

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Sandra KURE

FENOLNE SPOJINE IN FLUIDNOST CELIČNIH MEMBRAN

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

PHENOLIC COMPOUNDS AND CELL MEMBRANE FLUIDITY

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo v laboratoriju Katedre za kemijo, Oddelek za živilstvo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani in v laboratoriju za biofiziko, Oddelek za trdno snov, Inštitut Jožef Stefan, Ljubljana.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Veroniko Abram, za somentorico dr. Marjetu Šentjurc in za recenzentko doc. dr. Barbaro Jeršek.

Mentorica: prof. dr. Veronika Abram

Somentorica: dr. Marjeta Šentjurc

Recenzentka: doc. dr. Barbara Jeršek

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Sandra Kure

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD Dn
DK UDK 577.3 + 577.1: 547.56 (043) = 863
KG biološke membrane / modelne membrane / kamferol / fluidnost membran / EPR / elektronska paramagnetna resonanca / vgrajevanje kamferola v membrane / vpliv temperature / fluorescenčna spektrometrija / *Staphylococcus aureus*
AV KURE, Sandra
SA ABRAM, Veronika (mentorica) / ŠENTJURC, Marjeta (somentorica) / JERŠEK, Barbara (recenzentka)
KZ 1000 Ljubljana, SLO, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2006
IN FENOLNE SPOJINE IN FLUIDNOST CELIČNIH MEMBRAN
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XI, 69 str., 8 pregl., 44 sl., 78 vir.
IJ sl
JI sl / en
AI Namen naloge je bil ugotoviti, kako vpliva kamferol, kot eden izmed flavonoidov, na fluidnost bioloških in modelnih membran. Da bi bolje razumeli mehanizem protimikrobnega delovanja kamferola, ki so ga identificirali v listih netreska *Sempervivum tectorum*, smo proučevali vpliv kamferola na membrane eritrocitov in liposomov z metodo elektronske paramagnetne resonance (EPR) in s fluorescenčno emisijsko spektrometrijo. Za opazovanje z EPR smo v membrane vgradili spinsko označeni metilni ester palmitinske kisline MeFASL (10,3), ki se giblje skladno z molekulami okolice. Dobljeni spektri tako odražajo ureditev in dinamiko alkilnih verig lipidnega dvosloja. Te lastnosti pa so odvisne od fluidnosti membrane, ki je obratno sorazmerna viskoznosti. Pri liposomih je vgrajeni kamferol zmanjšal fluidnost membrane in sicer že pri najmanjši uporabljeni koncentraciji (0,7 mg/mL). Z večanjem koncentracije kamferola (1,3 mg/mL in 2,6 mg/mL) ni bistvenega vpliva na spremembo fluidnosti membrane. Dodatek kamferola ni imel učinka na membrano eritrocitov zaradi hemolize, ki jo je povzročil dimetilsulfoksid (DMSO), v katerem je bil raztopljen kamferol. Z metodo fluorescenčne emisijske spektrometrije smo spremljali kinetiko vgrajevanja kamferola v membrano liposomov pri temperaturi 25 in 60 °C. Ugotovili smo, da je kamferol hitreje prehajal v membrane pri višji temperaturi. Čas vgraditve kamferola v membrane liposomov je bil najkrajši pri največji dodani koncentraciji kamferola, in sicer se je kamferol s koncentracijo 0,34 mM vgradil v membrane že po 10 minutah. Fluorescensa liposomov z vgrajenim kamferolom je s temperaturo padala. Z merjenjem intenzitete emitirane svetlobe pri prehodu kamferola v citoplazemske membrano bakterij vrste *Staphylococcus aureus* smo poskušali preveriti protimikroben učinek kamferola, vendar smo dobili rezultate, ki so se zelo spremenjali.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Dn
DC UDC 577.3 + 577.1: 547.56 (043) = 863
CX biological membranes / model membranes / kaempferol / membrane fluidity / EPR / electron paramagnetic resonance / incorporation of kaempferol into the membrane / influence of temperature / fluorescence spectroscopy / *Staphylococcus aureus*
AU KURE, Sandra
AA ABRAM, Veronika (supervisor) / ŠENTJURC, Marjeta (co-advisor) / JERŠEK, Barbara (reviewer)
PP SI - 1000 Ljubljana, SLO, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
LI 2006
IN PHENOLIC COMPOUNDS AND CELL MEMBRANE FLUIDITY
TD Graduation Theses (University studies)
NO XI, 69 p., 8 tab., 44 fg., 78 ref.
LA sl
AL sl /en
AB The purpose of our thesis was to find out how kaempferol, one of the flavonoids, influences the fluidity of biological and model membrane. In order to get a detailed insight into the mechanism of antimicrobial action of kaempferol, which has been identified in *Sempervivum tectorum* leaves, we have investigated the effect of kaempferol on erythrocyte and liposome membranes using the electron paramagnetic resonance (EPR) and fluorescence emission spectroscopy. For the observation with EPR a spin-labeled methyl ester of palmitic acid MeFASL (10,3) has been incorporated into the membrane, which moves in balance with the surrounding molecules. The obtained spectra reflect the arrangement and dynamics of alkylic chains in the lipid bilayer. These properties depend on membrane fluidity, which is in inverse proportion to viscosity. The incorporated kaempferol decreased the membrane fluidity in liposomes already at the lowest concentration used (0,7 mg/mL). As the kaempferol concentration increases there (1,3 mg/mL and 2,6 mg/mL) is no additional impact on the membrane fluidity. The addition of kaempferol had no influence on membranes of erythrocytes due to the hemolysis, which was caused by dimethylsulfoxid (DMSO), in which the kaempferol was diffused. With the fluorescence emission spectroscopy we studied kinetics of incorporating of kaempferol into the liposome membrane at 25 °C and 60 °C. We have found out that the incorporation of the kaempferol into the membranes is faster at higher temperatures. The time of the kaempferol incorporation into the membrane liposome was the shortest with the highest concentration of the kaempferol addition and at 0,34 mM it was incorporated in 10 minutes. The fluorescence intensity of the liposome with the incorporated kaempferol decreased with the decrease in temperature. Our goal was to examine the antimicrobial action of kaempferol with the use of fluorescence emission spectroscopy while the crossing of the kaempferol into the bacterium *Staphylococcus aureus*. The results we have obtained vary a lot.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI).....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA.....	2
1.2 DELOVNA HIPOTEZA.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 MEMBRANE.....	3
2.1.1 Biološke membrane.....	3
2.1.1.1 Membranski proteini.....	7
2.1.1.2 Eritrociti.....	7
2.1.2 Modelne membrane – liposomi.....	8
2.1.3 Membrana grampozitivnih bakterij.....	10
2.2 FENOLNE SPOJINE.....	12
2.2.1 Flavonoidi.....	13
2.2.2 Prosti radikali.....	14
2.2.3 Antioksidativno delovanje polifenolov.....	15
2.2.4 Protimikrobnno delovanje polifenolov.....	16
2.2.5 Kamferol.....	16
2.2.6 Mehanizem delovanja polifenolnih spojin.....	18
2.2.7 β-sitosterol.....	18
3 MATERIAL IN METODE.....	19
3.1 MATERIALI.....	19
3.2 PRIBOR IN OPREMA.....	20
3.3 METODE DELA.....	21
3.3.1 Elektronska paramagnetna resonanca (EPR).....	21
3.3.1.1 Osnove EPR.....	21
3.3.1.2 Spinski označevalci.....	24
3.3.1.3 Opis spektrometra EPR.....	25
3.3.2 Postopek priprave eritrocitov.....	27
3.3.2.1 Vpliv kamferola na fluidnost membrane eritrocitov.....	27
3.3.3 Postopek priprave liposomov.....	28
3.3.3.1 Priprava liposomov s kamferolom.....	28
3.3.3.2 Priprava liposomov z β -sitosterolom in holesterolom.....	28
3.3.3.3 Spinsko označevanje liposomov.....	28
3.3.3.4 Določitev notranjega volumna liposomov.....	29
3.3.4 Fotonska korelacijska spektroskopija (PCS).....	30
3.3.4.1 Določanje velikosti liposomov.....	31
3.3.4.2 Določanje zeta potenciala liposomov.....	32

3.3.5	DSC analiza liposomov.....	32
3.3.6	Fluorescenčna emisijska spektrometrija liposomov.....	33
3.3.6.1	Osnove fluorescenčne spektrometrije.....	33
3.3.6.2	Spremljanje intenzitete fluorescence liposomov po dodatku kamferola.....	36
3.3.6.3	Vpliv temperature na lastnosti kamferola v membranah liposomov.....	37
3.3.6.4	Titracija kamferola z liposomi.....	37
3.3.7	Fluorescenčna emisijska spektrometrija celic bakterij vrste <i>S. aureus</i>.....	38
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	40
4.1	EPR SPEKTROMETRIJA ERITROCITOV.....	40
4.1.1	Kinetika vgrajevanja kamferola v membrane eritrocitov.....	40
4.2	EPR SPEKTROMETRIJA LIPOSOMOV.....	41
4.2.1	Vpliv kamferola na membrane liposomov.....	41
4.2.2	Vpliv β-sitosterola in holesterola na membrane liposomov.....	44
4.2.3	Notranji volumen in stabilnost liposomov.....	45
4.3	PCS LIPOSOMOV.....	46
4.3.1	Velikost liposomov.....	46
4.3.2	Zeta potencial liposomov.....	47
4.4	DSC MERITEV LIPOSOMOV.....	48
4.5	FLUORESCENČNA SPEKTROMETRIJA LIPOSOMOV.....	49
4.5.1	Kinetika vgrajevanja kamferola v membrane liposomov.....	49
4.5.2	Vpliv temperature na lastnosti kamferola v membranah liposomov.....	50
4.5.3	Vgrajevanje kamferola v membrane liposomov pri 25 in 60 °C.....	52
4.5.4	Vgrajevanje kamferola pri manjši koncentraciji liposomov.....	54
4.5.5	Titracija kamferola z liposomi.....	55
4.6	FLUORESCENČNA SPEKTROMETRIJA CELIC BAKTERIJ VRSTE <i>S. aureus</i>	56
4.6.1	Kinetika vgrajevanja kamferola v membrane celic bakterij vrste <i>S. aureus</i>... .	57
5	SKLEPI	59
6	POVZETEK.....	61
7	VIRI.....	63

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

	stran
Preglednica 1: Razvrstitev fenolnih spojin po številu C-atomov (Abram, 2000: 25, 30).....	13
Preglednica 2: Vsebnost kamferola in ostalih flavonoidov v posameznih živilih (Miean in Suhaila, 2001: 3111), (Shan in sod., 2005: 7755)	17
Preglednica 3: Eksperimentalni parametri za meritve spinsko označenih eritrocitov na EPR.....	27
Preglednica 4: Eksperimentalni parametri za meritve spinsko označenih liposomov na EPR.....	29
Preglednica 5: Parametri merjenja s fluorimetrom	37
Preglednica 6: Časovno spremenjanje velikosti liposomov brez in z vgrajenim kamferolom različnih koncentracij. Meritev je potekala pri 25 °C.....	46
Preglednica 7: Časovno spremenjanje zeta potenciala liposomov brez in z vgrajenim kamferolom različnih koncentracij. Meritev je potekala pri 25 °C.....	47
Preglednica 8: Ocena števila celic bakterij vrste <i>S. aureus</i> glede na cepljene razredčitve pred in po meritvi na fluorimetru	58

KAZALO SLIK

	stran
Slika 1: Zgradba celične membrane (Olson, 2000: 4).....	3
Slika 2: Zgradba fosfolipida (fosfatidilholin) (Blume, 1994: 1)	4
Slika 3: Premikanje lipidov po dvosloju membrane (Muller, 2004: 4).....	5
Slika 4: Strukturna formula holesterola (McMullen in sod., 1993: 517)	6
Slika 5: Fluidno membrano tvorijo fosfolipidi z nenasičenimi maščobnimi kislinami (A), vezan holesterol zmanjša fluidnost membrane (B) (Mallery, 2005: 1).....	6
Slika 6: Zgradba eritrocitove membrane (Freitas, 1999: 153)	8
Slika 7: Porazdelitev lipidov v obeh slojih membrane eritrocitov (Voet in Voet, 2004: 406)	8
Slika 8: Prečni prerez velikega večslojnega liposoma (MLV) (Model membranes, 2004: 2)	9
Slika 9: Fosfolipidi organizirani v mehurček – enoslojni liposom (ULV) (Liposomes, 2005: 1)	9
Slika 10: Štiri osnovni tipi liposomov glede na funkcionalnost (Lasic, 1993: 9)	10
Slika 11: Zgradba celične stene in citoplazemske membrane grampozitivnih bakterij (Madigan in sod., 1997: 74)	11
Slika 12: Peptidoglikanska mreža v celični steni bakterij (Madigan in sod., 1997: 73)	11
Slika 13: Strukturna formula flavonoidov in možna razporeditev substituent (R – R ₆) na aromatskih obročih (Saville in sod., 2001: 220)	14
Slika 14: Navadni netresk (<i>Sempervivum tectorum</i>) (Malke, 2005: 1)	16
Slika 15: Strukturna formula kamferola (Pietta, 2000: 1036).....	17
Slika 16: Strukturna formula β-sitosterola (Chemicalland21. com, 2000: 1)	18
Slika 17: Princip EPR - energijski nivoji nitroksidnega radikala v magnetnem polju (Štrancar, 2004: 2).....	23
Slika 18: Spekter EPR – absorpcijski spekter nitroksidnega radikala in njegov prvi odvod (Štrancar, 2004: 2).....	23

Slika 19: Splošna struktturna formula nitroksidnega radikala in prikaz π orbital (Nishide in Suga, 2005: 33)	24
Slika 20: Spinski označevalci MeFASL (10,3) z molsko maso 338 g/mol (Štrancar, 2000: 27)	24
Slika 21: Spinski označevalci v lipidnem dvosloju (Štrancar in sod., 2001: 1)	25
Slika 22: Spektrometer EPR za merjenje paramagnetnih molekul v magnetnem polju (EPR spektrometer Bruker BioSpin, 2005: 1).....	25
Slika 23: Blok shema spektrometra EPR (Rieger, 1988: 7).....	26
Slika 24: Spinski označevalci ASL z molsko maso 373 g/mol (Caron in Dugas, 1976: 20) ..	29
Slika 25: (A) shema fluktuacije v intenziteti svetlobe glede na velikost delcev; (B) hitrost padanja korelacijske funkcije (Rowle, 2003: 3)	31
Slika 26: Termogram DSC za MLV liposome pripravljene iz dimiristoilfosfatidilholina (DMPC) in N-palmitoil-sfingosina (C 16:0-ceramid) (Holopainen in sod., 2000: 2462)	33
Slika 27: Energijski diagram – proces od absorpcije do emisije svetlobe (Cantor, 2006: 1) ..	34
Slika 28: Shema fluorimetra; ima 2 monokromatorja (Rotomskis in sod., 2001: 484)	35
Slika 29: Fluorimeter za merjenje fluorescence (Fluorescence spectrophotometer Holger, 2003: 1)	36
Slika 30: Primerjava eksperimentalnih EPR spektrov eritrocitov brez in z vgrajenim kamferolom	40
Slika 31: Primerjava eksperimentalnih EPR spektrov liposomov brez in z vgrajenim kamferolom koncentracije 1,3 mg/mL	42
Slika 32: Temperaturna odvisnost maksimalnega hiperfinega razcepa $2A_{\max}$ spinskega označevalca MeFASL (10,3) v membranah liposomov.....	43
Slika 33: Temperaturna odvisnost maksimalnega hiperfinega razcepa $2A_{\max}$ spinskega označevalca MeFASL v membranah liposomov z vgrajenim β -sitosterolom in holesterolom.....	44
Slika 34: Časovno spremeljanje sprememb stabilnosti liposomov brez in z vgrajenim kamferolom	46
Slika 35: DSC termogram MLV (veliki večslojni liposomi) in ULV (majhni enoslojni liposomi)	48

Slika 36: Fluorescenčni emisijski spekter liposomov brez dodanega kamferola.....	49
Slika 37: Časovna odvisnost intenzitete fluorescence MLV liposomov pri različnih koncentracijah kamferola	50
Slika 38: Spremljanje intenzitete fluorescence liposomov MLV z že vgrajenim kamferolom in intenzitete fluorescence samega kamferola v destilirani vodi kot funkcija temperature.....	51
Slika 39: Primerjava spektra liposomov z vgrajenim kamferolom s spektrom kamferola v destilirani vodi po končanem 1-kratnem segrevanju (A) in po končanem 2-kratnem segrevanju (B) do 90 °C	52
Slika 40: Časovna odvisnost fluorescenčne intenzitete liposomov po dodatku kamferola pri dveh različnih temperaturah (25 in 60 °C)	53
Slika 41: (A) spremjanje intenzitete fluorescence liposomov MLV pri 25 in 60 °C kot funkcija časa.(B) spektra liposomov MLV z vgrajenim kamferolom po 60 minutnem merjenju	54
Slika 42: titracija kamferola z liposomi	55
Slika 43: Emisijski spekter bakterijskih celic <i>Staphylococcus aureus</i> v fiziološki raztopini ..	56
Slika 44: (A) časovna odvisnost fluorescenčne intenzitete celic S. aureus v fiziološki raztopini po dodatku kamferola pri 25 in 60 °C. (B) emisijski spekter bakterijskih celic S. aureus z vgrajenim kamferolom po 100 minutah segrevanja pri 25 in 60 °C.....	57

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

E	energija
EPR	elektronska paramagnetna resonanca
G+ bakterije	grampozitivne bakterije
HEPES	N- (2-hidroksietil) piperazin-N'- (2-etan-sulfonska kislina)
KA	kamferol
MK	maščobne kisline
Na-askorbat	natrijev askorbat
OD ₆₀₀	optična gostota pri valovni dolžini 600 nm
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
T	temperatura
UV	ultravijolično

1 UVOD

Membrane predstavljajo eno izmed najpomembnejših celičnih struktur v vsakem organizmu (prokarionti, evkarionti) in so odgovorne za transport snovi v in iz celice. Vse membrane imajo podobno zgradbo, ki je sestavljena iz dvojnega sloja fosfolipidov v katerega so vgrajeni proteini. Vsaka membrana ima drugačno membransko selektivnost, ki je odvisna od strukture in funkcije membrane. Različne biološko aktivne substance imajo močan vpliv na fluidnost membrane. Na ta način vplivajo na procese v membrani kot so transport, značilnosti receptorjev in posledično na celično rast, diferenciacijo in transformacijo (Šentjurc in sod., 2002).

Fenolne spojine imajo pomembno vlogo tako v rastlinskem svetu kot tudi v prehrani ljudi. S sintezo antioksidativnih zaščitnih snovi (predvsem fenolne spojine s trpkimi in grenačkimi snovmi) se rastline ščitijo pred napadi virusov, bakterij in tudi rastlinojedih organizmov ter pred nevarnimi sončnimi žarki, ki sprožajo nastanek prostih radikalov. Rastline in sadje vsebujejo vitamin C, vitamin E, karotenoide ter različne fenolne snovi, zlasti flavonoide. Številne epidemiološke študije kažejo povezavo med uživanjem hrane in pihač, ki vsebujejo veliko flavonoidov in zmanjšanjem nastanka mnogih bolezni modernega življenja, ki jih povzroča oksidativni stres. Flavonoidi naj bi delovali preventivno tudi pred procesi staranja (Vrhovšek, 2001).

V zadnjem času je v svetu vse večje zanimanje za naravne zdravilne učinkovine, ki izvirajo iz rastlin. Nekatere od teh sestavin uporabljajo v živilski industriji kot naravne konzervante in antioksidante, ki omogočajo podaljšano ohranjanje nekaterih živil ali pa za izboljšanje kakovosti izdelka. Njihova osnovna funkcija je preprečevati oksidacijo biološko in senzorično pomembnih komponent živil (Raspor in sod., 2000).

Ugotovljeno je bilo, da ima večina fenolnih spojin precej širok spekter protimikrobnega delovanja, učinkujejo lahko tako bakteriostatično kot fungistatično. Homogenizirani listi netreska *Sempervivum tectorum* so bolj ali manj zavrlji rast 7 izbranih mikroorganizmov. Antimikrobni učinek listov netreska je bil najbolje viden pri bakteriji *Staphylococcus aureus*, saj so v netresku prisotne različne fenolne spojine (Donko, 1995). Kasneje so v netresku identificirali dva flavonoida, eden od njiju je bil kamferol (Abram in Donko, 1999).

Nas je zanimalo, kako vpliva kamferol na permeabilnost membran, saj je kamferol zaradi svojih strukturnih značilnosti lipofilen. Z metodo elektronske paramagnetne rezonance (EPR) smo opazovali vpliv kamferola na spremembo fluidnosti membran pri eritrocitih in liposomih. Z metodo fluorescenčne spektrometrije pa smo opazovali spremembo intenzitete emitirane svetlobe pri prehodu kamferola v membrane liposomov in v membrane bakterijskih celic *Staphylococcus aureus*, ker smo želeli preveriti protimikrobni učinek kamferola.

1.1 NAMEN DELA

Namen raziskav v okviru diplomskega dela je bilo ugotoviti, kakšne spremembe povzroča kamferol v fluidnosti in obstojnosti membran. Zato, da dobimo podrobnejši vpogled v mehanizem protimikrobne in antioksidativne aktivnosti kamferola, smo raziskovali vpliv kamferola na eritrocite in liposome.

1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Predvidevali smo, da kamferol vpliva na spremembo fluidnosti tako pri bioloških (eritrociti) kot pri modelnih membranah (liposomi).

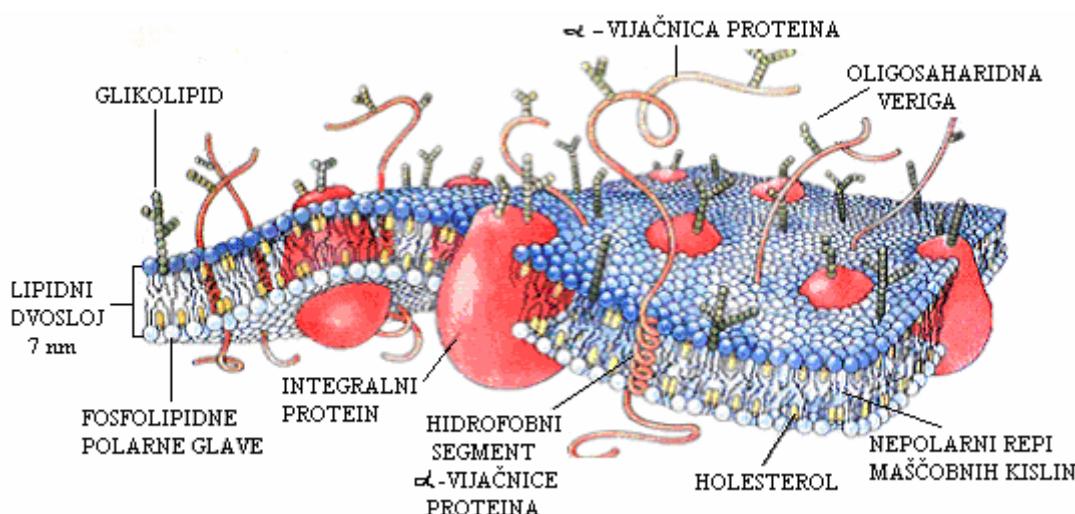
Da bi preverili delovno hipotezo, smo membrane eritrocitov in liposomov proučevali z metodo elektronske paramagnetne rezonance (EPR), pri čemer smo za opazovanje ureditve in dinamike alkilnih verig lipidnega dvsloja uporabili spinsko označeni metilni ester palmitinske kisline (MeFASL). Z metodo fluorescenčne emisijske spektrometrije pa je bilo bistvo raziskovanje emisije fluorescence kamferola pri vgrajevanju v membrane liposomov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MEMBRANE

2.1.1 Biološke membrane

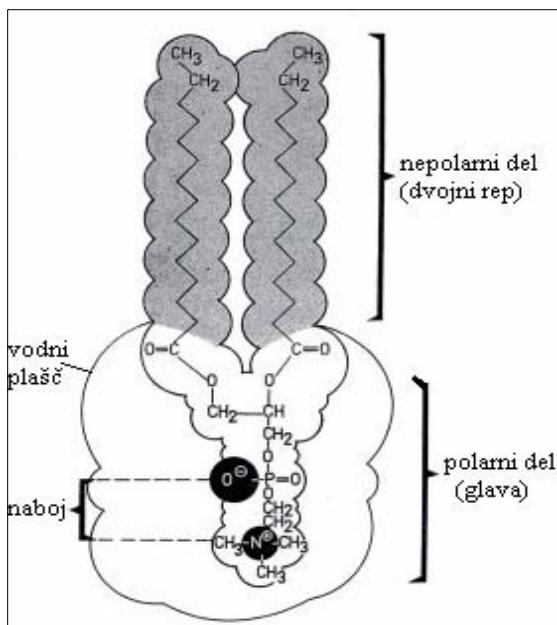
Vpliv fenolnih spojin na biološke membrane (slika 1) smo proučevali na membranah govejih eritrocitov. Celična membrana (plazmalema) je tanka opna debeline 7 – 8 nm, ki popolnoma obdaja celico, preprečuje izlitje celične vsebine in zagotavlja kontroliran prehod snovi med citoplazmo in okoljem. V membranah eritrocitov so prisotni različni lipidi (43 %) med katerimi najdemo fosfolipide, sfingolipide, holesterol, proteini (49 %) in ogljikovi hidrati (8 %). Membrane ne vsebujejo prostih ogljikovih hidratov, ampak so ti kovalentno vezani na lipide (glikolipidi) med katerimi je veliko gangliožidov in proteinske molekule (glikoproteini), mnogi med njimi z oligosaharidnimi strukturami na zunanjih strani celičnih membran, imenovan tudi glikokaliks. Te strukture so še mnogo večje in bolj razvejane kot tiste pri glikolipidih, saj je v povprečju v enem takem glikoproteinu med 10 in 20 sladkornih ostankov. Zato imajo lahko znatno večji vpliv na dinamiko in ureditev lipidov v membrani. Sistem lipidov, proteinov in sladkornih struktur je povezana celota in se kot taka odziva na spremembe oz. dražljaje iz okolice (Štrancar, 2000).



Slika 1: Zgradba celične membrane (Olson, 2000: 4)

Osnovno strukturno ogrodje membran je dvojni plasti lipidov (fosfolipidni dvosloj). Fosfolipidi so sestavljeni lipidi, v katerih sta dve hidroksilni skupini glicerola zaestreni z maščobnimi kislinama, tretja pa s fosforo kislino, ki je še dodatno zaestrena z aminoalkoholom. Hidrofilni del molekule predstavlja glicerol z vezano fosfatno skupino, hidrofobni del pa tvorita maščobni kislini (slika 2). Fosfolipidi so amfifilne molekule, ki se

zaradi te svoje lastnosti orientirajo s polarnim - hidrofilnim delom proti površinama membrane, z nepolarnim - hidrofobnim repom pa v notranjost skrito pred okolno vodo. Taka struktura, osnovana na hidrofobno/hidrofilnih interakcijah, je zelo stabilna in elastična. Ta značilnost membranskih lipidov omogoča njihovo združevanje v vodnem okolju v stabilno dvoslojno razporeditev, ki jo vzdržujejo hidrofobne interakcije. Dvojna plast lipidov nastane spontano, torej mora predstavljati razporeditev z majhno prosto entalpijo.



Slika 2: Zgradba fosfolipida (fosfatidilholin) (Blume, 1994: 1)

Pomembni lastnosti lipidnega dvosloja sta značilna prepustnost in fluidnost. Membrana je selektivno prepustna pregrada, saj lahko preko lipidnega dvosloja prehajajo majhne, nepolarse molekule (O_2 , CO_2 in ogljikovodiki), medtem ko polarne molekule, npr. ioni, aminokisline, sladkorji, proteini in nukleinske kisline, pa z navadno difuzijo ne morejo prehajati.

