

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Tjaša LEVIČNIK

**INTERAKCIJE VODOTOPNIH OBLIK KOENCIMA
Q₁₀ Z MODELNIMI LIPIDNIMI MEMBRANAMI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Tjaša LEVIČNIK

**INTERAKCIJE VODOTOPNIH OBLIK KOENCIMA Q₁₀ Z
MODELNIMI LIPIDNIMI MEMBRANAMI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**INTERACTIONS OF WATER-SOLUBLE FORMS OF COENZYME
Q₁₀ WITH MODEL LIPID MEMBRANES**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2014

Pričujoča diplomska naloga je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije in je bila opravljena na katedri za biokemijo in živilsko kemijo Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Za mentorico je imenovana prof. dr. Nataša Poklar Ulrih, za recenzenta pa prof.dr. Blaž Cigić.

Mentorica: prof. dr. Nataša Poklar Ulrih

Recenzent: prof. dr. Blaž Cigić

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Delo 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.

Tjaša Levičnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

- ŠN** Dn
- DK** UDK 577.161.6: 577.352 (043) = 163.6
- KG** modelne membrane/antioksidanti/koencim Q₁₀/ vodotopni koencim Q₁₀/polarizacija/anizotropija/antioksidativna učinkovitost
- AV** LEVIČNIK, Tjaša
- SA** POKLAR ULRIH, Nataša (mentorica)/ CIGIČ, Blaž (recenzent)
- KZ** SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA** Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
- LI** 2014
- IN** INTERAKCIJE VODOTOPNIH OBLIK KOENCIMA Q₁₀ Z MODELNIMI LIPIDNIMI MEMBRANAMI
- TD** Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP** XI, 45 str., 20 pregl., 15 sl., 6 pril., 33 vir.
- IJ** sl
- JI** sl/an
- AI** Koencim Q₁₀ je lipofilna molekula, ki je naravno prisotna v vsaki živi celici. Koencim Q₁₀ sodeluje pri prenosu elektronov v notranji mitohondrijski membrani, hkrati pa je tudi stabilizator celičnih membran in učinkovit antioksidant. Namen diplomske naloge je bil proučiti vpliv treh različnih oblik koencima Q₁₀, in sicer lipidotopnega (LS), vodotopnega koencima Q₁₀ s škrobom in vodotopnega koencima Q₁₀ s ciklodekstrinom, na fluidnost bioloških modelnih membran ter vpliv vseh treh oblik na lipidno peroksidacijo. Za proučevanje vpliva različnih oblik koencima Q₁₀ na membrane smo merili polarizacije in anizotropije fluorescence trifenilheksatriena (DPH) ob prisotnosti različnih modelnih lipidnih membran. Ugotovili smo, da ima tako pri večslojnih membranah (MLV), sestavljenih iz 1-palmitoil-2-oleil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (POPE), 1-palmitoil-2-oleil-sn-glicero-3-fosfoholina (POPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serin (POPS) in holesterola (CH), kot tudi pri enoslojnih membranah (ULV), pripravljenih iz POPE, POPC, POPS in CH, največji vpliv na urejenost membrane LS koencim Q₁₀. Pri T = 37 °C se učinek LS koencima Q₁₀ na urejenost ULV membrane še poveča. Pri ULV, pripravljenih iz DPPC lipidov, ima največji vpliv na urejenost membrane LS koencim Q₁₀ pri 45 °C. Pri meritvah antioksidativne sposobnosti različnih oblik koencima Q₁₀ smo ugotovili, da ima najboljši vpliv na zaviranje lipidne oksidacije LS koencim Q₁₀, medtem ko ima vodotopni koencim Q₁₀ s škrobnim kompleksom najmanjši učinek na zaviranje lipidne oksidacije.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

- DN** Dn
- DC** UDC 577.161.6: 577.352 (043) = 163.6
- CX** model membranes/antioxidants/coenzyme Q₁₀/ water-soluble coenzyme Q₁₀/polarization/anisotropy/antioxidative efficiency
- AU** LEVIČNIK, Tjaša
- AA** POKLAR ULRIH, Nataša (supervisor) / CIGIČ, Blaž (reviewer)
- PP** SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB** University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
- LI** 2014
- IN** INTERACTIONS OF WATER-SOLUBLE FORMS OF COENZYME Q₁₀ WITH MODEL LIPID MEMBRANES
- TD** Graduation Thesis (University studies)
- NO** XI, 45 p., 20 tab., 15 fig., 6 ann., 33 ref.
- LA** sl
- AL** sl/en
- AB** Coenzyme Q₁₀ is a lipophilic molecule, which is naturally present in all living cells. Coenzyme Q₁₀ helps transfer electrons within the inner mitochondrial membrane, and at the same time stabilizes cell membranes and works as an effective antioxidant. The aim of this thesis was to examine the influence of three different types of coenzyme Q₁₀ – lipid-soluble coenzyme Q₁₀, water-soluble coenzyme Q₁₀ with starch, and water-soluble coenzyme Q₁₀ with cyclodextrin on the fluidity of biological model membranes and lipid peroxidation. Polarization and anisotropy of diphenylhexatriene fluorescence in the presence of different model lipid membranes were measured. Tests revealed that out of the three, the lipid-soluble coenzyme Q₁₀ has the most substantial effect on membrane stabilization in the case of multilamellar vesicles (MLV), consisting of 1-palmitoil-2-oleil-sn-glycero-3-fosfocholine (POPC), 1-palmitoil-2-oleil-sn-glycero-3-fosfoethanolamine (POPE), 1-palmitoil-2-oleil-sn-glycero-3-fosfo-L-serine (POPS) and cholesterol (CH), as well as unilamellar vesicles (ULV), made of POPE, POPC, POPS and CH. The effect of the lipid-soluble coenzyme Q₁₀ on membrane stabilization in cases of MLV and ULV membranes further increases at higher temperatures. In the case of ULV membranes consisting of dipalmitoyl fosfphatidylcholin (DPPC) lipids, the lipid-soluble coenzyme Q₁₀ at 45 °C has the most substantial effect on membrane stabilization. Measurements of the antioxidant ability of different types of coenzyme Q₁₀ have shown that the lipid-soluble coenzyme Q₁₀ has the most beneficial effect on the inhibition of lipid oxidation, while the water-soluble coenzyme Q₁₀ with starch complex has the smallest effect on the inhibition of lipid oxidation.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
1.2 DELOVNA HIPOTEZA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI KOENCIMA Q ₁₀ (CoQ ₁₀).....	3
2.2 SINTEZA KOENCIMA Q ₁₀ V ORGANIZMU	4
2.3 OBLIKE KAPSULIRANEGA KOENCIMA Q ₁₀	5
2.3.1 Vodotopen kompleks koencima Q₁₀ z β-ciklodekstrinom	6
2.3.2 Vodotopen kompleks koencima Q₁₀ s škrobom	7
2.4 KOENCIM Q ₁₀ KOT DODATEK.....	7
2.4.1 Pomanjkanje koencima Q₁₀ v organizmu	7
2.4.2 Vnos koencima Q₁₀ s hrano	8
2.4.3 Vnos koencima Q₁₀ s farmacevtskimi oblikami	9
2.5 ANTIOKSIDATIVNO DELOVANJE KOENCIMA Q ₁₀	9
2.6 MODELNE MEMBRANE – LIPOSOMI.....	9
3 MATERIALI IN METODE	12
3.1 MATERIALI	12
3.1.1 Kemikalije in drobna oprema	12
3.1.2 Raztopine	13
3.1.3 Laboratorijska oprema	13
3.2 METODE.....	14
3.2.1 Priprava liposomov za merjenje fluorescence	14
3.2.2 Osnove fluorescenčne spektrometrije	14
3.2.3 Merjenje polarizacije in anizotropije	15

4	REZULTATI.....	18
4.1	MERJENJE POLARIZACIJE IN ANIZOTROPIJE.....	18
4.1.1	Merjenje polarizacije in anizotropije DPH v MLV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH pri T= 25 °C	18
4.1.2	Merjenje polarizacije in anizotropije DPH v MLV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH pri T= 37 °C	22
4.1.3	Merjenje polarizacije in anizotropije DPH v ULV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH pri T= 25 °C	25
4.1.4	Merjenje polarizacije in anizotropije DPH v ULV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH pri T= 37 °C	28
4.1.5	Merjenje polarizacije in anizotropije DPH v ULV pripravljenih iz DPPC lipidov pri T= 25 °C	31
4.1.6	Merjenje polarizacije in anizotropije v ULV pripravljenih iz DPPC lipidov pri T= 45 °C	33
4.2	SPEKTROFOTOMETRIČNO DOLOČANJE OKSIDACIJE LIPOSOMOV PRIPRAVLJENIH IZ PC SPROŽENE Z UV OBSEVANJEM – TBARS TEST ..	36
5	RAZPRAVA	38
5.1	VPLIV TEMPERATURE IN KONCENTRACIJE KOENCIMA Q ₁₀ NA INTERAKCIJO Z LIPOSOMI	38
5.1.1	Vpliv temperature in koncentracije treh različnih oblik koencima Q ₁₀ na interakcijo z MLV pripravljenih iz POPC, POPE, POPS in CH lipidov	38
5.1.2	Vpliv temperature in koncentracije treh različnih oblik koencima Q ₁₀ na interakcijo z ULV pripravljenih iz POPC, POPE, POPS in CH lipidov	39
5.1.3	Vpliv temperature in koncentracije treh različnih oblik koencima Q ₁₀ na interakcijo z ULV sestavljenih iz DPPC lipidov	39
5.2	VPLIV TREH RAZLIČNIH OBLIK KOENCIMA Q ₁₀ NA PREPREČEVANJE OKSIDACIJE LIPIDOV	40
6	SKLEPI.....	41
7	POVZETEK	42
8	VIRI	43
ZAHVALA		
PRILOGE		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Vsebnost koencima Q ₁₀ v živilih (Žmitek J. in Žmitek K., 2009).....	8
Preglednica 2: Sprememba v polarizaciji (ΔP) in anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v MLV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH ob dodatku lipidotopnega (LS) koencima Q ₁₀ pri T= 25 °C	19
Preglednica 3: Sprememba v polarizaciji (ΔP) in anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v MLV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH ob dodatku vodotopnega koencima Q ₁₀ s škrobnim kompleksom pri T= 25 °C.....	20
Preglednica 4: Sprememba v polarizaciji (ΔP) in anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v MLV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH ob dodatku vodotopnega koencima Q ₁₀ s kompleksom ciklodekstrina pri T= 25 °C.....	21
Preglednica 5: Sprememba v polarizaciji (ΔP) in anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v MLV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH ob dodatku lipidotopnega (LS) koencima Q ₁₀ pri T= 37 °C	23
Preglednica 6: Sprememba v polarizaciji (ΔP) in anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v MLV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH ob dodatku vodotopnega koencima Q ₁₀ s škrobnim kompleksom pri T= 37 °C.....	23
Preglednica 7: Sprememba v polarizaciji (ΔP) in anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v MLV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH ob dodatku vodotopnega koencima Q ₁₀ s kompleksom ciklodekstrina pri T= 37 °C.....	24
Preglednica 8: Sprememba v polarizaciji (ΔP) in anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v ULV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH ob dodatku lipidotopnega (LS) koencima Q ₁₀ pri T= 25 °C	25
Preglednica 9: Sprememba v polarizaciji (ΔP) in anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v ULV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH ob dodatku vodotopnega koencima Q ₁₀ s škrobnim kompleksom pri T= 25 °C.....	26
Preglednica 10: Sprememba v polarizaciji (ΔP) in anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v ULV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH ob dodatku vodotopnega koencima Q ₁₀ s kompleksom ciklodekstrina pri T= 25 °C.....	27

Preglednica 11: Sprememba v polarizaciji (ΔP) in anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v ULV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH ob dodatku lipidotopnega (LS) koencima Q ₁₀ pri T= 37 °C	29
Preglednica 12: Sprememba v polarizaciji (ΔP) in anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v ULV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH ob dodatku vodotopnega koencima Q ₁₀ s škrobnim kompleksom pri T= 37 °C.....	29
Preglednica 13: Sprememba v polarizaciji (ΔP) in anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v ULV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH ob dodatku vodotopnega koencima Q ₁₀ s kompleksom ciklodekstrina pri T= 37 °C.....	30
Preglednica 14: Sprememba v polarizaciji (ΔP) in anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v ULV pripravljenih iz DPPC lipidov ob dodatku lipidotopnega (LS) koencima Q ₁₀ pri T= 25 °C.....	31
Preglednica 15: Sprememba v polarizaciji (ΔP) in anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v ULV pripravljenih iz DPPC lipidov ob dodatku vodotopnega koencima Q ₁₀ s škrobnim kompleksom pri T= 25 °C.....	32
Preglednica 16: Sprememba v polarizaciji (ΔP) in anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v ULV pripravljenih iz DPPC lipidov ob dodatku vodotopnega koencima Q ₁₀ s kompleksom ciklodekstrina pri T= 25 °C	32
Preglednica 17: Sprememba v polarizaciji (ΔP) in anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v ULV pripravljenih iz DPPC lipidov ob dodatku lipidotopnega (LS) koencima Q ₁₀ pri T= 45 °C.....	34
Preglednica 18: Sprememba v polarizaciji (ΔP) in anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v ULV pripravljenih iz DPPC lipidov ob dodatku vodotopnega koencima Q ₁₀ s škrobnim kompleksom pri T= 45 °C.....	34
Preglednica 19: Sprememba v polarizaciji (ΔP) in anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v ULV pripravljenih iz DPPC lipidov ob dodatku vodotopnega koencima Q ₁₀ s kompleksom ciklodekstrina pri T= 45 °C	35
Preglednica 20: Spremljanje lipidne oksidacije na MLV pripravljenih iz PC lipidov v prisotnosti treh različnih oblik koencima Q ₁₀ z merjenjem absorbance pri 532 nm kot funkcije časa pri 25 °C	36

KAZALO SLIK

Slika 1: Koencim Q ₁₀ v različnih oksidativnih stanjih (Shinde in sod., 2005).....	3
Slika 2: Endogena sinteza koencima Q ₁₀ (Ernster in Dallner, 1995).....	5
Slika 3: Shematski prikaz inkluzijskega kompleksa koencima Q ₁₀ in β-ciklodekstrina (Pravst in sod., 2009)	6
Slika 4: Shematski prikaz kapsulacije koencima Q ₁₀ s škrobom (Oblak, 2009).	7
Slika 5: Večslojni vezikli (MLV) z več lipidnimi dvosloji in enoslojni vezikli (ULV), sestavljani iz samo enega lipidnega dvosloja (Mozafari in sod., 2006).....	10
Slika 6: Strukturne formule polarnih fosfolipidov (a) POPE, (b) POPC, (c) POPS (Avanti Polar Lipids, 2014)	11
Slika 7: Strukturna formula 1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholina (DPPC) (Gopalakrishnan, 2006).....	11
Slika 8: Kemijska reakcija med TBA in MDA, kjer nastane TBA-MDA produkt (Williamson in sod., 2003).....	16
Slika 9: Sprememba v polarizaciji (ΔP) fluoroforja DPH v MLV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH ob dodatku treh različnih oblik koencima Q ₁₀ pri T= 25 °C	22
Slika 10: Sprememba v polarizaciji (ΔP) fluoroforja DPH v MLV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH ob dodatku treh različnih oblik koencima Q ₁₀ pri T= 37 °C	24
Slika 11: Sprememba v polarizaciji (ΔP) fluoroforja DPH v ULV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH ob dodatku treh različnih oblik koencima Q ₁₀ pri T= 25 °C	28
Slika 12: Sprememba v polarizaciji (ΔP) fluoroforja DPH v ULV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH ob dodatku treh različnih oblik koencima Q ₁₀ pri T= 37 °C	30
Slika 13: Sprememba v polarizaciji (ΔP) fluoroforja DPH v ULV pripravljenih iz DPPC lipidov ob dodatku treh različnih oblik koencima Q ₁₀ pri T= 25 °C....	33
Slika 14: Sprememba v polarizaciji (ΔP) fluoroforja DPH v ULV pripravljenih iz DPPC lipidov ob dodatku treh različnih oblik koencima Q ₁₀ pri T= 45 °C....	35
Slika 15: Vpliv različnih oblik koencima Q ₁₀ na preprečevanje lipidne oksidacije povzročene z UV svetlobo	37

KAZALO PRILOG

- Priloga A:** Sprememba v anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v MLV pripravljenih iz POPE, POPC, POPS in CH ob dodatku treh različnih oblik koencima Q₁₀ pri T= 25 °C
- Priloga B:** Sprememba v anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v MLV pripravljenih iz POPE, POPC, POPS in CH ob dodatku treh različnih oblik koencima Q₁₀ pri T= 37 °C
- Priloga C:** Sprememba v anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v ULV pripravljenih iz POPE, POPC, POPS in CH ob dodatku treh različnih oblik koencima pri T= 25 °C
- Priloga D:** Sprememba v anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v ULV pripravljenih iz POPE, POPC, POPS in CH ob dodatku treh različnih oblik koencima Q₁₀ pri T= 37 °C
- Priloga E:** Sprememba v anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v ULV pripravljenih iz DPPC lipidov ob dodatku treh različnih oblik koencima Q₁₀ v pri T= 25 °C
- Priloga F:** Sprememba v anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v ULV pripravljenih iz DPPC lipidov ob dodatku treh različnih oblik koencima Q₁₀ pri T= 45 °C

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	anizotropija
CH	holesterol
DPH	difenilheksatrien (1,6-difenil-1,3,5-heksatrien)
DMF	dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
DPPC	1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholin
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina
LS	lipidotopni koencim Q ₁₀ (lipid-soluble)
LUV	veliki enoskojsni liposomi (large unilamellar vesicles)
MA	malonaldehid
MLV	veliki večslojni liposomi (multilamellar vesicles)
P	polarizacija
POPC	1-palmitoil-2-oleil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholin
POPE	1-palmitoil-2-oleil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanolamin
POPS	1-palmitoil-2-oleil- <i>sn</i> -glicero-3-(fosfo-L-serin)
SUV	majhni enoslojni liposomi (small unilamellar vesicles)
TBA	tiobarbiturna kislina
ULV	enoslojni liposomi (unilamellar vesicles)

1 UVOD

Koencim Q₁₀ (CoQ₁₀) je spojina, ki je naravno prisotna v vseh celičnih membranah organizma. Poznan je tudi kot ubikinon in je po načinu delovanja podoben vitaminom. Koencim Q₁₀ je pomemben pri sintezi ATP v mitohondrijih, saj sodeluje pri prenosu elektronov v dihalni verigi, hkrati pa je tudi učinkovit antioksidant. V telesu nastaja v procesu biosinteze, del pa ga zaužijemo s hrano. Največ koencima Q₁₀ je v organih z visoko porabo energije, kot so npr. srce, jetra, ledvica in mišice (Žmitek in sod., 2008a).

Koencim Q₁₀ je topen v maščobah, z ustrežno kapsulacijo pa lahko pripravimo vodotopno obliko. To je pomembno predvsem za živilsko industrijo, saj ga tako lahko dodajamo živilom (Prošek in sod., 2008).

Na Kemijskem inštitutu v Ljubljani so med prvimi v svetu pripravili vodotopno obliko koencima Q₁₀ v inkluzijskem kompleksu z β-ciklodekstrinom, ki ga lahko dodajamo živilom (Prošek in sod., 2008).

1.1 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je bil primerjati vpliv dveh vodotopnih oblik koencima Q₁₀ ter lipidotopnega (LS) koencima Q₁₀ na lastnosti modelnih celičnih membran (liposomov) ter ugotoviti antioksidativne lastnosti vseh treh oblik koencima Q₁₀.

Kot membranski model smo uporabili enoslojne (ULV) in večslojne (MLV) liposome, pripravljene iz 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoholina (POPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (POPE), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina (POPS) in holesterola (CH).

Z merjenjem fluorescenčne polarizacije smo spremljali spremembe v lastnostih modelnih membran ob prisotnosti lipidnega markerja DPH. Meritve smo opravili pri dveh temperaturah (sobni 25 °C in telesni 37 °C) ter pri treh različnih oblikah koencima Q₁₀ (dve vodotopni in ena oblika lipidotopnega koencima Q₁₀). Na enak način smo merili vpliv koencima Q₁₀ na lastnosti modelne lipidne membrane, pripravljene iz dipalmitoil-fosfatidilholina (DPPC), in sicer pri dveh temperaturah – 25 °C in 45 °C.

Antioksidativne lastnosti treh oblik koencima Q₁₀, v našem primeru lipidno oksidacijo v liposomih smo določali spektrofotometrično s pomočjo tiobarbiturne kisline.

1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Predvidevamo, da koencim Q₁₀ v vodotopni obliki integrira z modelnimi lipidnimi membranami in preprečuje lipidno oksidacijo.

