

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Ajda OTA

**VPLIV NOSILNIH SISTEMOV NA INTERAKCIJE KOENCIMA Q₁₀ Z
MODELNIMI LIPIDNIMI MEMBRANAMI**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**IMPACT OF CARRIER SYSTEMS ON THE INTERACTION OF
COENZYME Q₁₀ WITH MODEL LIPID MEMBRANES**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2014

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 7.12.2011 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti, znanstveno področje prehrana. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Nataša Poklar Ulrih.

Doktorska naloga je zaključek interdisciplinarnega doktorskega študijskega programa Bioznanosti. Delo je bilo opravljeno v laboratorijih Katedre za biokemijo in kemijo živil, Oddeleka za živilstvo Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani, delno pa tudi v Laboratoriju za biofiziko na Inštitutu Jožef Stefan.

Mentorica: prof. dr. Nataša Poklar Ulrih

Komisija za oceno in zagovor:

- Predsednik: prof. dr. Lea DEMŠAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
- Član: prof. dr. Nataša POKLAR ULRIH
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
- Član: prof. dr. Julijana KRISTL
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Ajda OTA

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
DK UDK 577.352:577.161.6(043)=163.6
KG koencim Q₁₀/ modelne membrane/fluidnost/nosilci/elektronska paramagnetna resonanca/fluorescenčna spektroskopija/diferenčna dinamična kalorimetrija/DSC
AV OTA, Ajda, univ. dipl. biol., univ. dipl. inž. živ. tehnol.
SA POKLAR ULRIH, Nataša (mentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij Bioznanosti, področje prehrana
LI 2014
IN VPLIV NOSILNIH SISTEMOV NA INTERAKCIJE KOENCIMA Q₁₀ Z MODELNIMI LIPIDNIMI MEMBRANAMI
TD Doktorska disertacija
OP XXII, 134 str., 5 pregl., 70 sl., 5 pril., 105 vir.
IJ sl/en
JI sl/en
AI Proučili smo vpliv nosilnih sistemov različnih komercialno dostopnih vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ na strukturne spremembe modelnih membran sestavljenih iz 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoholina ali mešanice fosfatidilholina in sfingomielina v molarnem razmerju 2,4:1 po stiku z njimi. Strukturne spremembe membrane smo merili s kombinacijo fluorescenčne spektrofotometrije, elektronske paramagnetne resonance in diferenčne dinamične kalorimetrije. Za spremljanje lastnosti membran blizu vodno-lipidne meje in znotraj lipidnega dvosloja modelnih membran smo uporabili dva fluoroforja in dva spinska označevalca. Rezultati kažejo, da različni vodotopni nosilni sistemi (glicerol v kombinaciji s poliglicerol estrom maščobne kisline (PGE), sojinim lecitinom in trigliceridi maščobnih kislin; predgeliran škrob kombiniran z arabskim gumijem in laktozo; natrijev oktenilsukcinat škroba z dekstrinom in glicerolom ali saharozo, laktozo, dekstrinom in glicerolom; β-ciklodekstrin) olajšajo prodiranje CoQ₁₀ v lipidno membrano, kjer opazimo povečanje ureditvenega parametra membranskih lipidov. Vodotopni pripravki CoQ₁₀ so omogočili boljšo zaščito pred oksidacijo v suspenziji liposomov in so pokazali večji antioksidativni potencial v vodnih in etanolnih raztopinah, merjen kot odstotek inhibicije radikalov ABTS⁺. Z izjemo nosilcev prisotnih v emulziji CoQ₁₀ (vzorec A, kjer so kot nosilci prisotni glicerol, sojin lecitin, poliglicerol ester maščobne kisline in trigliceridi maščobnih kislin) sami nosilci prisotni v drugih vodotopnih pripravkih niso bistveno vplivali na fluidnost membran. Pripravili smo nove kapsuete CoQ₁₀ v izolatu sojinih proteinov, v polisaharidu pululanu in v arheosomih pripravljenih iz PLMF *A. pernix*. Ti so omogočili boljšo disperzijo CoQ₁₀ v vodni raztopini.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDC 577.352:577.161.6(043)=163.6
CX coenzyme Q₁₀, model membranes/fluidity/carriers/electron paramagnetic resonance/fluorescent spectroscopy/differential dynamic calorimetry/DSC
AU OTA, Ajda
AA POKLAR ULRIH, Nataša (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biosciences, Field: Nutrition
PY 2014
TI IMPACT OF CARRIER SYSTEMS ON THE INTERACTION OF COENZYME Q₁₀ WITH MODEL LIPID MEMBRANES
DT Doctoral dissertation
NO XXII, 134 p., 5 tab., 70 fig., 5 ann., 105 ref.
LA sl/en
AL sl/en
AB We investigated the influence of carrier systems in commercially formulations of water soluble CoQ₁₀ on structural changes of model lipid membranes composed of 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine and mixture of phosphatidylcholine and sphingomyelin (2.4:1) after contact with them. Structural changes in the membrane were measured by the combination of fluorescence spectroscopy, electron paramagnetic resonance and differential scanning calorimetry. Two fluorophors and two spin probes were used to monitor membrane characteristics close to water-lipid interface and in the middle of the bilayer of model lipid membranes. Results show that different water soluble carrier systems (glycerol in combination with polyglycerol fatty acid ester, soy lecithin and triglyceride of fatty acid; pregelatinized starch combined with gum arabic and lactose; starch sodium octenylsuccinate with dextrin and glycerol; β -cyclodextrin) facilitate perturbation of CoQ₁₀ into lipid membrane where an increase in lipid order parameter is observed. In addition water soluble CoQ₁₀ formulations allowed better protection from oxidation in liposome solution, and showed better antioxidative potential in water and ethanol solution, measured as inhibition of ABTS^{•+} radical. With the exception of carriers present in emulsified formulation of CoQ₁₀ (Sample A, where glycerol, soy lecithin and PGE are present as carriers), the carriers present in other samples did not have a significant effect on membrane fluidity. Novel CoQ₁₀ encapsulates, using soy protein isolate, polysaccharide pullulan and archaeosomes prepared from *A. pernix* PLMF were developed. They enabled better dispersion of CoQ₁₀ in water solution.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	X
KAZALO SLIK	XI
KAZALO PRILOG	XX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XXI
1 UVOD	1
1.1 RAZISKOVALNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 KAPSULACIJA	3
2.1.1 Prednosti mikrokapsulacije snovi v živilski industriji:	3
2.1.2 Možni negativni učinki kapsulacije	4
2.1.3 Procesi kapsulacije	4
2.1.4 Material za kapsulacijo	6
2.2 KOENCIM Q ₁₀	7
2.2.1 CoQ₁₀ kapsulacijski sistemi	8
2.2.1.1 Kompleksi CoQ ₁₀ s ciklodekstrini	8
2.2.1.2 Kompleksi CoQ ₁₀ z modificiranimi polisaharidi	10
2.2.1.3 Nanoemulzije CoQ ₁₀	10
2.2.1.4 Emulzije	11
2.2.1.5 Liposomi s CoQ ₁₀ , obdani s trimetil hitozanom	12
2.2.1.6 CoQ ₁₀ v različnih mešanicah arabskega gumija, maltodekstrina in modificiranega škroba	12
2.2.2 Liposomi	13
2.2.3 Arheosomi	13
2.3 PEROKSIDACIJA LIPIDOV	16

3	MATERIAL IN METODE	18
3.1	KEMIKALIJE IN DROBNA OPREMA	18
3.2	LABORATORIJSKA OPREMA	20
3.3	VZORCI S CoQ ₁₀	21
3.3.1	Vzorci CoQ₁₀ s trga	21
3.4	PRIPRAVA KAPSULATOV	22
3.4.1	Kapsulacija koencima Q₁₀ v izolat sojinih proteinov	22
3.4.2	Kapsulacija koencima Q₁₀ v pululan	22
3.4.3	Priprava CoQ₁₀ v arheosomih	23
3.4.3.1	Izolacija polarnih lipidov arheje <i>Aeropyrum pernix</i> K1	23
3.4.3.2	Kapsulacija CoQ ₁₀ v arheosome	24
3.5	ANALIZNE METODE	25
3.5.1	Priprava liposomov kot modelnih membran	25
3.5.1.1	Priprava arheosomov	25
3.5.2	Vrstična elektronska mikroskopija (ang. <i>Scanning electronic microscopy</i>; SEM)	26
3.5.3	Fluorescenčna spektroskopija	26
3.5.3.1	Merjenje fluorescenčne anizotropije DPH in TMA-DPH	26
3.5.3.2	Merjenje fluorescenčne anizotropije DPH in TMA-DPH arheosomov	27
3.5.4	Elektronska paramagnetna resonanca (EPR)	28
3.5.5	Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC)	32
3.5.6	Določanje antioksidativne učinkovitosti CoQ₁₀	33
3.5.6.1	Določanje antioksidativnega potenciala z ABTS ^{•+} radikalom	33
3.5.6.2	Določanje oksidacije liposomov pripravljenih iz jajčnega fosfatidilholina, sprožene z UV obsevanjem –test TBARS	34
3.5.6.3	Ocena inhibicije oksidacije lipidov z uporabo lipofilnega fluoroforja BODIPY® 581/591 C ₁₁	34
3.5.7	Analiza temperaturne obstojnosti arhej <i>A. pernix</i>, arheosomov in polisaharida pululan	35
3.5.8	Analiza prepustnosti pululana za kisik (O₂)	35
3.5.9	Vpliv topil na pripravljene kapsulate in adsorbate CoQ₁₀	35
3.5.10	UV stabilnost vodnih suspenzij vodotopnih pripravkov CoQ₁₀	36

3.5.11	Termostabilnost vodotopnih pripravkov CoQ₁₀	36
4	REZULTATI.....	37
4.1	MORFOLOGIJA VZORCEV S CoQ ₁₀	37
4.2	VPLIV CoQ ₁₀ NA UREDITVENI PARAMETER LIPIDNIH DVOSLOJEV	38
4.2.1	CoQ₁₀	38
4.2.2	Vzorec A	39
4.2.3	Vzorec B	45
4.2.4	Vzorec C	50
4.2.5	Vzorec D	55
4.2.6	Vzorec E	60
4.2.7	Vzorec CoQ₁₀ v arheosomih	65
4.2.8	Vzorec CoQ₁₀ v pululanu	70
4.2.9	Vzorec CoQ₁₀ v izolatu sojinih proteinov	75
4.2.9.1	Merjenje fluorescenčne anizotropije DPH in TMA-DPH v membranah arheosomov kot funkcija temperature	80
4.3	SPREMLJANJE EPR SPEKTROV LIPOSOMOV PRIPRAVLJENIH IZ MEŠANICE PC-SM KOT FUNKCIJA TEMPERATURE	83
4.3.1	Mobilnost spinskih označevalcev v lipidni membrani z in brez dodatka CoQ₁₀	83
4.3.2	Mobilnost spinskih označevalcev v lipidni membrani z in brez dodatka komercialno dostopnih vzorcev CoQ₁₀	84
4.3.2.1	Spremembe EPR spektrov arheosomov v odvisnosti od temperature	87
4.4	SPREMLJANJE FAZNIH PREHODOV LIPOSOMOV PRIPRAVLJENIH IZ DPPC OB DODATKU CoQ ₁₀ IN VODOTOPNIH PRIPRAVKOV CoQ ₁₀	89
4.4.1	Vpliv CoQ₁₀ na fazne prehode multilamelarnih liposomov iz DPPC	89
4.4.2	Vpliv vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ na fazne prehode vačslojnih liposomov iz DPPC	90
4.5	DOLOČITEV ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI	96
4.5.1	Določanje antioksidativnega potenciala CoQ₁₀ z radikalom ABTS^{•+}	96
4.5.2	Spektrofotometrično določanje oksidacije liposomov pripravljenih iz PC sprožene z UV obsevanjem	97

4.5.3	Ocena inhibicije oksidacije z uporabo lipofilnega fluoroforja BODIPY[®] 581/591 C₁₁	98
4.6	PRIPRAVA KAPSULATOV	99
4.6.1	Kapsulacija koencima Q₁₀ v izolat sojinih proteinov	99
4.6.2	Kapsulacija CoQ₁₀ v pululan	99
4.6.3	Priprava kapsulatov CoQ₁₀ v arheosomih.	100
4.6.3.1	Analiza temperaturne obstojnosti arhej <i>A. pernix</i> , arheosomov in polisaharida pululan	100
4.6.4	Analiza prepustnosti pululana za kisik	101
4.6.5	Vpliv topil na pripravljene kapsulate CoQ₁₀	102
4.6.6	UV - stabilnost vodnih suspenzij CoQ₁₀ in vodotopnih pripravkov CoQ₁₀	103
4.6.6.1	Termostabilnost CoQ ₁₀ in vodotopnih pripravkov CoQ ₁₀	104
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	106
5.1	RAZPRAVA	106
5.1.1	Merjenje fluorescenčne anizotropije DPH in TMA-DPH v modelnih membranah ob dodatku različnih pripravkov CoQ₁₀	106
5.1.2	Priprava kapsulatov	109
5.1.3	Spremljanje EPR spektrov liposomov PC-SM ob prisotnosti različnih pripravkov CoQ₁₀ kot funkcija temperature	111
5.1.3.1	Računalniška simulacija eksperimentalnih EPR spektrov	112
5.1.4	Vpliv CoQ₁₀ in vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ na fazne prehode multilamelarnih liposomov iz DPPC	113
5.1.5	Določitev antioksidativne učinkovitosti vodotopnih pripravkov CoQ₁₀	116
5.1.5.1	Ocena inhibicije oksidacije lipidnov	116
5.1.5.1.1	Spektrofotometrično določanje oksidacije liposomov PC sprožene z UV iradiacijo.....	117
5.1.5.1.2	Ocena inhibicije lipidne oksidacije z uporabo fluoroforja BODIPY [®] 581/591 C ₁₁	117
5.2	SKLEPI	119
6	POVZETEK.....	121
6.1	POVZETEK	121
6.2	SUMMARY	123

7	VIRI	125
----------	-------------------	------------

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Pregled mikrokapsulacijskih procesov (Zuidam in Shimoni, 2010).	5
Preglednica 2: Materiali primerni za mikrokapsulacijo, ki se uporabljajo v živilstvu (Wandrey in sod., 2010)	6
Preglednica 3: Sestava vzorcev koencima Q ₁₀ (CoQ ₁₀) s trga.	21
Preglednica 4: Termodinamski profil faznih prehodov liposomov DPPC v prisotnosti vodotopnih pripravkov CoQ ₁₀ ter pri molarnem razmerju DPPC:CoQ ₁₀ 1:1 in njihovih nosilcev v koncentracijah, ki ustrezajo njihovi količini v posameznem pripravku. ^a T _m , temperatura faznega predprehoda; ^b T _m , temperature prehoda iz gel v tekoče kristalinično stanje; ^c ΔH _{cal} , entalpija predprehoda; ^d ΔH _{cal} , entalpija iz gel v tekoče kristalinično stanje; ^e temperatura in entalpija faznega prehoda, ki ustreza CoQ ₁₀	95
Preglednica 5: Pregled učinka CoQ ₁₀ , vzorcev CoQ ₁₀ iz trga in pripravkov CoQ ₁₀ v arheosomih, pululanu in izolatu sojinih proteinov. Analizne metode: fluorescenčna spektroskopija, elektronska paramagnetna resonanca (EPR) in diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC).	115

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Mikrokapsule vrste rezervoar (levo) in ogrodje (desno) (Zuidam in Shimoni, 2010).	3
Slika 2: Oksidativna fosforilacija (KEGG Pathway..., 2012).	7
Slika 3: Struktura koencima Q ₁₀ (Kommuru in sod., 2001).	8
Slika 4: α -, β -, in γ -ciklodekstrin (Wandrey in sod., 2010).	9
Slika 5: Shematski prikaz supramolekularnega kompleksa γ -CD-Co ₁₀ (levo) (Higashi in sod., 2009) in kompleksa β -CD-Co ₁₀ (desno) (Prošek in sod., 2005).	10
Slika 6: Strukturne formule uporabljenih lipidov. PC – fosfatidilholin, SM – sfingomielin, DPPC – dipalmitoil-fosfatidilholin, AI – 2,3-di-O-sesterpanil-sn-glicerol-1-fosfo-mio-inozitol, AGI – 2,3-di-O-sesterpanil-sn-glicerol-1-fosfo-1'-(2'-O- α -D-glukozil)-mio-inozitol; T _m – temperatura prehoda iz gel v tekoče kristalinično stanje (Avanti Polar Lipids, 2013; Ota in sod., 2012).	15
Slika 7: Klasifikacija induktorjev peroksidacije lipidov (LH – lipidi) (Schnitzer in sod., 2007).	16
Slika 8: Fizikalni in kemični dejavniki, ki vplivajo na peroksidacijo liposomalnih lipidov (Schnitzer in sod., 2007).	17
Slika 9: Shema kemijske strukture pululana z maltotriozo kot ponavljajočo se enoto (Singh in sod., 2008).	23
Slika 10: Spinska označevalca MeFASL(2,11) - A in MeFASL(10,3) – B.	28
Slika 11: Eksperimentalni EPR spekter spinskega označevalca MeFASL(10,3) v membrani liposomov (PC:SM = 2,4:1 (mol:mol)). ΔH – širina srednje črte EPR spektra, h_0 – amplituda srednje črte EPR spektra, h_1 – amplituda črte pri višjem magnetnem polju.	30

- Slika 12: SEM mikrografija vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ SPI – izolat sojinih proteinov.37
- Slika 13: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV pripravljenih iz DPPC z etanolno raztopino CoQ₁₀ (●) s koncentracijo 10 mg/mL; polna črta – 25 °C, črtkana črta – 45 °C..... 38
- Slika 14: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z etanolno raztopino CoQ₁₀ (●) s koncentracijo 10 mg/mL; polna črta – 25 °C, črtkana črta – 45 °C..... 39
- Slika 15: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo emulzije CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec A), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH..... 41
- Slika 16: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo emulzije CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec A), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. 42
- Slika 17: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo emulzije CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec A), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH.. 43
- Slika 18: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo emulzije CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec A), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. 44
- Slika 19: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec B), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH. 46

- Slika 20: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec B), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. 47
- Slika 21: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec B), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH. 48
- Slika 22: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec B), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH.. 49
- Slika 23: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec C), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH.. 51
- Slika 24: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec C), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH.. 52
- Slika 25: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec C) s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH. 53
- Slika 26: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec C), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. 54

- Slika 27: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. nosilca prisotnega v tem pripravku (Vzorec D), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH..... 56
- Slika 28: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. nosilca prisotnega v tem pripravku (Vzorec D), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. 57
- Slika 29: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. nosilca prisotnega v tem pripravku (Vzorec D), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH..... 58
- Slika 30: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. nosilca prisotnega v tem pripravku (Vzorec D), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. 59
- Slika 31: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec E), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH. 61
- Slika 32: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec E), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. 62
- Slika 33: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec E), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH. 63

- Slika 34: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec E), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. 64
- Slika 35: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo SUV arheosomov z 10 % CoQ₁₀ oz. samih arheosomov s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH. 66
- Slika 36: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo SUV arheosomov z 10 % CoQ₁₀ oz. samih arheosomov s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. 67
- Slika 37: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo SUV arheosomov z 10 % CoQ₁₀ oz. samih arheosomov s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH. 68
- Slika 38: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo SUV arheosomov z 10 % CoQ₁₀ oz. samih arheosomov s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. 69
- Slika 39: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo CoQ₁₀ v pululanu oz. samega pululana s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH. 71
- Slika 40: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo CoQ₁₀ v pululanu oz. samega pululana s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. 72
- Slika 41: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo CoQ₁₀ v pululanu oz. samega pululana s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH. 73

- Slika 42: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo CoQ₁₀ v pululanu oz. samega pululana s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. 74
- Slika 43: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo CoQ₁₀ v izolatu sojinih proteinov (SPI) oz. samega SPI s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH. 76
- Slika 44: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo CoQ₁₀ v izolatu sojinih proteinov (SPI) oz. samega SPI s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. 77
- Slika 45: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo CoQ₁₀ v izolatu sojinih proteinov (SPI) oz. samega SPI s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH. 78
- Slika 46: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo CoQ₁₀ v izolatu sojinih proteinov (SPI) oz. samega SPI s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. 79
- Slika 47: Temperaturna odvisnost ureditvenega parametra (S) PLMF iz arhej *A. pernix*, gojenih v medijih z različnim pH (■ – pH 6,0; ○ – pH 7,0; Δ – pH 8,0), določen z merjenjem fluorescenčne anizotropije DPH. (A) pH vzorcev za meritve je bil enak pH rastnega medija; (B) meritve opravljene pri pH 7,0. 81
- Slika 48: Temperaturna odvisnost ureditvenega parametra PLMF iz arhej *A. pernix*, gojenih v medijih z različnim pH (■ – pH 6,0; ○ – pH 7,0; Δ – pH 8,0), določen z merjenjem fluorescenčne anizotropije TMA-DPH. (A) pH vzorcev za meritve je bil enak pH rastnega medija; (B) meritve opravljene pri pH 7,0. 82

- Slika 49: Temperaturna odvisnost empiričnega korelacijskega časa (τ_{emp}) spinskih označevalcev MeFASL(2,11) (A) in MeFASL(10,3) (B) v liposomih SUV sestavljenih iz PS:SM (2.4:1) brez (kontrola - ■) in v prisotnosti etanolne raztopine CoQ₁₀(●). Molarno razmerje lipidi/ CoQ₁₀ je bilo 2:1..... 84
- Slika 50: Temperaturna odvisnost empiričnega korelacijskega časa (τ_{emp}) spinskih označevalcev MeFASL(2,11) (levo) in MeFASL(10,3) (desno) v liposomih SUV sestavljenih iz PS:SM (2.4:1) brez (kontrola - ■) in v prisotnosti vodotopnih pripravkov CoQ₁₀. Molarno razmerje lipidi/ CoQ₁₀ je bilo 2:1..... 85
- Slika 51: Temperaturna odvisnost empiričnega korelacijskega časa (τ_{emp}) spinskih označevalcev MeFASL(2,11) (levo) in MeFASL(10,3) (desno) v liposomih SUV sestavljenih iz PS:SM (2.4:1), brez (kontrola ■) in v prisotnosti različnih nosilcev prisotnih v vodotopnih pripravkih CoQ₁₀, v količini, ki je prisotna v vzorcu, ko je molarno razmerje lipidi/ CoQ₁₀ 2:1..... 86
- Slika 52: Korekcijski faktor polarnosti hiperfinega sklopitvenega tenzorja (p_A), določenega z računalniško simulacijo EPR spektrov spinskega označevalca MeFASL(2,11) v SUV, sestavljenih iz PS:SM (2,4:1) brez (kontrola) in v prisotnosti različnih vodotopnih pripravkov in čistega CoQ₁₀ (*etanol je bil uporabljen za kontrolo) pri 25 °C. p_A najbolj urejene domene je predstavljen s črnimi, p_A manj urejene domene pa je predstavljen z rdečimi stolpci. Molarno razmerje lipidi:COQ₁₀ je bilo pri vseh poskusih 2:1. 87
- Slika 53: DSC termogrami liposomov DPPC pripravljenih s CoQ₁₀ v molarnem razmerju DPPC:CoQ₁₀ 1:1 (rdeča polna črta), 1:2 (rdeča črkana črta) in 1:4 (rdeča pikasta črta) pri pH 7,0..... 89
- Slika 54: Termogram DSC liposomov DPPC (črna črta) v prisotnosti emulzije CoQ₁₀ – vodotopnega pripravka CoQ₁₀ – vzorec A, kjer je molarno razmerje DPPC: CoQ₁₀ enako 1:1 pri pH 7,0 (modra črta). 91

- Slika 55: Termogram DSC liposomov DPPC (črna črta) v prisotnosti vodotopnega pripravka CoQ₁₀ – vzorec B, kjer je molarno razmerje DPPC:CoQ₁₀ enako 1:1 pri pH 7,0 (modra črta). 91
- Slika 56: Termogram DSC liposomov DPPC (črna črta) v prisotnosti vodotopnega pripravka CoQ₁₀ – vzorec C, kjer je molarno razmerje DPPC:CoQ₁₀ enako 1:1 pri pH 7,0 (modra črta). 92
- Slika 57: Termogram DSC liposomov DPPC (črna črta) v prisotnosti vodotopnega pripravka CoQ₁₀ – vzorec D, kjer je molarno razmerje DPPC:CoQ₁₀ enako 1:1 pri pH 7,0 (modra črta). 92
- Slika 58: Termogram DSC liposomov DPPC (črna črta) v prisotnosti vodotopnega pripravka CoQ₁₀ – vzorec E, kjer je molarno razmerje DPPC:CoQ₁₀ enako 1:1 pri pH 7,0 (modra črta). 93
- Slika 59: Termogram DSC liposomov DPPC (črna črta) v prisotnosti vodne suspenzije CoQ₁₀ v arheosomih, kjer je molarno razmerje DPPC:CoQ₁₀ enako 1:1 pri pH 7,0 (modra črta). 93
- Slika 60: Termogram DSC liposomov DPPC (črna črta) v prisotnosti vodne suspenzije CoQ₁₀ v polisaharidu pululan, kjer je molarno razmerje DPPC:CoQ₁₀ enako 1:1 pri pH 7,0 (modra črta). 94
- Slika 61: Delež inhibicije radikala ABTS^{•+} v etanolu (črna) in mQ vodi (rdeča). Koncentracija CoQ₁₀ je 5 mg/mL. SPI– izolat sojinih proteinov. 96
- Slika 62: Oksidacija liposomov PC merjena kot funkcija časa obsevanja ($\lambda = 254$ nm), spremljana s TBARS-testom. 97
- Slika 63: Inhibicija oksidacije jajčnega fosfatidilholina inducirne z CuCl₂ v prisotnosti različnih vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ (10 mol%) merjena kot emisija fluorescence BODIPY® 581/591 C₁₁. 98

Slika 64: Vodna suspenzija CoQ ₁₀ v agregatih izolata sojinih proteinov (desno) in CoQ ₁₀ v vodi (levo).....	99
Slika 65: Vodna suspenzija CoQ ₁₀ zamreženega v polisaharidu pululanu (desno) in CoQ ₁₀ v vodi (levo).....	100
Slika 66: Termična stabilnost pululana, liofiliziranih celic arheje <i>A. pernix</i> in arheosomov pripravljenih iz PLMF <i>A. pernix</i>	101
Slika 67: Razlika med prepustnostjo polietilenske folije (PET) za kisik pod tlakom 1 bar brez (●) in s premazom pululana (●).	102
Slika 68: Masa spranega CoQ ₁₀ iz pripravljenih kapsulatov CoQ ₁₀ v pululanu in izolatu sojinih proteinov (SPI) z naslednjimi topili: etanol, metanol in heksan. Začetna masa CoQ ₁₀ v vzorcih je bila 2 mg.	103
Slika 69: Učinek UV sevanja ($\lambda = 254$ nm) na fotostabilnost vodnih suspenzij posameznih vodotopnih pripravkov CoQ ₁₀ ($c_{\text{CoQ}_{10}} = 2$ mg/mL). SPI-izolat sojinih proteinov.	104
Slika 70: Termostabilnost CoQ ₁₀ v posameznih vodotopnih pripravkih CoQ ₁₀ ($m_{\text{CoQ}_{10}} = 2$ mg). SPI-izolat sojinih proteinov. Temperatura je bila 80 °C.	105

KAZALO PRILOG

Priloga A: Strukturna formula fluorescentne sonde DPH in njegovega kationskega derivata TMA-DPH.

Priloga B: Spremembe fluorescenčne anizotropije (r) po titraciji SUV pripravljenih iz DPPC oz. mešanice PC in SM s suspenzijo vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ oz. njihovih nosilcev v prisotnosti fluoroforjev DPH in TMA-DPH.

Priloga C: Rezultati računalniške simulacije eksperimentalnega EPR spektra spinskega označevalca MeFASL(10,3) pri PC-SM liposomih v prisotnosti vodotopnega pripravka CoQ₁₀, kjer so kot nosilci prisotni natrijev oktenilsukcinat škroba, dekstrin in glicerol (vzorec C). Razmerje lipidi:CoQ₁₀ = 2:1 (mol:mol). Ureditveni parameter (S) in delež posameznih membranskih domen v PC-SM liposomih (molarno razmerje 2,4:1) označenih s spinskim označevalcem MeFASL(10,3) pri 25 °C in 45 °C. Kontrola (miliQ voda) –svetlo modra, vzorec C – temno modra.

Priloga D: Rezultati računalniške simulacije eksperimentalnih EPR spekrov z MeFASL(2,11) označenih PC-SM liposomov v prisotnosti CoQ₁₀ in vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ (razmerje lipidi:CoQ₁₀ = 2:1) pri 25 °C (A) in 45 °C (B). D1– najbolj urejena membranska domena; D2- manj urejena membranska domena.

Priloga E: Konformacija in razdalje med atomi molekule CoQ₁₀.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ABTS	2,2'-azobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina
AGI	2,3-di- <i>O</i> -sesterpanil- <i>sn</i> -glicerol-1-fosfo-1'-(2'- <i>O</i> - α -D-glukozi)-mio-inozitol
AI	2,3-di- <i>O</i> -sesterpanil- <i>sn</i> -glicerol-1-fosfo-mio-inozitol
BODIPY [®] 581/591 C11	4,4-difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-undekanojska kislina
CoQ ₁₀	koencim Q ₁₀
CSL	kalcijev stearoil-2-laktat
DMSO	dimetil sulfoksid
DPH	1,6-difenil-1,3,5-heksatrien
DPPC	1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholin
DSC	diferenčna dinamična kalorimetrija
EPR	elektronska paramagnetna resonance
EtOH	etanol
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina
HLB	hidrofilno-lipofilno ravnotežje
LUV	veliki enoslojni vezikli
MeFASL(10,3)	5-doksilpalmitoil metilester
MeFASL(2,11)	13-doksil metil palmitat
Mk	maščobna kislina
MLV	večslojni vezikli
MS	modificiran škrob
PC	fosfatidilholin
PGE	poliglicerol ester maščobne kisline
PLMF	polarna lipidna metanolna frakcija
PMMA	polimetil metakrilat
SEEDS	samo-emulgirni sistem za dovajanje zdravil
SEM	vrstična elektronska mikroskopija
SM	sfigomielin
SPI	izolat sojinih proteinov
S-SEEDS	trdni samo-emulgirni sistem za dovajanje zdravil
SUV	majhni enoslojni vezikli
TBARS	s tiobarbiturno kislino reagirajoče snovi
TgMk	trigliceridi maščobnih kislin
THF	tetrahidrofuran
TLC	tankoplastna kromatografija

TMA-DPH

N,N,N-trimetilamonijev-6-fenil-1,3,5-heksatrien

TMC

trimetil hitozan klorid

α -, β -, γ -CD

α -, β -, γ -ciklodekstrin

1 UVOD

Koencim Q₁₀ (CoQ₁₀), znan tudi kot ubikinon ali ubidekarenon, je hidrofobna, vitaminu podobna snov, ki jo najdemo v celicah mnogih organizmov. CoQ₁₀ sodeluje pri številnih pomembnih celičnih procesih. Ima vlogo prenašalca elektronov med kompleksi mitohondrijske dihalne verige. CoQ₁₀ je ključna komponenta v proizvodnji celične energije v obliki adenzin-trifosfata (ATP) in deluje kot antioksidant (Frei in sod., 1990). Eksogeni CoQ₁₀ se uporablja kot dodatek k prehrani in je zelo priporočljiv pri zdravljenju različnih bolezni srca in ožilja, degenerativnih bolezni mišic in zdravljenju raka. Zaradi 10 izoprenoidnih enot dolge stranske verige, je CoQ₁₀ slabo topen v vodi. Nepopolna in počasna absorpcija CoQ₁₀ iz prebavil je posledica njegove slabe topnosti v vodi in visoke molekulske mase (Greenberg in Frishman, 1990). Da bi odpravili težave z nizko topnostjo in biorazpoložljivostjo so CoQ₁₀ vgradili v različne nosilne sisteme kot so miceli, ciklodekstrini, modificiran škrob, nanodelci, emulzije (ang. *self-emulsifying drug delivery system*, SEDDS), ki vključujejo trigliceride s srednje dolgimi verigami in surfaktante z majhno HLB (hydrophile-lipophile balance) vrednostjo (Kommuru in sod., 2001; Žmitek in sod., 2008a; Higashi in sod., 2009).

Prehod učinkovin in nosilnih sistemov preko celične membrane je zapleten biološki proces, ki ga zaradi svoje dinamične narave pogosto težko razumemo. Modelne lipidne membrane, ki posnemajo celične membrane so zelo koristne pri študiju teh interakcij. Iz interakcije med različnimi nosilnimi sistemi z vgrajenim koencimom Q₁₀ in lipidi lahko sklepamo na mehanizem transporta, biorazporeditev, akumulacijo in učinkovitost. Podatke, pridobljene v študijah interakcij CoQ₁₀ z membranami, lahko uporabimo za načrtovanje in razvoj novih, izboljšanih nosilnih sistemov.

1.1 RAZISKOVALNE HIPOTEZE

Predvidevamo, da bo koencim Q₁₀ že vgrajen v obstoječe nosilce (β -ciklodekstrin, modificiran škrob, natrijev oktenilsukcinat škroba. emulzija) in koencim Q₁₀ vgrajen v nove nosilce (arheosome, pululan in sojini proteini) interagiral z modelnimi lipidnimi membranami v vodnem mediju.

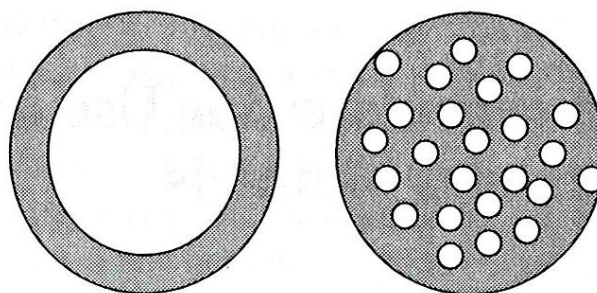
Proučili bomo, v katerih nosilcih se koencimu Q₁₀ poveča temperaturna stabilnost in zmanjša občutljivost na UV obsevanje.

2 PREGLED OBJAV

2.1 KAPSULACIJA

Kapsulacija je proces vklapljanja ene snovi v drugo, pri čemer nastajajo delci velikosti od nekaj nanometrov do nekaj milimetrov. Ločimo dve glavni vrsti kapsul (slika 1):

- rezervoar, ki ima ovoj okoli jedra z aktivno spojino
- ogrodje, kjer je vgrajena snov razporejena v nosilcu.



Slika 1: Mikrokapsule vrste rezervoar (levo) in ogrodje (desno) (Zuidam in Shimoni, 2010).

Figure 1: Reservoir type (left) and matrix type (right) microcapsules (Zuidam and Shimoni, 2010).

Glede na velikost delcev, ločimo:

- nanodelce
- mikrokapsule
- makrokapsule ... (Zuidam in Shimoni, 2010)

2.1.1 Prednosti mikrokapsulacije snovi v živilski industriji:

- lažje rokovanje z aktivno spojino
- imobilizacija aktivne spojine med obdelavo živil
- izboljšanje stabilnosti med izdelavo in shranjevanjem izdelka
- izboljšana varnost
- ustvarjanje novih senzoričnih lastnosti
- možnost prilagajanja lastnosti aktivne spojine (velikost delcev, struktura, topnost v olju, vodotopnost, barva)
- maskiranje priokusov
- kontroliranje sproščanja (Zuidam in Shimoni, 2010)

2.1.2 Možni negativni učinki kapsulacije

- dodatni stroški
- povečana kompleksnost proizvodnega procesa
- vprašanje stabilnosti kapsulatov med proizvodnjo in skladiščenjem (Zuidam in Shimoni, 2010).

2.1.3 Procesi kapsulacije

Številni kapsulacijski procesi temeljijo na tvorbi kapljic iz aktivne snovi (v plinasti, tekoči ali trdni fazi) in obdajanjem le-teh z nosilnim materialom (bodisi v plinasti ali tekoči fazi) z različnimi fizikalno kemijskimi procesi (Preglednica 1).

Določeno kapsulacijsko metodo izberemo glede na:

- željen učinek
- fizikalno kemijske lastnosti aktivne spojine
- pogoje med samim tehnološkim procesom
- način skladiščenja izdelka
- željeno velikost delcev
- način sproščanja snovi
- stroške

Preglednica 1: Pregled mikrokapsulacijskih procesov (Zuidam in Shimoni, 2010).

Table 1: Overview of microencapsulation processes (Zuidam and Shimoni, 2010).

Tehnologija	Morfologija	Delež aktivne komponente (%)	Velikost delcev (µm)
sušenje z razprševanjem	ogrodje	5–50	10–400
kapsulacija z razprševanjem (ang. <i>fluid bed coating</i>)	rezervoar	5–50	5–5000
sušenje s hlajenjem/zamrzovanjem (ang. <i>spray chilling/cooling</i>)	ogrodje	10–20	20–200
injiciranje taline (ang. <i>melt injection</i>)	ogrodje	5–20	200–2000
ekstruzija taline (ang. <i>melt extrusion</i>)	ogrodje	5–40	300–5000
emulgiranje	ogrodje	1–100	0,2–5000
priprava večslojnih emulzij	rezervoar	1–90	0,2–5000
koacervacija	rezervoar	40–90	10–800
priprava mikrosfer z ekstruzijo ali kapljanjem	ogrodje	20–50	200–5000
ko-ekstruzija	rezervoar	70–90	150–8000
inkluzijska kompleksacija (ang. <i>inclusion complexation</i>)	molekularna inkluzija	5–15	0,001–0,01
vgradnja v liposome	različna	5–50	10–1000
kapsulacija s hitro ekspanzijo superkritične tekočine (ang.: <i>encapsulation by rapid expansion of supercritical fluid</i>)	ogrodje	20–50	10–400
sušenje z zamrzovanjem ali vakuumsko sušenje	ogrodje	različno	20–5000
priprava nanodelcev	različno	različno	0,1–1

2.1.4 Material za kapsulacijo

Materiali primerni za mikrokapsulacijo, ki se uporabljajo v živilstvu so navedeni v Preglednica 2.

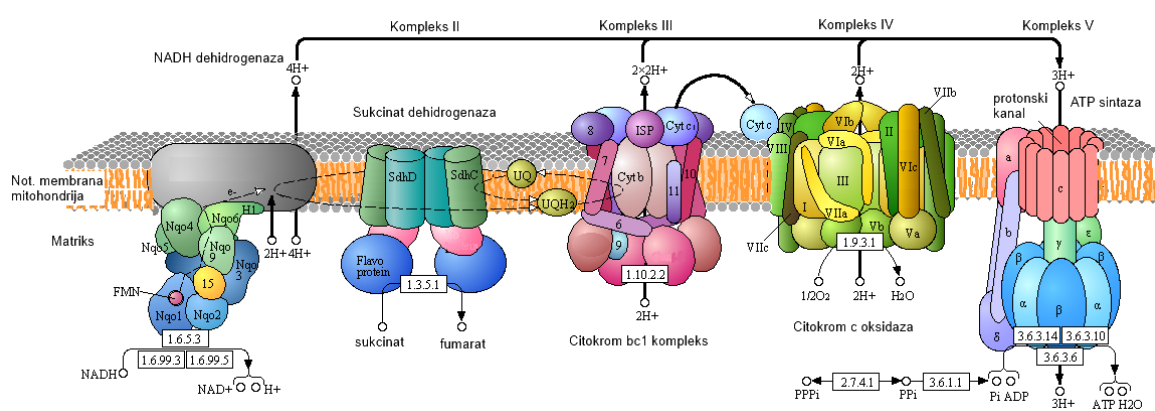
Preglednica 2: Materiali primerni za mikrokapsulacijo, ki se uporabljajo v živilstvu (Wandrey in sod., 2010).

Table 2: Materials suited for microencapsulation in the food industry (Wandrey et al., 2010).

Izvor	Polisaharidi	Protein	Lipid
rastline	škrob in derivati celuloza -derivati raslinski izvlečki -arabski gumi -karaja gumi -mesquite gumi -galaktomanani -pektin	gluten (koruza) izolati (soja, grah)	maščobne kisline/alkoholi gliceridi voski fosfolipidi
alge	karagenan alginat		
mikrobni /živalski	ksantan gelan dekstran hitozan ciklodekstrini	kazeini sirotkini protein želatina	maščobne kisline/alkoholi gliceridi voski fosfolipidi

2.2 KOENCIM Q₁₀

Koencim Q₁₀ (CoQ₁₀), imenovan tudi ubikinon ali ubidekarenon, je vitaminu podobna snov, ki jo najdemo v celicah mnogih organizmov. Je kofaktor v elektronski transportni verigi, kjer med oksidativno fosforilacijo in sintezo ATP prenaša proste elektrone iz kompleksov I in II h kompleksu III (slika 2). Poleg svoje bioenergetske funkcije in funkcije lovilca prostih radikalov CoQ₁₀ obnavlja alfa-tokoferol, še en pomemben antioksidant (Frei in sod., 1990; Crane, 2000, 2001, 2007).

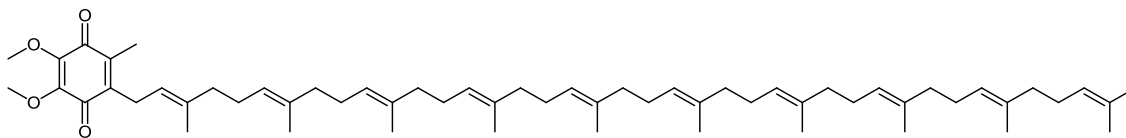


Slika 2: Oksidativna fosforilacija (KEGG Pathway..., 2012).

Figure 2: Oxidative phosphorylation (KEGG Pathway..., 2012).

Lokacija oksidirane (ubikinon) in reducirane (ubikinol) oblike CoQ₁₀ v membrani in njegova interakcija s fosfolipidnim slojem ni popolnoma poznana. Številni avtorji so z uporabo modelnih fosfolipidnih sistemov v kombinaciji z različnimi biofizikalnimi tehnikami skušali pojasniti mehanizem interakcij. Študije z uporabo protonske jedrne magnetne resonance (H-NMR) (Kingsley in Ferguson, 1981; Michaelis in Moore, 1985; Ulrich in sod., 1985), diferenčne dinamične kalorimetrije (DSC) (Aranda in Gomezfernandez, 1985) in infrardeče spektroskopije (Aranda in sod., 1986) so pokazale, da naj bi se kinonski obroč nahajal v hidrofobnem delu membrane, študije na podlagi fluorescenčne spektroskopije (Fato in sod., 1986) in linearnega dihroizma (Samori in sod., 1992) pa kažejo, da naj bi se kinonski obroč nahajal na meji med lipidno in vodno plastjo. Mnogi avtorji podpirajo hipotezo, po kateri naj bi ubikinoni v membrani tvorili agregate (Katsikas in Quinn, 1981; Michaelis in Moore, 1985; Ulrich in sod., 1985; Aranda in sod., 1986; Ausili in sod., 2008).

Zaradi desetih izoprenoidnih enot dolge stranske verige, je CoQ₁₀ slabo topen v vodi (slika 3). Predvidevajo, da je nepopolna in počasna absorpcija CoQ₁₀ iz prebavil posledica njegove slabe topnosti v vodi in visoke molekulske mase (Greenberg in Fishman, 1990).



Slika 3: Struktura koencima Q₁₀.

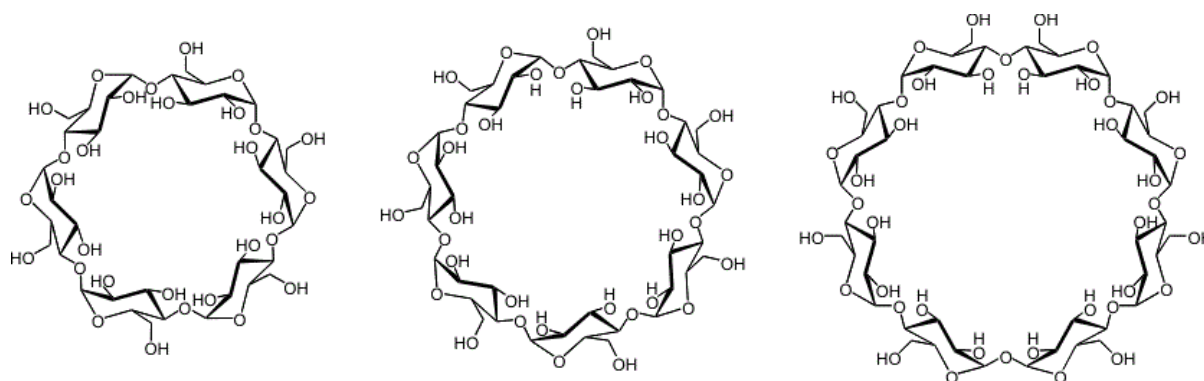
Figure 3: Chemical structure of coenzyme Q₁₀.

Uživanje lipofilnih snovi je pogosto povezana z nizko biološko razpoložljivostjo, visoko variabilnostjo znotraj in med posamezniki in nesorazmernostjo odmerkov (Gursoy in Benita, 2004). Da bi odpravili te težave, so naredili različne formulacije o katerih so poročali v literaturi, vključno z uporabo površinsko aktivnih snovi (surfaktantov), ciklodekstrinov, nanodelcev, trdnih disperzij, mikronizacije, lipidov in ojačevalcev prepustnosti (Aungst, 1993; Kommuru in sod., 2001; Nazzal in Khan, 2006; Zhang in sod., 2013).

2.2.1 CoQ₁₀ kapsulacijski sistemi

2.2.1.1 Kompleksi CoQ₁₀ s ciklodekstrini

Ciklodekstrini (CD) so družina cikličnih oligosaharidov (slika 4). sestavljeni iz α (1→4) D-glukopiranozidnih enot. Tipični ciklodekstrin sestavlja šest do osem monomernih enot glukoze. Obroči so stožčaste oblike z 0,7 do 0,8 nm globoko votlino. Njihova vodotopnost pri 25 °C se zelo razlikuje. Najbolj topen je γ -ciklodekstrin (23,2 g/100 mL), sledita α -ciklodekstrin (14,5 g/100 mL) in β -ciklodekstrin (1,85 g/100 mL) (Wandrey in sod., 2010).



Slika 4: α -, β -, in γ -ciklodekstrin (Wandrey in sod., 2010).

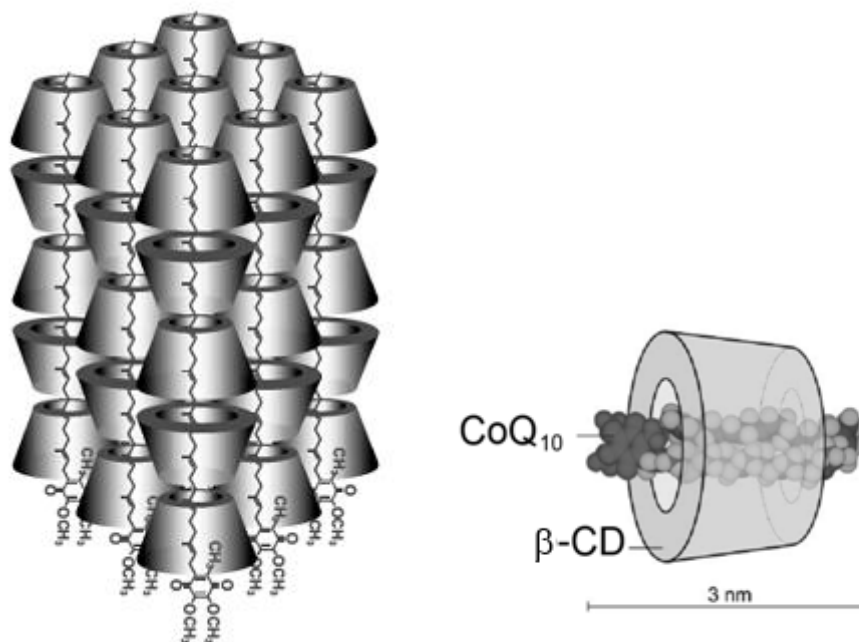
Figure 4: α -, β -, and γ -cyclodextrin (Wandrey et al., 2010).

Uporaba ciklodekstrinov je znana v farmacevtski in prehrambeni industriji, saj so kompleksi s CD termostabilni, odpornejši na oksidacijo in UV obsevanje (Milivojevič Fir in sod., 2009). Prvi poskus kompleksacije CoQ₁₀ in β -CD je bil opisan v patentu (Prošek in sod., 2005).

Higashi in sodelavci (2009) so pripravili komplekse CoQ₁₀ in γ -CD na štiri načine:

- z metodo gnetenja,
- z metodo gnetenja in segrevanjem,
- z metodo raztapljanja (CoQ₁₀ dodan vodni raztopini γ -CD in soniciran) in
- z metodo raztapljanja in segrevanjem

Kompleksi so tvorili supramolekularne strukture (slika 5), pri čemer je segrevanje izboljšalo vključevanje. Poleg zgoraj omenjenih metod se za pripravo suhih kompleksov CD-CoQ₁₀ uporablja tudi sušenje z razprševanjem (ang. *spray drying*) (Terao in sod., 2006) in koprecipitacija v vodni raztopini pri povišani temperature (Milivojevič Fir in sod., 2009).



Slika 5: Shematski prikaz supramolekularnega kompleksa γ -CD-Co₁₀ (levo) (Higashi in sod., 2009) in kompleksa β -CD-Co₁₀ (desno) (Prošek in sod., 2005).

Figure 5: Schematic representation of γ -CD-Co₁₀ supramolecular complex (left) (Higashi et al., 2009) and β -CD-Co₁₀ complex (right) (Prošek et al., 2005).

Študije so pokazale, da se oralna absorpcija in biorazpoložljivost močno povečata s povečano topnostjo kompleksov CD-CoQ₁₀ (Žmitek in sod., 2008b).

2.2.1.2 Kompleksi CoQ₁₀ z modificiranimi polisaharidi

Z namenom izboljšanja biorazpoložljivosti so razvili tudi komplekse CoQ₁₀ z različnimi modificiranimi polisaharidi, kot npr. modificiran škrob, bodisi sam ali v kombinaciji z mono-, di- ali polisaharidi (Chen in sod., 2005; Prošek in sod., 2005)

2.2.1.3 Nanoemulzije CoQ₁₀

Nanoemulzije so oljno vodne emulzije z velikostjo kapljic od 30 – 300 nm (Züllig in sod., 2006). V zadnjem času so se nanodelci raziskovali kot dozirni sistem za mikro- in makromolekule. Dokazano je bilo, da lahko nanodelci izboljšajo peroralno biorazpoložljivost zdravil s slabo absorpcijo. Zaradi lipofilne narave matriksa, trdni nanodelci na osnovi lipidov služijo za doziranje lipofilnih zdravil. Topnost lipofilnih zdravil se poveča z vgradnjo le-teh v nanodelce na osnovi lipidov, majhni nanodelci pa

ustvarijo večjo površino in tako povečajo absorpcije. Črevo ima poseben mehanizem za sprejemanje delcev, pri čemer se manjši, do 100 nm veliki delci 10 - do 250-krat lažje absorbirajo kot večji, 500 nm do 10 µm veliki delci (Hsu in sod., 2003).

V literaturi najdemo različne materiale v katere so vgradili CoQ₁₀ in jih oblikovali v nanodelce:

- PMMA (ang. *polymethyl methacrylate*) nanodelci s CoQ₁₀ pripravljene z mikrofluidizacijo (Kwon in sod., 2002),
- nanodelci iz oljno-vodne mikroemulzije pripravljene iz voska kot oljne faze in neionskega, anionskega ali kationskega surfaktanta (Ciu in Mumper, 2002),
- nanodelci CoQ₁₀ pripravljene s hlajenjem toplih mikroemulzij sestavljenih iz voska, Brij 78 in/ali Tween 20 (Hsu in sod., 2003),
- nanoliposomi sestavljeni iz fosfolipida, CoQ₁₀, holesterola in Tween80 v razmerju 2,5:1,2:0,4:1,8 (m/m) pripravljene z injiciranjem etanolne raztopine in soniciranjem (Xia in Xu, 2006),
- supernasičene CoQ₁₀ nanoemulzije (Züllli in sod., 2006),
- nano-lipidni nosilci (ang. NLC - nano lipid carriers) CoQ₁₀ na osnovi acetil palmitata z različnimi količinami kiprilnih/kapronskih triacilglicerolov (Teeranachaideekul in sod., 2007).

Nanoemulzije izboljšajo biorazpoložljivost po oralnem zaužitju in po aplikaciji na površino. Prednost nanoemulzij je njihova fizikalna stabilnost (Züllli in sod., 2006).

2.2.1.4 Emulzije

Iz praktičnega vidika razvoja CoQ₁₀ je poleg izboljšanja biorazpoložljivosti pomembno tudi zmanjšanje proizvodnih stroškov. Emulzija z maščobami in emulgatorji, ki se pogosto uporabljajo v živilski industriji, je eden izmed najbolj primernih pristopov k izboljšanju biorazpoložljivosti. Tak primer so emulzije, ki so jih razvili Thanatuksorn in sodelavci (2009). Uporabili so pet prosto dostopnih maščob (oljčno, sončnično in kokosovo olje ter maslo in kakavovo maslo), štiri tipe emulgatorjev (lecitin, monogliceridi, kalcijev stearoil-2-laktat (CSL) in estre monogliceridov in diacetil tartarne kisline) ter dva tipa vodne faze

(destilirana voda z ali brez 8 g/100 g (m/m) posnetega mleka). Izkazalo se je, da je CoQ₁₀ bolj topen v kokosovem in sončničnem olju kot pa v ostalih maščobah. Kot idealna formulacija se je izkazala emulzija kokosovega olja, vodne raztopine posnetega mleka in CSL. Biorazpoložljivost te emulzije je bila nekoliko večja od biorazpoložljivosti standardnih komercialnih CoQ₁₀ pripravkov (Thanatuksorn in sod., 2009).

Še ena oblika emulzij so samo-emulgirajoči sistemi za dostavo zdravil (SEDDS – self-emulsifying drug delivery system). Ti so lahko tekoči ali trdni (S-SEEDS). Priprava SEEDS vključuje raztapljanje aktivnih spojin v olju in njihovo mešanje z ustreznim disperznim medijem. Za pripravo suhih izdelkov uporabljajo različne tehnike: adsorbcija na trdne nosilce, sušenje z razprševanjem, ekstruzija, itd. (Tang in sod., 2008).

2.2.1.5 Liposomi s CoQ₁₀, obdani s trimetil hitozanom

Hitozan se zaradi svojih bioloških lastnosti, kot so biorazgradljivost in nizka toksičnost, že vrsto let uporablja kot pomožna snov v farmaciji. Zaradi visoke afinitete hitozana do celične membrane so derivate hitozana proučili kot material za obdajanje liposomov z namenom izboljšanja biorazpoložljivosti. Velika slabost hitozana je, da je netopen pri fiziološkem pH. Temu so se izognili z uporabo TMC – trimetil hitozan klorida, ki je topen v širokem pH območju (Zhang in Wang, 2009).

2.2.1.6 CoQ₁₀ v različnih mešanica arabskega gumija, maltodekstrina in modificiranega škroba

Za mikrokapsulacijo CoQ₁₀ so uporabili tudi različne mešanice arabskega gumija, maltodekstrina in modificiranega škroba. Ugotovili so, da je učinkovitost kapsulacije večja, če so maltodekstrinu in modificiranemu škrobu dodali 20 % gumi arabika. Termostabilnost in UV stabilnost tako mikrokapsuliranega CoQ₁₀ se je povečala (Bule in sod., 2010).

Kompleksnost bioloških membran je bila povod za razvoj številnih enostavnejših modelnih sistemov, katerih geometrijo in sestavo lahko spreminjamo. Modelni sistemi ohranijo osnovno strukturo lipidnega dvosloja, hkrati pa sistem poenostavijo tako, da lahko proučujemo vlogo, organizacijo in dinamiko posameznih komponent. Modelni sistemi vključujejo: dvosloje v obliki veziklov, planarne dvosloje in fragmente naravnih celičnih membran (Chan in Boxer, 2007).

2.2.2 Liposomi

Liposomi (vezikli) so umetni sferični mehurčki sestavljeni iz enega ali več lipidnih dvoslojev. Glede na število dvoslojev jih delimo na: večslojne vezikle (MLV - multilamellar vesicles), heterogene velikosti od 100 do 4000 nm in enoslojne vezikle (ULV - unilamellar vesicles) z velikostjo med 20 in 30 nm (majhni unilamelarni vezikli (SUV - small unilamellar vesicles) ter 40 do 1000 nm velike enoslojne vezikle (LUV - large unilamellar vesicles) (Lasic, 1993).

2.2.3 Arheosomi

Liposomi, ki so sestavljeni iz lipidov arhejskega izvora, ali pa le-te samo vsebujejo, se imenujejo arheosomi (Patel in Sprott, 1999). Lipidi arhej se bistveno razlikujejo od lipidov evkariontov (Koga in sod., 1998; Peretó in sod., 2004; Lopez-Garcia in Moreira, 2004; Wachterhauser, 2003). Ti so znani po svoji izjemni stabilnosti. Tudi pri daljšem shranjevanju med njimi ne prihaja do zlivanja ali združevanja, so zelo stabilni v širokem pH spektru, odporni na kemijsko hidrolizo ter encimsko razgradnjo s fosfolipazami (DeRosa, 1996; Bartuci in sod., 2005; Chong in sod., 2005; Gmajner in sod., 2011). Fitnilne verige v arhejskih lipidih so popolnoma nasičene in kot takšne niso občutljive na peroksidacijo, ki lahko povzroči fuzijo, agregacijo ali prepuščanje, kot je to pogosto pri konvencionalnih liposomih kot posledica prisotnosti nenasičenih maščobnih verig (Mathai in sod., 2001).

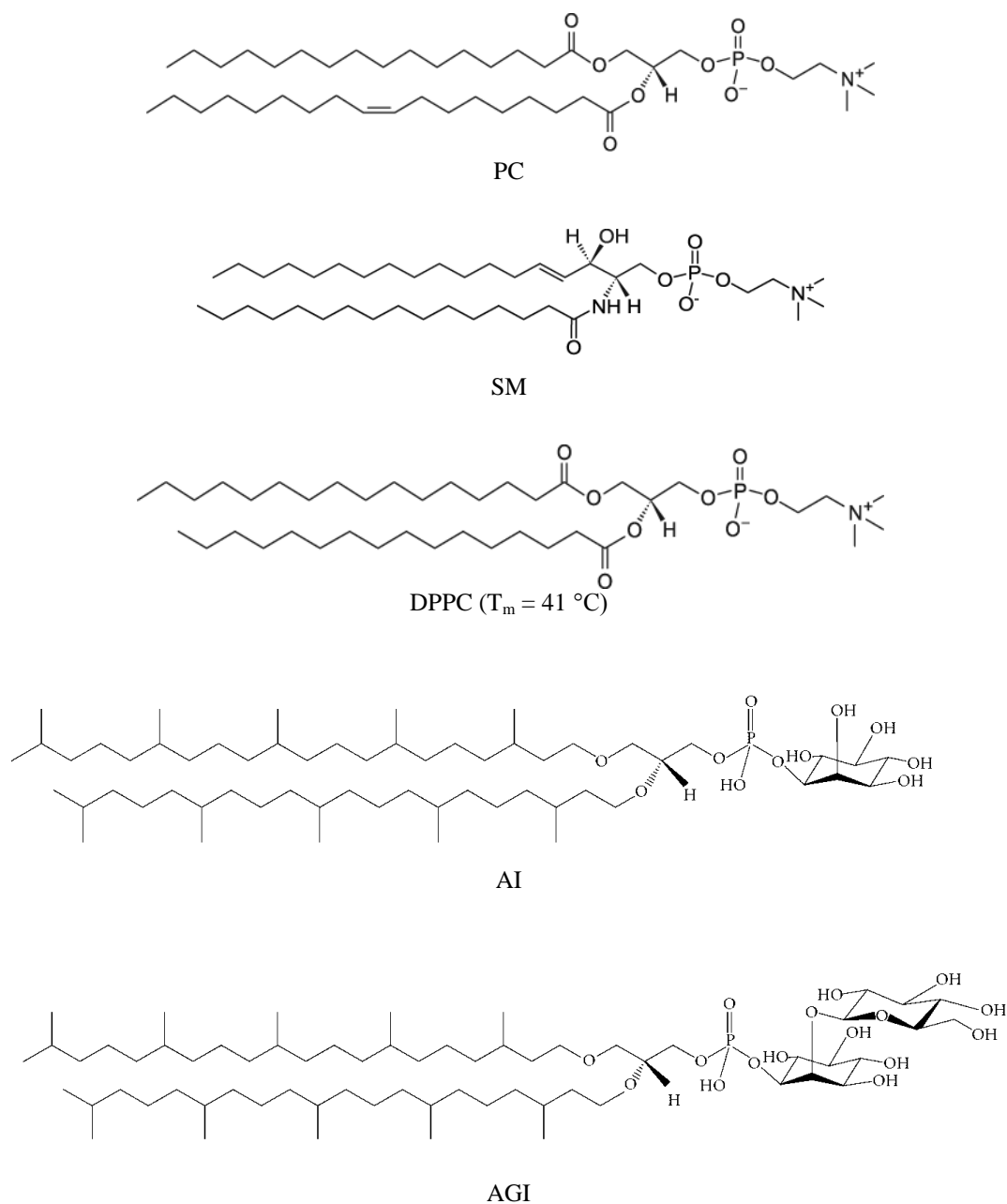
Arhealni lipidi imajo štiri značilnosti, ki povečajo stabilnost membrane:

- stereokemija glicerolfosfatne skupine – ogljikovodikove verige so vezane na sn-2 in sn-3 pozicijah-*sn*-glicerol-1-fosfata

- ogljikovodikove verige so na glicerolni ostanek vezane z eterso vezjo
- razvejane ogljikovodikove verige (izoprenoidi)
- mnoge arhejske vrste imajo rigidne bipolarne lipide iz tetraeterskega jedra, ki se razteza preko celotne membrane (Koga in Morii, 2005, 2006; Poklar Ulrich in sod., 2009);

Za naše raziskave smo uporabili arheosome pripravljene iz polarnih lipidov izoliranih iz aerobne in hipertermofilne arheje *Aeropyrum pernix* K1 (Sako in sod., 1996). Membranske lipide arheje *A. pernix* sestavlja izključno C_{25,25}-archeol (di-O-sesterpanil-glycerol). Glavna polarna lipida sta C_{25,25}-archetidil(glukozil)inositol (AGI), ki predstavlja 91 mol%, medtem ko C_{25,25}-archetidilinositol (AI) predstavlja 9 mol% polarne lipidne metanolne frakcije (PLMF) izolirane iz arheje *A. pernix* K1 (Morii in sod., 1999).

V naših poskusih smo uporabljali liposome iz mešanice fosfatidilholina (PC) in sfingomielina (SM) v razmerju 2,4:1, liposome iz dipalmitoil-fosfatidilholina (DPPC), ter liposome pripravljene iz polarnih lipidov izoliranih iz arheje *A. pernix* K1: AI - 2,3-di-O-sesterpanil-*sn*-glicerol-1-fosfo-mio-inozitol in AGI - 2,3-di-O-sesterpanil-*sn*-glicerol-1-fosfo-1'-(2'-O- α -D-glukozil)-mio-inozitol. Strukturne formule uporabljenih lipidov so prikazane na sliki 6.

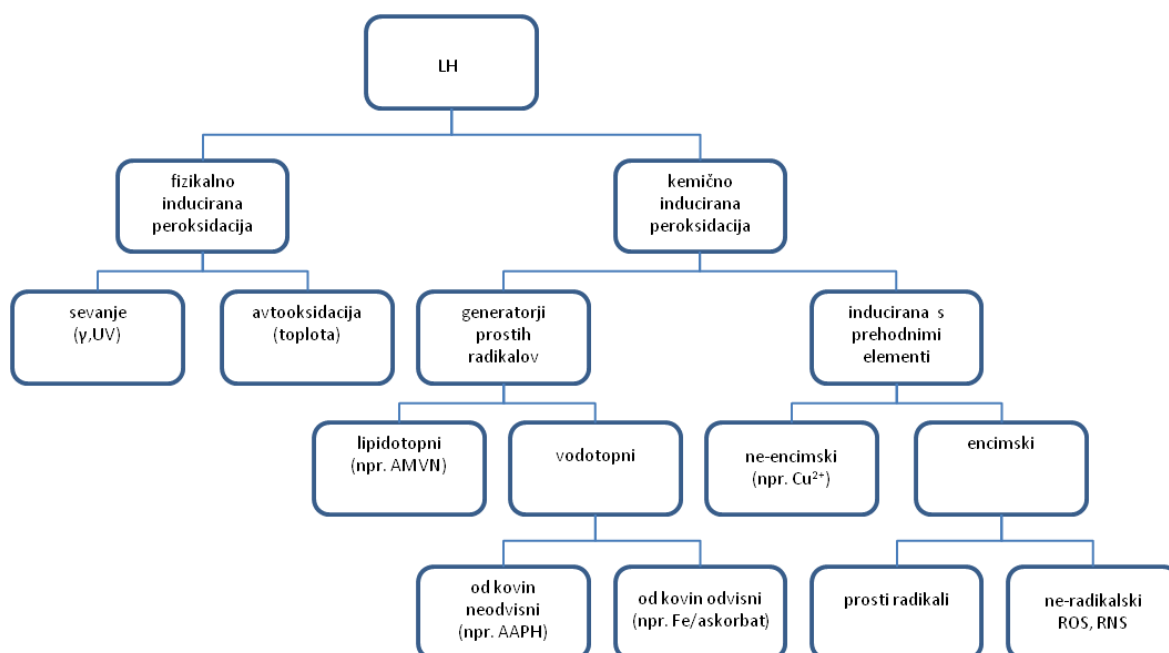


Slika 6: Strukturne formule uporabljenih lipidov. PC – fosfatidilholin, SM – sfingomielin, DPPC – 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoholin, AI – 2,3-di-O-sesterpanil-*sn*-glicerol-1-fosfo-mio-inozitol, AGI – 2,3-di-O-sesterpanil-*sn*-glicerol-1-fosfo-1'-(2'-O- α -D-glukozi)-mio-inozitol; T_m –temperatura prehoda iz gel v tekoče kristalinično stanje (Avanti Polar Lipids, 2013; Ota in sod., 2012).

Figure 6: Structural formulae of used lipids. PC – phosfatidilcholin, SM – sfingomielin, DPPC – 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glicero-phosphoholin, AI – 2,3-di-O-sesterpanyl-*sn*-glycerol-1-phospho-myio-inositol, AGI – 2,3-di-O-sesterpanyl-*sn*-glycerol-1-phospho-1'-(2'-O- α -D-glucosyl)-myio-inositol; T_m – temperature of the gel-to-liquid crystalline phase transition (Avanti Polar Lipids, 2013; Ota et al., 2012).

