

**UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA**

Sara Jagrič Munih

**FARMAKOKINETIKA KOENCIMA Q₁₀ PRI
ŠPORTNIH KONJIH KASAČIH IN NJEGOV POMEN
PRI PREPREČEVANJU OKSIDATIVNEGA STRESA
PRI VADBI**

Doktorska disertacija

Ljubljana, 2012

**UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA**

UDK 636.1.09:615.35:798.2.015:612.744:66.094.3.097.8:577.161.6(043.3)

Sara Jagrič Munih, univ. dipl. ing. zoot.

**FARMAKOKINETIKA KOENCIMA Q₁₀ PRI ŠPORTNIH KONJIH
KASAČIH IN NJEGOV POMEN PRI PREPREČEVANJU
OKSIDATIVNEGA STRESA PRI VADBI**

Doktorska disertacija

**PHARMACOKINETICS OF COENZYME Q₁₀ AND ITS EFFECTS ON
EXERCISE-INDUCED OXIDATIVE STRESS IN STANDARD BRED
HORSES**

Doctoral Thesis

Ljubljana, 2012

Sara Jagrič Munih

FARMAKOKINETIKA KOENCIMA Q₁₀ PRI ŠPORTNIH KONJIH KASAČIH IN
NJEHOV POMEN PRI PREPREČEVANJU OKSIDATIVNEGA STRESA PRI VADBI

Delo je bilo opravljeno na:

Veterinarski fakulteti, Univerze v Ljubljani
Inštitutu za fiziologijo, farmakologijo in toksikologijo
Predstojnik: prof. dr. Silvestra Kobal, dr. vet. med

V laboratoriju Klinike za kirurgijo in male živali

Predstojnik: doc. dr. Alenka Seliškar, dr. vet. med

Javni zagovor je bil opravljen v Ljubljani, dne _____

Mentorica: prof. dr. Silvestra Kobal, dr. vet. med.

Somentor: doc. dr. Tomaž Vovk, mag. farm.

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Modest Vengušt, dr. vet. med.

Član: izr. prof. dr. Iztok Grabnar, mag. farm.

Član: doc. dr. Marko Volk, dr. vet. med.

Član: prof. dr. Peter Dovč

Izjava o delu

Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat mojega lastnega
raziskovalnega dela.

Sara Jagrič Munih

FARMAKOKINETIKA KOENCIMA Q₁₀ PRI ŠPORTNIH KONJIH KASAČIH IN NJEGOV POMEN PRI PREPREČEVANJU OKSIDATIVNEGA STRESA PRI VADBI

IZVLEČEK

Ključne besede: Športna medicina – veterinarska; telesna vadba živali – fiziologija; antioksidanti – kri; ubikinon – kri – farmakokinetika; oksidativni stres – fiziologija; kri, kemične analize; lipidna peroksidacija – učinki zdravil; konji

Izbrana fizična vadba konj privede do njihove povečane fizične aktivnosti, in s tem do povečanega nastanka reaktivnih spojin (RS). To vodi v povečan obseg lipidne peroksidacije in poškodbe membran skeletnih mišic. Povečan nastanek RS zaradi vadbe, ob oslavljenem obrambnem sistemu, vodi v oksidativni stres. Z dodatkom antioksidantov v prehrani, kot je koencim Q₁₀ (CoQ₁₀), lahko zmanjšamo obseg lipidne peroksidacije in s tem oksidativnih poškodb, nastalih z vadbo. Z raziskavo smo želeli ugotoviti prisotnost oksidativnega stresa pri izbrani fizični vadbi 10 športnih konj kasačev ter raziskati ali je z 8 tedenskim peroralnim dajanjem CoQ₁₀ v odmerku 600 mg na dan možno preprečiti pojav oksidativnega stresa pri fizični vadbi konj. Ugotovljene plazemske koncentracijske profile CoQ₁₀ po peroralnem dajanju dveh različnih odmerkov (500 mg in 1000 mg) smo analizirali z metodami neprostorske farmakokinetične analize. Krvne parametre smo določali s pomočjo hematološkega, biokemijskega in elektrolitskega analizatorja. CoQ₁₀ v plazmi smo določali z metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC)-MS, MDA v plazmi z metodo HPLC in UV detekcijo, α -tokoferol v plazmi s HPLC s fluorescenčno detekcijo. S porastom kazalca oksidativnega stresa, t.j. MDA izmerjenega po vadbi, smo potrdili prisotnost oksidativnega stresa, povzročenega z vadbo. Ugotovili smo negativno korelacijo med MDA in CoQ₁₀ 48 ur po vadbi ($P < 0,05$). Korelacije med MDA in mišičnima encimoma kreatin kinazo (CK) in aspartat aminotransferazo (AST) v serumu niso bile signifikantne ($P > 0,05$). Po enkratnem peroralnem odmerku 500 mg in 1000 mg CoQ₁₀ so bile plazemske koncentracije CoQ₁₀ višje od endogenih ($P < 0,05$). V območju med 500 in 1000 mg farmakokinetika CoQ₁₀ ni bila proporcionalna. Farmakokinetična analiza je pokazala majhno biološko uporabnost CoQ₁₀ pri konjih kasačih. 8-tedensko peroralno dajanje CoQ₁₀ konjem v odmerku 600 mg na dan ni zmanjšalo stopnje lipidne peroksidacije in s tem oksidativnega stresa pri izbrani fizični vadbi konj v primerjavo s placebo skupino. Razlike med tretirano in placebo skupino so bile statistično višje zgolj v času odvzema vzorca v boksu, pred vadbo, po 8-tedenskem obdobju dajanja CoQ₁₀, pri tretirani skupini ($P < 0,05$).

Z našo raziskavo smo doprinesli k novim dognanjem na področju poznavanja farmakokinetike CoQ₁₀ pri športnih konjih kasačih. Hkrati smo ugotovili, da CoQ₁₀ v odmerku 600 mg ne prispeva k zmanjšanju oksidativnega stresa.

PHARMACOKINETICS OF COENZYME Q₁₀ AND ITS EFFECTS ON EXERCISE-INDUCED OXIDATIVE STRESS IN STANDARD BRED HORSES

ABSTRACT

Key words: Sport medicine – veterinary; physical conditioning, animal – physiology; antioxidants – blood; ubiquinone – blood – pharmacokinetics; oxidative stress – physiology, blood chemical analysis; lipid peroxidation – drug effects; horses

Increasing physical activity through exercise can modify the horse's metabolism which could result in enhanced production of reactive species (RS), thus inducing lipid peroxidation and exposing the horse to exercise-induced oxidative stress. Increased RS production could favour membrane lipid peroxidation, thereby decreasing muscle the cells' membrane integrity and leading to tissue damage. Because of its role as an effective antioxidant, dietary supplementation containing coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀) has been shown to reduce lipid peroxidation and oxidative damage caused by exercise. The main purpose of the present study was to examine the presence of oxidative stress induced by selected field exercise in 10 standardbred horses. Furthermore, we were also interested whether 8 weeks of supplementation with CoQ₁₀ in daily doses of 600 mg could prevent exercise-induced oxidative stress in standardbred horses. We also evaluated the changes in plasma concentration of CoQ₁₀ after one single oral dose of 500 mg and 1000 mg CoQ₁₀ by pharmacokinetic analysis. Blood samples were determined with an automated laser haematology analyser, biochemical and electrolyte analyser. Plasma malondialdehyde (MDA) was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) with an UV detector, plasma CoQ₁₀ was determined by HPLC-MS and plasma α -tokoferol was determined by HPLC fluorescence detector. The concentration of plasma MDA increased after exercise, thus showing the presence of exercise-induced oxidative stress, as evidenced by increased lipid peroxidation. A significant negative correlation between MDA and CoQ₁₀ 48 hours post exercise ($P < 0.05$) and the absence of significant correlations between MDA and serum CK and AST were found ($P > 0.05$). After one single oral dose of 500 mg and 1000 mg CoQ₁₀ the concentration of CoQ₁₀ increased

significantly ($P < 0.05$). However, the pharmacokinetics of the 2 different doses were not proportional. The pharmacokinetic profile of CoQ₁₀ showed low bioavailability of CoQ₁₀ in standardbred horses. After 8 weeks of supplementation with a daily dose of 600 mg CoQ₁₀ no effects on reducing exercise-induced oxidative stress were observed. Significant increases for the supplemented group relative to the placebo group were found for plasma CoQ₁₀ at the box values prior to exercise, after the 8 weeks of administration of CoQ₁₀ ($P < 0.05$). The present study lead to further knowledge on the pharmacokinetic profile of CoQ₁₀ in standardbred horses, though the benefits of 600 mg supplementation in reducing oxidative stress could not be proven.

VSEBINA

KAZALO PREGLEDNIC	12
KAZALO SLIK	13
KAZALO PREGLEDNIC	13
1 UVOD	21
1.1 NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE	22
2 PODATKI IZ LITERATURE	23
2.1 REAKTIVNE SPOJINE.....	23
2.1.1 Reaktivne dušikove spojine	24
2.1.2 Reaktivne kisikove spojine	25
2.1.2.1 Superoksidni radikal.....	25
2.1.2.2 Vodikov peroksid	25
2.1.2.3 Hidroksilni radikal	26
2.2 VLOGA RS V FIZIOLOŠKIH PROCESIH	26
2.2.1 Mehanizmi nastanka RS med vadbo	27
2.2.1.1 Mitohondrijska dihalna veriga	27
2.2.1.2 Z vadbo povzročena hipoksemija.....	28
2.2.1.3 Povečana koncentracija kateholaminov- avtooksidacija.....	28
2.2.1.4 Aktivacija nevtrofilcev kot odziv na akutno vadbo	28
2.2.1.5 Drugi mehanizmi nastanka RS	29
2.3 POSLEDICE PREKOMERNE TVORBE RS	29
2.3.2 Poškodbe biomolekul.....	29
2.3.2.1 Lipidna peroksidacija	30
2.3.2.2 Kazalniki lipidne peroksidacije	31
2.4 VADBA IN BIOLOŠKI ODZIV	32
2.4.1 Vadba in oksidativni stres	34
2.4.1.1. Oksidativni stres pri vadbi športnih konj	35
2.5 OBRAMBNI MEHANIZMI PRED RS IN OKSIDATIVNIM STRESOM.....	36
2.5.2 Delitev antioksidantov	38
2.5.2.1 Encimski antioksidanti.....	38
2.5.2.1.1 Superoksid dismutaza.....	39
2.5.2.1.2 Glutation peroksidaza	39
2.5.2.1.3 Katalaza	40
2.5.2.2 Neencimski antioksidantni sistem.....	41
2.5.2.2.1 Hidrofilni antioksidanti.....	41
2.5.2.2.2 Lipofilni antioksidanti	42
2.6 KAZALCI OKSIDATIVNEGA STRESA IN OKSIDATIVNIH POŠKODB, NASTALIH Z VADBO	43
2.6.1 Encimi kot indikatorji povečane prepustnosti mišičnih vlaken.....	43
2.6.1.1 Kreatin kinaza	44
2.6.1.2 Aspartat aminotransferaza	44
2.6.1.3 Laktat dehidrogenaza	44
2.6.2 Antioksidanti kot kazalci oksidativnega stresa	45

2.6.3 Metode merjenja kazalcev oksidativnega stresa	46
2.7 DODATKI ANTIOKSIDANTOV K PREPREČEVANJU OKSIDATIVNEGA STRESA	47
2.7.1 Dodatek antioksidantov v prehrani športnih konj	48
2.8 KOENCIM Q ₁₀	50
2.8.1 CoQ ₁₀ v obliki prehranskega dodatka	51
2.8.2.1 Absorpcija in biološka uporabnost CoQ ₁₀	52
2.8.2.1.1 Povečanje biološke uporabnosti z vodotopno obliko CoQ ₁₀	53
2.8.2.1.2 Betaciklodekstrinski kompleks CoQ ₁₀	53
2.8.2.2 Distribucija in privzem CoQ ₁₀	54
2.8.2.3 Metabolizem in izločanje CoQ ₁₀	54
2.8.3 CoQ ₁₀ pri športnih konjih kasačih.....	54
3 MATERIAL IN METODE	55
3.1 MATERIAL	55
3.1.1 Konji kasači, vključeni v študijo	55
3.1.1.1 Izbira in opis konj kasačev	55
3.1.2 Prehrana konj kasačev v obdobju poskusa	59
3.1.2.1 Priprava paste kompleksa CoQ ₁₀ -CD.....	60
3.1.3 Poskus določanja fizioloških vrednosti izbranih parametrov	60
3.1.4 Farmakokinetični poskus s CoQ ₁₀	60
3.1.5 Poskus z dodatkom CoQ ₁₀ oz. placeba.....	60
3.1.6 Opis izbrane fizične vadbe konj kasačev	60
3.2 METODE	61
3.2.1 Odvzem in priprava krvnih vzorcev.....	61
3.2.1.1 Odvzem vzorcev	61
3.2.1.2 Priprava vzorcev	62
3.2.2 Analizne metode	63
3.2.2.1 Hematološke analize.....	63
3.2.2.2 Biokemijske analize	64
3.2.2.3 Določanje celokupne antioksidativne kapacitete.....	64
3.2.2.4 Določanje aktivnosti superoksid dismutaze	64
3.2.2.5 Določanje aktivnosti glutation peroksidaze.....	65
3.2.2.6 Določanje α-tokoferola.....	65
3.2.2.7 Določanje CoQ ₁₀	65
3.2.2.8 Določanje MDA.....	66
3.2.3 Farmakokinetična analiza CoQ ₁₀	66
3.3 STATISTIČNA ANALIZA.....	67
4 REZULTATI.....	67
4.1 REZULTATI MERITEV FIZIOLOŠKIH VREDNOSTI IZBRANIH PARAMETROV	68
4.1.1 Rezultati hematoloških vrednosti	68
4.1.2 Rezultati biokemijskih vrednosti.....	70
4.1.3 Rezultati kazalnikov oksidativnega stresa.....	74
4.2 FARMAKOKINETIČNI REZULTATI CoQ ₁₀	76

4.2.1 Nephrostorska farmakokinetična analiza (NCA)	76
4.2.1.1 Proporcionalnost farmakokinetike CoQ ₁₀ z odmerkom	78
4.2.2 Farmakokinetično modeliranje	80
4.3 REZULTATI 8-TEDENKEGA OBDOBJA DAJANJA CoQ ₁₀ OZ. PLACEBA	81
4.3.1 Rezultati hematoloških vrednosti	81
4.3.2 Rezultati biokemijskih vrednosti	84
4.3.3 Rezultati kazalnikov oksidativnega stresa	91
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	95
5.1 RAZPRAVA	95
5.1.1 Meritve fizioloških vrednosti izbranih parametrov	95
5.1.2 Farmakokinetika CoQ ₁₀	99
5.1.3 8-tedensko obdobje dajanja CoQ ₁₀ oz. placeba	102
5.2 SKLEPI	109
6 POVZETEK	110
7 SUMMARY	112
9 ZAHVALE	115
10 REFERENCE	116

KAZALO PREGLEDNIC

<i>Preglednica 1: Povzetek glavnih RS (prirejeno po Halliwell in Gutteridge, 2010)</i>	24
<i>Preglednica 2: Podatki o konjih, vključenih v poskus določanja fizioloških vrednosti in farmakokinetika CoQ₁₀ (marec, 2010).</i>	55
<i>Preglednica 3: Podatki o konjih, vključenih v poskus 8-tedenskega dajanja CoQ₁₀ oz. placebo (marec, 2011)</i>	57
<i>Preglednica 4: Sestavnica industrijske krmne mešanice Tradition Cavalor (proizvajalec Cavalor, Belgija).</i>	59
<i>Preglednica 5: Povprečne vrednosti ($\pm$SD) hematoloških parametrov 10 konj kasačev glede na čas odvzema vzorca.</i>	69
<i>Preglednica 6: Povprečne vrednosti ($\pm$SD) biokemijskih parametrov 10 konj kasačev glede na čas odvzema vzorca.</i>	71
<i>Preglednica 7: Povprečne vrednosti ($\pm$SD) antioksidantnih parametrov 10 konj kasačev glede na čas odvzema vzorca.</i>	75
<i>Preglednica 8: Farmakokinetični parametri po aplikaciji CoQ₁₀ v odmerku 500 mg pri 10 konjih kasačih (n = 10).</i>	78
<i>Preglednica 9: Farmakokinetični parametri po aplikaciji CoQ₁₀ v odmerku 1000 mg pri 10 konjih kasačih (n = 10).</i>	78
<i>Preglednica 10: Povprečne vrednosti plazemske koncentracije CoQ₁₀ v 24 urnem intervalu pri 10 konjih kasačih pri 2 različnih odmerkih.</i>	79
<i>Preglednica 11: Povprečne vrednosti ($\pm$SD) hematoloških parametrov 10 konj kasačev glede na čas odvzema vzorca skupine CoQ₁₀ in placebo.</i>	81
<i>Preglednica 12: Povprečne vrednosti ($\pm$SD) biokemijskih parametrov 10 konj kasačev glede na čas odvzema vzorca skupine CoQ₁₀ in placebo.</i>	86
<i>Preglednica 13: Povprečne vrednosti ($\pm$SD) elektrolitov in mineralov 10 konj kasačev glede na čas odvzema vzorca skupine CoQ₁₀ in placebo.</i>	90
<i>Preglednica 14: Povprečne vrednosti ($\pm$SD) antioksidantov pri 10 konjih kasačih glede na čas odvzema vzorca skupine CoQ₁₀ in placebo.</i>	92

KAZALO SLIK

Slika 1: Glavna oksidativna pot v organizmu in glavni antioksidantni sistem, ki pretvarja ali inaktivira radikale ali ROS. O ₂ = kisik; O ₂ • ⁻ = supersoksidni radikal; H ₂ O ₂ = vodikov peroksid; HO• = hidroksilni radikal; LH = maščobna kislina; L = radikal maščobne kisline; LOO• = lipidni peroksid; SOD = superoksid dismutaza; CAT = katalaza; GPx = glutation peroksidaza; MPO = mieloperoksidaza; GSH = reducirani glutation; GSSG = oksidirani glutation; GS-X = glutation vezan na oksidant; NADPH = nikotinamid adenin fosfat; U = sečna kislina; Vit C = vitamin C; Vit E = vitamin E; UQ = ubikinon (prirejeno po Kirschvink in sod., 2008).....	37
Slika 2: Redoks stanja koencima Q ₁₀ (prirejeno po Žmitek J in Žmitek K, 2009).	50
Slika 3: Plazemske vrednosti laktata 10 konj kasačev, izmerjene pred vadbo (boks), po vadbi, 24 ur in 48 ur po vadbi. (* povprečne vrednosti parametra z nadnapisom nad stolpcem se statistično značilno razlikujejo glede na druge časovne odvzeme (P < 0,05)).	73
Slika 4: Vrednosti CK in AST aktivnosti v serumu 10 konj kasačev, izmerjene pred vadbo (boks), po vadbi, 24 ur in 48 ur po vadbi. (* povprečne vrednosti parametra z nadnapisom nad stolpcem se statistično značilno razlikujejo glede na druge časovne odvzeme (P < 0,05); ♦ povprečne vrednosti parametra z nadnapisom nad stolpcem se statistično značilno razlikujejo glede na vrednosti po vadbi (P < 0,05)).	74
Slika 5: Plazemske vrednosti MDA pri 10 konjih kasačih, izmerjene pred vadbo (boks), po vadbi, 24 ur in 48 ur po vadbi. (* povprečne vrednosti parametrov z nadnapisom nad stolpcem se statistično značilno razlikujejo glede na boks vrednosti (P < 0,05)).	76
Slika 6: Prikaz individualnih koncentracijskih profilov pri 10 konjih kasačih po enkratni aplikaciji odmerkov 500 in 1000 mg CoQ ₁₀	79
Slika 7: Enoprostorni farmakokinetični model.....	80
Slika 8: Vrednosti CK in AST aktivnosti v serumu 10 konj kasačev, izmerjene v Boks pred vadbo = čas odvzema po 8 tedenskem obdobju dajanja placeba oz. CoQ ₁₀ tik pred vadbo, Po vadbi = čas odvzema po vadbi po 8 tedenskem obdobju dajanja placeba oz. CoQ ₁₀ ; 24 ur po vadbi = čas odvzema 24 ur po vadbi po 8 tedenskem obdobju dajanja placeba oz. CoQ ₁₀ ; 48 ur po vadbi = čas odvzema 48 ur po vadbi po 8 tedenskem obdobju dajanja placeba oz. CoQ ₁₀	89
(♦ povprečne vrednosti parametra z nadnapisom nad stolpcem se statistično značilno razlikujejo glede na vrednosti po vadbi (P < 0,05)) * povprečne vrednosti parametra z nadnapisom nad stolpcem se statistično značilno razlikujejo glede na Boks baz vrednosti (P < 0,05)).	89
Slika 9: Plazemske koncentracije CoQ ₁₀ 10 konj kasačev pri skupini CoQ ₁₀ in placebo, izmerjene v času Boks pred vadbo = čas odvzema po 8 tedenskem obdobju dajanja placeba oz. CoQ ₁₀ tik pred vadbo, Po vadbi = čas odvzema po vadbi po 8 tedenskem obdobju dajanja placeba oz. CoQ ₁₀ ; 24 ur po vadbi = čas odvzema 24 ur po vadbi po 8 tedenskem obdobju dajanja placeba oz. CoQ ₁₀ ; 48 ur po vadbi = čas odvzema 48 ur po vadbi po 8 tedenskem obdobju dajanja placeba oz. CoQ ₁₀	93
Slika 10: Plazemske koncentracije MDA 10 konj kasačev pri skupini CoQ ₁₀ in placebo, izmerjene v Boks pred vadbo = čas odvzema po 8 tedenskem obdobju dajanja placeba oz. CoQ ₁₀ tik pred vadbo, Po vadbi = čas odvzema po vadbi po 8 tedenskem obdobju dajanja placeba oz. CoQ ₁₀ ; 24 ur po vadbi = čas odvzema 24 ur po vadbi po 8 tedenskem obdobju dajanja placeba oz. CoQ ₁₀ ; 48 ur po vadbi = čas odvzema 48 ur po vadbi po 8 tedenskem obdobju dajanja placeba oz. CoQ ₁₀	94
(* povprečne vrednosti parametra z nadnapisom nad stolpcem se statistično značilno razlikujejo glede na druge časovne odvzeme (P < 0,05); ♦ povprečne vrednosti parametra z nadnapisom nad stolpcem se statistično značilno razlikujejo glede na boks baz in vrednosti bok pred vadbo (P < 0,05); ** povprečne vrednosti parametra z nadnapisom nad stolpcem se statistično značilno razlikujejo glede na boks baz vrednosti (P < 0,05)).	94

SEZNAM OKRAJŠAV

°C	stopinja Celzija
λ_z	hitrostna konstanta terminalne faze
μL	mikroliter
μmol	mikromol
A	količina (<i>angl. amount</i>)
Alb	albumini
ALT	alanin aminotransferaza
AMP	adenozin monofosfat
ANOVA	analiza variance (<i>angl. Analysis of variance</i>)
AP	alkalna fosfataza
APCI	ionizacija pri atmosferskem tlaku
ARSO	Agencija Republike Slovenije za okolje
AST	aspartat aminotransferaza (<i>angl. aspartat aminotransferase</i>)
ATP	adenozin trifosfat
AUC ₀₋₂₄	površina pod krivuljo odvisnosti plazemske koncentracije od časa nič do 24 ure
AUC _{inf}	površina pod krivuljo odvisnosti plazemske koncentracije od časa na intervalu nič do neskončnosti
BASO	bazofilci (<i>angl. basophils</i>)
Ca ²⁺	kalcijevi ioni
Cat	katalaza (<i>angl. Catalase</i>)
CBC	celotna krvna slika (<i>angl. complete blood count</i>)
bp-	brez posebnosti
c _{baz}	bazalna koncentracija
CD	ciklodekstrin
cGPx	celična ali klasična GPx (<i>angl. classic GPx</i>)
CK	kreatin kinaza (<i>angl. creatine kinase</i>)
Cl	očistek (<i>angl. clearance</i>)
Cl ⁻	klor
Co ²⁺	kobalt
CoQ ₁₀	koencim Q ₁₀
CoQ ₁₀ H ₂	ubikinol
CRT	ocena kapilarne polnitve (<i>angl. capillary refill time</i>)

Cu ²⁺	baker
D	odmerek (<i>angl. dosage</i>)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (<i>angl. deoxyribonucleic acid, DNA</i>)
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
EOS	eozinofilci
EVH	energijska vrednost konja (<i>angl. energy value horse</i>)
FAD	flavin dinuklotid
FD	frekvenca dihanja
Fe ²⁺	železo
fL	femtoliter
FMN	flavin mononukleotid
g	gram
GGT	gama glutamil transferaza
GPx	glutation peroksidaza (<i>angl. Glutathione peroxidase</i>)
GSH	reduciran glutation
GSSG	oksidiran glutation
GS-X	glutation vezan na oksidant
h	ura (<i>angl. hour</i>)
H ⁺	vodik
H ₂ O	voda
HCT	hematokrit (<i>angl. haematocrit</i>)
HDL	lipoproteini visoke gostote (<i>angl. high density lipoprotein</i>)
HDW	porazdelitev eritrocitov glede na koncentracijo hemoglobina (<i>angl. haemoglobin distribution width</i>)
HGB	hemoglobin
HNO ₂	dušikova (III) kislina
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (<i>angl. high-performance liquid chromatography</i>)
HPLC-MS	tekočinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo
HOCl	hipoklorna kislina
INT	2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolijev klorid
I ⁻	iod
iP	anorganski fosfat
Iz	izgled

K ⁺	kalij
k	konj
kDa	kilodalton
Ko	kobila
k ₀	hitrostna konstanta endogenega nastajanja
k _a	hitrostna konstanta absorpcije
kas	kastrat
kg	kilogram
km	kilometer
L	liter
L [•]	alkilni radikal
LDH	laktat dehidrogenaza
LDL	lipoproteini nizke gostote (<i>angl. low density lipoprotein</i>)
ln	naravni logaritem
LOO [•]	peroksi radikal
LOOH	hidroperoksid
LUC	nepobarvane, nediferencirane celice (<i>angl. large unstained cells</i>)
LYMPH	limfociti (<i>angl. lymphocytes</i>)
M	molarnost
MCH	povprečna koncentracija HGB v enem eritrocitu (<i>angl. mean corpuscular haemoglobin</i>)
MCHC	povprečna koncentracija HGB v eritrocitih (<i>angl. mean corpuscular haemoglobin concentration</i>)
MCV	povprečna prostornina eritrocitov (<i>angl. mean corpuscular volume</i>)
MDA	malondialdehid
mg	miligram
Mg ²⁺	magnezij
min	minuta
MK	maščobna kislina
mL	mililiter
mmol	milimol
Mn ²⁺	mangan
MONO	monociti
MPO	mieloperoksidaza

MPV	povprečni volumen trombocitov (<i>angl. mean platelet volume</i>)
MRT	srednji čas zadrževanja (<i>angl. mean residence time</i>)
m/s	meter na sekundo
N ₂ O ₄	didušikov tetraoksid
Na ⁺	natrij
NaCl	natrijev klorid
NAD	nikotinamid adenin dinukleotid
NAD(P)H	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NaF	natrijev fluorid
NEUT	nevtrofilci (<i>angl. neutrophils</i>)
-NH ₂	amino skupina
nm	nanometer
NO [•]	dušikov oksid (<i>angl. nitrogen oxide</i>)
NO ₂ [•]	dušikov dioksid (<i>angl. nitrogen dioxide</i>)
NOS	dušikov oksid sintaza (<i>angl. nitrogen oxide</i>)
¹ O ₂	singletni kisik
³ O ₂	tripletni kisik
O ₂	kisik (<i>angl. oxygen</i>)
O ₂ ^{•-}	superoksidni radikal
O ₃	ozon
Obn	obnašanje
OH [•]	hidroksilni radikal
ONOO ⁻	peroksinitrit
ONOOH	peroksinitritna kislina
P	placebo skupina
P	perioda sinusne funkcije
P ³⁻	fosfor
P < 0,05	oznaka za statistično značilno
P _k	pregled kopit
PLT	trmbociti (<i>angl. platelets</i>)
P-PO	pulz po vadbi
P-PR	pulz pred vadbo
pO ₂	delni tlak kisika
Q ₁₀	skupina, ki je prejela CoQ ₁₀

r	korelacija
RBC	rdeče krvne celice (<i>angl. red blood cells</i>)
RBS	reaktivne bromidne spojine (<i>angl. reactive bromine species</i>)
RS	reaktivne spojine (<i>angl. reactive species</i>)
RCS	reaktivne kloridne spojine (<i>angl. reactive chlorine species</i>)
RDW	porazdelitev eritrocitov glede na koncentracijo HGB (<i>angl. red distribution width</i>)
RNS	reaktivne dušikove spojine (<i>angl. reactive nitrogen species</i>)
RO [•]	peroksilni radikal
RO ₂ [•]	alkoksilni radikal
ROS	reaktivne kisikove spojine (<i>angl. reactive oxygen species</i>)
s	sekunda
SD	standardni odklon (<i>angl. standard deviation</i>)
Se ²⁺	selen
-SH	tiolna skupina
SOD	superoksid dismutaza (<i>angl. superoxide dismutase</i>)
sp	spol
St	starost
sz	svetleča, zimska
t	čas
t _{1/2β}	terminalni razpolovni čas
t _{max}	čas maksimalne koncentracije
TBARS	tiobarbituratne reaktivne substance
TAC	celokupna antioksidativna kapaciteta (<i>angl. total antioxidant capacity</i>)
TG	trigliceridi
TP	celokupne beljakovine (<i>angl. total protein</i>)
TT	telesna temperatura
U	sečnina
U/L	enota na liter
UQ	ubikinon
UV	ultravijolično
V _d	volumen porazdelitve (<i>angl. distribution volume</i>)
VLDL	lipoproteini zelo nizke gostote (<i>angl. very low density lipoprotein</i>)
VNМК	večkrat nenasičene maščobne kisline

VO _{2max}	maksimalna poraba kisika
XO	ksantinska oksidaza (<i>angl. Xanthine oxidase</i>)
WBC	bele krvne celice (<i>angl. white blood cells</i>)
wtk	telesna masa konja
wtč	telesna masa človeka
Z	zamik sinusne funkcije
Zn ²⁺	cink
ž	žrebec

1 UVOD

V organizmu se neprestano vršijo oksido-redukcijske reakcije kot normalen fiziološki pojav. Kisik (O₂), kot najpogostejši prejemnik elektronov v omenjenih reakcijah, omogoča aerobnim organizmom, da porabljajo energijo. Poleg pomembne vloge oksidanta v reakcijah nastopa tudi v vlogi radikala. Poleg O₂ radikala, ki ga imenujemo superoksidni radikal (O₂[•]), poznamo še vrsto drugih radikalov. S skupnim izrazom jim pravimo reaktivne spojine (RS). Te lahko delimo na reaktivne kisikove spojine (angl. Reactive oxygen species, ROS), reaktivne dušikove spojine (angl. Reactive nitrogen species, RNS), reaktivne kloridne spojine (angl. Reactive chlorine species, RCS) in druge. Vendar pa RS ne zajemajo zgolj radikalov, temveč tudi spojine, ki niso radikali, vendar pri svojih reakcijah proizvajajo radikale. V določeni meri je nastajanje RS normalen fiziološki pojav. V kolikor pa njihov nastanek presega ta nivo, pride do poškodb biomolekul, kar lahko vodi v različna patološka stanja.

Eden izmed virov nastanka RS je fizična vadba. Kljub njenim ugodnim učinkom, pa prekomernost le-te še dodatno poveča privzem O₂ v organizem. Na ta način pride do kaskade reakcij, ki imajo za posledico tvorbo RS. Poznamo več različnih mehanizmov nastanka RS, kot so prenos elektronov v mitohondrijski dihalni verigi, ishemija-reperfuzija, z vadbo povzročena hipoksemija, avtooksidacija kateholaminov, vnetni procesi in aktivacija nevtrofilcev kot odziv na akutno vadbo. Poglavitni mehanizem nastanka RS pa poteka v mitohondrijski dihalni verigi, in sicer pri prenosu elektronov. Zaradi povečanega privzema O₂ v mitohondrije med vadbo, pride do povečane aktivnosti funkcije mitohondrijske dihalne verige med vadbo. Privzem O₂ neposredno vpliva na obremenitev skeletnih mišic, zaradi vadbe, kar ima za posledico povečan obseg lipidne peroksidacije. Na ta način pride do poškodb lipidov. Eden izmed končnih produktov lipidne peroksidacije je malondialdehid (MDA). Z njim ocenimo obseg poškodb, nastalih z RS. S fizično vadbo povzročen oksidativni stres pospeši nastanek poškodb mišičnih celic. Zaradi tega pride do povečanega izstopanja mišičnih encimov, kot sta kreatinin kinaza (angl. creatine kinase, CK) in aspartat aminotransferaza (angl. aspartat aminotransferase, AST), v kri. Oksidativni stres torej nastane ob izpostavitvi organizma prekomernemu nastajanju RS.

Do pojava oksidativnega stresa pa lahko pride tudi zaradi oslabljenega obrambnega sistema. Vlogo obrambnega sistema pred RS imajo antioksidanti, to so molekule, ki so sposobne stabilizirati ali deaktivirati radikale. Med najpomembnejše antioksidante sodijo encimi

superoksid dismutaza (SOD), glutation peroksidaza (GPx) in katalaza (angl. Catalase, Cat). Omenjeni antioksidanti pretvarjajo RS v manj aktivne oblike oz. jih odstranjujejo. Poznamo še nekatere druge antioksidante, kot so α -tokoferol (vitamin E), askorbinska kislina (vitamin C), lipojska kislina, β karoteni, in - za naš poskus pomemben - koencim Q₁₀ (CoQ₁₀). Ker je včasih obrambni sistem oslavljen, je nujen vnos antioksidantov s hrano. Določeni antioksidanti pa so zgolj eksogenega izvora in tako nujni za uravnavanje ravnotežja med oksidanti in antioksidanti v organizmu. CoQ₁₀ je endogeni lipofilni antioksidant, ki varuje celice pred nepopravljivimi oksidativnimi poškodbami, kot je lipidna peroksidacija in oksidacija deoksiribonukleinske kisline (angl. Deoxyribonucleic acid, DNA) in proteinov. Prisoten je v vseh celičnih membranah v organizmu. Poleg svoje antioksidantne vloge, sodeluje pri nastajanju membranskega gradienta protonov, potrebnega za delovanje adenozin trifosfat (ATP) sintaze. Zato ga v največjih količinah najdemo na notranji membrani mitohondrijev. Mnoge študije, izvedene na ljudeh in živalih, so dokazale ugoden učinek CoQ₁₀ na oksidativni stres, povzročen z vadbo. Obenem pa ga uporabljajo tudi v terapevtske namene, posebno pri kardiovaskularnih obolenjih. Zaradi njegovih ugodnih učinkov, smo se odločili za raziskavo, kjer smo konjem kasačem dodajali CoQ₁₀ v 8 tedenskem obdobju. Sodeč po do sedaj zbranih literaturnih virih, podobna študija še ni bila opravljena. Hkrati nas je zanimala tudi biološka uporabnost te lipofilne substance pri konjih kasačih. Kar smo v nadaljevanju ugotavljali s farmakokinetično analizo.

1.1 NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE

Z raziskavo smo želeli

- potrditi prisotnost oksidativnega stresa pri izbrani fizični vadbi športnih konj kasačev;
- ugotoviti ali z 8 tedenskim peroralnim dajanjem CoQ₁₀ v odmerku 600 mg na dan v primerjavi s kontrolno skupino preprečimo pojav oksidativnega stresa pri fizični vadbi konj kasačev
- določiti farmakokinetiko in izbrane farmakokinetične parametre za CoQ₁₀ pri konjih kasačih, pri čemer smo uporabili dva različna odmerka CoQ₁₀.

Namen raziskave je bil preveriti naslednje hipoteze:

1. Izbrana fizična vadba konj, ki so na kontroliranem obroku, privede do oksidativnega stresa. To se kaže v spremembah kazalcev oksidativnega stresa.
2. Pojav oksidativnega stresa pri fizični aktivnosti je povezan s povečano mišično aktivnostjo in intenzivnim procesom lipidne peroksidacije v mišicah. Produkt lipidne peroksidacije, MDA, privede do permeabilnosti celične membrane miocitov. Kar vodi do povišanih koncentracij mišičnih encimov v krvni plazmi. Posledično lahko izmerimo korelacijo med povišano koncentracijo mišičnih encimov in MDA kot končnim produktom lipidne peroksidacije v krvni plazmi.
3. Vrednosti krvnih kazalcev oksidativnega stresa so pri konjih, ki so na kontroliranem obroku pred izbrano fizično vadbo, v okviru fizioloških vrednosti, ki jih navaja literatura.
4. 8 tedensko peroralno dajanje CoQ₁₀ konjem v odmerku 600 mg na dan v primerjavi s kontrolno skupino zmanjša oksidativni stres in njegove posledice pri izbrani fizični vadbi konj.
5. Z načrtovanim poskusom lahko opredelimo farmakokinetiko CoQ₁₀ pri konjih. Izbrani farmakokinetični parametri nam povedo kakšna je biološka uporabnost CoQ₁₀ pri konjih. Hkrati lahko določimo ali je v izbranem območju farmakokinetika CoQ₁₀ proporcionalna odmerku.

2 PODATKI IZ LITERATURE

2.1 REAKTIVNE SPOJINE

Večina snovi v naravi in večina sestavin živih celic so molekule, v katerih so elektroni v molekulskih orbitalah v parih – pravimo torej, da so sparjeni. To je vzrok za njihovo relativno stabilnost v stiku z okoliškim kisikom (O₂) (Kreft in Pečar, 1998). Poznamo pa tudi snovi, ki imajo v svoji zunanji orbitali vsaj en nesparjen elektron, in take snovi imenujemo radikali (Rahman, 2007). Ti nastanejo pri različnih procesih, kot je enoelektronska redoks reakcija. Nesparjen elektron je vzrok za izrazito kemično reaktivnost radikalov. Pri radikalnih reakcijah reaktivni radikal reagira z molekulo v svoji bližini (Kreft in Pečar, 1998).

Biološke substrate lahko oksidira velika skupina radikalov in neradikalov, ki jih s skupnim izrazom definiramo kot reaktivne spojine (angl. Reactive species, RS). RS zajema tako kisikove (angl. Reactive oxygen species, ROS) kot tudi dušikove (angl. Reactive nitrogen species, RNS), kloridne (angl. Reactive chlorine species, RCS) in bromidne (angl. Reactive bromine species, RBS) spojine (Halliwell in Gutteridge, 2010). Poimenovanje RS je podrobneje prikazano v preglednici 1.

Preglednica 1: Povzetek glavnih RS (prirejeno po Halliwell in Gutteridge, 2010)

Radikali	Ne-radikali
Reaktivne kisikove spojine (ROS) Superoksidni radikal, O ₂ • ⁻ Hidroksilni radikal, OH• Hidroperoksidni radikal, HO ₂ • Peroksidni radikal, RO ₂ • Singletni kisik, ¹ O ₂ Δg ⁺	Reaktivne kisikove spojine (ROS) Vodikov peroksid, H ₂ O ₂ Ozon, O ₃ Singletni kisik, ¹ O ₂ Δg Organski peroksidi, ROOH Peroksinitrit, ONOO ^{-c} Peroksinitrat, O ₂ NOO ⁻
Reaktivne dušikove spojine (RNS) Dušikov oksid, NO• Dušikov dioksid, NO ₂ •	Reaktivne dušikove spojine (RNS) Peroksinitrit, ONOO ^{-c}

Legenda: ^c ONOO⁻ je pogosto vključen v ROS;

2.1.1 Reaktivne dušikove spojine

Termin RNS (se nanaša na skupino dušikovih radikalov kot sta dušikov oksid (angl. Nitric oxide, NO•) in dušikov dioksid (angl. Nitrogen dioxide, NO₂•) kot tudi na skupino ostalih reaktivnih molekul, ki niso radikali, kot so dušikova (III) kislina (HNO₂) in didušikov tetraoksid (N₂O₄), kjer je dušik reaktivni center (Halliwell in Gutteridge, 2010; Powers in Jackson, 2008). Primarni radikal, ki nastaja v celici, je NO• (Powers in Jackson, 2008). Slednji nastaja z oksidacijo enega od končnih dušikovih atomov v gvanidinski skupini L-arginina. Proces katalizira encim dušikov oksid sintaza (angl. Nitric oxide synthase, NOS) (Powers in Jackson, 2008). Poznamo tri izomere NOS, in sicer nevrogeno, endotelno in inducibilno. Slednja je še posebej problematična, saj poveča obseg vnetnih procesov (Claramunt in sod., 2009). NO• se pod različnimi pogoji lahko pretvori v druge RNS, kot je peroksinitrit (ONOO⁻) (Dröge, 2002).

2.1.2 Reaktivne kisikove spojine

Molekularni kisik (O₂), imenovan tudi biradikal, ima na zunanji orbitali dva nesparjena elektrona s paralelnimi spini (Sen, 1995). To stanje imenujemo tripletni kisik (³O₂) in zelo počasi reagira z večino organskih snovi (Kreft in Pečar, 1998). Poleg ³O₂ poznamo še singletni kisik (¹O₂), kjer sta elektrona sparjena, a se kot tak pojavlja le redkeje (Kreft in Pečar, 1998). Singletni kisik je zelo reaktiven, ima kratko razpolovno dobo, vendar lahko z difuzijo prehaja membrano (Powers in Jackson, 2008).

ROS ne zajema le radikalov, ki imajo O₂ v svojem centru, kot so superoksidni radikal (O₂^{•-}), hidroksidni radikal (OH[•]), hidroperoksidni radikal (HO₂[•]), temveč tudi reaktivne kisikove spojine, ki niso radikali, vendar pri svojih reakcijah lahko proizvajajo radikale (Powers in Jackson, 2008; Bresjanac, 1996). Med slednje prištevamo vodikov peroksid (H₂O₂), hipoklorno kislino (HOCl), singletni kisik (¹O₂), epoksidge (Gomes in sod., 2005; Sen, 1995) in ozon (O₃) (Halliwell in Gutteridge, 2010).

