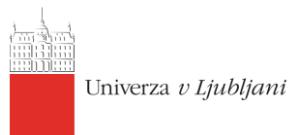




BIOTEHNIŠKI IZOBRAŽEVALNI CENTER LJUBLJANA
GIMNAZIJA IN VETERINARSKA ŠOLA



ZDRAVSTVENA FAKULTETA
FAKULTETA ZA ELEKTROTEHNIKO

MORFOLOŠKE LASTNOSTI ZUNAJCELIČNIH VEZIKLOV ERITROCITNEGA IZVORA

RAZISKOVALNO DELO

Miha Jozelj in Tobija Košir, dijaka 4. letnika tehniške gimnazije

MENTOR:

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

SO-MENTORICI:

prof. dr. Veronika Kralj-Iglič, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena fakulteta
Lidiya Gnidovec, prof., Biotehniški izobraževalni center Ljubljana

LJUBLJANA, 2022

Zahvala

Kljub temu, da sva še dijaka, ki iščeva poti in izzive, sva skozi potovanje klinične biofizike spoznala mnoge posameznike, ki so oplemenitili najino prvo raziskovalno delo.

Zahvaljujeva se mentorju, gospodu **Marku Jeranu**, strokovnemu sodelavcu *Laboratorija za klinično biofiziko* Zdravstvene fakultete in *Laboratorija za fiziko* Fakultete za elektrotehniko Univerze v Ljubljani, za vso strokovno pomoč, čas in potrpežljivost pri delu. Hkrati se Vam najlepše zahvaljujeva, da ste nama omogočili priložnost opravljanja dela izven okvirjev šole. Hvala za prijetno izkušnjo in izjemno priložnost, ki sva jo bila deležna z Vaše strani. Hvaležna sva Vam tudi za nepozabno izkušnjo ter vse znanje, ki je prišlo z njo. Hvala.

Za strokovno pomoč in vse odgovore na zastavljena vprašanja se iskreno zahvaljujeva prof. dr. **Veroniki Kralj-Iglič** iz *Laboratorija za klinično biofiziko* Zdravstvene fakultete Univerze v Ljubljani. Hvala tudi za lep sprejem, čas in motivacijo, ki ste jo posvetili skupnemu sodelovanju. Zelo sva srečna, da smo delali skupaj. Hvala.

Hvala prof. dr. Veroniki Kralj-Iglič, vodji *Laboratorija za klinično biofiziko* Zdravstvene fakultete in prof. ddr. **Alešu Igliču**, vodji *Laboratorija za fiziko* Fakultete za elektrotehniko, ker sta nama omogočila delo v okviru omenjenih inštitucij ter za lep sprejem med že uveljavljene raziskovalce. Iskrena hvala raziskovalcema: dr. **Darji Božič** iz *Zdravstvene fakultete in Fakultete za elektrotehniko Univerze v Ljubljani*, za pomoč pri pripravi vzorcev in dr. **Mateju Hočevarju** iz *Inštituta za materiale in tehnologije*, za čudovite SEM posnetke. Hvala tudi pred. dr. **Manci Pajnič** iz *Zdravstvene fakultete Univerze v Ljubljani* za sodelovanje in odvzem venske krvi.

Hvala tudi ga. **Lidiji Gnidovec** iz *Biotehniškega izobraževalnega centra Ljubljana*, ki naju je skozi vse aktivnosti podpirala in bila na voljo.

Zahvaljujeva se *Evropski komisiji* za financiranje projekta Ves4us (Research & innovation program: št. 801338), ter *Javni agenciji Republike Slovenije za raziskovalno dejavnost* za programe P2-0232, P2-0132 in P3-0388 ter projekte J3-3066, J3-2533, J3-3074, L2-2616 in L3-2621.

~ ~ ~

Na koncu vse to ne bi bilo omogočeno brez podpore osnovnih celic – **staršev**. Iskrena hvala za vašo spodbudo in motivacijo na vsakem koraku.

Hvala tudi vsem, ki so nama stali ob strani, naju bodrili in nama bili v oporo.

»The bubble's been engineered to allow us to learn from within it.«

*Alexandra Adornetto,
avstralska igralka in avtorica, ki piše za otroke in mladostnike*

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	4
ABSTRACT	5
1 UVOD	6
1.1 PRISTOP K DELU IN POTEK DELA	6
2 TEORETIČNI DEL.....	8
2.1 KRI IN KRVNE CELICE	8
2.2 ERITROCITI ALI RDEČE KRVNE CELICE.....	11
2.3 BIOFIZIKALNE LASTNOSTI ERITROCITOV IN NJIHOVIH MEMBRAN	13
2.4 ZUNAJCELIČNI VEZIKLI (ZV-jí)	14
2.5 VIZUALIZACIJA ZUNAJCELIČNIH VEZIKLOV – ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA	15
2.6 CILJ RAZISKOVALNEGA DELA.....	17
2.7 HIPOTEZE.....	17
3 EKSPERIMENTALNI DEL.....	18
3.1 PRIPOMOČKI	18
3.2 IZOLACIJA ZUNAJCELIČNIH VEZIKLOV.....	18
3.3 GEOMETRIJSKA ANALIZA ERITROCITNIH ZV-JEV.....	19
3.4 POVRŠINA IN PROSTORNINA KROGLE TER SFEROIDA.....	20
3.5 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV.....	21
4 REZULTATI.....	23
4.1 VZOREC ZUNAJCELIČNIH VEZIKLOV ERITROCITNEGA IZVORA PRI OSMOLARNOSTI 50 mOsmol/L.....	23
4.2 VZOREC ZUNAJCELIČNIH VEZIKLOV ERITROCITNEGA IZVORA PRI OSMOLARNOSTI 300 mOsmol/L	24
5 ZAKLJUČEK.....	25
6 LITERATURA.....	27
PRILOGE	30
ODTIS OBJAVLJENE PUBLIKACIJE.....	35

KAZALO TABEL

Tabela 1: Sestava krvi (<i>Dean, 2005</i>)	11
Tabela 2: Priprava vzorcev za študij vpliva osmolarnosti na morfologijo delcev.	19
Tabela 3: Rezultati dvostranskega <i>t</i> -testa za vzorca različnih osmolarnosti. Pri stopnji zaupanja $\alpha = 0,05$ so prikazani izračunani parametri: volumen V , površina S in relativni volumen v	24
Tabela 4: Analiza parametrov v vzorcu z osmolarnostjo 50 mOsmol/L (2 × mala polos a , velika polos b , prostornina V , površina S in relativni volumen v).....	30
Tabela 5: Analiza parametrov v vzorcu z osmolarnostjo 300 mOsmol/L (2 × mala polos a , 2 × velika polos b , prostornina V , površina S in relativni volumen v).....	32

KAZALO SLIK

Slika 1: Ločitev krvi na plasti zaradi posedanja celic (<i>Povzeto po: Dean, 2005</i>).....	8
Slika 2: Eritroci pod svetlobnim mikroskopom.....	12
Slika 3: Shematski prikaz prereza krogle s polmerom r	20
Slika 4: Shematski prikaz elipsoida, ki zajema polosi a , b in c	21
Slika 5: Prikaz opisovanja prolatnega sferoida z elipso.....	22
Slika 6: Polja vzorca osmolarnosti 50 mOsmol/L: (a) izvorna mikrografija, (b) mikrografija zgornjega levega predela in (c) mikrografija spodnjega desnega predela. Približki obrisov so podani s črtkano črto..	23
Slika 7: Polja vzorca pri izpostavitevi osmolarnosti 300 mOsmol/L: (a) izvorna mikrografija, (b) mikrografija zgornjega levega predela in (c) mikrografija spodnjega desnega predela. Približki obrisov so podani z rdečo črto.	24
Slika 8: Povzetek sprejete objave.	35

POVZETEK

Zunajcelični vezikli so heterogena skupina celičnih membranskih struktur nanometrskih razsežnosti. Nahajajo se v vseh telesnih tekočinah in nastajajo iz katerekoli celice. Zaradi pomembne vloge v medcelični komunikaciji so izjemnega pomena pri uravnavanju zdravja in bolezni.

V vzorcih biološkega izvora so pogosto prisotni delci, manjši od 1 μm , med katerimi so tudi zunajcelični vezikli. Vsebujejo biološko aktivne molekule, kot so proteini, nukleinske kisline in različni presnovki. Omenjene komponente na eni strani predstavljajo informacijo o celici, iz katerih izhajajo, in se na drugi strani lahko vpletajo v različne biološke procese celice, v katere vstopajo. Tako lahko vplivajo na razvoj in delovanje organizmov.

Zunajcelične vezikle smo izolirali iz suspenzije spranih eritrocitov, slikali izolate z vrstičnim elektronskim mikroskopom ter ocenili njihovo prostornino, površino in relativno prostornino. Uspelo nam je pridobiti in slikati izolat, bogat z eritrocitnimi zunajceličnimi vezikli. Ugotovili smo, da imajo zunajcelični vezikli pri osmolarnosti 50 mOsmol/L obliko, ki je blizu krogli, medtem ko imajo pri osmolarnosti 300 mOsmol/L podolgovato obliko, ki je blizu podolgovatemu sferoidu. Volumen V in površina S zunajceličnih veziklov pri 50 mOsmol/L sta bila znatno in statistično pomembno manjša kot pri 300 mOsmol/L. Relativni volumen v (mera za razmerje V in S : $v = (36\pi V^2/S^3)^{1/2}$) je bil pri 50 mOsmol/L znatno in statistično pomembno večji pri 50 mOsmol/L kot pri 300 mOsmol/L. Rezultati kažejo, da pri nižji osmolarnosti voda vstopa v vezikle in s tem poveča njihovo prostornino glede na površino (podobno kot pri eritrocitih, kjer se prostornina uravnava z Donnanovim ravnovesjem). Zmanjšanje volumna in površine v hipoosmolarnem okolju kaže na to, da je prišlo do selektivnega pokanja (večjih) zunajceličnih veziklov.

Ključne besede:

Zunajcelični vezikli, eritrociti, osmolarnost, diferencialno centrifugiranje, vrstična elektronska mikroskopija, morfologija, interdisciplinarno povezovanje, medicina

ABSTRACT

Extracellular vesicles are a heterogeneous group of cellular membrane structures of nanometer dimensions. They are found in all body fluids and are formed by cells. Due to their capacity to mediate intercellular communication, they play an important role in biological processes in health and disease.

Particles smaller than 1 μm including extracellular vesicles, are often present in samples of biological origin. They contain biologically active molecules such as proteins, nucleic acids and various metabolites. These components provide information about the mother cells and can simultaneously be involved in various biological processes within the recipient cells. This can have influence on the development and functioning of organisms.

In this work we observed the morphological parameters of erythrocyte extracellular vesicles at two different osmolarities of the external solution. Extracellular vesicles were isolated from suspension of washed erythrocytes and imaged with a scanning electron microscope. The contours of the imaged extracellular vesicles were used to assess the vesicle volume, area, and relative volume. We were able to obtain and image an isolate rich in erythrocyte extracellular vesicles. We found that extracellular vesicles at an osmolarity of 50 mOsmol/L have a shape close to a sphere, while at an osmolarity of 300 mOsmol/L they have an elongated shape close to a prolate spheroid. The volume V and the surface area S of extracellular vesicles at 50 mOsmol/L were considerably and statistically significantly lower than at 300 mOsmol/L. Relative volume $v = (36\pi V^2/S^3)^{1/2}$ at 50 mOsmol/L was considerably and statistically significantly higher at 50 mOsmol/L than at 300 mOsmol/L. These results indicate that at lower osmolarity water enters into vesicles and increases their volume relative to area (similar to erythrocytes where the volume is regulated according to the Donnan equilibrium). Decrease of volume and surface area at lower osmolarity indicates that selective popping of (larger) vesicles took place.

