

Posúdenie antioxidačnej kapacity u koní plemena American Quarter Horse

¹ Tamara Hoppejová

² Stanislav Hreško

³ František Zigo

⁴ Andrej Récky

¹ Katedra výživy a chovu zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, tamara.hoppejova@student.uvlf.sk

² Katedra výživy a chovu zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, stanislav.hresko@uvlf.sk

³ Katedra výživy a chovu zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, frantisek.zigo@uvlf.sk

⁴ Katedra výživy a chovu zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, andrej.recky@student.uvlf.sk

Grant: KEGA č. 011UVLF-4/2024 (20%), VEGA č. 1/0698/24 (60 %) a VEGA č. 1/0427/26 (20 %).

Názov grantu: Improving the quality of practical teaching with the support of animal breeding and higher education for students from the subject of animal husbandry.

Oborové zamčrení: GH – Výživa hospodárskych zvierat

© GRANT Journal, MAGNANIMITAS Assn.

Abstrakt Oxidačný stres predstavuje významný faktor ovplyvňujúci zdravotný stav, reprodukciu, fyzickú výkonnosť a adaptačné mechanizmy koní. Cieľom tejto štúdie bolo vyhodnotiť vybrané biomarkery antioxidačného statusu u klinicky zdravých koní plemena American Quarter Horse. Do štúdie bolo zaradených 13 klinicky zdravých koní (7 kobýl a 6 valachov) vo veku 4 až 15 rokov, využívaných na chov a rekreačné účely. Celkový antioxidačný status (TAS) a koncentrácia malondialdehydu (MDA) boli stanovené v sére, aktivita glutatiónperoxidázy (GPx) v heparinizovanej plnej krvi. Priemerná hodnota TAS bola $2,42 \pm 0,53$ mmol/l, aktivita GPx 862 ± 265 U/l a koncentrácia MDA $0,131 \pm 0,022$ μ mol/l. Výsledky poukazujú na priaznivý antioxidačný profil a absenciu známkov zvýšeného oxidačného stresu u sledovaných koní. Výsledky tejto štúdie prispievajú k rozšíreniu poznatkov o antioxidačnom statuse plemena American Quarter Horse v podmienkach Slovenska.

Kľúčová slova oxidačná rovnováha, antioxidačná ochrana, American Quarter Horse

1. ÚVOD

Oxidačný stres vzniká pri narušení rovnováhy medzi tvorbou reaktívnych foriem kyslíka (ROS) a antioxidačnou obranou organizmu. Nadmerná produkcia ROS vedie k oxidatívnejmu poškodeniu lipidov, bielkovín a nukleových kyselín, čím nepriaznivo ovplyvňuje bunkovú homeostázu a funkciu tkanív. U koní sa oxidačný stres podieľa na fyziologických adaptačných procesoch, ovplyvňuje zdravotný stav, reprodukčné funkcie aj športovú výkonnosť a jeho intenzita sa mení v závislosti od metabolickej záťaže a podmienok prostredia (Shono et al., 2020; Arfuso et al., 2022).

Dôležitou súčasťou enzymatickej antioxidačnej ochrany je glutatiónperoxidáza (GPx), ktorá katalyzuje redukciu peroxidu vodíka a organických hydroperoxidov. Celkový antioxidačný status (TAS) poskytuje komplexnú informáciu o antioxidačnej kapacite organizmu, zatiaľ čo malondialdehyd (MDA), konečný produkt

lipidovej peroxidácie, patrí medzi najčastejšie využívané ukazovatele oxidatívneho poškodenia (Bottegaro et al., 2018; Yildirim a Apaydin Yildirim, 2023).

Produkcia ROS fyziologicky narastá počas svalovej práce v dôsledku zvýšeného aeróbného metabolizmu. Ak tvorba reaktívnych foriem kyslíka presiahne kapacitu antioxidačného systému, dochádza k rozvoju oxidačného stresu sprevádzaného zmenami koncentrácií biomarkerov oxidatívneho poškodenia. Predchádzajúce štúdie preukázali, že intenzita fyzickej záťaže významne ovplyvňuje antioxidačný status športových a vytrvalostných koní, pričom rozsah zmien závisí od úrovne tréningu, kondície a adaptačnej schopnosti organizmu (Bottegaro et al., 2018; Arfuso et al., 2022).

