

Wpływ witaminy E i koenzymu Q10 na proliferację i morfologię komórek wątrobowych u prosiąt

IWONA OTROCKA-DOMAGAŁA, TADEUSZ ROTKIEWICZ, ANNA MIKOŁAJCZYK, BEATA KASPEROWICZ, JOANNA KARPIŃSKA*, AGNIESZKA PURZYŃSKA-PUGACEWICZ*

Katedra Anatomii Patologicznej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM, ul. Oczapowskiego 13, 10-719 Olsztyn
*Zakład Chemii Ogólnej i Nieorganicznej Wydziału Biologiczno-Chemicznego Uniwersytetu w Białymstoku, ul. Hurtowa 1, 15-399 Białystok

Otrocka-Domagala I., Rotkiewicz T., Mikołajczyk A., Kasperowicz B., Karpińska J., Purzyńska-Pugacewicz A.

Influence of vitamin E and coenzyme Q10 on the proliferation and morphological pattern of hepatocytes in piglets

Summary

The aim of the study was to investigate the influence of coenzyme Q10 and vitamin E on the morphological pattern and proliferation of the liver cells in piglets. The study was conducted on 40 piglets at the age of 10 weeks. Group I (control) – did not receive any substances, gr. II – received CoQ10 (120mg/animal/day) orally, gr. III – CoQ10 and vitamin E (0.15g/animal/day) intramuscularly, gr. IV- only vitamin E. CoQ10 and vitamin E supplementation was followed by 13 days of study. The levels of both substances in the plasma were determined by HPLC. The piglets were slaughtered on the 14th day of the experiment. The assessment of the liver morphological pattern was conducted using histopathological methods; PCNA expression in hepatocytes was examined by means of immunohistochemistry; SDH and LDH activity by histochemistry. The results indicate that CoQ10 supplementation does not influence the morphological pattern of the hepatocytes, nonetheless administration of both vitamin E and CoQ10 or vitamin E alone has a beneficial effect on hepatocytes and hepatic lobule morphology. Coenzyme Q10 markedly increased the proliferation of hepatocytes, but there were fewer PCNA-positive cells in the groups which received both CoQ10 and vitamin E. In contrast, vitamin E treatment reduced hepatocyte proliferation activity.

Keywords: vitamin E, coenzyme Q10, proliferation, hepatocytes, piglets

α -Tokoferol jest najbardziej aktywną biologicznie formą witaminy E. Jego zasadniczą funkcją jest ochrona wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, lipoprotein i fosfolipidów błon komórkowych przed peroksydacją. Niedobór tej witaminy u świń jest często spotykany i powoduje między innymi uszkodzenie mięśni szkieletowych, mięśnia sercowego, wątroby oraz innych narządów. W procesie uszkodzania komórek bardzo duże znaczenie mają wolne rodniki (10, 24). Przy ich usuwaniu witamina E ulega utlenieniu z wytworzeniem rodnika α -tokoferoksyłowego, który może być zredukowany przez koenzym Q10, kwas askorbinowy, glutation i inne substancje (4, 19, 27, 31). Ponadto α -tokoferol obniża mitochondrialną konsumpcję tlenu i działa jako substancja pomocnicza w eliminowaniu $O_2^{\cdot -}$ (anionorodnika nadtlenkowego) (23). Dzięki obecności grup hydroksylowych i metylowych, α -tokoferol może łączyć się z wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi, co wpływa na stabilizację błon plazmatycznych (28). Pełni również rolę inhibitora 5-lipoksygenazy odpowiedzialnej za powstawanie prozapalnych cytokin i interleukiny- 1β , modyfikuje ak-

tywność fosfolipazy A2 i cyklooksygenazy, ma więc wpływ na procesy degradacji i resyntezy glicerolofosfolipidów oraz na procesy syntezy prostaglandyn (3, 5, 9, 25, 33). Stwierdzono, że α -tokoferol w stężeniu fizjologicznym ma zdolność hamowania proliferacji komórek mięśni gładkich naczyń, a w stężeniach wyższych działa podobnie na komórki nerwiaka niedojrzałego i fibroblasty. Zjawisko to jest wynikiem hamowania aktywności cytozolicznej kinazy białek C (2, 6, 29). Factor i wsp. (12) zaobserwowali natomiast, że suplementacja witaminy E hamuje proliferację hepatocytów i jednocześnie przyczynia się do wzrostu stabilności DNA w wątrobie, co wpływa na obraz morfologiczny komórek wątrobowych. W stanach niedoboru witaminy E ma miejsce nadprodukcja reaktywnych cząsteczek tlenu, co w konsekwencji doprowadza do uszkodzenia błon plazmatycznych, uwalniania wielu enzymów litycznych, uszkodzenia genomu i nasilenia autolizy komórek (12, 24, 26).

