



GLUTATIONIN VUODENAIKAISVAIHTELU HEVOSILLA

Opinnäytetyö

Anna Jauhiainen

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Hyväksytty ____ . ____ . ____ _____

SAVONIA- AMMATTIKORKEAKOULU

Terveysala, Kuopio

OPINNÄYTETYÖ

Tiivistelmä

Koulutusohjelma: Bioanalytiikan koulutusohjelma	
Suuntautumisvaihtoehto: Bioanalytiikka	
Työn tekijä(t): Anna Jauhiainen	
Työn nimi: Glutationin vuodenaikaisvaihtelu hevosilla	
Päiväys: 1.12.2009	Sivumäärä / liitteet: 34
Ohjaajat: yliopettaja Sirkka-Liisa Halimaa	
Työyksikkö / projekti: Biolääketieteenlaitos, Fysiologia, FT MD MPH Mustafa Atalay	
<p>Tiivistelmä:</p> <p>Antioksidantit ovat aineita tai yhdisteitä, jotka pystyvät estämään elimistössä vapaiden radikaalien haittavaikutuksia. Antioksidanttien tehtävänä on hapettaa reaktiivisia happiyhdisteitä takaisin elimistölle vaarattomaan muotoon. Elimistön aerobisessa aineenvaihdunnassa käytettävästä hapesta osa jää elimistöön ja voi päätyä rakennusaineeksi reaktiivisiin happiyhdisteisiin. Kontrollottomasti syntyvät happiradikaalit aiheuttavat lihasten väsymistä ja sitä kautta lihaskivertä. Elimistön antioksidanttipuolustuskapasiteetti ja hapen reaktiiviset happiyhdisteet ovat yhdistetty luonnolliseen ikääntymis- ja sairastumisprosesseihin.</p> <p>Glutationi (GSH) on elimistön puolustusjärjestelmän tärkein non-entsymattinen antioksidantti. GSH osallistuu elimistön fysiologisiin toimintoihin kiihdyttämällä kalsiumionien virtausta soluun. Eniten GSH:a on elimistön aineenvaihdunnan aktiivisimmissa osissa kuten lihaksissa, maksassa ja punasoluissa. Ravinnossa ei ole valmiita glutationia vaan sitä saadaan seleenipitoisesta ruuasta. Glutationin tehtävänä on aminohappojen kuljetus ja elimistön happo-emästasapainon säätely. Hevosia on käytetty paljon antioksidanttien ja hapetusstressin tutkimiseen, koska hevosilla on korkea maksimaalinen hapenotto-kyky (VO_2max). Näin ollen hapetusstressin vaikutukset huomataan helpommin hevosilla kuin ihmisillä.</p> <p>Opinnäytetyön tarkoituksena oli tarkastella glutationin vuodenaikaisvaihtelua hevosilla. Tutkimus oli osa laajempaa tutkimusta ja se toteutettiin määrittämällä kudoksiotosten glutationipitoisuuksia. Tämän kvantitatiivisen tutkimuksen aineistona olivat Maa- ja elintarviketalouden (MTT) 20 suomenhevostammaa, joista otettiin paikallispuudutuksessa kudoksiotuksia näytteet viisi kertaa vuoden aikana. Mittausmenetelmänä käytettiin yleisesti käytettyä spektrofotometristä menetelmää.</p> <p>Tässä tutkimuksessa ei saatu esille tilastollisesti merkittäviä eroja glutationin pitoisuuksien vaihteluun vuodenaikojen mukaan. Voidaan olettaa, että liikunnalla ja antioksidantti- ja hapetusstressin vähentämisellä on suurempi vaikutus glutationin pitoisuuksien vaihteluun kuin vuodenaikojen vaihtelulla. Jatkotutkimusaihe voisi olla glutationin vuodenaikaisvaihtelu ihmisillä.</p>	
Avainsanat: (1-5) Antioksidantti, glutationi, hevonen, vuodenaikaisvaihtelu	
Julkinen __x__	Salainen ____

SAVONIA UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Health Professions Kuopio

THESIS

Abstract

Degree Programme: Degree programme in Biomedical laboratory sciences	
Option: Biomedical laboratory scientist	
Authors: Anna Jauhiainen	
Title of Thesis: Changes of Glutathione concentrations in seasonal changes	
Date: 1.12.2009	Pages / appendices: 34
Supervisor: Principal lecturer Sirkka-Liisa Halimaa	
Contact persons: University of Kuopio Department of Physiology FT MD MPH Mustafa Atalay	
<p>Abstract:</p> <p>Antioxidants are chemical elements or compounds which can prevent the oxidative effects of free radicals in the human system. In controllably forming oxygen radicals induce muscle fatigue which may lead to muscle damage. The defence capacity of antioxidants and reactive oxygen species in the human system are known to be related to the natural aging process and conditions which overcome. Glutathione (GSH) is the most important non-enzymatic antioxidant of the human defence mechanism. GSH takes part in many physiological functions by accelerating the flow of calcium ions into the cells. GSH is most abundant in the most active body parts such as muscles, liver and red cells. Nutrition does not contain complete glutathione, therefore selenium uptake is essential to the synthesis of GSH. The purpose of glutathione is the transportation of amino acids and regulation of the acid-base-balance. Horses have been widely used in the research of antioxidants and oxidative stress, for they have a high maximal oxygen consumption (VO_{2max}). Therefore the effects of oxidative stress are more easily observed in horses than humans.</p> <p>The objective of this thesis was to monitor the seasonal changes of glutathione levels in horses. This investigation was part of a larger research and was carried out by measuring glutathione concentration in tissue biopsies. The material for this quantitative research was 20 Finnhorse mares from MTT, which were sampled for tissue biopsies during general anesthesia – this was done five times within a year. GSH-concentrations were measured using a common spectrophotometric method.</p> <p>No statistically significant differences in glutathione concentrations were observed in this investigation. It can be presumed that physical exercise and antioxidant supplementation, rather than annual seasons, have an influence on changes of glutathione concentrations. Additional research could be done on seasonal change of glutathione in humans.</p>	
Keywords: (1-5) Antioxidant, glutathione, horse, seasonal change	
Public <input type="checkbox"/>	Secure <input type="checkbox"/>

SISÄLTÖ

1. JOHDANTO	5
2. TEOREETTINEN TAUSTA	7
2.1 Elimistön vapaat radikaalit	7
2.2 Elimistön reaktiiviset happiyhdisteet	7
2.3 Elimistön antioksidanttijärjestelmä	9
2.3.1 Glutacioni ja sen merkitys elimistön puolustusjärjestelmässä.....	10
2.3.2 Elimistön muita tärkeitä antioksidantteja.....	11
2.4 Elimistön hapetusstressi elimistön epätasapainotilan aiheuttajana ja liikunnan vaikutus	13
2.5 Vuodenaikojen vaihtelu hevosen ruokinnassa.....	16
3. TUTKIMUKSEN TARKOITUS, TAVOITE JA TEHTÄVÄ	18
4. AINEISTO JA MENETELMÄ	18
4.1 Kudosbiopsianäytteet	18
4.2 Näytteiden käsittely	19
4.3 Liuosten valmistus glutacionin mittaamista varten.....	19
4.4 Laite ja mittausmenetelmän kuvaus	20
4.5 Näytteiden mittaus.....	21
4.6 Tulosten tulkintamenetelmä	22
5. TUTKIMUKSEN LUOTETTAVUUS JA EETTISYYS	22
6. TULOKSET.....	24
6.1 Glutacionin (GSH) vuodenaikaisvaihtelun tulokset	24
6.2 Hapettuneen glutacionin (GSSG) vuodenaikaisvaihtelun tulokset.....	25
6.3 Kokonaisglutacionin (TGSH) vuodenaikaisvaihtelun tulokset.....	26
7. POHDINTA	28
LÄHTEET	31

1. JOHDANTO

Antioksidantit ovat aineita tai yhdisteitä, jotka pystyvät estämään elimistössä vapaiden radikaalien hapettavia vaikutuksia. Tehokkaan antioksidatiivisen puolustusjärjestelmän ansiosta aerobisten organismien elämä on mahdollista hapen ja reaktiivisten happiyhdisteiden ympäristössä. Ne voidaan jakaa elimistön itsensä tuottamiin entsyymaattisiin antioksidantteihin ja ruuan mukana saataviin non-entsyymaattisiin antioksidantteihin. (Mäntylä & Vuori 1994, 1629–1631; Lappalainen 2003, 14; Juntunen 2008, 17.) Aerobisessa aineenvaihdunnassa käytettävästä hapesta osa jää elimistöön ja voi päätyä rakennusaineeksi reaktiivisiin happiyhdisteisiin. (Lappalainen 2003, 14; Juntunen 2008, 10.) Elimistössä tapahtuvia pelkistyneen hapen reaktiivisia muotoja voidaan kutsua ROS:ksi (reactive oxygen species) (Juntunen 2008, 9-12). Antioksidanttien tehtävänä on hapettaa reaktiivisia happiyhdisteitä takaisin elimistölle vaarattomaan muotoon.

Glutathioni on puolustusjärjestelmän tärkein non-entsyymaattinen antioksidantti (Atalay 1998, 21–22). Glutathioni osallistuu elimistön fysiologisiin toimintoihin kiihdyttäen kalsiumionien virtaa soluun (Hermann 2003, 11). Eniten glutathionia on elimistön aineenvaihdunnan aktiivisimmissa osissa kuten lihaksissa, maksassa ja punasoluissa. Ravinnossa ei ole valmista glutathionia vaan elimistö valmistaa sitä seleenipitoisesta ruuasta. Glutathionin tehtävinä on aminohappojen kuljetus ja elimistön happo-emästasapainon säätely. (Atalay 1998, 21–22; Lappalainen 2003, 20–21.)

Hevosia on käytetty paljon antioksidanttien ja hapetusstressin tutkimiseen, koska hevosilla on korkea maksimaalinen hapenottokyky ($VO_2\text{max}$) (Kinnunen ym. 2009). Hevosilla on myös korkea aerobinen kapasiteetti ja ne harjoittelevat mielellään korkealla intensiteetillä (Tyler, Golland, Evans, Hodgson & Rose 1998, 391). Näin ollen hapetusstressin vaikutukset huomataan helpommin hevosilla kuin ihmisillä (Kinnunen ym. 2009).

Luonnossa ravintoaineiden saanti vaihtelee vuodenaikojen mukaan. Varsinkin talvikausina vitamiiniantioksidantteja saadaan ravinnon mukana niukemmin ja lisäravinteiden tarve kasvaa. Vuodenaikojen kierto on luonnollinen asia ja siihen liittyy olennaisesti valon ja ilmaston vaihtelut. Tästä syystä tutkimuksen kohteeksi oli luonnollista valita

eläin. Samoja menetelmiä voidaan joka tapauksessa soveltaa myös tutkittaessa ihmisten glutationipitoisuuksia.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli tarkastella glutationin vuodenaikaisvaihtelua hevosilla. Tutkimus oli osa laajempaa tutkimusta ja se toteutettiin määrittämällä kudossiopsioiden glutationipitoisuuksia. Glutationin pitoisuuksia voidaan määrittää myös plasmasta ja punasoluista, mutta tähän tutkimukseen kudospnäyte oli paras.