Významným faktorom ovplyvňujúcim antioxidačnú kapacitu je výživa. Dostatočný prísun stopových prvkov zabezpečuje optimálnu aktivitu antioxidačných enzýmov a prispieva k udržiavaniu redoxnej homeostázy. (Latham et al. 2021) preukázali, že suplementácia komplexne viazanými stopovými prvkami zvýšila aktivitu antioxidačných enzýmov a zlepšila fyziologickú odpoveď mladých koní na transportný stres.

Napriek rastúcemu záujmu o hodnotenie biomarkerov oxidačného stresu u koní zostávajú údaje o antioxidačnom statuse klinicky zdravých jedincov plemena American Quarter Horse chovaných v podmienkach Slovenska obmedzené. Cieľom tejto štúdie bolo vyhodnotiť celkový antioxidačný status, aktivitu glutatiónperoxidázy a koncentráciu malondialdehydu u klinicky zdravých koní plemena American Quarter Horse chovaných v podmienkach Slovenska a poskytnúť základné údaje využiteľné v ďalšom výskume aj klinickej praxi.

2. MATERIÁL A METODIKA

2.1 Zvieratá, odber a spracovanie vzoriek

Do štúdie bolo zaradených celkovo 13 klinicky zdravých koní plemena American Quarter Horse. American Quarter Horse je plemeno pochádzajúce zo Spojených štátov amerických, ktoré sa

začalo výraznejšie rozširovať v krajinách strednej Európy po spoločenských zmenách na prelome 80. a 90. rokov 20. storočia. Napriek rastúcej popularite tohto plemena sú informácie o antioxidačnom stave koní plemena American Quarter Horse chovaných v podmienkach Slovenskej republiky stále obmedzené. Monitorovanú skupinu tvorilo sedem kobýl a šesť valachov vo veku od 4 do 15 rokov, využívaných na chovné a rekreačné účely. Telesná hmotnosť koní sa pohybovala v rozmedzí od 470 do 540 kg. Telesná kondícia všetkých zvierat bola hodnotená pomocou 9-bodového systému Body Condition Score (BCS) a zodpovedala normálnej telesnej kondícii (BCS = 5) (Potter et al., 2024).

Kone pochádzali z farmy nachádzajúcej sa v regióne Spiš na východnom Slovensku a boli ustajnené v podmienkach vonkajšieho ustajnenia. Štúdia bola realizovaná počas zimného obdobia, keď sa zvieratá nenachádzali na pastve. Krmná dávka pozostávala predovšetkým z lúčneho sena pochádzajúceho od miestneho dodávateľa, ktoré tvorilo hlavnú zložku krmnej dávky. Počas celého obdobia štúdie mali kone neobmedzený prístup k pitnej vode.

Všetky zvieratá boli pravidelne odčervované v súlade s odporúčaným veterinárnym programom. Pred zaradením do štúdie boli všetky kone podrobené klinickému vyšetreniu a nevykazovali žiadne príznaky ochorenia ani iné zdravotné poruchy, ktoré by mohli ovplyvniť hodnotené parametre. Počas trvania štúdie boli všetky zvieratá chované v porovnateľných podmienkach manažmentu a ustajnenia.

2.2 Odber krvi a spracovanie vzoriek

Vzorky krvi boli odobraté z *vena jugularis* všetkých vyšetrovaných koní za štandardných podmienok s dôrazom na minimalizáciu stresu zvierat počas odberu. Krv určená na biochemické a antioxidačné analýzy bola odoberaná do skúmaviek so separačným gélom na získanie séra (SST). Ďalšie vzorky krvi určené na stanovenie aktivity glutatiónperoxidázy (GPx) boli odoberané do heparinizovaných skúmaviek.

