

OSNOVNA ŠOLA PRIMOŽA TRUBARJA LAŠKO



MORFOLOŠKE LASTNOSTI CELIČNIH DELCEV VODNIH HOMOGENATOV IGLIC NAVADNE SMREKE (*PICEA ABIES*)

RAZISKOVALNO DELO

PODROČJE: *BIOLOGIJA*

Anja Jančič in Frida Benedek,
učenki 9. razreda

MENTORJI:

strok. sod. **Marko Jeran**, Institut »Jožef Stefan« Ljubljana

Polonca Krašovec, prof., OŠ Primoža Trubarja Laško

Milena Žohar, prof., OŠ Primoža Trubarja Laško

Laško, 2023

ZAHVALA

Spoštovani mentorici in mentor!

Iskreno se vam zahvaljujema za vaše mentorstvo in vložen čas. Vedno ste nama bili na voljo in v oporo, brez vas nama ne bi uspelo.

Iskrena hvala gospodu **Marku Jeranu**, *strokovnemu sodelavcu* Odseka za anorgansko kemijo in tehnologijo Instituta »Jožef Stefan« Ljubljana, ki je koordiniral in usmerjal najino raziskovalno delo. S svojo strokovnostjo in izjemnim poznavanjem tematike ste naju navdušili in motivirali. Hvala za vse nasvete, pohvale in kritike, skozi katere sva se učili in rasli.

Zahvaljujema se *učiteljici* **Polonci Krašovec** za vso spodbudo in motivacijo ter njene koristne nasvete. V veselje nama je bilo, da sva bili vaši »prvi raziskovalki«.

Iskrena hvala tudi *učiteljici* **Mileni Žohar** za njeno strokovnost, usmeritve in pomoč. Veseli naju, da sva lahko svoje znanje uporabili tudi pri poskusih, ki smo jih izvajale skupaj.

Najlepša hvala *Odseku za anorgansko kemijo in tehnologijo* in *Odseku za fiziko trdne snovi* Instituta »Jožef Stefan« za prijazen sprejem. Počlašeni sva, da sva se imeli priložnost učiti in opravljati najino prvo raziskovalno delo na tej izjemni instituciji. Iskrena hvala tudi dr. **Maruši Mur** iz *Odseka za fiziko trdne snovi* za priložnost odličnega sodelovanja in opazovanja vzorcev na vrhunski opremi.

Hvala doc. dr. **Simoni Strgulc Krajšek** z Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani za pomoč pri karakterizacijah vzorca mahu. Za koristne napotke in sugestije s področja genetike in mikroskopije iglavcev sva hvaležni dr. **Lloydu Donaldsonu** iz Crown Research Institute (CRI) Secon, New Zealand.

Iskrena hvala *učiteljici slovenskega jezika in književnosti*, gospe **Lidiji Toplišek** za skrben pregled raziskovalnega dela, za vse nasvete in izboljšave tekočega jezika v nalogi.

Hvala *sošolkam* in *sošolcem*, vaša podpora nama ogromno pomeni.

Nenazadnje, iskrena hvala staršem in ostalim družinskim članom. Veseli sva, da vas imava. Iskreno sva hvaležni za vsako spodbudno besedo, pomoč in motivacijo. Brez vaše podpore danes pred seboj ne bi držali naloge, na katero sva tako zelo ponosni.

Najlepša hvala vsem!

*»Živiš lahko na dva načina.
Lahko se pretvarjaš, kot da ni nič čudežno.
Lahko pa imaš vse za čudež.«
– Albert Einstein*

KAZALO VSEBINE

POVZETEK.....	6
ABSTRACT	7
1 UVOD.....	8
1.1 METODOLOGIJA RAZISKOVALNEGA DELA.....	8
2 TEORETIČNI DEL	10
2.1 NAVADNA SMREKA (<i>PICEA ABIES</i>).....	10
2.2 BIOLOŠKO AKTIVNE ORGANSKE MOLEKULE V NAVADNI SMREKI.....	13
2.3 CELICA IN CELIČNA MEMBRANA.....	15
2.4 HOMOGENATI IGLIC NAVADNE SMREKE IN CELIČNI DELCI	18
2.5 SVETLOBNA MIKROSKOPIJA	20
2.6 CILJ RAZISKOVALNEGA DELA	21
2.7 HIPOTEZA.....	22
3 EKSPERIMENTALNI DEL	23
3.1 UVOD K EKSPERIMENTU	23
3.2 REAGENTI IN RAZTOPINE	23
3.3 DELOVNI PRIPOMOČKI IN ZAŠČITNA OPREMA.....	23
3.4 PRIPRAVA IGLIC IN HOMOGENATOV NAVADNE SMREKE	24
4 REZULTATI IN DISKUSIJA	27
4.1 MORFOLOŠKI PREGLED VZORCA IGLICE NAVADNE SMREKE.....	27
4.2 MORFOLOŠKE LASTNOSTI CELIČNIH DELCEV HOMOGENATOV IGLIC NAVADNE SMREKE V DEIONIZIRANI VODI	30
4.3 MORFOLOŠKE LASTNOSTI CELIČNIH DELCEV HOMOGENATOV IGLIC NAVADNE SMREKE V FIZIOLOŠKI RAZTOPINI	31
4.4 MORFOLOŠKE LASTNOSTI CELIČNIH DELCEV HOMOGENATOV IGLIC NAVADNE SMREKE V 9,0 % RAZTOPINI NATRIJEVEGA KLORIDA	32
4.5 CELIČNI DELCI HOMOGENATA PO 1-TEDENSKEM »STARANJU« V DEIONIZIRANI VODI.....	33
4.6 FIZIKALNO-MATEMATIČNI OPIS CELIČNIH DELCEV IGLIC NAVADNE SMREKE.....	35
5 ZAKLJUČEK.....	38
6 LITERATURA	40
7 DODATEK.....	44

KAZALO SLIK

Slika 1: Navadna smreka, ki je bila vključena v raziskovalno delo.....	10
Slika 2: Iglice navadne smreke.	11
Slika 3: Plod smreke, storž (Černe, 2016).....	12
Slika 4: Smrekovi vršički (Aktivni.si, 2020).....	13
Slika 5: Biološko aktivne spojine v navadni smreki (Jeran idr., 2021a; Čater, 2022).	14
Slika 6: Vrste celic (Godec idr., 2015).....	15
Slika 7: Rastlinska in živalska celica (Godec idr., 2015).....	16
Slika 8: Celična membrana (Britannica, 2022a).	16
Slika 9: Molekula fosfolipida fosfatidilholina, predstavljena (A) shematično, (B) z racionalnim zapisom formule, (C) s prostorskim modelom in (D) na simbolni ravni (Alberts idr., 2002).....	17
Slika 10: Model tekočega mozaika (Zorko, ni leta).	18
Slika 11: (a) Invertni svetlobni mikroskop Nikon Ti2 (ZDA) in (b) opazovani preparat v prekatnih ploščah. (c) Svetlobni mikroskop Brasser 1265157 (Nemčija).....	21
Slika 12: Lokacija rastišča smreke (Mapnall, 2012).	24
Slika 13: Prikaz faz priprave homogenatov iglic navadne smreke: (a) tehtanje iglic, (b) izpostavitve iglic natrijevem hipokloritu, (c) filtriranje iglic, (d) tekočina po prvem filtriranju iglic, (e) homogenizacija iglic s paličnim mešalnikom, (f) nastala brozga s peno, (g) brozga po toplotni obdelavi, (h) ločevanje brozge po homogenizaciji na tekočo fazo (homogenat) in ostanek rastlinskega tkiva. (i) Pripravljeni vzorci homogenatov navadne smreke.	26
Slika 14: Morfološki pregled vzorcev. (a) Prečni prerez trajnega preparata zdrave iglice navadnega bora in (b) povečana notranjost trajnega preparata, kjer je mogoče zaznati ksilem (XY) in transfuzijsko tkivo (TR). (c) Homogenat iglic navadne smreke v deionizirani vodi, mikroskopiran po 1 tednu od priprave in (d) homogenat iglic v fiziološki raztopini, mikroskopiran 1 dan po pripravi. (e) Z mehansko silo trgana iglica navadne smreke, ki v homogenat sprosti celične delce. (f) Mikroskopski prikaz organizacije organelov v lističu listnatega jeternjaka (<i>Plagiobhila</i> sp.) in (g) makroskopski pogled listnatega jeternjaka kot rastline.	27
Slika 15: Morfološki pregled v deionizirani vodi pripravljenega homogenata iglic navadne smreke: (a) in (b) pri sobni temperaturi ter (c) in (d) pod pogoji mikrovalovne homogenizacije.	30
Slika 16: Morfološki pregled v fiziološki raztopini (0,9 % NaCl) pripravljenega homogenata iglic navadne smreke: (a) in (b) pri sobni temperaturi ter (c) in (d) pod pogoji mikrovalovne homogenizacije.	31
Slika 17: Morfološki pregled v 9,0 % NaCl pripravljenega homogenata iglic navadne smreke: (a) in (b) pri sobni temperaturi ter (c) in (d) pod pogoji mikrovalovne homogenizacije.	32
Slika 18: Morfološki pregled v deionizirani vodi pripravljenega homogenata iglic navadne smreke, »staranega« 1 teden na sobni temperaturi: (a) in (b) pripravljenega pri sobni temperaturi ter (c) in (d) pod pogoji mikrovalovne homogenizacije.....	33
Slika 19: Prikaz primerov celičnih delcev z gladkimi konturami: (a)-(c) v homogenatu iglic navadne smreke na modelu 9,0 % raztopine NaCl, z uporabo mikrovalov, in (d)-(f) modeli teoretičnih oblik, ki ustrezajo oblikam z minimalno energijo membrane (Mesarec idr., 2014; Kralj-Iglič idr., 2022; Jeran idr., 2023). Oblike eritrocitnih struktur: (g) diskocit, (h) rožičasta oblika, (i) ehinocit, (j) ehinosferocit, (k) sferocit, (l) stomatocit, (m) eliptocit in (n) duh (Vehovar, 2018).	35

Slika 20: (a) Prikaz združevanja krvnih eritrocitov v rouleaux in vitro pogojih (Arko idr., 2022) in (b) stanja faze rouleaux po 1-tedenskem »staranju« homogenata iglic navadne smreke, pripravljenega v deionizirani vodi..... 36

KAZALO TABEL

Tabela 1: Količine topila in topljenca pripravljenih raztopin. 44

POVZETEK

Uporaba učinkovin naravnega izvora je na področju naravoslovnih znanosti svoj razcvet doživela z interdisciplinarnim povezovanjem različnih področij. Skozi raziskovanje biološko aktivnih učinkovin je bilo leta 1960 dognano, da naravni viri vsebujejo delce, ki spominjajo na celične vezikle, prisotne v bioloških sistemih.

Ker navadna smreka (*Picea abies*) predstavlja bogat vir biološko aktivnih učinkovin in celičnih delcev, jo pričujoče raziskovalno delo obravnava kot model. Ob pomoči mehanske obdelave iglic je bil v različnih medijih (deionizirana voda, fiziološka raztopina: 0,9 % in 9,0 % raztopina natrijevega klorida) pripravljen smúti. Iz slednjega so bili nato pripravljeni homogenati, ki predstavljajo vir morfološko zanimivih celičnih delcev.

Rezultati eksperimentalnega dela kažejo, da je vsebnost soli, skupaj z mehansko silo in s temperaturo, ključno pripomogla k homogenizaciji rastlinskega tkiva in donosu nastalih delcev. Razvidno je, da koncentracija soli ključno vpliva na nastanek in morfologijo nastalih celičnih struktur. V primerjavi s slanim medijem izkazuje deionizirana voda nastanek skupkov in aglomeratov delcev, ki jih lahko z uporabo termične energije preko mikrovalov ustrezno razgradimo na manjše enote.

V vseh uporabljenih medijih je bil evidentiran tudi nastanek delcev z dvojno membrano. Prav tako smo delce z dvojno membrano opazili v teden dni »staranem« vzorcu, pripravljenem v deionizirani vodi. V homogenatih iglic smo uspeli evidentirati delce z minimalno energijo membrane, ki po obliki spominjajo na delce krvnih celic. Vidnih je bilo več stomatocitnih in diskocitnih oblik.

Ključne besede: Navadna smreka, *Picea abies*, fiziološka raztopina, homogenizacija, homogenat, celični delci, vezikel, rastlinska in živalska celica

ABSTRACT

Through the interdisciplinary integration of different disciplines, the use of active substances of natural origin has developed in the field of natural sciences in 1960, while researching biological agents, it was discovered that natural sources contain particles similar to cell vesicles present in biological systems.

Since European spruce (*Picea abies*) is a rich source of biologically active substances and cellular particles, it is considered as a model in the present research work. The needles were mechanically processed and prepared for smear in different media (deionized water, saline: 0.9% and 9.0% sodium chloride solution). Homogenates were then prepared from these, providing a source of cell particles of morphological interest.

The results of the experimental work show that the salt content, together with the mechanical force and temperature, contributes decisively to the homogenization of the plant tissue and the yield of the resulting particles. It is obvious that the salt concentration has a decisive influence on the formation and morphology of the resulting cell structures. Compared to a saline medium, deionized water forms aggregates and agglomerates of particles that can be well broken down into smaller units using thermal energy via microwaves.

The formation of particles with a double membrane was also observed in all media used. Particles with double membrane were also observed in a one-week »aged« sample prepared in deionized water. In the homogenates of the needles, we detected particles with minimal membrane energy, similar in shape to particles of blood cells. Several stomatocidal and discozytic forms were observed.

Keywords: European spruce, *Picea abies*, physiological solution, homogenization, homogenate, cellular particles, vesicles, plant and animal cell

1 UVOD

V današnjem času vse pogosteje posegamo po pijačah z več sestavinami, imenovanih smútiji oz. zméšančki (*angl.* smoothies). Slednji posameznikom pomagajo vključevati več sadja in zelenjave v svojo prehrano. Različne študije tako pričajo o velikem razcvetu priprave in uživanja tovrstnih pijač (McCartney idr., 2018). Metoda priprave tovrstnih napitkov je uporabna tudi pri pripravi vzorcev rastlinskega izvora na področju raziskovalnega dela, pri pripravi medicinsko zanimivih delcev, imenovanih celični vezikli, iz navadne smreke (*Picea abies*) (Jeran idr., 2023). Celični vezikel predstavlja samostojno strukturo, sestavljeno pretežno iz tekočine (ali plina), obdano in zaprto z zunanjo membrano, imenovano lipidni dvosloj. Lipidni dvosloj je tako sestavljen iz hidrofilnih glav in hidrofobnih repov, ki se združujejo. Čeprav so celični vezikli podobni vakuolam, imajo tudi svoje edinstvene funkcije in sposobnosti. Lahko se zlijejo z membranami drugih celic ter opravljajo določene funkcije, kot na primer razgradnje drugih celic. Pomembno vlogo nosijo tudi pri shranjevanju in transportu snovi, kot so beljakovine, encimi, hormoni in nevrotransmiterji. So majhni delci, zelo pomembni pri usmerjanju različnih bioloških sistemov in procesov (Lewsley, 2020; Čater, 2021).

Ker je raziskovanje celičnih delcev rastlinskega vira pomembno za napredke v medicini in biologiji rastlinskih vrst, smo pričujoče raziskovalno delo posvetili prav njim. Konkretno nas zanima, kakšni delci se tvorijo ob različnih načinih obdelave vzorcev. Raziskovalnega dela smo se lotili s pripravo smútija. Iglice navadne smreke smo izpostavili raztopinam različnih slanosti in jih homogenizirali v tekoč smúti. Slednjega smo filtrirali in v tekočini, imenovani homogenat, opazovali morfologijo formiranih delcev. V drugem delu smo vzorec do vrelišča tekočega medija izpostavili mikrovalovom in v bistrem filtratu ponovno opazovali nastanek delcev. Pridobljene rezultate in ugotovitve smo strnili v zaključke, s katerimi smo pokazali »očarljivost«, ki se skriva v tovrstnih napitkih.

