

Univerza v Ljubljani
Veterinarska fakulteta



Interdisciplinarni doktorski študijski program Biomedicina

UDK 636.8.09:616.61:616–036;577.161.3:615.03(043.3)

Martina Krofič Žel, dr. vet. med.

**VPLIV VITAMINA E NA OKSIDATIVNI STRES IN
POTEK KRONIČNE LEDVIČNE ODPOVEDI PRI
MAČKAH**

Doktorska disertacija

**THE INFLUENCE OF VITAMIN E ON OXIDATIVE
STRESS AND THE COURSE OF FELINE CHRONIC
KIDNEY DISEASE**

Doctoral dissertation

Ljubljana, 2015

Martina Krofič Žel

Vpliv vitamina E na oksidativni stres in potek kronične ledvične odpovedi pri mačkah

Delo je bilo opravljeno na Kliniki za kirurgijo in male živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani, na Inštitutu za higieno in patologijo prehrane živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani, na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani, na Oddelku za genetsko toksikologijo in biologijo raka Nacionalnega inštituta za biologijo ter na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo na Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani.

Javni zagovor je bil opravljen:

Mentorica: izr. prof. dr. Alenka Nemec Svete

Somentorica: prof. dr. Nataša Tozon

Izjava o delu:

Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so rezultati korektno navedeni in nisem kršila avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu.

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Alenka Seliškar

Član: prof. dr. Janez Salobir

Član: prof. dr. Robert Frangež

Član: doc. dr. Bojan Knap

VPLIV VITAMINA E NA OKSIDATIVNI STRES IN POTEK KRONIČNE LEDVIČNE ODPOVEDI PRI MAČKAH

Izvleček

Ključne besede: Ledvične bolezni – terapija z zdravili; kronične bolezni; oksidativni stres – učinki zdravil; vitamin E – farmakologija – kri – terapevtska raba; antioksidanti – metabolizem; malondialdehid – kri; proteinski karbonili – kri; glutationska peroksidaza – kri; mačke

Namen raziskave je bil preučiti oksidativni stres pri mačkah s kronično ledvično odpovedjo. Oksidativni stres smo ovrednotili s stališča poškodb nekaterih bioloških molekul in antioksidantnega statusa. Ugotoviti smo želeli, ali dodatek vitamina E pri zdravljenju izboljša klinično stanje in upočasni napredovanje bolezni. V preliminarni raziskavi smo pri 28 mačkah s kronično ledvično odpovedjo in 30 zdravih mačkah z enkratnim odvzemom krvi določili celokupno antioksidantno kapaciteto, aktivnost superoksidne dismutaze, plazemske in eritrocitne glutathion peroksidaze ter koncentracijo selen v serumu. V klinično raziskavo smo vključili 34 mačk s kronično ledvično odpovedjo in 38 zdravih mačk. Zdravim mačkam smo določili koncentracijo malondialdehida in proteinskih karbonilov v plazmi, stopnjo poškodbe jedrne DNA limfocitov, aktivnost plazemske glutathion peroksidaze in koncentracijo vitamina E v plazmi. Mačke s kronično ledvično odpovedjo smo zdravili v skladu s smernicami mednarodnega združenja za bolezni ledvic in jim dodajali vitamin E oziroma placebo. Povečane stopnje lipidne peroksidacije, oksidativnih poškodb beljakovin in DNA pri mačkah s kronično ledvično odpovedjo nismo dokazali; antioksidantni mehanizmi niso iztrošeni. Dodajanje vitamina E ni značilno zmanjšalo oksidativnih poškodb bioloških molekul, ni podaljšalo časa preživetja in ni zmanjšalo stopnje izraženosti kliničnih znakov.

THE INFLUENCE OF VITAMIN E ON OXIDATIVE STRESS AND THE COURSE OF FELINE CHRONIC KIDNEY DISEASE

Abstract

Key words: Kidney diseases – drug therapy; chronic diseases; oxidative stress – drug effects; vitamin E – pharmacology – blood – therapeutic use; antioxidants – metabolism; malondialdehyde – blood; protein carbonyl – blood; glutathione peroxidase – blood; cats

The purpose of this study was to investigate oxidative stress and antioxidant status in cats with chronic kidney disease and to evaluate whether vitamin E supplementation had a beneficial effect on the course of the disease. In the preliminary study, 28 cats with chronic kidney disease and 30 healthy controls were included. Total antioxidant capacity, superoxide dismutase, plasma and erythrocyte glutathione peroxidase activity and serum selenium concentration were measured. In the clinical study, 34 cats with chronic kidney disease and 38 healthy controls were included. Plasma malondialdehyde, protein carbonyl concentration, DNA damage of peripheral lymphocytes, plasma glutathione peroxidase activity, and plasma vitamin E concentration were measured. Cats with chronic kidney disease were treated according to International Renal Interest Society guidelines. They were receiving vitamin E or a placebo in addition to standard therapy. Parameters of oxidative stress and antioxidant status were measured at the initiation of the therapy and 4, 8, 16, and 24 weeks thereafter. The results did not confirm a greater degree of lipid peroxidation or oxidative damage to proteins or DNA in cats with chronic kidney disease. The antioxidant mechanisms might not be exhausted in cats with chronic kidney disease. Vitamin E supplementation did not significantly reduce oxidative damage of biological molecules and did not affect the survival rate or reduce the severity of clinical signs.

Kazalo vsebine

1 UVOD	19
1.1 NAMEN RAZISKAVE	21
1.2 HIPOTEZE	21
2 PREGLED LITERATURE	22
2.1 KRONIČNA LEDVIČNA ODPOVED PRI MAČKAH	22
2.1.1 Podstopnje bolezni	23
2.2 VLOGA REAKTIVNIH KISI KOVIH ZVRSTI PRI KRONIČNI LEDVIČNI ODPOVEDI	24
2.3 POŠKODBE BIOLOŠKIH MOLEKUL	27
2.3.1 Lipidna peroksidacija in malondialdehid	27
2.3.2 Oksidativne poškodbe beljakovin	29
2.3.3 Oksidativne poškodbe DNA	29
2.4 ANTIOKSIDANTNI SISTEM V LEDVICAH	30
2.4.1 Glutation peroksidaza	31
2.4.2 Superoksidna dismutaza	33
2.4.3 Celokupna antioksidantna kapaciteta	34
2.4.4 Vitamin E	35
2.5 OKSIDATIVNI STRES PRI KRONIČNI LEDVIČNI ODPOVEDI	36
3 MATERIALI IN METODE	38
3.1 PRELIMINARNA RAZISKAVA	38
3.2 KLINIČNA RAZISKAVA	40
3.2.1 Merjenje arterijskega tlaka	45
3.3 ODVZEM IN PRIPRAVA VZORCEV KRVI	45
3.4 ANALIZNE METODE	47

3.4.1 Hematološke in biokemijske preiskave	47
3.4.2 Encimsko imunske preiskave	47
3.4.3 Antioksidantni parametri.....	47
3.4.3.1 Superoksidna dismutaza.....	48
3.4.3.2 Plazemska in eritrocitna glutathion peroksidaza.....	48
3.4.3.3 Celokupna antioksidantna kapaciteta.....	49
3.4.4 Vitamin E	49
3.4.5 Koncentracija selena v serumu	49
3.4.6 Pokazatelji oksidativnega stresa	50
3.4.6.1 Malondialdehid.....	50
3.4.6.2 Proteinski karbonili	50
3.4.6.3 Alkalni kometni test	50
3.4.6.3.1 Priprava pufrov.....	51
3.4.6.3.2 Priprava preparatov	51
3.4.6.3.3 Odvijanje DNA in elektroforeza	52
3.4.6.3.4 Nevtralizacija preparatov	52
3.4.6.3.5 Ovrednotenje poškodb DNA.....	52
3.4.7 Preiskave urina.....	52
3.5 STATISTIČNA ANALIZA	53
4 REZULTATI	55
4.1 PRELIMINARNA RAZISKAVA	55
4.2 KLINIČNA RAZISKAVA	57
4.2.1 Parametri oksidativnega stresa in antioksidantnega statusa.....	57
4.2.1.1 Malondialdehid.....	57
4.2.1.2 Proteinski karbonili	62
4.2.1.3 Aktivnost plazemske glutathion peroksidaze.....	65

4.2.1.4 Poškodbe DNA.....	66
4.2.1.5 Vitamin E	70
4.2.2 Klinični parametri.....	75
4.2.2.1 Ocena izraženosti kliničnih znakov	75
4.2.2.2 Koncentracija kreatinina v serumu, specifična gostota urina in razmerje med beljakovinami in kreatininom v urinu	81
4.2.2.3 Preživetje	87
5 RAZPRAVA	89
5.1 OKSIDATIVNI STRES IN ANTIOKSIDANTNI STATUS	90
5.1.1 Malondialdehid.....	90
5.1.2 Proteinski karbonili	91
5.1.3 Poškodbe DNA.....	92
5.1.4 Superoksidna dismutaza.....	92
5.1.5 Eritrocitna glutathion peroksidaza.....	93
5.1.6 Plazemska glutathion peroksidaza in selen.....	93
5.1.7 Celokupna antioksidantna kapaciteta.....	95
5.2 DODAJANJE VITAMINA E	95
5.2.1 Izbrani klinični in laboratorijski parametri ter preživetje	95
5.2.2 Oksidativni stres in antioksidantni status.....	97
6 ZAKLJUČKI	101
7 POVZETEK.....	102
8 SUMMARY	104
9 ZAHVALE	107
10 LITERATURA	108
11 PRILOGE	116
11.1 VPRAŠALNIK.....	116

11.2 PRIPOMOČEK ZA OCENO IZRAŽENOSTI KLINIČNIH ZNAKOV	117
11.3 IZBRANI HEMATOLOŠKI IN BIOKEMIJSKI PARAMETRI PRI MAČKAH S CKD, KI SO BILE VKLJUČENE V RAZISKAVO.....	118
11.4 ČLANEK (Krofič Žel in sod., 2014).....	126

Kazalo tabel

Tabela 1: Starost in telesna masa (povprečje $\pm$ SD) mačk, vključenih v preliminarno raziskavo	
Table 1: Age nad body weight (mean $\pm$ SD) in cats included in the preliminary study	39
Tabela 2: Starost in telesna masa (povprečje $\pm$ SD) mačk, vključenih v klinično raziskavo	
Table 2: Age nad body weight (mean $\pm$ SD) in cats included in the clinical study	40
Tabela 3: Število mačk s CKD glede na stopnjo po IRIS, ki so prejemale vitamin E oziroma placebo	
Table 3: Number of cats with CKD according to the stage of the disease in vitamin E and placebo group	44
Tabela 4: Število mačk s CKD pri posameznem odvzemu vzorcev	
Table 4: Number of cats with CKD at different sampling times	44
Tabela 5: Število mačk s CKD, ki so prejemale vitamin E oziroma placebo pri posameznem odvzemu vzorcev	
Table 5: Number of cats with CKD in vitamin E and placebo group at different sampling times	44
Tabela 6: Koncentracija selena v serumu, aktivnost plazemske in eritrocitne GPX ter plazemska TAC pri mačkah s CKD in kontrolni skupini v preliminarni raziskavi	
Table 6: Serum selenium concentration, plasma and erythrocyte GPX activity and plasma TAC in cats with CKD and in the control group in the preliminary study	56
Tabela 7: Parametri oksidativnega stresa in antioksidantnega statusa (povprečje $\pm$ SD) pri mačkah s CKD IRIS I	
Table 7: Parameters of oxidative stress and antioxidant status (mean $\pm$ SD) in cats with CKD IRIS I	60
Tabela 8: Parametri oksidativnega stresa in antioksidantnega statusa (povprečje $\pm$ SD) pri mačkah s CKD IRIS II	
Table 8: Parameters of oxidative stress and antioxidant status (mean $\pm$ SD) in cats with CKD IRIS II	61
Tabela 9: Parametri oksidativnega stresa in antioksidantnega statusa (povprečje $\pm$ SD; vrednost pri n = 1) pri mačkah s CKD IRIS III in IV	
Table 9: Parameters of oxidative stress and antioxidant status (mean $\pm$ SD; value if n = 1) in cats with CKD IRIS III and IV	62
Tabela 10: Stopnja izraženosti kliničnih znakov na začetku raziskave	
Table 10: Severity of clinical signs at the beginning of the study	75
Tabela 11: Stopnja izraženosti kliničnih znakov med klinično raziskavo pri mačkah s CKD IRIS I	
Table 11: Severity of clinical signs during clinical study in cats with CKD IRIS I	77
Tabela 12: Stopnja izraženosti kliničnih znakov med klinično raziskavo pri mačkah s CKD	78