Tämän kvantitatiivisen tutkimuksen aineistona olivat Maa- ja elintarviketalouden (MTT) Hevostutkimuksen Ypäjän tutkimustallin 20 suomenhevostammoista otetut kudossiopsianäytteet. Mittausmenetelmänä käytettiin yleisesti käytettyä spektrofotometristä mittausmenetelmää. Sitä käytetään yleensä aineiden tunnistamiseen, niiden puhdistukseen ja pitoisuuden määrittämiseen. (Halonen 2004, 66–67; Solunetti 2006.) Spektrofotometri on yleisesti käytetty menetelmä myös potilastutkimuksissa, koska se on luotettava ja moniin tutkimuksiin sopiva.

Oman ammatillisen kasvun ja ammatillisen kehityksen näkökulmasta tavoitteena oli oppia tutkitun tiedon hakua ja tieteellisen tiedon käsittelyä sekä tiedon käsittelyä ja laajemman tekstin kirjoittamista. Käytännön tutkimusosassa tavoitteenani oli oppia luotettavaa ja laadukasta laboratoriotyöskentelyä ja erilaisia määritysmenetelmiä sekä tutkimuksen tulosten luotettavaa tarkastelua. Aiheen valinta perustui osaksi kiinnostus tutkimuspuoleen ja osaksi syvä kiinnostus hevosiin.

2. TEOREETTINEN TAUSTA

2.1 Elimistön vapaat radikaalit

Vapaa radikaali voi olla mikä tahansa molekyyli tai molekyylin osa, jolla on uloimmalla elektronikuorellaan yksi tai useampi pariton elektroni (Huttunen 1994, 1606; Lappalainen 2003, 10). Happiradikaalit ovat happea sisältäviä molekyyliä tai molekyyliyhdistymiä, joilla on uloimmalla elektronikuorella parittomia elektroneja. Happiradikaalit voivat reagoida muiden yhdisteiden kanssa, jolloin ne yhdistyvät tai vievät toisilta elektroneja. Radikaalireaktiot ovat nopeita ja niitä syntyy koko ajan normaaleissa fysiologisissa oloissa. Tärkeintä on pitää elimistön biologiset hapettumis- ja pelkistymisreaktiot tasapainossa, jossa elimistön antioksidantit toimivat suuressa osassa. (Lappalainen 2003, 4-5.)

Elimistössä solut kuluttavat koko ajan happea eli energian tuotto on aerobista. Tällöin noin 95 % kulutetusta hapesta kuluu energian vapauttamiseen ravinnosta, jolloin lopputuotteina syntyy adenosiniinrifosfaattia (ATP), hiilidioksidia ja vettä. Käytetystä hapesta 1-3 % saattaa jäädä elimistöön ylimääräisenä. (Lappalainen 2003, 10.)

Vapaiden radikaalien huomattiin vuonna 1956 liittyvän luonnolliseen ikääntymiseen. Proteiinikarbonyylien normaali kronologinen ikä ja samalla niiden fysiologinen ikä ja tila vaikuttavat vanhenemisen merkkeihin. Proteiinikarbonyylit saattavat olla biomarkkereita luonnollisessa ikääntymisessä, jota hapetusstressi saattaa nopeuttaa. (Sen 1994, 24.)

2.2 Elimistön reaktiiviset happiyhdisteet

Elimistössä muodostuvia hapen reaktiivisia muotoja voidaan kutsua reaktiivisiksi happiyhdisteiksi eli ROS: eiksi (reactive oxygen species). Mikä tahansa entsyymi tai elektroninsiirron proteiini pystyy muodostamaan elektroninsiirtoketjun sivutuotteena reaktiivisia happiyhdisteitä. Solunsisäisinä reaktiivisten happiyhdisteiden lähteinä toimivat entsyymaattiset ja non-entsyymaattiset reaktiot. Solussa pääasiallinen lähde reaktiivisille happiyhdisteille on mitokondrio, jonka elektroninsiirtoketjussa reaktiivisia happiyhdis-

teitä muodostuu 2-5 % elimistön kokonaishapenkulutuksesta. Koska radikaalit ovat lyhytikäisiä, niiden määrää on hankala mitata suoraan. Epäsuorilla mittausten menetelmillä voidaan kuitenkin joko mitata yhdisteen määrää, jossa syntyneet radikaalit muutetaan pysyvämmäksi yhdisteeksi tai mitata syntyneiden vaurioiden määrää. (Juntunen 2008, 9-12.)

Elimistön aerobisessa aineenvaihdunnassa käytettävästä hapesta osa jää elimistöön ja voi päätyä rakennusaineeksi reaktiivisiin happiyhdisteisiin, joilla usein tarkoitetaan kaikkia hapen reaktiivisia muotoja (Lappalainen 2003, 11; Juntunen 2008, 10.) Kontrollimattomasti syntyvät happiradikaalit aiheuttavat lihasten väsymistä ja sitä kautta lihasvaurioita (Atalay 1998, 13). Elimistön antioksidanttipuolustuskapasiteetti ja hapen reaktiiviset happiyhdisteet ovat yhdistetty luonnollisiin ikääntymis- ja sairastumisprosesseihin (Atalay, Lappalainen & Sen 2006).

Reaktiivisten happiyhdisteiden vaikutukset käsitetään helposti negatiivisiksi, mutta pieninä pitoisuuksina ne vaikuttavat myös elimistön yleiseen hyvinvointiin. Terveellä ihmisellä reaktiiviset happiyhdisteet tuhoavat elimistöön hyökkäviä mikro-organismeja. (Sen 1994, 23.) Kontrolloitu reaktiivisten happiyhdisteiden muodostuminen on tärkeää elimistön signaloinnissa eli viestien välityksessä. Reaktiiviset happiyhdisteet ja typpioksididi (NO) toimivat elimistössä sopivana pitoisuutena välittäjäaineena reseptorien ja tuuman signaloinnissa. Signaloinnilla saadaan muutoksia solunsisäiseen happitasapainoon. Happiyhdisteet toimivat signaalimolekyylinä myös useissa fysiologisissa toiminnoissa kuten ventilaation kontrolloinnissa, verisuonitonuksen säätelyssä, osana erytropoietiniin tuotannon tarkkailua ja kalvorseptorien signaalivälitysprosesseissa. Vaikutus huomataan entsyymiaktiivisuuden muutoksena ja sen välittymisenä esimerkiksi solun jakautumiseen ja kuolemaa säätelevään signaalointiin. Sopiva määrä hapettuneita happiyhdisteitä ja typpioksidia on välttämätöntä luurankolihasen supistuksen signaalointiin, mutta liian suuret pitoisuudet johtavat supistusvoiman heikkenemiseen. (Juntunen 2008, 10–13.)

Maksa- ja munuaissoluissa haitallisia aineita muutetaan vaarattomiksi happiyhdisteiden avulla. Fagosytoivissa soluissa on solukalvolla oksidaaseja, jotka muodostavat O_2^- :ta. Parhaiten tunnettu oksidaasi on NADPH-oksidaasi, joka toimii vieraita mikro-organismeja vastaan immuunipuolustuksessa. (Juntunen 2008, 10–13.) Elimistössä reaktiivisten happiyhdisteiden ylimäärä voidaan torjua antioksidanttien avulla, jotka tor-

juvat ylimääräisten yhdisteiden muodostumista ja poistavat jo syntyneitä yhdisteitä. (Mäntylä & Vuori 1994, 1631.)

2.3 Elimistön antioksidanttijärjestelmä

Antioksidantit ovat aineita tai yhdistelmiä, jotka pystyvät estämään vapaiden radikaalien hapettavia vaikutuksia. Tehokkaan antioksidatiivisen puolustusjärjestelmän ansiosta aerobisten organismien elämä hapen ja reaktiivisten happiyhdisteiden ympäristössä on mahdollista. Ne pystyvät myös pelkistämään jo hapettuneen yhdisteen. Antioksidantit voidaan jakaa elimistön itsensä tuottamiin entsyymaattisiin antioksidantteihin (mm. katalaasi ja glutationiperoksidaasi) ja ruuan mukana saataviin non-entsyymaattisiin antioksidantteihin (mm. glutioni, C-vitamiini, E-vitamiini, bilirubiini, virtsahappo ja karotenoidit). (Mäntylä & Vuori 1994, 1631; Lappalainen 2003, 14; Juntunen 2008, 17.) Vetyperoksidin (H_2O_2) ja orgaanisen vetyperoksidin poistaminen elimistöstä tapahtuu entsyymaattisten antioksidanttien avulla (Juntunen 2008, 17). Monet antioksidantit tarvitsevat toisiaan, jotta toiminta elimistön puolustuksessa olisi tehokasta, esimerkiksi E-vitamiini ja glutioni täydentävät toisiaan (Atalay 1998, 14–15).

Antioksidanttien on osoitettu suojaavan elimistöä sydän- ja verisuonisairauksilta sekä muistihäiriöiltä (Atalay 1998, 14). C- ja E- vitamiinin on todettu urheilun ohessa auttavan elimistön puolustusta ja vähentävän reaktiivisten happiyhdisteiden muodostumista. Tutkimuksessa “Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans” ei saatu eroja treenaamattomien ja treenanneiden ryhmien välille, kun vitamiiniannos oli sama. (Ristowa ym. 2009, 8665.) Järvisen (2002, 1313) tutkimuksen mukaan antioksidanttimekanismien yhteisvaikutuksella oli suojaava vaikutus keuhkosyövässä. Pleuran mesotelioomassa antioksidatiiviset puolustusmekanismit olivat korostuneet terveeseen kudokseen verrattuna. Välimeren maissa ruokavalion on huomattu vaikuttavan positiivisesti veren rasva-arvoihin ja tehostavan elimistön puolustautumista hapetusstressiltä. Kasvispainotteinen ruokavalio nostaa plasman vitamiiniantioksidanttipitoisuuksia ja vähentää riskiä saada hapetusstressin aiheuttamia vaurioita. (Atalay ym. 2006 183–184.) Hevosilla antioksidanttien puutoksessa on havaittu selvä yhteys lihaksien toimintaan. Puutos aiheuttaa muun muassa kausittaista lihassairautta ja rhabdomyolyysiä, jossa poikkijuovaiset lihakset vaurioituvat (tying-up syndrooma) (Kirschvink, Moffarts & Lekeux 2007, 178–179).