1.1 METODOLOGIJA RAZISKOVALNEGA DELA

Priprava homogenatov iglic navadne smreke je bila opravljena v šolskem laboratoriju. Prav tako so bile osnovne faze mikroskopiranja izvedene na šolskih optičnih mikroskopih. Zaradi poglobljenih morfoloških analiz smo osnovne protokole priprave vzorcev nadgradili in izpopolnili s sterilnostjo ter opravili konkretno analizo še v sodelovanju z *Odsekom za anorgansko kemijo in tehnologijo* in *Odsekom za fiziko trdne snovi* Instituta »Jožef Stefan« Ljubljana. Delo na inštitutu je nadzorovalo strokovno usposobljeno osebje v sodelovanju z mentorji. Pred izvedbo mikroskopiranja smo bili seznanjeni z delovnim sistemom in aparaturami (primer: mikroskopi,

mikropipete). Pred vstopom v laboratorij smo nadeli zaščitna sredstva, dekontaminirali obuvala in nanje nadeli sterilne vrečke oz. obujke. Skozi celotno raziskovalno delo smo uporabljali osebna zaščitna sredstva (očala, halja, maska in rokavice) in sledili varnostnim opozorilom.

2 TEORETIČNI DEL

2.1 NAVADNA SMREKA (*PICEA ABIES*)

Navadna smreka (lat. *Picea abies*) (**Slika 1**) je do 50 metrov visok zimzeleni iglavec. Uvrščamo jo v družino borovk (lat. *Pinaceae*), ki ima v naših krajih štiri samonikle rodove: smreko, jelko, bor in macesen (Brus, 2004). Navadna smreka je ena izmed najbolj razširjenih in gospodarsko pomembnih drevesnih vrst pri nas. Domovina smreke so evropska gorstva srednjih in severnih predelov (Jeran, 2020). V Srednji Evropi je najbolj razširjeno gozdno drevo, ki ga sadijo tudi zunaj njegovega naravnega območja razširjenosti. Gozdovi navadnih smrek se raztezajo od južne Skandinavije ter vse do južnih predelov Alp, na Balkanu in v Karpatih, kjer uspevajo na nadmorski višini od 600 do 2.000 metrov (Jeran, 2020).



Slika 1: Navadna smreka, ki je bila vključena v raziskovalno delo.

Navadna smreka dobro uspeva na soncu in v polsenci, potrebuje visoko zračno vlažnost in ima rada vlažna peščeno-kamnita, s hranili revna tla. Smreka je značilna vrsta hladnih rastišč, odporna je na mraz in nizke zimske temperature. Zaradi temperaturnega intervala ji nižinske lege ne ustrezajo, prav tako ji ne ustrezajo sušna in vročinska območja. V čistih nižinskih sestojih ji moker sneg in žled pogosto lomita vrhove. Zaradi slabe zakoreninjenosti so predvsem čisti smrekovi sestoji zelo občutljivi na močan veter, ki pogosto povzroča vetrolom. Ker smreka raste na mnogih zanjo neprimernih rastiščih, jo napadajo številni škodljivci in bolezni. Največje težave povzročajo podlubniki in rdeča trohnoba. Ker je občutljiva na onesnažen zrak, se je izkazala kot model za monitoring onesnaženja (Mayer in Schwegler, 2005).

V Sloveniji je evidentiranih zelo malo naravnih rastišč smreke. Navadna smreka, ki po Sloveniji sicer raste od nižine do visokogorske gozdne meje, je samonikla le v Alpah in visokem Krasu.

Drugod jo je nasadil človek. Z izjemo suhega obalnega dela in močvirnatih delov Panonske nižine danes porašča skoraj vso Slovenijo. Po najnovejših podatkih Zavoda za gozdove smreka danes predstavlja 30 % drevesne sestave gozdov v Sloveniji. Ta odstotek je v zadnjih letih zelo upadel in je najnižji v zadnjih 10 letih, kar nakazuje nadaljevanje trenda zmanjševanja deleža iglavcev in naraščanja deleža listavcev (Zavod za gozdove Slovenije, 2022).

Smreka je vitko iglasto drevo s stožčasto krošnjo. Deblo mladega drevesa je rdečkasto rjavo, z razdrapano skorjo in s tankimi luskami, v kasnejših fazah je sivkasto rjavo in močno razpokano ter hrapavo. Obseg debla lahko doseže tudi od 4 do 6 metrov. Njene veje izraščajo v vretencih, spodnje so obrnjene navzdol, vendar na koncu ponovno usločene navzgor. Zgornje veje so obrnjene navzgor in se s starostjo lahko povesijo (Beiser, 2019).

Vsebuje brste, dolge do 6 mm (Beiser, 2019), in na koncu ošiljene iglice, ki v dolžino merijo od 1 do 3 cm (**Slika 2**). Na opisan način tako smreko enostavno ločimo od jelke. Smrekove iglice so v prečnem prerezu štirirobe in koničasto ošiljene. Lahko so ravne ali usločene, temno zelene barve in imajo bele vzdolžne proge. Iglice so pritrjene v širokih nastavkih in krtačasto razporejene okoli veje. Na veji ostanejo od 5 do 7 let, v nekaterih primerih tudi do 9 let (Jeran, 2020; Sedušak Kljakič in Remškar, 2020).



Slika 2: Iglice navadne smreke.

Plodovi smreke so storži (**Slika 3**), ki dozoriijo jeseni in ostanejo zaprti. Storži so rjavi, valjasti in dolgi približno od 10 do 16 cm. Najprej so zelene ali rdečkaste barve, kasneje se razvijejo v svetlo rjavo barvo. Visijo navzdol in imajo krilata semena. Luske na storžih so toge in trde, na robu potegnjene v bolj ali manj izraziti jeziček. Storži se pričnejo odpirati februarja. Iz njih nato izpadajo semena s krilci, ki jih veter ponese v okolico in nato preko poletja odpadejo (Beiser, 2019).



Slika 3: Plod smreke, storž (Černe, 2016).

Navadna smreka je enodomna in vetrocvetna rastlina, ki cveti od aprila do junija. V določenih letih je njeno cvetenje intenzivnejše. Ženski cvetovi so storžasta, pokončna socvetja in karminasto rdeče barve. Dolga so do 2 cm in rastejo na koncu poganjkov v zgornji tretjini krošnje. Iz njih se razvijejo navzdol viseči, od 10 do 18 cm dolgi storži, ki se med zorenjem povesejo. Moški cvetovi so valjasti in sprva rdečkasti, kasneje zaradi peloda obarvani rumenkasto in oddajo velike količine cvetnega prahu. V dolžino merijo do 2 cm in cvetijo v srednjem in zgornjem delu krošnje, na lanskih poganjkih (Beiser, 2019; Jeran, 2020; Sedušak Kljakič in Remškar, 2020).

Navadna smreka je zelo priljubljeno drevo, zato jo pogosto sadijo. Njena razširjenost se vztrajno povečuje, posledično je njeno vrsto tako težje natančno določiti. Zaradi svoje hitre rasti in prilagodljivosti je s komercialnega vidika zelo zanimiva za gozdarje. V preteklosti so jo množično sadili predvsem zaradi njenega lesa. Smrekovina je mehak, prožen in elastičen les z gostoto od 350 do 680 kg/m³. V Sloveniji je smrekovina daleč najpogostejši les, ki ga s pridom uporabljajo v gradbeništvu, pohištveni in papirni industriji ter pri izdelavi glasbil (Jeran idr., 2021a).

Smreka je bogata z eteričnimi olji, vsebuje tudi smolo in vitamin C. Iz iglic pridobivamo eterična olja, ki so primerna za samostojno uporabo ali uporabo v kremah. Prav tako se v mazilih uporablja smrekova smola. Iz ljudske tradicije so uporabni tudi vršički (**Slika 4**), ki pomirjajo kašelj, povečujejo prekrvavitev sluznic in blažijo vnetja grla. Še posebej so priročni za uporabo pozimi za lajšanje bolezenskih stanj (Kavšek, 2018; Jeran idr., 2021a).



Slika 4: Smrekovi vršički (Aktivni.si, 2020).

2.2 BIOLOŠKO AKTIVNE ORGANSKE MOLEKULE V NAVADNI SMREKI

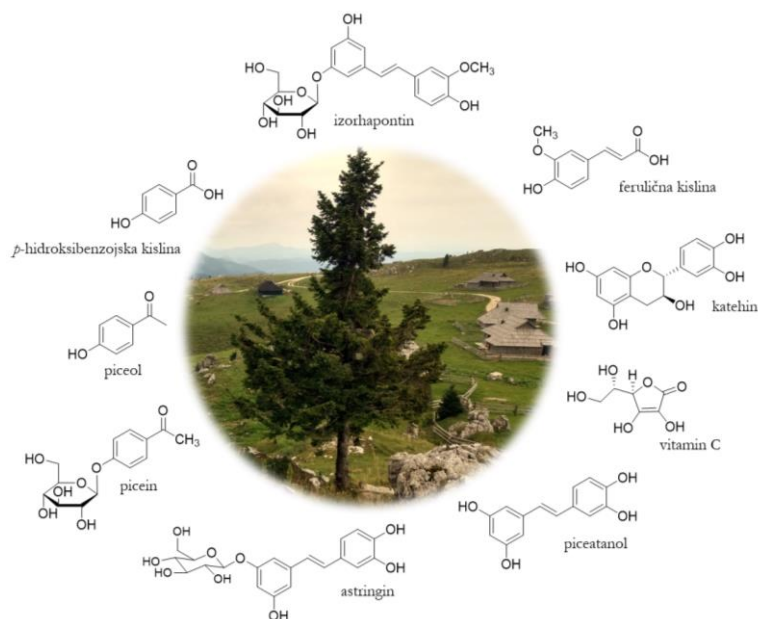
Najpogostejša elementa, ki sestavljata organske snovi, sta ogljik in vodik. Organske spojine lahko vsebujejo poleg ogljika in vodika še kisik, dušik, žveplo in halogene elemente. Organske molekule so lahko ravne, razvejane ali obročaste (ciklične). Lahko so zgrajene na verigah ogljikovih atomov različnih dolžin; večina jih je običajno zelo dolgih, kar omogoča ogromno število in raznolikost spojin (Jamšek idr., 2014; Stušek, 2007).

Biološko aktivna učinkovina je snov, ki kaže učinke na živ organizem. Običajno nas zanimajo snovi, katerih učinki so za človeka blagodejni. Na tem mestu gre lahko za neposredno pozitivno delovanje oz. posredno, ko snov negativno deluje na nek drug, za človeka škodljiv organizem. Učinek snovi je odvisen od uporabljene količine (doze). Da bi pri rokovanju zagotovili varno in učinkovito uporabo, moramo pri učinkovinah temeljito poznati njihov način vstopanja v telo, razporejanja in presnove v telesu ter nazadnje njihove razgradnje in izločanja (»ADME«, *angl.* absorption, distribution, metabolism and excretion; kar v prevodu imenujemo: absorpcija, porazdelitev, presnova in izločanje) (Jeran idr., 2021a; Čater, 2022).

Smreka predstavlja izjemno bogat naravni vir biološko aktivnih organskih molekul, ki se v določenih obdobjih nahajajo v različnih delih rastline (Bukhanko idr., 2020). Omenimo nekatere izmed znanih biološko aktivnih snovi navadne smreke (Jeran idr., 2021a; Čater, 2022) (**Slika 5**):

- *p*-hidroksibenzojska kislina in njeni glukozidi,
- piceol in njegov glukozid picein, ki se v farmacevtski industriji uporabljata za proizvodnjo zdravilnih učinkovin,
- piceatanol in astringin, ki je stilbenoid 3- β -D-glukozid piceatanola,
- ferulična kislina, znana kot osnova za proizvodnjo nekaterih aromatskih spojin,
- izorhapontin,
- stilbenoid, ki je predvsem prisoten v koreninah navadnih smrek,
- katehin oz. t.i. naravni antioksidant in sekundarni rastlinski metabolit ter

- vitamin C, ki velja za enega najpomembnejših antioksidantov v zunajcelični tekočini in je prisoten v smrekovih vršičkih.



Slika 5: Biološko aktivne spojine v navadni smreki (Jeran idr., 2021a; Čater, 2022).

Smrekova skorja je znana kot bogat vir fenolnih izvlečkov, terpenov, smolnih kislin, flavonoidov, lignina in holoceluloze (Bukhanko idr., 2020). Ker lubje lesnih vaskularnih rastlin pogosto velja za gozdni odpadke, v sebi skriva pomemben vir bioaktivnih učinkovin, celo tistih z velikim potencialom za krožno gospodarstvo. Predlagano je bilo kot potencialna surovina za proizvodnjo etanola iz lignoceluloze, sicer pa predstavlja bogat vir β -sitosterola in metil dehidroabietata, ki delujeta protibakterijsko in imata antioksidativne lastnosti (Jeran idr., 2022; Bukhanko idr., 2020). Iglice vsebujejo maščobne kisline, fenolne spojine, voske in ogljikove hidrate. Predstavljajo tudi vir dolgoveržnih alkoholov, kot na primer superhidrofoben nonakozan-10-ol (Jeran idr., 2022). Na vejah so prisotne tudi manjše vejice, ki vsebujejo smolne kisline in lignane. Ker je vsebnost lignanov v vejah veliko manjša kot v vejicah, imajo slednje potencial za uporabo pri proizvodnji površinsko aktivnih snovi, barv in lepil, izdelkov za osebno nego in kozmetike. Med omenjenimi veljajo tudi kot potencialna surovina za proizvodnjo antioksidantov (Jeran idr., 2022).

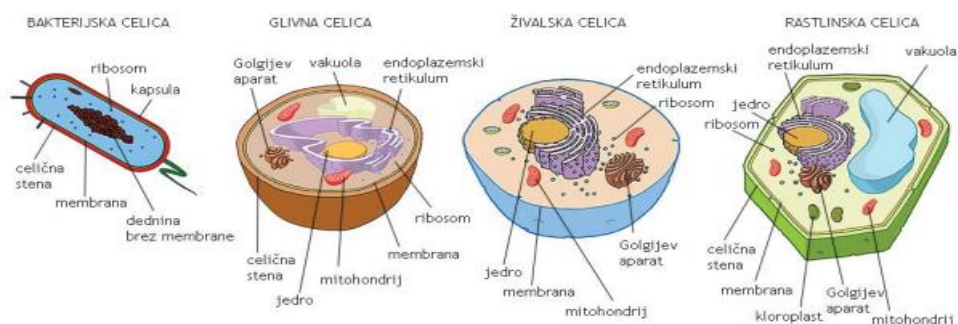
V vseh rastlinah so prisotne tudi fenolne spojine. Predstavljajo družino organskih molekul, ki vsebujejo aromatski obroč in vsaj eno, neposredno na aromatski vezano, hidroksilno skupino. V naravi običajno srečamo spojine z več »-OH« skupinami, zato se je zanje uveljavilo tudi ime polifenoli. Polifenoli predstavljajo heterogeno skupino organskih spojin, ki v rastlinah opravljajo funkcijo barvil, koencimov in protimikrobnih sredstev. Predstavljajo tudi tip učinkovin, ki se v rastlinah pojavijo kot odgovor na infekcije, kar imenujemo fitoaleksini. Polifenoli dajejo rastlinam

karakteristični okus, prehransko vrednost ter farmakološke in toksične učinke. Redko se v rastlinah pojavijo v prosti obliki, pogosto so vezani na sladkorje, aminoskupine, lipide in terpenoide in podobno (Kure, 2006; Čater, 2022).

2.3 CELICA IN CELIČNA MEMBRANA

Celica je osnovna strukturna in funkcionalna enota vseh organizmov. Ločimo enocelične in večcelične organizme. Ker se celice razlikujejo po obliki in velikosti, imajo tudi nekatere skupne značilnosti (Godec idr., 2015; Stušek in Vilhar, 2010).