IRIS II

Table 12: Severity of clinical signs during clinical study in cats with CKD IRIS II

Tabela 13: Stopnja izraženosti kliničnih znakov med klinično raziskavo pri mačkah s CKD IRIS III in IV

Table 13: Severity of clinical signs during clinical study in cats with CKD IRIS III and IV 79

Tabela 14: Koncentracija kreatinina v serumu, specifična gostota urina, UPC in sistolični arterijski tlak (povprečje $\pm$ SD) pri mačkah s CKD IRIS ITable 14: Serum creatinine concentration, urine specific gravity, UPC, and arterial blood pressure (mean $\pm$ SD) in cats with CKD IRIS I 82Tabela 15: Koncentracija kreatinina v serumu, specifična gostota urina, UPC in sistolični arterijski tlak (povprečje $\pm$ SD) pri mačkah s CKD IRIS IITable 15: Serum creatinine concentration, urine specific gravity, UPC, and arterial blood pressure (mean $\pm$ SD) in cats with CKD IRIS II 83Tabela 16: Koncentracija kreatinina v serumu, specifična gostota urina, UPC in sistolični arterijski tlak (povprečje $\pm$ SD; vrednost pri $n = 1$) pri mačkah s CKD IRIS III in IVTable 16: Serum creatinine concentration, urine specific gravity, UPC, and arterial blood pressure (mean $\pm$ SD; value if $n = 1$) in cats with CKD IRIS III and IV 84

Tabela 17: Ključ za oceno izraženosti kliničnih znakov

Table 17: Key for severity of clinical signs assessment 117

Tabela 18: Izbrani hematološki parametri pri mačkah s CKD (povprečje $\pm$ SD) na začetku raziskaveTable 18: Selected hematological parameters in cats with CKD (mean $\pm$ SD) at the beginning of the study 118Tabela 19: Izbrani biokemijski parametri (povprečje $\pm$ SD) pri mačkah s CKD na začetku raziskaveTable 19: Selected biochemical parameters (mean $\pm$ SD) in cats with CKD at the beginning of the study 119Tabela 20: Izbrani hematološki parametri (povprečje $\pm$ SD) pri mačkah s CKD IRIS ITable 20: Selected hematological parameters (mean $\pm$ SD) in cats with CKD IRIS I 120Tabela 21: Izbrani hematološki parametri (povprečje $\pm$ SD) pri mačkah s CKD IRIS IITable 21: Selected hematological parameters (mean $\pm$ SD) in cats with CKD IRIS II 121Tabela 22: Izbrani hematološki parametri (povprečje $\pm$ SD; vrednost pri $n = 1$) pri mačkah s CKD IRIS III in IVTable 22: Selected hematological parameters (mean $\pm$ SD; value if $n = 1$) in cats with CKD IRIS III and IV 122Tabela 23: Izbrani biokemijski parametri (povprečje $\pm$ SD) pri mačkah s CKD IRIS ITable 23: Selected biochemical parameters (mean $\pm$ SD) in cats with CKD IRIS I 123Tabela 24: Izbrani biokemijski parametri (povprečje $\pm$ SD) pri mačkah s CKD IRIS II

124

M. Krofič Žel: Vpliv vitamina E na oksidativni stres in potek kronične ledvične odpovedi pri mačkah.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2015. Doktorska disertacija

Table 24: Selected biochemical parameters (mean $\pm$ SD) in cats with CKD IRIS II

Tabela 25: Izbrani biokemijski parametri (povprečje $\pm$ SD; vrednost pri n = 1) pri mačkah s CKD IRIS III in IV

Table 25: Selected biochemical parameters (mean $\pm$ SD; value if n = 1) in cats with CKD IRIS III and IV

Kazalo slik

Slika 1: Starost mačk, vključenih v raziskavo	
Figure 1: Age of cats included in the study	41
Slika 2: Koncentracija MDA ($\mu\text{mol/L}$) pri mačkah s CKD in kontrolni skupini na začetku raziskave	
Figure 2: MDA ($\mu\text{mol/L}$) concentration in cats with CKD and in the control group at the beginning of the study	57
Slika 3: Koncentracija MDA ($\mu\text{mol/L}$) pri mačkah, ki so prejemale vitamin E oziroma placebo na začetku raziskave	
Figure 3: MDA concentration ($\mu\text{mol/L}$) in the vitamin E and placebo group at the beginning of the study	58
Slika 4: Koncentracija MDA ($\mu\text{mol/L}$) pri mačkah s CKD glede na stopnjo bolezni na začetku raziskave	
Figure 4: MDA ($\mu\text{mol/L}$) concentration in cats with CKD according to the stage of the disease at the beginning of the study	59
Slika 5: Koncentracija MDA ($\mu\text{mol/L}$) pri mačkah s CKD glede na stopnjo bolezni na začetku raziskave (združeni IRIS I in II v primerjavi z III in IV skupino)	
Figure 5: MDA ($\mu\text{mol/L}$) concentration in cats with CKD according to the stage of the disease at the beginning of the study (IRIS I and II together in comparison to III and IV)	59
Slika 6: Koncentracija proteinskih karbonilov (nmol/mL) pri mačkah s CKD in kontrolni skupini na začetku raziskave	
Figure 6: Protein carbonyl concentration (nmol/mL) in cats with CKD and in the control group at the beginning of the study	63
Slika 7: Koncentracija proteinskih karbonilov (nmol/mL) pri mačkah, ki so prejemale placebo oziroma vitamin E na začetku raziskave	
Figure 7: Protein carbonyl concentration (nmol/mL) in the placebo and vitamin E group at the beginning of the study	63
Slika 8: Koncentracija proteinskih karbonilov (nmol/mL) pri mačkah s CKD glede na stopnjo bolezni na začetku raziskave	
Figure 8: Protein carbonyl concentration (nmol/mL) in cats with CKD according to the stage of the disease at the beginning of the study	64
Slika 9: Aktivnost plazemske GPX (U/mL) pri mačkah s CKD glede na stopnjo bolezni na začetku raziskave	
Figure 9: Plasma GPX activity (U/mL) in cats with CKD according to the stage of the disease at the beginning of the study	65
Slika 10: Odstotek DNA v repu kometov pri mačkah s CKD in kontrolni skupini na začetku raziskave	
Figure 10: Percentage of DNA in tail in cats with CKD and in the control group at the	67

beginning of the study

Slika 11: Odstotek DNA v repu kometov pri mačkah, ki so prejemale vitamin E oziroma placebo na začetku raziskave

Figure 11: Percentage of DNA in tail in cats in the vitamin E and placebo group at the beginning of the study

67

Slika 12: Odstotek DNA v repu pri mačkah s CKD, ki so dobivale vitamin E oziroma placebo glede na stopnjo bolezni na začetku raziskave

Figure 12: Percentage of DNA in tail in cats with CKD in the vitamin E and placebo group according to the stage of the disease at the beginning of the study

68

Slika 13: Odstotek DNA v repu kometov izoliranih limfocitov pri skupini, ki je prejemale vitamin E oziroma placebo glede na stopnjo CKD in zaporedni odvzem vzorcev

Figure 13: Percentage of DNA in comet tail of isolated lymphocytes at different sampling times in vitamin E and placebo group in cats with CKD according to the stage of the disease

69

Slika 14: Koncentracija vitamina E v plazmi ($\mu\text{mol/L}$) pri skupini, ki je prejemale vitamin E oziroma placebo glede na stopnjo CKD in zaporedni odvzem vzorcev

Figure 14: Plasma vitamin E concentration ($\mu\text{mol/L}$) at different sampling times in vitamin E and placebo group in cats with CKD according to the stage of the disease

71

Slika 15: Koncentracija vitamina E v plazmi ($\mu\text{mol/L}$) pri kontrolni skupini in skupini, ki je prejemale vitamin E oziroma placebo glede na stopnjo CKD in zaporedni odvzem vzorcev

Figure 15: Plasma vitamin E concentration ($\mu\text{mol/L}$) at different sampling times in the control group, vitamin E and placebo group in cats with CKD according to the stage of the disease

72

Slika 16: Standardizirana koncentracija vitamina E (Vit.E(LS); brez enote) pri skupini, ki je prejemale vitamin E oziroma placebo glede na stopnjo CKD in zaporedni odvzem vzorcev

Figure 16: Standardized plasma vitamin E concentration (unitless) in successive measurements in vitamin E and placebo group according to the stage of the disease

73

Slika 17: Standardizirana koncentracija vitamina E (Vit.E(LS); brez enote) pri skupini, ki je prejemale vitamin E oziroma placebo glede na zaporedni odvzem vzorcev

Figure 17: Standardized plasma vitamin E concentration (unitless) in successive measurements in vitamin E and placebo group

74

Slika 18: Seštevek kliničnih znakov pri skupini, ki je prejemale vitamin E oziroma placebo glede na stopnjo CKD in zaporedni odvzem vzorcev

Figure 18: Score of clinical signs severity assessment at different sampling times in vitamin E and placebo group in cats with CKD according to the stage of the disease

80

Slika 19: Preživetje mačk s CKD glede na stopnjo bolezni

Figure 19: Survival of cats with CKD according to the stage of the disease

87

M. Krofič Žel: Vpliv vitamina E na oksidativni stres in potek kronične ledvične odpovedi pri mačkah.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2015. Doktorska disertacija

Slika 20: Preživetje mačk s CKD, ki so prejemale vitamin E oziroma placebo glede na stopnjo bolezni

Figure 20: Survival of cats with CKD in the vitamin E and placebo group according to the stage of the disease

Seznam okrajšav

ABTS ^{*+}	2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) – radikal
ACE	angiotenzin konvertaza; angl. Angiotensin Converting Enzyme
ACE 2	angiotenzin konvertaza 2; angl. Angiotensin Converting Enzyme 2
AOPP	produkti beljakovin, nastali z napredovalo oksidacijo; angl. Advanced Oxidation Protein Products
CAT	katalaza
CKD	kronična ledvična odpoved; angl. Chronic Kidney Disease
DNA	deoksiribonukleinska kislina
2,4-DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazin
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina
ET	transfer elektrona; angl. Electron Transfer
ETAAS	elektrotermalna atomska absorpcijska spektrometrija; Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry
FeLV	virus mačje levkemije; angl. Feline Leukemia Virus
FIV	virus mačje imunske pomanjkljivosti; angl. Feline Immunodeficiency Virus
FRAP	železoreducirajoč antioksidantni potencial; angl. Ferric Ion Reducing Antioxidant Power
GPX	glutation peroksidaza; angl. Glutathione Peroxidase
HAT	transfer vodikovega atoma; angl. Hydrogen Atom Transfer
HCl	klorovodikova kislina

HClO	hipoklorna kislina
HDO	visoko natančna oscilometrična naprava; angl. High Definition Oscillometry
Hgb	hemoglobin
HNE	4-hidroksinonenal
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti; angl. High Performance Liquid Chromatography
H ₂ O ₂	vodikov peroksid
IE	internacionalne enote
I.N.T	2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolijev klorid
IRIS	mednarodno združenje za bolezni ledvic; angl. International Renal Interest Society
MDA	malondialdehid; angl. Malondialdehyde
NaCl	natrijev klorid
NaOH	natrijev hidroksid
O ₂ ^{•-}	superoksidni radikal
[•] OH	hidroksilni radikal
8-OHdA	8-hidroksi-2-deoksiadenozin
8-OHdG	8-hidroksi-2-deoksigvanozin
8-oksoG	7,8-dihidro-8-oksogvanin
ONOO ⁻	peroksinitrit
ORAC	kapaciteta absorbance kisikovega radikala; angl. Oxygen Radical Absorbance Capacity

PG	prostaglandini
RAS	os renin angiotenzin aldosteron
ROO [•]	lipidni peroksilni radikali
ROS	reaktivne kisikove zvrsti; angl. Reactive Oxygen Species
SH	sulfhidrilne skupine
SD	standardni odklon; angl. Standard Deviation
SOD	superoksidna dismutaza
UPC	razmerje med koncentracijo beljakovin in kreatinina v urinu; angl. Urinary Protein to Creatinine Ratio
USG	specifična gostota urina; angl. Urine Specific Gravity
TAC	celokupna antioksidantna kapaciteta; angl. Total Antioxidant Capacity
TBARS	s tiobarbiturno kislino reagirajoče spojine ; angl. Thiobarbituric Acid Reacting Substances
TEAC	troloksu ekvivalentna antioksidantna kapaciteta; angl. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TGF-β1	transformirajoči rastni faktor β1; angl. Transforming Growth Factor β1
TRAP	skupna kapaciteta antioksidantov lovilcev radikalov; angl. Total Radical Trapping Antioxidant Parameter
Tris	tris (hidroksimetil) aminometan
U	enote; angl. Units
VEGF	žilni endotelijski rastni faktor; angl. Vascular Endothelial Growth Factor