2 PREGLED OBJAV

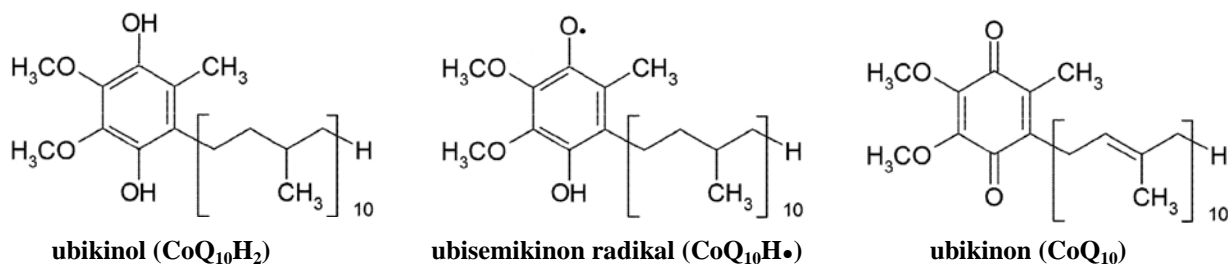
2.1 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI KOENCIMA Q₁₀ (CoQ₁₀)

Koencim Q₁₀ je kemijsko 2,3-dimetoksi-5-metil-6-dekaprenil-1,4-benzokinon (Lenaz in sod., 2007). Ta kristaliničen prah rumene barve z relativno visoko molekulsko maso (M=863 g/mol) je topen v maščobah (Žmitek in sod., 2008b).

Koencim Q₁₀ je dobil ime zaradi biokemijske vloge, ki jo ima v organizmu. Q je prva črka angleške besede Quinone, 10 pa pomeni število izoprenskih enot v stranski verigi (Boyer, 2005).

Koencim Q₁₀ najdemo v treh oksidativnih stanjih:

1. Ubikinon (oksidirana oblika)
2. Ubisemikinon in
3. Ubikinol (reducirana oblika) (Lenaz in sod., 2007)



Slika 1: Koencim Q₁₀ v različnih oksidativnih stanjih (Shinde in sod., 2005)

Koencim Q₁₀ je bil prvič izoliran l. 1957 iz mitohondrija srčne mišice goveda. Prof. Karl Folkers s sodelavci je l. 1958 natančno določil kemijsko sestavo koencima. Dr. Peter Mitchel je l. 1978 prejel Nobelovo nagrado za proučitev delovanja koencima Q₁₀ in določitve njegove vloge v organizmu (Rus P. in Rus R., 2008).

V organizmu je koencim Q₁₀ del transportne verige, ki se nahaja v lipidnem dvosloju notranje mitohondrijske membrane in sodeluje v verigi reakcij, kjer nastaja ATP (adenozin trifosfat). Koencim Q₁₀ je lipidotopna molekula. Deluje kot antioksidant in s svojim delovanjem ščiti telo pred prostimi radikali, ki lahko poškodujejo lipidne membrane, proteine in deoksiribonukleinsko kislino (DNA), ki je nosilka dednega zapisa.

Koencim Q₁₀ pospešuje obnovo DNA, ima pa tudi pomembno vlogo pri prenosu protonov preko membrane lizosomov, saj s tem ohranja optimalno vrednost pH v celicah. Lizosomi so celični organeli, ki imajo pomembno vlogo pri razgradnji odpadnih snovi v celici.

Lizosomi, ki ločujejo ostalo celico od prebavnih encimov, vsebujejo veliko koencima Q₁₀. Ena od funkcij koencima Q₁₀ je tudi ta, da deluje kot stabilizator celičnih membran (Rus P. in Rus R., 2008).

Koencim Q₁₀ v organizmu nastaja sam, del pa ga zaužijemo s hrano. Dokazano je, da povečan vnos koencima Q₁₀ s hrano, ne povzroči zmanjšanja njegove endogene sinteze. Po prenehanju dodajanja koencima Q₁₀, se namreč koncentracija v plazmi vrne v osnovno stanje (Bhagavan in Chopra, 2007).

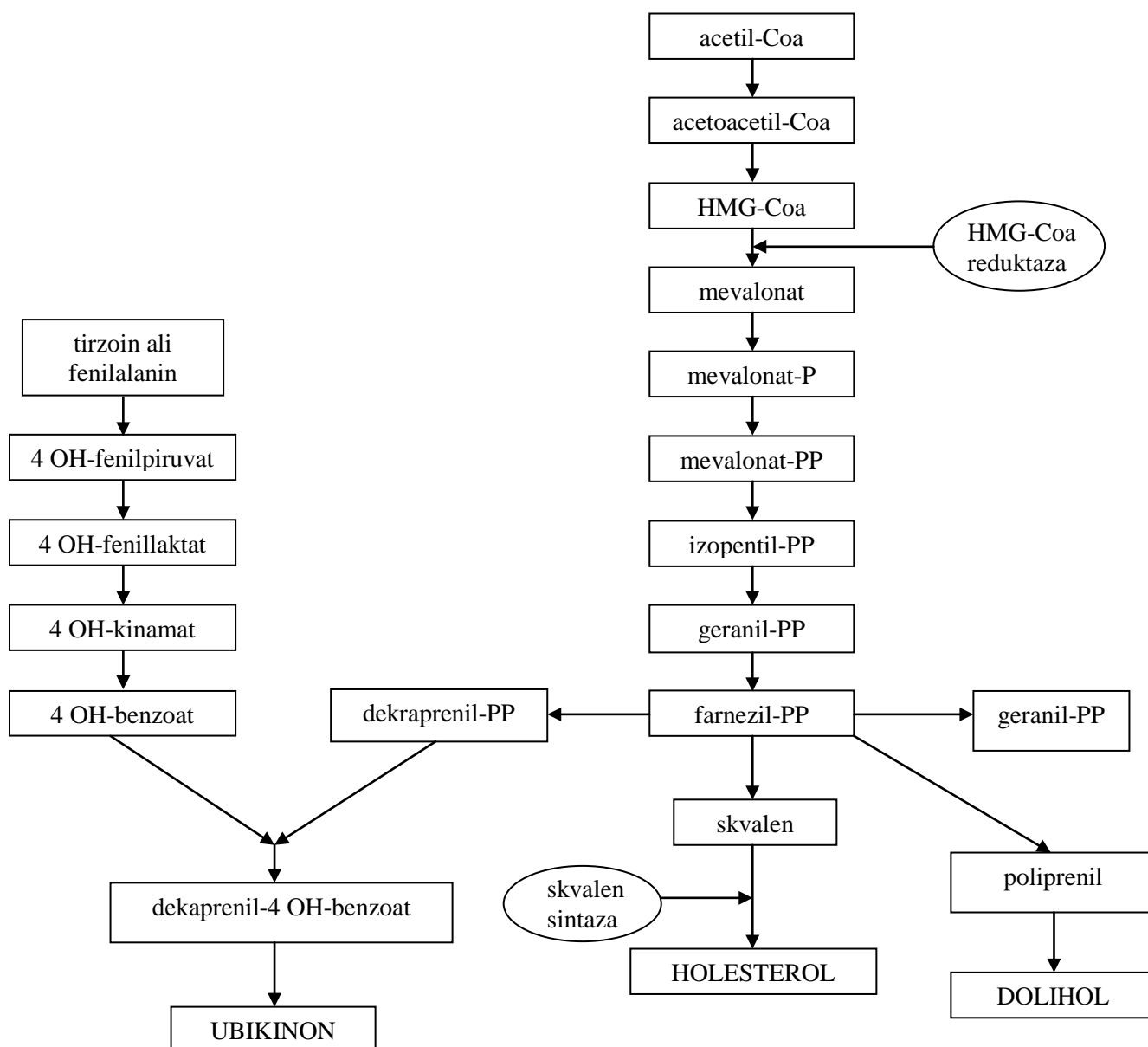
2.2 SINTEZA KOENCIMA Q₁₀ V ORGANIZMU

Biosinteza koencima Q₁₀ poteka deloma po isti poti kot pri holesterolu. Razlika je v tem, da se holesterol sintetizira večinoma v jetrih, medtem ko poteka biosinteza koencima Q₁₀ praktično v vseh tkivih in celicah (Bentinger in sod., 2007).

Biosinteza koencima Q₁₀ je kompleksen proces, ki poteka po dveh vzporednih metabolnih poteh (Slika 2). Prva pot vključuje sintezo benzokinonovega obroča, za katerega je kot aromatski prekursor potreben 4-hidroksibenzoat. 4-hidroksibenzoat se sintetizira iz aminokislina tirozina v vrsti reakcij. Sočasno po drugi, t. i. mevalonatni poti poteka sinteza lipofilnega poliizoprenoidnega repa, iz katere vstopa spojina acetil-CoA, ki se v seriji reakcij preko mevalonata pretvori do farnezil-pirofosfata. Farnezil-pirofosfat je prekursor, ki se v prisotnosti encima trans-prenil-transferaze pretvori do dekaprenil-pirofosfata, ki predstavlja stransko verigo koencima Q₁₀. Nato pride do združitve obeh osnovnih struktur koencima Q₁₀, t.j. 4-hidroksibenzoata in dekaprenil-pirofosfata, pri čemer nastane dekaprenil-4-hidroksibenzoat, ki se nato pretvori v ubikinon (slika 2) (Ernster in Dallner, 1995).

Pri biosintezi koencima Q₁₀ poleg izhodnih sestavin (tirozin oz. fenilalanin ter acetil-CoA), sodelujejo tudi vitamini B6 in B12, vitamin C, folna kislina, niacinamid ter pantotenska kislina (Mason, 2001).

Pri sintezi holesterola in koencima Q₁₀ ima pomembno vlogo regulatorni encim HMG-CoA reduktaza, ki sodeluje v mevalonatni poti tako pri sintezi holesterola kot tudi koencima Q₁₀.



Slika 2: Endogena sinteza koencima Q₁₀ (Ernster in Dallner, 1995)

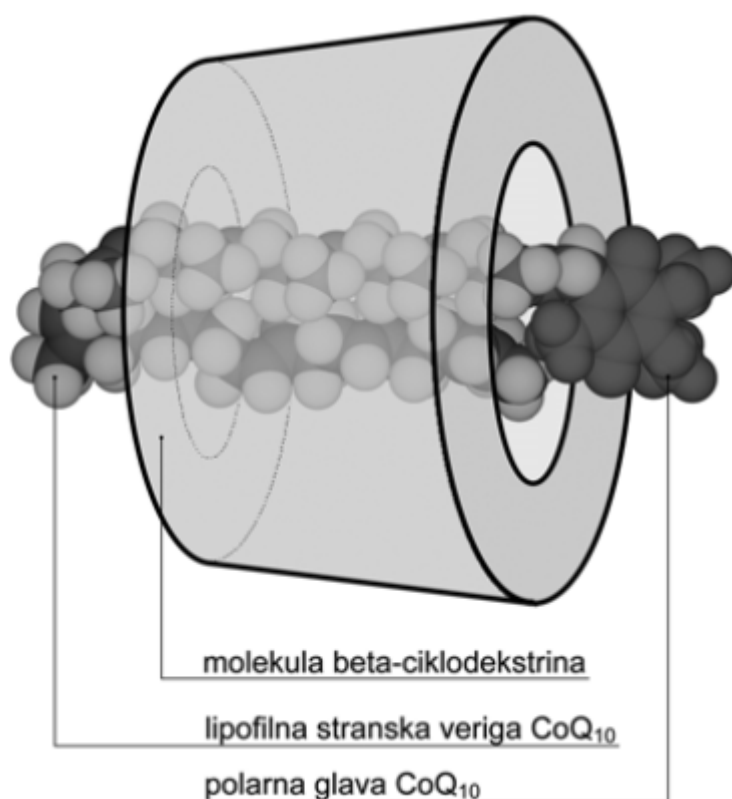
2.3 OBLIKE KAPSULIRANEGA KOENCIMA Q₁₀

Koencim Q₁₀ zaradi svoje oblike, predvsem zaradi izoprenske verige, ni topen v vodi in se zato lahko umesti v membrane, v katerih je lipofilno okolje. V organizmu se nahaja v mastnih kapljicah in membranah celice, celičnih jeder, mitohondrijev, peroksisomov, lizosomov in Golgijevega aparata (Prošek in sod., 2008).

2.3.1 Vodotopen kompleks koencima Q₁₀ z β-ciklodekstrinom

Vodotopna oblika koencima Q₁₀ je bila razvita z namenom, da bi koencim Q₁₀ lahko dodajali živilom, ki vsebujejo manj maščobe. Tako se danes koencim Q₁₀ dodaja živilom kot so npr. mleko in jogurti (Prošek in sod., 2008).

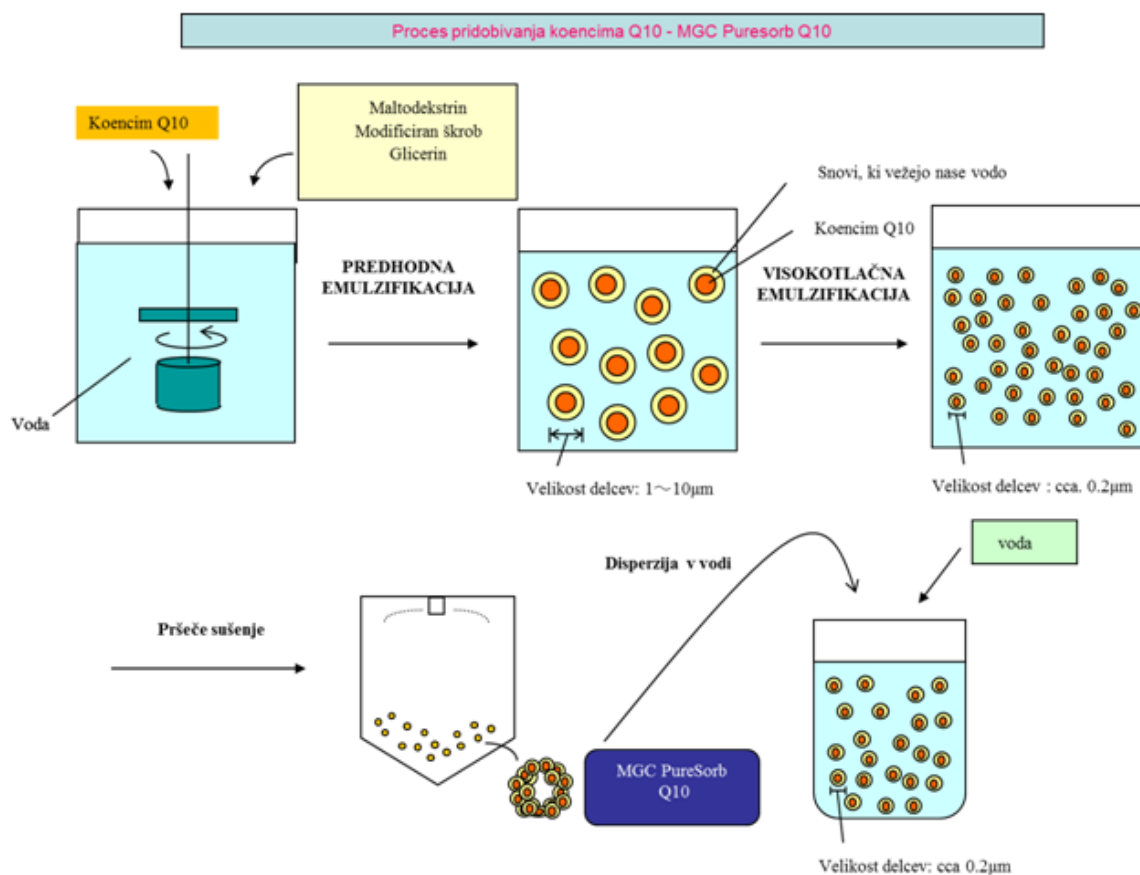
Na Kemijskem inštitutu v Ljubljani so med prvimi na svetu pripravili vodotopno obliko koencima Q₁₀, ki se lahko dodaja hrani. Gre za zapleten proces vstavljanja molekule koencima Q₁₀ v inkluzijski kompleks z β-ciklodekstrinom. Molekula β-ciklodekstrina je sestavljena iz sedmih med seboj povezanih molekul glukoze, tako da le-te tvorijo hidrofoben kanal v katerega se lahko vključi koencim Q₁₀. Kompleks se v kislem okolju želodca razpre in molekula koencima Q₁₀ zapusti kompleks. Sprostitev koencima Q₁₀ v želodec pa še ne pomeni dobre biodostopnosti (koncentracije koencima Q₁₀ v krvi), saj se koencim Q₁₀ absorbira skozi steno tankega črevesja skupaj z maščobami. Vodotopni kompleks s koencimom Q₁₀ se dodaja živilom, ki vsebujejo maščobe, npr. mleku (Prošek in sod., 2008).



Slika 3: Shematski prikaz inkluzijskega kompleksa koencima Q₁₀ in β-ciklodekstrina (Pravst in sod., 2009) .

2.3.2 Vodotopen kompleks koencima Q₁₀ s škrobom

Najnovejši postopek obdelave koencima Q₁₀ so razvili na Japonskem. Delce so zmanjšali na 0,2 μm, kar omogoča bistveno boljšo disperzibilnost v vodi (v primerjavi s koencimom Q₁₀ brez dodanega škroba). S Slike 4 je razvidno, da se lipidotopnemu koencimu Q₁₀ doda snovi, ki nase vežejo vodo, nato pa se molekule koencima Q₁₀ s postopkom visokotlačne emulzifikacije razbije na mikro delce (Oblak, 2009)



Slika 4: Shematski prikaz kapsulacije koencima Q₁₀ s škrobom (Oblak, 2009).

2.4 KOENCIM Q₁₀ KOT DODATEK

2.4.1 Pomanjkanje koencima Q₁₀ v organizmu

Celotna količina koencima Q₁₀ v telesu je približno 2 grama. Telo ga dnevno nadomesti okrog 0,5 g; v glavnem to stori z endogeno sintezo, nekaj pa ga vnesemo tudi s hrano (Kalen in sod., 1989; Bliznakov in sod., 1998).

Največji delež koencima Q₁₀ je v mitohondrijih (40–50 %), v jedru (25–30 %), v endoplazmatskem retikulumu (15–20 %) ter v citosolu (5–10 %) (Korošec, 2000).

Zaradi različnih dejavnikov, npr. genetskih sprememb, staranja, raka, uporabe zdravil idr., se vsebnost koencima Q₁₀ v organizmu zmanjšuje. V teh primerih je pomemben vnos koencima Q₁₀ s hrano ali v obliki prehranskih dopolnil (Prošek in sod., 2008).

Sposobnost sinteze koencima Q₁₀ s starostjo močno upada, tako npr. 50-letnik sintetizira za 20-60 % manj koencima Q₁₀ kot 20-letnik (Prošek in sod., 2008).

Pomanjkanje je opazno tudi pri ljudeh z različnimi obolenji, kot so npr. diabetes, rak, nevrodegenerativne bolezni, kardiovaskularne bolezni ter mitohondrijske motnje (Quinzii in sod., 2007).

Bistven upad endogene sinteze koencima Q₁₀ je opazen tudi pri bolnikih, ki uživajo zdravila za zniževanje holesterola (statine), saj statini inhibirajo sintezo mevalonata, ki je skupni prekursor holesterola in koencima Q₁₀. To je najverjetneje vzrok za nastanek miopatij (Litterru in sod., 2007).

2.4.2 Vnos koencima Q₁₀ s hrano

Poleg endogene sinteze pa del koencima Q₁₀ v organizem vnašamo tudi s hrano. V Preglednici 1 je razvidno, da je največja vsebnost koencima Q₁₀ v olivnem olju, mesu, perutnini ter sardinah in skušah.

Preglednica 1: Vsebnost koencima Q₁₀ v živilih (Žmitek J. in Žmitek K., 2009)

Živilo	Vsebnost koencima Q ₁₀ (mg/kg)
govedina, svinjina	13-40
perutnina	8-25
sardine	5-64
skuše	11-67
olivno olje	109-160
mandlji	5-14
mleko	0,2
arašidi	3
cvetača	2-7
peteršilj	8-26
brokoli	6-9
avokado	10

2.4.3 Vnos koencima Q₁₀ s farmacevtskimi oblikami

Na slovenskem tržišču je precej različnih izdelkov v različnih oblikah, ki vsebujejo dodan koencim Q₁₀. Nekatera imajo status zdravila, ki se izdaja brez recepta v lekarnah, prevladujejo pa predvsem prehranska dopolnila. Na voljo so v obliki: kapsul, sirupa, žvečljivih tablet in šumečih tablet, ki se pripravijo kot napitek.

Priporočen dnevni odmerek (RDA) za koencim Q₁₀ ni določen. V Sloveniji je zakonsko določen maksimalni dnevni vnos koencima Q₁₀ 50 mg/dan (Žmitek J. in Žmitek K., 2009).