2.3 PEROKSIDACIJA LIPIDOV

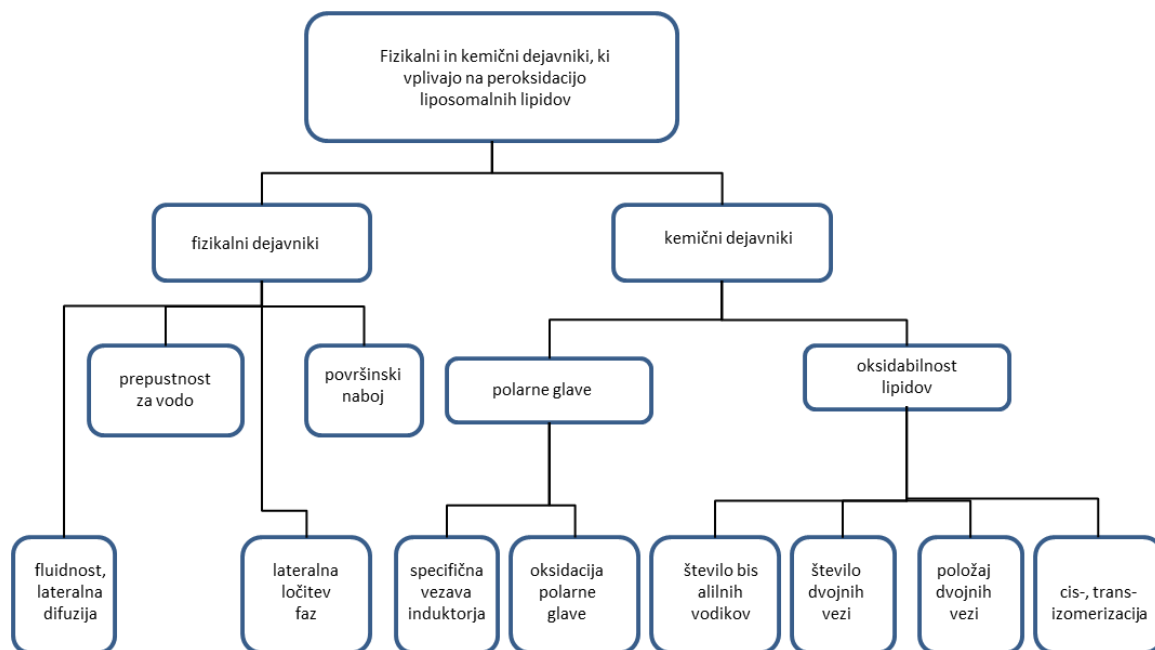
Prosti radikali, ki nastanejo z različnimi mehanizmi povzročajo peroksidacijo membranskih lipidov. Ta proces je zelo pomemben, ker spremeni fizikalne lastnosti membrane. Spremeni se njena prepustnost za različne snovi, vpliva pa tudi na vgradnjo lipidov in proteinov v membrane ter posledično na funkcijo membrane (Schnitzer in sod., 2007; Wong-Ekkabut in sod., 2007). Induktorji peroksidacije so prikazani na sliki 7.



Slika 7: Klasifikacija induktorjev peroksidacije lipidov (LH – lipidi) (Schnitzer in sod., 2007).

Figure 7: Classification of the inducers of lipid peroxidation (LH – lipids) (Schnitzer et al., 2007).

Na peroksidacijo lipidov vplivajo številni dejavniki. Fizikalni in kemični dejavniki, ki vplivajo na peroksidacijo lipidov, so prikazani na sliki 8.



Slika 8: Fizikalni in kemični dejavniki, ki vplivajo na peroksidacijo liposomalnih lipidov (Schnitzer in sod., 2007).

Figure 8: Physical and chemical factors that effect the peroxidation of liposomal lipids (Schnitzer et al., 2007).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 KEMIKALIJE IN DROBNA OPREMA

1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoholin (DPPC)	Avanti Polar Lipids, ZDA
1,6-difenil-1,3,5-heksatrien (DPH)	Sigma Aldrich Chemical Company, ZDA
2-(N-morfolino)etansulfonska kislina (MES)	Sigma Aldrich Chemical Company, ZDA
2,2'-azobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina (ABTS)	Sigma Aldrich Chemical Company, ZDA
2-propanol	Merck, Nemčija
2-tiobarbiturna kislina	Merck, Nemčija
4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina (HEPES)	Sigma Aldrich Chemical Company, ZDA
4,4-difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-undekanojska kislina (BODIPY [®] 581/591 C ₁₁)	Invitrogen Molecular probes (ZDA)
aceton	Merck, Nemčija
acetonitril	Sigma Aldrich Chemical Company, ZDA
CuCl ₂	Kemika, Hrvaška
dekstrin	Kemika, Hrvaška
dimetil sulfoksid	Merck, Nemčija
etanol	Merck, Nemčija
FeCl ₃	Fluka Chemica, Švica
fosfatidilholin (PC; jajčni)	Avanti Polar Lipids, ZDA
glicerol	Kemika, Hrvaška
glutaraldehyd	Sigma Aldrich Chemical Company, ZDA
arabski gumi	Kemika, Hrvaška
izolat sojinih proteinov	The Solae Company, Švica
kloroform	Merck, Nemčija
koencim Q ₁₀	Sigma Aldrich Chemical Company, ZDA

laktoza	Fluka Chemica, Švica
MeFASL(10,3)	Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Slovenja
MeFASL(2,11)	Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Slovenja
metanol	Merck, Nemčija
N,N,N-trimetil-4-(6-fenil-1,3,5-heksatrien-1-il)fenilamonijev p-toluensulfonat (TMA-DPH)	Sigma Aldrich Chemical Company, ZDA
natrijev oktenilsukcinat škroba	Dequin Sanfu Food Co., Ltd., Kitajska
perklorna kislina	Merck, Nemčija
Phospholipid C kit Wako Pure	Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japonska
poliglicerol ester maščobne kisline (PGE)	Zhengzhou honest food Co., Ltd. , Kitajska
predgeliran škrob	Huzhou Zhanwang Pharmaceutical Co., Ltd, Kitajska
pululan	TCI Europe NV, Belgija
saharoza	Fluka Chemica, Švica
sfingomielin (SM; jajčni)	Avanti Polar Lipids, ZDA
sojin lecitin	Sigma Aldrich Chemical Company, ZDA
tetrahidrofuran	Sigma Aldrich Chemical Company, ZDA
trigliceridi maščobnih kislin	Cognis, Nemčija
trikloroacetna kislina	Merck, Nemčija
β-ciklodekstrin	Jiangsu Fengyunu Biotechnology Co., Ltd., Japonska

3.2 LABORATORIJSKA OPREMA

centrifuge	Hettich Zentrifugen, Nemčija Tehtnica Železniki, Slovenija Eppendorf Centrifugen, Nemčija
HPLC	Agilent Technologies, ZDA
liofilizator	Martin Christ, Nemčija
N-DSC III kalorimeter	CSC 6300, CSC, ZDA
rotavapor	R210, Büchi, Švica
fluorescenčni spektrofotometer	Cary Eclipse, Varian, Avstralija
spektrofotometer	Cary Eclipse, Varian, Avstralija
EPR spektrometer ELEXSYSE 500	Bruker, Nemčija
2,5 mL kvarčne kivete	FLR Cary, Varian, Avstralija
vakuumska črpalka	Thermolyne Nuova Stirrer, Thermo Scientific ZDA
vibracijski stresalnik	Tehtnica Železniki, Slovenija
vrstični elektronski mikroskop Supra 35 VP	Carl Zeiss, Nemčija

3.3 VZORCI S CoQ₁₀

Proučevali smo vpliv nosilcev na interakcijo vodotopnih oblik koencima Q₁₀ z modelnimi membranami. Okarakterizirali smo komercialno dostopne vzorce CoQ₁₀ in pripravljene kapsulate: CoQ₁₀ v areheosomih, pululanu in izolatu sojinih proteinov.

3.3.1 Vzorci CoQ₁₀ s trga

Analizirali smo pet komercialno dostopnih vzorcev s sestavo nosilcev prikazano v preglednici 3.

Preglednica 3: Sestava vzorcev koencima Q₁₀ (CoQ₁₀) s trga.

Table 3: Composition of comercial coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀) formulations.

Vzorec	Vsebnost CoQ ₁₀ (%)	Nosilci (%)	Oblika	
A	10,8	glicerol	54,5	emulzija
		sojin lecitin	3,0	
		poligliceril ester - PGE	12,0	
		trigliceridi maščobnih kislin	5,0	
		voda	14,7	
B	13,2	laktoza	19,8 - 24,2	prašek
		predgeliran škrob	27,0 - 33,0	
		arabski gumi	21,6 - 26,4	
C	42,0	natrijev oktenilsukcinat škroba	40,0	prašek
		dekstrin	15,0	
		glicerol	3,0	
D	14,9	β-ciklodekstrin	74,0 - 76,0	prašek
E	22,1	laktoza	15,0 - 20,0	prašek
		natrijev oktenilsukcinat škroba	20,0 - 30,0	
		saharoza	20,0 - 25,0	
		glicerol	4,0 - 8,0	
		dekstrin	5,0 - 9,0	

3.4 PRIPRAVA KAPSULATOV

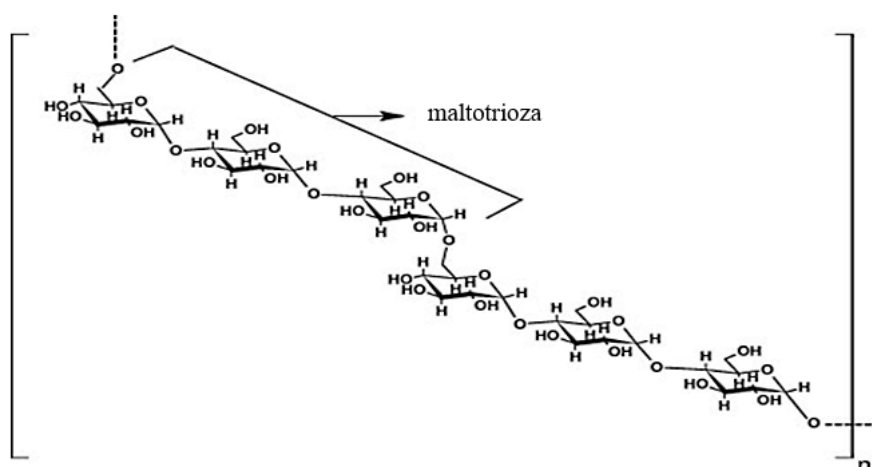
3.4.1 Kapsulacija koencima Q₁₀ v izolat sojinih proteinov

Obogatena oblika sojinih proteinov, znana kot izolat sojinih proteinov (ang. *soy protein isolate*; SPI) ima visoko prehransko vrednost in veliko uporabnost v živilski industriji. Ker je izolat sestavljen iz nepolarnih, polarnih in nabitih aminokislin, lahko znotraj svojih funkcionalnih skupin inkorporira številne učinkovine (Liu in sod., 2010). Glavne komponente SPI so glicin in β-konglicin (Zi Teng in sod., 2009). Te komponente so v vodnem okolju v glavnem v obliki globularnih molekul s hidrofilnim ovojem ter hidrofobnim jedrom, določena količina pa v obliki majhnih vodotopnih agregatov (Li in sod., 1985; Utsumi in Kinsella, 1985). Ob dodatku mrežnega povezovalca (ang. *cross-linking agent*) molekule SPI še naprej agregirajo in tvorijo različne strukture (npr. mikrosfere, hidrogeli, polimerne mešanice, nanodelce) (Jong in sod., 2008; Lazko in sod., 2004; Liu in sod., 2008).

Agregate SPI napolnjene s CoQ₁₀ (5 %) smo pripravili po metodi za pripravo nanodelcev s kurkuminom (Teng in sod., 2012). Izolat sojinih proteinov SUPRO® 500E IP (60 mg/mL) smo suspendirali v miliQ vodi, pustili nabrekati eno uro in dodali etanol do koncentracije 70 %. CoQ₁₀ smo raztopili v 99-odstotnem etanolu (3 mg/mL) in ga po kapljicah dodali raztopino CoQ₁₀, da smo dosegli masno razmerje SPI:CoQ₁₀ = 20:1. Dodali smo še toliko etanola, da je bila njegova končna koncentracija 80 %. Po 15 minutni ekvilibraciji smo tako pripravljeno disperzijo zamrežili z dodatkom glutaraldehida (28 μg/mg SPI). Reakcija je potekala pri sobni temperaturi 16 ur. Disperzijo smo razredčili s trikratno količino 80 % etanola. Etanol smo odstranili pri znižanem tlaku z uporabo rotavaporja in ga nadomestili z miliQ vodo. Disperzijo smo liofilizirali in shranili na -20 °C do analize.

3.4.2 Kapsulacija koencima Q₁₀ v pululan

Pululan (slika 9) je vodotopni eksopolisaharid glive *Aureobasidium pullulans* (Cheng in sod., 2011; Leathers, 2003; Prajapati in sod., 2013). Je užiten, nestrupen, ne-mutagen, brez vonja in okusa. Pululan je zelo stabilen v širokem pH območju in je odlična kisikova pregrada. Pululan izboljša obstojnost hrane, ker ga bakterije, plesni in glive težje asimilirajo kot vir ogljika (Singh in sod., 2008).



Slika 9: Shema kemijske strukture pululana z maltotriozo kot ponavljajočo se enoto (Singh in sod., 2008).
Figure 9: Schematic chemical structure of pullulan with maltotriose as repeating unit (Singh et al., 2008).

CoQ₁₀ zamrežen v pululanu smo pripravili tako, da smo v 40 mL vode miliQ raztopili 2 g pululana in raztopini dodali 300 mg CoQ₁₀. Mešanico smo 15 min sonicirali v ultrazvočni kopeli, nato pa 10 min mešali pri temperaturi 80 °C. Tako pripravljeno homogeno mešanico pululana in CoQ₁₀ smo ohladili, zamrznili v tekočem dušiku in posušili v liofilizatorju. Tako pripravljen vzorec smo shranili na -20 °C do analize.

3.4.3 Priprava CoQ₁₀ v arheosomih

Z namenom priprave sistema za zaščito koencima Q₁₀ in izboljšanja njegove termostabilnosti in UV stabilnosti smo CoQ₁₀ kapsulirali v arheosome. Predhodno smo proučili vpliv pH gojišča na strukturne značilnosti in fluidnost arheosomov.

3.4.3.1 Izolacija polarnih lipidov arheje *Aeropyrum pernix* K1

Arheje *A. pernix* K1 smo kupili pri japonski zbirki mikroorganizmov (Japan Collection of Microorganisms, Wake-shi, Japonska). Arhejo *A. pernix* smo gojili po metodi opisani v (Milek in sod., 2005), s to razliko, da smo kot puferni sistem uporabili 20 mM MES (2-(N-morfolino)etansulfonska kislina) za gojenje pri pH 6,0 in 20mM HEPES za gojenje pri pH 7,0 in 8,0. PLMF smo izolirali iz spranih in liofiliziranih celic *A. pernix*, po metodi opisani v Gmajner in sodelavci (2011). Izolirane PLMF smo analizirali s tankoplastno kromatografijo TLC z uporabo mešanice topil kloroform/metanol/ocetna kislina/voda

(85/30/15/5). Za analizo smo nanесли po 0,04 mg PLMF izoliranih iz *A. pernix* gojenih pri različnih pH. Razvite TLC plošče smo poškopili z 20 % H₂SO₄ in jih 20 min segrevali pri 180 °C, da so se pojavile lise lipidov. TLC plošče smo analizirali s programom Just TLC verzija 3.5.3 (Just TLC..., 2012), kjer smo primerjali intenzitete lis dveh lipidnih komponent.

3.4.3.2 Kapsulacija CoQ₁₀ v arheosome

Pripravili smo MLV arheosome z 10 % CoQ₁₀ (w/w). za pripravo smo uporabili metodo tankih filmov. V bučko smo odpipetirali 60 mg arhealnih lipidov raztopljenih v kloroformu in jim dodali 6 mg CoQ₁₀. Topilo smo odparili na rotavaporju pod znižanim tlakom. Tako pripravljen lipidni film smo rehidrirali s 3 mL 10 mM HEPES pufra. Iz tako pripravljenih večslojnih liposomov smo z ultrazvočnim sonikatorjem pripravili majhne enoslojne liposome.

3.5 ANALIZNE METODE

3.5.1 Priprava liposomov kot modelnih membran

Pripravili smo liposome različnih velikosti. Večslojne liposome (MLV) iz DPPC, PC in zmesi lipidov PC in SM smo pripravili z metodo tankih filmov (Lasic, 1993). Založne raztopine lipidov ($c = 10 \text{ mg/mL}$) smo pripravili v kloroformu in jih do uporabe hranili pri $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Liposome (5 mg/mL) smo pripravili v steklenih bučkah, kamor smo prenesli 1 mL raztopine DPPC, oz. $725 \text{ } \mu\text{L}$ PC in $275 \text{ } \mu\text{L}$ SM. Na rotavaporju smo pri tlaku 17 mbar iz zmesi odparili topilo. Na steni bučke nastal tanek film lipidov. Lipidni film smo s pomočjo steklenih kroglic hidrirali v 2 mL pufra (10 mM HEPES) ob mešanju na vibracijskem stresalniku. Za lažje oblikovanje liposomov smo bučko med stresanjem namakali v vodni kopeli s temperaturo $40 \text{ }^\circ\text{C}$ za pripravo liposomov PC:SM oz $45 \text{ }^\circ\text{C}$ za pripravo liposomov DPPC (Šentjurec in sod., 1999).

Iz večslojnih liposomov smo z ultrazvočnim sonikatorjem (Ultrasonic procesor, Sonics Vibra Cell VCX 750) neposredno pred meritvami pripravili majhne enoslojne liposome (čas soniciranja 15 min , delovni interval 10 s , prekinitvev 10 s , amplituda 40%). Postopek je potekal v ledeni kopeli. Majhne enoslojne liposome smo uporabili za merjenje fluorescence in EPR spektroskopijo, večslojne liposome pa za DSC meritve. Koncentracijo fosfolipidov v raztopinah smo preverili z uporabi *in vitro* encimskim testom Phospholipid C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japonska) po navodilih proizvajalca.

3.5.1.1 Priprava arheosomov

Za analizo smo uporabili SUV arheosome, ki smo jih pripravili s 30 minutno sonikacijo MLV arheosomov pripravljenih po predhodno opisanem postopku (10 s pulzi z 10 s premorom) v ledeni kopeli (Vibracell Ultrasonic Disintegrator VCX750, Sonics and Materials, ZDA). Da bi odstranili ostanke sonde, smo po soniciranju suspenzijo liposomov centrifugirali (10 min , 14.000 vrt./min , Eppendorf Centrifuge 5415C). Končna koncentracija liposomov je znašala 10 mg/mL .

3.5.2 Vrstična elektronska mikroskopija (ang. *Scanning electronic microscopy; SEM*)

Površino prašnatih vzorcev koencima Q₁₀ (vzorci B, C, D in E, ter vzorci CoQ₁₀ v arheosomih, pululanu in izolatu sojinih proteinov) smo opazovali z vrstičnim elektronskim mikroskopom Supra 35 VP (Carl Zeiss) s pospeševalno napetostjo 1 kV. Pred slikanjem smo vzorce pritrdili na nosilce z dvostranskim prevodnim ogljikovim trakom.

3.5.3 Fluorescenčna spektroskopija

3.5.3.1 Merjenje fluorescenčne anizotropije DPH in TMA-DPH

Meritve fluorescenčne anizotropije in polarizacije pogosto uporabljajo v biofizikalnih in biomedicinskih raziskavah, kot tudi za analitske namene. Po vzbujanju s polarizirano svetlobo, je emisija iz številnih vzorcev tudi polarizirana (Diaz in sod., 2003). Spremembe fluidnosti membran smo spremljali z uporabo fluoroforja DPH, ki se vgradi v notranjost lipidnega dvosloja in njegovega kationskega derivata TMA-DPH, ki se vgradi v bližino polarnih glav na vodno-lipidni meji (priloga A) (Donner in Stoltz, 1985).

Meritve fluorescenčne anizotropije smo opravili v kvarčnih kivetah (10 mm) s fluorescenčnim spektrofotometrom Cary Eclipse (Varian, Australia) pri temperaturah 25 °C in 45 °C, in z uporabo polarizatorjev z nominalno pasovno širino 5 nm za ekscitacijo in emisijo. Alikvote liposomov SUV (50 µL) smo označili s fluoroforjem DPH oz. TMA-DPH (1 mM oz. 2 mM založna raztopina v dimetilsulfoksidu) in razredčili do 2,5 mL z 10 mM HEPES pufrom. Končna koncentracija lipidov je znašala 0,1 mg/mL z 1 µM DPH oz. 2 µM TMA-DPH. Vzorce vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ in nosilcev, prisotnih v posameznih formulacijah, smo raztopili v mQ vodi ($c_{\text{CoQ}_{10}} = 2 \text{ mg/mL}$), raztopino čistega CoQ₁₀ pa smo pripravili v 99-odstotnem etanolu ($c_{\text{CoQ}_{10}} = 10 \text{ mg/mL}$). Suspenzije vzorcev smo dodajali raztopini SUV označenih z DPH oz. TMA-DPH. To nam je omogočilo proučitev vpliva teh pripravkov in njihovih komponent na fluidnost modelnih membran v razmerju $n_{\text{Lig}}/n_{\text{Lip}}$, kjer je n_{Lig} število molov CoQ₁₀ in n_{Lip} število molov lipidov, v območju od 0 do 1,8. Rezultate smo podali kot anizotropija (r), ki označuje anizotropijo DPH oz. TMA-DPH v lipidnih dvoslojih v prisotnosti vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ ali njihovih komponent. Za kontrolo smo vzeli mQ vodo oz. 99-odstotni etanol. Fluorescenčno

anizotropijo DPH oz. TMA-DPH smo merili pri ekscitacijski valovni dolžini 358 nm, z vertikalno orientiranim ekscitacijskim polarizatorjem, medtem ko smo vertikalne in horizontalne komponente polarizirane svetlobe detektirali pri 410 nm. Fluorescenčna anizotropija DPH oz. TMA-DPH v vodni raztopini je zanemarljiva. Anizotropija je bila izračunana s programom inštrumenta po spodnji enačbi (1),

$$r = I_{HH} - GI_{HV} / (I_{HH} + 2GI_{HV}) \quad (1)$$

kjer sta I_{HH} in I_{HV} intenziteti fluorescence horizontalno in vertikalno polarizirane emisije, ko vzorec vzbujamo z vertikalno polarizirano svetlobo (Lakowicz, 2006).

Vrednost G-faktorja, razmerja občutljivosti detekcijskega sistema za horizontalno (I_{HH}) in vertikalno polarizirano svetlobo (I_{HV}) smo določili za vsako meritev posebej. Iz vrednosti anizotropije smo izračunali ureditveni parameter (Enačba 2) (Pottel in sod., 1983):

$$S = [1 - 2(r/r_0) + 5(r/r_0)^2]^{1/2} - 1 + r/r_0 / 2(r/r_0) \quad (2)$$

kjer je r_0 vrednost anizotropije fluorescence DPH oz. TMA-DPH v odsotnosti kakršnegakoli rotacijskega gibanja fluoroforja.

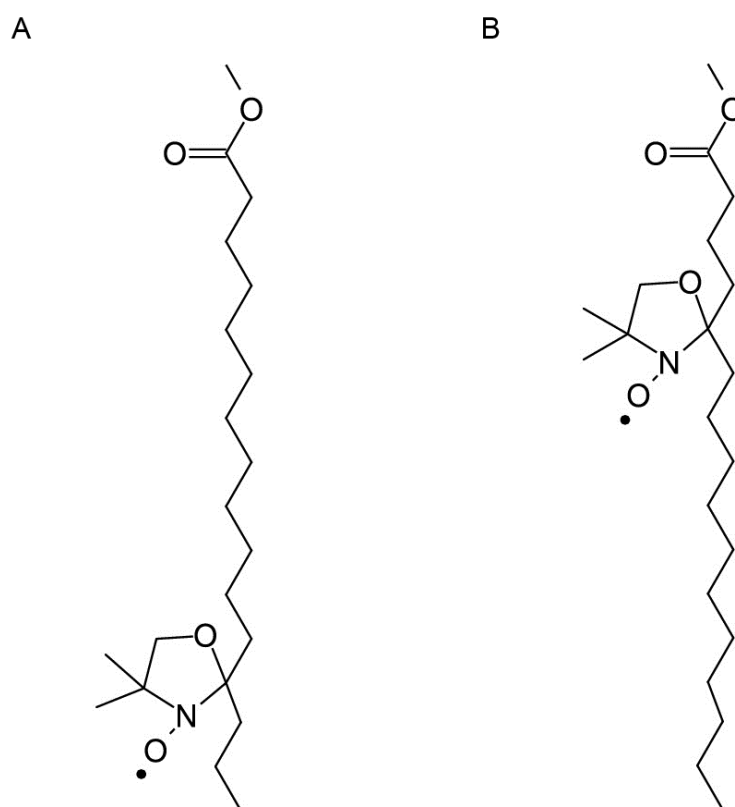
Fluorescenčna anizotropija je neposredno sorazmerna z ureditvijo membranskih lipidov in obratno sorazmerna s fluidnostjo membrane, zato zmanjšanje vrednosti anizotropije kažejo na večjo fluidnost membrane. Teoretična vrednost za r_0 znaša 0,4, medtem ko eksperimentalne vrednosti ležijo med 0,362 in 0,394 (Pottel in sod., 1983). Za izračune smo uporabili eksperimentalno določeno vrednost za DPPC pri 5 °C: za DPH znaša $r_0 = 0,370$ za TMA-DPH pa je $r_0 = 0,369$.

3.5.3.2 Merjenje fluorescenčne anizotropije DPH in TMA-DPH arheosomov

Za meritve fluorescenčne anizotropije smo v kiveti 2,5 mL 100 µM raztopine SUV arheosomov v ustreznem pufru dodali fluorofor. Končna koncentracija fluoroforja je znašala 0,5 µM za DPH in 1,0 µM za TMA-DPH. Meritve smo opravili v temperaturnem območju od 20 °C do 90 °C. Iz meritev anizotropije smo izračunali ureditveni parameter (enačba 2).

3.5.4 Elektronska paramagnetna resonanca (EPR)

Za proučevanje lipidnih membran moramo le-te spinsko označiti. Pri meritvah smo uporabili dva spinska označevalca, metilna estra palmitinske kisline MeFASL(10,3) in MeFASL(2,11). MeFASL(10,3) ima paramagnetni center (doksilni obroč z nitroksidno skupino) vezan na alkilni verigi na petem ogljikovem atomu od metilne skupine, MeFASL(2,11) pa ima paramagnetni center vezan na trinajstem ogljiku od metilne skupine (slika 10).



Slika 10: Spinska označevalca MeFASL(2,11) - A in MeFASL(10,3) – B.
Figure 10: Spin probes MeFASL(2,11) - A in MeFASL(10,3) – B.

Majhne ,enoslojne liposome smo označili s spinskim označevalcem MeFASL(10,3), ki ga uporabljamo za spremljanje lastnosti blizu površine membrane, ali MeFASL(2,11), ki ga uporabljamo za spremljanje lastnosti v notranjosti membrane. V epruveti smo posušili 35

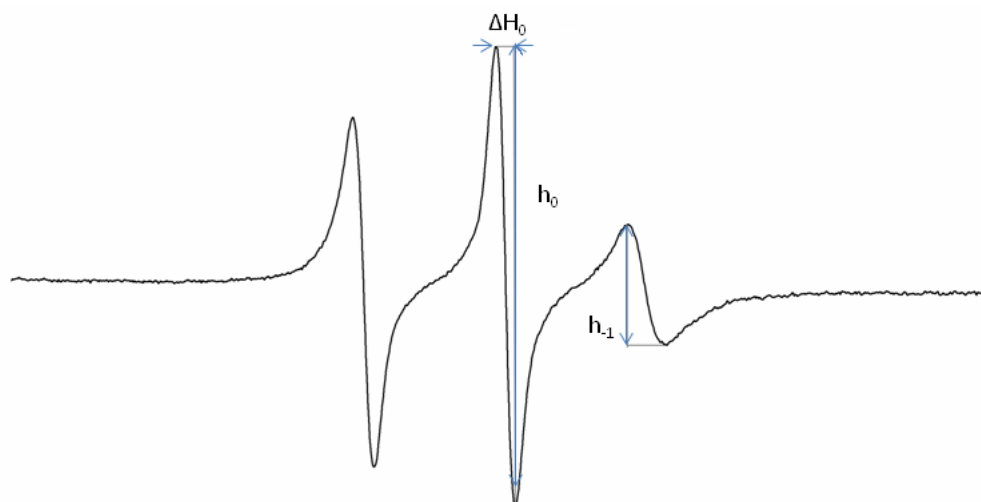
μL 10⁻⁴ M etanolne raztopine spinskega označevalca, da smo dobili enakomeren film spinskega označevalca. Dodali smo 50 μL suspenzije liposomov (5 mg/mL) in suspenzijo 10 minut mešali. Spinsko označenim liposomom smo dodali 28,7 μL vodotopnega pripravka CoQ₁₀ dispergirane v vodi s koncentracijo CoQ₁₀ 5 mg/mL. Enak volumen vode smo uporabili kot kontrolo. Mešanico smo 5 minut mešali na vibracijskem mešalniku, jo prenesli v 1-mm stekleno kapilaro (Euroglas Slovenija) in merili na X-pasovnem EPR spektrometru (ELEXSYSE 500 Bruker, Nemčija) v temperaturnem območju od 15 °C do 45 °C v 10 °C intervalu. Molarno razmerje lipidov : CoQ₁₀ je bilo 2:1.

Za meritve smo 50 μL SUV arheosomov v ustreznem pufru označili s spinskim označevalcem MeFASL(10,3), po prej opisanem postopku. Molarno razmerje MeFASL(10,3): lipidi je znašalo 1:250. Meritve smo opravili v temperaturnem območju od 5 °C do 95 °C. Da bi dobili natančnejše informacije o značilnosti membran arheosomov, smo EPR spektre računalniško obdelali.

Iz dobljenih spektrov (slika 11) smo izračunali empirični korelacijski čas (τ_{emp}) z uporabo spodnje enačbe (Marsh, 1981):

$$\tau_{emp} = k\Delta H[(h_0/h_{-1})^{1/2} - 1] \quad (3)$$

Širino srednje črte (ΔH) v mT, amplitudo srednje črte EPR spektra (h_0) in amplitudo črte pri višjem magnetnem polju (h_{-1}) smo odčitali iz EPR spektrov (Slika 11); k je konstanta spinskega označevalca, ki za MeFASL(10,3) in MeFASL(2,11) znaša $5,9387 \times 10^{-11} \text{ mT}^{-1}$ (Coderach in sod., 2000). Tako dobimo grobo oceno ureditve in dinamike gibanja spinskega označevalca in spremembe, ki jih povzroči vgraditev CoQ₁₀ ali drugih spojin iz nosilcev prisotnih v posameznih vzorcih v membrano. Kratek empirični korelacijski čas kaže na manjšo ureditev acilnih verig fosfolipidov, hitro gibanje nitroksidne skupine spinskega označevalca in posledično na veliko fluidnost membrane.



Slika 11: Eksperimentalni EPR spekter spinskega označevalca MeFASL(10,3) v membrani liposomov (PC:SM = 2,4:1 (mol:mol)). ΔH – širina srednje črte EPR spektra, h_0 – amplituda srednje črte EPR spektra, h_1 – amplituda črte pri višjem magnetnem polju.

Figure 11: Experimental EPR spectra of spin probe MeFASL(10,3) in liposomal membrane (PC:SM = 2,4:1 (mol:mol)). ΔH – line width of EPR spectra, h_0 – height of the mid-field, h_1 – height of the high-field line.

Podatki izmerjeni direktno iz spektra nam dajejo informacijo o lastnosti membrane v bližini spinskega označevalca, brez upoštevanja dejstva, da je membrana heterogena, sestavljena iz regij z različnimi lastnostmi (npr. lateralna heterogenost membrane, notranje in zunanje plasti membrane, nitroksidne skupine blizu polarnih glav lipidov, različne globine v slojih membrane). Da bi dobili podrobnejše informacije o karakteristikah membrane, smo EPR spektre obdelali s programom za simulacijo EPR spektrov EPRSIM C (Štrancar in sod., 2005). Pri tem upoštevamo, da je eksperimentalni spekter sestavljen iz več spektralnih komponent z nizi parametrov, ki opisujejo različna področja membrane (Štrancar in sod., 2003, 2005).

Vsaka spektralna komponenta je podana s parametri: ureditveni parameter (S), rotacijski korelacijski čas (τ_c), širina črte (W), korekcijska faktorja polarnosti (p_A in p_g) in delež posamezne spektralne komponente (d). Ureditveni parameter S podaja orientacijsko ureditev nitroksidne skupine spinskega označevalca in je odvisen od urejenosti okoliških acilnih verig fosfolipidov. Za popolnoma urejene membrane je $S = 1$, za izotropno razporejene molekule pa $S = 0$. Bolj fluidne membranske regije imajo manjši ureditveni parameter. Rotacijski korelacijski čas (τ_c) opisuje rotacijsko gibanje spinskega označevalca. Nanj vpliva gibanje acilnih verig okoliških lipidov. Širina črte (W) izhaja iz interakcij med spinskimi označevalci in prispevkov drugih paramagnetnih nečistoč (npr.

kisik, nehomogenosti zunanjega magnetnega polja). Korekcijska faktorja polarnosti izhajata iz polarnosti okolice nitroksidne skupine spinskega označevalca. Večji kot je korekcijski faktor polarnosti, v bolj polarnem okolju se nahaja soinski označevalec. Delež posamezne spektralne komponente (d) podaja relativno količino spinskega označevalca z določenim načinom gibanja, in je odvisen od porazdelitve molekul spinskega označevalca med regijami z različno fluidnostjo (Šentjerc in sod., 2002). Ker je lateralno gibanje spinskega označevalca znotraj membrane v časovni skali EPR meritve kratko (Johnson in sod., 1996), EPR spekter opisuje samo lastnosti bližnje okolice spinskega označevalca na manometrski skali. Vse membranske regije s podobnim gibanjem spinskega označevalca prispevajo k isti spektralni komponenti, zato vsaka spektralna komponenta odraža fluidnostne lastnosti določenega tipa membranskih nanodomen (velikih nekaj nm) (Štrancar in Arsov, 2003).

3.5.5 Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC)

Diferenčna dinamična kalorimetrija je zelo uporabna metoda za proučevanje toplotno induciranih sprememb lipidnih struktur med vgrajevanjem spojin. Prehod DPPC lipidov iz gel stanja v tekoče kristalinično stanje smo spremljali na NANO DSC serije III sistemu (Calorimetry Science, Provo, ZDA). Spremljali smo fazne prehode multilamelarnih liposomov iz DPPC (0,5 mg/mL) ob prisotnosti vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ in nosilcev prisotnih v posameznih formulacijah. Molarno razmerje CoQ₁₀ proti lipidom je bilo 1:1 in enaka količina posameznega nosilca, kot je prisotna v tako pripravljenem vzorcu. Referenčno celico smo napolnili z 10 mM HEPES pufrom, pH 7,0. Pred meritvijo smo vzorce odzračili. Merili smo v temperaturnem območju med 10 °C in 70 °C. Hitrost segrevanja in ohlajanja je bila 1 °C/min. Iz DSC poskusov dobljene termograme smo analizirali z uporabo orodja OriginPro8.1 (OriginLab Corporation, ZDA). Določili smo temperaturo faznega prehoda (T_m) in entalpijo (ΔH_{cal}). Termogrami so prikazani kot presežna molarna toplotna kapaciteta <C_p> (kJ/molK) v odvisnosti od temperature (°C).

Presežna molarna toplotna kapaciteta je definirana kot:

$$C_p = \frac{q_p}{\Delta T} \quad (4)$$

kjer q_p predstavlja prenos toplote na mol, ΔT pa razliko v temperaturi.

Sprememba entalpije je podana z enačbo:

$$\Delta H = \int_{T_1}^{T_2} C_p dT \quad (5)$$

kjer sta T₁ in T₂ temperaturi, pri katerih se proces začne oz. konča. Sprememba entalpije je površina pod krivuljo C_p v odvisnosti od temperature (Atkins in De Paula, 2006).

3.5.6 Določanje antioksidativne učinkovitosti CoQ₁₀

3.5.6.1 Določanje antioksidativnega potenciala z ABTS^{•+} radikalom

Ena izmed najpogosteje uporabljenih metod je indirektna metoda določanja antioksidativnega potenciala z ABTS^{•+} radikalom (Roginski in Lissi, 2005). Radikal lahko pridobimo iz ABTS (2,2'-azobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina) na več načinov: encimsko s peroksidazo, kemijsko z MnO₂, peroksidnimi radikali ali kalijevim persulfatom. V prisotnosti donorja vodikovega atoma ABTS^{•+} radikal hitro reagira in postane brezbarven (Abuja in Albertini, 2001; Erel, 2004).

Raztopino ABTS smo pripravili tako, da smo v 50 mL merilno bučko zatehtali 125,5 mg ABTS reagenta in 250 mg MnO₂ ter dopolnili do oznake z vodo miliQ. Raztopino smo dobro premešali in pustili čez noč pri sobni temperaturi. Tako pripravljeno raztopino ABTS^{•+} radikala smo centrifugirali (3000 g, 5 min) in prefiltrirali skozi 0,2 µm pore membranskega filtra. Alikvote raztopine ABTS^{•+} radikala (5 mL) smo zamrznili, liofilizirali (ALPHA 1-2 LDplus Freez Dryer, Martin Christ GbmH, Nemčija) in tako posušene shranili na -20 °C do uporabe (Durmaz, 2012). Pred uporabo smo jih ponovno raztopili, bodisi v vodi miliQ ali etanolu. V 2-mililitrske mikrocentrifugirke smo odpipetirali 1390 µL mQ vode ali etanola, dodali 500 µL suspenzije posameznih vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ oz čistega CoQ₁₀ (c = 5 mg/mL) v ustreznem topilu in 110 µL raztopine ABTS^{•+} radikala v vodi ali etanolu. Vzorce smo dobro premešali na vibracijskem mešalniku in jih shranili v temo. Po 30 min smo vzorce odcentrifugirali (4000 g/5 min) in prefiltrirali preko 0,45 µm membranskega filtra. Absorbanco smo merili pri valovni dolžini 734 nm (A₇₃₄).

Sposobnost lovljenja prostih radikalov smo izrazili kot delež inhibicije (%):

$$\% \text{ inhibicije ABTS}^{\bullet+} = [(A_{k734} - A_{734})/A_{k734}] \times 100 \quad (6)$$

3.5.6.2 Določanje oksidacije liposomov pripravljenih iz jajčnega fosfatidilholina, sprožene z UV obsevanjem –test TBARS

Antioksidativno učinkovitost posameznih vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ smo posredno preko zaviranja oksidacije preverili s TBARS testom (Pelle in sod., 1990). Lipidno oksidacijo v prisotnosti vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ smo merili spektrofotometrično s pomočjo tiobarbiturne kisline. Po 4 mL suspenzije liposomov s koncentracijo 10 mg/mL (jajčni PC - fosfatidilholin) z dodanih 10 mol% CoQ₁₀ (čistega ali vodotopnih pripravkov), smo dali v steklene posodice s premerom 3,5 cm, jih pokrili s kvarčnim steklom in dali pod UV luč (valovna dolžina 254 nm). Pripravili smo tudi dve kontroli: eno smo dali pod UV luč, drugo pa smo dali v temo. V določenih časovnih intervalih smo 0,2 mL suspenzije liposomov prenesli v stekleno epruveto s pokrovčkom in ji dodali 3 mL 20-odstotne raztopine trikloroacetne kisline. Raztopino smo dobro premešali in ji dodali 1 mL zmesi 2-odstotne tiobarbiturne kisline in 20-odstotne raztopine perklorne kisline. Vzorce smo ponovno dobro premešali in jih 25 minut segrevali v vreli vodni kopeli. Po končanem segrevanju smo epruvete ohladili v hladni vodi, reakcijsko mešanico prenesli v steklene centrifugirke in 8 min centrifugirali pri 2500 vrt./min v laboratorijski centrifugi. Bistri supernatant smo prenesli v kiveto in pomerili absorbanco pri 532 nm. Kot slepi vzorec smo uporabili 0,2 mL vode miliQ.

3.5.6.3 Ocena inhibicije oksidacije lipidov z uporabo lipofilnega fluoroforja BODIPY® 581/591 C₁₁

Za oceno relativnega antioksidacijskega potenciala vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ smo uporabili lipofilno sondo BODIPY® 581/591 C₁₁. Metoda temelji na občutljivosti fluorogene sonde BODIPY® 581/591 C₁₁ na oksidacijo z radikali, ki nastanejo iz lipidnih peroksidov (Drummen in sod., 2002).

Meritve fluorescence smo opravili v kvarčnih kivetah (l=10 mm) na fluorescenčnem spektrofotometru Cary Eclipse (Varian, Australija) pri 25 °C. Alikvote SUV pripravljenih iz jajčnega fosfatidilholina smo označili s fluorogeno sondo BODIPY® 581/591 C₁₁ (2 mM založna raztopina v dimetilsulfoksidu) in razredčili do končnega volumna 2,5 mL z 10 mM HEPES pufrom. Končna koncentracija lipidov je znašala 1 mg/mL, koncentracija BODIPY® 581/591 C₁₁ pa 1 µM. Vzorce smo 15 min inkubirali pri 25°C in s tem

omogočili vgradnjo fluorogene sonde v lipidni dvosloj. V kiveto smo dodali vodno suspenzijo posameznega vzorca vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ ($c_{\text{CoQ}_{10}}=2$ mg/mL), da je bilo molarno razmerje lipidi:CoQ₁₀=10:1. Peroksidacijo liposomov smo sprožili z dodatkom 20 μ L 1 mM CuCl₂. Emisijo fluorescence BODIPY 581/591 C₁₁ smo merili pri 520 nm, ob vzbujanju z valovno dolžino 500 nm.

3.5.7 Analiza temperaturne obstojnosti arhej *A. pernix*, arheosomov in polisaharida pululan

Termogravimetrično analiza je metoda, ki se uporablja za določanje relativne termične stabilnosti snovi. Merimo spreminjanje mase vzorca, kot funkcijo temperature. S termogravimetrično analizo (TGA SDTA 851, Mettler Toledo) smo z merjenjem zmanjševanja mase med segrevanjem proučili temperaturno obstojnost liofilizirane biomase arhej *A. pernix*, arheosomov in polisaharida pululan.

3.5.8 Analiza prepustnosti pululana za kisik (O₂)

Pululan smo zmešali z miliQ vodo (30:70, m:m) in mešanico tri ure pustili v vodni kopeli na 50 °C, da bi odstranili zračne mehurčke, ki so se ujeli v raztopino. Tako pripravljeno raztopino smo v tanki plasti nanесли na polietilensko (PET), folijo pri temperaturi 40 °C, da se je posušila. Suho folijo s pululanom smo prekrili s še eno plastjo PET folije in vstavili v merilno celico. Zgornjo komoro smo napolnili s kisikom (1 bar), spodnjo pa smo prepihali z dušikom. V določenih časovnih intervalih smo beležili prehajanje kisika preko PET folije s plastjo pululana. Količino kisika smo merili z aparatom Presens (PreSens Precision Sensing GmbH, Nemčija) in senzorjem kisika PST6 (PreSens Precision Sensing GmbH, Nemčija).

3.5.9 Vpliv topil na pripravljene kapsulate in adsorbate CoQ₁₀

Z namenom pridobiti nekaj informacij o tipu asociacije CoQ₁₀ v posameznih kapsulatih in adsorbatih smo le-te spirali z različnimi topili. Vzorce pripravljenih kapsulatov in adsorbatov CoQ₁₀ smo suspendirali v posameznih topilih (etanol, metanol in heksan). V 2 mL mikrocentrifugirke smo zatehtali toliko posameznega kapsulata, da je bila končna masa CoQ₁₀ 2 mg. Dodali smo po 2 mL posameznega topila, 10 s mešali na vibracijskem mešalniku in 10 min centrifugirali pri 14000 obr./min. V supernatantu smo

spektrofotometrično določili količino spranega CoQ₁₀. Postopek smo ponovili še štirikrat, da bi odstranili ves adsorbiran CoQ₁₀.

3.5.10 UV stabilnost vodnih suspenzij vodotopnih pripravkov CoQ₁₀

Fotostabilnost suspenzij posameznih vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ smo preverili tako, da smo po 3 mL posamezne suspenzije ($c_{\text{CoQ}_{10}} = 2 \text{ mg/mL}$) v steklenih posodah pokritih s kvarčnim steklom sevali pod UV lučjo ($\lambda = 254 \text{ nm}$). Suspenzijo čistega CoQ₁₀ smo pripravili tako, da smo v 2,7 mL vode odpipetirali 0,3 mL etanolne raztopine CoQ₁₀ s koncentracijo 20 mg/mL. V določenih časovnih intervalih smo iz posamezne posodice odpipetirali po 100 μL posamezne suspenzije, ki smo jo predhodno dobro premešali. Dodali smo 0,9 mL mešanice acetonitril:tetrahidrofuran:voda = 55:40:5 in 30 min mešali v ultrazvočni kopeli (Lunetta in Roman, 2008). S tem smo iz vzorcev odstranili ves CoQ₁₀. Po centrifugiranju smo v supernatantu spektrofotometrično (A_{270}) določili koncentracijo CoQ₁₀. Rezultate smo podali kot odstotek preostalega CoQ₁₀.

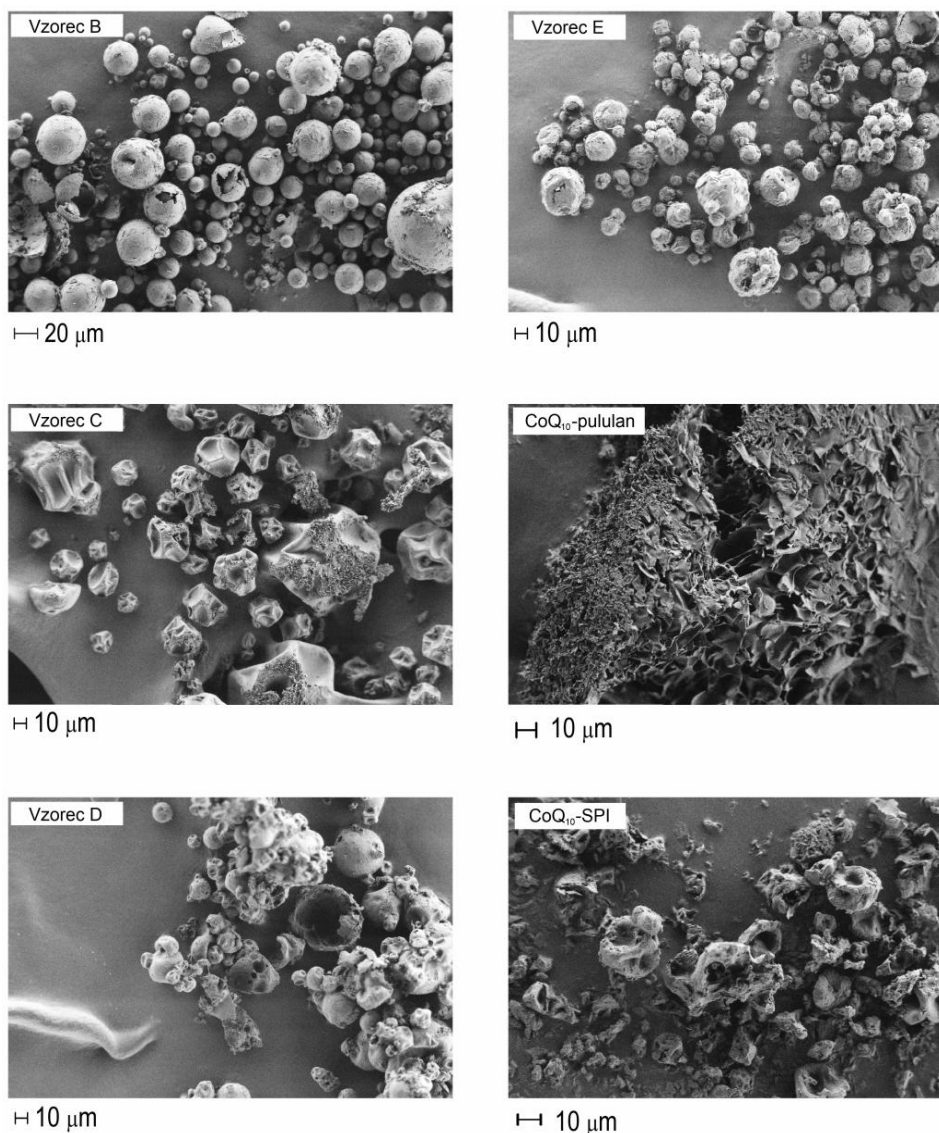
3.5.11 Termostabilnost vodotopnih pripravkov CoQ₁₀

Preverili smo termostabilnost CoQ₁₀ v posameznih vodotopnih pripravkih CoQ₁₀. V steklene vialo smo zatehtali toliko posameznega vodotopnega pripravka CoQ₁₀, da je bila končna masa CoQ₁₀ 2 mg. V primeru arheosomov smo v vialo odpipetirali po 400 μL SUV arheosomov z 10 % CoQ₁₀ ($c = 50 \text{ mg/mL}$). Vialo smo dali v peč na 80 °C in v določenih časovnih intervalih vzorčili. V ohlajeno vialo smo odpipetirali 2 mL mešanice acetonitril:tetrahidrofuran:voda = 55:40:5 in 30 min mešali v ultrazvočni kopeli (Lunetta in Roman, 2008). Po centrifugiranju smo v supernatantu spektrofotometrično (A_{270}) določili koncentracijo CoQ₁₀. Rezultate smo podali kot odstotek preostalega CoQ₁₀.

4 REZULTATI

4.1 MORFOLOGIJA VZORCEV S CoQ₁₀

Mikrografije SEM vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ kažejo sferične delce pripravljene z metodo sušenja z razprševanjem in globularnih struktur CoQ₁₀ v izolatu sojinih proteinov ter mrežasto strukturo liofiliziranega vzorca CoQ₁₀ v pululanu. Mikrokapsule analiziranih vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ so velikosti med 10 in 100 μm (Slika 12).



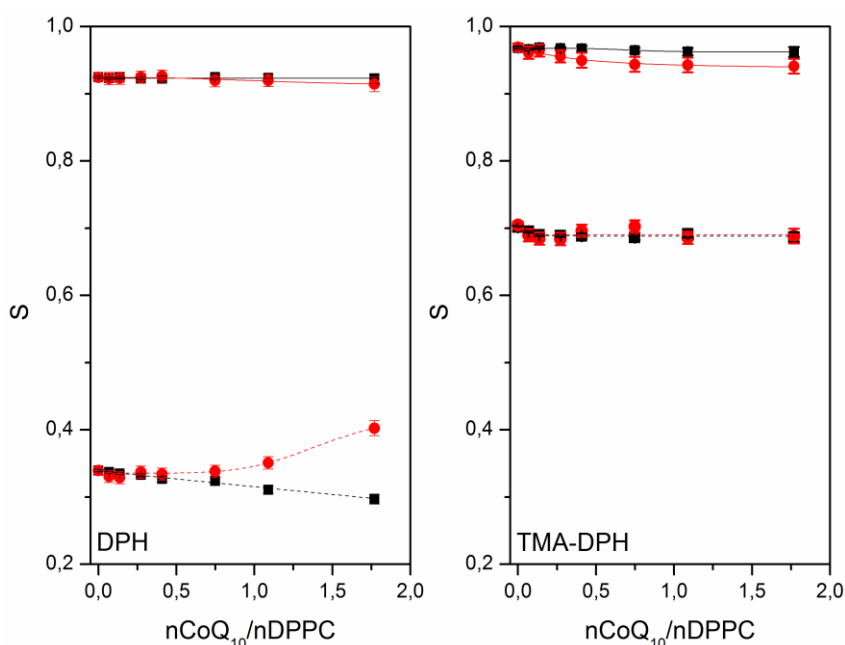
Slika 12: SEM mikrografija vodotopnih pripravkov CoQ₁₀. SPI – izolat sojinih proteinov.
Figure 12: SEM image of water soluble CoQ₁₀ formulations. SPI – soy protein isolate.

4.2 VPLIV CoQ₁₀ NA UREDITVENI PARAMETER LIPIDNIH DVOSLOJEV

Na slikah 15 do 46 so prikazane odvisnosti lipidnega ureditvenega parametra majhnih enoslojnih liposomov, pripravljenih iz DPPC oz. mešanice PS in SM (2,4:1), od molskega razmerja CoQ₁₀/lipidi v vodotopnih pripravkih CoQ₁₀ oz. ustreznih količin posameznega nosilca prisotnega v posameznem vodotopnem pripravku CoQ₁₀ pri 25 °C in 45 °C. Za spremljanje sprememb v notranjosti membrane smo uporabili fluorofor DPH, za spremljanje sprememb na vodno-lipidni meji pa njegov kationski derivat TMA-DPH.

4.2.1 CoQ₁₀

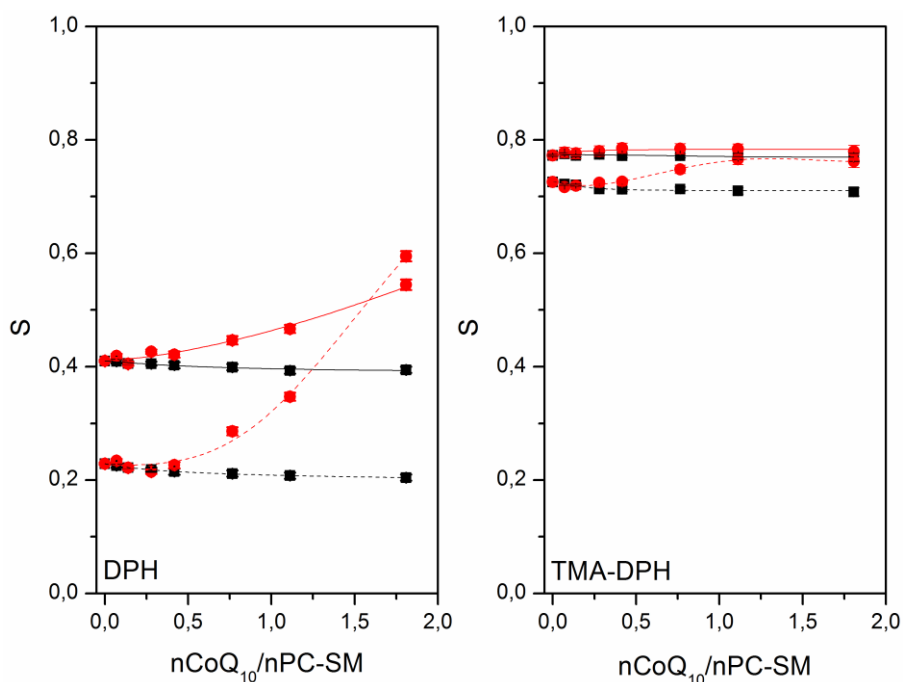
Vpliv čistega CoQ₁₀ na ureditveni parameter DPPC liposomov je prikazan na sliki 13. Čisti etanol, ki smo ga uporabili kot kontrolo, rahlo zniža fluorescenčno anizotropijo DPH in TMA-DPH. V zgornjem delu membrane (detekcija s TMA-DPH) smo opazili rahlo znižanje fluorescenčne anizotropije pri 25 °C. Pri tej temperaturi v notranjem delu nismo opazili večjih sprememb. Pri 45 °C, kjer je membrana v tekočem neurejenem stanju, smo opazili zmanjšanje fluidnosti membrane (slika 13 levo, rdeča črtkana črta).



Slika 13: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV pripravljenih iz DPPC z etanolno raztopino CoQ₁₀ (●) s koncentracijo 10 mg/mL; polna črta – 25 °C, črtkana črta – 45 °C. Absolutni etanol je bil uporabljen kot kontrola (■).

Figure 13: The changes in lipid order parameter (S) after titration of SUV constituted from DPPC with ethanol solution of CoQ₁₀ (●) with the concentration of 10 mg/mL; solid line – 25 °C, dashed line – 45 °C. Absolute ethanol was used for control (■).

Vpliv čistega CoQ₁₀ na ureditveni parameter liposomov pripravljenih iz mešanice PC in SM je prikazan na sliki 14. Opazili smo zvišanje fluorescenčne anizotropije DPH pri 25 °C in pri 45 °C, kar kaže na spremembe v notranjem delu membrane (slika 14 levo). Spremembe na površini membrane niso bile tako izrazite.



Slika 14: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z etanolno raztopino CoQ₁₀ (●) s koncentracijo 10 mg/mL; polna črta – 25 °C, črtkana črta – 45 °C. Absolutni etanol je bil uporabljen kot kontrola.

Figure 14: The changes in lipid order parameter (S) after titration of SUV constituted from PC and SM mix (2,4:1) with ethanol solution of CoQ₁₀ (●) with the concentration of 10 mg/mL; solid line – 25 °C, dashed line – 45 °C. Absolute ethanol was used for control (■).

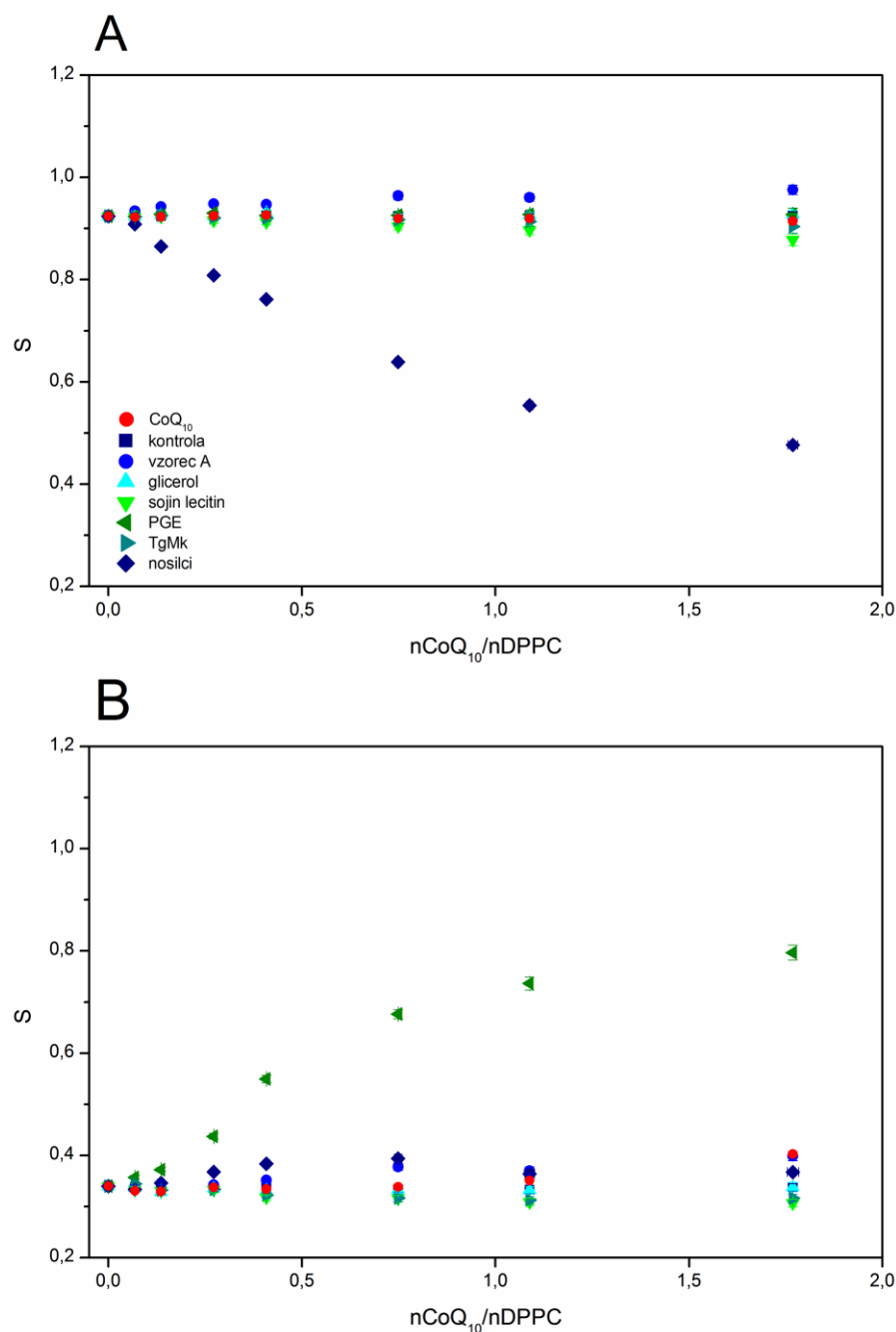
4.2.2 Vzorec A

Na slikah 15, 16, 17 in 18 so prikazane odvisnosti ureditvenega parametra v SUV liposomih, pripravljenih iz DPPC oz. mešanice PS in SM (2,4:1) od molskega razmerja CoQ₁₀/lipidi oz. ustrezni količini posamezne komponente nosilca prisotna v vzorcu A – emulziji CoQ₁₀ pri 25 °C in 45 °C. Vzorec A predstavlja tekočo emulzijo, kjer so kot komponente nosilca prisotni: glicerol, sojin lecitin, PGE, trigliceridi maščobnih kislin. Da bi ugotovili vpliv posameznih komponent na fluidnost membrane, smo analizo izvedli z vsakim posebej.

Prisotnost emulzije CoQ₁₀ je pri 25 °C povzročila ureditev acilnih verig, mešanica nosilcev, prisotnih v tem pripravku pa je povzročila povečanje fluidnosti notranjosti membrane DPPC liposomov. Tega učinka nismo opazili ob titraciji s posameznimi nosilci (Slika 15A). Nad faznim prehodom DPPC smo opazili rahlo povečanje urejenosti membrane ob dodatku emulzije CoQ₁₀. Sami nosilci prisotni v tem pripravku, z izjemo emulgatorja PGE (poliglicerol ester maščobne kisline), niso povzročili večjih sprememb. Dodatek PGE je povzročil postopno povečanje ureditve acilnih verig DPPC. Ureditveni parameter se je povečal za 2,3-krat (od 0,34 do 0,79) (slika 15B).

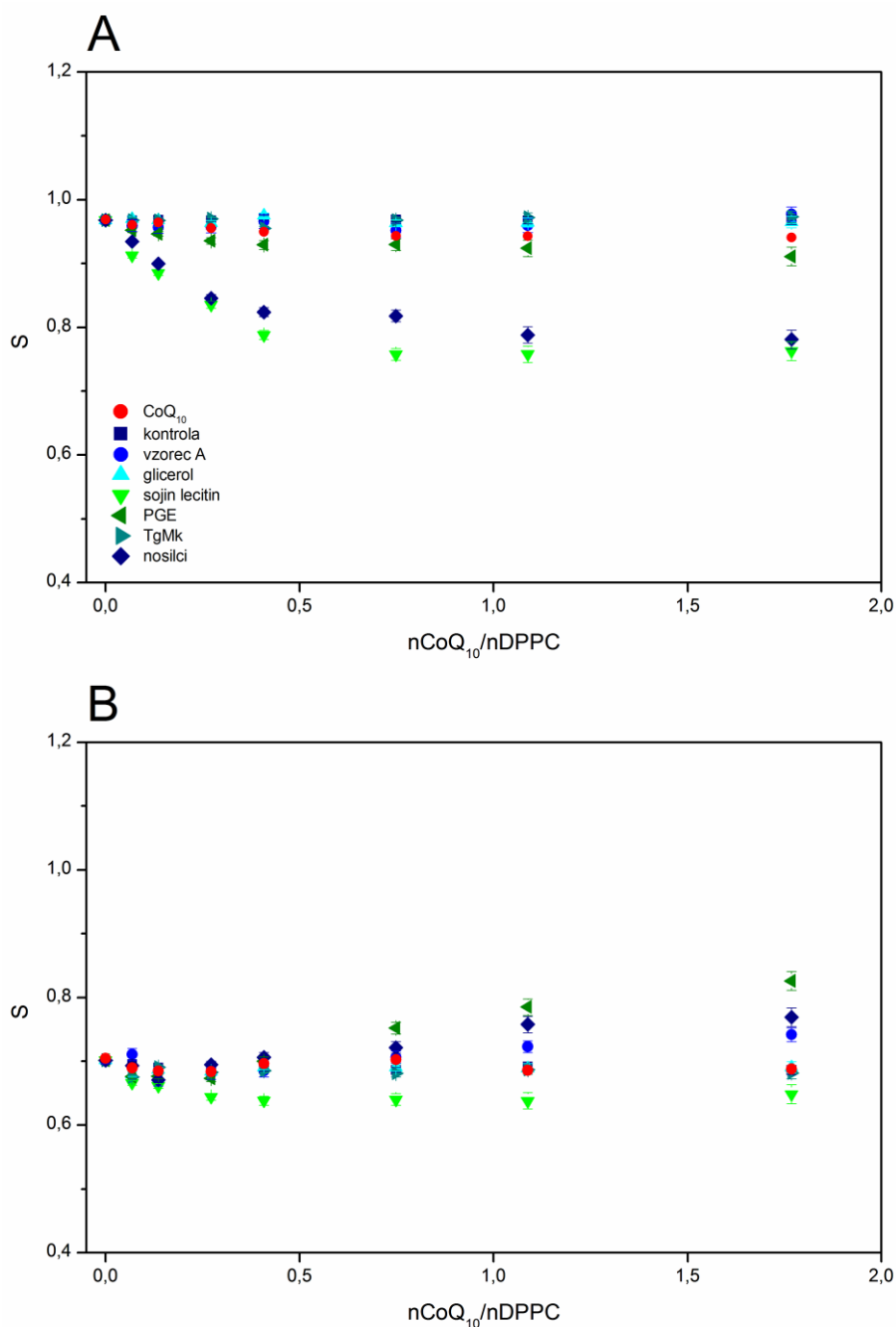
Titracija DPPC liposomov (pri 25 °C) s tem vodotopnim pripravkom ni povzročila spremembe fluorescenčne anizotropije TMA-DPH, s katerim zaznavamo spremembe na površini membrane. Večje spremembe smo opazili ob titraciji s samimi nosilci. Emulgator PGE je povzročil rahlo povečanje fluidnosti. Ob titraciji s suspenzijo sojinega lecitina smo opazili povečanje fluidnosti zgornjega dela membrane. Podoben učinek je bil opažen tudi ob prisotnosti suspenzije mešanice nosilcev prisotnih v vzorcu A (slika 16A). Nad temperaturo faznega prehoda je prišlo v prisotnosti emulzije CoQ₁₀ do rahlega povečanja anizotropije in posledično ureditvenega parametra, ko je razmerje $n_{CoQ_{10}}/n_{DPPC}$ preseglo vrednost 0,5. Podoben učinek smo opazili tudi v prisotnosti suspenzije nosilcev prisotnih v tem vzorcu. Največjo ureditev je povzročila prisotnost PGE, suspenzija sojinega lecitina pa je povzročila manjše povečanje fluidnosti na površini membrane (slika 16B).

V primeru SUV pripravljenih iz mešanice lipidov PC in SM v molarnem razmerju 2,4:1, smo pri 25 °C, ob prisotnosti emulzije CoQ₁₀, zaznali rahlo povečanje ureditve acilnih verig fosfolipidov. Mešanica nosilcev, prisotnih v tem vzorcu pa je povzročila rahlo povečanje fluidnosti tega dela membrane. Povečanje fluidnosti je bilo največje v prisotnosti PGE, največjo ureditev pa smo opazili ob prisotnosti triacilgliceridov maščobnih kislin (Slika 17A). Pri 45 °C suspenzija vseh nosilcev v tem vodotopnem pripravku CoQ₁₀ ni vplivala na ureditev acilnih verig fosfolipidov. Učinek emulgatorja PGE in trigliceridov maščobnih kislin je bil podoben kot pri 25 °C (slika 17B). Na površini SUV, pripravljenih iz mešanice lipidov PC in SM, posamezni nosilci, razen suspenzije sojinega lecitina, ki je povzročil zmanjšanje urejenosti površine membrane, pri 25 °C niso povzročili večjih sprememb (slika 18A). Pri 45 °C opazimo zmanjšanje urejenosti fosfolipidnih glav ob prisotnosti PGE in suspenzije sojinega lecitina (slika 18B).