Koenzym Q10 (ubichinon, ubidekarenon) jest głównym homologiem koenzymu Q w organizmie ssaków (11, 23). Najlepiej poznaną funkcją koenzymu Q10 jest

jego udział w transporcie elektronów w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym (18, 21). Forma zredukowana – ubiquinon, działa jako lipofilny antyoksydant, zapobiegając powstawaniu i szerzeniu się wolnych rodników, peroksydacji lipidów błon plazmatycznych oraz oksydacji białek i DNA (13, 14, 21, 30). Stabilizuje błony komórkowe, co czyni je bardziej odpornymi na działanie proteaz oraz zapobiega wypływowi z komórki różnych substancji (np. H_2O , Mg^{++} , K^+) (15). Ubichinon chroni także błony komórkowe przed działaniem fosfolipazy A i katepsyn w przebiegu procesów autolitycznych (1, 16, 20). Koenzym Q10 ma również zdolność regeneracji witaminy E. Niektórzy badacze uważają, że właśnie ochrona α -tokoferolu jest główną funkcją ubiquinonu, podczas gdy α -tokoferol jest najważniejszym i najsilniejszym błonowym antyoksydantem (19, 22, 31). Koenzym Q10 bierze także udział w aktywacji sygnałowych kinaz białkowych wpływających na proliferację komórkową (7, 8, 32).

Wątroba jest narządem, w którym ma miejsce synteza oraz włączenie egzogenego CoQ10 do endogennej puli koenzymu Q (CoQ10 i CoQ9) (21). Ponieważ CoQ i α -tokoferol są transportowane we krwi przez lipoproteiny, ich poziom w surowicy jest także zależny od sprawności przebiegu syntezy lipoprotein w wątrobie (3, 34).

Mając na uwadze wzajemne zależności pomiędzy witaminą E i koenzymem Q10, postanowiono prześledzić wpływ suplementacji tych substancji na obraz morfologiczny i proliferację komórek wątrobowych u prosiąt.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 40 loszkach rasy wbp w wieku 10 tygodni o średniej masie ciała 20 kg. Zwierzęta żywiono mieszanką pełnoporcjową grower-gran. w ilości 1,5 kg/dziennie/na prosię, przy stałym dostępie do wody. Zwierzęta utrzymywano w dobrych warunkach zoohigienicznych. Podzielono je na cztery grupy. Grupa I – kontrolna liczyła 9 prosiąt. Grupa II – 13 prosiąt, którym podawano *per os* CoQ10 – VITA CARE produkcji JEMO-PHARM-A/S DANIA w jednej dawce po 120 mg dziennie w postaci kapsułek, bezpośrednio po posiłku przez 13 kolejnych dni. Grupa III – 14 prosiąt, którym podawano CoQ10, w dawkach jak w grupie II oraz drogą iniekcji domięśniowej Vitaminum E (*Tocopherolum aceticum*), produkcji Polfa-Warszawa po 0,15 g dziennie na sztukę przez 13 kolejnych dni. Grupa IV – 14 prosiąt, którym podawano witaminę E, drogą iniekcji domięśniowej – podobnie jak w grupie III. Od wszystkich zwierząt pobierano krew do analizy chromatograficznej w 1. i 14. dniu doświadczenia. Zwierzęta poddano eutanazji w 14. dniu doświadczenia. Bezpośrednio po uśmierceniu pobierano wycinki wątroby. Wycinki przeznaczone do badania histopatologicznego i immunohistochemicznego utrwalano w zobojętnionej 10% formalinie, a następnie zatapiało w bloczki parafinowe, z których sporządzano skrawki mikrotomowe. Wycinki przeznaczone do badania histochemicznego zamrażano w płynnym azocie, a następnie sporządzano skrawki kriostatowe.

Skrawki parafinowe barwiono HE, PAS wg McManusa oraz immunohistochemicznie wybarwiano PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen). W skrawkach kriostatowych oznaczano aktywność dehydrogenazy bursztynianowej SDH i mleczanowej LDH wg met. Nachlusa. Ocenę aktywności dehydrogenaz oraz występowania glikogenu w hepatocytach strefy centralnej, środkowej i obwodowej zrazików wątrobowych przeprowadzano przy użyciu zestawu do komputerowej analizy obrazu, w skład którego wchodziły: kamera Panasonic CCD, mikroskop świetlny Motic, karta akwizycji obrazu z zastosowaniem programu komputerowego LUCIA 3,52. Analizę statystyczną uzyskanych wyników dokonano metodą analizy wariancji (test F) dla doświadczeń jedno- i dwuczynnikowych, a istotność różnic określono w oparciu o test q SNK (Studenta-Newmana-Keulsa).