Po odbere boli vzorky transportované do laboratória a spracované čo najskôr za štandardných laboratórnych podmienok. Vzorky krvi odobraté do SST skúmaviek boli následne centrifugované pri 3500 otáčkach za minútu počas 10 minút s cieľom získať sérum. Oddelené sérum bolo použité na stanovenie vybraných antioxidačných parametrov, zatiaľ čo heparinizovaná plná krv bola využitá na stanovenie aktivity glutatiónperoxidázy (GPx).

Obrázok 1. Laboratórny postup pri stanovení antioxidačných parametrov.



2.3 Stanovenie celkového antioxidačného statusu (TAS)

Celkový antioxidačný status bol stanovený pomocou súpravy Randox Total Antioxidant Status NX2332 (Randox Laboratories Ltd., Spojené kráľovstvo). Metóda je založená na inhibícii tvorby katiónového radikálu ABTS®. Absorbancia bola meraná spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 600 nm pomocou UV-VIS spektrofotometra ONDA V-10 PLUS (Giorgio Bormac S.r.l., Taliansko). Hodnoty TAS boli vypočítané podľa pokynov výrobcu s využitím kalibračných postupov a vyjadrené v mmol/l.

2.4 Stanovenie aktivity glutatiónperoxidázy (GPx)

Aktivita glutatiónperoxidázy bola stanovená pomocou súpravy Ransel RS504 (Randox Laboratories Ltd., Spojené kráľovstvo). Metóda je založená na oxidácii redukovaného glutatiónu kuménhydroperoxidom za prítomnosti glutatiónreduktázy a NADPH. Pokles absorbancie NADPH bol sledovaný pri vlnovej dĺžke 340 nm pomocou UV-VIS spektrofotometra ONDA V-10 PLUS (Giorgio Bormac S.r.l., Taliansko). Priemerná zmena absorbancie za minútu bola vypočítaná podľa nasledujúcej rovnice:

$$\Delta A/\text{min} = (A1 - A3) / 2$$

Aktivita GPx bola vypočítaná podľa vzťahu:

$$\text{GPx (U/l)} = 8412 \times (-\Delta A/\text{min})$$

Výsledky boli vyjadrené v jednotkách U/l hemolýzátu.

2.5 Stanovenie koncentrácie malondialdehydu (MDA)

Koncentrácia malondialdehydu bola stanovená metódou reaktívnych látok s kyselinou tiobarbiturovou podľa Ohkawa et al. (1979). Malondialdehyd reaguje s kyselinou tiobarbiturovou za vzniku farebného komplexu MDA-TBA, ktorý bol meraný spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 532 nm pomocou UV-VIS spektrofotometra ONDA V-10 PLUS (Giorgio Bormac S.r.l., Taliansko) (Ohkawa et al., 1979).

Koncentrácia MDA bola vypočítaná podľa Beerovho-Lambertovho zákona pomocou nasledujúcej rovnice:

$$\text{MDA } (\mu\text{mol/l}) = A \times 6,41$$

kde A predstavuje absorbanciu nameranú pri vlnovej dĺžke 532 nm.

2.6 Štatistická analýza

Získané údaje boli štatisticky vyhodnotené pomocou základných metód opisnej štatistiky. Pre všetky hodnotené parametre boli vypočítané priemerné hodnoty, smerodajné odchýlky, minimálne hodnoty a maximálne hodnoty.

3. VÝSLEDKY A DISKUSIA

Tabuľka 1. Individuálne hodnoty antioxidantných parametrov u koní plemena American Quarter Horse.