2.1.2.1 Superoksidni radikal

Superoksidni radikal nastaja z redukcijo ³O₂. Reakcijo katalizirata encima nikotinamid adenin dinukleotid fosfat oksidaza in ksantinska oksidaza (angl. Xanthine oxidase, XO). Do nastanka O₂^{•-} pa prihaja tudi v pri prenosu elektronov, v mitohondrijski dihalni verigi (Dröge, 2002). V mitohondrijih 1–3% elektronov pretvorijo O₂ v O₂^{•-} (Halliwell in Gutteridge, 2010). V primerjavi z drugimi radikali, je O₂^{•-} relativno nereaktiven. Dolg razpolovni čas mu omogoča difuzijo znotraj celice. Vnetne celice proizvajajo velike količine O₂^{•-}, da zaščitijo organizem pred vdorom neželenih organizmov. Pri reakciji dismutacije O₂^{•-} pride do nastanka H₂O₂. Ta reakcija je glavni vir H₂O₂ v celici (Powers in Jackson, 2008) (enačba 1).



2.1.2.2 Vodikov peroksid

H₂O₂ je reaktiven in sposoben generirati proste radikale, kot je OH[•]. Je stabilen in prehaja membrano. Ima relativno dolg razpolovni čas znotraj celice. H₂O₂ je citotoksičen, saj v Fentonovih reakcijah v stiku s kovinskimi ioni lahko proizvaja OH[•] (Halliwell in Gutteridge, 2010) (enačba 2).



Omenjena reakcija se v bioloških sistemih pojavlja kot del Haber-Weiss-ove reakcije. Pri njej ostane Fe²⁺ ali Cu²⁺ v reducirani obliki zaradi O₂^{•-}, pri čemer se iz H₂O₂ tvori OH[•] (Powers in Jackson, 2008) (enačba 3).



2.1.2.3 Hidroksilni radikal

Hidroksilni radikal je zelo reaktiven, z močnim oksidirajočim potencialom in sodi med potencialno najbolj uničujoče ROS, prisotne v bioloških sistemih. Poškoduje molekule na mestu njihovega nastanka. Zaradi močne reaktivnosti OH[•] ne prehaja membrane (Powers in Jackson, 2008).

2.2 VLOGA RS V FIZIOLOŠKIH PROCESIH

V zadnjih 20 letih je spoznanje o ROS dobilo nove razsežnosti na področju številnih medceličnih procesov, kamor se ROS vključujejo kot pomembni prenašalci. Tako imenovana redoks signalizacija je vključena v aktivacijo transkripcijskih faktorjev ter v procese mitoze in apoptoze. Nekatere ROS imajo pomembno fiziološko vlogo kot signalne molekule (Winrow in sod., 1993; Valko in sod., 2007). Določene RNS, kot je npr. NO[•], se sproščajo skupaj s citokini kot protivnetni obrambni sistem iz fagocitov (Halliwell in Gutteridge, 2010). Poleg tega je vloga RNS tudi ta, da uravnavajo in s tem sproščajo vaskularni tonus tako v sistemskem kot tudi v pulmonarnem obtoku ter sodelujejo pri bronhodilataciji in nevrotransmisiji (Mills in Higgins, 1997).

Organizem je neprestano izpostavljen endogenim in eksogenim ROS (Mudway in Kelly, 2000). Glavno mesto nastanka endogenih oksidantov so mitohondriji. V procesu mitohondrijske dihalne verige, nastajajo ROS v večjih količinah (Kowaltowski in Vercesi, 1999). Pri prenou elektronov iz verige, ti reagirajo z O₂, in tako pride do nastanka radikalov (McBride in Kraemer, 1999). Endogeni vir nastanka radikalov se vrši tudi v procesu ishemije-reperfuzije. Reakcije katalizira encim XO (Ji, 1999). Ishemija v nekem tkivu povzroči pomanjkanje O₂, s čimer se dihanje zaustavi, anaerobni metabolizem pa ne more zadostiti potrebam celice. Adenozin trifosfat (ATP) se porablja in ker se v procesu oksidativne fosforilacije ne more regenerirati, v celici ostaja adenozin monofosfat (AMP). Slednji se

metabolizira v hipoksantin, ki se zaradi pomanjkanja O_2 ne more metabolizirati naprej v sečno kislino, zato se kopiči v celici. Ob reperfuziji se v tkivo vrne O_2 . Pod vplivom XO se hipoksantin pretvarja v sečno kislino. Ob zadostni količini O_2 , pride do nastanka $O_2^{\cdot -}$ in H_2O_2 (Belviranh in Gökbel, 2006; Kreft in Pečar, 1998).

Eksogeni viri ROS, kot so O_3 , ionizirajoče in neionizirajoče sevanje (Mudway in Kelly, 2000), sami po sebi niso škodljivi, a v organizmu povzročijo nastanek RS in s tem poškodujejo molekule (Lykkesfeldt, 2007).

2.2.1 Mehanizmi nastanka RS med vadbo

RS nastajajo tako med aerobno kot tudi anaerobno vadbo (Güzel in sod., 2007). Poznamo različne vire nastanka RS v celici. Ti so odvisni od časa ali oblike vadbe (Ji, 1999). Vzrok za nastanek RS tekom vadbe je odgovornih več različnih mehanizmov mitohondrijih (McBride in Kraemer, 1999). Obseg posledic tvorbe RS je sorazmeren vadbi pod aerobnimi pogoji (Ji in Leichtweis, 1997). Tako je glavni mehanizem nastanka RS vključen pri prenosu elektronov iz dihalne verige v mitohondrijih (McBride in Kraemer, 1999). Poznamo še mehanizem nastanka RS med hipoksemijo (Clanton, 2007), avtooksidacijo kateholaminov (Deaton in sod., 2004), aktivacijo nevtrofilcev kot odgovor na akutno vadbo (Ji in Leichtweis, 1997) ter druge mehanizme, odgovorne za nastanek RS (Ji, 1999).

2.2.1.1 Mitohondrijska dihalna veriga

Primarni vzrok za nastanek RS med vadbo je proces dihalne verige v mitohondrijih (Kirschvink in sod., 2008; Soffler, 2007; Al-Qudah in Al-Majali, 2006; Ji, 1999). Najbolj poznani RS v dihalni verigi sta $O_2^{\cdot -}$ in H_2O_2 . Njun nastanek je posledica prenosa elektronov iz elektronske transportne verige na mestih z visokim potencialom, kot sta kompleksa I in III (Ji, 1999). Preko redukcije O_2 z enim elektronom nastane $O_2^{\cdot -}$. Za nastanek $O_2^{\cdot -}$ sta bili opisani 2 glavni reakciji. Prva je avto-oksidacija intermediata semikinona. Druga reakcija pa poteka preko reakcije O_2 s flavin mono- in di-nukleotidom (FMN/FAD) ter nikotinamid adenin dinukleotidom (NAD). $O_2^{\cdot -}$ je prekursor večine ostalih ROS in mediator oksidativnih verižnih reakcij. Dismutacija $O_2^{\cdot -}$, ki poteka spontano ali preko reakcije, katalizirane s superoksidno dismutazo (angl. superoxide dismutase, SOD), povzroči nastanek H_2O_2 . Na stopnjo produkcije H_2O_2 močno vpliva tudi prenos ionov preko notranje mitohondrijske membrane, kar nakazuje na regulacijo avto-oksidacije semikinona preko membranskega potenciala. H_2O_2

se nato lahko popolnoma reducira v vodo (Halliwell in Gutteridge, 2010). Lahko pa ob prisotnosti kovinskih ionov (Fe²⁺) preko Fentonove reakcije pride do nastanka OH[•] (Ji, 1999).

2.2.1.2 Z vadbo povzročena hipoksemija

Hipoksemija pomeni znižan delni tlak kisika (pO₂) v arterijski krvi. Posledica naporne vadbe se tako kaže v hipoksemiji in s tem zasičenosti hemoglobina (Hgb). Obenem pa je zato lahko zmanjšana zmogljivost za vadbo (Manohar in Goetz, 2003). Med hipoksemijo namreč pride do nastanka ROS, in sicer kot odgovor ali na fiziološki pojav ali na zmeren patofiziološki odziv. Z vadbo povzročena prehodna hipoksemija v skeletnih mišicah, ki naj bi potekala pod fiziološkimi pogoji, vodi do nastanka ROS. V kolikor je vadba zmerna, ROS nastajajo zaradi znižanih vrednosti pO₂, skupaj s spremembami v redoks stanju mišic (Clanton, 2007).

Najpogostejša oblika hipoksemije v naravnem okolju je t.i. »intermitentna hipoksemija« ali hipoksemija v presledkih. Ta oblika se vrši v mišicah, ko skozi daljše časovno obdobje prihaja do krajših obdobj v pomanjkanju z oskrbo O₂. Do intermitentne hipoksemije prihaja med vadbo, pod hipoksemičnimi pogoji. V kolikor je vadba kronična, se hipoksemija odraža v patološkem odzivu organizma. Vendar pa meja med fiziološkim in patološkim odzivom na hipoksemijo zaradi akutne oz. kronične vadbe še ni dokončno določena (Clanton, 2007).

2.2.1.3 Povečana koncentracija kateholaminov- avtooksidacija

Med dolgotrajno vadbo se v organizem sprošča povečana koncentracija kateholaminov. Zaradi tega pride do povečanega obsega oksidativnega metabolizma v srčni in skeletnih mišicah. β adrenergični receptorji so lahko potencialni vir povečane tvorbe ROS v mitohondrijih. Pri avtooksidaciji adrenalina do adrenokroma nastaja O₂^{•-}, ki je potencialen vir ROS (Belviranh in Gökbek, 2006; Ji, 1999; Ji in Leichtweis, 1997).

2.2.1.4 Aktivacija nevtrofilcev kot odziv na akutno vadbo

Nevtrofilci imajo pomembno vlogo pri obrambi tkiv pred vdorom virusov in bakterij v organizem. Podoben odziv imunskemu odgovoru je dosežen tudi pri akutni vadbi. Intenzivna vadba lahko povzroči poškodbe mišic, ki jih spremljajo vnetja. Tako pride do povečane aktivnosti proteaz in lizosomalnih encimov v mišicah. Kazalci protivnetnega odgovora so povezani s povečano aktivnostjo antioksidantnih encimov. Slednja hipoteza naj bi nakazovala, da se po vadbi v tkivih tvorijo RS zaradi vdora nevtrofilcev na mesto vnetij (Ji in Leichtweis,

1997). V nevtrofilcih namreč mieloperoksidaza (MPO) katalizira nastanek hipoklorne kisline (HOCl). Medtem ko O₂^{•-} lahko reagira z NO[•], pri čemer nastaja ONOO⁻ (Hancock in sod., 2001). Vnetni odziv je zato nujen zaradi odstranjevanja poškodovanih proteinov in preprečevanja nadaljnjega vdora bakterij na mesto vnetja. Hkrati pa ROS, ki se sproščajo iz nevtrofilcev, lahko prispevajo k sekundarnim poškodbam, ki so posledica lipidne peroksidacije. Vendar omenjeni mehanizem predstavlja sekundarni vir nastanka ROS, saj je potrebno kar nekaj časa za infiltracijo nevtrofilcev (Ji in Leichtweis, 1997).

2.2.1.5 Drugi mehanizmi nastanka RS

RS lahko nastajajo kot odgovor na vnetje in poškodbe tkiv (Halliwell in Gutteridge, 2010) ter kot posledica vadbe (Belviranh in Gökbek, 2006; McBride in Kraemer, 1999). Pri reakcijah, ki potekajo na aktivnem mestu vnetja, pride do uhajanja precejšnjih količin RS iz fagocitov, kar privede do nenadzorovane poškodbe tkiv (Powers in Jackson, 2008). Izmed vseh encimov, ki so odgovorni za nastanek radikalov, sta pomembna predvsem dva. To sta nikotinamid dinukleotid fosfat oksidaza in XO. Nikotinamid dinukleotid fosfat oksidaza se nahaja na celični membrani in znotraj fagocitov, XO pa najdemo v jetrih in nekaterih endotelni celicah (McBride in Kraemer, 1999).

Z vadbo povzročen stres zviša koncentracijo intracelularnega Ca²⁺ v endotelni celicah, s čimer se aktivira NOS. Vadba, posebej kronična, naj bi povečala nastajanje NO[•] in s tem vplivala na vazodilatacijo (Güzel in sod., 2007). Povečan nastanek NO[•] vodi v različna bolezenska stanja. Predvsem velja izpostaviti različna vnetja, ki so posledica izpostavljenosti organizma citokinom (Halliwell in Gutteridge, 2010).

2.3 POSLEDICE PREKOMERNE TVORBE RS

2.3.2 Poškodbe biomolekul

RS lahko poškodujejo vsako komponento celice, vključno s proteini, nukleinskimi kislinami in lipidi (Ji, 1999; Witt in sod., 1992). Posledica povečanega privzema O₂ in s tem nastanka RS je povečan obseg lipidne peroksidacije, kar vodi do poškodb tkiv (Al-Qudah in Al-Majali, 2006).

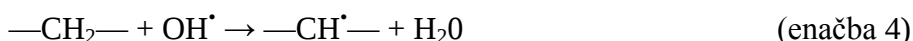
2.3.2.1 Lipidna peroksidacija

V osnovi so biološke molekule neradikalske. Če radikal taki molekuli odda ali vzame en elektron ali pa se celo pripne nanjo, prej neaktivna molekula, postane aktivna. Pride torej do nastanka novega radikala. Za reakcije, v katerih radikali reagirajo z neradikali, je značilno, da so verižne. Z biološkega stališča pomembna verižna reakcija radikalov se imenuje lipidna peroksidacija (Halliwell in Chirico, 1993).

Mehanizem lipidne peroksidacije ima tri stopnje: iniciacijo oz. začetek nastajanja radikalov, propagacijo oz. pomnoževalni efekt radikalskih reakcij in terminacijo, ki vključuje povezavo dveh radikalov in nastanek stabilnega produkta (Halliwell in Gutteridge, 2010; Burton in Ingold, 1986). Propagacija je še posebej izrazita pri lipidih z večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami (VNMK) in ob dejstvu, da je O₂ lipofilen plin in ga je v membrani raztopljenega 4-krat več kot v vodni sredini. Če se v takem okolju znajde en sam dovolj reaktiven radikal, steče lipidna peroksidacija (Halliwell in Gutteridge, 2010; Cornelli, 2009).

2.3.2.1.1 Iniciacija

Določene RS kot so OH[•], NO[•]₂ in peroksinitritna kislina (ONOOH), lahko iniciirajo lipidno peroksidacijo. Hidroksilni radikal tako zlahka začne iniciacijo peroksidacije MK, lipoproteinov in membran. Medtem ko npr. ¹O₂, O₃, HOCl oksidirajo lipide in s tem neposredno začnejo verižno reakcijo (Halliwell in Gutteridge, 2010; Cornelli, 2009). Radikal odvzame lipidom atom vodika (H⁺) in ga pretvori v alkilni radikal (L[•]). Abstrakcija H⁺ najlažje poteče v predelu dvojnih vezi VNMK (enačba 4).



2.3.2.1.2 Propagacija

Po začetni premestitvi dvojnih vezi (tvorba konjugiranega diena) v naslednjem koraku vstopi v dogajanje ³O₂ (ki je sam dokaj stabilen biradikal) in pretvori alkilni radikal v peroksi radikal (LOO[•]) (Halliwell in Gutteridge, 2010). Slednji so še posebno nevarni, saj vodijo v fazo propagacije (Sen, 1995). LOO[•] namreč iztrga H sosednjemu lipidu. Produkt reakcije je hidroperoksid (LOOH) in L[•], ki ponovno vstopa v reakcijo. Verižna reakcija teče, dokler ne zmanjka ali O₂ ali lipidov, oziroma dokler ne nastane radikal, ki ni več sposoben pritegniti H iz sosednjega lipida. LOOH lahko ob sledovih kovin vstopa v Fentonovo reakcijo, ki tvori

bodisi alkoksil radikal (LO[•]) ali LOO[•], ki lahko oksidirata sosednji lipid (Halliwell in Gutteridge, 2010).



Tako lahko nastajajo vedno novi hidroperoksidi (LOOH), ki so bolj polarne molekule, zato prihaja do porušitve membranske strukture. Verižna reakcija, ki jo sproži en sam OH[•], lahko peroksidira več tisoč verig maščobnih kislin (MK) (Kreft in Pečar, 1998).

2.3.2.1.3. Terminacija

Nadaljnja oksidacija MK verig in njihova fragmentacija, pri čemer nastajajo aldehihi in hidrokarboni, privede do zmanjšanja fluidnosti membrane (Halliwell in Gutteridge, 2010). Lipidna peroksidacija tako povzroči propad celične membrane, izpad funkcije membranskih encimov in motnje prenosa signalov v celico preko transmembranskih receptorskih signalov (Kreft in Pečar, 1998).

Eritrociti so ena najbolj na poškodbe ROS občutljivih celic v organizmu. Membrana eritrocitov je namreč sestavljena pretežno iz VNMK, ki so zelo občutljive na lipidno peroksidacijo. Eritrociti so napolnjeni s hemoglobinom, ki je eden najmočnejših katalizatorjev za nastanek lipidne peroksidacije (Ji in sod., 1990).

Pri mišični obremenitvi pride do nastanka radikalov in lipidne peroksidacije med samo vadbo ali po njej. Zato pri fizični vadbi lahko izmerimo povečane vrednosti parametrov, ki nakazujejo na lipidno peroksidacijo (McBride in Kraemer, 1999).

2.3.2.2 Kazalniki lipidne peroksidacije

Med številnimi produkti lipidne peroksidacije se kot najpogostejše kazalce štejejo aldehidi, izoprostani, lipidni peroksidi ter izdihani kratkoverižni ogljikovodiki (Halliwell in Gutteridge, 2010). Eden izmed končnih in najbolj mutagen produkt lipidne peroksidacije je malondialdehid (MDA), s katerim ocenimo obseg in posledice lipidne peroksidacije, povzročene z vadbo (Sachdev in Davies, 2008; Sen, 1995).

MDA nastaja predvsem pri peroksidaciji VNМК, kot so linolna, arahidonska in dokozaheksaenojska kislina. V majhnih količinah pa nastaja tudi v encimskih procesih metabolizma eikozanoidov (Halliwell in Gutteridge, 2010). Mehanizem nastanka MDA je vključen v tvorbo prostaglandinom podobnim endoperoksidom, ki nastajajo iz VNМК, z dvema vezema. Obstaja še drugi vir nastanka MDA, ki temelji na zaporedni tvorbi hidroperoksida in β -cepitvi VNМК. MDA tako direktno nastaja z β cepitvijo 3-hidroperoksialdehida ali pri reakciji med akroleinom in hidroksilnimi radikali (Lykkesfeldt, 2007). MDA lahko reagira tudi z DNA bazami in tako privede do mutagenih lezij (Halliwell in Gutteridge, 2010). MDA ni stabilen končni produkt lipidne peroksidacije, saj lahko kemijske reakcije potekajo še naprej. Količina izmerjenega MDA je tako pogojena z odbiro ustrezne metode vrednotenja MDA (Sachev in Davies, 2008).

MDA je v bioloških vzorcih v prosti ali vezani obliki vezan na tiolne (-SH) in amino (-NH₂) skupine makromolekul, kot so proteini in nukleinske kisline. V prosti obliki ga v bioloških vzorcih najdemo le v majhnih količinah. Njegovo določanje je po navadi omejeno z limito detekcije posamezne metode. Zato ga večinoma določamo v celokupni obliki (prostega in vezanega) (Pilz in sod., 2000).

Povišane vsebnosti MDA v plazmi potrjujejo, da se med vadbo tvorijo RS (McBride in Kraemer, 1999), ki posledično privedejo do lipidne peroksidacije, da je učinek povezan z intenziteto vadbe in, da proces izločanja produktov lipidne peroksidacije poteka počasi (Chiaradia in sod., 1998). Večina študij je merila vrednosti MDA pri oksidativnem stresu, povzročenim z vadbo (Urso in Clarkson, 2003).

2.4 VADBA IN BIOLOŠKI ODZIV

Stres predstavlja odziv organizma na ekstremne razmere, da se lahko brani pred različnimi stresorji in na ta način vzdržuje svojo homeostazo (Muir, 2004). Mnogi konji so dnevno izpostavljeni stresnim situacijam, ki med drugim vključujejo tudi trening. Med najpogostejše stresorje, s katerimi se soočajo športni konji, sodijo okoljske spremembe, transport, strah pred raznimi ovirami, kontakt z ljudmi, pa tudi poškodbe in bolezni. Stres tako ne vpliva samo na dobro počutje konj, temveč tudi na njihovo zmogljivost ter zdravstveno stanje (Art in Lekeux, 2005; Williams in sod., 2005).

Konj ima vzpostavljen regulatorni sistem, ki kljubuje različnim stresorjem, med drugim tudi vadbi (Coenen, 2005). Pomembno je, da med različnimi programi treninga spremljamo vrednosti krvnih parametrov, ki nam pomagajo oceniti fitnes konja, in s tem odziv na samo vadbo (Tateo in sod., 2008; Texeira-Neto in sod., 2008; Arslan in sod., 2002).

Fiziološki procesi, ki se odvijajo v organizmu konj tekom vadbe, se odražajo v spremembah krvnih parametrov. Tako so Kingston (2004a), McGowan (2008) ter Hodgson in Rose (1994) poročali o spremembah v hemodinamiki, aktivnostih encimov v serumu ter ostalih biokemijskih parametrih. Ugotovili so povišane vrednosti eritrocitov (angl. red blood cells, RBC), levkocitov (angl. white blood cells, WBC), povišani sta bili tudi koncentraciji Hgb in hematokrita (angl. haematocrit, Hct). Poročali so o povišani aktivnosti mišičnih encimov kreatin kinaze (angl. creatine kinase, CK) in aspartat aminotransferaze (angl. aspartat aminotransferase, AST) ter povišanih vrednostih encima alkalne fosfataze (angl. alkaline phosphatase, AP). Drugi biokemijski parametri, ki so bili ravno tako povišani po vadbi, so bili celokupni plazemski proteini (angl. total protein, TP), albumini, glukoza, urea, kreatinin in anorganski fosfat (angl. inorganic phosphate, iP). Vadba je vplivala tudi na spremembe v lipidogramu. Po vadbi so namreč ugotovili povišane vrednosti holesterola (Kingston, 2004a; McGowan, 2008; Hodgson in Rose, 1994). Vadba vpliva na zmanjšanje plazemskega volumna, kar ima za posledico prehajanje tekočin iz zunaj- v znotraj-žilni prostor zaradi dehidracije (Cuniberti in sod., 2012). Tako so Balogh in sod. (2001) po vadbi ugotovili znižane vrednosti elektrolitov, kot sta K⁺ in Ca²⁺.

Fizična vadba močno vpliva na spremembe v metabolizmu (Kedzierski in sod., 2009), saj se nivo le-tega med zelo intenzivno vadbo oz dirko naraste več kot 60-krat nad bazalnim (Hyypä, 2005). Vadba vpliva na aerobne in anaerobne procese v organizmu konj. Spremembe v aerobni kapacitivnosti se odražajo v povečani maksimalni porabi kisika (VO_{2max}), plazemskem in eritrocitnem volumnu in s tem v povečani aktivnosti mitohondrijev (Pösö in sod., 2004). Med naraščanjem intenzitete vadbe, se porabljajo zaloge energije iz aerobnih procesov. Zatem pa organizem začne porabljati zaloge energije iz anaerobnih procesov. Oskrba s substrati za anaerobno fosforilacijo je omejena (Gerard in Hodgson, 2001).

Med intenzivno fizično vadbo pride do katalize ATP v ADP, ta pa naprej razpade v AMP in inozin fosfata v mišičnih vlaknih. Pri tem procesu se porablja glikogen, ob enem pa narašča

koncentracija glukoze 3-fosfata, glicerola in laktata (Balogh in sod., 2001). Laktat je odličen vir energije. Nekaj se ga porablja kot energijski substrat tudi tekom aerobnega procesa (Piccione in sod., 2010a). Stopnja vadbe oz poraba VO_2 tik pod mejo metabolne acidoze in izmenjave dihalnih plinov v pljučih določa anaerobni prag. Takrat pride do oskrbe energije preko anaerobnega metabolizma. Laktat glede na intenziteto vadbe poraste. Ko preseže vrednost 4 mmol/L, je dosežen anaerobni prag. Zato se ta vrednost uporablja kot ocena odziva konj na vadbo (Gerard in Hodgson, 2001).

Po podatkih iz literature so imeli kasači po vadbi nižje vrednosti laktata v primerjavi z galoperji in športnimi konji za preskakovanje ovir in tako predstavljajo skupino konj z najnižjo akumulacijo laktata po vadbi. Konji, ki so dobro pripravljene na vadbo, imajo majhen porast laktata, kar pomeni, da so večji del vadbe opravili v aerobnih pogojih (Piccione in sod., 2010a).

Pod vplivom kateholaminov se med vadbo vranica skrči, iztisne eritrocite in tako se poveča kapacitivnost prenosa O_2 (McGowan, 2008; Art in Lekeux, 2005; Hyypä, 2005; Kingston, 2004a; Hodgson in Rose, 1994). Slednje ima pomemben vpliv pri prenosu O_2 in s tem aerobni vzdržljivosti med vadbo (Cuniberti in sod., 2012). Pri fizični vadbi naraste pretok O_2 skozi skeletne mišice, kar prispeva k povišani vrednosti ROS. V kolikor je vadba zelo intenzivna, lahko povzroči nastanek oksidativnega stresa (Kinnunen in sod., 2005a).

2.4.1 Vadba in oksidativni stres

V normalnih razmerah v celicah so RS v stalnem ravnotežju z antioksidanti, ki jih z različnimi mehanizmi sproti odstranjujejo (Moure in sod., 2001). Oksidativni stres torej nastopi pri prekomerni oksidaciji in/ali pomanjkljivi antioksidantni obrambi. S tem ko se celica ali organizem prilagodi na povečano delovanje obrambnih sistemov, lahko oksidativni stres povzroči adaptacijo (Halliwell in Gutteridge, 2010). Obenem pa lahko povzroči poškodbe celičnih struktur, kamor so vključeni lipidi in membrane, proteini ter DNA (Valko in sod., 2007). Nenazadnje pa lahko oksidativni stres povzroči apoptozo ali celično smrt (Halliwell in Gutteridge, 2010).

Mnoge študije so pokazale, da je fizična vadba eden izmed dejavnikov, ki vplivajo na ravnotežje med RS in antioksidanti, tako pri ljudeh kot pri živalih (De Moffarts in sod., 2005).

Medtem ko ima redna fizična vadba ugodne učinke na zdravje, pa naporna akutna vadba zmanjšuje te ugodne učinke zaradi nastanka oksidativnega stresa (Kinnunen in sod., 2005a; Williams in sod., 2003). Dokazano je, da telesna vadba poveča nastanek RS v mišicah in jetrih (Witt in sod., 1992). Hkrati pa z oksidacijo celičnih komponent, kot so membranski lipidi, proteini, ogljikovi hidrati in DNA, vpliva na spremembe v presnovnih procesih med samo vadbo (Piccione in sod., 2007), prispeva k poškodbi tkiv, splošni slabosti in zmanjšani fizični kondiciji kot tudi znižani obrambni sposobnosti imunskega sistema (De Moffarts in sod., 2005; Kinnunen in sod., 2005a).

2.4.1.1. Oksidativni stres pri vadbi športnih konj

Prekomerna fizična vadba je vzrok za nastanek RS, kar vodi v oksidativni stres konj (Kinnunen in sod., 2005a; Kirschvink in sod., 2008) in z njim povezan nastanek poškodb (Kirschvink in sod., 2008; Lykkesfeldt in Svendsen, 2007; Soffler, 2007; Ji, 1999). Pri športnih konjih se posledice pojava oksidativnega stresa pri fizični vadbi kažejo v zmanjšani aktivnosti mišic, patofizioloških spremembah v mišicah, poškodbah mišic (Sen, 1995) in v povečani potrebi po antioksidantih (Soffler, 2007; Kinnunen in sod., 2005a). Izbrana fizična vadba pospeši metabolizem ter zelo poveča privzem O₂ v mišične celice lokomotornega sistema, srca in celice ostalih tkiv (Ji, 1999). Poraba O₂ v organizmu konj naraste med maksimalno fizično vadbo (Art in Lekeux, 2005) in tako neposredno vpliva na obremenitev skeletnih mišic (Hargreaves, 2002). Vse to se odraža v povečani mitohondrijski tvorbi ROS (Art in Lekeux, 2005; Ji, 1999), ki vodi v nastanek lipidne peroksidacije (Chiaradia in sod., 1998; Dekkers in sod., 1996) in s tem do oksidativnega stresa, povzročenega z vadbo (Balogh in sod., 2001).

Skeletne mišice vsebujejo nižji nivo antioksidantov kot jetra ali srce in so zato bolj dovzetne za poškodbe, ki so posledice oksidativnega stresa (Ji, 1999). Glavni tarčni substrati za ROS so VNMK v membranah fosfolipidov. Njihova sprememba se odraža v nepravilni strukturi in funkciji (Grotto in sod., 2009; Del Rio in sod., 2005). Povečana tvorba ROS tako povzroči lipidno peroksidacijo v membranah in s tem zmanjšano integriteto membran v mišičnih celicah (Kirschvink in sod., 2008; Dekkers in sod., 1996) ter poškodbe mišic (Marlin in sod., 2002). Poškodovane membrane mišičnih celic postanejo bolj permeabilne, kar povzroči izstopanje mišičnih encimov iz celic, to pa ima za posledico povišane koncentracije CK in AST v serumu. Omenjena mišična encima sta indikatorja poškodb skeletnih mišic konj,

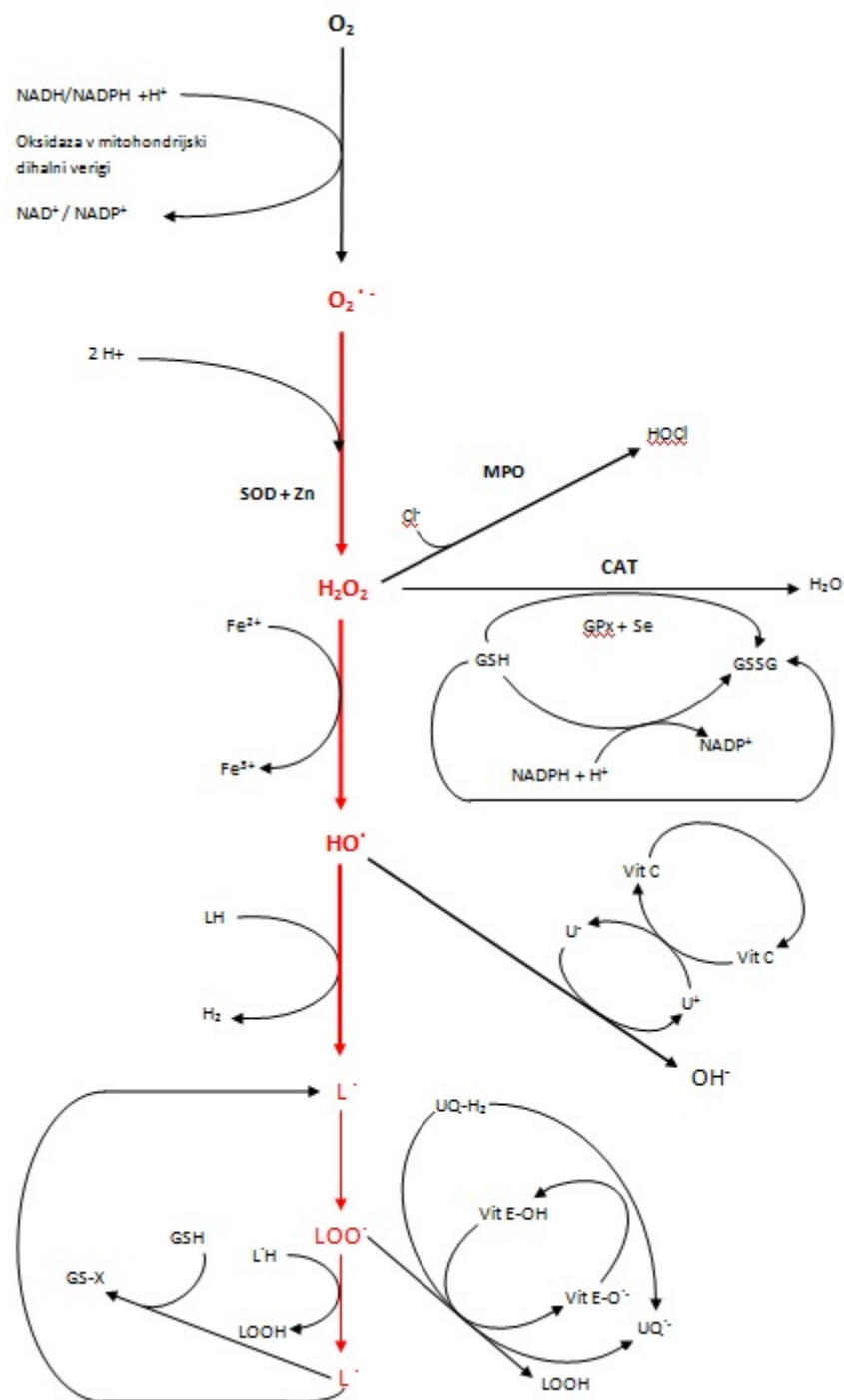
povzročenih z intenzivno fizično vadbo (Teixeira-Neto in sod., 2008; Lindholm, 1987). Hkrati pa Kirschvink in sod. (2008) ter Sacheck in Blumberg (2001) ugotavljajo, da obstaja pozitivna korelacija med stopnjo izstopanja mišičnih encimov in nastalo količino posameznih kazalcev oksidativnega stresa. Dokazana je tudi povezava med povečano prepustnostjo celične membrane mišic zaradi oksidativnega stresa in zmanjšanim antioksidantnim statusom (Hargreaves, 2002).

S športnimi konji je bilo narejenih kar nekaj študij, v katerih so dokazali korelacijo med oksidativnim stresom in poškodbami skeletnih mišic (Gondim in sod., 2009; Williams in sod., 2004; Hargreaves in sod., 2002; Marlin in sod., 2002; White in sod., 2001; Frankiewicz in Szarska, 2000). Chiaradia in sod. (1998) predvidevajo, da naj bi bila patogeneza z vadbo povzročene miopatije in hemolize pri konjih povezana s spremembami v lipidni peroksidaciji. Slednja nastaja pri tvorbi radikalov med akutnim ali kroničnim fizičnim naporom (Chiaradia in sod., 1998).

Na oksidativni stres, povzročen z vadbo, vplivajo še nekateri drugi dejavniki, kot sta npr. temperatura okolja in vlaga (Kirschvink in sod., 2008; Lykkesfeldt in Svendsen, 2007).

2.5 OBRAMBNI MEHANIZMI PRED RS IN OKSIDATIVNIM STRESOM

Organizem je v normalnih fizioloških pogojih dobro pripravljen, da se bori proti prekomernemu nastajanju RS in radikalov (Soffler, 2007). To vlogo obrambnega sistema pred RS imajo antioksidanti (Sies, 1991; Kaliora in sod., 2006). Antioksidant je vsaka snov, ki upočasni, prepreči ali odstrani oksidativno poškodbo tarčne molekule (Halliwell in Gutteridge, 2010). Delujejo tako, da »lovijo« oksidante, preden ti reagirajo z biološko komponento, preprečujejo verižne reakcije ali pa preprečujejo aktivacijo O₂ do visoko reaktivnih produktov (Sies, 1991) (Slika 1).



Slika 1: Glavna oksidativna pot v organizmu in glavni antioksidantni sistem, ki pretvarja ali inaktivira radikale ali ROS. O_2 = kisik; $O_2^{\bullet-}$ = supersoksidni radikal; H_2O_2 = vodikov peroksid; $HO^\bullet$ = hidroksilni radikal; LH = maščobna kislina; L = radikal maščobne kisline; $LOO^\bullet$ = lipidni peroksid; SOD = superoksid dismutaza; CAT = katalaza; GPx = glutation peroksidaza; MPO = mieloperoksidaza; GSH = reducirani glutation; GSSG = oksidirani glutation; GS-X = glutation vezan na oksidant; NADPH = nikotinamid adenin fosfat; U = sečna kislina; Vit C = vitamin C; Vit E = vitamin E; UQ = ubikinon (prirejeno po Kirschvink in sod., 2008).

Eden izmed načinov, da vzdržujemo ravnotežje med oksidanti in antioksidanti je ta, da natančno določimo program treninga in ga prilagodimo konjem glede na njihovo fiziološko

zmogljivost (Arslan in sod., 2002). Po drugi strani mnogi avtorji (Kinnunen in sod., 2005a; De Moffarts in sod., 2005; Kirschvink in sod., 2002) priporočajo vnos različnih vrst antioksidantov s hrano oz. prehranskimi dodatki. S tem naj bi pripomogli k varovanju pred poškodbami, povzročenimi z ROS.

2.5.2 *Delitev antioksidantov*

Antioksidante razdelimo na primarne, ki odstranjujejo ali sodelujejo pri odstranjevanju RS, ter sekundarne, ki vključujejo sisteme za obnavljanje ali odstranjevanje poškodovanih makromolekul (Moradas-Ferreida in Costa, 2000). Primarni antioksidantni obrambni sistem vključuje encimski in neencimski obrambni sistem (Moradas-Ferreida in Costa, 2000). Antioksidanti so bodisi endogenega izvora (kot npr. encimi: SOD, katalaze (angl. Catalase, Cat); drugi proteini in peptidi: albumin, transferin, glutation; koencim Q₁₀ (CoQ₁₀), sečna kislina, lipojska kislina, melatonin) ali pa jih pridobimo izključno s hrano (α -tokoferol (vitamin E), askorbinska kislina (vitamin C), karotenoidi, polifenoli, flavonoidi). Antioksidanti morajo biti prisotni v vseh predelih organizma, zato se razlikujejo po strukturi, izvoru, načinu delovanja, fizikalno-kemijskih lastnostih, možnosti regeneracije in redoks potencialu (Halliwell in Gutteridge, 2010). Najučinkovitejši so endogeni antioksidanti (encimi), ki se lahko uravnavajo glede na potrebe. Klasični predstavniki te kategorije so SOD, Cat in peroksidaze. Sekundarni antioksidanti, ki jih lahko imenujemo »blažilci šoka«, so naslednji po učinkovitosti, ker so na voljo v krvi in tkivih v visoki koncentraciji. Na njihovo tvorbo oksidativni stres za razliko od encimskih antioksidantov ne vpliva stimulatorno. Med sekundarne antioksidante spadajo albumin, transferin in sečna kislina (Halliwell in Gutteridge, 2010).

2.5.2.1 Encimski antioksidanti

Glavno vlogo pri primarnem obrambnem sistemu imajo t. i. endogeni antioksidanti, ki jih telo samo sintetizira. Primarna vloga teh encimov je zaščita pred nastankom O₂^{•-} in OH[•] (Kirschvink in sod., 2008; Masella in sod., 2005). Pomembno vlogo pri aktivnosti glutathion peroksidaze (angl. Glutathione peroxidase, GPx) in SOD imajo elementi v sledovih, selen (Se²⁺), cink (Zn²⁺), baker (Cu²⁺) in mangan (Mn²⁺). Slednji omogočajo aktivnost encimom, da pretvorijo O₂^{•-} v H₂O₂ in H₂O in s tem inaktivirajo pomembe oksidante (Kirschvink in sod., 2008).

2.5.2.1.1 Superoksid dismutaza

Encim SOD je bil prvič izoliran iz krvi krav leta 1969 (Kaneko in sod., 1997). Prisoten je v vsaki celici, v različnih izoencimskih oblikah, ki se med seboj razlikujejo glede na zahtevo po kovinskem ionu v aktivnem centru, aminokislinsko sestavo in kofaktorje. Pri evkariotih se nahaja v dveh oblikah. Pri prvem tipu SOD sta kot kovini zastopana Cu²⁺ in Zn²⁺; ta tip SOD se nahaja v citoplazmi (ZnCu-SOD). Pri drugem tipu, ki se nahaja v mitohondrijih, je kovina Mn²⁺, to je t. i. mitohondrijska Mn-SOD. Pri človeku se nahaja SOD v treh različnih oblikah. V zunajceličnih tekočinah se namreč pojavlja še tretja oblika SOD, ki vsebuje Cu²⁺ in Zn²⁺ in se nahaja v ekstracelularnih tekočinah in intersticijskem prostoru, v tkivih (Rahman, 2007; Berg in sod., 2001; Šuput in Kramarič, 1996). Primarna vloga zunajcelične SOD v tkivih sesalcev je povezana z mehanizmom citokinov in ni inducirana s substratom oz. oksidanti. Medtem ko je vloga ostalih dveh oblik SOD obramba pred ROS. Ker se v mitohondrijski transportni verigi elektronov tvori največ O₂^{•-}, je zato tam najpomembnejša mitohondrijska Mn-SOD (Rahman, 2007; Nordberg in Arnér, 2001). Slednja predstavlja 10–15 % celotne SOD. Je homotetramerni protein, z molekulsko maso 96 kDa in ima v aktivnem centru Mn²⁺. ZnCu-SOD ima dve identični podenoti z molekulsko maso 32 kDa, od katerih ima vsaka v aktivnem centru Cu²⁺ in Zn²⁺ ione (Matés in sod., 1999).

Vsebnost SOD v eritrocitih domačih živali je približno enaka ali višja od vrednosti v eritrocitih ljudi. Aktivnost SOD je zmanjšana pri živalih, ki jim v krmi primanjkuje Cu²⁺ in Zn²⁺ (Kaneko in sod., 1997). SOD katalizira dismutacijo dveh molekul O₂^{•-} do H₂O₂ in O₂ (enačba 7). Dejstvo, da SOD inhibira reakcije, ki temeljijo na prisotnosti O₂^{•-}, je bilo glavno vodilo za razvoj številnih metod za merjenje aktivnosti tega encima (Berg in sod., 2001; Henry in sod., 1976).



