

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Petra BLATNIK

**VPLIV IZBRANIH FENOLNIH SPOJIN NA
LASTNOSTI MODELNIH LIPIDNIH MEMBRAN**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Petra BLATNIK

**VPLIV IZBRANIH FENOLNIH SPOJIN NA LASTNOSTI
MODELNIH LIPIDNIH MEMBRAN**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**IMPACT OF SELECTED PHENOLIC COMPOUNDS ON MODEL
LIPID MEMBRANES PROPERTIES**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo v laboratoriju Katedre za biokemijo in kemijo živil, Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani in v Laboratoriju za biofiziko, Odseku za fiziko trdne snovi, Instituta Jožef Stefan v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Natašo Poklar Ulrich in za recenzentko prof. dr. Kristino Sepčić.

Mentorica: prof. dr. Nataša Poklar Ulrich

Recenzentka: prof. dr. Kristina Sepčić

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Članica:

Članica:

Član:

Datum zagovora:

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

Petra BLATNIK

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 577.352+577.1:547.56(043)=163.6
KG	modelne membrane / fenolne spojine / katehin / epikatehin / epigalokatehin / epigalokatehin-3-galat / kvercetin / butiliran hidroksitoluen / fluidnost membran / interakcije / elektronska paramagnetna resonanca / diferencialna kalorimetrija
AV	BLATNIK, Petra
SA	POKLAR ULRIH, Nataša (mentorica) / SEPČIĆ, Kristina (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2012
IN	VPLIV IZBRANIH FENOLNIH SPOJIN NA LASTNOSTI MODELNIH LIPIDNIH MEMBRAN
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 76 str., 4 pregl., 42 sl., 68 vir.
IJ	sl
JI	sl/an
AI	V diplomski nalogi smo proučevali vpliv fenolnih spojin na lastnosti modelnih membran (liposomov). Izbrali smo flavonoide (catehin, epikatehin, epigalokatehin, epigalokatehin-3-galat, kvercetin) in sintetični antioksidant butiliran hidroksitoluen. Catehin, epikatehin in kvercetin so glavni flavonoidi v sadju, epigalokatehin in epigalokatehin-3-galat pa sta prisotna predvsem v semenih stročnic in zelenem čaju. Na enoslojnih liposomih (ULV) smo spremljali spremembe fluidnosti membrane po dodatku flavonoidov z metodo elektronske paramagnetne resonance (EPR) in na večslojnih liposomih (MLV) iz dipalmiotoilfosfatidilholina (DPPC) temperaturne fazne prehode z metodo diferenčne dinamične kalorimetrije (DSC). EPR je zelo uporabna, občutljiva metoda za opis strukture in organiziranosti molekularnih sistemov in biomembran. Karakterizacija je odvisna od paramagnetnih centrov (spinskih označevalcev), ki jih dodamo proučevanemu sistemu. Spinski označevalci, ki smo ga mi vgradili v membrane liposomov, je doksilni derivat metilnega estra palmitinske kisline MeFASL(2,11), ki ima nitroksidno skupino na 13 C-atomu acilne verige. Karakteristike gibanja spinskega označevalca se odražajo v obliki črte EPR spektra, ki nam poda informacije o gibanju lipidnih repov v sredini lipidnega dvosloja. DSC je termoanalitična tehnika, ki jo uporabljam za študije faznih prehodov liposomov in membran. Iz DSC termogramov je razvidno, da je dodatek izbranih fenolnih spojin vplival na temperature faznega predprehoda (T_m') in temperature glavnega faznega prehoda (T_m) ter spremembo entalpije glavnega faznega prehoda (ΔH_{cal}).

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 577.352+577.1:547.56(043)=163.6
CX	model membranes / phenolic compounds / catechin / epicatechin / epigallocatechin / epigallocatechin-3-gallate / quercetin/butylated hydroxytoluene / membrane fluidity / electron paramagnetic resonance / differential scanning calorimetry
AU	BLATNIK, Petra
AA	POKLAR ULRIH, Nataša (supervisor) / SEPČIĆ, Kristina (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY	2012
TI	IMPACT OF SELECTED PHENOLIC COMPOUNDS ON MODEL LIPID MEMBRANES PROPERTIES
DT	Graduation thesis (university studies)
NO	X, 76 p., 4 tab., 42 fig., 68 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	<p>We investigated the influence of phenolic compounds on the properties of model membranes (liposomes). We selected flavonoids (catechin, epicatechin, epigallocatechin, epigallocatechin-3-gallate, quercetin), and the synthetic antioxidant butylated hydroxytoluene. Catechin, epicatechin and quercetin are the major flavonoids in fruits, while epigallocatechin and epigallocatechin gallate are found primarily in seeds of legumes and green tea. We monitored the changes in membrane fluidity in unilamellar liposomes (ULV) after the addition of flavonoids using electron paramagnetic resonance (EPR). In multilamellar (MLV) liposomes composed from pure dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) the temperatures of phase transitions were measured using differential scanning calorimetry (DSC). EPR is widely used, sensitive technique for characterization of structural and dynamical properties of molecular systems and biomembranes. Characterization depends on paramagnetic probes (spin probes) which are introduced into the system. Spin probe used in our investigation was the doxyl derivative of palmitic acid methyl ester MeFASL (2.11), which has nitroxid group on 13 C- atom of the acyl chain. Characteristics of spin label movements are reflected in the line shape of the EPR spectra, which gives us information on the dynamics of lipid tails in the middle of the lipid bilayer. It was found that different flavonoids influence on membrane fluidity in different ways. DSC is a thermal analytical technique that is used to study the phase transition of liposomes and membranes. DSC thermographs showed that the addition of selected phenolic compounds affect the pre-transition temperature (T_m') and the main transition temperature (T_m), as well as the change in enthalpy of the main phase transition (ΔH_{cal}).</p>

KAZALO

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO	V
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PREGLEDNIC	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA IN DELOVNA HIPOTEZA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 MEMBRANE	3
2.1.1 Biološke in modelne membrane	3
2.1.1 Fosfolipidi	5
2.1.2 Liposomi	7
2.1.3 Fluidnost membran	9
2.1.4 Lipidni rafti	12
2.2 FENOLNE SPOJINE	13
2.2.1 Definicija in kvalifikacija	13
2.2.2 Flavonoidi	14
2.2.2.1 Flavanoli – katehin, epikatehin, epigalokatehin, epigalokatehin-3-galat	15
2.2.2.2 Flavonoli – kvercetin	16
2.2.2.3 Butiliran hidroksitoluen (BHT)	17
2.2.3 Biosinteza fenolnih spojin	17
2.2.4 Biorazpoložljivost fenolnih spojin	18
3 MATERIALI IN METODE	20
3.1 MATERIALI	20
3.1.1 Kemikalije in drobna oprema	20
3.1.1 Raztopine	21
3.1.2 Laboratorijska oprema in pribor	21
3.2 METODE	22
3.2.1 Priprava velikih večslojnih liposomov (MLV)	22

3.2.2	Priprava enoslojnih liposomov (ULV)	22
3.2.3	Spinsko označevanje liposomov za EPR	22
3.2.4	Priprava liposomov za merjenje z metodo DSC	23
3.2.5	Elektronska paramagnetna resonanca	23
3.2.5.1	Osnove EPR	23
3.2.5.2	EPR spektrometer	26
3.2.5.3	Spinski označevalci	27
3.2.5.4	Korelacijski čas in ureditveni parameter	29
3.2.5.5	Eksperimentalni del EPR meritev	30
3.2.5.6	Računalniška obdelava EPR spektrov	31
3.2.6	Diferenčna dinamična kalorimetrija	32
3.2.6.1	Eksperimentalni del meritev	34
4	REZULTATI	35
4.1	ELEKTRONSKA PARAMAGNETNA RESONANCA	35
4.1.1	EPR meritve liposomov pri različnih temperaturah	35
4.1.2	Vpliv katehina na ULV liposome	38
4.1.3	Vpliv epikatehina na ULV liposome	40
4.1.4	Vpliv epigalokatehina na ULV liposome	43
4.1.5	Vpliv epigalokatehina-3-galata na ULV liposome	44
4.1.6	Vpliv kvercetina na ULV liposome	46
4.1.7	Vpliv butil hidroksitoluena na ULV liposome	48
4.1.8	Primerjava vpliva vrste fenolnih spojin na fluidnost membrane	50
4.2	DIFERENČNA DINAMIČNA KALORIMETRIJA	52
4.2.1	Vpliv katehina na fazne prehode MLV liposomov iz DPPC	52
4.2.2	Vpliv epikatehina na fazne prehode MLV liposomov iz DPPC	54
4.2.3	Vpliv epigalokatehina na fazne prehode MLV liposomov iz DPPC	55
4.2.4	Vpliv epigalokatehin-3-galata na fazne prehode MLV liposomov iz DPPC	56
4.2.5	Vpliv kvercetina na fazne prehode MLV liposomov iz DPPC	57
4.2.6	Vpliv butiliranega hidroksitoluena na fazne prehode MLV liposomov iz DPPC	58

5	RAZPRAVA IN SKLEPI	61
5.1	RAZPRAVA	61
5.2	SKLEPI	69
6	POVZETEK	70
7	VIRI	72

KAZALO SLIK

Slika 1: Membrana kot model tekočega mozaika s sestavnimi komponentami (Molecular Expressions, 2004)	3
Slika 2: Porazdelitev fosfolipidov v obeh slojih membrane eritrocitov (Membranes, 2009)	4
Slika 3: Strukturne formule fosfolipidov ter tridimenzionalne slike: (A) dipalmitoilfosfatidilholina (DPPC), (B) fosfatidilholin (PC) in (C) sfingomielin (SM) (Avanti Polar Lipids, 2010).....	6
Slika 4: Cilindrična oblika fosfolipidov (Lasic, 1998)	7
Slika 5: Lipidni agregat – liposom (Nelson in Cox, 2000).....	7
Slika 6: Shematični prikaz različnih tipov liposomov in njihove priprave (Pinherio in sod., 2011)	8
Slika 7: Premikanje lipidov po dvoslojni membrani (Boron in Boulpaep, 2009).....	9
Slika 8: Fazna stanja lipidov v bioloških membranah (van Meer in sod., 2008).....	10
Slika 9: Prikaz DSC diagrama faznega prehoda lipidnega dvosloja (Jain in Wagner, 1980)	11
Slika 10: Razvrstitev fenolnih snovi glede na število C-atomov (Abram, 2000: 25, 30)	14
Slika 11: Osnovne strukturne formule in delitev flavonoidov (Fraga, 2011)	15
Slika 12: (+)-catehin ($C_{15}H_{14}O_6$, (+)-3,3',4',5,7-pentahidroksiflavan), (-)-epikatehin ($C_{15}H_{14}O_6$, (-)-3,3',4',5,7-pentahidroksiflavan), (-)-epigalokatehin ($C_{15}H_{14}O_7$, (-)-3,3',4',5,5',7-heksahidroksiflavan), (-)-epigalokatehin-3-galat($C_{22}H_{18}O_{11}$) (Extrasynthese, 2009)	16
Slika 13: Kvercetin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavan) (Xi in Guo, 2006)	17
Slika 14: Struktruna formula butiliranega hidroksitoluena-BHT ($C_{15}H_{24}O$) (Shibamoto in Bjeldanes, 2009) 17	
Slika 15: Princip EPR – energijski nivoji nitroksidnega radikala v magnetnem polju (Štrancar, 2004)	24
Slika 16: Spekter EPR - absorpcijski spekter nitroksidnega radikala in njegov prvi odvod (Štrancar, 2004). 26	
Slika 17: EPR spektrometer ELEXSYS E500 (Bruker, Nemčija) (Mravljak, 2010).....	27
Slika 18: Spinski označevalec MeFASL (2,11) (Pajk, 2011)	28
Slika 19: Eksperimentalni spekter, kjer je prikazano, kako se določijo parametri za izračun korelacijskega časa tau (Berlec, 2011)	29
Slika 20: Tipičen termogram (DSC krivulja) za fazni prehod DPPC liposomov	34

Slika 21: EPR spektri MeFASL(2,11) v membranah ULV liposomov iz PC:SM = 2,4:1 (mol:mol) po dodatu 3,5 μ L etanola (kontrola) pri različnih temperaturah.....	35
Slika 22: EPR spektri MeFASL(2,11) v membranah ULV liposomov iz PC:SM = 2,4:1 (mol:mol) po dodatu 3,5 μ L etanolne raztopine kvercetina (1 mM končna koncentracija) pri različnih temperaturah.....	36
Slika 23: Reprezentativni EPR spekter spinskega označevalca MeFASL(2,11) v membranah liposomov iz PC:SM=2,4:1 (mol:mol), v katere je bil vgrajen epigalokatehin (1 mM končna koncentracija). Spektri so bili izmerjeni pri 10 °C (283 K).....	37
Slika 24: Temperaturna odvisnost empiričnega korelacijskega časa (τ_c) spinskega označevalca MeFASL(2,11), vgrajenega v ULV liposome (v prisotnosti etanola=kontrola ali v prisotnosti etanolne raztopine katehina v 1mM končni koncentraciji).....	38
Slika 25: Temperaturna odvisnost ureditvenega parametra (A), rotacijskega korelacijskega časa (B) in korekcijskega faktorja polarnosti (C) spinskega označevalca MeFASL(2,11) v ULV liposomih iz PC:SM=2,4:1 (mol:mol) z etanolom - kontrola (rdeče barve) ali z etanolno raztopino katehina v končni koncentraciji 1 mM (zelene barve) D1=srednje urejena domena, D2=manj urejena domena. Premer mehučkov je proporcionalen deležu spinskih označevalcev v posameznih domenah.....	39
Slika 26: Temperaturna odvisnost korelacijskega časa (τ_c) spinskega označevalca MeFASL(2,11), vgrajenega v ULV liposome (v prisotnosti etanola = kontrola ali v prisotnosti etanolne raztopine epikatehina v končni koncentraciji 1 mM).....	41
Slika 27: Temperaturna odvisnosti ureditvenega parametra (A), rotacijskega korelacijskega časa (B) in korekcijskega faktorja polarnosti (C) spinskega označevalca MeFASL(2,11) v ULV liposomih iz PC:SM=2,4:1 (mol:mol)z etanolom-kontrola (rdeče barve) ali z etanolno raztopino epikatehina v 1 mM končni koncentraciji (olivno zelene barve) D1=urejena domena, D2=manj urejena domena	42
Slika 28: Temperaturna odvisnost korelacijskega časa(τ_c) spinskega označevalca MeFASL(2,11), vgrajenega v ULV liposome (v prisotnosti etanola=kontrola ali v prisotnosti etanolne raztopine epigalokatehina v 1 mM končni koncentraciji).....	43
Slika 29: Temperaturna odvisnost ureditvenega parametra (A), rotacijskega korelacijskega časa (B) in korekcijskega faktorja polarnosti (C) spinskega označevalca MeFASL(2,11) v ULV liposomih iz PC:SM=2,4:1 (mol:mol) z etanolom-kontrola (rdeče barve) ali z etanolno raztopino epigalokatehina v 1 mM končni koncentraciji (violičaste barve) D1=urejena domena, D2=manj urejena domena	44
Slika 30: Temperaturna odvisnost korelacijskega časa (τ_c) spinskega označevalca MeFASL(2,11), vgrajenega v ULV liposome (v prisotnosti etanola=kontrola ali v prisotnosti etanolne razopine epigalokatehin-3-galata v 1 mM končni koncentraciji)	45

Slika 31: Temperaturna odvisnost ureditvenega parametra (A), rotacijskega korelacijskega časa (B) in korekcijskega faktorja polarnosti (C) spinskega označevalca MeFASL(2,11) pri ULV liposomih iz PC:SM=2,4:1 (mol:mol) z etanolom-kontrola (rdeče barve) ali z raztopino epigalokatehin-3-galata v 1 mM končni koncentraciji (rumene barve) D1=srednje urejena domena, D2=najmanj urejena domena.....	46
Slika 32: Temperaturna odvisnost korelacijskega časa (τ_c) spinskega označevalca MeFASL(2,11), vgrajenega v ULV liposome (v prisotnosti etanola=kontrola ali v prisotnosti etanolne razopine kvercetina v 1 mM končnikoncentraciji).....	47
Slika 33: Temperaturna odvisnost ureditvenega parametra (A), rotacijskega korelacijskega časa (B) in korekcijskega faktorja polarnosti (C) spinskega označevalca MeFASL(2,11) pri ULV liposomih iz PC:SM=2,4:1 (mol:mol) z etanolom-kontrola (rdeče barve) ali z etanolno raztopino kvercetina v 1 mM končni koncentraciji (modre barve) D1=srednje urejena domena, D2=manjj urejena domena.....	47
Slika 34: Odvisnost korelacijskega časa (τ_c) spinskega označevalca MeFASL(2,11), vgrajenega v ULV liposome (v prisotnosti etanola=kontrola ali v prisotnosti etanolne razopine BTH v 1 mM končni koncentraciji) od temperature.....	48
Slika 35: Temperaturne odvisnosti ureditvenega parametra (A), rotacijskega korelacijskega časa (B) in korekcijskega faktorja polarnosti (C) spinskega označevalca MeFASL(2,11) pri ULV liposomih iz PC:SM=2,4:1 (mol:mol) z etanolom-kontrola (rdeče barve) ali z etanolno raztopino butiliranega hidroksitoluena v 1 mM končni koncentraciji (rjave barve), D1=urejena domena, D2=najmanj urejena domena	49
Slika 36: Temperaturna odvisnost korelacijskega časa (τ_c) spinskega označevalca MeFASL(2,11), vgrajenega v ULV liposome (v prisotnosti etanola=kontrola ali v prisotnosti različnih fenolnih spojin v 1 mM končni koncentraciji).....	51
Slika 37: Primerjava DSC termograma MLV liposomov DPPC z DSC termogramom veziklov DPPC z dodano etanolno raztopino katehina (15mM) v molskem razmerju 1:1. Končna koncentracija DPPC veziklov je bila 0,5 mg/mL v 20 mM HEPES pufru, pH=7.....	53
Slika 38: Primerjava DSC termograma MLV liposomov DPPC z DSC termogramom veziklov DPPC z dodano etanolno raztopino epikatehina v molskem razmerju 1:1. Končna koncentracija DPPC veziklov je bila 0,5 mg/mL v 20 mM HEPES pufru, pH=7.....	54
Slika 39: Primerjava DSC termograma večslojnih DPPC liposomov z DSC termogramom večslojnih DPPC liposomov z dodano etanolno raztopino epigalokatehina v molskem razmerju 1:1. Končna koncentracija DPPC veziklov je bila 0,5 mg/mL v 20 mM HEPES pufru, pH=7.	55

Slika 40: Primerjava DSC termograma večslojnih DPPC liposomov z DSC termogramom večslojnih DPPC liposomov z dodano etanolno raztopino epigalokatehin-3-galata v molskem razmerju 1:1 in 2:1. Končna koncentracija DPPC veziklov je bila 0,5 mg/mL v 20 mM HEPES pufru, pH=7..... 57

Slika 41: Primerjava DSC termograma MLV liposomov DPPC z DSC termogramom liposomov DPPC z dodano etanolno raztopino kvercetina v molskem razmerju 1:1 in 2:1. Končna koncentracija DPPC veziklov je bila 0,5 mg/mL v 20 mM HEPES pufru, pH=7..... 58

Slika 42: Primerjava DSC termograma MLV liposomov DPPC z DSC termogramom liposomov DPPC z dodano etanolno raztopino BHT v molskem razmerju 1:1 in 2:1. Končna koncentracija DPPC veziklov je bila 0,5 mg/mL v 20 mM HEPES pufru, pH=7..... 59

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Eksperimentalni parametri za meritve spinsko označenih liposomov na EPR	31
Preglednica 2: Delež domene, ureditveni parameter, rotacijski korelacijski čas in korekcijski faktor polarnosti v liposomih PC:SM=2,4:1 (mol:mol) z dodano etanolno raztopino katehina (15 mM) označeni s spiskim označevalcem MeFASL(2,11) v odvisnosti od temperature. D1 predstavlja srednjo urejeno domeno, D2 pa predstavlja najmanj urejeno domeno.....	40
Preglednica 3: Povprečne vrednosti in standardni odkloni meritev korelacijskih časov pri sobni in 40 °C ob prisotnosti etanola (kontrola) ali 15 mM etanolnih raztopin izbranih polifenolov	50
Preglednica 4: Termodinamske vrednosti faznih prehodov MLV liposomov iz DPPC v prisotnosti fenolnih spojin, v molskem razmerju 1:1 in 2:1 T ['] _m – temperatura predprehoda, T _m – temperatura glavnega prehoda,	
T _{m1} (⁰ C) = drugi vrh glavnega prehoda ΔH _{cal} ' – entalpija predprehoda ΔH _{cal} – entalpija glavnega prehoda..	60

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BHT	butiliran hidroksitoluen
DPPC	1,2-diheksadekanoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholin
DSC	diferenčna dinamična kalorimetrija
EK	epikatehin
EGC	epigalokatehin
EGCG	epigalokatehin-3-galat
EPR	elektronska paramagnetna resonanca
ESR	elektronska spinska resonanca
HEPES	4-(2-hidroksietyl)-1-piperazinetansulfonska kislina
K	katehin
KV	kvercetin
l_d	tekoča neurejena faza
l_o	tekoča urejena faza
LUV	veliki enoslojni liposomi (large unilamellar vesicles)
MeFASL (2,11)	13-doksil metil palmitat
MeFASL (10,3)	5-doksil metil palmitat
MLV	večslojni liposomi (multilamellar vesicles)
PC	fosfatidilholin (palmitoil-oleil- <i>sn</i> -fosfatidilholin)
SM	sfingomyelin (N-(heksadekanoil)-sfing-4-enin-1-fosfoholin)
SUV	majhni enoslojni liposomi (unilamellar vesicles)
s_o	urejena faza
T_m	temperatura faznega prehoda
ULV	enoslojni liposomi (unilamellar vesicles)

1 UVOD

Sodobni način življenja je neločljivo povezan s hitrostjo, stresom in marsikdaj tudi z nepravilno prehrano. V pomanjkanju časa se zatekamo k hitro pripravljeni hrani, vse manj pa uživamo svežo zelenjavno in sadje. Takšna prehrana prav gotovo ne zagotavlja ustrezne oskrbe organizma z vitaminimi, minerali ter antioksidanti, kot so polifenoli, ki pa naj bi bili nujni za ohranitev zdravja in dobrega počutja. Fenolne spojine naj bi uživali vsak dan, vendar je njihova količina odvisna od prehranskih navad posameznika. Raziskovalci so dokazali, da uživanje hrane in pijač, bogatih s polifenoli znižuje tveganje za sodobne bolezni, kot so bolezni srca in ožilja in nekatere vrste raka (Tsuchiya, 2010). Učinek polifenolov je odvisen od zaužite količine in biorazpoložljivosti teh spojin, ki pa je lahko različna. Ni rečeno, da se tisti polifenoli, ki naj bi bili najbolj potrebni organizmu, tudi najbolje absorbirajo in jih je največ na razpolago različnim tkivom. Po absorpciji polifenolov lahko potekata tako konjugacija kot nastanek različnih metabolitov. Zato se lahko pojavijo v krvni plazmi drugačne spojine od zaužitih. Za dobro razumevanje pozitivnega delovanja polifenolov na zdravje človeka je zato nujno dobro poznati tudi njihovo biorazpoložljivost.

Raziskave na področju polifenolov in njihove uporabe so v zadnjem času pritegnile veliko pozornosti raziskovalcev predvsem zato, ker bi se lahko uporabili kot funkcionalni dodatek v prehrani in v farmacevtski industriji, zaradi njihove potencialne koristi na zdravje ljudi. Uporabnost polifenolov je odvisna od njihove biološke aktivnosti in predvsem biorazpoložljivosti. Na drugi strani pa njihovo uporabo v živilih in pijačah omejuje neprijeten, grenak okus.

Človeško telo je sestavljeno iz celic, ki jih obdajajo celične membrane različne sestave. Naloge membran segajo od varovanja tkiv in celic pred tujimi molekulami do interakcij z izbranimi molekulami, ki imajo biokemijsko in fiziološko vlogo v organizmu. Zaradi kompleksnosti človeškega organizma se lastnosti bioloških membran običajno proučujejo z uporabo modelnih lipidnih membran. Modelne lipidne membrane ali liposomi so podobni celični membrani po svoji strukturi in sestavi. Liposomi so zgrajeni iz naravnih, biorazgradljivih, netoksičnih, neimunogenih lipidnih molekul, vanje pa so lahko vgrajene ali vezane številne molekule.

1.1 NAMEN DELA IN DELOVNA HIPOTEZA

Zaradi zanimivih bioloških učinkov polifenolov dokazanih *in vitro*, smo žeeli bolje raziskati interakcije med izbranimi flavonoidi in modelnimi lipidnimi membranami. Za potrebe naše raziskave smo pripravili liposome s sestavo PC : SM = 2,4 : 1 in DPPC liposome in tako bolj podrobno raziskali mesto vgradnje fenolne spojine v membrano in vpliv na njene lastnosti. Vpliv polifenolov na modelne membrane smo raziskovali z dvema metodama in sicer z elektronsko paramagnetno resonanco (EPR) in diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC). Spremembo fluidnosti smo spremeljali z EPR. Vpliv na termotropno fazno obnašanje in pakiranje dvosloja v DPPC membranah smo raziskali z metodo diferenčne dinamične kalorimetrije. Poleg tega nas je zanimalo, če bi bilo mogoče povezati spremembe fluidnosti, ki jo zazna EPR spektroskopija, s spremembami temperature predprehoda oz. glavnega faznega prehoda, opazovano z DSC metodo.