1 UVOD

Mačke so med pogosto preučevanimi živalskimi vrstami edinstvene v tem, da so v starosti nagnjene k obolenju enega samega organa – ledvic. Kronična ledvična odpoved (angl. Chronic Kidney Disease, CKD) je med najpogostejšimi vzroki pogina pri mačkah. Gre za ireverzibilno postopno napredujočo izgubo funkcionalnega ledvičnega tkiva, ki v končni fazi ne glede na vzrok privede do ledvične fibroze. Preden se razvijejo klinični znaki uremije, lahko mačke z začetno stopnjo te bolezni živijo več let, nato pride do nenadne dekompenzacije in pogina. Lawler in sodelavci (2006) celo predpostavljajo, da gre pri mačji CKD za prilagoditveni mehanizem, ki bi lahko predstavljal evolucijsko prednost. Navajajo, da izguba ledvičnih cevčic in peritubularna fibroza potekata brez znanega začetnega dejavnika, da gre za selektivni proces in da imajo mačke s tubulointersticijskimi procesi daljšo življenjsko dobo kot mačke, pri katerih tovrstna patologija ni prisotna. Raziskave zadnjih let se osredotočajo predvsem na odkrivanje dejavnikov, ki napovedujejo preživetje ali dekompenzacijo bolezni (Lawler in sod., 2006; Elliott in Watson, 2013; Jepson in sod., 2009; Greene in sod., 2014).

Klinične raziskave kažejo, da standardna terapija s kalcitriolom in zaviralci angiotenzin konvertaze (angl. Angiotensin Converting Enzyme, ACE), ki upočasnijo napredovanje CKD pri drugih živalskih vrstah, pri mačkah slabše učinkuje. Trenutno najpomembnejši del zdravljenja je dolgoročno klinično spremljanje pacienta, ustrezna dieta in nudenje podporne terapije, ki blaži klinične znake uremije. Pri zdravljenju se prilagajamo potrebam in kliničnemu stanju posameznega pacienta (Korman in White, 2013; Polzin, 2013).

Pri ljudeh in psih s CKD je dokazano porušeno ravnotežje med prooksidativnimi in antioksidativnimi procesi, kar vodi v stanje oksidativnega stresa. Oksidativni stres pomembno sodeluje pri napredovanju bolezni, saj povzroči stanje kroničnega vnetja (Locattelli in sod., 2003), oksidativne poškodbe membranskih in plazemskih lipidov, beljakovin in DNA. Dodajanje antioksidantov, predvsem vitamina E, dokazano zmanjša oksidativni stres, izboljša

antioksidantne parametre, zmanjša poškodbe bioloških molekul in izboljša klinično stanje ljudi s CKD (Cristol in sod., 1997; Locattelli in sod., 2003; Bhogade in sod., 2008; Kan in sod., 2008; Priya in Vasudha, 2009).

Pri mačkah s CKD je področje oksidativnega stresa pri CKD slabo raziskano. Doslej so se z omenjeno problematiko ukvarjale tri raziskave in prišle do različnih zaključkov. Yu in Paetau-Robinson (2006) nista ugotovila značilnega povečanja pokazateljev oksidativnega stresa, medtem ko so Keegan in Webb (2010) ter Krofič Žel in sodelavci (2014) ugotovili, da pri mačkah s CKD pride do aktivacije antioksidantnih mehanizmov. Omenjene raziskave so bile izvedene na majhnem številu živali, pri čemer prvi dve nista upoštevali kliničnih stopenj bolezni po smernicah mednarodnega združenja za bolezni ledvic (angl. International Renal Interest Society, IRIS) (Yu in Paetau-Robinson, 2006; Keegan in Webb, 2010; Krofič Žel in sod., 2014).

1.1 NAMEN RAZISKAVE

Dinamika oksidativnega stresa in vpliv vitamina E na antioksidantni status ter klinično stanje pri mačkah s CKD še niso podrobno raziskani, zato je namen naše raziskave preučiti prisotnost oksidativnega stresa pri mačkah s CKD v vseh kliničnih stopnjah bolezni. Oksidativni stres želimo ovrednotiti s stališča poškodb bioloških molekul in antioksidantnega statusa organizma. Končno želimo ugotoviti, ali dodatek vitamina E k zdravljenju po priporočilih IRIS izboljša klinično stanje in upočasni napredovanje bolezni.

1.2 HIPOTEZE

V raziskavi smo si zastavili naslednje hipoteze:

1. Pri mačkah s CKD je oksidativni stres prisoten v vseh stopnjah bolezni (smernice IRIS) in vodi v oksidativne poškodbe lipidov, beljakovin in DNA, katerih obseg se z napredovanjem bolezni povečuje.
2. V vseh stopnjah CKD so parametri antioksidantnega statusa znižani, napredovanje bolezni pa vrednosti parametrov še zniža.
3. Dodajanje vitamina E k prehrani ob standardnem zdravljenju po smernicah IRIS zmanjša oksidativni stres, poveča parametre antioksidantnega statusa ter izboljša klinično stanje, ocenjeno na osnovi izbranih kliničnih in laboratorijskih parametrov ne glede na stopnjo bolezni.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 KRONIČNA LEDVIČNA ODPOVED PRI MAČKAH

Kronična ledvična odpoved je med najpogostejšimi vzroki pogina pri mačkah (King in sod., 2007). Pri mačkah, starejših od 15 let, navajajo do 30 % obolevnost (Allen in sod., 2000). Definirana je kot katerakoli ledvična bolezen, ki traja vsaj tri mesece in se odraža na spremenjenih laboratorijskih parametrih (povečana raven sečnine in kreatinina v serumu), spremenjenih kliničnih parametrih (izguba telesne mase, palpatorno majhne ledvice) in strukturnih spremembah ledvic (Polzin, 2013). Za CKD je značilna postopna izguba ledvične funkcije zaradi različnih bolezenskih procesov, ki so lahko prirojeni (dedni) ali pridobljeni (posledica vplivov okolja). Najpogosteje je posledica amiloidoze, tubulonefroze ali policistične bolezni ledvic. Terminalni stadij CKD je tubulointersticijska fibroza, ki nastane zaradi kroničnega vnetja. Stopnja fibroze je v korelaciji s stopnjo azotemije, hiperfosfatemije in anemije (Yabuki in sod., 2010; Chakrabarti in sod., 2012; Polzin, 2013).

Pri mačkah s CKD so v urinu ugotovili značilno višjo koncentracijo vnetnih citokinov interleukina 8 in TGF- β 1 (transformirajoči rastni faktor β 1, angl. Transforming Growth Factor β 1) ter zmanjšano koncentracijo VEGF (žilni endotelijski rastni faktor, angl. Vascular Endothelial Growth Factor) kot pri zdravih mačkah. Koncentracija kreatinina v serumu in koncentracija TGF- β 1 v urinu sta bili v pozitivni korelaciji, kar kaže na sodelovanje tega rastnega faktorja pri nastanku ledvične fibroze (Arata in sod., 2005; Habenicht in sod., 2013).

Klasifikacija IRIS uvršča mačke s CKD ne glede na vzrok bolezni v klinične stopnje in za vsako stopnjo predvideva smernice zdravljenja (Polzin, 2013; smernice IRIS, 2013a).

Glavno merilo za določitev stopnje je raven serumskega kreatinina (1. stopnja: koncentracija kreatinina do 140 μ mol/L, 2. stopnja: 140–249 μ mol/L, 3. stopnja: 250–439 μ mol/L, 4. stopnja: nad 440 μ mol/L). Stopnjo po IRIS lahko določimo le pri pacientih s stabilno CKD, prav tako

moramo izključiti druge bolezni, ki bi lahko vplivale na raven kreatinina v serumu. Raven kreatinina v krvi se lahko hitro spreminja, zato je priporočljivo določiti njegovo koncentracijo v štirinajstdnevnom razmiku. Ob odvzemu krvi mora biti žival primerno hidrirana in tešča (Elliott in Watson, 2013).

Da nastopi CKD, mora biti poškodovan velik del ledvičnega tkiva. Koncentracija kreatinina v krvi se poveča šele, ko je uničenih približno 75 % nefronov. Raven kreatinina v prvi in delno v drugi stopnji je zato znotraj referenčnih vrednosti. V prvi dve stopnji uvrstimo tiste paciente, pri katerih ugotovimo še katerega od spodaj naštetih parametrov:

- nezmožnost koncentracije urina,
- prisotnost renalne proteinurije,
- nenormalna oblika ali velikost ledvic ob palpaciji, kar potrdimo s slikovno diagnostiko,
- trend povečevanja koncentracije kreatinina v zaporednih vzorcih (Elliott in Watson, 2013).

2.1.1 Podstopnje bolezni

Razvrstitev v podstopnje glede na višino arterijskega krvnega tlaka in razmerje med koncentracijo beljakovin in kreatinina v urinu (angl. Urinary Protein to Creatinine ratio, UPC) opredeljujeta stopnjo tveganja za napredovanje bolezni in pogin. Povečane vrednosti omenjenih parametrov neodvisno pospešijo razvoj bolezni in pogin (King in sod., 2007; Elliott in Watson, 2013; Jepson in sod., 2009; IRIS 2013a).

Arterijski tlak je pri pacientih s CKD pogosto povišan. Trajno povišan tlak predstavlja tveganje za poškodbe možganskega ožilja, za odstop mrežnice in za poškodbo glomerulov. Smernice IRIS določajo stopnjo tveganja na podlagi najnižjega ponovljivo izmerjenega sistolnega arterijskega tlaka: minimalno tveganje (pod 150 mm Hg), nizko tveganje (150–159 mm Hg), zmerno tveganje (160–180 mm Hg) in visoko tveganje (nad 180 mm Hg).

UPC je neposreden odraz 24-urnega izločanja beljakovin z urinom. Za renalno proteinurijo je značilna prisotnost beljakovin v urinu brez prisotnosti vnetnih celic, eritrocitov ali bakterij v urinskem sedimentu. Paciente glede na vrednost UPC razdelimo po naslednjem ključu: brez proteinurije (UPC do 0,2), mejna proteinurija (UPC 0,2–0,4) in proteinurija (UPC več kot 0,4) (Kuwahara in sod., 2006, Syme in sod., 2006; Grauer, 2007; Elliott in Watson, 2013; Syme, 2009).

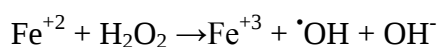
Dodatni negativni prognostični dejavniki za dekompenzacijo in smrt mačk s CKD so stopnja azotemije (Kuwahara in sod., 2006; Syme in sod., 2006; King in sod., 2007), hiperfosfatemija (King in sod., 2007), anemija (Kuwahara in sod., 2006; King in sod., 2007), levkocitoza (King in sod., 2007), hujšanje, stopnja dehidracije, cistitis, *diabetes mellitus* (Greene in sod., 2014) in povečana koncentracija fibroblastnega rastnega faktorja 23 v urinu (angl. Fibroblast Growth Factor 23, FGF-23) (Geddes in sod., 2013).

2.2 VLOGA REAKTIVNIH KISI KOVIH ZVRSTI PRI KRONIČNI LEDVIČNI ODPOVEDI

Pri presnovi fiziološko nastajajo številne reaktivne kisikove zvrsti (angl. Reactive Oxygen Species – ROS), ki zajemajo tako proste radikale kot tudi reaktivne kisikove spojine in lahko povzročijo oksidativne poškodbe membranskih in plazemskih lipidov, beljakovin in DNA (Galle, 2001). V celicah proksimalnih ledvičnih cevč, ki so med presnovno najaktivnejšimi v organizmu, nastajajo predvsem superoksidni radikal ($O_2^{\bullet-}$), vodikov peroksid (H_2O_2), hidroksilni radikal ($\bullet OH$), lipidni in DNA hidroperoksidi, lipidni peroksilni radikali ($ROO^{\bullet}$), hipoklorna kislina ($HClO$) in peroksinitrit ($ONOO^-$).