2.3.1 Glutationi ja sen merkitys elimistön puolustusjärjestelmässä

Glutationi (GSH) on puolustusjärjestelmän tärkein non-entsymattinen antioksidantti. Eniten GSH:ta on elimistön aineenvaihdunnan aktiivisimmissa osissa kuten lihaksissa, maksassa ja punasoluissa. (Atalay 1998, 21; Lappalainen 2003, 9-11; Kinnunen ym. 2005, 551). Glutationi on rakenteeltaan kolmesta aminohaposta muodostuva peptidi eli tripeptidi (γ -glutamyl-kysteinyglysiini) (Lappalainen 2003, 9; Juntunen, 2008, 20). Se osallistuu fysiologisiin toimintoihin kiihdyttäen kalsiumionien virtaa soluun (Hermann 2003, 10). Ravinnossa ei ole valmista glutationia vaan sitä saadaan seleenipitoisesta ruuasta. Glutationin syntetisointi tapahtuu sytoplasmassa, mutta sen konsentraatio on korkeampi solun mitokondriossa. (Atalay 1998, 22–23.) Elimistö tarvitsee glutationin valmistukseen seleenin lisäksi B₆-vitamiinia imeytymiseen ja metaboliaan (Sen 1994, 41–42). GSH on tärkeässä asemassa monissa fysiologisissa toiminnoissa. Sen tehtäviä on mm. proteiinien syntetisointi ja uudelleenvalmistus, aminohappojen kuljetus, entsyymien säännöstely ja redox-puskurointi sekä toiminta non-entsyymattisena tioliantioksidanttina. Se lisää myös vitamiiniantioksidanttien (E- ja C-vitamiinien) vaikutusta pelkistämällä hapettuneita muotoja takaisin. (Sen 1994, 29–30; Atalay 1998, 22; Lappalainen 2003, 20–21.)

Liikunnan aikana glutationi hapettuu, jolloin muodostuu glutationi disulfidia (GSSG) (Sen & Packer 2000, 653; Lappalainen 2003, 14). Hapettunut glutationi voidaan pelkistää takaisin glutationiksi käyttämällä NADPH:ta protoniluovuttajana. (Atalay 1998, 22; Sen & Packer 2000, 653). Glutationin muuttuminen reaktioyhtälönä: $GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2 GSH + NADP^+$ (Halliwell & Gutteridre 1999, 140).

Myös eläimillä on tutkittu paljon seleenin, josta elimistö muodostaa glutationin, vaikutusta eri sairauksien yhteydessä. Seleenin ja E-vitamiinin puutteen yhteys on pystytty osoittamaan erilaisiin lihassairauksiin, esimerkiksi sydänlihassairauksiin ja lihasvapiinaan. Myös ihmisillä on todettu glutationin puutteen yhteys erilaisiin sydänsairauksiin, kuten laajentuneeseen sydämeen, suonitukoksiin, rytmihäiriöihin ja jopa sydänpysähdyksiin sekä 5-13-vuotiailla lapsilla jänneaurioihin. Vastaavasti liika seleeni ja E-vitamiini voi olla myrkyllistä. (Halliwell & Gutteridre 1999, 159–161.) Calamari, Ferrari ja Bertin (2009, 178) tutkivat hevosilla lisäseleenin vaikutusta elimistön seleeni- ja glutationiperoksidaasipitoisuuteen. Tuloksista todettiin seleeniä saaneilla hevosilla selvä nousu seleenipitoisuudessa, mutta ei glutationiperoksidaasiaktiivisuudessa.

Glutationiperoksidaasin (GPx) toiminta on riippuvainen glutationin määrästä. GPx vaikuttaa solulimassa ja mitokondriossa katalysoimalla H_2O_2 :n H_2O :ksi ja alkoholiksi käyttämällä glutationia elektroninluovuttajana. Glutationiperoksidaasi pystyy hapettamaan glutationia glutationisulfidiksi (GSSG) ja pelkistämään monia erilaisia vetyperoksidin muotoja. GSSG voidaan pelkistää takaisin GSH:ksi glutationidisulfidireduktaasin (GRD) avulla käyttämällä NADPH:ta protoniluovuttajana. (Halliwell & Gutteridge 1999, 140–150.)

2.3.2 Elimistön muita tärkeitä antioksidantteja

C-vitamiini (L-askorbiinihappo, askorbiini) on vesiliukoinen vitamiini, jota saadaan ravinnosta eikä sitä voida syntetisoida elimistössä. Se pystyy palauttamaan E-vitamiinin ja lipoiinihapon hapettuneesta muodosta. (Lappalainen 2003, 10.) Hevosella C-vitamiinia muodostuu paksusuolella riittävästi normaalioloissa, jos hevosella ei ole mahdollisesti imeytymishäiriöitä. (Lillkvist 2002, 108–109.) C-vitamiinilla on suuri pelkistyspotentiaali, ja se kykenee muuttaman suurimman osan hapen radikaaleista vaarattomiksi. Hapettuneen C-vitamiinin (dehydroaskorbaatti) pelkistys voidaan tehdä esim. lipoiinin tai glutationin avulla. C-vitamiini pystyy toimimaan antioksidanttina vain, jos siirtymäalkuaineeksi luokiteltavia transitiometalleja (kupari Cu/rauta Fe) ei ole läsnä samaan aikaan. Transitiometallit mahdollistavat suurten C-vitamiinimäärien toiminnan pro-oksianttina samaan tapaan kuin E-vitamiinin. (Lappalainen 2003, 10–11.)

C-vitamiinia tarvitaan raudan hyväksikäyttöön ja muiden vitamiinien hyväksikäyttöön sekä vastustuskyvyn ylläpitoon. Puutosoireita ovat anemia, huono yleiskunto ja infektiot. Pitkään jatkuvassa puutostilassa ilmenee keripukkia, jolloin nivel- ja luustokivut ovat yleisiä. (Lillkvist 2002, 108–109.)

Ihmistutkimuksissa C-vitamiinin tutkimusnäyttö on vähäistä, vaikka sen on osoitettu vähentävän koe-eläimillä muun muassa diabetekseen liittyvää hapetusstressiä. (Lappalainen 2003, 10–11.) Terveillä, tupakoimattomilla aikuisilla tehty tutkimus osoitti, että kahden viikon C-vitamiinilisä nosti punasolujen glutationipitoisuutta jopa 50 % (Sen 1994, 44–45).

E-vitamiini (alfa-tokofenoli) on rasvaliukoinen vitamiini, jota saadaan ravinnosta. Sen pitoisuus elimistössä on korkein verrattuna muihin antioksidantteihin. E-vitamiinilla on suuri osuus antioksidanttipuolustuksessa ja hapetusstressin torjumisessa. Se osallistuu myös useisiin aineenvaihduntareaktioihin (Lappalainen 2003, 10). On tutkittu, että E-vitamiinilisästä on hyötyä urheilijoiden ja vanhusten lihaskunnan ylläpidossa ja elimistön hyvinvoinnissa, koska elimistö tarvitsee E-vitamiinia rasvojen polttoon ja hapetusstressin torjumiseen. E-vitamiinin vaikutusta on tutkittu myös verisuonten ahtautumiseen ja sepelvaltimotukoksiin ja havaittu sen vähentävän riskiä. E-vitamiini pystyy vaihentamaan happiradikaaleja ja edistämään sitä kautta elimistön tasapainoa. (Atalay 1998, 25–26.) E-vitamiini pystyy estämään lipidien hapettumista, jolloin sen on huomattu vähentävän myös lihasproteiinien hapettumista. Lisäksi se pystyy myös toimimaan pro-oksianttina hapettamalla mm. lipoproteiineja. E-vitamiini hapettuu itse vain heikoksi radikaaliksi, jolloin se voidaan regeneroida eli palauttaa muiden antioksidanttien avulla. E-vitamiinin puutos voi suurentaa lipidiperoksidaatiota ja nopeuttaa ROS-tuotantoa. (Lappalainen 2003, 10.)

Hevosilla, etenkin kilpa- ja siitoshevosilla, E-vitamiinin suositusannoksia on jatkuvasti nostettu, koska E-vitamiini on erittäin tärkeä lihasten toiminnalle energian tuotannossa ja hapenotossa. Riittävä E-vitamiinitaso auttaa lihasten toimintaa hapettomissa oloissa (anaerobinen energiantuotto), mikä siis on tärkeää äärimmäisissä kilpailusuorituksissa. Hapenkuljetukseen vaikuttaa myös se, että E-vitamiini osallistuu hemoglobiinin valmistukseen. A-vitamiinin ja seleenin imeytyminen ja sitä kautta glutationin valmistuminen sekä aineenvaihdunta ovat riippuvaisia E-vitamiinista. Myös yhteys vastustuskykyyn on havaittu. Puutosoireet alkavat usein lihasongelmina eli jäykkyytenä ja kipeytymisenä, koska silloin elimistön hapenkulutus on epänormaalia. (Lillkvist 2002, 99–100.)

Rotilla on tehty tutkimus E-vitamiinin ja kalaöljyn vaikutuksista antioksidanttien pitoisuuksiin. E-vitamiini näytti nostavan kokonaisglutationin (TGSH) aktiivisuutta maksassa ja sydänlihaksessa. Kalaöljy taas nosti katalaasi ja glutatiniperoksidaasin aktiivisuutta maksassa, mutta laskee TGSH-tasoa. E-vitamiini laskee kalaöljyn aiheuttamia antioksidanttientsyymien aktiivisuutta kaikissa tapauksissa. Glutationin säästäminen voi olla tärkeä mekanismi, jolla E-vitamiini laskee hapetusvaurioita kudoksissa. TGSH näyttää suojaavan maksaa hapetusvaurioilta. (Sen ym. 1997, 195.)

Superoksidismutaasi (SOD) on elimistössä ensimmäinen entsyymi happiradikaalien katalysoinnissa. Eukaryootti solussa esiintyy kahdenlaisia superoksidismutaasi entsyymejä, jotka ovat tärkeä osa entsyymaattista antioksidanttisysteemiä. Ne suojaavat solun herkkiä rakenteita vaurioitumiselta katalysoimalla O_2^- :n H_2O_2 :ksi ja hapeksi. Erimuotoisten superoksidismutaasi entsyymien aktiivisuus perustuu redox-aktiiviseen metallioniin, jonka läsnäolo on välttämätön O_2^- pilkkomiselle. (Sen 1994, 27; Juntunen 2008, 23.)

Kupari/Sinkki (Cu/Zn) superoksidismutaasi (SOD1)- entsyymi sijaitsee yleensä mitokondrion uloimmassa tilassa ja sytoplasmassa. Tehtävänä on poistaa solulimassa olevien entsyymien muodostamaa O_2^- :n tuottamaa H_2O_2 :ta ja happea. Vaikutusta voi olla myös solunsisäiseen signaalointiin. Mangaani (Mn) superoksidismutaasi (SOD2) sijaitsee mitokondrion sisimmässä tilassa ja on solulle elintärkeä, koska suurin osa hengitysketjun tuottamasta O_2^- :n ylimäärästä voidaan poistaa mitokondrion matriksissa. (Juntunen 2008, 23–24.)

Lipoaatin on todettu tehostavan muiden tärkeiden antioksidanttien tehoa ja vähentävän lipidiperoksidaatiota liikuntatutkimuksissa. Sen on myös havaittu lisäävän glukoosinottoa luurankolihasessa, lähes yhtä paljon kuin insuliini, sillä lipoaatin vaikutus on samantapaista sytoplasmian solukalvon signaalointimekanismeissa kuin insuliinilla. Sen vuoksi lipoaatilla saattaa olla myös terapeuttisia vaikutuksia diabeteksen ja siihen liittyvän hapetusstressin hoidossa. (Lappalainen 2003, 11.)