2.5.2.1.2 Glutation peroksidaza

Več kot desetletje je celična ali klasična GPx (angl. classic GPx, cGPX) veljala za edini tip GPx in edini selenoprotein, prisoten v celicah sesalcev. Sedaj je poznanih že 19 selenoproteinov, med katerimi so najpomembnejši štirje: c GPX I, plazemska ali ekstracelularna GPx, fosfolipidna H₂O₂ GPx in gastrointestinalna GPx. GPx so družina od Se²⁺ odvisnih in neodvisnih encimskih antioksidantov, ki se delijo v znotrajcelične in

zunajcelične. Katalitično aktivnost določajo štirje atomi Se²⁺, vezani na seleno-cisteinske ostanke (Kaneko in sod., 1997). Odkritje, da je GPx selenoencim, je omogočilo merjenje funkcionalnega biokemijskega parametra, ki je odvisen od Se²⁺. Aktivnost GPx se lahko meri v plazmi, eritrocitih ali trombocitih (Kaneko in sod., 1997). Nekatere študije pravijo, da naj bi imela GPx zelo pomembno antioksidativno sposobnost v fizioloških procesih, medtem ko ostali antioksidativni encimi opravljajo svojo funkcijo le ob nastanku oksidativnega stresa (Nordberg in Arnér, 2001).

cGPx je med vsemi omenjenimi vrstami GPx najbolj zastopana. Plazemska GPx je ekstracelularni encim, prisoten v krvni plazmi. V plazmo se sprošča iz ledvic, sintetizira pa se še v placenti, debelem črevesu in v pljučih. Njegova funkcija je odstranjevanje ekstracelularnega H₂O₂. Fosfolipidna H₂O₂ GPx se nahaja v membranah, kjer varuje lipide pred peroksidacijo (Kaneko in sod., 1997). V največji meri se izraža v testisih, zato je njegova funkcija obramba semenske tekočine pred oksidativnimi poškodbami. Njegova aktivnost je največja v nezrelih spermatidih, medtem ko je v spermijih Fosfolipidna H₂O₂ GPx prisotna v neaktivni obliki. Gastrointestinalna GPx se v največji meri izraža v gastrointestinalnem epiteliju, kjer preprečuje absorpcijo H₂O₂. Posamezne GPx se ne odzivajo enako glede na zaloge Se²⁺. Ob pomanjkanju Se²⁺ se namreč njihova aktivnost močno zmanjša. V najbolj aktivni obliki in hkrati kot edini antioksidantni encim nastopa cGPx (Brigelius-Flohé in sod., 2002).

Aktivnost cGPx v eritrocitih prežvekovalcev, konjev in podgan (ne pa pri prašičih in primatih) je neposredno povezana s koncentracijo Se²⁺ v krvi. Pomanjkanje Se²⁺ se odraža v zmanjšani aktivnosti GPx v eritrocitih (Kaneko in sod., 1997). Funkcija ostalih tipov GPx še ni povsem pojasnjena. GPx katalizira redukcijo H₂O₂ z veliko večjo afiniteto kot Cat (Urso in Clarkson, 2003; Nordberg in Arnér, 2001).

2.5.2.1.3 Katalaza

Sesalska Cat je kompleks štirih identičnih podenot z molekulsko maso 60 kDa (skupna molekulska masa je torej 240 kDa). Vsaka podenota vsebuje skupino hema (Fe³⁺ - protoporfirin IX (Matés in sod., 1999).

Cat nastaja v telesu v jetrih, eritrocitih in pljučih (Kaneko in sod., 1997). Nahaja se v peroksisomih aerobnih celic in ima eno najhitrejših katalitičnih zmožnosti med encimi. Ena

molekula Cat je namreč sposobna v eni minuti katalizirati približno 6 milijonov molekul vodikovega peroksida do vode (H₂O) in O₂ (Rahman, 2007). Varuje celice, s tem ko katalizira razgradnjo H₂O₂ do H₂O in O₂ (enačba 8), pri čemer ne pride do tvorbe radikalov. Cat se veže z NADPH in s tem zaščiti encime pred inaktivacijo in hkrati poveča učinkovitost (Wu in sod., 2003; Nordberg in Arnér, 2001; Kaneko in sod., 1997). Katalizira majhne molekule, kot so H₂O₂ in metil ter etil hidroperoksid. Ne katalizira pa razgradnje visoko molekularnih peroksidov, npr. produktov lipidne peroksidacije (Matés in sod., 1999). *In vitro* študije so pokazale, da je aktivnost Cat za razgradnjo H₂O₂ enaka ali celo večja kot aktivnosti GPx v eritrocitih sesalcev, razen pri psih (Kaneko in sod., 1997).



2.5.2.2 Neencimski antioksidantni sistem

Neencimske antioksidantne sisteme sestavljajo molekule z manjšo molekulsko maso, ki so topne ali v hidrofilnem ali v hidrofobnem mediju. Hidrofobni neencimski antioksidanti so esencialnega pomena pri varovanju lipidov pred verižnimi reakcijami peroksidacije (Kirschvink in sod., 2008; Valko in sod., 2001).

2.5.2.2.1 Hidrofilni antioksidanti

Glavni predstavnik neencimskega antioksidantnega obrambnega sistema je glutation. Ima izredno pomembno vlogo pri uravnavanju oksidoredukcijskih reakcij ter pri preprečevanju škodljivega delovanja radikalov v celici (Boyer, 2005). Glutation deluje kot lovilec radikalov z aktivno tiolno (-SH) skupino, pri čemer nastane oksidirani glutation (GSSG), sposoben odstranjevanja oksidantov iz raztopine (Masella in sod., 2005). Po oksidativnem stresu se glutation sprosti v kri; oksidirana oblika (GSSG) se prenese iz celic v jetra, kjer se reducira in reducirana oblika (GSH) se nato sprosti iz jeter. S tem se poveča vsebnost v celicah, ki uporabijo GSH kot substrat za GPx (Chiaradia in sod., 1998).

Askorbinska kislina je v vodi topen antioksidant, ki ima sposobnost, da oddaja elektrone ROS (Soffler, 2007). Kot taka neposredno reagira s O₂^{•-}, OH[•] in ¹O₂ (Clarkson in Thompson, 2000). Je esencialnega pomena pri regeneraciji vitamina E in ostalih antioksidantov iz njihove oksidirane oblike. Askorbinska kislina ima lahko tudi prooksidativen učinek ob prisotnosti Fe

in Cu²⁺, pri čemer nastaja OH[•]. Konji imajo to posebnost, da sami sintetizirajo askorbinsko kislino, zato njen vnos s hrano ni nujnega pomena (Soffler, 2007).

Askorbinska kislina in ostali vodotopni encimi predstavljajo prvo obrambo pred hidrofilnimi radikali, medtem ko α-tokoferol varuje pred lipofilnimi radikali (Dotan in sod., 2004; Dekkers in sod., 1996).

2.5.2.2.2 Lipofilni antioksidanti

Med hidrofobne antioksidante spadajo α-tokoferol, β-karoteni, flavonoidi, bilirubin, melatonin in ubikinol (CoQ₁₀H₂). α-tokoferol in karotenoidi so pomembni antioksidanti, ki pa jih organizem večine sesalcev in ljudi ne more sintetizirati, zato je njihov vnos nujno potreben s hrano (Ji, 1999).

α-tokoferol je lipofilna snov, ki se nahaja v celični membrani. Igra pomembno vlogo pri odstranjevanju radikalov, ki nastajajo v notranji mitohondrijski membrani in ostalih bioloških membranah (Ji, 1999). Pomemben je tudi, ker prekine verižno reakcijo lipidne peroksidacije. Ko se spremeni v radikal, ima šibko reaktivnost, s tem pa prepreči nadaljnje oksidacije sosednjih VNMK (Soffler, 2007).

Vsebnost α-tokoferola v skeletnih mišicah predstavlja približno 50% vsebine v jetrih, srcu in pljučnem tkivu (Evans, 2000). α-tokoferol je esencialnega pomena pri vzdrževanju normalne celične funkcije tekom vadbe (Ji, 1999).

Karotenoidi so barvni pigmenti, prisotni predvsem v rastlinah in mikroorganizmih. Epidemiološke študije kažejo, da je povečan vnos le-teh s hrano povezan z nižjim tveganjem za starostna obolenja. Karotenoidi vsebujejo konjugirane dvojne vezi. β-karoten je glavni karotenoidni prekurzor vitamina A in najbolj učinkovit pri odstranjevanju O₂^{•-} (Clarkson in Thompson, 2000). Karotenoidi pa imajo po drugi strani tudi prooksidativen učinek, ki poveča lipidno peroksidacijo (Rahman, 2007).

Bilirubin je netopen v vodi. *In vitro* lahko odstranjuje ONOOH, peroksilni radikal (RO₂[•]), alkoksilni radikal (RO[•]) in ¹O₂. Zaradi njegove vezave na albumine in albumin vezane MK prepreči poškodbe, nastale zaradi radikalov (Halliwell in Gutteridge, 2010).

Lipojska kislina je esencialna komponenta piruvata in α kompleks glutamat dehidrogenaza multiencimskega kompleksa. Tako njena oksidirana kot tudi reducirana oblika predstavljata antioksidativno vlogo. *In vitro* odstranjuje RO₂[•], HOCl, NO₂[•], OH[•] in ONOOH ter se veže s Cu²⁺ in Fe²⁺ ioni (Halliwell in Gutteridge, 2010).

CoQ₁₀ je esencialnega pomena v mitohondrijski dihalni verigi. Najdemo ga tudi v membranah ostalih celic in lipoproteinov. Sposoben je odstranjevati RO₂[•] in preprečiti lipidno peroksidacijo (Halliwell in Gutteridge, 2010). Njegov podroben opis in funkcija sta navedena v poglavju 2.9.

2.6 KAZALCI OKSIDATIVNEGA STRESA IN OKSIDATIVNIH POŠKODB, NASTALIH Z VADBO

2.6.1 Encimi kot indikatorji povečane prepustnosti mišičnih vlaken

Aktivnosti mišičnih encimov v plazmi in serumu so v normalnih pogojih nizke. Porast aktivnosti mišičnih encimov v serumu je lahko povezana tudi s povečano prepustnostjo celične membrane. Pri aktivni in dolgotrajni fizični vadbi pride v plazmi do porasta mišičnih encimov CK, AST in L-laktat dehidrogenaze (LDH) (Teixeira-Neto in sod., 2008). Lahko pa na spremembe v metabolizmu mišic pride tudi zaradi stresa konj pri dolgotrajnejšem transportu (Art in Lekeux, 2005).

Meritve serumskih encimov pri kasačih so pokazale, da aktivnosti encimov CK in gama glutamil transferaze (GGT) dosežeta vrh v zadnji četrtini treninga in se povrneta v normalno vrednost tik pred začetkom tekmovanja. Konji z oslabljeno mišično presnovo so imeli povišane vrednosti CK, glutamin oksal-ocetne transaminaze, LDH in GGT (Sommer, 1983, cit. po Arslan in sod., 2002).

Teixeira-Neto in sod. (2008) pa so pri endurance konjih, ki so tekmovali na razdalji 70 in 100 km, ugotovili porast in spremembe v mišični encimski aktivnosti, in sicer povišano CK, LDH in AST. Porast CK med fizično vadbo kasačev so opisali tudi Piccione in sod. (2007). Izoencimi so najbolj zanesljivi kazalci lipidne oksidacije (Lykkesfeldt in Svendsen, 2007). Vrednosti omenjenih mišičnih encimov dokazujemo s histokemičnimi in biokemičnimi metodami ter z elektronsko mikroskopijo za analizo mišične biopsije (Lindholm, 1987).

2.6.1.1 Kreatin kinaza

CK je najpomembnejši mišični encim, ki se nahaja v tkivih v različnih izoencimskih oblikah. Funkcija CK v mišicah je, da regenerira ADP v ATP in tako omogoča delovanje mišic. Ob poškodbi celične membrane se CK hitro sprosti iz mišičnih celic in doseže vrh v 4 do 12 urah po poškodbi mišice, na kar se iz krvi izloči v naslednjih 2 urah (Kaneko in sod., 1997).

CK je pomemben pokazatelj poškodb pri diagnostiki bolezni mišično-skeletnega sistema. Porast CK v serumu so izmerili pri zdravih konjih po naporni vadbi, kar nakazuje na povečano prepustnost mišičnih celic (Teixeira-Neto in sod., 2008).

Kreatinin kinaza je torej po eni strani lahko pokazatelj poškodbe mišic (De Moffarts in sod., 2005; McBride in Kraemer, 1999; Kaneko in sod., 1997). Vendar vrednosti CK lahko variirajo in so odvisne od sprememb v permeabilnosti membrane, celične nekroze, povečane encimske sinteze in drugih. Po drugi strani pa zmeren porast CK med aktivno vadbo ni povezan z nastankom kliničnih znakov oz. histoloških sprememb v celični strukturi mišic (Piccione in sod., 2007; Valberg in sod., 1993).

2.6.1.2 Aspartat aminotransferaza

AST je encim, ki je večinoma prisoten v mehkih tkivih in je ravno tako značilen kazalec v plazmi, ki kaže na poškodbo mehkih tkiv. Ob povišani koncentraciji AST ter pozitivni korelaciji s CK, lahko poškodbe kažejo na okvaro jeter (Kaneko in sod., 1997). AST je obenem pomemben pokazatelj akutne celične nekroze (Arslan in sod., 2002). Povišane vrednosti plazemske AST nakazujejo na poškodbe mišic in invazijo vnetnih celic v ekstracelularni prostor (Lykkesfeldt in Svendsen, 2007).

Med vadbo je najvišja koncentracija AST dosežena po 24 urah, njen razpolovni čas pa je 7 dni (Teixeira-Neto in sod., 2008). Tudi za AST velja, da je porast vrednosti v serumu odvisna od sprememb v membrani, povečane encimatske sinteze in celične nekroze (Piccione in sod., 2007; Valberg in sod., 1993).

2.6.1.3 Laktat dehidrogenaza

LDH se nahaja v različnih izoencimskih oblikah (Chiaradia in sod., 1998). V največji količini se nahaja v mehkih tkivih zasledimo pa ga tudi v pljučih, ledvicah in vranici (Chiaradia in sod., 1998; Kaneko in sod., 1997). Pri aktivni fizični vadbi pride v plazmi do porasta LDH, ki

je v normalnih pogojih prisoten le v zdravih celicah (Teixeira-Neto in sod., 2008). Najvišja koncentracija je dosežena v 24 urah po vadbi, z razpolovnim časom 7 dni. Porast LDH v serumu so izmerili pri zdravih konjih po naporni vadbi (Teixeira-Neto in sod., 2008). Obenem je lahko porast LDH pokazatelj poškodb mišic pri intenzivni vadbi (Chiaradia in sod., 1998).

Izoencimi LDH so bili v veterinarski medicini prvi (encimi), ki so jih uporabljali za ugotavljanje poškodb organov, vendar so le malo prispevali k sami diagnostiki. Danes LDH še vedno uporabljamo kot indikator poškodbe mišic tekom intenzivne vadbe, skupaj z encimoma CK in AST (Teixeira-Neto in sod., 2008).

2.6.2 Antioksidanti kot kazalci oksidativnega stresa

Za oceno prisotnosti in stopnje oksidativnega stresa se uporabljajo kazalci, kot so celokupna antioksidativna kapaciteta (angl. total antioxidant capacity, TAC), in antioksidantna encima, kot sta SOD in GPx (Lykkesfeldt in Svendsen, 2007; Urso in Clarkson, 2003). Pri pojavu in stopnji oksidativnega stresa imajo pomembno vlogo koncentracije lipofilnih antioksidantov v krvi, še posebej α -tokoferola in CoQ₁₀ (Lykkesfeldt in Svendsen, 2007).

Antioksidativno učinkovitost moramo vrednotiti z različnimi testi za različne mehanizme (Moure in sod., 2001). Meritve, ki jih opravljamo pri poškodbah reakcij oksidacije, zajemajo tri glavne makromolekule: DNA, lipide in proteine (Banarjee in sod., 2003). Za ugotavljanje oksidativnih poškodb so običajno zanimivi naslednji: količina oksidativne poškodbe DNA, aktivnost antioksidativnih encimov (Cat, SOD, GPx), koncentracije ne-encimskih antioksidantov (glutation, flavonoidi, katehini, antocianini, sečna kislina), koncentracije vitaminov (E, C in β -karoten), stopnja oksidativne poškodbe lipidov (izoprostani, tiobarbituratne reaktivne substance (TBARS) in poškodbe proteinov (število proteinskih karbonilov in modificiranih tirozinskih ostankov) (Moure in sod., 2001).

Biokemični laboratoriji, namenjeni kliničnim raziskavam, ugotavljajo aktivnosti antioksidantnih encimov v plazmi in tkivih. Na ta način antioksidantni encimi služijo kot pokazatelji oksidativnega stresa in poškodb, nastalih kot posledica le-tega (Slaughter in O'Brian, 2000).

2.6.3 Metode merjenja kazalcev oksidativnega stresa

Tvorbo oksidativnega stresa ocenimo in kvantificiramo z meritvami RS ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 in $OH^{\bullet}$) oz. oksidativnih poškodb, s spektrofotometričnimi metodami (elektronsko paramagnetno resonanco) ali s fluorescentnimi barvili (npr. diklorofluorescerinom) (Lykkesfeldt in Svendsen, 2007).

Pri ugotavljanju oksidativnega stresa se poslužujemo biokemijske ocene z indirektnimi kazalci, kot so antioksidativni kazalci, antioksidativni encimi in nizkomolekularni antioksidanti (De Moffarts in sod., 2007). V vlogi kazalcev oksidativnega stresa lahko merimo tudi vrednosti lipofilnih antioksidantov, kot sta α -tokoferol in CoQ₁₀ (Lykkesfeldt in Svendsen, 2007).

Glavni vir nastanka ROS med vadbo so skeletne mišice. Zato je na podlagi cirkulirajočih antioksidantov in ostalih kazalcev oksidativnih poškodb težko oceniti obseg poškodb in ugotoviti prisotnost oksidativnega stresa (Marlin in sod., 2002). Kljub vsemu pa najpogosteje merimo kazalce oksidativnega stresa v krvi in plazmi ter v eritrocitih (Halliwell in Gutteridge, 2010; De Moffarts in sod., 2005; Chiaradia in sod., 1998).

V plazmi izmerjen TAC (De Moffarts in sod., 2005) nam ponazarja širšo sliko relativne antioksidantne aktivnosti v različnih telesnih tekočinah in kako se le-te spreminjajo pod različnimi kliničnimi pogoji (Halliwell in Gutteridge, 2010). V plazmi merimo tudi količino MDA, pri čemer se kot indikator uporablja TBARS (Marnett, 1999). Povišane vrednosti laktata v plazmi nakazujejo na metabolično acidozo (Kaneko in sod., 1997) ter poškodbe mišic pri vadbi (Teixeira-Neto in sod., 2008). V plazmi merimo tudi vsebnost proteinov, katerih porast nakazuje na hemokoncentracijo, nastalo tekom vadbe (White in sod., 2001).

V eritrocitih določamo vrednosti SOD in GPx (De Moffarts in sod., 2005). Aktivnost SOD je zmanjšana pri živalih, ki jim v krmi primanjkuje Cu^{2+} in Zn^{2+} . Povišane vrednosti SOD nakazujejo na oksidativno poškodbo zaradi tvorbe H_2O_2 . Pomanjkanje Se^{2+} se odraža v zmanjšani aktivnosti GPx v eritrocitih, saj je Se^{2+} esencialni kofaktor pri tvorbi GPx (Kaneko in sod., 1997). Zmanjšano razmerje med GSH in GSSG nakazuje na povečan oksidativni stres (Lykkesfeldt in Svendsen, 2007).

Antioksidanti, kot so glutation, α -tokoferol in askorbinska kislina, naj bi se sprostili iz zalog v tkivih v ostale dele telesa in tako preprečevali oksidativni stres. Ker eritrociti vsebujejo antioksidante in se iz telesa zlahka odstranjujejo, se najpogosteje uporabljajo v *in vivo* študijah kot odgovor antioksidantov na oksidativni stres na celičnem nivoju (Clarkson in Thompson, 2000). Merjenje aktivnosti antioksidantnih encimov v eritrocitih predstavlja merilo aktivnosti teh encimov v celotnem tkivu (Van Lente in Pepoy, 1990).

2.7 DODATKI ANTIOKSIDANTOV K PREPREČEVANJU OKSIDATIVNEGA STRESA

Variabilnost endogenih in eksogenih antioksidantov pomembno vpliva na zaščito tkiv pred oksidativnimi poškodbami in z njimi povezanimi bolezenskimi stanji (Kinnunen in sod., 2005a). Obramba z antioksidanti se v organih, kot so skeletne mišice, srce, jetra, spreminja tekom fizičnega napora (Sen, 1995).

Če je organizem izpostavljen raznim stresnim dejavnikom kot so intenzivna telesna vadba, prekomerno uživanje alkohola in zdravil, izpostavljanje strupom, infekcije, neustrezna prehrana in sevanje, pride do povečane tvorbe RS in s tem do povečanega oksidativnega stresa in poškodb tkiv. Tako endogeni antioksidanti večinoma ne zadoščajo za optimalno zaščito pred oksidativnim stresom (Kaliara in sod., 2006). Zato je v takšnih primerih nujen vnos antioksidantov s hrano oz. prehranskimi dodatki kot dopolnitev endogenim antioksidantom za zagotovitev optimalne zaščite organizma (Kirschvink in sod., 2008). Pomanjkanje antioksidantov v krmi lahko močno vpliva na zmanjšan obrambni sistem in tako poveča možnost za nastanek z vadbo povzročenega oksidativnega stresa in njegovih posledic (Ji, 1999).

Prehranski dodatek antioksidantov predstavlja pomembno alternativo pri preprečevanju poškodb, povezanih z oksidativnim stresom (Lykkesfeldt in Svendsen, 2007; Witt in sod., 1992).

Eden izmed načinov, da vzdržujemo ravnotežje med oksidanti in antioksidanti, je ta, da natančno določimo program treninga in ga prilagodimo konjem glede na njihovo fiziološko zmogljivost (Arslan in sod., 2002). Zaradi povečanega nastajanja RS je prehranski dodatek antioksidantov še posebej pomemben pri zaščiti organizma v boju proti RS v prvih fazah treninga in pri uvajanju novih načinov vadbe (McBride in Kraemer, 1999).

Dodatek antioksidantov v prehrani ima ugodne učinke pri zdravljenju različnih patoloških procesov, posebno kroničnih vnetnih procesov, vendar pa moramo ob tem upoštevati predpisano terapijo z zdravili (Kirschvink in sod., 2008). Nekateri antioksidanti imajo namreč prooksidativno delovanje. Dokazano je citostatično in citotoksično delovanje flavonoidov na celice v kulturi in le malo jih je dokazalo protitumorno delovanje pri aplikaciji visokih odmerkov v živalskih modelih karcinogeneze. Dokazali so, da so nekateri učinki na celice artefakti, ker določeni antioksidanti, kot so polifenoli v celičnem mediju, hitro oksidirajo. Pri tem nastaja H₂O₂ in ustrezni kinoni, ki lahko poškodujejo sestavine celic (Halliwell in Gutteridge, 2010).

Individualno prilagojeni odmerki antioksidantov pri športnih konjih pripomorejo k dobri kondiciji in vzdržljivosti pri telesnih naporih. Odmerke je potrebno prilagoditi glede na starost, spol, pasmo in telesno obremenitev (Kirschvink in sod., 2008).

Obseg poškodb, ki je odvisen od intenzitete vadbe in stadija treninga, lahko zmanjšamo z vnosom antioksidantov, kot so α -tokoferol, Se²⁺ in CoQ₁₀ (Härtlova in sod., 2008; Sen, 1995; Witt in sod., 1992). Pomanjkanje antioksidantov v krmi lahko močno vpliva na zmanjšan obrambni sistem in tako poveča možnost za nastanek z vadbo povzročenega oksidativnega stresa in njegovih posledic

Omenjene raziskave tako kažejo, da naj bi ljudje, ki se aktivno ukvarjajo z vadbo, še dodatno povečali vnos α -tokoferola v hrano in s tem preprečili obseg lipidne peroksidacije. Vendar je ob tem potrebno upoštevati smernice glede odmerjanja (Ji, 1999). Najbolj uspešni antioksidanti pri preprečevanju poškodb, povzročenih z oksidativnim stresom tekom vadbe, so α -tokoferol, askorbinska kislina in β -karoten (McBride in Kraemer, 1999). Redna telesna vadba ter uravnotežena prehrana, ki zagotavlja zadostno oskrbo z antioksidanti, doprinese k želenim rezultatom (Härtlova in sod., 2008; Sen, 1995). Endogena sinteza nekaterih antioksidantov (npr. CoQ₁₀) se s starostjo zmanjšuje, zato postanejo vse bolj pomembni eksogeni viri (Halliwell in Gutteridge, 2010).

2.7.1 Dodatek antioksidantov v prehrani športnih konj

Pri športnih konjih je bilo narejenih kar nekaj študij, kjer so konji prejeli razne antioksidante v obliki dodatkov. Poskusi so pokazali, da so ti dodatki vsaj delno preprečili z

vadbo povzročene motnje (Notin in sod., 2010). V študiji, ki sta jo izvedla McMeniman in Hintz (1992), so polo poniji prejeli 10 tednov dodatek α -tokoferola (100 IU α -tokoferola na dan). Po vadbi na tekočem traku z 10° naklonom in hitrostjo 4 m/s so dokazali negativno korelacijo med α -tokoferolom v krvi in nekaterimi kazalci oksidativnega stresa.

Avellini in sod. (1999) so dirkalnim konjem dodajali α -tokoferol v odmerku 40 mg/dan in Se²⁺ v odmerku 20 µg/kg na dan. Na začetku in po 70 dneh poskusa so konji izvedli fizično vadbo. Ta je bila sestavljena iz dveh serij galopa, z vmesnim premorom 18 ur. Dodatek antioksidantov je odražal povečano antioksidativno kapaciteto (Avellini in sod. 1999). α -tokoferol so v 90-dnevni študiji dirkalnim in quarter konjem dodajali tudi Siciliano in sod. (1997). Konji so prejeli placebo, 80 IU α -tokoferola/kg/suhe snovi (SS) oz. 300 IU α -tokoferola/kg/SS. Nato so izvedli trening v kombinaciji s kasom in umirjenim galopom. Dodatek ni vplival na spremembe kazalcev oksidativnega stresa (TBARS) in aktivnost mišičnih encimov CK ter AST (Siciliano in sod., 1997), medtem ko je dodatek askorbinske kisline intravensko, v odmerku 5 g, preprečil porast nekaterih kazalcev z vadbo povzročene lipidne peroksidacije pri maksimalni zmogljivosti hitrostne dirke na razdalji 1000 m pri dirkalnih konjih (White in sod., 2001). V študiji na endurance konjih je 23 konj prejelo 3 tedne pred dirko v 5000 IU α -tokoferola, ostalih 23 konjev pa enako količino α -tokoferola ter 7 g askorbinske kisline na dan. Nato so izvedli 80 km dolgo endurance tekmo. Rezultati niso pokazali ugodnih učinkov dodatkov na lipidne perokside. Izmerili so celo pozitivno korelacijo med CK in AST ter lipidnimi peroksidi v plazmi (Williams in sod., 2004).

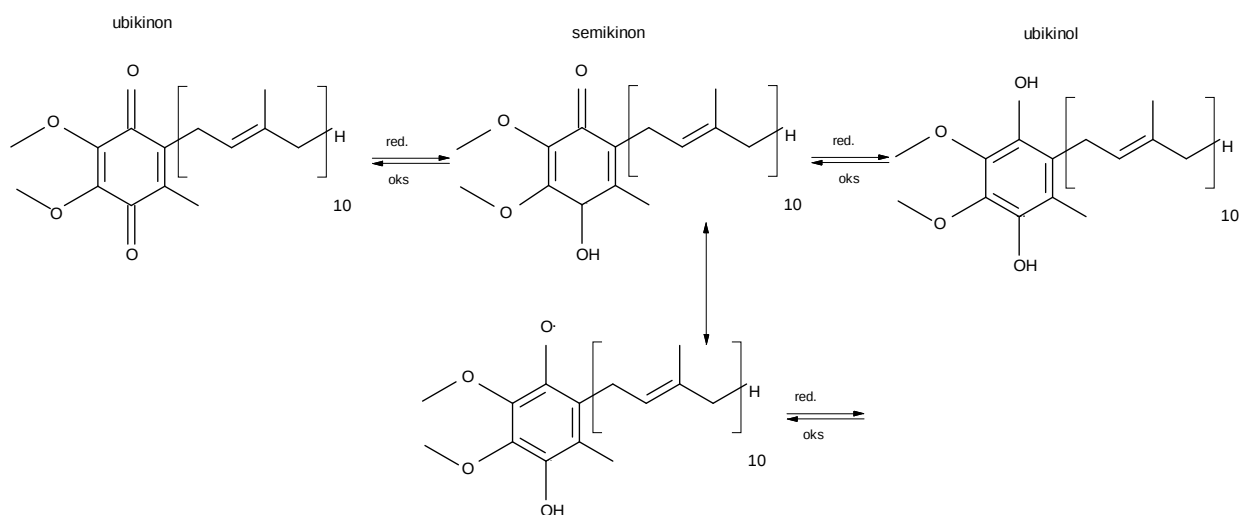
De Moffarts in sod. (2005) so izvedli študijo, v katero je bilo vključenih 40 dirkalnih konj, ki so v 3-mesečnem poskusnem obdobju prejeli mešanico antioksidantnega dodatka v krmi (α -tokoferol, askorbinska kislina, Se²⁺ in Cu²⁺). V času poskusa so izvedli približno 2,4 dirke na teden. Ugotovili so, da je dodatek antioksidantov skupaj z elementi v sledovih po 6 oz. 12 tednih izboljšal adaptivno sposobnost antioksidantov (De Moffarts in sod., 2005).

V raziskavi, ki so jo opravili Deaton in sod. (2004), je bilo v 4-tedenski poskus vključenih 5 obolelih konj s ponavljajočo obstrukcijo dihalnih poti. Trije konji so dobivali antioksidantski dodatek v odmerku 10 g α -tokoferol acetata/kg dodatka, 57 g kalcijevega askorbil monofosfata na kg/dodatka ter 4 mg Se²⁺/kg dodatka. Ostala dva konja nista dobivala antioksidantskih dodatkov. Po štirih tednih so konje pregledali. 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 po fizični obremenitvi. Medtem ko dodatek ni vplival na koncentracijo α -tokoferola, GSH, GSSG in glutation redoks razmerja v plazmi konj po fizični obremenitvi (Deaton in sod., 2004).

2.8 KOENCIM Q₁₀

Koencim Q ali ubikinon je 2,3 dimetoksil-5 metil-6 dekaprenil-1,4 benzokinon (Slika 4). Nahaja se v lipidnem dvosloju, v hidrofobni regiji, v celični membrani (Lenaz in sod., 2007; Battino in sod., 1990). Prisoten je v vseh celičnih membranah v organizmu (Crane, 2001). Sestavljen je iz tirozina, dobljenega iz kinonovega obroča in vezan na poliizoprenoidno verigo. Števili 9 in 10 pomenita število izoprenoidnih enot v stranski verigi pri višje razvitih vretenčarjih in sesalcih (Ernster in Dallner, 1995). Benzokinonski obroč se nahaja v treh različnih redoks stanjih. Najdemo ga lahko v popolnoma oksidiranemu stanju (ubikinon), delno reduciranem (ubisemikinon ($\cdot$ QH)) in v popolnoma reduciranemu stanju (ubikinol; CoQ₁₀H₂) (Slika 2). Poliizoprenoidna veriga stabilizira celično membrano. Dolžina izoprenoidnih enot vpliva na prepustnost membrane, interakcije s proteini in nezmožnost avtooksidacije (James in sod., 2004; Matsura in sod., 1992).



Slika 2: Redoks stanja koencima Q₁₀ (prirejeno po Žmitek J in Žmitek K, 2009).

Od vseh bioloških sistemov je fiziološka funkcija CoQ najboljše raziskana in poznana v notranji membrani mitohondrijev, kjer je CoQ vključen v tri glavne procese (Crane in Navas, 1997; James in sod., 2004; Turunen in sod., 2004):

- prenos elektronov s kompleksa I in II na kompleks III vzdolž dihalne verige;
- tvorba superoksidnega radikala z avtooksidacijo ubisemikinona;
- antioksidativno delovanje.

Njegova količina v mnogih membranah je od 3 do 30-krat višja od količine α -tokoferola (Crane, 2001). CoQ₁₀ je poznan tudi kot endogeni lipofilni antioksidant, ki je sposoben regeneracije ostalih antioksidantov, kot sta α -tokoferol in askorbat (Bhagavan in Chopra, 2006). Medtem ko lipojska kislina, ki je močno reducirajoča spojina, z nizkim redoks potencialom, regenerira CoQ₁₀ v aktivno obliko (Packer in sod., 1995). Večina CoQ₁₀ v membrani se nahaja v reducirani obliki (Crane, 2001), zato je učinkovit antioksidant, ki zavira inhibicijo lipidne peroksidacije v bioloških membranah in lipoproteinih. Poleg tega ščiti tudi membranske proteine in DNA pred oksidativnimi poškodbami, ki spremljajo lipidno peroksidacijo (Ankola in sod., 2007; Zhang in sod., 1996).

Njegovo antioksidativno vlogo še povečajo encimi NADH citokroma b₅ reduktaze, NADH/NADPH oksidoreduktaze in NADPH koencima Q reduktaze. Ti reducirajo vse q kinone in s tem vzdržujejo reducirano obliko CoQ₁₀ v plazmi in notranjih membranah (Crane, 2001).

Zaradi pglavitne vloge CoQ₁₀ v mitohondrijski funkciji, je pomemben kot prehranski dodatek pri različnih terapijah v klinični medicini. S starostjo pa se njegova sinteza zmanjša, s tem pa se zniža tudi njegova plazemska koncentracija (Nishimura in sod., 2009).

2.8.1 CoQ₁₀ v obliki prehranskega dodatka

Prehranski dodatki vsebujejo CoQ₁₀ v različnih oblikah in količinah, od česar je odvisna njegova biološka uporabnost in učinek. Mednarodnih enot za CoQ₁₀ ni (Janeš, 2009).

Njegova terapevtska uporaba se je izkazala za učinkovito pri okrevanju tkiv po ishemijskih poškodbah. Reducirana oblika CoQ₁₀ je prisotna v celični membrani, serumu in serumskih lipoproteinih, kjer varuje lipide pred peroksidacijo. Zato je njegova uporaba smiselna pri ljudeh v oksidativnem stresu (Janeš, 2009). CoQ₁₀ v obliki dodatkov krepi imunski sistem, kar je pokazala tudi študija, kjer je prišlo po uživanju dodatka CoQ₁₀ do porasta imunoglobulinov v serumu kronično obolelih pacientov (Gaby, 1996).

Dokazano je, da uživanje CoQ₁₀ v obliki dodatka k prehrani ne povzroči zmanjšanja endogene sinteze CoQ₁₀. Koncentracija CoQ₁₀ v plazmi se namreč po prenehanju jemanja CoQ₁₀ v obliki dodatka k prehrani ne glede na to, ali je slednji v ubikonon ali ubikinol obliki, v nekaj dneh povrne na izhodiščno raven, kakršna je bila pred začetkom jemanja dodatka k prehrani, nikakor pa ne na nižjo (Bhagavan in Chopra, 2007).

2.8.2 Farmakokinetika CoQ₁₀

2.8.2.1 Absorpcija in biološka uporabnost CoQ₁₀

Zaradi njegove lipofilne značilnosti je mehanizem absorpcije CoQ₁₀ v gastrointestinalnem traktu enak kot pri drugih lipidih (Bhagavan in Chopra, 2006). Absorpcija se poveča s hkratnim uživanjem obroka, ki temelji na čim višji vsebnosti maščob, in z delitvijo enega večjega na več manjših odmerkov (Žmitek J in Žmitek K, 2009). Ker je CoQ₁₀ zaradi dolge lipofilne izoprenske verige praktično netopen v vodi, je prva stopnja po njegovem privzemu vgraditev v hilomikrone (Bhagavan in Chopra, 2006). V takšni obliki se CoQ₁₀ absorbira iz tankega črevesa, od tam pa prehaja v hepatocite. Jetra ga sprostijo v kri skupaj z lipoproteini, kjer ima največjo afiniteto do lipoproteinov z zelo nizko gostoto (angl. very low-density lipoprotein, VLDL) in lipoproteinov z nizko gostoto (angl. low-density lipoprotein, LDL) (Kaikkonen in sod., 2002).

Za CoQ₁₀ je značilna kompleksna absorpcija, ki je odvisna od številnih aktivnih in pasivnih transportnih mehanizmov (Palamakula in sod., 2005). Plazemska koncentracija CoQ₁₀ začne naraščati približno 1–2 uri po zaužitju na prazen želodec. Maksimalno koncentracijo ($c_{\max}$) v krvni plazmi dosežemo po 2–6 urah po zaužitju. Po prenehanju dajanja CoQ₁₀ pa se krvna koncentracija v nekaj dneh povrne na izhodiščno raven, ne glede na obliko zaužite substance (Žmitek J in Žmitek K, 2009). Mnoge študije so dokazale dva vrha pri koncentraciji, in sicer naj bi bil drugi vrh dosežen 24 ur po zaužitju CoQ₁₀ (Bhagavan in Chopra, 2006). Faza distribucije CoQ₁₀ nastopi po dosegu $c_{\max}$ in traja 6–12 ur. Čas, ki je potreben da dosežemo $c_{\max}$ CoQ₁₀, je lažje predvideti pri vodotopnih kot v maščobah topnih oblikah CoQ₁₀ (Hosoe in sod., 2007).

CoQ₁₀ ima visoko katabolično hitrost, ki pa se kaže v relativno kratki razpolovni dobi ($t_{1/2}$). Ta variira med tkivi in znaša v povprečju med 49 in 125 ur (Turunen in sod., 2004). Rezultati farmakokinetičnih študij na ljudeh so pokazali, da je v krvi v času maksimalne koncentracije

CoQ₁₀ navadno do 5 % zaužitega odmerka CoQ₁₀ in največ po zaužitju vodotopnih oblik CoQ₁₀ (Žmitek J in Žmitek K, 2009).

Rezultati farmakokinetičnih študij med drugim tudi kažejo, da se CoQ₁₀ po končanem dodajanju ne akumulira v plazmi ali tkivih (Žmitek J in Žmitek K, 2009; Bhagavan in Chopra, 2006).

2.8.2.1.1 Povečanje biološke uporabnosti z vodotopno obliko CoQ₁₀

Vzrok za nizko biološko uporabnost CoQ₁₀ je nezadosten čas za absorpcijo v prebavnem traktu (Žmitek J in Žmitek K, 2009). Absorpcija CoQ₁₀ v tkiva je omejena predvsem zaradi njegove lipofilne narave (Terao in sod., 2006). Zato je učinkovitost absorpcije CoQ₁₀ zelo odvisna tudi od oblike, v kateri učinkovino zaužijemo (Žmitek J in Žmitek K, 2009). V ta namen so bile razvite številne vodotopne oblike CoQ₁₀, ki vplivajo na izboljšanje absorpcije ter s tem na povečanje biološke uporabnosti (Terao in sod., 2006).

2.8.2.1.2 Betaciklodekstrinski kompleks CoQ₁₀

Na Kemijskem inštitutu v Ljubljani so razvili kompleks, ki je topen v vodi in se tako hitreje absorbira (Žmitek J in Žmitek K, 2009). To je vodotopni kompleks koencima Q₁₀ in β-ciklodekstrina (Q₁₀CD). Vodotopnost je v tem primeru posledica specifične strukture β-ciklodekstrina, ki ima hidrofobno notranjost, v katero se ujame molekula CoQ₁₀, in precej bolj hidrofilno zunanost. Po razpadu kompleksa pod vplivom želodčnega soka, s čimer se sprostijo posamezne molekule CoQ₁₀ za absorpcijo, pa se β-ciklodekstrin izloči iz organizma v nespremenjeni obliki. Ta derivat škroba se tudi sicer pogosto uporablja v farmaciji za solubilizacijo lipofilnih substanc (Žmitek J in Žmitek K, 2009). Najprej je bila narejena študija s Q₁₀CD pri psih pasme beagle, kjer so Prošek in sod. (2008) dokazali boljšo biološko uporabnost vodotopne oblike Q₁₀CD v primerjavi z oljnimi kapsulami s CoQ₁₀ na osnovi sojinega olja. Žmitek in sod. (2008) so kasneje prišli do enakih izsledkov v študiji tudi na zdravih prostovoljcih. Rezultati slednje so pokazali, da je bila biološka uporabnost Q₁₀CD v povprečju na ravni 220 % biološke uporabnosti referenčnih oljnih kapsul (Žmitek in sod., 2008).

2.8.2.2 Distribucija in privzem CoQ₁₀

Skupna količina CoQ₁₀, prisotnega v telesu odraslega človeka, je od 0,5 do 1,5 g. Zaradi lipofilnosti se CoQ₁₀ distribuira v tista tkiva, ki imajo veliko vsebnost maščob, in ne glede na metabolne potrebe. Tako se največ CoQ₁₀ distribuira na notranjo mitohondrijsko membrano, nekaj malega tudi v druge organele in citosol. Velike količine CoQ₁₀ vsebujejo tudi limfociti in eritrociti ter organi, ki so bolj podvrženi oksidativnemu stresu (Bhagavan in Chopra, 2006).

Privzem CoQ₁₀ poteka v krvi, krvnih žilah, jetrih, vranici, medtem ko v drugih organih večinoma ne. Ker se CoQ₁₀ v telesu sintetizira de novo, njegov privzem v normalnih pogojih ni odvisen od eksogenega vnosa. Rezultati študij kažejo, da sta odmerek in čas odmerjanja CoQ₁₀ odločilna za privzem CoQ₁₀ v srce in možgane (Bhagavan in Chopra, 2006).

