperaturi, kar med drugim potrjuje tudi teorija gibanja delcev.

Ključne besede:

Lipidni vezikli, naravni viri, polmer, navadna smreka (*Picea abies*), macerat, homogenat, Folin-Ciocalteu, skupne fenolne spojine, medicina

ABSTRACT

A group of particles with an independent structure surrounded by an outer membrane, a lipid bilayer, and released by cells into the extracellular space are called extracellular vesicles. The fact that these particles can also be found in samples of natural origin is evident from the early days of research from 1960 onwards, when plants were discovered as a “green” source of medicinally important constituents. Within this research macerates or extracts of lipids and other constituents from spruce needles (*Picea abies*) were prepared in ethanol, chloroform, and hexane. With the process of electroformation using low voltage and low frequency excitations vesicles were formed. The resulting structures were characterized by light microscopy. Hexane and chloroform macerates show high potential for 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) commercial lipid substitution. In polar ethanol macerate, vesicular structures were formed, but in markedly smaller sizes. Based on the properties of the formed vesicles, it is possible to conclude on the content of lipid (nonpolar) components contained in the starting macerate and through them on the radius of the formed vesicular structures. Stable vesicular structures in hexane macerate predominate in two size groups: the first with a size of approximately 2.2 μm and the second 3.8 μm . There are fewer remaining populations, but they are evenly represented up to a radius of 6 μm . Vesicle-rich chloroform macerate showed the greatest presence of vesicular structures in the range of 3.8 to 4.2 μm . Chloroform spruce needle macerate, among other things, enabled the formation of vesicles measuring up to 18 μm in radius. The results of experiments and particle size analyzes indicate the stability of the formed vesicular structures. Vesicles of smaller dimensions are also more durable compared to larger ones. Experiments to quantify total phenolic compounds with Folin-Ciocalteu reagent have shown that experimental factors such as temperature, time and choice of homogenization medium have a significant influence on leaching and characteristics and quantitative content of total phenolic compounds. Most of them are eliminated in comparison with low temperature during direct microwave treatment at high temperature, which is also confirmed by the theory of Brownian particle motion.

Key words:

Lipid vesicles, natural sources, radius, European spruce (*Picea abies*), macerate, homogenate, Folin-Ciocalteu, total phenolic compounds, medicine

1 UVOD

Celice izločajo različne vrste delcev v zunajcelični prostor. Pogosto govorimo o t. i. celičnih veziklih (CV), ki ustrezajo velikosti do 30 nm. Vse več študij je pokazalo, da so CV vključeni v različne aplikacije, predvsem se znanja aplicirajo v medicino (Jeran idr., 2021c).

Celični vezikel je samostojna struktura, sestavljena pretežno iz tekočine (ali plina), obdana in zaprta z zunanjo membrano, imenovano lipidni dvosloj. Lipidni dvosloj je sestavljen iz hidrofilnih glav in hidrofobnih repov, ki se združujejo. Čeprav so podobni vakuolam, imajo celični vezikli tudi svoje edinstvene funkcije in sposobnosti. Lahko se zlijejo z membranami drugih celic ter opravljajo določene funkcije, kot na primer razgradnje drugih celic. Ključno vlogo nosijo tudi pri shranjevanju in transportu snovi, kot so beljakovine, encimi, hormoni in nevrotransmiterji. So majhni delci, a bistveni del različnih bioloških sistemov in procesov (Lewsey, 2020).

Vse več raziskav se trenutno ukvarja z raziskovanjem omenjenih celičnih delcev v naravnih oz. rastlinskih materialih (angl. *plant vesicles*). Temelji za to področje segajo v leto 1960, danes pa so nekatera znanja prinesla že konkretne klinične rezultate (Jeran idr., 2021c).

Motivacija za izvedbo raziskovalnega dela sega prav na področje uporabe naravnih virov za proizvodnjo celičnih delcev v povezavi z aktivnimi učinkovinami, ki jih le-ti vsebujejo. Zaradi razvoja uporabe naravnih lipidnih virov za modelne celice (liposome oz. orjaške fosfolipidne mehurčke) se delo v prvem sklopu dotika maceracije iglic navadne smreke in produkcije lipidnih veziklov iz pripravljenih izolatov ekstrakcije "trdno/tekoče", tj. maceratov. Ker iglice navadne smreke predstavljajo »zeleni« vir različnih naravnih organskih spojin in celičnih delcev, so zaradi nastanka vezikularnih struktur v vodnih medijih v drugem sklopu preučevani različni postopki izločanja skupnih fenolnih spojin iz rastlinskega vira v vodni medij. Nastalim raztopinam pravimo homogenati, saj predstavljajo sproščeno celično vsebino po razpadu celičnih sten in membrane rastlinskega tkiva.

1.1 METODOLOGIJA RAZISKOVALNEGA DELA

Priprava maceratov in homogenatov je bila opravljena v šolskem laboratoriju, priprava lipidnih veziklov, statistična obdelava podatkov in določanje skupnih fenolnih spojin pa v sodelovanju z

Laboratorijem za fiziko Fakultete za elektrotehniko in *Laboratorijem za klinično biofiziko* Zdravstvene fakultete Univerze v Ljubljani. Ker je bilo raziskovalno delo interdisciplinarno, je sodelovanje zunanjih inštitucij še bolj dragocenega pomena. Delo v tamkajšnjih laboratorijih je nadzorovalo strokovno usposobljeno osebje v sodelovanju z mentorji. Vso potrebno opremo so nam zagotovile gostujoče inštitucije. 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 delovni proces smo imeli na voljo zaščitna sredstva (rokavice, zaščitna očala in haljo) in smo sledili smernicam za varno in učinkovito delo.

2 TEORETIČNI DEL

2.1 NAVADNA SMREKA (lat. *PICEA ABIES*)

Navadna smreka (lat. *Picea abies*) (**Slika 1**) spada v rod borovk, ki obsega okvirno 35 zimzelenih rastlin. Njena domovina so evropska gorstva srednjih in severnejših predelov (Jeran idr., 2020). Razprostira se od južne Skandinavije do južnih predelov Alp na Balkanu in v Karpatih, kjer uspeva na od 600 do 2.000 m n. m. V Evropi se večinoma pojavlja na območjih, ki niso optimalna za njeno vitalnost. Zaradi poseganja človeka v okolje je težko določiti njeno naravno razširjenost. Upoštevajoč zgodovino naseljevanja v poletni dobi ločimo Alpsko-jugovzhodno evropsko področje, Karpatsko področje in Nordijsko-baltiško področje, ki so skoraj ločena med seboj. V Sloveniji je njeno naravno rastišče gorski svet, ki se razprostira vse od Pohorja do Julijskih Alp, prisotna pa je tudi na mraziščih dinarsko-kraškega sveta. Zaradi svoje velike prilagodljivosti je pri nas ena najbolj številčnih drevesnih vrst. Po podatkih Zavoda za gozdove je njena lesna zaloga v Sloveniji za leto 2019 znašala 30,4 % (Jeran, 2020; Jeran idr., 2021a).



Slika 1: Navadna smreka (Fotografija last avtorjev in mentorjev).

Navadna smreka je vitko in iglasto drevo s stožčasto krošnjo, ki lahko zraste do 50 (ponekod 70) metrov visoko. Gosto olistane veje in vejice so vretenčasto nameščene, vodoravno štrleče in pri mladih rastlinah upognjene navzgor, s starostjo pa se lahko (zaradi teže) povesejo. Listi smreke so iglasti in imajo močan sladkoben vonj. Iglice so temno zelene barve z bledimi belimi progami vzdolž vsake izmed štirih strani. V prečnem prerezu so listi štirikotne oblike, debeline do 1 mm in dolžine od 10 do 25 mm ter na koncu zašiljeni. Iglice na smreki ostanejo 5–7 let, v nekaterih primerih celo

do 9 let. Odpadle iglice se težko razkrajajo in povzročajo močno zakisanje tal, kar v kombinaciji s pomanjkanjem svetlobe povzroča odsotnost podrasti. Na koncih vej rastejo vitki storži, ki so obrnjeni navzdol (**Slika 2**). Zreli storži zrastejo v dolžino do 20 cm. Sprva so storži zeleni in povsem zaprti, ko dozori (ponavadi jeseni), postanejo rjavkasti. Ko zunanje razmere zadoščajo razmeram za razmnoževanje (v februarju), se tanke in na vrhu nazobčane luske razprejo in veter ponese semena s krilci v okolico (Jeran, 2020; Sedušak Kljakič & Remškar, 2020).

Smreka je enodomna rastlina, kar definiramo, kot da se na isti rastlini razvijejo tako moški kot ženski cvetovi. Moški cvetovi so na poganjkih prejšnje sezone, v srednjem in zgornjem delu krošnje, so rumenorjave ali rumenordeče barve ter merijo v dolžino 3 cm. Med razcvetom so pokončni. Ženski cvetovi so v socvetju in so obarvani svetlo rdeče. Sprva so pokončni, ko zrastejo 2–4 cm v dolžino, se razvijejo v valjaste in viseče storže. Za razliko od moških cvetov, ki so v prej omenjenih delih krošnje, se ženski nahajajo zgolj v vrhu krošnje (Sedušak Kljakič & Remškar, 2020; Jeran, 2020).



Slika 2: Storži navadne smreke (Urbanatura, 2017).

Navadna smreka je prva golosemenka, kateri so leta 2013 s pomočjo biokemijskega postopka, imenovanega *sekvenciranje*, z določanjem zaporedja v dednem materialu analizirali celoten genom. Ugotovljeno je bilo, da je njen genom velik 20 milijonov baznih parov in vsebuje veliko ponavljajočih (repetitivnih) odsekov deoksiribonukleinske kisline (DNK) (Jeran, 2020).

Navadna smreka je vsestransko uporabna rastlina. V preteklosti so jo uporabljali za kurjavo. Njen razmeroma lahek in mehak svetel les se pogosto uporablja v gradbeništvu, v pohištveni in papirni industriji ter pri izdelavi glasbil (Jeran, 2021a).

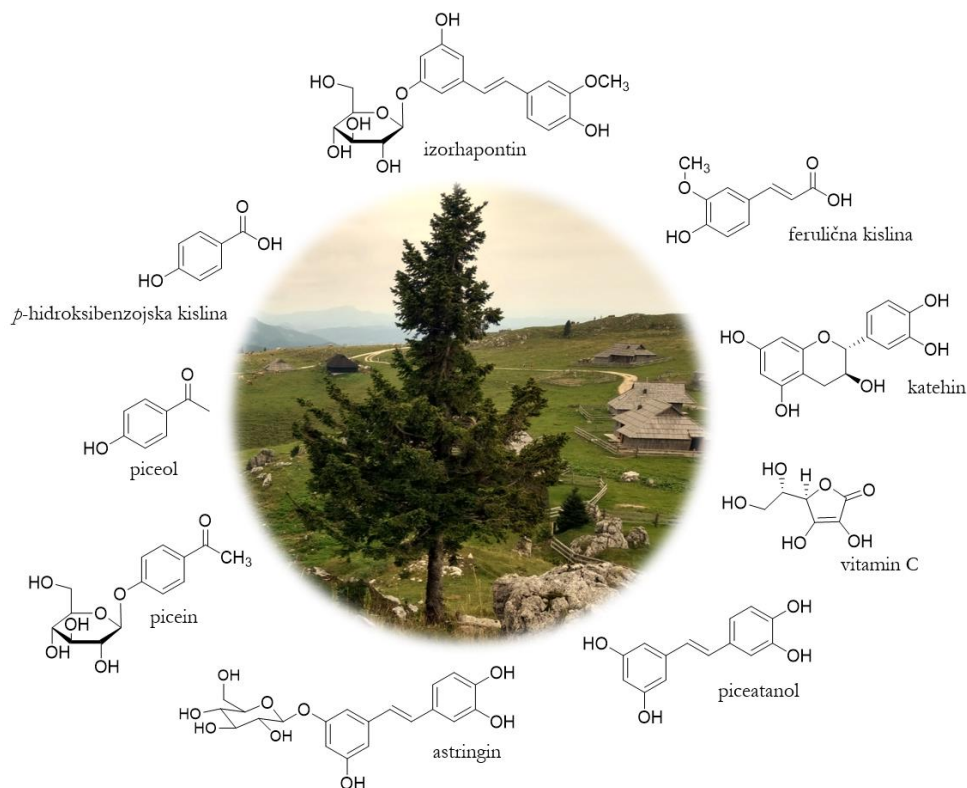
Mnogo smrekovih pripravkov je svoje mesto uporabe našlo pri uporabi v zdravilne namene. Omenimo eterična olja iglic in smolo kot mazilo, iglice in vršički pa so uporabni predvsem za pripravo čajev, kopeli in vitaminskih napitkov. V smreki prisotne zdravilne učinkovine naj bi pomagale pri izkašljevanju sluzi ob prehladih, lajšanju revmatizma, uničevanju bakterij in podobno. Mazilo iz smrekove smole kaže učinke tudi pri ozeblinah in revmatičnih bolečinah (Jeran, 2020; Jeran idr., 2021a).

2.2 BIOLOŠKO AKTIVNE UČINKOVINE V NAVADNI SMREKI

Biološko aktivna učinkovina je snov, ki kaže učinek na živ organizem. Običajno nas zanimajo snovi, katerih učinki so za človeka blagodejni. Na tem mestu gre lahko za neposredno pozitivno delovanje ali pa posredno, ko snov negativno deluje na nek drug, za človeka škodljiv organizem. Učinek snovi je odvisen od uporabljene količine (doze). Da bi pri rokovanju zagotovili varno in učinkovito uporabo, moramo pri učinkovinah temeljito poznati njihov način vstopanja v telo, razporejanja in presnove v telesu ter nazadnje njihove razgradnje in izločanja (»ADME«, angl. *absorption, distribution, metabolism and excretion*; kar v prevodu imenujemo: absorpcija, porazdelitev, presnova in izločanje) (Jeran idr., 2021a).

Že znane identificirane biološko aktivne snovi v smreki so (**Slika 3**) (Jeran idr., 2022):

- *p*-hidroksibenzojska kislina (PHBA) in njeni glukozidi,
- piceol in njegov glukozid picein, ki se v farmacevtski industriji uporabljata za proizvodnjo zdravilnih učinkovin,
- piceatanol in astringin, ki je stilbenoid 3- β -*D*-glukozid piceatanola,
- ferulična kislina, ki je osnova za proizvodnjo aromatskih spojin,
- izorhapontin – stilbenoid, ki je predvsem prisoten v koreninah navadnih smrek,
- katehin, t. i. naravni antioksidant in sekundarni rastlinski metabolit ter
- vitamin C, ki velja za enega najpomembnejših antioksidantov v zunajcelični tekočini. Prisoten je tudi v smrekovih vršičkih.



Slika 3: Biološko aktivne spojine v naravni smreki (Jeran idr., 2022).

