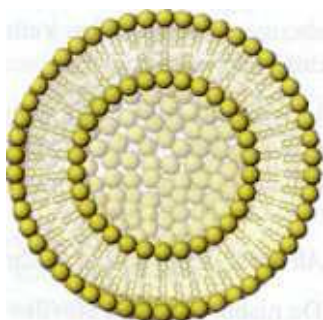


Organske mikro- in nanocevkke



Slika 1: Shematični prikaz majhnega okroglega liposoma, katerega membrana je sestavljena iz dvojne plasti fosfolipidnih molekul. Fosfolipidna molekula je sestavljena iz hidrofilne polarne glave in dveh nevtralnih hidrofobnih ogljikovodikovih verig. Polarne glave fosfolipidnih molekul v zunanji plasti so v stiku z zunanjo vodno raztopino, glave fosfolipidnih molekul v notranji plasti pa z vodno raztopino v liposomu. Konci nevtralnih repov fosfolipidnih molekul v obeh plasteh so v stiku drug z drugim.



Veronika Kralj - Igljč in Aleš Igljč

V zadnjem desetletju je zelo naraslo zanimanje za raziskovanje anorganskih mikro- in nanocevk. Nanocevkke so določene z zunanjim polmerom, ki meri od nekaj nanometrov do nekaj sto nanometrov. Pred kratkim so opazili mikro- in nanocevkke tudi v organskih in bioloških sistemih. V tem prispevku poročamo o obstoju obstojnih organskih mikrocevk in nanocevk v umetnih fosfolipidnih sistemih ter v suspenziji rdečih krvnih celic. Morda so fosfolipidne nanocevkke pomembne tudi pri usmerjenem transportu skozi celično membrano.

Zanorganskimi mikro- in nanocevkami se v zadnjih letih ukvarjajo mnogi raziskovalci, saj so posebej zanimive zaradi uporabe pri razvoju novih tehnologij (2, 7, 3). Med najbolj raziskane anorganske nanocevkke spadajo ogljikove (2) ter volfram-žveplove in molibden-žveplove nanocevkke (7). Védjenja o organskih mikro- in nanocevkah pa je za zdaj še malo. V prihodnosti bodo morda uporabne pri uravnavanju kemijskih in fizikalnih procesov v celičnih sistemih, pa tudi v mikroelektroniki.

Na liposomih je mogoče preučevati lastnosti celične membrane

Fosfolipidne molekule se lahko v vodni raztopini organizirajo v fosfolipidne mehurčke – liposome, katerih membrano sestavlja dvojna plast fosfolipidnih molekul. Ker je zgradba membrane liposomov (slika 1) podobna zgradbi celične membrane (slika 2), znanstveniki na liposomih preučujejo nekatere lastnosti celične membrane in membrane celičnih organel (8).

Liposome ustvarjamo tudi v vsakdanjem življenju. Nastajajo pri pripravi palačink, ko stepamo jajca v vodi, ali pri umivanju las z naravnim šamponom, narejenim iz jajc in pepela. Jajčni rumenjaki namreč vsebuje fosfolipid lecitin. Sredi 19. stoletja so lecitin prvič izolirali v laboratoriju in sicer iz možganov in jajčnih rumenjakov. Iz tega časa lahko zasledimo tudi prve opise nastanka liposomov v vodni raztopini. Že leta 1854 so liposome opazili tudi pod mikroskopom in jih poimenovali »umetne celice«.

SLOVAR MANJ ZNANIH BESED

CELIČNA ORGANELA - Del citoplazme, ki je omejen s svojo lastno membrano (npr. mitohondrij, Golgijevo telesce in endoplazmatski retikulum).

ELEKTROFORMACIJA - Metoda priprave liposomov v nizkofrekvenčnem električnem polju.

ENDOCITOZA - Tvorba membranskih mehurčkov, ki se odlepijo od matične membrane na notranji strani celice ali organele.

FAZNO KONTRASTNI MIKROSKOP - Optični inštrument, sestavljen iz kombinacije leč. Z njim lahko opazujemo zelo majhne predmete, ki se razlikujejo po lomnem količniku.

FLUORESCENČNI MIKROSKOP - Optični inštrument, sestavljen iz kombinacije leč. Z njim lahko opazujemo zelo majhne predmete, ki oddajajo vidno svetlobo določene valovne dolžine.