2.8.2.3 Metabolizem in izločanje CoQ₁₀

Metabolizem pri človeku ni dobro raziskan; večina raziskav je bila narejena na živalih, a tudi za te so podatki omejeni (Žmitek J in Žmitek K, 2009). Kot kaže, se CoQ₁₀ metabolizira v vseh tkivih, metaboliti se fosforilirajo v celicah, nato se s transportom prenesejo po krvi v ledvice, kjer se izločajo z urinom, vendar le v majhnih količinah. V večini se CoQ₁₀ izloča z žolčem, v blatu. Razpolovni čas izločanja pri ljudeh je približno 33 ur (Bhagavan in Chopra, 2006).

2.8.3 CoQ₁₀ pri športnih konjih kasačih

Vsebnost endogenega CoQ₁₀ v plazmi so izmerili pri netreniranih konjih pred in po vadbi. Pred treningom je bila vrednost CoQ₁₀ v plazmi konj približno 0,86 mg/l, nato je po 7 minutah vadbe dosegla vrh (1,03 mg/l) in po 19 minutah prišla na bazalni nivo (Tedeschi in sod., 2000). O privzemu CoQ₁₀ iz prebavnega trakta v mišice in njegovem vplivu na izboljšanje fizične zmogljivosti ter zmanjšanje oksidativnega stresa pri konjih ni po dosedanjih podatkih narejene še nobene raziskave (Harris PA in Harris RC, 2005).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Konji kasači, vključeni v študijo

3.1.1.1 Izbira in opis konj kasačev

V vse tri poskuse, opravljene v letih 2010 in 2011, je bilo skupaj vključenih 10 klinično zdravih konj kasačev, pasme angleški kasač, z zdravstveno kartoteko na Kliniki za reprodukcijo in konje Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani. Pogoji za izbiro so bili konji kasači, ki so tekmovali v kasaških dirkah.

Vsi konji so bili pred samo izvedbo poskusa klinično pregledani. Ocenili smo izgled, dlako in obnašanje konj. Pri kliničnem pregledu smo opravili: merjenje pulza in oceno dela srca, merjenje in oceno parametrov dihanja, merjenje telesne temperature in pregled nog (fizičen pregled kopit (PK), pregled gibal), oceno kapilarne polnitve (angl. capillary refill time, CRT) ter pregled sluznice.

V poskusu določanja fizioloških vrednosti in farmakokinetike CoQ₁₀ je bila starost konj od 2 do 10 let (povprečna starost $\pm$ SD = 6,2 $\pm$ 3,05 let). V poskus je bilo vključenih 5 kastratov, 1 žrebec in 4 kobile. Poleg omenjenih podatkov je bila podana še teža, izgled, dlaka in obnašanje konj. Drugi podatki, kot so telesna temperatura, frekvenca dihanja, pulz in CRT PK, so bili izmerjeni oz. ocenjeni v boksu (faza mirovanja) pred samo izvedbo izbrane fizične vadbe. Po vadbi smo izmed izbranih podatkov ocenili še pulz. Podrobni podatki so podani v preglednici 2.

Preglednica 2: Podatki o 10 konjih kasačih vključenih v poskus določanja fizioloških vrednosti in farmakokinetike CoQ₁₀ (marec, 2010).

Ozna ka konja	St (let)	T (kg)	sp	TT (°C)	FD	P-PR	P-PO	CRT (s)	Iz	PK	dlaka	obn
1	10	520	M, k	37	12	38	110	≤ 2	bp	bp	sz	bp
2	9	600	M, k	37,1	12	32	126	1	bp	bp	sz	bp
3	11	500	M, k	37,1	10	32	134	1	bp	bp	sz	bp
4	3	500	Ž	37,1	16	40	117	1	bp	bp	sz	bp
5	2	500	Ž	37,1	10	40	132	1	bp	bp	sz	bp
6	7	500	Ž	37,4	10	38	110	1	bp	bp	sz	bp
7	3	500	M, ž	37,7	10	36	124	1	bp	bp	sz	bp
8	6	600	M,k	37,3	12	32	122	1	bp	bp	sz	bp
9	9	600	M,k	37,5	10	28	118	1	bp	bp	sz	bp
10	4	500	Ž	37,2	10	36	132	1	bp	bp	sz	bp

Legenda: St = starost v letih, T = telesna teža (kg); Sp = spol; M = moški; Ž = ženski; k = kastrat, ž = žrebec; TT = telesna temperatura; FD = frekvenca dihanja (število vdihov na minuto); P-PR = pulz pred izbrano fizično

S. Jagrič Munih: Farmakokinetika koencima Q₁₀ pri športnih konjih kasačih in njegov pomen pri preprečevanju oksidativnega stresa pri vadbi

vadbo; P-PO = pulz po izbrani fizični vadbi; CRT = ocena kapilarne polnitve; s = sekunda; Iz = izgled konja; PK = pregled kopit; bp = brez posebnosti; obn = obnašanje konj; sz = svetleča, zimska

V poskusu dajanja CoQ₁₀ oz. placeba je bila starost konj od 3 do 12 let (povprečna starost $\pm$ SD = 6,9 $\pm$ 3,75 let). V poskus je bilo vključenih 6 kastratov, 2 žrebca in 2 kobili. Ostali podatki, ki vključujejo podroben opis konj v boksu pred izvedbo izbrane fizične vadbe, razen meritev pulza po vadbi, so prikazani v preglednici 3.

Preglednica 3: Podatki o 10 konjih kasačih vključenih v poskus 8-tedenskega dajanja CoQ₁₀ oz. placeba (marec, 2011).

Oznaka konja	St (let)	T (kg)	Sp	TT (° C)	FD	P-PR	P-PO	CRT (s)	Iz	PK	dlaka	Obn
1	11	520	kas	38,0	16	40	112	≤ 2	bp	bp	sz	bp
2	12	500	kas	37,4	12	40	116	1	bp	bp	sz	bp
3	11	500	kas	38,0	16	40	122	1	bp	bp	sz	bp
4	3	500	ko	37,5	12	38	120	1	bp	bp	sz	bp
5	3	470	ž	37,8	12	38	133	1	bp	bp	sz	bp
6	7	500	kas	37,4	10	38	110	1	bp	bp	sz	bp
7	3	500	ž	37,7	10	36	124	1	bp	bp	sz	bp
8	4	600	Ko	37,3	12	32	122	1	bp	bp	sz	bp
9	10	600	kas	37,5	10	28	118	1	bp	bp	sz	bp
10	5	600	kas	37,2	10	36	132	1	bp	bp	sz	bp

Legenda: St = starost v letih, T = telesna teža (kg); Sp = spol; Ko = kobila; kas = kastrat, ž = žrebec; TT = telesna temperatura; FD = frekvenca dihanja (število vdihov na minuto); P-PR = pulz pred izbrano fizično vadbo; P-PO = pulz po izbrani fizični vadbi; CRT = ocena kapilarne polnitve; s = sekunda; Iz = izgled konja; PK = pregled kopit; bp = brez posebnosti; Obn = obnašanje konj; sz = svetleča, zimska.

3.1.2 Prehrana konj kasačev v obdobju poskusa

Konji, vključeni v poskus določanja fizioloških vrednosti izbranih parametrov in farmakokinetike CoQ₁₀, so imeli pred samo izvedbo poskusa 6-tedensko obdobje izpiranja. Medtem ko so imeli konji, vključeni v poskus dajanja CoQ₁₀ oz. placebo, pred samim poskusom dobo izpiranja 4 tedne. V tem obdobju in v času poskusa so bili konji krmljeni s 4 kg popolne industrijske krmne mešanice brez ovsa, znamke Tradition Cavalor (proizvajalec Cavalor, Belgija) (Preglednica 4), 1 kg črnega ovsa in 8 kg sena na dan. V obdobju izpiranja in med samim poskusom konji niso prejeli nobenih drugih peroralnih pripravkov in zdravil. Konji so imeli vodo *ad libitum*. V dobi izpiranja kot tudi med samo izvedbo poskusa konji niso prejeli nobenih zdravil.

Preglednica 4: Sestavnica industrijske krmne mešanice Tradition Cavalor (proizvajalec Cavalor, Belgija).

Hranilna snov	Količina
Energijska vrednost konja (EVH)	0,85/kg
Prebavljiva energija	10,8 MJ/kg
Prebavljive surove beljakovine	9,65%
Surove beljakovine	13,5%
Surova maščoba	4%
Surovi pepel	8%
Surova celuloza	11%
Ca ²⁺	1,20%
Mg ²⁺	0,31%
P ³⁻	0,64%
Na ⁺	0,40%
Sestavljeni in enostavni sladkorji	33%
Dodatki	
Vitamin A	12,500 IU/kg
Vitamin D3	1,250 IU/kg
Vitamin E	100 mg/kg
Biotin	200 µg/kg
Holin klorid	160 mg/kg
Fe ²⁺	75 mg/kg
I ⁻	1,25 mg/kg
Co ²⁺	0,75 mg/kg
Cu ²⁺	40 mg/kg
Mn ²⁺	125 mg/kg
Zn ²⁺	125 mg/kg
Se ²⁺	0,50 mg/kg

Legenda: MJ-mega joule; IU = mednarodna enota; Ca²⁺ = kalcij; Mg²⁺ = magnezij; P³⁻ = fosfor; Na⁺ = natrij; Fe²⁺ = železo; I⁻ = jod; Co²⁺ = kobalt; Cu²⁺ = baker; Mn²⁺ = mangan; Zn²⁺ = cink; Se²⁺ = selen

3.1.2.1 Priprava paste kompleksa CoQ₁₀-CD

Pasta je vsebovala CoQ₁₀, ki je bil vključen v kompleks β-ciklodekstrina. Omenjeni kompleks je bil narejen na Kemijskem inštitutu po patentu Laboratorija za prehransko kemijo (Prošek, 2005). V omenjenem laboratoriju je bila pripravljena tudi pasta za farmakokinetičen poskus ter za skupino konj, ki je prejela CoQ₁₀, kot tudi za skupino konj, ki je prejela placebo. Le da pri placebo CoQ₁₀ ni bil dodan. Pasta s CoQ₁₀-CD je bila po izgledu rumena, homogena, za 7,48 g ± 0,30 % vsebnost CoQ₁₀ na 100 g paste, kot je jamčil analizni certifikat. Pasta, pripravljena za placebo skupino, je bila pripravljena po istem postopku kot pasta s CoQ₁₀, vendar ni vsebovala CoQ₁₀. Placebo pasta je bila po izgledu mlečne barve.

3.1.3 Poskus določanja fizioloških vrednosti izbranih parametrov

Konji kasači so imeli dobo izpiranja 6 tednov. Nato smo izvedli izbrano vadbo, opisano v poglavju 3.1.6.

3.1.4 Farmakokinetični poskus s CoQ₁₀

Po 6 tednih dobe izpiranja smo izvedli poskus po navzkrižnem eksperimentalnem načrtu. 5 konjev je dobilo enkratni odmerek CoQ₁₀ peroralno: 500 mg/konja; 5 konjev pa enkratni odmerek CoQ₁₀ peroralno: 1000 mg/konja. Sledila je doba izpiranja, ki je trajala 14 dni. Nato smo ponovili enkratni odmerek CoQ₁₀ peroralno, le da smo skupini konj zamenjali glede na odmerek (konji, ki so v prvem delu dobili nižji odmerek, so nato dobili višjega in obratno).

3.1.5 Poskus z dodatkom CoQ₁₀ oz. placebo

Pred samo izvedbo poskusa so imeli konji dobo izpiranja 4 tedne. Nato smo konje razdelili v 2 skupini: ena je prejela placebo (kontrolna skupina), druga skupina konj (poskusna skupina) je prejela CoQ₁₀. Poskus je trajal 8 tednov. Skupina 5 konj je prejela pasto s količino 600 mg CoQ₁₀ peroralno enkrat na dan z jutranjim obrokom zaradi boljše absorpcije. Druga skupina 5 konj je prejela placebo; enkrat na dan, z jutranjim obrokom.

3.1.6 Opis izbrane fizične vadbe konj kasačev

Med 6-tedenskim obdobjem izpiranja za meritve fizioloških vrednosti in 4 tedenskim obdobjem izpiranja pred poskusom dajanja CoQ₁₀ in placebo ter v 8-tedenskem obdobju

dajanja CoQ₁₀ in placeba so imeli konji osnovne aktivnosti v izpustu (»paddock«) in ogrevanje (»jogging«). V tem času noben konj ni bil udeležen v nobeni dirki.

Izbrana fizična vadba za poskus določanja fizioloških vrednosti in izvedba fizične vadbe po 8-tedenskem obdobju dajanja CoQ₁₀ oz. placeba je potekala na hipodromu v marcu 2010 in v marcu 2011. Vremenski podatki za marec 2010 (dopoldan, okrog 10.30 ure) so sledeči: zunanja temperatura je bila 2,5 °C, zračni tlak 984,3 mb in relativna vlažnost 73,90 %. V marcu 2011 (dopoldan, okrog 10.30 ure) pa je bila zunanja temperatura 10 °C, zračni tlak 984 mb in relativna vlažnost 96,9 %. Podatke o vremenu smo pridobili iz samodejne meteorološke postaje Ljubljana, v okviru Agencije Republike Slovenije za okolje (ARSO, 2010a; ARSO, 2010b; ARSO, 2010 a; ARSO, 2011b; Dnevni informativni bilten, 2011).

Pred samo izvedbo izbrane fizične vadbe, so imeli konji 15 min ogrevanja, na razdalji 2500 m in nato še kas na razdalji 2500 m, s hitrostjo 1,40 min/km. Sledila je izbrana fizična vadba, ki je bila sestavljena iz 4 period, od katerih je vsaka zajemala 500 m kasa pri naslednjih hitrostih: 1 min 30 s/km, 1 min 20 s/km, 1 min 25s/km in 1 min 20s/km. Po vsaki končani periodi so imeli konji 3 min počitka.

3.2 METODE

3.2.1 *Odvzem in priprava krvnih vzorcev*

3.2.1.1 Odvzem vzorcev

Vzorci krvi za laboratorijske preiskave smo odvzeli iz jugularne vene v epruvete s podtlakom. Odvzem za poskus meritev fizioloških vrednosti je potekal v naslednjem vrstnem redu. Po 6 tednih kontroliranega krmljenja smo konjem odvzeli kri v boksu, v fazi mirovanja. Nato je sledila izbrana fizična vadba, ponoven odvzem krvi takoj po vadbi, po 24 urah po vadbi in odvzem krvi po 48 urah po vadbi. Konji so bili pri odvzemih 24 ur in 48 ur po vadbi v fazi mirovanja.

Odvzem vzorcev krvi za farmakokinetične meritve CoQ₁₀ je sledil v naslednjem časovnem obdobju: 24 ur pred aplikacijo CoQ₁₀; 12 ur pred aplikacijo CoQ₁₀; 0-neposredno pred aplikacijo CoQ₁₀; 0,5 ur po aplikaciji CoQ₁₀; 1; 2; 3; 4; 6; 8; 12; 24; 48; 72 in 96 ur po aplikaciji CoQ₁₀.

V poskusu dajanja CoQ₁₀ oz. placeba smo konjem vzeli vzorce krvi petkrat. Prvič po 4 tedenskem obdobju izpiranja, v fazi mirovanja, v boks, preden smo pričeli z 8-tedenskim poskusom dajanja CoQ₁₀ oz. placeba. Po 8. tednih dajanja CoQ₁₀ oz. placeba je sledil drugi odvzem krvi, takoj po izvedbi izbrane fizične vadbe smo ponovno vzeli kri in nato še 24 ur in 48 ur po vadbi.

3.2.1.2 Priprava vzorcev

Epruvete smo pred vsakim poskusom ustrezno označili. Za hematološke preiskave in analizo MDA smo kri odvzeli v epruvete z antikoagulantom etilendiamintetraocetna kislina (EDTA) (Vacuette; Greiner Bio-One, Kremsmunster, Avstrija). EDTA vzorce za določanje celotne rdeče krvne slike (hemogram) in bele krvne slike (diferencialne) smo pustili na sobni temperaturi in jih v roku 2 do 3 ur po odvzemu analizirali. Epruvete z vzorci za določanje plazemske MDA smo centrifugirali 15 minut pri 1500 obratih/min, pri temperaturi 4 °C. Plazmo smo takoj ločili in shranili na -80 °C do analize.

Vzorce krvi za pridobitev seruma, v katerih smo analizirali biokemijske parametre, smo odvzeli v epruvete z gelom, brez antikoagulant (Vacuette; Greiner Bio-One, Kremsmunster, Avstrija). Epruvete smo po prihodu v laboratorij pustili stati na sobni temperaturi 10 minut, da je kri koagulirala, in jih nato centrifugirali 10 minut pri 1300 obratih/min, pri temperaturi 4 °C. Ločili smo serum in ga iz vsake epruvete razdelili v dve krioviali. Vzorce smo analizirali še isti dan.

Vzorec krvi za določanje glukoze in laktata smo odvzeli v epruvete z antikoagulantom in inhibitorjem glikolize natrijevim fluoridom (NaF/K3EDTA) (Vacuette; Greiner Bio-One, Kremsmuenster, Avstrija). Epruvete z vzorci smo centrifugirali pri 1500 obratih/min, 15 minut, pri temperaturi 4 °C. Tako smo dobili plazmo, ki je bila analizirana na dan odvzema vzorca.

Vzorec krvi za določanje TAC, α -tokoferola, CoQ₁₀, SOD in GPx smo odvzeli v epruvete z antikoagulantom (litij heparin). Takoj po odvzemu vzorcev smo le-te shranili v hladilni torbi do prihoda v laboratorij. Epruvete z vzorci za določanje TAC, vitamina E, CoQ₁₀, SOD in GPx smo centrifugirali 15 minut pri 1500 obratih/min, pri temperaturi 4 °C. Dobljeno plazmo za določanje TAC, vitamina E CoQ₁₀ smo razdelili v krioviala in shranili na -80 °C do analiz. Iz 1 x 6mL heparinske krvi smo odpipetirali 2 x 300 μ L v krioviala za določitev GPx v polni

krvi in shranili na -80 °C do analize. Preostalo kri smo porabili za pripravo hemolizata za določanje SOD.

Preostale eritrocite smo sprali širikrat s 3 mL 0,9 % natrijevega klorida (NaCl), tako da smo sediment eritrocitov resuspendirali v 3 mL 0,9 % NaCl, previdno s plastično pipeto pasterko. Vsakič smo centrifugirali 10 min pri 1200 obratih/min. Centrifugirane oprane eritrocite – sediment – smo prelili z 2 mL hladne redestilirane vode. Vse skupaj smo premešali s plastično pipeto 'pasterko' in pustili v hladilniku 15 minut. Tako pripravljenemu hemolizatu (v obeh centrifugirkah) smo določili koncentracijo hemoglobina z avtomatskim laserskim hematološkim analizatorjem, znamke Technicon H*1 (Siemens, Munchen, Nemčija) (samo CBC). Hemolizat smo nato odpipetirali in ga zamrznili na -80 °C do analize.

3.2.2 Analizne metode

Pri analiznih metodah smo upoštevali koeficient variabilnosti in s tem analizne napake ter rezultate ponavljali, v kolikor so odstopali od orientacijskih referenčnih vrednosti.

3.2.2.1 Hematološke analize

Hematološke analize smo opravili z avtomatskim laserskim hematološkim analizatorjem znamke Technicon H*1 (Siemens, Munchen, Nemčija) z za vrsto značilno programsko opremo (H*1 Multi-Species V30 Software, Tarrytown, New York, ZDA). Celotna krvna slika (angl. complete blood count, CBC) je vključevala belo (WBC) in rdečo (angl. red blood cell counts, RBC) krvno sliko, koncentracijo hemoglobina (angl. haemoglobin concentration, HGB), hematokrit (angl. haematocrit, HCT), povprečno prostornino eritrocitov (angl. mean corpuscular volume, MCV), povprečno vrednost HGB v enem eritrocitu (angl. mean corpuscular haemoglobin, MCH), povprečno koncentracijo HGB v eritrocitih (angl. mean corpuscular haemoglobin concentration, MCHC), porazdelitev eritrocitov v krvi glede na velikost njihovega volumna (angl. red distribution width, RDW), porazdelitve eritrocitov glede na koncentracijo hemoglobina (angl. haemoglobin distribution width, HDW), trombocitov (angl. platelets, PLT) in povprečni volumen trombocitov (angl. mean platelet volume, MPV). Belo krvno sliko (angl. white cell differential count, WDC) sestavljajo nevtrofilci (angl. neutrophils, NEUT), limfociti (angl. lymphocytes, LYMPH), monociti (angl. monocytes, MONO), eozinofilci (angl. eosinophils, EOS), bazofilci (angl. basophils, BASO)

in velike nepobarvane (peroksidazno negativne), nediferencirane celice (angl. large unstained cells, LUC), ki so lahko atipični limfociti, nezreli granulociti ali blasti.

3.2.2.2 Biokemijske analize

Analizirali smo naslednje biokemijske parametre: elektrolite, kamor sodijo Na²⁺, K⁺ in Cl⁻, magnezij (Mg²⁺), anorganski fosfor (angl. inorganic phosphate, iP), kalcij (Ca²⁺), železo (Fe²⁺), kreatinin, sečnino, celokupne beljakovine (angl. total protein, TP), albumine, bilirubin, alkalno fosfatazo (angl. alkaline phosphatase, AP), kreatin kinazo (angl. creatine kinase, CK), alanin aminotransferazo (ALT), aspartat aminotransferazo (angl. aspartat aminotransferase, AST), gama glutamil transferazo (GGT), glukozo, laktat, trigliceride (TG), lipoproteini visoke gostote (angl. high density lipoprotein, HDL), lipoproteini nizke gostote (angl. low density lipoprotein, LDL) in holesterol. Vrednosti elektrolitov smo določili s pomočjo elektrolitskega analizatorja znamke Ilyte Na/K/Cl (Instrumentation Laboratory, Lexington, MA, ZDA). Vse ostale parametre biokemijskega profila smo določili z avtomatskim biokemijskim analizatorjem znamke RX-Daytona (Randox, Crumlin, Velika Britanija).

3.2.2.3 Določanje celokupne antioksidativne kapacitete

TAC v plazmi smo določali spektrofotometrično, s komercialnim TAC kitom (Randox Crumlin, Velika Britanija) na avtomatskem biokemijskem analizatorju RX-Daytona (Randox, Crumlin, Velika Britanija) po navodilih proizvajalca. Metoda določanja, ki so jo postavili Miller in sod. (1993), je neposredna. V reakciji nastanejo radikali (ABTS^{•+}-2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)), ki jih reducirajo v vzorcu prisotni antioksidanti. To smo izmerili s padcem absorbance pri 600 nm po 3 minutah. Rezultate smo izrazili kot mmol/L Trolox ekvivalentov.

3.2.2.4 Določanje aktivnosti superoksid dismutaze

Aktivnost SOD v lizatih eritrocitov smo določali spektrofotometrično pri 510 nm s kitom reagentov RANSOD (Randox Laboratories, Crumlin, Velika Britanija), na biokemijskem analizatorju RX-Daytona (Randox, Crumlin, Velika Britanija) po navodilih proizvajalca. Uporabili smo metodo, ki temelji na osnovni metodi McCorda in Fridovicha (1969). Po omenjeni metodi ksantina in XO proizvajata superoksidne radikale. Indikatorska spojina, ki določa količino nastalega superoksidnega radikala je 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolijev klorid (INT). V reakciji nastaja barvilo formazan. Aktivnost SOD smo merili

s stopnjo inhibicije opisane reakcije. V naših vzorcih smo določili aktivnost SOD iz umeritvene krivulje odstotka inhibicije standardnih raztopin in z desetiškim logaritmom koncentracije (U/mL). Aktivnost SOD je izražena v enotah na gram hemoglobina (U/g Hgb).

3.2.2.5 Določanje aktivnosti glutation peroksidaze

Aktivnost GPx v polni krvi smo določali spektrofotometrično pri 340 nm z biokemijskim analizatorjem RX-Daytona (Randox Laboratories, Crumlin, Velika Britanija) z uporabo komercialnih kit reagentov RANSEL. Za določanje aktivnosti GPx smo uporabili posredno metodo določanja aktivnosti GPx z merjenjem hitrosti oksidiranega NADPH. Hitrost oksidacije NADPH, ki smo jo izmerili spektrofotometrično kot padec absorbance pri 340 nm, je proporcionalna aktivnosti GPx v vzorcu. Aktivnost GPx smo izrazili v enotah na gram hemoglobina (U/g Hgb).

3.2.2.6 Določanje α -tokoferola

Za določanje α -tokoferola smo uporabili postopek, opisan v literaturi (Zhao in sod., 2004; Sivertsen in sod., 2005). Najprej smo 0,5 mL vzorca plazme prenesli v epruveto in ga zmešali z 1 mL etanola. Mešanici smo dodali 3 mL n-heksana in jo tresli 10 sekund. Ko sta se plasti ločili, smo odpipetirali 2 mL zgornje heksanske faze in jo posušili do suhega pri približno 60 °C pod vakuumom (Syncore Reactor R-48, Büchi, Flawil, Švica). Suh ostanek smo raztopili v 0,5 mL metanola. Koncentracijo α -tokoferola smo določili s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (angl. high-performance liquid chromatography, HPLC) s fluorescenčno detekcijo. Rezultate smo ovrednotili s pomočjo umeritvene krivulje, ki smo jo pripravili z uporabo standardnih raztopin α -tokoferola (Sigma, Saint Louis, MO, USA). Uporabili smo sistem za tekočinsko kromatografijo (Waters Alliance 2695, Waters, Milford, MA, ZDA), opremljen s kolono μ Bondapak C18, 10 μ m, 3.9 x 300 mm (Waters), fluorescenčnim detektorjem Waters 474 in programom Millennium za vodenje sistema in obdelavo rezultatov. Za mobilno fazo smo uporabili metanol s pretokom 2 mL/min. Injekcijski volumen je bil 20 μ L, ločevanje na koloni je potekalo pri sobni temperaturi, za detekcijo pa smo uporabili valovno dolžino vzbujanja 295 nm in emisije 330 nm.

3.2.2.7 Določanje CoQ₁₀

Tik pred analizo smo plazmo odtajali na vodni kopeli s temperaturo 35-39 °C. V epruvete Eppendorf smo odpipetirali 200 μ L plazme, dodali 50 μ L para-benzokinon (2 mg/mL v 1-

propanolu) in mešali na vrtilnem mešalu 0,5 min. Para benzokinon je oksidant, zato smo ga pustili delovati 15 min. Dodali smo 400 µL 1-propanola in mešali na vrtilnem mešalu 2 min. Vzorce smo nato centrifugirali 4 minute pri 4 °C pri 10.000 obratih/min. Raztopino vzorca smo analizirali z metodo HPLC z masnim detektorjem (MS), s kemijsko ionizacijo pri atmosferskem tlaku (APCI).

3.2.2.8 Določanje MDA

Za določanje MDA v plazmi konj smo uporabili literaturni metodi (Mateos in sod., 2005; Pilz in sod., 2000) z nekaterimi spremembami. Standardne raztopine MDA smo pripravili iz 1,1,3,3-tetraetoksipropana s kislom hidrolizo. K 250 µL vzorca (plazma, standard) smo dodali 50 µL 6 M NaOH, premešali in nato inkubirali 30 minut v termostatisiranem stresalniku pri 60 °C. Ohlajene vzorce smo nakisali s 125 µL 5,25 M perklorne kisline in centrifugirali 10 minut pri 5 °C in 15000 obratih/min. K 250 µL supernatanta smo dodali po 25 µL 5 mM raztopine 2,4 dinitrofenilhidrazina in inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi, zaščiteno pred svetlobo. Vzorce smo nato ekstrahirali s heksanom, organsko fazo posušili in suhi ostanek raztopili v mobilni fazi. Koncentracijo derivatiziranega MDA smo določili z metodo HPLC in ultravijolično (UV) detekcijo pri 310 nm. Separacija vzorca je potekala s pomočjo mobilne faze, ki je bila sestavljena iz acetonitrila, vode in očetne kisline (38:62:0,2 %, v/v/v) ter kolone Gemini 110 A C18 (150 x 4,60 mm, velikost delcev 5 µm) in predkolone Gemini C18. Kolona je bila termostatisirana na 35 °C. Pretok mobilne faze skozi kolono je bil 0,9 mL/min. Injicirali smo 20 µL vzorca.

3.2.3 Farmakokinetična analiza CoQ₁₀

Ugotovljene plazemske koncentracijske profile CoQ₁₀ po peroralnem dajanju dveh različnih odmerkov smo analizirali z metodami neprostorske farmakokinetične analize.

Za neprostorsko analizo smo uporabili programsko orodje WinNonlin (WinNonlin software, Version 2.1, Pharsight Corp., USA). Hitrostno konstanto terminalne faze (λ_z) smo izračunali kot terminalni naklon na semi-logaritemskem diagramu s pomočjo linearne regresije. Terminalni razpolovni čas ($t_{1/2\beta}$) je bil določen z deljenjem naravnega logaritma 2 ($\ln 2$) z λ_z . Površino pod krivuljo odvisnosti plazemske koncentracije od časa nič do 24 ur (AUC_{24}) smo izračunali z linearno trapezoidno metodo. Površino pod krivuljo odvisnosti plazemske koncentracije od časa na intervalu nič do neskončnosti (AUC_{inf}) smo določili z ekstrapolacijo.

Maksimalno opaženo koncentracijo ($c_{\max}$) in čas, ko je bila ta dosežena ($t_{\max}$), smo določili neposredno iz meritev. Proporcionalnost parametrov farmakokinetike z odmerkom CoQ₁₀ smo določili s pomočjo primerjav AUC za konje, ki so prejeli 500 oz. 1000 mg odmerke. AUC₂₄ (24-urni interval po aplikaciji CoQ₁₀) smo odšteli površino pod plazemsko krivuljo v 24-urnem intervalu pred aplikacijo CoQ₁₀. Tako smo ocenili biološko uporabnost eksogenega CoQ₁₀. S t-testom za en vzorec smo preverjali ali sta bili ti dve AUC statistično značilno različni od nič.

3.3 STATISTIČNA ANALIZA

Glede na normalnost porazdelitev rezultatov v posameznih skupinah in število meritev smo uporabili parametrične ali neparametrične statistične analize in teste.

Korelacije med različnimi preiskovanimi parametri smo izračunali z neparametričnim Spearmanovim koeficientom korelacije ranga oziroma s parametričnim Pearsonovim korelacijskim koeficientom. Spearmanov koeficient korelacije ranga je neparametrična alternativa Pearsonovemu korelacijskemu koeficientu. Uporabili smo ga v primerih, kjer porazdelitev podatkov v skupinah ni bila normalna, kar smo predhodno preverili s Kolmogorov–Smirnov testom, ali pa v primerih, kjer varianca obeh skupin, ki smo ju primerjali, ni bila enaka.

Razlike med skupinami konj glede na različne parametre v različnih časovnih intervalih smo ovrednotili z analizo variance za ponavljajoče meritve (One way repeated measures analysis of variances), v primeru nenormalnih porazdelitev pa s Friedmanovo analizo variance za ponavljajoče meritve na rangiranih podatkih (Friedman repeated measures analysis of variance of ranks). V primeru statistično značilnih razlik med skupinami konj smo pare skupin med seboj primerjali na osnovi parametrične Holm-Sidakove metode (z upoštevanjem Bonfferonijeve korekcije) oziroma neparametričnega Tukeyevega testa.

V primeru primerjave parametrov med dvema skupinama smo razlike ovrednotili s parametričnim t-testom oziroma neparametričnim Mann-Whitneyevim testom in zaradi večjega števila testov uporabili Bonfferonijevo korekcijo.

Omenjene statistične metode smo izvedli s pomočjo računalniškega programa Sigma Stat 3.5. Razlike smo opredelili kot značilne pri stopnji tveganja $P < 0,05$.

4 REZULTATI

4.1 REZULTATI MERITEV FIZIOLOŠKIH VREDNOSTI IZBRANIH PARAMETROV

Vsi konji, vključeni v poskus meritev fizioloških vrednosti, so izvedli izbrano fizično vadbo. Rezultati hematoloških vrednosti meritev so podani v preglednicah 8, 9 in 10, ki zajemajo meritve v mirovanju, po vadbi, 24 ur ter 48 ur po vadbi. Konji so bili pri meritvah, opravljenih 24 in 48 ur po vadbi, v fazi mirovanja. Vse hematološke in biokemijske vrednosti tekom odvzemov so bile v okviru fizioloških meritev za kasače kot jih navaja literatura (Kingston, 2004b; Hodgson in Rose, 1994).

4.1.1 Rezultati hematoloških vrednosti

Preglednica 5 opisuje vrednosti hematoloških parametrov, izmerjenih v 4 različnih časovnih intervalih.

Preglednica 5: Povprečne vrednosti ($\pm$ SD) hematoloških parametrov 10 konj kasačev glede na čas odvzema vzorca.

Izmerjeni parametri	Boks	Po vadbi	24 ur po vadbi	48 ur po vadbi
RBC ($\times 10^{12}/L$)	8,89 $\pm$ 0,95	11,49 $\pm$ 0,68 ^x	9,01 $\pm$ 0,97	8,44 $\pm$ 0,72
Hgb (g/L)	141,80 $\pm$ 11,63	186,80 $\pm$ 12,25 ^x	142,70 $\pm$ 10,81	135,20 $\pm$ 9,52
Hct (L/L)	0,39 $\pm$ 0,03	0,51 $\pm$ 0,04 ^x	0,40 $\pm$ 0,03	0,37 $\pm$ 0,03
MCV (fL)	43,73 $\pm$ 2,67 ^x	44,77 $\pm$ 2,74 ^y	44,42 $\pm$ 2,72	43,64 $\pm$ 2,70
MCH (pg)	16,00 $\pm$ 0,84	16,27 $\pm$ 0,84 ^x	15,91 $\pm$ 0,83 ^y	16,07 $\pm$ 0,72
MCHC (g/L)	365,80 $\pm$ 4,66	363,70 $\pm$ 10,22	361,50 $\pm$ 9,11	365,30 $\pm$ 11,59
RDW (%)	18,88 $\pm$ 1,17	19,19 $\pm$ 1,20	18,83 $\pm$ 0,63	18,68 $\pm$ 0,53
HDW (g/L)	24,78 $\pm$ 1,72	24,55 $\pm$ 2,02	24,56 $\pm$ 1,99	24,50 $\pm$ 1,57
MPV (fL)	6,03 $\pm$ 0,90	4,93 $\pm$ 1,07 ^x	6,22 $\pm$ 0,51 ^y	5,77 $\pm$ 0,62
PLT ($\times 10^9/L$)	120,00 $\pm$ 28,33	109,30 $\pm$ 52,61	118,40 $\pm$ 26,83	119,80 $\pm$ 17,36
WBC ($\times 10^9/L$)	6,21 $\pm$ 1,43 ^{xy}	7,69 $\pm$ 1,92 ^z	6,79 $\pm$ 1,27 ^{yz}	5,95 $\pm$ 1,30 ^x
NEUT ($\times 10^9/L$)	2,93 $\pm$ 0,83 ^x	3,52 $\pm$ 0,90 ^y	3,47 $\pm$ 0,91	3,10 $\pm$ 0,76 ^x
LYMPH ($\times 10^9/L$)	2,57 $\pm$ 0,75	3,38 $\pm$ 1,36 ^x	2,63 $\pm$ 0,52 ^x	2,19 $\pm$ 0,61 ^y
MONO ($\times 10^9/L$)	0,40 $\pm$ 0,14	0,37 $\pm$ 0,15	0,38 $\pm$ 0,09	0,37 $\pm$ 0,12
EOS ($\times 10^9/L$)	0,16 $\pm$ 0,10	0,13 $\pm$ 0,05	0,17 $\pm$ 0,11	0,16 $\pm$ 0,13
BASO ($\times 10^9/L$)	0,35 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,06	0,03 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01
LUC ($\times 10^9/L$)	0,12 $\pm$ 0,03	0,19 $\pm$ 0,06 ^x	0,12 $\pm$ 0,04	0,10 $\pm$ 0,03

Legenda: RBC = eritrociti; Hgb = hemoglobin; Hct = hematokrit; MCV = povprečna prostornina eritrocitov; MCH = povprečna vrednost hemoglobina v enem eritrocitu; MCHC = povprečna koncentracija hemoglobina v eritrocitih; RDW = razporeditev eritrocitov glede na velikost njihovega volumna; HDW = porazdelitev eritrocitov glede na koncentracijo hemoglobina; MPV = povprečni volumen trombocitov; PLT = trombociti; WBC = levkociti; NEUT = nevtrofilci; LYMPH = limfociti; MONO = monociti; EOS = eozinofilci; BASO = bazofilci; LUC = velike nepobarvane (peroksidazno negativne) celice.

^{x,y,z} Povprečne vrednosti parametrov z različnimi nadnapisi v isti vrstici se statistično značilno razlikujejo med seboj ($P < 0,05$).

Vrednosti RBC, Hgb, Hct, WBC, MCV in LUC so bile statistično višje takoj po vadbi, v primerjavi z vrednostmi, izmerjenimi v boksu ($P < 0,05$). Po 48 urah po vadbi, v fazi mirovanja, so se omenjene vrednosti parametrov vrstile blizu vrednostim v boks. Število NEUT je značilno naraslo po vadbi, v primerjavi z vrednostmi v boks ($P < 0,05$). Njihovo število je pri odvzemu 48 ur po vadbi značilno padlo ($P < 0,05$). Število LYMPH se je po vadbi zmanjšalo in je bilo pri obeh meritvah v mirovanju statistično manjše v primerjavi z vrednostmi, izmerjenimi takoj po vadbi ($P < 0,05$). Vrednosti MPV so po vadbi padle v primerjavi z boks vrednostmi, vendar pa so se značilno povešale 24 ur po vadbi v primerjavi z vrednostmi takoj po vadbi ($P < 0,05$). V zadnjem časovnem odvzemu, 48 ur po vadbi, so vrednosti MPV padle in se zopet približale vrednostim boksa, medtem ko so vrednosti MCH značilno padle že po 24 urah po vadbi ($P < 0,05$). Vrednosti MCHC, RDW, HDW, PLT, BASO, MONO in EOS niso pokazale statistične značilnosti pri nobenem časovnem odvzemu ($P > 0,05$).

4.1.2 Rezultati biokemijskih vrednosti

V preglednici 6 so podane vrednosti za biokemijske parametre, izmerjene v 4 časovnih odvzemih. Z izjemo GGT, glukoze, Fe²⁺ in HDL so se vsi ostali biokemijski parametri statistično značilno spreminjali tekom odvzemov.

Preglednica 6: Povprečne vrednosti ($\pm$ SD) biokemijskih parametrov 10 konj kasačev glede na čas odvzema vzorca.