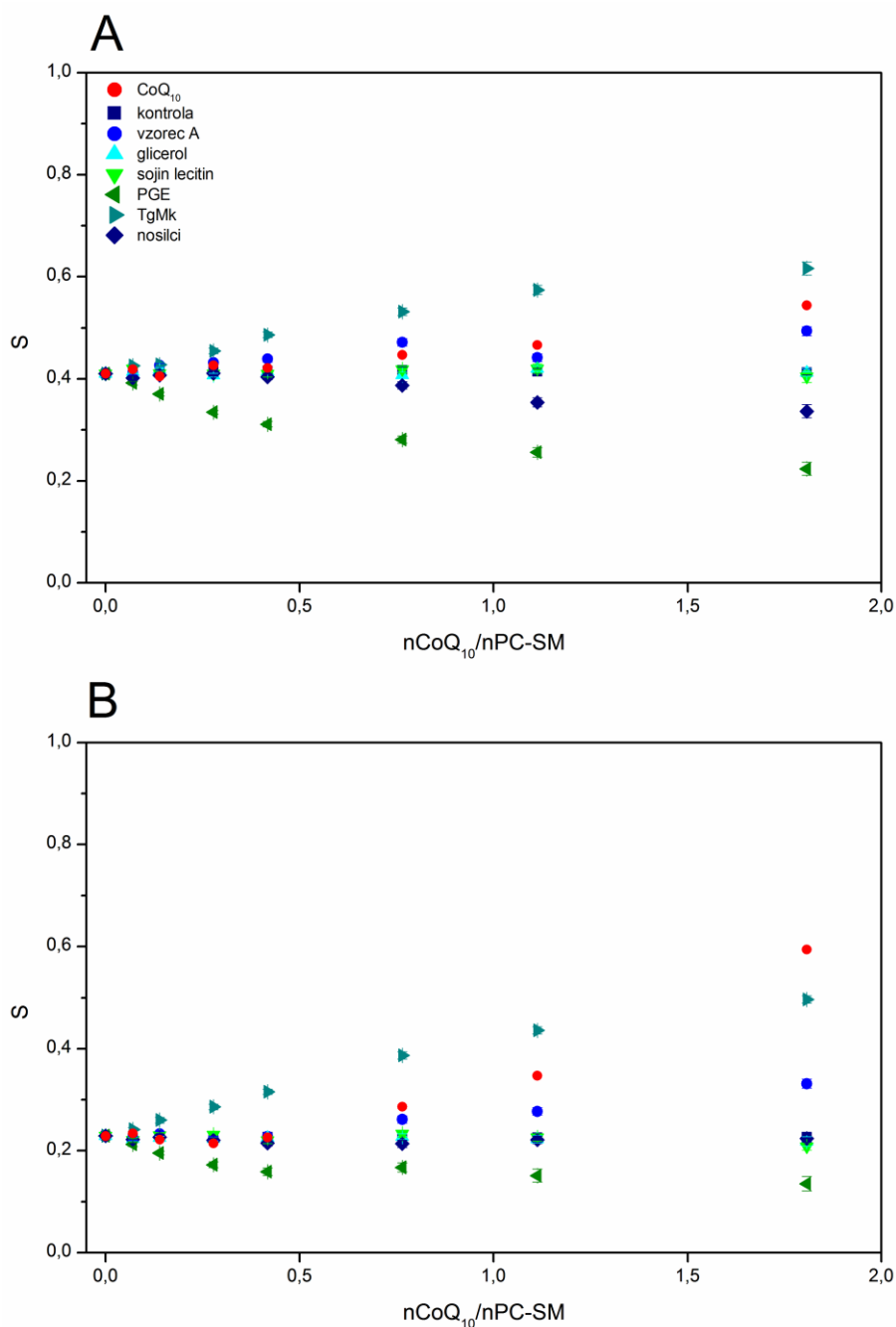
Slika 15: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo emulzije CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec A), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode. Nosilci: glicerol, sojin lecitin, poliglicerol ester maščobne kisline - PGE, trigliceridi maščobnih kislin - TgMk.

Figure 15: The changes in lipid order parameter (S) after titration of SUV constituted from DPPC with water suspension of CoQ₁₀ emulsion or components of carriers present in this formulation (Sample A) with the CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control. Carriers: glycerol, soy lecithin, polyglycerol ester of fatty acid - PGE, triglycerides of fatty acids - TgMk.



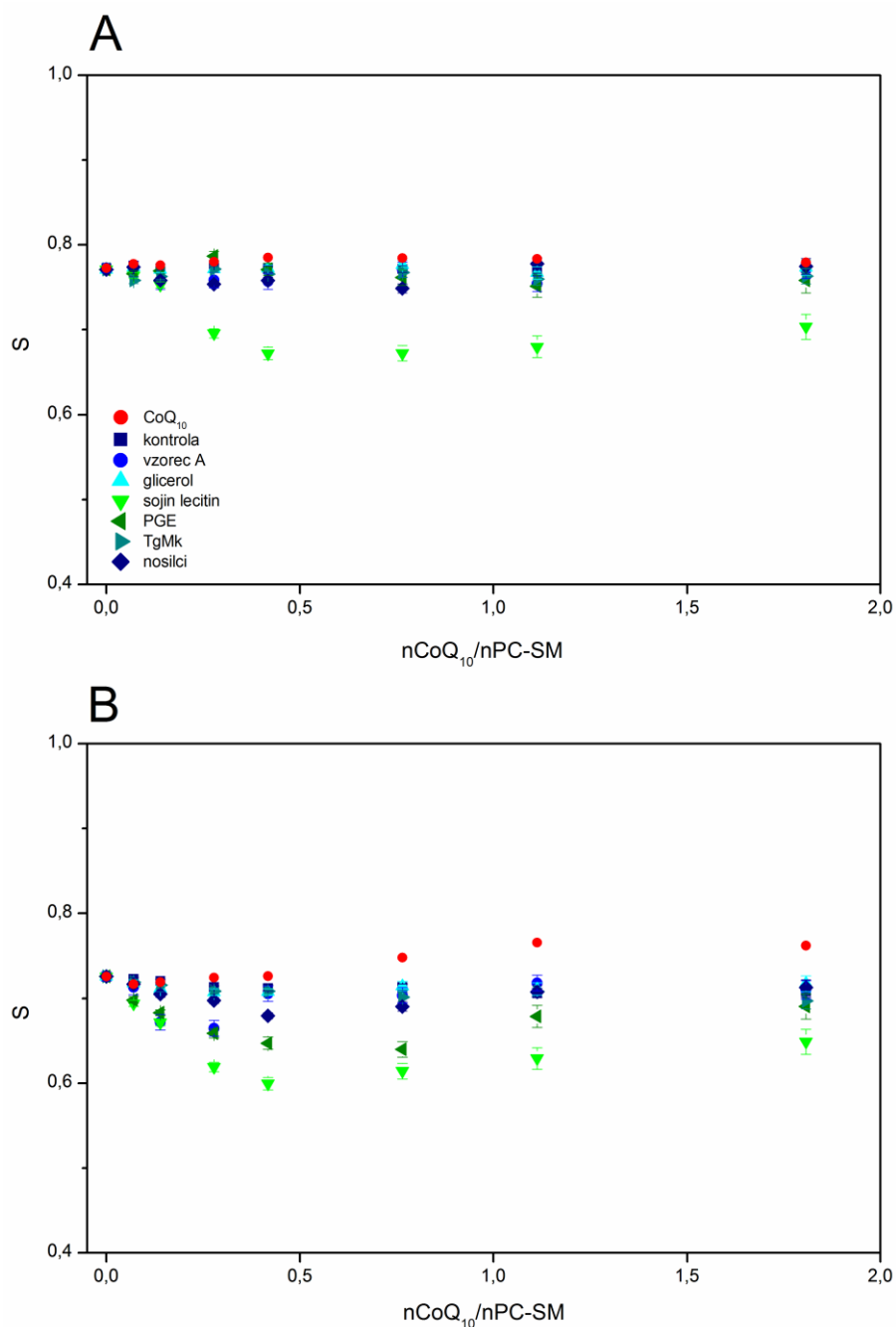
Slika 16: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo emulzije CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec A), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode. Nosilci: glicerol, sojin lecitin, poliglicerol ester maščobne kisline - PGE, trigliceridi maščobnih kislin - TgMk.

Figure 16: The changes in lipid order parameter (S) after titration of SUV constituted from DPPC with water suspension of CoQ₁₀ emulsion or components of carriers present in this formulation (Sample A) with the CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control. Carriers: glycerol, soy lecithin, polyglycerol ester of fatty acid - PGE, triglycerides of fatty acids - TgMk.



Slika 17: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo emulzije CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec A), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode. Nosilci: glicerol, sojin lecitin, poliglicerol ester maščobne kisline - PGE, trigliceridi maščobnih kislin - TgMk.

Figure 17: The changes in lipid order parameter (S) after titration of SUV constituted from PC and SM mix (2,4:1) with water suspension of CoQ₁₀ emulsion or components of carriers present in this formulation (Sample A) with the CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore DPH; A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control. Carriers: glycerol, soy lecithin, polyglycerol ester of fatty acid - PGE, triglycerides of fatty acids - TgMk.



Slika 18: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo emulzije CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec A), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode. Nosilci: glicerol, sojin lecitin, poliglicerol ester maščobne kisline - PGE, trigliceridi maščobnih kislín - TgMk.

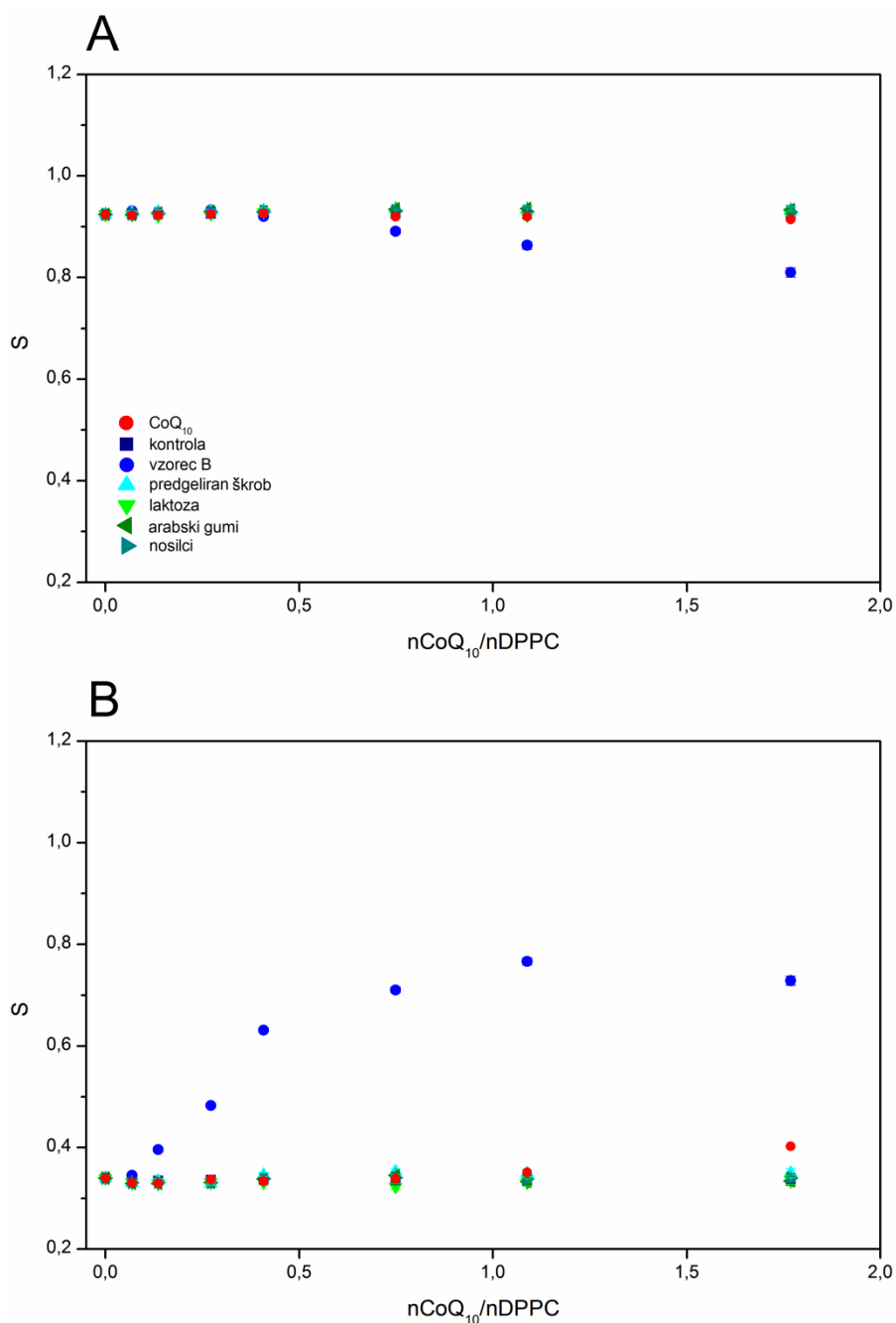
Figure 18: The changes in lipid order parameter (S) after titration of SUV constituted from PC and SM mix (2,4:1) with water suspension of CoQ₁₀ emulsion or components of carriers present in this formulation (Sample A) with the CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore TMA-DPH; A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control. Carriers: glycerol, soy lecithin, polyglycerol ester of fatty acid - PGE, triglycerides of fatty acids -TgMk.

4.2.3 Vzorec B

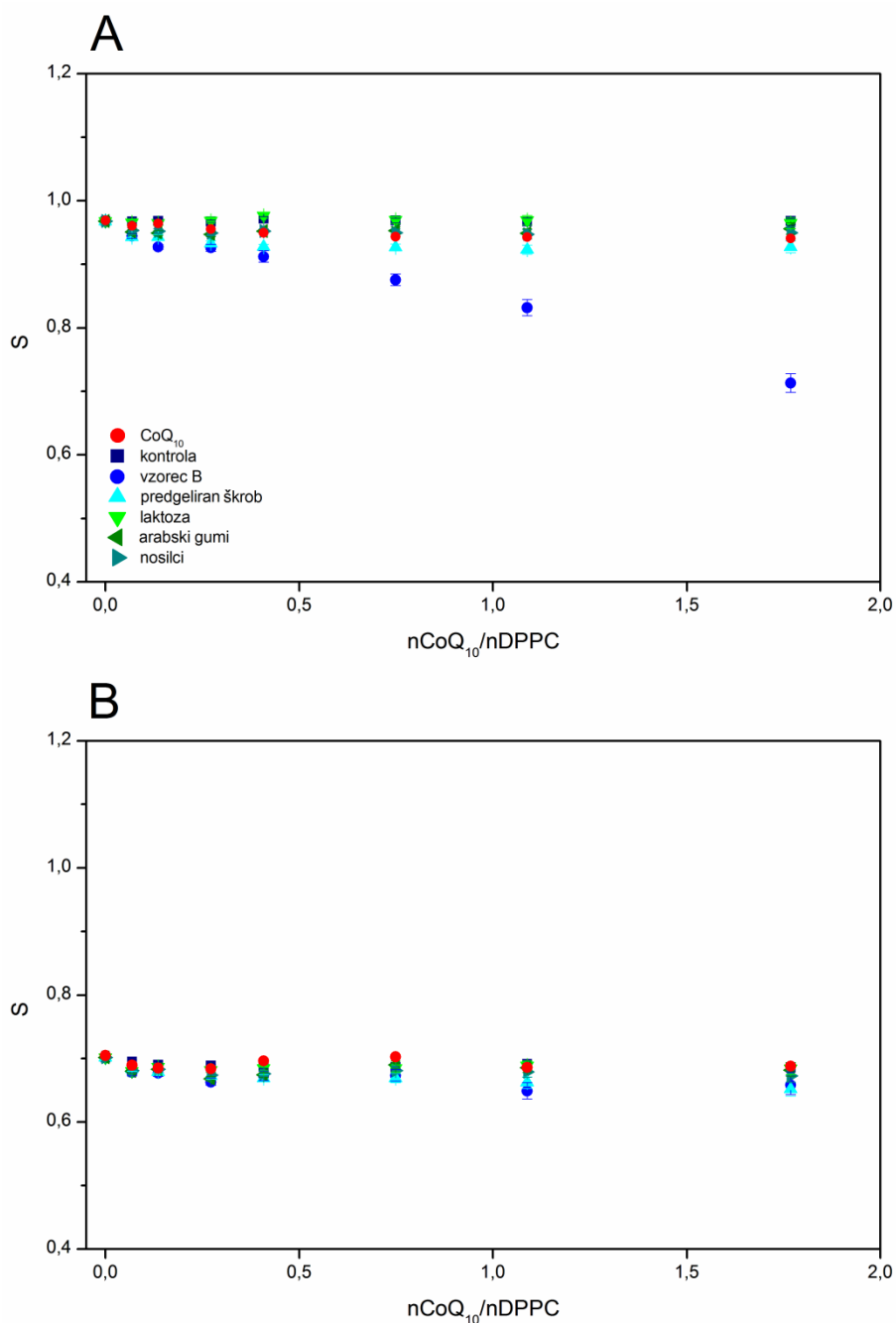
Na slikah 19, 20, 21 in 22 so prikazane odvisnosti ureditvenega parametra v SUV liposomih pripravljenih iz DPPC oz. mešanice PS in SM (2,4:1), označenih s fluoroforjem DPH oz. TMA-DPH, od molskega razmerja CoQ₁₀/lipidi oz. ustrezni količini posameznega nosilca prisotnega v vzorcu B – vodotopnega pripravka CoQ₁₀, kjer so kot nosilci prisotni predgeliran škrob, arabski gumi in laktoza.

Sami nosilci niso povzročili sprememb v urejenosti membrane liposomov pripravljenih iz DPPC in mešanice PC in SM (2,4:1) pod (25 °C) in nad (45 °C) temperaturo faznega prehoda (slika 19 in 21). Pri 25 °C pride ob prisotnosti tega vodotopnega pripravka, pri molarnem razmerju CoQ₁₀/DPPC nad 0,5, do povečevanja fluidnosti acilnih verig. Nad temperaturo faznega prehoda že pri nižjih molarnih razmerjih CoQ₁₀/lipidi opazimo povečanje ureditve acilnih verig. Največjo urejenost acilnih verig DPPC opazimo pri molarnem razmerju CoQ₁₀/lipidi 1:1. Pri titraciji SUV pripravljenih iz mešanice PC in SM s suspenzijo tega vodotopnega pripravka opazimo povečanje rigidnosti notranjosti lipidnega dvosloja tako pri 25 °C kot tudi pri 45 °C, kjer je učinek močnejši (Slika 21).

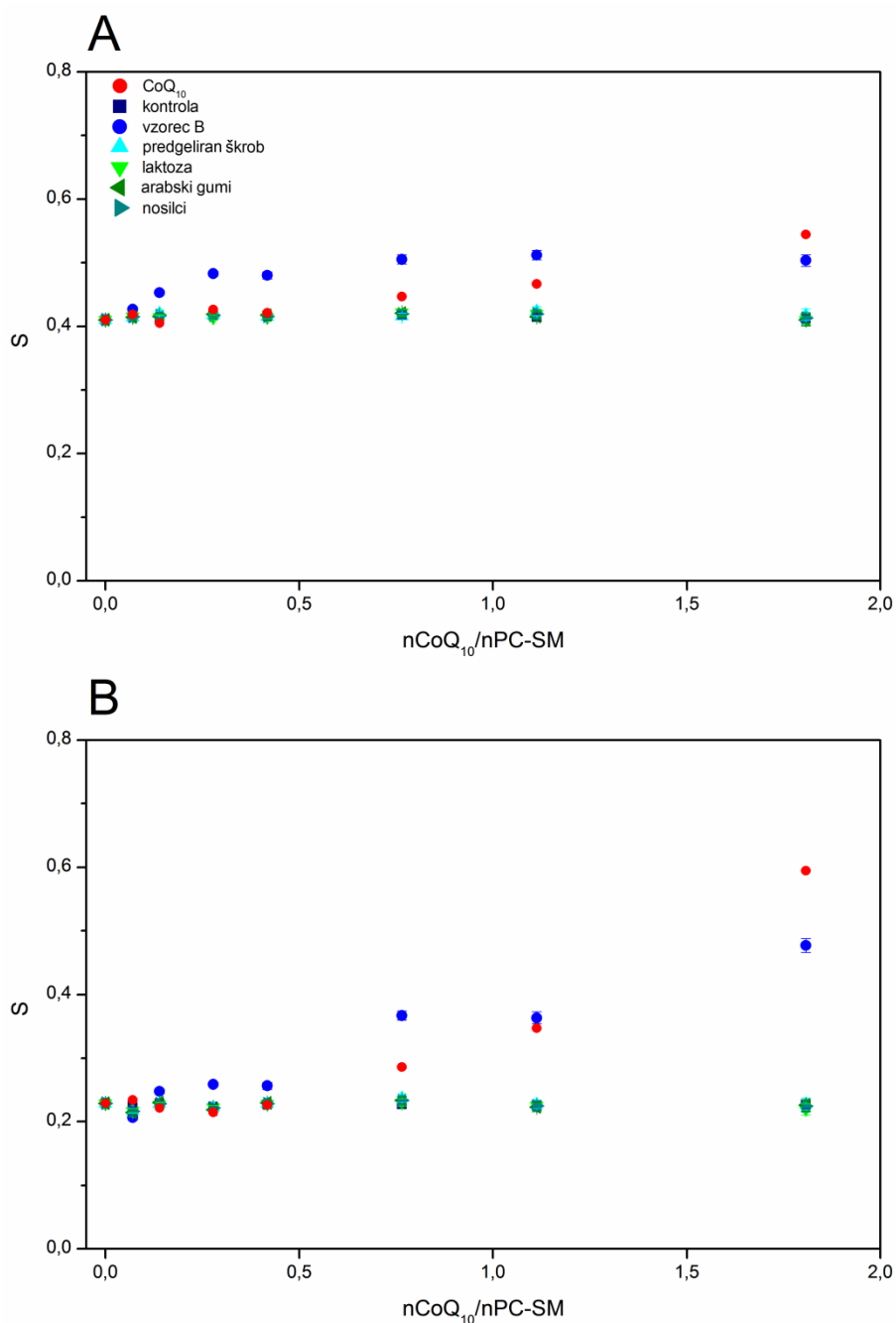
Spremembe fluorescenčne anizotropije TMA-DPH so pokazale, da prisotnost predgeliranega škroba, arabskega gumija in laktoze nima vpliva na urejenost površine membrane liposomov DPPC in PC-SM (slika 20 in 22). Ob dodatku tega pripravka CoQ₁₀ liposomom PC-SM, tako pri 25 °C kot tudi pri 45 °C opazimo zmanjšanje urejenosti površine membrane (Slika 22). Podoben učinek opazimo tudi pri liposomih DPPC, a le pri 25 °C (slika 20).



Slika 19: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec B), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode. Nosilci: predgeliran škrob, arabski gumi in laktoza. Figure 19: The changes in lipid order parameter (S) after titration of SUV constituted from DPPC with water suspension of water soluble CoQ₁₀ formulation or components of carriers present in this formulation (Sample B) with the CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore DPH A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control. Carriers: pregelatinized starch, arabic gum, lactose.

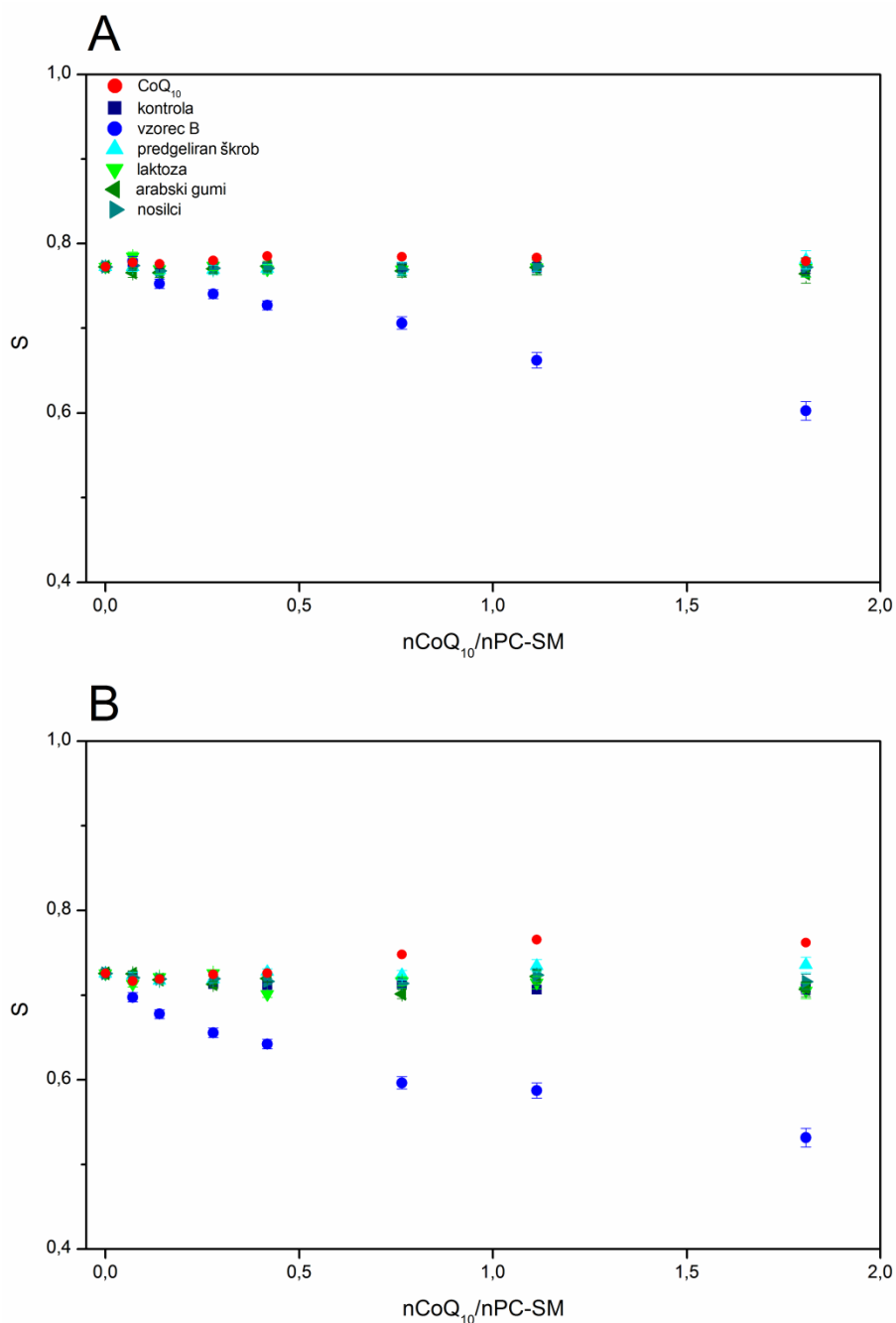


Slika 20: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec B), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode. Nosilci: predgeliran škrob, arabski gumi in laktoza. Figure 20: The changes in lipid order parameter (S) after titration of SUV constituted from DPPC with water suspension of water soluble CoQ₁₀ formulation or components of carriers present in this formulation (Sample B) with the CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control. Carriers: pregelatinized starch, arabic gum, lactose.



Slika 21: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec B), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode. Nosilci: predgeliran škrob, arabski gumi in laktoza.

Figure 21: The changes in lipid order parameter (S) after titration of SUV constituted from PC and SM mix (2,4:1) with water suspension of water soluble CoQ₁₀ formulation or components of carriers present in this formulation (Sample B) with the CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control. Carriers: pregelatinized starch, arabic gum, lactose.



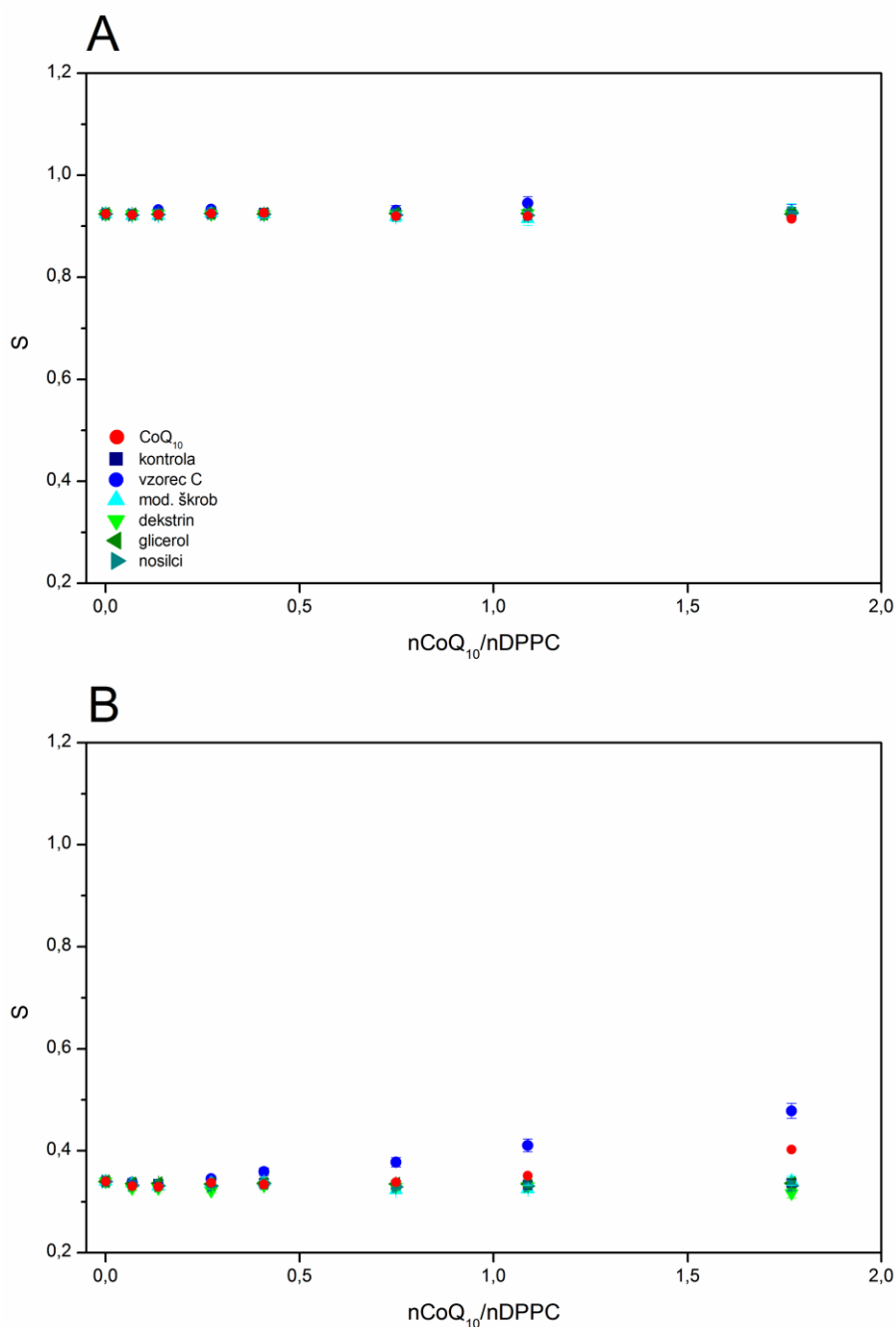
Slika 22: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec B), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode. Nosilci: pregeliran škrob, arabski gumi in laktosa.

Figure 22: The changes in lipid order parameter (S) after titration of SUV constituted from PC and SM mix (2,4:1) with water suspension of water soluble CoQ₁₀ formulation or components of carriers present in this formulation (Sample B) with the CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control. Carriers: pregelatinized starch, arabic gum, lactose.

4.2.4 Vzorec C

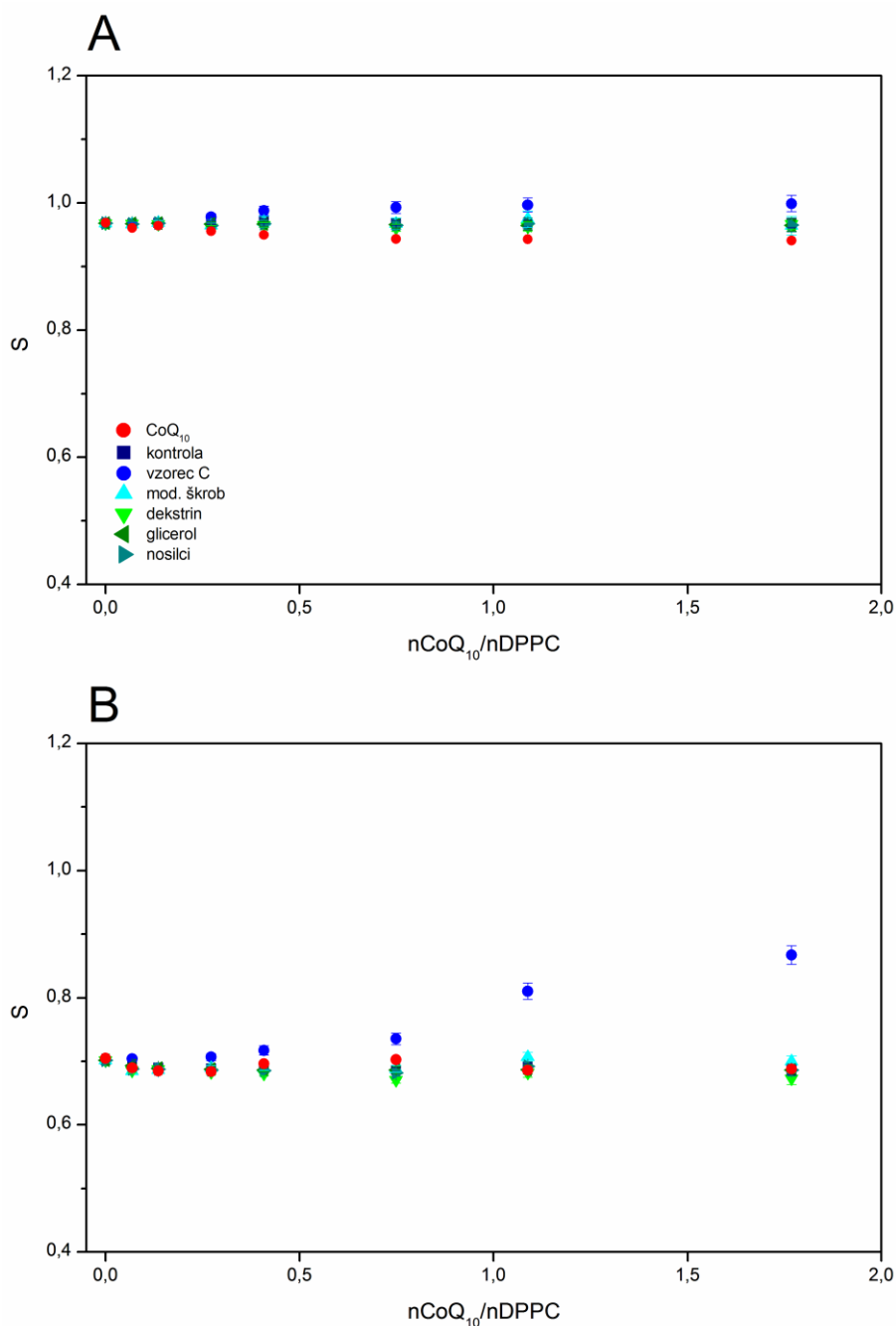
Na slikah 23, 24, 25 in 26 so prikazane odvisnosti ureditvenega parametra v liposomih SUV pripravljenih iz DPPC oz. mešanice PS in SM (2,4:1), označenih s fluoroforjem DPH oz. TMA-DPH, od molskega razmerja CoQ₁₀/lipidi oz. ustrezni količini posamezne komponente nosilca prisotnega v vzorcu C – vodotopnega pripravka CoQ₁₀, kjer so kot nosilci prisotni modificiran škrob (natrijev oktenilsukcinat škroba), dekstrin in glicerol.

Natrijev oktenil sukcinat škroba, dekstrin in glicerol niso povzročili sprememb v urejenosti membrane liposomov pripravljenih iz DPPC in mešanice PC in SM (2,4:1). Pri 25 °C prisotnost tega vodotopnega pripravka CoQ₁₀ ne vpliva na fluidnost acilnih verig DPPC, nad temperaturo faznega prehoda pa dodatek tega pripravka povzroči povečanje ureditve notranjosti membrane (slika 23). Pri PC-SM liposomih pride do povečanja ureditve, ki ga opazimo kot povečanje anizotropije DPH, pri 25 °C in pri 45 °C (slika 25). Ob prisotnosti tega pripravka CoQ₁₀ opazimo povečanje fluorescenčne anizotropije TMA-DPH tako pri liposomih DPPC, kot pri liposomih PC-SM, iz česar lahko sklepamo na povečanje rigidnosti površinskega dela membrane (slika 24 in 26).



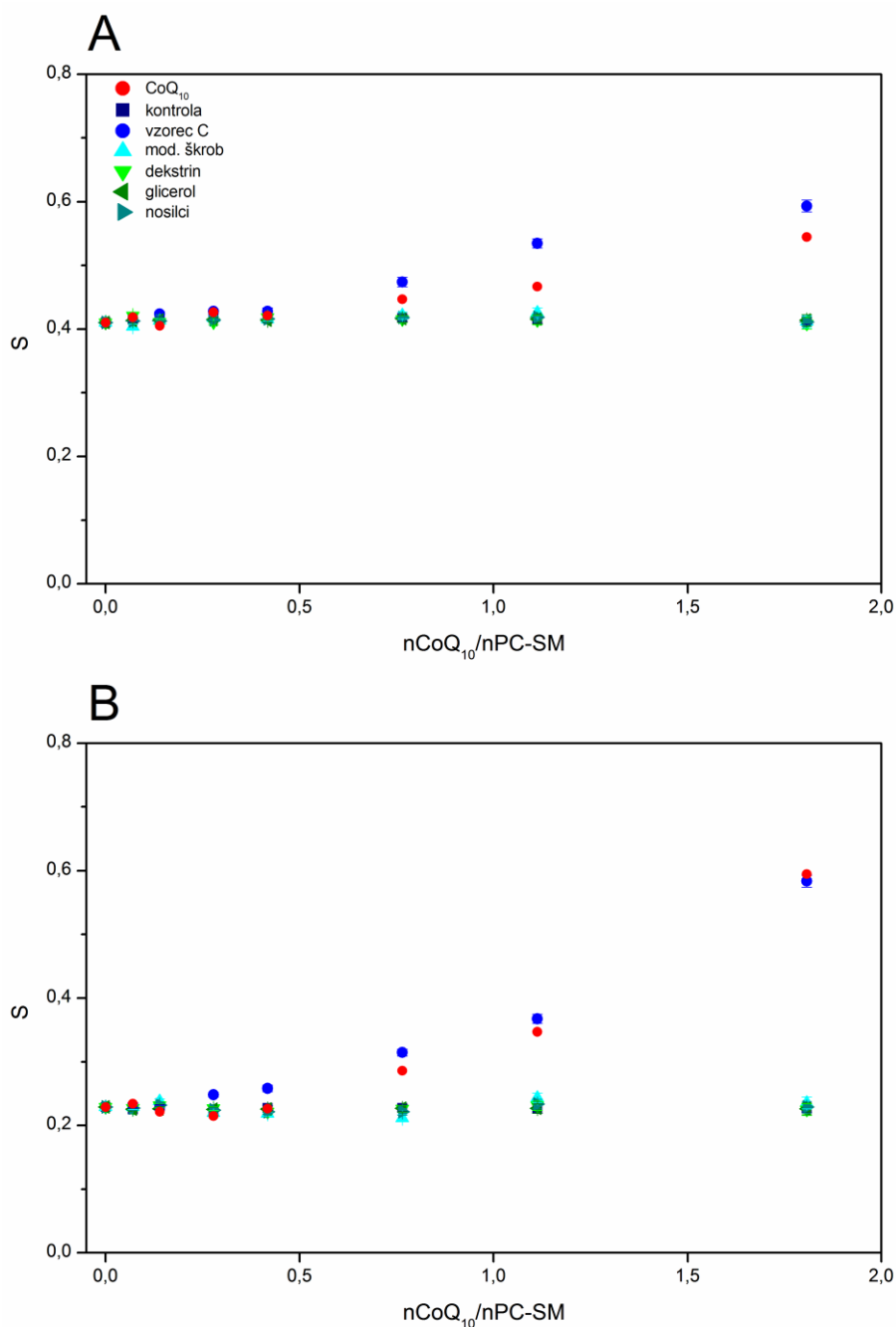
Slika 23: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec C), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode. Nosilci: natrijev oktenilsukcinat škroba (mod. škrob), dekstrin in glicerol.

Figure 23: The changes in lipid order parameter (S) after titration of SUV constituted from DPPC with water suspension of water soluble CoQ₁₀ formulation or components of carriers present in this formulation (Sample C) with the CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control. Carriers: starch natrium octenylsuccinate (mod. škrob), dextrin, glycerol.



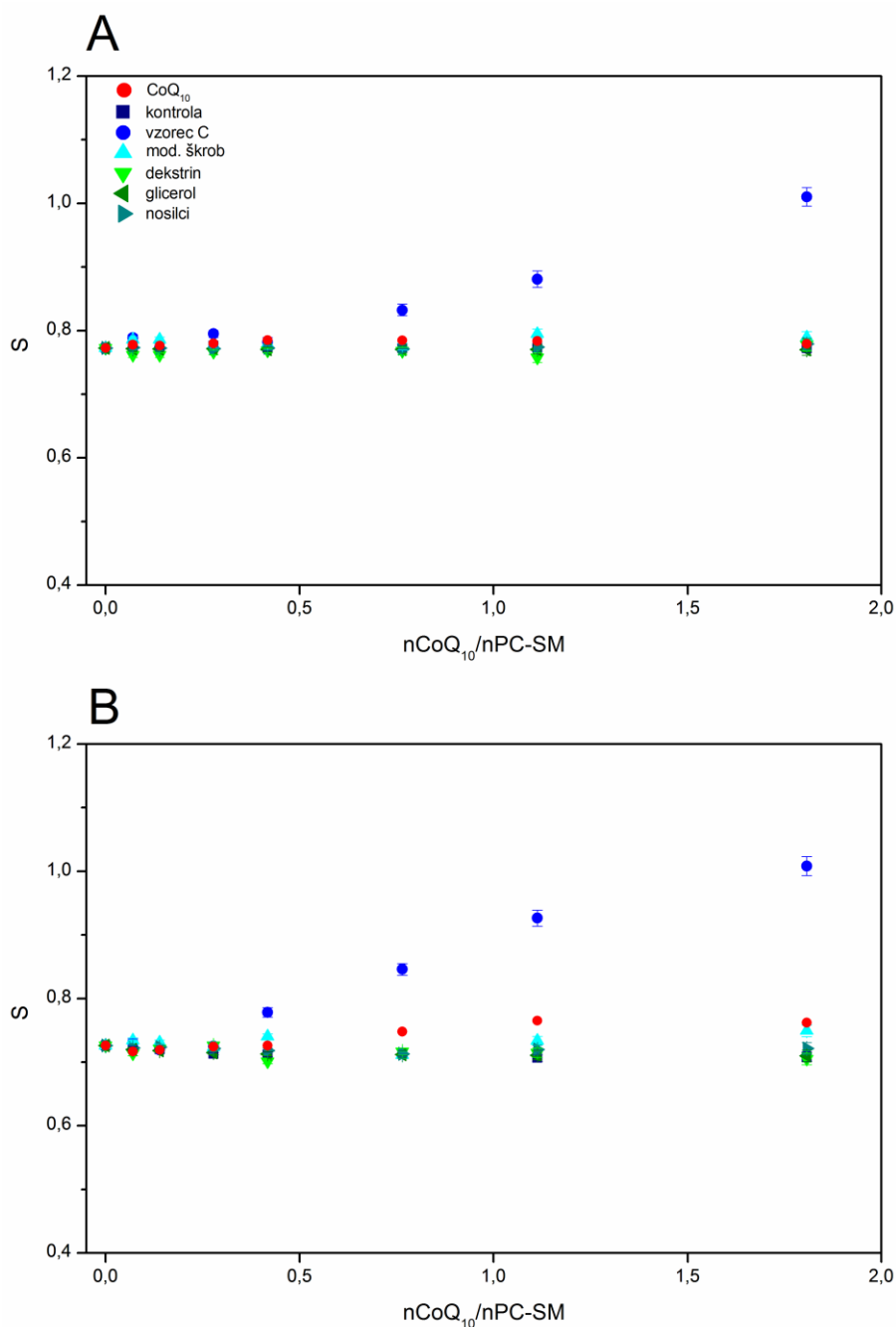
Slika 24: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec C), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode. Nosilci: natrijev oktenilsukcinat škroba (mod. škrob), dekstrin in glicerol.

Figure 24: The changes in lipid order parameter (S) after titration of SUV constituted from DPPC with water suspension of water soluble CoQ₁₀ formulation or components of carriers present in this formulation (Sample C) with the CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control. Carriers: starch natrium octenylsuccinate (mod. škrob), dextrin, glycerol.



Slika 25: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec C) s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode. Nosilci: natrijev oktenilsukcinat škroba (mod. škrob), dekstrin in glicerol.

Figure 25: The changes in lipid order parameter (S) after titration of SUV constituted from PC and SM mix (2,4:1) with water suspension of water soluble CoQ₁₀ formulation or components of carriers present in this formulation (Sample C) with the CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore DPH; A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control. Carriers: starch sodium octenylsuccinate (mod. škrob), dextrin, glycerol.



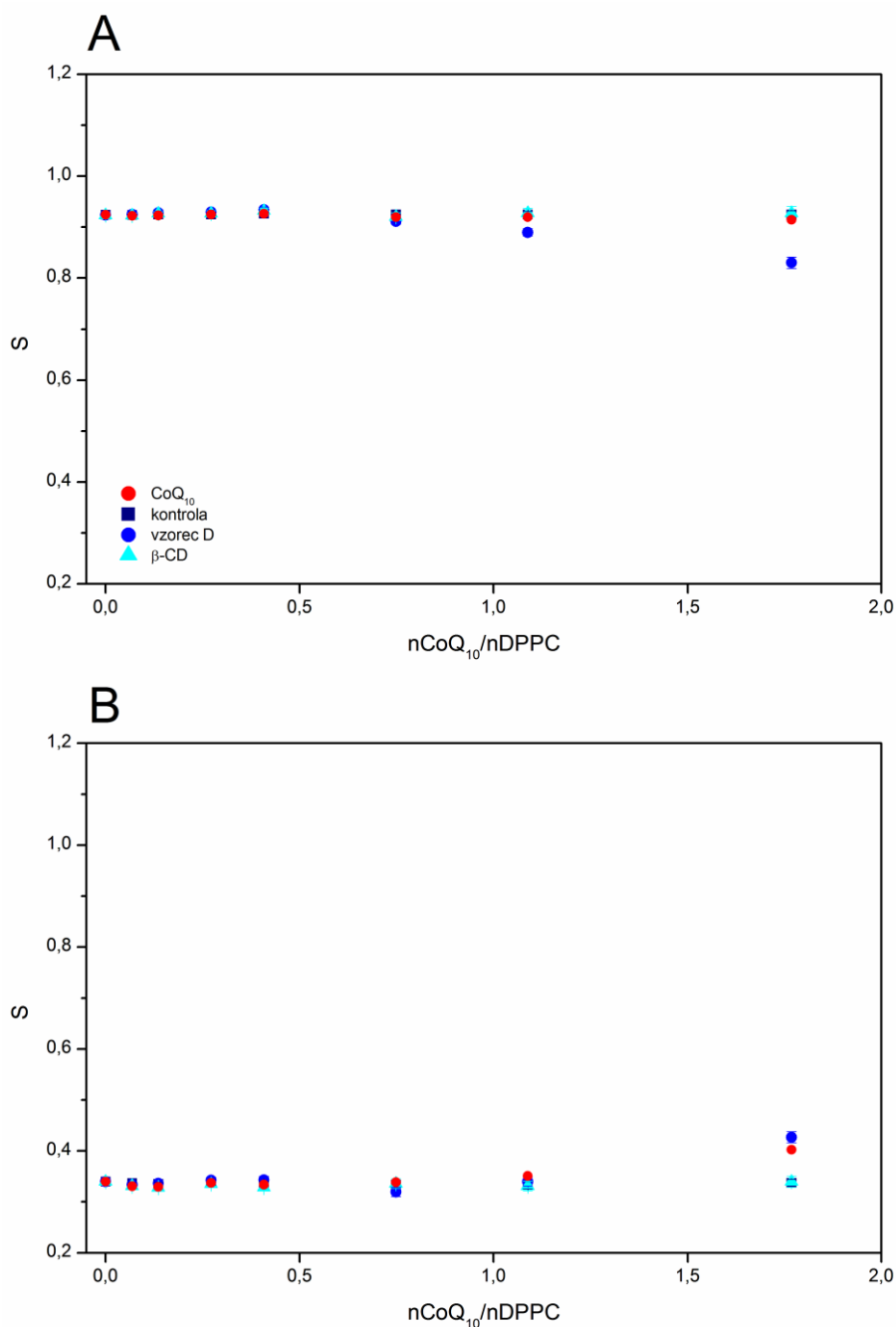
Slika 26: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec C), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode. Nosilci: natrijev oktenilsukcinat škroba (mod. škrob), dekstrin in glicerol.

Figure 26: The changes in lipid order parameter (S) after titration of SUV constituted from PC and SM mix (2,4:1) with water suspension of water soluble CoQ₁₀ formulation or components of carriers present in this formulation (Sample C) with the CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control. Carriers: starch natrium octenylsuccinate (mod. škrob), dextrin, glycerol.

4.2.5 Vzorec D

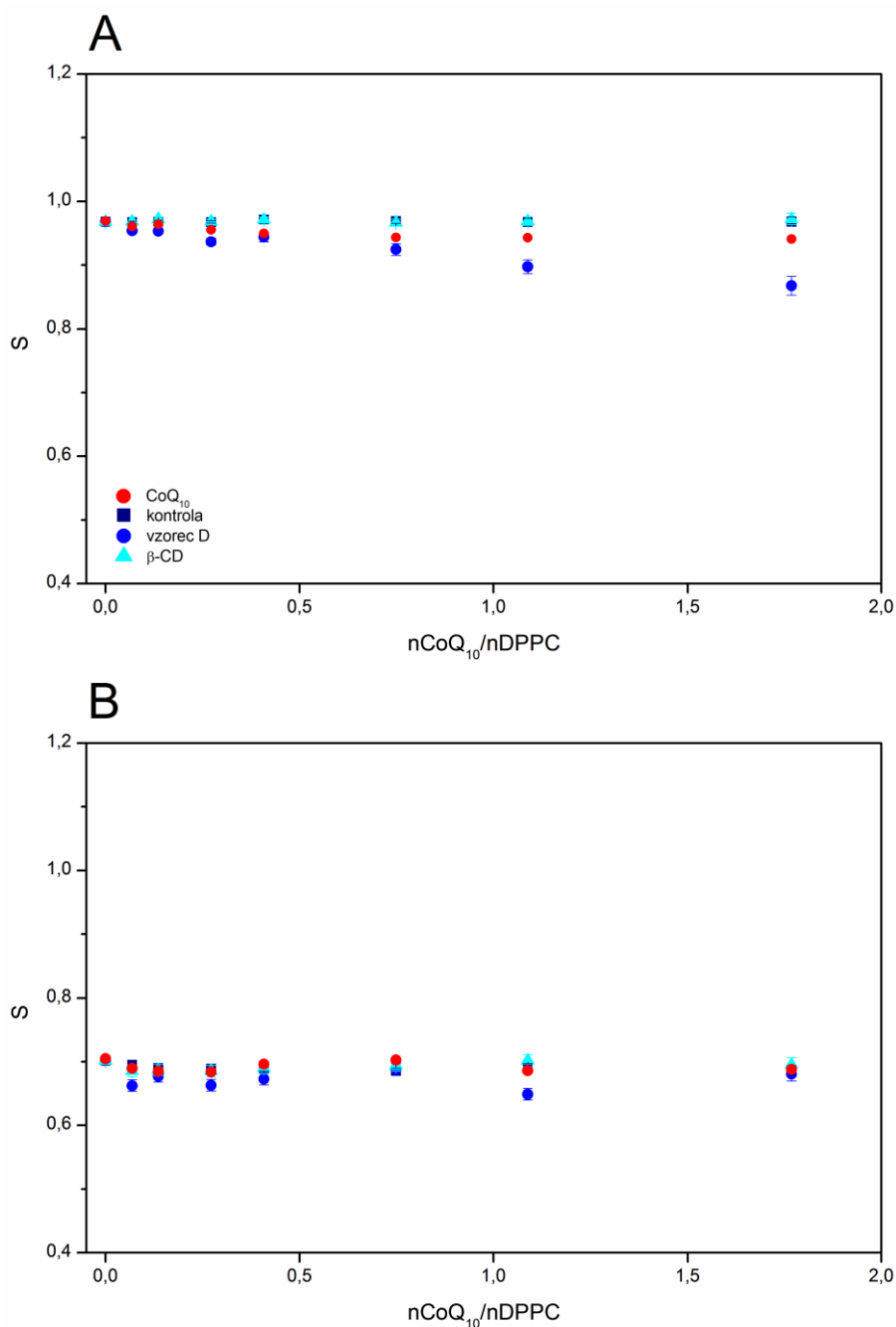
Na slikah 27, 28, 29 in 30 so prikazane odvisnosti ureditvenega parametra v liposomih SUV pripravljenih iz DPPC oz mešanice PS in SM (2,4:1), označenih s fluoroforjem DPH oz. TMA-DPH, od molskega razmerja CoQ₁₀/lipidi oz. ustrezni količini β-ciklodekstrina, ki je kot nosilec prisoten v vzorcu D.

Prisotnost samega β-ciklodekstrin ne vpliva na urejenost membrane liposomov pripravljenih iz DPPC in mešanice PC in SM (2,4:1). Učinek samega vodotopnega pripravka na acilne verige DPPC je opazen šele ko molarno razmerje CoQ₁₀/lipidi preseže vrednost 1,0. Tu pri 25 °C opazimo rahlo povečanje fluidnosti acilnih verig DPPC (slika 27A), nad temperaturo faznega prehoda pa pride do rahle ureditve notranjosti membrane liposomov (slika 27B), ki je primerljiva z ureditvijo, ki jo povzroči dodatek čistega CoQ₁₀. Pri 25 °C smo opazili zmanjšanje anizotropije TMA-DPH, ki kaže na zmanjšanje ureditve zgornjega dela membrane DPPC liposomov (slika 28A). Pri liposomih pripravljenih iz mešanice PC in SM pri 45 °C dodatek β-ciklodekstrinskega pripravka CoQ₁₀ povzroči povečanje urejenosti notranjega in površinskega dela membrane (slika 29B in slika 30B).



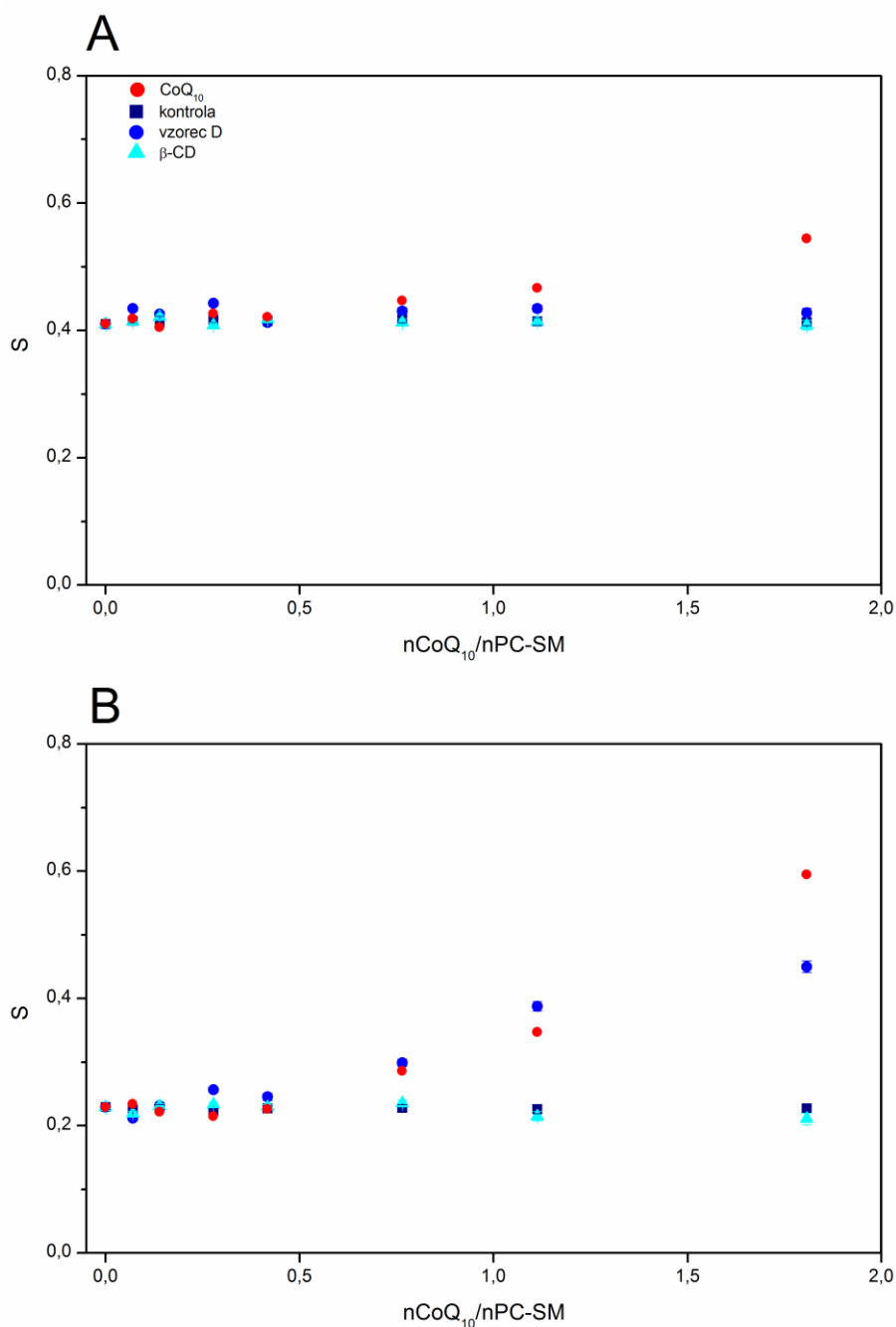
Slika 27: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. nosilca prisotnega v tem pripravku (Vzorec D), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode. Nosilec: β-ciklodekstrin (β-CD).

Figure 27: The changes in lipid order parameter (S) after titration of SUV constituted from DPPC with water suspension of CoQ₁₀ formulation or carrier present in this formulation (Sample D) with the CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control. Carrier: β-cyclodextrin (β-CD).



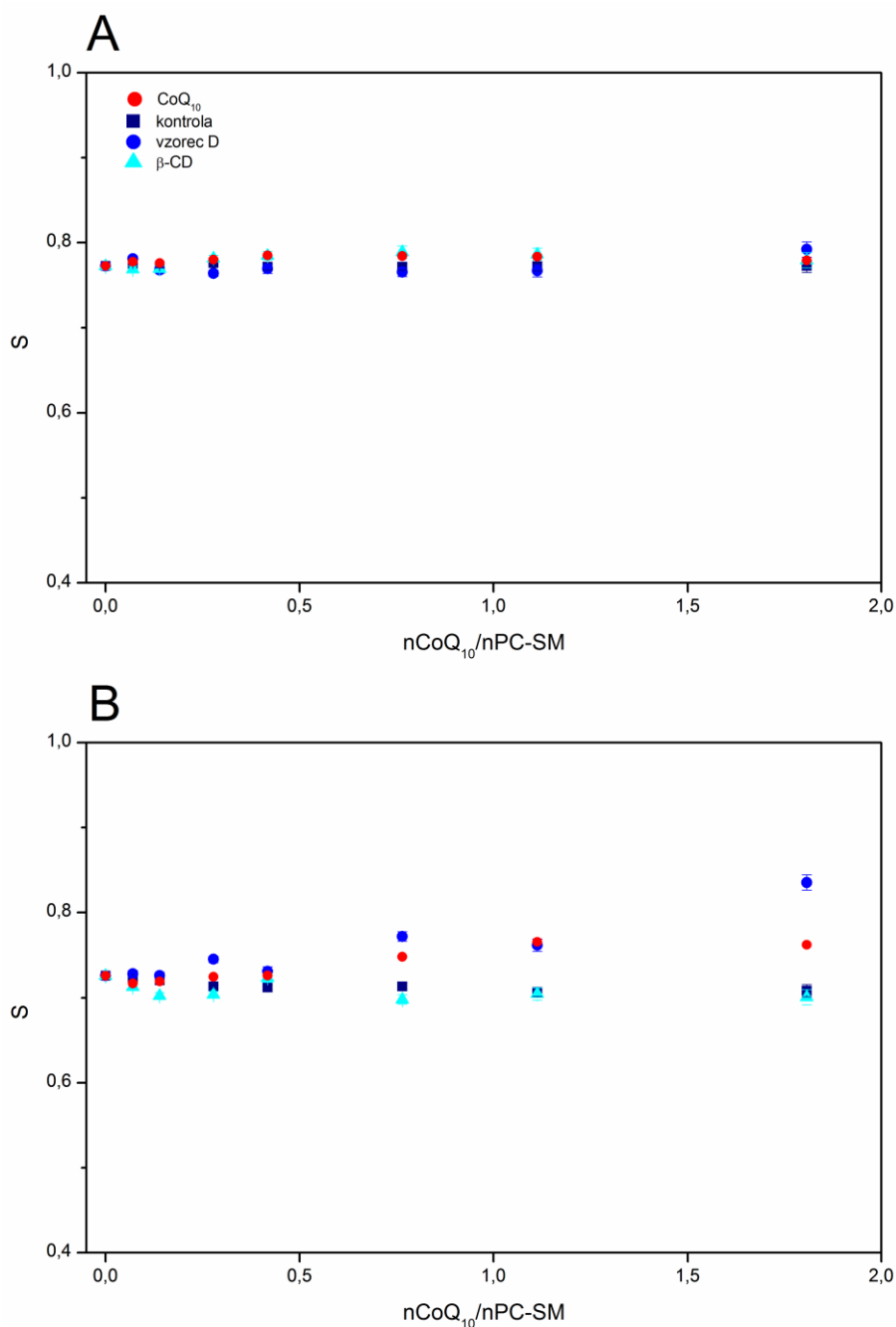
Slika 28: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. nosilca prisotnega v tem pripravku (Vzorec D), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode. Nosilec: β-ciklodekstrin (β-CD).

Figure 28: The changes in lipid order parameter (S) after titration of SUV constituted from DPPC with water suspension of water soluble CoQ₁₀ formulation or carrier present in this formulation (Sample D) with the CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control. Carrier: β-cyclodextrin (β-CD).



Slika 29: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. nosilca prisotnega v tem pripravku (Vzorec D), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode. Nosilec: β-ciklodekstrin (β-CD).

Figure 29: The changes in lipid order parameter (S) after titration of SUV constituted from PC and SM mix (2,4:1) with water suspension of water soluble CoQ₁₀ formulation or carrier present in this formulation (Sample D) with the CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore DPH.; A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control. Carrier: β-ciklodekstrin (β-CD).

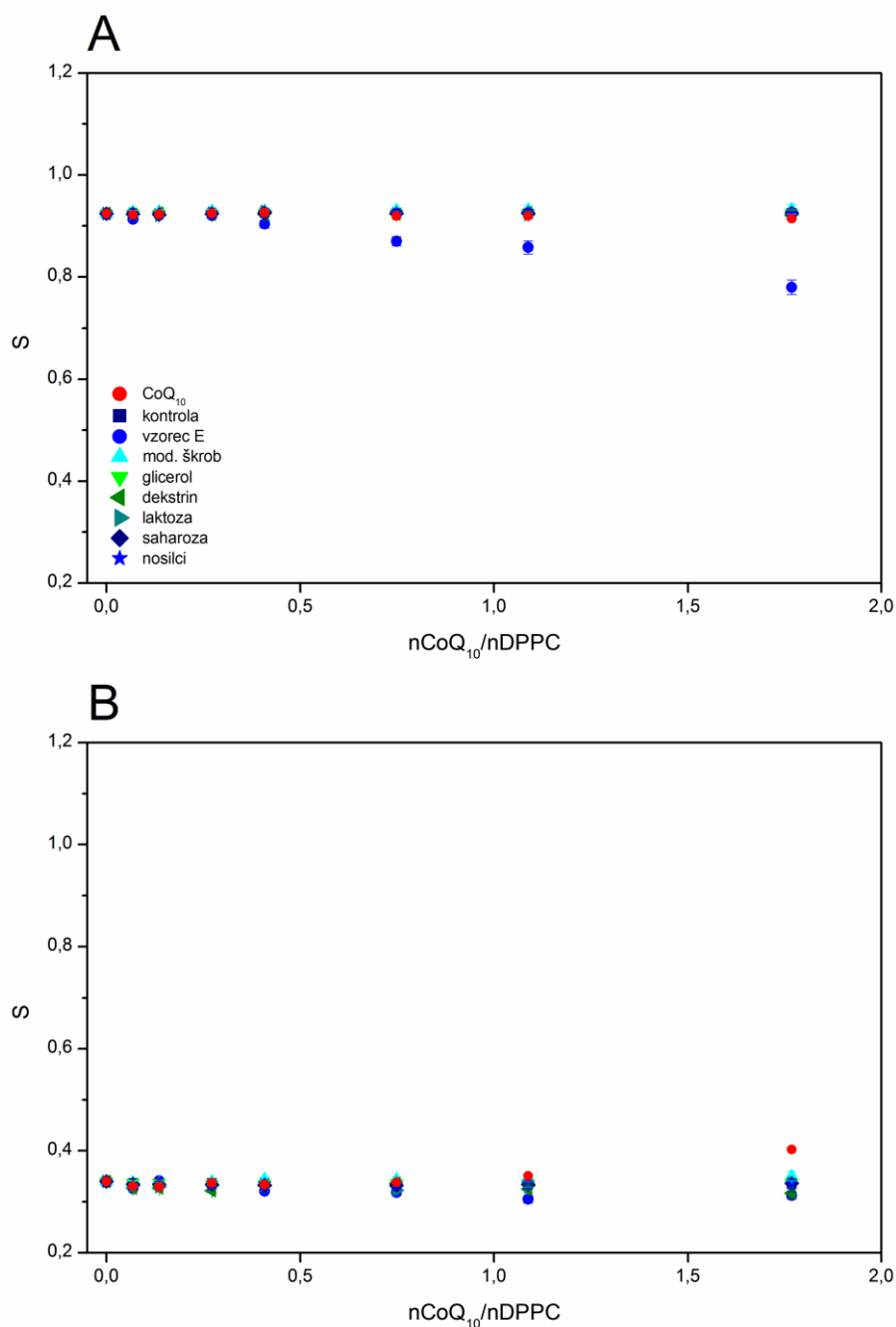


Slika 30: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. nosilca prisotnega v tem pripravku (Vzorec D), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode. Nosilec: β-ciklodekstrin (β-CD).
Figure 30: The changes in lipid order parameter (S) after titration of SUV constituted from PC and SM mix (2,4:1) with water suspension of water soluble CoQ₁₀ formulation or carrier present in this formulation (Sample D) with the CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control. Carrier: β-ciklodekstrin (β-CD).

