

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

Karla Klobučar

**METABOLIČKI I OKSIDACIJSKI STRES KONJA PRILIKOM
UTRKA DALJINSKOG JAHANJA**

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

II

KLINIKA ZA KIRURGIJU, ORTOPEDIJU I OFTALMOLOGIJU
ZAVOD ZA RENDGENOLOGIJU, ULTRAZVUČNU DIJAGNOSTIKU I
FIZIKALNU TERAPIJU

Predstojnik: Doc. dr. sc. Marko Stejskal

Predstojnik: Prof. dr. sc. Damir Stanin

Mentori: Doc. dr. sc. Nika Brkljača Bottegaro

Doc. dr. sc. Zoran Vrbanac

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Dr. sc. Jelena Gotić
2. Doc. dr. sc. Zoran Vrbanac
3. Doc. dr. sc. Nika Brkljača Bottegaro
4. Prof. dr. sc. Damir Stanin (zamjena)

III

ZAHVALA

Zahvaljujem se prije svega svojim mentorima doc. dr. sc. Niki Brkljača Bottegaro i doc. dr. sc. Zoranu Vrbancu na vodstvu, pruženoj podršci, pomoći i razumijevanju koju su mi pružili prilikom izrade ovog diplomskog rada kao i tijekom studiranja.

Također, zahvaljujem dr. sc. Krunoslavu Bojaniću na savjetima i pomoći pri analizi podataka. Veliko hvala i dr.sc. Jeleni Gotić, doc.dr.sc. Jeleni Šuran, dr.sc. Blanki Beer Ljubić, dr. sc. Diani Brozić i Agati Kučko na svojem doprinosu u nastanku ovoga rada. Zahvaljujem i Hrvatskom konjičkom savezu na suradnji i ustupljenim podacima koji su bili neophodni za ovo istraživanje.

Zahvaljujem se i svojim prijateljima i kolegama koji su me pratili tijekom studija i omogućili mi da studij prođe lakše i zabavnije uz stjecanje doživotnih prijateljstava.

Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima i sestrama, kao i cijeloj obitelji, koji su mi neprestano pružali nesebičnu podršku tijekom čitavog mog obrazovanja.

Vama posvećujem ovaj rad.

IV

POPIS I OBJAŠNJENJE KRATICA

ALT – alanin-aminotransferaza

AST – aspartat-aminotransferaza

BAP – biološki antioksidacijski potencijal (engl. *Biological Antioxidant Potential*)

Ca – kalcij

CK – kreatin kinaza

Cl – klor

d-ROMs – determinacija reaktivnih kisikovih metabolita (engl. *Determination of Reactive Oxygen Metabolites*)

FEI – Međunarodni konjički savez (fr. *Federation Equestre Internationale*)

GGT – gama-glutamilttransferaza

GUK – glukoza u krvi

HKS – Hrvatski konjički savez

IQR – interkvartilni raspon (engl. *Interquartile Range*)

K – kalij

LDH – laktat dehidrogenaza

MDA – malondialdehid

Mg – magnezij

Na – natrij

p – statistički značajna vrijednost

ROS – reaktivni kisikovi spojevi (engl. *Reactive Oxygen Species*)

SD – standardna devijacija

\bar{x} – aritmetička sredina

SADRŽAJ

1. UVOD

2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

3. MATERIJALI I METODE

4. REZULTATI

5. RASPRAVA

6. ZAKLJUČCI

7. LITERATURA

8. SAŽETAK

9. SUMMARY

10. ŽIVOTOPIS

1. UVOD

Daljinsko jahanje (engl. *endurance riding*) konjička je sportska disciplina u kojoj se procjenjuje sposobnost jahača i spremnost konja da u što kraćem vremenu prijeđu određenu udaljenost na zadanoj stazi. U današnje vrijeme daljinsko jahanje bilježi najbrži razvoj od svih konjičkih sportskih disciplina pri čemu je jedina u kojoj veterinari aktivno sudjeluju time što odlučuju o sposobnosti konja da završi natjecanje. Iako je prvo natjecanje daljinskog jahanja u Republici Hrvatskoj održano 2006. godine, dosad nije provedeno istraživanje na konjima koji sudjeluju kako bi se dobio uvid u stupanj metaboličkog stresa uzrokovanog fizičkim naporom tijekom utrke. Spoznaja o izloženošću metaboličkom i oksidacijskom stresu prilikom natjecanja pomogla bi veterinarima pravovremeno intervenirati i održavati dobrobit konja.

Cilj ovog rada je procijeniti ovisnost metaboličkog stresa kod konja s obzirom na duljinu utrke i brzinu kretanja konja te odrediti koje dobne, spolne i pasminske kategorije konja bolje podnose zahtjeve daljinskog jahanja. Hipoteza ovog rada je da su posljedice metaboličkog stresa izraženije na duljim utrkama i kod većih brzina kretanja konja te da konji arapskih pasmina postižu veće brzine uz kraće vrijeme oporavka pri čemu pokazuju manje promjene u biokemijskim parametrima od drugih pasmina konja.

Također, cilj rada bio je ustanoviti postoje li razlike u promjeni ispitivanih biokemijskih parametara krvi kod konja početnika i iskusnih konja, odnosno postižu li iskusniji konji veće brzine kretanja te kraće vrijeme oporavka za razliku od neiskusnih konja koji se više umaraju na stazi.

Utrka daljinskog jahanja uzrokuje pojačan oksidacijski odgovor organizma pri čemu konji daljinskog jahanja, koji su duži vremenski period u treningu, imaju naglašeniji aerobni metabolizam zbog čega se kod istih očekuje viša bazalna koncentracija prooksidansa.

Posljednji cilj rada bio je ispitati promjene biokemijskih parametara krvi prema odabranim skupinama konja te ustanoviti povezanost promjene biokemijskih parametara i pokazatelja oksidacijskog stresa kod natjecateljskih konja daljinskog jahanja.

2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

Iako relativno mlada disciplina, daljinsko jahanje popularnost je steklo u iznimno kratkom vremenskom razdoblju. Premda još nije uvršteno u olimpijske discipline, daljinsko je jahanje pod pokroviteljstvom Međunarodnog konjičkog saveza *Federation Equestre Internationale* (FEI), koji kroz četiri natjecateljske sezone (2011. - 2015.) bilježi porast broja natjecanja s 276 na čak 890. Ovisno o kategoriji, natjecateljima je cilj prijeći od 40 do 160 kilometara u jednom danu pri čemu brzine kretanja konja dosežu i više od 30 km/h. U daljinskom jahanju upotrebljavaju se konji različitih pasmina, premda su najpopularniji arapski punokrvnjaci zbog svoje lake građe i iznimne izdržljivosti. Nadalje, konji krupnije građe teže održavaju brzinu na većim udaljenostima, brže se umaraju te je time veća mogućnost ozljeda na natjecanjima zahtjevnog terena (MISHEFF, 2011.; MUÑOZ i sur., 2017.).

Za razliku od drugih disciplina konjičkog sporta, u daljinskom jahanju veterinarski pregled sastavni je dio samog natjecanja. Veterinarsko vijeće, koje se sastoji od najmanje tri veterinara, zaduženo je brinuti se o dobrobiti, sigurnosti i zdravlju konja te je upravo zbog toga pravilnikom određen broj etapa nakon kojih se obavlja veterinarski pregled konja. Uobičajena duljina svake etape je 20-40 km. Završetkom svake etape utrke, natjecateljski par dolazi na prostor predviđen za odmor i hlađenje, gdje se konj oporavlja i priprema za veterinarski pregled. Mjerenje vremena natjecateljskog para zaustavlja se tek u trenutku prijave veterinarskog pregleda, odnosno, u trenutku kada jahač procijeni da je konj dovoljno odmoran da udovolji zahtjevima veterinarskog pregleda. Veterinarskim se pregledom utvrđuje upravo sposobnost konja da, bez ugrožavanja zdravlja, ponovno prijeđe zadanu etapu. Svaki veterinarski pregled uključuje mjerenje bila, osnovni pregled kardiovaskularnog i respiratornog sustava, auskultaciju peristaltike, ispitivanje bolnosti leđa i napetosti mišića te procjenu kretanja u kasu, odnosno procjenu hromosti i prisutnost rana. Tijekom veterinarskog pregleda, odlukom veterinarskog vijeća, konji mogu biti isključeni iz daljnjeg natjecanja ako im je frekvencija bila veća od dopuštene, ako im je narušen metabolički status ili ako pokazuju znakove hromosti (KLOBUČAR i sur., 2016.). Hromost je najčešća indikacija za isključivanje konja iz natjecanja daljinskog jahanja, a najčešće su patologije lokomotornog sustava konja miopatije, dezmitis proksimalnog dijela suspenzornog ligamenta (ROBERT, 2014.) te tendinitis tetive površinskog fleksora (HOLBROOK, 2011.).