Katalaasia (CAT) löytyy kaikista organismeista. Eniten katalaasia on maksan ja munuaisten peroksisomeissa. (Sen 1994, 29.) Sen tehtävänä on muuttaa H_2O_2 takaisin H_2O :ksi ja O_2 :ksi ja hapettaa esimerkiksi metanolia ja etanolia. Katalaasi vaikuttaa aerobisten solujen peroksisomeissa, jotka osallistuvat solusta poistettavien aineiden hajoamiseen (Lappalainen 2003, 9). Rotilla katalaasia on löydetty myös sydänlihaksen mitokondrioiden matriksista (Atalay 1998, 21).

2.4 Elimistön hapetusstressi elimistön epätasapainotilan aiheuttajana ja liikunnan vaikutus

Hapetusstressi on elimistössä oleva epätasapainotila vapaiden radikaalien ja antioksidanttijärjestelmän välillä. Solun normaalissa toiminnassa syntyy aina pieniä määriä va-

paita radikaaleja ja se onkin tarkoituksenmukaista elintoimintojen säätelylle. Jos reaktiivisia yhdisteitä muodostuu elimistössä liikaa ja elimistön reaktiivisten happiyhdisteiden määrä on suurempi kuin sen torjunta, syntyy hapetusstressi. Hapetusstressi kuluttaa elimistön happivarastoja ja saattaa aiheuttaa vaurioita proteiineihin, lipideihin ja DNA:han. (Lappalainen 2003, 12; Juntunen 2008, 9.)

Elimistön hapetus/pelkistys (redox) -tilan häiriöt ovat osa hapetusstressiä. Sitä säätelevät glutationi ja tioredoksiini sekä vapaat radikaalit. Jos elimistön aineenvaihdunnassa muodostuu liikaa vapaita radikaaleja, laukeaa hapetusstressi, joka auttaa elimistöä redox- tasapainon ylläpitämisessä. On arveltu, että solun redox-tilalla on tärkeä vaikutus erilaistumisen, kasvun ja solukuoleman säätelyssä. (Khanna 2000, 37; Juntunen 2008, 9.)

Hapetusstressi muuttaa herkästi proteiinien rakennetta, koska peptidiketjujen päissä on muuntumisherkkiä aminohappoja. Muuntuneet proteiinit ovat herkempiä proteaasien vaikutuksille, esimerkiksi solukalvojen biologiset ominaisuudet muuttuvat, kun rakenneosina olevat lipidit suurenevat hapetusstressin vaikutuksesta. Se heikentää solukalvon reseptorien toimintaa, joka voi aiheuttaa solussa aineenvaihdintahäiriöitä ja solukuoleman, kun solun aineenvaihdunta vaikeutuu ja sen konsentraatio muuttuu. Myös solun perimään voi tulla muutoksia, kun DNA:n kaksoisjuoste saattaa katketa tai siihen liittyy vieraita radikaaliyhdisteitä. (Halliwell & Gutteridre 1999, 246–249; Lappalainen 2003, 12.)

Hapetusstressi ja hapettuneet yhdisteet voivat tuhota elimistöä solutasolla. Ne voivat olla solutason patogeenien aiheuttajia, jos solun rasvahapot hapettuvat, jolloin koko solu vaurioituu. Tällöin myös solun voimalaitos, mitokondrio, vaurioituu ja proteiinisynteesi häiriintyy. Hapetusstressin vaikutusta valkosoluihin ja immuunipuolustukseen on myös tutkittu. Hapettuminen voi vaurioittaa puolustuksen signaaleja ja aiheuttaa solukuoleman. (Khanna 2000, 31–32.) Hevosilla hapetusstressi voi aiheuttaa muun muassa erilaisia lihas- ja kudolvaurioita ja neurologisia häiriöitä (Soffer 2007, 135–137). Rotilla on tutkittu vaurioita mitokondriotasolla ja todettu, että harjoittelu ja E-vitamiinilisä lisäävät kestävyyttä (Halliwell & Gutteridre 1999, 536–537).

Hapetusstressin määrään vaikuttavat myös ravitsemustekijät, koska runsaan monityytyttymättömien n-3-rasvahappojen (esim. kalaöljyssä) saannin on huomattu lisäävän

LDL:n hapettumista ja solukalvojen peroksidaatiota. Toisaalta kalaöljyillä saattaa olla vaikutusta hapetusstressin muodostumisessa, koska se suurentaa muun muassa solukalvon E-vitamiinipitoisuutta ja vähentää tulehdusreaktioita. Kalaöljyjen kokonaisvaikutus hapetusstressiin on kuitenkin vielä epäselvää. (Lappalainen 2003, 13.)

Fyysinen rasitus voi nostaa elimistön hapenkulutuksen 20-kertaiseksi verrattuna lepoon. Lihasten hapenkulutus voi nousta jopa 200-kertaiseksi. Kun rasitus on tarpeeksi suurta, reaktiivisten happiyhdisteiden muodostus on niin suurta, että antioksidanttipuolustus ylittyy ja syntyy hapetusstressiä. Sen voimakkuus riippuu kudoksen kyvystä tehdä reaktiiviset happiyhdisteet vaarattomaksi antioksidanttipuolustuksen avulla. (Juntunen 2008, 16–18.)

Aerobinen liikunta suurentaa hapenkulutusta (VO_2), jolloin reaktiivisten happiyhdisteiden tuotanto kasvaa. Normaalisti teholtaan alle 50 % maksimaalisesta hapenottokyvystä (VO_{2max}) liikunta ei aiheuta antioksidatiivisen puolustuskapasiteetin ylitystä. On kuitenkin huomattu, että hapenkulutuksen ja hapetusstressin välillä on korrelaatio eli mitä raskaampaa liikunta on, sitä enemmän on reaktiivisten happiyhdisteiden muodostumista ja hapetusstressiä elimistössä. Säännöllisen liikunnan on huomattu voivan parantaa solun suoja mekanismeja, joten huono kunto altistaa hapetusstressin vaurioille. Toistuvalla liikunnalla on vaikutusta antioksidanttientsyymien aktiivisuuksiin. Solun korjaus- ja antioksidanttisysteemien tehostuminen saattavat olla mekanismeja, joilla saadaan liikunnan hyödyt välittymään terveyteen. (Juntunen 2008, 16–17.)

Liikunnan aikana kokonaisglutationin (TGS) määrä ei muutu, mutta glutathionin ja hapettuneen glutathionin (GSH/GSSG) suhde pienenee. Glutathioni pitoisuus laskee akuutin liikunnan seurauksena, koska se hapettuu jo pienessä rasituksessa. (Lappalainen 2003, 14). Superoksidismutaasin, glutathioniperoksidaasin ja glutathionin määrä ja aktiivisuus nousevat poikkijuovaisissa lihassoluissa säännöllisellä yli 60 min/ pv tai intensiivisellä yli 30 min/ pv kestävyysharjoittelulla (Sen, Marin, Kretzschmarr, Hänninen 1992, 1265–1267; Juntunen 2008, 26). Rotilla tehdyssä juoksutestissä sydänlihaksessa glutathionin pitoisuuden havaittiin pysyvän samana tai jopa nousevan. (Atalay, Seene, Hänninen & Sen 1996, 129).

Elimistö pystyy sopeutumaan ja tottuu ajan myötä hapetusstressiin, jos tila ei kasva liian suureksi (Halliwell & Gutteridge 1999, 246–249). Pieni määrä hapetusstressiä voi liittyä

kokonaisvaltaisesti harjoittelun terveysvaikutuksiin (Atalay 1998, 13). Fyysisen rasituksen ja sitä kautta hapetusstressin aiheuttamat vauriot on todistettu useissa ihmis- ja eläintutkimuksissa (de Moffarts ym. 2007, 114). Jamaikalla tehdyssä tutkimuksessa lapsilla huomattiin proteiininvajaussairaus, jossa rautaa oli elimistössä ylimäärin, mutta glutatationin määrä matala. Seurauksena oli erilaisia lihasongelmia. (Halliwell & Gutteridge 1999, 246–249.)

2.5 Vuodenaikojen vaihtelu hevosen ruokinnassa

Vuodenaikojen kierto on luonnollinen asia ja siihen liittyy olennaisesti valon ja ilmaston vaihtelut ja sitä kautta eläimille syntynyt sisäinen kello. Tärkeimmät rytmit ovat valoisuuden ja maan liikkeiden kautta tulevat vaihtelut. On tutkittu, että nisäkkäillä sisäinen kello sijaitsee hypotalamuksessa. (Guiseppe & Giovanni 2002, 145–146.) Luonnossa ravintoaineiden saanti vaihtelee vuodenaikojen mukaan. Koska antioksidantteja saadaan ravinnon mukana (varsinkin E- ja C-vitamiini), talvikausina lisäravinteen tarve kasvaa.

Luonnossa elävillä eläimillä myös ravinto vaihtelee vuodenajan mukaan. Tutkittavilla hevosilla ei ollut täysin luonnonmukainen ruokinta Suomen luonnonoloista johtuen. Lillkvistin (2002, 150–151) mukaan kesällä tuoreessa laidunheinässä on enemmän vitamiineja ja ravinteita, kuin kuivatussa ja talven yli säilötyssä heinässä, koska varastoidessa ravintoaineissa tapahtuu väkisinkin hävikkiä.

Hevosille laiduntaminen on luonnollisinta, koska hevosen ruuansulatus on kehittynyt pienissä erissä syömiseen ja rauhalliseen, jatkuvaan kävelyyn ruuan perässä (Lillkvist 2002, 144). Tuore laidunheinä on hevosille luontaisinta ravintoa ja hyvällä laitumella hevonen voi saada siitä kaiken tarvitsemansa energian ja valkuaisen. (Saastamoinen & Teräväinen 2003, 20–21.) Tarvittaessa voidaan antaa lisäksi kivennäis- ja hivenaineita (Saastamoinen & Teräväinen 2003, 20–21), mutta periaatteessa hyvä laidunheinä sisältää kaikki ravintoaineet oikeassa suhteessa keskenään (Lillkvist 2002, 144). Laidunheinän tarkkoja ravintoarvoja on hankala määrittää, koska heinän laatu vaihtelee paljon. Esimerkiksi kasvilajisto, kasvuaste, lannoitus, vuodenaika ja maaperä vaikuttavat paljon ravintoainepitoisuuksiin. Valkuais- ja E-vitamiinipitoisuus saattaa olla vain puolet loppukesästä verrattuna alkukesän pitoisuuksiin, A-vitamiinipitoisuus laskee noin neljänneksen. (Lillkvist 2002, 145–146.)