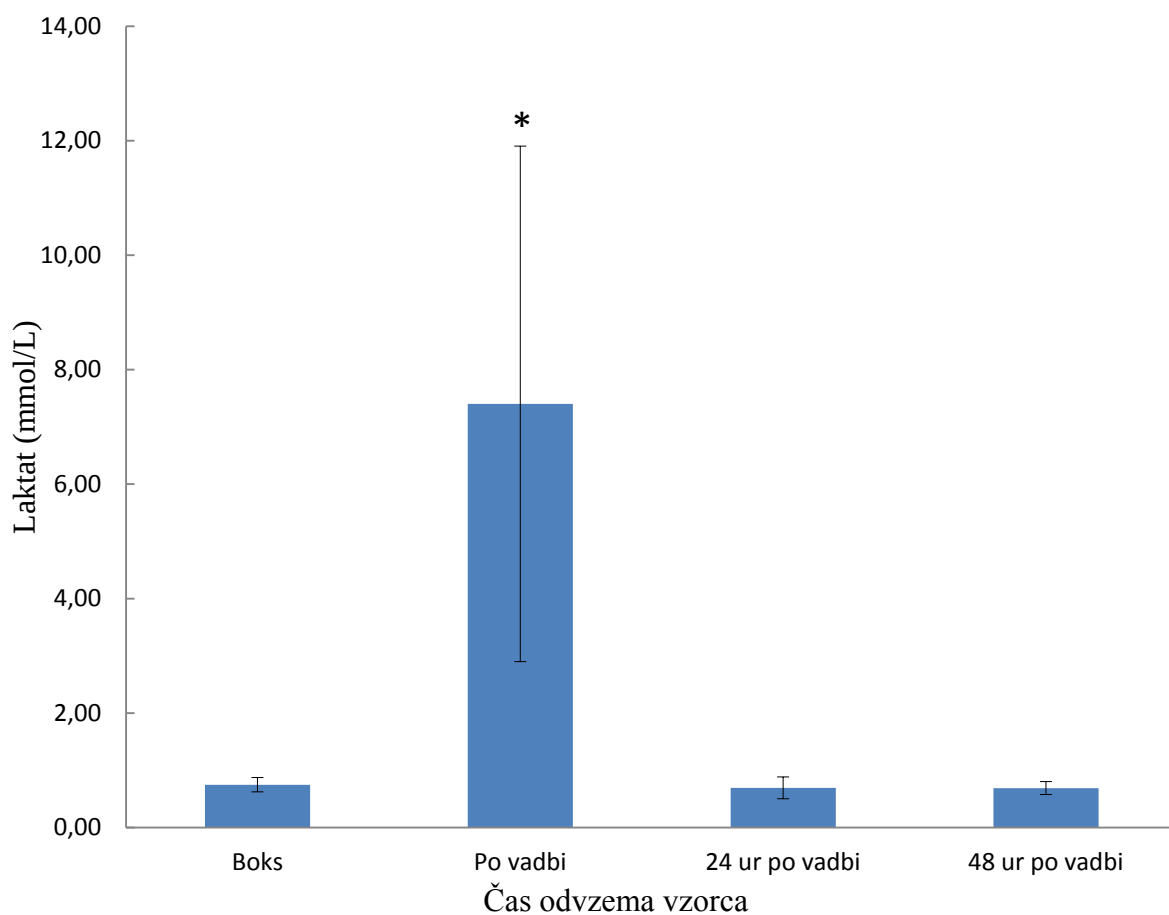
Izmerjeni parametri	Boks	Po vadbi	24 ur po vadbi	48 ur po vadbi
AP (U/L)	103,79 $\pm$ 24,60 ^x	115,85 $\pm$ 23,94 ^y	109,85 $\pm$ 23,81	97,47 $\pm$ 16,43 ^x
ALT (U/L)	13,02 $\pm$ 3,40 ^x	16,23 $\pm$ 4,61 ^y	14,77 $\pm$ 3,67 ^x	13,49 $\pm$ 2,66
GGT (U/L)	11,30 $\pm$ 2,67	12,20 $\pm$ 2,25	12,80 $\pm$ 3,58	11,60 $\pm$ 1,26
Sečnina (mmol/L)	5,70 $\pm$ 0,60 ^x	5,50 $\pm$ 1,02 ^x	6,68 $\pm$ 0,55 ^y	6,35 $\pm$ 0,74 ^y
Kreatinin (μ mol/L)	111,05 $\pm$ 15,94	140,96 $\pm$ 9,92 ^x	115,10 $\pm$ 11,79	115,18 $\pm$ 11,80
TP (g/L)	61,63 $\pm$ 3,04	65,57 $\pm$ 4,19 ^x	60,30 $\pm$ 3,09 ^y	60,32 $\pm$ 4,77 ^y
Bilirubin	35,86 $\pm$ 11,94	39,74 $\pm$ 11,77 ^x	36,746 $\pm$ 12,86	37,43 $\pm$ 12,19 ^y
Alb (g/L)	34,87 $\pm$ 1,22	37,37 $\pm$ 1,78 ^x	34,96 $\pm$ 1,43	34,78 $\pm$ 1,84
Glukoza (mmol/L)	4,23 $\pm$ 0,63	4,27 $\pm$ 1,69	4,65 $\pm$ 0,47	4,18 $\pm$ 0,57
Na ⁺ (mmol/L)	136,57 $\pm$ 1,03 ^x	137,79 $\pm$ 1,32 ^{yz}	136,70 $\pm$ 1,78 ^{xz}	137,90 $\pm$ 1,26 ^y
K ⁺ (mmol/L)	3,82 $\pm$ 0,35	3,57 $\pm$ 0,43	3,63 $\pm$ 0,40	3,12 $\pm$ 0,44 ^x
Cl ⁻ (mmol/L)	99,78 $\pm$ 1,38 ^x	97,92 $\pm$ 2,20 ^y	98,69 $\pm$ 1,47	99,42 $\pm$ 1,09 ^x
Ca ²⁺ (mmol/L)	3,17 $\pm$ 0,16 ^x	2,96 $\pm$ 0,16 ^y	2,94 $\pm$ 0,10 ^y	3,00 $\pm$ 0,17
iP (mmol/L)	1,00 $\pm$ 0,23 ^x	1,12 $\pm$ 0,23	1,16 $\pm$ 0,24	1,26 $\pm$ 0,16 ^y
Mg ²⁺ (mmol/L)	0,77 $\pm$ 0,12	0,70 $\pm$ 0,09 ^x	0,82 $\pm$ 0,12 ^y	0,77 $\pm$ 0,09
Fe ²⁺ (mmol/L)	32,24 $\pm$ 6,39	37,34 $\pm$ 8,30	31,98 $\pm$ 7,36	31,82 $\pm$ 6,89
TG (mmol/L)	0,31 $\pm$ 0,07 ^x	0,52 $\pm$ 0,19 ^{yz}	0,65 $\pm$ 0,16 ^y	0,50 $\pm$ 0,11 ^z
Holesterol (mmol/L)	2,34 $\pm$ 0,43	2,53 $\pm$ 0,45	2,29 $\pm$ 0,38	2,01 $\pm$ 0,29 ^x
HDL (U/L)	1,20 $\pm$ 0,18	1,13 $\pm$ 0,16	1,08 $\pm$ 0,13	1,15 $\pm$ 0,16
LDL (U/L)	0,39 $\pm$ 0,09 ^x	0,39 $\pm$ 0,07	0,37 $\pm$ 0,09 ^y	0,37 $\pm$ 0,10 ^y

Legenda: AP = alkalna fosfataza; ALT = alanin aminotransferaza; GGT = gama glutamil transferaza; TP = celokupne beljakovine; Alb = albumini, Na²⁺ = natrij, K⁺ = kalij, Cl⁻ = klor, Ca²⁺ = kalcij, iP = anorganski fosfor, Mg²⁺ = magnezij, Fe²⁺ = železo, TG = trigliceridi; HDL = lipoproteini visoke gostote; LDL = lipoproteini nizke gostote.

^{x,y,z} Povprečne vrednosti parametrov z različnimi nadnapisi v isti vrstici se statistično značilno razlikujejo med seboj (P < 0,05).

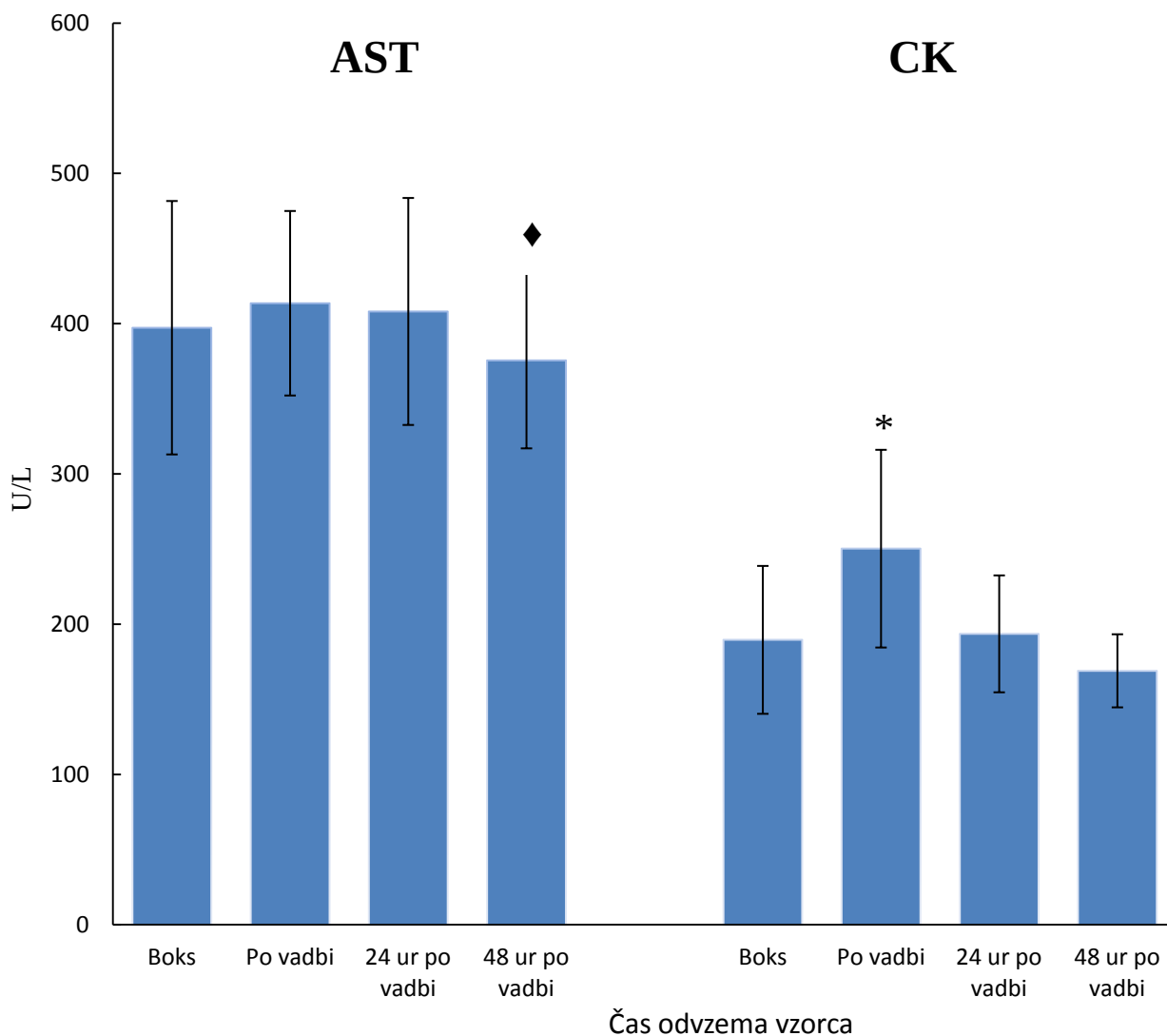
Po vadbi smo izmerili značilno povišane vrednosti ALP, ALT, kreatinina, alb, Na in Cl glede na vrednosti v boksu ($P < 0,05$). Z izjemo ALP so se vse omenjene vrednosti vrstile blizu vrednostim v boksu že po 24 urah po vadbi. Medtem ko so se vrednosti ALP in bilirubina vrstile blizu vrednostim boksa pri odvzemu 48 ur po vadbi. Vrednosti Ca in TG po vadbi so se statistično značilno razlikovale od vrednosti v boksu ($P < 0,05$). Značilno razliko v primerjavi z boks vrednostmi smo izmerili tudi pri odvzemih 24 in 48 ur po vadbi ($P < 0,05$). Sečnina je značilno porasla glede na vrednosti, izmerjene v boks. Tudi pri odvzemih 24 ur in 48 ur po vadbi je njena vrednost ostala statistično značilno povišana glede na boks vrednosti ($P < 0,05$). K in holesterol sta se značilno zmanjšala med odvzemom 48 ur po vadbi ter ostalimi odvzemi. Medtem ko smo pri LDL izmerili značilno zmanjšanje vrednosti le med boks vrednostmi in 24 ter 48 ur po vadbi ($P < 0,05$). Vrednosti iP so se značilno razlikovale med vrednostmi, izmerjenimi v boks in 48 ur po vadbi ($P < 0,05$). TP in Mg vrednosti se niso razlikovale med boksom in ostalimi tremi vrednostmi, izmerjenimi po vadbi. Kljub temu pa je bila značilna razlika takoj po vadbi in 24 ur po njej za vrednosti Mg. Medtem ko so se vrednosti TP značilno razlikovale takoj po vadbi v primerjavi z vrednostmi 24 in 48 ur po vadbi ($P < 0,05$).

Plazemska vrednost laktata se je po vadbi značilno povišala v primerjavi z vrednostmi v boks ($P < 0,05$). 24 in 48 ur po vadbi je njegova vrednost padla in se tako ni razlikovala od vrednosti v boks (slika 3).



Slika 3: Plazemske vrednosti laktata 10 konj kasačev, izmerjene pred vadbo (boks), po vadbi, 24 ur in 48 ur po vadbi. (* povprečne vrednosti parametra z nadnapisom nad stolpcem se statistično značilno razlikujejo glede na druge časovne odvzeme ($P < 0,05$)).

Slika 4 prikazuje aktivnosti encimov CK in AST, izmerjene v 4 časovnih odvzemih.



Slika 4: Vrednosti CK in AST aktivnosti v serumu 10 konj kasačev, izmerjene pred vadbo (boks), po vadbi, 24 ur in 48 ur po vadbi. (* povprečne vrednosti parametra z nadnapisom nad stolpcem se statistično značilno razlikujejo glede na druge časovne odvzeme ($P < 0,05$); ♦ povprečne vrednosti parametra z nadnapisom nad stolpcem se statistično značilno razlikujejo glede na vrednosti po vadbi ($P < 0,05$)).

Aktivnost CK je bila statistično značilno večja po vadbi v primerjavi z boks vrednostmi ($P < 0,05$). Po vadbi se je nivo CK znižal in pri vrednostih 24 in 48 ur po vadbi prišel blizu vrednostim boksa.

Kljub porastu aktivnosti AST po vadbi se je le-ta značilno razlikovala samo 48 ur po vadbi v primerjavi z aktivnostjo, izmerjeno po vadbi. Po 48 urah po vadbi se je njena aktivnost značilno zmanjšala v primerjavi z aktivnostjo po vadbi ($P < 0,05$).

4.1.3 Rezultati kazalnikov oksidativnega stresa

Kazalniki oksidativnega stresa, izmerjeni v poskusu meritev fizioloških vrednostih, so podani v preglednici 7.

Preglednica 7: Povprečne vrednosti ($\pm$ SD) antioksidantnih parametrov 10 konj kasačev glede na čas odvzema vzorca.

Izmerjeni parametri	Boks	Po vadbi	24 ur po vadbi	48 ur po vadbi
TAC (mmol/L)	1,25 $\pm$ 0,11	1,31 $\pm$ 0,08 ^x	1,22 $\pm$ 0,06 ^y	1,27 $\pm$ 0,11
GPx (U/g Hgb)	296,07 $\pm$ 43,81	285,49 $\pm$ 34,38 ^x	298,21 $\pm$ 43,76 ^y	299,98 $\pm$ 44,11 ^y
α -tokoferol (μ g/mL)	3,77 $\pm$ 1,10 ^x	3,83 $\pm$ 1,01 ^x	3,92 $\pm$ 1,09	4,17 $\pm$ 1,11 ^y
CoQ ₁₀ (mg/L)	0,68 $\pm$ 0,19	0,71 $\pm$ 0,20	0,61 $\pm$ 0,14	0,60 $\pm$ 0,13
SOD (U/g Hgb)	1390,74 $\pm$ 197,83	1345,62 $\pm$ 192,90	1396,33 $\pm$ 231,69	1430,58 $\pm$ 242,49

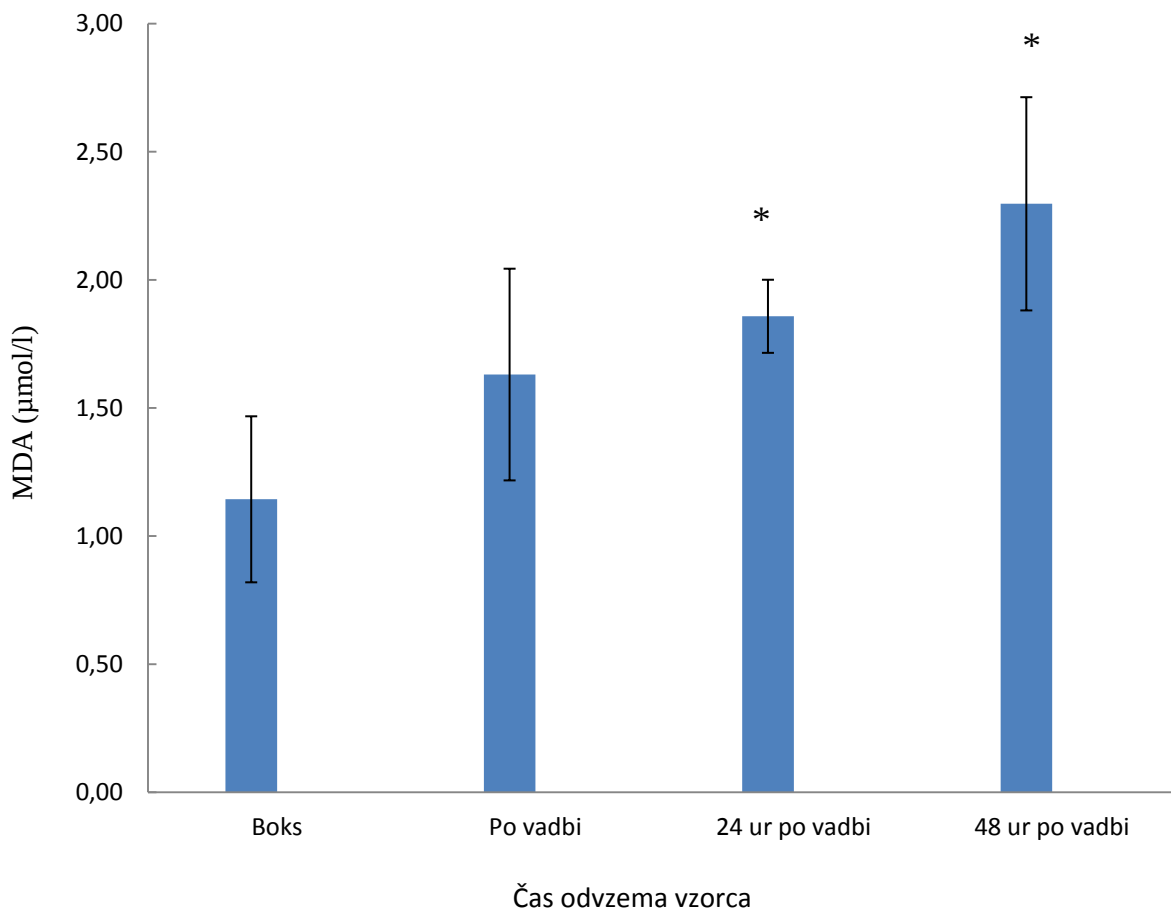
Legenda: TAC = celokupna antioksidativna kapaciteta; GPx = glutation peroksidaza; CoQ₁₀ = koencim Q₁₀; SOD = superoksid dismutaza.

^{x,y} Povprečne vrednosti parametrov z različnimi nadnapisi v isti vrstici se statistično značilno razlikujejo med seboj ($P < 0,05$).

Vrednosti SOD in CoQ₁₀ niso pokazale statistične značilnosti pri nobenem časovnem odvzemu ($P > 0,05$). Po vadbi smo izmerili rahel, a nesignifikanten porast CoQ₁₀ in padec v meritvah 24 in 48 ur po vadbi. Koncentraciji TAC in α -tokoferola sta po vadbi narasli. Vendar pa so se vrednosti po vadbi statistično značilno razlikovale od meritev 24 ur po vadbi pri TAC in 48 ur po vadbi pri α -tokoferolu ($P < 0,05$). Kljub padcu vrednosti GPx po vadbi je bila vrednost statistično višja pri odvzemih vzorcev 24 in 48 ur po vadbi v primerjavi z vrednostmi po vadbi ($P > 0,05$).

Meritev korelacije med MDA in CoQ₁₀ je pokazala negativno korelacijo ($r = -0,65$) in statistično značilnost zgolj 48 ur po vadbi ($P < 0,05$). Korelacije, izmerjene med MDA in α -tokoferolom, MDA in CK ter med MDA in AST, niso bile statistično značilne pri nobenem časovnem odvzemu ($P > 0,05$).

Koncentracije MDA v različnih časovnih odvzemih so prikazane na sliki 5.



Slika 5: Plazemske vrednosti MDA pri 10 konjih kasačih, izmerjene pred vadbo (boks), po vadbi, 24 ur in 48 ur po vadbi. (* povprečne vrednosti parametrov z nadnapisom nad stolpcem se statistično značilno razlikujejo glede na boks vrednosti ($P < 0,05$)).

Plazemska koncentracija MDA se je statistično značilno razlikovala med odvzemi. Po vadbi je koncentracija MDA narasla, vendar ne statistično značilno. Je pa bila statistično višja pri odvzemu vzorca 24 ur in 48 ur po vadbi glede na vrednosti v boksu ($P < 0,05$).

4.2 FARMAKOKINETIČNI REZULTATI CoQ₁₀

Ugotovljene plazemske koncentracijske profile CoQ₁₀ po peroralnem dajanju dveh različnih odmerkov smo analizirali z metodami neprostorske in prostorske farmakokinetične analize.

4.2.1 Neprostska farmakokinetična analiza (NCA)

$$cl = \frac{D}{AUC} \quad (9)$$

$$cl_k = cl_c \left(\frac{wt_k}{wt_c} \right)^{0,75} = \frac{60}{20} \left(\frac{500}{70} \right)^{0,75} = 13,10 \text{ l/h} \quad (10)$$

Legenda: Cl = očistek; D = odmerek; AUC = površina pod krivuljo; cl_k = očistek pri konju; cl_c = očistek pri človeku; wt_k = telesna masa konja; wt_c = telesna masa človeka

Po prvi enačbi (enačba 9) smo izračunali očistek pri konjih, ob poznavanju odmerka in AUC, glede na očistek pri človeku (Žmitek in sod., 2008). Očistek pri človeku smo ocenili iz razmerja med odmerkom za človeka in AUC človeka.

V naslednji enačbi (enačba 10) je sledilo še razmerje tež. Dobljeni očistek za konja nam pove, da je v primerjavi s človekom ($cl_c = 3$) očistek pri konju (cl_k) približno 4-krat večji.

Priporočen dnevni odmerek za CoQ₁₀ ni določen, saj je v telesu le-ta pretežno endogenega izvora in se potrebe med posamezniki lahko bistveno razlikujejo (Žmitek J in Žmitek K, 2009). V kliničnih študijah so pri zdravih prostovoljcih preizkušali odmerke med 90 in 200 mg (Östman in sod., 2012; Janeš, 2009; Liu in Artmann, 2009; Miles in sod., 2002). Glede na omenjene odmerke za ljudi smo za konja izračunali cca 500 mg, kar smo tudi uporabili za nižji odmerek in cca 1000 mg, kar smo izbrali za višji odmerek (enačbi 11 in 12). Enak odmerek smo dobili tudi, če smo vzeli enostavno razmerje telesnih mas človeka in konja, kar je približno 7-kratnik.

$$(90\text{mg}/3 \text{ L/h} \times 13,1 \text{ L/h}) \sim 400 \text{ mg} \quad (\text{enačba 11})$$

$$(200\text{mg}/3 \text{ L/h} \times 13,1 \text{ L/h}) \sim 900 \text{ mg} \quad (\text{enačba 12})$$

V preglednici 11 in 12 so podane povprečne vrednosti parametrov: AUC pred aplikacijo, AUC (0-24h) po aplikaciji odmerkov 500 mg in 1000 mg, od časa nič do 24 h; AUC_{inf}, $c_{\max}$, $t_{\max}$, $t_{1/2\beta}$ in λ_z pri 10 konjih kasačih.

Preglednica 8: Farmakokinetični parametri po aplikaciji CoQ₁₀ v odmerku 500 mg pri konjih kasačih (n = 10).

	Parameter	Povprečne vrednosti (± SD)
Pred aplikacijo	AUC(-24_0h) (mg/L × h)	16,58 ± 5,32
	c _{baz} (mg/L)	0,71 ± 0,27
Po aplikaciji	AUCinf (mg/L × h)	74,81 ± 58,43
	AUC(0-24h) (mg/L × h)	21,24 ± 4,86
	c _{max} (mg/L)	1,09 ± 0,23
	t _{max} (h)	10,40 ± 2,63
	t _{1/2β} (h)	44,45 ± 35,14
	λz (1/h)	0,02 ± 0,01

AUC = površina pod krivuljo; c_{baz} = bazalna koncentracija CoQ₁₀ v času 0; c_{max} = maksimalna opažena koncentracija; t_{max} = čas, pri katerem je dosežena c_{max}; t_{1/2β} = terminalni razpolovni čas; λz = hitrostna konstanta terminalne faze.

Preglednica 9: Farmakokinetični parametri po aplikaciji CoQ₁₀ v odmerku 1000 mg pri konjih kasačih (n = 10).

	Parameter	Povprečne vrednosti (± SD)
Pred aplikacijo	AUC(-24_0h) (mg/L × h)	17,37 ± 5,49
	c _{baz} (mg/L)	0,71 ± 0,27
Po aplikaciji	AUCinf (mg/L × h)	130,68 ± 127,77
	AUC(0-24h) (mg/L × h)	24,48 ± 10,70
	c _{max} (mg/L)	1,22 ± 0,52
	t _{max} (h)	8,50 ± 4,12
	t _{1/2β} (h)	70,16 ± 67,35
	λz (1/h)	0,02 ± 0,02

AUC=površina pod krivuljo; c_{baz} = bazalna koncentracija CoQ₁₀ v času 0; c_{max} = maksimalna opažena koncentracija; t_{max} = čas, pri katerem je dosežena c_{max}; t_{1/2β} = terminalni razpolovni čas; λz = hitrostna konstanta terminalne faze.

Na osnovi meritev pred aplikacijo obeh odmerkov smo dobili informacije o fizioloških koncentracijah CoQ₁₀ in njenih nihanjih. Nihanja teh koncentracij so bila zelo velika v primerjavi s porastom koncentracij po aplikaciji CoQ₁₀ (preglednica 8 in 9). Posledično nam je to onemogočalo zanesljiv izračun nekaterih farmakokinetičnih parametrov, kot so celokupni plazemski očistek (Cl), volumen porazdelitve (V_d) in srednji čas zadrževanja (angl. mean residence time, MRT). Iz preglednic 8 in 9 je razvidno, da so majhne razlike med odmerkoma v posameznih parametrih, posebno pri AUC(0-24h), c_{max} in t_{max}.

4.2.1.1 Proporcionalnost farmakokinetike CoQ₁₀ z odmerkom

Tudi v tem primeru je bila glavna težava nihanje endogenih koncentracij CoQ₁₀ in relativno majhen porast koncentracije CoQ₁₀ po aplikaciji. Prvi način izračuna porasti koncentracij po aplikaciji na osnovi odštevanja endogenih koncentracij (koncentracija ob času nič ali povprečna koncentracija iz 3 meritev pred aplikacijo) ni bil uspešen, saj je bila v številnih primerih koncentracija po odštetju negativna. Druga možnost je bila ocenitev AUC pred

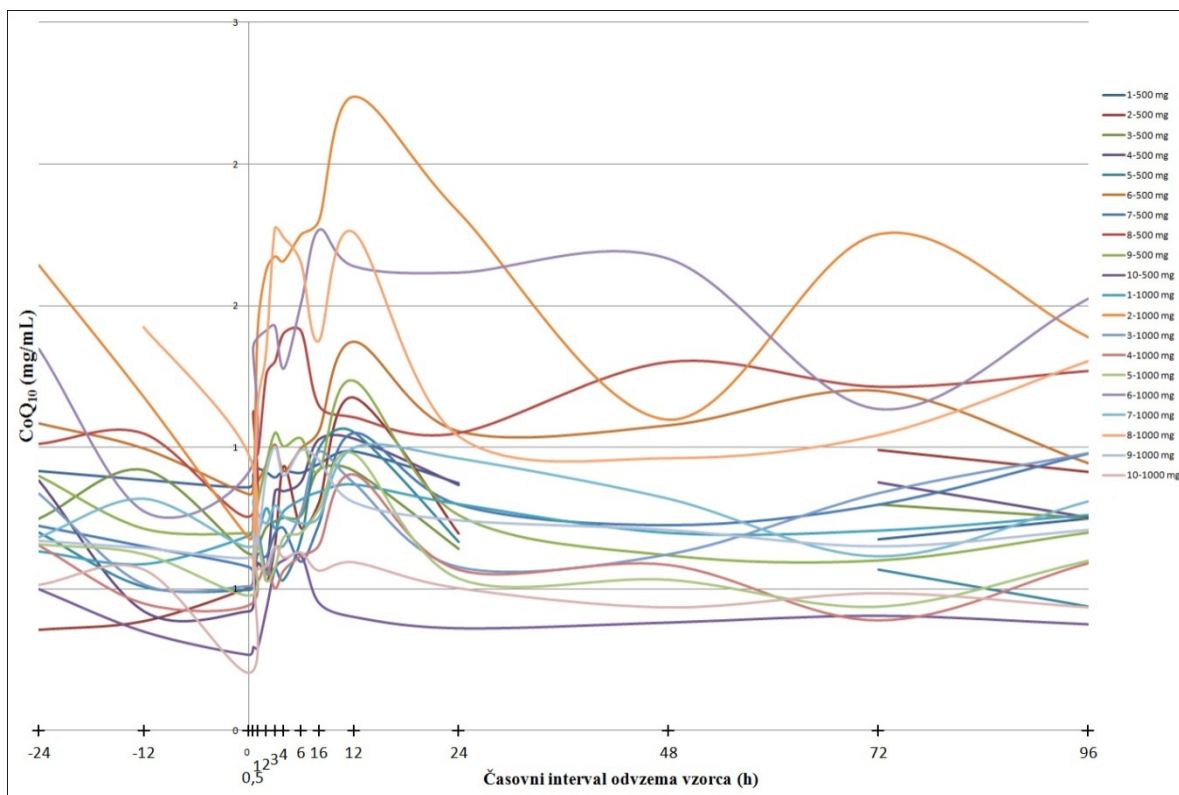
aplikacijo (iz treh koncentracij pred aplikacijo -AUC-24_0h) in nato ta AUC odšteti od AUC po aplikaciji v 24 h (AUC 0-24h). Ta način je bil uspešen, s tem smo dobili porast AUC po aplikaciji na račun apliciranega CoQ₁₀. AUC so bili različni od nič ($P < 0,05$). Kar pomeni, da je po aplikaciji CoQ₁₀ pri obeh odmerkih prišlo do statistično značilnega porasta koncentracije (preglednica 10). Razmerje AUC po 1000 in 500 mg pa ni enako 2, kar pomeni da ne gre za farmakokinetiko, ki je proporcionalna odmerku.

Preglednica 10: Povprečne vrednosti plazemske koncentracije CoQ₁₀ v 24 urnem intervalu pri 10 konjih kasačih pri 2 različnih odmerkih.

Odmerek	Povprečne vrednosti ($\pm$ SD)
500 mg AUC(0_24) - AUC(-24_0)	4,66 $\pm$ 3,53*
1000 mg AUC(0_24) - AUC(-24_0)	7,12 $\pm$ 5,41*

* = $P < 0,05$ (pri AUC je različen od 0)

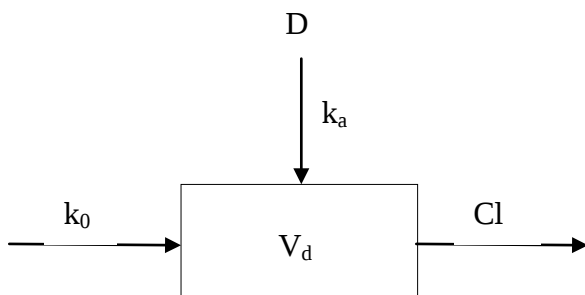
Na spodnji sliki 6 so prikazani individualni koncentracijski profili po enkratni aplikaciji odmerkov 500 in 1000 mg. Ti profili so različni tako glede na odmerek kot tudi na posamezno žival.



Slika 6: Prikaz individualnih koncentracijskih profilov pri 10 konjih kasačih po enkratni aplikaciji odmerkov 500 in 1000 mg CoQ₁₀.

4.2.2 Farmakokinetično modeliranje

V farmakokinetiki lahko podatke pridobimo na različne načine – z od modela neodvisnim pristopom (neprostorska analiza), s prostornimi modeli, fiziološkimi modeli in populacijskimi modeli (Welling, 1997). V naši študiji smo za ocenjevanje farmakokinetike vzeli enoprostorni model (slika 7).



Slika 7: Enoprostorni farmakokinetični model.

Legenda: D = odmerek, k_a = hitrostna konstanta absorpcije, k_0 = hitrostna konstanta endogenega nastajanja CoQ₁₀, V_d = volumen porazdelitve, Cl = očistek.

V prostornih modelih, ki predstavljajo homogen prostor, je organizem predstavljen kot skupek enega ali več prostorov. Strukturo prostora v večini primerov predstavlja volumen organizma ali skupek podobnih tkiv oz. tekočin, skozi katere se porazdeli določeno zdravilo. Vsi procesi v tem modelu so 1. reda (Welling, 1997). Omenjeni model predstavlja hitrostno konstanto endogenega nastajanja CoQ₁₀, volumen porazdelitve po peroralnem vnosu CoQ₁₀, hitrostno konstanto absorpcije in očistek CoQ₁₀ iz organizma.

Po literaturi naj se koncentracija CoQ₁₀ ne bi spreminjala. Analizni rezultati plazemske koncentracije CoQ₁₀ so prikazali drugače. Nihanja endogene koncentracije CoQ₁₀ smo nameravali oceniti s sinusno funkcijo, kot je razvidno iz spodnje enačbe (enačba 13):

$$\frac{dA(t)}{dt} = k_0 + \sin\left(\frac{t-Z}{P} * 2\pi\right) - Cl * \frac{A(t)}{V_d} \quad (\text{enačba 13})$$

Legenda: A = količina CoQ₁₀, k_0 = hitrostna konstanta endogenega nastajanja CoQ₁₀, t = čas; Z = zamik sinusne funkcije; P = perioda sinusne funkcije; Cl = očistek; V_d = volumen porazdelitve.

Enačba 13 predstavlja odvod količine CoQ₁₀ po času. Izračunamo ga s pomočjo hitrostne konstante endogenega nastajanja CoQ₁₀ ter s pomočjo periode sinusne funkcije. Pri čemer odštejemo vrednost očistka substance, ki smo ga pomnožili z razmerjem med količino CoQ₁₀ in volumnom porazdelitve. Zaradi zelo velikih nihanj endogene koncentracije CoQ₁₀, v

primerjavi s porastom koncentracije po dajanju peroralnega odmerka CoQ₁₀ konjem kasačem, ni bilo možno oceniti farmakokinetičnih parametrov. To je bil tudi razlog, da v nadaljevanju nismo uporabili populacijskega farmakokinetičnega modela, ki bi nam omogočil ocenitev populacijskih farmakokinetičnih parametrov ter njihove variabilnosti.

4.3 REZULTATI 8-TEDENKEGA OBDOBJA DAJANJA CoQ₁₀ OZ. PLACEBA

Vsi konji kasači, vključeni v poskus 8-tedenskega obdobja dajanja CoQ₁₀ oz. placeba, so po koncu obdobja dajanja izvedli izbrano fizično vadbo. Rezultati hematoloških, biokemijskih in antioksidantnih vrednosti meritev so podani v preglednicah 11, 12 in 13. Rezultati zajemajo meritve v mirovanju na dan 0 pred pričetkom poskusa, po 8 tednih poskusa, pred vadbo, po vadbi, 24 ur ter 48 ur po vadbi. Vse hematološke in biokemijske vrednosti tekom odvzemov so bile v mejah orientacijskih referenčnih fizioloških vrednosti za kasače, ki jih navaja literatura (Kingston, 2004b; Hodgson in Rose, 1994).

4.3.1 Rezultati hematoloških vrednosti

Preglednica 11 prikazuje povprečne vrednosti hematoloških parametrov v vseh 5 časovnih odvzemih pri skupini, ki je prejela CoQ₁₀, in placebo skupini.

Preglednica 11: Povprečne vrednosti ($\pm$ SD) hematoloških parametrov 10 konj kasačev glede na čas odvzema vzorca skupine CoQ₁₀ in placebo.

Parameter (enote)	Sk	Čas odvzema				
		Boks bazalne	Boks pred vadbo	Po vadbi	24 ur po vadbi	48 ur po vadbi
RBC ($\times 10^{12}/L$)	P	8,74 $\pm$ 0,90	9,28 $\pm$ 0,78	10,87 $\pm$ 0,83 ^x	8,79 $\pm$ 1,05	8,87 $\pm$ 0,81
	Q ₁₀	8,79 $\pm$ 0,86	8,65 $\pm$ 0,89	10,50 $\pm$ 1,24 ^x	8,82 $\pm$ 1,00	8,68 $\pm$ 0,92
Hgb (g/L)	P	137,00 $\pm$ 9,00	143,00 $\pm$ 7,94	177,40 $\pm$ 15,68 ^x	142,00 $\pm$ 12,71	141,20 $\pm$ 9,60
	Q ₁₀	145,80 $\pm$ 16,04	138,00 $\pm$ 18,03	170,40 $\pm$ 19,82 ^x	146,40 $\pm$ 17,39	140,60 $\pm$ 14,98
HCT (L/L)	P	0,37 $\pm$ 0,02	0,39 $\pm$ 0,02	0,47 $\pm$ 0,04 ^x	0,38 $\pm$ 0,03	0,37 $\pm$ 0,02
	Q ₁₀	0,39 $\pm$ 0,04	0,38 $\pm$ 0,05	0,46 $\pm$ 0,05 ^x	0,39 $\pm$ 0,05	0,38 $\pm$ 0,04
NEUT ($\times 10^9/L$)	P	3,77 $\pm$ 0,21 ^x	3,96 $\pm$ 0,54 ^{xy}	4,78 $\pm$ 0,97 ^{yz}	4,97 $\pm$ 1,07 ^z	4,07 $\pm$ 0,60 ^{xy}
	Q ₁₀	3,36 $\pm$ 0,76	3,37 $\pm$ 1,23	3,67 $\pm$ 1,37	3,94 $\pm$ 1,57	3,54 $\pm$ 1,48
EOS ($\times 10^9/L$)	P	0,17 $\pm$ 0,05 ^x	0,30 $\pm$ 0,12 ^y	0,22 $\pm$ 0,07	0,24 $\pm$ 0,11	0,25 $\pm$ 0,10
	Q ₁₀	0,13 $\pm$ 0,06	0,13 $\pm$ 0,04	0,11 $\pm$ 0,02	0,11 $\pm$ 0,05	0,11 $\pm$ 0,06
MCV (fL)	P	42,12 $\pm$ 2,11	42,38 $\pm$ 1,82	42,76 $\pm$ 1,89 ^x	43,28 $\pm$ 1,96	42,54 $\pm$ 1,83
	Q ₁₀	44,30 $\pm$ 1,23	44,06 $\pm$ 3,16	44,02 $\pm$ 3,30	43,82 $\pm$ 3,04	43,74 $\pm$ 3,16

MCH (pg)	P	15,74±0,59	15,46±0,66 ^x	16,34±0,65 ^y	16,18±0,54 ^y	15,96±0,51
	Q ₁₀	16,60±0,52	15,96±1,29	16,30±1,60	16,66±1,28	16,24±1,31
MCHC (g/L)	P	373,0±5,50 ^x	365,00±3,32 ^y	381,60±4,04 ^z	373,80±8,07 ^x	375,20±4,97 ^x
	Q ₁₀	374,20±4,32	361,60±4,54 ^x	370,20±10,43	380,40±11,06 ^y	371,80±4,09
RDW (%)	P	18,12±0,56 ^x	17,58±0,81 ^y	17,68±0,80 ^y	17,56±0,70	17,78±0,75
	Q ₁₀	17,66±0,18	17,44±0,47	17,48±0,49	17,54±0,50	17,56±0,51
HDW (g/L)	P	25,44±1,18	25,78±1,02 ^x	25,96±1,31 ^x	24,84±1,34 ^y	24,76±1,35 ^y
	Q ₁₀	24,62±0,68	25,00±0,47	26,02±2,16 ^x	25,00±1,00	24,24±0,52 ^y
MPV (fL)	P	9,68±1,85 ^x	8,02±1,44	7,64±1,05	7,40±1,90 ^y	8,60±1,48
	Q ₁₀	10,42±0,78 ^x	7,44±1,49 ^{yz}	6,80±1,16 ^z	7,44±0,95 ^{yz}	8,94±1,11 ^{xyb}
WBC (x10 ⁹ /l)	P	6,91±0,56	7,38±0,96	8,14±1,15	8,32±1,90	7,19±1,14
	Q ₁₀	6,70±1,26	6,87±1,62	7,79±2,17	7,45±2,01	6,92±1,64
LYMPH (x10 ⁹ /L)	P	2,52±0,52	2,62±0,37	2,74±0,76	2,58±0,76	2,37±0,57
	Q ₁₀	2,75±0,43	2,94±1,20	3,58±1,69	2,98±0,80	2,81±1,14

BASO (x10 ⁹ /L)	P	0,01±0,01	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,01	0,01±0,00
	Q ₁₀	0,01±0,00	0,01±0,01	0,01±0,01	0,01±0,01	0,01±0,01
MONO (x10 ⁹ /L)	P	0,40±0,08	0,45±0,09	0,35±0,06	0,47±0,13	0,46±0,11
	Q ₁₀	0,40±0,13	0,39±0,11	0,39±0,15	0,37±0,14	0,40±0,12
LUC (x10 ⁹ /L)	P	0,04±0,01	0,03±0,01	0,04±0,02	0,04±0,02	0,03±0,01
	Q ₁₀	0,04±0,02	0,04±0,02	0,04±0,03	0,03±0,01	0,04±0,02
PLT (x10 ⁹ /L)	P	134,60±28,14	124,60±17,90	122,60±20,19	115,00±24,85	122,20±28,62
	Q ₁₀	118,60±11,22	121,40±24,94	122,20±24,39	127,80±27,91	130,00±35,55

Legenda: Sk = skupina; RBC = eritrociti; Hgb = hemoglobin; Hct = hematokrit; MCV = povprečna prostornina eritrocitov; MCH = povprečna vrednost hemoglobina v enem eritrocitu; MCHC = povprečna koncentracija hemoglobina v eritrocitih; RDW = razporeditev eritrocitov glede na velikost njihovega volumna; HDW = porazdelitev eritrocitov glede na koncentracijo hemoglobina; MPV = povprečni volumen trombocitov; PLT = trombociti; WBC = levkociti; NEUT = nevtrofilci; LYMPH = limfociti; MONO = monociti; EOS = eozinofilci; BASO = bazofilci; LUC = velike nepobarvane (peroksidazno negativne) celice.

P = placebo skupina; Q₁₀ = skupina, ki je prejela CoQ₁₀; Boks baz = čas odvzema na prvi dan 8 tedenskega obdobja poskusa, pred dajanjem placeba oz. CoQ₁₀; Boks pred vadbo = čas odvzema po 8 tedenskem obdobju dajanja placeba oz. CoQ₁₀ tik pred vadbo, Po vadbi = čas odvzema po vadbi po 8 tedenskem obdobju dajanja placeba oz. CoQ₁₀; 24 ur po vadbi = čas odvzema 24 ur po vadbi po 8 tedenskem obdobju dajanja placeba oz. CoQ₁₀; 48 ur po vadbi = čas odvzema 48 ur po vadbi po 8 tedenskem obdobju dajanja placeba oz. CoQ₁₀.

^{x,y,z} Povprečne vrednosti parametrov z različnimi nadnapisi v isti vrstici se znotraj posamezne skupine statistično značilno razlikujejo (P < 0,05).