Zaradi izjemnih lastnosti so za raziskovalno delo zanimive tudi fenolne spojine. Fenolne spojine so zelo raznovrstna skupina organskih molekul, ki vsebujejo aromatski obroč in vsaj eno (ali več) hidroksilno skupino, ki je vezana direktno na aromatsko jedro. Fenolne spojine so t. i. sekundarni metaboliti, ki so prisotni v vseh rastlinah. V naravi običajno srečamo spojine z več »OH« skupinami, zato se je zanje uveljavilo tudi drugo ime: *polifenoli*. Polifenoli predstavljajo heterogeno skupino organskih spojin, ki v rastlinah opravljajo funkcijo barvil, koencimov, protimikrobnih sredstev in učinkovin, ki se pojavijo v rastlinah kot odgovor na infekcije, kar strokovno imenujemo fitoaleksini. Polifenoli dajejo rastlinam karakteristični okus, prehransko vrednost ter farmakološke in toksične učinke. Redko se v rastlinah pojavijo v prosti obliki, pogosto so vezani na sladkorje, amino skupine, lipide in terpenoide in podobno (Kure, 2006).

Hidroksilne skupine polifenolom ustvarjajo sposobnost zajemanja prostih radikalov ter jim dajejo močnejši kisli značaj v primerjavi z drugimi alkoholnimi skupinami. Tovrstna kemijska reaktivnost je odgovorna predvsem za antioksidativni značaj polifenolov. Nisca in sodelavci (2021) so z uporabo ultrazvočne ekstrakcije in ekstrakcije s pomočjo mikrovalov v vzorcih smreke zaznali močno

korelacijo med antioksidativno aktivnostjo in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin. Rezultati so med drugim pokazali tudi, da višja vsebnost polifenolov vodi do močnejšega antioksidantnega delovanja (Nisca idr., 2021). Čeprav lubje žilnih lesnatih rastlin pogosto velja za gozdni odpadke, lahko predstavlja pomemben vir bioaktivnih spojin z velikim krožno-gospodarskim potencialom. O njihovem pomenu in vrednosti priča veliko število objav, ki so usmerjene tudi v analizo fenolnih spojin, ekstrahiranih iz lubja. Iz lubja lesnatih rastlin bi biološko aktivne učinkovine tako lahko pridobivali tudi v industrijskem merilu (Tanase idr., 2019).

Pri razvoju »zelenih« in trajnostnih metod izolacije je mogoče zaslediti vse več študij, pri katerih s pomočjo ultrazvočne ekstrakcije pripravljajo izolate, bogate s skupnimi fenolnimi spojinami in učinkovinami z antioksidativnim delovanjem. Na modelu lubja navadne smreke je Spinelli s sodelavci (2019) pokazala, da je med vsemi trenutno aktualnimi »zelenimi« postopki izolacije prav ekstrakcija s pomočjo ultrazvoka ustvarila največji dobiček skupnih fenolnih spojin, le-ta je znašal: $54,97 \pm 2,00$ mg galne kisline/g suhe snovi.

Aktualna literatura s področja izolacij naravnih spojin iz različnih virov priča, da ekstrakcija ob pomoči ultrazvoka v primerjavi z drugimi »zelenimi« procesi ekstrakcije znatno poveča donos ekstrahiranih skupnih fenolnih spojin. Razlog se skriva prav v nastanku kavitacijskih mehurčkov, ki spodbujajo višji izkoristek ekstrakcije in s tem povečajo antioksidativno aktivnost ekstraktov (Spinelli et al., 2019).

2.3 IZOLACIJE AKTIVNIH UČINKOVIN IZ NAVADNE SMREKE

Med pogosto uporabljene in tehnično dovršene metode izolacij biološko aktivnih učinkovin iz naravnih virov uvrščamo ekstrakcijo. Ekstrakcija je separacijska metoda, pri kateri določeno snov odstranimo iz tekoče ali trdne zmesi tako, da jo raztopimo v drugi fazi (običajno tekoči), v kateri naj se ostale komponente ne bi raztapljale. Sestavljena je iz dveh glavnih zaporednih operacij. V prvem koraku zmes izpostavimo stiku s topilom, nato pa v drugem koraku običajno sledi ločevanje faz (Kogeljnik, 2018).

Pri iglicah navadne smreke bomo uporabili tehniko, imenovano maceracija oz. ekstrakcija »trdno-tekoče«, kjer uporabljamo tekoče topilo, s katerim odstranjujemo topne snovi iz trdnega realnega vzorca. Tehnika temelji na topnosti spojin v ekstrakcijskem topilu. Topnost neke spojine je odvisna od lastnosti, v kolikšni meri so njene molekule sposobne tvoriti vezi s topilom. Polarne spojine so praviloma dobro topne v polarnih topilih, nepolarne spojine v nepolarnih topilih.

Ekstrakcijo »tekoče–tekoče« uporabljamo, kadar ni mogoča destilacija oz. rektifikacija zaradi premajhne razlike v temperaturah vrelišča, tvorbe azeotropnih snovi in pri ločevanju temperaturno neobstoje snovi (vitamini, antibiotiki, aromatske snovi in drugo) (Čopar, 2020). Preprosta navadna ekstrakcija oz. maceracija običajno poteka v treh stopnjah (Zupanc Rezec & Hohkraut, 2019):

1. mešanje topila in snovi, ki jo ekstrahiramo; zmes pustimo v stiku dalj časa;
2. mehansko ločevanje ekstrakta in izluženega ekstrakcijskega ostanka (primer: s centrifugiranjem, filtracijo) in
3. termična ločitev ekstraktne faze v ekstrakt in topilo (z uparjanjem).

Maceracijo največkrat uporabljamo za pridobivanje tinktur in oljnih izvlečkov. V to skupino izvlečkov lahko uvrstimo tudi poparke (infuze) in prevretke (dekokte), ki jih pripravljamo z vodo, a bistveno krajši čas kot klasične macerate: celo ali zdrobljeno rastlino prelijemo z vrelo vodo za 5 do 15 minut (poparek) ali pa zdrobljeno rastlino prelijemo s hladno vodo in segrevamo do vrenja ter nato vremo nadaljnjih 15 do 30 minut (prevretek) (Jeran, 2020).

Ekstrakcije z organskimi topili se poslužujemo predvsem pri rastlinskih snoveh, ki so termolabilne in pri destilaciji z vodno paro ne dajejo eteričnega olja. Pri navedeni tehniki lahko uporabljamo čista organska topila ali njihove mešanice. Rastlinski material izpostavimo organskem topilu, katerega po ločevanju od rastlinskega preostanka kasneje pri znižanem tlaku tudi odstranimo. Dobimo preostanek, ki vsebuje poleg izluženih komponent tudi naš produkt (Čopar, 2020).

Kemijska tehnologija in inženirstvo vedno znova izpopolnjujeta in nadgrajujeta mnoge metode in tehnike za prenos na industrijski nivo. Tak primer je tudi ekstrakcija ob pomoči superkritičnih medijev. Ekstrakcija s superkritičnimi plini je sodobna metoda, ki je zaradi nizke temperature ekstrakcije primerna za termolabilne snovi. Izvedemo jo z utekočinjenimi plini (npr. ogljikovim dioksidom). V superkritičnem stanju imajo odlične lastnosti topila za separacijo organskih molekul. Prednost opisane tehnike je nastanek visokokakovostnih produktov, ki ne vsebujejo odvečnih topil (Zupanc Rezec & Hohkraut, 2019).

Metodo, sorodno destilaciji z vodno paro, imenujemo hidrodifuzija in je hitrejša ter preprostejša. Para pronica navzdol skozi rastlinski material in ekstrahirano eterično olje, para kondenzira na enak način kot pri parni destilaciji. Ekstrakcija sestoji iz dveh zaporednih operacij. V prvi spravimo zmes v intenziven stik s topilom, v drugi obe fazi ločimo. Ekstrakcijo večinoma uporabljamo za pridobivanje olj iz plodov semen in za pridobivanje arom, farmacevtskih substanc rastlin in sadežev ter začimb.

Splošno lahko proces ekstrakcije razdelimo na tri stopnje. Prva je fazna sprememba pri raztapljanju topljenca, ki ji sledi difuzija topljenca v topilu, ki se nahaja v porah trdnega materiala na površini delca. V zadnjem delu se vrši še prenos topljenca skozi tekočinski film na površini delca v glavni tok topila. Katera koli izmed teh stopenj lahko omejuje ekstrakcijsko hitrost. Ponavadi prvi proces poteče tako hitro, da je njegov vpliv na ekstrakcijsko hitrost zanemarljiv. Za učinkovito ločevanje je pomembna razlika v gostotah osnovnega in ekstrakcijskega topila ter netopnost enega v drugem (Zupanc Rezec & Hohkraut, 2019). Uspešnost ekstrakcije ugotovimo iz izračuna suhe snovi ali s pomočjo porazdelitvenega koeficienta k . Nernstov porazdelitveni koeficient k (**Enačba 1**) nam tako podaja razmerje ravnotežnih koncentracij komponente A v topilu 1 (c_1) in v topilu 2 (c_2):

$$k = \frac{c_1(A)}{c_2(A)}. \quad (\text{Enačba 1})$$

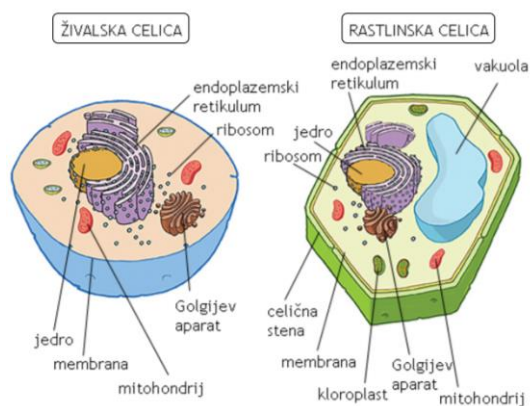
Zakovitost, ki velja: večji kot je k , tem uspešnejša je ekstrakcija (Zupanc Rezec & Hohkraut, 2019).

2.4 MODEL CELIČNE MEMBRANE IN NJEGOVO FORMIRANJE V VODNEM MEDIJU (ELEKTROFORMACIJA)

Ker bomo tekom raziskovalnega dela poleg izolacij svoje delo usmerili še v tvorbo celičnih struktur, moramo osvojiti še temelje celične biologije in tvorbe membranskih struktur. Ob pomoči mikroskopskih tehnik dela bomo lahko odkrivali pestrosti očem nevidnega.

V splošnem velja, da so celice različnih oblik in velikosti. Kljub temu da se celice zelo razlikujejo po obliki in velikosti, jim lahko pripišemo nekatere skupne značilnosti. Zunanji del celice je celična membrana, ki prepušča v ali iz celice le določene snovi. V njeni notranjosti sta citoplazma in jedro. Citoplazma sestoji iz citosola in celičnih vključkov, citosol pa je sestavljen pretežno iz vode in v njej raztopljenih snovi (molekul beljakovin, škroba, glikogena, maščob, soli in podobno). Celični vključki opravljajo natančno določene naloge. Nekateri celični vključki so zgrajeni zelo zapleteno in jih imenujemo organeli. Jedro vsebuje dedno snov, ki nosi informacije o zgradbi in delovanju celice oz. organizma. V organelih, imenovanih mitohondriji, potekajo procesi, v katerih se iz hrane sprošča energija, ki je potrebna za delovanje, rast in razvoj celice. Poleg energije se sproščata tudi ogljikov dioksid in voda (Godec idr., 2015).

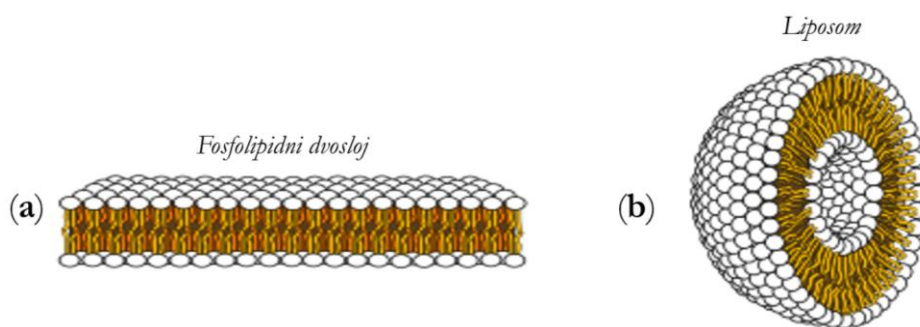
Ker celica predstavlja strukturirano in funkcionalno enoto vseh organizmov, velja omeniti še razliko v primerjavi z živalsko celico (**Slika 4**). Rastlinske celice so v primerjavi z živalskimi nekoliko večje. Povprečna velikost rastlinske celice znaša 50–100 μm in povprečna velikost živalske celice 5–30 μm . Rastlinska celica vsebuje mehurčku podobno strukturo, imenovano vakuola, ki vsebuje celični sok, ki sestoji pretežno iz vode. Če rastline v vakuolah nimajo dovolj vode, ovenijo. Celice rastline so obdane s trdo celično steno, zaradi katere imajo take celice določeno obliko. V rastlinskih celicah opazimo še eno pestrost organel, to so kloroplasti. Običajno so majhni, podobni zrnom in so zaradi zelenega barvila klorofila zelene barve (Godec idr., 2015).



Slika 4: Organeli živalske in rastlinske celice (Godec idr., 2015).

Osnovno strukturno ogrodje celičnih membran predstavlja dvojna plast lipidov, ki jo imenujemo fosfolipidni dvosloj (Vokič, 2019). Gre za 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 (Mildner, 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 zgolj 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, mitohondrije in kloroplaste obdajajo dvojne membrane, med katerimi je tanek medmembranski prostor. Eksoplazmatske strani notranje in zunanje membrane omenjenih organelov pa so usmerjene v medmembranski prostor (Mildner, ni leta).

Fosfolipidne molekule se lahko v vodni raztopini organizirajo v fosfolipidne mehurčke – liposome, katerih membrano sestavlja dvojna plast fosfolipidnih molekul. Ker je zgradba membrane liposomov (**Slika 5 (b)**) podobna zgradbi celične membrane (**Slika 5 (a)**), znanstveniki na liposomih preučujejo nekatere lastnosti celične membrane in membrane celičnih organel (Kralj-Iglič & Iglič, 2003).



Slika 5: (a) Fosfolipidni dvosloj in (b) liposom (Wikipedia, 2021).

Liposome ustvarjamo tudi v vsakdanjem življenju. Nastajajo pri pripravi palačink, pri stepanju jajca v vodi ali pri umivanju las z naravnim šamponom, narejenim iz pepela in jajc. Jajčni rumenjak vsebuje fosfolipid lecitin. Lecitin so sredi 19. stoletja izolirali iz možganov in jajčnega rumenjaka. Iz tega obdobja lahko zasledimo tudi prve opise nastanka liposomov v vodni raztopini. Že leta 1854 so liposome opazili pod mikroskopom in jih poimenovali »umetne celice« (Kralj-Iglič & Iglič, 2003).

Med načini priprave liposomov oz. lipidnih veziklov velja elektroformacija za enega izmed osrednjih. Prvo uporabo električnega polja pri sintezi orjaških fosfolipidnih mehurčkov sta prva leta 1986 vpeljala Angelova in Dimitrov (Angelova & Dimitrov, 1986). Njuna osrednja ideja je zajemala ločitev dvosloja in nadaljnjo tvorbo veziklov, kjer zunanje električno polje ustreza potrebam, ko se zmanjša privlačnost med plastmi in pripomore k destabilizaciji dvosloja ter posledično sodeluje pri njegovem upogibanju (Saremi, 2010). V današnjih raziskavah se postopek običajno vrši 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 (**Slika 6**). 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. Poglobljene študije so pokazale, da se zaprti in odlepljeni mehurčki med postopkom elektroformacije ne zlijejo (Stein idr., 2017).



