

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Petra JAZBEC KRIŽMAN

**VPLIV DODANEGA CoQ₁₀
NA NJEGOVO VSEBNOST V TKIVIH PIŠČANCEV
IN ZMANJŠEVANJE OKSIDACIJSKEGA STRESA
MED REJO**

Doktorska disertacija

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Petra JAZBEC KRIŽMAN

**VPLIV DODANEGA CoQ₁₀
NA NJEGOVO VSEBNOST V TKIVIH PIŠČANCEV
IN ZMANJŠEVANJE OKSIDACIJSKEGA STRESA
MED REJO**

Doktorska disertacija

**INFLUENCE OF ADDED CoQ₁₀ ON THEIR CONTENT IN CHICKEN
TISSUES AND REDUCING OXIDATIVE STRESS DURING RAISING**

Doctoral dissertation

Ljubljana, 2011

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Biotehniške fakultete in sklepa Senata univerze z dne 04.11.2010 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za neposreden prehod na doktorski podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje doktorata s področja živilstva.

Za mentorico je bila imenovana dr. Alenka Golc Wondra, razvojno-raziskovalna svetnica.

Večina analiz je bilo opravljenih v Laboratoriju za prehrambeno kemijo, na Kemijskem Inštitutu v Ljubljani. Priprava določenih vzorcev je bila opravljena na Oddelku za živilstvo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani, biokemijske analize so bile opravljene v diagnostičnem laboratoriju Klinike za kirurgijo in male živali, Univerzitetne veterinarske klinike v Ljubljani. Reja piščancev se je izvajala v testnem hlevu za perutnino Fakultete za kmetijstvo in biositemske vede, Univerze v Mariboru, industrijski poskus s piščanci pa v prostorih Perutnine Ptuj d.d., namenjenih redni proizvodnji.

Mentorica: dr. Alenka Golc Wondra, razvojno-raziskovalna svetnica

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica:

Članica:

Članica:

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega znanstveno raziskovalnega dela.

Doktorandka:

Petra JAZBEC KRIŽMAN

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
DK UDK 637.54 + 636.085: 577.161.6 (043)=163.6
KG piščanci/krma obogatena s CoQ₁₀/CoQ₁₀/holesterol/piščančje meso/frakcionacija celic piščančjih prsi/piščančji izdelki/piščančja plazma/antioksidativna mreža
AV JAZBEC KRIŽMAN, Petra, uni.dipl.biokem.
SA WONDRA GOLC, Alenka (mentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje: živilstvo
LI 2011
IN VPLIV DODANEGA CoQ₁₀ NA NJEGOVO VSEBNOST V TKIVIH PIŠČANCEV IN ZMANJŠEVANJE OKSIDACIJSKEGA STRESA MED REJO
TD Doktorska disertacija
OP XIV, 107 str., 39 pregl., 21 sl., 2 pril., 124 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Koencim Q₁₀ (CoQ₁₀) vzbuja vse več zanimanja, zaradi pomembne vloge v oksidativni fosforilaciji in močnega antioksidativnega delovanja. Namen raziskovanja je bil proučiti vlogo v krmo dodanega CoQ₁₀ pri piščancih in pripraviti funkcionalne izdelke iz mesa z biološko vgrajenim CoQ₁₀. V poskusu smo piščance krmili z dodatkom CoQ₁₀ (5 mg/dan) različna obdobja (zadnjih 10, 20, 30 in 40 dni pred zakolom). Vsebnost CoQ₁₀ se je statistično značilno povišala v plazmi, srcu, bedrih, prsih in perutih piščanca. Vrednost CoQ₁₀ se ni spreminjala v jetrih piščancev. Dodani CoQ₁₀ je vplival na znižanje holesterola v srcih in v krvi. Frakcioniranje celic piščančjih prsi je pokazalo, da se v krmo dodani CoQ₁₀ vgrajuje predvsem v celične membrane, kjer deluje kot antioksidant. Za analizo CoQ₁₀ in holesterola v posameznih frakcijah smo uporabili HPTLC metodo in rezultate potrdili s HPLC-MS metodo. Validacijski parametri so pokazali, da je HPTLC za omenjene vzorce dovolj zanesljiva, občutljiva in uporabna analitična metoda, kljub sicer njeni nižji občutljivosti in selektivnosti. V industrijskem poskusu smo piščance krmili s CoQ₁₀ dodanim v krmo zadnjih 20 dni pred zakolom. Iz mesa obogatenga s CoQ₁₀ smo pripravili piščančje izdelke. Vpliv CoQ₁₀ na delovanje antioksidativne mreže smo proučevali v plazmi piščanca. Dokazali smo medsebojno delovanje antioksidantov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dd
DC UDC 637.54 + 636.085: 577.161.6 (043)=163.6
CX chickens/feed fortified with CoQ₁₀/CoQ₁₀/cholesterol/chicken meat/fractionation of chicken breast cells/chicken products/chicken plasma/antioxidative network
AU JAZBEC KRIŽMAN, Petra
AA WONDRA GOLC, Alenka (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical Science, Field: Food Science and Technology
PY 2011
TI INFLUENCE OF ADDED CoQ₁₀ ON THEIR CONTENT IN CHICKEN TISSUES AND REDUCING OXIDATIVE STRESS DURING RAISING
DT Doctoral Dissertation
NO XIV, 107 p., 39 tab., 21 fig., 2 ann., 124 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Interest in coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀) has increased because of its important role in oxidative phosphorylation and antioxidant function. The aim of our work was to study the effect of added CoQ₁₀ in chicken feed on chicken body and preparation from chicken meat functional products. In experiment the chicken were fed with CoQ₁₀ for different periods of time (the last 10, 20, 30 and 40 before slaughtering). The content of CoQ₁₀ increased in plasma, heart, legs, breast and wings. No changes in CoQ₁₀ concentration were observed in chicken liver. Added CoQ₁₀ decreased cholesterol concentration in heart and in plasma. Fractionation of chicken breast cells shows, that added CoQ₁₀ was mainly built into the cell membranes, where its acts as important antioxidant. Cell fractions were analysed with HPTLC and concentrations of CoQ₁₀ and cholesterol were confirmed with HPLC-MS. Validation parameters demonstrated that HPTLC is sufficiently reliable, sensitive and flexible analytical tool, despite its inherently lower sensitivity and selectivity in comparison with HPLC-MS. In the industrial experiment the chicken were fed with CoQ₁₀ added in fodder in the last 20 days before slaughtering. We prepared the functional chicken products from meat fortified with CoQ₁₀. The influence of CoQ₁₀ on antioxidative network was studied in chicken plasma.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	X
Kazalo prilog	XI
Okrajšave in simboli	XII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA IN RAZISKOVALNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI CoQ ₁₀	4
2.1.1 Zgodovina koencima Q₁₀	5
2.1.2 Biosinteza CoQ₁₀ v organizmu	5
2.1.2.1 Porazdelitev CoQ ₁₀ v tkivih	7
2.1.2.2 Porazdelitev CoQ ₁₀ v organelih	8
2.1.3 Vnos CoQ₁₀ v organizem	9
2.1.3.1 Izboljšanje topnosti CoQ ₁₀	9
2.1.3.2 Kompleks CoQ ₁₀ z β – ciklodekstrinom	9
2.1.3.3 Absorbcija in transport CoQ ₁₀	11
2.1.3.4 Vnos CoQ ₁₀ s prehrano	11
2.1.4 Vloga CoQ₁₀	12
2.2 DELOVANJE ANTIOKSIDATIVNE MREŽE	13
2.2.1 Nastanek oksidativnega stresa	13
2.2.2 Obrambni mehanizmi pred oksidativnim stresom	14
2.2.3 Metode vrednotenja oksidativnega stresa	20
2.2.3.1 Inhibitorji oksidativnega stresa	21
2.3 REJA PIŠČANCEV	23
2.3.1 Vpliv CoQ₁₀ na rejo piščancev	23

2.3.2	Piščančje meso	24
2.4	KEMIJSKE ANALIZNE TEHNIKE	24
2.4.1	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)	24
2.4.2	Masna spektrometrija	25
2.4.2.1	Ionizacija z elektrorazprševanjem.....	25
2.4.2.2	Kemijska ionizacija pri atmosferskem tlaku	25
2.4.3	Planarna tekočinska kromatografija (TLC)	25
2.4.4	Validacija	26
2.4.4.1	Validacija analiznih metod.....	26
3	MATERIAL IN METODE	28
3.1	VPLIV DODANEGA CoQ₁₀ NA NJEGOVO KOPIČENJE V TKIVIH PIŠČANCEV	28
3.1.1	Način reje piščancev	28
3.1.1.1	Priprava krme	29
3.1.1.2	Priprava kompleksa CoQ ₁₀ -βCD.....	31
3.1.2	Kemikalije in priprava standardov	31
3.1.2.1	Kemikalije.....	31
3.1.2.2	Priprava raztopin standardov.....	31
3.1.3	Analizne metode	31
3.1.3.1	Analiza CoQ ₁₀ in holesterola v piščančjih tkivih in plazmi	31
3.1.3.2	Analiza CoQ ₁₀ in holesterola v frakcioniranih piščančjih prsih.....	33
3.2	INDUSTRIJSKA PRIDELAVA PIŠČANČJIH IZDELKOV S POVEČANO VSEBNOSTJO CoQ₁₀	35
3.2.1	Način reje piščancev	35
3.2.2	Odvzem in priprava vzorcev	36
3.2.3	Priprava vzorcev za analizo	36
3.3	VPLIV CoQ₁₀ NA DELOVANJE ANTIOKSIDATIVNE MREŽE	37
3.3.1	Način reje piščancev	37
3.3.2	Priprava nove oblike CoQ₁₀ z dekstrinom	37
3.3.3	Kemikalije in raztopine standardov	38
3.3.4	Analizne metode	38
3.3.4.1	Analiza CoQ ₁₀	38

3.3.4.2	Analiza α -tokoferola.....	39
3.3.4.3	Analiza lipojske kisline	39
3.3.4.4	Določanje aktivnosti glutation peroksidaze (GPx)	39
3.3.4.5	Določanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)	40
3.3.4.6	Določanje celokupne antioksidativne kapacitete (TAC).....	40
3.4	STATISTIČNA ANALIZA	40
4	REZULTATI	42
4.1	VPLIV DODANEGA CoQ ₁₀ V KRMO NA NJEGOVO KOPIČENJE V TKIVIH PIŠČANCEV	42
4.1.1	Reja piščancev	42
4.1.1.1	Merjenje telesnih mas piščancev.....	42
4.1.1.2	Prirast mase piščancev	44
4.1.1.3	Konverzija krme.....	44
4.1.2	Vpliv dodanega CoQ₁₀ v krmo na vsebnost CoQ₁₀ in holesterola v analiziranih vzorcih	45
4.1.2.1	Vpliv dodanega CoQ ₁₀ na vsebnost CoQ ₁₀ in holesterola v jetrih	45
4.1.2.2	Vpliv dodanega CoQ ₁₀ na vsebnost CoQ ₁₀ in holesterola v plazmi.....	47
4.1.2.3	Vpliv dodanega CoQ ₁₀ na vsebnost CoQ ₁₀ in holesterola v srcu.....	48
4.1.2.4	Vpliv dodanega CoQ ₁₀ na vsebnost CoQ ₁₀ in holesterola v prsih, bedrih in perutih	50
4.1.2.5	CoQ ₁₀ -holesterol indeks v prsih, bedrih in perutih	54
4.1.3	Vpliv dodanega CoQ₁₀ na vsebnost CoQ₁₀ in holesterola v frakcijah celic piščančjih prsi	55
4.2	INDUSTRIJSKA PRIDELAVA PIŠČANČJIH IZDELKOV S POVEČANO VSEBNOSTJO CoQ ₁₀	61
4.2.1	Vpliv dodanega CoQ₁₀ na vsebnost maščob, CoQ₁₀ in holesterola v prsih, bedrih in perutih	61
4.2.2	Vpliv dodanega CoQ₁₀ na vsebnost maščob, CoQ₁₀ in holesterola v različnih piščančjih izdelkih	63
4.2.3	CoQ₁₀-holesterol indeks v različnih piščančjih izdelkih	66
4.3	VPLIV DODANEGA CoQ ₁₀ NA DELOVANJE ANTIOKSIDATIVNE MREŽE V KRVI PIŠČANCA.....	67
4.3.1	Reja piščancev	68

4.3.1.1	Rezultati merjenja telesnih mas piščancev.....	68
4.3.1.2	Prirast piščancev.....	69
4.3.1.3	Konverzija krme.....	69
4.3.2	Antioksidativna mreža	70
4.3.2.1	Koncentracija analitov v plazmi piščancev kontrolne skupine.....	70
4.3.2.2	Analiza CoQ ₁₀ v plazmi piščancev.....	71
4.3.2.3	Analiza lipojske kisline v plazmi piščancev	72
4.3.2.4	Analiza α -tokoferola v plazmi piščancev.....	73
4.3.2.5	Analiza TAC v plazmi piščancev.....	74
4.3.2.6	Analiza SOD v plazmi piščancev.....	75
4.3.2.7	Analiza GPx v plazmi piščancev.....	76
5	RAZPRAVA.....	78
5.1	VPLIV DODANEGA CoQ ₁₀ NA NJEGOVO KOPIČENJE V TKIVIH PIŠČANCEV.....	78
5.1.1	Vpliv dodanega CoQ ₁₀ na njegovo vsebnost v frakcijah celic piščančjih prsi 82	
5.2	INDUSTRIJSKA PRIDELAVA PIŠČANČJIH IZDELKOV S POVEČANO VSEBNOSTJO CoQ ₁₀	83
5.2.1	QCI indeks v izdelkih iz piščančjega mesa.....	85
5.3	VPLIV DODANEGA CoQ ₁₀ NA DELOVANJE ANTIOKSIDATIVNE MREŽE 86	
6	SKLEPI	91
7	POVZETEK (SUMMARY).....	95
7.1	POVZETEK.....	95
7.2	SUMMARY.....	96
8	VIRI	98

PRILOGE
ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Koncentracije CoQ ₁₀ in CoQ ₉ (µg/g) v različnih tkivih (Åberg in sod., 1992: 232)	8
Pregl. 2: Razporeditev CoQ v organelih celic podganjih jeter (Bentiger in sod., 2007: S43)	9
Pregl. 3: Vsebnost CoQ ₁₀ v različni hrani	12
Pregl. 4: Položaj elektronov v nekaterih kisikovih spojinah in prostih radikalih (Halliwell, 2006: 314)	14
Pregl. 5: Redoks potenciali nekaterih antioksidantov in prostih radikalov (Buettner in Jurkiewicz, 1996: 534)	17
Pregl. 6: Shema poskusa krmljenja piščancev s CoQ ₁₀	28
Pregl. 7: Kemijska sestava krme	29
Pregl. 8: Vpliv dodanega CoQ ₁₀ v krmo na telesne mase piščancev (g) v skupinah (G0, G1, G2, G3 in G4) na 10. dan (1.tehtanje), 21. dan (2.tehtanje), 29. dan (3.tehtanje), 36. dan (4.tehtanje) in 42. dan (peto tehtanje) starosti piščancev	43
Pregl. 9: Vpliv dodatka CoQ ₁₀ na vsebnost CoQ ₁₀ (mg/kg) v jetrih piščanca v kontrolni skupini (G0) in v testnih skupinah (G1, G2, G3 in G4) in izračunani osnovni statistični parametri za vsebnost CoQ ₁₀ ; (n = 12)	46
Pregl. 10: Vpliv dodatka CoQ ₁₀ na vsebnost holesterola (mg/kg) v jetrih piščanca v kontrolni skupini (G0) in v testnih skupinah G1, G2, G3 in G4 in izračunani osnovni statistični parametri za vsebnost holesterola; (n = 12)	46
Pregl. 11: Vpliv dodatka CoQ ₁₀ na vsebnost CoQ ₁₀ (mg/L) v plazmi piščanca v kontrolni skupini (G0) in v testnih skupinah G1, G2, G3 in G4 in izračunani osnovni statistični parametri za vsebnost; (n = 20)	47
Pregl. 12: Vpliv dodatka CoQ ₁₀ na vsebnost holesterola (mg/L) v plazmi piščanca v kontrolni skupini (G0) in v testnih skupinah G1, G2, G3 in G4 in izračunani osnovni statistični parametri za vsebnost holesterola; (n = 20)	48
Pregl. 13: Vpliv dodatka CoQ ₁₀ na vsebnost CoQ ₁₀ (mg/kg) v srcu piščanca v kontrolni skupini (G0) in v testnih skupinah G1, G2, G3 in G4 in izračunani osnovni statistični parametri za vsebnost CoQ ₁₀ ; (n = 12)	49
Pregl. 14: Vpliv dodatka CoQ ₁₀ na vsebnost holesterola (mg/kg) v srcu piščanca v kontrolni skupini (G0) in v testnih skupinah G1, G2, G3 in G4 in izračunani osnovni statistični parametri za vsebnost holesterol; (n = 12)	49
Pregl. 15: Vpliv dodatka CoQ ₁₀ na vsebnost CoQ ₁₀ (mg/kg) v bedrih piščanca v kontrolni skupini (G0) in v testnih skupinah G1, G2, G3 in G4 in izračunani osnovni statistični parametri za vsebnost CoQ ₁₀ ; (n = 20)	51
Pregl. 16: Vpliv dodatka CoQ ₁₀ na vsebnost holesterola (mg/kg) v bedrih piščanca v kontrolni skupini (G0) in v testnih skupinah G1, G2, G3 in G4 in izračunani osnovni statistični parametri za vsebnost holesterola; (n = 20)	51

Pregl. 17: Vpliv dodatka CoQ ₁₀ na vsebnost CoQ ₁₀ (mg/kg) v prsih piščanca v kontrolni skupini (G0) in v testnih skupinah G1, G2, G3 in G4 in izračunani osnovni statistični parametri za vsebnost CoQ ₁₀ ; (n = 20)	52
Pregl. 18: Vpliv dodatka CoQ ₁₀ na vsebnost holesterola (mg/kg) v prsih piščanca v kontrolni skupini (G0) in v testnih skupinah G1, G2, G3 in G4 in izračunani osnovni statistični parametri za vsebnost holesterola; (n = 20)	52
Pregl. 19: Vpliv dodatka CoQ ₁₀ na vsebnost CoQ ₁₀ (mg/kg) v perutih piščanca v kontrolni skupini (G0) in v testnih skupinah G1, G2, G3 in G4 in izračunani osnovni statistični parametri za vsebnost CoQ ₁₀ ; (n = 20)	53
Pregl. 20: Vpliv dodatka CoQ ₁₀ na vsebnost holesterola (mg/kg) v perutih piščanca v kontrolni skupini (G0) in v testnih skupinah G1, G2, G3 in G4 in izračunani osnovni statistični parametri za vsebnost holesterola; (n = 20)	53
Pregl. 21: Vpliv dodatka CoQ ₁₀ na QCI indeks v bedrih, prsih in perutih piščanca v kontrolni skupini (G0) in v testnih skupinah G1, G2, G3 in G4	55
Pregl. 22: HPLC-MS in HPTLC validacijski parametri za analizo CoQ ₁₀ in holesterola...	58
Pregl. 23: Vpliv dodanega CoQ ₁₀ na koncentracijo CoQ ₁₀ (mg/mL), analizirano s HPTLC v različnih frakcijah celic piščančjih prsih v kontrolni skupini (G0) in v skupini, krmljeni 40 dni s CoQ ₁₀ (G4)	59
Pregl. 24: Vpliv dodanega CoQ ₁₀ na koncentracijo holesterola (mg/mL) analizirano s HPTLC v različnih frakcijah celic piščančjih prsih v kontrolni skupini (G0) in v skupini, krmljeni 40 dni s CoQ ₁₀ (G4)	60
Pregl. 25: Vpliv dodanega CoQ ₁₀ na vsebnost maščobe (%) v bedrih, prsih in perutih v skupinah S (standardno meso) in B (obogateno meso); (n = 4)	62
Pregl. 26: Vpliv dodanega CoQ ₁₀ na vsebnost CoQ ₁₀ in holesterola (mg/kg) v bedrih, prsih in peruti v skupinah S (standardno meso) in B (obogateno meso); (n = 4).....	62
Pregl. 27: Vpliv dodanega CoQ ₁₀ v krmo piščancev na vsebnost maščobe (%) v izdelkih obogatenih s CoQ ₁₀ (B) in standardnih izdelkih (S); (n = 4).....	64
Pregl. 28: Vpliv dodanega CoQ ₁₀ v krmo piščancev na vsebnost CoQ ₁₀ (mg/kg) v izdelkih obogatenih s CoQ ₁₀ (B) in v standardnih izdelkih (S), (n = 4).....	65
Pregl. 29: Vpliv dodanega CoQ ₁₀ v krmo piščancev na vsebnost holesterola (mg/kg) v obogatenih izdelkih z CoQ ₁₀ (B) in standardnih izdelkih (S); (n = 4).....	66
Pregl. 30: Vpliv CoQ ₁₀ na QCI indeks v različnih piščančjih proizvodih.....	67
Pregl. 31: Vpliv dodanega CoQ ₁₀ , lipojske kisline in kombinacije CoQ ₁₀ in lipojske kisline v krmo na telesne mase piščancev (g) v skupinah (SK, SQ, SL in SQL) na 16. dan (1.tehtanje), 33. dan (2.tehtanje) in 41. dan (3.tehtanje) starosti piščancev	68
Pregl. 32: Vpliv reje v kontrolni skupini na spremembe vsebnosti CoQ ₁₀ (mg/L), lipojske kisline	71
Pregl. 33: Vpliv dodatkov CoQ ₁₀ , lipojske kisline, in kombinacije CoQ ₁₀ in lipojske kisline na koncentracijo CoQ ₁₀ (mg/L) v plazmi v skupinah SK, SQ, SL, SQL med rejo; (n (SK) = 100, n (SQ, SL, SQL)= 50).....	72

Pregl. 34: Vpliv dodatkov CoQ ₁₀ , lipojske kisline, in kombinacije CoQ ₁₀ in lipojske kisline na koncentracijo lipojske kisline ($\times 10^{-1}$ mg/L) v plazmi v skupinah SK, SQ, SL, SQL med rejo; (n (SK) = 100, n (SQ, SL, SQL) = 50)	73
Pregl. 35: Vpliv dodatkov CoQ ₁₀ , lipojske kisline, in kombinacije CoQ ₁₀ in lipojske kisline na vsebnost α -tokoferola (mg/L) v plazmi v skupinah SK, SQ, SL, SQL med rejo; (n (SK) = 100, n (SQ, SL, SQL) = 50).....	74
Pregl. 36: Vpliv dodatkov CoQ ₁₀ , lipojske kisline, in kombinacije CoQ ₁₀ in lipojske kisline na vsebnost TAC (mmol/L) v plazmi v skupinah SK, SQ, SL, SQL med rejo; (n (SK) = 100, n (SQ, SL, SQL) = 50)	75
Pregl. 37: Vpliv dodatkov CoQ ₁₀ , lipojske kisline, in kombinacije CoQ ₁₀ in lipojske kisline na vsebnost SOD-a (U/g°Hgb) v plazmi v skupinah SK, SQ, SL, SQL med rejo; (n (SK) = 100, n (SQ, SL, SQL) = 50).....	76
Pregl. 38: Vpliv dodatkov CoQ ₁₀ , lipojske kisline, in kombinacije CoQ ₁₀ in lipojske kisline na vsebnost GPx (U/g°Hgb) v plazmi v skupinah SK, SQ, SL, SQL med rejo; (n (SK) = 100, n (SQ, SL, SQL) = 50)	77
Pregl. 39: Dnevni odmerki CoQ ₁₀ , preračunani na telesno maso piščancev v kontrolni skupini	79

KAZALO SLIK

Sl. 1: Redoks stanja CoQ ₁₀ : A-ubikinol, B-semikinon, C-ubikinon.....	4
Sl. 2: Shematski prikaz biosintezne poti CoQ ₁₀ , holesterola in dolihola (Turunen in sod., 2004: 178).....	6
Sl. 3: Shema kompleksnosti mevalovatne poti (Turunen in sod., 2004: 183).....	7
Sl. 4: Predvidena 3D struktura inkluzijskega kompleksa med β-CD in CoQ ₁₀ s prepognjeno izoprensko verigo (Prošek in sod., 2008: 156).....	10
Sl. 5: Primerjava absorbcij CoQ ₁₀ v oljni kapsuli in v kompleksu CoQ ₁₀ -βCD v plazmo (Prošek in sod., 2008: 922).....	11
Sl. 6: Shematski prikaz primarnega zaščitnega mehanizma.....	16
Sl. 7: Shema štirih obrambnih linij antioksidativne obrambe (Littarru, 1994: 44).....	17
Sl. 8: Prikaz delovanje antioksidativne mreže med vitaminom E, vitaminom C, CoQ ₁₀ , glutationom in lipojsko kislino (Packer in sod., 2001: 371S).....	19
Sl. 9: Pregled možnih parametrov za vrednotenje oksidacijskega stresa.....	20
Sl. 10: Prikaz frakcionacije piščančjega tkiva: P1 predstavlja frakcijo jedr, P2 predstavlja frakcijo mitohondrijev, P3 predstavlja frakcijo mikrosomov in S3 predstavlja preostali supernant.....	34
Sl. 11: Povprečni prirast (g/dan) kontrolne skupine (G0) in testnih skupin (G1, G2, G3 in G4).....	44
Sl. 12: Konverzija krme (kg/kg) kontrolne skupine (G0) in testnih skupin skupin (G1, G2, G3 in G4).....	45
Sl. 13: Relativna sprememba CoQ ₁₀ v G4 skupini v primerjavi z kontrolno skupino (G0).....	56
Sl. 14: HPTLC plošča z frakcijami dobljeni iz celic prsi. V točkah 1, 4, in 7 je nanešen standard CoQ ₁₀ (0,05 mg/mL) različnih volumnov v zaporedju 2,0; 4,0 in 6,0 μL, v točkah 10, 13, in 16 je nanešen standard holesterola (0,01mg/mL) različnih volumnov v zaporedju 4,0; 6,0; in 8,0 μL. Vzorci so bili nanešeni v točkah 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, in 15 z volumnom 10 μL.....	57
Sl. 15: Spremembe CoQ ₁₀ /holesterol indeksa v različnih frakcijah v kontrolni skupini (G0) in testni skupini (G4).....	60
Sl. 16: Povprečni prirast (g/dan) kontrolne skupine (SK) in testnih skupin (SQ, SL in SQL).....	69
Sl. 17: Konverzija krme (kg/kg) kontrolne skupine (SK) in testnih skupin skupin (SQ, SL in SQL).....	70
Sl. 18: Relativne spremembe QCI indeksa (QCI = CoQ ₁₀ (mg/kg)/holesterol (mg/kg)*1000) v različnih mišičnih tkivih piščanca v posameznih skupinah z različnimi časi krmljenja s CoQ ₁₀	81
Sl. 19: Sprememba QCI indeksa (%) glede na prejeto količino CoQ ₁₀ (mg) v času reje....	82
Sl. 20: Sprememba QCI indeksa (%) v različnih izdelkih iz piščančjega mesa glede na standardni izdelek.....	85

Sl. 21: Relativne spremembe analitov (CoQ₁₀, lipojske kisline, α -tokoferola, SOD, GPx in TAC) med skupino krmljeno z dodatkom CoQ₁₀ in kontrolno skupino..... 90

KAZALO PRILOG

Priloga A1: Denzitogram standarda CoQ₁₀

Priloga A2: Denzitogram standarda holesterola

Priloga A3: Denzitogram vzorca frakcije P2 testne skupine G4

Priloga B1: Kromatogram standarda CoQ₁₀

Priloga B2: Kromatogram standarda holesterola

Priloga B3: Kromatogram holesterola in CoQ₁₀ v frakciji P2 testne skupine G4

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ALA	α -lipojska kislina
APCI	ionizacija pri atmosferskem tlaku
ATP	adenozintrifosfat
AUC	površina pod koncentracijo plazme
CAT	katalaza
CD	ciklodekstrin
CoQ ₁₀	koencim Q ₁₀ , ubikinon
CoQ ₁₀ - β CD	kompleks β -ciklodektrina in koencima Q ₁₀
C _{max}	maksimalna koncentracija
DHLA	dihidro lipojska kislina
ESI	elektrosprej ionizacija
EDTA	etilendiamintetraoetna kislina
FADH ₂	reducirani flavinadenin dinukleotid
FDA	ameriški vladni urad za zdravila in prehrano, ki je pod okriljem ameriškega ministra za zdravje (angl. Food and Drug Administration)
FPP	farnezil pirofosfat
GPx	glutation peroksidaza
GSH	glutation
GSSG	oksidirani glutation
G6PD	glukoza-6-fosfat dehidrogenaza
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl. High Performance Liquid Chromatography)
HPTLC	tankoplastna kromatografija visoke ločljivosti (angl. High Performance Thin Layer Chromatography)
HPLC-MS	tekočinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo
HDL	lipoprotein visoke gostote (angl. High density lipoprotein)
H ₂ O ₂	vodikov peroksid
HO [•]	hidroksilni radikal
H ₂ O	voda
KV	koficijent variabilnosti
LMWA	nizkomolekularni antioksidanti (angl. Low molecular weight antioxidant)
LOQ	meja kvantizacije (angl. Limit of Quantification)
LOD	meja detekcije (angl. Limit of Detection)
LDL	lipoprotein nizke gostote (angl. Low density lipoprotein)
LO [•]	lipidni radikal
LOOH	lipidni peroksid
MDA	malondialdehid
m/z	razmerje mase in naboja

MS	masna spektrometrija, masni spektrometer
NADPH	nikotinamide adenine dinukleotid fosfat
NADP	nikotinamid adenin dinukleotid
³ O ₂	tripletni kisik
¹ O ₂	singletni kisik
O ^{•-}	superoksidni anionski kisikov radikal
QCI	CoQ ₁₀ - holesterol indeks
R [•]	alkilni radikal
ROS	reaktivne kisikove zvrsti (angl. Reactive oxygen species)
RNS	reaktivne dušikove zvrsti (angl. Reactive nitrogen species)
ROO [•]	peroksilni radikal
ROOH	hidroperoksid
RSD	relativna standardna deviacija
SOD	superoksid dismutaza
TAC	totalna antioksidativna kapaciteta (angl. Total antioxidant capacity)
T _{max}	čas maksimalne koncentracije
TNF- α	dejavnik tumorske nekroze α
t _{1/2}	razpolovni čas
UV	ultravijolično
UV-VIS	ultravijolično-vidno
VLDL	lipoproteini zelo nizke gostote (angl. Very low density lipoprotein)

1 UVOD

Zdravo prehranjevanje omogoča normalno delovanje našega organizma, krepi zdravje in nas varuje pred nastankom mnogih bolezni. Potrebno je uživati mešano in raznoliko prehrano, da zadostimo potrebam telesa po beljakovinah, ogljikovih hidratih, maščobah, vitaminih in mineralih.

Vključevanje mesa v prehrano ljudi ima zaradi visoke energetske vrednosti maščob, holesterola in nasičenih maščobnih kislin negativen pomen. Vendar pa je dejstvo, da je meso pomemben vir beljakovin, esencialnih maščobnih kislin, železa, cinka, mikroelementov, vitaminov in dolgoverižnih maščobnih kislin. Zaradi svoje bogate sestave je izredno pomembno živilo v prehrani ljudi, posebej v prehrani otrok, ostarelih, nosečih in doječih mater.

Piščančje meso vsebuje v primerjavi z ostalimi vrstami mesa manj maščob ter večjo vsebnost nenasičenih maščobnih kislin. Kakovost piščančjega mesa je povečala industrijsko vzrejo pitovnih piščancev (brojlerjev). Učinkovita rast piščancev je zagotovljena s kontroliranimi pogoji kot so: temperatura, umetna osvetlitev, prezračevanje, krma in voda. Zaradi ostrih pogojev, ki zagotavljajo hitro rast in maksimalno prirejo v najkrajšem možnem času, so piščanci izpostavljeni stresnim pogojem. Stres posledično vpliva na kakovost mesa, na obolelost in na prirast živali.

Zaradi načina pridelave in predvsem zaradi predelave smo hrano, ki jo uživamo, popolnoma osiromašili. Hipokrat je štiristo let pred našim štetjem rekel: « *Naj bo hrana zdravilo in zdravilo naj bo hrana.* » Danes se vse bolj zavedamo pomena njegovih besed. Živimo v času izbruha tako imenovanih civilizacijskih bolezni, kot so debelost, povišan krvni pritisk in sladkorna bolezen, bolezni srca in rak, hkrati pa se povečuje življenjska doba. Da bi preprečili bolezni in starostnikom omogočili kvalitetno preživljanje jeseni življenja, je pomembno, da spremenimo prehranjevalne navade in uživamo kvalitetno hrano. V današnjem času se na tržišču vse bolj pojavlja zdravju koristna, tako imenovana funkcionalna hrana. Načeloma s tem izrazom opisujemo hrano, ki ima poleg osnovnih komponent še neko drugo učinkovino, ki dokazano vpliva na organizem z izboljšanjem splošnega psihofizičnega stanja in tako preprečuje bolezni.

Med številnimi substancami naravnega izvora, ki se pojavljajo v obliki prehranskih dodatkov in funkcionalne hrane, vzbuja vse več zanimanja koencim Q₁₀. V času odkritja so raziskovali predvsem vlogo CoQ₁₀ pri tvorbi energije, danes pa se ukvarjajo z njegovo antioksidativno vlogo in s pozitivnimi učinki pri različnih bolezenskih stanjih, ki so posledica oksidativnega stresa. Proti učinkom oksidativnega stresa se telo bori z zelo kompleksnim obrambnim mehanizmom, v katerega so vključene različne substance in ga

imenujemo antioksidativna mreža. Pravilno delovanje antioksidativne mreže v organizmu je nedvomno ključnega pomena za obstoj vsakega organizma.

Raziskava obsega pripravo funkcionalnega živila z originalnim načinom vzreje piščancev z neposrednim hranjenjem s krmo, obogateno s CoQ₁₀. V preliminarnih raziskavah je bilo ugotovljeno, da imajo piščanci, krmljeni s CoQ₁₀, izboljšano telesno stanje. Po zakolu teh piščancev vsebuje njihovo meso večje količine CoQ₁₀ kot meso piščancev, ki so prejeli običajno krmo, brez CoQ₁₀. Pridobljeno obogateno meso s CoQ₁₀ služi za pripravo funkcionalnih prehranskih izdelkov, ki lahko pozitivno vplivajo na zdravstveno stanje ljudi. Takšna hrana ne zadosti samo človekove potrebe po hrani, ampak istočasno varuje njegov organizem.

Pri vzreji smo spremljali zdravstveno stanje, obnašanje in telesno maso piščancev. Raziskovalno delo je vključevalo preučevanje kopičenja vnešenega CoQ₁₀ v piščančjih tkivih. Kopičenje vnešenega CoQ₁₀ smo preučevali tudi na nivoju celice. CoQ₁₀ se kot lipofilna molekula vgrajuje v membrane. V mitohondrijskih membranah deluje kot kofaktor pretvorbe energije, v ostalih membranah pa kot antioksidant. Glede na mesto kopičenja CoQ₁₀ smo predvidevali kakšna je njegova funkcija.

1.1 NAMEN DELA IN RAZISKOVALNE HIPOTEZE

Organizem sam sintetizira zadostne količine CoQ₁₀, delno pa ga lahko vnesemo s hrano ali prehranskimi dodatki. Te vnesene količine postanejo pomembne, ko je lastna sinteza ovirana ali kadar organizem potrebuje večje količine CoQ₁₀ zaradi oksidativnega stresa. CoQ₁₀ nastaja v vsaki celici, njegova primarna vloga je pretvorba energije v oksidativni fosforilaciji, sekundarno pa deluje kot antioksidant. Vnešeni CoQ₁₀ se absorbira v plazmo, kjer primarno deluje kot antioksidant v lipoproteinih, iz plazme pa prehaja v celice.

Učinek dodanega CoQ₁₀ smo preučevali na piščancih, pri čemer smo spremljali:

- vpliv obogatene krme z dodatkom kompleksa CoQ₁₀-βCD na rast in razvoj piščancev brojlerjev (telesna masa piščancev),
- kopičenje dodanega CoQ₁₀ v krvi in različnih piščančjih tkivih,
- porazdelitev CoQ₁₀ v celicah piščančjih prsi
- izdelava piščančjih izdelkov iz obogatene mesa s CoQ₁₀
- vpliv CoQ₁₀ na antioksidativno mrežo v krvi piščancev

Hipoteze:

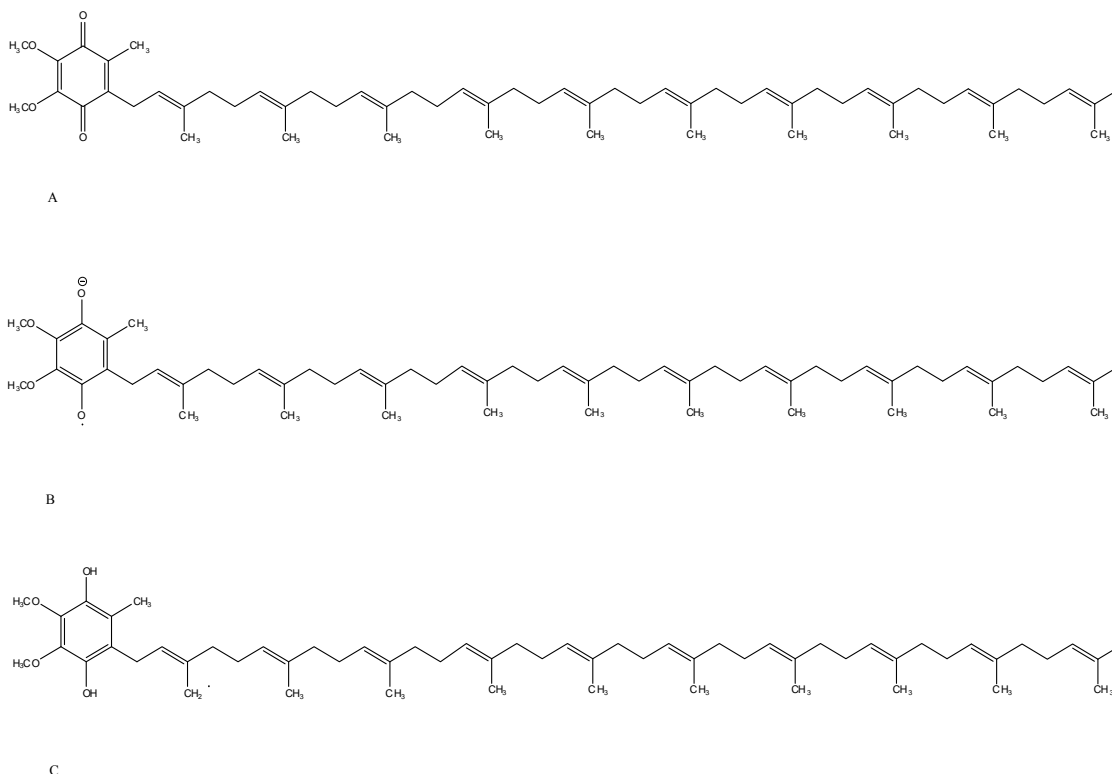
Piščanci so zaradi povečane metabolne aktivnosti izpostavljeni oksidativnemu stresu. Z dodatkom CoQ₁₀ v krmo bi oksidativni stres piščancev zmanjšali. Predpostavili smo, da se bo v krmo dodan CoQ₁₀ kopičil v tkivih, kar bi bilo ugodno tudi za potrošnika, ki to meso

uživa. Glede na to, da so piščanci mladi organizmi, predvidevamo, da je lastna sinteza zadostna, da oskrbuje mitohondrije s CoQ₁₀, torej bo dodan CoQ₁₀ v celicah primarno deloval kot antioksidant.

2 PREGLED OBJAV

2.1 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI CoQ₁₀

CoQ₁₀ je kemijsko izredno zanimiva spojina, sestavljena iz dveh delov. Polarni del molekule predstavlja kinolni obroč, nepolarni del molekule, ki mu preprečuje, da bi se topil v vodi pa je sestavljen iz 10 izoprenskih enot (IUPAC-IUB Commission, 1975). Glede na število izoprenskih enot ločimo koencime Q₁, Q₂ in vse do Q₁₂, vendar se v naravi pojavljajo le nekateri. Pri kvasovkah najdemo kinon s šestimi, pri glivah s sedmimi in pri bakterijah z osmimi izoprenskimi enotami. Kinon z devetimi enotami najdemo pri glodalcih, v zelenjavi in v školjkah, v človeku in v nekaterih drugih sesalcih pa se nahaja kinon z desetimi izoprenskimi enotami (Lester in Crane, 1959). CoQ₁₀ se nahaja v treh redoks stanjih: ubikinon (oksidirana oblika), ubikinol (reducirana oblika) in semikinon (Slika 1). V telesu ves čas vlada ravnovesje med oksidirano in reducirano obliko CoQ₁₀.



Slika 1: Redoks stanja CoQ₁₀: A-ubikinol, B-semikinon, C-ubikinon
Figure 1: Redox forms of CoQ₁₀: A-ubiquinol, B-semiquinon, C-ubiquinon

2.1.1 Zgodovina koencima Q₁₀

Koencim Q so prvi opisali R. A. Morton in sodelavci leta 1955. Dve leti kasneje je R.A. Morton iz podganjih jeter izoliral in raziskoval komponento, ki jo je poimenoval ubikinon (**ubiquitous-quinone**), kar pomeni povsod prisoten kinon (Morton s sod., 1957). V istem časovnem obdobju so znanstveniki na univerzi v Winsconsinu pod vodstvom D.F. Greena izolirali rumeno komponento iz mitohondrijev srčne mišice goveda. Odkritje je bilo rezultat raziskav, s katerimi so skušali določiti proteinske komplekse in mehanizme, po katerih poteka pretvorba energije. Raziskovanje so nadaljevali štirje doktorji znanosti F.L. Crane, Y. Hatefi, R.L. Lester in C. Widmeer. F.L. Crane je na kromatografski koloni poleg treh značilnih vrhov karotenoidov opazil še širok pas neznane substance značilne rumene barve, ki je imela močno absorpcijo pri 275 nm in sklepal, da je substanca kinon (Crane in sod., 1957). Leta 1958 je K. Folkers prejel nekaj kristalov Cran-ove substance in z Merckovo pomočjo določil kemijsko strukturo komponente (Slika 1). Kemijsko ime ubikinona oziroma koencima Q₁₀ je 2,3-dimetoksi-5-metil-6-poliprenil-1,4-benzokinon (Wolf in sod., 1958).

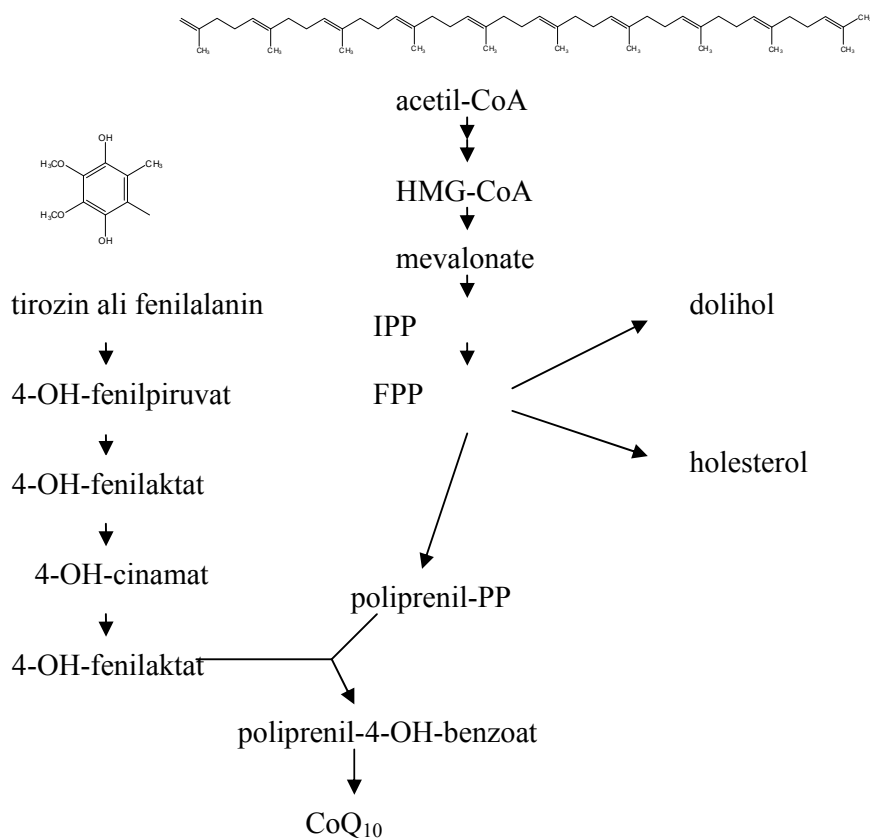
K. Folkers je bil prvi, ki je s pomočjo fermentacije pridobil zadostne količine CoQ₁₀ in je molekulo ovrednotil tako s prehranskega kot medicinskega vidika (Folkers s sod., 1970). Prvo klinično raziskavo za zdravljenje kardiovaskularnih obolenj s CoQ₇ je izvedel Y. Yamamura že leta 1965 (Yamamura in sod., 1967). Leta 1972 je G.P. Littarru iz Italije s K. Folkersom dokumentiral pomanjkanje CoQ₁₀ pri boleznih srca. V sredini 70-ih let se na Japonskem že začne proizvodnja čistega CoQ₁₀, kar je omogočilo porast kliničnih raziskav s CoQ₁₀ pri različnih bolezenskih stanjih in razvoj sodobne analize kemije, ki je omogočala vrednotenje vsebnosti in oblik CoQ₁₀.