Heinä on hevosen tärkein rehu, josta se voi saada kaikki tarvitsemansa ravintoaineet. Koska Suomen oloissa laidunheinää ei ole jatkuvasti saatavilla, on kehitelty erilaisia keinoja säilöä heinää. Yleisin säilöntämuoto on kuivattu tai esikuivattu heinä, jotka ovat sisäruokintakauden ehdoton päärehu. Hyvälaatuinen heinä on väriltään vaalean vihreää, lehtevää, vähäkortista ja maultaan makeaa sekä pölytöntä. Rehuanalyysin teettäminen on helppo tapa selvittää heinän ravinnepitoisuus, koska heinän laatu riippuu oleellisesti kasvilajistosta, kasvuolosuhteista, lannoituksesta, maaperästä ja ilmastosta. Myös korjuuolosuhteet ja varastointi ovat erittäin oleellisia ravintoaineiden säilymisen kannalta. (Lillkvist 2002, 149–152; Saastamoinen & Teräväinen 2003, 21.) Varastoinnin aikana heinässä tapahtuu aina ravintoaineiden hävikkiä. Karoteenin eli A-vitamiinin esiasteen pitoisuus laskee jo kuivatuksessa jopa puoleen. Mitä vihreämpää heinä on, sitä enemmän se sisältää karoteenia. Korjuuajankohdasta ja säilöntätavasta riippuen heinän valkuaisaine- ja sokeripitoisuus voi vaihdella, mutta ne ovat yleensä melko alhaiset. (Lillkvist 2002, 151; Saastamoinen & Teräväinen 2003, 21.)

Esikuivattu heinä on nykyään yleisin heinämuoto, jota hevosille syötetään. Sen säilytys on helppoa, koska heinä kääritään muoviin ja kosteankin heinän säilyvyys perustuu ilmatiiviiseen pakettiin. Rehuominaisuuksiltaan säilöheinä on erinomaista, koska se on pölytöntä, helposti sulavaa ja ennen kaikkea ravintoaineet säilyvät paremmin kuin täysin kuivassa heinässä. (Lillkvist 2002, 158–159.)

Kaura on yleisin hevosille annettava väkirehu. Muihin viljoihin verrattuna kauralla on suurempi kuitu- ja rasvapitoisuus ja valkuaisen laatu on parempi. Kauran tärkkelys sulaa hevosen ohutsuolessa helpommin kuin muiden viljojen. (Saastamoinen & Teräväinen 2003, 25.)

Soijarouhe on erittäin hyvä valkuaisrehu, koska siinä on korkea valkuaisainepitoisuus ja valkuainen on hyvälaatuista sekä se sisältää energiaa runsaasti ja on helposti sulavaa. Valkuaisaineet ovat hevosille välttämättömiä, koska elimistön jokainen solu tarvitsee valkuaista. Monet elimistön aineenvaihduntaan vaikuttavat aineet rakentuvat valkuaisaineista, esimerkiksi entsyymit ja vasta-aineet. Siitostammoilla soijarouheella on helppoa tyydyttää valkuaisaineen lisääntynyt tarve. (Lillkvist 2002, 79,181.)

Seosmelassileike on sokeripitoista ja hyvin sulavaa kuitua, mutta sisältää vain vähän tärkkelystä, joten se sopii hevosten rehuksi hyvin. Se on myös hyvin maittavaa korkean sokeripitoisuuden takia, joten myös huonosti syöville hevosille, energian määrää on helppo lisätä melassileikkeellä. (Lillkvist 2002, 177–178.)

Suomen maaperä on luonnostaan seleeniköyhää, joten lannoitteisiin alettu lisätä seleeniä. Sen seurauksena seleenin ja sitä kautta glutationin puutetta ei juuri esiinny ihmisillä eikä hevosilla. Myös kivennäisrehuihin on lisätty seleeniä, joten sen avulla voidaan säädellä myös kilpa- ja siitoshevosten lisääntyntä tarvetta. (Lillkvist 2002, 133–134.)

3. TUTKIMUKSEN TARKOITUS, TAVOITE JA TEHTÄVÄ

Tutkimuksen tarkoituksena on tutkia kudosisopsianäyteiden glutationin pitoisuuksien vaihtelua vuodenaikojen mukaan hevosilla.

Tavoitteena on selvittää millainen vaikutus luonnollisella vuoden kierrolla on hevosten glutationipitoisuuksiin. Aihetta ei tiettävästi ole tutkittu koskaan aikaisemmin.

Omat tavoitteeni on oppia tieteellisen ja tutkitun tiedon hakua sekä tiedon muokkausta ja tutkimuksen tekoa. Tavoitteenani on myös tutkimuslaboratoriossa työskentelyn perusteiden omaksuminen, koska työ tutkimuslaboratoriossa kiinnostaa enemmän kuin terveydenhuollon laboratoriossa toimiminen.

4. AINEISTO JA MENETELMÄ

4.1 Kudosisopsianäytteet

Tämän kvantitatiivisen tutkimuksen aineistona olivat Maa- ja elintarviketalouden (MTT) Hevostutkimuksen Ypäjän tutkimustallin 20 suomenhevostammaa. Iältään ne olivat tutkimushetkellä 4-16 vuotiaita. Hevoset olivat siitostammoja, joilla oli helppointa

miminimoida liikunta ja sen vaikutus glutationipitoisuuksiin ja hapetusstressiin. Rehuna hevoset saivat päivittäin kuiva- ja säilöheinää, kauraa, kivennäistä, soijarouhetta ja seosmelassia sekä monivitamiinivalmistetta kerran viikossa. Kesäkuukausina ne olivat pelkällä laidunheinällä ilman lisäruokintaa. Taulukossa 1 on esitetty hevosten syömät rehut ja niiden syöttömäärät tutkimusvuodenaikana. Hevosista otettiin paikallispuudutuksessa kudosispianäytteet viisi kertaa vuosina 2005–2006. Näytteet olivat säilytyksessä eppendorf putkissa $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tutkimukseen saakka.

Taulukko 1 Hevosten rehut ja niiden syöttömäärät tutkimuksen aikana

Hevosten saamat rehut tutkimuksen aikana	Syöttömäärä päivässä
kaura	0,75-2 l
kivennäinen	0,1–0,2 l
seosmelassi	0,5 l
soijarouhe	174–660 g
säilöheinä	5-8 kg
kuivaheinä	3-10 kg
lese	0-1 l
Hippolax	0-660 g
vitamiiniliuos	0-65 ml viikossa

4.2 Näytteiden käsittely

Pakastetut kudosisnäytteet jauhettiin morttelissa nestetyypin avulla hienoksi jauheeksi, jonka jälkeen jauhe kaadettiin nestetyypin avulla homogenisointiputkeen ja punnittiin. Paino kerrottiin viidellä ja saadun summan verran lisättiin metafosforihappoa (MPA:ta), jotta saatiin aina samassa suhteessa näytettä ja MPA:ta. Näytteet homogenisoitiin eli sekoitettiin teflonsekoittimella hyvin huolellisesti pohjaa myöten, jonka jälkeen näytteet sentrifugoitiin 15 minuuttia 5000 rpm. Saadussa supernatantissa oli glutationia. Supernatanti otettiin talteen mikrosentrifugiputkeen ja pakastettiin $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ mittaukseen saakka.

4.3 Liuosten valmistus glutationin mittaamista varten

5 % Metafosforihappo (MPA)

5 g metafosforihappoa + 100 ml milliQ aqua

Säilytys koko ajan + 4 °C.

100 mM K-phosphate (pH 7,5) buffer100mM $K_2HPO_4 \times 3 H_2O$ + 10mM EDTA 22,823g100mM KH_2PO_4 + 10mM EDTA 13,609gSäädä pH lisäämällä K_2HPO_4 - liuokseen (n.500ml) KH_2PO_4 -liuosta kunnes pH on 7,5.

Säilyy 6 kk + 4 °C.

100 mM K-phosphate (pH 7,5) buffer + 10 mM EDTA 1l100mM $K_2HPO_4 \times 3 H_2O$ + 10mM EDTA 22,823g + 3,7224 g EDTA/ 1l100mM KH_2PO_4 + 10mM EDTA 13,609g + 3,7224 g EDTA/ 1lSäädä pH lisäämällä K_2HPO_4 -liuokseen (n.500ml) KH_2PO_4 -liuosta kunnes pH on 7,5.

Säilyy 6 kk + 4 °C.

1,17 mM DTNB (5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) 250ml

DTNB 0,1159 g

Liuotus 250 ml K-phosphate buffer + 10 mM EDTA. Säilyy 1-2 viikkoa + 4 °C.

687,5 U/l GSSG reductase 20ml

29,1 µl reductase + 20 ml DTNB

Valmistettava päivittäin. Säilytys jäällä, ennen mittausta huoneenlämpöön.

NADPH (β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) liuos

1 mg NADPH 1 ml K-phosphate (pH 7,5) buffer. Valmistus päivittäin tarvittava määrä tai säilytys -20 °C. Suojattava valolta.

TEA (triethanolamine) liuos

Käytimme kaupallista liuosta.

2-VP (vinylpyridine) liuos

Käytimme kaupallista liuosta.

GSH ja GSSG standardit

käytimme kaupallisia standardeja, jotka oli käsitelty samalla tavalla kuin kudosbiopsiat ja pakastettu -80 °C valmiiksi.

4.4 Laite ja mittausmenetelmän kuvaus

Spektrofotometri on yleisesti käytetty mittauslaite. Spektrometrinen kuoppalevylukija valittiin sen tarvitseman pienemmän näytemäärän, helppouden, nopeuden ja luotettavuuden perusteella. Spektrofotometri on optinen laite, jonka mittausperiaate perustuu Lambert-Beerin lakiin eli valon pidättäytymiseen aineessa. Sitä käytetään yleensä aineiden tunnistamiseen, niiden puhtausasteen ja pitoisuuden määrittämiseen. Tavallisimmat spektrofotometrit mittaavat näkyvän- tai UV-valon absorptiota eli intensiteettiä näytteesä eri aallonpituuksilla UV-alueelta infrapuna-alueelle. Useat biologiset yhdisteet muo-

dostavat värillisiä reaktioita ja absorboituvat näkyvänä valona. Spektrofotometriä käytetään muun muassa nukleiinihappojen ja proteiinien pitoisuuden määrittämiseen. (Solunetti 2006; Halonen 2004, 66–67.)

Laitteen päärakennekomponentit ovat virtakomponentti, joka voi olla yksinkertainen muuntaja. Se muuttaa yleisjännitteen matalaksi ja kiinteäksi jännitteeksi. Säteilylähde eli valonlähde vaihtelee aallonpituuden mukaan. Näkyvällä valolla, 320–700nm, käytetään volframi- tai volframihalogeenilamppua. UV-alueella, 190–350 nm, käytetään yleensä deuteriumlamppua. Lamppu sijaitsee siten, että voimakas valonsäde kulkee monokromaattorin ja näytteen läpi. Monokromaattorin tehtävänä on erotella haluttu aallonpituus. Aallonpituus voidaan erottaa myös erilaisilla suodattimilla eli filtereillä. Valonsäde kulkee sisääntuloraon kautta hilalle tai prismalle, joka hajottaa valonsäteen spektriiksi. Haluttu spektri saadaan ohjattua tietyn aallonpituuden ulosmenorakoon, jolla voidaan kontrolloida myös valonsäteiden kaistaleveyttä. Spektrofotometrin suorituskyky arvioidaan monokromaattorin ominaisuuksien mukaan. Erotuskyvyn mittana käytetään resoluutiota ja kaistaleveyttä. Resoluutio on sitä parempi mitä kapeampi kaistaleveys on. Näytekyvetin täytyy olla kirkas ja puhdas mahdollisimman tarkan tuloksen saamiseksi. Kyvetin materiaali voi olla lasia tai muovia. Valodetektorin muuttama valon sähköiseksi signaaliksi, jonka voimakkuus on suoraan verrannollinen valonsäteiden määrään. Lukulaite pystyy havainnoimaan detektorilla muodostuneen virran voimakkuutta. Lukulaitteen antama lukema voidaan esittää %-transmittanssina, absorbanssiksi tai muuttaa suoraan tietokoneella entsyymin aktiivisuudeksi tai yhdisteen pitoisuudeksi. (Halonen 2004, 67–70.) Tässä tutkimuksessa laitteena käytettiin Tecan:in Spectra Fluor laitetta.