FOSFOLIPID - Molekula, v kateri sta dve glikovodikovski verigi zaestreni na fosforno kislino, vsebuje pa tudi ostanek glicerola in značilno glavo.

HIDROFILNOST - Stik molekul z molekulami vode je energijsko ugoden.

HIDROFOBNOŠT - Stik molekul z molekulami vode je energijsko neugoden.

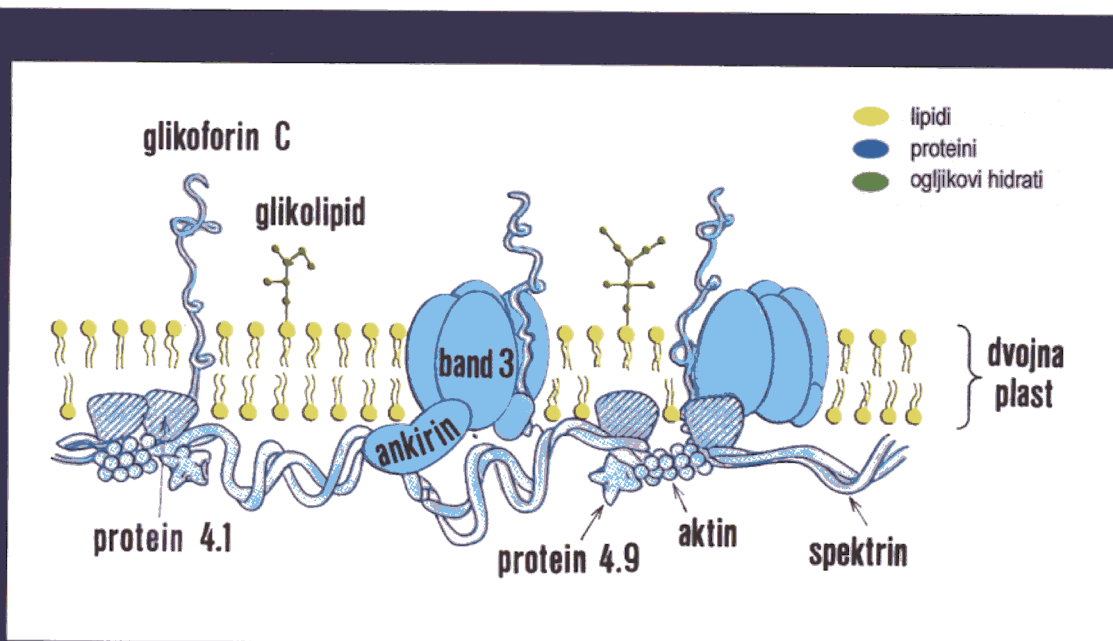
LIPOSOM - Fosfolipidni mehurček, katerega membrano sestavlja dvojna plast fosfolipidnih molekul.

MIKROMETER (μm) - Tisočinka milimetra.

NANOMETER (nm) - Milioninka milimetra.

VEZIKEL - Mehurček, ki nastane iz majhnega dela biološke membrane. Molekularna sestava membrane vesikla običajno ni popolnoma enaka sestavi membrane matične celice ali organele.

VEZIKULACIJA - Tvorba membranskih mehurčkov, ki se odlepijo od matične membrane na zunanji strani celice ali organele.

**SLIKA 2: STRUKTURA CELIČNE MEMBRANE**

Kot primer celične membrane je na risbi shematsko prikazana membrana rdeče krvne celice. Osnovni gradnik celičnih membran je lipidna dvojna plast, ki jo sestavljajo fosfolipidne molekule in molekule

holesterola. Glave fosfolipidnih molekul so obrnjene navzven proti zunanji oziroma notranji raztopini. V lipidno dvojno plast celične membrane so vgrajene še nekatere druge molekule, na primer različni membranski proteini (na sliki označeno v modri barvi).