Do leta 1969 so znanstveniki z nezaupanjem sprejemali dejstvo, da je CoQ₁₀ nujno potreben pri prenosu elektronov v dihalni verigi. Enega izmed prvih dokazov je predložil L. Ernster in sod. (1969), ki je dokazal, da pomanjkanje CoQ₁₀ vpliva na zmanjšanje aktivnosti nikotinamid-adenin-dinukleotid dehidrogenaze, sukcinat dehidrogenaze in citokroma *b*. Vendar pa natančna vloga CoQ₁₀ v dihalni verigi se vedno ni bila pojasnjena. Leta 1975 je P. Mitchell ugotovil, da je ključna vloga CoQ₁₀ povezana s prenosom protonov preko celične membrane in ne s prenosom elektronov, kar so vrsto let poizkušali dokazati drugi raziskovalci (Mitchell, 1975; Mitchell, 1976). Leta 1978 je za svoj prispevek prejel Nobelovo nagrado.

2.1.2 Biosinteza CoQ₁₀ v organizmu

Glavni vir CoQ₁₀ je biosinteza, ki poteka v vseh celicah živalskega organizma (Olson in Rudney, 1983; Elmberger in sod., 1987). Sinteza CoQ₁₀ poteka po kompleksni 17 stopenjski reakciji, v katero je vključenih najmanj sedem vitaminov: riboflavin, niacin,

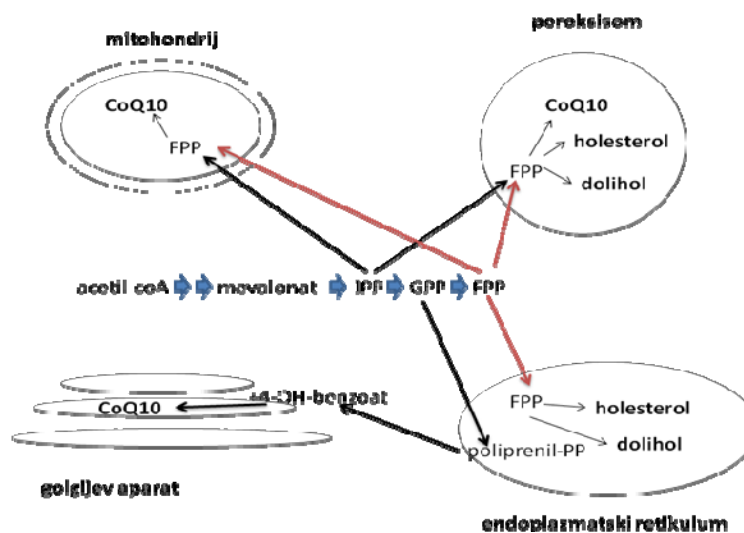
pirodoksin, folna kislina, kobalamin, askorbinska kislina in pantotenska kislina, sodelujejo pa tudi nekateri elementi v sledovih (Dallner in Sindelar, 2000). V celicah sesalca biosintezna pot CoQ₁₀ združuje dve metabolični poti, ki sta prikazani na sliki 2. Kinolni obroč se sintetizira iz tirozina oziroma fenilalanina, ki se preko več stopenj preoblikuje v 4-hidroksibenzoat. Veriga CoQ₁₀ se sintetizira iz acetyl-CoA preko mevalonatne poti do farnesil-PP (FPP). FPP se nato konvertira v dekaprenil-PP in s 4-hidroksibenzoično kislino kondenzira v dekaprenil-4OH-benzoate in katerega nato nastane CoQ₁₀. FPP je tudi prekursor holesterola in dolihola (Turunen in sod., 2004).



Slika 2: Shematski prikaz biosintezne poti CoQ₁₀, holesterola in dolihola (Turunen in sod., 2004: 178)
Figure 2: Schematic review of CoQ₁₀, cholesterol and dilhol biosynthesis (Turunen et al., 2004: 178)

Mevalonatna pot v podganjih jetrih je dober primer kompleksnosti celične organizacije (Slika 3). Pretvorba acetyl-CoA v FPP se zgodi v citoplazmi, saj se tam nahaja večina encimov potrebnih za potek reakcij. Sinteza CoQ₁₀ se začne v endoplazmatskem retikulumu in se zaključi v Golgijevem aparatu, od koder se transportira na različna mesta znotraj celice. CoQ₁₀ verjetno uporablja za transport mehanizme, ki so značilni za prenos lipidov: vezikularni transport, transport s pomočjo proteinov in transport s pomočjo micelij (Wüstner in sod., 2002). Mitochondrij verjetno sintetizira lastni CoQ₁₀ zaradi njegove

pomembnosti v dihalni verigi in za ostale funkcije, ki jih opravlja v mitohondrijskih membranah. Frakcioniranje celic je pokazalo, da je največ endogenega CoQ₁₀ prisotnega prav mitohondriju, večje količine pa se nahajajo v lizosomih in Golgijevev aparatu (Turunen in sod., 2004).



Slika 3: Shema kompleksnosti mevalovatne poti (Turunen in sod., 2004: 183)

Figure 3: Schematic review of complexity of mevalonate pathway (Turunen et al., 2004: 183)

Organizem si pri normalnem delovanju zagotovi zadostno količino potrebnega CoQ₁₀, vendar so raziskave pokazale, da v številnih primerih pride do zmanjšanja koncentracij, kot posledica bolezni, nekaterih zdravil, predvsem pri zdravljenju s statini (Littaru in Langsjoen, 2007), genetskih napak, nepravilne prehrane in staranja (Kalen in sod., 1989; Söderberg in sod., 1990).

2.1.2.1 Porazdelitev CoQ₁₀ v tkivih

V ljudeh in živalih je CoQ prisoten v vseh tkivih v različnih koncentracijah. Prevladujoča oblika CoQ pri živalih, ki živijo relativno kratek čas, npr. miš in podgana, je CoQ₉, pri človeku in živalih, ki živijo dlje časa pa je CoQ₁₀.

V preglednici 1 je prikazana razporeditev CoQ₁₀ in CoQ₉ v tkivih človeškega organizma in podgan. V tkivih podgan koncentracija CoQ₉ varira od 17 µg/g v pljučih do 202 µg/g v srcu. Približno 10-20 % koencima se nahaja v obliki CoQ₁₀, z izjemo možgan, vranice in tankega črevesja, kjer koncentracija CoQ₁₀ dosega 30-40 % celotnega CoQ. V človeškem organizmu vrednost CoQ₁₀ varirajo od 8 µg/g v pljučih do 114 µg/g v srcu. V človeških tkivih se nahaja majhna količina CoQ₉, v rangu od 2-7 %. Visoke koncentracije CoQ₁₀

vsebujejo tkiva, ki so metabolno aktivna in tista, ki imajo velike potrebe po energiji, kot so srce, ledvica, jetra in mišice (Ernster in Dallner, 1995).

Preglednica 1: Koncentracije CoQ₁₀ in CoQ₉ (μg/g) v različnih tkivih (Åberg in sod., 1992: 232)

Table 1: Concentration of CoQ₁₀ and CoQ₉ (μg/g) in different tissue (Åberg et al., 1992: 232)

tkivo	podgana		človek	
	CoQ ₉ (μg/g)	CoQ ₁₀ (μg/g)	CoQ ₉ (μg/g)	CoQ ₁₀ (μg/g)
srce	202	17	3	114
ledvica	124	22	33	67
jetra	131	21	2	55
mišica	43	3	1	40
možgani	37	19	1	13
trebušna slinavka	37	3	2	33
vranica	23	9	1	25
pljuča	17	2	1	8
testisi	32	5	1	11
debelo črevo	48	8	1	11
tanko črevo	51	19	1	12

2.1.2.2 Porazdelitev CoQ₁₀ v organelih

V celicah se 25-30 % CoQ₁₀ nahaja v jedru, 40-50 % v mitohondriju, 15-20 % v mikrosomih in 5-10 % v citosolu (Sustray in sod., 1961). V preglednici 2 je prikazana razporeditev CoQ v organelih podganjih jeter. Najvišja vsebnost CoQ₁₀ je v notranji in zunanji membrani mitohondrija, v lizosomih in golgijevih veziklih.

Preglednica 2: Razporeditev CoQ v organelih celic podganjih jeter (Bentiger in sod., 2007: S43)

Table 2: Distribution of CoQ in organelles of rat liver cells (Bentinger et al., 2007: S43)

organel	CoQ (µg/ mg proteina)
jedro	0,2
mitohondrij	1,4
zunanja membrana	2,2
notranja membrana	1,9
mikrosomi	0,2
lizosomi	1,9
lizosomalne membrane	0,4
golgijski vezikli	2,6
peroksisomi	0,3
plazemska membrana	0,7

2.1.3 Vnos CoQ₁₀ v organizem

CoQ₁₀ ima zaradi relativno visoke molekulske mase (863,34 g/mol) in hidrofobne narave, zelo slabo biorazpoložljivost. Raziskave na živalih so pokazale, da je njegova biorazpoložljivost okoli 2-3 % (Zhang in sod., 1995).

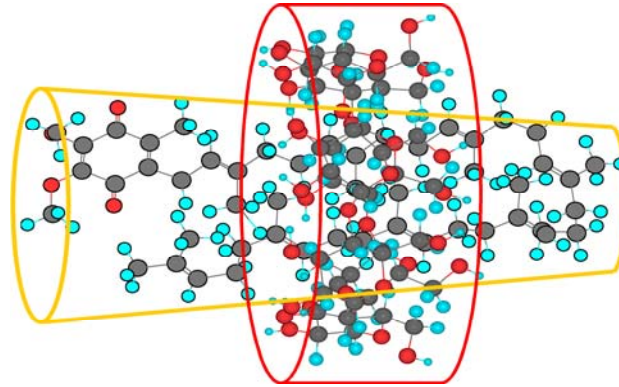
2.1.3.1 Izboljšanje topnosti CoQ₁₀

Za izboljšanje topnosti CoQ₁₀ se uporabljajo različne metode: priprava nanodelcev, v katere vključujejo CoQ₁₀ (Hsu in sod., 2003; Ankola in sod., 2007), raztapljanje CoQ₁₀ v zmesi sorbitan monooleata, polisorbata 80, trigliceridov, propilen glicola, α-tokoferola in polivinil pirolidona (Chopra in sod., 1998), priprava suhe emulzije (Takeuchi in sod., 1992), dispergacija CoQ₁₀ z Eudragit® (Nazzal in sod., 2002), nastanek nekovalentnega kompleksa CoQ₁₀ s polioksietanil-α-tokoferilsebacatom (Sikorska in sod., 2003), priprava fine oljno-vodne emulzije (Kommuru in sod., 2001; Nazzal in sod., 2002), inkludiranje CoQ₁₀ v γ-ciklodekstrin in substituirane ciklodekstrine (Lutka in Pawlaczyk, 1995).

2.1.3.2 Kompleks CoQ₁₀ z β – ciklodekstrinom

V Laboratoriju za prehrabeno kemijo na Kemijskem inštitutu so raziskovalci med prvimi na svetu pripravili vodotopen kompleks CoQ₁₀ z β-ciklodekstrinom (slika 4), ki so ga tudi

patentirali (Prošek in sod., 2005). Določene so bile fizikalno-kemijske lastnosti kompleksa CoQ₁₀ z β ciklodekstrinom: topnost, termostabilnost in fotostabilnost (Fir Milivojević in sod, 2009 a; Fir Milivojević in sod, 2009 b).



Slika 4: Predvidena 3D struktura inkluzijskega kompleksa med β -CD in CoQ₁₀ s prepognjeno izoprensko verigo (Prošek in sod., 2008: 156)

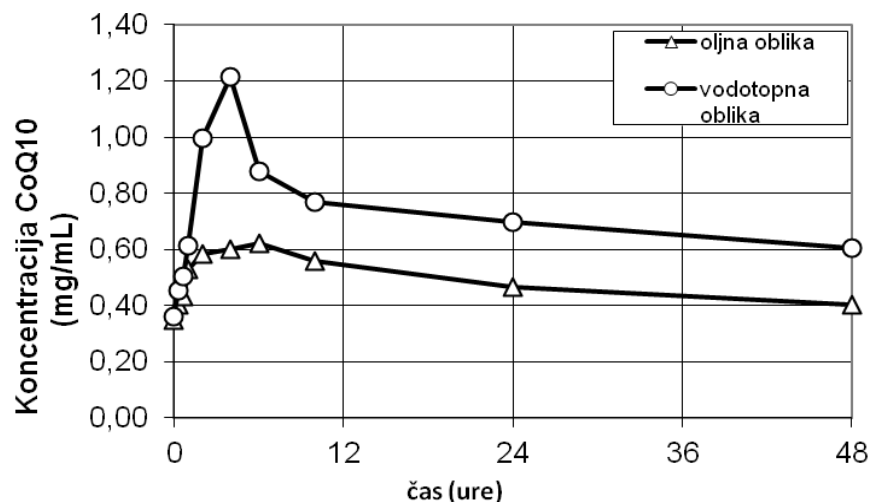
Figure 4: Expected 3D structure of inclusion complex of β -CD and CoQ₁₀ with folded isoprenic chain (Prošek et al., 2008: 156)

Za potrditev izboljšanih lastnosti kompleksa CoQ₁₀ z β -ciklodekstrinom sta bili narejeni dve bioekvivalenčni raziskavi. V prvi raziskavi smo primerjali relativno biorazpoložljivost dveh oblik CoQ₁₀, kompleksa CoQ₁₀- β CD in komercialno dostopnih oljnih kapsul CoQ₁₀. Različni obliki CoQ₁₀ je prejemala skupina psov beaglov, katerim smo po zaužitju v določenih intervalih jemali kri, v kateri smo določili koncentracijo CoQ₁₀. Iz dobljenih rezultatov smo za obe obliki CoQ₁₀ izračunali srednjo vrednost za bazno linijo koncentracije CoQ₁₀, maksimalno koncentracijo CoQ₁₀ v plazmi (C_{max}), čas maksimalne koncentracije CoQ₁₀ (T_{max}), površino pod koncentracijo plazme ($AUC_{(0-48h)}$) in razpolovni čas ($t_{1/2}$). Rezultati so pokazali prednost kompleksa CoQ₁₀- β CD v primerjavi z maščobotopno obliko v trikratnem povečanju $AUC_{(0-48h)}$, v skoraj dvakratnem povečanju C_{max} in skrajšanju T_{max} iz 6 na 4h (Prošek in sod., 2008). Druga raziskava je bila prav tako narejena na primerjavi dveh oblik CoQ₁₀, vendar tokrat na ljudeh. Rezultati so dokazali boljšo biorazpoložljivost kompleksa CoQ₁₀- β CD (Žmitek in sod., 2008).

Takšna oblika se tudi enostavno dodaja v živila, pri čemer β -ciklodekstrin deluje samo kot transportno sredstvo, ki poskrbi za boljšo porazdelitev CoQ₁₀ v želodcu in posledično boljšo biorazpoložljivost kot prašek ali CoQ₁₀ v oljnih kapsulah.

2.1.3.3 Absorbcija in transport CoQ₁₀

CoQ₁₀ se kot lipofilna substanca absorbira skozi gastrointestinalni trakt (Bhagavan in Chopra, 2006). Po absorpciji se vključi v hilomikrone in se z njimi transportira v jetra. V jetrih se prepakira v VLDL in LDL delce in z njimi potuje po krvi. Po zaužitju CoQ₁₀ začne koncentracija CoQ₁₀ v krvi glede na bazno linijo naraščati po 1-2 h, v primeru, da je CoQ₁₀ vnešen na prazen želodec. Maksimalno koncentracijo (C_{max}) doseže po 6-8 h. Na sliki 5 je predstavljena biorazpoložljivost različnih oblik CoQ₁₀ (oljne kapsule in kompleksa CoQ₁₀- β CD) v 48 h.



Slika 5: Primerjava absorpcij CoQ₁₀ v oljni kapsuli in v kompleksu CoQ₁₀- β CD v plazmo (Prošek in sod., 2008: 922)

Figure 5: Comparison of CoQ₁₀ absorption in oil capsules and in complex CoQ₁₀- β CD in plasma (Prošek et al., 2008: 922)

2.1.3.4 Vnos CoQ₁₀ s prehrano

CoQ₁₀ se v naravi nahaja v rastlinah in živalih, torej ga lahko zaužijemo preko rastlinske in živalske hrane. Vsebnost CoQ₁₀ v različni hrani je predstavljena v preglednici 3. Največ CoQ₁₀ se nahaja v mesu in ribah. Zelenjava in mlečni izdelki vsebujejo relativno malo CoQ₁₀.

Povprečni dnevni vnos CoQ₁₀ s hrano je ocenjen pod 10 mg. Raziskave na skupini ljudi na Danskem so pokazale, da je povprečen vnos CoQ₁₀ od 3 do 5 mg dnevno, od tega 64 % CoQ₁₀ zaužijejo z mesom in perutnino (Weber in sod., 1997 a). Kamei (1986) je ocenil, da je povprečen vnos CoQ₁₀ od 4-21 mg na dan, podobne rezultate so dobili tudi na populaciji ljudi na Finskem, kjer naj bi bil dnevni vnos CoQ₁₀ pri ženskah 3,8 mg, pri moških pa 4,8 mg (Mattila in Kumpulainen, 2001).

Organizem pridobi CoQ₁₀ iz treh virov: z biosintezo, s hrano ali s prehranskimi dodatki. Hrana je v primerjavi s prehranskimi dodatki bolj kompleksen matriks, kar bi lahko vplivalo na biorazpoložljivost CoQ₁₀. Vendar pa so raziskave pokazale, da ni razlik v absorpciji CoQ₁₀, ki se nahaja v mesu ali v prehranskih dodatkih. Naredili so primerjavo absorpcije 30 mg CoQ₁₀ vsebovanega v srcu prašiča in 30 mg kapsule CoQ₁₀. Rezultati raziskave so dokazali, da je hrana primeren vir CoQ₁₀ (Weber in sod., 1997 b).

Preglednica 3: Vsebnost CoQ₁₀ v različni hrani

Table 3: Content of CoQ₁₀ in different food

hrana	CoQ₁₀ (µg/100g) (Kamei in sod., 1986)	CoQ₁₀ (µg/100g) (Weber in sod., 1997 a)	CoQ₁₀ (µg/100g) (Mattila in Kumpulainen, 2001)	CoQ₁₀ (µg/100g) (Kubo in sod., 2008)
govedina	3100	3100	3650	3030-4010
piščanec	2100	1700	1400	1710-2500
riba	550-6430	430-2700	850-1590	180-13000
brokoli	860	660	-*	701
krompir	100	52	50	105
mleko	40	-*	10	31
jajca	370	150	120	73

*ni določeno

2.1.4 Vloga CoQ₁₀

Že več let je znano, da ima molekula CoQ₁₀ izredno pomembno vlogo v elektronski transportni verigi v notranji membrani mitohondrija. Pri elektronski transportni verigi sodelujejo štirje kompleksi proteinov in sicer:

- kompleks I-NADH oksidoreduktaza
- kompleks II-sukcinat oksidoreduktaza
- kompleks III-citokrom c oksidoreduktaza
- kompleks IV-citokrom c oksidaza

NADH odda svoj elektron kompleksu I, FADH₂ pa odda svoj elektron kompleksu II. Elektroni se iz teh dveh kompleksov prenesejo na CoQ₁₀, ki se nahaja v membrani in ta elektrone prenese na kompleks III. CoQ₁₀ lahko odda dva elektrona hkrati, citokromi pa lahko sprejmejo samo enega. Zato se elektroni v kompleksu III razdelijo na dve ločeni, a

vseeno povezani poti, ki sestavljajo Q-ciklus. Elektrone naprej prenese citokrom c, ki je vodotopen, na kompleks IV. Prenašalci elektronov so razporejeni tako, da afiniteta do elektronov vzdolž verige narašča. Pri prenosu elektronov po členih verige prihaja do črpanja protonov, s čimer se ustvarja protonski gradient, ki ga izkorišča ATP-sintaza pri tvorbi ATP-molekul (Littarru, 1995; Lenaz in sod., 2007).

Nadaljnje raziskave so dokazale prisotnost CoQ₁₀ tudi v ostalih organelih in ne samo v mitohondrijih, kjer mu pripisujejo antioksidativne lastnosti. Nedavni rezultati so pokazali, da ima CoQ₁₀ vpliv na izražanje genov, ki so vključeni v celično signaliziranje in metabolizem (Littaru in Tiano, 2007).

CoQ₁₀ pripisujejo tudi funkcije, ki so pomembne za celularni metabolizem, kot so regulacija permeabilnosti mitohondrijskih tranzicijskih por, regulacija fizikalno-kemijskih lastnosti membran, prav tako je odgovoren za aktivacijo mitohondrijskih nesklopljenih proteinov (Turunen in sod., 2004).

2.2 DELOVANJE ANTIOKSIDATIVNE MREŽE

2.2.1 Nastanek oksidativnega stresa

Porušeno ravnotežje med oksidanti in antioksidanti vodi v poškodbo, ki jo imenujemo »oksidativni stres« (Sies, 1985). V organizmu obstajajo različne vrste prostih radikalov, vendar so glavni izvor produkti, ki nastajajo pri aerobnem metabolizmu (Halliwell, 2006). Paradoks aerobnega življenja pojmuje kot »paradoks kisika«. Kisik, ki je za življenje višjih evkariontskih organizmov neobhodno potreben, je hkrati nevaren za njihov obstoj (Davies, 1995). Molekularni kisik se pri aerobnem metabolizmu reducira do vode. Pri redukciji kisika lahko pride do tvorbe superoksidnega aniona, vodikovega peroksida in hidroksilnega radikala (Sies, 1997).

Vzrok za reaktivnost kisika je v njegovi konfiguraciji (Preglednica 4). Osnovno stanje molekularnega kisika (³O₂) je tripletno, kot dvojni radikal, ki ima v svojih dveh zunanjih p-orbitalah dva nesparjena elektrona. Ti dve p-orbitali tvorita π-vez, od katerih ima vsaka en elektron. Ta dva elektrona lahko zavzameta tri različna stanja, oba »*spin down*«, oba »*spin up*« in nasprotno obrnjena »*spin up*« in »*spin down*«. Ta oblika kisika je stabilna, vendar pa v primeru absorpcije energije elektrona preneseta energijo v eno samo p-orbitalo, v kateri sta spina različno usmerjena. Pri tem pa dobimo zelo reaktivno molekulo ki jo imenujemo singletni kisik (¹O₂). Čeprav singletni kisik ni prosti radikal, ima oba elektrona v vzbujenem stanju. Ta lahko povzročata v organizmu poškodbe, ki so podobne poškodbam, ki jih povzročajo prosti radikali. Če se v eno izmed prostih orbital singletnega

kisika naseli dodaten elektron, ki je brez para, dobimo izredno agresiven superoksidni anion ($O_2^{\bullet -}$) (Halliwell, 2006).

Preglednica 4: Položaj elektronov v nekaterih kisikovih spojinah in prostih radikalih (Halliwell, 2006: 314)

Table 4: Electrons position in several oxygen compounds and free radicals (Halliwell, 2006: 314)

orbitale		π	π	σ
tripletni kisik	3O_2	↑	↑	
singletni kisik	1O_2	↑↓		
superoksidni anion	$O_2^{\bullet -}$	↑↓	↑	
vodikov peroksid	H_2O_2	↑↓	↑↓	
hidroksilni radikal	HO^{\bullet}	↑↓	↑↓	↑
voda	H_2O	↑↓	↑↓	↑↓

V normalnih pogojih celica superoksidne anione nevtralizira in jih spremeni v vodikov peroksid, ki sicer ni radikal, vendar je celici prav tako nevaren. Vodikov peroksid se v prisotnosti določenih elementov, ki jih telo nujno potrebuje, lahko pretvori v hidroksilni radikal.

Glavni izvor radikalov so torej mitohondriji zaradi molekul kisika, ki uidejo nadzoru. Vendar je v organizmu še kar nekaj drugih izvorov, ki se pojavijo v manjšem obsegu in manj pogosto. V mitohondrijih spodbuja nastanek radikalov vnetni citokin TNF- α (dejavnik tumorske nekroze alfa). Bele krvničke pri vnetjih oddajajo proste radikale, kot so superoksidi, vodikov peroksid in hidroksilni radikali, s katerimi uničujejo bakterije. Najškodljivejši dejavniki iz okolja pa so onesnaženi zrak, tobačni dim, ultravijolična svetloba, ionizirajoče sevanje, fizični in psihični stres, sprememba prehrane, poškodbe in obolenja.

2.2.2 Obrambni mehanizmi pred oksidativnim stresom

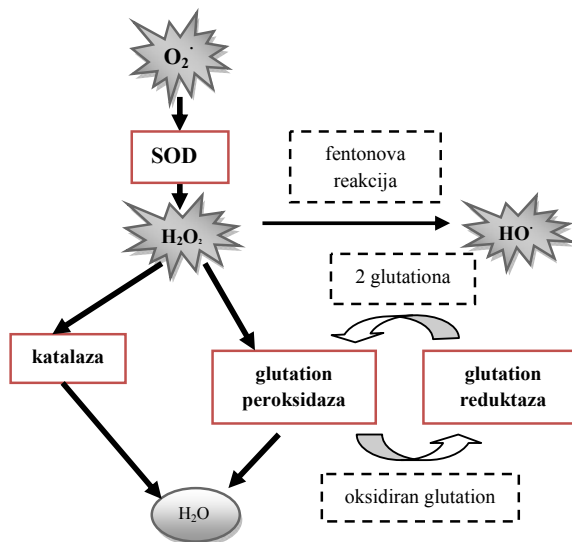
Za svojo obrambo ima organizem na voljo številne antioksidante, ki sta jih Halliwell in Gutteridge (1989) v svoji definiciji izrazov opisala kot »vsaka substanca, ki je zmožna pri nizki koncentraciji v primerjavi z oksidiranim substratom, signifikantno izničiti oziroma inhibirati oksidacijo substrata«. Antioksidante lahko razdelimo v dve glavni skupini: v makro molekule, ki so v glavnem encimi, in nizkomolekularne antioksidante (LMWA). Antioksidativni encimi vključujejo: superoksidno dismutazo (SOD), katalazo, glutation peroxidazo (GPx) in proteine, kot sta GSH reduktaza in glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (G6PD). Skupino LMWA sestavlja ogromno število antioksidantov, ki so sposobni

preprečiti oksidativno poškodbo z direktno ali indirektno reakcijo z reaktivnimi kisikovimi zvrstmi (ROS). Številni nizkomolekularni antioksidanti lahko v organizem vstopijo s hrano, npr. askorbinska kislina, tokoferol in polifenoli, medtem ko se nekatere LMWA molekule sintetizirajo v celici (glutation, karnozin, NADH). Ostale molekule, ki imajo antioksidativno aktivnost so odpadni produkti celic (bilirubin in sečna kislina).

Celotno obrambo organizma ponazarja delovanje antioksidativne mreže. Izraz antioksidativna mreža je prvi uporabil Packer s sodelavcem Colmanom v svoji knjigi *The Antioxidant Miracle* (1999), kjer je zapisal, da antioksidati ne delujejo sami, ampak so med seboj povezani v mrežo. Medsebojno delovanje antioksidantov so ugotovili že pred njim, vendar je Packer prvi zasnoval koncept delovanja antioksidativne mreže, v katero je vključil CoQ₁₀, askorbinsko kislino, tokoferol, glutation in lipojsko kislino. Njegovo mnenje je, da noben antioksidant ne deluje sam, ampak je vključen v mrežo vseh prisotnih antioksidantov in da je ta mreža tisti življenjski čudež, ki varuje organizem pred bolezenskimi stanji in upočasnjuje staranje.

Pravilno delovanje antioksidativne mreže v organizmu je nedvomno ključnega pomena za obstoj vsakega organizma. Antioksidativna mreža je določena glede na mesto obrambe in na antioksidante, ki so v določenem trenutku na razpolago. Antioksidativna učinkovitost je odvisna od njihove koncentracije, redoks potenciala in mobilnosti znotraj okolja, v katerem se nahajajo.

Obrambni mehanizem je sestavljen iz posameznih sistemov: zaščite pred začetkom poškodb (Halliwell in Gutteridge, 1989), popravljalnega mehanizma (Ames in sod., 1993; Ames in sod., 1995) in neposredne zaščite pred škodljivimi metaboliti (Halliwell in sod., 1994). Znotraj posameznega sistema ima glavno vlogo antioksidativni obrambni mehanizem, ki se je razvil kot odgovor na povišano koncentracijo kisika. V prvi vrsti se organizem brani s primarnim zaščitnim mehanizmom, ki nastopi takoj, ko se v organizmu pojavijo reaktivni radikali (Slika 6). Prva obrambna naloga antioksidativne mreže je zmanjševanje koncentracije vodikovega peroksida. Encim SOD katalizira reakcijo pretvorbe superoksidnega aniona v vodikov peroksid. Vodikov peroksid pa se lahko s pomočjo peroksidaz (katalaze ali GPx) pretvori do vode. Iz vodikovega peroksida pa lahko s Fentonovo reakcijo nastajajo hidroksilni radikali, ki lahko sprožijo verižno radikalsko reakcijo.



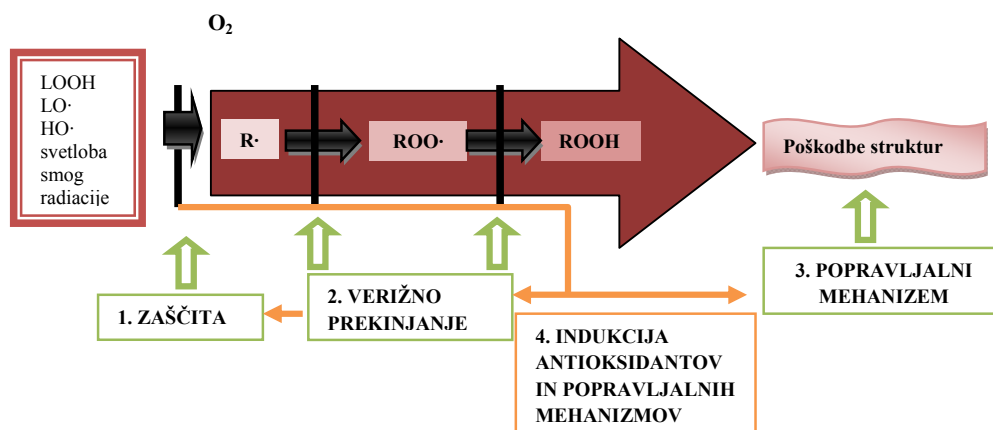
Slika 6: Shematski prikaz primarnega zaščitnega mehanizma

Figure 6: Schematic review of primar defense mehanism

Sekundarna obramba je prekinjanje radikalskih verižnih reakcij, ki so sestavljene iz treh delov: nastanka radikalov (iniciacija), širjenja verižne reakcije (propagacija) in prekinitve verižne reakcije (terminacija) (slika 7).

Antioksidanti prekinajo mehanizem verižne reakcije tako, da reagirajo s prostimi radikali in jih nevtralizirajo. To so tako imenovani «lovilci radikalov». Večina lovilcev radikalov ima majhno molekularno maso (LMWA), nekateri so lipofilni (E-vitamin, CoQ₁₀) in nekateri hidrofilni (albumin, askorbinska kislina, sečna kislina, bilirubin in tioli).

Tretja obrambna linija poskrbi za odstranjevanje poškodovanih molekul med oksidativnim napadom in zamenjavo poškodovanih struktur z novimi. Prilagoditveni mehanizmi so četrta obrambna linija, kjer radikali in ROS molekule delujejo kot sprožilci sintez ali transportov ustreznih antioksidantov na mesta, kjer so potrebni.



Slika 7: Shema štirih obrambnih linij antioksidativne obrambe (Littarru, 1994: 44)

Figure 7: Schematic review of four lines of antioxidant defense (Littarru, 1994: 44)

Vsak antioksidant, ki deluje v obrambnem mehanizmu, ima specifičen redoks potencial. Določitev redoks potenciala pri antioksidantih in radikalih ni vedno enostavna. Z leti se je klasična definicija, ki je bila podana z razmerjem med reducirano in oksidirano obliko določenega redoks para, dopolnila in se prilagodila tudi redoks potencialu okolja v celici. Razvoj sodobnih načinov merjenja je omogočil, da lahko zelo natančno določimo redukcijske potenciale tudi pri radikalih z zelo kratko življenjsko dobo (Preglednica 5).

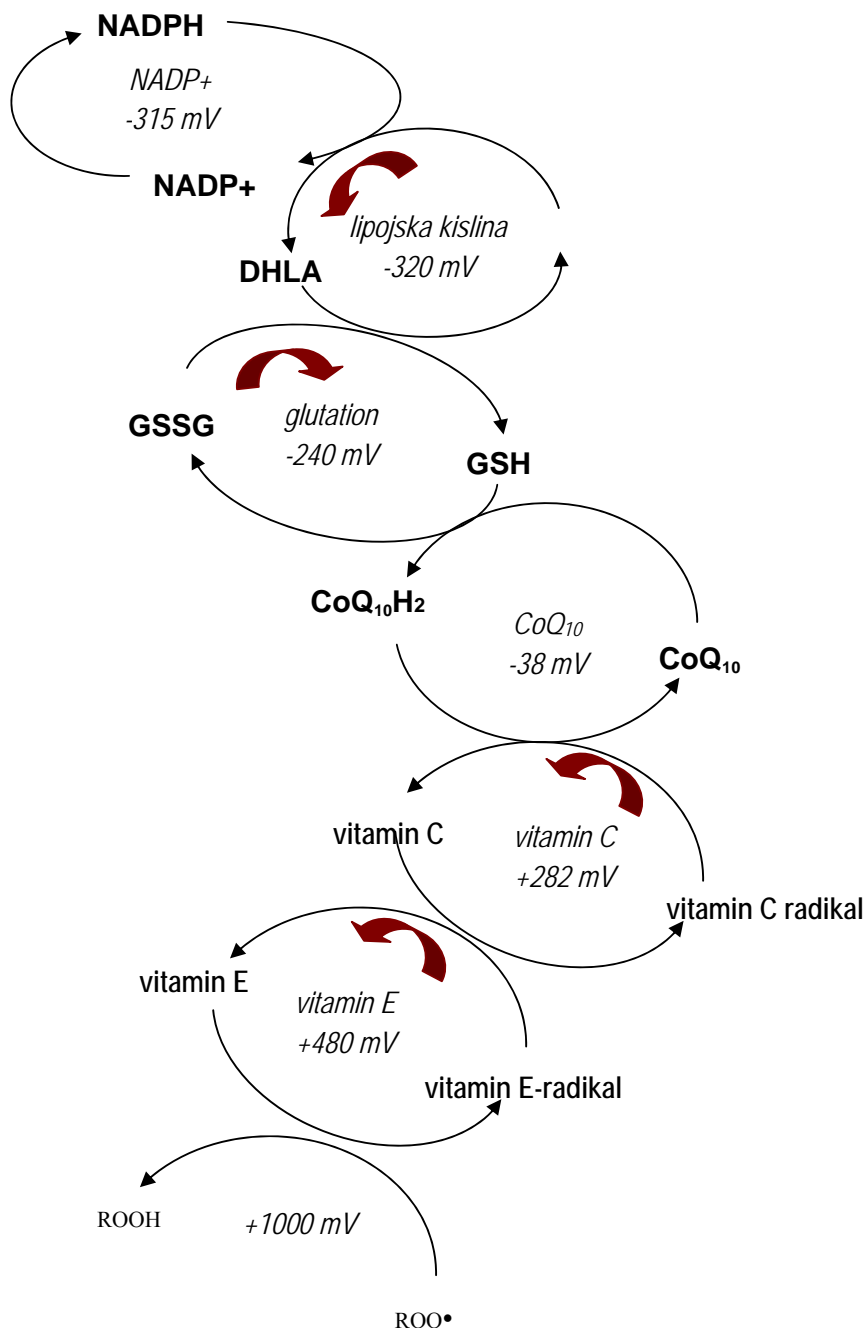
Preglednica 5: Redoks potenciali nekaterih antioksidantov in prostih radikalov (Buettner in Jurkiewicz, 1996: 534)

Table 5: Redox potential of several antioxidants and free radicals (Buettner et al., 1996: 534)

E'_0 (mV)	substancia	nastali radikal	vloga
-320	dihidro lipojska kislina	lipojska kislina	kofaktor
-240	GSH (glutation)	GSSG	antioksidant
-36	ubikinon	ubikinol	koencim
282	C- vitamin	C- vitamin [•]	vitamin
480	tokoferol	tokoferol [•]	vitamin
815	1/2 O ₂	H ₂ O	voda
1000	peroksil	LOO [•]	radikal
1600	alkoksil	LO [•]	radikal
2300	hidroksil	OH [•]	radikal

Na sliki 8 je prikazano delovanje antioksidativne mreže. Maščobne kisline se pod vplivom svetlobe ali drugih dejavnikov iz okolja spremenijo v različne proste radikale (LOO·, LO·, OH·), ki imajo visok redoks potencial (1000 mV). Spojina z bolj negativnim potencialom lahko prevzame elektron spojini z bolj pozitivnim potencialom. Pri preprečevanju verižnih radikalnih reakcij je zelo uspešen tokoferol z redoks potencialom 480 mV. Tokoferol pri reakciji nevtralizacije sam postane radikal (tokoferil), vendar z mnogo bolj stabilno strukturo kot jo imajo ostali radikali, zato se reakcija začasno prekine. Po določenem času bi tokoferil tudi sam reagiral in sprožil novo radikalno reakcijo. Tu se pokaže pomen antioksidacijske mreže, ki poskrbi za njegovo pravočasno regeneracijo z antioksidanti z nižjim redoks potencialom. Regenerirajo ga lahko spojine z bolj negativnim potencialom kot so: vitamin C (282 mV), CoQ₁₀ (-38 mV) in glutation (-240 mV).

Vitamin E - vitamin C cikel je prvi opisal L. Packer, ki je razložil, da tokoferol potrebuje konstantno regeneracijo (Packer in sod., 1979). Regeneracijo tokoferola s CoQ₁₀ sta prva opisala Mellors in Tappel (1966), mehanizem delovanja pa je podrobneje opisal V.E. Kagan (Kagan in sod., 2000). Po končani reakciji nastanejo radikali vitamina C, glutationa in ubikinon, ki jih je, glede na svoj redoks potencial (-320 mV), sposobna regenerirati lipojska kislina (Kagan in sod., 1992). Lipojsko kislino pa regenerirajo molekule NADH (-315 mV) s pomočjo encimskih katalizatorjev. V zadnji opisani reakciji radikali ne nastajajo in na ta način je antioksidativni proces zaključen.

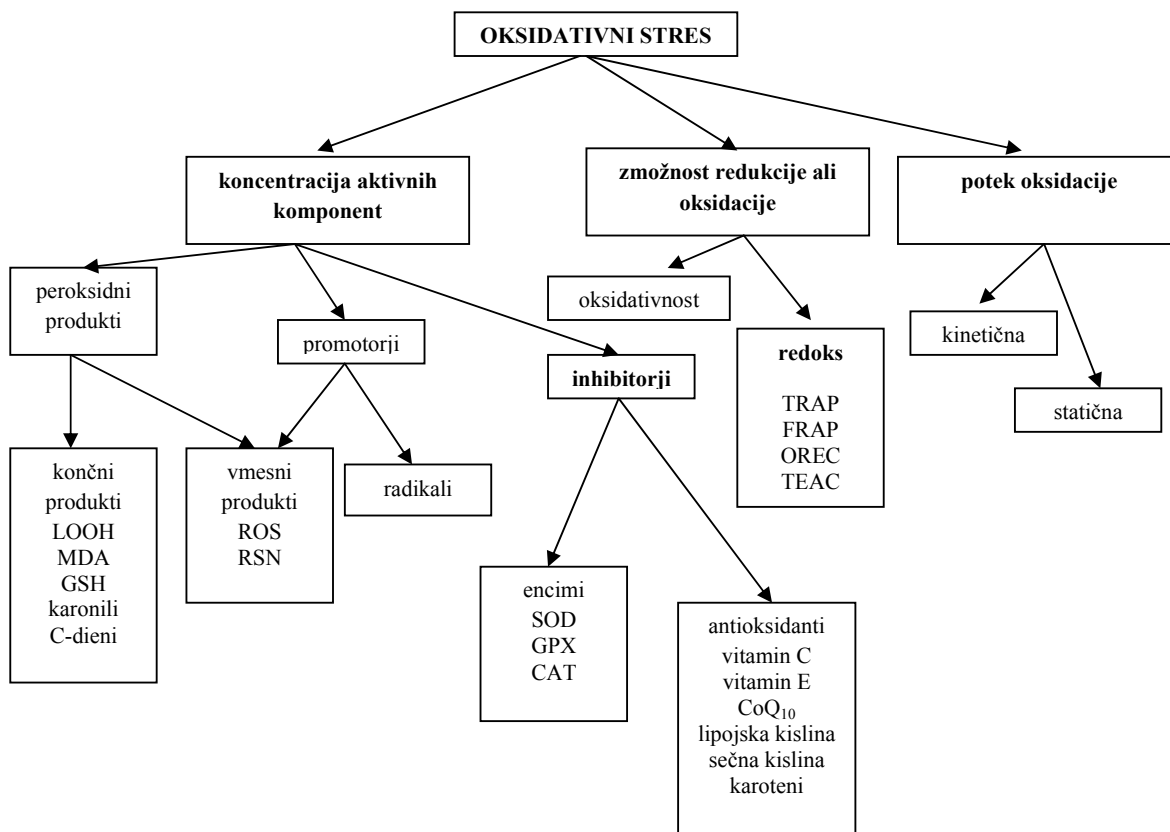


Slika 8: Prikaz delovanje antioksidativne mreže med vitaminom E, vitaminom C, CoQ₁₀, glutationom in lipojsko kislino (Packer in sod., 2001: 371S)

Figure 8: The antioxidative network showing the interaction among vitamin E, Vitamin C, CoQ₁₀, glutathion and lipoic acid (Packer et al., 2001: 371S)

2.2.3 Metode vrednotenja oksidativnega stresa

Oksidativni stres lahko merimo na več različnih načinov: z merjenjem aktivnih komponent, z merjenjem poteka oksidacije in z merjenjem redukcije in oksidacije (Slika 9). Aktivne komponente, ki lahko ovrednotijo oksidativni stres, so lahko: promotorji oksidativnega stresa, lahko so končni produkti oksidativnega stresa ali pa inhibitorji, med katere uvrščamo antioksidativne encime in antioksidante. Oksidacija v določenem sistemu je lahko statična ali kinetična.



Slika 9: Pregled možnih parametrov za vrednotenje oksidacijskega stresa

Figure 9: Review of possible parameters for evaluating oxidative stress

2.2.3.1 Inhibitorji oksidativnega stresa

V svojem raziskovalnem delu sem se osredotočila na inhibitorje oksidativnega stresa, oziroma člene antioksidativne mreže. Primarni obrambni sistem je sestavljen predvsem iz endogenih antioksidativnih encimov, sekundarni pa iz endogenih in eksogenih nizkomolekularnih antioksidantov.

2.2.3.1.1 CoQ₁₀

V organizmu se nahajajo štiri večje skupine maščobotopnih antioksidantov: karotenoidi, tokoferoli, estrogeni in CoQ₁₀ (Bentinger in sod., 2007). Med njimi je CoQ₁₀ edini, ki se sintetizira v telesu (Littaru in Tiano, 2007). CoQ₁₀ deluje kot zelo učinkovit antioksidant v reducirani obliki, kot ubikinol. V endomembranah in plazmi so znani trije encimi, ki so sposobni CoQ₁₀ pretvoriti v reducirano obliko: NADH citokrom b5 oksidoreduktaza, NADH/NADPH oksidoreduktaza in NADPH koencim Q reduktaza (Crane, 2000).