4.5 Näytteiden mittaus

Mittauksessa tehtiin aina yhden hevososen kaikkien vuodenaikojen näytteet samanaikaisesti sekä seitsemän standardia yhdelle kuoppalevyille.

Standardeihin käytettiin kaupallista GSH reagenssia, jota laimennettiin milliQ-vedellä eri pitoisuuksiin. Esilaimennokset stokista ja sen pitoisuus.

- 1 näyte blank eli pelkkää milliQ- vettä 250 μ l
2. 12,5 μ l standardia + 225 μ l vettä, pitoisuus 1,5 μ M
3. 25 μ l std + 225 μ l vettä, 3 μ M

3. 50 μl std + 200 μl vettä, 6 μM
4. 75 μl std + 175 μl vettä, 9 μM
5. 100 μl std + 150 μl vettä, 12 μM
6. 150 μl std + 100 μl vettä, 18 μM
7. 200 μl std + 50 μl vettä, 24 μM

Varovasti sulatettuihin ja hyvin sekoitettuihin 25 μl :n TGSH näytteisiin lisättiin 180 μl DTNB: tä ja kahden minuutin lämmityksen ja ravistelun jälkeen lisättiin 45 μl NADPH. Mittaus suoritettiin aallonpituudella 410 nm kineettisenä 5 minuutin seurantana.

GSSG näytteissä oli 98 μl näytettä, johon lisättiin 2 μl 2-VP ja sekoitettiin voimakkaasti. TEA lisättiin varovasti välillä voimakkaasti sekoittaen sen verran, että pH:ksi saatiin seitsemän. Tunnin inkuboinnin jälkeen jatkettiin samoin kuin TGSH:n kohdalla eli 180 μl DTNB: tä ja minuutin lämmityksen ja ravistelun jälkeen lisättiin 45 μl NADPH. Mittaus suoritettiin aallonpituudella 410 n kineettisenä 5 minuutin seurantana.

4.6 Tulosten tulkintamenetelmä

Tulokset siirrettiin analyysilaitteelta tietokoneelle Excel- tiedostoksi, jossa ne järjestettiin haluttuihin ryhmiin. Tulosten analysointi tehtiin SPSS 16.0 for Windows- ohjelman T-testillä. Tulokset esitetään taulukoina ja kuvioina sekä selitetään sanallisesti edempänä.

T-testi on yleisin tunnettu keskiarvojen erojen testausmenetelmä. Otos on peräisin normaalisti jakautuneesta populaatiosta ja mittaus on suoritettu vähintään välimatka asteikollisella mittarilla. Tilastollisesti merkittävä ero (p-arvo) on alle 0,05. (Metsämuuronen 2006, 383–386.)

5. TUTKIMUKSEN LUOTETTAVUUS JA EETTISYYS

Tutkimuksen luotettavuutta voidaan tarkastella reliabiliteetin ja validiteetin avulla. Reliabiliteetti on tutkimuksen toistettavuutta. Mittauksissa tulisi pyrkiä toistettaviin ja ei-sattumanvaraisiin tuloksiin. (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2007, 226–227.) Tässä tut-

kimuksessa toistattavuutta saatiin rinnakkaismittauksilla. Mitattaessa käytettiin joka hevosen kohdalla seitsemää standardia, joiden arvojen piti pysyä tietyllä alueella, jotta standardisuorasta tuli suora eikä poikkeamia tullut. Standardeista käytettiin kahta rinnakkaista mittausta ja näytteistä kolmea rinnakkaista näytettä, joiden keskinäiset erot eivät saaneet olla yli 5 %:a.

Validiteetti on tutkimuksen pätevyyttä, kykyä mitata sitä mitä on tarkoituskin (Hirsjärvi ym. 2007, 226–227). Tutkimuksen aineiston otoskoko oli melko pieni, 20 hevosta, mutta näytteet otettiin viisi kertaa jokaiselta, joten siten saatiin tutkimukseen laajuutta ja luotettavuutta. Aiheeni on osa laajempaa tutkimuskokonaisuutta, enkä näin ollen voinut vaikuttaa aineiston kokoon ja näytteenottoon. Toisaalta laajemman tutkimuksen näytteenotto oli oletettavasti huolellisesti vakioitu. Kudosbiopsian ottaminen on vaativaa, joten ottajan oli oltava kokenut. Voidaan myös arvioida, onko työskentelymenetelmä luotettava ja laadukas, koska samaa morttelia ja homogenisointilaitetta käytettiin kaikkien näytteiden homogenisointiin. Puhdistus oli toki huolellista, mutta oliko se riittävää.

Tutkimuseettisten ohjeiden mukaan luotettavien ja uskottavien tulosten edellytys on, että noudatetaan hyvän tieteellisen käytännön edellytyksiä. Näitä ovat huolelliset ja tarkat toimintatavat, tiedon avoimuus, muiden tutkimusten huomioonottaminen ja kunnioittaminen sekä rehellisyys. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2002.) Ihmisiä tutkittaessa eettisyyttä on ajateltava laajemmin kuin eläintutkimuksissa ja eettiset kysymykset ovat hieman erilaisia. Tässä tutkimuksessa hevoset olivat MTT:n tutkimushevosia, joten omistajien lupaa tutkimukseen ei erikseen tarvinnut pyytää. Tutkimusluvut MTT:n kanssa olivat väitöskirjatyön vuoksi valmiina.

Laki koe-eläintoiminnasta 20.1.2006/62 määrää, että koe- tai tutkimuseläimille ei saa aiheuttaa tarpeetonta kipua, tuskaa tai kärsimystä tutkimustoiminnassa. Kipua on vähennettävä kaikilla mahdollisilla keinoilla ja menetelmäksi on valittava vähiten kipua ja tuskaa tuottava. Myös olosuhteet on oltava eläimelle sopivat ja tarvittaessa on järjestettävä tarvittava eläinlääkintähuolto. Eläinkokeen saa suorittaa vain, jos tarvittavan tuloksen saavuttamiseksi ei ole mahdollista käyttää muuta luotettavaa menetelmää eikä kokeessa saa käyttää useampia eläimiä kuin kokeen tarkoituksen saavuttaminen edellyttää. (Laki koe-eläintoiminnasta 20.1.2006/62) Kudoksen näytteen ottaminen on huomattavasti kivuliaampaa kuin verinäytteenottaminen puudutuksesta huolimatta, joten voisi miettiä onko näytteiden ottamisesta ollut hevosille tarpeetonta kipua. Tässä tapauksessa lihas-

näytteet olivat välttämättömiä, koska muista näytemuodoista ei olisi saatu samaa informaatiota. Näytteet olivat kuitenkin kooltaan pieniä ja puudutus huolellista. Näytteet olivat myös otettu pitkällä aikavälillä, joten hevosilla on tuskin ollut suurta kipua. Talli-olosuhteet ovat hevosille suunniteltuja ja mahdollisimman hevosystävälliset sekä eläinlääkäri oli välittömästi saatavilla.

6. TULOKSET

6.1 Glutationin (GSH) vuodenaikaisvaihtelun tulokset

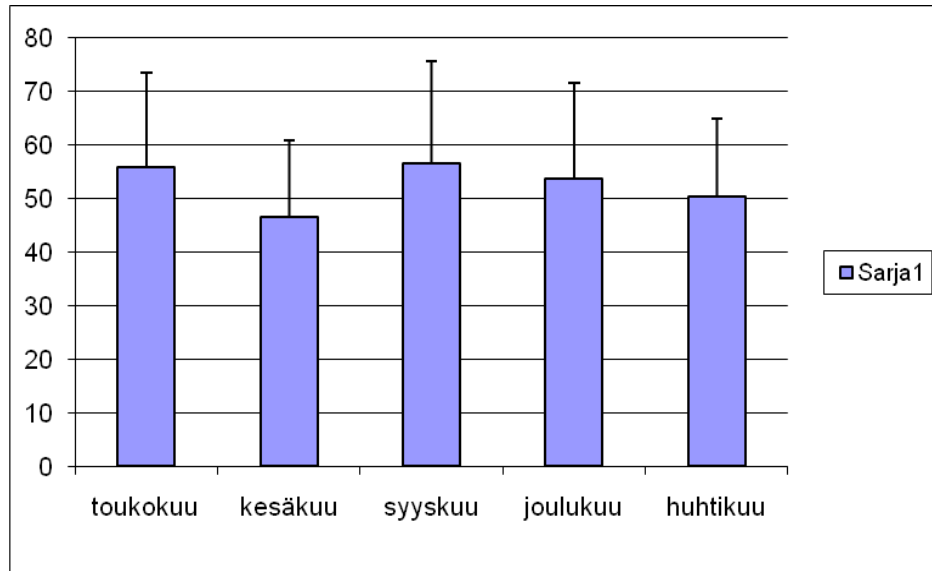
Glutationikudosbiopsianäytteet otettiin tutkimushevosilta viisi kertaa vuoden aikana. Syyskuussa mittauksessa oli mukana 17 hevosta ja huhtikuussa 18 hevosta, muilla kerroilla olivat mukana kaikki 20 hevosta. Taulukossa 2 ja kuviossa 1 on esitetty eri vuodenaikojen glutationipitoisuudet (μM) keskiarvoina ja –hajontoina (SD) (n) = otosten määrä.

Tämän tutkimuksen perusteella vuodenaikojen vaihtelun mukaan hevosilla oli glutationipitoisuuksissa pientä vaihtelua, mutta pitoisuuksissa ei ollut tilastollisesti merkittävää eroa ($p > 0.05$).

Taulukko 2 Yhteenveto glutationinäytteiden pitoisuuksien (μM) vuodenaikaisvaihtelusta hevosilla.

Glutacioninäytteiden näytteenottoajankohta (n)	Glutacioninäytteiden pitoisuuden(μM) keskiarvo \pm keski- hajonta (SD)
toukokuu (20)	55,6 \pm 17,8
kesäkuu (20)	46,5 \pm 14,3
syyskuu (17)	56,5 \pm 19,1
joulukuu (20)	53,5 \pm 18,0
huhtikuu (18)	50,2 \pm 14,7

Kuviossa 1 on esitetty glutationinäytteiden pitoisuuksien(μM) keskiarvot ja -vaihtelut tutkimushevosilla eri vuodenaikojen mukaan. Glutationinäytteiden pitoisuus on esitetty x-akselilla ja näytteenottoaika y-akselilla.