4.2.6 Vzorec E

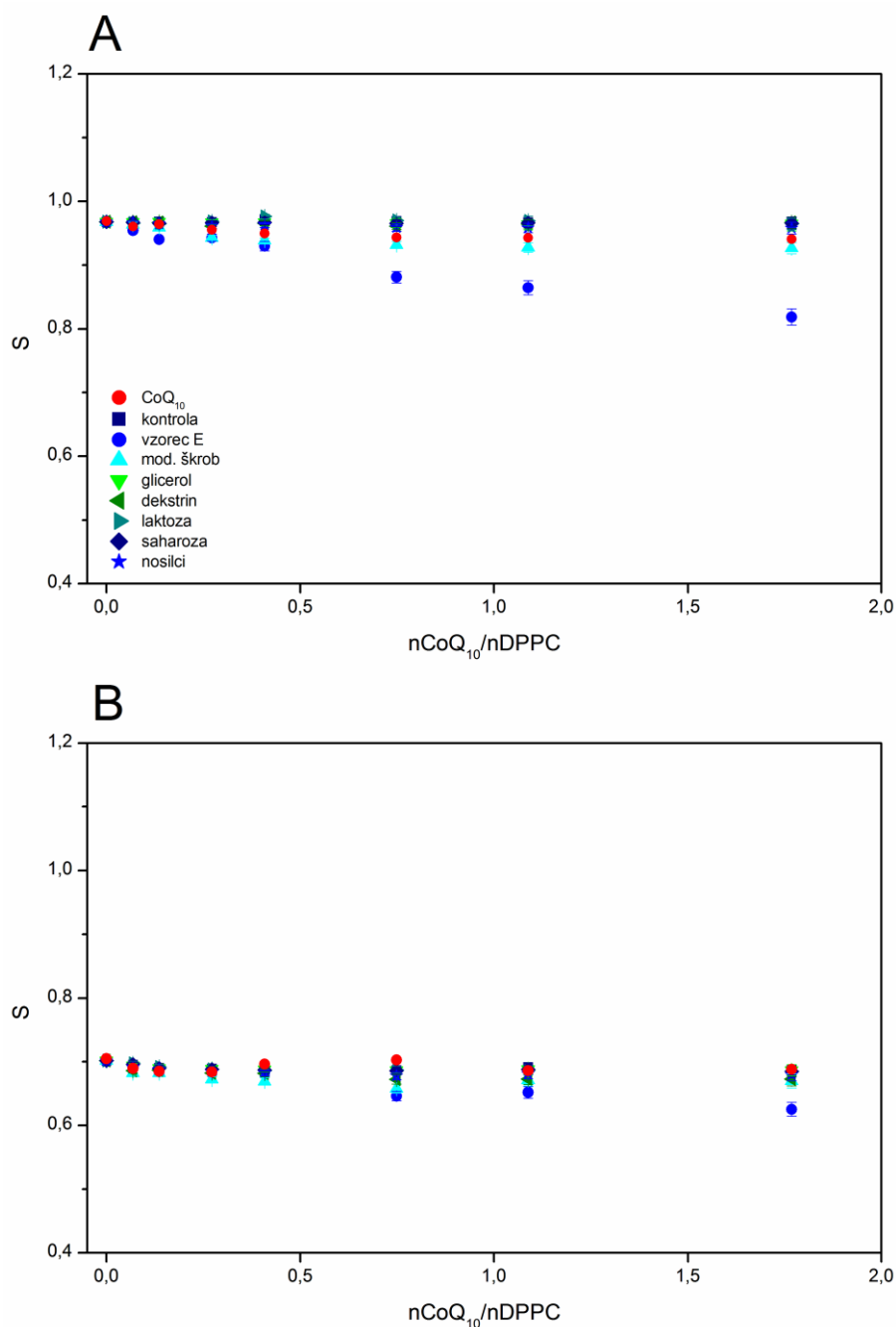
Na slikah 31, 32, 33 in 34 so prikazane odvisnosti ureditvenega parametra v liposomih SUV pripravljenih iz DPPC oz mešanice PS in SM (2,4:1), označenih s fluoroforjem DPH oz. TMA-DPH, od molskega razmerja CoQ₁₀/lipidi oz. ustrezni količini posameznega nosilca prisotnega v vzorcu C – vodotopnega pripravka CoQ₁₀, kjer so kot nosilci prisotni modificiran škrob (natrijev oktenilsukcinat škroba), saharoza, laktoza, dekstrin in glicerol.

Pod temperaturo faznega prehoda DPPC prisotnost tega vodotopnega pripravka povzroči zmanjšanje fluorescenčne anizotropije DPH, kar kaže na povečanje fluidnosti acilnih verig (slika 31A). Pri 25 °C opazimo tudi povečanje fluidnosti površine membrane liposomov DPPC. Manjše zmanjšanje fluidnosti opazimo tudi ob prisotnosti modificiranega škroba. Ostali nosilci prisotni v tem pripravku ne vplivajo na urejenost membrane (slika 32A). Nad temperaturo faznega prehoda DPPC tako vodotopni pripravek CoQ₁₀, kot tudi nosilci ne povzročajo večjih sprememb v urejenosti membrane (slika 32B). V primeru liposomov PC-SM tako vodotopni pripravek CoQ₁₀, kot tudi nosilci prisotni v njem niso vplivali na urejenost membrane (slika 33 in slika 34).



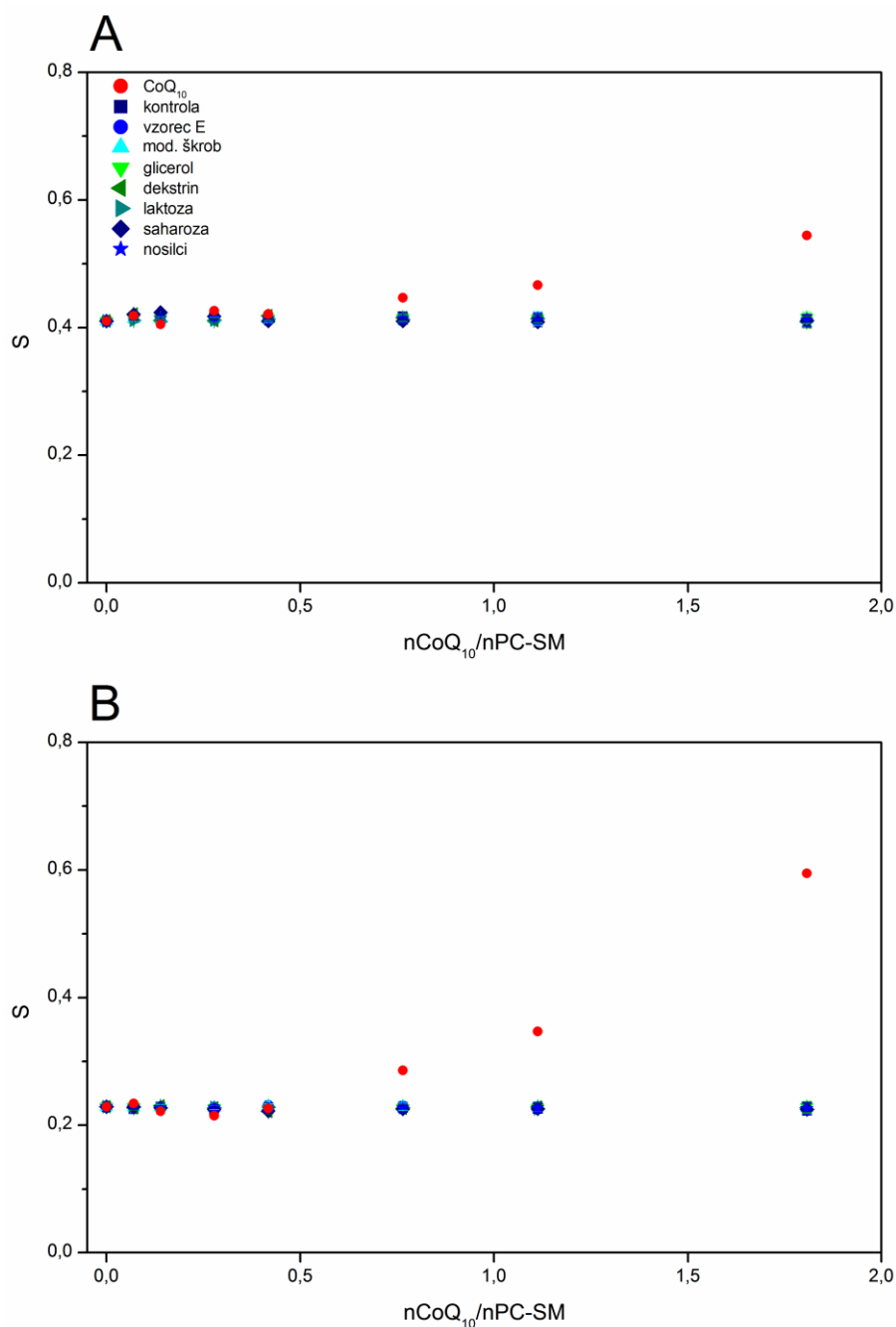
Slika 31: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec E), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode. Nosilci: natrijev oktenilsukcinat škroba (mod. škrob), saharoza, laktoza, dekstrin in glicerol.

Figure 31: The changes in lipid order parameter (S) after titration of SUV constituted from DPPC with water suspension of CoQ₁₀ formulation or components of carriers present in this formulation (Sample E) with the CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control. Carriers: starch sodium octenylsuccinate (mod. škrob), sacharose, lactose, dextrin, glycerol.



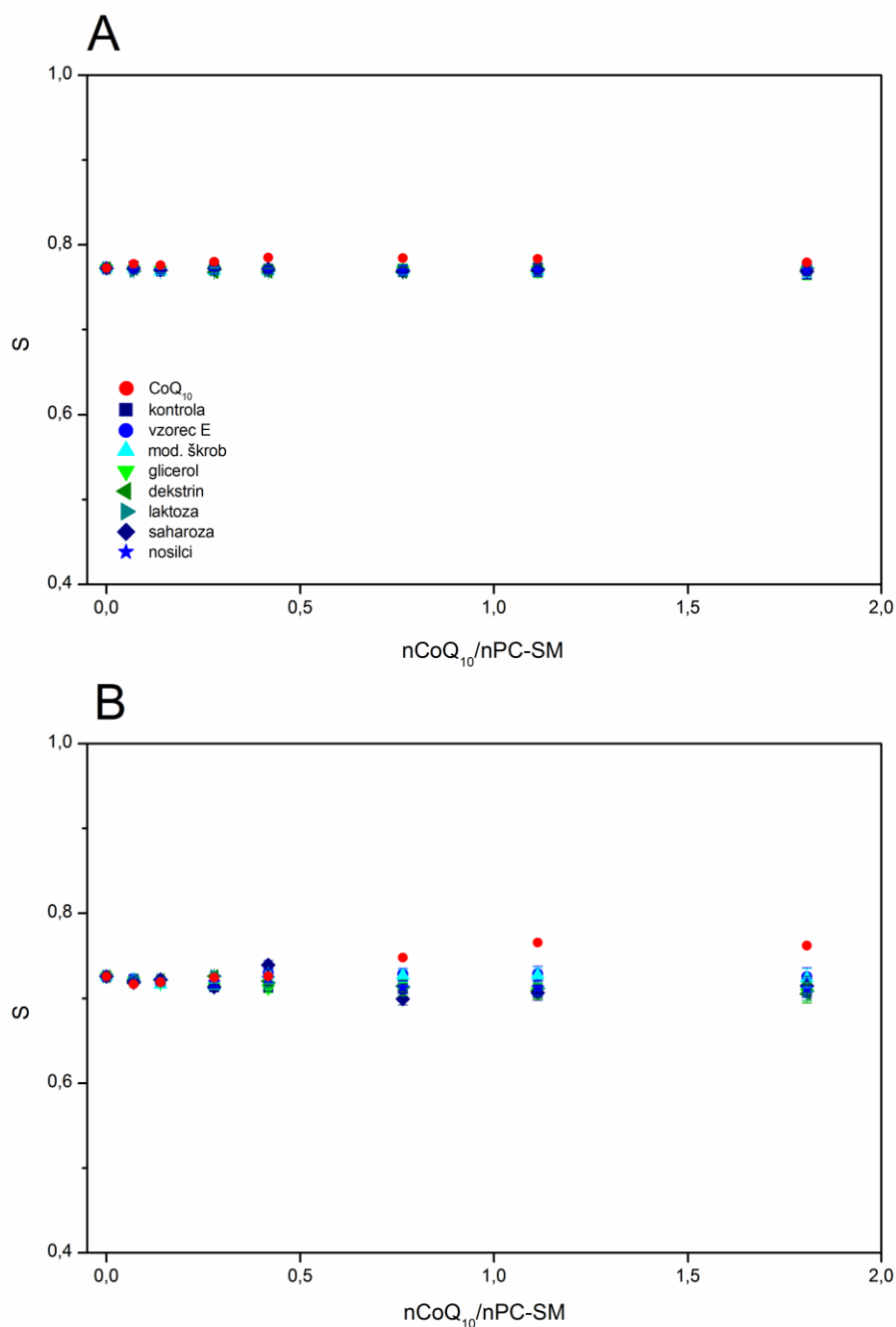
Slika 32: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec E), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode. Nosilci: natrijev oktenilsukcinat škroba (mod. škrob), saharoza, laktoza, dekstrin in glicerol.

Figure 32: The changes in lipid order parameter (S) after titration of SUV constituted from DPPC with water suspension of water soluble CoQ₁₀ formulation or components of carriers present in this formulation (Sample E) with the CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control. Carriers: starch natrium octenylsuccinate (mod. škrob), sacharose, lactose, dextrin, glycerol.



Slika 33: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec E), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode. Nosilci: natrijev oktenilsukcinat škroba (mod. škrob), saharoza, laktoza, dekstrin in glicerol.

Figure 33: The changes in lipid order parameter (S) after titration of SUV constituted from PC and SM mix (2,4:1) with water suspension of water soluble CoQ₁₀ formulation or components of carriers present in this formulation (Sample E) with the CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control. Carriers: starch sodium octenylsuccinate (mod. škrob), sacharose, lactose, dextrin, glycerol.



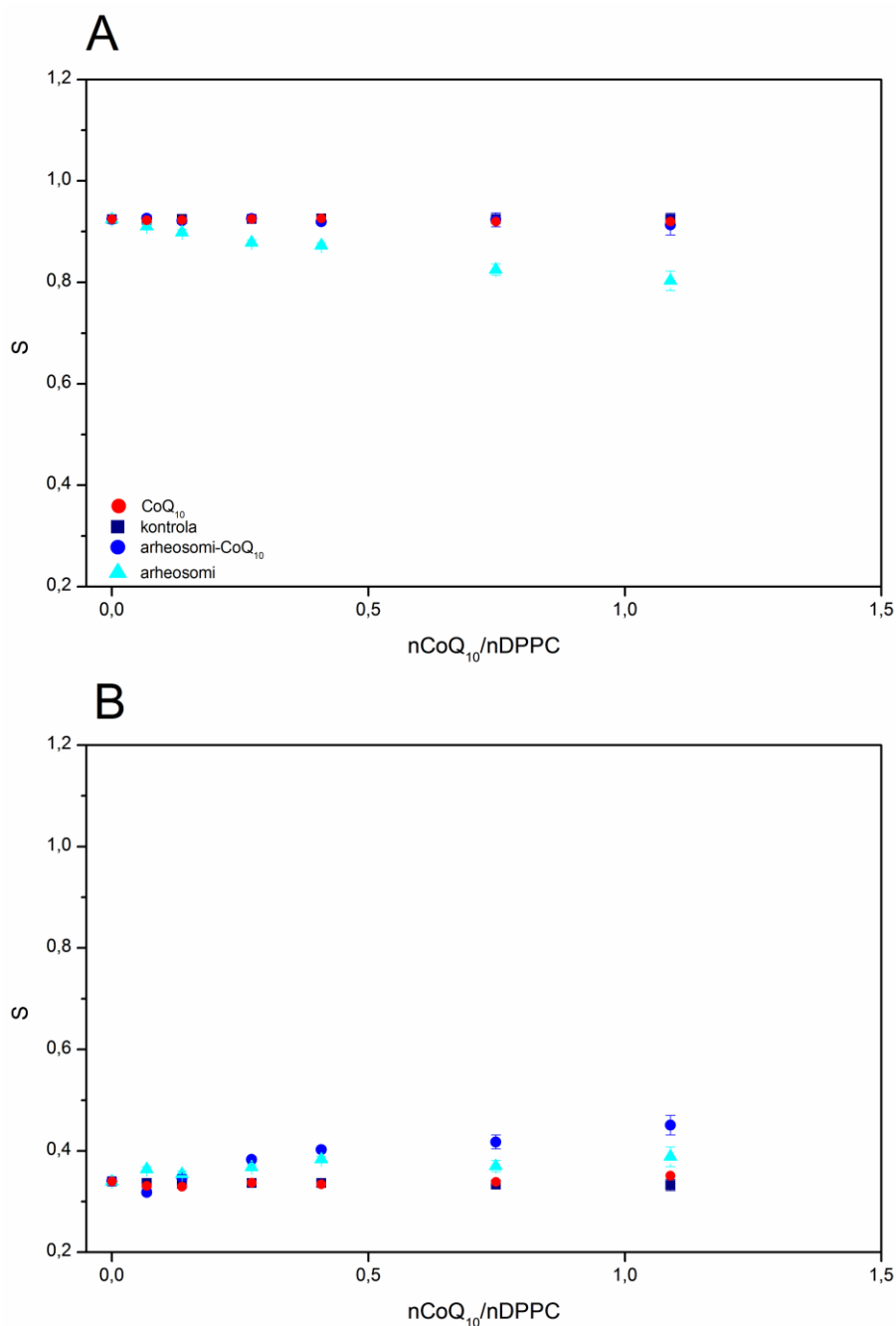
Slika 34: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec E), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode. Nosilci: natrijev oktenilsukcinat škroba (mod. škrob), saharoza, laktoza, dekstrin in glicerol.

Figure 34: The changes in lipid order parameter (S) after titration of SUV constituted from PC and SM mix (2,4:1) with water suspension of water soluble CoQ₁₀ formulation or components of carriers present in this formulation (Sample E) with the CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control. Carriers: starch natrium octenylsuccinate (mod. škrob), sacharose, lactose, dextrin, glycerol.

4.2.7 Vzorec CoQ₁₀ v arheosomih

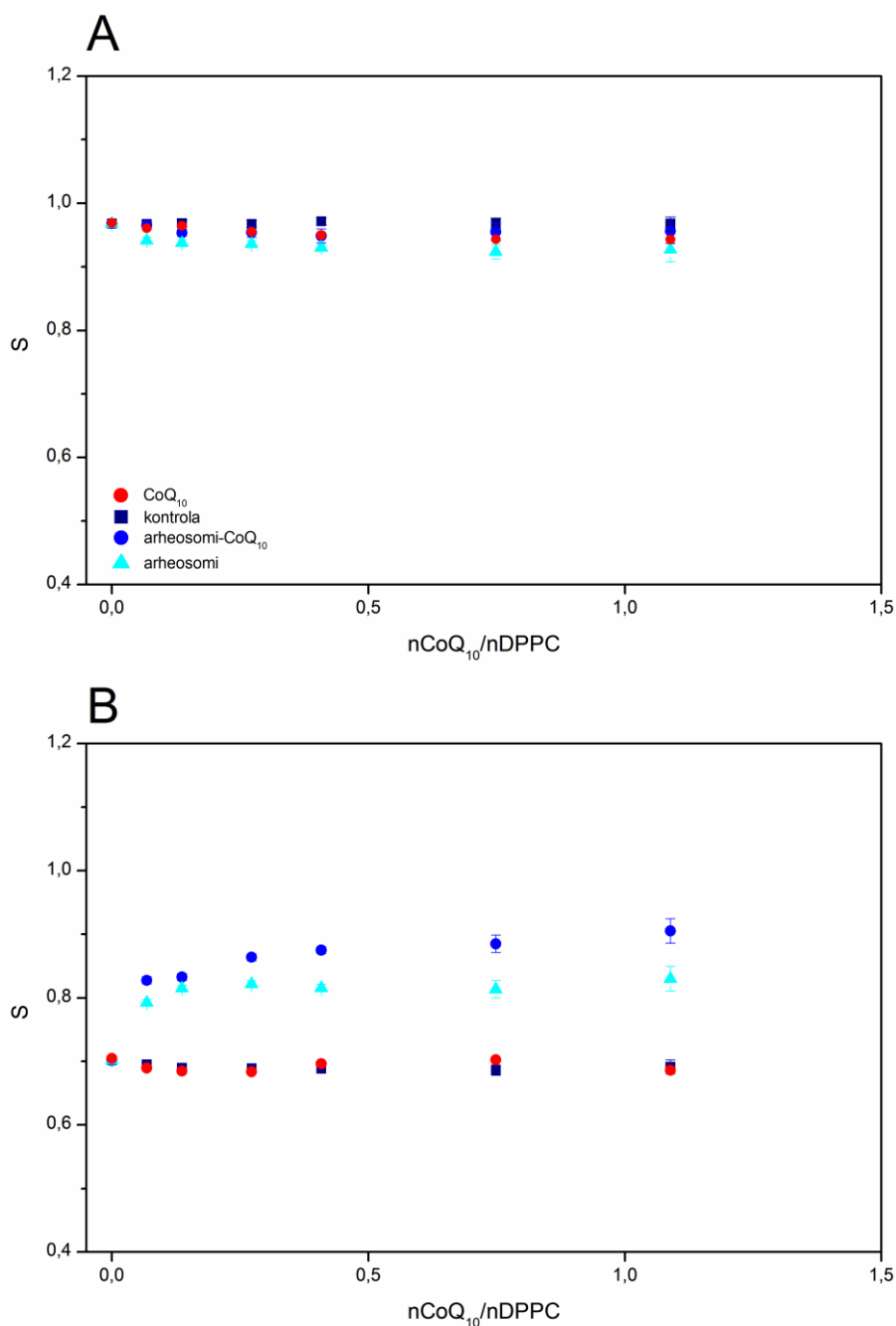
Na slikah 35, 36, 37 in 38 so prikazane odvisnosti ureditvenega parametra v liposomih SUV pripravljenih iz DPPC oz. mešanice PC in SM (2,4:1), označenih s fluoroforjem DPH oz. TMA-DPH, od molskega razmerja CoQ₁₀/lipidi oz. ustrezni količini arheosomov v kapsulatu CoQ₁₀ v arheosomih.

Pod temperaturo faznega prehoda DPPC prisotnost tega kapsulata ne povzroči večjih sprememb, medtem ko prisotnost samih arheosomov povzroči rahlo zmanjšanje fluorescenčne anizotropije DPH, kar kaže na povečanje fluidnosti acilnih verig (slika 35A). Pri 45 °C opazimo povečanje urejenosti acilnih verig membrane liposomov DPPC tako ob dodatku arheosomov s CoQ₁₀, kot tudi ob dodatku samih arheosomov. Ureditev je večja, ko je v arheosomih prisoten CoQ₁₀ (slika 35B). Dodatek arheosomov s CoQ₁₀ in samih arheosomov povzroči povečanje ureditve površine membrane pri 45 °C. Pri 45 °C je ureditev večja, ko je v arheosomih prisoten CoQ₁₀ (slika 36B). V primeru liposomov PC-SM dodatek arheosomov s CoQ₁₀ in samih arheosomov povzroči povečanje fluorescenčne anizotropije DPH, kar kaže na ureditve acilnih verig DPPC tako pri 25 °C, kot tudi pri 45 °C (slika 37). Spremembe na površini liposomov PC-SM, ob dodatku tega kapsulata oz. samih arheosomov, so podobne kot v primeru liposomov DPPC (slika 38).



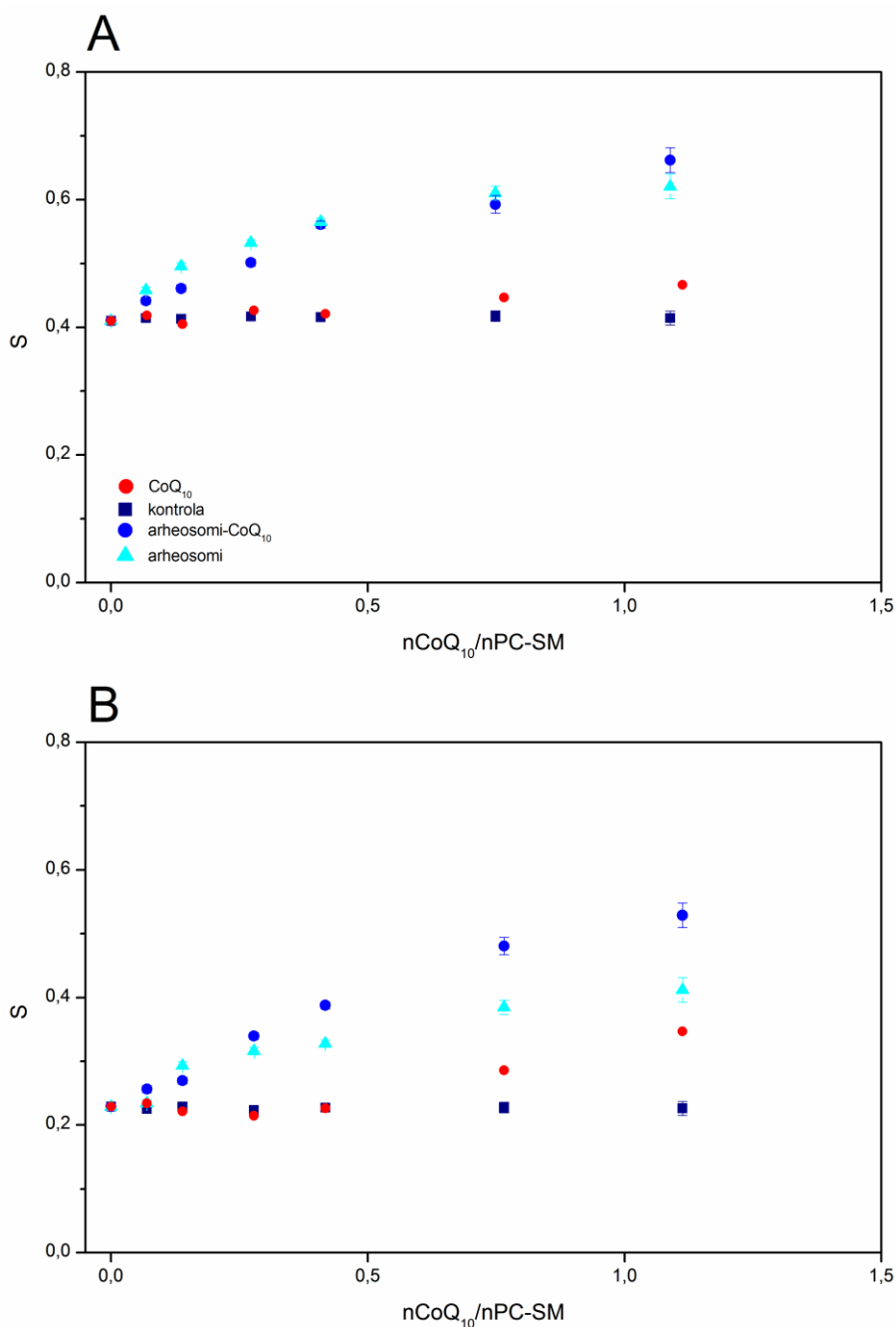
Slika 35: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo SUV arheosomov z 10 % CoQ₁₀ oz. samih arheosomov s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode.

Figure 35: The changes in lipid order parameter (S) after titration of SUV constituted from DPPC with water suspension of SUV archaeosomes with 10 % CoQ₁₀ or pure archaeosomes with CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control.



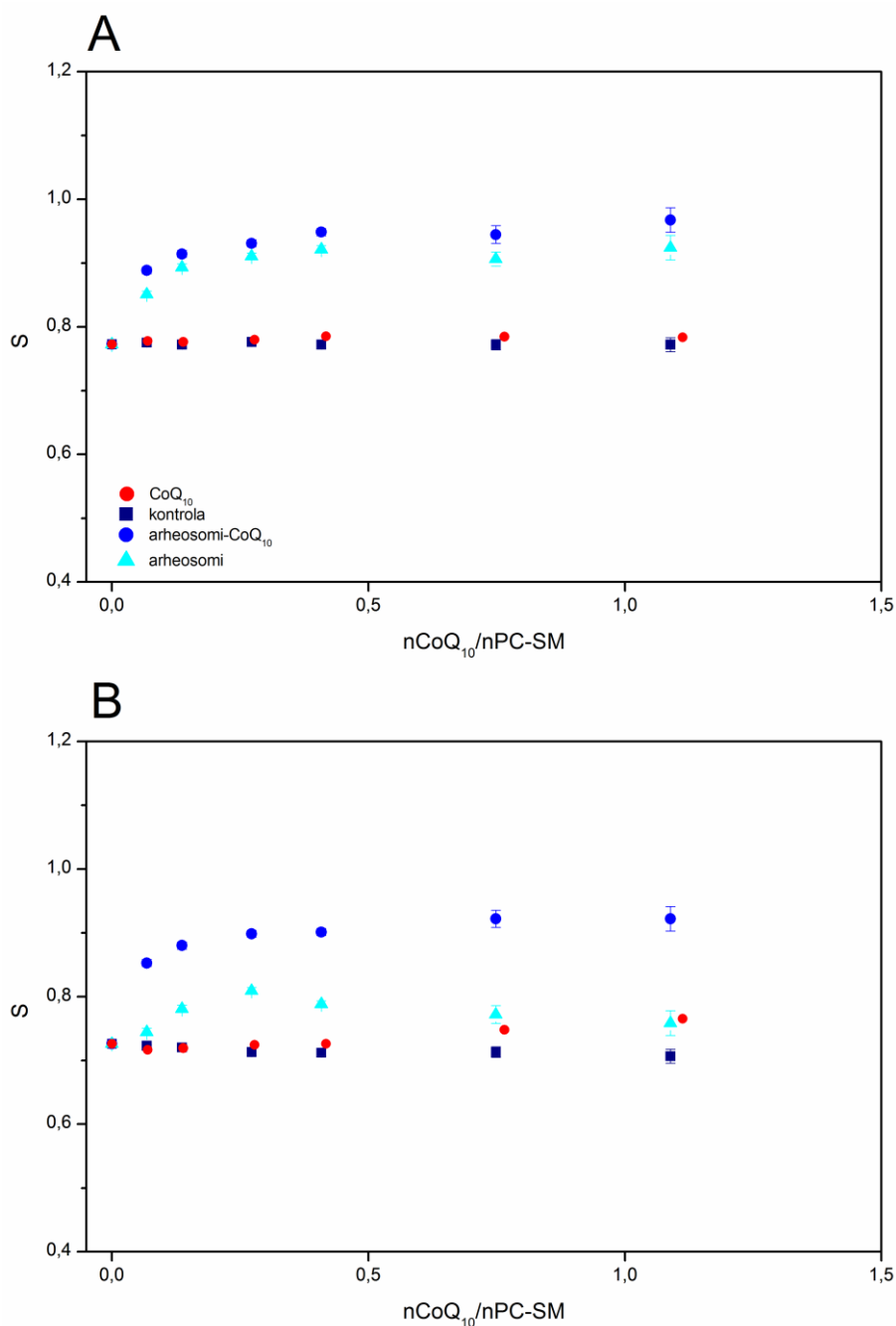
Slika 36: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo SUV arheosomov z 10 % CoQ₁₀ oz. samih arheosomov s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode.

Figure 36: The changes in lipid order parameter (S) after titration of SUV constituted from DPPC with water suspension of SUV archaeosomes with 10 % CoQ₁₀ or pure archaeosomes with CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control.



Slika 37: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo SUV arheosomov z 10 % CoQ₁₀ oz. samih arheosomov s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode.

Figure 37: The changes in lipid order parameter (S) after titration of SUV constituted from PC and SM mix (2,4:1) with water suspension of SUV archaeosomes with 10 % CoQ₁₀ or pure archaeosomes with CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control.



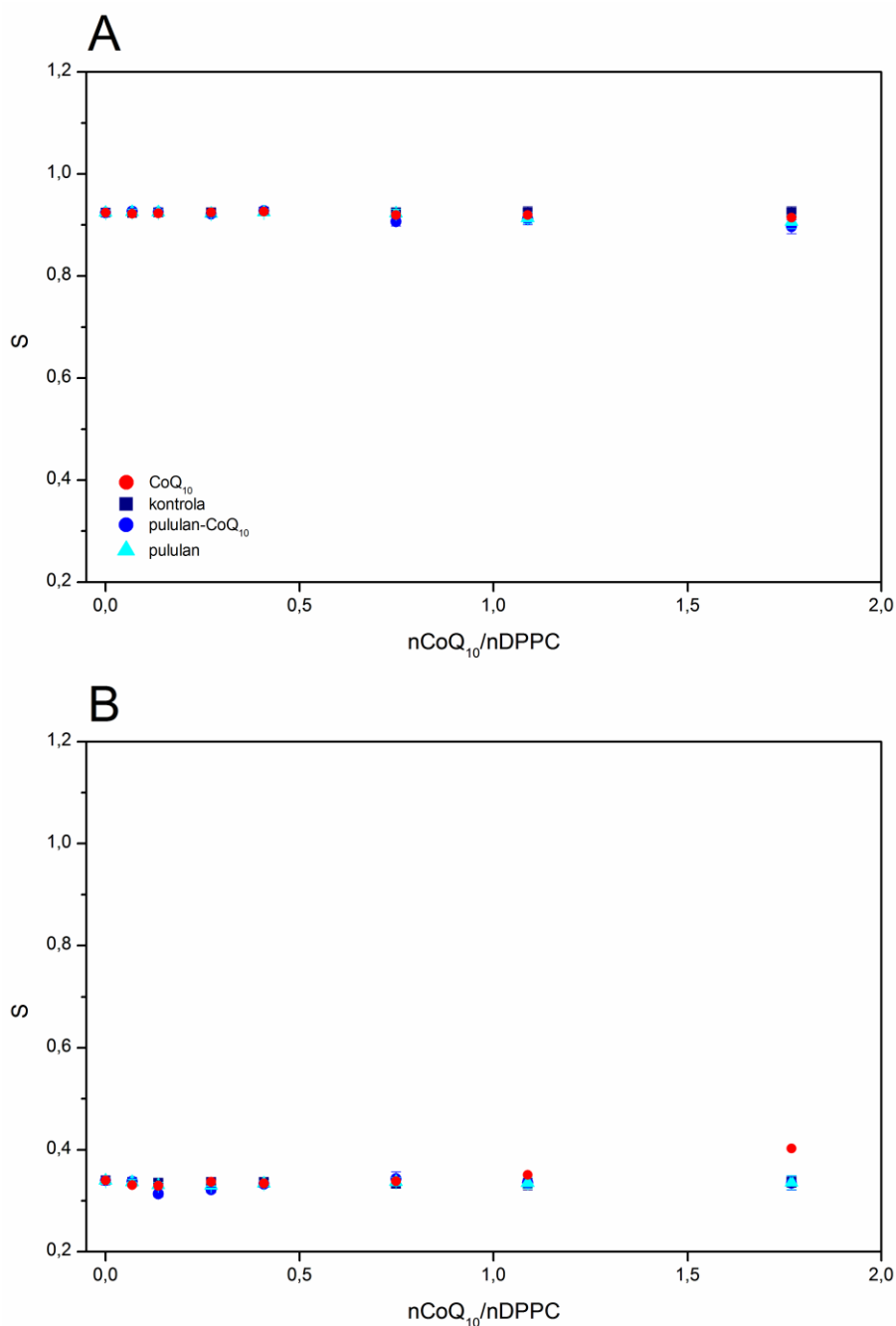
Slika 38: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo SUV arheosomov z 10 % CoQ₁₀ oz. samih arheosomov s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode.

Figure 38: The changes in lipid order parameter (S) after titration of SUV constituted from PC and SM mix (2,4:1) with water suspension of SUV archaeosomes with 10 % CoQ₁₀ or pure archaeosomes with CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control.

4.2.8 Vzorec CoQ₁₀ v pululanu

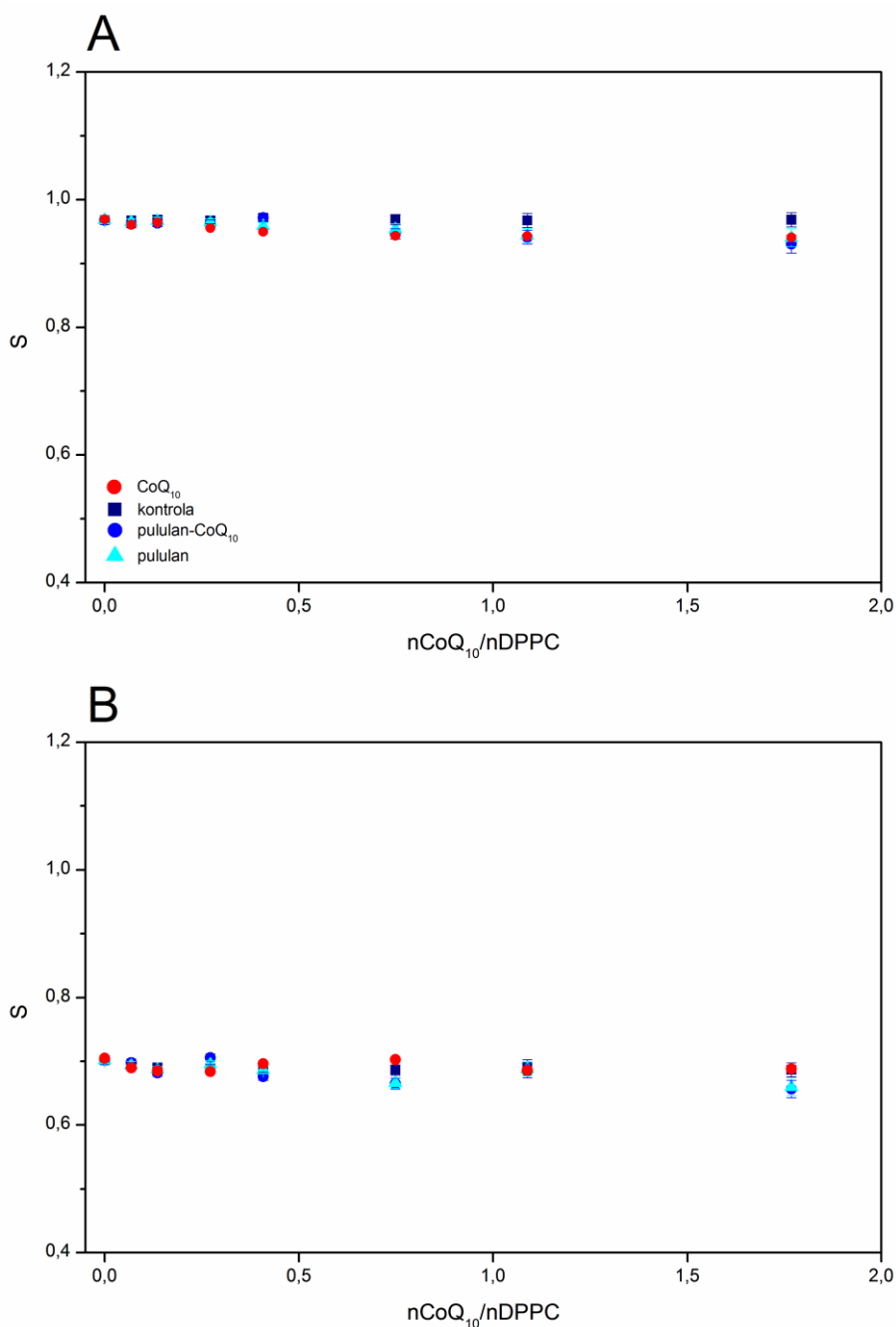
Na slikah 39, 40, 41 in 42 so prikazane odvisnosti ureditvenega parametra v SUV liposomih pripravljenih iz DPPC oz. mešanice PC in SM (2,4:1), označenih s fluoroforjem DPH oz. TMA-DPH, od molskega razmerja CoQ₁₀/lipidi oz. ustrezni količini pululana v kapsulatu CoQ₁₀ v polisaharidu pululan.

Dodatek CoQ₁₀ v pululanu ali samega pululana ni povzročil večjih sprememb v urejenosti acilnih verig membrane liposomov DPPC in PC-SM (slika 39 in slika 41). Na površini membrane liposomov DPPC in PC-SM dodatek tega kapsulata povzroči rahlo povečanje fluidnosti, ko je razmerje CoQ₁₀:lipidi okoli 1,8. Učinek samega pululana je podoben (slika 40 in slika 42).



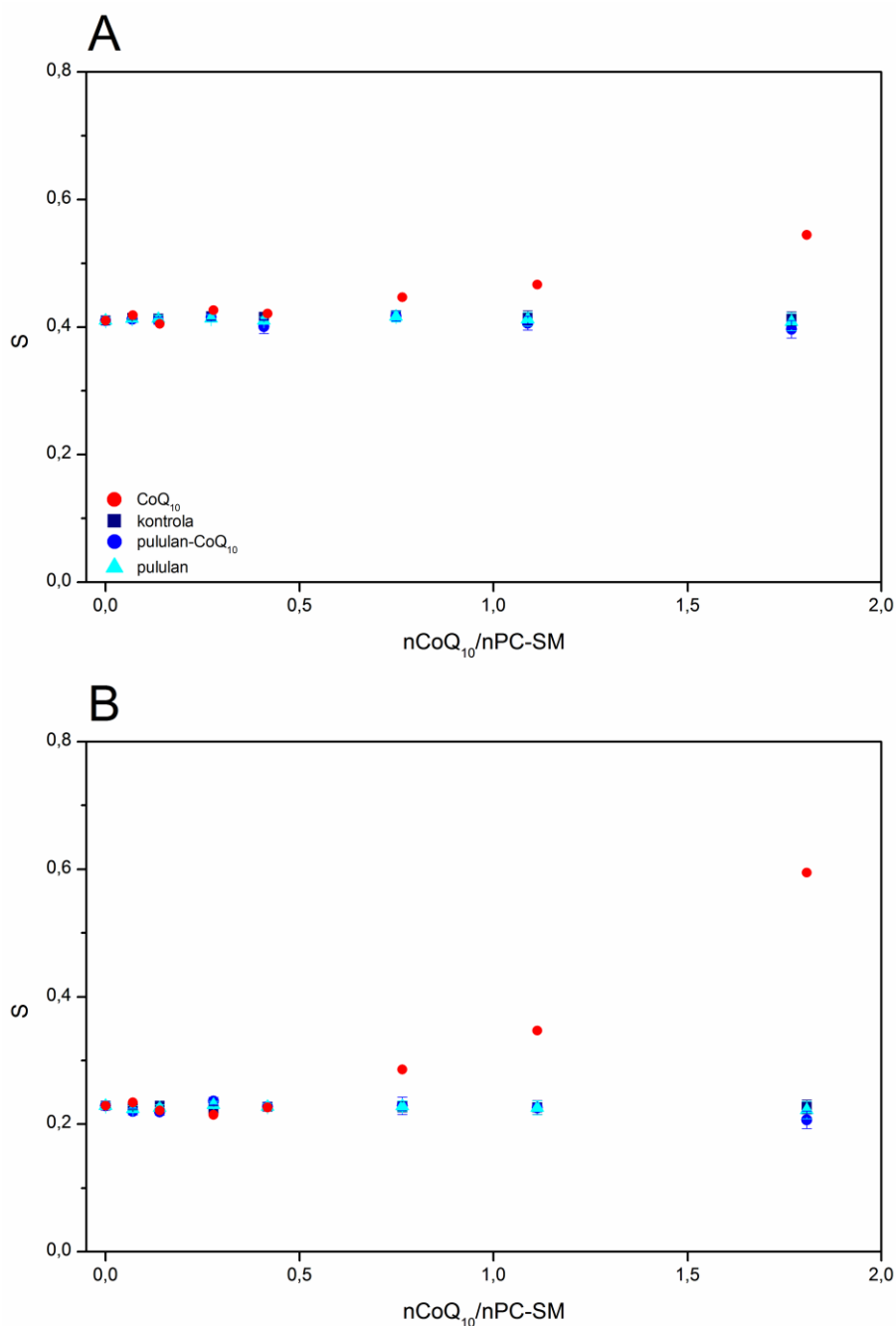
Slika 39: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo CoQ₁₀ v pululanu oz. samega pululana s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode.

Figure 39: The changes in lipid order parameter (S) after titration of SUV constituted from DPPC with water suspension of CoQ₁₀ in pullulan or pure pullulan with CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control.



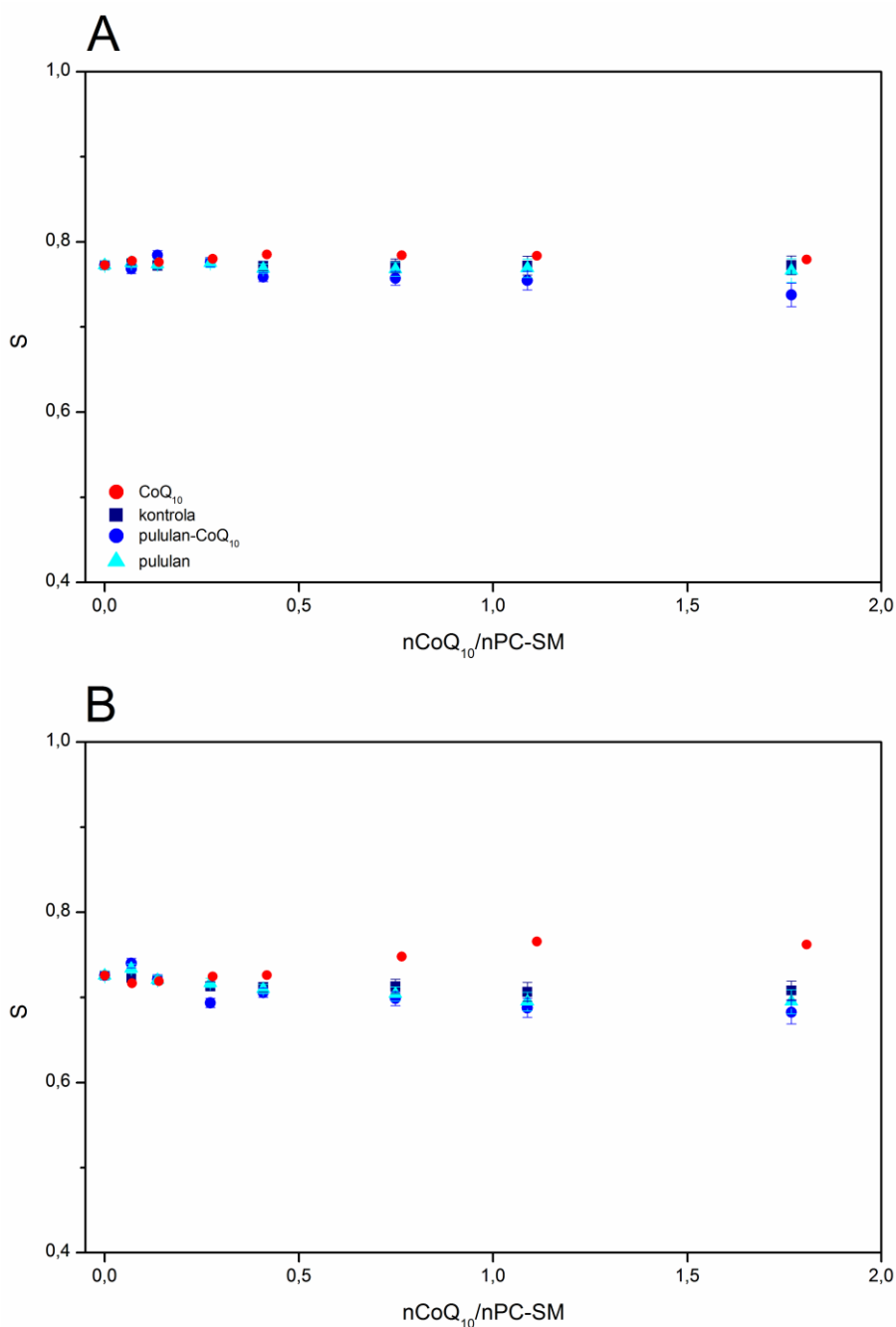
Slika 40: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo CoQ₁₀ v pululanu oz. samega pululana s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode.

Figure 40: The changes in lipid order parameter (S) after titration of SUV constituted from DPPC with water suspension of CoQ₁₀ in pullulan or pure pullulan with CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control.



Slika 41: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo CoQ₁₀ v pululanu oz. samega pululana s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode.

Figure 41: The changes in lipid order parameter (S) after titration of SUV constituted from PC and SM mix (2,4:1) with water suspension of CoQ₁₀ in pullulan or pure pullulan with CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control.



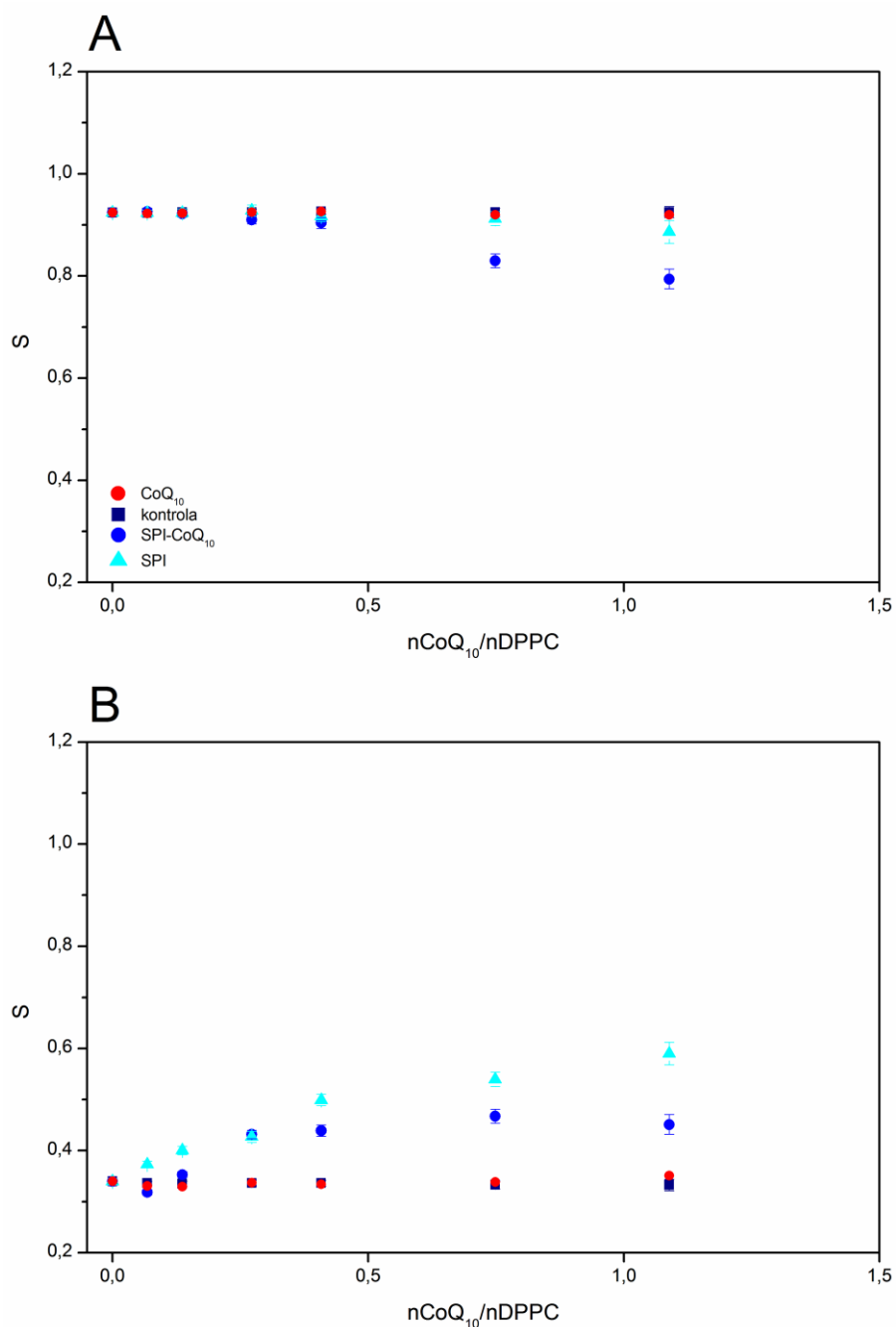
Slika 42: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo CoQ₁₀ v pululanu oz. samega pululana s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode.

Figure 42: The changes in lipid order parameter (S) after titration of SUV constituted from PC and SM mix (2,4:1) with water suspension of CoQ₁₀ in pullulan or pure pullulan with CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control.

4.2.9 Vzorec CoQ₁₀ v izolatu sojinih proteinov

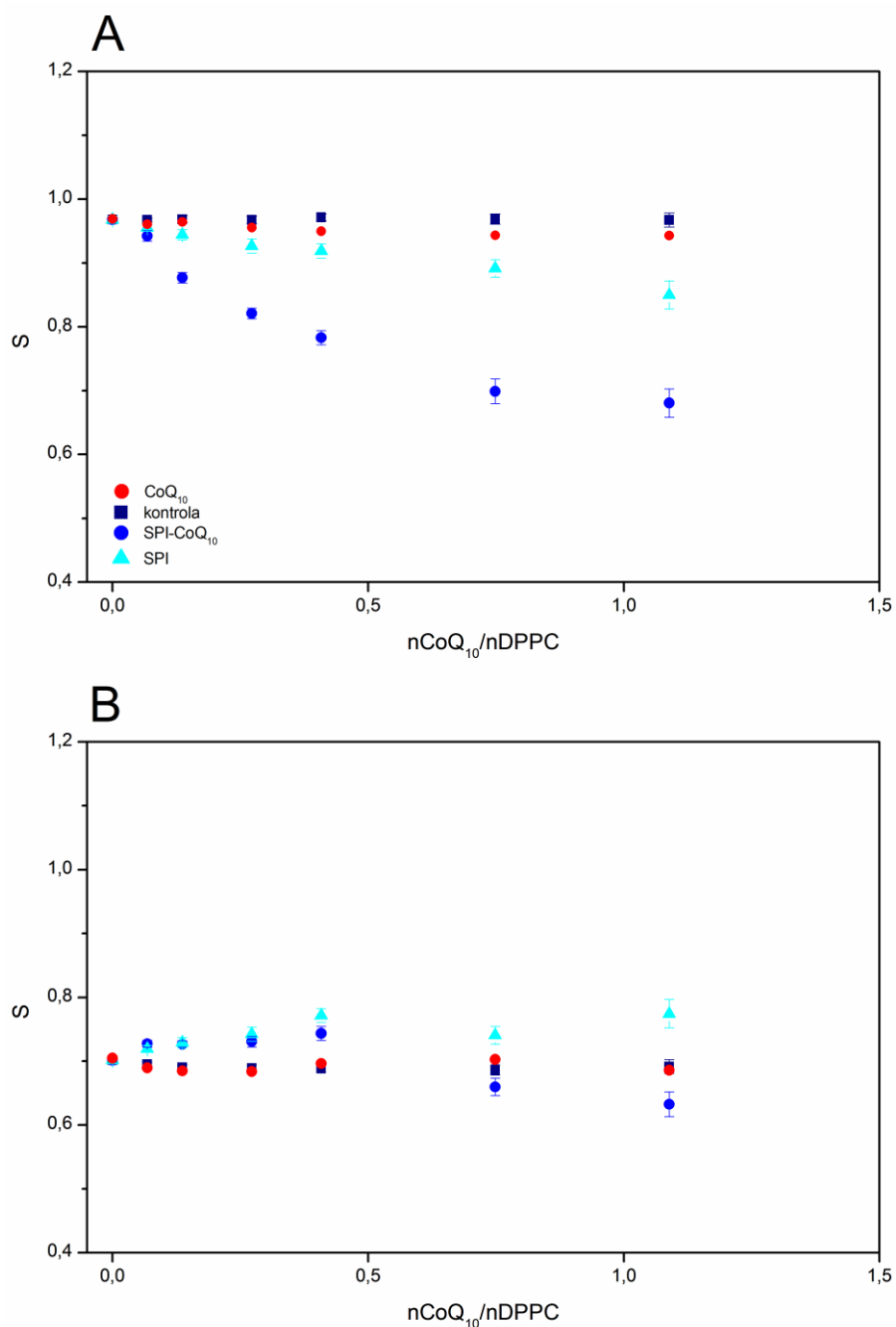
Na slikah 43, 44, 45 in 46 so prikazane odvisnosti lipidnega ureditvenega parametra v SUV pripravljenih iz DPPC oz. mešanice PC in SM (2,4:1), označenih s fluoroforjem DPH oz. TMA-DPH, od molskega razmerja CoQ₁₀/lipidi oz. ustrezni količini izolata sojinih proteinov (SPI) v agregatih SPI s CoQ₁₀.

Pri 25 °C je dodatek CoQ₁₀ v agregatih SPI povzročil zmanjšanje anizotropije DPH in TMA-DPH liposomov DPPC, kar kaže na povečanje fluidnosti membrane. Podoben, a ne tako izrazit učinek so povzročili tudi sami SPI (slika 43 in slika 44). Nad temperaturo faznega prehoda je ob dodatku tega kapsulata prišlo do povečanja ureditve acilnih verig DPPC. Ureditev je bila večja, ko smo dodali sam SPI (slika 43B). Na površini DPPC membrane, pri 45 °C, dodatek SPI povzroči rahlo povečanje ureditvenega parametra, medtem ko SPI s CoQ₁₀ ureditveni parameter rahlo zmanjšajo (slika 44B). V primeru liposomov PC-SM dodatek tega kapsulata in samega SPI povzroči povečanje fluorescenčne anizotropije DPH pri obeh temperaturah meritve. Učinek samega SPI je večji (slika 45). Dodatek SPI povzroči rahlo povečanje fluorescenčne anizotropije TMA-DPH, dodatek SPI s CoQ₁₀ pa njeno zmanjšanje. Učinek je večji pri 45 °C (slika 46).



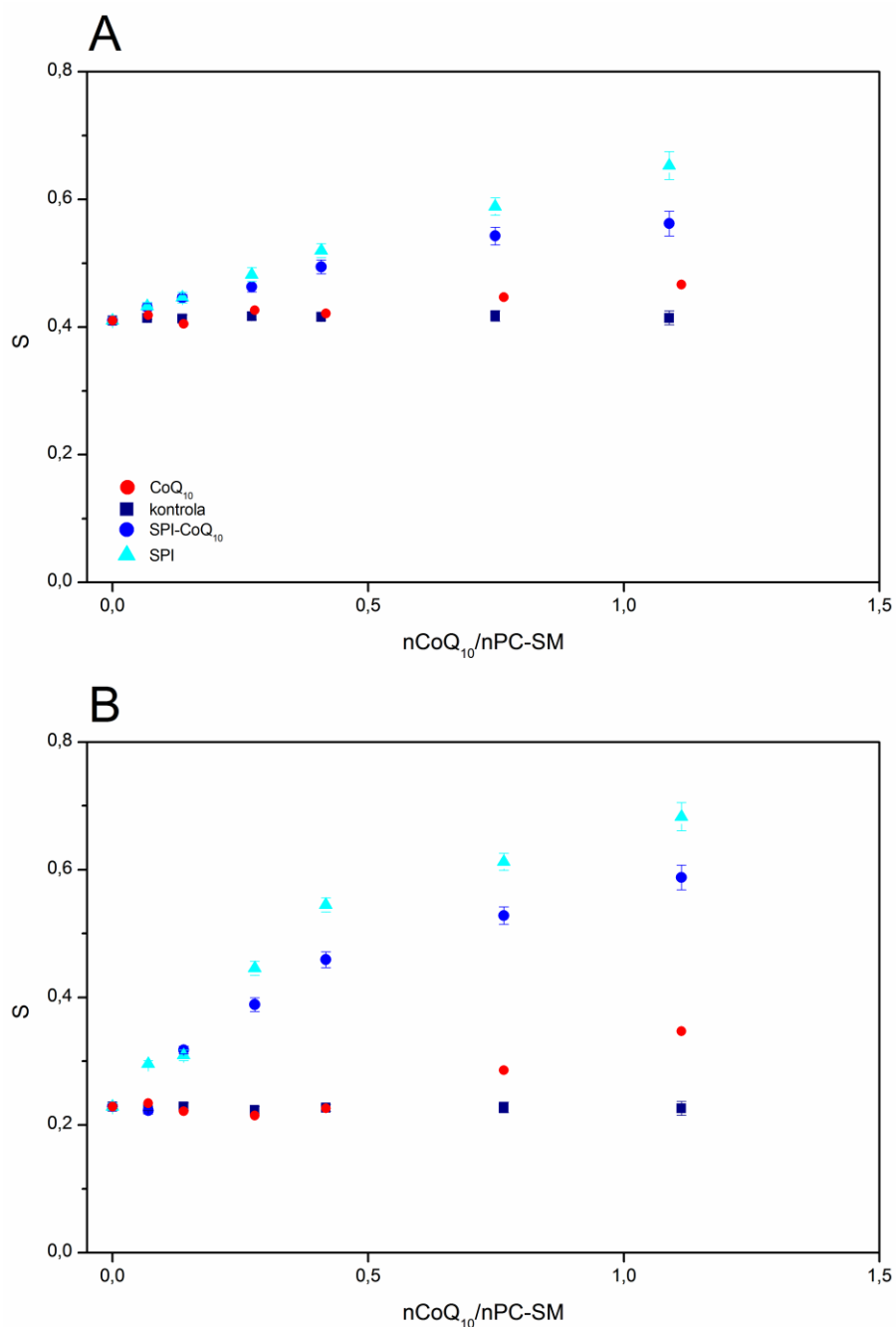
Slika 43: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo CoQ₁₀ v izolatu sojinih proteinov (SPI) oz. samega SPI s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode.

Figure 43: The changes in lipid order parameter (S) after titration of SUV constituted from DPPC with water suspension of CoQ₁₀ in soy protein isolate (SPI) or pure SPI with CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control.



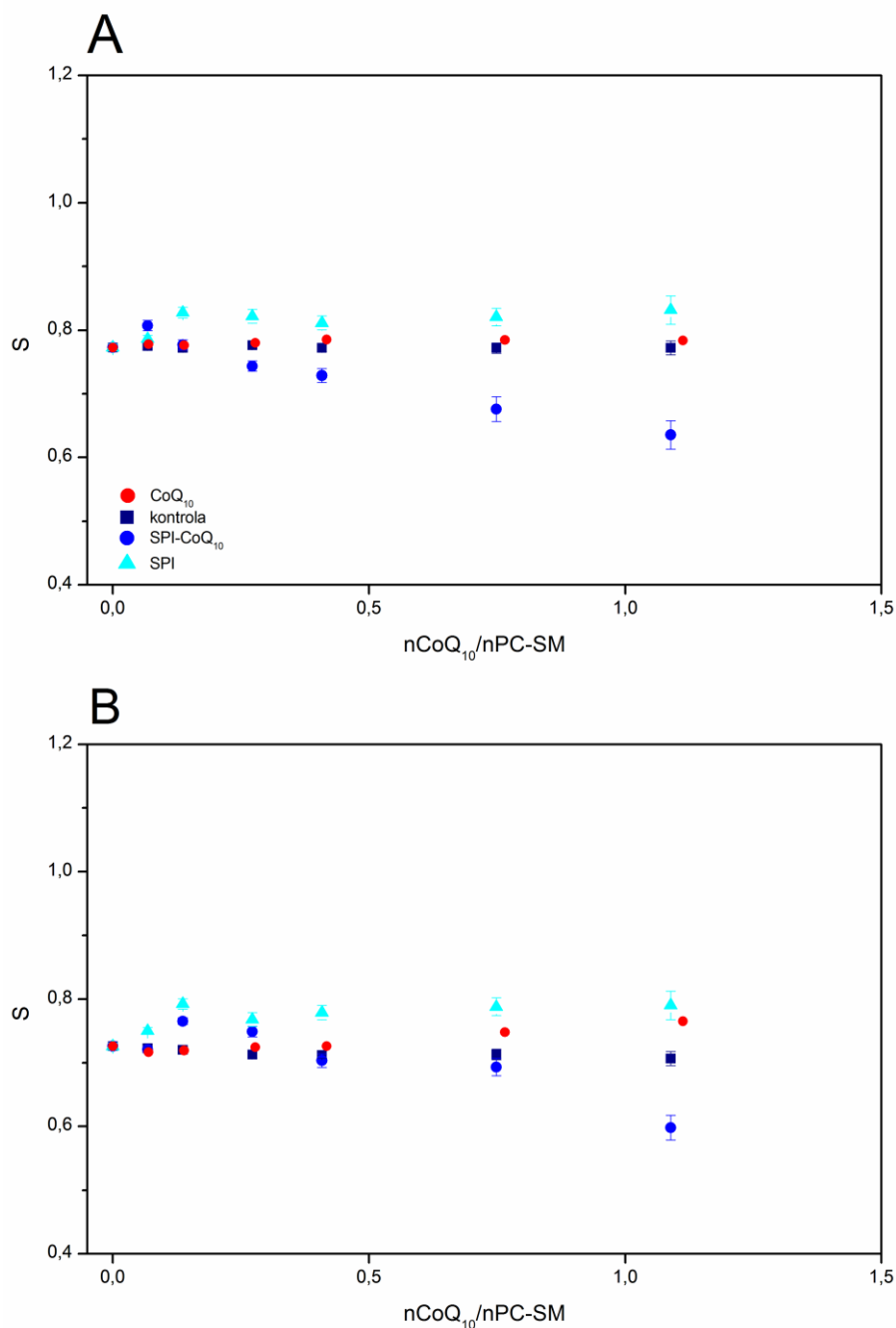
Slika 44: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo CoQ₁₀ v izolatu sojinih proteinov (SPI) oz. samega SPI s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode.

Figure 44: The changes in lipid order parameter (S) after titration of SUV constituted from DPPC with water suspension of CoQ₁₀ in soy protein isolate (SPI) or pure SPI with CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control.



Slika 45: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo CoQ₁₀ v izolatu sojinih proteinov (SPI) oz. samega SPI s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode.

Figure 45: The changes in lipid order parameter (S) after titration of SUV constituted from PC and SM mix (2,4:1) with water suspension of CoQ₁₀ in soy protein isolate (SPI) or pure SPI with CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control.

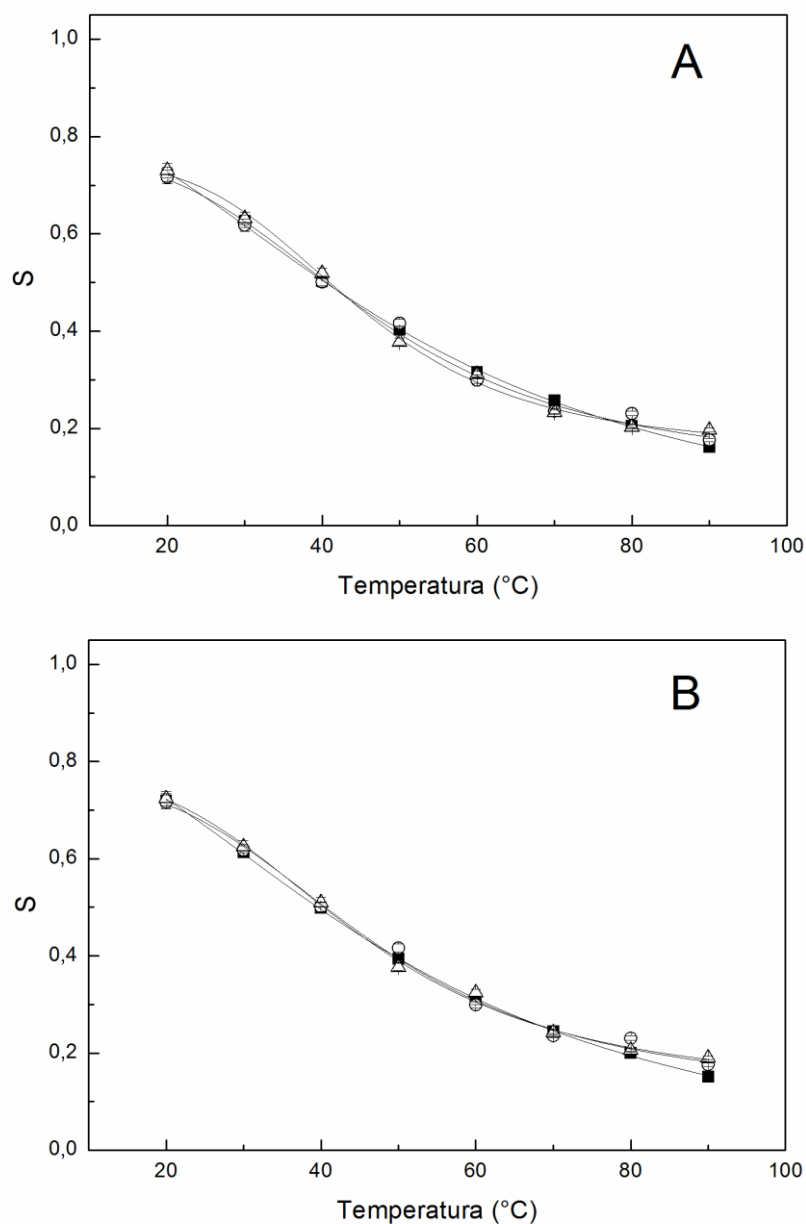


Slika 46: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji SUV, pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo CoQ₁₀ v izolatu sojinih proteinov (SPI) oz. samega SPI s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode.

Figure 46: The changes in lipid order parameter (S) after titration of SUV constituted from PC and SM mix (2,4:1) with water suspension of CoQ₁₀ in soy protein isolate (SPI) or pure SPI with CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control.

