

UNIVERZA V LJUBLJANI  
PEDAGOŠKA FAKULTETA  
NARAVOSLOVNOTEHNIŠKA FAKULTETA  
FAKULTETA ZA KEMIJO IN KEMIJSKO TEHNOLOGIJO  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Program: kemija in biologija

**VREDNOTENJE IZBRANIH KOLORIMETRIČNIH METOD ZA  
DOLOČANJE KONCENTRACIJE STEROIDOV**

DIPLOMSKO DELO

**EVALUATION OF SELECTED COLORIMETRIC METHODS FOR  
DETERMINATION OF STEROID CONCENTRATION**

GRADUATION THESIS

Mentorica: prof. dr. Kristina Sepčič

Kandidatka: Karmen Selan

Ljubljana, marec, 2008

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija kemije in biologije na Pedagoški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za biokemijo Oddelka za biologijo na Biotehniški fakulteti, Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega študija kemije in biologije je za mentorja imenovala prof. dr. Kristino Sepčič in za recenzenta prof. dr. Gregorja Anderluha.

Mentorica: prof. dr. Kristina Sepčič

Recenzent: prof. dr. Gregor Anderluh

Komisija za oceno in zagovor diplomske naloge:

Predsednik: prof. dr. Barbara Bajd  
Univerza v Ljubljani, Pedagoška fakulteta

Član: prof. dr. Kristina Sepčič  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Gregor Anderluh  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 13.3.2008

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Karmen Selan

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn  
DK 579.22:547.9:543.5(043.2)=163.6  
KG steroidi / holesterol / naravni steroidi / sintetični steroidi / encimski test / metoda po Rudel - Morrisu  
AV SELAN, Karmen  
SA SEPČIČ, Kristina  
KZ SI-1000 Ljubljana, SLO, Večna pot 111  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo  
LI 2008  
IN VREDNOTENJE IZBRANIH KOLORIMETRIČNIH METOD ZA DOLOČANJE KONCENTRACIJE STEROIDOV  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP X, 59 str., 2 preg., 43 sl., 43 vir.  
IJ sl  
JI sl/an  
AI Steroli so izredno pomembni za membrano, saj uravnavajo njeno fluidnost in trdnost, in jih imajo vsi evkarionti. Vsi steroli imajo steroidni skelet z –OH skupino vezano na C3-mestu, razlikujejo pa se po številu dvojnih vezi ter po razvejanosti in nasičenosti alkilne verige, vezane na C17-mesto steroidnega skeleta. Pri pripravi liposomov je koristno določiti, koliko sterola se nahaja v membrani, saj se v membrano ponavadi ne vključi celotna količina, ki jo zamešamo. Pri tem se ponavadi uporablja encimski kolorimetrični test za holesterol, ki pa ni najbolj uporaben tudi za druge naravne sterole. Posledično se nikoli natančno ne ve, če je koncentracija sterola, ki se vključi v membrano, prava. Glede na te pomanjkljivosti encimskega kolorimetričnega testa smo za določanje koncentracij različnih naravnih in sintetskih steroidov preizkusili alternativno metodo, ki sta jo leta 1973 razvila Rudel in Morris. Metoda je zelo stabilna in reproducibilna, žal pa zahteva uporabo precej agresivnih kemikalij. Naši rezultati so pokazali, da s to metodo lahko določimo koncentracije naslednjim steroidom: holesterolu, holesteril acetatu, stigmasterolu, ergosterolu, lanosterolu,  $\beta$ -sitosterolu in 7-dehidroholesterolu medtem ko z encimskim testom lahko določimo koncentracije naslednjih steroidov: holesterola,  $\beta$ -sitosterola, 7-dehidroholesterola, stigmasterola in ergosterola. Pri klasični metodi je potrebno, da steroid vsebuje nespremenjeno –OH skupino, vendar pozitivno reakcijo daje tudi estrska skupina na tem mestu. Za encimski test pa je nujno potrebno, da je prisotna nespremenjena –OH skupina in dvojna vez med C5 in C6-mestom. Dokazali smo, da je klasična metoda, ki sta jo opisala Rudel in Morris leta 1973 uporabna za večji spekter steroidov, je bolj natančna in ponovljiva, saj imajo rezultati pridobljeni s to metodo nizek raztros.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

D Dn  
DC 579.22:547.9:543.5(043.2)=163.6  
CX steroids / cholesterol / natural steroids / synthetic steroids / enzymatic test / method by Rudel - Morris  
AU SELAN, Karmen  
AA SEPČIĆ, Kristina  
PP SI-1000 Ljubljana, SLO, Večna pot 111  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology  
PY 2008  
TI EVALUATION OF SELECTED COLORIMETRIC METHODS FOR DETERMINATION OF STEROID CONCENTRATION  
DT Graduation thesis (University studies)  
NO X, 59 p., 2 tab., 43 fig., 43 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Sterols are of great importance to the membrane, as they regulate its fluidity and rigidity. They can be found in membranes of all eukaryotic cells. All the sterols bear a steroid skeleton with the hydroxyl group attached to the C3-position; however, they differ according to the number of double bonds and according to the branching and saturation of the alkyl chain, attached to the C17-position of the steroid skeleton. After the preparation of liposomes, it is useful to determine the amount of sterols in their membranes, as the whole amount of added sterols is usually not incorporated into them. For this purpose, an enzymatic colorimetric test for cholesterol determination is usually used. This test is however less convenient for determination of other natural sterols. Consequently, it is hard to estimate the exact quantity of the sterol incorporated into the membrane. In this thesis we tested an alternative method for determining the concentration of various natural and synthetic steroids, developed in 1973 by Rudel and Morris. This method was described as a very stable and reproducible, however it demands the use of rather aggressive chemicals. By using this method we can determine the concentration of the following steroids: cholesterol, cholesteryl acetate, stigmasterol, ergosterol, lanosterol,  $\beta$ -sitosterol and 7-dehidroholesterol. On the other hand, using the enzymatic test we can determine the concentration of the following steroids: cholesterol,  $\beta$ -sitosterol, 7-dehidroholesterol, stigmasterol and ergosterol. The unmodified hydroxyl group is required for a positive reaction by the Rudel-Morris test, however the ester group can also give a positive result. For the enzymatic colorimetric test, the presence of unmodified hydroxyl group and a double bond between C5 and C6 position is of crucial importance. We proved that the classic method, described by Rudel and Morris in 1973, is applicable to a larger spectrum of steroids; it is also more precise and repeatable.

## KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
<b>1 UVOD</b> .....	1
<b>2 PREGLED OBJAV</b> .....	3
2.1 ZGRADBA LIPIDNIH MEMBRAN.....	3
2.1.1 Biološke membrane .....	4
2.1.2 Liposomi .....	5
2.2 POMEMBNI LIPIDI V MEMBRANAH.....	7
2.2.1 Fosfolipidi .....	7
2.2.2 Steroidi.....	9
2.3 METODE ZA DOLOČANJE HOLESTEROLA .....	17
2.3.1 Metoda po Rudel – Morris-u .....	17
2.3.2 Encimski test .....	17
2.3.3 Ostale metode za določanje sterolov .....	18
<b>3 MATERIALI IN METODE</b> .....	23
3.1 MATERIALI .....	23
3.1.1 Kemikalije .....	23
3.1.2 Laboratorijska oprema .....	23
3.2 METODE .....	24
3.2.1 Priprava standardnih raztopin testnih steroidov .....	24
3.2.2 Določanje koncentracije steroidov v standardnih raztopinah z metodo po Rudel-Moriss-u .....	24
3.2.3 Določanje koncentracije steroidov z encimskim testom .....	25
3.2.4 Obdelava rezultatov .....	25
<b>4 REZULTATI</b> .....	26

4.1	DOLOČANJE KONCENTRACIJE STEROIDOV V STANDARDNIH RAZTOPINAH Z METODO PO RUDEL-MORRIS-U.....	26
4.2	DOLOČANJE KONCENTRACIJE STEROIDOV V STANDARDNIH RAZTOPINAH Z ENCIMSKIM TESTOM .....	32
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>38</b>
5.1	RAZPRAVA.....	38
5.2	SKLEPI.....	41
<b>6</b>	<b>POVZETEK.....</b>	<b>43</b>
<b>7</b>	<b>UČNA ENOTA .....</b>	<b>44</b>
7.1	UČNA ENOTA ZA BIOLOGIJO .....	44
7.1.1	<b>Delovni list.....</b>	<b>46</b>
7.2	UČNA ENOTA IZ KEMIJE .....	48
7.2.1	<b>Delovni list.....</b>	<b>50</b>
<b>8</b>	<b>VIRI.....</b>	<b>56</b>

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Uporabljene kemikalije.....	23
Preglednica 2: Uporabljena laboratorijska oprema .....	23

## KAZALO SLIK

Slika 1: Struktura biološke membrane.....	4
Slika 2: Prerez enoslojnega liposoma.....	5
Slika 3: Lipidni dvosloj.....	6
Slika 4: Fosfolipid.....	8
Slika 5: Kemijska in 3D struktura molekule sfingomielina.....	9
Slika 6: Strukturna formula gonana ali sterana, ki je osnova za vse steroide.....	10
Slika 7: Kemijska struktura molekule holesterola.....	11
Slika 8: Strukturna formula holesterola.....	12
Slika 9: Strukturna formula 7-dehidroholesterola.....	13
Slika 10: Strukturna formula lanosterola.....	13
Slika 11: Strukturna formula ergosterola.....	14
Slika 12: Strukturna formula stigmasterola.....	14
Slika 13: Strukturna formula $\beta$ -sitosterola.....	15
Slika 14: Strukturna formula 5-holesten-3-ona.....	15
Slika 15: Strukturna formula holesteril acetata.....	16
Slika 16: Strukturna formula holesteril sulfata.....	17
Slika 17: Določanje koncentracije holesterola po metodi, ki sta jo opisala Rudel in Morris (1973)..	26
Slika 18: Določanje koncentracije 7-dehidroholesterola po metodi, ki sta jo opisala Rudel in Morris (1973)..	27
Slika 19: Določanje koncentracije lanosterola po metodi, ki sta jo opisala Rudel in Morris (1973)..	27
Slika 20: Določanje koncentracije ergosterola po metodi, ki sta jo opisala Rudel in Morris (1973)..	28
Slika 21: Določanje koncentracije stigmasterola po metodi, ki sta jo opisala Rudel in Morris (1973).....	28
Slika 22: Določanje koncentracije $\beta$ -sitosterola po metodi, ki sta jo opisala Rudel in Morris (1973)..	29
Slika 23: Določanje koncentracije 5-holesten-3-ona po metodi, ki sta jo opisala Rudel in Morris (1973).....	29



Slika 24: Določanje koncentracije holesteril acetata po metodi, ki sta jo opisala Rudel in Morris (1973).....	30
Slika 25: Določanje koncentracije holesteril sulfata po metodi, ki sta jo opisala Rudel in Morris (1973).....	30
Slika 26: Določanje koncentracije steroidov po metodi, ki sta jo opisala Rudel in Morris (1973). .....	31
Slika 27: Določanje koncentracije holesterola z encimskim testom. ....	32
Slika 28: Določanje koncentracije 7-dehidroholesterola z encimskim testom.....	33
Slika 29: Določanje koncentracije lanosterola z encimskim testom. ....	33
Slika 30: Določanje koncentracije ergosterola z encimskim testom. ....	34
Slika 31: Določanje koncentracije stigmasterola z encimskim testom. ....	34
Slika 32: Določanje koncentracije $\beta$ -sitosterola z encimskim testom. ....	35
Slika 33: Določanje koncentracije 5-holesten-3-ona z encimskim testom.....	35
Slika 34: Določanje koncentracije holesteril acetata z encimskim testom.....	36
Slika 35: Določanje koncentracije holesteril sulfata z encimskim testom. ....	36
Slika 36: Določanje koncentracije steroidov z encimskim testom.....	37
Slika 37: Rastlinska celica.....	46
Slika 38: Živalska celica.....	47
Slika 39: Notranjost celice.....	47
Slika 40: Membranski model tekočega mozaika. ....	48
Slika 41: Skica tvorbe liposoma pri hidrataciji suhega lipidnega filma. ....	53
Slika 42: Nabrekanje lipidnega filma in nastanek večplastnega liposoma.....	54
Slika 43: Mikroskopska slika zmesi liposomov. ....	55

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

$\text{Al}_2\text{O}_3$	aluminijev oksid
$\text{BF}_3/\text{MeOH}$	metanolna raztopina borovega trifluorida
C	ogljikov atom
$-\text{CH}_3$	metilna skupina
$-\text{C}_2\text{H}_5$	etilna skupina
CEC	kapilarna elektrokromatografija ( <i>angl. <u>C</u>apillary <u>E</u>lectro<u>C</u>hromatography</i> )
Hol	holesterol
HPLC	visokotlačna tekočinska kromatografija ( <i>ang. <u>H</u>igh <u>P</u>ressure <u>L</u>iquid <u>C</u>hromatography</i> )
KOH	kalijev hidroksid
$L_d$	tekoča neurejena faza ( <i>ang. liquid disordered phase</i> )
$L_o$	tekoča urejena faza ( <i>ang. liquid ordered phase</i> )
$\text{MgO}_2$	magnezijev oksid
NaOH	natrijev hidroksid
$-\text{OH}$	hidroksilna skupina
$=\text{O}$	ketonska skupina
PC	fosfatidilholin
PEG	polietilenglikol
RCOOH	estrska skupina
S	trdna urejena faza ( <i>ang. solid phase</i> )
$\text{SO}_4^{2-}$	sulfatna skupina
SM	sfingomielin
$T_m$	temperatura faznega prehoda iz trdne v tekočo kristalinično fazo ( <i>ang. melting temperature</i> )
TLC	tankoplastna kromatografija ( <i>ang. <u>T</u>hin <u>L</u>ayer <u>C</u>hromatography</i> )

## 1 UVOD

Izhodišče moje diplomske naloge izhaja iz raziskovalnega dela, ki ga opravljajo na katedri za biokemijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani. Na katedri se ukvarjajo z membransko aktivnimi snovmi in toksini, ki se vežejo na in permeabilizirajo lipidne membrane, torej veliko delajo z različnimi naravnimi (celice) in umetnimi lipidnimi membranami (liposomi in lipidnimi mono- in dvosloji), ki se uporabljajo pri tovrstnih študijah. Pri pripravi umetnih membran (liposomov z različno lipidno sestavo) je vedno treba določiti koncentracije posameznih lipidov, ki so se vključili v membrano. V ta namen se uporablja standardni kolorimetrični encimski test. V zadnje čase je poudarek raziskav na katedri na toksinih, ki prepoznavajo in se vežejo na membranske sterole.

Steroli so izredno pomembni za membrano, saj uravnavajo njeno fluidnost in trdnost, in jih imajo vsi evkarionti. Živalska celica vsebuje predvsem holesterol, rastlinska fitosterole (stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol ali dezmosterol), glivna pa ergosterol. Vsi steroli imajo steroidni skelet z  $-OH$  skupino vezano na C3-mestu, razlikujejo pa se po številu dvojnih vezi znotraj steroidnega skeleta ter po razvejanosti in nasičenosti alkilne verige, vezane na C17-mesto steroidnega skeleta.

Pri pripravi liposomov je koristno določiti, koliko sterola se nahaja v membrani, saj se v membrano ponavadi ne vključi celotna količina, ki jo zamešamo. Pri tem na katedri za biokemijo uporabljajo encimski kolorimetrični test za holesterol, ki pa ni najbolj uporaben tudi za druge naravne sterole (čeprav je bistvo testa reakcija z  $-OH$  skupino, ki jo imajo vsi steroli). Posledično nikoli natančno ne vedo, če je koncentracija sterola, ki se vključi v membrano, prava.

Glede na te pomanjkljivosti encimskega kolorimetričnega testa je cilj mojega diplomskega dela bil preizkusiti alternativno metodo, ki sta jo leta 1973 razvila Rudel in Morris in ki so jo nekoč veliko uporabljali za določanje holesterola. Metoda je zelo stabilna in reproducibilna, žal pa zahteva uporabo precej agresivnih kemikalij. Cilj diplomskega dela je bil preizkusiti, ali bi bila ta metoda uporabna za določanje natančnih koncentracij tudi

ostalnih sterolov naravnega izvora ter sintetičnih derivatov holesterola, ter primerjati rezultate, pridobljene z obema metodama.

Pričakovali smo, da bomo z uporabo metode za določanje holesterola, ki sta jo opisala Rudel in Morris, uspeli določiti tudi koncentracije drugih naravnih sterolov in sintetičnih steroidov. Pričakovali smo tudi, da bo ta metoda (1) bolj natančna in (2) bolj uporabna za širok spekter steroidov od standardnega kolorimetričnega encimskega testa.

## 2 PREGLED OBJAV

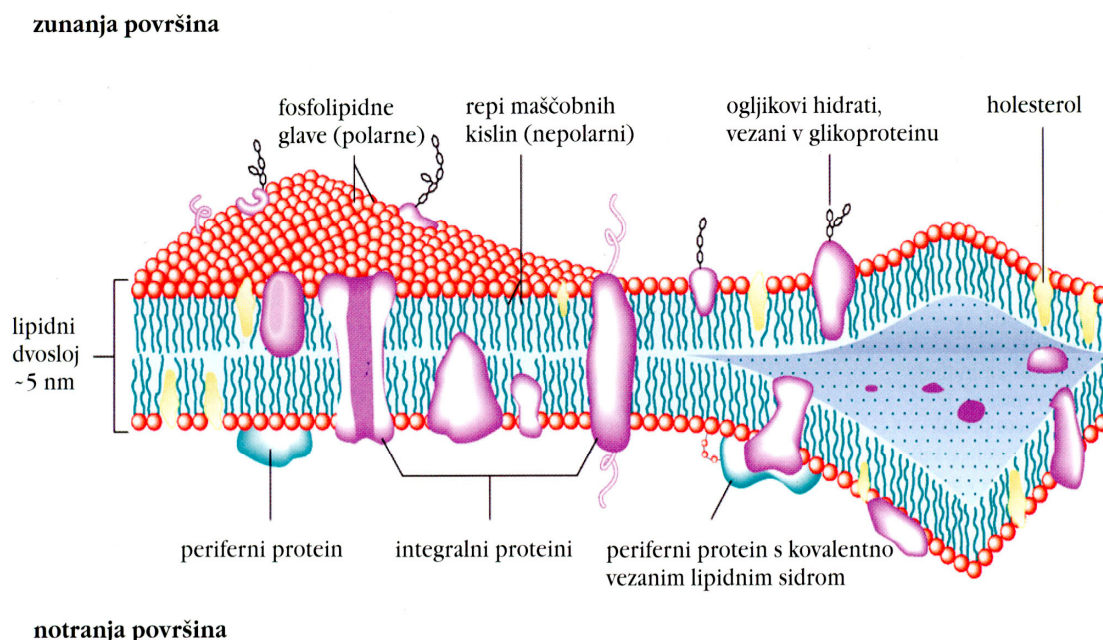
### 2.1 ZGRADBA LIPIDNIH MEMBRAN

Osnovno strukturno ogrodje membrane je dvojna lipidna plast (Boyer, 2005). Celične membrane so sestavljene iz domen, ki vsebujejo lipide z različno polarnostjo, proteine in ogljikove hidrate. Vsebnost ogljikovih hidratov je majhna, nahajajo se samo na zunanji plasti membranskega dvosloja in so vedno vezani na lipide (glikolipidi) ali na proteinske molekule (glikoproteini).

Prvi model, ki sta ga leta 1935 predlagala Davson in Danieli je razlagal membrano kot dvosloj, ki vsebuje fosfolipide, nevtralne lipide in membranske proteine. Leta 1972 sta Singer in Nicolson predlagala model tekočega mozaika (Singer in Nicolson, 1972). Dokazala sta obstoj amfifilnih proteinov v dvosloju ter dinamično strukturo membrane. Pokazala sta, da lahko majhne nepolarne molekule prehajajo skozi lipidni dvosloj, polarne molekule pa tega niso zmožne in jim pri prehodu pomagajo membranski proteini. Fosfolipidni dvosloj je fluidni matriks, v katerem se lipidi in proteini lahko premikajo v vseh smereh znotraj svojega sloja. Glede na ta model naj bi membrana bila sestavljena iz lipidnega dvosloja, v katerega so vgrajeni periferni in integralni proteini. Pri tem imajo lipidi strukturno vlogo, proteini pa transportno ter encimsko vlogo (Boyer, 2005). Nadaljnje raziskave pa so privedle do sprememb modela, ki sta ga predlagala Singer in Nicholson. Odkrili so, da membranski proteini in lipidi niso naključno razporejeni v membrani, ampak se lateralno združujejo v določene domene (Lichtenberg, 2005). Asimetričnost je lahko tudi vertikalna. Tako je v eritrocitnih membranah notranja plast sestavljena iz fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinozitola in glikolipidov, zunanja pa iz fosfatidilholina in sfingomielina (Boyer, 2005). Novejši model razlage membranske heterogenosti je model lipidnih raftov, ki sta ga predlagala Simons in Ikonen leta 1997 (Simons in Ikonen, 1997).

### 2.1.1 Biološke membrane

Biološke membrane evkariontskih celic (Slika 1) si predstavljamo kot mozaik različnih mikrodomen z različno lipidno in proteinsko sestavo ter različnimi fizikalnimi lastnostmi (Brown in London, 2000). V membranah sesalčjih celic so prisotni fosfolipidi (glicerofosfolipidi in sfingolipidi), ki se razlikujejo v strukturi vodilne polarne skupine in strukturi acilnih verig. V vsakem tipu celice je lahko prisotnih več kot tisoč različnih vrst fosfolipidov, med katerimi so najpomembnejši in večinsko najbolj zastopani sfingomielin (SM) in fosfatidilholin (PC). Slednji predstavlja več kot 50% vseh membranskih fosfolipidov (Ohvo-Rekilä in sod., 2002).