Key words:

Extracellular vesicles, erythrocytes, osmolarity, differential centrifugation, scanning electron microscopy (SEM), morphology, interdisciplinary connection, medicine

1 UVOD

Zunajcelični vezikli (ZV-ji) (*angl. extracellular vesicles*) so heterogena skupina nano-/ mikrometerskih delcev, zaprtih z membrano, ki jih najdemo v skoraj vsakem vzorcu biološkega izvora. Delujejo kot sredstvo za medcelično komunikacijo in so vključeni v več fizioloških in patoloških procesih, kot so embriogeneza, nevronска komunikacija, koagulacija krvi, vnetje, tumorigeneza in horizontalni prenos genov (Yáñez-Mó idr., 2015). V zadnjih desetletjih so ZV-je obsežno preučevali tudi zaradi njihove potencialne klinične uporabnosti: kot biomarkerje za spremljanje napredovanja različnih bolezni, kot zdravila ali kot vektorje za dostavo zdravilnih učinkovin. Kljub različnim uspehom, preboj do splošne aplikativne uporabe še vedno ovirajo nekatere tehnične zahteve pri njihovem pridobivanju, identifikaciji in karakterizaciji. Zaradi majhnosti ZV-jev in njihove heterogenosti glede na velikost in sestavo, je ponovljivost postopkov in količina pridobljenega materiala glede na začetni vzorec še vedno velik izziv. Poleg omenjenega so lastnosti izoliranega materiala močno odvisne od načina izolacije (Božič idr., 2021).

Navedeno lahko služi kot izziv ali kot motivacija za nadaljnje raziskovanje in interdisciplinarno povezovanje znanstvenih disciplin, ki ustvarjajo doprinos področju. Osnova tega dela so bili postopki izolacije ZV-jev iz suspenzije spranih eritrocitov in njihovo slikanje z elektronskim mikroskopom, kar so rezultati dela sodelavcev sodelujočih ustanov. Na slikah opažene oblike ZV-jev so podobne geometrijskim telesom, katerih volumen in površino lahko določimo na enostaven način, če določimo ustrezne geometrijske parametre s slik. V okviru pričajočega dela smo tako izvedli analizo za dva vzorca, ki sta se razlikovala po osmolarnosti zunanje raztopine. Določili smo volumen in površino omenjenih ZV-jev ter ustrezne povprečne vrednosti za obe skupini ZV-jev. Ugotovitev in pridobljena znanja bodo lahko osvetlila mehanizme stabilnosti eritrocitnih ZV-jev in dogajanja na ravni eritrocitne membrane. Kolikor nam je znano, je to prvi zapis o določanju površine in prostornine eritrocitnih zunajceličnih veziklov na reprezentativni populaciji ZV-jev, ki zadošča pogojem za statistično primerjavo.

1.1 PRISTOP K DELU IN POTEK DELA

Temeljenji praktični del smo opravili v *Laboratoriju za klinično biofiziko* Zdravstvene fakultete ter *Laboratoriju za fiziko* Fakultete za elektrotehniko Univerze v Ljubljani. Delo je bilo nadzirano s strani tehnično usposobljenega osebja v sodelovanju z mentorji. Vso potrebo opremo sta nam zagotovili sodelujoči inštituciji. Pred opravljanjem eksperimentalnega dela smo bili seznanjeni s temeljnimi varnostnimi predpisi, delovnimi aparaturami in eksperimentalno strategijo.

Kemikalije in delovne raztopine, ki so bile opremljene z oznakami za nevarne snovi, smo obravnavali v skladu s predpisi o nevarnih snoveh. Skozi celoten proces smo nosili zaščitna sredstva (zaščitno masko, rokavice, zaščitna očala in haljo) ter sledili smernicam za varno in učinkovito delo. Za izvedbo poskusa na eritrocitih človeške krvi smo predhodno pridobili pisno soglasje Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko (2019) s številko 0120-146/2019/5. Študija je bila izvedena v skladu s smernicami *Helsinške deklaracije*; kri je prostovoljno darovala zdrava odrasla oseba ženskega spola. Odvzem je potekal po standardnem protokolu, na tešče 12 ur pred odvzemom, ob 7.30 uri.

2 TEORETIČNI DEL

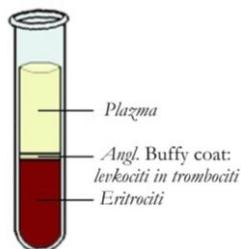
2.1 KRI IN KRVNE CELICE

Kri je pozornost ljudi pritegovala že od davnin. Menili so, da je s puščanjem krvi možno eliminirati bolezen (Kelnerič, 2018). Kasneje, v 17. stoletju, je Jean-Baptiste Denis poskušal transfuzirati telečjo kri za anemijo trpečem bolniku Antoinu du Mauroyu. Ugotovljeno je bilo, da so bile njegove rdeče krvne celice podvržene hemolizi (Yaya, 2021). V istem stoletju sta Malpighi in Swammerdam opisala obstoj rdečih krvnih celic (Cobb, 2002), vendar za prodorno odkritje njihovega znanstvenega opisa zasluge pripisujejo nizozemu Anthonyju van Leeuwenhoeku (Britannica kids, 2008). Njegova odkritja in poglobljeni opisi so tako omogočili izdelave mikroskopov z eno lečo in 250-kratno povečavo (Yaya, 2021).

Kri, opredeljena kot nenewtonska tekočina, predstavlja približno 7 % telesne teže posameznika (Sullivan, 2017). Povprečna odrasla oseba v telesu vsebuje več kot 5 litrov krvi. Omenjena življenska tekočina prenaša kisik in hranila do živih celic in odnaša njihove odpadne produkte. Zagotavlja imunske celice za boj proti okužbam in vsebuje trombocite, ki lahko tvorijo čep v poškodovani krvni žili, in s tem preprečijo izgubo krvi (Adam idr., 2022).

Preko cirkulacijskega sistema se kri prilagaja potrebam telesa. Tako ob vadbi srce črpa močnejše in hitreje, s tem zagotovi več krvi ter kisika mišicam. Ob okužbi kri na mesto okužbe med drugim dostavi tudi več imunskih celic, kjer se le-te kopijo, in s tem preprečijo nadaljnje škodljive reakcije (Adam idr., 2022).

Če epruveto s krvjo po odvzemu pustimo pri sobni temperaturi stati v navpičnem položaju, se zaradi gravitacijske sile prične ločevati na tri plasti (**Slika 1**), kar postane jasno vidno po približno 30 minutah. Ko se večje in gostejše komponente potopijo na dno epruvete, redkejša tekočina ostane na vrhu. Tekočina slammatega odtenka, ki tvori zgornjo plast, se imenuje plazma in ponavadi zajema približno 60 % krvi (Dean, 2005). Srednja, bela plast, je sestavljena iz belih krvnih celic in trombocitov ter spodnja z redečim odtenkom iz eritrocitov. Spodnji dve plasti celic ponavadi sestavlja približno 40 % krvi (Dean, 2005).



Slika 1: Ločitev krvi na plasti zaradi posedanja celic (Povzeto po: Dean, 2005).

Vzorec krvi je mogoče ločiti na posamezne komponente z vrtenjem v centrifugi, kjer se zaradi delovanja gravitacijske sile gibljejo zaradi sistemsko sile. V nihajočem rotorju se epruveta postavi skoraj pravokotno na os rotorja ter se večji in gostejši delci hitreje gibljejo proti dnu epruvete kot manjši in manj gosti. Če se delci gibljejo v mediju z gostotnim profilom, lahko tudi ločimo posamezne skupine delcev z različnimi gostotami. Na opisan način se lahko eritrociti zbirajo tudi za transfuzijo krvi (Adam idr., 2022).

Plazma v veliki večini predstavlja vodo (92 % prostornine) in vsebuje številne pomembne snovi (8 % prostornine), kot so beljakovina albumin, faktorji strjevanja krvi, protitelesa, encimi, hormoni, sladkorji, maščobni delci in zunajcelični vezikli (ZV-jì). Vsebuje tudi različne elektrolite, kot so natrijevi in kloridni ioni, odgovorni za ohranjanje osmolarnosti na optimalni ravni. Najdemo lahko tudi druga hranila, kot so glukoza ali aminokisline (Yaya, 2021).

Krvne celice izvirajo iz kostnega mozga. Svoje življenje začnejo kot matične celice in dozorijo v tri glavne vrste celic – eritrociti (rdeče krvne celice), levkociti (bele krvne celice) in trombociti. V nadaljevanju ločimo tudi tri vrste belih krvnih celic – limfociti, monociti in granulociti. Granulocite tako delimo na nevtrofilce, eozinofilce in bazofilce (Dean, 2005).

Eritrociti ali rdeče krvne celice so najpogostejsa vrsta celic v krvi. S premerom 6 µm (Youngchan, 2012) so eritrociti dovolj majhni, da se stisnejo skozi najmanjše krvne žile. Pri ljudeh, tako kot pri vseh sesalcih, zreli eritrociti nimajo jedra, kar omogoča celici več prostora za shranjevanje hemoglobina – beljakovine, ki veže kisik, in s tem omogoča rdečim krvnim celicam prenašanje več kisika (Adam idr., 2022).

Levkociti so del imunskega odziva in so na voljo v različnih oblikah in velikostih. Nekatere celice imajo jedra z več režnji in druge z eno veliko okroglo jedro. Nekateri vsebujejo pakete zrnc v svoji citoplazmi in so tako znani kot granulociti. Kljub različnim videzom imajo vse različne vrste levkocitov vlogo pri imunskega odziva. V krvi krožijo dokler ne prejmejo signala, da je del telesa okvarjen. Makrofagi so še posebej efektivni pri požiranju bakterij. Pomanjkanje makrofagov tako lahko vodi do ponavljajočih se bakterijskih okužb. Celice T so še posebej spretne v boju proti virusnim okužbam. Izguba njihovih funkcij povzroči povečano dovetnost za virusne okužbe (Dean, 2005). Signali vključujejo molekule interlevkina I (IL-1), ki jih izločajo makrofagi, prispevajo k zvišanju telesne temperature pri okužbah, in molekule histamina, ki jih sproščajo krožeci bazofilci in tkivni mastociti. V odgovor na nastale signale levkociti zapustijo krvno žilo tako, da se stisnejo skozi luknje sten krvnih žil. Preselijo se do vira signala in pomagajo aktivirati proces zdravljenja.

Nevtrofilci prebavljajo bakterije. Znani so tudi kot polimorfonuklearne celice, ker vsebujejo jedro, katerega oblika je nepravilna in vsebuje veliko rež, katere služijo zajemanju bakterij. Spadajo tudi v skupino belih krvnih celic, znanih kot granulociti, ker je njihova citoplazma posejana z zrnci, ki vsebujejo encime, kateri jih pomagajo prebaviti patogene (Dean, 2005).

Monociti so mladi levkociti, ki krožijo v krvi. Ko zapustijo kri in se preselijo v tkivo, se razvijejo v makrofage. Tam zagotavlja takojšnjo obrambo, saj lahko pogoltnejo ali fagocitozirajo ter prebavijo patogene mikroorganizme, preden druge vrste levkocitov dosežejo območje. V jetrih se tkivni makrofagi imenujejo Kupfferjeve celice in so specializirani za odstranjevanje škodljivih snovi iz krvi, ki je zapustila črevesje. Alveolarni makrofagi se nahajajo v pljučih in odstranjujejo škodljive snovi, ki se jih morda vdihne. Makrofagi v vranici odstranijo stare ali poškodovane rdeče krvne celice in trombocite iz krvnega obtoka. Makrofage nekateri imenujejo tudi kot »celice, ki predstavljajo antigen«, saj predstavljajo tuje beljakovine ali antigene drugim imunskim celicam ter sprožijo imunski odziv (Dean, 2005).

Limfociti, okrogle celice, so sestavljeni iz celic B in celic T ter vsebujejo veliko okroglo jedro. Obstajata dva glavna razreda celic: celice B, ki zorijo v kostnem mozgu, in celice T, ki zorijo v timusni žlezi. Ko se aktivirajo, celice B in T, sprožijo različne vrste imunskega odziva. Aktivirane celice B, znane tudi kot plazemske celice, proizvajajo zelo specifična protitelesa, ki se vežejo na sredstvo, ki je sprožilo imunski odziv. Celice T, imenovane T celice pomagalke, izločajo kemikalije, ki rekrutirajo druge imunske celice in pomagajo pri usklajevanju njihovega napada. Druga skupina, imenovana citotoksične celice T, napada virusno okužene celice (Dean, 2005).

