

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Blaž NEMANIČ

ZAŠČITA PRED OKSIDATIVNIM STRESOM ŠPORTNIH KONJ

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

DEFENCE MECHANISMS AGAINST OXIDATIVE STRESS IN SPORT HORSES

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija Kmetijstvo - zootehnika. Opravljeno je bilo na Katedri za prehrano Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za dodiplomski študij Oddelka za zootehniko je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Janeza Salobirja.

Recenzent: prof. dr. Andrej Lavrenčič

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Ivan ŠTUHEC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Janez SALOBIR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Andrej LAVRENČIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora: 29.06.2010

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

Blaž Nemanič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 636.1.084/.087(043.2)=163.6
KG	konji/prehrana živali/oksidativni stres/antioksidanti
KK	AGRIS L51/5120
AV	NEMANIČ, Blaž
SA	SALOBIR, Janez (mentor)
KZ	SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI	2010
IN	ZAŠČITA PRED OKSIDATIVNIM STRESOM ŠPORTNIH KONJ
TD	Diplomska naloga (univerzitetni študij)
OP	X, 54 str., 2 pregl., 16 sl., 119 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	<p>Prosti radikali so nestabilne in zelo reaktivne oblike kisikovih atomov, molekul ali ionov z vsaj enim neparnim elektronom. Kadar se ravnotežje poruši v prid prostih radikalov, kar imenujemo oksidacijski stres, pride do poškodb celičnih struktur. Ob normalni celični presnovi v organizmu nastajajo tudi reaktivne kisikove spojine. Reaktivne kisikove spojine so sposobne poškodovati DNK, lipide, beljakovine in ogljikove hidrate. To lahko vodi do nastanka različnih obolenj, kot so obolenja srca in ožilja, bolezni dihal, sklepov, mastitis itd. Oksidacijski stres povzroča tudi fizična obremenitev. Namen naloge je bil prikazati raziskave o pomenu dodajanja antioksidantov pri fizično aktivnih konjih. Raziskave drugih avtorjev kažejo, da kombinacije različnih antioksidantov, kot so vitamin E, vitamin C in elementi v sledovih, lahko oksidacijski proces v veliki meri zmanjšajo in s tem preprečijo možnost obolenj. Iz pregleda literature smo ugotovili, da konji, izpostavljeni večtedenskim fizičnim naporom, potrebujejo približno do 300 IE/kg SS obroka vitamina E za vzdrževanje koncentracije vitamina E na ustreznem nivoju v krvi in mišičnem tkivu, priporočila za vitamin C niso določena saj konji vitamin C lahko sintetizirajo sami. Za 500 kg težkega, fizično aktivnega, konja so dnevne potrebe po bakru okoli 86 mg, potrebe po cinku 236 mg Zn in potrebe po selenu od 1 do 1,25 mg.</p>

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 636.1.084/.087(043.2)=163.6
- CX horses/animal nutrition/oxidative stress/antioxidants
- CC AGRIS L51/5120
- AU NEMANIČ, Blaž
- AA SALOBIR, Janez (supervisor)
- PP SI-1230 Domžale, Groblje 3
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Animal Science
- PY 2010
- TI DEFENCE MECHANISMS AGAINST OXIDATIVE STRESS IN SPORT HORSES
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO X, 54 p., 2 tab., 16 fig., 119 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Free radicals are unstable and very reactive forms of oxygen atoms, molecules or ions, with at least one odd electron. When imbalance occurs in favour of the free radicals, which is called oxidative stress, cell structures are damaged. Reactive oxygen species are also formed at normal cell metabolism in organism. Reactive oxygen species are able to damage DNA, lipids, proteins and carbohydrates. This can lead to emergence of various diseases, such as cardiovascular diseases, respiratory diseases, joint problems, mastitis, etc. Oxidative stress can also be caused by physical overload. The aim of this paper was to present research work about the significance of adding antioxidants to active horses. Examined researches have shown that not many published papers exist on this matter. However, available researches show that combinations of various antioxidants, such as vitamin E, vitamin C and elements in traces can largely reduce oxidative processes and thus prevent the occurrence of diseases. Daily requirements for the weight of 500 kg horses in training are up to 300 IU/kg DM for vitamin E. Requirements for vitamin C are not set because horses can produce vitamin C by themselves. 86 mg of copper, 236 mg of zinc, and 1 to 1.25 mg of selenium are required to maintain the concentration in blood and muscle tissue.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI).....	III
Key Words Documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Okrajšave in simboli	X
1 UVOD.....	1
2 PROSTI RADIKALI IN OKSIDATIVNI STRES.....	2
3 OBRAMBNI MEHANIZMI	8
3.1 VITAMIN C	12
3.2 VITAMIN E	13
3.3 ELEMENTI, KI SO POMEMBNI ZA SINTEZO ANTIOKSIDANTSKIH ENCIMOV.....	14
3.3.1 Cink (Zn).....	14
3.3.2 Baker (Cu)	16
3.3.3 Selen (Se).....	16
3.4 SINERGIJSKO DELOVANJE RAZLIČNIH ANTIOKSIDANTOV IN ANTIOKSIDANTSKIH SISTEMOV	19
4 ŠKODLJIV VPLIV REAKTIVNIH KISIKOVIH SPOJIN IN MERITVE OKSIDATIVNEGA STRESA IN POŠKODB	21
5 VPLETENOST OKSIDATIVNEGA STRESA V NEKATERE BOLEZNI PRI PERUTNINI, PRAŠIČIH, GOVEDU IN KONJIH.....	24
5.1 OKSIDATIVNI STRES PRI PERUTNINI.....	24
5.2 OKSIDATIVNI STRES PRI PRAŠIČIH.....	24
5.3 OKSIDATIVNI STRES PRI GOVEDU	25

5.4	OKSIDATIVNI STRES PRI KONJIH.....	26
5.4.1	Obolenja sklepov.....	26
5.4.2	Vpliv antioksidantov na konje, ki imajo težave s ponavljajočo obstrukcijo dihalnih poti.....	26
6	OKSIDATIVNI STRES IN FIZIČNA OBREMENITEV.....	28
7	UČINKI RAZLIČNIH ANTIOKSIDANTOV PRI FIZIČNI OBREMENITVI.....	34
7.1	GLUTATION.....	34
7.2	VITAMIN E.....	34
7.3	VPLIV DODATKA VITAMINA E IN SELENA NA VSEBNOST VITAMINA E V KRVI IN IZLOČANJE MDA V PLAZMI KONJ PO FIZIČNI OBREMENITVI.....	36
7.4	VITAMIN C.....	38
7.5	VPLIV VITAMINA E NA ANTIOKSIDANTSKI STATUS PRI KONJIH.....	38
7.6	GLUTAMIN.....	40
7.7	DODAJANJE KOMBINACIJE ANTIOKSIDANTOV.....	41
8	SKLEPI.....	44
9	POVZETEK.....	45
10	VIRI.....	46

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Dnevne potrebe konj (odrasla telesna masa 500 kg NRC 2005)	18
Preglednica 2: Korelacije med povprečno hitrostjo in biokemijskimi spremenljivkami na koncu fizične obremenitve, med biokemijskimi spremenljivkami pred začetkom in koncem fizične obremenitve in med vsemi biokemijskimi spremenljivkami na koncu fizične obremenitve (n=40)	31

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1:Ravnovesje med antioksidanti in ROS (prirejeno po Deaton in Marlin, 2003)	3
Slika 2:Porušeno ravnovesje med antioksidanti in ROS (prirejeno po Deaton in Marlin, 2003).....	5
Slika 3:Porušeno ravnovesje med antioksidanti in ROS zaradi motene antioksidantske obrambe (prirejeno po Deaton in Marlin, 2003).....	6
Slika 4:Neravnovesje med ROS in antioksidanti ob pojavu bolezni (prirejeno po Deaton in Marlin, 2003).....	7
Slika 5:Neravnovesje med glutationom in askorbinsko kislino (prirejeno po Deaton in Marlin, 2003).	7
Slika 6:Odstranjevanje kisikovih prostih radikalov in drugih reaktivnih spojin v celicah sesalcev (prirejeno po Gutteridge in Halliwell, 1994; Fang in sod., 2002: 875)	10
Slika 7:Vpliv naravnega in sintetičnega vitamina E na koncentracijo α -tokoferola v plazmi (prirejeno po Gansen in sod., 2001)	14
Slika 8:Shema možnega mehanizma sinergističnega delovanja med vitaminom E, vitaminom C in β - karotenom in njihova regeneracija (prirejeno po Niki, 1991: 1122; Niki in sod.,1995: 1326).....	20
Slika 9:Shematski prikaz celične obrambe proti oksidativnim poškodbam celic (prirejeno po Lykkesfeldt in Svendsen, 2007)	22
Slika10:Vpliv dodatka mešanice vitamina C, vitamina E in selena, na koncentracijo askorbinske kisline v plazmi v času počitka in fizične obremenitve (prirejeno po Deaton in sod., 2004).....	27
Slika 11:Vpliv dodatka mešanice vitamina C, vitamina E in selena, na koncentracijo α -tokoferola v plazmi v času počitka in fizične obremenitve (prirejeno po Deaton in sod., 2004).....	28
Slika 12:Vplivi obremenitve konja na koncentracijo vitamina C, TGSH, in TBARS v plazmi (prirejeno po Marlin in sod., 2002)	30
Slika 13:Povprečna koncentracija α -tokoferola v plazmi konj, krmljenih s krmo z različno koncentracijo vitamina E (v IE/kg/SS) (prirejeno po Siciliano in sod.,1997)	35
Slika 14:Povprečna koncentracija α -tokoferola v mišicah konj, krmljenih s krmo z različno koncentracijo vitamina E (v IE/kg/SS) (prirejeno po Siciliano in sod.,1997)	36

Slika 15: Vsebnost malondialdehida v plazmi konj v 1.testu na začetku poskusa in v 2. testu, po 70 dneh obremenitve (prirejeno po Avellini in sod., 1999)	37
Slika 16: Vsebnost vitamina E v plazmi konj v 1. testu in v 2. testu po 70 dneh treninga in oskrbovanja z dodatki (prirejeno po Avellini in sod., 1999)	37
Slika 17:Koncentracija tokoferola v plazmi kobil, ki so jim dodajali 1500 IE viramina E na dan (prirejeno po Gard, 2003, cit. po Kane, 2010)	41

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ATP	adenozin trifosfat
ACW	antioksidantska kapaciteta v maščobah topnih komponent
ACL	antioksidantska kapaciteta v vodi topnih komponent
B	betakaroten
B [·]	konjugirani polienski radikal iz β-karotena
BO ₂	β-karoten peroksilni radikal
BOOH	β-karoten hidroperoksid
C	vitamin C
CAT	katalaza
CH ₂	metilna skupina
Cl ⁻	klor
CPK	kreatin fosfokinaza
Cu	baker
Cu(Zn)SOD	citoplazemska superoksid dizmutaza
DHA	dehidroaskorbat
DMSO	dimetil sulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kislina
E	vitamin E
E [·]	tokoferilni radikal
e ⁻	elektron
ESR	electron spin resonance
Fe ²⁺	železov 2+ ion
Fe ³⁺	železov 3+ ion
FRAP	ferric reducing-antioxidant power
GS-GS	oksidiran glutation
GSH	glutation
(GSH) ²	glutation sintetaza
GSH-Px	encim glutation peroksidaza
GSH-R	encim glutation reduktaza
GSSG	oksidiran glutation
GRR	glutation redoks razmerje
H ₂	vodik
H ₂ O	voda
H ₂ O ₂	vodikov peroksid
HOCl	hipoklorna kislina
HPLC	high pressure liquid chromatography
IE	internacionalna enota

L [·]	lipidni radikal
LH	maščobna kislina
LO [·]	aloksilni radikal
LO ₂	lipidni peroksilni radikal
LOO [·]	peroksilni radikal
LOH	lipidni alkohol
LOOH	lipidni hiperosid
MDA	malondialdehid
MDA	monodehidroaskorbat
mg	miligram
MnSOD	encimmitohondrijska superoksid dizmutaza
NAC	N-acetilcistein
NAD ⁺	nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH	nikotinamid dinukleotid fosfat
NO [·]	dušikov oksid
NRC	national reasearch council
O ₂ ^{-·}	superoksidni anion
O ₂ ^{·-}	superoksid
OCl ⁻	hipokloridni ion
OH [·]	hidroksilni radikal
OH ⁻	hidroksid
ONOO ⁻	peroksinitrit
PUFA	večkrat nenasičene maščobne kisline
ROOH	hidroperoksid
ROS	reaktivne kisikove spojine
Se	selen
SOD	superoksid dizmutaza
TAS	skupni antioksidantski status
TBARS	tiobarbiturne reaktivne substance
TEAC	trolox equivalent antioxidant capacity
TGSH	skupni glutation v rdečih krvničkah
TM	telesna masa
TRAP	total radical-trapping antioxidant parameter
UV sevanje	ultraviolečno sevanje
Zn	cink

1 UVOD

Vse celice živijo v aerobnih pogojih, zato so ves čas izpostavljene številnim oksidantom. Nastajanje oksidantov pa lahko vodi do oksidacijskih poškodb. Oksidanti so molekule, ki so vključene v mnoge procese v organizmu, ki povzročajo vnetja in poškodbe. Ob normalni celični presnovi v organizmu nastajajo tudi reaktivne kisikove spojine (ROS), med katere, spadajo: vodikov peroksid, lipidni vodikov peroksid in prosti vodik.

Reaktivne kisikove spojine so sposobne poškodovati DNK, lipide, beljakovine in ogljikove hidrate, kar lahko vodi do nastanka različnih obolenj. Zaradi stalne izpostavljenosti različnim oksidantom so aerobni organizmi razvili način, kako se pred oksidativnim stresom primerno zaščititi. V obrambni mehanizem spadajo številni encimi, elementi v sledovih in vitamini, ki so nujno potrebni za obstoj in normalno delovanje celotnega organizma.

V diplomski nalogi smo se osredotočili na pojav oksidativnega stresa pri konjih. Oksidativni stres lahko pri konjih predstavlja resen problem, saj so dandanes konji pogostokrat izpostavljeni zahtevnim treningom in tekmovanjem, da bi zadostili naši želji po uspehu. Za doseg optimalne fizične pripravljenosti in zdravja je konje potrebno ustrezno krmiti, da bi se izognili morebitnim boleznim in poškodbam.

Z ustreznim dodajanjem antioksidantov, kot so vitamin E, vitamin C in elementi v sledovih, lahko oksidativne procese v veliki meri zmanjšamo, s tem preprečimo možnost obolenj. S pravilnim krmljenjem in predvsem znanjem lahko preprečimo škodo, ki jo povzroča oksidativni stres, vendar moramo prehrano vsakemu konju prilagoditi posebej.

2 PROSTI RADIKALI IN OKSIDATIVNI STRES

Oksidativni stres povzročajo nestabilne in zelo reaktivne oblike kisikovih atomov, molekul in ionov z vsaj enim neparnim elektronom. Stopnja reaktivnosti prostih radikalov je odvisna od njihove "želje", da privlačijo elektron z nasprotnim spinom (Asmus in Bonifacic, 2000). Neradikalni derivati kisika, kot sta ozon in vodikov peroksid, sta kljub temu, da sta manj reaktivna, vseeno sposobna povzročiti oksidativne poškodbe. Proste radikale in neradikalne derivate kisika s skupnim imenom imenujemo reaktivne kisikove spojine (ROS) (Asmus in Bonifacic, 2000). Rezultat redukcije kisika je nastanek superoksidnih anionov ($O_2^{\cdot -}$) (enačba 1).



Superoksidni anion ima bodisi oksidacijsko funkcijo, kjer se le ta oksidira do vodikovega peroksida (H_2O_2) ali redukcijsko funkcijo, kjer se oksidira nazaj do kisika. Iz dveh superoksidnih anionov dismutaze nastane vodikov peroksid in kisik (enačba 2).



Reakcija lahko poteka spontano vendar pa je stopnja reakcije večja, kadar jo katalizira superoksid dismutaza (SOD) ($1,9$ do $2,3 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ proti $1,2 \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Butler in Halliwell, 1982; Forman in Fridovich, 1973; McCord in Fridovich, 1969). Vodikov peroksid lahko tvori veliko število oksidantov, med najbolj reaktivna dva spadata hidroksilni radikal OH^{\cdot} in hipoklorna kislina ($HOCl$).

Hidroksilni radikal nastaja ob prisotnosti tranzitne kovine npr. železa (Fe^{2+}), ko superoksid reagira z vodikovim peroksidom. Taka reakcija je poznana pod imenom Haber-Weissova reakcija (Halliwell in Gutteridge, 1986) (enačbe 3, 4, 5). Hipoklorna kislina pa nastaja iz vodikovega peroksida in klorida to reakcijo katalizira mieloperoksidaza (enačba 6) (Babior, 2000).



Dušikov oksid (NO^{\cdot}) lahko prav tako reagira s superoksidom, pri čemer nastaja peroksinitrit ($ONOO^-$) (enačba 7). Peroksinitrit ima relativno dolgo življenjsko dobo in je zmožen prehajati preko celičnih membran (Suzuki, 1990).

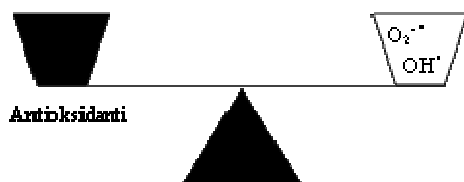


Glavni pomen tvorbe peroksinitrita, hidroksilnih radikalov in hipoklorne kisline je v tem, da ti zelo reaktivni oksidanti nastajajo iz manj reaktivnih. S tem je povečana tudi možnost nastanka oksidativnih poškodb (Halliwell, 1990; Pryor in Squadrito, 1995).

Prosti radikali, kot že omenjeno, so snovi, ki so sposobne oksidirati molekule. Proste radikale lahko delimo na več podskupin glede na njihovo kemično naravo ali reaktivnost. Oksidanti so (prosti) radikali, ki imajo na zunanji orbitali neparni elektron, kar prispeva k nestabilnosti molekule.

Radikalna skupina vsebuje vrste kot so hidroksilni radikal (HO^{\cdot}), dušikov oksid (NO^{\cdot}) in superoksid ($\text{O}_2^{\cdot -}$). Komponente so lahko prav tako visoko reaktivne, tudi če niso radikali. Med oksidante, ki niso prosti radikali štejemo peroksinitrit (ONOO^{\cdot}), vodikov peroksid (H_2O_2), hipoklorno kislino (HOCl), hidroperoksid (ROOH).

V organizmu ob normalnih pogojih prav tako nastajajo ROS, vendar lahko organizem sam vzpostavi ravnovesje med antioksidanti in nastalimi reaktivnimi kisikovimi spojinami (Slika 1). Pod normalnimi pogoji ob mirovanju in zdravih osebkih prav tako nastajajo ROS, vendar se primerno nevtralizirajo s pomočjo neencimatskega in encimatskega sistema, nastane nekakšno ravnovesje med produkcijo in odstranjevanjem ROS.