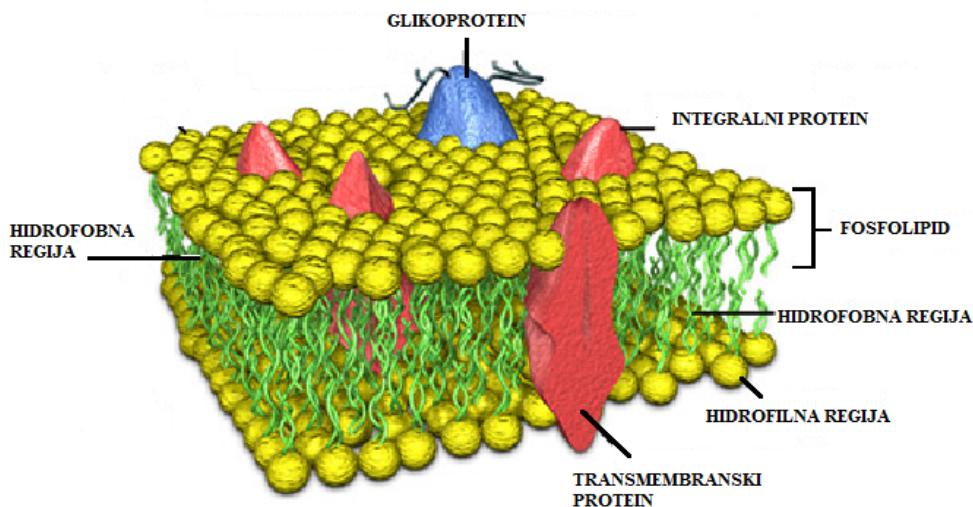
Cilj te študije je bil pripraviti liposome in raziskati strukturne spremembe membran zaradi interakcij lipidov z različnimi fenolnimi spojinami. Glede na pretekle raziskave v našem laboratoriju, ki jih je opravila Berlec (2011), v katerih je proučevala spremembe v fluidnosti membrane v zgornjem delu lipidnega dvosloja, smo predvidevali, da izbrani flavonoidi vplivajo na fluidnost membran tudi v njihovi notranjosti.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MEMBRANE

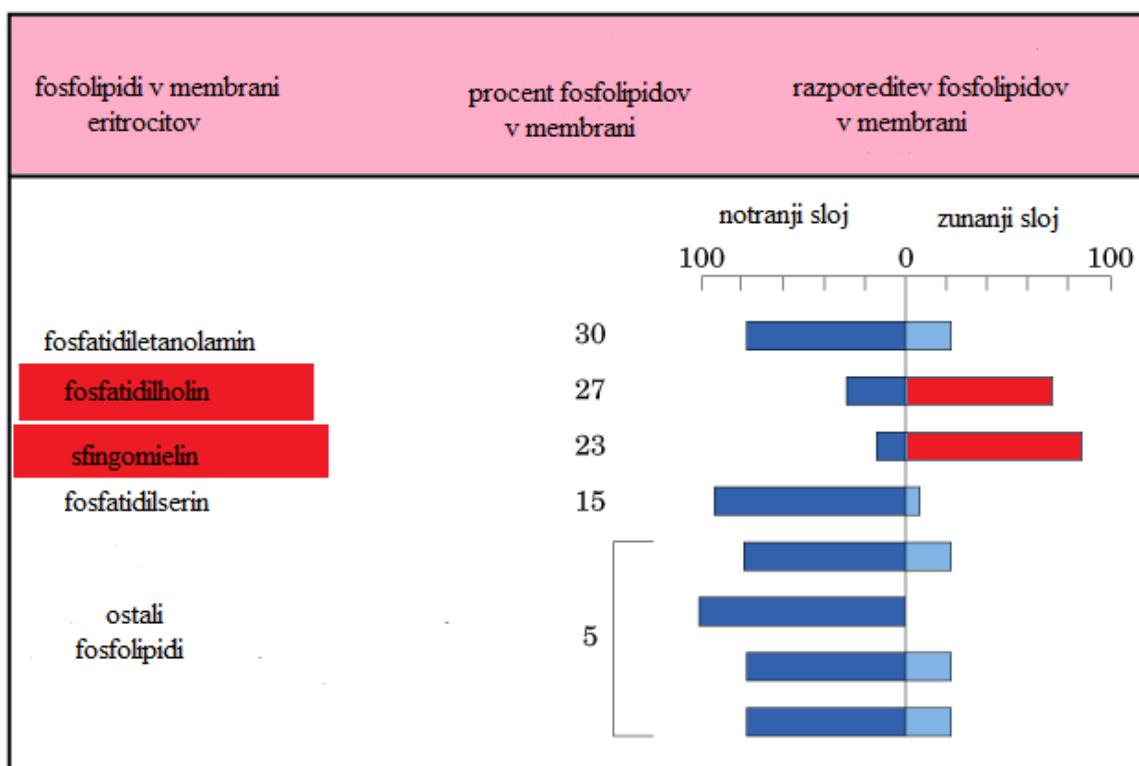
2.1.1 Biološke in modelne membrane

Za preživetje mora vsaka celica vzdrževati specifično bariero, kljub drugačni koncentraciji in sestavi okolja. To razliko v sestavi zunanjega in notranjega okolja celice uravnava plazmalema ali celična membrana. Poleg zaščite in tvorbe različnih odsekov v celici ima membrana še številne druge biokemijske funkcije v celičnem ciklu, kot sta signalizacija in transport snovi skozi membrano. Je tanka ($< 10 \text{ nm}$), heterogena, urejena dinamična struktura sestavljena iz lipidov, med katere so vgrajene molekule proteinov in ogljikovih hidratov. Lipidi so organizirani v lipidni dvosloj in se z lateralno difuzijo premikajo v ravnini membrane, kot opisuje model tekočega mozaika (Walz in sod., 2004). Membrane so semipermeabilne, kar pomeni, da je prehod molekul in ionov skozi membrano nadzorovan. Za molekule, ki so dobro topne v organski fazi je fosfolipidna membrana zelo prepustna, polarne spojine kot so glukoza, ioni in molekule z veliko molekulsko maso pa prečkajo membrano bolj počasi (Roger in New, 1990).



Slika 1: Membrana kot model tekočega mozaika s sestavnimi komponentami (Molecular Expressions, 2004)

Ker služi membrana kot meja med urejenim življenjem in kaosom, ni presenetljivo, da je membranski sistem zelo kompleksen. Zreli humani eritrociti nimajo jedra in organelov (notranjih membran), zato predstavljajo enega najenostavnješih modelov za študije membran. 50% mase membrane eritrocita predstavljajo lipidi (fosfolipidi, holesterol, glikolipidi), drugo polovico pa proteini. Glavni fosfolipidi, asimetrično razporejeni med polovicama membrane, so fosfatidilholin (lecitin), sfingomielin, fosfatidilserin in fosfatidiletanolamin. V zunanji polovici sta predvsem fosfatidilholin in sfingomielin (Živec in Ziherl, 2006). Ko skušamo razumeti vpliv fenolnih spojin na membrano eritrocita, ne smemo pozabiti, da ta vsebuje tudi številne proteine. Na fluidnost tako kompleksnega sistema vplivajo zato tudi interakcije med temi komponentami. Da pa bi se izognili kompleksnosti, so biofiziki izumili umetno pripravljene modelne membrane.

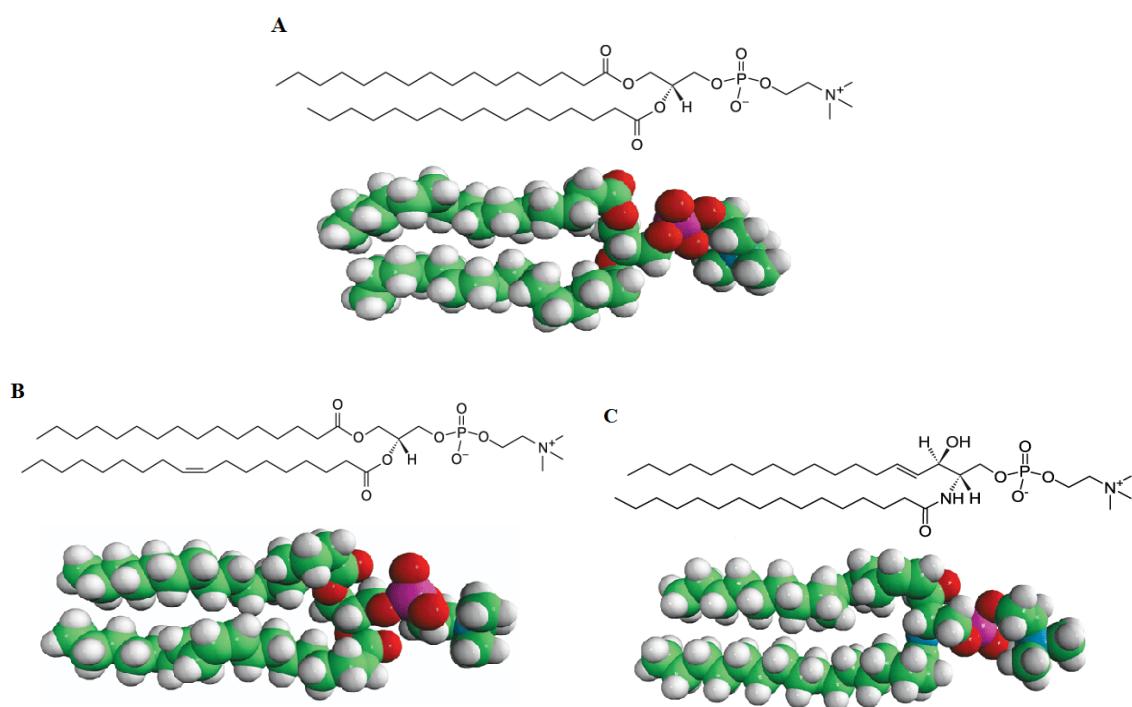


Slika 2: Porazdelitev fosfolipidov v obeh slojih membrane eritrocitov (Membranes, 2009)

2.1.1 **Fosfolipidi**

Molekule lahko glede na simetrijo in naboj v grobem delimo na dve skupini, polarne in nepolarne. Polarne molekule so topne v polarnih topilih, nepolarne pa so topne v nepolarnih topilih. Nekatere molekule, kot so fosfolipidi, pa so sestavljene iz polarnega in nepolarnega dela. Imenujemo jih amfifilne in glede na njihove hidrofilne in lipofilne interakcije se lahko organizirajo in tvorijo značilne strukture v določenem topilu (Lasic, 1998). Osnovni gradniki fosfolipidov so maščobne kisline, glicerol, fosfatna skupina in dodatna polarna skupina (ponavadi alkoholna). Če so ogljikovi atomi v maščobnih kislinah povezani z enojnimi vezmi govorimo o nasičenih maščobnih kislinah, ko pa je prisotna vsaj ena dvojna vez pa govorimo o nenasičenih (Boyer, 2005).

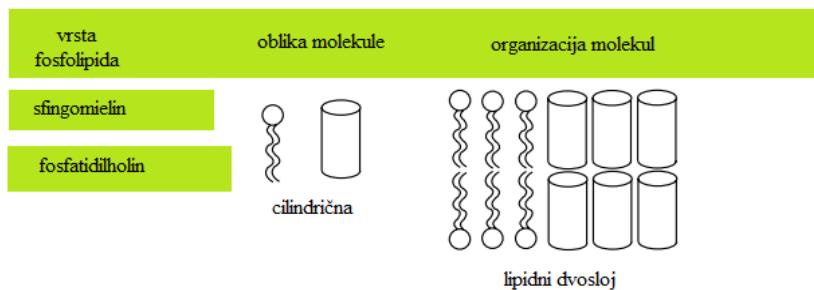
Različne kombinacije lipidnih glav in alifatskih repov omogočajo obstoj več kot 1000 različnih fosfolipidov v evkarionskih celicah. Lipidi v celici opravljajo 3 glavne funkcije in sicer, ker so v relativno reduciranim stanju služijo kot zaloga energije, so sekundarni prenašalci signalov in gradniki lipidnega dvosloja - »osnovnega matriksa« bioloških membran. Fosfolipidi so torej glavni sestavnici deli bioloških membran. Poznamo 2 vrsti fosfolipidov: fosfoglyceridi in sfingolipidi, skupaj z njihovimi hidroliziranimi produkti. Glicerofosfolipidi se sintetizirajo v endoplazmatskem retikulumu, sfingolipidi pa v golgijevem aparatu (van Meer in sod., 2008).



Slika 3: Strukturne formule fosfolipidov ter tridimenzionalne slike: (A) dipalmitoilfosfatidilholina (DPPC), (B) fosfatidilholin (PC) in (C) sfingomielin (SM) (Avanti Polar Lipids, 2010)

Najpogostejsi glicerofosfolipid je fosfatidilholin (PC), molekula, v kateri glicerol povezuje hidrofobno acilno ogljikovodikovo verigo s hidrofilno polarno glavo fosfatidilholina (Roger in New, 1990). Fosfatidilholin predstavlja več kot 50 % fosfolipidov v večini evkariontskih membran. Molekula ima cilindrično obliko (slika 4) in se v vodnih raztopinah spontano organizira v dvosloj, kjer so lipidni repi obrnjeni drug proti drugemu, polarne glave pa segajo v vodno fazo (van Meer in sod., 2008). Je nevtralen, sodeluje pri celični signalizaciji in vzdržuje strukturo celičnih membran (Boyer, 2005). Fosfatidilholin pridobivajo iz naravnih ali sintetičnih virov. Najpogosteje ga ekstrahiramo iz jajčnega rumenjaka, soje, manj pogosto iz govejega srca ali hrbtenjače (Roger in New, 1990).

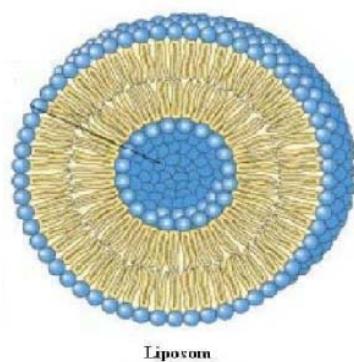
Sfingomielin (SM) je sfingolipid, ki spada med najpomembnejše gradnike evkariontskih membran. Maščobna kislina je vezana preko aminske skupine, hidroksilna skupina pa je zaestrena s fosfoholinsko enoto (Boyer, 2005). Imajo nasičene repe, kar jim omogoča tvorbo daljših, ožjih repov cilindričnih oblik (slika 4) kot pri PC in se pakirajo v bolj tesno gel (s_0) stanje (van Meer in sod., 2008).



Slika 4: Cilindrična oblika fosfolipidov (Lasic, 1998)

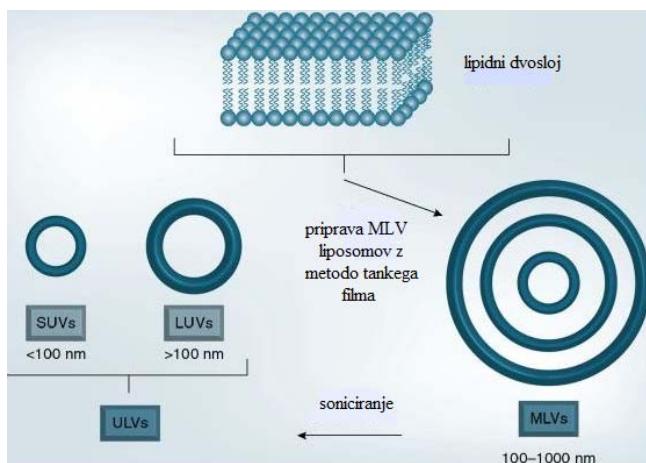
2.1.2 Liposomi

Liposomi ali fosfolipidni vezikli so okrogli koloidni delci, ki so sestavljeni iz enega ali več lipidnih dvoslojev. V notranjosti zadržujejo del topila v katerem plavajo, kar lahko izkoriščamo v različne namene. Liposomi so amfifilne narave, kar pomeni da so sestavljeni iz hidrofilnega in hidrofobnega dela. Hidrofilni del predstavljajo polarne glave fosfolipidov, ki privlačijo vodo, hidrofobni pa so nepolarni repi, ki vodo odbijajo. Ta lastnost omogoča urejanje delcev v zaprte strukture, ko jih izpostavimo polarnemu mediju (Roger in New, 1990). Liposomi se pojavljajo v naravi ali so sintetično pripravljeni v laboratoriju. Včasih so jih uporabljali zgolj kot model za študij bioloških membran, danes pa so zelo uporabni za vnos zdravil, kot reagenti in orodja v različnih znanstvenih disciplinah kot so matematika in teoretična fizika, biofizika, kemija, znanost o koloidih, biokemija in biologija (Lasic, 1998).



Slika 5: Lipidni agregat – liposom (Nelson in Cox, 2000)

Poleg kemijskih lastnosti, ki določajo membranske lastnosti kot so fluidnost, gostota naboja in prepustnost, so liposomi karakterizirani tudi z velikostjo in obliko. Velikost liposomov variira od majhnih veziklov premera 25 nm do 1000 nm liposomov vidnih pod svetlobnim mikroskopom. Lahko so sestavljeni iz enega sloja membrane ali pa so večslojni (Roger in New, 1990). Njenostavne jih delimo glede na velikost in sicer na velike večslojne liposome (MLV = multilamellar vesicles) s premerom od 100-1000 nm ter na enoslojne liposome (ULV = unilamellar vesicles). Enoslojne liposome pa nadalje delimo v velike enoslojne liposome (LUV = large unilamellar vesicles) s premerom od 100-800 nm in majhne enoslojne liposome (SUV = small unilamellar vesicles) (Kristl in sod., 1992), ki so manjši kot 100 nm.

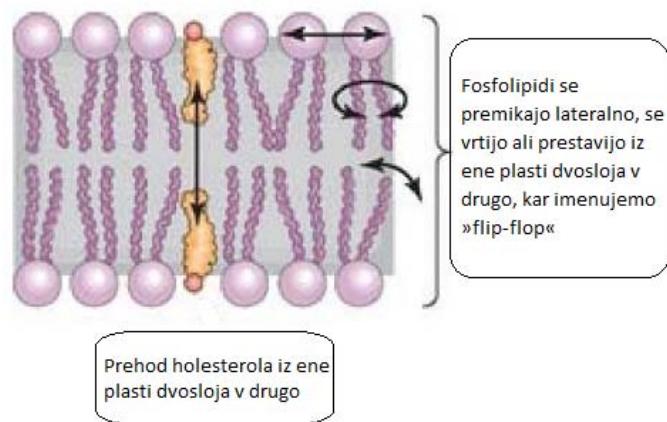


Slika 6: Shematični prikaz različnih tipov liposomov in njihove priprave (Pinherio in sod., 2011)

V sodobnih raziskavah se uporablja predvsem enoslojni vezikli s premerom od 50-150 nm. Ta velikostni razred je kompromis med učinkovitostjo liposoma (narašča z naraščanjem velikosti), stabilnostjo liposoma (pada z naraščanjem velikosti) in izlivom vsebine (Lasic, 1998). Tudi v naši raziskavi smo uporabili tako enoslojne liposome in sicer pri meritvah z elektronsko paramagnetno resonanco in večslojne liposome pri diferenčni dinamični kalorimetriji.

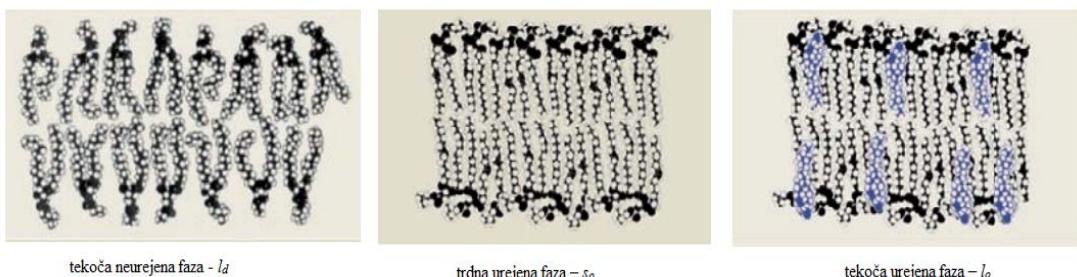
2.1.3 Fluidnost membran

Fluidnost membrane je proces gibanja molekul v membrani in odraža urejenost in dinamiko lipidnega dvosloja. Je obratno sorazmerna z mikroviskoznošjo. Gibanje je zaradi interakcij med steroli in fosfolipidi izrazitejše v sredini lipidnega dvosloja, manjše pa ob stiku z vodno fazo (Živec in Ziherl, 2006). Večina lipidov v membrani je sposobna prosto prehajati znotraj lipidnih dvoslojev. Gibljivi fosfolipidi v membrani se lahko hitro premikajo v vseh smereh znotraj svojega sloja, čemur pravimo lateralna difuzija (hitrost gibanja lipidnih molekul je reda 10^{-6} s). Druga vrsta gibanja je vrtenje lipidnih molekul okoli svoje osi znotraj enega lipidnega sloja (hitrost gibanja je reda velikosti 10^{-9} s) (Muller, 2004). Stopnja prehajanja molekul lipidov iz ene plasti dvosloja v drugo, kar imenujemo tudi »flip-flop« gibanje, je ekstremno nizka (ta proces je izredno počasen, hitrost gibanja je lahko tudi več kot 10^5 s) (Boron in Boulpaep, 2009). V čistih lipidnih membranah poteka prenos fosfolipidov iz enega dela membrane v drug v zelo omejenih količinah (saj je prehod zaradi polarne glave otežen) v primerjavi s holesterolom, kjer poteka prenos kar hitro. To lahko razložimo z majhnostjo molekule holesterola glede na fosfolipide (Roger in New, 1990).



Slika 7: Premikanje lipidov po dvoslojni membrani (Boron in Boulpaep, 2009)

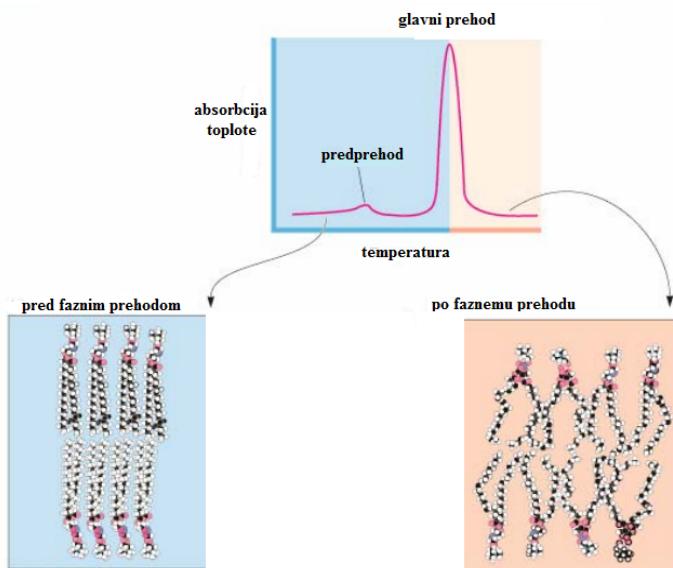
Dokazano je bilo, da so številne funkcije celične membrane povezane s heterogenostjo sestave in strukture lipidov. Lipidi obstajajo v številnih različnih faznih oblikah, vendar sta dve fazi dominantni za tvorbo domen in to sta tekoča in gel faza. Fazno stanje, v katerem se membrane nahajajo je odvisno od temperature in faznega prehoda T_m , ki je specifičen za vsak lipid (Dopico, 2007). Pri nizkih temperaturah je lipidni dvosloj v trdnem urejenem (gel) stanju (s_o), nad določeno temperaturo pa postane neurejen (l_d) in je v tekoči, sol fazi. Temperatura prehoda (T_m) je temperatura, pri kateri lipidi iz s_o stanja preidejo v l_d stanje (London, 2002). Odvisna je predvsem od dolžine in nasičenosti verig ogljikovih atomov, ki sestavljajo nepolarni rep amfifilnih molekul, medtem ko ima polarna glava manjši vpliv na T_m (Lasic, 1997). Za lipide, ki imajo ene nasičene acilne verige (nimajo dvojnih vezi), kamor spada večina naravnih sfingolipidov, je bilo ugotovljeno, da tvorijo lipidni dvosloj z visoko temperaturo faznega prehoda iz s_o stanja v l_d stanje. Za lipide, ki imajo nenasičene acilne verige, kot so naravni fosfolipidi pa je bilo ugotovljeno, da imajo nizko temperaturo faznega prehoda (London 2005, van Meer in sod., 2008). Ob 30% holesterola pa se fazni prehod zabriše. Tako se pojavi nova tekoča urejena (l_o) faza, v kateri so verige iztegnjene in tesno pakirane, kot v fazi s_o , imajo pa tako visoko stopnjo lateralne gibljivosti, kot v fazi l_d (Brown in London, 2000).



Slika 8: Fazna stanja lipidov v bioloških membranah (van Meer in sod., 2008)

V membrani se torej lipidi urejajo v različne faze z različno urejenostjo: tekoča neurejena ali tekoča kristalna faza ali sol-faza (liquid disorderd - l_d or liquid crystal - L_a), tekoča urejena faza (liquid ordered – l_o) in trdna urejena ali gel faza (solid ordered – s_o or L_β). Lipidi, ki imajo veliko polarno glavo, kot so DPPC, pa oblikujejo P_β fazo (rippled gel

phase), ki je vmesna faza trdne urejene faze in tekoče neurejene faze. Pri P_β fazi so acilne verige nagnjene, toda urejene, membrana pa oscilira.



Slika 9: Prikaz DSC diagrama faznega prehoda lipidnega dvosloja (Jain in Wagner, 1980)

Enostavni, enokomponentni nasičeni fosfolipidi, kot so DPPC, kažejo dva termotropna lamelarna prehoda. Predprehod je prehod iz gel L_β v gel P_β , torej iz trdne urejene faze v gel fazo z nagnjenimi verigami (rippled gel fazo). Glavni prehod pa je prehod pri višji temperaturi iz P_β v L_α , torej iz gel faze z nagnjenimi verigami v tekočo neurejeno fazo. V tekoči neurejeni fazi so acilne verige skrčene in neurejene, med tem ko so v trdni urejeni fazi iztegnjene in urejene (Nicolini in sod., 2006). Fazni prehodi so bili opisani za številne čiste in mešane lipidne sisteme in so vedno endotermne reakcije, torej se pri njih toplota porablja. T_m narašča z naraščanjem dolžine in pada z nenasičenostjo acilne verige, nanjo pa vpliva tudi narava polarne glave. Temperaturo faznega prehoda T_m v liposomih prilagodimo z izborom primernih lipidov. Fazne prehode raziskujemo zaradi kontrole puščanja liposomov. Puščanje je maksimalno okoli temperature faznega prehoda, zaradi sožitja dveh faz in defektov na mejah med dvema domenama (Lasic, 1998).

2.1.4 Lipidni rafti

Lipidni rafti so majhna s holesterolom in sfingomielinom obogatena področja celične membrane. Te domene so bile dokazane kot pomembne funkcionalne enote vsake celice, saj sodelujejo v številnih celičnih procesih, kot so celična signalizacija, endocitoza in eksocitoza in membranski transport v celici (London in Brown, 2000). Predstavljajo mesto pritrditve in vstopa celičnih patogenov, toksinov in drugih ligandov (Simons in Ehehalt, 2002). Vse več pa je dokumentiranih povezav med rafti in patogenezo, na primer pri nevrodegenerativnih boleznih (predvsem pri Alzheimerjevi bolezni), aterosklerozi in vdorih patogenov v celico (določene bakterije, virusi in prioni) (Pajk, 2011). Hipoteza o nastanku raftov predpostavlja, da določeni naravno prisotni lipidi agregirajo v ravnini zaradi medmolekularnih interakcij. Med te spadajo van der Walsove interakcije med dolgimi, skoraj v celoti nasičenimi verigami sfingomielina in glikosfingolipidov ter tvorba vodikovih vezi med glikosfingolipidi in glikoziliranimi molekulami (Dietrich in sod., 2001). Rafti v bioloških membranah so kratkotrajne, neuravnovešene strukture (Mattson, 2005).

Kljub hitro naraščajočemu številu publikacij, domene ali rafti v bioloških membranah zaradi svoje kompleksnosti zaenkrat postavljajo več vprašanj kot odgovorov, predvsem glede njihove prostorske in časovne komponente si raziskovalci niso enotni. Posredni dokazi različnih študij umeščajo velikost domen med 5 in 1000 nm, a v večini primerov pod ločljivostjo optičnih mikroskopov. Podobno je z življenjskim časom domene, od $<1 \mu\text{s}$ pa vse do nekaj deset minut (Pajk, 2011).

2.2 FENOLNE SPOJINE

2.2.1 Definicija in kvalifikacija

Spojine v živih organizmih lahko razdelimo na dve glavni skupini: primarne in sekundarne metabolite. Primarni metaboliti so tisti, ki nastanejo in so vključeni v primarne metabolične procese, tako kot npr. glikoliza, celično dihanje in fotosinteza. Sekundarni metaboliti nastajajo iz primarnih metabolitov. Zanje dostikrat niti ne vemo čemu služijo v rastlinah. Sekundarni metaboliti zajemajo zelo različne skupine spojin (poliketidi, fenolne spojine, terpenoidi, cianogeni glikozidi in glukozinolati, alkaloidi). K njim prištevamo tudi spojine, ki se pojavijo v rastlinah kot odgovor na infekcijo. To so fitoaleksini, spojine z zelo različnimi strukturami kot so izoprenoidi, flavonoidi in stilbeni (Abram, 2000).

Med sekundarne metabolite torej prištevamo tudi fenolne spojine (slika 10). Akumulirajo se v relativno visoki koncentraciji predvsem v listih, celičnih stenah in predvsem v predelih poškodovane rastline. V to skupino spadajo signalne molekule, pigmenti in aromatične snovi, s katerimi rastline privlačijo in odvračajo oziroma se zaščitijo pred insekticidi, gljivami, bakterijami in virusi (Vermerris in Nicholson, 2008). Imajo tudi številne druge funkcije v njihovem življenjskem ciklu, kot na primer strukturno vlogo pri opori in zaščiti pred UV žarki. Poleg opravljanja številnih funkcij v rastlinah naj bi bile fenolne spojine pomembne tudi za izboljšanje zdravja ljudi (Fraga, 2011).