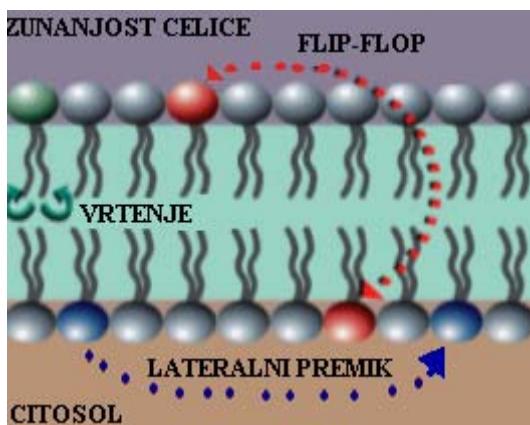
Druga značilnost, pomembna za delovanje bioloških membran, je fluidnost, ki je obratno sorazmerna viskoznosti. Dvosloj se obnaša kot tekočina z gostoto, kakršno imajo rastlinska olja, v katerem plavajo različni proteini. Model, ki najbolj ustreza temu, kar vemo o kemijski strukturi in biološki vlogi membrane, je model tekočega mozaika.

Membrana je aktivna pregrada s heterogeno razporeditvijo lipidov in proteinov urejenih v več področij – domen z različno ureditvijo in dinamiko alkilnih verig fosfolipidov. Fluidnost je odvisna od zgradbe plazemske membrane in opisuje povprečno ureditev in dinamiko fosfolipidnih alkilnih verig vseh membranskih domen glede na delež posameznih domen v membrani (Šentjurc in sod., 2002). Lipidni dvosloj je fluiden, če so lipidni v fazi tekočih kristalov (fosfolipidi z nenasičenimi ali kratkimi verigami), kadar pa so gradniki v gel fazi (imajo nasičene ali dolge verige) pa je lipidni dvosloj rigidен. Na fluidnost

membran močno vpliva temperatura in sicer so membrane bolj fluidne pri višjih temperaturah, saj imajo lipidne molekule več kinetične energije. Z zniževanjem temperature postanejo membrane bolj rigidne. Značilnost amfifilnih fosfolipidov je, da s spremembro temperature prehajajo iz ene faze v drugo. Temperaturo prehoda imenujemo temperaturo faznega prehoda (T_c) in je karakteristična za lipide, ki sestavljajo membrano. Pod to temperaturo je urejenost verig maščobnih kislin velika, gibljivost pa majhna, zato to fazo imenujemo gel oz. trda faza. Samo čisti lipidni sistemi imajo ostre, dobro definirane fazne prehode (Tavzes in Brzin, 1998).

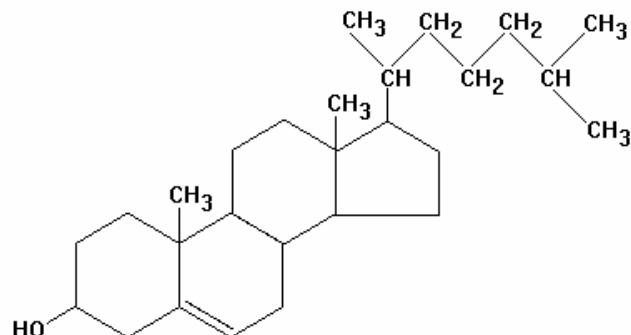
Poleg fizikalnih dejavnikov vplivajo na fluidnost membran tudi kemijski dejavniki, kot so dolžina acilnih verig, število dvojnih vezi, vpliv transmembranskih proteinov v membrani, ki immobilizirajo lipidne molekule v svoji bližini (Nelson in Cox, 2005).

Celične membrane so dinamične, fluidne strukture in večina njihovih lipidnih molekul je sposobna prosto prehajati znotraj lipidnih dvojnih plasti. Gibljivi fosfolipidi v membranah se lahko hitro premikajo v vseh smereh znotraj svojega sloja, čemur pravimo lateralna difuzija (hitrost gibanja lipidnih molekul je reda velikosti 10^{-6} sekunde) (slika 3). Druga vrsta gibanja je vrtenje lipidnih molekul okoli svoje osi znotraj enega lipidnega sloja (hitrost gibanja je reda velikosti 10^{-9} sekunde). Po drugi strani pa se molekule polarnega lipida težko prestavijo iz ene plasti dvosloja v drugo, kar imenujemo »flip-flop« gibanje, in gre za prenos lipidne molekule iz citosolne strani na zunanjo stran membrane in obratno (ta proces je izredno počasen, hitrost gibanja je lahko tudi več kot 10^5 sekund) (Muller, 2004).



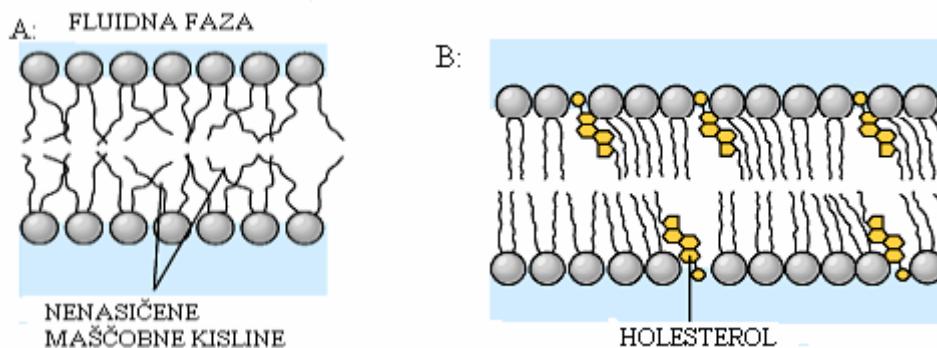
Slika 3: Premikanje lipidov po dvosloju membrane
(Muller, 2004: 4)

Kot smo že omenili je v bioloških membranah poleg fosfolipidov prisoten tudi cholesterol, ki ima zelo drugačno kemijsko strukturo kot ostali membranski lipidi in močno vpliva na lastnosti membrane. Uvrščamo ga v skupino sterolov. Osnova so trije šestčlenski in en petčlenski obroč združeni med seboj s kratko stransko verigo in $-OH$ skupino (slika 4). S hidroksilno skupino je vezan je blizu polarnih glav fosfolipidov, rigidni steroidni obroči pa so usmerjeni v notranjost dvosloja in delno immobilizirajo regije ogljikovodikovih verig, ki so pripete na polarne glave (slika 5 B).



Slika 4: Strukturna formula holesterola (McMullen in sod., 1993: 517)

Holesterolna molekula je toga in bolj negibljiva kot ostali membranski lipidi, zato uravnava fluidnost membrane tako, da nad T_c poveča urejenost acilnih verig znotraj membrane, torej zmanjša fluidnost, pod T_c pa se nasičene acilne verige raje združijo med seboj in izrinejo holesterol v področje membrane, kjer se združuje z nasičenimi verigami, kar povzroči povečanje fluidnosti urejene gel faze. Te spremembe v fluidnosti so sorazmerne spremembam v prepustnosti in stabilnosti membrane (Jezernik in sod., 1998).



Slika 5: Fluidno membrano tvorijo fosfolipidi z nenasičenimi maščobnimi kislinami (A), vezan holesterol zmanjša fluidnost membrane (B) (Mallery, 2005: 1)

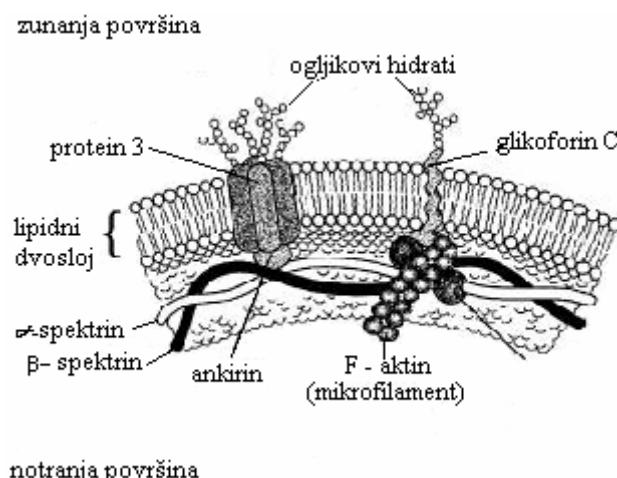
V rastlinskih membranah so namesto holesterola prisotni drugi steroli (fitosteroli), ki uravnavajo fluidnost membrane.

2.1.1.1 Membranski proteini

Za dinamično aktivnost celičnih membran so odgovorni proteini, ki imajo različne vloge. Lahko so npr. encimi, receptorski proteini ali transportni proteini in jih razdelimo v dve skupini glede na lego v membrani. To so periferni proteini, ki so na površini membrane, relativno polarni in vodotopni, ter integralni proteini, ki so potopljeni v notranjost lipidnega dvosloja. Periferni proteini so običajno vezani na membrano z nekovalentnimi, ionskimi in vodikovimi vezmi med svojimi aminokislinskimi ostanki in ustreznimi aminokislinskimi ostanki integralnega proteina, ki sega na površino membrane. Tako kot je asimetrična razporeditev lipidov, je v membrani asimetrična tudi razporeditev proteinov, saj so na notranji in zunanjji strani membrane različni periferni proteini. Integralni proteini imajo v svoji strukturi velik del sestavljen iz hidrofobnih aminokislin, ki jim omogočajo, da se z njimi potopijo v nepolarno področje lipidnega dvosloja. Ker običajno segajo skozi membrano, velikokrat delujejo kot transportni proteini, ki olajšajo gibanje molekul iz ene strani membrane na drugo (Boyer, 2005).

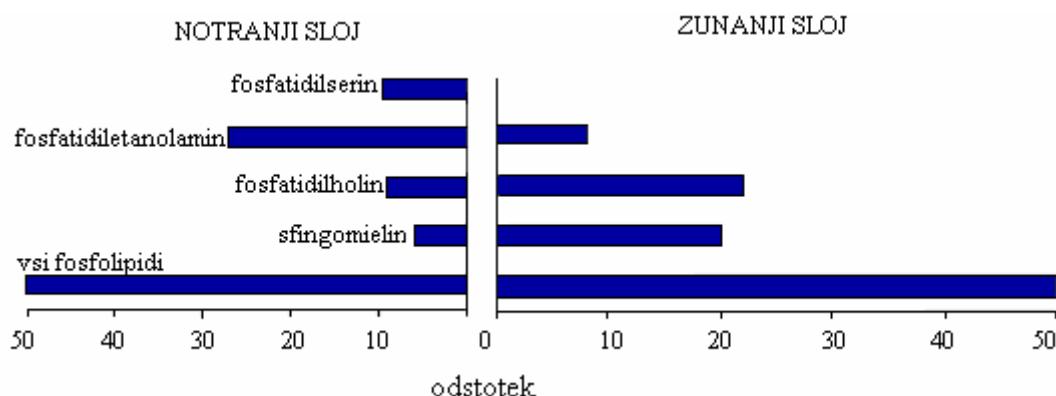
2.1.1.2 Eritrociti

Eritrociti so celice, velikosti od 7 do 8 μm in imajo obliko bikonkavne ploščice (diskocit). Imajo celično membrano in citoplazmo, ki predstavlja praktično vso prostornino celice, ne vsebujejo celičnega jedra in ostalih organelov, zato niso zmožni delitve in sinteze proteinov. Glavna sestavina je hemoglobin, ki ga je 98 % vseh proteinov v citoplazmi in da značilno rdečo barvo eritrocitom. Zlahka spremene obliko, kar jim omogoča neoviran prehod skozi kapilare zaradi velike upogljivosti eritrocitne membrane in njene odpornosti proti strižnim silam. Te lastnosti so posledica zgradbe membrane, ki je sestavljena iz lipidnega dvosloja, integralnih proteinov in proteinskega ogrodja, na katerega se prilega lipidna membrana. Glavne sestavine lipidne membrane so fosfolipidi in neesterificirani holesterol. Transmembranska proteina glikoforin C in protein 3 (anionski izmenjevalec) sta mesti, s katerima je fosfolipidna membrana pritrjena na proteinsko ogrodje. Glavni protein membranskega ogrodja je spektrin, ki je vlaknast protein, sestavljena iz α in β verige povezani v heterodimer. Dva heterodimera se s svojima koncema povežeta v tetramer in na ta način nastane mreži podobno ogrodje, na katerega se prilega lipidna membrana (slika 6). S staranjem eritrocitov se zmanjša upogljivost eritrocitne membrane, prav tako se zmanjša površinski naboj membrane (Andoljšek, 1998). Celice hemolizirajo, kadar nastopijo razlike v osmotskih tlakih znotraj in zunaj celice. Povečan tlak raztrga celično membrano in iz eritrocita se sprosti hemoglobin.



Slika 6: Zgradba eritrocitove membrane (Freitas, 1999: 153)

Študije lipidnih dvoslojev so pokazale, da porazdelitev lipidov v obeh plasteh membrane ni naključna. Tako je v eritrocitni plazemski membrani zunanja plast sestavljena pretežno iz fosfatidilholina in sfingomielina, notranja plast (citosolna stran) pa vsebuje več fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinozitola in glikolipidov. To označujemo kot asimetričnost membrane (slika 7).

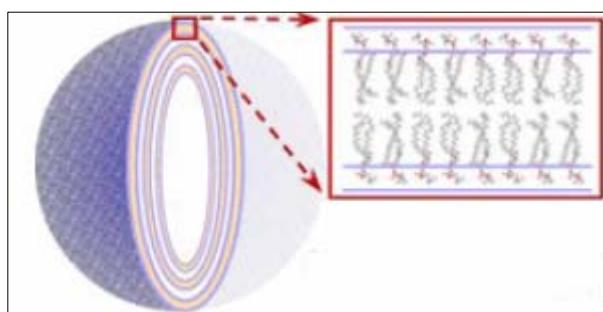


Slika 7: Porazdelitev lipidov v obeh slojih membrane eritrocitov (Voet in Voet, 2004: 406)

2.1.2 Modelne membrane – liposomi

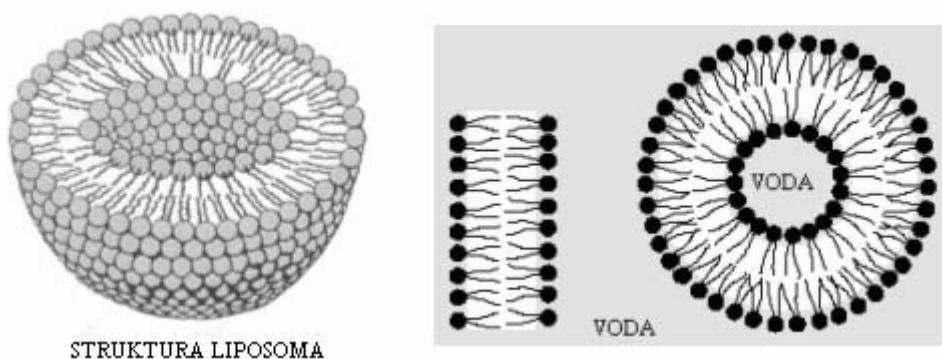
Liposomi so umetni veziki sferične oblike zgrajeni iz enega ali več lipidnih dvoslojev. Glede na velikost in število lipidnih dvoslojev ločimo:

- MLV (multilamellar vesicles) – liposomi z več dvosloji, veliki od 100 – 4000 nm
- ULV (unilamellar vesicles) – enoslojni liposomi, ki jih po velikosti delimo na majhne SUV (small unilamellar vesicles), ki so veliki od 20 – 100 nm in na velike LUV (large unilamellar vesicles) z velikostjo od 100 – 800 nm (Kristl in sod., 1992).



Slika 8: Prečni prerez velikega večslojnega liposoma (MLV) (Model membranes, 2004: 2)

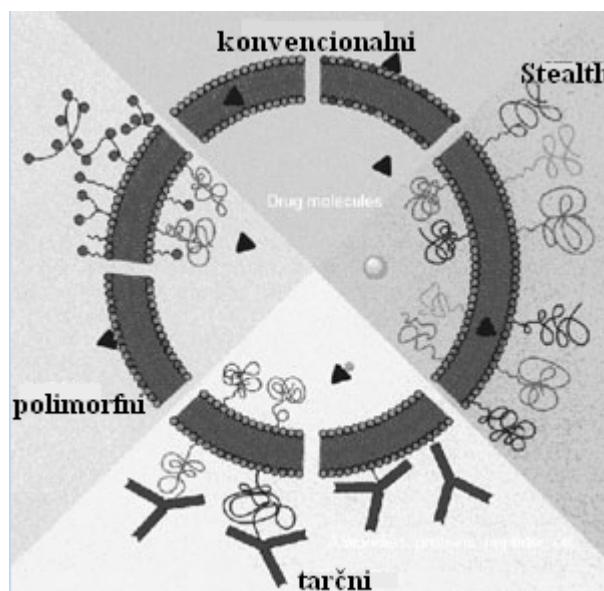
MLV liposomi nastanejo spontano ob stiku lipidov z vodno fazo. Z ekstruzijo MLV liposomov skozi polikarbonatno membrano z velikostjo por 100 nm dobimo ULV liposome (slika 9).



Slika 9: Fosfolipidi organizirani v mehurček – enoslojni liposom (ULV) (Liposomes, 2005: 1)

Glede na funkcionalnost pa ločimo štiri osnovne tipe liposomov (slika 10):

- nespecifični oz. konvencionalni liposomi so *in vivo* nestabilni in zato njihovo obnašanje nadzorujejo le *in vitro*,
- sterično stabilizirani oz. Stealth® liposomi so modificirani tako, da so v krvi tudi do 100-krat bolj stabilni kot konvencionalni,
- specifični oz. tarčni imajo na površino vezane ciljne molekule (protitelesa, ogljikove hidrate, antigene), s katerimi prepoznajo tarčne molekule,
- polimorfni liposomi pa so liposomi, ki po določenih interakcijah z ioni spremenijo fazo in strukturo; tak primer so npr. kationski liposomi.



Slika 10: Štiri osnovni tipi liposomov glede na funkcionalnost (Lasic, 1993: 9)

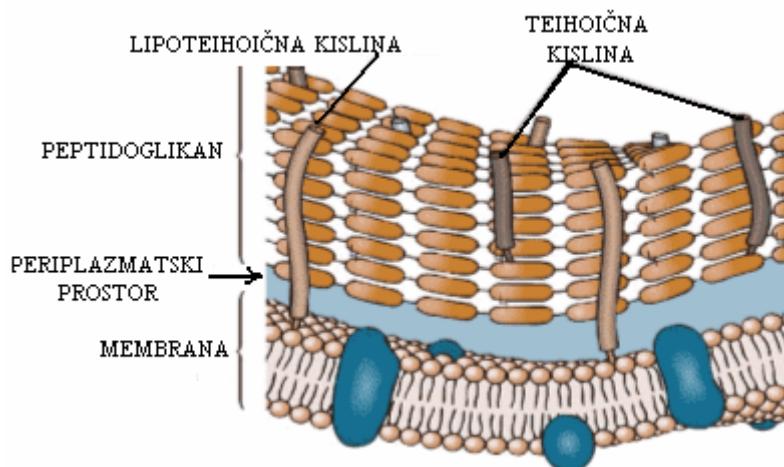
Liposomi so zelo mnogostranski in zaradi variabilnosti v njihovi strukturi jih poleg tega, da so dobri modeli bioloških membran, lahko uporabljamо še v različne druge namene predvsem kot transportni sistem različnih zdravilnih učinkovin, proteinov, nukleotidov idr. Vse te različne molekule so lahko v notranjosti liposoma ali pa na/v lipidnem dvosloju (Lasic, 1993).

Raziskovalci proučujejo možnost uporabe pri genskem zdravljenju ljudi, kjer so liposomi kot vektor za prenos rekombinatnih genov v somatske celice, da bi pozdravili bolezen ali vsaj omilili njeno nepredovanje. V veliki meri jih uporabljajo v farmacevtski industriji (specifični liposomi za prenos zdravila v točno določen organ), uporaba v kozmetiki (emulzije, kreme) in nenazadnje se uporaba liposomov v veliki meri povečuje tudi v živilski industriji za zaščito izdelkov pred vlago, toploto, za podaljšanje obstojnosti okusov, konzervansov, antioksidantov. Zadnje čase se liposome uporablja tudi pri pripravi emulzij kot so različni namazi, margarine in majoneze. V pekarstvu se liposomi med procesom mešanja in gnetenja testa ne uničijo, zato spodbujajo sproščanje okusov, dišav in drugih aditivov (Baianu in sod., 2004).

2.1.3 Membrana grampozitivnih bakterij

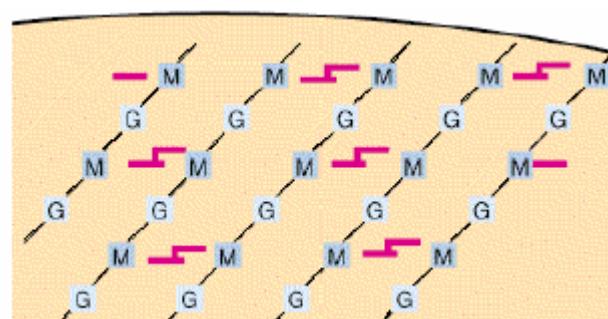
Bakterije lahko razvrščamo na več načinov glede na morfologijo, značilno rast kolonij, temperaturo rasti idr. Ena izmed možnosti razvrščanja bakterij je barvanje bakterijskih celic po Gramu. Ločimo grampozitivne in gramnegativne bakterije, ki jih označimo tudi kot G- in G+. Gramnegativne bakterije se obarvajo rdeče in grampozitivne bakterije modro zaradi razlike v strukturi celične membrane in različne količine peptidoglikana v celični steni. Med grampozitivne bakterije uvrščamo tudi bakterije rodov **Staphylococcus**, **Enterococcus**, **Streptococcus** idr. (Black, 2002).

Bakterije vrste *Staphylococcus aureus* so po obliki nesporogeni koki, ki se lahko pojavljajo posamezno ali v parih v obliki grozdov. So fakultativno anaerobni, koagulaza pozitivni mikroorganizmi. Kot grampozitivne bakterije imajo citoplazemskega membrano in debelo rigidno celično steno, sestavljeni iz peptidoglikana in poliolpolifosfatnih polimerov imenovanih teihoična kislina (Singleton in Sainsbury, 1980).



Slika 11: Zgradba celične stene in citoplazemske membrane grampozitivnih bakterij (Madigan in sod., 1997: 74)

Peptidoglikan (murein) zagotavlja trdnost celične stene, kjer predstavlja glavno sestavino stene (20 – 80 nm) pri G+ bakterijah in je s tem tudi nosilec večine lastnosti celične stene, medtem ko je pri G- bakterijah le ena od številnih komponent celične stene (5 – 10 nm). Peptidoglikan je sestavljen iz dveh gradnikov, N-acetilglukozamin in N-acetilmuraminska kislina. To sta aminosladkorja, izmenjujoče ponovljena v nekaj desetih kopijah, kar oblikuje dolg linearen filament. Več takih filamentov je povezanih med seboj s peptidi, ki dajejo trdnost celični steni. To trdnost pa še dodatno utrujuje teihoična kislina, ki je sestavljena iz polimerov glicerola, fosfatov in slatkornega alkohola ribitol. Kadar je na teihoično kislino vezan lipid, nastane lipoteihoična kislina (Madigan in sod., 1997).



Slika 12: Peptidoglikanska mreža v celični steni bakterij: G = N-acetilglukozamin, M = N-acetilmuraminska kislina, rdeče = peptidne vezi, ki dajejo trdnost strukturi (Madigan in sod., 1997: 73)

Bakterijska celična membrana je sestavljena iz fosfolipidnega dvosloja in je po strukturi zelo podobna membranam evkariontov s to razliko, da običajno ne vsebuje sterolov. Značilne lastnosti membran bakterij so prepustnost za vodo, pline in male hidrofobne molekule, majhna ionska prevodnost posebej za H^+ in Na^+ ter velika fluidnost membrane. Bakterije uravnavajo svojo lipidno sestavo z vključevanjem MK, ki vsebujejo metilne in hidroksilne skupine (Madigan in sod., 1997).

2.2 FENOLNE SPOJINE

Fenolne spojine so zelo raznovrstne in zajemajo spojine z aromatskim obročem in vsaj eno ali več hidroksilnih skupin direktno vezanih na aromatski obroč. Fenolne spojine so sekundarni metaboliti, ki so prisotne v vseh rastlinah in nastanejo iz primarnih metabolitov. V naravi so običajne spojine z več –OH skupinami in zato se je zanje uveljavilo tudi drugo ime - polifenoli. Polifenoli so zelo heterogena skupina organskih spojin, ki v rastlinskem svetu opravljamjo funkcijo barvil, koencimov, odvračal, protimikrobnih agensov in fitoaleksinov (spojine, ki se pojavijo v rastlinah kot odgovor na infekcije). Polifenoli dajo rastlinam karakteristični okus, prehransko vrednost, farmakološke in toksične učinke. Med polifenole sodijo tudi tanini. Polifenoli se v rastlinah redko pojavljajo prosti, največkrat so vezani na sladkorje, amino skupine, lipide in terpenoide (Donko, 1995).

Rastline in sadje vsebujejo vitamin C, vitamin E, karotenoide ter različne fenolne snovi, zlasti flavonoide. Slednji imajo biološke učinke, kot sta antioksidativna in protivnetna učinkovitost, zaviranje zlepljanja trombocitov ter protimikrobno delovanje. Fenolne spojine tudi prispevajo k barvi, aromi in ostalim karakteristikam določenega prehranskega izdelka. Flavonoide prodajajo kot dodatek prehrani skupaj z vitaminom C.

Vsebnost fenolnih spojin je odvisna od vrste rastline, kultivarja (pri sadju), deloma pa tudi od rastišča (vsebnost hranljivih snovi v zemlji), podnebnih razmer (temperatura, svetloba, količina padavin), agrotehničnih dejavnikov ter od načina predelave (Häkkinen in sod., 1999).

Več tisoč polifenolov lahko razvrstimo na več načinov, uveljavila pa se je klasifikacija po številu C-atomov (preglednica 1).

Preglednica 1: Razvrstitev fenolnih spojin po številu C-atomov (Abram, 2000: 25, 30)

St. C atomov	Skupina
6	Fenoli
7	Fenolne kisline
8	Fenilocetne kisline
9	Hidroksicimetne kisline Fenilpropeni Kumarini Izokumarini Kromoni
10	Naftokinoni
13	Ksantoni
14	Stilbeni Antrakinoni
15	Flavonoidi
18	Lignani Neolignani
30	Bitlavonoidi
n	Lignini Melanini kondenzirani tanini

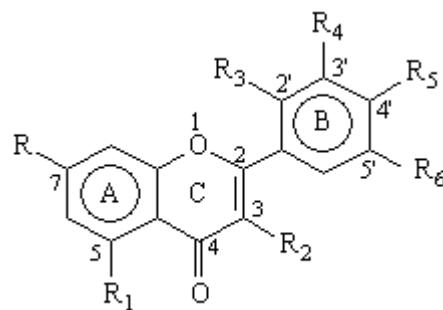
Flavanol
Flavonol
Flavon
Flavanon
Antocianidin
Izoflavon

Kvercetin
Kamferol
Rutin

2.2.1 Flavonoidi

Flavonoidi so fenolne spojine zgrajene iz 15 C-atomov, osnovno spojino flavon sestavljajo strukture, ki jih označimo s C₆C₃C₆. Med flavonoide spadajo spojine, ki se razlikujejo po oksidacijski stopnji heterocikličnega C₃ obroča, kot tudi po različnih substituentah na obročih A, B in C (slika 13). Do sedaj je poznanih že več kot 5000 različnih flavonoidov. Običajno so glikolizirani, kar pomeni, da imajo na obroč vezano glukozo, galaktozo, arabinozo, ramnozo ali daljše oligosaharide. V rastinah so flavonoidi rdeči, beli in rumeni pigmenti cvetov, sadežev, lubja in korenin. So grenkega okusa, zato odganjajo parazite. Zaradi zmožnosti absorpcije UV svetlobe, delujejo kot zaščita rastlin pred vplivi UV žarkov (Abram, 2000).