Slika 1: Ravnovesje med antioksidanti in ROS (prirejeno po Deaton in Marlin, 2003)

Vse celice živijo v aerobnih pogojih in so ves čas izpostavljene velikim številom oksidantov, ki izhajajo iz različnih eksogenih in endogenih virov (Gutteridge in Halliwell, 1994). Pomembno je vedeti, kako nastajanje oksidantov vodi do oksidativnih poškodb, saj so oksidanti molekule, ki so vključene v mnoge procese, kot so apoptoza in vnetje. Nastajanje prostih vodikovih radikalov je ključni dejavnik za pojav bolezni, karcinoma, osteoartritisa, srčno žilnih obolenj in drugih degenerativnih bolezni (Clark, 2002). Povečano nastajanje oksidantov ni nujno vedno povezano z oksidativno poškodbo. Poseben primer je radikal dušikov oksid, ki ima pomembno vlogo pri cirkulacijskih procesih kot mediator vazodilacije. Povečano nastajanje (NO^{\cdot}) samo po sebi še ni merilo za oksidativni stres, čeprav povečana koncentracija (NO^{\cdot}) lahko vodi k nastanku škodljivega oksidanta peroksinitrita (ONOO^-). Endogeni viri oksidantov so številni in vključujejo dihalno verigo v mitohondriju, ki pretvarja molekularni kisik v vodo. Nekaj odstotkov kisika ves čas izhaja iz elektronske transportne verige kot ROS, rezultat tega pa so oksidanti *in vivo*. Imunske reakcije lahko znatno prispevajo h kopičenju oksidantov, posebno med infekcijami ali kot rezultat avtoimunskega odgovora. Neutrofilci v postopku dihanja sproščajo ROS s ciljem, da napadejo ciljne tuje patogene.

Nastajanje reaktivnih vodikovih spojin je posledica normalne celične presnove. Levkociti se odzovejo na vnetje, ki ga povzroča izpostavljenost okoljskim vplivom (UV sevanje, onesnaževanje, kemične snovi, tobačni dim) (Evans in Halliwell, 2001). Nastali kisikovi prosti radikali vsebujejo tudi številne perokside, npr. vodikov peroksid, lipidni vodikov peroksid, prosti vodik. Tako nastale molekule pri pro-oksidativnih reakcijah so samo ohranjujoče in so sposobne poškodovati DNK, lipide, beljakovine in ogljikove hidrate.

V membranah celic se nahaja velik delež lipidov, ki vsebujejo nenasičene maščobne kisline, v maščobnih zalogah pa triacilgliceroli. Vir energije v procesu β -oksidacije predstavljajo lipidi, ki se v organizmu nahajajo v celičnih membranah ter kot lipidne zaloge (Ješe Janežič, 2001).

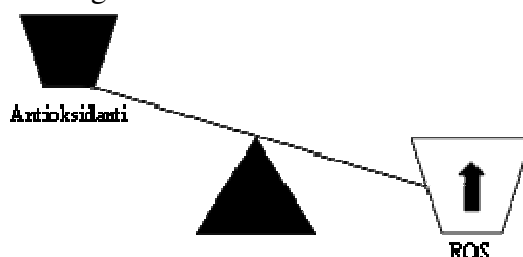
Lipidna peroksidacija je reakcija, v kateri nenasičene maščobne kisline neposredno reagirajo s kisikom, to vodi do nastanka kompleksnih kemičnih sprememb. Povišan nivo lipidne peroksidacije povzroča povečan vnos nenasičenih maščobnih kislin s prehrano, s tem pa se povečajo tudi potrebe po antioksidantih (RDA, 1989). Za lipidno reakcijo je značilno, da je verižna in da poteka v treh stopnjah (Burton in Ingold, 1986; Narita, 1993):

- iniciacija oz. začetek nastajanja prostih radikalov
- propagacija vstop prostih radikalov v reakcije
- terminacija povezave dveh radikalov ter nastanek stabilnega produkta.

Lipidno peroksidacijo lahko povzročajo poleg OH^\cdot radikalov tudi peroksilni (LOO^\cdot) in aloksilni (LO^\cdot) radikali, ki nastajajo v tako imenovani propagacijski fazi lipidne peroksidacije. Toksični peroksilni radikali (LOO^\cdot) imajo lastnost, da lahko poškodujejo večino celic v organizmu (Halliwell in Chirico, 1993). Vodikov peroksid (H_2O_2) in hiperoksidni radikal-anion ne reagirata neposredno z nenasičenimi maščobnimi kislinami. Propad celične membrane povzročajo produkti lipidne peroksidacije, kar na koncu vodi v razpad celice.

Lipidno peroksidacijo preprečujejo antioksidanti, ki se nahajajo v celičnih in subceličnih fosfolipidnih membranah (Fang in sod., 2002; Huang in sod., 2002). Antioksidanti delujejo tako, da razgrajujejo lipidne perokside v produkte, ki niso radikali in odstranjujejo peroksilne in aloksilne radikale, tako onemogočajo potek verižne reakcije (Šuput in Kamarič, 1998).

Oksidativni stres se pojavi, ko antioksidantska kapaciteta organizma ne more zadostiti oz. vzpostaviti ravnotežja med antioksidanti in ROS (Slika 2). Kljub zadostni antioksidantski kapaciteti (encimatski in neencimatski), lahko povečano nastajanje ROS poruši ravnovesje, kar vodi v nastanek oksidativnega stresa.



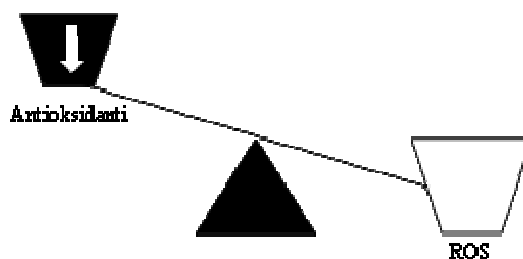
Slika 2: Porušeno ravnovesje med antioksidanti in ROS (prirejeno po Deaton in Marlin, 2003)

Med bolj pomembne antioksidante, ki znižuje lipidno peroksidacijo, spada vitamin E (Burton in Ingold, 1986; Fats... 1994; McCall in Frei, 1999; Marnett, 1999). Najpomembnejše reakcije med vitaminom E in nastalimi prostimi radikali, ki so nastali pri lipidni peroksidaciji so :



LOOH vstopa v reakcijo z glutationom (2GSH) ob prisotnosti encima glutation peroksidaza, kjer nastane lipidni alkohol (LOH), oksidiran glutation in voda. Tranzitne kovine katalizirajo razpad hidroperoksidov OH^\cdot , H^+ in alkoksilni ter peroksilni radikal (Fang in sod., 2002).

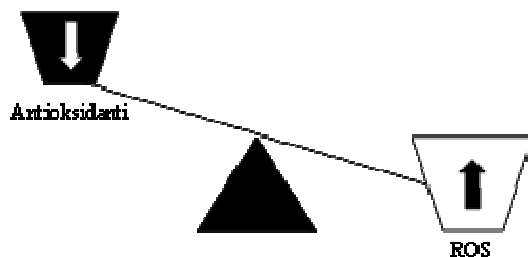
Normalno nastajanje ROS prav tako vodi do pojava oksidativnega stresa, kadar je motena antioksidantska obramba organizma (Slika 3). Oksidativni stres se lahko pojavi, kljub normalni produkciji ROS, zaradi redukcije komponent, ki sestavljajo encimatsko ali neencimatsko antioksidantsko obrambo.



Slika 3: Porušeno ravnovesje med antioksidanti in ROS zaradi motene antioksidantske obrambe (prirejeno po Deaton in Marlin, 2003)

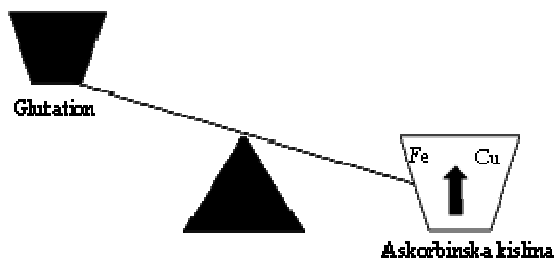
Med produkte lipidne peroksidacije spada tudi malondialdehid (MDA), ki je zelo mutagen in karcinogen. MDA je aldehyd malonske kisline, nastaja pa kot stranski produkt pri biosintezi prostaglandinov in pri presnovi arahidonske kisline (Marnett, 1999, 2002; Shuker, 2002).

Ob nastopu bolezni v organizmu se poveča nastajanje ROS, hkrati pa bolezen organizma prispeva tudi k slabši antioksidantski obrambi (Slika 4). Najslabši možen scenarij je zmanjšanje antioksidantske kapacitete in povečanje nastajanja ROS. To se lahko zgodi ob pojavu določenih bolezenskih stanj, kot so astma pri človeku ali obstrukcija dihalnih poti pri konjih.



Slika 4: Neravnovesje med ROS in antioksidanti ob pojavu bolezni (prirejeno po Deaton in Marlin, 2003)

Oksidativni stres se lahko pojavi tudi ob povečanem vnosu antioksidantov v organizem (Slika 5). Pod določenimi pogoji lahko prekomerni vnos antioksidantov prav tako vodi do oksidativnega stresa, npr. s prekomernim vnosom askorbinske kisline, ob prisotnosti železovih in bakrovih ionov. Škodljivi ROS se lahko pojavijo v interakciji z zmanjšano koncentracijo askorbinske kisline.



Slika 5: Neravnovesje med glutationom in askorbinsko kislino (prirejeno po Deaton in Marlin, 2003)

3 OBRAMBNI MEHANIZMI

Aerobni organizmi so zaradi stalne izpostavljenosti oksidantom razvili metode, kako se pred oksidativnim stresom ubraniti.

Antioksidacijski obrambni sistem organizma delimo na tri nivoje:

- primarni
- sekundarni
- terciarni

Primarno obrambo pred prostimi radikali vršijo celični encimi tako, da radikale spreminjajo v bolj stabilne produkte in s tem preprečijo verižne kemične reakcije (Seifried in sod., 2007). V primarno obrambo spadajo endogeni antioksidanti.

- glutation peroksidaza/reduktaza (GSH-Px/GSH-R)
- mitohondrijska superoksid dismutaza (MnSOD)
- citoplazemska superoksid dismutaza (Cu(Zn)SOD)
- Fe-katalaza (CAT)

SOD spreminja hiperoksidni radikal-anion v kisik in vodikov peroksid, ki ga CAT pretvarja v kisik in vodo. GSH-Px ima v tako imenovanem aktivnem centru selen z aminokislino cistein in za svoje pravilno delovanje potrebuje glutation kot substrat, v celici pa je ta prisoten v oksidirani (GS-SG) ali reducirani obliki (GSH). Glutation ima v celici vlogo pri nastajanju DNK molekul in proteinov, transportu aminokislin, vodikov peroksid pretvarja v vodo in sodeluje pri redukciji lipidnih hidroperoksidov (Gaté in sod., 1999)

Glutation je endogeni in eksogeni oksidant saj v organizmu nastaja *de novo*, nekaj ga v telo vnašamo s hrano in se delno absorbira v tankem črevesju (Roth in sod., 2002). Naloga NADPH v celici je, da regulira razmerje med (GSH)² in (GS-SG) in zagotavlja normalen redoks potencial. NADPH nastaja pri presnovi glukoze preko ciklusa pentoze-5-fosfata. V primeru zvišanja koncentracije (GS-SG) in znižanja koncentracije (GSH)² v celici se poveča presnova glukoze preko ciklusa pentoze-5-fosfata (Fang in sod., 2002).

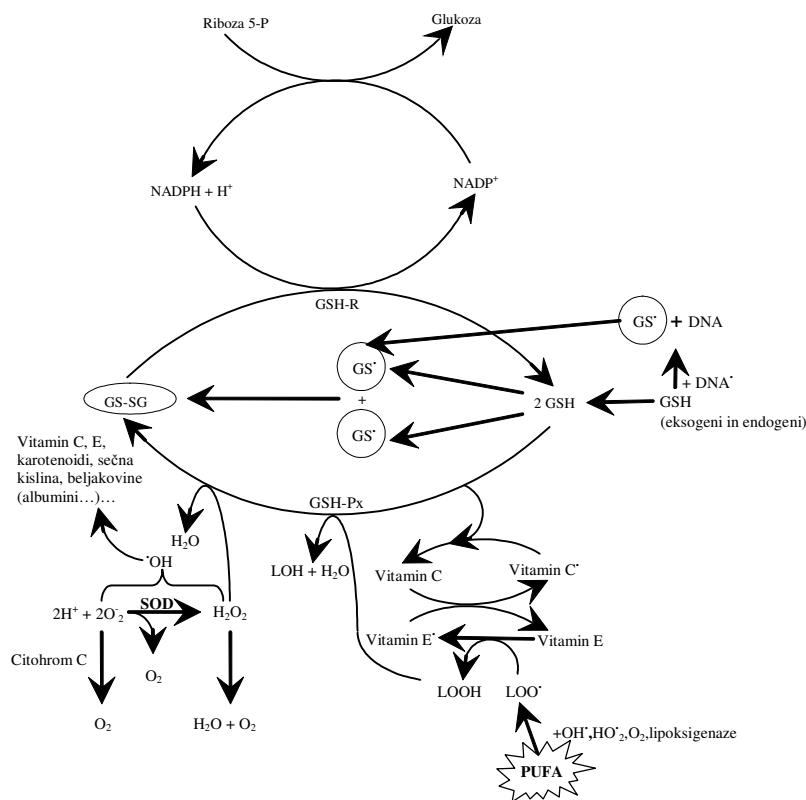
Glutation peroksidazo najdemo v mitohondrijih, citosolu in celičnih membranah. GSH-Px, kjer je glutation donor elektronov, reducira vodikov peroksid in organske hidroperoksidge.

Aktivnost GSH-Px je odvisna od selena, njegova aktivnost pa je največja v mišičnih vlaknih tipa I (visoko oksidativna vlakna) (Deaton in sod., 2004).

Glutation reduktaza je pomembna pri pretvorbi oksidirane glutationa (GSSG) nazaj v reducirano obliko (GSH) pri tem se porablja NADPH, kot reducent (Deaton in sod., 2004).

Katalaza (CAT) se v glavnem nahaja v peroksisomih in mitohondrijih. Njena naloga je odstranjevanje vodikovega peroksida. CAT kot kofaktor potrebuje železo, njena aktivnost je tako kot aktivnost GSH-Px in SOD, največja v visoko oksidativnih mišičnih vlaknih (Deaton in sod., 2004).

Antioksidante lahko primarno ločimo v dve skupini: antioksidanti z majhno molekularno maso in antioksidanti z veliko molekularno maso (encimatski). Med antioksidante z majhno molekularno maso sodijo vitamin C in E ter glutation (GSH). Encimatski antioksidanti pa so redkejši, vendar imajo pomembne funkcije. Npr. superoksid dismutaza katalizira dve molekuli $O_2^{\cdot -}$ v eno molekulo dioksida in eno molekulo H_2O_2 . Katalaza in GSH peroksidaza direktno odstranjujeta H_2O_2 , ki izhaja iz elektronske transportne verige. Dehidroaskorbat reduktaza in GSH reduktaza v veliki meri omogočata lažje recikliranje antioksidantov, vitamina C in GSH. Encimatsko in neencimatsko odstranjevanje kisikovih prostih radikalov v celicah sesalcev je prikazano na sliki 6.



GSH	glutation	LOH	lipidni alkohol
GS-GS	oksidiran glutation	LOO'	peroksilni radikal
GSH-R	encim glutation reduktaza	LOOH	lipidni hiperoksid
GSH-PX	encim glutation peroksidaza	PUFA	večkrat nenasičena maščobna kislina
SOD	encim superoksid dismutaza	CAT	encim katalaza

Slika 6: Odstranjevanje kisikovih prostih radikalov in drugih reaktivnih spojin v celicah sesalcev (Gutteridge in Halliwell, 1994; Fang in sod., 2002: 875)

V sekundarno obrambo spadajo eksogeni in endogeni antioksidanti. To so antioksidanti, ki preprečujejo oksidativne verižne reakcije, ne da bi se sami vključili vanje. Preprečujejo in zadržujejo vstop nastalih prostih radikalov v verižne reakcije. Pri teh reakcijah se prosti radikali oksidirajo in tako sami postanejo radikali. Nastali radikali so bolj stabilni in se lahko sami razgradijo oz. jih drugi antioksidanti reducirajo nazaj v njihovo prvotno obliko (Fang in sod., 2002).

Najpomembnejši eksogeni antioksidanti so:

- vitamin E
- vitamin C
- β -karoten
- polifenoli

Endogeni antioksidanti so:

- glutation
- koencim Q10
- sečna kislina
- lipojska kislina

Koencim Q deluje kot lipofilni antioksidant, prav tako pa igra pomembno vlogo v mitohondrijski elektronski transportni verigi. Reducirana oblika koencima Q je donor elektronov, s čimer preprečuje začetek in nadaljevanje lipidne peroksidacije in tudi reducira α -tokoferoksil nazaj v α -tokoferol (Ernster in Frosmark-Andree, 1993).

Sečna kislina nastaja ob razgradnji purinskih komponent pri večini sesalcev in se naprej razgrajuje ob sečni oksidazi. Pri ljudeh vodi neaktivnost sečne oksidaze do visoke koncentracije sečne kisline v plazmi (Becker, 1993). Funkcije sečne kisline kot antioksidanta so med drugim odstranjevanje ROS, kot so hipoklorna kislina in hidroksilni radikali (Sevianian in sod., 1991), pri čemer se oksidirajo do sečnega radikala, ki se potem reciklira nazaj do sečne kisline ali pa se oksidira naprej, kjer nastaja v glavnem alantoin (Becker, 1993; Kaur in Halliwell, 1990).

Naslednja zelo pomembna stopnja obrambe je terciarna obramba, ki ima sposobnost najti in popraviti napako oz. odstraniti oksidirane in poškodovane molekule. Sem uvrščamo encime, ki v DNK napako najdejo, poškodovan del izrežejo in vstavijo nepoškodovan del DNK. Ocenjeno je bilo, da je DNK vsake žive celice izpostavljena 10000 do 100000 oksidacijskim spremembam na dan in da 99,99 % poškodb popravijo encimi. Naloga terciarne obrambe je prav tako odstranjevanje oz. nevtraliziranje prostih radikalov. Terciarna obramba organizma nastopi takrat, kadar sta primarna in sekundarna obramba neučinkoviti pri nevtralizaciji prostih radikalov ali ko je antioksidantska obramba zaradi

določenih pogojev oslABLJena in zaradi tega nastajajo poškodbe celičnih struktur. V terciarno obrambo spadajo encimi:

- lipaze
- proteaze
- encimi, ki popravljajo poškodbe na DNA

Številne esencialne hranljive snovi imajo popolno oz. delno biološko vlogo pri primarni oksidativni zaščiti proti okoljskim ali oksidiranim snovem (Frei, 1994; Clark, 2002).

Številni elementi v sledovih so gradniki encimov, ki imajo antioksidantske lastnosti med njim so glutathion peroksidaza (selen), superoksid dizmutaze (bakar, cink, magnezij) in katalaze (železo). Pomembna pa sta še vitamin A in vitamin E, ki igrata pomembno vlogo pri vseh bioloških funkcijah kot celična antioksidanta (Frei, 1994).