Približno 60 % CoQ₁₀ potuje po krvi z LDL delci, 25 % s HDL in 15 % z ostalimi lipoproteini (Allema in sod., 1997). V LDL delcih ščiti maščobe in holesterol. Oksidativna sprememba LDL delcev naj bi bil prvi korak do razvoja arterogeneze (Witztumin sod., 1991). Poleg CoQ₁₀ je pomembni lipofilni antioksidant v plazmi vitamin E (Traber in Sies, 1996), ki je prav tako uspešen antioksidant pri lipidni peroksidaciji. CoQ₁₀ v tem primeru prevzame vlogo regeneriratorja tokoferola. V krvi vsebnost CoQ₁₀ predstavlja samo 1/10 vsebnosti tokoferola, v tkivih pa je količina CoQ₁₀ 6-10 krat višja kot količina tokoferola (Bentinger in sod., 2007). V primeru vnosa CoQ₁₀ s hrano ali s prehranskimi dodatki se njegova vsebnost v krvi poveča, glede na količino zaužitega CoQ₁₀ in njegove oblike. Raziskave so dokazale, da CoQ₁₀ ščiti lipide pred lipidno peroksidacijo bolj uspešno kot tokoferol, likopen in β-karoten (Stocker in sod., 1991).

2.2.3.1.2 Lipojska kislina

Lipojska kislina (1,2-ditiolan-3-pentanojska kislina) ima pomembno vlogo v metabolizmu kot kofaktor, vključen v različne komplekse encimov, ki katalizirajo oksidativno dekarboksilacijo α-keto kislin (Reed, 1974). Lipojsko kislino imenujemo univerzalni antioksidant, saj je zaradi svoje kemijske strukture sposobna delovati tako v reducirani (dihidrolipojska kislina) kot v oksidirani obliki (lipojska kislina) v vodnem in v maščobnem mediju (Kagan in sod., 1992, Islam, 2009). Obe obliki imata sposobnost ugašanja reaktivnih kisikovih zvrsti, kot so superoksidni radikal, hidroksilni radikali, peroksilni radikali in sigletni kisik (Flavia in sod., 2002). Lipojska kislina je močno reducirajuča komponenta, ki ima sposobnost regenerirati številne antioksidante v njihovo

aktivno obliko. Neposredno regenerira CoQ₁₀, glutation in askorbinsko kislino, indirektno pa α -tokoferol (Packer in sod., 1995; Biewenga in sod., 1997).

2.2.3.1.3 α -tokoferol

Vitamin E je skupno ime za osem sorodnih tokoferolov in tokotrienolov. Med njimi je najbolj raziskan α -tokoferol, ki ima od vseh oblik tudi največjo biorazpoložljivost in največjo antioksidativno aktivnost (Kamal-Eldin in Appelqvist, 1996). α -tokoferol je lipofilni antioksidant, ki je sposoben reagirati s prostimi lipidnimi radikali, ki nastajajo pri verižni reakciji lipidne peroksidacije in prepreči nadaljevanje propagacijske faze omenjene reakcije (Serbinova in Packer, 1994). Pri tem nastane α -tokoferol radikal, ki se z drugimi antioksidanti, kot so askorbinska kislina, reducirani glutation ali CoQ₁₀ (Kagan in sod., 2000) pretvori nazaj v reducirano obliko.

2.2.3.1.4 Superoksid dismutaza (SOD)

SOD je skupina encimov, ki katalizirajo razpad superoksidnega aniona na vodikov peroksid in kisik (Enačba 1).



SOD ima v aktivnem mestu različne kofaktorje, ki so lahko bakrov, cinkov, manganov ali železov ion. V živalih se v mitohondrijskem matriksu nahaja SOD, ki ima v aktivnem mestu manganov ion, v mitohondrijskem medmembranskem prostoru in drugje po celici pa se nahaja SOD, ki ima v aktivnem mestu bakrove ali cinkove ione (CuZnSOD) (Fridovich, 1997).

2.2.3.1.5 Glutation peroksidaza (GPx)

Glutation peroksidaza je del glutationskega sistema, ki ga sestavljajo še glutation, glutation reduktaza in glutation S-tranferaza. Glutation peroksidaza je encim, ki v svojem aktivnem mestu vsebuje selen in katalizira redukcijo vodikovega peroksida do vode z oksidacijo reduciranega glutationa (GSH) (Enačba 2).



Nastali produkt je oksidirani glutation (GSSG), ki sestoji iz dveh GSH, povezanih z disulfidnim mostom. GSSG se v reducirano stanje konvertira z glutation reduktazo (slika 8).

Obstajajo najmanj štiri vrste GPx, ki so pomembne pri detoksifikaciji vodikovega peroksida, lipidnih peroksidov in organskih hidroperoksidov (Brigelius-Flohe, 1999).

2.2.3.1.6 Celokupna antioksidativna kapaciteta (TAC)

Merjenje celokupne antioksidativne kapacitete v določenem poskusu je zaradi interakcij antioksidantov in vzpostavljenega ravnotežja med njimi lahko nepravilno. K povečanju celokupne antioksidativne kapacitete prispevajo posamezni antioksidanti kot so tokoferoli, ascorbinska kislina, karotenoidi, sečna kislina in bilirubin. Za določanje je bilo razvitih več metod (TRAP, FRAP, OREC in TEAC), večina od teh temelji na inhibiranju prostih radikalov v vzorcu. Merjenje antioksidativne kapacitete je smiselno, kadar iščemo podatke o biorazpoložljivosti določenega antioksidanta, zaužitega s hrano.

2.3 REJA PIŠČANCEV

Perutninska proizvodnja je ena izmed največjih in najhitreje rastočih mesnih proizvodenj na svetu. Vzrok leži v čedalji večji izobraženosti potrošnikov, ki dajejo prednost belemu mesu, predvsem piščančjemu in izdelkom iz piščančjega mesa.

Proizvodnja perutninskega mesa v Sloveniji predstavlja četrto najpomembnejšo živinorejsko dejavnost. Na področju priraje perutninskega mesa je vodilno podjetje Perutnina Ptuj, ki je kot prva v slovenski prostor vpeljala prosto rejo piščancev in zanjo pridobila označbo višje kakovosti (Pečaver, 2000).

Najpomembnejše lastnosti brojlerjev so hitra rast, dober izkoristek krme in odpornost na bolezni. Piščance brojlerje, ki jih dandanes vzrejajo, so rezultat dolgotrajnega selekcijskega dela. Čas, ki je potreben, da brojler doseže 1,5 kg žive teže, se je s 120 dni v letu 1925 skrajšal na 40 dni v letu 2005 (Albers in Groot, 1998). Doseganje izboljšane genetskega potenciala predstavlja metabolni napor za organizem, ki vodi k razvoju vodenice (ascitesa) in sindromu nenadne kapi. K slabšemu zdravstvenemu stanju živali pripomore osiromašeno okolje, prilagojena osvetlitev in majhna površina na kateri se giblje. Intenzivna reja piščancev vodi do razvoja resnih problemov, kot so: kronične deformacije nog, ožganine nožnih blazinic in ožganine v predelu tarzalnega sklepa, šepanje, kožne infekcije in anomalije na očeh (Bessei, 2006).

2.3.1 Vpliv CoQ₁₀ na rejo piščancev

Za zdravstveno stanje piščancev je izredno pomembno, kako organizem uspe reducirati oksidativni stres. Proti konstantno nastajajočim radikalom, ki so posledica aktivnega metabolizma, se organizem bori s serijo vodotopnih in maščobotopnih antioksidantov, ki

sestavljajo antioksidativno mrežo. V tej prepletajoči antioksidativni mreži igra pomembno vlogo CoQ₁₀. Dodatek CoQ₁₀ v krmo piščancev je pokazal pozitiven učinek na zmanjšanje vodenice (Geng in sod., 2004; Geng in Guo, 2005), ki predstavlja enega od največjih ekonomskih problemov pri brojlerjih (Holcman, 2004). Prav tako so nedavno dokazali, da se CoQ₁₀, zaužit s krmo pri kokoših nesnicah akumulira v jajcih, istočasno pa se zmanjšuje koncentracija holesterola (Kamisoyama in sod., 2010).

2.3.2 Piščančje meso

Perutninsko meso je kvalitetno zaradi visokovrednih beljakovin živalskega izvora in majhne vsebnosti mišične maščobe. Maščoba se pri perutnini nahaja pod kožo ali med mišičnino, ki pa jo med pripravo jedi zlahka odstranimo. Piščančje meso vsebuje od 70-75 % vode in 20 % beljakovin. Meso v posameznih delih piščanca se razlikuje v vsebnosti maščobe, ki je lahko od 1% v pustem mesu prsi do 13 % v temnejšem mesu beder in peruti. Vsebnost holesterola v mesu je med 60-80 mg/100 g mesa, vsebuje pa tudi ostale mikroelemente, kot so: natrij, kalij, fosfor, magnezij, železo, cink, selen, baker in mangan (Golob in sod., 2008).

2.4 KEMIJSKE ANALIZNE TEHNIKE

Ruski botanik M. Cvet je leta 1906 razvil metodo za določevanje rastlinskih barvil z uporabo kolon, napoljenih s CaCO₃. Po dodatku rastlinskega ekstrakta je z izpiranjem kolone z organskim topilom ločil več barvnih pasov. Od tod izvira tudi ime analizne tehnike kromatografija (barva, zapis). Danes kromatografija predstavlja analizno tehniko za ločevanje komponent v vzorcih. Komponente se ločujejo na podlagi različnih mehanizmov, kar je odvisno od izbire stacionarne in mobilne faze.

2.4.1 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl. High Performance Liquid Chromatography) je ena izmed najbolj uporabljenih analiznih tehnik. Razvila se je iz kolonske kromatografije, pri čemer so uporabljene gravitacijske sile pri kolonski kromatografiji nadgradile črpalke, ki dosegajo tudi do več barov nadtlaka. Črpalka zagotavlja tudi enakomeren pretok, ki potiska vzorec skozi kolono. V koloni je polnilo, ki ima zelo majhne delce. Danes je na tržišču veliko različnih kromatografskih kolon z različnimi stacionarnimi fazami (Berthod, 1991).

Za razumevanje tekočinske kromatografije moramo poznati določene izraze in zakonitosti (učinkovitost kromatografije, retenzijski faktor, širina kromatografskega vrha...), ki

ovrednotijo proces separacije. Ločene komponente ovrednotimo z različnimi detektorji, najbolj uporabljena sta UV in fluorometrični detektor.

2.4.2 Masna spektrometrija

Instrumenti, ki dajejo največ informacij o substanci, ki jo analiziramo, glede na količino uporabljene snovi, so masni spektrometri. Masni spektrometer sestoji iz treh glavnih delov: ionski izvor, masni analizator, ki razvrsti ione po njihovi masi z uporabo električnega in magnetnega polja, in detektor, ki meri količino posameznega iona. Ionizirane molekule vzorca so ločene na osnovi razmerja naboj/masa (m/z). Glede na naravo vzorca ločimo več ionizacijskih tehnik. Za tekoče vzorce največkrat uporabljamo ionizacijo z elektrorazprševanjem (ESI) in kemijsko ionizacijo pri atmosferskem tlaku (APCI) (Bruins, 1991)

2.4.2.1 Ionizacija z elektrorazprševanjem

Mobilno fazo z vzorcem potiskamo skozi zelo tanko, nabito kovinsko kapilaro (2,5-4 kV) do razpršilnika. ESI kapilara razprši raztopino vzorca v kapljice, ki so na površini električno nabite. Za razprševanje in hitrejše uparjevanje topila uporabljamo nosilni plin, kot je dušik. Ko topilo odpareva, se kapljice manjšajo in naboj se koncentrira. Ko dosežemo kritično točko, je topila v kapljici tako malo, da ne prenese nadaljnega večanja elektronske gostote, razpade ta v manjše kapljice. Temu pravimo Coulombovo cepljenje kapljic, ki poteka tako dolgo, dokler ne ostane substanca v obliki iona, ki potuje naprej v masni analizator (Fenn in sod., 1990).

2.4.2.2 Kemijska ionizacija pri atmosferskem tlaku

Mobilno fazo z vzorcem segrejemo do visoke temperature in razpršimo z velikim pretokom dušika. Nastane aerosol, ki ga ioniziramo s pomočjo igle, ki ustvarja visoko napetost. Slabost APCI je, da zaradi visokih temperatur pogosteje nastanejo fragmentirani ioni, medtem ko ESI štejemo med mehke tehnike ionizacije, kjer v glavnem dobimo molekulske ione (Zaikin in sod., 2006).

2.4.3 Planarna tekočinska kromatografija (TLC)

Planarno tekočinsko kromatografijo (angl. High Performance Thin Layer Chromatography) uvrščamo med planarne separacijske tehnike, ki omogočajo sočasno analizo različnih vzorcev in referenčnih standardov ter različne načine detekcije. V nasprotju s klasičnimi kromatografskimi tehnikami je tok mobilne faze posledica delovanja kapilarnih sil. Ločevanje komponent poteka med potovanjem mobilne faze po tanki plasti

sorbenta, ki je nanešen na primerni podlagi. Detekcijo komponent lahko izvedemo pri vidni ali UV svetlobi. Posamezne komponente vzorca, ki ne absorbirajo svetlobe, lahko derivatiziramo s primernimi derivatizacijskimi reagenti v spojine, ki svetlobo absorbirajo ali fluorescirajo. Z razvojem tehnike lahko lise na plošči integriramo in tudi kvantitativno ovrednotimo. Praktično največ uporabljamo HPTLC plošče, ki imajo manjše in bolj homogene delce sorbenta in tudi tanjšo plast, zato je separacija boljša, lise bolj ostre, meja detekcije pa nižja (Prošek, 2003).

2.4.4 Validacija

Pojem validacije je uvedla farmacevtska industrija leta 1956 s sprejetjem dobre proizvodne prakse. V analizi kemiji je najsprejemljivejša definicija, ki jo je leta 1986 pripravil ameriški vladni urad za zdravila in prehrano (ang. Food and Drug Administration):

» Validacija procesa je dokumentiran program, ki nudi visoko stopnjo zanesljivosti, da bo specifični proces konstantno proizvajal izdelek, ki ustreza vnaprej postavljenim specifikacijam.« Validiramo lahko opremo, procese, analizne postopke in postopke čiščenja. Pri validaciji analiznih postopkov ločimo tri sklope validacije: kvalifikacija osnovnih instrumentov (servisi), validacija analizne metode (v času razvoja metode) in preizkus ustreznosti sistema (Prošek in sod., 1997)

2.4.4.1 Validacija analiznih metod

Pri validaciji analiznih metod moramo določiti sledeče parametre:

Točnost

Točnost posamezne analizne metode pomeni, v kakšni meri smo se z neko določitvijo uspeli približati pravi vrednosti. Ne poznamo metode, ki bi dala absolutno pravilne rezultate, torej se pravi vrednosti lahko le približamo, kar pomeni, da si moramo postaviti dopustno mejo odstopanja od prave vrednosti. Čim bolj točne rezultate lahko zagotovimo s statistično obvladljivo metodo brez systemske napake, ter s precizno metodo, ki daje čim manjše sipanje meritev.

Selektivnost

Selektivnost metode pomeni, da je sposobna ovrednotiti posamezno substanco tudi tedaj, ko se nahaja v prisotnosti večjega števila drugih komponent.

Linearnost

Linearnost metode pomeni, da obstaja med koncentracijo substance in odzivom linearna zveza, $y = k * x$. Čeprav se zagovarja uporaba linearne umeritvene krivulje, mnogi analitiki dokazujejo uporabo umeritvenih krivulj višjih redov, kakor tudi logaritemskih krivulj. V

analiznih tehnikah ni linearnih odnosov med koncentracijo substance in odzivom, torej gre samo za linearne približke na relativno ozkem koncentracijskem območju.

Preciznost

Preciznost metode podaja velikost sipanja rezultatov pri posameznih ponovljenih meritvah. Meritve lahko potekajo ena za drugo, takrat govorimo o ponovljivosti meritev na kratki rok, lahko pa je med meritvami določena časovna odvisnost, takrat govorimo o ponovljivosti na daljši rok.

Delovno območje

Delovno območje posamezne analizne metode je območje med zgornjo in spodnjo točko umeritvene krivulje, ki ustreza definiranim parametrom (preciznost, zanesljivost in linearnost).

Meja detekcije (LOD)

Meja detekcije posamezne metode je tista najnižja koncentracija komponente v vzorcu, ki jo še lahko zaznamo, a je ne moremo ovrednotiti. Obstaja precej različnih načinov določevanja, ki so odvisni tudi od tega, katere tehnike se poslužujemo. Pri TLC metodi je to točka, ki jo že lahko vizualno zaznamo. Pri ostalih tehnikah pa se poslužujemo ali definicije, ki določa točko na podlagi razmerja $Z = \text{signal}/\text{šum}$ ($3 < Z < 6$), ali s pomočjo formule $\text{LOD} = 3,3 \sigma / S$, pri čemer je σ standardna deviacija in S naklon umeritvene krivulje.

Meja kvantizacije (LOQ)

Meja kvantizacije je minimalna količina injiciranega (nanešenega) vzorca, ki nam da ponovljive meritve. LOQ se lahko določa na več načinov:

- iz razmerja signal / šum, kjer mora biti signal 10 do 20 krat večji od šuma
- s pomočjo formule $\text{LOQ} = 10 * \sigma / S$, kjer je σ standardna deviacija, S pomeni naklon umeritvene krivulje
- iz standardne deviacije meritev, kjer mora biti za vzorce izbrane koncentracije relativna standardna deviacija (RSD) $< 15 \%$
- iz umeritvene krivulje, kjer mora biti RSD izračunane koncentracije najnižjega kalibracijskega standarda $< 15 \%$

Najbolj logičen je princip določitve LOD in LOQ iz intervala zaupanja.

Stabilnost

Skozi celoten proces določene analizne metode lahko pride do razpada komponent. Razlogi za razpad so lahko različni. Največkrat je krivo izpostavljanje zraku ali topilom ali izpostavljenosti višjim temperaturam, razpad pa lahko povzroči tudi nepravilno shranjevanje vzorcev.

Robustnost

Robustnost imenujemo parameter, ki pokaže, v kakšni meri je neka analizna metoda odvisna od enostavnih sprememb v laboratoriju in med laboratoriji.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 VPLIV DODANEGA CoQ₁₀ NA NJEGOVO KOPIČENJE V TKIVIH PIŠČANCEV

3.1.1 Način reje piščancev

Dvesto devet piščancev provenience *ROSS 308*, starih en dan, je zagotovila Perutnina Ptuj d.d. Poskus se je začel 28.3.2006 in bil končan 9.5.2006. Opravljen je bil v testnem hlevu za perutnino Fakultete za kmetijstvo in biositemske vede, Univerze v Mariboru. Reja je potekala po ustaljeni tehnologiji talne reje na globokem nastilu. Sto piščancev provenience *ROSS 308* je bilo razdeljenih v štiri testne skupine po 25 piščancev (G1-G4) in kontrolno skupino (G0) v kateri je bilo 109 piščancev. Prva skupina (G4) je dobivala krmo z dodatkom CoQ₁₀ vse dni poskusa (40 dni), druga skupina (G3) je prejela obogateno hrano zadnjih 30 dni, tretja skupina (G2) zadnjih 20 dni in četrta skupina (G1) 10 dni pred zakolom. Peta, kontrolna skupina (G0) je ves čas poskusa dobivala krmo brez dodatka CoQ₁₀ (Preglednica 6). Tehtanje piščancev se je izvajalo na 10., 21., 29., 36. in 42. dan, na isti dan se je tehtala tudi skupna poraba krme na posamezno skupino. Mikroklimatski pogoji so bili avtomatsko regulirani, redno je bila zabeležena vlaga in temperatura.

Preglednica 6: Shema poskusa krmljenja piščancev s CoQ₁₀
Table 6: Experimental design of feeding chicken with CoQ₁₀

Skupina piščancev	G0	G1	G2	G3	G4
začetek hranjena (na dan)	/	30	20	10	0
čas krmljena s krmo dodanim CoQ ₁₀ (število dni)	/	10	20	30	40
količina CoQ ₁₀ v krmi (mg/dan)	/	5	5	5	5
število piščancev	109	25	25	25	25

Piščanci provenience *Ross 308* so bili ob zakolu stari 42 dni. Pred zakolom je bila piščancem odvzeta kri, ki smo jo zbirali v epruvete s heparinom in jih nato 15 minut centrifugirali pri 4500 obr./min 5 °C. Po zakolu so bila ustrezno ločena posamezna tkiva (srce, jetra, prsa, bedra, peruti, maščoba) in shranjena pri -20 °C. Vzorci so bili vakuumsko

pakirani in ustrezno označeni. Za analizo je bilo v vsaki skupini (G0, G1, G2, G3, G4) pripravljenih naključno izbranih šest vzorcev posameznih tkiv. Vzorcem (bedra, peruti in prsa) smo odstranili kožo, odvečno maščobo ter kosti, kjer so le-te bile prisotne, in meso homogenizirali v sekljalniku.

3.1.1.1 Priprava krme

Piščanci so med vzrejo prejeli dve vrsti krme *Starter* (do 15. dneva) in *Finisher* (po 16. dnevu). Kemijska sestava obeh krm je prikazana v preglednici 7. Krmilo je bilo zmešano v mešalnici Perutnine Ptuj d.d.. Pripravljena je bila predmešanica, ki smo jo nato z dodatkom krmila redčili tako, da je bilo v končni mešanici 0,0042% CoQ₁₀. Kontrolna skupina je prejela krmo brez dodanega CoQ₁₀, ostale skupine so prejemale 5 mg CoQ₁₀ na dan ustrezno število dni, v skladu s protokolom (Preglednica 7).

Preglednica 7: Kemijska sestava krme

Table 7: Chemical composition of fodder

sestava %	starter	finišer
koruza	47	44
pšenica	8	20
sojine tropine	32	26
koruzni gluten	3	0
predmešanica	2,0*	2,0**
maščobe	1,7	2,7
monokalcijev fosfat	1,8	1,6
kalcijev karbonat	1,6	1,3
natrijev klorid	0,9	0,9
metionin	0,3	0,4
lizin	0,3	0,14
treonine	0,1	0,20
krmna mešanica vsebuje		
surove beljakovine	21,5	18,1
surove maščobe	3,5	5,5
surove vlaknine	5	5
surovega plevela	5	5

*V kg mešanice je dodano: vitamin A (E 672) 13500 IU; vitamin D3 (E 671) 5000 IU; vitamin E (DL- α tokoferol) 100 mg; vitamin B1 4 mg; vitamin B2 12 mg; vitamin B6 5 mg; vitamin B12 20 μ g; vitamin K3 4 mg; vitamin H 0,20 mg; folna kislina 2,0 mg; CYGRO (E 770) 5 mg; etoksikvin (BHA E320, BHT E321) 120 mg; niacin 70 mg; Mn 100 mg; Zn 80 mg; Fe 50 mg; Cu 20 mg; jod 2 mg; Co 0,3 mg; Se 0,30 mg; pantotenska kislina 20 mg; holin klorid 750 mg

**V kg mešanice je dodano: vitamin A (E 672) 12000 IU; vitamin D3 (E 671) 5000 IU; vitamin E (DL- α tokoferol) 50 mg; vitamin B1 3 mg; vitamin B2 6 mg; vitamin B6 4 mg; vitamin B12 15 μ g; vitamin K3 3 mg; vitamin H 0,15 mg; folna kislina 1,5 mg; CYGRO (E

Jazbec Križman P. Vpliv dodanega CoQ₁₀ na njegovo vsebnost v tkivih piščancev in zmanjševanje oksidacijskega stresa med rejo.
Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2011

770) 5 mg; etoksikvin (BHA E320, BHT E321) 120 mg; niacin 60 mg; Mn 100 mg; Zn 70 mg; Fe 40 mg; Cu 20 mg; jod 1 mg; Co 0,3 mg; Se 0,30 mg, pantotenska kislina 15 mg; holin klorid 600 mg

3.1.1.2 Priprava kompleksa CoQ₁₀-βCD

V krmo je bila dodana pasta, ki je vsebovala CoQ₁₀, vključen v β-ciklodekstrin, narejena po patentu Laboratorija za prehrabeno kemijo, Kemijski inštitut (Prošek in sod., 2005). Pasta je bila pripravljena v Laboratoriju za prehrabeno kemijo, analizni certifikati so jamčili za 7,5 % vsebnost CoQ₁₀. Do uporabe je bila pasta shranjena v temnem in hladnem prostoru (T < 6 °C).

3.1.2 Kemikalije in priprava standardov

3.1.2.1 Kemikalije

Metanol, etanol, 2-propanol, acetonitril, kloroform, petrol eter, dietil eter, fosfomolibdenska kislina in holesterol so bili dobavljeni pri proizvajalcu Merck (Darmstadt, Nemčija), očetna kislina pa pri Fluki (Seelze, Nemčija). Standard CoQ₁₀ je bil kupljen pri Sigm Aldrich (Steinheim, Nemčija). Surovine za proizvodnjo vodotopnega kompleksa CoQ₁₀-βCD so bile kupljene: β-ciklodekstrin pri Xi'an Hong Chang Pharmaceuticals (Kitajska) in CoQ₁₀ pri Linyi Tianliheng Trade (Kitajska). Deionizirano vodo smo pridobili iz Milli-Q aparature (Millipore, USA). Kompleks CoQ₁₀-βCD z 7,5 % vsebnostjo CoQ₁₀ smo sintetizirali v Laboratoriju za prehrabeno kemijo (Kemijski inštitut, Ljubljana).

3.1.2.2 Priprava raztopin standardov

Raztopine standarda CoQ₁₀ smo pripravili v 2-propanolu v koncentracijskem območju od 0,02 mg/L do 10 mg/L za analizo z HPLC-MS. Raztopine standarda holesterola smo pripravili v 2-propanolu v koncentracijskem območju od 1,0 mg/L do 1,5 mg/L. Za analizo CoQ₁₀ z HPTLC smo pripravili založno raztopino s koncentracijo 0,05 mg/L in za analizo holesterola založno raztopino s koncentracijo 0,01 mg/L.

3.1.3 Analizne metode

3.1.3.1 Analiza CoQ₁₀ in holesterola v piščančjih tkivih in plazmi

Ekstrakcija maščobe iz različnih piščančjih tkiv je bila izvedena na Oddelku za živilstvo, Katedra za tehnologijo mesa in vrednotenje živil Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani. Skupino, ki je pripravila vzorce je vodil dr. Tomaž Polak. Priprava vzorcev je opisana v treh diplomski nalogah (Penko, 2008; Halilović, 2008; Lušnič, 2008).

V dewarjevo steklenico smo natehtali 30 g sesekljanih in odtaljenih različnih piščančjih tkiv (jetra, srce, bedra, peruti in prsi), dodali destilirano vodo v razmerju 1:1 ter homogenizirali z ultraturaxom (Ultra-turax T25 in nastavkom S25N-18G;IKA, Nemčija). Med homogenizacijo je bila steklenička z vzorcem potopljena v ledeno kopel, da smo preprečili pregretje vzorca. Po končani homogenizaciji smo v 50 mL centrifugirko odtehtali 3 g homogenata in mu dodali 15 mL destilirane vode, segrete na 40 °C. Iz vsakega vzorca sta bili pripravljene dve paralelki. Paralelki smo nato ročno stresali 5 min in jih nato še za 15 min postavili na ultrazvočno kopel (Bransonic 3510e-DTH, Branson, Nemčija). Nato smo v vsako centrifugirko dodali 20 mL mešanice topil kloroform : metanol (2 : 1, v/v). Zmes v centrifugirki smo ročno stresali 5 min in jo nato še za 15 min postavili v ultrazvočno kopel. S šest minutnim centrifugiranjem pri 1750 × g smo ločili organsko fazo od vodne. Po centrifugiranju smo odpipetirali 10 mL spodnje-organske faze in jo prenesli v 100 mL bučko z okroglim dnom. Ekstrakcijo z 20 mL mešanice topila kloroform: metanol (2 : 1, v/v) smo ponovili še enkrat. Po končani ekstrakciji smo kloroform odparili z vakuumskim rotavaporjem (Büchi, Rotvapor R-114 z Vac® V-500, Švica). Ostanek v bučki smo raztopili v 2 mL heksana in vzorec shranili v temne vialke. Topilo smo nato odparili z dušikom in dobljene vzorce shranili do analiz pri -30 °C. Suh preostanek smo raztopili v 5 mL 2-propanola in koncentracijo CoQ₁₀ analizirali s HPLC-MS metodo. Po ustreznem redčenju smo analizirali koncentracijo holesterola s HPTLC metodo.

Ekstrakcija CoQ₁₀ in holesterola iz plazme je bila izvedena po sledečem postopku. Tik pred analizo smo plazmo odtajali v vodni kopeli s temperaturo 35-39 °C. 400 µL plazme smo denaturirali z 200 µL 10% raztopine perklorne kisline v etanolu. Iz nastale oborine smo CoQ₁₀ 3-krat ekstrahirali s po 2 mL n-heksana. Organske faze smo združili, topilo uparili pod znižanim tlakom in oljni preostanek raztopili v 200 µL 2-propanola. Holesterol v vzorcih smo analizirali s HPTLC metodo, CoQ₁₀ smo določili s HPLC-MS metodo.

CoQ₁₀ smo analizirali na stacionarni fazi Gemini C18, 5 µm, 150 x 4,6 mm (Phenomenex, Torrance, CA, ZDA). Mobilno fazo A je sestavljala mešanica topil 1,4-dioksan : metanol : etanol : očetna kislina (5 : 30 : 65 : 0,1, v/v/v/v), B pa 100 % acetonitril. Začetni pogoji kromatografije so bili 30 % A in 70 % B. Po 1 minuti je delež mobilne faze A začel linearno naraščati do 100 % 11 minut in ostal 3 minute nespremenjen. Nato smo sistem spremenili na začetne pogoje za 2 minuti. Pretok mobilne faze je bil 1 mL/min pri temperaturi kolone 45 °C. Retenzijski čas CoQ₁₀ je bil 10,6 ± 0,5 minute. Identifikacijo in kvantitativno določitev CoQ₁₀ smo izvedli s HPLC sistemom Finnigan Surveyor sklopljenim z masnim spektrometrom. Uporabili smo kemijsko ionizacijo s pozitivnimi ioni pri atmosferskem tlaku. Temperatura razprševanja je bila 450 °C, napetost razelektritve 6,0 kV, tok razelektritve 5,0 µA, tlak nosilnega plina (angl. sheath gas) 0,8 MPa, pretok pomožnega plina (angl. auxiliary gas) 1,7 l/min, temperatura kapilare 250 °C in napetost

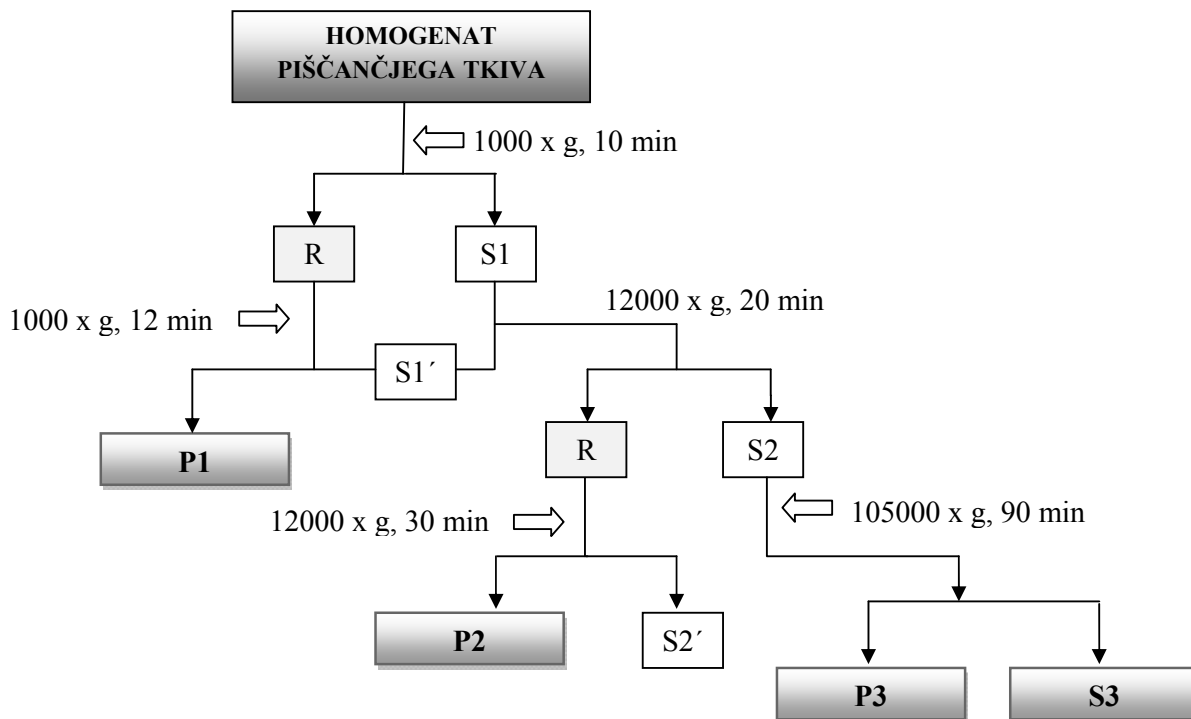
kapilare 23,0 V. Za kvantitativno določitev CoQ₁₀ smo uporabili molekulska masa (M+H)⁺ m/z 863,4 ± 0,5. Podatki so bili obdelani s programsko opremo Xcalibur 1,3 (Thermo Finnigan Corporation, ZDA)

Vzorci, uporabljeni v HPTLC analizi, so bili pred nanašanjem ustrezno redčeni. Faktor redčenja je bil dobljen z vizualno oceno predhodno pripravljenih testnih plošč. Na posamezno ploščo je bilo nanešeno 19 nanosov, 6 vzorcev, kontrolni vzorec v dveh paralelkah in 5 točk umeritvene krivulje. Vzorci so bili nanešeni z Linomatom IV (Camag, Mutenz, Švica) v črti dolžine 4 mm s 6 mm razmaki med nanosi. Ločba je potekala na HPTLC ploščah (Merck Silica gel 60, Code 1.05641). Plošče so bile razvite v normalni HPTLC kadi. Uporabljena je bil mobilna faza petroleter : dietileter : očetna kislina (170 : 30 : 2, v/v/v), čas razvijanja je bil 30 minut. Po končanem razvijanju so bile plošče posušene v sistemu za kontrolirano sušenje (Iskra PIO, Šentjernej, Slovenija), ki je bil izdelan po načrtih Kemijskega inštituta. Izvedena je bila derivatizacija ločenih komponent z 10 % fosformolibdensko kislino v etanolu. Po končani derivatizaciji so nastali na rumeni podlagi modri madeži, ki so bili posneti z denzitometrom, TLC scanner 3 (Camag, Mutenz, Švica) in ovrednoteni s programsko opremo CATS (Camag, Mutenz, Švica).

3.1.3.2 Analiza CoQ₁₀ in holesterola v frakcioniranih piščančjih prsih

Frakcioniranje piščančjih prsi je bilo narejeno v sodelovanju z Odsekom za molekularne in biomedicinske znanosti na Institutu Jožefa Stefana v Ljubljani. Shema frakcioniranja je prikazana na sliki 10 in je narejena po postopku, ki ga je opisal Casado in sod. (1992).

Natehtali smo 10 g razrezanih piščančjih prsi, ki smo jim dodali dodali 100 mL raztopine A (7mM imidazola, pH 7,4; 0,32 M saharoze in 2 mM EDTA) in 100 µL koktejla inhibitorjev proteaz (31µg/mL benzamidina, 25 µg/mL bacitracina, 2 µg/mL sojinega inhibitor tripsina, 1,4 µg/mL pepstatina, 1 µg/mL leupeptina, 0,1 mM PMSF). Mešanico smo homogenizirali z Ultraturaxom (IKA T²⁵ digital, Werke, Nemčija). Homogenat smo centrifugirali pri 1000 × g 10 min. Supernatant (S1) smo oddekantirali in usedlino resuspendirali v 40 mL pufra A. Zmes smo ponovno centrifugirali 12 min na 1000 × g in oddekantirali supernatant (S1'). Dobljena usedlina predstavlja frakcijo 1 (F1). Supernatanta S1 in S1' smo združili in centrifugirali 30 min na 12000 × g. Supernatant S2 smo oddekantirali in usedlino raztopili v pufri A, ter ponovno centrifugirali. Rezultat je bila F2 frakcija in supernatant S2'. Supernanta S2 in S2' smo združili in ponovno centrifugirali, ter tako dobili F3 frakcijo in supernatant, ki je predstavljal frakcijo S3.



Slika 10: Prikaz frakcioniranja piščančjega tkiva: P1 predstavlja frakcijo jeder, P2 predstavlja frakcijo mitohondrijev, P3 predstavlja frakcijo mikrosomov in S3 predstavlja preostali supernatant

Figure 10: Fractionation scheme of chicken homogenate: P1 present nuclear fraction, P2 present mitochondrial fraction, P3 present microsomal fraction and S3 is remaining supernatant

Posameznim usedlinam (P1-P3) smo dodali 50 mL tople destilirane vode in jih kvantitativno prenesli v lij ločnik. Ekstrakcijo željenih komponent smo ponovili dvakrat z 20 mL kloroforma. Organske faze smo združili in jih odparili na vakuumskem rotavaporju pri 30-40 °C (R-144, opremljen z vodno kopeljo B-480, Büchi, Flawil, Švica). Suhemu ostanku smo dodali 5 mL 2-propanola in ga filtrirali čez membranski filter 0,2 µm. Opisani postopek smo uporabili tudi na 50 mL supernanta S3. CoQ₁₀ in holesterol v posameznih frakcijah smo analizirali s HPTLC in HPLC-MS metodo.

Pri HPTLC metodi smo uporabili 10 cm × 10 cm HPTLC silikagelsko ploščo (Merck, Nemčija). Vzorce (10 µL), standardno raztopino CoQ₁₀ s koncentracijo 0,05 mg/mL (2,0 µL; 4,0 µL in 6,0 µL) in standardno raztopino holesterola s koncentracijo 0,01 mg/mL (4,0 µL; 6,0 µL in 8,0 µL) smo nanegli z avtomatskim nanašalnikom (Automatic Sample 4, Camag, Švica). Plošče smo razvili v vertikalni kadički, za mobilno fazo smo uporabili petroleter : dietileter : očetna kislina (170 : 30 : 2, v/v/v). Čas razvijanja je bil približno 30 min, v tem času je mobilna faza na plošči dosegla višino 8 cm. Po končanem razvijanju

smo ploščo sušili 5 min na programiranem TLC sušilniku pri 105 °C. Posušene plošče smo nato pomočili v 5 % fosfomolibdensko kislino v etanolu za 10 s. Po segrevanju na 110 °C 10 min, so nastali na rumeni podlagi vidni modri madeži, ki so bili posneti z denzitometrom, TLC scanner 3 (Camag, Mutenz, Švica) in ovrednoteni s programsko opremo CATS istega proizvajalca.

Za kvantitativno določevanje CoQ₁₀ in holesterola s HPLC-MS metodo smo uporabili Surveyor LC sistem (Thermo Finningan, Riviera Beach, CA, ZDA), sklopljen z masnim spektrometrom (Finningan MAT, San Jose, CA, ZDA). Za ločbo smo uporabili kolono Gold Hypersil C18, 5 µm, 150 mm × 4,6 mm (Thermo Scientific, Runcorn, Anglija). Za elucijo je bila uporabljena mobilna faza, sestavljena iz acetonitrila : 2-propanola : očetna kislina (55 : 45 : 1, v/v/v). Pretok mobilne faze je bil 1 mL/min pri temperaturi kolone 30 °C. Retenzijski čas CoQ₁₀ je bil 4,72 ± 0,1 minute, holesterola pa 4,0 ± 0,1 minute. Uporabili smo kemijsko ionizacijo s pozitivnimi ioni pri atmosferskem tlaku. Temperatura razprševanja je bila 400 °C, tok razelektritve 5,0 µA, tlak nosilnega plina 0,2 MPa, pretok dodatnega plina 1,7 L/min, temperatura kapilare 200 °C in napetost kapilare 27,0 V. Za kvantitativno določitev CoQ₁₀ smo uporabili molekulsko maso (M+H)⁺ *m/z* 863,4 ± 0,5 in za holesterol (M+H)⁺ *m/z* 386,0 ± 1. Podatki so bili obdelani s programsko opremo Xcalibur 1,3 (Thermo Finningan Corporation, ZDA).

3.2 INDUSTRIJSKA PRIDELAVA PIŠČANČJIH IZDELKOV S POVEČANO VSEBNOSTJO CoQ₁₀

3.2.1 Način reje piščancev

Piščanci provenience *ROSS 308*, stari en dan, so bili razdeljeni v dve skupini. Kontrolna skupina je vsebovala 36600 piščancev, testna pa 37000 piščancev. Poskus se je začel 10.4.2007 in se končal 25.5.2007. Dvajset dni pred zakolom so piščanci v testni skupini prejeli krmo, obogateno z dodatkom kompleksa CoQ₁₀-βCD, pripravljenega na Kemijskem inštitutu v Ljubljani. Vsak piščanec naj bi dnevno zaužil povprečno 5 mg CoQ₁₀. Test je bil izveden v optimalnih pogojih v prostorih Perutnine Ptuj d.d., namenjenih redni proizvodnji. Vzreja je bila spremljana v skladu s protokolom vzreje, ves čas sta bila spremljana tudi obnašanje in izgled testnih živali.

Priprava krme, s katero smo krmili piščance je opisana v poglavju 3.1.1.1 *Priprava krme*. CoQ₁₀ smo dodajali v obliki kompleksa CoQ₁₀-βCD, postopek je opisan v poglavju 3.1.1.2 *Priprava kompleksa CoQ₁₀-βCD*.

3.2.2 Odvzem in priprava vzorcev

Po 40 dneh krmljenja so bili piščanci dani v zakol. Po zakolu so bili izbrani posamezni kosi mesa iz kontrolne in testne skupine (prsna, bedra in peruti) in shranjeni pri -20°C do izvedbe analiz. Vzorci so bili vakuumsko pakirani in ustrezno označeni.

Iz mesa obeh skupin so bili pripravljene izdelki: pečene piščančje peruti, panirane piščančje krače, panirani piščančji fileji, piščančje prsi v ovitku, piščančje posebne klobase in piščančja jetrna pašteta, ki so bili ustrezno embalirani in shranjeni. V vseh skupinah so bila tkiva posameznih piščancev združena in homogenizirana. Iz homogeniziranega vzorca smo naredili dve paralelki. Vsaka izmed paralelk je bila injicirana dvakrat za analizo CoQ₁₀ in holesterola s HPLC-MS in nanešena dvakrat na HPTLC ploščo za analizo holesterola.

Za analizo vzorcev so bili uporabljene kemikalije, ki so opisane v poglavju 3.1.2.1 *Kemikalije*. Standardi so bili pripravljene kot je opisano v poglavju 3.1.2.2 *Priprava raztopin standardov*.

3.2.3 Priprava vzorcev za analizo

Ekstrakcijo vzorcev smo v primerjavi z ekstrakcijo opisano v poglavju 3.1.3.1 *Ekstrakcija piščančjih tkiv* spremenili. Želeli smo preveriti, če se količina maščob v posameznih delih piščanca in v piščančjih izdelkih zaradi krmljenja z dodatkom CoQ₁₀ spremeni. Ekstrakcija maščob je sledila spodaj napisanemu postopku.

Natehtali smo približno 30 g zmlatega vzorca, mu dodali destilirano vodo v razmerju 1:2 (v/v) in homogenizirali z Ultraturraxom (IKA, Nemčija) do homogene paste. Nato smo mu dodali 80 mL ekstrakcijske mešanice kloroform : metanol (2 : 1, v/v) in postavili za 30 min v ultrazvočno kopel. Mešanico smo nato kvantitativno prenesli v lij ločnik in dodali še 70 mL ekstrakcijske mešanice kloroform : metanol (2 : 1, v/v). Lij ločnik smo močno pretresli in pustili mirovati čez noč. Spodnjo, organsko fazo smo prefiltrirali čez Na₂SO₄ v stehano rotavaporsko bučko. Preostanek v lij ločniku smo ponovno ekstrahirali s 60 mL ekstrakcijske mešanice kloroform : metanol (2 : 1, v/v). Organske faze smo združili in jih odparili na rotavaporju pri 30-40 °C (R-144, opremljen z vodno kopeljo B-480, Büchi, Flawil, Švica). Rotavaporske bučke smo ponovno stehali in izračunali vsebnost maščobe. Za analizo vzorca smo odtehtali 100 mg maščobe, ki smo jo kvantitativno prenesli v 10 mL bučko in dopolnili z 2- propanolom. Raztopino smo pred nanosom filtrirali skozi membranski filter 0,45 (Millipore).

Pri določitvi CoQ₁₀ in holesterola v piščančjih izdelkih smo uporabili analizne metode, opisane v poglavju 3.1.3.2 *Analiza CoQ₁₀ in holesterola v frakcioniranih piščančjih prsi*.

