

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



Vliv doplňku omega 3 a omega 6 mastných kyselin na vnitřní prostředí dostihových koní v zátěži

Diplomová práce

Autor diplomové práce: Marcela Mádlíková

Vedoucí diplomové práce: MVDr. Härtlová Helena CSc.

© 2013 ČZU v Praze

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Vliv doplňku omega 3 a omega 6 mastných kyselin na vnitřní prostředí dostihových koní v zátěži“ vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které uvádím a cituji.

V Praze dne:

.....

podpis autora práce

Poděkování

Děkuji MVDr. Heleně Härtlové, CSc. za odborné vedení a poskytnutí studijních materiálů, které mi pomáhaly při zpracování této diplomové práce. Děkuji také Ing. Lukáši Zitovi, Ph.D. a Ing. Josefu Haklovi, Ph.D. za pomoc při statistickém zpracování. Poděkování patří i Ing. Kateřině Mikešové za poskytnuté informace. V neposlední řadě děkuji rodičům za podporu během celého studia.

SOUHRN

Fyzická zátěž zvyšuje v organismu koní produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), které způsobují poškození buněčných membrán tkání lipidovou peroxidací. Svalová tkáň je k lipoperoxidaci, ve srovnání s jinými tkáněmi těla, náchylnější, protože obsahuje méně antioxidantů, které by ji před nadprodukcí ROS chránily. Antioxidační obranný systém je tvořen enzymatickými a neenzymatickými antioxidanty. Ve srovnání s člověkem nemají zvířata tak vysokou koncentraci neenzymatických antioxidantů. Proto je zejména u koní zařazených do vrcholového sportu nutný příjem antioxidantů v krmné dávce. Jedním z vhodných doplňků antioxidantů do krmné dávky plnokrevných koní v plném tréninku se jevil přídavek oleje z pupalky dvouleté (*Oenothera biennis*) s vyšším obsahem mastných kyselin a to kyseliny α -linolenové, kyseliny γ -linolenové, kyseliny linolové a kyseliny olejové.

Cílem studie bylo potvrdit zlepšení antioxidační kapacity organismu plnokrevných koní v maximální zátěži po podání pupalkového oleje. 16ti-týdenní experiment byl proveden na 10ti klinicky zdravých plnokrevných koních. Každý z těchto koní byl v běžném tréninkovém programu. Prvních 8 týdnů experimentu byli koně krmeni dietou, odpovídající zátěži koní, bez pupalkového oleje (první 3 odběry krve) a dalších 8 týdnů stejnou dietou doplněnou o 150 ml oleje z pupalky dvouleté (následné 3 odběry krve). Sledovanými ukazateli úrovně antioxidantů byla celková antioxidační aktivita (TAS) a kyselina močová (UA). Míra lipidové peroxidace byla měřena pomocí testu pro látky reagující s kyselinou thiobarbiturovou (TBARS) a doplněna o změny aktivit vybraných svalových enzymů aspartátaminotranferázy (AST) a kreatinkinázy (CK). Zároveň byl sledován vliv na energetický a tukový metabolismus prostřednictvím vybraných metabolitů, a to glukózy a triacylglycerolů (TAG) a hormonu inzulinu. Biochemické analýzy byly provedeny komerčními kity. Statisticky byly hodnoceny odběry s přídavkem EPO (4., 5., 6. odběr) a jako kontrolní byl stanoven odběr č. 3 tj. v 0tý den podávání EPO. Předchozí odběry nebyly do statistických sledování zahrnuty.

Bylo prokázáno, že příjem pupalkového oleje v dávce 150 ml statisticky významně snížil hodnoty TBARS, inzulinu a zvýšil hodnoty glykémie a TAG. Studie neprokázala statisticky významný vliv na hodnoty kyseliny močové, TAS a svalových enzymů AST a CK. Závěrem lze konstatovat, že doplněk pupalkového oleje měl pozitivní vliv na snížení oxidativního stresu organismu a na energetický metabolismus dostihových koní v zátěži a jeho použití lze doporučit jako efektivní doplněk krmné dávky pro zlepšení zdravotního stavu koní v zátěži.

KLÍČOVÁ SLOVA

oxidační stres, volné radikály, antioxidanty, zátěž, Pupalka dvouletá

SUMMARY

Physical exercise increases a production of reactive oxygen species (ROS) in equine organism. ROS cause damage to cell membranes of tissues by lipid peroxidation. Muscle tissue is much more susceptible to lipoperoxidation, as compared to other body tissues, because it contains less antioxidants, which should be protected against over-production of ROS. The antioxidant defense system consists of enzymatic and non-enzymatic antioxidants. Animals do not have such a high concentration of non-enzymatic antioxidants in comparison with human. Therefore, especially horses enrolled in top-level sport require intake of antioxidants in the diet. One of the suitable supplements of antioxidants in the diet of thoroughbred horses in full training appears to be an addition of evening primrose oil (*Oenothera biennis*) with a higher content of fatty acid such as α -linolenic acid, γ -linolenic acid, linoleic acid and oleic acid.

The aim of the study was to confirm the improvement of the antioxidant capacity of the organism of thoroughbred horses in maximal exercise after the supplementation of evening primrose oil. 16-week experiment was conducted on 10 clinically healthy thoroughbred horses. Each of these horses was in normal training program. The first 8 weeks of the experiment, horses were fed by a diet without primrose oil (first 3 blood tests) and another 8 weeks the same diet was supplemented with 150 ml of evening primrose oil (subsequent 3 blood tests). The monitored indicators of antioxidants levels were total antioxidant activity (TAS) and uric acid (UA). The rate of lipid peroxidation was measured by thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) and it was accompanied by monitoring of changes in muscle enzyme activities of aspartate aminotransferase (AST) and creatine kinase (CK). We also monitored the influence on the energy and fatty metabolism by selected metabolites such as glucose, triacylglycerols (TAG) and the hormone insulin. Biochemical analyzes were performed by commercial kits. Samples with addition of EPO (3rd, 4th, 5th sampling) were statistically evaluated and sample No. 3 was determined as a control (means 0 day addition of EPO). Previous samples were not included in the statistical monitoring.

It has been shown that the intake of primrose oil in amount of 150 ml significantly decreased the values of TBARS, insulin and increased levels of blood glucose and TAG. Study did not show a statistically significant effect on uric acid levels, TAS and muscle enzymes AST and CK. It can be concluded that evening primrose oil supplement had a positive effect on the

reduction of oxidative stress of the organism and energy metabolism of race horses during exercise and it can be recommended as an effective supplement of diet for improving the health status of horses during exercise.

KEY WORDS

oxidative stress, free radicals, antioxidants, exercise, Evening Primose

1	ÚVOD.....	2
2	CÍL PRÁCE.....	4
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	5
3.1	Reakce organismu na zátěž	5
3.1.1	Anaerobní zátěž	6
3.1.2	Aerobní zátěž	7
3.2	Oxidativní stres	10
3.2.1	Exogenní a endogenní oxidanty.....	11
3.2.2	Antioxidanty	12
3.2.2.1	Neenzymatické antioxidanty	13
3.2.2.2	Enzymatické antioxidanty	17
3.3	Vliv zátěže na rovnováhu oxidantů a antioxidantů.....	18
3.4	Vybrané parametry energetického metabolismu.....	19
3.4.1	Inzulin	19
3.4.2	Glukóza.....	22
3.4.3	Triacylglyceroly (TAG).....	23
3.4.4	Kyselina močová (UA).....	24
3.4.5	Kreatinkináza (CK).....	25
3.4.6	Aspartátaminotransferáza (AST)	25
3.4.7	TBARS.....	26
3.4.8	Celková antioxidační kapacita (TAS).....	27
3.5	Pupalka dvouletá	27
4	MATERIÁL	29
4.1	Charakteristika vybrané skupiny koní.....	29

4.2	Charakteristika krmné dávky	29
4.2.1	Pupalkový olej	30
4.3	Charakteristika oblasti.....	31
5	METODIKA.....	31
5.1	Odběry.....	31
5.2	Metody stanovení	31
5.2.1	Inzulin	31
5.2.2	Glukóza.....	34
5.2.3	Triacylglyceroly (TAG).....	34
5.2.4	Kyselina močová (UA)	34
5.2.5	Kreatinkináza (CK).....	35
5.2.6	Aspartátaminotransferáza (AST)	35
5.2.7	TBARS.....	36
5.2.8	Celkový antioxidační status (TAS).....	38
5.3	Přístroje	39
5.4	Komerční kity.....	40
5.5	Statistické vyhodnocení výsledků	41
6	VÝSLEDKY.....	41
7	DISKUZE	47
7.1	Vliv přídavku EPO na oxidační status a antioxidační úroveň organismu koní v zátěži 47	
7.2	Vliv přídavku EPO na vybrané parametry energetického a tukového metabolismu .48	
8	ZÁVĚR.....	50
	LITERATURA	51

9	PŘÍLOHY	57
9.1	Příloha 1 – grafy	57
9.2	Příloha 2 – Pupalka dvouletá - rostlina	59
9.3	Příloha 3 – Pupalka dvouletá – semena.....	60
9.4	Příloha 4 – Luka Racing Bošovice.....	60
9.5	Příloha 5 – stanovení TBARS	61

1 ÚVOD

V dnešní době je význam koně v oblasti společenské, kulturní a sportovní. Ze sportovních a rekreačních aktivit je věnována velká pozornost dostihovému sportu. Je nejstarší a zároveň nejatraktivnější pro diváky i pro chovatele. Pro tento rychlostní sport je vyšlechtěn kůň plemene anglický plnokrevník a výkony v dostizích slouží jako kritéria pro zařazení do chovu.

Pozornost odborné veřejnosti a výzkumu je zaměřena na výkonnost koní, na procesy organismu při zátěži, na adaptaci tkání na zátěž, na dieteticky vyrovnané složení diety, poskytující co nejlepší konverzi živin v maximální výkon.

Výkonnost dostihových koní závisí především na genetických předpokladech a funkční výkonnostní kapacitě organismu. Tyto genetické a funkční předpoklady jsou pak ovlivněny vlivy vnějšího prostředí, které působí na výkonnost koně. Do komplexu těchto vlivů patří v první řadě vlastní trénink a výživa, pak také makroklima tréninkového prostředí, mikroklima stáje, způsob ustájení, ošetřování atd. (Hanák a Olehla, 2010).

Výkon – zátěž je stresor. Vyžaduje cirkulaci, mobilizaci energie a udržování konstantní tělesné teploty. Tyto mechanismy působí na senzory v regulačním systému a vedou k formulaci správné odpovědi. V průběhu zátěže vzniká oxidativní stres, který má u sportovních koní potenciální vliv na zdravotní stav a reaktivitu svalového aparátu, dýchacího a pohybového systému a tím také na optimální výkon. Oxidativní stres představuje nárůst volných radikálů a reaktivních kyslíkových forem (ROS) v buňkách, kde se hromadí ve vyšších než běžných hladinách. Při nadbytku oxidačního stresu dochází k porušení rovnováhy produkce volných radikálů a antioxidantů. ROS a volné radikály poškozují buňky a tkáně, zejména mitochondrie, buněčné membrány, DNA, proteiny a lipidy. Vyrovnanou kvalitativně i kvantitativně optimální krmnou dávku se snažíme tyto vedlejší produkty stresu eliminovat. Hlavní úlohu ve výživě dostihového koně sehraávají zejména energetické složky (sacharidy, tuky) a stavební (bílkoviny) a minerální látky a vitamíny. Nedostatek potřebných energetických zdrojů (sacharidů a tuků) vede k poklesu výkonnosti. K eliminaci volných radikálů a ROS slouží saturace antioxidanty. Hlavní role antioxidantů spočívá v inaktivaci nebo transformaci oxidantů a zabránění nebo omezení oxidačního poškození látek ROS a volnými radikály. U koní, doplňky stravy s antioxidanty podněcují zvýšení antioxidační ochrany v extracelulární kapalině a krevních buňkách a tím dochází k lepší regeneraci organismu po zátěži.

Problematika volných radikálů, oxidačního stresu a antioxidačních schopností organismu je nyní v centru zájmu výzkumu se zaměřením na výkonnostní schopnosti dostihových koní. S ohledem na fakt, že volné radikály mohou významně poškozovat lipidy, proteiny, nukleové kyseliny a tím způsobovat chorobné změny, je jim věnována stále větší pozornost.

2 CÍL PRÁCE

Hypotéza: Zátěž znamená pro dostihové koně stresovou situaci, která se prezentuje ve vnitřním prostředí změnami, které odrážejí vybrané biochemické ukazatele. V současnosti stojí ve středu zájmu právě oxidativní stres a antioxidační mechanismy organismu zvířete. Doplněk pupalkového oleje by měl mít díky svému vysokému obsahu omega 3 a omega 6 mastných kyselin pozitivní vliv na míru oxidativního stresu a na energetický metabolismus organismu dostihového koně v zátěži.

Základním cílem této diplomové práce bylo sledovat v průběhu tréninkové periody dopad omega 3 a omega 6 mastných kyselin přidaných do krmné dávky dostihových koní na míru oxidativního stresu sledovaného pomocí celkové antioxidační kapacity, kyseliny močové, testu pro látky reagující s kyselinou thiobarbiturovou, aspartátaminotransferázy a kreatinkinázy a jejich dopad na energetický metabolismus sledovaný prostřednictvím inzulinu, glykémie a triacylglycerolů.

V rámci řešení byly dále určeny tyto cíle:

- Vypracování literární rešerše na téma oxidativního stresu v organismu dostihového koně při zátěži, biochemických změn ve vnitřním prostředí zvířete a sledovaných parametrů.
- Zpracování odebraných vzorků.
- Analýza vybraných biomarkerů: inzulin, glykémie (GLC), triacylglyceroly (TAG), celková antioxidační kapacita (TAS), test pro látky reagující s kyselinou thiobarbiturovou (TBARS), kyselina močová (UA), kreatinkináza (CK) a aspartátaminotransferáza (AST).

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Reakce organismu na zátěž

Zátěž může být definována jako plánovaná strukturovaná činnost, která vede ke zvýšení energetického výdeje a srdeční frekvence. Existují různé druhy zátěže ve vztahu k intenzitě (aerobní a anaerobní), ke svalové kontrakci (izometrická, koncentrická a excentrická), a k frekvenci (akutní a chronická); (Gomes et al., 2012).

Reakce organismu na zátěž se dělí na bezprostřední reakci a postupnou adaptaci. Bezprostřední reakce je rychlá odpověď organismu na stresor. Její rychlost se pohybuje v rozmezí několika sekund, minut nebo hodin. Uskutečňuje se především prostřednictvím vzrušivých soustav organismu, které jsou k těmto funkcím předem připraveny (především nervový a endokrinní systém). Pro adaptaci nejsou zprostředkující soustavy organismu předem připraveny. Vlivem opakovaných podnětů (zátěží) dochází postupně k přestavbě příslušných orgánů a jejich funkcí, čímž reakce přejde v trvalý stav - adaptaci. Jde o proces značně složitý a dlouhodobý, který trvá několik dnů, měsíců, případně i let. K adaptačním změnám dochází na buněčné úrovni, na úrovni tkání, orgánů, systémů či celého organismu. Adaptací jsou tedy myšleny změny v organismu nutné k zachování homeostázy organismu koně (Hanák a Olehla, 2010).

S reakcí organismu na zátěž souvisí tzv. adaptační syndrom, což znamená obecné přizpůsobení se organismu ke stresu. Jde o adaptaci organismu na opakované působení stresorů. Je to souhrn specifických i nespecifických změn v organismu, neboli reakcí, které narušují homeostázu organismu a kterými organismus reaguje na opakovaně působící stresory (na zátěž nejen fyzickou, ale i emoční, chladovou, tepelnou, nemoc atd.). Selyeho teorie stresového syndromu se opírá především o neuro-humorální koncepci. Řídící funkci má centrální nervový systém (CNS), přičemž žlázy s vnitřní sekrecí, především hypofýza a nadledviny se pokládají za klíčové orgány. Ty slouží jako přepojovací stanice tzv. neurohumorálních vlivů na buňky a tkáně organismu (Hanák a Olehla, 2010; Coenen, 2005).

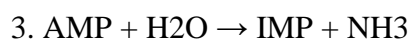
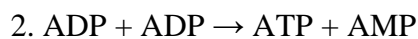
Hlavní fyziologický rozdíl mezi aerobní a anaerobní zátěží je zdroje energie. Aerobní zátěž lze charakterizovat využíváním aerobního metabolismu během fyzické námahy. Aerobní metabolismus generuje energii především z tuků a s využitím kyslíku vyrábí energii. Při aerobním metabolismu nedochází k hromadění kyseliny mléčné v krvi. Anaerobní zátěž

se vyznačuje krátkými intervaly vysoké až maximální námahy. Energie je dodávána přes anaerobní metabolismus bez využití kyslíku, což má za následek hromadění kyseliny mléčné v krvi (Gomes et al., 2012).

Fyzickou zátěž koně lze považovat za adaptační podnět pro rozvoj tréninkových adaptačních změn, pro trénovanost koně. Avšak ne každý podnět je schopen vyvolat v organismu adaptační změny. Musí to být vždy podnět dostatečně silný, působící po dostatečně dlouhou dobu, a v dostatečné frekvenci. Příliš slabé nebo naopak příliš silné adaptační podněty většinou k adaptaci nevedou (Hanák a Olehla, 2010).