Antioksidanti, ki delujejo skupaj ali posamezno, so zmožni kemično spremeniti ROS v manj reaktivne ali nereaktivne molekule, torej zmanjšujejo možnost za nastanek celičnih poškodb.

3.1 VITAMIN C

Funkcije C vitamina kot biološkega antioksidanta znotraj redoks sistema in kofaktorja za razne oksidazne funkcije vključujejo nastajanje kolagena, karnitina in noradrenalina. Aktivnost vitamina C določata L-askorbinska kislina in dehidro-L-askorbinska kislina, ki sta po biološki aktivnosti ekvivalentni (McDowell, 1989).

V prehrabene dodatke za konje dodajamo predvsem askorbinsko kislino, askorbil palmitat in kalcijev askorbil-2-fosfat (Snow in Frigg, 1987, 1990). Pri dvigovanju koncentracije askorbinske kisline v plazmi so Deaton in sod. (2003) ugotovili, da je askorbil palmitat bolj učinkovit od askorbil-2-monofosfata. Vitamin C se pri konjih sintetizira iz glukoze (Chatterjee, 1973). Oskrbovanje in dostopnost askorbinske kisline je kompleksna in je odvisna od kemične oblike, količine, pogostosti doziranja zato med posamezniki obstajajo zelo velike razlike (Snow in Frigg, 1990).

McDowell (1989) navaja, da je vitamin C pomemben pri pretvarjanju energije, hormonov in sintezi aminokislin. Vitamin C ima pomembno vlogo pri nastajanju kolagena, ki sestavni del vezivnega tkiva in kože.

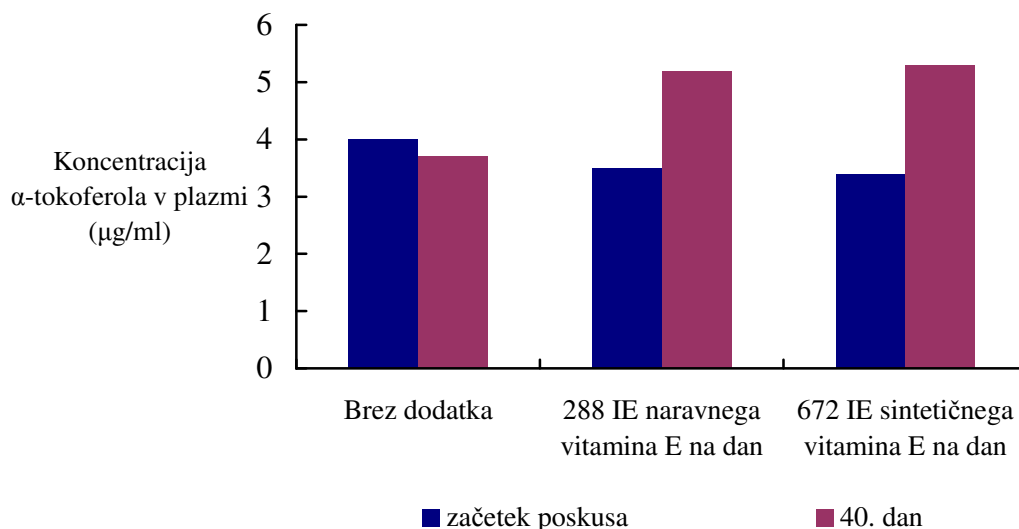
Priporočila za C vitamin za konje niso določena saj konji lahko C vitamin sintetizirajo sami.

3.2 VITAMIN E

Vitamin E je najbolj znan kot biološki antioksidant (Sies, 1993). Njegova lipofilna narava omogoča vključevanje v celične membrane, kjer varuje nenasičene maščobe in ostale komponente celične membrane, ki so dovzetne za oksidativne poškodbe. Vitamin E prispeva vodikov atom iz svoje fenolne skupine k maščobnim preroksilnim radikalom, ki nastajajo med oksidacijo membrane. Večkrat nenasičene maščobne kisline oblikujejo bolj stabilne maščobne perokside in stabilne tokoferilne radikale. Nastali maščobni peroksidi se nadaljnje razgradijo glutation peroksidazo, ki je odvisna od selena. Aktivnost vitamina E izhaja iz osmih različnih naravnih komponent štirih tokoferolov (α , β , γ , δ) in štirih tokotrienolov (α , β , γ , δ) (Lynch in sod., 1996a). Tokoferoli in tokotrienoli so sestavljeni iz kromanolnega obroča in stranske verige 16 ogljikov. Tokoferoli imajo nasičene stranske verige medtem, ko imajo tokotrienoli nenasičene stranske verige. Različne oblike α , β , γ , δ se razlikujejo po položaju in številu metilnih skupin na kromanolnem obroču kar prispeva, da imajo različne oblike E vitamina različne aktivne sposobnosti.

Stranska veriga α -tokoferola ima tri asimetrično vezane vodike, ki se odražajo v osmih različnih stereoizomerah (Lynch in sod., 1996b). Tokoferoli v naravi obstajajo kot 2R' 4R' 8'R. RRR α -tokoferol ima največjo biološko aktivnost (1,49 IE/mg) med ostalimi oblikami E vitamina. Največja vsebnost vitamina E se nahaja v sveži krmi (30 do 100 IE/kg SS), medtem ko imajo žita, kot so koruza, oves in ječmen manjšo koncentracijo (20 do 30 IE/kg SS). Pri skladiščenju krme se vsebnost E vitamina s časom zmanjšuje. Na primer vsebnost vitamina E se pri lucerni shranjeni pri 33°C po 12 tednih zmanjša za 54 do 73 odstotkov. Količina vnosa vitamina E je odvisna od načina in sestave konjevega obroka. Večina komercialnih krmnih mešanic za konje vsebuje α -tokoferol acetat, kar omogoča kompenzacijo vitamina E ob pomanjkanju le tega v voluminozni krmi. Vitamin E, ki se uporablja v komercialne namene, v krmo dodajamo največkrat v obliki α -tokoferol estra. Naravni vir RRR α - tokoferil acetata vsebuje 1,36 IE/mg, sintetični *all-rac*- α -tokoferil acetat, pa vsebuje 1IE/mg. Naravni vir vitamina E je bolj učinkovit pri večevanju koncentracije serumskega α -tokoferola v primerjavi s sintetičnim E vitaminom.

Gansen in sod. (2001, cit. po Kane 2010) so preučevali dostopnost naravne in sintetične oblike α -tokoferola pri konjih in ugotovili, da so imeli konji, ki so jim dodajali naravno obliko α -tokoferola večjo koncentracijo le tega v plazmi. Ugotovili so tudi, da je za doseg podobne koncentracije α -tokoferola v plazmi potrebno dodajati skoraj polovico manj IE naravnega vitamina E (Slika 7). Konjem, ki so jim dodajali 288 IE naravnega vitamina E, se je koncentracija po 40 dneh dvignila na skoraj isti nivo kot konjem po 40 dneh, ki so jim dodajali 672 IE sintetičnega vitamina E. Gansen in sod. (2001), (cit. po Kane 2010) zaključujejo, da je naravni vir vitamina E dokazano bolj učinkovit, oz. da je konjem bolj dostopen.



Slika 7: Vpliv naravnega in sintetičnega vitamina E na koncentracijo α -tokoferola v plazmi (Gansen in sod., 2001, cit. po Kane 2010)

Priporočila

Leta 1978 je NRC prvič objavil priporočila o krmljenju konj z vitaminom E, ki so bila 15 IE/kg SS (Preglednica 1), koncentracija je bila določena na podlagi vzdrževanja stabilnosti eritrocitov pri žrebetih, ki jih niso zadostno oskrbovali z E vitaminom. Leta 1989 je NRC povečal priporočila na 50 IE/kg SS oz. na približno 1 IE/kg TM. Raziskave so pokazale, da naj bi bila od 1,4 do 4,4 IE vitamina E/kg TM potrebna koncentracija za povečanje zalog vitamina E v tkivih pri konjih.

3.3 ELEMENTI, KI SO POMEMBNI ZA SINTEZO ANTIOKSIDANTSKIH ENCIMOV

3.3.1 Cink (Zn)

Cink (Zn) je prisoten v telesu kot komponenta več kot stotih encimov, npr. ogljikove anhidraze, alkalne fosfataze in karboksipeptidaze. Največja vsebnost cinka se pojavlja v žilnici očesa in v prostati, nekoliko nižja koncentracija cinka pa je v koži, jetrih, kosteh in mišicah. Manjša vsebnost cinka je v krvi, mleku, pljučih in možganih.

Cink je, kot navajajo Orešnik in Kermauner (2006), pomemben za normalen razvoj in kalcifikacijo kosti, učinkovit pa je tudi pri zdravljenju ran. Cink je vključen v sintezo in izločanje številnih hormonov kot so testosteron, inzulin, timosin, prostaglandini. Posebno

dobro je raziskan njegov pozitivni učinek na delovanje reproduktivnih organov. Ob pomanjkanju cinka se srečujemo s številnimi spremembami na koži (izpadanje dlake) in sluznicah (paraketoza), roževini kopit in okostju. Pomankanje cinka omejuje zauživanje krme, kar posledično prispeva k počasnejši rasti.

Pomanjkanje cinka so ugotovili pri žrebetih, ki so jih krmili s krmo, ki je vsebovala 5 mg Zn/kg krme. Pomanjkanje cinka se kaže pri žrebetih z izgubo apetita, počasnejšo rastjo, parakeratozo posebno na spodnjih delih nog zmanjšano serumsko in tkivno koncentracijo cinka in zmanjšano aktivnostjo alkalne fosfataze (Harrington in sod., 1973).

Absorpcija cinka iz prebavil je pri konjih odvisna od količine cinka v obroku, ki ga žival zaužije in v povprečju znaša 5 do 15 odstotkov. Pagan in Jackson (1991b) sta ugotovila, da je navidezna prebavljivost med 7,8 in 11,5 %. Wagner in sod. (2005) so ugotovili, da je absorpcija cinkovega oksida, cinkovega sulfata ali organskega cinkovega kelata med 12,8 in 13,9 % in 10,6 % pri odraslih konjih.

Večina krmil vsebuje 15 do 40 Zn/kg SS. Anorganski viri cinka so cinkov sulfat, cinkov oksid, cinkov klorid, cinkov karbonat in različni naravni viri cinkovih kelatov. Pomembno je omeniti, da je cink neizkoristljiv, če je vezan v fitatni obliki, zelo dobro pa je izkoristljiv, če je vezan na aminokislino ali beljakovino v tako imenovani kelatni obliki. Baker in sod. (2005) so ugotovili, da imajo odrasli konji v telesu več cinka, če so jim dodajali cink v obliki cinkovega oksida kot cink v kelatni obliki. Konji so dokaj tolerantni glede presežkov cinka. Maksimalna še spremenljiva koncentracija cinka znaša 500 mg/kg (NRC, 2005).

Priporočila

Priporočila NRC (2005) navajajo, da koncentracija 50 mg Zn/kg/SS (Preglednica 1) zadostuje vsem kategorijam konj, hkrati pa navajajo, da naj bi se koncentracija približevala vrednosti 90 mg Zn/kg SS, če se želimo izogniti tveganju za nastanek presnovnih bolezni okostja. Pri raziskavi na žrebetih so Harrington in sod. (1973) ugotovili, da je zadostna koncentracija 40 mg Zn/kg SS obroka. Pri oskrbi je pomembno upoštevati tudi endogene izgube, ki, kot je ugotovil Pagan (1994) znašajo 54 mg/dan za 550 kg težkega konja, kar je približno 0,1 mg/kg TM. Prava prebavljivost cinka je 20,8 %, na podlagi česar lahko določimo dnevno potrebo za 500 kg težkega konja, ki znaša 236 mg Zn/dan.

3.3.2 Baker (Cu)

Baker je vključen v mnoge encimske sisteme, ki so povezani s fosforilacijo in oksidacijo (Orešnik in Kermauner, 2006). Baker ima pomembno vlogo pri izkoriščanju železa iz telesnih rezerv in je zato zelo pomemben pri nastajanju hemoglobina. Potreben je za čvrstost kosti, normalno tvorbo vezivnega tkiva, elastina in kolagena. Pripisujejo pa mu tudi sodelovanje pri obrambnih funkcijah organizma.

Prisotnost bakra v krmi močno variira od približno 1 mg/kg v koruzi do 80 mg/kg melase sladkornega trsa (Cromwell in sod., 1978, 1984). Schryver in sod. (1974) so ugotovili, da znaša absorpcija bakra med 24 in 48 odstotki. Na presnovo bakra vpliva več dejavnikov. Baker je v interakciji z nekaterimi drugimi minerali kot so molibden, žveplo, cink, selen, srebro, kadmij in svinec (Underwood, 1981).

Konji relativno dobro prenašajo visoko koncentracijo bakra v krmi. Pri poni kobilah, ki so jih krmili s krmo, ki je vsebovala 792 mg Cu/kg krme 183 dni, je sicer prišlo do povečanja vsebnosti bakra v jetrih, negativnih vplivov, tako pri kobilah, kot tudi pri njihovih žrebetih ni bilo opaziti (Smith in sod., 1975).

Največja koncentracija bakra, ki jo konji še tolerirajo, je bila ocenjena na približno 250 mg/kg obroka (NRC, 2005).

Priporočila

NRC (2005) za baker priporoča 10 mg Cu/kg SS (Preglednica 1) krme za konje vseh starosti, vendar pa naj bi na potrebe vplival tudi spol, pasma, starost in brejost. Pagan (1994) je ocenil pravo prebavljivost bakra pri odraslih konjih na 40 odstotkov, endogene izgube na 0,069 mg/kg TM. Tako lahko določimo dnevno potrebo bakra za 500 kg težkega konja, ki znaša 86 mg/dan oz. 0,172 mg Cu/kg TM.

3.3.3 Selen (Se)

Selen je element, kateremu pripisujejo antioksidantske lastnosti (Orešnik in Kermauner, 2006). Encim glutation peroksidaza vsebuje selen. Njegova naloga je, da razgrajuje perokside, ki bi lahko poškodovali celične membrane. Pomembne lastnosti selena so, da varuje mišične celice pred degenerativnimi procesi, ugodno deluje na reprodukcijski sistem, v sodelovanju z E vitaminom vpliva na delovanje celic, ki proizvajajo imunoglobuline, potreben pa je tudi pri obnovi DNK.

Selen je v krmi in žitih navadno prisoten v organski obliki kot selenocistin, selenocistein in selenometionin (Podoll in sod., 1992). Med anorganske vire selena prištevamo natrijev

selenit in natrijev selenat. Ugotovili so, da ne obstaja razlik v biološki dostopnosti med organskim in anorganskim virom selena.

Preglednica 1: Dnevne potrebe konj NRC (2005)

Tip	Telesna masa (kg)	Cu (mg/dan)	Se (mg/dan)	Zn (mg/dan)	E (IE/dan)
Delo					
Lahko	500	100,0	1,00	400,0	800
Srednje	500	112,5	1,13	450,0	900
Težko	500	125,0	1,25	500,0	1000
Zelo težko	500	125,0	1,25	500,0	1000
Žrebc					
Neplemski	500	100,0	1,00	400,0	500
Plemenski	500	100,0	1,00	400,0	800
Breje kobile					
Zgodnja brejost (<5 mesecev)	500	100,0	1,00	400,0	800
5 mesecev	504	100,0	1,00	400,0	800
6 mesecev	508	100,0	1,00	400,0	800
7 mesecev	515	100,0	1,00	400,0	800
8 mesecev	523	100,0	1,00	400,0	800
9 mesecev	534	125,0	1,00	400,0	800
10 mesecev	548	125,0	1,00	400,0	800
11 mesecev	566	125,0	1,00	400,0	800
Doječe kobile (od 1. do 6. meseca)	500	125,0	1,25	500,0	1000
Rastoči konji					
4 mesecev	168	42,1	0,42	168,5	337
6 mesecev	216	54,0	0,54	215,9	432
12mesecev	321	80,3	0,80	321,2	642
18mesecev	387	96,9	0,97	387,5	775
18 lahko delo	387	96,9	0,97	387,5	775
18 srednje delo	387	96,9	0,97	387,5	775
24 mesecev	429	107,3	1,07	429,2	858
24 lahko delo	429	107,3	1,07	429,2	858
24 srednje delo	429	107,3	1,07	429,2	858
24 težko delo	429	107,3	1,07	429,2	858
24 zelo težko delo	429	107,3	1,07	429,2	858

Dnevne potrebe Se in Zn v preglednici so navedene ob predpostavki, da doječe kobile zaužijejo 2,5 % SS od svoje TM, rastoči konji in konji, ki težko ali zelo težko delajo zaužijejo 2,25 % SS krme od svoje telesne mase, konji, ki opravljajo srednje delo in ostale kategorije konj zaužijejo 2 % SS krme od svoje TM.

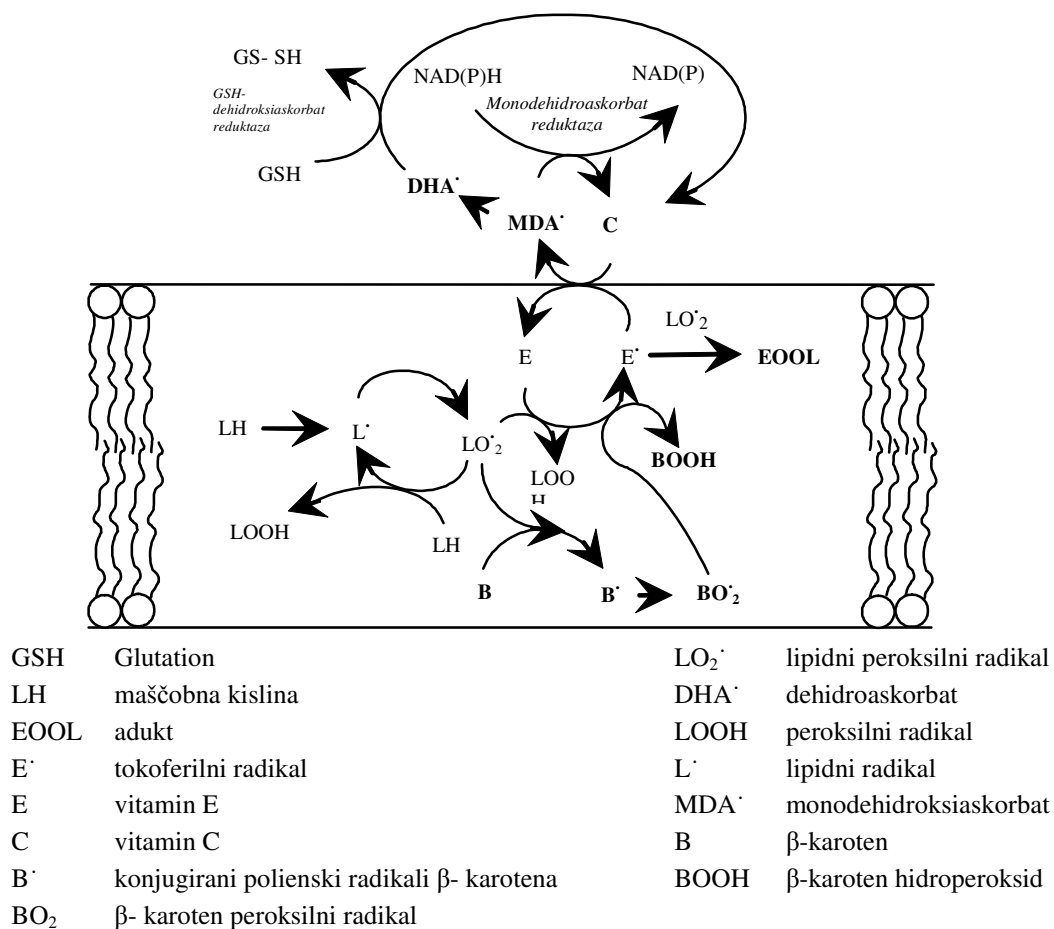
3.4 SINERGIJSKO DELOVANJE RAZLIČNIH ANTIOKSIDANTOV IN ANTIOKSIDANTSКИH SISTEMOV

Vitamin E je v maščobah topen vitamin, ki preprečuje lipidno peroksidacijo. Frankič in Salobir (2007) navajata, da vitamin E kot sestavni del celičnih membran varuje membranske lipide pred prostimi radikali in s tem ohranja njihovo integriteto. V vodi topni antioksidanti npr. vitamin C pa ščitijo molekule in ostale strukture v vodnem okolju in tako sodelujejo pri tako imenovanem recikliranju ostalih antioksidantov. Vitamin C in katehini imajo namreč to sposobnost, da lahko reducirajo oksidirane oblike Vitamina E tako, da je spet sposoben loviti proste radikale. Med antioksidanti tako lahko prihaja do sinergističnega vpliva, kar pomeni da ima več antioksidantov hkrati večji učinek, kot vsak posamezen posebej (Slika 8).