3.3 VPLIV CoQ₁₀ NA DELOVANJE ANTIOKSIDATIVNE MREŽE

3.3.1 Način reje piščancev

Poskus je bil opravljen v testnem hlevu za perutnino Fakultete za kmetijstvo in biosistemske vede, Univerze v Mariboru. Začel se je 18.11.2009 in se končal 28.12.2009. Reja je potekala po ustaljeni tehnologiji talne reje v globokem nastilu. V poskus je bilo vključenih 250 piščancev, od tega 75 petelinčkov in 75 kokošk. Razdeljeni so bili v tri testne skupine po 50 piščancev (25 petelinčkov in 25 kokošk), kontrolna skupina pa je bila sestavljena iz 100 piščancev (50 petelinčkov in 50 kokošk). Prva skupina je prejela CoQ₁₀ (5mg/dan), druga lipojsko kislino (50 mg/dan) in tretja kombinacijo CoQ₁₀ in lipojske kisline (CoQ₁₀ po 5 mg/dan in lipojsko kislino 50 mg/dan). Piščanci iz testnih skupin so začeli prejemati obogateno krmo od 16. dneva starosti do zakola (42. dan). Priprava krme je opisana v poglavju 3.1.1.1 *Priprava krme*.

Kri za serološke raziskave je bila piščancem odvzeta iz vene *cutaneae ulnaris*. Iz vsake skupine smo naključno izbrali 7 petelinčkov in 7 kokoši, katerim smo kri odvzeli na 16., 28. in 42. dan starosti. Kri smo odvzeli pred začetkom krmljenja s krmo, obogateno s CoQ₁₀, na sredini krmljenja in pred zakolom. Vzorce krvi smo zbirali v epruvete z litijevim heparinom (Vacuette, Greiner Bio-One, Kremsmunster, Avstrija). Pred centrifugiranjem smo odpipetirali kri v krio vialo za biokemične analize (SOD in GPx). Nato smo ostalo kri centrifugirali pri 3000 obr./min 15 min in supernatant prenesli v krio vialo za analizo TAC in za kemijske analize nizkomolekularnih antioksidantov. Krio vialo smo shranili na -80 °C do izvajanja analiz.

3.3.2 Priprava nove oblike CoQ₁₀ z dekstrinom

Pripravili smo novo obliko kompleksa s CoQ₁₀, pri čemer smo do sedaj uporabljeni β -ciklodekstrin zamenjali z dekstrinom. Dektrinini so mešanica polimerov D-glukoze, ki so med seboj povezani z α -(1,4) in α -(1,6) vezjo. Nastanejo z hidrolizo škroba, ki je lahko povzročena z toploto, z encimi ali s kislinami.

V Laboratoriju za prehrabeno kemijo na Kemijskem inštitutu smo po našem tehnološkem postopku pripravili disperzijo CoQ₁₀ in dekstrina, ki smo ga na Fakulteti za farmacijo z ustreznimi pretočnimi lastnostmi pretvorili v granulato. Proces pretvorbe smo izvedli s pomočjo tehnološkega procesa granulacije s tehnologijo vrtinčenja ob uporabi procesne komore z razprševanjem od zgoraj (TOP SPRAY). Končni proizvod v obliki prahu je vseboval 2 % CoQ₁₀. Z menjavo nosilca smo piščancem omogočili, da prejemajo CoQ₁₀ s produktom koruznega škroba, kar je podobno njihovi osnovni prehranski komponenti. Končni proizvod je v obliki prahu, ki se enostavno porazdeli med krmo. Zaradi odsotnosti vode pa je majhna verjetnost, da bi krmna mešanica splesnila.

3.3.3 Kemikalije in raztopine standardov

Metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, acetonitril, 1,4-dioksan, heksan in para benzokinon so bili dobavljeni pri Mercku (Darmstadt, Nemčija), očetna kislina pa pri Fluki (Seelze, Nemčija).

3.3.4 Analizne metode

3.3.4.1 Analiza CoQ₁₀

Plazmo smo ločili od eritrocitov in jo shranili pri -80 °C do analize. Tik pred analizo smo plazmo odtajali v vodni kopeli s temperaturo 35-39 °C. Vzorce za analizo CoQ₁₀ smo pripravili tako, da smo po tri vzorce plazem združili v eno epruveto. Ločili smo petelinčke in kokoši in v vsaki skupini pripravili po dva združena vzorca. V 4 mL plastično epruveto smo odpipetirali 100 µL plazme, kateri smo dodali 100 µL para-benzokinon (0,4 mg/mL v 1-propanolu) in mešali na vorteksu 0,5 min. Para benzokinon je oksidant in smo ga pustili delovati 15 min. Nato smo dodali 400 µL 1-propanola in mešali na vorteksu 2 min. Epruvete smo postavili v centrifugo (Centrifuge Kendro Lab. Products, Heraeus, Biofuge, Stratos), ohlajeno na 4 °C za 4 min in centrifugirali pri 10000 × g. Postopek smo povzeli po Mosca in sod. (2002).

Raztopino vzorca smo analizirali s HPLC-MS metodo. Uporabili smo Surveyor LC sistem (Thermo Finningan, Riviera Beach, CA, ZDA) sklopljen z masnim spektrometrom (Finningan MAT, San Jose, CA, ZDA). Za ločbo smo uporabili Hypersil Gold kolono 1,9 µm, 50 mm×2,1 mm s 3 µm predkolono, proizvajalca Thermo Scientific (Runcorn, Anglija). Mobilna faza je bila sestavljena iz mobilne faze A, ki je vsebovala 1,4-dioksan : metanol : etanol (5 : 30 : 65, v/v/v) z 0,1 % očetno kislino) in mobilne faze B, ki je bil 100 % acetonitril. Začetni pogoji gradientnega programa so bili 12 % mobilne faze A in 88 % mobilne faze B. Po treh minutah je mobilna faza A dosegla 95 % in ostala nespremenjena 3 min, nakar smo sistem spremenili na začetne pogoje. Pretok mobilne faze je bil 0,5 ml/min pri temperaturi kolone 35 °C. Volumen injiciranja je bil 5 µL. Retenzijski čas za CoQ₁₀ pa 4,7 ± 0,5 min. Uporabili smo kemijsko ionizacijo s pozitivnimi ioni pri atmosferskem tlaku. Temperatura razprševanja je bila 450 °C, napetost razelektritve 6,0 kV, tok razelektritve 5,0 µA, tlak nosilnega plina 0,8 MPa, pretok pomožnega plina 1,7 L/min, temperatura kapilare 230 °C in napetost kapilare 23,0 V. Za kvantitativno določitev CoQ₁₀ smo uporabili molekulska maso (M+H)⁺ m/z 863,4 ± 0,5. Podatki so bili obdelani s programsko opremo Xcalibur 1.3.

3.3.4.2 Analiza α -tokoferola

Plazmo, shranjeno na -80 °C smo tik pred analizo odtajali v vodni kopeli s temperaturo 35-39 °C. Vzorce za analizo tokoferola smo pripravili tako, da smo po tri vzorce plazme združili v eno epruveto. Ločili smo petelinčke in kokoši in v vsaki skupini pripravili po dva združena vzorca. Ekstrakcijo α -tokoferola smo povzeli po Karpinska in sod. (2006). V 4 mL plastično epruveto smo odpipetirali 200 μ L plazme, kateri smo dodali 200 μ L etanola in mešali na vorteksu 0,5 min. Nato smo dodali 400 μ L heksana in mešali na vorteksu 0,5 min, ter centrifugirali pri 4000 obr./min 5 min.

Za analizo smo uporabili HPLC (Thermo Electron corporation, San Jose, CA, ZDA) s fluorescenčnim detektorjem pri 295 nm. Ločbo smo naredili na LiChrosorb koloni 5 μ m (125 mm \times 4 mm), proizvajalca Phenomex (Torrance, CA, ZDA). Mobilna faza je bila 1 % 2-propanol v heksanu, pretok mobilne faze je bil 1 mL/min. Injicirali smo 20 μ L vzorca. Standardne umeritvene krivulje smo pripravili v območju od 0,2 μ g/mL do 20 μ g/mL.

3.3.4.3 Analiza lipojske kisline

Plazmo smo shranili na -80 °C, tik pred analizo smo jo odtajali v vodni kopeli s temperaturo 35-39 °C. Za analizo lipojske kisline smo uporabili združene vzorce, ki smo jih uporabili pri analizi CoQ₁₀ in tokoferola. Ekstrakcijo lipojske kisline smo povzeli po Chng (2010), s tem, da smo spremenili volumne vzorca in ekstrakcijskega topila. V 4 mL plastično epruveto smo odpipetirali 300 μ L plazme, kateri smo dodali 600 μ L acetonitrila in mešali na vorteksu 0,5 min. Epruvete smo postavili v centrifugo (Centrifuge Kendro Lab. Products, Heraeus, Biofuge, Stratos), ohlajeno na 4 °C pri 13000 obr./min za 10 min. Rastopine vzorcev smo prenesli v vialo, ki smo jih analizirali s HPLC (Agilent, 1100) sklopljenim z masnim spektrometrom hibridom kvadrupola z linearno ionsko pastjo (Applied Biosystems/MDS Sciex Concord, ON, Kanada). Za ločbo smo uporabili Hypersil Gold kolono 1,9 μ m, 50 mm \times 2,1 mm s 3 μ m predkolono, proizvajalca Thermo Scientific (Runcorn, Anglija). Metoda za analizo lipojske kisline je bila povzeta po Durrani in sod. (2007) in optimizirana glede na pretok mobilne faze.

3.3.4.4 Določanje aktivnosti glutatión peroksidaze (GPx)

Aktivnost GPx smo določali spektrofotometrično (340 nm) z avtomatskim biokemijskim analizatorjem RX Daytona (RANDOX, Crumlin, Velika Britanija). Uporabili smo komercialno dostopen kit reagentov RANSEL (RANDOX, Crumlin, Velika Britanija), katerega osnova je posredna metoda določanja aktivnosti GPx (Paglie in sod., 1967). GPx katalizira oksidacijo GSH s sintetičnim kumen hidroperoksidom; pri reakciji nastali GSSG se nato v indikatorski reakciji z GR in ob prisotnosti NADPH prevede v GSH in NADP.

Hitrost oksidacije NADPH, ki jo merimo kot padec absorbance pri 340 nm, je proporcionalna aktivnosti GPx v vzorcu. Aktivnost GPx smo izrazili v enotah na gram hemoglobina (U/g Hgb). Koncentracijo hemoglobina smo določili z avtomatskim laserskim hematološkim analizatorjem Technicon H*1 (SIEMENS, Munchen, Nemčija).

3.3.4.5 Določanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

Aktivnost SOD smo določali spektrofotometrično pri 510 nm s kitom reagentov RANSOD (RANDOX, Crumlin, Velika Britanija) na avtomatskem biokemijskem analizatorju RX Daytona (RANDOX, Crumlin, Velika Britanija). V uporabljeni metodi, ki je osnovana na originalni metodi McCorda in Fridovicha (1969), je sistem za proizvodnjo superoksidnih radikalov pripravljen iz ksantina in ksantin oksidaze. Indikatorska spojina je 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazolijev klorid (INT), ki reagira s superoksidnim radikalom v barvilo formazan. Aktivnost SOD smo merili s stopnjo inhibicije te reakcije. Iz umeritvene krivulje odstotka inhibicije standardnih raztopin in desetiškim logaritmom koncentracije (U/ml) smo določili aktivnosti SOD v neznanih vzorcih. Aktivnost SOD smo izrazili v enotah na gram hemoglobina (U/g Hgb). Koncentracijo hemoglobina smo določili z avtomatskim laserskim hematološkim analizatorjem Technicon H*1 (SIEMENS, Munchen, Nemčija).

3.3.4.6 Določanje celokupne antioksidativne kapacitete (TAC)

TAC (Total Antioxidant Capacity) smo določali spektrofotometrično (600 nm) s kitom reagentov TAS (Total Antioxidant Status, RANDOX, Crumlin, Velika Britanija) na avtomatskem biokemijskem analizatorju RX Daytona (RANDOX, Crumlin, Velika Britanija). Metoda določanja je posredna, saj v reakciji nastale proste radikale (ABTS^{•+}-2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)) reducirajo v vzorcu prisotni antioksidanti, kar merimo s padcem absorbance pri 600 nm po treh minutah. Rezultate smo izrazili kot mmol/L Trolox ekvivalentov (standard, 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kislina – derivat vitamina E).

3.4 STATISTIČNA ANALIZA

V poskusih zbrane vrednosti za posamezne opazovane parametre smo uredili s programom Microsoft Excel 2007. Iz urejenih podatkov smo s programskim paketom SAS/STAT (SAS Software, 1999) izračunali osnovne statistične parametre, kot so povprečje, standardni odklon, najmanjša in največja vrednost, koficient variabilnost, ter statistično obdelali podatke za posamezno opazovano lastnost. Za obdelavo podatkov z normalno porazdelitvijo po spodaj navedenih statističnih modelih smo uporabili postopek PROC GLM (General linear models).

Statistični model za vrednotenje dodatka CoQ₁₀ v krmo piščancev je vključeval vpliv eksperimentalne skupine (G0, G1, G2, G3, G4) na različna piščančja tkiva (bedra, prsa, peruti, jetra, srce, plazma).

Statistični model za vrednotenje dodatka CoQ₁₀ v različne mesne izdelke je vključeval vpliv skupine (S - standardni in B - obogateni izdelek) na vrsto mesnih izdelkov (pečena piščančja krila, pečene piščančje krače, panirani piščančji fileji, piščančje prsi v ovitku, piščančje posebne klobase).

Statistični model za vrednotenje dodatka CoQ₁₀ v krmo piščancev je vključeval vpliv CoQ₁₀, lipojske kisline in kombinacije CoQ₁₀ in lipojske kisline na različne analite v plazmi.

Povprečne vrednosti za eksperimentalne skupine so bile izračunane z uporabo Duncanovega testa in so primerjane pri 5 % tveganju.

4 REZULTATI

4.1 VPLIV DODANEGA CoQ₁₀ V KRMO NA NJEGOVO KOPIČENJE V TKIVIH PIŠČANCEV

Raziskovalno delo je bilo opravljeno v okviru projekta »Priprava in karakterizacija funkcionalnih živil iz piščančjega mesa, obogatene s CoQ₁₀ (L4-0491)«.

4.1.1 Reja piščancev

Štiri skupine piščancev so prejemale krmo, obogateno s CoQ₁₀ zadnjih 10 (G1), 20 (G2), 30 (G3) in 40 (G4) dni pred zakolom. Piščance smo tehtali med celotnim postopkom vzreje. Meritve smo izvajali na 10. dan, 21. dan, 29. dan, 36. dan in 41. dan starosti piščancev. V kontrolni skupini (G0) smo krmili 109 piščancev, v testnih skupinah (G1, G2, G3 in G4) pa po 25 piščancev.

4.1.1.1 Merjenje telesnih mas piščancev

Rezultati merjenj telesnih mas so predstavljeni v preglednici 8 iz katere je razvidno, da je bila začetna masa piščancev med 180 g in 216 g. Značilne razlike med skupinami so posledica naključne porazdelitve piščancev. Ob drugem tehtanju so največjo telesno maso dosegli piščanci v skupini G0 in G4, med ostalimi skupinami ni bilo statistično značilnih razlik. Razlike med posameznimi skupinami, ki bi lahko bile posledica vpliva različne krme, so se začele kazati ob tretjem tehtanju, kjer se začne nakazovati najboljši prirast mase v skupini G4. Statistično značilne razlike med kontrolno skupino in G4 skupino so se kazale vse do zadnjega tehtanja, kar je indikacija, da dodatek CoQ₁₀ v krmi vpliva na povečanje mase pri piščancih. V celotnem testnem obdobju se statistično ne razlikujejo mase v skupinah G2 in G4. Najvišjo povprečno maso je v celotnem testnem obdobju dosegala in vrževala G4 skupina, sledila je G2, nato pa skupini G3 in G1. Najnižjo povprečno maso je med celotnim obdobjem vzreje imela kontrolna skupina.

Preglednica 8: Vpliv dodanega CoQ₁₀ v krmo na telesne mase piščancev (g) v skupinah (G0, G1, G2, G3 in G4) na 10. dan (1.tehtanje), 21. dan (2.tehtanje), 29. dan (3.tehtanje), 36. dan (4.tehtanje) in 42. dan (peto tehtanje) starosti piščancev

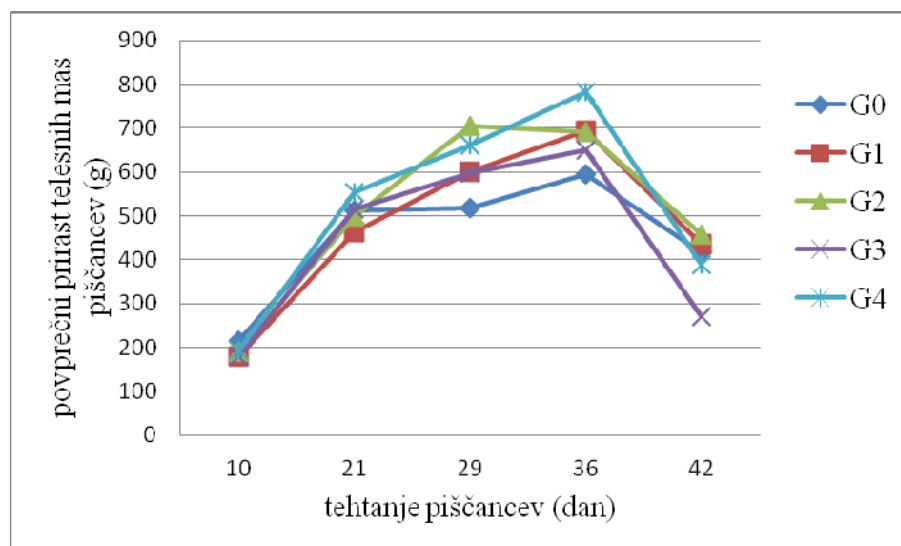
Table 8: Influence of exogenous CoQ₁₀ on chicken body mass (g) in groups (G0, G1, G2, G3 in G4) at 10th day (1. measuring), at 21th day (2. measuring), at 29th day (3. measuring), at 36th day (4.measuring) and at 42th day (5. measuring) of chicken ages

skupina	n	1.tehtanje ($\bar{x} \pm so$)	Z	skupina	n	2.tehtanje ($\bar{x} \pm so$)	Z
G0	109	216,93 ± 31,56 ^a		G0	109	729,12 ± 97,04 ^a	
G1	25	179,60 ± 51,07 ^b		G1	25	642,26 ± 186,88 ^b	
G2	25	191,89 ± 32,75 ^b	***	G2	25	690,04 ± 121,93 ^{a,b}	**
G3	25	179,60 ± 33,10 ^b		G3	25	694,20 ± 139,58 ^{a,b}	
G4	25	193,40 ± 31,21 ^b		G4	25	746,00 ± 112,19 ^a	
skupina	n	3.tehtanje ($\bar{x} \pm so$)	Z	skupina	n	4.tehtanje ($\bar{x} \pm so$)	Z
G0	109	1246,70 ± 154,98 ^b		G0	108	1842,87 ± 185,86 ^b	
G1	24	1243,54 ± 292,96 ^b		G1	24	1936,88 ± 355,77 ^b	
G2	25	1396,00 ± 168,95 ^{a,b}	**	G2	25	2088,00 ± 196,22 ^a	***
G3	25	1291,00 ± 203,51 ^b		G3	25	1940,80 ± 270,13 ^b	
G4	25	1406,00 ± 222,59 ^b		G4	25	2187,60 ± 279,46 ^a	
skupina	n	5.tehtanje ($\bar{x} \pm so$)	Z				
G0	108	2258,03 ± 219,49 ^b					
G1	24	2371,86 ± 333,06 ^b					
G2	25	2546,00 ± 226,82 ^a	***				
G3	25	2357,80 ± 306,28 ^b					
G4	25	2575,80 ± 309,73 ^a					

n - število opazovanj, \bar{x} – povprečna vrednost, so - standardni odklon, Z – vpliv CoQ₁₀ na telesno maso piščancev (p-vrednost), *** p ≤ 0,001 statistično zelo visoko značilen vpliv, ** p ≤ 0,01 statistično visoko značilen vpliv, * p ≤ 0,05 statistično značilen vpliv, nz – p > 0,05 statistično neznačilen vpliv, ^{a, b} – skupine z enako nadpisano črko se med seboj statistično ne razlikujejo

4.1.1.2 Prirast mase piščancev

Slika 11 prikazuje povprečne priraste mas skozi posamezna obdobja pitanja, ki smo jih izračunali na podlagi povprečnih mas piščancev, tehtanih na določen dan. Povprečni prirasti na 10. dan so se gibal od 180 g do 216 g. Najnižje priraste je v celotnem obdobju krmljenja dosegala kontrolna skupina, sledile so ji skupine G3, G1 in G2. Od obdobja 10-21 dni in 29-36 dni krmljenja je imela najvišje prirasti skupina G4. Glede na rezultate bi lahko sklepali, da dodatek CoQ₁₀ vpliva na priraste piščancev skozi celotno obdobja pitanja.

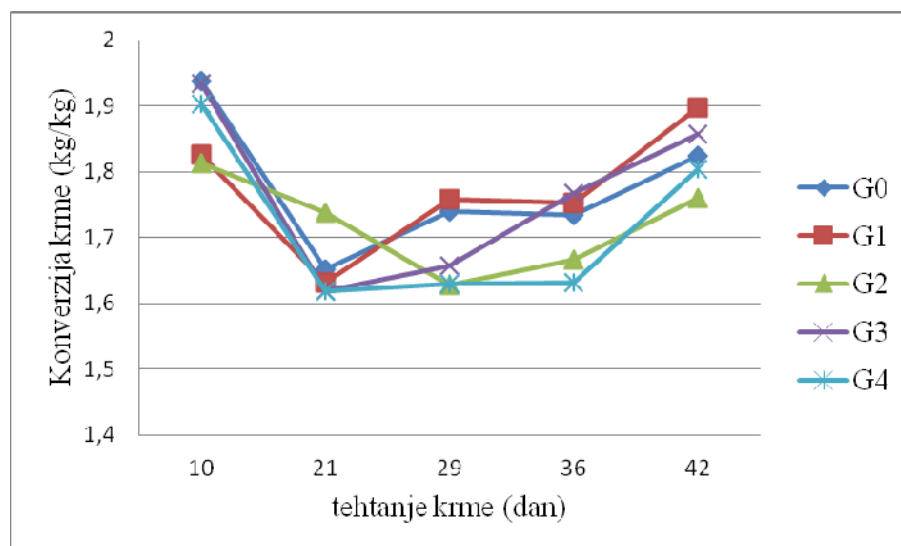


Slika 11: Povprečni prirast mase (g/dan) v kontrolni skupini (G0) in testnih skupinah (G1, G2, G3 in G4)

Figure 11: Average gain (g/day) of control group (G0) and test groups (G1, G2, G3 and G4)

4.1.1.3 Konverzija krme

Konverzija krme nam pove, koliko kilogramov krme je bilo potrebnih za pridobitev enega kilograma mesa. Slika 12 prikazuje konverzijo krme v zaporednih tehtanjih v posameznih skupinah. Najmanj nihanj skozi celoten test je imela skupina G4, kar lahko povežemo z vplivom dodatka CoQ₁₀. Zmanjševanje konverzije krme privede posledično tudi do znižanja stroškov vzreje. Pri visoki konverziji so zaradi povečane porabe krme stroški višji.



Slika 12: Konverzija krme (kg/kg) v kontrolni skupini (G0) in testnih skupinah skupin (G1, G2, G3 in G4)
Figure 12: Feed conversion (kg/kg) of control group (G0) and test groups (G1, G2, G3 in G4)

4.1.2 Vpliv dodanega CoQ₁₀ v krmo na vsebnost CoQ₁₀ in holesterola v analiziranih vzorcih

V vseh skupinah (G0, G1, G2, G3 in G4) smo po zakolu odvzeli vzorce (jetra, srce, prsi, peruti, bedra, maščoba in kri) in izmerili koncentracijo CoQ₁₀ in holesterola s HPLC-MS in HPTLC metodo. Rezultati so pokazali, da se je koncentracija CoQ₁₀ povežala v srcu, jetrih, perutih, bedrih, prsih in v krvi. Vsebnost CoQ₁₀ v maščobah določena z uporabljeno metodo je bila pod mejo detekcije.

4.1.2.1 Vpliv dodanega CoQ₁₀ na vsebnost CoQ₁₀ in holesterola v jetrih

V preglednicah 9 in 10 so prikazani osnovni statistični parametri za vsebnost CoQ₁₀ in holesterola v jetrih piščancev, ki so bili hranjeni s CoQ₁₀ različna časovna obdobja. Med posameznimi skupinami v koncentraciji CoQ₁₀ ni statistično značilnih razlik, kar nakazuje, da dodatek CoQ₁₀ v krmi ni vplival na povišanje koncentracije CoQ₁₀ v jetrih. Vendar je opaziti, da se koeficient variabilnosti (KV) v skupinah, ki so bile dlje časa krmljene s CoQ₁₀, povečuje. V G0 skupini je vrednost KV le 3,85 %, v G3 skupini 26,70 % in v G4 25,01 %. Med posameznimi skupinami ni bilo statistično značilnih razlik v vsebnosti holesterola.

Preglednica 9: Vpliv dodatka CoQ₁₀ na vsebnost CoQ₁₀ (mg/kg) v jetrih piščanca v kontrolni skupini (G0) in v testnih skupinah (G1, G2, G3 in G4) in izračunani osnovni statistični parametri za vsebnost CoQ₁₀; (n = 12)
Table 9: Influence of exogenous CoQ₁₀ on CoQ₁₀ concentration (mg/kg) in chicken liver in control group (G0) and in test groups (G1, G2, G3 and G4) and basic statistical parameters of CoQ₁₀ content; (n = 12)

skupina	\bar{x}	min	max	so	KV %	Z
G0	126,37	121,02	134,82	4,86	3,85	
G1	129,84	111,86	143,42	9,87	7,60	
G2	129,86	102,26	173,78	20,77	15,99	nz
G3	137,29	79,73	201,29	36,66	26,70	
G4	123,03	87,40	182,47	30,77	25,01	

n - število opazovanj, \bar{x} – povprečna vrednost, min – minimalna vrednost, max – maksimalna vrednost, so – standardni odklon, KV (%) – koficent variabilnosti, Z – vpliv dodatka CoQ₁₀ v krmo piščancev na vsebnosti CoQ₁₀ (p-vrednost), *** p ≤ 0,001 statistično zelo visoko značilen vpliv, ** p ≤ 0,01 statistično visoko značilen vpliv, * p ≤ 0,05 statistično značilen vpliv, nz – p > 0,05 statistično neznačilen vpliv

Preglednica 10: Vpliv dodatka CoQ₁₀ na vsebnost holesterola (mg/kg) v jetrih piščanca v kontrolni skupini (G0) in v testnih skupinah G1, G2, G3 in G4 in izračunani osnovni statistični parametri za vsebnost holesterola; (n = 12)

Table 10: Influence of exogenous CoQ₁₀ on cholesterol concentration (mg/kg) in chicken liver in control group (G0) and in test groups (G1, G2, G3 and G4) and basic statistical parameters of CoQ₁₀ content; (n = 12)

skupina	\bar{x}	min	max	so	KV %	Z
G0	2149,33	1683,21	2609,75	318,12	14,80	
G1	2160,09	1986,29	2338,06	133,02	6,16	
G2	2341,26	1961,95	2885,59	317,63	13,57	nz
G3	2418,09	1786,50	2954,07	481,89	19,93	
G4	2248,63	1725,90	2850,45	473,96	21,08	

n - število opazovanj, \bar{x} – povprečna vrednost, min – minimalna vrednost, max – maksimalna vrednost, so – standardni odklon, KV (%) – koficent variabilnosti, Z – vpliv dodatka CoQ₁₀ v krmo piščancev na vsebnost holesterola (p-vrednost), *** p ≤ 0,001 statistično zelo visoko značilen vpliv, ** p ≤ 0,01 statistično visoko značilen vpliv, * p ≤ 0,05 statistično značilen vpliv, nz – p > 0,05 statistično neznačilen vpliv

4.1.2.2 Vpliv dodanega CoQ₁₀ na vsebnost CoQ₁₀ in holesterola v plazmi

V preglednici 11 in 12 so predstavljene vrednosti CoQ₁₀ in holesterola v plazmi piščancev med krmljenjem. V vseh skupinah piščancev, ki so krmljene s CoQ₁₀, so v primerjavi s kontrolno skupino vsebnosti CoQ₁₀ statistično značilno različne ($p \leq 0,001$). Vrednost CoQ₁₀ se v vseh skupinah poveča za 1,6-krat v primerjavi s kontrolno skupino. Najvišjo koncentracijo CoQ₁₀ doseže v skupini G3, to je po 30 dnevih krmljenja, kjer se koncentracija CoQ₁₀ poveča za 80 %. Po 40 dnevih krmljenja se koncentracija CoQ₁₀ poveča le za 40 % v primerjavi s kontrolno skupino. Vloga krvi kot transportnega medija se kaže tudi v visokih vrednostih KV (%), predvsem v skupini G0 in G4, kjer dosežeta vrednosti 20 % (G0) in 28 % (G4), medtem, ko se v ostalih skupinah vrednosti KV (%) nahajajo med 13-16 %.

Koncentracija holesterola se v primerjavi s kontrolno skupino zniža v vseh testnih skupinah, razen v G1 skupini, vendar med posameznimi vrednostmi ni statistično značilnih razlik. Do največjih razlik med kontrolno in testno skupino pride po 40-dnevem krmljenju s CoQ₁₀, ko se vsebnost holesterola zniža za 30 %.

Preglednica 11: Vpliv dodatka CoQ₁₀ na vsebnost CoQ₁₀ (mg/L) v plazmi piščanca v kontrolni skupini (G0) in v testnih skupinah G1, G2, G3 in G4 in izračunani osnovni statistični parametri za vsebnost; (n = 20)

Table 11: Influence of exogenous CoQ₁₀ on CoQ₁₀ concentration (mg/L) in chicken plasma in control group (G0) and in test groups (G1, G2, G3 and G4) and basic statistical parameters of CoQ₁₀ content; (n = 20)

skupina	\bar{x}	min	max	so	KV %	Z
G0	3,51 ^d	2,41	4,58	0,70	19,90	
G1	5,46 ^{b,c}	3,99	6,98	0,73	13,31	
G2	5,74 ^{a,b}	3,76	7,18	0,90	15,69	***
G3	6,30 ^a	4,64	7,95	0,91	14,50	
G4	4,94 ^c	2,80	8,18	1,40	28,27	

n - število opazovanj, \bar{x} – povprečna vrednost, min – minimalna vrednost, max – maksimalna vrednost, so – standardni odklon, KV (%) – koficient variabilnosti, Z – vpliv dodatka CoQ₁₀ v krmo piščancev na vsebnost CoQ₁₀ (p-vrednost), *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, nz – $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv, a, b, c, d – skupine z enako nadpisano črko se med seboj statistično ne razlikujejo

Preglednica 12: Vpliv dodatka CoQ₁₀ na vsebnost holesterola (mg/L) v plazmi piščanca v kontrolni skupini (G0) in v testnih skupinah G1, G2, G3 in G4 in izračunani osnovni statistični parametri za vsebnost holesterola; (n = 20)

Table 12: Influence of exogenous CoQ₁₀ on cholesterol concentration (mg/L) in chicken plasma in control group (G0) and in test groups (G1, G2, G3 and G4) and basic statistical parameters of CoQ₁₀ content; (n = 20)

skupina	\bar{x}	min	max	so	KV %	Z
G0	36,36	16,11	63,94	14,18	39,00	
G1	37,40	13,57	80,86	17,59	47,04	
G2	30,02	21,12	59,09	8,16	27,18	Nz
G3	33,07	16,30	69,95	13,46	40,70	
G4	27,69	11,83	90,86	16,89	61,02	

n - število opazovanj, \bar{x} – povprečna vrednost, min – minimalna vrednost, max – maksimalna vrednost, so – standardni odklon, KV (%) – koficient variabilnosti, Z – vpliv dodatka CoQ₁₀ v krmo piščancev na vsebnost holesterola (p-vrednost), *** p ≤ 0,001 statistično zelo visoko značilen vpliv, ** p ≤ 0,01 statistično visoko značilen vpliv, * p ≤ 0,05 statistično značilen vpliv, nz – p > 0,05 statistično neznačilen vpliv

4.1.2.3 Vpliv dodanega CoQ₁₀ na vsebnost CoQ₁₀ in holesterola v srcu

Srce vsebuje v primerjavi z drugimi tkivi največ CoQ₁₀ (Bhagavan in sod., 2006). Visoko vsebnost CoQ₁₀ pripisujejo visokim energetske zahtevam tega organa. Rezultati merjenj koncentracij CoQ₁₀ in holesterola so predstavljeni v preglednicah 13 in 14. Koncentracija CoQ₁₀ se v posameznih skupinah statistično razlikuje (p ≤ 0,05): poveča se v rangu od 7,3 do 11,3 %, kar pa je v primerjavi z ostalimi analiziranimi tkivi malo. Razvidno je, da se koncentracije CoQ₁₀ v G0, G1 in G2 skupinah statistično ne razlikujejo. Prav tako se statistično ne razlikujejo koncentracije CoQ₁₀ v testnih skupinah od tistih v kontrolni skupini. Vendar lahko opazimo, da se koncentracija CoQ₁₀ v srcu s podaljševanjem obdobja krmljenja z dodatkom CoQ₁₀ povečuje. V srcu se koncentracija holesterola zmanjšuje, značilne razlike (p ≤ 0,01) so bile določene med koncentracijami holesterola v kontrolni skupini in v testnih skupinah od G2-G4.

Preglednica 13: Vpliv dodatka CoQ₁₀ na vsebnost CoQ₁₀ (mg/kg) v srcu piščanca v kontrolni skupini (G0) in v testnih skupinah G1, G2, G3 in G4 in izračunani osnovni statistični parametri za vsebnost CoQ₁₀; (n = 12)

Table 13: Influence of exogenous CoQ₁₀ on CoQ₁₀ concentration (mg/kg) in chicken heart in control group (G0) and in test groups (G1, G2, G3 and G4) and basic statistical parameters of CoQ₁₀ content; (n = 12)

skupina	\bar{x}	min	max	so	KV %	Z
G0	104,74 ^b	85,98	147,15	20,73	19,80	
G1	114,07 ^{a,b}	84,93	127,04	12,02	10,53	
G2	117,10 ^{a,b}	87,16	139,16	15,56	13,28	*
G3	123,83 ^a	83,34	156,78	25,40	20,49	
G4	123,04 ^a	105,01	153,05	16,69	13,57	

n - število opazovanj, \bar{x} – povprečna vrednost, min – minimalna vrednost, max – maksimalna vrednost, so – standardni odklon, KV (%) – koficient variabilnosti, Z – vpliv dodatka CoQ₁₀ v krmo piščancev na vsebnost CoQ₁₀ (p-vrednost), *** p ≤ 0,001 statistično zelo visoko značilen vpliv, ** p ≤ 0,01 statistično visoko značilen vpliv, * p ≤ 0,05 statistično značilen vpliv, nz – p > 0,05 statistično neznačilen vpliv, ^{a, b} – skupine z enako nadpisano črko se med seboj statistično ne razlikujejo

Preglednica 14: Vpliv dodatka CoQ₁₀ na vsebnost holesterola (mg/kg) v srcu piščanca v kontrolni skupini (G0) in v testnih skupinah G1, G2, G3 in G4 in izračunani osnovni statistični parametri za vsebnost holesterola; (n = 12)

Table 14: Influence of exogenous CoQ₁₀ on cholesterol concentration (mg/kg) in chicken heart in control group (G0) and in test groups (G1, G2, G3 and G4) and basic statistical parameters of CoQ₁₀ content; (n = 12)

skupina	\bar{x}	min	max	so	KV %	Z
G0	1443,83 ^a	1162,61	1787,89	212,38	14,71	
G1	1358,29 ^{a,b}	1185,47	1697,73	153,04	11,27	
G2	1105,62 ^c	678,31	1404,73	207,37	18,76	**
G3	1240,92 ^{b,c}	878,16	1653,52	205,87	16,59	
G4	1262,80 ^{b,c}	868,80	1451,55	166,41	13,18	

n - število opazovanj, \bar{x} – povprečna vrednost, min – minimalna vrednost, max – maksimalna vrednost, so – standardni odklon, KV (%) – koficient variabilnosti, Z – vpliv dodatka CoQ₁₀ v krmo piščancev na vsebnost holesterola (p-vrednost), *** p ≤ 0,001 statistično zelo visoko značilen vpliv, ** p ≤ 0,01 statistično visoko značilen vpliv, * p ≤ 0,05 statistično značilen vpliv, nz – p > 0,05 statistično neznačilen vpliv, ^{a, b, c} – skupine z enako nadpisano črko se med seboj statistično ne razlikujejo

4.1.2.4 Vpliv dodanega CoQ₁₀ na vsebnost CoQ₁₀ in holesterola v prsih, bedrih in perutih

Iz preglednic 15, 17 in 19 je razvidno, da med posameznimi mišičnimi tkivi v kontrolni skupini največ CoQ₁₀ vsebujejo piščančja bedra (21,9 mg/kg), in sicer kar 2,5-krat toliko kot v piščančjih prsih (8,89 mg/kg) in 3,2-krat toliko kot v piščančjih perutih (7,00 mg/kg). Rezultati so v skladu s pričakovanji, saj je temna mišičina beder metabolno najbolj aktivna. Namen raziskave je bilo ugotoviti, kako se vsebnost CoQ₁₀ spremeni v posameznih piščančjih delih, v različnem obdobju krmljenja z dodatkom CoQ₁₀. V vseh piščančjih delih se s podaljševanjem krmljenja, količina CoQ₁₀ povečuje. V piščančjih bedrih ni značilnih razlik, v prsih pa so značilne razlike zelo visoke ($p \leq 0,001$) in v perutih le statistično značilne ($p \leq 0,05$).

V piščančjih bedrih se po 40 dneh krmljenja koncentracija CoQ₁₀ poveča za 16 %, vendar pa razlika koncentracij med kontrolno in G4 skupino ni statistično značilna. Koncentracija holesterola v piščančjih bedrih se ne spreminja statistično značilno ($p \leq 0,05$).

V prsih se koncentracija CoQ₁₀ v posameznih skupinah povečuje s podaljševanjem krmljenja s CoQ₁₀. Do statističnih razlik pride med kontrolno skupino in vsemi testnimi skupinami. Po 40 dneh krmljenja s CoQ₁₀ se koncentracija CoQ₁₀ poveča za 45 %. V prsih se koncentracija holesterola ne spreminja statistično značilno (preglednica 18).

V perutih se koncentracija CoQ₁₀ s podaljševanjem obdobja hranjenja povečuje, vendar ne s tolikšnimi razlikami kot jih je opaziti v piščančjih prsih. Statistično značilnih razlik ni med koncentracijami v kontrolni skupini in v skupinah G1, G2 in G3. Prav tako ni statistično značilnih razlik med skupinami G2, G3 in G4. Po 40 dneh krmljenja z dodatkom CoQ₁₀ se v piščančjih perutih vsebnost CoQ₁₀ poveča za 25 %. Koncentracija holesterola se v perutih ne spreminja statistično značilno (preglednica 20).

Preglednica 15: Vpliv dodatka CoQ₁₀ na vsebnost CoQ₁₀ (mg/kg) v bedrih piščanca v kontrolni skupini (G0) in v testnih skupinah G1, G2, G3 in G4 in izračunani osnovni statistični parametri za vsebnost CoQ₁₀; (n = 20)

Table 15: Influence of exogenous CoQ₁₀ on CoQ₁₀ concentration (mg/kg) in chicken legs in control group (G0) and in test groups (G1, G2, G3 and G4) and basic statistical parameters of CoQ₁₀ content; (n = 20)

skupina	\bar{x}	min	max	so	KV %	Z
G0	21,90	16,76	29,96	4,59	20,97	
G1	23,44	15,72	30,82	4,87	20,90	
G2	23,82	18,84	28,23	2,93	12,30	nz
G3	24,66	17,58	30,83	4,49	18,21	
G4	25,34	17,81	32,66	5,89	23,20	

n - število opazovanj, \bar{x} – povprečna vrednost, min – minimalna vrednost, max – maksimalna vrednost, so – standardni odklon, KV (%) – koficient variabilnosti, Z – vpliv dodatka CoQ₁₀ v krmo piščancev na vsebnost CoQ₁₀ (p-vrednost), *** p ≤ 0,001 statistično zelo visoko značilen vpliv, ** p ≤ 0,01 statistično visoko značilen vpliv, * p ≤ 0,05 statistično značilen vpliv, nz – p > 0,05 statistično neznačilen vpliv

Preglednica 16: Vpliv dodatka CoQ₁₀ na vsebnost holesterola (mg/kg) v bedrih piščanca v kontrolni skupini (G0) in v testnih skupinah G1, G2, G3 in G4 in izračunani osnovni statistični parametri za vsebnost holesterola; (n = 20)

Table 16: Influence of exogenous CoQ₁₀ on cholesterol concentration (mg/kg) in chicken legs in control group (G0) and in test groups (G1, G2, G3 and G4) and basic statistical parameters of CoQ₁₀ content; (n = 20)

skupina	\bar{x}	min	max	so	KV %	Z
G0	721,55	552,78	896,43	103,94	14,41	
G1	711,27	641,89	867,12	72,15	10,14	
G2	586,14	425,01	874,57	152,22	25,97	nz
G3	580,87	361,06	811,30	153,24	26,40	
G4	754,00	546,06	1006,84	162,15	21,51	

n - število opazovanj, \bar{x} – povprečna vrednost, min – minimalna vrednost, max – maksimalna vrednost, so – standardni odklon, KV (%) – koficient variabilnosti, Z – vpliv dodatka CoQ₁₀ v krmo piščancev na vsebnost holesterola (p-vrednost), *** p ≤ 0,001 statistično zelo visoko značilen vpliv, ** p ≤ 0,01 statistično visoko značilen vpliv, * p ≤ 0,05 statistično značilen vpliv, nz – p > 0,05 statistično neznačilen vpliv

Preglednica 17: Vpliv dodatka CoQ₁₀ na vsebnost CoQ₁₀ (mg/kg) v prsih piščanca v kontrolni skupini (G0) in v testnih skupinah G1, G2, G3 in G4 in izračunani osnovni statistični parametri za vsebnost CoQ₁₀; (n = 20)

Table 17: Influence of exogenous CoQ₁₀ on CoQ₁₀ concentration (mg/kg) in chicken breast in control group (G0) and in test groups (G1, G2, G3 and G4) and basic statistical parameters of CoQ₁₀ content; (n = 20)

skupina	\bar{x}	min	max	so	KV %	Z
G0	8,89 ^c	7,46	11,93	1,67	18,81	
G1	10,82 ^b	8,44	13,55	1,47	13,55	
G2	12,40 ^{a,b}	9,33	14,41	1,60	12,93	***
G3	11,21 ^{a,b}	6,55	15,02	2,61	23,25	
G4	12,67 ^a	9,21	15,80	2,28	18,00	

n - število opazovanj, \bar{x} – povprečna vrednost, min – minimalna vrednost, max – maksimalna vrednost, so – standardni odklon, KV (%) – koficient variabilnosti, Z – vpliv dodatka CoQ₁₀ v krmo piščancev na vsebnost CoQ₁₀ (p-vrednost), *** p ≤ 0,001 statistično zelo visoko značilen vpliv, ** p ≤ 0,01 statistično visoko značilen vpliv, * p ≤ 0,05 statistično značilen vpliv, nz – p > 0,05 statistično neznačilen vpliv, ^{a, b, c} – skupine z enako nadpisano črko se med seboj statistično ne razlikujejo

Preglednica 18: Vpliv dodatka CoQ₁₀ na vsebnost holesterola (mg/kg) v prsih piščanca v kontrolni skupini (G0) in v testnih skupinah G1, G2, G3 in G4 in izračunani osnovni statistični parametri za vsebnost holesterola; (n = 20)

Table 18: Influence of exogenous CoQ₁₀ on cholesterol concentration (mg/kg) in chicken breast in control group (G0) and in test groups (G1, G2, G3 and G4) and basic statistical parameters of CoQ₁₀ content; (n = 20)

skupina	\bar{x}	min	max	so	KV %	Z
G0	539,34	472,73	698,91	66,48	12,33	
G1	544,78	430,52	680,52	85,43	15,68	
G2	505,16	436,94	598,68	59,67	11,81	nz
G3	515,39	405,80	574,46	50,65	9,83	
G4	521,41	442,54	668,37	62,10	11,91	

n - število opazovanj, \bar{x} – povprečna vrednost, min – minimalna vrednost, max – maksimalna vrednost, so – standardni odklon, KV (%) – koficient variabilnosti, Z – vpliv dodatka CoQ₁₀ v krmo piščancev na vsebnost

holesterola (p-vrednost), *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, nz – $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv

Preglednica 19: Vpliv dodatka CoQ₁₀ na vsebnost CoQ₁₀ (mg/kg) v perutih piščanca v kontrolni skupini (G0) in v testnih skupinah G1, G2, G3 in G4 in izračunani osnovni statistični parametri za vsebnost CoQ₁₀; (n = 20)

Table 19: Influence of exogenous CoQ₁₀ on CoQ₁₀ concentration (mg/kg) in chicken wings in control group (G0) and in test groups (G1, G2, G3 and G4) and basic statistical parameters of CoQ₁₀ content; (n = 20)

skupina	\bar{x}	min	max	so	KV %	Z
G0	7,00 ^b	5,22	8,71	1,15	16,44	
G1	7,22 ^b	5,50	8,76	1,28	16,31	
G2	7,67 ^{a,b}	5,90	9,81	1,28	16,72	*
G3	7,65 ^{a,b}	5,72	5,72	9,47	15,26	
G4	8,65 ^a	6,56	10,69	1,37	15,85	

n - število opazovanj, \bar{x} – povprečna vrednost, min – minimalna vrednost, max – maksimalna vrednost, so – standardni odklon, KV (%) – koficient variabilnosti, Z – vpliv dodatka CoQ₁₀ v krmo piščancev na vsebnost CoQ₁₀ (p-vrednost), *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, nz – $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv, ^{a, b} – skupine z enako nadpisano črko se med seboj statistično ne razlikujejo

Preglednica 20: Vpliv dodatka CoQ₁₀ na vsebnost holesterola (mg/kg) v perutih piščanca v kontrolni skupini (G0) in v testnih skupinah G1, G2, G3 in G4 in izračunani osnovni statistični parametri za vsebnost holesterola; (n = 20)

Table 20: Influence of exogenous CoQ₁₀ on cholesterol concentration (mg/kg) in chicken wings in control group (G0) and in test groups (G1, G2, G3 and G4) and basic statistical parameters of CoQ₁₀ content; (n = 20)

skupina	\bar{x}	min	max	so	KV %	Z
G0	731,81	388,28	191,42	26,16	26,16	
G1	791,35	603,53	1034,79	152,06	19,22	
G2	797,18	586,26	1129,14	161,04	20,20	nz
G3	711,77	604,83	809,48	63,00	8,85	
G4	721,06	608,85	934,37	94,89	13,16	

n - število opazovanj, \bar{x} – povprečna vrednost, min – minimalna vrednost, max – maksimalna vrednost, so – standardni odklon, KV (%) – koficient variabilnosti, Z – vpliv dodatka CoQ₁₀ v krmo piščancev na vsebnost

holesterola (p-vrednost), *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, nz – $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv

4.1.2.5 CoQ₁₀-holesterol indeks v prsih, bedrih in perutih

Dokazana pozitivna korelacija med plazemskimi lipidi in nivojem lipofilnih antioksidantov je vodila do uvedbe indeksa med lipidi in lipofilnimi antoksidanti (Horwitt in sod, 1972). Pri preučevanju CoQ₁₀ so plazemski nivo CoQ₁₀ normalizirali na plazemski nivo koncentracije holesterola. Tako definirani CoQ₁₀-holesterol indeks (QCI) so uporabili le pri plazmi in ga niso uporabili na drugih vzorcih.

$$QCI = \frac{\text{koncentracija CoQ}_{10} \left(\frac{mg}{kg} \right) \cdot 1000}{\text{koncentracija holesterola} \left(\frac{mg}{kg} \right)}$$

... (3)

Naša ideja je bila, da bi QCI indeks (enačba 3) uporabili kot merilo za izboljšavo kvalitete mesa. Za potrošnika je namreč ugodno, da vnese v organizem čim več antioksidantov, v našem primeru več CoQ₁₀ in čim manj holesterola. Za piščančje meso je pomembno, da je indeks QCI čim višji, oziroma, da se med rejo povečuje. Povišanje QCI indeksa pomeni torej izboljšavo kvalitete mesa.