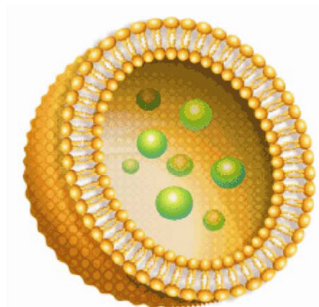
Slika 1: Struktura biološke membrane. Membrana je sestavljena iz lipidnega dvosloja z vključenimi integralnimi in perifernimi proteini (Boyer, 2005).

V membranah se istočasno nahajajo domene v tekoči neurejeni fazi ( $L_d$ ), ki so bogate z lipidi z nizko temperaturo prehoda ( $T_m$ ), in domene v trdni urejeni fazi (S), bogate z lipidi z visoko  $T_m$ . Pod  $T_m$  je difuzija lipidnih molekul počasna.  $T_m$  je odvisna od strukture acilnih verig in polarne skupine lipidov.  $T_m$  narašča z naraščajočo dolžino acilnih verig in stopnjo njihove nasičenosti ter se znižuje z naraščajočo nenasičenostjo lipidov. V trdni urejeni fazi so prisotni predvsem lipidi z dolgimi nasičenimi acilnimi verigami, zlasti sfingolipidi, ki imajo običajno visoke  $T_m$ , v tekoči fazi pa prevladujejo glicerofosfolipidi z mono- ali polinenasičenimi acilnimi verigami in nižjo  $T_m$ . Prisotnost holesterola (Hol) in

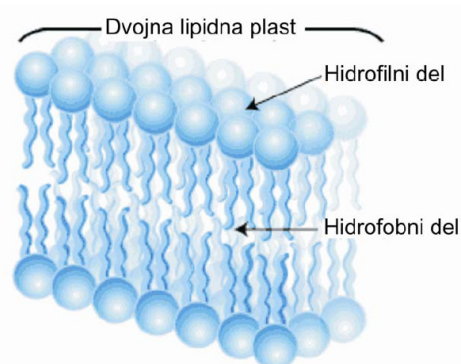
ostalnih sterolov, ki se tesno pakirajo med fosfolipidi in jih kondenzirajo, je razlog za pojav vmesne faze, tekoče urejene faze ( $L_o$ ). Lipidi v tej fazi so tesno pakirani, vendar imajo še vedno sposobnost hitrega lateralnega premikanja (London, 2002). Membranske domene v  $L_o$  fazi so osnova za tvorbo lipidnih raftov, ki imajo izjemno pomembne biološke funkcije kot so celična signalizacija in membranski transport (eksocitoza in endocitoza). Služijo tudi kot vezavna mesta za nekatere viruse, toksine in druge ligande (Edidin, 2003, London, 2002, Simons in Ikonen, 1997).

### 2.1.2 Liposomi

Beseda liposom izvira iz grškega jezika in pomeni maščobno telo. Liposomi ali lipidni vezikli (Slika 2) so zaokroženi delci, ki so sestavljeni iz enega ali več lipidnih dvoslojev. V notranjosti zadržujejo del topila v katerem plavajo, kar lahko izkoriščamo v različne namene. Njihove velikosti se gibljejo od 20 nm do 4  $\mu$ m. Sestavljeni so iz enega (enoslojni liposomi) ali več lipidnih dvoslojev, ki so urejeni koncentrično in vsebujejo enako število prostorov z vodo (večslojni liposomi). Molekulska struktura stene liposoma je zelo podobna strukturi celične membrane. Zgrajeni so predvsem iz amfifilnih molekul, npr. fosfolipidov, katerih lastnost je, da so sestavljeni iz hidrofilnega in hidrofobnega dela (Lasič, 1997).



Slika 2: Prerez enoslojnega liposoma. Zelene kroglice v notranjosti predstavljajo razne molekule, ki jih lahko zapremo v liposom. (<http://illuminate.usc.edu/article.php?articleID=118&page=3>).



Slika 3: Lipidni dvosloj. (<http://illuminate.usc.edu/article.php?articleID=118&page=3>).

Odkritje liposomov je primer naključja v znanstvenoraziskovalnem delu. Prvi liposom je leta 1961 v Angliji odkril Alec Bangham. Pokazal je, da fosfolipidni filmi zmešani z vodo spontano tvorijo koncentrične vezikle z eno ali več dvojnimi plastmi. Liposomi so amfifilne narave, kar pomeni, da so sestavljeni iz hidrofobnega in hidrofilnega dela. Hidrofilni del predstavljajo polarne glave fosfolipidov, ki privlačijo vodo, hidrofobni pa so nepolarni repi, ki vodo odbijajo (Slika 3). Ta lastnost omogoča urejanje delcev v zaprte strukture, ko jih izpostavimo polarnemu mediju. Tiste amfifilne molekule, ki imajo le en nepolarni rep (npr. detergenti, maščobne kisline in lizofosfolipidi) tvorijo micelle, tisti, ki imajo dva nepolarna repa pa se povežejo v lipidni dvosloj. V lipidnem dvosloju so nepolarni repi v notranjosti, polarne glave pa so v stiku z vodo in ščitijo nepolarno sredico. Ker bi bila na robovih hidrofobna sredica v kontaktu z vodo, se dvosloj zapre, da nastanejo sferične strukture – liposomi (Lasič, 1997).

#### 2.1.2.1 Lastnosti in uporaba liposomov

Različne liposomske strukture imajo različne fizikalne in kemijske lastnosti, kot so osmotska aktivnost, permeabilnost membrane v različnih topilih, interakcija z različnimi hidrofilnimi in hidrofobnimi molekulami ter agregatna stanja struktur, ki so odvisna od temperature, kemične sestave membrane in občutljivosti površine membrane na različne reagentne. V liposome lahko vgrajujemo tako hidrofilne in amfifilne kot tudi lipofilne učinkovine (nizkomolekularne učinkovine, peptide, proteine, RNK, DNK), s čimer spreminjamo lastnosti liposoma. Z dodajanjem hidrofobnih učinkovin na zunanjo površino omogočimo liposomu, da se giblje v hidrofobnih medijih ali pa prehaja v druge membrane. Hidrofilne učinkovine se nahajajo v vodnem mediju v osrednjem delu liposoma in ob



njegovi membrani. Amfifilne učinkovine so razporejene ob membrani in se z lipofilnim delom vanjo delno vgradijo, lipofilne učinkovine pa so popolnoma vključene v lipidni dvosloj (Lasič, 1997). Debelina lipidnega dvosloja je okoli 4 nm (Kočevar in Kristl, 2005).

Glede na velikost ločimo enomembranske in večmembranske vezikle. Enomembranske liposome ločimo glede na velikost na majhne, velike in liposome celičnih velikosti. Velikosti majhnih liposomov se gibljejo med 20 in 100 nm, velikih med 100 in 800 nm, enomembranski vezikli celičnih velikosti pa presegajo velikost 1  $\mu\text{m}$ .

Obstaja veliko različnih metod za pripravo liposomov, ki se med seboj ločijo po zahtevnosti priprave, homogenosti lipidnih veziklov, količini dobljenih lipidov in času, ki je potreben za pripravo (Lasch in sod, 2003). Na voljo so tri glavne metode: hidratacija in sonikacija, priprava s filtri in homogenizacija.

Liposomi se uporabljajo za različne namene. Uporabni so v medicini kot prenašalci zdravil, ker so biokompatibilni, razgradljivi in ne povzročajo imunskega odziva ter zdravilo prenesejo do tarčnega mesta v organizmu. Liposomi so tudi eni izmed najbolj preučevanih dostavnih sistemov za zdravljenje rakavih obolenj (Kočevar in Kristl, 2005). Uporabljajo jih tudi pri pripravi cepiv. V kozmetični industriji liposomi prenašajo hidrofilne in hidrofobne snovi. V genetiki se uporabljajo za prenos DNA oziroma RNA v celice. V biofiziki so liposomi model, na katerem preučujejo prepustnost, dinamiko in strukturo membran. Uporabni so tudi v ekologiji, živilski industriji in diagnostiki (Lasič, 1997).

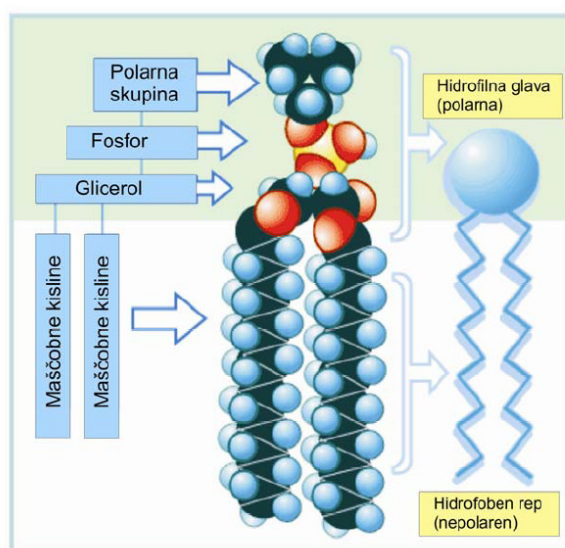
## 2.2 POMEMBNI LIPIDI V MEMBRANAH

### 2.2.1 Fosfolipidi

Molekula fosfolipida je sestavljena iz štirih glavnih delov. Na alkoholu, ki je ponavadi glicerol, sta zaestrena dva radikala (maščobni kislini), na tretjem mestu pa je zaestrena fosforjeva kislina, na katero je vezan še drugi alkohol (Slika 4). Skupaj z glikolipidi in

holesterolom so poglavitni gradniki celičnih membran in sestavljajo lipidno dvoslojno plast. Maščobne kisline so amfifilne molekule sestavljene iz polarne karboksilne skupine in nepolarne ogljikovodikove verige. Imajo 4 do 36 ogljikovih atomov. Če so ogljikovi atomi v maščobnih kislinah povezani z enojnimi vezmi govorimo o nasičenih maščobnih kislinah, če je prisotna vsaj ena dvojna vez pa o nenasičenih. Na mestu dvojne vezi, ki je v *cis* konfiguraciji se nenasičene maščobne kisline upognejo in se zato ne morejo v agregatih pakirati tesno kot nasičene. Nenasičene maščobne kisline so tudi bolj reaktivne. Maščobne kisline so dobro topne v organskih topilih, topnost v vodi pa pada z dolžino verige. Pri sobni temperaturi so vse nenasičene in vse nasičene maščobne kisline z manj kot deset ogljikovih atomov oljnate. Maščobne kisline gradijo nepolarne in polarne lipide. V nepolarnih triacilglicerolih se na osnovno molekulo glicerola vežejo tri maščobne kisline. Triacilgliceroli v celicah predstavljajo vir energije in toplotno izolacijo (Boyer, 2005).

Fosfolipide, ki imajo polaren in nepolaren del, najdemo v membranah in jih delimo v dve veliki skupini: glicerofosfolipide in sfingolipide. V glicerofosfolipidih sta na C1 in C2 mesto glicerola vezani dve maščobni kislini, C3 mesto pa je zaestreno s fosfatno skupino. Fosfatna skupina je dodatno zaestrena s še eno substituentom, ki je lahko vodik, etanolamin, holin, glicerol, serin ali inozitol. Pri fiziološkem pH imajo vsi glicerofosfolipidi razen fosfatidilholina in fosfatidiletanolamina negativen neto naboj. Osnovna molekula sfingolipidov pa je sfingozin, ki ima aminske in hidroksilne skupine (Boyer, 2005).

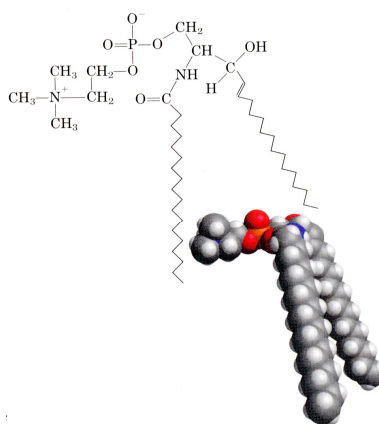


Slika 4: Fosfolipid. (<http://illumina.usc.edu/article.php?articleID=118&page=3>).

### 2.2.1.1 Sfingomielin (SM)

Osnovna molekula sfingolipidov je alkohol sfingozin, ki ima amsko in hidroksilno skupino. Na C2 atomu amske skupine je vezana maščobna kislina, na C1 atom hidroksilne skupine pa je vezana substituenta, ki je lahko vodik, fosfoholin, glukoza ali kompleksni oligosaharid (Boyer, 2005).

Sfingolipidi so esencialni za obstoj evkariontskih celic kot strukturna komponenta njihovih membran, funkcionirajo pa tudi kot sekundarni sporočevalci. Sfingomielin (Slika 5) je edini sfingolipid, ki vsebuje fosfor. Maščobna kislina je vezana preko amske skupine, hidroksilna skupina pa je zaestrena s fosfoholinsko enoto. Molekula ima polarno ionizirano glavo in dva nepolarna repa. Sfingomielin je prisoten v mielinskih ovojnica, kjer izolira aksonska vlakna (Boyer, 2005). Več kot polovica celičnega sfingomielina je skoncentrirana v plazemski membrani, kjer je tako kot fosfatidilholin prisoten na njeni zunanji polovici. Holesterol preferenčno tvori interakcije s sfingolipidi, kar je osnova za nastanek lipidnih raftov v plazemski membrani (Ohvo-Rekilä in sod, 2002).



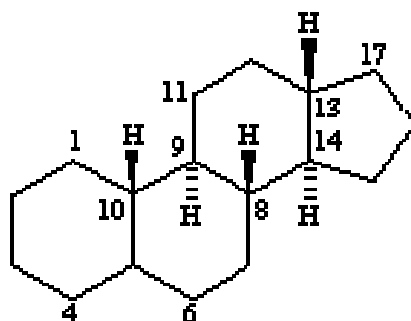
Slika 5: Kemijska in 3D struktura molekule sfingomielina (Nelson in Cox,2000).

### 2.2.2 Steroidi

Steroidi so terpenoidni lipidi z ogljikovim ogrodjem: štirimi medseboj povezanimi obroči, ki so na splošno razmeščeni v 6-6-6-5 člensko obliko. Osnovna struktura vsakega steroida (steroidni skelet) je prikazana na sliki 6. Zaporedoma so povezani najprej trije šestčlenski ogljikovi obroči, ki jim sledi eden petčlenski ogljikov obroč. Steroidi se med seboj razlikujejo po funkcionalnih skupinah, ki so vezane na te ogljikove obroče in po oksidacijskem stanju obročev. Na stotine različnih steroidov lahko najdemo tako v

rastlinah, živalih in tudi glivah. Vsi steroidi se sintetizirajo v celicah, bodisi iz lanosterola (živali in glive) ali cikloartenola (rastline). Oba sterola sta izpeljana iz ciklizacije triterpena skvalena (Rossier, 2006).

Steroidi so derivati (predvsem alkoholi) gonana, povsem hidrogeniranega ciklopentafenantrena. K steroidom sodijo: steroli, žolčne kisline (holna kislina), D-vitamini, kortikoidi (hormoni skorje nadledvične žleze in spolni hormoni), glikozidi digitalisa (digitoksin), in strupi kač (bufotalin), saponini (digitonin) in nekateri alkaloidi (solanin) (Schröter in sod., 1993).



Slika 6: Strukturna formula gonana ali sterana, ki je osnova za vse steroide (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/sectionF/steroid/ster10.html>).

#### 2.2.2.1 Steroli

Steroli so sestavni del vseh evkariontskih celic; za katere so življenjsko pomembni. Naravni steroli imajo na mestu 3 –OH skupino, na mestih 10 in 13 –CH<sub>3</sub> skupini, na mestu 17 pa alifatsko verigo (Schröter in sod., 1993).

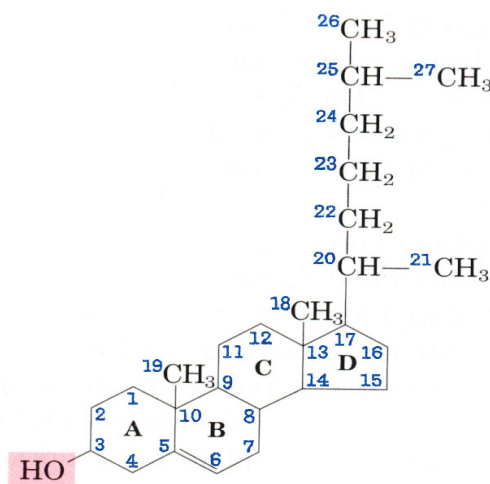
Sterole lahko najdemo kot proste sterole, kakor tudi v acilni obliki (sterolni ester), v alkilni obliki (sterolni alkilni etri), v sulfatni obliki (holesteril sulfat) ali v glikozidni obliki (sterolni glikozidi), ki lahko sami sebe acilirajo (acilni sterolni glikozidi). Njihova sinteza poteka na membrani endoplazmatskega retikuluma in je zelo zapletena ter vključuje čez 200 stopenj (<http://www.cyberlipid.org/cyberlip/home0001.htm>).

Steroli imajo pomembno vlogo pri regulaciji fizioloških lastnosti bioloških membran (Simons in Ikonen, 2000; Ohvo-Rekila in sod., 2002). Prisotnost različnih sterolov v različnih membranah kaže na njihove specializirane funkcije (Li in sod., 2003). Sterol je lahko "membransko aktiven" oz. spreminja fizikalno-biološke lastnosti membrane, kadar

izpolnjuje naslednje strukturne lastnosti: ima  $\beta$ -OH skupino na mestu C3, sklenjen steroidni skelet, holesterolu podobno alkilno verigo ter relativno majhno površino (<40 Å<sup>2</sup>/molekulo), ki meji na vodo oziroma zrak (Barenholz, 2002).

#### 2.2.2.2 Holesterol

Molekulo holesterola sestavlja steroidni skelet oz. 4 sklenjeni obroči (trije šestčlenski; A, B in C in en petčlenski obroč; D) z dvojno vezjo med atomoma C5 in C6 (obroč B), -OH skupino na mestu C3 (obroč A), ter izooktilno stransko verigo na mestu C17 (obroč D) (Sliki 7 in 8). Obroči so v *trans* konfiguraciji, kar naredi molekulo planarno in rigidno, izjema je njena izooktilna stranska veriga, ki je fleksibilna. Hidroksilna skupina je zelo pomembna, saj daje molekuli, ki bi bila sicer hidrofobna, amfifilni značaj, poleg tega pa omogoča njeno orientacijo v membrani in tvorbo vodikovih vezi med molekulami holesterola in molekulami vode ter z drugimi lipidnimi molekulami. Holesterol se v fosfolipidnih dvoslojih orientira tako, da je s polarno -OH skupino obrnjen proti vodni fazi, s hidrofobnim steroidnim obročem pa je zakopan v verige membranskih fosfolipidov (Boyer, 2005). V membranah se holesterol tesno povezuje s fosfolipidi in sfingolipidi, ki imajo nasičene acilne verige (Xu in London, 2000).



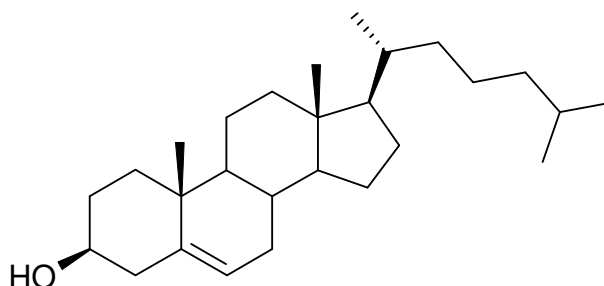
Slika 7: Kemijska struktura molekule holesterola. Sestavljen je iz steroidnega skeleta (obroči označeni z A, B, C in D), polarne -OH skupine ter izooktilne stranske verige. Ogljikovi atomi so oštevilčeni z modrim (Nelson in Cox, 2000).

Holesterol je bil prvi izolirani sterol. Izoliral ga je Poulletier de La Salle okoli leta 1770 iz žolčnih kamnov. Leta 1815 ga je izoliral M. E. Chevreul iz neomiljene frakcije živalskih

maščob in ga poimenoval holesterin (gr. *chole* = žolč in *stereos* = trden). Pravilno formulo ( $C_{27}H_{46}O$ ) je leta 1888 podal F. Reinitzer (<http://www.cyberlipid.org/sterols/ster0003.htm#sterols>).

Holesterol je brezbarvna kristalinična snov brez vonja, na otip deluje mastno, v vodi se slabo topi, topi pa se v vročem etanolu, dietil etru in benzenu. Tvori se v jetrih, največ pa ga najdemo v možganih, živčevju in v celičnih membranah. Izloča se tudi skozi kožo v obliki estra, ki kožo ščiti. Sodeluje v sintezi žolčnih kislin, vitamina D in spolnih hormonov (Boyer, 2005).

Zelo zgodaj je postalo jasno, da holesterol igra pomembno vlogo pri nadzoru celične membranske prepustnosti. Sedaj vemo tudi to, da ima ključno vlogo pri lateralni organizaciji membran in pri prosti prostorninski razširjenosti. Vretenčarski možgani so organ, ki je najbolj bogat s holesterolom, saj ga vsebujejo približno 25% od celotnega prostega holesterola v telesu (<http://www.cyberlipid.org/sterols/ster0003.htm#sterols>).