2.5 ANTIOKSIDATIVNO DELOVANJE KOENCIMA Q₁₀

Prosti radikali so visoko reaktivne molekule, ki poškodujejo celične strukture, vključno z nukleinskimi kislinami. Prosti radikali so molekule z vsaj enim nesparjenim elektronom. Nastajajo pri celični presnovi (dihanje), kot posledice dejavnikov okolja (UV, gama žarkov, kajenja itd.), jemanja zdravil ali poživil (alkohol, analgetiki, citostatiki itd.). Kisikovi prosti radikali imajo pomembno funkcijo pri procesu staranja, degenerativnih boleznih, raku, kardiovaskularnih boleznih, aterosklerozi, Alzheimerjevi, Crohnovi in Parkinsonovi bolezni, sladkorni bolezni, bolezni jeter in ledvic idr. Oksidativni stres je posledica porušenja ravnovesja med prostimi radikali in antioksidanti. Antioksidanti lovijo proste radikale, kelirajo kovinske ione ali odstranjujejo in/ali popravljajo poškodovane biomolekule (Korošec, 2000).

Koencim Q₁₀ je intracelularni antioksidant, ki ščiti membrane fosfolipdov, mitohondrijske proteine ter LDL lipoproteine pred prostimi radikali (Alleva in sod., 1995; Singh in sod., 2007). Ubikinol, reducirana oblika koencima Q₁₀, je eden od najmočnejših antioksidantov, saj ima kot lovilec prostih radikalov celo višji potencial od vitaminov E in C (Korošec, 2000).

Antioksidativna lastnost ubikinola se odraža v sposobnosti redukcije:

- lipidnih alkilperoksilnih radikalov
- α -tokoferoksilnih radikalov, pri čemer se regenerira α -tokoferol (Rudan-Tasič, 2000)

2.6 MODELNE MEMBRANE – LIPOSOMI

Liposomi so umetni vezikli, sferične oblike, sestavljeni iz ene ali več dvoslojnih membran (Slika 5). Sestavljeni so iz polarnih lipidov, ki so organizirani tako, da imajo lipofilno in hidrofilno skupino na isti molekuli. V raziskavi liposomi predstavljajo model lipidne

biološke membrane. Glede na število lipidnih dvoslojev in glede na velikost liposome ločimo na:

- MLV (multilamellar vesicles) – večslojni liposomi, velikosti do 500 μm
- ULV (unilamellar vesicles) – enoslojni liposomi, velikosti ≤ 0,1 μm (SUV – small unilamellar vesicles) ter velikosti 0,1 – 1 μm (LUV – large unilamellar vesicles) (Kristl in sod., 1992)

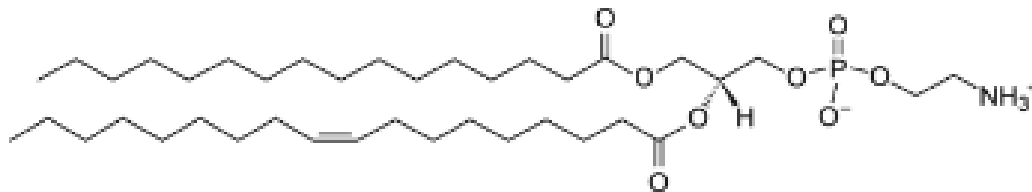


Slika 5: Večslojni vezikli (MLV) z več lipidnimi dvosloji in enoslojni vezikli (ULV), sestavljeni iz samo enega lipidnega dvosloja (Mozafari in sod., 2006)

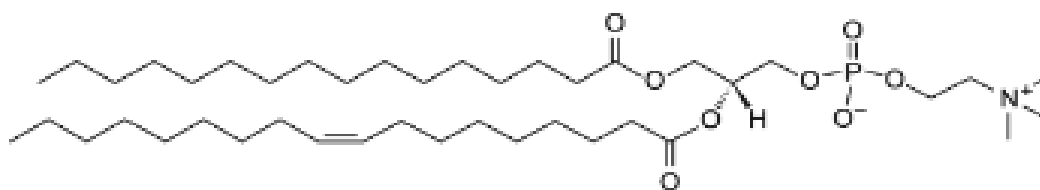
Liposomi, ki se uporabljajo v komercialne namene, so običajno sestavljeni iz lecitina (fosfatidilholina) in kefalina (fosfatidiletanolamina) v katere so vključeni tudi steroli (ergosteril, sitosterol ali holesterol) (Keller, 2001).

V naši raziskovalni nalogi smo uporabljali MLV in ULV liposome, sestavljene iz mešanice 1-palmitoil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (POPE), 1-palmitoil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfoholina (POPC), 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serin (POPS) in holesterola (CH) (Slika 6) ter ULV liposome, sestavljene iz 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoholina (DPPC) (Slika 7).

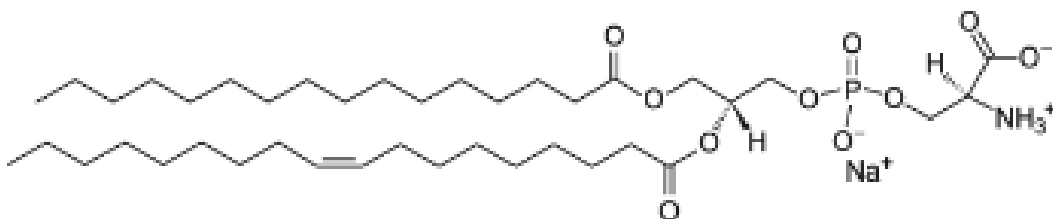
a:



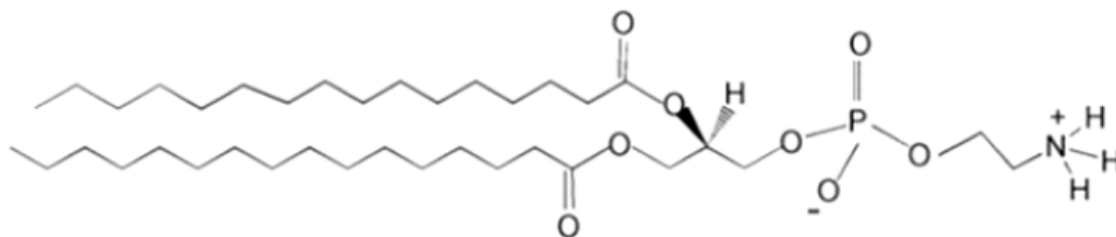
b:



c:



Slika 6: Strukturne formule polarnih fosfolipidov (a) POPE, (b) POPC, (c) POPS (Avanti Polar Lipids, 2014)



Slika 7: Strukturna formula 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoholina (DPPC) (Gopalakrishnan, 2006)

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije in drobna oprema

- fosfolipidi za pripravo liposomov (Avanti Polar Lipids, ZDA):
POPC = 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoholin
POPE = 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamin
POPS = 1-palmitoil-2-oleoil- *sn*-glicero-3-fosfo-L-serin
CH = holesterol
- DPPC = 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoholin (Avanti Polar Lipids, ZDA)
- PC = fosfatidilholin iz jajčnega rumenjaka
- kloroform Merck, Nemčija
- metanol Merck, Nemčija
- DPH = 1,6-difenil-1,3,5-heksatrien (Aldrich Chem. Co. Milwaukee, ZDA)
- etanol (Merck, Nemčija)
- tiobarbiturna kislina
- HEPES = 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina (Sigma, Aldrich, Nemčija)
- DMSO = dimetilsulfoksid, (Merck, Nemčija)
- 5 % koencim Q₁₀ vodotopna oblika (kompleks s ciklodekstrinom, Valens)
- 15 % koencim Q₁₀ vodotopna oblika (kompleks s ciklodekstrinom, Valens)
- 10 % koencim Q₁₀ vodotopna oblika (škrobni kompleks, MGC, Japonska)
- koencim Q₁₀ lipidotopna oblika (Sigma, Aldrich, ZDA)

3.1.2 Raztopine

Raztopine lipidov

10 mg/ml v mešanici metanola in kloroforma v razmerju 3:7 (v/v)

Raztopina DPH

1 mM raztopina v DMSO

Raztopine kislin

10 mM raztopina lipidotopnega (LS) koencima Q₁₀ v 99 % etanolu

10 mM raztopina vodotopnega koencima Q₁₀ z ciklodekstrinskim kompleksom v destilirani vodi

10 mM raztopina vodotopnega koencima Q₁₀ s škrobnim kompleksom v destilirani vodi

20 % raztopina trikloroacetne kisline

20 % raztopina perklorne kisline

Pufer za vezikle

20mM Hepes pH 7,0

3.1.3 Laboratorijska oprema

- rotavapor BÜCHI R-200; Švica
- mešalnik Vibromix, Tehtnica Železniki, Slovenija
- ekstrudor AVESTIN, Kanada
- vakuumska črpalka Thermolyne Nuova Stirrer, Thermo Scientific, ZDA
- fluorescenčni spektrofotometer Cary Eclipse, Varian, Mulgrave, Victoria, Avstralija
- 2,5 ml kvarčne kivete FLR Cary, Varian, Avstralija
- spektrofotometer Hewlett Packard, model HP-8453, ZDA

- centrifuga:

- Eppendorf & Schuell, No. 10300012, Nemčija
- Tehnica Železniki, Slovenija

3.2 METODE

3.2.1 Priprava liposomov za merjenje fluorescence

Liposome smo pripravili iz zmesi lipidov POPC, POPE, POPS, CH. Lipide smo raztopili v mešanici metanola in kloroforma v razmerju 3:7 (v/v). Z metodo tankih filmov smo iz zmesi lipidov POPC, POPE, POPS, CH v molskem razmerju POPC:POPE:POPS:CH = 4:2:1:3,6, ki ponazarja sestavo bioloških celičnih membran, pripravili liposome. V stekleno bučko smo odpipetirali 0,8 ml raztopine POPC, 3,8 mL raztopine POPE, 2,1 ml raztopine POPS in 3,7 mL raztopine CH. Na rotavaporju smo pri tlaku 17 mbar iz zmesi odparili topilo, morebitne preostanke topila pa izčrpali z vakuumsko črpalko. Na steni bučke je nastal tanek film lipidov. V bučko smo dodali 2,1 ml destilirane vode ali pufra in jo dali na stresalnik. Za lažje oblikovanje liposomov smo bučko med stresanjem namakali v vodni kopeli s temperaturo 40 °C. Tako smo pripravili MLV s končno koncentracijo lipidov 8,3 mg/ml. Poleg MLV smo z enakim postopkom pripravili tudi ULV, kjer smo posušenim lipidom v bučki namesto 2,1 ml dodali 5,7 ml destilirane vode ali pufra. Raztopino lipidov v destilirani vodi smo s pomočjo ekstrudorja 11-krat iztisnili preko polikarbonatne filtrne membrane z velikostjo por 400 nm, nato pa še 11-krat preko membrane z velikostjo por 100 nm. Tako smo dobili ULV s končno koncentracijo lipidov 3,1 mg/ml (Ota, 2009).

Liposome (ULV) iz DPPC smo pripravili po postopku, ki je opisan pod točko 3.2.1, le da smo v bučki posušili 0,5 ml raztopine DPPC in dodali 1 ml destilirane vode. Koncentracija ULV je bila 5,0 mg/ml. Liposome smo shranili na 4 °C in jih predhodno prepihali z dušikom (Ota, 2009).

3.2.2 Osnove fluorescenčne spektrometrije

Večina molekul je v osnovnem energijskem stanju. Po obsevanju z ustreznim elektromagnetnim valovanjem, pa lahko elektroni preidejo iz nižjega v višje energijsko stanje. Molekule preidejo nazaj v osnovno elektronsko stanje, pri čemer lahko emitirajo foton (Lakowicz, 2006).

Fluorescenco uvrščamo med emisijsko spektrometrijo. Pri prehodu elektronov iz višjih energijskih stanj v osnovno molekula odda del energije v obliki svetlobe (fotona). Prehod vzbujenega elektrona nazaj v osnovno stanje se zgodi zelo hitro, praktično že med samim vzbujanjem. Elektron se nahaja v vzbujenem stanju približno 10 ns, preden molekula z izsevanje fotona (fluorescenca) preide nazaj v osnovno stanje (Lakowicz, 1999).

3.2.3 Merjenje polarizacije in anizotropije

Meritve polarizacije in anizotropije se uporabljajo predvsem v biokemijskih raziskavah. Iz polarizacije in anizotropije dobimo informacije o velikosti in obliki proteinov, ali pa o stopnji togosti različnih molekularnih okolij. Primer je meritev fluidnosti membran. Princip meritve je na selektivnem vzbujanju florescenčnih označevalcev s polarizirano svetlobo.

Fluorescenčna anizotropija (A) in polarizacija (P) sta definirani takole:

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad \dots(1)$$

$$A = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad \dots(2)$$

kjer sta I_{\parallel} in I_{\perp} fluorescenčni intenziteti v vertikalni in horizontalni smeri: vzorec vzbujamo z vertikalno polarizirano svetlobo. Obstaja več dejavnikov, ki vplivajo na zmanjšanje vrednosti A in P. Eden izmed pomembnejših je rotacijska difuzija, ki toliko zarotira fluorescenčne označevalce med njihovim življenjskim časom, da emisijski spekter ni več polariziran. Čas rotacijske difuzije je mnogo krajši od življenjskega časa označevalcev v vzbujenem stanju (Lakowicz, 2006).

Polarizacijo in anizotropijo fluorescence 1,6-difenil-1,3,5-heksatriena (DPH) v prisotnosti lipidov smo merili s fluorescenčnim spektrofotometrom v kvarčnih kivetah pri 25 °C, 37 °C in 45 °C po vsakem dodatku različnih oblik koencima Q₁₀. Valovna dolžina vzbujanja je bila 358 nm, emisijo pa smo merili pri valovni dolžini 410 nm.

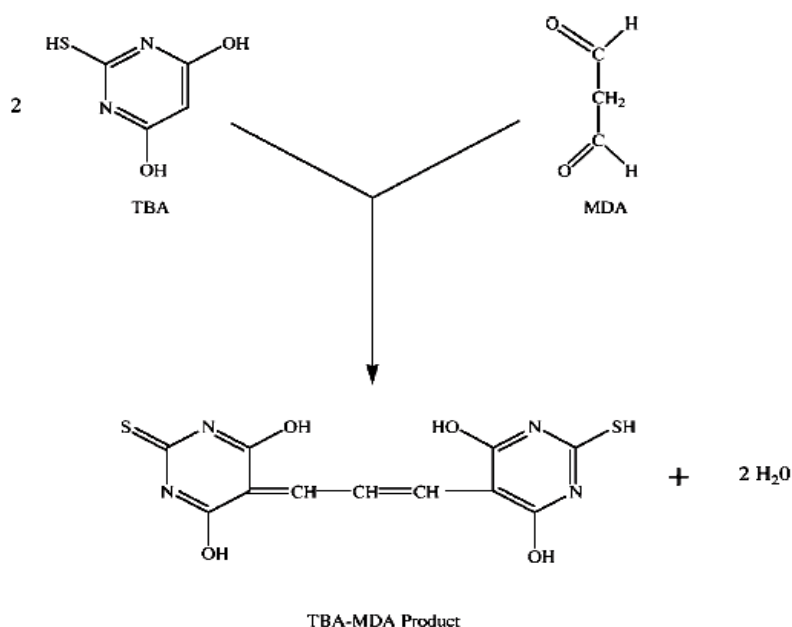
V rezultatih smo podajali ΔP , ki smo jo določili tako, da smo od merjene polarizacije DPH v liposomih (MLV ali ULV) v prisotnosti različnih oblik koencima Q₁₀ odšteli polarizacijo kontrole (polarizacija DPH v liposomih (MLV ali ULV) brez nosilca in brez koencima Q₁₀).

UV inducirana lipidna oksidacija v liposomih

Koencim Q₁₀ je učinkovit antioksidant saj preprečuje UV inducirano lipidno oksidacijo maščob, kar smo dokazali s TBARS testom.

TBARS test

Tiobarbiturna kislina (TBA) se pogosto uporablja za spremljanje lipidne oksidacije. Pri oksidaciji lipidov kot razpadni produkt večkrat nenasičenih maščobnih kislin nastane malonaldehid (MA). MA reagira z tiobarbiturno kislino in nastane rožnato obarvan kompleks, ki ga določamo spektrofotometrično pri 532 nm (Williamson in sod., 2003).



Slika 8: Kemijska reakcija med TBA in MDA, kjer nastane TBA-MDA produkt (Williamson in sod., 2003).

Zatehtali smo ustrezno količino tiobarbiturne kisline in dodali vodo, tako da smo dobili 2 % raztopino. Raztopino smo postavili v ultrazvočno kopel za 5 min. Nato smo suspenzijo segrevali v vreli vodi toliko časa, da se je tiobarbiturna kislina raztopila. Raztopino smo ohladili pri sobni temperaturi ter jo razredčili do določenega volumna. V epruvete smo odpipetirali po 3 ml 20 % raztopine trikloroacetne kisline, nato pa dodali še po 1 ml mešanice, ki smo jo pripravili tako, da smo zmešali polovico 2 % raztopine tiobarbiturne kisline ter polovico 20 % raztopine perklorne kisline. Po 1 ml tako pripravljene mešanice smo dodajali v epruvete z vzorci liposomov pripravljenih iz jajčnega fosfatidilholina (c = 10 mg/ml) z dodanim koencimom Q₁₀.

Po vsakem obsevanju smo v epruvete z zamaškom odpipetirali 0,2 ml suspenzije liposomov in dodali 3 ml 20 % raztopine trikloroacetne kisline, premešali ter dodali še 1 ml 20 % perklorne kisline. Vzorce smo segrevali v vodni kopeli 25 min, nato smo jih ohladili v vodi ter jih prelili v steklene centrifugirke. Centrifugirali smo 6 min pri 2500 min⁻¹. Po končanem centrifugiranju smo supernatant prelili v kiveto in izmerili absorbanco pri 532 nm proti slepemu vzorcu, pripravljenemu iz 0,2 ml vode in ostalih reagentov pri sobni temperaturi.

4 REZULTATI

4.1 MERJENJE POLARIZACIJE IN ANIZOTROPIJE

4.1.1 Merjenje polarizacije in anizotropije DPH v MLV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH pri $T=25\text{ °C}$

V preglednicah 2 do 4 so prikazane odvisnosti polarizacije (P) in anizotropije (A) DPH v MLV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH od molskega razmerja koencima Q_{10} /lipidi v etanolni raztopini (lipidotopni LS koencim Q_{10}) oz. vodnih raztopinah koencima Q_{10} (s škrobnim oz. ciklodekstrinskim kompleksom). Spremembe v polarizaciji fluoroforja DPH ob dodatku treh različnih oblik koencima Q_{10} v MLV pripravljenih iz zmesi POPE, POPC, POPS in CH pri $T=25\text{ °C}$ so prikazane na Sliki 9.

Dodatek lipidotopnega (LS) koencima Q_{10} je povzročil rahlo povečanje spremembe polarizacije (ΔP). ΔP smo določili tako, da smo od merjene polarizacije DPH v liposomih v prisotnosti različnih oblik koencima Q_{10} odšteli polarizacijo kontrole (polarizacija DPH v liposomih brez nosilca in brez koencima Q_{10}). Ko je molsko razmerje Q_{10} /lipidi preseglo vrednost 2,0, je bilo povečanje še izrazitejše. Dodatek vodotopnega koencima Q_{10} s ciklodekstrinskim kompleksom je povzročil znižanje ΔP in sicer sorazmerno s povečanjem molskega razmerja Q_{10} /lipidi. Učinek na znižanje ΔP je bil ob dodatku vodotopnega koencima Q_{10} s škrobnim kompleksom še izrazitejši (Slika 9).