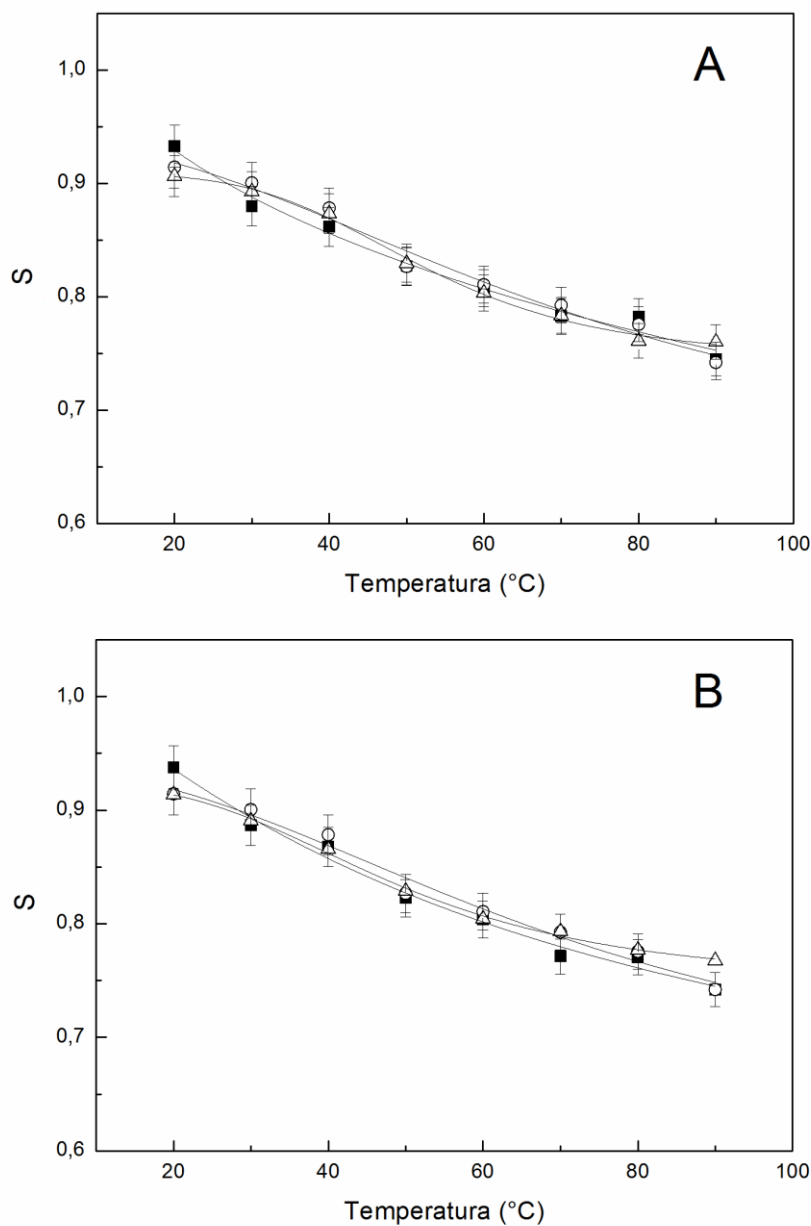
4.2.9.1 Merjenje fluorescenčne anizotropije DPH in TMA-DPH v membranah arheosomov kot funkcija temperature

Iz meritev fluorescenčne anizotropije DPH in TMA-DPH smo izračunali ureditveni parameter liposomov SUV, sestavljenih iz PLMF izoliranih iz celic *A. pernix* gojenih pri pH 6,0, 7,0 in 8,0. V testiranem temperaturnem območju nismo zaznali večjih sprememb v ureditvenem parametru, ne glede na pH rastnega medija, v katerem smo gojili *A. pernix* (slika 47). Podobne rezultate smo dobili tudi z uporabo fluoroforja TMA-DPH, ki nam da informacijo o ureditvi zgornjega dela membrane, blizu lipidnih polarnih glav. Tudi tu pH gojišča ne povzroči večjih sprememb v ureditvenem parametru (slika 48).



Slika 47: Temperaturna odvisnost ureditvenega parametra (S) PLMF iz arhej *A. pernix*, gojenih v medijih z različnim pH (■ – pH 6,0; ○ – pH 7,0; Δ – pH 8,0), določen z merjenjem fluorescenčne anizotropije DPH. (A) pH vzorcev za meritve je bil enak pH rastnega medija; (B) meritve opravljene pri pH 7,0.

Figure 47: Temperature dependence of the lipid order parameter (S) of the PLMF from *A. pernix* grown in medium with different pH (■ – pH 6.0; ○ – pH 7.0; Δ – pH 8.0) determined by measuring the fluorescence anisotropy of DPH. (A) pH of measured samples was the same as the pH of growth medium; (B) experiments were performed at pH 7.0.



Slika 48: Temperaturna odvisnost ureditvenega parametra PLMF iz arhej *A. permix*, gojenih v medijih z različnim pH (■ – pH 6,0; ○ – pH 7,0; △ – pH 8,0), določen z merjenjem fluorescenčne anizotropije TMA-DPH. (A) pH vzorcev za meritve je bil enak pH rastnega medija; (B) meritve opravljene pri pH 7,0.

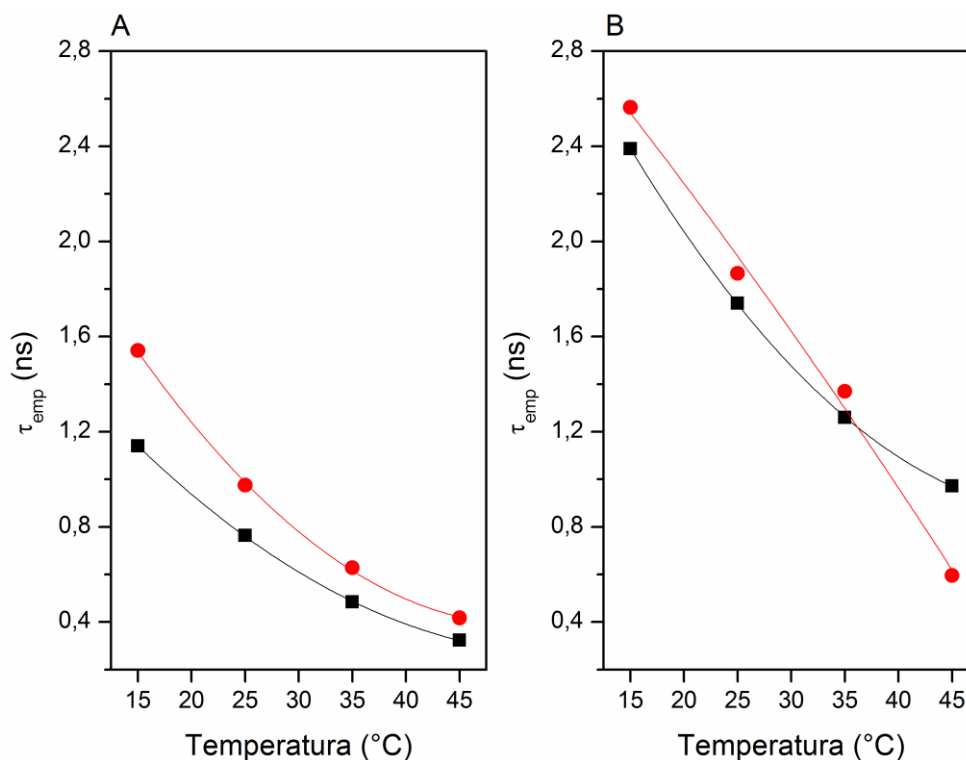
Figure 48: Temperature dependence of the lipid order parameter of the PLMF from *A. permix* grown in medium with different pH (■ – pH 6.0; ○ – pH 7.0; △ – pH 8.0) determined by measuring the fluorescence anisotropy of TMA-DPH. (A) pH of measured samples was the same as the pH of growth medium; (B) experiments were performed at pH 7.0.

4.3 SPREMLJANJE EPR SPEKTROV LIPOSOMOV PRIPRAVLJENIH IZ MEŠANICE PC-SM KOT FUNKCIJA TEMPERATURE

Da bi ugotovili, kako posamezni vodotopni pripravki CoQ₁₀ oz. njihovi nosilci vplivajo na fluidnost membran, smo z Xpasovnim EPR spektrometrom v temperaturnem območju od 15 °C do 45 °C posneli eksperimentalne EPR spektre majhnih unilamelarnih liposomov pripravljenih iz mešanice PC in SM v molarnem razmerju 2,4:1. Pri meritvah smo uporabili dva spinska označevalca, metilna estra palmitinske kisline MeFASL (10,3) in MeFASL (2,11). Iz dobljenih EPR spektrov smo izračunali empirični korelacijski čas.

4.3.1 Mobilnost spinskih označevalcev v lipidni membrani z in brez dodatka CoQ₁₀

Slika 49 prikazuje temperaturno odvisnost empiričnega korelacijskega časa (τ_{emp}) spinskih označevalcev, vgrajenih v liposome pripravljene iz PC-SM, z dodano etanolno raztopino CoQ₁₀. Razmerje CoQ₁₀/lipidi je bilo 1:2. Iz slike je razvidno, da je ob dodatku CoQ₁₀ prišlo do povečanja empiričnega korelacijskega časa spinskega označevalca MeFASL(2,11) v celotnem temperaturnem območju meritve (slika 49 A), kar pomeni, da dodatek CoQ₁₀ povzroči povečanje rigidnosti membrane. Na površini membrane liposomov, v bližini lipidnih glav, kjer se nahaja nitroksidna skupina spinskega označevalca MeFASL(10,3), je bilo povečanje empiričnega korelacijskega časa spinskega označevalca manjše, pri 45 °C pa opazimo zmanjšanje empiričnega korelacijskega časa spinskega označevalca, kar kaže na povečanje fluidnosti membrane pri tej temperaturi (slika 49B).



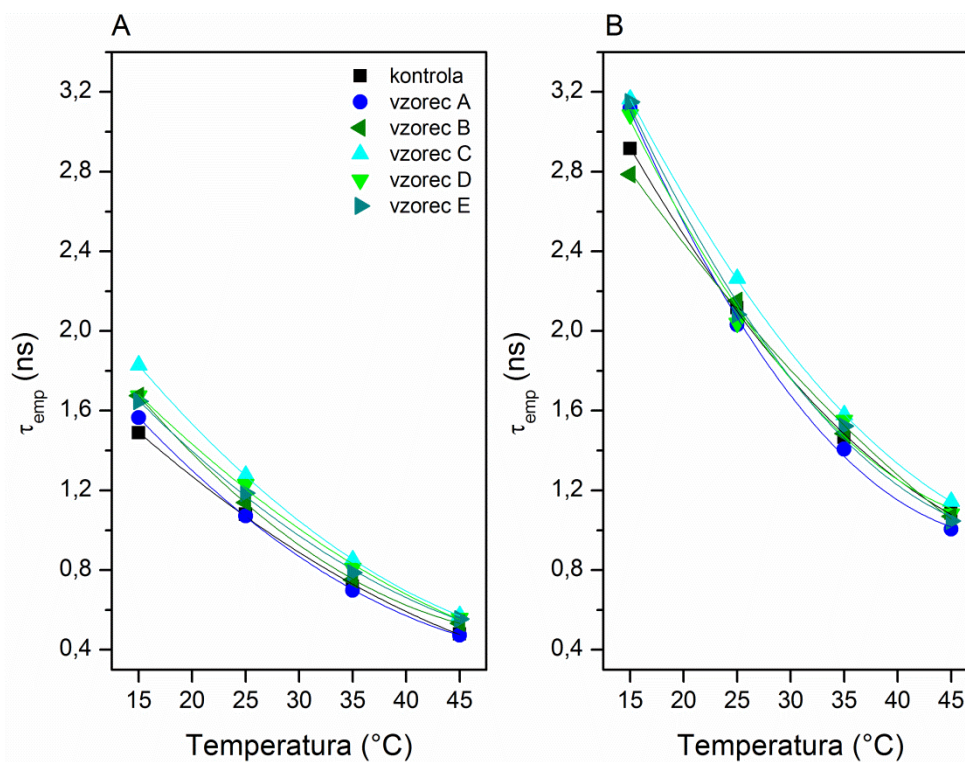
Slika 49: Temperaturna odvisnost empiričnega korelacijskega časa (τ_{emp}) spinskih označevalcev MeFASL(2,11) (A) in MeFASL(10,3) (B) v liposomih SUV sestavljenih iz PS:SM (2.4:1) brez (kontrola - ■) in v prisotnosti etanolne raztopine CoQ₁₀ (●). Molarno razmerje lipidi/ CoQ₁₀ je bilo 2:1.

Figure 49: Temperature dependence of the empirical correlation time (τ_{emp}) of the spin probes MeFASL(2,11) (A) and MeFASL(10,3) (B) in SUV composed of PS:SM (2.4:1) without (control ■) and in the presence of CoQ₁₀ (●). The molar ratio of lipid to CoQ₁₀ was 2:1.

4.3.2 Mobilnost spinskih označevalcev v lipidni membrani z in brez dodatka komercialno dostopnih vzorcev CoQ₁₀

Slika 50 prikazuje temperaturno odvisnost empiričnega korelacijskega časa (τ_{emp}) spinskih označevalcev, vgrajenih v liposome PC-SM v prisotnosti vodotopnih pripravkov CoQ₁₀. Razmerje CoQ₁₀/lipidi je bilo 1:2. Iz grafa je razvidno, da je v prisotnosti večine komercialno dostopnih vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ (vzorec B, C, D in E) prišlo do povečanja empiričnega korelacijskega časa spinskega označevalca MeFASL (2,11) v celotnem temperaturnem območju meritve (slika 50 levo), kar pomeni, da dodatek le-teh povzroči povečanje rigidnosti membrane. Dodatek emulzije CoQ₁₀ (vzorec A), kjer so kot nosilci prisotni glicerol, sojin lecitin, PGE in trigliceridi maščobnih kislin v celotnem merjenem temperaturnem območju ni povzročil večjih sprememb empiričnega korelacijskega časa. Večje zmanjšanje fluidnosti zgornjega dela membrane, v bližini

polarnih glav lipidov, smo opazili v prisotnosti vodotopnega pripravka CoQ₁₀, kjer so kot nosilci prisotni natrijev oktenilsukcinat škroba, dekstrin in glicerol (vzorec C), vpliv drugih vodotopnih pripravkov je bil majhen (slika 50 desno).

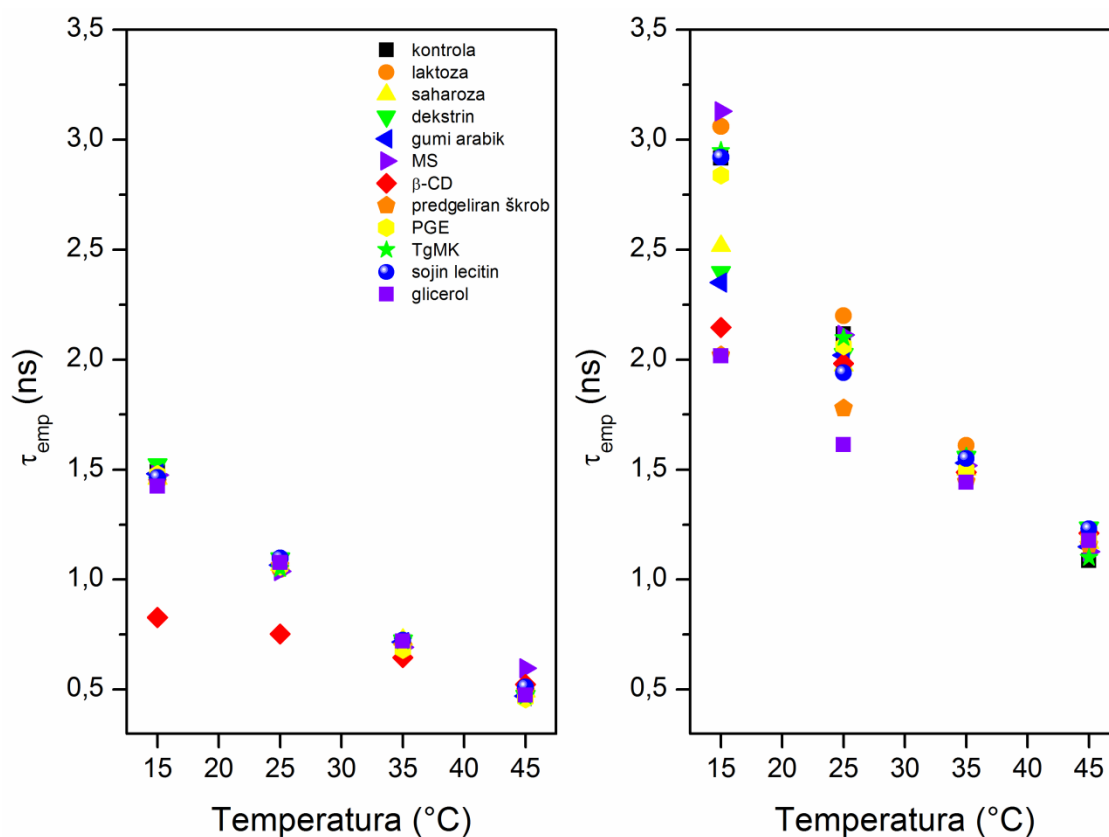


Slika 50: Temperaturna odvisnost empiričnega korelacijskega časa (τ_{emp}) spinskih označevalcev MeFASL(2,11) (levo) in MeFASL(10,3) (desno) v liposomih SUV sestavljenih iz PS:SM (2.4:1) brez (kontrola - ■) in v prisotnosti vodotopnih pripravkov CoQ₁₀. Molarno razmerje lipidi/ CoQ₁₀ je bilo 2:1.

Figure 50: Temperature dependence of the empirical correlation time (τ_{emp}) of the spin probes MeFASL(2,11) (left) and MeFASL(10,3) (right) in SUV composed of PS:SM (2.4:1) without (control ■) and in the presence of different water soluble CoQ₁₀ formulations. The molar ratio of lipid to CoQ₁₀ was 2:1.

Slika 51 prikazuje temperaturno odvisnost empiričnega korelacijskega časa (τ_{emp}) spinskih označevalcev, vgrajenih v liposome PC-SM v prisotnosti različnih nosilcev prisotnih v vodotopnih pripravkih CoQ₁₀. Količina posameznega nosilca ustreza količini, prisotni v vodotopnem pripravku CoQ₁₀, ko je razmerje CoQ₁₀/lipidi 1:2. Iz slike je razvidno, da prisotnost nosilcev z izjemo β -ciklodekstrina ne povzroči spremembe empiričnega korelacijskega časa spinskega označevalca MeFASL(2,11) v celotnem temperaturnem območju meritve. Zmanjšanje empiričnega korelacijskega časa spinskega označevalca MeFASL(2,11) ob dodatku β -ciklodekstrina je najverjetneje posledica napake meritve, saj je pri tej koncentraciji lipidov (5 mg/mL) dodatek β -ciklodekstrina povzročil agregacijo liposomov v kapilari in njihovo posedanje (slika 51 levo). Spremembe empiričnega

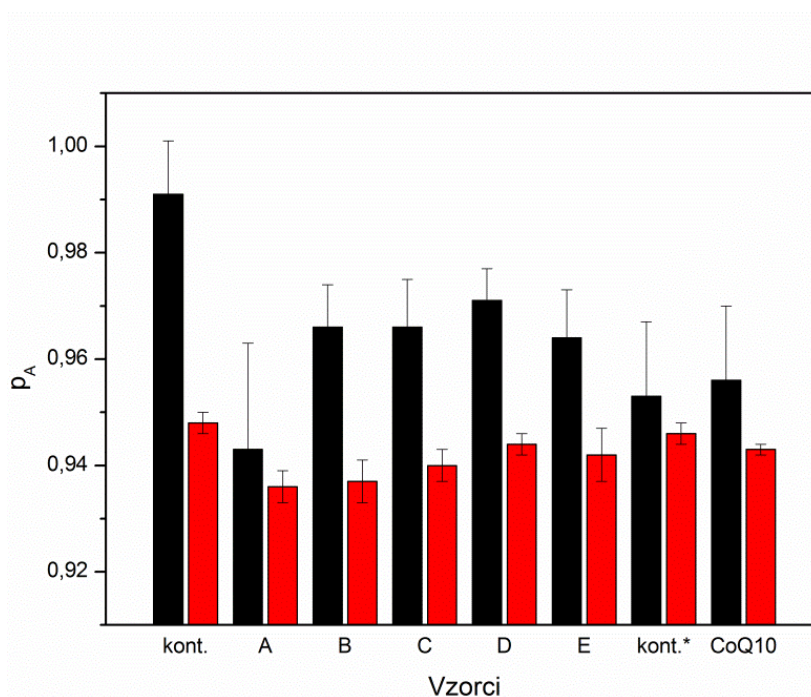
korelacijskega časa spinskega označevalca MeFASL(10,3), s katerim detektiramo spremembe v bližini polarnih glav, so bile bolj izrazite. Prisotnost saharoze, dekstrina, gumi arabika, β -ciklodekstrina in glicerola so povzročile zmanjšanje ureditve tega dela membrane, v prisotnosti laktoze in natrijevega oktenilsukcinata škroba (modificiran škrob – MS) pa smo pri 15 °C opazili rahlo zmanjšanje fluidnosti površine membrane. Z naraščanjem temperature so se spremembe v fluidnosti območja polarnih glav lipidov zmanjševale, pri 45 °C pa opaznejših razlik nismo več zaznali (slika 51 desno).



Slika 51: Temperaturna odvisnost empiričnega korelacijskega časa (τ_{emp}) spinskih označevalcev MeFASL(2,11) (levo) in MeFASL(10,3) (desno) v liposomih SUV sestavljenih iz PS:SM (2.4:1), brez (kontrola ■) in v prisotnosti različnih nosilcev prisotnih v vodotopnih pripravkih CoQ₁₀, v količini, ki je prisotna v vzorcu, ko je molarno razmerje lipidi/ CoQ₁₀ 2:1. MS (modificiran škrob) – natrijev oktenilsukcinat škroba; β -CD – β ciklodekstrin; TgMk – trigliceridi maščobnih kislin.

Figure 51: Temperature dependence of the empirical correlation time (τ_{emp}) of the spin probes MeFASL(2,11) (left) and MeFASL(10,3) (right) in SUV composed of PS:SM (2.4:1) without (control ■) and in the presence of different carriers present in water soluble CoQ₁₀ formulations in the amount present in the sample when molar ratio of lipid to CoQ₁₀ was 2:1. MS (modified starch) – starch sodium octenylsuccinate, β cyclodextrin; TgMk – triglycerides of fatty acids.

Podrobnejše informacije o karakteristikah membrane smo dobili z računalniško simulacijo EPR spektrov EPRSIM C (Štrancar in sod., 2005), kjer upoštevamo, da je eksperimentalni spekter sestavljen iz več spektralnih komponent. Ugotovili smo, da dodatek vseh vodotopnih pripravkov CoQ₁₀, kot tudi samega CoQ₁₀ povzroči zmanjšanje korekcijskega faktorja polarnosti (p_A) obeh membranskih domen, bolj urejene in manj urejene domene (slika 52).



Slika 52: Korekcijski faktor polarnosti hiperfinega sklopitvenega tenzorja (p_A), določenega z računalniško simulacijo EPR spektrov spinskega označevalca MeFASL(2,11) v SUV, sestavljenih iz PS:SM (2,4:1) brez (kontrola) in v prisotnosti različnih vodotopnih pripravkov in čistega CoQ₁₀ (*etanol je bil uporabljen za kontrolo) pri 25 °C. p_A najbolj urejene domene je predstavljen s črnimi, p_A manj urejene domene pa je predstavljen z rdečimi stolpci. Molarno razmerje lipidi:COQ₁₀ je bilo pri vseh poskusih 2:1.

Figure 52: The polarity correction factor of the hyperfine coupling tensor (p_A) determined by computer simulation of the EPR spectra of the spin probes MeFASL(2,11) in SUV composed of PS:SM (2.4:1) without (control) and in the presence of different water soluble CoQ₁₀ formulations and pure CoQ₁₀ (*ethanol was used as control) at 25 °C. p_A of the most ordered domain is presented in black and the p_A of less ordered domain is presented in red columns. The molar ratio of lipid to CoQ₁₀ in all experiments was 2:1.

4.3.2.1 Spremembe EPR spektrov arheosomov v odvisnosti od temperature

Empirični korelacijski čas spinskega označevalca MeFASL(10,3) (τ_{emp}) smo določili neposredno iz EPR spektrov. Ta z naraščanjem temperature pada. Tudi tu nismo opazili večjih razlik, ki bi bile posledica različnega pH gojišča. Da bi dobili podrobnejše informacije o vplivu različnega pH gojišča na strukturne karakteristike membrane, smo

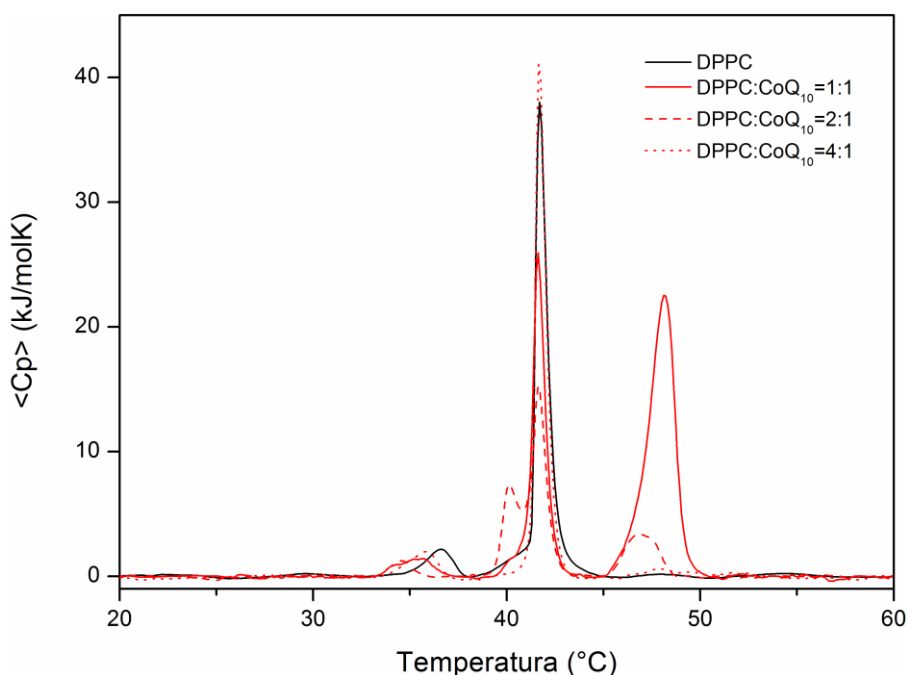
EPR spektre računalniško obdelali. Pri temperaturah pod 70 °C smo dobili ustrezna prileganja eksperimentalnih spektrov, pri čemer smo upoštevali dejstvo, da vsak spekter sestavljajo vsaj tri spektralne komponente. Opazili smo tri vzorce gibanja spinskega označevalca, ki jih lahko pripišemo dvokomponentni lipidni sestavi membrane (AI in AGI). Pri višjih temperaturah postane membrana bolj homogena in jo lahko opišemo z eno spektralno komponento (Ota in sod., 2012).

4.4 SPREMLJANJE FAZNIH PREHODOV LIPOSOMOV PRIPRAVLJENIH IZ DPPC OB DODATKU CoQ₁₀ IN VODOTOPNIH PRIPRAVKOV CoQ₁₀

Z metodo diferenčne dinamične kalorimetrije merimo spremembe v entalpiji in temperaturi faznih prehodov iz gel v tekoče kristalinično stanje. Poudariti je potrebno, da imajo ostre fazne prehode v ozkem temperaturnem področju samo čisti lipidni sistemi z nasičenimi maščobnimi kislinami (Budai in sod., 2003). Ker v temperaturnem območju med 0 °C in 100 °C v suspenziji liposomov sestavljenih iz mešanice različnih nenasičenih lipidov (npr. PC in SM) z DSC metodo ne moremo določiti faznih prehodov (Pawlikowska-Pawlega in sod., 2003), smo uporabili liposome pripravljene iz DPPC.

4.4.1 Vpliv CoQ₁₀ na fazne prehode multilamelarnih liposomov iz DPPC

Dodatek CoQ₁₀ (DPPC:CoQ₁₀ = 1:1) lipidom še pred oblikovanjem liposomov povzroči zmanjšanje entalpije glavnega faznega prehoda DPPC ($35,5 \pm 0,5$ kJ/mol na $23,3 \pm 0,5$ kJ/mol) in pojav novega vrha pri temperaturi $48,1 \pm 0,1$ °C. Delež CoQ₁₀ v agregiranem stanju narašča s koncentracijo CoQ₁₀ v liposomih DPPC (slika 53).



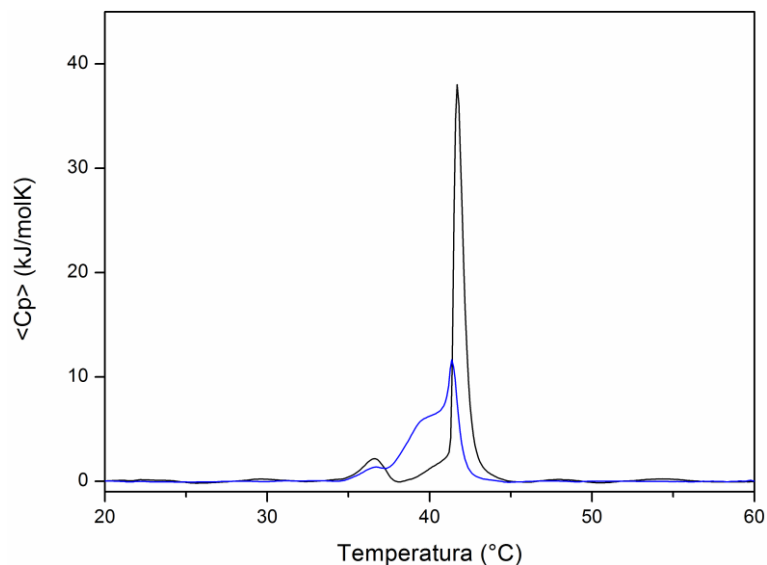
Slika 53: DSC termogrami liposomov DPPC pripravljenih s CoQ₁₀ v molarnem razmerju DPPC:CoQ₁₀ 1:1 (rdeča polna črta), 1:2 (rdeča črkana črta) in 1:4 (rdeča pikasta črta) pri pH 7,0.

Figure 53: DSC thermograms of DPPC liposoms (black line) prepared with pure CoQ₁₀ with DPPC:CoQ₁₀ molar ratio of 1:1 (red solid line), 1:2 (red dashed line) and 1:4 (red dotted line) at pH 7.0.

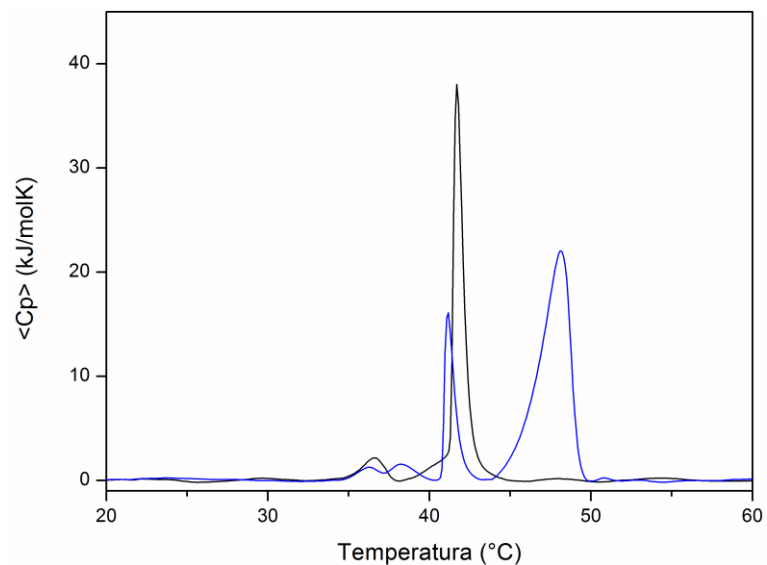
4.4.2 Vpliv vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ na fazne prehode vačslojnih liposomov iz DPPC

Na slikah 52, 53, 54, 55, 56, 57 in 58 so prikazani termogrami DSC liposomov DPPC v prisotnosti vodotopnih pripravkov CoQ₁₀; razmerje DPPC:CoQ₁₀ je bilo 1:1.

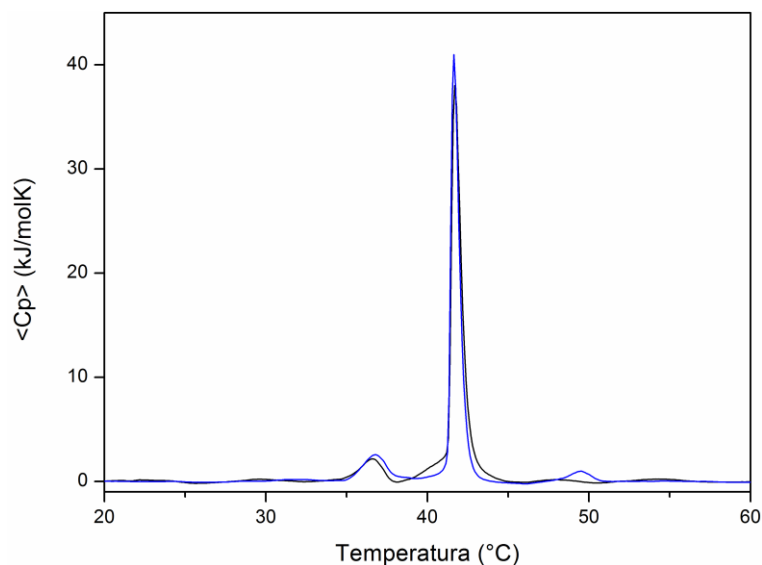
Dodatek emulzije CoQ₁₀ (vzorec A) - vodotopnega pripravka CoQ₁₀, kjer so kot nosilci prisotni glicerol, PGE in trigliceridi maščobnih kislin, je povzročil izginotje faznega prehoda in zmanjšanje entalpije glavnega faznega prehoda iz $35,5 \pm 0,5$ kJ/mol na $29,1 \pm 0,5$ kJ/mol. Vrh glavnega faznega prehoda se je zelo razširil. Razteza se v temperaturnem območju 8 °C (slika 54). Ob dodatku vodotopnega pripravka CoQ₁₀, kjer so kot nosilci prisotni predgeliran škrob, arabski gumi in laktoza (vzorec B) opazimo pojav novega vrha pri temperaturi $48,1 \pm 0,1$ °C, ki ustreza agregatom CoQ₁₀ (slika 55). Pojav tega vrha opazimo tudi ob dodatku vodotopnega pripravka CoQ₁₀, kjer so kot nosilci prisotni natrijev oktenilsukcinat škroba, dekstrin in glicerol (vzorec C). Tu je vrh pri temperaturi $49,1 \pm 0,1$ °C manjši. Njegova entalpija znaša $1,6 \pm 0,5$ kJ/mol (slika 56). Večje spremembe opazimo tudi ob dodatku vodotopnega pripravka CoQ₁₀, kjer je CoQ₁₀ kapsuliran v β-ciklodekstrin (vzorec D) ter ob dodatku vodotopnega pripravka CoQ₁₀, kjer so kot nosilci prisotni natrijev oktenilsukcinat škroba, laktoza, saharoza, dekstrin in glicerol (vzorec E). V prvem primeru se pri temperaturi $47,2 \pm 0,1$ °C pojavi vrh z entalpijo $38,0 \pm 0,5$ kJ/mol (slika 57), ob prisotnosti vodotopnega pripravka CoQ₁₀ –vzorec E, pa entalpija vrha pri $48,8 \pm 0,1$ °C znaša $41,6 \pm 0,5$ kJ/mol (slika 58). Vrh, ki ustreza agregatom CoQ₁₀ opazimo tudi ob dodatku CoQ₁₀ v pululanu (slika 60). Njegova entalpija znaša $25,6 \pm 0,5$ kJ/mol. V primeru arheosomov s CoQ₁₀ večjih sprememb nismo zaznali. V preglednici 4 so podane termodinamske vrednosti faznih prehodov v prisotnosti posameznih vodotopnih pripravkov CoQ₁₀, ter njihovih nosilcev v količini prisotni v teh pripravkih, ko je razmerje DPPC:CoQ₁₀ enako 1:1.



Slika 54: Termogram DSC liposomov DPPC (črna črta) v prisotnosti emulzije CoQ₁₀ – vodotopnega pripravka CoQ₁₀ – vzorec A, kjer je molarno razmerje DPPC: CoQ₁₀ enako 1:1 pri pH 7,0 (modra črta).
Figure 54: DSC thermogram of DPPC lipid vesicles (black line) in the presence of water soluble CoQ₁₀ formulation – Sample A) with DPPC:CoQ₁₀ molar ratio of 1:1 at pH 7.0 (blue line).

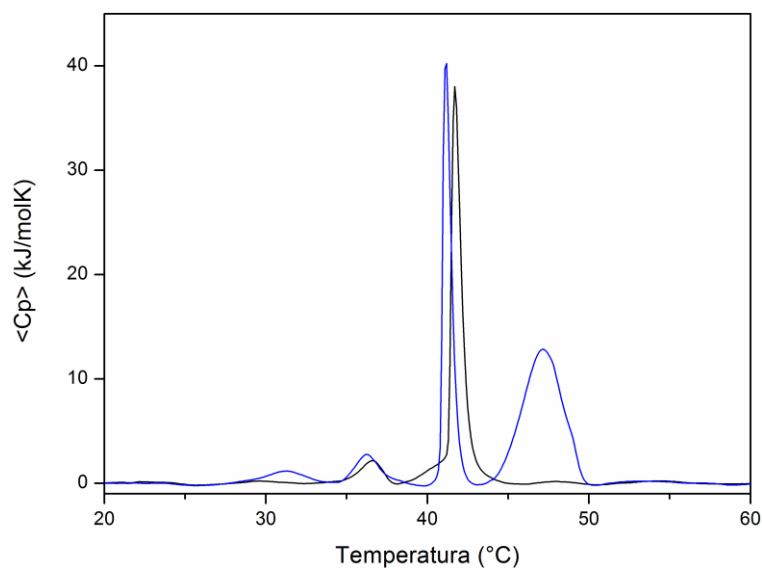


Slika 55: Termogram DSC liposomov DPPC (črna črta) v prisotnosti vodotopnega pripravka CoQ₁₀ – vzorec B, kjer je molarno razmerje DPPC:CoQ₁₀ enako 1:1 pri pH 7,0 (modra črta).
Figure 55: DSC thermogram of DPPC lipid vesicles (black line) in the presence of water soluble CoQ₁₀ formulation – Sample B, with DPPC: CoQ₁₀ molar ratio of 1:1 at pH 7.0 (blue line).



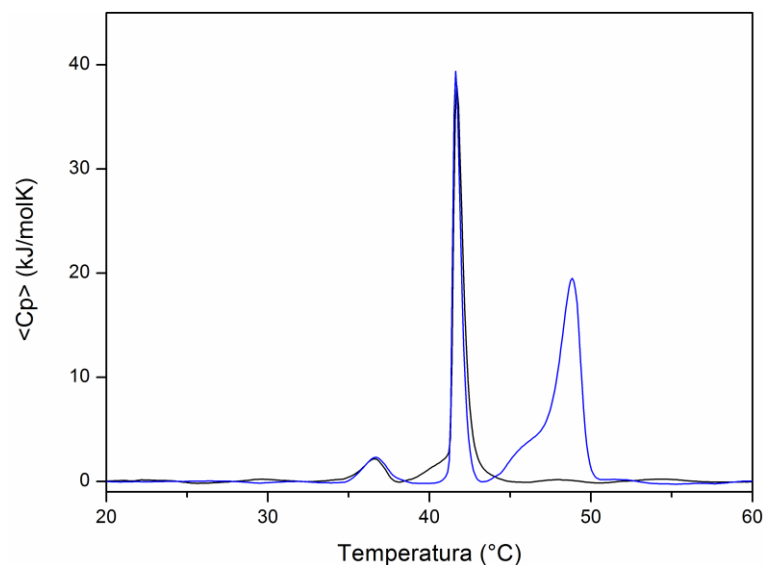
Slika 56: Termogram DSC liposomov DPPC (črna črta) v prisotnosti vodotopnega pripravka CoQ₁₀ – vzorec C, kjer je molarno razmerje DPPC:CoQ₁₀ enako 1:1 pri pH 7,0 (modra črta).

Figure 56: DSC thermogram of DPPC lipid vesicles (black line) in the presence of water soluble CoQ₁₀ formulation – Sample C, with DPPC: CoQ₁₀ molar ratio of 1:1 at pH 7.0 (blue line).



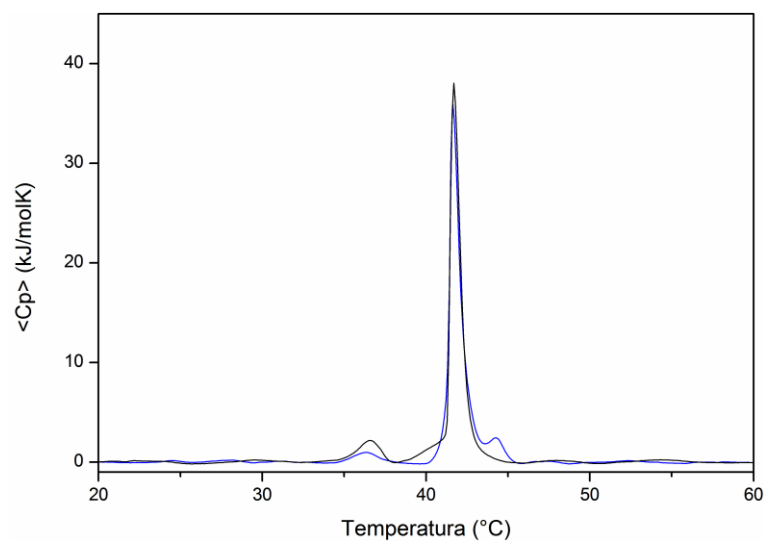
Slika 57: Termogram DSC liposomov DPPC (črna črta) v prisotnosti vodotopnega pripravka CoQ₁₀ – vzorec D, kjer je molarno razmerje DPPC:CoQ₁₀ enako 1:1 pri pH 7,0 (modra črta).

Figure 57: DSC thermogram of DPPC lipid vesicles (black line) in the presence of water soluble CoQ₁₀ formulation - Sample D, with DPPC: CoQ₁₀ molar ratio of 1:1 at pH 7.0 (blue line).



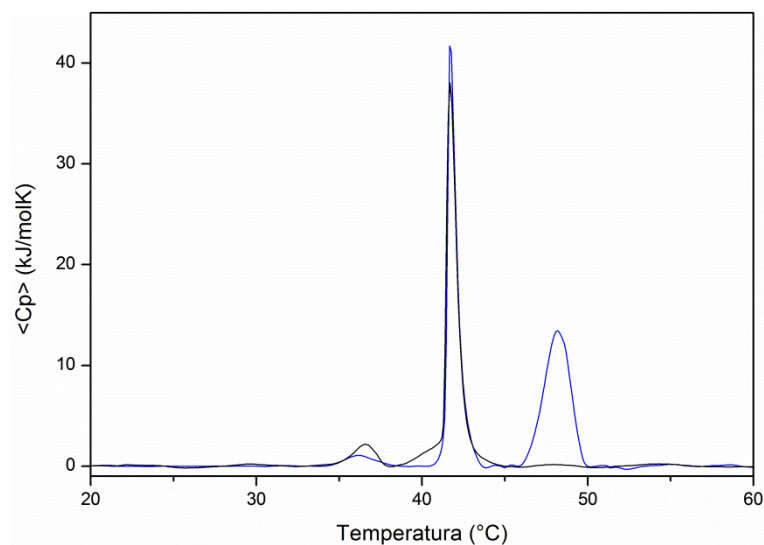
Slika 58: Termogram DSC liposomov DPPC (črna črta) v prisotnosti vodotopnega pripravka CoQ₁₀ – vzorec E, kjer je molarno razmerje DPPC:CoQ₁₀ enako 1:1 pri pH 7,0 (modra črta).

Figure 58: DSC thermogram of DPPC lipid vesicles (black line) in the presence of water soluble CoQ₁₀ formulation - Sample E, with DPPC: CoQ₁₀ molar ratio of 1:1 at pH 7.0 (blue line).



Slika 59: Termogram DSC liposomov DPPC (črna črta) v prisotnosti vodne suspenzije CoQ₁₀ v arheosomih, kjer je molarno razmerje DPPC:CoQ₁₀ enako 1:1 pri pH 7,0 (modra črta).

Figure 59: DSC thermogram of DPPC lipid vesicles (black line) in the presence of water suspension of CoQ₁₀ in archaeosomes, with DPPC: CoQ₁₀ molar ratio of 1:1 at pH 7.0 (blue line).



Slika 60: Termogram DSC liposomov DPPC (črna črta) v prisotnosti vodne suspenzije CoQ₁₀ v polisaharidu pululan, kjer je molarno razmerje DPPC:CoQ₁₀ enako 1:1 pri pH 7,0 (modra črta).

Figure 60: DSC thermogram of DPPC lipid vesicles (black line) in the presence of water suspension of CoQ₁₀ in polysaccharide pullulan, with DPPC: CoQ₁₀ molar ratio of 1:1 at pH 7.0 (blue line).

Preglednica 4: Termodinamski profil faznih prehodov liposomov DPPC v prisotnosti vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ ter pri molarnem razmerju DPPC:CoQ₁₀=1:1 in njihovih nosilcev v koncentracijah, ki ustrezajo njihovi količini v posameznem pripravku. ^aT_m, temperatura faznega predprehoda; ^bT_m, temperature prehoda iz gel v tekoče kristalinično stanje; ^cΔH'_{cal}, entalpija predprehoda; ^dΔH_{cal}, entalpija iz gel v tekoče kristalinično stanje; ^etemperatura in entalpija faznega prehoda, ki ustreza CoQ₁₀.

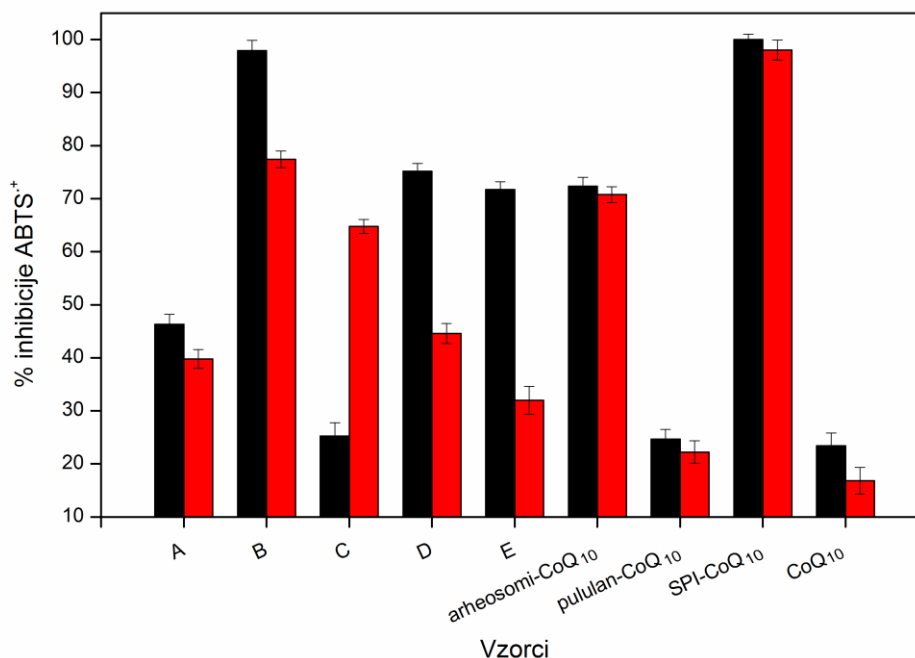
Table 4: Thermodynamic profile of the phase transitions of the DPPC lipid vesicles in the presence of water soluble CoQ₁₀ formulations at DPPC: CoQ₁₀ molar ratio of 1:1 and their carriers in corresponding concentrations as present in specific sample. ^aT_m, temperature of the phase pretransition; ^bT_m, temperature of the gel-to-liquid crystalline phase transition; ^cΔH'_{cal}, enthalpy of the pretransition; ^dΔH_{cal}, enthalpy of the gel-to-liquid crystalline transition; ^etemperature and enthalpy of phase transition corresponding to CoQ₁₀

DPPC	^a T _m (°C)	^c ΔH' _{cal} (kJ/mol)	^b T _m (°C)	^d ΔH _{cal} (kJ/mol)
DPPC	36,7 ± 0,1	3,5 ± 0,5	41,8 ± 0,1	35,5 ± 0,5
DPPC:CoQ ₁₀ 1:1	35,6 ± 0,1	3,0 ± 0,5	41,6 ± 0,1 48,1 ± 0,1	23,3 ± 0,5 38,7 ± 0,5
DPPC:CoQ ₁₀ 2:1	35,1 ± 0,1	2,8 ± 0,5	41,6 ± 0,1 46,9 ± 0,1	27,0 ± 0,5 6,9 ± 0,5
DPPC:CoQ ₁₀ 4:1	35,8 ± 0,1	3,3 ± 0,5	41,3 ± 0,1 47,9 ± 0,1	27,8 ± 0,5 1,5 ± 0,5
DPPC: vzorec A	/	/	41,4 ± 0,1	29,1 ± 0,5
DPPC: vzorec B	36,1 ± 0,1 38,4 ± 0,1	4,8 ± 0,5	41,2 ± 0,1 ^e 48,1 ± 0,1	12,5 ± 0,5 50,6 ± 0,5
DPPC: vzorec C	36,8 ± 0,1	5,0 ± 0,5	41,6 ± 0,1 ^e 49,1 ± 0,1	28,5 ± 0,5 1,6 ± 0,5
DPPC: vzorec D	31,3 ± 0,1 36,3 ± 0,1	3,5 ± 0,5 5,1 ± 0,5	41,2 ± 0,1 ^e 47,2 ± 0,1	26,9 ± 0,5 38,0 ± 0,5
DPPC: vzorec E	36,7 ± 0,1	3,7 ± 0,5	41,6 ± 0,1 ^e 48,8 ± 0,1	25,7 ± 0,5 41,6 ± 0,5
DPPC:arheosomi-CoQ ₁₀	36,3 ± 0,1	1,49 ± 0,5	41,6 ± 0,1	35,2 ± 0,5
DPPC:pululan-CoQ ₁₀	36,3 ± 0,1	2,3 ± 0,5	41,7 ± 0,1 48,2 ± 0,1	30,3 ± 0,5 25,6 ± 0,5
DPPC: glicerol	36,2 ± 0,1	4,2 ± 0,5	41,2 ± 0,1	35,5 ± 0,5
DPPC: dekstrin	36,3 ± 0,1	2,5 ± 0,5	41,7 ± 0,1	34,7 ± 0,5
DPPC: laktoza	36,3 ± 0,1	2,6 ± 0,5	41,7 ± 0,1	34,3 ± 0,5
DPPC: saharoza	36,1 ± 0,1	2,7 ± 0,5	41,7 ± 0,1	34,5 ± 0,5
DPPC: arabski gumi	36,9 ± 0,1	2,1 ± 0,5	42,6 ± 0,1	33,9 ± 0,5
DPPC: β-ciklodekstrin	36,4 ± 0,1	3,8 ± 0,5	41,3 ± 0,1	28,5 ± 0,5
DPPC: natrijev oktenilsukcinat škroba	36,4 ± 0,1	11,7 ± 0,5	41,4 ± 0,1	30,9 ± 0,5
DPPC: predgeliran škrob	36,0 ± 0,1	4,1 ± 0,5	41,7 ± 0,1	32,3 ± 0,5
DPPC: sojin lecitin	36,4 ± 0,1	3,2 ± 0,5	41,6 ± 0,1	32,9 ± 0,5
DPPC: trigliceridi maščobnih kislin	36,4 ± 0,1	3,7 ± 0,5	41,6 ± 0,1	36,2 ± 0,5
DPPC: PGE	36,4 ± 0,1	3,5 ± 0,5	41,9 ± 0,1 49,6 ± 0,1	21,4 ± 0,5 13,5 ± 0,5
DPPC:arheosomi	36,3 ± 0,1	1,4 ± 0,5	41,6 ± 0,1	32,5 ± 0,5
DPPC: pululan	36,3 ± 0,1	1,9 ± 0,5	41,7 ± 0,1	30,3 ± 0,5
DPPC: nosilci iz vzorca A	33,8 ± 0,1	1,8 ± 0,5	40,8 ± 0,1	22,4 ± 0,5

4.5 DOLOČITEV ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI

4.5.1 Določanje antioksidativnega potenciala CoQ₁₀ z radikalom ABTS^{•+}

Da bi določili kako na antioksidativni potencial vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ vpliva topilo smo uporabili indirektno metodo določanja antioksidativnega potenciala z radikalom ABTS^{•+}. Z izjemo vodotopnega pripravka CoQ₁₀, kjer so kot nosilci prisotni natrijev oktenilsukcinat škroba, dekstrin in glicerol – vzorec C, je bila antioksidativna učinkovitost vodotopnih pripravkov večja v primeru, ko smo kot topilo uporabili etanol (slika 61). V etanolu smo največjo antioksidativno učinkovitost določili vzorcema CoQ₁₀ v SPI in vzorcu B, vodotopnemu pripravku CoQ₁₀, kjer so kot nosilci prisotni predgeliran škrob, arabski gumi in laktoza, sledijo CoQ₁₀ v arheosomih in CoQ₁₀ v β-ciklodekstrinu – vzorec D, vzorec E, vzorec A, vzorec C, kjer so kot nosilci prisotni natrijev oktenilsukcinat škroba, dekstrin in glicerol in CoQ₁₀ v pululanu. Ko smo kot topilo uporabili vodo, je bila učinkovitost sledeča: CoQ₁₀ v SPI > vzorec B > CoQ₁₀ v arheosomih > vzorec C > vzorec D > vzorec A > vzorec E > CoQ₁₀ v pululanu.

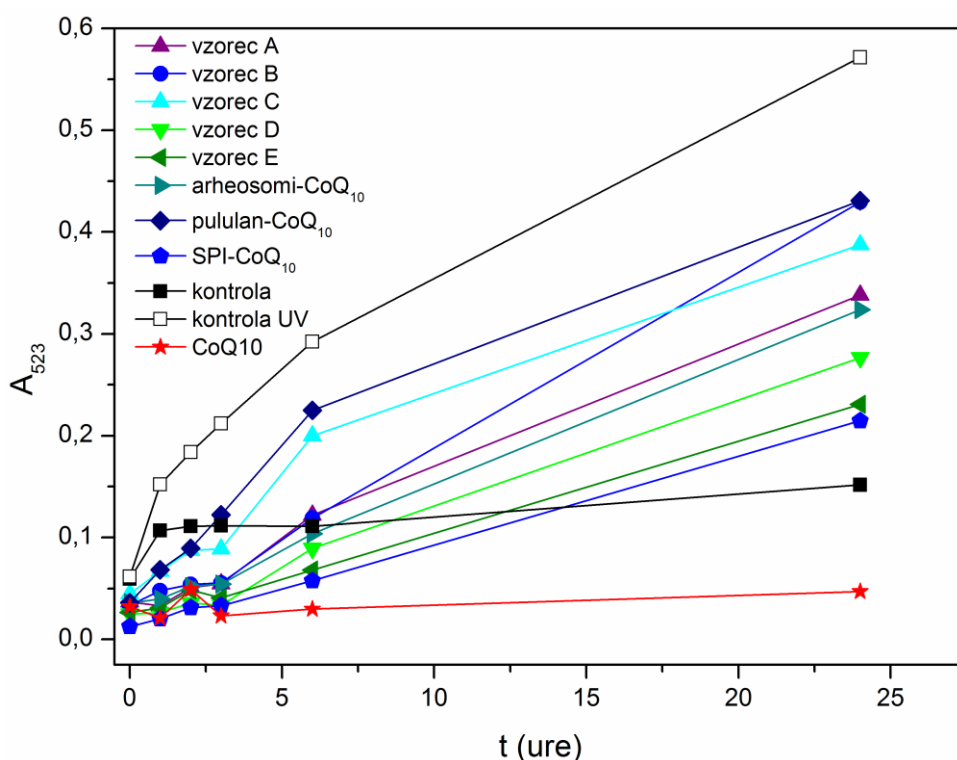


Slika 61: Delež inhibicije radikala ABTS^{•+} v etanolu (črna) in mQ vodi (rdeča). Koncentracija CoQ₁₀ je 5 mg/mL. SPI– izolat sojinih proteinov.

Figure 61: Percent of inhibition of ABTS^{•+} radical in ethanol (black) and mQ water (red). Concentration of CoQ₁₀ was 5 mg/mL. SPI–soy proteins isolate.

4.5.2 Spektrofotometrično določanje oksidacije liposomov pripravljenih iz PC sprožene z UV obsevanjem

Lipidno oksidacijo v prisotnosti vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ smo merili spektrofotometrično s pomočjo tiobarbiturne kisline, t.i. testom TBARS. Vsi vodotopni pripravki CoQ₁₀ so do neke mere zavirali oksidacijo lipidov v suspenziji liposomov pripravljenih iz jajčnega fosfatidilholina. Lipidna oksidacija je bila po 24-ih urah najmanjša v prisotnosti CoQ₁₀ v SPI, sledijo vodotopni pripravek CoQ₁₀, kjer so kot nosilci prisotni natrijev oktenilsukcinat škroba, laktoza, saharoza, dekstrin in glicerol – vzorec E, CoQ₁₀ v β-ciklodekstrinu – vzorec D, CoQ₁₀ v arheosomih, vzorec A – emulzija CoQ₁₀, vodotopni pripravek, kjer so kot nosilci prisotni natrijev oktenilsukcinat škroba, dekstrin in glicerol, ter vzorec B – vodotopni pripravek, kjer so kot nosilci prisotni predgeliran škrob, laktoza in arabskega gumija in CoQ₁₀ v pululanu (slika 62).

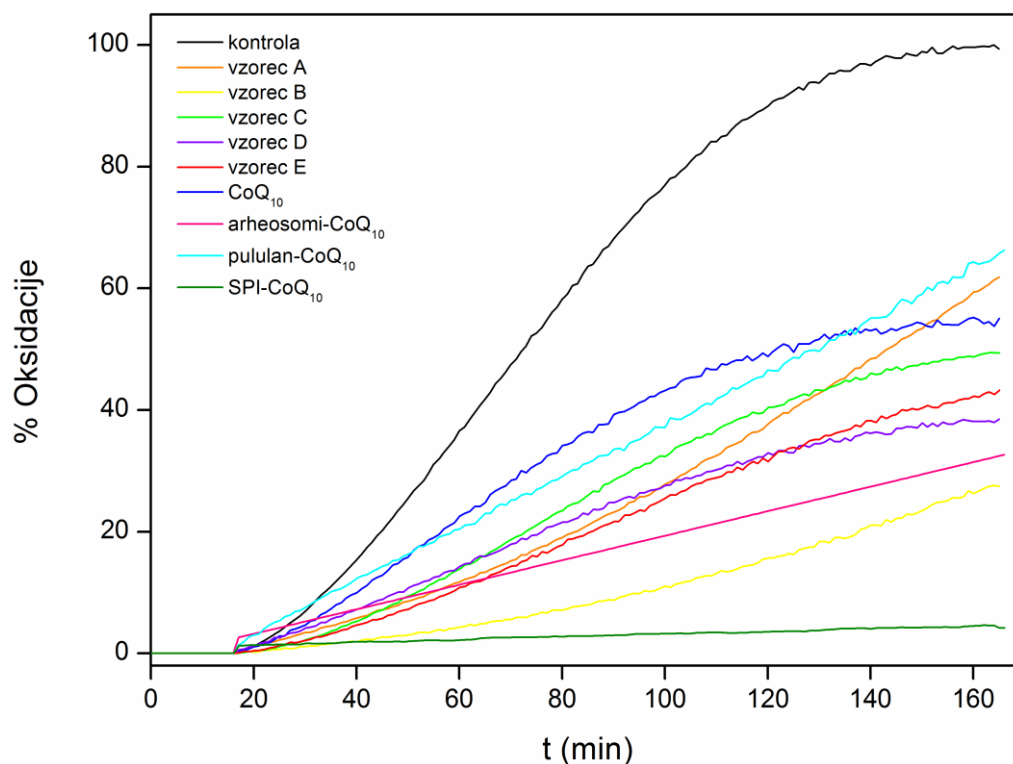


Slika 62: Oksidacija liposomov PC merjena kot funkcija časa obsevanja ($\lambda = 254$ nm), spremljana s TBARS-testom.

Figure 62: Oxidation of PC liposomes measured as a function of irradiation time ($\lambda = 254$ nm) monitored with TBARS-test.

4.5.3 Ocena inhibicije oksidacije z uporabo lipofilnega fluoroforja BODIPY® 581/591 C₁₁

Da bi ocenili, kako so posamezni vodotopni pripravki CoQ₁₀ sposobni zavirati lipidno oksidacijo smo uporabili lipofilno fluorogeno sondo BODIPY® 581/591 C₁₁. Prisotnost samega CoQ₁₀ in prisotnost vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ je zavirala oksidacijo v različni meri (slika 63). V primerjavi s čistim CoQ₁₀ je bila inhibicija oksidacije v prisotnosti večine vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ močnejša. Inhibicija oksidacije je bila največja v prisotnosti CoQ₁₀ v SPI, sledijo vzorec B, kjer so kot nosilci prisotni predgeliran škrob, laktoza in arabski gumi, arheosomi s CoQ₁₀, CoQ₁₀ v arheosomih, vzorca D in E, vzorec C, sam CoQ₁₀ in CoQ₁₀ v pululanu. Prisotnost emulzije CoQ₁₀ je sprva uspešno zavirala oksidacijo lipidov, po 60 minutah pa je le-ta začela naraščati.



Slika 63: Inhibicija oksidacije jajčnega fosfatidilholina inducirne z CuCl₂ v prisotnosti različnih vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ (10 mol%) merjena kot emisija fluorescence BODIPY® 581/591 C₁₁.

Figure 63: Inhibition of oxidation of egg phosphatidylcholine induced by CuCl₂ in the presence of different formulations of water soluble CoQ₁₀ (10 mol%) measured as fluorescence emission from BODIPY® 581/591 C₁₁.

4.6 PRIPRAVA KAPSULATOV

4.6.1 Kapsulacija koencima Q₁₀ v izolat sojinih proteinov

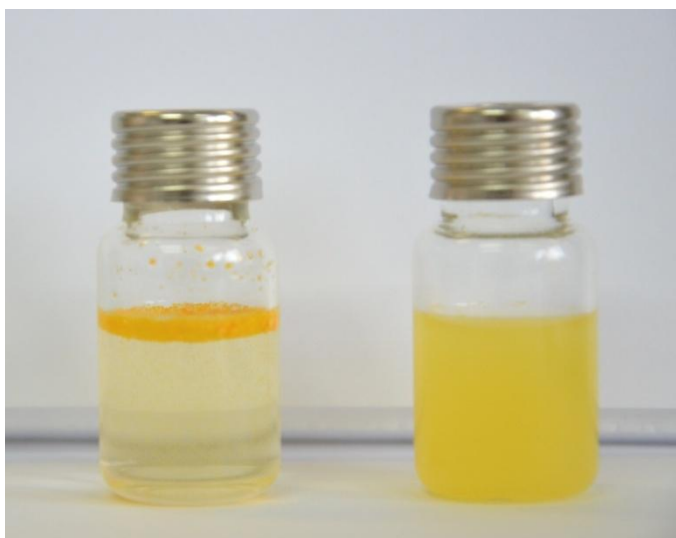
Za kapsulacijo CoQ₁₀ v izolat sojinih proteinov smo uporabili metodo koprecipitacije. Dobljeno suspenzijo agregatov sojinih proteinov s CoQ₁₀ smo posušili z zamrzovanjem pri znižanem tlaku. S pripravo CoQ₁₀ v agregatih izolata sojinih proteinov smo uspeli dobiti CoQ₁₀ v obliki, ki se lepo suspendira v vodni raztopini (slika 64).



Slika 64: Vodna suspenzija CoQ₁₀ v agregatih izolata sojinih proteinov (desno) in CoQ₁₀ v vodi (levo).
Figure 64: Water suspension of CoQ₁₀ in soy protein isolate aggregates (right) and CoQ₁₀ in water (left).

4.6.2 Kapsulacija CoQ₁₀ v pululan

Zaradi svoje termične stabilnosti v širokem območju pH in nepropustnosti za kisik smo skušali CoQ₁₀ povečati termostabilnost in ga zaščititi pred UV sevanjem z zamreženjem v polisaharid pululan. S pripravo CoQ₁₀ v pululanu smo uspeli dobiti CoQ₁₀ v obliki, ki se lepo suspendira v vodni raztopini (slika 65).



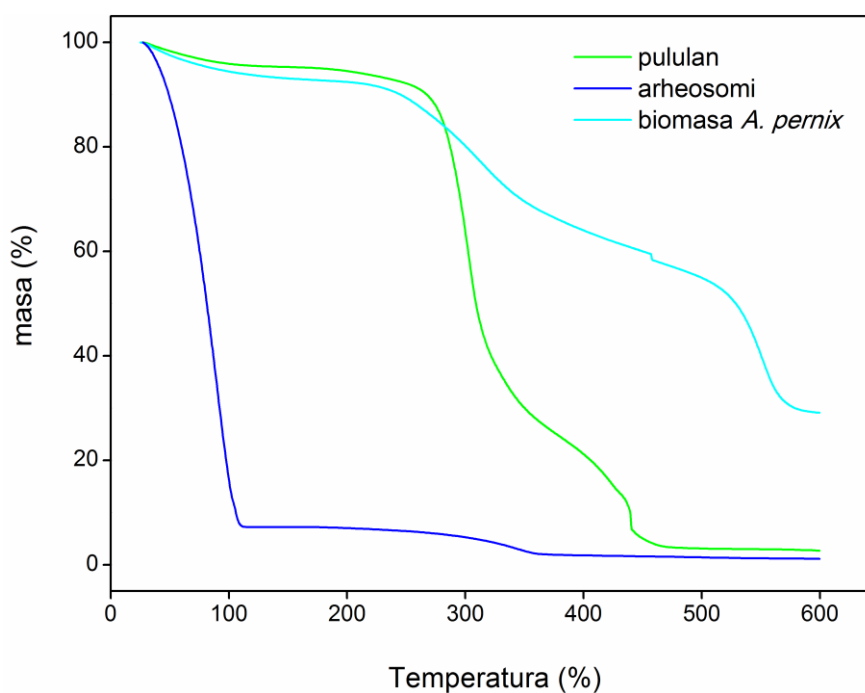
Slika 65: Vodna suspenzija CoQ₁₀ zamreženega v polisaharidu pululanu (desno) in CoQ₁₀ v vodi (levo).
Figure 65: Water suspension of CoQ₁₀ cross-linked in polysaccharide pullulan (right) and CoQ₁₀ in water (left).

4.6.3 Priprava kapsulatov CoQ₁₀ v arheosomih.

CoQ₁₀ smo želeli kapsulirati v arheosome, zato smo predhodno proučili njihove strukturne značilnosti. Proučevali smo vpliv pH gojišča na fluidnost membran arheosomov pripravljenih iz PLMF - polarnih lipidov arheje *Aeropyrum pernix* K1, ki jo gojimo v našem laboratoriju.

4.6.3.1 Analiza temperaturne obstojnosti arheje *A. pernix*, arheosomov in polisaharida pululan

Preverili smo temperaturno obstojnost polisaharida pululan in termostabilnost liofilizirane arhejske biomase ter arheosomov, pripravljenih iz polarne lipidne metanolne frakcije (PLMF) *A. pernix*. Rezultati so pokazali, da je pululan zelo termostabilen do 250 °C. Podobno termostabilnost smo opazili tudi pri biomasi arheje *A. pernix* in pri arheosomih pripravljenih iz PLMF te arheje. Iz slike 66 je razvidno, da so PLMF stabilni do 300 °C. Začetna izguba mase suspenzije arheosomov je posledica izhlapevanja vode, v kateri so bili PLMF pripravljeni.