Slika 6: Praktični prikaz elektroformacije v navpični viali (Fotografija last avtorjev in mentorjev).

2.5 SPEKTROFOTOMETRIJA

Ker se raziskovalno delo preko absorbance obarvanih raztopin dotika tudi določanja koncentracije snovi v vzorcu, se moramo seznaniti z osnovami spektrofotometrije oz. molekulske absorpcijske spektrometrije (MAS).

Fotoni UV in vidne svetlobe imajo v območju med 200 in 800 nm dovolj veliko energijo, da v molekulah povzročijo prehod elektronov iz osnovnih energijskih nivojev v višje energijske nivoje. Pri tem nastanejo zelo kratkoživa vzbujena stanja molekul, elektroni pa se v nadaljevanju vrnejo nazaj v osnovno stanje. Razlika v energiji elektronskega prehoda se izgubi v okolico v obliki toplote, v določenih primerih tudi zaradi svetlobe. Ravno zaradi elektronskih prehodov in prisotnosti določenih skupin, imenovanih kromoforji (gr. *kromofor*: nosilec barve), ki olajšajo prehode, zaznamo nekatere spojine obarvane (Keminfo, ni leta).

Spojine, ki jih zaznamo kot obarvane, absorbirajo določen del vidne svetlobe. Omenjeni del v preostalem spektru vidne svetlobe, ki prehaja v človeško oko, manjka. V splošnem velja, da vidimo predmet v komplementarni barvi absorbirane svetlobe, kar pomeni, če se absorbira rdeča barva, se odbijejo vse ostale, kar v nadaljevanju znamo kot modrozeleno. Spojine, ki so na pogled bele, brezbarvne oz. prozorne, absorbirajo svetlobo krajših valovnih dolžin, in sicer UV-svetlobo. Omeniti velja tudi izjemo, tako na primer nasičeni ogljikovodiki (alkani) absorbirajo svetlobo, ki ima valovno dolžino pod 150 nm in jim je zato UV-spekter nemogoče posneti (Keminfo, ni leta).

Absorpcijo svetlobe merimo z instrumenti, imenovanimi spektrofotometri. Merilo za intenzivnost absorpcije v vidnem in ultravijoličnem delu spektra je največkrat absorbanca (A), medtem ko je prepustnost (T) bolj značilna za spektre infrardeče spektroskopije (Keminfo, ni leta).

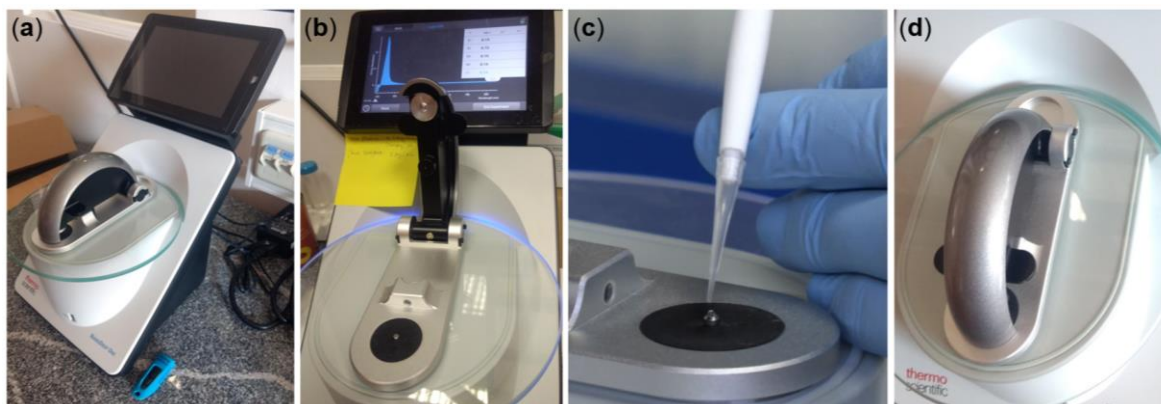
Osnovo spektrofotometrije podaja zveza, opisana v **Enačbi 2**.

$$A = \log \frac{I}{I_0} = \varepsilon \times c \times l \quad (\text{Enačba 2})$$

V zvezi I_0 predstavlja vpadni svetlobni tok, I prepuščen svetlobni tok, c koncentracijo snovi [v enoti: mol L⁻¹], l dolžina optične poti žarka vzorca [v enoti: cm] in faktor ε , imenovan molarne absorptivnosti [v enoti: L mol⁻¹ cm⁻¹]. Najpomembnejši podatek pri spektrih je položaj in višina absorpcijskega vrha, ki ga opišemo z valovno dolžino vrha oziroma maksimuma (λ_{max}).

Zvezo (**Enačba 2**) spremljata dva zakona. Prvi, Lambertov zakon pravi, da je intenziteta prepuščenega žarka, ki vstopa pravokotno na absorbirajočo snov, odvisna od dolžine poti. Beerov zakon nadalje pravi, da intenziteta prepuščenega žarka monokromatske svetlobe pri potovanju skozi raztopino eksponentno pojema z razdaljo. Če oba zakona združimo, dobimo Beer-Lambertovo enačbo oz. zakon, ki velja le za razredčene raztopine (**Enačba 2**). Enačba razlaga, da je zveza med absorbanco in koncentracijo spojine, ki absorbira elektromagnetno valovanje, linearna. Sicer je absorbanca odvisna od koncentracije raztopine, dolžine poti žarka skozi njo in molarne absorptivnosti spojine (Čačič & Špec, 2017; Gros idr., 2010).

V okviru raziskovalnega dela bomo uporabili spektrofotometer družine Thermo Scientific *NanoDrop*. Tehnologija zajema širok spekter delovanja, saj z 1-2 µL vzorca v nekaj sekundah lahko natančno kvantificira različne tipe DNK in RNK ter proteinov. Aparatura (**Slika 7**) deluje v območju 190–850 nm. Pionirska tehnologija zadrževanja vzorcev se je razvila z namenom, da raziskovalcem prinese več znanja o vzorcu in pospeši raziskave. Vzorec s pipeto preprosto nanese na označeno mesto in pomerimo (Kobis, 2022).



Slika 7: Aparatura *NanoDrop One*. (a) Aparatura v mirovanju, pred izvedbo analize, (b) ključna enota instrumenta, imenovana podstavek (angl. *pedestal*), pripravljena za nanos vzorca, (c) nanos 1–2 µL vzorca na rezo podstavka in (d) po nanosu vzorca zaprt podstavek. Ko podstavek zapremo, počakamo na izpis vrednosti, ki jo sistem izpiše na zaslonu.

2.6 CILJ RAZISKOVALNEGA DELA

Raziskovalno delo se dotika obravnave navadne smreke, za katero je bilo nedavno ugotovljeno, da predstavlja t. i. “zeleni” in trajnostni material za proizvodnjo biološkoaktivnih učinkovin in celičnih delcev, podobnih zunajceličnim veziklom (Jeran idr., 2021*c*). Vse več trenutnih raziskav na področju aktivnih učinkovin in celičnih delcev naravnega izvora predstavlja vedno večje izzive pri razvoju dostavnih sistemov v medicini in farmaciji. Lipidne komponente naravnega vzorca lahko služijo kot izhodni material za pripravo liposomov oz. veziklov. Raziskave na področju ved o življenju se usmerjajo tudi pri razvoju različnih modelov celičnih membran, s katerimi je v nadaljevanju mogoče razvijati metode in tehnike v medicinski diagnostiki. Predvsem so v uporabi orjaški fosfolipidni mehurčki (GUV-i) oz. liposomi, s katerimi simulirajo interakcije na celični ravni in ugotavljajo vplive različnih kemijskih spojin na njihovo delovanje. Zaradi komercialne dostopnosti reagentov in tvorbe odpadnih materialov v naravi bomo preko maceratom iglic navadne smreke uporabili poceni izhodni material za produkcijo vezikularnih struktur. Iz celične biologije in fiziologije velja, da višje rastline na površini listov vsebujejo različne snovi, ki jih med drugim ščitijo tudi pred poškodbami UV-B sevanja; take snovi so na primer t. i. epikutikularni voski, ki predstavljajo zmes visoko nepolarnih lipidov (Pleša, 2007). Lipidne komponente tako vsebujejo tudi iglice navadne smreke, ki jih obravnava pričujoče raziskovalno delo (Jeran idr., 2021*b*; Jeran idr., 2021*c*). Kot že omenjeno, bomo v prvem sklopu študirali pripravo modelnih celičnih membran (liposomov/veziklov), tvorjenih iz maceratom iglic navadne smreke ob pomoči treh, po polarnosti različnih, organskih topil (etanol, heksan, kloroform).

V nadaljevanju, v drugem sklopu, bomo v vzorcih homogenatov, ki med drugim predstavljajo vir celičnih komponent in aktivnih učinkovin v vodni fazi, obravnavali vsebnost skupnih fenolnih spojin. Za pripravo celičnih delcev in lipidnih veziklov rastlinskih vzorcev moramo zaradi njihove kompleksnosti dobro poznati faze (strokovno: mehanizme) njihovega nastanka. V večini primerov se začetni protokoli izolacije pogosto navezujejo na izhodni homogenat, preko katerega sledijo vse nadaljnje stopnje. Zaradi vsesplošne uporabe homogenatov aktivnih učinkovin bomo cilj usmerili v različne načine njihove priprave. V viru iglic navadne smreke bomo tako proučevali vsebnost skupnih fenolnih spojin, za katere velja direktna povezava z antioksidativnim delovanjem (Nisca idr., 2021; Jeran idr., 2022).

2.7 HIPOTEZA

Po pregledani literaturi in izoblikovanem cilju smo si zastavili hipotezo, ki nas je vodila skozi celotno raziskovanje.

Predvidevamo, da je mogoče s pomočjo postopka elektroformacije na platinasti elektrodi tvoriti lipidne vezikle iz predhodno pripravljenih macerarov iglic navadne smreke. Največjo formacijo letih bo mogoče zaznati ob uporabi manj polarnega maceracijskega topila. Predvidevamo, da se bodo leti v polarnih topilnih sistemih sicer tvorili, a bo njihova velikost manjša. Glede na nastanek lipidnih veziklov bo tako mogoče sklepati na vsebnost lipidnih komponent izhodnega vzorca in nadalje na polmer veziklov v posameznem mediju.

V drugem sklopu eksperimentov bomo v homogenatih navadne smreke ob pomoči reagenta Folin-Chicoteu preučevali vsebnost skupnih fenolnih spojin. Predvidevamo, da tako temperatura kot tudi medij (destilirana voda in fiziološka raztopina) vplivata na vsebnost skupnih fenolnih spojin. Največ skupnih fenolnih spojin bo mogoče zaznati pri direktni obdelavi iglic ob vrelišču medija.

3 EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 UVOD V EKSPERIMENTALNO DELO

Pri izvajanju eksperimentov moramo biti pozorni na čistočo reagentov, delovnih aparatov, inventarja in delovnega prostora. 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 v laboratoriju nosimo zaščitna sredstva (halja, očala, rokavice). Vse podrobnosti o uporabljenih kemikalijah so predstavljene v dodatku.

Pri delu potrebujemo poleg steklenih posod in aparatov tudi droben stekleni inventar.

Pri postopku maceracije smo pri delu rokovali s topili, ki izkazujejo na dielektrično konstanto (ϵ) različne polarnosti. Po postopku maceracije smo izmerili maso nastalega izolata (macerata) ter glede na začetno in končno maso izračunali izkoristek procesa priprave (**Enačba 3**) (Kogeljnik, 2018).

$$\text{Izkoristek maceracije } (\eta) = \frac{m(\text{macerata po procesu maceracije})}{m(\text{pred maceracijo zatehtanega rastlinskega materiala})} \quad (\text{Enačba 3})$$

Platinasti (Pt) elektrodi za elektroformacijo morata biti pred vsakim poskusom čisti, v nasprotnem primeru lahko privede do napačnih rezultatov. Z elektrodama vedno rokujemo v sterilnih rokavicah, saj se lahko zgodi prenos nečistoč z blazinic prstov ali iz okolice nanju. Očistimo ju z destilirano vodo, nato z »absolutnim« etanolom ter na koncu še s kloroformom ali triklorometanom in ju osušimo. Med procesom nastanka lipidnih veziklov 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.

Pri delu s homogenati smo rokovali tudi s Folin-Ciocalteuevim reagentom, ki vsebuje posebne tipe kislin, kot sta na primer $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ in $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ (Horvat Menih, 2014). Več tovrstnega kemizma bomo namreč spoznali v kasnejših letih izobraževanja, za osnovo raziskovalnega dela omenimo zgolj nekatere ključne korake, ki orišejo obravnavo te metode.

Omenjene kisline, ki jih vsebuje reagent, v bazičnem okolju z dodatkom natrijevega karbonata reagirajo s fenolnimi spojinami v analiziranem vzorcu. Bazične razmere so namreč nujne zaradi t. i.

postopka disociacije fenolnega protona, kar v nadaljevanju vodi v nastanek fenolatnega iona. Ta nato lahko reducira Folin-Ciocaltejev reagent in tako nastanejo kemijske spojine z modrim obarvanjem – najverjetneje tipi spojin: $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^{-4}$. Dognali so tudi, da se znotraj teh kompleksnih spojin najlažje reducira molibden, Mo(VI) , tako poteče prenos elektrona prav med Mo(VI) in reducenti (fenolatnimi ioni) (Horvat Menih, 2014). Proces lahko pojasnimo z enačbo (**Enačba 4**).



Nato sledi kvantitativna določitev s spektrofotometričnim merjenjem absorbance nastalega modrega kompleksa pri valovni dolžini 760 nm. O vzorcu pridobljene podatke nato v nadaljevanju primerjamo z umeritveno krivuljo, ki je pogosto pripravljena z galno kislino (Horvat Menih, 2014).

Poleg eksperimentalnega dela smo za poglobljene analize meritev uporabljali programski paket R. Programski paket R je za uporabo težje obvladljiv, saj nima uporabniškega vmesnika, preko katerega bi vnašali analize, temveč je potrebno obdelavo podatkov opraviti programsko. Začetki dela so bili kar zahtevni, vendar smo poiskali pomoč izkušenih strokovnjakov, ki so nam naredili predavanje o osnovah programskega jezika ter nam razložili potek analize konkretnih podatkov. Seznanjanje s profesionalnim orodjem za statistično analizo je bilo zelo zanimiva izkušnja, ki je pri raziskovalnem procesu razširila naš pogled na uporabo matematičnih in programskih orodij.

3.2 REAGENTI IN RAZTOPINE

a) Maceracija iglic navadne smreke

- Maceracijska topila

Pri posameznem topilu navajamo še dielektrično konstanto ($\epsilon^{20^\circ\text{C}}$), ki predstavlja merilo polarnosti posameznega topila (Smallwood, 1996).

