

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MOJCA BOHAR TOPOLOVEC

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MOJCA BOHAR TOPOLOVEC

**VPLIV FIZIČNE VADBE KONJ NA NASTANEK
REAKTIVNIH DUŠIKOVIH SPOJIN IN OKSIDATIVNIH
POŠKODB**

**INFLUENCE OF PHYSICAL EXERCISING OF THE
HORSES ON THE REACTIVE NITROGEN SPECIES AND
OXIDATIVE DAMAGE**

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2013

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Vovka, mag. farm. in na Veterinarski fakulteti, pri doc. dr. Alenki Nemeč Svete, dipl. inž. kem. teh.

Iz srca se zahvaljujem doc. dr. Tomažu Vovku, mag. farm. ki je sprejel mentorstvo, si vzel čas za mene in mi s svojimi nasveti pomagal pri izvedbi naloge.

Zahvaljujem se doc. dr. Alenki Nemeč Svete, dipl. inž. kem. teh. za pomoč pri meritvah biokemijskih parametrov in doc. dr. Robertu Roškarju, mag. farm. za analize na MS.

Margareti Cof, dipl. inž. kem. teh. in Nevenki Lilik, dipl. inž. kem. teh. se zahvaljujem za prijazne nasvete in pomoč pri praktičnih pripravah vzorcev. Zahvaljujem se tudi celotni Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko.

Iskrena hvala možu Tomažu in mami, ki sta me ves čas študija spodbujala in podpirala ter lastnikom konj in njihovim konjem, ki so mi omogočili izvedbo naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja doc. dr. Tomaža Vovka, mag. farm.

Mojca Bohar Topolovec

Ljubljana, september 2013

Predsednik magistrske komisije: izr. prof. dr. Matjaž Jeras, mag. farm.

Član magistrske komisije: doc. dr. Žiga Jakopin, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

| | |
|--|-------------|
| POVZETEK..... | VII |
| ABSTRACT | VIII |
| SEZNAM OKRAJŠAV..... | IX |
| 1 UVOD | 1 |
| 1.1 RADIKALI..... | 1 |
| 1.1.1 Nastanek radikalov | 1 |
| 1.2 REAKTIVNE KISIŠKOVE IN DUŠIKOVE ZVRSTI..... | 2 |
| 1.2.1 Reaktivne kisikove zvrsti | 2 |
| 1.2.1.1 Superoksidni radikal..... | 3 |
| 1.2.1.2 Vodikov peroksid | 4 |
| 1.2.1.3 Hidroksilni radikal..... | 4 |
| 1.2.2 Reaktivne dušikove zvrsti..... | 4 |
| 1.2.2.1 Dušikov oksid..... | 5 |
| 1.2.2.2 Peroksinitrit | 6 |
| 1.2.3 Drugi radikali..... | 6 |
| 1.3 OKSIDATIVNI IN NITROZATIVNI STRES | 6 |
| 1.3.1 Posledice oksidativno/nitrozativnega stresa | 7 |
| 1.3.1.1 Lipidna peroksidacija | 7 |
| 1.4 ZAŠČITA PRED RADIKALI | 8 |
| 1.4.1 Antioksidanti..... | 9 |
| 1.4.1.1 Mehanizem delovanja antioksidantov | 9 |
| 1.4.1.2 Izvor antioksidantov | 10 |
| 1.4.1.3 Topnost antioksidantov..... | 10 |
| 1.5 ANTIOKSIDATIVNI SISTEM | 10 |
| 1.6 FIZIČNA VADBA | 11 |
| 1.6.1 Ocena oksidativno/nitrozativnega stresa pri fizični vadbi..... | 12 |
| 1.6.1.1 Aspartatna aminotransferaza (EC 2.6.1.1.)..... | 12 |
| 1.6.1.2 Kreatinska kinaza (EC 2.7.3.2.)..... | 13 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1.6.1.3 | Laktatna dehidrogenaza (EC 1.1.1.27)..... | 13 |
| 1.6.1.4 | Nitrit in nitrat..... | 13 |
| 1.6.1.5 | Malondialdehid..... | 14 |
| 2 | NAMEN DELA..... | 15 |
| 3 | MATERIALI IN METODE..... | 16 |
| 3.1 | MATERIALI..... | 16 |
| 3.1.1 | Konji..... | 16 |
| 3.1.2 | Igle in epruvete za odvzem krvi ter mikrocentrifugirke za shranjevanje biološkega materiala..... | 16 |
| 3.1.3 | Reagenti in topila..... | 17 |
| 3.1.3.1 | Reagenti in topila za določitev MDA..... | 17 |
| 3.1.3.2 | Reagenti in topila za določitev NO_2^- in NO_3^- | 17 |
| 3.1.4 | Laboratorijska oprema..... | 17 |
| 3.2 | METODE..... | 18 |
| 3.2.1 | Opis izbrane fizične vadbe konj..... | 18 |
| 3.2.2 | Odvzem in priprava vzorcev..... | 19 |
| 3.2.2.1 | Odvzem vzorcev..... | 19 |
| 3.2.2.2 | Priprava vzorcev..... | 19 |
| 3.2.3 | Meritev aktivnosti encima aspartatna aminotransferaza (AST) v serumu..... | 20 |
| 3.2.3.1 | Priprava vzorcev..... | 20 |
| 3.2.3.2 | Reagenti, standard in kontrole..... | 20 |
| 3.2.3.3 | Postopek meritve..... | 20 |
| 3.2.4 | Meritev aktivnosti encima kreatinska kinaza (CK) v serumu..... | 20 |
| 3.2.4.1 | Priprava vzorcev..... | 20 |
| 3.2.4.2 | Reagenti, standard in kontrole..... | 21 |
| 3.2.4.3 | Postopek meritve..... | 21 |
| 3.2.5 | Meritev aktivnosti encima laktatna dehidrogenaza (LDH) v serumu..... | 21 |
| 3.2.5.1 | Priprava vzorcev..... | 21 |
| 3.2.5.2 | Reagenti, standard in kontrole..... | 21 |
| 3.2.5.3 | Postopek meritve..... | 22 |
| 3.2.6 | Meritev koncentracij NO_2^- in NO_3^- v plazmi, z Griessovim reagentom..... | 22 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.2.6.1 | Priprava vzorcev | 22 |
| 3.2.6.2 | Priprava reagentov | 22 |
| 3.2.6.3 | Priprava standardov $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ | 23 |
| 3.2.6.4 | Priprava standardov NO_2^- | 23 |
| 3.2.6.5 | Postopek priprave vzorcev za meritev skupne koncentracije $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ | 24 |
| 3.2.6.6 | Postopek priprave vzorcev za meritev koncentracije NO_2^- | 24 |
| 3.2.6.7 | Izračun koncentracij NO_2^- in NO_3^- | 25 |
| 3.2.7 | Meritev koncentracije MDA v plazmi z derivatizacijsko metodo z DNPH in z aparatom LC-MS/MS | 25 |
| 3.2.7.1 | Priprava vzorcev | 25 |
| 3.2.7.2 | Priprava reagentov | 25 |
| 3.2.7.3 | Priprava standardov MDA | 26 |
| 3.2.7.4 | Postopek priprave vzorcev za meritev MDA z metodo DNPH | 27 |
| 3.2.7.5 | Meritev MDA z aparatom LC-MS/MS | 28 |
| 3.3 | OBDELAVA PODATKOV IN STATISTIČNA ANALIZA | 29 |
| 4 | REZULTATI | 30 |
| 4.1 | REZULATATI MERITEV AST V SERUMU | 30 |
| 4.1.1 | Aktivnosti AST v serumu | 30 |
| 4.2 | REZULATATI MERITEV CK V SERUMU | 31 |
| 4.2.1 | Aktivnosti CK v serumu | 31 |
| 4.3 | REZULATATI MERITEV LDH V SERUMU | 32 |
| 4.3.1 | Aktivnosti LDH v serumu | 32 |
| 4.4 | REZULATATI MERITEV $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$, NO_2^- IN NO_3^- V PLAZMI | 33 |
| 4.4.1 | Umeritvena krivulja standardov $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ | 33 |
| 4.4.2 | Umeritvena krivulja standardov NO_2^- | 33 |
| 4.4.3 | Koncentracije $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$, NO_2^- in NO_3^- v plazmi | 34 |
| 4.5 | REZULATATI MERITEV MDA V PLAZMI | 35 |
| 4.5.1 | Povprečna umeritvena krivulja standardov MDA | 35 |
| 4.5.2 | Koncentracije MDA v plazmi | 36 |
| 4.6 | POVPREČNE KONCENTRACIJE PARAMETROV PRI TREH RAZLIČNIH ČASIH ODVZEMA KRVNIH VZORCEV | 37 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.7 | KORELACIJE IZMERJENIH PARAMETROV | 37 |
| 5 | RAZPRAVA..... | 40 |
| 5.1 | PRIMERJAVE OZNAČEVALCEV | 40 |
| 5.1.1 | Označevalci celičnih poškodb: AST, CK in LDH | 40 |
| 5.1.2 | Označevalci dušikovega oksida: NO ₂ ⁻ in NO ₃ ⁻ | 41 |
| 5.1.3 | Označevalec lipidne peroksidacije: MDA | 42 |
| 5.1.4 | Korelacije med označevalci celičnih poškodb, dušikovega oksida in lipidne peroksidacije..... | 42 |
| 6 | SKLEPI..... | 44 |
| 7 | LITERATURA..... | 45 |

POVZETEK

Fizična vadba lahko pri rekreativnih konjih izzove dodatno nastajanje kisikovih in dušikovih reaktivnih spojin, kar vodi v oksidativno/nitrozativni stres. Če se organizem s svojim antioksidativnim sistemom ni sposoben obraniti posledic učinkov tovrstnih reaktivnih spojin, lahko pride do lipidne peroksidacije. Posledice so spremembe in poškodbe membran mišičnih celic, sproščanje celičnih vsebin in porušenje celične funkcije. Z izbrano fizično vadbo v maneži (program »izmeničnega lonžiranja«) smo obremenili 10 rekreativnih konj in jim odvzeli vzorce krvi pred, takoj po končani obremenitvi (po 40 minutah) in nato še 24 ur po vadbi. Serumske vzorce smo ustrezno obdelali in nato z biokemijskimi reakcijami na biokemijskem analizatorju RX-Daytona izmerili aktivnosti encimov aspartatne aminotransferaze (AST), kreatinske kinaze (CK) in laktatne dehidrogenaze (LDH). V plazemskih vzorcih pa smo določili koncentracije označevalcev dušikovega oksida (NO_2^- in NO_3^-) z Griessovo reakcijo na mikrotitrskem čitalcu Safire² TM Genios ter koncentracije produkta lipidne peroksidacije malondialdehida (MDA) z derivatizacijsko metodo z dinitrofenilhidrazinom na tekočinskem kromatografu s tandemsko masnim spektrometrom. Izmerjene povišane aktivnosti mišičnih encimov AST, CK in LDH ter koncentracije produkta lipidne peroksidacije MDA takoj po fizični vadbi nakazujejo, da je verjetno prišlo do sprememb membran mišičnih celic, s tem pa do sproščanja encimov ter MDA v krvni obtok. Korelacije med encimi in MDA nismo uspeli dokazati. Do trajnih sprememb membran mišičnih celic očitno ni prišlo, saj so se aktivnosti mišičnih encimov po 24 urah znižale na nivo blizu bazalnih vrednosti. Lipidna peroksidacija pa je bila dolgotrajnejša, saj so bile koncentracije MDA povišane še 24 ur po fizični vadbi, kar kaže na počasen proces izločanja končnih produktov tega metabolnega procesa. Koncentracije NO_2^- in NO_3^- po fizični vadbi se niso spremenile, pri čemer korelacije med encimi in dušikovima oksidoma nismo dokazali. Z izbrano fizično vadbo konj smo povzročili spremembe v membranah mišičnih celic ter lipidno peroksidacijo, vendar pa vadba ni bila dovolj intenzivna, da bi povzročila oksidativno/nitrozativni stres v mišičnih celicah v takem obsegu, da bi povezavo teh procesov tudi dokazali.

Ključne besede: rekreativni konji, fizična vadba, reaktivne spojine, oksidativno/nitrozativni stres, oksidativne poškodbe

ABSTRACT

In healthy untrained horses, physical exercise can lead to increased levels of oxygen and nitric reactive species production. This causes oxidative/nitrosative stress. If the antioxidative system of the organism is unable to defeat the consequences of the reactive species impact, lipid peroxidation can take place. The consequences can be changes and damages of muscle cell membranes, release of cellular contents and the cellular dysfunctional. Ten healthy untrained horses took part in selected physical exercise (the "alternative lunging" program) in the manege. Their blood samples were taken before, immediately (40 minutes) after the exercise, and again 24 hours after the exercise. Blood samples were then processed. We measured serum activities of the AST, CK and LDH enzymes with biochemical reactions using the RX-Daytona biochemical analyzer. Plasma concentrations of the NO_2^- and NO_3^- were determined by means of the Griess reaction, using Safire² TM Genios microtiter plate reader, and those of MDA lipid peroxidation product by applying derivatization method with dinitrophenylhydrazine, using liquid chromatograph with tandem mass spectrometer. Immediately after physical exercise activities concentrations of muscle AST, CK and LDH enzymes, as well as MDA increased. We assume that the exercise induced changes in muscle cell membranes leading to consequent release of muscle enzymes and MDA into the bloodstream of animals. However, the enzymes–MDA correlation could not be demonstrated. Muscle cell membranes were not permanently affected, as the muscle enzymes activities dropped to the near-basal levels after 24 hours. However, the lipid peroxidation persisted, as the MDA concentrations were still increased 24 hours following the physical exercise. This shows that the excretion of the lipid peroxidation end product is slow. The concentration of NO_2^- and NO_3^- after physical exercise were unchanged and the correlation between the enzymes and these two nitric oxide markers could also not be demonstrated. Our selected physical exercises caused changes in the muscle cell membranes and the lipid peroxidation. However, they were obviously not intensive enough to cause oxidative/nitrosative stress in healthy untrained horses.

Key words: untrained horses, physical exercise, reactive species, oxidative/nitrosative stress, oxidative damage

SEZNAM OKRAJŠAV

| | |
|---------|--|
| ADP | adenozin difosfat |
| AO | antioksidant |
| AS | antioksidativni sistem |
| AST | aspartatna aminotransferaza |
| ATP | adenozin trifosfat |
| Cat | katalaza |
| CK | kreatinska kinaza |
| DNK | deoksiribonukleinska kislina |
| DNP | 2,4-dinitrofenilhidrazin |
| EDTA | etilendiamintetraocetna kislina |
| GPx | glutationska peroksidaza |
| GMP | gvanozin monofosfat |
| GSH | reducirani glutation |
| GTP | gvanozin trifosfat |
| KN | konj |
| KV | koeficient variacije |
| LDH | laktatna dehidrogenaza |
| LP | lipidna peroksidacija |
| MDA | malondialdehid |
| MS | masna spektrometrija |
| NAD(P)H | reducirana oblika nikotinamid-adenin-dinukleotida (fosfat) |
| NOS | sinetaza dušikovega oksida |
| ONS | oksidativno/nitrozativni stres |
| OR | osnovna raztopina |
| R | reagent |
| RA | radikal |
| p | statistično značilna verjetnost |
| r | Pearsonov koeficient korelacije |
| ROS | reaktivne kisikove zvrsti |

| | |
|-----------|-------------------------------------|
| RNS | reaktivne dušikove zvrsti |
| RS | reaktivne spojine |
| SD | standardna deviacija |
| SOD | superoksidna dismutaza |
| t | čas odvzema |
| XO | ksantinska oksidaza |
| \bar{x} | povprečna vrednost |
| VNMK | večkrat nenasičene maščobne kisline |

1 UVOD

Kisik (O_2) je nujno potreben za življenje ljudi in živali ter predstavlja približno 21% atmosfere. V atmosferi je večinoma v tripletnem stanju, to je v stanju biradikala, v katerem sta na zunanji orbitali prisotna dva neparjena elektrona. Organizmi so se prilagodili življenju s kisikom in ga začeli uporabljati ter izkoriščati sebi v prid. V telo prehaja s procesom dihanja in se z oksidacijo hrane porablja za pridobivanje energije, sprejema elektrone in se v več stopnjah reducira do vode (1,2). V osnovnem tripletnem stanju je molekula O_2 slabo reaktivna, v procesih njene enoelektronske redukcije pa nastajajo reaktivne kisikove zvrsti, ki lahko v bioloških sistemih povzročijo poškodbe. Organizmi so se temu prilagodili tako, da so razvili obrambne sisteme, s katerimi odstranjujejo reaktivne kisikove zvrsti oz. odstranjujejo poškodbe bioloških makromolekul, ki jih le-te povzročajo. Kljub številnim razvitim obrambnim mehanizmom pa ti niso popolni in zato radikale ter reaktivne spojine še vedno povezujejo z nastankom ali potekom številnih bolezni (2-5).