3.1.1 Anaerobní zátěž

Anaerobní metabolismus se vztahuje k biochemickým reakcím směřujícím k syntéze ATP, bez přítomnosti kyslíku. Může být rozdělen do dvou různých mechanismů. První systém zahrnuje energii fosfátu převedenou na kombinaci enzymových systémů kreatinkinázy (1), adenylátkinázy (2) a AMP deaminázy (3):



Tyto reakce se vyskytují v aktivních svalech při nejvyšší rychlosti, ale poskytují jen malé množství ATP po dobu několika sekund (Hinchcliff et al., 2008). V době extrémní energetické náročnosti, kdy je resyntéza ATP nedostatečná a dochází k akumulaci ADP, fosfát může být převeden z jedné molekuly ADP do druhé. Jedna molekula ATP je produkována s jednou molekulou adenosinmonofosfátu (AMP), který je metabolizován na inosinmonofosfát (IMP) a amoniak a kyselinu močovou (UA). Tato reakce se označuje jako myokinázová reakce (2); (Hinchcliff et al., 2008).

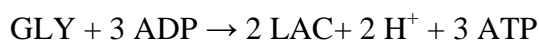
Druhá anaerobní dráha představuje glykolýzu přecházející nezávisle z oxidativních cest. Glykolýza vyžaduje glukózu-6-fosfát jako substrát, který může být odvozen z fosforylace glukózy hexokinázou nebo uvolněním intracelulárního glykogenu, který je metabolizován nejprve na glukózu-1-fosfát prostřednictvím glykogenolýzy a poté převeden na glukózu-6-

fosfát. Glykolytické cesty vedou k vytvoření dvou molekul pyruvátu, které jsou v nepřítomnosti kyslíku převedeny na laktát (Schubach and Gustavsson, 1998).

Ačkoli vyčerpání glykogenu není považováno za hlavní faktor přispívající k únavě během anaerobní zátěže, je jeho vyčerpání spojováno se sníženou anaerobní výrobou energie (Hinchcliff et al., 2008).

Intramuskulární glykogen a hladina glukózy v krvi působí jako převládající zdroj energie k doplnění ATP při anaerobní glykolýze. Některé ATP jsou odvozeny z deaminace adenosinnukleotidů. Avšak, na rozdíl od aerobního metabolismu, je relativně malá závislost na oxidaci volných mastných kyselin (FFA); (Hinchcliff et al., 2008).

Během intenzivní zátěže krátkého trvání (2 – 3 minut), je degradace glykogenu na laktát hlavní cestou pro zásobování ATP. Společný metabolismus glykogenu se vyznačuje zvyšováním koncentrace laktátu, oxoniových iontů a anorganického fosfátu v buňkách (Evans, 2000).

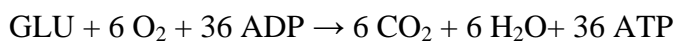


Na počátku zátěže, přibližně prvních 30 – 45 sekund, dodávka kyslíku do svalů nedosahuje úrovně, která je požadovaná pro aerobní metabolismus. Během tohoto období dochází ke zvýšení tepové frekvence a ventilace a zvýšení oxidační kapacity krve. Rezerva erytrocytů je mobilizována a přesměrována do kosterních svalů. Zvýšení tělesné teploty může zvýšit aktivitu enzymů. Laktát difunduje ze svalových buněk do krevního oběhu a je přepraven do jater, kde je zoxidován na glykogen. Během zátěže pomáhá mobilizace jaterních zásob glykogenu k udržení glykemie. Molekuly laktátu mohou být metabolizovány aerobně v průběhu a po skončení zátěže v srdeční svalovině (Evans, 2000).

3.1.2 Aerobní zátěž

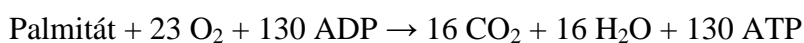
Když jsou při pomalé rychlosti zátěže nároky na energii nízké, aerobní metabolismus je schopný splnit požadavky pro zachování resyntézy ATP. Aerobní metabolismus je proto primární cesta, kterou se ATP regeneruje během vytrvalostních výkonů.

Aerobní metabolismus je proces, při kterém se oxidují tuky a sacharidy, zakončené produkcí ATP, oxidu uhličitého a vodou.



Sacharidy jsou uloženy ve svalové tkáni a játrech ve formě glykogenu. Glukóza je produktem metabolismu jaterního glykogenu a je transportována krevním oběhem do svalových buněk. Tuk je pak uložen v tělesných depech ve formě triacylglycerolů, to i ve svalových buňkách. Neesterifikované mastné kyseliny (NEFA) jsou transportovány z krevního řečiště do svalové tkáně (Evans, 2000).

Mobilizace NEFA je pomalá a jejich přínos, jako substrát pro aerobní metabolismus, se zvyšuje s časem a typem zátěže.



Svalová a jaterní glykogenolýza začíná brzy po začátku aerobní zátěže. Glukóza, čerpaná z jater, je následně transportována do myofibril, kde dojde k připojení glycolytické kaskády přes formaci glukóza-6-fosfát. Zvýšená koncentrace glukózy-6-fosfát byla zjištěna u koní po submaximální zátěži. Dochází také k uvolňování volných mastných kyselin (NEFA) z tukové tkáně nebo z jaterních zásob. Při dlouhodobé submaximální zátěži může krevní glukóza tvořit až 25% celkové energie výkonu. Jak energetické nároky stoupají, zvyšuje význam využití β oxidace volných mastných kyselin. Celkový efekt je takový, že klesá svalová glykogenolýza v čase během aerobní zátěže, zatímco oxidace volných mastných kyselin stoupá (Hinchcliff et al., 2008; Schubach and Gustavsson, 1998)).

Ačkoli lipidy jsou převládajícím zdrojem energie i při dlouhodobé submaximální zátěži, únava nastane dříve, než dojde k úplnému vyčerpání zásob lipidů. Při submaximálním zatížení je únava spojena s vyčerpáním intramuskulárního glykogenu, protože volné mastné kyseliny nemohou produkovat dostatek ATP bez zdroje pyruvátu. Během dlouhotrvající zátěže dochází k úbytku glykogenu ze svalových vláken typu I, pak II A a z glycolytických IIB. Tento úbytek (alespoň během submaximálního dlouhodobé zátěže) ovlivňuje formy glykogenu a to rozpustné v kyselině (macroglycogen) a na formy nerozpustné v kyselině (proglycogen). Ke svalové únavě pak nedochází ve stejnou dobu ve všech vláknech, ale postupně. Po zátěži nastane doplňování glykogenu (první proglycogen, pak macroglycogen) v opačném pořadí (tj. IIB - IIA - I) a může trvat až 72 hodin, nebo rychleji, s aplikací dextrózy nebo nandrolonu. Zřejmě pomalejší rychlost syntézy glykogenu po zátěži u koní, ve srovnání s jinými druhy zvířat, může odrážet nedostatek zvýšení receptorů GLU-4. Namáhavá zátěž způsobuje zvýšení celkového obsahu

proteinu GLU-4 v kosterních svaích. Jde o zvýšení, které je zmírněné doplňováním zásob svalového glykogenu infuzí glukózy. Přestože to vypadá, že vyčerpání glykogenových zásob hraje hlavní roli v nástupu únavy během aerobní zátěže, je řada dalších faktorů včetně AMP deaminace, hypertermie, dehydratace a vyčerpání elektrolytů, které k tomu přispívají. Samotný nástup únavy může být těžké objektivně posoudit, ale z nedávných výzkumů vyplynulo, že v experimentálním prostředí by se mohla uplatnit elektromyografie. Aerobní zátěž u koní je také spojována se snížením koncentrací větvených aminokyselin v krevním séru, ale tento pokles neodpovídá zvýšení obsahu aminokyselin ve svalové tkáni. Pro lepší vyhodnocení metabolismu aminokyselin při zátěži je však potřeba další výzkum. Jak se zdá, metabolismus aminokyselin hraje důležitou roli pro výkon i obnovu po zátěži.

Kapacita organismu koně pro aerobní syntézu ATP je primárně omezena dostupností kyslíku v pracujících svaích. Potenciálním omezením je funkce horních cest dýchacích, plic a kardiovaskulárního systému a koncentrace hemoglobinu v krvi. Trénink zvyšuje kapacitu dodávky kyslíku do svalů, čímž se zvyšuje schopnost zvířete k aerobní produkci energie (Evans, 2000).

K aerobní produkci ATP dochází v mitochondriích kombinací beta oxidace volných mastných kyselin (FFA), cyklu trikarboxylové kyseliny (TCA) a oxidační fosforylace (přes řetězec přenosu elektronů). Během procesu jsou koenzymy nikotinamidadeninukleotid (NAD^+) a flavinadeninukleotid (FAD^+) redukovány na NADH_2 a FADH_2 . Následně jsou NADH_2 a FADH_2 reoxidovány na NAD^+ a FAD^+ přes řetězec přenosu elektronů, ve kterém hraje kyslík roli finálního vodíkového příjemce pro tvorbu vody. Kyslík rozpuštěný v cytoplazmě a vázaný na myoglobin je rychle vyčerpán a musí být doplněn. Oxidativní fosforylace tedy závisí na hustotě kapilární sítě mezi svalovými vlákny (Hinchcliff et al., 2008).

Acetyl-CoA jako substrát pro cyklus dikarboxylové kyseliny a jeho kompletní oxidace vede ke vzniku 12 molekul ATP. Při submaximální intenzitě zátěže je většina pyruvátu, který je produkován glykolýzou, transportováno do mitochondrií a je převeden na acetyl-CoA, který vstupuje do cyklu trikarboxylové kyseliny. Výsledkem je 36 molekul ATP. Acetyl-CoA je také odvozen z oxidace mastných kyselin po jejich uvolnění z jater nebo tukové tkáně. Beta oxidace volných mastných kyselin je vysoce účinná a jako úplná oxidace poskytuje až 146 molekul ATP (Hinchcliff et al., 2008).

Zvýšení využití kyslíku během zátěže vede k úměrnému zvýšení produkce reaktivních forem kyslíku (ROS), které potenciálně způsobují oxidační stres. Jde o stav, kde vzrůstající tvorba ROS přemůže antioxidační ochranu těla, což vede k poškození lipidů, bílkovin a DNA. V reakci na oxidativní stres buňky syntetizují proteiny tepelného šoku v ochranných homeostatických reakcích. Nicméně střední intenzita zátěže je sice spojena s mírným poškozením svalů a potenciálně mírným oxidačním stresem, ale nedokáže vyvolat výše zmíněný obranný mechanismus. Snad proto, že spíše než vyčerpání energie se zdá být strůjcem této odpovědi acidóza. (Hinchcliff et al., 2008).

3.2 Oxidativní stres

Oxidační stres je definován jako narušení rovnováhy mezi antioxidanty a prooxidanty ve prospěch oxidantů (Sies, 1991). K oxidačnímu stresu může dojít, pokud antioxidační obranný systém je ochromen zvýšenou oxidační zátěží nebo sníženou dodávkou antioxidantů nebo pokud se nemůže vyrovnat s rychlostí produkce volných radikálů. Tím může nastat řetězová reakce, produkce volných radikálů a následné škody mohou vést ke změnám ve struktuře buněčných membrán, buněčné DNA a dalších buněčných komponentů. Mohou tak způsobit narušení normálních fyziologických procesů (z nichž některé mohou být nevratné), tj. oxidační poškození (Higgins and Snyder, 2006).

Volné radikály jsou nezávislé nestabilní molekuly, které obsahují jeden nebo více nepárových elektronů a jsou vytvořeny jako produkt normálních tělesných procesů. Tvoří se zejména v důsledku aerobního metabolismu, proto se jejich produkce zvyšuje s tělesným výkonem. Mohou být také vytvořeny v důsledku zranění, onemocnění nebo působení některých faktorů životního prostředí, jako je znečišťující látky, alergeny, nebo záření (Higgins and Snyder, 2006).

Pojem „reaktivní formy kyslíku“ (ROS) je často používán k popisu volných radikálů a dalších molekul, které jsou schopné působit oxidační poškození a obsahují jeden nebo více atomů kyslíku (Higgins and Snyder, 2006). ROS zahrnují volné radikály, stejně jako reaktivní sloučeniny bez nepárových elektronů v jejich vnějších orbitalech. K těmto neradikálním oxidantům patří peroxynitrit (ONOO⁻), peroxid vodíku (H₂O₂) a kyselina chlorná (HClO); (Kirschvink et al., 2008).

Dále jsou zde kromě ROS také „reaktivní formy dusíku“ (RNS), které jsou definovány jako podskupina oxidantů vyplývajících z oxidu dusnatého (NO^\cdot) a používá se termín nitrosativní stres (Kirschvink et al., 2008).

Oxidanty jsou nezbytné pro oxidačně – redukční regulaci a za určitých podmínek mohou mít prozánětlivé stimulační účinky. Oxidanty hrají důležitou úlohu při zneškodňování a ničení mikroorganismů prostřednictvím peroxidace a destabilizace jejich lipidových membrán, oxidace a inaktivace jejich bílkovin (Kowaltowski and Vercesi, 1999; Kobayashi et al., 2001).

Vystavení organismu oxidantům z různých zdrojů vedlo ke vzniku řady obranných mechanismů preventivních, reparačních a antioxidačních (Deaton, 2006).

3.2.1 Exogenní a endogenní oxidanty

Exogenní a endogenní oxidanty jsou vyvažovány oxidativními procesy, které udržují rovnováhu oxidantů / antioxidantů (Kirschvink et al., 2008).

Vystavení exogenním oxidantům je významné pro dýchací cesty a plíce, které jsou vystaveny inhalovaným oxidantům, jako ozón, ultrajemné částice a endotoxiny. Ačkoli antioxidační obranný systém dýchacích cest je zvláště dobře vyvinut (Mudway and Kelly, 2000), plicní oxidativní stres se jeví jako důležitý aktér v patogenezi respiračních chorob (Rahman, 2005). Při výzkumu koňského dýchacího aparátu bylo prokázáno, že působení ozónu vyvolává plicní oxidativní stres (Deaton et al., 2005).

Endogenní oxidanty mohou být rozděleny do tří skupin v závislosti na jejich původu. Hlavním zdrojem endogenních oxidantů je řetězec přenosu elektronů v mitochondriích, kde 1 – 3 % kyslíku se redukuje na vodu ze superoxidu ($\text{O}_2^{\cdot-}$); (Kowaltowski and Vercesi, 1999). Tato dráha vzniku oxidantů je zvláště významná během zátěže, kde se spotřeba kyslíku může zvýšit až 24 x u člověka a až 40 x u koní. Sekundární přispěvatelé k výrobě endogenních oxidantů jsou enzymy jako xantinoxidáza, membránové oxidázy, enzymy oxidu dusnatého (Kirschvink et al., 2008).

Pokud se vystavení exogenními nebo endogenními oxidanty zvyšuje nebo je nedostatečně vyváжено antioxidanty, oxidační poškození přechází v oxidaci DNA, proteinů, lipidů nebo sacharidů. Prakticky všechny buněčné molekuly mohou v přítomnosti vysokých koncentrací

oxidantů projít oxidací, ale původní intracelulární prostředí a reaktivita oxidantů, stejně jako umístění a biochemické vlastnosti cílové molekuly hrají rozhodující roli v "hierarchii" oxidantů (Kirschvink et al., 2008). Oxidativní modifikace DNA může vést k mutaci, řetězcovým zlomům na DNA, atd. Oxidace proteinů může vyvolat enzymatickou poruchu a peroxidace lipidů na buněčné membráně zahajující řetězovou reakci může ohrozit integritu buněk (Lykkesfeldt and Svendsen, 2007). Při zánětlivých stavech zvýšená tvorba oxidantů podporuje zánětlivý proces a přes mechanismus pozitivní zpětné vazby se navozuje začarovaný kruh (Valko et al., 2007). Konečné produkty oxidačních reakcí mohou být detekovány a jsou používány jako markery oxidantů (Kirschvink et al., 2008).

3.2.2 Antioxidanty

Systémy bránící uplatnění oxidativních radikálů v organismu dělíme na mechanismy preventivní, mechanismy reparační, fyziologické obranné mechanismy a antioxidanty.

Hlavní role antioxidantů spočívá v inaktivaci nebo transformaci oxidantů, které mohou být buď přeměněny antioxidačními enzymy do méně reaktivních forem, nebo které mohou reagovat s antioxidačními molekulami, které jsou chemicky stabilní (Kirschvink et al., 2008).

Antioxidanty jsou obsaženy v obranných systémech proti oxidantům, které zahrnují systémy bránící vytváření ROS, antioxidační systémy, které inaktivují oxidanty a systémy schopné omezit škodlivé účinky oxidantů tím, že umožňují opravy oxidativního poškození (Young et Woodside, 2001).

Antioxidační mechanismy se rozdělují na endogenní antioxidační systém a exogenně podané antioxidanty. Endogenní antioxidační systém tvoří enzymatické a neenzymatické mechanismy. Mezi antioxidanty patří také některé stopové prvky. Často však dochází k situaci, kterou charakterizuje nerovnováha mezi prooxidanty a antioxidanty, tato disbalance se může projevit četnými patofyziologickými procesy (Droge, 2002).

Studie Moffarts et al, (2005) prokázala, že u trénovaných plnokrevných koní dochází u několika krevních antioxidačních markerů k významným změnám a že perorální antioxidační suplementace může částečně vyvážit tyto změny tím, že zlepší hydrofilní, lipofilní a enzymatickou antioxidační kapacitu krve.