V preglednici 21 so predstavljene vrednosti QCI za različne vrste piščančjega mesa. Najvišji QCI indeks najdemo v kontrolni skupini v bedrih (30,48). Bedro ima višje koncentracije CoQ₁₀, kar mu zvišuje QCI indeks. V prsih je v kontrolni skupini vrednost QCI indeksa le polovična (16,72), najnižjo QCI vrednost pa ima perut 10,15. Iz teh rezultatov lahko povzamemo, da je za potrošnika najbolj ugodno, da uživa piščančja bedra. V vseh skupinah se QCI zvišuje med podaljševanjem obdobja s krmljenjem s CoQ₁₀. V prsih je vpliv dodanega CoQ₁₀ statistično zelo visoko značilen ($p \leq 0,001$), v bedrih in perutih pa le statistično značilen ($p \leq 0,05$). V vseh mišičnih tkivih pride do statistično značilnega povišanja CoQ₁₀ glede na kontrolno skupino le v skupini G4. V tej skupini dosega najvišje vrednosti QCI v prsih, kjer se poveča za 49 %, precej manj pa v perutih za 19 % in bedrih za 16 %.

Preglednica 21: Vpliv dodatka CoQ₁₀ na QCI indeks v bedrih, prsah in perutih piščanca v kontrolni skupini (G0) in v testnih skupinah G1, G2, G3 in G4

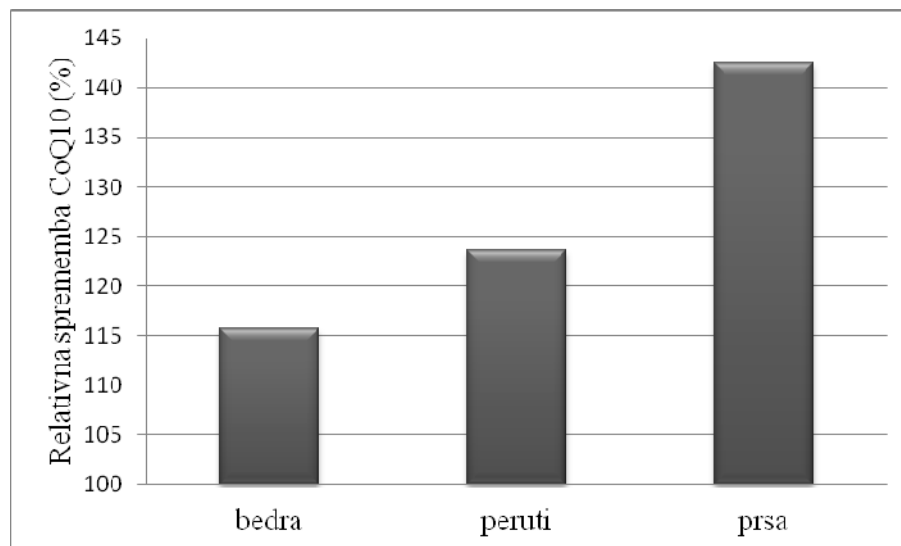
Table 21: Influence of CoQ₁₀ on QCI index in chicken legs, breasts and wings in control group (G0) and in tests groups G1, G2, G3 and G4

skupina	QCI indeks		
	prsa ($\bar{x} \pm so$)	bedra ($\bar{x} \pm so$)	peruti ($\bar{x} \pm so$)
G0	16,72 ± 3,73 ^c	30,48 ± 6,60 ^c	10,15 ± 3,07 ^b
G1	20,11 ± 2,78 ^{b,c}	34,34 ± 7,62 ^{c,b}	9,50 ± 2,22 ^b
G2	26,09 ± 3,95 ^a	42,84 ± 10,49 ^{a,b}	9,77 ± 1,46 ^b
G3	20,89 ± 3,46 ^b	45,47 ± 15,53 ^a	10,80 ± 1,67 ^{a,b}
G4	24,89 ± 6,70 ^a	35,26 ± 14,17 ^{a,b,c}	12,10 ± 1,74 ^a
Z	***	*	*

n - število opazovanj, \bar{x} – povprečna vrednost, so – standardni odklon, Z – vpliv dodatka CoQ₁₀ v krmo piščancev, na vrednost QCI (p-vrednost), *** p ≤ 0,001 statistično zelo visoko značilen vpliv, ** p ≤ 0,01 statistično visoko značilen vpliv, * p ≤ 0,05 statistično značilen vpliv, nz – p > 0,05 statistično neznačilen vpliv, ^{a, b, c} – skupine z enako nadpisano črko se med seboj statistično ne razlikujejo

4.1.3 Vpliv dodanega CoQ₁₀ na vsebnost CoQ₁₀ in holesterola v frakcijah celic piščančjih prsi

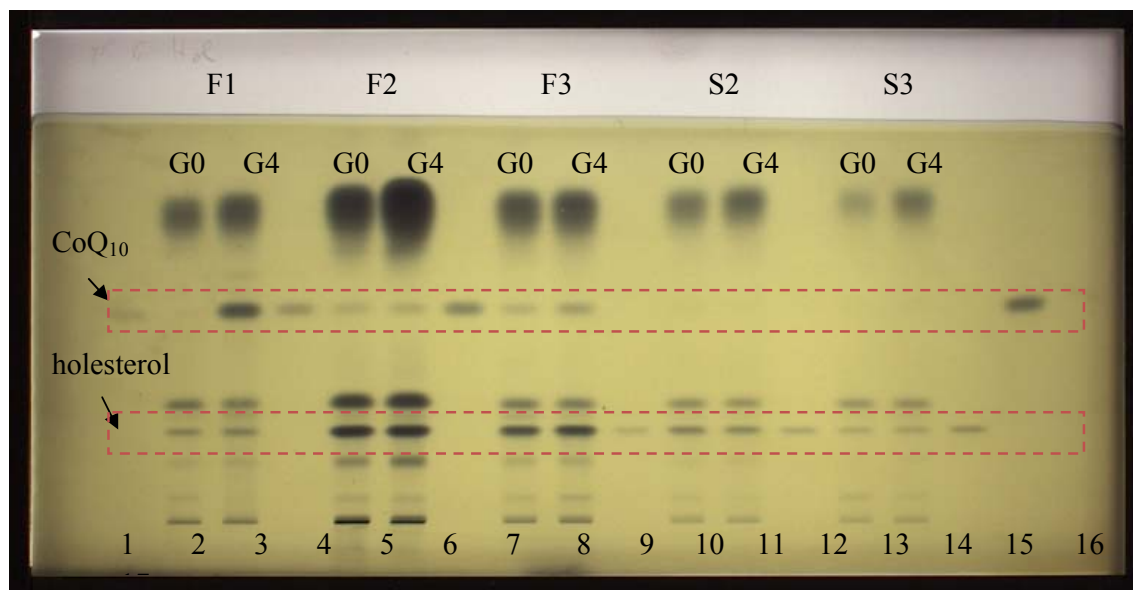
Slika 13 prikazuje relativni porast koncentracije CoQ₁₀ v posameznih piščančjih tkivih (bedra, prsa in peruti) po 40 dneh hranjenja. V bedrih se koncentracija CoQ₁₀ poveša za 16 %, v perutih za 24 % in v prsah za 43 %. Na podlagi teh rezultatov smo se odločili, da bomo natančno proučili razporeditev CoQ₁₀ v celicah piščančjih prsih. Glede na mesto vgradnje dodanega CoQ₁₀ bi lahko sklepali na funkcijo dodanega CoQ₁₀ v celicah.



Slika 13: Relativna sprememba CoQ₁₀ v G4 skupini v primerjavi z kontrolno skupino (G0)

Figure 13: Relative changes of CoQ₁₀ in G4 group normalized to control group (G0)

Pri frakcioniranju celic piščančjih prsi, povzetem po Casadu in sod. (1992), dobimo štiri frakcije. F1 frakcija je sestavljena v glavnem iz jeder in celičnih membran, F2 iz mitohondrijev, F3 je sestavljena iz manjših celičnih organelov (mikrosomov in lizosomov), preostali supernatant S3 vsebuje citosol in celične ostanke. V dobljenih celičnih frakcijah smo analizirali CoQ₁₀ in holesterol s HPLC-MS in HPTLC metodo. Slednja metoda je primerna za hitro vizualno ocenitev koncentracij substanc v frakcijah. Na sliki 14 je prikazana fotografija HPTLC plošče z nanešenimi vzorci in standardi. Na sliki je močno opazna razlika v koncentracijah CoQ₁₀ med skupinama G0 in G4 v F1 frakciji, manj je opazna razlika med skupinama (G0 in G4) v F3 frakciji. Razlika med skupinama v frakciji F2 na sliki 16 ni opazna. V supernatantu S2 in S3 ni mogoče vizuelno določiti koncentracij CoQ₁₀. Na plošči se tudi jasno vidi, da so koncentracije med posameznimi frakcijami (F1, F2, F3, S2 in S3) različne. Na sliki 14 so lepo razvidne koncentracije holesterola v posameznih skupinah. Razlik med koncentracijami holesterola med skupinami G0 in G4 ni mogoče razločiti, so pa jasno vidne razlike med frakcijami (F1, F2, F3, S2 in S3). Lise na plošči smo kvantitativno ovrednotili z denzitometrom. Denzitogrami CoQ₁₀, holesterola in vzorca so prikazani v prilogi A.



Slika 14: HPTLC plošča s frakcijami dobljenimi iz celic piščančjih prsi. V točkah 1, 4, in 7 je nanešen standard CoQ₁₀ (0,05 mg/mL) različnih volumnov v zaporedju 2,0; 4,0 in 6,0 μ L, v točkah 10, 13, in 16 je nanešen standard holesterola (0,01mg/mL) različnih volumnov v zaporedju 4,0; 6,0; in 8,0 μ L. Vzorci so bili nanešeni v točkah 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, in 15 z volumnom 10 μ L

Figure 14: HPTLC plate of fractions obtained from chicken breast cells. At points 1, 4, and 7 application volumes for CoQ₁₀ standard (0.05 mg/mL) were 2.0, 4.0, and 6.0 μ L, respectively, and at points 10, 13, and 16 application volumes for cholesterol standard (0.01 mg/mL)

Koncentracijo holesterola in CoQ₁₀ smo v posameznih frakcijah določili tudi s HPLC-MS metodo. Kromatogrami so bili posneti v SIM načinu, holesterol pri molekularni masi (M+H)⁺ m/z 368 \pm 1 in CoQ₁₀ pri molekularni masi (M+H)⁺ m/z 863,4 \pm 1. Kromatogrami standardov holesterola, CoQ₁₀ in vzorca so prikazani v prilogi B. Obe metodi sta validirali, izbrani validacijski parametri so predstavljeni v preglednici 22. Obe metodi sta primerni za kvantitativno vrednotenje CoQ₁₀ in holesterola v frakcijah. HPTLC metoda se je v primerjavi s HPLC-MS izkazala za odlično tehniko, kljub sicer njeni nižji selektivnosti in občutljivosti.

Preglednica 22: HPLC-MS in HPTLC validacijski parametri za analizo CoQ₁₀ in holesterola
Table 22: HPLC-MS in HPTLC validation data for analysis of CoQ₁₀ and cholesterol

parametri	minimalni pogoji	HPLC-MS	HPTLC
selektivnost	Rs > 1	Rs > 2.0	Rs>1,5
ponovljivost <i>n=6</i>	< 10%	5,0 %	7,0%
linearnost (<i>r</i> ²)	0,990	0,995	0,980
območje		(standardne raztopine)	HPTLC plošča
CoQ ₁₀	-	0,02-10,0 mg/L	0,5-150 ng/nanos
holesterol		1,0-15,0 mg/L	20-200 ng/nanos
LOD			
CoQ ₁₀	-	0,02 mg/L	20 ng/nanos
holesterol		0,5mg/L	10 ng/nanos
LOQ			
CoQ ₁₀	-	0,05 mg/L	50 ng/spot
holesterol		1,0 mg/L	20 ng/spot

V preglednici 23 so predstavljene koncentracije CoQ₁₀ znotraj posameznih frakcij (F1, F2, F3 in S3) v G0 in G4 skupini. Med kontrolnimi skupinami (G0) med posameznimi frakcijami so razlike zelo visoko statistično značilne ($p \leq 0,001$). Najvišjo vrednost CoQ₁₀ dosega frakcija F3, ki vsebuje manjše celične organele in frakcija F2, ki vsebuje mitohondrije. Najnižja vsebnost CoQ₁₀ pa je bila izmerjena v frakcijah F1 in S3. Med skupinami G0 in G4 so statistično značilne razlike ($p \leq 0,01$) le v frakciji F1, med ostalimi frakcijami (F2, F3 in S2) ni značilnih razlik.

Rezultati so pokazali, da se največ dodanega CoQ₁₀ v krmo piščancev nahaja znotraj frakcije F1, ki je sestavljena predvsem iz jeder in večjih kosov celičnih membran. Koncentracija CoQ₁₀ v G4 skupini se je povečala s faktorjem 2,6 glede na kontrolno skupino. Količina dodanega CoQ₁₀ se je sicer v manjši meri (48 %) povečala tudi v frakciji S3, ki vsebuje manjše dele celičnih membran in v frakciji F3 za 49 %. Statistično značilne razlike v koncentraciji CoQ₁₀ niso bile opazne v frakciji F2, ki vsebuje mitohondrije.

Preglednica 24 predstavlja koncentracije holesterola v posameznih frakcijah in znotraj skupin. Med kontrolnimi skupinami so razlike med posameznimi frakcijami statistično zelo visoko značilne ($p \leq 0,001$). Najvišja vrednost holesterola je v frakciji F2, sledi ji frakcija F3, nato pa frakciji F1 in S3, med katerima razlike niso statistično značilno različne. Znotraj posameznih frakcij med posameznima skupinama (G0 in G4) ni bilo statistično značilnih razlik.

Preglednica 23: Vpliv dodanega CoQ₁₀ na koncentracijo CoQ₁₀ (mg/mL), analizirano s HPTLC v različnih frakcijah celic piščančjih prsih v kontrolni skupini (G0) in v skupini, krmljeni 40 dni s CoQ₁₀ (G4)

Table 23: Influence of exogenous CoQ₁₀ concentration (mg/mL) analysed with HPTLC in different fractions chicken breast cells in control group (G0) and in group feeding 40 days with CoQ₁₀ (G4)

frakcija	skupina	$\bar{x} \pm so$	Z	ZG
F1	G0	3,52 ± 2,37 ^{b,y}	**	***
	G4	9,20 ± 2,04 ^a		
F2	G0	7,88 ± 2,56 ^{a,x}	nz	
	G4	7,68 ± 2,46 ^a		
F3	G0	8,52 ± 0,66 ^{a,x}	nz	
	G4	12,69 ± 3,03 ^a		
S3	G0	1,21 ± 0,36 ^{a,y}	nz	
	G4	1,79 ± 0,52 ^a		

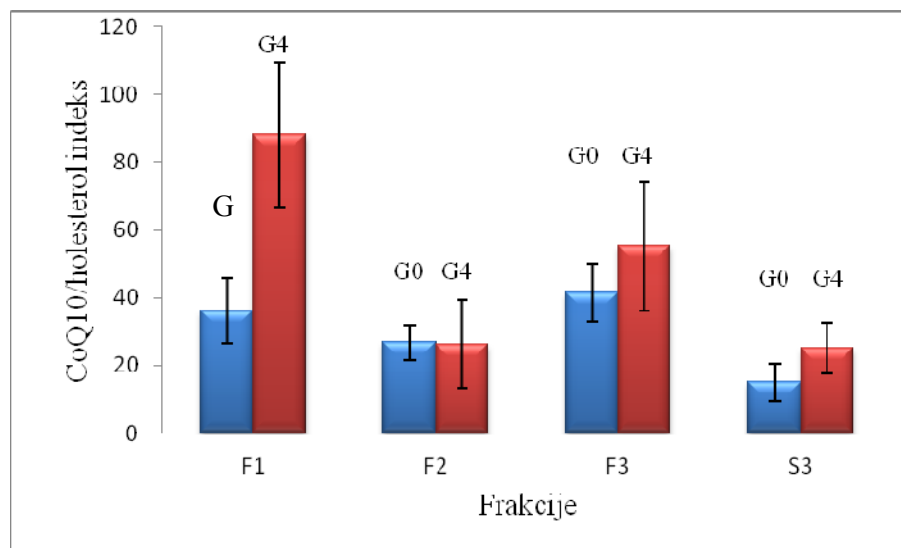
n - število opazovanj, \bar{x} - povprečna vrednost, so - standardni odklon, Z - vpliv dodatka CoQ₁₀ v krmo piščancev med skupinama G0 in G4 v posameznih frakcijah (p-vrednost), ZG - značilne razlike med frakcijami v G0 skupini, *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, nz - $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv, ^{a, b} - skupini (G4 in G0) znotraj frakcije z enako nadpisano črko se med seboj statistično ne razlikujejo, ^{x, y} - skupine G0 z enako nadpisano črko se med seboj statistično ne razlikujejo

Koncentracija CoQ₁₀ v celičnih frakcijah je ponavadi normalizirana na g proteina. Glede na to, da se koncentracija holesterola znotraj posameznih frakcij ne spreminja, smo koncentracijo CoQ₁₀ (mg/kg) normalizirali na koncentracijo holesterola. Na sliki 15 je razvidna porazdelitev dodanega CoQ₁₀ v celicah. Največje razlike so vidne v F1 frakciji, medtem ko v F2 ni vidnih razlik.

Preglednica 24: Vpliv dodanega CoQ₁₀ na koncentracijo holesterola (mg/mL) analizirano s HPTLC v različnih frakcijah celic piščančjih prsih v kontrolni skupini (G0) in v skupini, krmljeni 40 dni s CoQ₁₀ (G4)
Table 24: Influence of exogenous CoQ₁₀ on cholesterol concentration (mg/mL) analysed with HPTLC in different fractions chicken breast cells in control group (G0) and in group feeding 40 days with CoQ₁₀ (G4)

frakcija	skupina	$\bar{x} \pm so$	Z	ZG
F1	G0	97,01 ± 7,00 ^z		
	G4	104,59 ± 15,64		
F2	G0	295,92 ± 34,83 ^x		
	G4	292,74 ± 38,40		
F3	G0	204,86 ± 8,32 ^y	nz	***
	G4	229,28 ± 49,61		
S3	G0	79,87 ± 10,94 ^z		
	G4	71,00 ± 3,13		

n - število opazovanj, \bar{x} - povprečna vrednost, so - standardni odklon, Z - vpliv dodatka CoQ₁₀ v krmo piščancev med skupinama G0 in G4 (p-vrednost), ZG - značilne razlike med frakcijami v G0 skupini, *** p ≤ 0,001 statistično zelo visoko značilen vpliv, ** p ≤ 0,01 statistično visoko značilen vpliv, * p ≤ 0,05 statistično značilen vpliv, nz - p > 0,05 statistično neznačilen vpliv, ^{x, y, z} - skupine G0 z enako nadpisano črko se med seboj statistično ne razlikujejo



Slika 15: Spremembe CoQ₁₀/holesterol indeksa v različnih frakcijah v kontrolni skupini (G0) in v testni skupini (G4)

Figure 15: Changes of CoQ₁₀/cholesterol index in different fractions in control groups (G0) and in test group (G4)

4.2 INDUSTRIJSKA PRIDELAVA PIŠČANČJIH IZDELKOV S POVEČANO VSEBNOSTJO CoQ₁₀

Pozitivni rezultati krmljenja piščancev v sodelovanju s Perutnino Ptuj so nas privedli do ideje, da bi pripravili obogatene piščančje izdelke s CoQ₁₀, v katerih CoQ₁₀ ne bi bil dodan v končnem postopku, ampak bi bil biološko vgrajen v meso.

Z obogateno krmo je bilo krmljenih 37.000 piščancev v prostorih Perutnine Ptuj, namenjenih redni proizvodnji. Na podlagi rezultatov predhodne raziskave krmljenja piščancev z dodatkom CoQ₁₀ v različnih časovnih obdobjih (10, 20, 30 in 40 dni) smo se odločili, da bomo piščance krmili od 20 dneva starosti do zakola (20 dni). Piščancem v kontrolni in v testni skupini so bila odvzeta bedra, prsi, peruti in jetra, iz katerih so bili nato pripravljene piščančji proizvodi.

4.2.1 Vpliv dodanega CoQ₁₀ na vsebnost maščob, CoQ₁₀ in holesterola v prsih, bedrih in perutih

Iz skupine piščancev, krmljenih z obogateno krmo s CoQ₁₀ (B) in iz skupine piščancev, krmljenih po standardnem postopku (S) smo analizirali vzorce beder, prsi in peruti. V odvzetih vzorcih mesa smo določali vsebnost maščob, CoQ₁₀ in holesterola.

V preglednici 25 so prikazani odstotki maščob v odvzetih vzorcih (bedra, prsa in peruti). V kontrolni skupini se vsebnosti maščob med posameznimi mišičnimi tkivi zelo visoko značilno razlikujejo ($p \leq 0,001$). Največ maščobe v skupini S vsebujejo bedra (6,83 %) in peruti (6,45 %), med katerima ni statistično značilnih razlik, najmanj maščobe vsebujejo prsa (3,30 %). V bedrih, prsih in perutih, ki so bila odvzeta piščancem, krmljenim s CoQ₁₀ in piščancem, krmljenim po standardnem postopku, v vsebnosti maščobe ni statistično značilnih razlik.

V preglednici 26 so predstavljeni rezultati CoQ₁₀ v bedrih, prsih in perutih. Med posameznimi mišičnimi tkivi v kontrolni skupini je značilna razlika v vsebnosti CoQ₁₀ ($p \leq 0,001$) in holesterola ($p \leq 0,001$).

V kontrolni skupini (S) največ CoQ₁₀ vsebujejo bedra (20,64 mg/kg), nato prsa (12,10 mg/kg) in peruti (6,66 mg/kg). V skupini B se koncentracija CoQ₁₀ v vseh tkivih glede na skupino S značilno razlikuje ($p \leq 0,05$). Največji porast CoQ₁₀ je viden v perutih, kjer se vsebnost poveča s faktorjem 2,3 glede na kontrolno skupino. Vsebnost CoQ₁₀ se prav tako poveča v bedrih za 25 % in v prsih za 20 %. Največ holesterola vsebuje bedro (700,82 mg/kg), nato prsa (445,88 mg/kg), najmanj pa peruti (270 mg/kg). Koncentracije holesterola se v prsih, bedrih in perutih med skupinama S in B ne spreminjajo.

Preglednica 25: Vpliv dodanega CoQ₁₀ na vsebnost maščobe (%) v bedrih, prsih in perutih v skupinah S (standardno meso) in B (obogateno meso); (n = 4)

Table 25: Influence of exogenous CoQ₁₀ on content of fat (%) in legs, breast and wings in groups S (standardized meat) and B (fortified meat); (n = 4)

tkivo	skupina	$\bar{x} \pm so$	ZS	ZT
bedra	B	6,83 ± 0,17	nz	
	S	7,10 ± 0,26 ^a		
prsa	B	3,30 ± 0,25	nz	***
	S	3,47 ± 0,28 ^b		
peruti	B	6,45 ± 1,80	nz	
	S	6,78 ± 1,28 ^a		

n – število opazovanj, \bar{x} – povprečna vrednost, so – standardni odklon, ZS – vpliv dodanega CoQ₁₀ na vsebnost maščobe v skupini B in S, ZT – značilne razlike v vsebnosti maščobe v skupini S, *** p ≤ 0,001 statistično zelo visoko značilen vpliv, ** p ≤ 0,01 statistično visoko značilen vpliv, * p ≤ 0,05 statistično značilen vpliv, nz – p > 0,05 statistično neznačilen vpliv, ^{a, b} – vrednosti maščob med tkivi z enako nadpisano črko se med seboj statistično ne razlikujejo

Preglednica 26: Vpliv dodanega CoQ₁₀ na vsebnost CoQ₁₀ in holesterola (mg/kg) v bedrih, prsih in peruti v skupinah S (standardno meso) in B (obogateno meso); (n = 4)

Table 26: Influence of exogenous CoQ₁₀ on content of CoQ₁₀ and cholesterol concentration (mg/kg) in legs, breast and wings in groups S (standardized meat) and B (fortified meat); (n = 4)

tkivo	skupina	CoQ ₁₀ (mg/kg)	ZS	ZT	holesterol (mg/kg)	ZS	ZT
		$\bar{x} \pm so$			$\bar{x} \pm so$		
bedra	B	25,00 ± 8,06 ^x	*		864,26 ± 218,19	nz	
	S	20,64 ± 2,93 ^{a,y}			700,82 ± 104,06 ^a		
prsa	B	14,55 ± 0,32 ^x	*	***	388,36 ± 58,22	nz	***
	S	12,10 ± 2,33 ^{c,y}			445,88 ± 27,30 ^c		
peruti	B	15,45 ± 1,74 ^x	*		433,59 ± 67,76	nz	
	S	6,66 ± 2,29 ^{b,y}			270,26 ± 51,83 ^b		

n – število opazovanj, \bar{x} – povprečna vrednost, so – standardni odklon, ZS – vpliv dodanega CoQ₁₀ na vsebnost CoQ₁₀ in holesterola v skupini B in S, ZT – značilne razlike v vsebnosti CoQ₁₀ in holesterola v skupini S, *** p ≤ 0,001 statistično zelo visoko značilen vpliv, ** p ≤ 0,01 statistično visoko značilen vpliv, * p ≤ 0,05 statistično značilen vpliv, nz – p > 0,05 statistično neznačilen vpliv, ^{a, b} – vrednosti maščob med

tkivi z enako nadpisano črko se med seboj statistično ne razlikujejo, ^{x, y} – vrednosti maščob med tkivi v skupini S z enako nadpisano črko se med seboj statistično ne razlikujejo

4.2.2 Vpliv dodanega CoQ₁₀ na vsebnost maščob, CoQ₁₀ in holesterola v različnih piščančjih izdelkih

Iz odvzetega mesa (bedra, peruti, prsa in jeter), so bili pripravljene različni piščančji izdelki: pečena piščančja krila, pečene piščančje krače, panirani piščančji fileji, piščančje prsi v ovitku, piščančje posebne klobase in piščančja jetrna pašteta. V pripravljenih izdelkih smo določili vsebnosti maščob, CoQ₁₀ in holesterola.

Rezultati deleža maščob v izdelkih so predstavljeni v preglednici 27. V kontrolni skupini med posameznimi izdelki obstajajo značilne razlike ($p \leq 0,05$). Največ maščobe v skupini S vsebujeta piščančja jetrna pašteta (14,18 %) in pečena piščančja krila (13,74 %) med katerima ni statistično značilnih razlik. Tesno jima sledijo piščančje posebne klobase (12,01 %), medtem ko je delež maščob v ostalih izdelkih bistveno nižji: v paniranih piščančjih kračah (6,20 %), paniranih piščančjih filejih (2,87 %) in v piščančjih prsah v ovitku (0,85 %). Med kontrolno (S) in testno skupino (B) v različnih proizvodih v vsebnosti maščob ni bilo statistično signifikantnih razlik v paniranih piščančjih filejih, v piščančjih prsah v ovitku in v piščančji jetrni pašteti, so pa v ostalih piščančjih izdelkih razlike statistično neznačilne.

Preglednica 27: Vpliv dodanega CoQ₁₀ v krmo piščancev na vsebnost maščobe (%) v izdelkih obogatenih s CoQ₁₀ (B) in standardnih izdelkih (S); (n = 4)

Table 27: Influence of exogenous CoQ₁₀ on content of fat (%) in products fortified with CoQ₁₀ (B) and standardized products (S); (n = 4)

tkivo	skupina	$\bar{x} \pm so$	ZS	ZT
pečena piščančja krila	B	10,88 ± 0,70 ^y	**	
	S	13,74 ± 0,42 ^{a,x}		
panirane piščančje krače	B	6,65 ± 0,06 ^x	**	
	S	6,20 ± 0,12 ^{c,y}		
panirani piščančji fileji	B	2,61 ± 0,17 ^x	nz	
	S	2,87 ± 0,21 ^{d,x}		**
piščančje prsi v ovitku	B	0,85 ± 0,10 ^x	nz	
	S	0,85 ± 0,04 ^{e,x}		
piščančje posebne klobase	B	9,55 ± 0,77 ^y	*	
	S	12,01 ± 0,48 ^{b,x}		
piščančja jetrna pašteta	B	15,50 ± 1,42 ^x	nz	
	S	14,18 ± 0,59 ^{a,x}		

n – število opazovanj, \bar{x} – povprečna vrednost, so – standardni odklon, ZS – vpliv CoQ₁₀ na vsebnost maščobe v skupini B in S, ZT – značilne razlike v vsebnosti maščobe med piščančjimi izdelki v skupini S, *** p ≤ 0,001 statistično zelo visoko značilen vpliv, ** p ≤ 0,01 statistično visoko značilen vpliv, * p ≤ 0,05 statistično značilen vpliv, nz – p > 0,05 statistično neznačilen vpliv, ^{a, b, c, d, e} – vrednosti maščob v piščančjih izdelkih z enako nadpisano črko se med seboj statistično ne razlikujejo, ^{x, y} – vrednosti maščob v skupini B in S z enako nadpisano črko se med seboj statistično ne razlikujejo

V preglednici 28 so predstavljene vsebnosti CoQ₁₀ in koeficient variabilnosti (%) v piščančjih izdelkih. V kontrolni skupini je med piščančjimi izdelki zelo visoka značilna razlika (p ≤ 0,001). Največ CoQ₁₀ v S skupini vsebuje piščančja jetrna pašteta (45,14 mg/kg), znatno manj panirane piščančje krače (11,33 mg/kg) in panirani piščančji fileji (6,85 mg/kg), ter še manj ostali izdelki kot so: panirana piščančja krila, piščančje posebne klobase in piščančje prsi v ovitku.

V vseh obogatenih piščančjih izdelkih pride do značilnih razlik v vsebnosti CoQ₁₀ glede na kontrolno skupino. V pečenih piščančjih krilih in piščančjih prsih je zelo visoka statistična

razlika ($p \leq 0,001$), v pečenih piščančjih kračah in paniranih piščančjih filejih je visoka statistična razlika ($p \leq 0,01$), v piščančjih posebnih klobasah in piščančji jetrni pašteti je razlika značilna glede na kontrolno skupino.

Procentualno se vsebnost CoQ₁₀ najbolj poveča v pečenih piščančjih krilih (98 %), v paniranih piščančjih filejih (67 %) in piščančjih posebnih klobasah (47 %). V ostalih izdelkih pride le od 17 do 35 odstotnega povečanja.

Preglednica 28: Vpliv dodanega CoQ₁₀ v krmo piščancev na vsebnost CoQ₁₀ (mg/kg) v izdelkih obogatenih s CoQ₁₀ (B) in v standardnih izdelkih (S), (n = 4)

Table 28: Influence of exogenous CoQ₁₀ on CoQ₁₀ concentration (mg/kg) in products fortified with CoQ₁₀ (B) and in standardized products (S); (n = 4)

tkivo	skupina	$\bar{x} \pm so$	KV %	ZS	ZT
pečena piščančja krila	B	8,85 ± 1,42 ^x	16,05	***	
	S	4,47 ± 0,33 ^{d,y}	7,44		
panirane piščančje krače	B	13,68 ± 0,89 ^x	6,54	**	
	S	11,33 ± 0,53 ^{b,y}	4,65		
panirani piščančji fileji	B	11,41 ± 1,37 ^x	12,02	**	
	S	6,85 ± 1,05 ^{c,y}	15,38		***
piščančje prsi v ovitku	B	2,73 ± 0,25 ^x	9,15	***	
	S	1,16 ± 0,30 ^{c,y}	16,10		
piščančje posebne klobase	B	5,57 ± 0,55 ^x	9,88	*	
	S	3,85 ± 2,26 ^{d,y}	58,74		
piščančja jetrna pašteta	B	52,72 ± 6,98 ^x	13,24	*	
	S	45,14 ± 1,39 ^{a,y}	3,08		

n – število opazovanj, \bar{x} – povprečna vrednost, so – standardni odklon, ZS – vpliv CoQ₁₀ na vsebnost CoQ₁₀ v skupini B in S, ZT – značilne razlike v vsebnosti CoQ₁₀ med piščančjimi izdelki v skupini S, *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, nz – $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv, ^{a, b, c, d, e} – vrednosti CoQ₁₀ v piščančjih izdelkih z enako nadpisano črko se med seboj statistično ne razlikujejo, ^{x, y} – vrednosti CoQ₁₀ v skupini B in S z enako nadpisano črko se med seboj statistično ne razlikujejo

V preglednici 29 so prikazani rezultati vsebnosti holesterola v posameznih izdelkih. V kontrolni skupini so vidne značilne razlike med piščančjimi izdelki ($p \leq 0,001$). Najvišjo vsebnost holesterola v kontrolni skupini zasledimo v piščančji jetrni pašteti, najnižjo pa v piščančjih prsih v ovitku. Med obogatenimi izdelki (B) in standardnimi izdelki (S) v koncentraciji holesterola ni statistično značilnih razlik.

Preglednica 29: Vpliv dodanega CoQ₁₀ v krmo piščancev na vsebnost holesterola (mg/kg) v obogatenih izdelkih z CoQ₁₀ (B) in standardnih izdelkih (S); (n = 4)

Table 29: Influence of exogenous CoQ₁₀ on cholesterol concentration (mg/kg) in fortified products with CoQ₁₀ (B) and standardized products (S); (n = 4)

tkivo	skupina	$\bar{x} \pm so$	KV %	ZS	ZT
pečena piščančja krila	B	756,2 ± 105,7	13,98		
	S	775,5 ± 111,7 ^{d,e}	14,40		
panirane piščančje krače	B	599,9 ± 102,1	17,03		
	S	668,6 ± 35,3 ^b	5,28		
panirani piščančji fileji	B	592,8 ± 68,0	11,48		
	S	583,2 ± 65,0 ^c	11,27		
piščančje prsi v ovitku	B	386,6 ± 72,7	18,80	nz	***
	S	345,6 ± 72,6 ^e	21,00		
piščančje posebne klobase	B	451,4 ± 45,5	10,08		
	S	489,2 ± 48,0 ^d	9,80		
piščančja jetrna pašteta	B	1285,7 ± 92,8	7,22		
	S	1217,0 ± 102,2 ^a	8,40		

n – število opazovanj, \bar{x} – povprečna vrednost, so – standardni odklon, ZS – vpliv CoQ₁₀ na vsebnost holesterola v skupini B in S, ZT – značilne razlike v vsebnosti holesterola med piščančjimi izdelki v skupini S, *** p ≤ 0,001 statistično zelo visoko značilen vpliv, ** p ≤ 0,01 statistično visoko značilen vpliv, * p ≤ 0,05 statistično značilen vpliv, nz – p > 0,05 statistično neznačilen vpliv, ^{a, b, c, d, e} – vrednosti holesterola med piščančjimi izdelki z enako nadpisano črko se med seboj statistično ne razlikujejo

4.2.3 CoQ₁₀-holesterol indeks v različnih piščančjih izdelkih

Uvedeni QCI indeks, ki je merilo za izboljšavo mesa, smo uporabili tudi na analiziranih piščančjih proizvodih. Najboljši QCI indeks dosega piščančja jetrna pašteta, sledijo mu piščančje krače in nato piščančji fileji. Ostali trije izdelki (pečena piščančja krila, piščančje prsi v ovitku in piščančje posebne klobase) dosegajo nižji QCI indeks.

Preglednica 30: Vpliv CoQ₁₀ na QCI indeks v različnih piščančjih proizvodih

Table 30: Influence of CoQ₁₀ on QCI index in different chicken products

tkivo	skupina	$\bar{x} \pm so$	KV %	ZS	ZT
pečena piščančja krila	B	12,07 ± 3,57 ^x	29,54	**	
	S	5,84 ± 6,99 ^{d,e,y}	14,51		
panirane piščančje krače	B	23,44 ± 5,18 ^x	22,12	*	
	S	16,99 ± 1,53 ^{b,y}	9,02		
panirani piščančji fileji	B	19,65 ± 4,88 ^x	24,86	*	
	S	11,98 ± 2,85 ^{e,y}	23,78		***
piščančje prsi v ovitku	B	7,34 ± 1,94 ^x	26,37	**	
	S	3,34 ± 0,30 ^{e,y}	9,09		
piščančje posebne klobase	B	12,35 ± 0,03 ^x	0,24	*	
	S	7,60 ± 4,38 ^{d,y}	57,63		
piščančja jetrna pašteta	B	41,31 ± 7,38 ^x	17,86	*	
	S	37,23 ± 2,33 ^{a,x}	6,27		

n - število opazovanj, \bar{x} – povprečna vrednost, so – standardni odklon, KV (%) – koficient variabilnosti, ZS – vpliv CoQ₁₀ na vrednost QCI v skupini B in S, ZT – značilne razlike v QCI indeksu med piščančjimi izdelki v skupini S, *** p ≤ 0,001 statistično zelo visoko značilen vpliv, ** p ≤ 0,01 statistično visoko značilen vpliv, * p ≤ 0,05 statistično značilen vpliv, nz – p > 0,05 statistično neznačilen vpliv, a, b, c, d, e – vrednosti QCI med piščančjimi izdelki z enako nadpisano črko se med seboj statistično ne razlikujejo, ^{x, y}-vrednosti QCI v skupini B in S z enako nadpisano črko se med seboj statistično ne razlikujejo

4.3 VPLIV DODANEGA CoQ₁₀ NA DELOVANJE ANTIOKSIDATIVNE MREŽE V KRVI PIŠČANCA

V letu 2009 smo raziskovalno delo nadaljevali s projektom »Novi originalno razviti krmilni dodatki na osnovi vodotopnega CoQ₁₀ in njihov vpliv na ekonomičnost proizvodnje in zdravstveno stanje piščancev in kokoši nesnic med industrijsko vzrejo« (šifra projekta L1-2174). Namen projekta je bil razširiti znanje o medsebojnem delovanju antioksidativnih encimov in majhnih molekul z antioksidativnim delovanjem.

4.3.1 Reja piščancev

Piščanci smo spremljali med celotno rejo z opazovanjem njihovega zdravstvenega stanja. Razdeljeni so bili v tri testne skupine po 50 piščancev (25 petelinčkov in 25 kokošk), kontrolna skupina (z oznako SK) pa je bila sestavljena iz 100 piščancev (50 petelinčkov in 50 kokošk). Skupina SQ je bila krmljena z dodatkom CoQ₁₀, skupina SL je bila krmljena z dodatkom lipojske kisline in skupina SQL je bila krmljena s kombinacijo CoQ₁₀ in lipojske kisline. Med poskusom smo spremljali izkoriščanje krme in prirast mase piščancev z individualnim tehtanjem piščancev in tehtanjem krme ob menjavi na 16. dan, 33. dan in 41. dan starosti piščancev.

4.3.1.1 Rezultati merjenja telesnih mas piščancev

Iz preglednice je razvidno, da je bila začetna masa piščancev, vključenih v poskus, med 290 g in 345 g. Pri prvem tehtanju so bile med skupinami statistično značilne razlike, ki so posledica naključne razporeditve piščancev, saj so bili le-ti do prvega tehtanja krmljeni z enako krmo. Pri drugem tehtanju so največjo težo (1668 g) pridobili piščanci, ki so bili krmljeni z dodatkom CoQ₁₀. Piščanci, krmljeni z dodatkom lipojske kisline in kombinacije dodatka CoQ₁₀ in lipojske kisline pa so tehtali približno 1358 g, kar je za 350 g manj kot piščanci, krmljeni z dodatkom CoQ₁₀. Pri tretjem tehtanju so še vedno najvišjo težo dosegali piščanci iz skupine SQ, medtem ko se telesne mase piščancev skupin SK, SL in SQL niso statistično razlikovale. Na podlagi teh rezultatov lahko sklepamo, da CoQ₁₀ statistično značilno prispeva k povečanju telesnih mas piščancev. Zanimivo, da dodatek lipojske kisline in dodatek kombinacije CoQ₁₀ in lipojske kisline na pridobivanje teže nima učinka.