1.1 RADIKALI

Radikali (RA) (označeni s piko desno zgoraj) so atomi, ioni, molekule ali kompleksi, ki imajo enega ali več neparjenih elektronov (1,2). Lahko imajo pozitiven ali negativen naboj ali pa so brez naboja (nekateri imajo sodo število elektronov vendar imajo vsaj dva elektrona na različnih nivojih) (1). Zaradi primanjkljaja elektrona so večinoma zelo kratkoživi, njihov razpolovni čas je 10^{-6} - 10^{-7} s ali celo manj in zato so visoko reaktivni. Reagirajo z molekulami v svoji bližini, in sicer z odvzemom vodikovega atoma, adicijo na dvojno vez ali reakcijo dveh radikalov tako, da pridobijo manjkajoči elektron (1,2).

1.1.1 Nastanek radikalov

Radikali nastajajo s homolitsko cepitvijo kovalentne vezi, z reakcijo molekul z RA in pri enoelektronskih reakcijah oksidacije in redukcije. Pri tem bodisi tvorijo nove RA ali pa pride do njihove inaktivacije. Pri reakciji med dvema RA se prosta elektrona združita v kovalentno vez, medtem ko pri reakciji med RA in neradikalom vedno nastane novi RA.

Ker je v telesu večina molekul neradikalskih, lahko na ta način že en sam RA sproži obsežno verižno reakcijo (1,2,4).

Radikali nastajajo kot posledica notranjih (endogenih) dejavnikov: pri encimskih reakcijah, presnovi (prisotnost presnovkov učinkovin, strupov), boleznih, celičnem dihanju (hipo- in hiperoksigenacija), aktivnostih imunskega sistema (tvorijo jih levkociti, da z njimi napadajo bakterije), uhajanju elektronov iz mitohondrijske prenašalne verige in staranju. Nastajajo lahko tudi zaradi zunanjih (eksogenih) dejavnikov: izpostavljenost različnim sevanjem, toksinom, ozonu, fizičnemu stresu (zaradi intenzivne telesne obremenitve pri neprilagojenem obrambnem sistemu antioksidantov), psihičnemu stresu, idr. (5,6). Pri nekaterih reakcijah lahko delujejo tudi kot pomembni prenašalci in signalne molekule (7).

Med fiziološkimi procesi nastajajo neprestano v nižjih koncentracijah. Pri patoloških procesih in zaradi stresa (npr. bolezni, napor, idr.) pa se njihovo nastajanje poveča (8-10).

Biološko pomembni so kisikovi, dušikovi, ogljikovi in klorovi RA (1).

1.2 REAKTIVNE KISIŠKOVE IN DUŠIKOVE ZVRSTI

Vsem reaktivnim zvrstem je skupno, da so visoko reaktivne in lahko oksidirajo katerokoli organsko molekulo v organizmu (ogljikove hidrate, maščobe, aminokislino, nukleinske kisline) (1,4).

1.2.1 Reaktivne kisikove zvrsti

Reaktivne kisikove zvrsti (angl. Reactive Oxygen Species, ROS) zajemajo tako kisikove radikale kot reaktivne kisikove zvrsti, ki po svoji strukturi niso radikali (preglednica I) (1,4).

Preglednica I: Reaktivne kisikove zvrsti

| Kisikovi radikali | | Reaktivne kisikove zvrsti – »neradikali« | |
|------------------------------------|-----------------------|---|------------------------|
| tripletni kisik | $^3\text{O}_2$ | singletni kisik | $^1\text{O}_2$ |
| superoksidni radikal | $\text{O}_2^{\cdot-}$ | ozon | O_3 |
| hidroksilni radikal | HO^{\cdot} | vodikov peroksid | H_2O_2 |
| hidroperoksidni radikal | HO_2^{\cdot} | hipoklorna kislina | HOCl |
| peroksidni radikal | ROO^{\cdot} | hidroperoksid | ROOH |
| alkoksidni radikal | RO^{\cdot} | peroksid | ROOR |
| ariloksidni radikal | ArO^{\cdot} | | |
| semikinonski radikal | UQ^{\cdot} | | |
| vzbujena oblika singletnega kisika | $^1\text{O}_2$ | | |

Najpogostejša kisikova radikala v organizmu sta superoksidni radikal ($\text{O}_2^{\cdot-}$) in hidroksilni radikal (HO^{\cdot}), najpogostejša reaktivna kisikova spojina pa je vodikov peroksid (H_2O_2) (1).

Nastajajo na notranji membrani mitohondrija pri sintezi energijsko bogate molekule adenozin trifosfata (ATP) (1).

Reakcija oksidacije, to je vezava kisika in vodikovega atoma do nastanka molekule vode, poteka v štirih stopnjah. V vsaki stopnji pride med oksidacijo do prenosa elektrona in nastanka RA oz. reaktivne zvrsti ($\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 in HO^{\cdot}) (11).

1.2.1.1 Superoksidni radikal

Superoksidni radikal ($\text{O}_2^{\cdot-}$) nastaja z oksidacijo kisika pri prenosu elektronov v mitohondrijski dihalni verigi in z redukcijo tripletnega kisika s pomočjo encima ksantinske oksidaze (angl. Xanthine oxidase, XO), v mitohondriju in citozolu. Je najpogostejši RA. Prisotnost naboja omejuje njegovo gibljivost skozi biološke membrane (11). Vnetne celice ga proizvajajo v večjih količinah, kot zaščito pred neželenimi mikroorganizmi. Z encimom superoksidno dismutazo (angl. Superoxid dismutase, SOD) se katabolizira do vodikovega peroksida (enačba 1) (1,2,11).



1)

1.2.1.2 Vodikov peroksid

Vodikov peroksid (H_2O_2) nastaja v celici najpogosteje med reakcijo dismutacije. Lahko se reducira do H_2O z encimom katalazo (angl. Catalase, Cat) v peroksisomih in z glutationsko peroksidazo (angl. Glutathione Peroxidase, GPx) v citozolu ter mitohondrijih. Je reaktiven in sposoben tvoriti RA, kot npr. hidroksilni radikal. Je stabilen, lahko prehaja membrano in ima dolg razpolovni čas znotraj celice. V Fentonovih reakcijah, v stiku s kovinskimi ioni, tvori hidroksilni radikal in je zato tudi citotoksičen (enačba 2) (1,2,11).



2)

1.2.1.3 Hidroksilni radikal

Hidroksilni radikal (HO^{\cdot}) je eden izmed najreaktivnejših RA, ki zaradi nezmožnosti potovanja, saj reagira hitreje od hitrosti difuzije, poškoduje molekule lokalno. Nastaja pod vplivom ionizirajočega sevanja, ultrazvoka, ozona, pri radiolizi H_2O ali pri reakcijah kataliziranih s kovinami, kot je npr. Fentonova reakcija (enačba 2) (1,2,4,11).

Hidroksilni radikal reagira skoraj z vsemi vrstami celičnih sestavin, pri čemer nastanejo tudi novi RA (1,3,4).

1.2.2 Reaktivne dušikove zvrsti

Reaktivne dušikove zvrsti (angl. Reactive Nitrogen Species, RNS) zajemajo tako dušikove radikale kot tudi reaktivne dušikove zvrsti, ki pa po svoji strukturi niso radikali (preglednica II) (1,12).

Preglednica II: Reaktivne dušikove zvrsti

| Dušikovi radikali | | Reaktivne dušikove zvrsti – »neradikali« | |
|-------------------|------------------------------|--|------------------------------|
| dušikov oksid | NO [•] | nitrozilni kation | NO ⁺ |
| dušikov dioksid | NO ₂ [•] | nitroksidni anion | NO ⁻ |
| | | dušikova kislina | HNO ₂ |
| | | nitronijev ion | NO ₂ ⁺ |
| | | peroksinitrit | ONOO ⁻ |
| | | alkilni peroksinitrit | ROONO |

Reaktivne dušikove zvrsti sodijo med ROS, a jih zaradi večje preglednosti obravnavamo posebej. Najpogostejša dušikova radikala sta dušikov oksid (angl. Nitric oxide, NO[•]) in dušikov dioksid (angl. Nitrogen dioxide, NO₂[•]), med neradikalnimi reaktivnimi dušikovimi zvrstmi pa peroksinitrit (ONOO⁻) (1,5,12).

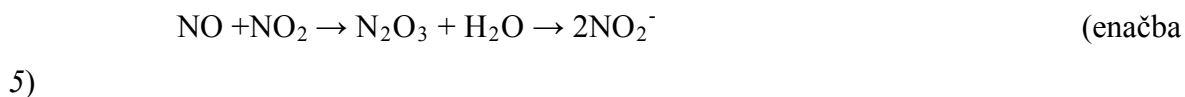
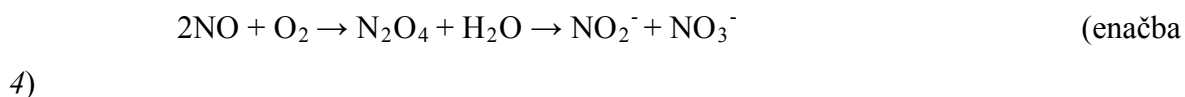
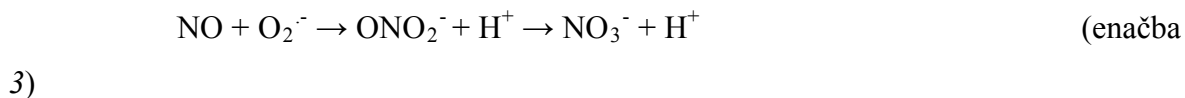
1.2.2.1 Dušikov oksid

Dušikov oksid (angl. Nitric oxide, NO[•]) nastaja v različnih celicah (nevronih, endotelijskih celicah, trombocitih, nevtrofilcih, idr.) z oksidacijo L-arginina v L-citrulin s pomočjo encima sintaza dušikovega oksida (angl. Nitric oxide synthase, NOS, EC 1.14.13.39). Je zelo kratkoživ, hitro reagira z drugimi molekulami in z lahkoto prehaja skozi membrane. Poznamo tri izomere NOS: nevrogeno (nNOS), endotelno (eNOS) in inducibilno (iNOS) (1,12). Izomeri nNOS in eNOS se izražata stalno, njuno aktivnost pa uravnavajo znotrajcelične koncentracije Ca²⁺ ionov, predvsem v skeletnih mišicah. Izomera iNOS se izraža v aktiviranih makrofagih po njihovi stimulaciji s citokini, lipopolisaharidi in drugimi imunskimi dejavniki (1,5,12-14).

Dušikov oksid je vključen v številne fiziološke funkcije. Nadzoruje tonus krvnih žil, saj deluje kot vazodilatator, uravnava krvni tlak, sodeluje pri adheziji trombocitov, idr. (1,13-15). Deluje tudi na encim gvanilatno ciklazo, ki pretvori gvanozin trifosfat (GTP) v ciklični gvanozin monofosfat (GMP), sekundarni celični prenašalec, ki sodeluje pri

delovanju proteinske kinaze, ionskih kanalčkov ter drugih fizioloških funkcijah. V makrofahih, fibroblastih in hepatocitih NO[•] deluje citotoksično, v odzivu na vnetje (13).

V zunajceličnem prostoru reagira z molekulami O₂ in H₂O. Končna produkta *in vivo* sta nitrit (NO₂⁻) in nitrat (NO₃⁻) (enačbe 3-5) (1,12,15,16).



1.2.2.2 Peroksinitrit

Peroksinitrit (ONOO⁻) nastane v mitohondrijih zaradi visokih koncentracij NO[•] in O₂⁻ in je veliko reaktivnejši od obeh (enačba 6). Z lahkoto prehaja skozi mitohondrijsko membrano in reagira z drugimi molekulami ter sodeluje pri reakcijah nastanka drugih RA. Povzroča oksidacijo/nitracijo različnih beljakovin, inaktivacijo encimov in lipidno peroksidacijo, kar vodi do celične nekroze. Ima tudi protimikrobni učinek in je pomembno orožje makrofagov za uničevanje patogenih mikroorganizmov (1,17).



1.2.3 Drugi radikali

Poznamo še številne druge RA: lipidne, lipidno peroksidne, lipidno-alkoksilne, proteinske, lipidni hidroperoksid, železo-kisikove komplekse, hipoklorit, idr. Nekateri RA so koristni, saj z njihovo pomočjo obrambne celice ubijajo številne patogene mikroorganizme, nekateri od njih pa so sami dovolj stabilni, da ne reagirajo oz. so v telesu inertni (tokoferilni radikal, askorbilni radikal in tudi NO[•]) (1).

1.3 OKSIDATIVNI IN NITROZATIVNI STRES

Pri normalnih pogojih organizem endogeno tvori reaktivne spojine (RS). V primeru nenormalnih stanj (npr. bolezni, stres, povečana vadba, idr.) pa je njihova produkcija povečana in lahko nenadzorovano poteka na mestu poškodbe ali obolenja. Kot smo že omenili, tudi zunanji oz. eksogeni dejavniki povečajo njihovo tvorbo. V obeh primerih govorimo o oksidativnem ali nitrozativnem stresu (glede na vrsto RS) (1,12). S tem izrazom opisujemo učinke škodljivega delovanja RS, ki so posledica daljše izpostavljenosti organizma oksidantom ali pa zmanjšane antioksidativne sposobnosti organizma (1-5,16). Glavno mesto nastajanja RS so mitohondriji (v pljučih, mišicah in drugih tkivih) (1,9).

1.3.1 Posledice oksidativno/nitrozativnega stresa

V primeru oksidativno/nitrozativnega stresa (ONS) manjšega obsega se celice same obranijo posledic učinkov RA bodisi z razpoložljivimi antioksidanti ali z njihovo povečano tvorbo in regeneracijo. Pri ONS večjega obsega pa prihaja do ireverzibilnih poškodb (modifikacije nukleinskih kislin, genov, proteinov, inaktivacije encimov ter poškodbe na celičnih membranah), katerih posledica so motnje v presnovi celice, poškodbe membranskih transportnih sistemov, lipidne peroksidacije, idr. (1,18).

Posledice dolgotrajnega delovanja endogenih in eksogenih dejavnikov povzročijo spremembe v organizmu. Te se pri konjih pretežno kažejo kot ponavljajoča se obstrukcija dihal, ishemično-reperfuzijska poškodba prebavil, bolezen motoričnih nevronov in pomanjkanje kondicije, osteoartritis, disfunkcija srednjega režnja hipofize, idr. (18,19).

1.3.1.1 Lipidna peroksidacija

Najpogostejša škoda, nastala zaradi RA, je oksidacija oz. razgradnja lipidov, ki so zelo raznolika skupina bioloških molekul; sestavni deli celičnih membran, pigmenti, kofaktorji encimov, hormoni, prekurzorji hormonov, signalne molekule, prenašalci elektronov in sodelujejo pri različnih bioloških funkcijah. Oksidativni razgradnji večkrat nenasičenih maščobnih kislin (VNMK), ki so sestavni del celičnih membran in organelov pravimo peroksidacija maščobnih kislin oz. lipidna peroksidacija (LP) (1). Ta proces vodi v spremembo prepustnosti celičnih membran tako, da lahko poveča njihovo prepustnost za snovi, ki jih normalno ne, zmanjša fluidnost membran, povzroči poškodbe membranskih proteinov, inaktivira encime in ionske kanale. Zaradi poškodovane celične membrane lahko celica tudi propade (1,4,20,21).