Tijekom dugih utrka daljinskog jahanja, konji su izloženi termolizi, gubitku elektrolita, nastanku velike količine produkata katabolizma kao posljedica hemolize, djelomične rabdomiolize, energetskeg metabolizma te metabolizma jetara i bubrega (MISHEFF, 2011.; MUÑOZ i sur., 2017.). Promjena hematoloških i biokemijskih parametara krvi posljedica je prilagodbe organizma konja na novonastali metabolički stres, odnosno katabolički odgovor organizma na fizičku aktivnost, ozljedu ili bolest. Niske razine hematokrita karakteristične su za konje daljinskog jahanja prije utrke, dok tijekom utrke rastu zbog gubitka tekućine znojenjem i kao posljedica kontrakcija slezene kojom se eritrociti ispuštaju u cirkulaciju (AL-QUDAH i AL-MAJALI, 2006.). Povišene vrijednosti ureje, ukupnih proteina i koncentracije natrija (Na) poslije natjecanja karakteristični su u konja treniranih za daljinsko jahanje (THOMAS i FREGIN, 1987.). Poslije utrke najviši porast vrijednosti u serumu bilježe indikatori mišićnog oštećenja u koje ubrajamo kreatin kinazu (CK), alanin-aminotransferazu (ALT) i aspartat-aminotransferazu (AST), dok koncentracija triglicerida tijekom utrke raste zbog povećanja energetskeg potreba organizma (LARSSON i sur., 2013.). Tijekom višesatne fizičke aktivnosti tjelesna temperatura konja povećava se za 1-3 °C (ROBERT, 2014.) te zbog održavanja homeostaze konj proizvodi 10-15 litara znoja na sat pri prosječnoj brzini kretanja od 16 km/h. Znoj konja sadržava relativno niske koncentracije kalcija (Ca), magnezija (Mg) i fosfora te visoke koncentracije natrija (Na), kalija (K) i klorida (Cl) (MCCUTCHEON i GEOR, 1996.). Pojave sindroma iscrpljenosti konja (engl. *exhausted horse syndrome*) i sinkronog podrhtavanja ošita (engl. *synchronous diaphragmatic flutter*) posljedice su dehidracije, poremećaja acidobazne ravnoteže i ravnoteže elektrolita, akumulacije topline i velike potrošnje energije (ROBERT, 2014.).

Oksidacijski stres definira se kao pomak ravnoteže u staničnim oksidativno-redukcijskim reakcijama u smjeru oksidacije pri čemu dolazi do prekomjernog stvaranja reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) i pojačanog stvaranja slobodnih radikala što dovodi do oštećenja stanica (SIES, 1997.). Fiziološki se većina potrošenog kisika razlaže na ugljikov dioksid i vodu, međutim 1-2 % kisika ne potroši se u potpunosti, nego dolazi do oslobađanja ROS-a, koji djeluje štetno na stanične membrane (WILLIAMS i sur., 2004.). Kako bi se funkcija stanica očuvala, organizam se brani stvaranjem antioksidansa koji uklanjaju štetne produkte iz organizma (WILLIAMS i sur., 2004.). Antioksidacijski sustav organizma sastoji se od vitamina, minerala i enzima. Uloga enzima jest katalizirati biokemijske reakcije, dok ostali antioksidacijski spojevi redukcijom prihvaćaju slobodne elektrone prooksidansa te tako sprječavaju razaranje tkiva (SIQUEIRA i sur., 2014.). Ukoliko je smanjena antioksidacijska

zaštita organizma ili ako je stvaranje ROS-a pojačano, oštećuju se membrane stanica (DEKKERS i sur., 1996.), nastupa denaturacija proteina i lipida te se trajno oštećuju tkiva, a narušavanjem strukture DNK-a dolazi do mutacija (GROTTO i sur., 2009.).

Razvojem bolesti ili tijekom fizičke aktivnosti dolazi do poremećaja ravnoteže u korist prooksidansa čime nastupa oksidacijski stres (WILLIAMS, 2016.). Test determinacije reaktivnih kisikovih metabolita (d-ROMs-a) najbolji je pokazatelj ukupnog sistemskog oksidacijskog statusa (KUSANO i sur., 2016.). Malondialdehid (MDA), osnovni i najpouzdaniji krajnji produkt lipidne peroksidacije, služi kao indikator stupnja oštećenja stanične membrane (GROTTO i sur., 2009.). Mjerenjem ukupne količine biološkog antioksidacijskog potencijala (BAP) dobiva se uvid u mogućnost odgovora organizma na oksidacijski stres. Koncentracija BAP-a precizan je i pouzdan pokazatelj antioksidacijske zaštite organizma (KUSANO i sur., 2016.).

Kod konja u treningu dolazi do postupne prilagodbe organizma na oksidacijski stres čime se sprječava trajno oštećenje organa (KINNUNEN i sur., 2005.). Brojna istraživanja dokazala su kako natjecanja u različitim konjičkim disciplinama izazivaju drugačiju izmjenu oksidansa i antioksidansa u organizmu. Razumijevanje mehanizama oksidacijskog stresa i antioksidacijskog odgovora u sportskih konja omogućava prilagodbu treninga radi postizanja boljih sportskih rezultata konja i očuvanja njihove dobrobiti (ANDRIICHUK i sur., 2014.).

3. MATERIJAL I METODE

KONJI

U istraživanje je uključeno 53 konja koja su uspješno završila utrku na jednom od četiri promatrana natjecanja daljinskog jahanja tijekom 2016. godine u Republici Hrvatskoj. Odabrani su najperspektivniji konji s obzirom na prijašnje rezultate i/ili prema mišljenju stručnjaka daljinskog jahanja Hrvatskog konjičkog saveza (HKS).

Konji su podijeljeni u skupine prema starosti; na mlađe od osam godina te osam godina i starije, što se podudara s dobnom podjelom konja daljinskog jahanja s obzirom na to da za sudjelovanje na utrkama najviše kategorije u daljinskom jahanju konj mora biti star najmanje osam godina (Pravilnik o daljinskom jahanju, 2016.). Prema spolu, konji su podijeljeni na skupinu muških (pastusi i kastrati) i ženskih životinja. S obzirom na pasminu, konji su podijeljeni na konje arapske pasmine (konji arapske pasmine i konji križanci arapskog punokrvnjaka) te na konje ostalih toplokrvnih pasmina. Nadalje, prema prijašnjem iskustvu u natjecanjima, konji su svrstani u skupinu početnika koji sudjeluju u natjecanjima kraće od tri sezone natjecanja i skupinu iskusnih konja koji se natječu najmanje treću sezonu. Brzina natjecateljskog para mjerio je elektronski (BelSoft Timing) službeni mjeritelj HKS-a, dok je srednja brzina omjer dužine natjecateljske staze i ukupnog vremena provedenog na stazi. S obzirom na to da je 14 km/h minimalna brzina potrebna za svladavanje staze i kvalifikaciju na najvišu kategoriju natjecanja u daljinskom jahanju (Pravilnik o daljinskom jahanju, 2016.), u ovome istraživanju srednja brzina konja podijeljena je na manje od 14 km/h i 14 km/h ili više. Vrijeme oporavka (engl. *recovery time*) srednja je vrijednost svih vremena koja se mjere od ulaska natjecateljskog para u cilj pojedine etape do prijave obveznog veterinarskog pregleda i mjeri je elektronski službeni mjeritelj HKS-a. U istraživanju je vrijeme oporavka podijeljeno u dvije kategorije, manje od osam minuta i osam minuta ili više.

NATJECANJA

Natjecanja su održana prema Pravilniku daljinskog jahanja HKS-a (2016.). Na svakom natjecanju održane su dvije utrke različitih dužina staza te je ukupno promatrano osam utrka. Staze dužine 42 i 47 km te dvije od 40 km prema Pravilniku svrstane su u kategoriju natjecanja na 40 km, dok su staze dužine 80, 81, 84 i 87 km svrstane u kategoriju natjecanja na 80 km.

UZORCI

Na svakoj utrci konjima su uzimana po dva uzorka krvi, prvi u razdoblju od sat vremena prije početka utakmice i drugi unutar 30 minuta nakon što je konj završio utakmicu. Uzorci krvi dobiveni su iz jugularne vene u komercijalne vakuumirane serumske epruvete od 5 mililitara s gelom s pomoću vakutainera (Vacutainer®, Becton Dickenson, SAD). Nakon vađenja krvi, uzorci su ostavljeni da koaguliraju 30 minuta te su zatim centrifugirani na 3500 okretaja/min tijekom 15 minuta i pohranjeni na -80 °C do analize.

Analize biokemijskih parametara i pokazatelja oksidacijskog stresa provedene su u laboratoriju Klinike za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta u Zagrebu. Koncentracije ureje, kreatinina, GUK-a, triglicerida, kolesterola, Ca i Mg te aktivnosti enzima AST, GGT, CK i LDH u serumu određivane su komercijalnim kitom Beckam Coulter® na biokemijskom analizatoru Olympus AU640 (Olympus, Japan) prema uputi proizvođača. Vrijednosti Na i K određivane su s pomoću analizatora elektrolita SmartLyte (Diamond Diagnostics, Njemačka). Kao referentne vrijednosti biokemijskih parametara u ovom istraživanju korištene su službene referentne vrijednosti Kliničkog laboratorija Klinike za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta.