Vrednosti RBC, Hgb in Hct so bile statistično višje pri po vadbi pri obeh skupinah, v primerjavi z vsemi ostalimi vrednostmi, izmerjenimi v drugih časovnih obdobjih (P < 0,05), medtem ko so bile vrednosti MCV statistično značilno povišane le med časom po vadbi in bazalnimi vrednostmi v boksu (P < 0,05), število EOS pa v času mirovanja po 8 tedenskem obdobju dajanja CoQ₁₀ ali placeba in pred obdobjem (P < 0,05) pri placebo skupini. Vrednosti HDW pri obeh skupinah so porastle do časa odvzema vzorca po vadbi. Nato pa v

času 24 in 48 ur po vadbi značilno padle pri HDW placebo in po 48 urah po vadbi pri HDW Q₁₀ skupini v primerjavi z vrednostmi po vadbi ($P < 0,05$). Statistično značilen porast v času odvzema po vadbi in 24 ur po vadbi smo izmerili pri številu NEUT v primerjavi z boks bazalnimi vrednostmi in vrednostih MCH v primerjavi z boks bazalnimi vrednostmi, pri placebo skupinah ($P < 0,05$). Število NEUT v placebo skupini je nato statistično značilno padlo 48 ur po vadbi v primerjavi s časom po 24 urah po vadbi. Medtem ko padec vrednosti MCH v placebo skupini v 48 urah po vadbi ni bil statistično značilen glede na vrednosti v boks pred vadbo in po vadbi. Vrednosti MCHC in MPV so se med skupinama statistično značilno razlikovale. Tako je bil opažen padec vrednosti v času mirovanja, v boks v primerjavi boks bazalnimi vrednostmi, ki je bil značilen le za skupino MCHC Q₁₀ in MPV Q₁₀ ($P < 0,05$). Vrednosti MPV Q₁₀ so bile po vadbi statistično nižje v primerjavi z vrednostmi v času boks bazalnih in 48 ur po vadbi, medtem ko so bile vrednosti MPV v placebo skupini značilno nižje le med 24 urah po vadbi in bazalnimi boks vrednostmi ($P < 0,05$). Vrednosti MCHC v placebo skupini so bile statistično višje po vadbi v primerjavi z odvzemi v ostalih časovnih presledkih. V skupini Q₁₀ pa so vrednosti MCHC značilno porasle 24 ur po vadbi glede na vrednosti v boks pred vadbo in nato padle do časa 48 ur po vadbi blizu boks bazalnim vrednostim, a ne značilno. Vrednosti RDW so se v časih pred in po vadbi značilno zmanjšale v primerjavi z vrednostmi, izmerjenimi v drugih časovnih intervalih. Vrednosti MCV Q₁₀, MCH Q₁₀, RDW Q₁₀, NEUT Q₁₀, EOS Q₁₀, PLT, WBC, LYMP, BASO, MONO in LUC niso pokazale statistične značilnosti pri nobenem časovnem odvzemu ($P > 0,05$). Tudi razlika glede na vpliv dodatka ni bila statistično značilna med skupinama pri nobenem izmed navedenih parametrov v preglednici 11 ($P > 0,05$).

4.3.2 Rezultati biokemijskih vrednosti

Rezultati biokemijskih vrednosti v 8-tedenskem obdobju dajanja CoQ₁₀ in placeba so prikazani v preglednicah 12 in 13. Preglednica 12 prikazuje rezultate biokemijskih parametrov in parametrov lipidograma, medtem ko so v preglednici 13 podani rezultati elektrolitov in mineralov. Izmed obeh preglednic se parametri HDL, LDL, holesterol, sečnina, glukoza, Na⁺, iP in Mg²⁺ niso statistično značilno razlikovali ne glede na čas odvzema vzorca znotraj posamezne skupine kot tudi ne glede na vpliv dodatka med skupinama ($P > 0,05$). Vpliv ($P < 0,05$).

Preglednica 12: Povprečne vrednosti (±SD) biokemijskih parametrov 10 konj kasačev glede na čas odvzema vzorca skupine CoQ₁₀ in placebo.

Parameter (enote)	Sk	Čas odvzema				
		Boks bazalne	Boks pred vadbo	Po vadbi	24 ur po vadbi	48 ur po vadbi
Kreatinin (μmol/L)	P	103,58±2,98 ^y _w	110,65±8,47 ^{yz} _w	129,13±2,61 ^x	112,46±8,73 ^z	104,01±7,76 _w
	Q ₁₀	108,30±20,73 _{yz}	129,92±11,72 ^y _z	152,50±22,69 ^x	132,94±18,77 ^y	123,91±15,9 _{8^z}
Bilirubin (μmol/L)	P	32,20±3,94	30,40±5,83	39,14±8,04 ^x	33,34±6,69	29,10±4,88
	Q ₁₀	35,80±11,11	33,70±10,76	40,08±15,26	36,10±16,88	33,46±13,86
TP (g/L)	P	61,43±2,03	61,98±2,72	66,76±3,14 ^x	63,39±3,24	62,57±2,42
	Q ₁₀	62,11±5,23	60,06±4,56 ^x	64,37±6,89 ^y	60,10±4,79 ^x	60,51±4,07 ^x
Alb (g/L)	P	33,58±1,55 ^x	34,27±1,54 ^{xz}	37,14±1,10 ^y	35,35±1,26 ^z	34,83±1,07 ^{xz}
	Q ₁₀	35,01±1,90	34,46±2,34	37,05±3,21 ^x	34,89±1,97	35,19±2,23
Laktat (mmol/L)	P	0,59±0,21	0,54±0,15	1,55±0,92	0,63±0,32	0,57±0,15
	Q ₁₀	0,50±0,08 ^x	0,62±0,18 ^x	2,14±0,88 ^y	0,72±0,22	0,73±0,24
Sečnina (mmol/L)	P	5,67±0,70	5,91±2,13	6,27±1,25	6,21±1,24	5,87±1,15
	Q ₁₀	6,50±0,85	6,61±0,78	7,03±0,92	7,28±1,21	6,65±1,32

Glukoza (mmol/L)	P	4,16±0,26	4,30±0,46	3,72±1,58	4,62±0,45	4,30±0,86
	Q ₁₀	4,24±0,21	4,64±0,43	4,26±0,84	4,78±0,30	4,84±0,67
ALT (U/L)	P	10,48±1,82	11,70±1,48	13,56±1,16	12,20±3,23	13,32±1,33
	Q ₁₀	9,62±2,12 ^x	10,96±1,32	12,60±1,55 ^y	13,00±1,96 ^y	12,62±0,93 ^y
AP (U/L)	P	103,00±30,53 _x	109,34±37,17 ^x _y	117,52±37,65 ^y	113,16±35,75 ^y _z	107,72±36,1 _{3^{xz}}
	Q ₁₀	78,20±11,58 ^x	104,88±33,43	111,30±34,14 ^y	105,20±35,84	101,90±31,8 ₉
GGT (U/L)	P	9,00±2,24 ^x	12,40±8,76	15,20±8,53 ^y	14,00±7,58	13,40±7,40
	Q ₁₀	9,20±1,79	11,00±4,47	10,80±2,95	9,20±1,30	10,60±3,21
TG (mmol/L)	P	0,28±0,06	0,31±0,07	0,33±0,07 ^x	0,20±0,06 ^y	0,29±0,05
	Q ₁₀	0,26±0,08	0,31±0,07	0,37±0,06 ^x	0,22±0,06 ^y	0,26±0,07
HDL (U/l)	P	1,10±0,14	1,07±0,10	1,11±0,11	1,08±0,11	1,11±0,09
	Q ₁₀	1,10±0,07	1,20±0,21	1,22±0,16	1,16±0,21	1,21±0,24
LDL (U/l)	P	0,30±0,06	0,32±0,06	0,34±0,07	0,33±0,08	0,32±0,08
	Q ₁₀	0,39±0,07	0,42±0,08	0,45±0,06	0,43±0,08	0,43±0,08

Holesterol (mmol/L)	P	1,80±0,20	1,83±0,17	1,93±0,21	1,92±0,24	1,92±0,24
	Q ₁₀	1,98±0,12	2,12±0,27	2,17±0,21	2,18±0,28	2,19±0,30

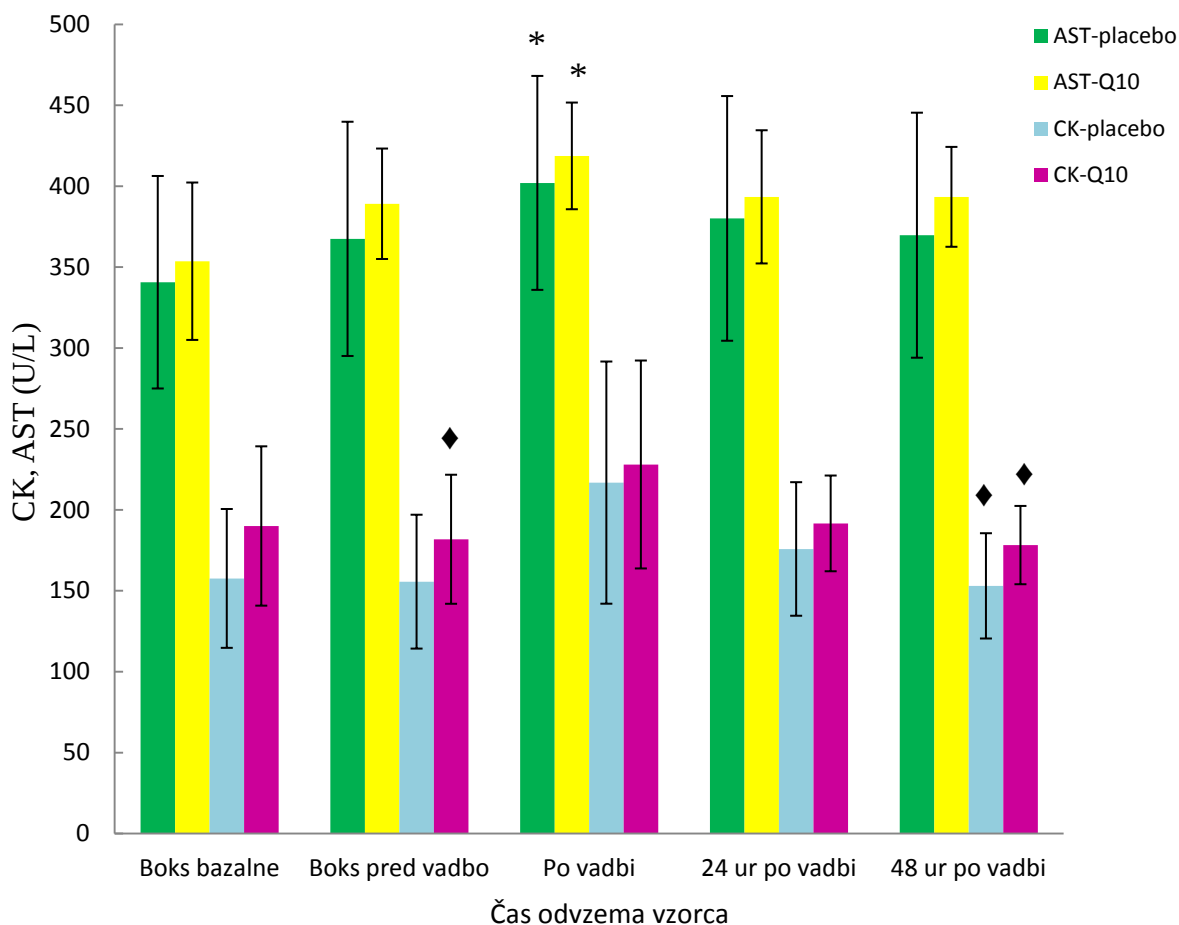
Legenda: Sk = skupina; AP = alkalna fosfataza; ALT = alanin aminotransferaza; GGT = gama glutamil transferaza; TP = celokupne beljakovine; Alb = albumini, TG = trigliceridi; HDL = lipoproteini visoke gostote; LDL = lipoproteini nizke gostote.

P = placebo skupina; Q₁₀ = skupina, ki je prejela CoQ₁₀; Boks baz = čas odvzema na prvi dan 8 tedenskega obdobja poskusa, pred dajanjem placeba oz. CoQ₁₀; Boks pred vadbo = čas odvzema po 8 tedenskem obdobju dajanja placeba oz. CoQ₁₀ tik pred vadbo, Po vadbi = čas odvzema po vadbi po 8 tedenskem obdobju dajanja placeba oz. CoQ₁₀; 24 ur po vadbi = čas odvzema 24 ur po vadbi po 8 tedenskem obdobju dajanja placeba oz. CoQ₁₀; 48 ur po vadbi = čas odvzema 48 ur po vadbi po 8 tedenskem obdobju dajanja placeba oz. CoQ₁₀.

^{x,y,z,w} Povprečne vrednosti parametrov z različnimi nadnapisi v isti vrstici se statistično značilno razlikujejo (P < 0,05).

Po vadbi smo izmerili statistično značilno povišane vrednosti ALT (placebo skupina), AP, GGT, TG, kreatinina, bilirubina (placebo skupina), TP, alb in laktata (CoQ₁₀ skupina) glede na boks bazalne vrednosti (P < 0,05). V času 24 ur po vadbi so vrednosti bilirubina (placebo skupina) značilno padle glede na čas pred vadbo. Medtem ko se vrednosti bilirubina pri Q₁₀ skupini niso razlikovale v nobenem časovnem odvzemu (P > 0,05). Meritve 48 ur po vadbi pa so pokazale statistično značilen padec bilirubina glede na vrednosti, izmerjene po vadbi. Vrednosti TG so se statistično znižale že po 24 urah po vadbi. Medtem ko so se vrednosti TP, alb (CoQ₁₀ skupina), kreatinina (CoQ₁₀ skupina) statistično znižale po 24 in po 48 urah po vadbi v primerjavi z vrednostmi, izmerjenimi takoj po vadbi (P < 0,05). Statistično znižanje vrednosti alb (placebo skupina) smo izmerili 24 ur po vadbi, glede na čas pred in po vadbi ter po 48 urah po vadbi v primerjavi z odvzemom vzorca po vadbi (P < 0,05). V času 24 ur po vadbi so se vrednosti kreatinina (placebo skupina) značilno povišale glede na boks bazalne vrednosti in statistično značilno padle v 48 urah po vadbi, v primerjavi z meritvami po vadbi (P < 0,05). Vrednosti parametrov ALT (skupina placebo), so ostale značilno povišane tudi po 24 in 48 urah po vadbi glede na odvzem vzorca v boks bazalnem času. Medtem ko so se vrednosti AP (placebo skupina) po vadbi značilno znižale 24 ur po vadbi. Nato pa so značilno porasle v 48 urah po vadbi glede na boks bazalne vrednosti (P < 0,05).

Slika 8 prikazuje aktivnosti encimov CK in AST v različnih časovnih odvzemih.



Slika 8: Vrednosti CK in AST aktivnosti v serumu 10 konj kasačev, izmerjene v Boks pred vadbo = čas odvzema po 8 tedenskem obdobju dajanja placeba oz. CoQ₁₀ tik pred vadbo, Po vadbi = čas odvzema po vadbi po 8 tedenskem obdobju dajanja placeba oz. CoQ₁₀; 24 ur po vadbi = čas odvzema 24 ur po vadbi po 8 tedenskem obdobju dajanja placeba oz. CoQ₁₀; 48 ur po vadbi = čas odvzema 48 ur po vadbi po 8 tedenskem obdobju dajanja placeba oz. CoQ₁₀.

(♦ povprečne vrednosti parametra z nadnapisom nad stolpcem se statistično značilno razlikujejo glede na vrednosti po vadbi ($P < 0,05$)) * povprečne vrednosti parametra z nadnapisom nad stolpcem se statistično značilno razlikujejo glede na Boks baz vrednosti ($P < 0,05$)).

Pri aktivnosti CK smo izmerili statistično značilnost med 48 ur po vadbi glede na vrednosti po vadbi pri obeh skupinah konj ($P < 0,05$). Ne pa tudi med vrednostmi po vadbi v primerjavi z boks bazalnimi vrednostmi, čeprav sta bili vrednosti med 48 ur po vadbi in bazalnimi vrednostmi v boku primerljivi (boks bazalna vrednost pri placebo je bila $157,60 \pm 42,90$ U/L in $190,00 \pm 49,22$ U/L za CoQ₁₀ skupino; 48 ur po vadbi za placebo je bila vrednosti $153,00 \pm 32,53$ U/L in $178,20 \pm 24,19$ U/L za CoQ₁₀ skupino). Aktivnost AST je bila statistično značilno povišana v času po vadbi, glede na bazalne vrednosti v boku ($P < 0,05$). Po 48 urah po vadbi je njena aktivnost padla, vendar ne značilno. Rezultat nesignifikantnih razlik v aktivnosti CK in AST bi lahko pripisali tudi velikim SD.

Preglednica 13: Povprečne vrednosti (±SD) elektrolitov in mineralov 10 konj kasačev glede na čas odvzema vzorca skupine CoQ₁₀ in placebo.

Parameter (enote)	Sk	Čas odvzema				
		Boks bazalne	Boks pred vadbo	Po vadbi	24 ur po vadbi	48 ur po vadbi
K ⁺ (mmol/L)	P	3,99±0,24 ^x	3,76±0,19	3,45±0,24 ^y	3,60±0,35	3,67±0,15
	Q ₁₀	4,08±0,31	4,00±0,21	3,63±0,31	3,80±0,40	3,99±0,16
Cl ⁻ (mmol/L)	P	99,44±1,38 ^{xz}	96,80±1,15 ^y	96,88±1,53 ^{xy}	98,14±0,91 ^{xyz}	99,34±0,90 ^z
	Q ₁₀	99,78±0,85 ^x	97,02±1,06 ^y	96,84±2,30 ^y	97,34±1,22 ^y	98,56±1,08
Ca ²⁺ (mmol/L)	P	2,92±0,10 ^x	2,97±0,08 ^{xy}	3,04±0,06 ^{xyz}	3,17±0,10 ^z	3,07±0,06 ^{yz}
	Q ₁₀	3,02±0,07	2,99±0,06 ^x	2,94±0,03 ^x	3,15±0,07 ^y	3,07±0,11
Fe ²⁺ (mmol/L)	P	26,86±6,53	30,14±6,18	31,82±6,43	21,3±3,48 ^a	30,68±6,15
	Q ₁₀	28,26±2,73	31,72±6,38	32,42±3,53	29,96±2,79 ^b	29,20±4,96
Na ⁺ (mmol/L)	P	140,28±1,01	139,22±1,55	140,10±0,36	139,50±0,70	139,80±1,10
	Q ₁₀	138,78±0,95	137,76±1,10	139,28±1,71	139,30±0,88	138,90±1,08
iP (mmol/L)	P	1,10±0,22	1,06±0,12	1,00±0,12	1,02±0,18	1,17±0,23
	Q ₁₀	1,22±0,14	1,09±0,14	1,01±0,15	1,20±0,32	1,29±0,16

Mg ²⁺ (mmol/L)	P	0,81±0,10	0,82±0,06	0,79±0,14	0,88±0,06	0,90±0,04
	Q ₁₀	0,78±0,10	0,82±0,06	0,76±0,06	0,82±0,05	0,90±0,05

Legenda: Sk = skupina; Na²⁺ = natrij, K⁺ = kalij, Cl⁻ = klor, Ca²⁺ = kalcij, iP = anorganski fosfor, Mg²⁺ = magnezij, Fe²⁺ = železo.

P = placebo skupina; Q₁₀ = skupina, ki je prejela CoQ₁₀; Boks baz = čas odvzema na prvi dan 8 tedenskega obdobja poskusa, pred dajanjem placeba oz. CoQ₁₀; Boks pred vadbo = čas odvzema po 8 tedenskem obdobju dajanja placeba oz. CoQ₁₀ tik pred vadbo, Po vadbi = čas odvzema po vadbi po 8 tedenskem obdobju dajanja placeba oz. CoQ₁₀; 24 ur po vadbi = čas odvzema 24 ur po vadbi po 8 tedenskem obdobju dajanja placeba oz. CoQ₁₀; 48 ur po vadbi = čas odvzema 48 ur po vadbi po 8 tedenskem obdobju dajanja placeba oz. CoQ₁₀.

^{x,y,z} Povprečne vrednosti parametrov z različnimi nadnapisi v isti vrstici se statistično značilno razlikujejo znotraj skupine (P < 0,05).

^{a,b} Povprečne vrednosti parametrov z različnimi nadnapisi se v določenem časovnem obdobju med skupinama statistično značilno razlikujejo (P < 0,05).

Izmed elektrolitov smo opazili statistične razlike pri K⁺ (placebo skupina), Cl⁻, Ca²⁺ in Fe²⁺ (placebo skupina) (P < 0,05). Z izjemo Cl⁻ in Ca²⁺ v placebo skupini, so se vrednosti vrstile blizu boks baz vrednostim oz. vrednostim boks pred vadbo. Pri času boks pred vadbo, po vadbi in 24 ur po vadbi smo opazili statistično značilno nižje vrednosti Cl⁻ v primerjavi z boks bazalnimi vrednostmi (P < 0,05). Pri Cl⁻ (CoQ₁₀ skupina) smo izmerili statistično značilen padec v boks pred vadbo v primerjavi z vrednostmi v boks pred 8 tedenskim obdobjem poskusa. Vrednosti Ca²⁺ v CoQ₁₀ skupini so se značilno povešale že v 24 urah in nato v 48 urah po vadbi, vrednosti Cl⁻ v CoQ₁₀ skupini pa v času 48 ur po vadbi. Vrednosti so ostale statistično povešane glede na tiste, izmerjene po vadbi v CoQ₁₀ skupini za Cl⁻ in glede na bazalne vrednosti v boks pri Ca²⁺ v skupini CoQ₁₀ (P < 0,05).

4.3.3 Rezultati kazalnikov oksidativnega stresa

Parametri kazalnikov oksidativnega stresa in njihove vrednosti so predstavljene v preglednici 14.

Preglednica 14: Povprečne vrednosti (±SD) antioksidantov pri 10 konjih kasačih glede na čas odvzema vzorca skupine CoQ₁₀ in placebo.

Parametar (enote)	Sk	Čas odvzema				
		Boks bazalne	Boks pred vadbo	Po vadbi	24 ur po vadbi	48 ur po vadbi
α -tokoferol (μg/mL)	P	3,80 ± 0,73 ^x	3,88 ± 0,61 ^x	4,79 ± 0,92 ^y	4,58 ± 0,83 ^{yz}	4,17 ± 0,83 ^{xz}
	Q ₁₀	3,01±0,91	3,86±0,74	3,82±0,78	3,78±0,44	3,73±0,65
GPx (U/g Hg)	P	270,53±37,04	267,36± 16,07	259,14± 18,40	280,53±30,29	270,28± 14,06
	Q ₁₀	282,25±20,82 ^x	263,97±21,04 ^y	257,79±27,61 ^y	255,25±24,91 ^y	267,64±21,18
TAC (mmol/L)	P	1,14 ± 0,07 ^x	1,18 ± 0,05 ^{xz}	1,29 ± 0,05 ^y	1,21 ± 0,07 ^{xz}	1,23 ± 0,04 ^{yz}
	Q ₁₀	1,12±0,06 ^x	1,15± 0,04 ^{xz}	1,25 ± 0,10 ^y	1,17±0,08 ^{xz}	1,21±0,04 ^{yz}
SOD (U/g Hgb)	P	1637,19 ± 188,70	1534,66 ± 159,54	1522,03 ± 170,75	1557,56 ± 152,17	1539,80 ± 173,27
	Q ₁₀	1457,83 ± 214,39	1574,07 ± 170,42	1578,70 ± 165,56	1567,63 ± 185,16	1587,63 ± 225,04

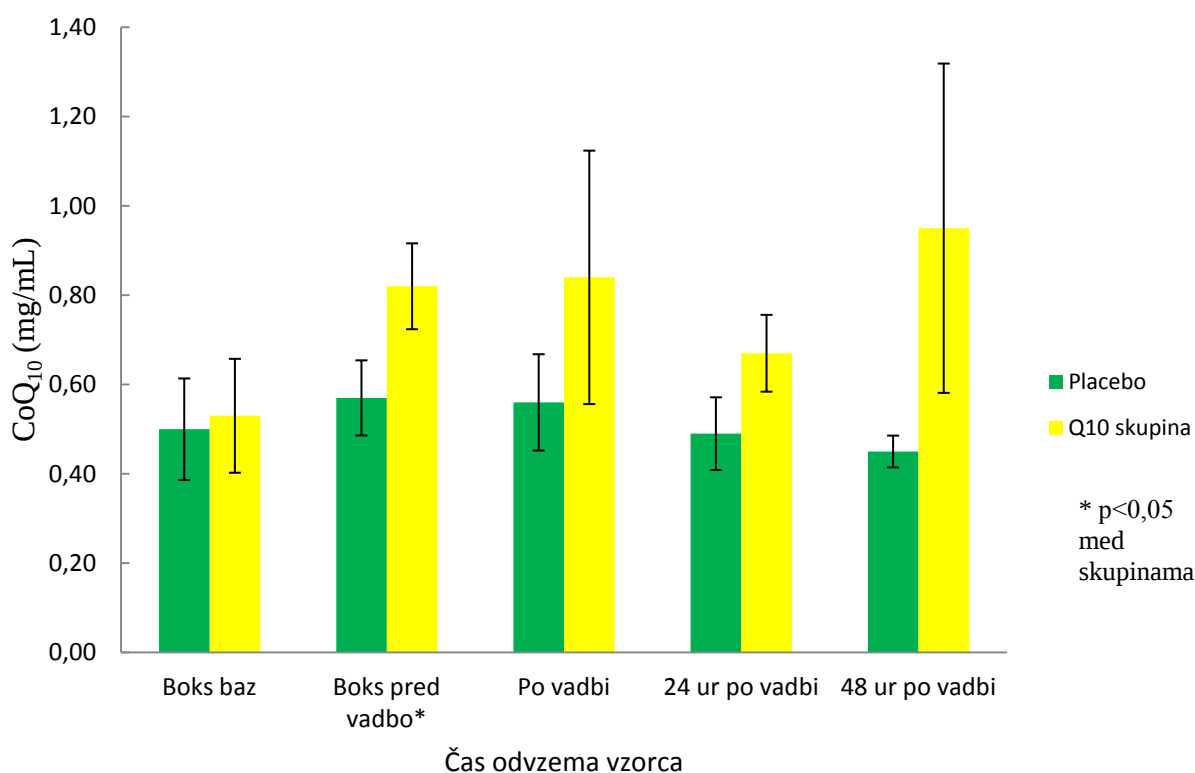
Legenda: Sk = skupina; P = placebo skupina; Q₁₀ = skupina, ki je prejela CoQ₁₀; GPx = glutation peroksidaza; TAC = skupna antioksidativna kapaciteta; SOD = superoksid dismutaza; Boks baz = čas odvzema na prvi dan 8 tedenskega obdobja poskusa, pred dajanjem placeba oz. CoQ₁₀; Boks pred vadbo = čas odvzema po 8 tedenskem obdobju dajanja placeba oz. CoQ₁₀ tik pred vadbo, Po vadbi = čas odvzema po vadbi po 8 tedenskem obdobju dajanja placeba oz. CoQ₁₀; 24 ur po vadbi = čas odvzema 24 ur po vadbi po 8 tedenskem obdobju dajanja placeba oz. CoQ₁₀; 48 ur po vadbi = čas odvzema 48 ur po vadbi po 8 tedenskem obdobju dajanja placeba oz. CoQ₁₀.

^{x,y,z} Povprečne vrednosti parametrov z različnimi nadnapisi v isti vrstici se statistično značilno razlikujejo (P < 0,05).

Vrednosti SOD niso pokazale statistične značilnosti pri nobenem časovnem odvzemu, v nobeni skupini (P > 0,05). Ravno tako ni bilo statistično značilnih razlik pri α -tokoferolu v skupini, ki je prejela CoQ₁₀ in pri placebo skupini GPx (P > 0,05). Vpliv dodatka ni bil značilen med skupinama v nobenem časovnem odvzemu (P > 0,05).

Koncentraciji TAC in α -tokoferola sta bili po vadbi statistično značilno višji od koncentracij v času meritev boks bazalnih in boks vrednosti pred vadbo ($P < 0,05$). Vrednosti so po vadbi padle in bile značilno nižje že v času 24 ur po vadbi pri TAC in 48 ur po vadbi pri α -tokoferolu ($P < 0,05$). Kljub padcu vrednosti GPx v boks pred vadbo, je bila vrednost statistično značilno nižja tudi pri odvzemih vzorcev po vadbi in 24 ur po vadbi v primerjavi z bazalnimi vrednostmi v boks pri Q₁₀ skupini ($P < 0,05$).

Na sliki 9 so prikazane koncentracije CoQ₁₀ pri skupini, ki je prejela CoQ₁₀ in skupini, ki je prejela placebo.

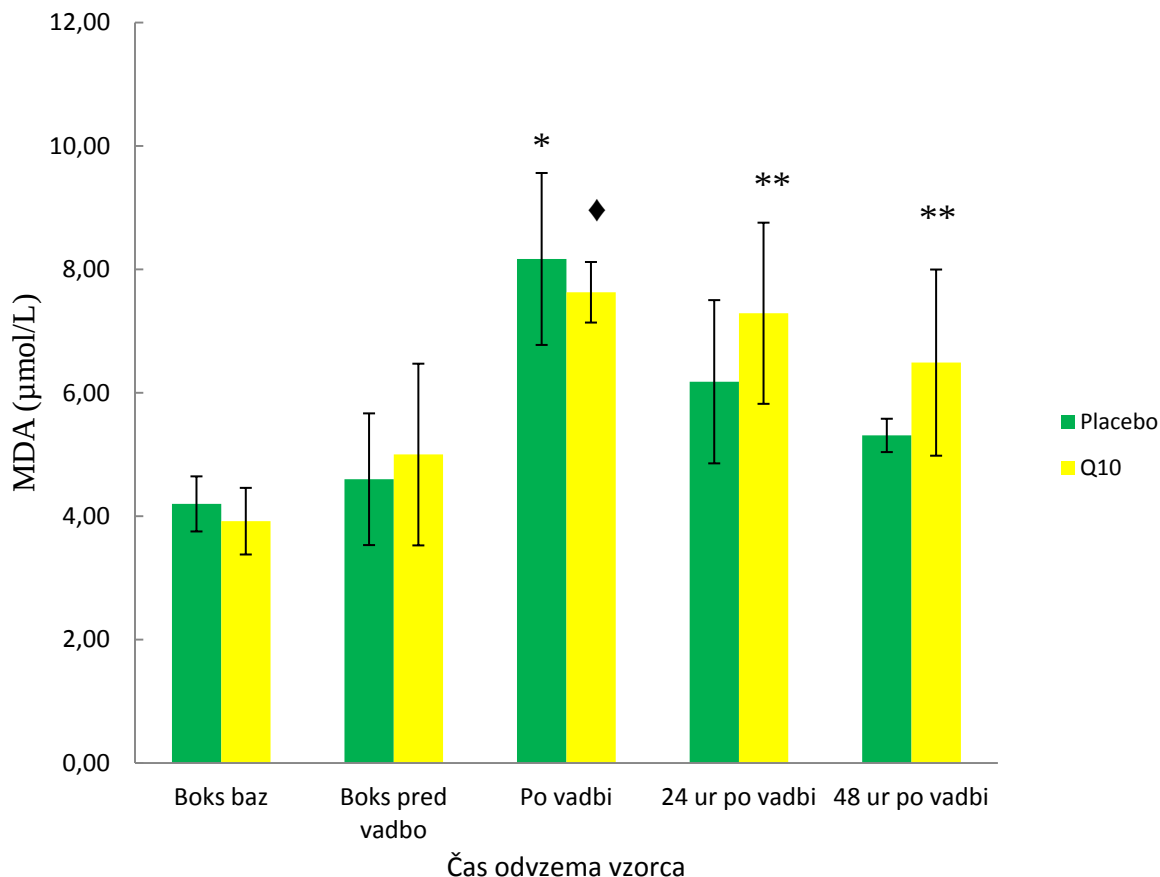


Slika 9: Plazemske koncentracije CoQ₁₀ 10 konj kasačev pri skupini CoQ₁₀ in placebo, izmerjene v času Boks pred vadbo = čas odvzema po 8 tedenskem obdobju dajanja placeba oz. CoQ₁₀ tik pred vadbo, Po vadbi = čas odvzema po vadbi po 8 tedenskem obdobju dajanja placeba oz. CoQ₁₀; 24 ur po vadbi = čas odvzema 24 ur po vadbi po 8 tedenskem obdobju dajanja placeba oz. CoQ₁₀; 48 ur po vadbi = čas odvzema 48 ur po vadbi po 8 tedenskem obdobju dajanja placeba oz. CoQ₁₀.

Znotraj skupin med različnimi časovnimi odvzemi ni bilo statističnih razlik ($P > 0,05$). Edina izmerjena statistično značilna razlika je bila med skupinama v času meritev v boks pred vadbo, po 8-tedenskem obdobju dajanja CoQ₁₀ in placeba, pred izvedbo fizične vadbe.

Plazemska vrednost CoQ₁₀ je bila tako statistično višja pri skupini, ki je prejela CoQ₁₀, v primerjavi s placebo skupino ($P < 0,05$).

Plazemska koncentracija MDA pri skupinah, v poskusu 8-tedenskega prejemanja CoQ₁₀ oz. placeba, je prikazana na sliki 10.



Slika 10: Plazemske koncentracije MDA 10 konj kasačev pri skupini CoQ₁₀ in placebo, izmerjene v Boks pred vadbo = čas odvzema po 8 tedenskem obdobju dajanja placebo oz. CoQ₁₀ tik pred vadbo, Po vadbi = čas odvzema po vadbi po 8 tedenskem obdobju dajanja placebo oz. CoQ₁₀; 24 ur po vadbi = čas odvzema 24 ur po vadbi po 8 tedenskem obdobju dajanja placebo oz. CoQ₁₀; 48 ur po vadbi = čas odvzema 48 ur po vadbi po 8 tedenskem obdobju dajanja placebo oz. CoQ₁₀.

(* povprečne vrednosti parametra z nadnapisom nad stolpcem se statistično značilno razlikujejo glede na druge časovne odvzeme ($P < 0,05$); ♦ povprečne vrednosti parametra z nadnapisom nad stolpcem se statistično značilno razlikujejo glede na boks baz in vrednosti bok pred vadbo ($P < 0,05$); ** povprečne vrednosti parametra z nadnapisom nad stolpcem se statistično značilno razlikujejo glede na boks baz vrednosti ($P < 0,05$)).

Koncentracija MDA se je statistično značilno povežala v času po vadbi pri obeh skupinah konj ($P < 0,05$), bolj pri placebo skupini. Nato je v 24 in 48 urah po vadbi značilno padla pri placebo skupini. Pri skupini CoQ₁₀ pa kljub padcu vrednosti MDA po vadbi ostala statistično značilno višja glede na vrednost, izmerjeno v času boks bazalnih vrednosti ($P < 0,05$).

Korelacije, izmerjene med MDA in CoQ₁₀, MDA in α -tokoferolom, MDA in CK ter med MDA in AST niso bile statistično značilne pri nobenem časovnem odvzemu, pri nobeni izmed skupin ($P > 0,05$). Pri meritvi korelacij med MDA in CK pri placebo skupini v času 48 ur po vadbi so bile te na meji statistične značilnosti, vendar je niso presegle ($P = 0,08$).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Meritve fizioloških vrednosti izbranih parametrov

Povišane vrednosti koncentracije MDA v plazmi in statistično značilne spremembe antioksidantov TAC in GPx ter večine hematoloških in biokemijskih parametrov nakazujejo na biološki odziv konj na izbrano fizično vadbo. Kljub statistično značilnim spremembam hematoloških in biokemijskih preiskav, je bil biološki odziv enak kot pri drugih raziskovalcih (Kingston, 2004b; Hodgson in Rose, 1994).

Zaradi prekomerne tvorbe ROS v organizmu pride do nastanka lipidne peroksidacije, ki vodi do sprememb v celični membrani. Posledica tega so miopatije in hemolize pri konjih, ki so povezane z vadbo (Marlin in sod., 2002; Chiaradia in sod., 1998). V našem poskusu smo izmerili povišane vrednosti plazemske MDA po izbrani fizični vadbi. Do podobnih vrednosti po vadbi so prišli tudi Kedzierski in sod. (2009), ki so opravljali študije na dirkalnih konjih na tekalni stezi. Po 30 minutah po vadbi niso izmerili statistično značilno povišanih vrednosti MDA (Kedzierski in sod., 2009). Medtem ko so White in sod. (2001) izmerili statistično značilen porast MDA v plazmi pri dirkalnih konjih že po 5 minutah po koncu dirke. Meritve MDA v omenjeni študiji so temeljile na analizi TBARS (White in sod., 2001), pri čemer moramo upoštevati dejstvo, da so pri konjih izmerili več kot 90 % MDA v obliki TBARS (Marlin in sod., 2002).

Po vadbi so torej vrednosti MDA naraščale in dosegle najvišjo koncentracijo v 48 urah po vadbi. Vrednosti so bile statistično višje 24 ur in 48 ur po vadbi glede na meritve v boks pred vadbo. Izmerjeni rezultati nakazujejo na povečan obseg lipidne peroksidacije v našem poskusu pri kasačih. Do podobnih rezultatov so prišli tudi Avelini in sod. (1999), ko so poročali o višjih vrednostih MDA pri dirkalnih konjih, po preizkusu maksimalne moči. Tudi 18 ur po vadbi so imeli dirkalni konji še vedno povišane vrednosti MDA (Chiaradia in sod.,

1998). Al-Qudah in Al- Majali (2008) sta izmerila povišane vrednosti plazemske MDA še po 14 dneh po koncu vzdržljivostnega jahanja dirkalnih konj. Kontinuiran porast MDA po vadbi lahko pripišemo počasnemu procesu izločanja končnih produktov lipidne peroksidacije (Chiaradia in sod., 1998). Porast MDA in padec vrednosti CoQ₁₀ 48 ur po vadbi je bil negativno koreliran. Padec plazemske koncentracije CoQ₁₀ po 24 in 48 urah po vadbi nakazuje na pomanjkanje CoQ₁₀ zaradi povečanega metabolnega stresa in povečane tvorbe ROS, kot so to ugotovili /tudi/ pri atletih po treningu (Zhou in sod., 2005).

Tedeschi in sod. (2000) so merili vrednosti CoQ₁₀ pri netreniranih konjih pred in po vadbi. Vrednosti CoQ₁₀ so porasle po 7 minutah vadbe na tekalni stezi in nato 15 minut po koncu vadbe padle blizu bazalnim vrednostim (Tedeschi in sod., 2000). Bazalne vrednosti CoQ₁₀ v študiji Tedeschi in sod. (2000) so bile višje kot vrednosti v boksu v našem poskusu.

V primerjavi z zelo majhnim številom narejenih študij s konji in meritvami CoQ₁₀ pa je GPx največkrat izmerjen in objavljen antioksidantni parameter pri konjih (Górecka in sod., 2002). V našem poskusu smo izmerili rahel padec GPx po vadbi, nato pa je njegova aktivnost statistično porasla po 24 in 48 urah po vadbi. Podobne rezultate, s statistično značilnim padcem aktivnosti GPx po koncu vzdržljivostnega jahanja so izmerili Al-Qudah in Al-Majali (2008) pri endurance konjih. Nasprotno našim rezultatom pa so Kinnunen in sod. (2005a) ter Frankiewicz in Szarska (2000) izmerili porast aktivnosti GPx po vadbi pri endurance konjih. Zapoznili porast v aktivnosti GPx bi lahko pomenil, da gre za nadomestni odgovor in da je GPx občutljiv kazalnik oksidativnega stresa, povzročenega z vadbo (Sacheck in Blumberg, 2001).

Porast α -tokoferola po vadbi, v našem poskusu, bi lahko pripisali sprostitvi α -tokoferola iz adipocitnega tkiva. To nakazuje na mobilizacijo maščob tekom tekme (Bergero in sod., 2005). Kar bi lahko potrdili s signifikantnim porastom TG po vadbi. Medtem ko v našem poskusu nismo ugotovili korelacij med MDA in α -tokoferolom, je bila korelacija med TBARS in α -tokoferolom negativna v poskusu na ponijih, pri vadbi na tekalni stezi (McMeniman in Hintz, 1992). Porast TBARS v plazmi lahko zaznamo pri živalih z nizko koncentracijo α -tokoferola v plazmi (McMeniman in Hintz, 1992).

Plazemska TAC je kot nekakšen skupek različnih antioksidantov, vključno z encimskimi in neencimskimi obrambnimi mehanizmi (Berzosa in sod., 2011). Vrednosti TAC so se v našem

poskusu rahlo povišale po vadbi in statistično značilno padle 24 ur po vadbi. Kar lahko nakazuje, da je bil obrambni sistem antioksidantov močno zmanjšan v periferni krvi. Možna pa je obenem tudi razlaga, da je šlo za kompenzatorni mehanizem med zunaj- in znotraj-celičnimi antioksidanti (Górecka in sod., 2002). Nasprotno so izmerili značilen padec vrednosti TAC Frankiewicz in Szarska (2000) med tekmo vzdržljivostnega jahanja pri endurance konjih. Medtem ko Kedzierski in sod. (2009) niso izmerili nobenih sprememb med standardizirano vadbo na terenu pri kasačih. Na podlagi omenjenih rezultatov lahko povzamemo, da še vedno ni dovolj podatkov, ki bi ocenili vpliv vadbe na vrednosti plazemske TAC (Kedzierski in sod., 2009; Balogh in sod., 2001).

Ravno tako lahko sklepamo tudi za SOD, saj vadba očitno nima pomembnega vpliva na njeno aktivnost (Wagner in sod., 2010). V našem poskusu se aktivnost SOD med časovnimi odvzemi ni značilno spreminjala. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi Balogh in sod. (2001). Pri pentatlon konjih se namreč aktivnost SOD 24 ur pred vadbo, takoj po vadbi in 24 ur po vadbi ni spremenila. Tudi Wagner in sod. (2010) niso izmerili značilnih razlik v aktivnosti SOD med standardizirano vadbo pri kasačih v mirovanju, med in po sami vadbi.

Aktivnosti encimov CK in AST so se v našem poskusu vrnile blizu bazalnim vrednostim že po 24 urah po vadbi. Korelacije med MDA in omenjenima encimoma nismo ugotovili. Iz tega lahko povzamemo, da z vadbo povzročen povečan obseg lipidne peroksidacije ni povzročil značilnih poškodb celic skeletnih mišic. Do podobnih rezultatov so prišli tudi Chiaradia in sod. (1998) pri športnih konjih.