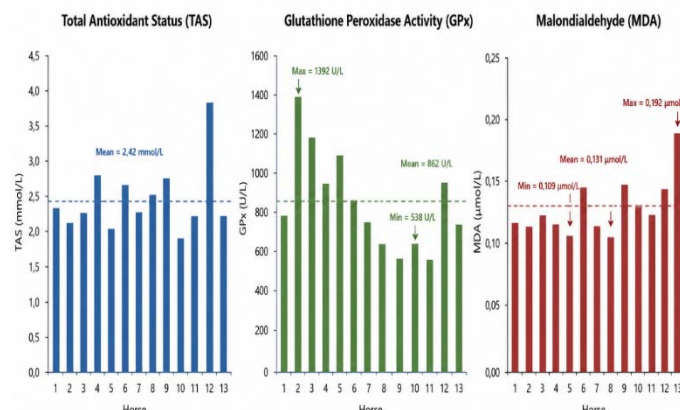
Kone	TAS (mmol/L)	GPX (U/L)	MDA (μ mol/L)
1	2.31	770	0.115
2	2.12	1392	0.115
3	2.23	1178	0.122
4	2.77	967	0.115
5	2.04	1102	0.109
6	2.69	833	0.141
7	2.46	736	0.122
8	2.73	652	0.109
9	1.92	538	0.135
10	2.23	648	0.128
11	1.81	551	0.160
12	3.85	1106	0.135
13	2.27	736	0.192

Tabuľka 2. Základné štatistické ukazovatele vybraných biomarkerov antioxidantného stavu

Parameter	Priemer $\pm$ SD	Minimum	Maximum
TAS (mmol/L)	2.42 $\pm$ 0.53	1.81	3.85
GPX (U/L)	862 $\pm$ 265	538	1392
MDA (μ mol/L)	0.131 $\pm$ 0.022	0.109	0.192

Hodnoty celkového antioxidantného statusu (TAS) sa pohybovali v rozmedzí 1,81–3,85 mmol/l, pričom priemerná hodnota dosiahla $2,42 \pm 0,53$ mmol/l (Tabuľka 1). Zistená variabilita hodnôt TAS bola nízka, čo poukazuje na relatívne homogénny antioxidantný status sledovanej skupiny. Celkový antioxidantný status odráža súhrnnú antioxidantnú kapacitu organizmu, pričom vyššie hodnoty indikujú efektívnejšiu ochranu pred účinkami reaktívnych foriem kyslíka. Získané výsledky korešpondujú so zisteniami Bottegara et al. (2018), podľa ktorých je antioxidantný status koní ovplyvnený najmä metabolickou aktivitou a intenzitou fyzickej záťaže.

Obrázok 2. Individuálne hodnoty vybraných antioxidantných biomarkerov u koní plemena American Quarter Horse



Poznámka: TAS – celkový antioxidantný stav; GPx – glutatiónperoxidáza; MDA – malondialdehyd.

Aktivita glutatiónperoxidázy sa pohybovala v rozmedzí od 538 do 1392 U/l, pričom priemerná hodnota dosiahla 862 ± 265 U/l. Najnižšia aktivita bola zaznamenaná u koňa č. 9, zatiaľ čo najvyššia aktivita bola zistená u koňa č. 2. Vyššia aktivita GPx môže naznačovať efektívnejšie enzymatické mechanizmy antioxidantnej obrany. Pozorovaná variabilita medzi jednotlivými zvieratami poukazuje na rozdiely v enzymatickej antioxidantnej obrane. GPx zohráva významnú úlohu pri detoxikácii peroxidu vodíka a lipidových hydroperoxidov, čím chráni bunkové štruktúry pred oxidačným poškodením. (Latham a kol. 2021) preukázali, že aktivita antioxidantných enzýmov u koní môže byť ovplyvnená nutričným stavom a podmienkami prostredia. Podobné zistenia uviedli aj (Niedźwiedz a kol. 2014), ktorí zaznamenali zmeny v aktivitách antioxidantných enzýmov u koní vystavených oxidačnému stresu.

Priemerná koncentrácia MDA dosiahla hodnotu $0,131 \pm 0,022$ μ mol/l, pričom hodnoty sa pohybovali v rozmedzí od 0,109 do 0,192 μ mol/l. Najvyššia koncentrácia bola zaznamenaná u koňa č. 13, zatiaľ čo najnižšie hodnoty boli zistené u koní č. 5 a č. 8.