Lipidna peroksidacija ne prizadene le lipidov, ampak tudi proteine, ogljikove hidrate in nukleinske kisline. S porušitvijo naravne organizacije membrane, se spremeni okolje membranskih proteinov in s tem njihova funkcija; pride do porušenja njihove strukture, modifikacije posameznih aminokislin, navzkrižnega povezovanja proteinov, idr. V tem smislu so še posebej ranljivi mitohondriji in mikrosomi, saj njihove membrane vsebujejo več VNMK in manj holesterola kot klasične celične membrane. Tudi deoksiribonukleinska kislina (DNK) je na udaru RA, saj pride v vsaki celici vsaj 10.000-krat na dan do cepljenja verig DNK, povečane porabe nikotinamid-adenin-dinukleotida (NAD) ter motene sinteze adenozin trifosfata (ATP), zato lahko RA poškodujejo tudi gene (1,20).

Proces LP lahko razdelimo na tri faze: sprožitev (iniciacijo), širjenje (propagacijo) in zaustavitev (terminacijo). Radikali, kot npr. hidroksilni radikal ($\text{HO}\cdot$) in dušikov oksid ($\text{NO}\cdot$) ter številne RS lahko sprožijo LP z adicijo ali z odstranitvijo vodikovega atoma z metilenske ($-\text{CH}_2$) skupine VNMK. Pri tem nastane ogljikov radikal ($-\text{CH}\cdot$), ki reagira s kisikom, pri čemer nastane peroksilni radikal ($\text{ROO}\cdot$). Ta je zelo reaktiven in lahko odcepi vodikov atom s sosednje VNMK. To privede do premestitve RA, ciklizacije in nastanka endoperoksida, ki nato reagira s kisikom in ustvari novi peroksilni radikal (verižna reakcija). Zaustavitev LP nastopi, ko se porabi ves substrat ali ko so odstranjeni vsi RA. Le redko pride do reakcije med dvema RA, mnogo pogosteje gre za reakcijo z antioksidantom (AO), ki zadrži LP ali pa jo prepreči (1,20).

Končni produkti LP so različni aldehidi: malondialdehid (MDA), ketoni, epoksidi, nižje maščobne kisline in različni ogljikovodiki npr. etan, etilen, pentan. Z njimi lahko tudi ocenimo obseg in posledice LP, povzročene s fizično vadbo (1,20).

1.4 ZAŠČITA PRED RADIKALI

Vsi aerobni organizmi so zaradi pridobivanja energije s pomočjo kisika izpostavljeni določenemu nivoju ONS. Za obrambo pred RS so zato razvili različne sisteme, primarne sekundarne in terciarne obrambne mehanizme. Primarni obrambni mehanizmi preprečujejo nastanek RS, sekundarni nevtralizirajo RS, terciarni pa poskrbijo za popravilo morebitnih poškodb zaradi njihovega delovanja (1).

Med najpomembnejše obrambne sisteme sodijo encimski antioksidanti: superoksidna dismutaza (SOD), katalaza (Cat) in glutationska peroksidaza (GPx) (1,6,22,23). Ostali endogeni antioksidanti so: glutation (GSH), sečna kislina, bilirubin, koencim Q₁₀, idr. Med eksogene antioksidante, ki jih v telo vnesemo s hrano pa uvrščamo: askorbinsko kislino ali vitamin C, α -tokoferol ali vitamin E, karotenoide, fenolne, polifenolne in razne žveplove spojine (6,22,24).

1.4.1 Antioksidanti

Antioksidanti (AO) so snovi, ki lahko upočasnijo, preprečijo ali odstranijo oksidativne poškodbe tarčnih molekul (1). Njihova lastnost je, da imajo v svoji strukturi vsaj en reaktiven vodikov atom, ki se zlahka odcepi in veže na RA. Pri tem nastane nov RA, ki je stabilnejši in zato manj škodljiv. To so torej molekule, ki ščitijo organizem pred oksidacijo tako, da stimulirajo imunski sistem ter odstranjujejo in aktivirajo kemijske intermedie, ki proizvajajo RA. Lahko jim imenujemo tudi »lovilci radikalov«, saj stabilizirajo RA, ki postanejo mnogo manj reaktivni in zato tudi manj škodljivi ter se precej lažje izločijo iz telesa (25,26).

V zunajceličnem prostoru in krvni plazmi predstavljajo antioksidativno plazemsko pregrado vse tiste snovi, ki imajo reduktivne sposobnosti in predstavljajo dobre »ponudnike« vodikovega atoma.

Antioksidanti so različno reaktivni. Prav reaktivnost je tista, ki v najvišji meri določa njihovo moč, ta pa je odvisna tudi od drugih dejavnikov kot so vrsta in nahajanje RA, mobilnost AO ter interakcije z drugimi AO.

Med AO prištevamo tudi naslednje kemijske elemente: selen, mangan, cink, baker, železo in krom. Ti sicer niso neposredni AO, vendar pa so nujno potrebni za delovanje AO, encimov (npr. mangan, cink in baker za SOD; železo za Cat, idr.) (1,26).

Antioksidante delimo glede na mehanizem delovanja, njihov izvor in topnost (1).

1.4.1.1 Mehanizem delovanja antioksidantov

Poznamo tri mehanizme delovanja AO. Preventivni AO vežejo nase ione kovin prehoda (najpomembnejša med njimi sta železo in baker) in s tem preprečijo njihovo interakcijo z

vodikovim peroksidom in superoksidnim radikalom, kar je temelj nastanka nevarnih hidroksilnih RA. V to skupino AO uvrščamo protein transferin, ki veže železo ter proteina ceruloplazmin in albumin, ki vežeta baker. V drugo skupino sodijo encimski AO: SOD, GPx in Cat, ki se nahajajo v celicah. Ti encimi katalizirajo pretvorbo RA, ROS in RNS v manj reaktivne produkte. V tretjo skupino pa uvrščamo tiste AO, ki so donorji elektronov. Ti nato reagirajo z RA, še preden lahko vplivajo na druge molekule. Tovrstni AO se oksidirajo v razmeroma stabilne in nereaktivne RA, ki se bodisi regenerirajo ali izločijo iz organizma. V tej skupini je mnogo predstavnikov, npr.: vitamin C, vitamin E, ubikinon ali oksidirana oblika koencima Q₁₀, različni β karoteni, bilirubin, tiolne spojine, organske kisline, flavoni, polifenoli, idr. (1).

1.4.1.2 Izvor antioksidantov

Antioksidante lahko razvrstimo glede na njihov izvor na tiste, ki nastajajo endogeno (SOD, GPx, Cat, koencim Q₁₀, lipoična kislina, hormoni z antioksidativno aktivnostjo, npr. melatonin ter proteini, ki vežejo železo in baker, npr. transferin, ceruloplazmin, albumin, idr.) ali eksogeno (vneseni v organizem s hrano-vitamin C, vitamin E, retinol ali vitamin A, karotenoidi, reducirani glutation GSH, idr.) (1).

1.4.1.3 Topnost antioksidantov

Glede na njihovo topnost delimo AO na hidrofilne oz. topne v vodi (vitamin C, glutation, flavonoidi) in hidrofobne oz. topne v maščobah (koencim Q₁₀, vitamin E, vitamin A, α in β karotenoidi). Hidrofilni AO reagirajo z oksidanti predvsem v citozolu in krvni plazmi, hidrofobni pa preprečujejo LP celičnih membran (1).

1.5 ANTIOKSIDATIVNI SISTEM

Antioksidativni sistem (AS) je neke vrste lasten obrambni sistem, ki določa kje, kdaj in koliko AO je potrebnih za preprečitev ONS (1).

V vsakem organizmu obstaja ravnotežje med AO in RS. To ravnotežje je dinamično in v večini primerov pomaknjeno v smer oksidacije, saj je ta potrebna za pridobivanje energije. Organizmi so zato razvili različne kontrolne mehanizme, ki neprestano vzdržujejo in

nadzorujejo vzpostavljeno ravnotežje. Že rahla sprememba v prid oksidaciji povzroči sprožitev mehanizmov za proizvodnjo endogenih AO. Takšno nesorazmerje lahko povzroči povečano nastajanje RS ali zmanjšano funkcionalnost AS zaradi premajhnega vnosa ali endogenega nastajanja AO ter povečane potrebe po njih (1,22).

Znano je, da pride pri povečanem nastajanju RA do izrabe določene vrste AO. Antioksidativni sistem (mreža antioksidantov) omogoča regeneracijo oksidirane oblike AO v reducirano, aktivno obliko, in sicer s pomočjo AO, ki ima nižji redoks potencial. Tak primer je npr. regeneracija oksidirane oblike vitamina E s koencimom Q₁₀ (27,28).

Če poznamo antioksidativni status organizma, torej potrebe organizma po AO, lahko zagotovimo primeren vnos le-teh. Vloga AO, kot zaviralcev oksidacijskih procesov, ki povzročajo škodo, je začela močno pridobivati na pomenu. Ravnotežje v povezavi s številnimi biološkimi reakcijami med RS in AO določa ali bodo učinki za organizem pozitivni ali negativni.

1.6 FIZIČNA VADBA

Stres predstavlja odziv organizma na ekstremne razmere, s katerim se ta lahko brani pred različnimi stresorji in na ta način vzdržuje svojo homeostazo. Konji so dnevno izpostavljeni različnim stresnim situacijam, kot so: sprememba okolja, transport, strah pred ovirami, stik z ljudmi, poškodbe, bolezni in tudi trening oz. fizična vadba (29).

Redna, dlje trajajoča fizična vadba ima ugodne učinke na zdravje, naporna, enkratna oz. akutna vadba pa lahko vodi do nastanka ONS, ki je posledica povečanega nastajanja RS v pljučih, skeletnih mišicah, srčni mišici, krvi in drugje (30). Reaktivne spojine nastanejo pri prenosu elektronov iz dihalne verige v mitohondrijih (primarno), med hipoksijo, pri avtooksidaciji kateholaminov, pri aktivaciji nevtrofilcev v odzivu na akutno vadbo ter s pomočjo drugih mehanizmov. Oksidativno/nitrozativni stres v mišičnih celicah nastane kot posledica povečanega primarnega metabolizma, zaradi večje potrebe po energiji in večje frekvence dihanja (31,32).

Med fizično vadbo se poveča vnos kisika za 10-15 krat, pri čemer se približno 2-5% vdihanega O₂ pretvori v RS (24,33,34). Najpogostejši RS prisotni v skeletnih mišicah med

vadbo sta superoksidni radikal (O_2^{\cdot}) in dušikov oksid (NO^{\cdot}), kar je posledica primarne poškodbe mitohondrijev. Antioksidativni sistem jih ne more v celoti odstraniti, zato pride do njihovega porasta in posledičnih poškodb mišic, kar se kaže v zmanjšani aktivnosti, patofizioloških spremembah in lezijah (31,32,35,36).

Sekundarna poškodba v skeletnih mišicah je poškodba celičnih membran, ki postanejo bolj prepustne, zato pride do povečanega izstopanja nekaterih mišičnih encimov iz celic, npr. aspartatne aminotransferaze (angl. aspartat aminotransferase, AST), kreatinske kinaze (angl. creatine kinase, CK) in laktatne dehidrogenaze (angl. lactat dehydrogenase, LDH) (30,32,37). Koncentracije teh encimov narastejo v krvi že kratek čas po fizični vadbi, ki predstavlja za organizem napor (38,39). Posledice vseh omenjenih sprememb pa vodijo tudi v poškodbe proteinov in DNK. Ne nazadnje lahko ONS povzroči tudi apoptozo ali celično smrt (1,6).

Razlike pa niso tako očitne pri redno treniranih konjih, ki so stalno izpostavljeni ONS in imajo zato bolj razvit AS (39).

1.6.1 Ocena oksidativno/nitrozativnega stresa pri fizični vadbi

Za oceno ONS pri fizični vadbi le redko dokazujemo prisotnost RS neposredno, saj so te spojine visoko reaktivne in zelo kratkožive, pa tudi metode za njihovo detekcijo so drage in težko dostopne za vsakdanjo rutino (npr. elektronska spinska resonanca; angl. Electron spin resonance, ESR) (1,4,40). Za dokaz njihove prisotnosti raje uporabljamo vmesne ali končne biološke označevalce, ki jih lahko izmerimo v vzorcih krvi ali urina. Najpogosteje so to različni proteini in encimi (AST, CK, LDH, idr.), funkcionalne skupine (karbonilne skupine), AO (GSH/GSSH-razmerja oksidant/reducent, SOD, GPx, Cat, vitamin E, idr.), NO_2^- , NO_3^- , produkti LP (MDA, pentan, lipidni hidroperoksidi, izoprostani, konjugirani dieni), idr. Pri tem dokazujemo njihovo prisotnost ali spremembe njihovih koncentracij oz. aktivnostih pred in po fizični vadbi (41,42).

V naši nalogi smo se odločili, da bomo ugotovili prisotnost ONS po fizični vadbi konj z naslednjimi označevalci: AST, CK, LDH, NO_2^- , NO_3^- in MDA.

1.6.1.1 Aspartatna aminotransferaza (EC 2.6.1.1.)

Aspartatna aminotransferaza (L-aspartat-2-oksoglutarat-aminotransferaza, AST) je encim, ki katalizira reverzibilno reakcijo transaminacije med L-asparaginsko kislino in 2-oksoglutaratno kislino, pri čemer nastaneta oksal-ocetna in glutaminska kislina. Najdemo jo v jetrih, srčni mišici, skeletni mišici, pljučih, krvi in drugje, in sicer v dveh izoencimskih oblikah, citoplazemski (40%) in mitohondrijski (60%) (44). Povišane koncentracije AST pozitivno korelirajo s CK pri poškodbi mišic (37,45,46).

1.6.1.2 Kreatinska kinaza (EC 2.7.3.2)

Kreatinska kinaza (CK) je encim, ki katalizira reverzibilno reakcijo med kreatin fosfatom in adenin difosfatom (ADP) v kreatinin in energetsko bogato molekulo ATP. Najdemo jo v skeletnih mišicah, srčni mišici, možganih, jetrih, pljučih, krvi in drugje, in sicer v treh izoencimskih oblikah. Je dimer, sestavljen iz podenote M (angl. muscle, mišica) in podenote B (angl. brain, možgani). Je najpomembnejši mišični encimi. Pri intenzivni fizični vadbi, kjer pride do poškodb mišičnih celic, se hitro sprosti v kri, zato je pomemben pokazatelj obsega tovrstnih poškodb (38,44,45,46).

1.6.1.3 Laktatna dehidrogenaza (EC 1.1.1.27)

Laktatna dehidrogenaza (L-laktat:NAD-oksidoreduktaza, LDH) je encim, ki sodeluje pri končni reakciji glikolize. Katalizira reverzibilno reakcijo, s katero iz piruvata nastane laktat. Najdemo jo v jetrih, skeletni mišici, srčni mišici, pljučih, krvi in drugje, in sicer v petih izoencimskih oblikah. Je tetramer, sestavljen iz kombinacij podenot M in H. Podenota M sodeluje pretežno v anaerobnih (skeletne mišice), podenota H pa v aerobnih reakcijah (srčna mišica) (44). Porast koncentracije LDH v serumu kaže na poškodbe mišičnih celic nastalih predvsem pri intenzivnejši vadbi (33,41,45).

1.6.1.4 Nitrit in nitrat

Nitrit (NO_2^-) nastaja endogeno v različnih tkivih, in sicer z oksidacijo endogenega NO^{\cdot} , z redukcijo nitrata (NO_3^-) v slini s pomočjo bakterij v ustih in v gastrointestinalnem traktu z encimom XO, z oksidacijo NO^{\cdot} med encimsko razgradnjo L-arginina ter pri prebavi rastlin in pitne vode (46,47).

Dušikov oksid je signal za relaksacijo gladkih mišičnih celic, njegov delež pa je proporcionalen vsoti koncentracij NO_2^- in NO_3^- .