Preglednica 2: Sprememba v polarizaciji (ΔP) in anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v MLV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH ob dodatku lipidotopnega (LS) koencima Q₁₀ pri T= 25 °C

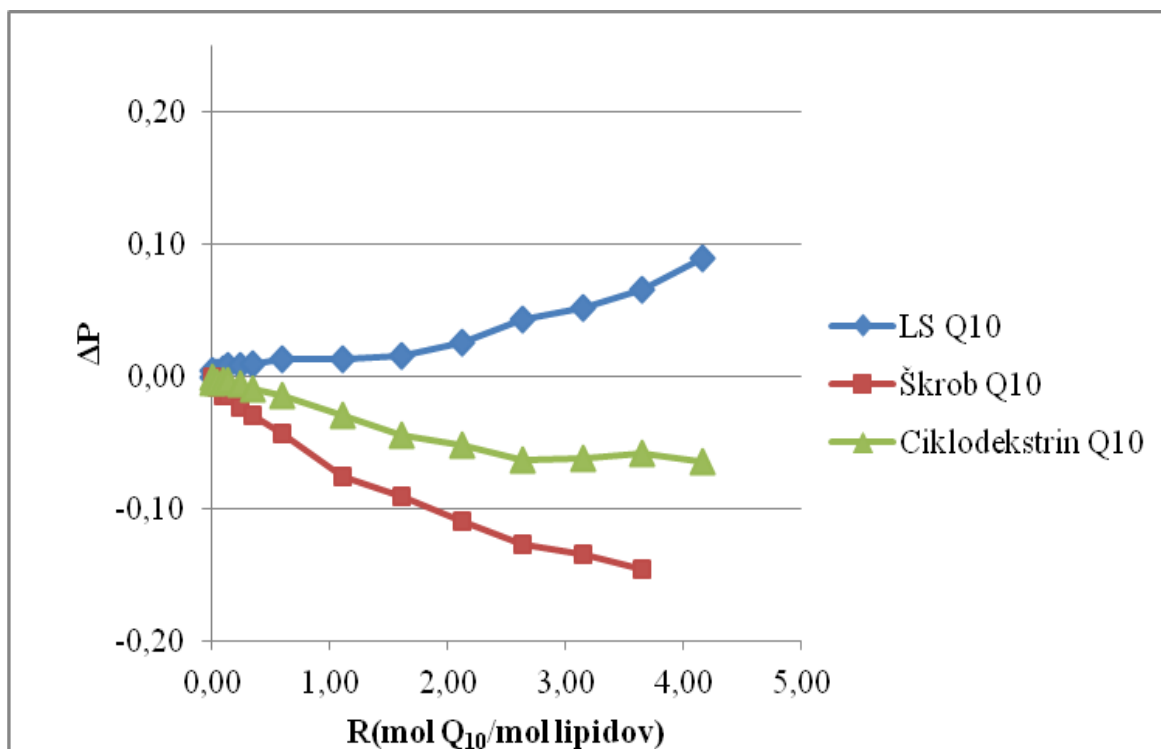
VQ ₁₀ (μ l)	R(mol Q ₁₀ /mol lip.)	LS Q10		LS Q ₁₀ kontrola		ΔP	ΔA
		P	A	P	A		
0	0,00	0,2912 \pm 0,0020	0,2202 \pm 0,0009	0,2912 \pm 0,0030	0,2202 \pm 0,0023	0,0000	0,0000
2	0,01	0,2965 \pm 0,0015	0,2202 \pm 0,0006	0,2913 \pm 0,0025	0,2169 \pm 0,0013	0,0052	0,0033
7	0,04	0,3028 \pm 0,0020	0,2254 \pm 0,0010	0,2987 \pm 0,0018	0,2219 \pm 0,0015	0,0041	0,0035
17	0,09	0,3032 \pm 0,0012	0,2283 \pm 0,0009	0,2973 \pm 0,0016	0,2225 \pm 0,0013	0,0060	0,0058
27	0,14	0,3045 \pm 0,0019	0,2268 \pm 0,0017	0,2962 \pm 0,0017	0,2206 \pm 0,0011	0,0083	0,0062
47	0,24	0,3033 \pm 0,0013	0,2277 \pm 0,0019	0,2945 \pm 0,0012	0,2191 \pm 0,0010	0,0089	0,0086
67	0,34	0,3015 \pm 0,0024	0,2274 \pm 0,0019	0,2914 \pm 0,0019	0,2187 \pm 0,0017	0,0101	0,0087
117	0,60	0,2937 \pm 0,0006	0,2184 \pm 0,0020	0,2801 \pm 0,0016	0,2078 \pm 0,0004	0,0136	0,0107
217	1,11	0,2889 \pm 0,0027	0,2125 \pm 0,0015	0,2757 \pm 0,0026	0,2023 \pm 0,0013	0,0132	0,0102
317	1,61	0,2797 \pm 0,0027	0,2051 \pm 0,0050	0,2636 \pm 0,0027	0,1916 \pm 0,0017	0,0161	0,0136
417	2,12	0,2783 \pm 0,0068	0,2082 \pm 0,0045	0,2516 \pm 0,0006	0,1855 \pm 0,0013	0,0267	0,0227
517	2,63	0,2871 \pm 0,0157	0,2068 \pm 0,0032	0,2436 \pm 0,0026	0,1745 \pm 0,0015	0,0435	0,0324
617	3,14	0,2844 \pm 0,0061	0,2055 \pm 0,0087	0,2318 \pm 0,0027	0,1652 \pm 0,0020	0,0526	0,0404
717	3,65	0,2832 \pm 0,0119	0,2058 \pm 0,0101	0,2168 \pm 0,0033	0,1606 \pm 0,0014	0,0664	0,0452
817	4,16	0,3033 \pm 0,0212	0,2235 \pm 0,0125	0,2136 \pm 0,0031	0,1536 \pm 0,0013	0,0898	0,0699

Preglednica 3: Sprememba v polarizaciji (ΔP) in anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v MLV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH ob dodatku vodotopnega koencima Q₁₀ s škrobnim kompleksom pri T= 25 °C

VQ ₁₀ (μ l)	R(mol Q ₁₀ /mol lip.)	ŠKROB Q ₁₀		ŠKROB kontrola		ΔP	ΔA
		P	A	P	A		
0	0,00	0,3228 \pm 0,0025	0,2383 \pm 0,0011	0,3228 \pm 0,0024	0,2383 \pm 0,0012	0,0000	0,0000
2	0,01	0,3042 \pm 0,0020	0,2241 \pm 0,0016	0,3110 \pm 0,0024	0,2294 \pm 0,0009	-0,0068	-0,0053
7	0,04	0,2950 \pm 0,0017	0,2185 \pm 0,0013	0,3022 \pm 0,0019	0,2275 \pm 0,0015	-0,0072	-0,0090
17	0,09	0,2865 \pm 0,0023	0,2139 \pm 0,0014	0,3009 \pm 0,0019	0,2239 \pm 0,0014	-0,0144	-0,0100
27	0,14	0,2811 \pm 0,0017	0,2068 \pm 0,0004	0,2946 \pm 0,0010	0,2172 \pm 0,0006	-0,0136	-0,0104
47	0,24	0,2710 \pm 0,0032	0,1977 \pm 0,0017	0,2942 \pm 0,0018	0,2158 \pm 0,0015	-0,0232	-0,0182
67	0,34	0,2620 \pm 0,0039	0,1922 \pm 0,0053	0,2915 \pm 0,0017	0,2150 \pm 0,0014	-0,0295	-0,0229
117	0,60	0,2465 \pm 0,0025	0,1803 \pm 0,0033	0,2894 \pm 0,0015	0,2149 \pm 0,0011	-0,0429	-0,0347
217	1,11	0,2122 \pm 0,0059	0,1524 \pm 0,0038	0,2874 \pm 0,0009	0,2118 \pm 0,0014	-0,0752	-0,0594
317	1,61	0,1991 \pm 0,0048	0,1441 \pm 0,0071	0,2895 \pm 0,0022	0,2105 \pm 0,0005	-0,0904	-0,0664
417	2,12	0,1814 \pm 0,0095	0,1288 \pm 0,0054	0,2898 \pm 0,0014	0,2142 \pm 0,0013	-0,1085	-0,0854
517	2,63	0,16275 \pm 0,0104	0,1233 \pm 0,0100	0,2889 \pm 0,0004	0,2108 \pm 0,0023	-0,1262	-0,0875
617	3,14	0,1502 \pm 0,0115	0,1065 \pm 0,0077	0,2847 \pm 0,0022	0,2074 \pm 0,0008	-0,1345	-0,1009
717	3,65	0,1407 \pm 0,0134	0,0927 \pm 0,0120	0,2865 \pm 0,0021	0,2073 \pm 0,0017	-0,1458	-0,1146

Preglednica 4: Sprememba v polarizaciji (ΔP) in anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v MLV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH ob dodatku vodotopnega koencima Q₁₀ s kompleksom ciklodekstrina pri T= 25 °C

VQ ₁₀ (μ l)	R(mol Q ₁₀ /mol lip.)	CIKLODEKSTRIN Q ₁₀		CIKLODEKSTRIN kontrola		ΔP	ΔA
		P	A	P	A		
0	0,00	0,3194±0,0011	0,2347±0,0023	0,3194±0,0078	0,2347±0,0021	0,0000	0,0000
2	0,01	0,3074±0,0006	0,2262±0,0013	0,3110±0,0018	0,2294±0,0014	-0,0036	-0,0032
7	0,04	0,2980±0,0011	0,2241±0,0014	0,3022±0,0026	0,2275±0,0016	-0,0042	-0,0033
17	0,09	0,2980±0,0010	0,2215±0,0036	0,3009±0,0022	0,2239±0,0008	-0,0029	-0,0023
27	0,14	0,2914±0,0016	0,2139±0,0032	0,2946±0,0018	0,2172±0,0011	-0,0032	-0,0033
47	0,24	0,2888±0,0030	0,2121±0,0011	0,2942±0,0023	0,2158±0,0011	-0,0054	-0,0037
67	0,34	0,2827±0,0031	0,2124±0,0022	0,2915±0,0016	0,2150±0,0010	-0,0088	-0,0027
117	0,60	0,2757±0,0025	0,2030±0,0025	0,2894±0,0020	0,2149±0,0025	-0,0137	-0,0119
217	1,11	0,2583±0,0023	0,1890±0,0050	0,2874±0,0009	0,2118±0,0008	-0,0292	-0,0228
317	1,61	0,2456±0,0016	0,1705±0,0032	0,2895±0,0012	0,2105±0,0009	-0,0439	-0,0401
417	2,12	0,2386±0,0096	0,1720±0,0049	0,2898±0,0018	0,2142±0,0016	-0,0513	-0,0422
517	2,63	0,2265±0,0077	0,1667±0,0053	0,2889±0,0028	0,2108±0,0010	-0,0625	-0,0441
617	3,14	0,2233±0,0047	0,1612±0,0029	0,2847±0,0033	0,2074±0,0011	-0,0614	-0,0462
717	3,65	0,2292±0,0137	0,1493±0,0055	0,2865±0,0053	0,2073±0,0023	-0,0574	-0,0580
817	4,16	0,2244±0,0161	0,1555±0,0145	0,2880±0,0005	0,2101±0,0016	-0,0636	-0,0546



Slika 9: Sprememba v polarizaciji (ΔP) fluoroforja DPH v MLV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH ob dodatku treh različnih oblik koencima Q₁₀ pri T= 25 °C

4.1.2 Merjenje polarizacije in anizotropije DPH v MLV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH pri T= 37 °C

V preglednicah 5 do 7 so prikazane odvisnosti polarizacije (P) in anizotropije (A) v MLV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH od molskega razmerja koencima Q₁₀/lipidi v etanolni raztopini (lipidotopni LS koencim Q₁₀) oz. vodnih raztopinah koencima Q₁₀ (s škrobnim oz. ciklodekstrinskim kompleksom). Spremembe v polarizaciji ΔP fluoroforja DPH ob dodatku treh različnih oblik koencima Q₁₀ v MLV pripravljenih iz zmesi POPE, POPC, POPS in CH pri T= 37 °C so prikazane na Sliki 10.

Dodatek lipidotopnega (LS) koencima Q₁₀ je tudi pri višji temperaturi povzročil povečanje ΔP . Preskok je najbolj izrazit pri molskem razmerju Q₁₀/lipidi = 1,11 kar nakazuje na to, da bi bilo povišanje ΔP s povečevanjem molskega razmerja vedno večje. Meritev od molskega razmerja 1,1 naprej nismo izvajali zaradi prevelikega sipanja svetlobe. Dodatek obeh vodotopnih oblik koencima Q₁₀ (s ciklodekstrinskim in škrobnim kompleksom) je povzročil znižanje ΔP , kar je še posebej izrazito pri koencimu Q₁₀ s škrobnim kompleksom (Slika 10).

Preglednica 5: Sprememba v polarizaciji (ΔP) in anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v MLV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH ob dodatku lipidotopnega (LS) koencima Q₁₀ pri T= 37 °C

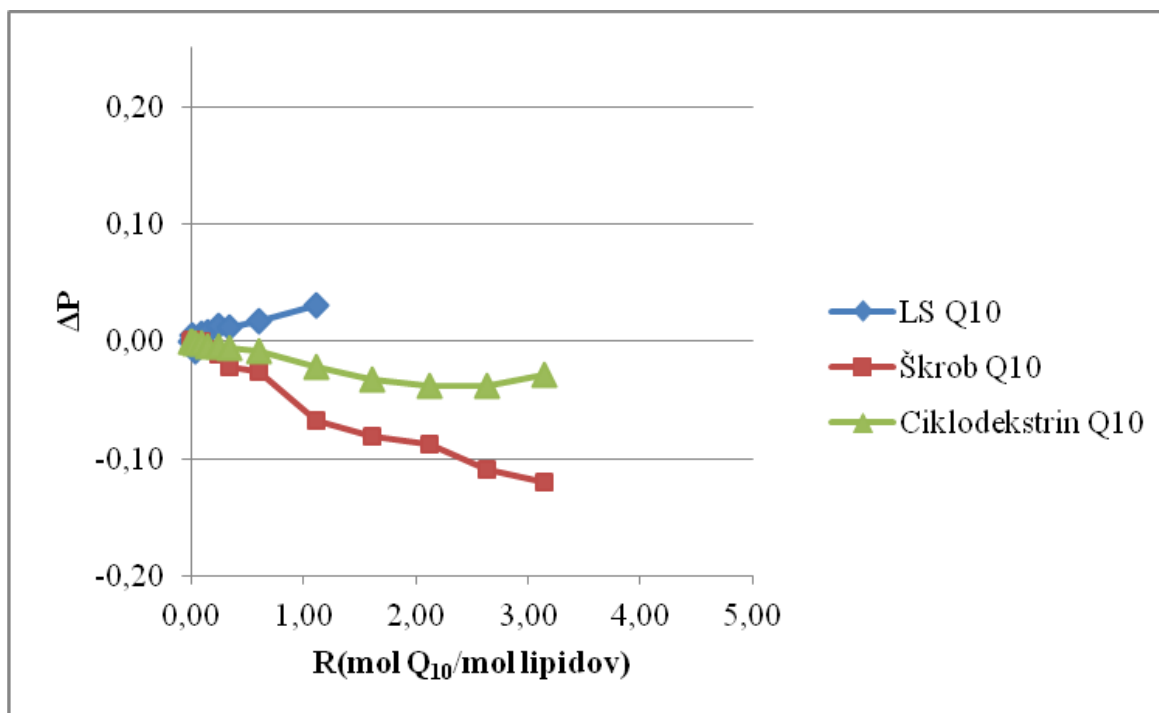
VQ ₁₀ (μ l)	R(mol Q ₁₀ /mol lip.)	LS Q ₁₀		LS Q ₁₀ kontrola		ΔP	ΔA
		P	A	P	A		
0	0,00	0,2687±0,0475	0,1939±0,0663	0,2687±0,0512	0,1939±0,0546	0,0000	0,0000
2	0,01	0,2629±0,0513	0,1937±0,0462	0,2578±0,0224	0,1910±0,0119	0,0051	0,0027
7	0,04	0,2645±0,0539	0,1935±0,0955	0,2731±0,0203	0,1879±0,0196	-0,0086	0,0056
17	0,09	0,2621±0,0292	0,1913±0,0444	0,2555±0,0412	0,1871±0,0140	0,0066	0,0042
27	0,14	0,3833±0,0259	0,3106±0,0288	0,2521±0,0114	0,1887±0,0268	0,0073	0,0063
47	0,24	0,2659±0,0383	0,1938±0,0336	0,2534±0,0320	0,1856±0,0237	0,0125	0,0082
67	0,34	0,2606±0,0365	0,1863±0,0086	0,2489±0,0160	0,1783±0,0097	0,0117	0,0080
117	0,60	0,2532±0,0317	0,1855±0,0422	0,2360±0,0182	0,1722±0,0271	0,0172	0,0133
217	1,11	0,2510±0,0416	0,1817±0,0049	0,2199±0,0192	0,1578±0,0115	0,0311	0,0239

Preglednica 6: Sprememba v polarizaciji (ΔP) in anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v MLV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH ob dodatku vodotopnega koencima Q₁₀ s škrobnim kompleksom pri T= 37 °C

VQ ₁₀ (μ l)	R(mol Q ₁₀ /mol lip.)	ŠKROB Q ₁₀		ŠKROB kontrola		ΔP	ΔA
		P	A	P	A		
0	0,00	0,2688±0,0018	0,1949±0,0009	0,2688±0,0024	0,1949±0,0010	0,0000	0,0000
2	0,01	0,2670±0,0009	0,1946±0,0016	0,2655±0,0006	0,1928±0,0014	0,0015	0,0018
7	0,04	0,2664±0,0014	0,1930±0,0015	0,2664±0,0025	0,1937±0,0015	0,0000	-0,0008
17	0,09	0,2608±0,0009	0,1911±0,0013	0,2616±0,0021	0,1911±0,0023	-0,0008	0,0000
27	0,14	0,2595±0,0028	0,1896±0,0021	0,2668±0,0028	0,1927±0,0020	-0,0073	-0,0031
47	0,24	0,2535±0,0027	0,1859±0,0029	0,2643±0,0018	0,1937±0,0016	-0,0109	-0,0078
67	0,34	0,2433±0,0029	0,1791±0,0029	0,2655±0,0017	0,1918±0,0011	-0,0222	-0,0128
117	0,60	0,2364±0,0028	0,1675±0,0012	0,2618±0,0026	0,1901±0,0014	-0,0254	-0,0227
217	1,11	0,1966±0,0083	0,1406±0,0020	0,2643±0,0032	0,1924±0,0022	-0,0677	-0,0518
317	1,61	0,1835±0,0080	0,1302±0,0037	0,2643±0,0029	0,1941±0,0013	-0,0808	-0,0639
417	2,12	0,1763±0,0084	0,1211±0,0083	0,2644±0,0011	0,1958±0,0027	-0,0881	-0,0747
517	2,63	0,1572±0,0085	0,1068±0,0144	0,2663±0,0012	0,1923±0,0013	-0,1091	-0,0855
617	3,14	0,1428±0,0059	0,1025±0,0126	0,2629±0,0024	0,1935±0,0007	-0,1201	-0,0910

Preglednica 7: Sprememba v polarizaciji (ΔP) in anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v MLV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH ob dodatku vodotopnega koencima Q₁₀ s kompleksom ciklodekstrina pri T= 37 °C

VQ ₁₀ (μ l)	R(mol Q ₁₀ /mol lip.)	CIKLODEKSTRIN Q ₁₀		CIKLODEKSTRIN kontrola		ΔP	ΔA
		P	A	P	A		
0	0,00	0,2627 \pm 0,0006	0,1947 \pm 0,0014	0,2627 \pm 0,0024	0,1947 \pm 0,0012	0,0000	0,0000
2	0,01	0,2646 \pm 0,0024	0,1923 \pm 0,0015	0,2655 \pm 0,0014	0,1929 \pm 0,0016	-0,0009	-0,0005
7	0,04	0,2648 \pm 0,0024	0,1940 \pm 0,0011	0,2664 \pm 0,0020	0,1938 \pm 0,0019	-0,0016	0,0002
17	0,09	0,2606 \pm 0,0024	0,1906 \pm 0,0021	0,2617 \pm 0,0023	0,1912 \pm 0,0014	-0,0011	-0,0006
27	0,14	0,2629 \pm 0,0019	0,1911 \pm 0,0030	0,2668 \pm 0,0021	0,1927 \pm 0,0024	-0,0038	-0,0016
47	0,24	0,2602 \pm 0,0017	0,1903 \pm 0,0012	0,2644 \pm 0,0022	0,1937 \pm 0,0014	-0,0042	-0,0034
67	0,34	0,2600 \pm 0,0020	0,1882 \pm 0,0038	0,2655 \pm 0,0025	0,1919 \pm 0,0016	-0,0055	-0,0037
117	0,60	0,2533 \pm 0,0022	0,1835 \pm 0,0017	0,2618 \pm 0,0011	0,1902 \pm 0,0016	-0,0085	-0,0067
217	1,11	0,2425 \pm 0,0040	0,1782 \pm 0,0016	0,2643 \pm 0,0020	0,1924 \pm 0,0015	-0,0218	-0,0142
317	1,61	0,2316 \pm 0,0059	0,1704 \pm 0,0036	0,2643 \pm 0,0023	0,1941 \pm 0,0023	-0,0327	-0,0237
417	2,12	0,2261 \pm 0,0084	0,1743 \pm 0,0029	0,2644 \pm 0,0036	0,1958 \pm 0,0028	-0,0383	-0,0215
517	2,63	0,2280 \pm 0,0102	0,1684 \pm 0,0077	0,2663 \pm 0,0021	0,1923 \pm 0,0013	-0,0383	-0,0239
617	3,14	0,2345 \pm 0,0027	0,1648 \pm 0,0079	0,2629 \pm 0,0027	0,1935 \pm 0,0015	-0,0284	-0,0287



Slika 10: Sprememba v polarizaciji (ΔP) fluoroforja DPH v MLV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH ob dodatku treh različnih oblik koencima Q₁₀ pri T= 37 °C

4.1.3 Merjenje polarizacije in anizotropije DPH v ULV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH pri T= 25 °C

V preglednicah 8 do 10 so prikazane odvisnosti polarizacije (P) in anizotropije (A) v ULV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH od molskega razmerja koencima Q₁₀/lipidi v etanolni raztopini (lipidotopni LS koencim Q₁₀) oz. vodnih raztopinah koencima Q₁₀ (s škrobnim oz. ciklodekstrinskim kompleksom). Spremembe v polarizaciji fluoroforja DPH ob dodatku treh različnih oblik koencima Q₁₀ v ULV pripravljenih iz zmesi POPE, POPC, POPS in CH pri T= 25 °C so prikazane na Sliki 11.