Preglednica 31: Vpliv dodanega CoQ₁₀, lipojske kisline in kombinacije CoQ₁₀ in lipojske kisline v krmo na telesne mase piščancev (g) v skupinah (SK, SQ, SL in SQL) na 16. dan (1.tehtanje), 33. dan (2.tehtanje) in 41. dan (3.tehtanje) starosti piščancev

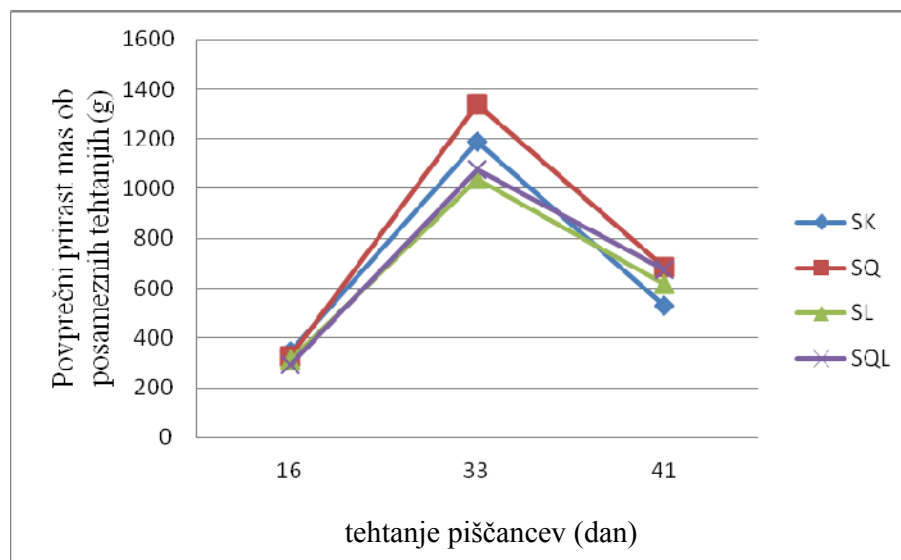
Table 31: Influence of exogenous CoQ₁₀, lipoic acid and combination of CoQ₁₀ and lipoic acid in fodder on chicken body mass (g) in groups (SK, SQ, SL and SQL) at 16th, 33th, and 41th day of chicken ages

skupina	n	1.tehtanje ($\bar{x} \pm so$)	Z	skupina	n	2.tehtanje ($\bar{x} \pm so$)	Z
SK	100	345,2 ± 68,7 ^a		SK	100	1535,7 ± 224,1 ^b	
SQ	49	327,7 ± 65,3 ^{a,b}	***	SQ	49	1667,9 ± 294,0 ^a	***
SL	50	311,4 ± 65,0 ^{b,c}		SL	50	1350,7 ± 291,2 ^c	
SQL	50	290,0 ± 71,0 ^c		SQL	49	1365,8 ± 347,9 ^c	
skupina		3.tehtanje ($\bar{x} \pm so$)	Z				
SK	100	2064,1 ± 264,8 ^b	***				

n - število opazovanj, \bar{x}	SQ	49	2350,4 ± 353,7 ^a	– povprečna vrednost, Z – vpliv dodatka CoQ ₁₀ piščancev (p-vrednost), zelo visoko značilen
so – standardni odklon, na telesno maso	SL	50	1966,6 ± 406,8 ^b	
*** p ≤ 0,001 statistično vpliv, ** p ≤ 0,01 statistično visoko značilen vpliv, * p ≤ 0,05 statistično značilen vpliv, nz – p > 0,05 statistično neznačilen vpliv, ^{a, b, c} – skupine z enako nadpisano črko se med seboj statistično ne razlikujejo	SQL	50	2040,7 ± 493,8 ^b	

4.3.1.2 Prirast piščancev

Slika 16 prikazuje povprečne priraste mas v posameznih skupinah (SK, SQ, SL in SQL), izračunane na podlagi povprečnih mas piščancev, tehtanih na določen dan. Povprečni prirasti na 16. dan so se gibali od 290 g do 345 g, na 33. dan od 1039 g do 1340 g in na 41. dan od 528 g do 674 g. Najnižje priraste je dosegala skupina piščancev, krmljenih z lipojsko kislino, najvišje pa skupina piščancev, krmljenih s CoQ₁₀.

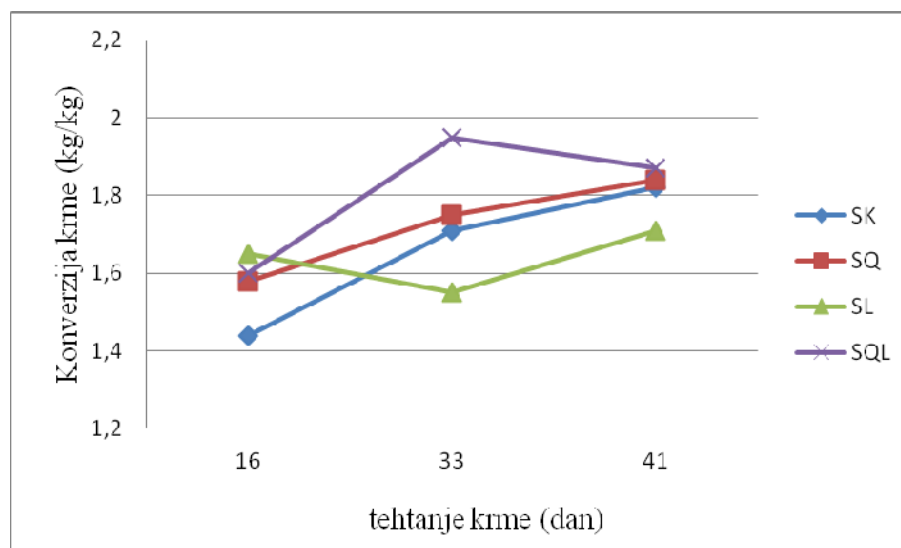


Slika 16: Povprečni prirast mas (g/dan) v kontrolni skupini (SK) in testnih skupinah (SQ, SL in SQL)

Figure 16: Average gain (g/day) of control group (SK) and test groups (SQ, SL and SQL)

4.3.1.3 Konverzija krme

Slika 17 prikazuje konverzijo krme v zaporednih tehtanjih na določene dneve reje v različnih testnih skupinah in v kontrolni skupini. Najnižjo konverzijo in s tem najboljši izkoristek krme je dosegla skupina piščancev, krmljenih z dodatkom lipojske kisline, najvišjo pa skupina piščancev, krmljenih s kombinacijo dodatkov CoQ₁₀ in lipojske kisline.



Slika 17: Konverzija kreme (kg/kg) v kontrolni skupini (SK) in testnih skupinah skupin (SQ, SL in SQL)

Figure 17: Feed conversion (kg/kg) of control group (SK) and test groups (SQ, SL and SQL)

4.3.2 Antioksidativna mreža

V posameznih skupinah piščancev (SK, SQ, SL, SQL) smo med antioksidanti z nizko molekularno maso spremljali spremembe v koncentracijah CoQ₁₀, lipojske kisline in α -tokoferola v plazmi piščancev. Med encimi z antioksidativnim delovanjem smo spremljali vsebnosti SOD in GPx. Skupno koncentracijo vseh antioksidantov pa smo spremljali s totalnim antioksidativnim statusom (TAC). Različne analite smo spremljali v krvi, ki je bila odvzeta prvič na 16. dan, drugič na 28. dan in tretjič na 40. dan starosti piščancev.

4.3.2.1 Koncentracija analitov v plazmi piščancev kontrolne skupine

Piščanci so zaradi intenzivne reje izpostavljeni stresnim dejavnikom, kar bi lahko vplivalo na koncentracije izbranih analitov. V preglednici 32 so predstavljene koncentracije antioksidantov z nizko molekularno maso: CoQ₁₀, α -tokoferola in lipojske kisline in izbrani biokemijski parametri SOD in GPx, ter TAC.

Iz preglednice 32 je razvidno, da vsebnost CoQ₁₀ v kontrolni skupini med rejo narašča, vendar razlike med posameznimi odvzemi niso značilno različne. Koncentracije lipojske kisline med rejo so značilno različne ($p \leq 0,01$), pri tretjem odvzemu je bila izmerjena koncentracija lipojske kisline namreč le še 24 % začetne vrednosti, to je koncentracije pri prvem odvzemu. Koncentracija α -tokoferola med rejo narašča, najvišji porast koncentracije je pri tretjem odvzemu, ki se tudi značilno razlikuje od koncentracij α -tokoferola v ostalih dveh odvzemih ($p \leq 0,001$).

Vsebnost TAC-a je najvišja pri drugem odvzemu, med prvim in drugim odvzemom pa ni značilnih razlik. Vsebnost SOD-a med rejo narašča ($p \leq 0,05$), najvišjo vrednost doseže pri tretjem odvzemu, med prvim in drugim odvzemom pa ni značilnih razlik. Prav tako med rejo narašča vrednost GPx s statistično visoko značilnostjo ($p \leq 0,01$).

Preglednica 32: Vpliv reje v kontrolni skupini na spremembe vsebnosti CoQ₁₀ (mg/L), lipojske kisline ($\times 10^{-1}$ mg/L), α -tokoferola (mg/L) TAC (mmol/L), SOD (U/g^oHgb) in GPx (U/g^oHgb) v plazmi
Table 32: Influence of chicken breeding in control groups on changes of CoQ₁₀ (mg/L), lipoic acid ($\times 10^{-1}$ mg/L), tocopherol (mg/L), TAC (mmol/L), SOD (U/g^oHgb) and GPx (U/g^oHgb) content

odvzem	CoQ ₁₀	Z	lipojska kislina	Z	α -tokoferol	Z
	(mg/L)		($\times 10^{-1}$ mg/L)		(mg/L)	
	($\bar{x} \pm so$)		($\bar{x} \pm so$)		($\bar{x} \pm so$)	
1.	0,46 \pm 0,06 ^a		0,37 \pm 0,16 ^a		8,74 \pm 0,59 ^b	
2.	0,59 \pm 0,15 ^a	nz	0,14 \pm 0,01 ^b	**	9,83 \pm 1,04 ^b	***
3.	0,72 \pm 0,26 ^a		0,09 \pm 0,01 ^b		12,97 \pm 0,94 ^a	
odvzem	TAC ($\bar{x} \pm so$)	Z	SOD ($\bar{x} \pm so$)	Z	GPx ($\bar{x} \pm so$)	Z
	(mmol/L)		(U/g ^o Hgb)		(U/g ^o Hgb)	
1.	0,90 \pm 0,15 ^b		49,86 \pm 8,97 ^b		18,69 \pm 2,77 ^b	
2.	1,17 \pm 0,14 ^a	*	49,86 \pm 8,97 ^{a,b}	*	19,27 \pm 2,30 ^b	**
3.	1,01 \pm 0,34 ^{a,b}		55,21 \pm 8,41 ^a		22,20 \pm 2,66 ^a	

\bar{x} – povprečna vrednost, so -standardni odklon, Z- vpliv reje na analite v skupini (SK, SQ, SL, SQL), *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, nz – $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv, ^{a, b} – skupine z enako nadpisano črko se med seboj statistično ne razlikujejo

4.3.2.2 Analiza CoQ₁₀ v plazmi piščancev

Iz preglednice 33 je razvidno, da koncentracija CoQ₁₀ v plazmi piščancev med rejo v kontrolni skupini narašča, vendar vrednosti niso statistično značilno različne. V skupini piščancev, krmljenih s CoQ₁₀ se vsebnost CoQ₁₀ v plazmi med rejo zvišuje s statistično značilnostjo ($p \leq 0,01$), najvišjo vrednost doseže pri tretjem odvzemu, kjer je vsebnost CoQ₁₀ v plazmi piščancev 3,7-krat tolikšna kot pri prvem odvzemu. Vrednost CoQ₁₀ se prav tako statistično značilno zvišuje ($p \leq 0,01$) v skupini, krmljeni z lipojsko kislino in v skupini, krmljeni s kombinacijo CoQ₁₀ in lipojske kisline. Pri posameznih odvzemih med skupinami ni statistično značilnih razlik.

Preglednica 33: Vpliv dodatkov CoQ₁₀, lipojske kisline, in kombinacije CoQ₁₀ in lipojske kisline na koncentracijo CoQ₁₀ (mg/L) v plazmi v skupinah SK, SQ, SL, SQL med rejo; (n (SK) = 100, n (SQ, SL, SQL)= 50)

Table 33: Influence of exogenous CoQ₁₀, lipoic acid and combination of CoQ₁₀ and lipoic acid on CoQ₁₀ concentration (mg/L) in plasma in SK, SQ, SL, SQL groups during chicken raising; (n (SK) = 100, n (SQ, SL, SQL)= 50)

odvzem	SK	SQ	SL	SQL	Z
1.	0,46 ± 0,06 ^a	0,47 ± 0,09 ^b	0,46 ± 0,09 ^a	0,48 ± 0,11 ^b	nz
2.	0,59 ± 0,15 ^a	0,84 ± 0,33 ^{a,b}	0,94 ± 0,38 ^b	0,70 ± 0,15 ^{a,b}	nz
3.	0,72 ± 0,26 ^a	1,78 ± 0,70 ^c	1,34 ± 0,13 ^c	1,54 ± 0,97 ^a	nz
ZT	nz	**	**	**	

n – število opazovanj, \bar{x} – povprečna vrednost, so – standardni odklon, Z – vpliv različnih dodatkov na CoQ₁₀ znotraj odvzemov (p-vrednost), ZT - vpliv različnih dodatkov na CoQ₁₀ v posamezni skupini (SK, SQ, SL, SQL), *** p ≤ 0,001 statistično zelo visoko značilen vpliv, ** p ≤ 0,01 statistično visoko značilen vpliv, * p ≤ 0,05 statistično značilen vpliv, nz – p > 0,05 statistično neznačilen vpliv, ^{a, b} – vrednosti v posamezni skupini z enako nadpisano črko se med seboj statistično ne razlikujejo

4.3.2.3 Analiza lipojske kisline v plazmi piščancev

V preglednici 34 so predstavljene vrednosti lipojske kisline v različnih skupinah (SK, SQ, SL in SQL). V kontrolni skupini je najvišja koncentracija lipojske kisline v plazmi na začetku krmljenja, potem pa vrednost začne sčasoma upadati. Statistično značilne razlike so med prvim odvzemom, kjer dosega najvišjo vrednost in ostalima dvema odvzemoma, med katerima pa ni značilnih razlik. V SQ skupini se vrednosti lipojske kisline značilno razlikujejo (p ≤ 0,05). Med rejo koncentracija lipojske kisline pada. V SL in SQL skupini vrednosti lipojske kisline zelo visoko značilno naraščajo (p ≤ 0,001), v obeh skupinah najvišji porast dosežejo pri drugem odvzemu.

Pri prvem odvzemu med različnimi skupinami ni statistično značilnih razlik, v drugem in tretjem odvzemu pride med skupinami do zelo visokih statistično značilnih razlik. Najvišji porast lipojske kisline je pri drugem odvzemu v SL skupini in SQL skupini.

Preglednica 34: Vpliv dodatkov CoQ₁₀, lipojske kisline, in kombinacije CoQ₁₀ in lipojske kisline na koncentracijo lipojske kisline ($\times 10^{-1}$ mg/L) v plazmi v skupinah SK, SQ, SL, SQL med rejo; (n (SK) = 100, n (SQ, SL, SQL) = 50)

Table 34: Influence of exogenous CoQ₁₀, lipoic acid and combination CoQ₁₀ and lipoic acid on lipoic acid concentration ($\times 10^{-1}$ mg/L) in plasma in SK, SQ, SL, SQL groups during chicken raising; (n (SK) = 100, n (SQ, SL, SQL) = 50)

odvzem	SK	SQ	SL	SQL	Z
1.	0,37 ± 0,16 ^{a,x}	0,51 ± 0,16 ^{a,x}	0,49 ± 0,08 ^{a,x}	0,54 ± 0,03 ^{b,x}	nz
2.	0,14 ± 0,01 ^{b,z}	0,50 ± 0,15 ^{a,z}	7,79 ± 0,70 ^{b,x}	6,14 ± 1,25 ^{a,y}	***
3.	0,09 ± 0,01 ^{b,z}	0,27 ± 0,02 ^{b,z}	1,62 ± 0,48 ^{c,x}	0,76 ± 0,35 ^{b,y}	***
ZT	*	*	***	***	

n – število opazovanj, \bar{x} – povprečna vrednost, so – standardni odklon, Z – vpliv različnih dodatkov na lipojsko kislino znotraj odvzemov (p-vrednost), ZT – vpliv različnih dodatkov na lipojsko kislino v posamezni skupini (SK, SQ, SL, SQL), *** p ≤ 0,001 statistično zelo visoko značilen vpliv, ** p ≤ 0,01 statistično visoko značilen vpliv, * p ≤ 0,05 statistično značilen vpliv, nz – p > 0,05 statistično neznačilen vpliv, ^{a, b} – vrednosti v posamezni skupini z enako nadpisano črko se med seboj statistično ne razlikujejo, ^{x, y, z} – vrednosti znotraj posameznega odvzema z enako nadpisano črko se med seboj statistično ne razlikujejo

4.3.2.4 Analiza α -tokoferola v plazmi piščancev

V preglednici 35 so prikazane vrednosti α -tokoferola v posameznih skupinah SK, SQ, SL in SQL. Vsebnost α -tokoferola v plazmi se med rejo v vseh skupinah značilno zvišuje. V SK, SL in SQL skupinah so med vrednosti α -tokoferola zelo visoke značilne razlike (p ≤ 0,001), v SQ skupini pa je ta razlika visoko značilna (p ≤ 0,01). V kontrolni skupini v vsebnosti α -tokoferola med prvim in drugim odvzemom ni značilnih razlik. Do značilne razlike med vrednostmi pride šele pri tretjem odvzemu. V SQ in SL skupini se vrednosti α -tokoferola statistično razlikujejo že pri drugem odvzemu. Navečji vpliv dodatkov na α -tokoferol se vidi v SQL skupini, kjer se vse vrednosti med seboj značilno razlikujejo.

Pri prvem odvzemu se vrednosti med skupinami statistično ne razlikujejo. Pri drugem odvzemu najvišjo vrednost α -tokoferola dosegajo piščanci v SL in SQ skupini, statistično nižje vrednost pa v SK in SQL skupini. Pri tretjem odvzemu najvišjo vrednost dosega SL skupina, statistično nižjo SQ, najnižje vrednosti pa imata skupini SQL in SK, med katerima ni statistično značilnih razlik.

Preglednica 35: Vpliv dodatkov CoQ₁₀, lipojske kisline, in kombinacije CoQ₁₀ in lipojske kisline na vsebnost α -tokoferola (mg/L) v plazmi v skupinah SK, SQ, SL, SQL med rejo; (n (SK) = 100, n (SQ, SL, SQL) = 50)

Table 35: Influence of exogenous CoQ₁₀, lipoic acid and combination CoQ₁₀ and lipoic acid on α -tocopherol concentration (mg/L) in plasma in SK, SQ, SL, SQL groups during chicken raising; (n (SK) = 100, n (SQ, SL, SQL) = 50)

odvzem	SK	SQ	SL	SQL	Z
1.	8,74 ± 0,59 ^{b,x}	9,46 ± 2,45 ^{b,x}	9,00 ± 2,45 ^{b,x}	8,82 ± 1,27 ^{c,x}	nz
2.	9,83 ± 1,04 ^{b,y}	13,93 ± 1,71 ^{a,x}	15,57 ± 0,98 ^{a,x}	10,94 ± 0,87 ^{b,y}	***
3.	12,97 ± 0,94 ^{a,z}	15,77 ± 0,70 ^{a,y}	17,70 ± 0,24 ^{a,x}	13,43 ± 0,16 ^{a,z}	***
ZT	***	**	***	***	

n - število opazovanj, \bar{x} – povprečna vrednost, so – standardni odklon, Z – vpliv različnih dodatkov na α -tokoferol znotraj odvzemov (p-vrednost), ZT – vpliv različnih dodatkov na α -tokoferol v posamezni skupini (SK, SQ, SL, SQL), *** p ≤ 0,001 statistično zelo visoko značilen vpliv, ** p ≤ 0,01 statistično visoko značilen vpliv, * p ≤ 0,05 statistično značilen vpliv, nz – p > 0,05 statistično neznačilen vpliv, ^{a, b} – vrednosti v posamezni skupini z enako nadpisano črko se med seboj statistično ne razlikujejo, ^{x, y, z} – vrednosti znotraj posameznega odvzema z enako nadpisano črko se med seboj statistično ne razlikujejo

4.3.2.5 Analiza TAC v plazmi piščancev

V preglednici 36 so predstavljene vrednosti TAC v različnih skupinah med rejo. V vseh skupinah se vrednosti TAC v plazmi značilno spreminjajo. V SQ in SL skupini so razlike med vrednosti statistično zelo visoko značilne (p ≤ 0,001), SK in SQL pa so razlike le značilne (p ≤ 0,05). V SK skupini vrednost TAC najprej naraste, nato pa pade. V testnih skupinah se v vseh primerih vrednost TAC signifikatno poveča že pri drugem odvzemu. Med posameznimi odvzemi med rejo se koncentracija TAC ne spreminja značilno.

Preglednica 36: Vpliv dodatkov CoQ₁₀, lipojske kisline, in kombinacije CoQ₁₀ in lipojske kisline na vsebnost TAC (mmol/L) v plazmi v skupinah SK, SQ, SL, SQL med rejo; (n (SK) = 100, n (SQ, SL, SQL) = 50)

Table 36: Influence of exogenous CoQ₁₀, lipoic acid and combination CoQ₁₀ and lipoic acid on TAC (mmol/L) in plasma in SK, SQ, SL, SQL groups during chicken raising; (n (SK) = 100, n (SQ, SL, SQL) = 50)

odvzem	SK	SQ	SL	SQL	Z
1.	0,90 ± 0,15 ^b	0,94 ± 0,13 ^b	0,93 ± 0,10 ^b	0,93 ± 0,10 ^b	
2.	1,16 ± 0,14 ^a	1,14 ± 0,12 ^a	1,17 ± 0,06 ^a	1,17 ± 0,19 ^a	nz
3.	1,00 ± 0,34 ^{a,b}	1,06 ± 0,12 ^a	1,16 ± 0,14 ^a	1,14 ± 0,31 ^a	
ZT	*	***	***	*	

n - število opazovanj, \bar{x} – povprečna vrednost, so – standardni odklon, Z – vpliv različnih dodatkov na TAC znotraj odvzemov (p-vrednost), ZT – vpliv različnih dodatkov na TAC v posamezni skupini (SK, SQ, SL, SQL), *** p ≤ 0,001 statistično zelo visoko značilen vpliv, ** p ≤ 0,01 statistično visoko značilen vpliv, * p ≤ 0,05 statistično značilen vpliv, nz – p > 0,05 statistično neznačilen vpliv, ^{a, b} – vrednosti v posamezni skupini z enako nadpisano črko se med seboj statistično ne razlikujejo,

4.3.2.6 Analiza SOD v plazmi piščancev

Preglednica 37 prikazuje vsebnosti antioksidativnega encima SOD med rejo v različnih skupinah. Znotraj skupin med rejo so statistično značilne razlike le v SK skupini, kjer vrednost SOD v plazmi med rejo narašča (p ≤ 0,05). V skupinah SQ, SL in SQL ni značilnih razlik med rejo, vrednosti v testnih skupinah nakazujejo neizrazito zniževanje vrednosti SOD. V SL skupini za 10 %, v SQ in SQL pa se upad zmanjša le za 6 % glede na prvi odvzem.

Med odvzemi so statistično značilne razlike SOD pri prvem (p ≤ 0,01) in zlasti pri tretjem odvzemu (p ≤ 0,001). Pri tretjem odvzemu vrednosti v skupinah SK, SL in SQL niso statistično značilne, najnižjo vrednost SOD ima SQ skupina.

Preglednica 37: Vpliv dodatkov CoQ₁₀, lipojske kisline, in kombinacije CoQ₁₀ in lipojske kisline na vsebnost SOD-a (U/g°Hgb) v plazmi v skupinah SK, SQ, SL, SQL med rejo; (n (SK) = 100, n (SQ, SL, SQL) = 50)

Table 37: Influence of exogenous CoQ₁₀, lipoic acid and combination CoQ₁₀ and lipoic acid on SOD content (U/g Hgb) in plasma in SK, SQ, SL, SQL groups during chicken raising; (n (SK) = 100, n (SQ, SL, SQL) = 50)

odvzem	SK	SQ	SL	SQL	Z
1.	47,57 ± 6,03 ^{b,y}	46,15 ± 3,95 ^{a,y}	55,42 ± 14,34 ^{a,x}	58,46 ± 12,14 ^{a,x}	**
2.	49,86 ± 8,97 ^{a,b,x}	47,08 ± 7,21 ^{a,x}	49,21 ± 10,07 ^{a,x}	52,15 ± 9,21 ^{a,x}	nz
3.	55,21 ± 8,41 ^{a,x}	43,29 ± 7,75 ^{a,y}	50,00 ± 7,06 ^{a,x}	55,00 ± 9,52 ^{a,x}	***
ZT	*	nz	nz	nz	

n - število opazovanj, \bar{x} – povprečna vrednost, so – standardni odklon, Z – vpliv različnih dodatkov na SOD znotraj odvzemov (p-vrednost), ZT – vpliv različnih dodatkov na SOD v posamezni skupini (SK, SQ, SL, SQL), *** p ≤ 0,001 statistično zelo visoko značilen vpliv, ** p ≤ 0,01 statistično visoko značilen vpliv, * p ≤ 0,05 statistično značilen vpliv, nz – p > 0,05 statistično neznačilen vpliv, ^{a, b} – vrednosti v posamezni skupini z enako nadpisano črko se med seboj statistično ne razlikujejo, ^{x, y} – vrednosti znotraj posameznega odvzema z enako nadpisano črko se med seboj statistično ne razlikujejo

4.3.2.7 Analiza GPx v plazmi piščancev

Preglednica 38 prikazuje vsebnosti GPx med rejo. Iz preglednice je razvidno, da obstajajo visoko značilne razlike tako med skupinami kot med posameznimi odvzemi. Koncentracija GPx v vseh skupinah med rejo narašča. V skupini SK se vrednost GPx poveča za 20 %, v skupini SQ za 50 % in v SQL za 63 %. Najvišji porast doseže v SL skupini, kjer se vrednost poveča za 103 %.

Preglednica 38: Vpliv dodatkov CoQ₁₀, lipojske kisline, in kombinacije CoQ₁₀ in lipojske kisline na vsebnost GPx (U/g^cHgb) v plazmi v skupinah SK, SQ, SL, SQL med rejo; (n (SK) = 100, n (SQ, SL, SQL) = 50)

Table 38: Influence of exogenous CoQ₁₀, lipoic acid and combination CoQ₁₀ and lipoic acid on GPx content (U/g Hgb) in plasma in SK, SQ, SL, SQL groups during chicken raising; (n (SK) = 100, n (SQ, SL, SQL)= 50)

odvzem	SK	SQ	SL	SQL	Z
1.	18,69 ± 2,77 ^{b,x}	14,97 ± 3,01 ^{c,z}	18,07 ± 1,66 ^{b,x,y}	16,26 ± 3,05 ^{c,y,z}	**
2.	19,27 ± 2,30 ^{b,x}	18,57 ± 3,78 ^{b,x}	33,86 ± 9,26 ^{a,y}	19,89 ± 2,04 ^{b,x}	***
3.	22,20 ± 2,66 ^{a,z}	22,49 ± 4,82 ^{a,z}	36,61 ± 7,60 ^{a,x}	26,54 ± 3,22 ^{a,y}	***
ZT	**	***	***	***	

n - število opazovanj, \bar{x} – povprečna vrednost, so -standardni odklon, Z – vpliv različnih dodatkov na GPx znotraj odvzemov (p-vrednost), ZT – vpliv različnih dodatkov na GPx v posamezni skupini (SK, SQ, SL, SQL), *** p ≤ 0,001 statistično zelo visoko značilen vpliv, ** p ≤ 0,01 statistično visoko značilen vpliv, * p ≤ 0,05 statistično značilen vpliv, nz – p > 0,05 statistično neznačilen vpliv, ^{a, b, c} – vrednosti v posamezni skupini z enako nadpisano črko se med seboj statistično ne razlikujejo, ^{x, y, z} – vrednosti znotraj posameznega odvzema z enako nadpisano črko se med seboj statistično ne razlikujejo

5 RAZPRAVA

V Sloveniji je reja perutnine ena najpomembnejših in hitro razvijajočih se vej živalorejske proizvodnje. Hitri razvoj genetike in tehnologije ter človeška želja po cenovno ugodni in visokokvalitetni beljakovinski hrani je rejo perutnine izpostavila precej ostrim pogojem. V želji po čim manjšem poginu piščancev in večji kvaliteti mesa so v krmo piščancem že doslej dodajali različne dodatke. CoQ₁₀ se je izkazal kot izredno dober dodatek krmi pri zmanjšanju ascitesa (Geng in sod., 2004). Ascites ali vodenica je bolezen, katere osnovni bolezenski znak je nabiranje tekočine v prsno-trebušni votlini. Prvotno je bil ugotovljen predvsem v rejah na višjih nadmorskih višinah. Kot osnovni razlog navajajo manjši parcialni tlak kisika. Vendar pa se ascites povečuje tudi pri rejah na nižjih nadmorskih višinah, kjer pa pojava ne moremo razložiti z nizkim parcialnim tlakom kisika. Razlog pripisujejo presnovnim spremembam, ki so posledica boljšega izkoristka energije iz krme, oziroma boljše konverzije krme in pri tem manjše porabe kisika (Holcman in sod., 2004). Geng s sod. (2004) pozitiven vpliv CoQ₁₀ na zmanjšanje ascitesa razlaga z antioksidativno vlogo CoQ₁₀ pri peroksidaciji v celičnih membranah in celičnih strukturah, s čimer se prepreči oksidativni stres v eritrocitih in srčnih mišičnih celicah.

Znanje o krmljenju piščancev z dodatkom CoQ₁₀ smo želeli razširiti, zato smo spremljali biorazpoložljivost dodanega CoQ₁₀ v plazmo in akumulacijo v posamezne dele celice. Prav tako smo poskušali določiti medsebojno delovanje CoQ₁₀ z določenimi nizkomolekularnimi antioksidanti in antioksidativnimi encimi v antioksidativni mreži v plazmi.

5.1 VPLIV DODANEGA CoQ₁₀ NA NJEGOVO KOPIČENJE V TKIVIH PIŠČANCEV

V prvem poskusu smo piščance krmili s CoQ₁₀ različna časovna obdobja od 10-40 dni s 5 mg CoQ₁₀ na dan. Med rejo smo piščance v kontrolni skupini in testnih skupinah spremljali z merjenjem njihovih telesnih mas in tehtanjem zaužite krme. Rezultati so pokazali, da so največ telesne mase pridobili piščanci, ki so prejeli dodatek CoQ₁₀ 40 dni. Ti piščanci so prav tako imeli najmanj nihanj v konverziji krme, kar posledično privede tudi do nižjih stroškov reje. Piščanci v kontrolni skupini so dosegli značilno nižjo končno telesno maso ($p \leq 0,001$) glede na testne skupine ter slabšo prirast in konverzijo krme kot ostale štiri testne skupine.

V poskusu smo želeli spremljati vpliv zaužitega CoQ₁₀ na koncentracijo CoQ₁₀ v krvi in razporeditev vnesenega CoQ₁₀ po različnih tkivih. Raziskave, ki prikazujejo razporeditev vnešenega CoQ₁₀ s krmo v različna tkiva, so bile opravljene predvsem na miših in

podganah, ki spadajo med živali z relativno kratekim življenjskim časom, zato imajo prevladujočo obliko CoQ v obliki CoQ₉ (Preglednica 1). Pri človeku in živalih, ki živijo daljši čas, je prevladujoča oblika CoQ₁₀. Starejše raziskave na podganah (Scaloti in sod., 1990; Reahal in Wrigglesworth, 1992; Zhang in sod., 1995; Lönnrot in sod., 1998) in na miših (Lass in sod., 1999) navajajo, da se CoQ₁₀, dodan v krmo z odmerkom od 10 do 123 mg/kg/dan absorbira samo v kri in jetra. Vendar pa so nedavne raziskave na podganah (Kwong in sod., 2002) in miših (Kazmalov in sod., 2003) pokazale, da visoki odmerki CoQ₁₀ od 150 do 650 mg/kg/dan prehajajo v tkiva in na celični ravni tudi v mitohondrije. Leta 1983 je bila narejena raziskava na gvinejskih prašičih, katerim so intravenozno injicirali 0,6 mg/kg [14 C]-CoQ₁₀. Rezultati so pokazali, da se vneseni CoQ₁₀ prenese iz krvi v srce, v nadledvično žlezo in možgane (Yuzuriha in sod., 1983). Možna razlaga za razlike v vnosu CoQ₁₀ med prašiči in mišmi ter podganami naj bi bila razlika med prevladujočo obliko CoQ, ki je v prašičih CoQ₁₀, v podganah in miših pa CoQ₉ (Miles, 2007). Raziskave, ki bi prikazovale razporeditev vnesenega CoQ₁₀ s krmo v živalih, ki živijo relativno dlje časa ter imajo prevladujočo obliko ubiquinon z 10 izoprenskimi verigami, doslej še niso bile objavljene.

V naši raziskavi smo spremljali piščance, ki so bili krmljeni z dodatkom CoQ₁₀ (5 mg/dan) različna obdobja (10, 20, 30 in 40 dni). Piščanci so med vzrejo pridobivali na masi, zato se je njihov odmerek CoQ₁₀ na kg piščanca s časom manjšal. V preglednici 39 so predstavljeni odmerki CoQ₁₀ na kg piščanca, ki jih lahko primerjamo z rezultati raziskav, opravljenih na drugih živalih. Vidimo, da so odmerki CoQ₁₀ v naši raziskavi od 5 do 28 - krat nižji v primerjavi t raziskavami narejenimi na podganah in miših, kjer so odmerjali dnevne količine CoQ₁₀ od 10 do 650 mg/kg.

Preglednica 39: Dnevni odmerki CoQ₁₀, preračunani na telesno maso piščancev v kontrolni skupini
Table 39: Daily dose of CoQ₁₀ calculated on chicken body mass in control group

dan tehtanja	povprečna telesna masa piščancev (g) v G0 skupini	koncentracija mg CoQ ₁₀ /kg
10	216	23,2
21	729	6,9
29	1246	4,0
36	1842	2,7
42	2258	2,2

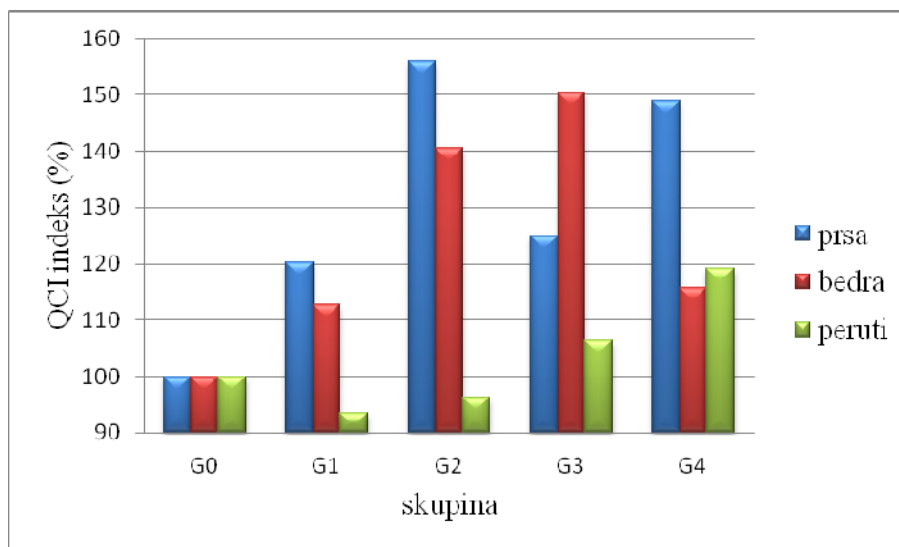
V raziskavi smo želeli z analiziranjem različnih tkiv spremljati vnos CoQ₁₀ s krmo. Po zaužitju krme, obogatene s CoQ₁₀, se le-ta preko hilomikronov prenese v jetra. Jetra so prvo mesto v organizmu, kjer se kopičijo lipofilne molekule, ki so zaužite s hrano.

Rezultati so pokazali, da se koncentracija CoQ₁₀ v jetrih po krmljenju s CoQ₁₀ v različnih testnih skupinah ni statistično značilno spremenila glede na kontrolno skupino ($p > 0,05$). Dokazano je, da v jetrih piščanca poteka glavna biosinteza lipidov (Leveille in sod., 1975). Jetra verjetno po neznanem mehanizmu uravnavajo vneseno koncentracijo CoQ₁₀ z endogeno sintezo CoQ₁₀. Z analizo holesterola v jetrih smo ugotovili, da CoQ₁₀ nima vpliva na vsebnost holesterola v jetrih med različnimi obdobji krmljenja s CoQ₁₀. V jetrih se CoQ₁₀ prepakira v lipoproteine in z njimi potuje po krvi. Plazma ima v organizmu vlogo transportnega medija, torej se molekule v krvi ne kopičijo, ampak samo potujejo po njej. Po krvi CoQ₁₀ zaradi svojih lipofilnih lastnosti potuje z lipoproteini (VLDL/LDL delci), kjer je pomemben predvsem zaradi svojih antioksidativnih lastnosti (Alleva in sod., 1995; Alleva in sod., 1997). Rezultati so pokazali porast CoQ₁₀ v plazmi v vseh testnih skupinah s faktorjem 1,6–krat v primerjavi s kontrolno skupino. Koncentracija holesterola se je v plazmi znižala, kot je navedeno v literaturi, vendar v primerjavi s kontrolno skupino statistično neznačilno. Do največjih razlik med kontrolno in testno skupino pride po 40-dnevnem krmljenju s CoQ₁₀, ko se vsebnost holesterola zniža za 30 %. Podatki v literaturi navajajo, da dodatek CoQ₁₀ v krmo piščancev značilno zniža holesterol v plazmi piščancev, če so le-ti krmljeni 21 dni z več kot 0,4 % CoQ₁₀ (Honda in sod., 2010). Predvidevamo, da v naši raziskavi zaradi nižjih količin vnosa CoQ₁₀ ni prišlo do statistično značilnega upada vsebnosti holesterola.

Iz krvi se CoQ₁₀ transportira v tkiva. V raziskavi smo preverili koncentracijo CoQ₁₀ v srcih in mišičnih tkivih (bedra, prsa in peruti). Porast v srcu je zanimiv, ker v primerjavi z drugimi tkivi vsebuje največ CoQ₁₀ (Bhagavan in sod., 2006). Visoko vsebnost CoQ₁₀ pripisujejo visokim energetske zahtevam organa. Vendar so rezultati naše raziskave pokazali, da so koncentracije CoQ₁₀ višje v jetrih kot v srcu. Vsebnost CoQ₁₀ se v srcih piščancev s podaljševanjem obdobja krmljenja s CoQ₁₀ statistično povečuje ($p \leq 0,05$), vendar le v območju od 7,3 % - 11,3 %, kar je v primerjavi z mišičnimi tkivi malo. Piščanci, ki smo jih krmili s CoQ₁₀, so mlad organizem in zato predvidevamo, da srce še ne zahteva dodatnega CoQ₁₀. Naše raziskave so pokazale statistično značilno znižanje holesterola ($p \leq 0,01$). Ugotovitve so zanimive, če predpostavimo, da so glavno področje zdravljenja s CoQ₁₀ srčno-žilne bolezni. Pri analizi mišičnih tkiv smo ugotovili, da največ CoQ₁₀ vsebujejo bedra (pribl. 22 mg/kg), precej manj prsa (pribl. 9 mg/kg) in peruti (pribl. 7 mg/kg). Dobljeni rezultati so v skladu s pričakovanji, saj je mišičnina beder metabolno najbolj aktivna. V literaturi ni navedenih podatkov o vsebnosti CoQ₁₀ za posamezne kose piščančjega mesa, obstaja pa podatek za celega piščanca, ki verjetno združuje bedra, prsi in peruti. Podatki se gibljejo od 21 do 25 mg/kg (Kamei in sod., 1986; Weber in sod., 1997a; Mattila in sod., 2001; Kubo in sod., 2008). Te vrednosti so primerljive z našimi rezultati, saj ne vemo, kako je bil pripravljen vzorec, oziroma v kakšnem razmerju so bili posamezni kosi izbrani kot vzorec. S podaljševanjem krmljenja s CoQ₁₀, se njegova vsebnost v vseh piščančjih mišičnih tkivih povišuje. Po 40 dneh krmljenja se vsebnost CoQ₁₀ najbolj poveča v prsih (za 45 %), nato v perutih (za 25 %) in

v bedrih (za 16 %). CoQ₁₀ se najbolj poveča v tkivih, ki vsebujejo manj CoQ₁₀. Vpliv dodatka v krmo piščancev na vsebnost holesterola v mišičnini piščancev ni statistično značilen ($p \leq 0,05$).

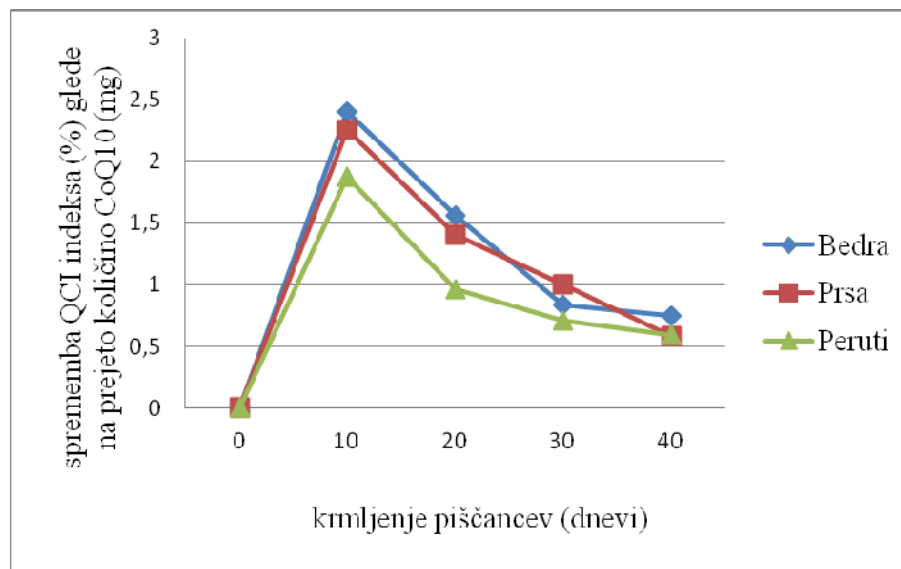
V piščančjem mesu, ki ga potrošniki največ uživajo, smo izračunali QCI indeks (CoQ₁₀/holesterol indeks), ki predstavlja merilo za izboljšavo kakovosti mesa s podaljševanjem krmljenja z dodatkom CoQ₁₀. Za potrošnika je ugodno, da se QCI indeks med rejo zvišuje, saj to pomeni večji vnos CoQ₁₀ in manjši vnos holesterola. Na sliki 18 so podane relativne spremembe QCI indeksa glede na kontrolno skupino med rejo. QCI indeks narašča v vseh delih piščanca, razen v perutih po 10 dnevih krmljenja, ko se za 9 % zmanjša in 20 dnevih krmljenja, ko se vrednost glede na kontrolno skupino ne spremeni. Največje izboljšanje smo dosegli v prsih, kjer se je po 20 dnevih krmljenja relativna sprememba QCI povečala za skoraj 50 %. Izboljšanje kvalitete mesa v odvisnosti od časa krmljenja kaže, da se kvaliteta mesa izboljša po 10 dnevih krmljenja, vendar pa pride do opazne izboljšave mesa šele po 20 dneh krmljenja.



Slika 18: Relativne spremembe QCI indeksa ($QCI = CoQ_{10} \text{ (mg/kg) / holesterol (mg/kg) * 1000}$) v različnih mišičnih tkivih piščanca v posameznih skupinah z različnimi časi krmljenja s CoQ₁₀

Figure 18: Relative changes in QCI index ($QCI = CoQ_{10} \text{ (mg/kg) / cholesterol (mg/kg) * 1000}$) in different chicken muscle tissue in test groups with different periods of feeding with CoQ₁₀

Iz ekonomskega vidika nas je zanimalo, kolikšen čas krmljenja je optimalen glede na porabljeno količino CoQ₁₀. Na sliki 19 vidimo, da je najboljši izkoristek glede na količino prejetega CoQ₁₀ po 10 dnevih, vendar takrat dosežemo najmanjše spremembe v QCI indeksu. Najvišje povečanje QCI indeksa glede na količino prejetega CoQ₁₀ je po 20 dnevih, potem pa razmerje ponovno pada.



Slika 19: Sprememba QCI indeksa (%) glede na prejeto količino CoQ₁₀ (mg) v času reje

Figure 19: Changes of QCI index (%) in comparison with content of received CoQ₁₀ (mg) during chicken raising

5.1.1 Vpliv dodanega CoQ₁₀ na njegovo vsebnost v frakcijah celic piščančjih prsi

Koncentracija CoQ₁₀ se je po 40 dnevih krmljena z dodatkom CoQ₁₀ med analiziranimi mišičnimi tkivi najbolj povečala v piščančjih prsih. Glede na te rezultate smo se odločili, da bomo frakcionirali celice piščančjih prsi in določili koncentracijo CoQ₁₀ in holesterola v posameznih frakcijah prsni celic. Rezultati analiz so pokazali, da se vneseni CoQ₁₀ s krmo nahaja predvsem v frakciji F1, ki je pretežno sestavljena iz jeder in večjih kosov celičnih membran. Manjši delež CoQ₁₀ vnesenega s krmo se je povečal tudi v frakciji F3, ki je sestavljena iz manjših organelov (lizosomov in mikrosomov) in v frakciji S3, ki vsebuje manjše ostanke celičnih membran. V frakciji F2, ki vsebuje mitohondrije, ni bilo sprememb v vsebnosti CoQ₁₀ med kontrolno in testno skupino (Jazbec in sod., 2009). Pričakovali smo, da se bo del vnesenega CoQ₁₀ prenesel do mitohondrijev, kjer ima CoQ₁₀ pomembno funkcijo v oksidativni fosforilaciji (Littarru, 1995). Vendar so dobljeni rezultati v skladu z mnenjem dr. Littarru-ja, ki pravi, da je glavna naloga vnešenega CoQ₁₀ antioksidativna zaščita organizma pred oksidativnim stresom.