O avtorjih:

VERONIKA KRALJ - IGLJČ je doktorica iz fizike na Fakulteti za naravoslovje in tehnologijo Univerze v Ljubljani. Po diplomu se je zaposlila na Inštitutu za biofiziko Medicinske fakultete v Ljubljani, kjer dela še danes. Leta 2003 je bila na Medicinski fakulteti izvoljena v naziv izredne profesorice za biofiziko. Kot mentorica sodeluje pri raziskovalnem in pedagoškem delu na Ortopedski kliniki v Ljubljani, predava pa tudi na podiplomskem študiju na Fakulteti za elektrotehniko v Ljubljani. Od leta 1996 je tudi stalna zunanja sodelavka Oddelka za biologijo na univerzi Åbo Akademi na Finskem. V različnih domačih in mednarodnih publikacijah in revijah je do sedaj objavila več kot 100 prispevkov. Glavna področja njenega znanstvenega delovanja so fizika bioloških membran, celična biofizika ter biomehanika sklepnih površin. Med drugim je članica sledečih strokovnih združenj: European Biophysical Societies' Association, Société Internationale de Recherche Orthopédique et de Traumatologie ter International Society of Electrochemistry.

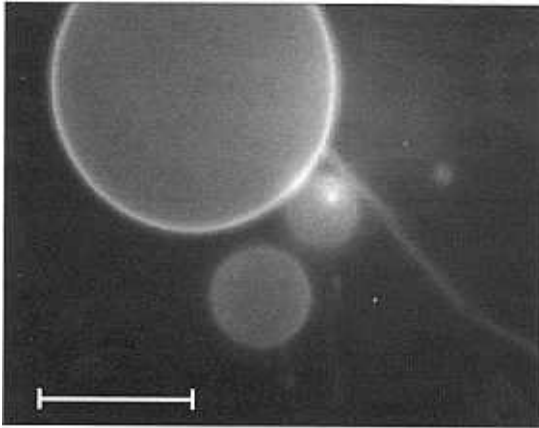
Kako veliki so liposomi in kako jih pripravljamo v našem laboratoriju?

V preteklosti so razvili različne metode za pripravo liposomov. Polmer kroglastih liposomov je lahko od nekaj deset nanometrov pa vse do nekaj deset mikrometrov (1, 8, 9), kar je odvisno od načina priprave liposomov. Ena od metod za pripravo velikih liposomov, ki dosegajo polmer do nekaj deset mikrometrov, je elektroformacija (1). Pri tej metodi liposomi rastejo v komori iz pleksi stekla, ki ima vgrajeni platinasti elektrodi. Prašek fosfolipidnih molekul raztopimo v mešanici kloroforma in metanola, naneseemo na elektrodi in pustimo, da tekočina izhlapi. Potem elektrodi, ki ju prekrivajo fosfolipidne molekule, zalijemo z vodno raztopino saharoze. Komoro zapremo, elektrodi pa priključimo na izmenično napetost s frekvenco 10 Hz. Tako imamo v prostoru med elektrodama spreminjajoče se elektromagnetno polje z amplitudo 1 kV/m. Ko postopoma zmanjšujemo jakost in frekvenco polja, na zunanji površini fosfolipidnega nanosa na elektrodah nastajajo liposomi.

Postopek traja nekaj ur. Po končani pripravi lahko liposome opazujemo pod faznokontrastnim mikroskopom. Če pa fosfolipidnim molekulam v prašku dodamo fluorescenčne označevalce, ki se v postopku priprave liposomov vgradijo v njihovo membrano, lahko opazujemo liposome tudi pod fluorescenčnim mikroskopom. Na Inštitutu za biofiziko Medicinske fakultete v Ljubljani in na Fakulteti za elektrotehniko v Ljubljani pripravljamo liposome z metodo elektroformacije.

Liposome povezujejo mikro- in nanocevk

Pri liposomih, ki so jih pripravili z metodo elektroformacije z dodanimi fluorescenčnimi označevalci, so Mathievet in sodelavci (8) opazili zanimiv pojav. Kadar so določen predel suspenzije liposomov osvetlili z lasersko svetlobo in tako na tem mestu zadušili fluorescenčni signal, so opazili, da se je že po dveh minutah v izbranem predelu opazovanega polja pod fluorescenčnim mikroskopom signal zopet pojavil. Ker so poznali hitrosti potovanja fosfolipidnih molekul po raztopini, so sklepali, da tega pojava ni mogoče opisati s prehajanjem fosfolipidnih molekul po raztopini z enega liposoma na drugega. Pojava tudi ni bilo mogoče razložiti z neposrednim izmenjevanjem fosfolipidnih molekul med liposomi v trenutku, ko ti zaradi neurejenega gibanja trčijo drug v drugega. Zato so Mathievet in sodelavci predpostavljali, da liposomi izmenjujejo membranske sestavine skozi mrežo nanocevk, ki povezujejo liposome v raztopini. Nanocevk pa so pretanke, da bi jih lahko opazili pod optičnim mikroskopom. Veljale pa so tudi za preveč krhke, da bi jih lahko ohranili za opazovanje pod elektronskim mikroskopom (8).