Lipidna peroksidacija nastopi, ko se vodikov atom izloči iz bis-alilne strani (metilne skupine [-CH₂-] med dvema dvojnima vezema večkrat nenasičenih maščobnih kislin PUFA). Nato nastane lipidni radikal (L[•]) s centrom v C atomu (enačba 11), ki reagira s kisikom in nastane peroksilni radikal (LOO[•]) (enačba 12). Peroksilni radikal lahko reagira s sosednjo stransko verigo PUFA (L'H) in nastane lipidni radikal (L'') in lipidni hiperoksid (LOOH) (enačba 13) čemur sledi verižna reakcija (Frei, 1994).



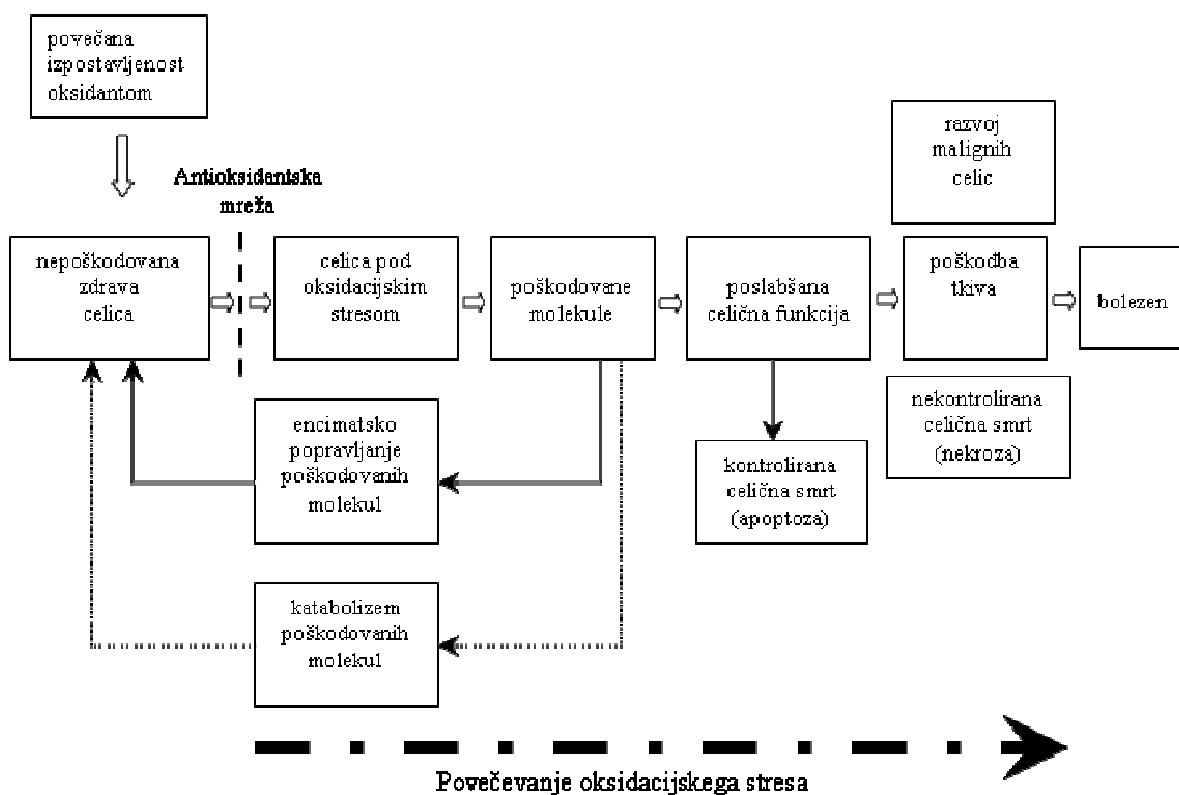
Lipidni peroksidi lahko razpadajo na številne aldehide, kot so malondialdehid in 4-hidroksi-2-nonenal, kateri lahko naprej povzročajo poškodbe z oksidacijo beljakovin ali DNK (Esterbauer in sod., 1991; Uchida in sod., 1999).



Slika 8: Shema možnega mehanizma sinergističnega delovanja med vitaminom E, vitaminom C in β-karotenom in njihova regeneracija (prirejeno po Niki, 1991: 1122; Niki in sod., 1995: 1326)

4 ŠKODLJIV VPLIV REAKTIVNIH KISIKOVIH SPOJIN IN MERITVE OKSIDATIVNEGA STRESA IN POŠKODB

Reaktivne kisikove spojine imajo lahko uničujoč učinek na lipide, beljakovine in DNK, kakor tudi na protivnetne aktivnosti. Na beljakovinah lahko povzročajo ROS strukturne spremembe, kot tudi spremembe v encimski aktivnosti. Tako npr. vodikov peroksid inducira inaktivacijo SOD (Choi in sod., 1999). Hipoklorna kislina inducira inaktivacijo inhibitorja α -1 proteinaze (Dallegrì in Ottonello, 1997). Oksidanti, kot so npr. hidroksilni radikali, lahko direktno povzročijo poškodbe DNK oz. aktivacijo specifičnih presnovnih poti, ki uničujejo DNK (Birnboim, 1988; Halliwell, 1990; Sarna in sod., 1993). Mehanizmi popravljanja DNK delujejo tako, da poškodovane nukleotide odstranijo, nepopravljeni oz. neodstranjeni deli nukleotidov pa lahko vodijo do mutacij in spremembe funkcije nastale beljakovine. Ocenjujejo, da dnevno nastane na celico 10000 baznih parov (Lindahl in Nyberg, 1972). Kontrolirana celična smrt nastopi, ko oksidativna poškodba vodi do nepopravljive celične funkcije. Ko so signalne stopnje poškodovane ali ko oksidativni stres presega zmoglosti obrambnega mehanizma, nastopi nekontrolirana celična smrt. Poškodbe tkiva in razvoj malignih celic lahko vodi v bolezen (Slika 9).



Slika 9: Shematski prikaz celične obrambe proti oksidativnim poškodbam celic (prirejeno po Lykkesfeldt in Svendsen, 2007)

Kot smo omenili oksidativni stres opisuje neravnovesje med prostimi radikali in antioksidanti (Lykkesfeldt in Svendsen, 2007). Metode za določitev oksidativnega stresa vključujejo neposredne in posredne meritve prostih radikalov in antioksidantov. Številne specifične meritve antioksidantov vključujejo meritve dveh najbolj pomembnih antioksidantskih biomarkerjev, kot sta GSH in askorbat, ki imata sposobnost regeneracije ostalih antioksidantov v njihovo aktivno stanje. Spremembe v koncentraciji vitamina E in koencima Q so prav tako merjene direktno kot biomarkerji oksidativnega stresa. GSH je prisoten v celici v koncentraciji 2 do 8 mM, zanemarljive količine pa so prisotne tudi v plazmi. Askorbat je prisoten v koncentraciji 20 do 50 μ M v plazmi, medtem ko so milimolarno koncentracijo askorbata prav tako zasledili v celici.

Aktivnost prostih radikalov in antioksidantov lahko določamo in situ z elektronsko spin resonanco, vendar ta metoda ni primerna za rutinske analize. Meritve antioksidantov se lahko osredotočajo na ocenjevanje skupne kapacitete antioksidantov ali natančne določitve

ključnih antioksidantov. Testi za skupno kapaciteto antioksidantov vključujejo skupni antioksidantski status (TAS), Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) in ferric reducing-antioxidant power (FRAP). Specifične metode bazirajo na visoko zmogljivi tekočinski kromatografiji (HPLC) in vključujejo določitev redoks para GSH-GSH disulfida (GSSH) in askorbat-dehidroaskorbinske kisline za nadaljnje informacije redoks stanja. Zmanjšani antioksidantski status in zmanjšano redoks razmerje GSH-GSH ali askorbat-dehidroksiaskorbinske kisline pomenijo povečanje oksidativnega stresa.

Meritve oksidativnih poškodb se osredotočajo predvsem na tri glavne makromolekule: DNK, beljakovine in lipide. Za določitev obsega poškodovane DNK uporabljajo kometni test, kjer semikvantitativno testirajo število poškodovanih sklopov DNK v sami celici (Collins, 2004). Stopnjo poškodbe DNK ocenjujemo z meritvijo baz DNK, ki so oksidirane oz. s količino poškodovanih fragmentov DNK (Ostling in Johanson, 1984.)

Maščobe posebno večkrat nenasičene maščobne kisline so nagnjene k oksidaciji. Lipidno oksidacijo lahko določamo na številne načine, dva najbolj uporabljana testa sta določitev malondialdehida (MDA) in isoprostanov. Test MDA vključuje derivatizacijo s tiobarbiturno kislino, kateri sledi spektrofotometrična določitev (Esterbauer in sod., 1991).

5 VPLETENOST OKSIDATIVNEGA STRESA V NEKATERE BOLEZNI PRI PERUTNINI, PRAŠIČIH, GOVEDU IN KONJIH

Oksidativni stres in bolezni pri domačih živalih so prvotno raziskovali pri prašičih, govedu in konjih. Glavne raziskave so bile opravljene pri prašičih in govedu z obolenji, kot so: pljučnica, enteritis, mastitis, endometritis in vnetje. Raziskave pri konjih pa so zajemale konje z obolenji, kot so: obstrukcija dihalnih poti, pljučno krvavenje zaradi povečane fizične obremenitve, oksidativni stres povzročen zaradi tekmovanja, laminitisa, artritisa, črevesnega zastoja.

5.1 OKSIDATIVNI STRES PRI PERUTNINI

Toplotni stres oz. visoka temperatura je dejavnik s katerim se pogosto srečujemo pri reji perutnine. Frankič in Salobir (2007) povzemata, da toplotni stres prispeva k sproščanju kateholaminov in kortikosterona, kar povzroča lipidno peroksidacijo v celičnih membranah. Visoka temperatura vpliva na konzumacijo krme, slabše izkoriščanje krme in posledično na slabši prirast in slabšo nesnost. Oksidativni stres, povzročen zaradi visoke temperature, povečuje nastajanje produktov oksidacije maščobnih kislin v organizmu, prav tako pa zmanjšuje koncentracijo vitamina E in C v plazmi. Pri pticah je ugotovljeno, da dodatek vitamina C v vročem okolju zmanjšuje nastajanje kortikosteroidnih hormonov, povečuje trdnost jajčne lupine, povečuje nesnost in kakovost jajc pri nesnicah. 250 mg vitamina E na kg krme naj bi bila zadostna koncentracija, ki značilno zmanjšuje negativni vpliv toplotnega stresa na proizvodnjo jajc. Pri pitovnih piščancih je bilo ugotovljeno, da 40 mg vitamina C na žival izboljšuje dnevni prirast in zmanjšuje pogin brojlerjev. Poleg temperature na oksidativni stres vplivajo tudi številne bolezni. Največjo gospodarsko škodo pri reji brojlerjev predstavlja pljučna hipertenzija in posledični ascites. Povečanje oksidativnega stresa prav tako povzroča kokcidioza, ki jo povzročajo za gostitelja zelo specifični zajedavci protozoji iz rodu *Eimeria*.

5.2 OKSIDATIVNI STRES PRI PRAŠIČIH

Sepsa je dokaj pogost pojav pri pujskih, katere lastnosti se odražajo kot povečanje žilnega tonusa in patološko povečanem pljučnem tlaku. Prav tako so s sepsa povezane motnje pri motoriki črevesja. Endotoksemični šok pri prašičih naj bi bil povezan tudi s povečanim oksidativnim stresom. Basu in Eriksson (1998, 2000) sta ugotovila zmanjšanje koncentracije antioksidantov v plazmi pri meritvi koncentracije α -tokoferola in povečano lipidno peroksidacijo pri meritvi izprostanov pri prašičih z notranjo zastrupitvijo. Dokazala sta, da propofol in retinol preko njunega antioksidantskega učinka preprečujeta lipidno peroksidacijo, ki je povezana z notranjimi zastrupitvami (Lykkesfeldt in Svendsen, 2007).

Frankič in Salobir (2007) navajata, da živali lahko s krmo zaužijejo nekatere zdravju škodljive snovi, kot so npr. mikotoksini. S plesnimi kontaminirana krma in s tem tudi z mikotoksini je zelo pogosta in se ji v praksi ni možno izogniti. Že dokaj nizke koncentracija mikotoksinov v krmi vpliva na zmanjšanje prireje, povečuje pojav kužnih bolezni, kar posledično lahko vodi v gospodarsko škodo. Ocenjujejo, da naj bi bila kar četrtina svetovnega pridelka žit kontaminirana z mikotoksini. Mikotoksini naj bi v organizmu živali povzročali oksidativni stres zaradi sprožanja produkcije prostih radikalov. Mikotoksini naj bi tudi zmanjševali sposobnost prehajanja antioksidantov skozi črevesno steno.

5.3 OKSIDATIVNI STRES PRI GOVEDU

Mastitis

Za zdravljenje akutnega in subkliničnega mastitisa pri govedu največkrat uporabljamo antibiotike, v kombinaciji z nesteroidnimi protivnetnimi zdravili (Lykkesfeldt in Svendsen, 2007). Pri kravah molznicah s subklinično obliko mastitisa, ki so ga povzročili, so Kleczkowski in sod. (2005) opazili znižanje koncentracije askorbata v plazmi v primerjavi z molznicami brez mastitisa. Prav tako so odkrili povečano stopnjo lipidnega hidroperoksida v eritrocitih pri kravah molznicah z akutnim mastitisom. Povečano lipidno peroksidacijo in nizko koncentracijo askorbata povezujejo z oksidativnim stresom, povzročenim zaradi obolenja vimena. Oksidativni stres zaradi mastitisa so Chaiyotwittayakun in sod. (2002) poskušali preprečiti z injeciranjem visokih doz askorbata in L-histidina v notranjost mlečne žleze. Ugotovili so, da askorbat ni imel nobenega učinka na klinične znake. Ugotovili so samo izboljšanje mlečnosti. Dodajanje vitamina E in selena kravam pred telitvijo je dobra preventiva proti mastitisu. Pri kravah, ki so jim podkožno injecirali 3000 IE vitamina E 10 in 5 dni pred telitvijo, so Smith in sod. (1997) opazili povečano koncentracijo α -tokoferola v plazmi v primerjavi s kravami, ki jim ga niso injecirali. Prav tako so opazili, da ima skupina belih krvničk z imenom neutrofili granulociti (neutrofilci) krav, ki so jim vitamin E injecirali, večjo sposobnost pobijanja bakterij.

Pljučnica

Na govedu je bilo do sedaj opravljeno malo raziskav o tem, kako pljučnica vpliva na povečanje oksidativnega stresa. Lykkesfeldt in Svendsen (2007) ugotavljata, da imajo pri infekciji dihalnih poti neutrofilci pomembno vlogo pri odstranjevanju mikroorganizmov s fagocitozo. Pljučnica pri govedu v nekaterih primerih povečuje število poškodovanih celic in tkiva. Med različnimi produkti, ki jih izločajo neutrofilci, so reaktivni dušikovi intermediati in NO^\cdot , ki povzročajo akutne in kronične vnetne reakcije. Poškodbe tkiv v največji meri povzroča ONOO^\cdot , ki nastane v reakciji med O_2^\cdot in NO^\cdot . Pri obolelih teletih

sta Ledwozyw in Stolarczyk (1992) ugotovila, da izolirani granulociti proizvedejo desetkrat več O_2^- in da imajo nižjo koncentracijo superoksid dizmutaze v plazmi kot zdrava teleta.

5.4 OKSIDATIVNI STRES PRI KONJIH

Na oksidativni stres pri konjih vplivata temperatura okolja in vlaga v zraku. Pri fizični obremenitvi ob povišani temperaturi in zračni vlagi so Mills in sod. (1996) ugotovili povečanje lipidne peroksidacije in oksidacije GSH. Zanimivo pri konjih je to, da termoregulacijo delno uravnava dušikov oksid NO.

5.4.1 Obolenja sklepov

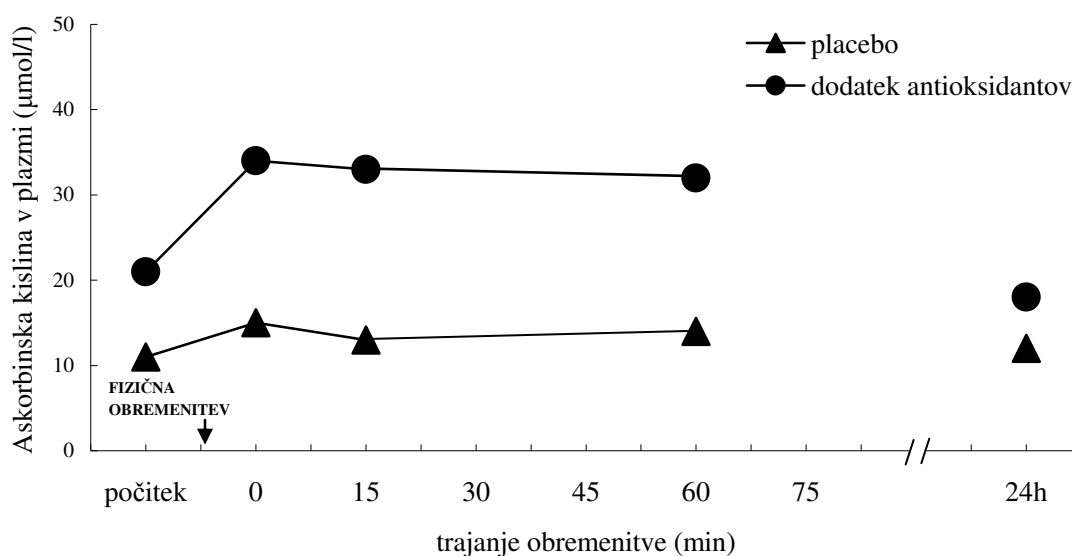
Pri konjih z obolelimi sklepi so De la Calle in sod. (2002) ugotovili povišan nivo dušikovega oksida v sinovialni tekočini in plazmi. Smith in sod. (1998) so v raziskavi pri konjih s sinovitisom ugotovili, da apliciranje dimetil sulfoksida (DMSO) učinkovito zmanjšuje koncentracijo levkocitov v sinovialni tekočini in tudi število neutrofilcev v primerjavi s konji, ki jim DMSO niso aplicirali. Apliciranje DMSO vpliva na zmanjšanje prostih radikalov in s tem posledično zmanjša oksidativni stres.