Sprememba v polarizaciji (ΔP) je najbolj izrazita pri dodatku lipidotopnega (LS) koencima Q₁₀, saj eksponentno narašča. Glavni preskok se zgodi pri molskem razmerju Q₁₀/lipidi = 1,1. Na drugi strani pa dodatek obeh vodotopnih oblik koencima Q₁₀ (s ciklodekstrinskim in škrobnim kompleksom) povzroči padec ΔP . Pri koencimu Q₁₀ s ciklodekstrinskim kompleksom se padec ustavi pri molskem razmerju Q₁₀/lipidi = 2,12, medtem ko se pri koencimu Q₁₀ s škrobnim kompleksom padanje ΔP nadaljuje vse do konca meritev (Slika 11).

Preglednica 8: Sprememba v polarizaciji (ΔP) in anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v ULV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH ob dodatku lipidotopnega (LS) koencima Q₁₀ pri T= 25 °C

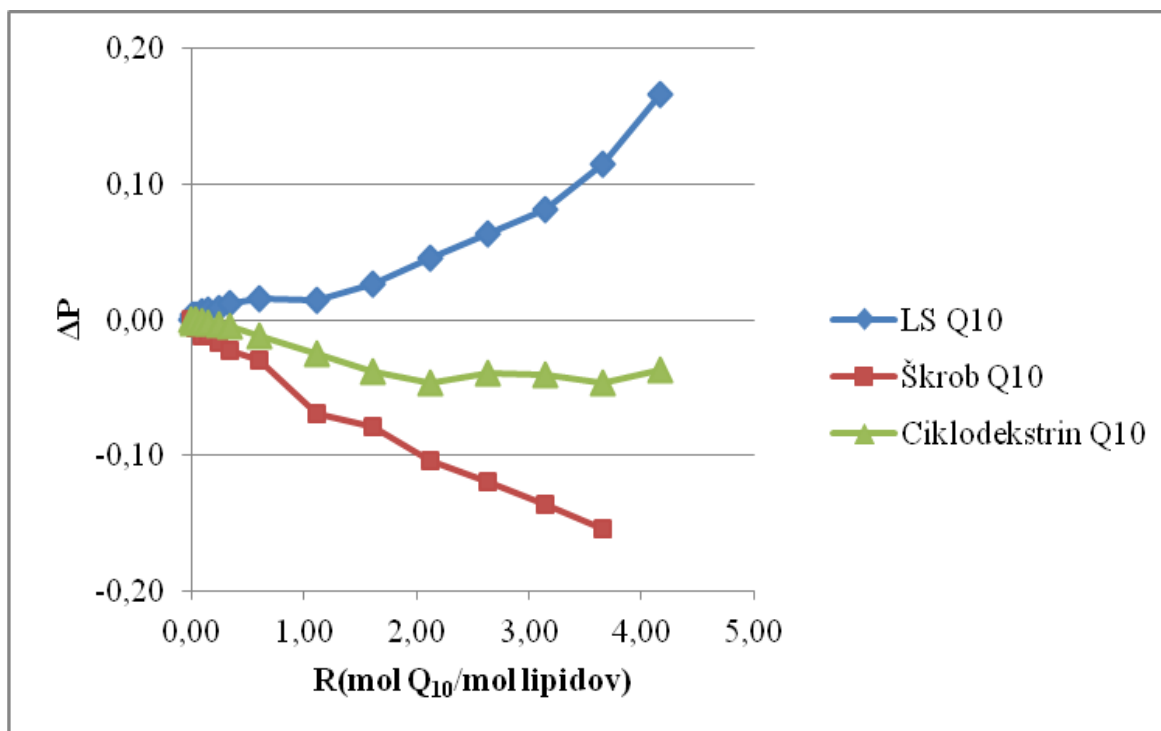
VQ ₁₀ (μ l)	R(mol Q ₁₀ /mol lip.)	LS Q10		LS Q ₁₀ kontrola		ΔP	ΔA
		P	A	P	A		
0	0,00	0,3019±0,0011	0,2292±0,0017	0,3019±0,0014	0,2292±0,0012	0,0000	0,0000
2	0,01	0,2999±0,0016	0,2251±0,0016	0,2967±0,0005	0,2230±0,0009	0,0032	0,0022
7	0,04	0,3104±0,0015	0,2310±0,0013	0,3068±0,0017	0,2276±0,0016	0,0036	0,0034
17	0,09	0,3120±0,0026	0,2337±0,0007	0,3054±0,0016	0,2286±0,0017	0,0066	0,0051
27	0,14	0,3123±0,0014	0,2328±0,0005	0,3044±0,0012	0,2273±0,0009	0,0079	0,0055
67	0,34	0,3110±0,0040	0,2344±0,0010	0,2990±0,0035	0,2255±0,0009	0,0121	0,0089
117	0,60	0,3054±0,0010	0,2299±0,0016	0,2896±0,0071	0,2157±0,0043	0,0158	0,0142
217	1,11	0,3001±0,0021	0,2217±0,0008	0,2857±0,0044	0,2105±0,0021	0,0144	0,0112
317	1,61	0,3012±0,0014	0,2217±0,0012	0,2748±0,0058	0,2003±0,0074	0,0264	0,0214
417	2,12	0,3080±0,0012	0,2282±0,0022	0,2629±0,0119	0,1937±0,0054	0,0452	0,0345
517	2,63	0,3195±0,0017	0,2423±0,0017	0,2554±0,0222	0,1818±0,0107	0,0641	0,0606
617	3,14	0,3253±0,0009	0,2376±0,0017	0,2437±0,0110	0,1743±0,0119	0,0817	0,0633
717	3,65	0,3438±0,0011	0,2684±0,0016	0,2293±0,0159	0,1689±0,0297	0,1145	0,0995
817	4,16	0,3904±0,0018	0,2966±0,0011	0,2244±0,0303	0,1604±0,0120	0,1661	0,1362

Preglednica 9: Sprememba v polarizaciji (ΔP) in anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v ULV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH ob dodatku vodotopnega koencima Q₁₀ s škrobnim kompleksom pri T= 25 °C

VQ ₁₀ (μ l)	R(mol Q ₁₀ /mol lip.)	ŠKROB Q ₁₀		ŠKROB kontrola		ΔP	ΔA
		P	A	P	A		
0	0,00	0,3206±0,0047	0,2365±0,0023	0,3206±0,0031	0,2365±0,0015	0,0000	0,0000
2	0,01	0,3059±0,0012	0,2265±0,0019	0,3108±0,0032	0,2289±0,0009	-0,0048	-0,0024
7	0,04	0,2963±0,0019	0,2202±0,0012	0,3026±0,0013	0,2271±0,0009	-0,0063	-0,0069
17	0,09	0,2889±0,0019	0,2163±0,0008	0,3007±0,0014	0,2231±0,0024	-0,0118	-0,0069
27	0,14	0,2844±0,0010	0,2079±0,0019	0,2950±0,0009	0,2174±0,0011	-0,0107	-0,0095
47	0,24	0,2771±0,0028	0,2021±0,0014	0,2942±0,0016	0,2166±0,0012	-0,0171	-0,0145
67	0,34	0,2679±0,0020	-	0,2900±0,0020	-	-0,0221	-
117	0,60	0,2579±0,0035	0,1871±0,0010	0,2882±0,0026	0,2148±0,0015	-0,0303	-0,0277
217	1,11	0,2176±0,0071	0,1582±0,0014	0,2864±0,0005	0,2108±0,0014	-0,0688	-0,0526
317	1,61	0,2115±0,0029	0,1495±0,0035	0,2898±0,0012	0,2094±0,0014	-0,0782	-0,0599
417	2,12	0,1864±0,0086	0,1331±0,0096	0,2902±0,0019	0,2132±0,0010	-0,1038	-0,0801
517	2,63	0,1690±0,0083	-	0,2878±0,0023	-	-0,1188	-
617	3,14	0,1462±0,0149	0,1073±0,0160	0,2825±0,0026	0,2068±0,0024	-0,1364	-0,0996
717	3,65	0,1316±0,0108	0,1024±0,0162	0,2857±0,0014	0,2057±0,0022	-0,1541	-0,1033
817	4,16	-	-	0,2857±0,0009	0,2094±0,0016	-	-

Preglednica 10: Sprememba v polarizaciji (ΔP) in anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v ULV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH ob dodatku vodotopnega koencima Q₁₀ s kompleksom ciklodekstrina pri T= 25 °C

VQ ₁₀ (μ l)	R(mol Q ₁₀ /mol lip.)	CIKLODEKSTRIN Q ₁₀		CIKLODEKSTRIN kontrola		ΔP	ΔA
		P	A	P	A		
0	0,00	0,3203±0,0024	0,2353±0,0021	0,3202±0,0028	0,2370±0,0022	0,0000	0,0000
2	0,01	0,3089±0,0011	0,2263±0,0022	0,3108±0,0031	0,2289±0,0014	-0,0019	-0,0026
7	0,04	0,3025±0,0018	0,2254±0,0026	0,3027±0,0019	0,2271±0,0006	-0,0002	-0,0017
17	0,09	0,2999±0,0018	0,2218±0,0013	0,3007±0,0024	0,2231±0,0008	-0,0008	-0,0013
27	0,14	0,2930±0,0001	0,2154±0,0013	0,2951±0,0030	0,2174±0,0013	-0,0020	-0,0020
47	0,24	0,2905±0,0020	0,2136±0,0018	0,2942±0,0036	0,2166±0,0016	-0,0037	-0,0030
67	0,34	0,2849±0,0027	0,2120±0,0007	0,2901±0,0023	0,2145±0,0016	-0,0051	-0,0026
117	0,60	0,2769±0,0040	0,2070±0,0035	0,2882±0,0016	0,2148±0,0015	-0,0113	-0,0078
217	1,11	0,2611±0,0042	0,1914±0,0010	0,2864±0,0016	0,2108±0,0010	-0,0253	-0,0194
317	1,61	0,2513±0,0072	0,1781±0,0036	0,2898±0,0020	0,2094±0,0004	-0,0385	-0,0313
417	2,12	0,2437±0,0115	0,1809±0,0070	0,2903±0,0031	0,2132±0,0011	-0,0466	-0,0323
517	2,63	0,2488±0,0107	0,1732±0,0078	0,2878±0,0008	0,2101±0,0010	-0,0390	-0,0369
617	3,14	0,2427±0,0134	0,1664±0,0096	0,2826±0,0022	0,2068±0,0014	-0,0399	-0,0404
717	3,65	0,2396±0,0078	0,1640±0,0058	0,2857±0,0030	0,2057±0,0008	-0,0461	-0,0417
817	4,16	0,2491±0,0109	0,1817±0,0123	0,2858±0,0027	0,2094±0,0007	-0,0367	-0,0277



Slika 11: Sprememba v polarizaciji (ΔP) fluoroforja DPH v ULV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH ob dodatku treh različnih oblik koencima Q_{10} pri $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$

4.1.4 Merjenje polarizacije in anizotropije DPH v ULV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH pri $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$

V preglednicah 11 do 13 so prikazane odvisnosti polarizacije (P) in anizotropije (A) v ULV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH od molskega razmerja koencima Q_{10} /lipidi v etanolni raztopini (lipidotopni LS koencim Q_{10}) oz. vodnih raztopinah koencima Q_{10} (s škrobnim oz. ciklodekstrinskim kompleksom). Spremembe v polarizaciji fluoroforja DPH v ULV pripravljenih iz zmesi POPE, POPC, POPS in CH ob dodatku treh različnih oblik koencima Q_{10} pri $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ so prikazane na Sliki 12.

Lipidotopni (LS) koencim Q_{10} povzroči naraščanje ΔP že takoj na začetku. Naraščanje poteka skoraj linearno v proučevanem, molsko razmerje Q_{10} /lipidi. Dodatek vodotopnega koencima Q_{10} s ciklodekstrinskim kompleksom pri molskem razmerju Q_{10} /lipidi = 0,04 povzroči rahel padec ΔP , nato so spremembe zanemarljive. Dodatek vodotopnega koencima Q_{10} s škrobnim kompleksom pa povzroči padanje ΔP , ki pri molskem razmerju Q_{10} /lipidi = 3,0 znaša -0.1 (Slika 12).

Preglednica 11: Sprememba v polarizaciji (ΔP) in anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v ULV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH ob dodatku lipidotopnega (LS) koencima Q₁₀ pri T= 37 °C

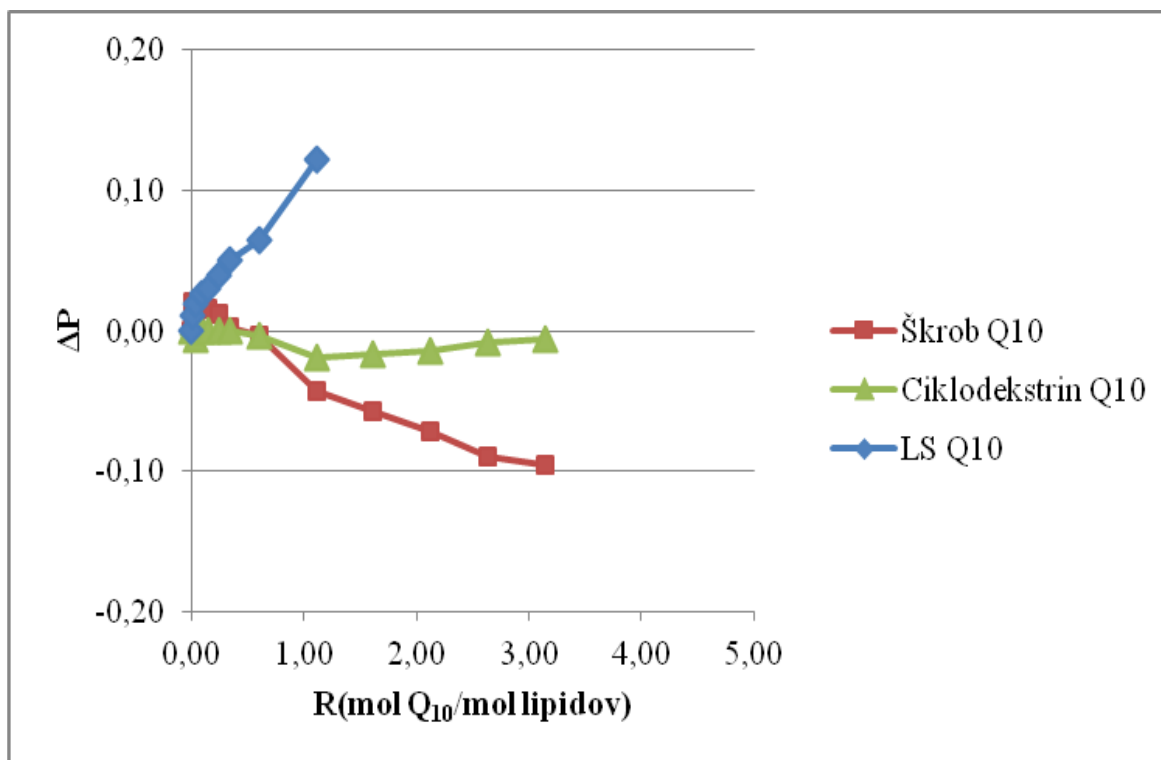
VQ ₁₀ (μ l)	R(mol Q ₁₀ /mol lip.)	LS Q ₁₀		LS Q ₁₀ kontrola		ΔP	ΔA
		P	A	P	A		
0	0,00	0,2846±0,0026	0,1979±0,0007	0,2846±0,0031	0,1979±0,0013	0,0000	0,0000
2	0,01	0,2716±0,0017	0,1962±0,0010	0,2611±0,0017	0,1861±0,0011	0,0105	0,0101
7	0,04	0,2725±0,0013	0,1959±0,0006	0,2531±0,0009	0,1827±0,0011	0,0195	0,0132
17	0,09	0,2761±0,0015	0,2047±0,0012	0,2490±0,0019	0,1849±0,0015	0,0271	0,0198
27	0,14	0,2806±0,0022	0,2106±0,0015	0,2506±0,0011	0,1871±0,0013	0,0300	0,0236
47	0,24	0,2948±0,0035	0,2175±0,0020	0,2554±0,0014	0,1850±0,0014	0,0394	0,0325
67	0,34	-	0,2177±0,0023	-	0,1826±0,0013	-	0,0351
117	0,60	0,3070±0,0017	0,2310±0,0015	0,2417±0,0023	0,1742±0,0024	0,0653	0,0569
217	1,11	0,3481±0,0033	0,2642±0,0037	0,2261±0,0027	0,1618±0,0014	0,1220	0,1024

Preglednica 12: Sprememba v polarizaciji (ΔP) in anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v ULV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH ob dodatku vodotopnega koencima Q₁₀ s škrobnim kompleksom pri T= 37 °C

VQ ₁₀ (μ l)	R(mol Q ₁₀ /mol lip.)	ŠKROB Q ₁₀		ŠKROB kontrola		ΔP	ΔA
		P	A	P	A		
0	0,00	0,2698±0,0028	0,1941±0,0009	0,2698±0,0018	0,1941±0,0026	0,0000	0,0000
2	0,01	0,2755±0,0020	0,2009±0,0008	0,2546±0,0020	0,1853±0,0017	0,0210	0,0157
7	0,04	0,2747±0,0028	0,2009±0,0011	0,2612±0,0028	0,1876±0,0006	0,0135	0,0133
17	0,09	0,2722±0,0042	0,1988±0,0025	0,2520±0,0015	0,1850±0,0013	0,0202	0,0138
27	0,14	0,2707±0,0015	0,1993±0,0019	0,2554±0,0025	0,1850±0,0010	0,0154	0,0143
47	0,24	0,2661±0,0018	-	0,2544±0,0013	-	0,0117	-
67	0,34	0,2577±0,0024	0,1920±0,0022	0,2554±0,0014	0,1848±0,0018	0,0023	0,0072
117	0,60	0,2501±0,0024	0,1789±0,0030	0,2535±0,0013	0,1837±0,0018	-0,0035	-0,0048
217	1,11	0,2130±0,0041	0,1517±0,0033	0,2557±0,0028	0,1857±0,0015	-0,0427	-0,0340
317	1,61	0,1977±0,0029	0,1372±0,0013	0,2555±0,0085	0,1876±0,0024	-0,0578	-0,0504
417	2,12	0,1844±0,0084	0,1262±0,0015	0,2557±0,0032	0,1888±0,0020	-0,0713	-0,0626
517	2,63	0,1671±0,0100	0,1160±0,0062	0,2562±0,0030	0,1850±0,0021	-0,0891	-0,0690
617	3,14	0,1577±0,0184	0,1053±0,0103	0,2533±0,0028	0,1863±0,0022	-0,0956	-0,0810

Preglednica 13: Sprememba v polarizaciji (ΔP) in anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v ULV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH ob dodatku vodotopnega koencima Q₁₀ s kompleksom ciklodekstrina pri T= 37 °C

VQ ₁₀ (μ l)	R(mol Q ₁₀ /mol lip.)	CIKLODEKSTRIN Q ₁₀		CIKLODEKSTRIN kontrola		ΔP	ΔA
		P	A	P	A		
0	0,00	0,2563±0,0011	0,1866±0,0009	0,2563±0,0026	0,1866±0,0012	0,0000	0,0000
2	0,01	0,2607±0,0014	0,1842±0,0011	0,2546±0,0021	0,1853±0,0020	0,0061	-0,0011
7	0,04	0,2558±0,0021	0,1864±0,0011	0,2612±0,0025	0,1876±0,0019	-0,0054	-0,0012
17	0,09	0,2517±0,0023	0,1841±0,0008	0,2520±0,0014	0,1850±0,0023	-0,0004	-0,0010
27	0,14	0,2558±0,0021	0,1856±0,0015	0,2554±0,0032	0,1850±0,0009	0,0004	0,0005
47	0,24	0,2547±0,0018	0,1856±0,0013	0,2544±0,0020	0,1860±0,0015	0,0003	-0,0004
67	0,34	0,2557±0,0027	0,1835±0,0021	0,2554±0,0009	0,1848±0,0011	0,0004	-0,0013
117	0,60	0,2496±0,0043	0,1828±0,0039	0,2535±0,0018	0,1837±0,0017	-0,0039	-0,0009
217	1,11	0,2364±0,0048	0,1733±0,0043	0,2557±0,0020	0,1857±0,0015	-0,0193	-0,0124
317	1,61	0,2387±0,0069	0,1698±0,0055	0,2555±0,0023	0,1876±0,0014	-0,0168	-0,0178
417	2,12	0,2412±0,0085	0,1773±0,0018	0,2557±0,0023	0,1888±0,0015	-0,0145	-0,0116
517	2,63	0,2475±0,0049	0,1826±0,0108	0,2562±0,0023	0,1850±0,0025	-0,0087	-0,0024
617	3,14	0,2472±0,0184	0,1719±0,0068	0,2533±0,0030	0,1863±0,0021	-0,0061	-0,0144



Slika 12: Sprememba v polarizaciji (ΔP) fluoroforja DPH v ULV pripravljenih iz zmesi lipidov POPE, POPC, POPS in CH ob dodatku treh različnih oblik koencima Q₁₀ pri T= 37 °C

4.1.5 Merjenje polarizacije in anizotropije DPH v ULV pripravljenih iz DPPC lipidov pri T= 25 °C

V preglednicah 14 do 16 so prikazane odvisnosti polarizacije (P) in anizotropije (A) v ULV pripravljenih iz DPPC lipidov od molskega razmerja koencima Q₁₀/lipidi v etanolni raztopini (lipidotopni LS koencim Q₁₀) oz. vodnih raztopinah koencima Q₁₀ (s škrobnim oz. ciklodekstrinskim kompleksom). Spremembe v polarizaciji fluoroforja DPH ob dodatku treh različnih oblik koencima Q₁₀ v ULV pripravljenih iz DPPC lipidov pri T= 25 °C so prikazane na Sliki 13.