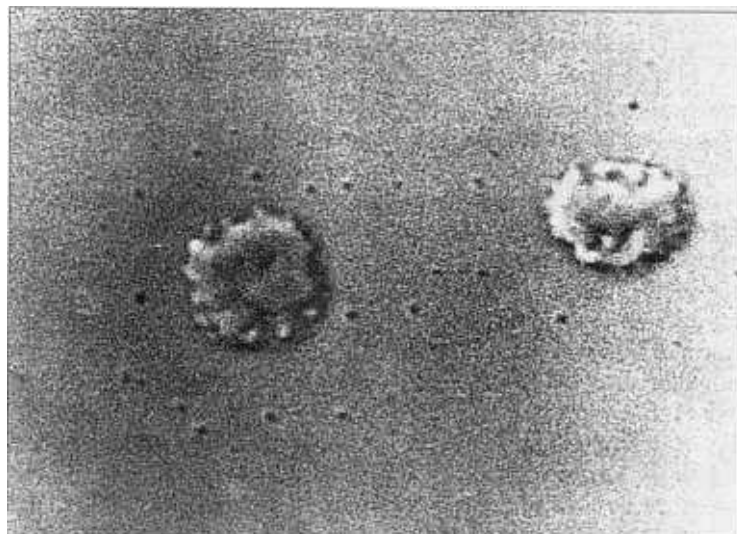
Slika 3: Liposom z dolgim tankim cevastim izrastkom, ki smo ga opazovali pod fluorescenčnim mikroskopom. Dolžina črtice na sliki je $20\ \mu\text{m}$ (prirejeno po Kralj-Iglič in sod., 2001a, © Elsevier).

In kaj smo opazili v našem laboratoriju ?

Pred kratkim smo na Inštitutu za biofiziko Medicinske fakultete v Ljubljani izvedli poskus (4, 6), pri katerem smo opazovali fosfolipidne nanocevkke, ki so na enem koncu pritrjene na liposom. Začetni polmer nanocevk je bil manjši od $100\ \text{nm}$, vendar so se opazovane nanocevkke postopoma debelile in krajšale, tako da smo jih lahko po določenem času opazili pod fluorescenčnim mikroskopom (slika 3). Z nekaj časovnega zamika smo jih lahko opazovali tudi pod faznokontrastnim mikroskopom.

Cevaste izrastke na liposomih opazimo ponavadi pol ure do uro po tistem, ko splaknemo liposome iz elektroformacijske komore, v kateri smo jih pripravili. Proces, v katerem raste polmer fosfolipidnih cevk od nekaj 100 nanometrov do nekaj mikrometrov, traja ponavadi nekaj ur. Mreža fosfolipidnih mikro- in