- ✓ Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, *absolutni*, Sigma-Aldrich), $\epsilon = 22,4$
- ✓ Triklorometan (CHCl_3 , $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich), $\epsilon = 4,8$
- ✓ Heksan (C_6H_{14} , *ACS reagent*, Sigma-Aldrich), $\epsilon = 1,9$

b) Homogenati iglic navadne smreke in njihove skupne fenolne spojine

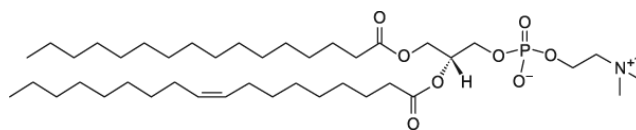
- 0,9 % raztopina natrijevega klorida – pripravljena iz natrijevega klorida (NaCl , *p. a.* trdni reagent, Sigma-Aldrich) v deionizirani vodi
- Dionizirana voda (dH_2O , *Sistem za pripravo ultra čiste deionizirane vode*, Werner GmbH)
- Reagent Folin-Ciocalteu (2 M *glede na kislino*, Sigma, pred uporabo $10\times$ redčen)
- 7,5 % raztopina natrijevega karbonata – pripravljena iz natrijevega karbonata (Na_2CO_3 , *brezvodni ACS reagent*, $\geq 99,5\%$, Sigma-Aldrich) v deionizirani vodi

- Galna kislina s koncentracijo 1 mg/mL – pripravljena iz galne kisline ($C_7H_6O_5$, *standardni certificirani material*, Sigma-Aldrich) v deionizirani vodi
- Imerzijsko olje za mikroskopijo (Nikon, *tip N*, 50 cc)

b) Lipidni vezikli, pripravljeni iz maceratom iglic navadne smreke

- Etanol (C_2H_5OH , *absolutni*, Sigma-Aldrich)
- Triklorometan ($CHCl_3$, $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich)
- Metanol (CH_3OH , *brezvodni*; 99,8 %, Sigma-Aldrich)
- 0,3 M raztopina glukoze – pripravljena iz D-(+)-glukoze ($C_6H_{12}O_6$, $\geq 99,5\%$, BioReagent, Sigma-Aldrich) v deionizirani vodi
- 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
- Imerzijsko olje za mikroskopijo (Nikon, *tip N* 50 cc)
- Deionizirana voda (dH_2O , *Sistem za pripravo ultra čiste deionizirane vode*, Werner GmbH)
- 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoholin (POPC) ($>99\%$, Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, Alabama, ZDA)

Lipid je bil raztopljen v mešanici kloroforma in metanola (v volumskem razmerju 2:1) s koncentracijo 1 mg/mL.



Slika 8: Struktura 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoholina (POPC) (Avanti polar lipids, 2021).

3.3 DELOVNI PRIPOMOČKI

a) Maceracija iglic navadne smreke

- Mlinček za mletje (*tip* PCML2013T, Gorenje, Slovenija)
- Sušilnik za sadje (*tip* ECG SO375, Nemčija)
- Zamrzovalnik (*tip* HZOS 3561, *model* K357/2 MELA, Gorenje, Slovenija)
- Precizna tehtnica Kern EMB (*tip* 3.6, Kern & Sohn, Nemčija)
- Rotacijski uparjalnik IKATM (*tip* RV 10 digital V Rotary Evaporator, Staufen, Nemčija)
- Laboratorijski stresalnik IKA (*tip* KS250 basic, Deutschland, Nemčija)
- Čaša (100 mL), 3 kos
- Erlenmajerica (500 mL), 3 kos
- Erlenmajerica (1000 mL), 3 kos
- Erlenmajerica (250 mL) 3 kosi
- Plutasti zamaški, 3 kos
- Pladenj, 1 kos
- Aluminijasta folija (Tuš, Slovenija), 1 kos

- Lepilni trak, 1 kos
- b) Homogenati iglic navadne smreke in njihove skupne fenolne spojine
- Mlinček za mletje (*tip* PCML2013T, Gorenje, Slovenija)
 - Precizna tehtnica Kern EMB (*tip* 3.6, Kern & Sohn, Nemčija)
 - Mikrovalovna pečica Midea (*tip* MG7017NP-BM, Kitajska)
 - Hladilnik coolstar (*tip* CS 42 HAR, Gorenje, Slovenija)
 - Zamrzovalnik (*tip* HZOS 3561, model K357/2 MELA, Gorenje, Slovenija)
 - Lepilni trak, 1 kos
 - Pladenj, 3 kos
 - Kvantitativni filtrirni papir z velikostjo por 4,0-12,0 μm (bel, MN 640M, Whatman No. 43, Macherey-Nagel, Nemčija), 15 kos
 - Merilni valj (50 mL), 13 kos
 - Kvantitativni lij, 3 kos
 - Centrifugirka/falkonka (50 mL, konusna iz polipropilena, Isolab, Nemčija), 15 kosov
 - Čaša (100 mL), 10 kos
 - Erlenmajerica (250 mL), 14 kos
 - Steklena palčka, 10 kos
 - Avtomatske pipete (20, 100 in 1000 μL ; Eppendorf Research)
 - Konice za pipete (100 in 1000 μL ; Merck)
 - Spektrofotometer Nanodrop One C (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
 - Mikrotiterska plošča s 96 luknjicami (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- c) Lipidni vezikli, pripravljene iz macerata iglic navadne smreke
- Precizna laboratorijska tehtnica Kern ABJ-120AM (Kern & Sohn, Nemčija)
 - Avtomatske pipete (20, 100 in 1000 μL ; Eppendorf Research)
 - Konice za pipete (100, 1000 μL ; Merck)
 - Laboratorijski eksikator s pokrovom in ventilom za odsesavanje (Brand, Nemčija)
 - Vakuumaska črpalka (MVP 015-2, Diaphragm Pumps, Pfeifer Vacuum)
 - Sistem za sintezo oz. elektroformacijo orjaških fosfolipidnih mehurčkov/veziklov (GUV), glavna enota: sistem Pt-elektrod s krokodilčki povezanih na generator izmeničnega električnega polja (Hameg Instruments, Nemčija)
 - Plastična mikroviala s pokrovom (Sarstedt, Nemčija), 2 mL
 - Platinasti elektrodi, v razmiku 0,5 mm, pritrjeni na pokrovu za vialo
 - Steklена viala s plastičnim pokrovom (Brand, Nemčija), 5 mL
 - Objektna stekla (Brand)
 - Štiriprekatne eksperimentalne kamrice za mikroskopijo (26 mm $\times$ 43 mm, CoverWell™ perfusion chambers, PC4L-0.5, Grace Bio-Labs, Sigma-Aldrich)
 - Invertni svetlobni mikroskop Eclipse TE2000-S (Nikon EM CCD), Tokio (Japonska), sklopljen s sistemom digitalnih kamer Spot boost (Visitron Systems)

3.4 PRIPRAVA IGLIC NAVADNE SMREKE

Za raziskovalno delo, ki je zajemalo maceracijo rastlinskega tkiva, smo uporabili s podlubniki neokuženo in z iglicami bujno rastočo smreko, ki se nahaja v občini Laško. Na karti *Google zemljevidi* se drevo nahaja na koordinati 46°09'09.4"N 15°14'01.3"E. 105 g sveže nabranih iglic na dan 09. 11. 2021 smo v nadaljevanju pri temperaturi 35 °C v sušilniku sušili 10 ur (**Slika 9**). Suhe iglice smo nato zmeli v mlinčku, jih shranili v plastične vsebnike in neprodušno zaprli.

V drugem delu, ki je zajemal pripravo homogenatov na vodni osnovi, smo direktno v eksperiment po delih aplicirali 140 g sveže nabranih in mletih iglic.



Slika 9: Sušenje iglic navadne smreke v sušilniku (Fotografija last avtorja in mentorjev).

3.5 PRIPRAVA MACERATOV IGLIC NAVADNE SMREKE

V 500 mL erlenmajerice smo zatehtali 30,0 g posušenih iglic navadne smreke. Zatehti smo dodali 200 mL maceracijskega topila (etanol, heksan, triklorometan) in vsebino na sobni temperaturi (22 °C) stresali na stresalniku pri 250 obratih na minuto točno 7 dni (168 ur). Po pretečenem času smo vsebino kvantitativno filtrirali skozi filtrirni papir s porami 4,0–12,0 µm. Trdni rastlinski preostanek smo nato po porcijah še spirali s 3 × 20 mL topila in vsebino kvantitativno prenesli v stehtano bučko. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom in preostanek stehtali. Količino izoliranega materiala smo določili z odštevanjem mase bučke z maceratom in predhodno stehtane (prazne) bučke. Izolirani material smo do nadaljnjih korakov/aplikacij hranili v neprodušno zaprti bučki, oviti v aluminijast papir in postavljeni v hladilnik na temperaturo 5 °C.

3.6 PRIPRAVA LIPIDNIH VEZIKLOV IZ MACERATOV IGLIC NAVADNE SMREKE

Elektroformacijo lipidnih veziklov smo izvajali po modificiranem postopku *Angelove in Dimitrova* (1986) (Angelova & Dimitrov, 1986).

Na par platinastih elektrod smo previdno, s polzenjem kapljice, nanesli 100 μ L delovne raztopine pripravljenih macerarov (iz etanola, heksana ter kloroforma) s koncentracijo 1 mg/mL v topilni mešanici kloroform/methanol (4:1).

S počasnim in enakomernim premikanjem kapljice po elektrodi smo ustvarili homogen nanos. Med ustvarjanjem nanosa je mešanica izparela, na elektrodi pa je ostal tanek sloj filma. 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 60 minut. Platinasti elektrodi z nanosom smo po sušenju vstavili v 2,0 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 pritrđimo 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 5,0 V. V nadaljevanju 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 z elektrod odstranili krokodilčka. Nastalo vsebino smo po elektroformaciji v plastični viali nežno in počasi odpipetirali v stekleno vialo (5 mL), 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 lipidnih veziklov pod mikroskopom smo vsebino v viali z enakomernimi obrati rahlo premešali (homogenizacija).

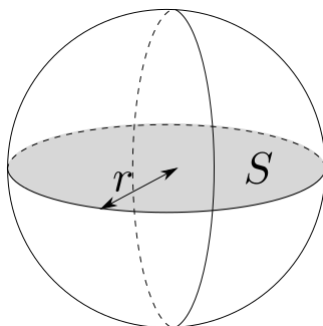
3.7 DOLOČANJE POLMEROV LIPIDNIH VEZIKLOV IN IZRAČUN NJIHOVIH PORAZDELITEV

Z elektroformacijo nastale lipidne vezikle, obdelane z raztopino glukoze, previdno homogeniziramo in pričnemo z vzorčenjem. Po 100 μ L suspenzije odpipetiramo v eksperimentalne kamrice, namenjene za kvantitativno analizo polj in zajem slike pod mikroskopom. Vsebino v kamricah

postavimo pod mikroskop in počakamo 30 minut, da se suspenzija lipidnih veziklov popolnoma posede na dno. Pregled in štetje opravimo s pomočjo imerzijskega olja pod 100-kratno povečavo.

Polja vzorca smo zajeli s sistemom digitalnih kamer, sklopljenih preko računalniškega sistema. Veziklom, tvorjenim iz etanolnega macerata, smo zajeli 19 polj (majhni vezikli, niso zajeti v nadaljnjo obravnavo), iz macerata v heksanu 19 (66 veziklov) ter macerata v kloroformu 183 polj (1044 veziklov). Slike posameznih polj smo prenesli v računalniški program *ImageJ*, kjer smo ročno označili konture posameznih veziklov. Ker smo veziklom želeli določiti porazdelitev njihovih velikosti ob predpostavki, da so vezikli skoraj idealne krogle, smo za parameter velikosti izbrali ploščino prereza na sliki (**Slika 10**) in ga preko znane matematične zveze med ploščino (S) in polmerom (r) (**Enačba 5**) pretvorili v polmer.

$$r = \sqrt{\frac{S}{\pi}} \quad (\text{Enačba 5})$$



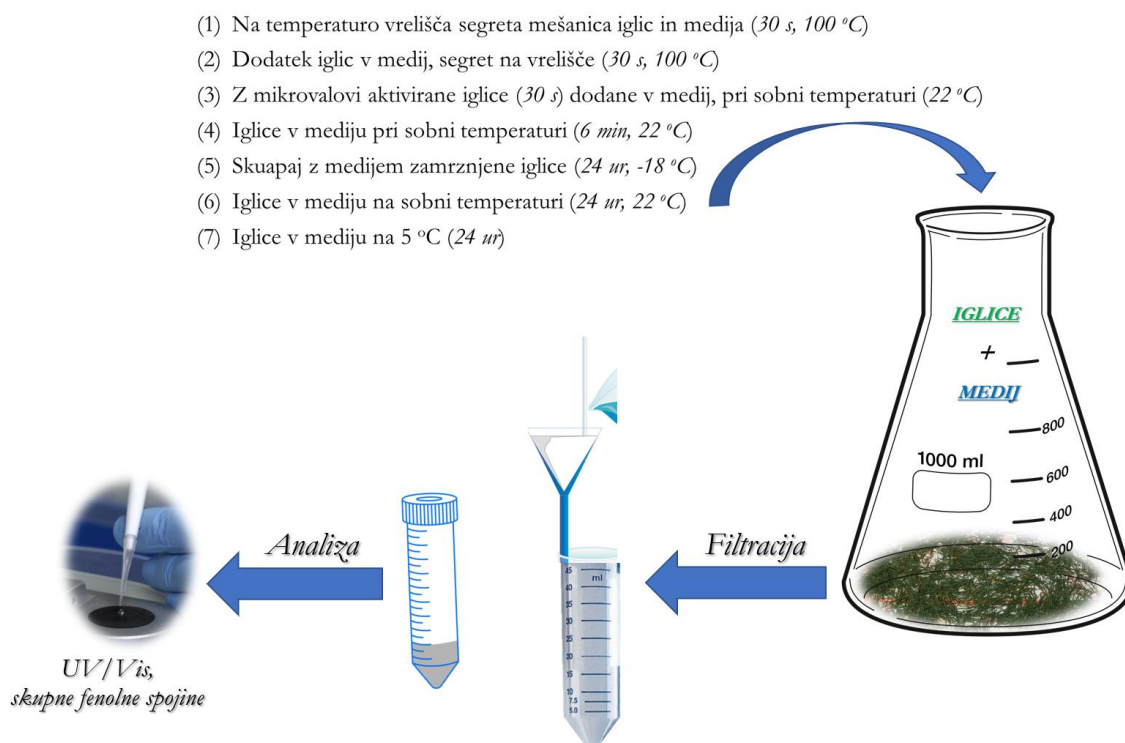
Slika 10: Shematski prikaz prereza krogle, kjer r označuje njen polmer in S njeno ploščino.

Pridobljene podatke smo prenesli v programski paket *Microsoft Excell 2016*, jih dopolnili z metapodatki in nato izvozili v “.csv” (*angl.* coma separated values). Datoteko “.csv” smo uvozili v statistično-programski jezik R. V programskem okolju *RStudio* smo v nadaljevanju napisali program za statistično obdelavo in izrisali histogram porazdelitve veziklov po polmeru.