Glavna gradbena tipa celic sta prokariotska celica (bakterijska celica) in evkariotska celica (glivna, rastlinska in živalska celica) (**Slika 6**). Prokariotska celica je evolucijsko izvirnejša in nima celičnega jedrnega ovoja, zato je dedni material prisoten v citoplazmi. V evkariotskih celicah je dedna snov shranjena v celičnem jedru. Organele, ki so z membrano obdani razdelki, imajo evkariotske celice, prokariotske le-teh ne vsebujejo. Organeli, skupni vsem evkariotskim celicam, so mitohondriji, endoplazemski retikulum, Golgijev aparat, lizosomi, ribosomi in jedro (Stušek in Vilhar, 2010).

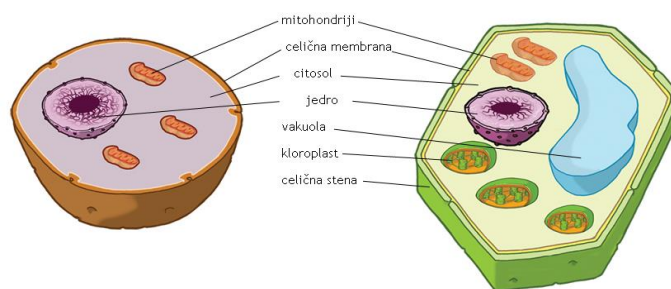


Slika 6: Vrste celic (Godec idr., 2015).

Rastlinske celice so v primerjavi z živalskimi nekoliko večje. Povprečna velikost rastlinskih celic je 50–100 μm in povprečna velikost živalskih celic 5–30 μm (Godec idr., 2015). V celici potekajo različni življenjski procesi, izmenjava snovi med celico in okoljem preko celične membrane. Poteka tudi sinteza organskih snovi, ki jih za svoje delovanje potrebuje organizem, in pretvorba energije, pomembna za potek življenjskih procesov (Stušek in Vilhar, 2010).

Tako rastlinske kot živalske celice imajo celično membrano in so evkariotske, zato vsebujejo z membrano obdane organele (jedro in mitohondriji) (**Slika 7**). Rastlinske celice za proces fotosinteze vsebujejo še kloroplaste. Ko je sladkor izdelan, ga mitohondriji razgradijo in celici ustvarijo energijo. Rastlinska celica vsebuje zgolj eno samo veliko vakuolo, namenjeno

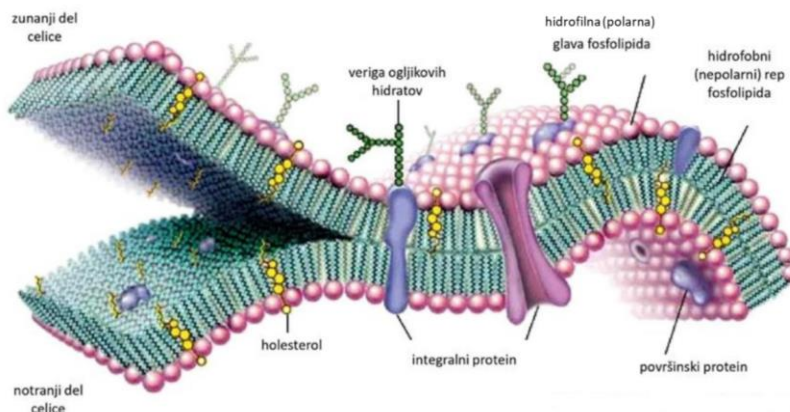
shranjevanju snovi, edinstvenost pravokotne oblike pa ji zagotavlja celična stena. Celice lahko vsebujejo tudi različne plastide, kot so amiloplasti, škrobna zrna in kromoplasti (Stušek, 2007).



Slika 7: Rastlinska in živalska celica (Godec *idr.*, 2015).

Za zagotavljanje dobrega raziskovanja morfoloških lastnosti celičnih delcev vodnih homogenatov iglic navadne smreke moramo dobro poznati zgradbo rastlinske celice, še posebej celične membrane.

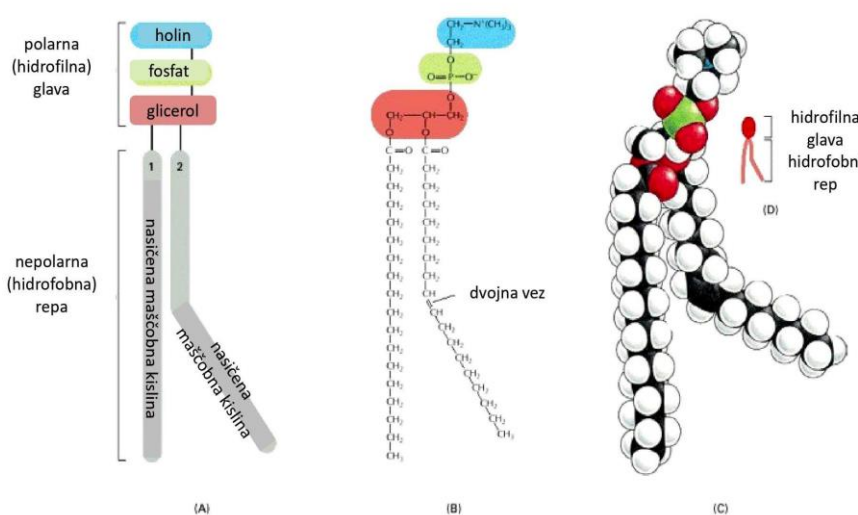
Celična ali plazemska membrana obdaja vsako živo celico, ji daje obliko in jo ločuje od zunanjega okolja (**Slika 8**). Celična membrana je izbirno in selektivno prepustna, prepušča zgolj pline, manjše molekule in ione. Glede na 50 μm , kolikor je dolžina celice, znaša debelina celične membrane 0,002 μm (Godec *idr.*, 2015).



Slika 8: Celična membrana (Britannica, 2022a).

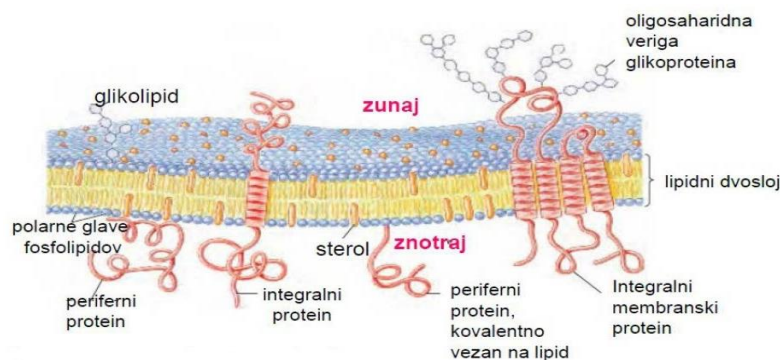
Celična membrana je sestavljena iz dveh glavnih sestavnih delov, iz beljakovin in lipidov. Lipidni dvosloj je trdno uveljavljen kot univerzalna osnova za strukturo celične membrane. Čeprav so za razkrivanje njegovih podrobnosti potrebne posebne tehnike, ga lahko opazimo tudi pod

elektronskim mikroskopom. Dvoslojno strukturo je mogoče pripisati posebnim lastnostim lipidnih molekul, zaradi katerih se le-te spontano sestavljajo v dvosloje. Lipidni dvosloj najpogosteje tvorijo fosfolipidi, ki imajo polarno glavo in dva hidrofobna repa. Njihova hidrofilna področja glave se spontano razporedijo tako, da so v stiku z vodnim citosolom in zunajcelično tekočino, medtem ko sta njuni hidrofobni repni območji obrnjeni stran od citosola in zunajcelične tekočine. Repi so običajno maščobne kisline, ki se razlikujejo po dolžini. En rep ima običajno enojno ali dvojno vez, v drugem slednje ni. Kot prikazuje **Slika 9**, vsaka dvojna vez v repu ustvari majhen pregib (Alberts idr., 2002).



Slika 9: Molekula fosfolipida fosfatidilholina, predstavljena (A) shematično, (B) z racionalnim zapisom formule, (C) s prostorskim modelom in (D) na simbolni ravni (Alberts idr., 2002).

Strukturo in funkcijo membrane lahko prikažemo z modelom, imenovanim model »tekočega mozaika« (Slika 10). Hipotezo tekočega mozaika sta v zgodnjih sedemdesetih letih zasnovala Singer in Nicolson (Ličar, 1992). Po slednjem modelu so membrane sestavljene iz lipidov, beljakovin in ogljikovih hidratov. V fosfolipidni dvosloj so v obliki mozaika vgrajeni tudi proteini. Površinski ali periferni proteini so pritrjeni le na hidrofilne glave fosfolipidov in se lahko gibljejo v spreminjajočih se fizikalno-kemijskih razmerah mikrookolja. Integralni proteini so neposredno vezani z membranskimi lipidi. V membranah so prisotni tudi proteini nosilci (*angl.* carriers), ki omogočajo transport nekaterih snovi skozi membrano. Lipidni dvosloj je sestavljen iz dveh zunanji hidrofilnih stranic in hidrofobne notranjosti in je tako slabo prepusten za v vodi topne snovi in ione. Zaradi slednjega membranski proteini skozi celično membrano prenašajo polarne molekule in ione (Lombard, 2014; Ličar, 1992).



Slika 10: Model tekočega mozaika (Zorko, ni leta).

V splošnem membrane izločajo polisaharidne tvorbe, kot je na primer kutikula. Iz oligosaharidnih stranskih verig glikolipidov in glikoproteinov izločajo tudi glikokaliks. Ta predstavlja osrednjega nosilca receptorskih molekul za specifično spoznavanje med celicami (Ličar, 1992).

Fosfolipidni dvosloj kroji strukturo vseh bioloških membran in predstavlja podlago za nastanek prvih zametkov membrane v evoluciji celice. Organele, kot so jedro, mitohondriji in kloroplasti, obdajajo dvojne membrane, med katerimi je tanek medmembranski prostor. Vakuole sestavlja zgolj enojna membrana (Mildner, ni leta; Klenovšek, 2021; Stušek, 2007).

2.4 HOMOGENATI IGLIC NAVADNE SMREKE IN CELIČNI DELCI

Homogenizacija je postopek, s katerim vzorec razdelimo na enake dele, tako da odstranitev enega ne poruši celotne molekularne sestave preostalega vzorca. Omenjeni še vedno natančno izraža molekularno sestavo preostalega vzorca. Homogenizacija se včasih uporablja tudi za temeljito mešanje snovi, ki se običajno ne mešajo. V takih primerih nastanejo emulzije (Shechter, 2019).

Biološki sistemi (organi, tkiva, celice, organeli) so od okolja oz. mikrookolja omejeni z različnimi strukturami, kot so celične stene in membrane. Za sprostitve njihove vsebine moramo le-te zdrobiti. Proces, s katerim dosežemo omenjeno, imenujemo homogenizacija. Katera koli metoda, ki se sicer uporablja za doseganje enotne mešanice dveh medsebojno netopnih tekočin, je lahko uporabna kot homogenizacija (Turk idr., 1997).

Homogenizacija izhaja iz grške besede *homogenes*, kjer *homos* pomeni enak in *genos* vrsta. Produkt homogenizacije imenujemo homogenat. Idealni homogenat biološkega izvora tako sestavlja zdrobljena celična stena in membrana, citoplazma in nepoškodovani celični organeli. Običajno

homogenizacijo vršimo z različnimi fizikalnimi tehnikami, kamor uvrščamo tudi uporabo mehanskega homogenizatorja. Najpreprostejši primer je uporaba terilnice, ki se v večji meri uporablja za homogenizacijo odpornejših materialov rastlinskega izvora. Po potrebi se lahko učinkovitost postopka povečuje z uporabo abrazivnih sredstev, kot so kremenčev pesek ali steklene kroglice. Drug način homogenizacije rastlinskega ali bakterijskega materiala zajema delovanje s spremembami pritiskov ob dodanem abrazivnem sredstvu. Abraziv tako lahko predstavljajo kristali ledu, ki nastanejo, če material zamrznemo. Za homogenizacijo mehkih živalskih tkiv so v rabi mešalci z različno velikimi nastavki – noži. Poleg fizikalnih načinov homogenizacije lahko določene celične stene in membrane razgradimo tudi kemijsko, predvsem z uporabo avtolize in različnih encimov. Da bi bila ponovljivost homogenizacije čim večja, moramo kontrolirati čim več dejavnikov. Mednje uvrščamo temperaturo, razmerje med količino medija in težo materiala, časom in hitrostjo procesa, vrednost *pH* in ionsko jakost in podobno. Ko z enim od omenjenih procesov nastane homogenat ali tkivna kaša, sledijo koraki k izolaciji iskane snovi. Z izolacijo se namreč znebimo večjih delcev, kar lahko izvedemo s pomočjo filtriranja ali celo centrifugiranja na različnih težnostnih pospeških (Vedantu, 2023; Turk idr., 1997).

Celice različne vrste delcev izločajo v zunajcelični prostor. Pri tem nastanejo delci celic različnih dimenzij in lastnosti. Med slednje uvrščamo tudi delce, obdane z membranami, imenovane celični vezikli, njihova velikost pa sega do 30 nm. Ugotovljeno je bilo, da vezikli sodelujejo pri t.i. horizontalnem prenosu tovora, predvsem nukleinskih kislin in drugih molekul, kot so ogljikovi hidrati, lipidi in sekundarni metaboliti. Zaradi teh pomembnih lastnosti se celični vezikli obravnavajo kot posredniki komunikacije med celicami in nosijo pomembne funkcije pri različnih fizioloških in patofizioloških procesih, med katere uvrščamo prenose signalov, celični cikel, imunski odziv, nevrolške bolezni, vnetja in tumorogenezo. Zaradi pomembne vloge v medcelični komunikaciji so izjemnega pomena pri uravnavanju zdravja in bolezni (Jeran idr., 2021*b*).

Raziskave priprave celičnih veziklov naravnega izvora segajo v leto 1960 (Jeran idr., 2021*b*). Tudi v Sloveniji so se zaradi različnih potreb pričele razvijati visoko donosne metode izolacije veziklov in celičnih delcev. Metode temeljijo na uporabi enostavnih in robustnih tehnik in predvsem na komercialno dostopnih in obnovljivih naravnih materialih. Celične delce preučujejo predvsem v vzorcih rastlinskega izvora, saj so se nekateri izmed njih izkazali za »zelene« in komercialno dostopne naravne materiale (Jeran idr., 2021*b*; Jeran idr., 2023). Jeran je s sodelavci (2023) ugotovil, da so v homogenatih iglic navadne smreke prisotni veziklom podobni delci, ki nastajajo

z obdelavo vzorca v centrifugi. Pri tem sta bila koncentracija in izplen nastalih delcev odvisna od centripetalnega pospeška rotorja centrifuge.

Zaradi motivacije in razvoja področja celičnih delcev smo svoje zanimanje v raziskovalnem delu usmerili k pripravi homogenatov iglic navadne smreke in njihovi morfološki analizi pod mikroskopom.