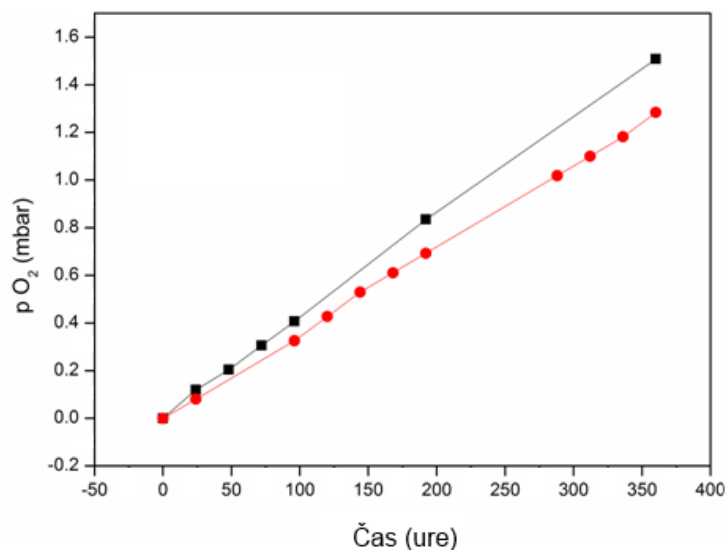


Slika 66: Termična stabilnost pululana, liofiliziranih celic arheje *A. pernix* in arheosomov pripravljenih iz PLMF *A. pernix*.

Figure 66: Thermal stability of pullulan, lyophilized archaea *A. pernix* cells and archaeosomes prepared from PLMF isolated from *A. pernix*.

4.6.4 Analiza prepustnosti pululana za kisik

Pululan, ki smo ga v tanki plasti nanegli na polietilensko (PET) folijo, je zmanjšal prepustnost le-te za kisik pri nadtlaku 1 bar. Po 360-ih urah je bila razlika v prepustnosti same PET folije za kisik v primerjavi PET folije s pululanskim premazom približno 20 % večja (slika 67).

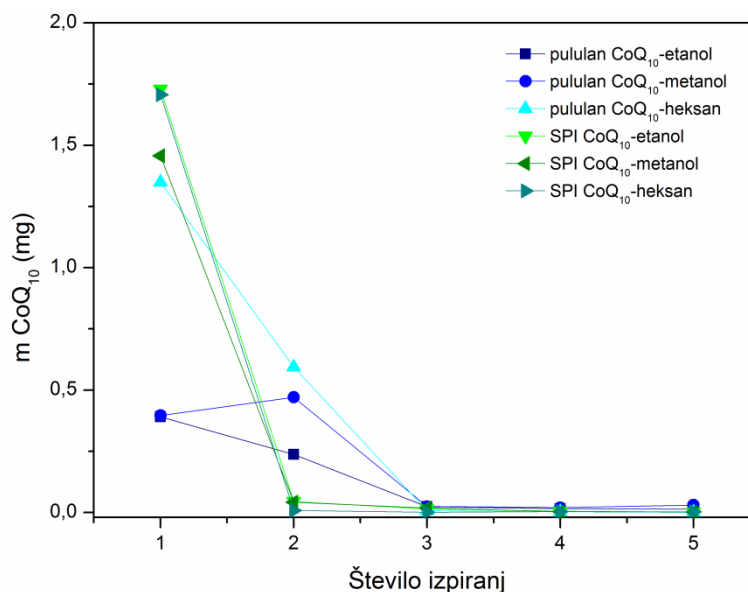


Slika 67: Razlika med prepustnostjo polietilenske folije (PET) za kisik pod tlakom 1 bar brez (●) in s premazom pululana (●).

Figure 67: Difference in oxygen permeability of polyethylene foil (PET) without (●) and with pullulan coating (●) under pressure of 1 bar.

4.6.5 Vpliv topil na pripravljene kapsulate CoQ₁₀

Z namenom pridobiti nekaj informacij o tipu asociacije CoQ₁₀ v posameznih kapsulatih smo pripravljene kapsulate spirali z različnimi topili (Park in sod., 2002). Etanol, metanol in heksan so že po prvem spiranju skoraj popolnoma odstranili CoQ₁₀ iz agregatov SPI. S spiranjem CoQ₁₀ v pululanu z metanolom smo po dveh spiranjih odstranili približno 45 % CoQ₁₀, po spiranju z etanolom pa približno 30 % CoQ₁₀. Po prvem spiranju s heksanom je bil tudi v tem pripravku CoQ₁₀ skoraj popolnoma odstranjen (slika 68). CoQ₁₀ je bil v celoti spran iz arheosomov že po prvem spiranju ne glede na uporabljeno topilo.

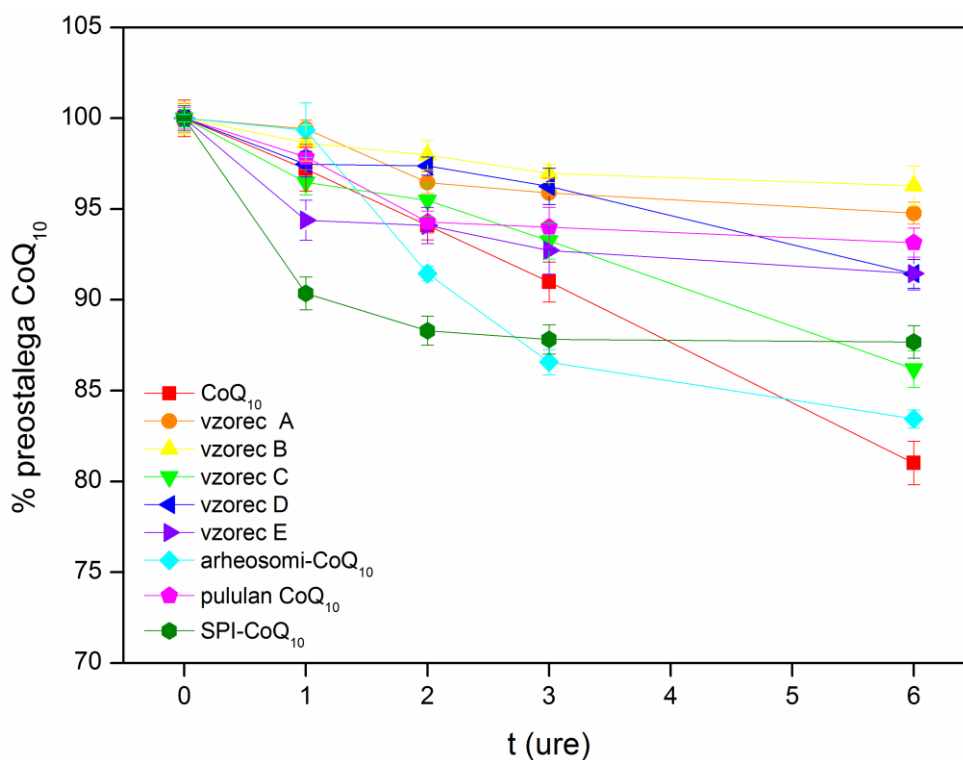


Slika 68: Masa spranega CoQ₁₀ iz pripravljenih kapsulatov CoQ₁₀ v pululanu in izolatu sojinih proteinov (SPI) z naslednjimi topili: etanol, metanol in heksan. Začetna masa CoQ₁₀ v vzorcih: je bila 2 mg.

Figure 68: Mass of CoQ₁₀ () extracted from CoQ₁₀ encapsulated in pullulan and soy protein isolate (SPI) with the following solvents: ethanol, methanol and hexane. Mass of CoQ₁₀ at the beginning was 2 mg.

4.6.6 UV - stabilnost vodnih suspenzij CoQ₁₀ in vodotopnih pripravkov CoQ₁₀

Z namenom proučiti, kako kapsulacija vpliva na UV stabilnost CoQ₁₀, smo spremljali zmanjševanje koncentracije CoQ₁₀ v vodnih suspenzijah vodotopnih pripravkov CoQ₁₀, ki smo jih obsevali z UV svetlobo valovne dolžine 254 nm (slika 69). Delež preostalega CoQ₁₀ večine vodotopnih pripravkov je bil po treh urah UV obsevanja večji kot njegov delež v suspenziji čistega CoQ₁₀. Po šestih urah UV sevanja so vsi kapsulati kazali večjo fotostabilnost kot sam CoQ₁₀.

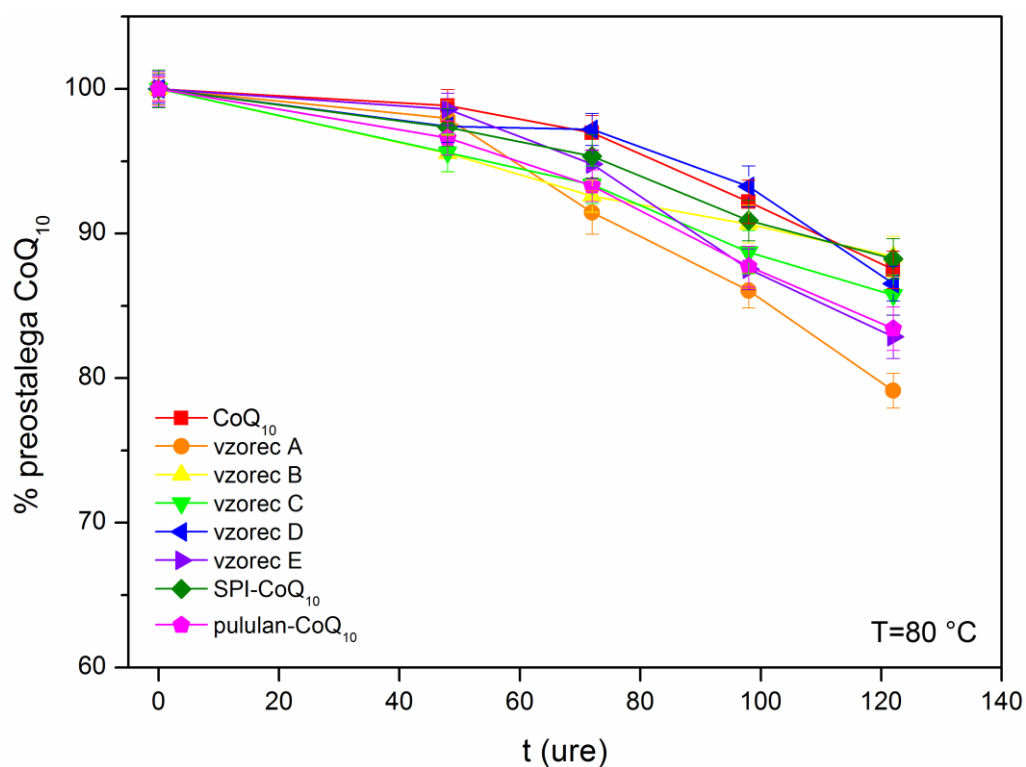


Slika 69: Učinek UV sevanja ($\lambda = 254$ nm) na fotostabilnost vodnih suspenzij posameznih vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ ($c_{\text{CoQ}_{10}} = 2$ mg/mL). SPI-izolat sojinih proteinov.

Figure 69: Effect of UV irradiation ($\lambda = 254$ nm) on the photostability of water suspensions of different water soluble CoQ₁₀ formulations ($c_{\text{CoQ}_{10}} = 2$ mg/mL). SPI – soy protein isolate.

4.6.6.1 Termostabilnost CoQ₁₀ in vodotopnih pripravkov CoQ₁₀

Pri proučevanju termostabilnosti vzorcev vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ smo jih segrevali na 80 °C in spremljali učinek toplote na razgradnjo CoQ₁₀. Rezultati so prikazani na sliki 70. Segrevanje CoQ₁₀ pri 80 °C ne povzroči večjega zmanjšanja koncentracije CoQ₁₀. Zmanjšanje koncentracije je nekoliko večje v primeru vzorca A, vzorca E in pa kapsulata CoQ₁₀ v pululanu. Veliko večje zmanjšanje koncentracije CoQ₁₀ smo opazili pri kapsulatu CoQ₁₀ v arheosome, kjer je eksperiment potekal v vodni suspenziji.



Slika 70: Termostabilnost CoQ₁₀ v posameznih vodotopnih pripravkih CoQ₁₀ ($m_{\text{CoQ}_{10}} = 2$ mg). SPI-izolat sojinih proteinov. Temperatura je bila 80 °C.

Figure 70: Thermostability of different water soluble CoQ₁₀ formulations ($m_{\text{CoQ}_{10}} = 2$ mg). SPI-soy protein isolate. Temperature was 80 °C.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Koencim Q₁₀ (CoQ₁₀), znan tudi kot ubikinon ali ubidekarenon, je hidrofobna, vitaminu podobna snov, ki jo najdemo v celicah mnogih organizmov. CoQ₁₀ je poznan tudi kot zelo učinkovit antioksidant, saj organizem ščiti pred oksidacijo lipidov, DNA in proteinov (Frei in sod., 2005; Yamamoto, 2005). Zaradi deset izoprenoidnih enot dolge stranske verige, je CoQ₁₀ slabo topen v vodi, kar ima za posledico nepopolno in slabo absorpcijo iz prebavil in posledično slabšo biorazpoložljivost (Greenberg in Frishman, 1990). Težave z nizko topnostjo in biorazpoložljivostjo so rešili z vgradnjo CoQ₁₀ v različne nosilne sisteme. S tem so olajšali tudi dodajanje CoQ₁₀ različnim, zlasti prehrabnim, farmacevtskim in kozmetičnim izdelkom (Prošek in sod., 2005). Ker vpliv teh nosilnih sistemov na interakcijo CoQ₁₀ z membrano še ni poznan, smo se odločili proučiti vpliv nekaterih komercialno dostopnih pripravkov vodotopnih oblik CoQ₁₀ in njihovih nosilcev na modelne membrane.

Prehod učinkovin in nosilnih sistemov preko celične membrane je zapleten biološki proces, zato se za študij teh interakcij poslužujemo modelnih lipidnih membran. Pri našem eksperimentalnem delu smo uporabili liposome različnih velikosti (MLV in SUV) pripravljene iz DPPC in mešanice PC, SM v razmerju 2,4:1. Uporabljena mešanica fosfatidilholina in sfingomielina simulira sestavo celične membrane človeških eritrocitov in trombocitov (Živec in Zihel, 2006).

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Merjenje fluorescenčne anizotropije DPH in TMA-DPH v modelnih membranah ob dodatku različnih pripravkov CoQ₁₀

Fluorescenčne sonde se pogosto uporabljajo za študij strukture in dinamike bioloških membran (Lakowicz, 2006). Na njihove foto-fizikalne lastnosti vplivajo spremembe v mikrookolju, kjer se sonda nahaja. Dve pogosti sondi, ki se uporabljata za študij lastnosti membran sta DPH in njegov kationski derivat TMA-DPH. Hidrofilna sonda DPH se vgradi v notranji, nepolarni del membrane, TMA-DPH pa ostane zasidrana na vodno-lipidni meji, z ogljikovodikovo verigo v lipidnem delu membrane (Kuhry in sod., 1983). Spremembe v fluorescenčni anizotropiji DPH in TMA-DPH ob dodatku CoQ₁₀ in različnih vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ smo merili, da bi dobili vpogled v ureditev lipidnega dvosloja DPPC in

mešanice PC in SM (2,4:1) v njihovi prisotnosti. Xu in London (2000) sta pokazala, da so vrednosti fluorescenčne anizotropije in posledično ureditvenega parametra najvišje v gel stanju, najnižje v tekočem urejenem stanju, srednje pa v tekočem urejenem stanju. Anizotropija DPH in TMA-DPH je odvisna od stopnje pakiranja membranskih verig in jo lahko povežemo z ureditvenim parametrom S. Fluidnost lahko definiramo kot recipročno vrednost ureditvenega parametra lipidov.

Fluidnost membrane liposomov SUV pripravljenih iz DPPC ali mešanice PC-SM smo določali z merjenjem anizotropije fluoroforjev DPH in TMA-DPH v prisotnosti CoQ₁₀, vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ oz nosilcev, ki so prisotni v teh pripravkih. Iz dobljenih podatkov smo izračunali ureditveni parameter.

Pri suspenziji DPPC liposomov titrirani z etanolno raztopino CoQ₁₀ smo v zgornjem delu membrane, v bližini polarnih glav lipidov (detekcija s TMA-DPH), opazili rahlo zmanjšanje fluorescenčne anizotropije pri 25 °C. Večjih sprememb v ureditvenem parametru acilnih verig DPPC liposomov pri 25 °C nismo opazili (slika 13), najverjetneje, ker je pri tej temperaturi membrana v gel fazi in molekule CoQ₁₀ niso mogle prodreti v notranjost lipidnega dvosloja. Pri 45 °C, kjer je membrana liposomov v tekočem kristaliničnem stanju je membrana postala bolj rigidna, kar kaže na vstop CoQ₁₀ v membrano. Ti podatki se skladajo z ugotovitvami Jemiola-Rzeminska in sodelavcev (1996), ki so ugotovili, da CoQ₁₀ pri nižjih temperaturah ne povzroči velikih sprememb v strukturi membrane. Pri večjih koncentracijah je CoQ₁₀ najverjetneje lociran med lipidnima slojema, pod regijo, kamor se vgradi DPH. Nad temperaturo faznega prehoda CoQ₁₀ prodre v membrano in uredi acilne verige membranskih lipidov (Jemiola-Rzeminska in sod., 1996). Molekulo CoQ₁₀ sestavlja 4,79 nm dolga lipofilna veriga in bolj polarna glava, kjer so kisikovi atomi in nekoliko večja gostota elektronov (priloga E). Lipofilna veriga se najverjetneje umesti na sredino, kjer je membrana manj urejena, polarna glava pa je obrnjena proti vodni fazi, kar so s študijami fluorescenčne spektroskopije in linearnega dihiroizma pokazali že (Fato in sod., 1986; Samori in sod., 1992).

Dodatek emulzije CoQ₁₀ – vodotopnega pripravka, kjer so kot nosilci prisotni glicerol, PGE in trigliceridi maščobnih kislin je povzročil urejanje acilnih verig DPPC medtem, ko

so nosilci povzročili zmanjšanje ureditve, kar pomeni, da se je fluidnosti membrane povečala. Ob dodatku vodotopnega pripravka CoQ₁₀, kjer so kot nosilci uporabljeni predgeliran škrob, arabski gumi in laktoza (vzorec B) in vzorca D (CoQ₁₀ v β-ciklodekstrinu) smo z uporabo fluoroforja DPH opazili manjše povečanje fluidnosti pri 25 °C. Nad temperaturo faznega prehoda DPPC (pri 45 °C) smo ob dodatku komercialno dostopnih vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ opazili urejanje acilnih verig CoQ₁₀. Urejanje je bilo največje ob prisotnosti CoQ₁₀ kapsuliranega v mešanico predgeliranega škroba, arabskega gumija in laktoze (vzorec B). Sledili so: vzorec C, kjer so kot nosilci prisotni natrijev oktenilsukcinat škroba, dekstrin in glicerol; vzorec D s CoQ₁₀ v β-ciklodekstrinu, emulzija CoQ₁₀ – vzorec A in vzorec E, kjer so kot nosilci prisotni natrijev oktenilsukcinat škroba, saharoza, laktoza, dekstrin in glicerol. Iz rezultatov lahko sklepamo, da v teh primerih mešanice nosilcev prisotne v teh pripravkih olajšajo, oz. pospešijo prodiranje CoQ₁₀ v DPPC lipidni dvosloj.

Titracija suspenzije liposomov PC-SM (2,4:1) z etanolno raztopino CoQ₁₀ pri 25 °C in pri 45 °C je pokazala naraščanje ureditvenega parametra z naraščanjem molarne razmerja nCoQ₁₀/nPC-SM. Podoben učinek smo opazili tudi na vodno-lipidni meji membrane, le da je bil tu učinek posebej pri 25 °C občutno manjši. Rezultati kažejo, da CoQ₁₀ prodre v membrano liposomov PC-SM in povzroči zmanjšanje fluidnosti. Povečanje ureditve acilnih verig PC-SM liposomov smo pri 25 °C in pri 45 °C opazili tudi ob dodatku večine proučevanih vzorcev CoQ₁₀ dostopnih na trgu. Izjema sta bila vzorca E –pripravek CoQ₁₀, kjer so kot nosilci prisotni natrijev oktenilsukcinat škroba, laktoza, saharoza, dekstrin in glicerol, ki ni povzročal sprememb v ureditvi acilnih verig (ne glede na temperaturo meritve), ter β-ciklodekstrinski kompleks (vzorec D) kjer je bila, pri 25°C, ureditev minimalna. V primeru β-ciklodekstrinskega kompleksa gre verjetno za premik dela CoQ₁₀ iz kompleksa β-ciklodekstrina in njegov prehod v lipidni dvosloj. Stopnja prehoda je najverjetneje odvisna od konstante stabilnosti kompleksa, kot so to na primeru kompleksov β-ciklodekstrina z dehidroepiandrosterolom, retinolom in retinojsko kislino pokazali McCormac in Gregoriadis (1994). Posamezni nosilci niso povzročali večjih sprememb v ureditvi membrane liposomov. Tudi tu so kot izjema izstopali nosilci vzorca A – emulzije CoQ₁₀ z glicerolom, sojinim lecitinom, PGE in trigliceridi maščobnih kislin. Ti so pri 25 °C povzročili povečanje fluidnosti membrane, ki smo jo zaznali kot zmanjšanje

anizotropije DPH. Primerjava posameznih nosilcev je pokazala, da je za ta efekt v največji meri odgovorna prisotnost sojinega lecitina (Slika 17). Večje spremembe ureditve membrane na vodno-lipidni meji smo opazili ob dodatku vzorca B – vodotopni pripravek CoQ₁₀, kjer so kot nosilci prisotni predgeliran škrob, laktoza in arabski gumi, kjer je prišlo do občutnega zmanjšanja ureditve te membranske regije. Dodatek vzorca C, vodotopnega pripravka CoQ₁₀, kjer so kot nosilci prisotni natrijev oktenilsukcinat škroba, dekstrin in glicerol, je povzročil večjo ureditev lipidne membrane na področju polarnih lipidnih glav. V primeru β-ciklodekstrinskega kompleksa CoQ₁₀ je do ureditve acilnih verig, kot posledice vstopa CoQ₁₀ v membrano prišlo le pri 45 °C. Emulzija CoQ₁₀ in vzorec E nista povzročala sprememb na vodno lipidni meji membrane.

Iz dobljenih rezultatov meritev fluorescenčne anizotropije lahko sklepamo, da tudi v primeru liposomov PC-SM, nosilci prisotni v proučevanih komercialno dostopnih vzorcih CoQ₁₀ omogočijo prehod CoQ₁₀ v membrano liposomov in da nosilci sami po sebi ne povzročajo večjih sprememb v urejenosti membrane. Izjema so bili, v primeru liposomov DPPC, kot tudi liposomov PC-SM nosilci prisotni v emulziji CoQ₁₀. Rezultati nakazujejo, da je v obeh primerih za ta učinek v največji meri odgovorna prisotnost sojinega lecitina. Mehanizma te spremembe ne poznamo, lahko pa bi bil posledica vgrajevanja sojinega lecitina v liposome, zaradi česar bi membrana postala bolj fluidna.

5.1.2 Priprava kapsulatov

Z namenom priprave novih oblik CoQ₁₀ smo le-tega poskušali vgraditi v eksopolisaharid pululan, z metodo sušenja z zamrzovanjem. Z metodo, ki so jo opisali Teng in sodelavci (2012), za pripravo nanodelcev izolata sojinih proteinov s kurkuminom, smo pripravili kapsulate CoQ₁₀ v izolatu sojinih proteinov. Pripravili smo tudi kapsulat CoQ₁₀ v arheosomih.

Tako pripravljene kompleksi so v vodi zlahka dispergirali, kar kaže na izboljšane topnostne lastnosti teh pripravkov CoQ₁₀ (slika 64 in slika 65). Za izboljšanje UV stabilnosti in termostabilnosti CoQ₁₀ smo CoQ₁₀ kapsulirali v arheosome, ki so zelo stabilni v širokem pH območju in v območju med 0 °C in 100 °C ne kažejo prehoda iz gel v tekoče kristalinično stanje (Gmajner in sod., 2011). Ker so predhodne študije *A. pernix in vivo* pokazale, da pH gojišča vpliva na domensko strukturo membrane arheje *A. pernix* (Poklar

Ulrich in sod., 2007), smo želeli proučiti tudi vpliv pH gojišča na strukturne lastnosti in fluidnost membrane.

Rezultati meritev fluorescenčne anizotropije DPH in TMA-DPH in EPR spektrometrije so pokazale, da se ureditveni parameter PLMF zmanjšuje s temperaturo, kar kaže na postopno zmanjševanje fluidnosti membrane. Večjih razlik, ki bi bile posledica različnih pH gojišč, nismo opazili. TMA-DPH, lociran na vodno-lipidni meji kaže manjše temperaturno inducirane spremembe kot DPH oz. MeFASL(10,3). Računalniška simulacija EPR spektrov je pokazala heterogenost membrane pod 55 °C. Ta heterogenost pri višjih temperaturah izgine. Rezultate potrjuje tudi TLC analiza izoliranih lipidov, ki ni pokazala razlik med sestavo PLMF A. *pernix* gojene pri različnih pH (Ota in sod., 2012).

Dodatek suspenzije vzorca CoQ₁₀ v SPI je povzročil rahlo povečanje fluidnosti acilnih verig DPPC liposomov pri 25 °C, pri 45 °C pa se je ob dodatku tega kapsulata fluidnost alkilnih verig zmanjšala. Nad temperaturo faznega prehoda DPPC je prišlo do zmanjšanja fluidnosti acilnih verig tudi ob dodatku same suspenzije SPI. Efekt je bil v tem primeru še večji. Podoben učinek smo opazili tudi v primeru liposomov PC-SM. Na vodno lipidni meji je tako v primeru liposomov DPPC, kot tudi v primeru liposomov PC-SM dodatek CoQ₁₀ v SPI povzročil zmanjšanje urejenosti te membranske regije. Dodatek SPI je imel, razen v primeru liposomov DPPC pri 25 °C obraten efekt. Prišlo je do rahlega povečanja urejenosti. Iz rezultatov lahko sklepamo, da ima v tem primeru že nosilec (SPI) močan vpliv na urejenost membrane liposomov, kar je najverjetneje posledica interakcije prostih funkcionalnih skupin samih SPI s površino membrane liposomov.

Dodatek suspenzije arheosomov s CoQ₁₀ je vodil v povečanje fluidnosti membrane, ki pa ga v tem primeru lahko pripišemo prisotnosti arhealnih lipidov, katerih membrana je pri 25 °C in pri 45 °C bolj urejena, kot membrana liposomov DPPC in PC-SM. Sami arheosomi zaradi svojih fizikalno kemijskih lastnosti, stabilnosti v širokem temperaturnem in pH območju (Gmajner in sod., 2011) ne omogočajo prehajanja CoQ₁₀ v membrano liposomov. Dodatka suspenzije kapsulata CoQ₁₀ v pululanu in raztopine pululana nista povzročila večjih sprememb fluidnosti membran liposomov DPPC in PC-SM. Ker je v tem primeru zaradi načina priprave CoQ₁₀ v kristalinični obliki, ki je zamrežena v polisaharidu pululan, je prehod v lipidni dvosloj otežen.

Termogravimetrična analiza temperaturne obstojnosti arhej *A. pernix*, arheosomov in polisaharida pululan je pokazala, da so polarni lipidi arheje *A. pernix* izjemno temperaturno odporni. Do razgradnje je prišlo šele pri 300 °C. Polisaharid pululan je temperaturno stabilen do 250 °C (Singhin sod., 2008). Pululan predstavlja tudi dobro kisikovo pregrado in je s tega vidika zanimiv za kapsulacijo snovi, ki so občutljive na razpad v prisotnosti kisika.

Iz rezultatov študije vpliva topil na pripravljene kapsulate lahko sklepamo, da je v primeru CoQ₁₀ v SPI le-ta molekularno razporejen po nosilcu (adsorbiran na agregate SPI) in ga kot takega tudi zlahka speremo z izbranimi topili. V primeru CoQ₁₀ v pululanu je vezava oz. zamreženje CoQ₁₀ močnejše, saj ga po dveh spiranjih v kompleksu s pululanom ostane še več kot 50 %.

5.1.3 Spremljanje EPR spektrov liposomov PC-SM ob prisotnosti različnih pripravkov CoQ₁₀ kot funkcija temperature

Z elektronsko paramagnetno resonanco, ki omogoča zaznavo in preučevanje domenske strukture lipidnih membran smo z uporabo dveh različnih spinskih označevalcev, MeFASL(10,3) in MeFASL(2,11), z različno lokacijo doksilne skupine na alkilni verigi, pridobili informacije o obnašanju molekul na vodno-lipidni meji in v notranjosti dvosloja. Eksperimentalne EPR spektre smo z računalniško simulacijo natančneje analizirali. Uporaba dveh različnih spinskih označevalcev z različno lokacijo doksilne skupine na alkilni verigi smo pridobili informacije o obnašanju molekul na vodno-lipidni meji in v notranjosti dvosloja. Različno okolje spinskega označevalca se kaže v razlikah v obliki spektra in vrednostih izračunanih parametrov

Rezultati meritev elektronske paramagnetne resonance so, tako kot rezultati meritev fluorescenčne anizotropije, pokazali, da čisti CoQ₁₀ in njegovi vodotopni pripravki vplivajo na notranjost membrane pripravljene iz mešanice PC in SM (2,4:1), kar smo detektirali s spinskim označevalcem MeFASL(2,11). Metodi podajata primerljive rezultate. V prisotnosti CoQ₁₀ opazimo rahlo povečanje empiričnega korelacijskega časa MeFASL(10,3) v temperaturnem območju med 15 °C in 35 °C (slika 49B). Ta učinek je bil bolj izražen v notranjosti membrane liposomov PC-SM, detektiran z MeFASL(2,11), kar kaže, da CoQ₁₀ zmanjša dinamiko acilnih verig lipidov, oz. zmanjša fluidnost membrane

(slika 49A). Podoben učinek smo opazili tudi ob prisotnosti večine vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ (molarno razmerje lipidi:CoQ₁₀ je bilo 2:1). V prisotnosti emulzije CoQ₁₀, vodotopnega pripravka, kjer so kot nosilci prisotni glicerol, sojin lecitin, PGE in triglicerid maščobnih kislin v celotnem temperaturnem območju meritve nismo zaznali večjih sprememb empiričnega korelacijskega časa MeFASL(2,11). Ostali vodotopni pripravki CoQ₁₀ so povzročili zmanjšanje fluidnosti notranjega dela membrane.

Večje povečanje ureditve membrane na vodno-lipidni meji smo opazili v prisotnosti vodotopnega pripravka CoQ₁₀, kjer so kot nosilci prisotni natrijev oktenilsukcinat škroba, dekstrin in glicerol (vzorec C). Učinek drugih vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ je bil majhen, z izjemo emulzije CoQ₁₀ (vzorec A), kjer smo pri temperaturah 35 °C in 45 °C zaznali zmanjšanje empiričnega korelacijskega časa, ki kaže na povečanje fluidnosti membrane na vodno lipidni meji.

5.1.3.1 Računalniška simulacija eksperimentalnih EPR spektrov

Več informacij o heterogenosti membrane smo dobili z računalniško simulacijo EPR spektrov s programom EPRSIM C. Ugotovili smo da je membrana liposomov PC-SM v molarnem razmerju 2,4:1 sestavljena iz dveh domen z različnimi lastnostmi: bolj urejene in manj urejene domene, ki se pri višjih temperaturah združita. Povečan empirični korelacijski čas v prisotnosti vzorca C ustreza povečanju ureditvenega parametra (iz 0,36 na 0,41) in povečanju deleža bolj urejene domene pri 25 °C (iz 0,47 na 0,62). Z naraščanjem temperature se ureditveni parameter bolj urejene domene in njen delež manjšata. Pri 45 °C je povečanje ureditvenega parametra v primerjavi s kontrolo minimalno (iz 0,19 na 0,21) (priloga C). V notranjosti membrane se razlike v empiričnem korelacijskem času, ob prisotnosti vodotopnih pripravkov CoQ₁₀, odražajo kot povečanje rotacijskega korelacijskega časa manj urejene domene (priloga D). Razlika je bila največja v prisotnosti vodotopnega pripravka CoQ₁₀, kjer so kot nosilci prisotni natrijev oktenilsukcinat škroba, dekstrin in glicerol (vzorec C), sledijo: CoQ₁₀ z β-ciklodekstrinom (vzorec D); pripravek CoQ₁₀, kjer so kot nosilci prisotni predgeliran škrob, arabski gumi in laktoza (vzorec B); vzorec E, kjer so kot nosilci prisotni natrijev oktenilsukcinat škroba, laktoza, saharoza, glicerol in dekstrin (vzorec E), ter emulzija CoQ₁₀ (vzorec A). Dodatek vseh vodotopnih pripravkov CoQ₁₀, kot tudi samega CoQ₁₀, je povzročil tudi zmanjšanje

korekcijskega faktorja polarnosti, kar kaže, da njihova prisotnost onemogoča vstop vode v membrano.

Rezultati meritev fluorescenčne anizotropije DPH oz. TMA-DPH in rezultati EPR meritev so nam dali podobne rezultate. Večja odstopanja smo opazili predvsem pri meritvah sprememb na vodno-lipidni meji membran, kar pa je najverjetneje odraz razlik v obliki in dimenziji sond, ki smo jih uporabili pri obeh metodah. TMA-DPH je zasidran na vodno-lipidni meji membrane, medtem ko MeFASL(10,3), z nitroksidno skupino na petem C atomu (šteto od metil estrske skupine), zaznava spremembe v zgornjem delu fosfolipidnega sloja.

5.1.4 Vpliv CoQ₁₀ in vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ na fazne prehode multilamelarnih liposomov iz DPPC

Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC) je fizikalna tehnika, s katero lahko določimo termodinamske parametre povezane s toplotno induciranimi faznimi prehodi. Do faznega prehoda pride, ko se alkilne verige lipidnih molekul iz relativno rigidne, iztegnjene, v glavnem trans konformacije v gel stanju, pretvorijo v orientacijsko bolj neurejeno stanje, za katerega je značilna povečana stopnja intra- in intermolekularnega gibanja (McElhaney, 1986). Oster fazni prehod lahko določimo samo v čistih lipidnih sistemih z nasičenimi maščobnimi kislinami. Pri naših meritvah smo uporabili liposome MLV, pripravljene iz DPPC.

Vezikli pripravljene iz DPPC imajo glavni fazni prehod pri temperaturi $41,8 \pm 0,1^\circ\text{C}$ in manjši fazni predprehod pri temperaturi $36,7 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Entalpija faznega predprehoda (ΔH_{cal}) znaša $3,5 \pm 0,8$ kJ/mol, entalpija glavnega faznega prehoda (ΔH_{cal}) pa $35,5 \pm 0,5$ kJ/mol. Naše izmerjene temperature faznega predprehoda in faznega prehoda se ujemajo s podatki v literaturi (Chan, 2007).

Iz termogramov DSC liposomov pripravljenih iz DPPC v prisotnosti čistega CoQ₁₀(1:1, mol:mol) nismo zaznali sprememb v termičnih lastnostih DPPC. Dodatek CoQ₁₀ pred formacijo liposomov povzroči manjše zmanjšanje entalpije glavnega faznega prehoda ($23,3 \pm 0,5$ kJ/mol) in dodatni vrh pri $48,1 \pm 0,1^\circ\text{C}$, ki ustreza CoQ₁₀ agregatom v lipidnem dvosloju. Kot so že poročali Katsikas in Quinn (1981) CoQ₁₀ ne vpliva na

termične lastnosti DPPC. Delež CoQ₁₀ v agregiranem stanju je proporcionalen njegovi koncentraciji v DPPC liposomih, kot so poročali že Jemiola-Rzeminska in sodelavci (1996).

Iz termogramov liposomov DPPC in izbranih vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ v molarnem razmerju DPPC:CoQ₁₀ = 1:1 lahko razberemo, da je do pojava novega vrha, ki ustreza agregatom CoQ₁₀ v membrani liposomov, prišlo v prisotnosti večine vodotopnih pripravkov CoQ₁₀, z izjemo CoQ₁₀ emulzije (vzorec A). Količina CoQ₁₀, ki je prodrl v membrano DPPC liposomov je bila največja v prisotnosti pripravka CoQ₁₀, kjer so kot nosilci prisotni predgeliran škrob, arabski gumi in laktoza (vzorec B), sledijo vzorec E – CoQ₁₀, kjer so kot nosilci prisotni natrijev oktenilsukcinat škroba, laktoza, saharoza, dekstrin in glicerol, β-ciklodekstrinski pripravek (vzorec D) in pripravek CoQ₁₀, kjer so kot nosilci prisotni natrijev oktenilsukcinat škroba, dekstrin in glicerol. Do vgrajevanja CoQ₁₀ v membrano DPPC liposomov je prišlo tudi v prisotnosti kapsulata CoQ₁₀ v pululanu. V prisotnosti CoQ₁₀ v arheosomih do vgrajevanja CoQ₁₀ v membrano ni prišlo.

Rezultati dobljeni s kalorimetričnimi meritvami potrjujejo, da nosilni sistemi olajšujejo vgrajevanje CoQ₁₀ v membrano, in da sestava samih nosilnih sistemov vpliva na učinkovitost vgrajevanja. Ob dodatku emulzije CoQ₁₀ (vzorec A) faznega predprehoda nismo več zaznali, entalpija prehoda iz gel v tekoče kristalinično stanje pa se je zmanjšala iz $35,5 \pm 0,5$ kJ/mol na $29,1 \pm 0,5$ kJ/mol (preglednica 4). Glede na sestavo tega vzorca, taka sprememba ni nepričakovana, saj so kot komponente nosilca prisotni emulgator PGE, Trigliceridi maščobnih kislin in sojin lecitin. Ta kombinacija povzroči povečanje fluidnosti membrane, ki smo jo opazili že pri meritvah fluorescenčne anizotropije.

Rezultati pridobljeni z fluorescenčno spektroskopijo, elektronsko paramagnetno resonanco (EPR) in diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC) so pokazali, da je najboljši dosatavni sistem CoQ₁₀ v lipidne membrane komercialno dostopen pripravek CoQ₁₀, kjer so kot nosilci prisotni natrijev oktenilsukcinat škroba, dekstrin in glicerol –vzorec C (preglednica 5).

Preglednica 5: Pregled učinka CoQ₁₀, vzorcev CoQ₁₀ iz trga in pripravkov CoQ₁₀ v arheosomih, pululanu in izolatu sojinih proteinov. Analizne metode: fluorescenčna spektroskopija, elektronska paramagnetna resonanca (EPR) in diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC).

Table 5: Overview of effect of CoQ₁₀, commercially available CoQ₁₀ formulations and CoQ₁₀ in archaeosomes, pullulan and soy protein isolate. Analysis methods: fluorescent spectroscopy, electron paramagnetic resonance (EPR) and differential dynamic calorimetry (DSC).

Analizna metoda		Fluorescenčna spektroskopija				EPR		DSC
Lipidi		DPPC		PC-SM 2,4:1		PC-SM 2,4:1		DPPC
Sonda		DPH	TMA-DPH	DPH	TMA-DPH	MeFASL (2,11)	MeFASL (10,3)	
Vzorec	Komponente nosilcev							
CoQ ₁₀	/	*/ ↑	*↓ /	*↑ ↑	*/ ↑	↑	↑	●
A	glicerol, PGE, TgMk, sojin lecitin	*↑ /	*/ ↑	*↑ ↑	*/ /	/	↑	○
B	predgeliran škrob, arabski gumi, laktoza	*↓ ↑	*↓ /	*↑ ↑	*↓ ↓	↑	↓*	●
C	natrijev oktenilsukcinat škroba, dekstrin, glicerol	*/ ↑	*↑ ↑	*↑ ↑	*↑ ↑	↑	↑	●
D	β-ciklodekstrin	*↓ ↑	*↓ /	*/ ↑	*/ ↑	↑	↑	●
E	natrijev oktenilsukcinat škroba, saharoza, laktoza, dekstrin, glicerol	*↓ /	*↓ ↓	*/ /	*/ /	↑	↑	●
arheosomi-CoQ ₁₀	PLMF <i>A. pernix</i>	*/ ↑	*/ /	*/ /	*/ /	NP		/
pululan-CoQ ₁₀	pululan	*/ /	*/ */	*/ /	*/ /	NP		●
SPI-CoQ ₁₀	izolat sojinih proteinov	*↓ /	*↓ ↓	*/ /	*↓ ↓	NP		NP

Legenda: * - 25 °C, ● - agregati CoQ₁₀ v membrani, ○ - povečanje fluidnosti membrane, ↓ - zmanjšanje urejenosti membrane; ↑ - povečanje urejenosti membrane; NP – ni podatka; modro polje – 45 °C; vijolično polje – najučinkovitejši pripravek; PGE – poliglicerol ester maščobne kisline, PLMF – polarni lipidi *A. pernix*.

5.1.5 Določitev antioksidativne učinkovitosti vodotopnih pripravkov CoQ₁₀

CoQ₁₀ poleg energetske funkcije opravlja tudi funkcijo lovilca prostih radikalov in je edini endogeni maščobotopni antioksidant (Kaikkonen in sod., 2000). Glede na to, da smo proučevali vodotopne pripravke CoQ₁₀, nas je zanimala njegova antioksidativna učinkovitost v vodi in etanolu, najpogostejših medijih, uporabnih v živilski industriji. Preverili smo kako na antioksidativni potencial vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ vpliva topilo. Uporabili smo indirektno metodo določanja antioksidativnega potenciala z radikalom ABTS^{•+}. Ugotovili smo, da je v primerjavi z vodnimi raztopinami, z izjemo vodotopnega pripravka CoQ₁₀, kjer so kot nosilci prisotni natrijev oktenilsukcinat škroba, dekstrin in glicerol – vzorec C, antioksidativna učinkovitost vodotopnih pripravkov večja v primeru, ko smo kot topilo uporabili etanol. V etanolni raztopini smo največjo antioksidativno učinkovitost določili vzorcu B, vodotopnemu pripravku CoQ₁₀, kjer so kot nosilci prisotni predgeliran škrob, arabski gumi in laktoza ter pripravku CoQ₁₀ v SPI, kjer je CoQ₁₀ molekularno razporejen po površini nosilca, zaradi česar je omogočen lažji stik in interakcija z radikali ABTS^{•+}. Sledili so: CoQ₁₀ v β-ciklodekstrinu - vzorec D; CoQ₁₀ v arheosomih, vzorec E; emulzija CoQ₁₀ - vzorec A, vzorec C, kjer so kot nosilci prisotni natrijev oktenilsukcinat škroba, dekstrin in glicerol ter CoQ₁₀ v pululanu. Ko smo kot topilo uporabili vodo je bila učinkovitost sledeča: kapsulat CoQ₁₀ v SPI > vzorec B > CoQ₁₀ v arheosomih > vzorec C > vzorec D > vzorec A > vzorec E. Večina etanolnih raztopin vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ je bila učinkovitejša pri inhibiciji radikala ABTS^{•+}, kot sam CoQ₁₀. Iz rezultatov lahko sklepamo, da je tako v vodi, kot tudi v etanolu CoQ₁₀ v izbranih vodotopnih pripravkih lažje interagiral z radikalom ABTS^{•+}. Ker je topnost CoQ₁₀ v etanolu boljša (Ondarroa in sod., 1986), je bil učinek v tem topilu pričakovano boljši.

5.1.5.1 Ocena inhibicije oksidacije lipidnov

Čeprav se oksidacija modelnih membran razlikuje od oksidacije bioloških membran, lahko rezultate pridobljene na modelnih sistemih uporabimo za razumevanje procesov, ki jih v bioloških membranah težje proučujemo. Učinkovitost zaviranja oksidacije lipidov z izbranimi komercialno dostopnimi pripravki CoQ₁₀ smo določili s testom TBARS in spektrofotometričnimi meritvami fluoroforja BODIPY® 581/591 C11, kjer smo spremljali

z UV iradiacijo (TBARS) oz kemično inducirano oksidacijo suspenzije liposomov PC v prisotnosti vodotopnih pripravkov CoQ₁₀.

5.1.5.1.1 Spektrofotometrično določanje oksidacije liposomov PC sprožene z UV iradiacijo

Rezultati testa TBARS so pokazali, da je bila oksidacija lipidov po 24-ih urah najmanjša v prisotnosti vodotopnega pripravka CoQ₁₀, kjer so kot nosilci prisotni natrijev oktenilsukcinat škroba, laktoza, saharoza, dekstrin in glicerol – vzorec E in v prisotnosti CoQ₁₀ v SPI, sledi CoQ₁₀ v β-ciklodekstrinu – vzorec D, vzorec A – emulzija CoQ₁₀, vodotopni pripravek, kjer so kot nosilci prisotni natrijev oktenilsukcinat škroba, dekstrin in glicerol in CoQ₁₀ v arheosomih, ter vzorec B - vodotopni pripravek, kjer so kot nosilci prisotni predgeliran škrob, laktoza in arabski gumi in CoQ₁₀ v pululanu.

5.1.5.1.2 Ocena inhibicije lipidne oksidacije z uporabo fluoroforja BODIPY[®] 581/591 C11

Metoda temelji na občutljivosti fluorogene sonde BODIPY[®] 581/591 C₁₁ na oksidacijo z radikali, ki nastanejo kot produkt oksidacije lipidov (Drummen in sod., 2002). Inhibicija oksidacije, ki smo jo spremljali z uporabo BODIPY[®] 581/591 C₁₁ je bila največja, v prisotnosti CoQ₁₀ v SPI, sledil pa je vzorec B, kjer so kot nosilci prisotni predgeliran škrob, laktoza in arabski gumi, sledila sta vzorca D in E, vzorec C in sam CoQ₁₀. Prisotnost emulzije CoQ₁₀ je sprva uspešno zavirala peroksidacijo lipidov, po 60 minutah pa je le-ta začela naraščati. Razlog za pospešeno peroksidacijo, opaženo ob dodatku tega pripravka je bila prisotnost nenasičenih lipidov (sojin lecitin) v samem vzorcu, ki so bili tudi sami podvrženi kemično sproženi peroksidaciji.

V primerjavi s čistim CoQ₁₀ je bila inhibicija oksidacije suspenzije liposomov v prisotnosti vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ močnejša. Rezultati kažejo, da dodatek vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ omogoča boljšo zaščito pred oksidacijo lipidov v suspenziji liposomov, kar dokazuje, da kapsulacija CoQ₁₀, zaradi katere CoQ₁₀ lažje dispergira v vodnih raztopinah, olajša prodiranje CoQ₁₀ v lipidno membrano in s tem preprečuje oksidacijo acilnih verig lipidov.

Izpostavljanje vodnih suspenzij vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ UV sevanju je pokazalo, da je po treh urah koncentracija CoQ₁₀ v večini pripravkov večja, kot v suspenziji čistega CoQ₁₀. Sklepamo, da s kapsulacijo CoQ₁₀ nekoliko zaščitimo pred UV sevanjem in tako izboljšamo njegovo fotostabilnost. Temperaturna razgradnja CoQ₁₀ je počasnejša. V večini pripravkov CoQ₁₀ je bila degradacija CoQ₁₀ večja kot degradacija samega CoQ₁₀ (z izjemo vzorca D – CoQ₁₀ v β-ciklodekstrinu). Pospešena degradacija CoQ₁₀ je najverjetneje posledica vpliva razpadnih produktov nosilcev prisotnih v teh pripravkih na stabilnost CoQ₁₀.

5.2 SKLEPI

- Iz dobljenih rezultatov meritev fluorescenčne anizotropije lahko sklepamo, da nosilci prisotni v proučevanih komercialno dostopnih vzorcih vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ omogočijo prehod CoQ₁₀ v membrano liposomov, in da nosilci sami po sebi ne povzročajo večjih sprememb v urejenosti membrane. Izjema so bili v primeru liposomov DPPC in PC-SM nosilci, prisotni v emulziji CoQ₁₀. Kaže, da je obeh primerih za ta učinek v največji meri odgovorna prisotnost sojinega lecitina.
- CoQ₁₀ poveča ureditev acilnih verig membrane liposomov pripravljenih iz DPPC in mešanice PC-SM v molarnem razmerju 2,4:1.
- Kalorimetrične meritve so pokazale, da je delež CoQ₁₀ v agregiranem stanju proporcionalen njegovi koncentraciji v liposomih DPPC.
- Rezultati potrjujejo, da nosilni sistemi večinoma olajšujejo vgrajevanje CoQ₁₀ v membrano in da sestava samih nosilnih sistemov vpliva na učinkovitost vgrajevanja. Na vgrajevanje CoQ₁₀ v membrano vpliva tudi lipidna sestava le-te.
- Dodatek vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ omogoča boljšo zaščito pred oksidacijo lipidov v suspenziji liposomov, kar dokazuje, da kapsulacija CoQ₁₀, zaradi katere CoQ₁₀ lažje dispergira v vodnih raztopinah, olajša prodiranje CoQ₁₀ v lipidno membrano in s tem preprečuje oksidacijo acilnih verig lipidov.
- Z namenom priprave novih oblik vodotopenga CoQ₁₀ smo le-tega vgradili v eksopolisaharid pululan, izolat sojinih proteinov in v arheosome pripravljene iz PLMF arheje *A. pernix*. Tako pripravljene kompleksi so se v vodi zlahka dispergirali, s čemer smo dosegli boljšo vodotopnost teh pripravkov CoQ₁₀.
- SPI in arheosomi, ki smo jih uporabili za enkapsulacijo vplivajo na fluidnost membrane liposomov DPPC in PC-SM.

- Polisaharid pululan, poleg odlične termične stabilnosti, deluje tudi kot kisikova bariera. Zaradi svojih lastnosti je zanimiv za kapsulacijo snovi, ki so občutljive na razpad v prisotnosti kisika.
- Kapsulacija poveča UV stabilnost CoQ₁₀.
- Kapsulacija CoQ₁₀ je v primerjavi s samim CoQ₁₀ nekoliko zmanjšala termostabilnost le-tega.

6 POVZETEK

6.1 POVZETEK

Koencim Q₁₀ (CoQ₁₀), znan tudi kot ubikinon ali ubidekarenon, je hidrofobna, molekula, ki jo najdemo v celicah mnogih organizmov. CoQ₁₀ sodeluje pri številnih pomembnih celičnih procesih. Ima vlogo prenašalca elektronov med kompleksi mitohondrijske dihalne verige. CoQ₁₀ je ključna komponenta v proizvodnji celične energije v obliki adenozin-trifosfata (ATP) in deluje kot antioksidant (Frei in sod., 1990).

Zaradi deset izoprenoidnih enot dolge stranske verige, je CoQ₁₀ slabo topen v vodi. Nepopolna in počasna absorpcija CoQ₁₀ iz prebavil je posledica njegove slabe topnosti v vodi in visoke molekulske mase (Greenberg in Frishman, 1990). Težave z nizko topnostjo in biorazpoložljivostjo so rešili z vgradnjo CoQ₁₀ v različne nosilne sisteme. S tem so olajšali tudi dodajanje CoQ₁₀ različnim, zlasti prehrabnim, farmacevtskim in kozmetičnim izdelkom (Prošek in sod., 2005).

V nalogi smo preiskali vpliv različnih komercialno dostopnih pripravkov vodotopnih oblik CoQ₁₀ in njihovih nosilcev na modelne membrane (preglednica 5). Pri eksperimentalnem delu smo uporabili liposome različnih velikosti (MLV in SUV) pripravljene iz DPPC in mešanice PC, SM v razmerju 2,4:1. Uporabljena mešanica fosfatidilholina in sfingomielina simulira sestavo celične membrane človeških eritrocitov in trombocitov (Živec in Zihlerl, 2006).

Ugotovili smo, da nosilci, prisotni v proučevanih komercialno dostopnih vzorcih vodotopnih pripravkov CoQ₁₀, omogočijo prehod CoQ₁₀ v membrano proučevanih liposomov, kjer opazimo ureditev acilnih verig lipidov, sami po sebi pa ne povzročajo večjih sprememb v urejenosti membrane. Izjema so bili v primeru liposomov DPPC, kot tudi PC-SM nosilci prisotni v emulziji CoQ₁₀ (glicerol, sojin lecitin, PGE in trigliceridi maščobnih kislin), ki so povzročili povečanje fluidnosti membrane. Kaže, da je v obeh primerih za ta učinek v največji meri odgovorna prisotnost sojinega lecitina.

Rezultati kažejo, da dodatek pripravkov CoQ₁₀ omogoča boljšo zaščito pred lipidno oksidacijo v suspenziji liposomov, kar dokazuje, da kapsulacija CoQ₁₀, zaradi katere

CoQ₁₀ lažje dispergira v vodnih raztopinah, olajša prodiranje CoQ₁₀ v lipidno membrano in s tem preprečuje oksidacijo acilnih verig lipidov.

Z namenom priprave novih vodotopnih oblik CoQ₁₀ smo le tega z metodo sušenja z zamrzovanjem vgradili v eksopolisaharid pululan, izolat sojinih proteinov (SPI) in v arheosome pripravljene iz PLMF *A. pernix*. Tako pripravljene kompleksi CoQ₁₀ so dispergirali v vodnih raztopinah, kar kaže na izboljšane topnostne lastnosti. Kapsulacija poveča fotostabilnost vendar nekoliko zmanjša termostabilnost vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ v primerjavi z nekapsuliranim CoQ₁₀.

6.2 SUMMARY

Coenzyme Q₁₀ (2,3-dimethoxy-5-methyl-6-multiprenyl-1,4-benzoquinone), also known as ubiquinone or ubidecarenone, is a lipid-soluble compound found in the cells of many organisms. CoQ₁₀ is involved in a variety of essential cellular processes. It acts as electron carrier between complexes of mitochondrial respiratory chain. CoQ₁₀ is a key component in cell energy production in the form of adenosine-triphosphate (ATP) and it acts as an antioxidant (Frei et al., 1990).

CoQ₁₀ has a low water solubility due to its ten isoprenoid units long side chain. Incomplete and slow absorption of CoQ₁₀ from intestinal tract is a result of its low solubility and high molecular mass (Greenberg and Frishman, 1990). Problems with low solubility and bioavailability were resolved with incorporation of CoQ₁₀ into different carrier systems. This facilitated the addition of CoQ₁₀ into different food, pharmaceutical and cosmetic products (Prošek et al., 2005).

In our work influence of different commercially available water soluble CoQ₁₀ formulations and its carriers on model lipid membranes (Table 5). Experiments were conducted using different size liposomes (MLV and SUV) prepared from DPPC or PC SM mix with molar ratio 2,4:1. Used mixture of phosphatidylcholine and sphingomyelin simulates membrane of human erythrocytes and thrombocytes (Živec and Zihlerl, 2006).

It was found that carriers present in studied commercially available water soluble CoQ₁₀ formulations enable passage of CoQ₁₀ into liposomal membrane where ordering of lipid acyl chains was observed. Carriers alone do not cause significant changes in membrane ordering. Exception in case of DPPC and PC-SM liposomes were the carriers present in CoQ₁₀ emulsion (glycerol, soy lecithin, polyglycerol ester of fatty acid and triglycerides of fatty acids) that caused an increase in membrane fluidity. This effect is believed to be induced by the presence of soy lecithin.

Results show that addition of water soluble CoQ₁₀ formulations provides better protection against lipid peroxidation of liposomal suspension, compared to pure CoQ₁₀. This proves

that CoQ₁₀ encapsulation facilitates penetration of CoQ₁₀ into lipid membrane, where it prevents lipid peroxidation of lipid acyl chains.

In order to develop novel water soluble CoQ₁₀ formulations, CoQ₁₀ was integrated into polysaccharide pullulan using freeze drying, incorporated into soy protein isolate aggregates and encapsulated in archaeosomes prepared from PLMF A. pernix.. Prepared complexes were easily dispersed in water solution, showing improved dissolution properties of these formulations. Encapsulation increases photo stability and slightly decreases the thermo stability of CoQ₁₀ in water suspensions of water soluble CoQ₁₀ formulations compared to unencapsulated CoQ₁₀.

7 VIRI

- Abuja P. M., Albertini R. 2001. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta*, 306, 1-2: 1-17
- Aranda F. J., Gomezfernandez J. C. 1985. The interaction of ubiquinone-10 and ubiquinol-10 with phospholipid-bilayers - a study using differential scanning calorimetry and turbidity measurements. *Biochimica et Biophysica Acta*, 820, 1: 19-26
- Aranda F. J., Villalain J., Gomezfernandez J. C. 1986. A fourier-transform infrared spectroscopic study of the molecular interaction of ubiquinone-10 and ubiquinol-10 with bilayers of dipalmitoylphosphatidylcholine. *Biochimica et Biophysica Acta*, 861, 1: 25-32
- Atkins P., De Paula J. 2006. *Atkins' physical chemistry*. 8th ed. Oxford, University Press: 1085 str.
- Aungst B. J. 1993. Novel formulation strategies for improving oral bioavailability of drugs with poor membrane permeation or presystemic metabolism. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 82, 10: 979-987
- Ausili A., Torrecillas A., Aranda F., de Godos A., Sanchez-Bautista S., Corbalan-Garcia S., Gomez-Fernandez J. C. 2008. Redox state of coenzyme Q₁₀ determines its membrane localization. *Journal of Physical Chemistry B*, 112, 40: 12696-12702
- Bartucci R., Gambacorta A., Gliozzi A., Marsh D., Sportelli L. 2005. Bipolar tetraether lipids: Chain flexibility and membrane polarity gradients from spin-label electron spin resonance. *Biochemistry*, 44, 45: 15017-15023
- Budai M., Szabo Z., Szogyi M., Grof P. 2003. Molecular interactions between DPPC and morphine derivatives: a DSC and EPR study. *International Journal of Pharmaceutics*, 250, 1: 239-250
- Bule M. V., Singhal R. S., Kennedy J. F. 2010. Microencapsulation of ubiquinone-10 in carbohydrate matrices for improved stability. *Carbohydrate Polymers*, 82, 4: 1290-1296
- Chan Y.-H.M., Boxer S.G. 2007. Model membrane systems and their applications. *Current Opinion in Chemical Biology*, 11: 581-587
- Chen C.-C., Leuenberger B., Ulm J. 2005. Water-dispersible coenzyme Q₁₀ dry powders. United States Patent Application US 20050142123 A1: 4 str.

- Cheng K.-C., Demirci A., Catchmark J. M. 2011. Pullulan: biosynthesis, production, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92, 1: 29-44
- Chong P. L. G., Ravindra R., Khurana M., English V., Winter R. 2005. Pressure perturbation and differential scanning calorimetric studies of bipolar tetraether liposomes derived from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biophysical Journal*, 89, 3: 1841-1849
- Coderch L., Fonollosa J., Estelrich J., De La Maza A., Parra J. L. 2000. Influence of cholesterol on liposome fluidity by EPR - Relationship with percutaneous absorption. *Journal of Controlled Release*, 68, 1: 85-95
- Crane F. L. 2000. New functions for coenzyme Q. *Protoplasma*, 213, 3-4: 127-133
- Crane F. L. 2001. Biochemical functions of coenzyme Q₁₀. *Journal of the American College of Nutrition*, 20, 6: 591-598
- Crane F. L. 2007. Discovery of ubiquinone (coenzyme Q) and an overview of function. *Mitochondrion*, 7: 2-7
- Cui Z. R., Hsu C. H., Mumper R. J. 2003. Physical characterization and macrophage cell uptake of mannan-coated nanoparticles. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 29, 6: 689-700
- DeRosa M. 1996. Archaeal lipids: Structural features and supramolecular organization. *Thin Solid Films*, 284: 13-17
- Diaz A. N., Sanchez F. G., Guerrero M. M. L. 2003. Modulated anisotropy fluorescence for quantitative determination of carbaryl and benomyl. *Talanta*, 60, 2-3: 629-634
- Donner M., Stoltz J. F. 1985. Lipid fluidity of red cell membranes assessed with different fluorescent probes. *Acta Medica Portuguesa*, 6: 27-30
- Drummen G. P. C., van Liebergen L. C. M., Op den Kamp J. A. F., Post J. A. 2002. C11-BODIPY581/591, an oxidation-sensitive fluorescent lipid peroxidation probe: (Micro)spectroscopic characterization and validation of methodology. *Free Radical Biology and Medicine*, 33, 4: 473-490
- Durmaz G. 2012. Freeze-dried ABTS^{•+} method: A ready-to-use radical powder to assess antioxidant capacity of vegetable oils. *Food Chemistry*, 133, 4: 1658-1663
- Erel O. 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, 37, 4: 277-285

- Fato R., Battino M., Esposti M. D., Castelli G. P., Lenaz G. 1986. Determination of partition and lateral diffusion-coefficients of ubiquinones by fluorescence quenching of normal-(9-anthroxy)stearic acids in phospholipid-vesicles and mitochondrial-membranes. *Biochemistry*, 25, 11: 3378-3390
- Frei B., Kim M. C., Ames B. N. 1990. Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 12: 4879-4883
- Gmajner D., Ota A., Šentjurc M., Poklar Ulrih N. 2011. Stability of diether C(25,25) liposomes from the hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* K1. *Chemistry and Physics of Lipids*, 164, 3: 236-245
- Greenberg S., Frishman W. H. 1990. Coenzyme-Q₁₀ - a new drug for cardiovascular-disease. *Journal of Clinical Pharmacology*, 30, 7: 596-608
- Gursoy R. N., Benita S. 2004. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 58, 3: 173-182
- Higashi T., Nishimura K., Yoshimatsu A., Ikeda H., Arima K., Motoyama K., Hirayama F., Uekama K., Arima H. 2009. Preparation of four types of coenzyme Q₁₀/gamma-cyclodextrin supramolecular complexes and comparison of their pharmaceutical properties. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 57, 9: 965-970
- Hsu C.-H., Cui Z., Mumper R., Jay M. 2003. Preparation and characterization of novel coenzyme Q₁₀ nanoparticles engineered from microemulsion precursors. *AAPS PharmSciTech*, 4, 3: 24-35
- Jemiola-Rzeminska M., Kruk J., Skowronek M., Strzalka K. 1996. Location of ubiquinone homologues in liposome membranes studied by fluorescence anisotropy of diphenyl-hexatriene and trimethylammonium-diphenyl-hexatriene. *Chemistry and Physics of Lipids*, 79, 1: 55-63
- Johnson M. E., Berk D. A., Blankschtein D., Golan D. E., Jain, R. K., Langer R. S. 1996. Lateral diffusion of small compounds in human *stratum corneum* and model lipid bilayer systems. *Biophysical Journal*, 71, 5: 2656-2668
- Jong L., Peterson S. C. 2008. Effects of soy protein nanoparticle aggregate size on the viscoelastic properties of styrene-butadiene composites. *Composites Part A - Applied Science and Manufacturing*, 39, 11: 1768-1777

- Kaikkonen J., Nyssonen K., Tomasi A., Iannone A., Tuomainen T. P., Porkkala-Sarataho E., Salonen J. T. 2000. Antioxidative efficacy of parallel and combined supplementation with coenzyme Q₁₀ and d-alpha-tocopherol in mildly hypercholesterolemic subjects: a randomized placebo-controlled clinical study. *Free Radical Research*, 33, 3: 329-340
- Katsikas H., Quinn P. J. 1981. The interaction of coenzyme-q with dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers. *FEBS Letters*, 133, 2: 230-234
- KEEG PATWAY: Oxidative phosphorylation-Reference pathway. 2012. Kyoto, Kanehisha Laboratories: 1 str.
<http://www.genome.jp/kegg/pathway/map/map00190.html> (februar 2014)
- Kingsley P. B., Feigenson G. W. 1981. H-1-NMR study of the location and motion of ubiquinones in perdeuterated phosphatidylcholine bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 635, 3: 602-618
- Koga Y., Kyuragi T., Nishihara M., Sone N. 1998. Did archaeal and bacterial cells arise independently from noncellular precursors? A hypothesis stating that the advent of membrane phospholipid with enantiomeric glycerophosphate backbones caused the separation of the two lines of descent (vol 46, pg 54, 1998). *Journal of Molecular Evolution*, 47, 5: 631-631
- Koga Y., Morii H. 2005. Recent advances in structural research on ether lipids from archaea including comparative and physiological aspects. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 69, 11: 2019-2034
- Koga Y., Morii H. 2006. Special methods for the analysis of ether lipid structure and metabolism in archaea. *Analytical Biochemistry*, 348, 1: 1-14
- Kommuru T. R., Gurley B., Khan M. A., Reddy I. K. 2001. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) of coenzyme Q₁₀: formulation development and bioavailability assessment. *International Journal of Pharmaceutics*, 212, 2: 233-246
- Kuhry J. G., Fonteneau P., Duportail G., Maechling C., Laustriat G. 1983. TMA-DPH - a suitable fluorescence polarization probe for specific plasma-membrane fluidity studies in intact living cells. *Cell Biophysics*, 5, 2: 129-140
- Kwon S. S., Nam Y. S., Lee J. S., Ku B. S., Han S. H., Lee J. Y., Chang I. S. 2002. Preparation and characterization of coenzyme Q₁₀-loaded PMMA nanoparticles by

- a new emulsification process based on microfluidization. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 210, 1: 95-104
- Lakowicz J. R. 2006. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York, Springer: 954 str.
- Lasic D. D. 1993. *Liposomes: from physics to applications*. Amsterdam, Elsevier: 575 str.
- Lazko J., Popineau Y., Legrand J. 2004. Soy glycinin microcapsules by simple coacervation method. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 37, 1-2: 1-8
- Leathers T. D. 2003. Biotechnological production and applications of pullulan. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62, 5-6: 468-473
- Li X., Li Y., Hua Y., Qiu A., Yang C., Cui S. 2007. Effect of concentration, ionic strength and freeze-drying on the heat-induced aggregation of soy proteins. *Food Chemistry*, 104, 4: 1410-1417
- Liu D., Tian H., Zeng J., Chang P. R. 2008. Core-shell nanoblends from soy protein/polystyrene by emulsion polymerization. *Macromolecular Materials and Engineering*, 293, 8: 714-721
- Lunetta S., Roman M. 2008. Determination of coenzyme Q₁₀ content in raw materials and dietary supplements by high-performance liquid chromatography-UV: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, 91, 4: 702-708
- Marsh D. 1981. *Electron spin resonance: Spin labels. V: Membrane spectroscopy*. Grell E. (ed.). Berlin, Springer: 51-142
- Mathai J. C., Sprott G. D., Zeidel M. L. 2001. Molecular mechanisms of water and solute transport across archaeobacterial lipid membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 29: 27266-27271
- McCormack B., Gregoriadis G. 1994. Drugs-in-cyclodextrins-in liposomes: a novel concept in drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 112: 249-258
- McElhaney R. N. 1986. Differential scanning calorimetric studies of lipid protein interactions in model membrane systems. *Biochimica et Biophysica Acta*, 864, 3-4: 361-421
- Michaelis L., Moore M. J. 1985. Location of ubiquinone-10 (CoQ-10) in phospholipid-vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 821, 1: 121-129

- Milek I., Cigič B., Skrt M., Kaletunc G., Poklar Ulrih N. 2005. Optimization of growth for the hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* on a small-batch scale. *Canadian Journal of Microbiology*, 51, 9: 805-809
- Milivojevič Fir M., Šmidovnik A., Milivojevič L., Žmitek J., Prošek M. 2009. Studies of CoQ₁₀ and cyclodextrin complexes: solubility, thermo- and photo-stability. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 64, 3-4: 225-232
- Moghimipour E., Kargar M., Ramezani Z., Handali S. 2013. The potent *in vitro* skin permeation of archaeosome made from lipids extracted of *Sulfolobus acidocaldarius*. *Archaea* 2013: ID782012, doi:10.1155/2013/782012: 7 str.
- Morii H., Yagi H., Akutsu H., Nomura N., Sako Y., Koga Y. 1999. A novel phosphoglycolipid archaetidyl(glucosyl)inositol with two sesterterpanyl chains from the aerobic hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* K1. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1436, 3: 426-436
- Nazzal S., Khan M. A. 2006. Controlled release of a self-emulsifying formulation from a tablet dosage form: Stability assessment and optimization of some processing parameters. *International Journal of Pharmaceutics*, 315, 1-2: 110-121
- Ondarroa M., Sharma S. K., Quinn P. J. 1986. Solvation properties of ubiquinone-10 in solvents of different polarity. *Bioscience Reports*, 6, 9: 783-796
- Ota A., Gmajner D., Šentjurc M., Poklar Ulrih N. 2012. Effect of growth medium pH of *Aeropyrum pernix* on structural properties and fluidity of archaeosomes. *Archaea* 2012, ID285152, doi: 10.1155/2012/285152: 9 str.
- Park C.W., Kim S.J., Park . ., Kim J. H., Kim J. K., Park G. B., Kim J. O. Ha Y. L. 2002. Inclusion complex of conjugated linoleic acid (CLA) with cyclodextrins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 2977-2983
- Patel G. B., Sprott G. D. 1999. Archaeobacterial ether lipid liposomes (archaeosomes) as novel vaccine and drug delivery systems. *Critical Reviews in Biotechnology*, 19, 4: 317-357
- Pawlikowska-Pawlega B., Gruszecki W. I., Misiak L. E., Gawron A. 2003. The study of the quercetin action on human erythrocyte membranes. *Biochemical Pharmacology*, 66, 4: 605-612

- Pelle E., Maes D., Padulo G. A., Kim E. K., Smith W. P. 1989. Invitro model to assess alpha-tocopherol efficacy - protection against UV-induced lipid-peroxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 570: 491-494
- Pelle E., Maes D., Padulo G. A., Kim E. K., Smith W. P. 1990. An invitro model to test relative antioxidant potential - ultraviolet-induced lipid-peroxidation in liposomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 283, 2: 234-240
- Peretó J., Lopez-Garcia P., Moreira D. 2004. Ancestral lipid biosynthesis and early membrane evolution. *Trends in Biochemical Sciences*, 29, 9: 469-477
- Poklar Ulrih N., Adamlje U., Nemec M., Šentjerc M. 2007. Temperature- and pH-induced structural changes in the membrane of the hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* K1. *Journal of Membrane Biology*, 219, 1-3: 1-8
- Poklar Ulrih N., Gmajner D., Raspor P. 2009. Structural and physicochemical properties of polar lipids from thermophilic archaea. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84, 2: 249-260
- Pottel H., Vandermeer W., Herreman W. 1983. Correlation between the order parameter and the steady-state fluorescence anisotropy of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene and an evaluation of membrane fluidity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 730, 2: 181-186
- Prajapati V. D., Jani G. K., Khanda S. M. 2013. Pullulan: An exopolysaccharide and its various applications. *Carbohydrate Polymers*, 95, 1: 540-549
- Prošek M., Šmidovnik A., Fir M., Stražičar M., Golc Wondra A., Andrenšek S., Žmitek J. 2005. Uporaba koencima Q₁₀ za učinkovitejšo vzrejo živali in pridelavo živalskih tkiv s povečano vsebnostjo tega koencima. Patent SI 22407 A: 24 str.
- Riche M., Williams T. N. 2010. Apparent digestible protein, energy and amino acid availability of three plant proteins in Florida pompano, *Trachinotus carolinus* L. in seawater and low-salinity water. *Aquaculture Nutrition*, 16, 3: 223-230
- Roginsky V., Lissi E. A. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92, 2: 235-254
- Sako Y., Nomura N., Uchida A., Ishida Y., Morii H., Koga Y., Hoaki T., Maruyama T. 1996. *Aeropyrum pernix* gen nov, sp nov, a novel aerobic hyperthermophilic archaeon growing at temperatures up to 100 degrees C. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46, 4: 1070-1077

- Samori B., Lenaz G., Battino M., Marconi G., Domini I. 1992. On coenzyme-q orientation in membranes - a linear dichroism study of ubiquinones in a model bilayer. *Journal of Membrane Biology*, 128, 3: 193-203
- Schnitzer E., Pinchuk I., Lichtenberg D. 2007. Peroxidation of liposomal lipids. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, 36, 4-5: 499-515
- Singh R. S., Saini G. K., Kennedy J. F. 2008. Pullulan: Microbial sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers*, 73, 4: 515-531
- Štrancar J., Koklič T., Arsov Z. 2003. Soft picture of lateral heterogeneity in biomembranes. *Journal of Membrane Biology*, 196, 2: 135-146
- Štrancar J., Koklič T., Arsov Z., Filipic B., Stopar D., Hemminga M. A. 2005. Spin label EPR-based characterization of biosystem complexity. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 45, 2: 394-406
- Šentjerc M., Štrancar J., Koklič T. 2002. Membrane domain alteration under the action of biologically active substances: an EPR study. *Current Topics in Biophysics*, 26: 65-73
- Šentjerc M., Vrhovnik K., Kristl J. 1999. Liposomes as a topical delivery system: the role of size on transport studied by the EPR imaging method. *Journal of Controlled Release*, 59, 1: 87-97
- Tang B., Cheng G., Gu J.-C., Xu C.-H. 2008. Development of solid self-emulsifying drug delivery systems: preparation techniques and dosage forms. *Drug Discovery Today*, 13, 13-14: 606-612
- Teeranachaidekul V., Souto E. B., Junyaprasert V. B., Müller, R. H. 2007. Cetyl palmitate-based NLC for topical delivery of coenzyme Q₁₀ - Development, physicochemical characterization and *in vitro* release studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 67, 1: 141-148
- Teng Z., Liu C., Yang X. Li L., Tang C., Jiang Y. 2009. Fractionation of soybean globulins using Ca²⁺ and Mg²⁺: A comparative analysis. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 86, 5: 409-417
- Teng Z., Luo Y. C., Wang Q. 2012. Nanoparticles synthesized from soy protein: Preparation, characterization, and application for nutraceutical encapsulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 10: 2712-2720

- Terao K., Nakata D., Fukumi H., Schmid G., Arima H., Hirayama F., Uekama K. 2006. Enhancement of oral bioavailability of coenzyme Q₁₀ by complexation with gamma-cyclodextrin in healthy adults. *Nutrition Research*, 26, 10: 503-508
- Thanatuksorn P., Kawai K., Hayakawa M., Hayashi M., Kajiwara K. 2009. Improvement of the oral bioavailability of coenzyme Q₁₀ by emulsification with fats and emulsifiers used in the food industry. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 1: 385-390
- Ulrich E. L., Girvin M. E., Cramer W. A., Markley J. L. 1985. Location and mobility of ubiquinones of different chain lengths in artificial membrane-vesicles. *Biochemistry*, 24, 10: 2501-2508
- Utsumi S., Kinsella J. E. 1985. Structure-function-relationships in food proteins - subunit interactions in heat-induced gelation of 7S, 11S, and soy isolate proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33, 2: 297-303
- Wachtershauser G. 2003. From pre-cells to Eukarya - a tale of two lipids. *Molecular Microbiology*, 47, 1: 13-22
- Wandrey C., Bartkowiak A., Harding S. 2010. Materials for encapsulation. V: Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing. Zuidam N. J., Nedovic V. (eds.). New York, Springer: 31-100
- Wong-Ekkabut J., Xu Z., Triampo W., Tang I. M., Tieleman D. P., Monticelli L. 2007. Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: A molecular dynamics study. *Biophysical Journal*, 93, 12: 4225-4236
- Xia S. Q., Xu S. Y. 2006. Improved assay of coenzyme Q₁₀ from liposomes by Tween 80 solubilisation and UV spectrophotometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 13: 2119-2127
- Xu X. L., London E. 2000. The effect of sterol structure on membrane lipid domains reveals how cholesterol can induce lipid domain formation. *Biochemistry*, 39: 843-849
- Yamamoto Y. 2005. Coenzyme Q₁₀ as a front-line antioxidant against oxidative stress. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 36, 2: 29-35
- Zhang J., Wang S. 2009. Topical use of Coenzyme Q₁₀-loaded liposomes coated with trimethyl chitosan: Tolerance, precorneal retention and anti-cataract effect. *International Journal of Pharmaceutics*, 372, 1-2: 66-75

- Zhou H. F., Zhang, J., Long Y. F., Liu G. Q., Duan M. X., Xia Q. 2013. Improvement of the oral bioavailability of coenzyme Q₁₀ with lecithin nanocapsules. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 13, 1: 706-710
- Živec K., Zihlerl K. 2006. Fluidnost eritrocitnih membran pri rakavih bolnikih – študija z elektronsko paramagnetno resonance. *Medicinski Razgledi*, 45: 3-19
- Zuidam N., Shimoni, E. 2010. Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. V: *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing*. Zuidam N. J., Nedovic V. (eds.). New York, Springer: 3-29
- Žmitek J., Žmitek K., Pravst I. 2008a. Improving the bioavailability of coenzyme Q₁₀ - From theory to practice. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 19, 4: 8-10
- Žmitek J., Šmidovnik A., Milivojevič Fir M., Prošek M., Žmitek K., Walczak J., Pravst I. 2008b. Relative bioavailability of two forms of a novel water-soluble coenzyme Q₁₀. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 52, 4: 281-287
- Züllli A.F., Belser E., Schmid D., Liechti C., Suter F. 2006. Preparation and properties of coenzyme Q₁₀ nanoemulsions. *Cosmetic Science and Technology*, 10: 40–46

ZAHVALA

Za kvalitetno vodstvo, vsestransko pomoč in spodbudo se zahvaljujem mentorici prof. dr. Nataši Poklar Ulrich.