3.8 PRIPRAVA HOMOGENATOV NAVADNE SMREKE

Iz sveže nabranih iglic v destilirani vodi in fiziološki raztopini smo pripravili homogenate in jim kvantitativno določili vsebnost skupnih fenolnih spojin (**Slika 11**). Za vsak posamezni poskus smo v

100 mL erlenmajerico zatehtali 10,0 g iglic in odmerili 20 mL medija – destilirane vode oz. fiziološke raztopine (0,9 % raztopina natrijevega klorida). V nadaljevanju smo vsebino izpostavljali različnim temperaturnim spremembam (segrevanje z mikrovalovi, ohlajanje na 5 °C v hladilniku oz. -18 °C v zamrzovalniku). Segrete mešanice smo ohladili na sobno temperaturo (6 min), jih dobro homogenizirali in vsebino filtrirali skozi kvantitativni lij v 50 mL falkonko. Podobno smo storili z vzorci, ki so bili izpostavljeni nizkim temperaturam. Iglice smo po filtraciji zavrgli, tekoči frakciji – homogenatom pa smo izmerili vsebnost skupnih fenolnih spojin.



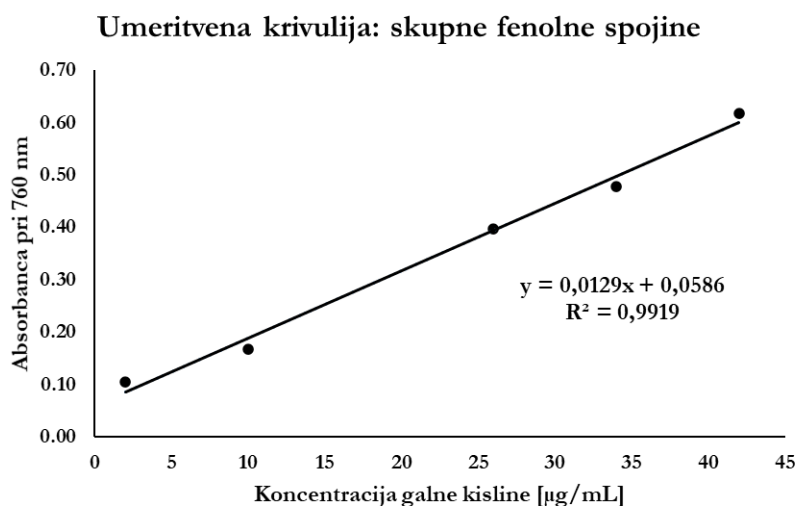
Slika 11: Eksperimentalni načrt priprave homogenatov za določanje skupnih fenolnih spojin.

3.9 KVANTITATIVNO DOLOČANJE SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN V HOMOGENATIH NAVADNE SMREKE

Kvantitativno določanje skupnih fenolnih spojin v vzorcih homogenatov navadne smreke smo opravili po modificiranem postopku Zhanga in sodelavcev (2010) (Zhang idr., 2010), kjer smo z uporabo reagenta Folin-Ciocalteu merili absorbanco s pomočjo UV/Vis spektroskopije.

Dobro homogeniziran alikvot vzorca smo najprej centrifugirali 5 minut na $2.000 \times g$. Po posedanju večjih delcev rastlinskega materiala smo $2,5 \mu\text{L}$ supernatanta prenesli v mikrotitrsko ploščo s 96 luknjicami, kjer je bilo že $12,5 \mu\text{L}$ $10 \times$ razredčenega reagenta Folin-Ciocalteu (pripravljen iz izhodnega s koncentracijo 2 mol/L). Mešanici smo dodali še $10,5 \mu\text{L}$ $7,5 \%$ raztopine natrijevega karbonata. Nastalo vsebino smo s pipeto dobro premešali in ploščo ovili v aluminijast papir ter pri sobni temperaturi postavili v temen prostor za 30 minut. Po pretečenem času smo na spektrofotometru Nanodrop One C pri 760 nm izmerili absorbanco. Meritev posameznega vzorca smo opravili trikrat in izračunali povprečno vrednost. Za meritev "slepega" oz. ničelnega vzorca smo uporabili destilirano vodo oz. fiziološko raztopino ter reagente brez dodanega vzorca.

Umeritvena oz. kalibracijska krivulja (**Slika 12**) je bila pripravljena iz standardnih raztopin galne kisline s koncentracijami 2, 10, 26, 34 in $42 \mu\text{g/mL}$. Krivulja je bila obravnavana kot linearna funkcija z enačbo: $y = 0,0129x + 0,0586$, R^2 premice je znašal 0,9919.



Slika 12: Umeritvena krivulja za določitev skupnih fenolnih spojin v homogenatih iglic navadne smreke.

Končni rezultat analize je podajal številčno vrednost mikrogram (μg) galne kisline na gram (g) zatehte rastlinskega materiala (iglic) (**Enačba 6** in **Enačba 7**).

Enačbi za izračun skupnih fenolnih spojin:

$$m(\text{galne kisline}) = \frac{AA - 0,0586}{0,0129} \times V \quad (\text{Enačba 6})$$

$$Vsebnost\ skupnih\ fenolnih\ spojin = \frac{m(galne\ kisline)}{m\ (rastlinskega\ materiala)} \quad (\text{Enačba 7})$$

kjer je:

ΔA	Razlika med absorbanco merjenega vzorca in absorbanco “slepe” raztopine
V	Prostornina vzorca (20 mL)
m (galne kisline)	Masa galne kisline, pridobljene preko umeritvene premice
m (rastlinskega materiala)	Zatehta iglic pred pripravo homogenata (10,0 g)
$Vsebnost\ skupnih\ fenolnih\ spojin$	Definirana kot $(\mu g\ galne\ kisline)/(g\ rastlinskega\ materiala - iglic)$

4 REZULTATI IN DISKUSIJA

4.1 PRIPRAVA MACERATOV IGLIC NAVADNE SMREKE

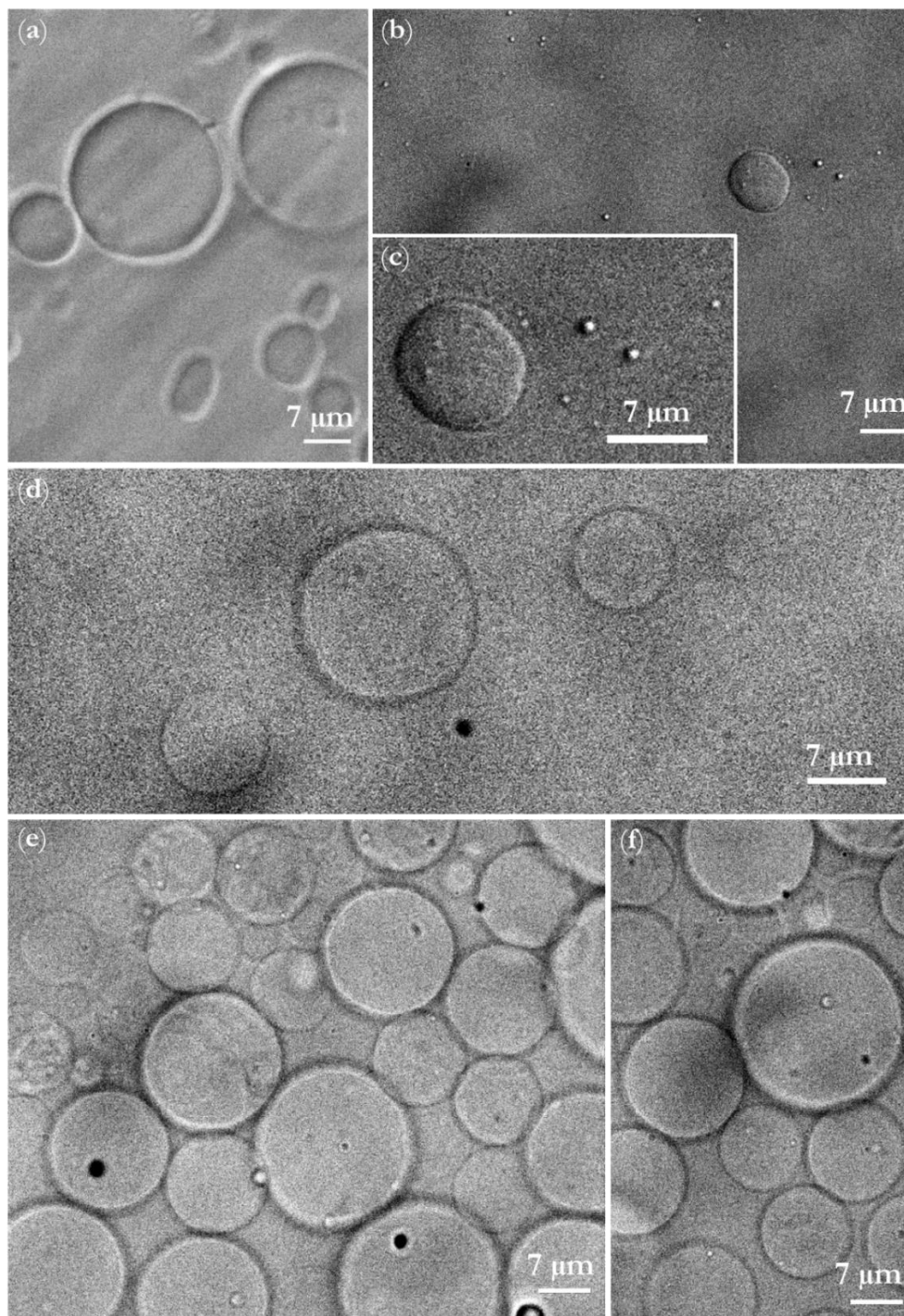
Tabela 1: Vpliv topila na izolirano maso in izkoristek maceracije.

Maceracijsko topilo	Izolirana masa [g]	Izkoristek maceracije [%]
Etanol	5,40	18,0
Kloroform	2,51	8,37
Heksan	0,55	1,83

Tabela 1 prikazuje vpliv uporabljenega topila na izolirano maso in izkoristek maceracije. Glede na polarnost uporabljenega topila lahko opazimo tudi trend izoliranih mas oz. izkoristka procesa izolacije. V etanolu, ki ima med topili največjo dielektrično konstanto ($\epsilon = 22,4$), smo pridobili največjo maso materiala. Dejstvo pripisujemo njegovi veliki polarnosti in v njem topnosti širokega spektra učinkovin, ki jih vsebujejo izhodne iglice. Zavedamo se, da naravni materiali, kot so iglice navadne smreke, vsebujejo mnogo za rast in razvoj rastline koristnih učinkovin, ki se med drugim razlikujejo tudi po polarnosti. Da je neka snov nizko polarna, dokazujejo nizke dielektrične konstante – v ta namen smo uporabili še topili, kot sta kloroform in heksan. Poskusi so tako pokazali, da je bilo v kloroformu izoliranega več materiala kot v heksanu. Dejstvo pripisujemo temu, da smo v kloroformu poleg nepolarnih komponent izlužili morebiti še kakšno snov s (delno) polarnim značajem, katere v heksanu nismo. Da bomo navedeno lahko trdili z gotovostjo, bomo morali opraviti še poglobljeno kvalitativno in kvantitativno analizo, kjer bomo s pomočjo knjižnice znanih spojin v bazah podatkov analizirali vsebujoče spojine posameznega vzorca ter rezultate primerjali. Tako bomo pridobili še večji vpogled v karakter maceratov.

Za nadaljnje delo maceratov nismo posebej čistili, saj nismo želeli preveč kemijsko in fizikalno posegati v sistem tvorbe lipidnih veziklov.

4.2 PRIPRAVA LIPIDNIH VEZIKLOV IZ MACERATOV NAVADNE SMREKE



Slika 13: Pod svetlobnim mikroskopom vidni z elektroformacijo nastali lipidni vezikli iz: (a) lipida POPC, ki velja kot modelni/standardni lipid, iz katerega pripravljajo modelne vezikle. Polja od (b) do (f) predstavljajo vezikle, nastale iz maceratov iglic navadne smreke v: (b) in (c) etanolu, (d) heksanu ter (e) in (f) kloroformu.

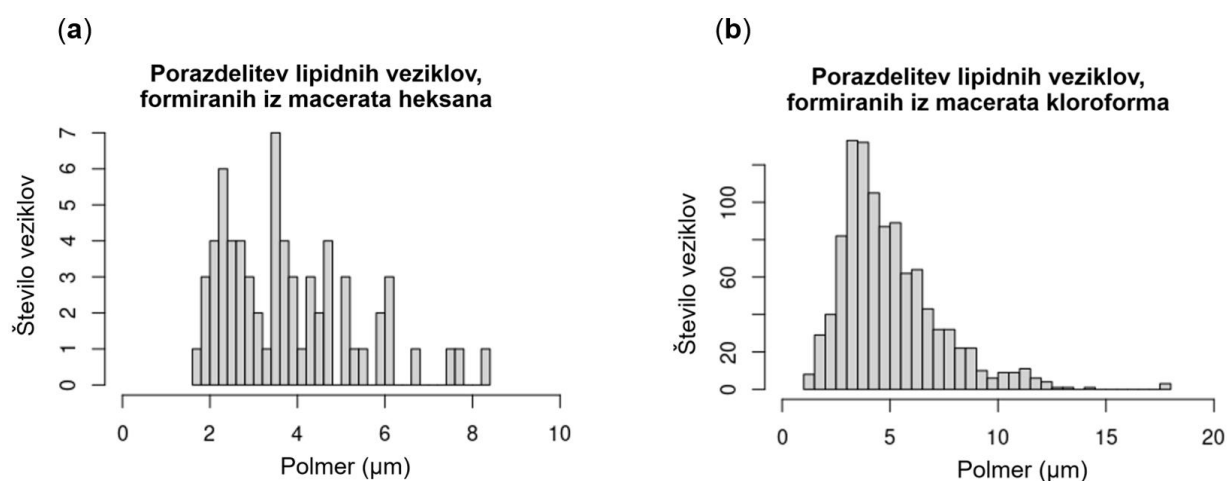
Slika 13 predstavlja z elektroformacijo nastale lipidne vezikle, tvorjene iz izhodnih macerarov iglic navadne smreke. Med vsemi uporabljenimi macerati so se v etanolu formirali najmanjši delci. Po pregledu celotnega preparata smo zaznali zgolj en velik vezikel in mnogo malih delcev. V maceratu heksana je bilo mogoče zaznati nekoliko več delcev pravilnih matematičnih oblik z enotnim videzom po celotni površini oz. t. i. unilamelarno strukturo, vendar je bila koncentracija le-teh znatno manjša v primerjavi s tistimi, ki so nastali iz macerata kloroforma. Lipidni vezikli, tvorjeni iz macerata kloroforma, so bili prav tako unilamelarnih struktur. Rezultati nam nakazujejo, da macerat etanola vsebuje najmanj lipidnih komponent, nekoliko več heksanski in največ kloroformski. Navedene ugotovitve potrjujejo tudi rezultati kvantitativnega štetja celičnih kuntur (delcev), kjer smo po pregledu preparata opazili največjo koncentracijo celic prav v vzorcu kloroforma (1044) in manj v maceratu heksana (66). Macerat etanola zaradi velikosti elektroformiranih delcev nismo zajeli v analizo. V maceratu etanola je mogoče zaznati tudi, da se je v splošnem tvorilo najmanj delcev. Kot že omenjeno, je med vsemi, za maceracijo uporabljenimi topili, bil najbolj polaren etanol, s pomočjo katerega smo izlužili največ materiala, a je bila koncentracija nepolarne frakcije očitno zelo nizka, da ni prišlo do formiranja velikih delcev oz. orjaših lipidnih veziklov (GUVs). Predvidevamo tudi, da zaradi nizke koncentracije lipidnih komponent v izhodnem vzorcu tudi energija formiranja ni bila velika, kar lahko nosi za posledico nastanek tovrstnih manjših delcev. V vzorcu je bilo tako na elektrodah prisotnih veliko komponent, ki ob “tekmi” za energijsko ugoden proces niso prišli do izraza, da bi formirali vezikel. Ugotavljamo, da ima polarnost medija za maceracijo korenit prispevek in lahko usmerja postopek elektroformacije. Delci, ki so bili tvorjeni ob pomoči macerata etanola, so iz aplikativnega vidika zanimivi za delce na nanometrski skali. Prej omenjeni mali delci lahko nastanejo z mehanskim obdelovanjem rastlinskih tkiv, ko celice v vodno raztopino sprostijo vsebino z vezikli (Jeran idr., 2021c).