Superoksidni radikal nastaja predvsem v mitohondrijih pri uhajanju elektronov v dihalni verigi ter pri oksidativnem izbruhu nevtrofilnih granulocitov med fagocitozo s pomočjo NADPH oksidaze. Tudi nefagocitne celice imajo NADPH oksidaze. Superoksidni radikal sintetizirajo v manjši meri, ta pa ima vlogo signalne molekule (Valko in sod., 2007).

Hidroksilni radikal je nevtralna oblika hidroksidnega iona. Je zelo reaktiven, toda njegova razpolovna doba je kratka, zato reagira v bližini mesta svojega nastanka. Najverjetnejša razlaga nastanka hidroksilnega radikala *in vivo* je naslednja: pod vplivom superoksidnega radikala se v celici iz molekul, ki vsebujejo železo, sprosti železov ion, ki z vodikovim peroksidom reagira v Fentonovi reakciji, da nastane hidroksilni radikal:



Na enak način kot železov ion lahko reagirajo tudi bakrov, kromov in kobaltov ion. Superoksidni radikal, ki sodeluje v Haber-Weissovi reakciji ($\text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$), reducira železov ion iz Fe^{+3} v Fe^{+2} : $\text{Fe}^{+3} + \text{O}_2^{\cdot-} \rightarrow \text{Fe}^{+2} + \text{O}_2$ (Halliwell, 2006; Valko in sod., 2007).

Glavno mesto nastanka vodikovega peroksida v celici so peroksisomi. Vsebujejo encim katalazo, ki vodikov peroksid razgradi na molekularni kisik in vodo. Na ta način se vzdržuje občutljivo ravnotežje v nastajanju in razgradnji ROS. Če se peroksisomi poškodujejo in je aktivnost encimov, ki skrbijo za razgradnjo vodikovega peroksida zmanjšana, se ta sprosti v citosol (Valko in sod., 2007).

Peroksilni radikali so derivati superoksidnega aniona. Najenostavnejši je hidroperoksilni radikal ($\text{HOO}^\cdot$), ki je protonirana oblika superoksidnega aniona. Hidroperoksilni radikal je glavni iniciator lipidne peroksidacije. Lipidni in DNA hidroperoksidi nastanejo kot posledica napada peroksilnega radikala na lipidne molekule in DNA (Valko in sod., 2007).

Sintaze dušikovega oksida v tkivih sintetizirajo $\text{NO}^\cdot$, ki ima v mnogih fizioloških procesih vlogo signalne molekule. Pri vnetnih procesih med oksidativnim izbruhom proizvajajo celice imunskega sistema superoksidni anion in dušikov oksid. Omenjeni molekuli lahko reagirata ($\text{NO}^\cdot + \text{O}_2^{\cdot-} \rightarrow \text{ONOO}^-$), da nastane peroksinitritni anion, ki je močan oksidant in lahko povzroči fragmentacijo DNA in oksidacijo lipidov.

ROS, ki nastajajo v fizioloških pogojih, delujejo tudi kot signalne molekule in povzročijo neposredno aktivacijo provnetnih jedrnih transkripcijskih dejavnikov in mitogenih signalnih poti ter aktivacijo levkocitov (Wardle, 2005; Singh in sod., 2006, Valko in sod., 2007).

Encimski in neencimski antioksidantni sistemi odstranjujejo ROS in s tem preprečujejo oksidativne poškodbe bioloških molekul (Galle, 2001). Porušenje ravnotežja med prooksidativnimi in antioksidativnimi procesi vodi v stanje oksidativnega stresa (Halliwell, 2006). Organizem je pri CKD dolgotrajno podvržen učinkom oksidativnega stresa. Število funkcionalnih nefronov se zmanjša, posledično postanejo zaradi kompenzacije lokalno hiperfunkcionalni, kar vodi v povečano raven oksidativne fosforilacije in posledično do nastanka večjih količin ROS (Agarwal, 2002). Pri bolnikih s CKD je aktivirana os renin-angiotenzin-aldosteron (RAS), ki vodi v sistemsko in ledvično hipertenzijo; ta dodatno poveča glomerulno filtracijo in posledično vodi v hiperfunkcijo nefronov. Angiotenzin II neposredno poveča produkcijo ROS v mezangijskih celicah in gladkih mišičnih celicah krvnih žil (Brown, 2008).

Novejše raziskave poudarjajo prisotnost encima angiotenzin konvertaze 2 (angl. Angiotensin Converting Enzyme 2, ACE 2), ki se izraža predvsem v epitelnih celicah proksimalnih ledvičnih cevok. Njeni glavni funkciji sta pretvorba angiotenzina I v neaktivni angiotenzin 1–9 in katabolizem angiotenzina II v angiotenzin 1–7. Angiotenzin 1–7 ima nasproten učinek kot angiotenzin II: zmanjša vazokonstrikcijo, izražanje provnetnih citokinov, proliferacijo celic in oksidativni stres ter pospeši natriurezo. Zato je pri uravnavi RAS v organizmu pomembno razmerje med ACE in ACE 2 (Mizuri in Ohashi, 2015). Pri psih s CKD so ugotovili zmanjšano izražanje ACE v epitelu proksimalnih cevok na račun povečanega izražanja ACE 2 v epitelu Henlejeve zanke, ki je bilo v pozitivni korelaciji s povečano koncentracijo kreatinina v serumu. Pri mačkah s CKD tovrstne korelacije niso ugotovili (Mitani in sod., 2014).

Pri CKD je zaradi povečane prepustnosti glomerulne membrane lahko prisotna proteinurija v katerikoli fazi bolezni in ni odvisna od serumske koncentracije kreatinina. Raven proteinurije določamo s pomočjo UPC, ki predstavlja pomemben prognostičen faktor za preživetje. Beljakovine so v urinu bolj izpostavljene oksidaciji kot v plazmi. Oksidirani albumini vstopijo v celice proksimalnih ledvičnih cevok, kjer stimulirajo nastanek provnetnih citokinov in kemokinov, ki aktivirajo transkripcijske dejavnike in vodijo v iniciacijo intersticijske fibroze. Proteini v urinu torej niso le pokazatelj patoloških procesov v ledvicah, ampak pomembno sodelujejo pri patogenezi CKD (Wardle, 2005; Brown, 2008; Syme, 2009).

2.3 POŠKODBE BIOLOŠKIH MOLEKUL

2.3.1 Lipidna peroksidacija in malondialdehid

Najpogostejša posledica oksidativnega stresa je lipidna peroksidacija. Vključuje oksidativne spremembe večkratnenasičenih maščobnih kislin in privede do poškodbe bioloških membran. Končni produkti lipidne peroksidacije so izoprostani, konjugirani dieni in aldehidi (Dotan in sod., 2004). Raven malondialdehida (MDA) v plazmi (ali serumu) je splošno uporabljan kazalec oksidativnega stresa in je pri ljudeh in psih s CKD povečana na račun vezanega MDA (Kamal-Eldin in Appelqvist, 1996; Kargin in Fidanci, 2001).

Glavni vir MDA v bioloških vzorcih je peroksidacija večkrat nenasičenih maščobnih kislin z dvema ali več dvojnimi vezmi, med katerimi je metilen. Pri sesalcih sta najpogostejša prekursorja arahidonska in dokozaheksaenojska kislina. Nastanek MDA iz večkratnenasičenih maščobnih kislin razlaga več hipotez. Pryor in Stanley (1975) predpostavljata, da je prekursor MDA biciklični endoperoksid s podobno strukturo kot endoperoksid, ki nastane pri biosintezi prostaglandinov (Del Rio in sod., 2005).

Esterbauer in sodelavci (1991) domnevajo, da z β -cepitvijo verige maščobne kisline nastanejo hidroperoksidi, kar vodi v nastanek hidroperoksid aldehida. Z β -cepljenjem le-tega lahko neposredno nastane MDA ali pa akroleinski radikal. Če akroleinski radikal reagira s hidroksilnim radikalom, nastane MDA (Esterbauer in sod., 1991; Del Rio in sod., 2005).

MDA naj bi nastajal tudi pri biosintezi tromboksana A₂. V nekaterih tkivih s pomočjo encima trombocitne tromboksan sintaze iz prostaglandinov (PG) PGH₂, PGH₃ in PGG₂ nastanejo v razmerju 1 : 1 : 1 MDA, tromboksan A₂ in C₁₇ spojine. Iz PGH₁, 8-izo-PGH₂ in 13(S)hidroksiPGH₃ nastaneta le MDA in C₁₇ spojina, tromboksan A₂ pa ne (Del Rio in sod., 2005; Esterbauer in sod., 1991).

V organizmu se MDA nahaja v prosti in vezani obliki z beljakovinami, nukleinskimi kislinami in lipoproteini. Prosti MDA je povečan, kadar so oksidativne poškodbe lipidov nastale akutno, in obenem da podatek o trenutnem stanju lipidne peroksidacije v organizmu, medtem ko se raven vezanega MDA poveča pri kroničnih procesih.

Pri podganah se MDA presnovi do ogljikovega dioksida in vode. Presnova poteka v mitohondrijih, kjer aldehyd dehidrogenaze MDA najprej pretvorijo v malonsko kislino semialdehyd, ki se spontano dekarboksilira v acetaldehyd. Aldehyd dehidrogenaze ga oksidirajo v acetat, ki se oksidira do ogljikovega dioksida in vode. Majhen del MDA se v jetrih lahko oksidira do malonata, ki se pretvori v malonilkoencim A, nato pa dekarboksilira v acetilkoencim A (Esterbauer in sod., 1991).

MDA se z urinom izloča predvsem v obliki adukta z lizinom in z njegovim N-acetiliranim derivatom. V manjših količinah so v urinu ugotovili tudi prost MDA, adukte s serinom in etanolaminom ter z gvaninom in deoksigvanozinom. V primeru oksidativnega stresa v organizmu se v plazmi in urinu poveča koncentracija adukta MDA z lizinom, medtem ko je koncentracija adukta z deoksigvanozinom v jetrih in v urinu nespremenjena (Draper in sod., 2000).

V urinu so ugotovili tudi spojine, nastale pri presnovni razgradnji proteinov, spremenjenih z MDA. Večina teh spojin ni endogenega izvora, ampak je nastala z razgradnjo z MDA spremenjenih beljakovin, zaužitih s hrano živalskega izvora. Povečano količino teh spojin so zaznali pri podganah s pomanjkanjem vitamina E, pri zastrupitvi z ogljikovim tetrakloridom in pri dajanju železovega nitriloacetata, ki vzpodbuja lipidno peroksidacijo (Esterbauer in sod., 1991).

Pri ljudeh s končno stopnjo CKD so ugotovili povečano plazemsko koncentracijo MDA na račun vezanega MDA, saj je nastajanje MDA zaradi oksidativnega stresa povečano (De Vecchi in sod., 1997; Ozden in sod., 2002; Agarwal, 2002; Priya in Vasudha, 2009). V raziskavi pri mačkah (Yu in Paetau-Robinson, 2006) in psih (Buranakarl in sod., 2009) s CKD z uporabo metode TBARS (s tiobarbiturno kislino reagirajoče spojine, angl. Thiobarbituric Acid Reactive Substances) niso ugotovili značilno povečane koncentracije MDA v serumu oziroma plazmi.

2.3.2 Oksidativne poškodbe beljakovin

Oksidativne poškodbe beljakovin zajemajo oksidacijo polipeptidnih verig, fragmentacijo beljakovin, nastanek novih prečnih povezav med beljakovinami (angl. Advanced Oxidation Protein Products, AOPP) in oksidacijo stranskih aminokislinskih ostankov ter nastanek tiolnih skupin. Za dokazovanje oksidativnih poškodb beljakovin se najpogosteje uporablja določanje proteinskih karbonilnih skupin v plazmi, ki so pokazatelj dalj časa trajajočega oksidativnega stresa (Dalle-Donne in sod., 2003; Halliwell in Whiteman, 2004; Valko in sod., 2007).