Koncentracije d-ROMs-a i BAP-a mjerene su s pomoću komercijalnog kita Diacron® (Grosseto, Italija) na biokemijskom analizatoru Olympus AU640 (Olympus, Japan) prema uputi proizvođača. Koncentracije ukupnog MDA-a u serumima konja izmjerene su na Zavodu za farmakologiju i toksikologiju tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti prema modificiranoj metodi GROTTO i sur. (2007) na HPLC-DAD Shimadzu 2010 LC sustavu (Shimadzu, Japan) opremljenom Intersustain C18 kolonom (4,6-150 mm-5 µm). Paralelno s uzorcima, na jednak se način pripremio vanjski standard 1,1,3,3 – tetraetoksipropan, u koncentracijama 0.5, 1, 5, 10 i 20 µM te je analizi prethodila kalibracija. U 150 µl svakog seruma ili standarda dodalo se 50 µl vode i 50 µl natrijeve lužine (3 N). Nakon 30 minuta inkubacije u tresućoj kupelji na 60 °C dodano je 250 µl 6-postotne fosfatne kiseline i 250 µl 0,8-postotne tiobarbiturne kiseline, nakon čega su uzorci inkubirani još 45 minuta u kupelji temperature 90 °C. Nakon hlađenja, spoj malondialdehida i tiobarbiturne kiseline ekstrahiran je dodavanjem 250 µl metanola i 100 µl 10-postotna natrijeva dodecil-sulfata, vorteksiranjem 20 sekundi te centrifugiranjem na 4000 U/min 10 minuta. U analizi je korištena pokretna faza od metanola i 50 mM vodene otopine kalijeve dihidrogenfosfata u omjeru 50:50 s dodatkom kalijeve lužine do postizanja pH od oko 6,7. Protok pokretne faze bio je 1 ml/min, vrijeme analize 10 minuta, a valna duljina UV detektora 532 nm.

STATISTIČKA ANALIZA

Statistička analiza podataka učinjena je korištenjem programskog softvera R verzije v3.2.2 (R: *A language and environment for statistical computing*. R Core Team (2013.)). Istraživane varijable bile su rezultati analize biokemijskih parametara i pokazatelja oksidacijskog stresa iz seruma konja te kategorije konja (spol, dob, pasmina, iskustvo), dužine staze, vremena oporavka i prosječne brzine konja. Anderson-Darling test je korišten za testiranje normalnosti numeričkih varijabli. Varijable s normalnom distribucijom izražene su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom ($\bar{x} \pm SD$), a varijable koje nisu imale normalnu raspodjelu, s pomoću medijana i interkvartilnog raspona (IQR). Razlike u aritmetičkim sredinama prije i poslije utrke normalno raspodijeljenih varijabli testirane su s pomoću Student t-testa s uparenim uzorcima. Upareni uzorci varijabli koje nisu pokazivale normalnu raspodjelu testirani su s pomoću Mann-Whitney U-testa. Međusobne korelacije normalno distribuiranih numeričkih varijabli određene su Pearsonovim koeficijentom korelacije, a varijable koje nisu bile normalno distribuirane Spearmanovim koeficijentom korelacije. Jednosmjernom ANOVA-om testiran je utjecaj dobi, pasmine, spola, iskustva konja i dužine utrke na istraživane varijable s normalnom distribucijom, a Kruskal-Wallisov neparametrijski test primijenjen je za varijable koje su odstupale od normalne distribucije. Svi rezultati statističkih testova smatrani su značajnim pri vrijednosti $p < 0,05$.

4. REZULTATI

U istraživanje bila su uključena 53 konja starosti od 4 do 14 godina ($7,7 \pm 2,0$), od toga 33 ženke i 20 mužjaka (16 kastrata i 4 pastuha). Konja arapske pasmine ili križanca arapskog konja bilo je 27, a 26 konja drugih toplokrvnih pasmina. Prosječna brzina kretanja i prosječno vrijeme oporavka nisu pokazali statistički značajnu ovisnost u odnosu na dob, spol, pasminu i iskustvo konja te dužinu staze. Premda statistički neznajno, uz veću brzinu kretanja zabilježeno je i 1,79 minuta kraće prosječno vrijeme oporavka arapskih konja u odnosu na konje ostalih toplokrvnih pasmina ($p=0,061$).

Vrijednosti promatranih biokemijskih parametara i pokazatelja oksidacijskog stresa dobivenih iz seruma konja prije utrka, poslije utrka te razlika vrijednosti prije i poslije utrka prikazani su u Tablicama 1, 2 i 3.

Tablica 1. Vrijednosti parametara elektrolita (Na, K, Ca, Mg), ureje i kreatinina dobivenih iz krvi konja uzimane prije i poslije utrke daljinskog jahanja te razlika njihovih vrijednosti.

PARAMETAR	PRIJE	POSLIJE	RAZLIKA PRIJE I POSLIJE
Na (mmol/L) (od 132,0 do 146,0)	$146,94 \pm 7,51$	$144,60 \pm 7,29$	$-2,34 \pm 5,53^*$
K (mmol/L) (od 2,4 do 4,7)	3,5 (od 3,30 do 3,70)	$2,64 \pm 0,43$	-0,8 (od -1,20 do -0,50)**
Ca (mmol/L) (od 2,5 do 3,4)	$3,15 \pm 0,20$	$3,18 \pm 0,20$	$0,03 \pm 0,19$
Mg (mmol/L) (od 0,7 do 0,9)	$0,87 \pm 0,09$	$0,89 \pm 0,12$	0,02 (-0,10 do 0,60)
Urea (mmol/L) (od 3,3 do 6,6)	6 (od 5,30 do 6,80)	$8,61 \pm 1,54$	$2,46 \pm 1,17^{**}$
Kreatinin ($\mu\text{mol/L}$) (do 115,0)	98 (od 91,00 do 104,00)	130 (od 121,00 do 140,00)	32 (od 21,0 do 39,00)**

*Statistički značajne vrijednosti ($p<0,005$); **statistički značajne vrijednosti ($p<0,001$). Uz parametre navedene su njihove referentne vrijednosti (referentne vrijednosti Kliničkog laboratorija Klinike za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta u Zagrebu). Varijable s normalnom distribucijom izražene su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom ($\bar{x} \pm \text{SD}$), a varijable koje nisu imale normalnu raspodjelu pomoću medijana i interkvartilnog raspona (IQR).

Tablica 2. Vrijednosti biokemijskih parametara dobivenih iz krvi konja uzimane prije i poslije utrke daljinskog jahanja te razlika njihovih vrijednosti.

PARAMETAR	PRIJE	POSLIJE	RAZLIKA PRIJE I POSLIJE
CK (U/L) (do 130,0)	299,00 (od 237,00 do 377,00)	783,00 (od 607,00 do 1347,00)	466,00 (od 244,00 do 1056,00)*
LDH (U/L) (od 162,0 do 412,0)	373,00 (od 320,00 do 456,00)	558,00 (od 475,00 do 664)	155,00 (od 110,00 do 232,00)*
AST (U/L) (do 490,0)	403,00 (od 361,00 do 429,00)	478,00 (od 409,00 do 529,00)	74,00 (od 52,00 do 100,00)*
GGT (U/L) (do 28,0)	16,00 (od 14,00 do 18,00)	16,00 (od 14,00 do 20,00)	0,00 (od -1,00 do 2,00)
GUK (mmol/L) (od 3,1 do 5,0)	5,80 (od 5,30 do 6,50)	6,30 ± 1,95	0,00 (od -0,70 do 1,10)
Trigliceridi (mmol/L) (od 0,1 do 0,5)	0,20 (od 0,10 do 0,30)	0,20 (od 0,10 do 0,30)	0,00 (od -0,10 do 0,10)
Kolesterol (mmol/L) (od 1,8 do 4,6)	2,40 (od 2,10 do 2,70)	2,60 ± 0,33	0,15 ± 0,20 *

*Statistički značajne vrijednosti ($p < 0,001$). Uz parametre navedene su njihove referentne vrijednosti (referentne vrijednosti Kliničkog laboratorija Klinike za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta u Zagrebu). Varijable s normalnom distribucijom izražene su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom ($\bar{x} \pm SD$), a varijable koje nisu imale normalnu raspodjelu pomoću medijana i interkvartilnog raspona (IQR).