Glede na vezikle, tvorjene s kemijsko čistim lipidom POPC, ki je na področju preučevanja celičnih mebran uporabljen kot “zlati standard”, kažejo potenciale uporabe vezikli, tvorjeni iz macerata heksana in kloroforma. Po izgledu oz. morfološki obliki so si namreč zelo podobni. Njihova membrana je po 24-ih urah opazovanja še vedno enake oblike, kar nosi še eno svetlo točko.

Med vsemi topili, uporabljenimi za maceracijo, je imel najmanj polaren značaj prav heksan. Dielektrična konstanta kloroforma je za 2,9 enote večja od dielektrične konstante heksana. Ker rastline vsebujejo širok nabor spojin, imajo lahko nekateri lipidi, čeprav znani kot nepolarni, izražen tudi polarni značaj. Takšni lipidi naravnega izvora se tako posledično lažje raztapljajo v topilih, ki

imajo delno polarni značaj. Kljub temu da je protokol elektroformacije namenjen izključno tvorbi veziklov iz lipidov, v našem primeru, ko imamo opravka z realnim vzorcem, ne moremo izključiti dejstva, da pri "tekmi" za tvorbo mehurčkov sodelujejo tudi molekule, ki po osnovni strukturi niso lipidi, a imajo za pogoje elektroformacije izražen dovoljšen karakter nizke polarnosti. Omenjena lastnost je verjetno tudi energijsko ugodna, da se večji delci tako tudi formirajo.

4.3 DOLOČANJE POLMEROV LIPIDNIH VEZIKLOV IN IZRAČUN NJIHOVIH PORAZDELITEV



Slika 14: Prikaz porazdelitve polmerov lipidnih veziklov, formiranih iz macerata heksana in kloroforma.

Slika 14 prikazuje histograma, ki predstavljata z elektroformacijo nastale delce iz macerata heksana in kloroforma ter le-te razporejene po polmeru (velikosti) nastalih veziklov. V obeh primerih smo s pomočjo elektroformacije uspeli za analizo pridobiti zadostno število le-teh. S pomočjo histograma velikosti veziklov lahko razberemo porazdelitev (distribucijo) velikosti delcev, preko katere lahko v nadaljevanju sklepamo o lastnostih nastalih veziklov. Pri postopku elektroformacije se je tvorila množica vezikularnih struktur različnih dimenzij. V vidnem polju mikroskopa je bilo mogoče zaznati le časovno dovolj stabilne vezikle, ki pred opazovanjem niso razpadli.

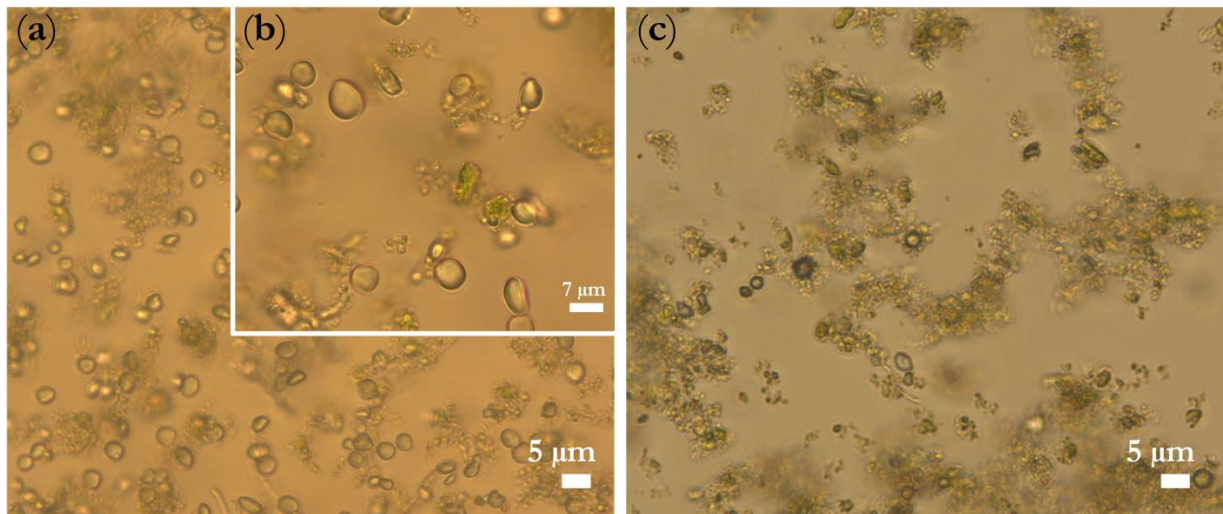
Kot že omenjeno, je glede na vsebnost nepolarne frakcije (lipidov), v primerjavi s kloroformom, iz macerata heksana nastalo manj veziklov. Nadaljnja primerjava v obeh topilnih sistemih nastalih vezikularnih struktur njihovo manjšo velikost kaže v maceratu heksana. Za izgradnjo takšne membrane manjših velikosti je potrebno dovesti tudi manj izhodnega materiala oz. lipidov. Stabilne

vezikularne strukture prevladujejo v dveh velikostnih redih. **Slika 14 (a)** prikazuje izstopanje dveh populacij, prve z velikostjo okoli 2,2 μm in druge okoli 3,8 μm . Preostalih populacij je manj, a so dokaj enakomerno zastopane vse do polmera 6 μm . Če so pri postopku elektroformacije nastali vezikli večjih dimenzij, so najverjetneje razpadli na manjše oz. so se le-ti popolnoma razgradili. Struktur s polmerom, večjim od 8,2 μm v vzorcih nismo zaznali.

V maceratu kloroforma (**Slika 14 (b)**) je bilo očitno prisotnih več lipidnih komponent, zato smo poleg večjega števila veziklov v povprečju izmerili tudi njihovo večjo velikost. Največja prisotnost vezikularnih struktur je bila v območju od 3,8 do 4,2 μm . V vzorcu je bilo mogoče zaznati tudi pojav populacij, večjih od 10 μm . Primerjalno, glede na heksan, je tokrat v primeru kloroforma histogram pomaknjen nekoliko bolj v levo, tj. v smeri manjših velikosti polmera. Razlog omenjenega je morda skrit v morebitnem nastanku večjih vezikularnih struktur, katere so hitro razpadle in jih je bilo mogoče opaziti zgolj manjše število. V primeru macerata kloroforma so največji obravnavani vezikli v polmer merili okoli 18 μm .

Pridobljeni rezultati velikosti delcev nakazujejo na stabilnost formiranih vezikularnih struktur. Vezikli manjših dimenzij so v primerjavi z večjimi tako bolj obstojni.

4.4 PRIPRAVA HOMOGENATOV NAVADNE SMREKE

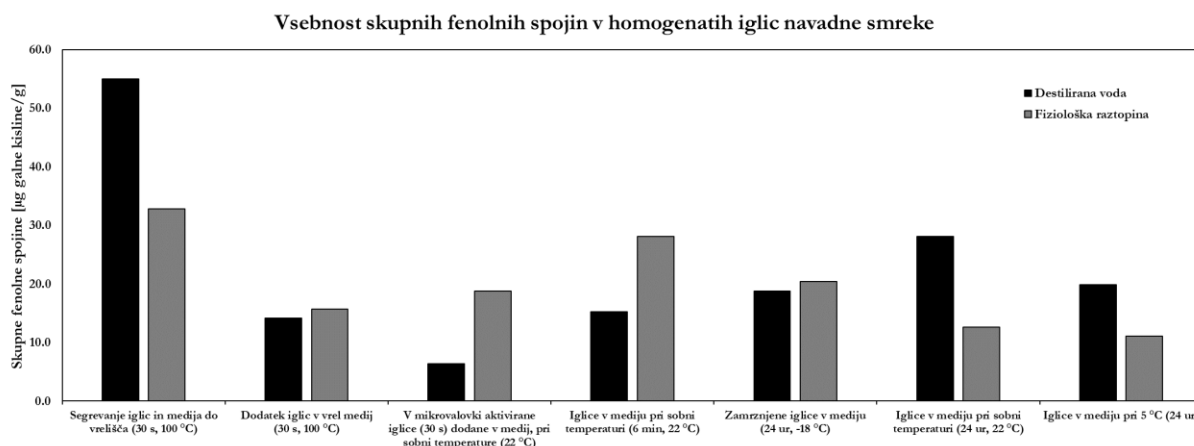


Slika 15: Svetlobna mikroskopija homogenatov iglic navadne smreke: (a) in (b) v fiziološki raztopini ter (c) v destilirani vodi.

Posnetki na svetlobnem mikroskopu (**Slika 15**) razkrivajo vpogled v očem nevidne lastnosti homogenatov. Kljub temu da ima vsebina homogen značaj, pod mikroskopom opazimo mnoge strukture in organizacijo le-teh po površini vzorca.

Homogenata v fiziološki raztopini (**Slika 15 (a)** in **(b)**) in v destilirani vodi (**Slika 15 (c)**) na pogled izkazuje enake strukturne fragmente, vendar je koncentracija z membrano obdanih delcev večja v fiziološki raztopini. V vodnem homogenatu (**Slika 15 (c)**) so se delci orientirali v t. i. skupke, kjer je med drugim mogoče zaznati še nekaj deformiranih rastlinskih celic. Največjo pestrost velikosti celičnih struktur je mogoče zaznati v homogenatih iglic navadne smreke v fiziološki raztopini (**Slika 14 (a)** in **(b)**). Velik prispevek k prisotnosti struktur je odvisen tudi od vrste oz. velikosti por filtra (v našem primeru so bile pore velike do 12,0 μm).

4.5 KVANTITATIVNO DOLOČANJE SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN V HOMOGENATIH IGLIC NAVADNE SMREKE



Slika 16: Rezultati kvantitativnih določanj skupnih fenolnih spojin v homogenatih iglic navadne smreke.

Homogenati iglic navadne smreke so bili pripravljeni v fiziološki raztopini in destilirani vodi. Vpliv tehnike priprave homogenatov smo spremljali z izločanjem skupnih fenolnih spojin v okoliško raztopino. **Slika 15** prikazuje, da so se v raztopino izločili delci, ki prinesejo tudi svoj prispevek k določitvi učinkovin, saj se le-te poleg prosto plavajočih nahajajo tudi v prisotnih delcih.

Stolpčki na **Sliki 16** prikazujejo vpliv tehnik priprave biološko aktivnih učinkovin iz naravnih virov. Takšne postopke moramo dobro poznati, preden začnemo s produkcijo na večji skali. Mnogi industrijski procesi, ki pri svojem delu rokujejo z učinkovinami naravnega izvora (arome, dodatki v

prehrani, kozmetika in podobno), morajo pred izolacijo na večjem nivoju opraviti sorodne meritve, saj so s količino izoliranega materiala povezani stroški. Vsak tak podatek, ki ga pokaže ena t. i. preliminarna raziskava, je dragocen podatek za nadaljnje delo.

Največjo vsebnost skupnih fenolnih spojin lahko zaznamo ob direktnem obdelovanju vzorca iglic navadne smreke na vrelišču obeh medijev. Čeprav je mikrovalovni proces, da tekočina zavre, trajal zelo kratek čas (30 s), se je v danem primeru izločilo največ učinkovin (55,0 µg/g v destilirani vodi oz. 32,8 mg/g v primeru uporabe fiziološke raztopine). Glede na aktivacijo izločanja skupnih fenolov z uporabo mikrovalov je proces pri sobni temperaturi (22 °C) nekoliko upočasnen. Omenjenemu sledi izločanje učinkovin pri nižjih temperaturah – v hladilniku na 5 °C. Eksperimentalni trend lahko razložimo s teorijo gibanja delcev, saj je znano, da se delci pri višji temperaturi gibljejo hitreje, s tem pa višja temperatura pripomore k odpiranju por rastlinskega tkiva. Vsebina se je tako zaradi trkov sprostila iz rastlinskega tkiva in v raztopini prisotnih celičnih delcev. Tehnika zamrzovanja iglic z medijem se je izkazala za neuporabno, saj ima povišana temperatura očitno večji efekt na izluževanje kot deformacija rastlinskega tkiva z zamrzovanjem in nato odtaljevanjem. To ponovno potrjuje teorijo gibanja delcev: pri nizkih temperaturah so spremembe bistveno počasnejše kot pri povišanih temperaturah.

Pri aktivaciji samih iglic navadne smreke pod mikrovalovnimi pogoji smo predvidevali, da bodo voda in sorodne polarne molekule, ki jih vsebujejo iglice, pripomogle pri deformaciji tkiva rastline in ob nadaljnjem dodatku medija pripomogle k izluževanju. Po takšnem postopku ne pride do učinkovitega izluževanja tovrstnih učinkovin, zato navedeno lahko dodatno potrdi trditev, da je bilo v primeru direktne izpostavitve iglic mediju pod mikrovalovi izluževanje najbolj uspešno.

Ob spremljanju procesa izločanja skupnih fenolnih spojin v času 6-minutne in 24-urne izpostavitve rastlinskega tkiva je očitno, da se skozi daljše časovno obdobje v destilirano vodo izloči več učinkovin, zaznan je bil porast iz 15,2 na 28,2 µg/g. V fiziološki raztopini količina skupnih fenolnih spojin po 24 urah pade iz 28,1 na 12,6 µg/g. Razlog za omenjeno se morebiti skriva v občutljivosti učinkovin v fiziološkem mediju, saj je lahko skozi daljše časovno obdobje izpostavljenosti iglic mediju prišlo do spremembe pH vrednosti, kar je lahko vodilo v zmanjšanje skupnih fenolnih spojin. Manjši alikvot poglobljenega poskusa je pokazal, da ob vizualnem spremljanju barvnega prehoda ob dodajanju baze povzroči 1 M raztopina NaOH prehod rumene barve raztopine v škrlatno rjavo. Obratno, dodatek enakega volumna raztopine 1 M raztopine HCl alkalni raztopini povzroči prehod barve nazaj v rumeno. Glede na to, da gre za spojine z najmanj enim aromatskim

obročem in vsebujočimi eno ali več hidroksilnimi skupinami, je prehod barve možno interpretirati podobno kot pri naravnih barvilih/indikatorjih antocianinih, ki spadajo tudi med polifenole (Wiki FKKT UL, 2010). S podrobnimi opisi različnih strukturnih sprememb (premiki protonov) in vplivom izomerije takih snovi je mogoče pojasniti takšne spremembe (Kralj Cigić, 2017).