ROS, ki povzročajo nastanek proteinskih karbonilnih skupin, so superoksidni, hidroksilni, peroksilni, alkoksilni in hidroperoksilni radikal ter vodikov peroksid, hipoklorna kislina, ozon, singletni kisikov ion in peroksinitrit. Karbonilne skupine in njihovi derivati nastanejo z neposredno oksidacijo stranskih verig beljakovin in preko sekundarne reakcije aminokislinskih ostankov z MDA, 4-hidroksinonenalom in drugimi aldehidi (Dalle-Donne in sod., 2003). Oksidaciji sta najbolj podvrženi aminokislini cistein in metionin; pogosto oksidirajo tudi lizin, arginin, prolin in treonin (Wardle, 2005; Dalle-Donne in sod., 2003). Oksidirane beljakovine (proteinski karbonili) se v celici akumulirajo, nekatere so odporne na proteolizo in lahko preprečijo razgradnjo drugih oksidiranih beljakovin (Berlett in Stadtman, 1997). Različni avtorji potrjujejo povečano koncentracijo karbonilnih skupin (Himmelfarb in sod., 2000; Mimić-Oka in sod. 2001) in tiolnih skupin (Himmelfarb in sod., 2000) in AOPP (Witko-Sarsat, 1998) pri pacientih s CKD v primerjavi z zdravimi ljudmi.

2.3.3 Oksidativne poškodbe DNA

Oksidativne poškodbe DNA zajemajo modifikacije sladkorjev in baz, nastanek kovalentnih prečnih vezi ter sproščanje baznih parov iz DNA, kar privede do enojnega ali dvojnega lomljenja DNA vijačnice. Purinske baze, predvsem gvanin, so posebej dovzetne za oksidacijo. Pri napadu hidroksilnega radikala na purine nastanejo 8-hidroksi-2-deoksigvanozin (8-OHdG), 8-hidroksi-2-

deoksiadenozin (8-OHdA), 7,8-dihidro-8-oksogvanin (8-oksoG), formamidopirimidini in druge spojine. 8-OHdG je najpogostejše preučevan parameter v zvezi z oksidativnimi poškodbami DNA pri mačkah (Yu in Paetau-Robinson, 2006) in pri ljudeh (Dotan in sod., 2004; Valko in sod., 2007). Pri bolnikih s CKD je raven 8-OHdG v urinu povečana, 8-OHdG se uporablja tudi kot pokazatelj oksidativnega stresa, ki ga povzroči uremija. Pri bolnikih s CKD lahko poškodbe DNA ugotavljamo tudi s pomočjo ocene pogostnosti mikrojeder in fragmentiranosti mitohondrijske DNA ter s testom komet (Sung in sod., 2013).

Test komet (angl. Single Cell Gel Electrophoresis assay) je občutljiva metoda za odkrivanje poškodb DNA na nivoju posameznih celic. S testom komet ugotavljamo enojne in dvojne prelome vijačnice DNA, območja DNA, ki so nestabilna v alkalnem okolju, in razrahljan kromatin. Metoda temelji na potovanju negativno nabite DNA v električnem polju proti pozitivnemu polu. Poškodovana fragmentirana DNA potuje hitreje kot intaktna. V primeru poškodovane DNA dobijo celična jedra obliko kometa, po čemer je test dobil ime. Poškodbe DNA ovrednotimo z računalniškim programom za analizo slike. Izmerimo lahko več parametrov, kot so odstotek DNA v tako imenovanem repu kometa oziroma glavi kometa in dolžina repa kometa (Tice in sod., 2000).

Z metodo testa komet so ugotovili poškodbe DNA pri ljudeh s CKD, ki se je z napredovanjem bolezni povečevala (Stopper in sod., 2001; Stoyanova in sod., 2010). V nasprotju z raziskavami pri ljudeh pri mačkah z začetno stopnjo CKD med zdravimi in bolnimi živalmi niso ugotovili značilnih razlik (Yu in Paetau-Robinson, 2006).

2.4 ANTIOKSIDANTNI SISTEM V LEDVICAH

Najpomembnejši encimski antioksidantni sistemi v ledvicah so plazemska in eritrocitna glutation peroksidaza (GPX), superoksidna dismutaza (SOD), katalaza (CAT) in endotelijska sintaza dušikovega oksida; neencimski pa glutation, vitamina E in C, karotenoidi in sulfhidrilne (SH) skupine albuminov (Locattelli in sod., 2003). Plazemska glutation peroksidaza deluje kot

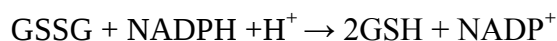
antioksidantni encim lokalno v proksimalnih ledvičnih cevkah in sistemsko v plazmi (Arthur, 2000).

2.4.1 Glutation peroksidaza

Glutation peroksidaza (GPX) katalizira redukcijo vodikovega peroksida in drugih organskih peroksidov v vodo ali v alkohole. Pri sesalcih najdemo več izoencimov, ki se v različnih tkivih različno izražajo. GPX-1 ali citosolno GPX najdemo v citosolu in mitohondrijih in katalizira pretvorbo hidroperoksidov maščobnih kislin ter vodikovega peroksida na račun oksidacije glutaciona (Ursini in sod., 1995; Mates, 2000).



Glutation se nato z glutation reduktazo reducira, pri čemer se oksidira NADPH:



GPX-1 je prisotna v vseh tkivih, predvsem v eritrocitih, ledvicah in jetrih. Citosolna GPX-2 je prisotna v prebavilih, zunajcelična GPX-3 pa v celicah proksimalnih ledvičnih cev. GPX-4 ali fosfolipidna GPX se nahaja v citosolu. Neposredno reducira fosfolipidne hidroperoksidge, hidroperoksidge maščobnih kislin in holesterolne hidroperoksidge, ki nastanejo v peroksidiranih membranah in oksidiranih lipoproteinih. GPX-4 je najbolj izražena v epitelih celicah ledvičnih cev in v testisih (Ursini in sod., 1995; Arthur, 2000). Prej naštetih izoencimov GPX imajo na aktivnem mestu selenocistein, ki se v zaporednih reakcijah najprej oksidira in nato reducira. Pri miših so odkrili tudi GPX-5 in GPX-6, ki imata podobno strukturo kot ostale selenoglutation peroksidaze, vendar na aktivnem mestu nimata selena (Arthur, 2000; Mates, 2000).

V krvi sta prisotni plazemska in eritrocitna GPX. Glavni vir GPX v plazmi so celice ledvičnih cev (Avissar in sod., 1994; Whittin in sod., 2002). Številne raziskave pri ljudeh s CKD ugotavljajo zmanjšano aktivnost plazemske GPX na vseh stopnjah bolezni (Schiavon in sod., 1994; Ceballos-Picot in sod., 1996; Witko-Sarsat in sod., 1998; Zachara in sod., 2004; El-Far in sod., 2005). Zmanjšano aktivnost plazemske GPX razlagajo kot posledico povečane lipidne peroksidacije v organizmu, zmanjšane števila funkcionalnih nefronov (Ceballos-Picot in sod.,

1996; El-Far in sod., 2005; Zagrodzki in sod., 2007) in prisotnosti uremičnih toksinov (El-Far in sod., 2005; Zagrodzki in sod., 2007), porabe plazemske GPX, inaktivacije GPX ali abnormalne heksoza monofosfatne poti (Zagrodzki in sod., 2007). Zmanjšano aktivnost plazemske GPX ugotavljajo že v zgodnjem stadiju bolezni, zato je primeren diagnostični in prognostični pokazatelj stopnje bolezni in ledvične funkcije (Schiavon in sod., 1994; Ceballos-Picot in sod., 1996). V nasprotju s prej navedenimi raziskavami so pri mačkah s CKD ugotovili značilno povečano aktivnost plazemske GPX v končnem stadiju bolezni, medtem ko je bila njena aktivnost v začetnih stopnjah bolezni nespremenjena. Ti rezultati nakazujejo prisotnost kompenzatornih mehanizmov, ki so, kot odgovor na povečan oksidativni stres, v tej stopnji še vedno prisotni (Krofič Žel in sod., 2014).

Pri ljudeh s CKD ugotavljajo znižano koncentracijo selen v polni krvi in plazmi, ki se z napredovanjem bolezni stopnjuje. Kot vzrok navajajo zmanjšan vnos beljakovin z dieto, ki ima zmanjšano vsebnost beljakovin in povečano izločanje selen iz telesa zaradi proteinurije (Ceballos-Picot in sod., 1996; Allan in sod., 1999; Zagrodzki in sod., 2007). Ker je selen kofaktor GPX, navajajo nekateri avtorji pomanjkanje selen kot enega glavnih možnih vzrokov za znižano aktivnost GPX (Zagrodzki in sod., 2007). Druge raziskave tega niso potrdile (Ceballos-Picot in sod., 1996; Zachara in sod., 2004).

Pri zdravih mačkah niso ugotovili korelacije med aktivnostjo plazemske GPX in koncentracijo selen v plazmi, tudi če so vnos selen močno povečali. Aktivnost plazemske GPX je korelirala s koncentracijo selen le, če je bil ta element v pomanjkanju (Foster in sod., 2001; Todd in sod., 2012). Pri mačkah s CKD se koncentracija selen v serumu v primerjavi z zdravimi mačkami ne razlikuje in se z napredovanjem bolezni ne spreminja. Selen pri mačkah s CKD ni omejujoč dejavnik (Krofič Žel in sod., 2014).

Različni avtorji ugotavljajo različna odstopanja v aktivnosti eritrocitne GPX: Ceballos Picot in sodelavci (1996) so ugotovili povečano aktivnost pri bolnikih s CKD; Ozden, Zachara in El-Far (Ozden in sod., 2002, Zachara in sod., 2004; El-Far in sod., 2005) niso ugotovili značilnih razlik, medtem ko so nekatere raziskave ugotovile zmanjšano aktivnost tega encima (Yoshimura in sod., 1997; Sommerburg in sod., 2002). Pri mačkah s CKD v primerjavi z zdravimi mačkami niso

ugotovili značilnih razlik v aktivnosti eritrocitne GPX. Značilnih razlik ni bilo niti med posameznimi kliničnimi stopnjami CKD (Krofič Žel in sod., 2014).

2.4.2 Superoksidna dismutaza

Encim superoksidna dismutaza (SOD) katalizira reakcijo dismutacije superoksidnega radikala v kisik in vodikov peroksid: $O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$

Katalaza (CAT) ali GPX nato vodikov peroksid pretvorita v molekularni kisik in vodo. SOD ščiti dehidrataze pred inaktivacijo s superoksidnim radikalom. Glede na kofaktor uvrščamo superoksidne dismutaze v štiri razrede: Cu, Zn-SOD, Fe-SOD, Ni-SOD in Mn-SOD. Fe-SOD in Mn-SOD imajo homologno strukturo, ostale superoksidne dismutaze se med seboj strukturno razlikujejo. Pri ljudeh so ugotovili tri vrste SOD: citosolno Cu, Zn-SOD, mitohondrijsko Mn-SOD in zunajcelično SOD (angl. Extracellular-SOD, EC-SOD) (Mates, 2000).

Mn-SOD je homotetramer. Vsaka podenota vsebuje en atom mangana, ki se pri dismutaciji superoksida pretvarja iz Mn(III) v Mn(II) in nazaj v Mn(III). Njeno aktivnost inducirajo citokini, in oksidanti. Cu, Zn-SOD je homodimer. Vsaka podenota ima aktivno mesto, sestavljeno iz enega bakrovega in enega cinkovega atoma, ki ju povezuje histidin (Mates, 2000).

EC-SOD je sekretorni tetramerni glikoprotein, ki vsebuje baker in cink. Ima visoko afiniteto do nekaterih glikozaminoglikanov, predvsem heparina in heparan sulfata. Nahaja se v intersticiju ter v plazmi, limfi in sinovialni tekočini. Je edini zunajcelični encim, ki odstranjuje superoksidni anion. Njene aktivnosti ne inducirajo niti substrat niti drugi oksidanti (Mates, 2000).

Raziskave kažejo, da je aktivnost tega encima pri dializnih bolnikih s CKD nižja kot pri zdravih ljudeh (Mates, 2000; Locattelli in sod., 2003). Domnevajo, da gre pri humanih bolnikih s CKD za znižanje ravni izražanja tega encima. Ugotovili so tudi zmanjšano aktivnost Cu, Zn-SOD in Mn SOD v jetrih in ledvicah podgan z eksperimentalno povzročeno CKD (Vaziri in sod., 2003). V nasprotju s prej omenjenimi raziskavami pri mačkah s CKD v primerjavi z zdravimi niso ugotovili značilne razlike v aktivnosti SOD. To razliko bi lahko razložili z drugačno oksidativno

presnovo pri mačkah. Raziskave aktivnosti SOD pri ljudeh pretežno obravnavajo dializne bolnike, pri katerih je oksidativni stres dokazano večji (Keegan in Webb, 2010).