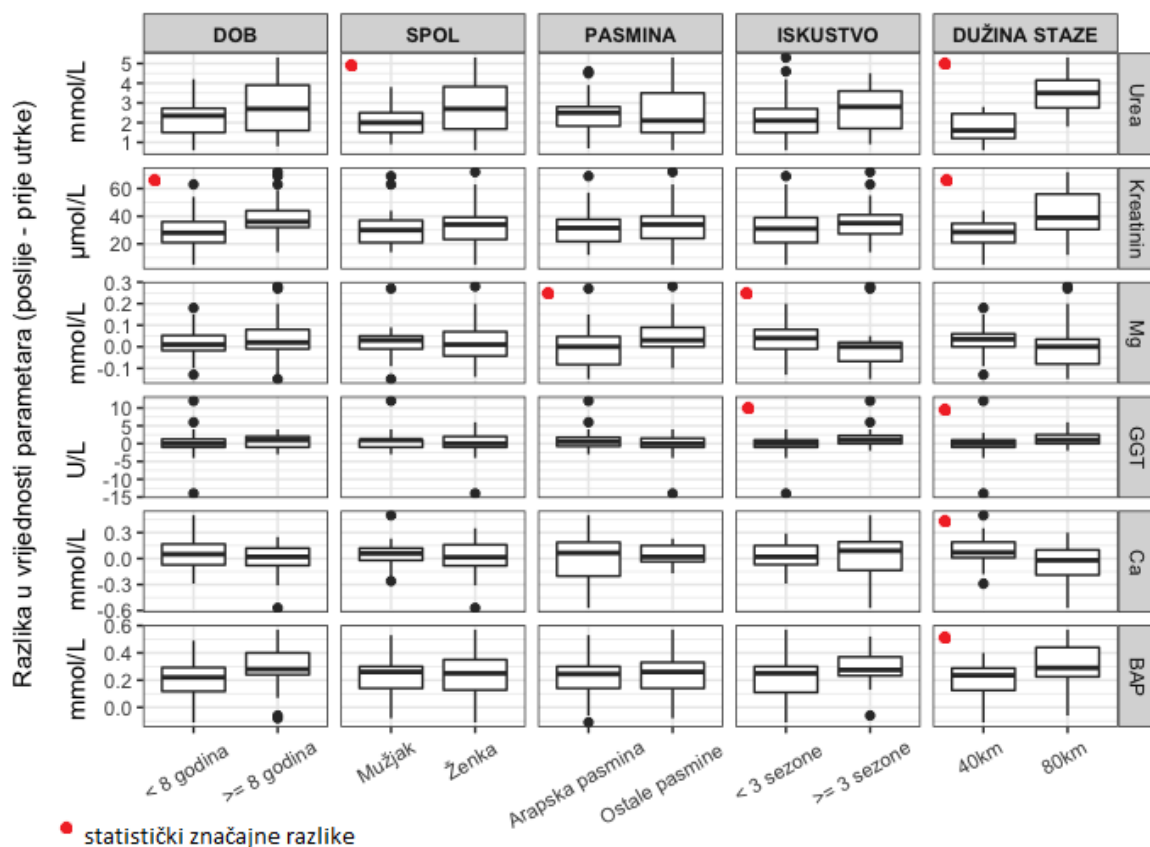
Tablica 3. Vrijednosti pokazatelja oksidacijskog stresa dobivenih iz krvi konja uzimane prije i poslije utrke daljinskog jahanja te razlika njihovih vrijednosti.

PARAMETAR	PRIJE	POSLIJE	RAZLIKA PRIJE I POSLIJE
d-ROMs (U CARR)	156,36 + 37,73	163,20 ± 31,54	5,90 ± 14,36*
BAP (mmol/L)	2,58 ± 0,16	2,83 ± 0,14	0,25 ± 0,15**
MDA (mmol/L)	4,74 ± 0,94	4,98 ± 1,17	0,30 ± 0,85*

*Statistički značajne vrijednosti ($p < 0,02$); **statistički značajne vrijednosti ($p < 0,001$). Varijable s normalnom distribucijom izražene su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom ($\bar{x} \pm SD$), a varijable koje nisu imale normalnu raspodjelu pomoću medijana i interkvartilnog raspona (IQR).

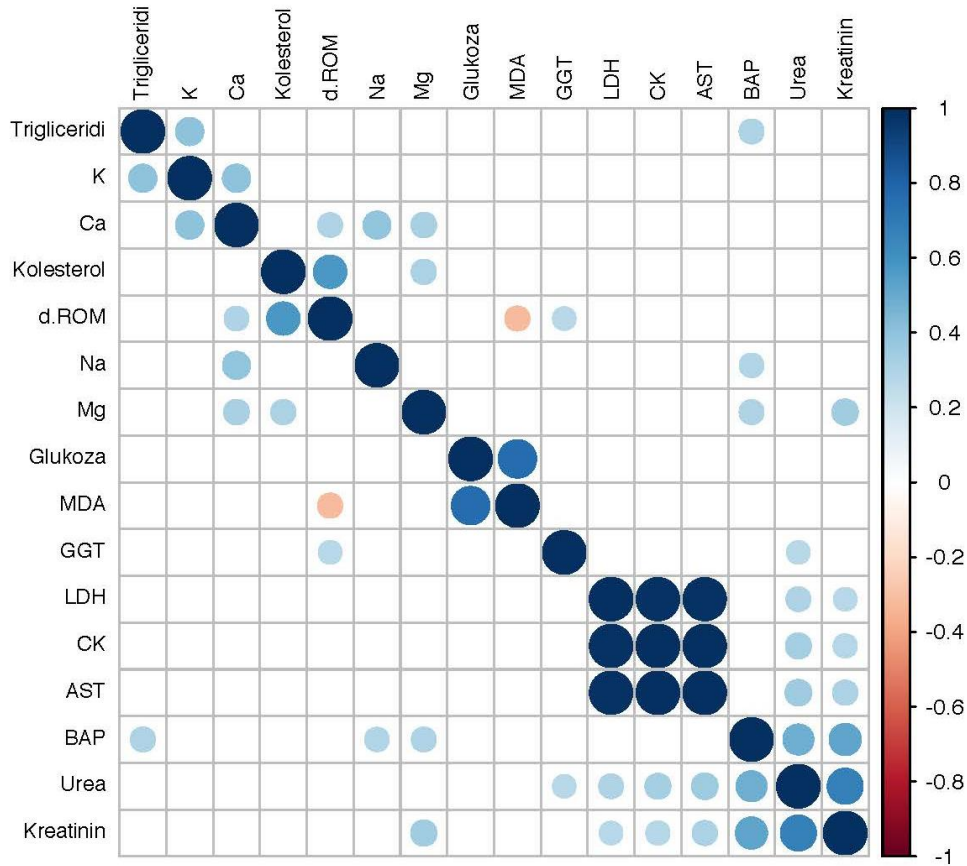
Najmanja izmjerena vrijednost CK-a prije utrke iznosila je 187,00 U/L, dok je najviša iznosila 1865,00 U/L, pri čemu su sve izmjerene vrijednosti bile značajno više od referentnih vrijednosti kod svih konja. Mjerenjem prije utrke znatno više vrijednosti od referentnih bilježe i koncentracije glukoze koje su bile više od 5,0 mmol/L kod 94% konja (48/53) te koncentracije ureje koje su bile više od 6,6 mmol/L kod 28% konja (15/53).

S obzirom na promatrane kategorije konja, uočene su znatne razlike u vrijednostima određenih biokemijskih parametara i pokazatelja oksidacijskog stresa prije i poslije utrke (Slika 1). S obzirom na spol, statistički je značajna promjena koncentracija CK-a ($p=0,014$), AST-a ($p=0,040$) i LDH-a ($p=0,034$), pri čemu su kod sva tri navedena parametra mušjaci imali manje promjene od ženki. Razlike vrijednosti CK-a, AST-a i LDH-a statistički su značajne i s obzirom na dužinu staze ($p<0,001$), pri čemu su veće razlike imali konji koji su se natjecali na stazama dužine 80 km u odnosu na one koji su se natjecali na 40 km.



Slika 1. Razlike vrijednosti prije i poslije utrka odabranih biokemijskih i oksidacijskih parametara u odnosu na prikazane kategorije konja. Statistički značajne razlike promatranih skupina označene su punim crvenim kružićem ($p < 0,05$).

Korelacije promjena promatranih biokemijskih parametara i pokazatelja oksidacijskog stresa prikazani su korelogramom (Slika 2).



Slika 2. Korelacije promjene biokemijskih parametara i pokazatelja oksidacijskog stresa prikazane korelogramom. Prikazane su samo statistički značajne korelacije ($p < 0,05$) pomoću korelacijskog koeficijenta raspona od -1 do 1, u boji, pri čemu plava boja označava linearne pozitivne korelacije, dok crvena boja označava negativne linearne korelacije. Porastom veličine kruga i intenziteta boje raste i jačina korelacije.