2.5 SVETLOBNA MIKROSKOPIJA

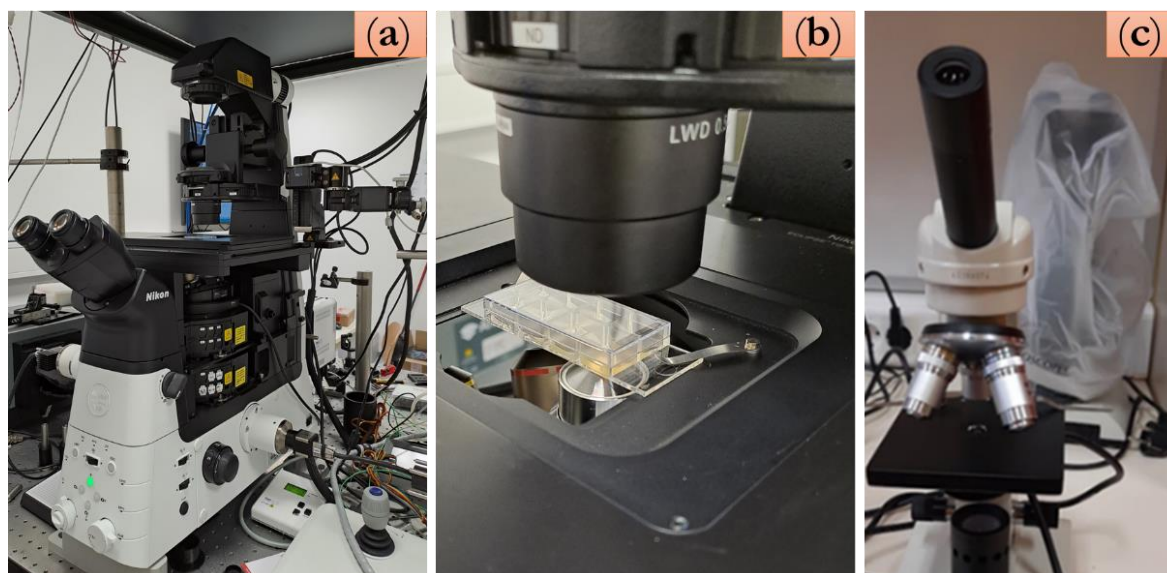
Od vseh instrumentov, ki se uporabljajo pri študiju bioloških vzorcev, je bil prav mikroskop tisti, ki je največ prispeval k poglobitvi znanja na tem področju. Vid predstavlja najdragocenejši človeški čut, zato bi človek pričakoval, da bi bila lajšanje šibkega vida in razširitev moči normalnega vida prednostna naloga znanstvenih prizadevanj. Vendar je trajalo vsaj 1.300 let od odkritja optične povečave do prve praktične uporabe pojava izuma očal (Bardell, 2004).

Mikroskopija je veda, ki uporablja mikroskope za proučevanje objektov (vzorcev), ki so premajhni, da bi jih lahko opazovali s prostim očesom. Zaradi omenjenega pogosto z besedo »mikroskopsko« opisemo predmete oziroma organizme, ki so tako majhni, da jih ne vidimo s prostim očesom. Beseda mikroskop izvira iz grškega jezika, in sicer besede *mikrós*, kar pomeni majhno, in *skopeîn*, kar pomeni gledati ali videti. Prvi izumljen in najpogosteje uporabljen je optični mikroskop. V splošni rabi je, poleg optičnega, tudi svetlobni mikroskop. Da pridobimo kakovostno sliko vzorca, mikroskope delimo glede na vire, ki jih uporabljajo. Mednje uvrščamo: svetlobo oz. fotone (optična mikroskopija) in elektrone (elektronska mikroskopija). Ločimo jih tudi po načinu pregleda vzorca. Če analiziramo celoten vzorec, govorimo o optični in transmisijski elektronski mikroskopiji. V primeru, ko analiziramo zgolj določeno območje, uporabljamo konfokalno in vrstično elektronsko mikroskopijo. Kljub temu da so mikroskopi danes že dobro poznani, se še vedno izpopolnjujejo in razvijajo za različne veje aplikativne znanosti (Kramar, 2015).

Svetlobna mikroskopija predstavlja ključno orodje v sodobni celični biologiji. Odraža jo več lastnosti, zaradi katerih je idealna za opazovanje biologije v živih celicah. Njena ločljivost se dobro ujema z velikostjo podceličnih struktur in razmeroma nemoteča narava svetlobe pomeni, da lahko žive celice opazujemo dlje in sledimo njihovi dinamiki (Thorn, 2017). Sestavne dele klasičnega svetlobnega mikroskopa (**Slika 11 (c)**) delimo na optične dele, odgovorne za nastanek slike, in mehanske dele, v katere so vpeti optični deli in ki omogočajo delo z mikroskopom. Med optične dele uvrščamo okular, objektiv, kondenzor, kolektor in žarnico, med mehanske dele pa

glavo, stativ, revolver, objektno mizico, vijak za pomik po objektni mizici, vijak za nastavitve višine kondenzorja ter makrometrski in mikrometrski vijak. Med osnovni lastnosti mikroskopa uvrščamo povečavo in ločljivost, ki zagotavljata kakovost slike opazovanega preparata. Smiselne povečave sodobnih svetlobnih mikroskopov segajo od 10× do 1000×. Skupno povečavo mikroskopa dobimo, ko pomnožimo povečavo okularja in objektiva. V splošnem nam slednja pove, kolikokrat je slika, opažena pod mikroskopom, večja od slike, ki jo vidimo s prostim očesom, ne prispeva pa k pridobivanju novih informacij. Karakteristika ločljivosti je definirana kot najmanjša razdalja med dvema točkama na opazovanem objektu, pri kateri ju še uspešno ločimo kot dve točki (Zupančič, 2015).

Invertni svetlobni mikroskop (**Slika 11 (a) in (b)**) se uporablja za opazovanje živih celic, ki rastejo v celični kulturi v gojitveni posodi. Objektivi se nahajajo pod objektno mizico, na katero postavimo gojitveno posodo s celicami, ki običajno rastejo po dnu posode. Višina posodice tako ne ovira izostrovanja in ne omejuje delovnih razdalj objektiva. Vir svetlobe, kolektor in kondenzor so nad objektno mizico. Lahko je prirejen tako, da je tudi fazno-kontrastni, fluorescenčni ali konfokalni mikroskop (Zupančič, 2015).



Slika 11: (a) Invertni svetlobni mikroskop Nikon Ti2 (ZDA) in (b) opazovani preparat v prekatnih ploščah. (c) Svetlobni mikroskop Brasser 1265157 (Nemčija).

2.6 CILJ RAZISKOVALNEGA DELA

Pospešeno raziskovanje navadne smreke (*Picea abies*) v današnjem času motivira raziskovalce različnih naravoslovnih disciplin. Veliko raziskav se ukvarja z izolacijo in karakterizacijo biološko aktivnih in farmacevtsko zanimivih spojin, ki jih v različnih letnih časih vsebuje rastlina (Jeran

idr., 2021b). Zaradi pospešenega razvoja medicinske diagnostike in razvoja dostavnih sistemov, kot so na primer liposomi, so raziskovalci začeli iskati alternativne vire na področju naravnih spojin. Ker so celični delci manjših velikosti prisotni tudi v rastlinskih vzorcih in predstavljajo alternativo biološkim tekočinam, so v današnjem času raziskave usmerjene tudi v razvoj poceni in ponovljivih metod izolacij in karakterizacije omenjenih delcev. Ker so lahko vir teh delcev tudi rastline, tako predstavljajo t.i. »zeleni« in trajnostni material (Jeran idr., 2021b). Zaradi navedenega nas je tovrstni pristop k raziskovanju in uporabi naravnih materialov močno pritegnil, posebej zato, ker imajo tovrstni delci pomembno uporabno vrednost, kot že omenjeno, na področju tarčne dostave zdravilnih učinkovin.

Cilj raziskovalnega dela je zajemal pripravo homogenatov iglic navadne smreke v vodnih medijih, kot so deionizirana voda, 0,9 % raztopina natrijevega klorida (fiziološka raztopina) in 9,0 % raztopina natrijevega klorida (NaCl). Z mehansko deformacijo rastlinskega tkiva obdelani vzorci bodo poleg različnim količinam soli izpostavljeni tudi dvema temperaturnima spremembama. Primerjalno glede na sobno temperaturo in homogenizacijo pri temperaturi vrelišča, z uporabo mikrovalov, bomo tako preučili nastanek formirajočih se delcev.

Po proučeni literaturi smo si zastavili hipotezo, ki nas je kot rdeča nit vodila skozi celo raziskovalno delo.

2.7 HIPOTEZA

Ob pomoči različnih načinov priprave vodnih homogenatov bo mogoče zaznati razliko v nastanku celičnih delcev in njihovi morfologiji. Predvidevamo, da se bo največ le-teh formiralo ob pomoči povišane temperature, z uporabo mikrovalov. V obravnavanih raztopinah različnih slanosti (deionizirana voda, 0,9 in 9,0 % raztopina NaCl) predvidevamo nastanek večjega števila delcev v fizioloških pogojih pri 0,9 % raztopini NaCl.

Glede na morfologijo nastalih delcev bomo lahko sklepali na lastnosti struktur delcev in jih na mikroskopski ravni povezali s celicami v bioloških sistemih.

3 EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 UVOD K EKSPERIMENTU

Pred pričetkom laboratorijskega eksperimentalnega dela se moramo ustrezno zavarovati z osebno zaščitno opremo (zaščitna halja, zaščitna očala, zaščitne rokavice). Prav tako moramo poskrbeti, da je delovni prostor primerno pripravljen in očiščen. Pri delu z aparaturami moramo ravnati v skladu z navodili za uporabo. Po končanem delu si vedno umijemo roke in razkužimo z alkoholom.

V okviru eksperimentalnega dela smo uporabili steklene posode in aparature ter drobno laboratorijsko opremo.

Fiziološka raztopina je 0,9 % raztopina natrijevega klorida (NaCl) v deionizirani vodi. V medicini se uporablja za različne namene, kot so izpiranje ran med operativnimi posegi, izpiranje nosne votline, priprava obkladkov in podobno. Pri dehidraciji in krvavitvah se uporablja za nadomeščanje izgubljene vode, natrijevih in kloridnih ionov. V domačem okolju se najpogosteje uporablja za nežno izpiranje občutljive nosne sluznice dojenčka, da se mu odmaši nos in dojenček lažje zaduha. Pri vsakodnevni higieni nežnih predelov telesa je fiziološka raztopina namenjena čiščenju oči, predvsem zunanosti vek (Monique, 2016).

3.2 REAGENTI IN RAZTOPINE

- 0,1 % raztopina natrijevega hipoklorita (NaClO), pripravljena iz Arekine (Šampionka, Slovenija), ki vsebuje 6 % natrijev hipoklorit
- 0,9 in 9,0 % raztopina natrijevega klorida (NaCl), pripravljena z raztapljanjem trdnega reagenta (p. a., Sigma-Aldrich) v deionizirani vodi
- deionizirana voda (dH₂O), Sistem za pripravo ultra čiste deionizirane vode, Institut »Jožef Stefan«, Ljubljana, Slovenija)
- iglice navadne smreke

3.3 DELOVNI PRIPOMOČKI IN ZAŠČITNA OPREMA

a) *Delovni pripomočki:*

- mikrovalovna pečica Midea (MG7017NP-BM, Kitajska)
- palični mešalnik Bosch (MSM 66202, 600 W, Slovenija)
- svetlobni mikroskop Brasser 1265157 (Nemčija)
- invertni svetlobni mikroskop Nikon Ti2 (ZDA)
- 8-prekatna komora za nanos vzorcev za mikroskopijo (Zell, Nemčija)
- precizna tehtnica Kern 440-47 (Kern & Sohn, Nemčija)
- bel kvantitativni filtrirni papir z velikostjo por 4,0–12,0 μm (MN 640M, Whatman No. 43, Macherey-Nagel, Nemčija), 30 kos

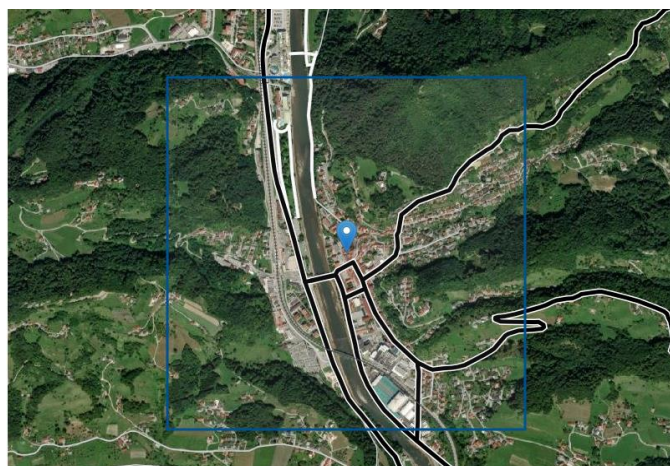
- aluminijasta folija Alu-fix (Premium, Avstrija), 1 kos
- žlička, 4 kos
- kvantitativni lij, 6 kos
- stojalo, 6 kos
- mufa in prižema, 6 kos
- steklena palčka, 9 kos
- objektna in krovna stekla (Iso Lab, Nemčija), 9 kos
- plastična kapalka (1 mL), 6 kos
- čaša (300 mL), 3 kos
- čaša (250 mL), 6 kos
- čaša (500 mL), 3 kos
- čaša (1000 mL), 9 kos
- erlenmajerica (200 mL), 6 kos
- erlenmajerica (500 mL), 11 kos
- štoparica, 1 kos
- samostoječa centrifugirka oz. falkonka (50 mL), konusna iz polipropilena (Isolab, Nemčija), 12 kos
- pladenj, 9 kos
- lepilni trak, 1 kos

b) Zaščitna oprema:

- zaščitne rokavice, 1 paket
- zaščitna očala, 2 kos
- zaščitna maska, 2 kos
- zaščitna halja, 2 kos
- zaščita za obutev (obujke), 2 kos

3.4 PRIPRAVA IGLIC IN HOMOGENATOV NAVADNE SMREKE

Iglice smo za potrebe raziskovalnega dela nabrali na smreki, ki se nahaja v občini Laško. Na aplikaciji *Mapnall Google zemljevidi* (www.mapnall.com) se smreka, ki je darovala vzorec, nahaja na zemljepisni širini 46° 9' 17" N in zemljepisni dolžini 15° 14' 82" E (**Slika 12**).



Slika 12: Lokacija rastišča smreke (Mapnall, 2012).

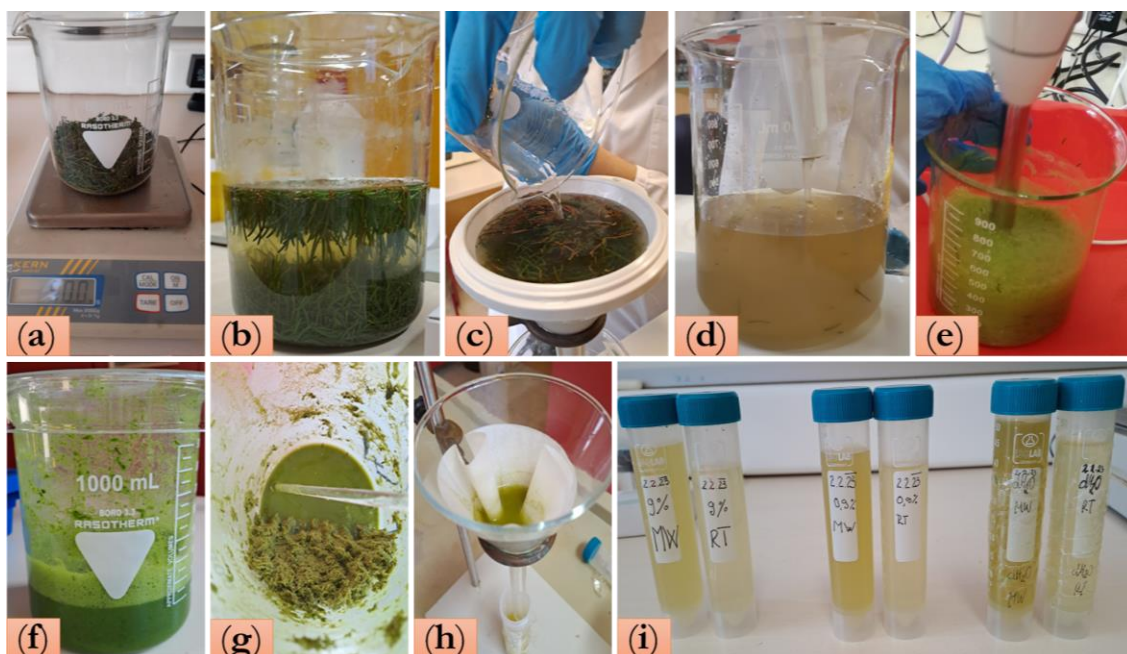
Vzorci smo odvezemali v več fazah nabiranja v zimskem času, od konca novembra do konca januarja. Sveže nabrane iglice smo z namenom dekontaminacije dezinficirali z uporabo 0,1 % raztopine natrijevega hipoklorita. Pred delom smo, z uporabo mikrovalov, sterilizirali tudi vso uporabljeno steklovino, deionizirano vodo, 0,9 in 9,0 % raztopino NaCl ter ves drobni inventar. Vse ključne korake dela smo izvajali ob uporabi Bunsenovega gorilnika in s tem okoli vzorca zagotovili aseptično okolje. Med delom smo večkrat tudi razkuževali roke.