5.4.2 Vpliv antioksidantov na konje, ki imajo težave s ponavljajočo obstrukcijo dihalnih poti

Deaton in sod. (2004) so opravili zanimivo raziskavo, da bi ugotovili, kako antioksidanti vplivajo na konje, ki imajo težave z obstrukcijo dihalnih poti. Tekočina, ki prekriva pljučni epitelij ima veliko antioksidantsko kapaciteto. Askorbinska kislina pri konjih predstavlja glavni neencimatski antioksidant, konji pa, kot je bilo že omenjeno, lahko sami sintetizirajo askorbinsko kislino. Pri konjih, ki boleajo za ponavljajočo se obstrukcijo dihalnih poti je obseg oksidativnega stresa povezan s količino neutrofilcev pri vnetju dihalnih poti. Ugotovili so, da imajo oboleli konji nižjo koncentracijo askorbinske kisline v bronhoalveolarni tekočini v primerjavi z zdravimi konji. Nižja antioksidantska kapaciteta pri obolelih konjih lahko prispeva k oksidativnemu stresu.

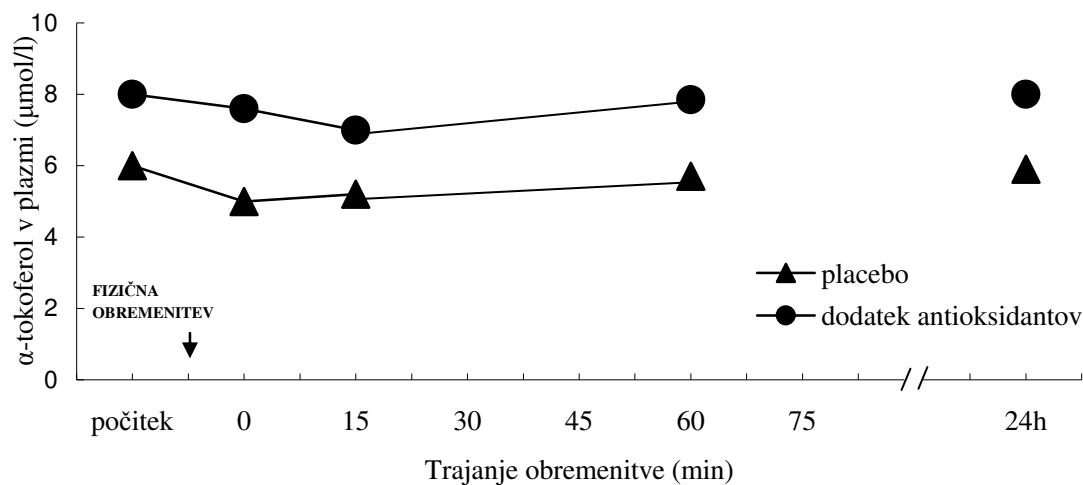
V raziskavi, ki so jo opravili Deaton in sod. (2004), je bilo v poskus vključenih 5 obolelih konj s ponavljajočo obstrukcijo dihalnih poti. Vsak konj je prvotno opravil primarno vajo na tekočem traku, pri kateri so določili maksimalno porabo kisika. Trije konji so nato po štirih tednih začeli dobivati antioksidantski dodatek, ostala dva pa nista dobivala antioksidantskih dodatkov. Po štirih tednih so konje pregledali. Antioksidantski dodatek je vseboval sledeče komponente: vitamin E kot 10 g α -tokoferol acetata/kg dodatka, vitamin C kot 57 g kalcijevega askorbil monofosfata na kg/dodatka in 4 mg selena/kg dodatka. Dnevna količina dodatka ni podana.

Med poskusom so bili konji fizično obremenjeni 3 krat tedensko in sicer na tekočem traku po 17 minut na dan, preostale štiri dni na teden pa so bili po 30 minut v sprehajalni napravi. Antioksidantski dodatek je močno povečal koncentracijo askorbinske kisline v plazmi pri konjih ob počitku, 0, 15, 60 minut in 24. ur po fizični obremenitvi v primerjavi s konji, ki dodatka niso dobivali. Koncentracija α -tokoferola v plazmi se je pri konjih, ki so dobivali dodatki prav tako povečala vendar pa fizična obremenitev na povečanje ni vplivala. Fizična obremenitev oz. antioksidantski dodatek na koncentracijo GSH, GSSG in glutation redoks razmerje nista vplivala.



Slika 10: Vpliv dodatka mešanice vitamina C, vitamina E in selena, na koncentracijo askorbinske kisline v plazmi v času počitka in fizične obremenitve (prirejeno po Deaton in sod., 2004).

Koncentracija askorbinske kisline v plazmi konj, ki so jih oskrbovali z antioksidanti, se je takoj po fizični obremenitvi dvignila nad 30 $\mu\text{mol/l}$ in nato v eni uri rahlo padla (Slika 10), po 24 urah po obremenitvi pa je koncentracija askorbinske kisline padla pod 20 $\mu\text{mol/l}$. Pri konjih, ki jim niso dodajali antioksidantskega dodatka, se je koncentracija askorbinske kisline v plazmi le rahlo spremenila. Največja sprememba je bila opazna takoj po fizični obremenitvi (Deaton in sod., 2004).



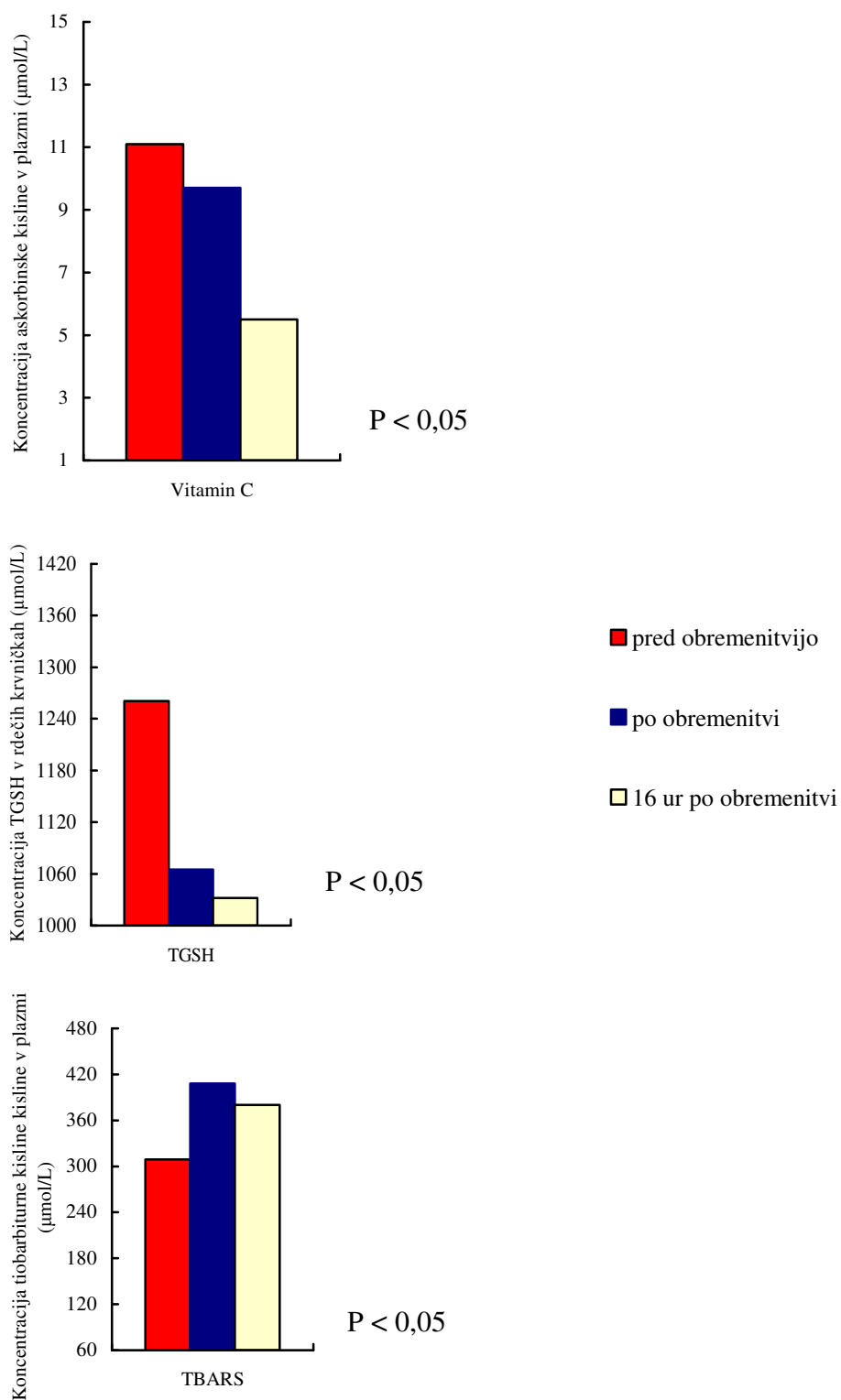
Slika 11: Vpliv dodatka mešanice vitamina C, vitamina E in selena, na koncentracijo α -tokoferola v plazmi v času počitka in fizične obremenitve (prirejeno po Deaton in sod., 2004).

Koncentracija α -tokoferola v plazmi konj, ki so jim dodajali antioksidantski dodatek, je bila najvišja pred fizično obremenitvijo, po obremenitvi pa je začela padati in se je po eni uri po obremenitvi dvignila na skoraj isti nivo, kot je bil pred fizično obremenitvijo (Slika 11). Pri konjih, ki jim antioksidantskega dodatka niso dodajali, opazimo podobne spremembe, le da je začetna koncentracija za približno 2 $\mu\text{mol/l}$ manjša (Deaton in sod., 2004).

6 OKSIDATIVNI STRES IN FIZIČNA OBREMENITEV

Podaljšano fizično obremenitev povezujemo s povečanjem oksidativnega stresa, ki lahko negativno vpliva na delovne sposobnosti in zdravstveno stanje pri konjih. Marlin in sod. (2002) so postavili hipotezo, da tekmovanje konj na vzdržljivostnih dirkah oz. endurance dirkah povzroča spremembe v antioksidantski kapaciteti, kar povzroča sistemski oksidativni stres. V raziskavo so vključili 40 konj, ki so tekmovali na 140 km dolgi vzdržljivostni preizkušnji. Temperatura je bila 15 do 19 °C relativna zračna vlaga pa 62 do 68 %. Konjem so odvzeli vzorce krvi pred fizično obremenitvijo, takoj po fizični obremenitvi in 16 ur po fizični obremenitvi. Koncentracija askorbinske kisline pred obremenitvijo je znašala 11,1 $\mu\text{mol/L}$ (4,6 do 20,3 $\mu\text{mol/L}$) in takoj po njej 9,7 $\mu\text{mol/L}$ (3,0 do 38,9 $\mu\text{mol/L}$). Veliko zmanjšanje koncentracije so ugotovili 16 ur po fizični obremenitvi, saj je padla na 5,5 $\mu\text{mol/L}$ (2,8 do 15,5 $\mu\text{mol/L}$; $P < 0,05$). Koncentracija skupnega glutationa v rdečih krvničkah (TGSH) po fizični obremenitvi, se je občutno zmanjšala. Na začetku je bila 1261 $\mu\text{mol/L}$ (883 do 1532 $\mu\text{mol/L}$) na koncu obremenitve 1065 $\mu\text{mol/L}$ (757 do 1334 $\mu\text{mol/L}$; $P < 0,05$) in po 16 urah 1032 $\mu\text{mol/L}$ (752 do 1362 $\mu\text{mol/L}$; $P < 0,05$). Glutation redoks razmerje je po obremenitvi ostalo nespremenjeno, zmanjšalo se je šele po 16. urah

po obremenitvi. Koncentracija snovi, ki reagirajo s tiobarbiturno kislino (TBARS) se je po fizični obremenitvi povečala iz začetne, ki je znašala 309 nmol/L (66 do 1048 nmol/L) na 408 nmol/L (170 do 1196 nmol/L; $P < 0,05$) po obremenitvi in po 16 urah je 380 nmol/L (99 do 1161 nmol/L). Zanimivo je, da se koncentracija α - tokoferola po obremenitvi oz. 16. urah ni spremenila. Povprečna hitrost med tekmovanjem je bila dobro korelirana s koncentracijo askorbinske kisline po obremenitvi.



Slika 12: Vplivi obremenitve konj na koncentracijo vitamina C, TGSH in TBARS v plazmi (prirejeno po Marlin in sod., 2002)

Ugotovili smo zanimivo povezavo med povprečno hitrostjo in koncentracijo askorbinske kisline v plazmi. Konji, ki so tekli z večjo povprečno hitrostjo so imeli ob koncu dirke tudi višjo koncentracijo askorbinske kisline v plazmi. Možna razlaga za to je, da konji, ki so imeli nižjo koncentracijo askorbinske kisline v plazmi niso bili sposobni doseči velike hitrosti na dirki. Pomembna je tudi povezava v koncentraciji askorbinske kisline na koncu testa, saj je višja koncentracija askorbinske kisline prispevala tudi k višji koncentraciji železa na koncu testa. Višja koncentracija α -tokoferola na začetku testa je prispevala k nižji koncentraciji TBARS na koncu testa.

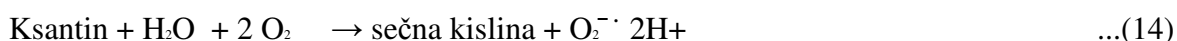
Preglednica 2: Korelacije med povprečno hitrostjo in nekaterimi biokemijskimi parametri pred in na koncu fizične obremenitve (prirejeno po Marlin in sod. 2002)

	R	P-vrednost
Povprečna hitrost/ askorbinska kislina (konec)	0,622	<0,01
GSH (začetek) / sečna kislina (konec)	-0,331	0,04
GSH (začetek) / GRR (konec)	-0,410	<0,01
TGSH (začetek)/ TBARS (konec)	-0,359	0,03
Sečna kislina (začetek obremenitve./ sečna kislina (konec)	0,468	<0,01
α - tokoferol (začetek)/ TBARS (konec)	-0,425	<0,01
GSH (konec)/ TBARS (konec)	-0,370	0,02
Askorbinska kislina (konec)/ železo (konec)	0,529	<0,01
AST (konec)/ sečna kislina (konec)	0,514	<0,01
CK (konec)/ sečna kislina (konec)	0,373	0,02
Sprememba v CK/ sečna kislina (konec)	0,368	0,02
Legenda: GSH	=	glutation
GRR	=	glutation redoks razmerje
TGSH	=	skupni glutacion v rdečih krvničkah
TBARS	=	tiobarbiturne reaktivne substance
AST	=	aspartat aminotransferaza
CK	=	kreatin fosfokinaza

Fizična obremenitev lahko za nekajkrat poveča porabo kisika. Med počitkom je poraba kisika pri angleškem polnokrvnem konju približno 5 mL/min/kg telesne mase (Butler in sod., 1993), kar je veliko manj, kot med maksimalno fizično obremenitvijo, ki znaša med

110 in 220 mL/min/kg (Young in sod., 2002). Poraba kisika individualnih mišičnih vlaken je lahko še večja zaradi povečanja krvnega obtoka in arteriovenozne razlike (Lykkesfeldt in sod., 1995). Povečana poraba kisika, pa lahko vodi do nastanka oksidativnega stresa.

Ksantin dehidrogenaza je encim, ki tvori proste radikale kisika. Ta oksidira hipoksantin do ksantina in nato ksantin do sečne kisline. Pri tem se porablja NAD⁺ kot prejemnik elektronov in nastaja NADH. Med intenzivno telesno obremenitvijo lahko vlakna v aktivnih mišicah postanejo hipoksična, kar pomeni, da nimajo dovolj kisika (Packer, 1997). Med ishemijo (pomanjkanjem krvi v tkivu) se tvori ksantin po poti anaerobnega metabolizma ATP. Tako se ksantin dehidrogenaza pretvori v ksantin oksidazo (Kanter, 1998). Med reperfuzijo (ponovno vzpostavitvijo pretoka krvi skozi tkivo) ksantin oksidaza še vedno pretvarja hipoksantin v sečno kislino, vendar pri tem uporablja kisik kot prejemnik elektronov in tako nastaja superoksid (enačba 14) (Heunks in Dekhuijzen, 2000).



Med fizično obremenitvijo lahko nastajajo poškodbe tkiva, ki povzročajo aktivacijo vnetnih celic, kot so neutrofilci in nadaljnjega nastajanja prostih radikalov iz NADPH oksidaze (Kanter, 1998). Prav tako se lahko med fizično obremenitvijo povečuje koncentracija kateholamina, pri njihovi oksidaciji pa nastajajo ROS (Sealy in sod. 1984).

Povečanje telesne temperature zaradi fizične obremenitve lahko povzroči oksidativni stres (Sanchez-Quesada in sod. 1998). Povečanje temperature in relativne vlage od 20° C in 40 % na 30°C in 80% povečuje oksidacijo glutationa v rdečih krvničkah hemolizata in lipidni peroksidaciji v plazmi pri maksimalno fizično obremenjenih konjih (Mills in sod., 1996).