Povečana aktivnost CK po vadbi, izmerjena v našem poskusu, je povzročila prehodno povečanje prepustnosti membran miocitov. To nakazuje na normalen fiziološki odziv konja na vadbo (Tateo in sod., 2008; Texeira-Neto in sod., 2008), ne pa tudi na kakršnekoli dolgotrajnejše spremembe v integriteti celic (Hodgson in Rose, 1994). Tateo in sod. (2012) so ugotovili povečano aktivnost CK pri konjih, ko so jih po dolgotrajnem transportu raztovorili in jih zaprli v bokse. Po 4 urah po transportu je aktivnost CK padla blizu vrednostim pred transporantom, kar nakazuje na minimalne spremembe v mišicah (Tateo in sod., 2012). Glede na kratkotrajen transport konj v našem poskusu lahko aktivnosti CK pripisujemo odzivu na samo vadbo.

Tudi zmeren porast aktivnosti AST po vadbi, kot smo ga izmerili v našem poskusu, naj ne bi povzročil trajnejših sprememb na miocitih (Snow in sod., 1982). Za razliko od aktivnosti mišičnih encimov pa jetrnim encimom ne pripisujemo pomembnih vplivov na račun vadbe (McGowan, 2008). Kljub statističnemu porastu aktivnosti ALT in AP po vadbi, le-ta ni bil klinično pomemben (Chiaradia in sod., 1998).

Spremljanje vrednosti laktata je pomembno pri vadbi, saj na ta način ocenimo kondicijo in pripravljenost konj na fizično obremenitev (Lindner, 2000). Hkrati pa ocenimo fitnes pri športnih konjih (Piccione in sod., 2010a). Značilno povišane vrednosti laktata po vadbi glede na meritve pred vadbo iz našega poskusa, se ujemajo z literaturnimi podatki iz študije na kasačih (Piccione in sod., 2010a), polo konjih (Zobba in sod., 2011), endurance konjih (Al-Qudah in Al-Majali, 2008) in drugih športnih konjih (Lindner, 2000). Če se vrednosti laktata vrnejo na bazalni nivo kmalu oz. takoj po vadbi, to nakazuje na dobro fizično pripravljenost konj (Zobba in sod., 2011). Povprečne vrednosti laktata v našem poskusu so padle že po 24 urah po vadbi. Zato sklepamo, da so bili konji dobro pripravljeni na fizično obremenitev.

V poskusu smo izmerili značilno povišanje vrednosti RBC, WBC, Hct in Hgb po izbrani fizični vadbi. Omenjene vrednosti so se vrnile na nivo vrednosti, izmerjenih v boks, pred vadbo, v 24 oz. v 48 urah po vadbi. Naši rezultati sovpadajo z rezultati iz študij, opravljenimi na športnih konjih (Piccione in sod., 2010b; Padalino in sod., 2007; Kingston, 2004a). Povečanje hematoloških parametrov, kot so RBC, Hct in Hgb, po vadbi pripisujemo kontrakciji vranice. Ob fizičnem naporu se vranica skrči in iztisne številne RBC v kri kot odziv konja na strah, vznemirjenje in vadbo (Ricketts, 2004). Značilno zmanjšanje vrednosti MCH po vadbi sovпада z rezultati študije Padalino in sod. (2007). Vzrok pripisujejo povečanemu treningu in spremembam v hematopoezi (Padalino in sod., 2007). Vrednost MPV v naši študiji je nesignifikantno padla po vadbi in nato signifikantno porastla. Enak trend, vendar z nesignifikantnimi razlikami, so izmerili tudi Piccione in sod. (2008). Medtem ko so Ogoński in sod. (2008) izmerili signifikanten porast MPV po 3 mesecih rednega treninga pri kasačih. Povišane vrednosti pripisujejo boljši razpoložljivosti ter prenosu O₂ (Ogoński in sod., 2008).

Kot odziv na močno in zmerno intenziteto vadbe so v večini študij izmerili povišane vrednosti sečnine in kreatinina (Hodgson in Rose, 1994). Značilno povišanje kreatinina v našem poskusu je najverjetneje posledica dehidracije zaradi povečane izgube tekočine z znojem

(Piccione in sod., 2010b). Tudi koncentracija sečnine v našem poskusu je po vadbi kasačev porasla. Vendar je ostala povišana tudi po 24 in 48 urah po vadbi glede na meritev v boksu. To povišanje lahko pripisujemo katabolizmu proteinov, ki se vrši še po samem prenehanju vadbe (Snow in sod., 1983).

Spremembe v Alb, TP, Na⁺, Cl⁻ in Ca²⁺ nakazujejo na dehidracijo konj, ki je posledica fizične aktivnosti (Nemec-Svete in sod., 2008; Coenen, 2005). Koncentracija iP v našem poskusu je po ostala povišana še 48 ur po vadbi v primerjavi z vrednostmi v boku. Vzrok je v intenzivnosti vadbe, vendar pa večje energijske zahteve po ATP najbrž niso bile potrebne (Arslan in sod., 2002). Vrednosti P³⁻ so bile po 48 urah povadbi v primerjavi z ostalimi časovnimi odvzemi, značilno nižje. Omenjene vrednosti bi lahko bile posledica izgube P³⁻ z znojem in njegovo prehajanje iz kontraktilnih mišic (Snow in sod., 1983).

Kot so ugotovili že avtorji študij pri kasačih (Piccione in sod., 2010b; Tateo in sod., 2008), so bile tudi v našem poskusu vrednosti TG po vadbi povišane. Sicer meritve plazemskih TG za spremljanje aktivnosti konj po vadbi niso značilne. Kljub temu pa metabolizem lipidov pri konjih variira glede na intenziteto in dolžine vadbe, kot tudi na pasmo, spol in starost (Kedzierski in sod., 2009). Omenjeno dejstvo je lahko razlog za spremembe v vrednostih holesterola in LDL, ki smo jih določili v našem poskusu.

Različna intenziteta vadbe, fitnes športnih konj, čas odvzema vzorcev kot tudi analitične metode vplivajo na razlike v vrednostih parametrov med različnimi študijami. Zato jih je včasih težko primerjati med seboj.

5.1.2 Farmakokinetika CoQ₁₀

Porast površine pod plazemsko krivuljo CoQ₁₀ smo ovrednotili na osnovi razlik med površinama 24 ur po aplikaciji ter površino pod plazemsko krivuljo 24 ur pred aplikacijo. Slednja predstavlja doprinos endogenega CoQ₁₀ k celokupni površini. Študije navajajo različne časovne intervale, od 0-10 ur (Liu in Artmann, 2009; Molyneux in sod., 2007), od 0-12 ur (Žmitek in sod., 2008) od 0-48 ur (Prošek in sod., 2008; Constantinescu in sod., 2007) ter od 0-144 ur (Miles in sod., 2002) po aplikaciji CoQ₁₀. V našem poskusu smo izbrali 24-urni opazovani interval po aplikaciji, in sicer zato, ker je v večini primerov koncentracija CoQ₁₀ padala na endogene vrednosti. To pa pomeni, da se je večina apliciranega CoQ₁₀ že

izločila. Mehanizem absorpcije in prenosa CoQ₁₀ je zelo podoben kot pri α -tokoferolu (Žmitek J in Žmitek K, 2009). Ker farmakokinetičnih študij o CoQ₁₀ pri konjih po do sedaj zbranih literaturnih virih ni, smo vzeli zato med drugim za primerjavo in razlago rezultate farmakokinetike α -tokoferola pri športnih konjih. Podobne rezultate našim so namreč dobili Hargreaves (2002) pri endurance konjih, ko so jim aplicirali α -tokoferol peroralno. AUC so merili v 24-urnem intervalu. Glede na višino odmerka, ki je bil kar 35-krat višji od priporočenega, so v serumu izmerili nizek porast. V omenjeni študiji so merili količino α -tokoferola v blatu. Prišli so do ugotovitev, da se je z blatom izločila velika količina peroralno zaužitega α -tokoferola (Hargreaves, 2002). To trditev podpira tudi dejstvo, da sama absorpcija α -tokoferola kot tudi CoQ₁₀ temelji na emulzifikaciji s pomočjo žolčnih kislin v tankem črevesju (Žmitek J in Žmitek K, 2009; Hargreaves, 2002). Absorpcija namreč poteka s pomočjo micel v tankem črevesju, ki se nato s hilomikroni prenesejo do limfnega sistema (Bhagavan in Chopra, 2006). Da pa se tvorijo micele, se mora iz žolčnega mehurja izločati žolč. Ker konji nimajo žolčnega mehurja, se pri njih žolč v majhnih količinah neprestano izloča iz jeter. Njegova količina se nekoliko poveča ob hkratnem zaužitju obroka (Hargreaves, 2002). Tako CoQ₁₀ kot α -tokoferol se po krvnem obtoku prenašata z lipoproteini VLDL in LDL (Žmitek J in Žmitek K, 2009; Hargreaves, 2002). V majhnih količinah se CoQ₁₀ prenaša tudi s HDL (Bhagavan in Chopra, 2006). Zato so nizke koncentracije omenjenih lipoproteinov onemogočile absorpcijo peroralno zaužitega α -tokoferola v tkiva (Hargreaves, 2002). Tudi pri podganah niso dokazali privzema CoQ₁₀ na oljni osnovi v tkiva. V 4-dnevnem obdobju dajanja CoQ₁₀ so izmerili samo povišano koncentracijo v krvi (Zhang in sod., 1995). Weber in sod. (1997) so v navzkrižni študiji 9 ljudem dali 30 mg CoQ₁₀ v obliki kapsul ter enako količino v svinjskem mesu, v enkratnem odmerku. Iz dobljenih rezultatov so ugotovili, da je bil porast serumskih koncentracij CoQ₁₀ po zaužitju le-tega pokazatelj absorpcije CoQ₁₀ v intestinalnem traktu (Weber in sod., 1997). Enako lahko sklepamo tudi, da se CoQ₁₀ pri konjih kasačih v našem poskusu ni absorbiral iz prebavnega trakta v tkiva, ampak se je izločil. Da bi to lahko z gotovostjo potrdili, bi morali meriti vsebnost CoQ₁₀ tudi v blatu.

Farmakokinetični parametri vodotopne oblike CoQ₁₀ pri konjih kasačih v našem poskusu kažejo na nizko biološko uporabnost. Rezultati farmakokinetike pri konjih kasačih so bolj primerljivi z rezultati študij s formulacijami CoQ₁₀ na oljni osnovi, opravljenimi pri psih (Prošek in sod., 2008; Kommuru in sod., 1999), ljudeh (Liu in Artmann, 2009; Hosoe in sod., 2007; Miles in sod., 2002; Tomono in sod., 1986) in podganah (Nishimura in sod., 2009).

Rezultati $c_{\max}$ v našem poskusu v primerjavi z bazalnimi vrednostmi, so bili podobni rezultatom $c_{\max}$ in bazalnim vrednostim za oljno formulacijo CoQ₁₀, ki so jo prejeli psi pasme beagle (30 mg) (Prošek in sod., 2008). Podobne rezultate našim so izmerili tudi v študiji Kommuru in sod. (1999) pri psih, pasme beagle in pri psih rakunarih (Zaghloul in sod., 2002). Psi pasme beagle so prejeli CoQ₁₀ 4 dni, dvakrat dnevno, v odmerku 30 mg, v 2 različnih oblikah formulacij. Od teh je bila ena v praškasti in druga v oljni obliki. Le-te pa so bile aplicirane s kapsulami. Izmerili so 2,2-krat višjo $c_{\max}$ kot bazalno vrednost (Kommuru in sod., 1999). Psi rakunari so v navzkrižni študiji prejeli 3 različne formulacije CoQ₁₀, v enkratnem odmerku 30 mg. Dve formulaciji sta temeljili na vodni osnovi, ki so bile psom aplicirane v obliki mehkih želatinastih kapsul. Medtem ko je bila slednja oblika CoQ₁₀ v obliki kapsule s praškom, ki je bil komercialno dostopen. Avtorji ne navajajo ali je šlo za vodotopno ali lipofilno obliko. Porast $c_{\max}$ za prašek je bil zanemarljiv v primerjavi s porastom $c_{\max}$ ostalih dveh oblik (Zaghloul in sod., 2002).

Tudi rezultati lipofilnih oblik, ki so jih dajali podganam (Nishimura in sod., 2009), kažejo podoben trend kot pri zgoraj omenjenih študijah s CoQ₁₀ v lipofilni obliki.

Pri vodotopnih oblikah je bila biološka uporabnost veliko večja ne glede na vrsto organizma. V nasprotju z našimi rezultati, so Prošek in sod. (2008) pri psih po enkratnem odmerku vodotopne oblike CoQ₁₀ izmerili porast $c_{\max}$ na 3,3-kratno vrednost bazalne vrednosti. Pri psih rakunarih iz študije Zaghloul in sod. (2002) pa sta bili $c_{\max}$ vodotopnih oblik kar za 3,6-oz. 6,2-krat višji od $c_{\max}$ CoQ₁₀ v obliki praška. Tudi Hatanaka in sod. (2008) so dokazali boljšo biološko uporabnost pri različnih formulacijah CoQ₁₀ na vodni osnovi, pri podganah.

Podobne rezultate so izmerili tudi v študijah pri ljudeh (Žmitek in sod., 2008; Molyneux in sod., 2007; Terao in sod., 2006; Miles in sod., 2002), kjer so uporabili različne formulacije CoQ₁₀ na vodni osnovi.

Čas, ko je bila dosežena maksimalna koncentracija CoQ₁₀ v plazmi konj kasačev iz našega poskusa, je bil v povprečju daljši za približno 2 uri od $t_{\max}$ formulacij na oljni osnovi (Hosoe in sod., 2007; Ullman in sod., 2005; Kommuru in sod., 1999; Tomono in sod., 1986). Medtem ko je bil $t_{\max}$ pri vodotopni obliki CoQ₁₀ krajši kar za polovico $t_{\max}$ (Prošek in sod., 2008; Žmitek in sod., 2008; Zaghloul in sod., 2002) v našem poskusa za višji odmerek. Tudi $t_{1/2\beta}$ je bil za 3,5 krat daljši kot $t_{1/2\beta}$ CoQ₁₀ na oljni osnovi in 4,4- krat daljši pri višjem odmerku od

vodotopne oblike, izmerjeni pri psih (Prošek in sod., 2008). V farmakokinetični študiji s 4 različnimi formulacijami CoQ₁₀ so izmerili celo 2 vrha, in sicer po 6 in po 18 urah. Omenjeni fenomen naj bi nastal zaradi redistribucije in enterohepatičnega kroženja CoQ₁₀ (Constantinescu in sod., 2007, Tomono in sod., 1986). Glede na podatke, da naj bi bil povprečni $t_{1/2\beta}$ pri ljudeh med 49 in 125 urami (Turunen in sod., 2004), smo v naši študiji izmerili še hitrejši terminalni razpolovni čas.

Opazili smo le statistično značilen porast AUC po dajanju obeh odmerkov v primerjavi z bazalnimi vrednostmi. Varnost CoQ₁₀ je bila dokazana pri visokih odmerkih glede na priporočila ljudem in pri živalih (Bhagavan in Chopra, 2006). Zaradi nizke toksičnosti pri živalih in njegove negenotoksičnosti (Hidaka in sod., 2008) bi lahko konjem aplicirali tudi višji odmerek CoQ₁₀. Pred tem pa bi morali najprej povečati delež maščob v obroku, da bi dosegli višje koncentracije lipoproteinov, s katerimi se CoQ₁₀ prenaša po krvnem obtoku. Vključitev maščob v obrok športnim konjem naj bi predstavljal 20 % skupne dnevne prebavljive energije. Dodatek maščob v obrok vpliva na porast plazemskih fosfolipidov in holesterola, hkrati pa zniža nivo plazemskih TG. Ti se iz jeter sprostijo v obliki VLDL (Pösö in sod., 2004). Zaradi zmanjšanih vrednosti TG v plazmi, je tudi povečanje maščob v obroku vprašljivo za boljšo absorpcijo CoQ₁₀ pri konjih, in sicer ne glede na višino odmerka. V območju med 500 in 1000 mg farmakokinetika CoQ₁₀ pri konjih kasačih ni bila proporcionalna. Razmerje AUC po aplikaciji 500 mg in 1000 mg namreč ni bilo enako 2. Medtem ko je bila linearnost farmakokinetika ugotovljena v študiji Kaikkonen in sod. (2002) glede na dnevni odmerek 200 mg pri ljudeh.

5.1.3 8-tedensko obdobje dajanja CoQ₁₀ oz. placebo

Študija ni bila zakrita, vendar s tem nismo vplivali na rezultate pri sami analizi.

Dodatek CoQ₁₀ v prehrano naj bi ugodno vplival na fizično zmogljivost in s tem zmanjšal obseg oksidativnega stresa, povzročenega z vadbo, pri zdravih ljudeh in športnikih (Zhou in sod., 2005). Na ljudeh in živalih je bilo narejenih in nato objavljenih kar nekaj študij, v katerih so preučevali vpliv dajanja CoQ₁₀ skozi daljše časovno obdobje na oksidativni stres, povzročen z vadbo (Östman in sod., 2012; Leelarungrayub in sod., 2010; Cooke in sod., 2008; Kon in sod., 2007; Niklowitz in sod., 2007; Braun in sod., 1991). Medtem ko je naš tovrstni poskus, izveden na konjih kasačih, prvi. Naš namen je bil ugotoviti ali 8-tedensko obdobje

dajanja CoQ₁₀ vpliva na zmanjšanje oksidativnega stresa, povzročenega za vadbo. Po 8-tedenskem obdobju dajanja CoQ₁₀ konjem kasačem smo v plazmi izmerili značilen porast CoQ₁₀ pri tretirani skupini konj pred izvedbo fizične vadbe. Porast CoQ₁₀ v serumu pri tretirani skupini podgan po 4-tedenskem obdobju dajanja CoQ₁₀ na oljni osnovi so izmerili tudi Kon in sod. (2007). Zhou in sod. (2005) so izmerili 3,2-kraten signifikanten porast plazemskega CoQ₁₀ pri tretirani skupini zdravih prostovoljcev po 4 tednih prejemanja CoQ₁₀. Razlike v koncentraciji pred in po vadbi pa niso bile signifikantne. Slednji rezultati se ujemajo z našimi – v naši študiji prav tako nismo izmerili statistično značilnih razlik med skupinama. Po 6 tednih dajanja CoQ₁₀ oz. placeba so izmerili signifikanten porast pri tretirani skupini treniranih moških, pred izvedbo izbrane vadbe (Laaksonen in sod., 1995). Enak rezultat so zmerili tudi pri moških kolesarjih, tretiranih s CoQ₁₀, po 8-tedenskem obdobju dajanja CoQ₁₀ (Braun in sod., 1991). Prav tako je bil izmerjen signifikanten porast plazemskega CoQ₁₀ v tretirani skupini v primerjavi s placebom že po 28 dneh (Weston in sod., 1997) oz. 14 dneh dajanja CoQ₁₀ (Cooke in sod., 2008). V omenjeni študiji so bili vključeni zdravi trenirani in netrenirani prostovoljci (Weston in sod., 1997) ter kolesarji (Cooke in sod., 2008). V študiji Weston in sod. (1997) je bil porast plazemskega CoQ₁₀ 2,2-krat višji glede na porast v placebo skupini. V našem poskusu je bil ta porast le 1,4-krat višji pri tretirani skupini konj v primerjavi s placebo skupino.

Dodatek CoQ₁₀ ni signifikantno vplival na kazalnike z vadbo povzročenega oksidativnega stresa med skupinama konj. Prav tako v 8-tedenskem obdobju dajanja CoQ₁₀ nismo izmerili signifikantnih razlik med tretirano in placebo skupino v hematoloških in biokemijskih parametrih, razen pri Fe²⁺. Tudi korelacije med kazalniki oksidativnega stresa in mišičnima encimoma niso bile statistično značilne. Značilne razlike so bile zgolj znotraj skupin, glede na časovne odvzeme.

Kljub signifikantnemu porastu MDA in TAC pri obeh skupinah po vadbi pa sta bili vrednosti nekoliko nižji pri tretirani skupini konj. Omenjena parametra sta v 24 oz. 48 urah po vadbi padla in ostala nekoliko povišana glede na rezultate pred izvedbo vadbe. Izmerjeni rezultati MDA nakazujejo, da je prišlo do povečanega obsega lipidne peroksidacije pri obeh skupinah konj. Obseg pa je bil nekoliko manjši pri tretirani skupini konj, kar lahko nakazuje na manjši nivo oksidativnega stresa pri konjih, ki so prejeli CoQ₁₀ (Urso in Clarkson, 2003), iz česar lahko povzamemo, da je bil zato tudi manjši porast TAC pri tretirani skupini. Vpliv 8-

tedenskega obdobja dajanja CoQ₁₀ treniranim kolesarjem ni imel vpliva na lipidno peroksidacijo med endurance treningom (Braun in sod., 1991). Nasprotno so Leelarungrayub in sod. (2010) izmerili signifikantno nižje vrednosti MDA pri tretirani skupini plavalcev. Medtem ko dodatek CoQ₁₀ ni vplival na spremembe TAC po izbrani vadbi. S tem so dokazali, da je bilo 20-dnevno obdobje dajanja CoQ₁₀ dovolj dolgo, da je zmanjšalo oksidativni stres (Leelarungrayub in sod., 2010). V nasprotju z našimi rezultati, so Cooke in sod. (2008) izmerili signifikanten porast MDA po vadbi pri tretirani skupini. Vzrok prej pripisujejo raznim produktom, ki so interferirali z MDA, kot pa tvorbi lipidne peroksidacije (Cooke in sod., 2008).

α -tokoferol kot eden izmed kazalnikov oksidativnega stresa je bil signifikantno povišan po vadbi pri placebo skupini. V roku 48 ur je bil njegov padec značilen. Ker je šlo za placebo skupino, lahko sklepamo, da gre za enak odziv α -tokoferola kot pri rezultatih fizioloških meritev. Porast α -tokoferola v plazmi po vadbi je bil na račun sprostitve α -tokoferola iz adipocitnega tkiva (Bergero in sod., 2005), medtem ko je bil pri tretirani skupini po vadbi rahel padec α -tokoferola. Notranja membrana mitohondrija vsebuje tako α -tokoferol kot CoQ₁₀. Oba imata funkcijo, da preprečujeta nastanek radikalov in s tem zavirata lipidno peroksidacijo. Ubikinol namreč regenerira tokoferoksilni radikal do α -tokoferola. To so dokazali pri miših in podganah, ki so jim izmerili povišane vrednosti α -tokoferola v mitohondrijih jeter, srca in skeletnih mišic (Sohal in Forster, 2007). Lahko povzamemo, da je glede na povečan porast CoQ₁₀ pri tretirani skupini, le ta prevzel obrambno funkcijo.

Antioksidantni odziv in njegova adaptacija na oksidativni stres je prisotna tako pri akutni kot tudi pri kronični vadbi (Ji, 1999). Aktivacija antioksidantnih encimov med akutno vadbo pomeni odziv obrambnega mehanizma na povečan nastanek RS. Akutna vadba tako naj ne bi vplivala značilno na spremembe v vrednosti α -tokoferola v tkivih. Njegova vsebnost naj bi bila v organizmu dovoljšnja, da nastopa kot obrambni mehanizem pred povečanim nastankom RS (Ji, 1999).

Kljub temu, da naj bi tudi kronična vadba deloma imela za posledico adaptacijo obrambnega mehanizma, pa je le-ta velikokrat oslabljen. Pri tem pride do prekomerne tvorbe RS, ki je obrambni mehanizem ni sposoben sproti odstraniti. To seveda vodi do poškodb, zmanjšani fizični zmogljivost in raznih bolezenskih stanj (Fisher-Wellman in Bloomer, 2009). Kronična vadba pri odraslih podganah je imela za posledico povečan nastanek RS v mikrosomih.

Vendar pa je bil ta nastanek RS manjši v primerjavi s skupino odraslih podgan, ki niso bile pod vplivom nobene vadbe. Nastanek RS v mitohondrijih mišic je bil značilno zmanjšan pri mladih podganah, v primerjavi z odraslimi, po kronični vadbi (Ji, 1999). Kronična vadba ima po mnenju znanstvenikov Ji in Leichtweis (1997) dvojni učinek. Po eni strani tako inducira aktivnost antioksidantnih encimov in stimulira sintezo GSH. Po drugi strani pa poveča porabo α -tokoferola in GSH in s tem je zmanjšana njuna koncentracija v določenih tkivih (Ji in Leichtweis, 1997).

Kronična vadba povzroči prehoden padec vrednosti α -tokoferola v tkivih in rezerv glutaciona (Ji in Leichtweis, 1997). Po kronični vadbi so bile vrednosti α -tokoferola v skeletnih mišicah, jetrih in srcu podgan znižane (Ji, 1999).

Vsekakor pa je pomembno, da pri dodatkih antioksidantov upoštevamo njihovo ravnotežje in oskrbo s kombinacijo le-teh, kot da damo poudarek zgolj na posamezen antioksidant (Ji in Leichtweis, 1997).

Po do sedaj dostopnih literaturnih virih je bila objavljena zgolj ena študija na galoperjih, kjer so jim dajali dodatek CoQ₁₀. Rathgeber-Lawrence in sod. (1991) so v omenjeni študiji preučevali vpliv dodatka CoQ₁₀ na kardiovaskularni in mišično-skeletni sistem. V poskusu je sodelovalo 16 galoperjev, starih od 2 do 10 let. Osem konj iz omenjene skupine je prejelo dodatek CoQ₁₀, vmešan v dopolnilno krmno mešanico. Vsak konj je prejel 1,2 mg CoQ₁₀ na kg telesne mase. To je znašalo v povprečju 643,8 mg CoQ₁₀ na konja. Ostalih 8 konj je prejelo placebo. Skupno so konji prejeli dodatek CoQ₁₀ oz. placeba 6 tednov. Fizična vadba je obsegala trening konj trikrat tedensko, vsak drugi dan, na tekalni stezi. V vmesnih dnevih pa so bili konji v izpustu približno eno uro. Tu so imeli poseben režim treninga, sestavljen iz kasa in hoje, glede na odmerjen čas. Ugotovili so, da je dodatek signifikantno povišal nasičenost O₂ v venski krvi pri tretirani skupini, pri čemer naj ne bi prišlo do privzema O₂ v tkiva oz. naj bi bil ta privzem zelo majhen (Rathgeber-Lawrence in sod., 1991). Eden izmed možnih vzrokov za zmanjšanje privzema O₂ v tkiva je bil v obrambnem mehanizmu CoQ₁₀ pred povečanim nastankom ROS v mitohondrijih skeletnih mišic. Dodatek CoQ₁₀ je odstranil odvečne ROS in s tem zavaroval mitohondrijske membrane. Na ta način so lahko mitohondriji opravljali svojo funkcijo nemoteno in s tem porabljali O₂ z enako hitrostjo. Omenjeni mehanizem je omogočal mitohondrijem, da so proizvajali več ATP kot pod

normalnimi pogoji. Tako so tkiva posledično potrebovala manj O₂ (Rathgeber-Lawrence in sod., 1991). Žal pa avtorji niso merili koncentracije CoQ₁₀, tako da so to zgolj domneve.

Največ študij, kjer so športnim konjem dajali antioksidantni dodatek, je bilo narejenih z dodatkom α -tokoferola (Williams, 2010; Hargreaves, 2002; Siciliano in sod., 1997; McMeniman in Hintz, 1992; Petersson in sod., 1991). Kienzle in sod. (2006) so v svoji študiji konjem dodajali α -tokoferol oz. Se²⁺. Medtem ko so pripravek obeh, tako α -tokoferola kot Se²⁺, dodajali Härtlova in sod. (2008). Lamprecht (2010) pa je v svojem poskusu športnim konjem kasačem dajala SOD. V omenjenih študijah so preučevali vpliv dodatka antioksidantov na zmanjšanje kazalnikov oksidativnega stresa pri športnih konjih. Dodatek SOD ter α -tokoferola in Se²⁺ ni vplival na zmanjšan obseg oksidativnega stresa, povzročenega z vadbo (Lamprecht, 2010; Kienzel in sod., 2006; Härtlova in sod., 2008; Siciliano in sod., 1997). Padec SOD med in po vadbi so izmerili Cooke in sod. (2008) po enkratnem odmerku CoQ₁₀. Medtem ko se v našem poskusu SOD ni signifikantno razlikoval ne znotraj skupin kot tudi ne med skupinama. Signifikanten padec GPx po 8-tedenskem obdobju dajanja CoQ₁₀ smo izmerili pri tretirani skupini. Po sami vadbi je bil trend padca aktivnosti GPx enak pri obeh skupinah konj. Medtem ko je Lamprecht (2010) ugotovila signifikanten porast GPx po vadbi pri tretirani kot tudi pri placebo skupini. Endogeni antioksidanti so tako opravili vlogo obrambnega sistema in zato eksogeni vnos ni imel učinka (Lamprecht, 2010). V našem poskusu je GPx v 24 in 48 urah po vadbi porastel pri placebo skupini, pri tretirani pa je bil njegov padec še 24 ur po vadbi signifikantno nižji kot pred začetkom 8 tedenskega obdobja poskusa. Lamprecht (2010) je ugotovila, da sta povišana SOD in GPx kompenzatorno vplivala na oksidativni stres, povzročen z vadbo. Povišana aktivnost GPx je namreč nakazovala na povečano tvorbo H₂O₂ (Urso in Clarkson, 2003).

Povečan obseg lipidne peroskidacije lahko poškoduje membrane celic. Pri vadbi primarno pride do poškodb membran miocitov. Zato prihaja do povečanih aktivnosti CK in AST v plazmi kot odziv na poškodbe skeletnih mišic (Lindholm, 1987). Ker korelacije med MDA in CK ter AST niso bile statistične ne med skupinama kot tudi ne znotraj skupin, sklepamo, da do resnejših poškodb celic skeletnih mišic ni prišlo. Prav tako dodatek CoQ₁₀ ni imel vpliva na razlike med skupinama. So bile pa vrednosti CK nekoliko nižje pri tretirani skupini, vendar ne značilno, kar je v skladu z rezultati, ki so jih izmerili Östman in sod. (2012). Nasprotno so izmerili nižjo aktivnost CK pri tretirani skupini v primerjavi s placebom pri podganah (Kon in

sod., 2007; Shimomura in sod., 1991). V omenjenih študijah je CoQ₁₀ imel zaščitno vlogo pred poškodbami mišičnih celic. Hkrati pa je stabiliziral fosfolipidno membrano pred škodljivim učinkom ROS (Kon in sod., 2007). SOD, apliciran konjem, je po 60 dneh značilno zmanjšal aktivnost CK pri tretirani skupini konj v fazi mirovanja. Medtem ko na aktivnost CK po vadbi dodatek SOD ni vplival (Notin in sod., 2010). Prav tako dodatek α -tokoferola ni vplival na aktivnost CK tekom 90-dnevnega obdobja dodajanja (Siciliano in sod., 1997). Kljub vsemu pa so v nekaterih študijah dokazali pozitivno korelacijo med različnimi antioksidantnimi dodatki in aktivnostjo CK v plazmi (De Moffarts in sod., 2005; Kinnunen in sod., 2005b). Kinnunen in sod. (2005b) so izmerili manjši porast plazemske CK in AST po tretiranju z lipojsko kislino v primerjavi s placebo skupino. Ker so ALT, AP in GGT jetrni encimi, jim ne pripisujemo pomembnih vplivov na račun vadbe (McGowan, 2008). Tako tudi dodatek CoQ₁₀ ni imel vpliva na spremembe v aktivnostih omenjenih encimov. Enak trend kot je bil izmerjen pri poskusu fizioloških vrednosti, smo izmerili tudi v omenjenem poskusu 8-tedenskega dajanja CoQ₁₀ oz placeba. Kljub značilnim spremembam v aktivnosti teh encimov pa vadbi pripisujemo majhen vpliv (Kingston, 2004).

Glede na spremembe v vrednostih elektrolitov, TP, Alb in kreatinina pri obeh skupinah konj lahko povzamemo, da je do sprememb prišlo zaradi dehidracije, ki je bila posledica vadbe (Piccione in sod., 2010b; Nemec-Svete in sod., 2008; Coenen, 2005). Glede na rezultate lipidograma smo izmerili zgolj značilen padec v plazemskih TG 24 ur po vadbi pri obeh skupinah. Medtem ko dodatek CoQ₁₀ treniranim in netreniranim prostovoljcem (Cooke in sod., 2008) ni vplival na spremembe v lipidogramu. Enake rezultate so izmerili tudi ob dodatku α -tokoferola športnim konjem (Petersson in sod., 1991). Omenjeni rezultati nakazujejo, da je povišana vrednost TG v našem poskusu zgolj odziv na vadbo. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi Piccione in sod. (2010b) ter Tateo in sod. (2008) pri odzivu vadbe na spremembe fizioloških vrednosti. O dodatku CoQ₁₀ na ostale biokemijske parametre iz našega poskusa v literaturi nismo našli podatkov, ki bi nam pomagali pri razlagi vrednosti. Glede na enak trend spreminjanja vrednosti v placebo in tretirani skupini predvidevamo, da so omenjene spremembe posledica odziva konj na izvedbo fizične vadbe. Enak trend sprememb smo namreč izmerili tudi pri poskusu meritev fizioloških vrednosti.

Dodatek CoQ₁₀ v našem poskusu je signifikantno vplival na vrednosti Fe²⁺ med skupinama konj. Signifikantno višjo vrednost Fe²⁺ smo namreč izmerili pri tretirani skupini konj, po

vadbi. Fe²⁺ se veže na hem, ki skupaj z globinom tvori hemoglobin in je odgovoren za prenos O₂ po krvi (Robinson, 2007). Možna razlaga za porast Fe²⁺ v serumu je na račun povečanega razpada eritrocitov (Qian in sod., 2002). Kljub ne značilni razliki v številu eritrocitov, so bili ti višji v tretirani skupini konj v našem poskusu. Vendar pa je bil trend spreminjanja vrednosti enak pri obeh skupinah. Tudi trend porasta vrednosti Hgb in Hct po vadbi in padca po 24 urah je bil enak tako pri tretirani kot tudi pri placebo skupini in je sovpadal s trendom meritev fizioloških vrednosti. Kar je v skladu z dejstvom, da je sprostitvev eritrocitov iz vranice po vadbi posledica delovanja kateholaminov. S tem se je hkrati povečal prenos O₂ po krvi (Kingston, 2004b). CoQ₁₀ ima poleg vloge antioksidanta tudi funkcijo, da poveča sintezo ATP v transportni verigi elektronov v notranji mitohondrijski membrani. Pri podganah so ugotovili, da se je eksogeni CoQ₁₀ prenesel v notranjo mitohondrijsko membrano (Rathgeber-Lawrence in sod., 1991). Pod aerobnimi pogoji povečane količine ATP inhibirajo pretvorbo piruvata v procesu glikolize do končnega produkta, laktata (Gerard in Hodgson, 2001). V kolikor bi dodatek CoQ₁₀ vplival na povečano sintezo ATP v našem poskusu, bi bile vrednosti laktata pri tretirani skupini značilno nižje. Vendar pa razlik med skupinama ni bilo. Izmerili smo le enak trend povišanja po vadbi. Ta je bil celo signifikantno višji pri tretirani skupini kot pri placebo. Omenjenega fenomena si zaradi pomanjkanja podobnih študij ne znamo razlagati. Piruvat pretvarja v laktat z isto hitrostjo pri obeh skupinah konj (Rathgeber-Lawrence in sod., 1991). Tudi Weston in sod. (1997) ter Rathgeber-Lawrence in sod. (1991) niso izmerili vpliva dodatka CoQ₁₀ na razliko v vrednosti laktata med tretirano in placebo skupino.

CoQ₁₀ se sintetizira *de novo* v vsaki celici organizma. Iz tega lahko sklepamo, da v normalnih pogojih njegov eksogeni vnos ni potreben (Bhagavan in Chopra, 2006). Oksidativni stres, povzročen z vadbo, je nakazal, da je endogeni CoQ₁₀ skupaj z ostalimi antioksidanti obranil organizem konj. Zato konji niso potrebovali dodatnih količin eksogenega CoQ₁₀. Po drugi strani pa bi boljša absorpcija CoQ₁₀ lahko pripomogla k zmanjšanju obsega lipidne peroksidacije, in sicer tako, da bi omejila porast MDA ter ostalih kazalnikov oksidativnega stresa. V nadaljevanju bi bilo smiselno narediti biopsijo skeletnih mišic konj in ugotoviti vsebnost CoQ₁₀ pred in po tretiranju. S tem bi ugotovili ali je bil privzem omenjene substance v celice skeletnih mišic. Vsekakor bi bila zanimiva raziskava z dodatkom CoQ₁₀ konjem kasačem pri kronični vadbi, saj je obrambni mehanizem veliko bolj izčrpan kot pri akutni vadbi.

5.2 SKLEPI

- Vrednosti izbranih fizioloških parametrov in krvnih kazalcev oksidativnega stresa so bile pred izbrano fizično vadbo konj kasačev v mejah fizioloških vrednosti, ki jih navaja literatura.
- Ugotovili smo, da je izbrana fizična vadba konj v prvem delu poskusa privedla do biološkega odziva konj. To smo potrdili s signifikantnimi spremembami v izbranih fizioloških parametrih po vadbi.
- Izbrana vadba je privedla do povečane lipidne peroksidacije, saj smo po vadbi izmerili porast MDA. S tem smo potrdili prisotnost oksidativnega stresa, povzročenega z vadbo. Hkrati so se spremenili tudi nekateri kazalci oksidativnega stresa. MDA in CoQ₁₀ sta signifikantno negativno korelirala 48 ur po vadbi.
- Kljub povišanemu MDA po vadbi, pa nismo ugotovili korelacije med MDA in CK ter AST. Iz česar sklepamo, da do trajnejših poškodb mišičnih celic ni prišlo.
- Po enkratnem peroralnem odmerku 500 mg in 1000 mg CoQ₁₀ smo ugotovili značilen porast v plazemski koncentraciji CoQ₁₀ ($P > 0,05$).
- Razmerje AUC po aplikaciji 500 mg in 1000 mg CoQ₁₀ ni bilo enako 2, kar pomeni da ne gre za farmakokinetiko, ki je proporcionalna odmerku.
- Na podlagi farmakokinetične analize smo ugotovili nizko biološko uporabnost CoQ₁₀, kar bi lahko bila posledica slabe absorpcije pri konjih kasačih.
- Po 8 tednih dajanja CoQ₁₀ konjem v odmerku 600 mg je bila njegova plazemska koncentracija višja ($P < 0,05$) pri tretirani skupini, v primerjavi s placebo skupino.
- Ugotovili smo, da 8-tedensko peroralno dajanje CoQ₁₀ konjem v odmerku 600 mg na dan ni zmanjšalo stopnje lipidne peroksidacije in s tem oksidativnega stresa pri izbrani fizični vadbi konj.

6 POVZETEK

Fizična vadba je nujno potrebna za vzdrževanje fizične zmogljivosti konj kasačev. Prekomerna fizična vadba vodi v prekomeren nastanek RS. Biološki sistemi posedujejo obrambne mehanizme pred reaktivnimi zvrstmi, ki bodisi preprečujejo oksidativne poškodbe ali poškodovane molekule obnovijo oz. odstranijo. V kolikor je le-ta mehanizem porušen zaradi prekomernega nastajanja RS, pride do pojava oksidativnega stresa, ki lahko med drugim povzroči poškodbe makromolekul. S fizično vadbo povzročen oksidativni stres pri konjih privede predvsem do miopatij. Membrane miocitov, ki že fiziološko vsebujejo nižje vsebnosti antioksidantov kot ostale celice, so bolj dovzetne za lipidno peroksidacijo. Eden izmed produktov lipidne peroksidacije je malondialdehid (MDA). V študijah na konjih je le-ta parameter največkrat uporabljen pokazatelj lipidne peroksidacije. Zaradi intenzivne fizične vadbe pride v krvi do povečane vsebnosti mišičnih encimov, kot sta CK in AST. Oba navedena encima sta indikatorja poškodb mišic. Zato značilna pozitivna korelacija med MDA in CK ter AST nakazuje, da je s fizično vadbo izzvan oksidativni stres povzročil poškodbe membrane miocitov. Odziv organizma na fizično vadbo privede do fizičnega stresa, kar se kaže tudi v spremembah hematoloških in biokemijskih parametrov. Da bi preprečili oksidativni stres in poškodbe, nastale s fizično vadbo, različni avtorji priporočajo vnos antioksidantov s hrano. V zadnjem času je močno v porastu zanimanje za dodajanje CoQ₁₀. CoQ₁₀ po podatkih številnih avtorjev pripomore k zmanjšanju oksidativnega stresa in z njim nastalih poškodb kot posledic lipidne peroksidacije. Farmakokinetični profil vodotopne oblike CoQ₁₀ pri človeku kaže na povečan obseg in hitrost absorpcije ter povečano biološko uporabnost v primerjavi z ostalimi oblikami CoQ₁₀. Podatkov o plazemskih koncentracijah CoQ₁₀ pri športnih kasačih po do sedaj zbranih literaturnih virih ni.

Namen naloge v prvem delu je bil ugotoviti prisotnost fizičnega in oksidativnega stresa pri konjih kasačih. Zanimalo nas je, ali bodo pred treningom vrednosti izbranih fizioloških parametrov ter kazalcev oksidativnega stresa v mejah fizioloških vrednosti. Obenem smo želeli ugotoviti, ali bo s fizično vadbo izzvan oksidativni stres povzročil tudi poškodbe mišičnih encimov.

V drugem delu naloge, ki je zajemal farmakokinetiko CoQ₁₀, je bil naš namen izmeriti plazemske koncentracije CoQ₁₀ ter iz njih določiti $c_{\max}$. Hkrati nas je zanimal čas, pri katerem plazemska koncentracija doseže $c_{\max}$, AUC in biološko razpolovno dobo ($t_{1/2\beta}$) po enkratnem

dajanju dveh različnih odmerkov CoQ₁₀. Odmerke smo določili glede na alometrično skaliranje in določili višino odmerka 500 mg in 1000 mg. Zanimala nas je tudi proporcionalnost farmakokinetike z odmerkom.