Kuvio 1. Glutationipitoisuuksien (μM) vuodenaikaisvaihtelukeskisarvo ja -hajonta hevosilla.

6.2 Hapettuneen glutathionin (GSSG) vuodenaikaisvaihtelun tulokset

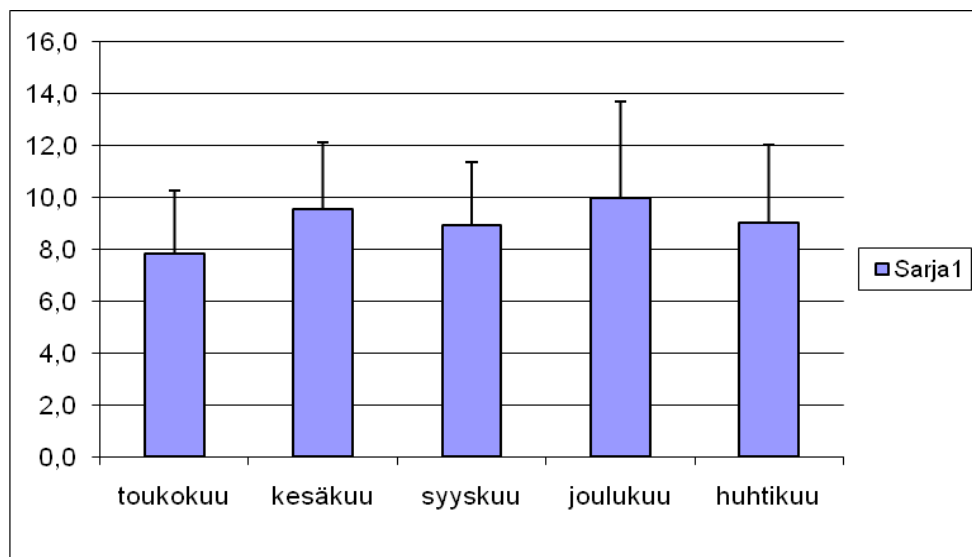
Hapettuneen glutathionin kudosispianäytteet otettiin tutkimushevosilta viisi kertaa vuoden aikana. Syyskuussa mittauksessa oli mukana 17 hevosta ja huhtikuussa 18 hevosta, muilla kerroilla kaikki 20 hevosta olivat mittauksissa. Taulukossa 3 ja kuviossa 2 on esitetty eri vuodenaikojen glutathionipitoisuudet (μM) keskiarvoina ja -hajontoina (SD) (n) = otosten määrä.

Tämän tutkimuksen mukaan vuodenaikojen vaihtelun mukaan hevosilla on hapettuneen glutathionin pitoisuuksissa lievää vaihtelua, mutta tässä tutkimuksessa tilastollisesti merkittävä ero saatiin vain touko- ja joulukuun pitoisuuksien välille (p 0.038).

Taulukko 3 Yhteenveto GSSG:n pitoisuuksien vuodenaikaisvaihtelusta hevosilla.

Hapettuneen glutatoinin näytteiden näytteenottoajankohdat (n)	Hapettuneen glutatoinin näytteiden pitoisuuksien (μM) keskiarvo \pm keskihajonta (SD)
toukokuu (20)	7,8 \pm 2,5
kesäkuu (20)	9,5 \pm 2,6
syyskuu (17)	8,9 \pm 2,4
joulukuu (20)	10,0 \pm 3,7
huhtikuu (18)	9,0 \pm 3,0

Kuviossa 2 on esitetty hapettuneen glutatoinin kudosisiopsianäytteiden pitoisuuksien keskiarvot ja -hajonnat vuodenaikojen vaihtelun mukaan. Pitoisuus (μM) on esitetty x-akselilla ja näytteenottoajankohta y-akselilla.

**Kuvio 2.** Hapettuneen glutatoinin kudosisiopsianäytteiden pitoisuuden (μM) vuodenaikaisvaihtelu hevosilla.

6.3 Kokonaisglutatoinin (TGSH) vuodenaikaisvaihtelun tulokset

Kokonaisglutatoinin kudosisiopsianäytteet otettiin tutkimushevosilta viisi kertaa vuoden aikana. Syyskuussa mittauksessa oli mukana 17 hevosta ja huhtikuussa 18 hevosta, muilla kerroilla kaikki 20 hevosta olivat mittauksissa. Taulukossa 4 ja kuviossa 3 on

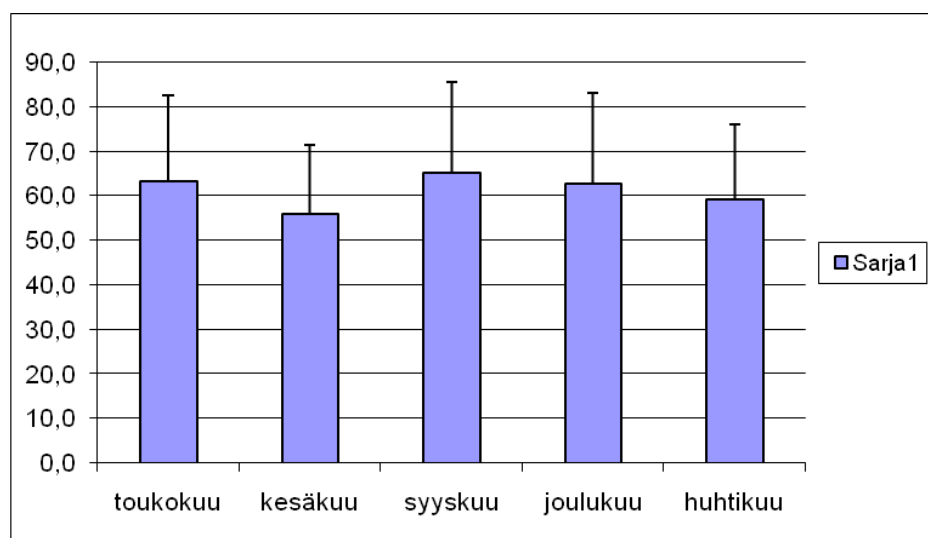
esitetty eri vuodenaikojen kokonaisglutationipitoisuudet (μM) keskiarvoina ja – hajontoina (SD) (n) = otosten määrä.

Tässä tutkimuksessa ei saatu esille tilastollisesti merkittäviä eroja kokonaisglutationin pitoisuuksiin eri vuodenaikoina. Pitoisuuksissa on lievää vaihtelua vuodenaikojen mukaan, mutta ne eivät ole merkittäviä.

Taulukko 4 TGSH:n vuodenaikaisvaihtelu hevosilla.

Kokonaisglutationi näytteiden näytteenottoajankohdat (n)	Kokonaisglutationi näytteiden pitoisuuksien (μM) keskiarvo \pm keskihajonta (SD)
toukokuu (20)	63,4 \pm 19,3
kesäkuu (20)	56,0 \pm 15,5
syyskuu(17)	65,4 \pm 20,1
joulukuu(20)	62,8 \pm 20,2
huhtikuu (18)	59,3 \pm 16,8

Kuviossa 3 on esitetty kokonaisglutationin vuodenaikaisvaihtelun pitoisuudet(μM) viisi kertaa vuoden aikana otetuista näytteistä. Kokonaisglutationinäytteiden pitoisuus on esitetty x-akselilla ja näytteenottoajankohta y-akselilla.



Kuvio 3. Kokonaisglutationin pitoisuuksien (μM) vuodenaikaisvaihtelu hevosilla.

Tämän tutkimuksen tulosten perusteella glutationin pitoisuudella ei näytä olevan tilastollisesti merkittäviä vaihteluja vuodenaikojen mukaan. Pitoisuuksissa on pieniä vaihteluja, mutta tilastollisesti merkittävää eroa ei ilmennyt.

Tutkimuksessa pyrittiin tutkimaan glutationin pitoisuuden vaihtelua Suomen oloissa. Tähän kuuluu laidunkauden ja sisäruokintakauden vaihtelun vaikutus ja päivän pituuden vaihtelun kautta tuleva melatoniinipitoisuuden vaikutus. Hevoset olivat vain kaksi kuukautta luonnonmukaisissa oloissa kesälaitumella ja lopun vuodesta tallissa säilötyllä ravinnolla. Siitostammojen valinnalla pyrittiin minimoimaan hevosten liikunta ja sen vaikutukset tuloksiin. Nämä seikat voivat tuoda esille vain hyvin pienet vaihtelut glutationin pitoisuuksien vaihteluun vuodenaikojen vaihtelun mukaan. Kesän ja talven erot tulevat selkeimmin esille ja ne voivat selittyä päivän pituuden vaihtelulla.

Hevosten ruokintaan lisätty monivitamiiniliuos voi osaltaan selittää hyvin pienet vaihtelut, koska antioksidanttien saanti oli tasaista läpi vuoden. Toisaalta oli tärkeää taata siitostammojen oma sekä kehittyvien varsojen terveys. Myös hyvin säilötyt laadukkaat rehut takaavat antioksidanttien saannin myös talvella.

7. POHDINTA

Tutkimuseettisen neuvottelukunnan (2002) mukaan tutkimusta tehdessä tulee olla rehellinen, huolellinen ja tarkka. Myös muiden tutkimusten huomioonottaminen kuuluu ohjeisiin. Näitä noudatettiin tutkimuksen teon ajan. Lain koe-eläintoiminnasta 20.1.2006/62 mukaan eläimelle ei saa aiheuttaa tarpeetonta kipua ja menetelmä on valittava mahdollisimman kivuttomaksi. Nämä asiat oli otettu huomioon tutkimuksen teossa.

Koska aiheesta ei ole aikaisempia tutkimuksia, työ oli hyödyllinen varsinkin hevosalan ammattilaisille. Hevosten tasapainoisen ruokinnansuunnitteluun tuloksista voi olla apua. Tutkimuksen tulokset voivat antaa aihetta tutkia samaa aihetta myös ihmisillä.

Huolimatta siitä, että tässä tutkimuksessa ei saatu esille tilastollisesti merkittäviä eroja glutationin pitoisuuksien vuodenaikaisvaihtelusta, tuloksia voidaan hyödyntää hevosten ruokinnan suunnittelussa, varsinkin kilpa- ja siitoshevosilla. Antioksidanttien tarve on niillä ryhmillä suurin. Kilpahevosten antioksidanttien tarve on osoitettu useissa tutkimuksissa ja siitoshevokset tarvitsevat vitamiinilisää hedelmällisyyden parantamiseen ja kehittyvän sikiön hyvinvointiin.