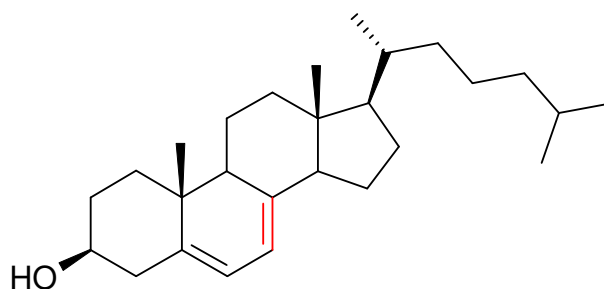


Slika 8: Strukturna formula holesterola.

#### 2.2.2.3 7-dehidroholesterol

7-dehidroholesterol je tako kot holesterol zoosterol, torej sterol živali. Je zadnji prekurzor v sintezi holesterola. V koži se pretvori v provitamin D<sub>3</sub>, navzočnost te spojine v koži pa nam omogoča, da lahko proizvedemo vitamin D<sub>3</sub> s pomočjo UV-žarkov v sončni svetlobi. Lahko ga najdemo tudi v mleku nekaterih sesalčjih vrst. Odkril ga je Nobelov nagrajenec Adolf Windaus (1928) (Martini in sod., 2006).

Struktura 7-dehidroholesterola (Slika 9) se od holesterola razlikuje v tem, da ima še eno dodatno dvojno vez in sicer med mestoma C7 in C8.

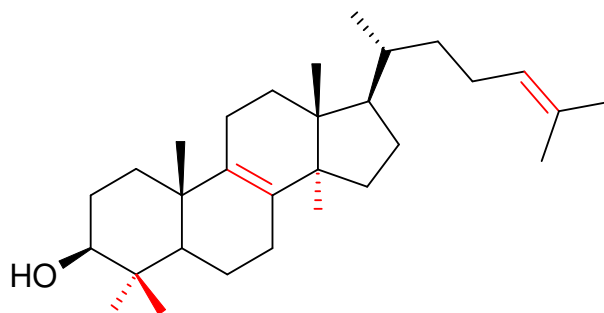


Slika 9: Strukturna formula 7-dehidroholesterola. Z rdečo barvo so prikazane strukturne lastnosti, po katerih se prikazana molekula razlikuje od molekule holesterola.

#### 2.2.2.4 Lanosterol

Lanosterol najdemo kot glavno sestavino neomiljenega deleža volnene maščobe (lanolin). Je glavni prekursor pri sintezi vseh naravnih živalskih in glivnih sterolov (<http://www.cyberlipid.org/sterols/ster0003.htm#sterols>).

Struktura lanosterola (Slika 10) se od holesterola razlikuje bistveno bolj od strukture 7-dehidroholesterola. Na mestu C3 ima vezano –OH skupino, na mestu C14 ima vezano eno –CH<sub>3</sub> skupino, na mestu C4 ima vezani dve –CH<sub>3</sub> skupini, dvojno vez ima med mestoma C8 in C9, na mestu C17 pa je vezana izooktilna stranska veriga, ki ima med mestoma C27 in C28 dvojno vez.

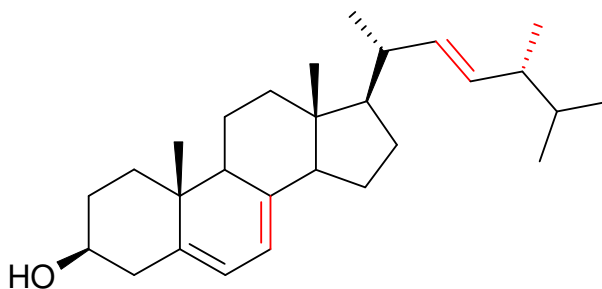


Slika 10: Strukturna formula lanosterola. Z rdečo barvo so prikazane strukturne lastnosti, po katerih se prikazana molekula razlikuje od molekule holesterola.

#### 2.2.2.5 Ergosterol

Ergosterol je glaven sterol gliv in kvasovk. Ergosterol, na enak način kot holesterol, v kombinaciji s sfingomielinom tvori tekočo urejeno fazo in lipidne rafte. Ima tudi mnogokatero funkcijo pri regulaciji rasti kvasovk ([http://www.lipidlibrary.co.uk/Lipids/plant\\_st/index.htm](http://www.lipidlibrary.co.uk/Lipids/plant_st/index.htm)).

Struktura ergosterola (Slika 11) se od holesterola razlikuje po dodatni dvojni vezi med mestoma C7 in C8. Dvojna vez je še prisotna v izooktilni stranski verigi in sicer med mestoma C22 in C23. V izooktilni stranski verigi pa je še prisotna dodatna  $-CH_3$  skupina in sicer na mestu C24.

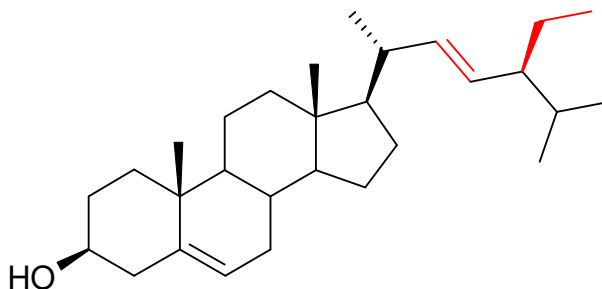


Slika 11: Strukturna formula ergosterola. Z rdečo barvo so prikazane strukturne lastnosti, po katerih se prikazana molekula razlikuje od molekule holesterola.

#### 2.2.2.6 Stigmasterol

Stigmasterol je nenasičen rastlinski sterol, ki ga najdemo v membranah rastlinskih celic, kakor tudi v rastlinskih maščobah ali rastlinskih oljih. Veliko ga je v olju soje, bučničnih zrnih, semenih navadne ogrščice in v številnih zdravilnih zeliščih. Lahko ga najdemo tudi v različni zelenjavi, stročnicah, oreščkih, semenih in nepasteriziranem mleku. Uporablja se kot prekursor v proizvodnji sintetičnega progesterona, dragocenega človeškega hormona, ki igra pomembno fiziološko vlogo pri regulaciji in obnovi tkiva. Progesteron je tudi vmesni del v biosintezi androgenov, estrogenov in kortikosteroidov ([http://www.lipidlibrary.co.uk/Lipids/plant\\_st/index.htm](http://www.lipidlibrary.co.uk/Lipids/plant_st/index.htm)).

Struktura stigmasterola (Slika 12) se od holesterola razlikuje po bolj razvejani izooktilni stranski verigi. Na mestu C24 ima  $-C_2H_5$  skupino in med mestoma C22 in C23 ima prisotno dvojno vez.



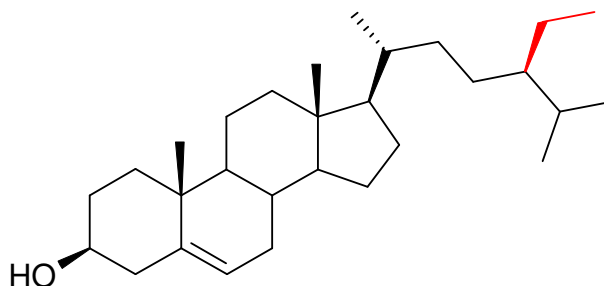
Slika 12: Strukturna formula stigmasterola. Z rdečo barvo so prikazane strukturne lastnosti, po katerih se prikazana molekula razlikuje od molekule holesterola.



### 2.2.2.7 $\beta$ -sitosterol

$\beta$ -sitosterol je tudi eden izmed fitosterolov. Je barve beljaka in voščene narave. V kraljestvu rastlin je široko razporejen in tako ga lahko najdemo v pritlikavi palmi, semenih buče, riževih otrobih, pšeničnih kalčkih, koruznem olju in soji. Sam ali v kombinaciji z ostalimi fitosteroli lahko zmanjša raven holesterola v krvi in se lahko včasih tudi uporablja pri zdravljenju hiperholesterolemije (Prager in sod., 2002).

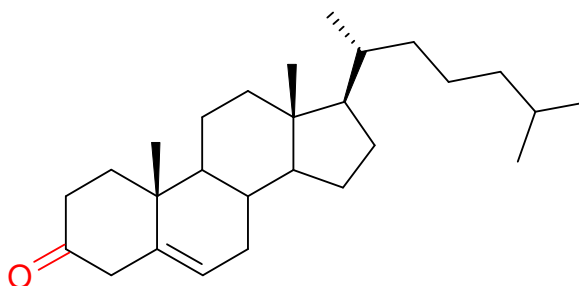
Struktura  $\beta$ -sitosterola (Slika 13) je zelo podobna strukturi stigmasterola. Razlikujeta se le v tem, da  $\beta$ -sitosterol nima prisotne dvojne vezi v izooktilni stranski verigi med mestoma C22 in C23, ampak ima prisotno samo  $-C_2H_5$  skupino na mestu C24. Torej se struktura  $\beta$ -sitosterola od holesterola razlikuje po bolj razvejani izooktilni stranski verigi in sicer ima v njej na mestu C24 vezano  $-C_2H_5$  skupino.



Slika 13: Strukturna formula  $\beta$ -sitosterola. Z rdečo barvo so prikazane strukturne lastnosti, po katerih se prikazana molekula razlikuje od molekule holesterola.

### 2.2.2.8 5-holesten-3-on

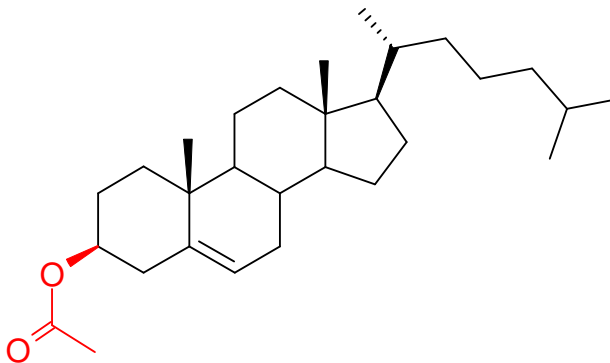
5-holesten-3-on je sintetični derivat holesterola, katerega struktura (Slika 14) je skoraj identična strukturi holesterola. Edina razlika med njima je, da 5-holesten-3-on nima  $-OH$  skupine na C3 mestu, ampak ima namesto nje keto  $=O$  skupino, ker je prišlo do oksidacije.



Slika 14: Strukturna formula 5-holesten-3-ona. Z rdečo barvo so prikazane strukturne lastnosti, po katerih se prikazana molekula razlikuje od molekule holesterola.

### 2.2.2.9 Holesteril acetat

Holesteril acetat je sintetični derivat holesterola, katerega struktura (Slika 15) je zelo podobna strukturi holesterola. Razlika med njima je, da holesteril acetat nima –OH skupine na C3 mestu, ampak ima estrsko RCOOH skupino.



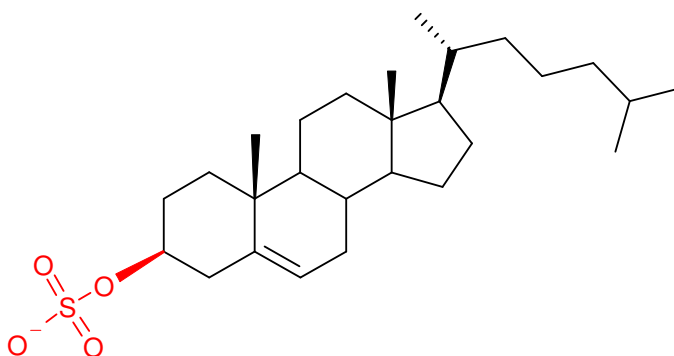
Slika 15: Strukturna formula holesteril acetata. Z rdečo barvo so prikazane strukturne lastnosti, po katerih se prikazana molekula razlikuje od molekule holesterola.

### 2.2.2.10 Holesteril sulfat

Holesteril sulfat je sulfatni ester holesterola, ki nastane v sesalčni celici. Najdemo ga tako v rdečih krvničkah, kot tudi v keratiniziranih slojih v koži, pri živalih pa v kopitih in parkljih ([http://www.lipidlibrary.co.uk/Lipids/plant\\_st/index.htm](http://www.lipidlibrary.co.uk/Lipids/plant_st/index.htm)).

Čeprav je prisoten v majhni količini, je glaven sulfolipid pri različnih tipih celic, predvsem v ledvicah, reprodukcijskih in živčnih tkivih. V večini organov se koncentrira v epitelni celični steni ali v plazemskih membranah. Holesteril sulfat ima tudi pomembno vlogo pri vzdrževanju celovitosti in adheziji raznih kožnih slojev, medtem ko ureja tudi nekatere encimske dejavnosti. Njegova funkcija še vedno ni popolnoma pojasnjena, vemo pa, da lahko igra pomembno vlogo pri celični adheziji, prepoznavanju in signalni transdukciji. V primesi ima stabilizirajočo vlogo, na primer ščiti eritrocite pred osmotskim razpadom. Je glavni mobilni steroidni sulfat v krvni plazmi, čeprav ga tudi pri tem spremlja dehidroepiandrosteron sulfat, katerega funkcija pa je še neznana ([http://www.lipidlibrary.co.uk/Lipids/chol\\_der/index.htm](http://www.lipidlibrary.co.uk/Lipids/chol_der/index.htm)).

Struktura holesteril sulfata (Slika 16) se od strukture holesterola razlikuje v tem, da ima na mestu C3 vezano sulfatno skupino ( $-\text{SO}_4^-$ ) namesto –OH skupine, ostalih razlik med njima ni.



Slika 16: Strukturna formula holesteril sulfata. Z rdečo barvo so prikazane strukturne lastnosti, po katerih se prikazana molekula razlikuje od molekule holesterola.

## 2.3 METODE ZA DOLOČANJE HOLESTEROLA

### 2.3.1 Metoda po Rudel – Morris-u

Metodo za natančno določanje holesterola v serumu sta leta 1973 opsala Rudel in Morris. Holesterol določamo tako, da pripravljene standardne raztopine steroidov ali naravne vzorce, ki vsebujejo holesterol, obdelamo s KOH in etanolom in nato ekstrahiramo s heksanom in destilirano vodo. Sledi evaporacija heksanske plasti (ki vsebuje sterole) z dušikom in njena obdelava z *o*-ftalaldehidom in žvepleno kislino. Količino holesterola v vzorcu določimo z merjenjem absorpcije raztopine na spektrofotometru pri 550 nm, koncentracijo pa odčitamo iz standardiziranih umeritvenih premic (Rudel in Morris, 1973).

*o*-ftalaldehid je reagent, ki ima široko uporabo v diagnostiki in ostalih področjih. Uporablja se lahko kot dezinfekcijsko sredstvo, kot reagent za dokazovanje proteinov, ter kot reagent za dokazovanje holesterola (tukaj ga še najmanj uporabljajo)

(<http://cancerweb.ncl.ac.uk/cgi-bin/omd?o-phthalaldehyde>).

### 2.3.2 Encimski test

Wako Free Cholesterol C test je *in vitro* encimski kolorimetrični postopek za določanje količine prostega holesterola v serumu. Prosti holesterol v serumu se oksidira s pomočjo holesterol oksidaze v holestenon in vodikov peroksid. Vodikov peroksid povzroči količinsko oksidativno utekočinjenje fenola in 4-aminoantipirina v prisotnosti peroksidaze, kar se odraža v razvoju rdeče barve. Količina prostega holesterola v vzorcu se določa z

merjenjem absorbance pri absorpcijski valovni dolžini 550 nm (Wako Chemicals GmbH, navodila za izvedbo testa).

### **2.3.3 Ostale metode za določanje sterolov**

Za določanje koncentracije holesterola in ostalih steroidov lahko poleg navedenih določevalnih tehnik uporabljamo širok spekter različnih metod. S temi metodami ne samo da določamo količine, ampak lahko tudi ločujemo med seboj večje število molekul ali spojin v vzorcu.

#### **Salkowskijev test**

Test izvajamo tako, da k 1 ml raztopine holesterola v kloroformu dodamo 1 ml konc.  $H_2SO_4$ . Ob prisotnosti koncentrirane kisline se raztopina holesterola v kloroformu obarva oranžno zaradi kondenzacije dveh sterolov v bisterol in zaradi dodatnih dvojnih vezi.

#### **Precipitacija holesterola s saponinom**

K 1 ml 0.1% holesterola v zmesi aceton - absolutni etanol dodamo 3 ml 0.5% saponina v 50% etanolu, segrejemo za nekaj sekund ter spravimo za 1 uro v hladilnik. Saponin (digitonin) se kondenzira s 3-beta-steroli v netopen digitonid. Pozitivna reakcija se kaže kot motna, bela oborina.

#### **Liebermann-Burchardov test za sterole**

Liebermann-Burchardov test dokazuje prisotnost sterolov s 3-hidroksi skupino in C-5 dvojno vezjo. K 2 ml raztopine sterolov v kloroformu dodamo 15 kapljic acetanhidrida, premešamo, ohladimo in dodamo 5 kapljic koncentrirane  $H_2SO_4$ . Acetanhidrid se kondenzira s 3-hidroksi skupino sterolov, če je prisotna C-5 dvojna vez. Hkrati pride do epimerizacije (premika dvojne vezi) in intramolekularne dehidracije. Pozitivna reakcija daje zelenomodro barvo.

**Tankoplastna kromatografija (TLC)** je porazdelitvena kromatografija v ožjem pomenu besede. Razvila se je zaradi potreb po uspešnejšem ločevanju lipidov, ker papirna kromatografija v ta namen ni zadostovala. Pri TLC uporabljamo za nosilce snovi, ki tvorijo ob nanosu na trdno podlago neakomerne tanke površine. Najpogosteje se uporabljajo

silikagel, celit,  $MgO_2$ ,  $Al_2O_3$  ali magnezijev silikat pa tudi organske substance, kot so celuloza, poliamid ali polieten. Prednost TLC pred papirno kromatografijo je predvsem v večji izbiri nosilcev, kar omogoči večjo ločljivost, lažjo detekcijo in izolacijo substanc iz kromatograma. Ker so delci pri TLC zelo majhni, je razmerje površine proti volumnu zelo veliko, to pa omogoča veliko delovno površino glede na količino nosilca (Sepčič in sod., 2002).

Za ločevanje lipidov se priporoča se uporaba silikagela G brez fluorescenčnega indikatorja. Za mobilno fazo ponavadi uporabljamo mešanico topil kloroform/metanol/ocetna kislina/acetona/voda (35/25/4/14/2, v/v). Po razvijanju ploščo naphamo z raztopino primulina in lipidne madeže identificiramo pod UV-svetilko. Tako lahko analiziramo tudi prosti holesterol (ki potuje s fronto mobilne faze) in holesterolne estre (Ota, 2003).

**Visokotlačna tekočinska kromatografija (HPLC)** se uporablja za analizo in ločevanje snovi, ter omogoča ločevanje snovi na osnovi adsorpcije, porazdelitve, ionske izmenjave in velikosti molekul na nosilcih in v kolonah, ki zdržijo velike delovne pritiske. HPLC se odlikuje z izredno veliko ločljivostjo in občutljivostjo. Ker je ničelni volumen vzorca med delci nosilca izredno majhen, prepreči velike razredčitve komponent vzorca, ki ga ločujemo. Kolone, ki se uporabljajo v HPLC tehniki, so navadno debele le od 0,4 do 0,6 cm in dolge do 20 cm. Prenesejo delovni pritisk od 5 do 20  $kg/cm^2$ . »Srce« vsakega HPLC sistema je črpalka, ki ustvarja delovni pritisk med 250 in 400 bari. Visoki tlaki omogočajo uporabo krajših kolon in predvsem takih stacionarnih faz, katerih delci imajo bistveno manjše dimenzije. Črpalka poganja mobilno fazo skozi kolono, eluirane frakcije pa analiziramo z ustreznim detektorjem (UV/VIS, fluorescenčni ali refrakcijski detektor, kar je odvisno od samih lastnosti molekul v vzorcu) (Sepčič in sod., 2002).

Pred ločitvijo sterolov z HPLC je pomembno, da sterolne frakcije omilimo (saponificiramo). Ločitev poteka na osnovi adsorpcije, pri čemer kot mobilno fazo uporabimo mešanico acetonitrila/metanola v razmerju 50/50. Za določanje sterolnih frakcij se uporabljata svetlobno razpršilni detektor in elektronski integrator (<http://www.cyberlipid.org/sterolt/ster0002.htm>).

**Plinska kromatografija** je tip porazdelitvene kromatografije. Tudi tu temelji ločitev snovi na porazdelitvi med tekočo stacionarno fazo, ki je vezana na trden nosilec in pa mobilno plinasto fazo, ki jo predstavlja nek inerten plin ali mešanica inertnih plinov. Izvedba plinske kromatografije je zapletena, omogoča pa ločitev in detekcijo zelo majhnih količin hlapnih snovi. Tekočo stacionarno fazo lahko adsorbiramo kar na notranje stene kolone ali pa jo uvajamo na trden nosilec (celit, teflonski prah, steklo v prahu). Stacionarno tekočo fazo navadno pripravimo tako, da trdno snov raztopimo v hlapnem topilu in jo uvajamo na trdno podlago. Kot topilo se najpogosteje uporablja eter, v katerem raztopimo polietilenglikol (PEG). Ko eter izhlapi, so vsi delci prekriti s PEG, ki je pri uporabljenih temperaturah v tekočem stanju in tako predstavlja tekočo stacionarno fazo. Vzorec, ki mora biti kemično obstojen ob spremembi agregatnega stanja, uplinimo in ga skupaj z inertnim plinom uvajamo v kolono. Le-to predstavlja sistem cevki, ki je lahko dolg od 1 – 20 m s premerom 0,5 cm. Druga možnost je kapilarni sistem, ki je dolg od 30 – 100 m. Za zelo natančno ločevanje se uporabljajo zelo fini kapilarni sistemi dolgi tudi do 2 km. V takem sistemu se snovi neprestano porazdeljujejo med stacionarno in plinasto fazo glede na njihove porazdelitvene koeficiente. Na koncu posamezne komponente določimo z detektorji (toplotna prevodna celica, ionizirajoči argonski detektor ali plamenska celica). Prednost plinske kromatografije je predvsem v izredni dolžini delovne površine, ki je nujna za dobro separacijo. Ker je mobilna faza plin, je tudi hitrost ločitve neprimerno večja (Sepčić in sod., 2002).