Trombociti pomagajo pri strjevanju krvi in so nepravilno oblikovani delci celic, ki krožijo v krvi vse dokler se bodisi ne aktivirajo, da tvorijo krvni strdek, ali jih odstrani vranica. Trombocitopenija je stanje nizke ravni trombocitov in prinaša povečano tveganje za krvavitev. Nasprotno, visoka raven trombocitov ali trombocitemija, poveča tveganje za nastanek neustreznih krvnih strdkov. Ti bi lahko bistvenim organom, kot sta srce in možgani, prikrajšali oskrbo s krvjo, kar bi povzročilo srčni infarkt oz. možgansko kap. Trombociti izvirajo iz matičnih celic kostnega mozga. Matične celice se razvijejo v predhodnike trombocitov imenovane megakariociti, ki trombocite vstavijo v krvni obtok, ker krožijo v povprečju približno 9 dni. Če v tem času naletijo na poškodovane stene krvnih žil, se prilepijo na poškodovano mesto in se aktivirajo, da tvorijo krvni strdek, kar zamaši luknjo. V nasprotnem primeru jih ob koncu življenske dobe odstrani iz krvnega obtoka vranica. Pri različnih boleznih, kjer je vranica prekomerno aktivna, na primer pri revmatoidnem artritisu in levkemiji, vranica odstrani višek trombocitov, kar tako vodi do povečane krvavitve (Dean, 2005).

V vsakdanjem življenju se velikokrat srečamo s popolno/diferencialno krvno sliko, ki predstavlja rutinski test zdravstvenega pregleda. Test lahko diagnosticira in spremišča številne bolezni, kot so anemije, okužbe, vnetne bolezni in malignosti. Število rdečih krvnih celic odkrije anemijo (Dean, 2005).

Popolna krvna slika meri naslednje značilnosti eritrocitov (Dean, 2005):

- skupna količina hemoglobina v krvi,
- število eritrocitov,
- povprečna velikost eritrocitov in
- količina prostora, ki ga eritrociti zavzamejo v krvi ali hematokrit.

Tabela 1: Sestava krvi (Dean, 2005).

Sestava krvi	Referenčno območje	SI-referenčno območje
Levkociti	4500–11.000/mm ³	4,5–11,0 × 10 ⁹ /L
Eritrociti	Moški: 4,3–5,9 × 10 ⁶ /mm ³ Ženske: 3,5–5,5 × 10 ⁶ /mm ³	Moški: 4,3–5,9 × 10 ¹² /L Ženske: 3,5–5,5 × 10 ¹² /L
Hemoglobin	Moški: 13,5–17,5 g/dL Ženske: 12,0–16,0 g/dL	Moški: 2,09–2,71 mmol/L Ženske: 1,86–2,48 mmol/L
Hematokrit	Moški: 41–53 % Ženske: 36–46 %	Moški: 0,41–0,53 Ženske: 0,36–0,46
Povprečni volumen eritrocitov	80–100 µm ³	80–100 fL
Povprečna količina hemoglobina	25,4–34,6 pg/celico	0,39–0,54 fmol/celico
Trombociti	150,000–400,000/mm ³	150–400 × 10 ⁹ /L

2.2 ERITROCITI ALI RDEČE KRVNE CELICE

Eritrociti, znani tudi kot rdeče krvne celice, sodelujejo pri transportu kisika v krvi. Glede na to, da vsak kubični milimeter krvi vsebuje 4-6 milijonov celic, predstavljajo eritrociti najštevilčnejšo vrsto celic v telesu. Gledano z vrha se zdi, da so eritrociti pri fizioloških *in vitro* pogojih okrogli, a stranski pogled kaže, da so pravzaprav bikonkavni disk. Omenjena oblika poveča razmerje med površino in prostornino celice, s čimer se poveča učinkovitost difuzije kisika in ogljikovega dioksida v celico in iz nje (Dean, 2005).

Za eritrocite velja, da imajo prožno membrano. Omenjena lastnost omogoča, da se pri prehodu skozi okrog 3 µm široke kapilare deformirajo. Po ocenah eritrocitno membrano v masnih odstotkih sestavljajo naslednje snovi: proteini (39,6 %), lipidi (35,1 %), ogljikovi hidrati (5,8 %) in

voda (19,5 %) (Yawata, 2006). Med lipidi prevladujejo fosfolipidi (60 %; predvsem fosfatidilholin, fosfatidiletanolamin, sfingomielin in fosfatidilserin, redkejši so: fosfatidilinozitol, fosfatidilinozitol monofosfat, fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat, fosfatidilna kislina, lizofosfatidilholin in lizofosfatidiletanolamin). Okvirno 30 % lipidov predstavlja ne-esterificirani holesterol in nekaj več kot 10 % glikolipidi, ki tvorijo glikokaliks (Božič idr., 2021).

Eritrociti vsebujejo ogromne količine hemoglobina, beljakovine, ki veže kisik. Da bi bil prenos kisika čim bolj učinkovit, eritrociti sesalcev nimajo jedra in drugih organel. Zaradi navedenega se ob poškodbi ne morejo popraviti sami in imajo omejeno življenjsko dobo približno 120 dni. Odstranitev starih in umirajočih eritrocitov izvaja vranica. Dokazano je bilo, da vsako sekundo umre 2-3 milijone eritrocitov. Proizvodnja eritrocitov mora biti enaka njihovi smrti, sicer bi se populacija celic zmanjšala (Dean, 2005).

Telo mora imeti način za oceno koncentracije eritrocitov v krvi, tako da se eritrociti proizvajajo s hitrostjo, ki ustreza telesnim potrebam. Regulacija in proizvodnja eritrocitov se imenuje eritropoeza. V fazi mehanizmov eritropoeze ledvice spremljajo raven kisika v krvi. Če so ravni kisika nizke, ledvice izločajo hormon, imenovan eritropoetin. Eritropoetin vstopi v krvni obtok in potuje po telesu. Vse celice so tako izpostavljene eritropoetinu, vendar se na hormon odzivajo le celice rdečega kostnega mozga, ki imajo receptorje za eritropoetin. Eritropoetin nato spodbuja nastajanje eritrocitov v kostnem mozgu, omenjeni eritrociti zapustijo kostni mozeg in se premaknejo v krvni obtok. Ko se populacija eritrocitov poveča, se poveča zmogljivost krvi za prenašanje kisika. Ko ledvice zaznajo, da so ravni kisika ustrezne, se odzovejo z upočasnitvijo izločanja eritropoetina. Omenjena negativna povratna zanka zagotavlja, da velikost populacije eritrocitov ostane sorazmerno konstantna in, da zmogljivost krvi za prenašanje kisika vedno zadostuje za potrebe telesa (Dean, 2005). Rdeče barvilo eritrocitom daje pigment hemoglobin.



Slika 2: Eritrociti pod svetlobnim mikroskopom.

2.3 BIOFIZIKALNE LASTNOSTI ERITROCITOV IN NJIHOVIH MEMBRAN

Med pretakanjem krvi morajo eritrociti stalno spremnjati svojo obliko, zato je njihova deformabilnost ena njihovih osnovnih lastnosti (Smrkolj, 2000). V splošnem je membrana eritrocitov sestavljena iz dveh delov: lipidnega dvosloja in membranskega skeleta, ki je neprekinjena mreža beljakovin. V normalnih pogojih je membranski skelet pritrjen na notranjo stran dvosloja in sodeluje z lipidnim dvoslojem. Normalna oblika rdečih krvnih celic *ex vivo* pri fiziološkem pH 7,4 je *diskocit*. Pri alkalni pH vrednosti 11 je oblika rdečih krvnih celic sestavljena iz *sferične* matične celice in *brstov*, ki lahko postanejo prosti ZV-ji ali pa ostanejo povezani z matično celico z ozkim vratom (Iglič idr., 1997).

Za vzdrževanje konstantnega volumna so celice razvile mnogo regulatornih mehanizmov. Ob vsaki spremembi celičnega volumna se ti mehanizmi aktivirajo in uravnajo volumen na normalno velikost. V citosolu eritrocitov se nahajajo anionske makromolekule (proteini, organski fosfati, idr.), ki jih membrana ne prepušča. Zaradi selektivne prepustnosti membrane pride do Donnanovega ravnovesja, ki je določeno z enakostjo osmoznih tlakov v notranjosti predelka, ki ga obdaja membrana, in zunaj njega ter enakostjo elektrokemijskega potenciala ionov, ki lahko prehajajo membrano v obeh predelkih (Loeb, 1921). Ob spremembi zunajcelične ali znotrajcelične osmolarnosti, inducirani transmembranski tok vode povzroči nabrekanje ali krčenje eritrocitov. Vzpostavitev normalnega volumna se zagotavlja s transportom ionov skozi ionske kanalčke, ob pomoči ionskih prenašalcev ali črpalk. Med vsemi ionskimi transportnimi sistemi je najpomembnejša Na^+/K^+ črpalka, ki v največji meri uravnava transmembranske gradiente ionov in s tem vzpostavi usmerjen tok vode, ki uravna volumen celice na normalno velikost (Sardini, 2003).

V hipotoničnem mediju začno eritrociti nabrekati. Navedeno ima za signal vključitve mehanizmov zmanjšanja celičnega volumna, kar imenujemo *regulatorno zmanjšanje celičnega volumna*. Mehanizem deluje dokler se celični volumen ne približa normalni, optimalni velikosti. Krčenje eritrocitov (npr. v hipertoničnem mediju) aktivira drug niz mehanizmov za povečevanje celičnega volumna do normalne velikosti, ki se imenuje *regulatorno povečanje celičnega volumna* (Lang, 1998; Wehner idr., 2003).

Oblika rdečih krvnih celic se lahko spreminja s spremenjanjem različnih kemijskih in fizikalnih parametrov, ki vplivajo na lastnosti membrane in prostornine celice. Zlasti v smislu modela dvoslojnega para, z ohranjanjem konstantnega volumna celice (V) (Evans, 1974). Oblika eritrocitov se spremeni zaradi spremembe pogojev, ki povzročajo spremembo razlike med površinama zunanjega in notranjega enosloja (ΔA). Eksperimentalne ugotovitve kažejo, da zmanjšanje ΔA

povzroči, spremembo normalne oblike v obliko *skodelice*, med tem, ko zvišanje ΔA povzroči transformacijo *diskocitne* oblike v *ehinocitno*. Ekstrinzično inducirana transformacija *diskocit–ehinocit* je s spiranjem v sveži plazmi reverzibilna, intrinzično inducirana transformacija pa ne. Transformacijo *diskocit–ehinocit* zaradi stika s steklom preprečimo z opazovanjem med plastičnimi pokrovi (angl. plastic coverslips). Ko se koncentracija ehinocitogenih amfifilnih molekul še poveča, se pojavijo prave krogle (*sferociti*) in na koncu pride do hemolize. Ugotovitve kažejo tudi, da pride do sproščanja ZV-jev, ko se eritrocit zaradi brstena približa *sferocitni* oblici (Hägerstrand & Isomaa, 1989).

2.4 ZUNAJCELIČNI VEZIKLI (ZV-ji)

ZV-ji so z membrano obdani celični fragmenti, ki imajo pomembno vlogo v medcelični komunikaciji. V zunajcelični prostor se sproščajo tako *in vivo* kot tudi *in vitro*. Izolirali so jih iz raznolikih bioloških vzorcev, kot so kri, bronhoalveolarni izperek, sinovialna tekočina, urin, plodovnica, sperma, mleko, slina; ter iz kultur večine tipov sesalskih celic (Ferdin, 2016). Glede na velikost in mesto nastanka v celici, ZV-je ločimo na eksosome (30–100 nm), mikrovezikle (100–1.000 nm) in apoptotska telesca (1.000–5.000 nm) (Ferdin, 2016). Njihova proteinska, nukleinska (*mRNA*) in lipidna sestava odseva sestavo celice izvora in je odvisna od trenutnega stanja celice. Posledično so ZV-ji postali pomemben vir novih biooznačevalcev za raznolika telesna stanja s pomembno diagnostično in prognostično vrednostjo, še posebno za bolezni osrednjega živčevja. Raziskave potekajo tudi v smeri ciljanja ZV-jev v diagnostične in terapevtske namene, pri čemer se znanstveniki srečujejo s številnimi preprekami. Ravno zaradi velikega kliničnega potenciala se je zanimanje za karakterizacijo, nastanek in vlogo ZV-jev v zadnjih letih močno povečalo, pri čemer je prišlo tudi do pomembnega napredka pri razvoju metod za njihovo izolacijo in analizo (Ferdin, 2016).