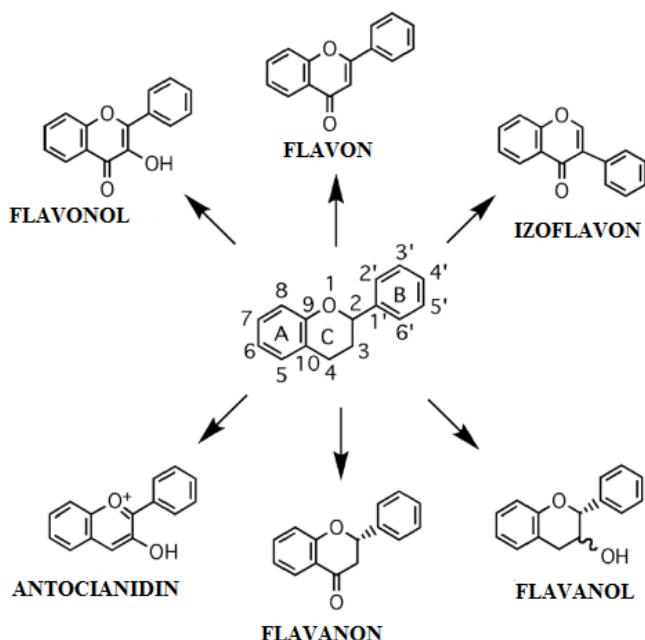
Fenolne spojine so tiste, ki imajo eno ali več hidroksilnih skupin pritrjenih na vsaj eden aromatski obroč benzena (Vermerris in Nicholson, 2008).

8	C_6C_2	Fenilacetne kisline
9	C_6C_3	Hidroksicimetna kisline Fenilpropeni Kumarini Izokumarini Kromoni
10	C_6C_4	Naftokinoi
13	$C_6C_1C_6$	Ksantoni
14	$C_6C_2C_6$	Stilbeni Antrakinoni
15	$C_6C_3C_6$	Flavonoidi
18	$(C_6C_3)_2$	Lignani Neolignani
30	$(C_6C_3C_6)_2$	Biflavonoidi
n	$(C_6C_3)_n$	Lignini
	$(C_6)_n$	Melanini
	$(C_6C_3C_6)_n$	Kondenzirani tanini

Slika 10: Razvrstitev fenolnih snovi glede na število C-atomov (Abram, 2000: 25, 30)

2.2.2 Flavonoidi

Flavonoidi so polifenoli (slika 11) in so velika podskupina fenolnih spojin, ki jih najdemo v rastlinah. V skupini je več kot 8000 različnih spojin, ta številka pa zaradi novo odkritih strukturno različnih spojin, še vedno narašča. Flavonoidi so pigmenti odgovorni za odtenke rumene, oranžne in rdeče barve v rastlinah. So pomembni faktorji za rast, razvoj in obrambo rastline. Številni flavonoidi so biološko aktivni in *in vitro* kažejo protivnetne, protialergijske, protitrombozne, protiaterosklerozne, protitumorne aktivnosti, uravnavajo imunski sistem in inhibirajo številne encime. Zelo pomembno vlogo imajo tudi kot antioksidanti – lovilci prostih radikalov, ki jih prištevamo med reaktivne kisikove zvrsti (ROS = reactive oxygen species) (Rice-Evans in Packer, 2003). Večino flavonoidov najdemo v obliki glikozidov, to je spojin, ki imajo z glikozidno vezjo vezanih eno ali več sladkornih enot na fenolno -OH skupino. Le malo flavonoidov je prisotnih v obliki aglikonov, spojin, ki nimajo sladkorne komponente (Suzuki in Hara, 2010).



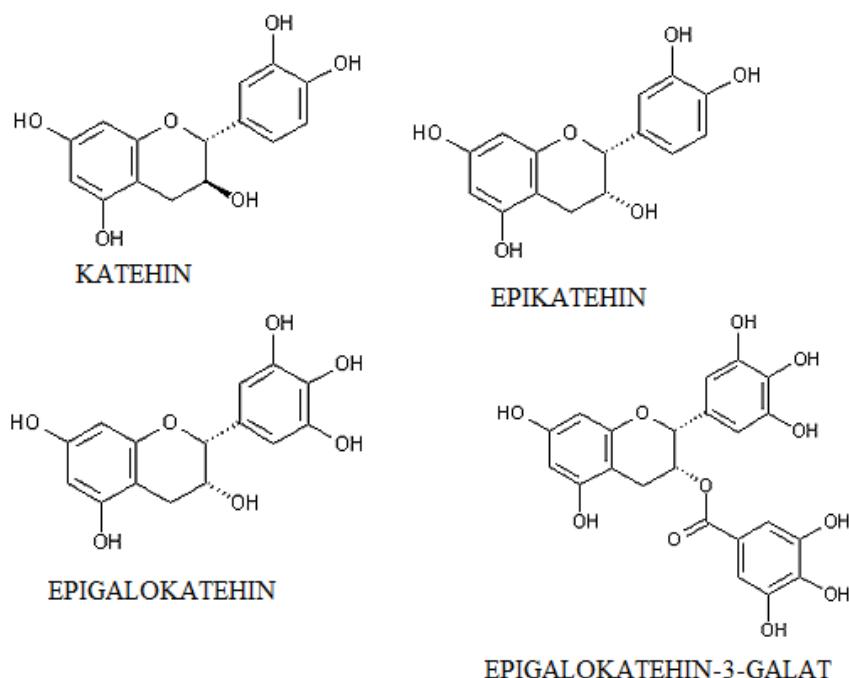
Slika 11: Osnovne strukturne formule in delitev flavonoidov (Fraga, 2011)

Kot je prikazano na sliki 11, so flavonoidi molekule s 15 C-atomi in osnovno strukturo $C_6C_3C_6$ (Vermerris in Nicholson, 2008). Sestavljeni so iz dveh aromatskih obročev (A in B), povezanih preko treh C-atomov, ki tvorijo heterociklični obroč (obroč C) s kisikovim atomom. Razdelimo jih v šest razredov: flavonoli, flavoni, izoflavoni, flavanoni, antocianidini in flavanoli (Manach in sod., 2004; Suzuki in Hara, 2010).

2.2.2.1 Flavanoli – katehin, epikatehin, epigalokatehin, epigalokatehin-3-galat

Flavanoli obstajajo tako v monomerni (catehini) in polimerni (proantocianidini) oblikah. Epikatehin in katehin sta najbolj razširjena flavanola v sadju, medtem ko so glavni vir epigalokatehina in epigalokatehin-3-galata semena stročnic, vino in še posebno čaj in čokolada (slika 12). V nasprotju z drugimi flavonoidi so flavanoli v živilih v obliki aglikonov (Manach in sod., 2004). Ekstrakti zelenega čaja vsebujejo catehine, ki imajo velik spekter bioloških aktivnosti. Tako vplivajo na celične procese v membrani, kot so prenos signala, celični cikel, metabolizem arahidonske kisline in funkcionalnost mitohondrija, zato je veliko raziskav študiralo interakcije med membranami in catehini. Dobljeni rezultati so pokazali, da se catehini čaja vežejo na lipidni dvosloj, povzročajo agregacijo liposomov in povzročanje puščanja lipidnega dvosloja (Sun in sod. 2009). Veliko študij je bilo narejenih zato, da bi našli tisti del strukture, ki je odgovoren za

biološke spremembe povzročene zaradi prisotnosti katehina in drugih flavonoidov. Povezanost med sposobnostjo lovljenja radikalov in antibakterijsko učinkovitostjo katehinov ter sposobnostjo spremicanja fizikalnih lastnosti membrane lahko študiramo z različnimi biofizikalnimi tehnikami (Caturla in sod. 2002).

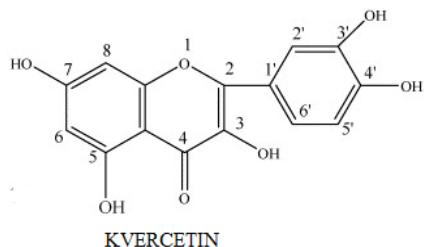


Slika 12: (+)-catehin ($C_{15}H_{14}O_6$, (+)-3,3',4',5,7-pentahidroksiflavan), (-)-epikatehin ($C_{15}H_{14}O_6$, (-)-3,3',4',5,7-pentahidroksiflavan), (-)-epigalokatehin ($C_{15}H_{14}O_7$, (-)-3,3',4',5,5',7-heksahidroksiflavan), (-)-epigalokatehin-3-galat($C_{22}H_{18}O_{11}$) (Extrasynthese, 2009)

2.2.2.2 Flavonoli – kvercetin

Kvercetin je flavonoid (slika 13), ki ima v *in vitro* poskusih določenih veliko lastnosti pomembnih za zdravje ljudi. Je eden najbolj razširjenih bioflavonoidov, prisoten je v večini užitnega sadja in zelenjave. Najbogatejši viri so čebula, kodrasti ohrov, por, brokoli in borovnice. Kvercetin je v naravi prisoten v glikozilirani obliki, najpogosteje pa je sladkorna komponenta ramnoza ali glukoza. Kopiči se v površinskih plasteh listov in stebela, saj je njegova biosinteza pogojena s svetlobo (Manach in sod., 2004). Kvercetin ima veliko farmacevtskih učinkov kot je sposobnost preprečevanja razvoja tumornih celic, zaustavitev celičnega cikla in indukcija celične smrti ter preprečevanje ekspresije proteinov vročinskega šoka. Kvercetin inhibira encimsko aktivnost alkalne fosfataze, fosfolipaze A₂

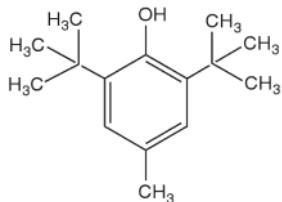
in protein kinaze. Deluje tudi kot antioksidant v fosfolipidni membrani (Pawlikowska-Pawłęga in sod., 2007).



Slika 13: Kvercetin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavanon) (Xi in Guo, 2006)

2.2.2.3 Butiliran hidroksitoluen (BHT)

Butiliran hidroksitoluen ali butilhidroksitoluen (slika 14) je eden najbolj uporabnih umetnih antioksidantov v živilski industriji. BHT je fenolna spojina, ki prepreči oksidacijo lipidov, s tem ko da vodikov atom prostemu radikalu. Splošno velja kot varen konzervans, človek pa ga dnevno zaužije 0,1 mg/kg telesne teže. Ima tudi nekaj koristnih terapevtskih učinkov (Simán in Eriksson, 1996).



Slika 14: Struktruna formula butiliranega hidroksitoluena-BHT ($C_{15}H_{24}O$) (Shibamoto in Bjeldanes, 2009)

2.2.3 Biosinteza fenolnih spojin

Flavonoidi se sintetizirajo v rastlinskih tkivih in sodelujejo pri svetlobni fazi fotosinteze kot prenašalci elektronov (Middleton in sod., 2000). Biosinteza flavonoidov se od biosinteze drugih fenolnih spojin razlikuje po tem, da nastaneta obroča A in B po različni poti. Fenilpropanski del (obroča B in C) se tvori preko *p*-kumarne kisline po šikimatni poti. Obroč A pa nastane iz acetil-CoA in je poseben del sinteze poliketidov. Za to sintezo je

značilno, da izhajajo vse C₂ enote iz acetil-CoA, tako kot se tudi sintetizirajo maščobne kisline in določene druge fenolne spojine. Biosinteza fenolnih spojin v rastlinah je kompleksen proces in je rezultat interakcije med vsaj petimi različnimi metaboličnimi potmi (Abram in Simčič, 1997). Biosinteza flavonoidov je lahko stimulirana tudi s pomočjo eksogenih dejavnikov kot sta sprememba toplove in temperature.

2.2.4 **Biorazpoložljivost fenolnih spojin**

Biorazpoložljivost lahko definiramo na različne načine, najbolj sprejemljiva definicija je, da je biorazpoložljivost delež nutrientov, ki se prebavi, absorbira in presnavlja po običajnih metaboličnih poteh in je dostopna različnim tkivom v organizmu (Walton, 2006). Zato ni pomembno le vedeti koliko hraničnih snovi je prisotno v hrani ali prehranskem dopolnilu, ampak tudi koliko teh hraničnih je biološko razpoložljivih.

Absorbcija, porazdelitev, presnova in izločanje flavonoidov pri ljudeh ni podrobno raziskana (Hollman in Katan, 1999). Flavonoidi v obliki aglikona se enostavno absorbirajo v endotelijalne celice prebavnega trakta, saj jim lipofilna narava omogoča pasivno difuzijo ali prehod skozi fosfolipidno membrano v notranjost celic mukoze. Vendar so polifenoli v živilih večinoma v obliki estrov, glikozidov ali polimerov, ki pa se tako enostavno ne morejo absorbirati. Pred absorpcijo se morajo take spojine pretvoriti v aglikone s pomočjo encimov v tankem ali encimov mikroflore v debelem črevesu. Za glikozilirane flavonoide, razen antocianinov, menijo, da se morajo najprej pretvoriti v ustrezne aglikone s pomočjo nespecifičnega encima laktaza floridzin hidrolaze (LPH), ki katalizira razcep β-glikozidne vezi in tako odcepi sladkorno komponento od aglikona. Monoglukozidni flavonoidi se lahko transportirajo skozi lipidni dvosloj tudi s pomočjo Na-glukoznega prenosa-1. Večina flavonoidnih glikozidov, ki vstopajo v enterocite se nato deglikozilira s pomočjo encima β-glukozidaze iz citosola epitelnih celic (Suzuki in Hara, 2010). Med in po absorpciji so polifenoli deležni številnih sprememb, tako konjugacije v črevesnem epitheliju in kasneje v jetrih nastanka spojin, ki vsebujejo metilne, sulfatne in glukuronidne skupine. Poleg tega se v debelem črevesu flavonoidi razgradijo v fenolne spojine ali aldehyde. Zato je spojina, ki preide v krvno plazmo različna od nativne oblike fenolnih spojin v živilih, kar otežuje določanje metabolitov in spremeljanje njihove biološke aktivnosti (D'Archivio in sod., 2007).

Glavni cilj raziskav biorazpoložljivosti je ugotoviti, katere fenolne spojine se najbolje absorbirajo, kateri so njihovi metaboliti in katere spojine so biološko aktivne. Na stopnjo in obseg absorpcije ter naravo metabolitov, ki krožijo v krvni plazmi, vpliva bolj kot koncentracija, kemijska zgradba polifenolov (D'Archivio in sod., 2007).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije in drobna oprema

Fosfatidilholin	Avanti Polar LIpids, ZDA
Sfingomielin	Avanti Polar LIpids, ZDA
1,2-diheksadekanoli- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholin	Avanti Polar LIpids, ZDA
(+)-catehin	Extrasynthese, Francija
(-)-epikatehin	Extrasynthese, Francija
(-)-epigalokatehin	Extrasynthese, Francija
(-)-epigalokatehin-3-galat	Extrasynthese, Francija
kvercetin	Extrasynthese, Francija
butiliran hidroksitoluen	Sigma Chemical CO., USA
MeFASL(2,11)	Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Slovenija
Etanol	Merck, Nemčija
HEPES	Sigma - Aldrich, Nemčija

3.1.1 Raztopine

Raztopine lipidov:

5 mg lipidov v mešanici metanola in kloroformu v razmerju 3:7 (v/v)

Raztopina MeFASL(2,11):

10^{-4} M raztopina MeFASL (2,11) v etanolni raztopini

Raztopine fenolnih spojin:

15 mM raztopine fenolnih spojin v 99% etanolu

Pufer za liposome:

20 mM HEPES, pH 7,0

3.1.2 Laboratorijska oprema in pribor

laboratorijska steklovina (epruvete, bučke za rotavapor, pinceta,...)

avtomatske mikropipete	Eppendorf, Nemčija
tehtnica	EXACTA 2200 EB, Tehnica Železniki, Slovenija
ultrazvočna kopel Sonis 4GT	Iskra, Pro, Slovenija
rotavapor	BÜCHI R-200, Švica
kapilare za EPR spektrometer	75 mm, Euroglass, Slovenija
EPR spektrometer	ELEXSYS E 500 Bruker, Nemčija
Mešalnik	Vibromix, Slovenija
N-DSC III kalorimeter	CSC 6300, CSC Scientific Company, Virginia, ZDA

Vakumska črpalka

Thermolyne Nuova Stirrer, Thermo Scientific, ZDA

3.2 METODE

Pripravili smo zmes lipidov PC in SM v molskem razmerju PC:SM=2,4:1. To smo naredili tako, da smo zatehtali 22,0 mg SM, jih raztopili v 2,2 mL mešanice metanola in kloroform, ki smo ju prej zmešali v razmerju 3:7 (v/v). 21,9 mg PC smo raztopili v 2,2 mL enake mešanice. V stekleno bučko smo odpipetirali 0,362 mL raztopine PC in 0,138 mL raztopine SM ter jo posušili pod znižanim tlakom (9 mbar) na rotacijski vodni vakuumski črpalki (2 h). Na steni bučke je nastal tanek film lipidov.

3.2.1 Priprava velikih večslojnih liposomov (MLV)

Dobljenemu lipidnemu filmu v bučki smo dodali 1 mL destilirane vode, 10-15 steklenih kroglic ter bučko začeli stresati na vibracijskem mešalniku. Za lažje oblikovanje liposomov

je stresanje potekalo v kopeli pri 40 °C, 20 min. Tako smo pripravili MLV liposome s

končno koncentracijo 5 mg lipidov/mL. Pred vsakim merjenjem smo MLV liposome razbili z ultrazvokom na enakomerne liposome-ULV.

3.2.2 Priprava enoslojnih liposomov (ULV)

Suspenzijo večslojnih veziklov - MLV smo 20 min sonicirali z ultrazvokom. Razbijanje je potekalo na ledeni kopeli s 5 sekundnimi pulzi na ON in OFF, tako da smo dobili enoslojne liposome (ULV).

3.2.3 Spinsko označevanje liposomov za EPR

Liposome narejene iz PC in SM (2,4:1 (mol:mol)) smo za meritve z EPR spinsko označevali z spinskim označevalcem MeFASL(2,11). Z vakuumsko črpalko smo pri znižanem tlaku (17 mbar) posušili 35 µL 10^{-4} M spinskega označevalca MeFASL(2,11), raztopljenega v etanolu (10 min) in nato dodali 50 µL liposomov (5 mg liposomov/mL) ter

10 min mešali na stresalniku. Vzorcu smo nato dodali ali 3,5 µL etanola (kontrola) ali enak volumen etanolne raztopine (15 mM) fenolne spojine in premešali na stresalniku. Končna koncentracija fenolne spojine z zmesi je bila 1 mM. Spinski označevalec se je vgradil v fosfolipidne membrane že pripravljenih liposomov, njegova nitroksidna skupina pa se nahaja v območju fosfolipidnih repov. Te vzorce smo prenesli v kapilare s premerom 1 mm in opravili meritve z EPR spektrometrom v temperaturnem območju od 10 do 50 °C v intervalu po 5 °C.

Za meritve smo pripravili liposome z etanolno raztopino fenolnih spojin v dveh paralelkah, da bi lažje ocenili napako meritve.

3.2.4 Priprava liposomov za merjenje z metodo DSC

Liposome MLV iz DPPC smo pripravili po postopku, ki je opisan pod točko 3. 2. 1. in 3. 2. 2., le da smo posušene lipide raztopili v 20 mM HEPES pufru (pH=7). Tako pripravljene liposome smo razredčili s HEPES pufrom, da je bila končna koncentracija 0,5 mg/mL. Prepihali smo jih z dušikom in spravili v hladilnik na 4 °C do uporabe.

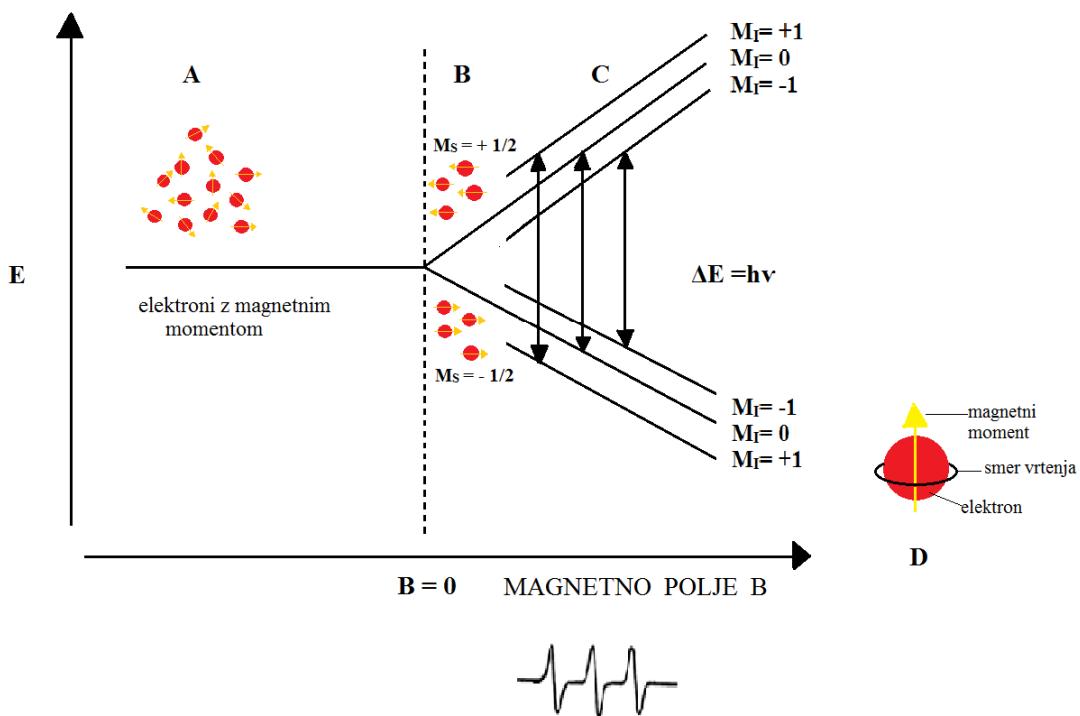
3.2.5 Elektronska paramagnetna resonanca

3.2.5.1 Osnove EPR

Elektronska paramagnetna resonanca (EPR) ali elektronska spinska resonanca (ESR) je metoda, ki zagotavlja številne edinstvene pristope za določevanje pomembnih membranskih lastnosti, v odvisnosti od globine dvosloja. Z EPR določamo membranske lastnosti, predvsem struktурno dinamične parametre, kot so ureditev in upogibanje acilnih verig v posameznih delih membrane, heterogenost membrane, pa tudi polarnost (gradient polarnosti skozi membrano) ter difuzijo kisika in dušikovega oksida (Subczynski in sod., 2009).

EPR je občutljiva na paramagnetne vrste molekul, to so molekule z nesparjenim elektronom, ki imajo lasten spin. Spin elektrona je opisan s t. i. kvantnim številom S, njegova vrednost za elektron pa je $S = \frac{1}{2}$. Elektron zaradi vrtenja okoli svoje osi ustvarja v svoji okolici magnetno polje. Zato si ga lahko zamišljamo kot majhen magnet z magnetnim momentom, ki je vzporeden z osjo vrtenja, smer magnetnega momenta pa je določena s

smerjo vrtenja elektrona (slika 15 D). Dva elektrona, ki se med seboj razlikujeta samo po smeri vrtenja okoli svoje osi, tvorita elektronski par. Magnetna momenta sta v takem paru nasprotno usmerjena, zato se izničita. Ker so v kemijskih in biokemijskih snoveh elektroni večinoma združeni v pare, te snovi nimajo magnetnih momentov; so diamagnetne. Kadar pa je v molekuli liho število, npr. v radikalih, ostane en elektron sam (nesparjen elektron); ker torej ni v paru z elektronom, ki bi se vrtel v nasprotni smeri, njegov magnetni moment ostane. Taka molekula je paramagnetna. Mesto v molekuli, kjer je nesparjen elektron, imenujemo paramagnetni center, ki pa ga lahko zaznamo z EPR.



Slika 15: Princip EPR – energijski nivoji nitroksidnega radikala v magnetnem polju (Štrancar, 2004)

A: Osnovni energijski nivo nesparjenih elektronov - elektroni so poljubno usmerjeni saj niso izpostavljeni magnetnemu polju.

B: Razcep energijskih nivojev (Zeemanov efekt) zaradi uvedbe zunanjega magnetnega polja

C: Hiperfini razcep energijskih nivojev elektrona, zaradi interakcije magnetnega momenta elektrona z magnetnim momentom jedra dušika. Puščice prikazujejo možne prehode elektronov med energijskimi nivoji, ko je izpolnjen resonančni pogojo.

D: Shematski prikaz klasične predstave elektrona in njegovega magnetnega momenta (Šentjurc in Štalc, 1976)

Paramagnetne snovi, ki vsebujejo nesparjene elektrone, postavimo v zunanje magnetno polje. Dokler snov ni izpostavljena magnetnemu polju, so nesparjeni elektroni v snovi poljubno usmerjeni in imajo enako energijo (slika 15 A). Ko pa uvedemo v sistem neko zunanje magnetno polje, se elektroni uredijo tako, da so njihovi magnetni momenti paralelno ali antiparalelno glede na zunanje magnetno polje in imajo zato različno energijo (Zeemanov efekt) (Fajer, 2006). Nastaneta dva energijska nivoja z razliko v energiji, ki je proporcionalna gostoti magnetnega polja (Fajer, 2006). Elektroni s projekcijo spina $m_s = -\frac{1}{2}$ (minimalna energija) so vzporedni s smerjo zunanjega magnetnega polja, elektroni s projekcijo $m_s = +\frac{1}{2}$ (maksimalna energija) pa so antiparalelno ali nasprotno usmerjeni (slika 15 B). Energijsko razliko (ΔE) med dvema nivojema merimo z EPR. To opravimo tako, da na paramagnetni vzorec v magnetnem polju delujemo z elektromagnetnim valovanjem. Počasi spreminjamо gostoto magnetnega polja in s tem energijsko razliko med Zeemanovimi energijskimi stanji. Ko je energija elektromagnetnega valovanja enaka energijski razlike med energijskimi stanji elektronov, z drugimi besedami, ko je izpolnjen resonančni pogoj, prehajajo elektroni iz stanja $m_s = +1/2$ v stanje $m_s = -1/2$ in obratno (Karas, 2008). Posledica tega je resonančna absorpcija elektromagnetnih valov, kar zaznamo kot vrh na EPR spektru. Energijska razlika, pri kateri pride do prehoda iz enega energijskega stanja v drugega, je podana za enačbo:

$$\Delta E = \beta g B = h v \quad \dots(1)$$

ΔE energijska razlika

h Planckova konstanta = $6,626 \times 10^{-34}$ Js

v frekvenca elektromagnetnega delovanja

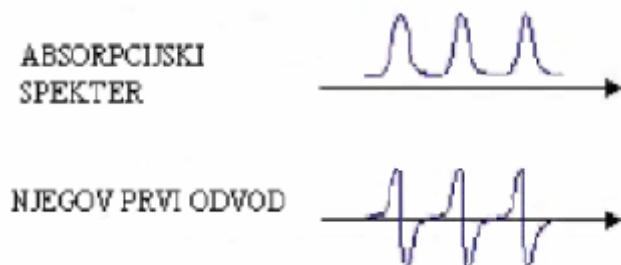
β Bohrov magneton = $9,273 \times 10^{-24}$ J/T

g Zeemanov spektroskopski cepitveni tenzor (opisuje jakost interakcije med magnetnim poljem in magnetnim momentom elektrona in je značilen za dano snov)

B..... gostota magnetnega polja (Šentjurc in Štalc, 1976)

Nesparjeni elektroni so zelo občutljivi na vplive iz okolice. Jedra atomov, okrog katerih krožijo nesparjeni elektroni imajo lahko spin I , ki je različen od nič in zato ima tudi svoj magnetni moment. Zaradi interakcije magnetnega momenta jedra in magnetnega momenta nesparjenega elektrona, se vsak energijski nivo še dodatno razcepi (slika 15 C). Pri spinskih označevalcih kroži nesparjen elektron okrog dušikovega jedra, ki ima spin $I = 1$, zato dobimo tri podnivoje pri vsaki skupini elektronov (Karas, 2008).