Flavonoide so našli v rastlinah: limonah, soji, sezamu, olivah, rožiču, medu. Veliko so jih našli tudi v kožicah grozdnih jagod, tako v belem kot v rdečem vinu, v pivu in čaju. Flavonoidni polimeri so čreslovine – tanini, ki imajo zelo trpek okus in dajejo suhost ali trpkost vinu (Wondra, 1997).



Slika 13: Strukturna formula flavonoidov in možna razporeditev substituent ($R - R_6$) na aromatskih obročih (Saville in sod., 2001: 220)

Vse fenolne spojine razen flavonoidov izhajajo samo iz aminokisline fenilalanin ali njenega prekurzorja šikimske kisline. Pri flavonoidih pa aromatski obroč B in obroč C nastaneta iz fenilalanina, A obroč pa nastane iz acetil-CoA po poliketidni poti (Goodwin in Mercer, 1983).

2.2.2 Prosti radikali

Prosti radikali ali pravilneje radikali so atomi, molekule ali ioni z vsaj enim elektronom brez para. So zelo reaktivne molekule, ki poškodujejo celične strukture, vključno z nukleinskimi kislinami in geni ter dejansko niso nikoli prosti. Prosti radikali nastajajo pri cepitvi kovalentne vezi in so rezultat normalne celične presnove (dihanja) ter posledica dejavnikov okolja (UV in gama žarkov, toplove, onesnaženega okolja ...). Tudi nekatere snovi in zdravila (aflatoknsini, alkohol, analgetiki, idr.) povzročajo nastajanje prostih radikalov. Kisikovi prosti radikali so udeleženi pri številnih normalnih in patoloških procesih v celicah. Za preprečevanje in popravo oksidativnih poškodb celic je pomemben antioksidacijski sistem, ki potrebuje določen čas za popravilo mikro poškodb celic (Korošec, 2000).

V večini živih organizmov kisik ni le nujno potreben za življjenje-dihanje, temveč je tudi glavni vzrok poškodb in smrti (oksidacija uničuje celice, celične strukture in lahko povzroči mutacije ipd.) (Jovanovic in Simic, 2000). Celice vseh živih organizmov so ves čas izpostavljene različnim spremembam, ki povzročijo oksidativni stres. Take spremembe so lahko endogenega (procesi v mitohondrijih, endoplazmatskem retikulumu, peroksizomih, citoplazmi in celični membrani) ali pa eksogenega-zunanjega izvora (ionizacijsko sevanje, ozon in razni elicitorji).

Med glavne vrste prostih radikalov štejemo superoksidni anion ali peroksilni radikal ($O_2\cdot$), hidroksilni radikal ($OH\cdot$), radikal dušikovega oksida ($NO\cdot$), peroksidni radikal ($ROO\cdot$) in reaktivne zvrsti kisika (ROS). Nekateri prosti radikali so tudi koristni, saj prav z njihovo pomočjo v posebnih obrambnih celicah ubijamo bakterije.

V celicah potekajo oksidacije na membranskih lipidih (peroksidacija maščobnih kislin, kar vpliva na spremembo prepustnosti membran). Maščobe zelo hitro reagirajo s prostimi radikali in razširi se lipidna peroksidacija in ostale verižne rakičje prostih radikalov. Zaradi poškodovane celične membrane celica propade, ker je moten pretok hranil in odpadnih snovi. Prosti radikali reagirajo s proteini (oksidacija –SH skupin), moteno pa je tudi delovanje encimov (Korošec, 2000).

2.2.3 Antioksidativno delovanje polifenolov

Antioksidanti so snovi, ki varujejo vsako posamezno celico v organizmu pred poškodbami radikalov tako, da upočasnijo ali preprečijo oksidacijo substrata. Kadar je ravnotežje med prostimi radikali in antioksidanti porušeno, govorimo o oksidativnem stresu. Antioksidanti ga preprečujejo z lovljenjem prostih radikalov, s keliranjem kovinskih ionov in popravilom ali odstranjevanjem oksidativno poškodovanih biomolekul (celic).

Antioksidante delimo po kemijski zgradbi na vodotopne, med katere uvrščamo askorbinsko kislino, glutation, in pa lipofilne antioksidante (topni v maščobah) kamor spadajo flavonoidi, ubikinon ali koencim Q₁₀, vitamin E, karotenoidi. Glede na način delovanja pa jih razvrščamo v tri skupine: antioksidanti, ki vežejo proste radikale, reducenti (reducirajo oksidante) in sinergisti, ki povečujejo delovanje antioksidantov (boljši rezultati so z uživanjem raznovrstnih antioksidantov, kot s pretiranim uživanjem samo enega hranila) (Korošec, 2000).

Pri rastlinah sevanje in infekcije sprožijo sintezo antioksidantov, ki sproti nevtralizirajo nastale proste radikale. Če je koncentracija sekundarnih metabolitov (flavonoidi in druge polifenolne spojine) v rastlini zelo visoka, bi ti lahko poškodovali tudi lastno tkivo rastlin. Zato se v rastlinah antioksidanti v večjih količinah ne kopijo v citoplazmi celic, ampak v ločenih predelkih (v vakuolah idr.) (Kreft in sod., 2000).

Uporaba naravnih antioksidantov se širi tako v prehranjevanju kot v proizvodnji hrane. Fenolne spojine služijo za izboljšanje hranilne in senzorične kakovosti živil. Nekatere od njih imajo antioksidativne lastnosti, kar ima ugoden vpliv na človekovo zdravje, obenem pa podaljšujejo obstojnost živil, ki te snovi vsebujejo. Flavonoidi z odvzemanjem kisika preprečijo neželeno oksidacijo živila, z lovljenjem prostih radikalov pa preprečijo tvorbo hidroperoksidov pri verižnih rakičijah (Madhavi in sod., 1996). Določene fenolne spojine imajo tudi protimikrobne lastnosti, zato jih prištevamo med konzervanse.

Z ustreznim uživanjem hrane predvsem sadja in zelenjave s prisotnimi naravnimi antioksidanti (flavonoidi in vitamini) lahko vzpostavimo ravnotežje v organizmu in preprečimo nastanek bolezni kot so nastanek rakavih tkiv, ateroskleroza, diabetes, okvara jeter idr. (Doll, 1990).

2.2.4 Protimikrobnno delovanje polifenolov

Delovanje polifenolov je lahko direktno zaviralno oz. destruktivno na določene mikroorganizme ali pa delujejo le kot sinergisti in povečajo učinek ostalih konzervansov. Fenolne spojine so zelo reaktivne in hitro tvorijo vezi z drugimi molekulami. Pri vezavi na proteine mnogokrat povzročijo inaktivacijo posameznih encimov ali povzročijo poškodbe na genskem materialu. Ugotovili so, da povzroči dodatek fenolnih spojin na rastni medij motnje na citoplazemski membrani, tako da celica skozi membrano v okolico izgubi mnogo intracelularnega materiala. Na protimikrobnno aktivnost polifenolov vplivajo še prisotnost lipidov, soli, pH in temperatura. Soli delujejo sinergistično s polifenoli ter tako povečajo njihovo antimikrobnno učinkovitost (Davidson, 1993).

Način protimikrobnega delovanja fenolnih spojin je močno odvisen od njihove koncentracije. Nychas (1995) meni, da v manjših koncentracijah vplivajo na encime, ki so povezani z oskrbo celice z energijo, medtem ko večje koncentracije lahko povzročijo obarjanje proteinov. Lahko povzročijo motnje na citoplazemski membrani bakterij tako, da pride do sprememb v permeabilnosti membran ali sprememb v sestavi maščobnih kislin in vsebnosti fosfolipidov v celici.

Basile in sod. (2000) so ugotovili, da je imel ekstrakt pridobljen iz listov navadnega kostanja protimikrobnii učinek na 7 vrst bakterij. V ekstraktu so med drugim določili tudi kamferol, ki pa ni imel protimikrobnega učinka.

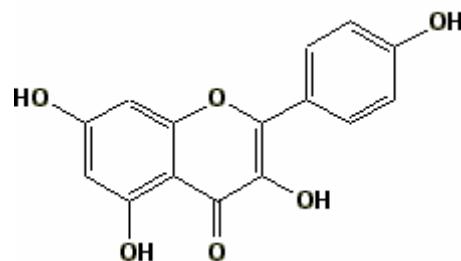
2.2.5 Kamferol

V diplomski nalogi smo uporabili kamferol, ki so ga identificirali v listih navadnega netreska (Abram in Donko, 1999).



Slika 14: Navadni netresk (*Sempervivum tectorum*) (Malke, 2005: 1)

Kamferol (ang. kaempferol) uvrščamo v skupino flavonoidov (slika 15), njegova molekulska formula je $C_{15}H_{10}O_6$ in molska masa 286,24 g/mol. Kemijsko ime je 3,4',5,7-tetrahidroksiflavon.



Slika 15: Strukturna formula kamferola (Pietta, 2000: 1036)

Tvori rumene kristale (Extrasynthese, 1124 S, Batch 21, Francija) in ima točko taljenja pri temperaturi 273 – 279 °C.

Kamferol je zelo razširjen flavonoid in v preglednici 2 so zbrani podatki o njegovi vsebnosti v nekaterih živilih. Od naštetih živil ga je največ v čebuli in žajblju.

Preglednica 2: Vsebnost kamferola in ostalih flavonoidov v posameznih živilih (Miean in Suhaila, 2001: 3111), (Shan in sod., 2005: 7755)

ŽIVILO	vsebnost (mg/kg suhe mase)					
	skupni flavonoidi	miricetin	kvercetin	luteolin	kamferol	apigenin
zeleni čili	84	12	ND	33	39	ND
čebulni listi	2721	ND	1498	391	832	ND
papaja	1264	ND	811	ND	453	ND
buča	371	ND	ND	ND	371	ND
redkev	65	ND	18	9	39	ND
korenje	233	ND	55	38	140	ND
črni čaj	1491	303	1070	ND	118	ND
limonina trava	178	ND	ND	ND	178	ND
jajčevec	220	40	ND	ND	80	ND
origano	ND	ND	ND	ND	330	ND
žajbelj	ND	ND	ND	ND	640	ND
klinčki	ND	ND	280	ND	240	ND
kumina	ND	ND	ND	ND	160	ND

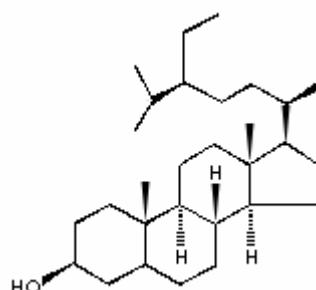
* ND = ni določen

2.2.6 Mehanizem delovanja polifenolnih spojin

Naravni ekstrakti začimb z dokazano antioksidativno in protimikrobnou aktivnostjo vsebujejo polifenolne spojine med katere uvrščamo flavonoide, tokoferole, katechine, kumarine idr. Mehanizem delovanja flavonoidov na dvojno plast lipidov v liposomih so proučevali Oteiza in sod. (2005) in domnevajo, da se bolj hidrofobne komponente flavonoidov porazdelijo v notranjost membrane liposomov ali pa se tvorijo vodikove vezi na površini membrane liposomov med polarnimi glavami lipidov in bolj hidrofilnimi komponentami flavonoidov. Različna porazdelitev in reakcije flavonoidov v/na membrani je odvisna od njihovih kemijskih lastnosti kot so število in položaj $-OH$ skupin na aromatskem obroču, stopnji polimerizacije, prisotnosti metoksi skupin na C-obroču. Porazdelitev določenih flavonoidov v hidrofobno področje membrane prepreči lipidno in proteinsko oksidacijo. S tvorbo vodikovih vezi med flavonoidi in zunanjim področjem membrane se zmanjša dostop škodljivih molekul (npr. oksidanti) in na ta način flavonoidi zaščitijo strukturo in funkcijo membrane. Porazdelitev flavonoidov (naringenin, rutin) v hidrofobno področje lipidne membrane povzroči zmanjšanje fluidnosti membrane (Oteiza in sod., 2005).

2.2.7 β -sitosterol

β -sitosterol je fitosterol z molekulsko formulo $C_{29}H_{50}O$ (slika 16) in molsko maso 414,7 g/mol. Njegovo kemijsko ime je 5-holesten-24beta-etyl-3beta-ol. Izoliran je bil iz soje in pripravljen v obliki belega prahu (SIGMA, Nemčija). Njegova točka taljenja je pri temperaturi 130 – 145 °C. Ker je netopen v vodi, smo ga za poskuse na liposomih raztopljal v mešanici organskih topil metanol in kloroform v razmerju 3 : 7 (v/v).



Slika 16: Strukturna formula β -sitosterola (Chemicalland21. com, 2000: 1)

Sterole, ki sestavljajo celično membrano, imajo tudi rastline. Imenujemo jih fitosteroli ali rastlinski steroli. Rastlinski steroli so po sestavi podobni holesterolu, razlikujejo se le po stranski verigi. Za zdaj so jih določili več kot štirideset, najbolj razširjeni rastlinski steroli pa so β -sitosterol, kampesterol in stigmasterol. Rastlinske sterole najdemo v maščobnih delih živil rastlinskega izvora in sicer so v stročnicah (soji, čičerki, fižolu, leči), kumarah, arašidih, mandlijih in drugih oreščkih ter v oljih, predvsem v sezamovem, sojinem in arašidnem olju. Nerafinirana olja jih vsebujejo več kot rafinirana. Večji količini sterolov v hrani pripisujejo manj težav s povečanimi lipidi in manj obolenj za rakom, predvsem za rakom debelega črevesja, prostate in prsi (Pavčič, 2001).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIALI

- goveja kri (obrat klavnica MESO KAMNIK)
- 3,8 % raztopina natrijevega citrata za preprečevanje koagulacije krvi
- fosfatni pufer, PBS (pH=7,4), sestavljen iz: Na₂HPO₄ (0,03 M), NaCl (0,11 M), KH₂PO₄ (0,03 M), Na₂EDTA (1mM)
- MeFASL (10,3) raztopljen v etanolu; 5-doksil metil palmitat
- DMSO (dimetilsulfoksid, C₂H₆OS)
- kamferol (1124 S, Batch 21, Extrasynthese, Genay, Francija)
- fosfolipidi za pripravo liposomov: POPC, POPE, POPS (Avanti Polar Lipids) in HOLESTEROL (3672, Merck, Nemčija)
 - POPC = 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoholin (760,1 g/mol)
 - POPE = 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamin (718,0 g/mol)
 - POPS = 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serin (784,0 g/mol)
 - CH = holesterol (386,7 g/mol)
- kloroform
- metanol
- β-sitosterol iz soje (S-9889-SIGMA, Nemčija)
- ASL je N-(1-oksi-2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinil)-N-dimetil-N-hidroksietil amonijev jodid
- Na-askorbat (ampule Plavit C, Pliva Zagreb)
- destilirana voda
- krom - žveplena kislina za spiranje kvarčnih kivet (Kemika, Hrvaška)
- fiziološka raztopina (10 mM pufer HEPES (Sigma – Aldrich, Nemčija), pH = 7,0 in 150 mM NaCl)
- gojišče BP agar (Baird – Parker, 401116, Biolife, Italija)
- gojišče BHI (Brain heart broth, 1.10493, Merck 1, Nemčija)
- bakterije vrste *Staphylococcus aureus* (ŽMJ 72)
- fosfatni pufer KH₂PO₄ (pH = 7,2) (1112408, Kemika, Zagreb)

3.2 PRIBOR IN OPREMA

- spektrometer EPR (ELEXSYSE 500, Bruker, Nemčija)
- rotavapor (BÜCHI R-200, Švica)
- dializne kasete Slide-A-Lyzer 10 K (0,5 – 3 mL; Pierce Chemical Company, Rockford, ZDA)
- mešalnik (Vibromix 104 EV, Tehnica Železniki, Slovenija)
- tehtnice (EXACTA 2200 EB, Tehnica Železniki, Slovenija)
- kapilare za EPR spektrometer (75 mm, Euroglass, Slovenija)
- fluorimeter (Cary Eclipse, Varian, Avstrija)
- spektrofotometer (UV-VIS, Hewlett-Packard HP 8453, ZDA)
- aparat DSC (Nano-DSC III diferenčni dinamični kalorimeter-Calorimetry Science Corporation, Provo, ZDA)
- spektrometer PCS zetasizer 3000 (Malvern, Anglija; Fakulteta za farmacijo)
- ekstrudor (AVESTIN, Kanada)
- kivete za zetasizer (Sarstedt, No. 67.754)
- centrifuge (Eppendorf 5415C, Hamburg, Nemčija)
- plastične epruvete
- bučke za rotavapor
- 2,5 mL kvarčne kivete (FLR Cary, Varian, Avstrija)
- filter papir (Schleicher & Schuell, No. 10300012, Nemčija)
- avtomatske pipete (Eppendorf, Nemčija)
- inkubator (Kambič, Semič)
- laboratorijska steklovina

3.3 METODE DELA

Proučevanje fizikalnih lastnosti bioloških (eritrociti) in modelnih membran (liposomi) s spektroskopsko metodo elektronske paramagnetne resonanse (EPR) smo izvedli v laboratoriju za biofiziko, Oddelek za trdno snov, Inštitut Jožef Stefan v Ljubljani. Meritve fluorescence liposomov pa smo opravili na fluorescenčnem spektrofotometru v laboratorijih Katedre za kemijo, Oddelek za živilstvo, Biotehniška fakulteta.

3.3.1 Elektronska paramagnetna resonanca (EPR)

3.3.1.1 Osnove EPR

Elektronska paramagnetna resonanca (EPR) ali kot jo tudi imenujejo, elektronska spinska resonanca (ESR) je fizikalni fenomen, pri katerem paramagnetne molekule ali ioni pod vplivom zunanjega magnetnega polja absorbirajo mikrovalovno sevanje. Na tem pojavu temelji EPR spektroskopija, ki je uporabna za nedestruktivno analizo kompleksnih bioloških sistemov. Z njeno pomočjo lahko zaznamo spremembe v metabolizmu, ki so posledica delovanja biološko aktivnih sestavin na sistem, ali patološka stanja, kot so vnetja, rak ipd. (Filipič in Štrancar, 2000).

Včasih pa biološki material (membrane, encime) lahko zaznamujemo z določenimi paramagnetnimi spojinami, ki jih imenujemo spinski označevalci. Ti služijo kot neke vrste sonda za opazovanje strukture v svoji okolini in sprememb, ki nastanejo kot posledica delovanja biološko aktivnih učinkovin (kancerogeni, citostatiki itd.). Za elektronsko paramagnetno resonanco je pomemben spin elektrona. To je kvantnomehanska količina, ki karakterizira vrtenje elektrona okoli svoje osi. Opisana je s t. i. kvantnim številom S . Za elektron je $S = \frac{1}{2}$. Elektron zaradi vrtenja okoli svoje osi ustvarja v svoji okolini magnetno polje. Zato si ga lahko zamišljamo kot majhen magnet z magnetnim momentom, ki je vzporeden z osjo vrtenja, smer magnetnega momenta pa je določena s smerjo vrtenja elektrona (slika 17 D). Dva elektrona, ki se med seboj razlikujeta samo po smeri vrtenja okoli svoje osi, tvorita elektronski par. Magnetna momenta sta v takem paru nasprotno usmerjena, zato se uničita. Ker so v kemičnih in biokemičnih snoveh elektroni večinoma združeni v pare, te snovi nimajo magnetnih momentov; so diamagnetne. Kadar pa elektroni niso združeni v pare, npr. v prostih radikalih, ostane en elektron sam (nesparjen elektron); ker torej ni v paru z elektronom, ki bi se vrtel v nasprotni smeri, njegov magnetni moment ostane. Taka molekula je paramagnetna. Mesto v molekuli, kjer je nesparjen elektron, imenujemo paramagnetni center. Le paramagnetne molekule lahko zaznamo z metodo EPR.

Elektroni, ki niso izpostavljeni nobenim zunanjim vplivom, so v snovi poljubno usmerjeni in imajo enako energijo (slika 17 A). Če pa damo snov s paramagnetnimi centri v magnetno polje, magnetni momenti interagirajo s tem zunanjim magnetnim poljem B , energijski nivo elektronov se razcepi na dva nivoja (slika 17 B). Elektroni, katerih magnetni momenti so orientirani vzporedno z magnetnim poljem B , imajo višjo energijo

kot elektroni, katerih magnetni momenti so orientirani v nasprotno smer. Dobimo energijska nivoja, ki ustreza paralelni ($+\frac{1}{2}$) in antiparalelni ($-\frac{1}{2}$) orientaciji spina S , med njima pa energijsko razliko ΔE , ki jo lahko detektiramo z EPR. V mnogih paramagnetskih centrih imajo jedra, okoli katerih krožijo nesparjeni elektroni, spin, ki ga označuje kvantno število I . Zato magnetni moment elektrona interagira tudi z magnetnim momentom jedra. Posledica te interakcije je, da se omenjeni skupini elektronov razdelita še na več podskupin z različnimi energijami. Po zakonih kvantne mehanike je število teh podskupin enako $2I + 1$, kjer je I spin jedra. Vsak energijski nivo elektronov se torej razcepi na $2I + 1$ nivojev, kar imenujemo hiperfini razcep A . Velikost razcepja je odvisna od notranjih elektrostatičnih polj in od jakosti interakcij med obema momentoma. Oblika spektra EPR pa je odvisna še od dinamike paramagnetskih centrov (Šentjurc in Štalc, 1976).

Če na vzorec v magnetnem polju delujemo z elektromagnetnim valovanjem z energijo, ki je enaka energijski razlike med nivojema, ki jih karakterizira spin elektrona, pride do prehoda elektronov z enega energijskega nivoja na drugega. Pri tem se absorbira energija elektromagnetnega valovanja, kar zaznamo z metodo EPR. Kar lahko na enostaven način tudi izračunamo iz resonančnega pogoja. Pri magnetnih poljih okoli 0,34 T je resonančni pogoj za absorpcijo izpolnjen pri frekvenci mikrovalov okoli 9,6 GHz.

Resonančni pogoj je izpolnjen, če je:

$$\Delta E = h \nu_0 = \mu_B B g + A M_I \quad \dots(1)$$

ΔEenergijska razlika

hPlanckova konstanta $= 6,626 \cdot 10^{-34}$ Js

ν_0frekvenca elektromagnetnega valovanja

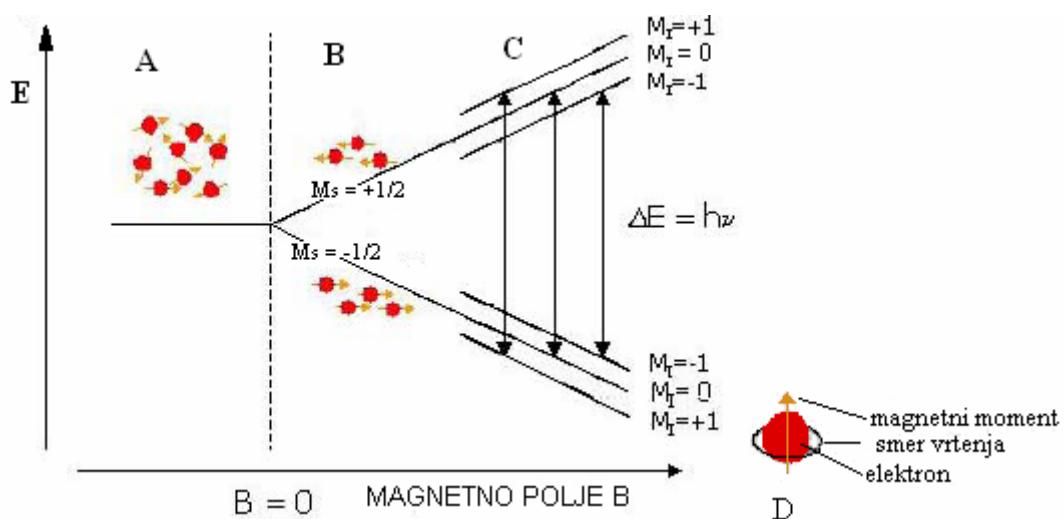
gZeemanov spektroskopski cepljeni tenzor (opisuje jakost interakcije med magnetnim poljem in magnetnim momentom elektrona in je značilen za dano snov)

μ_BBohrov magneton (velikost elektronskega magnetnega momenta, konstanta)

Bgostota magnetnega polja

Ahiperfini sklopitveni tenzor

M_Iprojekcija spina jedra

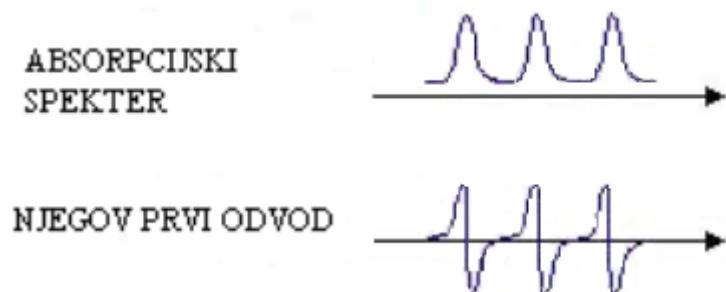


Slika 17: Princip EPR - energijski nivoji nitroksidnega radikala v magnetnem polju (Štrancar, 2004: 2)

Legenda:

- A: Osnovni energijski nivo nesparjenega elektrona, kadar ni magnetnega polja.
- B: Razcep energijskih nivojev elektrona zaradi interakcije magnetnega momenta elektrona z zunanjim magnetnim poljem B .
- C: Hiperfini razcep energijskih nivojev elektrona zaradi interakcije magnetnega momenta elektrona z magnetnim momentom jedra dušika s spinom $I = 1$. Puščice označujejo možne prehode elektronov med energijskimi nivoji, ko je izpolnjen resonančni pogoj.
- D: Shematski prikaz elektrona in njegovega magnetnega momenta (Šentjurc in Štalc, 1976).

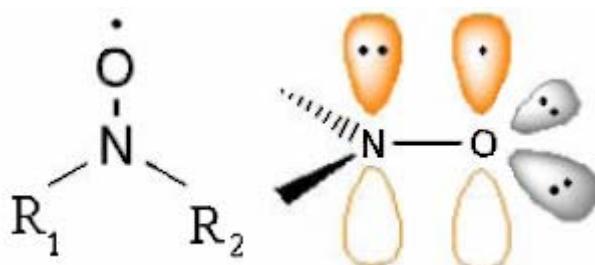
Pri običajnih izvedbah spektrometrov EPR je frekvenca elektromagnetnega valovanja konstantna, reda velikosti 10^4 MHz, spremenjamo pa gostoto magnetnega polja. Poleg tega so spektrometri prirejeni tako, da je spekter EPR prvi odvod absorpcijske krivulje. To povečuje občutljivost aparature in omogoča natančnejšo določitev magnetne poljske gostote, pri kateri se absorbira elektromagnetno valovanje (slika 18).