ZV-ji predstavljajo generični izraz za delce, ki se naravno sprostijo iz celice, so omejeni z lipidnim dvoslojem in se ne morejo podvajati, saj nimajo funkcionalnega jedra (Théry idr., 2018). Opredelitev velja za katero koli celico, vključno z rastlinsko ali bakterijsko, ki je lahko vir ZV-jev (Vozel, 2020). Sprva so bili imenovani celični prah, saj so domnevali, da gre za pakete celičnih odpadkov in/ali stranski produkt razgradnje celic. Kasneje je bilo opaženo, da so posegli v različne biološke procese in igrajo pomembno vlogo pri razvoju in delovanju organizma. Predlagani so bili različni mehanizmi njihovega nastanka (Božič idr., 2020).

ZV-ji izzovejo fiziološki ali patološki odziv, ko dosežejo tarčno celico. Tarčna celica je lahko sosednja, oddaljena ali izvorna, kar nakazuje njihovo pomembno v avtoregulaciji. Avtorji raziskav navajajo tri različne načine delovanja ZV-jev (Vozel, 2020):

1. sprožitev celične signalizacije preko vezave na receptorje plazemske membrane tarčne celice,
2. sproščanje tovora vezikov v citosol tarčne celice preko zlitja zunajceličnih veziklov s plazemsko membrano tarčne celice,
3. endocitoza veziklov.

ZV-ji imajo celično membrano in vsebujejo pomembne biološke molekule, kot so beljakovine, lipidi, nukleinske kisline in metaboliti. Zaradi navedenega so nosilci dragocenih informacij o celicah, iz katerih prihajajo, ki odražajo njihovo vsebnost in stanje. Samo sestavljanje biološke membrane temelji na ravnotežju njenih komponent, ki jih po eni strani usmerja celica sama skozi proizvodnjo in regulacijo komponent membrane in na drugi strani zunanjí dejavniki, kot so kemikalije, temperatura in pritisk. Ko se pogoji, ki določajo konfiguracijo membrane, spremenijo, se membranske sestavine preuredijo glede na nove pogoje sistema (Božič idr., 2020).

Ker ZV-ji vsebujejo različne molekule, pomembne v medcelični komunikaciji, bi jih lahko uporabili pri diagnosticiranju in zdravljenju številnih bolezni. Zaradi njihove vloge jih je primerno poimenovati teranostična orodja (Fais idr., 2016). Uporabljali bi jih namreč lahko kot biomarkerje pri diagnosticiranju nalezljivih bolezni, nevrodegenerativnih bolezni, avtoimunskih bolezni ali tumorjev. Za namene zdravljenja bi jih lahko uporabili pri regeneraciji tkiv, kot platforme za cepiva proti nalezljivim boleznim ali tumorjem, kot imunosupresijo ali kot prenašalce zdravil. Čeprav izolatov ZV-je v standardni klinični praksi še niso uporabili za zdravljenje, jih že uporabljajo v obliku pripravkov, bogatih z ZV-ji, med katere uvrščamo tudi plazmo bogato s trombociti. Taka plazma namreč zaradi načinov priprave vsebuje pomembne koncentracije trombocitov in iz njih nastalih ZV-jev. Tako trombociti, kot tudi iz trombocitov nastali vezikli, imajo pomembne regenerativne učinke, prav trombocitni vezikli pa naj bi imeli glavno vlogo pri regeneraciji (Vozel idr, 2020). Stabilni ZV-ji bi bili lahko uporabni tudi za razvoj analitskih standardov ali v farmaciji kot dostavní sistemi za toksične in biokemijsko občutljive učinkovine.

2.5 VIZUALIZACIJA ZUNAJCELIČMNIH VEZIKLOV – ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA

Skozi študije priprave ZV-jev, so raziskovalci razvijali tudi uporabo različnih metod in tehnik za njihovo karakterizacijo. Tehnike pretočne citometrije, kromatografije in sisanja svetlobe (DLS/SLS) dajejo posredne informacije o populacijah z velikim številom ZV-jev. Za identifikacijo

in karakterizacijo posameznih delcev so v rabi različne mikroskopske tehnike. Zaradi majhnosti ZV-jev jih pod svetlobnim mikroskopom ne vidimo, zato uporabljamo elektronske mikroskope in dodatke k svetlobni mikroskopiji (fluorescenčno označevanje, sledenje gibanju ZV-jev). Presevna elektronska mikroskopija daje informacije o strukturi ZV-jev, medtem ko vrstična elektronska mikroskopija (*angl.* Scanning Electron Microscopy, SEM) nakazuje tudi na 3-dimenzionalno obliko ZV-jev. SEM kot karakterizacijski metodi lahko pripišemo visoko ločljivost in veliko globinsko ostrino. Uporabljamo jo lahko pri opazovanju različnih materialov, preučevanju struktur in fragmentov pri velikih povečavah. Elektronski mikroskopi nam omogočajo opazovanje predmetov na povečavah, višjih od najboljših optičnih mikroskopov, ki za učinkovito mikroskopiranje sežejo le do okrog 1000-kratne povečave. Omenjeno velja, saj imajo elektroni lahko do 100.000-krat manjšo valovno dolžino od fotonov, ki sestavljajo vidno svetlobo. Zaradi uporabe elektronskega curka imajo elektronski mikroskopi veliko boljšo ločljivost in povečavo (tunelski elektronski mikroskop celo do velikosti posameznih atomov) (Jeran idr., 2019). Izvor elektronov je na vrhu stolpa v mikroskopu. Tam se nahaja volframova žička, ki s segrevanjem proizvede snop elektronov. Na poti nazaj, do vzorca, prehaja snop elektronov skozi serijo elektronskih leč, ki ga fokusirajo. Bolj kot je snop ozek, manjša je točka na vzorcu, ki jo obseva. Opisani velikosti pravimo velikost točke oz. *angl.* spot size. Ko je snop izostren, ga tuljava usmeri na osi, namenjene preiskovanju vzorca po linijah (*angl.* raster scanning). Na samem dnu stolpa se nahaja komora za vzorec. Vključno s stolpom in virom elektronov mora biti pred mikroskopiranjem vzpostavljen vakuum. Od vrste mikroskopiranja je odvisno ali je vakuum visok ali nizek. Za manjše povečave se uporablja nizek vakuum in za večje visok. Za opazovanje na višjih povečavah je potrebno vzorce še naprašiti s prahom zlata (Au). Napraševanje se dogaja v ločeni napravi in traja do 5 minut. Po identičnem postopku vzorec namestimo v komoro, le, da v tem primeru komoro evakuiramo do visokega vakuma (Jeran idr., 2019). Komora, v kateri se nahaja vzorec, na nekoliko dvignjeni polici, vsebuje senzorje za toploto ter optične kamere, ki dajo vpogled v dogajanje okolice vzorca. V nadaljevanju omogočajo premikanje delovnega sistema, na katerem je vzorec, po x -, y - in z -oseh. Ker so za delovanje SEM-a nujno potrebni elektroni, je pomembno, da je vzorec, ki ga opazujemo, električno prevoden (Jeran idr., 2019).

Slikanje ZV-jev s SEM je potekalo tako, da smo na ploščat aluminijev cilinder namestili vzorec, letega z vijaki namestili v kovinski nosilec, ki smo ga nato pritrdirali na ploščo, katero smo potisnili v komoro in komoro evakuirali.

2.6 CILJ RAZISKOVALNEGA DELA

Cilj raziskovalnega dela smo usmerili v interdisciplinarni pristop, pri katerem smo uporabili metode eksperimentalne biofizike in matematike. V *Laboratoriju za klinično biofiziko* je bila razvita metoda za izolacijo velikega števila zunajceličnih veziklov z diferencialnim centrifugiranjem iz *in vitro* staranih eritrocitov in za njihovo opazovanje s SEM. To je omogočilo slikanje populacije eritrocitnih ZV-jev in analizo njihove povprečne oblike ter velikosti na reprezentativnem vzorcu.

Namen naloge je bil z analizo SEM slik ZV-jev, izoliranih iz teden dni staranih spranih eritrocitov, določiti njihovo povprečno obliko, prostornino in površino pri dveh osmolarnostih zunanjih raztopine.

Zunajcelične vezikle smo izolirali z diferencialnim ultracentrifugiranjem ter izolat razdelili na dva alikvota. Alikvota smo izpostavili raztopinama z različnima osmolarnostima. Izbrali smo hipoosmolarno raztopino, ker smo pričakovali, da bo voda prešla v vezikle in bodo pri tem nabreknili do krogle. Isoosmolarno raztopino smo uporabili za primerjavo. Vzorca smo pripravili za pregled s SEM-om, ju slikali ter analizirali morfologijo ZV-jev. Na podlagi pridobljenih rezultatov smo skušali ugotoviti kako so morfološke lastnosti veziklov povezane z mehanizmi njihovega formiranja in stabilnosti.

2.7 HIPOTEZE

Po skrbno prebrani literaturi in izoblikovanem cilju smo si zastavili hipotezi, ki sta nas vodili skozi celotno eksperimentalno delo.

Predvidevamo, da bodo imeli eritrocitni ZV-ji pri manjši osmolarnosti večji volumen kot pri večji osmolarnosti. V nadaljevanju predvidevamo tudi, da bodo imeli eritrocitni ZV-ji pri manjši osmolarnosti večji relativni volumen kot pri večji osmolarnosti. V zadnjem delu predvidevamo še, da se ZV-ji v raztopinah z različno osmolarnostjo ne bodo razlikovali po površini.

3 EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 PRIPOMOČKI

(a) Reagenti in raztopine

- Fosfatno-citratni pufer (PBS-citrat; pH 7,4), pripravljen iz:
137 mM NaCl (Sigma-Aldrich, CAS: 7647-14-5, lot: 90070, Steinheim, Nemčija);
2,68 mM KCl (Sigma-Aldrich, CAS: 7447-40-7, lot: 80520, Steinheim, Nemčija);
10,14 mM Na₂HPO₄ (Sigma-Aldrich, CAS: 10028-24-7, lot: 81330, Steinheim, Nemčija);
1,84 mM KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich, CAS: 7778-77-0, lot: 8191A, Steinheim, Nemčija)
10,9 mM Na₃C₆H₅O₇ × 2 H₂O (Carlo Erba Reagents, CAS: 6132-04-3, Rodano, Italija)
in nato filtriran skozi filter s prepustnostjo do 0,2 mikrona Chromafil RC-20/25 (ref.: 729030, lot: 9.155, Macherey-Nagel GmbH, Nemčija)
- 2 % Osmijev tetraoksid (OsO₄, SPI-Chem, CAS: 20816-12-0, lot: 1141030, West Chester, USA)
- Natrijev klorid (NaCl, Sigma-Aldrich, CAS: 7647-14-5, lot: 90070, Steinheim, Nemčija)
- Natrijev dodecil sulfat (SDS, CH₃(CH₂)₁₁OSO₃Na, Sigma-Aldrich, CAS: 151-21-3, lot: 051M0115V, Steinheim, Nemčija)
- Deionizirana voda (dH₂O) (Laboratorij za mikrosenzorske strukture in elektroniko, Fakulteta za elektrotehniko, UL)
- Etanol (C₂H₅OH, Emplura®, Merck, CAS: 64-17-5, Darmstadt, Nemčija).
- Heksametildisilazan (HMDS, (CH₃)₃SiNHSi(CH₃)₃, Sigma-Aldrich, CAS: 999-97-3, lot: STBH8712, Steinheim, Nemčija)
- Mešanica zlata in paladija (Au/Pd, PECS Gatan 682, Gatan, Inc. ZDA)

(b) Inventar in aparature

- Igla za odvezem krvi G21 (Microlance, Becton Dickinson, ZDA)
- Evakuirane epruvete z natrijevim citratom (4,5 mL; BD Vacutainers, 367714A, Becton Dickinson, ZDA)
- 0,2-Mikronski filtri (Chromafil RC-20/25, ref. 729030, Macherey-Nagel GmbH, Nemčija)
- Filter MCE (MF-MilliporeTM, ref. VMWP01300)
- Avtomatske pipete (20, 100, 1000 µL; Eppendorf Research)
- Konice za pipete (100, 1000 µL; Merck)
- Centrifuga Centric 400/R (Domel, Slovenija)
- Ultracentrifuga Beckman L8–70M z rotorjem SW55Ti (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Vrstični elektronski mikroskop JSM-6500F (JEOL Ltd., Tokyo, Japan)
- Invertni svetlobni mikroskop Eclipse TE2000-S (Nikon EM CCD; Tokio, Japonska), sklopljen s sistemom digitalnih kamer Spot boost (Visitron Systems)

3.2 IZOLACIJA ZUNAJCELIČNIH VEZIKLOV

Kri je darovala odrasla oseba ženskega spola brez ugotovljene bolezni. Odvezem krvi je potekal zjutraj, oseba je bila pred odvezmom tešča najmanj 12 ur.