EPR spekter je prvi odvod absorpcijske krivulje (slika 16). To poveča občutljivost aparature in omogoča natančnejšo določitev gostote magnetnega polja, pri kateri se absorbira elektromagnetno valovanje.



Slika 16: Spekter EPR - absorpcijski spekter nitroksidnega radikala in njegov prvi odvod (Štrancar, 2004)

3.2.5.2 EPR spektrometer

Osnovni princip delovanja EPR spektrometra je podoben optičnemu spektrometru, le da moramo tu uvesti zunanje magnetno polje, da razcepimo energijska stanja paramagnetičnih centrov. Inštrument, katerega smo uporabili, je zvezni valovni EPR spektrometer ali CW-EPR spektrometer. Glavne komponente spektrometra so mikrovalovni most, rezonator v katerega vstavimo vzorec, elektromagnet in konzola z detektorjem, ojačevalnikom in ostalo potrebno elektroniko spektrometra (slika 17). Poleg tega je spektrometer opremljen s termostatom za ohlajevanje in segrevanje vzorca. V našem eksperimentu smo vzorec segrevali od 283 do 323K. Vzorec smo segrevali tako, da smo čez njega pihali segret dušik, ki smo ga dobili s segrevanjem tekočega dušika. Spektrometer deluje v X-pasovnem frekvenčnem območju, kar pomeni, da je tipično področje delovanja v področju mikrovalov od 8-12 GHz.

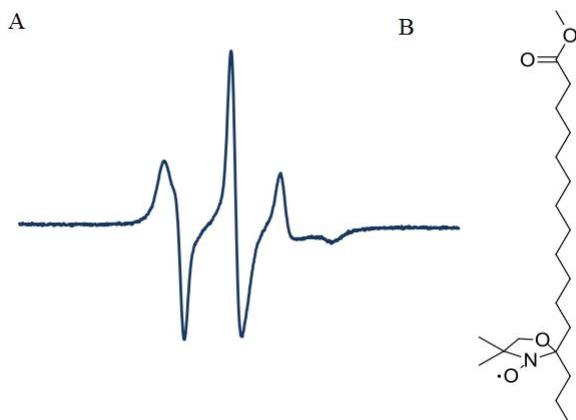
Mikrovalovni resonator je celica, v katero damo vzorec in se nahaja med poloma elektromagneta, ki ustvarjata homogeno magnetno polje z določeno gostoto magnetnega polja in jo lahko zvezno spremojamo. Kot nam že samo ime pove (ang. Continuos Wave, CW) pri tem načinu merjenja naš vzorec stalno obsevamo z elektromagnetnim valovanjem primerne frekvence in opazujemo njegovo absorpcijo. Resonator je povezan z izvorom mikrovalov in detektorjem, ki sprejema signale iz rezonatorja (Brustolon in Giamello, 2009).



Slika 17: EPR spektrometer ELEXSYS E500 (Bruker, Nemčija) (Mravljak, 2010)

3.2.5.3 Spinski označevalci

Z metodo EPR opazujemo le paramagnetne snovi. To so lahko radikali, ioni prehodnih elementov, elektronski defekti v trdnih snoveh in podobno. Kljub temu, da je v naravnih bioloških sistemih prisotnih precej paramagnetnih snovi, npr. radikalov, pa ti ponavadi niso najbolj primerni za študij lastnosti takih sistemov, bodisi zaradi kratkoživosti, bodisi zaradi nizkih koncentracij. Zato v take sisteme vgrajujemo druge radikale (t.i. spinske označevalce, ki so bolj stabilni in hkrati bolj občutljivi na okolico, v kateri se nahajajo. Med mnogimi spinskimi označevalci so se morda najbolj uveljavili nitroksidni radikali (Štrancar, 2000). Stabilni nitroksidni radikali so efektivno orodje za reševanje številnih problemov na področju medicine, biologije, kemije in fizike na molekularnem nivoju.



Slika 18: Spinski označevalci MeFASL (2,11) (Pajk, 2011)

A: pripadajoč spekter membrane liposomov ($PC:SM = 2,4:1$ (mol:mol)), posneto pri $25^\circ C$

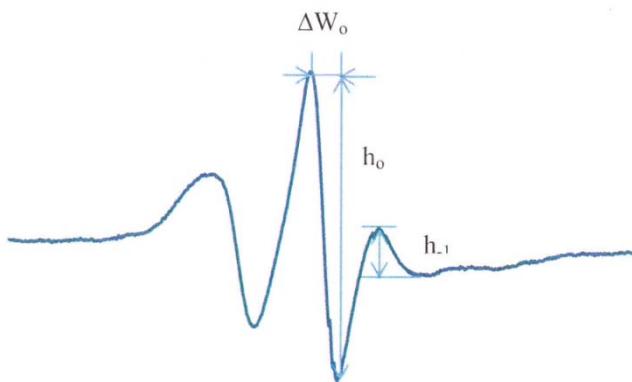
B: strukturna formula spinskega označevalca MeFASL (2,11): $m = 2$, $n = 11$

Z uporabo spinskih označevalcev lahko določimo transmembranski profil heterogenih membran glede na ureditev, dinamiko acilnih verig in polarnost okolice, v nekaterih primerih tudi membranskih domen in membranskih faz, ne da bi jih fizično ločili. Profili se razlikujejo v nasičenih in nenasičenih membranah, nanje pa vplivajo razne biomolekule kot so holesterol, membransko vezani proteini, ali druge membranske komponente. Da lahko dobimo informacije o profilu membrane moramo vanje vgraditi spinske označevalce, ki so podobni gradnikom bioloških membran in se enostavno vključijo v membranski dvosloj, z nitroksidno skupino na različnih mestih v acilni verigi (Subczynski in sod., 2009). V meritvah smo uporabili MeFASL (2,11), ester palmitinske kisline, ki ima doksilni obroč z nitroksidno skupino vezan na acilno verigo na trinajstem C-atomu od metilne skupine (slika 18). Glede na mesto nitroksidne skupine, nam ta spinski označevalci odraža informacije v notranjosti membranskega dvosloja. Oblika EPR spektra posreduje fizikalne značilnosti okolice spinskega označevalca. MeFASL ima nesparjen elektron, ki se z veliko verjetnostjo nahaja v π orbitali, le-ta pa je orientirana približno v smeri dolge osi molekule. Zato je EPR spekter označevalca močno odvisen od urejenosti molekul v sistemu. Označevalci se zaradi lipofilne acilne verige zelo hitro vgrajuje v membrano (Štrancar, 2000). Nitroksidne radikale uporabljam pri analizi modelnih membran, v primeru bioloških eksperimentov pa je uporaba omejena, saj so nitroksidni radikali občutljivi na

oksidativne agente, pH in prisotnost drugih radikalov, ki vodijo do nastanka diamagnetnih komponent, ki izbrišejo EPR signal (Kristl in sod., 2002).

3.2.5.4 Korelacijski čas in ureditveni parameter

Pri počasnem gibanju ali dobro urejenih sistemih lahko iz spektra spinskega označevalca MeFASL (10,3), ki ima nitroksidno skupino blizu polarne glave (na 5 C-atomu acilne verige od metilne skupine), izmerimo maksimalni hiperfini razcep ($2A_{\max}$), ki je proporcionalen ureditvenemu parametru (S). Parameter S pove povprečni odklon acilnih verig od normale na ravnino dvosloja in ima vrednost od 0 (neurejen sistem, npr. neviskozna tekočina) do 1 (popolna ureditev). Ko vgradimo v membrano spinski označevalec z nitroksidno skupino blizu sredine dvosloja, kjer je gibanje bolj neurejeno in hitro (MeFASL (2,11)) pa maksimalnega hiperfinega razcepa ne moremo izmeriti. V tem primeru določimo empirični korelacijski čas, ki da informacijo o hitrosti gibanja spinskega označevalca.



Slika 19: Eksperimentalni spekter, kjer je prikazano, kako se določijo parametri za izračun korelacijskega časa tau (Berlec, 2011)

h_0 = amplituda srednje črte EPR spektra

h_1 = amplituda črte pri višjem magnetnem polju

ΔW_0 = širina srednje črte EPR spektra

Parameter τ_c je empirični korelacijski čas in sporoča čas, v katerem molekule pozabijo svoje prvotno mesto ter ima vrednost od 10^{-11} do 10^{-9} s pri hitri dinamiki (večja fluidnost) in okoli 10^{-7} s pri počasni dinamiki (manjša fluidnost) (Živec in Ziherl., 2006). Parametra $2A_{max}$ in τ_c naraščata s padanjem fluidnosti membrane, torej daljši korelacijski čas pomeni počasno gibanje (Zhao in sod., 2007; Poklar in sod., 2010). Nizka urejenost in hitra dinamika pomeni veliko fluidnost.

Empirični korelacijski čas τ_c smo izračunali iz enačbe

$$\tau_c = k \Delta W_0 (h_0/h_{-1} - 1)^{1/2} \quad \dots(2)$$

k konstanta spinskega označevalca

ΔW , h_0 in h_{-1} so parametri, ki jih lahko izmerimo na EPR spektru (slika 19)

3.2.5.5 Eksperimentalni del EPR meritev

Meritve smo opravili na EPR spektrometu ELEXSYS E500 (Bruker, Nemčija), na Institutu Jožef Stefan, v Laboratoriju za biofiziko (preglednica 1). Meritve smo opravili v temperaturnem razponu od 283 K do 323 K (10 °C do 50 °C), v intervalih 5 K za vsak posamezen vzorec. Po posamezni meritvi smo iz spektrov neposredno odčitali parametre ΔW_0 , h_0 in h_{-1} , in nato s pomočjo enačbe izračunali empirični korelacijski čas τ_c . Pri tem smo upoštevali medsebojno primerljivost serij, kar smo potrdili z primerjavo dobljenih spektrov.

Preglednica 1: Eksperimentalni parametri za meritve spinsko označenih liposomov na EPR

Ojačanje (receiver gain)	MeFASL (2, 11) 60-70 dB
Konverzijski čas (conversion time)	20,48 ms
Čas snemanja (sweep time)	20,97 s
Časovna konstanta (time constant)	5,12 s
Centralno magnetno polje (center field)	3320 Gauss
Območje meritve (sweep width)	100 Gauss
Mikrovalovna moč	10 mW
Število snemanj za en spekter	9

Za natančnejšo analizo eksperimentalnih spektrov smo le-te obdelali z računalniškim programom EPRSIM WIZ 6. 2. 2. (© Janez Štrancar), programskim paketom za simulacijo EPR spektrov nitroksidnih radikalov.

3.2.5.6 Računalniška obdelava EPR spektrov

Iz EPR spektrov želimo pridobiti čim več informacij o lastnosti okolice, v kateri se nahaja spinski označevalec. Določanje otežuje dejstvo, da se že pri membranah s preprosto sestavo lipidov pojavljajo lateralne nehomogenosti - domene z lokalno različnimi lastnostmi. To pomeni, da je membranski EPR spekter odvod seštevka absorpcijskih linij iz različnih domen. Za analizo EPR spektrov so zato nepogrešljive računalniško podprte simulacijske metode, kamor spada tudi EPRSIM WIZ 6. 2. 2. (© Janez Štrancar), program razvit v Laboratoriju za biofiziko Instituta Jožef Stefan, ki smo ga uporabili za simulacijo EPR spektrov (Pajk, 2011).

Simulacija je zasnovana na modelu, da program EPRSIM vsako linijo EPR spektra opiše s 5 spektralnimi parametri. Ureditveni parameter (S) je merilo za urejenost acilnih verig lipidov. Rotacijski korelacijski čas (τ_c) je odvisen od dinamike acilnih verig in opisuje hitrost gibanja (Koklič, 2004). Širina črte (W) vključuje prispevke nehomogenosti zunanjega magnetnega polja, interakcij med posameznimi spiskimi označevalci in

paramagnetnih nečistoč. Parameter φ je komponenta ureditvenega parametra, ki ponazarja oviranost vrtenja acilne verige okoli normale na ravnino membrane. Nizka vrednost pomeni močno ovirano rotacijo, visoka vrednost pa izotropno gibanje spinskega označevalca (Šentjurc in sod., 2002). Korekcijski faktor polarnosti p_A je odvisen od polarnosti okolja spinskega označevalca. Vrednost parametra p_A je večja od 1 za spinski označevalec v polarnem okolju in manj od 1 za spinski označevalec v nepolarnem okolju (Koklič, 2004). Poleg teh parametrov, ki karakterizirajo gibanje spinskega označevalca v njegovem okolju, je treba upoštevati še delež spinskih označevalcev v posameznem okolju (d). Program glede na te parametre izračuna obliko spektra, ki se najbolje prilega našemu eksperimentalnemu spektru.

Omenjeni parametri (S , τ_c , φ , p_A in drugi) se določijo z računalniško simulacijo EPR spektra, pri čemer izberemo najboljši približek ali fit eksperimentalnemu spektru. S pomočjo simulacije dobimo natančnejše informacije o spremembah v domenski strukturi membrane.

3.2.6 Diferenčna dinamična kalorimetrija

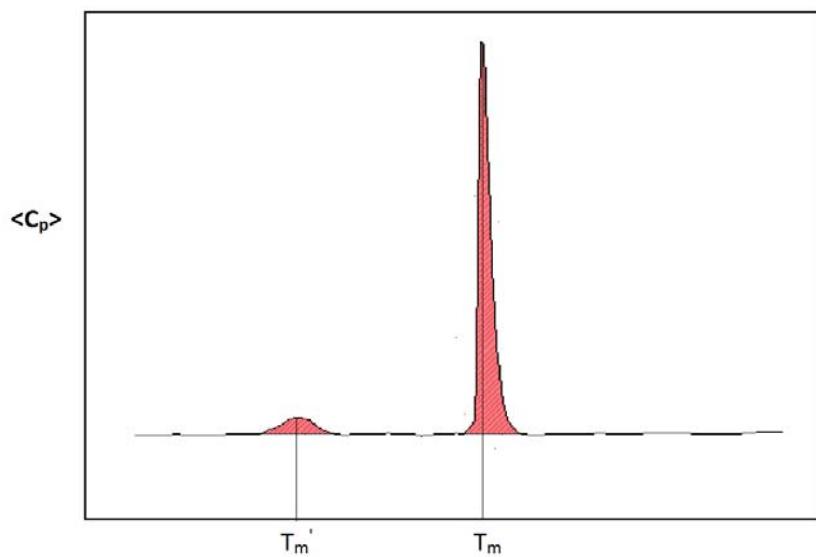
Membranski lipidi obstajajo v različnih polimorfnih oblikah med katerimi se ob temperaturni indukciji pojavijo fazni prehodi. Diferenčna dinamična kalorimetrija - DSC je preprosta in razširjena termodinamska tehnika, primerna za študije termodinamičnih parametrov termotropskih faznih prehodov v lipidih modelnih ali bioloških membranah. Je zelo uporabna tehnika za raziskavo toplotnih sprememb, ki jih povzroči vgraditev fenolnih spojin v lipidno membrano.

Tehnika temelji na diferencialnem toplotnem toku med vzorcem, ki je podvržen faznemu prehodu znotraj specifičnega temperaturnega razpona in inertnim referenčnim vzorcem. Med faznim prehodom kontrolni sistem zazna temperaturno razliko med vzorcem in referenčno celico in zato dovede toploto vzorcu, da sta temperaturi vzorca in referenčne celice enaki. Presežek toplotne je posnet kot funkcija temperature. Parametri pri endotermni reakciji, ki so posneti med faznim prehodom so pomembni za študije interakcij med membranami in polifenoli. Ti parametri so: T_m - temperatura faznega prehoda in ΔH -

površina pod vrhom, ki predstavlja spremembo entalpije med faznim prehodom (Dopico, 2007).

Diferenčna dinamična kalorimetrija je edini neposreden in zato najpomembnejši način za določitev termodinamskih parametrov faznih prehodov bioloških membran. Temelji na množini dovedene ali odvedene toplice, potrebne za kompenzacijo merjenega topotnega efekta v sistemu (raztopine lipidov v merilni celici), ki mu med merjenjem enakomerno spremenimo temperaturo (topotni efekt je posledica npr. faznega prehoda). Merjenje poteka ob istočasni prisotnosti referenčnega sistema (enaka količina topila v referenčni celici), tako da merjeni topotni efekt ustreza samo spremembi entalpije, ki se nanaša na spremembo stanjatopljenca. Da odstranimo nezaželjene vplive okolja in motnje, ki so posledica same merilne tehnike, posnamemo vedno tudi t.i. bazno linijo, torej opravimo meritve, pri kateri raztopino v merilni celici zamenjamo z enako količino čistega topila. To bazno linijo nato odštejemo od termograma, ki smo ga pridobili za merjeno raztopino. Rezultat meritve je ponavadi podan kot odvisnost presežne topotne kapacitete pri konstantnem tlaku, $\langle Cp \rangle$, od temperature. Vrh take krivulje se pojavi pri temperaturi T_m' -temperaturi predprehoda in T_m -temperaturi glavnega prehoda (slika 20), črtkana površina na termogramu (površina termograma pod krivuljo) pa je sorazmerna spremembi entalpije prehoda pri T_m' in T_m . Sprememba entalpije je podana z enačbo:

$$\Delta H_{\text{cal}} = \int_{T_1}^{T_2} Cp \, dT \quad \dots(3)$$



Slika 20: Tipičen termogram (DSC krivulja) za fazni prehod DPPC liposomov

3.2.6.1 Eksperimentalni del meritev

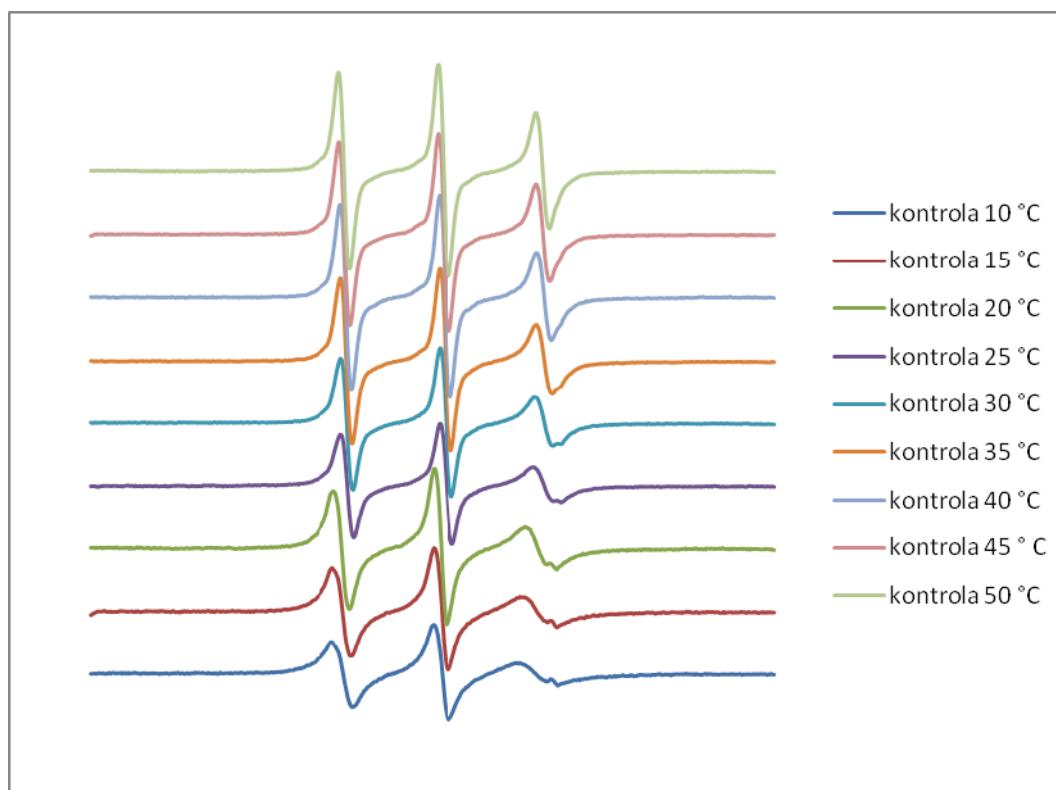
Diferenčna dinamična kalorimetrija je zelo uporabna tehnika za raziskavo toplotnih sprememb, ki jih povzroči vgraditev fenolnih spojin v lipidno membrano (Ota, 2009). Pripravili smo raztopine liposomov in fenolnih spojin v molarinem razmerju 1:1. Končni volumen raztopine je bil 0,5 mL. Raztopine smo 20 min odzračevali, da smo preprečili nastanek mehurčkov med poskusom. Referenčno celico smo napolnili s HEPES pufrom, vzorčno pa s preiskovalno raztopino. Kalorimeter smo zaprli, povišali tlak na 3 atm in začeli s poskusom. Merili smo v temperaturnem območju med 283 K in 323 k (10 °C do 50 °C). Hitrost segrevanja je bila 1 °C/min. Iz DSC poskusov dobljene termograme smo analizirali z računalniškim programom OriginPro8. Termogrami so prikazani kot presežna toplotna kapaciteta $\langle C_p \rangle$ [kJ/mol K] v odvisnosti od temperature [°C].

4 REZULTATI

4.1 ELEKTRONSKA PARAMAGNETNA RESONANCA

4.1.1 EPR meritve liposomov pri različnih temperaturah

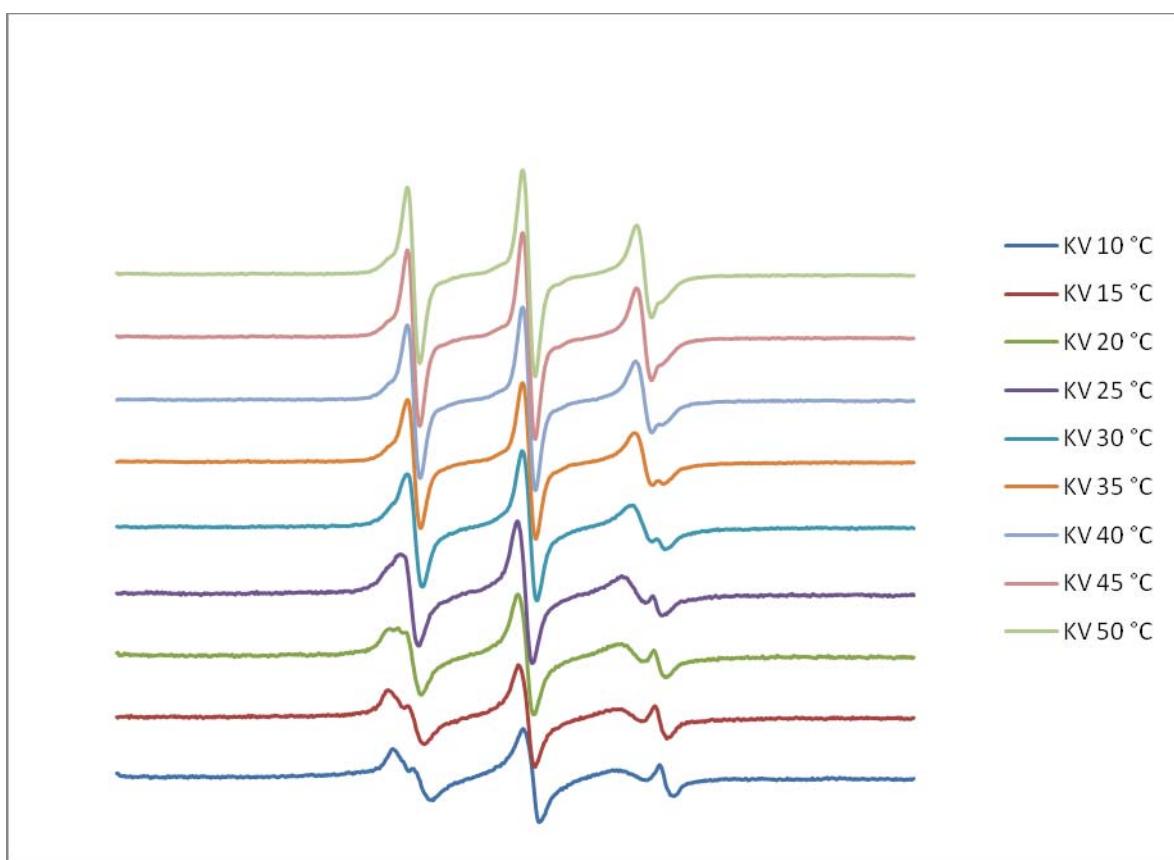
Skušali smo ugotoviti kakšen je učinek različnih fenolnih spojin na fluidnost bioloških celičnih membran, zato smo za naš poskus uporabili ULV liposome, sestavljene iz fosfatidilholina in sfingomielina (PC:SM=2,4:1 (mol:mol), ki grobem ponazarjajo sestavo zunanjega sloja membrane eritrocitov. Z X-pasovnim EPR spektrometrom smo pri 9 temperaturah (od 283 K do 323 K, interval 5 K) posneli eksperimentalne spektre ULV liposomov, označenih s spinškim označevalcem (MeFASL (2,11)), najprej z dodatkom etanola, kot kontrole, in nato z dodatkom etanolne raztopine izbranih fenolnih spojin v 1 mM končni koncentraciji (slike 24, 26, 28, 30 in 32). Meritve smo izvajali v 2 paralelkah in dobljene rezultate primerjali.



Slika 21: EPR spektri MeFASL(2,11) v membranah ULV liposomov iz PC:SM = 2,4:1 (mol:mol) po dodatku 3,5 µL etanola (kontrola) pri različnih temperaturah.

EPR spektri lipidnih veziklov označenih z MeFASL (2,11) so tipični za slabo urejeno hitro gibanje nitroksidne skupine spinskega označevalca. Slika 21 prikazuje, da je membrana veziklov ob dodatku etanola (kontrola) v notranjosti neurejena ter da se s višanjem temperature neurejenost acilnih verig povečuje.

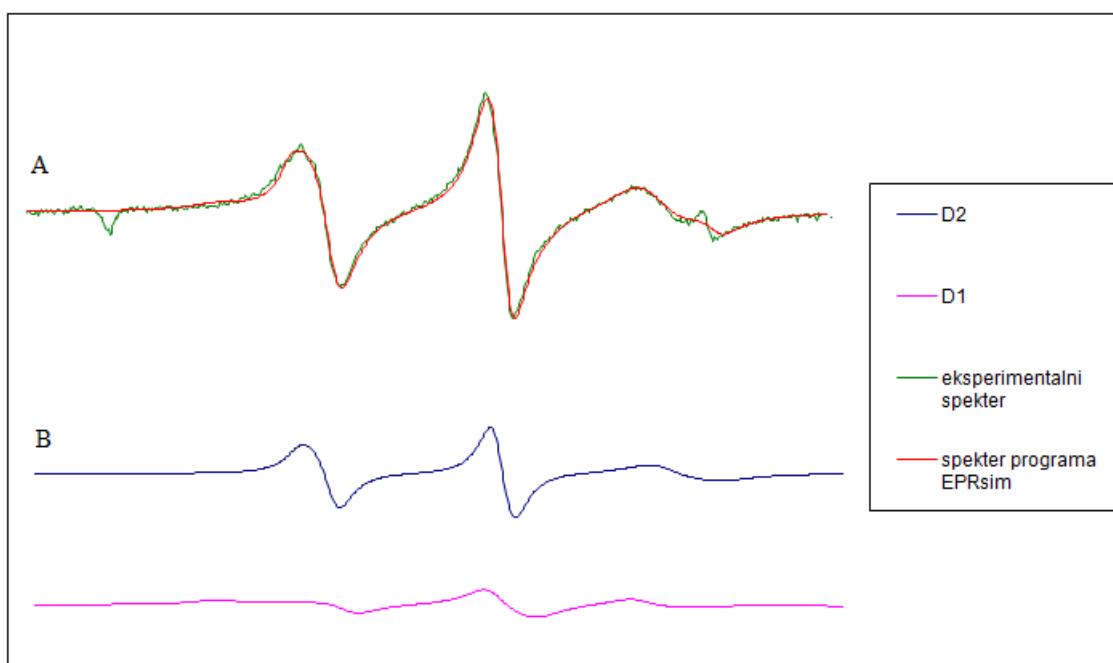
Na sliki 22 pa so prikazani spektri ob dodatku etanolne raztopine kvercetina v 1 mM končni koncentraciji. Razvidno je, da ima dodatek kvercetina večji vpliv na membrano kot etanol. Iz EPR spektrov smo odčitali vrednosti ΔW , h_0 in h_{-1} , s pomočjo katerih smo izračunali empirični korelacijski čas - τ_c . Večji τ_c pomeni bolj urejeno, manj fluidno membrano.