Poskusi so pokazali, da imajo faktorji, kot so temperatura, čas in izbira medija, pomemben vpliv na izluževanje in kvantitativno vsebnost skupnih fenolnih spojin.

5 ZAKLJUČEK

Raziskovalno delo, ki je zajemalo produkcijo lipidnih veziklov iz naravnih virov, je združevalo različne poglede naravoslovnih znanosti. Interdisciplinarno smo povezali znanja kemije, biologije, medicine, fizike in matematike. Učinkovitost takšnega povezovanja omogoča kvalitetno reševanje izzivov raziskovalnega dela.

Predvidevali smo, da bo mogoče s pomočjo postopka elektroformacije na platinasti elektrodi tvoriti lipidne vezikle iz predhodno pripravljenih maceratom iglic navadne smreke. Pričakovali smo, da bomo največjo formacijo omenjenih delcev zaznali pri uporabi manj polarnega maceracijskega topila. Rezultati eksperimentalnega dela so ob pomoči merila polarnosti – dielektrične konstante uporabljenih topil *potrdili omenjeni sklop hipoteze*. V maceratu polarnega etanola so sicer vezikularne strukture nastale, vendar v izrazito manjšem obsegu kot v kloroformu in heksanu. Taki delci v primerjavi z delci, formiranimi iz macerata kloroforma in heksana, nosijo druge možnosti uporabe. Zaradi navedenih lastnosti v maceratu etanola nastalih delcev nismo umestili v nadaljnjo študijo. Najbolj zanimivi iz vidika inovativnih membran celic so prav vezikli, formirani iz macerata heksana in kloroforma. Dejstvo potrjuje tudi morfologija iz lipida POPC nastalih veziklov, ki po morfoloških lastnostih ustrezajo omenjenim “naravnim” iz maceratom.

V nadaljevanju smo sklepali, da bo mogoče preko nastalih lipidnih veziklov sklepati na vsebnost lipidnih komponent, ki jih vsebuje izhodni macerat, in nato preko le-tega na polmer nastalih vezikularnih struktur. Tudi to trditev *potrjujejo eksperimentalna dejstva*.

Etanol je med vsemi, za maceracijo uporabljenimi topili izražal najbolj polaren značaj. Res je, da smo z njim izlužili največ materiala, a je bila koncentracija nepolarne oz. lipidne frakcije očitno zelo nizka, da ni prišlo do formiranja velikih delcev oz. orjaških lipidnih veziklov (GUVs). Ker je bila v raztopini na voljo nizka koncentracija nepolarnih oz. lipidnih komponent, je energijski proces formiral zgolj vsebino, ki je bila na voljo, kar je rezultiralo v nastanek manjših struktur. Na podlagi nastanka veziklov iz macerata heksana in kloroforma je bilo dokazano tudi, da polarnost separacijskega medija nosi pomembno vlogo pri usmerjanju elektroformacije. Ker vzorci naravnega izvora vsebujejo velik nabor molekul, se le-ti razlikujejo tudi po polarnosti. Iz navedenega je mogoče povzeti, da imajo lahko nekateri lipidi, čeprav znani kot nepolarne, izražen tudi polarni značaj. Takšne snovi posledično lažje raztapljajo v topilih, ki imajo delno polarni značaj. Ker imajo pogoji elektroformacije značilno nizke frekvence in napetosti, pri katerih se formirajo lipidni vezikli, ne

moremo izključiti dejstva, da pri nastanku struktur sodelujejo tudi molekule, ki po osnovni strukturi niso lipidi, a imajo za pogoje elektroformacije izražen dovoljšen karakter nizke polarnosti, ki ustreza tudi energiji nastanka takih struktur. Pri postopku elektroformiranja se je tvorila množica vezikularnih struktur različnih dimenzij; največ vezikularnih struktur smo tako zaznali v maceratu kloroforma in nekaj manj v maceratu heksana. Statistična primerjava v obeh topilih nastalih vezikularnih struktur kaže njihovo manjšo velikost v maceratu heksana. Razlog se tako skriva med drugim tudi v zalogi izhodnega lipida, ki je na voljo procesu, da ga lahko izkoristi za formacijo. V maceratu heksana stabilne vezikularne strukture prevladujejo v dveh velikostnih redih: prvi z velikostjo okoli 2,2 μm in drugi okoli 3,8 μm . Preostalih populacij je manj, a so dokaj enakomerno zastopane vse do polmera 6 μm . V maceratu kloroforma je bilo prisotnih več lipidnih komponent, zato smo poleg večjega števila veziklov izmerili tudi njihovo večjo velikost. Največja prisotnost vezikularnih struktur je bila tako v območju od 3,8 do 4,2 μm . Kloroformski macerat je omogočil nastanek veziklov, ki v polmer merijo celo okoli 18 μm . Rezultati poskusov in analize velikosti delcev nakazujejo na stabilnost formiranih vezikularnih struktur. Vezikli manjših dimenzij so v primerjavi z večjimi tudi bolj obstojni.

Drugi sklop je zajemal obravnavo homogenatov iglic navadne smreke in kvantitativno določitev skupnih fenolnih spojin s pomočjo reagenta Folin-Chicoteu. Vpogled v pripravljene homogenate je ob uporabi mikroskopije razkril, da oba tipa homogenatov vsebujeta enake strukturne fragmente. Največjo pestrost z membrano obdanih celičnih struktur je bilo mogoče zaznati v homogenatih s fiziološko raztopino. V homogenatu z destilirano vodo so se delci orientirali v t. i. skupke, kjer je med drugim mogoče zaznati še nekaj deformiranih rastlinskih celic. V nadaljevanju smo predvidevali, da tako temperatura kot medij (destilirana voda, fiziološka raztopina) vplivata na vsebnost skupnih fenolnih spojin, kvantitativno določenih spektrofotometrično ob pomoči reagenta Folin-Chicoteu. Izmed vseh obravnavanih tehnik priprave homogenatov (**Slika 11**) velja omeniti, da smo največjo količino skupnih fenolnih spojin zaznali ob direktnem obdelovanju vzorca iglic navadne smreke na vrelišču obeh medijev. Glede na aktivacijo izločanja skupnih fenolov z uporabo mikrovalov je proces pri sobni temperaturi (22 °C) nekoliko upočasnen, temu sledi izločanje pri nižjih temperaturah – v hladilniku na 5 °C. Tako pridobljeni trend lahko razložimo s teorijo gibanja delcev, kjer se delci pri višjih temperaturah gibljejo hitreje, s tem pa višja temperatura pripomore k odpiranju por rastlinskega tkiva. Vsebina se je tako zaradi trkov sprostila iz rastlinskega tkiva in v raztopini prisotnih celičnih delcev. Poskus zamrzovanja iglic v mediju v primerjavi s povišano

temperaturo ni pokazal zadovoljivih rezultatov, saj povišana temperatura kaže očitno večji efekt v primerjavi z deformacijo rastlinskega tkiva z zamrzovanjem. Tudi tokrat teorija o gibanju delcev potrdi, da so pri nizkih temperaturah spremembe bistveno počasnejše kot pri povišanih. Ob predpostavki, da bo vsebnost skupnih fenolnih spojin mogoče zaznati pri direktni obdelavi iglic ob vrelišču medija, lahko *potrdimo tudi drugi del hipoteze*. V splošnem so poskusi pokazali, da imajo eksperimentalni faktorji, kot so temperatura, čas in izbira homogenizacijskega medija, pomemben vpliv na izluževanje in karakteristike ter kvantitativno vsebnost skupnih fenolnih spojin.

Kot smo skozi celotno delo navajali, smo skozi preplet različnih raziskovalnih vsebin pridobili zanimiva dognanja. Predvsem smo podrobneje spoznali naravne spojine v iglicah navadne smreke in možnosti njihove uporabe. Kot posameznik in kot skupina se moramo vedno spraševati, kaj lahko doprinesemo družbi, v kateri nam je dano ustvarjati. Mladi se še kako zavedamo, da živimo v času, ki ga obdajajo res veliki izzivi. V prihodnosti bomo kreirali planet in življenje na njem morali peljali v smer manjšega obremenjevanja okolja. Ta študija, ki smo jo izvajali, dokazuje, da je lahko tudi narava vir kemikalij in reagentov, ki kažejo s komercialnega stališča prednost. Naše delo je tako pokazalo, da je modelne celice oz. lipidne vezikle, tvorjene iz maceratom rastlinskega materiala, mogoče uporabljati kot alternativo sintetičnim lipidom. Stabilnost nastalih vezikularnih struktur je tako podobna tistim, ki jih ustvarjajo sintetični lipidi, kar nosi mnoge prednosti v samem raziskovalnem procesu. Za boljšo ozaveščenost in družbeno odgovornost moramo kot družba poskrbeti za reciklacijo ali ponovno uporabo materialov, ki jih kot potrošniki uporabljamo v vsakdanjem življenju. Narava je vir mnogih učinkovin, zato jo moramo spoštovati in ji vračati, kar potrebuje – le tako bomo v misli na boljši jutri lahko živeli v sinergiji.

6 LITERATURA

Ahtik, G.; Užmah, T. Preučevanje lastnosti cikličnega terpena in študij njegove vsebnosti v vzorcih, pripravljenih z maceracijo. Raziskovalno delo, Osnovna šola Primoža Trubarja Laško, Laško, Slovenija, 2018.

Angelova, I. M.; Dimitrov, D. S. Liposome electroformation. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 1986, 81, 303-311. <https://doi.org/10.1039/DC9868100303>

Avati polar lipids, Inc. Safety data sheet: 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoholin. Dostopno na spletu: https://avantilipids.com/assets/products/attachments/850457C_E_7950_US.pdf (Obiskano 11. septembra 2021).

Carl Roth. Varnostni list: D(+)-glukoza. Dostopno na spletu: <https://www.carlroth.com/medias/SDB-HN06-SI-SL.pdf?context=bWFzdGVyfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0c3wyMzM1MDR8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0cy9oMDMvaGZmLzkwNDk1MTUwOTgxNDIucGRmfDUyOTFiYjA4N2YzNWUxZWZhODZlMWM0NTM1MTAwZGYxMjBkYWUyZmM3MWVjZjVhYTBJYTAyZTI1NDU2NjdjZjA> (Obiskano 11. septembra 2021).

Carl Roth. Varnostni list: D-(+)-saharoza. Dostopno na spletu: <https://www.carlroth.com/medias/SDB-4661-SI-SL.pdf?context=bWFzdGVyfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0c3wyMzE1Nzh8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0cy9oNjKvaDNhLzkwNDY4NzYyMjU1NjYucGRmfDUwYWVjYjY3ZDkyMjE2YTlhZWJkOTBhYzNmNjcZmU3YTQxM2RjNWQ2ZWUwNzczNDVhZDhjNTJjYjA1ODc3NGQ> (Obiskano 11. septembra 2021).

Carl Roth. Varnostni list: etanol (bioetanol). Dostopno na spletu: <https://www.carlroth.com/medias/SDB-6724-SI-SL.pdf?context=bWFzdGVyfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0c3wyNzUzNTl8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0cy9oNTMvaGVlLzkwMjc4MDUyMTY3OTgucGRmfDlkMTJjY2IxODhlNzQyYTExNjNmMDQ1ZGRkMjIyNzRlN2JhM2MzODkzMmQ2YzQ4MmNlN2QwYTAwYmE3NmJlOTI> (Obiskano 11. septembra 2021).

Carl Roth. Varnostni list: metanol. Dostopno na spletu: <https://www.carlroth.com/medias/SDB-8388-SI-SL.pdf?context=bWFzdGVyfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0c3wzNjI5Nzd8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0cy9oYWUvaGI2LzkwMzE2NTQ0MDgyMjIucGRmfDdlOTQ4OTU3ODQxN2ZmZjM2MDBiODg2OWQzODU1M2Q1Yjk4ZjgwMjcwNDQ0ZGIwNjdjY2IxNThkNDUyZDhhYWI> (Obiskano na spletu 11. septembra 2021).

Carl Roth. Varnostni list: triklorometan. Dostopno na spletu: <https://www.carlroth.com/medias/SDB-4432-SI-SL.pdf?context=bWFzdGVyfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0c3wzNTc4MTV8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0cy9oOTgvaDQ0LzkwMjUyOTk2NDQ0NDYucGRmfDcwODc1MTYyNzg4YmMyMTg2ZjNiYWE1ZjdhMGQ2NjQxMmI0NTgxN2EzYTM1MmMzN2E4NmZlZDU2NDg5NDdhOTA> (Obiskano 11. septembra 2021).

Čačič, I.; Špec, A. Detekcija parametrov in aktivnih komponent v medu. Raziskovalno delo, Osnovna šola Primoža Trubarja Laško, Laško, Slovenija, 2017. Dostopno na spletu: <https://www.knjiznica-celje.si/raziskovalne/4201703737.pdf> (Obiskano 22. januarja 2022).

Čopar, S. Raziskovanje biološko aktivnih učinkovin v iglicah navadne smreke (*Picea abies*) z maceracijo rastlinskega materiala. Raziskovalno delo, Osnovna šola Primoža Trubarja Laško, Laško, Slovenija, 2020. Dostopno na spletu: <https://www.knjiznica-celje.si/raziskovalne/4202004991.pdf> (Obiskano 27. januarja 2022).

Čuš, K. Plinska kromatografija z masno spektrometrijo za določanje galaktoze in manoze v realnih vzorcih. Diplomsko delo, Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Maribor, Slovenija, 2014. Dostopno na spletu: <https://dk.um.si/Dokument.php?id=67313> (Obiskano 27. januarja 2022).

Global safety management. Safety data sheet: *n*-hexane: Dostopno na spletu: https://beta-static.fishersci.com/content/dam/fishersci/en_US/documents/programs/education/regulatory-documents/sds/chemicals/chemicals-h/S25352A.pdf (Obiskano 11. septembra 2021).

Godec, G.; Glažar, A. S.; Grubelnik, L. Osnovna zgradba celice. V *Naravoslovje 6: i-učbenik za naravoslovje v 6. razredu osnovne šole*, Zmazek, B., ur.; Grubelnik, V., ur.; Mušinović Zadravec, T., ur.; Zavod RS za Šolstvo: Ljubljana, Slovenija, 2015; str. 99-101. Dostopno na spletu: <https://eucbeniki.sio.si/nar6/1500/index4.html> (Obiskano 31. januarja 2022).

Godec, G.; Grubelnik, L.; Glažar, S. A.; Jamšek, S.; Zmazek, B. Razvrščanje organizmov na osnovi razlik v zgradbi celice. V *Naravoslovje 7: i-učbenik za naravoslovje v 7. razredu osnovne šole*, Zmazek, B., ur.; Grubelnik, V., ur.; Mušinović Zadravec, T., ur.; Zavod RS za Šolstvo: Ljubljana, Slovenija, 2015; str. 106. Dostopno na spletu: <https://eucbeniki.sio.si/nar7/1810/index1.html> (Obiskano 31. januarja 2022).