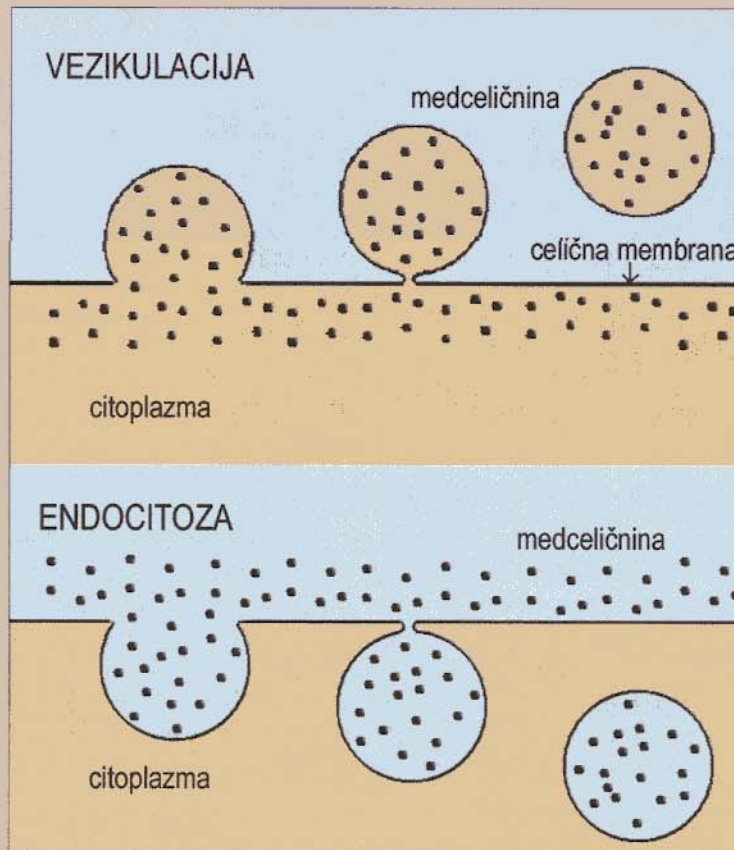
Slika 4: Vezikulacija človeških eritrocitov pod interferenčnim kontrastnim mikroskopom. Sinhrono gibanje matične celice in hčerinskih mehurčkov (veziklov) nakazuje, da so hčerinski mehurčki povezani z matično celico z nanocevkami. Premer matične celice je približno $5\ \mu\text{m}$ (prirejeno po Kralj-Iglič in sod., 2001b, © Elsevier).



O avtorjih:



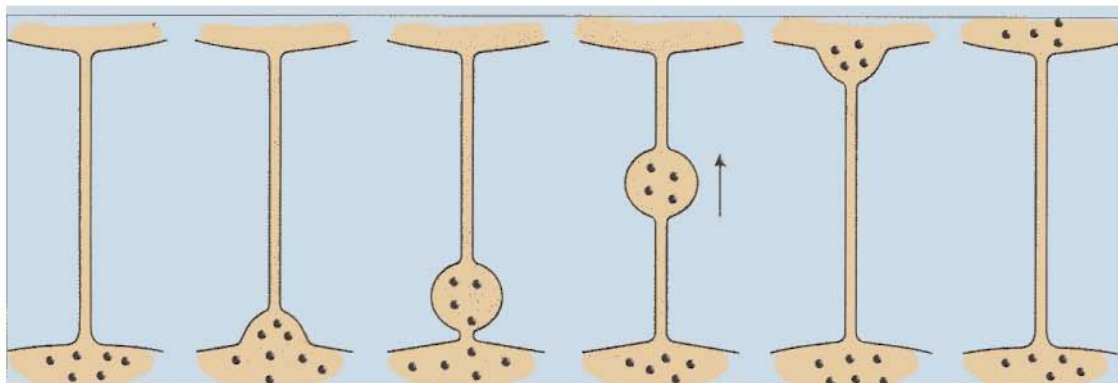
ALEŠ IGLJIČ je doktoriral iz fizike na Fakulteti za naravoslovje in tehnologijo ter iz elektrotehnike na Fakulteti za elektrotehniko, oboje na Univerzi v Ljubljani. Na Fakulteti za elektrotehniko je zaposlen kot izredni profesor. Od leta 1996 je tudi stalni zunanji sodelavec Oddelka za biologijo na univerzi Åbo Akademi na Finskem. Glavna področja njegovega znanstvenega delovanja so celična biofizika in biomehanika, fizika membran ter biomehanika kolka. V različnih domačih in mednarodnih publikacijah in revijah je do sedaj objavil več kot 100 prispevkov. Med drugim je član dveh strokovnih združenj: Biophysical Society (USA) in European Society of Biomechanics.



ILUSTRACIJA: B. LAZAR

Slika 5: Vezikulacija in endocitoza

Shematski prikaz tvorbe membranskih mehurčkov, v katerih se prenašajo snovi skozi celično membrano. Kadar mehurček potuje iz notranjosti celice v prostor zunaj celice, govorimo o vezikulaciji. Kadar potuje snov v mehurčku iz zunanosti celice v njeno citoplazmo, imenujemo pojav endocitoza.



nanocevk vpliva tudi na kasnejšo obliko liposoma. S tem, ko se cevke krajšajo in debelijo, se lahko del njihove membrane pomakne na liposom.

Z opisanim poskusom smo prvič neposredno potrdili obstoj fosfolipidnih mikro- in nanocevk v suspenziji liposomov, ki so jih pred tem Mathievet in sodelavci samo predpostavljali.