Slika 18: Spekter EPR – absorpcijski spekter nitroksidnega radikala in njegov prvi odvod (Štrancar, 2004: 2)

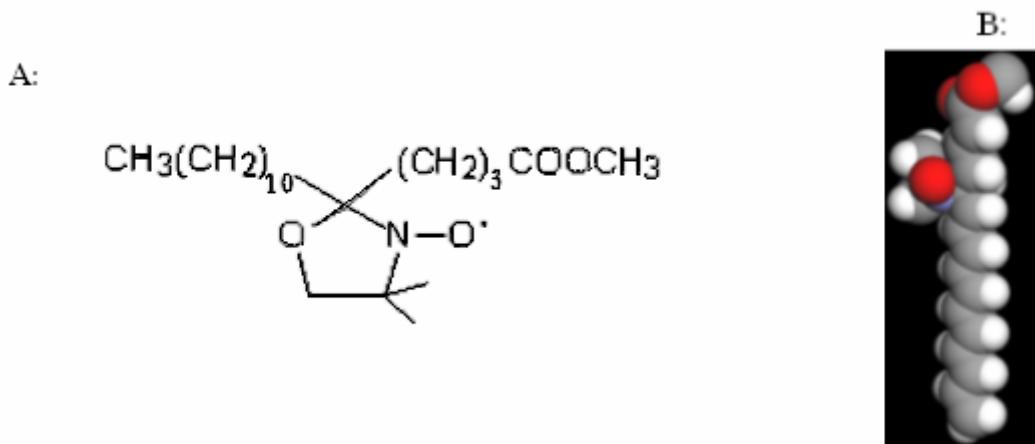
3.3.1.2 Spinski označevalci

Kot smo omenili, lahko z EPR opazujemo le paramagnetne snovi. To so lahko radikali, ioni prehodnih elementov, elektronski defekti v trdnih snoveh in podobno. Kljub temu da je v naravnih bioloških sistemih prisotnih precej paramagnetnih snovi, npr. radikalov, pa ti ponavadi niso najbolj primerni za študij lastnosti takih sistemov, bodisi zaradi kratkoživosti bodisi zaradi majhnih koncentracij. Zato v take sisteme vgrajujemo t. i. spinske označevalce, ki so bolj stabilni in hkrati bolj občutljivi na okolico, v kateri se nahajajo. Ti služijo kot sonda za opazovanje strukture v svoji okolici. S spiskimi označevalci lahko preučujemo vpliv zdravilnih učinkov ter drugih fizikalno kemičnih dejavnikov na strukturo okolice spinskega označevalca. Med mnogimi spiskimi označevalci so se najbolj uveljavili nitroksidni radikali (slika 19). Poudariti moramo veliko kemijsko stabilnost nitroksidne skupine z nesparjenim elektronom. Nitroksidne spinske označevalce uporabljamo v številnih raziskavah bioloških sistemov (Štrancar, 2000).



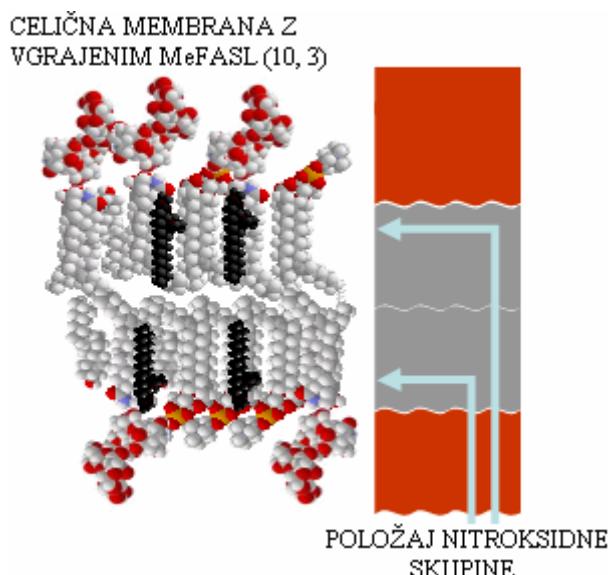
Slika 19: Splošna strukturna formula nitroksidnega radikala in prikaz π orbital (Nishide in Suga, 2005: 33)

R_1 in R_2 (slika 19) sta dela molekule spinskega označevalca, ki ju izberemo glede na sistem, ki ga raziskujemo. V nitroksidnih radikalih kroži elektron s spinom $S = \frac{1}{2}$ okoli jedra dušika s spinom $I = 1$. Iz oblike spektrov dobimo informacije o ureditvi in dinamiki alkilnih verig fosfolipidov v neposredni okolici spinskega označevalca.



Slika 20: Spinski označevalec MeFASL (10,3) z molsko maso 338 g/mol; (A) strukturna formula, (B) shematični prikaz (barve pomenijo naslednje atome: bela – vodik, siva – ogljik, rdeča – kisik, modra – dušik) (Štrancar, 2000: 27)

Pri našem delu smo uporabili zdaj že standardni spinski označevalec MeFASL (10,3) (slika 20). To je metilni ester palmitinske kisline z doksilno skupno z nitroksidnim radikalom na petem ogljikovem atomu. MeFASL je lipofilna molekula in se dobro topi v etanolu. Njegove prednosti so številne. Ta spinski označevalec ima π orbitalo, v kateri se z veliko verjetnostjo nahaja nesparjeni elektron, orientirano približno v smeri dolge osi molekule in je spekter tega spinskega označevalca močno odvisen od urejenosti molekul v sistemu.



Slika 21: Spinski označevalec v lipidnem dvosloju (Štrancar in sod., 2001: 1)

Za EPR merjenja v lipidnem dvosloju (modelnih in bioloških membranah) uporabimo spinske označevalce, ki se čim bolje vgradijo v lipidni dvosloj (slika 21). Zato uporabimo spojine, ki so analogne tistim v lipidnem dvosloju, in na katere je pripet nitroksidni radikal. Taka spinsko označena molekula se giblje skladno s podobnimi molekulami v okolini (Berliner, 1974).

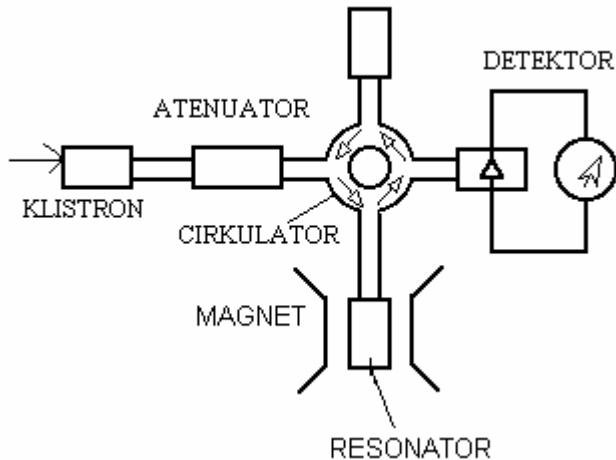
3.3.1.3 Opis spektrometra EPR



Slika 22: Spektrometer EPR za merjenje paramagnetskih molekul v magnetnem polju (EPR spektrometer Bruker BioSpin, 2005: 1)

Na sliki 23 je blok shema EPR spektrometra, s katerim izmerimo absorpcijo energije v paramagnetnem vzorcu in preko tega raziskujemo stanje atomov in molekul ter interakcije med njihovimi magnetnimi momenti.

Potrebujemo izvor valovanja (klistron), celico z vzorcem (resonator), detektor vpadlega in absorbiranega valovanja s polprepustnim zrcalom in ozkopasovnim filtrom ter ojačevalnik signalov. Klistron služi kot izvor mikrovalov, ki se prenašajo do vzorca z valovodi, ki omogočajo optimalen prenos mikrovalov. Moč valovanja lahko zmanjšamo z atenuatorjem. Vzorec postavimo v resonator, ki je sklopljen z valovodom. Frekvenca izvora mora biti ujeta z rezonančno frekvenco resonatorja, v katerem se na določenem mestu mikrovalovi zgostijo. Resonatorji so ponavadi oblikovani tako, da odbijajo neabsorbirane mikrovalove nazaj v valovod. Zato mora biti pred resonatorjem v valovodu vgrajen še cirkulator, ki opravlja funkcijo polprepustnega zrcala pri optičnem spektrometru. Valovanje iz izvora torej prepušča proti resonatorju, valovanje iz resonatorja se usmeri na detektor. Zaradi težav pri spremjanju frekvence klistrona se namreč pri EPR raje spreminja magnetno polje, kot pa frekvenco in s tem vpliva na razcep nivojev, ki mora ustrezati energiji mikrovalov. Za detektor mikrovalov lahko uporabimo različne diode, ki so občutljive v mikrovalovnem območju. Absorpcijo fotona zaznamo kot spremembo električnega toka skozi detektor (Curtain in Gordon, 1984).



Slika 23: Blok shema spektrometra EPR (Rieger, 1988: 7)

3.3.2 Postopek priprave eritrocitov

Eritrocite smo izolirali iz goveje krvi (krava, mlad bikec). Kri smo ujeli v 3,8 % raztopino natrijevega citrata v razmerju 1 : 4 (25 mL citrata : 75 mL krvi), da smo preprečili koagulacijo krvi. Nekaj mililitrov krvi smo centrifugirali 10 min pri 1500×g. Po prvem centrifugiranju smo s kapalko odstranili serum, ki se je ločil od eritrocitov. Eritrocite na dnu epruvete smo razredčili s pufrom PBS (pH 7,4) in ponovno centrifugirali. Na ta način smo eritrocite trikrat sprali s pufom PBS. Po četrtem centrifugiranju smo od suspenzije eritrocitov odvzeli 10 mL in ji dodali 10 mL pufra PBS. S tem smo dobili približno 50 % hematokrit, ki smo ga uporabili za proučevanje fluidnosti membran eritrocitov pod vplivom kamferola v odvisnosti od časa (Močnik, 2004).

3.3.2.1 Vpliv kamferola na fluidnost membrane eritrocitov

Za merjenje časovne odvisnosti smo s pomočjo rotavaporja pri tlaku 17 mbar na steni epruvete posušili 25 µL 10⁻³ M etanolne raztopine MeFASL (10,3), dodali 0,7 mL pufra PBS (pH 7,4) in 0,2 mL hematokrita, vse skupaj stresali 10 min in centrifugirali 5 min pri 900×g. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant in odpipetirali 45 µL suspenzije eritrocitov v drugo epruveto, v katero smo dodali še 1 mL pufra PBS in centrifugirali 5 min. Sedimentu na dnu epruvete smo dodali 5 µL raztopine kamferola raztopljenega v DMSO (2,6 mg KA / 0,1 mL DMSO) oz. 5 µL DMSO za kontrolo in stresali 5 min. Kontrolo smo naredili tudi s 5 µL pufra PBS. Vzorec smo prenesli v kapilaro in na spektrometu EPR smo zvezno spremljali časovno odvisnost 150 min brez prekinitev pri temperaturi 25 °C.

Preglednica 3: Eksperimentalni parametri za meritve spinsko označenih eritrocitov na EPR

frekvenca modulacije	100 kHz
amplituda modulacije	2 G
območje snemanja (Sweep)	100 G
ojačanje (Receiver Gain)	68 dB
časovna konstanta filtra (Time Constant)	10,24 ms
konverzijski čas (Conversion time)	40,96 ms
center magnetnega polja (Center field)	3320 G
frekvenca mikrovalov (Microwave)	9,5 GHz
mikrovalovna moč (Power)	10,05 mV
število snemanj za 1 spekter	3
število meritev	31

3.3.3 Postopek priprave liposomov

Liposome smo pripravili iz zmesi lipidov, ki ponazarjajo sestavo bioloških celičnih membran.

Liposome smo pripravili v molskem razmerju POPC/POPE/POPS/CH = 4 : 2 : 1 : 3,6 z metodo tankih filmov. Kratice posameznih lipidov so pojasnjene v točki 3.1. Lipide v prahu smo raztopili v osnovni raztopini mešanice metanola in kloroforma v razmerju 3 : 7 (v/v).

V stekleno bučko smo dali 8,0 mg POPC, 3,8 mg POPE, 2,1 mg POPS in 3,6 mg CH. Z rotavaporjem smo pri tlaku 17 mbar iz zmesi odparili topilo, nato smo bučko dali za nekaj časa še na črpalko, ki je izčrpala še preostanke topila. Na steni bučke se je naredil tanek film, kateremu smo dodali 0,7 mL destilirane vode in med stresanjem smo bučko namakali v vodno kopel s temperaturo 40 °C za lažje oblikovanje liposomov. Pripravljeni liposomi so imeli končno koncentracijo lipidov 25 mg/mL oz. 39,6 mM. Pri takem postopku smo dobili velike večslojne liposome (MLV). Tako pripravljeni liposomi (brez dodanega kamferola) so nam služili za kontrolni vzorec.

Za merjenje na fluorimetru smo poleg MLV liposomov pripravili tudi majhne enoslojne (ULV) liposome. S pomočjo ekstrudorja smo preko polikarbonatne filtrne membrane z velikostjo por 400 nm vzorec 20-krat iztisnili, nato pa še skozi membrano z velikostjo por 100 nm. Na ta način smo dobili ULV liposome s približno enako velikostjo 100 nm in s koncentracijo 3,1 mg/mL.

3.3.3.1 Priprava liposomov s kamferolom

Poleg kontrolnega vzorca liposomov smo pripravili še liposome z dodanimi različnimi koncentracijami kamferola in sicer 0,7 mg/mL oz. 1,3 mg/mL oz. 2,6 mg/mL. Kamferol smo raztopljal v mešanici metanola in kloroforma v razmerju 3 : 7 (v/v) in ga dodali fosfolipidom pred pripravo tankega filma.

3.3.3.2 Priprava liposomov z β -sitosterolom in holesterolom

Te liposome smo pripravili po enakem postopku (glej točko 3.3.3.1), le da smo namesto kamferola v bučko dodali enkrat 1,7 mg holesterola, drugič pa 1,8 mg β -sitosterola. Dodane količine smo določili glede na molsko razmerje optimalne koncentracije vpliva kamferola na fluidnost membrane liposomov.

3.3.3.3 Spinsko označevanje liposomov

Liposome smo spinsko označili z MeFASL (10,3), ki se je vgradil v fosfolipidne membrane liposomov. 40 μ L etanolne raztopine MeFASL (10^{-4} M) smo posušili na steni epruvete in mu dodali 50 μ L liposomov brez oz. z vgrajeno učinkovino (kamferol,

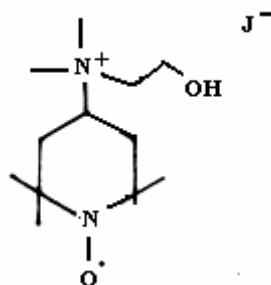
β -sitosterol ali holesterol) ter 5 min mešali na stresalniku. Vzorec smo nato prenesli v kapilaro in merili na spektrometru EPR temperaturno odvisnost od 1,5 do 40 °C po 5 °C.

Preglednica 4: Eksperimentalni parametri za meritve spinsko označenih liposomov na EPR

frekvenca modulacije	100 kHz
amplituda modulacije	1,50 G
ojačanje (Receiver Gain)	60 dB
časovna konstanta filtra (Time Constant)	20,48 ms
konverzijski čas (Conversion time)	40,96 ms
center magnetnega polja (Center field)	3320 G
območje snemanja (Sweep)	100 G
mikrovalovna moč (Power)	20,07 mV
število snemanj za 1 spekter	3
število meritev	9

3.3.3.4 Določitev notranjega volumna liposomov

Notranji volumen liposomov (V_n) je definiran kot razmerje volumna vodnega prostora, ki ga omejujejo zaključene membrane liposomov, proti celotnemu volumnu vzorca. Za določitev V_n smo v liposome vgradili spinski označevalec ASL (koncentracija 10^{-2} mol/L). ASL je hidrofilni spinski označevalec z nabojem (slika 24), ki se med hidratacijo delno vgradi v vodno fazo znotraj liposomov in zaradi naboja ne prehaja skozi membrano. ASL, ki ostane zunaj liposomov, reduciramo z natrijevim askorbatom (Na-ASC; koncentracija 0,1 mol/L; 1 : 1, v/v), ki prav tako ne prehaja skozi membrano, do hidroksilamina. Ta ni paramagneten in na spektrometru EPR ne da signala.



Slika 24: Spinski označevalec ASL z molsko maso 373 g/mol (Caron in Dugas, 1976: 20)

Eksperimentalni del:

Pripravili smo liposome iz 16,0 mg POPC, 7,6 mg POPE, 4,2 mg POPS in 7,2 mg CH kot kontrolni vzorec oz. smo dodali v drugo bučko še kamferol s koncentracijo 2,6 mg/mL. Iz zmesi smo odparili topilo in v vsako bučko dodali po 0,7 mL vodne raztopine ASL (10^{-2} M). Pripravljeni liposomi so imeli končno koncentracijo lipidov 50 mg/mL.

Za merjenje na EPR spektrometru smo pripravili dva vzorca liposomov brez kamferola. V prvi vzorec smo dodali vodo (razredčitev 1 : 1, v/v), v drugi pa 0,1 M natrijev askorbat (prav tako razredčitev 1 : 1, v/v). Raztopino natrijevega askorbata koncentracije 0,1 M smo vsakič pripravili neposredno pred merjenjem. Na enak način smo redčili liposome z vgrajenim kamferolom. Vsem štirim vzorcem smo izmerili spekter EPR in izračunali intenziteto EPR spektrov, ki je določena z dvojnim integralom.

Nato smo pripravljene liposome brez in s kamferolom prenesli v dializne kasete s polprepustno membrano in pustili dializirati v vodi čez noč. Na ta način smo odstranili ASL, ki se ni vgradil v notranjost liposomov.

Po dializiranju so bili liposomi v gelasti obliki, zato smo vsebino redčili s prefiltrirano destilirano vodo v razmerju 1 : 1 (v/v). Tako je bila končna koncentracija liposomov 25 mg/mL. Za merjenje na EPR spektrometru smo pripravili vzorce na enak način kot za merjenje pred dializo. Dializiranim liposomom brez oz. z vgrajenim kamferolom smo spremljali stabilnost do enega meseca. Iz razmerja intenzitet z askorbatom (I) in brez askorbata (I_0) smo določili notranji volumen:

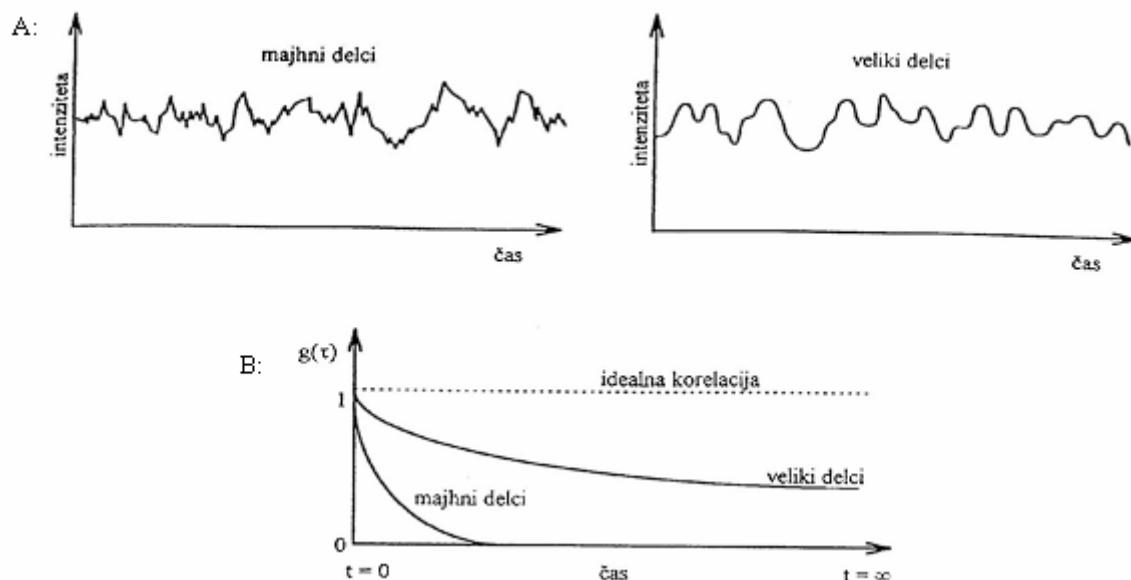
$$V_n = I / I_0 \quad \dots (2)$$

3.3.4 Fotonska koreacijska spektroskopija (PCS)

Velikost in zeta potencial liposomov smo določili s PCS napravo Zetasizer 3000 na Fakulteti za farmacijo. PCS (photon correlation spectroscopy) imenovana tudi dinamično svetlobno sisanje, analizira spremembe v intenziteti sisanja, ki nastanejo v kratkih intervalih zaradi Brownovega gibanja delcev in kapljic. Brownovo gibanje je posledica naključnih trkov molekul topila ob vsak delec, čemur sledi difuzija delcev, kar zaznamo kot fluktuacijo intenzitete sipane svetlobe s časom. Veliki delci difundirajo počasneje kot majhni in zato je hitrost fluktuacije intenzitete sipane svetlobe manjša (slika 25). Hitrost gibanja delcev ni odvisna samo od njihove velikosti, temveč tudi od viskoznosti medija in kinetične energije delcev, to pa je pogojeno s temperaturo sistema. Temperatura mora biti med merjenjem konstantna. PCS omogoča določevanje povprečne velikosti delcev submikronskih velikosti (10 nm do nekaj μm).

Prednosti PCS je v hitrih meritvah in v majhni količini vzorca. Vzorec ostane nespremenjen, saj ga ni potrebno predhodno obdelati, pa tudi med merjenjem ne pride do sprememb. V praksi se uporablja za rutinsko merjenje velikosti delcev ali struktur

koloidnih sistemov. Primerna je za liposome, nanodelce in mikroemulzije. Omejitve v uporabi PCS so predvsem v tem, da merimo dejansko hidrodinamski polmer kapljice (skupaj s solvatnim ovojem), ki je odvisen od različnih dejavnikov. Tako je izmerjeni polmer delca običajno večji kot dejanski. Metoda je neprimerena tudi, če so delci preveliki in pride do sedimentacije (Rowle, 2003).



Slika 25: (A) shema fluktuationi svetlobe glede na velikost delcev (levo - majhni delci; desno - veliki delci); (B) hitrost padanja korelacijske funkcije. Strmo padajoča eksponentna funkcija za majhne, počasi padajoča za velike delce (Rowle, 2003: 3)

Rezultati dajo povprečno velikost delcev in širino distribucije delcev, katere merilo je polidisperzni indeks (PI). PI lahko zavzame vrednosti od 0 - 1, pri čemer pomeni 0 monodisperzne, 1 pa zelo nehomogeno porazdelitev delcev po velikosti.

3.3.4.1 Določanje velikosti liposomov

Eksperimentalni del:

Za merjenje velikosti in polidisperznega indeksa liposomov smo vzorce razredčili z destilirano vodo do rahle motnosti, da smo dobili primerno disperzijo delcev za meritve. Premajhna koncentracija razredčenega vzorca zmanjša statistično zanesljivost meritve avtokorelacijske funkcije, previsoka pa povzroči neželene interakcije med delci in večkratno sipanje svetlobe. Vzorec mora biti čist. Vsebnost prašnih delcev lahko popači rezultate, saj se svetloba siplje tudi na njih. Tako pripravljen vzorec smo nalili v kivetno in jo vstavili v merilno celico (Podlogar in Gašperlin, 2003). Temperatura merjenja je bila

25 °C, število ponovitev 3, čas merjenja 120 sekund. Pomerili smo liposome brez kamferola (kontrola) in liposome z različno koncentracijo kamferola (0,7 mg/mL, 1,3 mg/mL in 2,6 mg/mL). Liposome z večjo koncentracijo kamferola (1,3 mg/mL in 2,6 mg/mL) je bilo potrebno filtrirati skozi filtrirni papir (črn trak, Schleicher & Schuell) zaradi motnosti raztopine.

3.3.4.2 Določanje zeta potenciala liposomov

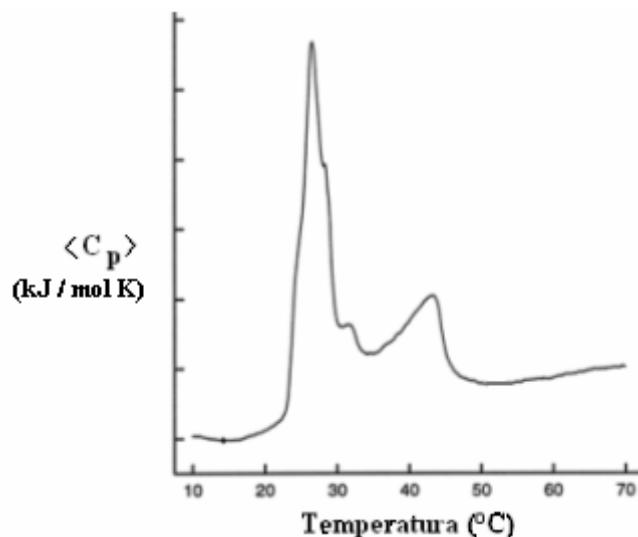
Eksperimentalni del:

Z napravo PCS Zetaseizer 3000 smo določili tudi površinski naboj delcev, ki ga imenujemo zeta potencial. Vzorce smo pripravili tako kot za določitev velikosti. 10 mL vzorca smo z injekcijsko brizgo vbrizgali v merilno celico. Temperatura merjena je bila 25 °C, število ponovitev 5, čas merjenja 20 sekund. Velikost in zeta potencial liposomov smo merili takoj po pripravi in po enem mesecu starosti. Liposome smo shranjevali v hladilniku pri 4 °C.

3.3.5 DSC analiza liposomov

Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC) se uporablja za določanje temperature faznih prehodov v snovi in temelji na množini dovedene ali odvedene toplove, potrebne za kompenzacijo merjenega toplotnega efekta v sistemu (raztopina liposomov v merilni celici), ki mu med merjenjem enakoverno spremijamo temperaturo. Merjenje poteka ob istočasni prisotnosti referenčnega sistema (enaka količina topila v referenčni celici; v našem primeru je bila to destilirana voda), tako da merjeni toplotni efekt ustreza samo spremembji entalpije, ki se nanaša na spremembo stanja liposomov. Da odstranimo nezaželene motnje okolja, posnamemo vedno t. i. bazno linijo (meritev čistega topila, torej dest. vode). To bazno linijo nato odštejemo od termograma, ki smo ga dobili za merjeno raztopino. Rezultat meritve podajamo kot odvisnost presežne toplotne kapacitete pri konstantnem tlaku $\langle C_p \rangle$ od temperature (Salobir, 1998).

Meritve DSC smo uporabljali za določevanje temperaturno induciranih faznih prehodov liposomov (mešanica POPC/POPE/POPS/CH) iz gel faze pri nižji temperaturi v tekočo fazo pri višji temperaturi. Temperatura prehoda je odvisna od dolžine verig, kemijske strukture polarnih glav ter interakcije med njimi in topilom. V modelnih membranah, ki jih sestavlja ena vrsta lipida, lahko opazimo več prehodov. Na sliki 26 je pokazan primer termograma DSC iz literature:



Slika 26: Termogram DSC za MLV liposome pripravljene iz dimiristoilfosfatidilholina (DMPC) in N-palmitoil-sfingosina (C 16:0-ceramid), kjer se vidijo fazni prehodi (Holopainen in sod., 2000: 2462)

Eksperimentalni del:

Meritve faznih prehodov liposomov smo opravili na aparatu DSC (differential scanning calorimeter) v laboratorijih Katedre za kemijo, Oddelek za živilstvo, Biotehniška fakulteta. Za merjenje na DSC-ju smo liposome razredčili z destilirano vodo na koncentracijo 0,2 mg/mL liposomov MLV in 0,3 mg/mL liposomov ULV. Vsak vzorec smo posebej 30 minut razplinjevali in nato pomerili fazne prehode v odvisnosti od temperature. Meritve smo izvedli samo pri liposomih brez dodanega kamferola. Pomerili smo tudi bazno linijo z destilirano vodo.