2.4.3 Celokupna antioksidantna kapaciteta

Celokupna antioksidantna kapaciteta (angl. Total Antioxidant Capacity, TAC) zajema skupno delovanje vseh antioksidantov v plazmi in telesnih tekočinah in predstavlja integriran parameter in ne le vsote vseh merljivih antioksidantov (Ghiselli in sod., 2000), kot so urati, askorbinska kislina, bilirubin, proteinske sulfhidrilne (SH) skupine, koencim Q10 in α -tokoferol (Aejmelaeus in sod., 1997).

Poznamo več metod določanja TAC, katerih rezultati med seboj niso popolnoma primerljivi. Metode razdelimo v dve skupini, in sicer na tiste, ki temeljijo na prenosu vodikovega atoma (angl. Hydrogen Atom Transfer, HAT) in tiste, ki temeljijo na prenosu elektrona (angl. Electron Transfer, ET). Metode HAT večinoma uporabljajo kompetitivno reakcijsko shemo, pri kateri antioksidant in substrat tekmujeta za peroksilni radikal. Najpogosteje uporabljeni metodi HAT sta kapaciteta absorbance kisikovega radikala (angl. Oxygen Radical Absorbance Capacity, ORAC) in skupna kapaciteta antioksidantov lovilcev radikalov (angl. Total Radical Trapping Antioxidant Parameter, TRAP). Metode, ki temeljijo na ET, merijo kapaciteto antioksidanta, da reducira oksidant, ki nato spremeni barvo. Najpogosteje uporabljeni metodi sta železoreducirajoč antioksidantni potencial (angl. Ferric Ion Reducing Antioxidant Power, FRAP), in troloksu ekvivalentna antioksidantna kapaciteta (angl. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, TEAC) (Dotan in sod., 2004; Huang in sod., 2005).

Pri mačkah so ugotavljali plazemsko TAC v treh raziskavah: Yu in Paetau Robinson (2006) z metodo ORAC pri mačkah z začetno stopnjo CKD v primerjavi z zdravimi živalmi nista ugotovila značilnih razlik. Keegan in Webb (2010) sta pri mačkah s CKD z metodo TEAC ugotovila značilno znižano TAC, medtem ko Krofič Žel in sodelavci (2014) z uporabo iste metode, vendar reagenčnega kompleta drugega proizvajalca, niso ugotovili značilnih razlik med zdravimi in bolnimi živalmi ne glede na stopnjo bolezni.

2.4.4 Vitamin E

Vitamin E (α -tokoferol) je v maščobah topni antioksidant, ki ščiti lipidne membrane pred peroksidacijo. Preprečuje verižno reakcijo peroksidacije lipidov tako, da reducira lipidne peroksilne radikale. Vitamin E predstavlja družino osmih v maščobi topnih tokoferolov in se nahaja v celičnih membranah in v plazemskih lipoproteinih. α -tokoferol ima med vsemi tokoferoli največjo biorazpoložljivost, zato je njegova uporaba najbolj raziskana. Ker lipidni peroksilni radikali reagirajo z α -tokoferolom veliko hitreje kot lipidi, lahko ena molekula vitamina E zaščiti kar 10^3 – 10^8 molekul večkratnenasičenih maščobnih kislin (Kamal-Eldin in Appelqvist, 1996). Pri tem nastane tokoferilni radikal, ki se regenerira v α -tokoferol s pomočjo askorbinske kisline, koencima Q₁₀ ali z glutationom (Valko in sod., 2007; Halliwell, 2006).

Pri humanih uremičnih pacientih je raven vitamina E v serumu znižana, kar je najverjetneje posledica povečane porabe tega vitamina zaradi povečanega nastanka ROS (Bhogade in sod., 2008). Dokazana je značilna negativna povezava med koncentracijo vitaminov E in C in koncentracijo kreatinina, sečnine in MDA v serumu (Priya in Vasudha, 2009). Pri dializnih bolnikih so ugotovili pozitiven učinek dodajanja vitamina E k prehrani. Dializni bolniki, ki so dva meseca prejeli vitamin E, so imeli v primerjavi s kontrolno skupino nižjo serumsko koncentracijo MDA, medtem ko je bila aktivnost SOD ter CAT znižana (Bhogade in sod., 2008). Drugi avtorji navajajo izboljšanje kliničnega stanja dializnih bolnikov po dodajanju vitamina E: anemija je bila blažja, odziv na terapijo z eritropoetinom se je izboljšal (Cristol in sod., 1997), pojavnost ateroskleroze in kardiovaskularnih bolezni je bila manjša (Locattelli in sod., 2003; Priya in Vasudha, 2009), poškodbe DNA, ocenjene s testom komet, so se zmanjšale (Kan in sod., 2002). Ali zdravljenje, ki vključuje dajanje vitaminov in antioksidantov, pri mačkah s CKD deluje, zaenkrat ostaja nepojasnjeno (Roudebush in sod., 2009, Korman in White, 2013).

2.5 OKSIDATIVNI STRES PRI KRONIČNI LEDVIČNI ODPOVEDI

Številne raziskave pri ljudeh s CKD (Ceballos-Picot in sod., 1996; Kamal-Eldin in Appelqvist, 1996; Galle, 2001; Dalle-Donne in sod., 2003; Wardle, 2005; Bhogade in sod., 2008; Priya in Vasudha, 2009) potrjujejo stanje oksidativnega stresa, ki se odraža s poškodbami DNA, beljakovin in lipidov ter znižano aktivnostjo plazemske GPX. Raziskave dokazujejo prisotnost oksidativnega stresa že zgodaj v poteku CKD; ta se z napredovanjem bolezni stopnjuje.

Tudi pri psih s CKD so raziskave pokazale prisotnost oksidativnega stresa. Kargin in Fidanci (2001) sta ugotovila zmanjšano aktivnost CAT, SOD in GPX v eritrocitih ter povečano koncentracijo MDA v plazmi psov s CKD. Buranakarl in sodelavci (2009) so ugotovili, da je razmerje med MDA in kreatininom v urinu v pozitivni korelaciji z UPC. Merili so tudi aktivnost CAT, koncentracijo glutationa v eritrocitih ter koncentracijo serumskega MDA, vendar korelacije s stopnjo azotemije niso ugotovili. Nedavna raziskava Silve in sodelavcev (2013) je pokazala prisotnost oksidativnega stresa pri uremičnih psih z znižano TAC, zmanjšano produkcijo superoksidnega radikala v nevtrofilnih granulocitih ter pospešeno apoptozo le-teh. Z metodo TBARS so ugotovili manjšo raven lipidne peroksidacije kot pri zdravih psih.

Oksidativni stres pri mačkah s CKD še ni podrobno raziskan. Pri vzorcu desetih mačk z začetno stopnjo CKD Yu in Paetau-Robinson (2006) nista ugotovila značilnega povečanja pokazateljev oksidativnega stresa (TAC, serumska koncentracija 8-OHdG, koncentracija MDA v plazmi, poškodba DNA perifernih limfocitov). Po dajanju kombinacije vitamina C, vitamina E in β karotena so se oksidativne poškodbe DNA značilno zmanjšale.

Keegan in Webb (2010) sta na vzorcu dvajsetih mačk s CKD ugotovila značilno znižano plazemsko TAC, nespremenjeno aktivnost SOD in povečan oksidativni izbruh nevtrofilnih granulocitov. Zaključila sta, da je pri mačkah s CKD zaradi kroničnega vnetja povečana produkcija superoksidnega radikala v nevtrofilnih granulocitih, kar v organizmu vodi v

prooksidativne procese. Ker je bilo razmerje med reducirano in oksidirano obliko glutationa povečano, zaključujeta, da so antioksidantni obrambni mehanizmi pri CKD aktivirani.

Krofič Žel in sodelavci (2014) so preučevali aktivnost plazemske in eritrocitne GPX, nivo plazemske TAC in koncentracijo selena v serumu šestindvajsetih mačk s CKD ter jih primerjali z zdravimi mačkami. Mačke s CKD so obravnavali po skupinah glede na stopnjo bolezni po smernicah IRIS. Ugotovili so, da se aktivnost eritrocitne GPX, koncentracija selena v serumu in plazemska TAC pri mačkah s CKD ne razlikujejo v primerjavi s skupino zdravih živali. Tudi primerjava navedenih parametrov med posameznimi stopnjami CKD ni pokazala značilnih razlik. Pri mačkah v IRIS IV so v primerjavi s skupino zdravih ugotovili značilno povečano aktivnost plazemske GPX, kar kaže na indukcijo antioksidantnih obrambnih mehanizmov.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 PRELIMINARNA RAZISKAVA

Preliminarno raziskavo smo izvedli na Kliniki za kirurgijo in male živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani. Obravnavali smo 58 mačk, med njimi je bilo 30 mačk zdravih in 28 s CKD. Na podlagi izključitvenih kriterijev smo izključili dve mački s CKD in 11 iz skupine zdravih živali. Končno smo v preliminarno raziskavo vključili 19 zdravih mačk in 26 mačk s CKD. V skupini zdravih mačk je bilo deset samcev in devet samic. Šest samcev je bilo kastriranih, pet samic steriliziranih. V skupino mačk s CKD smo vključili 15 kastriranih samcev in 11 samic; deset samic je bilo steriliziranih.

Mačke smo po smernicah IRIS (IRIS, 2013a) glede na vrednosti kreatinina v serumu razdelili v štiri skupine: pet v IRIS I (koncentracija kreatinina v serumu do 140 $\mu\text{mol/L}$), devet v IRIS II (koncentracija kreatinina 140–249 $\mu\text{mol/L}$), sedem v IRIS III (koncentracija kreatinina 250–439 $\mu\text{mol/L}$) in pet v IRIS IV (koncentracija kreatinina v serumu več kot 440 $\mu\text{mol/L}$). Pri vseh mačkah smo vzeli anamnezo in opravili klinični pregled ter jim odvzeli vzorce krvi in urina.

Starost in telesno maso mačk, vključenih v preliminarno raziskavo, prikazuje Tabela 1. Mačke v kontrolni skupini so bile značilno mlajše kot mačke s CKD ($p < 0,05$).

Tabela 1: Starost in telesna masa (povprečje $\pm$ SD) mačk, vključenih v preliminarno raziskavoTable 1: Age and body weight (mean $\pm$ SD) of cats included in the preliminary study

Stopnja CKD	Starost (let)	Telesna masa (kg)
I (n = 5)	11,0 $\pm$ 5,4	4,1 $\pm$ 0,7
II (n = 9)	12,6 $\pm$ 6,6	4,5 $\pm$ 1,2
III (n = 7)	13,4 $\pm$ 3,6	3,1 $\pm$ 0,6
IV (n = 5)	11,6 $\pm$ 3,6	3,0 $\pm$ 0,7
Kontrolna skupina (n = 19)	5,1 $\pm$ 5,1*	4,2 $\pm$ 1,5

Legenda: CKD kronična ledvična odpoved; n število mačk; * značilna razlika ($p < 0,05$) v primerjavi z IRIS I ($p = 0,027$), II ($p = 0,002$), III ($p = 0,000$) in IV ($p = 0,011$)

Legend: CKD chronic kidney disease; n number of cats; * ($p < 0,05$) control group versus IRIS I ($p = 0,027$), IRIS II ($p = 0,002$), IRIS III ($p = 0,000$), and IRIS IV ($p = 0,011$)

Pri mačkah smo z enkratnim odvzemom določili izbrane hematološke (krvna slika, diferencialna bela krvna slika in relativno ter absolutno število retikulocitov), biokemijske (sečnina, kreatinin, alkalna fosfataza, holesterol, trigliceridi, alanin-aminotransferaza, skupne beljakovine, albumini, kalcij, anorganski fosfat in elektroliti (natrij (Na^+), kalij (K^+), kloridi (Cl^-)) in urinske parametre (specifična gostota, kemijska analiza z reagenčnim trakom, UPC) ter parametre antioksidantnega statusa: celokupna antioksidantna kapaciteta (TAC), aktivnost eritrocitne superoksidne dismutaze (SOD), aktivnost plazemske in eritrocitne glutation peroksidaze (GPX) ter koncentracijo selen v serumu.