V 1000 mL čašo smo zatehtali 50,0 g iglic in jih prelili z 0,1 % raztopino natrijevega hipoklorita. V raztopini smo jih pustili 30 minut in vsebino večkrat premešali (**Slika 13 (a) in (b)**). Po 30 minutah smo vsebino ločili s filtracijo (**Slika 13 (c) in (d)**). Iglice smo nato v nadaljevanju, v 1000 mL čaši, 3 × sprali z deionizirano vodo (490 mL) in ponovno filtrirali.

Iz dezinficiranih iglic smo pripravili homogenate. Pripravo homogenatov smo izvedli v treh različnih medijih: deionizirani vodi ter 0,9 in 9,0 % raztopini NaCl. Za vsako izmed priprav smo v 1000 mL čašo vstavili 50,0 g smrekovih iglic in jim prilili 200 mL homogenizacijskega medija. Z uporabo paličnega mešalnika pri najnižji hitrosti 50 Hz smo vsebino mleli 5 minut (**Slika 13 (e)**). Vsebino smo večkrat premešali in pri sobni temperaturi pustili stati 30 minut. Po pretečenem času smo mletje s paličnim mešalnikom nadaljevali še 2 minuti. Polovični volumen nastale brozge smo nato filtrirali skozi kvantitativni lij v sterilne 50 mL falkonke. Pri sobnih pogojih je tako nastal homogenat (**Slika 13 (f)**).

Drugo polovico brozge smo postavili v mikrovalovno pečico in vsebino pri najvišji moči segrevali 4 minute, da je dosegla vrelišče. Po mikrovalovni obdelavi brozge smo vsebino ohladili na sobno temperaturo (60 minut), dobro premešali in vsebino ločili s filtracijo, ponovno skozi kvantitativni lij v 50 mL falkonke (**Slika 13 (g) in (h)**). Pripravljene vzorce (**Slika 13 (i)**) smo do mikroskopiranja zaščitili z aluminijasto folijo. Mikroskopiranje smo izvedli znotraj 2 ur po pripravi vzorcev, analizirali smo tudi pri sobni temperaturi »staran« vzorec, po 1 tednu od priprave.

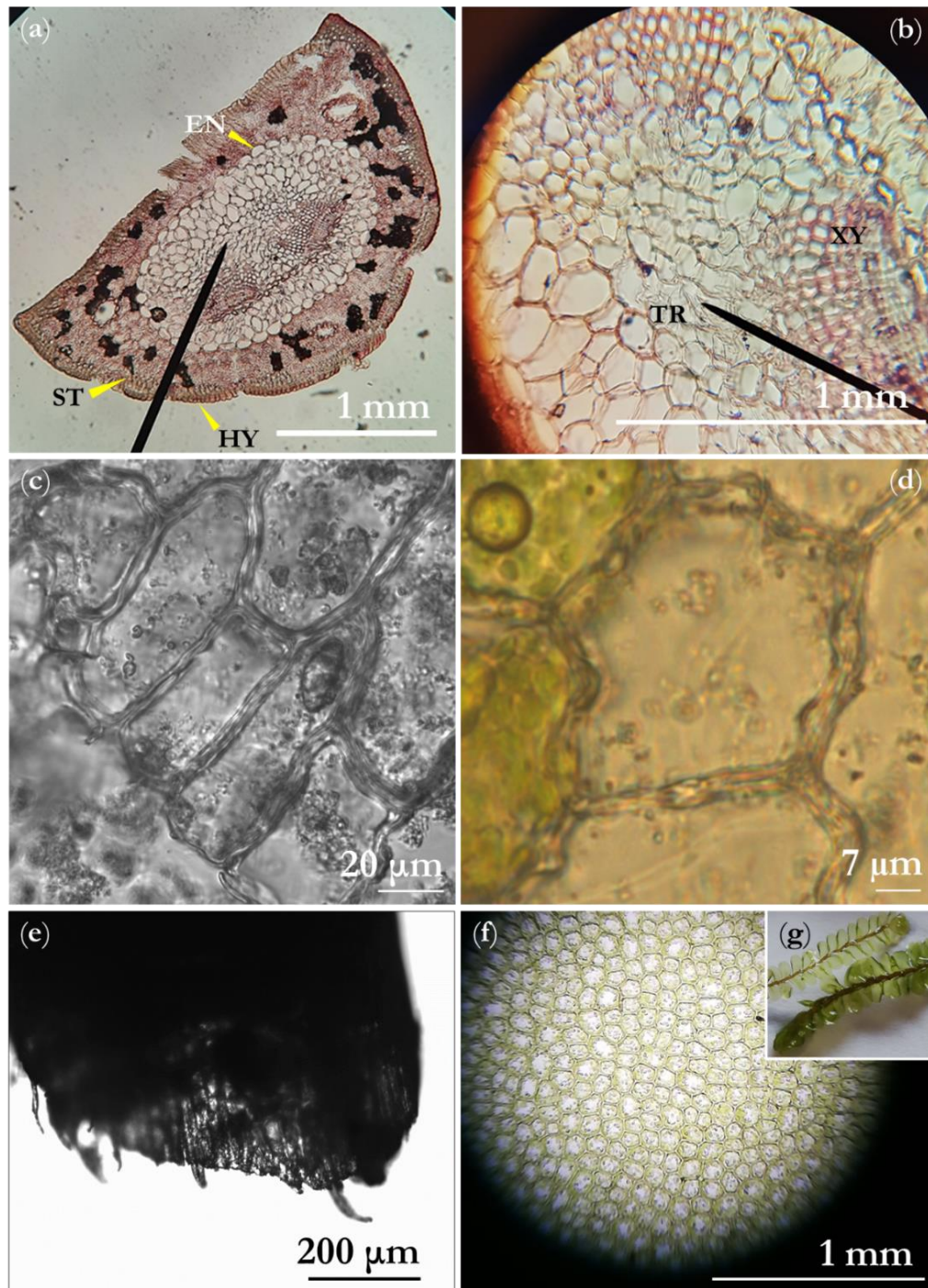
Iglice smo po pripravi homogenatov zavrgli na kompostnik.



Slika 13: Prikaz faz priprave homogenatov iglic navadne smreke: (a) tehtanje iglic, (b) izpostavitve iglic natrijevem hipokloritu, (c) filtriranje iglic, (d) tekočina po prvem filtriranju iglic, (e) homogenizacija iglic s paličnim mešalnikom, (f) nastala brozga s peno, (g) brozga po toplotni obdelavi, (h) ločevanje brozge po homogenizaciji na tekočo fazo (homogenat) in ostanek rastlinskega tkiva. (i) Pripravljeni vzorci homogenatov navadne smreke.

4 REZULTATI IN DISKUSIJA

4.1 MOFOLOŠKI PREGLED VZORCA IGLICE NAVADNE SMREKE



Slika 14: Morfološki pregled vzorcev. (a) Prečni prerez trajnega preparata zdrave iglice navadnega bora in (b) povečana notranjost trajnega preparata, kjer je mogoče zaznati ksilem (XY) in transfuzijsko tkivo (TR). (c) Homogenat iglic navadne smreke v deionizirani vodi, mikroskopiran po 1 tednu od priprave in (d) homogenat iglic v fiziološki raztopini, mikroskopiran 1 dan po pripravi. (e) Z mehansko silo trgana iglica navadne smreke, ki v homogenat sprosti celične delce. (f) Mikroskopski prikaz organizacije organelov v lističu listnatega jeternjaka (*Plagiochila* sp.) in (g) makroskopski pogled listnatega jeternjaka kot rastline.

V prečnem prerezu trajnega preparata zdravega navadnega bora, ki ponazarja t.i. lignificirano tkivo, smo opazovali njegove manjše organele (**Slika 14 (a)**). Donaldson in Williams (2018) sta s pomočjo barvil, ki sproščajo fluorescenco, ločila med različnimi organeli znotraj same iglice. Predvsem sta pokazala, da različna rastlinska tkiva fluorescirajo zaradi naravnih molekul, ki jih imenujemo fluorofori in so prisotne v celičnih stenah in znotraj protoplasta ali lumna. Med splošno znanimi molekulami iglavcev sta lignin in klorofil dobro znana fluorofora, druge komponente, ki jih vsebuje vzorec, pa nekoliko manj. Povečan pogled preparata (**Slika 15 (a)** in **(b)**) tako razkrije prisotnost ksilema (XY), endodermisa (ED), stomatov (ST), hipodermisa (HY) in transfuzijskega tkiva (TR).

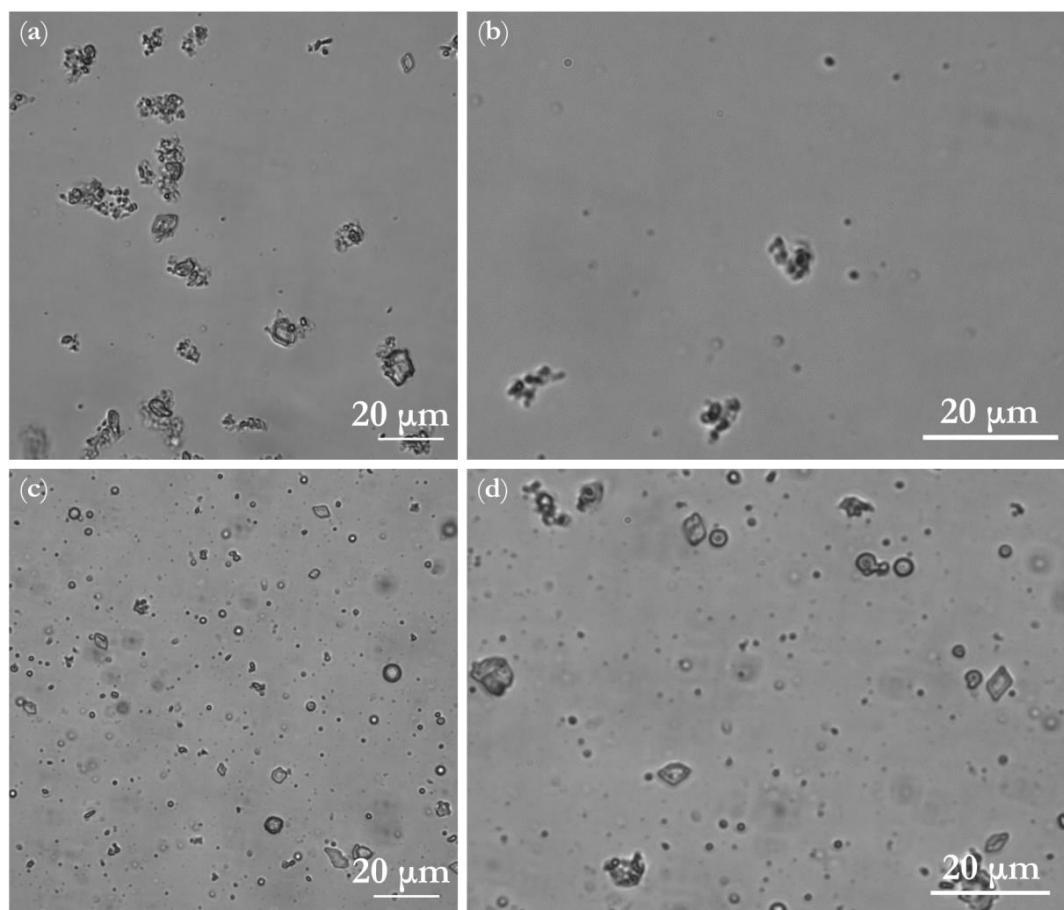
Snovi se prevajajo iz listov v korenine ter v nasprotni smeri po posebnih prevajalnih ali transfuzijskih tkivih, ki so združena v žile. Žile gradita dve vrsti tkiv, ksilem in floem. Ksilem omogoča transport vode in mineralnih snovi in floem transport organskih snovi (Podobnik in Devetak, 1997). Celične stene endodermisa imajo olesenel in plutast trak, imenovan kasparski trak okoli vseh sten celice. V položaju endodermisa, znotraj okvirno 1 cm od konjic poganjkov cvetočih rastlin, je prisoten škrobnat ovoj, kjer se nahaja plast celic s shranjenim škrobom (Britannica, 2022a). Stoma je katera koli mikroskopska odprtina ali pora povrhnjic listov in mladih stebel. Glavna funkcija organela zajema izmenjavo plinov med zunanjim zrakom in razvejanim sistemom med seboj povezanih zračnih kanalov znotraj lista. Obsega tudi nadzor izgube vode iz rastline (Petruzzello, 2022). Hipodermis je iz ene ali več plasti celic, kar omogoča prepustnost svetlobe. Zmanjšuje izgubo vode s kutikulo ali z epidermalnimi laski, ki zadržujejo vlago in odbijajo svetlobo. Ščiti pred okužbami, da je notranjost lista sterilna (Pickering, 1996).

Preparat homogenata v deionizirani vodi, ki je stal na sobni temperaturi 1 teden po pripravi, je pokazal posebno organiziranost delcev (**Slika 14 (c)**). Posnetek kaže, da vzorec vsebuje citoplazmo in škrobna zrnca. Takšna organiziranost v preparatu kaže na organizirano sestavo ostankov delcev iglic, ki so ob trganju med pripravo homogenata zajeli najbolj energijsko ugodno stanje. Najverjetneje so večji razpadli delci zaobjeli manjše in jih vključili v večjo celično enoto. Podobno organizacijo struktur smo zasledili ob pripravi homogenata z uporabo fiziološke raztopine. Vzorec je 24 ur pred mikroskopiranjem stal na sobni temperaturi. Notranjost vzorca, preučevana z barvno kamero (**Slika 14 (d)**), je razkrila podobno sestavo, ki je bila vidna na preparatu **Slike 14 (c)**. Temno zeleni predeli preparata kažejo na področja z večjo vsebnostjo klorofila. Ker je bil vsak izmed pripravljenih homogenatov po pripravi filtriran skozi filter papir por 4-12 μm (Macherey-Nagel, Düren, Nemčija), bo potrebno upoštevati, da so v analiziranih vzorcih prisotni, glede na velikost por filtra, delci manjših velikosti. Z mešalnikom

obdelane/deformirane iglice (**Slika 14 (e)**) so tako ob pomoči mehanske sile in tekočega medija (deionizirana voda, fiziološka raztopina 0,9 % raztopina NaCl in 9,0 % raztopina NaCl) v okoliško raztopino sprostile delce, ki vsebujejo membrano in so različnih oblik. Takšne delce imenujemo celični delci in so manjših velikosti. Običajno so takšni delci lahko tudi posledica nastanka veziklov oz. majhnih celičnih delcev, ki jih celica potrebuje za medcelično komunikacijo in posredovanje različnih informacij z drugimi celicami (Jeran idr., 2021*b*). Do trganja membrane osnovnega delca lahko pride na različne načine. V našem primeru smo to izvedli s pomočjo mehanske sile v mešalniku in ob pomoči efekta osmoze z raztopinami različnih slanosti. Mehansko odprta iglica (**Slika 14 (e)**) je bila tako pripravljena, da v okoliško raztopino sprostijo celične delce.