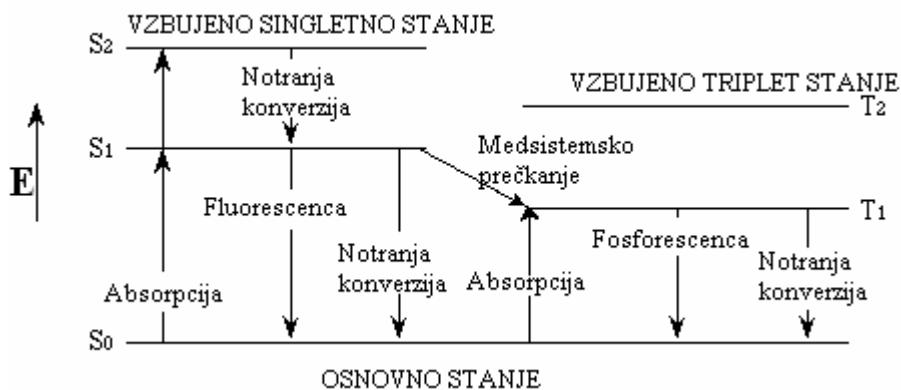
3.3.6 Fluorescenčna emisijska spektrometrija liposomov

3.3.6.1 Osnove fluorescenčne spektrometrije

Skladno s kvantno teorijo ima vsak elementarni delec (atom, molekula, ion) enoten niz energijskih stanj: osnovna in vzbujena. Z absorpcijo energije preide delec v vzbujeno stanje, relaksacijski procesi pa ga vrnejo v energijsko stabilnejše osnovno stanje in pri tem oddajajo svetlobo v obliki fotonov. Fluoresanca je eden od relaksacijskih procesov. Okolje molekule (pH, topilo, temperatura, raztopljeni kisik) in njena struktura (konjugiranost, funkcionalne skupine, togost, idr.) pa odločata, ali bo molekula fluorescirala ali ne. Od organskih spojin fluorescirajo le tiste, ki vsebujejo aromatske obroče ali visoko konjugirane alifatske sisteme. Celo za te spojine velja, da lahko pri različnih pogojih zelo različno fluorescirajo. Tako npr. kamferol slabo fluorescira v vodi, postane pa močno fluorescenten v manj polarnih topilih kot so metanol, kloroform itd. (Vesnaver, 1978).

V fluorescenčni spektroskopiji ločimo tri vrste metod: direktne, kjer merimo intenziteto naravne fluorescirajoče spojine; derivatizacijske, kjer nefluorescirajočo spojino pretvorimo v fluorescirajoči derivat; pogasitvene, kjer zmanjšamo signal fluorescirajoče spojine z dodatkom gasilne molekule. Pojav fluorescence uporabljamo za proučevanje konformacijske lastnosti spojin, stabilnosti liposomov in nanodelcev, imunološke reakcije, pri raziskovanju vezave substratov na encime (Baumgartner, 1995).

Večina molekul je v osnovnem stanju v obliki S_0 . To pomeni, da so vsi elektroni sparjeni in imajo nasprotni spin. Za vsako molekulo obstaja več t. i. singlet elektronskih energijskih stanj, ki so označeni z S_0 , S_1 in S_2 . Znotraj vsakega od teh stanj obstajajo vibracijski nivoji označeni z 0, 1 in 2. Kadar se energija fotona prenese na delec, povzroči to preskok elektrona v energijsko višjo orbitalo (slika 27). Takrat govorimo o vzbujenem ali ekscitiranem stanju, kjer sta dve orbitali zasedeni s po enim elektronom. Oba elektrona imata lahko še vedno nasproten spin (vzbujeno singletno stanje S_1 , S_2) ali pa imata enak spin (vzbujeno triplet stanje T_1 , T_2). Temu procesu pravimo medsistemske prečkanje (Lakowicz, 1999).



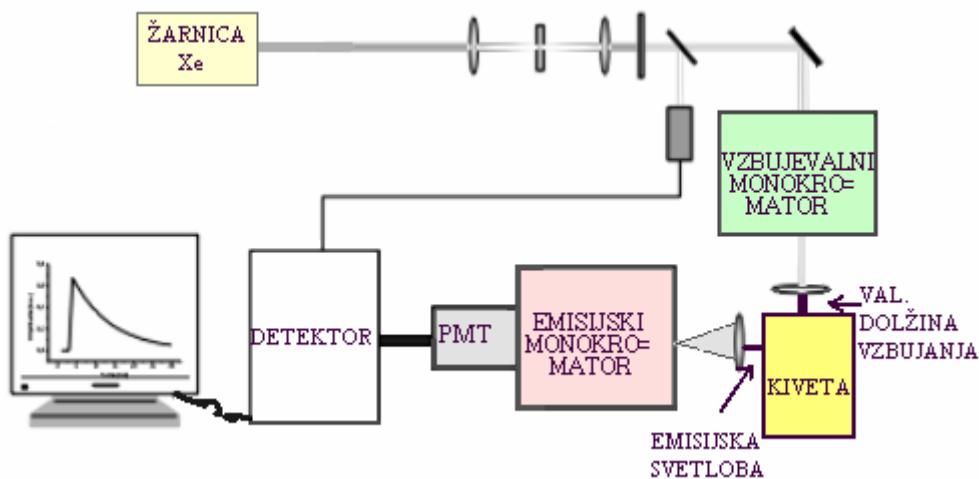
Slika 27: Energijski diagram – proces od absorpcije do emisije svetlobe (fluorescencija in fosforescencija) (Cantor, 2006: 1)

Delec je v vzbujenem stanju zelo kratek čas in v procesu releksacije odda energijo drugim atomom, molekulam, kar se kaže kot dvig temperature okolja in lahko pride do fotokemične razgradnje, do fluorescence ali fosforescence.

Fluorescencija je pojav, pri katerem se molekula, ki absorbira svetlubo in s tem preide v višje vzbujeno stanje, vrne v osnovno stanje s sevalnim prehodom. Pri tem se le delež absorbirane energije ponovno emitira kot svetloba. Take molekule fluorescirajo in jih imenujemo fluorofori. Vzbujeno stanje fluorofora je navadno zelo kratko in znaša od 0,5 do 8,0 ns. Tipičen čas za celoten proces fluorescence je 10^{-4} sekunde. Fluoroforje delimo na interne in eksterne. Interni imajo lastnost fluorescence in so prisotni v naravi (flavonoidi – kamferol, aromatske aminokisline). Kadar pa snovi, ki jih proučujemo, same ne fluorescirajo, jih dodajamo eksterne fluoroforje (sintetične barve, modificirane biomolekule) (Lakowicz, 1999).

Malo snovi fluorescira, vsak absorbirani foton pa ne povzroči emisije. To je takrat, ko se vibracijska energijska stanja osnovnega in vzbujenega stanja prekrivajo in se molekula lahko vrne v osnovno stanje z vrsto nesevajočih prehodov. Pri prehodu med vibracijskimi energijskimi stanji se vedno nekaj energije iz absorbirane svetlobe pretvori v toploto, zato je frekvence izsevane svetlobe (emisija) nižja od frekvence absorbirane svetlobe. Glede na valovno dolžino vzbujevalne svetlobe se fluorescenca pojavi pri nižji energiji, emisijski fluorescenčni spektri so premaknjeni proti daljšim valovnim dolžinam, kar imenujemo Stokes-ov premik (Ivanoš, 1999).

Neradiacijski procesi, ki konkurirajo fluorescenci, so interna konverzija, prehod triplet-singlet (ang. intersystem crossing) ter interakcije z drugimi molekulami ali kromoforji, ki zmanjšujejo intenziteto emisije (ang. quenching). Vsi ti procesi med seboj tekmujejo za depopulacijo vzbujenega singletnega stanja. Od hitrosti konkurenčnih pojavov je odvisna intenziteta fluorescence (Lakowich, 1999).



Slika 28: Shema fluorimetra; ima 2 monokromatorja - s prvim monokromatorjem izberemo valovno dolžino in vzbujenje, z drugim pa se izbere emitirano svetlubo, PMT je fotopomnoževalka (Rotomskis in sod., 2001: 484)

Slika 28 prikazuje shemo aparature, ki se uporablja za merjenje fluorescence. Vir svetlobe je visokotlačna ksenonova žarnica, ki deluje na principu rekombinacije ksenonovih ionov z elektroni v električnem toku. Žarnica daje zvezni spekter v območju valovnih dolžin med 270 in 700 nm. Vzbujevalni monokromator prepušča svetlubo tiste valovne dolžine, s katero želimo vzbujati molekule vzorca v raztopini. Snop vzbujevalne monokromatske svetlobe prehaja nato v kivetno z raztopino. Svetlubo, ki jo emitira vzorec v raztopini, merimo pravokotno na smer vpadne svetlobe. Ker želimo vedeti, kolikšna je intenziteta emitirane svetlobe pri posameznih valovnih dolžinah, jo najprej vodimo preko emisijskega manokromatorja. Prepuščana monokromatska svetluba prehaja nato na fotopomnoževalko. Ker želimo doseči čim večjo intenziteto fluorescenčne svetlobe, bomo za vzbujanje običajno uporabljali svetlubo tiste valovne dolžine, pri kateri ima absorbcijski spekter vzorca svoj maksimum. Vzbujevalni monokromator bomo nastavili na to valovno dolžino

in merili intenziteto fluorescenčne svetlobe v odvisnosti od njene valovne dolžine, ki jo bomo nastavljali z emisijskim monokromatorjem. Tako posneti spektri se imenujejo emisijski fluorescenčni spektri (Vesnaver, 1978).



Slika 29: Fluorimeter za merjenje fluorescence (Fluorescence spectrophotometer Holger, 2003: 1)

3.3.6.2 Spremljanje intenzitete fluorescence liposomov po dodatku kamferola

Predno smo začeli z meritvami na fluorimetru, smo preverili fluorescenco kamferola. V 2,5 mL kvarčno kiveto smo pipetirali 25 μL raztopljenega kamferola v mešanici metanola in kloroforma v razmerju 3 : 7 (v/v) in dodali 2475 μL mešanice organskega topila metanol in kloroform v razmerju 3 : 7 (v/v). Pri valovni dolžini vzbujanja 370 nm in napetosti na fotopomnoževalki 800 V je imel kamferol veliko intenziteto emitirane svetlobe, zato liposomom ni bilo potrebno dodajati drugih fluoroforjev. Da bi ugotovili ali kamferol v vodi fluorescira, smo posneli spekter kamferola v vodi (namesto organskega topila smo dodali enako količino destilirane vode) in ugotovili, da ima kamferol v vodi zelo majhno intenziteto emitirane svetlobe. Za merjenje na fluorimetru smo redčili liposome z destilirano vodo na koncentracijo 1 mg/mL. Še predno smo v kiveto dodali kamferol, smo posneli spekter samih liposomov in ugotovili, da sami liposomi ne fluorescirajo. V 0,5 mL kvarčno kiveto smo dali 500 μL liposomov in dodajali različne volumne raztopine kamferola s koncentracijo 1,3 mg/mL, ki je bil raztopljen v mešanici metanola in kloroforma v razmerju 3 : 7 (v/v). Tako po dodatku kamferola (10 μL , 20 μL ali 40 μL) smo spremljali intenziteto emitirane svetlobe v odvisnosti od časa. Meritev smo spremljali 60 minut. Valovna dolžina vzbujanja je bila 370 nm, intenziteta fluorescence je bila merjena pri 450 nm, PMT (fotopomnoževalka) 800 V, temperatura je bila 24 °C.

Kinetiko vgrajevanja kamferola v membrane liposomov smo spremljali tudi pri liposomih ULV. V kiveto smo odpipetirali 645 μL liposomov ULV s koncentracijo 1 mg/mL, jih redčili s 1355 μL destilirane vode ter dodali 160 μL kamferola v mešanici metanola in

kloroformu v razmerju 3 : 7 (v/v). Spremljali smo intenziteto fluorescence pri temperaturi 25 in 60 °C v odvisnosti od časa. Parametri meritev so podani v preglednici 5.

Preglednica 5: Parametri merjenja s fluorimetrom

valovna dolžina vzbujanja	370 nm
valovna dolžina emitirane svetlobe	450 nm
širina rez vzbujevalnega in emisijskega monokromatorja	5 nm
PMT fotopomnoževalka (občutljivost)	800 V
temperatura	24 °C

3.3.6.3 Vpliv temperature na lastnosti kamferola v membranah liposomov

500 µL liposomov s koncentracijo 1 mg/mL smo inkubirali približno 20 minut na sobni temperaturi s 40 µL kamferola s koncentracijo 1,3 mg/mL. Po 20 minutah smo v 2,5 mL kivetu odpipetirali 500 µL raztopine liposomov z vgrajenim kamferolom in dodali 2000 µL destilirane vode. V drugo 2,5 ml kivetu smo odpipetirali 40 µL kamferola s koncentracijo 1,3 mg/mL in dodali 2460 µL destilirane vode. Na fluorimetru smo spremljali spremembo intenzitete emitirane svetlobe pri liposomih z vgrajenim kamferolom in spremembo samega kamferola v destilirani vodi v odvisnosti od temperature. Segrevali smo do 90 °C s hitrostjo 1 °C/minuto. Valovna dolžina vzbujanja je bila 370 nm, merjenje emisije pri 450 nm, PMT 800 V. Po končanem segrevanju smo ista vzorca znova segrevali do 90 °C in tako spremljali reverzibilnost procesov.

3.3.6.4 Titracija kamferola z liposomi

V kivetu smo odpipetirali 31 µL kamferola s koncentracijo 1,3 mg/mL raztopljenega v mešanici metanola in kloroformu v razmerju 3 : 7 (v/v) ter dodali 1969 µL destilirane vode. Kamferol smo titrirali z dodajanjem liposomov. Sprva smo dodajali liposome po 2 µL, nato po 10 µL in na koncu po 50 µL ter po vsakem dodatku počakali 15 minut, da se je kamferol vgradil v membrano liposomov. Računali smo molsko razmerje R (mol kamferol : mol lipidov) ter odčitali intenziteto fluorescence pri 420 nm. Valovna dolžina vzbujanja je bila 370 nm, merjenje emisije pri 450 nm, PMT 800 V in temperatura 25 °C. Titracijo smo izvedli tako z liposomi MLV kot tudi z ULV. Začetna koncentracija kamferola v kiveti je bila pri obojih liposomih enaka (0,02 mg/mL), začetna koncentracijo liposomov MLV je bila 8,3 mg/mL, liposomov ULV pa 3,1 mg/mL.

3.3.7 Fluorescenčna emisijska spektrometrija celic bakterij vrste *S. aureus*

V literaturi nismo zasledili podatkov, da se lahko protimikrobnii učinek polifenolnih spojin določa s fluorescenčno emisijsko spektrometrijo, vendar smo se kljub temu odločili, da poskusimo preveriti protimikrobnii učinek kamferola na celice bakterij vrste *Staphylococcus aureus* z omenjeno metodo. Mikrobiološki del teh poskusov smo izvedli v laboratorijih Katedre za živilsko mikrobiologijo, Oddelek za živilstvo, Biotehniška fakulteta.

Celice so preko noči rastle v gojišču BHI pri temperaturi 37 °C tako, da so bile v eksponentni fazi rasti. Pred meritvijo na fluorimetru smo na gojišču Baird – Parker določili začetno število celic s standardno gojitveno števno metodo SIS EN ISO 4833 (2003).

Gojišče Baird – Parker agar (BP agar, Biolife) je selektivno gojišče za izolacijo koagulaza pozitivnih stafilokokov. K-telurit, glicin in litijev klorid inhibirajo rast drugih bakterij, piruvat pa spodbuja rast stafilokokov, dodan je tudi jajčni rumenjak. Premer kolonij bakterij vrste *S. aureus* je pri inkubaciji na 37 °C po 48 urah 3 mm, so črne barve (zaradi redukcije telurita), svetleče, običajno z motnim robom. Gojišče okoli kolonij je prozorno in motno zaradi delovanja različnih encimov na lipoproteine jajčnega rumenjaka in pride do nastanka različno topnih produktov (Jeršek, 2002).

Eksperimentalni del:

Na spektrofotometru smo pomerili optično gostoto celic v gojišču pri valovni dolžini 600 nm ($OD_{600} \sim 1,0$). Celice smo želeli ločiti od gojišča, zato smo 273 µL celic z gojiščem centrifugirali 10 minut pri 7000 min^{-1} v Eppendorfovi centrifugi. Po centrifugiranju smo odlili supernatant, pelet pa resuspendirali v 1 mL fiziološke raztopine (10 mM pufer HEPES, pH = 7,0 in 150 mM NaCl) ter zopet centrifugirali 10 minut pri 7000 min^{-1} . Po koncu centrifugiranja smo odlili supernatant in dodali 1 mL fiziološke raztopine ter vsebino premešali na mešalniku. Za merjenje fluorescence smo v 2,5 mL kvarčno kiveto pipetirali 250 µL celic resuspendiranih v fiziološki raztopini in 2250 µL fiziološke raztopine ter dodali še 200 µL raztopljenega kamferola v mešanici metanola in kloroforma 3 : 7 (v/v). Koncentracija raztopine kamferola je bila 96,2 µg/mL. Kinetiko vgrajevanja kamferola v membrano celic bakterij vrste *S. aureus* smo spremljali pri temperaturi 25 in 60 °C približno 100 minut. Vedeli smo, da temperatura 60 °C poškoduje bakterijske celice, vendar smo poskuse vseeno izvedli zaradi primerjave rezultatov na liposomih. Valovna dolžina vzbujanja je bila 370 nm, intenziteta fluorescence je bila merjena pri 450 nm pri PMT 800 V.

Začetno število celic bakterij vrste *S. aureus* smo določili pred meritvijo na fluorimetru tako, da smo:

- 250 µL celic smo resuspendirali v 2250 µL fiziološke raztopine in dodali 200 µL kamferola, ki je bil raztopljen v mešanici metanola in kloroforma 3 : 7 (v/v). Koncentracija kamferola je bila 96,2 µg/mL.

- 250 µL celic resuspendirali v 2250 µL fiziološke raztopine in namesto kamferola smo dodali 200 µL mešanice metanola in kloroforma v razmerju 3 : 7 (v/v).

Po fluorescenčni meritvi smo število celic bakterij vrste *S. aureus* določili v:

- 250 µL celic resuspendiranih v 2250 µL fiziološke raztopine z vgrajenim kamferolom koncentracije 96,2 µg/mL pri 25 in 60 °C.

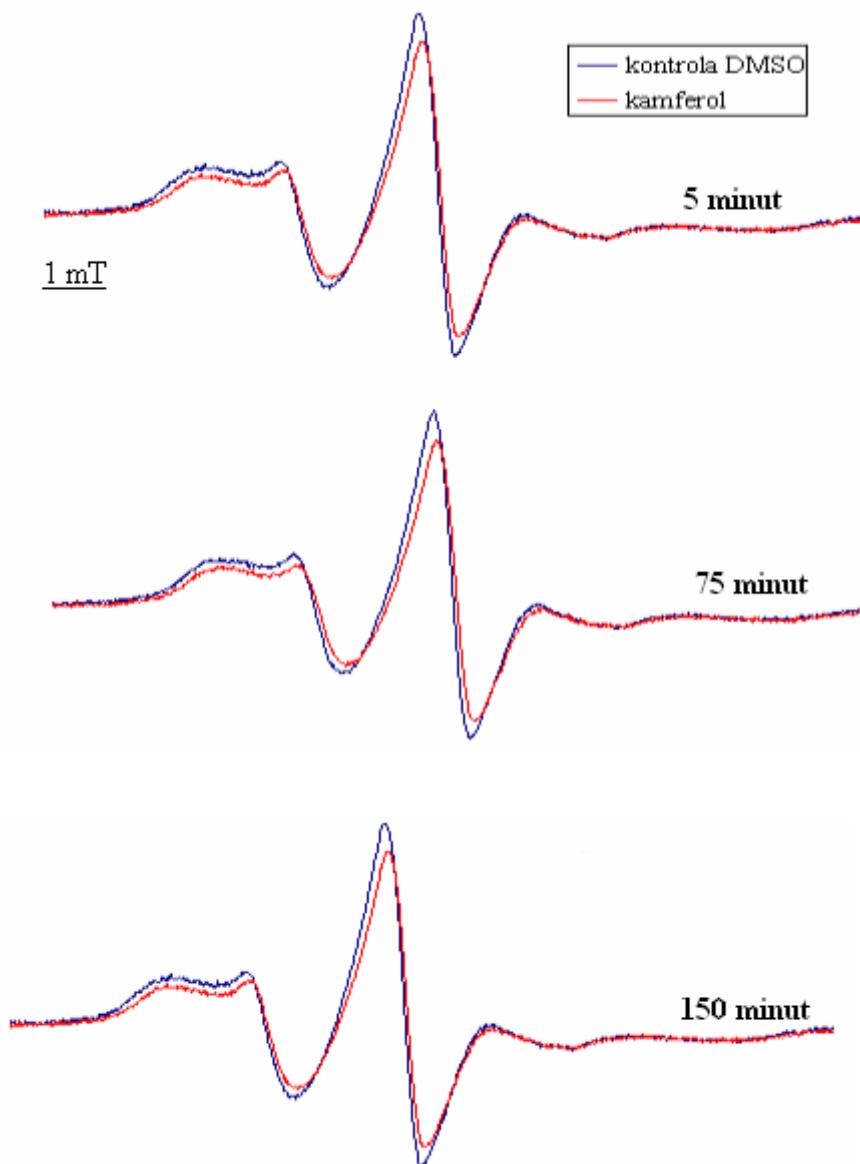
Naredili smo osnovne razredčitve tako, da 1 mL vzorca pred in po meritvi na fluorimetru odpipetiramo v 9 mL fosfatnega pufra (razredčitve od 10^{-1} do 10^{-5}). Na gojišče BP smo cepili 0,1 mL vzorca in gojišča inkubirali 1-2 dni pri temperaturi 37 °C.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 EPR SPEKTROMETRIJA ERITROCITOV

4.1.1 Kinetika vgrajevanja kamferola v membrane eritrocitov

Skušali smo ugotoviti, kakšen je učinek kamferola na fluidnost in obstojnost bioloških celičnih membran, zato smo za naš poskus uporabili membrane eritrocitov, ki smo jih proučevali v peletu (trikrat) spranih govejih eritrocitov. V membrane eritrocitov smo vgradili spinski označevalec MeFASL (10,3) in takoj po dodatku raztopine kamferola v DMSO oz. DMSO (kontrola) spremljali EPR spektre 150 min brez prekinitve.



Slika 30: Primerjava eksperimentalnih EPR spektrov eritrocitov brez in z vgrajenim kamferolom (2,6 mg KA / 0,1 mL DMSO) pri različnih časih vgrajevanja (5, 75 in 150 min) in pri temperaturi 25 °C. Prikazani so rezultati po štirikratnih merjenjih.

Primerjava eksperimentalnih spektrov EPR pri eritrocitih brez in z vgrajenim kamferolom je pokazala, da kamferol ni imel vpliva na fluidnost membrane eritrocitov niti po daljšem času inkubiranja (do 150 minut) (slika 30). Poskušali smo temu poiskati vzrok, zato smo poskus naredili v večji epruveti. Izkazalo se je, da je takoj po dodatku DMSO na pelet prišlo do hemolize eritrocitov, česar pa mi v kapilari nismo videli. Zaradi poškodovane eritrocitne membrane se je iz celic sprostil hemoglobin, kar je vzrok za tako spremenljive rezultate. Do teh spoznanj smo prišli šele, ko smo že zaključili poskuse na eritrocitih.

4.2 EPR SPEKTROMETRIJA LIPOSOMOV

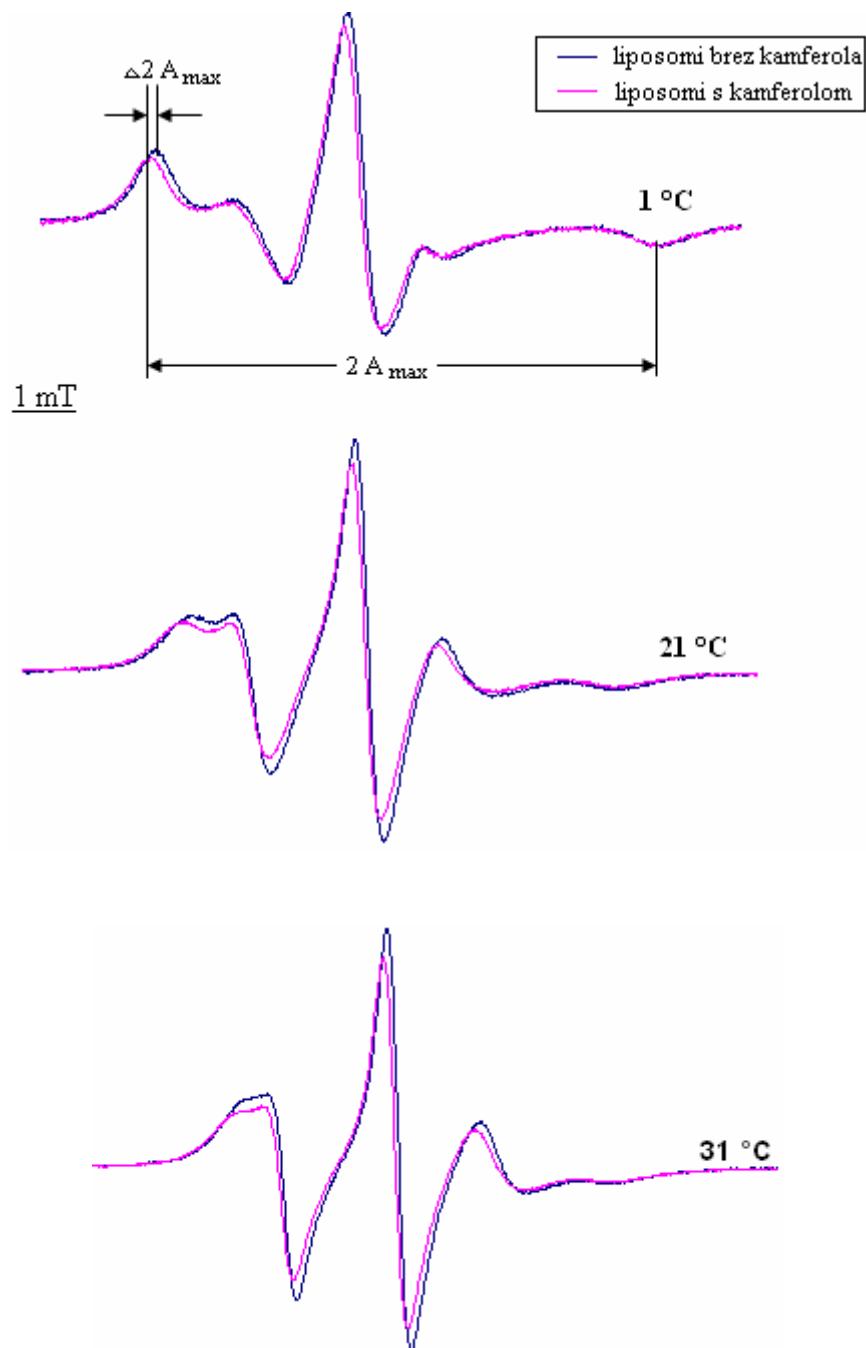
Za merjenje liposomov z metodo elektronske paramagnetne resonance (EPR) smo pripravili velike večslojne liposome (MLV) iz zmesi lipidov v molskem razmerju POPC/POPE/POPS/CH = 4 : 2 : 1 : 3,6 (glej točko 3.3.3).

4.2.1 Vpliv kamferola na membrane liposomov

Učinek kamferola smo želeli preveriti tudi na membranah liposomov sestavljenih iz lipidov, ki ponazarjajo približno sestavo lipidov v bioloških celičnih membranah. Pred pripravo vzorca smo v membrane liposomov vgradili različne koncentracije kamferola (0,7 mg/mL, 1,3 mg/mL oz. 2,6 mg/mL) in nato določeno količino le-teh inkubirali s spinškim označevalcem MeFASL (10,3). Iz posnetih EPR spektrov smo izmerili maksimalni hiperfini razcep $2A_{max}$ v odvisnosti od temperature (slika 31).