Ob dodatku lipidotopnega (LS) koencima Q₁₀ do molskega razmerja Q₁₀/lipidi = 0,40 ne pride do nobenih sprememb v polarizaciji. Po tej vrednosti, pa začne polarizacija padati. Polarizacija se zniža tudi v primeru dodatka vodotopnega koencima Q₁₀ s ciklodekstrinskim kompleksom, preskok je najbolj izrazit pri molskem razmerju Q₁₀/lipidi = 0,70. Najizrazitejši padec polarizacije pa je zaznan pri molskem razmerju Q₁₀/lipidi = 1,89 in sicer ob dodatku vodotopnega koencima Q₁₀ s škrobnim kompleksom (Slika 13).

Preglednica 14: Sprememba v polarizaciji (ΔP) in anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v ULV pripravljenih iz DPPC lipidov ob dodatku lipidotopnega (LS) koencima Q₁₀ pri T= 25 °C

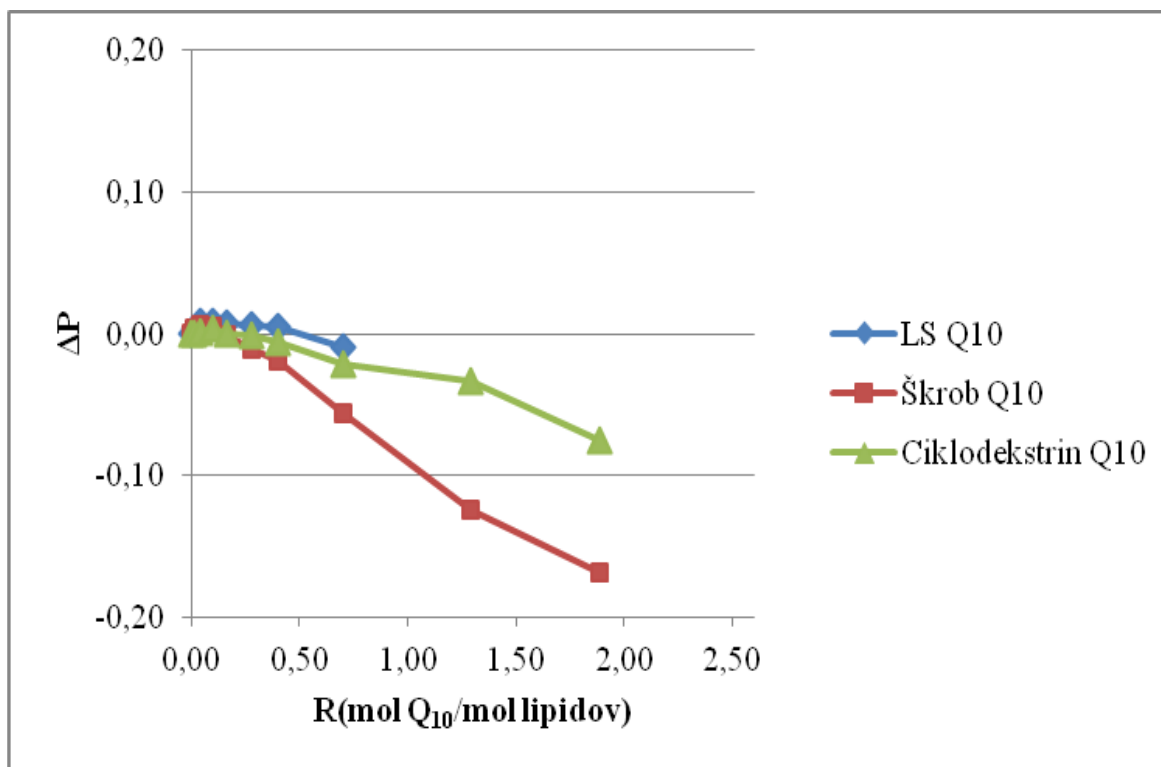
VQ ₁₀ (μ l)	R(mol Q ₁₀ /mol lip.)	LS Q ₁₀		LS Q ₁₀ kontrola		ΔP	ΔA
		P	A	P	A		
0	0,00	0,4177±0,0015	0,3236±0,0020	0,4177±0,0021	0,3236±0,0011	0,0017	0,0000
2	0,01	0,4222±0,0020	0,3244±0,0016	0,4180±0,0017	0,3197±0,0011	0,0042	0,0047
7	0,04	0,4278±0,0032	0,3305±0,0024	0,4196±0,0038	0,3230±0,0026	0,0083	0,0076
17	0,10	0,4299±0,0025	0,3342±0,0019	0,4207±0,0020	0,3252±0,0015	0,0091	0,0090
27	0,16	0,4273±0,0021	0,3310±0,0026	0,4195±0,0024	0,3219±0,0022	0,0079	0,0091
47	0,28	0,4280±0,0019	0,3306±0,0017	0,4223±0,0036	0,3254±0,0020	0,0057	0,0051
67	0,40	0,4247±0,0011	0,3283±0,0013	0,4195±0,0030	0,3223±0,0035	0,0052	0,0060
117	0,70	0,4117±0,0038	0,3241±0,0034	0,4212±0,0029	0,3305±0,0028	-0,0095	-0,0063

Preglednica 15: Sprememba v polarizaciji (ΔP) in anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v ULV pripravljenih iz DPPC lipidov ob dodatku vodotopnega koencima Q₁₀ s škrobnim kompleksom pri T= 25 °C

VQ ₁₀ (μ l)	R(mol Q ₁₀ /mol lip.)	ŠKROB Q ₁₀		ŠKROB kontrola		ΔP	ΔA
		P	A	P	A		
0	0,00	0,4318±0,0015	0,3380±0,0015	0,4318±0,0032	0,3380±0,0020	0,0000	0,0000
2	0,01	0,4360±0,0024	0,3384±0,0022	0,4325±0,0028	0,3343±0,0018	0,0035	0,0041
7	0,04	0,4350±0,0018	0,3434±0,0020	0,4283±0,0016	0,3326±0,0020	0,0067	0,0108
17	0,10	0,4328±0,0017	0,3359±0,0014	0,4284±0,0019	0,3329±0,0020	0,0044	0,0030
27	0,16	0,4243±0,0021	0,3300±0,0011	0,4258±0,0031	0,3818±0,0010	-0,0015	-
47	0,28	0,4180±0,0023	0,3248±0,0012	0,4283±0,0034	0,3320±0,0041	-0,0103	-0,0072
67	0,40	0,4091±0,0020	0,3126±0,0030	0,4278±0,0020	0,3296±0,0026	-0,0187	-0,0171
117	0,70	0,3746±0,0027	0,2900±0,0013	0,4306±0,0018	0,3347±0,0015	-0,0560	-0,0448
217	1,29	0,3178±0,0037	0,2396±0,0035	0,4418±0,0022	0,3391±0,0014	-0,1241	-0,0995
317	1,89	0,2719±0,0041	0,2075±0,0021	0,4398±0,0018	0,3424±0,0023	-0,1680	-0,1349
417	2,49	0,2494±0,0078	0,1840±0,0109	-	-	-	-
517	3,08	0,2172±0,0074	0,1762±0,0124	-	-	-	-
617	3,68	0,1886±0,0049	0,1284±0,0052	-	-	-	-

Preglednica 16: Sprememba v polarizaciji (ΔP) in anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v ULV pripravljenih iz DPPC lipidov ob dodatku vodotopnega koencima Q₁₀ s kompleksom ciklodekstrina pri T= 25 °C

VQ ₁₀ (μ l)	R(mol Q ₁₀ /mol lip.)	CIKLODEKSTRIN Q ₁₀		CIKLODEKSTRIN kontrola		ΔP	ΔA
		P	A	P	A		
0	0,00	0,4352±0,0051	0,3402±0,0007	0,4352±0,0025	0,3402±0,0027	0,0000	0,0000
2	0,01	0,4326±0,0022	0,3365±0,0024	0,4325±0,0015	0,3343±0,0010	0,0000	0,0022
7	0,04	0,4302±0,0027	0,3336±0,0023	0,4283±0,0024	0,3326±0,0010	0,0019	0,0010
17	0,10	0,4316±0,0015	0,3354±0,0010	0,4284±0,0018	0,3329±0,0017	0,0032	0,0025
27	0,16	0,4265±0,0008	0,3334±0,0009	0,4258±0,0016	0,3818±0,0010	0,0006	-
47	0,28	0,4271±0,0019	0,3310±0,0021	0,4283±0,0013	0,3320±0,0010	-0,0012	-0,0010
67	0,40	0,4215±0,0010	0,3241±0,0017	0,4278±0,0010	0,3296±0,0006	-0,0063	-0,0055
117	0,70	0,4093±0,0025	0,3174±0,0025	0,4306±0,0012	0,3347±0,0016	-0,0213	-0,0174
217	1,29	0,4090±0,0033	0,2948±0,0026	0,4418±0,0008	0,3391±0,0020	-0,0329	-0,0443
317	1,89	0,3644±0,0035	0,2775±0,0054	0,4398±0,0014	0,3424±0,0016	-0,0755	-0,0649



Slika 13: Sprememba v polarizaciji (ΔP) fluoroforja DPH v ULV pripravljenih iz DPPC lipidov ob dodatku treh različnih oblik koencima Q₁₀ pri T= 25 °C

4.1.6 Merjenje polarizacije in anizotropije v ULV pripravljenih iz DPPC lipidov pri T= 45 °C

V preglednicah 17 do 19 so prikazane odvisnosti polarizacije (P) in anizotropije (A) v ULV pripravljenih iz DPPC lipidov od molskega razmerja koencima Q₁₀/lipidi v etanolni raztopini (lipidotopni LS koencim Q₁₀) oz. vodnih raztopinah koencima Q₁₀ (s škrobnim oz. ciklodekstrinskim kompleksom). Spremembe v polarizaciji fluoroforja DPH ob dodatku treh različnih oblik koencima Q₁₀ v ULV pripravljenih iz DPPC lipidov pri T= 45 °C so prikazane na Sliki 14.

Pri tej temperaturi je zaznано povišanje polarizacije v primeru dodatka lipidotopnega (LS) koencima Q₁₀ in sicer pride do povišanja pri molskem razmerju Q₁₀/lipidi = 2,49. V primeru dodatkov obeh vodotopnih oblik koencima Q₁₀ (s ciklodekstrinskim in škrobnim kompleksom) pa ne pride do sprememb v polarizaciji (Slika 14).

Preglednica 17: Sprememba v polarizaciji (ΔP) in anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v ULV pripravljenih iz DPPC lipidov ob dodatku lipidotopnega (LS) koencima Q₁₀ pri T= 45 °C

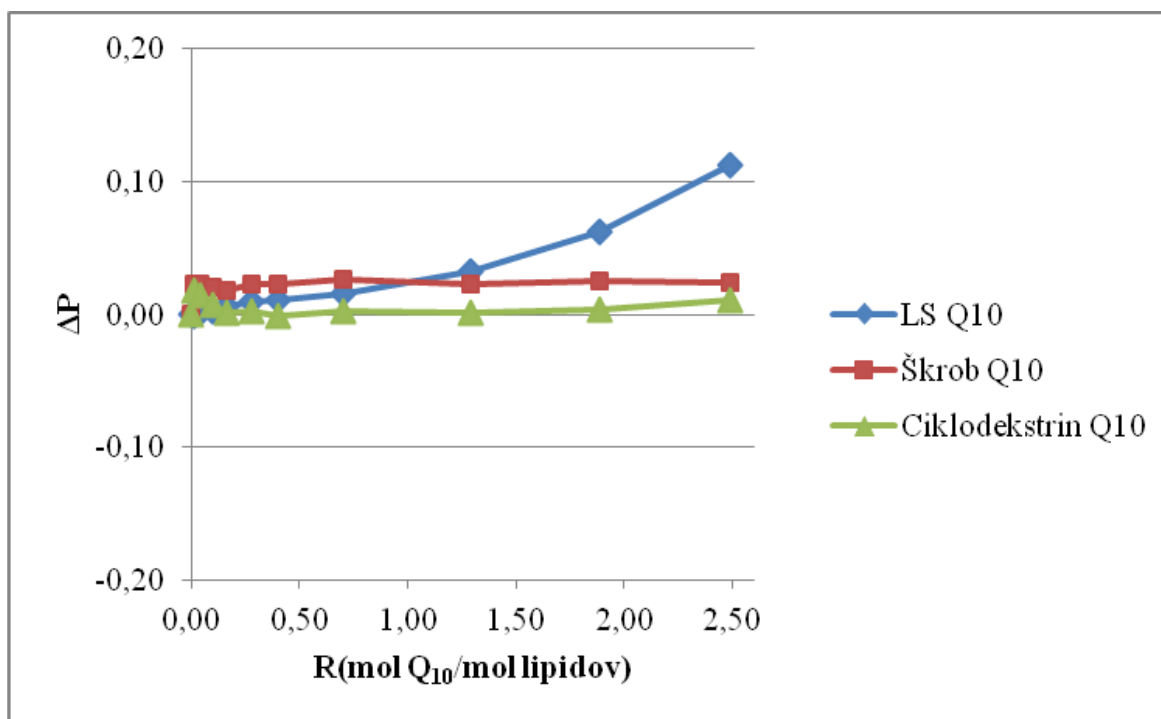
VQ ₁₀ (μ l)	R(mol Q ₁₀ /mol lip.)	LS Q ₁₀		LS Q ₁₀ kontrola		ΔP	ΔA
		P	A	P	A		
0	0,00	0,1480±0,0024	0,0971±0,0018	0,1480±0,0082	0,0971±0,0007	0,0000	0,0000
2	0,01	0,1637±0,0014	0,1157±0,0018	0,1641±0,0022	0,1144±0,0010	-0,0004	0,0013
7	0,04	0,1615±0,0019	0,1137±0,0005	0,1607±0,0011	0,1135±0,0006	0,0008	0,0002
17	0,10	0,1601±0,0021	0,1129±0,0023	0,1580±0,0016	0,1111±0,0014	0,0021	0,0018
27	0,16	0,1594±0,0014	0,1085±0,0014	0,1536±0,0017	0,1056±0,0013	0,0058	0,0029
47	0,28	0,1491±0,0032	0,1047±0,0007	0,1399±0,0030	0,0972±0,0013	0,0092	0,0076
67	0,40	0,1348±0,0043	0,0959±0,0012	0,1240±0,0012	0,0887±0,0019	0,0109	0,0072
117	0,70	0,1299±0,0037	0,0879±0,0029	0,1146±0,0017	0,0761±0,0011	0,0153	0,0119
217	1,29	0,1325±0,0029	0,0944±0,0044	0,0996±0,0007	0,0698±0,0026	0,0329	0,0246
317	1,89	0,1472±0,0057	0,1012±0,0033	0,0846±0,0022	0,0582±0,0013	0,0626	0,0431
417	2,49	0,1939±0,0008	0,1357±0,0029	0,0818±0,0026	0,0500±0,0020	0,1122	0,0858
517	3,08	0,2789±0,0204	0,2105±0,0141	0,0702±0,0017	0,0486±0,0003	0,2088	0,1619
617	3,68	0,3570±0,0232	0,2772±0,0163	0,0679±0,0019	0,0460±0,0019	0,2891	0,2313
717	4,27	0,4329±0,0192	0,3440±0,0180	0,0645±0,0031	0,0418±0,0036	0,3685	0,3023

Preglednica 18: Sprememba v polarizaciji (ΔP) in anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v ULV pripravljenih iz DPPC lipidov ob dodatku vodotopnega koencima Q₁₀ s škrobnim kompleksom pri T= 45 °C

VQ ₁₀ (μ l)	R(mol Q ₁₀ /mol lip.)	ŠKROB Q ₁₀		ŠKROB kontrola		ΔP	ΔA
		P	A	P	A		
0	0,00	0,1207±0,0020	0,1009±0,0027	0,1207±0,0028	0,1009±0,0013	0,0000	0,0000
2	0,01	0,1417±0,0022	0,0954±0,0019	0,1185±0,0027	0,1069±0,0017	0,0232	-0,0116
7	0,04	0,1470±0,0021	0,1000±0,0008	0,1235±0,0034	0,1117±0,0016	0,0235	-0,0118
17	0,10	0,1505±0,0022	0,1089±0,0013	0,1297±0,0024	0,1193±0,0026	0,0208	-0,0104
27	0,16	0,1483±0,0017	0,1116±0,0024	0,1300±0,0031	0,1208±0,0010	0,0184	-0,0092
47	0,28	0,1605±0,0043	0,1136±0,0021	0,1370±0,0026	0,1253±0,0021	0,0234	-0,0117
67	0,40	0,1606±0,0031	0,1152±0,0022	0,1379±0,0039	0,1265±0,0021	0,0227	-0,0114
117	0,70	0,1666±0,0041	0,1126±0,0013	0,1396±0,0023	0,1261±0,0005	0,0270	-0,0135
217	1,29	0,1651±0,0019	0,1194±0,0012	0,1422±0,0027	0,1308±0,0021	0,0228	-0,0114
317	1,89	0,1618±0,0016	0,1122±0,0020	0,1370±0,0031	0,1246±0,0012	0,0248	-0,0124
417	2,49	0,1586±0,0028	0,1112±0,0016	0,1349±0,0020	0,1231±0,0017	0,0237	-0,0119

Preglednica 19: Sprememba v polarizaciji (ΔP) in anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v ULV pripravljenih iz DPPC lipidov ob dodatku vodotopnega koencima Q₁₀ s kompleksom ciklodekstrina pri T= 45 °C

VQ ₁₀ (μ l)	R(mol Q ₁₀ /mol lip.)	CIKLODEKSTRIN Q ₁₀		CIKLODEKSTRIN kontrola		ΔP	ΔA
		P	A	P	A		
0	0,00	0,1215 \pm 0,0023	0,0993 \pm 0,0028	0,1215 \pm 0,0028	0,0993 \pm 0,0013	0,0000	0,0000
2	0,01	0,1369 \pm 0,0006	0,0911 \pm 0,0021	0,1185 \pm 0,0027	0,1069 \pm 0,0017	0,0184	-0,0159
7	0,04	0,1375 \pm 0,0028	0,0934 \pm 0,0030	0,1235 \pm 0,0034	0,1117 \pm 0,0016	0,0140	-0,0184
17	0,10	0,1372 \pm 0,0009	0,0995 \pm 0,0018	0,1297 \pm 0,0024	0,1193 \pm 0,0026	0,0075	-0,0198
27	0,16	0,1311 \pm 0,0031	0,0977 \pm 0,0021	0,1300 \pm 0,0031	0,1208 \pm 0,0010	0,0011	-0,0231
47	0,28	0,1398 \pm 0,0009	0,0979 \pm 0,0027	0,1370 \pm 0,0026	0,1253 \pm 0,0021	0,0028	-0,0275
67	0,40	0,1371 \pm 0,0023	0,0972 \pm 0,0009	0,1379 \pm 0,0039	0,1265 \pm 0,0021	-0,0008	-0,0294
117	0,70	0,1418 \pm 0,0020	0,0946 \pm 0,0009	0,1396 \pm 0,0023	0,1261 \pm 0,0005	0,0022	-0,0315
217	1,29	0,1432 \pm 0,0038	0,1033 \pm 0,0008	0,1422 \pm 0,0027	0,1308 \pm 0,0021	0,0009	-0,0276
317	1,89	0,1414 \pm 0,0011	0,0998 \pm 0,0020	0,1370 \pm 0,0031	0,1246 \pm 0,0012	0,0044	-0,0248
417	2,49	0,1455 \pm 0,0041	0,1000 \pm 0,0029	0,1349 \pm 0,0020	0,1231 \pm 0,0017	0,0106	-0,0231

Slika 14: Sprememba v polarizaciji (ΔP) fluoroforja DPH v ULV pripravljenih iz DPPC lipidov ob dodatku treh različnih oblik koencima Q₁₀ pri T= 45 °C