Do oznaczenia obecności w jądrach antygeny PCNA wykorzystano przeciwciała monoklonalne, mysie, anti-PCNA (DAKO) należące do klonu PC-10 (IgG2 kappa), w rozcieńczeniu 1 : 150. W barwieniu zastosowano uniwersalny zestaw firmy DAKO-ARK™ (Animal Research Kit), Peroxidase, przeznaczony do barwienia immunohistochemicznego skrawków parafinowych przy użyciu mysich pierwotnych przeciwciał. Technika barwienia oparto o metodę immunoperoksydazową z wykorzystaniem kompleksu streptawidyna-biotyna-peroksydaza, eliminującą możliwość wystąpienia reakcji niespecyficznych. Po odparafinowaniu i nawodnieniu, preparaty przeznaczone do oznaczania PCNA, umieszczono w buforze cytrynianowym o pH 6,0, następnie gotowano w kuchence mikrofalowej dwa razy po 5 minut, przy mocy 650 W, celem odsłonięcia antygenów. W celu inaktywacji endogennej peroksydazy, preparaty przez 5 minut inkubowano w obecności zawartego w zestawie blokera peroksydazy. Przed przystąpieniem do dalszego barwienia mieszano oddzielnie przeciwciała anti-PCNA z biotynylowaną anti-mysią immunoglobuliną (wtórne przeciwciała) w odpowiednich stosunkach wyliczonych wg wzorów. W ten sposób uzyskano wiązanie biotynylowanego wtórnego przeciwciała z pierwotnym przeciwciałem. Do tych kompleksów dodawano normalną mysią surowicę – Blokując Reagent, która wiązała pozostałą niezwiązaną w poprzednich reakcjach biotynylowaną anti-mysią immunoglobulinę, zmniejszając w ten sposób możliwość wystąpienia interakcji z endogenną immunoglobuliną zawartą w tkance. Uzyskane w ten sposób biotynylowane pierwotne przeciwciała, nakładano na preparaty i inkubowano przez 15 ± 5 minut. W dalszej kolejności nakładano na szkiełka streptawidynę znakowaną peroksydazą, a następnie użyto 3,3' diaminobenzyny (DAB) jako chromogenu, w celu uzyskania barwnego produktu reakcji. Preparaty następnie podbarwiono hematoksyliną, odwodniono i zamykano w balsamie kanadyjskim. Kontrolę negatywną wykonano z użyciem przeciwciał IgG2 kappa, natomiast kontrolę pozytywną przeprowadzono w komercyjnie przygotowanych przez firmę DAKO skrawkach. W uzyskanych preparatach, przy powiększeniu 480 \times , określano liczbę komórek intensywnie wybarwiających się chromogenu (PCNA $^{++}$), liczbę komórek wykazujących ślady obecności antygeny PCNA $^{+}$ oraz liczbę komórek nie wykazujących obecności antygeny PCNA $^{-}$. Uzyskane wyniki

analizowano statystycznie przy zastosowaniu testu NIR i programu komputerowego Statistica 6,0.

W pobranej krwi z żyły czezej przedniej do próbek z heparyną oznaczano poziom CoQ10 i α -tokoferolu w osoczu metodą HPLC (High-Performance Liquid Chromatographic Method). Próbkę krwi z grupy I posłużyły do wykonania matrycy do oznaczania koenzymu Q10 i α -tokoferolu. Do wykonania roztworu wzorcowego CoQ10 użyto Coenzymu Q10 Sigma-Aldrich, natomiast jako wzorca do oznaczania witaminy E użyto α -tokoferolu Sigma-Aldrich. Jako rozpuszczalnika użyto n-heksanu Sigma-Aldrich. Do 0,5 ml osocza zwierząt dodawano 0,5 ml metanolu i 2,5 ml n-heksanu. Następnie mieszano przez 1 minutę i dwukrotnie wirowano w temp. 4°C, przez 5 minut przy obrotach 3000/min⁻¹. Po odwirowaniu ściągano pipetą warstwę heksanową do oddzielnej próbki, a do pierwszej ponownie dodawano 2,5 ml n-heksanu i ponownie mieszano i wirowano w takich samych warunkach. Uzyskane n-heksanowe ekstrakty łącznie i odparowywano do sucha w atmosferze azotu. Tak otrzymane ekstrakty, po rozpuszczeniu w 0,5 ml n-heksanu, analizowano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Zastosowana metoda przygotowania próbki pozwala na uzyskanie średniego odzysku α -tokoferolu z próbki osocza wynoszącego 83,60%, zaś dla koenzymu Q10 – 83,43%.