Organizacija staranih delcev v homogenatih iglic navadne smreke (**Sliki 14 (c)** in **(d)**) nas v nekaterih ozirih spominja na organizacijo organelov listnatega jeternjaka (*Plagiochila* sp.) (**Sliki 14 (f)** in **(g)**). Jeternjak sicer tvori mrežo med seboj povezanih delcev, ki vsebujejo celične stene, kloroplaste in oljna telesca. Del takšne mreže smo opazili pri prej omenjenih vzorcih, a se od jeternjaka vseeno razlikuje. V primeru homogenata smrekovih iglic so se delci orientirali glede na pogoje priprave vzorca in najverjetneje tudi zaradi njenega staranja. Preparat homogenata iglic je omenjeno orientacijo vseboval zgolj ob končnih delih kapljice preparata, kamor so lahko splavali večji delci in se orientirali. Osrednji del preparata je zajemal polno manjših delcev, ki jih lahko vidimo na **Sliki 14 (d)**. Model listnatega jeternjaka je služil med drugim tudi za podrobno primerjavo med vzorci glede na njihov različen izvor in pogoje, v katerih uspevajo.

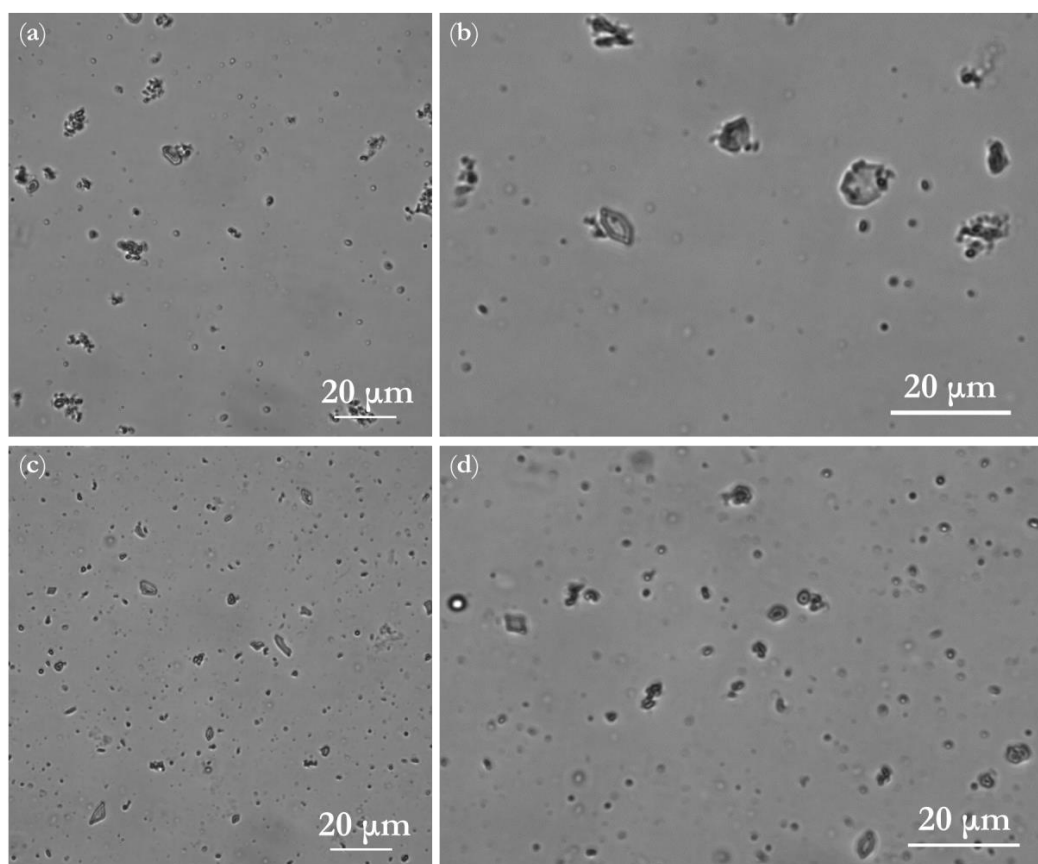
4.2 MORFOLOŠKE LASTNOSTI CELIČNIH DELCEV HOMOGENATOV IGLIC NAVADNE SMREKE V DEIONIZIRANI VODI



Slika 15: Morfološki pregled v deionizirani vodi pripravljenega homogenata iglic navadne smreke: (a) in (b) pri sobni temperaturi ter (c) in (d) pod pogoji mikrovalovne homogenizacije.

Morfološki pregled v deionizirani vodi pripravljenega preparata je tako pri homogenizaciji pri sobni temperaturi kot pod pogoji mikrovalov vseboval večje delce, skupke in aglomerate (**Slika 15**). Primerjalno gledano je vzorec, pripravljen s homogenizacijo pri sobni temperaturi (**Slika 15** (a) in (b)), vseboval večjo vsebnost skupkov delcev in manjšo vsebnost manjših celičnih delcev kot tisti pod pogoji mikrovalovne homogenizacije (**Slika 15** (c) in (d)), kjer so se večji skupki razgradili v manjše. Pod pogoji mikrovalovne homogenizacije je bilo tako opaziti večjo vsebnost manjših celičnih delcev. Takšni delci so različnih velikosti in oblik. Prevladujejo kroglasti delci in nekaj tudi takšnih, ki spominjajo na oblike človeških krvnih celic (**Slika 19** (g)–(n)). Takšne oblike delcev so bile tudi matematično določene in temeljijo na energiji, ki je potrebna, da se tak delec tvori – t.i. delci z minimalno membransko energijo (Jeran idr., 2023).

4.3 MORFOLOŠKE LASTNOSTI CELIČNIH DELCEV HOMOGENATOV IGLIC NAVADNE SMREKE V FIZIOLOŠKI RAZTOPINI



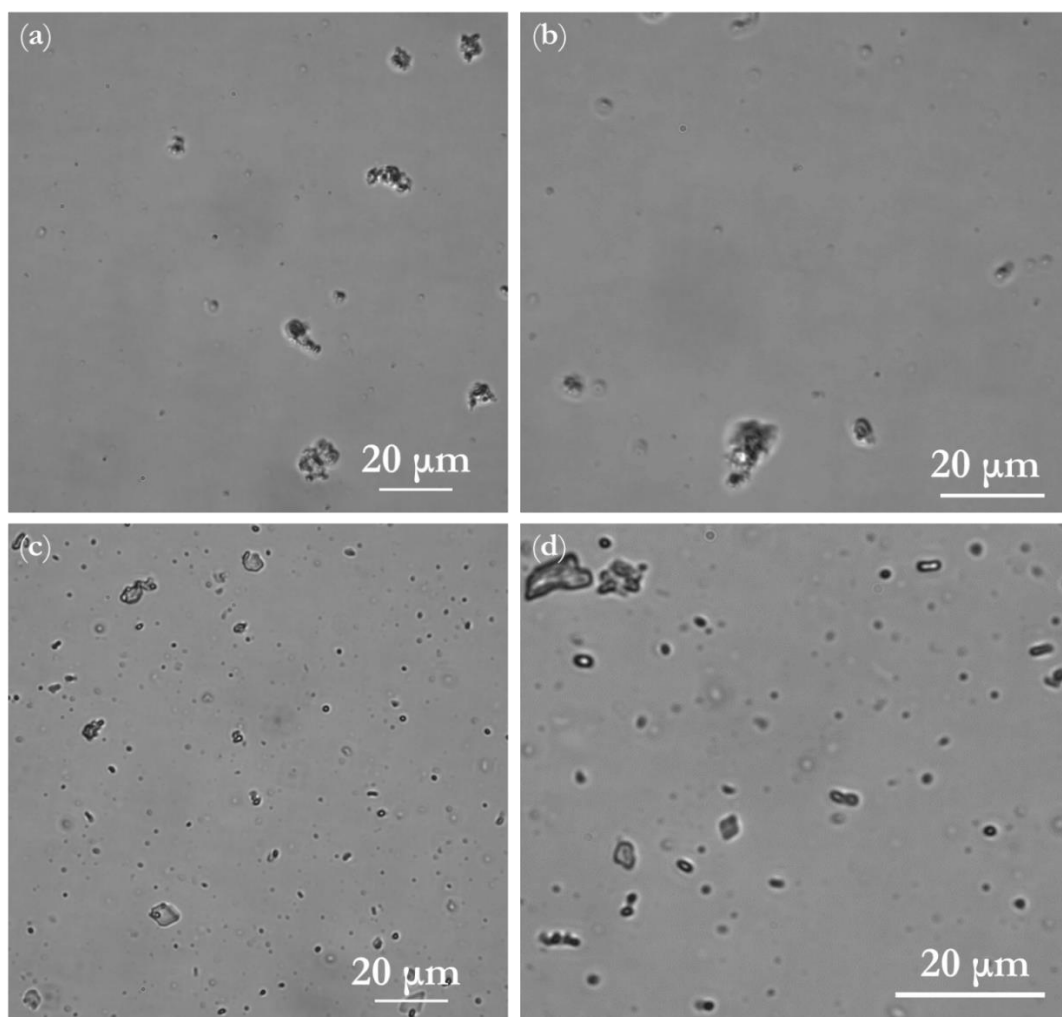
Slika 16: Morfološki pregled v fiziološki raztopini (0,9 % NaCl) pripravljenega homogenata iglic navadne smreke: (a) in (b) pri sobni temperaturi ter (c) in (d) pod pogoji mikrovalovne homogenizacije.

Analiza pod mikroskopom je pokazala, da vzorec homogenata, pripravljenega v fiziološki raztopini (0,9 % NaCl), še vedno vsebuje skupke delcev in aglomerate (**Slika 16**). Na videz vzorec izkazuje podobno organizacijo delcev kot tisti z uporabo deionizirane vode (**Slika 15**). Na panelu **Slike 16 (b)** zaznamo tudi večji celični delec z dvojno membrano, ki spominja na celični vezikel. Celični vezikel predstavlja samostojno strukturo delca, sestavljenega pretežno iz tekočine (ali plina), obdanega in zaprtega z zunanjo membrano, imenovano lipidni dvosloj. Lipidni dvosloj je sestavljen iz hidrofilnih glav in hidrofobnih repov, ki se tako združujejo. Čeprav so takšni delci podobni vakuolam, imajo celični vezikli tudi svoje specifične funkcije in sposobnosti. Lahko se na primer zlivajo z membranami drugih celic in opravljajo točno določene funkcije (na primer razgradnje drugih celic) (Lewsley, 2020).

Preparat na **Slikah 16 (c) in (d)** pri pogojih mikrovalovne homogenizacije v fiziološki raztopini vsebuje (tudi glede na deionizirano vodo) več manjših delcev, ki prav tako tvorijo različne

matematične strukture in oblike; predvsem so očitni tisti, ki vsebujejo dvojno membrano ter podobno kot pri sobni temperaturi (**Slika 16 (a) in (b)**) vsebujejo veziklom podobne delce. Zaključimo lahko, da je fiziološka raztopina poleg rastlinskega tkiva omogočala odpiranje tudi večjih aglomeriranih delcev in skupkov ter ustvarila pomemben prispevek pri nastanku manjših celičnih delcev, tudi takšnih, podobnih celičnim veziklom.

4.4 MORFOLOŠKE LASTNOSTI CELIČNIH DELCEV HOMOGENATOV IGLIC NAVADNE SMREKE V 9,0 % RAZTOPINI NATRIJEVEGA Klorida



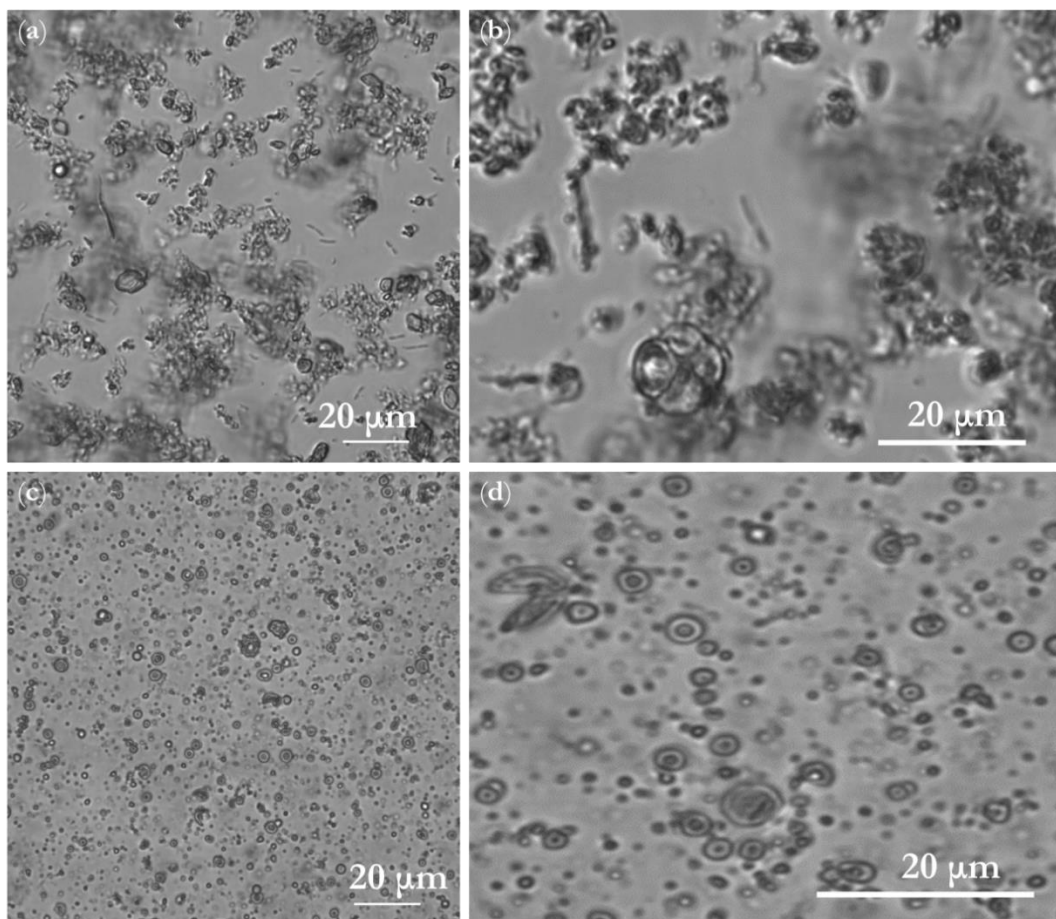
Slika 17: Morfološki pregled v 9,0 % NaCl pripravljenega homogenata iglic navadne smreke: (a) in (b) pri sobni temperaturi ter (c) in (d) pod pogoji mikrovalovne homogenizacije.

Morfološki pregled homogenata, pripravljenega v 9,0 % raztopini NaCl, pri sobni temperaturi (**Slika 17 (a) in (b)**) v primerjavi s fiziološko raztopino (**Slika 16 (a) in (b)**) izkazuje manjšo koncentracijo celičnih delcev ter veliko skupkov delcev in aglomeratov. Zaznali smo nastanek

predvsem krogelnih oblik delcev majhnih dimenzij. Homogenizacija z mikrovalovi (**Slika 17 (c)** in **(d)**) je prinesla veliko materiala manjših dimenzij, glede na fiziološke pogoje nekoliko manj. Zaznali smo predvsem morfološko heterogene strukture, različnih velikosti in (matematičnih) oblik.

Glede na rezultate lahko zaključimo, da je vsebnost soli skupaj z mehansko silo in temperaturo ključno pripomogla k homogenizaciji rastlinskega tkiva in izplenu nastalih delcev. Rezultati kažejo, da koncentracija soli ključno vpliva na nastanek in morfologijo nastalih celičnih struktur. V primerjavi z le-to pa deionizirana voda kot delovni medij izkazuje nastanek skupkov in aglomeratov delcev, ki jih z uporabo termične energije preko mikrovalov lahko ustrezno razgradimo na manjše enote.