Ker je NO[•] kratkoživi, saj v telesu zelo hitro oksidira do NO₂⁻ in NO₃⁻, se ga ne da izmeriti neposredno (34). Dokažemo ga le posredno, lahko npr. z Griessovo reakcijo. V prvi fazi najprej določimo celokupno koncentracijo NO₂⁻+NO₃⁻ in sicer tako, da najprej reduciramo nitrate do nitrita. Tega merimo spektrofotometrično preko azo produkta, ki nastane pri Griessovi reakciji. Brez redukcije vzorca določimo le koncentracijo nitrita. Iz razlike med celokupno koncentracijo nitratov in nitritov ter koncentracijo nitritov izračunamo koncentracijo nitratov (16).

1.6.1.5 Malondialdehid

Z malondialdehidom (MDA) lahko ocenimo obseg in posledice LP, povzročene z vadbo (22,33). Nastaja pri lipidni peroksidaciji VNMK, kot so arahidonska, linolenska in dokozaheksanojska kislina. Malondialdehid lahko reagira z bazami v verigi DNK, predvsem z gvaninom, kar lahko vodi v mutagenost. Ustvari tudi prečne povezave med DNK in proteini. V celicah se MDA razmeroma hitro presnavlja do acetata s pomočjo encima aldehydna dehidrogenaza. Povišane vrednosti MDA v plazmi potrjujejo, da se med vadbo tvorijo RA in RS, ki posledično privedejo do LP (34,41). Pri vadbi pa ne pride do njihovega porasta takrat, ko je organizem že prilagojen na dalj časa trajajočo obremenitev (39,41). Malondialdehid lahko določamo v plazmi konj s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (angl. High-performance liquid chromatography, HPLC), ob uporabi različnih detektorjev, kot so ultravijolični, fluorescenčni ali masni (49,50).

2 NAMEN DELA

Cilj naše naloge je ugotoviti ali fizična vadba konj vpliva na nastanek reaktivnih dušikovih spojin in kakšne so oksidativne posledice. V ta namen bomo izbrane konje obremenili s fizično vadbo in jim nato odvzeli vzorce krvi ob treh različnih časih. Za ocenitev oksidativno/nitrozativnega stresa (ONS) bomo v serumskih vzorcih izmerili aktivnosti encimov AST, CK in LDH, v plazemskih pa koncentracije reaktivnih dušikovih spojin NO_2^- in NO_3^- ter produkta lipidne peroksidacije, MDA.

Aktivnosti encimov AST, CK in LDH bomo določili z biokemijskimi reakcijami s pomočjo analizatorja RX-Daytona, koncentracije NO_2^- in NO_3^- z Griessovo reakcijo na mikrotitrskem čitalcu Safire² TM Genios, koncentracije MDA pa z derivatizacijsko metodo z dinitrofenilhidrazinom (DNPH), ob uporabi tekočinskega kromatografa s tandemsko masnim spektrometrom.

Primerjali bomo spreminjanje aktivnosti/koncentracij posameznega označevalca znotraj različnih časovnih intervalov. Ocenili bomo ali se proučevani označevalci po fizični vadbi spremenijo in ali v določenem času med seboj pozitivno korelirajo.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Konji

V nalogo smo vključili 10 jahalnih, rekreativnih, toplokrvnih konj (5 kobil in 5 kastratov) različnih pasem (5 madžarske toplokrvne pasme, 3 slovenske toplokrvne pasme, 1 češke toplokrvne pasme in 1 pasme Quarter), starih med 6 in 18 let (povprečna starost \pm SD = 10,9 let \pm 4,0 let) in sicer na osnovi pisne privolitve njihovih lastnikov. Izključili smo breje kobile in kobile z žrebeti.

Konji so bili pred vključitvijo v raziskavo klinično pregledani (telesna temperatura, pulz, dihanje, pregled lokomotornih organov) in zdravi. Oceno zdravstvenega stanja je opravil veterinar. Konji pred in med raziskavo niso dobivali nobenih prehranskih dodatkov, razen osnovne hrane (oves, seno in voda).

3.1.2 Igle in epruvete za odvzem krvi ter mikrocentrifugirke za shranjevanje biološkega materiala

Za meritve biokemijskih označevalcev AST, CK in LDH smo kri odvzeli s sterilnimi iglami za enkratno uporabo (Terumo Venoject; 20 Gx1 ½"UTW, 0,9x40 mm, Belgija) in plastičnim nastavkom (Vacuette; Greiner, Kremmunster, Avstija), in sicer v sterilne 5-mL epruvete z gelom, brez dodanega antikoagulanta (Vacuette; Greiner Bio-One, Kremmunster, Avstija). Krvne vzorce za MDA, NO₂⁻ in NO₃⁻ pa smo odvzeli v sterilne 4-mL epruvete z dodanim antikoagulantom, etilendiamintetraocetno kislino (EDTA) (Vacuette; Greiner Bio-One, Kremmunster, Avstija).

Po ustrezni pripravi smo serumske in plazemske vzorce prenesli v 1,5-mL mikrocentrifugirke in jih shranili v zamrzovalniku pri temperaturi -80°C, vse do analize.

3.1.3 Reagenti in topila

3.1.3.1 Reagenti in topila za določitev MDA

- 2,4-dinitrofenilhidrazin, 97 % (Sigma-Aldrich Chemie; Steinheim, Nemčija),
- 2,4-dinitrofenilhidrazin, raztopina s fosforno kislino (Sigma-Aldrich Chemie; Steinheim, Nemčija),
- acetonitril (Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA),
- klorovodikova kislina, 37 % (Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija),
- malonaldehid tetrabutylamonijeva sol (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA),
- natrijev hidroksid (NaOH) (Fluka Analytical; St. Louis, ZDA),
- očetna kislina, 100 % (Ledocet) (Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija),
- trikloroocetna kislina (TCA) (Merck Chemicals; Darmstadt, Nemčija),
- ultračista voda, pridobljena z Milli Q-Advantage A10; specifična upornost 18,2 MΩcm, celokupni organski ogljik (TOC) 5 µg/L (Millipore Corp., Billerica, MA)

3.1.3.2 Reagenti in topila za določitev NO_2^- in NO_3^-

Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit (Cat. No. 780001, Lot. No. 0433486):

- pufer (Cat. No. 780022),
- encim nitratna reduktaza (Cat. No. 780010),
- kofaktor nitratne reduktaze (Cat. No. 780012),
- nitratni standard (Cat. No. 780014),
- nitritni standard (Cat. No. 780016),
- Griessov reagent 1 in 2

3.1.4 Laboratorijska oprema

- analitska tehtnica (Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica),

- avtomatske pipete (0,5-10 µL; 20-200 µL; 100-1000 µL) (Eppendorf Research; Hamburg, Nemčija),
- biokemijski analizator RX-Daytona (Randox; Crumlin, velika Britanija),
- centrifuga CENTRIC 322 A (Tehtnica; Železniki, Slovenija),
- centrifuga 5415 R (Eppendorf Research; Hamburg, Nemčija),
- centrifuga Heraeus MEGAFUGE 16R (Heraus, Langenselbond, Nemčija),
- filtri Centrisart ® I., cut-off 10.000 (Sartorius, Goettingen, Nemčija),
- hladilnik (2-8°C) (LTH; Škofja Loka, Slovenija),
- inkubator (Heraus Holding GmbH; Hanau, Nemčija),
- vstavki za vialo 0,1 mL (Machrey-Nagel; Düren, Nemčija),
- mikrotitrski čitalec Safire² TM Genios (Tecan, Genios; Zürich, Švica),
- masni analizator Agilent 6460 s trojnim kvadrupolnim MS/MS analizatorjem,
- plastične epruvete oz. mikrocentrifugirke: 1,5 mL (Sarstedt; Nümbrecht, Nemčija),
- steklovina (steklene čaše za 25 in 250 mL; steklene bučke za 10, 25, 50, 100 in 250 mL),
- vibracijski mešalnik Vibromix 114EV (Tehtnica, Železniki, Slovenija),
- zamrzovalnik (-20°C) (Gorenje; Velenje, Slovenija),
- zamrzovalnik (-80°C) (Sanyo Electric Co., Ltd.; Japonska)

3.2 METODE

3.2.1 Opis izbrane fizične vadbe konj

Izbrana fizična vadba je potekala v maneži s programom »izmeničnega lonžiranja« v naslednjem vrstnem redu: 10 minut hoda (ogrevanje), 5 minut počasnega kasa, 10 minut hitrega kasa, 15 minut galopa-skupaj 40 minut dela ter 15-20 minut ohlajanja.

3.2.2 Odvzem in priprava vzorcev

3.2.2.1 Odvzem vzorcev

Vzorci krvi iz jugularne vene na vratu (lat. *V. jugularis*) je jemal v epruvete s podtlakom veterinarski tehnik z dovoljenjem za odvzem krvi živali in sicer po tri-krat vsakemu konju.

Prvi odvzem smo izvedli pred fizično obremenitvijo, da bi določili bazalne vrednosti (odvzem 1 ob času t_1). Sledila sta fizična vadba po programu in nato drugi odvzem po končanem galopu, to je 40 minut po začetku obremenitve (odvzem 2 ob času t_2). Tretji odvzem pa smo opravili 24 ur po končani vadbi (odvzem 3 ob času t_3).

3.2.2.2 Priprava vzorcev

Epruvete smo pred vsakim odvzemom ustrezno označili in vzorce krvi odvzeli v predpisanem vrstnem redu (44).

Vzorci krvi za pridobitev seruma, v katerem smo merili aktivnosti biokemijskih parametrov (AST, CK in LDH), smo odvzeli v epruvete z gelom, brez dodanega antikoagulant (Vacuette; Greiner Bio-One, Kremsmunster, Avstija). Pustili smo jih stati na sobni temperaturi, da je kri koagulirala in jih centrifugirali 10 minut pri 1.500 obratih/minuto v centrifugi, pri sobni temperaturi. Ločili smo serum in ga prenesli v ustrezno označene mikrocentrifugirke ter jih do analize shranili v zamrzovalniku pri temperaturi -80°C .

Vzorci krvi za pridobitev plazme, v kateri smo merili koncentracije NO_2^- , NO_3^- in MDA, smo odvzeli v epruvete z dodanim antikoagulantom, etilendiamintetraocetno kislino (EDTA) (Vacuette; Greiner Bio-One, Kremsmunster, Avstija). Centrifugirali smo jih pri 1.500 obratih/minuto v centrifugi, pri temperaturi 4°C . Ločili smo plazmo in jo prenesli v ustrezno označene mikrocentrifugirke ter jih do analize shranili v zamrzovalniku pri temperaturi -80°C .

3.2.3 Meritev aktivnosti encima aspartatna aminotransferaza (AST) v serumu

3.2.3.1 Priprava vzorcev

Serumske vzorce smo počasi odmrznili pri sobni temperaturi in jih pred nadaljnjo uporabo dobro premešali na vibracijskem mešalniku.

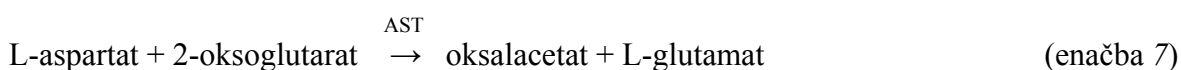
3.2.3.2 Reagenti, standard in kontrole

Reagenta (R1, R2), standard in kontrole (nizka, visoka), so bili že pripravljene s strani proizvajalca.

- R1: pufer TRIS, 80 mmol/L, pH 7,5; L-aspartat: 240 mmol/L; malatna dehidrogenaza (MDH): $\geq 1,5$ U/ml; LDH: ≥ 2 U/mL.
- R2: 2-oksoglutarat, 12 mmol/L; NADH: 0,18 mmol/L

3.2.3.3 Postopek meritve

Po predhodno opravljenih kalibracijah in uporabah predpisanih kontrol proizvajalca, smo v serumskih vzorcih fotometrično izmerili aktivnosti AST [μ kat/L] z biokemijskim analizatorjem RX-Daytona (Randox, Crunlin, Velika Britanija), skladno z navodili proizvajalca (enačbi 7 in 8).



V reakciji je delež nastalega NADH neposredno sorazmeren s katalitično aktivnostjo AST. En katal (mol/s) je tista aktivnost encima, ki v eni sekundi prevede 1 mol substrata v produkt (44).

3.2.4 Meritev aktivnosti encima kreatinska kinaza (CK) v serumu

3.2.4.1 Priprava vzorcev

Serumske vzorce smo počasi odmrznili pri sobni temperaturi in jih pred nadaljnjo uporabo dobro premešali na vibracijskem mešalniku.

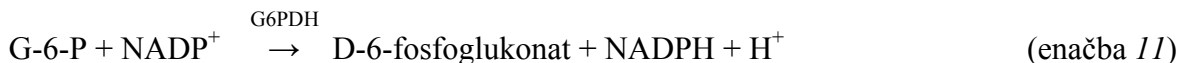
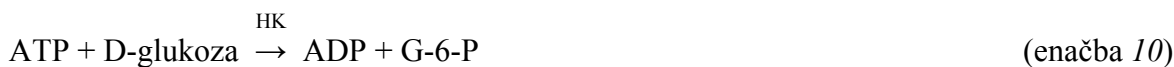
3.2.4.2 Reagenti, standard in kontrole

Reagenti (R1a, R1b, R2), standard in kontrole (nizka, visoka), so bili že pripravljene s strani proizvajalca.

- R1a: imidazolni pufer, 0,1 mol/L, pH 6.7; glukoza: 20,0 mmol/L; magnezijev acetat: 10 mmol/L; EDTA: 2,0 mmol/L
- R1b: ADP: 2,0 mmol/L; AMP: 5,0 mmol/L; diadenozin pentafosfat: 10 μmol/L; NADP: 2,0 mmol/L; hrenova kinaza: ≥ 2,5 U/mL; glukoza-6-dehidrogenaza (G-6-PDH): ≥ 1,5 U/mL; N-acetilcistein: 20,0 mmol/L
- R2: substrat kreatin fosfat: 30,0 mmol/L

3.2.4.3 Postopek meritve

Po predhodno opravljenih kalibracijah in uporabi predpisanih kontrol proizvajalca, smo v serumskih vzorcih fotometrično izmerili aktivnosti CK [μkat/L] z biokemijskim analizatorjem RX-Daytona (Randox, Crunlin, Velika Britanija), skladno z navodili proizvajalca (enačbe 9-11).



V reakciji je delež nastalega NADH neposredno sorazmeren s katalitično aktivnostjo CK.

3.2.5 Meritev aktivnosti encima laktatne dehidrogenaze (LDH) v

serumu

3.2.5.1 Priprava vzorcev

Serumske vzorce smo počasi odmrznili pri sobni temperaturi in jih pred nadaljnjo uporabo dobro premešali na stresalniku.

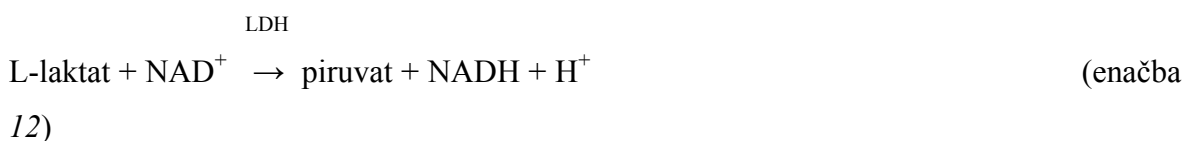
3.2.5.2 Reagenti, standard in kontrole

Reagenta (R1, R2), standard in kontrole (nizka, visoka), so bili že pripravljene s strani proizvajalca.

- R1: pufer TRIS, 72 mmol/L; pH 9,2; mlečna kislina: 44 mmol/L; stabilizatorji in konzervansi
- R2: NAD: 7,7 mmol/L; stabilizatorji in konzervansi

3.2.5.3 Postopek meritve

Po predhodno opravljenih kalibracijah in uporabi predpisanih kontrol proizvajalca smo v serumskih vzorcih fotometrično izmerili aktivnosti LDH [$\mu\text{kat/L}$] z biokemijskim analizatorjem RX-Daytona (Randox, Crunlin, Velika Britanija), skladno z navodili proizvajalca (enačba 12).