Analizę chromatograficzną przeprowadzono używając zestawu do wysokosprawnej chromatografii cieczowej firmy Thermo Separation Product, składającego się z: niskogradentowej dwukanałowej pompy Spectra System P 2000, degazera próżniowego SCM 1000, detektora UV Spectra System UV 3000 oraz kolumny Hilbar (TM) 250-4 LiChrosorb (TM) RP-18 (5 μ m), produkcji Merck – Niemcy. Zastosowano fazę ruchomą składającą się z 80% metanolu i 20% n-heksanu przy szybkości przepływu 1 ml/min. Pomiar przeprowadzono przy $\lambda = 280$ nm. Stosując opisane powyżej warunki analizy czas retencji α -tokoferolu wynosił: 3,948 \pm 0,085 min., zaś czas retencji koenzymu Q10 był równy: 11,817 \pm 0,172 min.

Oznaczeń dokonano stosując metodę standardu zewnętrznego (metoda krzywej wzorcowej). Zarejestrowane w tych warunkach krzywe wzorcowe były liniowe w zakresie: 0,1-134,4 μ g/ml dla α -tokoferolu i w zakresie 0,1-70 μ g/ml dla koenzymu Q10. Równania krzywych wzorcowych, z których wyliczono stężenia analitów w badanych próbkach miały następującą postać:

$$y = 0,0006x + 0,7988r^2 = 0,9933 \text{ dla } \alpha\text{-tokoferolu (gdzie:}$$

x – powierzchnia pod pikiem, y – stężenie)

$$y = 0,00004x + 0,863r^2 = 0,992 \text{ dla koenzymu Q10 (gdzie:}$$

x – powierzchnia pod pikiem, y – stężenie).

Uzyskane wyniki poziomów α -tokoferolu i koenzymu Q10 wyrażono w μ g/ml krwi i analizowano statystycznie stosując dwuczynnikową analizę wariancji, określając średnią, odchylenie standardowe i istotność różnic ($p \leq 0,05$ oraz $p \leq 0,01$).

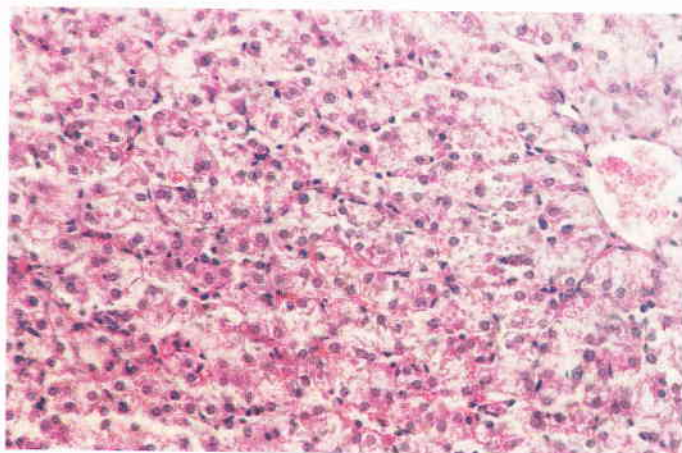
Tab. 1. Zmiany histopatologiczne stwierdzone w wątrobie badanych zwierząt

Zmiany histopatologiczne	Grupa zwierząt			
	I – kontrolna n = 9	II – CoQ10 n = 13	III – CoQ10 + Vit. E, n = 14	IV – Vit. E n = 14
Przekrwienie zrazików	3	5	7	6
Zwyrodnienie miąższowe hepatocytów w strefie centralnej zrazików	6	8	5	5
Zwyrodnienie wodniczkowe hepatocytów	5	4	5	3
Ogniskowe nacieki komórek limfoidalnych	1	–	–	–
Obecność pseudozrazików	2	–	–	1
Rozplem tkanki łącznej międzyzrazikowej	1	1	–	1
Ogniska martwicy skrzepowej hepatocytów	1	–	–	–