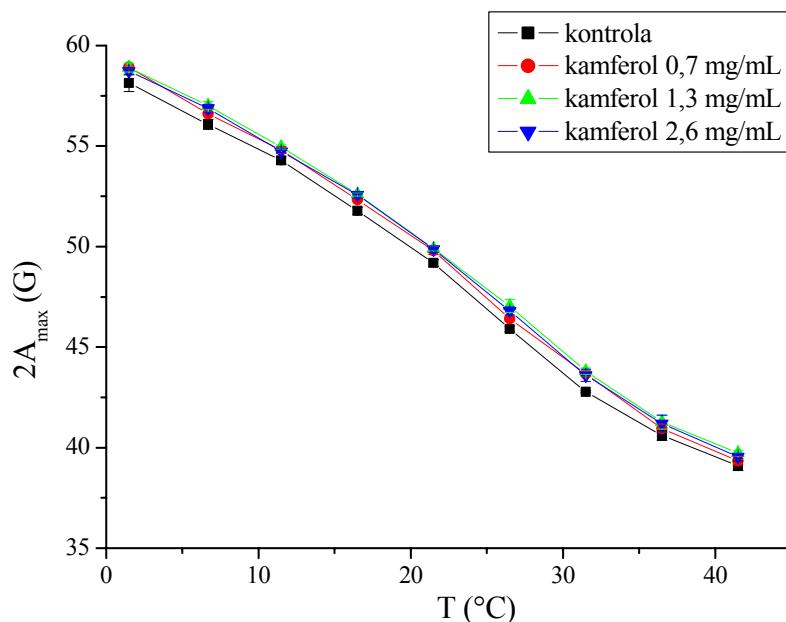
Na sliki 31 so EPR spektri liposomov z in brez kamferola. Iz spektrov smo odčitali maksimalen hiperfini razcep $2A_{max}$, ki je sorazmeren ureditvenemu parametru S. To je parameter, ki označuje povprečen odmik alkilne verige spinskega označevalca od normale na ravnino membrane. Za popolnoma urejene sisteme, kjer je velika omejitev rotacijskega gibanja spinskega označevalca, je $S = 1$. Kadar pa je gibanje molekul hitro in je majhna omejitev rotacijskega gibanja nitroksidne skupine (izotropna tekočina), je $S = 0$.

Večji $2A_{max}$ pomeni bolj urejeno in manj fluidno membrano. Z višanjem temperature postanejo membrane liposomov bolj fluidne, dodatek kamferola pa poveča urejenost lipidne dvojne plasti, $2A_{max}$ se poveča in na ta način zmanjša fluidnost membrane.



Slika 31: Primerjava eksperimentalnih EPR spektrov liposomov brez in z vgrajenim kamferolom koncentracije 1,3 mg/mL v membrane liposomov pri različnih temperaturah (1, 21 in 31 °C). Kamferol je bil raztopljen v mešanici metanola in kloroforma v razmerju 3 : 7 (v/v) in smo ga dodali lipidom pred nastankom tankega filma

Temperaturna odvisnost $2A_{\max}$ je na sliki 32, kjer vidimo, da je $2A_{\max}$ padal s temperaturo tako pri liposomih brez kamferola (kontrola) kot pri liposomih z različno koncentracijo kamferola. To pomeni, da se je z višanjem temperature zmanjšala urejenost lipidne dvojne plasti in membrane liposomov so postale bolj fluidne. V urejenih membranah in počasnem gibanju molekul je bil $2A_{\max}$ velik (pri $T = 1^{\circ}\text{C}$) in sorazmeren ureditvenemu parametru S. Pri manj urejenih membranah smo ga težje določili (slika 31, $T = 31^{\circ}\text{C}$). V liposomih brez kamferola je bil $2A_{\max}$ manjši kot pri liposomih s kamferolom v celotnem temperaturnem območju. Vpliv kamferola smo opazili že pri najmanjši koncentraciji kamferola, vendar se z večanjem koncentracije bistveno ni spremenjal.



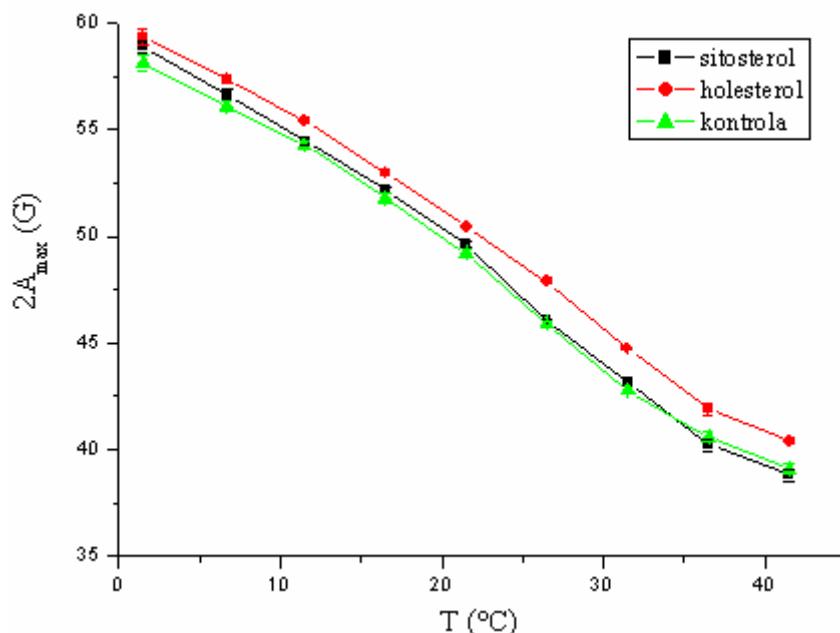
Slika 32: Temperaturna odvisnost maksimalnega hiperfinega razcepa $2A_{\max}$ spinskega označevalca MeFASL (10,3) v membranah liposomov za tri različne koncentracije kamferola (0,7 mg/mL; 1,3 mg/mL in 2,6 mg/mL). Kamferol je bil raztopljen v mešanici metanola in kloroforma v razmerju 3 : 7 (v/v). Liposomi so imeli koncentracijo fosfolipidov 25 mg/mL. V membrane liposomov smo vgradili $40 \mu\text{L} 10^{-4} \text{ M}$ etanolne raztopine MeFASL (10,3). Na grafu so prikazane povprečne vrednosti in standardna napaka petih meritev.

Do podobnih rezultatov je v svoji diplomske nalogi prišla Močnikova (2004), kjer je z metodo EPR proučevala vpliv različnih koncentracij kamferola (1,3 mg/mL, 2,6 mg/mL in 5,1 mg/mL) v membranah PC/PS liposomih. Ugotovila je, da je kamferol zmanjšal fluidnost membrane in da obstaja optimalna koncentracija kamferola (2,6 mg/mL), ki povzroči največje spremembe v fluidnosti membrane.

4.2.2 Vpliv β -sitosterola in holesterola na membrane liposomov

S tem, ko smo opazili, da je dodatek kamferola zmanjšal fluidnost membrane liposomov, smo žeeli preveriti, kakšne spremembe v membranah povzroči dodatek β -sitosterola in holesterola. β -sitosterol je rastlinski sterol, ki je po sestavi podoben holesterolu, razlikuje se le po stranski verigi. Zaradi ciklične strukture smo pričakovali, da bosta oba sterola vplivala na spremembo membranske strukture podobno kot kamferol.

Pred pripravo vzorca smo lipidom dodali raztopino β -sitosterola oz. holesterola v mešanici metanola in kloroformu v razmerju 3 : 7 (v/v). Količine dodanega β -sitosterola in holesterola smo določili glede na molsko razmerje kamferola s koncentracijo 1,3 mg/mL. Pripravljene liposome smo spinsko označili z MeFASL-om (10,3) in spremljali $2A_{\max}$ v odvisnosti od temperature (slika 33).



Slika 33: Temperaturna odvisnost maksimalnega hiperfinega razcepa $2A_{\max}$ spinskega označevalca MeFASL v membranah liposomov z vgrajenim β -sitosterolom (koncentracija 1,8 mg/mL) in holesterolom (koncentracija 1,7 mg/mL). Liposomi so imeli koncentracijo fosfolipidov 25 mg/mL. V membrane liposomov smo vgradili 40 μ L 10^{-4} M etanolne raztopine MeFASL (10,3). Prikazane so povprečne vrednosti in standardna napaka dveh meritev.

S slike 33 vidimo, da je tudi tu vrednost $2A_{\max}$ v odvisnosti od temperature padala. β -sitosterol ni vplival na fluidnost membrane liposomov. Vzrok je lahko v sami strukturi β -sitosterola ali pa pri tako majhni dodani koncentraciji (1,8 mg/mL) nima vpliva na dinamiko alkilnih verig v membrani.

Povečana količina dodanega holesterola pa poveča urejenost membranskih domen glede na kontrolo, kar pomeni, da zmanjša fluidnost membrane liposomov. To je predvsem pomembno v naravnem biološkem sistemu, kjer ima holesterol sposobnost regulacije

fluidnosti celične membrane in sicer poveča ureditev alkilnih verig v slabše urejeni membrani, v dobro urejeni gel fazi pa jo zmanjša. Na ta način vpliva holesterol na permeabilnost membran.

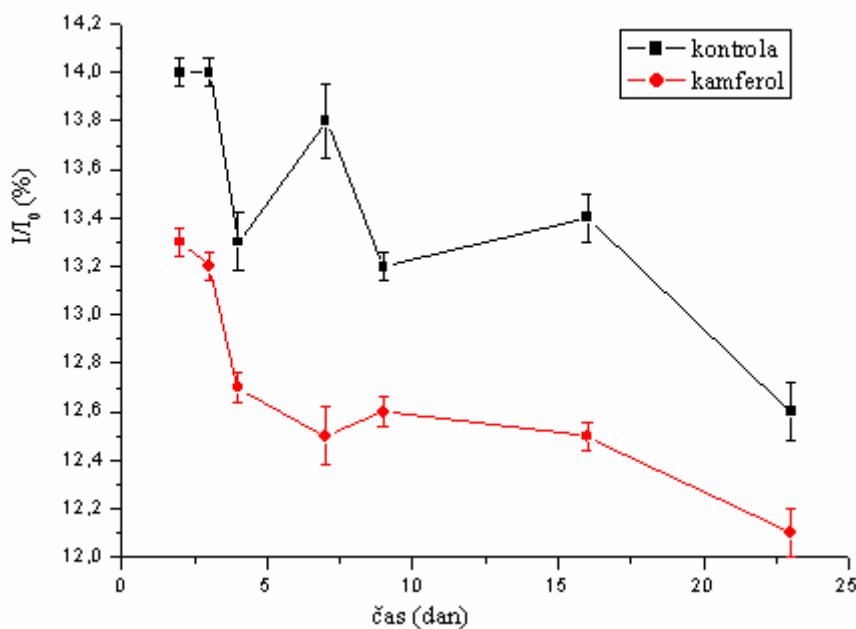
Naši rezultati sovpadajo z Močnikovimi (Močnik, 2004), ki je v svoji diplomski nalogi ugotovila, da holesterol podobno kot kamferol vpliva na fluidnost membrane PC/PS liposomov. Ta učinek je za enake koncentracije obeh spojin, pri holesterolu veliko večji.

4.2.3 Notranji volumen in stabilnost liposomov

Notranji volumen (V_n) liposomov brez in z vgrajenim kamferolom koncentracije 2,6 mg/mL smo spremljali v časovnem obdobju enega meseca. Pred pripravo vzorca smo dodali spinski označevalci ASL, ki se je med hidratacijo delno vgradil v vodno fazo znotraj liposomov. Takoj po pripravi liposomov smo izmerili notranji volumen iz razmerja intenzitet EPR spektrov po dodatku Na-askorbata (I) in brez Na-askorbata (I_0); $V_n = I/I_0$. Intenziteta EPR spektra pomeni površino pod krivuljo, ki jo opiše absorpcijski spekter in je sorazmerna številu paramagnetnih centrov v vzorcu. Zato lahko EPR spektroskopijo uporabljamo v primerih, ko se zaradi nekega procesa (oksidacija, redukcija), ki poteka v vzorcu, spreminja koncentracija spinskega označevalca.

Vzorce smo nato pustili čez noč dializirati, da smo odstranili ASL, ki se ni vgradil v notranjost liposomov. Spremljali smo spremembo intenzitete EPR spektra po dodatku Na-askorbata s časom. Membrane liposomov so pokale in spinski označevalci ASL, ki je bil vgrajen v notranjosti liposomov, se je sproščal iz liposomov. Na-askorbat ga je reduciral do hidroksilamina, ki ni paramagneten in na EPR spektrometru ne da signala. To ima za posledico zmanjšanje intenzitete EPR spektra.

Na sliki 34 smo opazili, da se je intenziteta liposomov v kontroli po 23 dnevih signifikantno zmanjšala, medtem ko se je v liposomih s kamferolom počasi zmanjševala že takoj po pripravi. Sklepamo, da so liposomi s kamferolom manj stabilni in da ta bistveno vpliva na sestavo liposomov.



Slika 34: Časovno spremljanje sprememb stabilnosti liposomov brez in z vgrajenim kamferolom (2,6 mg/mL). Prikazane so povprečne vrednosti in standardna napaka treh meritev

4.3 PCS LIPOSOMOV

4.3.1 Velikost liposomov

Z merjenjem velikosti liposomov smo skušali ugotoviti, če se s staranjem liposomov njihova velikost spreminja. Za meritev smo uporabili liposome, ki so bili stari ali 1 dan oz. približno štiri tedne. V preglednici 6 so podane povprečne vrednosti velikosti liposomov treh meritev.

Preglednica 6: Časovno spreminjanje velikosti liposomov brez in z vgrajenim kamferolom različnih koncentracij. Meritev je potekala pri 25 °C.

VELIKOST LIPOSOMOV (nm)		
	1 DAN	1 MESEC
KONTROLA	645 ± 34	820 ± 50
KA 1	752 ± 43	854 ± 31
KA 2	836 ± 39	921 ± 16
KA 3	753 ± 24	773 ± 11

KA 1 = 0,7 mg/mL kamferola
KA 2 = 1,3 mg/mL kamferola
KA 3 = 2,6 mg/mL kamferola

Iz preglednice 6 je razvidno, da so bili sveži liposomi z vgrajenim kamferolom večji kot kontrolni liposomi, kar pomeni, da je kamferol bistveno vplival na velikost liposomov. To vidimo pri vseh treh koncentracijah vgrajenega kamferola. Po enem mesecu se je velikost liposomov povečala tako pri kontrolnih liposomih kot pri liposomih z vgrajenim kamferolom različnih koncentracij. Sklepamo, da je prišlo do medsebojnega združevanja liposomov.

Polidisperzni indeks je bil pri sveže pripravljenih liposomih 1, po enem mesecu starosti pa $0,94 \pm 0,03$, kar pomeni, da smo imeli zelo nehomogeno porazdelitev delcev po velikosti. Opazili smo tudi nekatere organoleptične spremembe in sicer so bili starejši liposomi bolj viskozni kot sveže pripravljeni. Malenkostno so se razlikovali tudi v barvi. Pri delu smo zato uporabljali največ pet dni stare liposome.

4.3.2 Zeta potencial liposomov

Na liposomih brez in z vgrajenim kamferolom različne koncentracije smo določili tudi površinski naboj delcev, ki ga imenujemo zeta potencial. Z merjenjem zeta potenciala smo skušali ugotoviti, če se s staranjem liposomov spreminja površinski naboj. V preglednici 7 so podane povprečne vrednosti zeta potenciala liposomov pri petih merjenjih.

Preglednica 7: Časovno spremenjanje zeta potenciala liposomov brez in z vgrajenim kamferolom različnih koncentracij. Meritev je potekala pri 25°C .

	ZETA POTENCIAL LIPOSOMOV (mV)	
	1 DAN	1 MESEC
KONTROLA	-43 \pm 1,5	-57 \pm 5,0
KA 1	-52 \pm 3,6	-51 \pm 1,5
KA 2	-56 \pm 1,1	-43 \pm 1,0
KA 3	-63 \pm 0,9	-40 \pm 2,0

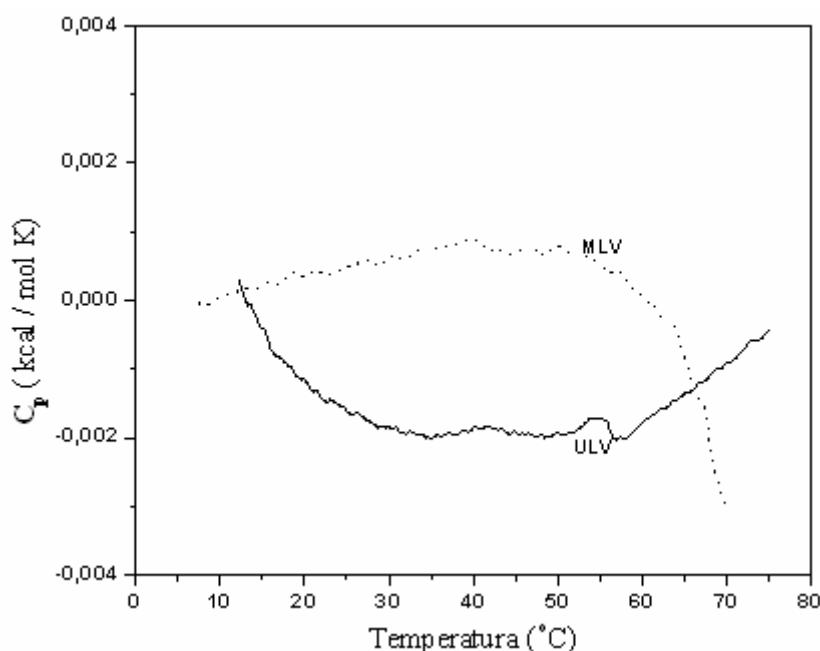
KA 1 = 0,7 mg/mL kamferola
KA 2 = 1,3 mg/mL kamferola
KA 3 = 2,6 mg/mL kamferola

Sveži liposomi z vgrajenim kamferolom so imeli večji negativni površinski naboj kot kontrolni liposomi. Po enem mesecu starosti liposomov se je površinski naboj zmanjšal pri liposomih z vgrajenim kamferolom pri vseh treh koncentracijah, pri kontroli pa povečal. Te spremembe so bile premosorazmerne s koncentracijo kamferola po 1 dnevu in obratno sorazmerne po 1 mesecu.

Oteiza in sodelavci (Oteiza in sod., 2005) so ugotovili, da so flavoni in flavanoni bolj hidrofobni in imajo zato večji vpliv na površinski naboj liposomov v primerjavi s flavonoli (kamferol, kvercetin, morin idr.). Izmed flavonolov je imel kamferol večji vpliv na površinski naboj liposomov, ker ima na obroču B vezano samo eno -OH skupino. Medtem ko imata kvercetin in morin vezani po dve -OH skupini na obroču B, kar pomeni manjšo hidrofobnost in posledično manjši vpliv na površinski naboj liposomov.

4.4 DSC MERITEV LIPOSOMOV

Na liposomih mešanice fosfolipidov POPC/POPE/POPS/CH smo opravili DSC meritev, s katero določimo temperaturno inducirane fazne prehode iz gel faze pri nižji temperaturi v tekočo fazo pri višji temperaturi.¹



Slika 35: DSC termogram MLV (veliki večslojni liposomi) in ULV (majhni enoslojni liposomi) za mešanico lipidov POPC/POPE/POPS/HOLESTEROL brez dodanega kamferola. Koncentracija lipidov je bila 39,6 mM

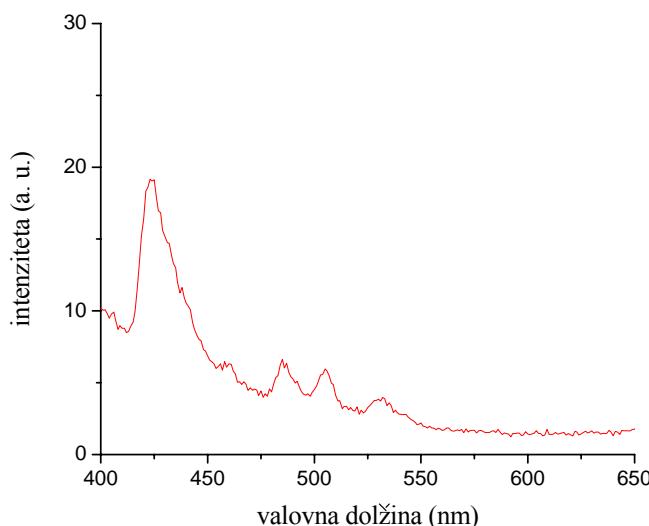
Liposomi sestavljeni iz štirih vrst lipidov (POPC/POPE/POPS/HOLESTEROL) niso imeli faznega prehoda. Menimo, da so v tekoči kristalni fazi v preiskovanem temperaturnem območju zaradi heterogene sestave. Pri liposomih MLV topotna kapaciteta C_p pada pri temperaturah višjih od 50 °C. Sklepamo, da je prišlo najverjetneje doobarjanja liposomov. Če primerjamo sliko 35 s podatki iz literature (slika 26), kjer so liposomi sestavljeni samo iz dveh vrst lipidov (DMPC/C16:0-ceramid), vidimo pri slednjih faznih prehodih.

¹ Meritev na kalorimetru DSC je izvedla prof. dr. Nataša Poklar Ulrich

4.5 FLUORESCENČNA SPEKTROMETRIJA LIPOSOMOV

Iz zmesi lipidov POPC/POPE/POPS in holesterola smo pripravili velike MLV in majhne ULV liposome s koncentracijo lipidov 39,6 mM. Z merjenjem na fluorimetru smo ugotovili, da je imel raztopljeni kamferol v mešanici metanola in kloroform (3 : 7, v/v) veliko intenziteto emitirane svetlobe, zato liposomom ni bilo potrebno dodajati drugih fluoroforjev. Pri našem poskusu smo žeeli raziskati, kako se spreminja fluorescenčna emisijska intenziteta kamferola pri vgrajevanju v membrane liposomov.

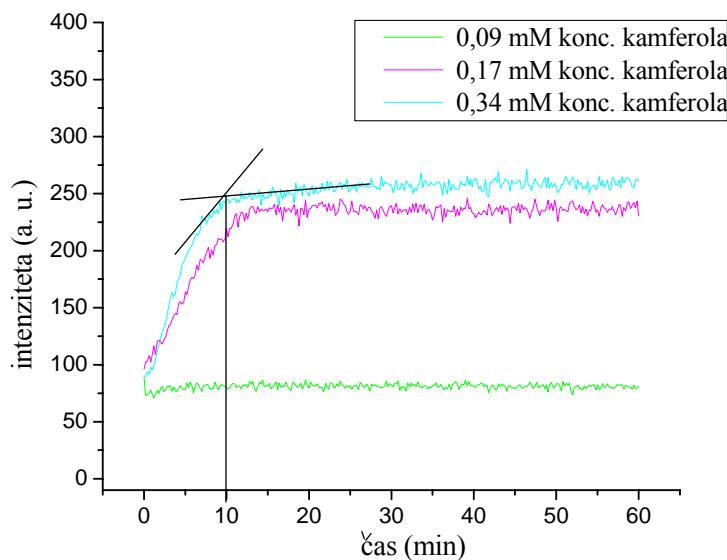
Predno smo začeli z merjenjem sprememb emisijske intenzitete kamferola v prisotnosti liposomov, smo posneli spekter samih liposomov v vodi in ugotovili, da imajo prazni liposomi zelo majhno intenziteto emitirane svetlobe (slika 36).



Slika 36: Fluorescenčni emisijski spekter liposomov brez dodanega kamferola. Valovna dolžina vzbujanja je bila 370 nm, PMT (fotopomnoževalka) 800 V. Koncentracija MLV (veliki večslojni) liposomov v kiveti je bila 0,96 mg/mL

4.5.1 Kinetika vgrajevanja kamferola v membrane liposomov

Liposomom smo dodajali različne koncentracije raztopine kamferola in pričeli s takojšnjim merjenjem spremembe emisijske intenzitete pri vgrajevanju kamferola v membrane liposomov. Kamferol je bil raztopljen v mešanici metanol in kloroform v razmerju 3 : 7 (v/v). Kinetika vgrajevanja kamferola je prikazana na sliki 37.



Slika 37: Časovna odvisnost intenzitete fluorescence MLV liposomov pri različnih koncentracijah kamferola. Valovna dolžina vzbujanja je bila 370 nm, intenziteta fluorescence je bila merjena pri 450 nm, PMT (fotopomnoževalka) 800 V. Temperatura je bila 24 °C, koncentracija liposomov je bila 0,98 mg/mL (1,55 mM), 0,96 mg/mL (1,52 mM) in 0,93 mg/mL (1,46 mM). Koncentracija kamferola je bila 0,09 mM, 0,17 mM in 0,34 mM

Slike 37 vidimo, da se je intenziteta emitirane svetlobe takoj po dodatku kamferola začela povečevati, zato sklepamo, da se je kamferol vgradil v membrane liposomov oz. da je bil v nepolarnem okolju. To se lepo vidi predvsem pri dodani višji koncentraciji kamferola (0,17 mM in 0,34 mM), kjer se je intenziteta fluorescence povečala do vrednosti okoli 250 a. u. Čas vgrajevanja kamferola v membrane liposomov je bil najkrajši pri največji dodani koncentraciji kamferola in sicer se je kamferol s koncentracijo 0,34 mM vgradil v membrane že po 10 minutah. Pri manjši koncentraciji dodanega kamferola (0,17 mM) se je čas vgraditve podaljšal na približno 15 minut in tudi intenziteta fluorescence je padla. Pri dodani 0,09 mM koncentraciji kamferola je bila intenziteta emitirane svetlobe zelo majhna. Ko se je kamferol enkrat vgradil v membrane liposomov, je tam tudi ostal, ker se intenziteta fluorescence s časom ni spremenjala.

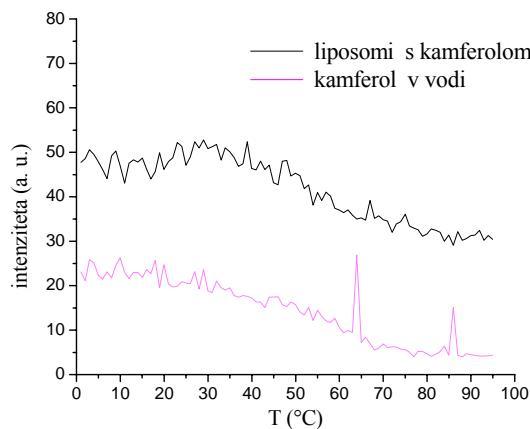
Na podlagi dobljenih rezultatov smo pri vseh nadaljnjih poskusih dodajali raztopino kamferola s koncentracijo 0,34 mM.

4.5.2 Vpliv temperature na lastnosti kamferola v membranah liposomov

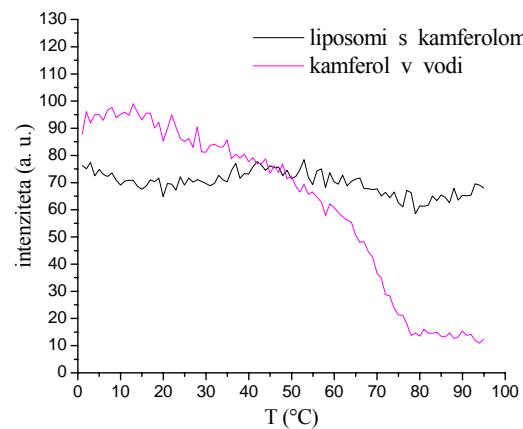
Zanimalo nas je, kako sprememba temperature vpliva na lastnosti vgrajenega kamferola v membranah liposomov. Pred merjenjem na fluorimetru smo liposome inkubirali s kamferolom približno 20 minut na sobni temperaturi. Spremembo intenzitete fluorescence smo spremljali tudi pri samem kamferolu v destilirani vodi v odvisnosti od temperature

(slika 38 A). Po končanem segrevanju smo ista vzorca znova segrevali do 90 °C in tako spremljali reverzibilnost procesov (slika 38 B).