MDA sa považuje za významný marker lipidovej peroxidácie a oxidačného poškodenia. Relatívne nízke koncentrácie zistené v tejto štúdii môžu naznačovať nízky stupeň oxidačného stresu u vyšetrovaných koní. Podobné výsledky uviedli (Yildirim a Apaydin 2023), ktorí pozorovali nižšie koncentrácie MDA u koní s priaznivým antioxidantným stavom. Zvýšené koncentrácie MDA boli spojené s rôznymi patologickými stavmi a zvýšeným oxidačným stresom u koní.

Celkovo získané výsledky naznačujú priaznivý antioxidantný profil charakterizovaný relatívne vysokými hodnotami TAS, primeranou aktivitou GPx a nízkymi koncentraciami MDA. Zistené hodnoty môžu slúžiť ako predbežné referenčné údaje pre klinicky zdravé kone plemena American Quarter Horse chované v porovnateľných podmienkach.

4. ZÁVER

U klinicky zdravých koní plemena American Quarter Horse bola priemerná hodnota TAS $2,42 \pm 0,53$ mmol/l, aktivita GPx dosiahla 862 ± 265 U/l a koncentrácia MDA predstavovala $0,131 \pm 0,022$ μ mol/l. Nízke koncentrácie MDA spolu s primeranou aktivitou GPx a vyššími hodnotami TAS poukazujú na zachovanú antioxidantnú ochranu a nízku úroveň oxidačného stresu. Vzhľadom na rastúcu

popularitu westernového jazdenia a zvyšujúci sa záujem o chov koní plemena American Quarter Horse na Slovensku prispievajú predložené výsledky k rozšíreniu poznatkov o antioxidačnom statuse tohto plemena, pre ktoré sú údaje získané v miestnych podmienkach zatiaľ obmedzené.

Zdroje

1. ARFUSO, F., FAZIO, F., RIZZO, M., GIUDICE, E. a PICCIONE, G. Oxidative stress and sports performance in equine athletes: A review. *Antioxidants*, 2022, roč. 11, č. 1176. DOI: 10.3390/antiox11061176.
2. BOTTEGARO, N. B., GOTIC, J., SURAN, J., BROZIC, D., KLOBUCAR, K., BOJANIC, K. a VRBANAC, Z. Effect of prolonged submaximal exercise on serum oxidative status in endurance horses. *BMC Veterinary Research*, 2018, roč. 14, č. 216. DOI: 10.1186/s12917-018-1540-y.
3. LATHAM, C. M., DICKSON, E. C., OWEN, R. N., LARSON, C. K. a WHITE-SPRINGER, S. H. Complexed trace mineral supplementation alters antioxidant activities and expression in response to trailer stress in yearling horses in training. *Scientific Reports*, 2021, roč. 11, č. 7352. DOI: 10.1038/s41598-021-86478-7.
4. NIEDŹWIEDŹ, A. a JAWORSKI, Z. Oxidant-antioxidant status in the blood of horses with symptomatic recurrent airway obstruction (RAO). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2014, roč. 28, s. 1845–1852. DOI: 10.1111/jvim.12452.
5. OHKAWA, H., OHISHI, N. a YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 1979, roč. 95, s. 351–358. DOI: 10.1016/0003-2697(79)90738-3.
6. POTTER, S. J., ERDODY, M. L., BAMFORD, N. J., KNOWLES, E. J., MENZIES-GOW, N., MORRISON, P. K., ARGO, C. M. G., MCINTOSH, B. J., KAUFMAN, K., HARRIS, P. A. a BAILEY, S. R. Development of a body condition index to estimate adiposity in ponies and horses from morphometric measurements. *Equine Veterinary Journal*, 2024, roč. 56, s. 299–308. DOI: 10.1111/evj.13975.
7. SHONO, S., GIN, A., MINOWA, F., OKUBO, K. a MOCHIZUKI, M. The oxidative stress markers of horses—the comparison with other animals and the influence of exercise and disease. *Animals*, 2020, roč. 10, č. 617. DOI: 10.3390/ani10040617.
8. YILDIRIM, F. a APAYDIN YILDIRIM, B. Evaluation of oxidative stress parameters of horses housed with goats in individual boxes. *Online Journal of Animal and Feed Research*, 2023, roč. 13, s. 367–372. DOI: 10.51227/ojafr.2023.52.