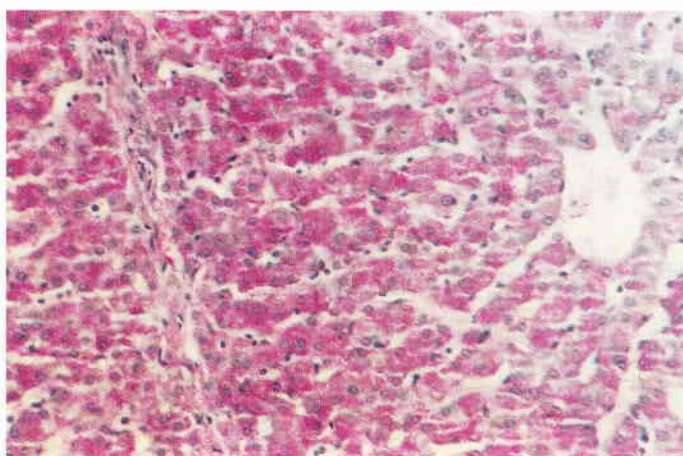
Wyniki i omówienie

Badaniem mikroskopowym stwierdzono w wątrobie obecność różnych zmian morfologicznych, które przedstawia tab. 1. Badaniem tym stwierdzono więcej zmian morfologicznych w wątrobie prosiąt kontrolnych (ryc. 1), u których poziom koenzymu Q10 i witaminy E w osoczu był najniższy. Suplementacja koenzymu Q10 nie przyczyniła się do likwidacji uszkodzeń morfologicznych, natomiast podawanie witaminy E łącznie z koenzymem Q10 lub osobno wpływało korzystnie na morfologię komórek i zrazików wątrobowych. Uzyskane wyniki są zgodne z badaniami innych autorów (12), którzy również obserwowali poprawę obrazu histopatologicznego wątroby przy suplementacji witaminy E, i świadczą o bardzo ważnej, ochronnej roli tej witaminy przed uszkodzeniem komórek wątrobowych.

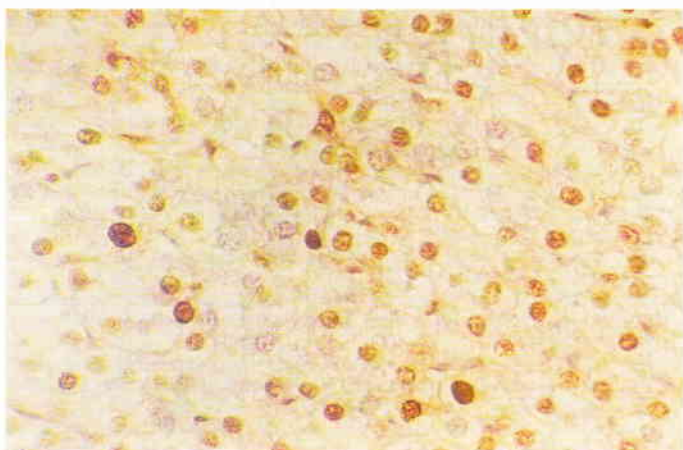
U prosiąt z grupy kontrolnej, aktywność dehydrogenazy SDH i LDH lokalizowała się głównie w komórkach leżących w strefie środkowej i obwodowej zrazików wątrobowych. U zwierząt otrzymujących koenzym Q10, witaminę E oddzielnie lub razem z CoQ10 stwierdzono większą aktywność tych enzymów w strefie centralnej w porównaniu z grupą kontrolną i różnice te były



Ryc. 1. Zwyrodnienie miąższowe i wodniczkowe komórek wątrobowych u prosięcia z grupy I. Barw. HE, pow. 240 \times



Ryc. 2. Duża zawartość glikogenu w komórkach wątrobowych u świni z grupy IV. Barwienie PAS wg McManusa, pow. 240×



Ryc. 3. Obecność komórek wątrobowych PCNA++, PCNA+ i PCNA- u świni z grupy II, wykazujących wysoką aktywność proliferacyjną. Barwienie immunohistochemiczne PCNA, pow. 480×

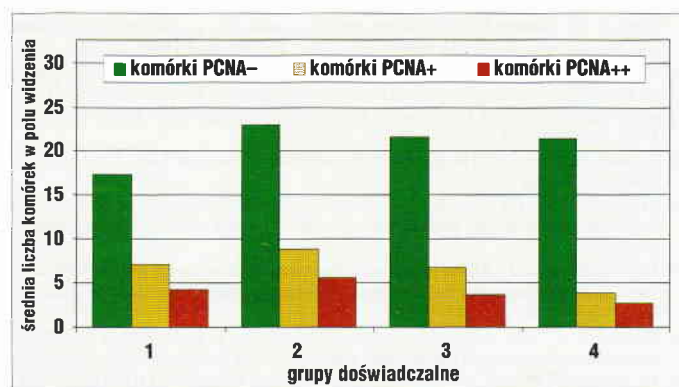
statystycznie istotne ($p < 0,05$), natomiast w strefie środkowej i obwodowej aktywność dehydrogenaz była bardzo wysoka. Zwiększona aktywność tych enzymów wskazuje na lepszą funkcję mitochondriów w procesach oddechowych komórek i wytwarzaniu ATP. Wyższy poziom energetyczny komórek może być wykorzystany w procesie proliferacji i produkcji substancji białkowych hepatocytów.