Za pregled doktorske disertacije in koristne napotke se zahvaljujem tudi prof. dr. Lei Demšar in prof. dr. Julijani Kristl.

Družbi FARMICOM d. o. o. bi se zahvalila za finančno podporo. Raziskavo je delno financirala Evropska unija in sicer iz Evropskega socialnega sklada.

Hvala vsem sodelavcem Katedre za biokemijo in kemijo živil, Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete za pomoč in prijetno vzdušje v laboratoriju.

Za pomoč pri obdelavi EPR rezultatov se zahvaljujem dr. Marjeti Šentjunc, iz Inštituta Jožef Stefan, za pomoč pri termogravimetričnih analizah se zahvaljujem dr. Romani Cerc-Korošec, iz Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo, za pomoč pri elektronski mikroskopiji pa dr. Marjanu Bele iz Kemijskega inštituta.

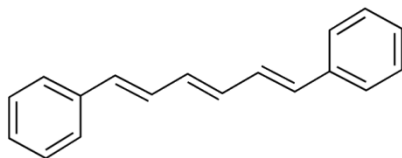
Posebna zahvala gre tudi kolegom: Aniti, Barbari, Dejanu, Janezu, Katji Č., Katji P., Katji I., Kseniji, Lini, Markotu, Nedi, Petri, Saši, Teji, Tjaši in Tamari, ki so v teh letih postali tudi dobri prijatelji. Študij in obštudijske dejavnosti so bile v vaši družbi prijetnejše.

Na koncu pa hvala moji družini, ki mi je vsa ta leta stala ob strani in me podpirala.

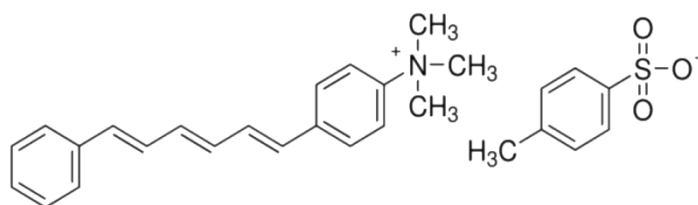
Hvala vsem!



PRILOGE



DPH



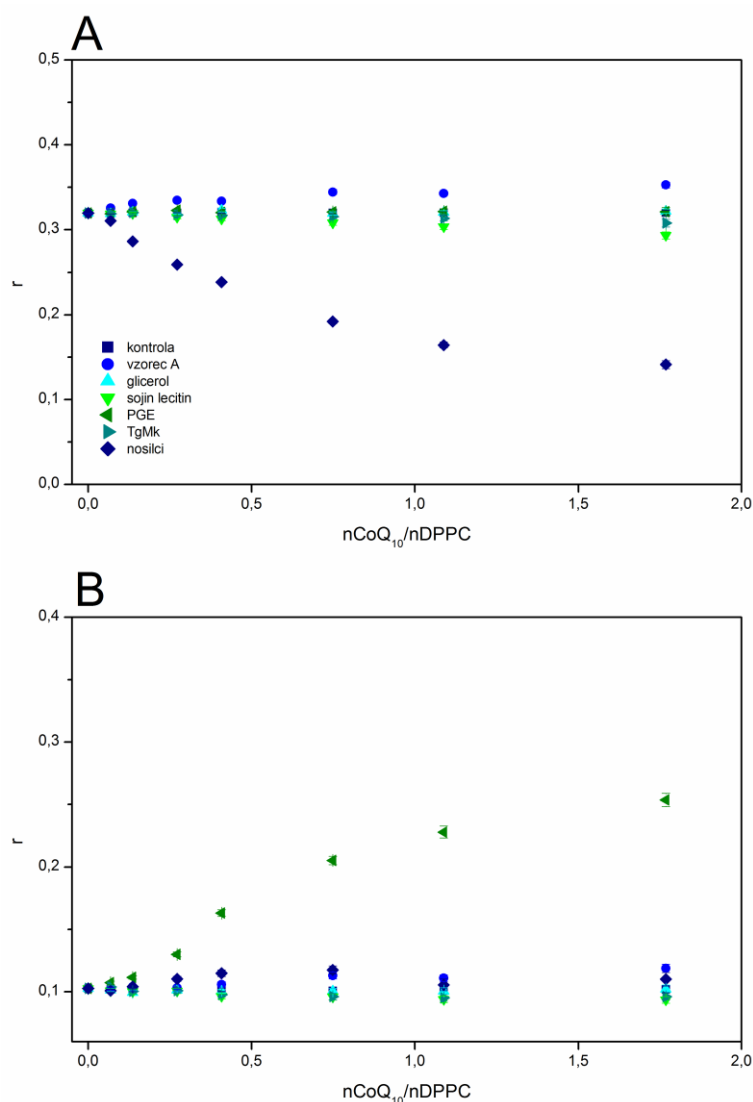
TMA-DPH

Priloga A: Strukturna formula fluorescentne sonde DPH in njegovega kationskega derivata TMA-DPH.

Appendix A: Structural formula of fluorescent probe DPH and its cationic derivative TMA-DPH.

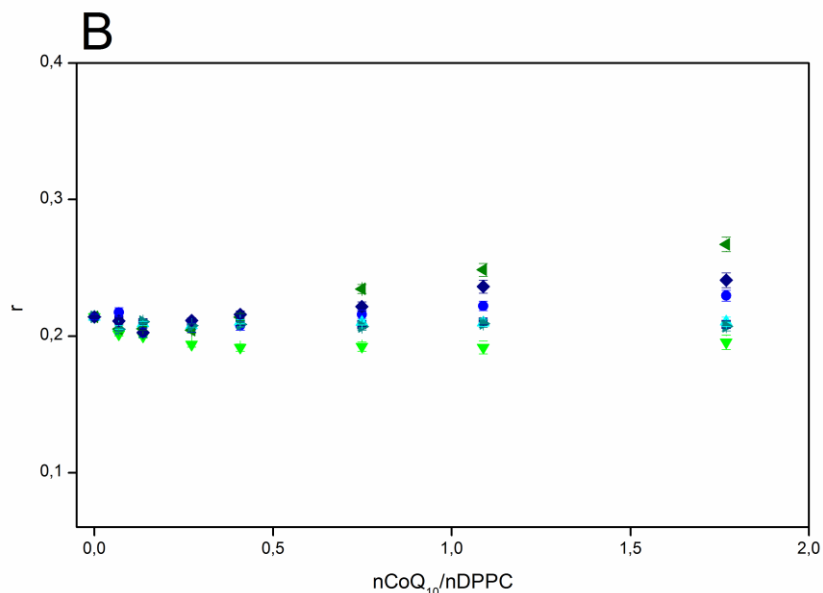
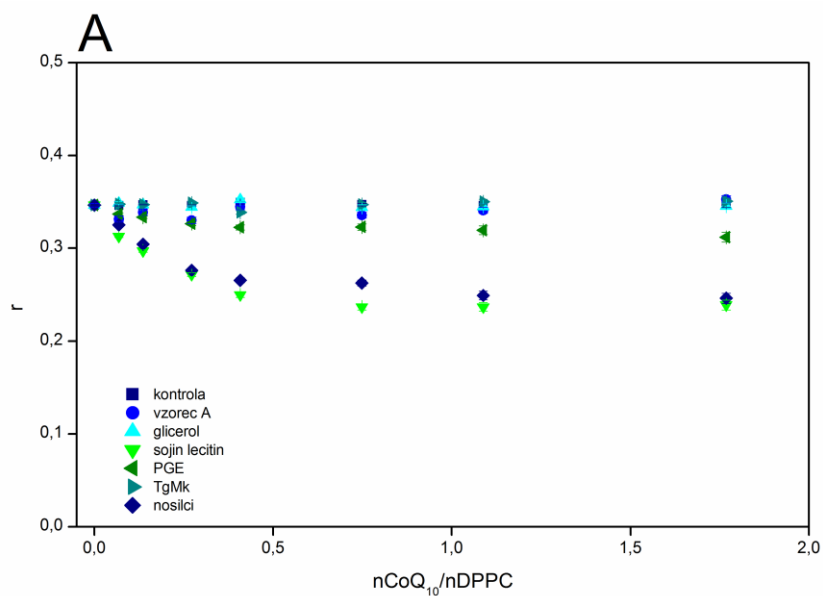
Priloga B: Spremembe fluorescenčne anizotropije (r) po titraciji SUV pripravljenih iz DPPC oz. mešanice PC in SM z vodno suspenzijo vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ oz. njihovih nosilcev v prisotnosti fluoroforjev DPH in TMA-DPH.

Appendix B: The changes in fluorescence anisotropy (r) after titration of SUV constituted from DPPC or PC-SM mix with water suspension of water soluble CoQ₁₀ formulations or their carriers in the presence of fluorophores DPH and TMA-DPH.



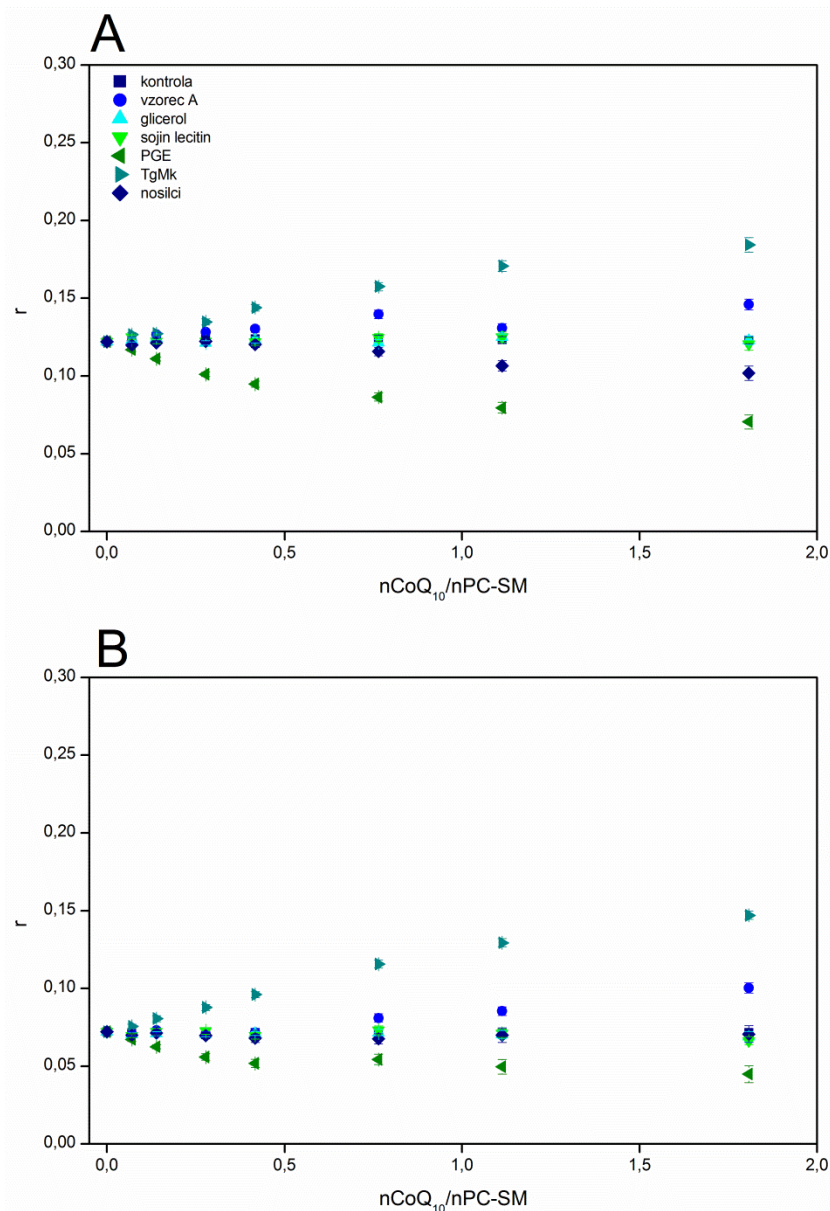
Priloga B1: Spremembe fluorescenčne anizotropije (r) po titraciji SUV pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo emulzije CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec A), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode. Nosilci: glicerol, sojin lecitin, poliglicerol ester maščobne kisline - PGE, trigliceridi maščobnih kislin - TgMk.

Appendix B1 The changes in fluorescence anisotropy (r) after titration of SUV constituted from DPPC with water suspension of CoQ₁₀ emulsion or components of carriers present in this formulation (Sample A) with the CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control. Carriers: glycerol, soy lecithin, polyglycerol ester of fatty acid - PGE, triglycerides of fatty acids - TgMk.



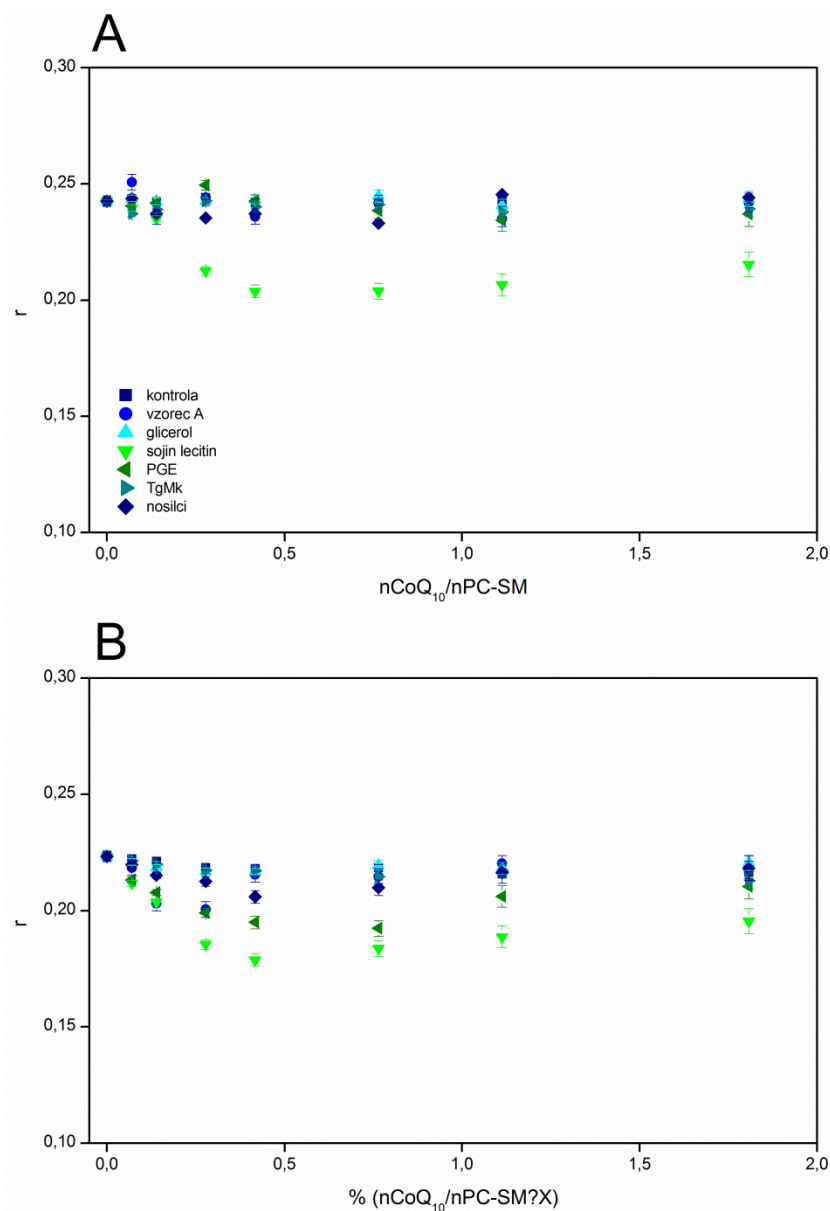
Priloga B2: Spremembe fluorescenčne anizotropije (r) po titraciji SUV pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo emulzije CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec A), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode. Nosilci: glicerol, sojin lecitin, poliglicerol ester maščobne kisline - PGE, trigliceridi maščobnih kislin - TgMk.

Appendix B2: The changes in fluorescence anisotropy (r) after titration of SUV constituted from DPPC with water suspension of CoQ₁₀ emulsion or components of carriers present in this formulation (Sample A) with the CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control. Carriers: glycerol, soy lecithin, polyglycerol ester of fatty acid - PGE, triglycerides of fatty acids - TgMk.



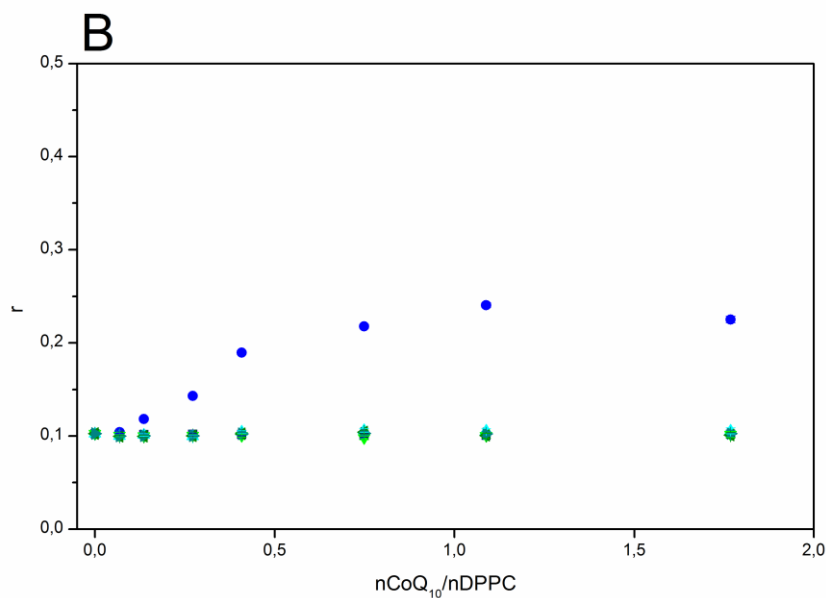
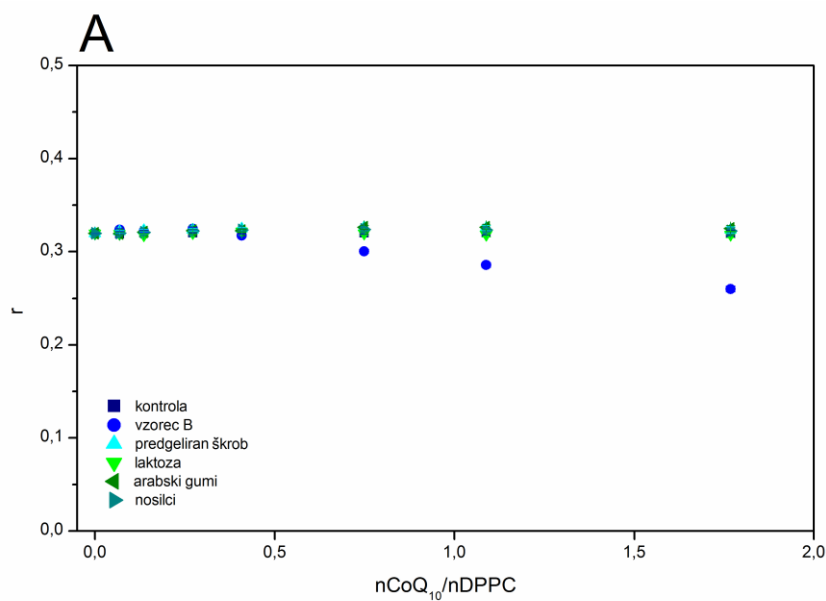
Priloga B3: Spremembe fluorescenčne anizotropije (r) po titraciji SUV pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno vodno suspenzijo emulzije CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec A), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode. Nosilci: glicerol, sojin lecitin, poliglicerol ester maščobne kisline - PGE, trigliceridi maščobnih kislin - TgMk.

Appendix B3: The changes in fluorescence anisotropy (r) after titration of SUV constituted from PC and SM mix (2,4:1) with water suspension of CoQ₁₀ emulsion or components of carriers present in this formulation (Sample A) with the CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore DPH; A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control. Carriers: glycerol, soy lecithin, polyglycerol ester of fatty acid - PGE, triglycerides of fatty acids - TgMk.



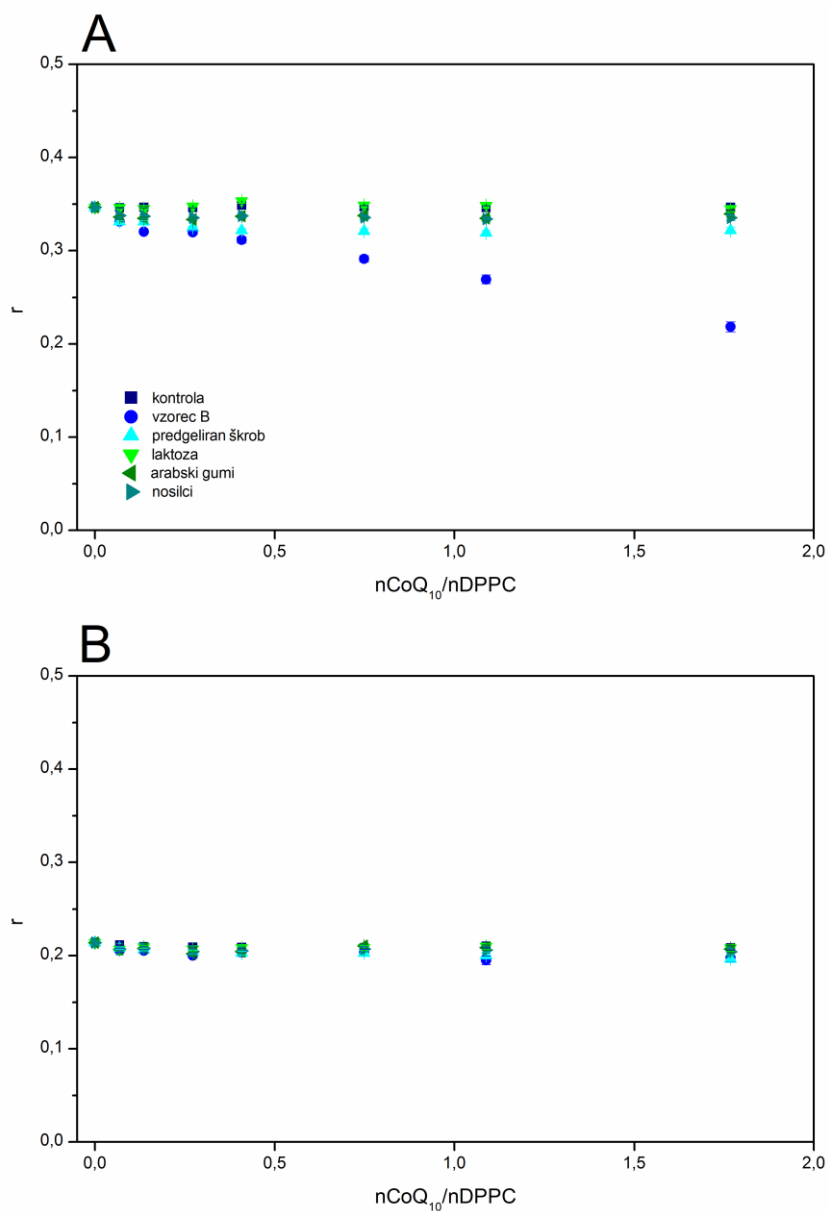
Priloga B4: Spremembe fluorescenčne anizotropije (r) po titraciji SUV pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo emulzije CoQ_{10} oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec A), s koncentracijo CoQ_{10} 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode. Nosilci: glicerol, sojin lecitin, poliglicerol ester maščobne kisline - PGE, trigliceridi maščobnih kislin - TgMk.

Appendix B4: The changes in fluorescence anisotropy (r) after titration of SUV constituted from PC and SM mix (2,4:1) with water suspension of CoQ_{10} emulsion or components of carriers present in this formulation (Sample A) with the CoQ_{10} concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore TMA-DPH; A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control. Carriers: glycerol, soy lecithin, polyglycerol ester of fatty acid - PGE, triglycerides of fatty acids -TgMk.



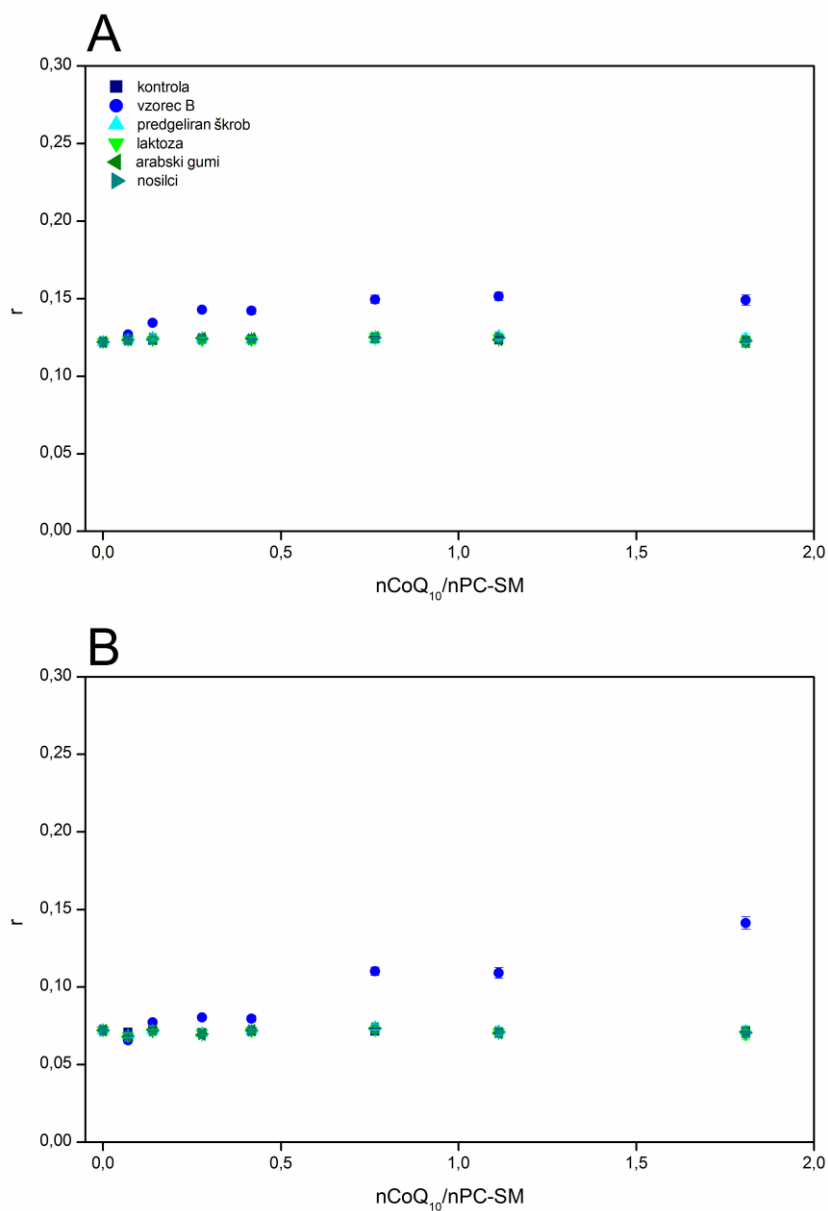
Priloga B5: Spremembe fluorescenčne anizotropije (r) po titraciji SUV pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec B), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode. Nosilci: predgeliran škrob, arabski gumi in laktoza.

Appendix B5: The changes in fluorescence anisotropy (r) after titration of SUV constituted from DPPC with water suspension of water soluble CoQ₁₀ formulation or components of carriers present in this formulation (Sample B) with the CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore DPH A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control. Carriers: pregelatinized starch, arabic gum, lactose.



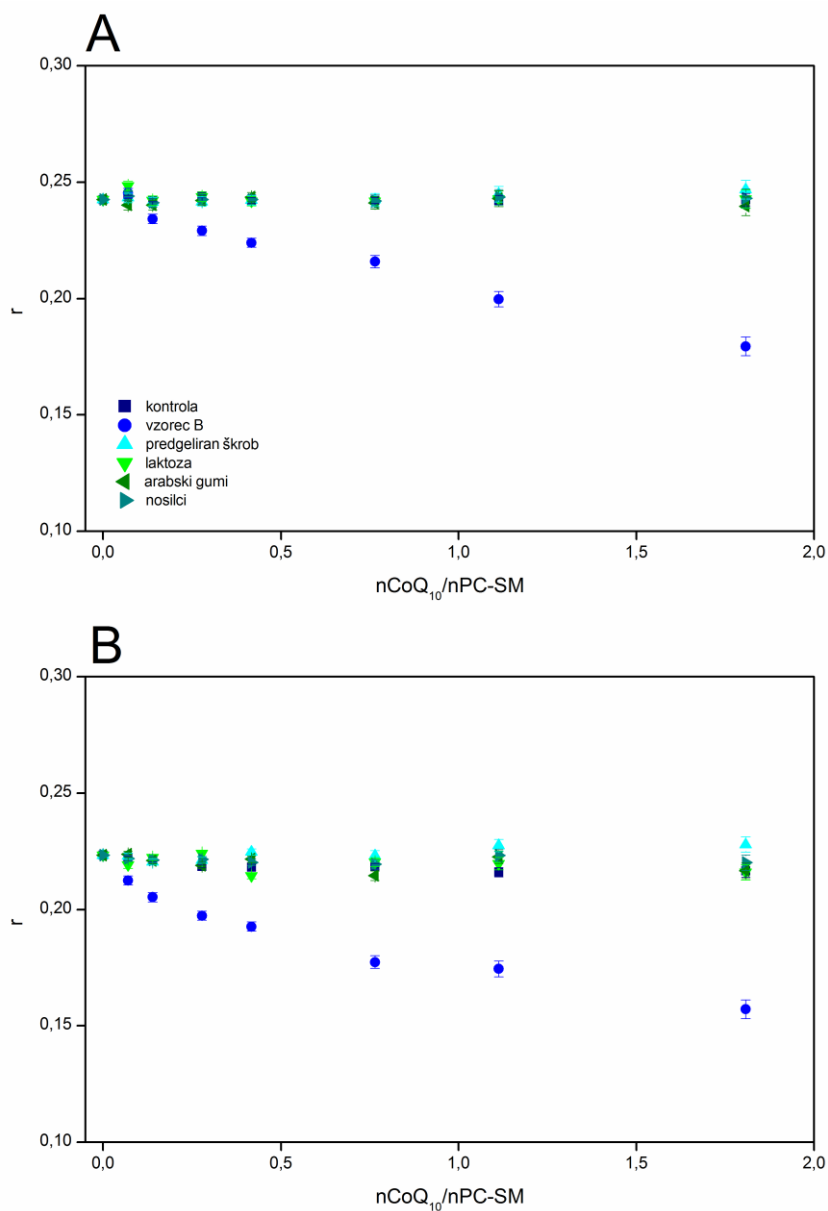
Priloga B6: Spremembe fluorescenčne anizotropije (r) po titraciji SUV pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec B), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode. Nosilci: predgeliran škrob, arabski gumi in laktoza.

Appendix B6: The changes in fluorescence anisotropy (r) after titration of SUV constituted from DPPC with water suspension of water soluble CoQ₁₀ formulation or components of carriers present in this formulation (Sample B) with the CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control. Carriers: pregelatinized starch, arabic gum, lactose.



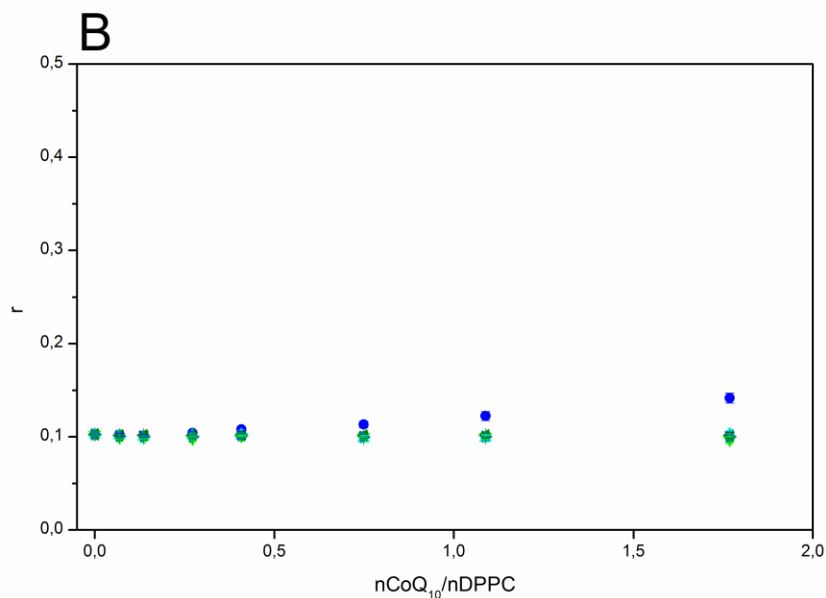
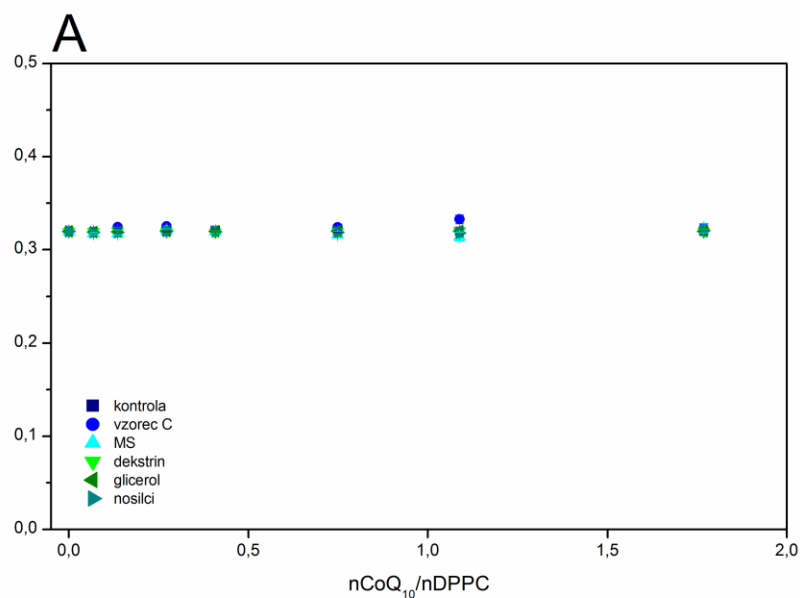
Priloga B7: Spremembe fluorescenčne anizotropije (r) po titraciji SUV pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec B), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode. Nosilci: predgeliran škrob, arabski gumi in laktoza.

Appendix B7: The changes in fluorescence anisotropy (r) after titration of SUV constituted from PC and SM mix (2,4:1) with water suspension of water soluble CoQ₁₀ formulation or components of carriers present in this formulation (Sample B) with the CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore DPH A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control. Carriers: pregelatinized starch, arabic gum, lactose.



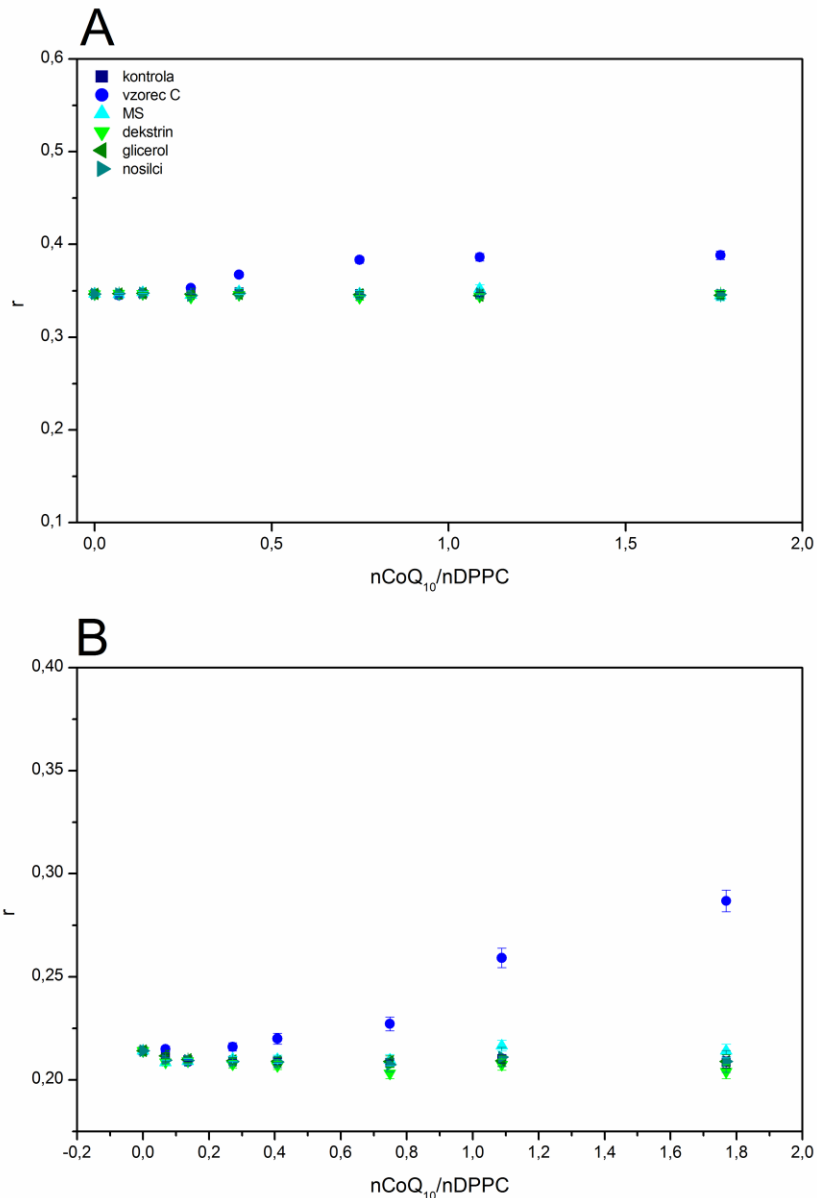
Priloga B8: Spremembe fluorescenčne anizotropije (r) po titraciji SUV pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ_{10} oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec B), s koncentracijo CoQ_{10} 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode. Nosilci: predgeliran škrob, arabski gumi in laktoza.

Appendix B8: The changes in fluorescence anisotropy (r) after titration of SUV constituted from PC and SM mix (2,4:1) with water suspension of water soluble CoQ_{10} formulation or components of carriers present in this formulation (Sample B) with the CoQ_{10} concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore TMA-DPH A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control. Carriers: pregelatinized starch, arabic gum, lactose.



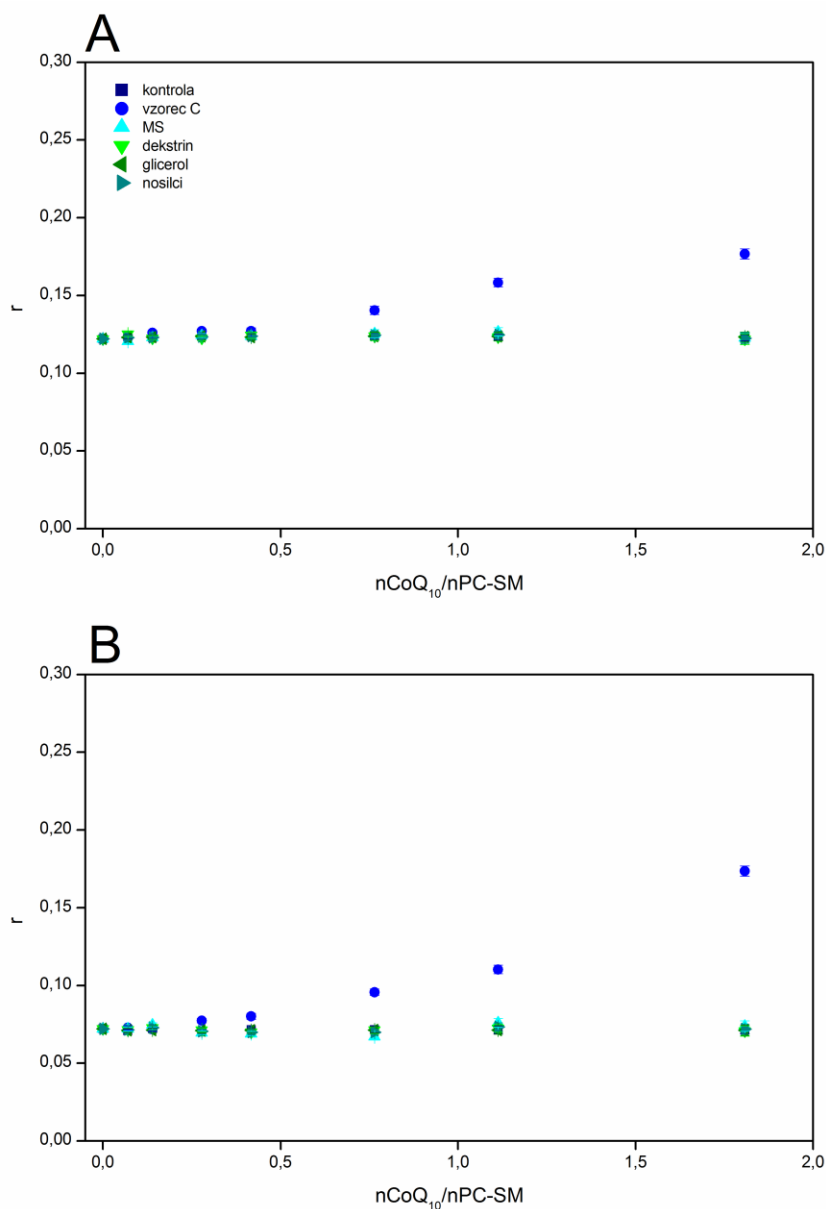
Priloga B9: Spremembe fluorescenčne anizotropije (r) po titraciji SUV pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec C), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode. Nosilci: natrijev oktenilsukcinat škroba (mod. škrob), dekstrin in glicerol.

Appendix B9: The changes in fluorescence anisotropy (r) after titration of SUV constituted from DPPC with water suspension of water soluble CoQ₁₀ formulation or components of carriers present in this formulation (Sample C) with the CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control. Carriers: starch natrium octenylsuccinate (mod. škrob), dextrin, glycerol.



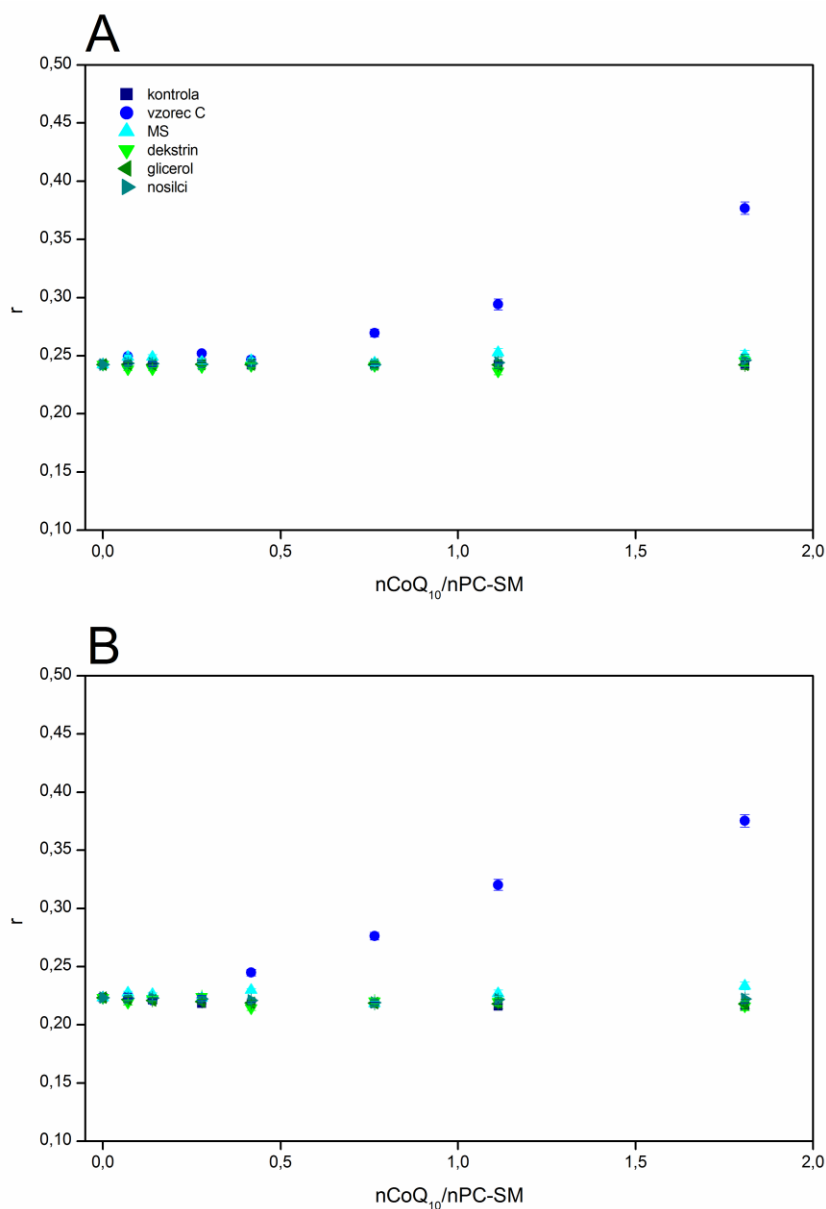
Priloga B10: Spremembe fluorescenčne anizotropije (r) po titraciji SUV pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec C), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode. Nosilci: natrijev oktenilsukcinat škroba (mod. škrob), dekstrin in glicerol.

Appendix B10: The changes in fluorescence anisotropy (r) after titration of SUV constituted from DPPC with water suspension of water soluble CoQ₁₀ formulation or components of carriers present in this formulation (Sample C) with the CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control. Carriers: starch sodium octenylsuccinate (mod. škrob), dextrin, glycerol.



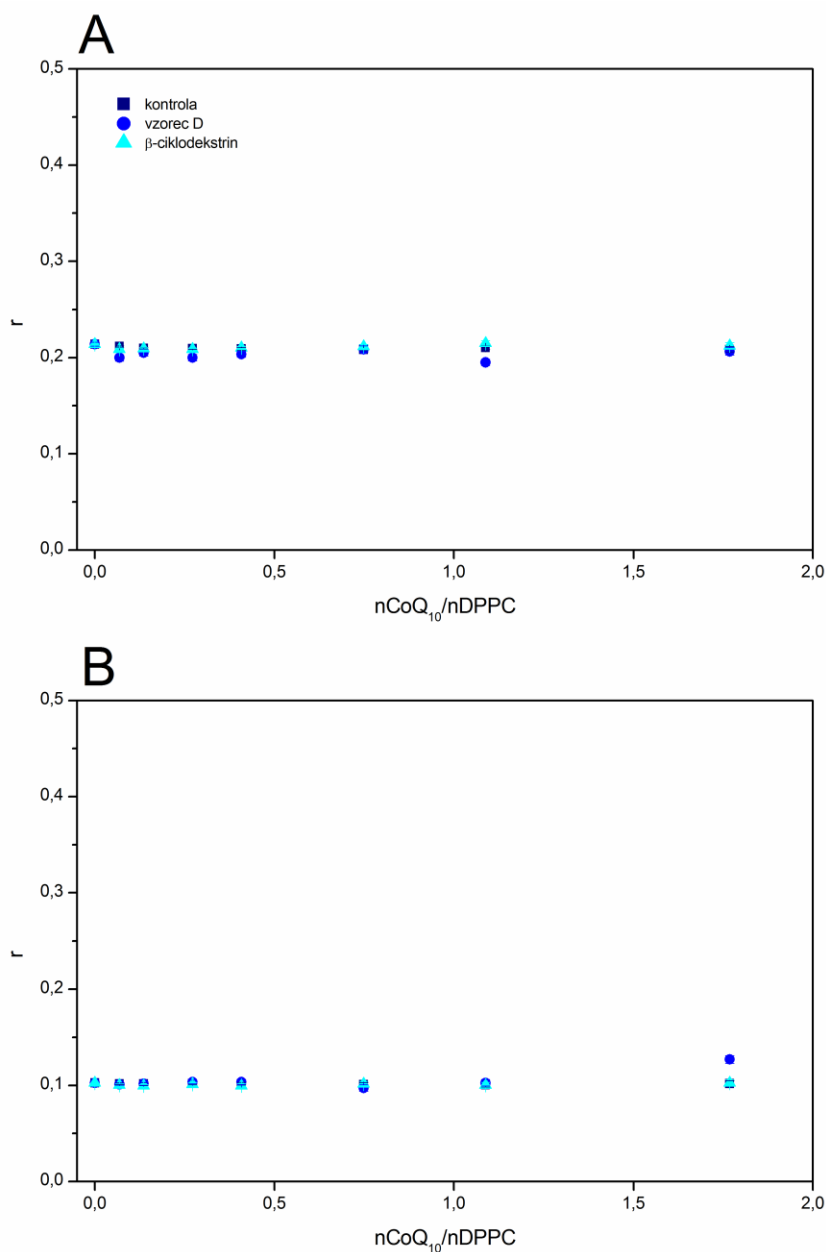
Priloga B11: Spremembe fluorescenčne anizotropije (r) po titraciji SUV pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec C) s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode. Nosilci: natrijev oktenilsukcinat škroba (mod. škrob), dekstrin in glicerol.

Appendix B11: The changes in fluorescence anisotropy (r) after titration of SUV constituted from PC and SM mix (2,4:1) with water suspension of water soluble CoQ₁₀ formulation or components of carriers present in this formulation (Sample C) with the CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore DPH; A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control. Carriers: starch natrium octenylsuccinate (mod. škrob), dextrin, glycerol.



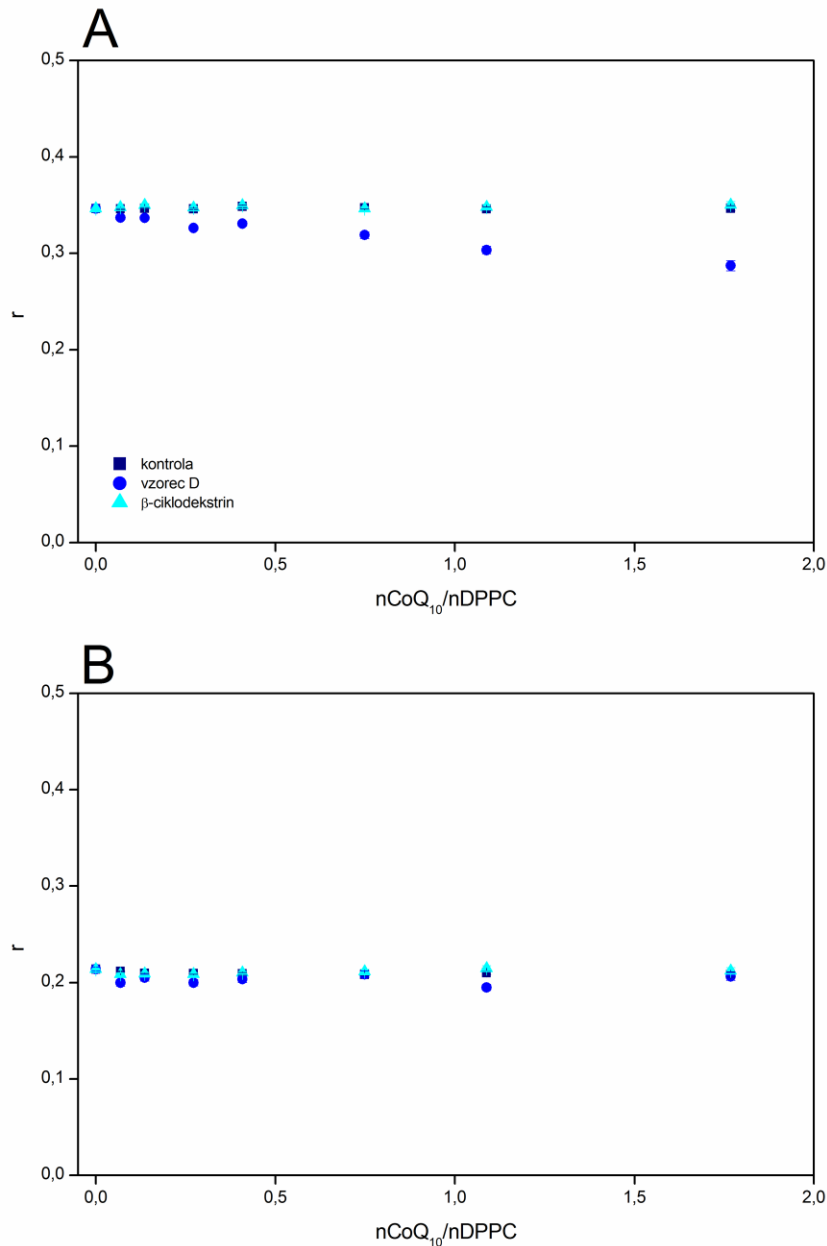
Priloga B12: Spremembe fluorescenčne anizotropije (r) po titraciji SUV pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec C), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode. Nosilci: natrijev oktenilsukcinat škroba (mod. škrob), dekstrin in glicerol.

Appendix B12: The changes in fluorescence anisotropy (r) after titration of SUV constituted from PC and SM mix (2,4:1) with water suspension of water soluble CoQ₁₀ formulation or components of carriers present in this formulation (Sample C) with the CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control. Carriers: starch natrium octenylsuccinate (mod. škrob), dextrin, glycerol.

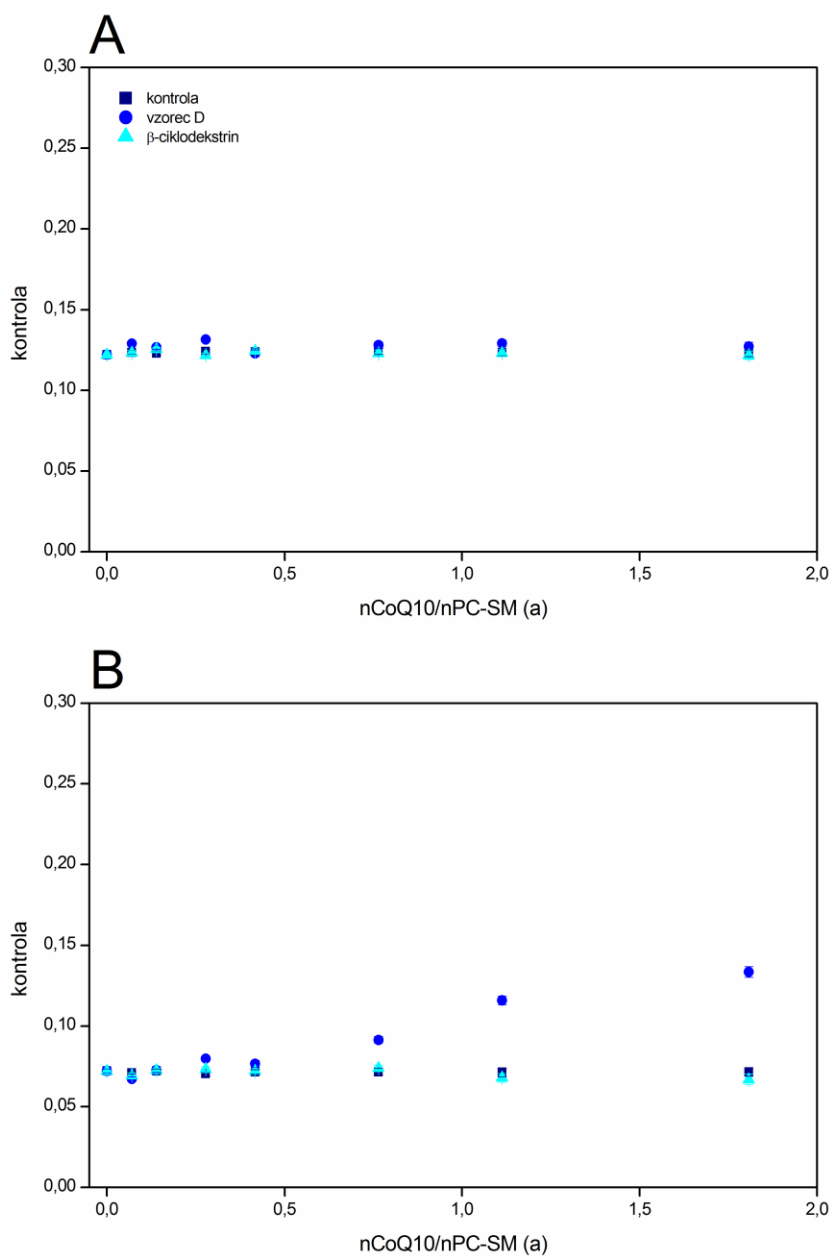


Priloga B13: Spremembe fluorescenčne anizotropije (r) po titraciji SUV pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. nosilca prisotnega v tem pripravku (Vzorec D), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode. Nosilec: β-ciklodekstrin (β-CD).

Appendix B13: The changes in fluorescence anisotropy (r) after titration of SUV constituted from DPPC with water suspension of CoQ₁₀ formulation or carrier present in this formulation (Sample D) with the CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control. Carrier: β-cyclodextrin (β-CD).

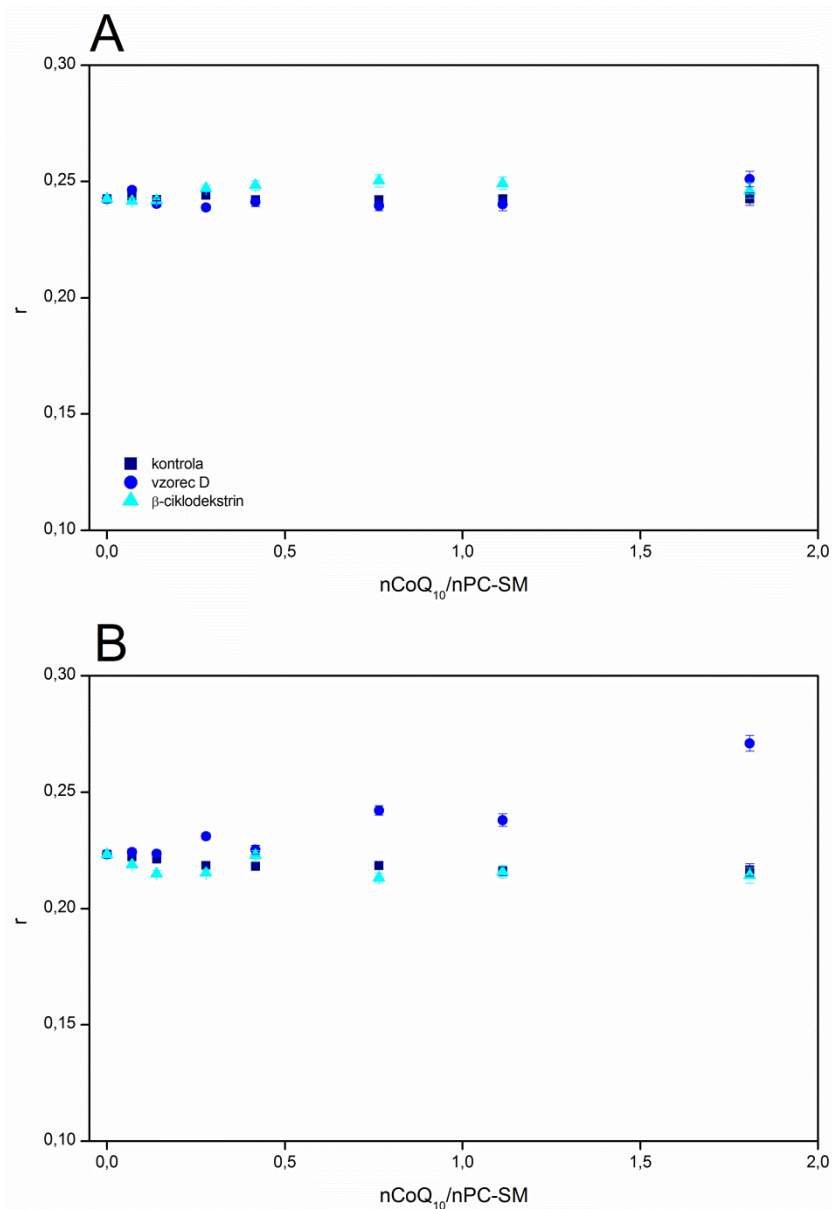


Priloga B14: Spremembe fluorescenčne anizotropije (r) po titraciji SUV pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ10 oz. nosilca prisotnega v tem pripravku (Vzorec D) s koncentracijo 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode. Nosilec: β -ciklodekstrin (β -CD).
 Appendix B14: The changes in fluorescence anisotropy (r) after titration of SUV constituted from DPPC with water suspension of water soluble CoQ10 formulation or carrier present in this formulation (Sample D) with the concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore TMA-DPH.; A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control. Nosilec: β -ciklodekstrin (β -CD).