U koní doplňky stravy s antioxidanty podněcují zvýšení antioxidační ochrany v extracelulární tekutině a krevních buňkách (Kirschvink et al. 2002).

3.2.2.1 Neenzymatické antioxidanty

Kyselina askorbová, glutathion, kyselina močová a jsou důležité hydrofilní antioxidanty. Vitamin E je hlavní lipofilní antioxidant a jako takový, je přítomen v membránách a lipoproteinech (Deaton and Marlin, 2003).

Kyselina askorbová

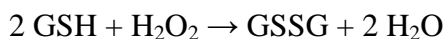
Kyselina askorbová – vitamin C je ve vodě rozpustný vitamin odvozený od sacharidů. Vyskytuje se zejména v čerstvém ovoci a zelenině. Kyselina askorbová je silným redukčním činidlem (Voet and Voet, 2005). Kyselina askorbová je v přiměřeném množství syntetizována v játrech a dalších tkáních z glukózy. Bylo zjištěno, že její potřeba se může zvýšit v době stresu a nemoci, kdy přirozená produkce nemusí uspokojit poptávku. Nedávno bylo prokázáno, že kyselina askorbová je klíčovým antioxidantem ve fluidní výstelce plic a že její hladiny jsou sníženy v důsledku rekurentní obstrukce dýchacích cest nebo zánětu plic obecně (Higgins and Snyder, 2006).

Kyselina askorbová působí jako kofaktor pro biosyntézu prokolagenu, katecholaminů a karnitinu. Kromě toho obrovské množství ROS (např., hydroxylové radikály, peroxylové radikály, superoxidové anionty, kyselina chlorná, a ozon) a reaktivních forem dusíku (např. peroxynitrit), a radikály odvozené od antioxidantů (např. α -tocopheroxyl a radikály kyseliny močové) jsou detoxikovány kyselinou askorbovou. Kyselina askorbová se oxiduje na dehydroaskorbát (DHA) ve dvou jedoelektronových fázích, s uvolněním atomu vodíku v každé fázi. Ve srovnání s ROS je 1- elektronový standardní redukční potenciál kyseliny askorbové nízký. Z tohoto důvodu je kyselina askorbová snadno oxidována vysoce oxidačními molekulami (Deaton et Marlin, 2003).

Glutathion

Thioly jsou silná redukční činidla a mají negativní standardní snížené potenciály, a proto působí jako elektronové akceptory. Nejzastoupenější neproteinový thiol v savčích buňkách je glutathion. Glutathion je tripeptid obsahující γ -amidovou vazbu [L- γ -glutamyl-L-cysteinyglycine (GSH)], což je netypická peptidová vazba vycházející z γ -karboxylu kyseliny

glutamové (Voet and Voet, 2005). Aktivní skupina glutathionu je sulfhydrylová (-SH) skupina cysteinu. Glutathionperoxidáza (GPX) katalyzuje oxidaci glutathionu, ve které jsou 2 glutathionové molekuly spojeny pomocí jejich sulfhydrylových skupin v disulfidový most (Deaton and Marlin, 2003).



Zoxidovaný glutathion (GSSG) je následně redukován glutathionreduktázou (GPR) s využitím NADPH. Poměr GSSG na celkovém glutathionu (GSH a GSSG), nazvaný glutathionový redoxní poměr (GRR). Je citlivým indikátorem oxidativního stresu (Deaton and Marlin, 2003) Rovnováha mezi GSH a GSSG pomáhá udržovat správný oxidační stav sulfhydrylových skupin proteinů uvnitř buněk (Voet and Voet, 2005).



Nachází se v buňkách živočichů a většiny rostlin i bakterií v poměrně vysoké koncentraci (0,1 – 10 mmol/l). Podílí se na transportu některých aminokyselin do buněk. Jeho hlavní funkcí je konjugace s xenobiotiky v druhé fázi biotransformace. Mimo to se podílí na detoxikaci, transportu a různých metabolických pochodech. Chrání thiolové skupiny bílkovin, podílí se na detoxikaci volných radikálů a tvoří rezervu thiolových skupin buňky (Voet and Voet, 2005).

Kyselina močová

Kyselina močová vzniká při odbourávání purinových sloučenin a u většiny savců (kromě člověka), je dále degradována močovou oxidázou. Absence činnosti močové oxidázy u člověka vede k vysokým plazmatickým koncentracím kyseliny močové, v porovnání s jinými druhy. Kyselina močová funguje jako antioxidant. Váže ionty železa ve formě pevného chelátu, takže nevstupují do Fentonovy reakce a nevznikají hydroxylové radikály. Tím chrání kyselinu askorbovou před oxidací a deaktivuje ROS, jako je kyselina chlorná a hydroxylové radikály. Je oxidována na močový radikál, který je pak buď syntetizován na kyselinu močovou, nebo dále oxidován (přenos 2 elektronů) a tvoří převážně alantoinovou, ale také oxoniovou a parabanovou kyselinu. Tvoří 35-65% antioxidantů v plazmě. (Deaton and Marlin, 2003).

Kyselina močová je velmi málo rozpustná ve vodě. Při vyšších koncentracích v roztoku krystalizuje a z těla může být vyloučena v pevné formě. Je proto hlavním odpadním

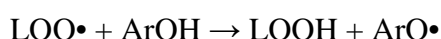
produktu u živočichů, kteří mají omezený přístup k vodě a musí jí šetřit (urikotelní organismy); (Voet and Voet, 2005).

Vitamin E (tokoferol)

Vitamin E je skupina látek isoprenoidní povahy, které jsou rozpustné v tucích. Snadno se oxidují a to i jedoelektronovým přenosem. Působí jako antioxidační ochrana lipidových struktur, neboť zabraňují oxidaci vysoce nenasycených vyšších mastných kyselin. Nachází se v mnoha rostlinných materiálech (pšeničné klíčky, kokosový a palmový olej, zelí atd.). Jeho nedostatek vede především ke ztrátě reprodukční schopnosti (odumírání embryí u březích samic, u samců k atrofii pohlavních žláz) a k svalové dystrofii (Voet and Voet, 2005).

Vitamin E je důležitý pro výkonnost. Hladina vitamínu E v tkáni by měla být dostatečně vysoká, aby se zabránilo tvorbě produktů lipoperoxidace. K získání maximálního obsahu tokoferolu v různých tkáních koně v zátěži potřebují přibližně 4 – 6 mg α -tokoferolu/ kg tělesné hmotnosti / den (Higgins and Snyder, 2006).

Jsou známy čtyři typy tokoferolů a čtyři typy tokotrienolů, které projevují aktivitu vitamínu E. α -tokoferol (ArOH) je nejaktivnější forma, která představuje přibližně 90% aktivity vitamínu E ve tkáních. α -tokoferol reaguje s lipidovými peroxylovými radikály, které tvoří lipidový peroxid vodíku a tokoferoxylový radikál ArO•, a zabraňuje pokračování lipidové peroxidace. In vitro, α -tokoferol reaguje s peroxylovými radikály rychleji než peroxylové radikály s lipidy (Deaton and Marlin, 2003).



Selen

Selen je jedním z nejčastěji se vyskytujících vnitřních antioxidantů, které pomáhají v prevenci peroxidace lipidů a následného poškození buněk. V rámci buněčné antioxidační obrany je selen součástí enzymu glutathion peroxidázy, který je široce rozšířený po celém těle. Tento enzym přeměňuje redukovaný glutathion (GSH) na oxidovaný glutathion (GSSH) a ničí peroxidy převedením na neškodné alkoholy. Tato konverze peroxidů brání před reakcí s lipidovými membránami a ztrátou integrity membrány. Selen je kofaktorem glutathion oxidázy (GPX) a zlepšuje dostupnost glutathionu (GSH). Ochrana selenem proti poškození jater a ledvin byla prokázána výsledkem zvýšené antioxidační kapacity buněk, jak o tom svědčí zvýšená aktivita superoxid diomelázy (SOD) a GR a zvýšený obsah GSH. Bylo

prokázáno, že kombinace selenu s dalšími antioxidanty snižuje u zvířat oxidační stres (Ping-Chi Hsu and Yueliang Leon Guo, 2002).

Selen se také nachází v jiných vybraných proteinech v těle. Jeden ze selenoproteinů (jodothyronin dejodináza) hraje důležitou roli v aktivaci hormonů štítné žlázy. podle studie Crandell (200?) prováděné na potkanech může existovat souvislost mezi nedostatkem selenu a funkcí štítné žlázy. Existují spekulace, zda některý z klinických projevů hypotyreózy může být ve skutečnosti způsoben nedostatkem selenu.

Koenzym Q (ubiquinol)

Koenzym Q je isoprenoidní koenzym hydrofobní povahy. Je dobře rozpustný v lipidové části biologické membrány. Je přenašečem dvou vodíků v dýchacím řetězci (redukce chinonu na hydrochinon). Vyskytuje se též v semichinonové podobě a může přenášet pouze jeden vodíkový atom (Voet and Voet, 2005).

Koenzym Q také funguje jako lipofilní antioxidant. Redukovaná forma koenzymu Q působí jako donor elektronů chránící iniciaci a propagaci peroxidace lipidů a také redukuje α -tocoferoxylový radikál zpět na α -tocopherol. Ubiquinol, na rozdíl od α -tokoferolu, může být syntetizován v organismu (Deaton and Marlin, 2003).

Karotenoidy

Karotenoidy jsou skupinou žlutých a červených vysoce nenasycených alifatických a alicyklických uhlovodíků a jejich oxidačních produktů. Karotenoidy se podílejí na přenosech energie při fotosyntéze. Mají ochranný účinek proti působení UV záření. Jsou významnými utilizátory singletového kyslíku a peroxylových radikálů (Deaton and Marlin, 2003).

Živočichové je neumějí syntetizovat a musejí je přijímat z potravy. Rozdělují se na karoteny (uhlovodíky) a kyslík obsahující žluté xanthofyly. Karoteny α , β a γ se liší strukturním uspořádáním konců polyenového řetězce.

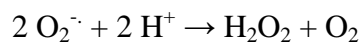
Nejhojněji je zastoupen β – karoten, který se dnes vyrábí ve velkém měřítku synteticky; užívá se jako barvivo, potravinářské aditivum a součást farmaceutických a kosmetických přípravků (Voet and Voet, 2005). β – karoten působí jako provitamin, zdroj vitamínu A. Je obsažen v zelených rostlinách a v menší míře v mrkvi, kukuřici a v semenech luskovin. Hlavní

doplňkové zdroje jsou částečně ve vodě rozpustné retenylové estery palmitátu a syntetického acetátu. Během zimy obsahují byliny méně pigmentu a to může vést k nedostatku β -karotenu. Výzkum ukázal, že použití některých syntetických β -karotenů jako jediného zdroje vitamínu nemůže splnit požadavky koňského organismu na vitamin A, ani to není doporučováno. Teplo, světlo a oxidace může zničit obsah β -karotenu v krmivu (Higgins and Snyder, 2006).

3.2.2.2 Enzymatické antioxidanty

Enzymatické antioxidanty doplňují neenzymatické antioxidanty. Buď katalyzují reakce odstraňující ROS, nebo redukují zoxidované antioxidanty. Například, superoxid dismutáza (SOD) působí na superoxidové radikály, a tím dochází k vytvoření kyslíku a méně reaktivního peroxidu vodíku (H_2O_2). Glutathionreduktáza (GPR) může regenerovat zoxidovaný glutathion (GSSG, glutathion disulfid) na redukovaný glutathion (GSH). Mezi hlavní antioxidační enzymy patří SOD, glutathionperoxidáza (GPX), glutathionreduktázu (GSPD), kataláza a thioredoxiny, glutaredoxiny a peroxiredoxiny (Deaton et Marlin, 2003).

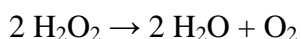
Superoxidismutáza (SOD) je enzym ze třídy oxidoreduktáz, katalyzující disproportionaci superoxidu kyslíku:



Je jedním z prvků obranného systému organismů proti oxidačnímu stresu. Je primárně lokalizována v mitochondriích a cytosolu buněk a neutralizuje superoxidové radikály. Je známo, že v kosterních svalech savců existují dvě izoformy SOD, tj. CuZn SOD, který se nachází v první řadě v cytosolu, a MnSOD, který se nachází v první řadě v mitochondriích. Aktivita SOD ve svalu je nejvyšší ve vysoce oxidativních svalových vláknech (tj. typu I a II). Také existuje extracelulární forma SOD (ECSOD), která je nalezena v plazmě a také ve tkáni a vyžaduje Cu a Zn (Deaton and Marlin, 2003).

Glutathionperoxidáza (GSHPx) se nachází v mitochondriích, cytosolu a v membránách buněk a redukuje H_2O_2 a organické hydroperoxydy, které používají redukovaný glutathion (GSH) jako elektronový donor. Aktivita GSHPx je závislá na selenu a její činnost je nejvyšší ve svalových vláknech typu I (tj. vysoce oxidativní vlákna). Glutathionreduktáza je nezbytná pro přeměnu zoxidovaného glutathionu (GSSG) zpět na redukovanou formu (GSH) pomocí NADPH jako redukčního činidla (Deaton and Marlin, 2003).

Kataláza (CAT) se nachází především v peroxisomech a mitochondriích. Katalyzuje disproportionaci toxického peroxidu vodíku:



Je přítomna ve všech živočišných orgánech, zejména v erytrocytech a v peroxisomech jaterních buněk, dále v rostlinných tkáních a aerobních mikroorganismech. Její prostetickou skupinou je hem. Je mimořádně katalyticky účinná. Jedna molekula enzymu může za minutu přeměnit 5 milionů molekul H_2O_2 (Voet et Voet, 2005).

CAT vyžaduje železo jako kofaktor. Podobně jako u GSHPx a SOD je její aktivita nejvyšší ve vysoce oxidativních svalových vláknech (Deaton et Marlin, 2003).

Thioredoxiny (TRX) opravují zoxidované skupiny sulfhydrylu, odstraňují H_2O_2 , a působí jako utilizátoři radikálů. Podílí se také na regeneraci zoxidované kyseliny askorbové. Třída thioredoxinů se skládá z thioredoxinu, thioredoxinreduktázy a thioredoxinperoxidázy. Glutaredoxin (GRX) se podílí na ochraně a opravě proteinů a neproteinových thiolů, jako je glutathion (Deaton and Marlin, 2003).

Peroxiredoxiny (PRX) jsou antioxidační enzymy, které chrání protein a lipidy proti oxidativnímu poškození. Jsou také zapojeny do regulace apoptózy, buněčné proliferace, diferenciaci a genové exprese (Deaton and Marlin, 2003).

Nachází se v cytosolu, mitochondriích, peroxisomech a plazmě. Existují různě rozdílné peroxiredoxiny (Prx1 až Prx6), ale všechny obsahují reaktivní cysteinový zbytek. Mohou se chovat jako peroxidázy, s thioredoxinem a nebo glutathionem jako elektronovým donorem (Deaton and Marlin, 2003).

3.3 Vliv zátěže na rovnováhu oxidantů a antioxidantů

Změny v rovnováze oxidantů / antioxidantů vyvolané zátěží jsou v podstatě následkem zvýšeného mitochondriálního transportu elektronů ve svalových buňkách (DiMeo and Venditti, 2001). Zvýšená tvorba ROS může podpořit membránovou peroxidaci svalových buněk a tím snížit jejich membránovou integritu. Tuto hypotézu podporují pozitivní korelace, které byly zjištěny mezi únikem svalových enzymů do krve a plazmovými lipidovými peroxidy (Williams et al, 2004). Četné studie prokázaly, že změny v poměru oxidantů

a antioxidantů vyvolané zátěží u pracujících koní se liší s ohledem na typ zátěže (dostih, standardizovaný trénink na běžeckém páse, standardizovaný trénink na závodisti, vytrvalostní zátěž) a markery hodnocené z krve, ačkoli je obecně známé, že zátěž způsobuje významné změny v oxidačně – antioxidační rovnováze (Kirschvink et al., 2008).

Intenzita zátěže (monitorováno spotřebou kyslíku nebo srdeční frekvencí), doba trvání zátěže a atmosférické podmínky (teplota, relativní vlhkost) jsou určujícími faktory pro toto zátěží vyvolané prooxidační zatížení (Williams et al, 2004).

Změny obsahu antioxidantů vyvolané zátěží se nemusí nutně objevit v průběhu nebo bezprostředně po zátěži, ale mohou být detekovatelné o 16 – 24 h později (Marlin et al, 2002). Dosud nebyla vypracována studie, zda takové dlouhotrvající odchylky oxidační / antioxidační rovnováhy ovlivňují opakovanou na sebe navazující zátěž, čili trénink. Nicméně, trénink může pozitivně ovlivnit antioxidační kapacitu organismu. Avšak příliš intenzivní trénink a nadměrná fyzická zátěž na dostizích mohou vyvolat poruchy v oxidační/antioxidační rovnováze. Ty však mohou souviset také s nevhodným nutričním přísunem antioxidantů (Marlin et al, 2002; Kirschvink et al., 2008).

3.4 Vybrané parametry energetického metabolismu

Hematologie a biochemické rozbory plazmy a krevního séra jsou důležitým nástrojem při posouzení zdraví dostihových koní. Je třeba brát v úvahu mnoho faktorů, které mohou ovlivnit výsledky měření. Nicméně pokud jsou vzorky odebrány standardizovaným způsobem a jsou porovnány s výsledky koní stejného plemene a ve stejných tréninkových podmínkách, interpretace krevních výsledků je jednodušší a přesnější (Hinchcliff et al., 2008).