Kri je bila odvzeta v evakuirane epruvete z Na-citratom (4,5 mL; BD Vacutainers, 367714A, Becton Dickinson, ZDA) in nato centrifugirana pri $300 \times g$ 10 min. Plazmo smo odstranili in eritrocite trikrat sprani s 300 mOsmol/L PBS-citratom. Eritrocite smo nato suspendirali v PBS-citrat z dodatkom 10 mM detergenta SDS (v razmerju 1:10 na vzorec). Vzorec smo v nadaljevanju inkubirali 2 h pri sobni temperaturi na krožnem mešalu, čemur je sledila izolacija ZV-jev z diferencialnim centrifugiranjem po postopku: $300 \times g$ 10 min, $2.000 \times g$ 10 min in $4.000 \times g$ 10 min. Supernatant po $4.000 \times g$ smo filtrirali skozi 0,8-mikronski filter, nato filtrat centrifugirali pri $50.000 \times g$ in 4°C 70 min. Nastali pelet smo sprali PBS-citratom.

Izolat v 300 mOsmol/L PBS-citratu je bil suspendiran v $d\text{H}_2\text{O}$ do končne osmolarnosti 50 mOsm/L (za vzorec 50 mOsmol/L) ter drugi alikvot v enakem razmerju, redčen z osnovnim pufom 300 mOsmol/L PBS-citrat (za vzorec 300 mOsmol/L).

Vzorec ZV-jev, izoliranih iz starane suspenzije eritrocitov in suspendiranih v pufru PBS-citrat, smo redčili z ustreznim medijem, pripravljenim z ustrezno kombinacijo $d\text{H}_2\text{O}$ in 4 M NaCl, kot prikazuje **Tabela 2**.

Tabela 2: Priprava vzorcev za študij vpliva osmolarnosti na morfologijo delcev.

Ciljna osmolarnost (mOsmol/L)	$V_{d\text{H}_2\text{O}} (\mu\text{L})$	$V_{4 \text{ M NaCl}} (\mu\text{L})$	$V_{\text{ZV v PBS-citratu}} (\mu\text{L})$
50	833,0	0	167,0
300	802,0	31,0	167,0

3.3 GEOMETRIJSKA ANALIZA ERITROCITNIH ZV-JEV

Vzorca ZV-jev pri različnih osmolarnosti (50 in 300 mOsmol/L) v PBS-citratu sta bila 2 uri inkubirana v 2 % OsO₄ in nanešena na 0,05-mikronska MCE filtra. Filtra smo vzeli iz držala in ju vstavili na mikrotitrsko ploščo z 12-timi luknjicami. Po treh stopnjah izpiranja v destilirani vodi sta bila vzorca dehidrirana v seriji raztopin etanola – od raztopine z najmanjšo vsebnostjo etanola do najvišje: 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 % in »absolutni« etanol. Sledila je obdelava vzorcev s 30 % in nato s 50 % mešanico heksametildisilazana z »absolutnim« alkoholom. V zadnji stopnji sta bila vzorca obdelana še s čistim heksametildisilazanom in vsebina posušena na zraku.

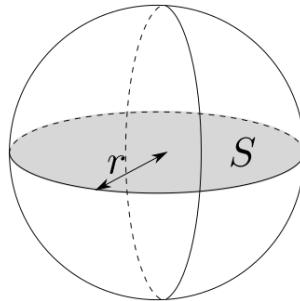
Za opazovanje vzorcev pod vrstičnim elektronskim mikroskopom JSM-6500F (JEOL Ltd., Tokio, Japonska), sta bila vzorca predhodno naprašena z zmesjo Au/Pd (PECS Gatan 682).

3.4 POVRŠINA IN PROSTORNINA KROGLE TER SFEROIDA

Krožnica v ravnini ponazarja množico točk, ki so enako oddaljene od izbrane točke. Izbrana točka ustvarja središče krožnice S in njen polmer r , kot oddaljenost izbrane točke od središča. Volumen V in površino S krogle s polmerom r (**Slika 3**) izračunamo s formulama:

$$S = 4 \pi r^2, \quad (\text{Enačba 1})$$

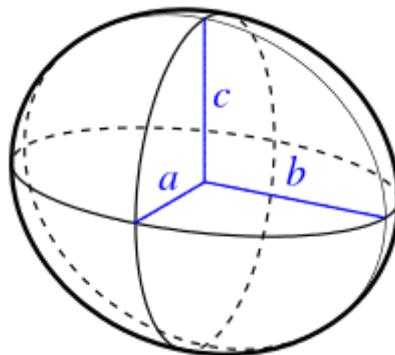
$$V = \frac{4}{3} \pi r^3 \quad (\text{Enačba 2})$$



Slika 3: Shematski prikaz prerezka krogle s polmerom r .

Elipsoid (**Slika 4**) je oblika, ki jo je mogoče pridobiti iz krogle tako, da jo deformiramo s pomočjo smernih skalarjev, ali bolj splošno z *afino transformacijo*. Je kvadratna površina, ki jo lahko definiramo kot ničelni niz polinoma druge stopnje v treh spremenljivkah. Med kvadratnimi površinami je za elipsoid značilna ena od naslednjih dveh lastnosti: (a) vsak ravninski prečni rez je bodisi elipsa, bodisi je prazen ali je reduciran na eno točko, (b) je omejen, kar pomeni, da je lahko zaprt v dovolj veliko kroglo (Böhm, 1955).

Elipsoid ima tri v parih pravokotne simetrične osi, ki se sekajo v središču simetrije, ki se imenuje središče elipsoida. Odseki, ki so na osi simetrije razmejeni z elipsoidom, se imenujejo glavne osi ali preprosto osi elipsoida. Če imajo tri osi različne dolžine (a , b in c) (**Slika 4**), pravimo, da je elipsoid triosen ali redko skalen, osi pa so enolično definirane (Böhm, 1955).



Slika 4: Shematski prikaz elipsoida, ki zajema polosi a , b in c .

Če imata dve osi enako dolžino je elipsoid vrtenja imenovan tudi *sferoid*. V tem primeru je elipsoid nespremenljiv glede na vrtenje okoli tretje osi, zato obstaja neskončno veliko načinov za izbiro dveh pravokotnih osi enake dolžine. Če imajo vse tri osi enako dolžino, je elipsoid *krogla* (Böhm, 1955). V našem delu smo obliko podolgovatih zunajceličnih veziklov opisali s prolatnim *sferoidom*, pri katerem sta manjši polosi a in c enaki (označili smo ju z a), polos b pa je daljša. Za tako telo sta površina (S) in prostornina (V) (Wikipedia, 2017; Satterly, 1960).

$$S = 2 \pi a^2 + \left(\frac{2 \pi a b^2}{\sqrt{b^2 - a^2}} \left(\arcsin \frac{\sqrt{b^2 - a^2}}{b} \right) \right) \quad (\text{Enačba 3})$$

$$V = \frac{4}{3} \pi a^2 b \quad (\text{Enačba 4})$$

Relativni volumen podaja razmerje med volumnom in površino in je definiran kot:

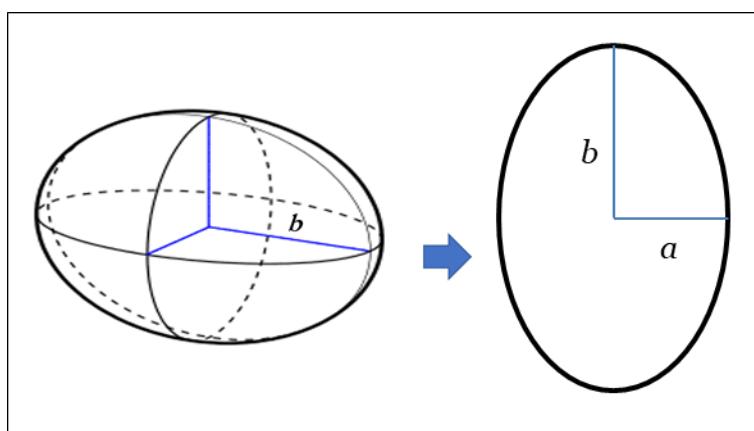
$$\nu = \sqrt[3]{\frac{36 \pi V^2}{S^3}}. \quad (\text{Enačba 5})$$

3.5 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV

Za beleženje, urejanje in izračun karakteristik podatkov raziskave smo uporabili programski paket *Microsoft Excel (2018)* in za morfološko analizo programski paket *CorelDRAW-2018*.

Posnetka SEM mikrografov smo uvozili v programski paket *CorelDRAW-2018*. Na posnetku mikrograфа smo v levem zgornjem in desno spodnjem kotu začrtali 2 enaka pravokotnika in v njem s pomočjo orodja za označevanje obrisali konture struktur, ki smo jih prepoznali kot vezikle. Vsakemu izmed obravnavanih vzorcev smo na enakem mestu pripisali enake dimenzijsne pravokotnika (**Slika 6** in **Slika 7**). Pri osmolarnosti 50 mOsmol/L smo predpostavili da gre za

krogle. Izmerili smo premer krogle ter za izračun volumna in površine uporabili **enačbi 1** in **2**. Pri osmolarnosti 300 mOsmol/L smo predpostavili, da gre za *sferoid* (**Slika 4**). Konture struktur smo opisali z elipso, katere velika polos je identična z veliko poloso elipsoida, ter mala polos identična z ostalima polosema elipsoida. Zaradi enostavnnejšega določanja velike in male polosi eliptične konture, s programom *CorelDRAW*, smo konturo obrnili tako, da je pri merjenju ležala velika polos v navpični smeri (**Slika 5**).



Slika 5: Prikaz opisovanja prolatnega sferoida z elipso.

Geometrijske parametre obeh populacij smo primerjali glede na povprečne vrednosti in standardne deviacije. Za primerjavo smo uporabili *t*-test. Rokovali smo s programom *Microsoft Excel (2018)*. Določili smo tudi statistično moč razlike. Za izračun moči dveh vzorčnih populacij smo uporabili prosto dostopen programski set *Inference for means: comparing two independent samples*, avtorja prof. Rollina Branta (<https://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/n2.html>).

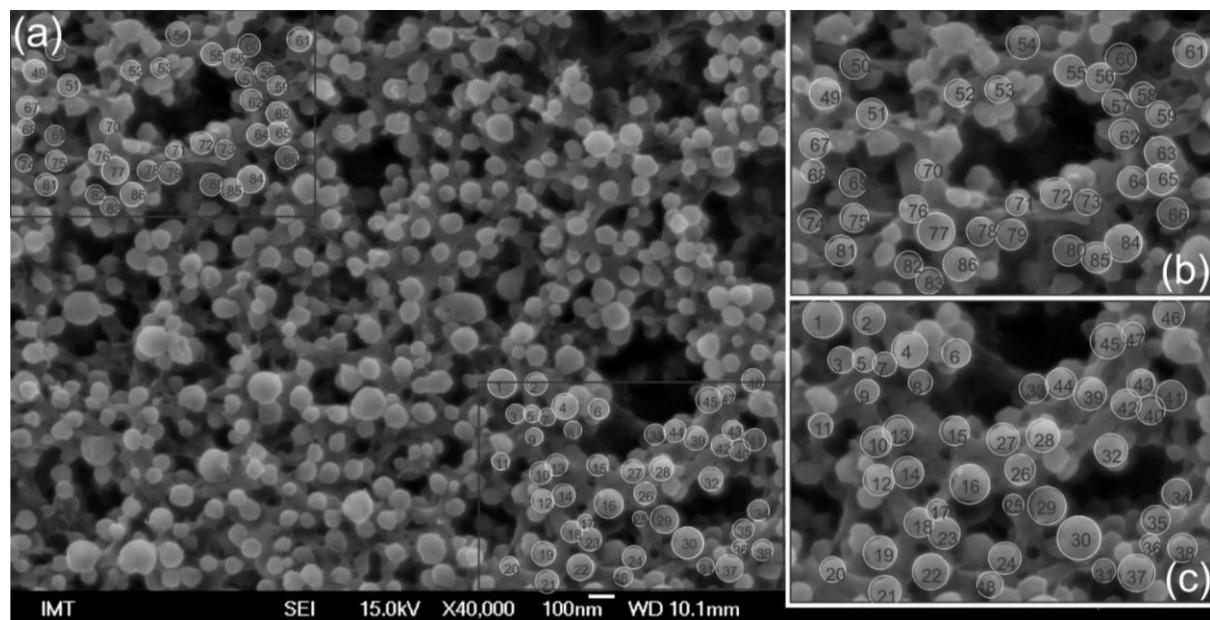
4 REZULTATI

Na **Sliki 6** in **Sliki 7** opazimo, da je izolat vseboval veliko število ZV-jev, kar je omogočilo kvalitetno statistično obdelavo obeh vzorcev. V analizo smo vključili 86 ZV-jev pri osmolarnosti 50 mOsm/L in 109 ZV-jev pri osmolarnosti 300 mOsm/L. Posamezne meritve so prikazane v **Tabeli 4** in **Tabeli 5** v *Prilogi*.