Kapilaren plinski kromatografski postopek je bil opisan za določevanje glavnih rastlinskih sterolov in holesterola v užitnih oljih in maščobah. Za ekstrakcijo neomiljenih snovi se uporablja C18 adsorbent, ki pa se ga lahko uporablja tudi za vzorčno čiščenje pred omiljenjem. Minimalna količina holesterola in ostalih sterolov je >20 mg/kg.

Lipidni vzorec omilimo z 0,5 N NaOH in metanolom, čemur sledi metilacija z 10% borovotrifluoridno metanolno raztopino (BF<sub>3</sub>/MeOH). Zmes ekstrahiramo z etrom, ki mu je dodan merilni standard (0,4% 5 $\alpha$ -holestan) in analiziramo s plinsko kromatografijo (<http://www.cyberlipid.org/sterol/ster0001.htm#6>).

### **Kapilarna elektroforeza (CE)**

Kapilarna elektroforeza omogoča ločevanje številnih analitov na osnovi njihove gibljivosti v električnem polju. V svoji najenostavnejši izvedbi kapilarna elektroforeza vsebuje nabit kapilarni sistem (s pufrom omočen silikagel, ki je potopljen v rezervoar s pufrom). Rezervoar je priključen na močen tok. Po nanosu majhne količine vzorca v kapilaro vključimo tok in vzpostavimo električno polje, ki povzroči pojav elektroosmotskega toka. Ionski analiti se bodo gibalni proti ustrezni nasprotno nabiti elektrodi in vzorec se ločuje na osnovi polarosti ter različnega odnosa med maso in nabojem (Bruggemann, 2002).

Tudi pri ločevanju s kapilarno elektroforezo je sterole treba saponificirati (omiliti). Lipidni ostanek raztopimo v puferski raztopini (100 mM natrijevega acetata in metanola / 100 mM očetne kisline in metanola; ti dve raztopini sta v razmerju 19/1). Elektroforezo izvedemo pri 23,5 V in 25°C s topljivo kremenasto kapilaro (50 µm ID x 47 cm), detekcija je pri 210 nm. Retencija (zadrževanje) holesterola traja okoli 15 minut, detekcijska meja pa je 5 µg/ml (<http://www.cyberlipid.org/sterol/ster0001.htm#6>).

### **Kapilarna elektrokromatografija (CEC)**

Kapilarna elektrokromatografija je nova in razburljiva hibridno ločitvena tehnika, ki izrablja združene prednosti obeh tehnik, tako kapilarne elektroforeze (visoka učinkovitost) kot tudi HPLC-ja (visoka selektivnost). Je tekočinska ločitvena tehnika v kateri je tok generiran na izhodišču elektroosmoze. Na površjih, ki vsebujejo nabite funkcionalne skupine, je površinski električni naboj nadomeščen z ioni iz raztopine, ki je v stiku s površjem. Ko je električni potencial nanesen vzporedno s površjem, ioni potujejo proti nasprotno nabiti elektrodi. Ti ioni nato ustvarijo strižne sile v tekočini in raztopina potuje navzgor po koloni. Prednost metode je v tem, da je hitrost pretoka skozi presek kolone velika (Knox in Grant, 1991).

Kapilarne elektrokromatografske ločitve rastlinskih sterolov in sorodnih estrov so bile izvedene pod različnimi pogoji. Stacionarne faze so bile ali oktadecilsilikagel (C18) ali triakontilsilikagel (C30), mobilne faze pa so bile sestavljene iz acetonitrila, tetrahidrofurana, tris (hidroksimetil) aminometanskega pufra v vodnem ali nevodnem

sistemu. C18 je bolj selektiven za večino sterolov z ustaljeno hidrofobno stransko verigo, medtem ko C30 ne kaže nobenega trenda

(<http://www.cyberlipid.org/sterol/ster0001.htm#6>).



### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Kemikalije

Preglednica 1: Uporabljene kemikalije.

Kemikalija	Proizvajalec
holesterol, $\geq 98\%$	Avanti Polar Lipids, ZDA
7-dehidroholesterol, $\geq 98\%$	Bio Chemika, Švica
lanosterol, $\geq 96\%$	Sigma – Aldrich, ZDA
ergosterol, $\geq 95\%$	Sigma – Aldrich, ZDA
stigmasterol, $\geq 95\%$	Sigma – Aldrich, ZDA
$\beta$ -sitosterol, 97%	Sigma – Aldrich, ZDA
5-holesten-3-on, ni podatkov o čistosti	Sigma – Aldrich, ZDA
holesteril acetat, $\geq 95\%$	Sigma – Aldrich, ZDA
holesteril sulfat, $\geq 98\%$	Sigma – Aldrich, ZDA
encimska raztopina R1A	Wako Chemicals, Nemčija
pufrska raztopina R1	Wako Chemicals, Nemčija
KOH, 33%	Merck, Nemčija
etanol, 96%	Merck, Nemčija
heksan	Merck, Nemčija
deionizirana voda	
<i>o</i> -ftalaldehid	Merck, Nemčija
ocetna kislina	Merck, Nemčija
žveplena kislina	Merck, Nemčija

##### 3.1.2 Laboratorijska oprema

Preglednica 2: Uporabljena laboratorijska oprema.

Laboratorijska oprema	Proizvajalec
tehtnica	Sartorius, Švedska
hladilnik, 4°C	Gorenje, Slovenija
zamrzovalnik, -80°C	Gorenje, Slovenija
magnetno mešalo	Tehtnica MM 540, Slovenija
vibracijski stresalnik	Vibromix 114 EV, Tehtnica, Slovenija
vodna kopel	B-480, Buchi, Švica
mikrotitrne plošče	Biacore AB, Švedska
čitalec mikrotitrnih plošč	MRX, Dynex Technologies, Nemčija

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Priprava standardnih raztopin testnih steroidov

Standardne raztopine testnih steroidov smo pripravili tako, da smo vsakega od izbranih steroidov posebej natančno zatehtali (10 mg). Teh 10 mg smo nato raztopili v 1 ml 96% etanola. Da se je raztopila celotna količina steroida, smo morali vzorec v zaprti stekleni posodici rahlo segreti in mešati na magnetnem mešalu. Tako smo dobili začetne koncentracije 10 mg/ml, iz katerih smo naredili naslednje razredčitve: 5 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml in 0,1 mg/ml. Tako pripravljene standardne raztopine steroidov smo potem uporabljali za naše izbrane določevalne teste.

### 3.2.2 Določanje koncentracije steroidov v standardnih raztopinah z metodo po Rudel-Moriss-u

V visoki epruveti smo zamešali 25  $\mu$ l posamezne standardne raztopine steroida, 75  $\mu$ l 33% raztopine KOH in 0,75 ml 96% etanola. Vsako epruveto smo zamašili s kovinskim zamaškom in dobro premešali na vibracijskem stresalniku. Delali smo dva vzporedna primerjalna vzorca. Že pri tej fazi smo začeli delati tudi slepo probo, ki je bila v posebni epruveti in je namesto 25  $\mu$ l standardne raztopine steroida vsebovala le 25  $\mu$ l 96% etanola, ki smo mu nato dodali 75  $\mu$ l 33% raztopine KOH in 0,75 ml 96% etanola.

Dobljene raztopine smo inkubirali 15 minut na vodni kopeli pri 60°C in nato ohladili na sobno temperaturo, da smo lahko nadaljevali z delom.

Dodali smo 2,5 ml heksana in ponovno dobro premešali na vibracijskem stresalniku. Sledil je dodatek 0,75 ml deionizirane vode in 1-minutno mešanje na vibracijskem stresalniku. Dobljeno raztopino smo nato nekaj časa pustili stati pri miru, da so se plasti lepo ločile med seboj.

Iz teh vzorcev smo nato prenesli po 2,5 ml zgornje (heksanske) plasti v čiste epruvete in evaporirali heksan s prepihanjem z dušikom.

V vsako epruveto smo nato dodali 0,5 ml *o*-ftalaldehida (predhodno smo ga raztopili (12,5 mg) v 25 ml očetne kisline, ker je moral biti pripravljen vsak dan sproti) in dobro premešali na vibracijskem stresalniku. Epruvete smo pred tem obvezno zamašili s

kovinskimi zamaški. To mešanje je moralo biti močno, da so se vsi steroidi, ki so ostali na stenah epruvete po sušenju, odlepili in raztopili.

Vzorec smo ponovno inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi.

Tako dobljeni raztopini smo nato dodali še 0,25 ml koncentrirane žveplene kisline in dobro premešali na vibracijskem stresalniku v zamašeni epruveti.

Po 200  $\mu$ l tako pripravljene raztopine smo prenesli v jamice mikrotitrne plošče in pomerili absorpcijo pri 550 nm točno 30 minut po dodatku žveplene kisline. Vsak vzorec smo pomerili dvakrat.

### **3.2.3 Določanje koncentracije steroidov z encimskim testom**

Po 10  $\mu$ l pripravljenih standardnih raztopin steroidov smo odpipetirali v jamice mikrotitrne plošče. Tudi tukaj smo delali po dva vzoredna primerjalna vzorca. Tem 10  $\mu$ l smo nato dodali 300  $\mu$ l prej pripravljene encimske raztopine. Le-to smo pripravili tako, da smo raztopili 30 mg reagenta R1A (barvnega reagenta, ki ga sestavljajo holesteroloksidaza, peroksidaza in 4-aminoantipirin) v 30 ml raztopine R1 (pufrske raztopine, ki je sestavljena iz fosfatnega pufra, fenola in površinsko aktivne snovi). Tako pripravljeno mikrotitrno ploščo smo inkubirali 30 minut pri 37°C in nato pomerili absorpcijo pri 550 nm.

### **3.2.4 Obdelava rezultatov**

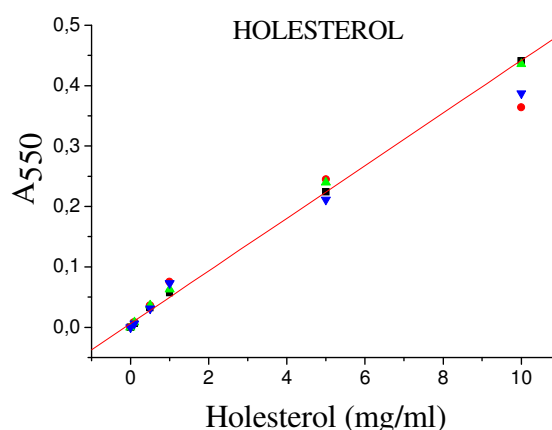
Iz odčitanih rezultatov smo nato za vsako koncentracijo in vsak steroid posebej izračunali aritmetično sredino in standardno napako, ter podatke predstavili v obliki grafov. Iz teh podatkov smo z uporabo linearne regresije naredili tudi umeritvene krivulje za vse uporabljene in analizirane steroide. Rezultate smo obdelali s programskim orodjem Origin 7.0 (OriginLab, ZDA).

## 4 REZULTATI

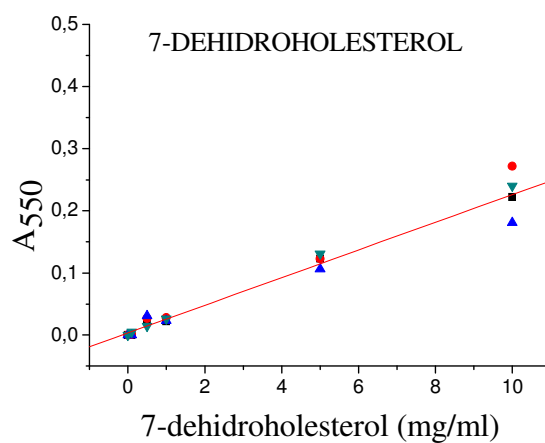
### 4.1 DOLOČANJE KONCENTRACIJE STEROIDOV V STANDARDNIH RAZTOPINAH Z METODO PO RUDEL-MORRIS-U

Rezultati določanja koncentracije steroidov z metodo po Rudel – Morisu so prikazani na slikah 17 – 25, medtem ko slika 26 prikazuje rezultate za vse steroide skupaj. Iz slike 26 je razvidno, da poleg holesterola dajejo s tem testom dobre rezultate še holesteril acetat, stigmasterol in ergosterol. Vrednosti absorpcij so v lepem naraščajočem koncentracijskem sosledju, krivulje pa so zelo podobne umeritveni krivulji za holesterol. Nekoliko nižje absorpcije kažejo lanosterol,  $\beta$ -sitosterol in 7-dehidroholesterol. Ta metoda pa ni primerna za holestenon in holesteril sulfat, ki sta zelo slabo absorbirala, ali pa sploh nista absorbirala. Njune umeritvene krivulje so popolnoma vodoravne.

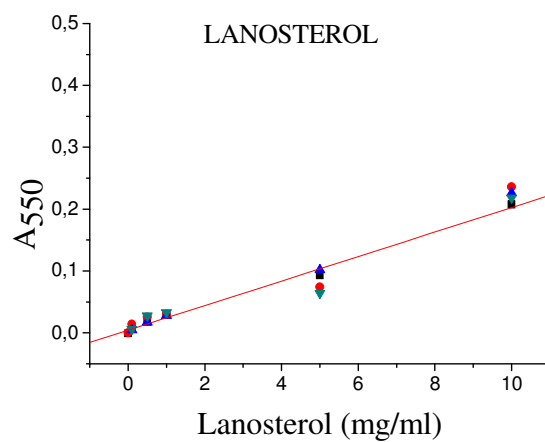
Pri vseh testiranih steroidih smo opazili zelo nizki raztros rezultatov, kar nakazuje na ponovljivost uporabljene metode in primernost pridobljenih umeritvenih premic za dokazovanje koncentracij steroidov v vzorcih. Največje sipanje vrednosti opazimo pri višjih koncentracijah (5 in 10 mg/ml).



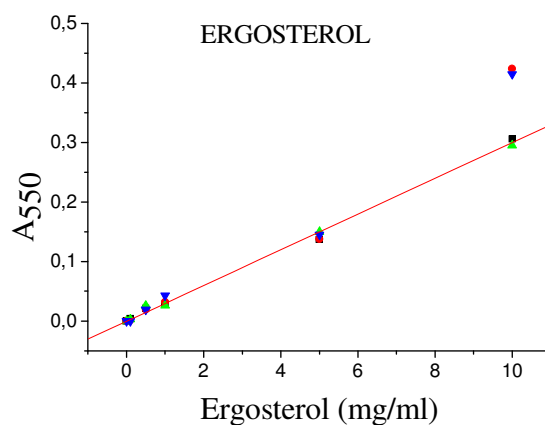
Slika 17: Določanje koncentracije holesterola po metodi, ki sta jo opisala Rudel in Morris (1973). Koncentracijo holesterola v standardnih raztopinah v etanolu (0, 0,1, 0,5, 1, 5 in 10 mg/ml) smo pomerili, kot je opisano v točki 3.2.2. Točke prikazujejo rezultate štirih neodvisnih meritev, premica pa linearno regresijo.



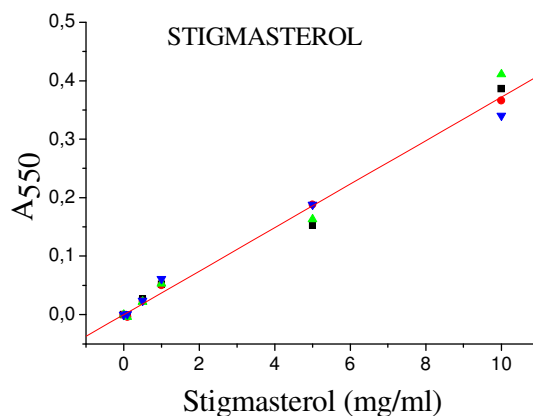
Slika 18: Določanje koncentracije 7-dehidroholesterola po metodi, ki sta jo opisala Rudel in Morris (1973). Koncentracijo 7-dehidroholesterola v standardnih raztopinah v etanolu (0, 0,1, 0,5, 1, 5 in 10 mg/ml) smo pomerili, kot je opisano v točki 3.2.2. Točke prikazujejo rezultate štirih neodvisnih meritev, premica pa linearno regresijo.



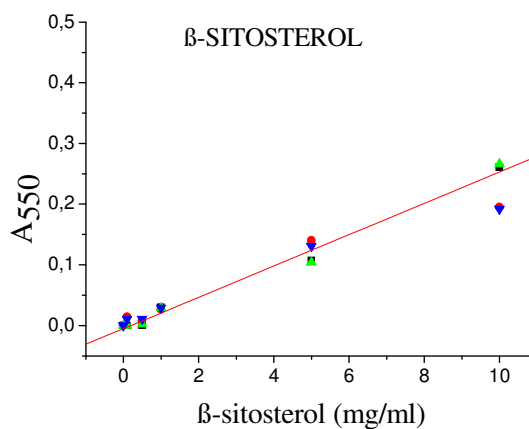
Slika 19: Določanje koncentracije lanosterola po metodi, ki sta jo opisala Rudel in Morris (1973). Koncentracijo lanosterola v standardnih raztopinah v etanolu (0, 0,1, 0,5, 1, 5 in 10 mg/ml) smo pomerili, kot je opisano v točki 3.2.2. Točke prikazujejo rezultate štirih neodvisnih meritev, premica pa linearno regresijo.



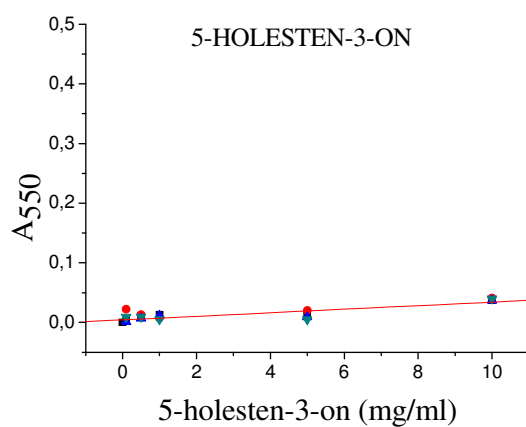
Slika 20: Določanje koncentracije ergosterola po metodi, ki sta jo opisala Rudel in Morris (1973). Koncentracijo ergosterola v standardnih raztopinah v etanolu (0, 0,1, 0,5, 1, 5 in 10 mg/ml) smo pomerili, kot je opisano v točki 3.2.2. Točke prikazujejo rezultate štirih neodvisnih meritev, premica pa linearno regresijo.



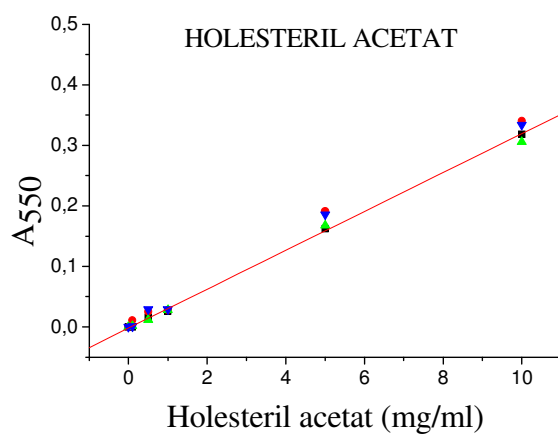
Slika 21: Določanje koncentracije stigmasterola po metodi, ki sta jo opisala Rudel in Morris (1973). Koncentracijo stigmasterola v standardnih raztopinah v etanolu (0, 0,1, 0,5, 1, 5 in 10 mg/ml) smo pomerili, kot je opisano v točki 3.2.2. Točke prikazujejo rezultate štirih neodvisnih meritev, premica pa linearno regresijo.



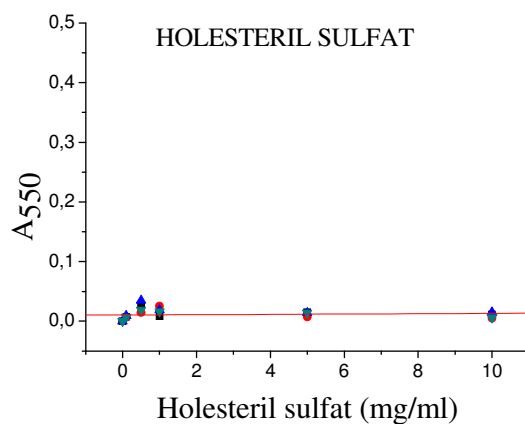
Slika 22: Določanje koncentracije  $\beta$ -sitosterola po metodi, ki sta jo opisala Rudel in Morris (1973). Koncentracijo  $\beta$ -sitosterola v standardnih raztopinah v etanolu (0, 0,1, 0,5, 1, 5 in 10 mg/ml) smo pomerili, kot je opisano v točki 3.2.2. Točke prikazujejo rezultate štirih neodvisnih meritev, premica pa linearno regresijo.