4.2 SPEKTROFOTOMETRIČNO DOLOČANJE OKSIDACIJE LIPOSOMOV PRIPRAVLJENIH IZ PC SPROŽENE Z UV OBSEVANJEM – TBARS TEST

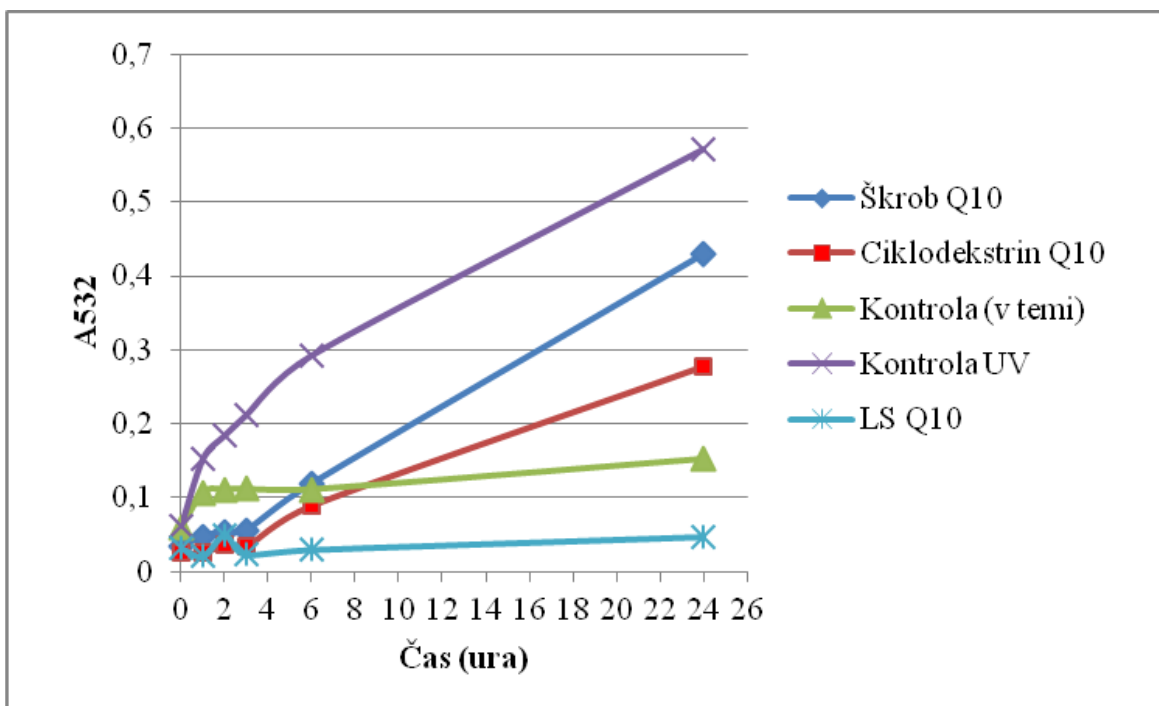
V naši raziskovalni nalogi, smo želeli pokazati ali različne oblike koencima Q₁₀ vplivajo na lipidno oksidacijo. Poskus smo izvedli z liposomi (MLV) pripravljenimi iz jajčnega fosfatidilholina (PC), ki vsebujejo večkrat nenasičene maščobne kisline, in dodanim koencimom Q₁₀. Liposomi so bili izpostavljeni ultravijolični (UV) svetlobi. Kot posledica lipidne oksidacije je nastal kot razpadni produkt večkrat nenasičenih maščobnih kislin, malonaldehid (MA), ki je reagiral s tiobarbiturno kislino (TBA) in nastal je TBA-MDA produkt. Lipidno oksidacijo smo določali z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 532 nm, ki je sorazmerna s koncentracijo nastalega TBA-MDA produkta.

Kot smo pričakovali, v odsotnosti koencima Q₁₀, UV svetloba povzroča največjo oksidacijo lipidov. Lipidotopen koencim Q₁₀ najbolj učinkovito prepreči lipidno oksidacijo v preiskovanem vzorcu in času 24 ur. Vzorec z dodanim vodotopnim koencimom Q₁₀ s škrobnim kompleksom ima že zaznan antioksidativni učinek, kar je razvidno iz Slike 15. Še boljši antioksidativni efekt pa ima koencim Q₁₀ z ciklodekstrinskim kompleksom.

Kontrolni vzorec lipidov hranjen v temi brez obsevanja z UV svetlobo in brez dodanega koencima Q₁₀, je stabilen napram oksidaciji. Rezultati TBARS testa so pokazali, da ima najboljši antioksidativni učinek vzorec z dodanim LS koencimom Q₁₀ (Slika 15).

Preglednica 20: Spremljanje lipidne oksidacije na MLV pripravljenih iz PC lipidov v prisotnosti treh različnih oblik koencima Q₁₀ z merjenjem absorbance pri 532 nm kot funkcije časa pri 25 °C

čas [ure]	A ₅₃₂ -škrob Q ₁₀	A ₅₃₂ -ciklodekstrin Q ₁₀	A ₅₃₂ -kontrola (v temi)	A ₅₃₂ -kontrola UV	A ₅₃₂ -LS Q ₁₀
0	0,03369	0,02483	0,05944	0,06149	0,03210
1	0,04769	0,02615	0,10693	0,15211	0,02100
2	0,05385	0,03574	0,11111	0,18387	0,04899
3	0,05539	0,03364	0,11154	0,21185	0,02314
6	0,11905	0,08924	0,11098	0,29239	0,02976
24	0,42939	0,27653	0,15171	0,57150	0,04704



Slika 15: Vpliv različnih oblik koencima Q₁₀ na preprečevanje lipidne oksidacije povzročene z UV svetlobo

5 RAZPRAVA

5.1 VPLIV TEMPERATURE IN KONCENTRACIJE KOENCIMA Q_{10} NA INTERAKCIJO Z LIPOSOMI

Proučevali smo kako sprememba temperature in koncentracije koencima Q_{10} vplivata na lastnosti membran liposomov. Membrane sestavljene iz mešanice POPE, POPC, POPS in CH lipidov v molskem razmerju POPC:POPE:POPS:CH = 4:2:1:3,6 se pri 25 °C in 37 °C nahajajo v fluidnem stanju.

Da bi lahko merili spremembe v polarizaciji in anizotropiji ob dodatku treh različnih oblik koencima Q_{10} (lipidotopen koencima Q_{10} , koencimu Q_{10} s škrobom in koencimu Q_{10} s ciklodekstrinom) ter brez nosilnih sistemov brez koencima Q_{10}) smo za študij lastnosti membran uporabili hidrofobno sondo DPH, ki se vgradi v notranji (nepolarni) del membrane (Kuhry in sod., 1983). Z meritvijo sprememb v polarizaciji in anizotropiji smo dobili vpogled v ureditev lipidnega dvosloja liposomov. Vrednosti fluorescenčne polarizacije so najvišje v gel stanju, najnižje pa v tekočem urejenem stanju (Xu in London, 2000).

5.1.1 Vpliv temperature in koncentracije treh različnih oblik koencima Q_{10} na interakcijo z MLV pripravljenih iz POPC, POPE, POPS in CH lipidov

Pri membranah MLV sestavljenih iz POPE, POPC, POPS in CH, ter dodanemu LS koencimu Q_{10} opazimo, da se pri $T = 37$ °C (Slika 10) sprememba polarizacije in s tem urejenost membrane poveča pri molskem razmerju $Q_{10}/\text{lipidi} = 1,11$ bolj kot pri 25 °C (Slika 9). Koencim Q_{10} ima večji vpliv na urejenost membrane pri 37 °C. Membrana liposomov MLV, sestavljena iz POPE, POPS, POPC in CH, je pri 37 °C v manj urejenem stanju. Na osnovi dobljenih rezultatov sklepamo, da se LS koencim Q_{10} vgradi v lipidni dvosloj in povzroča povečanje polarizacije DPH in s tem večjo urejenost membrane.

Pri vodotopnem koencimu Q_{10} s škrobnim kompleksom se ΔP DPH pri temperaturi $T = 25$ °C in $T = 37$ °C zmanjšuje kar pomeni, da povzroči vodotopni koencim Q_{10} s škrobom večjo fluidnost membrane pri obeh temperaturah za približno enako vrednost (Slika 9 in Slika 10).

Vodotopni koencim Q_{10} s ciklodekstrinom zniža ΔP pri obeh temperaturah za približno enako vrednost, kar pomeni, da je vpliv koencima Q_{10} s ciklodekstrinom na povečanje fluidnosti membrane, primerljiv ne glede na temperaturo (Sliki 9 in 10).

5.1.2 Vpliv temperature in koncentracije treh različnih oblik koencima Q_{10} na interakcijo z ULV pripravljenih iz POPC, POPE, POPS in CH lipidov

Podobno kot v prejšnjem primeru smo tokrat proučevali vpliv treh oblik koencima Q_{10} na polarizacijo enoslojnih veziklov ULV, sestavljenih iz POPC, POPE, POPS in CH, ki se pri 25 °C nahajajo v fluidnem stanju. Pri lipidotopnem (LS) koencimu Q_{10} se urejenost membrane povečuje z naraščanjem molskega razmerja Q_{10} /mol lipidov pri obeh temperaturah, vendar je efekt pri višji temperaturi 37 °C (Slika 12) večji kot pri temperaturi 25 °C (Slika 11). Lipidotopni (LS) koencim Q_{10} ima večji vpliv na urejenost modelne lipidne membrane pri višji temperaturi, podobno kot smo opazili pri MLV liposomih (Slika 12).

Pri vodotopnem koencimu Q_{10} s škrobom z naraščanjem molskega razmerja Q_{10} /mol lipidov ΔP DPH pada pri obeh temperaturah in s tem vpliva na povečanje fluidnosti membrane. Največji preskok je zaznan tako pri 25 °C kot pri 37 °C pri molskem razmerju Q_{10} /lipidi = 1,60, kjer se fluidnost membrane začne opazno povečevati (Sliki 11 in 12). Vendar pa se fluidnost od tega razmerja dalje bolj povečuje pri $T = 25$ °C (Slika 11).

Koencim Q_{10} s ciklodekstrinom pri obeh temperaturah z naraščanjem molskega razmerja Q_{10} /mol lipidov zniža ΔP , vendar se pri $T = 25$ °C zniža bolj kot pri $T = 37$ °C. Fluidnost membrane je torej večja v prisotnosti vodotopnega koencima Q_{10} s ciklodekstrinom pri nižji temperaturi, medtem ko je pri višji temperaturi ΔP manjša. ΔP membrane se pri obeh temperaturah in molskem razmerju Q_{10} /lipidi večjem od 2,12 ne spreminja več (Sliki 11 in 12).

5.1.3 Vpliv temperature in koncentracije treh različnih oblik koencima Q_{10} na interakcijo z ULV sestavljenih iz DPPC lipidov

Liposomi, sestavljeni iz DPPC lipidov, se pri 25 °C nahajajo v urejenem stanju (gel stanje). Pri lipidotopnem (LS) koencimu Q_{10} lahko pri razmerju 1 mol Q_{10} /mol lipidov opazimo padanje v polarizaciji (Slika 13), kar pomeni, da LS koencim Q_{10} znižuje urejenost lipidnega dvosloja. Pri 45 °C pa je efekt nasproten. Pri molskih razmerjih lipidov večjih od 1 mol Q_{10} /mol lipidov Q_{10} poveča polarizacijo. Pri temperaturi 45 °C so DPPC lipidi v neurejenem (bolj fluidnem) stanju kot pri 25 °C (Sliki 13 in 14). Lipidni dvosloj sestavljen iz DPPC lipidov je pri 25 °C v gel stanju, molekule LS koencima Q_{10} se težko uspejo vgraditi v lipidni dvosloj in povečajo fluidnost membrane (Slika 13).

Pri koencimu Q₁₀ s škrobnim kompleksom pride pri 25 °C (Slika 13) do padca ΔP DPH, vgrajenega v DPPC lipidni dvosloj. Do opaznega povečanja fluidnosti pride pri razmerju 0,5 mol Q₁₀/mol lipidov. Pri 45 °C je učinek na ΔP zanemarljiv (Slika 14). Efekta ni, s tem pa ni niti vpliva na urejenost membrane.

Pri koencimu Q₁₀ s ciklodekstrinom opazimo zanemarljiv vpliv, kot pri koencimu Q₁₀ s škrobnim kompleksom, na ΔP DPH v lipidnem dvosloju, sestavljenega iz DPPC lipidov (Slika 14).

5.2 VPLIV TREH RAZLIČNIH OBLIK KOENCIMA Q₁₀ NA PREPREČEVANJE OKSIDACIJE LIPIDOV

S TBARS testom smo primerjali vpliv antioksidativne sposobnosti različnih oblik koencima Q₁₀ na preprečevanje lipidne oksidacije z UV svetlobo.

S Slike 15 je razvidno, da ima najboljši učinek na preprečevanje lipidne oksidacije LS koencim Q₁₀, saj se je v primerjavi s kontrolo v temi, tvorilo precej manj TBA-MDA produktov. To pomeni, da obsevanje lipidov z UV svetlobo v prisotnosti LS koencim Q₁₀ ni imelo bistvenega učinka na oksidacijo membrane. Rezultati se ujemajo z meritvami polarizacije in anizotropije, ki kažejo da LS koencim Q₁₀ povzroči pri 25 °C povečanje ΔP DPH in s tem zmanjšanje fluidnosti membrane pri ULV pripravljenimi iz POPE, POPC, POPS in CH lipidov (Slika 9).

Pri vodotopnem koencimu Q₁₀ s škrobnim kompleksom je antioksidativna učinkovitost najslabša od vseh treh proučevanih oblik koencima, vendar pa je kljub temu večja v primerjavi s kontrolo (lipidi brez prisotnega koencima Q₁₀ obsevani z UV svetlobo). S Slike 15 je razvidno, da se v odvisnosti od časa oksidativne sposobnosti vodotopnih oblik koencima Q₁₀ znižujejo, kljub temu, da je boljša kot pri kontroli. Slika 15 kaže tudi, da se v odvisnosti od časa oksidativne spremembe v membrani liposoma povečujejo.

Pri vodotopnem koencimu Q₁₀ s ciklodekstrinom je antioksidativni učinek opazen, vendar se tudi tu oksidacijski procesi v membrani s časom povečujejo. Rezultati se ujemajo z rezultati spremljanja polarizacije in anizotropije, ki kažejo, da se ΔP in ΔA DPH s višanjem molskega razmerja Q₁₀/mol lipidov znižuje in s tem se fluidnost povečuje.

6 SKLEPI

- Pri membranah MLV, sestavljenih iz POPC, POPE, POPS in CH, pri 25°C in 37°C, ima največji vpliv na urejenost membrane LS koencim Q₁₀, kar pomeni, da zmanjša fluidnost membrane in jo bolj stabilizira.
- Pri membranah MLV sestavljenih iz POPC, POPE, POPS in CH, pri 25°C in 37°C, vodotopni koencim s škrobnim kompleksom povzroči znižanje ΔP in s tem poveča fluidnost membrane, medtem ko vodotopni koencim Q₁₀ s ciklodekstrinom praktično nima posebnega efekta.
- Pri membranah ULV sestavljenih iz POPC, POPE, POPS in CH, ima največji vpliv na urejenost membrane LS koencim Q₁₀, kar je še posebej izrazito pri temperaturi 37 °C.
- Pri membranah ULV sestavljenih iz POPC, POPE, POPS in CH, koencim Q₁₀ s škrobnim kompleksom povzroča povečanje fluidnosti membrane, medtem ko se urejenost lipidne membrane v prisotnosti vodotopnega koencima Q₁₀ s ciklodekstrinom manj spreminja.
- Pri ULV, sestavljenih iz DPPC lipidov, je opaziti, da LS koencim Q₁₀ znižuje urejenost lipidov, vendar le pri nižji temperaturi (25°C). Pri višji temperaturi (45 °C) je efekt namreč nasproten, saj LS koencim Q₁₀ povzroči večjo urejenost lipidnega dvosloja in s tem zmanjša fluidnost.
- Pri ugotavljanju antioksidativne učinkovitosti se je izkazalo, da ima največji vpliv na preprečevanje lipidne oksidacije LS koencim Q₁₀, najmanjšega pa vodotopni koencim Q₁₀ s škrobom. Kljub temu smo dokazali, da ima v primerjavi s kontrolnim vzorcem tudi koencim Q₁₀ s škrobom nekaj antioksidativne učinkovitosti.

7 POVZETEK

Koencim Q₁₀ je lipofilna molekula, ki je naravno prisotna v vsaki živi celici in sodeluje pri prenosu elektronov v notranji mitohondrijski membrani, hkrati pa je tudi stabilizator celičnih membran in učinkovit antioksidant. Njegovo delovanje je podobno vitaminom, vendar ga ne uvrščamo med vitamine, saj ga telo lahko tudi samo proizvede z endogeno sintezo, del pa ga zaužijemo s hrano. Z staranjem organizma, so potrebe po koencimu Q₁₀ vedno večje, povečana poraba koencima Q₁₀ v telesu je tudi pri različnih boleznih, kajenju, jemanju določenih zdravil ipd.

Z raziskovalno diplomsko nalogo smo želeli prikazati vpliv treh različnih oblik koencima Q₁₀ (LS, vodotopnega s škrobnim kompleksom in vodotopnega s ciklodekstrinskim kompleksom) na modelne lipidne membrane ter prikazati vpliv vseh treh oblik na lipidno oksidacijo.

Z merjenjem polarizacije in anizotropije smo lahko proučili vpliv treh različnih oblik koencima Q₁₀ na fluidnost bioloških modelnih membran. Pripravili smo MLV in ULV liposome, oboje sestavljene iz 1-palmitoil-2-oleil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (POPE), 1-palmitoil-2-oleil-sn-glicero-3-fosfoholina (POPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serin (POPS) in holesterola (CH) ter ULV liposome sestavljene iz DPPC lipidov.

Ugotovili smo, da ima tako pri večslojnih membranah MLV, kot tudi enoslojnih membranah ULV, največji vpliv na fluidnost membrane LS koencim Q₁₀. Pri obeh temperaturah se LS koencim Q₁₀ vgradi v lipidno dvosloj in povzroči povečanje urejenosti lipidnega dvosloja.

Obe vodotopni oblik koencima Q₁₀ (s ciklodekstrinskim in škrobnim kompleksom) vplivata na ULV in MLV membrane tako, da povečujeta njeno fluidnost. Nobena od vodotopnih oblik koencima Q₁₀ se namreč ne vgradi v membrano in ne povzroči urejenosti lipidnega dvosloja.

Pri ULV liposomih, sestavljenih iz DPPC lipidov, je opaziti, da LS koencim Q₁₀ znižuje urejenost lipidov, vendar le pri nižji temperaturi, ko je membrana pri tej temperaturi v gel fazi in koencim Q₁₀ ne more prodreti v lipidni dvosloj. Pri višji temperaturi (45 °C) je efekt namreč nasproten, saj je pri tej temperaturi membrana v tekočem kristaliničnem stanju in se koencim Q₁₀ lahko vgradi v lipidni dvosloj, zato rezultati kažejo, da postane membrana bolj rigidna.

Pri ugotavljanju antioksidativne učinkovitosti se je izkazalo, da ima največji vpliv na preprečevanje lipidne oksidacije LS koencim Q₁₀, najmanjšega pa vodotopni koencim Q₁₀ s škrobom.