A:



B:



Slika 38: Spremljanje intenzitete fluorescence liposomov MLV z že vgrajenim kamferolom in intenzitete fluorescence samega kamferola v destilirani vodi kot funkcija temperature. (A) pri 1-kratnem segrevanju, (B) pri 2-kratnem segrevanju liposomov. Segrevanje do 90 °C s hitrostjo 1 °C/min, vzbujanje pri 370 nm in merjenje intenzitete pri 450 nm, PMT (fotopomnoževalka) 800 V. Koncentracija liposomov 0,93 mg/mL, koncentracija kamferola 0,096 mg/mL

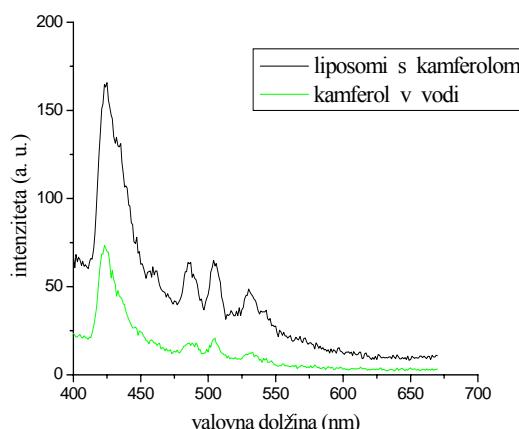
Intenziteta fluorescence liposomov z vgrajenim kamferolom kot tudi intenziteta samega kamferola v vodi je s temperaturo padala (slika 38 A). Ena od razlag za manjšo intenziteto kamferola pri višji temperaturi je proces ugašanja (neradiacijski procesi). Intenziteta kamferola v vodi je bila manjša od intenzitete kamferola vgrajenega v membrane liposomov, kar je v skladu s tem, da kamferol slabo fluorescira v vodi, postane pa močno fluorescenten v nepolarnem okolju (Vesnaver, 1978).

Isti vzorec smo 2-krat segrevali do 90 °C (slika 38 B) in ugotovili, da je proces irreverzibilen. Intenziteta emitirane svetlobe kamferola vgrajenega v liposome se je pri drugem segrevanju povečala v primerjavi s prvim segrevanjem. Intenziteta fluorescence liposomov z vgrajenim kamferolom se pri drugem segrevanju ni bistveno spremenjala, medtem ko je bila intenziteta fluorescence kamferola v destilirani vodi večja do 50 °C, po tej temperaturi pa se je močno zmanjšala. Med segrevanjem se lahko v raztopini zgodi veliko procesov, ki vplivajo na emisijo. Ti procesi so lahko na primer trki z molekulami v okolini (s topilom), tvorba kompleksov, prenos energije, konformacijske spremembe ter vsi procesi, ki so vezani na translacijsko in rotacijsko gibanje molekul (Lakowicz, 1999).

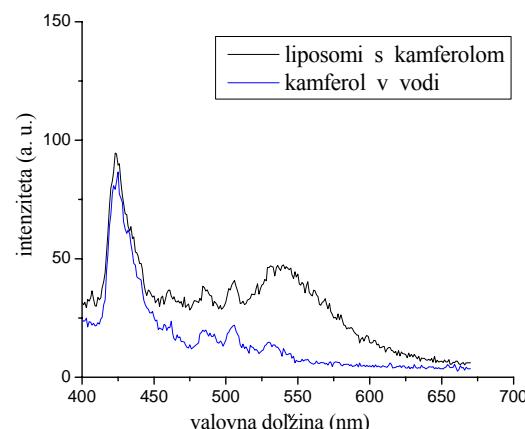
Po končanem segrevanju smo izmerili še fluorescenčne emisijske spektre za liposome z vgrajenim kamferolom in za kamferol v vodi (slika 39). Fluorescenčni emisijski spektri predstavljajo odvisnost intenzitete od valovne dolžine in s primerjavo dveh spektrov pri določeni valovni dolžini lahko ocenimo, kaj se je dogajalo z vzorcem med meritvijo. Opazili smo, da se je intenziteta fluorescence vgrajenega kamferola v membrane liposomov po drugem segrevanju zmanjšala v primerjavi z intenziteto vgrajenega

kamferola po prvem segrevanju, kar lahko razlagamo z možnimi neradiacijskimi procesi, ki so konkurirali fluorescenci in tako zmanjšali intenziteto emisije.

A:



B:

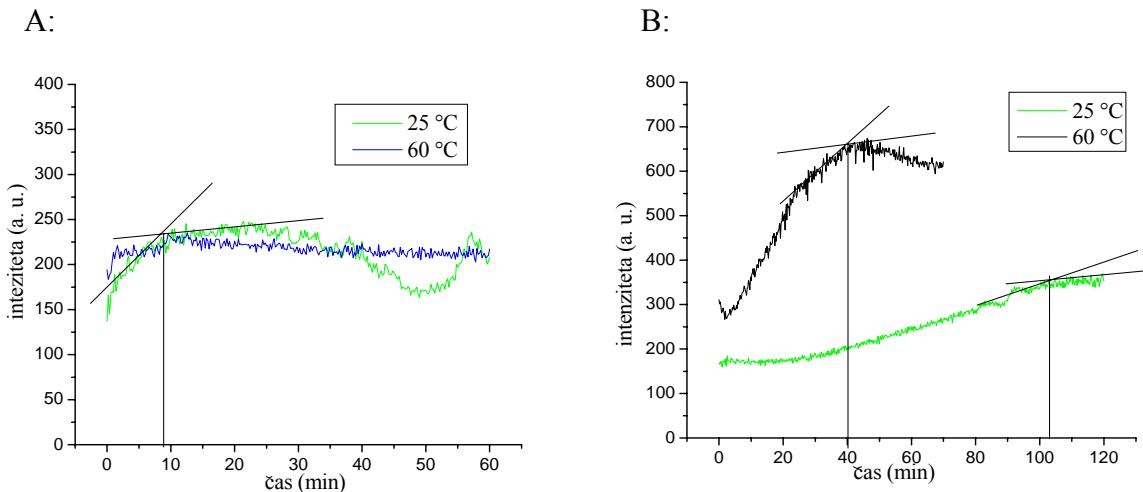


Slika 39: Primerjava spektra liposomov z vgrajenim kamferolom s spektrom kamferola v destilirani vodi po končanem 1-kratnem segrevanju (A) in po končanem 2-kratnem segrevanju (B) do 90 °C. Valovna dolžina vzbujanja 370 nm, PMT (fotopomnoževalka) 800 V, koncentracija liposomov 0,93 mg/mL, koncentracija kamferola 0,096 mg/mL

Intenziteta celotnega spektra kamferola v prisotnosti liposomov se poveča, kar pomeni, da se kamferol nahaja v bolj nepolarnem okolju.

4.5.3 Vgrajevanje kamferola v membrane liposomov pri 25 in 60 °C

Pri poskusu, kjer smo spremljali vpliv temperature na lastnosti kamferola v membranah liposomov, smo opazili spremembo intenzitete fluorescence v temperaturnem območju med 25 in 60 °C. Na osnovi tega smo se odločili za spremeljanje kinetike vgrajevanja kamferola v membrane liposomov tako pri velikih MLV kot pri majhnih ULV liposomih pri omenjenih temperaturah. Predvidevali smo, da se bo kamferol v membrane liposomov hitreje vgradil pri višji temperaturi.



Slika 40: Časovna odvisnost fluorescentne intenzitete liposomov po dodatku kamferola pri dveh različnih temperaturah (25 in 60 °C). (A) vgrajevanje kamferola v membrano MLV liposomov, (B) vgrajevanje kamferola v membrano liposomov ULV. Valovna dolžina vzbujanja 370 nm, merjenje intenzitete pri 450 nm, fotopomnoževalka 800 V, koncentracija liposomov 0,93 mg/mL, koncentracija kamferola 0,096 mg/mL

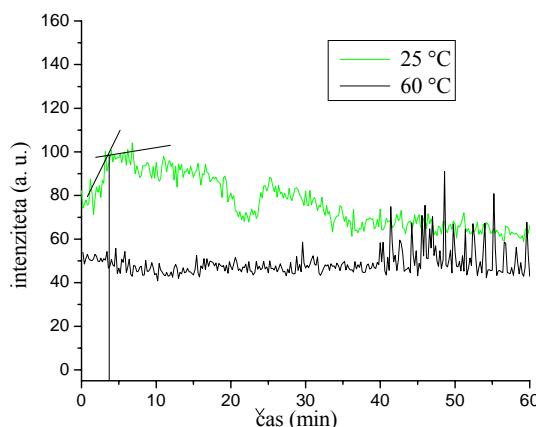
S slike 40 A vidimo, da se je kamferol s koncentracijo 0,34 mM vgradil v membrane liposomov pri temperaturi 25 °C približno po 10 minutah in intenziteta fluorescence vgrajenega kamferola je bila okoli 250 a. u. Ti rezultati sovpadajo z dobljenimi rezultati na sliki 37 pri koncentraciji kamferola 0,34 mM. Po 40 minutah je intenziteta emitirane svetlobe najprej padala, nato pa začela zopet naraščati, kar bi si lahko razlagali, da kamferol prehaja še v druge plasti membrane liposomov, ker smo imeli MLV liposome (veliki večslojni vezikli). Pri temperaturi 60 °C je bil čas vgrajevanja kamferola v membrane liposomov MLV zelo kratek (manj kot 5 minut), intenziteta fluorescence pa se s časom ni spremenjala, zato sklepamo, da je kamferol v membrani tudi ostal. S tem smo potrdili naša domnevanja, da se bo kamferol pri višji temperaturi hitreje vgradil v membrane liposomov.

Pri ekstrudiranih liposomih (slika 40 B) velikosti 100 nm (ULV - enoslojni liposomi) se je podaljšal čas vgraditve kamferola v membrane v primerjavi z liposomi MLV (slika 40 B). Pri 25 °C se je kamferol vgradil po približno 110 minutah, pri 60 °C pa v 40 minutah. Tudi intenziteta emitirane svetlobe kamferola pri obeh temperaturah je bila večja v primerjavi z liposomi MLV. Na osnovi dobljenih rezultatov sklepamo, da sta velikost liposomov in število lipidnih dvoslojev pomembna pri vgrajevanju kamferola v membrane. Manjši so bili liposomi, počasneje je prehajal kamferol v membrane ne glede na vpliv temperature.

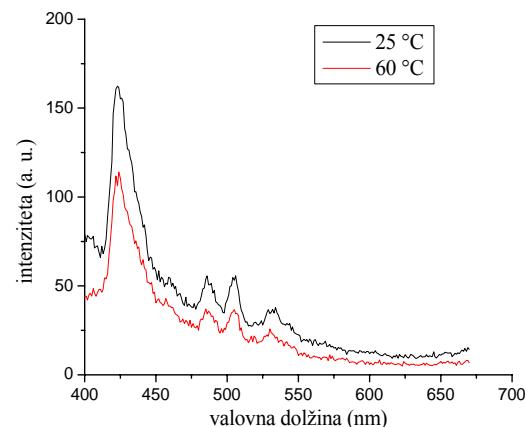
4.5.4 Vgrajevanje kamferola pri manjši koncentraciji liposomov

V tem poskusu smo poskušali ugotoviti, kakšne so razlike, če spremljamo kinetiko vgrajevanja kamferola v membrane liposomov MLV pri manjših koncentracijah kamferola in liposomov prav tako pri 25 in 60 °C.

A:



B:



Slika 41: (A) spremjanje intenzitete fluorescence liposomov MLV v raztopini s koncentracijo 0,099 mg/mL in koncentracijo kamferola 0,010 mg/mL pri dveh različnih temperaturah (25 in 60 °C) kot funkcija časa. (B) spektra liposomov MLV z vgrajenim kamferolom po 60 minutnem merjenju pri temperaturi 25 in 60 °C. Valovna dolžina vzbujanja 370 nm, merjenje intenzitete fluorescence pri 450 nm, PMT 800 V.

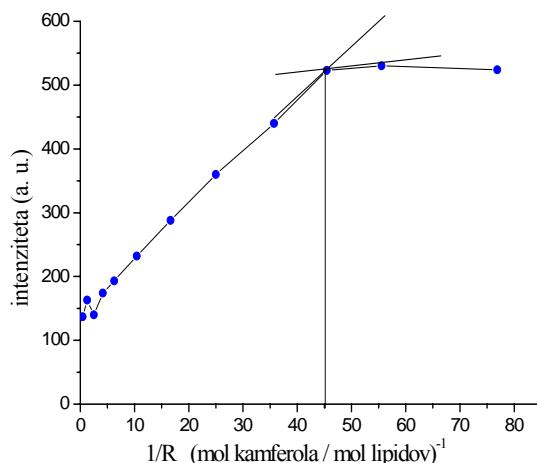
Pri 25 °C in 10-krat manjši koncentraciji liposomov in kamferola je bil prehod kamferola v membrano liposomov hitrejši in sicer je prešel v membrano v manj kot 5 minutah (slika 41 A). Tudi tu je prišlo do zmanjšanja intenzitete emitirane svetlobe že po 20 minutah, nato je začela naraščati in po 25 minutah se je začela zopet zmanjševati. Pri temperaturi 60 °C je bilo vgrajevanje kamferola v membrane liposomov verjetno zelo hitro (nekaj sekund). Ko je kamferol prešel v membrano, je tam tudi ostal, ker se intenziteta fluorescence s časom ni spremenjala. Po 40 minutah merjenja je prišlo do večjega sisanja svetlobe najverjetneje zaradi združevanja liposomov in kamferola v skupke.

Po končanem 60 minutnem segrevanju smo izmerili še fluorescenčni emisijski spekter pri 10-krat manjši koncentraciji liposomov z vgrajenim kamferolom pri 25 in 60 °C (slika 41 B). Opazili smo, da je bila intenziteta celotnega spektra vgrajenega kamferola po segrevanju pri 60 °C manjša v primerjavi z intenziteto po segrevanju pri 25 °C. Ena od razlag za manjšo intenziteto kamferola pri višji temperaturi je proces ugašanja (neradiacijski procesi), ki konkurira fluorescenci in je tako zmanjšal intenziteto emisije.

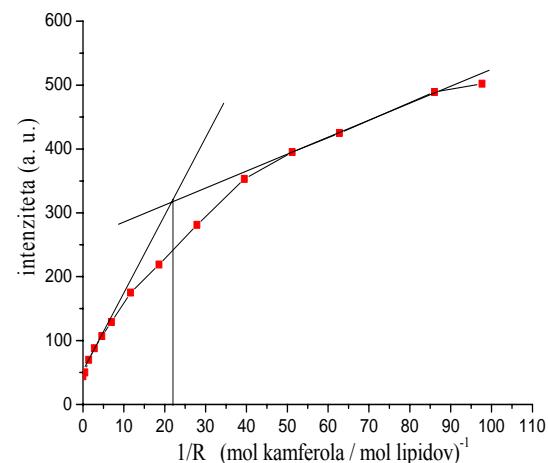
4.5.5 Titracija kamferola z liposomi

Do sedaj smo pri vseh poskusih spremljali vgrajevanje določene količine kamferola v membrane liposomov. Nato nas je zanimalo, kolikšna količina kamferola pa bi se vgradila v membrane oz. kdaj bi dosegli nasičenost liposomov s kamferolom. Zato smo izvedli titracijo. Sprva smo poskušali liposome titrirati s kamferolom, vendar je bil šum prevelik, zato smo raje uporabili reverzno titracijo, kjer smo kamferol titrirali z liposomi. Titracijo smo izvedli tako, da smo kamferolu dodajali liposome po μL in vsakokrat počakali, da se je kamferol vgradil v membrane in šele nato posneli fluorescenčne emisijske spekture. Kamferol smo titrirali tako z velikimi MLV kot z majhnimi ULV liposomi.

A:



B:



Slika 42: (A) titracija kamferola z liposomi MLV, začetna koncentracija liposomov 8,33 mg/mL in začetna koncentracija kamferola 0,02 mg/mL. (B) titracija kamferola z liposomi ULV velikosti 100 nm, začetna koncentracija liposomov 3,1 mg/mL in začetna koncentracija kamferola 0,02 mg/mL. Valovna dolžina vzbujanja 370 nm, merjenje emisije pri 450nm, PMT 800, $T = 25^\circ\text{C}$. R je molsko razmerje kamferol : lipidi.

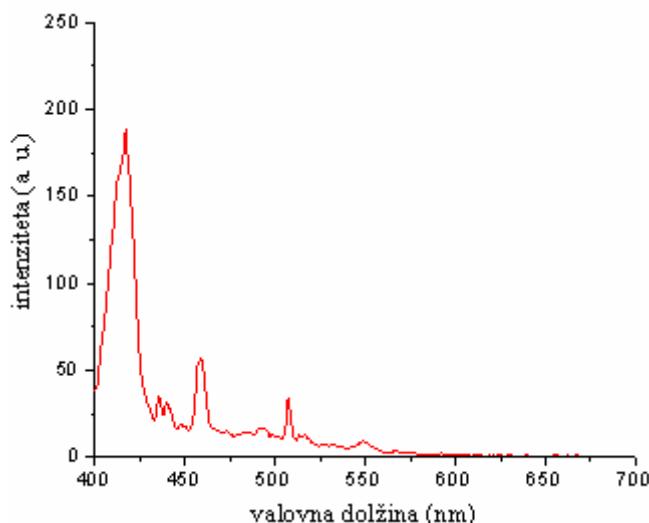
Iz fluorescenčnih emisijskih spektrov smo odčitali intenziteto fluorescence pri 420 nm in iz izračunanega molskega razmerja R (mol kamferola : mol lipidov) smo dobili titracijsko krivuljo (slika 42). Opazili smo, da smo pri manjših enoslojnih liposomih (ULV) dosegli nasičenost pri manjših koncentracijah kamferola v primerjavi z velikimi večslojnimi liposomi (MLV). Tako smo za titracijo 1 mola kamferola potrebovali 45 molov lipidov pri liposomih MLV in 22 molov lipidov pri liposomih ULV. Temu je lahko vzrok sama zgradba liposomov (število lipidnih dvoslojev) in bolj homogena porazdelitev delcev pri majhnih liposomih.

Po koncu merjenja tako pri spektrometriji EPR kot pri fluorometriji smo opazili aggregate liposomov in kamferola. Sklepamo, da je kamferol po določenem času povzročil obarjanje liposomov, kar kaže na to, da je kamferol destabiliziral liposome, kar se vidi tudi na sliki 34.

4.6 FLUORESCENČNA SPEKTROMETRIJA CELIC BAKTERIJ VRSTE *S. aureus*

Donko je leta 1995 dokazal antimikrobní učinek listov netreska, ki so v 94,5 % inhibirali rast bakterij *Staphylococcus aureus* in 92,1 % *Bacillus cereus*. Zaključil je, da bi za njegovo antimikrobní aktivnost lahko bile odgovorne fenolne spojine netreska (Donko, 1995). Kasneje so v ekstraktu iz svežih listov netreska izolirali fenolne spojine, med njimi so dokazali tudi kamferol kot edini aglikon oligomerne polifenolne frakcije (Abram in Donko, 1999). V našem poskusu smo zato žeeli preveriti antimikrobní učinek kamferola z metodo fluorescenčne emisijske spektrometrije, kjer smo spremljali spremembo intenzitete emitirane svetlobe pri prehodu kamferola v membrano bakterij *Staphylococcus aureus*.

Celice *S. aureus* smo po centrifugiranju resuspendirali v fiziološki raztopini (10 mM pufer HEPES, pH = 7,0 in 150 mM NaCl) in jim pred dodatkom kamferola na fluorimetru izmerili emisijski spekter (slika 43).



Slika 43: Emisijski spekter bakterijskih celic *Staphylococcus aureus* v fiziološki raztopini (10 mM pufer HEPES in 150 mM NaCl) brez dodanega kamferola. Valovna dolžina vzbujanja 370 nm, PMT 800 V

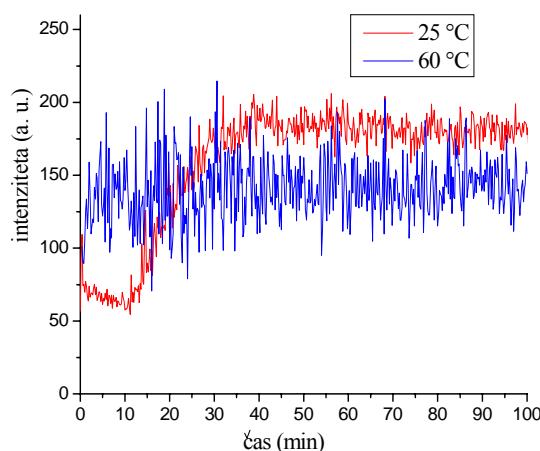
Slike 43 vidimo, da so imele celice bakterij vrste *S. aureus* zelo veliko intenziteto emitirane svetlobe v primerjavi z liposomi (slika 36). Celice so večje v primerjavi z liposomi in zato bolj sipajo svetlobo ter vsebujejo tudi naravne fluorofore.

4.6.1 Kinetika vgrajevanja kamferola v membrane celic bakterij vrste *S. aureus*

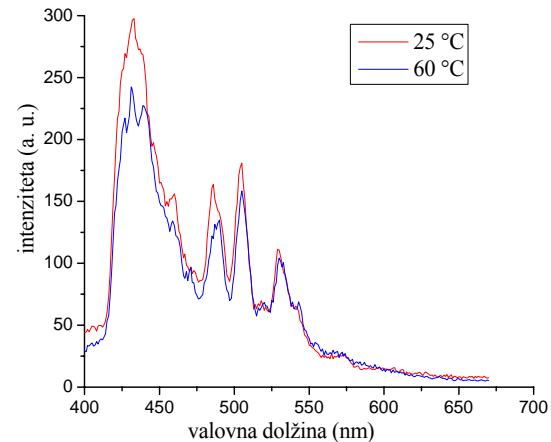
Čeprav v literaturi nismo zasledili poskusov, kjer bi spremljali protimikrobní učinek polifenolnih spojin na bakterije z metodo fluorescenčne spektrometrije, smo se kljub temu odločili, da z omenjeno metodo poskusimo preveriti protimikrobní učinek kamferola na bakterije vrste *Staphylococcus aureus*. Celice *S. aureus* smo nacepili na gojišče BP, ki je selektivno gojišče za stafilokoke. Tako smo določili začetno število celic, ki je bilo $3,1 \times 10^8$ cfu/mL. Kolonije so bile značilne sivočrne barve z motno in prozorno cono.

Za merjenje na fluorimetru smo $250 \mu\text{L}$ celic resuspendirali v $2250 \mu\text{L}$ fiziološke raztopine ter dodali raztopino kamferola s koncentracijo $96,2 \mu\text{g/mL}$ in pričeli s takojšnjim merjenjem intenzitete kamferola pri temperaturi 25 in 60°C (slika 44 A). Pri temperaturi 60°C opazimo veliko sipanje svetlobe najverjetnejše zaradi medsebojnega združevanja celic in kamferola. Poskus, kjer smo spremljali kinetiko vgrajevanja kamferola v membrane celic *S. aureus*, smo trikrat ponovili in vsakokrat dobili drugačne spekture fluorescenčne intenzitete. Rezultati niso bili ponovljivi in mislimo, da je bil vzrok temu mešanica metanola in kloroformja $3 : 7$ (v/v), v kateri je bil raztopljen kamferol. Kot primer so rezultati enega izmed poskusov predstavljeni na sliki 44. Zavedali smo se, da se pri temperaturi 60°C celice poškodujejo oz. odmrejo (Buzrul in Alpas, 2006), vendar smo poskus vseeno izvedli zaradi primerjave rezultatov na liposomih. Po končanem 100 minutnem segrevanju smo izmerili še fluorescenčni emisijski spekter celic z vgrajenim kamferolom pri 25 in 60°C (slika 44 B).

A:



B:



Slika 44: (A) časovna odvisnost fluorescenčne intenzitete celic *S. aureus* v fiziološki raztopini (10 mM pufer HEPES in 150 mM NaCl) po dodatku kamferola pri dveh različnih temperaturah (25 in 60°C). (B) emisijski spekter bakterijskih celic *S. aureus* z vgrajenim kamferolom po 100 minutah segrevanja pri 25 in 60°C . Valovna dolžina vzbujanja 370 nm, merjenje intenzitete fluorescence pri 450 nm, PMT 800 V, koncentracija kamferola $96,2 \mu\text{g/mL}$.

Začetno število celic smo določili pred meritvijo na fluorimetru tako, da smo celicam v fiziološki raztopini dodali enkrat raztopino kamferola s koncentracijo 96,2 µg/mL, drugič pa namesto kamferola dodali 200 µL mešanice metanola in kloroformu v razmerju 3 : 7 (v/v). Po fluorescenčni meritvi smo število celic določili v enakih vzorcih z vgrajenim kamferolom pri 25 in 60 °C. Na gojišče BP smo cepili 0,1 mL vzorcev in po 2 dnevih inkubacije pri 37 °C odčitali rezultate (preglednica 8).

Preglednica 8: Ocena števila celic bakterij vrste *S. aureus* glede na cepljene razredčitve pred in po meritvi na fluorimetru

VZORCI	N (cfu/mL)
<i>S. aureus</i> + KA (t = 0)	< 10
<i>S. aureus</i> + topilo (t = 0)	< 10
<i>S. aureus</i> + KA (t = 100 min, 25 °C)	< 10
<i>S. aureus</i> + KA (t = 100 min, 60 °C)	< 10

Legenda:

KA = kamferol raztopljen v metanolu in kloroformu v razmerju 3 : 7 (v/v)

Topilo = metanol in kloroform 3 : 7 (v/v)

N = število celic/mL

Iz preglednice 8 vidimo, da je pri vseh vzorcih število < 10 cfu/mL. Sklepamo, da je lahko pri bakterijah vrste *S. aureus* prišlo takoj po dodatku raztopine kamferola in takoj po dodatku topila do poškodbe celične stene ali citoplazemske membrane. Bhateja in sod. (2006) so ugotovili, da ima ekstrakt izoliran iz modrozelenih alg, ki so ga raztoplili v metanolu, protimikrobnii učinek na bakterije vrste *S. aureus*. Do podobnih rezultatov so prišli tudi Al-Dabbas in sod. (2006), ki so raziskovali ekstrakt iz rastline *Varthemia iphionoides*, v katerem so analizirali polifenolne spojine. Ekstrakt so raztopljal v različnih topilih in prišli do ugotovitev, da ima ekstrakt raztopljen v kloroformu protimikrobnii učinek na bakterije vrste *S. aureus* za razliko od ekstrakta, ki je bil raztopljen v vodi ali etanolu, pa tega učinka ni imel.

5 SKLEPI

Z rezultati raziskav na modelnih membranah – liposomih lahko potrdimo začetno predpostavko, da je kamferol vplival na spremembo fluidnosti membrane, na membranah govejih eritrocitov pa kamferol ni imel vpliva na fluidnost membrane zaradi hemolize eritrocitov, ki jo je povzročil dodatek DMSO za kontrolo oz. kamferol raztopljen v DMSO neposredno na pelet. Poskušali smo temu poiskati vzrok, zato smo poskus naredili v večji epruveti. Izkazalo se je, da je takoj po dodatku DMSO na pelet prišlo do hemolize eritrocitov, česar pa mi v kapilari nismo videli. Zaradi poškodovane eritrocitne membrane se je iz celic sprostil hemoglobin, kar je vzrok za tako spremenljive rezultate. Do teh spoznanj smo prišli šele, ko smo že zaključili poskuse na eritrocitih.