5. RASPRAVA

Ovo je prvo istraživanje koje je provedeno na konjima daljinskog jahanja u Republici Hrvatskoj. Na natjecanjima su promatrani konji različite dobi, spola, pasmine i iskustva tijekom utrka različitih dužina staza. Promatrajući postignute rezultate na utrkama, zamijećeno je da su iskusni konji postizali nešto veće brzine kretanja uz kraće vrijeme oporavka što je i odlika uspješnog konja daljinskog jahanja. YOUNES i sur. (2016.) zaključili su kako konji početnici postižu lošije rezultate u daljinskom jahanju jer ne mogu kontrolirati brzinu kretanja stoga se više umaraju i duže oporavljaju, što odgovara dobivenim rezultatima u ovome istraživanju. Promatrajući rezultate po pasminskim skupinama, arapski konji bilježe veću prosječnu brzinu kretanja i kraće vrijeme oporavka, što ide u prilog tvrdnji kako s obzirom na konstituciju, temperament, građu i razvoj kardiovaskularnog sustava spadaju u najpogodniju pasminu za natjecanja daljinskog jahanja (LAWRENCE i sur., 1992.; GARLINGHOUSE i sur., 1999.; TRACHSEL i sur. 2016.).

Do promjene biokemijskog profila tijekom dugih utrka daljinskog jahanja dolazi primarno zbog smanjenog volumena krvi, velike potrošnje energije te pojačanog mišićnog rada (LARSSON i sur., 2013.). Rezultati promatranih serumskih parametara u ovom istraživanju pokazali su statistički značajan porast koncentracije ureje, kreatinina, kolesterola, CK-a, LDH-a i AST-a poslije natjecanja u odnosu na koncentraciju u krvi prije natjecanja. Najviši porast u serumu zabilježen je za vrijednosti pokazatelja mišićnog metabolizma CK-a i AST-a, koji bilježe međusobnu pozitivnu korelaciju vrijednosti u krvi u oba mjerenja, što potvrđuju i rezultati prijašnjih istraživanja na konjima daljinskog jahanja (SCHOTT, 2006.; MUÑOZ, 2010.; ADAMU i sur., 2012.; LARSSON i sur., 2013.). S obzirom na to da vrijednost CK-a ima tendenciju relativno brzog pada i rasta, može se smatrati dobrim pokazateljem intenziteta treninga i oporavka konja od povećane fizičke aktivnosti (ROBERT, 2014.). Važnost praćenja vrijednosti CK-a uočili su ADAMU i sur. (2017.) svojim istraživanjem na konjima daljinskog jahanja pri čemu su CK uvrstili u pet čimbenika s pomoću kojeg je moguće izračunati indeks metaboličkog poremećaja (MDI – *Metabolic disorder index*) koji može predvidjeti razvoj metaboličkog poremećaja i u skladu s time, isključivanje konja iz daljnjeg natjecanja. Blago do umjereno povećanje vrijednosti CK-a u serumu uobičajeno je čak i kod zdravih konja treniranih za daljinsko jahanje i ono ne bi trebalo biti veće od nekoliko tisuća jedinica po litri (MUÑOZ, 2010.) što potvrđuju rezultati ovoga istraživanja u kojem su vrijednosti CK-a svih promatranih konja prije natjecanja bile veće od referentnih vrijednosti. Navedeni je podatak važno uzeti u obzir prilikom procjene

zdravstvenog stanja konja u daljinskom jahanju zbog odstupanja od referentnih vrijednosti konja koji nisu u treningu ili se natječu u drugim, bitno drugačijim sportskim disciplinama.

Povišene vrijednosti ureje konja zabilježene su u ovome istraživanju prije natjecanja, što je uobičajena pojava kod konja treniranih za daljinsko jahanje (ROBERT, 2014.). Porast kreatinina poslije natjecanja uočen je i u istraživanju SCHOTTA i sur. (2006.) te je objašnjen hemokonzentracijom, kontrakcijama slezene i smanjenom perfuzijom bubrega tijekom utrke. Veća razlika u vrijednostima ureje i kreatinina prije i poslije natjecanja uočena je na duljim utrkama, a nastaje zbog većeg stupnja dehidracije kod duljeg izlaganja pojačanom fizičkom naporu. Promatrajući dobne skupine, kod starijih konja dobivene su statistički značajno više vrijednosti kreatinina. Premda KANEKO i sur. (1997.) vrijednosti kreatinina pripisuju prehrani i količini mišićne mase životinje, JORDANA i sur. (1998.) istraživanjem na magarcima uočavaju značajno više koncentracije kreatinina kod starijih životinja.

U ovom istraživanju utvrđena je statistički značajna pozitivna korelacija stupnja promjene vrijednosti ureje i CK-a te vrijednosti ureje i AST-a. Konji koji se natječu u daljinskom jahanju skloni su razvoju miopatija uzrokovanih naporom, pri čemu se u serumu uočavaju povećane vrijednosti CK-a i AST-a (ROBERT, 2014.) te se u težim slučajevima javlja i mioglobinurija koja može uzrokovati oštećenje bubrežnih kanalića te akutno zatajivanje bubrega (PIERCY i RIVERO, 2014.) i samim time dovesti do povećanja vrijednosti ureje. S obzirom da nijedan konj u ovom istraživanju nije isključen iz natjecanja zbog metaboličkih problema, oštećenje nije bilo znatno, ali dobivenim rezultatima možemo postaviti sumnju na njegov potencijalni razvoj.

Uspoređivanjem muških i ženskih konja uočeno je da kobile bilježe znatno više koncentracije ureje, CK-a, AST-a i LDH-a. Prijašnjim istraživanjima dokazano je da su kobile puno češće zahvaćene s ponavljajućom rabdomiolizom zbog napora (engl. *recurrent exertional rhabdomyolysis*) (MACLEAY i sur., 1999.; MCGOWAN i sur., 2002.), pri čemu dolazi do znatnog povećanja vrijednosti enzima mišićnog oštećenja odnosno CK-a, AST-a i LDH-a (PIERCY i RIVERO, 2014.), što je moglo utjecati i na rezultate u ovom istraživanju s obzirom na to da je daljinsko jahanje iznimno iscrpljujuća disciplina. Također, pojava rabdomiolize u kobila najčešća je za vrijeme estrusa, premda nije utvrđena direktna povezanost između fluktuacije vrijednosti progesterona i vrijednosti CK-a (FRAUENFELDER i sur., 1986.; HARRIS i sur., 1990.).

Rezultati ovog istraživanja, u kojem se vrijednosti GGT-a nisu razlikovale prije i poslije natjecanja podudaraju se s rezultatima LARSSON i sur. (2013.), ali se razlikuju od rezultata istraživanja ADAMU i sur. (2014.), u kojem su uspoređivani konji koji su završili utrku te oni koji su bili isključeni tijekom utrke daljinskog jahanja na 80 km. Osnovni kriterij odabira konja za ovo istraživanje bio je upravo uspješan završetak utrke, što može djelomično objasniti razlike u rezultatima. Dokazane su korelacije između vrijednosti GGT-a i intenziteta treninga (MCKENZIE, 2014.) što je uočeno i u ovome istraživanju statistički značajnom razlikom između vrijednosti GGT-a s obzirom na dužinu staze, odnosno veća vrijednost GGT-a zabilježena je kod konja na utrkama od 80 km.

Premda je koncentracija kolesterola bilježila statistički značajan porast poslije utrke, što može biti posljedica mobilizacije lipida uslijed napornog rada (ANDERSON, 1975.), uspoređujući skupine prema trajanju vremena oporavka zamijećene su niže vrijednosti kod konja s dužim vremenom oporavka. Uz duže vrijeme oporavka kao indikator pojačanog metaboličkog stresa, niže vrijednosti kolesterola u konja s dužim vremenom oporavka bi također mogle ukazivati na metabolički stres s obzirom na to da je pri većem metaboličkom stresu povećana sinteza kortizola što posljedično dovodi do pada kolesterola u krvi (VYROUBAL i sur., 2008.; ONMAZA i sur. (2011.).

Znoj konja sadrži relativno niske koncentracije Ca, Mg i P te visoke koncentracije Na, K i Cl (MCCUTCHEON i GEOR, 1996.). Pad vrijednosti Na i K poslije natjecanja posljedica je pojačanog znojenja i povećane aktivnosti Na-K pumpe tijekom oporavka konja (SCHOTT i sur., 2006.; ROBERT, 2014.). Hipokalijemija je jedan od uzroka pojave sindroma iscrpljenosti konja kao i sinkronog podrhtavanja ošita (MCGOWAN i GEOR, 2014.), ozbiljnih poremećaja metabolizma i zahtijevaju hitnu veterinarsku intervenciju. Premda nije pronađena statistički značajna razlika u vrijednostima Ca prije i poslije utrke, promjena koncentracija Ca je bila značajno manja na dužim utrkama u usporedbi s kraćim utrkama što je u skladu s istraživanjem SCHOTT i sur. (2006.) koji su povezali niže vrijednosti Ca i Mg s pojačanim znojenjem konja a samim time i većim gubitkom elektrolita.

Koncentracija glukoze prije i poslije fizičke aktivnosti u ovome istraživanju nije statistički značajno različita, međutim, vrijednosti glukoze prije natjecanja bilježe više vrijednosti od referentnih kod čak 90% ispitanih konja. Uzrok može biti odabir vremena vađenja krvi prije utrke koje je bilo neposredno nakon uzimanja obroka. Naime, za razliku od drugih disciplina konjičkog sporta gdje hranjenje konja neposredno prije fizičke aktivnosti

nije poželjno, kod konja daljinskog jahanja prehrana za vrijeme i neposredno prije utrke izrazito je važna. Također, hiperglikemija prije natjecanja može biti uzrokovana stresom povezanim s transportom konja prilikom dolaska na natjecanja te stresom zbog samog dolaska u novu okolinu s velikim brojem konja.

Konji koji se treniraju za daljinsko jahanje koriste se uglavnom aerobnim metabolizmom pri kojem dolazi do povećane potrošnje kisika i, posljedično, aktivacije oksidacijskih metaboličkih procesa radi osiguravanja energije za mišićnu aktivnost i održavanje funkcije stanica (SIQUEIRA i sur., 2014.). Znatno porast svih promatranih pokazatelja oksidacijskog stresa (d-ROMs, MDA, BAP) u serumu ispitivanih konja upućuje da je fizička aktivnost dovela do povećane aktivacije oksidacijskog i antioksidacijskog sustava te je u skladu s drugim istraživanjima na konjima daljinskog jahanja (KINNUNEN i sur., 2005.; SIQUIERA i sur., 2014.).

D-ROMs smatra se najboljim pokazateljem ukupnog sistemskog oksidacijskog statusa (KUSANO i sur., 2016.). Treninzi većeg intenziteta u konja uzrokuju oslobađanje ROS-a (KINNUNEN i sur., 2005.) što u ovom istraživanju karakterizira porast vrijednosti d-ROMs-a poslije utrke. Koncentracije d-ROMs-a u ovom istraživanju pozitivno su korelirale s koncentracijama GGT-a što je utvrđeno i kod ljudi te se GGT smatra markerom oksidacijskog stresa (LEE i sur., 2004.). Rezultati ovog istraživanja upućuju na mogućnost jednake povezanosti i kod konja.

Vrijednosti MDA-a u dosadašnjim istraživanjima na konjima daljinskog jahanja promatrali su SIQUIERA i sur. (2014.) te, premda bez statističke značajnosti, bilježe porast vrijednosti promatranog parametra dok je u ovom istraživanju porast MDA-a bio statistički značajan. Navedene promjene pripisali su sposobnosti ROS-a koji se stvara tijekom treninga da poveća aktivnost oksidansnih enzima. AL-QUDAH i AL-MAJALI (2008.) zabilježili su povišene koncentracije MDA-a u konja i 14 dana nakon utrke daljinskog jahanja, a CHIARADIA i sur. (1998.) kontinuirani porast vrijednosti MDA-a nakon treninga objašnjavaju sporim procesom eliminacije produkata lipidne peroksidacije. Svojim preglednim člankom o ravnoteži prooksidansa i antioksidansa u konja, KIRSCHVINK i sur. (2008.) produkte lipidne peroksidacije, kao što je MDA, predložili su kao izvrstan indikator slobodne aktivnosti radikala u organizmu.

Mjerenjem ukupne količine BAP-a dobiva se uvid u odgovor organizma na oksidacijski stres (KUSANO i sur., 2016.), međutim dosad je opisan mali broj istraživanja u

kojima se određivala njegova koncentracija, kako kod ljudi, tako i kod konja. Ovim istraživanjem zabilježene su znatno više vrijednosti BAP-a kod konja koji su se natjecali na dužim utrka s obzirom na to da pojačano stvaranje prooksidansa tijekom dužih utrka uzrokuje jaču antioksidacijsku obranu organizma (KINNUNEN i sur., 2005.; SIQUIERA i sur., 2014.). Također, PARKER i sur. (2014.) u svojem istraživanju kod ljudi željeli su utvrditi utjecaj intenziteta treninga na sistemski oksidacijski stres i antioksidansni kapacitet te su zaključili kako odgovarajući treninzi (srednjeg do visokog intenziteta) stimuliraju prilagodbu organizma i jačaju obrambene mehanizme organizma u borbi protiv ROS-a. Konji koji se natječu u daljinskom jahanju, osobito na utrka većih udaljenosti, podvrgnuti su godinama treninga što rezultira jačom antioksidacijskom obranom organizma koja ih štiti od posljedica oksidacijskog stresa (SIQUEIRA i sur., 2014.). Trening potiče aktivnost enzima antioksidansnog djelovanja u skeletnom mišićju, međutim ostaje nepoznato koje je optimalno vrijeme trajanja treninga ili njegov intenzitet za maksimalno djelovanje tih enzima (CRISWELL i sur., 1993.).

Vrijednosti ureje i triglicerida pokazuju znatnu pozitivnu korelaciju s koncentracijom BAP-a što se podudara s rezultatima ADAMU i sur. (2012.) te je ona moguća posljedica oksidacijskog stresa s obzirom na to da se ureja smatra neenzimskim antioksidansom u krvi tijekom fizičke aktivnosti (KIRSCHVINK i sur., 2008.). Povećana količina slobodnih radikala, prisutnih za vrijeme oksidacijskog stresa uzrokovanog fizičkom aktivnosti, dovodi do povećanja vrijednosti ureje u krvi te ujedno oštećuje lipidnu membranu mišića posljedično povećavajući koncentraciju triglicerida u krvi (ADAMU i sur., 2012.).

Značajna pozitivna korelacija zabilježena je između vrijednosti Ca i d-ROMs-a što je moguća posljedica utjecaja oksidacijskog stresa na oštećenje proteina u stanici. Poznato je da proteini reguliraju razinu unutarstaničnog Ca, a njihovim se oštećenjem povisuje razina Ca unutar stanice i u krvi. Ukoliko se razina Ca previše povisi unutar stanice, aktiviraju se enzimi koji mogu oštetiti DNK i cijepati strukturne proteine (BROSTROM i BROSTROM, 1990.).

Vrijednosti MDA znatno su pozitivno korelirale s koncentracijom glukoze u krvi što upućuje na direktan utjecaj hiperglikemije na poticanje lipidne peroksidacije membrana stanica. Sličnu povezanost nalazimo i u istraživanju TRACHMAN i sur. (1993.), koji su na kulturi mezangijskih stanica glomerula bubrega kod štakora potvrdili kako visoka koncentracija glukoze direktno utječe na proces lipidne peroksidacije koja uzrokuje oštećenja

membrane navedenih stanica. VIRGILI i sur. (1996.) također su na eritrocitima ljudi dokazali da hiperglikemija znatno utječe na povišenu koncentraciju antioksidansa. Iz navedenih je istraživanja vidljivo da hiperglikemija, ovisno o trajanju i koncentraciji, kod ljudi i štakora potiče stvaranje oksidacijskog stresa, međutim mehanizmi reakcija nisu u potpunosti istraženi (TRACHMAN i sur., 1993. i VIRGILI i sur., 1996.).

Zabilježena je negativna korelacija stupnja promjene koncentracija MDA-a i d-ROMs-a, što se podudara s istraživanjem AYALA i sur. (2014.) s obzirom na to da slobodni radikali induciraju lipidnu peroksidaciju, čiji je konačni produkt MDA, pri čemu dolazi do povećanja koncentracije MDA-a te smanjenja koncentracije slobodnih radikala koji se u ovim reakcijama troše.

Razlika vrijednosti prije i poslije utrke d-ROMs-a i kolesterola pozitivno je korelirala što se podudara s istraživanjem kod ljudi kod kojih je djelovanje slobodnih radikala, odnosno oksidacijskog stresa, okidač akumulacije kolesterola u krvnim žilama (GESQUIERE i sur., 1999.). Prema tvrdnjama navedenih autora, prooksidansi izazivaju pojačanu sintezu kolesterola u jetrima, otpuštanje u krvotok i smanjenje hidrolize estera kolesterola što rezultira povećanom koncentracijom kolesterola u krvi.

Ovo istraživanje imalo je određena ograničenja koja je potrebno naglasiti. Sudjelovanje u istraživanju bilo je na volonterskoj osnovi, stoga nisu svi konji koji su se natjecali bili uključeni. Iz istog razloga, relativno je mala populacija promatranih konja, ali unatoč tomu, uključen je podjednak broj konja iz svake promatrane kategorije. Ograničenje istraživanja bili su različiti režimi prehrane konja zbog čega nije bilo moguće odrediti količinu unosa antioksidansa, međutim većina je hranjena balansiranom prehranom namijenjenom konjima treniranim za daljinsko jahanje. Također, konji su proveli različito vrijeme u transportu do mjesta natjecanja, no smatramo da to nije posebice utjecalo na dobivene rezultate s obzirom na to da je svim konjima omogućeno vrijeme odmora i da su svi konji prije početka natjecanja uspješno prošli veterinarski pregled.

6. ZAKLJUČCI

Konji arapske pasmine ostvaruju najveće brzine uz najkraće vrijeme oporavka, što naglašava prilagođenost njihovih morfološko-fizioloških karakteristika zahtjevima daljinskog jahanja. Iskustvo konja ne utječe na vrijednosti većine promatranih biokemijskih parametara, premda iskusni konji postižu nešto veće brzine i kraće vrijeme oporavka.

Utrke daljinskog jahanja uzrokuju znatan metabolički stres, posebice na mišićni sustav konja, na što su kobile osjetljivije. Metabolički stres ima znatniji utjecaj na starije konje u pogledu više koncentracije kreatinina zbog slabijeg bubrežnog kapaciteta u starijih životinja.

Fizički napor tijekom dužih utrka daljinskog jahanja uzrokuje znatniji metabolički stres na organizam konja, pojačano stvaranje prooksidansa te jači antioksidacijski odgovor organizma konja. Brzina kretanja konja ne utječe na razvoj metaboličkog i oksidacijskog stresa.

Konji trenirani za daljinsko jahanje imaju fiziološki više vrijednosti CK-a prije natjecanja od referentnih vrijednosti, što bi trebalo uzeti u obzir prilikom interpretacije rezultata biokemijskih pretraga krvi konja daljinskog jahanja. Promjene u koncentraciji promatranih elektrolita poslije utrke naglašavaju važnost rehidracije konja za vrijeme i poslije utrka daljinskog jahanja.

Vrijednosti MDA značajno su pozitivno korelirale s koncentracijom glukoze u krvi što ukazuje na usku povezanost hiperglikemije i procesa lipidne peroksidacije.

7. LITERATURA

ADAMU, L., A. F. N. RASEDEE, N. MOHD ADZAHAN, A. RASEDEE, B. AHAMAD (2017): The use of a metabolic disorder index as a predictor for metabolic eliminations in endurance horses. *J Equine Vet Sci.* 51, 113-121.

ADAMU, L., M. A. NORANIZA, A. RASEDEE, A. BASHIR (2012): Metabolic responses in endurance horses during racing in relation to uric acid profile, leucocytes, heart rate and plasma biochemical parameters. *Vet Med.* 57, 591–596.

ADAMU, L., M. N. ADZAHAN, A. RASEDEE, B. AHMAD (2014): Responses of serum biochemical parameters, electrolytes and heart rate in and 80km endurance race. *J Vet Adv.* 4, 329-337.

AL-QUDAH, K. M., A. M. AL-MAJALI (2006): Status of biochemical and antioxidant variables in horses before and after long distance race. *Rev Med Vet.* 157, 307–312.

AL-QUDAH, K. M., A. M. AL-MAJALI (2008): Higher Lipid Peroxidation Indices in Horses Eliminated from Endurance Race Because of Synchronous Diaphragmatic Flutter (Thumps). *J Equine Vet Sci.* 28, 573-578.

ANDERSON, M. G. (1975): The effect of exercise on blood metabolite levels in the horse. *Equine Vet J.* 7, 27-33.

ANDRIICHUK, A., H. TKACHENKO, N. KURHALUK (2014): Oxidative stress biomarkers in the blood of holsteiner horses during excercise training. *Slupskie Prace Biologiczne* 11, 5-28.

AYALA, A., M. F. MUÑOZ, S. ARGUELLES (2014): Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Laboratory.* <http://dx.doi.org/10.1155/2014/360438>

BROSTROM, C. O., M. A. BROSTROM (1990): Calcium-dependent regulation of protein synthesis in intact mammalian cells. *Ann Rev Physiol.* 52, 577–590.

CHIARADIA, E., L. AVELLINI, F. RUECA, A. SPATERNA, F. PORCIELLO, M. T. ANTONIONI (1998): Physical exercise, oxidative stress and muscle damage in racehorses. *Comp Biochem Physiol B.* 119, 833-6.

- CRISWELL, D., S. POWERS, S. DODD (1993): High intensity training-induced changes in skeletal muscle antioxidant enzyme activity. *Med Sci Sports Exerc.* 25, 1135-40.
- DEKKERS, J.C., L. J. DOORNEN, H. C. KEMPER (1996): The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise - induced muscle damage. *Sports Med.* 21, 213-38.
- GARLINGHOUSE, S. E., M. J. BURILL (1999): Relationship of body condition score to competition rate during 160km endurance races. *Equine Vet J Suppl.* 30, 591-5.
- GESQUIERE, L., N. LOREAU, A. MINNICH, J. DAVIGNON, D. BLACHE (1999): Oxidative stress leads to cholesterol accumulation in vascular smooth muscle cells. *Free Radical Biology and Medicine.* 27, 134-145.
- GROTTO, D., L. D. SANTA MARIA, S. BOEIRA, J. VALENTINI, M. F. CHAR, A. M. MORO, P. C. NASCIMENTO, V. J. POMBLUM, S. C. GARCIA (2007): Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography – visible detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43, 619-624.
- GROTTO, D., L. D. SANTA MARIA, J. VALENTINI, C. PANIZ, G. SCHMITT, S. C. GARCIA, V. J. POMBLUM, J. B. T. RECHA, M. FARINA (2009): Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspect for malondialdehyde quantification. *Quim Nova* 32, 169-174.
- FRAUENFELDER, H. C., P. D. ROSSDALE, S. W. RICKETTS, W. R. ALLEN (1986): Changes in serum muscle enzyme levels associated with training schedules and stage of the oestrous cycle in Thoroughbred racehorses. *Equine Vet J.* 18, 371–374.
- HARRIS, P.A. (1990): An outbreak of the equine rhabdomyolysis syndrome in a racing yard. *Vet Rec.* 127, 468-470.
- HOLBROOK, T.C. (2011): The endurance horse. U: Wiley-Blackwell, editor. *Adam's and Stashak's lameness in horses.* 6th ed. Chichester: UK. (1055–1061).
- JAGRIČ MUNIH, S., A. NEMEC SVETE, P. ZRIMŠEK, P. KRAMARIČ, V. KOS KADUNC, T. VOVK, S. KOBAL (2012): Plasma malondialdehyde, biochemical and haematological parameters in standardbred horses during a selected field exercise test. *Acta Veterinaria* 62, 53-65.

- JORDANA, J., P. FOLCH, R. CUENCA (1998): Clinical biochemical parameters of the endangered Catalanian donkey breed: normal values and the influence of sex, age, and management practices effect. *Res Vet Sci.* 64, 7-10.
- KANEKO, J. J., J. W. HARVEY, M. L. BRUSS (1997): *Clinical biochemistry of domestic animals.* 5th ed. New York/London: Academic Press.
- KINNUNEN, S., M. ATALAY, S. HYPPA, A. LEHMUSKERO, O. HANNINEN, S. OKSALA (2005): Effect on prolonged exercise on oxidative stress and antioxidant defense in endurance horses. *J Sports Sci Med.* 4, 415-21.
- KIRSCHVINK, N., B. D. MOFFARTS, P. LEKEUX (2008): The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *Vet J.* 177, 178–91.
- KLOBUČAR, K., Z. VRBANAC, A. KUČKO, J. GOTIĆ, N. BRKLJAČA BOTTEGARO (2016): The role and importance of veterinarians in endurance riding. *Hrvatski veterinarski vjesnik.* 24 (5-6), 40-45.
- KUSANO, K., M. YAMAZAKI, M., KIUCHI, M., KANEKO, K., KOYAMA, K. (2016): Reference range of blood biomarkers for oxidative stress in Thoroughbred racehorse (2-5 years old). *J Equine Sci.* 27, 125-129.
- LARSSON, J., P. H. PILBORG, M. JOHANSEN, M. T. CHRISTOPHERSEN, A. HOLTE, L. ROEPSTORFF, L. H. OLSEN, A. P. HARRISON (2013): Physiological Parameters of Endurance Horses Pre-Compared to Post-Race, Correlated with Performance: A Two Race Study from Scandinavia. *ISRN Vet Sci.*, 684353. <http://doi.org/10.1155/2013/684353>
- LAWRENCE, L., S. JACKSON, K. KLINE, L. MOSER, D. POWELL, M. BIEL (1992): Observations on body weight and condition of horses in a 150-mile endurance ride. *J Equine Vet Sci.* 12, 320-324.
- LEE, D. H., R. BLOMHOFF, D. R. JACOBS JR. (2004): Is serum gamma glutamyltransferase a marker of oxidative stress? *Free Radic Res.* 38, 535-539.
- MACLEAY, J. M., S.A. SORUM, S.J. VALBERG, W.E. MARSH, M. D. SORUM (1999): Epidemiologic analysis of factors influencing exertional rhabdomyolysis in Thoroughbreds. *Am J Vet Res.* 60, 1562-1566.

- MCCUTCHEON, L. J., R. J. GEOR (1996): Sweat fluid and ion losses in horses during training and competition in cool vs. hot ambient conditions: implications for ion supplementation. *Equine Vet J.* 28, 54–62.
- MCGOWAN, C. M., R. J. GEOR (2014): Endocrine and metabolic disorders of the equine athlete. U: *Equine Sports Medicine and Surgery*. Hinchcliff KW, Kaneps AJ, Geor RJ, editors. 2nd ed. Elsevier: WB Saunders. (787-796).
- MCGOWAN, C. M., T. FORDHAM, R. M. CHRISTLEY (2002): Incidence and risk factors for exertional rhabdomyolysis in Thoroughbred racehorses in the United Kingdom. *Vet Rec.* 151, 623-626.
- MCKENZIE, E. C. (2014): Biochemical abnormalities of the athletic horse. U: *Equine Sports Medicine and Surgery*. Hinchcliff KW, Kaneps AJ, Geor RJ, editors. 2nd ed. Elsevier: WB Saunders. (933–934).
- MISHEFF, M. M. (2011): Lameness in endurance horses. U: Ross MW, Dyson SJ, editors. *Diagnosis and management of lameness in the horse*. 2nd ed. St Louis, Elsevier Saunders. (1137–1149).
- MUÑOZ, A., C. CASTEJÓN-RIBER, C. RIBER, M. ESGUEVA, P. TRIGO, F. CASTEJÓN (2017): Current knowledge of pathological mechanisms and derived practical applications to prevent metabolic disturbances and exhaustion in the endurance horse. *J Equine Vet Sci.* 51, 24-33.
- MUÑOZ, A., C. RIBER, P. TRIGO, C. CASTEJÓN-RIBER, F. CASTEJÓN (2010): Dehydration, electrolyte imbalances and renin-angiotensin-aldosterone-vasopressin axis in successful and unsuccessful endurance horses. *Equine Vet J.* 42, 83-90.
- ONMAZ, A. C., R. VAN DEN HOVEN, V. GUNES, M. CINAR, O. KUCUK (2011.): Oxidative stress in horses after a 12-hours transport period. *Rev Med Vet.* 162, 213–7.
- PARKER, L., T. A. MCGUCKIN, A. S. LEICHT (2014): Influence of exercise intensity on systemic oxidative stress and antioxidant capacity. *Clin Physiol Funct Imaging.* 34, 377-383.
- PIERCY, R. J., J. RIVERO (2014): Muscle disorders of equine athletes. U: *Equine Sports Medicine and Surgery*. Hinchcliff KW, Kaneps AJ, Geor RJ, editors. 2nd ed. Elsevier: WB Saunders. (109-143).

Pravilnik o daljinskom jahanju (2016). Dostupno na: www.konjicki-savez.hr

ROBERT, C. (2014): Veterinary aspects of training and racing endurance horses. U: *Equine Sports Medicine and Surgery*. Hinchcliff KW, Kaneps AJ, Geor RJ, editors. 2nd ed. Elsevier: WB Saunders. (1083-1104).

SCHOTT, H. C., D. J. MARLIN, R. J. GEOR, T. C. HOLBROOKS, C. M. DEATON, T. VINCENT, K. DACREY, R. C. SCHROTER, E. JOSE-CUNILLERA, C. J. CORNELISSE (2006): Changes in selected physiological and laboratory measurements in elite horses competing in a 160 km endurance ride. *Equine Vet J.* 36, 37-42.

SIES, H. (1997): Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* 82, 291-5.

SIQUIERA, R.F., R. A. WEIGL, G. R. NUNES, C. S. MORI, W. R. FERNANDES (2014): Oxidative profiles of endurance horses racing different distances. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 66, 455-461.

THOMAS, D. P., G. F. FREGIN (1987): Endurance training-induced hypervolemia in the horse. *Med Sci Sports Exerc.* 19, 524-5.

TRACHMAN, H., S. FUTTERWEIT, R. S. BIENKOWSKI (1993): Taurine prevents glucose-induced lipid peroxidation and increased collagen production in cultured rat mesengial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 191, 759-65.

TRACHSEL, D.S., A. GIRAUDETA, D. MASO, G. HERIE, D. D. HAURI, E. BARREY, C. ROBERT (2016): Relationships between body dimensions, body weight, age, gender, breed, and echocardiographic dimensions in young endurance horses. *BMC Vet Res.* 12, 226.

VIRGILI, F., N. BATTISTINI, R. CANALI, V. VANNINI, A. TOMASI (1996): High glucose-induced membrane lipid peroxidation on intact erythrocytes and on isolated erythrocyte membrane (ghosts). *J Nutr Biochem.* 7, 156 – 161.

VOTION, D. (2014): Metabolic responses to exercise and training. U: *Equine Sports Medicine and Surgery*. Hinchcliff KW, Kaneps AJ, Geor RJ, editors. 2nd ed. Elsevier: WB Saunders. (747-761).

VYROUBAL, P., C. CHIARLA, I. GIOVANNINI, R. HYSPLER, A. TICHA, D. HRNCIARIKOVA, Z. ZADAK (2008): Hypocholesterolemia in clinically serious conditionsd review. *Biomed Pap.* 152, 181–9.

WILLIAMS, C. A., D. S. KRONFELD, T. M. HESS (2004): Antioxidant supplementation and subsequent oxidative stress of horses during 80km endurance race. *J Anim Sci.* 82, 588 - 594.

WILLIAMS, C.A. (2016): The effect of oxidative stress during exercise in the horse. *J Anim Sci.* 94, 4067- 4075.

YOUNES, M., C. ROBERT, E. BARREY, F. COTTIN (2016): Effect of Age, Exercise Duration, and Test Conditions on Heart Rate Variability in Young Endurance Horses. *Front Physiol.* 7, 155.

8. SAŽETAK

Daljinsko jahanje fizički je najzahtjevnija disciplina konjičkog sporta. U istraživanje su uključena 53 konja koja su uspješno završila utrku na jednome od četiri promatrana natjecanja daljinskog jahanja u Republici Hrvatskoj. Uspoređivana je prosječna brzina kretanja i prosječno vrijeme oporavka konja u odnosu na dob, spol, pasminu i iskustvo te dužinu staze. Konjima su u svrhu istraživanja metaboličkog i oksidacijskog stresa uzimana dva uzorka krvi, prije i nakon utrke. Istraživani su odabrani serumski biokemijski parametri, a kao pokazatelji oksidacijskog stresa korišteni su test determinacije reaktivnih metabolita kisika (d-ROMs), malondialdehid (MDA) i biološki antioksidansni potencijal (BAP). Konji arapske pasmine imali su kraće vrijeme oporavka. Dob, spol i iskustvo konja nisu imali znatan utjecaj na vrijednosti promatranih parametara. Vrijednosti kreatin kinaze i glukoze u krvi (GUK) prije utrke bile su više od referentnih vrijednosti. Vrijednosti bubrežnih parametara i parametara mišićnog oštećenja bilježe porast poslije utrke te je razlika znatnija na većim dužinama utrka. Povećanjem dužine utrke povećava se i gubitak elektrolita. Znatan porast vrijednosti svih promatranih pokazatelja oksidacijskog stresa zabilježen je poslije utrke. BAP bilježi veći porast na utrkama od 80 km u odnosu na kraće utrke, a s njegovim porastom proporcionalno su rasle vrijednosti ureje i triglicerida. MDA i GUK proporcionalno su rasli, što upućuje da zabilježena hiperglikemija utječe na lipidnu peroksidaciju stanice.

Utrke daljinskog jahanja uzrokuju pojačane zahtjeve organizma koji se očituju povećanim gubitkom elektrolita, aktivnosti mišićnog i mokraćnog sustava te oksidacijskim stresom.

Ključne riječi: daljinsko jahanje, konj, metabolizam, oksidacijski stres

9. SUMMARY

METABOLIC AND OXIDATIVE STRESS IN ENDURANCE HORSES DURING RACING

Endurance riding is the most physically demanding discipline of equine sport. The study included 53 horses that successfully completed the race in one of the four observed endurance riding competitions in Croatia. The average speed and recovery time were compared to age, sex, breed, experience and length of the race track. Two blood samples were taken from horses for the purpose of metabolic and oxidative stress research, one before and one after the race. The analysis consisted of several serum biochemical parameters, as well as determination of reactive oxygen metabolites (d-ROMs), malondialdehyde (MDA) and biological antioxidant potential (BAP) as indicators of oxidative stress. Horses of Arabian breeds had shorter recovery time. Age, sex and horse experience did not have a significant influence on the studied parameters. Creatine kinase and blood glucose values prior to the race were higher than reference values. Values of renal parameters and parameters of muscle damage increased after races, and the degree of change was more significant at longer racing lengths. Electrolyte loss was more pronounced during longer races. Significant increase in all observed oxidative stress markers were recorded after the race. BAP has recorded higher values during longer races. Positive correlations were recorded for BAP, urea and triglyceride concentrations. MDA and blood glucose have increased proportionally, indicating that hyperglycemia affected cells lipid peroxidation.

Endurance riding causes increased body requirements that are manifested by increased electrolyte loss, muscular and urinary system activity, and oxidative stress.

Key words: endurance riding, equine, metabolism, oxidative stress

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 24. rujna 1993. u Zagrebu, Republika Hrvatska. 2008. godine završila sam Osnovnu školu „Jabukovac“ u Zagrebu. 2012. godine završila sam Prirodoslovno-matematičku V. gimnaziju u Zagrebu i upisala Integrirani preddiplomski i diplomski studij veterinarske medicine na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Služim se engleskim jezikom u govoru i pismu te poznajem početni stupanj njemačkog jezika.