8 VIRI

- Alleva R., Tomasetti M., Battino M., Curatola G., Littarru G.P., Folkers K. 1995. The roles of coenzyme Q₁₀ and vitamin E on the peroxidation of human low density lipoprotein subfractions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 20: 9388–9391
- Avanti Polar Lipids. 2012. *Lipid products: Phospholipids*. Alabaster, Avanti Polar Lipids, Inc: 1 str.
http://www.avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=123&Itemid=131 (3.5.2014)
- Bentinger M., Brismar K., Dallner G. 2007. The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion*, 7, Suppl. 1: S41-S50
- Bhagavan H.N., Chopra R.K. 2007. Plasma coenzyme Q₁₀ response to oral ingestion of coenzyme Q₁₀ formulations. *Mitochondrion*, 7, Suppl. 1: S78-S88
- Bliznakov E.G., Wilkins D.J. 1998. Biochemical and clinical consequences of inhibiting coenzyme Q₁₀ biosynthesis by lipid-lowering HMG-CoA reductase inhibitors (statins): A critical review. *Advances in Therapy*, 15: 218-228
- Boyer R. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 449-460
- Ernster L., Dallner G. 1995. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1271: 195-204
- Gopalakrishnan G. 2006. Lipid membranes for the fabrication of functional micro- and nano-structures. Lausanne, ~~École Polytechnique~~ *École Polytechnique* F20 str.
- Kalen A., Appelkvist E.L., Dallner G. 1989. Age-related changes in the lipid compositions of rat and human tissues. *Lipids*, 24: 579-584
- Keller B.C. 2001. Lysosomes in nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, 12: 25-31
- Korošec L. 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih. V: *Antioksidanti v živilstvu*, 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11–21

- Kristl J., Šmid – Korbar J., Srčič S. 1992. Farmacevtska tehnologija. Del 1: Praktikum. Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 157-159
- 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.
- Lakowicz J.R. 2006. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. New York, Springer: 954 str.
- Lenaz G., Fato R., Formiggini G., Genova M.L. 2007. The role of coenzyme Q in mitochondrial electron transport. *Mitochondrion*, 7, Suppl. 1: S8-S33
- Littarru G.P., Langsjoen P. 2007. Coenzyme Q₁₀ and statins: Biochemical and clinical implications. *Mitochondrion*, 7, Suppl. 1: S168-S174
- Mason P. 2001. Dietary supplements. 2nd ed. London, Pharmaceutical Press: 59-61
- Oblak T. 2009. Koencim Q₁₀. Logatec, Farmicom d.o.o. (osebni vir)
- Ota A. 2009. Vpliv ferulne, kavne in p-kumarne kisline ter njihovih stirenov na modelne membrane. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 9 str.
- Pelle E., Meaes D., Padulo G.A., Kim E.K., Smith W.P. 1990: An *in vitro* model to test relative antioxidant potential: ultraviolet-induced lipid peroxidation in liposomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 283, 2: 234-240
- Pravst I., Žmitek K., Žmitek J. 2010. Coenzyme Q₁₀ contents in foods and fortification strategies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50, 4: 269-280
- Prošek M., Šmidovnik A., Jazbec P. 2008. Vloga koencima Q₁₀ pri pretvorbi energije in obrambi organizma. *Proteus*, 71, 4: 150-157
- Quinzii C.M., Hirano M., DiMauro S. 2007. CoQ₁₀ deficiency diseases in adults. *Mitochondrion*, 7, 1: S112-S126
- Rudan-Tasič D. 2000. Vitamin C, vitamin E in koencim Q₁₀. V: Antioksidanti v živilstvu, 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 48-51
- Rus P., Rus R. 2008. Koencim Q₁₀. *Zdravstveno varstvo*, 47, 2: 89-98

- Shinde S., Patil N., Tendolkar A. 2005. Coenzyme Q₁₀: A review of essential functions. *Internet Journal of Nutrition and Wellness*, 1, 2: 1-14
- Singh U., Devaraj S, Jialal I. 2007. Coenzyme Q₁₀ supplementation and heart failure. *Nutrition Reviews*, 65, 6: 286–293
- Williamson K.S., Hensley K., Floyd R.A. 2003. Fluorometric and colorimetric assessment of thiobarbituric acid-reactive lipid aldehydes in biological matrices. XVI: Methods in biological oxidative stress. Hensley K., Floyd R.A. (eds.). Totowa, Humana Press: 57-65
- 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, 5: 843–849
- Žmitek J., Šmidovnik A., Fir M., Prošek M., Žmitek K., Walczak J., Pravst I. 2008a. Relative Bioavailability of two forms of a novel water – soluble coenzyme Q₁₀. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 52, 4: 281-287
- Žmitek J., Žmitek K., Pravst I. 2008b. Improving the bioavailability of coenzyme Q₁₀. From theory to practice. *AgroFood Industry Hi-Tech*, 19: 8-10
- Žmitek J., Žmitek K. 2009. Koencim Q₁₀ kot prehransko dopolnilo in zdravilo. *Farmacevtski vestnik, strokovno glasilo slovenske farmacije*, 60, 3: 150-157

ZAHVALA

Na začetku čestitam sebi, ker sem uspešno zaključila tisto, kar sem si od nekdaj močno želela. Čeprav pozno, sem dosegla svoj cilj z vztrajnostjo, kar mi bo tudi v prihodnosti dalo nov zagon ter zavedanje, da lahko dosežem vse kar si srčno želim.

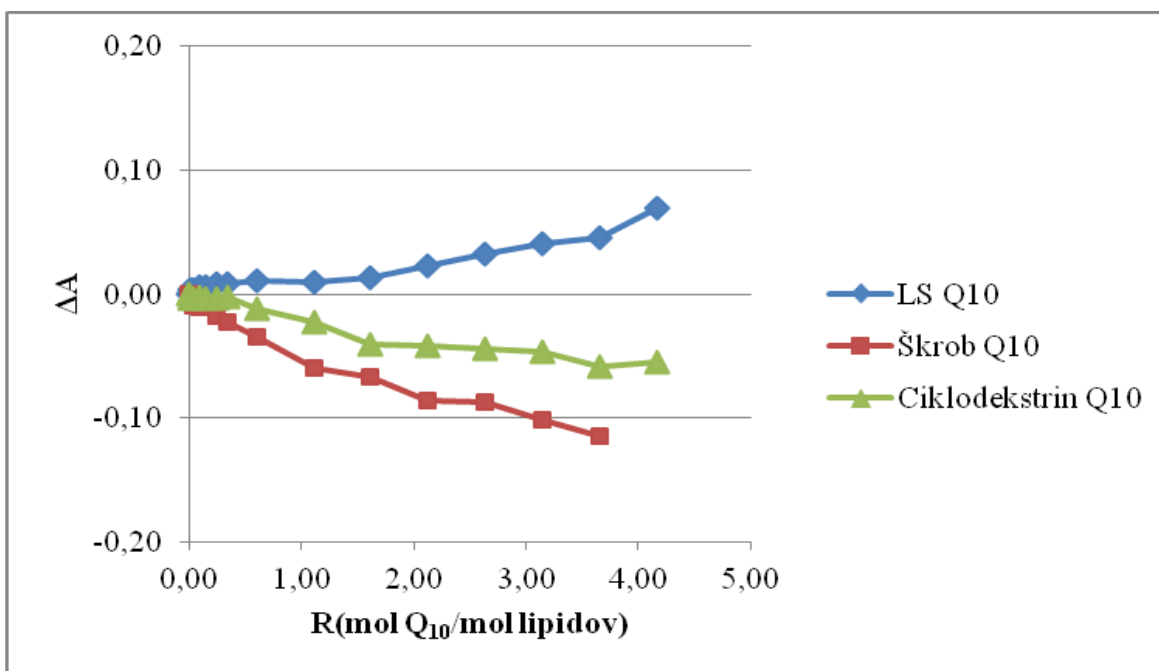
Za strokovno vodenje in pomoč pri izvedbi diplomske naloge se iskreno zahvaljujem mentorici prof. dr. Nataši Poklar Ulrih, ki nikoli ni zares obupala nad mano ter recenzentu prof. dr. Blažu Cigiću.

Zahvaljujem se tudi Ajdi Ota, za vso pomoč pri izvedbi praktičnega dela diplomske naloge.

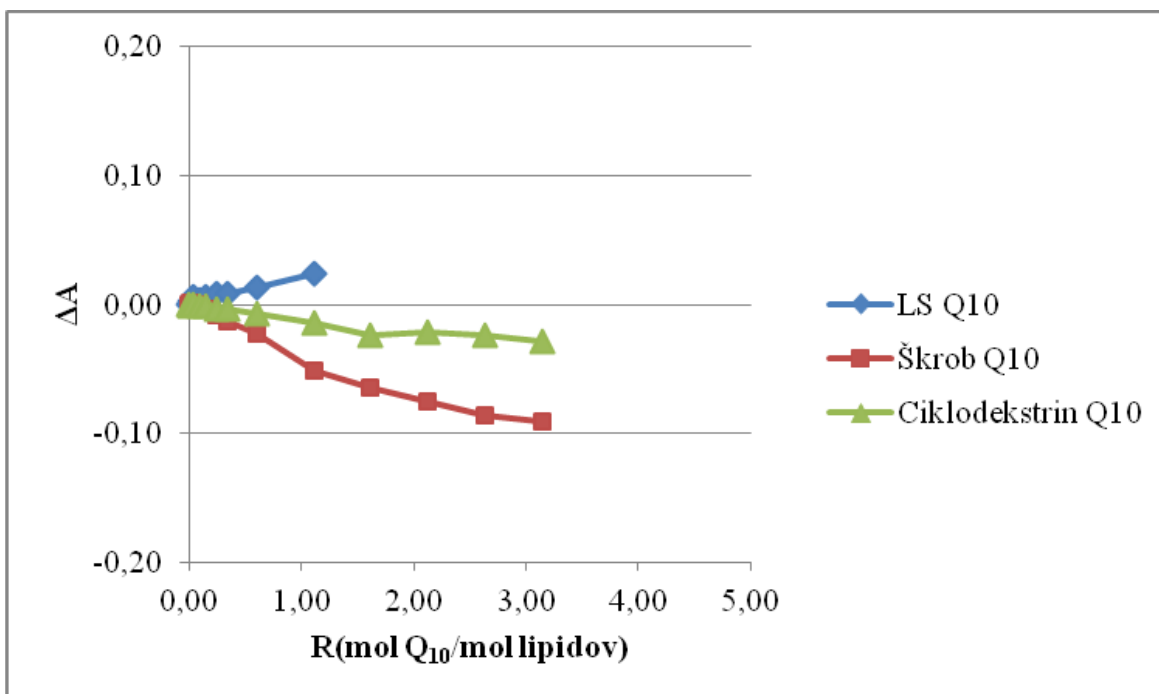
Največja zahvala pa gre mojim domačim, staršema Cirili in Bogomirju ter bratu Igorju, ki so mi ves čas študija stali ob strani in me spodbujali. V času nastajanja diplomske naloge, pa iskrena hvala mojemu možu Gregorju, ki je nesebično skrbel za najinega sinka Jakoba, medtem ko sem veliko časa in energije posvečala zaključku študija.

Na koncu pa še zahvala mojemu dedku Štefanu in babici Antoniji, katerima ta diplomska naloga pomeni največ. Predvsem njuna želja po tem, da zaključim študij, mi je v vseh teh letih »pavziranja« dajal občutek krivde in hkrati moč, da zaključim študij in jima izpolnim željo. Hvala vama, dedi in babi!

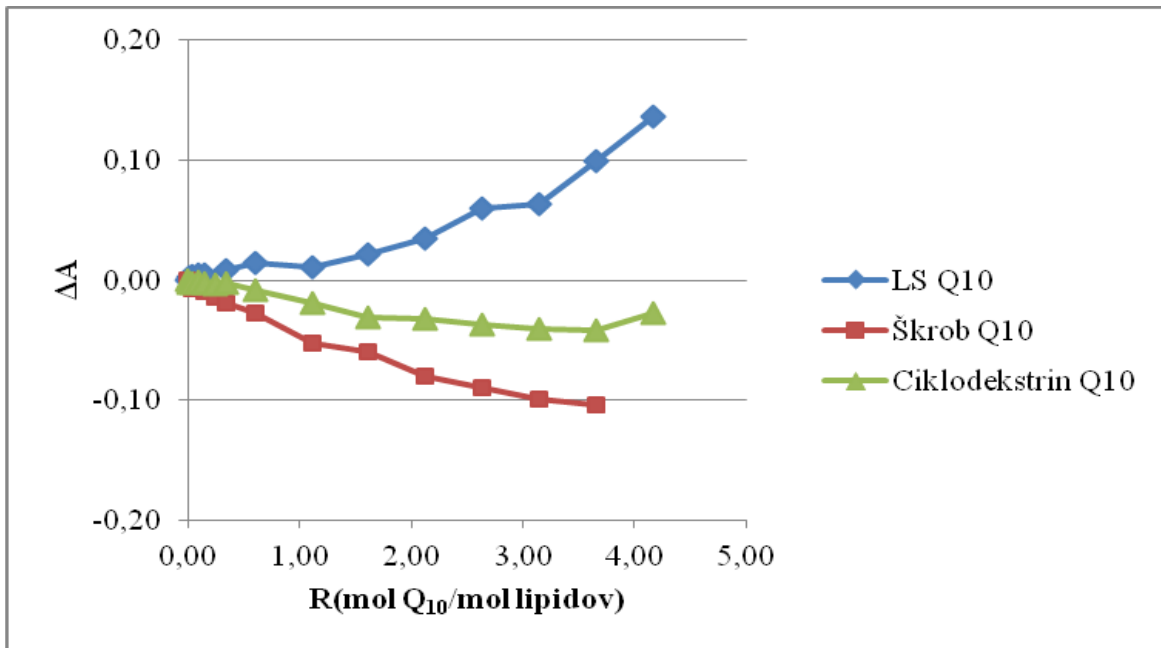
PRILOGE



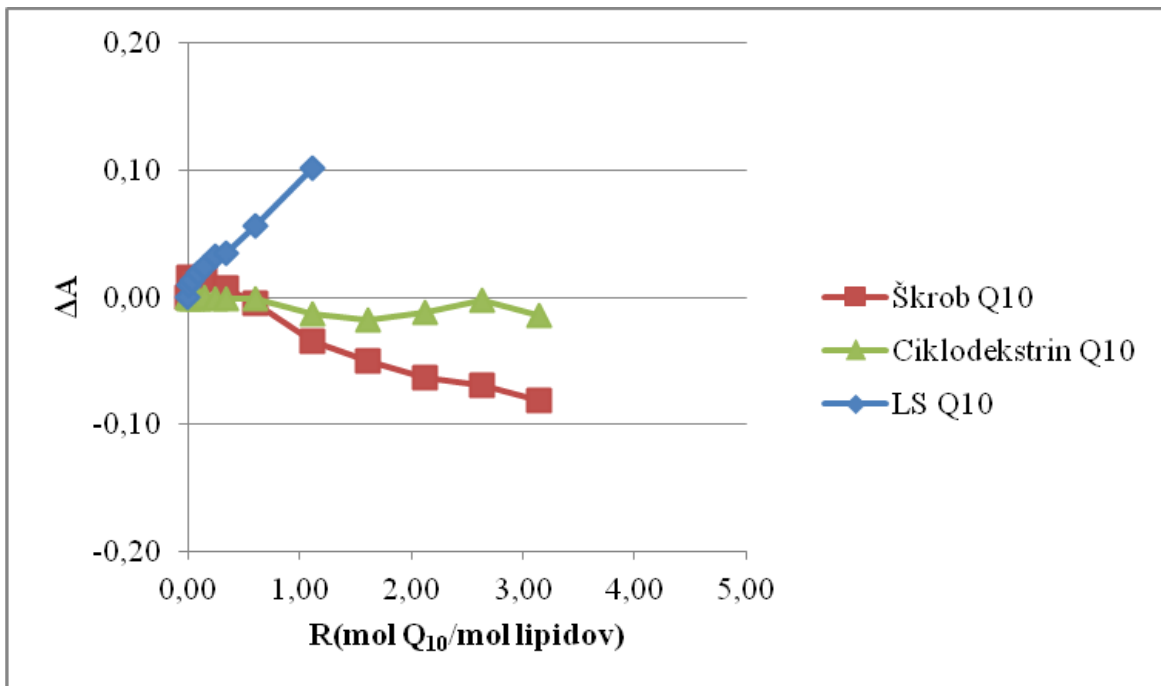
Priloga A: Sprememba v anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v MLV pripravljenih iz POPE, POPC, POPS in CH ob dodatku treh različnih oblik koencima Q₁₀ pri T= 25 °C



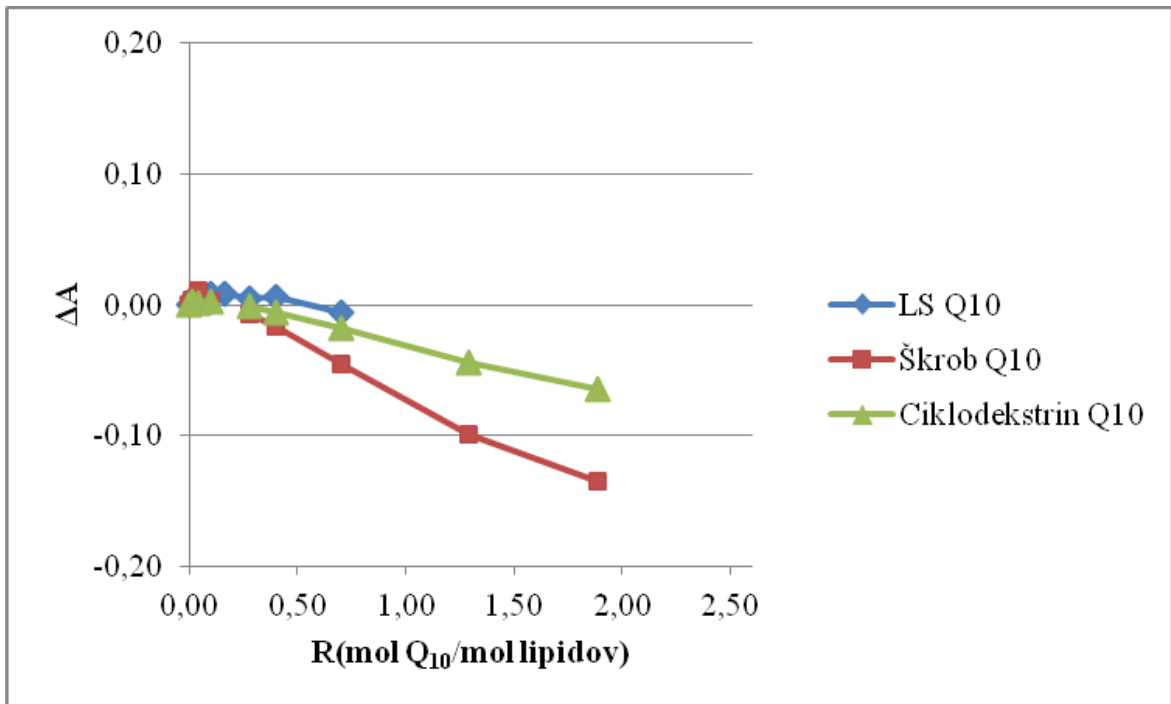
Priloga B: Sprememba v anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v MLV pripravljenih iz POPE, POPC, POPS in CH ob dodatku treh različnih oblik koencima Q₁₀ pri T= 37 °C



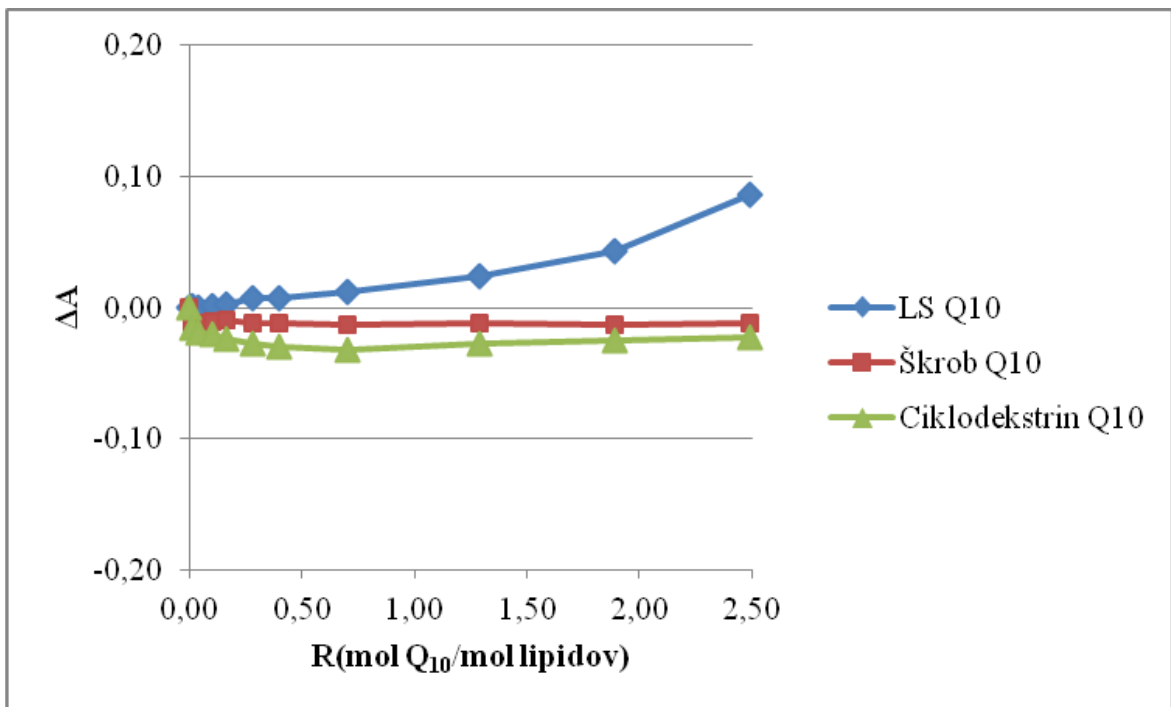
Priloga C: Sprememba v anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v ULV pripravljenih iz POPE, POPC, POPS in CH ob dodatku treh različnih oblik koencima pri $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$



Priloga D: Sprememba v anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v ULV pripravljenih iz POPE, POPC, POPS in CH ob dodatku treh različnih oblik koencima Q₁₀ pri $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$



Priloga E: Sprememba v anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v ULV pripravljenih iz DPPC lipidov ob dodatku treh različnih oblik koencima Q₁₀ v pri T= 25 °C



Priloga F: Sprememba v anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH v ULV pripravljenih iz DPPC lipidov ob dodatku treh različnih oblik koencima Q₁₀ pri T= 45 °C