Pri osmolarnosti 50 mOsmol/L so bile konture delcev blizu krogov z nekoliko različnimi velikostmi (**Slika 6**), tako smo privzeli, da so ZV-ji v tem vzorcu krogle ter volumen in površino izračunali z **Enačbo 1** in **Enačbo 2**.

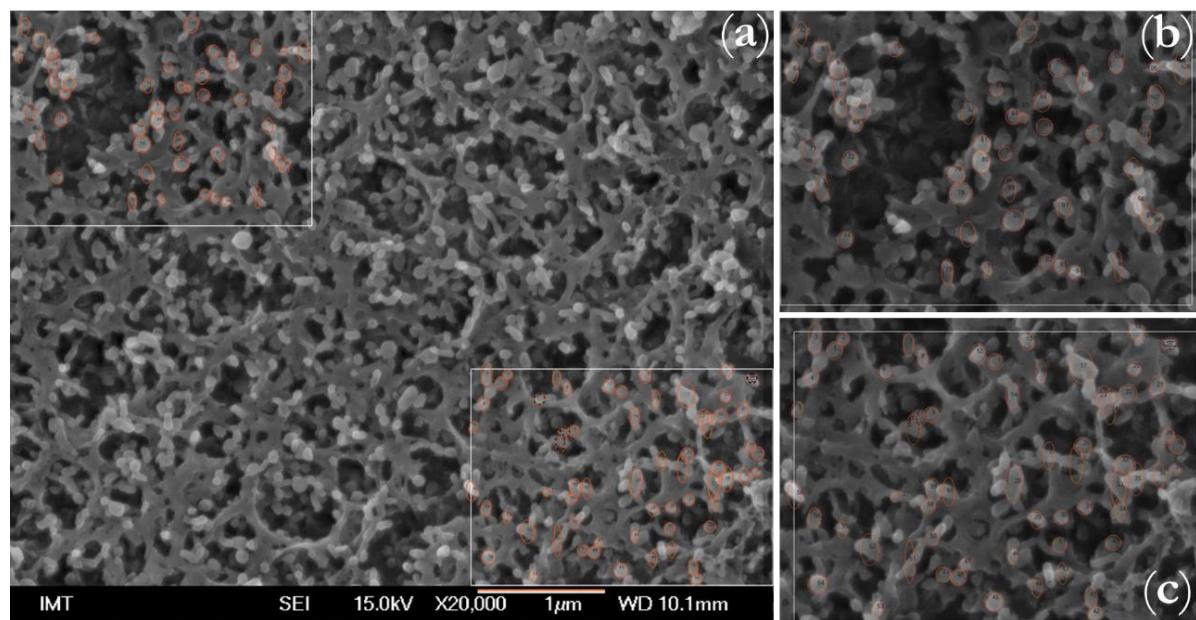
Pri osmolarnosti 300 mOsmol/L zaznamo različne oblike, ki sicer nakazujejo tridimenzionalno obliko, če vzamemo v obzir, da so svetlejši deli slike bližje izvoru elektronov (**Slika 7**). Zavedati se je potrebno, da so konture dvodimensionalni liki, ki tretje dimenzijske ne morejo upoštevati. Med obrisi najdemo tudi take, ki so podobne valjem s kroglastimi zaključki. Ker ne opazimo konkretnega razloga za preferenčno usmeritev ZV-jev, se lahko zgodi, da ima ZV, kateremu ustreza obris kroga, valjasto strukturo, a je ta orientirana pravokotno na ravnino opazovanja. Tako pridobljene prostornine in površine, ki jih dobimo za celotno populacijo, so zato nekoliko podcenjene. Glede na opažene obrise smo privzeli kot najpreprostejši približek oblike *sferoid*.

4.1 VZOREC ZUNAJCELIČNIH VEZIKLOV ERITROCITNEGA IZVORA PRI OSMOLARNOSTI 50 mOsmol/L



Slika 6: Polja vzorca osmolarnosti 50 mOsmol/L: (a) izvorna mikrografija, (b) mikrografija zgornjega levega predela in (c) mikrografija spodnjega desnega predela. Približki obrisov so podani s črtkano črto.

4.2 VZOREC ZUNAJCELIČNIH VEZIKLOV ERITROCITNEGA IZVORA PRI OSMOLARNOSTI 300 mOsmol/L



Slika 7: Polja vzorca pri izpostavitvi osmolarnosti 300 mOsmol/L: (a) izvorna mikrografija, (b) mikrografija zgornjega levega predela in (c) mikrografija spodnjega desnega predela. Približni obrisov so podani z rdečo črto.

Statistična analiza je pokazala, da sta povprečna prostornina in povprečna površina eritrocitnih zunajceličnih veziklov pri osmolarnosti 50 mOsmol/L znatno in statistično pomembno manjša kot pri osmolarnosti 300 mOsmol/L (**Tabela 3**). Relativni volumen, ki podaja razmerje med volumnom in površino, je bil prav tako znatno in statistično pomembno manjši pri večji osmolarnosti.

Tabela 3: Rezultati dvostranskega *t*-testa za vzorca različnih osmolarnosti. Pri stopnji zaupanja $\alpha = 0,05$ so prikazani izračunani parametri: volumen V , površina S in relativni volumen v .

Povprečna vrednost (standardni odmik)	50 mOsmol/L (86 ZV-jev)	300 mOsmol/L (109 ZV-jev)	Razlika	<i>p</i>	<i>P</i>
V (nm ³)	$3,18 \times 10^5$ ($1,49 \times 10^5$)	$4,32 \times 10^5$ ($2,66 \times 10^5$)	-30 %	$<10^{-3}$	0,82
S (nm ²)	$2,20 \times 10^4$ ($0,68 \times 10^4$)	$2,79 \times 10^4$ ($1,09 \times 10^4$)	-24 %	$<10^{-6}$	0,94
v	1	0,94 (0,07)	6 %	$<10^{-12}$	1

Razliko med vrednostima obeh osmolarnosti, pri 50 mOsmol/L in 300 mOsmol/L, smo delili s povprečno vrednostjo, vrednost *p* prikazuje verjetnost, ki ustreza statistični pomembnosti in vrednost *P* statistično moč pri $\alpha = 0,05$.

5 ZAKLJUČEK

Izolacija ZV-jev iz krvi in njenih pripravkov je svojevrsten izziv. Kri vsebuje visoko koncentracijo krvnih celic, ki so bogat vir ZV-jev, ki med drugim nastanejo lahko tudi po odvzemuh vzorca.

Raziskovalno delo, ki je temeljilo na izolaciji ZV-jev in njihovem slikanju s SEM, je združevalo interdisciplinarno sintezo znanja in temeljne načine povezovanja v naravoslovju. Tako smo medicinskemu aspektu dodali še fizikalni in matematični aspekt. Učinkovitost takšnega povezovanja in ustvarjanja znanj omogoča kvalitetno reševanje izzivov raziskovalnega dela in področju prinaša trajnost.

Pred začetkom laboratorijskega in empiričnega dela smo si zadali tri hipoteze, ki so nas vodile skozi celotno raziskovanje. Zastavljene hipoteze izvirajo iz izkušenj, pridobljenih pri eritrocitih (Canham, 1970) in sicer, da je volumen določen z Donnanovim ravnovesjem, torej se uravnava s prehajanjem vode preko membrane, medtem ko se površina membrane ohranja. Zaradi navedenega se pri prehajjanju vode v eritrocit poveča tudi njegov relativni volumen.

Razultati raziskovalnega dela (**Slika 6**, **Slika 7** in **Tabela 3**) kažejo, da imajo ZV-ji pri manjši osmolarnosti manjši volumen in manjšo površino kot pri večji osmolarnosti, kar pomeni, da smo **prvo in tretjo** hipotezo **ovrgli**. Med drugim smo ugotovili, da imajo ZV-ji pri manjši osmolarnosti večji relativni volumen, s čimer smo **potrdili drugo hipotezo**.

Mikroskopski pregled vzorca pri osmolarnosti 50 mOsmol/L razkrije delce, katerih kontura je blizu krožnici. Pri višji osmolarnosti (300 mOsmol/L) se pojavijo očitna odstopanja od krožnice. Skozi metodologijo določanja prostornine in površine, smo iz dvodimensionalne slike skonstruirali trodimensionalni objekt. Nekateri izmed obravnavanih ZV-jev, ki imajo na sliki za konturo krožnico so lahko elipsoidi, obrnjeni pravokotno na sliko, kar lahko predstavlja potencialni vir napake. V slednjem primeru sta tako volumen kot površina pri večji osmolarnosti podcenjena, zato bi lahko bile prave razlike še večje kot smo ugotovili z našo analizo. V nasprotju z omenjenim je relativni volumen lahko le precenjen, ker se nekateri delci zdijo bolj polni kot realno so. Omenimo še, da opisani parameter ni odvisen od velikosti pravih velikosti, saj nima dimenzijs. Če primerjamo **Sliki 6 in 7**, je očitno, da je oblika zunajceličnih veziklov pri različnih osmolarnostih različna.

Ker so ZV-ji zavzeli obliko krogla, ki ima največji volumen pri dani površini, sklepamo, da je v ZV-je prešla voda. Ker je membrana krhka za raztezanje, je verjetno, da je pri tem, ko so ZV-ji dosegli obliko krogla in je bilo nadaljnje prehajanje vode vanje indicirano, prišlo do pokanja ZV-jev. Zmanjšanje volumna pri nižji osmolarnosti lahko tako razložimo s tem, da so popokali večji ZV-ji. Pokanje večjih ZV-jev pri manjši osmolarnosti predstavlja možno razlago za dobljene

rezultate, vendar pa so za boljše razumevanje mehanizmov, ki uravnavajo obliko in velikost ZV-jev, potrebne nadaljnje raziskave.

Pri eritrocitih je uravnavanje volumna opisano z Donnanovim ravnovesjem. Če v celico vdira medij, predvsem v primeru hipoosmolarnosti medija, se *diskocit* napne v *makrosferocit*, pri čemer membrana eritrocita nima več prostostne stopnje, da bi z upogibanjem dosegla energijski minimum. pride do natezanja membrane, relativni volumen naraste. Ker je membrana krhka za natezanje, se pojavijo v membrani manjše ali večje pore in končno pride tudi do pokanja eritrocita. Napeti *makrosferociti* običajno niso obstojni. Če membrana poči, tako da postane prepustna za večje molekule, pri čemer pa delno ohrani svojo integriteto, lahko opazimo nepravilno oblikovane celice ali povsem izpraznjene duhce. Eritrocitni duhci so ostanki hipotonično liziranih membran in sestavljeni iz 49 % proteinov, 43 % lipidov in 8 % ogljikovih hidratov (Demič, 2016). Če mediju dodamo surfaktante, se ti običajno vgradijo v membrano eritrocitov, zaradi česar pride do gubanja membrane in nastanka brstov in spremembe oblike v *ehinocitno* oz. *sferohinocitno*. V določenih primerih brsti po določenem času odpadejo in ostanejo gladki *mikrosferociti*. *Mikrosferociti* so za razliko od *makrosferocitov* precej stabilni. Določeni surfaktanti lahko povzročijo nastanek por v membrani, in posledično iztekanje celične vsebine. V tem primeru eritrociti postanejo hipokromni. Pri visokih koncentracijah surfaktanta pride do raztapljanja lipofilnih komponent. Tako za vdiranje medija v celico ali za samo razpadanje veziklov ne moremo točno določiti točke, kdaj se je to zgodilo. Za natančno določanje trenutka vdora bi bile potrebne nadaljnje in še bolj poglobljene raziskave. Lahko zgolj domnevamo, da se je ta točka lahko zgodila ob nastanku samih veziklov, ali se je zgodila med ali po centrifugiranju krvi (Božič, 2021). Ne moremo tudi izključiti dejstva, da so popokali zaradi samih morfoloških parametrov, katere smo spremenjali v mediju.