3.4.1 Inzulin

Inzulin je hlavní hormon zodpovědný za metabolismus glukózy. Inzulin je primárně produkován β buňkami Langerhansových ostrůvků a je uvolňován do krevního oběhu přes portální systém. Podle Schmidt and Hickey (2009) důkazy naznačují, že i centrální nervový systém produkuje inzulin stejně. Inzulin je produkován jako prekurzor proinzulin, který se štěpí na C-peptid a inzulin. Oba jsou vylučovány v ekvimolárním množství do portálního oběhu. Zralá molekula inzulinu se skládá ze dvou polypeptidových řetězců,

řetězce A a řetězce B. Tyto dva řetězce jsou spojeny dvěma disulfidovými můstky. Uvnitř řetězce A je také disulfidový most (Jansson et al., 2002).

Sekrece inzulínu je řízena koncentrací glukózy v plazmě. Inzulín má jako hormon řadu důležitých metabolických funkcí (Jansson et al., 2002). Nejdůležitější funkcí inzulínu je stimulace vstřebávání glukózy tkáněmi, ve chvíli kdy jsou živiny hojně dostupné, například po krmení. Kosterní sval a tukové tkáně jsou dvě hlavní lokality absorpce glukózy. Také játra reagují na zvýšenou hladinu inzulínu absorpcí glukózy z krve. Inzulín se váže na receptory na povrchu plazmatické membrány a spouští řadu vnitřních mechanismů. To vede k pohybu transportérových proteinů glukózy (GLUT4) na plazmatickou membránu, která umožňuje rychlé vstřebání glukózy (Frank, 2009).

Dalšími funkcemi inzulínu jsou zvýšení propustnosti buněčných membrán pro glukózu, aminokyseliny, mastné kyseliny a ionty K^+ , Mg^{2+} a Fe^{2+} , tím dochází ke snížení plazmatické koncentrace glukózy, syntéze glykogenu v játrech a kosterní svalovině, oxidace glukózy na mastné kyseliny (především v játrech); (Jelínek a kol., 2003). Slinivka bezprostředně reaguje na množství glukózy v krvi uvolněním inzulínu – potřeba se zvyšuje, když je krmivo energeticky bohaté na lehce stravitelné cukry a škrobové látky. Naopak potřeba inzulínu se snižuje během fyzické aktivity (Jansson et al., 2002).

Inzulín reaguje na metabolismus sacharidů, bílkovin i lipidů, a to především v játrech, tukové tkáni a kosterní svalovině. Signalizace přes inzulínové receptory ovlivňuje také centrální nervový systém, cévní řečiště, ledviny, srdce, slinivku břišní, a gastrointestinální trakt. Signalizace inzulínu zasahuje do metabolismu slinivky břišní, lipoproteinů, vody, homeostázy elektrolytů a cévního tonu. To znamená, že regulace působení inzulínu má kromě základního vlivu na metabolismus sacharidů také vliv na integraci dalších metabolických procesů. Důsledkem tohoto pozorování je, že dysregulace v produkci inzulínu nebo účinku inzulínu je v příčinné souvislosti s několika chronickými onemocněními. Jedná se především o metabolický syndrom koní a obezitu (Schmidt and Hickey, 2009).

Faktory jako je strava, věk, plemeno, genetické predispozice a obezita mohou u koní zapříčinit vznik citlivosti na inzulín. Některé krmné doplňky mohou u zvířat, která trpí sníženou citlivostí na inzulín nebo inzulínovou rezistencí zvýšit citlivost na inzulín a tím snížit riziko pro vznik onemocnění jako je metabolický syndrom nebo laminitida.

Fyziologické hodnoty inzulínu v krvi koní nepřesahují 430 pmol.l^{-1} . Nejvyšší koncentrace bývá 2 hodiny po nakrmení ($287 - 430 \text{ pmol.l}^{-1}$).

Koncentrace inzulínu v plasmě měřena v průběhu času v odezvě na glukózu může sloužit jako ukazatel citlivosti na inzulín. Větší citlivost na inzulín vede k jeho menší sekreci. Proto je snížení inzulínové odpovědi na glukózu spojeno se zvýšením citlivosti na inzulín. Inzulínová rezistence a obezita se zdají být společnými prekurzory laminitidy u koní. Obecně lze říci, že metabolický syndrom u koní je charakterizován hyperinzulinémií, inzulínovou rezistencí, obezitou a hypertriglyceridemií. U koní, stejně jako u lidí může nedostatečná zátěž a přejídání vyvolat metabolické onemocnění (Schmidt et Hickey, 2009).

Vyrovnaný příjem energie s energetickým výdejem, je důležitý pro zátěž koně. Hormony jako jsou grehlin, adiponektin a inzulín hrají hlavní roli při zprostředkování energetické bilance buď prostřednictvím jejich vlivu na příjem krmiva, nebo metabolickou regulaci. Odpovědi na glukózu a inzulín jsou pozměněny výživou a obezitou. Stupeň zátěže a stres také mění metabolismus glukózy a inzulínu (Jansson et al., 2002).

Zátěž zásadním způsobem zasahuje do vzniku inzulínové rezistence a diabetu. Experimentálně je známo, že zátěž zlepšuje citlivost na inzulín. Jde o účinek, který může trvat po dobu 24 až 48 hodin po zátěži. Zátěž také může zlepšit metabolismus lipidů v kosterním svalstvu, vyvolat mitochondriální biogenezi a zvýšit aktivitu enzymů zapojených do oxidace mastných kyselin. Dále zátěž obvykle snižuje systémovou koncentraci inzulínu a může zlepšit citlivost jaterních a tukových tkání k inzulínu (Schmidt and Hickey, 2009).

V průběhu zátěže pracující svaly přijímají glukózu bez pomoci inzulínu. Dochází ke snížení koncentrace inzulínu a zvýšení koncentrace glukózy v plazmě. Změny v koncentracích inzulínu jsou připisovány zvýšení cirkulujících katecholaminů, které inhibují uvolňování inzulínu. Změny v koncentraci glukózy představují stimulaci glykogeneze v játrech (Gorgon et al., 2007). Inzulín je velmi důležitý při zotavení po zátěži, kdy nasycení glykogenem je neaktivnější. Poslední studie prokázaly souvislost mezi zvýšením sympatické dráhy vyvolané zátěží a změnami v hladinách inzulínu a glukagonu. Funkčně to umožňuje zvířeti zvýšit glukoneogenezi k udržení koncentrace glukózy v krvi během zátěže (Hinchcliff et al., 2008).

Mnohé z nedávných studií, které se zabývaly reakcí inzulínu na fyzickou zátěž, se soustředily na složení a načasování krmení před zátěží. Krmiva s vysokým obsahem sacharidů jsou prospěšná pro optimální syntézu svalového glykogenu při zátěži. Výsledné zvýšení hladiny

glukózy v krvi pozorované po nakrmení koně krmivem s vysokým obsahem sacharidů obvykle vyvolává zvýšení sekrece inzulínu. Cílem nedávného výzkumu bylo potvrdit, že vysoce energetické krmení vyvolá před zátěží zvýšení hladiny inzulínu, který může zapříčinit snížení hladiny glukózy v krvi přímo před nebo během zátěže. Jak se zdá, tak trénink dokáže ovlivnit inzulínovou odezvu na zátěž a zvyšuje schopnost syntetizovat glykogen během obnovy (Hinchcliff et al., 2008).

3.4.2 Glukóza

Glukóza je jednoduchý sacharid, který představuje hlavní zdroj energie pro buňky. Je ústřední jednotkou sacharidového metabolismu a zároveň indikátor jeho úrovně. Hladina glukózy v krevní plasmě (glykémie) závisí na absorpci glukózy v tenkém střevě, glykogenolýze, glukoneogenezi a utilizaci glukózy periferními tkáněmi. Nejintenzivnější přeměna glukózy probíhá v metabolicky aktivních tkáních – játra, ledviny, trávicí soustava, mléčná žláza, nervové buňky a tkáň exokrinních a endokrinních žláz. Glukóza je základním substrátem při syntéze glykosidů, glykoproteinů, glykolipidů, nukleonových kyselin, aminokyselin a tuků (Jelínek a kol., 2003).

Hladina glukózy v krvi koní se pohybuje v rozmezí 4,2 – 6,4 mmol.l⁻¹ (Reed et al., 1997, Eades et al., 2004). Stabilita glukózy v séru a plazmě po odebrání je 7 dní (při +4 až +7°C). Poločas rozpadu glukózy v krevní plazmě koně je 20 – 90 minut, což svědčí o tom, že glukóza je permanentně využívána v tkáních a resorbovaná z jater a střev. Nejvíce glukózy spotřebuje CNS, trávicí soustava a ledviny (Jelínek a kol., 2003).

Změny v koncentraci glukózy a inzulínu, včetně zvýšené nebo snížené citlivosti vůči inzulínu může přispět ke vzniku metabolického onemocnění jako je například laminitida nebo equinní inzulínová rezistence (Eades et al., 2004).

Udržování koncentrace glukózy v krvi je důležitou funkcí jater. Jestliže koncentrace poklesne pod obvyklou hodnotu (důsledek tělesné námahy nebo hladovění), uvolňuje se glukóza z jater do krevního oběhu. Pochod je zprostředkován hormonem glukagonem. Tento stav se nazývá hypoglykémie. Hypoglykémie vzniká při nedostatečném přívodu sacharidů a vyčerpání zásob sacharidů v těle a zvýšené utilizaci glukózy v tkáních. Hypoglykémie vzniká též při poruchách glykogenolýzy, glukoneogeneze, a při nedostatečné tvorbě přísunu glykogenních substrátů. Na hypoglykémii jsou náchylná především mladá zvířata. Nízká

koncentrace glukózy v krvi způsobí uvolnění glukagonu z pankreatických α buněk do krevního oběhu. Receptory glukagonu v jaterních buňkách reagují na přítomnost glukagonu aktivací adenylátcyklasy. V důsledku toho v těchto buňkách dochází ke zvýšení koncentrace cAMP. Zvýšení koncentrace cAMP vyvolává zvýšení rychlosti rozkladu glykogenu, a proto stoupá intracelulární koncentrace GLU – 6 – P (glukózo – 6 – P). U sportovních koní dochází k poklesu glukózy po zátěži na tratích delších než 60 km (Jelínek a kol., 2003; Voet et Voet, 2005).

Zvýšená hladina glukózy v krvi nad fyziologickou normu se nazývá hyperglykémie. Je-li hladina glukózy vyšší (obvykle bezprostředně po strávení potravy = alimentární hyperglykémie), hladina glukagonu klesá a z pankreatických β buněk se uvolňuje hormon insulin. Jako odpověď na přítomnost inzulinu se zvyšuje rychlost transportu glukózy mnoha živočišnými membránami. Zvýšení koncentrace glukózy v krvi napomáhá inaktivaci glykogenfosforylázy a její přeměně na fosforylázu. Čili glukóza inhibuje fosforylázu. Při koncentraci glukózy nad obvyklou hodnotu mohou játra ukládat nadbytečnou glukózu v podobě glykogenu. Patologicky vzniká hyperglykémie při snížené utilizaci glukózy (diabetes mellitus), v důsledku nízké hladiny inzulinu anebo poruchách receptorů citlivých na insulin (Jelínek a kol., 2003; Voet and Voet, 2005). Zvýšení koncentrace glukózy v krvi je u koní poměrně běžné a dochází k ní především při zvýšené stresové zátěži temperamentních zvířat v souvislosti s odběrem krve, aplikací léků nebo při bolestivé fixaci. Ke snížení koncentrace glukózy dochází při nedostatku pohotové energie v krmné dávce, při nedostatku energie vzhledem k dusíkatým látkám v krmné dávce a při těžkém narušení funkce jater. (Gordon et al., 2007).

3.4.3 Triacylglyceroly (TAG)

Synonymum pro triacylglyceroly jsou neutrální tuky, či triglyceridy (dřívější označení). Triacylglyceroly jsou metabolity lipidů. Chemicky jde o estery mastných kyselin a trojsytného alkoholu glycerolu. Patří k základním živinám (Doubek a kol., 2010). V tenkém střevě jsou částečně hydrolyzovány, především na monoacylglyceroly. Ty jsou pak v buňkách střevního epitelu reesterifikovány. Poté se vytvoří komplexy se specifickými proteiny, cholesterolem a fosfolipidy a dochází k vylučování do krevního řečiště v podobě lipoproteinových částic. TAG obsažené v buňkách tukové tkáně (adipocytech) jsou u živočichů významnou zásobárnou energie, jejich syntéza a odbourávání jsou řízeny

hormonálně. Mnoho rostlin, řepka, slunečnice, len, ale i pupalka dvouletá vytváří zásoby TAG ve formě rostlinných olejů v semenech (Voet et Voet, 2005).

Snížená koncentrace je důsledkem narušené mobilizace tuků, tvorby a uvolňování lipoproteinů vlivem rozsáhlé přeměny tuků v játrech. Ke snížení koncentrace TAG v krvi dochází při narušení funkce jater, rozvoji steatózy jater nebo při dlouhodobém nedostatku energie v krmné dávce. Naopak zvýšená hodnota ukazuje na zvýšený příjem energie, zejména tuků (Doubek a kol., 2010).

Normální obsah triacylglycerolů v krvi koní se pohybuje do 1 mmol.l^{-1} . Zvýšený obsah ($1,0 - 5,0 \text{ mmol.l}^{-1}$) způsobuje hyperlipidemii, bez makroskopické lipelyze séra a bez klinických příznaků onemocnění. S obsahem nad 5 mmol.l^{-1} přechází stav do klinické hyperlipemie, což je důsledek negativní energetické bilance (Reed et al., 1997, Eades et al., 2004).

3.4.4 Kyselina močová (UA)

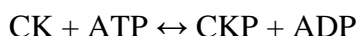
Kyselina močová kolísá v závislosti na příjmu purinů (Jelínek a kol., 2003), intenzitě vlastní tvorby a na jejím vylučování (Rasanen et al., 1996). Podle Hinchcliff et al. (2008) slouží vrchol koncentrace kyseliny močové jako ukazatel degradace ATP ve svalech.

Kyselina močová spolu s plasmatickou koncentrací laktátu jsou ukazatele anaerobního metabolismu po maximální zátěži. Maximální koncentrace UA v krvi je dosaženo 30 minut po zátěži. (Hinchcliff et al., 2008). Fyziologické hodnoty kyseliny močové v krevním séru koní se podle Bowlinga et al. (2000) pohybují mezi 0 až $60 \mu\text{mol.l}^{-1}$.

Zvýšená koncentrace kyseliny močové poukazuje na to, že tělo neumí dobře zvládat důsledky odbourávání purinů. Příčinou může být nadprodukce kyseliny močové nebo ji tělo nedovede dostatečně dobře vyloučit. Koncentrace kyseliny močové stoupá také po intenzivní tělesné námaze. Zvýšená koncentrace může vést k tvorbě krystalů kyseliny močové v kloubech. To způsobuje bolest a zánět kloubu. Kyselina močová může vyvolávat i tvorbu krystalů v moči nebo ledvinových kamenů a může tak poškodit ledviny. Nízká koncentrace kyseliny močové v krvi je vzácnější. Nízké koncentrace kyseliny močové mohou být způsobeny některými typy onemocnění jater nebo ledvin či účinkem toxických látek (Rasanen et al., 1996).

3.4.5 Kreatinkináza (CK)

Kreatinkináza je intracytoplazmatický enzym. Podílí se na energetickém metabolismu svalového vlákna. Vnášením fosfátu do proteinu katalyzuje reverzibilní fosforylaci (Doubek a kol., 2010).



Zvýšení aktivity kreatinkinázy závisí na míře poškození kosterní svaloviny, extrémní fyzické námaze, či kolikových křečích. U koní reaguje kreatinkináza na poškození svalů rychleji než AST. Na druhé straně referenční aktivita kreatinkinázy u koní nevyklučuje myopatii. Při zátěžovém testu prováděném pro potvrzení diagnózy Polysacharide Storage Myopathy u koní se zjišťuje až dvojnásobné zvýšení aktivity kreatinkinázy (Doubek a kol., 2010).

Nejvyšších hodnot v krevním séru dosahuje za 4 – 6 hodin po jednorázovém poškození svalů. Její poločas rozpadu je 6 – 10 hodin. Zvyšující se aktivita CK v rozmezí dnů je indikátorem pokračujícího poškození svalových vláken (Ludvíková and Jahn, 2005).

Normální hodnoty aktivity kreatinkinázy u koní se pohybují mezi 1 – 5,0 $\mu\text{kat.l}^{-1}$. Vyšší hodnoty vedou k myopatii a kardiomyopatii (Reed et al., 1997, Eades et al., 2004).

3.4.6 Aspartátaminotransferáza (AST)

Aspartátaminotransferáza je stejně jako CK intracytoplazmatický enzym. Není orgánově specifickým enzymem. Její aktivita se stanovuje při podezření na onemocnění jater. Spolu s alaninaminotransferázou (ALT) a gama glutanyltransferázou (GGT) je považována za test poškození hepatocytů (Doubek a kol., 2010).