Slika 22: EPR spektri MeFASL(2,11) v membranah ULV liposomov iz PC:SM = 2,4:1 (mol:mol) po dodatku 3,5 μ L etanolne raztopine kvercetina (1 mM končna koncentracija) pri različnih temperaturah.

Membrana je heterogena tvorba, sestavljena iz domen z različno fluidnostjo. Da bi pridobili več informacij in natančnejšo sliko o okolici, v kateri se nahaja spinski označevalec smo uporabili računalniško simulacijo EPR spektrov. Eksperimentalni EPR

spekter je superpozicija več spektralnih komponent, ki odražajo gibanje nitroksidnega spinskega označevalca v določenem tipu domene. Ugotovili smo, da so EPR spektri večinoma seštevek dveh vrst domen, oziroma dveh vrst gibanja, ki smo jih glede na ureditvene parametre poimenovali D1, ki je bolj urejena domena (srednje rigidna domena); D2, ki je manj urejena domena (fluidna domena). Dve domeni se pojavljata le pri nižjih temperaturah, z višanjem temperature pa postane membrana homogena. Z višanjem temperature postanejo membrane liposomov tudi bolj fluidne.

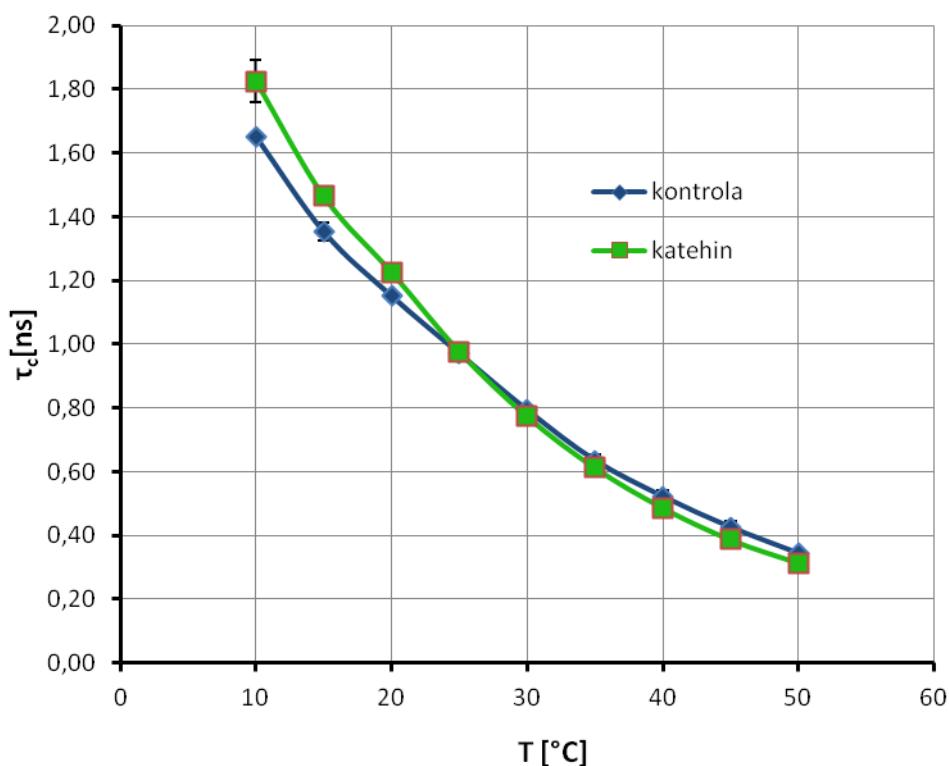


Slika 23: Reprezentativni EPR spekter spinskega označevalca MeFASL(2,11) v membranah liposomov iz PC:SM=2,4:1 (mol:mol), v katere je bil vgrajen epigalokatehin (1 mM končna koncentracija). Spektri so bili izmerjeni pri 10 °C (283 K).

- A: Eksperimentalni spekter in izračunani spekter s pomočjo programa EPRSIM, ki je najboljši približek eksperimentalnemu spektru EPR.
- B: Izračunani spekter je seštevek dveh spektralnih komponent, ki predstavljajo membranske domene z različno urejenostjo: D1 - bolj urejena domena, D2 – manj urejena domena

4.1.2 Vpliv katehina na ULV liposome

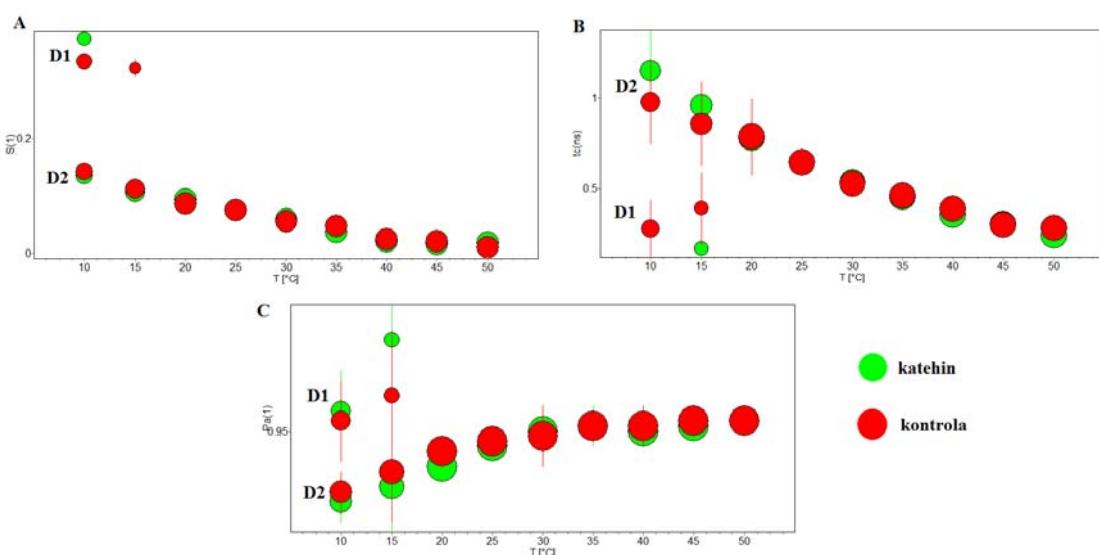
Slika 24 prikazuje temperaturno odvisnosti korelacijskega časa (τ_c) spinskega označevalca, ki je bil vgrajen v ULV liposome, z dodano etanolno raztopino katehina (1 mM končna koncentracija) ali samo ob dodatku etanola (kontrola). Iz grafa je razvidno, da se je s temperaturo korelacijski čas manjšal, kar pomeni, da se je fluidnost membrane povečevala. Razlike med kontrolnim vzorcem in liposomi s katehinom so bile majhne. To kaže na majhen vpliv katehina na fluidnost membrane.



Slika 24: Temperaturna odvisnost empiričnega korelacijskega časa (τ_c) spinskega označevalca MeFASL(2,11), vgrajenega v ULV liposome (v prisotnosti etanola=kontrola ali v prisotnosti etanolne raztopine katehina v 1mM končni koncentraciji).

Mehurčni diagrami na sliki 25 prikazujejo temperaturno odvisnost posameznih parametrov, ki smo jih izračunali s simulacijo EPR spektrov. Dobro ujemanje z eksperimentalnim spektrom smo dobili, ko smo upoštevali, da sta v membrani dva tipa domen. Če diagram C (slika 25), ki ponazarja temperaturno odvisnost korelacijskega časa obeh domen, primerjamo s sliko 24 ugotovimo, da se rezultati ujemajo in sicer z naraščanjem

temperature korelacijski čas pada, torej fluidnost narašča, kar je razvidno tudi iz preglednice 2. Delež urejene domene D1 se zmanjšuje na račun povečanja deleža manj urejene domene D2. Pri temperaturi 20 °C se domeni lipidnega dvosloja, kateremu je dodana etanolna razopina katehina (1 mM končna koncentracija) in nato kontrola združita. Ureditveni parameter S, pada z višanjem temperature in doseže pri 50 °C vrednost 0,02, kar ponazarja slabo ureditev v notranjosti lipidnega dvosloja. Faktor polarnosti je skozi celo temperaturno območje pod vrednostjo 1, kar pomeni nepolarno okolje nitroksidnega radikala v obeh domenah.



Slika 25: Temperaturna odvisnost ureditvenega parametra (A), rotacijskega korelacijskega časa (B) in korekcijskega faktorja polarnosti (C) spinskega označevalca MeFASL(2,11) v ULV liposomih iz PC:SM=2,4:1 (mol:mol) z etanolom - kontrola (rdeče barve) ali z etanolno raztopino katehina v končni koncentraciji 1 mM (zelene barve) D1=srednje urejena domena, D2=manj urejena domena. Premer mehučkov je proporcionalen deležu spinskih označevalcev v posameznih domenah.

Preglednica 2: Delež domene, ureditveni parameter, rotacijski korelacijski čas in korekcijski faktor polarnosti v liposomih PC:SM=2,4:1 (mol:mol) z dodano etanolno raztopino katehina (1 mM končna koncentracija) označeni s spinskim označevalcem MeFASL(2,11) v odvisnosti od temperature. D1 predstavlja srednjo urejeno domeno, D2 pa predstavlja najmanj urejeno domeno.

T [°C]	Delež domene		Ureditveni parameter		Rotacijski korelacijski čas		Korekcijski faktor polarnosti	
	D1	D2	D1	D2	D1	D2	D1	D2
10	0,41	0,59	0,37	0,14	0,25	1,15	0,96	0,94
15	0,28	0,72	0,32	0,11	0,16	0,96	0,96	0,93
20	/	1,0	/	0,09	/	0,77	/	0,94
25	/	1,0	/	0,07	/	0,65	/	0,95
30	/	1,0	/	0,06	/	0,53	/	0,95
35	/	1,0	/	0,04	/	0,45	/	0,95
40	/	1,0	/	0,02	/	0,38	/	0,95
45	/	1,0	/	0,02	/	0,31	/	0,95
50	/	1,0	/	0,02	/	0,23	/	0,95

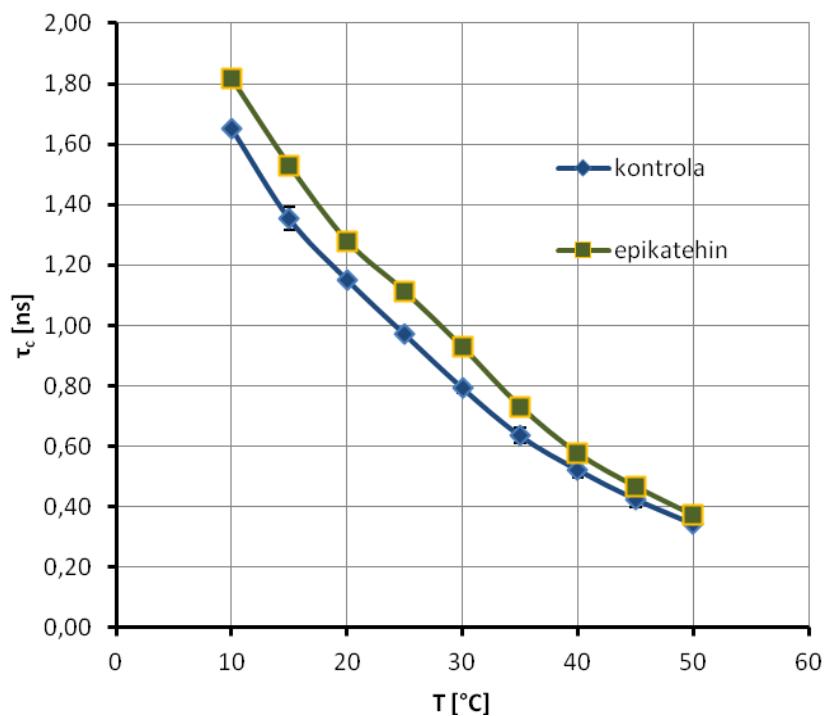
Iz preglednice 2 je razvidno združevanje domen ob dodatku katehina pri 20 °C. Razvidno je tudi padanje rotacijskega korelacijskega časa in ureditvenega parametra z višanjem temperature, kar ponazarja, da membrana z višanjem temperature postaja bolj fluidna.

4.1.3 Vpliv epikatehina na ULV liposome

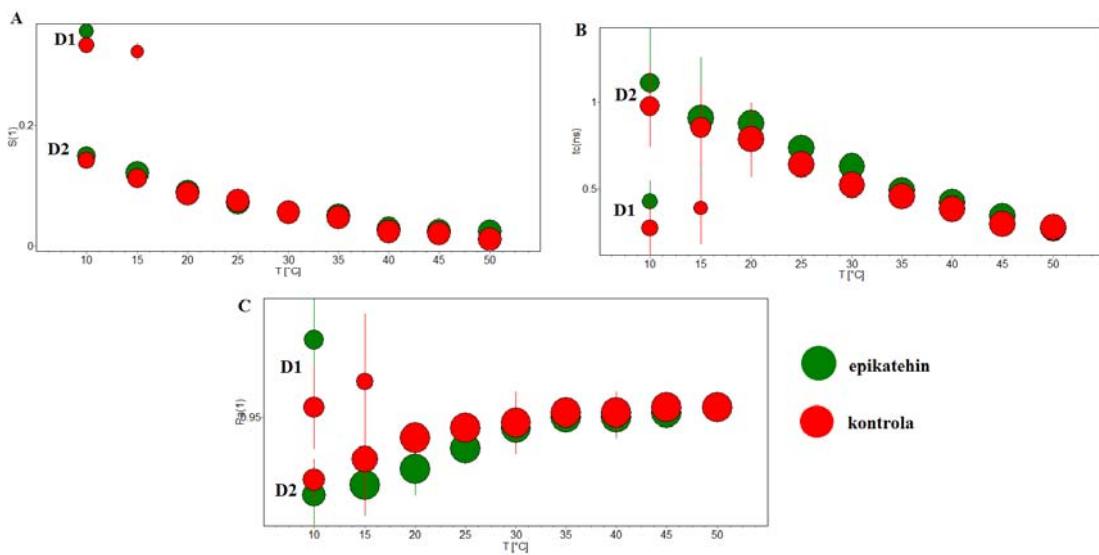
Slika 26 prikazuje temperaturno odvisnost korelacijskega časa - τ_c spinskega označevalca MeFASL(2,11) vgrajenega v ULV liposome, v prisotnosti epikatehina in etanola kot kontrole. Padanje korelacijskega časa s povišanjem temperature je bilo podobno, kot pri liposomih z dodanim katehinom, toda razlike med kontrolo in liposomi z etanolno raztopino epikatehina so bile bistveno večje. To pomeni, da se korelacijski čas ob dodatku etanolne raztopine epikatehina poveča in s tem fluidnost membrane zmanjša.

Za natančnejšo sliko urejenosti heterogenega membranskega dvosloja smo zopet uporabili računalniško simulacijo in s pomočjo mehurčnega diagrama določili parametre, kot so ureditveni parameter, rotacijski korelacijski čas in korekcijski faktor polarnosti (slika 27). Urejena domena D1 se ob dodatku epikatehina pojavi le pri temperaturi 10 °C, potem pa se zlije skupaj z manj urejeno domeno D2. Na ureditveni parameter dodatek epikatehina nima velikega vpliva. S slike 27 B je razvidno, da je dodatek epikatehina ULV liposomom povečal korelacijski čas D1 in D2 domeni, kar pomeni da se je fluidnost zmanjšala, kar se ujema s podatki izmerjenimi direktno iz EPR spektra (slika 26). Z višanjem temperature pa

korelacijski čas pada, kar pomeni, da se fluidnost povečuje. Na faktor polarnosti epikatehin ni imel velikega vpliva. Lastnosti membrane se nad 10 °C odražajo v enem tipu domen, ureditveni parameter spinskega označevalca MeFASL(2,11) pa se je zmanjšal na vrednost 0,1, kar ponazarja neurejeno membrano in hitro gibanje molekul.



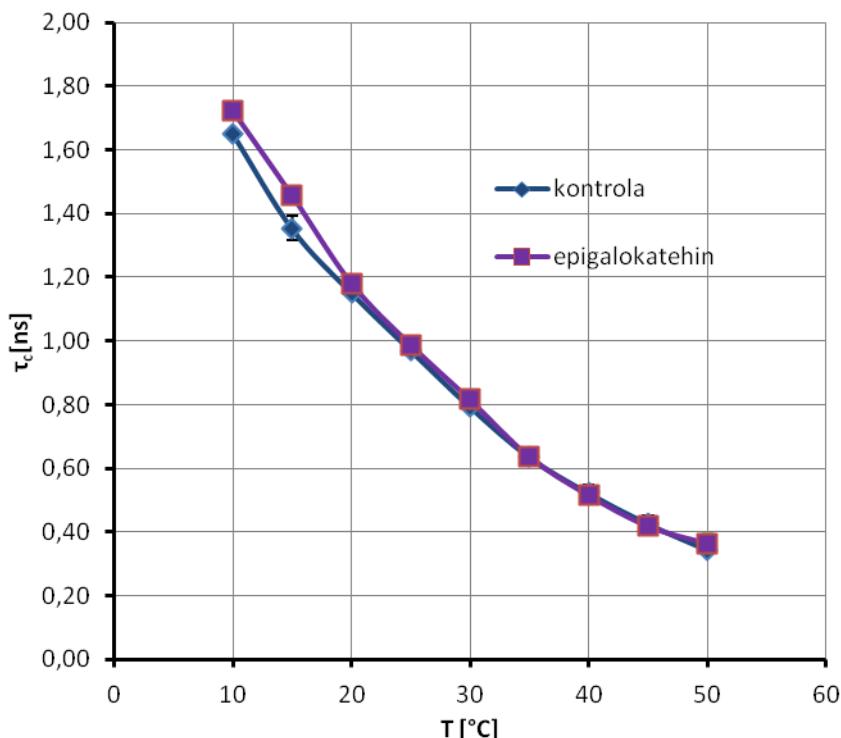
Slika 26: Temperaturna odvisnost korelacijskega časa (τ_c) spinskega označevalca MeFASL(2,11), vgrajenega v ULV liposome (v prisotnosti etanola = kontrola ali v prisotnosti etanolne raztopine epikatehina v končni koncentraciji 1 mM).



Slika 27: Temperaturna odvisnost ureditvenega parametra (A), rotacijskega korelacijskega časa (B) in korekcijskega faktorja polarnosti (C) spinskega označevalca MeFASL(2,11) v ULV liposomih iz PC:SM=2,4:1 (mol:mol)z etanolom-kontrola (rdeče barve) ali z etanolno raztopino epikatehina v 1 mM končni koncentraciji (olivno zelene barve) D1=urejena domena, D2=manj urejena domena

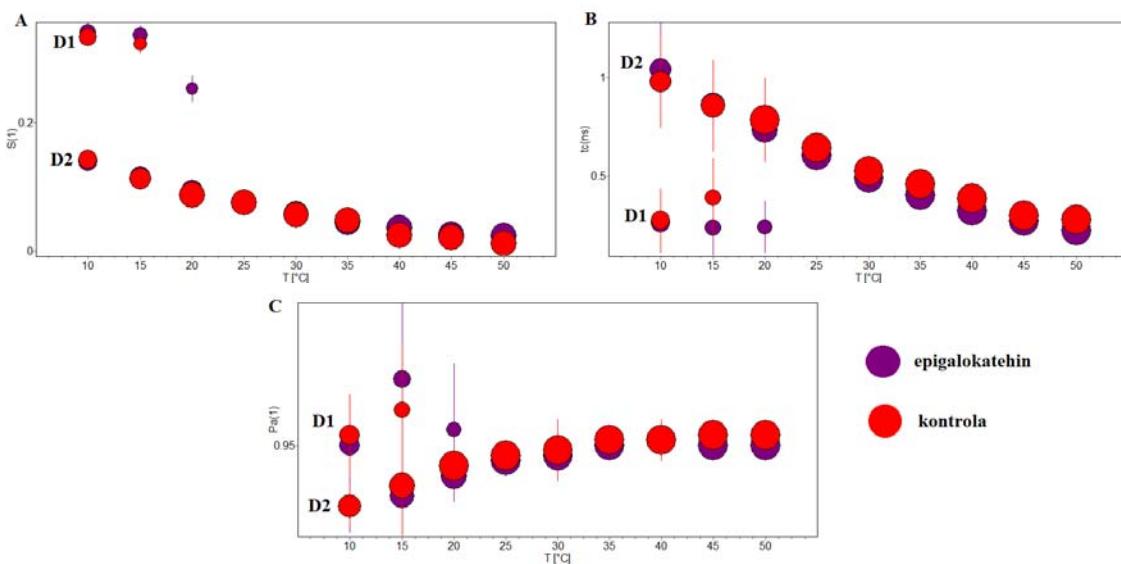
4.1.4 Vpliv epigalokatehina na ULV liposome

Na sliki 28 je prikazana temperaturna odvisnost korelacijskega časa spinskega označevalca MeFASL(2,11) v ULV liposomih, ki smo jim dodali fenolno spojino ali čisti etanol. Opazili smo, da dodatek etanolne raztopine epigalokatehina v 1 mM končni koncentraciji ni bistveno vplival na spremjanje korelacijskega časa s temperaturo, podobno kot pri katehinu.



Slika 28: Temperaturna odvisnost korelacijskega časa(τ_c) spinskega označevalca MeFASL(2,11), vgrajenega v ULV liposome (v prisotnosti etanola=kontrola ali v prisotnosti etanolne raztopine epigalokatehina v 1 mM končni koncentraciji).

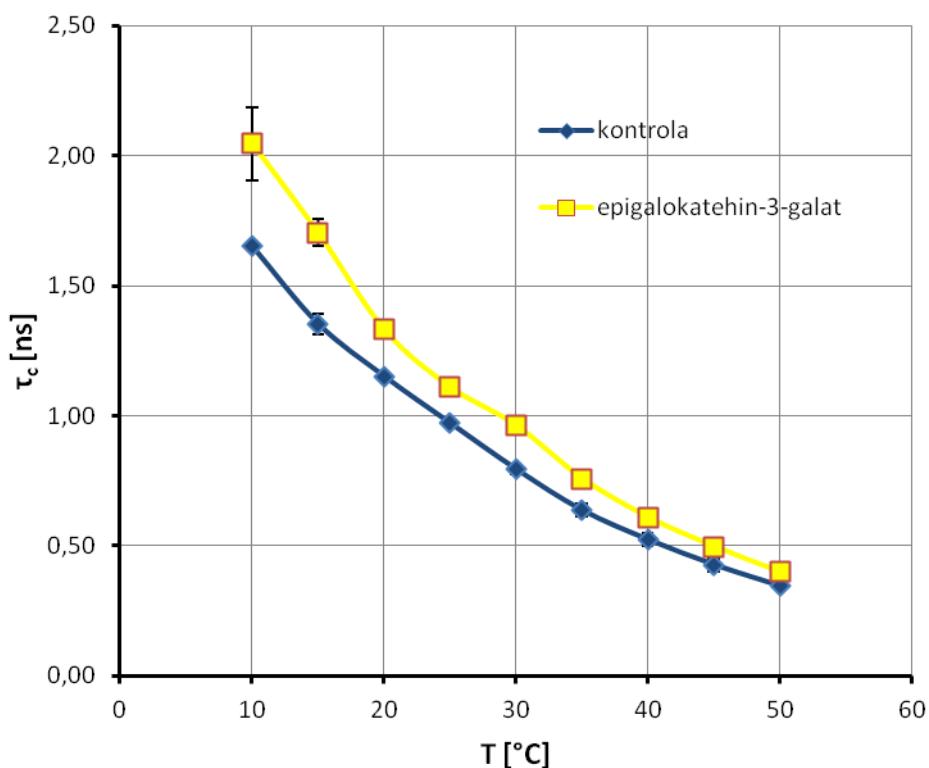
Iz mehurčnega diagrama (slika 29) je razvidno, da ob dodatku epikatehina ULV liposomom ne zaznamo velikih sprememb, v primerjavi s kontrolnim vzorcem. Tvorita se dve različni domeni: D1-urejena domena in D2-manj urejena domena. Delež urejene domene se je manjšal na račun manj urejene domene, domeni pa se združita pri 25 °C.



Slika 29: Temperaturna odvisnost ureditvenega parametra (A), rotacijskega korelacijskega časa (B) in korekcijskega faktorja polarnosti (C) spinskega označevalca MeFASL(2,11) v ULV liposomih iz PC:SM=2,4:1 (mol:mol) z etanolom-kontrola (rdeče barve) ali z etanolno raztopino epigalokatehina v 1 mM končni koncentraciji (vijoličaste barve) D1=urejena domena, D2=manj urejena domena

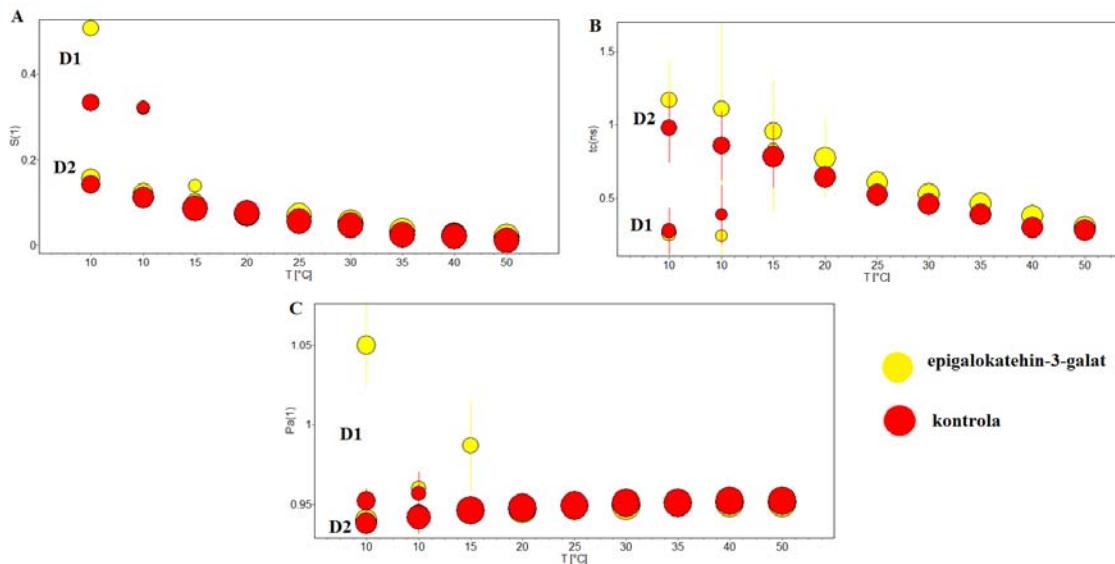
4.1.5 Vpliv epigalokatehina-3-galata na ULV liposome

Na sliki 30 je prikazana temperaturna odvisnost korelacijskega časa spinskega označevalca MeFASL(2,11) v ULV liposomih, ki smo jim dodali fenolno spojino ali čisti etanol. Slike je razvidno, da so se po dodatku etanolne raztopine epigalokatehin-3-galata v ULV liposome pojavile večje razlike v korelacijskem času glede na kontrolo kot pri epikatehinu. Zato sklepamo, da etanolna raztopina epigalokatehin-3-galata bolj vpliva na fluidnost membrane. Korelacijski čas se je po dodatku etanolne raztopine epikatehin-3-galata povečal v primerjavi s kontrolo, kar pomeni, da se je fluidnost zmanjšala.