SEM analiza zahteva predpripravo vzorca, ki vključuje kemijsko fiksacijo in dehidracijo vzorca. Različne organske molekule in supramolekularne strukture imajo različne fizikalno-kemijske lastnosti. Za ohranitev njihove naravne morfologije so zato potrebne različne strategije. Izkazalo se je, da je postopek fiksacije, ki je bil pred kratkim razvit za pripravo, z lipidnimi molekulami bogatih membran (Božič idr., 2021), primeren tudi za fiksiranje eritrocitov in eritrocitnih ZV-jev.

Raziskovalno delo v sodobno-razvijajoči se družbi, na področju zunajceličnih veziklov, dosega neverjetne rezultate. Zaradi njihove vsestranskoosti in univerzalnosti bodo labko v prihodnosti pripeljali še do boljših diagnostičnih metod. Kljub temu, da je področje zelo motivirajoče, sva se skozi delo soočila z različnimi izjavami in ugotovili, da nam ostaja še vedno veliko dela. To je najlepša izkušnja, ki sva jo pridobila. ... Delati nekaj za dobrobit družbe in se ob tem učiti – to je nekaj najlepšega, če ne celo plemenitega.

6 LITERATURA

- Adam, M. P.; Ardinger, H.H.; Pagon, R.A.; Wallace, S. E.; Bean, L. J. H.; Gripp, K. W; Mirzaa, G. M.; Amemiya, A. GeneReviews®. University of Washington, Seattle, Washington, USA; 1993-2022. Dostopno na spletu: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1116/> (Obiskano 21. januarja 2022).
- Bizjak, V. Uporaba pretočne citometrije za spremljanje karakteristik celic cho v bioprocesih. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Ljubljana, Slovenija, 2006. dostopno na spletu: <https://repozitorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=132949&lang=slv> (Obiskano 11. februarja 2022).
- Böhm, W. Die fadenkonstruktionen der flächen zweiter ordnung. *Math. Nachr.*, 1995, 13, (3-4): 151-156.
- Božič, D. Mehanizmi vezikulacije in stabilnost vezikularnih struktur v vzorcih humane krvne plazme in morskih mikroalg. Doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Ljubljana, Slovenija, 2021.
- Božič, D.; Hočevar, M.; Kisovec, M.; Pajnič, M.; Pađen, L.; Jeran, M.; Bedina Zavec, A.; Podobnik, M.; Kogej, K.; Iglič, A.; Kralj-Iglič, V. Stability of erythrocyte-derived nanovesicles assessed by light scattering and electron microscopy. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 12772. <https://doi.org/10.3390/ijms222312772>
- Božič, D.; Hočevar, M.; Kononenko, V.; Jeran, M.; Štibler, U.; Fiume, I.; Pajnič, M.; Pađen, L.; Kogej, K.; ..., Kralj-Iglič, V: Chapter Five – Pursuing mechanisms of extracellular vesicle formation. Effects of sample processing. V *Advances in Biomembranes and Lipid Self-Assembly*; Bongiovanni, A., Pocsfalvi, G., Manno, M., Kralj-Iglič, V., ur.; Elsevier/Academic Press: London, UK, 2020; Vol. 32, str. 113–155. <https://doi.org/10.1016/bs.abl.2020.09.003>
- Brant, R. Inference for means: comparing two independent samples. Dostopno na spletu: <https://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/n2.html> (Obiskano 17. marca 2022).
- Britannica kids. Anthony van Leeuwenhoek Available online: Dostopno na spletu: <https://kids.britannica.com/students/article/Anthony-van-Leeuwenhoek/275421> (Obiskano 04. februarja 2022).
- Canham, P. B. The minimum energy of bending as a possible explanation of the biconcave shape of the human red blood cell. *J. Theor. Biol.*, 1970, 26, 1, 61-76. [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(70\)80032-7](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(70)80032-7)
- Cobb, M. Malpighi, Swammerdam and the colourful silkworm: replication and visual representation in early modern science. *Annals Sci.* 2002, 59, 2, 111-147. <https://doi.org/10.1080/00033790110050759>
- Černivec, M.; Čurin Šerbec, Vesna Galvani, V.; Ghielmetti, M.; Hartman, K.; Kopitar, A. N.; Koren, S.; Kosmač, M.; Rupreht R.; Vranec T. Priročnik za vaje pri predmetu Molekularna imunologija z imunokemijo za študente Univerzitetnega študijskega programa Biokemija. Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino: Ljubljana, Slovenija, 2012.
- Dean, L. 2005. Blood groups and red cell antigens. Dostopno na spletu: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2261/> (Obiskano 09. februar 2022).
- Demič, R. Priprava orjaških unilamelarnih veziklov iz eritrocitnih membran. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Ljubljana, Slovenija, 2016. Dostopno na spletu: <https://repozitorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=138590&lang=slv> (Obiskano 19. februarja 2022).
- Evans, A. E., Skalak R. Mechanics and thermodynamics of biomembranes. Boca Raton: CRC press, 1980. <https://doi.org/10.1201/9781351074339>
- Evans, E. A. Bending resistance and chemically induced moments in membrane bilayers. *Biophys. J.*, 1974, 14, 12, 923–931. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(74\)85959-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(74)85959-X)
- Ferdin J.; Lenassi M. Zunajcelični vezikli in njihov klinični potencial. *Med. Razgl.* 2016, 55, 1, 63-82. <https://www.dlib.si/details/URN:NBN:SI:doc-P4K9NYKM>

- Hägerstrand, H.; Isomaa B. Vesiculation induced by amphiphiles in erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, 1989, 982, 2, 179-186. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(89\)90053-9](https://doi.org/10.1016/0005-2736(89)90053-9)
- Healthline. How much blood is in your body and how much you can lose. Dostopno na spletu: <https://www.healthline.com/health/how-much-blood-in-human-body> (Obiskano 3. marca 2022).
- Helfrich, W. Blocked lipid exchange in bilayers and its possible influence on the shape of vesicles. *Z Naturforsch C Biosci*, 1974, 29C, 510–515. 10.1515/znc-1974-9-1010.
- Iglič, A. A possible mechanism determining the stability of spiculated red blood cells. *Biomechanics*, 1997, 30, 1, 35-40. [https://doi.org/10.1016/S0021-9290\(96\)00100-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9290(96)00100-5)
- Iglič, A.; Hägerstrand, H.; Kralj-Iglič, V.; Bobrowska-Hägerstrand, M. A possible physical mechanism of red blood cell vesiculation obtained by incubation at high pH. *J Biomech*, 1998, 31, 2, 151-156. [https://doi.org/10.1016/S0021-9290\(97\)00136-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9290(97)00136-X)
- Internet archive. Blood cells. Dostopno na spletu: <https://web.archive.org/web/20160724155754/http://www.biosbcc.net:80/doohan/sample/htm/Blood%20cells.htm> (Obiskano 15 februarja 2022).
- Investiopedia. T-test. Dostopno na spletu: <https://www.investopedia.com/terms/t/t-test.asp> (Obiskano 19. februarja 2022).
- Jeran, M.; Drab, M.; Veršnjak, B.; Košir, S. Lastnosti vrstične elektronske mikroskopije (SEM) kot metode za preučevanje in karakterizacijo vzorcev. *Kemija v šoli in družbi*, 2019, 1, 1-5. <https://kemija.net/clanek/1663>
- Kelnerič, T. Meduza, Versace in Olgica? Raziskovalna naloga, Osnovna šola Olge Meglič, Ptuj, Slovenija, 2018. Dostopno na spletu: https://bistra.si/images/raziskovalne-naloge/2018/O%C5%A0_Zgodovina_ali_umetnostna_zgodovina_Meduza_Versace_in_Olgica.pdf (Obiskano 05. decembra 2021).
- 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. decembra 2021).
- Lang, F.; Busch, G. L.; Ritter, M.; Völkl, H.; Waldegger, S.; Gulbins, E.; Häussinger, D. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.*, 1998, 78, 1, 247-306. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.1.247>
- Lang, K. S.; Lang, P. A.; Bauer, C.; Duranton, C.; Wieder T., Huber, S.M.; Lang, F. 2005. Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cell. Physiol. Biochem.*, 2005, 15, 5, 195-202. <https://doi.org/10.1159/000086406>
- Loeb, J. Donnan equilibrium and the physical properties of proteins: I. Membrane potentials. *J. Gen. Physiol.*, 1921, 3, 5, 667-690. <https://doi.org/10.1085/jgp.3.5.667>
- Mohandas, N.; Evans, E. Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 1994, 23, 787-818. 10.1007/s10254-003-0009-x
- Provencher, S. W. 1982. Contin: A general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations. *Comput. Phys. Commun.*, 1982, 27, 3, 229-242. [https://doi.org/10.1016/0010-4655\(82\)90174-6](https://doi.org/10.1016/0010-4655(82)90174-6)
- Sardini, A.; Amey, J. S.; Weylandt, K. H.; Nobles, M.; Valverde, M. A.; Higgins, C. F. 2003. Cell volume regulation and swelling-activated chloride channels. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2003, 1618, 2, 153-162. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2003.10.008>
- Satterly, J. Formulae for volumes, surface areas and radii of gyration of spheres, ellipsoids and spheroids. *The Mathematical Gazette*, 1960, 44, 437, 15-19. <https://www.jstor.org/stable/3608515>
- Smrkolj, T. Oblika eritrocita in njegova deformabilnost pri spremenjenih zunanjih pogojih. *Med. Razgl.*, 2000, 39, 23-31. <https://www.dlib.si/stream/URN:NBN:SI:DOC-0CD0GYY8/bb154272-7cbf-424e-a326-972814dd87af/PDF>

- Théry, C.; Witwer, W. K.; Aikawa, E.; Alcaraz, M. J.; Anderson, J. D.; Andriantsitohaina, R.; Antoniou, A.; Arab, T.; Archer, F.; Atkin-Smith, G. K.; ...; Zuba-Surma, E. K. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J. Extracell. Vesicles*, 2018, 7, 1, 1535750. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>
- Vozel D. Uporaba plazme, bogate s trombociti in zunajceličnimi vezikli, za zdravljenje kroničnih vnetij pooperativnih votlin senčnice. Doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Ljubljana, Slovenija, 2020. Dostopno na spletu: <https://repozitorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=136563&lang=slv> (Obiskano 10. februarja 2022).
- Vozel, D.; Božič, D.; Jeran, M.; Jan, Z.; Pajnič, M.; Paden, L.; Steiner, N.; Kralj-Iglič, V.; Battelin, S. Autologous platelet- and extracellular vesicle-rich plasma is an effective treatment modality for chronic postoperative temporal bone cavity inflammation: randomized controlled clinical trial. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2021, 9, 677541. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.677541>
- Wehner, F., Olsen, H., Tinel, H., Kinne-Saffran, E., Kinne, R. K. H. Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport and signal transduction. V: *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*; Helene, S; Pedersen, F., ur., Springer, Berlin, Heidelberg; 2003; Vol. 148., 1-80. <https://doi.org/10.1007/s10254-003-0009-x>
- Wikipedia. Sferoid. 2017. Dostopno na spletu: <https://sl.wikipedia.org/wiki/Sferoid> (Obiskano 10. marca 2022).
- Yáñez-Mó, M.; Siljander; R.-M. P.; Andreu, Z.; Zavec, A. B.; Borràs, F. E.; Buzas, E. I.; Buzas, K.; Casal, E.; ...; de Wever, O. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J. Extracell. Vesicles*, 2015, 4, 27066. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>
- Yaya, F. 2021. Physical properties of red blood cells in aggregation. Université Grenoble Alpes & Universität des Saarlandes, 2021. Dostopno na spletu: https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-03281595/file/YAYA_2021_archivage.pdf (Obiskano 19. februarja 2022).
- Yoshihito, Y. Cell membrane: the red blood cell as a model. Wiley-VCH Verlag GmbH: Darmstadt, 2006.
- Zelič, K. Elektronski mikroskop. *FMF Revija*, 2010. <https://revija.fmf.si/2010/02/elektronski-mikroskop/>

PRILOGE

Tabela 4: Analiza parametrov v vzorcu z osmolarnostjo 50 mOsmol/L (2 x mala polos a , velika polos b , prostornina V , površina S in relativni volumen ν).