3.2.6 Meritev koncentracij NO_2^- in NO_3^- v plazmi, z Griessovim reagentom

3.2.6.1 Priprava vzorcev

Plazemske vzorce smo počasi odmrznili pri sobni temperaturi in jih pred nadaljnjo uporabo dobro premešali na vibracijskem mešalniku.

Nato smo jih prefiltrirali skozi ultrafiltre s celulozno membrano (celuloza triacetat-CTA) Centrisart® I. (10-30 kDa), da smo odstranili proteine, predvsem hemoglobin, ki moti barvno reakcijo. Najprej smo odstranili pokrov in notranjo epruveto z membranskim filtrom. V zunanjo epruveto smo prenesli po 1 mL ustreznega vzorca, vstavili notranjo epruveto z membranskim filtrom spodaj in vzorce pustili stati v pokončnem položaju 5 minut, da so se membranski filtri dobro omočili. Nato smo epruvete centrifugirali 10 minut

pri 3.000 obratih/minuto. Za nadaljnjo analizo smo iz notranjih epruвет odpipetirali ustrezne volumne filtratov (20 in 50 μL).

3.2.6.2 Priprava reagentov

- Pufer: vsebino stekleničke za pufer smo raztopili v 100 mL vode.
- Encim nitratna reduktaza: vsebino stekleničke smo raztopili v 1,2 mL pripravljene pufra.
- Kofaktor nitratne reduktaze: vsebino stekleničke smo raztopili v 1,2 mL pripravljene pufra.
- Nitratni standard: liofilizat smo raztopili v 1 mL pripravljene pufra.
- Nitritni standard: liofilizat smo raztopili v 1 mL pripravljene pufra.
- Griessov reagent 1 in 2: sta bila že pripravljena.

Vse raztopine smo imeli med delom shranjene v hladilniku pri temperaturi 2-8°C.

3.2.6.3 Priprava standardov $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$

V 1,5-mL mikrocentrifugirko smo prenesli 0,9 mL pufra in dodali 0,1 mL nitratnega standarda ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$) ter vsebino dobro premešali. Dobili smo osnovno standardno raztopino s koncentracijo 200 μM . Za pripravo standardov ostalih koncentracij, smo osnovnemu standardu dodajali različne volumne pufra (preglednica III) za izdelavo umeritvene krivulje. Nitratne standarde za določitev umeritvene krivulje smo pripravljali v mikrotitrskih ploščicah (51).

Preglednica III: Priprava nitratnih standardov $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$

| volumen nitratnega standarda [μL] | volumen pufra [μL] | koncentracija nitratnega standarda [μM] |
|--|---------------------------------|--|
| 0 | 80 | 0 |
| 5 | 75 | 5 |
| 10 | 70 | 10 |
| 15 | 65 | 15 |
| 20 | 60 | 20 |
| 25 | 55 | 25 |
| 30 | 50 | 30 |

| | | |
|----|----|----|
| 35 | 45 | 35 |
|----|----|----|

3.2.6.4 Priprava standardov NO_2^-

V 1,5-mL mikrocentrifugirko smo prenesli 0,9 mL pufru in dodali 0,1 mL nitritnega standarda (NO_2^-) ter dobro premešali. Tako smo dobili osnovno standardno raztopino s koncentracijo 200 μM . Za pripravo standardov različnih koncentracij smo osnovnemu standardu dodajali različne volumne pufru (preglednica IV) za izdelavo umeritvene krivulje. Nitritne standarde za določitev umeritvene krivulje smo pripravljali v mikrotitrskih ploščicah (51).

Preglednica IV: Priprava nitritnih standardov NO_2^-

| volumen nitritnega standarda [μL] | volumen pufru [μL] | koncentracija nitritnega standarda [μM] |
|--|---------------------------------|--|
| 0 | 100 | 0 |
| 5 | 95 | 5 |
| 10 | 90 | 10 |
| 15 | 85 | 15 |
| 20 | 80 | 20 |
| 25 | 75 | 25 |
| 30 | 70 | 30 |
| 35 | 65 | 35 |

3.2.6.5 Postopek priprave vzorcev za meritev skupne koncentracije $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$

V vdolbinice mikrotitrskih ploščic smo odpipetirali po 100 μL pufru. Nato smo v vsako dodali po 20 μL ustreznega vzorca (filtrat ali nitratni standard), 20 μL pufru, 5 μL kofaktorja nitratne reduktaze in na koncu še 5 μL encima nitratna reduktaza. Mikrotitrskih ploščic smo pokrili in jih inkubirali 3 ure pri sobni temperaturi. Nato smo v vsako vdolbinico dodali po 25 μL Griessovega reagenta 1 in še po 25 μL Griessovega reagenta 2. Sledila je 10-minutna inkubacija pri sobni temperaturi, da se je razvila barvna reakcija.

Absorbanco smo izmerili spektrofotometrično, s pomočjo mikrotitrskega čitalca Safire², pri valovni dolžini $\lambda=540$ nm (49).

3.2.6.6 Postopek priprave vzorcev za meritev koncentracije NO_2^-

V vdolbinice mikrotitrsko ploščice smo odpipetirali po 100 μL pufra. Nato smo v vsako dodali po 50 μL ustreznega vzorca (filtrat ali nitritni standard), 25 μL Griessovega reagenta 1 in 25 μL Griessovega reagenta 2. Mikrotitrsko ploščico smo inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi, da se je razvila barvna reakcija. Absorbanco smo izmerili spektrofotometrično, s pomočjo mikrotitrskega čitalca Safire², pri valovni dolžini $\lambda=540$ nm (49).

3.2.6.7 Izračun koncentracij NO_2^- in NO_3^-

Skupno koncentracijo $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ smo izračunali (enačba 13) s pomočjo naklona in odseka regresijske premice umeritvene krivulje. Na podoben način smo izračunali tudi koncentracijo NO_2^- (enačba 14). Iz razlik omenjenih koncentracij smo nato izračunali še koncentracijo NO_3^- (enačba 15) (49).

$$(\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-) [\mu\text{M}] = \left(\frac{A_{540}\text{-točka, kjer seka os y}}{\text{naklon}} \right) \left(\frac{200 \mu\text{L}}{\text{volumen vzorca } [\mu\text{L}]} \right) \times \text{redčitev} \quad (\text{enačba 13})$$

$$(\text{NO}_2^-) [\mu\text{M}] = \left(\frac{A_{540}\text{-točka, kjer seka os y}}{\text{naklon}} \right) \left(\frac{200 \mu\text{L}}{\text{volumen vzorca } [\mu\text{L}]} \right) \times \text{redčitev} \quad (\text{enačba 14})$$

$$(\text{NO}_3^-) [\mu\text{M}] = (\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-) - (\text{NO}_2^-) \quad (\text{enačba 15})$$

3.2.7 Meritev koncentracije MDA v plazmi z derivatizacijsko metodo z DNPH in aparatom LC-MS/MS

3.2.7.1 Priprava vzorcev

Plazemske vzorce smo počasi odmrznili pri sobni temperaturi in jih pred nadaljnjo uporabo dobro premešali na vibracijskem mešalniku.

Za pripravo vseh reagentov in vzorcev smo uporabljali ultračisto vodo, pridobljeno z aparatom Milli Q-Advantage A10 (v nadaljevanju: voda).

3.2.7.2 Priprava reagentov

- 0,1 M klorovodikova kislina (HCl): v 100-mL merilno bučko smo odpipetirali 0,829 mL 37% HCl in dopolnili z vodo do oznake.
- 4 M klorovodikova kislina (HCl): 50 mL 4 M HCl smo pripravili iz 16,57 mL 37% HCl, ki smo ji dodali vodo do oznake.
- 1 M klorovodikova ksilina (HCl): 10 mL 1 M HCl smo pripravili iz 0,829 mL 37% HCl, ki smo ji dodali vodo do oznake.
- 6 M natrijev hidroksid (NaOH): v 10-ml merilno bučko smo nalili približno 5 mL vode in med mešanjem počasi dodajali predhodno natehtani NaOH (2,40 g), ki se je sproti raztapljal. Ko se je ves NaOH raztopil, smo dolili vodo do oznake in raztopino še enkrat dobro premešali.
- 20% trikloroacetna kislina (TCA): v 25-mL merilno bučko smo natehtali 5,00 g TCA in dodali vodo do oznake.
- 1 mg/mL raztopina 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH): uporabili smo raztopino DNPH v fosforni kislini ($c = 0,2 \text{ M}$); 250 μL te raztopine smo odpipetirali v 10 mL merilno bučko ter jo dopolnili do oznake s 4 M HCl.
- 0,2 M pufer očetna kislina/amonijev acetat ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO-NH}_4^+$): v 100-mL merilno bučko smo nalili približno 50 mL vode. S pipeto smo dodali 1146 μL 100% očetne kisline. Nato smo dodali

17,66 mL 25% (m/m %) raztopine amonijaka v vodi ter dopolnili z vodo do oznake.

Vse raztopine smo pripravili sproti in jih med delom imeli shranjene v hladilniku pri temperaturi 2-8°C.

3.2.7.3 Priprava standardov MDA

V 10-mL merilno bučko smo natehtali 43,5 mg tetrabutilamonijeve soli malondialdehida ter dodali acetonitril do oznake. Dobili smo osnovno raztopino I (OR I) s koncentracijo 1 mg/mL. 180 µL OR I smo nato odpipetirali v 50-mL merilno bučko in jo dopolnili do oznake z 0,1 M HCl. Nastalo raztopino smo dobro premešali. Tako smo pripravili standard MDA s koncentracijo 50 µM (osnovna raztopina II; OR II). Tega smo nato ustrezno redčili z 0,1 M HCl, da smo dobili standarde s koncentracijami 10, 7,5, 5, 2,5, 1,88 in 1,25 µM. Standard s koncentracijo 1,25 µM (narejen je bil v dvojniku) smo dalje redčili z 0,1 M HCl, da smo dobili raztopini s koncentracijama 0,625 in 0,5 µM. Ti dve koncentraciji smo uporabili kot kalibratorje za izdelavo umeritvene krivulje (preglednica V).

Po 1 mL vsakega standarda MDA z določeno koncentracijo smo pripravili v 1,5-mL mikrocentrifugirkah.

Preglednica V: Priprava standardov MDA

| koncentracija standarda MDA [µmol/L] | volumen 50 µM ORI II [µL] | volumen 1,25 µM standarda MDA [µL] | volumen 0,1 M HCl [µL] |
|--------------------------------------|---------------------------|------------------------------------|------------------------|
| 10 | 200 | / | 800 |
| 7,5 | 150 | / | 850 |
| 5 | 100 | / | 900 |
| 2,5 | 50 | / | 950 |
| 1,88 | 37,6 | / | 962,4 |
| 1,25 | 25 | / | 975 |
| 0,625 | / | 500 | 500 |
| 0,5 | / | 400 | 600 |
| 0 | / | / | 1000 |

Na enak način smo pripravili še standarde MDA s koncentracijami 6, 3 in 1 μM (kontrolne) (preglednica VI).

Preglednica VI: Priprava kontrol MDA

| koncentracija standarda MDA [$\mu\text{mol/L}$] | volumen 50 μM ORI II [μL] | volumen 1,25 μM standarda MDA [μL] | volumen 0,1 M HCl [μL] |
|---|---|--|-------------------------------------|
| 6 | 20 | / | 980 |
| 3 | 60 | / | 940 |
| 1 | 120 | / | 880 |

3.2.7.4 Postopek priprave vzorcev za meritev MDA z metodo DNPH

V 1,5-mL mikrocentrifugirke smo odpipetirali po 200 μL ustreznega vzorca (standarda ali kontrole) in jim dodali po 50 μL 6 M NaOH, premešali ter inkubirali 30 minut v termostatanem stresalniku pri 60°C in 20 obratih/minuto. V tem času je potekla alkalna hidroliza na proteine vezanega MDA. Vzorce smo nato 10 minut hladili v hladilniku. Potem smo vsakemu vzorcu dodali po 250 μL ohlajene (na -5°C) 20 % raztopine TCA in centrifugirali 10 minut pri 5°C in 13.100 obratih/minuto. V tej fazi so se oborili proteini. Po 450 μL supernatanta smo prenesli v nove 1,5-mL mikrocentrifugirke in v vsako dodali po 4 μL 6 M NaOH ter vsebine dobro premešali, da smo dobili raztopine s pH 6-7. V vsako mikrocentrifugirko smo dodali še po 25 μL 1 M HCl (pH~2), dobro premešali in centrifugirali 10 minut pri 5°C in 13.100 obratih/minuto. Po 200 μL supernatantov smo prenesli v nove 1,5-mL mikrocentrifugirke ter v vsako dodali po 150 μL 1 M HCl (pH~2); raztopine smo dobro premešali in jih centrifugirali 10 minut pri 5°C in 13.100 obratih/minuto. Po 175 μL vsakega od supernatantov smo prenesli v nove 1,5-mL mikrocentrifugirke in jim dodali po 25 μL raztopine DNPH ter dobro premešali. Sledila je inkubacija 60 minut pri 50°C na termostatanem stresalniku pri 20 obratih/minuto, zaščiteno pred svetlobo. Pri teh pogojih je potekla derivatizacija MDA. Ker je nastali produkt MDA-DNPH nestabilen na svetlobi, smo derivatizirane vzorce 10 minut hladili v temi na sobni temperaturi. V nove 1,5-mL mikrocentrifugirke smo prenesli po 200 μL ohlajenih supernatantov, jim dodali po 75 μL pufru ter jih dobro premešali. Po 170 μL vsake raztopine smo nato odpipetirali v vložke, ki smo jih nato vstavili v obarvane viale.

Postopek priprave vzorcev z manjšimi spremembami smo povzeli po članku Czaunderne in sod. (49). Viale z vzorci, standardi in kontrolami smo zložili v avtomatski vzorčevalnik in ga vstavili v masni analizator.

3.2.7.5 Meritev MDA z aparatom LC-MS/MS

Uporabili smo aparat Agilent 6460 s trojnim kvadrupolnim MS/MS analizatorjem. Uporabili smo metodo ionizacije z razprševanjem raztopin v električnem polju oz. elektrorazprševalno ionizacijo-ESI (angl. electrospray ionization). Pri kvantifikaciji derivatiziranega MDA smo spremljali prehod 235,1 (pirazolska oblika produkta MDA-DNPH) na 159,2 (fragmentacija z odcepom skupin NO₂ in NO) in za odziv ionov upoštevali 159,2. Nastavitve masnega analizatorja in pogoje merjenja smo povzeli po diplomski nalogi Čvan M. (50): sušilni plin-300°C, 5 L/min; nebulizacijski plin-45 psi; Jetstream[®] plin-320°C, 11 L/min; napetost na kapilari-3500 V, napetost[®] Nozzle- 500 V; MDA-prehod SRM (angl. selected reaction monitoring)-spremljanje starševskega in hčerinskega iona, 235,1→159,2; kolizijska energija (CE)-20 eV; fragmentor (FR)-100 V. Dobljeni rezultati so bile površine vrhov.

3.3 OBDELAVA PODATKOV IN STATISTIČNA ANALIZA

Podatke meritev in izračune smo zbrali in obdelali s programom Microsoft Excel 2010. Uporabili smo ga za izdelavo grafičnega prikaza podatkov (stolpčni in črtni grafikon). Podatke smo predstavili kot povprečja (\bar{x}) s standardnimi deviacijami (SD) in koeficienti variacije (KV).

Statistično analizo smo izvedli s programom IBM Statistical Package for Social Sciences za Windows (verzija 20.0; SPSS Inc. Chicago, IL, ZDA). Naredili smo opisno statistiko s testoma normalnosti Kolmogorov-Smirnov test in Shapiro-Wilkov, s katerima smo ugotavljali ali so podatki porazdeljeni normalno (Gaussova normalna porazdelitev) ali nenormalno. Glede na ugotovljeno normalno porazdelitev naših podatkov (Shapiro-Wilkov test) smo izvedli parametrični test večkratne analize variance RMANOVA (angl. Repeated Measures ANOVA), s katerim smo ugotavljali ali se proučevani parametri spremenijo po fizični vadbi in še Bonferronijev popravek (angl. Bonferroni correction), saj smo vsakemu

konju odvzeli manj kot 5 vzorcev krvi. Za proučevane parametre smo s pomočjo Pearsonovih korelacijskih koeficientov ovrednotili tudi njihove medsebojne korelacije.