Slika 23: Določanje koncentracije 5-cholesten-3-ona po metodi, ki sta jo opisala Rudel in Morris (1973). Koncentracijo 5-cholesten-3-ona v standardnih raztopinah v etanolu (0, 0,1, 0,5, 1, 5 in 10 mg/ml) smo pomerili, kot je opisano v točki 3.2.2. Točke prikazujejo rezultate štirih neodvisnih meritev, premica pa linearno regresijo.

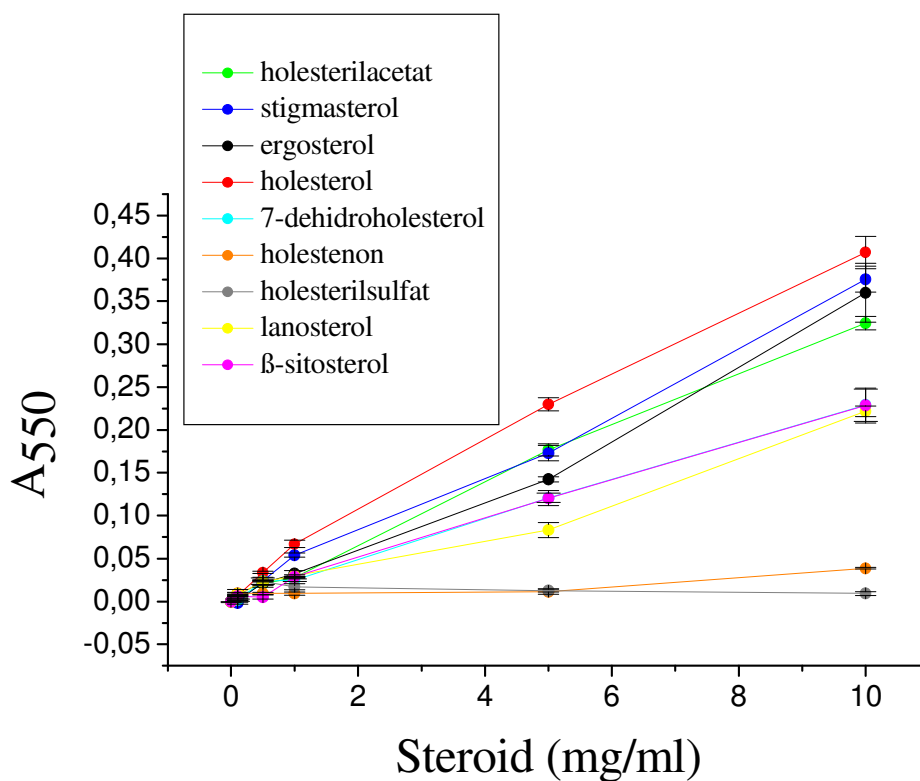


Slika 24: Določanje koncentracije holesteril acetata po metodi, ki sta jo opisala Rudel in Morris (1973). Koncentracijo holesteril acetata v standardnih raztopinah v etanolu (0, 0,1, 0,5, 1, 5 in 10 mg/ml) smo pomerili, kot je opisano v točki 3.2.2. Točke prikazujejo rezultate štirih neodvisnih meritev, premica pa linearno regresijo.



Slika 25: Določanje koncentracije holesteril sulfata po metodi, ki sta jo opisala Rudel in Morris (1973). Koncentracijo holesteril sulfata v standardnih raztopinah v etanolu (0, 0,1, 0,5, 1, 5 in 10 mg/ml) smo pomerili, kot je opisano v točki 3.2.2. Točke prikazujejo rezultate štirih neodvisnih meritev, premica pa linearno regresijo.





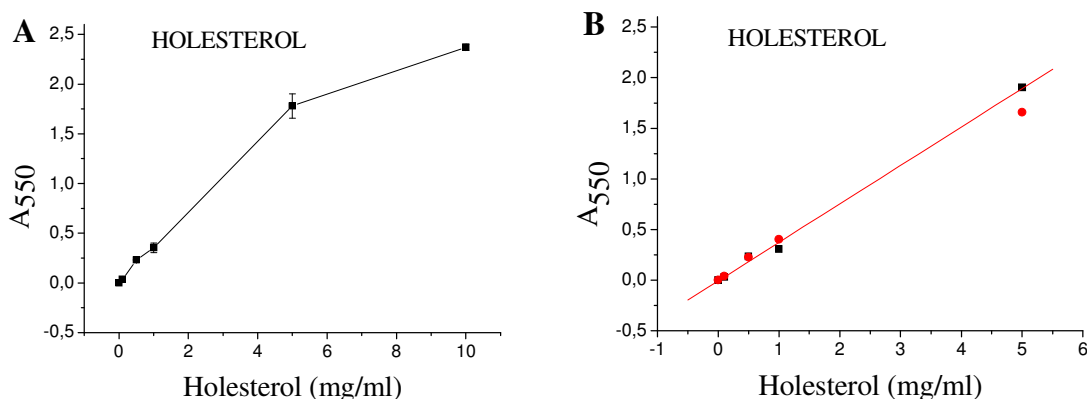
Slika 26: Določanje koncentracije steroidov po metodi, ki sta jo opisala Rudel in Morris (1973). Koncentracijo steroidov v standardnih raztopinah v etanolu (0, 0,1, 0,5, 1, 5 in 10 mg/ml) smo pomerili, kot je opisano v točki 3.2.2. Vsaka točka prikazuje povprečje štirih meritev in pripadajočo standardno napako.

#### 4.2 DOLOČANJE KONCENTRACIJE STEROIDOV V STANDARDNIH RAZTOPINAH Z ENCIMSKIM TESTOM

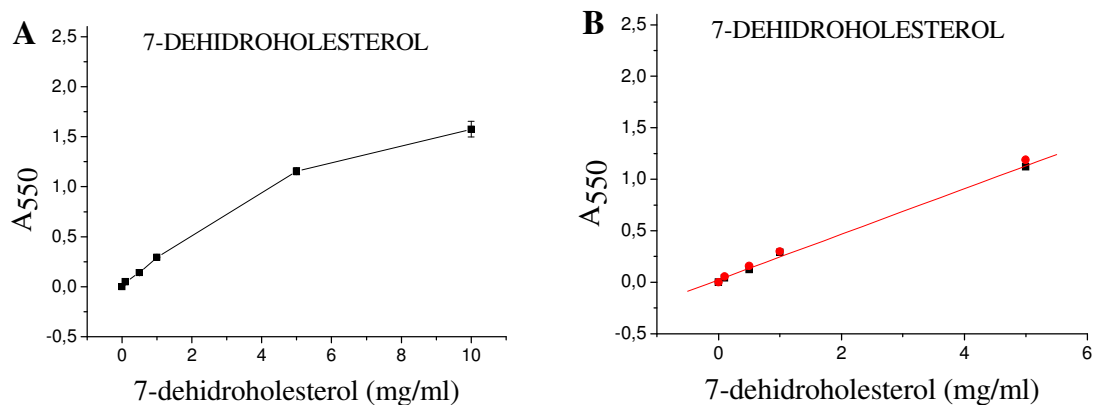
Rezultati določanja koncentracije steroidov z encimskim testom Wako so prikazani na slikah 27 – 35, medtem ko slika 36 prikazuje vse rezultate skupaj. Ker je pri nekaterih vzorcih absorpcija pri najvišji testirani koncentraciji (10 mg/ml) bila zelo visoka in bi lahko vplivala na napačno interpretacijo rezultatov zaradi nelinearnega odnosa med absorpcijo in koncentracijo (slike 27A, 28A, 30A, 31A, 32A), smo pri grafih, ki prikazujejo regresijske premice (slike 27B, 28B, 29B, 30B, 31B, 32B, 33B, 34B in 35B) upoštevali samo rezultate meritev v koncentracijskem rangu od 0 do 5 mg/ml.

Encimska metoda je, glede na navodila proizvajalca, najbolj primerna za določanje koncentracije holesterola, kar je razvidno tudi iz rezultatov. Nekoliko slabše rezultate (nižje absorpcije) dajejo  $\beta$ -sitosterol, 7-dehidrosterol, stigmasterol in ergosterol. Metoda pa ni primerna za določanje koncentracij lanosterola, holesteril acetata, holestenona in holesteril sulfata, katerih umeritvene krivulje so zelo blizu skupaj in so večinoma vodoravne.

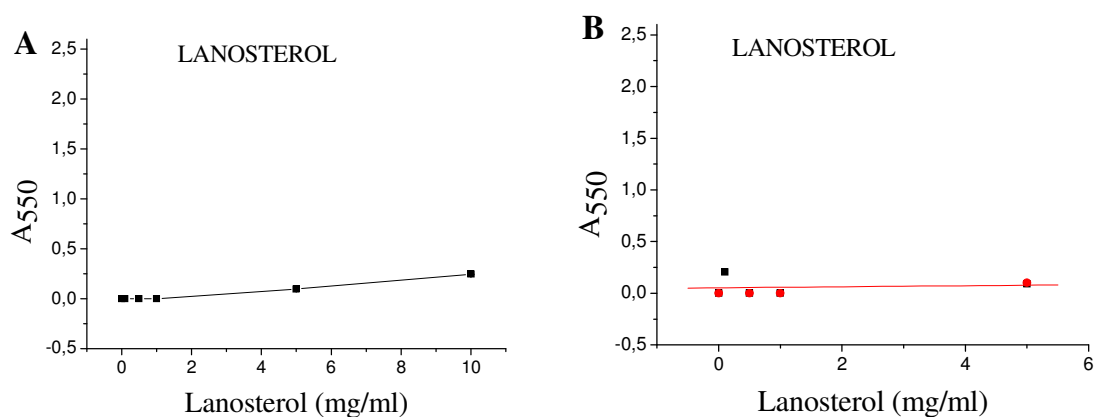
Največje sipanje rezultatov je ponovno prisotno pri najvišji koncentraciji (10 mg/ml) in pa tudi pri naslednji koncentraciji (5 mg/ml). Največje sipanje rezultatov pri vseh koncentracijah je opaziti pri holesteril sulfatu.



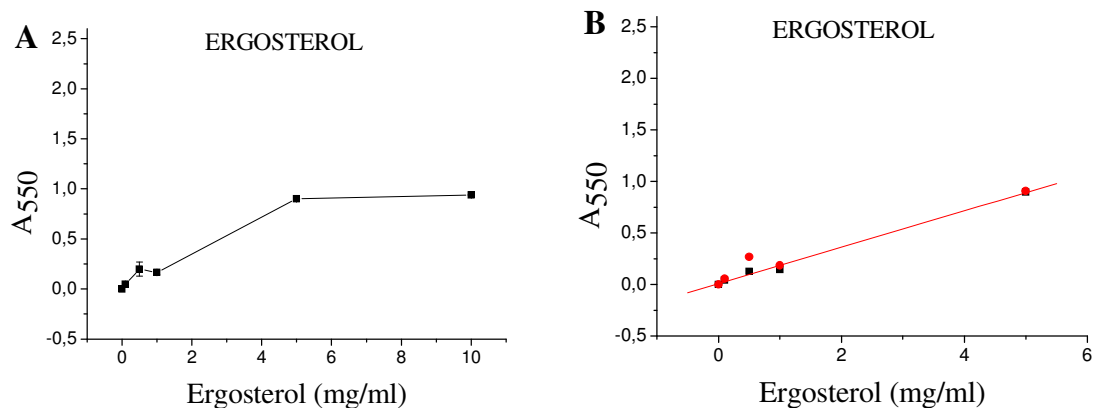
Slika 27: Določanje koncentracije holesterola z encimskim testom. Koncentracijo holesterola v standardnih raztopinah v etanolu (0, 0,1, 0,5, 1, 5 in 10 mg/ml) smo pomerili, kot je opisano v točki 3.2.3. Slika A prikazuje povprečje dveh meritev in ustrezno standardno napako, slika B pa rezultate dveh neodvisnih meritev in regresijsko premico v koncentracijskem območju 0 - 5 mg/ml.



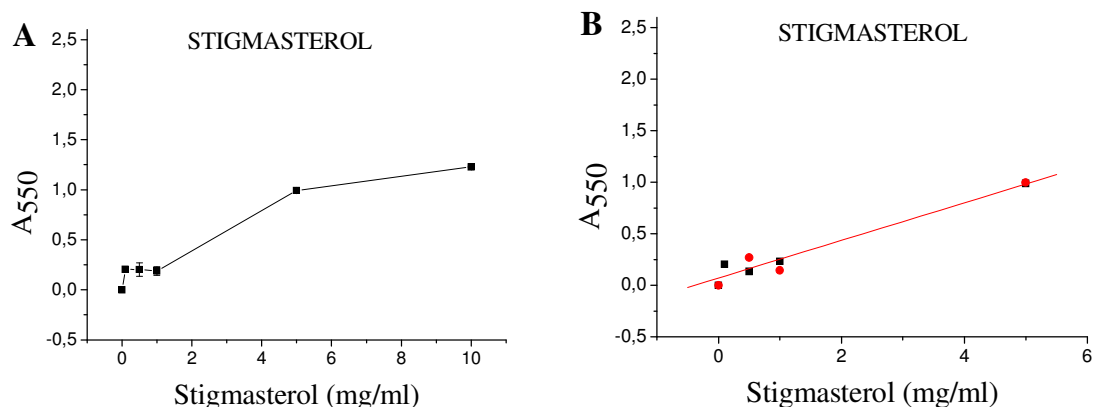
Slika 28: Določanje koncentracije 7-dehidroholesterola z encimskim testom. Koncentracijo 7-dehidroholesterola v standardnih raztopinah v etanolu (0, 0,1, 0,5, 1, 5 in 10 mg/ml) smo pomerili, kot je opisano v točki 3.2.3. Slika A prikazuje povprečje dveh meritev in ustrezno standardno napako, slika B pa rezultate dveh neodvisnih meritev in regresijsko premico v koncentracijskem območju 0 - 5 mg/ml.



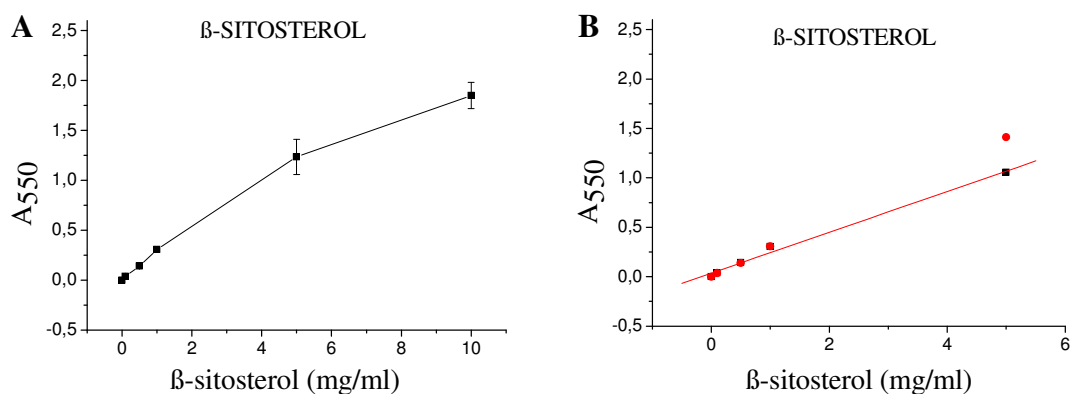
Slika 29: Določanje koncentracije lanosterola z encimskim testom. Koncentracijo lanosterola v standardnih raztopinah v etanolu (0, 0,1, 0,5, 1, 5 in 10 mg/ml) smo pomerili, kot je opisano v točki 3.2.3. Slika A prikazuje povprečje dveh meritev in ustrezno standardno napako, slika B pa rezultate dveh neodvisnih meritev in regresijsko premico v koncentracijskem območju 0 - 5 mg/ml.



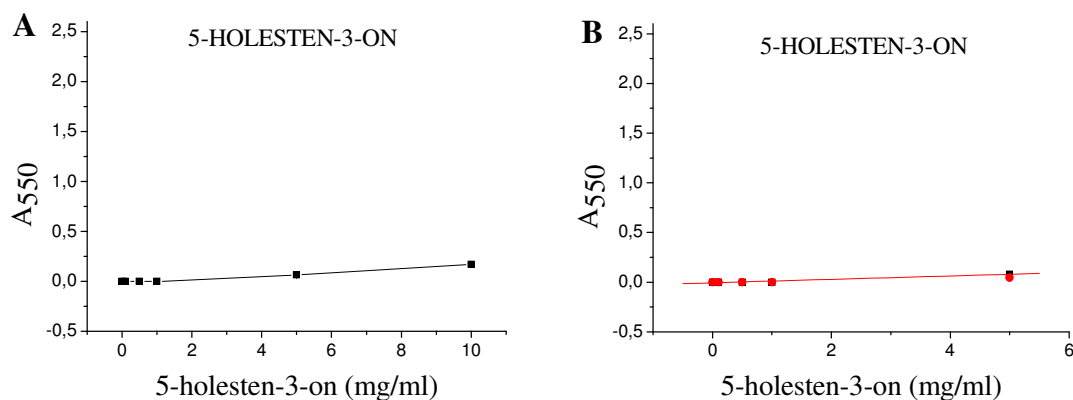
Slika 30: Določanje koncentracije ergosterola z encimskim testom. Koncentracijo ergosterola v standardnih raztopinah v etanolu (0, 0,1, 0,5, 1, 5 in 10 mg/ml) smo pomerili, kot je opisano v točki 3.2.3. Slika A prikazuje povprečje dveh meritev in ustrezno standardno napako, slika B pa rezultate dveh neodvisnih meritev in regresijsko premico v koncentracijskem območju 0 - 5 mg/ml.



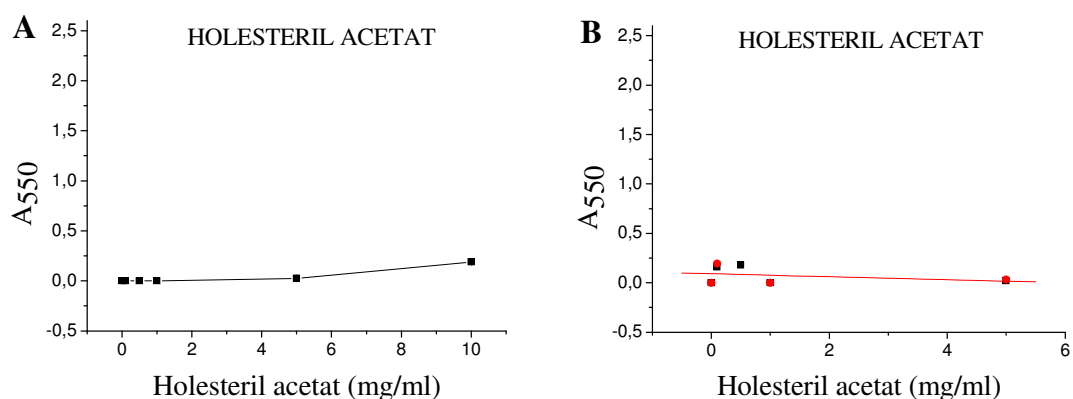
Slika 31: Določanje koncentracije stigmaterola z encimskim testom. Koncentracijo stigmaterola v standardnih raztopinah v etanolu (0, 0,1, 0,5, 1, 5 in 10 mg/ml) smo pomerili, kot je opisano v točki 3.2.3. Slika A prikazuje povprečje dveh meritev in ustrezno standardno napako, slika B pa rezultate dveh neodvisnih meritev in regresijsko premico v koncentracijskem območju 0 - 5 mg/ml.



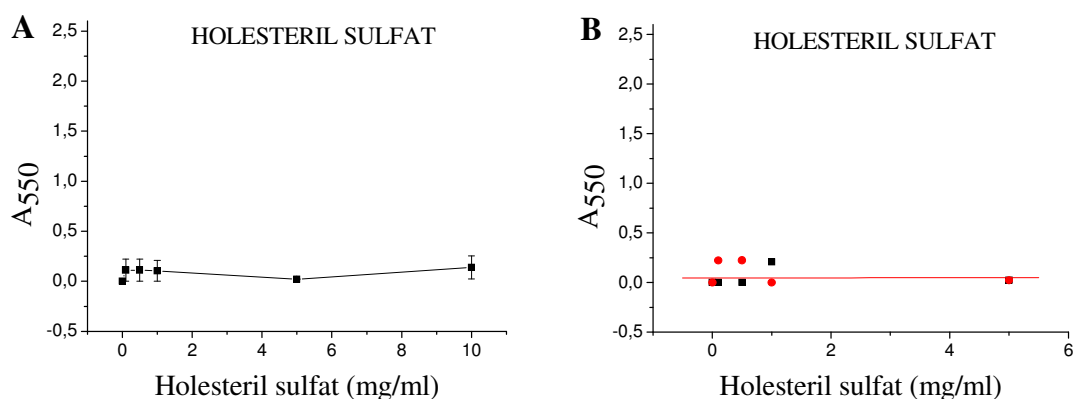
Slika 32: Določanje koncentracije  $\beta$ -sitosterola z encimskim testom. Koncentracijo  $\beta$ -sitosterola v standardnih raztopinah v etanolu (0, 0,1, 0,5, 1, 5 in 10 mg/ml) smo pomerili, kot je opisano v točki 3.2.3. Slika A prikazuje povprečje dveh meritev in ustrezno standardno napako, slika B pa rezultate dveh neodvisnih meritev in regresijsko premico v koncentracijskem območju 0 - 5 mg/ml.