7 UČINKI RAZLIČNIH ANTIOKSIDANTOV PRI FIZIČNI OBREMENTVI

7.1 GLUTATION

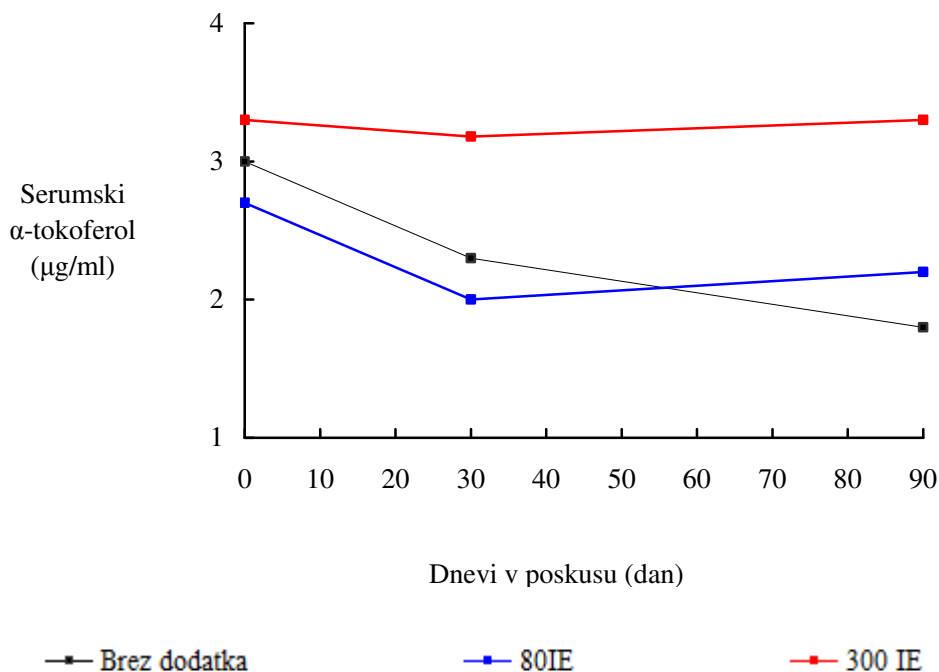
Glutation pri podganah slabo prehaja v tkiva (Sen in sod., 1994a), zato kaže več zanimanja aplikacija prekursorjev glutaciona npr. N-Acetilcistein (NAC) je derivat cisteina in je zaradi svoje tiolne skupine zmožen direktno odstranjevati vodikov peroksid, hidroksilne radikale in hipokloro kislino (Gillissen in Nowak, 1998). NAC se z lahkoto spremeni v cistein, ki je pomemben prekursor nastajanja celičnega glutaciona. Velika fizična obremenitev povečuje oksidacijo GSH v krvi in v pljučih pri podganah, ki so jim dodajali NAC intraperitonealno (Sen in sod., 1994b). Infuzija NAC zmanjšuje oksidacijo glutaciona v krvi pri ljudeh ob kratkotrajnem intenzivnem telesnem naporu (Medved in sod., 2003). Pomanjkanje selena kot kofaktorja glutacion peroksidaze se odraža v zmanjšani aktivnosti glutacion peroksidaze (Witt in sod., 1992).

7.2 VITAMIN E

V raziskavi so Petersson in sod. (1991) preučevali vpliv vitamina E na lipidno peroksidacijo med fizično obremenitvijo pri konjih. Preučevali so dve skupini konjev pod fizično obremenitvijo in kontrolno skupino, ki ni bila fizično obremenjena. Konje so 4 mesece krmili s krmo, ki je v osnovi vsebovala 13 IE vitamina E, nato so jim ga v krmo še dodatno dodajali. Ugotovili so, da pri nobeni skupini ni bilo kliničnih znakov pomanjkanja vitamina E, kljub hipotezi, da fizična obremenitev lahko povečuje znake lipidne peroksidacije, kot so nastajanje pentanov v izdihanem zraku in snovi, ki reagirajo s tiobarbiturno kislino v plazmi. Dodajanje vitamina E ni spremenilo odziva na fizično obremenitev, potrebno pa je omeniti, da vzorcev mišičnega tkiva in krvi niso odvzeli neposredno po fizični obremenitvi, kar je lahko tudi razlog, da razlik niso odkrili.

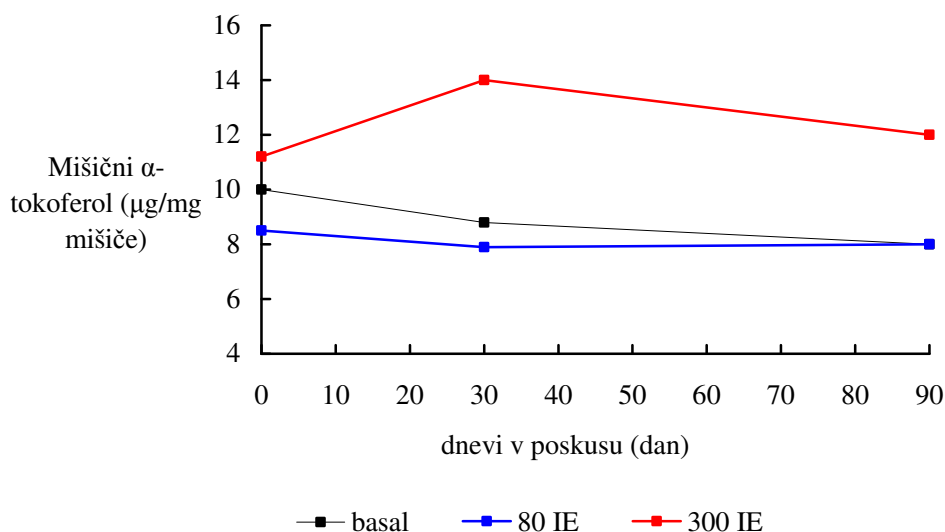
Siciliano in sod. (1997) so opravili raziskavo o vplivu različnih koncentracij vitamina E na mišično integriteto pri fizično obremenjenih konjih. Raziskavo so opravili na 19 konjih, ki so jih razdelili v tri skupine. Prvi skupini niso dodajali vitamina E, E vitamin je vsebovala samo osnovna krma, drugi skupini so dodajali 80 IE vitamina E/kg SS tretji pa 300 IE vitamina E/kg SS. Osnovna krma je vsebovala manj kot 44 IE vitamin E/kg SS. V 90 dnevnom poskusu so bili konji fizično obremenjeni 5-krat na teden. Konjem so odvzeli vzorce krvi in mišičnega tkiva na začetku poskusa, po 30 dneh in na koncu poskusa 90. dan. Ugotovili so, da je konjem, ki so bili na osnovni krmi, koncentracija α -tokoferola v plazmi padla iz 3 na 2 $\mu\text{g/ml}$ in da je od 30. do 90. dne koncentracija še rahlo padala. Konjem, ki so jim dodajali 80 IE vitamina E, je koncentracija α -tokoferola v prvih 30 dneh

padla, po 30. dnevu pa je ostala konstantna (Slika 13). Konjem, ki so jim dodajali 300 IE vitamina E, se koncentracija α -tokoferola ni spremenila.



Slika 13: Povprečna koncentracija α -tokoferola v plazmi konj, krmljenih s krmo z različno koncentracijo vitamina E (v IE/kg SS) (prirejeno po Siciliano in sod., 1997)

Koncentracija α -tokoferola v mišicah pri konjih, ki so jim dodajali 300 IE vitamina E, je v prvih 30 dneh močno narasla, po 30 dnevu pa je bil izmerjen rahel padec koncentracije. Pri konjih, ki so jim dodajali 80 IE vitamina E in pri konjih brez dodatka vitamina E, je koncentracija padala vseh 90 dni (Slika 14).

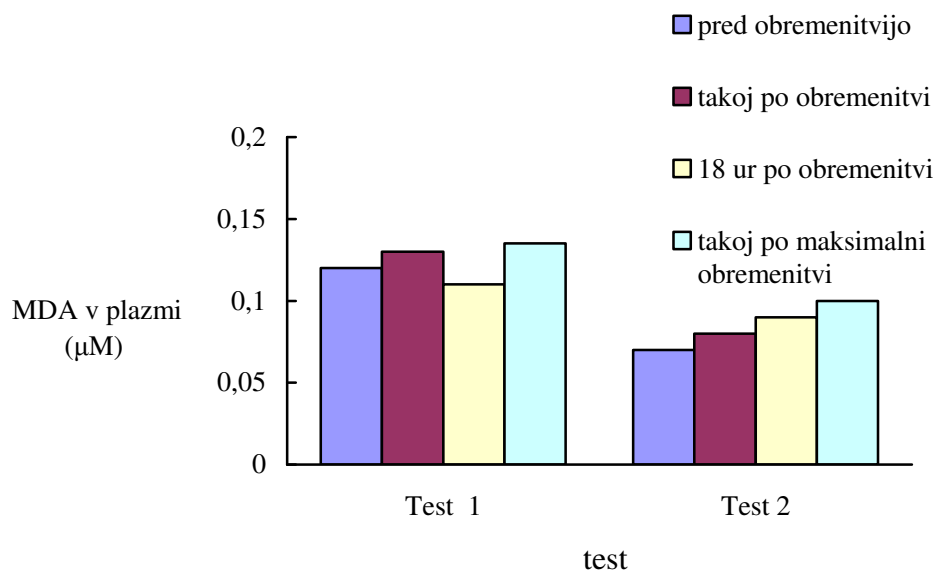


Slika 14: Povprečna koncentracija α -tokoferola v mišicah konj, krmljenih s krmo z različno koncentracijo vitamina E (v IE/kg/SS) (prirejeno po Siciliano in sod.,1997)

Siciliano in sod. (1997) sklepajo, da naj bi konji, ki so izpostavljeni več tedenskem fizičnem naporu potrebovali dodatek vitamina E nekje do 300 IE/kg SS za vzdrževanje koncentracije vitamina E na ustreznem nivoju v krvi in mišičnem tkivu. Dodajanje 80 IE/kg SS koncentracije α -tokoferola v plazmi in mišicah na dolgi rok skoraj ne spremeni.

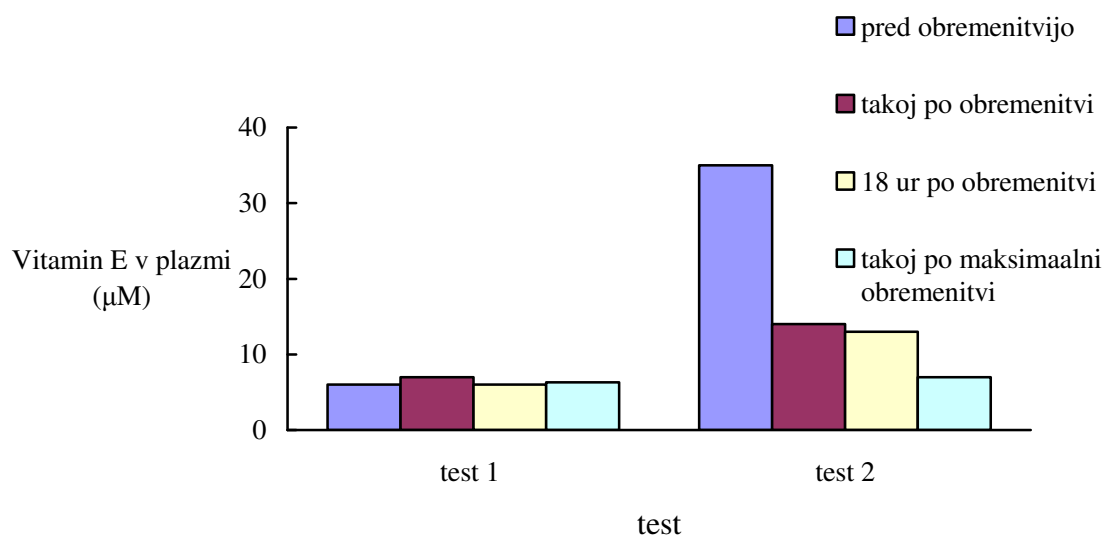
7.3 VPLIV DODATKA VITAMINA E IN SELENA NA VSEBNOST VITAMINA E V KRVNI IN IZLOČANJE MDA V PLAZMI KONJ PO FIZIČNI OBREMENTVI

Avellini in sod. (1999) so v raziskavi preučevali vpliv dodatkov vitamina E in selena na 70 dnevno fizično obremenitev 3 letnih žrebcev. Konjem so dnevno dodajali 20 µg selena/kg in 40 mg vitamina E/kg. Primerjali so vsebnost malondialdehida, končnega produkta lipidne peroksidacije, s koncentracijo vitamina E v krvi (Slika 15). Na začetku poskusa (test 1) in na koncu poskusa po 70. dneh in oskrbovanju z vitaminom E in selenom (test 2) so kri vzorčili pred obremenitvijo, po obremenitvi, po 18 urah počitka in po največji fizični obremenitvi. Pri obeh testih so Avellini in sod. (1999) opazili povečano vsebnost MDA.



Slika 15: Vsebnost malondialdehida v plazmi konj v 1. testu na začetku poskusa in v 2. testu, po 70 dneh obremenitve (prirejeno po Avellini in sod., 1999)

Vsebnost MDA v plazmi je bila pri konjih pred treningom, pri konjih, ki so počivali in konjih, ki so bili fizično obremenjenih signifikantno večja kot pri konjih, ki so bili 70 dni v treningu in oskrbovani z vitaminom E (Slika 16). Pri prvem testu ni bilo ugotovljenih razlik med posameznimi časovnimi intervali vzorčenja.



Slika 16: Vsebnost vitamina E v plazmi konj v 1. testu in v 2. testu po 70. dneh treninga in oskrbovanja z dodatki vitamina E in selena (prirejeno po Avellini in sod., 1999)

Pred obdobjem treningov je bila vsebnost vitamina E ne glede na čas vzorčenja zelo majhna. Avellini in sod. (1999) sklepajo, da trening in oskrbovanje konjev z vitaminom E in selenom ugodno vpliva oz. izboljšuje antioksidantsko obrambo konjev. Če želimo konje, ki so v aktivnem treningu, ustrezno zaščititi pred oksidativnim stresom, jim moramo dodajati poleg vitamina E še selen.

7.4 VITAMIN C

Vitamin C ima mnoge pozitivne učinke na antioksidantsko zaščito pri živalih. Dodajanje askorbinske kisline v obrok zmanjšuje koncentracije TBARS v plazmi pri človeku po 30 minutah zmerne obremenitve (Alessio in sod., 1997). Odmerek 1 g askorbinske kisline prepreči nastajanje prostih radikalov (merjeno z ESR spektroskopijo) in lipidno peroksidacijo po fizični obremenitvi (Ashton in sod., 1999).

Oralna aplikacija askorbinske kisline ima nizko biološko dostopnost pri konjih (Löscher in sod., 1984; Snow in sod., 1987). Oskrba konjev z derivati askorbinske kisline, kot so askorbil palmitat in kalcijev askorbil monofosfat, dvigne koncentracijo askorbinske kisline v plazmi (Deaton in sod., 2003; Snow in Frigg, 1987). Intravenozna aplikacija 5 g askorbinske kisline pred fizično obremenitvijo preprečuje povečanje TBARS v plazmi po 1 km dolgi dirki (White in sod., 2001).

Snow in Frigg. (1987) so pri konjih, ki so jim dnevno dodajali 4,5 ali 20 g askorbinske kisline v kristalni obliki, ugotovili skoraj dvakratno povečanje koncentracije askorbinske kisline v plazmi v primerjavi s kontrolno skupino, ki jim askorbinske kisline niso dodajali. Pri tem niso opazili nobenih razlik glede na odmerek 4,5 g ali 20 g/dan. Toksičnost askorbinske kisline pri konjih, ki so jim dali enkratno odmerek 20g/dan en dan, ni poznana (NRC, 1987), glede dodajanja na daljše obdobje pa nimamo ocen.

7.5 VPLIV VITAMINA E NA ANTIOKSIDANTSKI STATUS PRI KONJIH

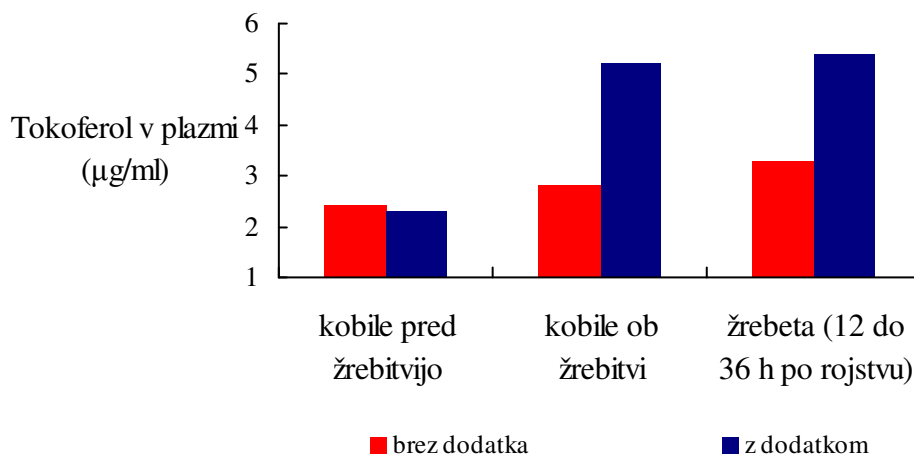
Gansen in sod. (1995) so ugotavljali, kako različne oblike E vitamina vplivajo na koncentracijo α -tokoferola v plazmi. Ugotovili so podobno povečanje serumskega α -tokoferola pri konjih, ki so jim 6 tednov dodajali naravni vir vitamina E (212 mg RRR α -tokoferol acatata, 252 mg RRR γ -tokoferol acetata in 116 mg RRR- δ -tokoferil acetata) kot pri konjih, ki so jih krmili s sintetično obliko (672 mg all-rac- α -tokoferil acetata). Ugotovili so, da naravni vir vitamina E vsebuje le približno eno tretjino učinkovitosti α -tokoferola v primerjavi s sintetično obliko.

Pagan in sod. (2005) so prav tako preučevali, kako različne oblike vitamina E vplivajo na koncentracijo α -tokoferola v plazmi. Ugotovili so, da je bila sintetična oblika vitamina E (*all-rac- α -tokoferil acetat*) manj učinkovita pri večanju koncentracije α -tokoferola v

plazmi kot naravna oblika vitamina E. Tako je naravna oblika vitamina E bolj učinkovita pri dvigovanju α -tokoferola v plazmi v krajšem časovnem obdobju dodajanja (~14 dni) kot druge oblike vitamina E.

Kot je že znano, ima vitamin E pozitiven učinek na organizem, še posebno pri fizično obremenjenih konjih, saj vzdržuje mišično integriteto in ravnovesje med antioksidanti in prostimi radikali. Plemenski konji oz. kobile predstavljajo pomembno kategorijo, ki je prav tako izpostavljena stresu v obdobju parjenja, brejosti in dojenja. Gard (cit. po Kane 2010) navaja, da vitamin E ni vedno v zadostni meri dostopen plemenskim kobilam, posebej če žrebijo in dojijo v zimskih mesecih, ko nimajo dostopa do zelene krme in paše. Kobile v pozni brejosti in zgodnji laktaciji je priporočljivo krmiti s krmo z visoko koncentracijo vitamina E, saj le na ta način lahko zagotovimo zadostno koncentracijo vitamina E v kolostrumu in mleku. Posebej pa je potrebno izpostaviti kobile, ki so v prejšnjih letih slabo prenašale pasivno imunost na svoja žrebeta. Te naj bi oskrbovali z dvakratnim odmerkom vitamina E na dan, najmanj mesec dni pred žrebitvijo in po njej.