Zvýšení aktivity AST může zapříčinit poškození kosterní svaloviny, extrémní fyzická zátěž, poškození myokardu, hemolytické stavy či obezita (Doubek a kol., 2010).

Maxima po jednorázovém poškození svalů dosahuje za 24 – 48 hodin. Poločas jejího rozpadu je 2 – 4 dny (Ludvíková and Jahn, 2005).

Obsah aspartátaminotransferázy u koní se pohybuje v rozmezí 2,5 – 5,0 $\mu\text{kat}\cdot\text{l}^{-1}$. Vyšší obsah způsobuje myopatii a zvýšení hepatocelulární permeability. Zvýšené hodnoty perzistují i 7 -14 dnů po poškození jater nebo svalů. Zvýšení aspartátaminotransferázy s kreatinkinázou vede k poškození svalů (Reed et al., 1997, Eades et al., 2004). Elevace AST bez současné elevace CK ukazuje na poškození jiného orgánu než svalů (Ludvíková and Jahn, 2005).

3.4.7 TBARS

Test pro látky reagující s kyselinou thiobarbiturovou (TBARS - thiobarbituric acid-reactive substances) se používá pro stanovení peroxidace lipidů a oxidativního poškození v biologických tekutinách, respektive pro kvantifikaci některých konečných produktů lipoperoxidace. Barvicí postup testu TBARS je jednoduchý, snadný, reprodukovatelný a technicky spolehlivý (Pothiwong, 2007).

Peroxidy lipidů jsou nestabilní ukazatele oxidačního stresu v buňkách, které se rozkládají na složité a reaktivní sloučeniny, jako je malondialdehyd (MDA) a 4 – hydroxynonenal (4-HNE). Jedná se o přírodní bioprodukty z peroxidace lipidů. Oxidativní modifikace lipidů může být vyvolána in vitro širokou škálou pro-oxidačních látek a dochází k ní in vivo během stárnutí, v průběhu některých onemocnění a po zátěži. Měření konečných produktů peroxidace lipidů je jedním z nejlépe přijímaných analýz týkajících se oxidačního poškození. Tyto aldehydické vedlejší produkty lipidové peroxidace jsou obecně přijímané markery oxidačního stresu (Joshi et al., 2011).

TBARS je dobře zavedeným testem pro screening a monitorování peroxidace lipidů. Rychlé MDA tvoří 1:2 adukt s thiobarbiturovou kyselinou. MDA-TBA adukt, který je vytvořen z reakce MDA ve vzorcích s TBA, může být měřen kolorimetricky nebo fluorimetricky. Hladiny TBARS jsou stanoveny ze standardu malondialdehydu. Test TBARS poskytuje příslušné informace týkající se činnosti volných radikálů v chorobných stavech a měření mnoha vlastností antioxidantních sloučenin. Přestože specifická TBARS k jiným látkám než MDA je sporný, test je široce využíván pro detekci peroxidace lipidů. Lipidy s vyšším stupněm nenasycených vazeb produkují vyšší hodnoty TBARS (Joshi et al., 2011).

3.4.8 Celková antioxidační kapacita (TAS)

Množství všech antioxidačních látek v plazmě se stanovuje pomocí tzv. celkové antioxidační kapacity (TAS). TAS je kombinací antioxidačních obranných mechanismů zahrnujících enzymatické a neenzymatické systémy (Marlin et al., 2002). TAS představuje schopnost organismu vzdorovat oxidačnímu stresu. K poklesu dochází při stavech, kdy je zvýšena produkce volných radikálů (onemocnění, vysoká zátěž). Proto je žádoucí, aby hladina TAS byla co nejvyšší (Kirschvink et al., 2008). Správný management a dodávka antioxidantů v krmivu je cesta k udržení rovnováhy mezi TAS a ROS. U koní, doplňky stravy s antioxidanty podněcují zvýšení antioxidační ochrany v extracelulární kapalině a krevních buňkách a tím dochází k lepší regeneraci organismu po zátěži. Největší vliv na antioxidační kapacitu má albumin a kyselina močová (Young and Woodside, 2001).

3.5 Pupalka dvouletá

Pupalka dvouletá, lat. *Oenothera biennis* je rostlina čeledi *Onagraceae* – pupalkovité. Původ má v Severní Americe a nachází se v částech Asie a Evropy. Dorůstá až 1,5 m. Doba květu je červen až srpen. Květy mají žlutou barvu, až 8 cm v průměru, čtyři okvětní plátky vyrůstají v druhém roce života v paždí přisedlých listů (příloha 2). Květy se otvírají večer a uvadají do následujícího rána. Roste jako plevel na stráních, železničních náspech, na rumišťích a březích vod. Osidluje okolí pískoven, lomů a přístavů.

Pupalky dvouleté se kromě okrasné rostliny v zahradách využívá také jako léčivé byliny. V USA se původně z listů pupalky a kořene připravovaly nálevy, odvary a obklady pro léčbu kožních problémů. Teprve v posledních letech došlo k rozšíření užívání oleje. Pro výrobu pupalkového oleje se pupalka pěstuje komerčně ve více než 30 zemích. Pupalkový olej je bohatým zdrojem různých esenciálních nenasycených mastných kyselin, nejvíce však omega MK, a to kyseliny linolové, kyseliny α -linolenové, kyseliny γ -linolenové a kyseliny olejové (zastoupení MK v pupalkovém oleji viz tabulka 3). Semena pupalky jsou nejen zdrojem esenciálních nenasycených kyselin, ale i polyfenolů (příloha 3). Obsah polyfenolů odpovídá obsahu v semenech brutnáku nebo v zeleném čaji. Podle Ing. Ireny Sukové (2011) byl při pokusu na extraktu ze semen pupalky na lékařské univerzitě ve Varšavě prokázán obsah polyfenolů, které náleží do následujících skupin: deriváty flavan-3-ol (katechin a prokyanidin B3), deriváty žlučových kyselin (kyselina žlučová, etylgalát a pentagalloylglukóza) a depsidy

(kyselina ellagová). Z hlediska antioxidační aktivity je nejvýznamnější pentagalloylglukóza. Pupalkový olej se získává lisováním semen za studena s použitím vrutových lisů nebo extrakcí hexanem, surový produkt je pak rafinovaný. Obsah oleje v semenech je 18 – 30 %. Pupalkový olej je jasně žluté barvy a má hustotu 0.9283 g/cm³. Používá se v humánní medicíně k léčbě kožních problémů, jako je atopický ekzém, lupénka, ale i závažnějších chorob, např. roztroušená skleróza, rakovina prsu, srdeční onemocnění, diabetická neuropatie, či autoimunitní a gastrointestinální poruchy organismu. Složky pupalkového oleje jsou obvykle identifikovány metodou plynové chromatograficky hmotnostní spektrometrií nebo vysoce výkonnými technikami kapalinové chromatografie. Pupalkový olej je v humánní medicíně komerčně dostupný v různých formách (např., tobolky). V USA je klasifikován jako "doplňěk stravy" podle zákona „Dietary Supplement Health and Education Act“ z roku 1994. Roční celosvětová produkce pupalkového oleje byla v roce 2000 odhadnuta na 1000 až 4000 tun. Ve Spojeném království je pupalkový olej pro humánní medicínu registrován na léčbu mastalgie, PMS a prostaty (Grau et al., 1996; Belch et al., 2000).

Pupalka dvouletá je Ministerstvem Zemědělství doporučena také jako zdroj fyto-masy pro energetické využití. Předpokládaný hlavní, případně vedlejší produkt je štěpka a řezanka ze stonků pro energetické využití (spalování, bioplyn) a zejména semena k získávání oleje pro výrobu kapalných biopaliv a léčiv.

4 MATERIÁL

4.1 Charakteristika vybrané skupiny koní

Pokusu se zúčastnilo 10 koní plemene anglický plnokrevník (5 klisen a 5 hřebců), kteří se pravidelně zúčastňují dostihových soutěží v ČR i v zahraničí. Hmotnost vybraných koní se pohybovala okolo 470 kg (\pm 30 kg) a věk mezi 3 – 5 roky. Koně byli sledováni v období celkově 16 týdnů (13.6 – 3. 10. 2012). Zátěžový tréninkový deník je shrnut v tabulce č.

Tabulka 1: Tréninkový program

	chod	Doba trvání	rychlost
Pondělí, čtvrtek	Krok	10 min	100 m/min
	Klus	20 min	200 m/min
	Cval	6 min	350 m/min
	Krok	10 min	100 m/min
Úterý, pátek	Krok	15 min	100 m/min
	Klus	20 min	200 m/min
	Trysk	3 min	800 m/min
	Krok	10 min	100 m/min
Středa, sobota	Krok	15 min	100 m/min
	Klus	8 min	300 m/min
	Krok	15 min	100 m/min
	Krok	15 min	100 m/min

4.2 Charakteristika krmné dávky

Krmná dávka obsahovala luční seno, mačkaný oves, Fitmin House müsli (Dibaq a.s., ČR), Fitmin Horse Opti (Dibaq a.s., ČR), Fitmin Horse Energy (Dibaq a.s., ČR) a doplněk vitaminů a minerálů (Equistro, Vetoquinol, s.r.o.). Stanovení složek diety bylo provedeno v laboratoři České Zemědělské Univerzity v Praze. Koně měli neomezený přístup k vodě. Krmné dávky souvisely s mírou maximální zátěže.

Prvních 8 týdnů byli všichni koně krmeni dietou, která neobsahovala pupalkový olej (odběry 1, 2, 3). V průběhu dalších 8 týdnů byla tato dieta doplněna o 150 ml pupalkového oleje (odběry 4, 5, 6).

Tabulka 2: Složení živin krmiva (anglický plnokrevník, 500 kg, maximální zátěž)

Živiny (g)	Luční seno	Oves	Fitmin Horse Opti	Fitmin Horse Energy	Fitmin Horse House Müsli	Σ
Sušina	6521,2	3569,2	468,85	744,56	905	12208,81
N – látky	398,3	388	767	61,84	106,1	1721,24
Popeloviny	364	128	40,65	10,8	59,2	602,65
Ether extrakt	114,1	157,2	33,5	81,6	49,2	435,6
Vláknina	2695	389,2	26	14,56	55	3166,76

4.2.1 Pupalkový olej

Výrobce: SOLIO Kft, Maďarsko.

Množství dovezeného oleje celkem 100 l.

Tabulka 3: zastoupení MK v pupalkovém oleji (tučně omega MK); (Velíšek, 2006)

Mastná kyselina	Pupalkový olej %
Myristová	0,07
Palmitová	6-10
Palmitolejová	0,04
Stearová	1,5-3,5
Olejová	5-12
Linolová	65-80
α-linolenová	0,2
γ-linolenová	8-14
Oktadekatetraenová	-
Arachová	0,3
Eikosenová	0,2
Behenová	0,1
Dokosenová	-
Lignocerová	0,05
Tetrakosenová	-

4.3 Charakteristika oblasti

Koně jsou ustájeni ve sportovní stáji Luka Racing v Bošovicích u Písku. Pro tuto oblast je charakteristický kopcovitý terén. V současné době je zde ustájeno 63 koní. Ve středu je k dispozici unikátní all-weather dráha, další travnatá a skoková dráha (celkem přes 5 km), krytý kolotoč, krytá hala 40 x 15 m, výběhy a pastviny (40 ha); (příloha 4).

5 METODIKA

5.1 Odběry

Krevní vzorky byly odebírány ze zevní hrdelní žíly (*vena jugularis externa*) do polyetylenových zkumavek (Vacutainer system Sarstedt, s.r.o., UK). Krev na hematologické vyšetření byla odebrána do zkumavek s protisrážlivým činidlem (EDTA) a na biochemické vyšetření do zkumavek se separačními granulemi. Doba odběrů byla půl hodiny po krmení, tzn. v 6:30. Vzorky byly transportovány v uzavřené odběrové nádobě, kde byly chráněné před světlem a vysokou nebo extrémně nízkou teplotou. Časový interval od odběru krve do zpracování v laboratoři se pohyboval od jedné do dvou hodin. Zpracování vzorků probíhalo v laboratoři Katedry veterinárních disciplín (KVD) ČZU.

5.2 Metody stanovení

Vzorky

Po převezení vzorků do laboratoře byly vzorky určené na biochemické vyšetření vloženy do centrifugy a centrifugovány 10 minut při 3 000 otáčkách/ minutu. Po vyjmutí z centrifugy bylo ze zkumavek odebráno sérum a zkumavky se sérem byly označeny podle pořadí odběru. Parametry CK, AST, GLU, UA a TG byly stanoveny hromadně na automatickém analyzátoru XL – 200, Erba Lachema. Inzulin a TBARS se stanovovaly jednotlivě.

5.2.1 Inzulin

Použitá souprava Mercodia Equine Insulin ELISA dodávaná firmou Mercodia AB. Souprava pro kvantitativní stanovení inzulinu z krevního séra koní.

Princip metody

Metoda je založena na přímé sendvičové technologii, kde jsou dvě monoklonální protilátky nasměrované proti odlišným antigenním determinantům na molekule inzulinu. V průběhu inkubace reaguje ve vzorku inzulin s peroxidázou, která spojuje anti-inzulinové protilátky a anti-inzulinové protilátky vázané na mikrotitrační destičku. Následuje promývací krok, který odstraní nenavázané enzymem označené protilátky. Vázaný konjugát je detekován reakcí s 3,3'- 5,5'- tetramethylbenzidinem (TMB). Reakce se zastaví přidáním kyseliny, což je kolorimetrický koncový bod, který může být vyhodnocen spektrofotometricky.

Potřeby

Mikrodestička

Kalibrátory 1, 2, 3, 4, 5 (5 lahviček po 1000 IL)

Kalibrátor 0 (1 lahvička – 5 ml)

Enzymový konjugát 11X (1 lahvička – 1,3 ml)

Wash Buffer (1 láhev – 500 ml)

Substrát TMB (1 láhev – 22 ml)

Stop roztok (1 lahvička – 7 ml)

Příprava roztoku enzymového konjugátu 1X

Připravíme potřebné množství roztoku konjugátu 1X ředěním konjugátu 11x (1 + 10) v konjugátu Buffer dle níže uvedené tabulky. Důkladně promícháme.

Počet kapek	Enzymový konjugát 11X	Enzymový konjugát Buffer
12 kapek	1 lahvička	1 lahvička
8 kapek	700 µl	7 ml
6 kapek	500 µl	5 ml
4kapky	400 µl	4 ml

Postup práce

Všechny reagensie a vzorky se musí ohřát na pokojovou teplotu. Každé stanovení provedeme ve dvojnásobném vyhotovení. Připravíme kalibrační křivky pro každý test.

1. Připravíme roztok enzymového konjugátu 1X.
2. Připravíme mikrotitrační jamky v dostatečné kapacitě pro kalibrátory a vzorky ve dvou vyhotoveních.
3. Napipetujeme 25 μ l z každého kalibrátoru a vzorku do příslušných jamek.
4. Přidáme 100 μ l roztoku enzymového konjugátu 1X do každé jamky.
5. Inkubujeme na třepačce (700 - 900 otáček) po dobu 2 hodin při pokojové teplotě (18 - 25 ° C).
6. Promyjeme 6 krát v 700 μ l Wash Buffer 1X roztoku na každou jamku pomocí automatického promývače, po závěrečném promytí desku otočíme a oklepeme proti savému papíru. Při mycím procesu nesmí dojít k promočení.

Nebo ručně.

Zlikvidujeme reakční objem otočením mikrodestičky nad umyvadlem. Přidáme 350 μ l mycího roztoku do každé jamky. Zlikvidujeme promývací roztok, klepneme několikrát proti savému papíru, aby se odstranila přebytečná kapalina. Opakujeme 5 krát. Vyhneme se delšímu máčení při promývání.

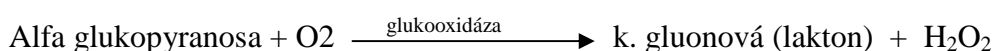
7. Přidáme 200 μ l substrátu TMB do každé jamky.
8. Inkubujeme po dobu 15 minut při pokojové teplotě.
9. Přidáme 50 μ l Stop roztoku do každé jamky. Umístíme desku na třepačce po dobu asi 5 sekund, aby došlo k míchání.
10. Měříme při optické hustotě 450 nm a vypočítáme výsledky. K měření musí dojít během 30 minut.

5.2.2 Glukóza

Použitá souprava BIO-LA-TEST® GLUKÓZA LIQUID 500 S (GLU L 500 S) dodávaná firmou PLIVA-Lachema Diagnostika s.r.o., CR.

Princip metody

V přítomnosti glukózaoxidázy je glukóza oxidována na glukonovou kyselinu a peroxid vodíku. Peroxid vodíku reaguje v přítomnosti peroxidázy s fenolem a 4-aminoantipyrinem za vzniku chinoniminového barviva. Intenzita vzniklého růžového zbarvení je úměrná koncentraci glukózy.



5.2.3 Triacylglyceroly (TAG)

Použitá souprava BIO-LA-TEST® TRIACYLGLYCEROLY LIQUID 250 S (TG L 250 S) dodávaná firmou PLIVA-Lachema Diagnostika s.r.o., CR.

Princip metody

Jedná se o specifickou enzymatickou metodu, kdy se stanovuje enzymatickou hydrolýzou uvolněný glycerol.

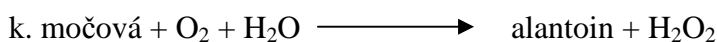


5.2.4 Kyselina močová (UA)

Použitá souprava BIO-LA-TEST® kyselina močová Liquid 500 (UA L 500) dodávaná firmou Erba Lachema s.r.o., CR.