Gros, N.; Harrison, T.; Štrumbelj Drusany, I.; Kapun-Dolinar, A. Spectrometry at school: hands-on experiments. *Science in school* **2010**, *14*, 42-47.
<https://www.scienceinschool.org/article/2010/spectrometer-2/>

Horvat Menih, I. Primerjava antioksidativnega delovanja prehranskih dopolnil, čajev in svežih rastlin ameriškega slamnika (*Echinacea purpurea*) in ingverja (*Zingiber officinalis*). Raziskovalna naloga, II. Gimnazija Maribor, Maribor, Slovenija, 2014. Dostopno na spletu: https://zpm-mb.si/wp-content/uploads/2015/03/S%C5%A0_Interdisciplinarno_BIO_KE_Primerjava_antioksidativnega_delovanja_prehranskih.pdf (Obiskano 10. februarja 2022).

Jeran, M. Navadna smreka (*Picea abies*) kot vir aktivnih učinkovin. *Trdoživ: Bilten slovenskih terenskih biologov in ljubiteljev narave* **2020**, *9*, 2, 22-24. Dostopno na spletu: https://issuu.com/trdoziv/docs/trdoziv18_web_v01/s/11878727 (Obiskano 19. februarja 2022).

Jeran, M.; Barrios-Francisco, R.; Kralj-Iglič V. Biološko aktivne učinkovine v navadni smreki (*Picea abies*): razumevanje kemijskih lastnosti limonena pri njegovi uporabi in vsestranski biološki aktivnosti. *Kemija v šoli in družbi* **2021a**, *1*, 1-6. Dostopno na spletu: <https://www.kemija.net/clanek/1755> (Obiskano 09. januarja 2022).

Jeran, M.; Barrios-Francisco, R.; Sedušak Kljakič, A.; Remškar, H.; Novak, U. Non-destructive characterisation of natural materials: quantitative determination of borneol and limonene in European spruce needles (*Picea abies*) by FTIR spectroscopy. V *Proceedings of Socratic lectures, 4th international minisymposium* (December 2020), University of Ljubljana, Faculty of Health

- Sciences: Ljubljana, Slovenija, 2021b; str. 79-86. https://www.zf.uni-lj.si/images/stories/datoteke/Zalozba/Sokratska_2021.pdf
- Jeran, M.; Božič, D.; Novak, U.; Hočevar, M.; Romolo, A.; idr. European spruce (*Picea abies*) as a possible sustainable source of cellular vesicles and biologically active compounds. V Proceedings of Socratic lectures, 5th international minisymposium (April 2021), University of Ljubljana, Faculty of Health Sciences: Ljubljana, Slovenija, 2021c; str. 104-113. https://www.zf.uni-lj.si/images/stories/datoteke/Zalozba/Sokratska_5.pdf
- Jeran, M; Pečan, L. I.; Barrios-Francisco, R. Interdisciplinary insight on European spruce (*Picea abies*): biologically active compounds and their usage. *Proceedings of Socratic lectures* **2022**, 6, 64-70. https://www.zf.uni-lj.si/images/zalozba/9_Jeran_M_-Socratic_6_revised_2021.pdf
- Keminfo. Ultravijolična spektroskopija. Dostopno na spletu: <https://keminfo.pef.uni-lj.si/ro03m/uv.htm> (Obiskano 09. februar 2022).
- Klenovšek, T. Stabilnost membrane orjaških fosfolipidnih mehurčkov, pripravljenih z metodo elektroformacije. Raziskovalno delo, Osnovna šola Primoža Trubarja Laško, Laško, Slovenija, 2021. Dostopno na spletu: <https://www.knjiznica-celje.si/raziskovalne/4202105732.pdf> (Obiskano 05. december 2021).
- Kobis. UV-Vis: NanoDrop instrumenti. Dostopno na spletu: <https://www.kobis.si/index.php/prodajni-program/molekulska-spektroskopija/uv-vis/185-uuv-vis-nanodrop-instrumenti> (Obiskano 29. novembra 2021).
- Kogelnik, R. Določevanje prisotnosti proteinov in aktivnosti nekaterih encimov v figah. Diplomsko delo, Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Maribor, Slovenija, 2018. Dostopno na spletu: <https://dk.um.si/Dokument.php?id=129422> (Obiskano 27. januarja 2022).
- Kralj Cigić, I. O barvnih spremembah. V Skozi mavrico kemijskih sprememb: kemijski poskusi; Gimnazija Moste Ljubljana, Ljubljana, 29. november 2017; str. 7. https://gimoste.si/images/datoteke/Skozi_mavrico_kemijskih_sprememb.pdf
- Kralj-Iglič, V; Iglič, A. Organske mikro- in nanocevkke. *Proteus* **2003**, 66, 3, 106-111. Dostopno na spletu: <http://physics.fe.uni-lj.si/publications/pdf/Proteus2003.pdf> (Obiskano 01. februarja 2022).
- Kure, S. Fenolne spojine in fluidnost celičnih membran. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Ljubljana, Slovenija, 2006. Dostopno na spletu: <https://repozitorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=133643&lang=slvi> (Obiskano 17. januar 2022).
- Lewsley, J. What are vesicles, and how do they work. *Medical News Today* **2020**. Dostopno na spletu: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/vesicle#structure> (Obiskano 28 december 2021).
- Mildner, B. Biološke membrane, struktura i dinamika. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet (repozitorij), (ni leta). Dostopno na spletu: https://www.pmf.unizg.hr/_download/repository/14obk-_p13-biološke_membrane.pdf (Obiskano 29. december 2021).
- Nisca, A.; Ștefănescu, R.; Stegăruș, D. I.; Mare, A. D.; Fartzadi, L.; Tanase, C. Phytochemical profile and biological effects of spruce (*Picea abies*) bark subjected to ultrasound assisted and microwave-assisted extractions. *Plants* **2021**, 10, 870. <https://doi.org/10.3390/plants10050870>

- Pleša, P. Učinki povečanega UV-B sevanja na iglice smreke (*Picea abies*). Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Ljubljana, Slovenija, 2007. Dostopno na: http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn_plesa_petra.pdf (Obiskano 22. februar 2022).
- Pregelj, T. Določanje antioksidantov v zdravilnih zeliščih. Diplomsko delo, Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Ljubljana, Slovenija, 2009. Dostopno na: http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn_pregelj_tadeja.pdf (Obiskano 11. februar 2022).
- Saremi, B. Synthesis of giant unilamellar vesicles (GUV) from RSE liposomes in high and low ionic strength buffers. Master of applied science, Texas technical University, USA, 2010. Dostopno na: https://ttu-ir.tdl.org/bitstream/handle/2346/45531/Saremi_Bahar_Thesis.pdf?sequence=1&isAllowed=y (Obiskano 07. januar 2022).
- Sedušak Kljakič, A.; Remškar, H. Protimikrobno delovanje macerata iglic navadne smreke (*Picea abies*) na bakterije *Legionella pneumophila*. Raziskovalno delo, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola; Univerza v Ljubljani, Zdravstvena fakulteta, Fakulteta za elektrotehniko, Ljubljana, Slovenija, 2020.
- Smallwood, I. M. Handbook of organic solvent properties; Elsevier, Oxford, UK, 1996; str. 7, 65, 141.
- Spinelli, S.; Costa, C.; Conte, A.; La Porta, N.; Padalino, L.; Del Nobile, M.A. Bioactive compounds from Norway spruce bark: comparison among sustainable extraction techniques for potential food applications. *Foods* **2019**, *8*, 524. <https://doi.org/10.3390/foods8110524>
- Stein, H.; Spindler, S.; Bonakdar, N.; Wang, C.; Sandoghdar, V. Production of isolated giant unilamellar vesicles under high salt concentrations. *Front. Physiol.* **2017**, *63*, 8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00063>
- Tanase, C.; Coșarcă, S.; Muntean, D-L. A critical review of phenolic compounds extracted from the bark of woody vascular plants and their potential biological activity. *Molecules* **2019**, *24*, 1182. <https://doi.org/10.3390/molecules24061182>
- ThermoFisher Scientific. Safety data sheet: gallic acid. Dostopno na spletu: <https://www.fishersci.com/store/msds?partNumber=AC410860051&productDescription=GALLIC+ACID%2C+98%25+5KG&vendorId=VN00032119&countryCode=US&language=en> (Obiskano 11. septembra 2021).
- Urbanatura. Navadna smreka (*Picea abies*). Dostopno na spletu: <https://www.urbanatura.si/vsebina/551> (Obiskano 07. januar 2022).
- Vokič, N. Vpliv izbranih tripanocidnih učinkovin na membrane z različnimi steroli. Magisterijsko delo, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, Slovenija, 2019. Dostopno na: <https://repozitorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=116913&lang=slv> (Obiskano 02. februar 2022).
- Wiki FKKT UL. Polifenoli. Dostopno na: <http://wiki.fkkt.uni-lj.si/index.php/Polifenoli> (Obiskano 21. februar 2022).
- Wikipedija. Lipid. Dostopno na spletu: <https://sl.wikipedia.org/wiki/Lipid> (Obiskano 07. januar 2022).

- Zhang, L.; Chen, J.; Wang, Y.; Wu, D.; Xu, M. Phenolic extracts from *Acacia mangium* bark and their antioxidant activities. *Molecules* **2010**, *15*, 3567-3577. <https://doi.org/10.3390/molecules15053567>
- Zupanc Rezec, A.; Hochkraut, S. Kvantitativna vsebnost teobromina v ekstraktih navadne bodike (*Ilex aquifolium*) in njihovo delovanje na kvasovke (*Saccharomyces cerevisiae*). Raziskovalno delo, Osnovna šola Primoža Trubarja Laško, Laško, Slovenija, 2019. Dostopno na spletu: <https://www.knjiznica-celje.si/raziskovalne/4201903799.pdf> (Obiskano 19. januarja 2022).
- Zupanc Rezec, A.; Hohkraut S. Kvantitativna vsebnost teobromina v ekstraktih navadne bodike (*Ilex aquifolium*) in njihovo delovanje na kvasovke (*Saccharomyces cerevisiae*). Raziskovalno delo, Osnovna šola Primoža Trubarja Laško, Laško, Slovenija, 2021. Dostopno na spletu: <https://www.knjiznica-celje.si/raziskovalne/4201903799.pdf> (Obiskano 08. februar 2022).

Literatura je citirana po najnovejši različici odprtodostopne (angl. open access) zbirke znanstvenih publikacij družine MDPI in stilu ACS.

7 DODATEK

7.1 KVANTITATIVNO DOLOČANJE SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN V HOMOGENATIH IGLIC NAVADNE SMREKE

(a)	Absorbanca					$\Delta = 0,0129 \times \epsilon + 0,0586$ Koncentracija, uvertvena krivulja	Masa galne kisline v prostornini 20 ml.	Skupne fenolne spojine na 10,0 g iglic ($\mu\text{g/g}$)
	A760 (1)	A760 (2)	A760 (3)	Povprečna A	A - A0			
Meritev v destilirani vodi								
Slepi vzorec	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00	0	0	0
Segrevanje iglic in medija do vrelišča (30 s, 100 °C)	0,44	0,43	0,43	0,43333333	0,41	27,49670801	549,9741602	55,0
Dodatek iglic v vreli medij (30 s, 100 °C)	0,17	0,17	0,17	0,17	0,15	7,085271318	141,7054264	14,2
V mikrovvalovski aktivirane iglice (30 s) dodane v medij, pri sobni temperaturi (22 °C)	0,12	0,12	0,12	0,12	0,10	3,299302326	64,18604651	6,4
Iglice v mediju pri sobni temperaturi (6 min, 22 °C)	0,17	0,18	0,18	0,17666667	0,16	7,602067183	132,0413437	13,2
Zamrznjene iglice v mediju (24 ur, -18 °C)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,18	9,410852713	188,2170543	18,8
Iglice v mediju pri sobni temperaturi (24 ur, 22 °C)	0,26	0,26	0,26	0,26	0,24	14,0620155	281,2403101	28,1
Iglice v mediju pri 5 °C (24 ur)	0,21	0,2	0,21	0,20666667	0,19	9,927648579	198,552716	19,9

(b)	Absorbanca					$\Delta = 0,0129 \times \epsilon + 0,0586$ Koncentracija, uvertvena krivulja	Masa galne kisline v prostornini 20 ml.	Skupne fenolne spojine na 10,0 g iglic ($\mu\text{g/g}$)
	A760 (1)	A760 (2)	A760 (3)	Povprečna A	A - A0			
Meritev v fiziološki raztopini								
Slepi vzorec	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0	0	0
Segrevanje iglic in medija do vrelišča (30 s, 100 °C)	0,28	0,28	0,28	0,28	0,27	16,3875969	327,751938	32,8
Dodatek iglic v vreli medij (30 s, 100 °C)	0,17	0,17	0,17	0,17	0,16	7,860465116	157,2093023	15,7
V mikrovvalovski aktivirane iglice (30 s) dodane v medij, pri sobni temperaturi (22 °C)	0,19	0,19	0,19	0,19	0,18	9,410852713	188,2170543	18,8
Iglice v mediju pri sobni temperaturi (6 min, 22 °C)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,24	14,0620155	281,2403101	28,1
Zamrznjene iglice v mediju (24 ur, -18 °C)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,19	10,18604651	203,7209302	20,4
Iglice v mediju pri sobni temperaturi (24 ur, 22 °C)	0,15	0,15	0,15	0,15	0,14	6,310077519	126,2015504	12,6
Iglice v mediju pri 5 °C (24 ur)	0,14	0,14	0,14	0,14	0,13	5,534883721	110,6976744	11,1

Slika 17: Eksperimentalne meritve določanje skupnih fenolnih spojin v vzorcih homogenatov navadne smreke v dveh različnih medijih: (a) v destilirani vodi in (b) v fiziološki raztopini.

7.2 VARNOSTNA OPOZORILA KEMIKAJIJ

Tabela 2: Varnostna opozorila uporabljenih kemikalij.

Reagent	Formula	M (g/mol)	Piktogram	Stavk H	Stavk P	CAS
<i>n</i> -Heksan	C_6H_{14}	86,19		H225, H304, H315, H336, H361f, H373	P202, P280, P303 + P361 + P353 P304 + P340 P308 + P313	110-54-3
Etanol	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$	46,07		H225, H319	P210, P233, P305+P351+P338	64-17-5
Metanol	CH_4O	32,04		H225, H301 + H311 + H331, H370	P280-P233-P310- P309-P302+P352- P210	67-56-1
Triklorometan	CHCl_3	119,4		H302, H315, H319, H331, H351, H361d, H372	P202, P260, P302 + P352, P304+P340 P305 + P351 + P338, P308 + P313	67-66-3
<i>D</i> -(+)-saharoza	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	342,30	/	/	/	57-50-1
<i>D</i> -(+)-glukoza	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	180,2	/	/	/	50-99-7
Galna kislina	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$	170,12		H315, H319, H335	P261, P264, P271, P280, P302 + P352, P305 + P351 + P338	149-91-7
POPC, 1-palmitoil-2- oleoil- <i>m</i> -glicero- -3-fosfoholin	$\text{C}_{42}\text{H}_{82}\text{NO}_8\text{P}$	760,08	/	/	/	26853-31-6