Komórki wątrobowe gromadziły różną ilość glikogenu, mniej ziarnistości stwierdzano w komórkach strefy centralnej zrazików, więcej – w środkowej i obwodowej. Ilość glikogenu w komórkach wątrobowych zależy od jakości i ilości pobieranego pokarmu oraz od toczących się procesów katabolicznych. W prawidłowych hepatocytach występują liczne ziarnistości glikogenu. Analizując uzyskane preparaty z wątrób stwierdzono większe ilości glikogenu w hepatocytach u świń otrzymujących koenzym Q10 i witaminę E (ryc. 2), a różnice te w porównaniu z grupą kontrolną były statystycznie istotne ($p < 0,05$). Większa zawartość glikogenu predysponowała komórki wątrobowe do lepszych procesów przemiany materii i energii.

Ekspresję antygenu PCNA obserwowano w części komórek wątrobowych w postaci obfitych złogów barw-

nika, co świadczy, że komórki te były w trakcie cyklu komórkowego i ulegały podziałowi. Obecność dużej liczby takich komórek świadczy o dużej aktywności proliferacyjnej. W części komórek wątrobowych reakcja na obecność PCNA była słaba, w postaci śladowych złogów brązowego barwnika. Komórki te można uważać za nowo powstałe, w których białko PCNA uległo już częściowej degradacji, lub za komórki wchodzące w cykl komórkowy, w których ilość tego białka będzie wzrastać. Część komórek nie wykazywała nawet śladowych ilości białka PCNA, można je uważać za komórki w fazie międzypodziałowej. Analiza uzyskanych preparatów wskazuje, że istnieje stały poziom proliferacyjny komórek wątrobowych, niezbędny do wyrównania uszkodzonych i zużytych komórek. Podawanie koenzymu Q10 przyczyniło się do wzrostu liczby komórek będących w trakcie podziału (ryc. 3), a różnice te były statystycznie istotne ($p < 0,05$). Nieznacznie mniejszą aktywność proliferacyjną komórek wątrobowych stwierdzono przy podawaniu łącznym koenzymu Q10 i witaminy E, jednak była ona większa niż w grupie kontrolnej, a różnice te były również statystycznie istotne. Podawanie witaminy E przyczyniło się do zmniejszenia proliferacji komórek wątrobowych, była ona mniejsza niż w grupie kontrolnej, jednakże różnice te nie były statystycznie istotne. Średnią aktywność proliferacyjną w grupach przedstawiono na ryc. 4.

Badając poziom witaminy E i koenzymu Q10 w osoczu stwierdzono ich wzrost u zwierząt po suplementacji, przy czym największy, statystycznie istotny ($p < 0,01$) w grupie III, w stosunku do pozostałych grup, co przedstawiono w tab. 2. Okazuje się, że istnieją pewne zależności pomiędzy suplementacją CoQ10 i α -tokoferolu a stężeniem, wychwytem i retencją tych substancji we krwi i narządach. Lass i wsp. (21), jak również Lass i Sohal (23) zaobserwowali, że suplementacja koenzymu Q10 powoduje wzrost poziomu α -tokoferolu w mitochondriach wątroby, mięśnia sercowego, mięśni szkieletowych i nerek. Na tej podstawie stwierdzili, że zjawisko to jest wynikiem wpływu CoQ na regenerację mitochondrialnego α -tokoferolu oraz/lub ma miejsce zjawisko sprzężonego mitochondrialnego wychwytu obu tych substancji. Zauważono również, że wzrost α -tokoferolu w diecie podnosi koncentrację endogenego koenzymu Q w wątrobie, śledzionie i osoczu, co



Ryc. 4. Aktywność proliferacyjna komórek wątrobowych w poszczególnych grupach zwierząt

można tłumaczyć wzrostem syntezy lub obniżeniem rozpadu tego związku (17, 35), ponadto wzrasta zdolność wychwytu egzogenego CoQ do plazmy i komórek wątrobowych (35). Uzyskane wyniki własne badania poziomu koenzymu Q10 w osoczu przy suplementacji witaminy E potwierdzają wyniki uzyskane przez innych autorów, jednocześnie sugerują, że podawanie CoQ nie wpływa w sposób statystycznie istotny na wzrost poziomu witaminy E w plazmie. Celem potwierdzenia tych wyników niezbędne są dalsze badania.