Princip metody

Kyselina močová se oxiduje kyslíkem za katalýzy enzymem urikasou na peroxid vodíku a allantoin. Vzniklý peroxid vodíku se stanovuje oxidační kopulací se sodnou solí N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-m-toluidinu a 4-aminoantipyrinem za katalýzy enzymem peroxidasou.

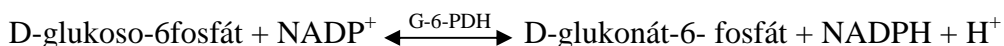
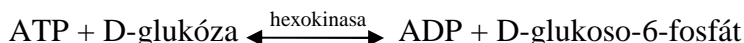
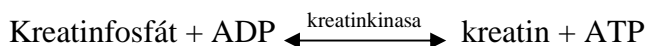


5.2.5 Kreatinkináza (CK)

Použitá souprava BIO-LA-TEST® Kreatinkinasa NAC LIQUID 100 (CK NAC L 100) dodávaná firmou Erba Lachema s.r.o., CR.

Princip metody

Kreatinkináza se enzym katalyzující fosforylaci kreatinu na keatinfosfát. Při stanovování zpětnou reakcí se stanovuje vzniklé ATP.

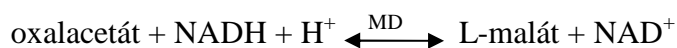


5.2.6 Aspartátaminotransferáza (AST)

Použitá souprava BIO-LA-TEST® AST UV Liquid 250 (AST UV L 250), AST UV Liquid 500 (AST UV L 500) dodávaná firmou Erba Lachema s.r.o., CR.

Princip metody

AST katalyzuje přenos NH₂ skupiny z aspartátu na oxoglutarát a jeho ketoskupiny na původní aspartát. Z aspartátu se stane ketokyselina, oxalacetát a z oxoglutarátu glutamát. Vznikající oxalacetát se při chemické metodě neenzymaticky mění samovolnou dekarboxylací na pyruvát. Stanovujeme tedy pyruvát. V enzymatické metodě se vznikající axalacetát mění malátdehydrogenázou s koenzymem NADH na malát a NAD⁺.



Katalitická koncentrace je úměrná poklesu absorbance při 340, 334 nebo při 365 nm.

5.2.7 TBARS

Pro test pro látky reagující s kyselinou thiobarbiturovou byla použita biochemická souprava OxiSelect™ TBARS Assay Kit (MDA Quantitation) firmy CELL BIOLABS, INC. Tento kit obsahuje MDA standard pro použití pozitivní kontroly. Tento kit je nástroj pro přímé kvantitativní měření MDA v biologických materiálech, v tomto případě v séru.

Princip metody

Neznámý obsah malondyaldehydu (MDA) ve vzorcích a standardech reaguje s TBA při 95°C. Po krátké inkubaci jsou vzorky a standardy vyhodnoceny spektrofotometricky nebo fluorometricky. Obsah MDA v neznámém vzorku je určen porovnáním s predeterminační křivkou MDA standardu.

Potřeby

MDA Standard (1.0 mL)

Thiobarbituric Acid (1.0 g)

Roztok SDS Lysis (20 mL)

TBA Acid Dulient (25 mL)

Roztok Sodium Hydroxide (5 mL)

Roztok BHT (1.0 mL)

Vzorky séra

Tepelný inkubátor

Mikrocentrifuga

n-Butanol

mikrodestička pro spektrofotometrické vyhodnocení

Příprava reagentů

TBA Acid Diluent: zředíme TBA Diluent deionizovanou vodou v poměru 5:10.

Roztok SDS Lysis: krátce zahřejeme roztok při 37°C, aby došlo k rozpuštění SDS krystalů.

TBA reagent: TBA reagent připravíme těsně před použitím. Odměříme 2.6 mg/mL roztoku TBA Reagentu. Do TBA přidáme TBA Acid Diluent a promícháme, dokud se jemný prášek nerozpustí (12,5 mL TBA Diluent na 65 mg TBA). Použijeme pH metr kde upravíme pH roztoku přidáním roztoku hydroxidu sodného. Součástí pH metru je teploměr.

Roztok BHT: do každého vzorku přidáme antioxidant BHT (10 µl), aby se zabránilo dodatečné oxidaci lipidů v průběhu vzorkování a TBA reakce.

Příprava kalibrační křivky standardů

Připravíme ředící řadu MDA standardů v koncentračním rozmezí 125 µM – 0 µM ředěním MDA Standardu deionizovanou vodou (Tab. 4). Standardy jsou provedeny duplicitně.

Tabulka 4: Příprava MDA Standardů

Standard Tubes	MDA Standard (µL)	Water (µL)	MDA Standard (µM)
1	125 µL	875 µL	125
2	250 µL of Tube #1	250 µL	62.5
3	250 µL of Tube #2	250 µL	31.25
4	250 µL of Tube #3	250 µL	15.63
5	250 µL of Tube #4	250 µL	7.81
6	250 µL of Tube #5	250 µL	3.91
7	250 µL of Tube #6	250 µL	1.95
8	250 µL of Tube #7	250 µL	0.98
9	0 µL	250 µL	0.0

Postup práce

1. Očíslujeme zkumavky podle počtu vzorků a standardů. Do odpovídajících zkumavek dáme 100 μL z každého vzorku a MDA standardu.
2. Přidáme 100 μL roztoku SDS Lysis do každého vzorku a každého MDA standardu a důkladně promícháme. Vzorky necháme inkubovat 5 minut při pokojové teplotě.
3. Přidáme 250 μL TBA Reagentu do každého vzorku a každého standardu.
4. Zavřeme každou zkumavku, naskládáme do stojanu a vložíme do horké lázně. Necháme vzorky inkubovat 45 – 60 minut při 95°C.
5. Po vyndání zkumavek z horké lázně je obložíme na 5 minut kostkami ledu.
6. Vložíme všechny zkumavky do centrifugy a zapneme přístroj na 15 minut při 3000 rpm.
7. Po vyndání zkumavek z centrifugy odebereme z každé zkumavky 300 μL supernatanu a přidáme 300 μL n-Butanolu. 1 – 2 minuty je důkladně promícháme a poté vložíme do centrifugy a zapneme přístroj na 5 minut při 10 000 g.
8. Po vyndání zkumavek z centrifugy přeneseme z každé zkumavky 200 μL do odpovídající jamky mikrodestičky. Mikrodestička je kompatibilní pro spektrometrické měření. Měří se při absorbanci 532 nm. Obsah MDA ve vzorcích je určen porovnáním s predeterminační křivkou MDA standardu (příloha 5).

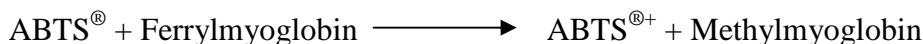
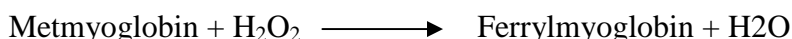
5.2.8 Celkový antioxidační status (TAS)

Použitá souprava Total Antioxidant Status STANDART (TAS CAL) NX 2332 dodávaná firmou RANDOX Laboratories Ltd, UK.

Princip metody

ABTS[®] (2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazolin sulphonát] se inkubuje s peroxidázou (metmyoglobin) a peroxidem vodíku a dochází k tvorbě radikálních kationtů ABTS^{®+} (registrovaná ochranná známka společnosti Boehringer Mannheim). Ty mají relativně stabilní

modrozelenou barvu a měří se při 600 nm. Antioxidanty v přidaném vzorku způsobují potlačení této barvy v takové míře, která je úměrná jejich koncentraci.



5.3 Přístroje

Biochemický analyzátor XL – 200, Erba Lachema

Přístroj Erba XL – 200 je moderní stolní analyzátor, který používá systém filtrů s výrazně ekonomickým provozem. Přístroj disponuje rozsáhlým programem řízení kvality a vyznačuje se snadnou obsluhou. Umožňuje výkon až 200 testů za hodinu a až 400 testů s ISE (Na / K / Cl / Li). Používá skleněné kyvety s pracovním objemem 180 µl.

Centrifuga Mini Spin, Eppendorf

Centrifuga Mini Spin, Eppendorf je miniaturní centrifuga s hliníkovým rotorem a ocelovým víkem, která je zároveň tichá. Má autoklávovatelný rotor při +121 °C. Maximálních otáček dosáhne za 13 sekund, za stejnou dobu dokáže i zastavit. Maximální kapacita je pro 12 zkumavek o objemu 1,5/2,0 ml.

Třepačka Vortex[®] Genie 2

Vortex Genie [®] 2-Mixer se používá pro třepání a míchání malých objemů. Má přepínač pro konstantní nebo střední třas. Dodává se s třepacím nástavcem pro zkumavky o objemu 25ml. Rozsah otáček: 600 – 2700 ot./min. Výrobce Si Scientific Industries, Inc.

Spektrofotometr VersaMax

VersaMax je monochromátorový mikrodestičkový reader pro endpoint a kinetické čtení ve viditelné oblasti spektra v 96-jamkových destičkách. Rozsah vlnových délek je 340 – 850 nm, nastavení po 1 nm, šířka vlnového pásma 2 nm. Součástí je software pro pořízení a analýzu dat SoftMaxPro. SoftMax Pro software se stará o ovládání všech funkcí přístroje, sběr dat a jejich funkční analýzu. Výrobce je Eastport Praha, s.r.o.

Vodní lázeň Memmert

Vodní lázeň Memmert je elektricky vyhřívaná vodní lázeň elektronicky kontinuálně řízená pomocí mikroprocesoru s pulzním ovládním. Přístroj je vybaven systémem diagnostiky chyb, vizuálním alarmem při překročení teploty o 10 °C a digitálním časovačem. Rozsah nastavitelných teplot je od 10 do 95°C s aktivací módu varu. Přesnost nastavení a odečtu 0,1°C. Vlastní vana i plášť lázně jsou zhotoveny z nerezového plechu. Topná tělesa jsou uložena v prolisech zvnějšku na bocích a pod dnem vany, takže nejsou v přímém kontaktu s náplní lázně. Výrobce Merci s.r.o.

Stolní pH metr InoLab

Jedná se o stolní mikroprocesorový přístroj na měření pH a teploty. Přístroj má velký dobře čitelný displej. Kalibrace je automatická. K přístroji je připojena elektroda SenTix 41.

Analytické váhy

Výrobce Schoeller instruments, s.r.o.

5.4 Komerční kity

- Souprava BIO-LA-TEST® TRIACYLGLYCEROLY LIQUID 250 S (TG L 250 S) dodávaná firmou PLIVA-Lachema Diagnostika s.r.o., CR.
- Souprava BIO-LA-TEST® kyselina močová Liquid 500 (UA L 500) dodávaná firmou Erba Lachema s.r.o., CR.
- Souprava BIO-LA-TEST® AST UV Liquid 250 (AST UV L 250), AST UV Liquid 500 (AST UV L 500) dodávaná firmou Erba Lachema s.r.o., CR.
- Souprava BIO-LA-TEST® Kreatinkinasa NAC LIQUID 100 (CK NAC L 100) dodávaná firmou Erba Lachema s.r.o., CR.
- Souprava BIO-LA-TEST® GLUKÓZA LIQUID 500 S (GLU L 500 S) dodávaná firmou PLIVA-Lachema Diagnostika s.r.o., CR.
- Souprava Merckodia Equine Insulin ELISA dodávaná firmou Merckodia AB.

- Souprava OxiSelect™ TBARS Assay Kit (MDA Quantitation) firmy CELL BIOLABS, INC.
- Souprava Total Antioxidant Status STANDART (TAS CAL) NX 2332 dodávaná firmou RANDOX Laboratories Ltd, UK.

5.5 Statistické vyhodnocení výsledků

Statistické vyhodnocení naměřených údajů bylo vyhodnoceno pomocí statistického softwarového programu STATISTICA CZ 2011 verze 9.1. Pro porovnání průměrných hodnot jednotlivých parametrů mezi kontrolním odběrem a následnými třemi odběry byl použit t - test pro závislé vzorky. Proměnlivost popisovala směrodatná odchylka – SD. Dále byly zjišťovány korelační vztahy mezi parametry tukového a energetického metabolismu a aktivitou svalových enzymů, antioxidační kapacitou a TBARS. Pro všechny statistické analýzy, byla hladina významnosti stanovena na $p \leq 0,05$. Statisticky signifikantní rozdíly jsou označeny různými písmeny.

6 VÝSLEDKY

Triacylglyceroly (TAG)

Již po 4 týdnech saturace pupalkovým olejem – EPO (4. odběr) byly průměrné hodnoty TAG statisticky významně vyšší ($P \leq 0,05$), v porovnání s průměrnými hodnotami před jeho podáváním (kontrola). Hodnoty na konci období podávání EPO (6. odběr) jsou také průkazně vyšší (Tab. 5, Graf 1).

Glukóza

Stejný efekt byl zaznamenán u glykémie, kde průměrné hodnoty ve 4. a 6. odběru (4 týdny a 8 týdnů po zahájení podávání EPO) byly průkazně vyšší ($P \leq 0,05$), v porovnání s kontrolním odběrem před zahájením jeho podávání (Tab. 5, Graf 1).

Inzulin

Hodnoty inzulinu byly z finančního důvodu stanoveny až od třetího odběru, což nemělo na sledování zásadní význam, protože 3. odběr byl kontrolní, tedy bez přídatku EPO. U hodnot inzulinu, jak prokazuje Tab. 5 a Graf 2, došlo v porovnání s hodnotami bez EPO (kontrola) ke statisticky významnému poklesu koncentrace ($P \leq 0,05$) již ve 4 týdnech po počátku podávání EPO (4. a 5. odběr). Nicméně na konci sledovaného období nebyl pokles statisticky významný. Zároveň ale v posledním odběru průměrná koncentrace inzulinu pozitivně korelovala s hodnotami glykémie (Tab. 6).

Ostatní korelace mezi parametry tukového a energetického metabolismu nebyly statisticky významné.

Tabulka 5: Vybrané krevní parametry energetického a tukového metabolismu před (kontrola), a po podání pupalkového oleje (4., 5., 6. odběr).

Parametry	Odběr	Počet vzorků	průměr	SD	p
TAG mmol. l ⁻¹	Kontrola	10	0,371 ^A	0,06822	
	4.	10	0,525 ^B	0,154	0,00294
	5.	10	0,419 ^A	0,116	0,19110
	6.	10	0,504 ^B	0,153	0,0069
Glukóza mmol. l ⁻¹	Kontrola	10	5,34 ^A	0,49	
	4.	10	6,05 ^B	0,40	0,01845
	5.	10	5,58 ^A	0,30	0,31056
	6.	10	7,14 ^B	1,12	0,001905
Inzulin μg. l ⁻¹	Kontrola	10	0,208 ^A	0,092	
	4.	10	0,135 ^B	0,069	0,00205
	5.	10	0,138 ^B	0,036	0,00978
	6.	10	0,173 ^A	0,113	0,46323

Statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$) jsou označeny abecedním indexem.

Tabulka 6. Korelace mezi vybranými parametry tukového a energetického metabolismu (kontrola, 5. a 6. odběr).

Parametr	Odběr	TAG	Inzulin	Glukóza
TAG	kontrola		-0,124	0,392
	5.		0,188	0,462
	6.		0,270	-0,307
Inzulin	kontrola	-0,124		-0,212
	5.	0,188		0,041
	6.	0,270		0,670 ^A
Glukóza	kontrola	0,392	-0,212	
	5.	0,462	0,041	
	6.	-0,307	0,670 ^A	

Statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$) jsou označeny abecedním indexem.

Látky reagující s kyselinou thiobarbiturovou (TBARS)

Látky reagující s kyselinou thiobarbiturovou (TBARS) jako představitelé míry obsahu látek vzniklých lipoperoxidací, především malondialdehydu, prokázaly již po 4 týdnech saturace EPO (4. odběr) statisticky významný pokles ($P \leq 0,05$), stejně tak na konci sledování (6. odběr) s kontrolním odběrem před zahájením jeho podávání (kontrola); (Tab. 7, Graf 3). Korelace mezi TAS a TBARS byla v 5. odběru středně silná, ale statisticky neprůkazná (Tab. 8).

Celková antioxidační aktivita (TAS)

Průměrné hodnoty TAS byly ve 4 týdnech po počátku saturace EPO (4. odběr) statisticky významně nižší ($P \leq 0,05$) než před zahájením jeho podávání (kontrola). V 5. a 6. odběru došlo ke zvýšení hodnot, které však nebylo statisticky významné (Tab. 7) v porovnání s kontrolním odběrem (kontrola). Na konci experimentu (6. odběr) byla zjištěna úzká korelace mezi hodnotami TAS a AST (Tab. 8).

Kyselina močová (UA)

Hodnoty kyseliny močové se od sebe v průběhu testování průkazně nelišily. Byl zjištěn mírný pokles koncentrace UA po přidání pupalkového oleje (4., 5. a 6. odběr), který však nebyl statisticky významný (Tab. 7, Graf 4).