Na osnovi kliničnega pregleda, izbranih hematoloških, biokemijskih in urinskih preiskav ter hitrega testa za ugotavljanje okužbe z virusom mačje levkemije (angl. Feline Leukemia Virus, FeLV) ali z virusom mačje imunske pomanjkljivosti (angl. Feline Immunodeficiency Virus, FIV) smo iz preliminarne raziskave izključili vse mačke z akutno poškodbo ledvic, akutnim infekcijskim sindromom, prerenalno ali postrenalno azotemijo, nefropatijo iz toksičnih ali infekcijskih vzrokov, obstrukcijo sečil, jetrnimi boleznimi, srčnim popuščanjem, onkološke paciente in mačke s kliničnimi znaki FeLV ali FIV. Na ta način smo izključili vpliv prej naštetih patoloških stanj na oksidativni stres organizma.

3.2 KLINIČNA RAZISKAVA

Klinično raziskavo smo izvedli na Kliniki za kirurgijo in male živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani. Obravnavali smo 45 naključno izbranih zdravih mačk in pregledali 90 kartotečnih zapisov mačk s CKD, od katerih je 34 mačk s CKD ustrezalo vključitvenim kriterijem in so njihovi lastniki podpisali soglasje za sodelovanje v klinični raziskavi. Na podlagi istih izključitvenih kriterijev kot v preliminarni raziskavi smo iz skupine zdravih mačk izključili sedem živali. V klinično raziskavo smo vključili 38 zdravih mačk in 34 mačk s CKD. V skupini zdravih mačk je bilo 24 samcev, med njimi 21 kastriranih. Vključili smo 14 zdravih samic, med njimi 11 steriliziranih. V skupini mačk s CKD je bilo 17 samcev, 16 kastriranih, in 17 steriliziranih samic.

Starost in telesno maso mačk, vključenih v preliminarno raziskavo, prikazuje Tabela 2. Mačke v kontrolni skupini so bile značilno ($p < 0,05$) mlajše kot mačke s CKD (Slika 1).

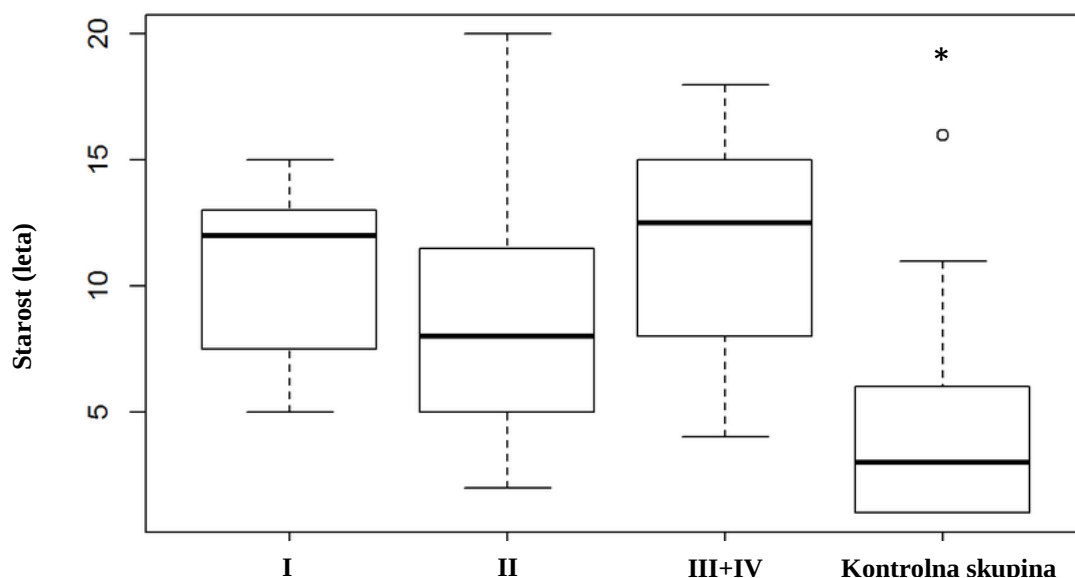
Tabela 2: Starost in telesna masa (povprečje $\pm$ SD) mačk, vključenih v klinično raziskavo

Table 2: Age nad body weight (mean $\pm$ SD) in cats included in the clinical study

Stopnja CKD	Starost (let)	Telesna masa (kg)
I (n = 7)	10,4 $\pm$ 3,7	5,2 $\pm$ 1,6
II (n = 15)	9,0 $\pm$ 5,6	4,7 $\pm$ 1,4
III in IV (n = 12)	11,7 $\pm$ 4,7	4,5 $\pm$ 1,7
Kontrolna skupina (n = 38)	4,3 $\pm$ 3,2	4,6 $\pm$ 0,9

Legenda: CKD kronična ledvična odpoved; n število mačk

Legend: CKD chronic kidney disease; n number of cats



Slika 1: Starost mačk, vključenih v raziskavo

Figure 1: Age of cats included in the study

Legenda: * značilna razlika ($p < 0,05$) v primerjavi z IRIS I ($p=0,005$), v primerjavi z IRIS II ($p=0,010$) in v primerjavi z IRIS III+IV ($p=0,000$);
 ○ osamelec
 Legend: * $p < 0,05$ (control group versus IRIS I, IRIS II, and IRIS III+IV); ○ outlier

Med raziskavo je ena mačka poginila zaradi pitoraksa, pri sedmih so se lastniki zaradi hudih kliničnih znakov uremije odločili za evtanazijo.

Mačke s CKD smo glede na smernice IRIS (IRIS, 2013a) uvrstili v skupine I–IV, jih zdravili v skladu s prej omenjenimi smernicami in jim dodajali placebo (mineralno olje) oziroma vitamin E v obliki d-alfa-tokoferil acetata (E-oil, Natural Wealth, Hrvaška) v dozi 100 internacionalnih enot (IE)/mačko/dan. Sedem mačk smo uvrstili v skupino IRIS I, 15 v IRIS II, pet v IRIS III in sedem v IRIS IV.

Pri mačkah s CKD smo vzeli podrobno anamnezo, opravili natančen klinični pregled in izmerili arterijski krvni tlak. Lastniki so izpolnili vprašalnik (poglavje 11.1 Vprašalnik). Stopnjo izraženosti kliničnih znakov smo ocenjevali glede na počutje živali, odstotek izgube telesne

mase, stopnjo dehidracije, prisotnost ulceracij v ustni votlini, pogostnost bruhanja in neješčnost (poglavje 11.2 Pripomoček za oceno izraženosti kliničnih znakov, Tabela 14). Glede na končni seštevek točk smo klinične znake opisali kot blage, zaznavne, hude in nesprejemljive.

Počutje živali je ocenil lastnik na podlagi njenega obnašanja: aktivnosti, negovanja, zanimanja za okolico in apetita. Počutje je lastnik opisal kot:

- zelo dobro: mačka je zelo igriva, zelo aktivna, se neguje, zanima za okolico, normalen apetit,
- dobro: mačka je igriva, aktivna, se neguje, zanima za okolico, normalen apetit,
- srednje: mačka je manj igriva, več spi, se manj neguje, zmanjšan apetit,
- slabo: mačka ni igriva, ni aktivna, pretežno spi ali leži, se ne neguje, zmanjšan apetit,
- zelo slabo: mačka ni igriva, pretežno spi ali leži, se ne neguje, se ne zanima za okolico, neješčnost.

Stopnjo dehidracije smo ocenili pri kliničnem pregledu (Frantar, 1997; DiBartola in Bateman, 2012):

- ≤ 5 %: ni kliničnih znakov,
- 5-10 %: srednja; zaznavno zmanjšan kožni turgor, podaljšan čas polnjenosti kapilar, rahlo vdrti očesni bulbusi, suhe sluznice,
- 10-12 %: zmerna; togost kože, podaljšan čas polnjenosti kapilar, vdrti očesni bulbusi, suhe sluznice,
- 12-15 %: znaki šoka, pogin.

Pri zdravljenju smo upoštevali naslednje smernice zdravljenja po IRIS (IRIS, 2013b):

I. stopnja: korekcija dehidracije z dajanjem podkožne ali intravenske infuzije (Hartmannova raztopina Braun, B. Braun, Nemčija), korekcija sistemske hipertenzije z dihidropiridinskim zaviralcem kalcijevih kanalčkov amlodipinom (0,625 mg/mačko na dan, Amlopin; Lek, Slovenija);

II. stopnja: zdravljenje kot v prvi stopnji, znižanje vnosa fosfatov z dietno prehrano, po potrebi dodajanje vezalcev fosfatov (kalcijev karbonat in hitozan, 1 g/mačko/12h p/o; Ipakitine; Vetoquinol, Francija);

III. stopnja: zdravljenje kot v drugi stopnji; preprečevanje bruhanja z dajanjem H_2 blokatorjev (ranitidin 3 mg/kg/12h p/o ali i/m; Ranital; Lek, Slovenija) in antiemetikov (maropitant 1 mg/kg/dan s/c ali 2 mg/kg/dan p/o; Cerenia; Zoetis, ZDA);

IV. stopnja: zdravljenje kot v tretji stopnji; skrbimo za zadosten vnos kalorij in beljakovin s prehrano ter za primerno hidracijo.

V času trajanja klinične raziskave so vse mačke prejemale komercialno dieto Royal Canin Renal (Royal canin, Francija). V primeru uporabe terapevtikov smo pri vseh živalih uporabili enake odmerke.

Pri zdravih mačkah smo na začetku raziskave kri odvzeli enkrat in določili izbrane hematološke (krvna slika, diferencialna bela krvna slika in relativno ter absolutno število retikulocitov), biokemijske (sečnina, kreatinin, alkalna fosfataza, holesterol, trigliceridi, alanin aminotransferaza, skupne beljakovine, albumini, kalcij, anorganski fosfat in elektroliti) in urinske parametre (specifična gostota, kemijska analiza z reagenčnim trakom, UPC) ter parametre oksidativnega stresa (koncentracija MDA in proteinskih karbonilov v plazmi, poškodba jedrne DNA limfocitov, izražena kot odstotek DNA v repu kometov) in antioksidantni status (aktivnost plazemske GPX in koncentracija vitamina E v plazmi). Koncentracijo MDA in proteinskih karbonilov smo določili pri devetih živalih.

Pri mačkah s CKD smo našteje parametre določili pred začetkom zdravljenja in 4, 8, 16 in 24 tednov po začetku zdravljenja.

V Tabeli 3 je prikazano število mačk s CKD po posameznih stopnjah bolezni, ki so prejemale vitamin E oziroma placebo. Tabeli 4 in 5 prikazujeta število mačk s CKD pri posameznem zaporednem odvzemu vzorcev.

M. Krofič Žel: Vpliv vitamina E na oksidativni stres in potek kronične ledvične odpovedi pri mačkah.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2015. Doktorska disertacija

Tabela 3: Število mačk s CKD glede na stopnjo po IRIS (IRIS, 2013a) , ki so prejemale vitamin E oz. placebo

Table 3: Number of cats with CKD according to the stage of the disease in vitamin E and placebo group

Stopnja CKD	Placebo	Vitamin E
I	4	3
II	8	7
III in IV	4	8

Legenda: CKD kronična ledvična odpoved

Legend: CKD Chronic Kidney Disease

Tabela 4: Število mačk s CKD pri posameznem odvzemu vzorcev

Table 4: Number of cats with CKD at different sampling times

Stopnja CKD	Zaporedni odvzem vzorcev				
	1	2	3	4	5
I	7	6	6	6	6
II	15	13	10	10	10
III in IV	12	6	4	4	2

Legenda: CKD kronična ledvična odpoved

Legend: Chronic Kidney Disease

Tabela 5: Število mačk s CKD, ki so prejemale vitamin E oziroma placebo pri posameznem odvzemu vzorcev

Table 5: Number of cats with CKD in vitamin E and placebo group at different sampling times

Zaporedni odvzem vzorcev		Stopnja CKD		
		I	II	III in IV
1	Vitamin E	3	7	8
	Placebo	4	8	4
2	Vitamin E	2	6	4
	Placebo	4	7	2
3	Vitamin E	3	4	3
	Placebo	3	6	1
4	Vitamin E	3	6	2
	Placebo	3	4	2
5	Vitamin E	3	5	1
	Placebo	3	5	1

Legenda: CKD kronična ledvična odpoved

Legend: Chronic Kidney Disease

3.2.1 Merjenje arterijskega tlaka

Arterijski tlak smo merili na prednji desni nogi na sredini podlahti z visoko natančno oscilometrično napravo (angl. High Definition Oscillometry, HDO; S+B MedVet GmbH, Nemčija). Uporabili smo manšeto z oznako c1. Med meritvijo so mačke ležale v stranski legi, manšeta se je nahajala v višini desnega atrija. Pri vsakem pregledu smo izvedli pet zaporednih meritev in iz dobljenih rezultatov izračunali povprečje.