Kot statistično značilne smo upoštevali p vrednosti, ki so bile manjše od 0,05.

4 REZULTATI

4.1 REZULATATI MERITEV AST V SERUMU

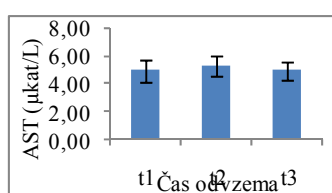
4.1.1 Aktivnosti AST v serumu

Preglednica VII prikazuje izmerjene aktivnosti AST [μ kat/L] v serumskih vzorcih konj, njihove povprečne vrednosti (\bar{x}), standardne deviacije (SD) in koeficiente variacije (KV) za tri različne čase vzorčenja ($t_1 = 0$, $t_2 = 40$ min, $t_3 = 24$ ur), slika 1 pa povprečne vrednosti in SD aktivnosti AST [μ kat/L] v obliki stolpčnega grafikona.

Preglednica VII: Aktivnosti AST [μ kat/L] v serumskih vzorcih, njihove povprečne vrednosti (\bar{x}), standardne deviacije (SD) in koeficienti variacije (KV); vzorci so bili odvzeti v treh različnih časovnih intervalih ($t_1 = 0$, $t_2 = 40$ min, $t_3 = 24$ ur)

| oznaka konja | čas odvzema | | |
|--------------|-------------|-------------------|------------------|
| | $t_1 = 0$ | $t_2 = 40$ min | $t_3 = 24$ ur |
| KN-1 | 4,23 | 4,86 | 4,58 |
| KN-2 | 5,05 | 5,33 | 5,19 |

| | | | |
|---|--------------|--------------|--------------|
| KN-3 | 3,77 | 3,95 | 3,63 |
| KN-4 | 6,10 | 6,40 | 6,21 |
| KN-5 | 6,08 | 6,29 | 5,45 |
| KN-6 | 5,47 | 5,57 | 5,27 |
| KN-7 | 5,03 | 5,31 | 4,90 |
| KN-8 | 4,25 | 4,73 | 4,60 |
| KN-9 | 4,46 | 4,88 | 4,57 |
| KN-10 | 4,91 | 5,06 | 4,8 |
| \bar{x} [μkat/L] | 4,94 | 5,24 | 4,92 |
| SD [μkat/L] | 0,78 | 0,73 | 0,68 |
| KV (%) | 15,88 | 13,94 | 13,82 |



Slika 1: Povprečne vrednosti in SD aktivnosti AST [μ kat/L] v serumskih vzorcih konj, odvzetih v treh različnih časovnih intervalih ($t_1 = 0$, $t_2 = 40$ min, $t_3 = 24$ ur)

4.2 REZULATATI MERITEV CK V SERUMU

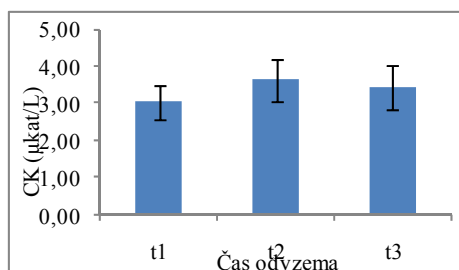
4.2.1 Aktivnosti CK v serumu

Preglednica VIII prikazuje izmerjene aktivnosti CK [$\mu\text{kat/L}$] v serumskih vzorcih konj, njihove povprečne vrednosti (\bar{x}), standardne deviacije (SD) in koeficiente variacije (KV) za tri različne čase vzorčenja ($t_1 = 0$, $t_2 = 40$ min, $t_3 = 24$ ur), slika 2 pa povprečne vrednosti in SD koncentracij CK [$\mu\text{kat/L}$] v obliki stolpčnega grafikona.

Preglednica VIII: Aktivnosti CK [$\mu\text{kat/L}$] v serumskih vzorcih konj, njihove povprečne vrednosti (\bar{x}), standardne deviacije (SD) in koeficienti variacije (KV); vzorci so bili odvzeti v treh različnih časovnih intervalih ($t_1 = 0$, $t_2 = 40$ min, $t_3 = 24$ ur)

| oznaka konja | čas odvzema | | |
|---------------------------------|--------------|----------------|---------------|
| | $t_1 = 0$ | $t_2 = 40$ min | $t_3 = 24$ ur |
| KN-1 | 2,61 | 3,33 | 3,17 |
| KN-2 | 3,72 | 4,28 | 3,95 |
| KN-3 | / | 3,54 | 2,84 |
| KN-4 | 3,12 | 4,35 | 3,88 |
| KN-5 | 3,14 | 3,44 | 2,94 |
| KN-6 | 2,64 | 2,85 | 2,61 |
| KN-7 | 3,12 | 3,55 | 3,22 |
| KN-8 | 2,96 | 3,50 | 3,13 |
| KN-9 | 2,27 | 3,00 | 4,03 |
| KN-10 | 3,58 | 4,53 | 4,34 |
| \bar{x} [$\mu\text{kat/L}$] | 3,02 | 3,64 | 3,41 |
| SD [$\mu\text{kat/L}$] | 0,46 | 0,57 | 0,59 |
| KV (%) | 15,35 | 15,64 | 17,26 |

(/ manjkajoči rezultat)



Slika 2: Povprečne vrednosti in SD aktivnosti CK [$\mu\text{kat/L}$] v serumskih vzorcih konj, odvzetih v treh različnih časovnih intervalih ($t_1 = 0$, $t_2 = 40$ min, $t_3 = 24$ ur)

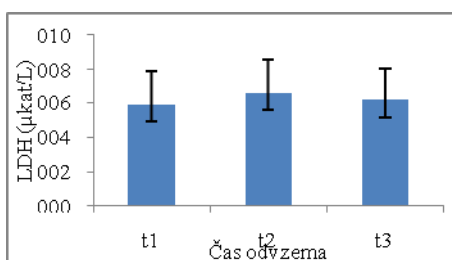
4.3 REZULATATI MERITEV LDH V SERUMU

4.3.1 Aktivnosti LDH v serumu

Preglednica IX prikazuje izmerjene aktivnosti LDH [$\mu\text{kat/L}$] v serumskih vzorcih konj, njihove povprečne vrednosti (\bar{x}), standardne deviacije (SD) in koeficiente variacije (KV) za tri različne čase vzorčenja ($t_1 = 0$, $t_2 = 40$ min, $t_3 = 24$ ur), slika 3 pa povprečne vrednosti in SD koncentracij LDH [$\mu\text{kat/L}$] v obliki stolpčnega grafikona.

Preglednica IX: Aktivnosti LDH [$\mu\text{kat/L}$] v serumskih vzorcih konj, njihove povprečne vrednosti (\bar{x}), standardne deviacije (SD) in koeficienti variacije (KV); vzorci so bili odvzeti v treh različnih časovnih intervalih ($t_1 = 0$, $t_2 = 40$ min, $t_3 = 24$ ur)

| oznaka konja | čas odvzema | | |
|---------------------------------|--------------|----------------|---------------|
| | $t_1 = 0$ | $t_2 = 40$ min | $t_3 = 24$ ur |
| KN-1 | 5,51 | 6,64 | 6,22 |
| KN-2 | 8,43 | 8,96 | 8,63 |
| KN-3 | 3,83 | 4,83 | 3,52 |
| KN-4 | 8,06 | 8,96 | 8,06 |
| KN-5 | 6,18 | 6,45 | 5,85 |
| KN-6 | 2,97 | 3,21 | 2,89 |
| KN-7 | 5,97 | 6,15 | 5,70 |
| KN-8 | 4,00 | 4,54 | 6,20 |
| KN-9 | 5,42 | 6,45 | 6,22 |
| KN-10 | 8,79 | 9,26 | 8,17 |
| \bar{x} [$\mu\text{kat/L}$] | 5,92 | 6,55 | 6,15 |
| SD [$\mu\text{kat/L}$] | 2,01 | 2,04 | 1,88 |
| KV (%) | 33,98 | 31,11 | 30,55 |

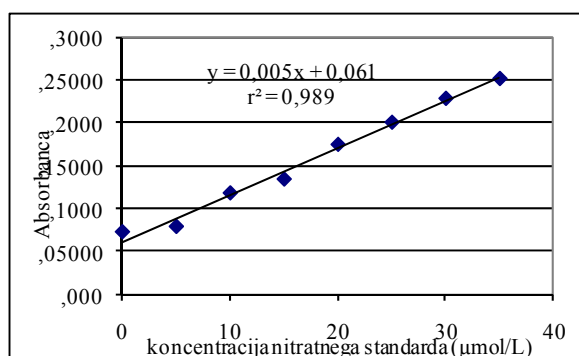


Slika 3: Povprečne vrednosti in SD aktivnosti LDH [μ kat/L] v serumskih vzorcih konj, odvzetih v treh različnih časovnih intervalih ($t_1 = 0$, $t_2 = 40$ min, $t_3 = 24$ ur)

4.4 REZULATATI MERITEV $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$, NO_2^- IN NO_3^- V PLAZMI

4.4.1 Umeritvena krivulja standardov $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$

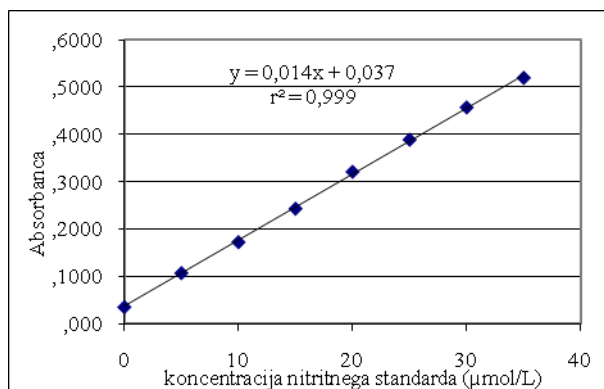
Slika 4 prikazuje umeritveno krivuljo, izdelano s pomočjo nitratnih standardov ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$) različnih koncentracij [$\mu\text{mol/L}$].



Slika 4: Umeritvena krivulja nitratnega standarda ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$); $\lambda = 540 \text{ nm}$

4.4.2 Umeritvena krivulja standardov NO_2^-

Slika 5 prikazuje umeritveno krivuljo izdelano s pomočjo nitritnih standardov (NO_2^-) različnih koncentracij [$\mu\text{mol/L}$].



Slika 5: Umeritvena krivulja nitritnega standarda (NO_2^-); $\lambda = 540 \text{ nm}$

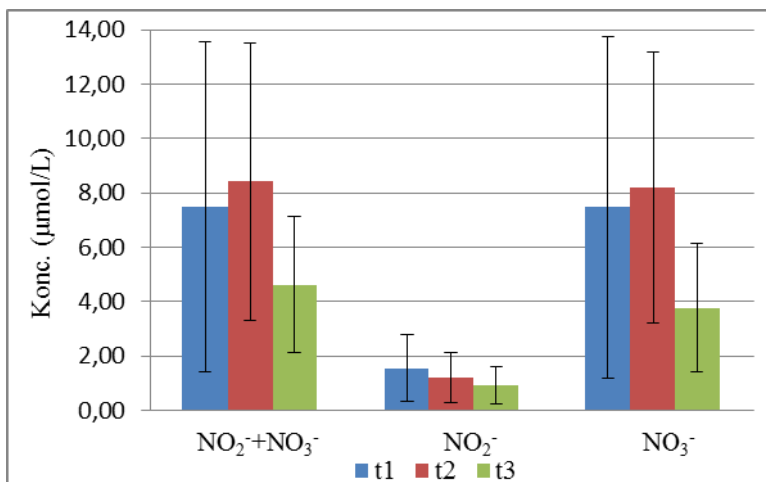
4.4.3 Koncentracije $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$, NO_2^- in NO_3^- v plazmi

Preglednica X prikazuje izmerjene koncentracije $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ [$\mu\text{mol/L}$] in NO_2^- [$\mu\text{mol/L}$] ter izračunane koncentracije NO_3^- [$\mu\text{mol/L}$], njihove povprečne vrednosti (\bar{x}), standardne deviacije (SD) in koeficiente variacije (KV) v plazemskih vzorcih konj, odvzetih v treh različnih časovnih intervalih ($t_1 = 0$, $t_2 = 40$ min, $t_3 = 24$ ur), slika 6 pa povprečne vrednosti in SD koncentracij $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ [$\mu\text{mol/L}$], NO_2^- [$\mu\text{mol/L}$] in NO_3^- [$\mu\text{mol/L}$] v obliki stolpčnega grafikona .

Preglednica X: Koncentracije $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ [$\mu\text{mol/L}$], NO_2^- [$\mu\text{mol/L}$] in NO_3^- [$\mu\text{mol/L}$] v plazemskih vzorcih konj, odvzetih v treh različnih časovnih intervalih ($t_1 = 0$, $t_2 = 40$ min, $t_3 = 24$ ur).

| oznaka konja | $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ [$\mu\text{mol/L}$]/ čas odvzema | | | NO_2^- [$\mu\text{mol/L}$]/ čas odvzema | | | NO_3^- [$\mu\text{mol/L}$]/ čas odvzema | | |
|--|---|-------------------|------------------|---|-------------------|------------------|---|-------------------|------------------|
| | $t_1 = 0$ | $t_2 = 40$ min | $t_3 = 24$ ur | $t_1 = 0$ | $t_2 = 40$ min | $t_3 = 24$ ur | $t_1 = 0$ | $t_2 = 40$ min | $t_3 = 24$ ur |
| KN-1 | 6,22 | 7,20 | 1,60 | 0,10 | 0,92 | 0,29 | 6,12 | 6,28 | 1,31 |
| KN-2 | 11,11 | 10,16 | 5,62 | 0,36 | 0,60 | 1,97 | 10,75 | 9,56 | 3,65 |
| KN-3 | 5,98 | 8,05 | 6,51 | 0,59 | 1,14 | 1,44 | 5,39 | 6,92 | 5,07 |
| KN-4 | 6,95 | 5,38 | 8,80 | 1,45 | 1,40 | 0,60 | 5,49 | 3,99 | 8,20 |
| KN-5 | 1,04 | 2,09 | / | 1,25 | 3,51 | 0,49 | / | / | / |
| KN-6 | 5,02 | 8,09 | 2,65 | 3,22 | 0,43 | 0,26 | 1,80 | 7,66 | 2,40 |
| KN-7 | 1,44 | 6,44 | / | 1,61 | 1,73 | 1,87 | / | 4,82 | / |
| KN-8 | 5,98 | 7,89 | 1,75 | 4,04 | 1,08 | 0,68 | 1,94 | 6,90 | 1,07 |
| KN-9 | 8,60 | 7,25 | 4,67 | 1,71 | 0,40 | 1,38 | 6,89 | 6,85 | 3,29 |
| KN-10 | 22,56 | 21,62 | 5,45 | 1,15 | 0,85 | 0,23 | 21,41 | 20,77 | 5,22 |
| \bar{x} [$\mu\text{kat/L}$] | 7,49 | 8,42 | 4,63 | 1,55 | 1,21 | 0,92 | 7,47 | 8,19 | 3,78 |
| SD [$\mu\text{kat/L}$] | 6,08 | 5,10 | 2,51 | 1,23 | 0,91 | 0,68 | 6,30 | 4,98 | 2,36 |
| KV (%) | 81,12 | 60,56 | 54,12 | 79,82 | 75,53 | 73,65 | 84,35 | 60,73 | 62,41 |

(/ manjkajoči rezultat)



Slika 6: Povprečne vrednosti in SD koncentracij NO₂⁻+NO₃⁻ [µmol/L], NO₂⁻ [µmol/L] in NO₃⁻ [µmol/L] v plazemskih vzorcih konj, odvzetih v treh različnih časovnih intervalih (t₁ = 0, t₂ = 40 min, t₃ = 24 ur).