4.5 CELIČNI DELCI HOMOGENATA PO 1-TEDENSKEM »STARANJU« V DEIONIZIRANI VODI

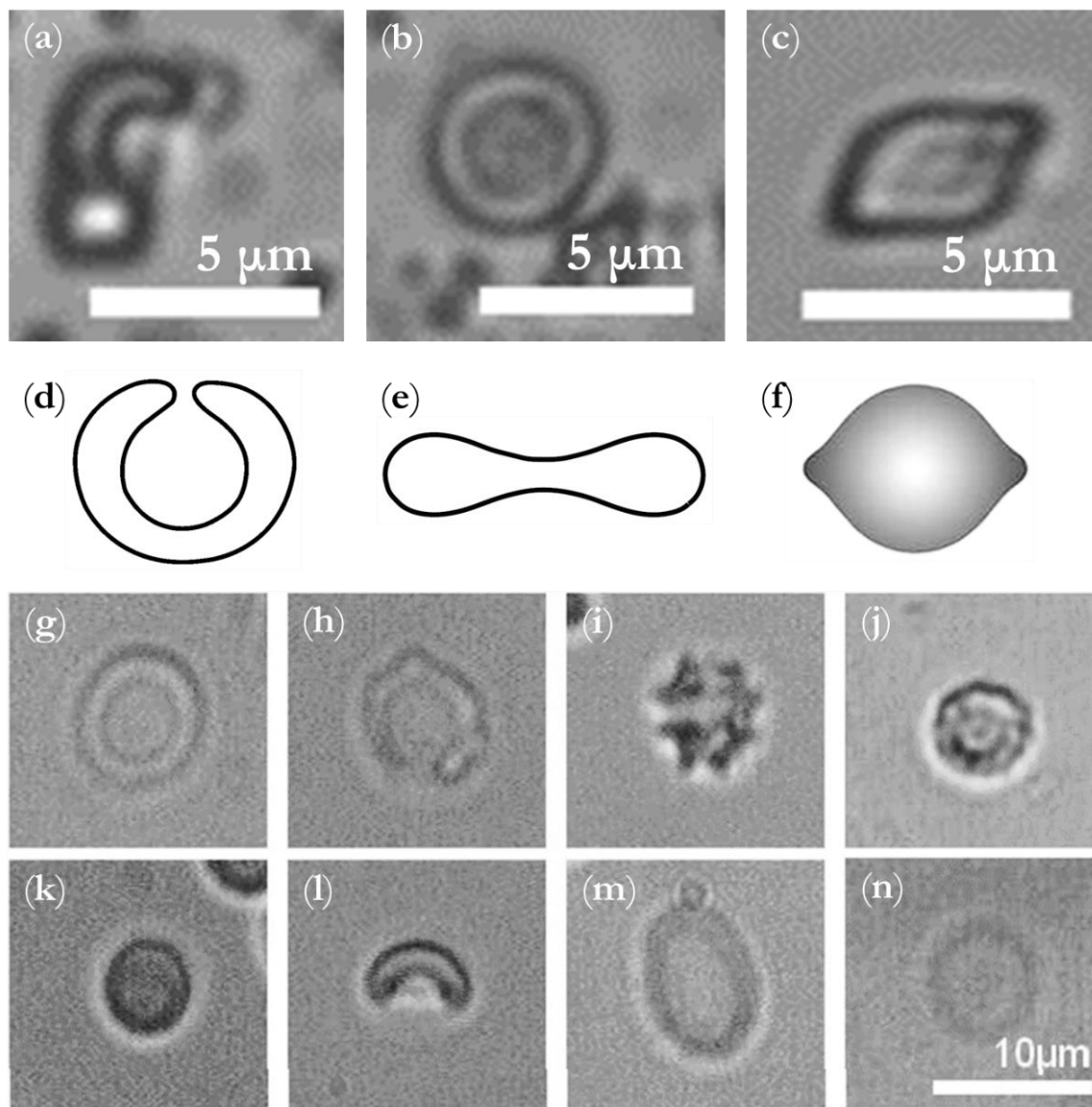


Slika 18: Morfološki pregled v deionizirani vodi pripravljenega homogenata iglic navadne smreke, »staranega« 1 teden na sobni temperaturi: (a) in (b) pripravljenega pri sobni temperaturi ter (c) in (d) pod pogoji mikrovalovne homogenizacije.

Slika 18 prikazuje morfologijo delcev, nastalih z obdelavo iglic v deionizirani vodi po 1-tedenskem »staranju« vzorca pri sobni temperaturi. Vzorec, predhodno pripravljen pri sobni temperaturi (Slika 18 (a) in (b)), je vseboval veliko delcev različnih morfoloških dimenzij. Jasni so aglomerati in skupki delcev, sestavljeni iz majhnih celičnih delcev, ostankov trganih celičnih membran in tudi ostankov rastlinskega tkiva, manjših od dimenzij filtra, s katerim je bila raztopina pred staranjem filtrirana (pod 4-12 μm). Tedenska izpostavitve vzorca homogenata sobni temperaturi je tako pokazala, da lahko delci skozi daljše časovno obdobje koncentrirajo delce v mikroskopski notranjosti in pripomorejo k večji razgradnji. Ne moremo povsem trditi, da je skozi tedensko staranje vzorec ostal popolnoma sterilen, saj je v njem možno zaznati bakterije rodu *Bacillus* (bacil). Za potrditev domneve bi bilo potrebno preveriti morfologijo preparata še pri večjih povečavah, na primer z uporabo vrstične elektronske mikroskopije (SEM) ali selektivnega barvanja oz. označevanja bakterijskih celic.

Pri staranem vzorcu homogenata, pripravljenega z uporabo mikrovalov (Slika 18 (c) in (d)), je nastala povečana koncentracija z membrano obdanih celičnih delcev, podobnih delcem krvnih celic, predvsem različnih morfoloških oblik in heterogenih dimenzij. V splošnem je izplen delcev izjemno velik. Fragmentov morebitnih bakterijskih kultur ni mogoče zaznati, saj je mikrovalovna aktivacija homogenizacije poleg fragmentacije skupkov in aglomeratov omogočala tudi sterilizacijo končnega vzorca. Očitno je, da vzorec skozi daljše obdobje staranja pod omenjenimi pogoji spremeni lastnosti na mikroskopski skali. Predvsem velja omeniti nastanek stabilnih celičnih struktur, ki skozi svoje obdobje staranja ne spreminjajo sestave in jih je verjetno za daljše obdobje mogoče hraniti v raztopini z zmanjšano koncentracijo soli, ki vzorcu dodatno ne omogoča povečanega efekta osmoze in posledično pokanja nastalih delcev.

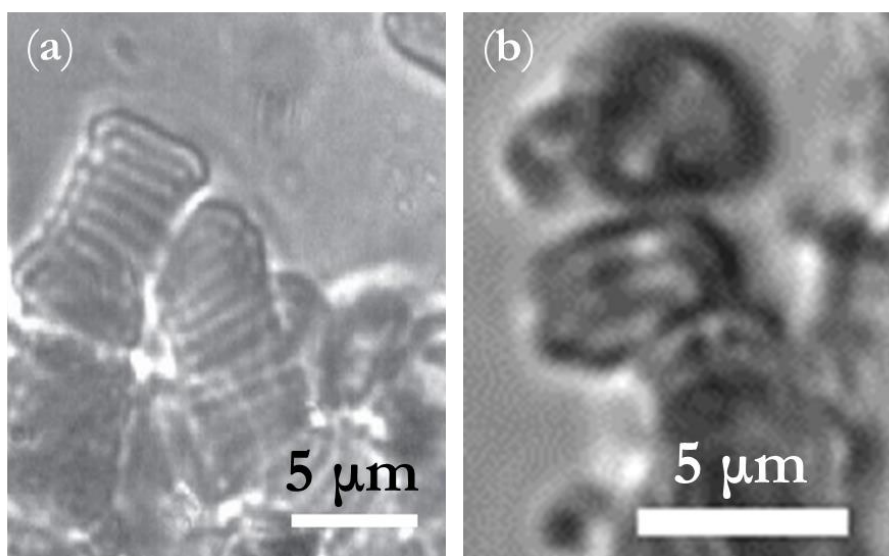
4.6 FIZIKALNO-MATEMATIČNI OPIS CELIČNIH DELCEV IGLIC NAVADNE SMREKE



Slika 19: Prikaz primerov celičnih delcev z gladkimi konturami: (a)-(c) v homogenatu iglic navadne smreke na modelu 9,0 % raztopine NaCl, z uporabo mikrovvalov, in (d)-(f) modeli teoretičnih oblik, ki ustrezajo oblikam z minimalno energijo membrane (Mesarec idr., 2014; Kralj-Iglič idr., 2022; Jeran idr., 2023). Oblike eritrocitnih struktur: (g) diskocit, (h) rožičasta oblika, (i) ehinocit, (j) ehinosferocit, (k) sferocit, (l) stomatocit, (m) eliptocit in (n) duh (Vehovar, 2018).

Morfološke oblike z membrano obdanih delcev so bile teoretično določene s t.i. minimumom proste energije membrane (Jeran idr., 2023; Kralj-Iglič idr., 2022; Mesarec idr., 2014). Gre za energijo, ki je potrebna, da do tvorbe membrane sploh pride. Slednje bi lahko razložili tudi na primeru milnice. Ko zanko neke oblike pomočimo v milnico, se na način, da se zmanjša površina, naravno napne membranska struktura.

Oblike delcev (**Slika 19 (d)–(f)**) je mogoče opisati z različnimi fizikalnimi parametri, kot je razmerje med prostornino in površino (imenovano relativni volumen) in povprečno ukrivljenostjo membrane. Oblike delcev, nastalih v homogenatih iglic navadne smreke, ki ustrezajo teoretičnim oblikam (**Slika 19 (a)–(c)**) so bile očitno izražene predvsem v homogenatih, pripravljenih s pomočjo mikrovalov. Ustreden dodatek soli (0,9 in 9,0 % NaCl) je nastanek omenjenih delcev formiral tudi pri sobni temperaturi. V splošnem je bilo zaznanih več stomatocitnih in diskocitnih oblik.



Slika 20: (a) Prikaz združevanja krvnih eritrocitov v rouleaux in vitro pogojih (Arko idr., 2022) in (b) stanja faze rouleaux po 1-tedenskem »staranju« homogenata iglic navadne smreke, pripravljenega v deionizirani vodi.

Pri morfološki analizi vzorca homogenata iglic navadne smreke v deionizirani vodi, »staranega« 1 teden, je bilo mogoče opaziti t.i. *rouleaux*, ki spominja na združevanje krvnih eritrocitov (**Slika 20**). Tvorba rdečih krvnih celic (eritrocitov) *rouleaux* je reverzibilen pojav, ki se običajno pojavi med nizkim pretokom krvi in majhnimi strižnimi silami v obtoku. Določena patološka stanja tako lahko spremenijo molekularno sestavo krvi in posledično lastnosti eritrocitov, kar povzroči povečano združevanje v tvorbo *rouleaux*. Posledica nastanka takšne tvorbe je oslABLJENA perfuzija in oksigenacija tkiv. Pojav *rouleaux* je mogoče opaziti pri zdravem darovalcu, lahko pa je povezan tudi s številnimi stanji, kot so maligna obolenja, bolezni vezivnega tkiva, vnetja, sladkorna bolezen, nosečnost in podobno (Suarez, 2016).

Analogijo opisanega pojava smo opazili prav tako pri homogenatu smrekovih iglic v deionizirani vodi. Najverjetneje je združevanje poteklo skozi 1-tedensko staranje, saj le-tega nismo zaznali takoj po običajni pripravi. Sklepamo lahko, da je skozi daljšo časovno izpostavljenost vzorca v

deionizirani vodi v tekočem homogenatu prišlo do različnih fizikalnih sprememb. Predvsem tu sklepamo na prispevek osmoze, nastanek in vzpostavitev ionskega ravnovesja ob razgradnji večjih skupkov in aglomeratov na manjše (stabilne) delce, vpliv nihanja temperature v prostoru in podobno. Strižne sile smo pri pripravi uvedli zgolj pri pripravi homogenata že v začetni fazi, ko je bilo rastlinsko tkivo deformirano. Kasnejše konkretne uporabe strižnih sil ni bilo, zato se pri nastanku združevanja *rouleaux* opiramo zgolj na fizikalne parametre izpostavljeni tekočini.

5 ZAKLJUČEK

Z namenom interdisciplinarne povezave v naravoslovju smo pri raziskovalnem delu združili znanja kemije in fizike v bioloških sistemih in s tem kakovostno razložili opazovan sistem. Menimo, da je takšen pristop pri vsakodnevnem raziskovanju zelo pomemben, saj delo še dodatno osmisli. V tem duhu smo skozi posamezne faze dela delovali tudi mi. Ugotovili smo, da je za tak preplet potrebnih veliko znanja in izkušenj. Pri delu smo se srečali z mnogimi metodami in tehnikami, ki jih bomo zagotovo srečali še skozi življenje in z njimi krojili svoje poklicno področje. Vsekakor se naše delo na tej točki ne konča, temveč nadaljuje, saj nam je prineslo toliko zadovoljstva in sreče, da si želimo z nadaljnjim delom pomagati pri razvoju področja. Skozi poglobljeno izobraževanje bo mogoče osvojeno znanje prenesti na višjo stopnjo in z izkušnjami graditi področje.

Raziskovalno delo sta usmerjala cilj in hipoteza. *Predvidevali smo, da bo ob pomoči različnih načinov priprave vodnih homogenatov mogoče zaznati razliko v nastanku celičnih delcev in njihovi morfologiji. Dodali smo še, da se bo največ le-teh formiralo ob pomoči povišane temperature, z uporabo mikrovalov.*

Prvi del hipoteze lahko potrdimo, saj so glede na medije, v katerih smo pripravljali homogenate, vzorci na mikroskopski ravni izkazovali različne identitete. Pri sobni temperaturi so se v večjem obsegu pojavili večji delci, skupki in aglomerati delcev, ki jih očitno pri povišani temperaturi ne opazimo. Pod pogoji mikrovalovne homogenizacije smo tako zaznali večjo vsebnost manjših celičnih delcev različnih velikosti in oblik. Zvišana temperatura do 45 °C poveča prepustnost membrane zaradi rahljanja fosfolipidnih komponent. Nad navedeno temperaturo se denaturirajo membranski proteini, tako se poveča širjenje vode v celici in posledično nastane pritisk na membrano. Opisana deformacija membranske strukture povzroči, da membrana izgubi nadzor nad tem, kaj vstopa ali izstopa iz celice (Singh, 2021). Omenjeno potrjujejo tudi v tem delu opisani mikrovalovni eksperimenti. Po predhodni mehanski obdelavi iglic so le-te tudi pri višji temperaturi iz celic rastlinskega tkiva zaradi toplotnega »šoka« nenadzorovano sprostile vsebino v tekočino. Membrane celic so počile, formirali so se delci. Iz prostih membran so se tako oblikovali celični delci, nekateri izmed njih so verjetno nastali tudi z zlivanjem oz. združevanjem v večje oblike. Rezultati se skladajo tudi s teorijo fluidnosti membrane, saj velja, da je le-ta pri višjih temperaturah bolj tekoča kot pri nizkih. Ob nižjih temperaturah se membrana strdi in zaradi omejevanja gibanja molekul, ki sestavljajo membrano, postane bolj statična (Singh, 2021).

V obravnavanih raztopinah različnih slanosti (deionizirana voda, 0,9 in 9,0 % raztopina NaCl) smo predvidevali nastanek večjega števila delcev v fizioloških pogojih, pri 0,9 % raztopini NaCl.