#	a (nm)	b (nm)	V (nm ³)	S (nm ²)	ν
1	109,37	109,37	684629	37559	1
2	87,44	87,44	349863	24007	1
3	73,98	73,98	211864	17184	1
4	100,69	100,69	534304	31837	1
5	67,04	67,04	157659	14111	1
6	79,67	79,67	264614	19929	1
7	67,04	67,04	157659	14111	1
8	67,04	67,04	157659	14111	1
9	67,04	67,04	157659	14111	1
10	86,81	86,81	342419	23666	1
11	67,04	67,04	157659	14111	1
12	86,81	86,81	342419	23666	1
13	83,97	83,97	309844	22140	1
14	88,55	88,55	363361	24621	1
15	82,23	82,23	291033	21234	1
16	111,10	111,10	717729	38760	1
17	60,79	60,79	117571	11604	1
18	82,72	82,72	296221	21486	1
19	93,13	93,13	422711	27234	1
20	70,51	70,51	183429	15610	1
21	90,28	90,28	385140	25595	1
22	100,69	100,69	534304	31837	1
23	88,55	88,55	363361	24621	1
24	90,28	90,28	385140	25595	1
25	57,95	57,95	101823	10543	1
26	85,08	85,08	322298	22729	1
27	90,28	90,28	385140	25595	1
28	92,92	92,92	419883	27112	1
29	106,59	106,59	633811	35677	1
30	121,51	121,51	938955	46363	1
31	80,71	80,71	275122	20453	1
32	92,02	92,02	407772	26588	1
33	81,61	81,61	284452	20913	1
34	81,61	81,61	284452	20913	1
35	81,61	81,61	284452	20913	1
36	50,17	50,17	66100	7905	1
37	104,16	104,16	591464	34069	1
38	81,61	81,61	284452	20913	1
39	92,02	92,02	407772	26588	1
40	81,61	81,61	284452	20913	1

41	85,08	85,08	322298	22729	1
42	83,34	83,34	302981	21812	1
43	78,14	78,14	249690	19172	1
44	86,81	86,81	342419	23666	1
45	99,86	99,86	521157	31313	1
46	86,81	86,81	342419	23666	1
47	51,63	51,63	72029	8370	1
48	72,94	72,94	203046	16703	1
49	85,98	85,98	332660	23214	1
50	83,14	83,14	300716	21703	1
51	85,98	85,98	332660	23214	1
52	77,24	77,24	241141	18732	1
53	75,29	75,29	223396	17802	1
54	92,92	92,92	419883	27112	1
55	85,98	85,98	332660	23214	1
56	79,25	79,25	260486	19721	1
57	72,73	72,73	201312	16608	1
58	70,09	70,09	180198	15426	1
59	72,31	72,31	197874	16419	1
60	86,61	86,61	339962	23552	1
61	92,92	92,92	419883	27112	1
62	83,14	83,14	300716	21703	1
63	85,98	85,98	332660	23214	1
64	85,98	85,98	332660	23214	1
65	85,98	85,98	332660	23214	1
66	86,61	86,61	339962	23552	1
67	84,87	84,87	319938	22618	1
68	64,26	64,26	138874	12967	1
69	77,93	77,93	247700	19070	1
70	57,53	57,53	99644	10392	1
71	59,68	59,68	111245	11184	1
72	85,98	85,98	332660	23214	1
73	72,94	72,94	203046	16703	1
74	66,00	66,00	150428	13676	1
75	79,67	79,67	264614	19929	1
76	78,14	78,14	249690	19172	1
77	104,16	104,16	591464	34069	1
78	79,67	79,67	264614	19929	1
79	85,98	85,98	332660	23214	1
80	85,98	85,98	332660	23214	1
81	85,98	85,98	332660	23214	1
82	75,29	75,29	223396	17802	1
83	74,67	74,67	217883	17508	1
84	104,16	104,16	591464	34069	1
85	85,98	85,98	332660	23214	1
86	92,92	92,92	419883	27112	1

Tabela 5: Analiza parametrov v vzorcu z osmolarnostjo 300 mOsmol/L ($2 \times$ mala polos a , $2 \times$ velika polos b , prostornina V , površina S in relativni volumen v).

#	$2a$ (nm)	$2b$ (nm)	V (nm 3)	S (nm 2)	v
1	91	104	455910	28731	1,00
2	76	76	233285	18323	1,00
3	80	186	616289	38959	0,85
4	77	111	345934	24350	0,97
5	66	91	205049	17125	0,97
6	90	90	387014	25678	1,00
7	62	131	259490	21451	0,88
8	59	106	189954	16894	0,92
9	84	116	433400	28168	0,97
10	75	180	531959	35502	0,85
11	88	88	357731	24366	1,00
12	84	116	433400	28168	0,97
13	94	94	430119	27551	1,00
14	77	156	487537	32305	0,89
15	72	104	279633	21143	0,97
16	60	140	266066	22244	0,85
17	136	201	1944643	77264	0,96
18	95	95	450288	28406	1,00
19	79	79	255394	19463	1,00
20	83	83	303718	21847	1,00
21	82	132	463931	30070	0,95
22	109	109	680595	37411	1,00
23	81	152	523430	33411	0,91
24	75	213	624862	41174	0,80
25	102	102	557504	32752	1,00
26	76	222	676176	43651	0,79
27	67	159	378523	28206	0,85
28	94	232	1062293	56740	0,84
29	70	107	275976	21087	0,96
30	86	86	329964	23088	1,00
31	86	86	330012	23090	1,00
32	126	126	1035213	49480	1,00
33	85	233	884549	51421	0,81
34	61	133	259951	21588	0,87
35	91	197	857825	47710	0,88
36	66	143	322984	24913	0,87
37	70	70	181080	15476	1,00
38	102	102	557504	32752	1,00
39	86	86	330012	23090	1,00
40	89	89	368848	24868	1,00
41	70	119	307830	23059	0,93
42	82	82	287540	21064	1,00

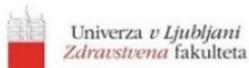
43	59	126	227757	19704	0,88
44	63	131	273832	22112	0,89
45	110	110	696291	37984	1,00
46	59	98	176054	15858	0,94
47	70	70	181593	15505	1,00
48	93	93	417853	27025	1,00
49	87	87	340501	23577	1,00
50	88	88	357731	24366	1,00
51	55	253	399381	34977	0,65
52	107	186	1112099	54497	0,93
53	56	89	146791	13925	0,95
54	111	111	725247	39030	1,00
55	54	103	156371	14980	0,91
56	73	124	341755	24745	0,93
57	55	55	85774	9404	1,00
58	86	86	329964	23088	1,00
59	77	147	460227	30759	0,91
60	72	165	443938	31189	0,86
61	75	159	470839	31839	0,88
62	66	138	310247	24109	0,88
63	116	116	806650	41899	1,00
64	54	119	180931	17010	0,87
65	99	99	509875	30859	1,00
66	75	186	545956	36436	0,83
67	73	104	288537	21568	0,97
68	83	83	295067	21430	1,00
69	84	119	444319	28722	0,97
70	72	87	238195	18687	0,99
71	83	152	545104	34217	0,92
72	84	110	408617	26937	0,98
73	74	148	425680	29469	0,89
74	90	90	378670	25308	1,00
75	66	147	331227	25536	0,86
76	82	145	511543	32566	0,93
77	43	90	85348	10199	0,88
78	132	132	1209048	54875	1,00
79	96	116	558153	32977	0,99
80	102	130	706437	38736	0,99
81	106	106	626014	35383	1,00
82	69	119	300503	22735	0,93
83	73	73	206904	16914	1,00
84	89	89	364231	24660	1,00
85	59	59	109426	11062	1,00
86	96	123	590318	34374	0,98
87	94	94	439026	27930	1,00
88	78	78	247692	19070	1,00

89	68	144	344142	25913	0,88
90	120	120	915603	45591	1,00
91	91	121	518060	31630	0,98
92	80	80	272116	20304	1,00
93	61	77	151873	13889	0,99
94	78	78	251943	19288	1,00
95	45	180	193660	20664	0,69
96	66	126	283090	22257	0,91
97	56	109	179691	16476	0,90
98	54	123	187107	17492	0,86
99	69	126	314985	23709	0,92
100	94	94	440996	28013	1,00
101	59	161	297701	24856	0,81
102	102	102	551690	32524	1,00
103	97	132	654172	37020	0,98
104	82	132	464055	30078	0,95
105	57	57	97110	10215	1,00
106	81	170	581668	36610	0,88
107	92	138	613053	35847	0,96
108	82	111	390131	26223	0,98
109	63	109	227289	18877	0,93

ODTIS OBJAVLJENE PUBLIKACIJE

Prvi rezultati pričajočega raziskovalnega dela so bili *poslani* in *sprejeti* v mednarodno publikacijo *Proceedings of Socratic Lectures* (2022), ki bo izšla v sklopu konference s področja klinične biofizike. V teku je trenutno še priprava druge publikacije.

Slika 8: Povzetek sprejete objave.



<i>Scientific contribution</i>	1
Using a physical approach to study morphological properties of erythrocyte extracellular vesicles	2
Jozelj M ^{1,2} , Košir T ^{1,2} , Božič D ^{1,2,‡} , Hočvar M ³ , Pajnič M ² , Iglič A ^{1,4} , Kralj-Iglič V ^{2,*} , Jeran M ^{1,2,*}	4
1 University of Ljubljana, Faculty of Electrical Engineering, Laboratory of Physics, Ljubljana, Slovenia	5
2 University of Ljubljana, Faculty of Health Sciences, Laboratory of Clinical Biophysics, Ljubljana, Slovenia	6
3 Department of Physics and Chemistry of Materials, Institute of Metals and Technology, Ljubljana, Slovenia	7
4 University of Ljubljana, Faculty of Medicine, Laboratory of Clinical Biophysics, Ljubljana, Slovenia	8
* Correspondence: Veronika Kralj-Iglič: veronika.kralj-iglič@fe.uni-lj.si & Marko Jeran: marko.jeran@fe.uni-lj.si	9
‡ Present address: BIA Separations, Ajdovščina, Slovenia	10
JM and KT, and KIV and JM, respectively, contributed equally to this work.	11
	12
Abstract: Extracellular vesicles (EVs) are membrane-enclosed structures of nanometer dimensions. They are formed by cells and can be found in isolates from body fluids. It is indicated that they play important role in intercellular communication in health and disease. In this work we observed the morphological parameters of EVs isolated by differential centrifugation from washed erythrocytes, in which vesiculation was accelerated by addition of detergent (sodium dodecyl sulfate). Isolates were aliquoted and embedded in suspensions of two different osmolarities. Isolates were imaged with a scanning electron microscope and the images were analyzed by using the contours of EVs from which the volume V , surface area A , and relative volume $v = (36\pi A^3/V^2)^{1/2}$ were assessed by a geometrical model. EVs were considered as spheres or spheroids. The isolates were rich in erythrocyte EVs so that representative sets (86 vesicles at osmolarity of 50 mOsmol/L and 109 vesicles at osmolarity of 300 mOsmol/L) could be outlined. The EVs at osmolarity of 50 mOsmol/L had shapes close to a sphere, while at osmolarity of 300 mOsmol/L they had elongated shapes that were approximated by prolate spheroids. The average volume/surface area of EVs at osmolarity 50 mOsmol/L were 3.18×10^{-5} nm ³ / 2.20×10^4 nm ² and at osmolarity 300 mOsmol/L they were 4.3×10^{-5} nm ³ / 2.79×10^4 nm ² . The respective differences in favor of the values at 300 mOsmol/L were statistically significant and of sufficient power. The relative volume of EVs at 50 mOsmol/L and 300 mOsmol/L were 1 and 0.96, respectively. While the difference in v suggests that, similarly to erythrocytes, water enters EVs in order to attain the Donnan equilibrium, the differences in V and A suggest that selective popping of (larger) EVs in the hypoosmolar sample took place.	13
Keywords: Extracellular vesicles, erythrocytes, osmolarity, differential centrifugation, scanning electron microscopy (SEM), morphology, interdisciplinary connection, medicine	32
	33
	34

Citation: Jozelj M, Košir T, Božič D, Hočvar M, Pajnič M, Iglič A, Kralj-Iglič V, Jeran M. Using a physical approach to study morphological properties erythrocyte extracellular vesicles. *Proceedings of Socratic Lectures*. 2022. Accepted.

Publisher's Note: UL ZF stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).