Slika 30: Temperaturna odvisnost korelacijskega časa (τ_c) spinskega označevalca MeFASL(2,11), vgrajenega v ULV liposome (v prisotnosti etanola=kontrola ali v prisotnosti etanolne razopinje epigalokatehin-3-galata v 1 mM končni koncentraciji).

Iz mehurčnega diagrama (slika 31) je razvidno, da se ob dodatku epigalokatehin-3-galata ULV liposomom ureditveni parameter in korekcijski faktor polarnosti nekoliko povečata pri temperaturah do 15 °C. Najbolj pa se je povečal korelacijski čas v celiem temperaturnem območju. Delež urejene domene se je manjšal na račun manj urejene domene D2. Za razliko od kontrole, kjer sta se domeni združili pri 15 °C pa se ob dodatku epigalokatehin-3-galata združita pri 20 °C.

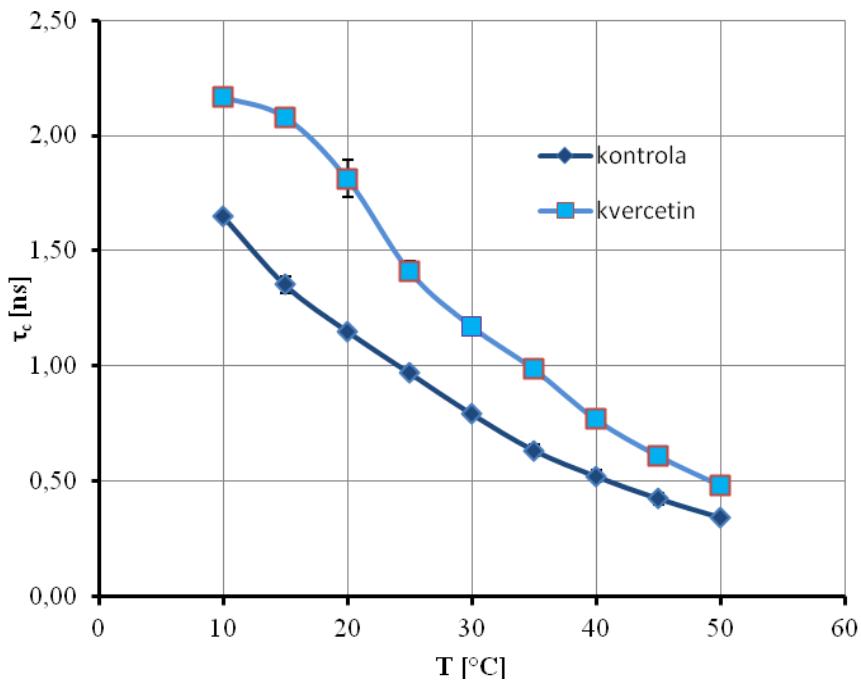


Slika 31: Temperaturna odvisnost ureditvenega parametra (A), rotacijskega korelacijskega časa (B) in korekcijskega faktorja polarnosti (C) spinskega označevalca MeFASL(2,11) pri ULV liposomih iz PC:SM=2,4:1 (mol:mol) z etanolom-kontrolo (rdeče barve) ali z raztopino epigalokatehin-3-galata v 1 mM končni koncentraciji (rumene barve) D1=srednje urejena domena, D2=najmanj urejena domena.

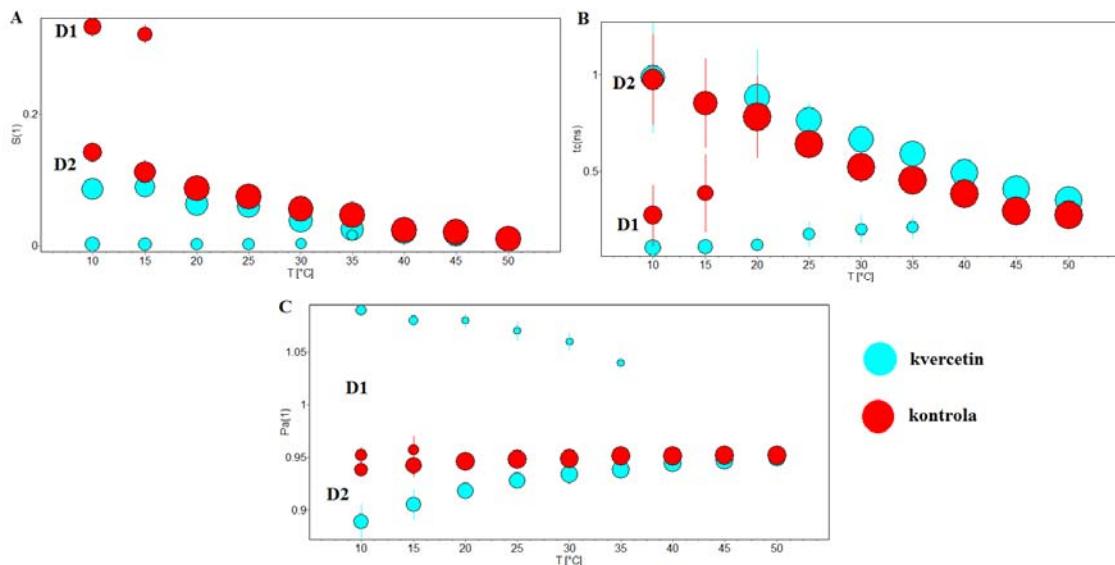
4.1.6 Vpliv kvercetina na ULV liposome

Ker smo želeli razširiti naš spekter raziskav na več vrst flavonoidov, smo se odločili, da bomo poleg proučevanja vplivov flavanolov na modelne membrane za raziskavo izbrali tudi flavonoid, ki spada v skupino flavanolov - kvercetin. Za kvercetin smo se odločili, ker je eden najbolj razširjenih bioflavonoidov, saj je prisoten v večini užitnega sadja in zelenjave. Kljub temu, da kvercetin in epigalokatehin-3-galat spadata v različni skupini flavonoidov, se v membrani obnašata podobno. S slike 32 je razvidna sprememba korelacijskega časa τ_c spinskega označevalca MeFASL(2,11) v ULV liposomih po dodatku etanolne raztopine kvercetina v 1 mM končni koncentraciji. Iz grafa je razvidno, da je imela etanolna raztopina kvercetina velik vpliv na fluidnost membrane, ki pa se je z višanjem temperature zmanjševal.

Iz mehurčnega diagrama (slika 33) je razvidno, da sta se ob dodatku kvercetina ULV liposomom domeni združili pri 40 °C. Največje razlike so opazne v korelacijsem času, ki je bil v liposomih s kvercetinom večji kot pri kontroli. V teh liposomih smo tudi opazili pomembno zvišanje polarnosti glede na kontrolo, kar ponazarja večji vdor vode v lipidni dvosloj.



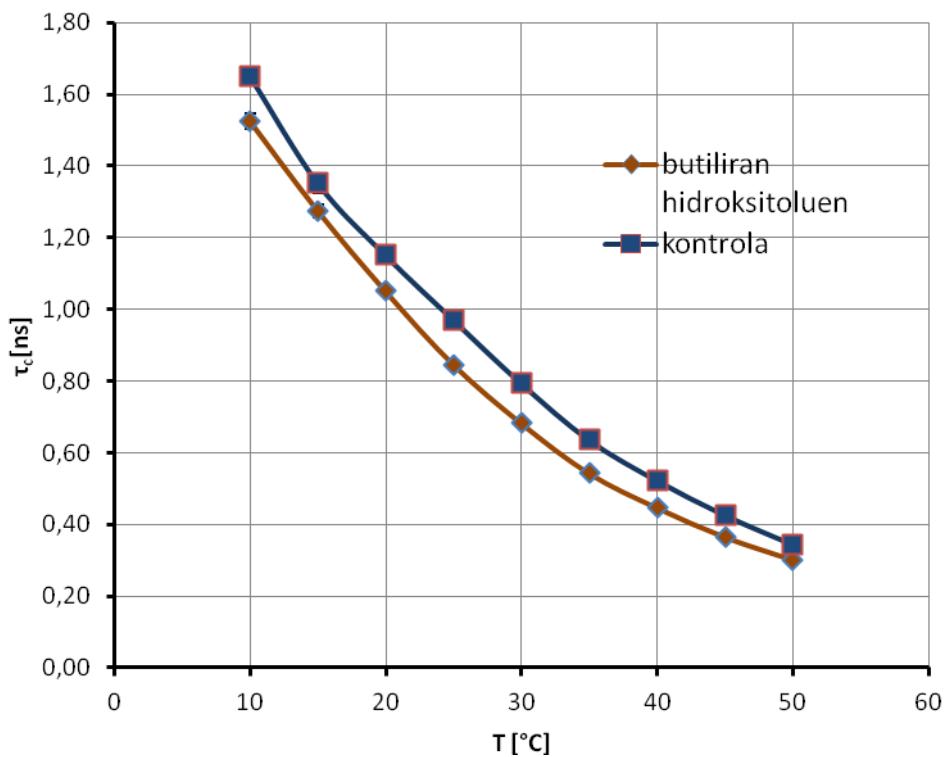
Slika 32: Temperaturna odvisnost korelacijskega časa (τ_c) spinskega označevalca MeFASL(2,11), vgrajenega v ULV liposome (v prisotnosti etanola=kontrola ali v prisotnosti etanolne razopine kvercetina v 1 mM končnikoncentraciji).



Slika 33: Temperaturna odvisnost ureditvenega parametra (A), rotacijskega korelacijskega časa (B) in korekcijskega faktorja polarnosti (C) spinskega označevalca MeFASL(2,11) pri ULV liposomih iz PC:SM=2,4:1 (mol:mol) z etanolom-kontrola (rdeče barve) ali z etanolno raztopino kvercetina v 1 mM končni koncentraciji (modre barve) D1=srednje urejena domena, D2=manj urejena domena

4.1.7 Vpliv butil hidroksitoluena na ULV liposome

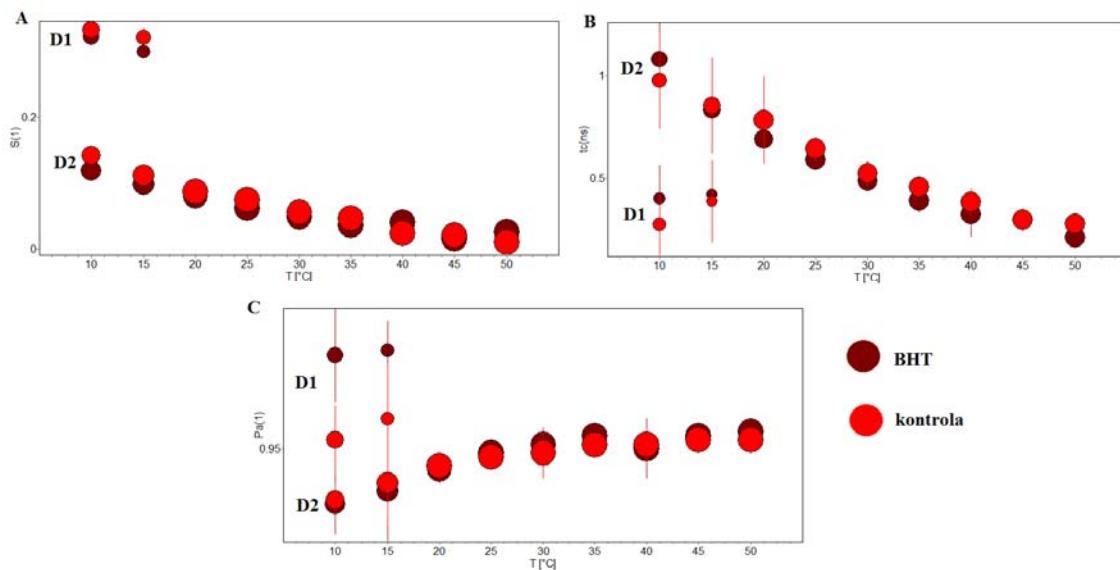
Butiliran hidroksitoluen je sintetičen antioksidant, ki se veliko uporablja v živilski industriji, saj je splošno prepoznan kot varen aditiv. Dodatek etanolne raztopine BHT (1 mM končna koncentracija) ULV liposomom označenimi s spinškim označevalcem MeFASL(2,11) je za razliko od drugih fenolnih spojin povzročil obratni učinek na fluidnost (slika 34). Ob dodatku BTH se je korelacijski čas zmanjšal, kar pomeni, da je postala membrana bolj fluidna.



Slika 34: Odvisnost korelacijskega časa (τ_c) spinskega označevalca MeFASL(2,11), vgrajenega v ULV liposome (v prisotnosti etanola=kontrola ali v prisotnosti etanolne razopine BTH v 1 mM končni koncentraciji) od temperature.

Iz mehurčnega diagrama (slika 35) je razvidno, da dodatek BTH ULV liposomom ni bistveno vplival na domensko sestavo. Delež urejene domene D1 se je manjšal na račun manj urejene domene D2, domeni pa sta se združili pri 25 °C. S slike 35 je razvidno, da

BTH ni vplival niti na ureditveni parameter in ne na korelacijski čas domen kot tudi ne na korekcijski faktor polarnosti.



Slika 35: Temperaturne odvisnosti ureditvenega parametra (A), rotacijskega korelacijskega časa (B) in korekcijskega faktorja polarnosti (C) spinskega označevalca MeFASL(2,11) pri ULV liposomih iz PC:SM=2,4:1 (mol:mol) z etanolom-kontrola (rdeče barve) ali z etanolno raztopino butiliranega hidroksitoluena v 1 mM končni koncentraciji (rjave barve), D1=urejena domena, D2=najmanj urejena domena

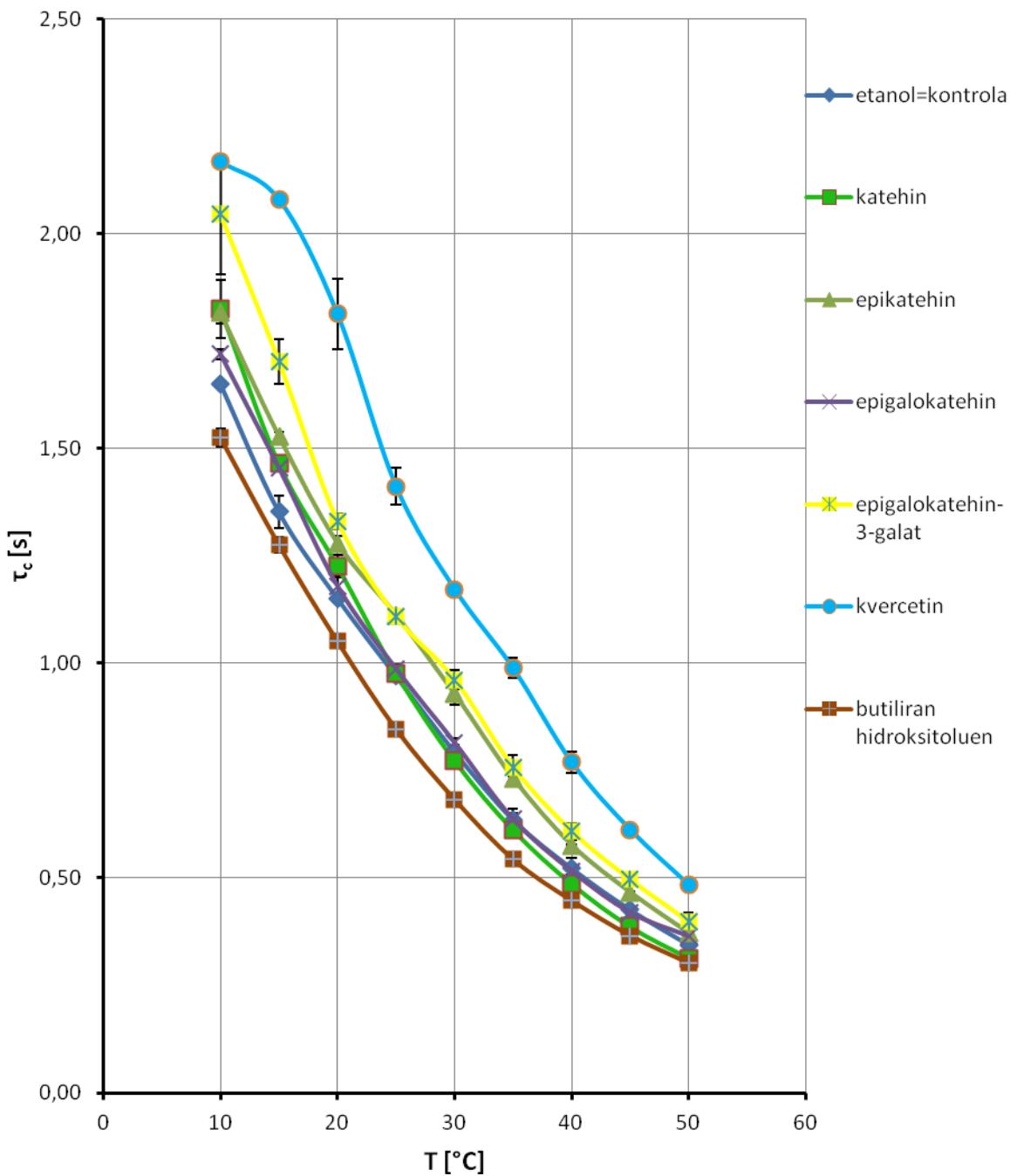
4.1.8 Primerjava vpliva vrste fenolnih spojin na fluidnost membrane

Zaradi lažje primerjave rezultatov smo se odločili za dve različni temperaturi merjenja in sicer 25 °C (298 K), ki je temperatura, pri kateri smo izvajali poizkuse interakcij med polifenoli in liposomi in 40 °C (313 K), ki je najbližja fiziološki temperaturi, saj so uporabljeni liposomi predstavljeni model membrane eritrocita. Pri obeh temperaturah je bil učinek največji pri kvercetinu, potem pa si sledijo v naslednjem zaporedju: kvecetin > epigalokatehin-3-galat > epikatehin > epigalokatehin = katehin = kontrola (preglednica 3).

Preglednica 3: Povprečne vrednosti in standardni odkloni meritev korelacijskih časov pri sobni in 40 °C ob prisotnosti etanola (kontrola) ali etanolnih raztopin izbranih polifenolov v 1 mM končni koncentraciji

Dodatek etanolne raztopine izbranih polifenolov v 1 mM končni koncentraciji	T=25 °C (298 K)		T=40 °C (313 K)	
	τ (ns)	σ	τ (ns)	σ
kontrola (etanol)	0,97	/	0,52	0,02
katehin	0,98	0,02	0,49	/
epikatehin	1,11	0,01	0,58	/
epigalokatehin	0,99	0,01	0,52	0,01
epigalokatehin-3-galat	1,11	0,01	0,61	0,02
kvercetin	1,41	0,04	0,78	0,03
butiliran hidroksitoluen	0,85	/	0,45	/

Slika 36 prikazuje odvisnost korelacijskega časa MeFASL(2,11) od temperature v ULV liposomih za vse merjene vzorce in s tem spremembe v notranjosti lipidnega dvosloja. Prikazuje padanje korelacijskega časa z naraščanjem temperature, kar ponazarja hitrejše gibanje acilnih verig in s tem povečanje fluidnosti membrane s temperaturo. S slike 36 je jasno razvidno, da ima na fluidnost membrane v notranjosti največji vpliv kvercetin, ki najbolj zmanjša fluidnost membrane, sledita mu epigalokatehin-3-galat in epikatehin, medtem ko epigalokatehin in katehin nimata bistvenega učinka. B butiliran hidroksitoluen se obnaša popolnoma drugače in fluidnost poveča.



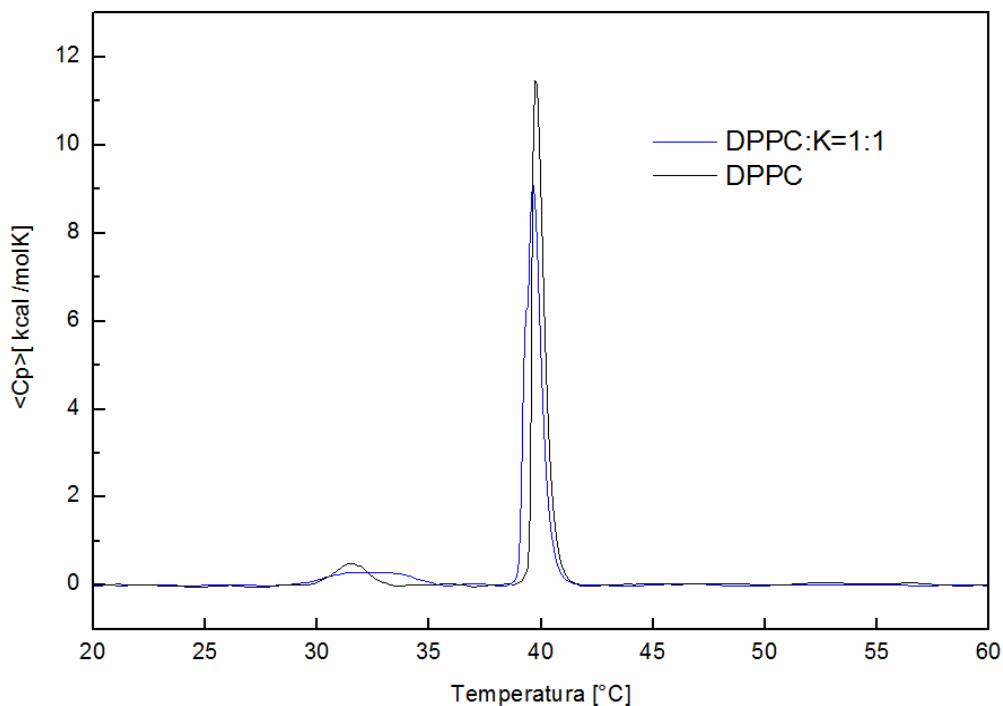
Slika 36: Temperaturna odvisnost korelacijskega časa (τ_c) spinskega označevalca MeFASL(2,11), vgrajenega v ULV liposome (v prisotnosti etanola=kontrola ali v prisotnosti različnih fenolnih spojin v 1 mM končni koncentraciji).

4.2 DIFERENČNA DINAMIČNA KALORIMETRIJA

4.2.1 Vpliv katehina na fazne prehode MLV liposomov iz DPPC

Na DSC termogramu DPPC liposomov (kontrola) (slika 37) je lepo viden glavni fazni prehod pri temperaturi $39,7 \pm 0,1$ °C in manjši fazni predprehod pri temperaturi $31,5 \pm 0,1$ °C. Sprememba entalpije faznega predprehoda ($\Delta H_{cal}'$) znaša $3,7 \pm 0,2$ kJ/molK, spremembra entalpije glavnega faznega prehoda (ΔH_{cal}) pa $32,3 \pm 0,2$ kJ/molK. Po vgradnji izbranih fenolnih snovi v DPPC liposome v molarnem razmerju 1:1 in 1:2 smo termogram primerjali s kontrolo in določili vpliv fenolov na fazni prehod.

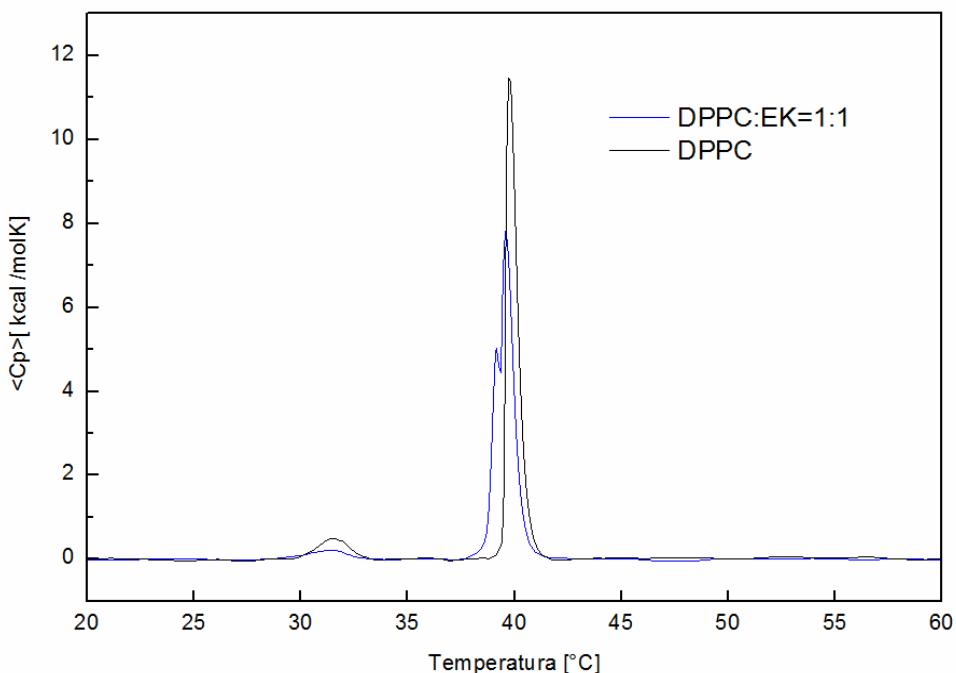
DSC termogram na sliki 37 prikazuje endotermni fazni prehod binarnega sistema DPPC in katehina. Krivulja po dodatku katehina ostane simetrična, z lepo ločljivim predprehodom in glavnim prehodom. Razvidno je, da dodatek 15 mM etanolne raztopine katehina DPPC liposomom (DPPC:K=1:1 (mol:mol)), različno vpliva na temperaturo predprehoda (T_m') in temperaturo glavnega prehoda (T_m). Predprehod se razširi, kar pomeni, da kvercetin vpliva na urejenost polarnih glav. Na temperaturo glavnega prehoda nima velikega vpliva, spremembra entalpije glavnega prehoda pa se nekoliko poveča in sicer na $32,7 \pm 0,1$ kJ/molK.



Slika 37: Primerjava DSC termograma MLV liposomov DPPC z DSC termogramom veziklov DPPC z dodano etanolno raztopino katehina (15mM) v molskem razmerju 1:1. Končna koncentracija DPPC veziklov je bila 0,5 mg/mL v 20 mM HEPES pufru, pH=7.