Tudi drugi del domneve lahko potrdimo. Ravno fiziološka raztopina je v primerjavi z deionizirano vodo in 9,0 % raztopino NaCl izkazovala višje število delcev. Kljub temu da je homogenat v fiziološki raztopini vseboval skupke in aglomerate delcev, so bili v njem opazni tudi celični delci z dvojno membrano, ki spominjajo na vezikel. Opaženo je bilo, da je fiziološka raztopina vsebovala ravno pravšnjo koncentracijo soli, ki je zagotovila enakomeren potek osmoze in posledično zagotavljala stabilnost nastalih delcev. Blagi pogoji slanosti so na rastlinski material delovali učinkoviteje v primerjavi s tistimi, pri katerih je bila uporabljena $10 \times$ večja koncentracija soli. V 9,0 % raztopini NaCl se je formiralo manj delcev, opaznih je bilo tudi več skupkov in aglomeratov. Zaznali smo nastanek predvsem krogelnih oblik delcev majhnih dimenzij.

V zadnjem delu smo predvidevali, da bomo lahko glede na morfologijo nastalih delcev sklepali na lastnosti struktur delcev in jih na mikroskopski ravni povezali s celicami v bioloških sistemih.

Že iz nastanka celičnih delcev homogenatov v deionizirani vodi je bil očiten nastanek delcev z dvojno membrano, kar se je izrazilo še v nadaljnjih poskusih v uporabljenih raztopinah soli in predvsem v 1 teden »staranem« v deionizirani vodi. Tudi ta del hipoteze lahko z gotovostjo potrdimo. V homogenatih iglic smo uspeli zaznati delce z minimalno energijo membrane, ki delujejo podobno tistim iz človeških celic. V splošnem je bilo zaznanih več stomatocitnih in diskocitnih oblik.

Raziskovalno delo nam je dalo ogromno novega znanja in predvsem novega pogleda na svet. Kljub temu da je smúti kot pripravek zaradi učinkovin v sadju in zelenjavi zelo zdravilen, smo »odkrili« še eno njegovo dimenzijo – mikroskopski pogled. V »notranjosti« se pojavljajo delci, za katere morda sami sploh ne vemo, kje vse so pomembni. Kljub temu da so delci res majhni, so v nekem smislu lahko celo nosilci biološko aktivnih spojin oz. življenja. Skozi delo smo gojili spoštljiv odnos do okolja in uporabili obnovljiv vir. Ker nas skozi vsakdan spremlja mnogo sintetičnih učinkovin, je vredno razmisliti, kaj ponuja narava. Narava nam ponuja ogromno učinkovin, a jih moramo znati uporabiti, ne da bi ji škodovali. Imamo zgolj en planet, zato je potrebno z njim ravnati preudarno in skrbno. Prav je, da podarjene dobrine ohranjamo in jih negujemo za prihodnje generacije.

6 LITERATURA

- Aktivni.si. Smrekovi vršički: zdravi nas že samo zrak v smrekovem gozdu (2020). Dostopno na spletu: <https://aktivni.metropolitan.si/prehrana/smrekovi-vrsicki/> (Obiskano 18. januar 2023).
- Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. (2002). The lipid bilayer. 4. Edition, New York: Garland science. Dostopno tudi na spletu: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26871/>
- Arko, M.; Romolo, A.; Šuštar, V.; Kralj-Iglič, V. Role of erythrocyte sedimentation rate (ESR) in preparation of platelet and extracellular vesicles rich plasma. *Proc. Soc. Lect.* **2022**, 7, 160-165. <https://doi.org/10.55295/PSL.2022.D23>
- Bardell, D. The Invention of the microscop. *Bios* **2004**, 75, 2, 78-84. <https://www.jstor.org/stable/4608700>
- Beiser, R. (2019). Drevesa in ljudje. Ljubljana: Mladinska knjiga. Str. 127.
- Britannica, The Editors of Encyclopaedia. (2011). Cortex, plant tissue. Dostopno na spletu: <https://www.britannica.com/science/cortex-plant-tissue> (Obiskano 17. februar 2023).
- Britannica, The Editors of Encyclopaedia. (2022a). Cell membrane, biology. Dostopno na spletu: <https://www.britannica.com/science/cell-membrane> (Obiskano 17. februar 2023).
- Britannica, The Editors of Encyclopaedia. (2022b). Stomate. Dostopno na spletu: <https://www.britannica.com/science/stomate> (Obiskano 17. februar 2023).
- Brus, R. (2004). Drevesne vrste na Slovenskem. Ljubljana: Mladinska knjiga. Str. 28.
- Bukhanko, N.; Attard, T.; Arshadi, M.; Eriksson, D.; Budarin, V.; idr. Extraction of cones, branches, needles and bark from Norway spruce (*Picea abies*) by supercritical carbon dioxide and soxhlet extractions techniques. *Ind. Crops Prod.* **2020**, 145, 112096, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112096>
- Čater, N. Navadna smreka (*Picea abies*) kot vir biološko aktivnih macerarov in homogenatov. Raziskovalno delo, Osnovna šola Primoža Trubarja Laško, Laško ter Univerza v Ljubljani, Zdravstvena fakulteta in Fakulteta za elektrotehniko, Ljubljana, Slovenija, **2022**. Dostopno na spletu: <https://www.knjiznica-celje.si/raziskovalne/4202105732.pdf>
- Černe, A. Nastajanje lesa in smreke v rastni sezoni 2009. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Ljubljana, Slovenija, **2016**. Dostopno na spletu: http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/lesarstvo/vs_cerne_andrej.pdf
- Donaldson, L.; Williams, N. Imaging and spectroscopy of natural fluorophores in pine needles. *Plants* **2018**, 7, 10. <https://doi.org/10.3390/plants7010010>
- Godec, G.; Glažar, A. S.; Grubelnik, L. Osnovna zgradba celice. V Naravoslovje 6: i-učbenik za naravoslovje v 6. razredu osnovne šole, Zmazek, B., ur.; Grubelnik, V., ur.; Mušinović Zadravec, T., ur.; Zavod RS za Šolstvo: Ljubljana, Slovenija, **2015**; str. 99-101. Dostopno na spletu: <https://eucbeniki.sio.si/nar6/1500/index4.html> (Obiskano 31. januarja 2023).
- Jamšek, S.; Sajovic, I.; Godec, A.; Vrtačnik, M.; Wissiak Grm, K.; idr. Kateri elementi sestavljajo organske spojine? V Kemija, i-učbenik za kemijo v 9. razredu osnovne šola, Vrtačnik, M., ur.; Zavod RS za Šolstvo: Ljubljana, Slovenija, **2014**; str. 8-9. Dostopno na spletu: <https://eucbeniki.sio.si/kemija9/1302/index2.html>

- Jeran, M. Navadna smreka (*Picea abies*) kot vir aktivnih učinkovin. Trdoživ: Bilten slovenskih terenskih biologov in ljubiteljev narave **2020**, 9, 2, 22-24. https://issuu.com/trdoziv/docs/trdoziv18_web_v01/s/11878727
- Jeran, M.; Barrios-Francisco, R.; Kralj-Iglič V. Biološko aktivne učinkovine v navadni smreki (*Picea abies*): razumevanje kemijskih lastnosti limonena pri njegovi uporabi in vsestranski biološki aktivnosti. Kemija v šoli in družbi **2021a**, 1, 1-6. <https://www.kemija.net/clanek/1755>
- Jeran, M.; Božič, D.; Novak, U.; Hočevar, M.; Romolo, A.; idr. European spruce (*Picea abies*) as a possible sustainable source of cellular vesicles and biologically active compounds. V Proceedings of Socratic lectures, 5th international minisymposium (April 2021), Kralj-Iglič, V., ur.; University of Ljubljana, Faculty of Health Sciences: Ljubljana, Slovenija, **2021b**, str. 104-113. https://www.zf.uni-lj.si/images/stories/datoteke/Zalozba/Sokratska_5.pdf
- Jeran, M.; Pečan, L. I.; Barrios-Francisco, R. Interdisciplinary insight on European spruce (*Picea abies*): biologically active compounds and their usage. *Proc. Soc. Lect.* **2022**, 6, 64-70. <https://doi.org/10.55295/PSL.2021.D.009>
- Jeran, M.; Romolo, A.; Spasovski, V.; Hočevar, M.; Novak, U.; Štukelj, R.; Šuštar, V.; Kisovec, M.; Bedina Zavec, A.; Kogej, K.; Iglič, A.; Trebše, P.; Kralj-Iglič, V. Small cellular particles from european spruce needle homogenate. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, 24, 4349. <https://doi.org/10.3390/ijms24054349>
- Kavšek, P. (2018). Gozdna kuhinja. Ljubljana: Založba Kmečki glas. Str. 60.
- Klenovšek, T. Stabilnost membrane orjaških fosfolipidnih mehurčkov, pripravljenih z metodo elektroformacije. Raziskovalno delo, Osnovna šola Primoža Trubarja Laško, Laško ter Univerza v Ljubljani, Zdravstvena fakulteta in Fakulteta za elektrotehniko, Ljubljana, Slovenija, **2021**. Dostopno na spletu: <https://www.knjiznica-celje.si/raziskovalne/4202105732.pdf>
- Kralj-Iglič, V.; Pocsfalvi, G.; Iglič, A. Morphology and formation mechanisms of cellular vesicles harvested from blood. V: Extracellular vesicles: role in diseases, pathogenesis and therapy, Paul, M. K., ur., IntechOpen, London, UK, **2022**, str. 1-18. <https://dx.doi.org/10.5772/intechopen.101639>
- Kramar, S. Mikroskopija. V Priročnik: muzejska konzervatorska in restavratorska dejavnost, Skupnost muzejev Slovenije, Ljubljana, Slovenija, **2015**, 2, 6.3.2, 1-4. http://www.sms-muzeji.si/ckfinder/userfiles/files/6-3-2-2015_p.pdf
- Kure, S. Fenolne spojine in fluidnost celičnih membran. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Ljubljana, Slovenija, **2006**. Dostopno na spletu: <https://repozitorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=133643&lang=slvi>
- Lewsley, J. What are vesicles, and how do they work. *Medical News Today* **2020**. Dostopno na spletu: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/vesicle#structure> (Obiskano 21. februar 2023).
- Ličar, P. (1992). Biologija celice: zoološki del za študente 1. letnika živilske tehnologije. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo. Str. 20-23.
- Lombard, J. Once upon a time the cell membranes: 175 years of cell boundary research. *Biol. Direct.* **2014**, 9, 32, 1-35. <https://doi.org/10.1186/s13062-014-0032-7>
- Mapnall. (2012). Zemljevid – Občina Laško. Dostopno na spletu: http://www.mapnall.com/sl/Zemljevid-Ob%C4%8Dina-La%C5%A1ko_1399165.html (Obiskano 23. januar 2023).

- Mayer, J.; Schweigler, H. W. (2005). Katero drevo je to? Drevesa, grmi, okrasne lesnate rastline. Kranj: Narava. Str. 256.
- McCartney, D.; Rattray, M.; Desbrow, B.; Khalesi, S.; Irwin, C. Smoothies: Exploring the attitudes, beliefs and behaviours of consumers and non-consumers. *Curr. Res. Nutr. Food Sci.* **2018**, 6, 2, 425-436. <https://dx.doi.org/10.12944/CRNFSJ.6.2.17>
- Mesarec, L.; Fošnarič, M.; Penič, S.; Kralj-Iglič, V.; Kralj, S.; Gózdź, W.; Iglič, A. Numerical study of membrane configurations. *Adv. Condens. Matter Phys.* **2014**, 2014, 373674. <https://doi.org/10.1155/2014/373674>
- Mildner, B. (ni leta). Biološke membrane, struktura i dinamika. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet (repozitorij). Dostopno na spletu: https://www.pmf.unizg.hr/_download/repository/14obk-_p13-biološke_membrane.pdf (Obiskano 11. januar 2021).
- Monique. (2016). Fiziološka raztopina – kako jo naredimo doma? Dostopno na spletu: <https://obliznprste.si/nekulinaricni-nasveti/fizioloska-raztopina-kako-jo-naredimo-doma/> (Obiskano 22. januar 2023).
- Petruzzello, M. (The Editors of Encyclopaedia Britannica). (2022). Xylem, plant tissue. Dostopno na spletu: <https://www.britannica.com/science/xylem> (Obiskano 17. februar 2023).
- Pikering, W. R. (1996). Biologija – Shematski pregledi. Ljubljana: Tehniška založba Slovenije. Str. 32.
- Podobnik, A.; Devetak, D. (1997). Biologija 4 in 5 – Raznolikost živih bitij 1 in 2. Ljubljana: DZS. Str. 85-86.
- Sedušak Kljakič, A.; Remškar, H. Protimikrobno delovanje macerata iglic navadne smreke (*Picea abies*) na bakterije *Legionella pneumophila*. Raziskovalno delo, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola; Univerza v Ljubljani, Zdravstvena fakulteta, Fakulteta za elektrotehniko, Ljubljana, Slovenija, **2020**.
- Shechter, D. (BEE International). (2019). What is the purpose of homogenization? Dostopno na spletu: <https://www.beei.com/blog/author/deb-shechter/page/2> (Obiskano 20. december 2022).
- Singh, A. Membranes, science: Factors affecting cell membrane permeability and fluidity. Conduct Science, (2021). Dostopno na spletu: <https://conductscience.com/factors-affecting-cell-membrane-permeability-and-fluidity/> (Obiskano 26. februar 2023).
- Stušek, P. (2007). Celica (Učbenik za strokovne in tehniške gimnazije). Ljubljana: DZS. Str. 25.
- Stušek, P.; Vilhar, B. (2010). Biologija celice in genetika (Učbenik za biologijo v programih gimnazijskega izobraževanja). Ljubljana: DZS. Str. 20, 154.
- Suarez, H. (Sonographic tendencies). (2016). Rouleaux. Dostopno na spletu: <https://sonographictendencies.com/2016/11/05/rouleaux/> (Obiskano 23. februar 2023).
- Thorn, K. A quick guide to light microscopy in cell biology. *Mol. Biol. Cell.* **2017**, 27, 2, 219-222. <https://doi.org/10.1091/mbc.e15-02-0088>
- Turk, T.; Maček, P.; Anderluh, G.; Sepčič, K. (1997). Biokemijski praktikum. Ljubljana: Študentska organizacija Univerze, Zbirka Scripta. Str. 19-21.
- Vedantu. (2023). Introduction to homogenization. Dostopno na spletu: <https://www.vedantu.com/chemistry/homogenization> (Obiskano 20. december 2022).

Vehovar, U. Merjenje vpliva učinkovin na obliko eritrocitov s primerjavo reprezentativnih populacij. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena fakulteta, Ljubljana, Slovenija, **2018**. Dostopno na spletu: <https://repozitorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=111168&lang=eng>

Zavod za gozdove Slovenije. (2022). Poročilo zavoda za gozdove Slovenije o gozdovih za leto 2021. Dostopno na spletu: http://www.zgs.si/fileadmin/zgs/main/img/PDF/LETNA_POROCILA/2021_Porocilo_o_gozdovih_ZGS.pdf (Obiskano 19. december 2022).

Zorko M. (ni leta). Biokemija 1 (MF), predavanja: Biološke membrane in transport. Dostopno na spletu: <http://ibk.mf.uni-lj.si/teaching/biokemija1/predavanja/predavanje29Z13.pdf> (Obiskano 24. januar 2023).

Zupančič, D. Mikroskopiranje, mikroskopske metode in celični organeli. Študijsko gradivo, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biologijo celice, Ljubljana, Slovenija, 1. izdaja, **2015**. Dostopno na spletu: https://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/e-knjige/LBM_Celicna_biologija_z_genetiko_1_del_vaj.pdf

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

7 DODATEK

Tabela 1: Količine topila in topljenca pripravljenih raztopin.

% Topljenca v končni raztopini	m (topljenca) [g]	m (topila) [g]	m (raztopine) [g]
0,9 % NaCl	18,0	182,0	200
9,0 % NaCl	1,8	198,2	200
0,1 % NaClO	8,3	491,7	500