O možni vlogi organskih mikro- in nanocevk pri transportu snovi v celici

Dolge in tanke membranske strukture, kot so omenjene nanocevke, lahko obstajajo tudi v bioloških sistemih. To, na primer, nakazujejo poskusi z rdečimi krvnimi celicami (5). Rdeče krvne celice v nekaterih okoliščinah izločijo manjše membranske mehurčke – vezikle (slika 4). Ker je pod mikroskopom mogoče videti, da se matične celice in hčerinski mehurčki v suspenziji gibljejo usklajeno (sinhrono), sklepamo, da so hčerinski mehurčki z matično celico verjetno povezani z nanocevkami. Opazujemo lahko tudi posebno nihanje hčerinskih mehurčkov v smeri od površine matične celice in nazaj proti njej; videti je, kot da bi bili mehurčki pripeti na matično celico z nevidno vzmetjo. Iz tega sklepamo, da so lahko membranske nanocevke pomemben del membranskih struktur v celicah in medceličnem prostoru, vendar pa zaradi tanke in krhke zgradbe za zdaj ostajajo prikrite.

Prav mogoče je, da imajo membranske mikro- in nanocevke pomembno vlogo pri prenosu snovi med celicami ali pa med celičnimi organelami. Tak prenos (transport) bi lahko potekal neposredno skozi mikro- in nanocevke (9). Morda nanocevke tudi vodijo usmerjeni transport membranskih mehurčkov (slika 5), ki nastanejo pri endocitozi in vezikulaciji celice (3).

Slika 6: Shematski prikaz prenosa snovi v membranskih mehurčkih.

Snov (temne pike) je zajeta v okroglih membranskih mehurčkih, ki se usmerjeno gibajo med dvema celicama ali med dvema celičnima organeloma. Nanocevka usmerja mehurček od prve do druge membranske površine. Nanocevka ima pri tem podobno vlogo kot med bregovoma napeta jeklenica, ob kateri drsi brod čez reko.

LITERATURA

1. ANGELOVA, M. I., SOLEAU, S., MELEARD, P., FAUCON, J. F. IN BOTHOREL, P., 1992: Preparation of giant vesicles by external AC electric fields: kinetics and application.- Prog Colloid Polym Sci 89: 127-131.
2. FORRO, L., SCHÖNENBERGER, C., 2001: Carbon nanotubes, materials for the future.- Europhysics News 32: 86-90.
3. IGLIČ, A., HÄGERSTRAND, H., BOBROWSKA-HÄGERSTRAND, M., ARRIGLER, V., KRALJ-IGLIČ, V., 2003: Possible role of phospholipid nanotubes in directed transport of membrane vesicles.- Phys Lett A 310: 493-497.
4. KRALJ-IGLIČ, V., GOMIŠEK, G., MATHENG, J., ARRIGLER, V., IN SVETINA, S., 2001a: Myelin-like protrusions of giant phospholipid vesicles prepared by electroformation.- Coll Surf A 181: 315-318.
5. KRALJ-IGLIČ, V., IGLIČ, A., BOBROWSKA-HÄGERSTRAND, M., HÄGERSTRAND, H., 2001b: Tethers connecting daughter vesicles and parent red blood cell may be formed due to ordering of isotropic membrane constituents.- Coll Surf A 179: 57-64.
6. KRALJ-IGLIČ, V., IGLIČ, A., GOMIŠEK, G., SEVŠEK, F., ARRIGLER, V., IN HÄGERSTRAND, H., 2002b: Microtubes and nanotubes of a phospholipid bilayer membrane. J Phys A: Math Gen 35: 1533-1549.
7. KRALJ-IGLIČ, V., REMŠKAR, M., VIDMAR, G., FOŠNARIČ, M., IGLIČ, A., 2002a: Deviatoric elasticity as a possible physical mechanism explaining collapse of inorganic micro and nanotubes.- Phys Lett A 296: 151-155.
8. LASIC, D. D., 1993: Liposomes.- Amsterdam: Elsevier.
9. MATHIVET, L., CRIBIER, S., IN DEVAUX, P. F., 1996: Shape changes and physical properties of giant phospholipid vesicles prepared in the presence of an AC electric field.- Biophys J 70: 1112-1121.