4.2.2 Vpliv epikatehina na fazne prehode MLV liposomov iz DPPC

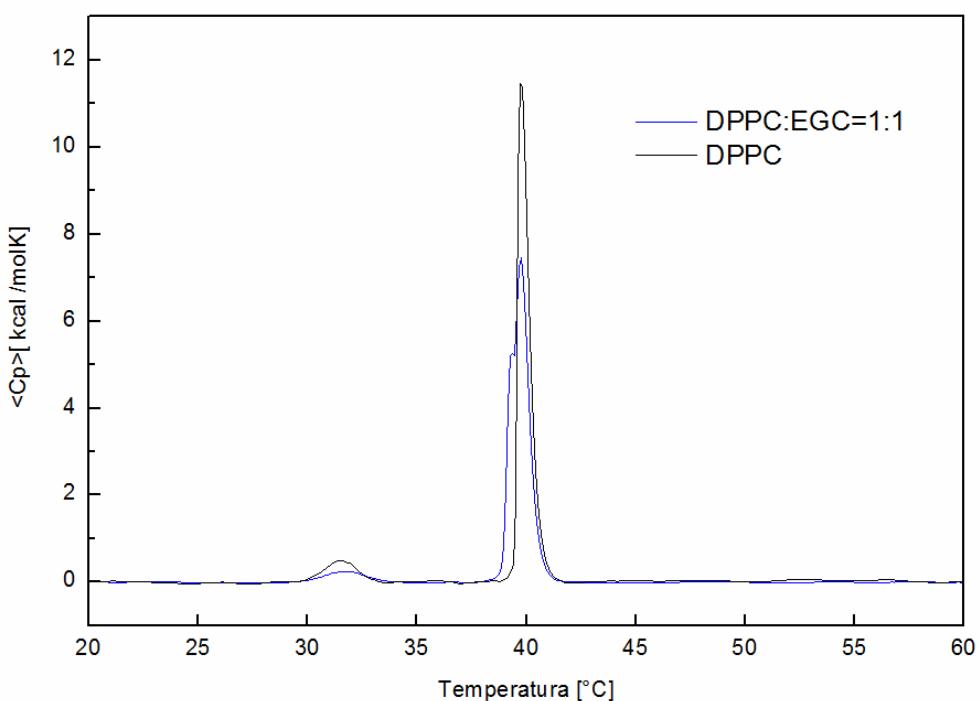
Ob dodatku 15 mM etanolne raztopine epikatehina DPPC veziklom (DPPC:EK=1:1 (mol:mol)), temperatura predprehoda T_m' ostaja enaka ($31,5 \pm 0,2$ °C), pri temperaturi glavnega prehoda pa se pojavita dva vrha, prvi vrh pri $39,2 \pm 0,1$ °C in drugi oster vrh pri $39,6 \pm 0,1$ °C (slika 38). Ta rezultat jasno kaže, da je prišlo do kompleksnih interakcij ali do nehomogenega mešanja med epikatehinom in lipidnim dvoslojem. Sprememba entalpije faznega predprehoda se zmanjša na $2,1 \pm 0,1$ kJ/molK, sprememba entalpije glavnega faznega prehoda pa se poveča na $33,07 \pm 0,1$ kJ/molK.



Slika 38: Primerjava DSC termograma MLV liposomov DPPC z DSC termogramom veziklov DPPC z dodano etanolno raztopino epikatehina v molskem razmerju 1:1. Končna koncentracija DPPC veziklov je bila 0,5 mg/mL v 20 mM HEPES pufru, pH=7.

4.2.3 Vpliv epigalokatehina na fazne prehode MLV liposomov iz DPPC

Dodatek 15 mM etanolne raztopine epigalokatehina DPPC liposomom (DPPC:EGC=1:1 (mol:mol)), je vplival na pojav razširjenega, manj ločljivega vrha predprehoda, pri glavnem prehodu pa sta se pojavila dva vrha, ki nakazujeta interakcije ali nehomogenost med epigalokatehinom in DPPC liposomi (slika 39). Epigalokatehin ni bistveno vplival na temperaturo predprehoda in glavnega prehoda. Sprememba entalpije predprehoda se je nekoliko znižala.

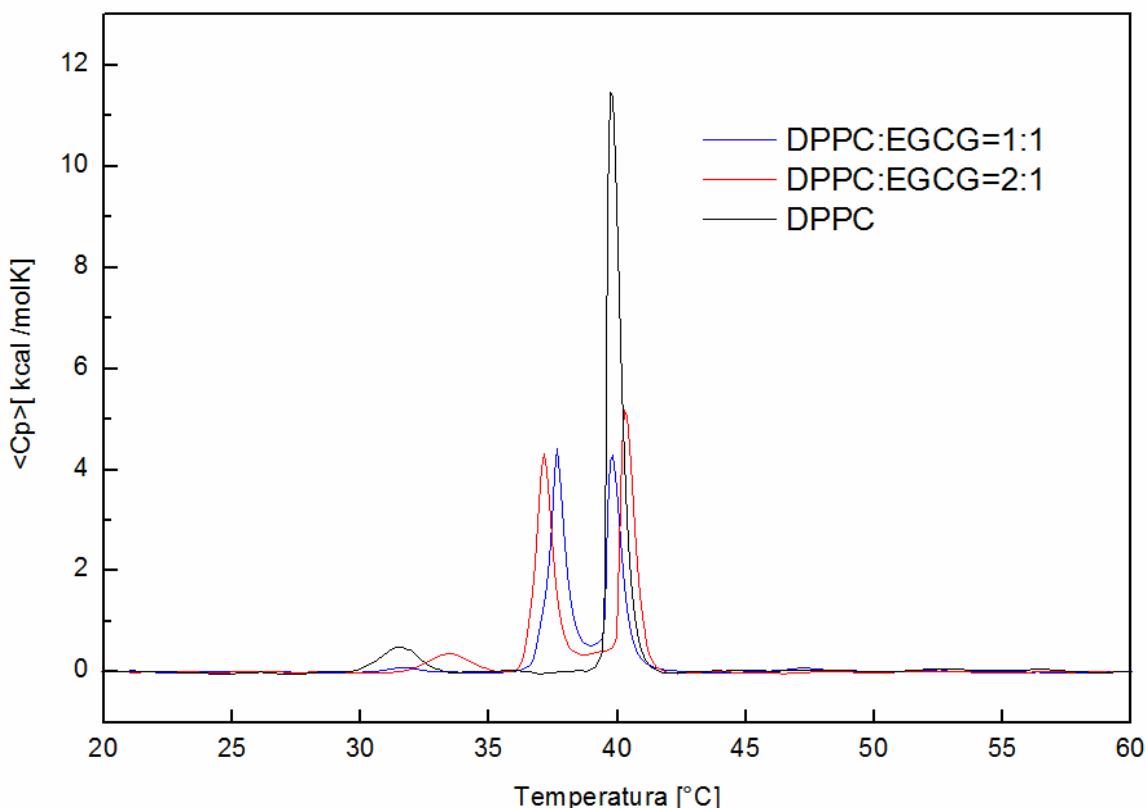


Slika 39: Primerjava DSC termograma večslojnih DPPC liposomov z DSC termogramom večslojnih DPPC liposomov z dodano etanolno raztopino epigalokatehina v molskem razmerju 1:1. Končna koncentracija DPPC veziklov je bila 0,5 mg/mL v 20 mM HEPES pufru, pH=7.

4.2.4 **Vpliv epigalokatehin-3-galata na fazne prehode MLV liposomov iz DPPC**

Dodatek 15 mM etanolne raztopine epigalokatehin-3-galata (EGCG) DPPC liposomom (DPPC:EGCG=1:1 (mol:mol)), je znižal vrh predprehoda. Temperatura glavnega faznega prehoda ima tako dva vrhova, ki sta v primerjavi s termogrami DPPC liposomov po dodatku epikatehina in epigalokatehina ločena. Dva vrha nastaneta zaradi nehomogenosti med epigalokatehin-3-galatom in DPPC liposomi. Prvi vrh glavnega prehoda- T_{m1} predvidevamo, da pripada delu liposoma, v katerega se je vgradil epigalokatehin-3-galat, drugi vrh glavnega prehoda- T_m , ki ostane na isti poziciji kot vrh pri DPPC, pa pripada liposomom DPPC. Sprememba entalpije faznega predprehoda se zmanjša na $0,5\pm0,1$ kJ/molK, sprememba entalpije glavnega prehoda pa se zmanjša na $30,3\pm0,1$ kJ/molK.

Poleg molarne razmerje DPPC:EGCG=1:1 smo za primerjavo pripravili binarno mešanico v molarjem razmerju DPPC:EGCG=2:1 (slika 40). Iz termograma je razvidna sprememba faznih prehodov in entalpije. Temperatura predprehoda se je dvignila na $33,4\pm0,1$ °C, glavni prehod pa se je znova razdelil na dva vrha, prvi T_{m1} pri $37,2\pm0,1$ °C in drugi T_m pri $40,3\pm0,1$ °C . Sprememba entalpije glavnega faznega prehoda pa se je povečala na $33,2\pm0,1$ kJ/molK. Predvidevamo, da je pojav 2 vrhov rezultat nehomogenosti binarne mešanice liposomov DPPC in epigalokatehin-3-galata.

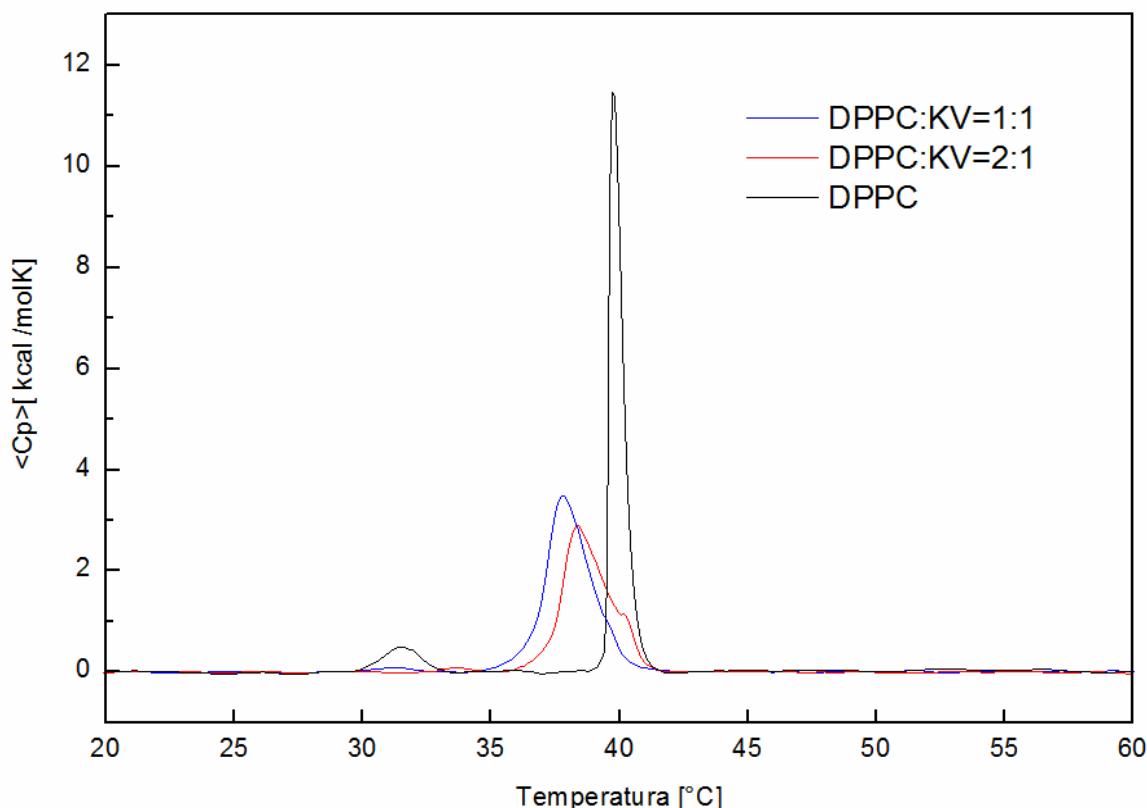


Slika 40: Primerjava DSC termograma večslojnih DPPC liposomov z DSC termogramom večslojnih DPPC liposomov z dodano etanolno raztopino epigalokatehin-3-galata v molskem razmerju 1:1 in 2:1. Končna koncentracija DPPC veziklov je bila 0,5 mg/mL v 20 mM HEPES pufru, pH=7.

4.2.5 Vpliv kvercetina na fazne prehode MLV liposomov iz DPPC

Dodatek 15 mM etanolne raztopine kvercetina (KV) DPPC liposomom (v molarnem razmerju DPPC:KV= 1:1) je povzročil, da je predprehod izginil, temperatura glavnega prehoda pa se je znižala na $37,8 \pm 0,1$ °C (slika 41). Sprememba entalpije glavnega faznega predprehoda se je v primerjavi z DPPC znižala na $30,3 \pm 0,1$ kJ/molK.

Za primerjavo smo zopet pripravili molarno razmerje DPPC:KV=2:1 (slika 41), kar je v primerjavi z liposomi DPPC brez vgrajene fenolne spojine povzročilo padec temperature glavnega prehoda na $38,4 \pm 0,1$ °C. Sprememba entalpije glavnega faznega prehoda pa se je drastično zmanjša na $27,2 \pm 0,1$ kJ/molK.



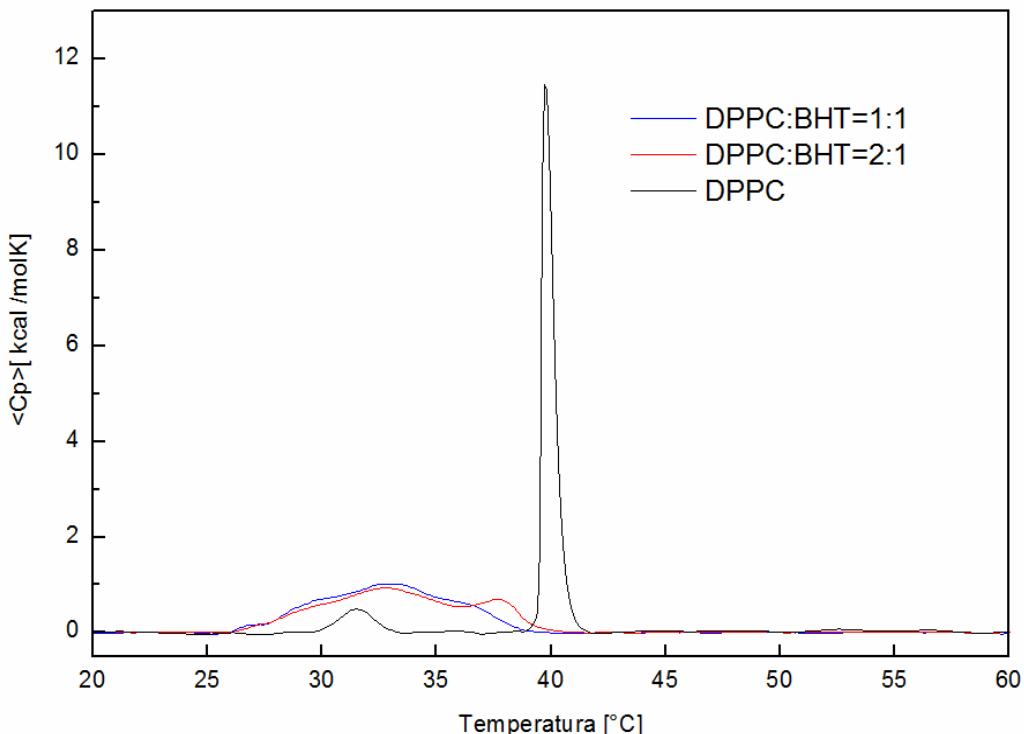
Slika 41: Primerjava DSC termograma MLV liposomov DPPC z DSC termogramom liposomov DPPC z dodano etanolno raztopino kvercetina v molskem razmerju 1:1 in 2:1. Končna koncentracija DPPC veziklov je bila 0,5 mg/mL v 20 mM HEPES pufru, pH=7.

4.2.6 Vpliv butiliranega hidroksitoluena na fazne prehode MLV liposomov iz DPPC

Dodatek 15 mM etanolne raztopine butiliranega hidroksitoluena (BHT) DPPC liposomom (v molarinem razmerju DPPC:BHT= 1:1) je povzročil izginotje predprehoda, temperatura glavnega prehoda pa se je drastično znižala, na $33,0 \pm 0,1$ °C (slika 42). Sprememba entalpije glavnega faznega prehoda pa se je zmanjšala na $30,9 \pm 0,1$ kJ/molK. Vrh je postal zelo širok (temperaturno območje 14 °C).

Pripravili smo tudi DPPC liposome, v katere smo vgradili butiliran hidroksitoluen (DPPC:BTH=2:1) (slika 42). Tudi to molarno razmerje je povzročilo izginotje faznega predprehoda, glavni prehod je imel dva vrha, kar zopet prikazuje nehomogenost binarne

mešanice liposomov DPPC in BHT. Glavni prehod pade na temperaturo $32,8 \pm 0,1$ °C, sprememba entalpije pa se je zmanjšala na $31,3 \pm 0,1$ kJ/molK.



Slika 42: Primerjava DSC termograma MLV liposomov DPPC z DSC termogramom liposomov DPPC z dodano etanolno raztopino BHT v molskem razmerju 1:1 in 2:1. Končna koncentracija DPPC veziklov je bila 0,5 mg/mL v 20 mM HEPES pufru, pH=7.

V preglednici 4 so zbrani vsi rezultati termodinamskih vrednosti faznih prehodov DPPC liposomov s dodatkom 15mM etanolne raztopine posameznih izbranih fenolnih spojin.

Preglednica 4: Termodinamske vrednosti faznih prehodov MLV liposomov iz DPPC v prisotnosti fenolnih spojin, v molskem razmerju 1:1 in 2:1 T_m – temperatura predprehoda, T_m – temperatura glavnega prehoda, T_{m1}(°C) = drugi vrh glavnega prehoda ΔH_{cal'} – entalpija predprehoda ΔH_{cal} – entalpija glavnega prehoda.

Molska razmerja	T _m (°C)	T _{m1} (°C)	T _m (°C)	ΔH _{cal'} (kJ/molK)	ΔH _{cal} (kJ/molK)
DPPC(c=0,5mg/mL)	31,5±0,1		39,7±0,1	3,7±0,1	32,3±0,1
DPPC :EGC = 1:1	31,9±0,1		39,8±0,1	2,3±0,1	31,5±0,1
DPPC :EK = 1:1	31,5±0,1	39,2±0,1	39,6±0,1	2,1±0,1	33,1±0,1
DPPC :K = 1:1	31,9±0,1		39,6±0,1	5,3±0,1	32,7±0,1
DPPC:KV=1:1	31,3±0,1		37,8±0,1	0,7±0,1	31,9±0,1
DPPC:KV=2:1	33,6±0,1		38,4±0,1	0,4±0,1	27,2±0,1
DPPC:EGCG=1:1	31,7±0,1	37,6±0,1	39,8±0,1	0,5±0,1	30,3±0,1
DPPC:EGCG=2:1	33,4±0,1	37,2±0,1	40,3±0,1	2,9±0,1	33,2±0,1
DPPC:BTH=1:1			33,0±0,1		30,9±0,1
DPPC:BTH=2:1		32,8±0,1	37,8±0,1		31,3±0,1

Legenda: T_m(°C) = vrh glavnega prehoda

T_{m1}(°C) = drugi vrh glavnega prehoda

K – katehin

EK – epikatehin

EGC – epigalokatehin

EGCG – epigalokatehin-3-galat

KV – kvercetin

BHT – butiliran hidroksitoluen

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Zelenjava, sadje, stročnice, žitarice in pijače, kot so čaj, rdeče vino in kava, so glavni vir polifenolov. Vsebnost polifenolov v hrani je odvisna od genetskih, okoljskih in tehnoloških parametrov. Nekatere je možno uporabiti tudi za povečanje vsebnosti teh spojin. Delovanje polifenolov na človeško zdravje je odvisno od dnevnega vnosa, predvsem pa od biorazpoložljivosti. Vnos monomernih flavonolov, flavonov in flavanolov je relativno nizek, zaradi omejene absorpcije in hitrega izločanja pa njihova koncentracija v plazmi redko preseže $1 \mu\text{mol/L}$ (Manach in sod., 2004). Flavononi in izoflavoni pa so flavonoidi z najboljšim profilom biorazpoložljivosti, koncentracija v plazmi pa lahko doseže $5 \mu\text{mol/L}$. Za dobro razumevanje potencialnega pozitivnega vpliva polifenolov na zdravje človeka moramo predvsem poznati in razumeti njihovo biorazpoložljivost. Način privzema fenolnih spojin preko gastrointestinalnega trakta še ni povsem pojasnjen. Večina polifenolov je hidrofilnih in zato ne morejo skozi steno črevesnega epitelia s pasivno difuzijo. Za to potrebujejo posebne prenosalce v celični membrani in za nekatere so pokazali, da pomagajo pri transportu teh spojin (Manach in sod., 2004). Merjenje količine vključenih polifenolov v biološke membrane po določenem inkubacijskem času ni vedno uspešno, ker jih celice hitro metabolizirajo in izločijo (Shahidi in Ho, 1999) in zato raziskovalci uporablajo modelne lipidne membrane. Z metodama kot sta elektronska paramagnetna resonanca in diferenčna dinamična kalorimetrija potem lahko sledijo vplivu vgrajenih polifenolov na lastnosti membran (Nakayama in sod., 2006).

5.1 RAZPRAVA

Naš namen je bil ugotoviti vpliv izbranih polifenolov na dve vrsti modelnih lipidnih membran; eno sestavljeno iz PC:SM=2,4:1 (mol:mol), ki ponazarja grobo sestavo zunanje membrane eritrocitov, in drugo iz DPPC. Rezultate smo pridobili z elektronsko paramagnetno resonanco, ki omogoča zaznavo in proučevanje domenske strukture lipidnih membran in z diferenčno dinamično kalorimetrijo, s katero določamo termodinamske parametre povezane s topotno induciranimi faznimi prehodi. Za EPR meritve smo uporabili spinski označevalec MeFASL (2,11), ki ima doksilno skupino na trinajstem C-atomu od metilne skupine in odraža gibanje acilnih verig v notranjosti lipidnega dvosloja. Za natančnejše analize koeksistence različnih vrst domen smo eksperimentalno dobljene

EPR spektre obdelali z računalniškim programom EPRSIM. Z GHOST kondenzacijsko metodo smo zaznali 2 vrsti različnih domen in sicer urejeno domeno D1 z višjim ureditvenim parametrom in manj urejeno domeno D2 z nizkim ureditvenim parametrom.

Sprememba v reologiji membrane lahko vpliva na številne biološke procese na sami membrani. Tako se lahko spremeni encimska aktivnost, transport metabolitov, prenos signalov, delovanje membranskih receptorjev, procesi endo- in eksocitoze in interakcije med membranskimi komponentami in citoskeletom. Kar precej rezultatov tovrstnih raziskav je bilo že predstavljenih a le nekatere povezujejo aktivnost katehinov iz čaja z lastnostmi membran in z molekularnimi interakcijami med fosfolipidno membrano in katehini ter bioaktivnostjo katehinov na podlagi lokacije in afinitete preiskovanih spojin do lipidnega dvosloja. Nekateri so določili lokacijo katehinov v lipidnem dvosloju, toda večina raziskav je uporabila neprave pogoje za proučevanje interakcij med katehini in fosfolipidi (na primer preveliko molarno razmerje med katehini in fosfolipidi) (Caturla, 2002).

Tsuchiya (2010), Berlec (2011) in Poklar in sodelavci (2010) so v svojih raziskavah dokazali, da polifenoli zmanjšujejo fluidnost membrane, s tem ko delujejo na zunanjji in notranji del lipidnega dvosloja. Zaključili so tudi, da je struktura flavonoidov pomemben faktor pri vgraditvi v lipidni dvosloj in posledično vpliva na spremembo fluidnosti lipidnih modelnih membran.

Flavonoidi imajo različno število hidroksilnih in metilnih skupin in so tudi različno polimerizirani. Vse to vpliva na specifične in nespecifične interakcije z membranami (Fraga, 2011). Predvsem pomembni parametri so velikost molekule, njena tridimenzionalna zgradba in hidrofilnost/hidrofobnost. Hidrofilni karakter določenih flavonoidov omogoča vezavo na polarne glave lipidov, dočim preidejo hidrofobni flavonoidi v notranjost lipidnega dvosloja in tam sprožijo spremembe v fluidnosti membran (Fraga, 2011).

Tsuchiya (2010) je proučeval interakcije različnih liposomov s 17 strukturno različnimi flavonoidi s spremeljanjem fluorescenčne polarizacije fluoroforov, ki so segali različno globoko v notranjost lipidnega dvosloja. Ugotovil je, da so najbolj zmanjšale fluidnost v

notranjosti membran tiste spojine, ki so imele na C-obroču na mestu 3 -OH skupino, nato tiste brez -OH na B-obroču, sledile so one s 5,7-dihidroksi na A- in nato šele tiste s 3',4'-dihidroksi substitucijo na B-obroču. Hashimoto in sod. (1999) je pred tem ugotovil, da estrsko vezana galna kislina na mestu 3 na C-obroču poveča hidrofobnost molekule. Če primerjamo vrednost porazdelitvenega faktorja log P3 za sistem oktanol/voda za EGCG in EGC (Poklar in sod. 2010) je res med njima velika razlika in EGCG je bolj hidrofoben. Vendar pa se hkrati za več kot 50 % poveča topološka polarna površina molekule EGCG in število vodikovih vezi, ki jih ta spojina lahko tvori. Hashimoto in sod. (1999) so zaključili, da se ECG in EGCG vgrajujejo na površino lipidnega dvosloja in s tem vplivata na strukturo membrane, medtem ko je imel epikatehin galat (najbolj hidrofobna spojina od testiranih) največjo afiniteto do lipidnega dvosloja in se je raje vgradil v notranjost membrane. Porazdelitveni koeficienti, ki so jih ti avtorji določili za sistem oktanol/fosfatni pufer imajo naslednji vrstni red spojin z oziroma na njihovo hidrofobnost: epikatehin galat (ECG) > epigalokatehin galat > epikatehin > epigalokatehin.

Relativna hidrofobnost flavonoidov se zmanjšuje z naraščanjem hidroksilnih skupin v njihovi strukturi. Molekule, ki imajo največ -OH skupin, so najbolj polarne in močno reagirajo z membrano. Ko primerjamo strukturne formule v nalogi testiranih fenolih spojin ugotovimo, da imata katehin, epikatehin in kvercetin 5 -OH skupin, epigalokatehin 6 -OH, epigalokatehin-3-galat 8 -OH skupin in butiliran hidroksitoluen le 1 -OH skupino. Če upoštevamo te predpostavke lahko naše uporabljene fenolne spojine razvrstimo po hidrofobnosti (PubChem, 2010) v naslednjem vrstnem redu: butiliran hidroksitoluen > EK = K > KV > EGC > EGCG (Berlec, 2011). Epigalokatehin-3-galat je torej najbolj polaren in zato se veže na površino lipidnega dvosloja, butiliran hidroksitoluen pa je najbolj nepolaren, kar mu omogoča najlažji vdor v notranjost lipidnega dvosloja.

Kemijska struktura kvercetina napoveduje večjo afiniteto spojine do okolja z majhno polarnostjo, saj ima aromatski del, ki je hidrofoben in se zato laže vgradi v hidrofobno okolje. Hkrati pa prisotnost 5 hidroksilnih skupin povečuje polarnost molekule. Spojina ima planarno strukturo zaradi dvojne vezi med C₂-C₃ na C-obroču, kar lahko razloži afiniteto do lipidnega dvosloja (Manach in sod., 2004). Amfifilni značaj molekule kvercetina kaže na njen predvideno lokalizacijo na membrani. Vezava na površje lipidnega dvosloja kvercetinu omogoča antioksidativno delovanje in zaščito peroksidacijo

fosfolipidov pred kisikovimi radikali vodnega medija (Pawlikowska-Pawlega in sod., 2006) in tako lahko kvercetin prepreči hemolizo eritrocitov in zaščiti lipide eritrocitov pred oksidacijo. (Pawlikowska-Pawlega in sod., 2002; Movileano in sod., 2000).

Membrana je heterogena, sestavljena iz različnih domen (področij) z različnimi karakteristikami gibanja acilnih verig in je zato fluidnost domen različna. V raziskavi smo za bolj natančen opis interakcij flavonoidov z modelnimi membranami uporabili računalniško simulacijo EPR-spektra. Na slikah 21 in 22 so lepo vidni spektri, ki so tipični za gibanje spinskega označevalca MeFASL(2,11), ki ima nitroksidno skupino pri repu acilnih verig lipidnega dvosloja, in ki kažejo na neurejeno hitro gibanje. Iz spektra je razvidno, da se je z višanjem temperature ureditev acilnih verig zmanjševala. Membrana ULV liposomov je postala z višanjem temperature bolj fluidna, dodatek izbranih polifenolov pa je povečal urejenost lipidnih repov in tako zmanjšal fluidnost membrane. Z naraščanjem temperature pa se je razlika med korelacijskim časom membran z različnimi fenolnimi spojinami zmanjševala (slika 36). Največjo spremembo korelacijskega časa smo opazili z vgraditvijo epigalokatehin-3-galata (slika 30) in kvercetina (slika 32), kar pomeni, da sta slednja najbolj vplivala na ureditev acilnih verig in povzročila večjo rigidnost membrane. Spremembe v fluidnosti glede na kontrolo sledijo v naslednjem zaporedju: KV > EGCG = EK > EGC > K = kontrola > BHT. Dodatek sintetičnega antioksidanta BHT k ULV liposomom pa je imel obratni učinek (slika 34). Korelacijski čas se je ob dodatku BTH zmanjšal, kar pomeni, da se je fluidnost lipidnega dvosloja v okolini spinskega označevalca povečala.