Kilpahevosten suurempi liikuntamäärä ja sen vuoksi lisääntynyt antioksidanttien tarve on todettu Kinnusen ym. (2005) tutkimuksessa, jossa tutkittiin hevosten antioksidanttipuolustuksen toimintaa ja kohtalaisessa treenissä olevien hevosten antioksidanttikapasiteettia välittömästi rasituksen jälkeen. He totesivat hevosten olevan herkkiä hapetusstressille, mutta vahvempi antioksidanttikapasiteetti saattaa parantaa harjoituksen aikaisista hapetusstressin sietoa. Myös de Moffarts, Kirschvink, Art, Pincemail ja Lekeux (2003) tutkivat antioksidanttivalmisteen vaikutusta antioksidanttipuolustukseen treenattavilla hevosilla. Tutkimuksessa todettiin vitamiinivalmisteen tasoittavan osittain pitoisuuksien vaihteluita nostamalla veren antioksidanttikapasiteettia. On myös tutkittu hevosten antioksidanttitasojen vaihtelua kahden kestävyyskilpailun aikana eri olosuhteissa. Tutkimuksessa todettiin antioksidanttivalmisteen antamisen ennen ja jälkeen kilpailun parantavan hevosen suoritusta ja hyvinvointia. (Harveges ym. 2002.)

Useiden muiden tutkimusten valossa ja tämän tutkimuksen perusteella johtopäätöksenä voisi arvioida, että liikunnalla ja antioksidanttivalmisteilla on suurempi vaikutus glutationin pitoisuuksien muutoksiin kuin vuodenaikojen vaihtelulla Suomen olosuhteissa. Jatkotutkimusaiheena voisi olla glutationin vuodenaikaisvaihtelu ihmisillä tai hevosilla, mutta eri olosuhteissa.

Bioanalyytikon ammatin näkökulmasta tutkimus lisäsi luotettavuutta paljon käytetyn menetelmän toimivuudesta ja luotettavuudesta, myös humaaninäytteiden tutkimisessa. Omasta ammatillisesta näkökulmastani tarkasteltuna tutkimus lisäsi omaa työskentelytarkkuutta ja antoi valmiuksia toimia itsenäisesti vaativan tutkimustyön parissa. Tutkimus voi antaa myös lisämahdollisuuksia toimia tulevaisuudessa eläinten parissa ja eläinnäytteiden tutkimisessa, koska kykenen toimimaan aikaisemmin oppimani pohjalta preanalytiikassa ja tämän tutkimuksen myötä analytiikassakin. Tutkimuksen teon aikana tutustuin kudosbiopsioiden näytteenottoon. Näytteiden analysoinnin tein itsenäisesti.

Tutkimuksen teon aikana tutustuin myös koe-eläintutkimuksiin ja niitä koskevaan eettisyyteen.

Alussa asettamani tavoitteet työskentelystä laboratoriossa ja tutkimuksen teosta täyttyivät. Opin kuukauden aikana laboratoriossa paljon tarkkuutta, huolellisuutta ja kärsivällisyyttä. Opin myös uusia menetelmiä ja laitteiden käyttöä. Menetelmällisesti tutkimukseni sopii myös ihmisnäytteiden tutkimuslaboratorioon. Aiheen kirjallisuuteen tutustuessani löysin myös paljon ammatillisesti kiinnostavaa luettavaa vaikka kaikki artikkelit eivät olleet tähän tutkimukseen tarpeellisia. Yleissivistyksen ja urheiluhevosten kannalta oli kuitenkin paljon hyödyllistä luettavaa. Teoreettista taustaa kirjoittaessa opin tekstin käsittelyä ja muokkausta, sekä pitkäjänteisyyttä laajan tutkimuksen tekemisessä. Ammatillinen kasvuni ja ajatteluni kehittyivät tutkimusta tehdessä huomattavan paljon. Tekeminen oli hetkittäin erittäin raskasta, joten samalla opin myös itsestäni paljon.

Lopuksi haluan kiittää ohjaavaa yliopettajaa Sirkka-Liisa Halimaata jatkuvasta kannustuksesta ja kullanarvoisista neuvoista. Suuri kiitos kuuluu myös FT MD MPH Mustafa Atalaylle, joka antoi minulle mahdollisuuden suorittaa tutkimuksen laboratoriossaan ja perehdytti minut antioksidanttien maailmaan. Kiitän myös hänen laboratoriossaan työskenteleviä kärsivällisestä ohjauksesta näytteiden analysoinnissa ja muiden analyysimenetelmien esittelystä. Haluan kiittää Susanna Kinnusta, joka tarjosi minulle mahdollisuuden osallistua tutkimuksen tekemiseen ja kärsivällisesti vastasi kysymyksiini.

LÄHTEET

Atalay, M. 1998. Tissue Antioxidant Responses to Physical Exercise-Induced Oxidative Stress. Kuopion yliopiston julkaisuja D. Lääketiede 158. Kuopion yliopisto. Väitöskirja.

Atalay, A., Lappalainen, J. & Sen, CK. 2006. Dietary Antioxidants for the Athlete. *Current Sports Medicine Reports* (5), 182-186.

Atalay, M., Seene, T., Hänninen, O. & Sen, CK. 1996. Skeletal muscle and heart antioxidant defencesin response to sprint training. *Acta Physiologica Scandinavia* 158 (2), 129-34.

Calamari, L., Ferrari, A. & Bertin, G. 2009. Effect of selenium source and dose on selenium status of mature horses. *Journal of Animal Science* 87, 167-178.

De Moffarts, B., Kirschvink, N., Art, T., Pincemail, J. & Lekeux, P. 2003. Effect of oral antioxidant supplementation on blood antioxidant status in trained thoroughbred horse. *The Veterinary Journal* 169, 65-74.

De Moffarts, B., Portier, K., Kirschvink, N., Coulder, J., Fellmann, N., van Erck, E., Letellier, C., Motta, C., Pincemail, J., Art, T. & Lekeux, P. 2007. Effects of exercise and oral antioxidant supplementation enriched in (n-3) fatty acids on blood oxidant markers and erythrocyte membrane fluidity in horses. *The Veterinary Journal* 174, 113-121.

Guiseppe, C. & Giovanni, P. 2002. Biological Rhythm in Livestock. *Journal of Veterinary Science* 3 (3), 145-157.

Halliwell, B. & Gutteridre, J.M.C. 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. 3.painos. Oxford science publications. University press.

Halonen, T. 2004. Fotometriset menetelmät. Teoksessa I. Penttilä (toim.) Kliiniset laboratoriotutkimukset. Helsinki: WSOY, 66-76.

Hermann, A. 2003. The Neuromodulatory Roles of Glutathione, S-Nitrosoglutathione and Cysteine in the Central Nervous System. Tampereen yliopiston julkaisuja 927. Lääketiede. Fysiologia. Väitöskirja.

Hirsjärvi, S., Remes, P., Sajavaara, P. 2007. Tutki ja kirjoita. 13. painos. Helsinki: Otava.

Huttunen, J. 1994. Antioksidanttien hyödyt kliinisessä lääketieteessä, totta vai tarua. Duodecim 110 (17), 1606–1610.

Juntunen, R. 2008. Säännöllisen kestävyysliikunnan vaikutus sydämen lämpöshokkiproteiineihin ja antioksidanttientsyymeihin rotilla. Kuopion yliopisto. Liikuntalääketiede. Biolääketieteenlaitos/ fysiologia. Pro gradu.

Järvinen, K. 2002. Keuhkopussin syövän solutason antioksidatiiviset puolustusmekanismit. Suomen Lääkärilehti 57 (11), 1313.

Khanna, S. 2000. Thiol Antioxidants protection against oxidative stress and redox regulation of cellular Responses. Kuopion yliopiston julkaisuja C. Luonnontieteen ja ympäristötieteet 109. Kuopion yliopisto. Väitöskirja.

Kinnunen, S., Hyyppä, S., Lehmuskero, A., Oksala, N., Mäenpää, P., Hänninen, O., Atalay, M. 2005. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and exercise-induced oxidative stress in trotters. European Journal of Applied Physiology 95, 550-556.

Kinnunen, S., Oksala, N., Hyyppä, S., Sen, C.K., Radak, Z., Laaksonen, D.E., Szabo, B., Jakus, J. & Atalay, M. 2009. α -Lipoic acid modulates thiol antioxidant defences and attenuates exercise-induced oxidative stress in standardbred trotters.

Kirschvink, N., Moffarts, B. & Lekeux, P. 2007. The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. The Veterinary Journal 177 (2), 178-191.

Laki koe-eläintoiminnasta 20.1.2006/62. Viitattu 29.10.2009.

<http://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/2006/20060062>

Lappalainen, J. 2003. Säännöllisen liikuntaharjoittelun vaikutus hapetusstressiin tyyppin 1 diabeetikoilla. Kuopion yliopisto. Liikuntalääketiede. Fysiologian laitos. Syventävien opintojen opinnäytetyö.

Lillkvist, A. 2002. Ruokinnalla tuloksiin 3. 2. painos. Parainen: Hevosfakta oy.

Metsämuuronen, J. 2006. Tutkimuksen tekemisen perusteet ihmistieteissä. 2. painos. Jyväskylä: Gummerus

Mäntylä, E. & Vuori, E. 1994. Antioksidanttien turvallisuus. Duodecim 110 (17): 1629–1642.

Ristowa, M., Zarsea, K., Oberbachc, A., Klöttingc, N., Birringera, M., Kiehintopfd, M., Stumvollc, M., Kahne, R. & Blüherc, M. 2009. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. Proceedings of the National Academy of Sciences 106 (21), 8665–8670.

Saastamoinen, M. & Teräväinen, H. (toim.) 2003. Hevosen ruokinta ja hoito. Teos-sarja Tieto tuottamaan 101. 5. painos. ProAgria Maaseutukeskusten liiton julkaisuja no 991. Vantaa.

Sen, CK. 1994. Exercise Induced Oxidative Stress: Glutathione Dependent Antioxidant Protection. Kuopion yliopiston julkaisuja D. Lääketiede 47. Kuopion yliopisto. Väitöskirja.

Sen, CK., Atalay, M., Ågren, J., Laaksonen, DE., Roy, S. & Hänninen, O. 1997. Fish oil and vitamin E supplementation in oxidative stress at rest and after physical exercise. Journal of Applied Physiology 83 (1), 189-195.

Sen, CK., Marin, E., Kretzschmar, M., Hänninen, O. 1992. Skeletal muscle and liver glutathione homeostasis in response to training, exercise, and immobilization. Journal of Applied Physiology 73 (4), 1265-72.

Sen, CK. & Packer, L. 2000. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. American Society for Clinical Nutrition 72 (suppl.), 653–669.

Soffer, C. 2007. Oxidative stress. Vet Equine 23 (1), 135-157.

Solunetti 2006. Biokemiallisia menetelmiä. Julkaistu 2006. Viitattu 29.2.2009.

<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/spektrofotometria/>

Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2002. Tutkimuseettiset kysymykset. Päivitetty 3.4.2002. Viitattu 29.10.2009. <http://www.tenk.fi/HTK/>

Tyler, CM., Golland, LC., Evans, DL., Hodgson, DR. & Rose, RJ. 1998. Sketal muscle adaptations to prolonged training, overtraining and detraining in horses. European Journal of Applied Physiology 436, 391-397.