Na Švedskem je Gard leta 2003 (cit. po Kane, 2010) opravil raziskavo, v kateri je brejim kobilam 21 dni pred žrebitvijo dodajal po 1500 IE vitamina E na dan v naravni vodotopni obliki. Ugotovil je, da imajo njihova žrebeta ob žrebitvi in 12 do 36 ur po žrebitvi višjo koncentracijo α -tokoferola v plazmi (Slika 17). Pri kobilah, ki so jim dodajali vitamin E so ugotovili povečan prenos protiteles na žrebeta, kar ugodno vpliva na celoten imunski sistem. Stopnja IgG v kolostrumu in serumu je bila višja pri kobilah, ki so jim dodajali 160 IE vitamina E na kg krme, kot pri kobilah, ki so jim dodajali 80 IE vitamina E na kg krme. Žrebeta vseh kobil so imela takoj po rojstvu podobno koncentracijo IgG, IgA in IgM v serumu, takoj po zaužitju kolostruma pa je ugotovil povišano koncentracijo IgG, IgA in IgM pri žrebetih od kobil, ki so jim dodajali več vitamina E.



Slika 17: Koncentracija tokoferola v plazmi kobil, ki so jim dodajali 1500 IE vitamina E na dan (prirejeno po Gard, 2003, cit. po Kane, 2010)

Oskrbovanje z E vitaminom zmanjšuje stopnjo lipidne peroksidacije v izdihanem zraku in plazmi pri človeku in podganah, ki so bili pod različnimi fizičnimi obremenitvami (Dillard in sod. 1978; Goldfarb in sod., 1994; Meydani in sod., 1993; Sumida in sod., 1989). Poškodbe mišic človeka zaradi 6 dnevne zaporedne fizične obremenitve so bile manjše ob vnosu α -tokoferola (Itoh in sod., 2000). Med 90 dnevnim treningom konj se je koncentracija α -tokoferola v plazmi zmanjšala pri konjih, ki so jim dodajali 80 IE/kg obroka, medtem ko se koncentracija α -tokoferola v plazmi ni zmanjševala konjem ki so jim dodajali 300 IE /kg ob predpostavki, da je že osnovna krma vsebovala 40 IE vitamina E/ kg (Siciliano in sod., 1997).

7.6 GLUTAMIN

Stohrer in sod. (2007) so postavili hipotezo, da naj bi oralna administracija L-glutamina, ki je prekurzor GSH, lahko izboljšala intracelularno GSH/GSSG razmerje in s tem prispevala k boljši zaščiti pred prostimi radikali. Konje pasme haflinger so razdelili v dve skupini: kontrolno, ki ji glutamina niso dodajali in skupino, ki so ji 4 dni dodajali 20 g glutamina/100 kg telesne mase. Vzorce krvi so zbrali pred dodajanjem glutamina, takoj pred treningom, takoj po treningu in 20 ur po treningu na nadmorski višini 2000 m. Koncentracija glutamina takoj pred treningom je bila 400 ± 54 mol/l. Po dodajanju glutamina pa je nivo narasel na 600 ± 80 mol/l. Tudi koncentracija GSH je bila takoj po treningu višja pri konjih, ki so jim dodajali glutamin (891 ± 277 mol/l) pri kontrolni skupini pa 803 ± 182 mol/l. Koncentracija GSSG pri kontrolni skupini je bila nekoliko višja. Pričakovano sta se pri skupini, ki so ji dodajali glutamin, povišala skupna antioksidantska kapaciteta in koncentracija vitamina C v plazmi. Aktivnost kreatin kinaze v plazmi, ki je

indikator mišičnih poškodb, je bila nižja pri skupini, ki so ji dodajali glutamin. Dokazujejo, da dodatek glutamina pozitivno vpliva na antioksidantski status, prav tako pa preprečuje morebitne poškodbe mišic ob fizični obremenitvi.

7.7 DODAJANJE KOMBINACIJE ANTIOKSIDANTOV

Igrashi in sod. (1991) ter Suzuki (1990) so preučevali medsebojno delovanje posameznih antioksidantov in predpostavili hipotezo, da naj bi imela več kot dva različna antioksidanta medsebojno sinergistično delovanje. Oksidacija antioksidantov se lahko zmanjša z drugimi antioksidanti. Tako za askorbinsko kislino menijo, da reciklira oksidirani α -tokoferol in sečno kislino (Becker, 1993; Packer in sod., 1979), medtem ko glutathion reducira oksidirano askorbinsko kislino (Borsook in sod., 1937). Antioksidanti se prav tako razlikujejo po svoji aktivnosti in lokaciji. α -tokoferol je pomemben lipidni antioksidant, ki odstranjuje proste radikale vključno s superoksidi, hidrosilne radikale in lipidneperokside (Tidius in Houston, 2001), medtem ko je askorbinska kislina pomemben antioksidant v vodni fazi.

Baskin in sod. (2000) so v raziskavi na vlečnih psih ugotovili, da je istočasno oskrbovanje vlečnih psov z α -tokoferolom, luteinom in β -karotenom zmanjšalo poškodbe DNK po treh dneh vzdržljivostne obremenitve v primerjavi s skupino, ki jo niso oskrbovali.

Kombinacije antioksidantov kot so derivati askorbinske kisline, vitamin E in selen preprečujejo povečanje koncentracije sečne kisline v plazmi pri konjih, kateri so bolehalo za ponavljajočim obolenjem obstrukcije dihal (Kirschvink in sod., 2002). Koncentracija askorbinske kisline je bila višja po zmernem fizičnem naporu pri konjih, ki so jih oskrbovali s kombinacijo antioksidantov (Deaton in sod., 2002).

De B. Moffarts in sod. (2005) so predpostavili, da dodajanje kombinacij različnih antioksidantov v obdobju 3 mesecev lahko izboljšajo antioksidantsko obrambo konj. S tem naj bi posledično prispevali k manjši mišični utrujenosti in poškodbam mišičnih vlaken ter k boljšemu vsesplošnem počutju konja. Konji se tako lahko spopadajo z večjimi izzivi na treningih in lahko dosegajo boljše rezultate na tekmovanjih. V poskus je bilo vključenih 40 angleških polnokrvnih konj v treningu. Od tega 20 kobil, (10 starih 2 leti, ostalih 10 pa 3 leta). 17 žrebcev in 3 kastrati (10 starih 3 leta in 10 starih 2 leti). Poskus so opravili v tri mesečnem tekmovalnem obdobju (med avgustom in novembrom 2002). Konji so bili ves čas pod veterinarskim nadzorom. Konji so dnevno trenirali in v povprečju so z njimi opravili 2,4 dirke na teden. Vsi konji so bili vhlavljeni v boksih z nastilom iz slame. Krmili so jih 2 krat dnevno s senom (6 kg/dan) in ovsom (6 kg/dan), kar jim je zagotavljalo povprečen vnos 120 mg vitamina E, 0,4 mg Se, 48 mg Zn in 75 mg Cu. Vzorce krvi so v trimesečnem obdobju poskusa odvzeli trikrat, na začetku poskusa, po 6 tednih in po 12 tednih. Ugotavljali so vsebnost sledečih markerjev: askorbinsko kislino (AA),

antioksidantsko kapaciteto v vodi topnih komponent v plazmi (ACW), glutacion: reduciran (GSH), oksidirani (GSSG), redoks razmerje glutaciona ($GSSG/(GSH+GSSG)$), α -tokoferol, β -karoten, antioksidantsko kapaciteto v maščobah topnih komponent v plazmi (ACL), aktivnost glutacion peroksidaze (GPx), aktivnost superoksid dismutaze (SOD), selen (Se), baker (Cu) in cink (Zn) ter kreatin fosfokinazo (CPK) kot indikator stanja mišic. Konje so razdelili v dve skupini. Trideset konj je bilo v skupini, ki je prejela antioksidante, 10 pa v kontrolni skupini, ki jim niso dodajali antioksidantov. Konji so bili enakomerno porazdeljeni tudi glede na spol in starost. Dodatek antioksidantov v poskusu je konjem dnevno zagotavljal vitamine in elemente v sledovih: askorbinsko kislino 11,50 mg α -tokoferol acetat 7000 mg β -karoten 500 mg Cu 187 mg Zn 769 mg in Se 7 mg. Pri konjih, ki jim antioksidantov niso dodajali, so opazili znižanje koncentracije GSH v krvi in veliko povečanje GSSG in prav tako GRR. Povečanje GSSG in GRR kaže na povečanje oksidativnih procesov ob koncu tekmovalnega obdobja zaradi stresa in fizične obremenitve, hkrati pa simultano zmanjšanje GSH kaže na osiromašenje antioksidantskih rezerv. Zmanjšanje antioksidantske kapacitete se je pokazala v močno zmanjšani aktivnosti, SOD izmerjeni v 12. tednu.

Koncentracija antioksidantov v kontrolni skupini je presenetljiva, saj so bili konji ves čas izpostavljeni fizični obremenitvi. Rezultati raziskave kažejo na prehodno povečanje askorbinske kisline v 6. tednu poskusa pri konjih, ki jim niso dodajali antioksidantov, kar je bilo nepričakovano. V 6. tednu poskusa so na konjih ugotovili povišano koncentracijo kreatin kinaze, kar kaže na to, da so imeli konji poškodovane mišice, prav tako pa so opazili povečanje koncentracije β -karotena v plazmi, vendar vzrok za to povečanje ostaja neznan. Potrebno pa je vedeti, da so ti konji tekmovali oz. dirkali že 7 mesecev prej in da se je njihova antioksidantska kapaciteta prilagodila na določen režim fizične obremenitve. Pričakovano je bilo tudi, da se antioksidantska kapaciteta ne bo zmanjšala, ampak da bo ostala na približno enakem nivoju.

Pri skupini 30 konj, ki so jim dodajali antioksidante je bilo opaziti pomembno povečanje koncentracije nekaterih snovi v krvi in zelo spremenjena hidrofилna, lipofilna in encimatska antioksidantska kapaciteta. Koncentracija α -tokoferola, β -karotena in selena v plazmi se je ob dodajanju antioksidantov pri konjih močno povečala, kar kaže na uspešno absorpcijo antioksidantov. Koncentracija cinka in bakra se nista veliko spremenili, kar kaže na morebitno slabšo absorpcijo in dostopnost oz. nalaganje teh elementov v druga tkiva, kot so jetra in mišice in ne v kri. Koncentracija GSH, GSSG in GRR se zaradi dodajanja antioksidantov ni spremenila. Aktivnost GPx v eritrocitih se je pri kontrolni skupini močno zmanjšala, medtem ko je pri skupini z antioksidanti ostala nespremenjena po 6. tednu in povečana po 12. tednu poskusa. De B. Moffarts in sod. (2005) so ugotovili, da antioksidanti ne samo preprečujejo aktivnost GPx, ampak jo tudi izboljšujejo in da dodajanje antioksidantov izboljšuje antioksidantski status športnih konj.

Zabeležili so tudi zanimive razlike med spoloma in različnimi starostmi. Med preiskovanimi markerji je bila koncentracija askorbinske kisline in ACW veliko višja pri dvoletnikih, kot pri triletnikih. Razlog za to je sinteza kolagena med obdobjem rasti (Hoffman in sod., 1995). Koncentracija α -tokoferola in selena je bila višja pri triletnikih. Pri žrebcih so ugotovili, da imajo v primerjavi s kobilami višjo koncentracijo askorbinske kisline v plazmi, k temu pa naj bi prispeval temperament. Kobile so imele višjo koncentracijo α -tokoferola v plazmi, kot tudi večjo aktivnost SOD in GPx. Dodajanje antioksidantov tako delno omogoča uravnavanje antioksidantskega ravnotežja v glavnem z izboljšanjem ACW, α -tokoferola, β -karotena, ACL in selena v plazmi.

8 SKLEPI

- V organizmu ob normalnih pogojih, prav tako nastajajo reaktivne kisikove spojine (ROS), vendar ima organizem sposobnost, da lahko sam vzpostavi ravnovesje med nastalimi reaktivnimi kisikovimi spojinami in antioksidanti. Oksidativni stres povzročajo nestabilne in zelo reaktivne oblike kisikovih atomov, molekul in ionov, ki imajo vsaj en neparni elektron.
- Oksidativni stres se v organizmu pojavi, ko antioksidantska kapaciteta organizma ne zmore vzpostaviti ravnovesja med antioksidanti in nastalimi ROS. Povečano nastajanje ROS poruši ravnovesje med antioksidanti in ROS, kar vodi v nastanek oksidativnega stresa.
- Aerobni organizmi so zaradi stalne izpostavljenosti oksidantom razvili način, da se lahko pred oksidativnim stresom ustrezno zaščitijo. Antioksidantski obrambni sistem delimo na tri nivoje: primarni, sekundarni in terciarni. V antioksidantski obrambni sistem so vključeni številni encimi, vitamini in elementi v sledovih, ki imajo antioksidantske lastnosti.
- Število objav na področju oksidativnega stresa pri konjih in antioksidantske zaščite ni veliko. Opravljene raziskave kažejo na ugodne učinke posameznih antioksidantov: ti zmanjšujejo oksidativni stres, preprečujejo morebitna obolenja in poškodbe. Pri obolenjih sklepov so pri konjih ugotovili ugoden učinek DMSO, ker zmanjšuje nastajanje prostih radikalov in s tem posledično zmanjšuje oksidativni stres.
- Pri fizično obremenjenih konjih so Siciliano in sod. (1997) ugotovili, da konji potrebujejo za vzdrževanje ravni vitamina E na ustreznem nivoju v krvi in mišičnem tkivu nekje do 300 IE/kg/SS vitamina E.
- Zelo pomembna je oblika vitamina E dodajanja konjem. Znanstevniki Gansen in sod.(2001) so ugotovili, da je naravna oblika vitamina E bolj učinkovita. Za doseg podobne koncentracije α -tokoferola v plazmi, je bilo potrebno dodajati skoraj polovico manj naravnega vitamina E.
- Dodajanje antioksidantov izboljšuje antioksidantsko obrambo konj. S tem posledično prispevamo k manjši mišični utrujenosti, manj poškodbam in boljšemu vsesplošnemu počutju konja.

9 POVZETEK

Za doseganje dobrih športnih rezultatov tako kot pri ljudeh, je tudi pri konjih potreben višji nivo treninga. Pri povečani vsakodnevni fizični obremenitvi prosti radikali nastajajo v večjem obsegu s tem pa se večja možnost za nastanek različnih obolenj npr. obolenj sklepov, srca, ožilja, dihal itd. Naš cilj je izničiti oz. zmanjšati poškodbe, ki jih povzročajo prosti radikali, to lako dosežemo tako, da konjem dodajamo antioksidante, kot so vitamin E, vitamin C in elemente v sledovih. Do sedaj opravljene raziskave kažejo kakšna količina posameznih antioksidantov je potrebna za vzdrževanje optimalne antioksidantske kapacitete. Za zmanjšanje stroškov ob morebitnih poškodbah in boleznih, ki jih povzroča oksidativni stres dodajamo konjem antioksidante.

Iz pregleda literature smo ugotovili minimalne potrebe antioksidantov, ki jih je smotrno dodajati glede na prehrano in fizično obremenitev športnih konj. Iz leta v leto se selekcioniranje in trening športnih konj vlaga vse več sredstev in vse težje je vzgojiti vrhunškega konja, zato nam omenjene raziskave pomagajo priti do tega cilja in konja dolgoročno obdržati zdravega.

10 VIRI

- Alessio H.M., Goldfarb A.H., Cao G. 1997. Exercise-induced oxidative stress before and after vitamin C supplementation. *International Journal of Sport Nutrition*, 7: 1-9
- Ashton T, Young L.S., Peters J.R., Jones E., Jackson S.K., Davies B., Rowland C.C. 1999. Electron spin resonance spectroscopy, exercise, and oxidative stress: An ascorbic acid intervention study. *Journal of Applied Physiology*, 87: 2032-2036
- Asmus K.D., Bonifacic M. 2000. Free radical Chemistry. V: Handbook of Oxidants in Exercise. Sen C.K., Packel L., Hanninen O. (eds.). Amsterdam, Elsevier: 3-54
- Avellini L., Chiardia E., Gaiti A. 1999. Effect of exercise training, selenium and vitamin E on some free radical scavengers in horses (*Equus caballus*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B*, 123: 147-154
- Babior B.M. 2000. Phagocytes and oxidative stress. *American Journal of Medicine*, 109: 33-44
- Baker L.A., Wrigley M.R., Pipkin J.L., Haliburton J.T., Bachman R.C. 2005. Digestibility and retention of inorganic and organic sources of copper and zinc in mature horses. V: Proceedings of the 19th Equine Science Society, Tucson, 31 maj-3 jun. 2005. Tucson Equine Science Society: 162-167
- Baskin C.R., Hinchcliff K.W., DiSilvestro R.A., Reinhart G.A., Hayek M.G., Chew B.P., Burr J.R., Swenson R.A. 2000. Effects of dietary antioxidant supplementation on oxidative damage and resistance to oxidative damage during prolonged exercise in sled dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 61: 886-891
- Basu S., Eriksson M. 1998. Oxidative injury and survival during endotoxemia. *FEBS Letters*, 438: 159-160
- Basu S., Eriksson M. 2000. Vitamin E in relation to lipid peroxidation in experimental septic shock. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 62: 195-199
- Becker B.F. 1993. Towards the physiological function of uric acid. *Free Radical Biology and Medicine*, 14: 615-631
- Birnboim H.C. 1988. A superoxide anion induced DNA strand-break metabolic pathway in human leukocytes: Effects of vandate. *Biochemistry and Cell Biology*, 66: 374-381
- Borsook H., Davenport H.W., Jeffries, C.S.R., Warren R.C. 1937. The oxidation of ascorbic acid and its reduction in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 117: 237-279
- Butler J., Halliwell B. 1982. Reaction of iron-EDTA chelates with the superoxide radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 218: 174-178

- Butler P.J., Woakes A.J., Smale K., Roberts C.A., Hillidge C.J., Snow D.H., Marlin D.J. 1993. Respiratory and cardiovascular adjustment during exercise of increasing intensity and during recovery in thoroughbred racehorses. *Journal of Experimental Biology*, 179: 159-180
- Burton G.W., Ingold K.U. 1986. Vitamin E: Application of the principles of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function. *Accounts of Chemical Research*, 19: 194- 201
- Collins A.R. 2004. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology*, 26: 249-261
- Chaiyotwittayakun A., Erskine R.J., Bartlett P.C., Herd T.H., Sears P.M., Harmont R.J. 2002. The effect of ascorbic acid and L-histidine therapy on acute mammary inflammation in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 85: 60-67
- Chatterjee, I. B. 1973. Evolution of biosynthesis of ascorbic-acid. *Science*, 182: 1271-1272
- Choi S.Y., Kwon H.Y., Kwon O.B., Kang, J.H. 1999. Hydrogen peroxide-mediated Cu, Zn-superoxide dismutase fragmentation: Protecting by carnosine, homocarnosine and anserine. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1472: 651-657
- Clark S.F. 2002. The biochemistry of antioxidants revisited. *Nutrition and Clinical Practice*, 17: 5-17
- Cromwell G.L., Hays V.W., Clark T.L. 1978. Effects of copper sulphate, copper sulfide, and sodium sulfide on performance and copper liver stores of pigs. *Journal of Animal Science*, 46: 692-698
- Cromwell, G.L., Stahly T.S, Monegue H.J. 1984. Effects of level and source of copper (sulfate vs. oxide) on performance and liver copper levels on weanling pigs. *Journal of Animal Science*, 59, Suppl. 1: 267
- Dallegri F, Ottonello L. 1997. Tissue injury in neutrophilic inflammation. *Inflammation Research*, 46: 382-391
- Deaton C.M., Marlin D.J. 2003. Exercise associated oxidative stress. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 2, 3: 278-291
- Deaton C.M., Marlin D.J., Roberts C.A., Smith N., Harris P.A., Kelly F.J., Schroter R.C. 2002. Antioxidant supplementation and pulmonary function at rest and exercise. *Equine Veterinary Journal Supplement*, 34: 58-65
- Deaton C.M., Marlin D.J., Smith N.C., Harris P.A., Schroter R.C., Kelly F.J. 2004. Antioxidant supplementation in horses affected by recurrent airway obstruction. *American Society for Nutritional Sciences. Journal of Nutrition*, 134: 2056S-2067S