Pri liposomih je kamferol zmanjšal fluidnost membrane in sicer že pri najmanjši uporabljeni koncentraciji. Z večanjem koncentracije kamferola ni bistvenega vpliva na spremembo fluidnosti membrane. Membrane liposomov postanejo z višanjem temperature bolj fluidne, dodatek kamferola pa poveča urejenost lipidne dvojne plasti in tako zmanjša fluidnost membrane. Učinek kamferola na fluidnost membrane je manjši kot pri holesterolu in večji kot pri β -sitosterolu, ki imata, podobno kot kamferol, strukturo z večimi aromatskimi obroči, vendar pa ne tako rigidne kot pri sterolih.

Liposomi z vgrajenim kamferolom so po daljšem časovnem obdobju manj stabilni v primerjavi z liposomi brez kamferola. Sveži liposomi z vgrajenim kamferolom različne koncentracije so večji kot kontrolni liposomi, kar pomeni, da je kamferol bistveno vplival na velikost liposomov. Velikost liposomov se je po enem mesecu povečala tako pri tistih brez kot z vgrajenim kamferolom različnih koncentracij. Sklepamo, da je prišlo do medsebojnega združevanja. Sveži liposomi z vgrajenim kamferolom imajo večji negativni površinski naboj (zeta potencial) kot kontrolni liposomi. Po enem mesecu starosti liposomov se je površinski naboj zmanjšal pri liposomih z vgrajenim kamferolom pri vseh treh koncentracijah, pri kontroli pa povečal.

Liposomi sestavljeni iz štirih vrst lipidov (POPC/POPE/POPS/HOLESTEROL) nimajo faznega prehoda za razliko od liposomov, ki so sestavljeni samo iz dveh vrst lipidov (DMPC/C16:0-ceramid) in se vidijo fazni prehodi (Holopainen in sod., 2000).

Z metodo fluorescenčne emisijske spektrometrije smo raziskovali emisijo fluorescence kamferola pri vgrajevanju v membrane liposomov. Ugotovili smo, da je čas vgraditve kamferola v membrane liposomov najkrajši pri največji dodani koncentraciji kamferola. Ko se je kamferol enkrat vgradil v membrane liposomov, je tam tudi ostal, ker se intenziteta fluorescence s časom ni spremenjala.

Intenziteta fluorescence liposomov z vgrajenim kamferolom kot tudi intenziteta samega kamferola v vodi s temperaturo pada, kar si lahko razlagamo s pojavom neradiacijskih procesov, ki konkurirajo fluorescenci. Intenziteta kamferola v vodi je bila manjša od intenzitete kamferola vgrajenega v membrane liposomov.

Kamferol se vgradi hitreje v membrane pri višji temperaturi tako pri MLV (veliki večslojni) kot pri ULV (manjši enoslojni) liposomih, s tem da se pri manjših liposomih podaljša čas vgraditve zaradi majhnosti in enega lipidnega dvosloja.

Pri 10-krat manjši koncentraciji liposomov in kamferola je bil prehod kamferola v membrano liposomov hitrejši tako pri temperaturi 25 kot pri 60 °C.

Pri titraciji z manjšimi enoslojnimi liposomi (ULV) smo dosegli nasičenost pri manjših koncentracijah kamferola v primerjavi z velikimi večslojnimi liposomi (MLV). Tako smo za titracijo 1 mola kamferola potrebovali 45 molov lipidov pri liposomih MLV in 22 molov lipidov pri liposomih ULV.

S poskusom, kjer smo spremljali kinetiko vgrajevanja kamferola v membrane bakterij vrste *S. aureus*, smo žeeli preveriti protimikrobní učinek kamferola, vendar smo vsakokrat dobili drugačne spektre fluorescenčne intenzitete. Rezultati niso bili ponovljivi in mislimo, da je bil vzrok temu mešanica metanola in kloroforma v razmerju 3 : 7 (v/v), v kateri je bil raztopljen kamferol, saj smo pri vzorcih takoj po dodatku raztopine kamferola in takoj po dodatku topila metanol in kloroform (3 : 7, v/v) ugotovili, da je število celic iz $3,1 * 10^8$ cfu/mL padlo pod 10 cfu/mL.

Predlogi za nadaljne delo:

- če bi poskus vpliv kamferola na fluidnost membrane eritrocitov ponovili, predlagam razzapljanje kamferola v etanolu ali dietiletru,
- mogoče bi bilo dobro preveriti učinek še preostalih flavonolov (npr. kvercetin, rutin) na membrano eritrocitov (EPR) in liposomov (EPR in fluorescenčna emisijska spektrometrija),
- preveriti protimikrobní učinek kamferola na bakterije vrste *S. aureus* (najverjetneje bo potrebna priprava protoplastov bakterij).

6 POVZETEK

Fluidnost modelnih membran – liposomov je odvisna predvsem od sestave lipidnega dvosloja. Kaže se v njeni mehkosti in prilagodljivosti ter določa pomembne fizikalne lastnosti liposomov kot so agregiranje, prepustnost, sproščanje vgrajenih snovi, stabilnost končnega pripravka idr. Pri liposomih lahko spremojamo njihovo fluidnost s temperaturo in s sestavo gradnikov, t. j. z razmerjem fosfolipidov z nenasičenimi in nasičenimi acilnimi verigami, z raznimi lipofilnimi dodatki kot so holesterol idr. (Zinmer in Freisleben, 1988).

Pri diplomskem delu smo proučevali vpliv kamferola na fluidnost membran liposomov, da bi bolje razumeli mehanizem protimikrobnega delovanja fenolnih spojin iz netreska. Pri liposomih, ki so bili pripravljeni iz palmitoiloleoilglicerofosfoholina (POPC), palmitoiloleoilglicerofosfoetanolamina (POPE), palmitoiloleoilglicerofosfoserina (POPS) in holesterola, smo ugotovili, da se z višanjem temperature fluidnost membrane povečuje. Vpliv kamferola pa je zmanjšal fluidnost membrane in sicer že pri najmanjši uporabljeni koncentraciji. Z večanjem koncentracije kamferola ni bistvenega vpliva na spremembo fluidnosti membrane. Pri isti molarni koncentraciji smo primerjali učinek kamferola, holesterola in β -sitosterola na spremembe v fluidnosti membrane. Večji vpliv na fluidnost liposomskih membran je imel holesterol v primerjavi s kamferolom, ne glede na temperaturo, pri kateri smo merili. Fluidnost se je vedno zmanjšala, kar pomeni večjo urejenost membranskih domen ob prisotnosti kamferola oz. holesterola v membrani. β -sitosterol ni imel učinka na membrane liposomov.

Močnikova je leta 2004 v svoji diplomske nalogi prišla do podobnih rezultatov in sicer je na liposomih, ki so bili pripravljeni iz fosfatidilholina (PC) in fosfatidilserina (PS), dokazala, da je kamferol zmanjšal fluidnost membrane. Ugotovila je, da obstaja določena koncentracija kamferola (2,6 mg/mL), ki je povzročila največje spremembe v fluidnosti membrane. S primerjavo istih koncentracij kamferola in holesterola na spremembo fluidnosti membrane je dokazala, da je imel holesterol večji vpliv na fluidnost liposomskih membran.

Tsuchiya (1999) je proučeval vpliv katehinov iz zelenega čaja na fluidnost membrane liposomov, ki so bili pripravljeni iz dipalmitoilfosfatidilholina in dioleoilfosfatidilholina. Ugotovil je, da katehini bistveno zmanjšajo fluidnost membrane tako v hidrofilnem kot v hidrofobnem področju lipidnega dvosloja.

V naravnem biološkem sistemu je regulacija lipidne sestave membran velikega pomena. Razni stresi okolja vplivajo na fluidnost membran, ki je ključni faktor v funkciji membrane, vpliva na celično permeabilnost, transport hrani preko membrane idr. Hill in sodelavci (1999) so proučevali povezavo fluidnost membrane liposomov in prepustnost snovi skoznjo. Ugotovili so, da zmanjšana fluidnost membrane povzroči počasnejši transport vode, sečnine, acetamida, glicerola in NH_3 skozi membrane liposomov. Medtem ko protoni in CO_2 nemoteno prehajajo skozi membrano ne glede na spremembo fluidnosti membrane.

Za vzdrževanje konstantne membranske fluidnosti celice regulirajo svojo lipidno sestavo z večjo produkcijo nasičenih maščobnih kislin ter s spremembro dolžine alkilne verige (Nelson in Cox, 2005). Fluidnost membrane ima pomembno vlogo pri številnih fizioloških procesih v celici, čeprav mehanizem na molekularni ravni še ni popolnoma pojasnjен. Velika sprememba v fluidnosti membrane lahko povzroči nastanek nekaterih patoloških stanj, še posebno tistih, ki jih spremlja oksidativni stres. Prosti radikali povzročijo zmanjšanje fluidnosti membrane s spremembro membranskih lipidov v procesu lipidne peroksidacije, ki spremeni lastnosti membrane in možne prekinitev v funkciji membrane in membranskih proteinov (Sivanova in sod., 2004).

Ker smo se hoteli čim bolj približati pravi celični membrani, smo preverili še učinek kamferola na membranah eritrocitov. Poskus nam ni uspel, ker je DMSO, v katerem je bil raztopljen kamferol, povzročil hemolizo eritrocitov. Iz literaturnih virov je znano, da flavonoidi, med katere spada tudi kamferol, povzročijo tako spremembe v fluidnosti eritrocitne membrane kot v konformaciji transportnih proteinov ter tako preprečijo prenos določenih molekul (Hendrich, 2006).

Nekatere študije dokazujejo, da vpliv flavonoidov poveča fluidnost membrane in sicer so Sivonova in sodelavci (2004) proučevali vpliv Picnogenola na fluidnost membran eritrocitov. Picnogenol je ekstrakt, ki je pripravljen iz mešanice flavonoidov zlasti iz procianidinov in fenolnih kislin, pridobljen iz skorje francoškega bora. Ugotovili so, da je Picnogenol zmanjšal urejenost fosfolipidnih molekul v hidrofobnem področju membran eritrocitov, kar pomeni, da se je povečala fluidnost membrane. Picnogenol z vezavo prostih radikalov ali keliranjem kovinskih ionov zaščiti membrano pred oksidativnimi poškodbami.

Poleg proučevanja vpliva kamferola na fluidnost membran liposomov z metodo EPR smo pri diplomskem delu z metodo fluorescenčne spektrometrije raziskovali emisijo fluorescence kamferola pri vgrajevanju v membrane liposomov. Ugotovili smo, da kamferol fluorescira v nepolarnem okolju, zato liposomom ni bilo potrebno dodajati drugih fluoroforjev. Kinetika vgrajevanja kamferola v membrane liposomov je odvisna od koncentracije kamferola in temperature. Pri 60 °C je proces vgrajevanja potekal hitreje kot pri 25 °C. Pri titraciji z manjšimi enoslojnimi liposomi (ULV) smo dosegli nasičenost pri manjših koncentracijah kamferola v primerjavi z velikimi večslojnimi liposomi (MLV) iz česar sklepamo, da je za nasičenost pomembna velikost liposomov in število lipidnih dvoslojev. V literaturi nismo našli podatkov s katerimi bi lahko primerjali naše rezultate.

S poskusom, kjer smo spremljali kinetiko vgrajevanja raztopine kamferola (96,2 µg/mL) v membrane bakterij vrste *S. aureus*, smo poskušali preveriti protimikrobni učinek kamferola, vendar smo vsakokrat dobili drugačne spektre fluorescenčne intenzitete. Rezultati niso bili ponovljivi in mislimo, da je bil vzrok temu mešanica metanola in kloroforma v razmerju 3 : 7 (v/v), v kateri je bil raztopljen kamferol, saj smo pri vzorcih takoj po dodatku raztopine kamferola in takoj po dodatku topila metanol in kloroform (3 : 7, v/v) ugotovili, da je število celic iz $3,1 * 10^8$ cfu/mL padlo pod 10 cfu/mL.

7 VIRI

- Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26.-27 oktobra 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23-32
- Abram V., Donko M. 1999. Tentative identification of polyphenols in *Sempervivum tectorum* and assessment of the antimicrobial activity of *Sempervivum* L. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47: 485-489
- Al-Dabas M.M., Suganuma T., Kitahara K., Hou De-X., Fujii M. 2006. Cytotoxic, antioxidant and antibacterial activities of *Varthemia iphionoides* Boiss. extracts. Journal of Ethnopharmacology: sprejeto v tisk, online may 2006: 7 str.
- Andoljšek D. 1998. Bolezni krvi in krvotvornih organov. V: Interna medicina. Kocijančič A., Mrevlje F. (ur.). Ljubljana, EWO, DZS: 1039-1040
- Baianu I.C., Lozano P.R., Prisecaru V.I., Lin H.C. 2004. Novel techniques and their applications to agricultural biotechnology, health foods and medical biotechnology. Urbana, University of Illinois at Urbana. (January 2004) <http://www.cogprints.org/view/subjects/archives.html> (junij 2006): 39 str.
- Basile A., Sorbo S., Giordano S., Ricciardi L., Ferrara S., Montesano D., Cobianchi R.C., Vuotto M.L., Ferrara L. 2000. Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves. Fitoterapia, 71: 110-116
- Baumgartner S. 1995. Teoretične osnove in uporabnost fluorescenčne spektroskopije v farmaciji. Farmacevtski vestnik, 46, 3-4: 305-328
- Berliner L.J. 1974. Spin labeling: theory and applications. Academic Press, New York: 79 -91
- Bhateja P., Mathur T., Pandya M., Fatma T., Rattan A. 2006. Activity of green microalgae extracts against in vitro generated *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. Fitoterapia, 77: 233-235
- Black J.G. 2002. Microbiology: principles and explorations. 5th ed. Chichester, Wiley: 78, 243
- Blume R. 1994. Lehrerband zum Themenheft Chemie für Gymnasien (Fette, Seifen und Waschmittel). Bielefeld, Fakultät für Chemie, Universität Bielefeld. (März 2005). http://dc2.uni-bielefeld.de/dc2/tip/06_04.htm (julij 2006): 1 str.
- Boyer R.F. 2005. Temelji biokemije. 2nd ed. Ljubljana, Študentska založba: 225-229

- Buzrul S., Alpas H. 2006. Modeling inactivation kinetics of food borne pathogens at a constant temperature. Food Science and Technology: sprejeto v tisk, online march 2006: 6 str.
- Cantor M. 2006. Fluorescence spectroscopy. Rutgers, The State University of New Jersey, Department of Chemistry. (January 2006)
<http://chemistry.rutgers.edu/grad/chem585/lecture2.html> (maj 2006): 1 str.
- Caron M., Dugas H. 1976. Specific spin-labeling of transfer ribonucleic acid molecules. Nucleic Acids Resarch, 3, 1: 19-34
- Chemicaland21.com. 2000. β -sitosterol. Seoul, Arakor Holding Inc. (January 2000)
<http://www.chemicaland1.com/lifescience/phar/beta-SITOSTEROL.htm> (junij, 2006): 1 str.
- Curtain C.C., Gordon L.M. 1984. ESR spectroscopy of membranes. V: Membranes, detergents and receptor solubilization. New York, Alan R. Liss, Inc.: 177-213
- Davidson P.M. 1993. Parabens and phenolic compounds. V: Antimicrobials in food. Davidson P.M., Branen A.L. (eds.). 2nd ed. New York, Basel, Hong Kong: M. Dekker: 263-306
- Doll R. 1990. An overview of the epidemiological evidence linking diet and cancer. Proceedings of the Nutrition Society, 49, 2: 119-131
- Donko M. 1995. Antimikrobnna aktivnost netreska. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 14, 19, 46
- EPR spektrometer Bruker BioSpin Elexsys E500 CW. 2005. Rheinstetten, Bruker Biospin Nemčija. (January 2005)
<http://www.bruker-biospin.de/EPR/elexsys/images/e500cw.jpg> (maj 2006): 1str.
- Filipič B., Štrancar J. 2000. Hibridno optimiranje parametrov EPR spektrov. Ljubljana, Inštitut Jozef Stefan. (september 2000)
<http://www-ai.ijs.si/SemAI/slais/slais00.html> (maj 2006): 1 str.
- Fluorescence spectrophotometer Holger Teknologi as. 2003. Ulsan, University of Ulsan. (January 2003)
http://home.ulsan.ac.kr/~rfc/machine/machine_1.html (maj 2006): 1 str.
- Freitas R.A. 1999. Nanomedicine. Volume I: basic capabilities. Austin, TX, Landes Bioscience: 153-153
- Goodwin T.W., Mercer E.I. 1983. Introduction to plant biochemistry. 2nd ed. Oxford, Pergamon Press: 528-563

Häkkinen S.H., Kärenlampi S.O., Heinonen I.M., Mykkänen H.M., Törrönen A.R. 1999. Content of the flavonols quercetin, myricetin and kaempferol in 25 edible berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 6: 2274-2279

Hendrich A.B. 2006. Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta Pharmacologica Sinica*, 27, 1: 27-40

Hill W.G., Rivers R.L., Zeidel M.L. 1999. Role of leaflet asymmetry in the permeability of model biological membranes to protons, solutes and gases. *Journal of General Physiology*, 114, 3: 405-414

Holopainen J.M., Lemmich J., Richter F., Mouritsen O.G., Rapp G. in Kinnunen P.K.J. 2000. Dimyristoylphosphatidylcholine/C16:0-ceramide binary liposomes studied by differential scanning calorimetry and wide- and small-angle X-ray scattering. *Biophysical Journal*, 78, 5: 2459-2469

Ivanoš J. 1999. Micelizacija površinsko aktivnih snovi ob prisotnosti polielektrolita. Diplomsko delo. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 5-8

Jeršek B. 2002. Praktikum mikrobiološke analize. Skripta in delovni zvezek za študente IV. letnika živilstva. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11-11

Jezernik K., Pšeničnik M., Sterle M. 1998. Biologija celice. Ljubljana, Društvo študentov biologije. Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo <http://dsb.biologija.org/vpr/material.php> (maj 2006): 2-4

Jovanovic S.V., Simic M.G. 2000. Antioxidants in nutriton. V: Reactive oxygen species. Chiueh C.C. (ed.). New York, The New York Academy of Sciences: 326-334

Korošec L. 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26.-27. oktobra. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11-21

Kreft I., Škrabanja V., Bonafaccia G. 2000. Temelji prehranskih in biotskih vplivov antioksidantov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26.-27. oktobra 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 33-37

Kristl J., Šmid – Korbar J., Srčič S. 1992. Farmacevtska tehnologija. Del 1: Praktikum. Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 157-159

Lakowicz J.R. 1999. Principles of fluorescence spectroscopy. 2nd ed. New York, Kluwer Academic Plenum Publishers: 4, 698

Lasic D.D. 1993. Liposomes: from physics to applications. Amsterdam, Elsevier: 9-19

Liposomes. 2005. Henderson, Livon Laboratories, Inc. (January 2005)
<http://www.livonlabs.com/liposomal-encapsulation.html> (maj 2006): 1 str.

Madhavi D.L., Deshpande S.S., Salunkhe D.K. 1996. Food antioxidants: technological, toxicological and health perspectives. New York, Marcel Dekker: 490-490

Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 1997. Brock biology of microorganisms. 8th ed.
Upper Saddle River, New Jersey, Pearson Prentice Hall: 70-76, 145

Malke K. 2005. Hauswurz *Sempervivum tectorum*. Vienna, Natur-Lexikon.com. (March 2005)
<http://www.natur-lexikon.com/Texte/km/001/00016-Hauswurz/km00016-Hauswurz.html>
(maj 2006): 1 str.

Mallery C. H. 2005. Lipid fluidity. Miami, University of Miami, Department of Biology.
(June 2006)
<http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/memb/> (maj 2006): 1 str.

McMullen T.P.W., Lewis R.N.A.H., McElhaney R.N. 1993. Differential scanning calorimetric study of the effect of cholesterol on the thermotropic phase behavior of an homologous series of linear saturated phosphatidylcholines. Biochemistry, 32: 516-522

Miean K.H., Suhaila M. 2001. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin and apigenin) content of edible tropical plants. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 6: 3106-3112

Močnik M. 2004. Interakcije fenolnih spojin z membranami. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 20-22, 34-38

Model membranes. 2004. Calabria, Molecular Biophysics Laboratory, University of Calabria, Department of Physics. (March 2004)
<http://www.fis.unical.it/~biophysics/lipids.htm> (maj 2006): 2 str.

Muller M. 2004. Membrane fluidity. Chicago, The University of Illinois at Chicago, Department of Biological Sciences. (January 2004)
<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lecturesf04am/lect08.htm> (maj 2006): 4 str.

Nelson D.L., Cox M.M. 2005. Lehninger principles of biochemistry. 4th ed. New York, W. H. Freeman: 369-381

Nishide H., Suga T. 2005. Organic radical battery. Tokio, The Electrochemical Society Interface.
http://www.electrochem.org/dl/interface/wtr/wtr05/wtr05_p32-36.pdf (maj 2006): 33 str.

Nychas G.J.E. 1995. Natural antimicrobials from plants. V: New methods of food preservation. Gould G.W. (ed.), London, Blackie Academic&Professional: 59-89

- Olson J.D. 2000. Erythrocyte membrane. San Antonio, University of Texas Health Science Center at San Antonio, Department of Pathology. (August 2000)
http://heme-coag.uthscsa.edu/wwwRedCell98/HOS%20Lecture/wRed_Cell_1998.html
(maj 2006): 4 str.
- Oteiza P.I., Erlejman A.G., Verstraeten S.V., Keen C.L., Fraga C.G. 2005. Flavonoid-membrane interactions: a protective role of flavonoids at the membrane surface? Clinical & Development Immunology, 12, 1: 19-25
- Pavčič M. 2001. S fitosteroli nad holesterol. Za srce, 10, 2: 10-10
- Pietta P.G. 2000. Flavonoids as antioxidants. Journal of Natural Products, 63, 7: 1035-1042
- Podlogar F., Gašperlin M. 2003. Izbor metod za določevanje fizikalnih lastnosti koloidnih sistemov v farmaciji. Farmacevtski vestnik, 54: 47-56
- Raspor P., Kovač B., Batič M., Berglez D. 2000. Biopresesi pridobivanja antioksidantov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26.-27 oktobra 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 53-65
- Rieger P. 1988. Electron Spin Resonance. ESR Spectroscopy. USA, Brown University.
<http://www.chm.bris.ac.uk/emr/Phil/esr.pdf> (maj 2006): 7 str.
- Rotomskis R., Vaicaitis V., Frolov D., Bagdonas S. 2001. TPPS₄ spectroscopy: investigations of aggregation and protonation properties. Lithuanian Journal of Physics, 41, 4-6: 484-494
- Rowle A. 2003. PCS in 30 minutes. Information materials of Malvern Instruments Ltd:1-8
- Salobir M. 1998. Vpliv mutacij na konformacijsko stabilnost ekvinatoksina II. Doktorska disertacija. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 33-33
- Saville D.J., Ping-Chuen Ho. 2001. Inhibition of human CYP3A4 activity by grapefruit flavonoids, furanocoumarins and related compounds. Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences, 4, 3: 217-227
- Shan B., Cai Y.Z., Sun M., Corke M. 2005. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 7749-7759
- Singleton P., Sainsbury D. 1980. Dictionary of microbiology. Chichester: Wiley – Interscience Publication, John Wiley & Sons : 388-388
- SIS EN ISO 4833. 2003. Microbiology – General guidiance for the enumeration of microorganisms – Colony count technique at 30 °C. 2nd ed: 3, 4

Sivanova M., Waczulikova I., Kilanczyk E., Hrnčiarova M., Bryszewska M., Klajnert B., Duračkova Z. 2004. The effect of Pycnogenol on the erythrocyte membrane fluidity. General Physiology and Biophysics, 23, 1: 39-51

Šentjurc M., Štalc A. 1976. Uporaba paramagnetne rezonance v biologiji in medicini. Medicinski razgledi, 15: 259-279

Šentjurc M., Štrancar J., Koklič T. 2002. Membrane domain alteration under the action of biologically active substances: an EPR study. Current Topics in Biophysics, 26, 1:65-73

Štrancar J. 2000. EPR spektroskopija površinske plasti celičnih membran. Doktorska disertacija. Ljubljana, Fakulteta za matematiko in fiziko.
<http://www.ijs.si/ijs/dept/epr/janezPhD.pdf> (maj 2006): str. 11, 27

Štrancar J. 2004. EPR characterization of biosystem. Ljubljana, Inštitut Jozef Stefan: 12
<http://www.ijs.si/ijs/dept/epr/eprbasics.pdf> (maj, 2006): 2 str.

Štrancar J., Schara M., Pečar S., 2001. Exploration of the glycosylated membrane surface and its interaction with the lipid double layer with EPR. Ljubljana, Inštitut Jozef Stefan.
<http://www.ijs.si/ijs/dept/epr/Janez.html> (maj 2006): 1 str.

Tavzes Č., Brzin J. 1998. Vpliv jasmonske kisline na fluidnost membran in vsebnost mineralov pri glivah *Laccaria laccata* in *Heterobasidion annosum*. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 15-17

Tsuchiya H. 1999. Effects of green tea catechins on membrane fluidity. Pharmacology, 59, 1: 34-44

Vesnaver G. 1978. Osnove spektrofluorimetrije. V: Živilsko inženirstvo 4. Bitenčevi živilski dnevi 1978, Ljubljana, 15.-16.december 1978. Bučar F. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 67-76

Voet D., Voet J.G. 2004. Biochemistry. 3rd ed. Hoboken, John Wiley & Sons, Inc: 406-406

Vrhovšek U. 2001. Flavonoidi kot predstavniki antioksidantov. V: Funkcionalna hrana. 21. Bitenčevi živilski dnevi 2001, Portorož, 8.-9. november 2001. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 97-107

Wondra M. 1997. Zdravstveni učinki vina. V: Tehnologija, hrana, zdravje. Knjiga 1. 1. slovenski kongres o hrani in prehrani z mednarodno udeležbo, Bled, 21-25 aprila 1996. Raspor P., Pitako D., Hočevar I. (ur.), Ljubljana, Društvo živilskih in prehranskih strokovnih delavcev Slovenije: 39-45

Zinmer G., Freisleben H.J. 1988. Membrane fluidity determination from viscosimetry. V: Metodes for studying membrane fluidity. Aloia R.C., Curtain C.C., Gordan L.M. (eds). New York, Allan R. Liss: 297-318

ZAHVALA

Na začetku čestitam sebi, ker sem uspešno zaključila tisto, kar sem si od nekdaj močno želeta.

Za strokovno vodenje in pomoč pri izdelavi diplomske naloge se iskreno zahvaljujem mentorici prof. dr. Veroniki Abram, somentorici dr. Marjeti Šentjurc in recenzentki doc. dr. Barbari Jeršek.

Zahvala gre tudi Marjani Nemec univ. dipl. inž. za pomoč pri izvedbi praktičnega dela diplomske naloge, Iztoku Dogši univ. dipl. mikr. za pomoč pri analiziranju rezultatov in svetovanju.

Hvala tudi doc. dr. Nataši Poklar Ulrih za vodenje in pomoč pri meritvah s fluorescenčno spektrometrijo in DSC.

Največja zahvala pa gre mojim staršem in sestri Stanki, ki so mi ves čas stali ob strani in me spodbujali vsa študijska leta. Iskrena hvala tudi mojemu fantu Tadeju in njegovim staršem.

Zahvaljujem pa se tudi Nataši, Marjanu, Andreju, Borutu in vsem ostalim, ki so mi kakorkoli pomagali pri nastajanju diplomske naloge.

Zahvala vsem, ki so zaupali vame in v moje sposobnosti, predvsem v mojih šibkih trenutkih.

POPRAVKI

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Sandra KURE

**FENOLNE SPOJINE IN FLUIDNOST CELIČNIH
MEMBRAN**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2006