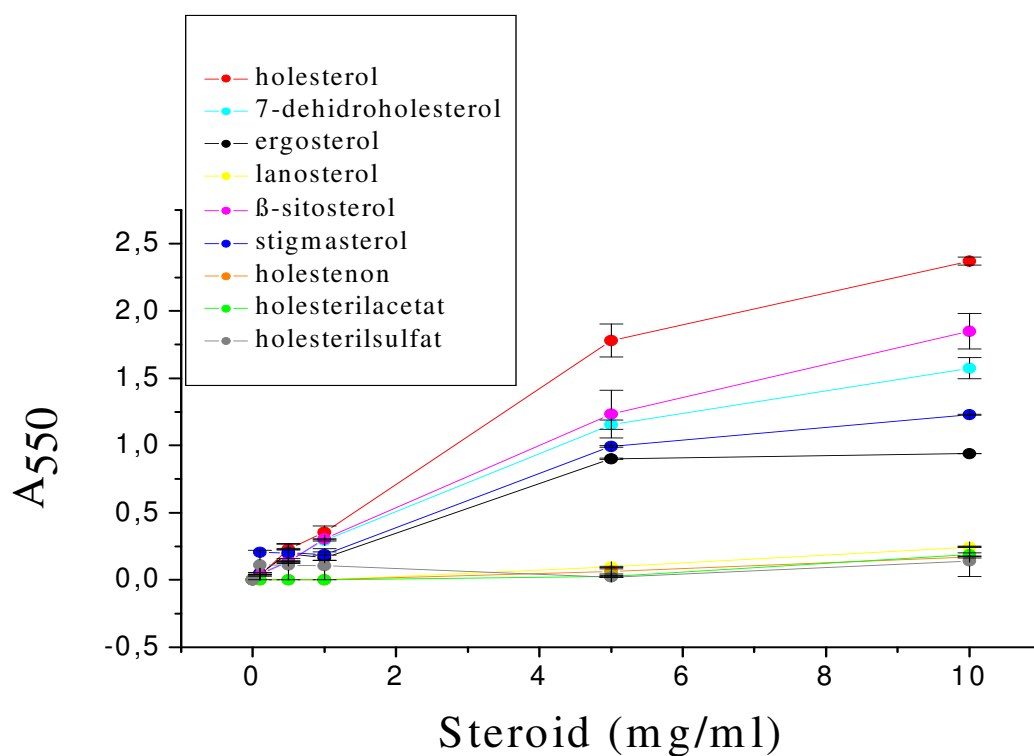
Slika 33: Določanje koncentracije 5-cholesten-3-ona z encimskim testom. Koncentracijo 5-cholesten-3-ona v standardnih raztopinah v etanolu (0, 0,1, 0,5, 1, 5 in 10 mg/ml) smo pomerili, kot je opisano v točki 3.2.3. Slika A prikazuje povprečje dveh meritev in ustrezno standardno napako, slika B pa rezultate dveh neodvisnih meritev in regresijsko premico v koncentracijskem območju 0 - 5 mg/ml.



Slika 34: Določanje koncentracije holesteril acetata z encimskim testom. Koncentracijo holesteril acetata v standardnih raztopinah v etanolu (0, 0,1, 0,5, 1, 5 in 10 mg/ml) smo pomerili, kot je opisano v točki 3.2.3. Slika A prikazuje povprečje dveh meritev in ustrezno standardno napako, slika B pa rezultate dveh neodvisnih meritev in regresijsko premico v koncentracijskem območju 0 - 5 mg/ml.



Slika 35: Določanje koncentracije holesteril sulfata z encimskim testom. Koncentracijo holesteril sulfata v standardnih raztopinah v etanolu (0, 0,1, 0,5, 1, 5 in 10 mg/ml) smo pomerili, kot je opisano v točki 3.2.3. Slika A prikazuje povprečje dveh meritev in ustrezno standardno napako, slika B pa rezultate dveh neodvisnih meritev in regresijsko premico v koncentracijskem območju 0 - 5 mg/ml.



Slika 36: Določanje koncentracije steroidov z encimskim testom. Koncentracijo steroidov v standardnih raztopinah v etanolu (0, 0,1, 0,5, 1, 5 in 10 mg/ml) smo pomerili, kot je opisano v točki 3.2.3. Vsaka točka prikazuje povprečje dveh meritev in ustrezno standardno napako.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Različni steroidi imajo glede na svojo strukturo različno sposobnost za tvorbo urejenih membranskih domen. Ta je odvisna od zgradbe njihove alifatske verige, modifikacij –OH skupine na mestu C3, odsotnosti dvojne vezi oziroma prisotnosti dodatnih dvojnih vezi v izooktilni verigi, prisotnosti dodatnih alkilnih skupin, ter od prisotnosti ali odsotnosti izooktilne verige (Wang in sod., 2004). Majhne spremembe v osnovni strukturi steroida močno spremenijo ne samo zgoraj napisane fizikalne lastnosti, ampak tudi spektralne lastnosti steroidov pri kolorimetričnih testih za določanje njihove koncentracije.

V tej nalogi smo z uporabo izbranih kolorimetričnih metod za določanje koncentracije steroidov preizkušali katera izmed izbranih dveh metod je bolj uspešna, bolj ponovljiva in ustrežnejša za večino izbranih steroidov. Za določevanje koncentracije holesterola se danes najbolj uporablja encimski kolorimetrični test, ki pa ni najbolj uporaben tudi za druge naravne sterole (čeprav je bistvo testa reakcija z –OH skupino, ki jo imajo vsi steroli). Zaradi te pomanjkljivosti encimskega kolorimetričnega testa smo se odločili, da preizkusimo tudi alternativno metodo, ki sta jo razvila Rudel in Morris. Metoda naj bi bila stabilna in reproducibilna, žal pa zahteva uporabo precej agresivnih kemikalij. Metodi smo preizkusili na izbranih steroidih, tako naravnega izvora kot tudi na sintetičnih derivatih holesterola. Čeprav uporabljeni testi za določene sterole niso bili primerni (občutljivost ni tako velika kot za holesterol), smo lahko pripravili umeritvene krivulje, s pomočjo katerih bomo v prihodnje lahko določali koncentracije sterolov v naših liposomih.

Pričakovali smo, da bomo z uporabo metode za določanje holesterola, ki sta jo opisala Rudel in Morris, uspeli določiti tudi koncentracije drugih naravnih sterolov in sintetičnih steroidnih derivatov. Pričakovali smo tudi, da bo ta metoda bolj natančna in bolj uporabna za širok spekter steroidov od standardnega kolorimetričnega encimskega testa.

Rezultati pridobljeni s klasično metodo po Rudel in Morrisu iz leta 1973 so nam pokazali, da je ta metoda zelo primerna za določanje koncentracije naslednjih steroidov: holesterola,



holesteril acetata, stigmasterola in ergosterola. Nekoliko nižje absorpcije so dali lanosterol,  $\beta$ -sitosterol in 7-dehidroholesterol. Izmed teh treh izstopa  $\beta$ -sitosterol, ker ima najvišje absorpcije in najmanjši raztros rezultatov. Od vseh navedenih steroidov pa je seveda ta metoda najbolj primerna za holesterol in šele nato za ostale. Metoda sploh ni primerna za holesteril sulfat (Slika 25) in 5-holesten-3-on (Slika 23), ker so njune umeritvene krivulje popolnoma vodoravne in ni opaziti nobenega naraščanja absorpcije sorazmerno z višanjem koncentracije steroida. Umeritvene krivulje, ki smo jih narisali iz rezultatov pridobljenih s klasično metodo, so primerne za dokazovanje koncentracij steroidov v vzorcih.

Glede ponovljivosti te metode je pomembno analizirati tudi raztros rezultatov za vsak steroid posamezno in posamezno za vsako koncentracijo. Raztros rezultatov je nizek, kar kaže, da je metoda ponovljiva. Večje sipanje rezultatov je opazno pri višjih koncentracijah in sicer pri 5 in 10 mg/ml.

Klasična metoda je torej primerna za določanje koncentracije različnih steroidov. Pri klasični metodi se pojavlja tudi nižja standardna napaka za vsako koncentracijo in steroid posebej.

Za razliko od klasične metode pa so rezultati dobljeni z encimskim testom nekoliko slabši. Encimski test je najbolj uporaben ravno in izključno za holesterol. Slabša absorbcija je opazna še pri  $\beta$ -sitosterolu, 7-dehidroholesterolu, stigmasterolu in ergosterolu. Najbolj se na encimski test poleg holesterola odziva  $\beta$ -sitosterol, saj je njegova krivulja najbolj podobna krivulji holesterola. Vse krivulje lepo naraščajo premosorazmerno s koncentracijjo, »zalomi« pa se pri koncentracijah višjih od 5 mg/ml, saj absorpcija nato ne narašča, ampak se ustali pri enaki vrednosti ali celo upade, ker je verjetno dosežen limit zmogljivosti spektrofotometra. Kljub temu, da so absorpcije steroidov, ki pozitivno reagirajo z encimskim testom, višje kot pri klasičnem testu, je ta test bolj selektiven. Encimski test, namreč, ni uporaben za lanosterol (Slika 29), holesteril acetat (Slika 34), 5-holesten-3-on (Slika 33) in holesteril sulfat (Slika 35). Njihove umeritvene krivulje so popolnoma vodoravne in iz njih ni videti nobene sorazmernosti v naraščanju absorbcije sorazmerno s koncentracijo, največkrat ta ostaja ista ali celo upada.

Z raztrosom rezultatov lahko napovemo kakšna je ponovljivost metode. Pri encimskem testu so opazna večja nihanja pri koncentracijah 5 in 10 mg/ml, nižje koncentracije pa imajo nižji raztros rezultatov. Zaradi velikega sipanja pri višjih koncentracijah lahko

rečemo, da je ponovljivost slabša za vse ostale steroide razen holesterola. Ravno zaradi takšnega sipanja bi bilo potrebno narediti tudi korekcijo pri izdelavi umeritvenih krivulj. Od vseh dobljenih rezultatov najbolj izstopa holesteril sulfat, pri katerem je opazno precejšnje sipanje rezultatov za vse izbrane koncentracije.

Encimski test je v primerjavi s klasično metodo uporaben za manjše število steroidov, saj se potrди dejstvo, da je primeren in občutljiv predvsem za holesterol. Test ima tudi večji raztros rezultatov in zaradi tega večjo standardno napako.

Kot vsaka metoda, tako imata tudi klasična metoda in encimski test svoje prednosti in slabosti. Klasična metoda je sicer dolgotrajnejši postopek, ki zahteva delo z agresivnimi kemikalijami, vendar ima širšo uporabo za večje število steroidov, je stabilna in reproducibilna. Je tudi cenejša, saj je encimski test precej drag in specifičen predvsem za holesterol. Encimski test je po drugi strani veliko hitrejši, saj lahko naenkrat pregledamo bistveno večje število vzorcev kot s klasično metodo.

Naši rezultati nakazujejo, da je nespremenjena  $-OH$  skupina na mestu C3 pomemben dejavnik za pozitivno reakcijo pri obeh testih, saj imajo steroli z modificirano  $-OH$  skupino (ketonska skupina in sulfatna skupina) slabše odzive na absorbcijo svetlobe in zaradi tega so njihove umeritvene krivulje bolj ali manj vodorovane. Če steroid vsebuje nespremenjeno  $-OH$  skupino reagira in daje rdeče obarvanje. Pri obeh metodah pa se pokažejo tudi izjeme. Tako se pri klasični metodi pokaže, da lahko reagira tudi modificirana  $-OH$  skupina (estrška skupina v holesteril acetatu). Tu se nam je potrdilo dejstvo, ki sta ga opisala tudi Rudel in Morris v svojem članku iz leta 1973. S to metodo sta dokazala, da je uporabna za prosti holesterol in njegove estre – na primer za holesteril acetat (Rudel in Morris, 1973). Ostala dva steroida, tako 5-holesten-3-on in holesteril sulfat ne dajeta pozitivne reakcije s klasično metodo. Pri encimskem testu pa je zanimivo to, da ne daje pozitivne reakcije lanosterol, ki nima modificirane  $-OH$  skupine. Mogoče lanosterol ne daje pozitivne reakcije z encimskim testom zato, ker je njegova dvojna vez obroču premaknjena na drugo pozicijo (med C8 in C9 mestom) kot pri holesterolu (med C5 in C6 mestom), prisotno pa imamo še eno dvojno vez v izooktilni verigi in na obroče imamo vezane še tri dodatne  $-CH_3$  skupine. Če je dvojna vez v sterolnem obroču

postavljena tako kot pri holesterolu (med C5 in C6 mestom), bo steroid absorbiral ne glede na to, koliko dodatkov ima na obročkih in na izooktilni verigi.

Na opažene razlike v absorpcijah v naših testih bi lahko vplivala tudi čistost izbranih steroidov. Ocenjujemo, da je v našem primeru ta vpliv minimalen, saj so vsi bili izjemno čisti. Najmanjša čistost je bila prisotna pri ergosterolu, stigmasterolu in holesteril acetatu in sicer  $\geq 95\%$ . Koncentracijo ergosterola in stigmasterola lahko določimo z obema metodama, koncentracijo holesteril acetata pa samo s klasično metodo, saj vsebuje spremenjeno –OH skupino in tako ne reagira z reagenti encimskega testa. Podatka o čistosti za 5-holesten-3-on nismo našli, vendar so sintetično pridobljeni derivati načeloma zelo čisti.

Naša pričakovanja in hipoteze so se uresničile, saj smo dokazali, da je klasična metoda, ki sta jo opisala Rudel in Morris leta 1973 uporabna za večji spekter steroidov. Da se jo uporabiti za 7 od 9 izbranih steroidov, medtem ko je encimski test uporaben le za 5 od 9 izbranih steroidov izmed katerih najbolj izstopa holesterol. Potrdili pa smo tudi drugo hipotezo, da je klasična metoda po Rudel in Morrisu bolj natančna in ponovljiva, saj imajo rezultati dobljeni s to metodo nizek raztros rezultatov, medtem ko je pri encimskem testu opazen višji raztros rezultatov pri višjih koncentracijah, kar kaže na slabšo ponovljivost in natančnost.

## 5.2 SKLEPI

- ❖ Nespremenjena –OH skupina na C3 mestu je ključnega pomena za pozitivno reakcijo z obema izbranimi metodama, tako s klasično metodo po Rudel-Morrisu kot tudi z encimskim testom.
- ❖ Pri klasični metodi lahko daje pozitivno reakcijo tudi spremenjena –OH skupina na C3 mestu in sicer spremenjena v estrsko skupino, kakršno imamo pri holesteril acetatu. Ostale spremembe –OH skupine na C3 mestu, kot je ketonska ali sulfatna skupina, ne dajejo pozitivne reakcije z nobenim od izbranih testov.

- ❖ Pozitivne reakcije pri encimskem testu ne ovirajo različni dodatki na obročih ali v izooktilni verigi, dokler je –OH skupina nespremenjena in prisotna na C3 mestu, poleg nje pa je prisotna tudi dvojna vez med C5 in C6 mestoma.
  
- ❖ Negativno reakcijo pri encimskem testu lahko dobimo tudi takrat, ko je –OH skupina na C3 mestu nespremenjena, a imamo spremenjeno pozicijo dvojne vezi v obroču iz C5 in C6 mesta na C8 in C9 mesto (lanosterol).
  
- ❖ Za uspešnost dokazovanja koncentracije steroida pri encimskem testu je torej pomembna tako pozicija dvojne vezi v obroču (med C5 in C6 mestoma), kot tudi nespremenjena –OH skupina na C3 mestu.

## 6 POVZETEK

Za uravnanje fluidnosti in trdnosti membran so steroli zelo pomembni. Imajo jih vsi evkarionti. Živalska celica vsebuje predvsem holesterol, rastlinska fitosterole, glivna pa ergosterol. Vsi steroli imajo steroidni skelet z  $-OH$  skupino vezano na C3-mestu, razlikujejo pa se po številu dvojnih vezi ter po razvejanosti in nasičenosti alkilne verige, vezane na C17-mesto steroidnega skeleta. Pri pripravi liposomov je koristno določiti, koliko sterola se nahaja v membrani, saj se v membrano ponavadi ne vključi celotna količina, ki jo zamešamo. Pri tem se uporablja encimski kolorimetrični test za holesterol, ki pa ni najbolj uporaben tudi za druge naravne sterole (čeprav je bistvo testa reakcija z  $-OH$  skupino, ki jo imajo vsi steroli). Posledično se nikoli natančno ne ve, če je koncentracija sterola, ki se vključi v membrano, prava. Glede na te pomanjkljivosti encimskega kolorimetričnega testa smo za določanje koncentracij izbranih steroidov preizkusili alternativno metodo, ki sta jo leta 1973 razvila Rudel in Morris. Metoda je zelo stabilna in reproducibilna, žal pa zahteva uporabo precej agresivnih kemikalij (*o*-ftalaldehid, koncentrirana žveplova kislina). S klasično metodo od izbranih steroidov ne moremo določiti koncentracije 5-holesten-3-ona in holesteril sulfata, določimo pa lahko koncentracije naslednjim steroidom: holesterolu, holesteril acetatu, stigmasterolu, ergosterolu, lanosterolu,  $\beta$ -sitosterolu in 7-dehidroholesterolu. Z encimskim testom ne moremo določiti koncentracije lanosterola, holesteril acetata, 5-holesten-3-ona in holesteril sulfata, določimo pa lahko koncentracije naslednjih steroidov: holesterola,  $\beta$ -sitosterola, 7-dehidroholesterola, stigmasterola in ergosterola. Za pozitivno reakcijo s klasično metodo je potrebno da steroid vsebuje nespremenjeno  $-OH$  skupino, kar pa ne velja za vse spremembe te skupine, saj pozitivno reakcijo daje tudi esterska skupina. Za encimski test pa je nujno pomembno, da je prisotna nespremenjena  $-OH$  skupina in dvojna vez med C5 in C6-mestom. Dokazali smo, da je klasična metoda, ki sta jo opisala Rudel in Morris leta 1973 uporabna za večji spekter steroidov, da je bolj natančna in ponovljiva, saj imajo rezultati dobljeni s to metodo nizek raztros rezultatov, medtem ko je encimski test ni primeren za večji spekter steroidov, opazen pa je tudi višji raztros rezultatov za višje koncentracije, kar kaže na slabšo ponovljivost in natančnost.

## 7 UČNA ENOTA

Kot bodoča profesorica kemije in biologije sem v okviru diplomskega dela pripravila tudi učni enoti iz kemije in iz biologije za osnovne šole. Obe učni enoti sta vzeti iz učnih načrtov za biologijo in za kemijo.

### 7.1 UČNA ENOTA ZA BIOLOGIJO

<b>RAZRED:</b> 9 razred osnovne šole
<b>PREDMET:</b> biologija
<b>UČNA TEMA:</b> Celice – tkiva – organi
<b>UČNA ENOTA:</b> Notranja zgradba celice
<b>UČNA METODA:</b> razlaga
<b>UČNA OBLIKA:</b> frontalna
<b>PRIPOMOČKI:</b> delovni zvezek, delovni list, prosojnice s slikami, maketa celice in celične membrane, svetlobni mikroskop, računalnik
<b>OPERATIVNI CILJI:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Spoznajo mikroskopsko zgradbo celice.</li><li>• Znajo povezati zgradbo celice z njeno funkcijo.</li><li>• Znajo skicirati celico.</li><li>• Razlikujejo rastlinsko celico od živalske.</li></ul>
<b>VSEBINSKA PRIPRAVA:</b> <p>Ker je celica prva snov v šolskem letu jo je potrebno dobro osvojiti in poznati za naprej, ker spoznavamo organske sisteme pri človeku. Na začetku ure bi lahko ponovili kaj je celica in kakšna je njena vloga. S pomočjo histološkega preparata prereza celice, si ogledamo, kako izgleda celica od znotraj. Če je le možno to projeciramo preko grafoskopa ali power point predstavitve, da vsi učenci vidijo. Učitelj zgradbo celice nariše na tablo in počaka, da prerišejo vsi učenci in nato razlaga naprej notranjo zgradbo celice.</p> <p>S svetlobnim mikroskopom smo opazili <b>jedro</b>, <b>celično membrano</b> in <b>citoplazmo</b>. V rastlinskih celicah tudi <b>kloroplaste</b>. Te sestavne dele celice imenujemo s skupnim imenom</p>

**celični organeli**, kar bi po naše pomenilo organčki v celicah. Z elektronskim mikroskopom postanejo vidni še številni drugi celični organeli, ki so še manjši. Vsak celični organel ima določeno kemijsko zgradbo in v njem potekajo procesi tako, da lahko celica deluje.

**Celična membrana** je izbirno prepustni ovoj, ki obdaja citoplazmo in celične organele. S tem ločuje notranjost celice od okolja. Na njeni površini lahko z elektronskim mikroskopom opazimo majhne vdolbinice, ki omogočajo prehod snovi v celico in iz nje. Prek teh vdolbinic celica nenehno uravnava količino vode in soli, izloča nerabne snovi in sprejema iz okolja tiste, ki jih potrebuje za normalno delovanje (Svečko, 2006).

Celična membrana je zunanji del celice. Skoznjo prehajajo snovi v celico in iz nje. Sestoji iz lipidnega dvosloja ter različnih beljakovinskih molekul. Te so razporejene mozaično in neprestano spreminjajo svojo lego in razporeditev, torej nekako »plavajo« v lipidnem dvosloju. Ponazoritveni prikaz (model) membrane, s katerim lahko razložimo njene lastnosti, imenujemo **model tekočega mozaika** (Stušek in sod., 2003).