Tretji del naloge je zajemal 8-tedensko obdobje dodajanja CoQ₁₀ konjem kasačem. Namen omenjenega dela je bil ugotoviti, ali bo pri tretirani skupini prišlo do zmanjšanja oksidativnega stresa in oksidativnih poškodb, nastalih s fizično vadbo, v primerjavi s kontrolno skupino.

V poskusu meritev izbranih fizioloških parametrov in krvnih kazalcev oksidativnega stresa so bili omenjeni parametri pred izvedbo vadbe v mejah fizioloških vrednosti. Spremembe hematoloških in biokemijskih parametrov so kazale na normalen fiziološki odziv konj na telesno vadbo. 24 oz. 48 ur po vadbi je bilo dovolj, da se je večina vseh hematoloških in biokemijskih parametrov vrnila na vrednosti boksa. V nasprotju pa je bil MDA povišan še 48 ur po vadbi, kar nakazuje na povečano lipidno peroksidacijo zaradi prekomernega nastajanja ROS med vadbo. Izmerili smo tudi signifikantno negativno korelacijo med MDA in CoQ₁₀ 48 ur po vadbi. Antioksidantni obrambni sistem ni bil dovolj močan, da bi organizem obranil pred oksidativnim stresom, povzročenim z vadbo. A slednji ni povzročil trajnejših poškodb mišičnih celic. Korelacije med MDA in CK ter AST namreč niso bile signifikantne.

Farmakokinetika CoQ₁₀ je po enkratnem peroralnem odmerku 500 mg in 1000 mg CoQ₁₀ pokazala majhno biološko uporabnost in s tem slabo absorpcijo omenjene lipofilne substance pri konjih. Kljub temu sta bila oba odmerka signifikantno višja glede na plazemsko koncentracijo CoQ₁₀. Razmerje AUC po aplikaciji 500 mg in 1000 mg CoQ₁₀ ni bilo enako 2, kar pomeni da ne gre za farmakokinetiko, ki je proporcionalna odmerku. V zadnjem delu študije smo ugotovili, da 8 tedensko obdobje dajanja CoQ₁₀ konjem v odmerku 600 mg ni zmanjšalo obsega oksidativnega stresa, nastalega z vadbo.

Kljub pričakovanim ugodnejšim rezultatom smo prispevali k novim dognanjem na področju poznavanja fizične zmogljivosti športnih konj kasačev po peroralnem vnosu CoQ₁₀. Predvsem zato, ker do danes še ni bilo objavljene nobene študije o farmakokinetiki CoQ₁₀ pri športnih konjih.

7 SUMMARY

Physical exercise is necessary for the maintenance of physical capacity of the standardbred horses. Excessive exercise can lead to enhanced production of RS. Biological systems possess defensive mechanisms against RS, which either prevent oxidative injuries or remove damaged molecules. If this mechanism is depleted due to increased overproduction of RS, oxidative stress occurs, resulting in cellular damage. Exercise-induced oxidative stress can lead to miocytes. The membranes of miocytes, that compared to other cells already contain lower levels of antioxidants, tend to be more susceptible to lipid peroxidation. One of the main products of lipid peroxidation is malondialdehyde (MDA). Most studies on horses have used MDA as a measure of oxidative stress imposed by exercise.

Skeletal muscle may be subjected to a greater level of oxidative stress during exercise. Therefore the increased levels of CK and AST could be seen after exercise. For this reason the positive correlation between MDA in CK and AST show that the oxidative stress is challenged during physical exercise which has caused injuries of miocytes membranes. Response of organism on physical training leads to physical stress, which is being showed also in changes of hematoloških and biochemical parameters. In order to prevent oxidative stress and injuries that were caused by physical exercise, various authors recommend entry of antioxidants with food. Recent research suggest that CoQ₁₀ plays crucial role as an antioxidant. Increased attention has been focused on this lipid compound as an inhibitor of lipid peroxidation, preventing oxidative stress induced damage. Pharmacokinetic profile of water-soluble coenzyme CoQ₁₀ in human shows the increased absorption and bioavailability in comparison to other formulations of coenzyme CoQ₁₀. To date there is no evidence on pharmacokinetic profile of CoQ₁₀ in standardbred horses.

The intention of the first part of the thesis was to find out the presence of physical and oxidative stress in standardbred horses. We were interested whether the values of chosen physiological parameters before the exercise will be within reference values. In addition, we were aiming to find out whether the challenged oxidative stress induced by physical exercise will cause any injuries or damage of the muscle enzymes.

The second part of our research has been focused on pharmacokinetic profile of CoQ₁₀. The intention of this part was to measure the plasma concentration of CoQ₁₀ and from them

determine c_{max} . Moreover, we were interested in the amount of time which is needed to reach the peak plasma concentration (t_{max}) and areas under curve (AUC) and plasma half-life values ($t_{1/2\beta}$) after single dose of two different doses. CoQ₁₀. The doses were determined according to the allometric scaling. We also determined the increases in amount of plasma concentration of CoQ₁₀ after one single oral dose of 500 mg and 1000 mg CoQ₁₀. Furthermore, we were also interested in proportion of pharmacokinetic with the dose of CoQ₁₀.

The third part of the present study consisted of 8 weeks supplementation of CoQ₁₀ or placebo to the standardbred horses. Our goal was to find out whether the supplemented CoQ₁₀ in trained group will have any effect on reduced amount of oxidative stress and oxidative injuries caused by physical exercise in comparison to control group.

In the first part of the present study, the changes of haematological and biochemical parameters reflect a normal physiological response to a selected field exercise test in standardbred horses. Twenty-four or 48 hours of rest was enough for most of the haematological and biochemical parameters to return to their box values after exercise. In contrast, plasma MDA continued to increase after exercise and reached its highest values 48 hours post exercise, which clearly indicates increased lipid peroxidation due to increased production of ROS during exercise. After 48 hours of rest significant negative correlation between MDA and CoQ₁₀ has been determined. However, the antioxidant system could not prevent from exercise-induced oxidative stress. Given the rapid decline of CK after exercise and the absence of significant correlations between MDA and serum muscle enzymes CK and AST, we can conclude that exercise-induced oxidative stress as evidenced by increased lipid peroxidation did not cause any permanent alteration in muscle cell integrity. On the basis of results from the present study we also conclude that the standardbred horses were in good fitness and condition.

After one single oral dose of 500 mg in 1000 mg CoQ₁₀ the pharmacokinetic profile of CoQ₁₀ has shown low absorption and bioavailability of mentioned lipophilic compound. Despite this, both doses were significantly higher than plasma CoQ₁₀ concentrations. We didn't prove proportional pharmacokinetic, as the relationship of AUC after use of both doses wasn't equal 2. Although in theory CoQ₁₀ could be beneficial for decreasing the exercise-induced oxidative stress, the present study could not demonstrate that such effects exist after 8 week of supplementation with a daily dose of 600 mg CoQ₁₀ to the standardbred horses. In spite of

expecting more favourable results, we somehow contributed to the new determinings in the field of physical capacity of the standardbred horses after oral supplementation of CoQ₁₀. Especially because there have been no studies yet published regarding the pharmacokinetic profile of CoQ₁₀ on standardbred horses.

9 ZAHVALE

Za vsestransko pomoč in zaupanje v naš projekt se zahvaljujem mentorici prof. dr. Silvestri Kobal.

Iskrena zahvala za pomoč, strokovno podporo ter vzpodbude tudi somentorju, doc. dr. Tomažu Vovku.

Hvala članom komisije doc. dr. Modestu Venguštu, prof. dr. Iztoku Grabnarju, doc. dr. Marku Volku ter prof. dr. Petru Dovču za tehten pregled doktorske naloge in nasvete.

Iskrena zahvala doc. dr. Alenki Nemec-Svete. Vaša nesebična pomoč, strokovnost in večni optimizem je definitivno pripomogel k nastanku in zaključku tega dela.

Hvala dr. Petri Jazbec Križman in prof. dr. Mirku Prošku za njuno pomoč pri analizi CoQ₁₀ in pripravku paste.

Zahvaljujem se tudi doc. dr. Petri Zrimšek za nesebično pomoč pri statistiki.

Hvala Aleksandru in študentkam Nini ter obema Nikama za pomoč pri laboratorijskem delu.

Hvala dragima prijateljicama Miji in Aleši za njun prispevek pri nastajanju omenjenega dela. Aleši posebna zahvala za slovensko lektoriranje.

Hvala g. Byrne za angleško lektoriranje uvoda.

Zahvala gre tudi dr. Alešu Snoju ter tehnikom na Inštitutu za fiziologijo, farmakologijo in toksikologijo za vso vašo nesebično pomoč.

Posebna zahvala gre družini Dolinšek, Mirku Gregorcu ter Žanu Milanu. Brez njihovih zmagovitih konj omenjene naloge ne bi bilo.

Hvala tudi dr. Petri Kramarič in dr. Vesni Kos Kadunc za pomoč pri izvedbi poskusa.

Tomažu hvala za razumevanje, potrpežljivost, podporo in ljubezen.

Hvala staršem ter sestricam Raheli, Ines in Larisi za vzpodbude. Rahela, hvala za prevode.

Hvala Tamari za pomoč pri reševanju računalniških zapletov.

10 REFERENCE

1. Al-Qudah KM, Al-Majali AM. Higher lipid peroxidation indices in horses eliminated from endurance race because of synchronous diaphragmatic flutter (Thumps). *J Vét Sci* 2008; 28: 573–8.
2. Al-Qudah KM, Al-Majali AM. Status of biochemical and antioxidant variables in horses before and after long distance race. *Rev Méd Vét* 2006; 157: 307–12.
3. Ankola DD, Viswanad B, Bhardway B, Ramarao P, Kumar MNVR. Development of potent oral nanoparticulate formulation of coenzyme Q₁₀ for treatment of hypertension: can the simple nutritional supplements be used as first line therapeutic agents for prophylaxis/therapy? *Eur J Pharm Biopharm* 2007; 67: 361–9.
4. Arslan M, Özcan M, Tosun C, Çöteliuğlu Ü, Matur E. The effects of physical exercise on some plasma enzymes and Ca and P levels in race horses. *J Fac Vet Med Univ Istanbul* 2002; 28: 91–7.
5. Art T, Lekeux P. Exercise-induced physiological adjustments to stressful conditions in sports horses. *Livest Prod Sci* 2005; 92: 101–11.
6. Avellini L, Chiaradia E, Gaiti A. Effect of exercise training, selenium and vitamin E on some free radical scavengers in horses (*Equus caballus*). *Comp Biochem and Physiol B* 1999; 123: 147–54.
7. Balogh N, Gaal T, Ribiczeyne PP, Petri A. Biochemical and antioxidant changes in plasma and erythrocytes of pentathlon horses before and after exercise. *Vet Clin Pathol* 2001; 30: 214–8.
8. Battino M, Ferri E, Gorini A, et al. Natural distribution and occurrence of coenzyme Q homologues. *Membr Biochem* 1990; 9: 179–90.
9. Banarjee AK, Madnal A, Chanda D, Chakraborti S. Oxidant, antioxidant and physical exercise. *Mol Cell Biochem* 2003; 253: 307–12.
10. Berzosa IC, Cebrián L, Fuentes-Broto E, et al. Acute Exercise Increases Plasma Total Antioxidant Status and Antioxidant Enzyme Activities in Untrained Men. *J Biomed Biotechnol* 2011; 1–7.
11. Bhagavan HN, Chopra RK. Plasma coenzyme Q₁₀ response to oral ingestion of coenzyme CoQ₁₀ formulations. *Mitochondrion* 2007; 7(suppl.1): S78–S88.
12. Bhagavan HN, Chopra RK. Coenzyme Q₁₀: absorption, tissue uptake, metabolism and pharmacokinetics. *Free Radical Res* 2006; 40: 445–53.
13. Belviranh M, Gökbel H. Acute exercise induced oxidative stress and antioxidant changes. *Eur J Gen Med* 2006; 3: 126–31.

14. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, eds. Biochemistry. 5th ed. New York: WH Freeman, 2001: 189-221.
15. Bergeo D, Assenza A, Caola G. Contribution to our knowledge of the physiology and metabolism of endurance horses. *Livest Prod Sci* 2005; 92: 167–76.
16. Boyer R. Temelji biokemije. Ljubljana: Študentska založba, 2005: 373–4.
17. Braun B, Clarkson PM, Freedson PS, Kohl RL. Effects of coenzyme Q10 supplementation on exercise performance, VO₂max, and lipid peroxidation in trained cyclists. *Int J Sport Nutr* 1991; 1: 353–65.
18. Bresjanac M. Izbrana poglavja iz patološke fiziologije. 8.izd. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, 1996: 25-40.
19. Brigelius-Flohé R, Winkler K, Müller C. Estimation of individual types of glutathione peroxidase. In: Sies H, Packer L, eds. Protein sensors and reactive oxygen species: selenoproteins and thioredoxin. London: Academic Press 2002: 101.
20. Burton GW, Ingold KU. Vitamin E: Application of the principles of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function. *Acc Chem Res* 1986; 19: 194–201.
21. Chiaradia E, Avellini L, Rueca F, et al. Physical exercise, oxidative stress and muscle damage in racehorses. *Comp Biochem Physiol B* 1998; 119: 833–6.
22. Cornelli U. Antioxidant use in nutraceuticals. *J Clin Dermatol* 2009; 27, 175–94.
23. Claramunt RM, López C, Pérez-Torralba M. Elguero J, Escames G, Acuña-Castroviejo D. Fluorinated indazoles as novel selective inhibitors of nitric oxide synthase (NOS): Synthesis and biological evaluation. *Bioorg Medic Chem* 2009; 17: 6180–7.
24. Clarkson PM, Thompson HS. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 637S–46S.
25. Clanton TL. Hypoxia-induced reactive oxygen species formation in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2007; 102: 2379–88.
26. Coenen M. Exercise and stress: impact on adaptive processes involving water and electrolytes. *Livest Prod Sci*; 2005: 131–45.
27. Constantinescu R, McDermott MP, DiCenzo R, de Blieck EA, Hyson HC, Flint Beal M in sod. A randomized study of the bioavailability of different formulations of coenzyme q10 (ubiquinone). *J Clin Pharm* 2007; 47: 1580–6.
28. Cooke M, Iosia M, Buford T, et al. Effects of acute and 14-day coenzyme Q10 supplementation on exercise performance in both trained and untrained individuals. *J Int Sports Nutr* 2008; 5:8.

29. Crane FL. Biochemical functions of coenzyme Q₁₀. J Am Coll Nutr 2001; 20: 519–98.
30. Crane FL, Navas P. The diversity of coenzyme Q function. Mol Aspects Med 1997; 18: s1–6.
31. Cuniberti B, Badino P, Odore R, Girardi C, Re G. Effects induced by exercise on lymphocyte β -adrenergic receptors and plasma catecholamine levels in performance horses. Res Vet Sci 2012; 92: 116–20.
32. Deaton CM, Marlin DJ, Smith NC, Harris PA, Schroter RC, Kelly FJ. Antioxidant supplementation in horses affected by recurrent airway obstruction. J Nutr 2004; 134: 2065S–7S.
33. Dekkers JC, van Doornen LJP, Kemper HCG. The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. Sports Med 1996; 21: 213–38.
34. De Moffarts B, Portier K, Kirschvink N, et al. Effects of exercise and oral antioxidant supplementation enriched in (*n*-3) fatty acids on blood oxidant markers and erythrocyte membrane fluidity in horses. Vet J 2007; 174: 113–21.
35. De Moffarts B, Kirschvink N, Art, T, Pincemail J., Lekeux P. Effect of oral antioxidant supplementation on blood antioxidant status in trained thoroughbred horses. Vet J 2005; 169: 65–74.
36. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. Nutr Metab Cardiovasc Dis 2005; 15: 316–28.
37. Dnevni podatki po postajah za leto 2010a. Meteorološki arhiv Agencije RS za okolje. Ljubljana, Agencija RS za okolje.
38. Dnevni podatki po postajah za leto 2011a. Meteorološki arhiv Agencije RS za okolje. Ljubljana, Agencija RS za okolje.
39. Dnevni podatki po postajah za leto 2010b. Arhiv radarskih slik Agencije RS za okolje. Ljubljana, Agencija RS za okolje.
40. Dnevni podatki po postajah za leto 2011b. Arhiv radarskih slik Agencije RS za okolje. Ljubljana, Agencija RS za okolje.
41. Dnevni informativni bilten 21. Oktobra 2011. Ljubljana, Ministrstvo za obrambo, Uprava RS za zaščito in reševanje.
<http://meteo.arso.gov.si/met/sl/climate/tables/yearbook/2011/station-data/> (1. Sept. 2012)
42. Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. Prog Lipid Res 2004; 43: 200–27.

43. Drüge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47–95.
44. Ernster L, Dallner G. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1271: 195–204.
45. Evans WJ. Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am J Clin Nutr* 2000; 72(suppl): 647S–52S.
46. Fisher-Wellman K, Bloomer RJ. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dyn Med* 2009, 8:1.
47. Frankiewicz JA, Szarska E. Anti-oxidant level to exercise in the blood endurance horses. *Biol Sport* 2000; 17: 217–27.
48. Gaby AR. The role of coenzyme Q10 in clinical medicine: Part I. *Altern Med Rev* 1996; 1(suppl.1): 11–7.
49. Gerard MP, Hodgson DR. Metabolic energetics of locomotion. In: Back W, Clayton HM, eds. *Equine locomotion*. London: Saunders, 2001: 327–29, 337, 339.
50. Gomes A, Fernandes E, Lima JLFC. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J Biochem Biophys Meth* 2005; 65: 45–80.
51. Gondim FJ, Zoppi CC, dos Reis Silveira L, Pereira-da-Silva L, Vaz de Macedo D. Possible relationship between performance and oxidative stress in endurance horses. *J Equine Vet Sci* 2009; 29: 206–12.
52. Górecka R, Sitarska E, Kluciński W. Antioxidant parameters of horses according to age, sex, breed and environmet. *Pol J Vet Sci* 2002; 5: 209–16.
53. Grotto D, Santa Maria L, Valentini J, et al. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quim Nova* 2009; 32: 169–74.
54. Güzel NA, Hazar S, Erbas D. Effects of different resistance exercise protocols on nitric oxide, lipid peroxidation and creatine kinase activity in sedentary males. *J Sports Sci Med* 2007; 6: 417–22.
55. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am J Clin Nutr* 1993; 57(suppl.5): 715S–25S.
56. Halliwell B, Gutteridge JMC, eds. *Free radicals in biology and medicine*. 4th ed. New York: Oxford University Press, 2010.
57. Hancock JT, Desikan R, Neill SJ. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem Soc Trans* 2001; 29: 345–50.
58. Harris PA, Harris RC. Ergogenic potential of nutritional strategies and substances in the horse. *Livest Prod Sci* 2005; 92: 147–65.

59. Hargreaves BJ. Vitamin E status and antioxidant status of endurance horses. Blacksburg: Faculty of the Virginia; Polytechnic Institute; State University 2002. Doktorska disertacija.
60. Hargreaves BJ, Kronfeld DS, Waldron JN, et al. Antioxidant status of horses during two 80-km endurance races. *J Nutr* 2002; 132: 1781–3.
61. Hatanaka J, Kimura Y, Lai-Fu Z, Onoue S, Yamada S. Physicochemical and pharmacokinetic characterization of water-soluble coenzyme Q₁₀ formulations. *Int J Pharm* 2008; 363: 112–7.
62. Härtlova H, Rajmon R, Dörflerová A, et al. Effect of dietary supplementation with Vitamin E and Selenium in thoroughbred horses on the concentration of F2-isoprostanes in the blood plasma as a marker of lipid peroxidation. *Acta Vet Brno* 2008; 77: 335–40.
63. Henry LEA, Halliwell B, Hall DO. The superoxide dismutase activity of various photosynthetic organisms measured by a new rapid assay technique. *FEBS Letters* 1976; 66: 303–6.
64. Hidaka T, Fujii K, Funahashi I, Fukutomi N, Hosoe K. Safety assessment of coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀). *BioFactors* 2008; 32: 199–208.
65. Hodgson DR, Rose RJ. Hematology and biochemistry. In: Hodgson DR, Rose RJ, eds. *The athletic horse: principles and practice of equine sports medicine*. Philadelphia: WB Saunders Company, 1994: 65–8.
66. Hosoe K, Kitano M, Kishida H, Kubo H, Fujii K, Kitahara M. Study on safety and bioavailability of ubiquinol (kaneka QHTM) after single and 4-week multiple oral administration to healthy volunteers. *Regul Toxicol Pharmacol* 2007; 47: 19–28.
67. Hyypä S. Endocrinal responses in exercising horses. *Liv Prod Sci* 2005; 92: 113–21.
68. James AM, Smith RA, Murphy MP. Antioxidant and prooxidant properties of mitochondrial coenzyme Q. *Arch Biochem Biophys* 2004; 423: 47–56.
69. Janež D. Koencim Q₁₀ in vitamini, topni v lipidih-vir večne mladosti? Prehranska dopolnila I: Minerali in vitamini: podiplomsko izobraževanje. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo 2009; 122–38.
70. Ji LL. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 222: 283–92.
71. Ji LL, Leichtweis S. Exercise and oxidative stress: sources of free radicals and their impact on antioxidant system. *Age* 1997; 20: 91–106.
72. Ji LL, Dillon DA, Bump KD, Lawrence LM. Antioxidant enzyme response to exercise in equine erythrocytes. *Equine Vet Sci* 1990; 10: 380–3.

73. Kaikkonen J, Tuomainen TP, Nyyssonen K, Salonen JT. Coenzyme Q10: absorption, antioxidative properties, determinants and plasma levels. *Free Radic Res* 2002; 36: 334-344.
74. Kaliora AC, Dedoussis GV, Schmidt H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis (Review). *Atherosclerosis* 2006; 187:1-17.
75. Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. Clinical biochemistry of domestic animals. 5th ed. California, Academic press 1997, 182-440.
76. Kedzierski W, Bergero D, Assenza A. Trends of hematological and biochemical values in the blood of young race horses during standardized field exercise tests. *Acta Vet Beograd* 2009; 59: 457-66.
77. Kienzle E, Freismuth A, Reusch A. Double-blind placebo-controlled bitamin E or selenium supplementation of sport horses with unspecified muscle problems. An example of the potential of placebos. *J Nutr* 2006; 136: 2045S-7S.
78. Kingston JK. Hematologic and serum biochemical responses to exercise and training. In: Hinchliff KW, Kaneps AJ, Geor RJ, eds. *Equine sports medicine and surgery*. Edinburgh: Saunders, 2004a: 939-48.
79. Kingston JK. Appendixex. In: Hinchliff KW, Kaneps AJ, Geor RJ, eds. *Equine sports medicine and surgery*. Edinburgh: Saunders, 2004b: 1295-301.
80. Kinnunen S, Atalay M, Hyyppä S, Lehmuskero A, Hänninen O, Oksala N. Effects of prolonged exercise on oxidative stress and antioxidant defense in endurance horse. *J Sports Sci Med* 2005a; 4: 415-21.
81. Kinnunen S, Hyyppä S, Lappalainen J, et al. Exerciseinduced oxidative stress and muscle stress protein responses in trotters. *Eur J appl Physiol* 2005b; 93: 496-501.
82. Kirschvink N, De Moffarts B, Lekeux P. The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *Vet J* 2008; 177: 178-91.
83. Kommuru TR, Ashraf M, Khan MA, Reddy K. Stability and bioequivalence studies of two marketed formulations of coenzyme Q₁₀ in beagle dogs. *Chem Pharm Bull* 1999; 47: 1024-8.
84. Kon M, Kimura F, Akimoto T, et al. Effect of Coenzyme Q₁₀ supplementation on exercise-induced muscular injury of rats. *Exerc Immunol Rev* 2007; 13: 76-88.
85. Kowaltowski AJ, Vercesi AE. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1999; 26: 463-71.
86. Kreft S, Pečar S. Vloga radikalov pri obolenjih. *Farm Vestn* 1998; 49: 469-81.
87. Laaksonen R, Fogelholm M, Himberg JJ, Laakso J, Salorinne Y. Ubiquinone supplementation and exercise capacity in trained young and older men. *Eur J Appl Physiol* 1995; 72: 95-100.

88. Lamprecht ED. Inflammatory and antioxidant status of horses undergoing intense exercise and nutritional supplementation. New Brunswick: Rutgers, The state University of New Jersey, 2010. Doktorska disertacija
89. Leelarungrayub D, Sawattikanon N, Klaphajone J, Pothongsunan P, Bloomer RJ. Coenzyme Q10 supplementation decreases oxidative stress and improves physical performance in young swimmers: A pilot study. *Open Sports Red J*, 2010; 4(1):e1–8.
<http://www.benthamscience.com/open/tosmj/articles/V004/1TOSMJ.pdf> (10. julij 2012)
90. Lenaz G, Fato R, Formiggini G, Genova ML. The role of coenzyme Q in mitochondrial electron transport. *Mitochondrion* 2007; 7: S8–S33.
91. Lindner A. Use of blood biochemistry for positive performance diagnosis of sport horses in practice. *Rev Méd Vét* 2000; 151: 611–8.
92. Lindholm A. Pathophysiology of exercise induced diseases of the musculoskeletal system of the equine athlete. In: Gillespie JR, Robinson NE. Eds. *Equine exercise physiology 2*. Davis, ICCEP Publications California: 1987: 711–27.
93. Liu ZX, Artmann C. Relative bioavailability comparison of different coenzyme Q10 formulations with a novel delivery system. *Altern Ther Health Med* 2009; 15: 42–6.
94. Lykkesfeldt J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clin Chim Acta* 2007; 380: 50–8.
95. Lykkesfeldt J, Svendsen O. Oxidants and antioxidants disease: oxidative stress in farm animals. *Vet J* 2007; 173: 502–11.
96. Manohar MMM, Goetz TE. Arterial hypoxemia in exercising thoroughbreds is not affected by pre-exercise nedocromil sodium inhalation. *Respir Physiol Neurobiol* 2003; 145–54.
97. Marlin DJ, Fenn K, Smith N, et al. Changes in circulatory antioxidant status in horses during prolonged exercise. *J Nutr* 2002; 132: 1622S–27S.
98. Marnett LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malonialdehyde. *Mutat Res* 1999; 424: 83–95.
99. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovaninni C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 2005; 16: 577–86.
100. Mateos R, Lecumberri E, Ramos S, Goya L, Bravo L. Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress. Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *J Chromatogr B* 2005; 827: 76–82.

101. Matés JM, Perez-Gomez C, De Castro IN. Antioxidant enzymes and human diseases. Clin Biochem 1999; 32: 595–603.
102. Matura T, Yamada K, Kawasaki T. Difference in antioxidant activity between reduced coenzyme Q9 and reduced coenzyme Q10 in the cell: studies with isolated rat and guinea pig hepatocytes treated with a water-soluble radical initiator. Biochim Biophys Acta 1992; 1123: 309–15.
103. McBride JM, Kraemer WJ. Free radicals, exercise, and antioxidants. J Strength Cond Res 1999; 13: 175–83.
104. McCord JM, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. J Biol Chem 1969; 244: 6056–63.
105. McGowan C. Clinical pathology in the racing horse: the role of clinical pathology in assessing fitness and performance in the racehorse. Vet Clin North Am Equine Pract 2008; 24: 405–21.
106. McMeniman NP, Hintz HF. Effect of vitamin E status on lipid peroxidation in exercised horses. Equine Vet J 1992; 24(6): 482–4.
107. Meteorološki arhiv Agencije RS za okolje. Ljubljana, Agencija RS za okolje
108. Miller NJ, Rice-Evans CA, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. Clin Sci 1993; 84: 407–12.
109. Milles MV, Horn P, Miles L, Tang P, Steele P, DeGrauw T. Bioequivalence of coenzyme Q₁₀ from over-the-counter supplements. Nutr Res 2002; 22: 919–29.
110. Mills PC, Higgins AJ. Oxidant injury, nitric oxide and pulmonary vascular function: Implications for the exercising horse. Vet J 1997; 153: 125–48.
111. Molyneux S, Florkowski C, Mcgrane Y, Lever M, George P. Concentration response to the coenzyme Q₁₀ supplement Q-gel in human volunteers. Nutr Res 2007; 27: 307–12.
112. Moradas-Ferreira P, Costa V. Adaptive response of the yeast *Sacharromyces cerevisiae* to reactive oxygen species: defences, damage and death. Redox Report 2000; 5(suppl.5): 277–85.
113. Moure A, Cruz JM, Franco D, et al. Natural antioxidants from residual sources. Food Chem 2001; 72: 145–71.
114. Mudway IS, Kelly FJ. Ozone and the lung: a sensitive issue. Mol Aspects Med 2000; 21: 1–48.
115. Muir W. Recognizing and treating pain in horses. In: Reed SM, Bayly WM, Sellon DC, eds. Equine internal medicine. 2nd ed. St Louis: Saunders, 2004: 1529–41.

116. Nemec-Svete A, Čebulj-Kadunc N, Krulc P. Influence of a calmativ on selected blood parameters in horses under stessful conditions. *Acta Vet (Beogr)* 2008; 58: 509–19.
117. Niklowitz P, Sonnenschein A, Janetzky B, Andler W, Menke T. Enrichment of coenzyme Q₁₀ in plasma and blood cells: defense against oxidative damage. *Int J Biol Sci* 2007, 3: 257–62.
118. Nishimura A, Yanagawa H, Fujikawa N, Kiriyaama A, Shibata N. Pharmacokinetic profiles of coenzyme Q₁₀: absorpion of three different oral formulations in rats. *J Health Sci* 2009; 55: 540–48.
119. Nordberg J, Arner ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants: and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biol Med* 2001; 31: 1287–312.
120. Notin C, Vallon L, Desbordes F, Leleu C. Oral supplementation with superoxide dismutase in Standardbred trotters in training: a double-blind placebo-controlled study. *Equine Vet J* 2010; 42(suppl.38): 375–81.
121. Ogoński T, Piłkuła R, Majewski G. Blood plasma antioxidants and dehydration in three-month-long trained Standardbred trotters before and after an intensive race. *Med Wet* 2008; 64: 421–26.
122. Östman B, Sjödin A, Michaëlson K, Byberg L. Coenzyme Q₁₀ supplementation and exercise-induced oxidative stress in humans. *Nutrition* 2012; 28: 403–17.
123. Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *FRBM* 1995; 19: 227–50.
124. Padalino B, Rubino G, Centoducati P, Petazzi F. Training versus overtraining: evaluation of two protocols. *J Equine Vet Sci* 2007; 27: 28–31.
125. Palamakula A, Soliman M, Khan MM. Regional permeability of coenzyme Q₁₀ in isolated rat gastrointestinal tracts. *Pharmazie* 2005; 60: 212–4.
126. Petersson KH, Hintz HF, Schryver HF, Combs GF. The effect of Vitamin E on membrane integrity during submaximal exercise. *Equine Exerc Physiol* 1991; 3: 315–22.
127. Piccione G, Messina V, Casella S, Giannetto C, Caola G. Blood lactate levels during exercise in athletic horses. *Comp Clin Pathol* 2010a; 19: 535–9.
128. Piccione G, Casella S, Gianetto C, et al. Haematological and haematological responses to training and competition in standardbred horses. *Comp Clin Pathol* 2010b; 19: 95–101.
129. Piccione G, Casella S, Monteverde V, Gianetto C, Caola G. Haematological modifications during official 1600 and 2000 meters trot races in standardbred horses. *Acta Vet Beograde* 2008; 58: 325–32.

130. Piccione G, Fazio F, Giannetto C, Assenza A, Giovanni C. Oxidative stress in thoroughbreds during official 1800-meters races. *Vet Arh* 2007; 77: 219–27.
131. Pilz J, Meineke I, Gleiter CH. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivate. *J Chromatogr* 2000; 742: 315–25.
132. Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev* 2008; 88: 1243–76.
133. Pösö AR, Hyyppä S, Geor RJ. Metabolic responses to exercise and training. In: Hinchliff KW, Kaneps AJ, Geor RJ, eds. *Equine sports medicine and surgery*. Edinburgh: Saunders, 2004: 777–780.
134. Prošek M, Butinar J, Lukanc B, et al. Bioavailability of water-soluble CoQ₁₀ in beagle dogs. *J Pharmaceut Biomed Anal* 2008; 47: 918–22.
135. Prošek M, Šmidovnik A, Fir M, et al. Nova vodotopna oblika koencima Q₁₀ v obliki inkluzijskega kompleksa z beta-ciklodekstrinom, postopek njegove priprave in njegova uporaba. Slovenski patent št. 21783, objavljen 31.12.2005. Ljubljana: Urad RS za intelektualno lastnino, 2005: 18 str.
136. Qian, ZM, Sheng XD, Liao QK, Ping HK, 2002. Effect of different durations of exercise on transferrin-bound iron uptake by rat erythroblast. *J Nutr Biochem* 2002; 13: 47–54.
137. Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Inter Aging* 2007; 2: 219–36.
138. Rathgeber-Lawrence R, Ratzlaff M, Grant BD, Grimes KL. The effects of coenzyme Q₁₀ as a nutritional supplement on musculoskeletal fitness in the exercising horse. *Proceedings of the 10th Annual Meeting of the Association for equine Sports Medicine*. Reno, Nevada, 1991: 30-4.
139. Ricketts SW. Hematologic and biochemical abnormalities in athletic horses. In: Hinchcliff KW, Kaneps AJ, and Geor RJ, eds. *Equine sports medicine and surgery*, Edinburgh: Saunders 2004: 950–66.
140. Robinson NE. Gas transport in the blood. In: Cunningham JG, Klein BG, eds. *Veterinary physiology*. 4th ed. St Louis: Saunders, 2007: 596.
141. Sachdev S, Davies KJA. Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radic Bio Med* 2008; 44: 215–23.
142. Sacheck, JM, Blumberg J.B. Role of Vitamin E and oxidative stress in exercise. *Nutrition* 2001; 17: 809–14.
143. Sen CK. Oxidants and antioxidants in exercise. *J Appl Physiol* 1995; 79: 675–86.

144. Shimomura Y, Suzuki M, Sugiyama S, Hanaki Y, Ozawa T. Protective effect of coenzyme Q10 on exercise-induced muscular injury. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 176: 349–55.
145. Siciliano PD, Parker AL, Lawrence LP. Effect of dietary vitamin E supplementation on the integrity of skeletal muscle in exercised horses. *J Anim Sci* 1997; 75: 1553–60.
146. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* 1991; 91: 31–8.
147. Sivertsen T, Øvernes G, Østerds O, Nymoen U, Lunder T. Plasma vitamin E and blood selenium concentration in Norwegian dairy cows: regional differences and relations to feeding and health. *Acta Vet Scand* 2005; 46: 177–91.
148. Slaughter MR, O'Brian PJ. Fully-automated spectrophotometric method for measurement of antioxidant activity of catalase. *Clin Biochem* 2000; 33: 525–34.
149. Soffler C. Oxidative stress. *Vet Clin North Am: Equine Prac* 2007; 23: 135–57.
150. Sohal RS, Forster MJ. Coenzyme Q, oxidative stress and aging. *Mitochondrion* 2007; 7S (7suppl): S103–11.
151. Snow DH, Mason DK, Ricketts SW, Douglas TA. Post-race blood biochemistry in thoroughbreds. In: Snow DH, Persson SGB, Rose RJ, eds. *Equine exercise physiology: exercising*. Cambridge: Granta Edition, 1983: 397.
152. Snow DH, Kerr MG, Nimmo MA, Abbott EM. Alterations in blood, sweat, urine, and muscle composition during prolonged exercise in the horse. *Vet Rec* 1982; 110: 377–84.
153. Šuput D, Kramarič L. Prosti radikali. Izbrana poglavja iz patološke fiziologije. 8. izd. Ljubljana: Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, 1996: 41.
154. Tateo A, Padalino B, Boccaccio M, Maggiolino A, Centoducati P. Transport stress in horses: effects of two different distances. *J Vet Behav* 2012; 7: 33–42.
155. Tateo A, Valle E, Padalino B, Centoducati P, Bergero D. Change in some physiologic variables induced by Italian traditional conditioning in Standardbred yearling. *J Equine Vet Sci*; 2008; 28: 743–50.
156. Tedeschi D, Baragli P, Pellegrini Masini A, et al. Plasma Coenzyme Q10 in untrained horses during incremental exercise on treadmill. In. 2nd Conference of the International Coenzyme Q10 association. Frankfurt, Germany, 2000: 1–3.
157. Teixeira-Neto AR, Ferraz GC, Moscardini ARC, Balsamão GM, Souza JCF, Queiroz-Neto A. Alterations in muscular enzymes of horses competing long-distance endurance rides under tropical climate. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2008; 60: 543–49.

158. Terao K, Nakata D, Fukumi H, et al. Enhancement of oral bioavailability of coenzyme Q₁₀ by complexation with γ -cyclodextrin in healthy adults. *Nutr Res* 2006; 26: 503–8.
159. Tomono Y, Hasegawa J, Seki T, Mmotegi K, Morishita N. Pharmacokinetic study of deuterium-labelled coenzyme Q₁₀ in man. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1986; 24: 536–41.
160. Turunen M, Olsson J, Dallner G. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1660: 171–99.
161. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology* 2003; 189: 41–54.
162. Valberg S, Jönsson L, Lindholm A, Holgren N. Muscle histopathology and plasma aspartat aminotransferase, creatin kinase and myoglobin changes with exercise in horses with recurrent exertional rhabdomyolysis. *Equine Vet J* 1993; 25: 11–6.
163. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44–84.
164. Valko M, Morris H, Mazur M, Raptá P, Bilton RF. Oxygen free radical generating mechanisms in the colon: do the semiquinones of vitamin K play a role in the aetiology of colon cancer. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1527: 161–6.
165. Van Lente F, Pepoy M. Coupled-Enzyme determination of catalase activity in erythrocytes. *Clin Chem* 1990; 36: 1339–43.
166. Wagner E, Potter GD, Gibbs PG, et al. Copper, zinc-superoxide dismutase activity in exercising horses fed two forms of trace mineral supplements. *J Equine Vet Sci* 2010; 30: 31–37.
167. Weber C, Bysted A, Hølmer G. Intestinal absorption of Coenzyme Q₁₀ administered in a meal or as capsules to healthy subjects. *Nutr Res* 1997; 6: 941–5.
168. Welling PG. Pharmacokinetics: Processes, mathematics and application. 2nd ed. (ACS Professional reference books). Washington: American Chemical Society, 1997: 4–5.
169. Weston SB, Zhou S, Weatherby RP, Robson SJ. Does exogenous Coenzyme Q₁₀ affect aerobic capacity in endurance athletes? *Int J Sport Nutr* 1997; 7: 197–206.
170. White A, Estrada M, Walker K, et al. Role of exercise and ascorbate on plasma antioxidant capacity in thoroughbred race horses. *Comp Biochem Physiol A* 2001; 128: 99–104.
171. Williams CA. Antioxidant research and its application to feeding horses. In: Feeding and veterinary management of the sport horse. 17th Kentucky equine research nutrition conference. Lexington, 2010; 17–22.

172. Williams CA, Kronfeld DS, Hess TM, et al. Comparison of oxidative stress and antioxidant status in endurance horses in three 80 km races. *Equine Comp Exerc Physiol* 2005; 2: 153–7.
173. Williams CA, Kronfeld DS, Hess TM, et al. Antioxidant supplementation and subsequent oxidative stress of horses during an 80-km endurance race. *J Anim Sci* 2004; 82: 588–94.
174. Williams CA, Kronfeld DS, Hess TM, et al. Oxidative stress in horses in three 80 km races. *Equine Nutr Phys Soc Proc* 2003; 18: 47–52.
175. Winrow VR, Winyard PG, Morris CJ, Blake DR. Free radicals in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction. *Br Med Bull* 1993; 49: 506–22.
176. Witt EH, Reznick AZ, Viguie CA, Starke-Reed P, Packer L. Exercise, oxidative damage and effects of antioxidant manipulation. *J Nutr* 1992; 122: 766–73.
177. Wu M, Lin Z, Wolfbeis OS. Determination of the activity of catalase using a europium(III)-tetracycline-derived fluorescent substrate. *Anal Biochem* 2003; 320: 129–35.
178. Zaghloul A, Gurley B, Khan M, Bhagavan H, Chopra R, Reddy I. Bioavailability assessment of oral coenzyme Q10 formulations in dogs. *Drug Dev Ind Pharm* 2002; 28: 1195–200.
179. Zhang Y, Turunen M, Appelkvist E. Restricted uptake of dietary coenzyme Q is in contrast to the unrestricted uptake of α -tocopherol into rat organs and cells. *J Nutr* 1996; 126(suppl.9): 2089–97.
180. Zhang Y, Aberg F, Appelkvist EL, Dallner G, Ernster L. Uptake of dietary coenzyme Q supplement is limited in rats. *J Nutr* 1995; 125: 446–53.
181. Zhao B, Tham SJ, Lu J, Lai MH, Lee LKH, Moomchhala SM. Simultaneous determination of vitamins C, E and β -carotene in human plasma by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *J Pharm Pharma Sci* 2004; 7: 200–4.
182. Zhou, S, Zhang Y, Davie A, et al. Muscle and plasma coenzyme Q10 concentration, aerobic power and exercise economy of healthy men in response to four weeks of supplementation. *J Sports Med Phys Fitness* 2005; 45: 337–46.
183. Zobba R, Ardu M, Niccolini S, et al. Physical, haematological, and biochemical responses to acute intense exercise in polo horses. *J Equine Vet Sci* 2011; 7 str.
184. Žmitek J, Žmitek K. Koencim Q₁₀ kot prehransko dopolnilo in zdravilo. *Pharm J Of Slovenia* 2009; 60: 150–7.
185. Žmitek J, Šmidovnik A, Fir M, et al. Relative bioavailability of two forms of a novel water-soluble Coenzyme Q₁₀. *Ann Nutr Metab* 2008; 52: 281–7.