Aspartátaminotransferáza (AST)

U průměrných hodnot aktivity aspartátaminotransferázy bylo 4 týdny po začátku podávání EPO (4. odběr) pozorováno statisticky významné zvýšení ($P \leq 0,05$), ve srovnání s kontrolním odběrem před zahájením jeho podávání (kontrola). Poté hodnoty mírně klesly (5. a 6. odběr), stále však byly vyšší než v kontrolním odběru bez EPO. Rozdíly ale nejsou statisticky významné (Tab. 7, Graf 5). V posledním – 6. odběru průměrné aktivity AST pozitivně korelovaly s hodnotami antioxidačních látek – TAS a s průměrnými aktivitami enzymu kreatinkinázy (CK); (Tab. 8).

Kreatinkináza (CK)

Průměrná hodnota sérové aktivity CK ve 4. odběru (4 týdny po počátku podávání EPO), ve srovnání s kontrolním odběrem před zahájením jeho podávání (kontrola), statisticky významně klesla ($P \leq 0,05$). Hodnota v 5. odběru byla nejvyšší, ne však statisticky významně. Důvodem vyšší průměrné hodnoty mohla být extrémně vysoká hodnota CK jednoho koně ze sledované skupiny ($28,8 \mu\text{kat.l}^{-1}$). Bez ohledu na toto zjištění došlo v průběhu pokusu k mírnému poklesu průměrných hodnot CK v krevním séru. Pokles aktivit CK však nebyl statisticky významný (Tab. 7, Graf 5). V posledním – 6. odběru průměrné aktivity CK pozitivně korelovaly s hodnotami AST (Tab. 8).

Tabulka 7: Aktivita svalových enzymů a celkový oxidační a antioxidační status v krevním séru před (kontrola), a po podání pupalkového oleje (4., 5., 6. odběr).

Parametry	Odběr	Počet vzorků	průměr	SD	p
TAS mmol. l ⁻¹	Kontrola	10	0,887 ^A	0,085	
	4.	10	0,791 ^B	0,115	0,035298
	5.	10	1,252 ^A	0,495	0,060148
	6.	10	1,156 ^A	0,438	0,104170
TBARS μmol. l ⁻¹	Kontrola	10	90,319 ^A	17,96	
	4.	10	74,446 ^B	20,53	0,029901
	5.	10	68,271 ^A	34,51	0,091482
	6.	10	38,052 ^B	14,68	0,000194
UA μmol. l ⁻¹	Kontrola	10	14,00 ^A	6,20	
	4.	10	10,70 ^A	2,791	0,186837
	5.	10	10,50 ^A	2,550	0,081425
	6.	10	11,00 ^A	4,667	0,212580
AST μkat. l ⁻¹	Kontrola	10	5,855 ^A	1,108	
	4.	10	7,325 ^B	0,890	0,00344
	5.	10	5,956 ^A	0,881	0,824019
	6.	10	6,512 ^A	0,905	0,052844
CK μkat. l ⁻¹	Kontrola	10	4,178 ^A	0,951	
	4.	10	3,214 ^B	0,849	0,033586
	5.	10	6,128 ^A	7,835	0,440351
	6.	10	3,887 ^A	1,218	0,543978

Statisticky významné rozdíly (P < 0,05) jsou označeny abecedním indexem.

Tabulka 8: Korelace mezi aktivitou svalových enzymů, TBARS a celkovou oxidační aktivitou v krevním séru (5. a 6. odběr).

Parametry	Odběr	AST	CK	TAS	TBARS
AST	5.		0,226	0,182	0,407
	6.		0,661 ^A	0,765 ^A	0,393
CK	5.	0,226		0,519	-0,007
	6.	0,661 ^A		0,468	0,089
TAS	5.	0,182	0,519		0,562
	6.	0,765 ^A	0,468		0,119
TBARS	5.	0,407	-0,007	0,562	
	6.	0,393	0,089	0,119	

Statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$) jsou označeny abecedním indexem.

7 DISKUZE

7.1 Vliv přídatku EPO na oxidační status a antioxidační úroveň organismu koní v zátěži

U dostihových koní v plné zátěži dochází k tvorbě a kumulaci kyslíkových radikálů a následné lipidové peroxidaci membrán buněk, které může vyústit až v poškození tkání (Kirschvink et al., 2008). Jedním z cílů práce bylo potvrdit pozitivní dopad přídatku oleje z pupalky dvouleté - EPO na antioxidační kapacitu organismu a tím snížení oxidativního stresu u koní v plné zátěži. Prokázat míru lipoperoxidace membrán buněk u konkrétního jedince v konkrétním okamžiku lze koncentrací malondialdehydu – MDA v krvi (White et al. 2001). Koncentrace MDA měřená prostřednictvím thiobarbiturát reaktivní substance (TBARS) u plnokrevných koní po zátěži, může být měřítkem oxidativního poškození tkání volnými radikály, jako produkty zátěže (Chiaradia et al., 1998). Silnou korelaci mezi fyzickou zátěží a produkty oxidativního stresu (TBARS) prokázal také Davis (2000). Také v našem sledování k objektivizaci míry poškození membrán buněk kyslíkovými radikály byly využity TBARS. U námi sledovaných plnokrevných koní v maximální zátěži došlo k statisticky významnému poklesu koncentrací TBARS již 4 týdny po podávání EPO (4. odběr). Další postupné snížení hodnot prokázal i 5. a 6. odběr tj. za 6 a 8 týdnů po podání EPO. Naše zjištění tedy poukazují na pozitivní dopad přídatku EPO do krmné dávky. Zároveň ke snížení produktů lipoperoxidace přispěl i správný management koní trenérem, protože jak uvádí Hornsby et al. (1993) eliminace produktů lipoperoxidace je pomalý proces, a pokud není po zátěži dostatečná klidová perioda, může docházet k akumulaci těchto nebezpečných látek a nakonec může dojít až k poškození tkání.

Pro potvrzení o míře narušení membrán svalových vláken byla vyšetřována aktivita specifických svalových enzymů aspartátaminotransferázy (AST) a kreatinkinázy (CK) (Valdberg, 2009). Přesto, že hodnoty průměrných aktivit AST a CK v krevním séru námi sledovaných koní překročily referenční hodnoty udávané Reed et al. (1997) a Eades et al. (2004), nelze je považovat za hodnoty prezentující narušené membrány svalových buněk. Domníváme se tak proto, že aktivity AST i CK u námi sledovaných koní byly srovnatelné s hodnotami, které uvádí Jagrič et al. (2012) u koní po zátěži, a také proto, že CK nepřekročilo aktivitu s takovou intenzitou (vice než 35x), kterou uvádí Valdberg et al. (1998) a při níž se ještě neprokázala myopatie. AST nebyly vyšší, než aktivity prezentované Harris (2000) ($7,5 \mu\text{kat} \cdot \text{l}^{-1}$) jako normálové po submaximálním zátěžovém testu. Pouze extrémně

vysoká hodnota CK jednoho ze sledovaných koní ($28,8 \mu\text{kat.l}^{-1}$) mohla být důsledkem poškození svalových vláken po extrémní zátěži, což je ve shodě se zjištěními Ludvíková and Jahn (2005). Korelaci AST a CK v 6. odběru podporuje výrok Ludvíková and Jahn (2005), že elevace hodnot AST nastupuje téměř současně s elevací CK.

To, že účinek pupalkového oleje s vyšším obsahem gama - linolenové kyseliny a dalších antioxidantů zvyšuje celkovou antioxidační aktivitu (TAS) prokázala řada autorů (Wettasinghe et al, 2002; Lu a Foo, 1995). Zvýšení celkové antioxidační kapacity po přidavku antioxidantů do diety potvrdila i studie Moffarts et al. (2005), kteří však pro stanovení celkové antioxidační kapacity použili jiné parametry. Předpokládaný kladný účinek EPO na zvýšení celkové antioxidační kapacity se u našich koní projevil ve zvýšených hodnotách v 6. a 8. týdnu podávání EPO, nicméně toto zvýšení nebylo statisticky významné. Zároveň se zvýšením TAS došlo k mírnému, statisticky neprůkaznému, poklesu hodnot kyseliny močové. Bereme-li kyselinu močovou jako významný antioxidant a scavengerový (vychytávací) systém krevní plazmy, který představuje 35 – 65% celkové antioxidační kapacity v plazmě (PAOC) (Maples and Mason, 1988), pak by působení TAS bylo o to vyšší, o co méně aktivní byla kyselina močová. Ovšem pokud respektujeme zjištění Morffarts et al. (2007), kteří neprokázali vliv vitaminového doplňku omega 3 a omega 6 mastných kyselin na hladiny kyseliny močové, nemůžeme toto tvrdit. Na druhou stranu došlo k poklesu TBARS, což je významným indikátorem snížení zátěži ROS. Korelace mezi TAS a TBARS byla v 5. odběru středně silná, ale statisticky neprůkazná.

7.2 Vliv přidavku EPO na vybrané parametry energetického a tukového metabolismu

Glukóza, inzulin a triacylglyceroly byly vybrány jako parametry charakterizující energetický a tukový metabolismus námi sledovaných koní.

Glukóza je představitelem pohotové energie v organismu koní v zátěži (Pagan et al, 2001). Ve 4. a v posledním odběru tj. po 4 a 8 - mi týdnech saturace EPO došlo k průkaznému zvýšení hodnot ve srovnání s kontrolním odběrem. Pouze v posledním odběru překračovala glukóza hodnoty uváděné Eades et al. (2004) jako referenční. Ostatní naměřené průměrné hodnoty glykémie u námi sledovaných koní se pohybovaly u horní referenční meze (Eades et al., 2004). Podle Gordona et al. (2007) je zvýšení koncentrace glukózy v krvi u koní

poměrně běžné a může souviset se zvýšenou stresovou zátěží temperamentních koní v souvislosti s odběrem krve. Protože naše odběry byly prováděny vždy 30 minut po nakrmení, mohly být hladiny glukózy zvýšeny i postprandiálně. Na skutečnost zvýšení glykémie po nakrmení poukazuje i Doubek a kol. (2007). To se shoduje i s konstatováním Jelínka a kol. (2003), který uvádí, že poločas rozpadu glukózy v krevní plasmě koně je 20 – 90 minut.

Tím, že se hodnoty glykémie pohybovaly při horní hranici referenčních mezí (Eades et al., 2004, Doubek a kol, 2007), metabolismus koně s ohledem na nutnost potřeby glukózy pro požadovanou výkonnost nepotřeboval aktivovat větší množství inzulinu (Pagan et al, 2001). Naopak ve 4. a 5. odběru došlo k průkaznému snížení hodnot. Průměrné hodnoty inzulinu se v průběhu sledovaného období pohybovaly mezi $0,13 \mu\text{g.l}^{-1}$ až $0,20 \mu\text{g.l}^{-1}$. Naše zjištění nekoreluje se závěrem, ke kterému dospěli Hess et al. (2012). Ti ve své studii zkoumali vliv doplňku mastných kyselin prostřednictvím rybího oleje na inzulinovou citlivost u plnokrevných koní a nezjistili jeho vliv na hladiny inzulinu v krvi testovaných koní. Naše zjištění je podpořeno závěry studie Gordona et al. (2007), kteří uvádí, že v průběhu zátěže pracující svaly přijímají glukózu bez pomoci inzulinu a tudíž dochází ke snížení koncentrace inzulinu a zvýšení koncentrace glukózy v plazmě.

Průměrné hodnoty triacylglycerolů v průběhu sledovaného období se pohybovaly mezi $0,37 - 0,53 \text{ mmol.l}^{-1}$. Vyšší hodnoty byly zaznamenány už po 4 týdnech saturace EPO. Podle Doubka a kol. (2010) ukazují vyšší hodnoty na zvýšený příjem energie, což časově odpovídá zařazení pupalkového oleje do krmné dávky. Hodnoty TAG jsou však podle Reeda et al. (1997) a Eadese et al. (2004) v referenčních mezích a poukazují na skutečnost, že koně neměli potřebu čerpat energii z tukových zásob.

8 ZÁVĚR

Sledování provedená u plnokrevných dostihových koní v maximální zátěži prokázala, že:

- Dotace pupalkového oleje v dávce 150 ml do jejich krmné dávky statisticky významně snížila látky reagující s kyselinou thiobarbiturovou (TBARS), jako představitele látek vzniklých lipoperoxidací, především malondialdehydu.
- Celková antioxidační aktivita (TAS) se zvýšila již po 6-týdnech saturace a přetrvávala do konce pokusu, ale její zvýšení nebylo statisticky významné.
- Studie neprokázala statisticky významné změny sérových hodnot kyseliny močové ani vybraných svalových enzymů - aspartátaminotransferáza (AST) a kretininkinázy (CK).
- Vlivem podávání pupalkového oleje došlo ke statisticky významnému zvýšení hladin glukózy a triacylglycerolů a snížení hladin hormonu inzulínu.

Závěrem lze konstatovat, že pupalkový olej, a v něm obsažené antioxidanty, mají pozitivní vliv na snížení oxidativního stresu dostihových koní v maximální zátěži, což dokládaly i hodnoty aktivit vybraných svalových enzymů. Zároveň byl prokázán dopad přídatku oleje z pupalky dvouleté na energetický a tukový metabolismus. Použití oleje z pupalky dvouleté může být tedy vhodným doplňkem diety sportovních koní v zátěži.

LITERATURA

1. Belch J. J. F., Hill A. 2000. Evening primrose and borage oil in rheumatological conditions. *American Journal of Clinical Nutrition*. 71. 352 - 356.
2. Bowling B. A., Hodgson D. R., Rose R. J. 2000. *Manual of equine practice*. 2nd ed. W. B. Saunders Company. 403-426. ISBN 0-7216-8665-6.
3. Coenen M. 2005. Exercise and stress – Impact on adaptive processes involving water and electrolytes. *Livestock Production Science*. 92. 131 – 145.
4. Crandell K. 200?. Selenium – How important it is. *Equine News*. 2/4. 9 – 11.
5. Davis U. C. 2000. Oxidative stress and antioxidants. *Equine sports medicine and science*. 131 – 135.
6. Deaton C. M. et Marlin D. J. 2003. Exercise-Associated Oxidative Stress. *Clinical Techniques in Equine Practice*. 2/3. 278 – 291.
7. Deaton, C. M. 2006. The role of oxidative stress in an equine model of human asthma. *Redox Report: Communications in Free Radical Research*. 11. 46–52.
8. Deaton C. M., Marlin D. J., Smith N. C., Roberts C. A., Harris P. A., Schroter R. C., Kelly F. J. 2005. Antioxidant and inflammatory responses of healthy horses and horses affected by recurrent airway obstruction to inhaled ozone. *Equine Veterinary Journal*. 37. 243–249.
9. Di Meo S., Venditti P. 2001. Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biological Signals and Receptors*. 10. 125–140.
10. Doubek J., Bouda J., Doubek M., Fűrll M., Knotková Z., Pejřilová S., Pravda D., Scheer P., Svobodová Z., Vodička R. 2003. *Veterinární hematologie*. Noviko Brno. 464 s. ISBN 80-86542-02-5.
11. Doubek J., Šlosárová S., Řeháková K., Bouda J., Scheer P., Pipersová I., Tomenendálová J., Matalová E. 2010. *Interpretace základních biochemických a hematologických nálezů u zvířat*. Noviko s.r.o. Brno. 99 s.

12. Droge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Rev.* 82. 47-95.
13. Eades S. C., Bounous D.I. 1997. *Laboratory profiles of equine diseases.* Mosby. 304 s.
14. Evans D. L. 2000. *Training and fitness in athletic horses.* Rural industries research and development corporation. 65 s. ISBN 1440-6845.
15. Frank N. 2009. Equine Metabolic Syndrome. *Journal of Equine Veterinary Science.* 29/5. 259 – 266.
16. Gomes E. C., Silva A. N., Oliveira M. R. 2012. Oxidants, Antioxidants, and the Beneficial Roles of Exercise-Induced Production of Reactive Species. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 756132
17. Gordon M. E., McKeever K. H., Betros C. L., Manso Filho H. C. 2007. Exercise-induced alterations in plasma concentrations of ghrelin, adiponectin, leptin, glucose, insulin and cortisol in horses. *The Veterinary Journal.* 173. 532 – 540.
18. Grau J., Jung R., Munker B. 1996. *Bobulovitě, užitkové a léčivé rostliny.* Ikar Praha. 287 s. ISBN 80-7202-023-4.
19. Hanák J., Olehla Č. 2010. *Klinická fyziologie koní a jejich trénink.* Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. ISBN: 970-80-7305-131.
20. Harris P. A. 2000. Myopathy in horses and its relationship to nutrition – “Myopatie koní a jejich vztah k výživě”. In: *Sborník referátů pracovního semináře ČHS. Brno.* 1 - 37.
21. Hess T. M., Rexford J., Hansen D. K. Ahrens N. S., Harris M., Engle T., Ross T., Allen K. G. 2012. Effects of U-3 (n-3) Fatty Acid Supplementation on Insulin Sensitivity in Horses. *Journal of Equine Veterinary Science.* 1-8.
22. Higgins A. J., Snyder J. R. 2006. *The equine manual.* Elsevier saunders. 1442 s. ISBN 0702027693.