Vse membrane v celici imajo enako osnovno zgradbo iz lipidov in beljakovin, ki jo opisuje model tekočega mozaika. Pa poglejmo, kaj nam model membrane pove. Membrana je sestavljena iz dvojne plasti lipidov. Imajo polarno glavo in dva nepolarna repa (shemo narišemo na tablo). Polarna glava je obrnjena proti vodi, na zunanosti membranske zgradbe. Nepolarna repa pa sta pred vodo skrita v notranjost membranske zgradbe. Taka zgradba membrane je zelo stabilna in tudi zelo elastična. Izraz tekoči v modelu zgradbe membrane nakazuje, da je lipidni dvosloj oljnat, kar je posledica rahlo zloženih nepolarnih repov. Izraz mozaik pomeni, da so v membrani poleg lipidov tudi beljakovine. Te se zaradi tekočinskosti membrane lahko v njej gibljejo. Sestavni del membran je še ena skupina lipidov – **steroli**, med katerimi je v membranah živalskih celic najpogostejši **holesterol**, ki daje membrani nekoliko večjo trdnost. Holesterol je nujen za pravilno delovanje celičnih membran, vendar lahko povišana količina te snovi v krvi povzroča tudi mašenje žil in posledično srčno ali možgansko kap. Zato je hrana, ki vsebuje manj holesterola, boljša za naše dolgoročno zdravje. Med sterole uvrščamo tudi številne spolne hormone, ki imajo pomembno vlogo v našem življenju, saj so pomembni tudi za naše spolno vedenje. Mednje uvrščamo tudi snovi, ki jih prenekateri športniki nedovoljeno izkoriščajo za doseganje boljših rezultatov – doping, ki pa ima pogosto usodne posledice za njihovo zdravje (Dermastia in Turk, 2005).

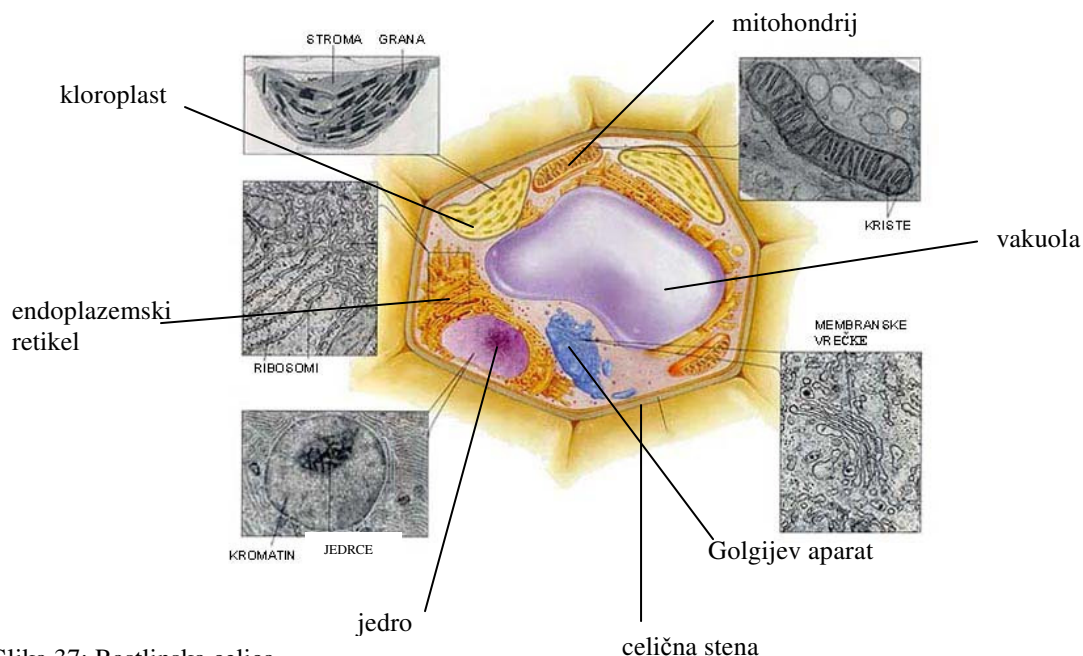
**Citoplazma** zapolnjuje prostor med jedrom in celično membrano. Je vodna raztopina, ki vsebuje 60 do 80% vode. V njej potekajo vsi življenjski procesi, ki omogočajo normalno delovanje celice. **Celično jedro** nadzoruje delovanje vseh celičnih organelov. V njem so nitaste strukture, ki jih imenujemo **kromosomi**. Vsak kromosom gradi molekula DNK, na kateri so drug za drugim nanizani geni. V njih so zapisane dedne informacije.

**Mitohondriji** so majhne, fižolasto oblikovane tvorbe. V njih se iz organskih snovi sprošča energija, potrebna za biokemijske reakcije, ki potekajo v celici in omogočajo njeno delovanje in obstoj. Lahko jih imenujemo tudi energijske celične centrale. Ribosomi so celični organeli, ki omogočajo nastajanje beljakovin, potrebnih za rast in delovanje celice. Navodila za izgradnjo beljakovin so zapisana v kromosomih (Svečko, 2006).

Obravnavana učna enota je iz obveznega dela učnega načrta. Ta učna enota se dobro prekriva z izbrano učno enoto iz kemije, ki je opisana spodaj.

### 7.1.1 Delovni list

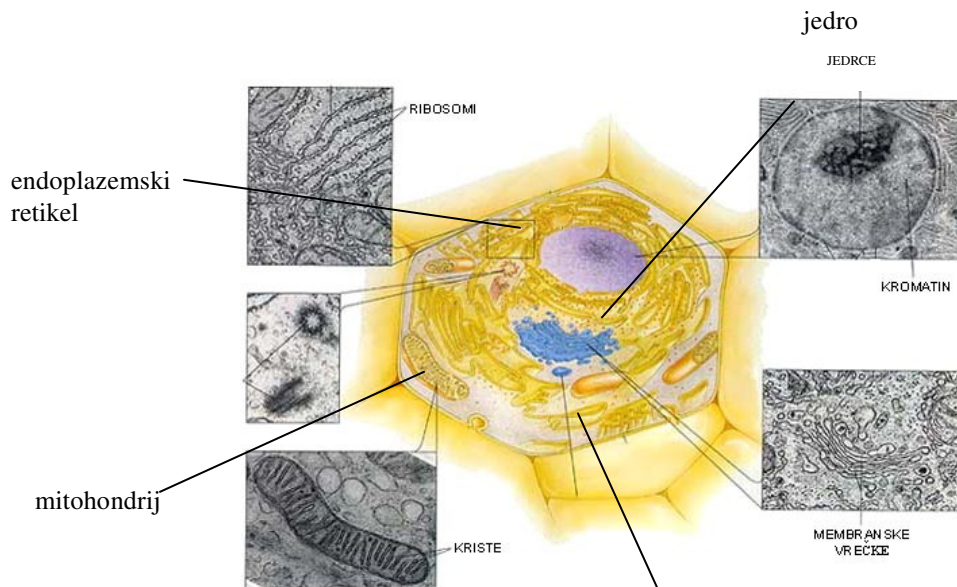
1. Označi sestavne dele rastlinske celice.



Slika 37: Rastlinska celica  
([http://www2.arnes.si/%7Emvni/zanimivosti/drobtinice/celica/rastlinska\\_celica.htm](http://www2.arnes.si/%7Emvni/zanimivosti/drobtinice/celica/rastlinska_celica.htm)).



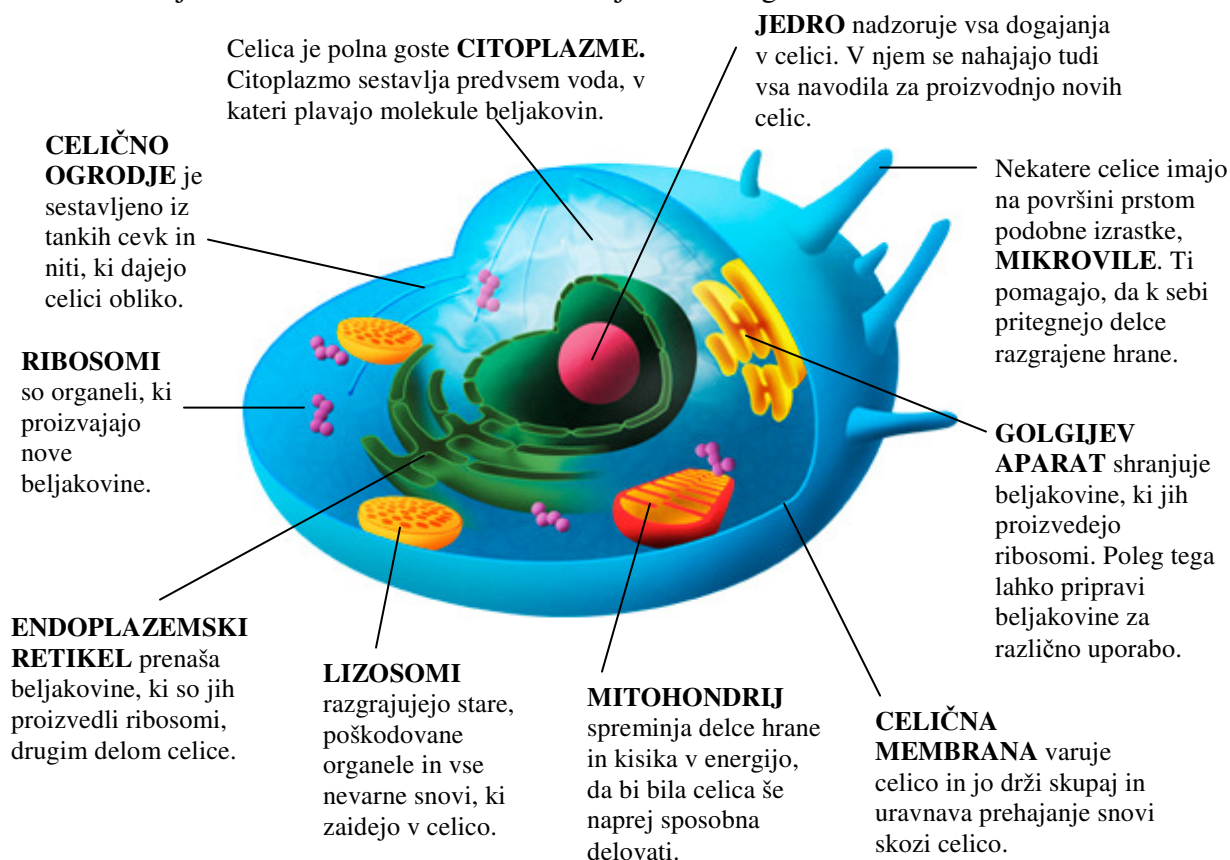
## 2. Označi sestavne dele živalske celice.



Slika 38: Živalska celica

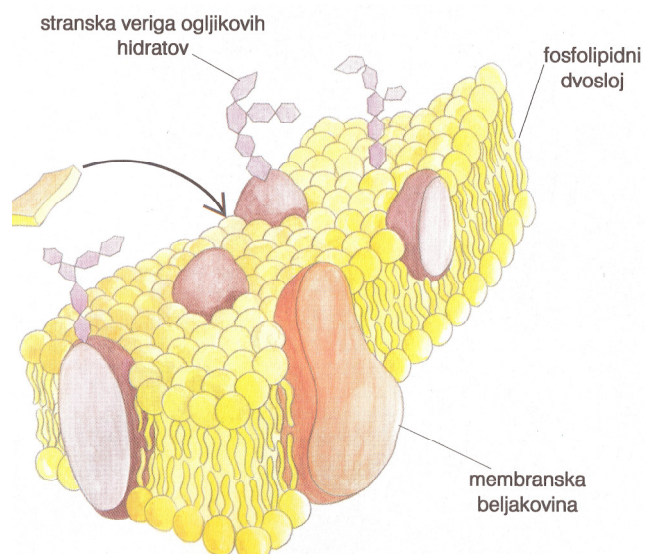
([http://www2.arnes.si/%7Emverni/zanimivosti/drobtinice/celica/zivalska\\_celica.htm](http://www2.arnes.si/%7Emverni/zanimivosti/drobtinice/celica/zivalska_celica.htm)).

## 3. Poimenuj označene dele celice ter navedi njihovo nalogo.



Slika 39: Notranjost celice (Claybourne, 2005).

4. Na spodnji skici imaš označeno podrobnejšo zgradbo celične membrane. Še enkrat si jo podrobneje oglej, ko boste pri pouku kemije obravnavali lipide.



Slika 40: Membranski model tekočega mozaika (Dermastia in Turk, 2005).

5. Odgovori na vprašanja.

- Kaj je celica? Celica je najmanjša enota življenja.
- Kateri organel je nadzorni center celice? Jedro.
- Kateri organeli dajejo celici energijo za delovanje? Mitohondriji.
- Kateri organeli so odgovorni za nastanek beljakovin? Ribosomih.
- Kakšna je naloga endoplazemskega retikla? Njegova naloga je, da prenaša beljakovine, ki so jih proizvedli ribosomi, drugim delom celice.

## 7.2 UČNA ENOTA IZ KEMIJE

<b>RAZRED:</b> 9 razred
<b>PREDMET:</b> kemija
<b>UČNA TEMA:</b> Lipidi
<b>UČNE ENOTA:</b> Lipidi v kozmetiki
<b>UČNA METODA:</b> razlaga in razgovor
<b>UČNA OBLIKA:</b> frontalna

**PRIPOMOČKI:** delovni zvezek, delovni list, prosojnice s shemami, izvajanje eksperimentov (priprava emulzij – majoneza; izdelava liposomov in opazovanje pod mikroskopom)

**OPERATIVNI CILJI:**

- Spoznajo strukturne značilnosti lipidov in njihovo osnovno delitev v podskupine.
- Se naučijo na osnovi strukturnih značilnosti prepoznavati predstavnike iz različnih podskupin lipidov.
- Spoznajo glavne fizikalne in kemijske lastnosti lipidov ter razumejo povezavo med kemijsko zgradbo in lastnostmi lipidov.
- Spoznajo glavne funkcije lipidov v naravi, njihovo vlogo v prehrani in kozmetiki ter druge načine uporabe.

**VSEBINSKA PRIPRAVA:**

Preden obravnavamo enoto lipidi v kozmetiki smo se z lipidi že zelo dobro seznanili, zato samo ponovimo njihovo osnovno delitev, naštejemo kakšnega predstavnika posamezne skupine, ponovimo strukturne značilnosti in z njimi povezane glavne fizikalne in kemijske lastnosti. Pri tej enoti se osredotočimo predvsem na glavne funkcije lipidov v naravi, v prehrani in kozmetiki.

Lipidi so vir energije in sestavni del bioloških membran in v nasprotju z drugimi biološkimi polimeri niso opredeljeni s ponavljajočimi se monomernimi podenotami. Njihova edina skupna značilnost je, da so netopni v vodi zaradi velikega deleža nepolarnih skupin. Glavni skupini lipidov sta maščobe in fosfolipidi. **Maščobe** so založne spojine in bogat vir energije. Maščoba je kombinacija molekule glicerola s tremi maščobnimi kislinami. Kemijsko so torej maščobe triacilgliceroli. Maščobne kisline v njih so lahko različno dolge, razlikujejo se po številu in namestitvi dvojnih vezi v verigi. Maščobna kislina, ki nima dvojnih vezi med dvema ogljikovima atomoma, je nasičena. Maščobe, ki vsebujejo nasičene maščobne kisline (maslo ali margarina), so pri sobni temperaturi trdne in je potrebna visoka temperatura, da se raztalijo. Kadar so med ogljikovimi atomi v maščobni kislini dvojne vezi, je molekula nenasičena. Nenasičene maščobne kisline sestavljajo olja, ki so zaradi dvojnih vezi pri sobni temperaturi tekoča. Maščobe so zelo dober vir energije, ki jo organizem dobi s hrano. V naših prebavilih encimi maščobe cepijo na glicerol in proste maščobne kisline, ki vstopijo v celični metabolizem. Ker se maščobe

presnavljajo počasneje od sladkorjev, so za organizem pomembne predvsem takrat, ko ta nima dovolj ogljikovih hidratov in porablja svoje »maščobne zaloge«. **Fosfolipidi** so sestavljeni lipidi, v katerih je ena od treh maščobnih kislin zamenjana s fosfatno skupino. Fosfolipidi so sestavni del bioloških membran. Če fosfolipide zmešamo z vodo, se s svojimi nepolarnimi deli obrnejo drug proti drugemu, polarni deli pa so izpostavljeni vodi. Če se tak dvosloj sklene, nastane struktura, ki jo imenujemo **liposom**. Liposomi so podobni celicam, saj je v njihovi notranjosti ujeta voda, voda pa jih tudi obdaja (Dermastia in Turk, 2005). Lipidi so maščobe, ki same po sebi niso aktivne substance. V kozmetiki jih uporabljajo kot baze, ki jim primešajo druge sestavine, lipidi pa koži pomagajo, da prevzame aktivne sestavine. Liposomi so posebej sestavljeni lipidni ovoji, v katere vgrajujejo različna zdravila ali snovi, ki se po nanosu vsrkajo v kožo, nato pa se iz njih sproščajo vgrajene snovi (<http://www.viva.si/clanek.asp?arhiv=1&id=1723>). Med lipide uvrščamo tudi veliko in kemijsko izredno raznoliko vrsto skupino **terpenov**. V njej najdemo denimo lepo dišeče snovi, predvsem zelo hlapna dišavna (eterična) olja različnih rastlinskih vrst pa tudi rastlinska barvila, kot sta betakaroten in ksantofil (Dermastia in Turk, 2005).

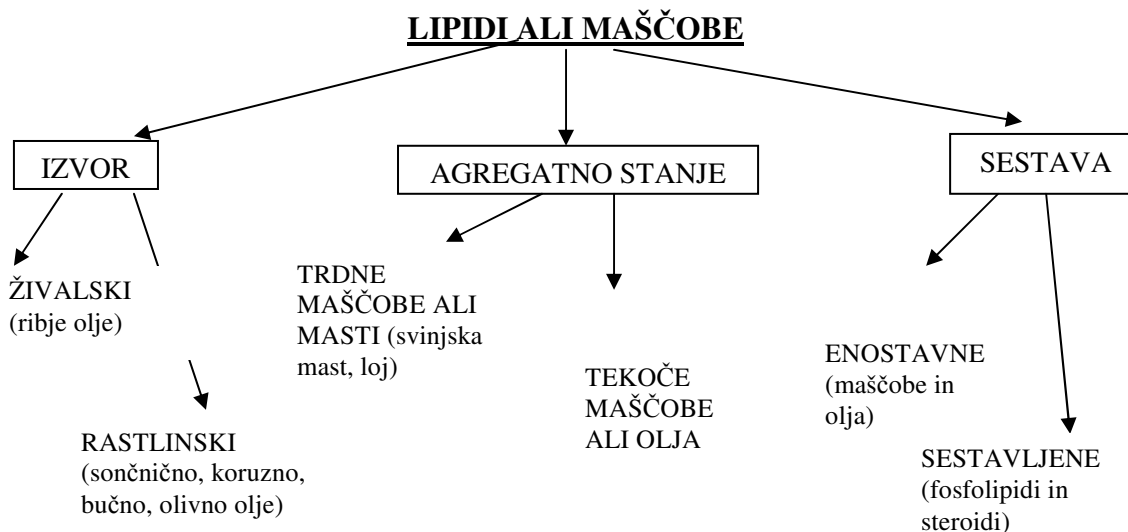
Obravnavana učna enota je izbirna možnost, saj spada med izbirne vsebine učnega načrta. Učno enoto lahko uporabimo tudi kot dodatek k učni temi kisikova družina organskih spojin, kjer obravnavamo učno enoto maščobe.

### 7.2.1 Delovni list

Še enkrat si ogledaj delovni list biologije, kjer ste obravnavali celično membrano.

1. Kaj so lipidi? Lipidi so vir energije, sestavni del bioloških membran in so netopni v vodi. Lipidi so maščobne snovi, netopne v vodi, ki z beljakovinami in ogljikovimi hidrati sodijo med glavne strukturne sestavine celice. Funkcije lipidov so: shranjevanje energije, zaščita organizma pred mrazom in sodelovanje pri procesih prebave. Ločimo več podskupin (fosfolipidi, glikolipidi idr.). Mednje štejemo olja, voske, sterole, estre maščobnih kislin in maščobne kisline (<http://www.eslovar.com/l/lipidi.html>).

## 2. Delitev lipidov.



Veliko olj uporabljamo kot maziva, pri proizvodnji lakov in barv ter za druge slikarske barve. To so predvsem laneno in repično olje. Olje je tudi v drugih semenih. Če s prerezanim jedrcem oreha podrgnemo po papirju, bo ostala mastna sled. Olja pridobivamo iz semen s stiskanjem, večje količine pa tako, da zdrobljenim semenom dodamo topila, v katerih se olja dobro topijo.

- Kako hranimo maščobe? Toplota, svetloba in vlaga pospešujejo razkroj maščob. Maščobe spremenijo barvo in dobijo neprijeten vonj in okus. Postanejo žarke. Razkroj maščob poteka pod vplivom bakterij in drugih mikroorganizmov. Pri tem nastanejo proste maščobne kisline, ki imajo neprijeten vonj. Lahko poteče tudi oksidativni razpad molekul maščob, pri čemer razpadejo večinoma nenasičene maščobne kisline, iz katerih nasanejo aldehidi, ketoni in karboksilne kisline. Neprijeten vonj in okus imajo predvsem aldehidi. Tudi maščobe v žlezah lojnicah na naši koži razpadajo. Ker tudi pri tem razkroju nastajajo snovi z neprijetnim vonjem, se moramo redno umivati, drugače zaudarjamo (Glažar in sod., 2005).