Možnih teorij, zakaj večina CoQ₁₀ ostane v celični membrani, je več. CoQ₁₀, ki potuje z LDL/VLDL delci, se prenese do celic, kjer mora v celico vstopiti čez celično membrano. Okolje v celični membrani je lipofilno in je za CoQ₁₀ ugodno. CoQ₁₀ zato nima težnje, da bi se premikal v citosol, kjer je hidrofilno okolje. Za potovanje po citosolu CoQ₁₀ tudi nima svojih transportnih sistemov. Zato mora koristiti prenašalne sisteme (miceliji, proteini in vezikularni transport), ki so namenjeni drugim lipofilnim molekulam, kot je tokoferol.

Biosinteza CoQ₁₀ poteka po mevalonatni poti, katere kompleksnost prikazuje slika 3, kjer je razvidno, da se sinteza CoQ₁₀ zaključi v samem mitohondriju. Mitohondrij torej za svoje potrebe sam proizvaja CoQ₁₀. To pomeni, da bi molekula CoQ₁₀, ki se nahaja v citosolu, potrebovala za vstop v mitohondrij določen signal, za katerega pa še ni pojasnjeno, če sploh obstaja. Potrebne so nadaljne raziskave, ki bodo transportne sisteme in signale v celici potrdile.

Glede na vsa ta dejstva je velika verjetnost, da molekule CoQ₁₀ ostanejo v membrani celice, oziroma je mogoč vstop v citoplazmo, mitohondrij pa se sam oskrbuje s CoQ₁₀ z biosintezo. Dejstvo je, da mitohondriji v mladih piščancih verjetno proizvedejo zadostno količino CoQ₁₀ in zato mitohondriji ne dajo signala za pomanjkanje CoQ₁₀. Možno je, da bi koncentracija vnesenega CoQ₁₀ narasla v mitohondrijih v starejših piščancev, katerim se biosinteza CoQ₁₀ s starostjo upočasnjuje.

V dobljenih celičnih frakcijah smo vsebnost CoQ₁₀ in holesterola analizirali s HPLC-MS metodo in HPTLC metodo. HPTLC metoda ima nižjo selektivnost in občutljivost kot HPLC-MS metoda, vendar pa je primerna kot hitra presejalna metoda. Validacijski parametri so pokazali, da sta obe metodi primerni za kvantitativno vrednotenje. HPTLC metoda se je kot poceni in preprosta metoda izkazala za informativno in uporabno metodo, ki jo v današnjem času izpodrivajo druge metode bolj sofisticirane metode.

5.2 INDUSTRIJSKA PRIDELAVA PIŠČANČJIH IZDELKOV S POVEČANO VSEBNOSTJO CoQ₁₀

Zdrav način prehranjevanja vključuje v jedilnike tudi meso in mesne izdelke, ki so pomembni predvsem zaradi vnosa beljakovin, nekaterih mineralov, predvsem železa, cinka, selena in vitaminov B kompleksa. Način življenja, ki ga živimo postaja čedalje bolj stresen, predvsem zaradi prehitrega vsakodnevnega tempa. Posledica je premalo gibanja in spanja, ter malomaren odnos do prehranjevanja. Za optimalno fizično in psihično delovanje organizma čedalje več ljudi posega po prehranskih dodatkih, ki pa jih v veliki meri lahko nadomestimo s tako imenovano funkcionalno hrano. Definicij, ki opisujejo funkcionalno hrano je več. Načeloma z izrazom opisujemo hrano, ki ima poleg osnovnih komponent še neko drugo učinkovino, ki dokazano ugodno vpliva na organizem. Najpogostejši dodatki v hrano so prehranska vlaknina, maščobne kisline, antioksidanti, vitamini in minerali. CoQ₁₀ se vse več uporablja kot prehranski dodatek, zato je smiselno pripraviti mesne proizvode iz mesa obogatene s CoQ₁₀.

V ta namen smo v prostorih Perutnine Ptuj d.d. namestili dve jati piščancev, kontrolno in testno skupino, ki smo jo zadnjih 20 dni krmili s krmo obogateno s CoQ₁₀. Po 42 dneh smo piščancem odvzeli bedra, prsi in peruti, katerim smo določili vsebnost maščobe, CoQ₁₀ in

holesterola. Največ maščobe v kontrolni skupini vsebujejo bedra (6,83 %) in peruti (6,45 %), med katerima ni statistično značilnih razlik, najmanj maščobe vsebujejo prsa (3,30 %). V bedrih, prsih in perutih, ki so bila odvzeta piščancem, krmljenim s CoQ₁₀ in piščancem krmljenim po standardnem postopku v vsebnosti maščobe ni statistično značilnih razlik, kar smo pričakovali. V kontrolni skupini največ CoQ₁₀ vsebujejo bedra (20,64 mg/kg), nato prsa (12,10 mg/kg) in peruti (6,66 mg/kg). V obogatenem piščančjem mesu se koncentracija CoQ₁₀ v vseh tkivih glede na kontrolno skupino značilno razlikuje ($p \leq 0,05$). Največji porast CoQ₁₀ je viden v obogatenih perutih, kjer se vsebnost poveča za 2,3-krat kot v kontrolni skupini. Vsebnost CoQ₁₀ se prav tako poveča v bedrih za 25 % in v prsih za 20 %. Koncentracija holesterola med obogatenim mesom in kontrolnim mesom se statistično ne spreminja.

Iz odvzetega mesa so bili pripravljene standardni proizvodi Perutnine Ptuj, d.d.: pečena piščančja krila, pečene piščančje krače, panirani piščančji fileji, piščančje prsi v ovitku, piščančje posebne klobase in piščančja jetrna pašteta, katerim smo prav tako določili vsebnost maščobe, CoQ₁₀ in holesterola. V vsebnosti maščobe med kontrolno in testno skupino ni bilo značilnih razlik v paniranih piščančjih filejih, v piščančjih prsi v ovitku in piščančji jetrni paštet, v ostalih izdelkih so razlike bile statistične, kar nismo pričakovali. Razlog pripisujemo visokim vrednostim KV (%). Rezultati so pokazali, da obogateni izdelki vsebujejo statistično značilno več CoQ₁₀ kot standardni izdelki. Vsebnost CoQ₁₀ se najbolj poveča v pečenih piščančjih krilih za cca. 67 %, kar je pričakovano, saj pride do visokega porasta CoQ₁₀ tudi v obogatenih piščančjih krilih. V obogatenih paniranih piščančjih kračah pride do cca. 20 % povišanja, kar je skoraj identično povišanju v obogatenih piščančjih bedrih. Do visokega porasta pride tudi v primeru obogatenih paniranih piščančjih filejih cca. 67 % in v piščančjih prsih v ovitku cca. 135 %. V piščančji jetrni paštet je porast CoQ₁₀ najnižji, kar je v skladu s pričakovanji, saj v jetrih v prvem poskusu krmljenja piščancev s CoQ₁₀ koncentracija CoQ₁₀ ni statistično značilno porasla.

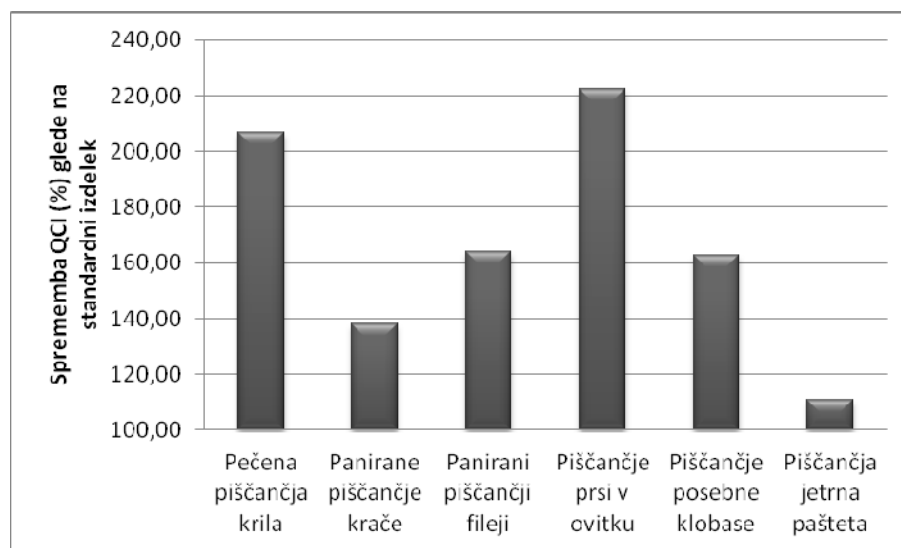
Dnevni odmerek komercialno dostopnih prehranskih izdelkov s CoQ₁₀ je od 10-30 mg/dan. Vendar je optimalen dnevni odmerek vnosa CoQ₁₀ neznan, oziroma zanj ne obstajajo uradna priporočila. Ocenjeni dnevni vnos CoQ₁₀ na Finskem je za moškega 5,4 mg in za žensko 3,8 mg (National Public Health Institute, 1998), na Japonskem pa cca. 4,48 mg (Kubo in sod., 2008). Piščančje prsi v ovitku, piščančje posebne klobase in piščančja jetrna pašteta so izdelki, ki jih neposredno vnašamo v telo. Obogatena piščančja jetrna pašteta vsebuje povprečno 52,72 mg CoQ₁₀/kg vzorca, kar pomeni, da z vnosom 100 g, vnesemo v telo 5,27 mg CoQ₁₀. S 100 g piščančje posebne klobase vnesemo 0,56 mg CoQ₁₀, s piščančjimi prsi v ovitku pa 0,27 mg. Pečena piščančja krila, panirane piščančje krače in panirani piščančji fileji vsebujejo večje količino CoQ₁₀, vendar so to izdelki, ki jih moramo po nakupu še toplotno obdelati. Weber in sod. (1997) so preučevali izgube CoQ₁₀ med pripravo hrane. Rezultati so pokazali, da se vsebnost CoQ₁₀ pri cvrtju zmanjša za 14-32 %, pri vretju pa naj ne bi prišlo do izgub vsebnosti CoQ₁₀. S 100 g pečenih piščančjih kril

vnesemo 0,89 mg CoQ₁₀, s 100 g paniranih piščančjih krač 1,37 mg in s paniranimi piščančjimi fileji 1,14 mg, brez vračunane kasnejše toplotne obdelave izdelkov.

Hrana, ki vsebuje CoQ₁₀, je bolj kompleksen matriks kot kapsule. Absorpcija komponent iz gastrointestinalnega trakta je ena od pomembnejših determinant biorazpoložljivosti. Literaturni podatki kažejo, da hrana pospeši intestinalno absorpcijo CoQ₁₀ (Ochiai in sod., 2007). Znano je, da hrana pospeši izločanje žolčnih kislin, ki tvorijo micelle, v katere se nato vključujejo vodo-netopne komponente. To poveča možnost vključevanja v vodi netopnih komponent in absorpcijo le-teh skozi gastrointestinalni trakt. Strahu, da bi z obogatnimi izdelki presegli priporočen dnevni odmerek, ki naj bi znašal 30 mg / dan, ni. Dejstvo pa je, da bi s temi izdelki povečali vnos CoQ₁₀, kar številne raziskave navajajo za pozitivno.

5.2.1 QCI indeks v izdelkih iz piščančjega mesa

Višje vrednosti QCI indeksa so posledica ali večje vsebnosti CoQ₁₀ in/ali manjše vsebnosti holesterola v mesu in pomenijo boljšo zaščito pred škodljivim vplivom oksidacijskega stresa. Na sliki 20 so predstavljene relativne spremembe QCI indeksa za različne izdelke iz piščančjega mesa glede na standardni izdelek. Razvidno je, da je največja sprememba QCI v piščančjih prsih v ovitku, kjer se indeks izboljša na 220 % in pečenih piščančjih krilih, kjer se indeks izboljša na 206 %. Do večjega izboljšanja (za 60 %) pride tudi v piščančjih filejih in piščančji posebni klobasi. Slabše razmerje v indeksu pa imata panirane piščančje krače in piščančja jetrna pašteta.



Slika 20: Sprememba QCI indeksa (%) v različnih izdelkih iz piščančjega mesa glede na standardni izdelek
Figure 20: Changes of QCI index (%) in different products of chicken meat normalized to the standardized product

5.3 VPLIV DODANEGA CoQ₁₀ NA DELOVANJE ANTIOKSIDATIVNE MREŽE

Naše dosedanje raziskave so pokazale, da se v piščancih, krmljenih 40 dni z dodatkom CoQ₁₀, ta verjetno ne vgrajuje v mitohondrije, kjer bi potencialno lahko deloval kot prenašalec elektronov, ampak se večinoma vgrajuje v celične membrane, kjer deluje kot antioksidant. V nadaljevanju raziskovalnega dela nas je zanimala vloga CoQ₁₀ v antioksidativni mreži, vzpostavljeni v piščančji plazmi. V krvi piščanca se nahajajo endogeni antioksidanti, s krmo pa v kri prehajajo tudi eksogeni antioksidanti. V organizmu se v vsakem okolju vzpostavi antioksidativna mreža z antioksidanti in antioksidativnimi encimi, ki jih ima organizem v določenem času na voljo.

Oksidativni stres lahko merimo na več načinov (Slika 9). Po pregledu literature vidimo, da se raziskovalci v svojih raziskavah posvečajo predvsem merjenjem že nastalih oksidativnih molekul, ki so posledica oksidativnega stresa. Glede na to, da je objavljenih že mnogo raziskav, kjer prikazujejo delovanje CoQ₁₀ kot uspešnega nizkomolekularnega antioksidanta (James in sod., 2004), smo v naši raziskavi poskušali ugotoviti vlogo CoQ₁₀ v antioksidativni mreži. Med rejo smo spremljali izbrane nizkomolekularne obnovljive antioksidante (CoQ₁₀, lipojska kislina, tokoferol) in antioksidativne encime (GPx in SOD). Celokupno koncentracijo antioksidantov smo spremljali s celokupno antioksidativno kapaciteto. Molekulo CoQ₁₀ učinkovito regenerira lipojska kislina (Packer in sod., 1995), zato smo v poskus vključili tudi krmljenje piščancev z lipojsko kislino. CoQ₁₀ in lipojska kislina sta antioksidanta, ki jih organizem proizvaja sam. CoQ₁₀ je lipofilna molekula, lipojska kislina je univerzalna molekula, saj se lahko nahaja tako v lipofilnem kot hidrofilnem okolju, poleg tega pa je s svojo majhno molekulsko maso sposobna prehajati čez membrano (Packer in sod., 1995).

Pri spremljanju telesnih mas piščancev smo ugotovili, da piščanci z uživanjem CoQ₁₀ dodanega v krmo, dosegajo najvišjo maso. Ko smo v krmo piščancev CoQ₁₀ dodali še lipojsko kislino, piščanci niso več pridobivali na telesni masi. Prav tako niso pridobivali na masi piščanci, krmljeni samo z lipojsko kislino, kar je v skladu s podatki iz literature (Hamano in sod., 1999).

Konstantno vnašanje krme v organizem piščancev je povezano z veliko metabolno aktivnostjo. Posledica je večja poraba kisika v mitohondrijih, kjer poteka oksidativna fosforilacija in s tem tudi večji prenos kisika po krvi. Vse to pa vodi do nastanka več prostih radikalov, ki lahko ob nezadostni obrambi, povzročijo oksidativni stres in razvoj bolezenskega stanja. Morebitne posledice oksidativnega stresa smo spremljali s koncentracijami izbranih analitov. Pri merjenju izbranih analitov smo zasledili, da vsebnost CoQ₁₀ minimalno narašča, vendar so vrednosti porasta CoQ₁₀ statistično neznačilne. Vsebnost lipojske kisline pada, vrednosti so značilno različne ($p \leq 0,01$). Razlog, da koncentracija lipojske kisline tako močno pada je verjetno v tem, da je večina lipojske

kislina vezana s proteini in se le-ta ne nahaja v prosti obliki. Vsebnost tokoferola med rejo narašča, vrednosti so visoko značilno različne ($p \leq 0,001$), saj piščanci v premiksu do 15. dneva starosti prejemaajo 100 mg α -tokoferola na kg krme, od 15. dneva starosti pa 50 mg na kg krme. Piščanci sorazmerno s starostjo zaužijejo vedno več krme. V kontrolni skupini je posamezen piščanec do 16. dneva starosti zaužil 0,5 kg krme, od 17. dneva do 33. dneva starosti 2,6 kg in od 34. dneva do 41. dneva 3,8 kg. Z večjim vnosom krme piščanci zaužijejo tudi večje količine α -tokoferola. Vsebnost SOD med rejo narašča, razlike so statistično značilne ($p \leq 0,05$). Prav tako narašča vsebnost GPx, razlike so prav tako statistično značilne ($p \leq 0,01$). Naraščanje SOD in GPx v kontrolni skupini pripisujemo obrambi organizma proti oksidativnemu stresu s samoprodukcijo antioksidativnih encimov. Piščanci na ta način vzdržujejo antioksidativno mrežo, kar se odraža v neznačilni spremembi TAC v prvem in zadnjem odvzemu plazme.

CoQ₁₀ se nahaja v treh redoks stanjih, kot ubikinol, ubikinon in semikinon. Za določitev ubikinola in ubikinona se večinoma uporablja reverzna kromatografija z elektrokemijskim detektorjem (Tang in sod., 2001). Vendar moramo upoštevati, da pri shranjevanju vzorcev ali med ekstrakcijskimi postopki ubikinol hitro oksidira v ubikinon (Grossi in sod., 1992). Redoks stanja CoQ₁₀ naj bi bila stabilna v vzorcu plazme, shranjene na -80 °C najmanj 48 h (Menke in sod., 2000). Zaradi velikega števila vzorcev smo se odločili, da bomo analizirali samo oksidirano obliko CoQ₁₀. Za pretvorbo ubikinola v ubikinon smo v prvem postopku uporabili 10 % perklorno kislino, v naslednjem pa para benzokinon. Za analizo CoQ₁₀ smo v začetnem delu raziskovalne naloge uporabljali kot ekstrakcijsko topilo heksan, ki je klasično ekstrakcijsko topilo (Barshop in Gangoiti, 2007). Zaradi velikega števila vzorcev plazme pa smo uvedli enostopenjsko ekstrakcijo z 1-propanolom, ki je lipofilen alkohol, se meša z vodo in je za ekstrakcijo CoQ₁₀ najbolj primeren (Tang in sod., 2001; Mosca in sod., 2002). Zaradi neposrednega injiciranja vzorca v HPLC je metoda preprosta in hitra. Za analizo CoQ₁₀ je uporabna reverzna kromatografija s C18 stacionarno fazo, saj je molekula hidrofobna. V začetnem delu smo uporabljali C18, 5 μ m, 150 x 4,6 mm (Phenomenex, Torrance, CA, ZDA), v zadnjem poskusu smo za ločbo uporabili Hypersil Gold kolono 1,9 μ m (50 mm x 2,1 mm) z 3 μ m predkolono, proizvajalca Thermo Scientific (Runcorn, Anglija), s čimer smo skrajšali metodo iz 17 min na 10 min in zmanjšali pretok iz 1 ml/min na 0,5 ml/min.

Analize CoQ₁₀ v plazmi piščancev so pokazale, da so se koncentracije CoQ₁₀ v vseh testnih skupinah med rejo zviševale. Najvišji porast CoQ₁₀ je bil viden v skupini piščancev, ki so krmiljeni samo s CoQ₁₀. Pri zadnjem odvzemu se je koncentracija CoQ₁₀ povišala s faktorjem 3,8-krat glede na prvi odvzem. Porast CoQ₁₀ v plazmi piščancev z dodatkom lipojske kisline lahko razlagamo z regeneracijskim učinkom lipojske kisline na CoQ₁₀. V skupini piščancev, ki smo jih krmili z obema dodatkom, bi pričakovali, da se bo koncentracija CoQ₁₀ še povečala zaradi vnosa CoQ₁₀ in regeneracijskega učinka lipojske kisline. Iz rezultatov vidimo, da kri vendarle ne deluje po principu nenehne sprejemanja

in povečevanja vsebnosti, ampak sama uravnovesi koncentracije antioksidantov, ki jih potrebuje v določenem okolju za optimalno delovanje antioksidativne mreže. Delovanje CoQ₁₀ in lipojske kisline je razvidno tudi pri spremljanju vrednosti totalne antioksidativne kapacitete, ki se med krmljenjem s CoQ₁₀ in lipojsko kislino ne povečuje. To si lahko razlagamo tako, da doseže plazma neko ravnotežje antioksidantov, ki ga nato le še vzdržuje. Rezultati so v skladu z mnenjem Hallewella (2006), ki prav tako ugotavlja, da organizem sam vzpostavi ravnotežje med zaužitimi antioksidanti.

Lipojska kislina se v plazmi nahaja v prosti in vezani obliki. Po zaužitju lipojske kisline se ta v večini nahaja v prosti obliki (Biewenga in sod., 1997). Analiza lipojske kisline je zaradi močne vezave na proteine in zaradi nizkih koncentracij v krvi, ki so do 100-krat nižje od koncentracij CoQ₁₀, zelo problematična. Zaradi majhne molekulske mase bi pričakovali, da je za analizo najbolj primerna plinska kromatografija, vendar molekule lipojske kisline zaradi prisotnih disulfidnih mostičkov hitro polimerizirajo, zato je potrebna zaščita žveplovih atomov z vodikom. Za boljšo občutljivost je primerno, da lipojsko kislino še derivatiziramo, kar analizo naredi še dolgotrajnejšo in bolj kompleksno (Kataoka, 1998). Bolj selektivna in senzitivna metoda je HPLC-ESI-MS metoda v MRM načinu snemanja, kjer izoliramo fragmentirani ion (m/z 205), ki ga uporabljamo za kvantifikacijo (Durrani in sod. 2007).

V naši raziskavi smo v plazmi piščancev analizirali lipojsko kislino prisotno v prosti obliki. Glede na redukcijski potencial CoQ₁₀, ki je za 200 mV višji od potenciala lipojske kisline (Preglednica 5), smo pričakovali, da CoQ₁₀ ne bo vplival na koncentracijo lipojske kisline. Rezultati pa so pokazali, da med rejo vsebnost lipojske kisline v skupini, krmljeni s CoQ₁₀ pada. Koncentracija lipojske kisline se zvišuje v skupini, krmljeni z dodatkom lipojske kisline in v skupini, krmljeni z obema dodatkom. Vpliv dodatka lipojske kisline je v obeh skupinah piščancev statistično zelo visok ($p \leq 0,001$), vendar je višji porast v skupini, krmljeni samo z dodatkom lipojske kisline.

Pomanjkanje vitamina E pri perutnini povzroči encefalomalacijo. V milejši obliki se pojavijo motnje v prirastku telesne mase, zauživanju krme, motnje v ravnotežju, v hujših primerih pride pogosto do pogina. Za preprečitev teh motenj, piščancem v krmo dodajajo vitamin E, katerega delež povečujejo s povečanjem prisotnosti nenasičenih maščobnih kislin. V literaturi lahko zasledimo podatke vpliva CoQ₁₀ in lipojske kisline na regeneracijo tokoferola. CoQ₁₀ neposredno regenerira tokoferol (James in sod., 2004), lipojska kislina pa posredno (Kagan in sod., 2000). Iz naših rezultatov je razvidno, da imata oba dodatka, tako CoQ₁₀ kot lipojska kislina enak učinek na zvišanje vsebnosti tokoferola. V primeru dodajanja CoQ₁₀ in lipojske kisline se ravnotežje ponovno vzpostavi, kar pomeni, da se koncentracija tokoferola v krvi ni bistveno povečala kot pri krmljenju samo s CoQ₁₀ ali samo z lipojsko kislino.

Vse celice evkariontskih organizmov proizvajajo močne antioksidativne encime, ki jih razdelimo v tri glavne skupine: SOD, katalaze in GPx, ki sodelujejo v prvi obrambni liniji proti ROS molekulam (Sies, 1997). Visoke koncentracije ROS molekul so povezane s staranjem organizma in številnimi bolezenskimi stanji, kar privede do zmanjšanja koncentracij antioksidativnih encimov v organizmu (Mates in sod., 1999).

Superoksid dismutaze ščitijo celice pred superoksidnim anionom z njegovo dismutacijo do kisika in manj reaktivnega vodikovega peroksida (McCord, 2000). Rezultati so pokazali, da se med rejo v kontrolni skupini vrednost SOD povečuje, kar nakazuje, da so piščanci izpostavljeni oksidacijskemu stresu in se s samoproduciranjem SOD molekul borijo proti njemu. Vrednosti SOD med rejo najbolj padajo v primeru krmljenja z lipojsko kislino, manj se zmanjšujejo v piščancih, krmljenih s CoQ₁₀ ali kombinacijo obeh. To nakazuje, da je lipojska kislina močan antioksidant, kar bi lahko sklepali tudi iz njenega redukcijskega potenciala.

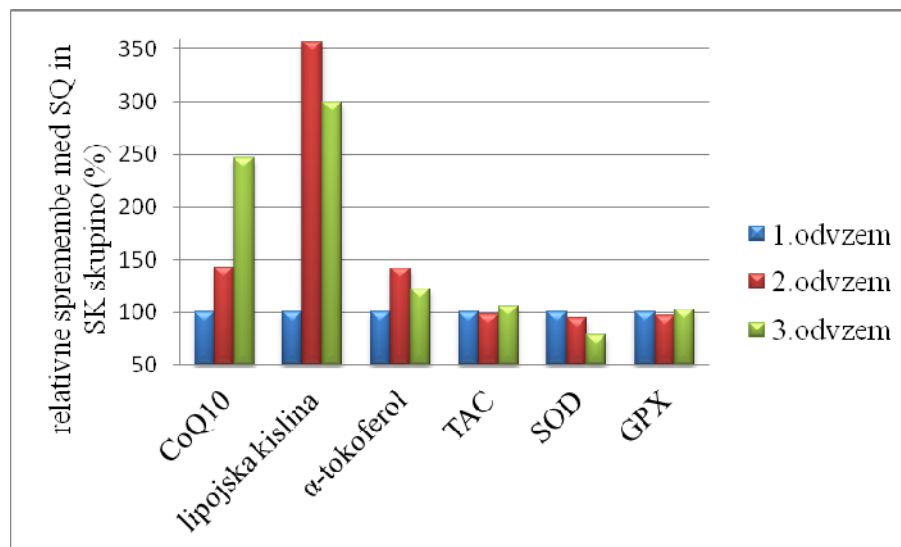
Glutation peroksidaza je encim, ki katalizira redukcijo vodikovega peroksida do vode. V svojem aktivnem mestu ima selen, zato za optimalno delovanje glutacion peroksidaze v krmo piščancev dodajajo selen. S tem želijo preprečiti poškodbe celic, ki bi nastale zaradi delovanja peroksidov in hidroperoksidov. Med rejo vsebnost GPx v kontrolni in vseh testnih skupinah narašča. V kontrolni skupini vrednosti GPx naraščajo zaradi samoprodukcije GPx proti oksidativnemu stresu. Vrednosti GPx najbolj narastejo v primeru krmljenja z lipojsko kislino, kar zopet nakazuje, da je lipojska kislina močan antioksidant.

TAC je biokemijski parameter, primeren za vrednotenje sprememb totalnega antioksidacijskega statusa v serumu ali plazmi, ki bi lahko bil posledica vnosa ali proizvodnje antioksidantov. Metoda temelji na sproščanju prostih radikalov do neke končne točke, pri kateri se izmeri koncentracija prostih radikalov. Glede na število inhibiranih prostih radikalov se določi antioksidacijski status. V naši raziskavi je bil TAC izmerjen s Trolox-ekvivalentom, ki ga je opisali Miller in sod. (1993).

Rezultati so pokazali, da med rejo vrednost parametra TAC pada. V primeru dodanih nizkomolekularnih antioksidantov se vrednost TAC poviša, vendar ni značilne razlike med njegovimi vrednostmi v plazmi pri krmljenju z dodatkom CoQ₁₀, lipojske kisline ali kombinacije obeh antioksidantov. Podatki iz literature navajajo pozitivno korelacijo pri zdravih psih beaglih med vnosom 30 mg CoQ₁₀ in vrednostmi TAC v 24 urah (Tomišič in sod., 2009).

V naši raziskavi nas je posebno zanimal vpliv CoQ₁₀ kot dodatka v krmi, ki vpliva na antioksidacijsko mrežo v krvi. Koncentracija CoQ₁₀ v krvi je nizka v primerjavi s koncentracijo tokoferola (Bentinger in sod., 2007), vendar je bolj učinkovit lipofilni

antioksidant kot tokoferol. Če CoQ₁₀ dodajamo v krmo, se njegova vsebnost v krvi poveča. Na sliki 21 so predstavljene relativne spremembe CoQ₁₀, lipojske kisline in tokoferola glede na vsebnosti analitov v kontrolni skupini. Če piščance krmimo s CoQ₁₀, se njegova koncentracija povečuje. Tako visok porast relativne spremembe lipojske kisline gre predvsem na račun padca vsebnosti lipojske kisline v kontrolni skupini, istočasno nam pa to pove, da CoQ₁₀ vzdržuje boljšo antioksidativno obrambo v krvi piščancev. Najmanjši učinek ima CoQ₁₀ na koncentracijo α -tokoferola, kar razlagamo s tem, da se tokoferol s krmo konstantno dovaja v kri. Dodan CoQ₁₀ v krmo znižuje vsebnost SOD v krvi, kar razlagamo, da organizmu ni potrebno skrbeti za samoprodukcijo antioksidativnih encimov. Očitno je, da ima CoQ₁₀ vpliv na totalno antioksidativno kapaciteto, kar je pozitivno za organizem.



Slika 21: Relativne spremembe analitov (CoQ₁₀, lipojske kisline, α -tokoferola, SOD, GPx in TAC) med skupino krmiljeno z dodatkom CoQ₁₀ in kontrolno skupino

Figure 21: Relative changes of analytes (CoQ₁₀, lipoic acid and α -tocopherol, SOD, GPx and TAC) between groups feeding with feed with CoQ₁₀ and control group

6 SKLEPI

Na podlagi rezultatov lahko oblikujemo naslednje sklepe:

V piščancih smo v kontrolni skupini določili vsebnosti CoQ₁₀ za posamezne piščančje kose (jetra, srce, bedra, prsa in peruti), kar še v literaturi ni bilo objavljeno. Piščančja jetra v kontrolni skupini vsebujejo pribl. 126 mg/kg, piščančja srca pa pribl. 104 mg/kg CoQ₁₀. Pri analizi mišičnih tkiv smo ugotovili, da največ CoQ₁₀ vsebujejo bedra (pribl. 22 mg/kg), precej manj prsa (pribl. 9 mg/kg) in peruti (pribl. 7 mg/kg). Dobljeni rezultati so v skladu s pričakovanji, saj je mišičnina beder metabolno najbolj aktivna.

Pri krmljenju piščancev s CoQ₁₀ v različnih obdobjih (10, 20, 30 in 40 dni) je razvidno, da so največ telesne mase pridobili piščanci, ki so prejeli dodatek CoQ₁₀ 40 dni. Ti piščanci so imeli najmanj nihanj v konverziji krme, kar posledično privede do nižjih stroškov reje.

Po krmljenju piščancev različnih obdobj smo spremljali vpliv dodanega CoQ₁₀ na vsebnost CoQ₁₀ in holesterola v plazmi, jetrih srcih, bedrih, perutih in prsih. Krmljenje piščancev s CoQ₁₀ statistično ne vpliva na vsebnost CoQ₁₀ v jetrih. Jetra verjetno uravnajo vnešeni CoQ₁₀ z biosintezo CoQ₁₀. Z analizo holesterola v jetrih smo ugotovili, da CoQ₁₀ nima vpliva na vsebnost holesterola v jetrih med različnimi obdobji krmljenja s CoQ₁₀.

V plazmi piščancev se vsebnost CoQ₁₀ poveča v vseh testnih skupinah za približno 1,6-krat v primerjavi s kontrolno skupino. Koncentracija holesterola se v plazmi zniža, vendar statistično neznatno, kar razlagamo z nižjim odmerkom dodanega CoQ₁₀ na piščanca kot v literaturi.

Vsebnost CoQ₁₀ se v srcih piščancev s podaljševanjem obdobja krmljenja s CoQ₁₀ statistično povečuje ($p \leq 0,05$), vendar v rangu od 7,3 % - 11,3 %, kar je v primerjavi z mišičnimi tkivi malo. Piščanci, ki smo jih krmili s CoQ₁₀, so mlad organizem in zato predvidevamo, da srce še ne zahteva dodatnega CoQ₁₀. Naše raziskave so pokazale statistično značilno znižanje holesterola ($p \leq 0,01$).

V vseh analiziranih piščančjih mišičnih tkivih (bedra, prsi in peruti) se s podaljševanjem krmljenja s CoQ₁₀ vsebnost CoQ₁₀ povečuje. Po 40 dneh krmljenja se vsebnost CoQ₁₀ najbolj poveča v prsih za 45 %, nato v perutih za 25 % in v bedrih za 16 %. CoQ₁₀ se najbolj poveča v tkivih, ki vsebujejo manj CoQ₁₀. Vpliv dodatka v krmo piščancev na vsebnost holesterola v mišičnini piščancev ni statistično značilen ($p \leq 0,05$).

Uvedeni QCI indeks, ki ponazarja izboljšavo mesa, narašča v vseh delih piščanca, razen v perutih po 10 dnevih krmljenja, ko se za 9 % zmanjša in po 20 dnevih krmljenja, ko se vrednost glede na kontrolno ne spremeni. Najboljše izboljšanje smo dosegli v prsih, kjer se je po 20 dnevih krmljenja relativna sprememba QCI povečala za skoraj 50 %. V vsej mišičnini piščanca je najvišje povečanje QCI indeksa glede na količino prejetega CoQ₁₀ po 20 dnevih.

Rezultati analiz CoQ₁₀ v frakcijah celic piščančjih prsi so pokazali, da se vnešeni CoQ₁₀ s krmo nahaja predvsem v frakciji F1, ki je pretežno sestavljena iz jeder in večjih kosov celičnih membran. Manjši delež CoQ₁₀ vnešenega s krmo se je povečal tudi v frakciji F3, ki je sestavljena iz manjših organelov (lizosomov in mikrosomov) in v frakciji S3, ki vsebuje manjše ostanke celičnih membran. V frakciji F2, ki vsebuje mitohondrije, ni bilo sprememb v vsebnosti CoQ₁₀ med kontrolno in testno skupino.

V dobljenih celičnih frakcijah smo vsebnost CoQ₁₀ in holesterola analizirali s HPLC-MS metodo in HPTLC metodo. Validacijski parametri so pokazali, da sta obe metodi primerni za kvantitativno vrednotenje. HPTLC metoda se je kot poceni in preprosta metoda izkazala za informativno in uporabno metodo, ki jo v današnjem času izpodrivajo druge, bolj sofisticirane metode.

V industrijskem poskusu v analiziranem piščančjem mesu največ maščobe v kontrolni skupini vsebujejo bedra (6,83 %) in peruti (6,45 %), med katerima ni statistično značilnih razlik, najmanj maščobe vsebujejo prsa (3,30 %). V bedrih, prsih in perutih, ki so bila odvzeta piščancem, krmljenim s CoQ₁₀ in piščancem krmljeni po standardnem postopku v vsebnosti maščobe ni statistično značilnih razlik. V kontrolni skupini največ CoQ₁₀ vsebujejo bedra (20,64 mg/kg), nato prsa (12,10 mg/kg) in peruti (6,66 mg/kg). V obogatenem piščančjem mesu se koncentracija CoQ₁₀ v vseh tkivih glede na kontrolno skupino značilno razlikuje ($p \leq 0,05$). Največji porast CoQ₁₀ je viden v obogatenih perutih, kjer se vsebnost poveča za 2,3-krat v primerjavi s kontrolno skupino. Vsebnost CoQ₁₀ se prav tako poveča v bedrih za 25 % in v prsih za 20 %. Koncentracija holesterola med obogatenim mesom in kontrolnim mesom se statistično ne spreminja.

Analizirali smo tudi pripravljene standardne proizvode Perutnine Ptuj, d.d.: pečena piščančja krila, pečene piščančje krače, panirani piščančji fileji, piščančje prsi v ovitku, piščančje posebne klobase in piščančja jetrna pašteta, kjer smo določili vsebnost maščobe, CoQ₁₀ in holesterola. V vsebnosti maščobe med kontrolno in testno skupino ni bilo značilnih razlik v paniranih piščančjih filejih, v piščančjih prsih v ovitku in piščančji jetrni pašteti, v ostalih izdelkih so bile razlike statistične, kar nismo pričakovali. Razlog pripisujemo visokim vrednostim KV (%). Rezultati so pokazali, da obogateni izdelki vsebujejo statistično značilno več CoQ₁₀ kot standardni izdelki. Vsebnost CoQ₁₀ se najbolj

poveča v pečenih piščančjih krilih za cca. 67 % , kar je pričakovano, saj pride do visokega porasta CoQ₁₀ tudi v obogatenih piščančjih krilih. V obogatenih paniranih piščančjih kračah pride do cca. 20 % povišanja, kar je skoraj identično povišanju v obogatenih piščančjih bedrih. Do visokega porasta pride tudi v primeru obogatenih paniranih piščančjih filejih, cca. 67 % in v piščančjih prsih v ovitku cca. 135 %. V piščančji jetrni pašteti pride do najnižjega porasta CoQ₁₀, kar je v skladu s pričakovanji, saj v jetrih v prvem poskusu koncentracija CoQ₁₀ ni statistično značilno porasla.

Največja sprememba v QCI indeksu je v piščančjih prsih v ovitku, kjer se indeks izboljša za 220 % in pečenih piščančjih krilih, kjer se indeks izboljša za 206 %. Do večjega izboljšanja pride tudi v piščančjih filejih in v piščančji posebni klobasi. Slabše razmerje v indeksu pa dosegajo panirane piščančje krače in piščančja jetrna pašteta.

V zadnjem poskusu smo spremljali vpliv CoQ₁₀ na delovanje antioksidativne mreže. Pri spremljanju telesnih mas piščancev smo ugotovili, da piščanci z uživanjem CoQ₁₀, dodanega v krmo, dosegajo najvišjo maso, kar smo dokazali že v predhodnem poskusu. Ko smo v krmo piščancev CoQ₁₀ dodali še lipojsko kislino, piščanci niso več pridobivali na telesni masi. Prav tako niso pridobivali na masi piščanci, krmljeni samo z lipojsko kislino.

V kontrolni skupini piščancev smo pri merjenju izbranih analitov zasledili, da vsebnost CoQ₁₀ minimalno narašča, vendar so vrednosti CoQ₁₀ statistično neznačilne. Vsebnost lipojske kisline pada, vrednosti so značilno različne ($p \leq 0,01$). Vsebnost tokoferola med rejo narašča, vrednosti so značilno različne ($p \leq 0,001$), saj piščanci v premiksu do 15 dneva starosti prejema 100 mg α -tokoferola na kg krme, od 15. dneva starosti pa 50 mg na kg krme. Vsebnost SOD in GPx med rejo narašča, kar razlagamo s samoobrambo organizma proti oksidativnemu stresu. Piščanci na ta način vzdržujejo antioksidativno mrežo, kar se vidi v neznačilni spremembi TAC v prvem in zadnjem odvzemu plazme.

Analize CoQ₁₀ v plazmi piščancev so pokazale, da so se koncentracije CoQ₁₀ v vseh testnih skupinah med rejo zviševale. Najvišji porast CoQ₁₀ je bil viden v skupini piščancev, ki so krmljeni samo s CoQ₁₀. Porast CoQ₁₀ v plazmi piščancev z dodatkom lipojske kisline lahko razlagamo z regeneracijskim učinkom lipojske kisline na CoQ₁₀. V skupini piščancev, katero smo krmili z obema dodatkom, bi pričakovali, da se bo koncentracija CoQ₁₀ še povečala zaradi vnosa CoQ₁₀ in regeneracijskega učinka lipojske kisline. Iz rezultatov vidimo, da kri vendarle ne deluje po principu nenehnega sprejemanja in povečevanja vsebnosti, ampak sama uravnovesi koncentracije antioksidantov, ki jih potrebuje v določenem okolju za optimalno delovanje antioksidativne mreže.

Rezultati so pokazali, da tekom reje vsebnost lipojske kisline v skupini, krmljeni s CoQ₁₀ pada. Koncentracija lipojske kisline se zvišuje v skupini, krmljeni z lipojsko kislino in v skupini, krmljeni z obema dodatkom. Vpliv dodatka lipojske kisline je v obeh skupinah

piščancev statistično zelo visok ($p \leq 0,001$), vendar je višji porast v skupini krmljeni samo z dodatkom lipojske kisline.

Iz naših rezultatov je razvidno, da imata oba dodatka, tako CoQ₁₀ kot lipojska kislina enak učinek na zvišanje vsebnosti tokoferola. V primeru dodajanja CoQ₁₀ in lipojske kisline se zopet vzpostavi ravnotežje, kar pomeni, da se koncentracija tokoferola v krvi ni bistveno povečala, kot pri krmljenju samo s CoQ₁₀ ali samo z lipojsko kislino.

Rezultati so pokazali, da se med rejo v kontrolni skupini vrednost SOD povečuje, kar nakazuje, da so piščanci izpostavljeni oksidacijskemu stresu in se s samoproduciranjem SOD molekul borijo proti stresu. Vrednosti SOD med rejo najbolj padajo v primeru krmljenja z lipojsko kislino, manj padajo v piščancih krmljenih z CoQ₁₀ ali kombinacijo obeh. To nakazuje, da je lipojska kislina močan antioksidant, kar lahko sklepamo iz njenega redukcijskega potenciala.

Med rejo vsebnost GPx v kontrolni in vseh testnih skupinah narašča. V kontrolni skupini vrednosti GPx naraščajo zaradi samoprodukcije GPx proti oksidativnemu stresu. Vrednost GPx najbolj naraste v primeru krmljenja z lipojsko kislino, kar zopet nakazuje, da je lipojska kislina močan antioksidant.

Rezultati so pokazali, da med rejo vrednost TAC pada. V primeru dodanih nizkomolekularnih antioksidantov se vrednost TAC poviša, vendar ni signifikantne razlike med dodatkom CoQ₁₀, lipojske kisline ali kombinacije obeh antioksidantov.

7 POVZETEK (SUMMARY)

7.1 POVZETEK

CoQ₁₀ je ključna komponenta v notranji mitohondrijski membrani, kjer igra pomembno vlogo v oksidativni fosforilaciji. Prisoten je tudi v ostalih subcelularnih frakcijah in v plazemskih lipoproteinih, kjer deluje kot antioksidant. CoQ₁₀ je prav tako poznan po učinku pri izražanju genov. Zaradi naštetih funkcij se CoQ₁₀ uporablja kot prehranski dodatek in kot zdravilo. Številne klinične raziskave dokazujejo pozitivne vplive CoQ₁₀ pri kardiomiopatijah, obolenjih mišic in nevrodegenerativnih obolenjih.

CoQ₁₀ ima zaradi relativno visoke molekulske mase in hidrofobne narave slabo biorazpoložljivost, medtem, ko ima vezan v kompleks z ciklodekstrinom dokazano boljšo biorazpoložljivost, zaradi povečane topnosti v vodi. V raziskavi smo poleg omenjenega kompleksa uporabili tudi novo obliko kompleksa, pri čemer smo β-ciklodekstrin zamenjali z dekstrinom. Z menjavo nosilca smo piščancem omogočili, da CoQ₁₀ uživajo s produktom koruznega škroba, kar je podobno njihovi osnovni prehrabeni komponenti.

Namen raziskovanja je bil proučiti vpliv v krmo dodanega CoQ₁₀ na vzrejo piščancev in pripraviti funkcionalne izdelke iz mesa z biološko vgrajenim CoQ₁₀. Med rejo smo spremljali telesno maso piščancev. Po krmljenju piščancev s CoQ₁₀ v različnih obdobjih (10, 20, 30 in 40 dni) je razvidno, da so največ telesne mase pridobili piščanci, ki so prejeli dodatek CoQ₁₀ 40 dni. Ti piščanci so imeli najmanj nihanj v konverziji krme, kar je posledično privedlo do znižanja stroškov reje.

Rezultati naših raziskav so pokazali, da se je z uživanjem krme obogatene z dodatkom CoQ₁₀ povečala vsebnost CoQ₁₀ v plazmi, srcu, ter v piščančjem mesu (prsi, bedra, peruti). Dodani CoQ₁₀ je vplival na znižanje holesterola v srcu in krvi. Najvišje vsebnosti CoQ₁₀ smo dobili v piščančjih prsih po 40 dnevih krmljenja s CoQ₁₀. Frakcioniranje celic piščančjih prsi je pokazalo, da se je vsebnost CoQ₁₀ povečala v celičnih membranah in ne v mitohondrijih. To potrjuje našo predpostavko, da ima s krmo vnešeni CoQ₁₀ pri piščancih predvsem antioksidativne lastnosti.