4.5 REZULATATI MERITEV MDA V PLAZMI

4.5.1 Povprečna umeritvena krivulja standardov MDA

Iz koncentracij izbranih standardov MDA in izmerjenih površin vrhov standardov MDA smo izračunali enačbo premice za povprečno umeritveno krivuljo, in sicer s pomočjo enačbe 16. Iz izračunanih Pearsonovih koeficientov korelacije (r) za posamezne umeritvene krivulje, pa smo določili povprečno vrednost r^2 in podali še najnižjo in najvišjo vrednost r^2 .

$$\bar{y} = (\bar{k} \pm SD) * x + (\bar{n} \pm SD) \quad (\text{enačba 16})$$

Enačba premice za povprečno umeritveno krivuljo standardov MDA je:

$$\bar{y} = (774,87 \pm 42,39) * x + (116,75 \pm 88,66).$$

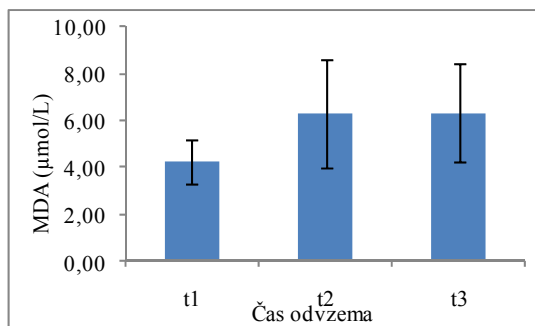
Povprečna vrednost r^2 je 0,994, [min:0,992 ; max:0,999] .

4.5.2 Koncentracije MDA v plazmi

Preglednica XI prikazuje izmerjene koncentracije MDA [$\mu\text{mol/L}$], njihove povprečne vrednosti (\bar{x}), standardne deviacije (SD) ter koeficiente variacije (KV) v plazemskih vzorcih konj, odvzetih v treh različnih časovnih intervalih ($t_1 = 0$, $t_2 = 40$ min, $t_3 = 24$ ur), slika 7 pa povprečne koncentracije MDA [$\mu\text{mol/L}$] v obliki stolpčnega grafikona.

Preglednica XI: Koncentracije MDA [$\mu\text{mol/L}$], njihove povprečne vrednosti (\bar{x}), standardne deviacije (SD) ter koeficienti variacije (KV) v plazemskih vzorcih konj, odvzetih v treh različnih časovnih intervalih ($t_1 = 0$, $t_2 = 40$ min, $t_3 = 24$ ur)

| oznaka konja | čas odvzema | | |
|---------------------------------|--------------|----------------|---------------|
| | $t_1 = 0$ | $t_2 = 40$ min | $t_3 = 24$ ur |
| KN-1 | 4,79 | 5,95 | 5,32 |
| KN-2 | 2,94 | 5,06 | 4,53 |
| KN-3 | 3,34 | 3,91 | 10,62 |
| KN-4 | 5,04 | 5,18 | 4,94 |
| KN-5 | 3,00 | 5,11 | 5,19 |
| KN-6 | 4,55 | 8,42 | 6,09 |
| KN-7 | 3,52 | 5,44 | 9,58 |
| KN-8 | 5,28 | 5,07 | 5,30 |
| KN-9 | 4,82 | 6,77 | 5,60 |
| KN-10 | 5,34 | 11,95 | 6,26 |
| \bar{x} [$\mu\text{mol/L}$] | 4,26 | 6,29 | 6,34 |
| SD [$\mu\text{mol/L}$] | 0,96 | 2,33 | 2,06 |
| KV (%) | 22,42 | 37,09 | 32,44 |



Slika 7: Povprečne vrednosti in SD koncentracije MDA [$\mu\text{mol/L}$] v plazemskih vzorcih konj, odvzetih v treh različnih časovnih intervalih ($t_1 = 0$, $t_2 = 40$ min, $t_3 = 24$ ur).

4.6 POVPREČNE KONCENTRACIJE PARAMETROV PRI TREH RAZLIČNIH ČASIH ODVZEMA KRVNIH VZORCEV

Preglednica XII prikazuje kumulativni pregled izračunanih povprečnih vrednosti koncentracij posameznih parametrov in njihovih SD pri treh različnih časih odvzema krvnih vzorcev ($t_1 = 0$, $t_2 = 40$ min, $t_3 = 24$ ur) ter statistično značilne razlike med njimi ($p < 0,05$).

Preglednica XII: Povprečne koncentracije posameznih parametrov in njihove SD pri treh različnih časih odvzema krvnih vzorcev ($t_1 = 0$, $t_2 = 40$ min, $t_3 = 24$ ur)

| izmerjeni parameter | čas odvzema | | |
|--|--------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|
| | $t_1 = 0$ | $t_2 = 40$ min | $t_3 = 24$ ur |
| | $\bar{x} \pm SD$ | $\bar{x} \pm SD$ | $\bar{x} \pm SD$ |
| AST [μ kat/L] | 4,93 \pm 0,78 ¹⁻² | 5,24 \pm 0,73 ^{1-2,2-3} | 4,92 \pm 0,68 ²⁻³ |
| CK [μ kat/L] | 3,02 \pm 0,46 ¹⁻² | 3,64 \pm 0,56 ¹⁻² | 3,41 \pm 0,59 |
| LDH [μ kat/L] | 5,91 \pm 2,01 ¹⁻² | 6,54 \pm 2,04 ¹⁻² | 6,15 \pm 1,88 |
| NO ₂ ⁻ in NO ₃ ⁻ [μ mol/L] | 7,49 \pm 6,07 | 8,42 \pm 5,10 | 4,63 \pm 2,50 |
| NO ₂ ⁻ [μ mol/L] | 1,55 \pm 1,23 | 1,21 \pm 0,91 | 0,92 \pm 0,68 |
| NO ₃ ⁻ [μ mol/L] | 7,47 \pm 6,03 | 8,19 \pm 4,98 | 3,78 \pm 2,36 |
| MDA [μ mol/L] | 4,26 \pm 0,95 ¹⁻² | 6,29 \pm 2,33 ¹⁻² | 6,34 \pm 2,06 |

Legenda: Statistično značilno ($p < 0,05$) se razlikujejo med seboj povprečne vrednosti parametrov pri treh različnih časih odvzema krvnih vzorcev ($t_1 = 0$, $t_2 = 40$ min, $t_3 = 24$ ur) z nadpisanimi številkami (1-2, 2-3)

4.7 KORELACIJE IZMERJENIH PARAMETROV

V preglednici XIII so prikazane korelacije (Pearsonovi koeficienti korelacije, r) med posameznimi parametri in njihove verjetnosti pri prvem času odvzema (t_1), v preglednicah XIV in XV pa korelacije pri drugem in tretjem času odvzema (t_2 in t_3) krvnih vzorcev.

Kot statistično značilne smo izbrali p vrednosti, ki so bile manjše od 0,05 (v krepkem tisku).

Preglednica XIII: Korelacije (Pearsonovi korelacijski koeficienti, r) med posameznimi parametri in njihove verjetnosti pri prvem času odvzema ($t_1 = 0$) krvnih vzorcev

| | r (verjetnost korelacij ob času $t_1 = 0$) | | | | | | |
|---|--|-------------------|-------------------|---|------------------------------|------------------------------|-------------------|
| | AST | CK | LDH | NO ₂ +NO ₃ ⁻ | NO ₂ ⁻ | NO ₃ ⁻ | MDA |
| AST | / | 0,311 (0,416) | 0,403 (0,248) | -0,157 (0,666) | 0,076 (0,835) | 0,064 (0,881) | -0,133 (0,715) |
| CK | 0,311 (0,416) | / | 0,734 (0,024) | 0,431 (0,246) | -0,301 (0,431) | 0,627 (0,132) | -0,360 (0,341) |
| LDH | 0,403 (0,248) | 0,734 (0,024) | / | 0,569 (0,086) | -0,520 (0,124) | 0,762 (0,028) | -0,017 (0,962) |
| NO ₂ +NO ₃ ⁻ | -0,157 (0,666) | 0,431 (0,246) | 0,569 (0,086) | / | -0,193 (0,592) | 0,977 (0,001) | 0,436 (0,208) |
| NO ₂ ⁻ | 0,076 (0,835) | -0,301 (0,431) | -0,520 (0,124) | -0,193 (0,592) | / | -0,466 (0,245) | 0,436 (0,207) |
| NO ₃ ⁻ | 0,064 (0,881) | 0,627 (0,132) | 0,762 (0,028) | 0,977 (0,001) | -0,466 (0,245) | / | 0,436 (0,207) |
| MDA | -0,133 (0,715) | -0,360 (0,341) | -0,017 (0,962) | 0,436 (0,208) | 0,436 (0,207) | 0,436 (0,207) | / |

Preglednica XIV: Korelacije (Pearsonovi korelacijski koeficienti, r) med posameznimi parametri in njihove verjetnosti pri drugem času odvzema ($t_2 = 40$ min) krvnih vzorcev

| | r (verjetnost korelacij ob času $t_2 = 40$ min) | | | | | | |
|---|--|------------------|------------------|---|------------------------------|------------------------------|-------------------|
| | AST | CK | LDH | NO ₂ +NO ₃ ⁻ | NO ₂ ⁻ | NO ₃ ⁻ | MDA |
| AST | / | 0,212 (0,557) | 0,339 (0,338) | -0,329 (0,354) | 0,498 (0,143) | -0,147 (0,706) | 0,041 (0,909) |
| CK | 0,212 (0,557) | / | 0,849 (0,002) | 0,523 (0,121) | 0,036 (0,922) | 0,485 (0,186) | 0,193 (0,594) |
| LDH | 0,339 (0,338) | 0,849 (0,002) | / | 0,395 (0,259) | 0,037 (0,919) | 0,409 (0,275) | 0,223 (0,536) |
| NO ₂ +NO ₃ ⁻ | -0,329 (0,354) | 0,523 (0,121) | 0,395 (0,259) | / | -0,486 (0,154) | 0,997 (0,001) | 0,802 (0,005) |
| NO ₂ ⁻ | 0,498 (0,143) | 0,036 (0,922) | 0,037 (0,919) | -0,486 (0,154) | / | -0,317 (0,406) | -0,329 (0,354) |
| NO ₃ ⁻ | -0,147 (0,706) | 0,485 (0,186) | 0,409 (0,275) | 0,997 (0,001) | -0,317 (0,406) | / | 0,831 (0,006) |
| MDA | 0,041 (0,909) | 0,193 (0,594) | 0,223 (0,536) | 0,802 (0,005) | 0,329 (0,354) | 0,831 (0,006) | / |

Preglednica XV: Korelacije (Pearsonovi korelacijski koeficienti, r) med posameznimi parametri in njihove verjetnosti pri tretjem času odvzema ($t_3 = 24$ ur) krvnih vzorcev

| | r (verjetnost korelacij ob času $t_3 = 24$ ur) | | | | | | |
|--|--|-------------------|-------------------|--|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------|
| | AST | CK | LDH | NO₂+NO₃⁻ | NO₂⁻ | NO₃⁻ | MDA |
| AST | / | 0,223 (0,535) | 0,429 (0,216) | 0,336 (0,416) | -0,257 (0,474) | 0,427 (0,291) | -0,606 (0,063) |
| CK | 0,223 (0,535) | / | 0,851 (0,002) | 0,480 (0,229) | 0,148 (0,683) | 0,456 (0,256) | -0,362 (0,304) |
| LDH | 0,429 (0,216) | 0,851 (0,002) | / | 0,256 (0,386) | 0,093 (0,799) | 0,338 (0,413) | -0,548 (0,101) |
| NO₂+NO₃⁻ | 0,336 (0,416) | 0,480 (0,229) | 0,256 (0,386) | / | 0,351 (0,394) | 0,965 (0,001) | 0,205 (0,626) |
| NO₂⁻ | -0,257 (0,474) | 0,148 (0,683) | 0,093 (0,799) | 0,351 (0,394) | / | 0,094 (0,825) | 0,173 (0,681) |
| NO₃⁻ | 0,427 (0,291) | 0,456 (0,256) | 0,338 (0,413) | 0,965 (0,001) | 0,094 (0,825) | / | 0,173 (0,681) |
| MDA | -0,606 (0,063) | -0,362 (0,304) | -0,548 (0,101) | 0,205 (0,626) | 0,173 (0,681) | 0,173 (0,681) | / |

5 RAZPRAVA

Rekreativni konji niso obremenjeni z vsakodnevno fizično vadbo, zato bi lahko izbrana fizična vadba, ki smo jo stopnjevali po programu »izmeničnega lonžiranja«, zanje predstavljala stres.

Z vadbo smo konjem, vključenim v raziskavo, povečali vnos kisika, kar lahko predstavlja dodaten vir RS. Te verjetno nastajajo primarno zaradi prenosa elektronov v dihalni verigi v mitohondrijih, pa tudi z drugimi mehanizmi (hipoksija, vnetje, idr.). Posledica delovanja RS je lahko povečan obseg LP. V primeru povečanega nastajanja RS, jih AS ni sposoben v celoti odstraniti, zato lahko pride do primarnih poškodb tkiv na mestih nastanka RS, npr. mitohondrijev oz. sekundarnih poškodb ostalih celičnih struktur, med drugimi tudi celičnih membran o čemer poročajo številne raziskave (19,20,22,24,25,27,30,31).

S prvim odvzemom krvnih vzorcev pred fizično vadbo konj ($t_1 = 0$) in meritvami AST, CK, LDH, NO_2^- , NO_3^- ter MDA v njih smo želeli določiti njihove bazalne vrednosti. Z naslednjim odvzemom (t_2), takoj po končani fizični vadbi, ki je trajala 40 minut, pa smo želeli ugotoviti, ali je prišlo do sprememb glede na bazalne vrednosti in ONS. S tretjim odvzemom (t_3), ki smo ga opravili 24 ur po končani fizični vadbi, smo nato želeli izvedeti, ali je bil 24 urni počitek dovolj, da so se omenjene encimske aktivnosti vrnile na nivo bazalnih vrednosti. Poleg tega smo z analizo korelacij med posameznimi parametri želeli poiskati morebitne povezave med njimi in na osnovi tega sklepati na potencialno povezanost med posameznimi procesi.

5.1 PRIMERJAVE OZNAČEVALCEV

5.1.1 Označevalci celičnih poškodb: AST, CK in LDH

Encimi AST, CK in LDH so pri konjih fiziološko prisotni v jetrih, srčnih in skeletnih mišicah, pljučih, krvi in drugod (45). Njihove aktivnosti se v serumu lahko zvišajo zaradi različnih vzrokov, med drugim tudi zaradi fizične vadbe, pri kateri prihaja do poškodb ali sprememb v membranah mišičnih celic (45).

Naši izsledki kažejo, da so se aktivnosti encimov AST, CK in LDH glede na prvi odvzem pri drugem statistično značilno zvišale. Kaže, da je zaradi fizične vadbe verjetno prišlo do sprememb v membranah mišičnih celic in posledičnega sproščanja encimov v krvni obtok. Podoben vpliv, vendar pri drugačnih fizičnih obremenitvah konj, so dokazali tudi v drugih raziskavah (27, 28, 33, 37, 38, 39, 41, 46).

Štiriindvajset ur po končani obremenitvi, so se izmerjene aktivnosti encima AST statistično značilno znižale in dejansko približale bazalnim vrednostim. To kaže, da se ta encim po tem času ni več sproščal iz celic. Nasprotno pa so v raziskavi dokazali Marlin D.J. in sodelavci (39), saj je bila aktivnost encima AST 16 ur po končani fizični vadbi še vedno nespremenjena. Razlog za nasprotujoče si rezultate je najverjetneje v različno zahtevni fizični vadbi med primerjanimi raziskavami nastalih v konjih, ki so bili vanje vključeni (športni in ne rekreativni).

V naši raziskavi so ostale aktivnosti encimov CK in LDH pri tretjem odvzemu podobne tistim, ki smo jih izmerili pri drugem času odvzema. Podobne rezultate so dobili tudi Chiardia E. in sodelavci (41) ter Hargreaves B.J. in sodelavci (46), ki pa so izbrali drugačno fizično vadbo konj, kot mi.