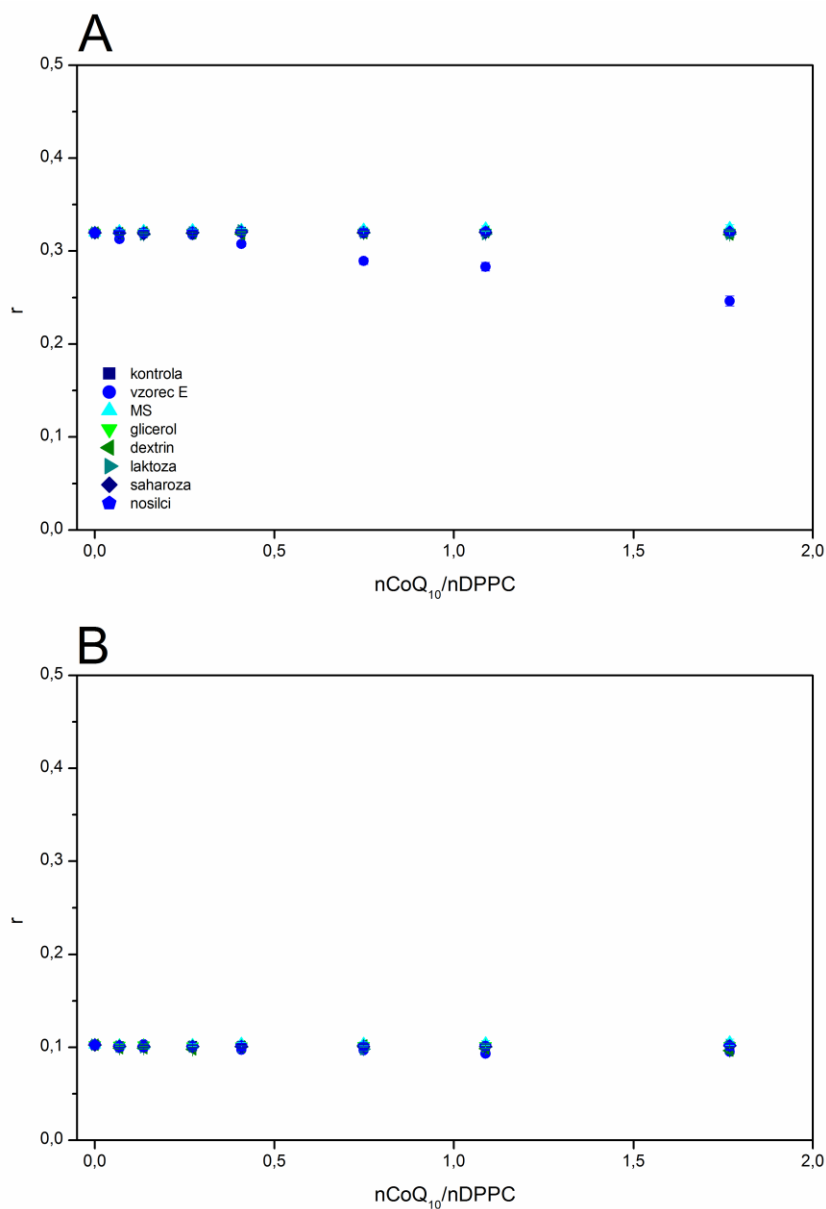
Priloga B15: Spremembe fluorescenčne anizotropije (r) po titraciji SUV pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. nosilca prisotnega v tem pripravku (Vzorec D) s koncentracijo 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode. Nosilec: β-ciklodekstrin (β-CD).

Appendix B15: The changes in fluorescence anisotropy (r) after titration of SUV constituted from PC and SM mix (2,4:1) with water suspension of water soluble CoQ₁₀ formulation or carrier present in this formulation (Sample D) with the concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore DPH; A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control. Carrier: β-ciklodekstrin (β-CD).



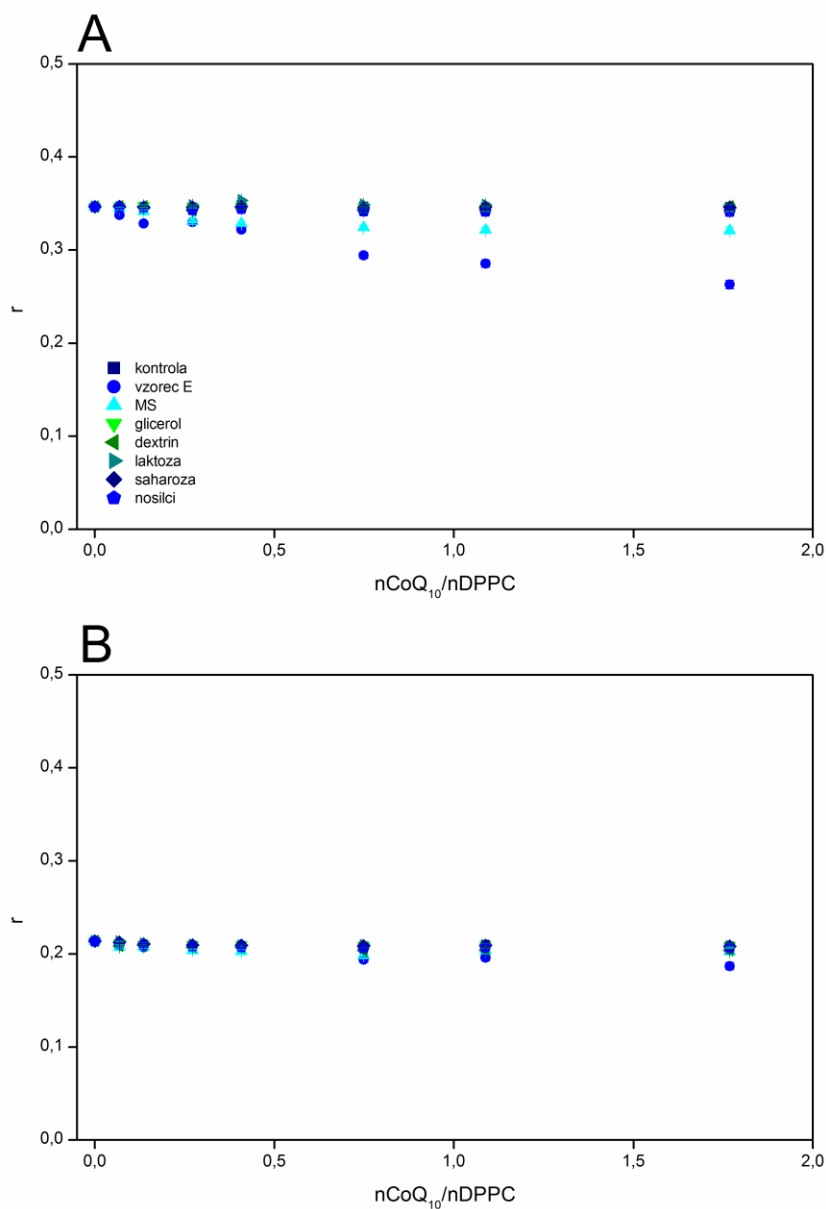
Priloga B16: Spremembe fluorescenčne anizotropije (r) po titraciji SUV pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. nosilca prisotnega v tem pripravku (Vzorec D) s koncentracijo 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode. Nosilec: β-ciklodekstrin (β-CD).

Appendix B16: The changes in fluorescence anisotropy (r) after titration of SUV constituted from PC and SM mix (2,4:1) with water suspension of water soluble CoQ₁₀ formulation or carrier present in this formulation (Sample D) with the concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore TMA-DPH; A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control. Carrier: β-ciklodekstrin (β-CD).



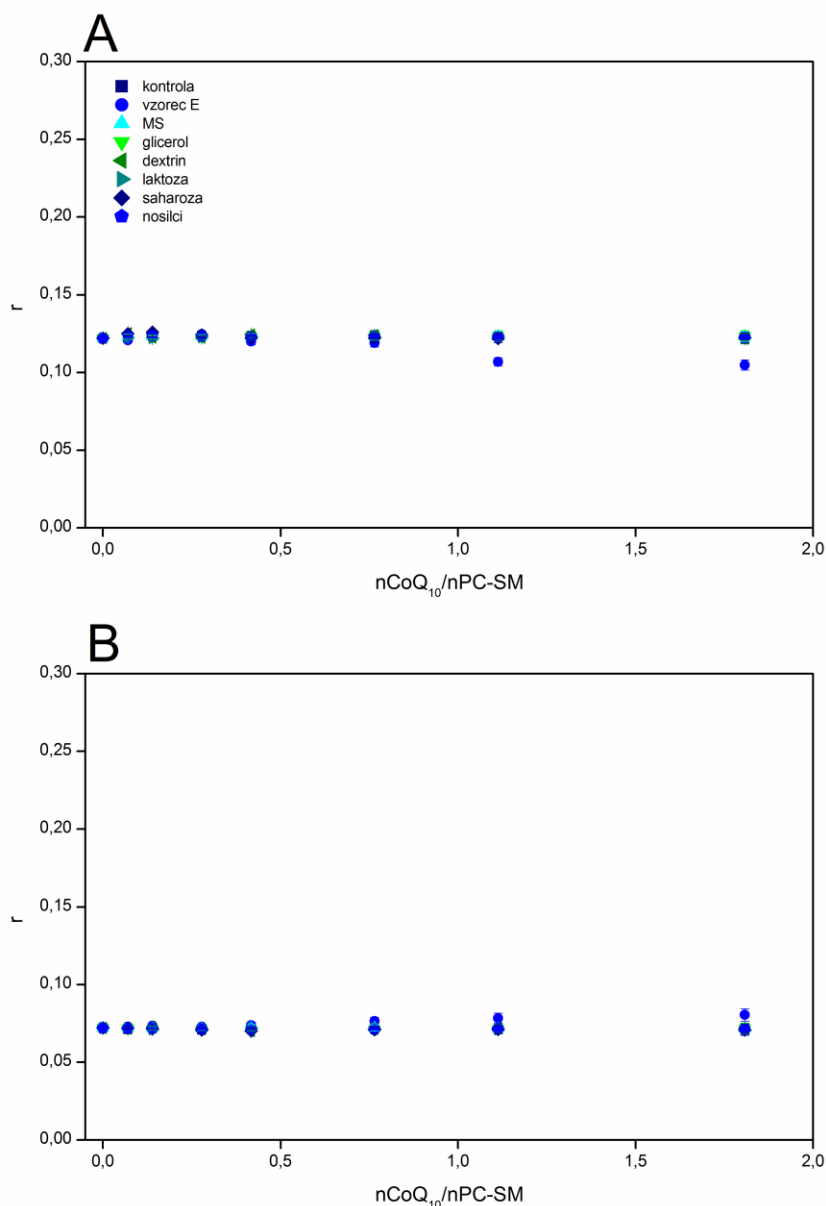
Priloga B17: Spremembe fluorescenčne anizotropije (r) po titraciji SUV pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ_{10} oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec E), s koncentracijo CoQ_{10} 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode. Nosilci: natrijev oktenilsukcinat škroba (mod. škrob), saharoza, laktoza, dekstrin in glicerol.

Appendix B17: The changes in fluorescence anisotropy (r) after titration of SUV constituted from DPPC with water suspension of CoQ_{10} formulation or components of carriers present in this formulation (Sample E) with the CoQ_{10} concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control. Carriers: starch natrium octenylsuccinate (mod. škrob), sacharose, lactose, dextrin, glycerol.



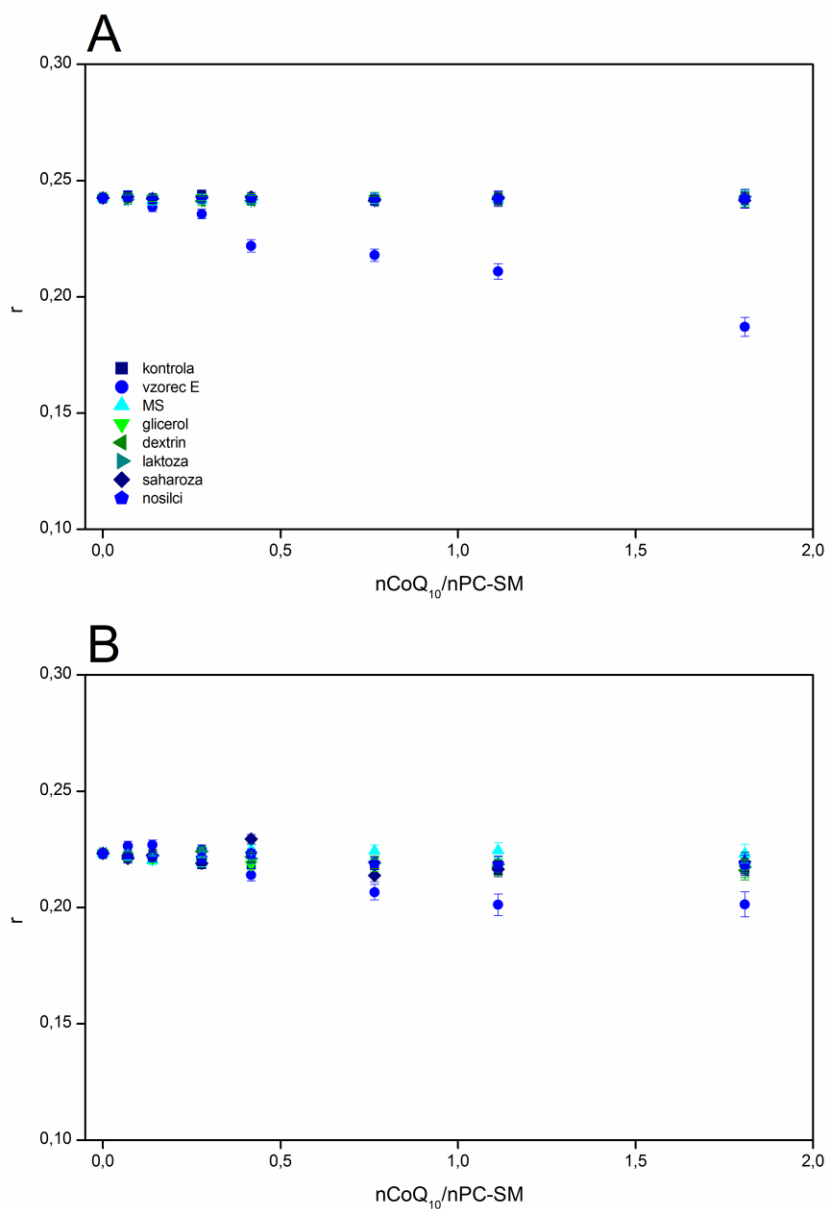
Priloga B18: Spremembe fluorescenčne anizotropije (r) po titraciji SUV pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ_{10} oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec E), s koncentracijo CoQ_{10} 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode. Nosilci: natrijev oktenilsukcinat škroba (mod. škrob), saharoza, laktoza, dekstrin in glicerol.

Appendix B18: The changes in fluorescence anisotropy (r) after titration of SUV constituted from DPPC with water suspension of water soluble CoQ_{10} formulation or components of carriers present in this formulation (Sample E) with the CoQ_{10} concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control. Carriers: starch sodium octenylsuccinate (mod. škrob), sacharose, lactose, dextrin, glycerol.



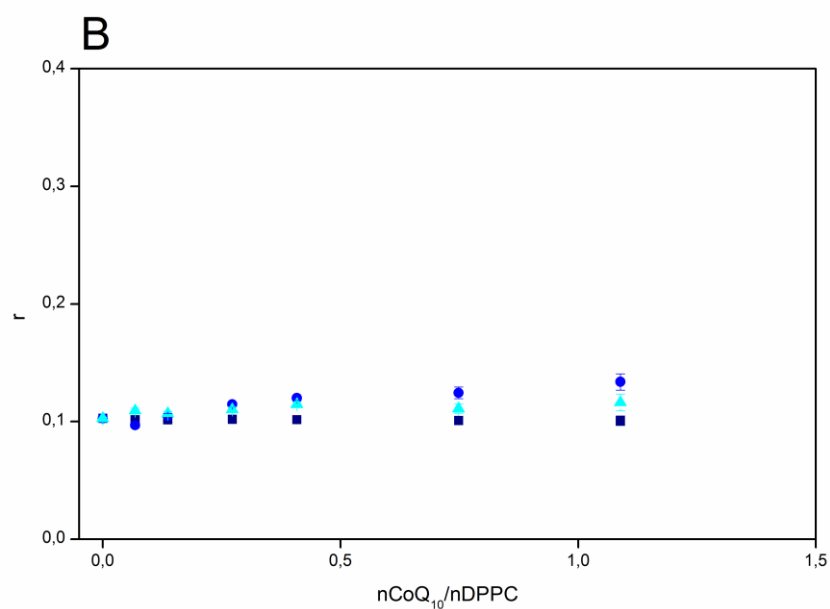
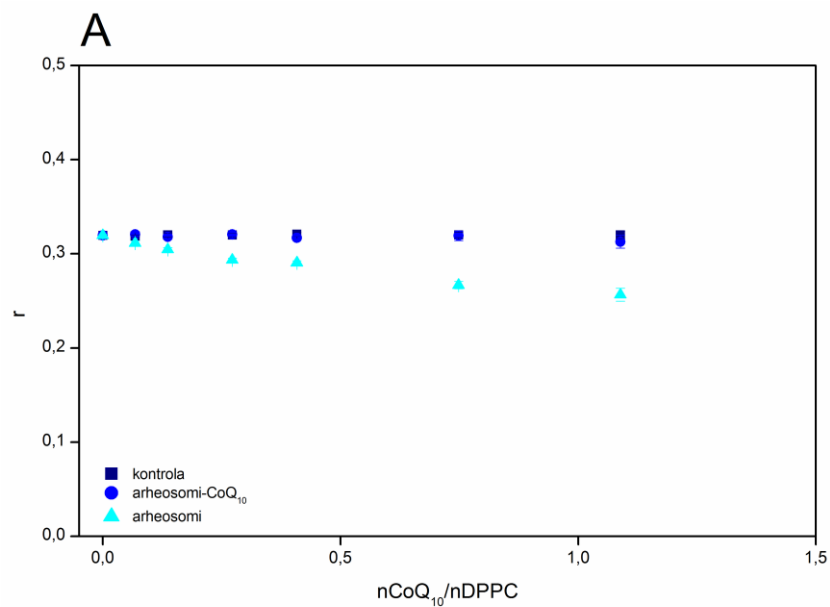
Priloga B19: Spremembe fluorescenčne anizotropije (r) po titraciji SUV pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec E), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode. Nosilci: natrijev oktenilsukcinat škroba (mod. škrob), saharoza, laktoza, dekstrin in glicerol.

Appendix B19: The changes in fluorescence anisotropy (r) after titration of SUV constituted from PC and SM mix (2,4:1) with water suspension of water soluble CoQ₁₀ formulation or components of carriers present in this formulation (Sample E) with the CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control. Carriers: starch natrium octenylsuccinate (mod. škrob), sacharose, lactose, dextrin, glycerol.



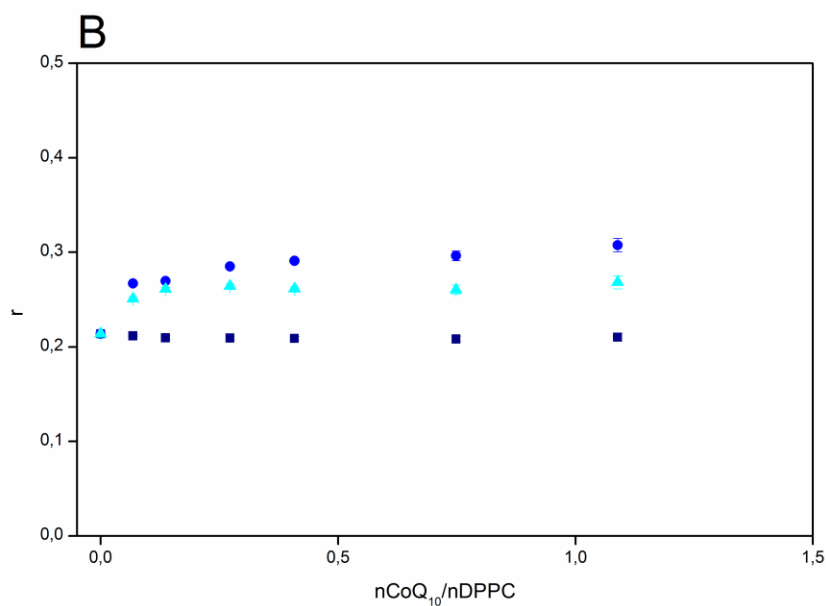
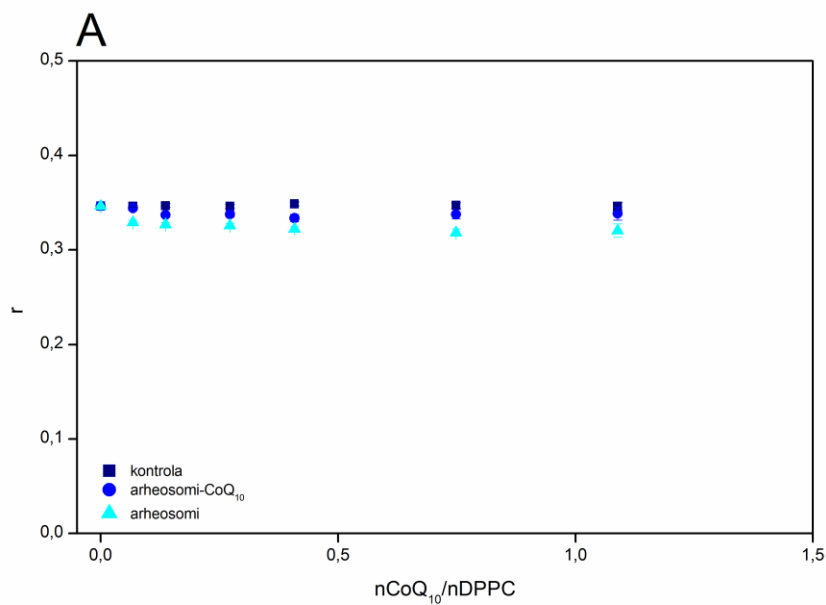
Priloga B20: Spremembe fluorescenčne anizotropije (r) po titraciji SUV pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo vodotopnega pripravka CoQ₁₀ oz. komponent nosilcev prisotnih v tem pripravku (Vzorec E), s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode. Nosilci: natrijev oktenilsukcinat škroba (mod. škrob), saharoza, laktoza, dekstrin in glicerol.

Appendix B20: The changes in fluorescence anisotropy (r) after titration of SUV constituted from PC and SM mix (2,4:1) with water suspension of water soluble CoQ₁₀ formulation or components of carriers present in this formulation (Sample E) with the CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control. Carriers: starch natrium octenylsuccinate (mod. škrob), sacharose, lactose, dextrin, glycerol.



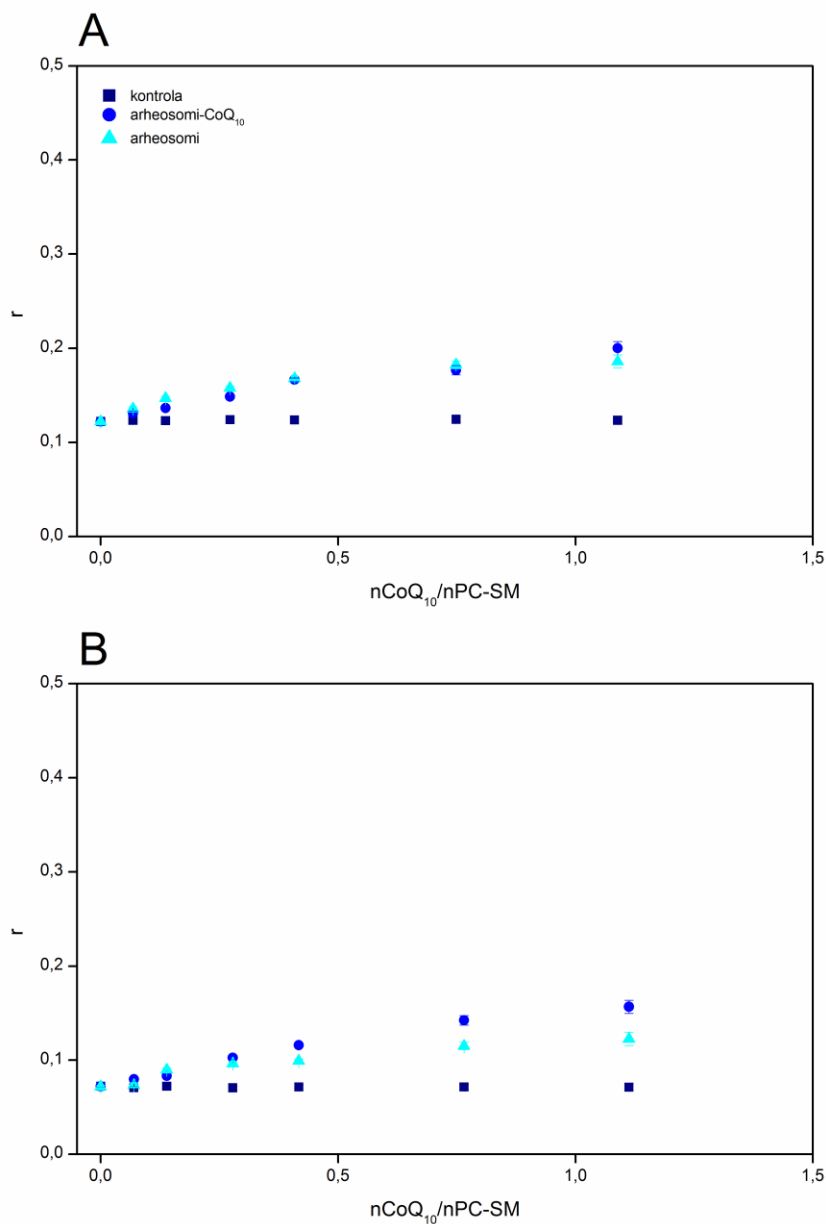
Priloga B21: Spremembe fluorescenčne anizotropije (r) po titraciji SUV pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo SUV arheosomov z 10 % CoQ₁₀ oz. samih arheosomov s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode.

Appendix B21: The changes in fluorescence anisotropy (r) after titration of SUV constituted from DPPC with water suspension of SUV archaeosomes with 10 % CoQ₁₀ or pure archaeosomes with CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore DPH; A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control.



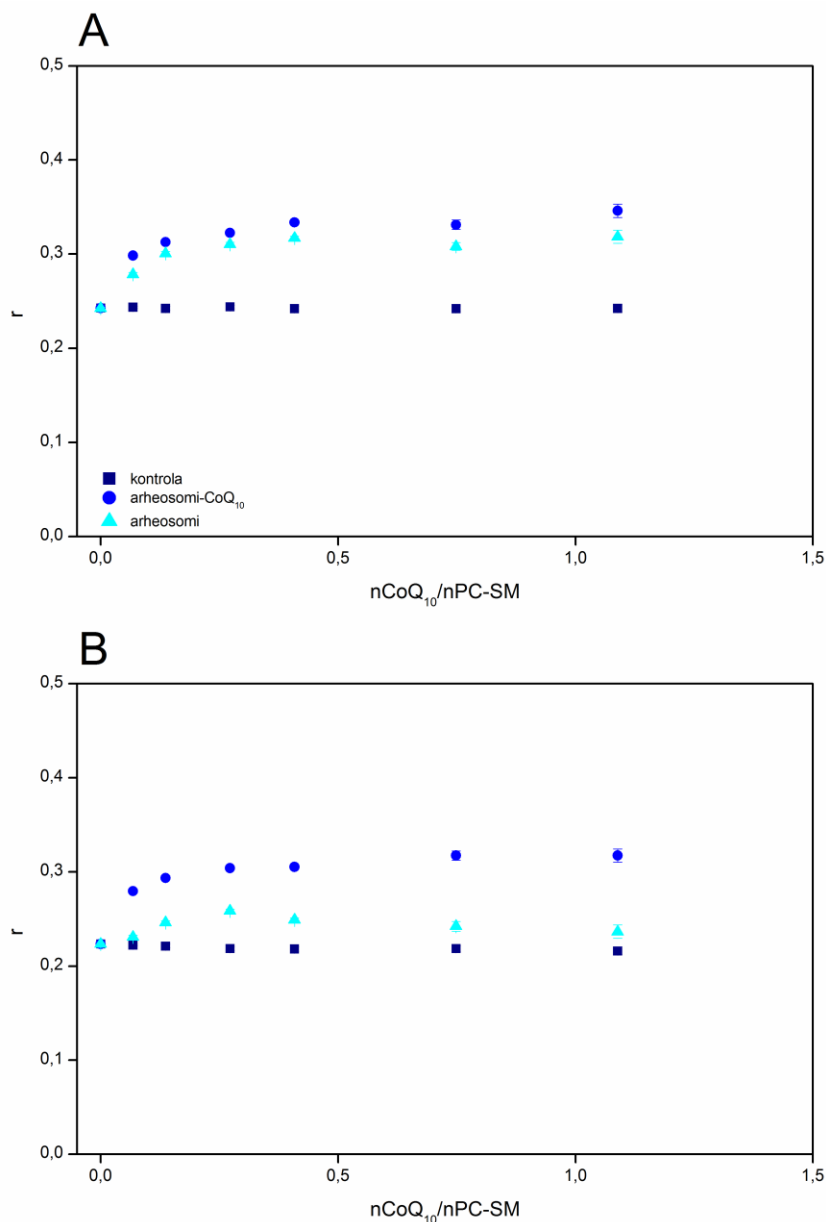
Priloga B22: Spremembe fluorescenčne anizotropije (r) po titraciji SUV pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo SUV arheosomov z 10 % CoQ₁₀ oz. samih arheosomov s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode.

Appendix B22: The changes in fluorescence anisotropy (r) after titration of SUV constituted from DPPC with water suspension of SUV archaeosomes with 10 % CoQ₁₀ or pure archaeosomes with CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore TMA-DPH; A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control.



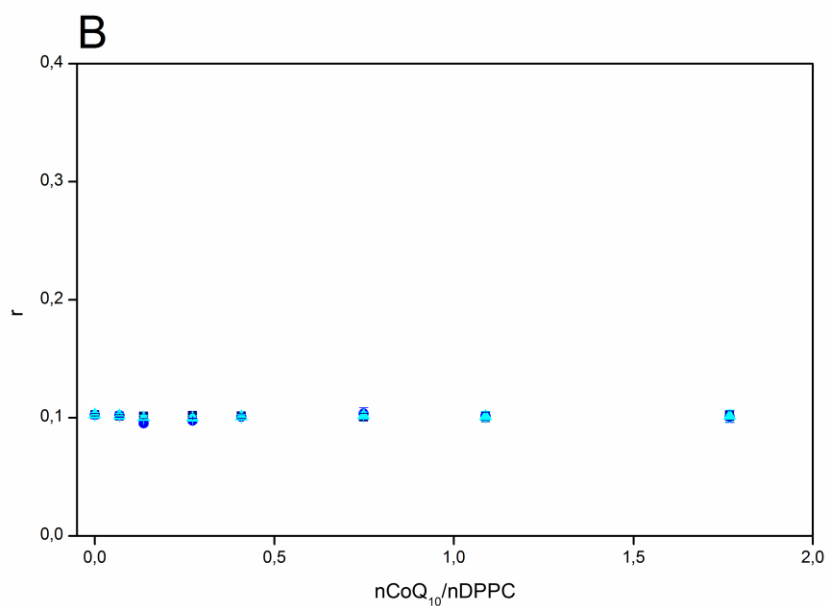
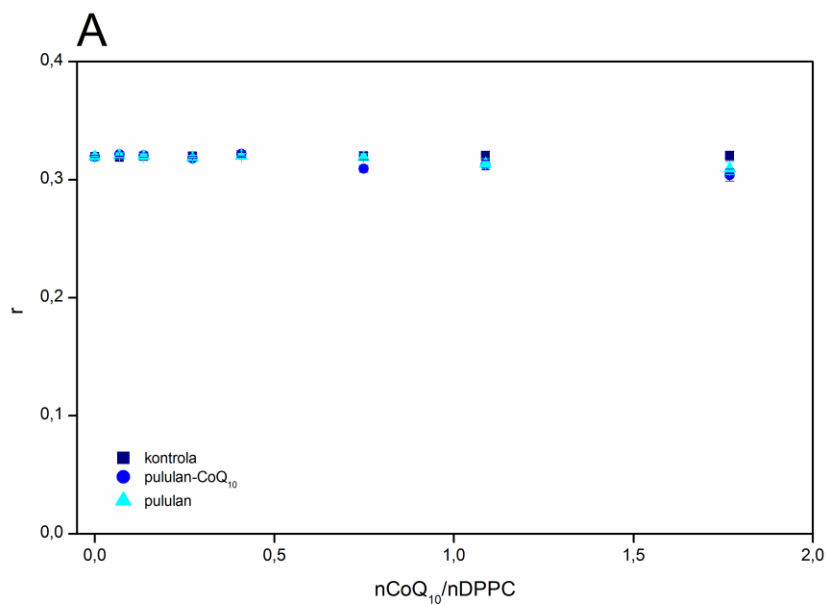
Priloga B23: Spremembe fluorescenčne anizotropije (r) po titraciji SUV pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo SUV arheosomov z 10 % CoQ₁₀ oz. samih arheosomov s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode.

Appendix B23: The changes in fluorescence anisotropy (r) after titration of SUV constituted from PC and SM mix (2,4:1) with water suspension of SUV archaeosomes with 10 % CoQ₁₀ or pure archaeosomes with CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore DPH; A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control.



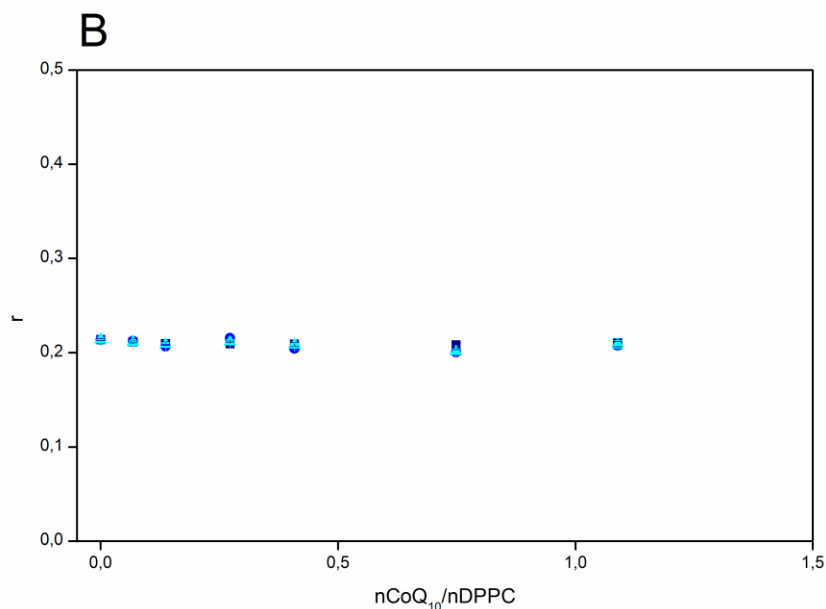
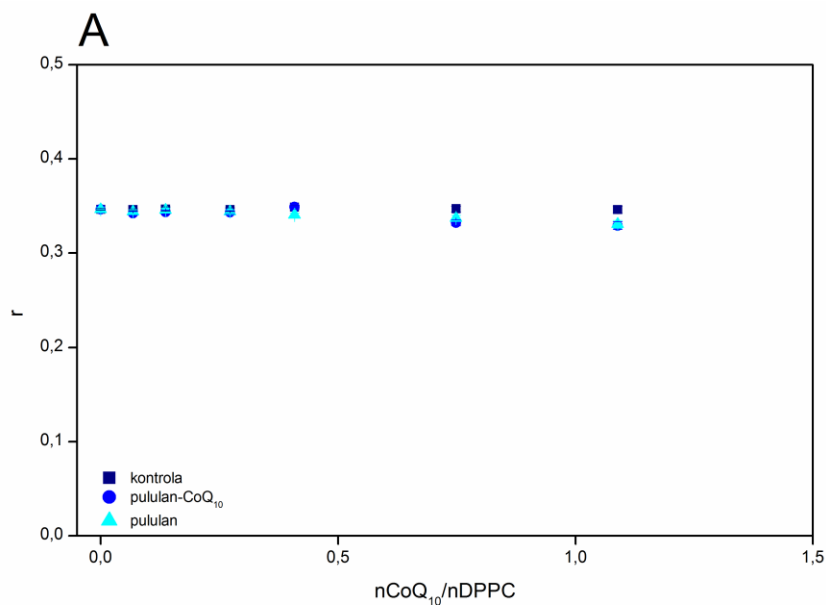
Priloga B24: Spremembe fluorescenčne anizotropije (r) po titraciji SUV pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo SUV arheosomov z 10 % CoQ₁₀ oz. samih arheosomov s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode.

Appendix B24: The changes in fluorescence anisotropy (r) after titration of SUV constituted from PC and SM mix (2,4:1) with water suspension of SUV archaeosomes with 10 % CoQ₁₀ or pure archaeosomes with CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore TMA-DPH; A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control.



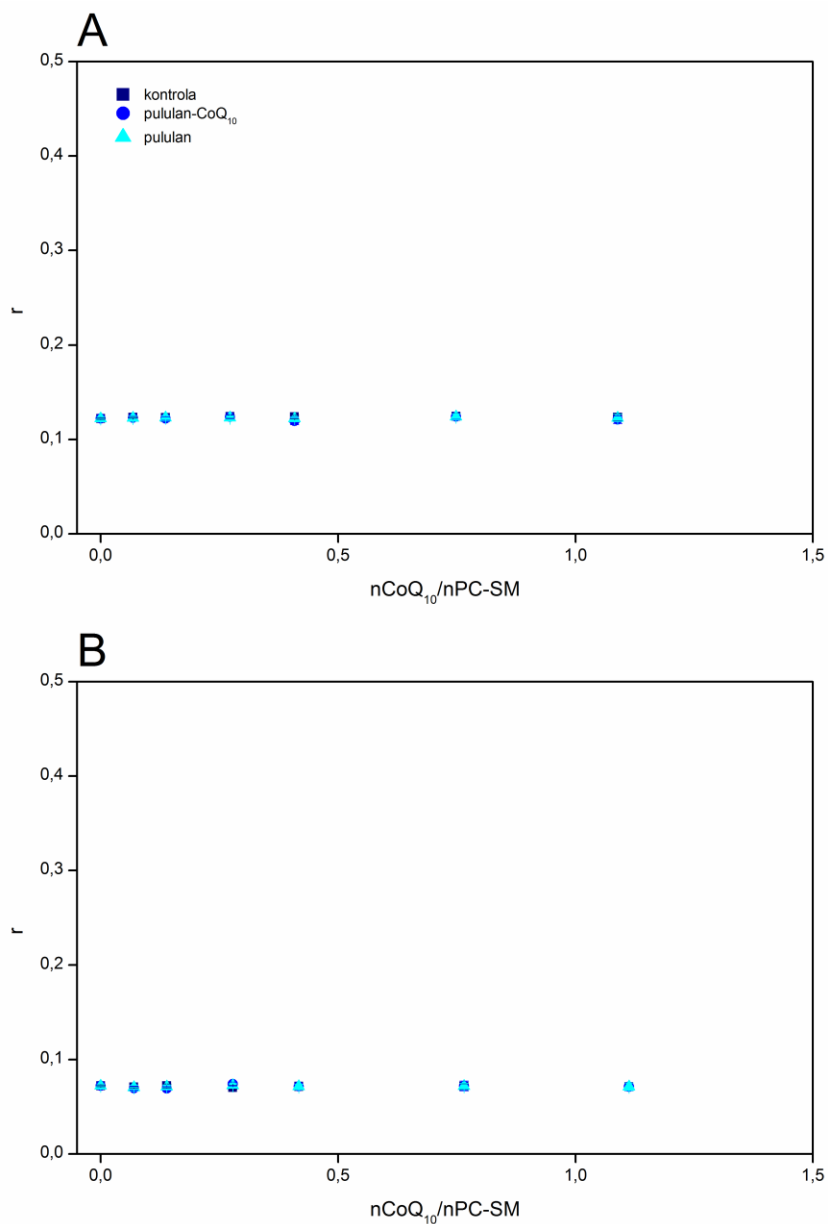
Priloga B25: Spremembe fluorescenčne anizotropije (r) po titraciji SUV pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo CoQ₁₀ v pululanu oz. samega pululana s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode.

Appendix B25: The changes in fluorescence anisotropy (r) after titration of SUV constituted from DPPC with water suspension of CoQ₁₀ in pullulan or pure pullulan with CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore DPH; A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control.



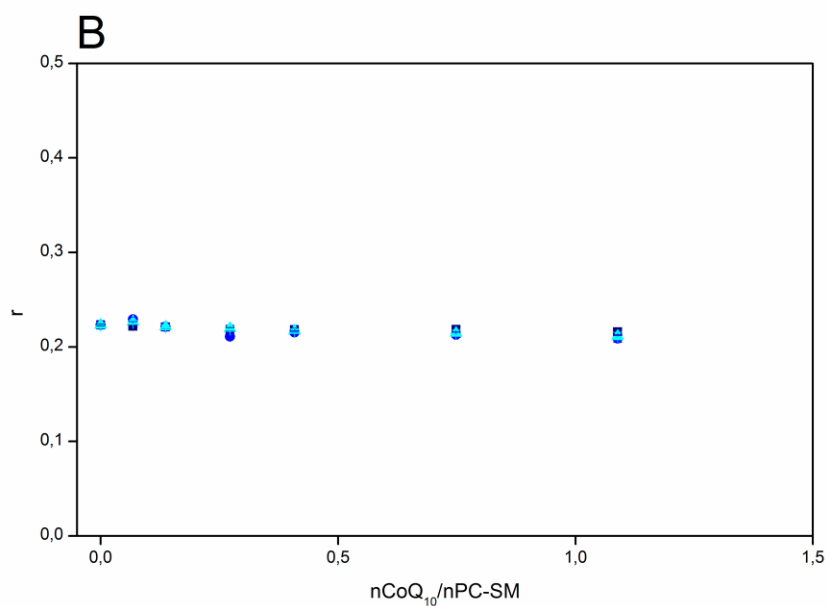
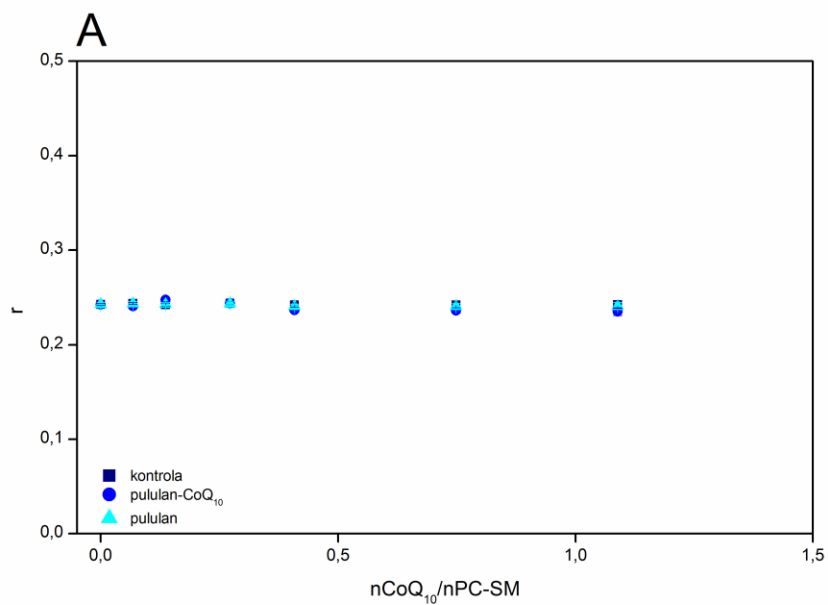
Priloga B26: Spremembe fluorescenčne anizotropije (r) po titraciji SUV pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo CoQ₁₀ v pululanu oz. samega pululana s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode.

Appendix B26: The changes in fluorescence anisotropy (r) after titration of SUV constituted from DPPC with water suspension of CoQ₁₀ in pullulan or pure pullulan with CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore TMA-DPH; A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control.



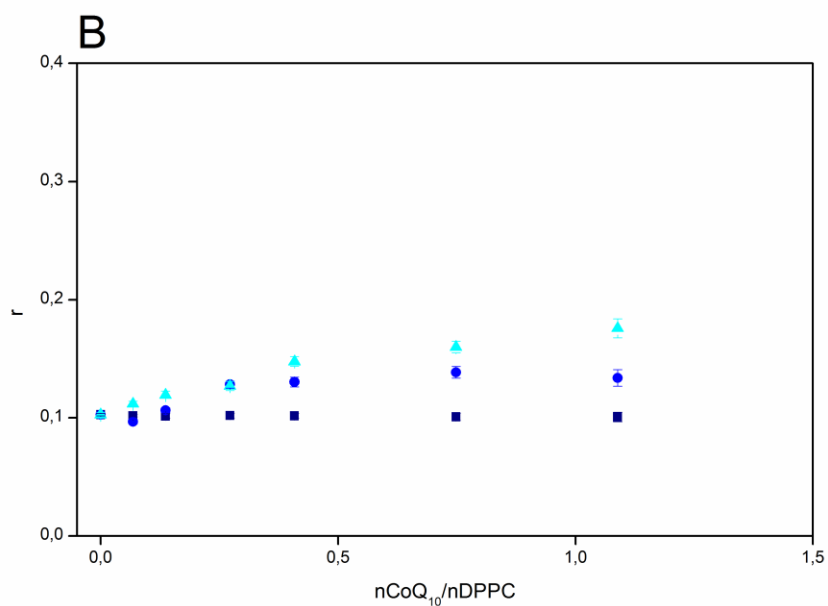
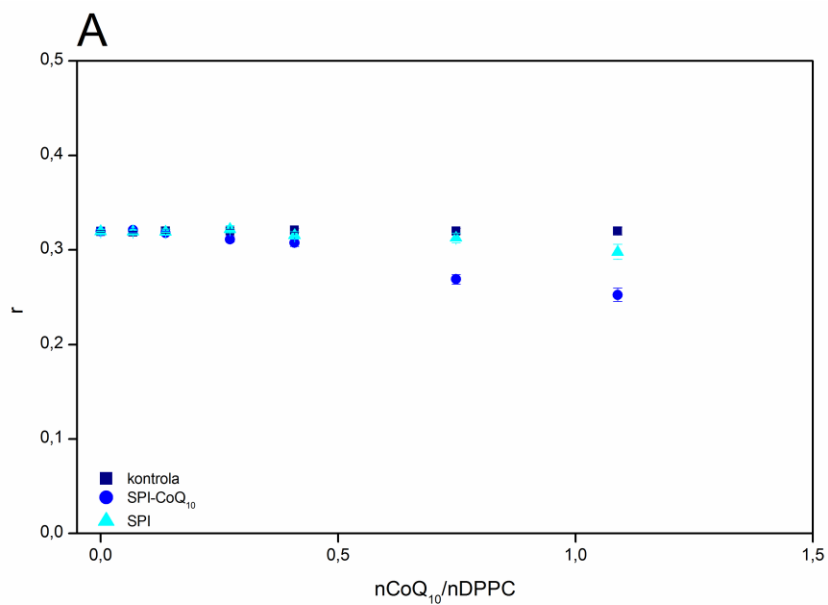
Priloga B27: Spremembe fluorescenčne anizotropije (r) po titraciji SUV pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo CoQ₁₀ v pululanu oz. samega pululana s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode.

Appendix B27: The changes in fluorescence anisotropy (r) after titration of SUV constituted from PC and SM mix (2,4:1) with water suspension of CoQ₁₀ in pullulan or pure pullulan with CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore DPH; A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control.



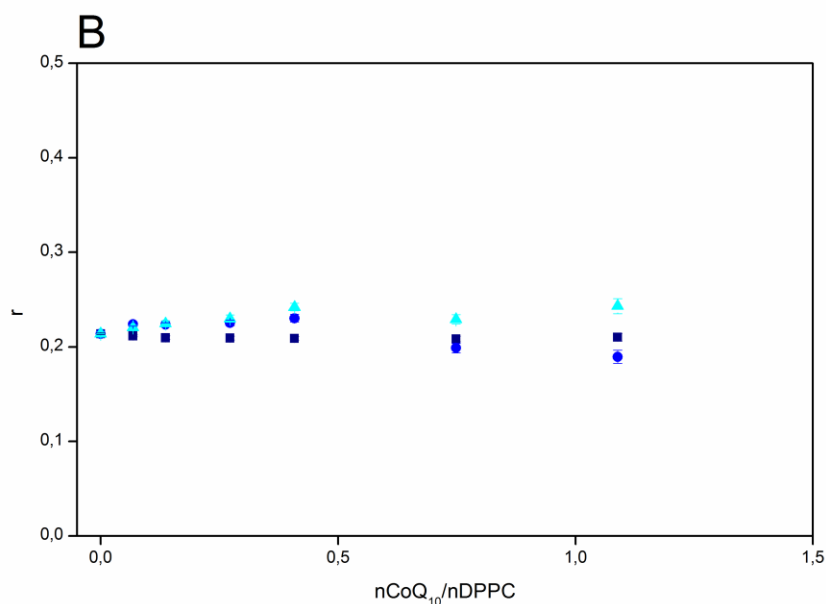
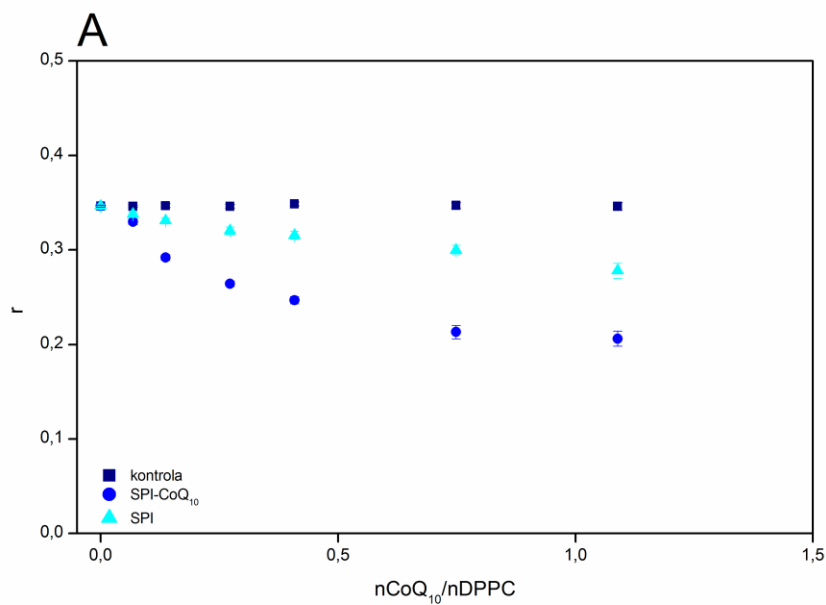
Priloga B28: Spremembe fluorescenčne anizotropije (r) po titraciji SUV pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo CoQ₁₀ v pululanu oz. samega pululana s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. . Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode.

Appendix B28: The changes in fluorescence anisotropy (r) after titration of SUV constituted from PC and SM mix (2,4:1) with water suspension of CoQ₁₀ in pullulan or pure pullulan with CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore TMA-DPH; A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control.



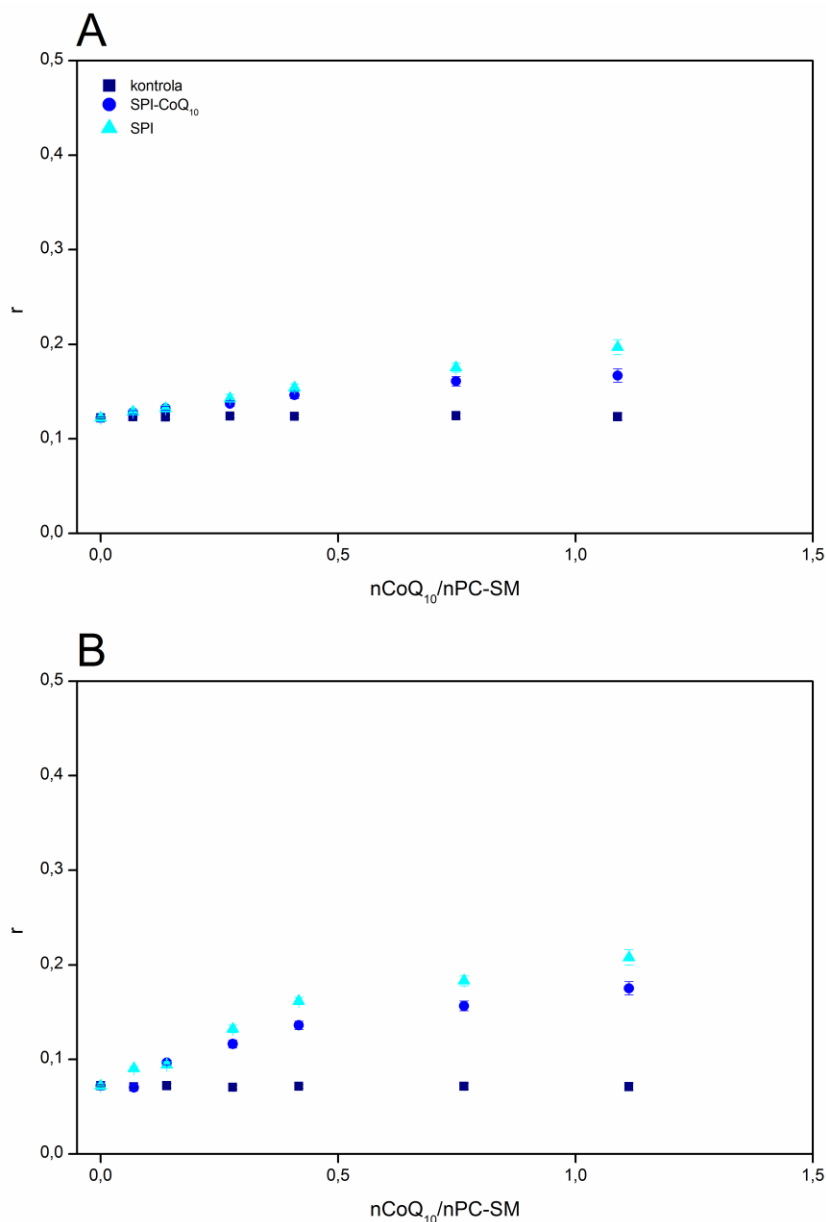
Priloga B29: Spremembe fluorescenčne anizotropije (r) po titraciji SUV pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo CoQ₁₀ v izolatu sojinih proteinov (SPI) oz. samega SPI s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. . Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode.

Appendix B29: The changes in fluorescence anisotropy (r) after titration of SUV constituted from DPPC with water suspension of CoQ₁₀ in soy protein isolate (SPI) or pure SPI with CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore DPH; A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control.



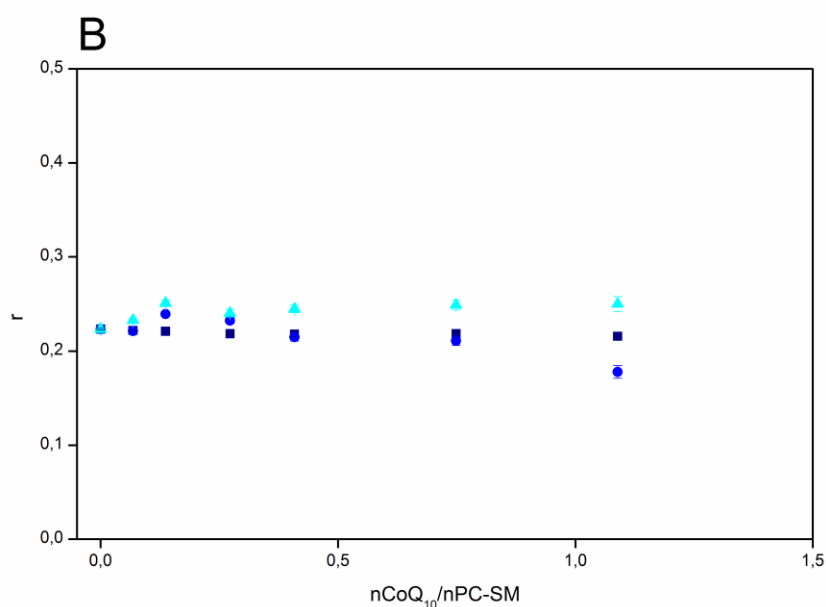
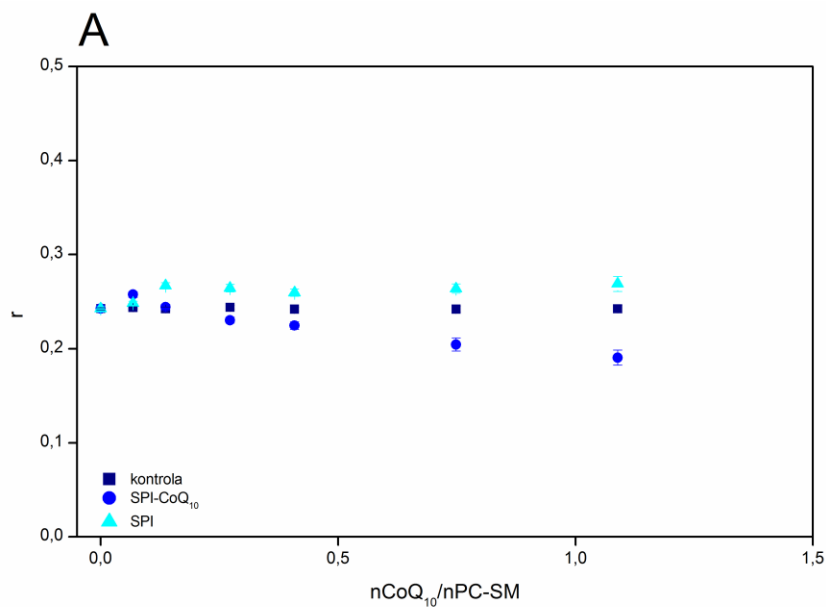
Priloga B30: Spremembe fluorescenčne anizotropije (r) po titraciji SUV pripravljenih iz DPPC z vodno suspenzijo CoQ₁₀ v izolatu sojinih proteinov (SPI) oz. samega SPI s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode.

Appendix B30: The changes in fluorescence anisotropy (r) after titration of SUV constituted from DPPC with water suspension of CoQ₁₀ in soy protein isolate (SPI) or pure SPI with CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore TMA-DPH; A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control.



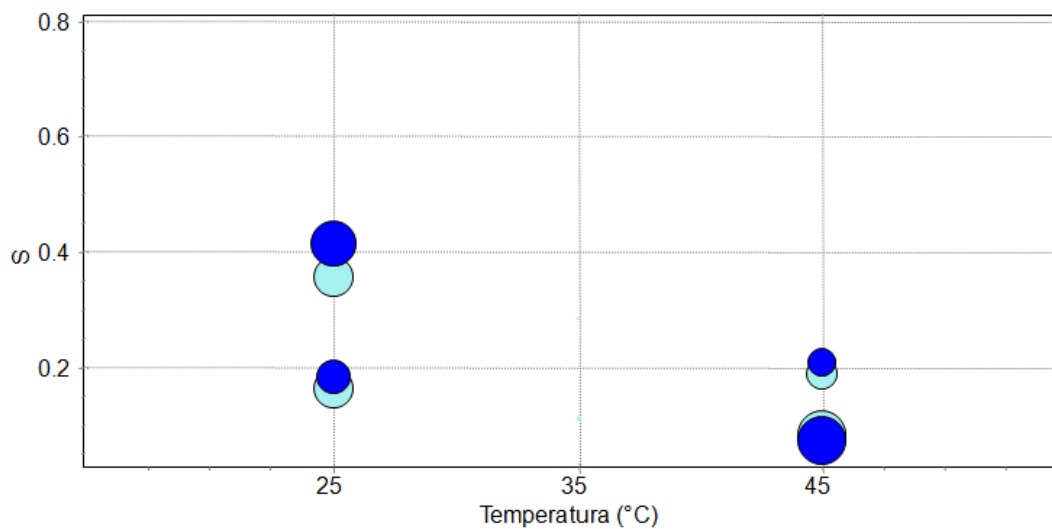
Priloga B31: Spremembe fluorescenčne anizotropije (r) po titraciji SUV pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo CoQ₁₀ v izolatu sojinih proteinov (SPI) oz. samega SPI s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode.

Appendix B31: The changes in fluorescence anisotropy (r) after titration of SUV constituted from PC and SM mix (2,4:1) with water suspension of CoQ₁₀ in soy protein isolate (SPI) or pure SPI with CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore DPH; A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control



Priloga B32: Spremembe fluorescenčne anizotropije (r) po titraciji SUV pripravljenih iz mešanice PC in SM (2,4:1) z vodno suspenzijo CoQ₁₀ v izolatu sojinih proteinov (SPI) oz. samega SPI s koncentracijo CoQ₁₀ 2 mg/mL v prisotnosti fluoroforja TMA-DPH. A – 25 °C, B – 45 °C. Kot kontrola je bila uporabljena suspenzija liposomov z dodatkom ustrezne količine vode.

Appendix B32: The changes in fluorescence anisotropy (r) after titration of SUV constituted from PC and SM mix (2,4:1) with water suspension of CoQ₁₀ in soy protein isolate (SPI) or pure SPI with CoQ₁₀ concentration of 2 mg/mL in the presence of fluorophore TMA-DPH; A – 25 °C, B – 45 °C. Liposomal suspension with appropriate amount of water was used for control.



Priloga C: Rezultat računalniške simulacije eksperimentalnega EPR spektra spinskega označevalca MeFASL(10,3) pri PC-SM liposomih v prisotnosti vodotopnega pripravka CoQ₁₀, kjer so kot nosilci prisotni natrijev oktenilsukcinat škroba, dekstrin in glicerol (vzorec C). Razmerje lipidi:CoQ₁₀=2:1 (mol:mol). Ureditveni parameter (S) in delež posameznih membranskih domen v PC-SM liposomih (molarno razmerje 2,4:1) označenih s spinskim označevalcem MeFASL(10,3) pri 25 °C in 45 °C. Kontrola (miliQ voda) –svetlo modra, vzorec C – temno modra.

Appendix C: Result of computer simulation of experimental EPR spectra of the spin probe MeFASL(10,3) in PC-SM liposomes in the presence of water soluble CoQ₁₀ formulation, where starch sodium octenylsuccinate, dextrin and glycerol are present as carriers (sample C). Lipid : CoQ₁₀ = 2:1; (mol:mol). Lipid order parameter (S) and proportion of membrane domains in PC-SM liposomes (molar ratio 2.4:1) labeled with spin probe MeFASL(10,3) at 25 °C and 45 °C. Control (miliQ water) – light blue, sample C – dark blue.

Priloga D: Rezultati računalniške simulacije eksperimentalnih EPR spekrov z MeFASL(2,11) označenih PC-SM liposomov v prisotnosti CoQ₁₀ in vodotopnih pripravkov CoQ₁₀ (razmerje lipidi:CoQ₁₀=2:1) pri 25 °C (A) in 45 °C (B). D1–najbolj urejena membranska domena; D2- manj urejena membranska domena.

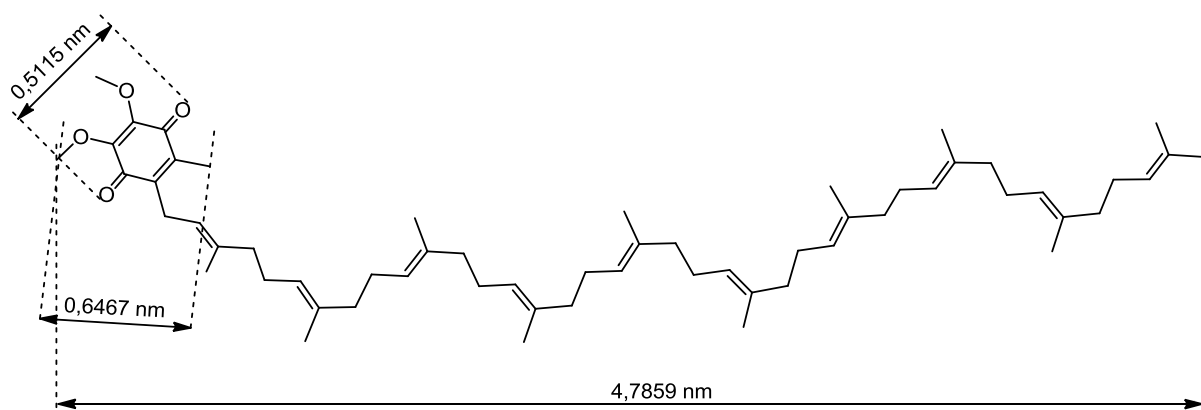
Appendix D: Results of computer simulation of experimental EPR spectra of MeFASL(2,11) labeled PC-SM liposomes in the presence of water soluble CoQ₁₀ formulations (lipid:CoQ₁₀ ratio 2:1) at 25 °C (A) and 45 °C (B). D1 –most ordered membrane domain;D2-les ordered membrane domain.

A

D1	delež	S	dS	tau	dtau	p_A	dp_A
Kontrola	0,016	0,295	-0,007	0,508	-0,169	0,991	0,010
Vzorec A	0,014	0,137	-0,004	0,402	0,169	0,943	0,020
Vzorec B	0,021	0,259	-0,004	0,396	0,075	0,966	-0,008
Vzorec C	0,098	0,280	-0,009	0,449	0,198	0,966	-0,009
Vzorec D	0,040	0,218	-0,010	0,532	0,228	0,971	0,006
Vzorec E	0,019	0,218	-0,003	1,380	0,142	0,964	0,009
Kontrola _{EtOH}	0,010	0,121	-0,004	0,681	0,219	0,953	-0,014
CoQ ₁₀	0,016	0,368	-0,012	0,534	0,082	0,956	-0,014
D2							
Kontrola	0,974	0,085	-0,003	0,707	0,069	0,948	-0,002
Vzorec A	0,974	0,066	-0,003	0,824	0,073	0,936	-0,003
Vzorec B	0,976	0,073	-0,003	0,909	0,116	0,937	-0,004
Vzorec C	0,899	0,082	-0,002	1,030	0,126	0,940	-0,003
Vzorec D	0,956	0,082	-0,002	0,968	0,122	0,944	0,002
Vzorec E	0,978	0,077	-0,004	0,889	0,140	0,942	-0,005
Kontrola _{EtOH}	0,988	0,084	-0,002	0,762	0,076	0,946	0,002
CoQ ₁₀	0,974	0,021	-0,001	0,886	0,092	0,943	-0,001

B

D2*	delež	S	dS	tau	dtau	p_A	dp_A
Kontrola	0,991	0,025	-0,001	0,409	0,037	0,953	0,002
Vzorec A	0,993	0,024	-0,001	0,397	0,035	0,943	-0,002
Vzorec B	0,998	0,023	-0,001	0,465	0,021	0,942	0,001
Vzorec C	0,997	0,024	-0,001	0,493	0,062	0,946	0,003
Vzorec D	1,000	0,024	-0,001	0,480	0,055	0,946	0,002
Vzorec E	0,992	0,022	-0,001	0,486	0,038	0,944	-0,002
EtOH	0,988	0,029	-0,001	0,400	0,033	0,954	-0,001
CoQ ₁₀	0,998	0,012	-0,001	0,339	-0,058	0,947	0,003



Priloga E: Konformacija in razdalje med atomi molekule CoQ₁₀.

Appendix E: Conformation and distances between atoms in CoQ₁₀ molecule.