## 3. Eksperiment priprave emulzije.

Danes bomo pripravili emulzijo vode in olja oziroma majonezo. Majoneza je emulzija, ki je zmes dveh tekočin, ki se med seboj normalno ne mešata. Če vodo in olje hitro mešamo se okoli kapljic olja razporedi tanka plast vode in zato te kapljice olja ostanejo

razpršene v vodi. Vendar bi se ti dve tekočini med seboj ponovno takoj ločili, če ne bi dodali emulgatorja. Emulgator je snov, ki povzroča in pospešuje nastanek emulzije. Sodi med površinsko aktivne snovi. Jajca in želatina sta med hrano snovi, ki vsebujejo emulgatorje. V našem primeru, torej v majonezi je emulgator jajčni rumenjaki, ki vsebuje lecitin, maščobni emulgator (<http://recipes.howstuffworks.com/question617.htm>).

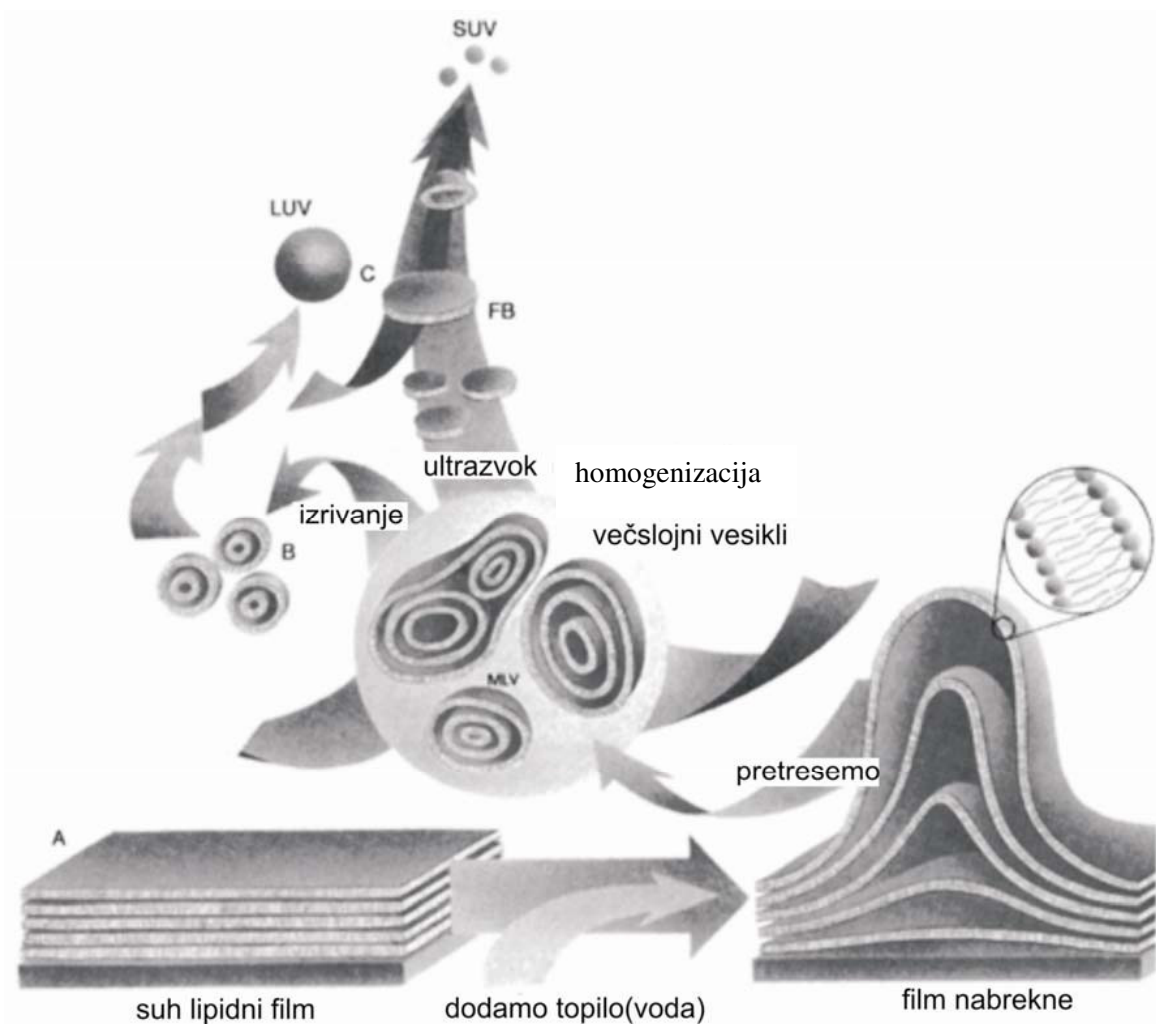
Vzamemo dve čaši in ju označimo s številko 1 in 2. V vsako nalijemo 200 ml vode. V prvo čašo, označeno s številko 1, dodamo 10 žlic olja, dobro premešamo in opazujemo, kaj se dogaja. Opazimo, da kapljice olja najprej potonejo in čez nekaj časa priplavajo nazaj na površje vode. Po parih minutah premešamo to zmes. Kaj opazimo? Opazimo, da so kapljice olja razpršene povsod po vodi, vendar če zmes stoji nekaj časa, kapljice ponovno priplavajo na površje vode. Naredimo še primerjavo. V drugo čašo, označeno s številko 2, dodamo 10 žlic olja in dobro premešamo. Opazimo, da se je ponovil opisan postopek zgoraj. Sedaj tej zmesi dodamo še jajce in ponovno dobro premešamo. Kaj opazimo? Opazimo, da je sedaj zmes enotna in se kapljice olja ne nabirajo na površini vode. Dobili smo torej emulzijo vode in olja oziroma majonezo.

- Kaj je emulzija? Emulzija je fino razpršena netopljiva snov v tekočini. Je tekočina iz dveh (ali več) snovi, od katerih je ena razpršena v drugi, v kateri se ne topi (<http://www.eslovar.com/page.php?id=9632>).
- Naštej emulzije iz vsakodnevnega življenja. Mleko, maslo, majoneza, kozmetična krema, loščilo za čevlje...

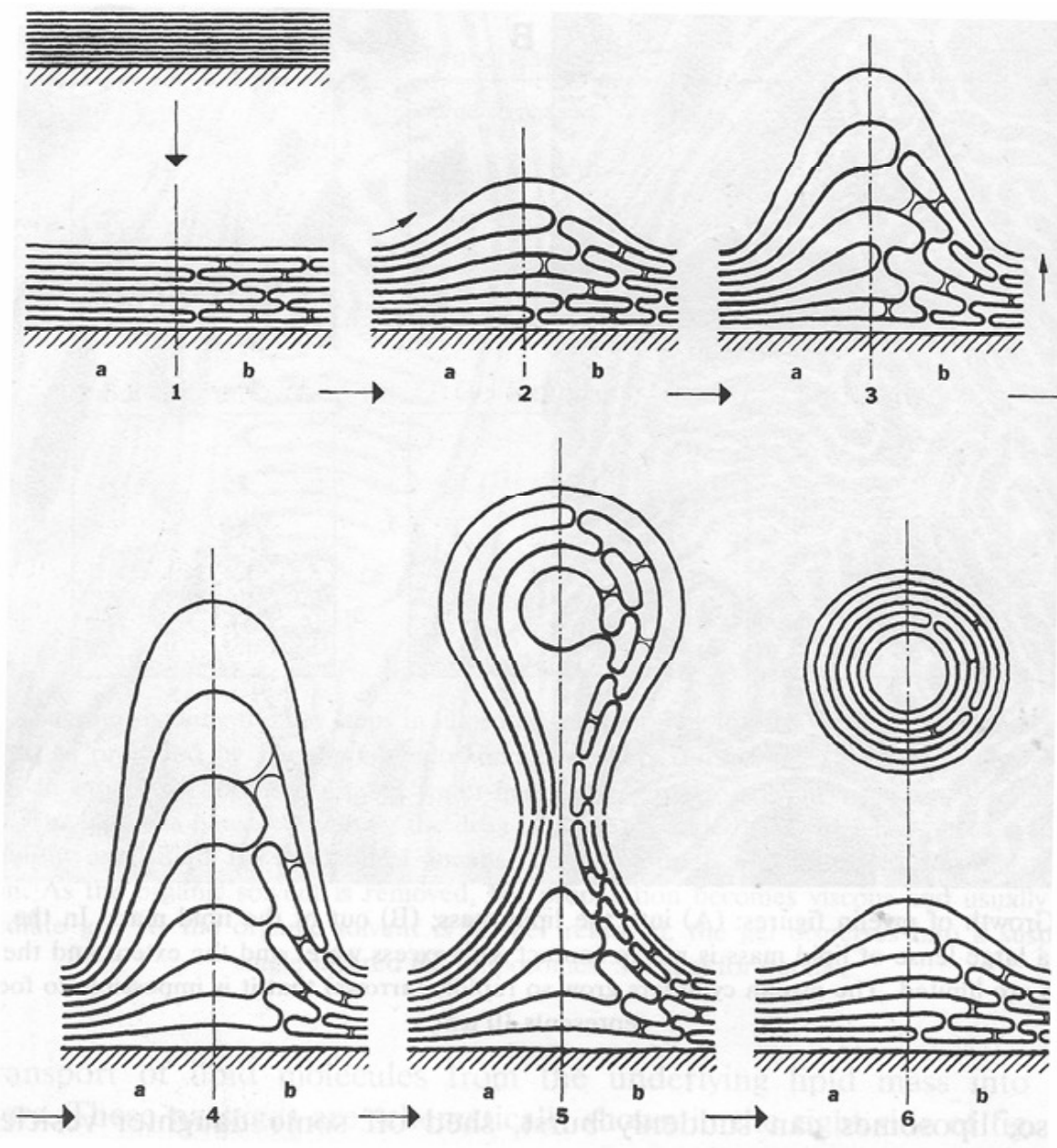
#### 4. Izdelava liposomov in njihovo opazovanje pod svetlobnim mikroskopom.

Če hočemo pripraviti liposome, je potrebno raztopiti lipide v topilu. Večina molekul (npr. fosfolipidi), ki tvorijo liposome, niso topne v vodi. Če zmešamo suhe praške ali voske z vodo, se zelo redko zgodi, da bi se tvorili liposomi. Lipide je potrebno najprej urediti v lipidno membrano. To naredimo tako, da lipide raztopimo v organskem topilu, kjer se zaradi svoje narave pri točno določeni temperaturi in koncentraciji preidejo v lamelarno fazo, kjer se uredijo v vzporedne membrane. Raztopino takih tankih plasti zamrznemo in posušimo tako, da topilo izpari in ostane samo lipidni film. Ko suh lipidni film namočimo v vodi, membrane nabreknejo. Na površini filma se pojavijo izbokline, ker začne voda

prodirati skozi lipidno membrano. Eksoterma hidrationska reakcija hoče zmanjšati energijo sistema, kar povzroči da se specifična površina sistema poveča. Izboklina narašča v mehur. Vezikli se ne začnejo tvoriti sami od sebe, temveč jim je potrebno malo pomagati. Raztopino z nagubanimi filmi je potrebno dobro pretresti (Lasič, 1997).

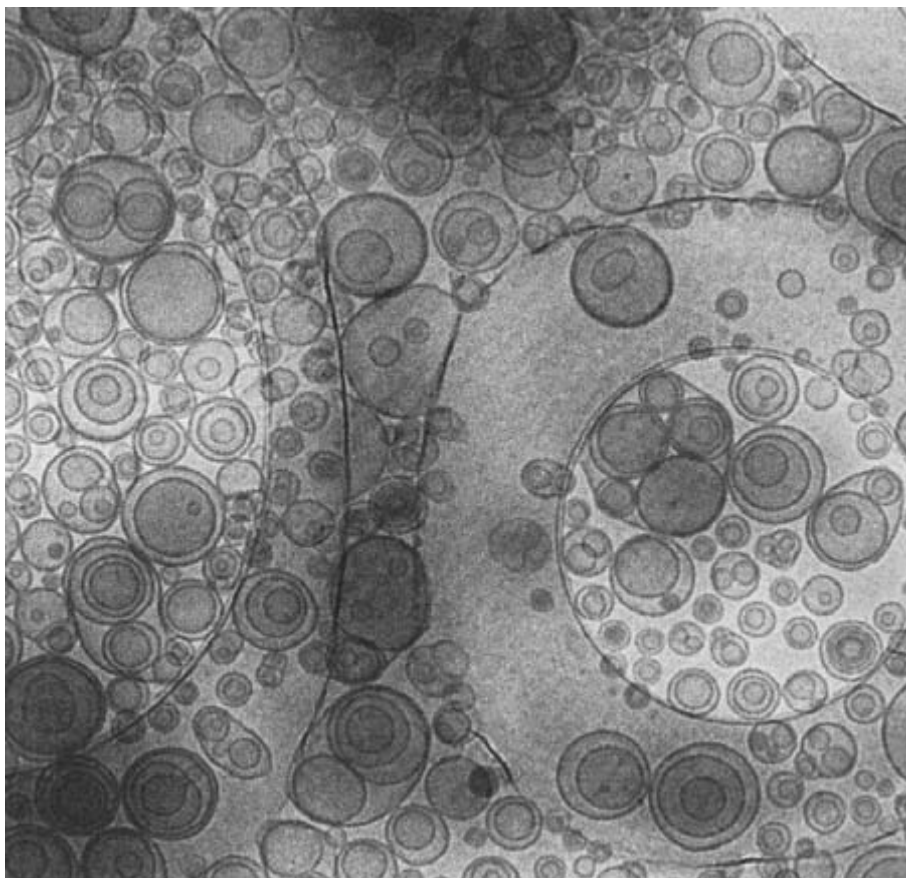


Slika 41: Skica tvorbe liposoma pri hidrationski suhega lipidnega filma (Lasič, 1997).



Slika 42: Nabrekanje lipidnega filma in nastanek večplastnega liposoma (Lasič, 1997).





Slika 43: Mikroskopska slika zmesi liposomov (Lasič, 1997).

- Kaj je liposom? Liposom je mikroskopsko velik mešiček, ki je sestavljen iz maščobnih snovi. Služi za vnašanje snovi v celico, uporablja pa se pri raziskovanju celic (<http://www.eslovar.com/page.php?id=18959>).

## 8 VIRI

<http://cancerweb.ncl.ac.uk/cgi-bin/omd?o-phthalaldehyde>

<http://illum.in.usc.edu/article.php?articleID=118&page=3>

<http://recipes.howstuffworks.com/question617.htm>

[http://www2.arnes.si/%7Emverni/zanimivosti/drobtinice/celica/rastlinska\\_celica.htm](http://www2.arnes.si/%7Emverni/zanimivosti/drobtinice/celica/rastlinska_celica.htm)

[http://www2.arnes.si/%7Emverni/zanimivosti/drobtinice/celica/zivalska\\_celica.htm](http://www2.arnes.si/%7Emverni/zanimivosti/drobtinice/celica/zivalska_celica.htm)

<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/sectionF/steroid/ster10.html>

<http://www.cyberlipid.org/>

<http://www.eslovar.com>

<http://www.lipidlibrary.co.uk/>

<http://www.viva.si/clanek.asp?arhiv=1&id=1723>

Barenholz Y. 2002. Cholesterol and other membrane active sterols: from membrane evolution to “rafts”. *Progress in Lipid Research*, 41: 1-5

Boyer R.F. 2005. Lipidi, biološke membrane in transport. V: *Temelji biokemije*. 2<sup>nd</sup> ed. Ljubljana, Študentska založba: 208-240

Brown D.A., London E. 2000. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 17221-17224

- Bruggemann, O. 2002. *Molecularly Imprinted Materials V: R. Freitag: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, str.139
- Claybourne, Anna. 2005. *Usbornova enciklopedija človeškega telesa*. Ljubljana. Karantanija. str. 12, 13
- Dermastia M., Turk T. 2005. *Od molekule do celice: učbenik za splošno gimnazijo*. 1. izd., 1. natis. Ljubljana. Rokus. str. 32-35, 50, 51
- Edidin M. 2003. *The state of lipid rafts: From model membranes to cells*. *Annual Review of Biophysics & Biomolecular Structure*, 32: 257-283
- Glažar S. A., Godec A., Vrtačnik M., Wisiak Grm K. S., 2005. *Moja prva kemija 2: kemija za 9. razred devetletne osnovne šole*. 1. izdaja. Ljubljana. Modrijan. str. 49, 51
- Knox J.H. in Grant I.H. 1991. *Electrochromatography in packed tubes using 1.5 to 50 µm silica gels and ODS bonded silica gels*. *Chromatographia*, 23: 317-328
- Kočevar N., Kristl J. 2005. *Ciljana dostava učinkovin v tumorske celice z liposomi*. *Farmaceutski vestnik*, 3: 56
- Lasch J., Weissing V., Brandl M. 2003. *Preparation of liposomes*. V: *Liposomes*. 2<sup>nd</sup> ed. Torchilin V.P., Weissing V. (eds). Oxford, Oxford University Press: 3-29
- Lasič D.D. 1997. *Liposomes in gene delivery*. Boca Raton, CRC Press: 320 str.
- Li, X. M., M.M. Momsen, H.L. Brockman, R.E. Brown, *Sterol structure and sphingomyelin acyl chain length modulate lateral packing elasticity and detergent solubility in model membranes*. *Biophys. J.* 85 (2003) 3788-3801

- Lichtenberg D., Goñi F.M., Heerklotz H. 2005. Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. *Trends in Biochemical Sciences*, 30: 430-436
- London E. 2002. Insights into lipid structure and formation from experiments in model membranes. *Current Opinion in Structural Biology*, 12: 480-486
- Martini F. in sod. (2006). *Human Anatomy*. Pearson/Benjamin-Cummings Publishers, str.89
- Nelson D.L., Cox. M.M. 2000. Lipids. V: *Lehninger principles of biochemistry*. 3<sup>rd</sup> ed. New York, Worth Publishers: 363-388
- Ohvo-Rekilä H., Ramstedt B., Leppimäki P., Slotte J.P. 2002. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Progress in Lipid Research*, 41: 66-97
- Ota, A., 2003. Interakcija hemolitičnega proteina iz bukovega ostrigarja (*Pleurotus ostreatus*) z membranskimi lipidi. Diplomsko delo, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Ljubljana
- Prager, N., Bickett, K., French, N., Marcovici, G. (2002). A randomized, double-blind, placebo-controlled trial to determine the effectiveness of botanically derived inhibitors of 5-alpha-reductase in the treatment of androgenetic alopecia. *Journal of alternative and complementary medicine (New York, N.Y.)* 8 (2): 143-52
- Rossier, M. F. (2006). T channels and steroid biosynthesis: in search of a link with mitochondria. *Cell Calcium*. 40 (2): 155-64
- Rudel L. L., Morris M. D. 1973. Determination of cholesterol using *o*-phthalaldehyde. *Journal of Lipid Research*, 14: 364-366
- Schröter W., Lautenschläger K.-H., Bibrack H., Schnabel A. 1993. *KEMIJA – splošni priročnik*. 1. izdaja. Ljubljana. Tehniška založba Slovenije. str. 712

Sepčič K., Anderluh G., Turk T., Maček P. 2002. Biokemijski praktikum. Ljubljana.  
Študentska založba. str. 38–59

Simons K., Ikonen E. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387: 569-572

Singer S.J. Nicolson G.L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell  
membranes. *Science* 175:720-731

Stušek P., Podobnik A., Gogala N. 2003. Biologija: učbenik za splošne gimnazije. Celica.  
3. izd., 5. natis. Ljubljana. DZS. str. 25

Svečko M. 2006. Biologija 9. učbenik za 9. razred devetletne osnovne šole. 1. izd., 3. natis.  
Ljubljana. DZS. str. 12

Učni načrt za biologijo za osnovno šolo. 1998. Nacionalni kurikularni svet. Področna  
kurikularna komisija za osnovno šolo. Predmetna kurikularna komisija za biologijo.  
Ljubljana.

Učni načrt za kemijo za osnovno šolo. 1998. Nacionalni kurikularni svet. Področna  
kurikularna komisija za osnovno šolo. Predmetna kurikularna komisija za kemijo.  
Ljubljana.

Wako Chemicals GmbH, Free Cholesterol C, Enzymatic colorimetric Method (COD-PAP),  
For the quantitative determination of free cholesterol in serum, navodila za izvedbo  
encimskega testa

Wang J., Megha, London E. 2004. Relationship between Sterol/Steroid Structure and  
Participation in Ordered Lipid Domains (Lipid Rafts): Implications for lipid raft  
structure and function. *Biochemistry*, 43:1010-1018

Xu X., London E. 2000. The effect on sterol structure on membrane lipid domains reveals  
how cholesterol can induce lipid domain formation. *Biochemistry*, 39: 844-849

## ZAHVALA

Svoji mentorici prof. dr. Kristini Sepčič se iskreno zahvaljujem za vso podporo, prejeta znanje, nasvete in praktično pomoč.

Zahvaljujem se tudi recenzentu prof. dr. Gregorju Anderluhu za pomoč pri nastajanju diplomske naloge.

Ireni Pavešič se prav tako zahvaljujem za vso praktično pomoč v laboratoriju.

Hvala tudi mojemu Marku za vso praktično pomoč in vso podporo v težkih, napornih in stresnih trenutkih.

Nazadnje pa gre velika zahvala mojim domačim in bližnjim za vso finančno podporo in spodbude tekom celotnega študija.