Przeprowadzone badania wskazują, że suplementacja koenzymu Q10 nie wpływa w sposób istotny na obraz morfologiczny komórek wątrobowych. Natomiast witamina E podawana łącznie z koenzymem Q10 lub osobno, ma korzystny wpływ na morfologię komórek i zrazików wątrobowych, pobudza komórki do większego gromadzenia glikogenu i wzrostu aktywności mitochondrialnych enzymów oddechowych. Podawanie CoQ10 zwiększa aktywność proliferacyjną komórek wątrobowych, która była nieznacznie niższa w przypadku zwierząt otrzymujących jednocześnie witaminę E. Natomiast suplementacja samej witaminy E zmniejsza liczbę komórek wątrobowych będących w trakcie podziału.

Reasumując, należy stwierdzić, że mimo różnych efektów działania witaminy E i koenzymu Q10, są one niezbędne, wzajemnie się uzupełniają w regulacji wielu procesów życiowych komórek.

Piśmiennictwo

1. Atar D., Mortensen S. A., Flachs H., Herzog W. R.: Coenzyme Q10 protects ischemic myocardium in an open-chest swine model. *Clin Investig.* 1993, 71 (Suppl), 103-111.
2. Boscoboinik D., Szweczyk A., Hensey C., Azzi A.: Inhibition of cell proliferation by α -tokoferol. Role of protein kinaze C. *J. Biol. Chem.* 1991, 266, 6188-6194.
3. Brigelius-Flohe R., Traber M. G.: Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J.* 1999, 13, 1145-1155.
4. Chan A. C., Tran K., Raynor T., Ganz P. R., Chow C. K.: Regeneration of vitamin E in human platelets. *J. Biol. Chem.* 1991, 266, 17290-17295.
5. Chan A. C., Wagner M., Kenned C., Mroske C., Proulx P., Lanciville O., Tran K., Choy P. C.: Vitamin E up-regulates phospholipase A2, arachidonic acid release and cyclooxygenase in endothelial cells. *Akt. Ernähr.-Med.* 1998, 23, 1-8.
6. Clement S., Tassinato A., Boscoboinik D., Azzi A.: The effect of alpha-tocopherol on the synthesis, phosphorylation and activity of protein kinase C in smooth muscle cells after phorbol 12-myristate 13-acetate down-regulation. *Eur. J. Biochem.* 1997, 246, 745-749.
7. Crane F. L., Navas P.: The diversity of coenzyme Q function. *Mol. Aspects. Med.* 1997, 18 (Suppl), S1-S6.
8. Crane F. L., Sun I. L., Crowe R. A., Alcain F. J., Low H.: Coenzyme Q10, plasma membrane oxidase and growth control. *Mol. Aspects. Med.* 1994, 15(Suppl), S1-S11.
9. Devaraj S., Jialal I.: Alpha-tocopherol decreases interleukin-1 β release from activated human monocytes by inhibition of 5-lipoxygenase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999, 19, 1125-1133.
10. Diplock A. T.: The modulating influence of vitamin E in biological membrane unsaturated phospholipid metabolism. *Acta Vitaminol. Enzymol.* 1982, 4, 303-309.
11. Drzewoski J., Stepień M.: Farmakologia kliniczna koenzymu Q10. *Przegl. Lek.* 1988, 45, 680-683.
12. Factor V. M., Laskowska D., Jensen M. R., Weitach J. T., Popescu N. C., Thorgerisson S. S.: Vitamin E reduces chromosomal damage and inhibits hepatic tumor

Tab. 2. Średni poziom α -tokoferolu i CoQ10 w osoczu badanych zwierząt

Poziom	Grupa zwierząt			
	I – kontrolna n = 9	II – CoQ10 n = 13	III – CoQ10 + Vit. E n = 14	IV – Vit. E n = 14
α -tokoferolu w osoczu na początku doświadczenia (przed suplementacją)	6,89 \pm 1,32	7,96 \pm 1,75	7,45 \pm 0,27	7,67 \pm 2,62
α -tokoferolu w osoczu po zakończeniu doświadczenia	7,66 \pm 2,92	9,82 \pm 3,11	11,55 \pm 2,13**	10,72 \pm 2,16
CoQ10 w osoczu na początku doświadczenia (przed suplementacją)	1,14 \pm 0,17	1,08 \pm 0,09	1,04 \pm 0,05	1,14 \pm 0,19
CoQ10 w osoczu po zakończeniu doświadczenia	1,16 \pm 0,33	1,25 \pm 0,24**	1,24 \pm 0,13*	1,17 \pm 0,18

Objaśnienia: * istotność przy $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$

formation in a transgenic mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, 97, 2196-2201.