Zvišane aktivnosti mišičnih encimov v krvi po fizični vadbi, ki smo jo izbrali, bi lahko bile posledica sprememb celičnih membran mišičnih celic, ki običajno postanejo bolj prepustne in zato omogočajo sproščanje encimov v kri (45). Številni avtorji povezujejo zvišane serumske aktivnosti mišičnih encimov s povečanim oksidativnim stresom, ki ga lahko sproži fizična vadba (27,28,38,41,46).

5.1.2 Označevalci dušikovega oksida: NO_2^- in NO_3^-

Kratkoživi NO^\cdot nastaja v različnih tkivih in se hitro oksidira do NO_2^- in NO_3^- . Njegov delež je sorazmeren njuni vsoti. Tako smo s pomočjo umeritvenih krivulj nitratnih in nitritnih standardov z izmerjenimi vrednostmi absorbanc $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ v plazemskih vzorcih konj izračunali njuno vsoto koncentracij, poleg tega pa tudi količino NO_2^- , iz razlik obeh koncentracij pa še količino NO_3^- . Povprečne izračunane vrednosti vsaj delno kažejo na zvišanje koncentracij $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ in NO_3^- , med prvim in drugim odvzemu krvi, vendar pa tega statistično nismo uspeli dokazati. Pri tretjem odvzemu smo opazili trend znižanja vrednosti pod bazalne nivoje. Značilne spremembe NO_2^- in NO_3^- so

dokazali Ceylan E. in sodelavci (34), vendar pa pri drugačni intenzivnejši fizični vadbi konj.

5.1.3 Označevalec lipidne peroksidacije: MDA

Malondialdehid je kot najpomembnejši končni produkt lipidne peroksidacije (LP) dober pokazatelj njene intenzivnosti. Povišane koncentracije MDA v plazmi nam pokažejo ali je izbrana fizična vadba povzročila nastanek RS, ki so nato izzvali LP, ali je učinek LP povezan z intenzivnostjo fizične obremenitve in ali je proces izločanja končnih produktov LP počasen ali hiter.

Pri fizični vadbi, ki smo jo izbrali, je verjetno zaradi povečanega nastajanja RS prišlo do povečane LP, kar smo dokazali s primerjavo koncentracij MDA pred in takoj po končani vadbi. Štiriindvajset ur po končani fizični vadbi pa so koncentracije MDA ostale približno enake tistim, izmerjenim pri drugem odvzemu. Menimo, da je izbrana fizična vadba privedla do LP in oksidativnega stresa v takšnem obsegu, da se je MDA še 24 ur po fizični obremenitvi sproščal v krvni obtok. Zvišane koncentracije MDA v plazmi konj še 18 ur po končani, sicer drugačni fizični vadbi, so dokazali tudi Chiardia E. in sodelavci (41).

5.1.4 Korelacije med označevalci celičnih poškodb, dušikovega oksida in lipidne peroksidacije

Korelacije med temi označevalci smo ugotovili s Pearsonovimi korelacijskimi koeficienti (r). V kolikor imata dva označevalca pozitivno korelacijo ($+r$), ugotavljamo ob istem času odvzema krvnega vzorca, da to pomeni, da se s povečanjem aktivnosti/koncentracije enega označevalca poveča tudi aktivnost/koncentracija drugega. Kadar imata dva označevalca negativno korelacijo ($-r$), ob istem času odvzema krvnega vzorca pa to pomeni, da s povečanjem aktivnosti/koncentracije enega označevalca upada aktivnost/koncentracija drugega in obratno. S pomočjo teh analiz smo želeli dokazati povezavo med različnimi označevalci in s tem med posameznimi procesi, ki so posledica fizične vadbe.

Pred fizično vadbo konj smo kot statistično značilne dokazali pozitivne korelacije med: LDH in CK, LDH in NO_3^- ter vsoto koncentracij $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ in količino NO_3^- . Pri vseh treh odvzemih smo dokazali statistično značilne pozitivne korelacije le med encimoma CK in LDH. To je verjetno posledica dejstva, da se oba encima sproščata v kri iz istih celic.

Prav tako smo v vseh časovnih točkah odvzemov uspeli dokazati statistično značilne pozitivne korelacije med vsoto koncentracij $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ in količino NO_3^- , kar je smiselno, saj predstavlja količina NO_3^- del skupne koncentracije $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$. Vsota koncentracij $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ pa ni korelirala s količino NO_2^- , najverjetneje predvsem zato, ker je slednja bistveno manjša od koncentracije NO_3^- in je zato povezanost težje dokazljiva. Za stanje pred fizično vadbo konj lahko zaključimo, da morebitne poškodbe mišičnih celic vsekakor niso povezane z LP, prav tako pa tudi ne s povečano tvorbo dušikovega oksida.

Takoj po fizični vadbi pa smo dokazali statistično značilne pozitivne korelacije med aktivnostma CK in LDH, vsoto koncentracij $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ in količino NO_3^- , nivoje MDA in vsoto koncentracij $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ ter količinama MDA in NO_3^- . Na podlagi naših izsledkov lahko zaključimo, da je LP povezana z NO^\cdot . Naši rezultati niso pokazali korelacij med označevalci celičnih poškodb in NO^\cdot ter označevalci celičnih poškodb in LP. Zato menimo, da s fizično vadbo konj povzročene poškodbe mišičnih celic niso bile posledica povečanega nastajanja NO^\cdot , prav tako pa tudi ne povečanega obsega LP. Predvidevamo, da je bilo povečano sproščanje encimov iz mišičnih celic posledica večje prepustnosti celičnih membran, ki jih je povzročila fizična vadba (45).

Štiriindvajset ur po fizični vadbi konj smo uspeli dokazati le statistično značilno korelacije med aktivnostima LDH in CK ter vsoto koncentracij $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ in količino NO_3^- , tako kot pred in takoj po fizični obremenitvi živali.

6 SKLEPI

Z izbrano fizično vadbo konj smo povzročili spremembe v prepustnosti membran skeletnih mišičnih celic, saj smo takoj po končani fizični obremenitvi izmerili porast aktivnosti mišičnih encimov AST, CK in LDH.

Izbrana fizična vadba konj ni vplivala na obseg nastajanja NO[•], saj se koncentraciji njegovih označevalcev (NO₂⁻ in NO₃⁻) po vadbi nista povečali.

Med fizično obremenitvijo konj je prišlo do aktivacije LP, saj smo takoj po končani vadbi izmerili porast koncentracij MDA. Količine MDA, izmerjene 24 ur po končani fizični aktivnosti so ostale približno enake tistim, izmerjenim takoj po končani vadbi, kar kaže na počasen proces izločanja končnih produktov LP.

Dokazali smo korelacije med aktivnostmi CK in LDH pri vseh treh časih odvzemov krvnih vzorcev, kar kaže na to, da sta se oba encima sočasno sproščala iz mišičnih celic v krvni obtok.

Povezanost smo dokazali tudi med koncentracijama NO₂⁻+NO₃⁻ in količino NO₃⁻, in sicer prav tako v vseh treh različnih časih odvzetih krvnih vzorcih, kar je smiselno, saj predstavlja količina NO₃⁻ del skupne koncentracije NO₂⁻+NO₃⁻.

Dokazali smo še korelacijo med koncentracijo NO₂⁻+NO₃⁻ in količino NO₃⁻ ter MDA in sicer takoj po končani izbrani fizični vadbi konj, iz česar bi lahko sklepali na povezavo med LP in nitrozativnim stresom.

Takoj po zaključku izbrane fizične vadbe konj nismo uspeli dokazati korelacije med aktivnostmi mišičnih encimov in koncentracijo označevalca lipidne peroksidacije MDA ter med aktivnostjo mišičnih encimov in koncentracijama označevalcev NO[•]. Zato lahko sklepamo, da poškodbe mišičnih celic, ki jih je pri konjih povzročila fizična vadba, niso posledica delovanja NO[•], prav tako tudi ne povečanega obsega LP, temveč bi lahko bile posledica normalnega fiziološkega odziva na izbrano fizično aktivnost.

Z izbrano fizično vadbo rekreativnih konj smo očitno povzročili spremembe v membranah mišičnih celic in v obsegu LP, vendar pa ta aktivnost ni bila dovolj intenzivna, da bi

povzročila oksidativno/nitrozativni stres v mišičnih celicah v takem obsegu, da bi lahko dokazali povezavo med omenjenimi procesi.

7 LITERATURA

1. Halliwell B, Gutteridge JMC: Free radicals in biology and medicine, 4th edition. Oxford University Press, 2007: 1-9, 21-23, 53-78, 79-81, 106-108, 187-267, 286-293, 316-325, 392-394
2. Manček B, Pečar S: Radikali in zaščita pred poškodbami z radikali v bioloških sistemih. Farmaceutski Vestnik 2001; 52:133-44
3. El-Bahr SM: Biochemistry of free Radicals and Oxidative Stress. Science Illustration 2013; 5:111-117
4. Osredkar J: Oksidativni stres. Zdravstveni Vestnik 2012; 81:393-406
5. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M: Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-Biological Interactions 2006; 160:1-40
6. Rahman I, Biswas SK, Kode A: Oxidant and antioxidant balance in the airway and airway disease. European Journal of Pharmacology 2006; 533:222-239
7. Dröge W: Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. Physiological reviews 2002; 82:47-95
8. Art T, Lekeux P: Exercise-induced physiological adjustment to stressful conditions in sport horses. Livestock productio science 2005; 92:101-111
9. Valko M, Leibfritz D, Mancol J, cronin MTD, Mazur M, Telser J: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disesae. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 2007;39:44-84

10. Martinez-Cayuela M: Oxygen free radicals and human disease. *Biochemie* 1995; 77:147-161
11. Rao PS, Kalva S, Ywrramilli A, Mamidi S: Free Radicals and Tissue Damage: Role of Antioxidants. *Free radicals and Antioxidants* 2011;4:2-7
12. Stamler JS, Meissner G: Physiology of nitric Oxide in Skeletal Muscle. *Physiological reviews* 2001; 81:209-237
13. Wink DA, Mitchell JB: Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radical Biology & Medicine* 1998, 25:434-456
14. Dedon PC, Tannenbaum SR: Reactive nitrogen species in the chemical biology of inflammation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2004; 423:12-22
15. Thomas DD et al.: The chemical biology of nitric oxide: Implication in cellular signaling. *Free Radical Biology & Medicine* 2008; 45:18-31
16. Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PLM: Nitrite and Nitrate Determination in Plasma A Critical Evaluation. *Clinical Chemistry* 1995; 41/6:892-896
17. Radi R, Cassina A, Hodora R, Quijano C, Castro L: Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radical Biology & Medicine* 2002, 33:1451-1464
18. Kirschvink N, Moffarts B, Lekeux P: The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *The Veterinary Journal*, doi:10.1016/j.tvjl.2007.07.003
19. Soffler C: Oxidative stress. *Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*, Saunders, Editor: Vassallo John, 2007; 23:135-157

20. Halliwell B, Chirico S: Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American journal of clinical nutrition* 1993; 57:715-725
21. Viitala PE, Newhouse IJ, LaVoie N, Gottardo C: The effects of antioxidant vitamin supplementation on resistance exercise induced lipid peroxidation in trained and untrained participants. *Lipid in Health and Disease* 2004; 3:14 doi:10.1186/1476-511X-3-14
22. Deaton CM, Marlin DJ: Exercise-Associated Oxidative Stress. *Clinical Techniques in Equine Practice* 2003; 2:278-291
23. Mates JM, Perez-Gomez C, Castro I: Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clinical Biochemistry*, 1999; 8:595-603
24. Ji LL: Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients. *Free Radical Biology & Medicine* 1995; 18:1079-1086
25. Ji LL, Leichtweis S: Exercise and oxidative stress: sources of free radicals and their impact on antioxidant system. *Age* 1997; 20:91-106
26. Benzie IFF: Evolution of dietary antioxidants. *Comparative Biochemistry and Physiology* 2002; 136:113-126
27. Moffarts B, Kirschvink N, Art T, Pincemail J, Lekeux P: Effect of oral antioxidant supplementation on blood antioxidant status in thoroughbred horses. *The Veterinary Journal* 2005; 169:65-74
28. Williams CA, Kronfeld DS, Hess TM, Sakert KE, Waldron JN, Crandall KM, Hoffman RM, Harris PA: Antioxidant supplementation and subsequent oxidative stress of horses during an 80-km endurance race. *American Society of Animal Science* 2004; 82:588-594

29. Muir W: Recognizing and treating pain in horses. In: Reed SM, Bayly WM, Sellon DC, eds. Equine internal medicine. 2nd ed. St Louis: Saunders, 2004:1530-1541
30. Powers SK, Bradley nelson W, Hudson MB: Exercise-induced oxidative stress in humans: Cause and consequences. Free Radical Biology & Medicine 2011; 51:942-950
31. Banerjee AK, Mandal A, Chanda D, Chakraborti S: Oxidant, antioxidant and physical exercise. Molecular and Cellular Biochemistry, 2003; 253:307-312
32. Sachdev S, Davies KJA: Production, detection, and adaptive responses of free radicals in exercise. Free Radical Biology & Medicine 2008; 44:215-223
33. Urso ML, Clarkson PM: Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. Toxicology 2003;189:41-54
34. Ceylan E, Dede S, Degar Y, Yörük I: Investigation of the Effects of Carrying Heavy Load on Prooxidation/Antioxidant Status and Vitamin D3 in healthy Horses. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances 2009, 4: 41-46
35. Maranon G, et al.: Effect of Competition on Nitric Oxide, Carbon Monoxide, and Cyclic Guanosine Monophosphate Levels in trainin Horses. Journal of Equine Veterinary science 2009; 29:627-632
36. Lauer T, Kleinbongard P, Kelm M: Index of NO Bioavailability in Human Blood: News in physiological science 2002; 17:251-255

37. Siciliano PD, Lawrence LM, Danielsen K, Powell DM, Thompson KN: Effect of conditioning and exercise type on serum creatine kinase and aspartate aminotransferase activity. *Equine Veterinary Journal* 1995, 18:243-247
38. Al-Qudah KM, Al-Majali AM: Status of biochemical and antioxidant variables in horses before and after long distance race. *Revue Med Vet* 2006; 6:307-312
39. Marlin DJ et al.: Changes in Circulatory Antioxidant Status in Horses during Prolonged Exercise. *The Journal of Nutrition* 2002;132:1622-1627
40. Tarpey MM, Wink DA, Grisham MB: Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo consideration. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 2004; 286:431-444
41. Chiaradia E, Avellini L, Rueca F, Spaterna A, Porciello F: Physical exercise, oxidative stress and muscle damage in racehorses. *Comparative biochemistry and physiology* 1998; 119:833-836
42. Lykkesfeldt J, Svensen O: Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. *The Veterinary Journal* 2007; 173:502-511
43. Pala FS, Gürkan H: The role of free radicals in ethiopathogenesis of diseases: *Advances in Molecular Biology* 2008; 1:1-9
44. Štraus B: *Medicinska biokemija*, 2. izdaja, Medicinska naklada, Zagreb 1992: 432, 452-464, 477-508
45. Kingston JK: Hematologic and serum biochemical response to exercise and training. In: Hinchliff KW, Kaneps AJ, Geor RJ, eds. *Equine sport medicine and surgery*. Edinburg: Saunders, 2004: 939-948

- 46.Hargreaves BJ, Kronfeld DS, Waldron JN, et al: Antioxidant status and muscle cell leakage during endurance exercise. Equine veterinary journal. Supplementation 2002; 34:116-121
- 47.Bryan NS: Nitrite in nitric oxide biology: Cause or consequence? Free Radical Biology & Medicine 2006; 41:691-701
- 48.Omar SA, Artime E, Webb AJ: A comparison of organic and inorganic nitrites/nitrates. Nitric Oxide 2012; 26:229-240
- 49.Czauderna M, Kowalczyk J, Marounek M: The simple and sensitive measurement of malondialdehyde in selected specimens of biological origin and some feed by reversed phase high performance liquid chromatography. Journal of Chromatography B 2011; 879:2251-2258
- 50.Čvan M: Vpliv protiepileptičnih učinkovin na oksidativni stres v celični liniji limfocitov B, Diplomsko delo, Ljubljana 2013: 29-30
- 51.Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA