

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Vesna JEŠE JANEŽIČ

KONCENTRACIJA MALONDIALDEHIDA V KRVNI PLAZMI IN
SEČU KOT INDIKATOR PEROKSIDACIJE LIPIDOV V
PREHRANSKIH RAZISKAVAH

MAGISTRSKO DELO

CONCENTRATION OF PLASMA AND URINARY
MALONDIALDEHYDE AS AN INDICATOR OF LIPID
PEROXIDATION IN NUTRITIONAL RESEARCHES

M.Sc. THESIS



Ljubljana, 2001

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija živilstva. Opravljeno je bilo na Inštitutu za prehrano Oddelek za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. K. Salobirja in za somentorico prof. dr. M. Zelenik-Blatnikovo.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Veronika ABRAM 
Univerza v Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

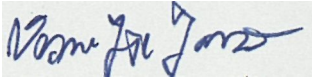
Član: prof. dr. Karl SALOBIR 
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: prof. dr. Marija ZELENIK-BLATNIK 
Univerza v Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Anamarija PLESTENJAK 
Univerza v Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.


Vesna Ješe Janežič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Md

DK UDK 619:612.39:636.4.085:547.915(043)=863

KG poskusne živali - prašiči/modelne prehranske raziskave/krvna plazma/seč/
sončnično olje/ekstra sončnično olje/laneno olje/lipidna peroksidacija/
malondialdehid/tekočinska kromatografija visoke ločljivosti/HPLC

AV JEŠE JANEŽIČ, Vesna, univ. dipl. inž. živilstva

SA SALOBIR, Kari (mentor)/ZELENIK-BLATNIK, Marija (somentor)

KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

LI 2001

IN KONCENTRACIJA MALONDIALDEHIDA V KRVNI PLAZMI IN SEČU KOT
INDIKATOR PEROKSIDACIJE LIPIDOV V PREHRANSKIH RAZISKAVAH

TD Magistrsko delo

OP IX, 95 str., 41 si., 23 tab., 80 ref.

IJ si

JI sl/en

AI

Prosti radikali pri maščobnih kislinah z več dvojnimi vezmi sprožijo lipidno peroksidacijo, pri kateri nastajajo telesu škodljivi razgradili produkti. Eden takih je malondialdehid (MDA), ki velja za citotoksično, mutageno in karcinogeno snov. Preko določanja MDA v plazmi in seču smo želeli ugotoviti, koliko uživanje maščob, bogatih z večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami, vpliva na stopnjo lipidne peroksidacije *in vivo*. Za ta namen smo vpeljali HPLC-metodo za določanje MDA v plazmi in v seču ter izvedli modelni poizkus na prašičih. 24 prašičev, s telesno maso od 53 do 58 kg, razdeljenih v 6 skupin po 4 živali, individualno vhlavljenih v presnovnih kletkah, je dobivalo enake osnovne obroke, ki so simulirali prehrano človeka glede na uporabljena živila ter glede na energijske vrednosti obrokov in deleže energije iz posameznih hranljivih snovi. Skupine so k osnovnemu dnevnu obroku dobivale dodatek maščob: skupina 1: nič dodatka, skupina 2: 85 g sončničnega olja (SO), skupina 3: 85 g (oleinskega) ekstra sončničnega olja (ESO), skupini 4 in 5: 85 g lanenega olja (LO) in skupina 6: 170 g lanenega olja. Skupine brez dodatka maščob, s SO in z ESO se glede koncentracije MDA v plazmi in dnevno s sečem izločenega MDA statistično niso razlikovale. Tak rezultat je mogoče razložiti z bogato vsebnostjo vitamina E v obeh sončničnih oljih. Vrednosti MDA pa so statistično značilno večje v plazmi in seču skupin s 85 g in 170 g LO. Sklepamo lahko, da v živalskem organizmu s telesno maso 60 kg že 85 g LO povzroči dobro merljiv oksidacijski stres. Uporabljena biokemijska metoda in model raziskave se kažeta kot primerna za preučevanje prehranskih vplivov na stopnjo oksidacijskega stresa.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Md
DC UD.C 619;612.39:636.4.085:547.915(043)=863
CX experimental animals - pigs/model nutritional researches/blood plasma/urine/
sunflower oil/extra sunflower oil/flax oil/malondialdehyde/high performance liquid
chromatography/HPLC
AU JEŠE JANEŽIČ, Vesna
AA SALOBIR, Karl (supervisor) / ZELENIK-BLATNIK, Marija (co-supervisor)
PP 1000 Ljubljana, SLO, Jamnikarjeva 101
PB Univ. of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Dep. of Food Science and Technology
PY 2001
TI CONCENTRATION OF MALONDIALDEHYDE IN BLOOD PLASMA AND
URINE AS INDICATOR OF LIPID PEROXIDATION IN NUTRITIONAL
RESEARCHES
DT M.Sc. Thesis
NO IX, 95 p., 41 fig., 23 tab., 80 ref.
LA si
AL sl/en

Free radicals attack double bounds in unsaturated fatty acids and initiate lipid peroxidation, which gives harmful end products such as malondialdehyde (MDA). MDA has cytotoxic, mutagenic and carcinogenic effects. In the study determination of MDA in plasma and urine served as an indicator for establishing the influence of dietary fats, rich in polyunsaturated fatty acids, on the degree of lipid peroxidation *in vivo*. For this purpose high performance liquid chromatography (HPLC) for MDA determination in plasma and urine was modified and used. There after a model experiment on pigs was performed. 24 pigs were divided in 6 groups of 4 animals. Each pig was placed in its own metabolic cage, and was fed with basal feed rations, which simulated human nutrition regarding foods, used energy value of daily rations, and partition of nutrients on energy content. Groups were distinguished by the amount and sort of oil added to the basal feed ration: group 1: without any added oil, group 2: 85 g sunflower oil (SO), group 3: 85 g extra sunflower oil (ESO), groups 4 and 5: 85 g flax oil (FO), group 6: 170 g FO. There were no significant differences in MDA concentrations in plasma and in urine excreted in 24 hours among groups: without oil, containing SO or ESO. Such result can be attributed to the high content of vitamin E in sunflower oils. However, there was a statistically significant difference between groups with 85 g and 170 g FO and all other groups. MDA values in plasma and urine of these two groups were statistically higher and indicated a well pronounced oxidative stress. It could be concluded that the application of as much as 85 g FO in the animal model provokes a well measurable oxidative stress. The biochemical method and the. research model employed appear to be appropriate for future research in the nutritional influences on the degree of oxidative stress.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA	DOKUMENTACIJSKA	INFORMACIJA.....	II
KEY	WORDS	DOCUMENTATION.....	III
KAZALO VSEBINE.....			IV
KAZALO SLIK.....			VI
KAZALO TABEL.....			VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....			IX
1	UVOD.....		1
2	PREGLED LITERATURE.....		3
2.1	PROSTI RADIKALI.....		3
2.1.1	Vzroki za nastanek prostih radikalov.....		4
2.1.2	Biološki učinki prostih radikalov.....		5
2.1.3	Kisikovi radikali in reaktivne oblike kisika.....		6
2.2	OKSIDACIJSKI STRES.....		9
2.2.1	Peroksidacija - ena izmed posledic oksidacijskega stresa.....		10
2.2.1.1	Mehanizem lipidne peroksidacije - avtooksidacije.....		11
2.2.1.1.1	Začetek (inicijacija) avtooksidacije.....		12
2.2.1.1.2	Napredovanje (propagacija) avtooksidacije.....		12
2.2.1.1.2.1	Razvoj.....		12
2.2.1.1.2.2	Cepitev hidroperoksidov.....		13
2.2.1.1.2.3	Zaključek (terminacija) avtooksidacije.....		13
2.2.2	Zaščita organizma pred lipidno peroksidacijo in njenimi produkti.....		14
2.3.1	Zakaj je malondialdehid nezaželen v organizmu?.....		24
2.3.2	MDA v reakcijah z beljakovinami.....		24
2.3.3	Imunološke lastnosti beljakovin, spremenjenih z MDA.....		26
2.3.4	MDA v reakcijah z nukleozidi.....		27
2.3.5	Metabolizem MDA in izločanje derivatov MDA s sečem.....		30
2.3.6	Vpliv antioksidantov in prooksidantov na koncentracijo MDA.....		31
2.3.7	Povezava med bolezenskimi stanji in koncentracijo MDA v organizmu.....		33
2.4	MERJENJE PRODUKTOV LIPIDNE PEROKSIDACIJE.....		34
2.4.1	Določanje malondialdehida.....		35
2.5	TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC).....		37
2.6	PLAZMA IN SERUM.....		38
3	MATERIAL IN METODE DELA.....		40
3.1	ZASNOVA POIZKUSA.....		40
3.2	PRIPRAVA KRMNIH OBROKOV ZA PRAŠIČE.....		41
3.3	ANALIZA KRMNIH OBROKOV IN MAŠČOBNOKISLINSKA SESTAVA UPORABLJENIH OLJ.....		47
3.4	ODVZEM IN PRIPRAVA KRVI TER SEČA ZA ANALIZE.....		49

3.4.1	Shema odvzemov krvi in seča	49
3.4.2	Način odvzema krvi	49
3.4.3	Način odvzema seča	49
3.5	DOLOČITEV MALONDIALDEHIDA V PLAZMI IN SEČU	50
3.5.1	Princip določitve malondialdehida	51
3.5.2	Pribor	51
3.5.3	Aparature	51
3.5.4	Reagenti	52
3.5.4.1	Reagenti za kemijsko analizo plazme in seča.....	52
3.5.4.2	Reagenti za pripravo mobilne faze za HPLC.....	53
3.5.4.3	Reagenti za čiščenje kolone.....	53
3.5.5	Priprava vzorca	54
3.5.6	HPLC-analiza	55
3.5.7	Umeritvena krivulja	57
3.5.8	Kromatograma plazme in seča	58
3.5.7	Čiščenje kolone	59
3.6	STATISTIKA	59
4	REZULTATI	61
4.1	MALONDIALDEHID, DOLOČEN V PLAZMI IN SEČU.....	61
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	74
5.1	RAZPRAVA.....	74
5.2	SKLEPI.....	83
6	POVZETEK	84
6.1	POVZETEK	84
6.2	SUMMARY	86
7	VIRI	89
	ZAHVALA	95

KAZALO SLIK

Slika 1:	Poškodbe, ki jih povzročajo prosti radikali (Madhavi in sod., 1995).....	5
Slika 2:	Strukturna formula malondialdehida (Pryor in sod., 1975).....	15
Slika 3:	Mehanizem lipidne peroksidacije do nastanka hidroperoksida (Pryor in sod., 1975).....	16
Slika 4:	Možne reakcije alkoksilnih radikalov (Madhavi in sod., 1995).....	17
Slika 5:	Mehanizem nastanka cikličnega peroksida ($V_{a,b}$) in hidroperoksilnega epidioksida ($VI_{a,b}$) (Pryor in sod., 1975).....	18
Slika 6:	Oblikovanje malondialdehida (MDA) iz cikličnega peroksida ($V_{a,b}$) in hidroperoksilnega epidioksida ($VI_{a,b}$) (Pryor in sod., 1975).....	19
Slika 7:	Nastanek obarvanega kompleksa po reakciji med malondialdehidom (MDA) in tiobarbiturno kislino (TBK) (Pryor in sod., 1975).....	20
Slika 8:	Nastanek hidroperoksilnih bicikloendoperoksidov (VIII) in (IX) (Pryor in sod., 1975; Frankel, 1991).....	21
Slika 9:	Nastajanje malondialdehida (MDA) iz hidroperoksilnih bicikličnih endoperoksidov (Pryor in sod., 1975).....	21
Slika 10:	Mehanizem nastanka cikličnega peroksida ($XII_{a,b}$) in hidroperoksilnega epidioksida ($XIII_{a,b}$) v dienskem sistemu, ki ob cepitvi dasta MDA (Pryor in sod., 1975).....	22
Slika 11:	Nastanek bicikličnega endoperoksidnega radikala ($XIV_{a,b}$) v dienskem sistemu (Pryor in sod., 1975).....	23
Slika 12:	Struktura kondenzacijskega produkta med eno molekulo MDA in eno molekulo aminokislina (Esterbauer in sod., 1991).....	25
Slika 13:	Kondenzacijski produkt iz ene molekule MDA in dveh molekul aminokislin (Esterbauer in sod., 1991).....	25
Slika 14:	Struktura reakcijskega produkta med tremi molekulami MDA in dvema molekulama cisteina (Esterbauer in sod., 1991).....	25
Slika 15:	Mehanizem nastanka kompleksa iz dveh MDA, nasičenega aldehida in primarnega amina (Esterbauer in sod., 1991).....	26
Slika 16:	Trije možni načini modifikacije s-amino skupin z MDA v polilizinu (Esterbauer in sod., 1991).....	26
Slika 17:	Oblikovanje kompleksa po reakciji med dezoksigvanozinom in eno oziroma dvema molekulama MDA; R = deoksiriboza (Esterbauer in sod., 1991).....	28
Slika 18:	Po reakciji adenzina z MDA lahko nastaneta, preko vmesnega produkta, kompleksa z eno oziroma tremi molekulami MDA; R = riboza (Esterbauer in sod., 1991).....	28
Slika 19:	Nastanek kompleksa po reakciji med tremi molekulami MDA in eno citidina; R = riboza (Esterbauer in sod., 1991).....	29
Slika 20:	Dimeri (1) ali trimeri (2, 3) MDA, ki nastajajo <i>in vitro</i> v koncentriranih vodnih raztopinah (Esterbauer in sod., 1991).....	29
Slika 21:	Možna navzkrižna povezava med MDA, gvaninsko in citozinsko bazo v dvoverižni DNK (Esterbauer in sod., 1991).....	30
Slika 22:	Metaboliti MDA, prisotni v seču; (1): N^{ϵ} -(2-propenal)lizin, (2): N^{α} -acetil- N^{ϵ} -(2-propenal)lizin, (3): N-(2-propenal)etanolamin, (4): N-(2-propenal)-serin (Esterbauer in sod., 1991).....	31
Slika 23:	Razmerja med energijskimi deleži hranljivih snovi v obroku s 85 g olja.....	44

Slika 24:	Razmerja med energijskimi deleži hranilnih snovi v obroku brez dodane maščobe.....	44
Slika 25:	Razmerja med energijskimi deleži hranilnih snovi v obroku s povečano vsebnostjo olja (170 g).....	45
Slika 26:	Watersov HPLC-sistem (foto: V. Rezar):.....	52
Slika 27:	Spreminjanje sestave mobilne faze med kromatografsko analizo vzorca	55
Slika 28:	Kromatogram TEP standarda: (1): kompleks MDA-TBK ₂	56
Slika 29:	Umeritvena krivulja za določanje MDA s pomočjo HPLC: S = površina, c = koncentracija TEP standarda.....	57
Slika 30:	Kromatogram vzorca svinjske plazme: (1): kompleks MDA-TBK ₂ . Kromatografski pogoji: kot na Sliki 28.....	58
Slika 31:	Kromatogram vzorca svinjskega seča: (1): kompleks MDA-TBK ₂ . Kromatografski pogoji: kot na Sliki 28.....	58
Slika 32:	Primerjava koncentracij MDA v plazmi med skupinama iz prvega in drugega poizkusa, ki sta dobivali k obrokom 85 g lanenega olja. Primerjave so narejene za posamezne odvzeme krvi. Različne črke znotraj posameznih odvzemov pomenijo statistično značilne razlike med skupinama iz prvega in drugega poizkusa.....	62
Slika 33:	Primerjava množin MDA v dnevnem seču med skupinama s 85 g lanenega olja iz prvega in drugega poizkusa, ločenih po zaporednih odvzemih seča. Enake črke znotraj posameznih odvzemov pomenijo, da med skupinama iz prvega in drugega poizkusa ni bilo statistično značilnih razlik.....	63
Slika 34:	Spreminjanje koncentracij MDA v plazmi med skupinami v času poizkusa, znotraj posameznih odvzemov krvi. Različne črke nad stolpci znotraj posameznih odvzemov krvi pomenijo statistično značilne razlike med skupinami, s $P < 0,05$	65
Slika 35:	Vpliv vrste in količine dodane maščobe v obroku na koncentracije MDA v plazmi prašičev. Različne črke nad stolpci znotraj posameznih skupin pomenijo statistično značilne razlike med zaporednimi odvzemi krvi, s $P < 0,05$	68
Slika 36:	Spreminjanje koncentracij MDA v seču med skupinami v času poizkusa, glede na zaporedno številko odvzema seča. Različne črke nad stolpci znotraj posameznih odvzemov pomenijo statistično značilne razlike med skupinami, s $P < 0,05$	71
Slika 37:	Spreminjanje množin MDA, dnevno izločenega s sečem, med poizkusom, glede na vrsto in količino dodane maščobe v obroku. Različne črke nad stolpci znotraj posameznih skupin pomenijo statistično značilne razlike med zaporednimi odvzemi seča, s $P < 0,05$	73
Slika 38:	Spreminjanje koncentracij MDA v plazmi prašičev pri skupinah prvega in drugega poizkusa, ki sta dobivali k obrokom 85 g lanenega olja.....	77
Slika 39:	Spreminjanje množin MDA v seču prašičev pri skupinah iz prvega in drugega poizkusa, ki sta dobivali k obrokom 85 g lanenega olja.....	77
Slika 41:	Spreminjanje množin MDA, dnevno izločenega s sečem, pri prašičih v času poizkusa; krivulje predstavljajo skupine prašičev, ki so uživali obroke z različno vrsto oziroma količino maščob.....	82

KAZALO TABEL

Tabela 1:	Pregled in lokacija antioksidantov (Šuput in Kamarič, 1998).....	14
Tabela 2:	Pogoji centrifugiranja krvi.....	39
Tabela 3a:	Zasnova poskusa.....	40
Tabela 3b:	Sestava dnevnih krmnih obrokov v poizkusu.....	40
Tabela 4:	Izračunana vsebnost in pokritost potreb po mineralih, vitaminih in aminokislinah v nedopolnjenem obroku za prašiča na dan.....	42
Tabela 5:	Sestava mineralno-vitaminskega dodatka za enega prašiča na dan.....	43
Tabela 6:	Sestava in izračunana hranilna vrednost poizkusnih dnevnih obrokov.....	46
Tabela 7:	Količine hranilnih snovi v krmnih obrokih.....	47
Tabela 8:	Maščobnokislinska sestava obrokov.....	48
Tabela 9:	Maščobnokislinska sestava olj, ki smo jih uporabili v prehranskem poizkusu.....	48
Tabela 10:	Karakteristični števili, ki določata kakovost uporabljenih olj.....	49
Tabela 11:	Shema odvzemov krvi in seča v predpoizkusnem in poizkusnem obdobju...	50
Tabela 12:	Gradientno spreminjanje razmerij topil v mobilni fazi.....	56
Tabela 13:	Povprečni koncentraciji MDA v plazmi in seču prašičev prvega in drugega poizkusa, pred začetkom krmljenja s poskusnimi krmnimi obroki.....	61
Tabela 14:	Primerjava koncentracij MDA v plazmi za skupini iz prvega in drugega poizkusa, ki sta dobivali k obrokom 85 g lanenega olja, ločeno po posameznih odvzemih krvi.....	62
Tabela 15:	Primerjava množin MDA v dnevnem seču za skupini iz prvega in drugega poizkusa, ki sta dobivali k obrokom 85 g lanenega olja, ločeno po posameznih odvzemih seča.....	63
Tabela 16:	Koncentracije MDA v plazmi, ločeno po skupinah, glede na vrsto krmnega obroka in zaporedno številko odvzema krvi.....	66
Tabela 17:	Spreminjanje koncentracij MDA v plazmi znotraj skupin v času poizkusa...	67
Tabela 18:	Množina MDA, dnevno izločenega s sečem, ločeno po skupinah, glede na vrsto krmnega obroka in zaporedno številko odvzema seča.....	69
Tabela 19:	Spreminjanje množin dnevno izločenega MDA s sečem, znotraj posameznih skupin v času poizkusa.....	72
Tabela 20:	Natančnost znotraj analize za vzorce plazme z različnimi koncentracijami MDA.....	75
Tabela 21:	Natančnost znotraj analize pri treh vzorcih plazme z različnimi koncentracijami MDA.....	75
Tabela 22:	Potrebe po vitaminu E glede na stopnjo nenasičenosti zaužitih maščobnih kislin (Muggli, 1994).....	78
Tabela 23:	Potrebe po vitaminu E pri zaužitju olja različne maščobnokislinske sestave.	79

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

MDA	malondialdehid
PUFA	večkrat nenasičene maščobne kisline
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
HNE	4-hidroksinonenal
TBK	tiobarbiturna kislina
TBARS	s tiobarbiturbo kislino reagirajoče snovi

1 UVOD

V zadnjih letih je vse več raziskav usmerjenih v odkrivanje povezav in posledic, ki jih ima oksidacijski stres na organizem. O oksidacijskem stresu govorimo, kadar je prooksidativna obremenitev večja kot antioksidativna zaščita. Do tega pride zaradi premočnega nastajanja reaktivnih kisikovih vrst ter prostih radikalov in/ali zaradi oslabitve antioksidacijskega sistema zaradi zmanjšane endogene sinteze, manjšega uživanja antioksidantov ali povečane potrebe po antioksidantih. Ena izmed posledic oksidacijskega stresa je povečana lipidna peroksidacija. To je kompleksen proces, kjer so nenasičene maščobne kisline (npr. iz fosfolipidov v celičnih membranah) podvržene reakciji s kisikom. Iz nenasičene maščobne kisline reaktivni prosti radikal odvzame vodikov atom. Sledi vrsta propagacijskih reakcij, ki skupaj predstavljajo mehanizem verižnih reakcij prostih radikalov s produkti, tj. lipidnimi hidroperoksidi. Ti in pa konjugirani dieni, ki se oblikujejo, razpadejo na številne produkte, vključno z alkani, alkeni, hidroksialkeni, malondilaldehidom (MDA) in hlapnimi ogljikovodiki. Čim bolj nenasičena je maščobna kislina, tem bolj je izpostavljena peroksidaciji.

Malondialdehid (MDA), sekundarni produkt oksidacije lipidov, je zelo reaktivna substanca, za katero predvidevajo, da je citotoksična, mutagena in karcinogena. Navzkrižno reagira z lipidi in beljakovinami, inaktivira nekatere encime in se kovalentno veže z nukleinskimi kislinami. Zaradi tega je MDA v organizmu nezaželen. Glavna prekursorja MDA v tkivih sesalcev sta arahidonska in dokozaheksaenojska kislina, medtem ko je v hrani njegov glavni vir trikrat nenasičena linolenska kislina. Možnosti za nastanek MDA se bistveno zmanjšajo, če čimbolj zmanjšamo faktorje, ki povzročajo oksidacijski stres in s tem lipidno peroksidacijo. Torej se skušamo izogniti virov prostih radikalov, kot so cigaretni dim, smog, ionizirajoče sevanje, prelirana z veliko nenasičenih maščobnih kislin, ter povečati antioksidacijsko zaščito organizma z zadostnim uživanjem antioksidativnih snovi.

Z merjenjem količine MDA v plazmi in seču je možno zasledovati lipidno peroksidacijo v bioloških vzorcih. Ker je koncentracija MDA v plazmi in njegova množina, izločena s sečem, zelo odvisna od vrste in količine zaužite maščobe, smo iz tega izpeljali hipotezo, da bi z definirano sestavo "enolončniškega" obroka in z dozirano prooksidativno obremenitvijo prašičev z nenasičenimi maščobnimi kislinami lahko postavili primeren model za preučevanje alimentarnih vplivov na oksidacijski stres. V takem modelu bi stopnjo oksidacijskega stresa lahko merili z določanjem MDA v plazmi in v seču ali pa z drugimi metodami, ki se v ta namen uporabljajo, to je: z določanjem koncentracij drugih produktov in posledic reakcij prostih radikalov, kot sta na primer heksanal in nonenal (produkta peroksidacije nenasičenih maščobnih kislin) ali 8-hidroksigvanin in 8-hidroksi-2-dezoksigvanozin (produkta poškodb DNK), ali s kometnim testom (vizualizacija poškodb DNK),

S tem namenom smo izvedli modelno raziskavo na prašičih, v kateri smo z osnovnim obrokom tipa enolončnice posnemali prehrano človeka, peroksidacijsko obremenitev organizma smo manipulirali z dodatkom različne vrste in količine maščob, stopnjo oksidacijskega stresa pa smo zasledovali z merjenjem koncentracije MDA v krvni plazmi in v seču prašičev..

Ker preprostejše spektrofotometrične metode za določanje MDA niso dovolj natančne in specifične, je bilo treba v okviru raziskave najprej uvesti dovolj občutljivo HPLC-metodo za MDA, neobremenjeno z napakami spektrofotometrične določitve. Pri izvedbi biološkega poizkusa na prašičih pa smo skušali čim bolj simulirati prehrano človeka, čim bolj definirati obrok in druge poskusne postopke, da bi bila variabilnost rezultatov znotraj skupin čim manjša in da bi bili čim bolj odvisni od alimentarne peroksidativne obremenitve.

Želeli smo postaviti model, ki bi bil dobro uporaben za raziskave prehranskih vplivov na oksidacijski stres, in kot sklepamo iz rezultatov, smo prišli do zanesljive metode za določanje MDA in do uporabnega živalskega modela za indukcijo in preučevanje oksidacijskega stresa.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 PROSTI RADIKALI

Prosti radikali so kemične vrste, ki imajo neparni elektron. Lahko jih imamo za dele molekul z izredno reaktivnostjo. V celicah nastajajo nenehno, bodisi naključno, kot stranski produkti metabolizma, ali namerno, npr. pri fagocitozi. V biokemiji prostih radikalov igrajo najpomembnejše vloge reaktantov v aerobnih celicah *kisik in njegovi derivati* (hiperoksidni in hidroksilni radikali), *vodikov per oksid* in *ioni prehodnih kovin*. Za preprečevanje nastajanja prostih radikalov oziroma omejitev njihovih škodljivih učinkov so celice razvile obsežen obrambni sistem. Ta vključuje encime, ki razgradijo perokside, beljakovine, potrebne za vezavo ionov prehodnih kovin, ter vrsto drugih spojin, ki ujamejo proste radikale.

Reaktivni prosti radikali, ki nastajajo v notranjosti celic, lahko oksidirajo biomolekule, kar vodi v smrt celic in poškodbe tkiv. Dokazovanje vključenosti prostih radikalov v nastajanje bolezni je izredno težavno zaradi njihove kratke življenjske dobe.

Prosti radikali bi lahko nastali na tri načine:

- ~ s homolitsko cepitvijo kovalentne vezi nereaktivne molekule, pri čemer vsak del molekule zadrži po enega od elektronov iz para:



Homolitska cepitev zahteva visoko energijsko raven, ki jo je mogoče doseči z visoko temperaturo, UV-svetlobo ali ionsko radiacijo. Zaradi teh razlogov ta cepitev prostih radikalov ne da prav pogosto.

- ~ s heterolitsko cepitvijo kovalentne vezi nereaktivne molekule:



V tem primeru en del molekule ali en atom prevzame skupen elektronski par, kar vodi v nastanek ionov z nabojem in ne prostih radikalov.

- ~ s prenosom samskega elektrona na nereaktivno molekulo:



Tako nastajanje prostih radikalov je v bioloških sistemih najverjetnejše in najpogostejše.

Prosti radikali so lahko pozitivno nabiti, negativno nabiti ali nevtralni.

Za kisik, kot zelo pomembno molekulo v biokemiji prostih radikalov, je rečeno, da so elektroni razporejeni tako, da sta dva elektrona "neparna". Tako imamo kisik včasih za di-radikal. Čeprav di-radikalna narava kisika omogoča njegovo reagiranje s številnimi drugimi prostimi radikali, pa v splošnem z neradikalnimi vrstami reagira relativno počasi. Zato je z upoštevanjem njegovih reakcij v kontekstu biokemije prostih radikalov lažje

govoriti o kisiku kot o normalni molekuli, ki rada odda en elektron ali ga sprejme - odvisno od narave nastanka prostega radikala - medtem ko sam ni prosti radikal (Cheeseman in Slater, 1993).

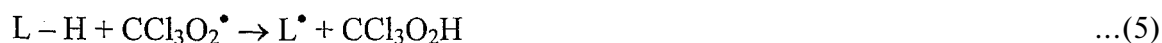
2.1.1 Vzroki za nastanek prostih radikalov

V bioloških sistemih nastajajo prosti radikali v ksenobiotičnem metabolizmu zdravil in kemikalij, pri obsevanju, vključno z ionizirajočim sevanjem in svetlobo, pri reakcijah, ki jih katalizirata železo in baker, pri izločanju oksidantov iz vnetih levkocitov ter pri drugih imuno-obrambnih procesih celic. Tako kot ionizirajoče sevanje je nevarna UV-svetloba s kratko valovno dolžino. Prosti radikali, ki pri tem nastajajo, kvarno učinkujejo predvsem na oči.

Onesnaževalci okolja sami po sebi vsebujejo proste radikale ali toksine, ki »poskrbijo« za njihov nastanek. Ksenobiotiki lahko tvorijo proste radikale na tri načine: (i) nekateri so prosti radikali že sami po sebi, in torej direktno reagirajo in oblikujejo biopolimerne radikale; (ii) nekateri, ki niso prosti radikali sami po sebi, so tako zelo reaktivni, da povzročajo nastanek prostih radikalov v celici; (iii) nekateri sprožijo aktivacijo encimov, potrebnih za nastanek prostih radikalov. Dušikov dioksid (NO_2) in dušikov oksid (NO), ki se nahajata v onesnaženem zraku, cigaretne dimu, smogu in sajah v urbanem zraku, v izpušnih plinih avtomobilov, sta toksina in hkrati prosta radikala. Dušikov dioksid, v zraku, polnem smoga, reagira z večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami (PUFA) tako *in vitro* kot *in vivo* in sproži nastajanje prostih radikalov. Naslednji onesnaževalec okolja, ki je reaktiven, je ozon. V reakcijah z biološkim materialom tvori proste radikale (Madhavi in sod., 1995). Toksična snov, ki pride v organizem iz okolja, je tudi ogljikov tetraklorid, ki izkazuje svojo toksičnost s tem, da se v procesu s citokromom P-450 v jetrih presnovi v triklorometilni prosti radikal (Cheeseman in Slater, 1993). Kot večina radikalov z ogljikom v centru triklorometil (CCl_3) reagira zelo hitro s kisikom, pri čemer nastane peroksidni radikal:



Triklorometilperoksidni radikal (CCl_3O_2) agresivno jemlje vodikove atome iz lipidov:



in prične lipidno peroksidacijo.

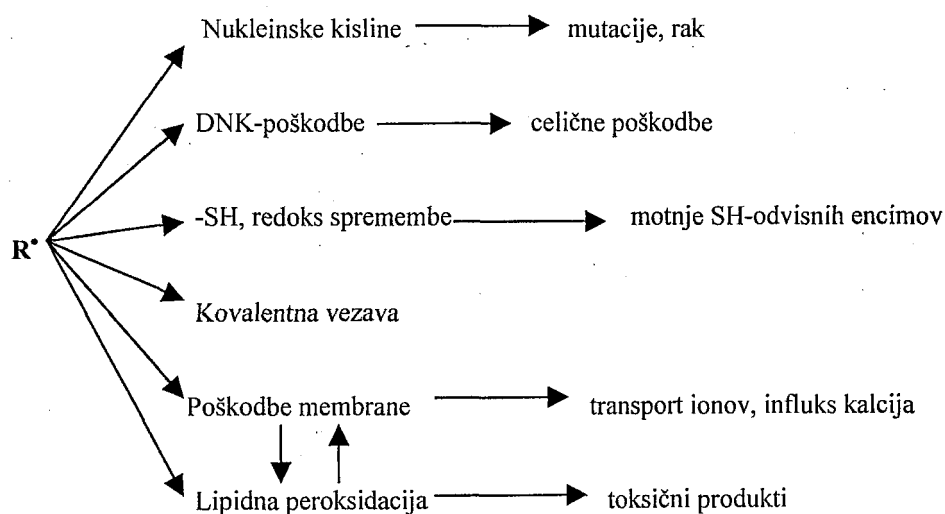
Toksičnost CCl_4 v jetrih je torej mišljena v smislu njegove zmožnosti pričeti peroksidacijo lipidov. Enak učinek kot ogljikov tetraklorid ima bromobenzen (Halliwell in Chirico, 1993). Ker nastali prosti radikali premagajo antioksidativno obrambo jeter, pride do oksidativnega propada celičnih membran in številnih poškodb tkiv. Mnoge druge toksične snovi so "redoks-ciklične", kar pomeni, da najprej sprejmejo en elektron in s tem postanejo prosti radikali, nato ga oddajo kisiku, s čimer dobimo hiperoksid in nato vodikov peroksid. Zaradi povečane količine vodikovega peroksida se porabijo zaloge glutation peroksidaze, ki ga sicer sproti odstranjuje. Posledica je oksidativna poškodba celic (Cheeseman in Slater, 1993).

Tudi v normalnih metabolnih procesih v človeškem organizmu ves čas nastajajo prosti radikali. Njihov nastanek je bodisi naključen ali nameren. O namernem nastanku govorimo v primerih, ko se prosti radikali uporabijo za zadrževanje določenih reakcij. Nekateri encimi uporabijo proste radikale v svojih aktivnih mestih v procesu katalize (npr. ribonukleotid reduktaza). V teh primerih prosti radikali v resnici niso povsem "prosti" in je njihova reaktivnost usmerjena le v specifično reakcijo. Aktivirani fagociti namensko proizvajajo hiperoksid kot del svoje baktericidne vloge. Čeprav ti prosti radikali nastajajo le na manjših delih površin fagocitne plazmine membrane in fagocitoznih bakterij, neizogibno prihaja do majhnega prepuščanja hiperoksida, vodikovega peroksida in ostalih reaktivnih oblik kisika (Dreosti, 1991).

V normalnih okoliščinah je glavni naključni izvor prostih radikalov v celicah proces dihalne verige, ko elektroni "uhajajo" iz procesa prenosa elektronov k molekularnemu kisiku. Posledica je nastanek hiperoksida. To se dogaja npr. v mitohondrijih in endoplazmatskem retikulumu. Pogosto so v nastanek prostih radikalov vključeni tudi ioni prehodnih kovin, ki povečajo možnost avtooksidacije askorbinske kisline, tiolov (glutaciona, cisteina), adrenalina in koencimov flavina. Produkt njihove avtooksidacije je prav tako hiperoksid (Dreosti, 1991).

2.1.2 Biološki učinki prostih radikalov

Če pri normalnem celičnem metabolizmu nastaja toliko prostih radikalov, da presežejo običajno učinkovit zaščitni mehanizem, se pojavijo motnje metabolizma celic. Glavne motnje, inducirane z reakcijami prostih radikalov, so prikazane na Sliki 1:



Slika 1: Poškodbe, ki jih povzročajo prosti radikali (Madhavi in sod., 1995)

Kovalentna vezava membranskih encimov in/ali receptorjev s prostimi radikali-spremeni aktivnost membranskih komponent. Prav tako kovalentna vezava prostega radikala s komponentami membrane spremeni strukturo celic in prizadene funkcijo membran in/ali antigenski značaj. Pri kovalentni vezavi lahko pride do motenj pri transportu snovi, do

oksidacije tiolnih skupin ali spremembe v razmerju večkrat nenasičenih maščobnih kislin (PUFA) in beljakovin.

Začetek lipidne peroksidacije PUFA ima direktne učinke na membranske strukture, produkti oksidacije pa vplivajo na fluidnost membran, na navzkrižne povezave, strukturo in funkcijo celic. Poškodbe membranskih fosfolipidov imajo daljnosežne posledice. Tako arahidonska kot linolna kislina, ki sta prekurzorja sinteze prostaglandinov, sta v tem procesu izgubljeni. To vodi v stanje neuravnoteženosti teh biokemičnih komponent, življenjsko pomembnih za celično regulacijo. Spremembe mehanskih karakteristik se kažejo kot povečana permeabilnost in s tem povezane motnje sicer uravnoveženega transporta natrija, kalija, kalcija in magnezija, kakor tudi motnje drugih procesov, povezanih s transportom ionov (Madhavi in sod., 1995).

Med najnevarnejšimi učinki prostih radikalov so poškodbe DNK. *In vitro* raziskave so jasno pokazale, da prosti radikali v neposredni bližini molekul DNK povzročajo njihove strukturne poškodbe, posledica pa so mutacije in citotoksični učinki. Zato je verjetnost, da so tovrstne poškodbe povezane z razvojem rakavih obolenj, zelo velika (Madhavi in sod., 1995).

Seveda ne smemo pozabiti, da so zelo reaktivni prosti radikali ujeti takoj in v neposredni bližini svojega nastanka. Njihov radij difuzije je običajno zelo majhen. Primer so reaktivni prosti radikali, nastali v endoplazmatskem retikulumu, ki ne morejo difundirati dovolj daleč, da bi reagirali z DNK v jedru. Poleg tega jih ima večina kratko razpolovno dobo: za CCl_3 in OH znaša razpolovni čas le nekaj mikrosekund, kar jim omogoča potovanje le v območju 100 nm od mesta nastanka. Uničujoč učinek prostih radikalov na DNK je možen le, če nastanejo v njeni neposredni bližini, kar se zgodi v primeru izpostavljenosti ionizirajočemu sevanju, ki je vzrok za nastanek prostih radikalov in posledično za spremembe na DNK.

V nasprotju z zelo reaktivnimi prostimi radikali pa so manj reaktivni prosti radikali sposobni potovati dlje, a niso dovolj reaktivni, da bi sprožili nastanke kovalentnih kompleksov, odgovornih za mutacije in citotoksične učinke (Madhavi in sod., 1995).

2.1.3 Kisikovi radikali in reaktivne oblike kisika

V nastanek prostih radikalov v organizmu je pogosto vključen kisik. Čeprav je bistven za aerobne procese, je v pogojih, ko je koncentracija vdihanega kisika velika, lahko škodljiv. Nevaren ni kisik v osnovnem stanju, marveč kisikovi prosti radikali, ki pri tem nastajajo. Ti so anorganski: hiperoksidni (O_2), hidroksilni (OH), hipokloritni (ClO), ali organski: alkoksilni (RO) in alkilperoksilni (ROO) (Dreosti, 1991). Zadnja dva nastaneta zaradi reagiranja kisika in prostega radikala z ogljikom (R), ki nastane iz biološke molekule (lipida, nukleinske kisline, ogljikovega hidrata ali beljakovine). Tudi žveplovi prosti radikali (RS) so dokaj pogosti (Cheeseman in Slater, 1993).

Zaradi velike pomembnosti kisikovih radikalov si podrobneje oglejmo nastanek nekaterih izmed njih.

Hiperoksidni prosti radikalni anion ali kratko **hiperoksid** ($O_2^- \bullet$) je produkt redukcije kisika, ko se na molekulo kisika prenese samski elektron:



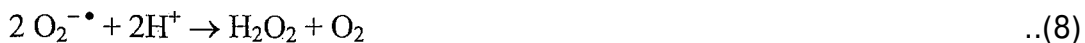
Hiperoksid, čeprav je prosti radikal, ni prav posebno nevaren. Njegovi glavni lastnosti sta, da je vir vodikovega peroksida in reducent ionov prehodnih kovin. Nekaj hiperoksida se razvije v organizmu naključno, zaradi reakcij avtooksidacije in izgubljanja elektronov iz transportne verige elektronov, ki so namenjeni h končnemu prejemniku - kisiku. Naslednji pomembnejši delež hiperoksida nastane namerno, na primer v aktiviranih fagocitih ter nekaterih tipih celic: fibroblastih in limfocitih. Odstranitev prebitkov hiperoksida s supeoksid dismutaznimi (SOD) encimi spada med pomembne fiziološke antioksidativne obrambne mehanizme. SOD encimi pretvorijo hiperoksid v O_2 in H_2O_2 (Halliwell in Chirico, 1993).

Hidroperoksilni radikal (EKV) je reaktivna protonizirana oblika hiperoksida, ki nastane pri majhni pH-vrednosti.

Vodikov peroksid (H_2O_2) nastane pri redukciji kisika z dvema elektronoma:



Vodikov peroksid pogosto nastane tudi iz hiperoksida, in sicer tako, da dve molekuli hiperoksida reagirata in tvorita vodikov peroksid in kisik:



Ker tu prosti radikali delujejo kot reaktanti, ki dajo neradikalske produkte, je ta reakcija znana kot dvojna zamenjava. Poteče lahko spontano ali pa je posledica delovanja encima superoksid dismutaze.

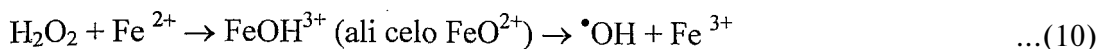
Vodikov peroksid ni prost radikal, vendar spada v kategorijo reaktivnih oblik kisika, ki vključuje ne le proste kisikove radikale, marveč tudi neradikalske kisikove derivate, ki so vključeni v produkcijo kisikovih radikalov. Ob odsotnosti ionov prehodnih kovin se hiperoksid in vodikov peroksid brez težav odstranita in sta le redko škodljiva (Cheeseman in Slater, 1993).

Lastnost H_2O_2 je, da z lahkoto prehaja skozi celične membrane in prizadene točno določene cilje. Tako visoka koncentracija H_2O_2 v celicah sesalcev inaktivira gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenazo, glikolitični encim. Sicer povečano nastajanje hiperoksida ali vodikovega peroksida v celicah pripelje na koncu do DNK-poškodb, vendar niti eden niti drugi ne reagirata direktno z DNK ali z membranskimi lipidi. Vpliv je posreden, preko hidroksilnih radikalov ali hidroperoksilnih radikalov; hiperoksid in vodikov peroksid namreč povzročata nastanek hidroksilnih in hidroperoksilnih radikalov (Halliwell in Chirico, 1993).

Hidroksilni radikal ($\bullet OH$) je najbolj reaktiven in uničujoč kisikov prosti radikal. Nastane iz vodikovega peroksida, ki razmeroma lahko razpade, še posebej v prisotnosti ionov prehodnih kovin (Cheeseman in Slater, 1993):



Reakcija je zapisana nekoliko skrajšano, saj v resnici v vmesni stopnji nastane še okso-železov kompleks (Halliwell in Chirico., 1993):



Tu vidimo, da služi kovinski ion kot katalizator reakcije. Železov Fe^{2+} ion ali bakrov Cu^+ ion sta v reakciji z vodikovim peroksidom bistveno bolj reaktivna, kot njuni oksidirani obliki: Fe^{3+} in Cu^{2+} .

Cheeseman in Slater (1993) navajata naslednja dva mehanizma nastanka Fe^{2+} in Cu^+ ionov:

Prva možnost so reakcije, ki so katalizirane z železovim Fe^{2+} ali bakrovim Cu^+ ionom in so tako rekoč odvisne od hiperoksida, saj nastaneta reducirani obliki ionov z njuno pomočjo:



Seveda je možna avtooksidacija reduciranih oblik ionov železa in bakra, pri čemer spet nastane hiperoksid:



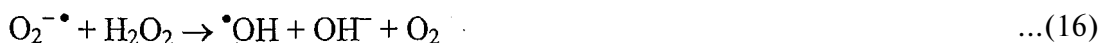
Vidimo, da so reverzibilne redoks reakcije, torej reakcije ionov prehodnih kovin in kisika, izrednega pomena pri pospeševanju reakcij prostih radikalov (Cheeseman in Slater, 1993).

Druga možnost nastanka reducirane oblike železovega ali bakrovega iona je s pomočjo askorbata:



Iz tega je razvidno, da lahko mešanica železovih soli, askorbata in H_2O_2 predstavlja znaten izvor hidroksilnih radikalov (Halliwell in Chirico, 1993).

Možna, čeprav v bioloških sistemih redka zaradi majhnih steady-state koncentracij, je nekatalizirana - spontana reakcija nastanka hidroksilnega radikala, kjer hiperoksid direktno reagira z vodikovim peroksidom (Cheeseman in Slater, 1993):



V organizmu nastane $\cdot\text{OH}$ še na tretji način: pride do homolitske cepitve vode zaradi izpostavljenosti ionizirajočemu sevanju (Halliwell in Chirico, 1993).

Halliwell in Chirico (1993) menita, da je hidroksilni radikal (OH) pravo zlo zaradi ekstremne reaktivnosti. Reagira z večino biomolekul na točno določene načine. Kljub zelo kratki razpolovni dobi je sposoben povzročiti veliko škodo v sicer ozkem območju svojega nastanka v celici, saj se po celici ne razširja.

Iz zgornjega, res precej poenostavljenega modela, je jasno razvidno, da imajo ključno vlogo v biokemiji kisikovih prostih radikalov *kisik sam po sebi*, *hiperoksid*, *vodikov peroksid*, *ioni prehodnih kovin* in *hidroksilni radikali*, pri čemer prvi štirje z različnimi interakcijami oblikujejo zadnjega.

Singletni kisikov radikal, sicer neradikal, je pogosto povezan z ostalimi kisikovimi prostimi radikali (Cheeseman in Slater, 1993). Nastane, če energija, ki jo absorbira kisikova molekula povzroči prerazporeditev elektronov. Nastanek te kisikove vrste ni usposobljen za začetek lipidne peroksidacije, saj singletni kisikov radikal reagira direktno z maščobno kislino in pri tem nastanejo peroksidi. Vodika ne odvzame, torej ne začne verižne reakcije.

Med samo lipidno peroksidacijo lahko katerikoli alkilperoksilni radikali, ki trčijo med seboj, oblikujejo manjše količine singletnega kisika, ki nato povzroči nastanek še več peroksidov. Tako nastalega singletnega kisika je malo, saj so trčenja radikalov redka, ker je njihova steady-state koncentracija v membranah majhna.

Singletni kisikov radikal nastane še v primerih, ko določene snovi osvetljujemo v prisotnosti kisika: pri tem absorbirajo svetlobo, preidejo v vzbujeno stanje, nakar prenesejo prebitok energije na kisik in ga tako spremenijo v singletno stanje. Med take snovi, občutljive za svetlobo, spadajo barvila (eozin), določene vrste zdravil (tetraciklini) ter številne substance v človeškem organizmu (porfirini, vitamin riboflavin, pigment bilirubin). Na primer: kopičenje porfirinov v koži pri bolnikih z določenimi oblikami porfirije lahko pripelje do poškodb kože, ko sončna svetloba in porfirini reagirajo in oblikujejo singletni kisik.

Prav tako številna živila vsebujejo pigmente, ki dajo na svetlobi singletni kisikov radikal. Mleko, ki je izpostavljeno močni svetlobi, se na primer hitro pokvari, ko prisotni riboflavin povzroči oblikovanje singletnega kisika (Halliwell in Chirico, 1993).

2.2 OKSIDACIJSKI STRES

Naključno nastajanje prostih radikalov je zaradi dobre antioksidativne zaščite organizma zelo majhno. Zaradi učinkovitega encimskega sistema pri prenosu elektronov h končnemu prejemniku kisiku je izgubljanje elektronov iz transportne verige zelo majhno, poleg tega pa so rudi kovinski ioni ustrezno zaščiteni. Kljub temu pa to še ne zadošča popolnoma za zaščito organizma pred prostimi radikali. Živali in človek imajo izdelane še druge vrste encimske in neencimske antioksidativne obrambe, ki "obračunajo" z izredno nizko stopnjo proizvedenih prostih radikalov, nastalih med normalnimi metabolnimi aktivnostmi v organizmu (Cheeseman in Slater, 1993).

Raznolika antioksidativna obramba organizma pa ni popolnoma učinkovita ravno zaradi določenih koristnih bioloških funkcij, ki jo igrajo nekateri prosti radikali ter druge

reaktivne oblike kisika. V primeru, ko pa se antioksidativna zaščita zmanjša ali nastane več reaktivnih oblik kisika (oksidacijska obremenitev se poveča), se uravnotežen antioksidativni/prooksidativni sistem organizma poruši. Nastaja več prostih radikalov, kot jih je organizem sposoben uničiti. V takem primeru govorimo o *oksidacijskem stresu*.

Oksidacijski stres povzroči veliko med seboj povezanih motenj v celičnem metabolizmu, vključno s cepitvami DNK-verig, povečanjem intracelularnega "prostega" Ca^{2+} , poškodbami membranskih ionskih prenašalcev in/ali drugih specifičnih beljakovin, peroksidacijo lipidov. Poškodbe so lahko neposredne ali posredne. Primer neposrednih sta oksidacija tiolnih skupin s H_2O_2 , ali pa nastanek OH v bližini DNK-molekule in njena cepitev na fragmente. Primer posrednega vpliva je pretirano povečanje intracelularnega "prostega" Ca^{2+} , ki lahko aktivira proteaze (te napadejo skeletne celice) ali nukleaze (fragmentacija DNK). Območje, kjer imajo na eni strani reaktivne oblike kisika regulatorsko vlogo, na drugi pa že uničujočo, je zelo ozko. Na kateri strani razmejitvene črte bodo, je odvisno od: obsežnosti njihovega nastajanja, ciljnih celic, aktivnosti antioksidativne obrambe in prisotnosti oziroma odsotnosti ionov prehodnih kovin. Na podoben način lahko majhne koncentracije lipidnih hidroperoksidov sprožijo delovanje lipoksigenaz in ciklooksigenaz, ki vplivajo na prostaglandinsko in levkotriensko sintezo *in vivo*, medtem ko bi lahko velika koncentracija peroksidov te encime inaktivirala.

Do kakšne vrste poškodb celic pride, je odvisno od jakosti oksidacijskega stresa, od mehanizma, s katerim je bil povzročen, od dolžine trajanja in narave celic, ki jih je stres doletel. Lipidna peroksidacija, kot ena izmed posledic stresa, je pri ljudeh povezana s poškodbami arterijskih žil in s tem z razvojem aterosklerotičnih poškodb (Halliwell in Chirico, 1993).

2.2.1 Peroksidacija - ena izmed posledic oksidacijskega stresa

Vse glavne skupine biomolekul so podvržene napadu prostih radikalov, verjetno pa so najbolj dovzetni lipidi, ki vsebujejo nenasičene maščobne kisline, katerih dvojne vezi so glavna tarča napadov prostih radikalov (Cheeseman in Slater, 1993).

Lipidi so ena izmed najbolj obsežnih skupin od vseh sestavin hrane in ostalih bioloških sistemov. To skupino organskih biomolekul lahko razdelimo na tri podenote: enostavni lipidi (triacilgliceroli, estri sterolov, voski), sestavljeni lipidi (fosfolipidi, glikolipidi, sfingolipidi, lipoproteini) in derivati lipidov (maščobne kisline, vitamini, topni v maščobah, in provitamini, steroli, terpeni, etri). Lipidi se nahajajo v živalskih ali rastlinskih tkivih kot **membranski lipidi** ali kot **lipidne zaloge**, ki lahko postanejo vir energije v procesu p- oksidacije. V membranah so vezani fosfolipidi, steroli, sfingolipidi in glikolipidi, v maščobnih depojih se nahajajo triacilgliceroli. Celične membrane vsebujejo velik delež večkrat nenasičenih maščobnih kislin, ki so vzrok, da lipidi radi reagirajo s kisikom, kar vodi do kompleksnih kemičnih sprememb. Pri hrani se to izrazi kot značilna aroma hrane - žarkost (Madhavi in sod., 1995).

V osnovi so biološke molekule neradikalske. V primeru pa, ko odda prosti radikal en elektron taki molekuli, ji ga odvzame ali se preprosto pripne nanjo, postane prej neaktivna molekula aktivna - nastane prosti radikal. Za reakcije, v katerih prosti radikali reagirajo z neradikali, je značilno, da so verižne. Z biološkega stališča pomembna verižna reakcija

prostih radikalov se imenuje **lipidna peroksidacija** (Halliwell in Chirico, 1993). Ker gre za direktno reakcijo lipidne molekule z molekularnim kisikom, je znana še pod imenom **avtooksidacija**. Dolžina trajanja začetne faze avtooksidacije je odvisna od prisotnosti, majhnih komponent snovi, ki bodisi podaljšajo to fazo (antioksidanti) bodisi skrajšajo (prooksidanti) (Madhavi in sod., 1995).

Lipidna peroksidacija igra bistveno vlogo pri razvoju ateroskleroze. Dokazovanje končnih produktov lipidne peroksidacije je pomembno za ugotavljanje vloge prostih radikalov pri določenih boleznih ali pri poškodbah tkiv s toksini.

Nekatere raziskave kažejo nekoliko drugačno sliko, ko gre za poškodbe in smrt celic. Še bolj kot peroksidacija membranskih lipidov naj bi bili pomembni drugi faktorji: povečana intracelularna koncentracija Ca^{2+} ionov, poškodbe beljakovin, DNK poškodbe.

Zelo zanimivo in malo drugačno, kot so običajni pogledi na ta problem, je stališče Halliwella in Chiricove (1993) glede uživanja nasičenih in nenasičenih maščobnih kislin: kot že omenjeno, so tako posamezne večkrat nenasičene maščobne kisline - še zlasti arahidonati - kot tiste, ki so vključene v lipide, ves čas izpostavljene napadom prostih radikalov in se oksidirajo v lipidne perokside. V nasprotju z njimi so enkrat nenasičene in nasičene maščobne kisline odpornejše proti na napadom prostih radikalov. Iz tega razloga naj bi ljudje uživali več teh maščobnih kislin v zameno za večkrat nenasičene. Posledično naj bi postali lipoproteini v organizmu manj občutljivi za peroksidacijo, s čimer bi se zmanjšale možnosti za razvoj ateroskleroze.

Lipidni peroksidi so toksični in sposobni poškodovati večino telesnih celic. Večje količine večkrat nenasičenih maščobnih kislin v hrani, kjer se peroksidacija pogosto odvija, dajo končne produkte z neprijetnim vonjem, okusom in celo toksičnimi učinki. Zaradi tega se poraja vprašanje upravičenosti uživanja ribjih olj pri bolnikih z različnimi boleznimi, saj je zaradi velike vsebnosti večkrat nenasičenih maščobnih kislin v teh oljih peroksidacija zelo izrazita in hitra, rok uporabnosti olj pa temu primerno zelo kratek. Ribja olja namreč ne vsebujejo zadosti antioksidativnih snovi (npr. vitamina E), ki bi jih ščitila pred peroksidacijo. Pri testih preučevanja terapevtične učinkovitosti ribjih olj na bolnike ni mogoče z gotovostjo trditi, kakšna je resnična kakovost olja, ki ga pacient res dobiva, razen če stopnja peroksidacije ni istočasno ugotovljena z laboratorijskimi analizami. Pri visokih temperaturah lipidni peroksidi razpadejo na produkte z zelo neprijetnim vonjem in okusom: epokside, ketone, aldehide in kisline. V človeškem organizmu razpada lipidnih peroksidov pri telesni temperaturi $37^{\circ}C$ ni, saj je večina peroksidov pri tej temperaturi stabilna (Halliwell in Chirico, 1993).

2.2.1.1 Mehanizem lipidne peroksidacije - avtooksidacije

Mehanizem avtooksidacije ima tri stopnje: **iniciacija** oz. začetek nastajanja prostih radikalov, **propagacija**, kjer prosti radikali vstopajo v reakcije, produkti, ki pri tem nastajajo pa se cepijo naprej, ter **terminacija**, ki vključuje povezavo dveh radikalov in nastanek stabilnega produkta (Gordon, 1990).

2.2.1.1.1 Začetek (iniciacija) avtooksidacije

Živila vsebujejo snovi, ki katalizirajo oksidacijo maščobnih kislin. Med te snovi spadajo v prvi vrsti ioni kovin (Fe, Cu), ki so v hrani v zelo majhnih, a vendarle dovolj snih koncentracijah, da katalizirajo te reakcije. Na iniciacijo v veliki meri vplivata tudi UV svetloba in toplota (Gordon, 1990).

Vodikov atom ima en proton in en elektron, zaradi česar ga uvrščamo med proste radikale. Odstranitev vodikovega atoma iz biološke molekule pusti za seboj neparni elektron na atomu, na katerega je bil vodik vezan (Halliwell in Chirico, 1993). Pri lipidih (RH) gre za odvzem vodikovega atoma s C-atoma, ki je med dvema dvojnima vezema. To je eden izmed mehanizmov začetka lipidne peroksidacije (Madhavi in sod., 1995):



Večje, ko je število dvojnih vezi v verigi maščobne kisline, lažja je odcepitev vodikovega atoma. V tem je vzrok velike občutljivosti večkrat nenasičenih maščobnih kislin za peroksidacijo. Zelo reaktivni prosti radikali, kot je $\bullet OH$, zelo pogosto napadejo biološke molekule z odvzemom vodika (Halliwell in Chirico, 1993):



Drug možni mehanizem začetka lipidne peroksidacije je, da pride do adicije radikala na dvojno vez (Madhavi in sod., 1995).

Pri izoliranih večkrat nenasičenih maščobnih kislinah so ugotovili še en način začetka lipidne peroksidacije. Sprožijo precej reaktiven **hidroperoksilni radikal (HO_2^{\bullet})**:



Zaenkrat še ni dokazano, da bi bil hidroperoksilni radikal sposoben pričeti peroksidacijo v membranah. Njegova vključitev v peroksidacijo je pogostejša v fazi, ko so že prisotni lipidni hidroperoksidi (Halliwell in Chirico, 1993; Cheeseman in Slater, 1993).

2.2.1.1.2 Napredovanje (propagacija) avtooksidacije

2.2.1.1.2.1 Razvoj

Nadaljnje reakcije lipidnih radikalov (R^{\bullet}) so lahko različne, vendar v aerobnih celicah prevladuje tista, kjer vstopi radikal v reakcijo s kisikom, pri čemer nastane **alkilperoksilni radikal (ROO^{\bullet})** (Halliwell in Chirico, 1993):



Ker so prosti radikali zelo reaktivni, je zgornja reakcija zelo hitra, skoraj nobene aktivacijske energije ne potrebuje, zato je količina ROO^{\bullet} radikalov precej večja od R^{\bullet} radikalov. Enak proces kot v aerobnih celicah organizmov se odvija v hrani, kjer je prisoten kisik (Madhavi in sod., 1995).

Alkilperoksilni radikal reagira z novo molekulo maščobe, nakar nastane **hidroperoksid (ROOH)** in nov prosti radikal, ki preko zgornje reakcije ponovno začne verižno reakcijo.

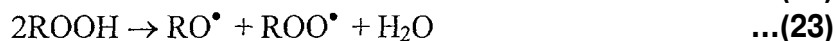


Kot pri vsaki verižni reakciji nastaja tudi pri tej vse več prostih radikalov in s tem se vse več maščobnih molekul pretvori v hidroperokside, ki so *primarni produkti* oksidacije maščob (Madhavi in sod., 1995).

Dolžina propagacijske stopnje je odvisna od več faktorjev, na primer od razmerja med lipidi in beljakovinami v membrani (alkilperoksilni radikali napadajo membranske beljakovine in če se poveča vsebnost beljakovin, je možnosti za radikalske reakcije več), od maščobno kislinske sestave lipidov, od koncentracije kisika in od prisotnosti znotraj-membranskih antioksidantov, ki lahko prekinejo verižno reakcijo (Halliwell in Chirico, 1993).

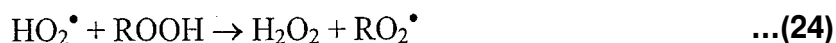
2.2.1.1.2.2 Cepitev hidroperoksidov

Primarni produkti oksidacije maščob - hidroperoksidi v hrani še ne puščajo okusa po žarkem, saj so nehlapni in brez vonja ter okusa. Ne zaznamo jih, dokler ne dosežejo določene koncentracije in se začno cepiti v spojine s kratkimi verigami. Možna je monomolekularna ali homolitska cepitev in oblikovanje **alkoksilnih radikalov (RO)** (reakcija 22) ter bimolekularna cepitev hidroperoksidov (reakcija 23):



Alkoksilni radikali nato vstopajo v nadaljnje reakcije in nastajajo spojine z neprijetnim žarkim okusom in vonjem (alkoholi, aldehidi, ketoni, karbonili, epoksidi ...) (Madhavi in sod., 1995).

Obstaja pa še ena možnost reagiranja hidroperoksidov, ki sem jo že omenila. Gre za njihov vstop v reakcijo s hidroperoksilnim radikalom:

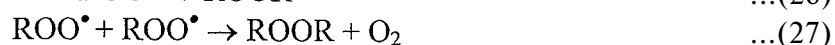


Na ta način nastane še več alkilperoksilnih radikalov (RO_2^\bullet), ki zaradi večjega števila lahko napadejo še več stranskih verig večkrat nenasičenih maščobnih kislin (Halliwell in Chirico, 1993).

2.2.1.1.2.3 Zaključek (terminacija) avtooksidacije

Prosti radikali so električno nevtralni in slabo topni. Ker jim manjka vez, so strukturno nestabilni. Da bi vzpostavili normalne vezi, težijo k reakcijam, kjerkoli je to mogoče. Zaradi tega so zelo reaktivni. Ko zmanjka nenasičenih lipidov (ali maščobnih kislin), na katere bi se vezali, se vežejo drug z drugim, s čimer oblikujejo stabilno neradikalno

mešanico. Zaključne reakcije ustavijo ponavljajoče reakcije prostih radikalov, značilne za propagacijsko stopnjo (Madhavi in sod., 1995).



2.2.2 Zaščita organizma pred lipidno peroksidacijo in njenimi produkti

Menijo, da je lipidna oksidacija pomembna pri razvoju koronarne srčne bolezni, ateroskleroze, raka in v procesih staranja. Običajno kompleksni antioksidativni obrambni mehanizem ščiti celični sistem pred poškodbami, ki jih povzročijo prosti radikali in lipidni peroksidi (Madhavi in sod., 1995).

Antioksidant je poljubna snov, ki že v majhnih koncentracijah v primerjavi s koncentracijo snovi, ki jo napade prosti radikal, prepreči, odloži ali zavira oksidacijo tarčne snovi. Antioksidanti lahko učinkujejo na različnih stopnjah oksidacijskega procesa. Lipidno peroksidacijo lahko preprečijo na začetni stopnji (faza iniciacije) z odstranjevanjem prostih radikalov. Odstranjujejo lahko intermediarne radikale (kot so alkilperoksilni in alkoksilni radikali) in tako prekinajo verižno reakcijo. Takšni antioksidanti so fenoli in aromatični amini (Šuput in Kamarič, 1998).

V normalnih fizioloških pogojih so celice sesalcev zaščitene pred kisikovimi radikali s pomočjo:

- encimov: superoksidne dismutaze (SOD), ki odstranjuje hiperoksidne radikale; katalaze (KAT), ki odstranjuje vodikov peroksid; glutation peroksidaze (GSH), ki odstranjuje vodikov peroksid in lipidne hidroperokside;
- vitaminov: A, C, E (odda vodik alkilperoksilnemu radikalumu);
- cisteina, glutationa, hidrosikinonov, serumskih beljakovin, selena (Petelin, 1999).

Razporeditev nekaterih pomembnih telesnih antioksidantov v organizmu prikazuje Tabela 1.

Tabela 1: Pregled in lokacija antioksidantov (Šuput in Kamarič, 1998)

ANTIOKSIDANTI:		
V CELICI	V CELIČNI MEMBRANI	ZUNAJ CELICE
superoksidne dismutaze	α -tokoferol	ceruloplazmin (inaktivira Cu^{+} in deloma Fe^{2+})
katalaza	karotenoidi	transferin in laktoferin, ki vežeta Fe^{3+}
glutationska peroksidaza	estri askorbinske kisline, ki so bolj liposolubilni kot sama kislina	hemopeksin in haptoglobin, ki vežeta hem
		ekstracelularna superoksidna dismutaza (malo aktivna)
		α -tokoferol, raztopljen v plazemskih lipidih.
		mukus, ki lovi hidroksilne radikale

2.3 MALONDIALDEHID

Z lipidno peroksidacij o nastane iz večkrat nenasičenih maščobnih kislin vrsta produktov. Posamezna maščobna kislina da več različnih geometrijskih izomer in več različnih derivatov (Halliwell in Chirico, 1993).

Ker je raznolikost aldehydov, nastalih pri cepitvi lipidnih hidroperoksidov, v bioloških sistemih bistveno večja kot v enostavnih maščobah in oljih in ker je njihova koncentracija običajno zelo nizka, so analize aldehydov v tkivih, celicah in celičnih organelah precej težavne. Nekateri aldehydi so zelo reaktivni in jih imamo za sekundarne toksične produkte; vplivajo na večje število reakcij prostih radikalov. Najpogosteje obravnavani aldehydi so: 4-hidroksinonenal (HNE), 4-hidroksiheksenal in malondialdehyd. V nasprotju s prostimi radikali imajo aldehydi dolgo življenjsko dobo in se zato lahko razširjajo z mesta nastanka (npr. membran) na oddaljena področja, kjer napadejo cilje intra- ali ekstracelularno.

Malondialdehyd (MDA), ki se pojavi v svežih ali peroksidiranih bioloških vzorcih, je najpogosteje posledica oksidacijske razgradnje tistih večkrat nenasičenih maščobnih kislin, ki imajo več kot dve dvojni vezi z metilensko skupino vmes. V tkivih sesalcev sta glavna prekursorja malondialdehida arahidonska (20:4) in dokozaheksaenojska (22:6) kislina (Esterbauer in sod., 1991). V večini hrane pa je glavni vir peroksidacij linolenska kislina, ki se oksidira 10- do 15krat hitreje kot oleinska kislina (Madhavi in sod., 1995). Strukturna formula malondialdehida je prikazna na Sliki 2. Kemijsko ime za MDA pa je 1,3-propandion. Sinonimi za malondialdehyd so še naslednji: malonaldehyd, malonski aldehyd, malonski dialdehyd, malonidialdehyd, propandial, 1,3-propandial, 1,3-propandialdehyd, NCI-C54842 (Malondialdehyde, 2001).

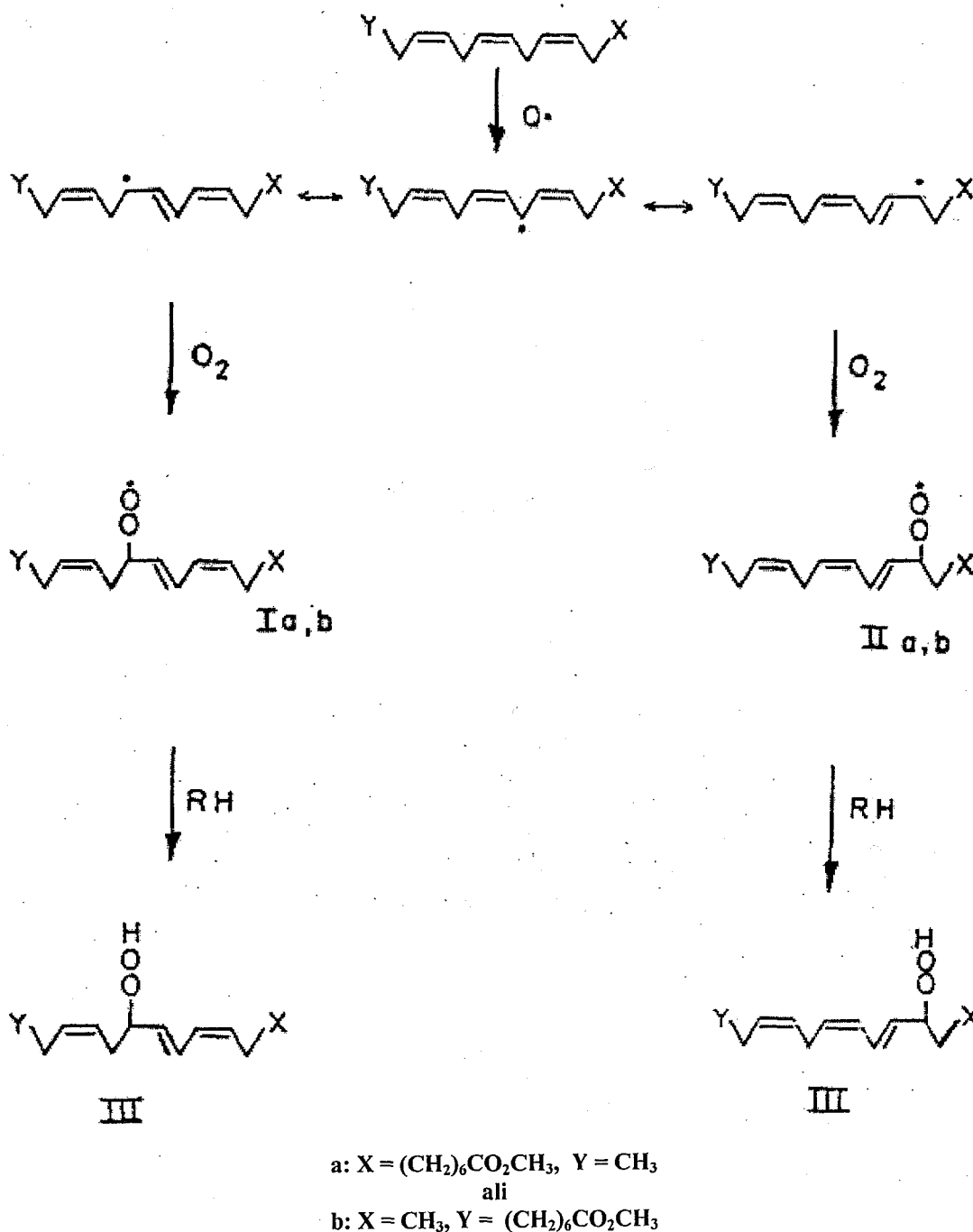


Slika 2: Strukturna formula malondialdehida (Pryor in sod., 1975)

Nastanek malondialdehida je možen preko različnih komponent: cikličnih peroksidov, hidroperoksilnih epidioksidov, bicikličnih endoperoksidov. Slednji ima sorodno strukturo kot endoperoksidi, ki nastanejo v zaporedju biosinteznih reakcij v tvorbi prostaglandinov. Že Dahle in sodelavci so leta 1962 predlagali mehanizem, po katerem se endoperoksidi oblikujejo v procesu ciklizacije prostih radikalov in iz njih v nadaljevanju nastane malondialdehyd. Nastanek endoperoksidov je odvisen od hitrosti nastajanja hidroperoksidov, s katerimi tekmujejo. Hidroperoksidi namreč nastajajo med avtooksidacijo večkrat nenasičenih maščobnih kislin ali njihovih estrov, ki vsebujejo tri ali več dvojnih vezi. Ko so 20:3 ali 20:4 večkrat nenasičene maščobne kisline podvržene avtooksidaciji, nastaja pri tem poleg cele vrste stereo in pozicijskih izomer celo nekaj malega naravnih, fiziološko aktivnih prostaglandinov.

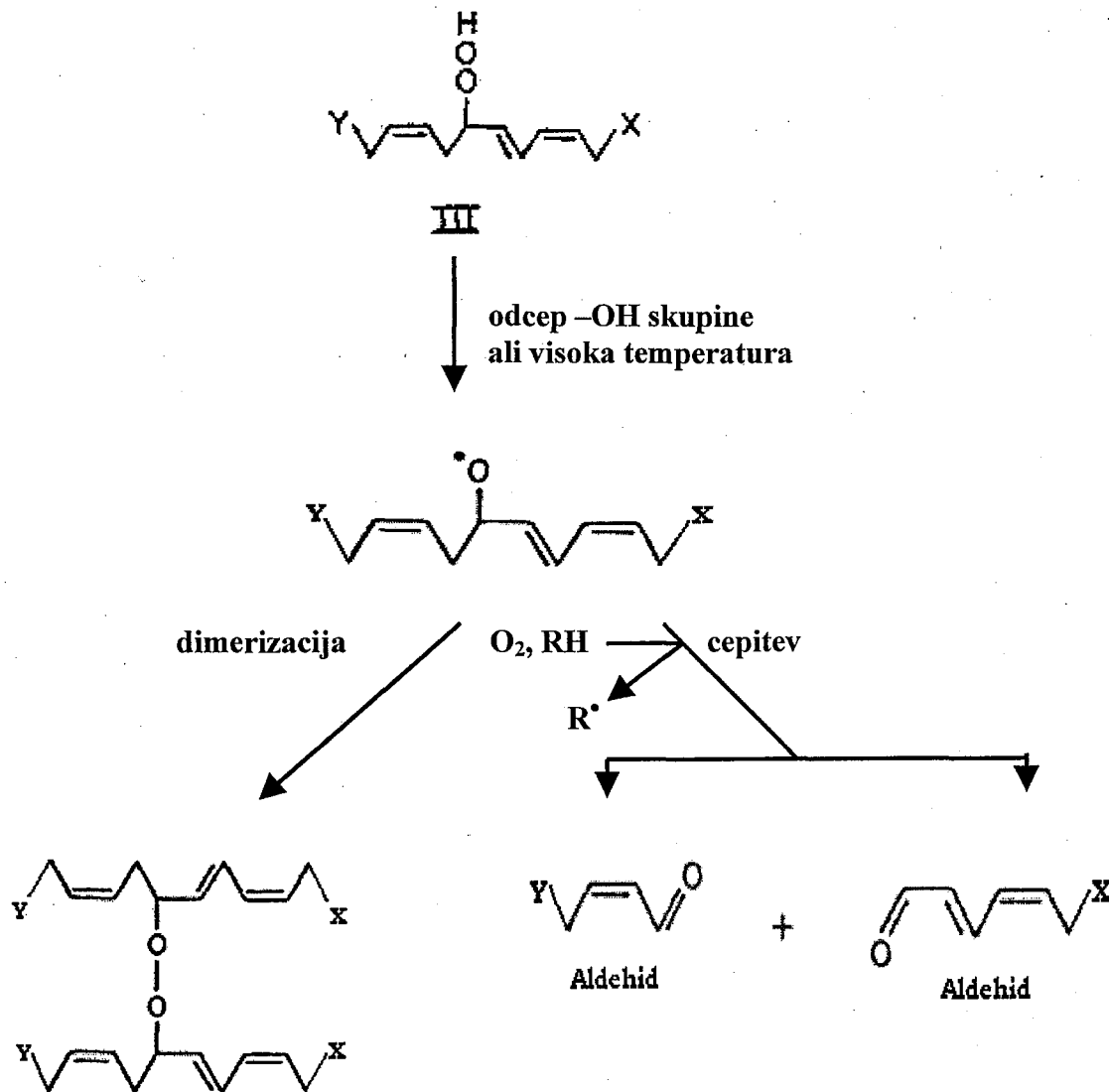
Mehanizem nastanka malondialdehida (glej Sliko 3), kot ga podajajo Pryor in sodelavci (1975), je naslednji: v trienskem sistemu pride do odcepa vodikovega atoma na C-atomu, ki je med dvema dvojnima vezema. Takšen način odcepa vodika ustvari prosti radikal, ki reagira s kisikom in nastane ena izmed dveh možnih konjugacijskih oblik peroksilnih

radikalov, označenih z $I_{a,b}$ in $II_{a,b}$ - V nadaljevanju se odcepi še en vodikov atom in nastane hidroperoksid (III) (Slika 3) (Pryor in sod., 1975).



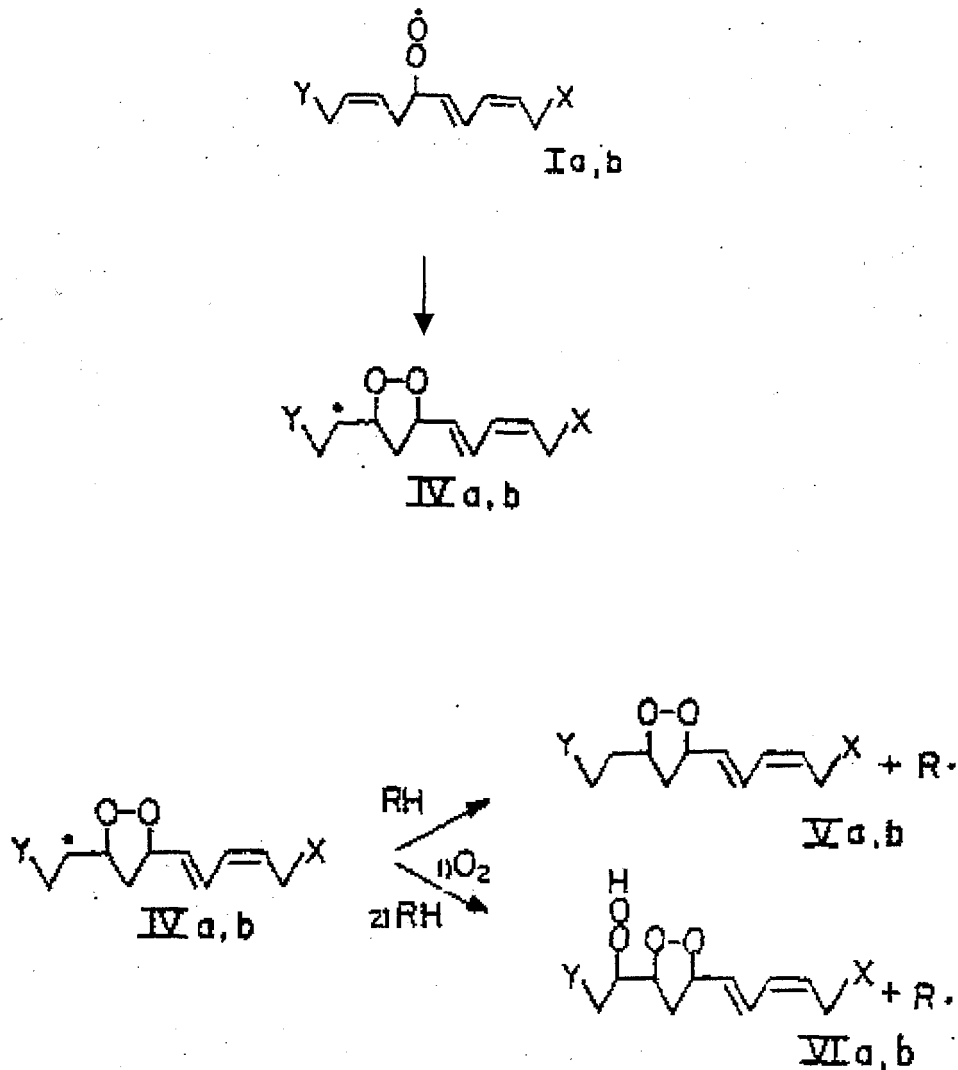
Slika 3: Mehanizem lipidne peroksidacije do nastanka hidroperoksida (Pryor in sod., 1975)

Zaradi različnih faktorjev, npr. visoke temperature, se hidroperoksidi cepijo. Na Sliki 4 je prikazan nastanek alkoksilnih radikalov, njihovo združevanje ali cepitev na sekundarne produkte oksidacije - aldehide.



Slika 4: Možne reakcije alkoksilnih radikalov (Madhavi in sod., 1995)

Pri radikalu $\text{I}_{a,b}$ lahko pride do ciklizacije in nastanka cikličnega peroksilnega radikala s 5-členskimi obroči ($\text{IV}_{a,b}$) (Slika 5). Prosti radikal ($\text{IV}_{a,b}$) lahko odcepi vodikov atom iz molekule lipida (RH), s čimer dobimo ciklični peroksid ($\text{V}_{a,b}$). Verjetnejša kot ta pa je reakcija radikala ($\text{IV}_{a,b}$) s kisikom in oblikovanje hidroperoksilnega epidioksida ($\text{VI}_{a,b}$) (Slika 5).



a: X = (CH₂)₆CO₂CH₃, Y = CH₃

ali

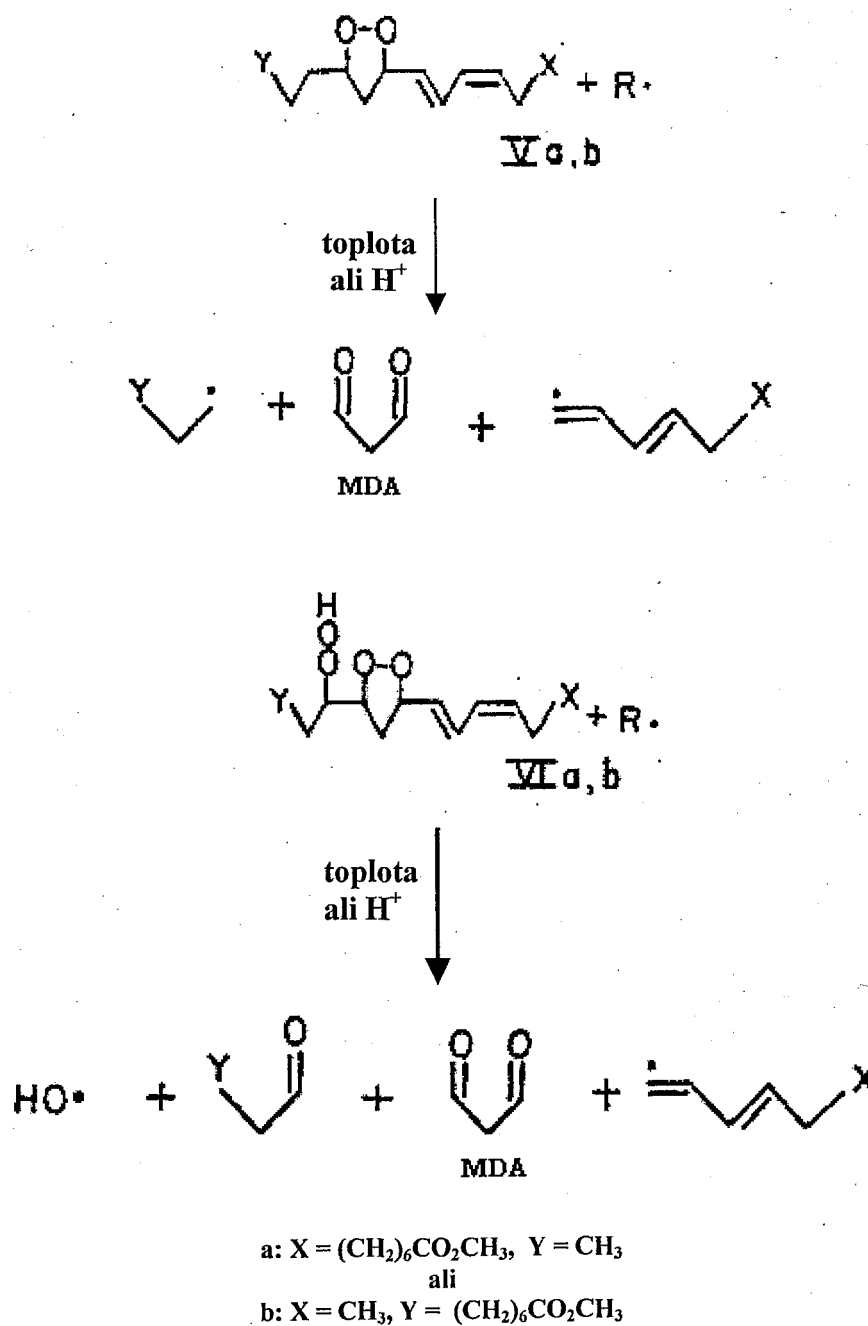
b: X = CH₃, Y = (CH₂)₆CO₂CH₃

a: X = (CH₂)₆CO₂CH₃, Y = CH₃

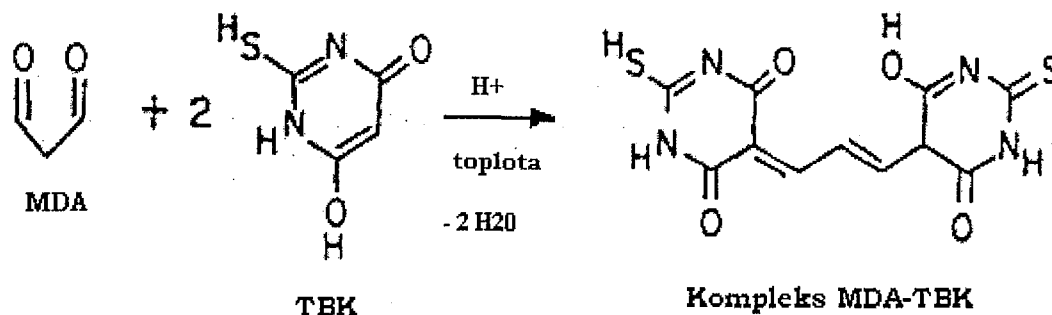
ali

b: X = CH₃, Y = (CH₂)₆CO₂CH₃

Slika 5: Mehanizem nastanka cikličnega peroksida (V_{a,b}) in hidroperoksilnega epidioksida (VI_{a,b}) (Pryor in Peroksid^{sod., 1975}) je nehlapen prekursor malondialdehida (MDA). Razpade pod vplivom toplote ali kisline (Slika 6). To sta hkrati tudi pogoja, v katerih se izvede reakcija s tiobarbitumo kislino (TBK). Enake pogoje za nastanek malondialdehida potrebuje hidroperoksilni epidioksid (VI_{a,b}) (Slika 6). MDA, ki je nastal iz (V_{a,b}) ali (VI_{a,b}), skupaj z dvema moloma TBK tvori obarvan kompleks, primeren za absorpcijsko ali fluorescenčno fotometrijo (Slika 7).



Slika 6: Oblikovanje malondialdehida (MDA) iz cikličnega peroksida ($V_{a,b}$) in hidroperoksilnega epidioksida ($VI_{a,b}$) (Pryor in sod., 1975)



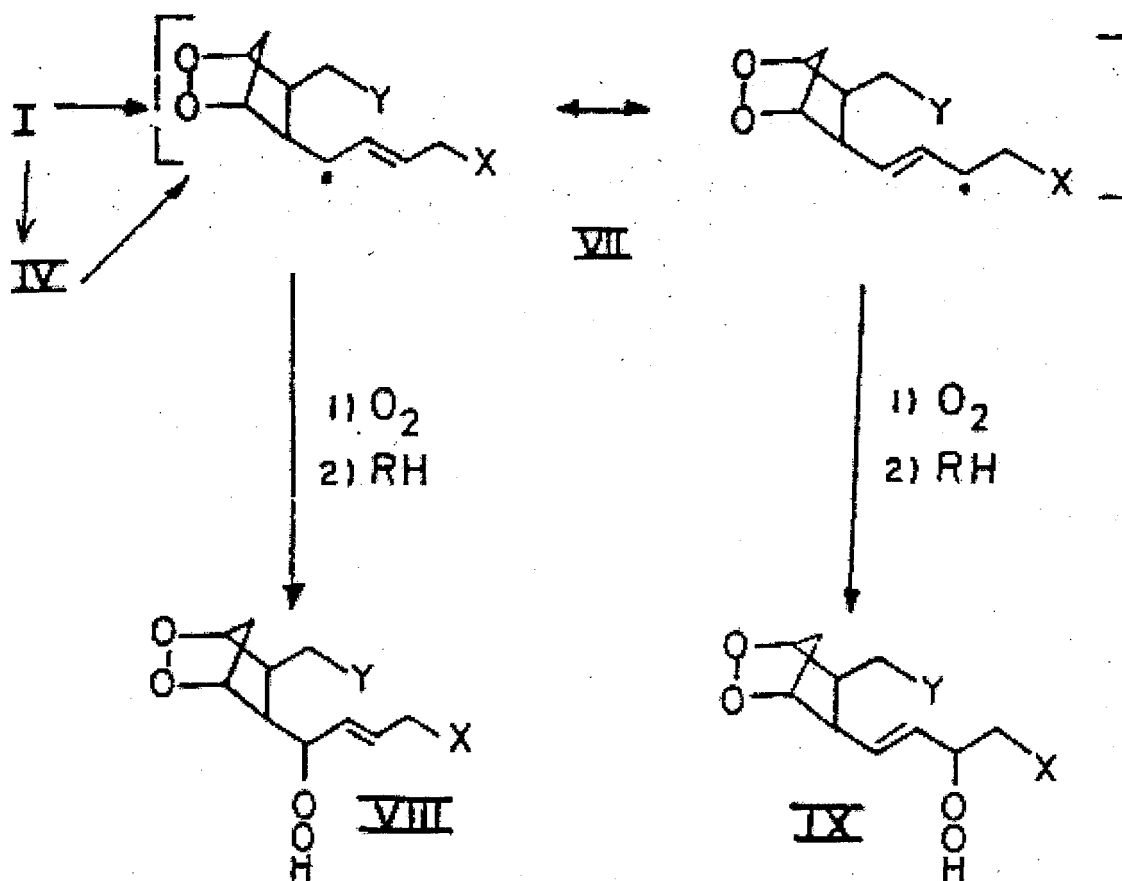
Slika 7: Nastanek obarvanega kompleksa po reakciji med malondialdehidom (MDA) in tiobarbiturno kislino (TBK) (Pryor in sod., 1975)

MDA naj bi nastajal še po enem mehanizmu (Slika 8 in Slika 9). Gre za nastanek iz bicikličnega endoperoksida, ki je analogen endoperoksidu, nastalemu med biosintezo prostaglandinov. Peroksilni radikal (I) se običajno preko radikala zaključi v obroč, s čimer oblikuje biciklični endoperoksilni radikal (VII) (Pryor in sod., 1975). Ta se po stopnjah preoblikuje v prostaglandinu podobne endoperoksidne komponente - hidroperoksilne bicikloendoperoksidi (VIII) in (IX) (Esterbauer in sod., 1991) (Slika 8). Pod vplivom toplote ali kisline se hidroperoksilni biciklični endoperoksidi cepijo in pri tem nastaja MDA (Slika 9).

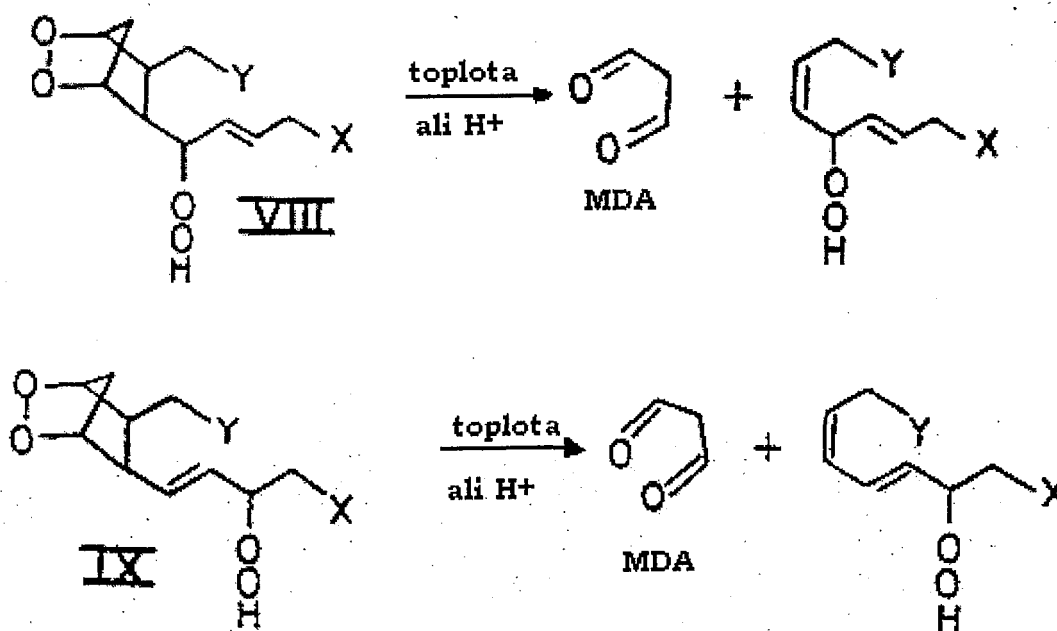
V biosintezi prostaglandinov je ciklizacija od (I) do (IX) vodena z encimi in na koncu nastane le en specifičen endoperoksid. Pri neencimskih sistemih pa je pričakovati celo serijo pozicijskih in stereo izomer (Pryor in sod., 1975).

Primer encimsko vodenega mehanizma je oksidacija arahidonske kisline s ciklooksigenazami. Pri tem nastanejo v trombocitih prostaglandini, ki se naprej cepijo v različne produkte. Pri cepitvi prostaglandina PGH₂ nastane pod vplivom tromboksan sintetaze za celice pomemben tromboksan A₂. Poleg njega se oblikujejo še drugi produkti, med drugim MDA (Esterbauer in sod., 1991; West, 1990).

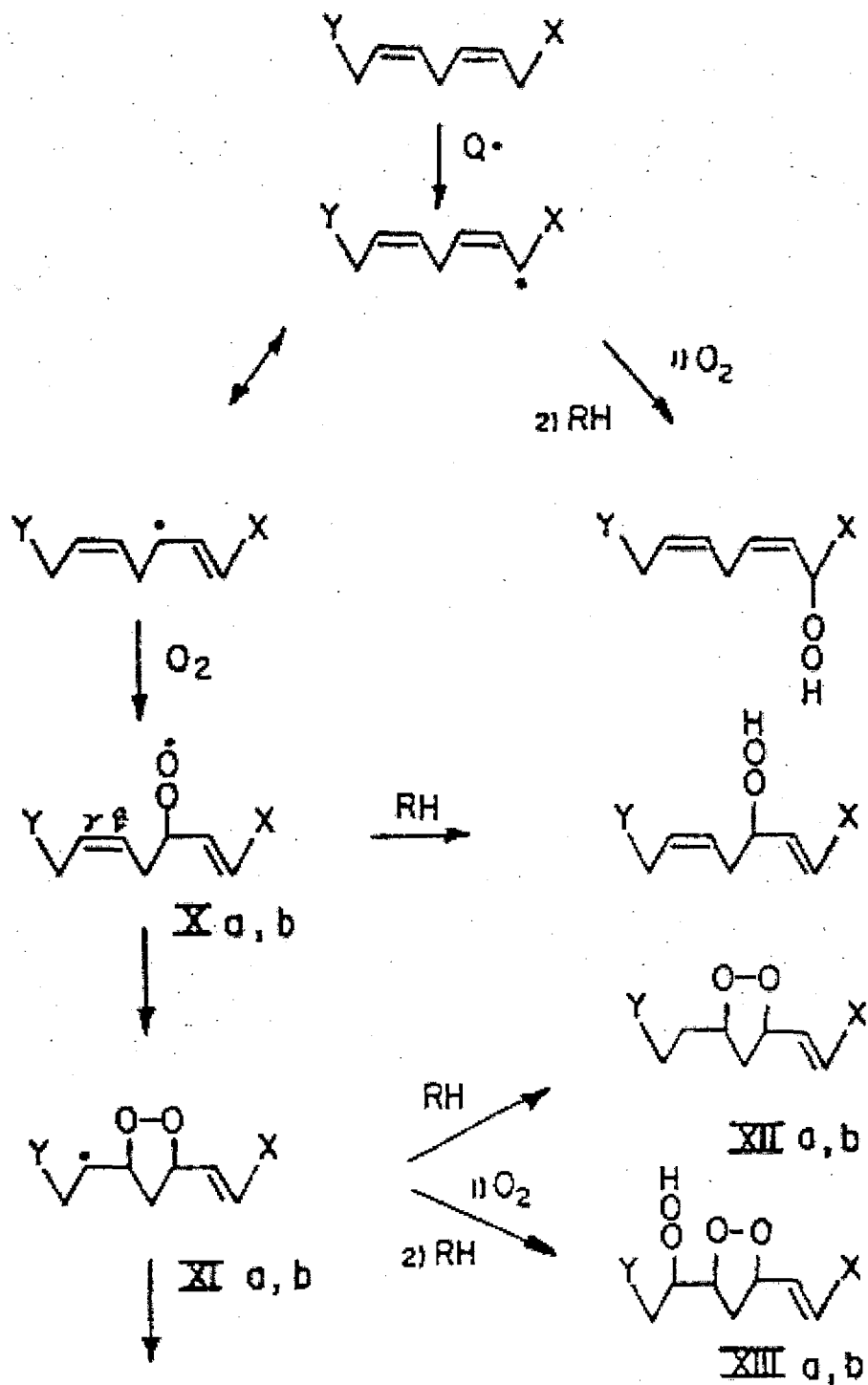
Dahle s sodelavci (1962) je predvideval, da lahko pride do ciklizacije v 5-členski obroč le pri tistih radikalih, pri katerih se vodik odcepi iz položaja med dvema dvojnima vezema v večkrat nenasičeni maščobni kislini (primer je radikal I). Na ta način naj bi dali peroksilni radikal v ustreznem položaju za nadaljnje reakcije le trienski sistemi. Pryor in sodelavci (1975) so predlagali mehanizem, kjer bi lahko nastal ustrezen peroksilni radikal tudi v dienskem sistemu (Slika 10). Primer so maščobne kisline z dvema dvojnima vezema (18:2). V tem primeru naj bi prišlo do odcepa vodika, ki je bodisi na 8-C-atomu in s tem pred dvojnimi vezmi oziroma na 13-C-atomu, ki je za dvojnimi vezmi v maščobni kislini (Slika 10). Tako nastane peroksilni radikal (X_{a,b}), enakovreden radikal (I). Peroksilni radikal (X_{a,b}) naj bi bil sposoben ciklizacije v radikal (XI_{a,b}) in pretvorbe v ciklični peroksid (XII_{a,b}) ali še verjetneje v hidroperoksilni epidioksid (XIII_{a,b}). Pričakovati je, da produkt (XIII_{a,b}) razpade na več komponent, med katerimi je za nas pomemben MDA. Razpad naj bi bil podoben cepitvi hidroperoksilnega epidioksida (VI_{a,b}) iz trienskega sistema (Pryor in sod., 1975).



Slika 8: Nastanek hidroperoksilnih bicikloendoperoksidov (VIII) in (IX) (Pryor in sod., 1975; Frankel, 1991)



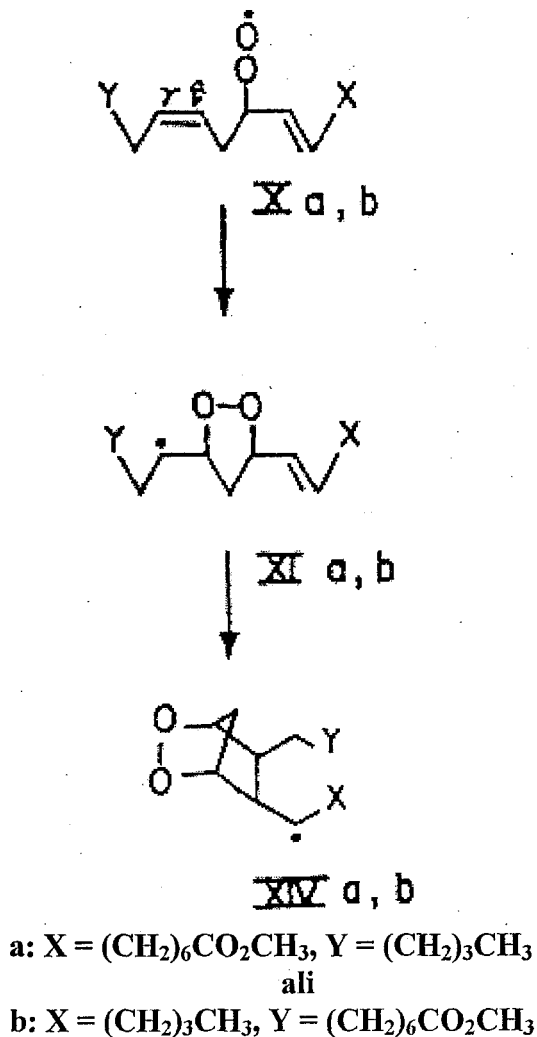
Slika 9: Nastajanje malondialdehida (MDA) iz hidroperoksilnih bicikličnih endoperoksidov (Pryor in sod., 1975)



- a: X = (CH₂)₆CO₂CH₃, Y = (CH₂)₃CH₃
ali
b: X = (CH₂)₃CH₃, Y = (CH₂)₆CO₂CH₃

Slika 10: Mehanizem nastanka cikličnega peroksida (XII_{a,b}) in hidroperoksilnega epidioksida (XIII_{a,b}) v dienskem sistemu, ki ob cepitvi dasta MDA (Pryor in sod., 1975)

V trienskem sistemu je, kot sem že zapisala, možen nastanek MDA iz bicikličnega endoperoksida (Slika 8). V dienskem sistemu nastaja analogen biciklični sekundarni radikal (XIV_{a,b}) iz (X_{a,b}) preko (XI_{a,b}) (Slika 11).



Slika 11: Nastanek bicikličnega endoperoksidnega radikala (XIV_{a,b}) v dienskem sistemu (Pryor in sod., 1975)

Radikal (XIV_{a,b}), ki nastane v dienskem sistemu, je bistveno manj stabilen kot radikal (VII) iz trienskega sistema. Zaradi tega naj bi bil razvoj bicikličnih endoperoksidov v dienskem sistemu manj intenziven (Pryor in sod., 1975).

Zanimivo je še, da encimski sistem, kije odgovoren za sintezo prostaglandinov iz sistema s tremi dvojnimi vezmi, ni sposoben formirati endoperoksidov iz maščobnih kislin z dvema dvojnima vezema (Pryor in sod., 1975).

Iz prikazanega pregleda peroksidacijskih procesov in mehanizmov, v katerih nastaja malondialdehid, lahko povzamemo, da je biokemijskih poti, po katerih lahko nastane, več. Ker malondialdehid ne nastaja samo pri nekontrolirani "avtooksidaciji" lipidov, ampak tudi pri sintezi eikozanoidov, lahko tudi sklepamo, da nekaj malondialdehida vedno

nastaja tudi brez oksidacijskih stresov. Zato majhne koncentracije MDA v tkivih, telesnih tekočinah in seču lahko vedno pričakujemo, če le imamo na voljo dovolj občutljivo analitsko metodo.

2.3.1 Zakaj je malondialdehid nezaželen v organizmu?

Malondialdehid (MDA) je zelo reaktivna substanca, za katero predvidevajo, da je karcinogena, mutagena, toksična za jetrne celice in da je pobudnik različnih nezaželenih reakcij. Reagira lahko z lipidi in beljakovinami, inaktivira ribonukleaze ter druge encime in se kovalentno veže na nukleinske kisline. Inkubacija kožnih fibroblastnih celic z MDA se kaže v citoplazmatski vakuolizaciji, kafioreksiji, tvorbah satelitskih jeder in v redukciji beljakovinske sinteze v celicah. MDA inducira nastanek kromosomskih napak v razvitih celicah sesalcev. Domneva se, da fluorescentni produkti starostnega pigmenta lipofuscina nastanejo z interakcijo med MDA in lipidno-beljakovinskim kompleksom pigmenta (Chio in Tappel, 1969; Yau, 1979; Shamberger in sod., 1974; Basu in Marnett, 1983; Lee, 1980).

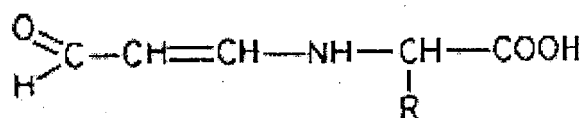
Vrsta raziskav je potrdila mutagenost in citotoksičnost malondialdehida. Yau (1979) je prikazal njegove negativne učinke na celice limfomov sesalcev (glodalcev), kultivirane *in vitro*. Že samo 10 μM raztopina MDA, dodana k celični suspenziji, je zadoščala za inhibicijo celične rasti. V celični populaciji se je bistveno povečalo število celic velikank. Pri celicah z dodatkom 20 μM raztopine MDA je bil celični volumen po 24 urah dvakrat večji kot pri netretiranih celicah. Vzrok je bil v zakasneni celični delitvi in nekontrolirani rasti. Inhibicija rasti in povečano število celic z velikim volumnom izgineta, če se MDA odstrani. Oba parametra sta se povečevala, če je bila dodana koncentracija MDA večja. Vzrok v citotoksičnosti in mutagenosti naj bi bil ravno v navzkrižnih reakcijah MDA z DNK, amino kislinami, beljakovinami ali fosfolipidi (Yau, 1979).

Ob vsakodnevem dodajanju 6 oziroma 12 mg MDA v obliki raztopine na hrbte mišk jih je imelo po 30 tednih poskusa kar 52 % tumorje. Že po 10-minutnem delovanju MDA so se na koži mišk pojavili oranžni madeži. To je verjetno posledica reagiranja MDA z beljakovinami in nastajanja Schiffovih baz (Shamberger in sod., 1974).

2.3.2 MDA v reakcijah z beljakovinami

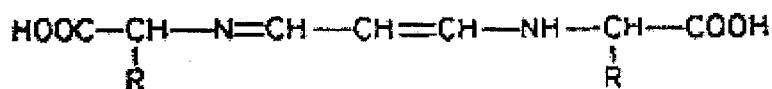
Za beljakovine je MDA nevaren, ker reagira z njihovimi tiolnimi skupinami, se navzkrižno veže z amino skupinami in nenazadnje povzroči agregacije beljakovin (Rice-Evans in sod., 1991).

Pri reakciji glicina z MDA v zelo kisli raztopini se v obliki trdne oborine pojavi kompleks *N*-propenal-amino-ocetna kislina, v katerem je razmerje 1:1, Način vezave med eno molekulo MDA in eno molekulo aminokislina je prikazan na Sliki 12.



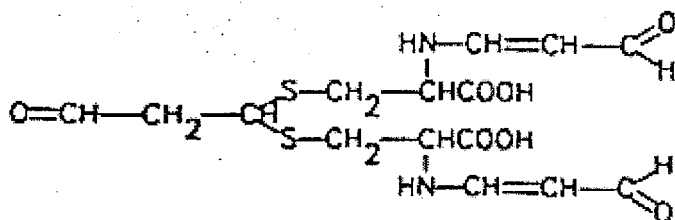
Slika 12: Struktura kondenzacijskega produkta med eno molekulo MDA in eno molekulo aminokislino (Esterbauer in sod., 1991)

Slika 13 kaže kompleks, ki nastane po reakciji ene molekule MDA z dvema molekulama aminokislino. Če tako reagira glicin z MDA se pojavi rumen fluorescirajoč supernatant. Analogni kompleksi nastanejo v močno kislih raztopinah še iz valina in levcina.



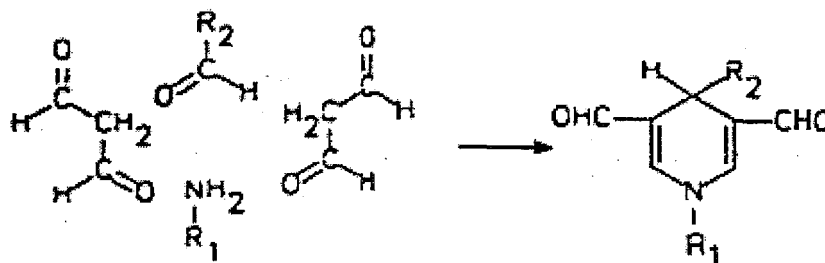
Slika 13: Kondenzacijski produkt iz ene molekule MDA in dveh molekul aminokislin (Esterbauer in sod., 1991)

V pogojih, ki so bližje fiziološkim razmeram (pH = 4,2) so preučevali reakcijo MDA z različnimi aminokislinami. Pri histidinu, tirozinu, triptofanu in argininu so vstopale v reakcijo izključno α -amino skupine in tvorile z MDA le komplekse v razmerju 1:1, kot je na Sliki 12. V reakciji cisteina in MDA pri nevtralnem pH in pri sobni temperaturi je imel kompleks nekoliko drugačno strukturo: vseboval je dva cisteinska ostanka in tri molekule MDA (Slika 14).



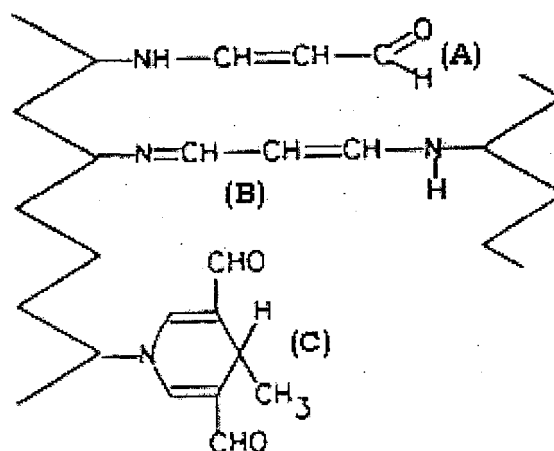
Slika 14: Struktura reakcijskega produkta med tremi molekulami MDA in dvema molekulama cisteina (Esterbauer in sod., 1991)

Različne kompleksne spojine nastajajo tudi v reakcijah MDA z amini. Primer je nastanek kompleksne spojine, kjer se povežejo MDA, nasičen aldehyd in primarni amin. Stehiometrija reakcije je 2:1:1 (Slika 15).



Slika 15: Mehanizem nastanka kompleksa iz dveh MDA, nasičenega aldehida in primarnega amina (Esterbauer in sod., 1991)

V nasprotju s prostimi aminokislinami se beljakovine v fizioloških pogojih bistveno hitreje modificirajo. Očitno imajo aminokislinski ostanki v beljakovinah prednost pri reagiranju z MDA. V polilizinu se na primer *s*-amino skupine modificirajo z MDA kar na tri načine. 22 % od vključenega MDA je prisotnega v obliki nestabilnega amino-propenala (A), 77 % kot bolj stabilna navzkrižna povezava z amino-imino-propensko strukturo (B), preostanek, manj kot 1 % pa ima dihidro-piridinsko strukturo (C) (Slika 16) (Esterbauer in sod., 1991).



Slika 16: Trije možni načini modifikacije *s*-amino skupin z MDA v polilizinu (Esterbauer in sod., 1991)

2.3.3 Imunološke lastnosti beljakovin, spremenjenih z MDA

Esterbauer in sodelavci (1991) navajajo, da so nekateri raziskovalci ugotovili povečano tvorba protiteles pri kuncih, če so jim intradermalno vbrizgali lizozim jajčnega beljaka, prej obdelanega z MDA. Odziv protiteles na lizozim, obdelan z MDA, je bil drugačen kot odziv na nativni lizozim. Iz tega sklepajo, da protitelesa prepoznajo specifično povezavo, ki nastane med lizinskim ostankom beljakovine in MDA.

To domnevo je potrdila raziskava, kjer so razvili monoklonsko protitelo za apolipoprotein B, ki je bil prej modificiran z MDA. Apolipoprotein B je beljakovinski del lipoproteina z

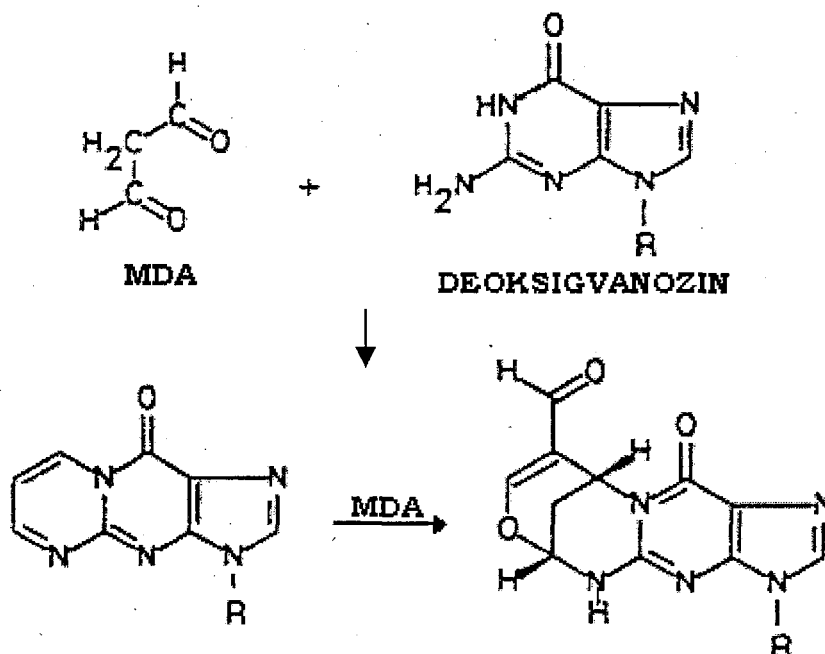
nizko gostoto (LDL) (Esterbauer in sod., 1991). Če se LDL oksidira, to pomeni, da pride do razkroja njegovih maščobnih kislin, pri čemer nastanejo aldehidne komponente. Glavna vira MDA v LDL sta arahidonska in dokozaheksaenojska kislina. Nastali MDA povzroči modifikacije apolipoproteina B (Gebicki in sod., 1991). Te spremembe naj bi bile odločilni pri nastajanju gobastih celic in v patogenezi ateroskleroze. Z imunocitološkimi metodami so pokazali, da so beljakovine, ki vsebujejo z MDA modificirane lizinske ostanke, prisotne v aortah kuncev z aterosklerozo. Kasneje so razvili protiserum in številne tipe monoklonskih protiteles, delujočih proti z MDA ali 4-hidroksinonenalom (HNE) spremenjenemu LDL v *in vitro* pogojih. Za vsa ta protitelesa se zdi, da so specifična za MDA-lizinske ali HNE-lizinske povezave v beljakovinah. Hkrati so dognali, da so te vrste povezav značilne za aterosklerotične poškodbe in oksidativno spremenjeni LDL. Sočasno so ugotovili, da kunčji in človeški serum vsebujeta lastna protitelesa proti MDA- ali HNE-modificiranim beljakovinom.

Uporaba imunocitoloških metod za protitelesa, specifična za MDA- ali HNE-lizin beljakovinske komplekse, je pokazala, da se modifikacija beljakovin z aldehidi pojavi tudi v kultiviranih humanih fibroblastih, izpostavljenih askorbinski kislini. Tako se namreč sproži lipidna peroksidacija in stimulira ekspresija kolagena. Lastna protitelesa, delujoča proti beljakovinom, ki so modificirane z aldehidi, naj bi predstavljala del lastnega obrambnega mehanizma, katerega naloga je odstranjevanje z aldehidi poškodovanih beljakovin. Odkritje teh protiteles je hkrati dalo prvi resnejši dokaz, da do poškodb beljakovin s produkti lipidne peroksidacije v resnici prihaja (delali so v *in vivo* pogojih) in da morda le ti igrajo pomembno vlogo v patogenezi človeških bolezni (npr. ateroskleroze) (Esterbauer in sod., 1991).

2.3.4 MDA v reakcijah z nukleozidi

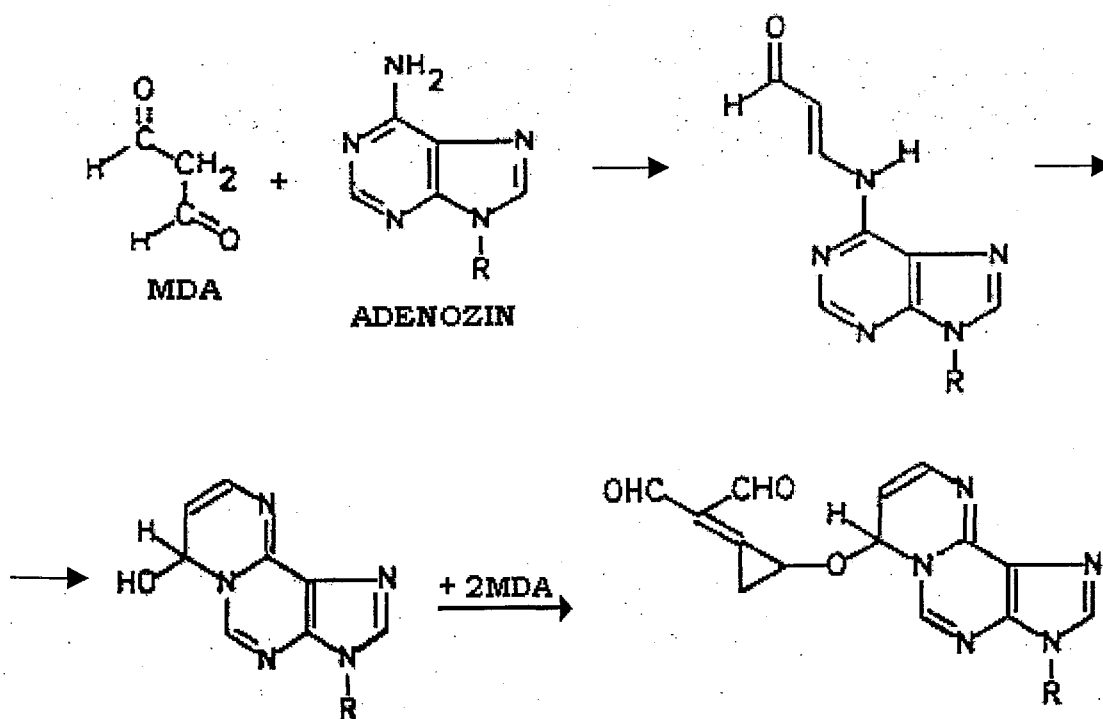
Številne genotoksične substance, vključno s karcinogeni, lahko sprožijo lipidno peroksidacijo. Endogeno nastali produkti lipidne peroksidacije (MDA, HNE in ostali) pa lahko reagirajo z bazami DNK in izzovejo mutacije. Poleg tega lipidna peroksidacija in njeni produkti lahko inhibirajo sistem za odpravljanje napak na DNK in s tem indirektno povečujejo hitrost spontanih mutacij (Esterbauer in sod., 1991).

MDA, HNE ter drugi α,β -nenasičeni aldehidi (akrolein, krotonaldehid) v *in vitro* pogojih reagirajo z nukleozidi. Najbolj reaktivna organska baza je gvanin, ki tvori z MDA komplekse 1 : 1 ter 1 : 2, kot to kaže Slika 17, povzeta po Esterbauerju in sodelavcih (1991).

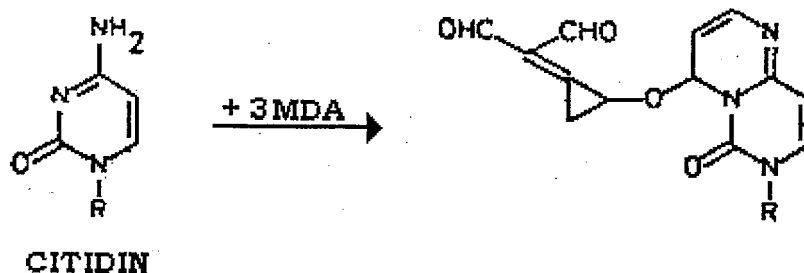


Slika 17: Oblikovanje kompleksa po reakciji med dezoksigvanozinom in eno oziroma dvema molekulama MDA; R = deoksiriboza (Esterbauer in sod., 1991)

Adenozin tvori z MDA (Slika 18) 1 : 1 ter 1 : 3 kompleksne povezave. Citidin reagira s tremi molekulami MDA (Slika 19), medtem ko timidin kompleksov ne tvori.

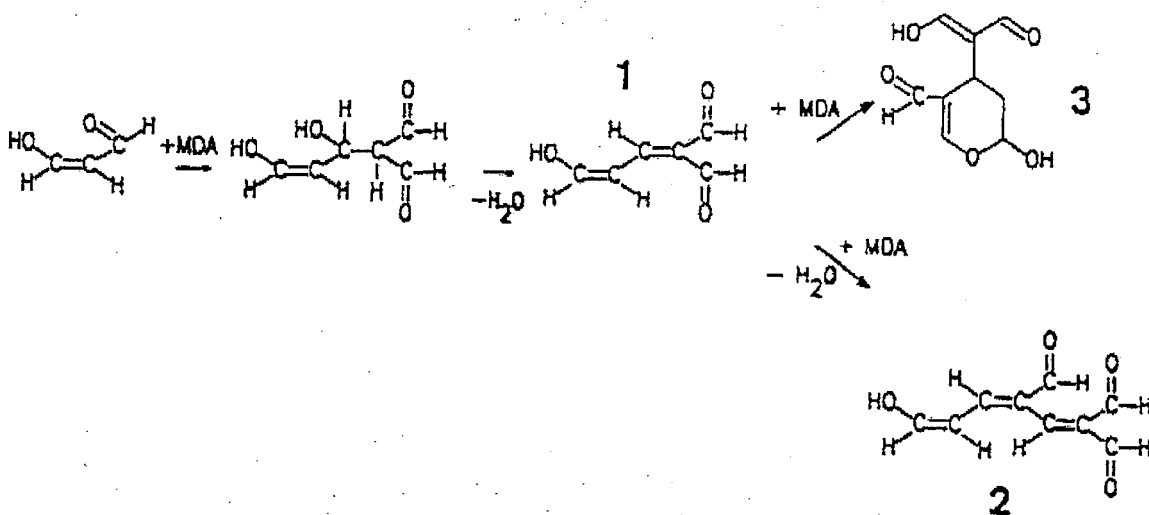


Slika 18.: Po reakciji adenozina z MDA lahko nastaneta, preko vmesnega produkta, kompleksa z eno oziroma tremi molekulami MDA; R = riboza (Esterbauer in sod., 1991)

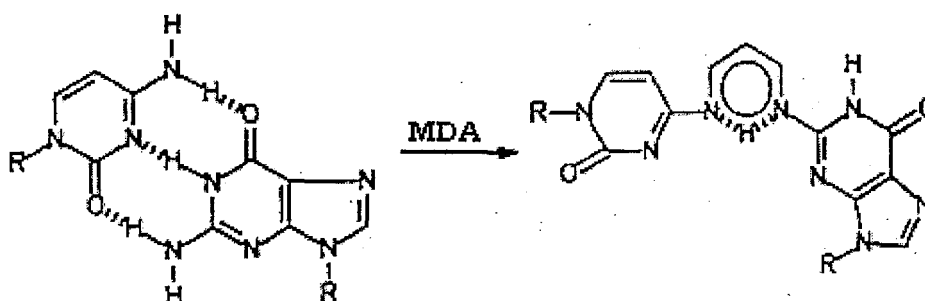


Slika 19: Nastanek kompleksa po reakciji med tremi molekulami MDA in eno citidina; R = riboza (Esterbauer in sod., 1991)

Hitrost reakcije med MDA in nukleozidi se strmo dviga s padanjem pH. Gvanozin *in vitro* reagira pri pH = 1 kar 18-krat hitreje kot pri pH = 4,2. Ker pa so za modifikacije nukleozidov *in vitro* potrebni dolgi reakcijski časi in velike koncentracije reaktantov (mM in več), Esterbauer in sodelavci (1991) menijo, da je bolj malo verjetnosti, da bi prišlo do njih v širšem obsegu v *in vivo* pogojih. Poleg tega v nekaterih raziskavah ugotavljajo, da nastajajo oligomerni MDA-kompleksi s po dvema ali tremi molekulami MDA vedno le v koncentriranih vodnih raztopinah MDA (Slika 20) in da je zato malo verjetno, da se zgodi di- ali trimerni MDA v *in vivo* pogojih. Povedano drugače: te vrste oligomerni kompleksi med MDA in DNK verjetno ne nastajajo. Še en dokaz v prid tej trditvi je študija, kjer so po encimski razgradnji DNK molekule dodali MDA in našli le 1 : 1 gvanozin-MDA kompleks. Tudi ideja, da MDA lahko modifikira dvovertično DNK tako, da se oblikuje amino-imino-propen navzkrižna povezava med -NH₂ skupino gvanozinske baze in -NH₂ skupino komplementarne citozinske baze (Slika 21) ni zanesljiva (Esterbauer in sod., 1991).



Slika 20: Dimeri (1) ali trimeri (2, 3) MDA, ki nastajajo *in vitro* v koncentriranih vodnih raztopinah (Esterbauer in sod., 1991)



Slika 21: Možna navzkrižna povezava med MDA, gvaninsko in citozinsko bazo v dvovertični DNK. (Esterbauer in sod., 1991)

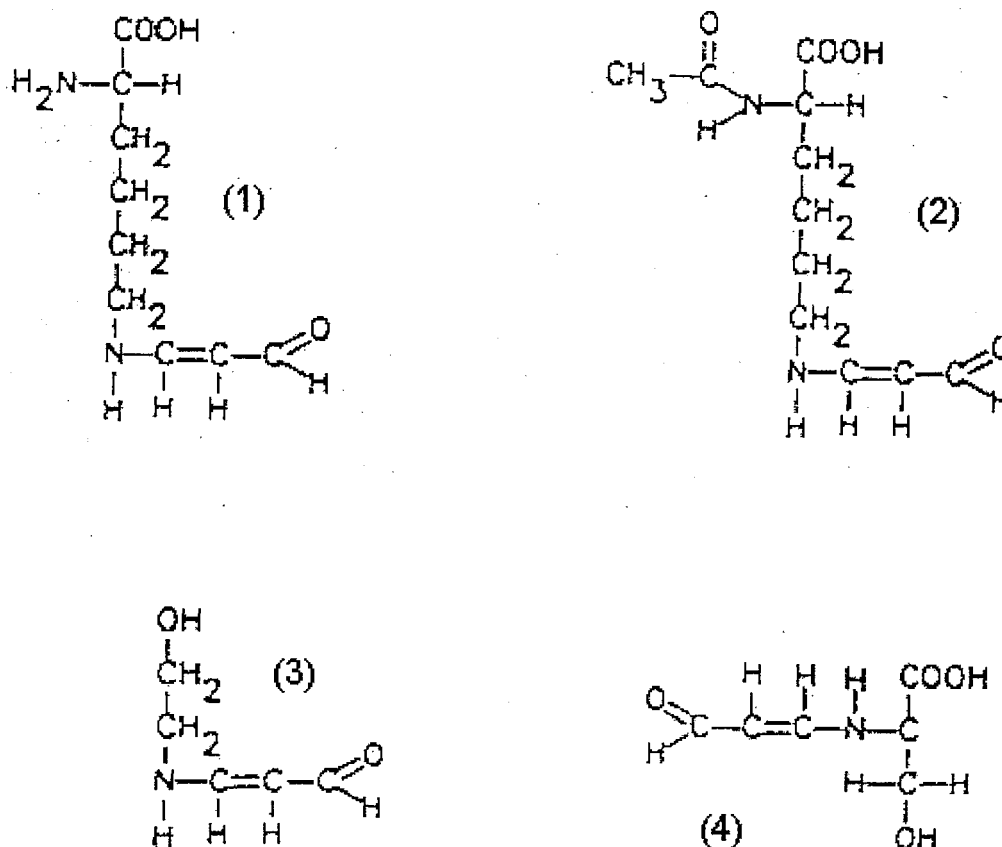
Čeprav *in vivo* redko pride do modifikacij DNK-baz ali same DNK z MDA ter ostalimi aldehidi, naj bi obstajali zadostni dokazi, da aldehidi povzročajo številne genotoksične efekte, vključno z mutacijami in sprožitvijo nastanka tumorjev (Shamberger in sod., 1974; Yau in sod., 1979; Basu in sod., 1983).

Esterbauer (1991) povzema, da je MDA mutagen za bakterijske celice in celice sesalcev ter karcinogen za glodalce.

2.3.5 Metabolizem MDA in izločanje derivatov MDA s sečem

Presnovo MDA in izločanje presnovkov MDA je v izčrpnem preglednem članku prikazal Esterbauer in sodelavci (1991). V jetrih podgan se lahko MDA oksidativno presnovi do CO_2 in H_2O . V tem procesu mitohondrijska aldehyd dehidrogenaza najprej pretvori MDA v semialdehyd jabolčne kisline, ki se spontano dekarboksilira v acetaldehyd. Aldehyd dehidrogenaza katalizira oksidacijo acetaldehyda v acetat in naprej v CO_2 in H_2O . V mišjih jetrih je nastanek semiladehida jabolčne kisline kataliziran z aldehyd deliidgeiiazom iz citosola. Manjši del MDA se je sposoben oksidirati v jetrih v malonat, ki se pretvori v malonil-CoA in dekarboksilira v acetyl-CoA.

V seču podgan in ljudi so našli različne nenasičene spojine, ki so vsebovale dvojno vez, aldehydno ter amino skupino in so izhajale iz presnovnih procesov skrajševanja verig beljakovin, modificiranih z MDA (Slika 22). Gre za: N^ϵ -(2-propenal)lizin, N^α -acetyl- N^ϵ -(2-propenal)lizin, N -(2-propenal)-serin in N -(2-propenal)etanolamin. Večji del teh produktov ni endogenega izvora in predstavljajo cepitvene produkte tistih z MDA spremenjenih beljakovin, ki se zaužijejo s hrano živalskega izvora. Njihov porast v seču je bil opažen pri podganah, v eksperimentalnih pogojih pomanjkanja vitamina E, zastrupitve s CCl_4 , vbrizganja železovega nitriloacetata (stimulira lipidno peroksidacijo) ali krmljenja s krmo, v kateri je bilo jetrno olje polenovke (Esterbauer in sod., 1991).



Slika 22: Metaboliti MDA, prisotni v seču; (1): *N*^ε-(2-propenal)lizin, (2): *N*^α-acetil-*N*^ε-(2-propenal)lizin, (3): *N*-(2-propenal)etanolamin, (4): *N*-(2-propenal)-serin (Esterbauer in sod., 1991)

2.3.6 Vpliv antioksidantov in prooksidantov na koncentracijo MDA

Zaradi delovanja prostih radikalov prihaja do lipidne peroksidacije. Posledica te je tudi nastanek MDA. Da preprečimo njegov nastanek, je potrebno odstraniti proste radikale, za kar so potrebni antioksidanti. Določeno antioksidativno zaščito ima organizem že sam po sebi, če pa ta ne zadošča, jo je potrebno okrepiti z antioksidanti iz hrane. Vrsta raziskav kaže, da se koncentracija MDA v telesu (v plazmi, seču) zmanjša, če se hrani dodajo antioksidanti (Dixon in sod., 1998, Cadenas in sod., 1996, Avellini in sod., 1999, Lubec in sod., 1997, Huh in sod., 1994).

Tako se je statistično značilno znižala koncentracija MDA v plazmi pri ženskah, ki so v hrano dobivale dodatek β-karotena (0,5 mg/dan). Skupina z dodatkom je imela v plazmi povprečno koncentracijo MDA $0,351 \pm 0,063$ nmol/ml, skupina brez njega pa $0,410 \pm 0,153$ nmol/ml (Dixon in sod., 1998).

Dodatek vitamina E (100 mg) k hrani je zmanjšal produkte lipidne peroksidacije v seču, merjene kot kompleks med MDA in tiobarbiturno kislino. Koncentracija MDA se je v seču moških, ki so dobivali dodatek vitamina E 30 dni, med poskusom statistično značilno in progresivno zmanjševala (za 27 %: s $3,92 \pm 0,47$ na $3,29 \pm 0,46$ nmol/mg kreatinina), v

primerjavi s sečem moških, ki antioksidanta niso dobivali. Podoben trend upadanja se je pokazal pri uživanju vitamina C (Cadenas in sod., 1996).

Poseben fenomen je peroksidacija, ki je posledica fizične aktivnosti. Pri njej se namreč poveča potreba tkiv po kisiku in celično dihanje, zaradi česar pride do povečane tvorbe prostih radikalov. Tri leta starim dirkalnim konjem so dodajali h krmi vitamin E in selen ter spremljali njihovo antioksidativno zaščito in koncentracijo MDA v plazmi ob različnih fizičnih obremenitvah. Rezultati so pokazali, da se je s fizično obremenitvijo in dodatkom vitamina E ter selena statistično značilno povečala antioksidativna zaščita tako v ekstracelularnih telesnih tekočinah kot v krvi, znižala pa se tudi koncentracija MDA v plazmi. Preden so konjem začeli dodajati vitamin E in selen v krmo, so bile koncentracije MDA v plazmi pred fizično obremenitvijo, še bolj pa po njej, bistveno večje. To dokazuje, da se z zadostno količino zaužitih antioksidatov organizem lahko ustrezno zaščiti pred peroksidacijskimi procesi, ki so posledica fizične obremenitve (Avellini in sod., 1999).

L-arginin naj bi zmanjševal lipidno peroksidacijo pri ljudeh, zbolelih za sladkorno boleznijo. V poskusu je ena skupina bolnikov dobivala dodatek 1 g L-arginina 2-krat dnevno, 3 mesece, druga pa placebo. Pri prvi skupini se je koncentracija MDA v seču statistično značilno znižala ($P < 0,0032$), kar potrjuje zaščitno vlogo L-arginina (Lubec in sod., 1997).

V *in vitro* pogojih je bila ugotovljena inhibitorna vloga ženskega spolnega hormona estradiola na nastanek lipidnih peroksidov v jetrnem tkivu. Pri podganah, uporabljenih v poskusu, so našli v jetrih samcev statistično značilne višje vsebnosti MDA-ja kot pri samicah (Huh in sod., 1994).

Pri zauživanju večjih količin alkohola (kronični alkoholizem) nastajajo med razgradnjo v jetrih toksični prosti radikali, ki naj bi sprožili lipidno peroksidacijo in nastanek MDA. Da bi dokazali vlogo lipidne peroksidacije pri okvarah jeter zaradi alkohola, so pri podganah sprožili obolenje jeter z dodajanjem alkohola k obrokom. Merjenja MDA v jetrih so pokazala, da se poveča v skupini podgan z alkoholom tretirani (Teare in sod., 1994). Prav tako se je povečala vrednost MDA v seču podgan, ki so jim dali enkratno akutno količino alkohola (5g etanola/kg) in drugič 10 dni kronične oralne doze po 0,5 g etanola/kg. V prvem primeru je izločanje MDA naraslo za 1,5-krat v času 18 do 36 ur po zaužitju in ostalo nespremenjeno do 48 ur po zaužitju. V primeru kroničnega uživanja alkohola je bil porast MDA zabeležen prvič po osmih dneh od začetka poskusa. To kaže na potrditev domneve, da kronično in akutno uživanje alkohola spremeni lipidni metabolizem in izločanje lipidnih metabolitov (Moser in sod., 1993). Pozitivno korekcijo ($r = 0,153$, $P = 0,03$) med plazminim MDA in tedenskim uživanjem alkohola so Nielsen in sodelavci (1997) ugotovili pri ljudeh, zajetih v poskus na Danskem.

Znano je, da nastaja v cigaretnem dimu veliko prostih radikalov. Kljub temu niso našli statistično značilne razlike v koncentracijah MDA med skupinama mladih odraslih kadilcev in nekadilcev. Očitno so prosti radikali pri njih še zadosti hitro odstranjeni (Leonard in sod., 1995). Nielsen in sodelavci (1997) so našli le rahlo povišano vrednost plazminega MDA pri kadilcih. Ugotovili pa so pozitivno korekcijo med koncentracijo plazminega MDA in dnevnim izpostavljanjem cigaretnemu dimu.

Pri kravah molznicah z zamaščenimi jetri je bila vrednost MDA v jetrih značilno višja ($P < 0,05$) kot pri zdravih živalih. Hkrati je bila pri kravah z okvaro jeter značilno nižja ($P < 0,01$) koncentracija plazminega α -tokoferola, kar kaže na majhen antioksidativni status teh živali in povečano intenzivnost jetrnih lipoperoksidacijskih procesov (Mudron in sod., 1999).

Delavci, ki so bili pri delu izpostavljeni manganu, so imeli v plazmi statistično značilne večje vrednosti mangana v primerjavi z referenčno skupino. Korelacija med koncentracijo mangana v plazmi in MDA je bila pozitivna. Pri teh delavcih je bila povečana tudi aktivnost superoksid dismutaze (Yiin in sod., 1996).

2.3.7 Povezava med bolezenskimi stanji in koncentracijo MDA v organizmu

Številne raziskave dokazujejo, da med razvojem nekaterih bolezenskih stanj pri ljudeh in velikimi koncentracijami MDA v organizmu obstaja pozitivna povezava.

Tako je bila koncentracija MDA, merjena v človeških eritrocitih, pri ljudeh, ki so trpeli za senilno demenco Alzheimerjevega tipa, značilno večja v primerjavi s skupino zdravih starostnikov ter skupino mlajše populacije ($P < 0,01$) (Bermejo in sod., 1997).

Pri jetrnih boleznih pride do okvar delovanja jetrnih celic zaradi zmanjšane antioksidativne zaščite tkiva, kar povzroči oksidacijski stres in peroksidacijo membranskih fosfolipidov. Povečane koncentracije MDA v plazmi ($1,59 \pm 1,23$ nmol/ml) so Bianchi in sodelavci (1997) opazili pri pacientih s cirozo jeter, ki so jih primerjali z zdravo kontrolno skupino ($0,84 \pm 0,41$ nmol/ml).

Tudi pri ljudeh z Downovim sindromom ni izključena določena vloga oksidacijskega stresa. Pri njih pride pri 30-ih do 40-ih letih do podobnih sprememb v možganih, kot pri Alzheimerjevi bolezni. Vsestranski proces staranja je pospešen. Vrednosti MDA v seču, biomarkerju lipidne peroksidacije, so pri posameznikih z Downovim sindromom statistično zvišane ($0,255 \pm 0,158$ nmol/ml proti $0,204 \pm 0,128$ nmol/ml pri kontrolni skupini), kar kaže na povečan oksidacijski stres (Jovanovič in sod., 1998).

Sladkorna bolezen je verjetno sprožilec oksidacijskega stresa. Rdeče krvničke, ki so bile v *in vitro* pogojih dalj časa izpostavljene večji koncentraciji glukoze (45 mM), so izkazovale višjo stopnjo membranske peroksidacije. Pri sladkorni bolezni gre ravno za problem podaljšane hiperglikemije. Pri podganah s sproženo sladkorno boleznijo je lipidna peroksidacija *in vivo* narasla na stopnjo, primerljivo s tisto, ki se pojavi pri hudem pomanjkanju vitamina E (Gallaher in sod., 1993). Da je lipidna peroksidacija prisotna pri sladkornih bolnikih, ki niso odvisni od inzulina, kaže raziskava, v katero je bilo vključenih 78 bolnikov in 28 zdravih oseb. Pacienti so se delili še na podskupini s prisotno mikroalbuminurijo oziroma brez nje. Koncentracije MDA v plazmi in seču so bile pri bolnikih s sladkorno boleznijo v primerjavi z zdravimi ljudmi statistično značilno večje. Pri delitvi na že omenjeni podskupini so bile vrednosti v plazmi večje pri pacientih, ki so trpeli za mikroalbuminurijo (Ozben in sod., 1995). Jain in sodelavci (1999) pa so ugotovili, da so imeli bolniki s sladkorno boleznijo tipa 1, ki so bili hiperketotični (povečana vrednost ketonskih teles), vrednosti MDA v plazmi statistično značilno večje ($P < 0,05$) v primerjavi z normoketotičnimi bolniki. Med normoketotičnimi sladkornimi

bolniki in zdravo skupino razlik niso ugotovili. Možno je, da je ketoza rizični faktor za povečano lipidno peroksidacijsko stopnjo pri sladkorni bolezni.

Kisikovi radikali in lipidna peroksidacija se pojavita tudi pri revaskularizacijskih operacijah. 37 pacientom, ki so jim presadili ledvice ali so jim reševali ud, so določili koncentracijo MDA (merjena kot kompleks s tiobarbiturno kislino) v plazmi pred operacijo in po njej. Vsi pacienti so se na uspešno revaskularizacijo odzvali s pomembnim porastom MDA-TBK po približno eni uri po vzpostavljeni revaskularizaciji (vzpostavitvi ponovnega pretoka). Zatem se je vrednost zopet znižala in približala tisti pred operacijo. MDA-TBK pri presaditvi ledvic je v povprečju porasel za 107 %, pri revaskularizaciji uda pa za 54 % (Rabi in sod., 1992). Koncentracija MDA v seču se je zaradi izpostavljenosti tkiva kisiku med operacijo srca (vstavitev bypassa) močno dvignila. Vrednost takoj po anesteziji je znašala $1,38 \pm 0,80$ mmol/mol kreatinina in je med reperfuzijo narasla na $3,87 + 1,87$ mmol/mol kreatinina (Gerritsen in sod., 1997).

Pri bolnicah z rakom na dojkah so v primerjavi z zdravo kontrolno skupino ugotovili statistično značilno povečano vrednost MDA v serumu ($P < 0,01$). Hkrati so pri njih ugotovili zvečano raven serumskega bakra ($P < 0,01$), pri raku v 3. stadiju pa značilno nižjo raven serumskega selena ($P < 0,05$). Zato je možno, daje povečan oksidacijski stres pri bolnicah z rakom na dojki posledica sprememb v koncentracijah določenih elementov v sledovih (Huang in sod., 1999).

Pri ljudeh s hudimi opeklinami (med 20 in 55 % telesne površine) se je raven urinarne MDA v primerjavi z zdravimi osebami dvignila celo za 20-krat in je dosegla maksimalno vrednost približno tri dni po poškodbah. Še po 20 dnevih so bile vrednosti precej večje od normalnih. Pri sedmih pacientih od desetih so se vrednosti spustile na normalne po 30 dnevih (Guichardant in sod., 1994).

2.4 MERJENJE PRODUKTOV LIPIDNE PEROKSIDACIJE

Lipidna peroksidacija je običajno prvi parameter, ki ga uporabimo, ko želimo dokazati vključenost prostih radikalov v celične poškodbe. Za to je več razlogov:

- verjetnost, da pride do lipidne peroksidacije, je zelo velika, če nastanejo reaktivni prosti radikali v biološkem tkivu, kjer so prisotne nenasičene maščobne kisline;
- lipidna peroksidacija je izjemno pomemben proces v patologiji zaradi uničujočega učinka prostih radikalov na celice;
- za merjenje lipidne peroksidacije je bilo razvitih več analitskih tehnik, od katerih pa vse niso primerne za *in vivo* razmere.

Za vse analize je pomembno, da pride do čim manjših sprememb v produktih lipidne peroksidacije med odvzemom in pripravo vzorcev.

Običajno se določajo naslednji produkti lipidne peroksidacije:

- lipidni hidroperoksidi
- konjugirani dieni
- s tiobarbiturno kislino reagirajoče snovi (TBARS) in malondialdehid (MDA)
- drugi aldehidi (razen MDA)
- hlapni ogljikovodiki

- fluorescenčni produkti (lahko tudi MDA)

Ker številni faktorji vplivajo na deleže posameznih produktov, je za ugotavljanje lipidne peroksidacije zanesljivejše, da se določi več produktov (Cheeseman in Holley, 1993).

2.4.1 Določanje malondialdehida

V bioloških vzorcih se MDA lahko nahaja v prosti ali v vezani obliki z beljakovinami, nukleinskimi kislinami ter ostalimi biološkimi nukleofili (Esterbauer, 1996). Sprva so MDA v vzorcih določali na podlagi TBK-testa. Ta test so najprej uporabljali živilski kemiki za merjenje žarkosti maščob. Analiza temelji na nastanku obarvanega kompleksa MDA-TBK₂ med eno molekulo MDA in dvema molekulama tiobarbiturne kisline (TBK) (Slika 7). Nastanek kompleksne spojine (reakcija derivatiziranja) poteka pri povečani temperaturi v kislem mediju. Količino nastalega rožnato obarvanega produkta določimo spektrofotometrično pri valovni dolžini 532 nm. TBK-test je bil deležen velikega zanimanja zaradi preprostega postopka analize in visoke občutljivosti (nanomoli). Na drugi strani pa naj bi bila metoda premalo specifična, kar naj bi vodilo do precenjenih koncentracij MDA v vzorcih. S tiobarbiturno kislino namreč reagirajo tudi številne druge spojine, prisotne v bioloških vzorcih (nekateri sladkorji in aminokisline, sečnina, biliverdin, zdravila, glioksal, furfuraldehid), pri čemer prav tako nastanejo obarvane kompleksne spojine, ki absorbirajo svetlobo v območju 530-535 nm. Zato so s spektrofotometrično določitvijo dobljene vrednosti MDA-TBK₂ prevelike. Pri interpretiranju rezultatov spektrofotometrične določitve je zato primerneje uporabljati izraz "s TBK reagirajoče substance" (thiobarbituric acid reactive substances = TBARS). Specifičnost določitve MDA se lahko poveča z uporabo različnih separacijskih tehnik, kot so tenkoplastna kromatografija (TLC), tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) in plinska kromatografija (GC), pri katerih vzorec derivatiziramo ali pa tudi ne (Esterbauer in sod., 1991). Tudi pri kromatografskih metodah je najpogosteje uporabljen derivatizacijski reagent TBK.

Postopek za izolacijo in merjenje kompleksa MDA-TBK₂ s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) so razvili Bird in sodelavci (1983). Uporabili so reverzno fazno HPLC za separacijo kompleksa MDA-TBK₂ od ostalih sestavin vzorca, vključno s tistimi, ki pri segrevanju v kislem mediju reagirajo s TBK. Občutljivost merjenja MDA se je z uvedbo HPLC bistveno povečala. S HPLC analizo je možno izmeriti zelo majhne vrednosti MDA v bioloških vzorcih (Draper in sod., 1993). Zaznamo ga lahko na podlagi merjenja absorbance pri 532 nm ali na podlagi merjenja fluorescence pri 553 nm, pri čemer je valovna dolžina vzbujanja (λ_{ex}) 515 nm (Tatum in sod., 1990). Seveda se je zopet pojavilo veliko število različnih HPLC-metod (Wong in sod., 1987; Lepage in sod., 1991; Kishida in sod., 1990; Carbonneau in sod., 1991; Richard in sod., 1992a; Chirico, in sod., 1993; Fukunaga in sod., 1993; Templar in sod., 1999). Razlike so v vrsti uporabljene mobilne faze, vrsti kromatografske kolone ter izbiri ostalih kromatografskih pogojev.

Ker TBK-test ni pokazal dejanske količine MDA v biološkem materialu, so številni raziskovalci začeli razvijati lastne metode za njegovo določitev. Osnovna reakcija je še vedno derivatizacija MDA s TBK v kislem mediju pri povišani temperaturi. Odvisno od eksperimentalnih pogojev pa izmerjene količine MDA močno variirajo in je težko oceniti, ali MDA-vrednost resnično predstavlja peroksidacijo *in vivo* (Esterbauer, 1996). Problem

je zlasti to, da biološki vzorci vsebujejo relativno malo prostega MDA in pri daljši inkubaciji vzorcev večina izmerjenega MDA nastane iz razpadlih hidroperoksidov (ROOH), ki nastanejo pri oksidaciji lipidov med analizo v fazi segrevanja (Esterbauer in sod., 1991).

Razlike med TBK-metodami, kojih raziskovalci uporabljajo, so v različnih predpripravah vzorcev, koncentracijah in vrsti uporabljene kisline (trikloroacetna, fosforna, fosforvolframova, očetna), v časih segrevanja ter prisotnosti ali odsotnosti antioksidantov (Esterbauer, 1996).

Vrste uporabljenih kislin in optimalen pH:

S kislino se MDA ekstrahira iz kompleksov, v katere je vezan v biološkem materialu. Večina MDA pri živalih in ljudeh je v vezani obliki, večinoma gre za Schiffove baze: karbonilni skupini MDA vstopata v reakcijo z amino skupino amino spojine. Pogosto gre za s-amino skupino lizinskega ostanka beljakovin. Za reakcije, kjer nastanejo Schiffove baze z vezavo alifatskega aldehida, kakršen je MDA, je značilno, da so reverzibilne. V kislem pH-območju kompleksi hitro hidrolizirajo, ob čemer se sprosti MDA (Finot, 1997). Kislina je hkrati katalizator za reakcijo MDA s TBK in zagotavlja ustrezen pH, ki naj bi bil pomemben za stabilnost kompleksa MDA-TBK₂ (Bird in Draper, 1984). V nevtralnem ali celo alkalnem mediju začne kompleks počasi disociirati (Wong in sod., 1987). Primeren pH naj bi bil, odvisno od avtorja, med 2 in 3,5. Ohkawa in sodelavci (1979) ter Yagi (1982) so dobili največjo koncentracijo kompleksa MDA-TBK₂ pri pH = 3,5. Bird in Draper (1984) sta s HCl uravnala kislost človeškega in podganjega seča na pH = 2-3 in povečala dobit kompleksa MDA-TBK₂ za večkrat. Lepage in sodelavci (1991) so ugotovili, da je za standard najugodnejši pH med 3,3 in 3,5, za plazmo pa med 2,5 in 4,5. Vendar je treba biti pri dodajanju kisline pazljiv, ker prevelika količina močne kisline (pH, nižji od 2) lahko inhibira razvoj barve (Rice-Evans in sod., 1994). Segrevanje v močni kislini vodi k nastanku produktov, ki absorbirajo pri isti valovni dolžini kot kompleks MDA-TBK₂ (Bird in Draper, 1984).

V rabi so različne kisline: kombinacija fosforvolframove in žveplove kisline (H₂SO₄) (Yagi, 1982); HCl (Jacobson in sod., 1983); očetna kislina (Ohkawa in sod., 1979); trikloroacetna kislina (Templar in sod., 1999); fosforna (V) kislina (Nielsen in sod., 1997, Chirico, 1994; Wong in sod., 1987); perklorna kislina (Templar in sod., 1999).

Nekateri raziskovalci raztapljajo TBK-reagent v kisljih pufrih: fosfatnem (Draper in sod., 1993), acetatnem (Fukunaga in sod., 1993), da zagotovijo konstanten pH. Draper in sodelavci (1993) ugotavljajo, da pH nekaterih vzorcev seča med derivatiziranjem naraste nad pH = 3, kar zmanjša zmožnost nastajanja kompleksa. Vzrok večjega pH naj bi bil v sproščanju amoniaka iz sečnine. V tem primeru se uporabi TBK-reagent, pripravljen v fosfatnem pufru s pH = 2,8. Ker pa se topnost TBK v pufru zmanjša, je potrebno uporabiti večji volumen TBK-raztopine kot sicer (Draper in sodelavci, 1993)

Uporaba antioksidanta butilhidroksitoluena (BHT):

BHT se doda reakcijski mešanici že takoj na začetku analize kot antioksidant, da prepreči Hpidne peroksidacije med samo analizo - zlasti med segrevanjem (Templar, 1999). BHT naj bi preprečeval razpad lipidnih hidroperoksidov v MDA med analizo (Drury in sod.,

1997). S tem se izognemo prevelikim koncentracijam MDA-ja v vzorcih. Na samo tvorbo kompleksa MDA-TBK₂ BHT nima vpliva (Lepage, 1991). Z uporabo BHT so izmerili manjšo vrednost MDA-TBK₂ v človeškem in podganjem seču (Draper in sod., 1993), medtem ko se vrednost v človeškem serumu (Draper in sod., 1993) in plazmi, zbranih v vakuetah z EDTAK₂ (Fukunaga in sod., 1998), ni spremenila. Templar in sodelavci (1999) navajajo, da so pri vzorcih plazme, ki so jo hranili 60 dni pri -70° C, ugotovili rahlo manjšo stopnjo oksidacije, če so dodali BHT.

Temperatura in čas:

Za nastanek kompleksa med MDA in TBK sta bistvenega pomena ustrezna temperatura in čas segrevanja. Če je potekala reakcija pri 70° C, je nastajalo manj produkta, saj so izmerili le $24,9 \pm 4,2$ % od absorpcijske intenzitete, merjene pri 100° C. Hkrati je bila reakcija zaključena v 60 minutah. Če so reakcijsko mešanico segrevali nadaljnje 3 ure, ni nastalo nič več novega kompleksa (Lepage in sod., 1991). Glede časa, potrebnega za nastanek kompleksa, si avtorji niso enotni. Tako se v literaturi poleg časa 60 minut (Lepage in sod., 1991) pojavljajo še te vrednosti: 30 minut (Draper in sod., 1993), 45 minut (Chirico, 1994), 90 minut (Lee in sod., 1992). Uporabljane temperature za segrevanje vzorca so med 80° C (Nelson in sod., 1993; Lee in sod., 1992) in 100° C (Cadenas in sod., 1996; Bird in sod., 1983). Pogosti sta temperaturi 90° C (Wong in sod., 1987; Chirico in sod., 1993; Templar in sod., 1999) in 95° C (Fukunaga in sod., 1998; Richard in sod., 1992a).

2.5 TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC)

Kromatografska analiza je postopek, kjer se najprej ločijo posamezne komponente vzorca in jih nato zaznajo z ustreznim detektorjem, da bi se kvalitativno ali kvantitativno določile določene komponente v vzorcu.

Mobilna in stacionarna faza ne smeta reagirati med seboj, komponente vzorca se zaradi različne topnosti do obeh faz med kromatografskim eksperimentom postopoma razdvojijo in tako ločijo med seboj (Žorž, 1991).

Pri HPLC se raztopljen vzorec skupaj z mobilno fazo s pomočjo črpalke pod visokim tlakom (do 400 barov) potiska skozi kolono, v kateri je stacionarna faza. Velikost delcev stacionarne faze v kolonije manjša od 10 μm (Prošek, 1992).

Kadar je stacionarna faza polarna in mobilna faza nepolarna, se govori o normalno fazni kromatografiji. V primeru pa, ko je stacionarna faza nepolarna in mobilna faza polarna, je to reverzno fazna kromatografija (Žorž, 1991). Če ostaja sestava mobilne faze med ločitvijo nespremenjena, je to izokraska tehnika. V primeru, da se med postopkom polarnost mobilne faze spreminja je to gradientna tehnika ločevanja.

Prednosti HPLC, ki so ji omogočile hiter razvoj, so: analizni postopek je hiter, ločljivost je dobra, omogočeno je natančno delo, velika občutljivost, postopek je mogoče avtomatizirati, potrebna je le majhna količina vzorca, možna je večkratna uporaba kolone (Prošek, 1992).

Osnovne komponente vsakega HPLC-sistema so naslednje:

- * rezervoar za mobilno fazo
- * črpalka, ki zagotavlja enakomeren pretok mobilne faze skozi kolono
- * injektor za doziranje vzorca
- * kromatografska kolona, na kateri poteka ločevanje komponent v vzorcu
- * detektor za prepoznavanje in kvantifikacijo komponent, ki se izperejo iz kolone
- * računalnik za končno obdelavo podatkov

Tudi pri HPLC se želi kvantitativno določiti snov, ki se analizira. HPLC sodi med relativne tehnike, to pomeni, daje rezultat zanesljiv le toliko, kot je zanesljiv standard, ki je bil uporabljen za umerjanje odziva detektorja. Uporabljajo se naslednje metode določevanja koncentracij:

- * eksterni standard
- * interni standard
- * umeritvena krivulja
- * standardni dodatek

Najpogosteje se uporablja kvantizacija z umeritvenimi krivuljami, posebej kadar je število vzorcev veliko in so njihove koncentracije v širšem razponu, včasih lahko tudi preko nekaj velikostnih razredov. V ta namen se pripravijo raztopine znanih koncentracij, ki pokrivajo ves interval pričakovanih koncentracij in ga v določeni meri še presegajo na obeh skrajnostih (Žorž, 1991). Analizirajo se na enak način kot vzorci.

2.6 PLAZMA IN SERUM

Kri sestoji iz celic, suspendiranih v tekočini, imenovani *plazma*. Če se kri pomeša z antikoagulantom, ki preprečuje strjevanje, se celice lahko ločijo od tekočine (plazme) s centrifugiranjem (West, 1990). V uporabi so različni antikoagulanti: citrat, heparin, etilendiamintetraocetna kislina (EDTA). Wong in sodelavci (1987) navajajo, da po enodnevnem shranjevanju plazme v vakuetah z EDTA pri 4° C, ni bilo statistično značilnega povečanja koncentracije lipoperoksidov glede na rezultate analiz, dobljene eno uro po odvzemu krvi. V nasprotju s tem pa je lipoperoksidna koncentracija porasla za 1,5-krat do 2-krat pri podobnem načinu hranjenja seruma ali plazme v vakuetah s heparinom ali citratom. EDTA je zaželen tudi v primerih, ko lipidno peroksidacijo sprožijo železovi ioni (Fe^{3+}), ki se sprostijo iz eritrocitov, če pride do hemolize krvi. Z železovimi ioni se EDTA poveže v kelatni kompleks, hkrati pa ima lastnost šibkega antioksidanta (Nielsen in sod., 1997).

Po centrifugiranju krvi z dodanim antikoagulantom se skupni volumen krvi razdeli na dva večja sklopa: v spodnjem, ki predstavlja približno 46 % skupnega volumna, so eritrociti na dnu (teh je za 45 %), prekrti s plastjo levkocitov ter trombocitov (skupaj jih je med 0,5 % in 1 %). Zgornji del, torej preostalih 54 %, pa zavzema supernatant plazma (West, 1990).

V literaturi najdemo različne podatke, kakšni naj bodo pogoji centrifugiranja krvi. V Tabeli 2 je navedenih nekaj primerov.

Tabela 2: Pogoji centrifugiranja krvi

Table 2: Conditions of blood centrifugation

VRSTA KRVI	POGOJI CENTRIFUGIRANJA	LITERATURA
Človeška kri	900 g, 20 minut pri 4 ⁰ C	Wong in sod., 1987
	1000 g, 15 minut pri 4 ⁰ C	Templar in sod., 1999
	1000 g, 10 minut pri 3 ⁰ C	Carbonneau in sod., 1991; Fukunaga in sod., 1998
	1600 g, 10 minut pri 4 ⁰ C	Richard in sod., 1992a
Podganja kri	750 g, 15 minut pri 4 ⁰ C	Fukunaga in sod., 1995

Po centrifugiranju je treba plast plazme zelo previdno odvzeti, da se ne kontaminira s trombociti, ki so bogati z lipoperoksidi in bi lahko postali glavni izvor MDA (Lepage in sod., 1991).

Če se antikoagulant ne doda in pustimo, da se kri strdi, se tekočina, izločena kot supernatant, imenuje *serum*. Serum se razlikuje od plazme v tem, da nima fibrinogena (ta se pretvori v fibrin in ostane v strdku), protrombina ter drugih koagulacijskih faktorjev, ki se porabijo med oblikovanjem strdka (West, 1990).

Zaradi preprostejšega in bolj enotnega ločevanja od kompleksnega dela krvi za določanje MDA največkrat uporabljajo plazmo.

3 MATERIAL IN METODE DE LA

3.1 ZASNOVA POIZKUSA

Namen raziskave je bil ugotoviti, ali različne stopnje oksidativne obremenitve organizma vplivajo na koncentracije MDA v plazmi in seču prašičev. Različne stopnje oksidativne obremenitve smo med skupinami dosegli s spreminjanjem vrste in količine maščob v obrokih.

Prehranski poskus smo izvedli na 24 prašičih (2-krat po 12 živali), ki smo jih pripeljali s farme v Ihanu. Telesna masa živali se je gibala med 50 in 60 kg. Vsaka je bila nameščena v svojo presnovno kletko, v kateri je ostala tri tedne, kolikor je trajal poizkus. Prašiči so dnevno dobivali en krmni obrok, sestavljen tako, da je po sestavi in hranilni vrednosti simuliral prehrano človeka (enolončnico).

Ker za sočasno namestitvev prašičev v kletke za presnovne raziskave nismo imeli dovolj kletk, smo poizkus izvedli v dveh zaporednih poizkusih in ju imenovali kar prvi in drugi poizkus. V vsakem smo imeli po 12 prašičev, razdeljenih v 3 skupine s po 4 živalmi. Ena skupina iz prvega poizkusa (številka 3) in ena iz drugega (številka 4) sta imeli enak krmni obrok, da smo s statistično analizo lahko ugotovili primerljivost obeh poizkusov (Tabela 3a). Sestave krmnih obrokov so prikazane v Tabeli 3b.

Tabela 3a: Zasnova poskusa

Table 3a: The scheme of the experiment

PRVI POIZKUS			DRUGI POIZKUS		
ŠTEVILKA SKUPINE	ŠTEVILO ŽIVALI	VRSTA KRMNEGA OBROKA	ŠTEVILKA SKUPINE	ŠTEVILO ŽIVALI	VRSTA KRMNEGA OBROKA
1	4	(A)	4	4	(A)
2	4	(B)	5	4	(D)
3	4	(C)	6	4	(E)

Tabela 3b: Sestava dnevnih krmnih obrokov v poizkusu

Table 3b: The composition of the experimental daily feed rations

ŽIVILO	KOLIČINA ŽIVILA NA DAN (g)				
	OBROK (A)	OBROK (B)	OBROK (C)	OBROK (D)	OBROK (E)
Krompir	350	350	350	350	350
Fižol v zrnju	200	200	200	200	200
Surova riževa moka	360	360	360	360	580
Treonin	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
Metionin	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3
Mineralno-vitaminski dodatek	66,7	66,7	66,7	66,7	66,7
Sončnično olje	85				0,0
Ekstra sončnično olje		85			0,0
Laneno olje			85	170	0,0

Opomba: Poudarjene številke pomenijo glavne razlike med sestavinami obrokov

Laneno olje smo kupili pri Kemofarmaciji, zanjo ga dobavlja podjetje Lex. V olju ni bilo dodanih antioksidantov. Do uporabe smo litrske steklenice hranili v temnem in hladnem prostoru. Sončnično in ekstra sončnično olje, ki je bogato z oleinsko maščobno kislino, smo kupili v tovarni olja Gea, Slovenska Bistrica. Hranili smo ju v enakih pogojih kot laneno olje.

3.2 PRIPRAVA KRMNIH OBROKOV ZA PRAŠIČE

Krmni obrok za prašiče so sestavljale sestavine, ki jih uporabljamo v prehrani ljudi: kuhan krompir, zmlet riž in kuhan fižol. Da so bile pokrite potrebe po vseh hranljivih snoveh, je bil obrok dopolnjen z aminokislinami, minerali in vitamini. Razlike v prehrani med skupinami živali so bile le v vrsti in količini rastlinskih olj. Kontrolna skupina živali je dobivala krmno mešanico brez maščobe.

Energijska vrednost krmnega obroka je morala zadoščati za pokritje vzdrževalnih potreb pri prašičih, težkih 60 kg. Za izračun potreb po energiji za vzdrževanje telesnih funkcij smo vzeli naslednjo enačbo (Nutrient requirements of swine, 1998):

$$ME = 106kcal * W^{0,75} / dan \quad \dots(35)$$

ME: presnovna energija

W: telesna teža živali

Osnovni obrok, na podlagi katerega smo izračunali pokritost potreb po energiji ter hranljivih snoveh, smo sestavili po priporočilih Svetovne zdravstvene organizacije (Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases, 1990), tako da so k skupni energiji prispevale beljakovine 10 do 15 %, ogljikovi hidrati 55 do 60 % ter maščobe do 30 % zaužite energije, razen pri skupini, ki je dobivala 170 g lanenega olja (obrok d, glej Tabelo 3b) in s tem večji delež energije z maščobami.

Za izračun potrebnih količin posameznih živil, s katerimi smo pokrili energijske potrebe prašičev, smo uporabili prehranski program Genesis. Z njim smo izračunali tudi količine posameznih aminokislin, vitaminov in mineralov v obroku ter primerjali teoretično izračunane količine teh snovi z normativi za prašiče (Tabela 4) s telesno maso, kakršno so imele naše poskusne živali. Ker v obroku ni bilo dovolj aminokislin, mineralov in vitaminov smo dodali suplementaren dodatek, posebej sestavljen za naš poskus. Mineralno-vitaminskega so nam pripravili v mešalnici Dobrodej. Sestava dodatka je prikazana v Tabeli 4. Vitaminov C in E nismo dodali zaradi njunih antioksidativnih lastnosti. Manjkajoče količine aminokislin smo dodali v vsak obrok posamično. Šlo je za dve aminokislini: metionin in treonin. Ker je za mineralno-vitaminski dodatek potreben nosilec, je bila potrebna dnevna količina dodatka na prašiča 66,7 g. Sestava dodatkov je prikazana v Tabeli 5.

Tabela 4: Izračunana vsebnost in pokritost potreb po mineralih, vitaminih in aminokislinah v nedopolnjenem obroku za prašiča na dan

Table 4: Calculated and daily required values for minerals, vitamins and amino acids in the unsupplemented feed ration per pig/day

PARAMETER POTREB	PREHRANSKA VREDNOST OBROKA	POTREBE PRI PRAŠIČU NA DAN	POKRITOST DNEVNIH POTREB Z OBROKOM (%)
Energijska vrednost	2750 kcal	2285 kcal	120
Natrij	40 mg	2580 mg	1,6
Kalij	4490 mg	4890 mg	92
Magnezij	581 mg	1030 mg	56
Kalcij	270 mg	12880 mg	2
Mangan	11 mg	5,15 mg	212
Železo	16 mg	100 mg	16
Baker	2 mg	9,01 mg	22
Cink	8 mg	100 mg	8
Fosfor	1459 mg	11590 mg	13
Klor	3284 mg	2060 mg	159
Jod	14 µg	360 µg	4
Selen	34 µg	390 µg	9
Vitamin A	453 IE	3347 IE	14
Vitamin D	0 IE	386 IE	0
Vitamin K	16 µg	1290 µg	1
Tiamin – B ₁	2 mg	2,58 mg	77
Riboflavin – B ₂	1 mg	5,15 mg	19
Niacin – B ₃	13 mg	18,03 mg	70
Vitamin B ₆	2 mg	2,58 mg	90
Folat	548 µg	770 µg	77
Vitamin B ₁₂	0 µg	12,88 µg	0
Biotin	12 µg	130 µg	10
Pantotenska kislina	5 mg	18,03 mg	28
Lizin	5 g	3,5 g	143
Histidin	2 g	1,12 g	178
Izolevcin	5 g	2,63 g	190
Levcin	7 g	2,45 g	286
Metionin	1 g	0,98 g	102
Metionin + cistin	2 g	4,3 g	46
Fenilalanin	5 g	1,75 g	286
Fenilalanin + tirozin	8 g	4,24 g	188
Treonin	4 g	5,3 g	75
Triptofan	1 g	0,91 g	110
Valin	5 g	2,34 g	213

Tabela 5: Sestava mineralno-vitaminskega dodatka za enega prašiča na dan
Table 5: The composition of the mineral-vitamin supplement per pig/day

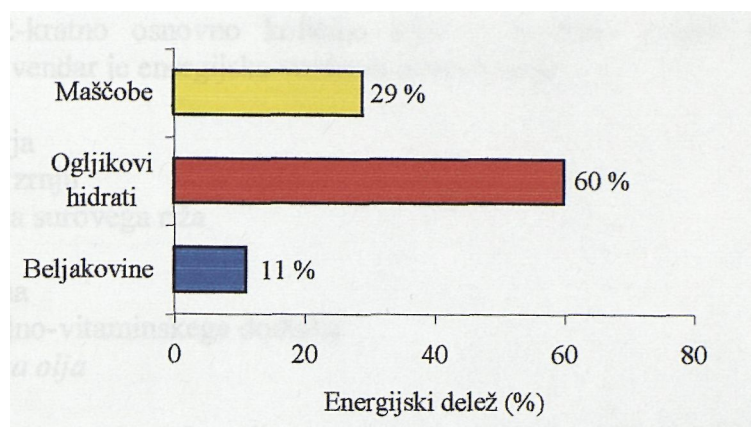
SUROVINE IN KONCENTRACIJA UČINKOVIN	POTREBEN DODATEK UČINKOVIN ZA ŽIVAL NA DAN	POTREBNA KOLIČINA SUROVIN ZA ŽIVAL NA DAN
Ruekana: 31 % Ca 18,5 % P 5,5 % Na	12610 mg Ca 10150 mg P	41 g
MgO: 50 % Mg	450 mg Mg	900 mg
FeSO ₄ : 25 % Fe	84 mg Fe	336 mg
CuSO ₄ : 25 % Cu	7 mg Cu	28 mg
ZnSO ₄ : 35 % Zn	92 mg Zn	263 mg
KJ: 3,3 % J	350 µg J	10,6 mg
Na-selenit: 1 % Se	356 µg Se	35,6 mg
Vit. A: 500000 IE/g	3663 IE	7,3 mg
Vit. D ₃ : 500000 IE/g	425 IE	0,85 mg
Vit. K: 52 %	1420 µg	2,73 mg
Tiamin-B ₁ : 100 %	640 µg	0,64 mg
Riboflavin-B ₂ : 86 %	4,56 mg	5,3 mg
Niacin-B ₃ : 100 %	5,53 mg	5,53 mg
Vit. B ₆ : 100 %	0,64 mg	0,64 mg
Folat: 8,15 %	244 µg	3 mg
Vit. B ₁₂ : 0,1 %	14,2 µg	14,2 mg
Biotin: 2 %	130 µg	6,5 mg
Pantoten. ksl.: 100 %	14,3 mg	14,3 mg

Končna sestava osnovnega obroka, računana za surova živila za enega prašiča na dan, je bila naslednja:

- >350 g krompirja
- >200 g fižola v zrnju
- >360 g zmletega surovega riža
- >1,3 g treonina
- >2,3 g metionina
- >66,7 g mineralno-vitaminskega dodatka
- >85 g olja (sončnično/ekstra sončnično/laneno)

Priprava obrokov: Pred kuhanjem smo fižol 24 ur namakali v vodi. V primerni količini vode smo skuhali krompir in fižol, ju zmleli, stehali za posamezne obroke, zapakirali v vrečke in zamrznili do uporabe. Pred krmljenjem smo zmes odmrznili, ji dodali zmleti riž, treonin, metionin, mineralno-vitaminski dodatek in ustrezno vrsto olja, ter zalili z nekaj vode, da je postala gosto kašasta tekoča. S to mešanico smo v tritedenskem poizkusnem obdobju enkrat dnevno krmili prašiče, vsak dan ob isti uri, in sicer ob 9h.

Izračunana energijska vrednost takega obroka je bila 11550 kJ (2750 kcal), razmerja med osnovnimi hranilnimi snovmi pa so prikazana na Sliki 23.



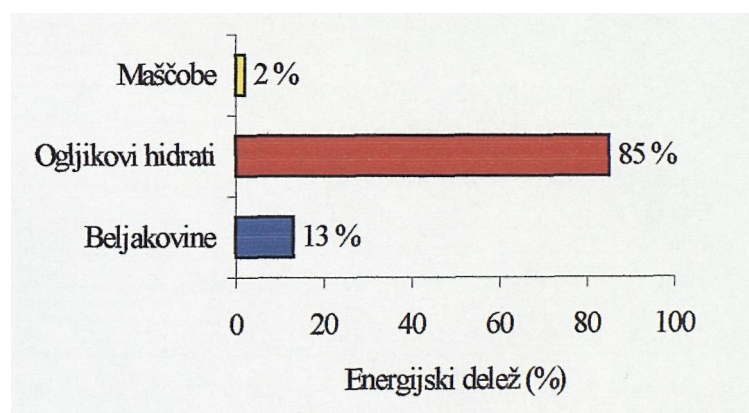
Slika 23: Razmerja med energijskimi deleži hranljivih snovi v obroku s 85 g olja
Figure 23: Percentage of energy content of nutrients in daily feed ration with 85 g oil content

Pripravili smo še dve drugi vrsti obrokov, ki sta se ločili od osnovnega po količini dodane maščobe: pri enem maščobe nismo dodajali, pri drugem smo dodali 2-kratno količino olja (170 g). Mineralno-vitaminski dodatka in aminokislini treonin ter metionin smo dodali v enakih količinah kot pri osnovnem obroku.

Energijska vrednost obroka brez maščobe je bila enaka kot v osnovnem obroku z dodatkom 85 g olja, kar smo dosegli s povečanjem količine zmletega riža (glej Tabelo 3b ali Tabelo 6).

- >350 g krompirja
- >200 g fižola v zrnju
- >550 g *zmletega surovega riža*
- >1,3 g treonina
- >2,3 g metionina
- >66,7 g mineralno-vitaminskega dodatka

Razmerja med deleži hranljivih snovi so pri tem obroku seveda drugačne kot pri obrokih z dodatkom maščob (Slika 24).

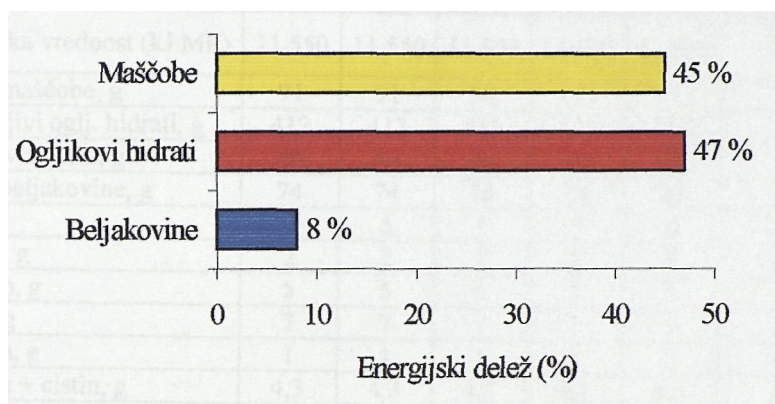


Slika 24: Razmerja med energijskimi deleži hranilnih snovi v obroku brez dodane maščobe
Figure 24: Percentage of energy content of nutrients in daily feed ration without oil content

V obroku z 2-kratno osnovno količino olja so količine ostalih glavnih sestavin nespremenjene, vendar je energijska vrednost obroka večja:

- >350 g krompirja
- >200 g fižola v zrnju
- >360 g zmletega surovega riža
- >1,3 g treonina
- >2,3 g metionina
- >66,7 g mineralno-vitaminskega dodatka
- >170 g lanenega olja

Z dodatkom dvakratne količine olja se energijska vrednost obroka poveča na 14700 kJ (3500 kcal), spremenijo pa se tudi razmerja med hranljivimi snovmi (Slika 25).



Slika 25: Razmerja med energijskimi deleži hranilnih snovi v obroku s povečano vsebnostjo olja (170 g)
Figure 25: Percentage of energy content of nutrients in daily feed ration with 170 g oil content

V Tabeli 6 so pregledno napisane sestave in izračunane hranilne vrednosti vseh petih poskusnih obrokov.

Tabela 6: Sestava in izračunana hranilna vrednost poizkusnih dnevni obrokov.

Table 6: The composition and calculated nutritional values of five experimental daily feed rations

SESTAVA OBROKA	POSKUSNI DNEVNI OBROKI					PARAMETER HRANILNE VREDNOSTI	POKRITOST DNEVNIH POTREB ZA VZDRŽEVANJE (% OD NRC) ⁽¹⁾
	(A)*	(B)*	(C)*	(D)*	(E)*		
Krompir, g	350	350	350	350	350		
Fižol v zrnju, g	200	200	200	200	200		
Riž, v zrnju, zmlet, g	360	360	360	360	580		
Treonin, g	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3		
Metionin, g	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3		
Min.-vit. dodatek, g	66,7	66,7	66,7	66,7	66,7		
Olje *, g	85	85	85	170	0		
Energijska vrednost (kJ ME)	11.550	11.550	11.550	14.700	11.550		(A), (B), (C), (E): 120 ; (D): 153
Surove maščobe, g	91	91	90	175	7		/
Izkoristljivi oglj. hidrati, g	412	412	412	412	583		/
Skupna vlaknina, g	46	46	46	46	49		/
Surove beljakovine, g	74	74	74	74	89		(A) do (D): 106, (E): 127
Lizin, g	5	5	5	5	6		(A) do (D): 143, (E): 171
Histidin, g	2	2	2	2	3		(A) do (D): 178, (E): 268
Izolevcin, g	5	5	5	5	5		190
Levcin, g	7	7	7	7	9		(A) do (D): 286, (E): 367
Metionin, g	1	1	1	1	2		(A) do (D): 102, (E): 204
Metionin + cistin, g	4,3	4,3	4,3	4,3	5,3		(A) do (D): 100, (E): 123
Fenilalanin, g	5	5	5	5	5		188
Fenilalanin + tirozin, g	8	8	8	8	9		(A) do (D): 188, (E): 212
Treonin, g	5,3	5,3	5,3	5,3	5,3		100
Triptofan, g	1	1	1	1	1		110
Valin, g	5	5	5	5	7		(A) do (D): 213, (E): 299
Natrij, mg	2295	2295	2295	2295	2310		89
Kalij, mg	4490	4490	4490	4490	4720		(A) do (D): 92, (E): 96
Magnezij, mg	1030	1030	1030	1030	1172		(A) do (D): 100, (E): 114
Kalcij, mg	12880	12880	12880	12880	12890		100
Mangan, mg	11	11	11	11	15		(A) do (D): 212, (E): 290
Železo, mg	100	100	100	100	100		100
Baker, mg	9	9	9	9	9		100
Cink, mg	100	100	100	100	100		100
Fosfor, mg	11610	11610	11610	11610	11870		100
Klor, mg	252	252	252	252	252		8
Jod, µg	364	364	364	364	368		100
Selen, µg	390	390	390	390	390		100
Vitamin A, IE	1553	1553	1553	1553	1553		123
Vitamin C, mg	64	64	64	64	64		/
Vitamin D, IE	425	425	425	425	425		110
Vitamin E, mg	53	53	5	10	2		(A), (B): 282, (C):27, (D):53, (E):11

* Vrsta olja v obroku: (A) sončnično olje
(B) ekstra sončnično (oleinsko) olje
(C) laneno olje
(D) laneno olje 2-krat (170 g)
(E) brez dodatka olja

(1) NRC: Nutrient requirements of swine (1998)

se nadaljuje

Tabela 6: Nadaljevanje

Table 6: Continuation

PARAMETER HRANILNE VREDNOSTI	POSKUSNI DNEVNI OBROKI					POKRITOST DNEVNIH POTREB ZA VZDRŽEVANJE (% OD NRC) ⁽¹⁾
	(A) *	(B) *	(C) *	(D) *	(E) *	
Vitamin K, µg	1420	1420	1420	1420	1420	110
Tiamin – B ₁ , mg	2,64	2,64	2,64	2,64	2,64	102
Riboflavin – B ₂ , mg	5,56	5,56	5,56	5,56	5,56	108
Niacin – B ₃ , mg	18,35	18,53	18,53	18,53	21,53	(A) do (D): 110, (E): 120
Vitamin B ₆ , mg	2,64	2,64	2,64	2,64	3,64	(A) do (D): 102, (E): 140
Folat, µg	792	792	792	792	1160	(A) do (D): 103, (E): 150
Vitamin B ₁₂ , µg	14,2	14,2	14,2	14,2	14,2	110
Biotin, µg	142	142	142	142	149	(A) do (D): 109, (E): 114
Pantotenska kislina, mg	19,3	19,3	19,3	19,3	21,3	(A) do (D): 107, (E): 118

* Vrsta olja v obroku: (A) sončnično olje

NRC: Nutrient requirements of swine (1998)

(B) ekstra sončnično (oleinsko) olje

(C) laneno olje

(D) laneno olje 2-krat (170 g)

(E) brez dodatka olja

3.3 ANALIZA KRMNIH OBROKOV IN MAŠČOBNOKISLINSKA SESTAVA UPORABLJENIH OLJ

Dejanske količine hranljivih sestavin krmnih obrokov (surove beljakovine, surove maščobe, surovo vlaknino, surovi pepel, skupne sladkorje, škrob, fosfor, kalcij, kalij, natrij), ki so navedene v Tabeli 7, maščobnokislinsko sestavo teh obrokov (Tabela 8) ter maščobnokislinsko sestavo uporabljenih olj (sončničnega, ekstra sončničnega in lanenega) (Tabela 9) s pripadajočimi peroksidnimi, jodnimi in kislinskimi števili (Tabela 10) so določili po že uvedenih metodah v laboratoriju Inštituta za prehrano, Oddelek za zootehniko, Biotehniška fakulteta.

Tabela 7: Količine hranilnih snovi v krmnih obrokih

Table 7: Amount of nutrients in the diets

SESTAVINA OBROKA *	OBROK I ^(a) (g/kg suhe snovi)	OBROK II ^(b) (g/kg suhe snovi)
Surove beljakovine	125,78	115,75
Surove maščobe	3,97	3,84
Surova vlaknina	23,52	18,75
Surovi pepel	95,34	73,75
Fosfor	20,17	15,18
Kalcij	17,65	13,54
Kalij	8,35	6,81
Natrij	3,69	3,50
Škrob	616,26	688,25
Saharoza	33,65	15,49

* obrok ne vsebuje olja in mineralno-vitaminskega dodatka

^(a) Obrok I vsebuje: 360 g riža, 350 g krompirja, 200 g fižola, 1,3 g treonina in 2,3 g metionina

^(b) Obrok II vsebuje: 580 g riža, 350 g krompirja, 200 g fižola, 1,3 g treonina in 2,3 g metionina

Razlike v maščobnokislinski sestavi obrokov, ki se razlikujeta po količini dodanega riža, so neznatne (Tabela 8).

Tabela 8: Maščobnokislinska sestava obrokov

Table 8: Fatty acids composition

MAŠČOBNA KISLINA	UTEŽNI % MAŠČOBNE KISLINE	
	OBROK I ^(a)	OBROK II ^(b)
Miristinska (14:0)	0,851	0,999
Palmitinska (16:0)	23,361	23,856
Palmitoleinska (16:1, n-7)	0,426	0,453
stearinska (18:0)	1,702	1,993
Oleinska (18:1, n-9) in 18:1, t	14,262	15,902
Linolna (18:2, n-6) in 18:2, tt	31,732	33,117
Linolenska (18:3, n-3)	22,365	17,994
arahinska (20:0)	0,250	0,302

^(a) Obrok I vsebuje: 360 g riža, 350 g krompirja, 200 g fižola, 1,3 g treonina in 2,3 g metionina

^(b) Obrok II vsebuje: 580 g riža, 350 g krompirja, 200 g fižola, 1,3 g treonina in 2,3 g metionina

Kot so pokazale analize maščobnokislinske sestave olj, vsebuje laneno olje velik delež (> 50 %) trikrat nenasičene linolenske maščobne kisline. Zaradi tega je zelo podvrženo avtooksidaciji. V nasprotju z njim je ekstra sončnično olje močno stabilno zaradi velike vsebnosti oleinske kisline in naravno prisotnega vitamina E (Tabela 9).

Tabela 9: Maščobnokislinska sestava olj, ki smo jih uporabili v prehranskem poizkusu

Table 9: Fatty acids composition of the flax, sunflower and extra sunflower oil

MAŠČOBNA KISLINA	UTEŽNI % MAŠČOBNE KISLINE		
	LANENO OLJE	SONČNIČNO OLJE	EKSTRA SONČNIČNO OLJE
miristinska (14:0)	0,064	0,094	0,061
palmitinska (16:0)	6,253	6,853	4,632
palmitoleinska (16:1, n-7)	0,140	0,155	0,171
stearinska (18:0)	3,054	3,300	1,865
oleinska (18:1, n-9) in 18:1, t	18,587	26,238	71,801
linolna (18:2, n-6) in 18:2, tt	14,126	57,017	15,070
linolenska (18:3, n-3)	52,293	0,515	0,519
arahinska (20:0)	0,154	0,242	0,213
gadoleinska (20:1, n-9)	0,249	0,176	0,276
behenska (22:0)	0,044	0,470	0,458
ostale	5,036	4,94	4,934

Razlike med uporabljenimi olji se pokažejo tudi pri določitvi peroksidnega in kislinskega števila (Tabela 10).

Tabela 10: Karakteristični števili, ki določata kakovost uporabljenih olj

Table 10: Peroxide and acid value

VRSTA OLJA	PEROKSIDNO ŠTEVILO ^(a)	KISLINSKO ŠTEVILO ^(b)
Sončnično	4,33	0,251
Ekstra sončnično	5,98	0,085
Laneno	29,60	0,194

(a) Peroksidi, ki jih vsebujejo maščobe, oksidirajo KJ do elementarnega joda, ki ga titrimetrično določimo z $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

(b) Če pride do hidrolize triacilglicerolov, se sprostijo proste maščobne kisline. Kislinsko število se izračuna na osnovi porabe NaOH za nevtralizacijo prostih maščobnih kislin v 1 g maščobe.

3.4 ODVZEM IN PRIPRAVA KRVI TER SEČA ZA ANALIZE

3.4.1 Shema odvzemov krvi in seča

Prašiči so pred pričetkom krmljenja s posebej pripravljenimi krmnimi mešanicami nekaj dni dobivali običajno krmo za prašiče, kot prej na farmi, da so se lažje privadili na nove razmere. Prvi odvzem krvi in seča smo izvedli v tem obdobju. V času poizkusa smo opravili še štiri odvzeme seča. Kri smo skupno odvzeli trikrat (Tabela 11).

3.4.2 Način odvzema krvi

Kri smo odvzeli iz vratne vene prašičev v 5 ml vakuete z dodanim antikoagulantom EDTA K_3 . Med transportom smo jih hranili v hladnem in temnem prostoru (npr. hladilni torbi). Kri smo nato čim prej centrifugirali pri 4° C, 400 g, 10 minut. Pri tem je prišlo do ločitve dveh plasti: zgornja je bila plazma, ki smo jo previdno odpipetirali in prenesli v več 2 ml plastičnih Eppendorfovih epruvet. Pred zaprtjem smo jih prepihali z dušikom, da smo izrinili zrak, možnega povzročitelja heželjenih oksidacij. Če plazme nismo uporabili za analize isti dan, smo jo zamrznili na -70 C.

Opozorilo: Vse vzorce z vidno hemolizo smo zavrgli!

3.4.3 Način odvzema seča

V posode, nameščene pod presnovnimi kletkami, se je stekal seč, ki smo ga zbirali po 24 ur. Izmerili smo njegovo količino. En del (10-15 ml) smo prefiltrirali skozi kvali filter papir (izločimo delce blata, krme ...) v epruvete z brusom. Enako kot plazmo smo ga razdelili v več 2 ml epruvetk, prepihali z dušikom in zamrznili na -70 C.

Tabela 11: Shema odvzemov krvi in seča v predpoizkusnem in poizkusnem obdobju

Table 11: The scheme for blood and urine collection

VRSTA OBROKA	ZAPOREDNI DAN POIZKUSA	VRSTA ODVZEMA	
Predpoizkusno obdobje	1		
	2		
	3		
	Osnovna krma – faza prilagajanja	4	
		5	seč
		6	kri
Poizkusno obdobje	7		
	8		
	9		
	10		
	11		
	12	seč	
	13		
	14		
	15		
	16		
	17		
	Krmni obroki – različni po skupinah	18	
		19	seč
	20		
	21	kri	
	22	seč	
	23		
	24		
	25		
	26		
	27	seč	
	28	kri	

3.5 DOLOČITEV MALONDIALDEHIDA V PLAZMI IN SEČU

Za določitev MDA v plazmi in seču smo uporabili metodo, kot jo navajajo Wong in sodelavci (1987), z modifikacijo po Chiricovi (1994) in Fukunageju in sodelavcih (1995).

Metoda je bila modificirana v tem, da smo za preprečitev oksidacije vzorcev pred segrevanjem dodali butilhidroksitoluen (BHT) kot antioksidant (Chirico, 1994) in po ohladitvi prefiltrirali vzorce, kot navajajo Fukunaga in sodelavci (1995).

Pri HPLC analizi smo izvedli še eno modifikacijo, ki pa ni navedena v nobenem članku: namesto splošno uporabljene izokratske tehnike smo uporabili gradientno tehniko ločevanja. Začetna sestava mobilne faze in ostali pogoji HPLC-analize so bili taki, kot jih navaja Chirico (1994).

3.5.1 Princip določitve malondialdehida

Iz vzorcev smo s pomočjo fosforne kisline sprostili MDA iz vezanih oblik. Po dodatku TBK se je med segrevanjem tvoril rožnato obarvan kompleks med eno molekulo MDA in dvema molekulama tiobarbiturne kisline (TBK). Po ohladitvi pod tekočo vodo smo vzorce prefiltrirali in s pomočjo HPLC-tehnike določili koncentracijo MDA.

3.5.2 Pribor

- > vakuete za odvzem krvi: Vacuette, 5 ml z EDTAK3, Greiner
- > Eppendorfove epruvete: 2 ml, plastične epruvetke s pokrovčkom
- > 50 in 100 ml steklene čašice
- > 25, 50, 100 ml, 500 ml in 1000 ml steklene bučke
- > avtomatsko nastavljive pipete za volumne od 10 μ l do 5 ml
- > Hachove epruvete: 10 ml, steklene epruvete, s pokrovčkom na navoj
- > 5 ml injekcijske brizge, plastične, dvodelne
- > vial: prozorno steklo, s pokrovčkom iz PTFE in silikonsko septo, 2 ml, 12 x 32 mm, Waters (WAT270946)
- > 0,22 μ m membranski filtri Millipore, nesterilni, za filtriranje vzorcev pred HPLC analizo (SLGV013NL)
- > 0,45 μ m filtri Millipore za filtriranje vodnih mobilnih faz za HPLC (HATF04700)
- > filtrirna nuča

3.5.3 Aparature

- > kad za vodno kopel
- > termostatski blok
- > vakuumska vodna črpalka
- > stresalnik
- > ultrazvočna kopel
- > Waters HPLC aparatura:
 - stekleni rezervoarji za mobilno fazo
 - Alliance 2690, Separations Module, ki vključuje dve črpalki, termostatiran sistem za avtomatsko injiciranje vzorcev in termostatiran prostor za kolono
 - kromatografska kolona: Waters Symmetry C₁₈, 5 μ m, 4,6 x 150 mm
 - kromatografska predkolona: Waters Symmetry C₁₈, 5 μ m, 3,9 x 20 mm
 - 2487, Dual X Absorbance Detektor
 - Millennium³² Chromatography Manager: računalniški program za obdelavo rezultatov



Slika 26: Watersov HPLC-sistem (foto: V. Rezar)
Figure 26: Waters HPLC system (photo: V. Rezar)

3.5.4 Reagenti

3.5.4.1 Reagenti za kemijsko analizo plazme in seča

>: **0,44 M raztopina fosforne (V) kisline (H_3PO_4)** iz: 85 % H_3PO_4 , gostota 1,71 g/ml; Merck, Code No. 100552

1 ml 85 % H_3PO_4 smo razredčili z destilirano vodo v 100 ml bučki do oznake.

> **0,6 % raztopina 2-tiobarbiturne kisline (TBK)** iz: tiobarbiturne kisline, >98 %, molska masa 144,15 g/mol; FLUKA, Code No. 88481

V 100 ml čašo smo zatehtali 0,6 g TBK in dopolnili z destilirano vodo do 60 ml. V vodni kopeli smo jo segrevali na 50-55° C toliko časa, da se je raztopila. Raztopino smo nato kvantitativno prenesli v 100 ml bučko in jo dopolnili z destilirano vodo do oznake. Hranili smo jo pri sobni temperaturi. Uporabna je najmanj dva tedna (Wong in sod., 1987).

> **0,2 % raztopina BHT v etanolu:** 2,6-di-terc-butyl-p-krezol, >99 %, molska masa 220,36 g/mol; FLUKA, Code No. 34750

0,2 g BHT smo zatehtali in razredčili z absolutnim etanolom v 100 ml bučki do oznake.

> **40 % etanol** iz: absolutnega etanola, 99,8 %, gostota 0,79 g/ml; Merck, Code No. 1.00983.1000

200 ml absolutnega etanola smo razredčili z destilirano vodo do 500 ml.

- > **Standardne raztopine:** 1,1,3,3-tetraetoksiopropan (TEP), 97 %, molska masa 220,31 g/mol, gostota 0,918 g/ml; FLUKA, Code No. 86570

V 25 ml bučko smo odpipetirali 50 μ l 1,1,3,3-tetraetoksiopropana (TEP) in dopolnili do oznake s 40 % etanolom. Iz TEP se med analizo (s hidrolizo) sprosti stehiometričen delež MDA (Nielsen in sod., 1997). Dobili smo osnovno raztopino s koncentracijo 8,08 μ mol MDA/ml raztopine. Pripravljali smo jo enkrat mesečno. Za vmesni standard smo odpipetirali 0,5 ml osnovne raztopine v 100 ml bučko in dopolnili s 40 % etanolom do oznake. Koncentracija je 40,4 nmol/ml. Pripravljali smo jo vsakih 14 dni. Delovne standarde smo pripravljali enkrat tedensko iz vmesnega standarda. Vse standardne raztopine smo hranili pri temperaturi 4° C.

3.5.4.2 Reagenti za pripravo mobilne faze za HPLC

- > **voda MilliQ:** dodatno očiščena deionizirana voda

- > **1 M raztopina kalijevega hidroksida (KOH):** Merck, Code No. 105021

Zatehtali smo 56 g KOH, raztopili v vodi MilliQ in dopolnili do oznake 1000 ml.

- > **50 mM kalijev dihidrogen fosfatni pufer (KH₂PO₄-pufer), pH = 6,9:** 99,995 %, molska masa 136,09 g/mol; Merck, Code No. 1.05108.0500

Zatehtali smo 6,8 g KH₂PO₄ in z vodo MilliQ razredči do 600 ml. pH raztopine smo uravnali na 6,9 z dodatkom 1 M KOH. Dopolnili smo do oznake 1000 ml. Raztopino smo prefiltrirali s pomočjo vakuumske vodne črpalke skozi 0,45 μ m Milliporov membranski filter.

- > **metanol za tekočinsko kromatografijo:** 99,9 %, gostota 0,79 g/ml; Merck, Code No. 1.06007.2500

3.5.4.3 Reagenti za čiščenje kolone

- > **25 %, 50 %, 75 % etanol za tekočinsko kromatografijo:** 99,9 %, Merck, Code No. 1.11727.2500

25 ml, 50 ml oziroma 75 ml etanola smo v 100 ml bučki razredčili z vodo MilliQ do oznake ter ga prefiltrirali s pomočjo vakuumske vodne črpalke skozi 0,45 μ m Milliporov membranski filter.

- > **raztopina 6 M gvanidinijevega hidroklorida in 0,2 M očetne kisline:**
gvanidinijev hidroklorid: 99+ %, molska masa 95,53 g/mol; SIGMA, Code No. 98H5402
očetna kislina: 100 %, gostota 1,05 g/ml; Merck, Code No. 100066

V čašo smo zatehtali 286,59 g gvanidinijevega hidroklorida, ga razredčili z vodo MilliQ in kvantitativno prenesli v 500 ml bučko. Dodali smo 5,72 ml očetne kisline in z vodo MilliQ dopolnili do oznake. Raztopino smo prefiltrirali s pomočjo vakuumske vodne črpalke skozi 0,45 um membranski filter.

- > **2 % raztopina natrijevega dodecilsulfata (SDS):** >99 %, molska masa 288,38 g/mol; Merck, Code No. 1.13760.0100

V čašo smo zatehtali 2g SDS-a, ga raztopili v vodi MilliQ, kvantitativno prenesli v 100 ml bučko in z vodo dopolnili do oznake. Enako kot zgoraj smo raztopino prefiltrirali.

- > **100 mM dikalijevega sol etilendiamintetraočetne kisline (EDTA_{K2}), pH = 7,8:** 98 %, molska masa 368,4 g/mol; SIGMA, Code No. 87H1092.

V čašo smo zatehtali 18,42 g EDTAK₂, jo raztopili v vodi MilliQ in uravnali pH z dodatkom 1M raztopine KOH. Raztopino smo kvantitativno prenesli v 500 ml bučko, dopolnili do oznake z vodo MilliQ in jo prefiltrirali s pomočjo vakuumske vodne črpalke skozi 0,45 um membranski filter.

3.5.5 Priprava vzorca

Vzorci smo pripravljali v treh vzporednih določitvah.

V Hachove epruvete smo odpipetirali:

- ✓ 1,5 ml 0,44 M raztopina H₃PO₄
- ✓ 100 µl plazme/seča/standarda/vode pri slepem vzorcu
- ✓ 10 µl 0,2 % raztopina BHT v absolutnem etanolu

premešali, pustili stati 10 minut, nato dodali:

- ✓ 0,5 ml 0,6 % raztopino TBK v destilirani vodi
- ✓ 0,89 ml destilirane vode

premešali, postavili v vodno kopel ali termostatshi blok za 60 minut, pri 95 C.

Vzorci smo nato hitro ohladili pod tekočo vodo in prefiltrirali z uporabo 5 ml brizg in 0,22 µm Milliporovih membranskih filtrov v 2 ml vial. Če smo vzorce pripravili dan pred določitvijo komponent s HPLC, smo jih shranili v hladilniku.

Hachove epruvete smo po uporabi dobro oprali s čistilom za čiščenje steklovine in jih za nekaj ur namočili v 30 % raztopino HNO₃.

3.5.6 HPLC-analiza

Derivat malondialdehida s tiobarbiturno kislino (MDA-TBK₂) v vzorcu smo po derivatizaciji določili s HPLC-metodo. Uporabili smo metodo, kot jo navaja Chirico (1994).

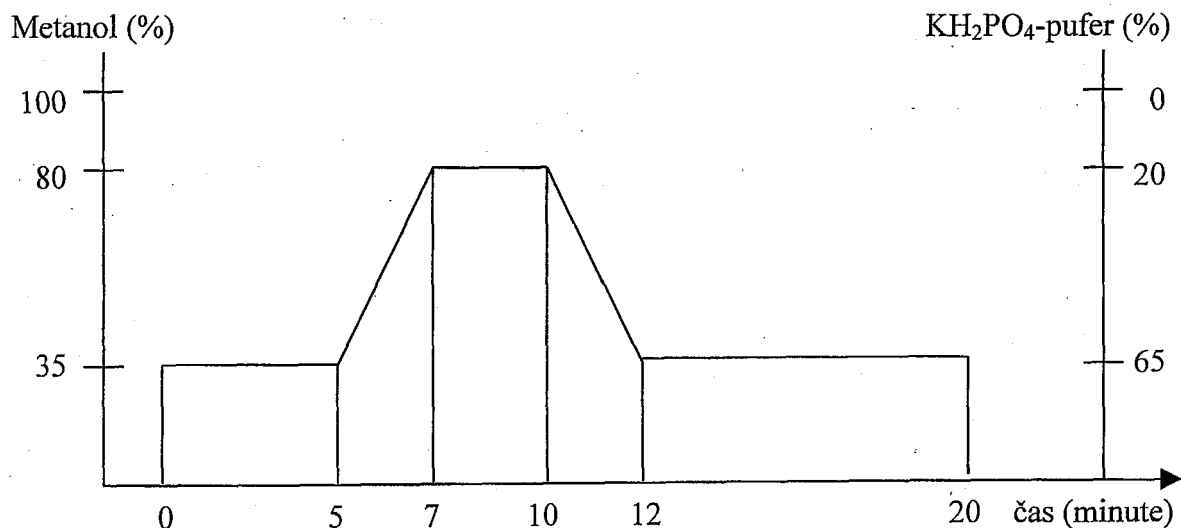
Za mobilno fazo smo uporabili dvoje topil: metanol in 50 mM raztopino KH₂PO₄ (pH = 6,9). Sestavo mobilne faze smo spreminjali po gradientnem programu, grafično prikazanem na Sliki 27 in v Tabeli 12. Pretok mobilne faze je bil 1 ml/min.

Pred pričetkom injiciranja smo kolono spirali z mobilno fazo (MeOH : KH₂PO₄-pufer = 35 % : 65 %) vsaj eno uro oziroma toliko časa, da se je bazna linija ustalila.

Slep vzorec smo pripravili enako kot vzorce, s tem da smo 100 µl vzorca zamenjali s 100 µl destilirane vode.

Na kolono smo injicirali 50 µl pripravljenih raztopin. Retenzijski čas za kompleks MDA-TBK₂ je bil $6,5 \pm 0,3$ minute. Za analizo enega vzorca smo potrebovali 20 minut.

Kromatogram standarda s kromatografskimi podatki je prikazan na Sliki 28.

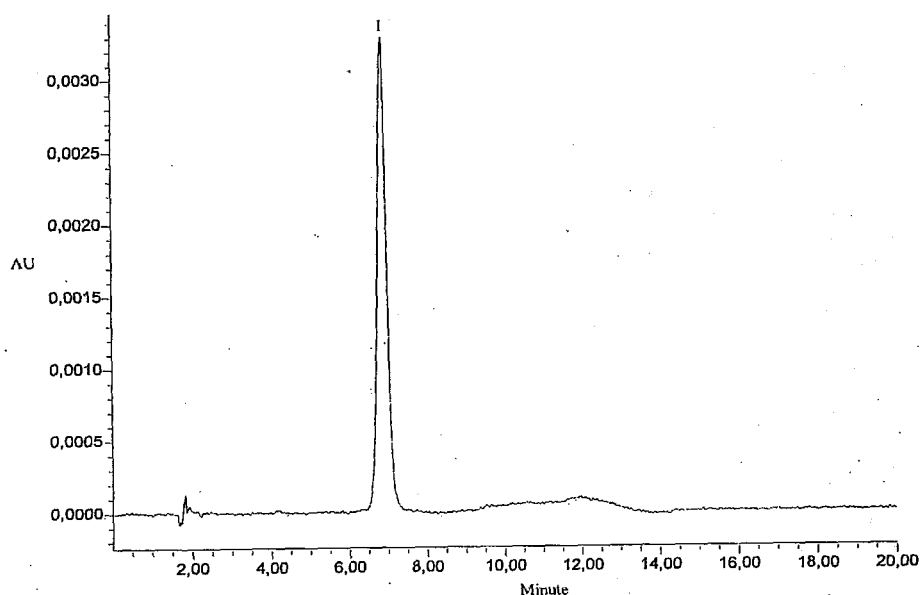


Slika 27: Spreminjanje sestave mobilne faze med kromatografsko analizo vzorca
Figure 27: Gradient profile of the mobile phase during the sample analysis

Tabela 12: Gradientno spreminjanje razmerij topil v mobilni fazi

Table 12: Changing of the mobile phase composition during the sample run

ČAS (min)	METANOL (%)	KH ₂ PO ₄ -pufer (%)	PRETOK (ml/min)
0	35	65	1
5	35	65	1
7	80	20	1
10	80	20	1
12	35	65	1
20	35	65	1



Slika 28: Kromatogram TEP standarda: (1): kompleks MDA-TBK₂
Figure 28: Chromatogram of TEP standard: (1): MDA-TBK₂ adduct

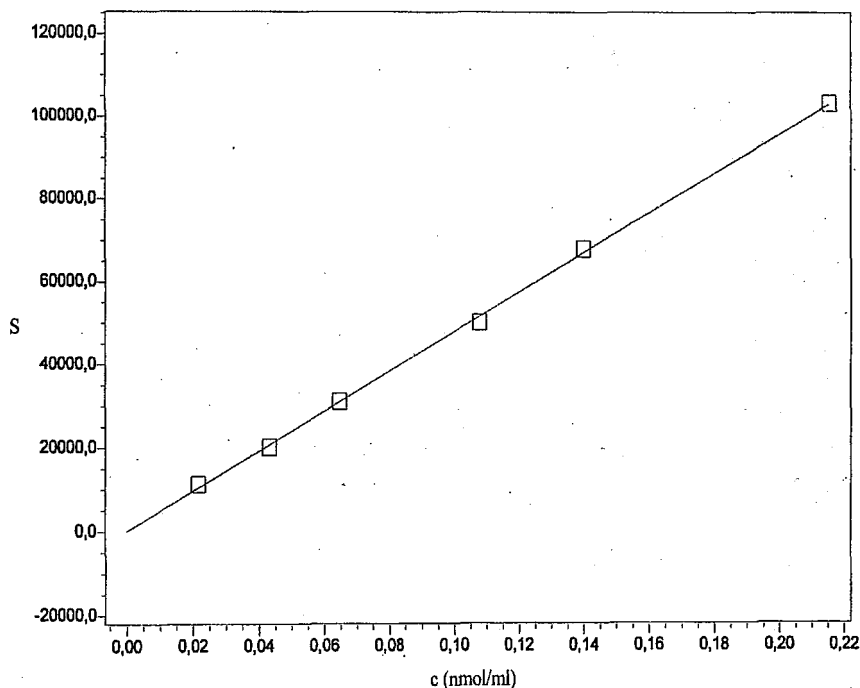
Kolona: Waters Symmetry C₁₈, 5 μm, 4,6 x 150 mm
Predkolona: Waters Symmetry C₁₈, 5 μm, 3,9 x 20 mm
Temperatura kolone: sobna temperatura
Temperatura vzorca: 20^o C
Mobilna faza: topilo A: metanol
topilo B: KH₂PO₄-pufer (pH = 6,9)
gradient, z začetnim razmerjem A : B = 35 % : 65 % (kot na Sliki 27 in v Tabeli 12)
Pretok mobilne faze: 1 ml/min
Volumen injiciranja: 50 μl
Absorbanca: 532 nm
Komponente: kompleks malondialdehid-tiobarbiturna kislina (MDA-TBK₂)



3.5.7 Umeritvena krivulja

Umeritvene krivulje smo pripravljali z redčenjem osnovnega TEP-standarda v različnih koncentracijskih območjih, od 0,08 nmol MDA/ml do 6,464 nmol MDA/ml, odvisno od koncentracij MDA v različnih vzorcih (seč, plazma). Koncentracija malondiladehida v plazmi in seču je bila izračunana iz umeritvene krivulje in v plazmi izražena kot nmol MDA/ml plazme, v seču pa kot nmol MDA/dan.

Primer umeritvene krivulje prikazuje Slika 29. Enačba regresijske premice in koeficient korelacije (r), ki vrednotita linearnost umeritvene krivulje, sta pokazala, da je bilo območje, v katerem so se predvidoma nahajale koncentracije MDA v vzorcih, res linearno.



Slika 29: Umeritvena krivulja za določanje MDA s pomočjo HPLC:
S = površina, c = koncentracija TEP standarda

Figure 29: Calibration curve for MDA determination with HPLC:
S = area, c = concentration of TEP standard

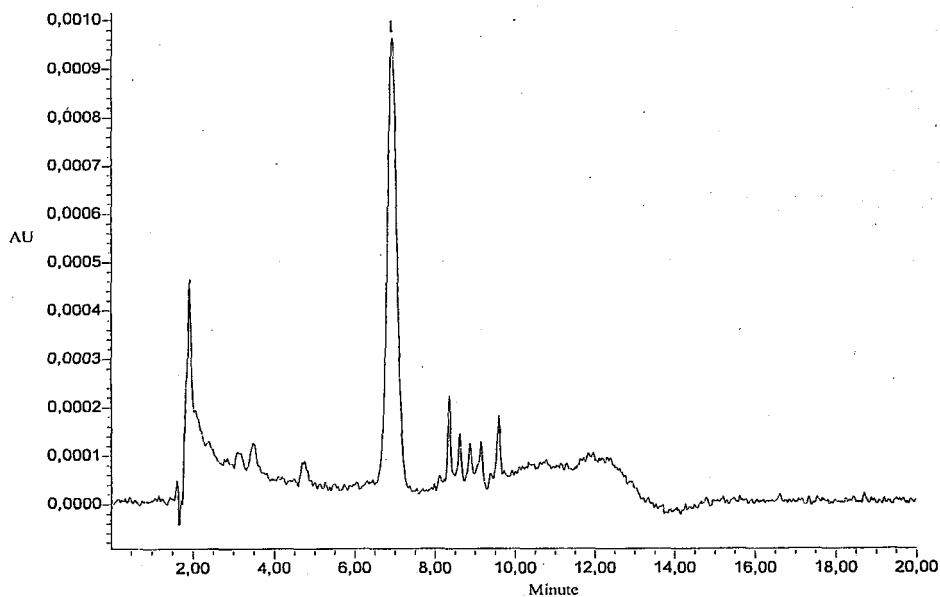
$$S = 15934 c + 151,34$$

$$r = 0,9996$$

...(36)

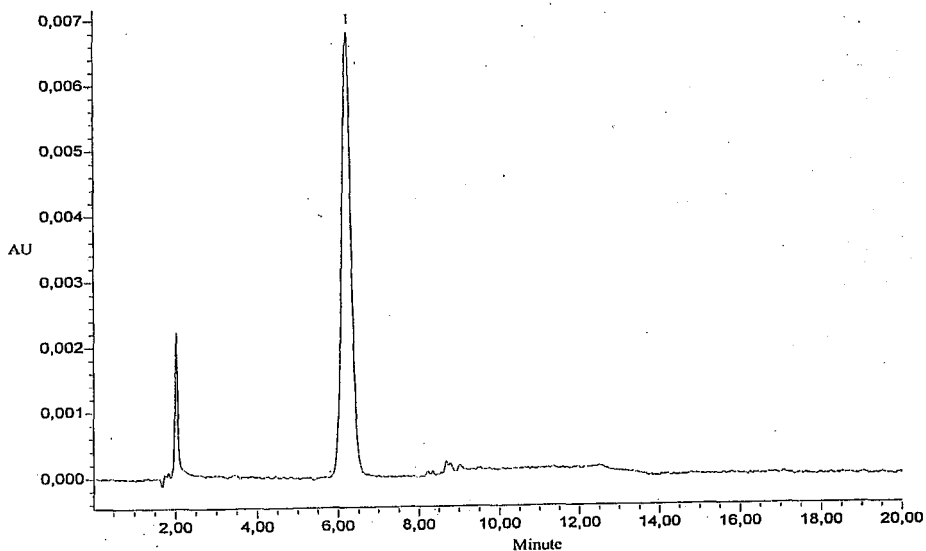
3.5.8 Kromatograma plazme in seča

Na Slikah 30 in 31 sta primera kromatogramov, kakršne smo dobili za plazmo in seč.



Slika 30: Kromatogram vzorca svinjske plazme: (1): kompleks MDA-TBK₂. Kromatografski pogoji: kot na Sliki 28.

Figure 30: Chromatogram of pig plasma: (1): MDA-TBK₂ adduct



Slika 31: Kromatogram vzorca svinjskega seča: (1): kompleks MDA-TBK₂. Kromatografski pogoji: kot na Sliki 28.

Figure 31: Chromatogram of pig urine: (1): MDA-TBK₂ adduct

3.5.7 Čiščenje kolone

Ob koncu dneva ali po približno 40 injiciranjih smo kolono očistili po sledečem postopku (TALON™, 1998):

1. 10 volumnov kolone (VK) vode MilliQ
2. 2 VK raztopine 6 M gvanidinijevega hidroklorida in 0,2 M raztopine očetne kisline
3. 20 VK vode MilliQ (Sistem moramo zares dobro sprati z vodo, ker je v naslednjem koraku uporabljen SDS, ki z gvanidinijevim hidrokloridom tvori oborino!)
4. 3 VK 2 % raztopina SDS
5. 1 VK 25 % raztopina etanola
6. 1 VK 50 % raztopina etanola
7. 1 VK 75 % raztopina etanola
8. 5 VK 100 % etanola
9. 1 VK 75 % raztopina etanola
10. 1 VK 50 % raztopina etanola
- 11.1 VK 25 % raztopina etanola
12. 1 VK vode MilliQ
13. 5 VK 100 mM EDTAK₂
14. 2 VK vode MilliQ
- 15.2 VK raztopine 6 M gvanidinijevega hidroklorida in 0,2 M raztopine očetne kisline
16. spiranje z vodo MilliQ (vsaj 20 VK)

Ob rednem čiščenju je bila kolona uporabna za 700 injiciranj.

3.6 STATISTIKA

Statistično ovrednotenje rezultatov smo opravili s pomočjo programskega paketa SAS (SAS/STAT, 1990) s proceduro GLM (General linear models) po statističnem modelu, v katerega smo vključili vpliv skupine, odvzema, skupine znotraj odvzema in ponovitve. Razlike med skupinami smo ocenili s pomočjo linearnih kontrastov.

MODELA:

$$y_{ijk} = \mu + S_i + O_j + S_i \cdot O_j + P_k + e_{ijk} \quad \dots(37)$$

y_{ijk} = opazovana vrednost

μ = srednja vrednost

S_i = vpliv i-te skupine ($i = 1, \dots, 5$)

O_j = vpliv j-tega odvzema ($j = 1, \dots, 5$)

$S_i \cdot O_j$ = interakcija med i-to skupino in j-tim odvzemom

P_k = vpliv k-tega poizkusa ($k = 2$)

e_{ijk} = ostanek

$$y_{ij} = \mu + \text{poizkus}_i + e_{ij} \quad \dots(38)$$

y_{ij} = opazovana vrednost

μ = srednja vrednost

e_{ij} = ostanek

Rezultate smo namesto s srednjimi vrednostmi podali z *ocenjenimi srednjimi vrednostmi* (LSM) \pm *standardnimi napakami* LSM (SE-LSM). S tem smo zmanjšali napako, ki je bila posledica neprimernosti posameznih vzorcev (npr.: izničili smo vpliv rahle hemolize na koncentracije MDA, ki je bila precej večja v hemolizirani kot v nehemolizirani plazmi).

4 REZULTATI

4.1 MALONDIALDEHID, DOLOČEN V PLAZMI IN SEČU

Ugotovljene koncentracije MDA v plazmi in njegove množine v seču so izračunane na podlagi treh ponovitev in predstavljajo njihovo srednjo vrednost. V seču smo najprej določili koncentracijo MDA v nmol/ml. Ker smo koncentracijo določili v seču, zbranim v 24 urah, smo jo lahko preračunali in izrazili kot množino MDA v nmol izločenega s sečem na dan, kar sicer ne bi bilo mogoče.

Zaradi premajhnega števila metabolnih kletk smo bili prisiljeni celoten poizkus izpeljati v dveh delnih poizkusih s po 12 prašiči. Na začetku prvega in drugega poizkusa, to je pri prvem odvzemu plazme in seča, je vsakih 12 prašičev predstavljajo eno skupino, ker so vsi dobivali enako krmo. Med seboj smo primerjali ocenjene srednje vrednosti koncentracij MDA v plazmi in seču teh dveh začetnih skupin. Ugotovili smo, da v plazmi pred začetkom krmljenja prašičev s poizkusnimi krminimi obroki ni bilo statistično značilnih razlik med živalmi prvega in drugega poizkusa. V prvem poizkusu smo analizirali le plazmo 9 prašičev, ker od treh zaradi hemolize ni bila primerna, medtem ko smo v drugem poizkusu analizirali plazmo 11 prašičev. V seču so se množine dnevno izločenega MDA statistično visoko značilno, s $P < 0,0001$, razlikovale med začetnima skupinama iz prvega in drugega poizkusa. V obeh skupinah smo analizirali seč vseh 12 prašičev (Tabela 13).

Tabela 13: Povprečni koncentraciji MDA v plazmi in seču prašičev prvega in drugega poizkusa, pred začetkom krmljenja s poskusnimi krmnimi obroki

Table 13: Average concentrations of MDA in plasma and daily urine of pigs from the first and the second experiment, before the start of feeding with experimental feed rations

TELESNA TEKOČINA	MDA (LSM \pm SE-LSM)		P-vrednost
	PRVI POIZKUS (n = št. živali)	DRUGI POIZKUS (n = št. živali)	
Plazma	0,470 ^a \pm 0,046 nmol/ml (n = 9)	0,473 ^a \pm 0,042 nmol/ml (n = 11)	P < 0,965
Seč	5.254 ^a \pm 380 nmol/24 ur (n = 12)	8.375 ^b \pm 380 nmol/24 ur (n = 12)	P < 0,0001

Različne črke pri plazmi oziroma seču pomenijo statistično značilne razlike med poizkusoma.

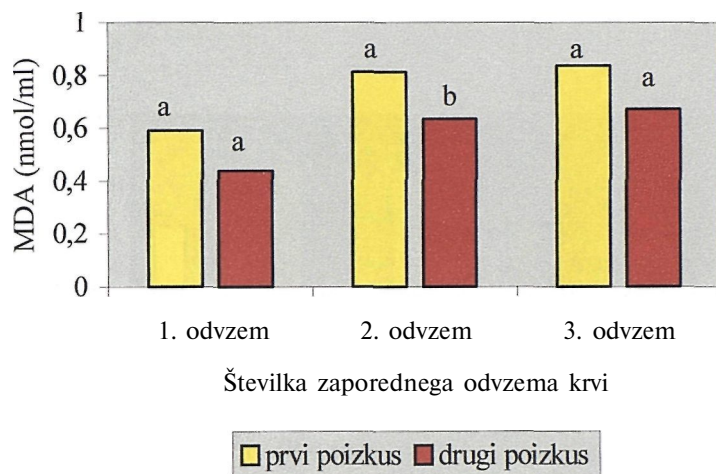
Zanimalo nas je tudi, če so bili pogoji za oba poizkusa enaki in sta poizkusa primerljiva. Zato smo v obeh poizkusih imeli enako krmljeno skupino, ki je dobivala k osnovnemu obroku po 85 g lanenega olja. V Tabelah 14 in 15 so prikazane primerjave rezultatov koncentracij MDA v plazmi in seču za skupini z dodatkom 85 g lanenega olja iz prvega in drugega poizkusa, glede na posamezne odvzeme krvi oziroma seča. Ugotovili smo, da se povprečni koncentraciji MDA v plazmi teh dveh skupin pri prvem odvzemu plazme, ko so prašiči dobivali običajno komercialno krmo kot na farmi, nista statistično značilno razlikovali. Po 14 dnevih uživanja krmnih obrokov z lanenim oljem se je pojavila med skupinama statistično značilna razlika ($P < 0,020$), ki je po treh tednih trajanja poizkusa izginila (Tabela 14, Slika 32). V seču v celotnem času trajanja poizkusa ni bilo statistično značilnih razlik med skupinama (Tabela 15, Slika 33).

Tabela 14: Primerjava koncentracij MDA v plazmi za skupini iz prvega in drugega poizkusa, ki sta dobivali k obrokom 85 g lanenega olja, ločeno po posameznih odvzemih krvi

Table 14: Comparison of MDA concentrations in plasma for groups of pigs from the first and the second experiment, both fed with 85 g flax seed oil added to basal feed rations. Concentrations in groups are presented by the consecutive numbers of blood collections.

ZAPOREDNI ODVZEM KRVI	MDA (LSM ± SE-LSM) (nmol/ml)		P-vrednost
	PRVI POIZKUS	DRUGI POIZKUS	
Prvi	0,590 ^a ± 0,110	0,439 ^a ± 0,090	P < 0,365
Drugi	0,812 ^a ± 0,040	0,635 ^b ± 0,040	P < 0,020
Tretji	0,836 ^a ± 0,074	0,671 ^a ± 0,086	P < 0,205

Različne črke znotraj posameznih zaporednih odvzemov pomenijo statistično značilne razlike med skupinama iz prvega in drugega poizkusa.



Slika 32: Primerjava koncentracij MDA v plazmi med skupinama iz prvega in drugega poizkusa, ki sta dobivali k obrokom 85 g lanenega olja. Primerjave so narejene za posamezne odvzeme krvi. Različne črke znotraj posameznih odvzemov pomenijo statistično značilne razlike med skupinama iz prvega in drugega poizkusa.

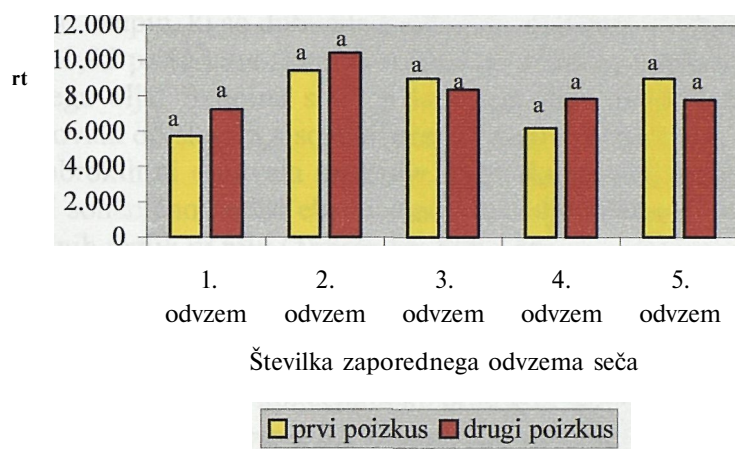
Figure 32: Comparison of the MDA concentration in plasma between groups of pigs from the first and the second experiment, both fed with 85 g flax seed oil added to basal feed rations. Concentrations in groups are presented by the consecutive numbers of blood collections. Different letters within the individual blood collection mean statistically significant differences between groups from the first and the second experiment.

Tabela 15: Primerjava množin MDA v dnevnem seču za skupini iz prvega in drugega poizkusa, ki sta dobivali k obrokom 85 g lanenega olja, ločeno po posameznih odvzemih seča

Table 15: Comparison of MDA in daily urine for groups of pigs from the first and the second experiment, both fed with 85 g flax seed oil added to basal feed rations. Results are presented regarding the consecutive number of urine collection.

ZAPOREDNI ODVZEM SEČA	MDA (LSM ± SE-LSM) (nmol/24 ur)		
	PRVI POIZKUS	DRUGI POIZKUS	P-vrednost
Prvi	5.969 ^a ± 661	7.231 ^a ± 661	P < 0,152
Drugi	9.434 ^a ± 1.008	10.426 ^a ± 1.008	P < 0,512
Tretji	8.975 ^a ± 1.404	8.353 ^a ± 1.404	P < 0,765
Četrti	6.188 ^a ± 1.082	7.840 ^a ± 937	P < 0,300
Peti	8.972 ^a ± 2.077	7.775 ^a ± 2.077	P < 0,698

Enake črke pri posameznih zaporednih odvzemih pomenijo, da med poizkusoma ni statistično značilnih razlik.



Slika 33: Primerjava množin MDA v dnevnem seču med skupinama s 85 g lanenega olja iz prvega in drugega poizkusa, ločenih po zaporednih odvzemih seča. Enake črke znotraj posameznih odvzemov pomenijo, da med skupinama iz prvega in drugega poizkusa ni bilo statistično značilnih razlik.

Figure 33: Comparison of MDA in daily urine for groups of pigs from the first and the second experiment, both fed with 85 g flax seed oil added to basal feed rations. Results are separated regarding the consecutive number of urine collection. Different letters within individual urine collection mean statistically significant differences between groups from the first and the second experiment.

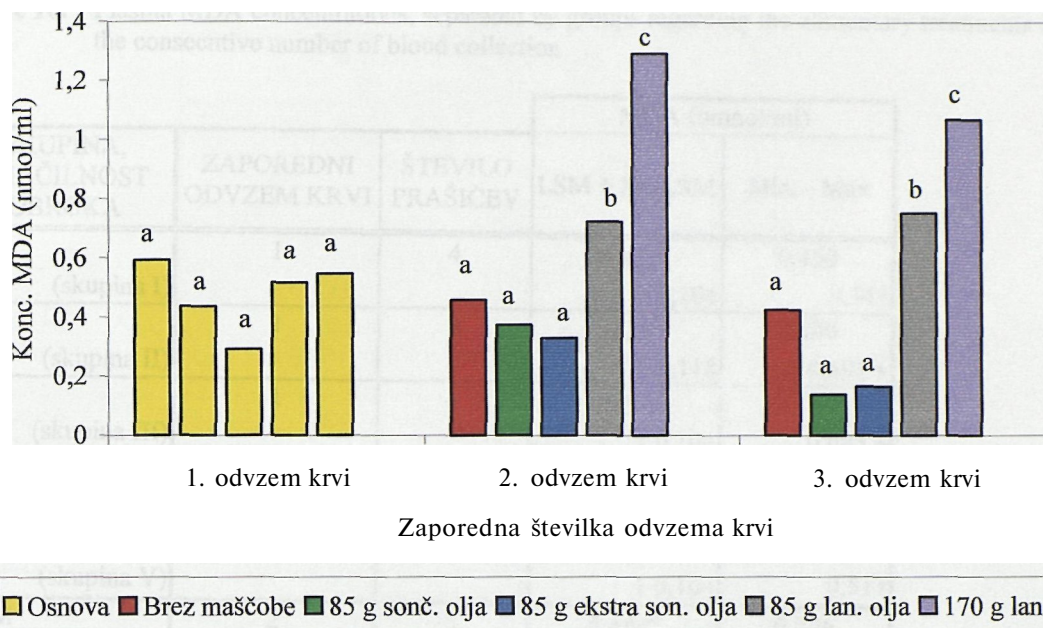
Nato smo želeli izvedeti, ali med skupinami, ki so dobivale različne krmne obroke, obstajajo razlike ali ne. Poleg tega smo ugotavljali še, če se je med poskusom spreminjala koncentracija MDA znotraj posameznih skupin. Prašiče smo zato pred prvim odvzemom krvi in seča tako v prvem kot drugem poizkusu razdelili po skupinah, glede na krmo, ki so jo v nadaljevanju dobivali, čeprav so na začetku zaradi enake krme predstavljali le eno skupino z 12 živalmi. Ker se je skupina, ki je imela v krmi 85 g lanenega olja, pojavila v prvem in drugem poizkusu, smo te rezultate združili v eno skupino, ki je tako vsebovala 8 prašičev, vse ostale pa so imele po 4 prašiče. Če je število prašičev kje manjše, je to, bodisi, zaradi neprimernosti vzorca za analizo ali zaradi pogina prašiča.

Med skupinami pri prvem odvzemu plazme ni bilo statistično značilnih razlik v koncentracijah MDA, kar smo zaradi enake kenne, s katero so bili prašiči krmljeni, rudi pričakovali (Tabela 16, Slika 34). Razlike med posameznimi živalmi sicer obstajajo, saj je bila najnižja izmerjena koncentracija MDA v plazmi 0,250 nmol/ml in največja 0,737 nmol/ml. Slednja je pripadala rahlo hemolizirani plazmi. Če pogledamo le nehemolizirano plazmo, je bila največja koncentracija 0,544 nmol/ml.

Drugi odvzem krvi je bil opravljen 14 dni po začetku krmljenja prašičev s posebnimi krmnimi obroki. Povprečna koncentracija MDA v plazmi skupine prašičev, ki so z obroki dobivali po 170 g lanenega olja, se je statistično značilno, s $P < 0,0001$, razlikovala od ostalih štirih skupin (Tabela 16, Slika 34). Statistično značilno, vendar s $P < 0,01$, se je razlikovala skupina prašičev, krmljenih s 85 g lanenega olja, od skupin, ki so dobivale sončnično oziroma ekstra sončnično olje. Zanimivo je, da sta se skupini s 85 g lanenega olja in tista, ki maščobe ni dobivala, razlikovali statistično značilno le s $P < 0,05$. Med skupinami, krmljenimi z obroki brez olja, s sončničnim oziroma ekstra sončničnim oljem, statistično značilnih razlik ni bilo (Tabela 16, Slika 34).

Po 21 dnevih poskusa smo tretjič odvzeli vzorce krvi. Enako kot po 14 dnevih se je statistično značilno ($P < 0,0001$) razlikovala plazma prašičev, krmljenih s 170 g lanenega olja, od skupin, ki so dobivale sončnično ali ekstra sončnično olje in obroke brez maščobe. S $P < 0,05$ pa se je ta skupina statistično značilno razlikovala od skupine, krmljene s 85 g lanenega olja. Skupina s 85 g lanenega olja se je statistično značilno, s $P < 0,0001$, razlikovala od skupin s sončničnim in ekstra sončničnim oljem ter s $P < 0,05$ od skupine, ki v obrokih ni dobivala maščobe. Med skupinami, krmljenimi z obroki, ki so vsebovali bodisi sončnično bodisi ekstra sončnično olje oziroma maščoba ni bila dodana, statistično značilnih razlik ni bilo (Tabela 16, Slika 34).

Kako so se spreminjale koncentracije MDA v plazmi znotraj posameznih skupin med poizkusom, prikazujeta Tabela 17 in Slika 35. V skupini prašičev, ki v obrokih niso dobivali maščobe, se koncentracije produkta niso statistično značilno spremenile. Videnje le rahel padec, in sicer z 0,592 nmol/ml na 0,425 nmol/ml, če primerjamo koncentracije pred pričetkom in po treh tednih poskusa. V skupini s sončničnim oljem je bila statistično značilna razlika ($P < 0,05$) med odvzemoma pred poskusom in na koncu poskusa, medtem ko statistično značilnega znižanja koncentracij MDA po 14 dnevih še ni bilo. V skupini z ekstra sončničnim oljem je bil pri tretjem odvzemu opazen padec v koncentraciji MDA, ki pa ni bil statistično značilen. V skupini s 85 g lanenega olja sta se statistično značilno ($P < 0,05$) razlikovali koncentraciji prvega in tretjega odvzema krvi. Že pri drugem odvzemu (po 14 dnevih poskusa) je bila koncentracija MDA v plazmi povečana in se je do tretjega odvzema le še rahlo zvečala. Koncentracija MDA v plazmi prašičev, ki so dobivali po 170 g lanenega olja v obroke, je bila po 14 dnevih poskusa precej povečana in se je statistično značilno, s $P < 0,0001$, razlikovala od koncentracije pred poskusom, vendar pa se je v tretjem tednu poskusa že začela zniževati. V tej skupini med drugim in tretjim odvzemom krvi ni bilo statistično značilnih razlik (Tabela 17, Slika 35).



Slika 34: Spreminjanje koncentracij MDA v plazmi med skupinami v času poizkusa, znotraj posameznih odvzemov krvi. Različne črke nad stolpci znotraj posameznih odvzemov krvi pomenijo statistično značilne razlike med skupinami, s $P < 0,05$

Figure 34: Comparison of plasma MDA concentration between groups within individual consecutive blood collection during the experiment. Different letters within individual blood collection mean statistically significant differences between groups ($P < 0.05$)

Koncentracije MDA v plazmi, ločeno po skupinah, glede na wsto krmnega obroka in zaporedno številko odvzema krvi

Plasma MDA concentrations, separated by groups regarding the alimentary treatments ratio and the consecutive number of blood collection

SKUPINA, ZNAČILNOST OBROKA	ZAPOREDNI ODVZEM KRVVI	ŠTEVILO PRAŠIČEV	MDA (nmol/ml)	
			LSM ± SE-LSM	Min. - Max
PKK (skupina I)	1	4	0,592 ^a ± 0,104	0,450 0,544
PKK (skupina II)	1	3	0,436 ^a ± 0,118	0,430 0,691 *
PKK (skupina III)	1	4	0,291 ^a ± 0,104	0,250 0,685 *
PKK (skupina IV)	1	5	0,516 ^a ± 0,085	0,305 0,737 *
PKK (skupina V)	1	4	0,546 ^a ± 0,104	0,415 0,517
BDM (skupina I)	2	3	0,458 ^a ± 0,119	0,296 0,448
85 g DSO (skupina II)	2	4	0,374 ^a ± 0,104	0,391 0,555
85 g DESO (skupina III)	2	4	0,330 ^a ± 0,104	0,321 0,461
85 g DLO (skupina IV)	2	8	0,723 ^b ± 0,067	0,589 0,940
170 g DLO (skupina V)	2	4	1,293 ^c ± 0,104	0,911 2,014
BDM (skupina I)	3	3	0,425 ^a ± 0,118	0,292 0,496
85 g DSO (skupina II)	3	4	0,139 ^a ± 0,104	0,188 0,262
85 g DESO (skupina III)	3	4	0,166 ^a ± 0,104	0,172 0,354 **
85 g DLO (skupina IV)	3	7	0,753 ^b ± 0,072	0,593 1,073
170 g DLO (skupina V)	3	4	1,070 ^c ± 0,104	0,739 1,471

Ocenjene srednje vrednosti skupiu, ki so znotraj istega odvzema označene z različnimi črkami, se statistično značilno razlikujejo najmanj s $P < 0,05$.

* maksimalne vrednosti pripadajo rahlo hemolizirani plazmi

LSM: ocenjena srednja vrednost

SE: standardna napaka

- PKK: predposkusna komercialna krma (kot na farmi)
- BDM: krmni obrok brez dodatka maščobe
- 85 g DSO: krmni obrok z dodatkom 85 g sončničnega olja
- 85 g DESO: krmni obrok z dodatkom 85 g ekstra sončničnega olja
- 85 g DLO: krmni obrok z dodatkom 85 g lanenega olja
- 170 g DLO: krmni obrok z dodatkom 170 g lanenega olja

Tabela 17: Spreminjanje koncentracij MDA v plazmi znotraj skupin v času poizkusa
Table 17: Change in MDA concentrations in plasma within groups during the experiment

	MDA (LSM ± SE-LSM) (nmol/ml)		
	1. odvzem krvi	2. odvzem krvi	3. odvzem krvi
Skupina I (BDM)	0,592 ^a ± 0,104	0,458 ^a ± 0,119	0,425 ^a ± 0,118
Skupina II (85 g DSO)	0,436 ^a ± 0,118	0,374 ^{ab} ± 0,104	0,139 ^b ± 0,104
Skupina III (85 g DESO)	0,291 ^a ± 0,104	0,330 ^a ± 0,104	0,166 ^a ± 0,104
Skupina IV (85 g DLO)	0,516 ^a ± 0,085	0,723 ^{ab} ± 0,067	0,753 ^b ± 0,072
Skupina V (170 g DLO)	0,546 ^a ± 0,104	1,293 ^b ± 0,104	1,070 ^b ± 0,104

Ocenjene srednje vrednosti, ki so znotraj iste skupine označene z različnimi črkami, se statistično značilno razlikujejo najmanj s $P < 0,05$.

Legenda:

LSM: ocenjena srednja vrednost

SE-LSM: standardna napaka

Skupina I: 1. odvzem: predposkusna komercialna krma (kot na farmi)

2. in 3. odvzem: obrok brez dodatka maščobe (BDM)

Skupina II: 1. odvzem: predposkusna komercialna krma (kot na farmi)

2. in 3. odvzem: obrok z dodatkom 85 g sončničnega olja (DSO)

Skupina III: 1. odvzem: predposkusna komercialna krma (kot na farmi)

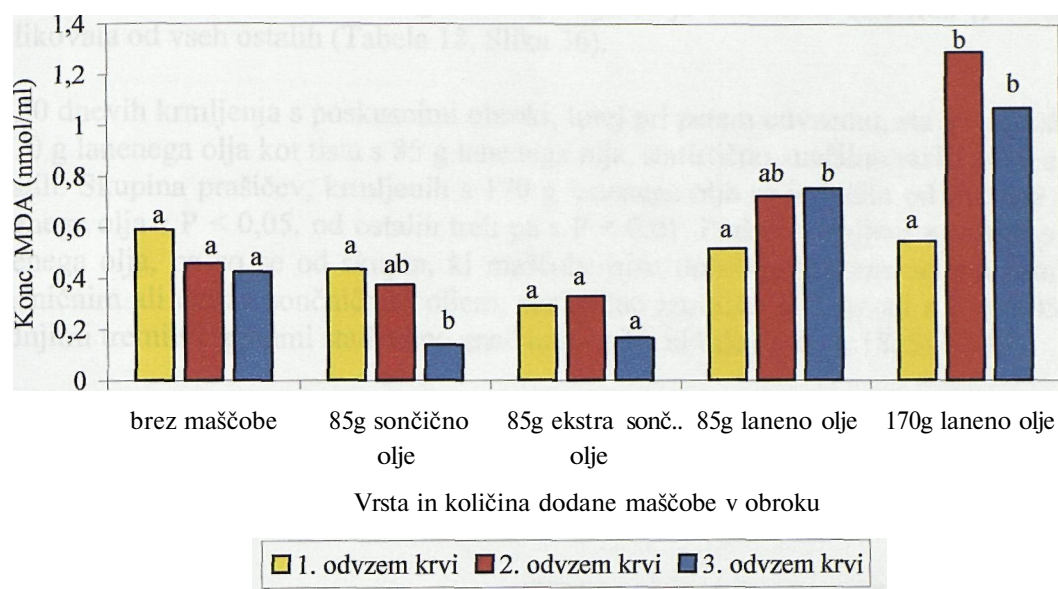
2. in 3. odvzem: obrok z dodatkom 85 g ekstra sončničnega olja (DESO)

Skupina IV: 1. odvzem: predposkusna komercialna krma (kot na farmi)

2. in 3. odvzem: obrok z dodatkom 85 g lanenega olja (DLO)

Skupina V: 1. odvzem: predposkusna komercialna krma (kot na farmi)

2. in 3. odvzem: obrok z dodatkom 170 g lanenega olja (DLO)



Slika 35: Vpliv vrste in količine dodane maščobe v obroku na koncentracije MDA v plazmi prašičev. Različne črke nad stolpci znotraj posameznih skupin pomenijo statistično značilne razlike med zaporednimi odvzemi krvi, s $P < 0,05$.

Figure 35: Change in MDA concentrations in plasma within groups, separated by the quantity and types of oil added to basal feed rations. Different letters within individual groups mean statistically significant differences between the consecutive number of blood collection ($P < 0.05$).

Pri prvem odvzemu seča, ko so imeli prašiči še enako krmo, so bile razlike v množini dnevno izločenega MDA med vnaprej določenimi skupinami živali precej velike, vendar ne statistično značilne (Tabela 18, Slika 36). Tako je bila najnižja množina MDA pri prašiču, ki ga je s sečem izločil 3.071 nmol/24 ur in najvišja pri prašiču z 11.086 nmol/24 ur.

Pri drugem odvzemu seča (prašiči so 5-krat dobili poskusne obroke) se je skupina, ki je k obrokom dobivala 170 g lanenega olja, že statistično značilno, s $P < 0,0001$, razlikovala od vseh ostalih skupin. Množina MDA v seču prašičev iz skupine s 85 g lanenega olja je bila statistično značilno večja od skupine brez maščobe ($P < 0,05$) in skupine z ekstra sončničnim oljem ($P < 0,05$), medtem ko se od skupine s sončničnim oljem ni razlikovala. Prav tako pri drugem odvzemu ni bilo statistično značilnih razlik med skupinami z obroki brez maščobe, s sončničnim in ekstra sončničnim oljem (Tabela 18, Slika 36).

Statistične razlike so bile pri tretjem odvzemu (12-krat so dobili poskusne obroke) identične drugemu odvzemu seča, z eno razliko: pri drugem odvzemu se statistično značilno nista ločili skupini s 85 g lanenega olja in 85 g sončničnega olja, pri tretjem odvzemu pa ni bilo statistično značilne razlike med skupinama s 85 g lanenega olja in 85 g ekstra sončničnega olja (Tabela 18, Slika 36).

Pri četrtem odvzemu seča (prašiči so eksperimentalne obroke dobili 15-krat) se skupine brez dodatka maščobe, s 85 g sončničnega oziroma ekstra sončničnega olja ter skupina s 85 g lanenega olja niso statistično značilno razlikovale med seboj. Za prve tri skupine to ni neobičajno, medtem ko smo pričakovali, da bo skupina s 85 g lanenega olja različna od

njih. Le skupina prašičev s 170 g lanenega olja se je statistično značilno ($P < 0,0001$) razlikovala od vseh ostalih (Tabela 18, Slika 36).

Po 20 dnevih krmljenja s poskusnimi obroki, torej pri petem odvzemu, sta se tako skupina s 170 g lanenega olja kot tista s 85 g lanenega olja, statistično značilno razlikovali od vseh ostalih. Skupina prašičev, krmljenih s 170 g lanenega olja se je ločila od skupine s 85 g lanenega olja s $P < 0,05$, od ostalih treh pa s $P < 0,01$. Prašiči, krmljeni z obroki po 85 g lanenega olja, pa so se od skupin, ki maščobe niso dobivali oziroma so bili krmljeni s sončničnim ali ekstra sončničnim oljem, statistično značilno razlikovali s $P < 0,05$. Med slednjimi tremi skupinami statistično značilnih razlik ni bilo (Tabela 18, Slika 36).

Tabela 18: Množina MDA, dnevno izločenega s sečem, ločeno po skupinah, glede na vrsto krmnega obroka in zaporedno številko odvzema seča

Table 18: MDA excreted in the daily urine, presented by groups regarding the type of feed ration and the consecutive number of urine collection

SKUPINA, ZNAČILNOST OBROKA	ZAPOREDNI ODVZEM SEČA	ŠTEVILO PRAŠIČEV	MDA (nmol/24 ur)	
			LSM \pm SE-LSM	Min. – Max.
PKK (skupina I)	1	4	8.716 ^a ± 1.990	7.556 10.038
PKK (skupina II)	1	4	4.826 ^a ± 1.990	3.071 5.303
PKK (skupina III)	1	4	5.677 ^a ± 1.990	4.827 6.080
PKK (skupina IV)	1	8	6.463 ^a ± 1.340	4.723 9.151
PKK (skupina V)	1	4	8.740 ^a ± 1.990	6.866 11.086
BDM (skupina I)	2	4	3.327 ^a ± 1.990	2.553 4.048
85 g DSO (skupina II)	2	4	5.989 ^{ab} ± 1.990	5.074 6.628
85 g DESO (skupina III)	2	4	4.937 ^a ± 1.990	4.017 6.148
85 g DLO (skupina IV)	2	8	9.929 ^b ± 1.340	7.442 12.770
170 g DLO (skupina V)	2	4	24.819 ^c ± 1.990	12.237 39882

Ocenjene srednje vrednosti skupin, ki so znotraj istega odvzema označene z različnimi črkami, se statistično značilno razlikujejo najmanj s $P < 0,05$.

- LSM: ocenjena srednja vrednost
- SE: standardna napaka
- PKK: predposkusna komercialna krma (kot na farmi)
- BDM: krmni obrok brez dodatka maščobe
- 85 g DSO: krmni obrok z dodatkom 85 g sončničnega olja
- 85 g DESO: krmni obrok z dodatkom 85 g ekstra sončničnega olja
- 85 g DLO: krmni obrok z dodatkom 85 g lanenega olja
- 170 g DLO: krmni obrok z dodatkom 170 g lanenega olja

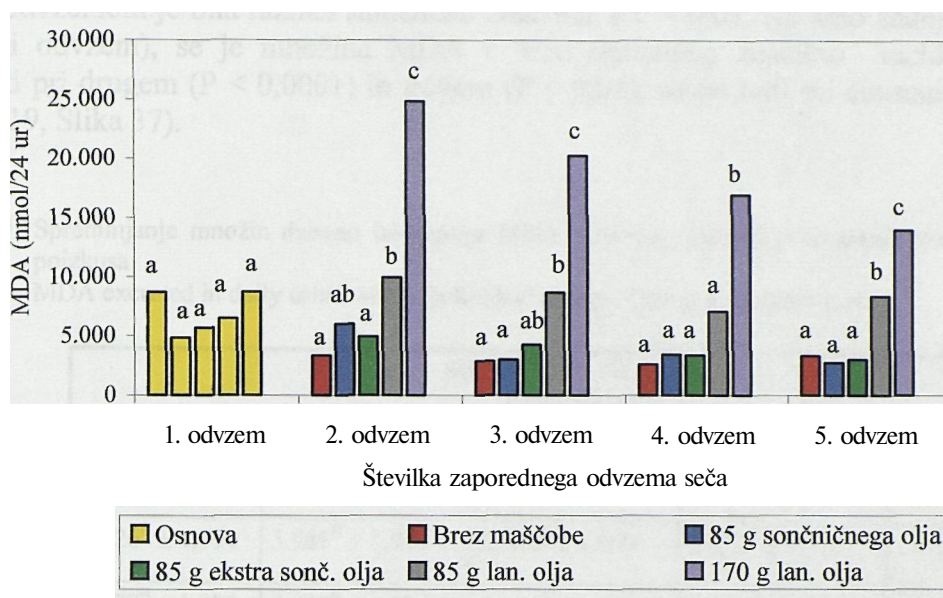
Tabela 18: Nadaljevanje

Table 18: Continuation

SKUPINA, ZNAČILNOST OBROKA	ZAPOREDNI ODVZEM SEČA	ŠTEVILO PRAŠIČEV	MDA (nmol/24 ur)	
			LSM ± SE-LSM	Min – Max
BDM (skupina I)	3	3	2.871 ^a ± 2.271	2.896 3.272
85 g DSO (skupina II)	3	4	2.986 ^a ± 1.990	1.163 3.866
85 g DESO (skupina III)	3	4	4.233 ^{ab}	3.143
85 g DLO (skupina IV)	3	8	8.664 ^b ± 1.340	6.332 14.501
170 g DLO (skupina V)	3	4	20.249 ^c ± 1.990	11.400 34.200
BDM (skupina I)	4	3	2.587 ^a ± 2.271	2.369 3.112
85 g DSO (skupina II)	4	4	3.432 ^a ± 1.990	2.740 3.651
85 g DESO (skupina III)	4	4	3.360 ^a ± 1.990	2.617 3.905
85 g DLO (skupina IV)	4	7	7.100 ^a ± 1.435	5.560 11.066
170 g DLO (skupina V)	4	4	16.937 ^b ± 1.990	10.528 24.830
BDM (skupina I)	5	3	3.318 ^a ± 2.271	3.235 4.039
85 g DSO (skupina II)	5	4	2.736 ^a ± 1.990	2.318 2.792
85 g DESO (skupina III)	5	4	3.015 ^a ± 1.990	2.371 3.739
85 g DLO (skupina IV)	5	8	8.373 ^b ± 1.340	4.603 17.243
170 g DLO (skupina V)	5	4	13.950 ^c ± 1.990	7.098 23.901

Ocenjene srednje vrednosti skupin, ki so znotraj istega odvzema označene z različnimi črkami, se statistično značilno razlikujejo najmanj s $P < 0,05$.

- LSM: ocenjena srednja vrednost
- SE: standardna napaka
- BDM: krmni obrok brez dodatka maščobe
- 85 g DSO: krmni obrok z dodatkom 85 g sončničnega olja
- 85 g DESO: krmni obrok z dodatkom 85 g ekstra sončničnega olja
- 85 g DLO: krmni obrok z dodatkom 85 g lanenega olja
- 170 g DLO: krmni obrok z dodatkom 170 g lanenega olja



Slika 36: Spreminjanje koncentracij MDA v seču med skupinami v času poizkusa, glede na zaporedno številko odvzema seča. Različne črke nad stolpci znotraj posameznih odvzemov pomenijo statistično značilne razlike med skupinami, s $P < 0,05$.

Figure 36: Comparison of MDA excreted in daily urine between groups within the consecutive urine collection during the experiment. Different letters within individual urine collection mean statistically significant differences between groups ($P < 0.05$).

Tabela 19 in Slika 37 prikazujeta, kako so se med poizkusom spreminjale množine MDA dnevno izločenega s sečem, v posamezni skupini. V skupini prašičev, ki so dobivali krmo brez dodatka maščobe, se je množina MDA že po petih dnevih statistično značilno ($P < 0,05$) znižala z 8.716 nmol/24 ur na 3.327 nmol/24 ur. Tako znižana je ostala bolj ali manj do zadnjega, petega odvzema, po 20 dnevih. Rezultati tega odvzema se niso statistično značilno razlikovali od predhodnih odvzemov, niti od prvega. Izračunana P-vrednost med prvim in petim odvzemom je bila namreč 0,065.

Znotraj skupin, krmljenih s sončničnim oziroma ekstra sončničnim oljem, med poskusom nismo dobili statistično značilnih razlik. V obeh skupinah pa je bil zaznan trend padanja množin MDA (Tabela 19, Slika 37).

V skupini, krmljeni z obroki, ki so vsebovali po 85 g lanenega olja, statistično značilnih razlik med odvzemi ni bilo. Pri drugem odvzemu je bila koncentracija kompleksa največja, nakar se je nekoliko znižala (Tabela 19, Slika 37).

Pred začetkom krmljenja prašičev z obroki po 170 g lanenega olja, torej pri prvem odvzemu seča, je bila ocenjena srednja vrednost množine MDA v seču 8.741 nmol/24 ur. Vrednost tega odvzema se je statistično značilno razlikovala od vrednosti vseh nadaljnjih odvzemov, in sicer s $P < 0,0001$ od drugega in tretjega odvzema ter s $P < 0,05$ od četrtega in petega odvzema. Po petih dnevih krmljenja z novo krmo (drugi odvzem) se je množina MDA v seču povečala za skoraj 3-krat, na 24.819 nmol/24 ur, nakar se je začela zniževati. Med drugim in tretjim odvzemom (12-krat poskusna krma) ni bilo statistično značilnih razlik. Trend padanja množin izločenega MDA se je nadaljeval pri četrtem (15-krat so dobili poseben obrok) in petem (20-krat poskusni obrok) odvzemu seča. Med drugim in

četrtem odvzemom je bila razlika statistično značilna, s $P < 0,01$. Ko smo zadnjič odvzeli seč (peti odvzem), se je množina MDA v seču statistično značilno razlikovala od vrednosti pri drugem ($P < 0,0001$) in tretjem ($P < 0,05$), ne pa tudi pri četrtem odvzemu (Tabela 19, Slika37).

Tabela 19: Spreminjanje množin dnevno izločenega MDA s sečem, znotraj posameznih skupin v času poizkusa

Table 19: MDA excreted in daily urine within individual groups, during the experiment

	MDA (LSM \pm SE-LSM) (nmol/24 ur)				
	1. odvzem seča	2. odvzem seča	3. odvzem seča	4. odvzem seča	5. odvzem seča
Skupina I (BDM)	8.716 ^a \pm 1.990	3.327 ^b \pm 1.990	2.871 ^b \pm 2.271	2.587 ^b \pm 2.271	3.318 ^{ab} \pm 2.271
Skupina II (85 g DSO)	4.826 ^a \pm 1.990	5.989 ^a \pm 1.990	2.986 ^a \pm 1.990	3.432 ^a \pm 1.990	2.736 ^a \pm 1.990
Skupina III (85 g DESO)	5.677 ^a \pm 1.990	4.937 ^a \pm 1.990	4.233 ^a \pm 1.990	3.360 ^a \pm 1.990	3.015 ^a \pm 1.990
Skupina IV (85 g DLO)	6.463 ^a \pm 1.340	9.929 ^a \pm 1.340	8.664 ^a \pm 1.340	7.100 ^a \pm 1.435	8.373 ^a \pm 1.340
Skupina V (170 g DLO)	8.741 ^a \pm 1.990	24.819 ^b \pm 1.990	20.249 ^{bc} \pm 1.990	16.937 ^{cd} \pm 1.990	13.950 ^d \pm 1.990

Ocenjene srednje vrednosti, ki so znotraj iste skupine označene z različnimi črkami, se statistično značilno razlikujejo najmanj s $P < 0,05$.

Legenda:

LSM: ocenjena srednja vrednost

SE-LSM: standardna napaka

Skupina I: 1. odvzem: predposkusna komercialna krma (kot na farmi)

2. do 5. odvzem: obrok brez dodatka maščobe (BDM)

Skupina II: 1. odvzem: predposkusna komercialna krma (kot na farmi)

2. do 5. odvzem: obrok z dodatkom 85 g sončničnega olja (DSO)

Skupina III: 1. odvzem: predposkusna komercialna krma (kot na farmi)

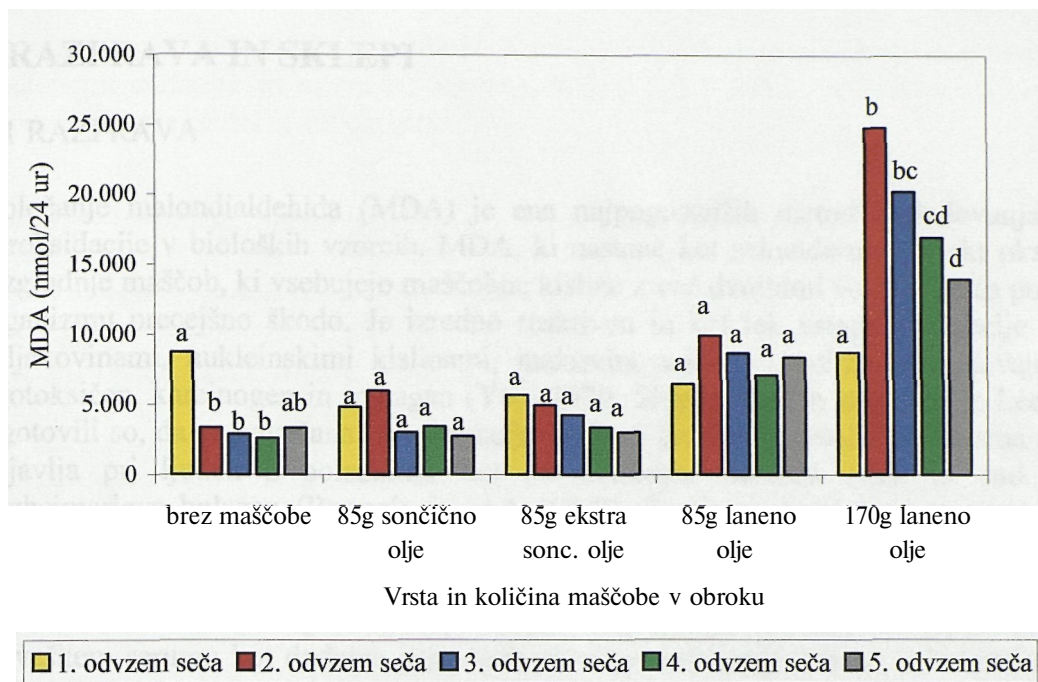
2. do 5. odvzem: obrok z dodatkom 85 g ekstra sončničnega olja (DESO)

Skupina IV: 1. odvzem: predposkusna komercialna krma (kot na farmi)

2. do 5. odvzem: obrok z dodatkom 85 g lanenega olja (DLO)

Skupina V: 1. odvzem: predposkusna komercialna krma (kot na farmi)

2. do 5. odvzem: obrok z dodatkom 170 g lanenega olja (DLO)



Slika 37: Spreminjanje množin MDA, dnevno izločenega s sečem, med poizkusom, glede na vrsto in količino dodane maščobe v obroku. Različne črke nad stolpci znotraj posameznih skupin pomenijo statistično značilne razlike med zaporednimi odvzemi seča, s $P < 0,05$

Figure 37: Change in MDA excreted in daily urine within groups, different in quantity and types of oil added to basal feed rations. Different letters within individual group mean statistically significant differences between consecutive number of urine collection ($P < 0,05$)

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Določanje malondialdehida (MDA) je ena najpogostejših metod zasledovanja lipidne peroksidacije v bioloških vzorcih. MDA, ki nastane kot sekundarni produkt oksidativne razgradnje maščob, ki vsebujejo maščobne kisline z več dvojnimi vezmi, lahko povzroči v organizmu precejšno škodo. Je izredno reaktiven in kot tak vstopa v reakcije z lipidi, beljakovinami, nukleinskimi kislinami, inaktivira nekatere encime. Domnevajo, da je citotoksičen, karcinogen in mutagen (Yau, 1979; Shamberger in sod., 1974; Lee, 1980). Ugotovili so, da se povečana koncentracija MDA v plazmi in množina, izločena s sečem, pojavlja pri ljudeh z boleznimi, kot so sladkorna bolezen (Jain in sod., 1999), Alzheimerjeva bolezen (Bermejo in sod., 1997), Downov sindrom (Jovanovič in sod., 1998), rak (Huang in sod., 1999), ter pri različnih bolezenskih stanjih: presaditvah organov (Rabi in sod., 1992), hudih opeklinah (Guichardant in sod., 1994). Na Japonskem so že leta 1968 začeli Yagi in njegovi sodelavci uporabljati merjenje koncentracij MDA v človeškem serumu kot dodaten parameter za diagnosticiranje nekaterih bolezni (Yagi in sod., 1968). Metoda za določanje MDA takrat še ni bila tako izpopolnjena in natančna, kot so današnje, vendar je že takrat temeljila na reakciji derivatizacije MDA s tiobarbiturno kislino.

V metodi, ki smo jo uporabili za naš poskus, smo namesto seruma uporabili plazmo, s čemer smo se izognili sproščanju lipoperoksidov iz trombocitov med koagulacijo krvi. Kri smo zbirali v vakuete, ki so vsebovale antikoagulant EDTAK3. Če smo po centrifugiranju dobili vzorce z močno hemolizo, smo jih zavrgli, ker Wong in sodelavci (1987) navajajo, da se je ob dodatku hemolizata eritrocitov k plazmi povečala koncentracija lipoperoksidov za 2- do 4-krat. Na pojav same hemolize imajo bistven vpliv pogoji centrifugiranja in vrsta krvi (prašičja, piščančja, kunčja, človeška). Kri prašičev je pri tako visokih hitrostih centrifugiranja, kot jih navaja literatura (glej Tabelo 2), hitro hemolizirala. Zato smo spremenili pogoje centrifugiranja (400 g, 10 minut, 4° C).

Ker smo uporabili HPLC-tehniko za ločevanje kompleksa MDA-TBK₂ od ostalih komponent v vzorcu, smo bistveno povečali specifičnost določitve. Če bi določali barvni kompleks spektrofotometrično, tako kot so ga nekoč, bi dobili nerealno visoke koncentracije malondialdehida, saj vrsta spojin reagira s TBK in absorbira svetlobo v valovnem območju, značilnem za kompleks MDA-TBK₂. S HPLC pa so te moteče substance odstranjene. Ker smo namesto izokratske uporabili gradientno tehniko, smo podaljšali življenjsko dobo kolone, saj smo omogočili različnim snovem, ki so se vezale na stacionarno fazo, da so se z nje ponovno sprale. Poleg tega smo po približno 60 injiciranih vzorcih kolono spirali na način, kot je opisan v materialih in metodah pod točko 3.5.7. Tako je bila kolona uporabna za približno 700 injiciranj, kar je dvakrat več, kot če bi jo po vsakem sklopu injiciranih vzorcev spirali le z mešanico metanola in vode (80 : 20), kot je to delala Chiricova (1994).

Za uporabljeno metodo smo preverili točnost in natančnost. Za ugotavljanje točnosti metode potrebujemo standardni referenčni material. Ker ga za primer določanja malondialdehida ni na tržišču, smo točnost metode preverili s pomočjo standardnega dodatka, kot to najdemo v literaturi (Templar in sod., 1999; Richard in sod., 1992b). V plazmo smo dodali od 0 do 2 nmol MDA/ml in po derivatizaciji s TBK ugotovili, da je bil

izkoristek reakcije med 90 % in 104 %. Natančnosti uporabljene metode smo ovrednotili s koeficienti variacije, ki so znašali med 3,4 % in 7,9 %, odvisno od koncentracije MDA v vzorcih plazme in seča (Tabela 20).

Tabela 20: Natančnost znotraj analize za vzorce plazme z različnimi koncentracijami MDA
 Tablic 20: Within run precision on plasma MDA concentrations from four different pools

Vzorec	Konc. MDA ($\bar{x} \pm SD$) (nmol/ml)	RSD (%)	n
A	0,324 ± 0,03	7,9	6
B	0,510 ± 0,04	7,2	5
C	0,803 ± 0,03	3,4	5
D	1,218 ± 0,05	4,2	5

\bar{x} : aritmetična sredina

SD: standardni odklon

RSD: relativni standardni odklon ali koeficient variacije

n: število vzorednih določitev istega vzorca

Ker za določanje malondialdehida ni predpisa, ki bi določal največje dovoljeno odstopanje med vzorednimi določitvami (paralelkami), smo našo točnost primerjali z rezultati, kakršne so dobili drugi raziskovalci. Za podobna koncentracijska območja so dobili koeficiente variacije med 3,2 % in 12% (Tabela 21). Natančnost naše metode je torej primerljiva z natančnostjo meritev drugih avtorjev.

Tabela 21: Natančnost znotraj analize pri treh vzorcih plazme z različnimi koncentracijami MDA
 Table 21: Within run precision of MDA analysis in plasma using three MDA concentrations

	Richard in sod. (1992a)	Templar in sod. (1997)
	n = 10	n = 10
Konc. MDA ($\bar{x} \pm SD$) (nmol/ml)	NIZKA: 0,46 ± 0,028 SREDNJA: 0,96 ± 0,12 VISOKA: 2,16 ± 0,26	NIZKA: 0,369 ± 0,013 SREDNJA: 0,710 ± 0,030 VISOKA: 0,874 ± 0,028
RSD (%)	NIZKA: 6 SREDNJA: 10 VISOKA: 12	NIZKA: 3,5 SREDNJA: 4,2 VISOKA: 3,2

\bar{x} : aritmetična sredina

SD: standardni odklon

RSD: relativni standardni odklon ali koeficient variacije

n: število vzorednih določitev istega vzorca

Glavni namen našega dela je bil ugotoviti, ali vrsta in količina zaužite maščobe vpliva na oksidativno obremenitev organizma. To pomeni, če se z zaužitjem maščobe, ki vsebuje večkrat nenasičene maščobne kisline, resnično poveča lipidna peroksidacija v organizmu, odraz česar je povečana koncentracija MDA v plazmi ter njegova dnevno izločena količina s sečem. Poskusne živali so bili prašiči, ki smo jih uporabili kot model, zaradi podobnosti presnovnih procesov s človeškimi. Med seboj smo zato primerjali olja z različno maščobnokislinsko sestavo, saj je ta bistvena za proces lipidne peroksidacije in nastanek MDA. Da pa bi z večjo gotovostjo presegli oksidacijsko zaščito živali v poizkusu in da bi dosegli dovolj veliko razliko v merjenem parametru oksidacijskega stresa med

najbolj obremenjeno poskusno skupino in kontrolno skupino brez dodatka maščob, smo eni od skupin dajali dvakratno količino olja z največjo nenasičenostjo in najmanj vitamina E.

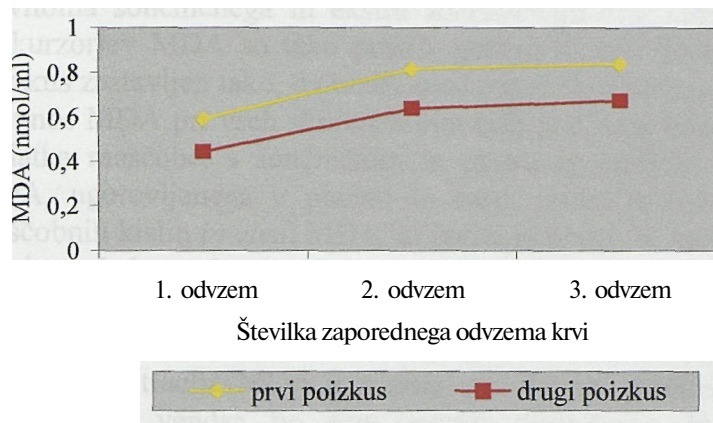
Da bi bila prehrana živali v poizkusu čim bolj podobna prehrani ljudi, smo uporabili način prehrane z enolončnico. Kot osnovne sestavine obroka smo uporabili živila, ki se uporabljajo tudi v človeški prehrani: riž, krompir in fižol. Dobili smo obrok tipa enolončnice. Ob dodatku 85 g olja obrokom je bila pokritost energijskih potreb s hranljivimi snovmi takšna, da je ustrezala priporočilom WHO (1990). Torej so k skupni energiji prispevale beljakovine 10 do 15 %, ogljikovi hidrati 55 do 60 % ter maščobe do 30 % zaužite energije. Pri skupini brez dodatka maščobe in pri skupini s 170 g lanenega olja je bilo to razmerje spremenjeno, saj so maščobe prispevale k skupni energiji 2 % oziroma 45 %.

Praščem smo prvič odvzeli kri in seč pred začetkom poskusa, da smo določili začetne vrednosti MDA. Razlike med individualnimi živalmi so bile razmeroma velike, čeprav so bile živali pred odvzemom krmljene z enako krmo. Tako je bila najmanjša določena koncentracija MDA v plazmi 0,250 nmol/ml in največja 0,737 nmol/ml, ki pa je pripadala rahlo hemolizirani plazmi. Če pogledamo le nehemolizirano plazmo, vidimo, da je največja izmerjena koncentracija 0,544 nmol/ml, kar še vedno kaže na razlike med posameznimi živalmi. Se precej večji je bil razmik med minimalno in maksimalno koncentracijo pri vzorcih seča, kjer je bila najmanjša izločena množina MDA 3.071 nmol/24 ur in največja 11.086 nmol/24 ur. Glede na enako tretiranje vseh praščev pred začetkom poizkusa je bil vzrok teh razlik verjetno v različni individualni zaščitenosti in odzivnosti posameznih živali na oksidacijsko obremenitev ter v individualni odpornosti na stres. Posledica stresa (t.i. adaptacijskega sindroma) je tudi povečano nastajanje prostih radikalov in z njimi sprožena lipidna peroksidacija *in vivo*. Prašči veljajo za zelo občutljive za stres in stresni situaciji zanje sta bili: prevoz od farme do Inštituta ter novi življenjski pogoji. Vsak praščje bil nameščen v svojo metabolno kletko, kar je bila zanje gotovo ena od stresnih Obremenitev, saj raje živijo v skupini.

Poleg tega smo ugotovili, da je bila pri prvem odvzemu seča povprečna množina MDA v seču praščev iz drugega poizkusa statistično značilno večja od množine MDA praščev iz prvega poizkusa. Največja individualna množina MDA v prvem poizkusa je bila 6,080 nmol/24 ur, medtem ko je bila v drugem poizkusu le ena množina MDA nižja od 6,080 nmol/24 ur. Predvidevamo, da je bil vzrok osnovna krma, ki je bila za drugo skupino praščev stara mesec dni. V tem času je maščoba v njej gotovo vsaj delno že peroksidirala, njeni razgradni produkti pa so se v večjih količinah pojavili v seču. Ker v plazmi statistično značilnih razlik med poizkusoma ni bilo, nas to napeljujejo na misel, da se s hrano zaužiti eksogeni MDA iz organizma hitreje izloči preko seča, spremembe v koncentraciji MDA v plazmi pa so bolj posledica peroksidacije maščob *in vivo*.

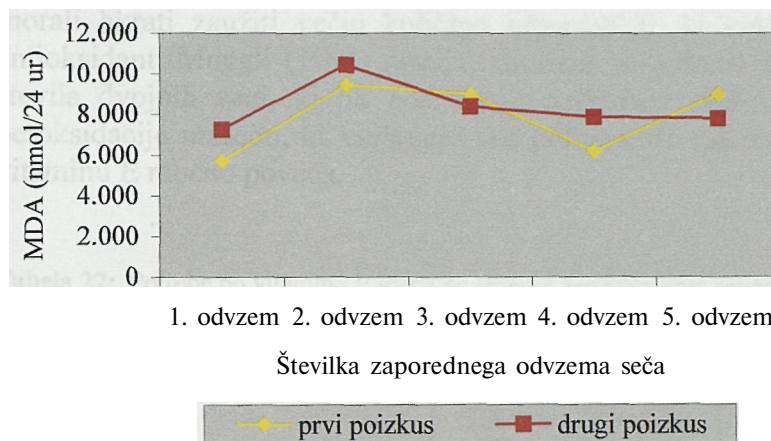
Zanimalo nas je še, če so bili pogoji pri obeh poizkusih dovolj podobni, oziroma, če sta oba poizkusa kljub časovnemu razmaku primerljiva. Zato smo v oba poizkusa vključili skupino, ki je dobivala dodatek 85 g lanenega olja, torej smo imeli v prvem in drugem poizkusu skupini s popolnoma enakim tretiranjem. Med skupinama je bila statistično značilna razlika v koncentraciji MDA v plazmi le pri drugem odvzemu krvi, ne pa tudi pri prvem in tretjem. Kot kaže Slika 38, pri drugem odvzemu krvi razlike v plazemski koncentraciji MDA niso večje kot pri prvem in tretjem, statistična značilnost razlik pa je

bolj posledica manjše variabilnosti rezultatov. Značilnih razlik tudi ni bilo pri vseh petih odvzemih seča (Slika 39). Ker se je na različnih prašičih in v različnih časih tretiranja živali pokazal enak vpliv uporabe različnih krmnih obrokov, lahko sklepamo, da drugih nekontroliranih vplivov ni bilo in da smemo rezultate obeh poizkusov primerjati med seboj.



Slika 38: Spreminjanje koncentracij MDA v plazmi prašičev pri skupinah prvega in drugega poizkusa, ki sta dobivali k obrokom 85 g lanenega olja

Figure 38: Change in MDA concentrations in plasma of two groups of pigs from the first and the second experiment, fed with 85 g flax seed oil added to basal feed rations



Slika 39: Spreminjanje množin MDA v seču prašičev pri skupinah iz prvega in drugega poizkusa, ki sta dobivali k obrokom 85 g lanenega olja

Figure 39: Change in daily urinary MDA excretion of two groups of pigs from the first and the second experiment, fed with 85 g flax seed oil added to basal feed rations

Celoten poizkus je pokazal, da obstaja statistično značilna pozitivna povezava med uživanjem maščob z večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami, kot je na primer linolenska kislina, in pojavom MDA tako v plazmi kot v seču. Kolikšen del MDA je nastal pri avtooksidaciji maščob še pred zaužitjem le-te, kolikšen del pa se ga je oblikovalo endogeno, nismo zasledovali. Dejstvo pa je, da so bile koncentracije MDA v plazmi in množina dnevno izločenega s sečem po treh tednih krmljenja statistično značilno večje v

skupinah z obroki, ki so vsebovali 85 g lanenega olja in 170 g lanenega olja, kot pa v tistih s 85 g sončničnega, 85 g ekstra sončničnega olja ali brez dodatka maščobe (kontrolna skupina). Laneno olje je bogato s trikrat nenasičeno linolensko kislino, ki je vsebuje kar 52 % (Tabela 9), zaradi česar je to olje bolj nestabilno, bolj podvrženo peroksidaciji in predstavlja za človeka ali živalski organizem večjo prooksidacijsko obremenitev. Peroksidno število uporabljenega lanenega olja je bilo v primerjavi s peroksidnima številoma sončničnega in ekstra sončničnega olja večje (Tabela 10). Nekaj MDA ali prekursorjev MDA so tako prašiči gotovo zaužili že s samim obrokom. Vendar je bil poizkus zastavljen tako, da razlik med osnovnimi obroki pri vseh skupinah ni bilo in da je bil vnos MDA pri vseh skupinah čim bolj podoben. Glede na rezultate pri skupinah brez dodatka maščobe, s sončničnim in ekstra sončničnim oljem menimo, da največji del MDA, ugotovljenega v plazmi in seču, izvira iz lipidne peroksidacije dolgoveržnih maščobnih kislin *in vivo*. MDA, ki izvira iz hrane, se med absorpcijo v organizmu poveže z lizinom iz hrane in ni več mutagen (Nelson in sod., 1993). Nevaren pa ostaja MDA, kije posledica oksidacije maščobnih kislin v organizmu. V primeru lanenega olja je glavni vir peroksidacijske obremenitve predstavljal linolenska kislina. Med tritedenskim poskusom se je koncentracija MDA v plazmi pri skupini prašičev s 170 g lanenega olja začela zmanjševati, vendar po treh tednih zmanjšanje še ni bilo statistično značilno. Predvidevamo, da se je organizem začel prilagajati na veliko oksidativno obremenitev tako, da je izboljšal lastno antioksidativno zaščito. Vrednosti MDA bi se morda v plazmi zmanjšale še bolj ali pa bi se morda povečale manj, če bi prašiči s krmo dobili več antioksidativnih snovi. Piche in sodelavci (1988) menijo, da dodatek vitamina E zavre oksidacijo dolgoveržnih nenasičenih maščobnih kislin *in vivo*. Jenkinson in sodelavci (1999) navajajo, da bi s hrano, ki je bogata z večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami, morali hkrati zaužiti večjo količino vitamina E, ki velja za biološko aktiven lipidni antioksidant. Muggli (1994) navaja, kolikšne so potrebe po vitaminu E v odvisnosti od števila dvojnih vezi, ki jih posedujejo maščobne kisline (Tabela 22). Za preprečitev peroksidacije maščob, ki vsebujejo več polinenasičenih maščobnih kislin, se potreba po vitaminu E močno poveča.

Tabela 22: Potrebe po vitaminu E glede na stopnjo nenasičenosti zaužitih maščobnih kislin (Muggli, 1994)
Table 22: Requirements of vitamin E for antioxidative protection of fatty acids with different degrees of unsaturation (Muggli, 1994)

MAŠČOBNA KISLINA		ŠTEVILO DVOJNIH VEZI V MAŠČOBNI KISLINI	POTREBA* PO VITAMINU E (mg)
Oleinska kislina	18:1 n-9	1	0,13
Linolna kislina	18:2 n-6	2	0,89
γ-linolenska kislina	18:3 n-6	3	1,34
α-linolenska kislina	18:3 n-3	3	1,34
Dihomo-γ-linolenska kislina	18:3 n-6	3	1,34
Arahidonska kislina	20:4 n-6	4	1,79
Ejkozapentaenojska kislina (EPA)	20:5 n-3	5	2,24
Dokozaheksaenojska kislina (DHA)	22:6 n-3	6	2,68

* mg dl-α-tokoferilacetata na g zaužite maščobne kisline
 (mg dl-α-tocopheryl acetate per gram fatty acid consumed)

Antioksidativnih vitaminov namenoma nismo dodali, saj smo želeli ugotoviti vpliv različnih olj na proces lipidne peroksidacije *in vivo*. Izzvati smo želeli oksidacijski stres, torej porušiti ravnotežje med oksidacijsko obremenitvijo in antioksidativno zaščito organizma. Kako pomembno je zadostno uživanje antioksidantov za preprečevanje lipidne peroksidacije, tudi če uživamo malo maščob, se lahko prepričamo s pregledom rezultatov koncentracij MDA v plazmi skupine prašičev, krmljenih z obroki brez dodane maščobe. Enako kot skupini z lanenim oljem so zaužili premalo vitamina E (glej Tabelo 6). V plazmi je bila ves čas poskusa koncentracija MDA znatna in se je v treh poskusnih tednih relativno malo znižala, kar potrjuje hipotezo, da lipidna peroksidacija *in vivo* poteka permanentno. Gebicki in sodelavci (1991) navajajo, da sta vanjo najbolj vključeni arahidonska in dokozaheksaenojska kislina, ki sta sestavini plazminega LDL. Kontrolna skupina se tudi ni statistično značilno razlikovala od skupin, ki sta z obroki dobivali maščobo v obliki 85 g sončničnega oziroma 85 g ekstra sončničnega olja. V teh dveh skupinah so bile kljub zaužitim maščobam koncentracije MDA v plazmi nizke. Gotovo je imel na to določen vpliv vitamin E, ki je naravno prisoten v obeh sončničnih oljih in ki je preprečeval avtooksidacijo maščobnih kislin olja še pred njegovim zaužitjem, kakor tudi kasneje, v organizmu. Znotraj skupine s sončničnim oljem so se koncentracije MDA v plazmi v času od začetka do konca poskusa celo statistično značilno zmanjšale. To pa pomeni, da se peroksidacijska obremenitev živali s poskusnim postopkom, to je dodatkom sončničnega olja, ni povečala, ampak celo zmanjšala, kljub dnevni dodatku 85 g olja, bogatega z linolno kislino. Sicer je tudi maščobnokislinska sestava teh dveh olj glede peroksidacijske obremenitve ugodnejša, kajti ne vsebujeta veliko tri- in večkrat nenasičenih maščobnih kislin. V sončničnem olju je, s 57 %, glavna maščobna kislina linolna (Tabela 9), ki ima le dve nenasičeni dvojni vezi, medtem ko ima ekstra sončnično olje dobrih 71 % enkrat nenasičene oleinske kisline, ki velja za zelo stabilno, in le 16 % dva- in večkrat nenasičenih maščobnih kislin (Tabela 9). Boljšo sliko o peroksidacijski obremenitvi in sočasni antioksidativni zaščiti pri zaužitju olja v posameznih skupinah dobimo, če po podatkih Mugglija (1994), ki so prikazani v Tabeli 22, izračunamo pokritost potreb po vitaminu E glede na zaužite maščobne kisline (Tabela 23). Vidimo, da sta sončnično in ekstra sončnično olje zadostno zaščitena z vitaminom E, kar pa ne velja za laneno olje, pri katerem je izračunana zaščitenost olja pred oksidacijo le 7 %.

Tabela 23: Potrebe po vitaminu E pri zaužitju olja različne maščobnokislinske sestave
Table 23: Requirements of vitamin E for the intake of fats of different fatty acid composition

Vrsta in količina zaužitega olja	Z oljem zaužita maščobna kislina (g)			Vsebnost vitamina E v zaužitem olju (mg)	Potrebna zaščita zaužitega olja z vitaminom E (mg)	Dejanska zaščitenost zaužitega olja z vitaminom E (%)
	Oleinska (18:1)	Linolna (18:2)	Linolenska (18:3)			
85 g SO (81,26 g m.k.)*	21,3	46,32	0,42	53,1	44,55	119
85 g ESO (81,26 g m.k.)*	58,34	12,24	0,42	53,1	19,03	280
85 g LO (81,26 g m.k.)*	15,11	11,47	42,49	4,95	69,11	7
170 g LO (162,5 g m.k.)*	30,22	22,94	84,98	9,89	138,22	7

SO: sončnično olje

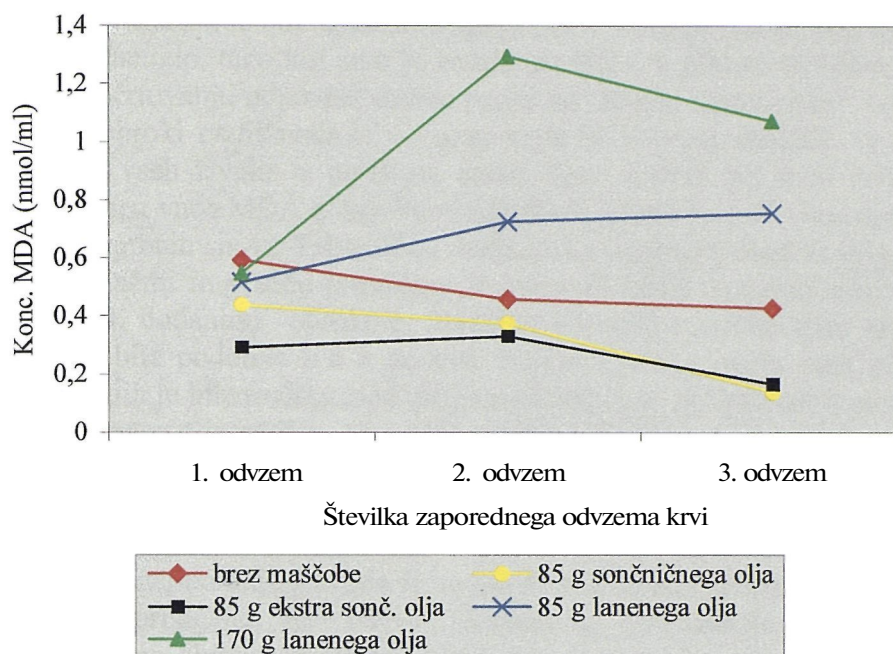
ESO: ekstra sončnično olje

LO: laneno olje

*olja vsebujejo 95,6 % maščobnih kislin (m.k.) in 4,4 % glicerola (Holland in sod., 2000)

-;

Kako so se spreminjale koncentracije MDA v plazmi med poskusom, tako znotraj skupin kot med skupinami, je zelo razvidno s Slike 40.



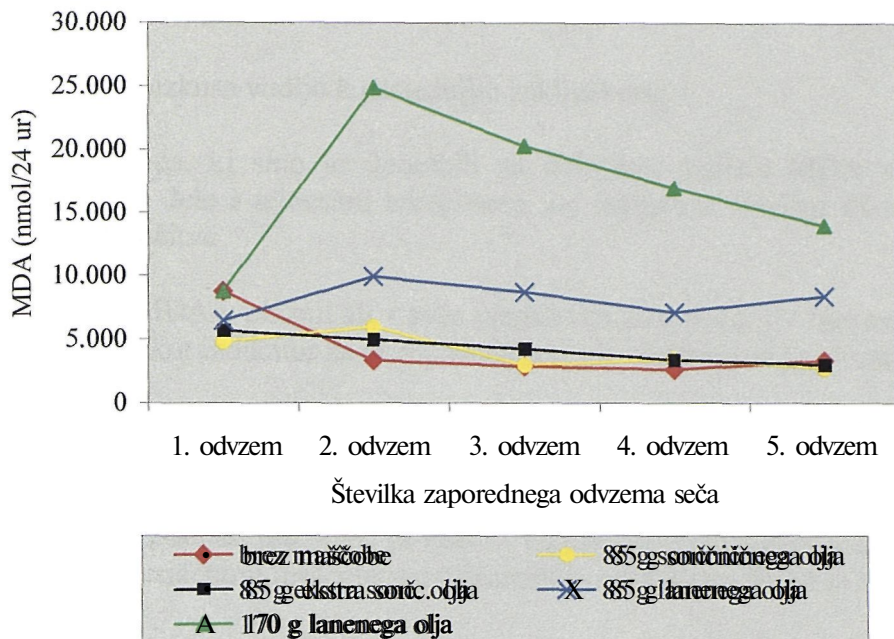
Slika 40: Spreminjanje koncentracij MDA v plazmi prašičev v času poizkusa; krivulje predstavljajo skupine prašičev, ki so uživali obroke z različno vrsto oziroma količino maščob.

Figure 40: Change in plasma MDA concentrations in groups of pigs fed with different oils added to basal feed rations

Ze rezultati, dobljeni pri vzorcih plazme, kažejo, da je bila peroksidacija lipidov pri živalih, ki so dobivale sončnično ali ekstra sončnično olje majhna, iz česar bi lahko sklepali, da sta olji primerni za uživanje, saj ne povzročata dodatne neželene lipidne oksidacije v organizmu. Na drugi strani pa laneno olje ni jedilno olje. V splošnem se v prehrani ljudi zelo malo uporablja in kot olje z oznako jedilne kakovosti se lahko dobi le v določenih trgovinah z bio- hrano. Mi smo ga uporabili, ker je njegova maščobnokislinska sestava zelo primerna za povečanje peroksidacijske obremenitve oziroma da bi potrdili ali ovrgli trditev, da se zaradi velikega deleža trikrat nenasičene α -linolenske maščobne kisline koncentracija malondialdehida v plazmi in seču poveča bolj kot ob enaki količini sončničnega ali ekstra sončničnega olja. Sklepamo, da bi imelo podoben učinek vsako olje, ki vsebuje visok delež tri- ali večkrat nenasičenih maščobnih kislin (na primer ribje olje) in ni zaščiteno z antioksidanti, ki bi varovali te maščobne kisline med shranjevanjem in bi hkrati preprečevali njihovo peroksidacijo *in vivo*. To hipotezo potrjuje več raziskav, med njimi raziskava Draperja in sodelavcev (1984), ki so ugotovili, da se po uživanju nezaščitenega jetrnega olja polenovke, kot vira $n-3$ maščobnih kislin, v seču podgan poveča izločanje MDA. Ker so podgane pred odvzemom seča postili, menijo, da je bila povečana množina MDA v seču posledica peroksidacije maščobnih kislin *in vivo*.

Siu in Draper (1982) sta ugotovila, da se le okoli 10 % malondialdehida izloči s sečem, kar pomeni, da so količine, ki jih bodisi dobimo v telo s hrano bodisi v telesu nastanejo, bistveno večje. Siu in Draper (1982) sta podganam intubirala v želodce C-MDA. Te podgane so s sečem izločile le za približno 10 % več ^{14}C v primerjavi z živalmi, ki sta jim

intubirala C-acetat. 60 do 70 % radioaktivnega ogljika se je v 12 urah pojavilo v obliki $^{14}\text{CO}_2$, kar pomeni, da se MDA v organizmu presnovi oziroma oksidira do CO_2 in da se večina, v organizmu nastalega MDA, v seču sploh ne pojavi. V naši raziskavi nismo zasledovali kakšna je bila koncentracija MDA v obrokih, ker bi bilo za to potrebno uvesti analitsko metodo, tako kot smo jo uvedli za MDA v plazmi in MDA v seču. Vendar pa smo pri načrtovanju poizkusa skrbno pazili na "skupni imenovalec" vsebnosti MDA, to je da so se obroki razlikovali le v vnosu vrste in količine maščob ter da so bili osnovni obroki pri vseh živalih v poizkusu enaki. Zato smemo pri vseh živalih predpostavljati enak eksogen vnos MDA z osnovnim obrokom, enako pa tudi vnos drugih za oksidacijski stres pomembnih snovi. Tako lahko razlike ali podobnosti med skupinami v koncentraciji MDA v plazmi in v seču pripišemo le vplivom razlik oziroma obremenitev presnove z maščobami, dodanimi obrokom. Statistično značilne razlike med skupinami in znotraj skupin so bile podobne kot v plazmi. Nazoren prikaz razlik nam podaja Slika 41. Po pričakovanjih je bila razlika med skupino prašičev, ki so dobivali k osnovnemu obroku po 170 g lanenega olja na dan, ter vsemi ostalimi skupinami statistično značilna. Ta skupina je imela po petih dnevih krmljenja z dodatkom lanenega olja, ko smo prvič odvzeli seč, množine MDA v njem statistično značilno višje od vseh ostalih. V času poizkusa se je razlika zniževala in množine MDA v seču te skupine so se že po desetih dnevih poizkusa statistično značilno znižale, toda še vedno so bile daleč največje. Rezultati kažejo, da se je organizem prilagajal na veliko oksidativno obremenitev tako, da je izboljšal antioksidativno obrambno sposobnost. S tem je preprečeval lipidno peroksidacijo *in vivo* in nastajanje MDA. Razen boljše antioksidativne zaščite so vse druge možne razlage, zakaj je prišlo do zmanjšanja količin MDA, malo verjetne. Olje se med poskusom po kakovosti ni izboljševalo, kvečjemu poslabšalo. Večja oksidacijska obremenitev pa v organizmu očitno sproži obrambni mehanizem povečanja antioksidativne sposobnosti. Rezultati tudi kažejo, da so za to očitno potrebne precej velike oksidativne obremenitve. Pri skupini s 85 g lanenega olja še niso bile zadostne, saj so ostajale množine MDA v seču med poskusom razmeroma konstantno povečane. Podobno kot v plazmi pa so se zmanjšale tudi vrednosti MDA v seču kontrolne skupine, ter v skupinah s sončničnim in ekstra sončničnim oljem. Hkrati med temi tremi skupinami ni bilo statistično značilnih razlik. Tudi rezultati, dobljeni na vzorcih seča, kažejo, da obe vrsti sončničnih olj, pri uporabljenem odmerku, za poskusne živali nista predstavljali večje oksidacijske obremenitve in da sta s te plati prehransko ugodni oziroma enako dobri kljub veliko večji nenasičenosti navadnega sončničnega olja. Verjetno je ta ugotovitev prenosljiva tudi na človeka.



Slika 41: Spreminjanje množin MDA, dnevno izločenega s sečem, pri prašičih v času poizkusa; krivulje predstavljajo skupine prašičev, ki so uživali obroke z različno vrsto oziroma količino maščob.

Figure 41: Change in daily urinary MDA excretion in groups of pigs fed with different oils added to basal feed rations

Za namen našega poizkusa pa tak rezultat kaže, da je od olj, uporabljenih za povzročitev stresa v modelnih raziskavah na živalih, primerno le laneno olje. Večji odmerek lanenega olja da večji odziv v koncentraciji MDA v plazmi in v seču kot indikatorjev oksidacijskega stresa. Z večjo obremenitvijo organizma torej dobimo tudi večjo občutljivost modela za merjenje antioksidacijske zaščite oziroma za merjenje učinkovitosti antioksidantov. Na drugi strani pa rezultati kažejo, da hrana brez maščobe in premajhno uživanje antioksidativnih snovi popolnoma ne zaščiti organizma pred lipidno peroksidacijo *in vivo*.

Iz rezultatov, predstavljenih na Slikah 40 in 41, lahko tudi sklepamo, da bi bila za preučevanje antioksidacijske zaščite organizma primernejša tako močna prooksidacijska obremenitev, kot jo predstavlja 170 g lanenega olja. Taka obremenitev povzroča dovolj veliko razliko med krivuljo koncentracije MDA v plazmi ali seču pri lanenem olju in krivuljo "osnovne" koncentracije MDA, kot jo kažejo krivulje skupin brez dodatka maščob, sončničnega olja in ekstra sončničnega olja. Pri tako veliki razliki bi bila občutljivost modela za preučevanje različnih možnosti za zaščito organizma večja.

Ujemanje med rezultati, ki smo jih dobili na vzorcih plazme in seča, je zelo dobro. Iz njih povzemamo, da bi za ugotavljanje lipidne peroksidacije *in vivo* oziroma za oceno telesnega oksidacijskega statusa lahko uporabljali eno ali drugo telesno tekočino. Pogosto bo verjetno enostavnejše uporaba seča, saj je lažje dosegljiv, zlasti če delamo poizkuse na ljudeh.

5.2 SKLEPI

Rezultati poizkusa vodijo k naslednjim zaključkom:

HPLC-metoda, ki smo jo uporabili za določanje količin MDA v plazmi in seču, je primerna za delo s telesnimi tekočinami, saj izključuje številne faktorje, ki lahko motijo točnost določitve.

Določanje MDA v plazmi ali v seču predstavlja zelo občutljiv biokemijski parameter in bi lahko služil kot indikator za ocenjevanje stopnje oksidacijskega stresa pri ljudeh.

Laneno olje je od uporabljenih olj imelo največji vpliv na proces lipidne peroksidacije *in vivo*.

Statistično značilna pozitivna povezava obstaja med uživanjem maščob, bogatih s tri- in večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami in nastankom MDA *in vivo*.

Pri skupinah, ki sta dobivali sončnično in ekstra sončnično olje, kjer prevladujeta dvakrat oziroma enkrat nenasičeni maščobni kislini (linolna in oleinska), poteka lipidna peroksidacija *in vivo* v manjšem obsegu kot pri skupinah z lanenim oljem, ki je bogato s trikrat nenasičeno α -linolensko kislino. K rezultatom prispeva svoj delež vitamin E, ki je naravno bogato prisoten v obeh sončničnih oljih in je biološko močno učinkovit lipidni antioksidant. Stopnja nenasičenosti maščobnih kislin navadnega sončničnega olja ni prišla do izraza, ker je olje dovolj zaščiteno z vitaminom E.

Iz rezultatov lahko povzamemo, da sta sončnično in ekstra sončnično olje z vidika prostih radikalov za prehrano zelo ugodni maščobi, saj ne poslabšata antioksidacijskega statusa organizma.

Hrana z malo maščobe organizma ne obvaruje dovolj dobro pred procesom lipidne peroksidacije *in vivo*, če hkrati ne vsebuje dovolj antioksidativnih snovi.

Za vse maščobe, še zlasti pa za tiste, ki so bogate z večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami, je pomembno, da so dobro zaščitene z antioksidativnimi snovmi, saj so sicer vir lipidne peroksidacije *in vivo*.

Rezultati kažejo, da se organizem zelo velikim oksidativnim obremenitvam prilagodi. Koncentracije MDA v plazmi in seču se v skupini z dodatkom 170 g lanenega olja proti koncu poizkusa zmanjšajo.

Za modelne raziskave je že obremenitev, ekvivalentna 85 g lanenega olja, zadostna za "porušenje" antioksidacijske zaščite oziroma za razvoj oksidacijskega stresa. Z obremenitvijo s še več olja pa se oksidacijski stres še poveča in s tem se verjetno poveča tudi občutljivost za mejenje učinkovitosti antioksidantov oziroma živil, bogatih z antioksidativno učinkovitimi snovmi.

6 POVZETEK

6.1 POVZETEK

Problem oksidacijskega stresa in posledice, kijih ima ta za organizem, postajajo v zadnjih letih vse pomembnejša tema številnih raziskav. O oksidacijskem stresu govorimo v primeru, ko se uravnotežen antioksidativni/prooksidativni sistem organizma poruši, kar se zgodi, če se antioksidativna zaščita organizma zmanjša ali pa se poveča oksidacijska obremenitev. Slednja se poveča zaradi premočnega nastajanja prostih radikalov (reaktivnih kisikovih vrst in nekisikovih radikalov), ki jih organizem ni več sposoben nevtralizirati. Prosti radikali vstopajo v reakcije z biomolekulami, jih oksidirajo, kar vodi v poškodbe celic in tkiv. Vse glavne skupine biomolekul so podvržene napadu prostih radikalov, verjetno najobčutljivejši pa so lipidi. V njih so najbolj izpostavljene dva- in večkrat nenasičene maščobne kisline, pri katerih pride do odvzema vodikovega atoma iz alilne metilne skupine. To je začetek verižnih reakcij, skupno imenovanih lipidna peroksidacija. Primarni produkti peroksidacije lipidov so hidroperoksidi, ki v nadaljnjih reakcijah razpadejo na številne produkte, vključno z alkoholi, aldehidi, ketoni, karbonili, epoksidi. Med aldehidi so nekateri zelo reaktivni. Do sedaj so bili najbolj intenzivno preučevani zlasti trije: 4-hidroksinonenal, 4-hidroksiheksenal in malondialdehid (MDA).

Sekundarni produkt oksidacije lipidov - malondialdehid (MDA) - je citotoksičen, mutagen in karcinogen. Je pobudnik številnih neželenih reakcij z različnimi biomolekulami. Navzkrižno reagira z lipidi in beljakovinami, inaktivira nekatere encime in se kovalentno veže z nukleinskimi kislinami. Domnevajo, da so eden od vzrokov začetka razvoja nekaterih bolezni pri ljudeh ravno biomolekule, spremenjene zaradi reagiranja z MDA. Odkrili so povezave med visokimi koncentracijami MDA v plazmi in njegovimi množinami, izločenimi v seču, ter Alzheimerjevo boleznijo, cirozo jeter, Downovim sindromom, sladkorno boleznijo, različnimi vrstami raka. Zaradi tega je MDA v organizmu nezaželen. Glavna prekurzorja MDA v tkivih sesalcev sta arahidonska in dokozaheksaenojska kislina, medtem ko je v hrani njegov glavni vir trikrat nenasičena linolenska kislina. Možnosti za nastanek MDA se bistveno zmanjšajo, če se izognemo glavnim zunanjim dejavnikom, ki povzročajo lipidno peroksidacijo in s tem oksidacijski stres (cigaretni dim, smog, ionizirajoče sevanje, različna zdravila, žarke maščobe, veliko nenasičenih maščob) in če hkrati skrbimo za zadostno uživanje antioksidativnih snovi.

V naši raziskavi smo želeli preučiti, kakšno stopnjo oksidacijskega stresa izzove zauživanje različnih količin in različnih vrst maščobe. Kot indikator oksidacijskega stresa smo uporabili koncentracije MDA v plazmi in 24-urnem seču. Poizkus smo izvedli na 6 skupinah prašičev s po 4 živalmi. Koncentracijo MDA v plazmi in njegovo množino, izločeno s sečem, je možno uporabiti kot indikator lipidne peroksidacije v bioloških vzorcih. Njegove vrednosti v biološkem materialu smo izmerili s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC). Priprava vzorca za HPLC-analizo temelji na reakciji derivatizacije med eno molekulo MDA iz vzorca ter dvema molekulama reagenta tiobarbiturine kisline (TBK). Nastanek rožnato obarvanega kompleksa poteka pri povišani temperaturi v kislem mediju. Koncentracijo dobljenega kompleksa smo kvantitativno določili s HPLC, z uporabo absorpcijskega detektorja, pri valovni dolžini 532 nm.

V hrani imata največji vpliv na koncentracijo MDA v plazmi in njegovo množino, izločeno s sečem, vrsta in količina zaužite maščobe ter količina zaužitih antioksidativnih

snovi. Zaužitje maščobe, bogate z večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami, najbolj poveča lipidno peroksidacijo *in vivo*. Da bi ugotovili, koliko zauživanje maščob, bogatih z nenasičenimi maščobnimi kislinami, vpliva na lipidno peroksidacijo, smo v poizkusu različnim skupinam prašičev v dodatku k osnovnemu krmnemu obroku tipa enolončnice, dodajali olja z različno maščobnokislinsko sestavo: skupina 1: nič dodatka; skupina 2: 85 g sončničnega olja; skupina 3: 85 g ekstra sončničnega olja; skupini 4 in 5: 85 g lanenega olja; skupina 6: 170 g lanenega olja. Poskusno obdobje je trajalo tri tedne. V tem času smo prašičem trikrat odvzeli kri in petkrat seč ter v obeh telesnih tekočinah določili koncentracije MDA.

Poizkus je pokazal, da obstaja statistično značilna pozitivna povezava med uživanjem maščob z večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami, kot je na primer linolenska kislina in koncentracijo MDA tako v plazmi kot v seču. Koncentracije MDA v plazmi in množina dnevno izločenega s sečem, so bile po treh tednih krmljenja statistično značilno večje v skupinah z obroki, ki so vsebovali 85 g lanenega olja in 170 g lanenega olja, kot pa v tistih s 85 g sončničnega, 85 g ekstra sončničnega olja ali brez dodatka maščobe (kontrolna skupina). Pri skupini prašičev z dodatkom 170 g lanenega olja smo dobili koncentracijo MDA v plazmi 1,070 nmol/ml, množino, izločeno s sečem, pa 13.950 nmol/24 ur, obe vrednosti pa sta bili statistično značilno večji od ostalih skupin. Statistično značilno seje od ostalih skupin razlikovala tudi skupina z obroki, ki so vsebovali 85 g lanenega olja. Koncentracija v plazmi je bila po treh tednih 0,753 nmol/ml in v seču 8.373 nmol/24 ur. Statistično značilno pa se med seboj niso razlikovale skupine z obroki brez maščobe (plazma: 0,425 nmol/ml, seč: 3.318 nmol/24 ur), s 85 g sončničnega olja (plazma: 0,139 nmol/ml, seč: 2.736 nmol/24 ur) ter s 85 g ekstra sončničnega olja (plazma: 0,166 nmol/ml, seč: 3.015 nmol/24 ur). Nobeni od skupin nismo posebej dodajali antioksidativnih vitaminov, edina zaščita je bil naravno prisoten vitamin E v sončničnem in ekstra sončničnem olju. Zadostna zaščita z vitaminom E je tudi vplivala na najnižje vrednosti MDA pri teh dveh skupinah in torej na manjši obseg lipidne peroksidacije *in vivo*. Prašiči, ki so dobivali obroke brez maščobe, so zaužili premalo antioksidativnih snovi in pokazalo se je, da zato organizem ni bil popolnoma zaščiten pred procesom lipidne peroksidacije *in vivo*. Da je bil ta proces v skupinah z lanenim oljem najizrazitejši, je posledica velike vsebnosti α -linolenske kisline in premajline vsebnosti vitamina E v lanenem olju.

Ker se je pri skupini z največjo prooksidacijsko obremenitvijo, to je z dodatkom 170 g lanenega olja, med poizkusom koncentracija MDA in množina v seču zmanjševala, menimo, da velika oksidacijska obremenitev sproži v organizmu obrambni mehanizem za povečanje antioksidativne sposobnosti. Ker je dal ta odmerek lanenega olja večji odziv v koncentracijah MDA v plazmi in seču kot manjši odmerek, to pomeni, da z večjo obremenitvijo organizma dobimo tudi večjo občutljivost modela za merjenje antioksidacijske zaščite oziroma za merjenje učinkovitosti antioksidantov. Torej bi bila za preučevanje antioksidacijske zaščite organizma primernejša tako močna prooksidacijska obremenitev, kot jo predstavlja 170 g lanenega olja, kot pa ostale.

Zaključimo lahko, da predstavlja določanje MDA v plazmi in seču zelo občutljiv biokemijski parameter, primeren indikator za ocenjevanje stopnje oksidacijskega stresa pri ljudeh, in da je uporabljeni preizkusni model, s simuliranjem človeške prehrane na prašičih in z obremenjevanjem organizma z nenasičenimi maščobami, zelo uporaben za povzročanje in preučevanje oksidacijskega stresa za namene prehrane ljudi.

6.2 SUMMARY

Consequences which an oxidative stress has on human body have become one of the most studied subject in recent years. We talk about oxidative stress in circumstances, when an antioxidative/prooxidative system of organism is unbalanced, which occurs when the antioxidative protection of organism is reduced or when the oxidative load increases. The oxidative load increases because of increased formation of free radicals (reactive oxygen species or nonoxygen radicals) which the organism is not able to neutralise. Free radicals react with biomolecules and oxidise them, which leads to cell and tissue injuries. All main groups of biomolecules are subjected to free radicals attack, but probably the most susceptible are lipids. The most exposed to free radical attack in lipids are twice and more unsaturated fatty acids, in which a hydrogen radical is abstracted from the allylic methylene group. That is the beginning of chain reactions, known as lipid peroxidation. Lipid hydroperoxides are primary products of lipid peroxidation and since they are highly reactive, they can easily undergo propagation reactions with end products, such as alcohols, aldehydes, ketones, carbonyls and epoxides. Among aldehydes the most studied are 4-hydroxynonenal, 4-hydroxyhexenal and malondialdehyde (MDA).

It has been reported that a secondary product of lipid peroxidation - malondialdehyde (MDA) - is cytotoxic, mutagenic and carcinogenic. It is involved in cross-link reactions with all types of biomolecules. Consequences of such crosslinkings can be deleterious for the body cells. MDA can cross-link with lipids and proteins, inactivate some enzymes and bind covalently to nucleic acids. It is presumed, that biomolecules, modified with MDA, are one of the reasons for the development of some human diseases. A positive correlation was found between high concentrations of MDA in plasma and urine and Alzheimer disease, liver cirrhosis, Down's syndrome, diabetes and different types of cancer. Because of that MDA is harmful for organism. The main precursors of MDA in mammalian tissues are arachidonic and docosahexaenoic acids, meanwhile the main source of MDA in the food is linolenic acid. Possibilities for MDA formation can be reduced by avoiding the main external factors which are responsible for lipid peroxidation and oxidative stress: cigarette smoke, smog, ionising radiation, various drugs, rancid fats, consumption of lots of unsaturated fatty acids, while taking care for a sufficient consumption of antioxidative substances can also reduce MDA formation.

MDA concentration in plasma and its excretion in urine can be used as an indicator of lipid peroxidation in biological samples. In our experiment we used high performance liquid chromatography (HPLC) for measuring MDA values in biological material. Preparation of samples was based on the reaction of derivatization between one molecule of MDA and two molecules of reagent thiobarbituric acid (TBA). The pink adduct was formed under high temperature and in acidic medium. HPLC was used for quantitative determination of MDA-(TBA)₂ adduct. Detection was done with absorbance detector at wavelength 532 nm.

The greatest impact on plasma MDA concentration and on MDA excreted in urine have the type and the quantity of consumed fat on one side and the quantity of consumed antioxidants on the other side. Consumption of fat, rich in polyunsaturated fatty acids, increases the lipid peroxidation *in vivo*. In the experiment on pigs our goal was to study how much the quantity and degree of unsaturation of fats influence the peroxidation and free radical formation. For this purpose the following experimental pattern was conducted:

24 pigs with the mean body weight of 55 kg were divided in 6 groups. Pigs of all groups were fed with identical basal ration, which had the characteristics of a hot-pot. The basal diet in each group was supplemented with oil of different quality and/or type: group 1 (control): no oil supplement; group 2: 85 g sunflower oil; group 3: 85 g extra sunflower oil; groups 4 and 5: 85 g flax seed oil; group 6: 170 g flax seed oil. The experimental period lasted three weeks. During the experiment blood samples were taken three times and the 24 hour urine was collected five times. In both body fluids MDA concentrations were determined.

There was a statistically significant positive correlation between Consumption of fats, rich in polyunsaturated fatty acids, such as linolenic acid, and concentrations of MDA in plasma and urine. After three weeks treatment concentrations of MDA in plasma and its amounts excreted in daily urine were statistically significantly higher in groups, fed with rations containing 85 g or 170 g flax oil, than in the group without oil added to basal ration or in groups with addition of 85 g sunflower oil or 85 g extra sunflower oil. The average MDA concentration in the plasma in group 6 (170 g flax oil added) was 1.070 nmol/ml, and the average 24 hour urinary excretion was 13,950 nmol/24 h. Both values were statistically significantly higher than in all other groups. Statistically significant difference was also between group 4 and 5 (85 g flax oil added to basal feed ration) and other groups. The average plasma MDA concentration in that group was 0.753 nmol/ml and in urine 8,373 nmol/24 h at the end of the experiment. There were no statistically significant differences between the following groups: without addition of oil (plasma MDA: 0.425 nmol/ml, MDA in urine: 3,318 nmol/24 h), with 85 g sunflower oil (plasma MDA: 0.139 nmol/ml, MDA in urine: 2,736 nmol/24 h) and with 85 g extra sunflower oil (plasma MDA: 0.166 nmol/ml, MDA in urine: 3,015 nmol/24 h). The only source of antioxidants was naturally presented vitamin E in feed ingredients of the basal ration and in oils used. An adequate vitamin E intake in groups which consumed sunflower and extra sunflower oil, provided sufficient manifested and the lowest values of MDA in plasma and urine, consequent to minor extent of lipid peroxidation *in vivo*. Furthermore, pigs in control group did not consume enough antioxidative substances and the consequence was incomplete protection against the process of lipid peroxidation *in vivo*, which reflected in high concentration of MDA in plasma and urine. Because of high content of α -linolenic acid and the insufficient supply of vitamin E caused the most extended process of lipid peroxidation in groups with addition of flax oil.

During the experiment, the concentration of MDA in plasma and MDA excreted in 24 hour urine were diminishing in the group with the highest prooxidative load (i.e. 170 g flax oil). We presume that very high oxidative load leads to adaptation of endogenous antioxidative protective mechanism in a sense of increased antioxidative ability. A portion of 170 g flax oil gave greater response in MDA values than a portion of 85 g flax oil. With such a high oxidative load (as is 170 g flax oil) we get greater sensitivity of the model for measuring the antioxidative protection or for measuring the efficiency of antioxidants can be attained. For further studies of antioxidative protection of organism such high oxidative load as is 170 g flax oil could be therefore more convenient than lower oxidative stress.

It could be concluded, that the determination of MDA concentrations in plasma and urine represents a very sensitive biochemical parameter and could be used as an indicator for the estimation of free radical load or of antioxidative protection. The simulation of human nutrition on pigs and loading the animal organism with unsaturated fats could become

very useful experimental model for causing and studying the oxidative stress for the purpose of human nutrition.

7 VIRI

- Avellini L., Chiaradia E., Gaiti, A. 1999. Effect of exercise training, selenium and vitamin E on some free radical scavengers in horses (*Equus caballus*). *Comparative Biochemistry and Physiology part B*: 123, 2: 147-154
- Basu A.K., Marnett L J. 1983. Unequivocal demonstration that malondialdehyde is a mutagen. *Carcinogenesis*, 4, 3: 331-333
- Bermejo P., G'omez-Serranillos P., Santos J., Pastor E., Gil P., Mart'in-Arag'on S. 1997. Determination of malondialdehyde in Alzheimer's disease: a comparative study of high-performance liquid chromatography and thiobarbituric acid test. *Gerontology*, 43,4:218-222
- Bianchi G., Marchesini G., Fabbari A., Ronchi M., Chianese R, Grossi G. 1997. Lipoperoxide plasma levels in patients with liver cirrhosis. *Hepatogastroenterology*, 47,3:784-788
- Bird R.P., Hung S.O.S., Hadley M, Draper H.H. 1983. Determination of malonaldehyde in biological materials by high-pressure liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 128: 240-244
- Bird R.P., Draper H.H. 1984. Comparative studies on different methods of malondialdehyde determination. *Methods in Enzymology*, 105: 299-305
- Cadenas S., Rojas C, M'endez J., Herrero A., Barja G. 1996. Vitamin E decreases urine lipid peroxidation products in young healthy human volunteers under normal conditions. *Pharmacology & Toxicology*, 47, 1-3: 247-253
- Carbonneau M. A., Peuchant E., Sess D., Canioni P., Clerc M. 1991. Free and bound malondialdehyde measured as thiobarbituric acid adduct by HPLC in serum and plasma. *Clinical Chemistry*, 37, 8: 1423-1429
- Cheeseman K.H., Slater T.F. 1993. An introduction to free radical biochemistry. V: *British Medical Bulletin: Free radicals in medicine*. Cheeseman K.FL, Slater T.F. (ed.). London, Churchill Livingstone: 481-493
- Cheeseman K.H., Holley A.E. 1993. Measuring free radical reactions in vivo. V: *British Medical Bulletin: Free radicals in medicine*. Cheeseman K.FL, Slater T.F. (ed.). London, Churchill Livingstone: 494-505
- Chio K.S., Tappel A.L. 1969. Inactivation of ribonuclease and other enzymes by peroxidizing lipids and by malondialdehyde. *Biochemistry*, 8, 7: 2827-2832
- Chirico S., Smith C, Marchant C, Mitchinson M.J., Halliwell B. 1993. Lipid peroxidation in hyperlipidaemic patients. A study of plasma using an HPLC-based thiobarbituric acid test. *Free Radical Research Communications*, 19, 1: 51-57

- Chirico S. 1994. High-performance liquid chromatography-based thiobarbituric acid tests. V: *Methods in Enzymology, Volume 233: Oxygen radicals in biological systems, part C*. Packer L. (ed.). New York, Academic Press: 314-318
- Dahle L. K., Hill E. G., Holman R. T. 1962. The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 98: 253-261
- Dixon Z.R., Shie F.S., Warden B.A., Burri B.J., Neidlinger T.R. 1998. The effect of a low carotenoid diet on malondialdehyde-thiobarbituric acid (MDA-TBA) concentrations in women: a placebo-controlled double-blind study. *Journal of the American College of Nutrition*, 17, 1:54-58
- Draper H.H., Polensek L., Hadley M, McGirr L.G. 1984. Urinary malondialdehyde as an indicator of lipid peroxidation in the diet and in the tissues. *Lipids*, 19, 11: 836-843
- Draper H.H., Squires E.J., Mahmoodi H., Wu J., Agarwal S., Fladley M. 1993. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radical Biology & Medicine*, 15: 353-363
- Dreosti I.E. 1991. Trace elements, micronutrients, and free radicals. Totowa, Humana Press *Inc.*: 231 str.
- Drury J.A., Nycyk J.A., Cooke R.W. I. 1997. Comparison of urinary and plasma malondialdehyde in preterm infants. *Clinica Chimica Acta*, 263: 177-185
- Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H. 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine*, 11:81-128
- Esterbauer H. 1996. Estimation of peroxidative damage. *Pathologie et Biologie*, 44, 1: 25-28
- Finot P.A. 1997. Effects of processing and storage on the nutritional value of food proteins. V: *Food proteins and their applications*. Damodaran S., Paraf A. (ed.). New York, Marcel Dekker: 551-577
- Frankel E.N. 1991. Recent advances in lipid oxidation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 54: 495-511
- Fukunaga K., Suzuki T., Takama K. 1993. Highly sensitive high-performance liquid chromatography for the measurement of malondialdehyde in biological samples. *Journal of Chromatography*, 621: 77-81
- Fukunaga K., Takama K., Suzuki T. 1995. High-performance liquid chromatographic determination of plasma malondialdehyde level without a solvent extraction procedure. *Analytical Biochemistry*, 230: 20-23

- Fukunaga K., Yoshida M., Nakazono N. 1998. A simple, rapid, highly sensitive and reproducible quantification method for plasma malondialdehyde by high-performance liquid chromatography. *Biomedical Chromatography*, 12: 300-303
- Gallaher D.D., Csallany A.S., Shoeman D.W., Olson J. M. 1993. Diabetes increases excretion of urinary malonaldehyde conjugates in rats. *Lipids*, 28, 7: 663-666
- Gebicki J.M., Jiirgens G., Esterbauer H. 1991. Oxidation of low-density lipoprotein in vitro. V: *Oxidative stress; oxidants and antioxidants*. Sies H. (ed.). San Diego, Academic Press: 650 str
- Gerritsen W.B., Aarts L.P., Morshuis W.J., Haas F.J. 1997. Indices of oxidative stress in urine of patients undergoing coronary artery bypass grafting. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 35, 10: 737-742
- Gordon M.H. 1990. The mechanism of antioxidant action in *vitro*. V: *Food antioxidants*. Hudson B.J.F. (ed.). Essex, Elsevier Science Publishers Ltd.: 1-19
- Guichardant M., Valette-Talbi L., Cavadini C, Crozier G., Berger M. 1994. Malondialdehyde measurement in urine. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 655: 112-116
- Halliwel B., Chirico S. 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 57 (suppl): 715S-725S
- Holland B., Welch A.A., Unwin I.D., Buss D.H., Paul A.A., Southgate D.A.T. 2000. McCance and Widdowson's *The composition of foods*. Fifth revised and extended edition. Cambridge, Royal Society of Chemistry, 9 str.
- Huang Y.L., Sheu J.Y., Lin T.H. 1999. Association between oxidative stress and changes of trace elements in patients with breast cancer. *Clinical Biochemistry*, 32, 2: 131-136
- Huh K., Shin U.S., Choi J.W., Lee S.I. 1994. Effect of sex hormones on lipid peroxidation in rat liver. *Archives of Pharmacal Research*, 17, 2: 109-114
- Jacobson E.A., Newmark H.L., Bird R.P., Bruce W.R. 1983. Increased excretion of malonaldehyde equivalents in the urine after consumption of cooked, stored meats. *Nutrition Reports International*, 28, 3: 509-517
- Jain S.K., McVie R., Jackson R., Levine S.N., Lim G. 1999. Effect of hyperketonemia on plasma lipid peroxidation levels in diabetic patients'. *Diabetes Care*, 22, 7: 1171-1175
- Jenkinson A., Franklin M.F., Wahle K., Duthie G.G. 1999. Dietary intakes of polyunsaturated fatty acids and indices of oxidative stress in human volunteers. *European Journal of Clinical Nutrition*, 53: 523-528
- Jovanović S.V., Clements D., MacLeod K. 1998. Biomarkers of oxidative stress are significantly elevated in Down syndrome. *Free Radical Biology and Medicine*, 25, 9: 1044-1048

- Kishida E., Oribe M., Moclaizuki K., Kojo S., Iguchi H. 1990. Determination of malondialdehyde with chemical derivatization into the pyrimidine compound and HPLC. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1045: 187-188
- Kosugi H., Kojima T., Kikugawa K. 1993. Characteristics of the thiobarbituric acid reactivity of human urine as a possible consequence of lipid peroxidation. *Lipids*, 28, 4: 337-343
- Lee D.M. 1980. Malondialdehyde formation in stored plasma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 95, 4: 1663-1672
- Lee H.S., Shoeman D.W., Csallany A.S. 1992. Urinary response to *in vivo* lipid peroxidation induced by vitamin E deficiency. *Lipids*, 27, 2: 124-128
- Leonard M.B., Lawton K., Watson I.D., MacFarlane I. 1995. Free radical activity in young adult cigarette smokers. *Journal of Clinical Pathology*, 24, 4: 385-387
- Lepage G., Munoz G., Champagne J., Roy C.C. 1991. Preparative steps necessary for the accurate measurement of malondialdehyde by high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 197: 277-283
- Lubec B., Hayn M., Kitzmüller E., Vierhapper H., Lubec G. 1997. L-arginine reduces lipid peroxidation in patients with diabetes mellitus. *Free Radical Biology and Medicine*, 43, 7: 355-357
- Madhavi D.L., Deshpande S. S., Salunkhe D.K. 1995. Food antioxidants. New York, Marcel Dekker, Inc.: 490 str
- Malondialdehyde. 2001. V: Chem Id (Chemical Identification), <http://igm.nlm.nih.gov/> (15.01.2001)
- Moser J., Bagclii D., Akubue P.I., Stohs S.J. 1993. Excretion of malondialdehyde, formaldehyde, acetaldehyde and acetone in the urine of rats following acute and chronic administration of ethanol. *Alcohol & Alcoholism*, 28, 3: 287-295
- Mudron P., Rehage J., Qualmann K., Sallmann H.P., Scholz H. 1999. A study of lipid peroxidation and vitamin E in dairy cows with hepatic insufficiency. *Zentralblatt fur Veterinarmedizin. Reihe A*, 46,4: 219-224
- Muggli R. 1994. Vitamin E-Bedarf bei Zufuhr von Polyenfettsäuren. *Fat Science Technology*, 96, 1: 17-19
- Nelson G. J., Morris V. C, Schmidt P. C, Levander O. 1993. The urinary excretion of thiobarbituric acid reactive substances and malondialdehyde by normal adult males after consuming a diet containing salmon. *Lipids*, 28, 8: 757-761
- Nielsen F., Mikkelsen B.B., Neilsen J.B., Andersen H.R., Grandjean P. 1997. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress; reference interval and effects of life-style factors. *Clinical Chemistry*, 43, 7: 1209-1214

- Nutrient requirements of swine. 1998. 10 ed.. Washington D.C., National Academy Press: 189 str.
- Olikawa H., Ohishi N., Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95: 351-358
- Ozben T., Nacitarhan S., Tuncer N. 1995. Plasma and urine malondialdehyde levels in non-insuline-dependent diabetic patients with and without microalbuminuria. *International Journal of Clinical Laboratory Research*, 25, 3: 162-164
- Petelin M. 1999. Učinek superoksidne dismutaze in katalaze na zdravljenje vnetja in obnovo obzobnih tkiv pri psih pasme beagle. Doktorska disertacija. Ljubljana, Medicinska fakulteta: 5-19
- Piche L.A., Draper H.H., Cole P.D. 1988. Malondialdehyde excretion by subjects consuming cod liver oil vs a concentrate of n-3 fatty acids. *Lipids*, 23, 4: 370-371
- Prošek M. 1992. Kromatografske metode v biotehnologiji. V: *Biotehnologija*. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 341-354
- Pryor W.A., Stanley J.P., Blair E. 1975. Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: II. A suggested mechanism for the formation of TBA-reactive materials from prostaglandin-like endoperoxides. *Lipids*, 11,5: 370-379
- Rabi H., Klioschorur G., Colombo T., Tatzber F., Esterbauer H. 1992. Human plasma lipid peroxide levels show a strong transient increase after successful revascularization operations. *Free Radical Biology and Medicine*, 13, 4: 281-288
- Rice-Evans C.A., Diplock A.T., Symons M.C.R. (ed.). 1991. *Techniques in Free Radical Research*. Amsterdam, Elsevier: 291 str
- Richard M.J., Guiraud P., Meo J., Favier A. 1992a. High-performance liquid chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct in biological materials (plasma and human cells) using a commercially available reagent. *Journal of Chromatography*, 577: 9-18
- Richard M.J., Portal B., Meo J., Coudray C, Hadjian A., Favier A. 1992b. Malondialdehyde kit evaluated for determining plasma and lipoprotein fractions that react with thiobarbituric acid. *Clinical Chemistry*, 38, 5: 704-709
- SAS/STAT. 1995. *Users Guide*. 5th edition. Cary, SAS Institute Inc., Programme Version 8E.
- Shamberger R.J., Andreone T.L., Willis C.E. 1974. Antioxidants and cancer. IV. Initiating activity of malonaldehyde as a carcinogen. *Journal of the National Cancer Institute*, 53, 6: 1771-1773
- Siu G.M., Draper H.H. 1982. Metabolism of malonaldehyde *in vivo* and *in vitro*. *Lipids*, 17, 5: 349-355

- Šuput D., Kamarič L. 1998. Prosti radikali. Izbrana poglavja iz patološke fiziologije. Ljubljana, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo: 23-43
- TALON™ and TALON Superflow™ Metal Affinity Resin. User manual. 1998. Palo Alto, Clontech laboratories, Inc.: 1-37
- Tatum V.L., Changchit C, Chow C.K. 1990. Measurement of malondialdehyde by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Lipids*, 25, 4:226-229
- Teare J.P., Greenfield S.M., Watson D., Punchard N.A., Miller N., Rice-Evans C.A., Thompson R.P.H. 1994. Lipid peroxidation in rats chronically fed ethanol. *Gut*, 35: 1644-1647
- Templar J., Kon S.P., Milingan T.P., Newman D.J., Raftery M.J. 1999. Increased plasma malondialdehyde levels in glomerular disease as determined by fully validated HPLC method. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 14: 946-951
- Žorž M. 1991. HPLC. Ljubljana, samozaložba: 155 str
- West J.B. (ed.). 1990. Best and Taylor's physiological basis of medical practice. 12. izdaja. Baltimore, Williams & Wilkins: 1170 str
- Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. 1990. Geneva, WHO: 203 str.
- Wong S.H.Y., Knight J., Hopfer S.M., Zaharia O., Leach C.N. Jr., Sunderman W.Jr. 1987. Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malodialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clinical Chemistry*, 33, 2: 214-220
- Yagi K., Nishigaki I., Ohafna H. 1968. Measurement of serum TBA-value. *Vitamins*, 37: 105-112
- Yagi K. 1982. Assay for serum lipid peroxide level and its clinical significance. V: Lipid peroxides in biology and medicine. Yagi K. (ed.). New York, Academic Press: 223-242
- Yau T.M. 1979. Mutagenicity and cytotoxicity of malonaldehyd in mammalian cells. *Mechanisms of Ageing and Development*, 11: 137-144
- Yiin S.J., Lin T.H., Shin T.S. 1996. Lipid peroxidation in workers exposed to manganese. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, 22, 5: 318-386



ZAHVALA

Na tem mestu bi se rada zahvalila vsem, ki so mi kakorkoli pomagali pri izdelavi magistrskega dela:

- mentorju: prof. dr. Karlu Salobirju za strokovno pomoč in spodbudo pri delu,
- somentorici in članicama komisije: prof. dr. Mariji Zelenik-Blatnik, prof. dr. Veroniki Abram in prof. dr. Anamariji Plestenjak za strokovno pomoč,
- vsem sodelavcem Inštituta za prehrano ter ostalim na Oddelku za zootehniko, ki so mi pomagali pri izvedbi poizkusa,
- dr. Blažu Cigiču z Oddelka za živilstvo in njegovi ženi, za rešitev nekaterih problemov, povezanih s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti,
- gospe Marti Anžlovar, univ. dipl. slov., za lektoriranje naloge,
- svoji družini: možu Blažu, materi, tašči in tastu, ki so verjeli vame in mi ves čas stali ob strani.