13. Forsmark-Andree P., Ernster L.: Evidence for a protective effect of endogenous ubiquinol against oxidative damage to mitochondrial protein and DNA during lipid peroxidation. *Mol. Aspects. Med.* 1994, 15(Suppl), 73-81.
14. Frei B., Kim M. C., Ames B. N.: Ubiquinol-10 is effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990, 87, 4879-4883.
15. Greenberg S., Frishman W. H.: Coenzyme Q10: a new drug for cardiovascular disease. *J. Clin. Pharmacol.* 1990, 30, 596-608.
16. Hano O., Thomson-Gorman S. L., Zweier J. L., Lakkata E. G.: Coenzyme Q10 enhances cardiac functional and metabolic recovery and reduces Ca^{2+} overload during postischemic reperfusion. *Am. J. Physiol.* 1994, 35, H2174-H2181.
17. Ibrahim W. H., Bhagavan H. N., Chopra R. K., Chow C. K.: Dietary coenzyme Q10 and vitamin E alter the status of these compounds in rat tissues and mitochondria. *J. Nutr.* 2000, 130, 2343-2348.
18. Kagan T., Davis C., Lin L., Zakeri Z.: Coenzyme Q10 can in some circumstances block apoptosis, and this effect is mediated through mitochondria. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1999, 887, 31-47.
19. Kagan T., Serbinova E., Packer A.: Antioxidant effects of ubiquinones in microsomes and mitochondria are mediated by tocopherol recycling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990, 169, 851-857.
20. Koyama T., Keatissuwat W., Kinjo M., Saito H.: Suppressive effect of coenzyme Q10 on phospholipase A2 activation in cardiac cells after prolonged swimming. *Life Sci.* 1992, 51, 1113.
21. Lass A., Forster J. M., Sohal R. S.: Effect of coenzyme Q10 and α -tocopherol administration on their tissue levels in the mouse: Elevation of mitochondrial α -tocopherol by coenzyme Q10. *Free Rad. Biol. Med.* 1999, 26, 1375-1382.
22. Lass A., Sohal R. S.: Electron transport-linked ubiquinone-dependent recycling of alpha-tocopherol inhibits autooxidation of mitochondrial membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* 1998, 352, 229-36.
23. Lass A., Sohal R. S.: Effect of coenzyme Q10 and α -tocopherol content of mitochondria on the production of superoxide anion radicals. *FASEB J.* 2000, 14, 87-94.
24. Moszczyński P., Pyć R.: Biochemia witamin. Część II. Witaminy lipofilne i kwas askorbinowy. *Wyd. Nauk. PWN, Warszawa, Łódź* 1999.
25. Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W.: *Biochemia Harpera*. Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa 1998.
26. Nelson J. S.: Pathology of vitamin E deficiency. [w:] *Vitamin E-A Comprehensive Treatise* (Machlin, L. J., wyd.), Marcel-Dekker, NY 1980, 397-428.
27. Packer J. L., Slater T. F., Willson R. L.: Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature (Lond.)* 1979, 278, 737-738.
28. Phoenix J., Edwards R. H. T., Jackson M. J.: The effect of vitamin E analogues and long hydrocarbon chain compounds on calcium-induced muscle damage. A novel role for α -tocopherol? *Biochim. Biophys. Acta* 1991, 1097, 212-21.
29. Ricciarelli R., Tassinato A., Clément S., Őzer N. K., Boscoboinik D., Azzi A.: Alpha-Tocopherol specifically inactivates cellular protein kinase C alpha by changing its phosphorylation state. *Biochem. J.* 1998, 334, 243-249.
30. Stocker R., Bowry V. W., Frei B.: Ubiquinol-10 protects human low-density lipoproteins more efficiently against lipid peroxidation than does α -tocopherol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, 88, 1646-1650.
31. Stoyanovsky D. A., Osipov A. N., Quinn P. J., Kagan V. E.: Ubiquinone-dependent recycling of vitamin E radicals by superoxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 1995, 323, 343-351.
32. Sun I. L., Sun E. E., Crane F. L.: Stimulation of serum-free cell proliferation by coenzyme Q. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992, 189, 8-13.
33. Tran K., Wong J. T., Lee E., Chan A. C., Choy P. C.: Vitamin E potentiates arachidonate release and phospholipase A2 activity in rat heart myoblastic cells. *Biochem. J.* 1996, 319, 385-391.
34. Yuzuriha T., Takada M., Katayama K.: Transport of [^{14}C]coenzyme Q10 from the liver to other tissues after intravenous administration to guinea pigs. *Biochim. Biophys. Acta* 1983, 759, 286-291.
35. Zhang Y., Turunen M., Appelkvist E. L.: Restricted uptake of dietary coenzyme Q is in contrast to the unrestricted uptake of α -tocopherol into rat organs and cells. *J. Nutr.* 1996, 126, 2089-97.

Adres autora: dr Iwona Otrocka-Domagala, ul. Jarocka 72/12, 10-699 Olsztyn; e-mail: tadrot@moskit.uwm.edu.pl