- Deaton, C.M., Marlin D.J., Smith N.C., Roberts C.A., Harris P.A., Kelly F.J., Schroter R.C. 2003. Pulmonary bioavailability of ascorbic acid in an ascorbate-synthesising species, the horse. *Free Radical Research*, 37: 461-467
- De B. Moffarts., Kirschvink N., Art T., Pincemail J., Lekeux P. 2005. Effect of oral antioxidant supplementation on blood antioxidant status in trained thoroughbred horses. *The Veterinary Journal*, 196: 65-74
- De la Calle J., Burba D.J., Ramaswamy C.M., Hosgood G., Williams J., LeBlanc C., Moore R.M. 2002. Plasma and synovial fluid endothelin-1 and nitric oxide concentrations in horses with and without joint disease. *American Journal of Veterinary Research*, 63: 1648-1654
- Dillard C.J., Litov R.E., Tappel A.L. 1978. Effects of dietary vitamin E, selenium, and polyunsaturated fats on in vivo lipid peroxidation in the rats as measured by pentane production. *Lipids*, 13: 396-402
- Ernster L., Forsmark-Andree P. 1993. An endogenous antioxidant in aerobic organisms. *Clinical Investigations*, 71: S60-S65
- Esterbauer H, Schaur R.J., Zollner H. 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology Medicine*, 11: 81-128
- Evans, P., Halliwell B. 2001. Micronutrients: oxidant/ antioxidant status. *British Journal of Nutrition*, 85: S67-S74
- Fang Y.Z., Yang S., Wu G. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18: 872-879
- Fats and oils in human nutrition: Report of a joint expert conclusion. 1994. Rome, FAO: 147 str.
- Forman H.J., Fridovich I. 1973. Superoxide dismutase: A comparison of rate constants. *Archive of Biochemistry and Biophysics*, 158: 396-400
- Frankič T., Salobir J. 2007. Antioksidanti v prehrani živali: pomen za živali in porabnike. V: Zbornik predavanj, 16. mednarodno znanstveno posvetovanje o prehrani domačih živali "Zadravčevi-Erjavčevi dnevi", Radenci, 8-9 nov. 2007. Murska Sobota Kmetijsko gozdarski zavod: 27-40
- Frei, B. 1994. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *American Journal of Medicine*, 97: 5S-13S
- Gansen, S., Lindner A., Wagner A. 1995. Influence of a supplementation with natural and synthetic vitamin E in serum α -tocopherol content and V_4 of Thoroughbred horses. V: Proceedings of the 14th Equine Nutrition and Physiology Symposium, Ontario, 19-21 jan. 1995. Ontario, Equine Nutrition and Physiology Society: 68

- Gaté L., Paul J., Nguyen Ba G., Tew K.D., Tapiero H. 1999. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 53: 169-180
- Gillissen A., Nowak D. 1998. Characterization of N-acetylcysteine and ambroxol in antioxidant therapy. *Respiratory Medicine*, 92: 609-623
- Goldfarb A.H., McIntosh M.K., Boyer B.T., Fatouros J. 1994. Vitamin E effects on indexes of lipid peroxidation in muscle from DHEA-treated and exercised rats. *Journal of Applied Physiology*, 76: 1630-1635
- Gutteridge J.M.C., Halliwell B. 1994. Antioxidants in nutrition, health, and disease. New York, Oxford University Press: 135 str.
- Halliwell B. 1990. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radical Research Communications*, 9: 1-32
- Halliwell B., Chirico S. 1993. Lipid peroxidation: its mechanisms, measurement, and significance. *American Journal of Clinical Nutrition*, 57: 715-725
- Halliwell B., Gutteridge J.M. 1986. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: Some problems and concepts. *Archive of Biochemistry and Biophysics*, 246: 501-514
- Harrington, D.D., Walsh J., White V. 1973. Clinical and pathological findings in horses fed zinc deficient diets. *Equine Nutrition and Physiology Society*, Gainesville 18-20 jan., Florida, University of Florida, USA 3: 51
- Heunks L.M., Dekhuijzen P.N. 2000. Respiratory muscle function and free radicals: From cell to COPD. *Thorax*, 55: 704-716
- Hoffman R.M., Kronfeld D.S., Holland J.L., Greiwe-Crandell K.M. 1995. Preweaning diet and stall weaning method influences stress response in foals. *Journal of Animal Science*, 73: 2922-2930
- Huang H.Y., Appel L.J., Croft K.D., Miller III E.R., Mori T.A., Puddey I.B. 2002. Effects of vitamin C and vitamin E on in vivo lipid peroxidation: results of a randomized controlled trial. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76: 549-555
- Igrashi O., Yonekawa Y., Fujiyama-Fujihara Y. 1991. Synergistic action of vitamin E and vitamin C in vivo using a new mutant of Wistar-strain rats, ODS, unable to synthesize vitamin C. *Journal of Nutritional Sciences and Vitaminology (Tokyo)*, 37: 359-369
- Itoh H., Ohkuwa T., Yamazaki Y., Shimoda T., Wakayama A., Tamura S., Yamamoto T., Sato Y., Miyamura M. 2000. Vitamin E supplementation attenuates leakage of enzymes following 6 successive days of running training. *International Journal of Sports Medicine*, 21: 369-374

- Ješe Janežič V. 2001. Koncentracija malondialdehida v krvni plazmi in seču kot indikatorja peroksidacije v prehranskih raziskavah. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 95 str.
- Kane E. Vitamin E: An Essential Nutrient for Horses. Kentucky Equine Research http://www.ker.com/library/Proceedings/04/VitaminE_p73.pdf (20. feb. 2010)
- Kanter M. 1998. Free radicals, exercise and antioxidant supplementation. *Proceedings of the Nutrition Society*, 57: 9-13
- Kaur H., Halliwell B. 1990. Action of biologically-relevant oxidizing species upon uric acid. Identification of uric acid oxidation products. *Chemico-Biological Interactions*, 73: 235-247
- Kirschvink N., Smith N., Fievez L., Bougnet V., Art T., Degand G., Marlin D., Roberts C., Genicot B., Lindsey P., Lekeux P. 2002. Effect of chronic airway inflammation and exercise on pulmonary and systemic antioxidant status of healthy and heaves-affected horses. *Equine Veterinary Journal*, 34: 563-571
- Kleczkowski M., Klucinski W., Shaktur A., Sikora J. 2005 Concentration of ascorbic acid in the blood of coes with subclinical mastitis. *Polish Journal of Veterinary Science*, 8: 705-712
- Ledwozyw A., Stolarczik H. 1992 The involvement of polymorphonuclear leucocytes in the pathogenesis of bronchopneumonia in calves. VI. Superoxide dismutase and lipoprotein lipase activities. *Acta Veterinaria Hungarica*, 40: 267-277
- Lindahl T., Nyberg B. 1972. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, 11: 3610-3618
- Lykkesfeldt J., Loft S., Poulsen H.E. 1995. Determination of ascorbic acid in plasma by high-performance liquid chromatography with coulometric detection- Are they reliable biomarkers of oxidative stress. *Analytical Biochemistry*, 229: 329-335
- Lykkesfeldt J., Svendsen O. 2007. Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. *The Veterinary Journal*, 173: 502-511
- Lynch, G.L. Coelho M.B. 1996a. Vitamin E structure and bioavailability. V: Vitamin E, Animal Nutrition and Management. Mount Olive, 1996. New Jersey, BASF Corporation, USA. 51-53
- Lynch, G.L. Coelho M.B. 1996b. Natural occurrence and content of vitamin E in feedstuffs. V: Vitamin E, Animal Nutrition and Management, Mount Olive, 1996. New Jersey, BASF Corporation, USA. 43-48
- Löscher W., Jaeschke, G. Keller H. 1984. Pharmacokinetics of ascorbic acid in horses. *Equine Veterinary Journal*, 16: 59-65

- Marnett L.J. 1999. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research*, 424: 83-95
- Marnett L.J. 2002. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology*, 181-182: 2219-2222
- Marlin, D.J., Fenn, K., Smith N., Deaton, C.D., Roberts, C.A., Harris, P.A., Dunster, C, Kelly, F. J. 2002. Changes in circulatory antioxidant status in horses during prolonged exercise. *American Society for Nutritional Sciences* 6 Suppl. 2: 1226S-1627S
- Medved I., Brown M.J., Bjorksten A.R., Leppik J.A., Sostaric S, McKenna M.J. 2003. N-Acetylcysteine infusion alters blood redox status but not time to fatigue during intense exercise in humans. *Journal of Applied Physiology*, 94: 1572-1582
- Meydani M., Evans W.J., Handelman G., Biddle L., Fielding R.A., Meydani S.N., Burrill J., Fiatarone M.A., Blumberg J.B., Cannon J.G. 1993. Protective effect of vitamin E on exercise-induced oxidative damage in young and older adults. *American Journal of Physiology*, 264: R992-R998
- McCall M.R., Frei B. 1999. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radical Biology & Medicine*, 26: 1034-1053
- McDowell L.R. 1989. *Vitamins in Animal Nutrition*. New York: Academic press, 213-217
- McCord J.M., Fridovich I. 1969. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulphite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *Journal of Biological Chemistry*, 244: 6056-6063
- Mills P.C., Smith N.C., Casasa I., Harris P., Harris R.C., Martin, D.J. 1996. Effects of exercise intensity and environmental stress on indices of oxidative stress and iron homeostasis during exercise in the horse. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, 74: 60-66
- Narita H. 1993. Synthetic antioxidants. V: *Encyclopaedia of food science food technology and nutrition*. Vol 1. Macrae R., Robinson R.K., Sadler M.J. (eds.). San Diego, Academic Press: 216-226
- Niki E. 1991. Action of ascorbic acid as scavenger of active and stable oxygen radicals. *American Journal of Clinical Nutrition*, 54: 1119-1124
- Niki E., Nouguchi N., Tsuchihashi H., Gotoh N. 1995. Interaction among vitamin C, vitamin E, and β -carotene. *American Journal of Clinical Nutrition*, 62: 1322-1326
- NRC. 1987. *Vitamin tolerance of animals*. Washington, DC. National Academy Press.
- NRC. 2005. *Mineral tolerance of Animals*, 2nd rev. (Eds.). Washington, DC: The National Academy Press, 109-124

- Ostling O., Johanson K.J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123: 291-298
- Orešnik A., Kermauner A. 2006. *Osnove prehrane živali*. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 44
- Packer L. 1997. Oxidants, antioxidant nutrients and the athlete. *Journal of Sports Sciences*, 15: 353-363
- Packer J.E., Slater T.F., Wilson R.L. 1979. Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature*, 278: 737-738
- Pagan, J.D. 1994. Nutrient digestibility in horses. Versailles, Kentucky, USA, Kentucky Equine Research: 77-89
- Pagan, J.D. Jackson S.G. 1991b. Distillers dried grains as a feed ingredient for horse rations: a palatability and digestibility study. V: Proceedings of the 12th Equine Nutrition Physiological Society Symposium, Calgary 1991. Alberta Equine Nutrition Physiological Society: 49-54
- Pagan, J.D., Kane E., Nash D. 2005. Form and source of tocopherol affects vitamin E status in Thoroughbred horses. *Pferdeheilkunde*, 21: 101-102
- Petersson K.H., Hintz H.F., Schryver H.F., Combs Jr G.F, Lindholm A, Jeffcot L. B.. 1991 The effect of vitamin E on membrane integrity during submaximal exercise. V: *Equine Exercise Physiology*. Davis, CA, ICEEP Publications: 315-322
- Podoll K.L., Bernard J.B., Ullrey D.E, Debar S.R., Ku P.K., Magee W.T. 1992. Dietary selenate versus selenite for cattle, sheep, and horses. *Journal of Animal Science*, 70: 1965-1970
- Pryor W.A., Squadrito G.L. 1995. The chemistry of peroxynitrite: A product from reaction of nitric oxide with superoxide. *American Journal of Physiology*, 268: L699-L722
- Roth E., Oehler R., Manhart N., Exner R., Wessner B., Strasser E., Spitter A. 2002. Regulative potential of glutamine-relation to glutathione metabolism. *Nutrition*, 18: 217-221
- RDA 1989. Recommended Dietary Allowances. 10th ed.. Whashington, National Academy Press: 99-105
- Sanchez-Quesada J.L., Jorba O., Payes A., Otal C., Serra-Grima R., González-Sastre F., Ordonez-Llanos J. 1998. Ascorbic acid inhibits the increase in low- density lipoprotein (LDL) susceptibbility to oxidation and the proportion of electronegative LDL induced by intense aerobic exercise. *Coron Artery Disease*, 9: 249-255
- Sarna S., Sahi T., Koskenvuo M., Kapiro J. 1993. Increased life expectancy of world class male athletes. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 25: 237-244

- Schryver H.F., Hintz H.F., Lowe J.E., Hintz R.L., Harper R.B., Reid J.T. 1974. Mineral composition of the whole body, liver and bone of young horse. *Journal of Nutrition*, 104: 126-132
- Sealy R.C., Puzyna W., Kalyanaraman B., Felix C.C. 1984. Identification by electron spin resonance spectroscopy of free radicals produced during autoxidative melanogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 800: 269-276
- Seifried H., Anderson D., Fischer E., Milner J. 2007. A review of interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 9: 567-579
- Sen C.K., Atalay M., Hanninen O. 1994a. Exercise- induced oxidative stress: Glutathione supplementation and deficiency. *Journal of Applied Physiology*, 77: 2177-2187
- Sen C.K., Rankinen T., Väisänen S., Rauramaa R. 1994b. Oxidative stress after human exercise: Effect of N- Acetylcysteine supplementation. *Journal of Applied Physiology*, 76: 2570-2577
- Sevianian A, Daviies K.J, Hochstein P.1991. Serum urate as an antioxidant for ascorbic acid. *American Journal of Clinical Nutrition*, 54: 1129S-1134S
- Shuker D.E.G. 2002. The enemy at the gates ? DNA adducts as biomarkers of exposure to exogenous and endogenous genotoxic agents. *Toxicology Letters*, 134: 51-56
- Siciliano P.D., Parker A.L., Lawrence L.M. 1997. Effect of dietary vitamin E supplementation on the integrity os sceletal muscle in exercised horses. *Journal of Animal Science*, 75: 1553- 1560
- Sies H. 1993. Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*, 215: 213-219
- Smith G., Bertone A.L., Kaeding C., Simmons E.J., Apostoles S. 1998. Anti-inflammatory effects of topically applied dimethyl sulfoxide gel on endotoxin-induced synovitis in horses. *American Journal of Veterinary Research*, 59: 1149-1152
- Smith J.D., Jordan R.M., Nelson M.L. 1975. Tolerance of ponies to high levels of dietary copper. *Journal of Animal Science*, 41: 1645-1649
- Smith K.L., Hogan J.S., Weiss W.P. 1997 Dietary vitamin E and selenium affect mastitis and milk quality. *Journal of Animal Science*, 75: 1659-1665
- Snow D.H., Frigg M. 1987. Oral administration of different formulations of ascorbic acid to the horse. V: Proceedings of the 10th Equine Nutrition Physiology Society Symposium, Forth Collins, 1987. Forth Collins, Colorado Equine Nutrition Physiology Society: 617
- Snow D.H., Frigg M. 1990: Bioavailability of ascorbic acid in horses. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 13: 393-403

- Snow D.H., Gash S.P., Cornelius J. 1987. Oral administration of ascorbic acid to horses. *Equine Veterinary Journal*, 19: 520-523
- Stohrer M., Brincker B., Menn M., Stangassinger M. 2007. Antioxidative status of horses after glutamine supplementation and altitude training. *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology*, 16: 23
- Sumida S., Tanaka K., Kitao H., Nakadomo F. 1989. Exercise-induced lipid peroxidation and leakage of enzymes before and after vitamin E supplementation. *International Journal of Biochemistry*, 21: 835-838
- Suzuki Y. 1990: Synergism of ascorbic acid and glutathione in the reduction of hexavalent chromium in vitro. *Industrial Health*, 28: 9-19
- Šuput D., Kamarič L. 1998. Prosti radikali. V: Izbrana poglavja iz patološke fiziologije. Robarič S. (ur.). Ljubljana, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo: 23-43
- Tidius P.M., Houston M.E. 2001. Vitamin A status and response to exercise training. *Sports Medicine*, 31: 1465-1472
- Uchida K., Shiraishi M., Naito Y., Torii Y., Nakamura Y., Osawa T. 1999. Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation: 4-hydroxy-2-nonenal is a potential inducer of intracellular peroxide production. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 2234-2242
- Underwood, E.J. 1981. *The Mineral Nutrition of livestock*. 2nd ed. Slough, UK, Commonwealth Agricultural Bureaux, 10
- Wagner E.L., Potter G.D., Eller E.M., Gibbs P.G., Hood D.M. 2005. Absorption and retention of trace minerals in adult horses. *Professional Animal Scientist*, 21: 207-211
- White A., Estrada M., Walker K., Wisnia P., Filgueira G., Valdes F., Araneda O., Behn C., Martinez R. 2001. Role of exercise and ascorbate on plasma antioxidant capacity in thoroughbred race horses. *Comparative Biochemistry and Physiology part A Molecular and Integrative Physiology*, 128: 99-104
- Witt E.H., Reznick A.Z., Viguie C.A., Starke-Reed P., Packer L. 1992 Exercise, oxidative damage and effects of antioxidant manipulation. *Journal of Nutrition*, 122: 766-773
- Young L.E., Marlin D.J., Deaton C., Brown-Feltner H., Roberts C.A., Wood J.L., 2002 Heart size estimated by echocardiography correlates with maximal oxygen uptake. *Equine Veterinary Journal*, Suppl. 34: 467-471

ZAHVALA

Za vodenje pri delu in pridobljenem znanju se zahvaljujem mentorju prof. dr. Janezu Salobilju.

Za pregled diplomske naloge, komentarje in nasvete se zahvaljujem prof. dr. Andreju Lavrenčiču.

Nazadnje pa se za hiter pregled in nasvete zahvaljujem prof. dr. Ivanu Štuhcu

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Blaž NEMANIČ

**ZAŠČITA PRED OKSIDATIVNIM STRESOM
ŠPORTNIH KONJ**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010