Več informacij o heterogenosti membrane pa smo dobili s pomočjo programa EPRSIM z mehurčnimi diagrami. Ugotovili smo, da je membrana iz PC:SM=2,4:1 (mol:mol) sestavljena iz dveh domen D1, ki je bolj urejena domena in D2, ki je manj urejena domena. Pri temperaturi okoli 20°C pa je postala membrana homogena s samo eno domeno. Vsaka domena ima drugačno fluidnost. Iz mehurčnih diagramov ni opaziti velikih sprememb ureditvenega parametra, pri nekaterih fenolnih spojinah pa opazimo spremembo v korelacijskem času in korekcijskem parametru polarnosti, ki kaže na to, da ob bolj urejeni membrani voda lažje prodira v lipidni dvosloj (slika 30).

Naši rezultati elektronske paramagnetne resonance se lahko primerjajo z rezultati nekaterih navedenih avtorjev, ki so raziskovali interakcije med polifenoli in modelnimi membranami z različnimi metodami. Tsuchiya (1999) je raziskal vpliv katehinov čaja na modelne membrane sestavljene iz DPPC in POPC z metodo polarizacije. Njegove ugotovitve so, da dodatek različnih koncentracij katehinov znatno zmanjša fluidnost membrane v hidrofilni in hidrofobni regiji lipidnega dvosloja. Galatni estri katehina pa so najbolj vplivali na zmanjšanje fluidnosti. Pawlikowska-Pawlęga in sod. (2002) je raziskovala vpliv kvercetina na strukturne in dinamične spremembe večslojnih liposomov DPPC z metodo EPR. Zaključili so, da flavonoidi z več hidroksilnimi skupinami močneje interagirajo z lipidnimi membranami. Kvercetin je lokaliziran blizu polarnih glav, saj mu kemična struktura s 5 – OH skupinami preprečuje interakcije s hidrofobnimi deli membrane, njegova reakcija s polarnimi glavami pa DPPC vpliva tudi na konformacijo acilnih verig. Glavni efekt takih interakcij so spremembe v ureditvi lipidnih verig. Zaradi kompleksnosti eritrocitnih membran, saj le te vsebujejo tudi različne proteine, pa je vpliv kvercetina lažje razumeti na modelnih membranah (Pawlikowska-Pawlęga in sod., 2002; Pawlikowska-Pawlęga in sod., 2006).

V članku Poklarjeve in sod. (2010) so rezultati pokazali, da flavonoidi EGCG in EGC v notranjosti lipidnega dvosloja delujejo drugače kot v zunanjem sloju. V zunanjem sloju povečajo urejenost lipidnega dvosloja, v notranjosti pa povečajo neurejenost. Naši rezultati z MeFASL(2,11) in s PC:SM (2,4:1 (mol:mol)) liposomi pa so pokazali obraten učinek in sicer so povečali urejenost v notranjem delu dvosloja. To razliko si lahko razlagamo kot posledico drugačne sestave modelnih membran, saj smo mi uporabili ULV iz fosfatidilholina in sfingomielina (2,4:1 (mol:mol)), Poklar in sodelavci pa so uporabili MLV pripravljene iz POPC:POPE:POPS:CH v razmerju 4:2:1:3,6, ki so vsebovali nenasičene maščobne kisline kot tudi holesterol.

Berlec je pri svojem delu (2011) ugotovila, da je dodatek fenolnih spojin (catehin, epicatehin, epigalokatehin, epigalokatehin-3-galat in kvercetin) k ULV liposomom, narejenih iz mešanice lipidov fosfatidilholina in sfingomielina v molskem razmerju 2,4:1, povečal urejenost in zmanjšal dinamiko acilnih verig fosfolipidov v okolini fluorofora DPH in spinskega označevalca MeFASL(10,3). Membrana iz tekočega neurejenega stanja

je prešla v bolj urejeno stanje – postala je bolj rigidna. Njene rezultate lahko primerjamo z rezultati naše raziskave, saj smo uporabili iste fenolne spojine in enako sestavo in obliko liposomov. Vsi izbrani flavonoidi vplivajo podobno tudi v notranjosti lipidnega dvosloja. Na notranji in zunanji del membrane sta imela največji vpliv epigalokatehin-3-galat in kvercetin. Spremembe pa so v številu domen, saj je Berlec (2011) z programom EPRSIM zaznala obstoj 3 domen, od katerih sta dve prevladujoči, podobno kot v našem primeru, ko smo zaznali obstoj le 2 domen. To si razlagamo z bolj fluidnim gibanjem acilnih verig v primerjavi z urejenim gibanjem fosfolipidnih glav. Podobne rezultate so dobili tudi Pawlikowska-Pawłęga in sod. (2006), ki so z metodo EPR in uporabo spinskih označevalcev z različno pozicijo nitroksidne skupine dokazali, da se kvercetin pri fiziološkem pH veže na polarno regijo fosfolipidnega dvosloja. Ta pa je obnjena proti vodni fazi, torej je na površini celične membrane.

DSC metoda meri spremembo v entalpiji faznega prehoda lipidov iz gel kristalnega stanja v neurejeno tekoče kristalno stanje ter temperaturo prehoda, medtem ko je EPR metoda pa je bolj občutljiv na gibanje molekul v določenem razponu okoli spinskega označevalca (Budai in sod., 2002). Glavni fazni prehod nastopi takrat, ko lipidne molekule preidejo iz relativno urejenega gel stanja v neurejeno tekoče kristalno stanje. Pod T_m so fosfolipidi togi, tesno zloženi, nad T_m pa so fleksibilni in omogočena je lateralna difuzija. Pri nekaterih liposomih pa opazimo predprehod, ki je posledica interakcij med polarnimi glavami fosfolipidov. Predprehod je dobro ločljiv od glavnega prehoda pri liposomih, ki se tesno pakirajo (MLV) in postane manj izrazit pri soniciranih enoslojnih liposomih. Samo čisti lipidni sistemi z nasičenimi maščobnimi kislinami imajo ostro določljiv fazni prehod v ozkem temperaturnem intervalu (Budai in sod., 2002).

Glede na lipidno sestavo in vsebnost proteinov v membrani eritrocitov ostrega faznega prehoda ne moremo določiti, tako kot ga lahko določimo z analizo modelnih membran, ki so sestavljene iz sintetičnih lipidov (Pawlikowska-Pawięga in sod., 2002). Wójtowicz in sodelovci (1996) je z metodo diferenčne dinamične kalorimetrije raziskal vpliv kvercetina na temperaturo faznega prehoda in prišel do zaključka, da se ob dodatku izbranega flavonoida temperatura faznega prehoda zmanjša (Pawlikowska-Pawięga in sod., 2002). Avtorji tega članka so zaključili, da znižanje temperature glavnega faznega prehoda (T_m) in

znižanje entalpije prehoda (ΔH_{cal}) in tudi razširitev vrha glavnega prehoda ponazarja penetracijo flavonoida v lipidni dvosloj in domnevo o lokaciji med polarnim in nepolarnim delom lipidnega dvosloja (Pawlikowska-Pawłega in sod., 2002).

Iz DSC termogramov naše raziskave smo ugotovili, da na temperaturo faznega prehoda in entalpijo prehoda imajo najmanjši vpliv katehin, epikatehin in epigalokatehin. Epigalokatehin-3-galat izrazito vpliva na temperaturo faznega prehoda DPPC liposomov. Delovanje kvercetina in butiliranega hidroksitoluena je pa popolnoma drugačno. Kvercetin in BTH znižata temperaturo prehoda, vrh se razširi in entalpija prehoda se zniža, kar pomeni, da se ti dve molekuli vrineta v lipidni dvosloj in vplivata na interakcije med nepolarnimi repi. Učink BTH je večji kot KV. Iz naših raziskav je razvidno da katehin, epikatehin in epigalokatehin najmanj vplivajo na spremembo temperature faznega prehoda, vrh prehoda pa še vedno ostaja oster. Vpliv na termodinamske parametre faznega prehoda DPPC lipidov je v korelaciji s polarnostjo molekul: $K < EK \leq EGK << EGCG$. Pri dodatku EK, EGK in EGCG pa se pojavita na termogramu dva vrha, ki se najostreje ločita po dodatku EGCG. Predvidevamo, da se molekule EGCG začnejo kopićiti na liposomih, rajši kot da se naključno vežejo.

Na osnovi DSC rezultatov lahko sklepamo, da na jakost interakcij izbranih flavonoidov na membrane vpliva predvsem sama struktturna flavonoida (slika 12, 13 in 14) ter agregatno stanje liposomov, njihova velikost kot tudi površinski naboj. Večjo afiniteto do hidrofilnega dela lipidnega dvosloja doprinesejo 3 hidroksilne skupine v B obroču epigalokatehin-3-galata (ta ima še dodatne 3 zaradi vezanega galata na 3 C-atomu C-obroča) in epigalokatehina. Katehin in njegova stereoizomera epikatehin pa imata le 2 hidroksilni skupini na B-obroču in sta manj polarna ter imata večjo afiniteto do hidrofobnega dela.

Rezultati EPR kažejo, da ko imamo liposome v neurejenem tekočem kristalnem stanju se epikatehin-3-galat in kvercetin adsorbirata na polarni del lipidnega dvosloja in s tem močno vplivata na fluidnost acilnih verig. Katehin, epikatehin in epigalokatehin pa so hidrofobne narave in se vključujejo v lipofilni del lipidnega dvosloja in s tem vplivajo na urejenost v notranjosti membrane.

Rezultati DSC pa kažejo da, ko imamo liposome urejenem gel kristalnem stanju, urejenost dvosloja najbolj porušita BTH in KV, saj penetrirata v lipidni dvosloj. Ostale spojine, pa interagirajo s polarnimi glavami na površini liposomov, razen EGCG, ki ali penetrira v lipidni dvosloj ali pa povzroči separacijo liposomov.

Iz rezultatov EPR je razvidno, da na lipidni dvosloj ULV zgrajenih iz PC in SM (2,4:1 (mol:mol)) najbolj vplivata kvercetin in epigalokatehin-3-galat in BHT. Z delnim vgrajevanjem v membrane povzročita povečanje ureditve acilnih verig. Z diferenčno dinamično kalorimetrijo z uporabo DPPC liposomov, smo prav tako ugotovili največji učinek teh treh spojin, vendar kvercetin in butiliran hidroksitoluen porušita interakcije v lipidnem dvosloju. Najmanj vpliva na membrano (urejeno ali neurejeno) so imeli katehin, epikatehin in epigalokatehin, kar smo opazili z obema izbranimi metodama.

5.2 SKLEPI

Dodatek izbranih flavonoidov (catehin, epicatehin, epigalokatehin, epigalokatehin-3-galat in kvercetin) ULV liposomom pripravljenim iz PC in SM v razmerju 2,4:1 (mol:mol) poveča urejenost in zmanjša dinamiko fosfolipidnih acilnih verig v okolici spinskega označevalca MeFASL(2,11). Lipidni dvosloj postane bolj urejen in bolj rigiden. Nasprotni učinek pa ima dodatek sintetičnega antioksidanta BHT. Ta poveča dinamičnost fosfolipidnih verig okoli spinskega označevalca MeFASL(2,11) in s tem poveča fluidnost membrane.

Membrane ULV liposomov, ki so pod 20 °C heterogene in sestavljene iz dveh vrst domen, postanejo z višanjem temperature homogene, z samo eno domeno in bolj fluidne. Z metodo EPR smo največje spremembe fluidnosti ugotovili ob dodatku epigalokatehin-3-galata in kvercetina.

Dodatek izbranih fenolnih spojin vpliva na temperaturo faznega prehoda MLV liposomov sestavljenih iz DPPC. Na spremembo najbolj vplivata polifenola epigalokatehin-3-galat in kvercetin, kar smo dokazali tudi z metodo EPR.

6 POVZETEK

Flavonoidi so ene najbolj razširjenih fenolnih spojin prisotnih v rastlinah. Kljub temu, da biokemijski in fiziološki mehanizem bioloških učinkov *in vitro* ni popolnoma znan, jim pripisujemo pozitivni učinek na zdravje ljudi. Čeprav je bilo narejenih veliko raziskav biološke aktivnosti flavonoidov, jih le nekaj potrjuje povezavo teh lastnosti z interakcijami flavonoidov z lipidnimi membranami (Caturla in sod., 2002). Nekateri flavonoidi, ki jih zaradi kemijske zgradbe celice ne morejo absorbirati, lahko povzročijo določene spremembe blizu površine membrane. Lahko povzročijo spremembe v fizikalnih lastnostih membrane, modulirajo aktivnost encimov, interakcije z receptorji, prehod ionov, prenos signalov, transport in tudi druge membranske funkcije.

V diplomski nalogi smo poskušali razložiti vpliv polifenolov na fluidnost membrane, ki temelji na lokaciji in afiniteti polifenolov v lipidnem dvosloju in na tvorbo membranskih domen z elektronsko paramagnetno resonanco in diferenčno dinamično kalorimetrijo. Ker so biološke membrane kompleksne in bi določene komponente kot so proteini motili detekcijo, smo izdelali ULV liposome iz PC:SM=2,4:1 (mol:mol), ki po svoji sestavi predstavljajo model za zunanji sloj membrane eritrocitov, za meritve z metodo DSC pa smo pripravili MLV liposome iz DPPC (0,5mg/mL).

Z metodo elektronske paramagnetne resonance smo ugotovili, da dodatek izbranih fenolnih spojin poveča urejenost in zmanjša dinamiko acilnih verig fosfolipidov v okolici spinskega označevalca MeFASL(2,11), ki detektira lastnosti v sredini membranskega dvosloja. Največje spremembe smo opazili ob dodatku kvercetina in epigalokatehin-3-galata. Za bolj podrobnejši vpogled v možno heterogenost membrane smo eksperimentalne spektre obdelali z programom EPRSIM, kjer smo dodatno določili delež domen, ureditveni parameter, rotacijski korelacijski čas in korekcijski faktor polarnosti. Ugotovili smo, da so ULV liposomi sestavljeni iz PC:SM=2,4:1 (mol:mol), pri temperaturah pod 20 °C sestavljeni iz dveh vrst domen: urejenih in manj urejenih domen, ki pri višjih temperaturah preidejo v eno samo domeno, kar ponazarja homogenost membrane. Dodatek fenolnih spojin najbolj vpliva na polarnost v okolici spinskega označevalca in na rotacijski korelacijski čas.

Z metodo diferenčne dinamične kalorimetrije smo spremljali fazne prehode MLV liposomov iz DPPC ob dodatku izbranih fenolnih spojin. Iz DSC krivulj smo odčitali

temperature in entalpije predprehodov in glavnih prehodov. Iz slik 36, 37 in 38 je razvidno, da katehin, epikatehin in epigalokatehin nimajo velikega vpliva na lipidni dvosloj MLV liposomov. Dodatek epigalokatehin-3-galata, kvercetina in butil hidroksitoluena (sliki 39 in 40) pa zniža temperaturo in entalpijo faznega prehoda. Pri dodatku kvercetina in butilhidroksitoluena se tudi razširi vrh krivulje na termogramu, kar ponazarja vpliv flavonoidov na acilne verige modelnih membran.

7 VIRI

Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26.-27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23-32

Abram V., Simčič M. 1997. Fenolne spojine kot antioksidanti. Farmacevtski vestnik, 48: 573-589

Avanti Polar Lipids. 2010. Catechin, epicatechin, epigallocatechin, epigallocatechin gallate, quercetin. Alabaster, Avanti Polar Lipids: 6 str.
http://avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=1&Itemid=1 (23. nov. 2011)

Berlec B. 2011. Interakcije izbranih fenolnih spojin z modelnimi lipidnimi membranami. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 72 str.

Boron W.F., Boulpaep E.L. 2009. Medical physiology: a cellular and molecular approach. 2nd ed. Philadelphia, Saunders Elsevier: 24-24

Boyer R. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 634-635

Brustolon M., Giacchello E. 2009. Electron paramagnetic resonance. New Jersey, John Wiley & Sons: 37-48

Budai M., Szabó Z., Szögyi M., Gróf P. 2002. Molecular interactions between DPPC and morphine derivates: a DSC and EPR study. International Journal of Pharmaceutics, 250: 239-250

Caturla N., Vera-Sampler E., Villalaínn J., Mateo C.R., Micol V. 2002. The relationship between the antioxidant and the antibacterial properties of galloylated catechins and the structure of phospholipid model membrane. Free Radical Biology & Medicine, 34, 6: 648-662

Dietrich C., Bagatolli L.A., Volovyk Z.N., Thompson N.L., Levi M., Jacobson K., Gratton E. 2001. Lipid rafts reconstituted in model membranes. Biophysical Journal, 80: 1417–1428

Dopico A.M. 2007. Methods in membrane lipids. Methods in Molecular Biology, 400: 171-197

D'Archivio M., Filesi C., Di Benedetto R., Raffaella Gargiulo R., Giovannini C., Masella R. 2007. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. Annali dell Istituto Superiore di Sanita, 43, 4: 348-361

Extrasynthese. 2009. Catechin, epicatechin, epigallocatechin, epigallocatechin gallate. Genay Cedex, Extrasynthese: 4 str.
http://www.extrasynthese.com/catalogue/catechins_tannins/epigallocatechin_gallate,r21,p473419,c0981_S.html (december 2011)

- Fajer P.G. 2006. Electron spin resonance spectroscopy labeling in peptide and protein analysis. V: Encyclopedia of analytical chemistry. Meyers R. A. (ed.). Hoboken, John Wiley & Sons: 5725–5761
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470027318.a1609/full> (05. dec. 2011)
- Fraga C.G. 2011. Plant phenolics and human health: biochemistry, nutrition and pharmacology. New Jersey, John Wiley & Sons: 108-114
- Hashimoto T., Kumazawa S., Nanjo F., Hara Y., Nakayama T. 1999. Interaction of tea catechins with lipid bilayer investigated with liposome system. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 63, 12: 2252-2255
- Hollman P.C.H., Katan M.B. 1999. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. Food and Chemical Toxicology, 37: 937-942
- Jain M.K., Wagner C.R. 1980. Introduction to biological membranes. New York, John Wiley and Sons: 423 str.
<http://web.virginia.edu/Heidi/chapter9/chp9.htm> (10. dec. 2011)
- Karas R. 2008. Stabilnost alternativnega pigmenta razsoljenega mesa in njegova primernost za koagulacijo mesnih emulzij. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 60-61
- Koklič T. 2004. Vpliv domenske strukture membran na interakcijo liposomov s celicami. Doktorska disertacija. Ljubljana, Fakulteta za matematiko in fiziko: 9-9
- Kristl J., Šmid-Korbar J., Srčič S. 1992. Farmacevtska tehnologija. Del I. Praktikum. Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 157-159
- Kristl J., Volk B., Ahlin P., Gombač K., Šentjurc M. 2002. Interactions of solid lipid nanoparticles with model membranes and leukocytes studied by EPR. International Journal of Pharmaceutics, 256: 133-140
- Lasic D.D. 1997. Liposomes in gene delivery. Boca Raton, CRC Press: 320-322
- Lasic D.D. 1998. Novel applications of liposomes. Trends in Biotechnology, 16, 7: 307-321
- London E. 2002. Insight into lipid raft structure and formation from experiments in model membranes. Current Opinion in Structural Biology, 12: 480-486
- London E. 2005. How principles of domain formation in model membranes may explain ambiguities concerning lipid raft formation in cells. Biochimica et Biophysica Acta, 1746: 203 – 220
- London E., Brown D.A. 2000. Insolubility of lipids in Triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). Biochimica et Biophysica Acta, 1508: 182-195

Manach C., Scalbert A., Monard C., Rémesy C., Jiménez I. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. American Journal of Clinical Nutrition, 79: 727-747

Mattson M.P. 2005. Membrane microdomain signalling: Lipid rafts in biology and medicine. Totowa, Humana Press Inc.: 17-17

Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T.C. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease and cancer. Pharmaceutical Reviews, 52, 4: 673-751

Muller M. 2004. Membrane fluidity. Chicago, The University of Illinois, Department of Biological Sciences:
4 str
<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lecturesf04am/lect08.htm> (1. nov. 2011)

Membranes. 2009. Arizona, The University of Arizona, Department of Chemistry and Biochemistry: 4 str.
<http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc462/462a/NOTES/LIPIDS/Membranes.html> (2. dec. 2011)

Molecular Expressions – Cell biology and microscopy structure and function of cells& viruses. 2004.
Florida, Florida State University, National High Magnetic Field Laboratory: 1 str.
<http://micro.magnet.fsu.edu/cells/plasmamembrane/plasmamembrane.html> (23. nov. 2011)

Movileano L., Neagoe I., Flonta M.L. 2000. Interaction of the antioxidant flavonoid quercetin with planar lipid bilayers. International Journal of Pharmaceutics, 205, 1-2: 135-146

Mravljak M. 2010. EPR spektroskopija. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo: 10 str.
http://wwwffa.unilj.si/fileadmin/datoteke/FK/Gradiva_FK/2010/Predavanja/IFA/EPR_spektroskopija_3.pdf
(2. dec. 2011)

Nakayama T., Kajiya K., Kumazawa S. 2006. Interaction of plant polyphenols with liposomes. V: Advances in planar lipid bilayers and liposomes. Liu L. A. (ed.). London, Elsevier: 107-130

Nelson D.L., Cox M.M. 2000. Lehninger principles of biochemistry. 3rd ed. New York, Worth Publishers, Inc.: 240-267

Nicolini C., Kraineva J., Khurana M., Periasamy N., Funari S.S., Winter R. 2006. Temperature and pressure effects on structural and conformational properties of POPC/SM/cholesterol model raft mixtures-a FT-IR, SAXS, DSC, PPC and Laurdan fluorescence spectroscopy study. Biochimica et Biophysica Acta, 1758, 2: 248–258

Ota A. 2009. Vpliv ferulne, kavne in p-kumarne kisline ter njihovih stirenov na modelne membrane. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11-12

Pajk S. 2011. Vplivi nekaterih produktov oksidacije holesterola na strukturiranost modelnih membran. Doktorska disertacija. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo: 21-28

- Pawlikowska-Pawlega B., Gruszecki W.I., Misiak L.E., Gawro A. 2002. The study of the quercetin action on human erythrocyte membranes. *Biochemical Pharmacology*, 66, 4: 605–612
- Pawlikowska-Pawlega B., Gruszecki W.I., Misiak I., Paduch R., Piersiak T., Zarzyka B., Pawelec J., Gawron A. 2006. Modification of membranes by quercetin, a naturally occurring flavonoid, via its incorporation in the polar head group. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1768, 9: 2195-2204
- Pinheiro M., Lucio M., Lima J., Reis S. 2011. Liposomes as drug delivery systems for the treatment of TB: Liposome-based drug delivery therapy. *Nanomedicine*, 6, 8: 1413-1428
http://www.medscape.com/viewarticle/752329_4 (07. dec. 2011)
- Poklar Ulrich. N., Ota A., Šentjurc M., Kure S., Abram V. 2010. Flavonoids and cell membrane fluidity. *Food Chemistry*, 121, 1: 78-84
- Rice-Evans C.A., Packer L. 2003. Flavonoids in health and disease. 2nd ed. New York, Marcel Dekker: 37-63
- Roger R., New C. 1990. Liposomes: a practical approach. Oxford, IRL Press: 5-20
- Shahidi F., Ho C-T. 1999. Phytochemicals and phytopharmaceuticals. California, AOCS Press: 349-359
- Shibamoto T., Bjeldanes L.F. 2009. Introduction to food technology. 2nd ed. London, Elsevier Inc: 244-244
- Simán C.M., Eriksson U.J. 1996. Effect of butylated hydroxytoluene on α -tocopherol. *Toxicology Letters*, 87, 2-3: 103-108
- Simons K., Ehehalt R. 2002. Cholesterol, lipid rafts and disease. *Journal of Clinical Investigation*, 110, 5: 597-603
- Subczynski W.K., Widomska J., Feix J.B. 2009. Physical properties of lipid bilayers from EPR spin labelling and their influence on chemical reactions in a membrane environment. *Free Radical Biology & Medicine*, 46, 6: 707-718
- Suzuki T., Hara H. 2010. Role of flavonoids in intestinal tight junction regulation. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 22, 5: 401-408
- Sun Y., Hung W.C., Chen F.Y., Lee C.C., Huang H.W. 2009. Interaction of tea catechin (-)-epigallocatechin gallate with lipid bilayers. *Biophysical Journal*, 96: 1026–103
- Šentjurc M., Štalc A. 1976. Uporaba paramagnetne rezonance v biologiji in medicini. Medicinski razgledi, 15: 259-279
- Šentjurc M., Štrancar J., Koklič T. 2002. Membrane domain alteration under the action of biologically active substances: an EPR study. *Current Topics in Biophysics*, 26, 1: 65-73

- Štrancar J. 2000. EPR spektroskopija površinske plasti celičnih membrane. Doktorska disertacija. Ljubljana, Fakulteta za matematiko in fiziko: 11-12
- Štrancar J. 2004. EPR characterization of biosystem. Ljubljana, Inštitut Jozef Stefan: 12-12
- Tsuchiya H. 1999. Effects of green tea catechins on membrane fluidity. *Pharmacology*, 59, 1: 34-44
- Tsuchiya H. 2001. Stereospecificity in membrane effects of catechins. *Chemico-Biological Interactions*, 134, 1: 41-54
- Tsuchiya H. 2010. Structure-dependent membrane interaction of flavonoids associated with their bioactivity. *Food Chemistry*, 120, 4: 1089–1096
- van Meer G., Voelker D. R., Feigenson G. W. 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9: 112-124
- Vermerris W., Nicholson R. 2008. Phenolics compound biochemistry. Gainesville, Springer Science+Business media: 1-10
- Walton M. C. 2006. Berry fruit anthocyanins in human nutrition-bioavailability and antioxidant effect. Thesis. Massey, Nutritional Science: 8 str.
http://mro.massey.ac.nz/bitstream/handle/10179/1583/02_whole.pdf?sequence=1
(15. dec. 2011)
- Walz D., Teissié J., Milazzo G. 2004. Bioelectrochemistry of membranes. Basel, Springer Science+Business Media: 61-65
- Wojtowicz K., Pawlikowska-Pawlega B., Gawro A., Misiak L.E., Gruszecki W.I. 1996. Modifying effect of Quercetin on the lipid membrane. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 34, 1: 49-50. Cit po: Pawlikowska-Pawlega B., Gruszecki W.I., Misiak L.E., Gawro A. 2002. The study of the quercetin action on human erythrocyte membranes. *Biochemical Pharmacology*, 66, 4: 605–612
- Xi J., Guo R. 2006. Interactions between flavonoids and hemoglobin in lecithin liposomes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 40, 4: 305–311
- Zhao L., Feng S., Kogherginsky N., Kostetski I. 2007. DSC and EPR investigations on effects of cholesterol component on molecular interactions between paclitaxel and phospholipid within lipid bilayer membrane. *International Journal of Pharmaceutics*, 338, 1-2: 258-266
- Živec K., Ziherl K. 2006. Fluidnost eritrocitnih membran pri rakavih bolnikih – študija z elektronsko paramagnetno resonanco. *Medicinski Razgledi*, 45: 3-19