23. Hinchcliff K. W., Geor J. R., Kaneps A. J. 2008. Equine exercise physiology – The Science of Exercise in the Athletic Horse. Saunders Elsevier. USA. ISBN 9780702028571.
24. Hornsby P. J., Crivello J. F. 1993. The role of lipid peroxidation and biological antioxidants in the function of the adrenal cortex. Part 1: a background review. *Molecular Cell Endocrinology*. 30. 1-20.
25. Chiaradia E., Avellini L., Rueca F., Spaterna A., Porciello F., Antonioni M. T. 1998. Physical exercise, oxidative stress and muscle damage in racehorses. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B*. 119. 833-836.
26. Jagrič M. S., Nemeč S. A., Zrimšek P., Kramarič P., Kos K. V., Vovk T., Kopal S. 2012. Plasma malondialdehyde, biochemical and haematological parameters in standardbred horses during selected field exercise test. *Acta veterinaria (Beograd)*. 62/1.53 - 65.
27. Jansson A., Nyman S., Lindholm A., Lindberg J. E. 2002. Effects on exercise metabolism of varying starch and sugar proportions. *Equine Veterinary Journal*. 34. 17 – 21.
28. Jelínek P., Koudela K., Doskočil J., Kotrbáček V., Koudela K., Kovářů F., Kroupová V., Kučera M., Kudláč E., Trávníček J., Valent M. 2003. Fyziologie hospodářských zvířat. GRAFOS. Brno. 414 s. ISBN 8071576441.
29. Kirschvink N., Moffarts B., Lekeux P. 2008. The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *The Veterinary Journal*. 177. 178–191
30. Kirschvink N., Fieves L., Bougnet V., Art T., Degand G., Smith N., Marlin D., Roberts C., Harris P., Lekeux P. 2002. Effect of nutritional antioxidant supplementation on systemic and pulmonary antioxidant status, airway inflammation and lung function in heaves-affected horses. *Equine Veterinary Journal*. 34. 705-712.
31. Kobayashi T., Tsunawaki S., Seguchi H. 2001. Evaluation of the process for superoxide production by NADPH oxidase in human neutrophils: evidence for cytoplasmic origin of superoxide. *Redox Report: Communications in Free Radical Research*. 6. 27–36.

32. Kowaltowski A. J., Vercesi A. E. 1999. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. 26. 463–471.
33. Lu F., Foo L. Y. 1995. Phenolic antioxidant components of mening primrose. In: *Nutrition, Lipids, Health and Disease*, (Eds.) Ong A. S. H., Niki E., Packer L. AOCS Press. Champaign Il (USA). 86 - 95.
34. Ludvíková E., Jahn P. 2005. Myopatie u koní a jejich diferenciální diagnostika. *Klinika chorob koní, Fakulta veterinárního lékařství Veterinární a farmaceutické univerzity Brno. Veterinářství*. 55. 345 – 348.
35. Lykkesfeldt J., Svendsen O. 2007. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *Veterinary Journal*. 173. 502–511.
36. Maples, K.R., Mason, R.P. 1988. Free radical metabolite of uric acid. *Journal of biological chemistry*. 263. 1709 – 1712.
37. Marlin D. J., Fenn K., Smith N., Deaton C. D., Roberts C. A., Harris P. A., Dunster C., Kelly F. J. 2002. Changes in circulatory antioxidant status in horses during prolonged exercise. *The Journal of Nutrition*. 132. 1622–1627.
38. Moffarts B., Kirschvink N., Art T., Pincemail J., Lekeux P. 2005. Effect of oral antioxidant supplementation on blood antioxidant status in trained thoroughbred horses. *The Veterinary Journal*. 169. 65–74.
39. Morffarts B., Portier K., Kirschvink N., Coudert J., Fellmann N., Erck E., Letellier C., Motta C., Pincemail J., Art T., Lekeux P. 2007. Effects of exercise and oral antioxidant supplementation enriched in (n – 3) fatty acids on blood oxidant markers and erythrocyte membrane fluidity in horses. *The veterinary journal*. 174. 113 - 121.
40. Mudway I. S., Kelly F. J. 2000. Ozone and the lung: a sensitive issue. *Molecular Aspects of Medicine*. 21. 1–48.
41. Pagan, J. D., Geor, R. J., Caddel, S. E., Pryor P.. 2001. The relationship between glycemic response and the incidence of OCD in thoroughbred weanlings: a field study. *Proceedings American association of equine practitioners*. 47. 322 – 324.

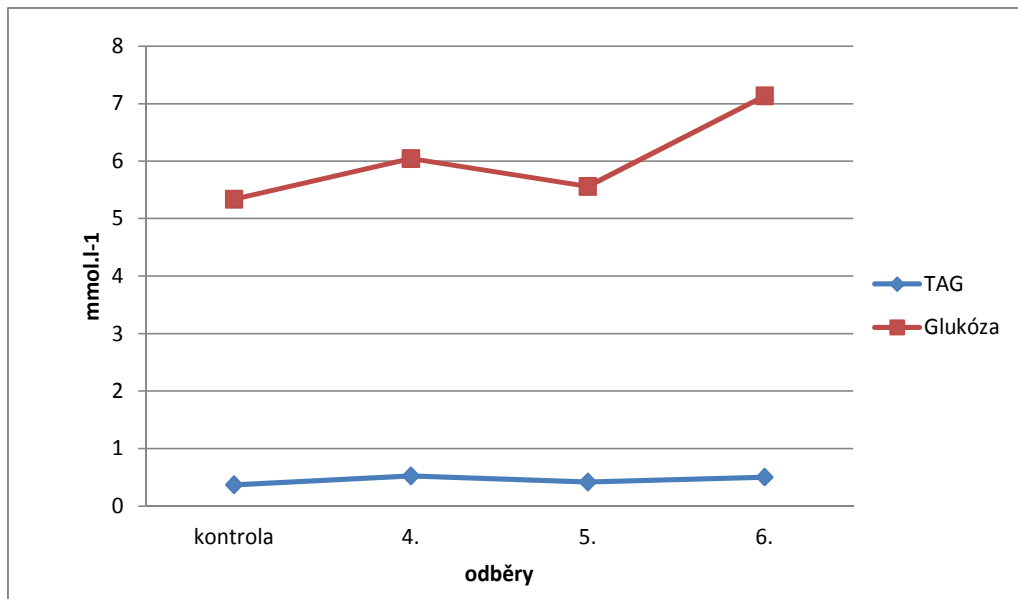
42. Ping-Chi Hsu, Yueliang Leon Guo. 2002. Antioxidant nutrients and lead toxicity. *Toxicology*. 180. 33-44.
43. Rahman I. 2005. The role of oxidative stress in the pathogenesis of COPD: implications for therapy. *Treatments in Respiratory Medicine*. 4. 175–200.
44. Rasanen L. A., Wiitanen P. A. S., Lilius E. M., Hyyppa S., Reeta A. 1996. Accumulation of Uric Acid in Plasma after Repeated Bouts of Exercise in the Horse. *Comparative biochemistry and physiology*. 114/2. 139 – 144.
45. Reed S. M., Bayly W. M., Sellon D. C. 2004. *Equine internal medicine*. Saunders, 1659.
46. Schmidt S. L., Hickey M. S. 2009. Regulation of insulin action by diet and exercise. *Journal of equine veterinary science*. 29/5. 274 – 284.
47. Schubach K., Gustavsson E. B. 1998. Muscle anaerobic response to a maximal treadmill exercise test in Standardbred trotters. *Equine Veterinary Journal*. 30/6. 504 – 510.
48. Sies H. 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine*. 91. 31–38.
49. Suková I. Bioaktivní polyfenoly v extraktu ze semen pupalky. [online]. *Agronavigátor*. 26. 9. 2011. [cit. 2013-02-20]. Dostupné z <<http://www.agronavigator.cz/service.asp?act=print&val=113963>>.
50. Valberg S. J. 2009. The musculoskeletal system. Heritable muscle diseases. In: *Current Therapy in Equine Medicine*. (Eds.). Robinson N. E., Sprayberry K. A. Saunders Elsevier. 461 – 468. ISBN-9781416054757.
51. Valberg S. J. 1998. Exertional Rhabdomyolysis. In: *Advances in Equine Nutrition*. (Ed.) Pagan J.D. Kentucky Equine Research Inc. Waltham Centre for Equine Nutrition and Care. Melton Mowbray. 507- 512.
52. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T., Mazur M., Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 39. 44–84.

53. Velíšek, J. 2006. *Chemie potravin*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotních oborů. 164s. ISBN 80-7013-435-6.
54. Voet D. et Voet J. G. 2005. *Biochemie*. Victoria Publishing. Praha. 1350 s. ISBN: 80-85605-44-9.
55. Pothiwong W., Laorpaksa A., Pirarat N., Sirisawadi S., Intarapanya J., Jianmongkol S. 2007. Autoxidation of brain homogenates from various animals as measured by thiobarbituric acid assai. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 56/3. 336-338.
56. Wettasinghe M., Shahidi F. 2002. Iron (II) chelation activity of extracts of borage and evening primrose meals. *Food Research International*. 35/1. 65 – 71.
57. White A., Estrada M., Walker K. Wisnia P., Figueira G., Valdés F., Araneda O., Martinez R. 2001. Role of exercise and ascorbate on plasma antioxidant capacity in thoroughbred race horses. *Comparative Biochemistry Physiology. Part A: Molecular & Integrative physiology*. 128/1. 90 – 104.
58. Williams C. A., Kronfeldt D. S., Hess T. M., Saker K. E., Waldron J. N., Crandell K. M., Hoffman R. M., Harris P. A. 2004. Antioxidant supplementation and subsequent oxidative stress of horses during an 80-km endurance race. *Journal of Animal Science*. 82. 588–594.
59. Young I. S., Woodside J. V. 2001. Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*. 54. 176–186.

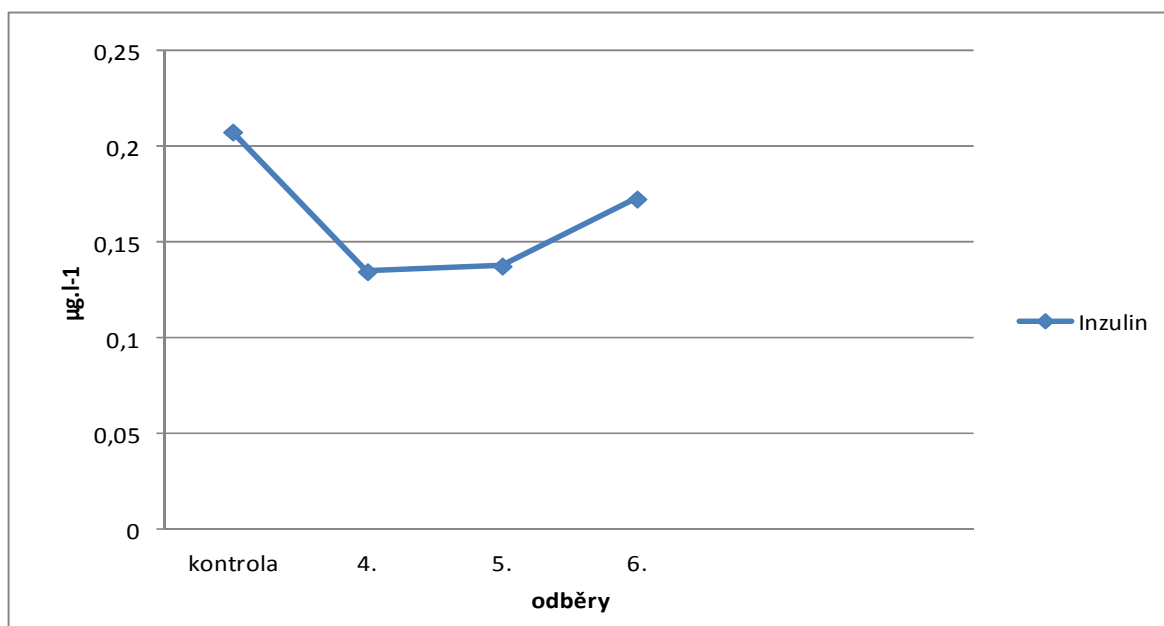
9 PŘÍLOHY

9.1 Příloha 1 – grafy

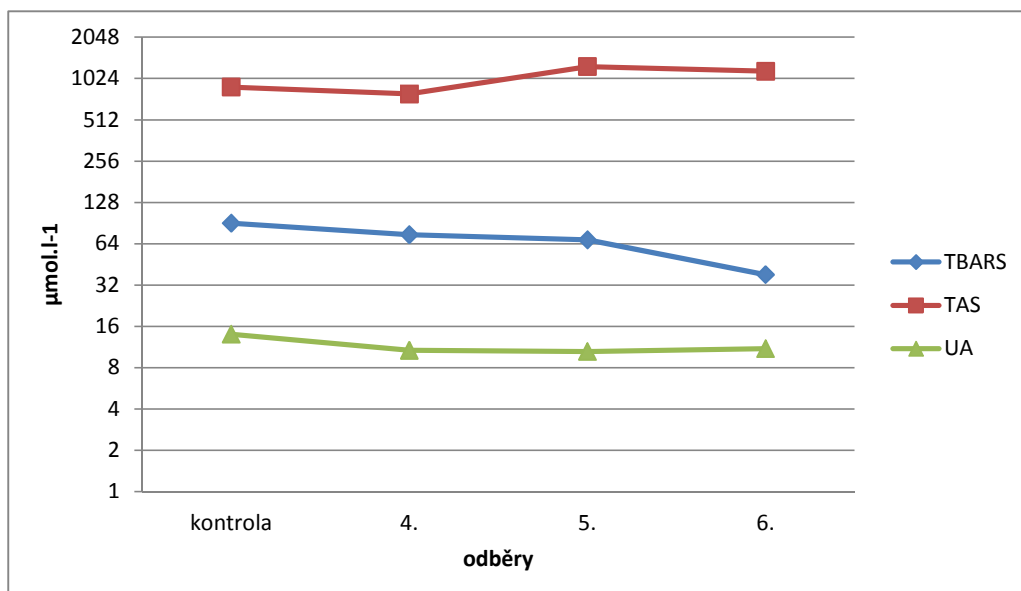
Graf 1. Dynamika změn průměrných hodnot triacylglycerolů (TAG) a glukózy od kontrolního odběru (bez přidavku pupalkového oleje) do 4. - 6. odběru (4., 6., 8. týden podávání pupalkového oleje).



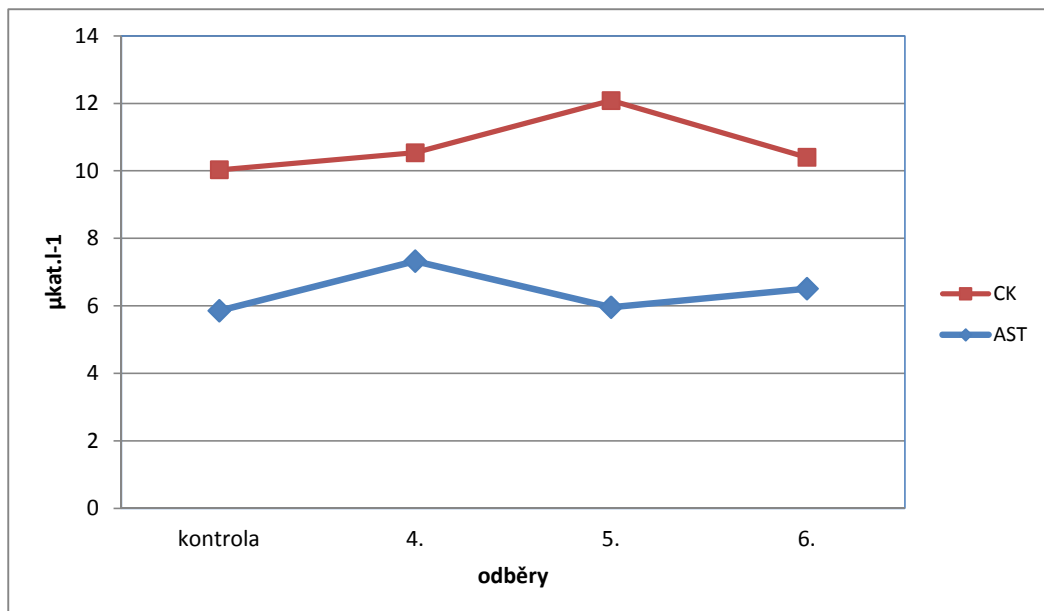
Graf 2. Dynamika změn koncentrace inzulinu od kontrolního odběru (bez přidavku pupalkového oleje) do 4. - 6. odběru (4., 6., 8. týden podávání pupalkového oleje).



Graf 3. Dynamika změn průměrných sérových hodnot celkových oxidačních (TAS) a antioxidačních látek (TBARS) a kyseliny močové (UA) od kontrolního odběru (bez přidavku pupalkového oleje) do 4. - 6. odběru (4., 6., 8. týden podávání pupalkového oleje).



Graf 4. Dynamika změn průměrných hodnot aktivit vybraných svalových enzymů aminotransferázy (AST) a kreatinkinázy (CK) od kontrolního odběru (bez přidavku pupalkového oleje) do 6. odběru (4., 6., 8. týden podávání pupalkového oleje).



9.2 Příloha 2 – Pupalka dvouletá - rostlina



Dostupné z <http://tilia.zf.mendelu.cz/ustavy/553/lakt/_private/data/OENOTHERA%20BIENNIS.htm>

9.3 Příloha 3 – Pupalka dvouletá – semena



Dostupné z <http://tilia.zf.mendelu.cz/ustavy/553/lakr/_private/data/OENOTHERA%20BIENNIS.htm>

9.4 Příloha 4 – Luka Racing Bošovice



Dostupné z <<http://www.lukaracing.cz/galleries/18-treninkove-stredisko>>

9.5 Příloha 5 – stanovení TBARS