Za analizo CoQ₁₀ in holesterola v posameznih frakcijah smo uporabili HPLC metodo, katere rezultate smo potrdili s HPLC-MS metodo. Validacijski parametri so pokazali, da je tudi HPTLC uporabna metoda za omenjene vzorce, kljub sicer njeni nižji občutljivosti in selektivnosti.

V industrijskem poskusu smo z dodatkom CoQ₁₀ krmili piščance zadnjih 20 dni pred zakolom in iz obogatene mesa pripravili piščančje izdelke. Obogateni piščančji izdelki so namenjeni potrošniku, saj lahko pozitivno vplivajo na njegovo zdravstveno stanje. Uvedli smo tudi QCI indeks, ki predstavlja merilo za izboljšanje kvalitete mesa in prikazuje razmerje med CoQ₁₀ in holesterolom. Rezultati so pokazali najvišji porast indeksa v obogatenih piščančjih prsih v ovitku.

Dokazali smo, da je CoQ₁₀ v organizmih piščancev pomemben predvsem kot antioksidant. Z merjenjem različnih antioksidantov in antioksidativnih encimov smo poskušali določiti vlogo CoQ₁₀ v antioksidativni mreži. V poskusu smo krmili piščance s CoQ₁₀ in lipojsko kislino in kombinacijo obeh dodatkov. Piščanci, ki so uživali CoQ₁₀ so pridobivali na telesni masi, v primeru dodatka lipojske kisline ali kombinacijo obeh, do sprememb v telesnih masah piščancev ni prišlo.

Ugotovili smo, da dodatek CoQ₁₀ vpliva na povečanje vsebnosti CoQ₁₀ v plazmi. Rezultati so pokazali, dodatek CoQ₁₀ vpliva na povišanje α -tokoferola, vendar nima vpliva na vsebnost lipojske kisline, kar je pričakovano glede na položaj omenjenih antioksidantov v antioksidativni mreži. Zaradi povišane količine antioksidantov, ki poskrbijo za odstranjevanje prostih radikalov med rejo, padajo vsebnosti SOD. S povečanjem vsebnosti antioksidantov v plazmi pa vplivamo na povečanje TAC, kar nakazuje na boljše delovanje antioksidativne mreže.

7.2 SUMMARY

CoQ₁₀ is a key component in inner mitochondrial membrane, where it plays important role in oxidative phosphorylation. It is also present in other subcellular fractions and in plasma lipoproteins, where it is endowed with antioxidant properties. CoQ₁₀ was also recognized to have an effect on gene expression. These three functions are important for its use in clinical practice and as a food supplement. A large number of clinical studies indicate that dietary CoQ₁₀ administration has beneficial effect, particularly in cardiomyopathies, degenerative muscle, and neurodegenerative diseases.

The bioavailability of CoQ₁₀ is relatively low due to its lipophilic nature and relatively high molecular weight. Increasing the availability of CoQ₁₀ in aqueous medium could consequently also increase its bioavailability, which achieved by complexing CoQ₁₀ with β CD. In the study a new form of complex CoQ₁₀ with dextrine was prepared. With the new carrier the chickens received CoQ₁₀ in the corn starch, which is normally present in their feed.

The aim of our work was to study the effect of added CoQ₁₀ in chicken feed on chicken body and to prepare functional chicken products. The weighing of chicken showed, that the biggest growth achieved in chicken groups where the chickens were fed with added CoQ₁₀ 40 days.

The results of our study showed that added CoQ₁₀ increased CoQ₁₀ concentration in plasma, heart and in chicken meat (breast, legs, wings). Added CoQ₁₀ decreased cholesterol concentration in heart and in plasma. The highest increase of CoQ₁₀ concentration was observed in chicken breast cells after 40 days feeding with CoQ₁₀ added in feed. Fractionation of chicken breast cells showed, that added CoQ₁₀ was mainly built into cell membranes and not in mitochondria. This confirmed our hypothesis that added CoQ₁₀ in chicken tissues acts mostly as antioxidant.

Cell fractions were analyzed with HPTLC and concentrations of CoQ₁₀ and cholesterol were confirmed with HPLC-MS. Validation parameters demonstrated that HPTLC is a reliable, sensitive and flexible analytical tool in comparison with HPLC-MS, despite its inherently lower sensitivity and selectivity.

In the industrial experiment the chicken were fed with CoQ₁₀ added in fodder the last 20 days before slaughtering and the functional product were prepared from meat fortified with CoQ₁₀. The content of CoQ₁₀ expectedly increased in all chicken products. We calculated the QCI index (CoQ₁₀ / cholesterol) to determine the improvement of meat quality. The results shows the highest increase in fortified breaded chicken fillet. The fortified chicken products can have a positive effect consumer's health. Absorbed CoQ₁₀ together with simultaneously absorbed fats can protect non-saturated fats from uncontrolled oxidation and reduce the risk of atherosclerosis.

It was proved that CoQ₁₀ in young chickens has important role as antioxidant in plasma and in chicken tissues. In the study we indicate the antioxidative role of CoQ₁₀ in antioxidative network by measuring different LMWA and activity antioxidant enzymes. In experiment we fed chicken with CoQ₁₀, lipoic acid and combination of both. The chicken body mass increased only in the groups of chicken fed with CoQ₁₀. The influence of CoQ₁₀ on antioxidative network was studied in chicken plasma. The added CoQ₁₀ in feed increased CoQ₁₀ concentration and α -tocopherol in plasma, but had no effect on concentration of lipoic acid. The results indicated the acts of antioxidants network.

8 VIRI

- Åberg F., Appelkvist E.L., Dallner G., Ernster L. 1992. Distribution and redox state of ubiquinones in rat and human tissue. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 295: 230-234
- Albers G.A.A., Groot I.A. 1998. Future trends in poultry breeding. *World Poultry*, 14, 8: 42-43
- Alleva R., Tomasetti M., Battino M., Curatola G., Littarru G.P., Folkers K. 1995. The roles of coenzyme Q and vitamin E on the peroxidation of human low density lipoprotein subfractions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92: 9388-9391
- Alleva R., Tomasetti M., Bompadre S., Littaru P. 1997. Oxidation of LDL and their subfractions: kinetic aspects and CoQ₁₀ content. *Molecular Aspects of Medicine*, 18: 105-112
- Ankola D.D., Viswanad B., Bhardwaj V., Ramarao P., Ravi Kumar M.N.V. 2007. Development of potent oral nanoparticulate formulation of coenzyme Q₁₀ for treatment of hypertension: Can the simple nutritional supplements be used as first line therapeutic agents for prophylaxis/therapy? *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 67: 361-369
- Ames B.N., Shigenaga M.K., Hagen T.M. 1993. Oxidants, antioxidants, and degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 90: 7915-7922
- Ames B.N., Gold L.S., Willet W.C. 1995. The cause and prevention of cancer. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 92: 5258-5265
- Barshop B.A., Gangoiti J.A. 2007. Analysis of coenzyme Q in human blood and tissues. *Mitochondrion*, 7, Suppl.1: S89-S93
- Bentinger M., Brisma K., Dallner G. 2007. The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion*, 7S: S41-S50
- Berthod A. 1991. Silica: backbone material of liquid chromatographic column packing. *Journal of Chromatography A*, 549: 1-28

- Bessei W. 2006. Welfare of broilers: a review. *Worlds Poultry Science Journal*, 62: 466-466
- Bhagavan H.N., Chopra R.K. 2006. Coenzyme Q10: absorption, tissue uptake, metabolism and pharmacokinetics. *Free Radical Research*, 40: 445-453
- Biewenga G., Haenen G.R., Bast A. 1997. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *General Pharmacology*, 29, 3: 315-331
- Brigelius-Flohe R. 1999. Tissue-specific functions of individual glutathion peroxidases. *Free Radical Biology & Medicine*, 27: 951-965
- Bruins A.P. 1991. Mass spectrometry with ion sources operating at atmospheric pressure. *Mass Spectrometry Reviews*, 10: 53-77
- Buettner G.R., Jurkiewicz B.A. 1996. Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiation Research*, 145: 532-541
- Casado V., Luis C., Canela E., Franco R., Mallol J. 1992. The distribution of A1 adenosine receptor and 5'-nucleotidase in pig brain cortex subcellular fractions. *Neurochemical Research*, 17: 129-139
- Chng H.T., New L.S., Neo A.H., Goh C.W., Browne E.R., Chan E.C.Y. 2010. A sensitive LC/MS/MS bioanalysis assay of orally administered lipoic acid in rat blood and brain tissue. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51: 754-757
- Chopra R.K., Goldman R., Sinatra S.T., Bhagavan H.N. 1998. Relative bioavailability of coenzyme Q10 formulations in human subjects. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 68: 109-113
- Crane F. L., Hatefi Y., Lester R. L., Widmer C. 1957. Isolation of a quinone from beef heart mitochondria. *Biochemica et Biophysica Acta*, 25: 220-221
- Crane F.L. 2000. New functions for coenzyme Q. *Protoplasma*, 213: 127-133
- Dallner G., Sindelar P.J. 2000. Regulation of ubiquinone metabolism. *Free Radical Biology and Medicine*, 29: 285-294
- Davies K.J. 1995. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochemical Society Symposia*, 61: 1-31

- Durrani A.I., Schwartz H., Schmid W., Sontag G. 2007. α -Lipoic acid in dietary supplements: Development and comparison of HPLC-CEAD and HPLC-ESI-MS methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45: 694-699
- Elmberger P.G., Kalen A., Appelkvist E.L., Dallner G. 1987. In vitro and in vivo synthesis of dalichol and other main mevalonate products in various organs of the rat. *European Journal of Biochemistry*, 168: 1-11
- Ernster L., Lee I. Y., Norling B., Persson B. 1969. Studies with ubiquinone-depleted submitochondrial particles. Essentiality of ubiquinone for the interaction of succinate dehydrogenase, NADH dehydrogenase, and cytochrome *b*. *European Journal of Biochemistry*, 9: 299-310
- Ernster L., Dallner G. 1995. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1271: 195-204
- Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F., Whitehouse C.M. 1989. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 246: 64-71
- Fir Milivojević M., Milivojević L., Prošek M., Šmidovnik A. 2009 a. Property studies of coenzyme (Q10)-cyclodextrins complexes. *Acta Chimica Slovenica*, 56: 885-891
- Fir Milivojević M., Šmidovnik A., Milivojević L., Žmitek J., Prošek M. 2009 b. Studies of CoQ₁₀ and cyclodextrine complexes: solubility, thermo- and photo stability. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 64: 225-232
- Flavia N.I., Quartacci M.F., Sgherri C. 2002. Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40: 463-470
- Folkers K., Littarru G.P., Ho L., Runge T.M., Havanonda S., Cooley D. 1970. Evidence for a deficiency of coenzyme Q10 in human heart disease. *Internationale Zeitschrift für Vitaminforschung*, 4: 380-390
- Fridovich I. 1997. Superoxide anion radical (O₂^{•-}), superoxide dismutases, and related matters. *Journal of Biological Chemistry*, 30: 18515-18517
- Islam M.T. 2009. Antioxidant activities of dithiol α -lipoic acid. *Bangladesh Journal of Medical Science*, 8: 3-6

- Geng A.L., Guo Y.M. 2005. Effect of dietary coenzyme Q10 supplementation on hepatic mitochondrial function and the activities of respiratory chain-related enzymes in ascitis broiler chickens. *British Poultry Science*, 46: 626-634
- Geng A.L., Guo Y.M. Yang Y. 2004. Reduction of ascites mortality in broilers by coenzyme Q10. *Poultry Science*, 83: 1587-1593
- Golob T., Stibilj V., Žlender B., Dobrešek U., Jamnik M., Polak T., Salobir J., Čandek-Potokar M. 2006. Slovenske prehranske tabele-meso in mesni izdelki. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 148-155
- Grossi G., Bargossi A.M., Fiorella P.L., Piazzzi S., Battino M., Bianchi G.P. 1992. Improved high-performance liquid chromatographic method for the determination of coenzyme Q. *Analytical Biochemistry*, 320: 125-128
- Halilović J. 2008. Vpliv dodanega koencima Q10 v krmo piščancev na njegovo vsebnost v drobovini. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 21-21
- Halliwell B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141: 312-322
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 1989. Free radicals in biology and medicine. 2nd ed. Oxford, Clarendon Press: 245 str.
- Halliwell B. 1994. Free radical and antioxidants: a personal view. *Nutrition Review*, 52: 253-263
- Hamano Y., Sugawara S., Kamota Y., Nagai E. 1999. Involvement of lipoic acid in plasma metabolites, hepatic oxygen consumption, and metabolic response to a β -agonist in broiler chickens. *British Journal of Nutrition*, 82: 497-503
- Holcman A. 2004. Reja kokoši v manjših jatah. Ljubljana, Kmečki glas: 205 str.
- Honda, K., Kamisoyama, H., Motoori, T., Saneyasu, T., Hasegawa, S. 2010. Effect of dietary coenzyme Q10 on cholesterol metabolism in growing chickens. *Japan Poultry Science Association*, 47: 41-47
- Hsu C.H., Cui Z., Mumper R.J., Jay M. 2003. Preparation and characterization of novel coenzyme Q10 nanoparticles engineered from microemulsion precursors. *Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, 3: Article 32

- Iupac-Iuc Commission 1975. Nomenclature of quinines with isoprenoid side-chains. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 8: 189-192
- James A.M., Smith R.A.J., Murphy M.P. 2004. Antioxidant and prooxidant properties of mitochondrial coenzyme Q. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 423: 47-56
- Jazbec P., Šmidovnik A., Puklavec M., Križman M., Šribar J., Milivojević L., Prošek M. 2009. HPTLC and HPLC-MS quantification of coenzyme Q10 and cholesterol in fractionated chicken-breast tissue. *Journal of Planar Chromatography*, 22: 395-398
- Kagan V.E., Fabisiak J.P., Quinn P.J. 2000. Coenzyme Q and vitamin E need each other as antioxidants. *Protoplasma*, 214: 11-18
- Kagan V.E., Shvedova A., Serbinova E., Khan S., Swanson C., Powell R., Packer L. 1992. Dihydrolipoic acid – a universal antioxidant both in the membrane and in the aqueous phase. Reduction of peroxy, ascorbyl and chromanoxyl radicals. *Biochemical Pharmacology*, 44: 1637-1649
- Kalen A., Appelqvist E. L., Dallner G. 1989. Age-related changes in the lipid compositions of rat and human tissues. *Lipids*, 24: 579-584
- Kamal-Eldin A., Appelqvist L-Å. 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31: 671-701
- Kamei M, Fujita T., Kanbo T., Sakaki K., Oshiba K., Otahi S., Matsui- Yuasa I., Monsawa S. 1986. The distribution and content of ubiquinone in foods. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 56: 57-63
- Kamisoyama H., Honda K., Kitaguchi K., Hasegawa S. 2010. Transfer of dietary coenzyme Q10 into the egg yolk of laying hens. *Journal of Poultry Science*, 47: 28-33
- Karpinska J., Mikołuc B., Motkowski R., Piotrowska-Jastrzebska J. 2006. HPLC method for simultaneous determination of retinol, α -tocopherol and coenzyme Q10 in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 42: 232-236
- Kataoka H. 1998. Chromatographic analysis of lipoic acid and related compounds. *Journal of Chromatography B*, 717: 247-262
- Kazmalov S., Sumien N., Forster M.J., Sohal R.S. 2003. Coenzyme Q intake elevates the mitochondrial and tissue levels of Coenzyme Q and alpha-tocopherol in young mice. *Journal of Nutrition*, 13: 3175-3180

- Kommuru T.R., Gurley B., Khan M.A., Reddy I.K. 2001. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) of coenzyme Q10: formulation development and bioavailability assessment. *International Journal of Pharmaceutics*, 212: 233-246
- Kubo H., Fujii K., Kawabe T., Matsumoto S., Kishida H., Hosoe, K. 2008. Food content of ubiquinol-10 and ubiquinone-10 in the Japanese diet. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21: 199-210
- Kwong L.K., Kazmalov S., Rebrin I., Bayne A.C., Jana C.K., Morris P., Forster M.J., Sohal R.S. 2002. Effects of coenzyme Q(10) administration on its tissue concentrations, mitochondrial oxidant generation, and oxidative stress in the rat. *Free Radical & Biology Medicine*, 33: 627-638
- Lass A., Forster M.J., Sohal R.S. 1999. Effects of coenzyme Q10 and alpha-tocopherol administration on their tissue levels in the mouse: elevation of mitochondrial alpha-tocopherol by coenzyme Q10. *Free Radical & Biology Medicine*, 26: 1375-1382
- Lenaz G., Fato R., Formiggini G., Genova M.L. 2007. The role of coenzyme Q in mitochondrial electron transport, *Mitochondrion* 7, Suppl. 1: S8-S33
- Lester R.L., Crane F.L. 1959. The natural occurrence of coenzyme Q and related compounds. *Journal of Biological Chemistry*, 234: 2169-2175
- Littaru G.P. 1994. Energy and defense: facts and perspectives on coenzyme Q10 in biology and medicine. Roma, Casa Editrice Scientifica Internazionale: 44-44
- Littaru G.P., Langsjoen P. 2007. Coenzyme Q10 and statins: Biochemical and clinical implications. *Mitochondrion*, 7, Suppl. 1: S168-S174
- Littaru G.P., Tiano L. 2007. Bioenergetic and antioxidant properties of CoQ10: recent developments. *Molecular Biotechnology*, 37: 31-37
- Lönnrot K., Holm P., Lagerstedt A., Huhtala H., Alho H. 1998. The effects of lifelong ubiquinone Q10 supplementation on the Q9 and Q10 tissue concentration and life span of male rats and mice. *Biochemistry & Molecular Biology International*, 44: 727-737
- Lušnic M. 2008. Razvoj analitske metode za določanje koencima Q10 v maščobno bogatih tkivih piščancev. Diplomsko delo, Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 35-35

- Lutka A., Pawlaczyk J. 1995. Inclusion complexation of coenzyme Q₁₀ with cyclodextrins. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 52: 379-386
- Mates J.M., Perez-Gomez C., De Castro I.N. 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, 32, 8: 595-603
- McCord J.M. 2000. The evolution of free radicals and oxidative stress. *American Journal of Medicine*, 108: 652-659
- McCord J.M., Fridovich I. 1969. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. *Journal of Biological Chemistry*, 244: 6056-6063
- Mattila P., Kumpulainen J. 2001. Coenzymes Q9 and Q10: contents in foods and dietary intake. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14: 409-417
- Menke T., Niklowitz P., Adam S., Weber M., Schluter B., Andler W. 2000. Simultaneous detection of ubiquinol-10, ubiquinone-10, and tocopherols in human plasma microsamples and macrosamples as a marker of oxidative damage in neonates and infants. *Analytical Biochemistry*, 282: 209-217
- Miles M.V. 2007. The uptake and distribution of coenzyme Q(10). *Mitochondrion* 7, Suppl. 1: S72-S77
- Mitchell P. 1975. Protonmotive redox mechanism of the cytochrome bc₁ complex in the respiratory chain: Protonmotive ubiquinone cycle. *FEBS Letters*, 56: 1-6
- Mitchell P. 1976. Possible molecular mechanisms of the protonmotive function of cytochrome systems. *Journal of Theoretical Biology*, 62: 327-367
- Morton R.A., Wilson G.M., Lowe J.S., Leat W.M.F 1957. Ubiquinone. *Chemical Industry*, 1649-1650
- Mosca F., Fattorini D., Bompadre S., Littarru G.P. 2002. Assay of coenzyme Q10 in plasma by a single dilution step. *Analytical Biochemistry*, 305: 49-54
- National Public Health Institute. 1998. The 1997 Dietary survey of finnish adults. Helsinki, National Public Health Institute: 96. str. (Publication B8/1998)
- Ochiai A., Itagaki S., Kurokawa T., Kobayashi M., Hirano T., Iseki K. 2007. Improvement in intestinal coenzyme Q10 absorption by food intake, *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 127, 8: 1251-1254

- Olson R. E., Rudney H. 1983. Biosynthesis of ubiquinone. *Vitamin & Hormones*, 40: 1-43
- Packer L., Slater T.F., Willson R.L. 1979. Direct observation of free radical interaction between E and vitamin C. *Nature*, 278: 737-738
- Packer L., Witt E.H., Tritschler H.J. 1995. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radical Biology & Medicine*, 19: 227-250
- Packer L., Colman C. 1999. *The antioxidant miracle*. New York, John Wiley & Sons 1-30
- Packer L., Weber S.U., Rimbach G. 2001. Molecular aspects of α -tocotrienol antioxidant action and cell signalling. *Journal of Nutrition*, 311: 369-373
- Paglia D.E., Valentine W.N. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 70: 158-69
- Parthasarathy S., Rankin S.M. 1992. Role of oxidized LDL in arterogenesis. *Progress in Lipid Research*, 31: 127-143
- Penko A. 2008. Vpliv dodanega koencima Q10 v krmo piščancev na njegovo vsebnost v mesu. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 35 str.
- Pečaver M. 2005. Ureditev združitvev in prevzemov podjetij v Sloveniji: primer Perutnine Ptuj in Pivke perutninarstvo. Diplomsko delo. Ljubljana, Ekonomska fakulteta: 25 str.
- Prošek M., Golc Wondra A., Pečavar A. 1997. Validacija analiznih metod v tenkoplastni in tekočinski kromatografiji. Ljubljana, Kemijski inštitut: 10 str.
- Prošek M., Šmidovnik A., Jazbec P. 2008. Vloga koencima Q10 pri pretvorbi energije in obrambi organizma. *Proteus*, 71, 4: 150-157
- Prošek M., Šmidovnik A., Fir M., Stražišar M., Golc Wondra A., Andrenšek S., Žmitek J. 2005. Nova vodotopna oblika koencima Q10 v obliki inkluzijskega kompleksa z beta-ciklodektrinom, postopek njegove priprave in njegova uporaba. Slovenski patent P-200500127: 7 str.
- Prošek M., Pukl M. 1991. Kvantitativna planarna kromatografija. Ljubljana, Zavod Republike Slovenije za šolstvo in šport: 8-14 str.

- Prošek M., Butinar J., Lukanc M., Milivojević Fir M., Milivojević L., Križman M., Šmidovnik A. 2008. Bioavailability of water soluble CoQ₁₀ in beagle dogs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47: 918-922
- Reahal S., Wrigglesworth J. 1992. Tissue concentrations of CoQ₁₀ in the rat following its oral and intraperitoneal administration. *Drug Metabolism and Disposition*, 20: 423-427
- Reed L.J. 1974. Multienzyme complexes. *Accounts of Chemical Research*, 7: 40-46
- Scalori V., Alessandri M.G., Giovannini L., Bertelli A. 1990. Plasma and tissue concentrations of coenzyme Q₁₀ in the rat after intravenous, oral and topical administrations. *International Journal of Tissue Reactions*, 12: 149-154
- Sies H. 1985. *Oxidative stress: Introduction remarks in oxidative stress*. London, Academic Press: 3-3
- Sies H. 1997. *Oxidative stress: Oxidants and antioxidants*. *Experimental Physiology*, 82, 291-295
- Sikorska M., Borowy-Borowski H., Zurakowski B., Walker P.R. 2003. Derivatised α -tocopherol as a CoQ₁₀ carrier in a novel water-soluble formulation. *BioFactors*, 18: 173-183
- Serbinova E.A., Packer L. 1994. Antioxidant properties of α -tocopherol and α -tocotrienol. *Methods in Enzymology*, 243: 354-366
- Söderberg M., Edlung C., Kristensson K., Dallner G. 1990. Lipids composition of different regions of the human brain during aging. *Journal of Neurochemistry*, 54: 415-423
- Stocker R., Bowry V.W., Frei B. 1991. Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does α -tocopherol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88: 1646-1650
- Sustray P.S., Jayaraman J., Ramasarma T. 1961. Distribution of coenzyme Q in rat liver cell fractions. *Nature*, 189: 577-580
- Takeuchi H., Sasaki H., Niwa T., Hino T., Kawashima Y., Uesugi K., Ozawa H. 1992. Improvement of photostability of ubidecarenone in the formulation of a novel

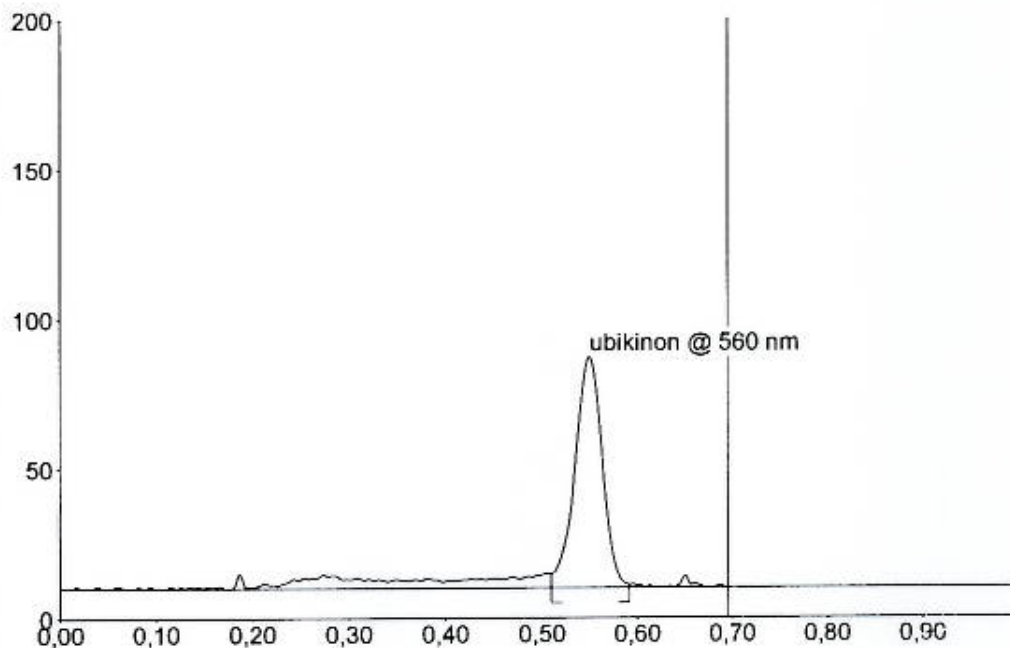
- powdered dosage form termed redispersible dry emulsion. *International Journal of Pharmaceutics*, 86: 25-33
- Tang P.H., Miles M.V., Degrauw A., Hershey A., Pesce A. 2001. HPLC Analysis of reduced and oxidized coenzyme Q₁₀ in human plasma. *Clinical Chemistry*, 47: 256-265
- Tomsič K., Prošek M., Lukanc B., Seliškar A., Nemeč-Svete A. 2009. 24-hour follow-up study of plasma coenzyme Q₁₀, total antioxidant capacity and selected blood parameters after a single oral dose of water-soluble coenzyme Q₁₀ in healthy beagle dogs. *Slovenian Veterinary Research*, 46: 93-103
- Traber M.G., Sies H. 1996. Vitamin E in humans: Demand and delivery. *Annual Review of Nutrition*, 16: 321-317
- Turunen M., Olsson J., Dallner G. 2004. Metabolism and function of coenzyme Q₁₀. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1660: 171-199
- Zhang Y.Y., Åberg F., Appelkvist E.L., Dallner G., Ernster L. 1995. Uptake of dietary coenzyme Q supplement is limited in rats. *Journal of Nutrition*, 125: 446-453
- Witztum J.L., Steinberg D. 1991. Role of oxidized low density lipoprotein in arterogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 88: 1785-1792
- Winkler B.S., Orselli S.M., Rex T.S. 1994. The redox couple between glutathione and ascorbic acid: A chemical and physiological perspective. *Free Radical Biology & Medicine*, 17: 333-349
- Weber C., Bysted A., Holmer G. 1997 a. The coenzyme Q₁₀ content of the average Danish diet. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 67: 123-129
- Weber C., Bysted A., Holmer G. 1997 b. Intestinal absorption of coenzyme Q₁₀ administered in a meal or as capsules to healthy subjects. *Nutrition Research*, 17: 941-945
- Weber C., Bysted A., Hølmer G. 1997 c. Coenzyme Q₁₀ in the diet: Daily intake and relative bioavailability. *Molecular Aspects of Medicine*, 18, Suppl. S: s251-s254
- Wolf D.E., Hoffman C.H., Trenner N.R., Arison B.H., Shunk C.H., Linn B.O., McPherson J.F., Folkers K. 1958. Coenzyme Q: Structure studies on the coenzyme Q group. *Journal of the American Chemical Society*, 80: 4752-4758

- Wüstner D., Herrmann A., Hao M., Maxfield F.R. 2002. Rapid nonvesicular transport of sterol between the plasma membrane domain of polarized hepatic cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 30325-30336
- Yamamura Y., Ishiyama T., Yamagami T., Morita Y., Ishio S., Kashiwamura S., Trader A., Tsukamoto N., Toyama S., Nakajima Y., Wada N. 1967. Clinical use of coenzyme Q for treatment of cardiovascular disease. *Japanese Circulation Society*, 31: 168-175
- Yuzuriha T., Takada M., Katayama K. 1983. Transport of [¹⁴C]- coenzyme Q10 from the liver to other tissues after intravenous administration to guinea pigs. *Biochimica et Biophysica Acta*, 759: 286-291
- Zaikin V.G., Halket J. M. 2006. Derivatization in mass spectrometry: Soft ionization mass spectrometry of small molecules. *European Journal of Mass Spectrometry*, 12, 2: 79-115
- Zhang Y., Aberg F., Appelkvist E.L., Dallner G., Ernster L. 1995. Uptake of dietary coenzyme Q supplement is limited in rat. *Journal of Nutrition*, 125: 446-453
- Žmitek J., Šmidovnik A., Fir M., Prošek M., Žmitek K., Walczak J., Pravst I. 2008. Relative bioavailability of two forms a novel soluble CoQ₁₀. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 52: 281-287

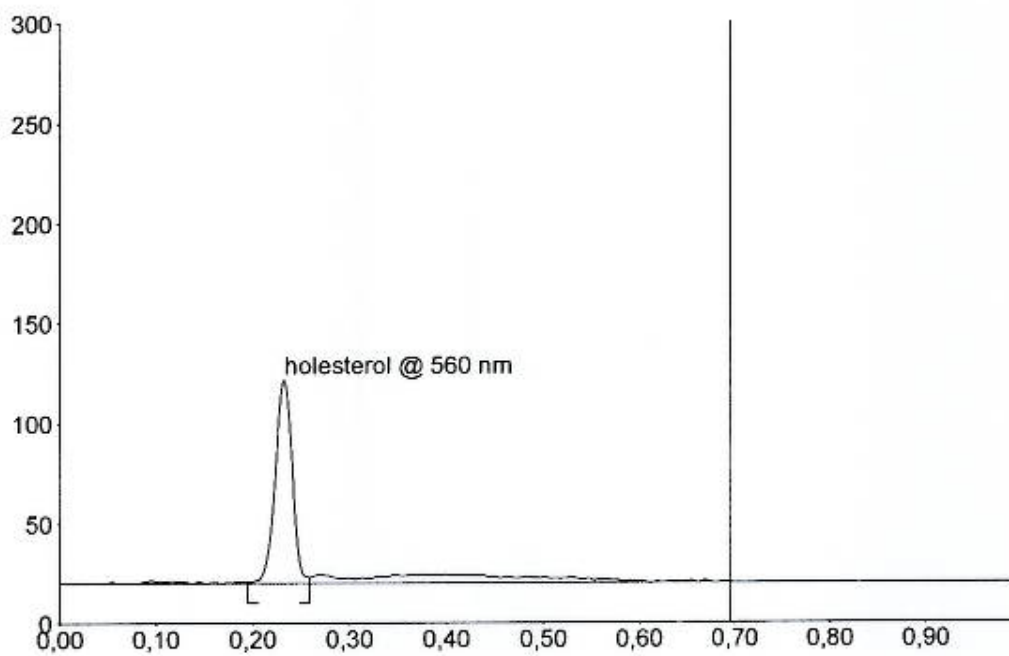
PRILOGE

PRILOGA A

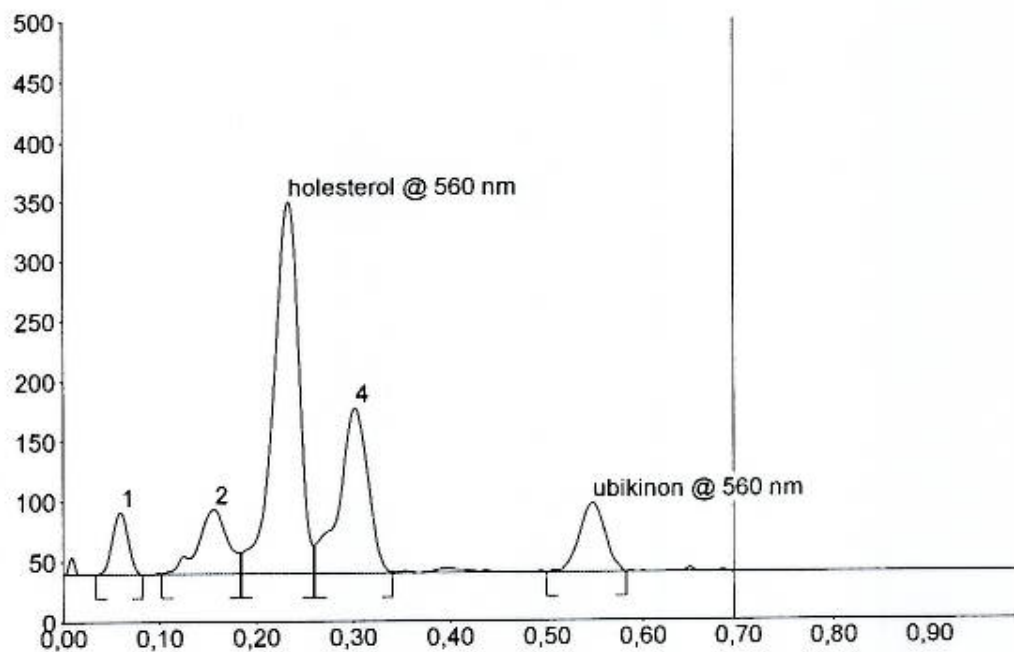
Priloga A1: Deztogram standarda CoQ₁₀



Priloga A2: Denzitogram standarda holesterola



Priloga A3: Denzitogram vzorca frakcije P2 testne skupine G4

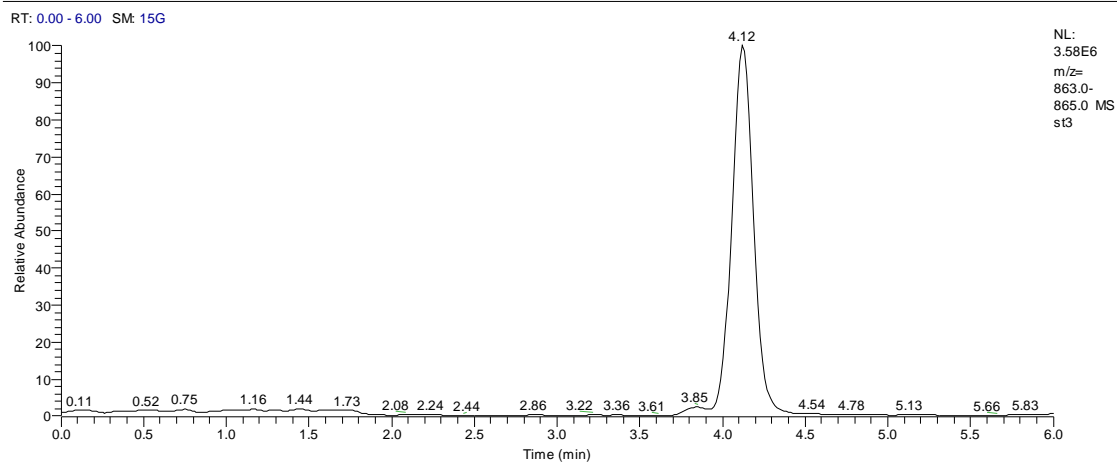


PRILOGA B

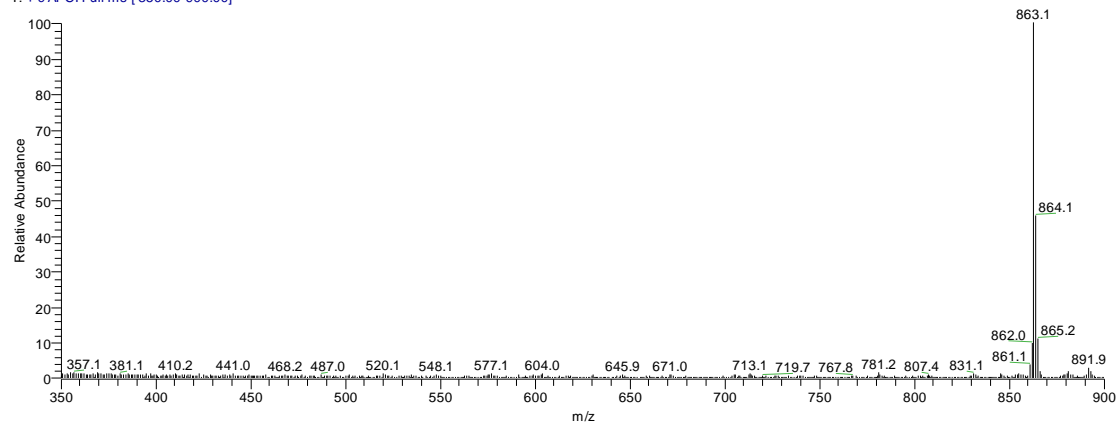
Priloga B1: Kromatogram standarda CoQ₁₀

D:\OldData\...\02042008 analiza koko\st3

02-Apr-08 1:54:29 PM



st3 #307-325 RT: 3.99-4.24 AV: 19 NL: 1.68E6
T: + c APCI Full ms [350.00-900.00]

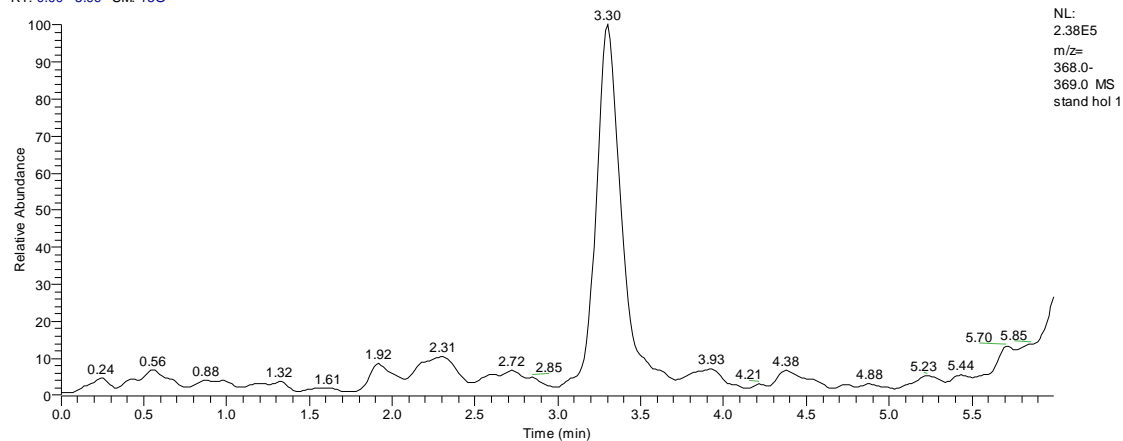


Priloga B2: Kromatogram standarda holesterola

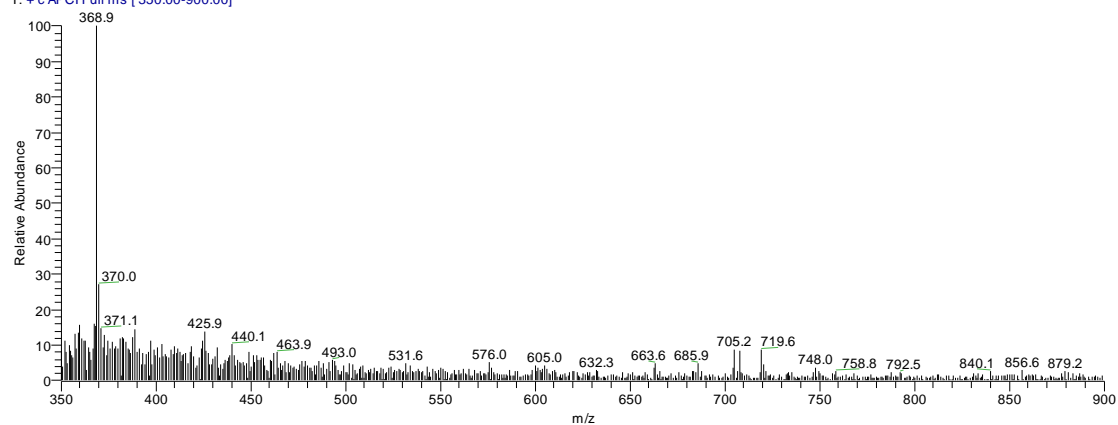
D:\OldData\..\stand hol 1

07-Apr-08 12:23:43 PM

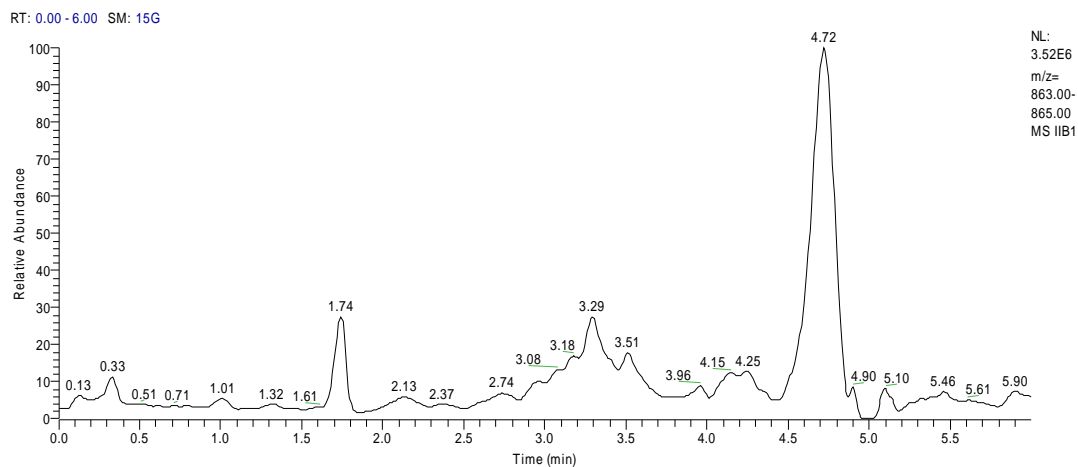
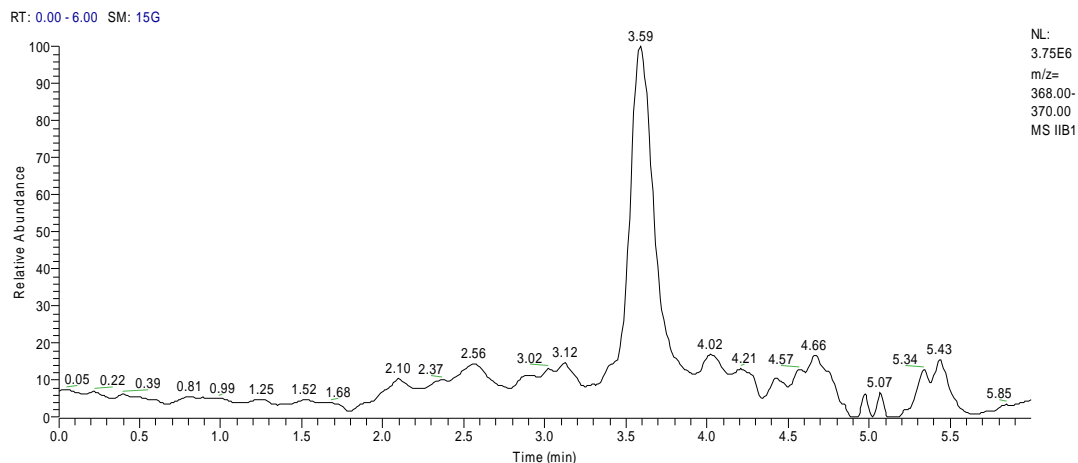
RT: 0.00 - 5.99 SM: 15G



stand hol 1 #229-252 RT: 3.16-3.48 AV: 24 NL: 1.31E5
T: + c APCI Full ms [350.00-900.00]



Priloga B3: Kromatogram holesterola in CoQ₁₀ v frakciji P2 testne skupine G4



ZAHVALA