3.3 ODVZEM IN PRIPRAVA VZORCEV KRVİ

Kri za določanje hematoloških in biokemijskih parametrov ter parametrov oksidativnega stresa in antioksidantnega statusa smo odvzeli iz desne jugularne vene.

Za hematološke preiskave in alkalni kometni test smo odvzeli 0,5 mL krvi v 0,5 mL epruvete z antikoagulantom EDTA (BD Microtainer Tubes; Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, ZDA). Po opravljeni hematološki analizi smo vzorec polne krvi do priprave preparatov hranili na temperaturi 4 °C. Preparate smo pripravili v času treh ur po odvzemu vzorca. Alkalni kometni test smo izvajali na Nacionalnem inštitutu za biologijo na Oddelku za genetsko toksikologijo in biologijo raka.

Kri za biokemijske preiskave in določitev okužbe z virusoma FeLV in FIV smo istočasno odvzeli 2 mL krvi v 4 mL epruvete z aktivatorjem koagulacije in separacijskim gelom (Vacurette; Greiner Bio-One, Kremsmünster, Avstrija). Kri smo centrifugirali v roku 1 ure po odvzemu 10 minut pri $1300 \times g$ na sobni temperaturi (22 – 24 °C) ter odločili serum.

Hematološke in biokemijske preiskave ter določitev okužbe z virusoma FeLV in FIV smo izvajali v Diagnostičnem laboratoriju Klinike za kirurgijo in male živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani na dan odvzema.

Za določitev koncentracije selen v serumu smo 1 mL krvi odvzeli v 1,5 mL plastično epruvetko (Eppendorf Brand, Wertheim, Nemčija). Po odvzemu smo vzorce krvi za 30 min pustili na 4 °C, da je kri koagulirala. Vzorce smo nato centrifugirali pri $1300 \times g$ 10 min pri 4 °C. Tako pridobljen serum smo do analize hranili na –80 °C. Analizo smo opravili na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo na Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani v seriji po zaključku raziskave. Analizo smo opravili največ dve leti po začetku raziskave.

Za določanje aktivnosti plazemske in eritrocitne GPX, SOD, TAC in koncentracije vitamina E smo odvzeli 4 mL krvi v dve 2 mL epruveti z antikoagulantom litijevim heparinom (Vacuette; Greiner Bio-One, Kremsmünster, Avstrija). Za določanje plazemskega nivoja TAC, aktivnosti plazemske GPX in koncentracije vitamina E smo kri centrifugirali 15 min pri $1500 \times g$ na 4 °C in plazmo takoj po centrifugiranju odpipetirali ter jo do analize shranili na –80 °C. Za določitev eritrocitne GPX in SOD smo po navodilih proizvajalca (Ransod kit; Randox, Crumlin, Velika Britanija) pripravili hemolizate eritrocitov in jih do analize shranili na –80 °C. Vse vzorce smo analizirali v seriji po zaključku raziskave. Analizo plazemske in eritrocitne GPX, SOD in TAC v preliminarni raziskavi smo opravili največ dve leti po začetku raziskave, medtem ko smo analizo plazemske GPX in koncentracijo vitamina E v klinični raziskavi opravili največ tri leta in šest mesecev po začetku raziskave.

Koncentracijo vitamina E v plazmi smo določali v Laboratoriju za kemijske analize krme na Inštitutu za higieno in patologijo prehrane živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani. Aktivnost plazemske in eritrocitne GPX, SOD in TAC smo določali v Diagnostičnem laboratoriju Klinike za kirurgijo in male živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani.

Za določitev koncentracije MDA in proteinskih karbonilov v plazmi smo odvzeli 2 mL krvi v 2 mL epruveto z antikoagulantom EDTA (Vacuette; Greiner Bio-One, Kremsmünster, Avstrija). Vzorec smo takoj po odvzemu centrifugirali 15 min pri $1500 \times g$ na 4 °C, plazmo razdelili na dva dela in jo do analize hranili pri –80 °C. Vzorce smo analizirali v laboratoriju na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani v seriji po zaključku raziskave. Analizo smo opravili največ tri leta in osem mesecev po začetku raziskave.

3.4 ANALIZNE METODE

Vse serumske in plazemske vzorce ter vzorce polne krvi, kismo jih hranili na -80°C , smo pred izvajanjem analiznih postopkov počasi odmrznili pri sobni temperaturi in jih dobro premešali na vibracijskem mešalniku.

3.4.1 Hematološke in biokemijske preiskave

Hematološke parametre smo določali z avtomatskim hematološkim analizatorjem ADVIA 120 (Siemens, München, Nemčija).

Biokemijske parametre seruma smo, z izjemo elektrolitov, določali na biokemijskem analizatorju RX Daytona (Randox, Crumlin, Velika Britanija). Elektrolite smo določali z analizatorjem ILYte (Instrumentation Laboratory, Lexington, ZDA).

3.4.2 Encimsko imunske preiskave

Okužbo z virusoma FIV in FeLV smo določali iz seruma s hitrim encimskoimunskim testom (SNAP feline triple; IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, ZDA).

3.4.3 Antioksidantni parametri

Aktivnost plazemske in eritrocitne GPX, eritrocitne SOD in nivo plazemske TAC smo določali spektrofotometrično na biokemijskem analizatorju RX Daytona (Randox, Crumlin, Velika Britanija).

Koncentracijo hemoglobina v hemolizatu eritrocitov smo določili na biokemijskem analizatorju RX Daytona (Randox, Crumlin, Velika Britanija) spektrofotometrično s hemoglobincianidno metodo (Randox, Crumlin, Velika Britanija).

3.4.3.1 Superoksidna dismutaza

Aktivnost SOD smo določali v hemolizatu eritrocitov s pomočjo reagenčnega kompleta Ransod (Ransod kit; Randox, Crumlin, Velika Britanija). Postopek temelji na metodi McCorda in Fridovicha (1967). V reagenčnem kompletu je sistem za proizvodnjo superoksidnih radikalov pripravljen iz ksantina in ksantin oksidaze. Nastali superoksidni radikali reagirajo z indikatorsko spojino 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolijevim kloridom (I.N.T), da nastane barvilo formazan. Aktivnost SOD v vzorcih smo merili s stopnjo inhibicije prej omenjene reakcije. Aktivnost SOD smo preračunali na koncentracijo hemoglobina v vzorcu in jo izrazili v enotah na gram hemoglobina (U/g Hgb; U – enote, angl. Units).

3.4.3.2 Plazemska in eritrocitna glutathion peroksidaza

Aktivnost plazemske in eritrocitne GPX smo določali s pomočjo reagenčnega kompleta Ransel (Ransel kit, Randox, Crumlin, Velika Britanija), ki temelji na metodi Paglie in Valentina (1967). Osnova metode je reakcija, kjer GPX katalizira oksidacijo glutathiona s kumen hidroperoksidom. V prisotnosti glutathion reduktaze in NADPH se oksidirani glutathion pretvori v reducirano obliko, pri čemer se NADPH oksidira v NADP^+ . Hitrost oksidacije NADPH je proporcionalna aktivnosti GPX in jo izmerimo kot padec absorbance pri valovni dolžini 340 nm. Aktivnost plazemske GPX smo izrazili v U/mL, aktivnost eritrocitne GPX pa smo preračunali na koncentracijo hemoglobina v vzorcu in jo izrazili v U/g Hgb.

3.4.3.3 Celokupna antioksidantna kapaciteta

Plazemsko TAC smo določali z reagenčnim kompletom TAS (TAS kit, Randox, Crumlin, Velika Britanija), ki temelji na metodi Millerja in sodelavcev (1993). Gre za metodo posrednega določanja, pri kateri antioksidanti v vzorcu reducirajo v reakciji nastale proste radikale (ABTS^{*+}-2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)), kar izmerimo kot zmanjšanje absorbance pri valovni dolžini 600 nm po 3 min. Rezultate smo izrazili kot mmol/L Trolox ekvivalenta.

3.4.4 Vitamin E

Pred meritvijo smo vzorce plazme obdelali po postopku, povzetem po literaturi (Zhao in sod. 2004, Sivertsen in sod. 2005). Vzorcem smo dodali etanol, ki je povzročil precipitacijo beljakovin. Tokoferole smo nato ekstrahirali z dodatkom heksana, centrifugirali in odstranili supernatant, ki smo ga posušili. Suhi preostanek smo raztopili v metanolu in koncentracijo vitamina E določili z metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (angl. High Performance Liquid Chromatography, HPLC) in s fluorescenčnim detektorjem. Meritve smo izvedli z analizatorjem Alliance HPLC System 2695 (Waters, Milford, Massachusetts, ZDA). Izmerjeno koncentracijo vitamina E smo standardizirali na vsoto koncentracij holesterola in trigliceridov (Vit.E(LS) – lipidno standardizirana koncentracija vitamina E) v serumu (Thurnham in sod., 1986; Winbauer in sod., 1999).

3.4.5 Koncentracija selen v serumu

Koncentracijo selen v serumu smo merili z elektrotermalno atomsko absorpcijsko spektrometrijo (angl. Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry, ETAAS) z elektrotermalnim atomskim absorpcijskim spektrometrom Varian Spektr AA-800 (Varian

Australia Pty Ltd., Mulgrave, Victoria, Avstralija).

3.4.6 Pokazatelji oksidativnega stresa

3.4.6.1 Malondialdehid

Vzorci plazme za določanje celokupnega MDA smo pred meritvijo derivatizirali z 2,4-dinitrofenilhidrazinom (2,4-DNPH), povzeto po literaturi (Pilz in sod., 2000). MDA in 2,4-DNPH reagirata, pri čemer nastane pirazolski derivat. Produkt smo določali z metodo HPLC in metodo ionizacije z razprševanjem raztopin v električnem polju oz. elektrorazprševalno ionizacijo (angl. electrospray ionization, ESI). Meritve smo izvedli z analizatorjem Agilent 6460 (Agilent Technologies, Santa Clara, ZDA) s trojnim kvadrupolnim MS/MS detektorjem.

3.4.6.2 Proteinski karbonili

Oksidativne poškodbe proteinov smo določali spektrofotometrično s komercialno dostopnim reagenčnim kompletom za določanje koncentracije proteinskih karbonilnih skupin (Protein carbonyl assay kit, Cayman Chemical, ZDA), ki temelji na metodi Levina in sodelavcev (1994). Proteinski karbonili reagirajo z 2,4-DNPH. Nastane spojina hidrazonski derivat, katerega koncentracijo smo določili spektrofotometrično z mikrotiterskim čitalcem Safire2™ Genios, (Tecan, Genios, Zürich, Švica) pri valovni dolžini 380 nm.

3.4.6.3 Alkalni kometni test

Stopnjo poškodb DNA v limfocitih smo določali z alkalno različico testa komet (Östling in Johanson 1984, Singh in sod., 1988). V postopku priprave celic membrane in vsebino razgradimo pri visokem pH (10) v prisotnosti detergentov ter na ta način izoliramo DNA iz jeder limfocitov.

DNA, ki je negativno nabita v električnem polju, v alkalnem mediju potuje proti pozitivnemu polu. Bolj je DNA poškodovana, več je prepotuje v tako imenovan rep kometa. S pomočjo fluorescenčnega mikroskopa in z računalniškim programom za analizo slike ovrednotimo poškodbe DNA glede na jakost fluorescence v repu. Bolj je DNA poškodovana, več DNA je v repu kometa.

3.4.6.3.1 Priprava pufrov

Raztopina za liziranje celic: za 100 mL raztopine za liziranje smo odtehtali 14,6 g NaCl, 3,72 g EDTA, 0,12 g Tris-HCl. pH smo uravnali na 10 z 10 M NaOH. Tik pred uporabo smo dodali 1 % Triton X 100. Raztopino smo pred uporabo ohladili na 4 °C.

Elektroforetski pufer: 1 L elektroforetskega pufra smo pripravili tako, da smo zmešali 5 mL 0.2 M EDTA, 30 mL 10 M NaOH in do 1 L dolili destilirano vodo, ohlajeno na 4 °C.

Nevtralizacijski pufer: za 200 mL nevtralizacijskega pufra smo zatehtali 9,67 g Tris-HCl ter s pomočjo HCl uravnali pH na 7,5. Pred uporabo smo nevtralizacijski pufer ohladili na 4 °C.

3.4.6.3.2 Priprava preparatov

Peskana objektna stekelca smo razmastili tako, da smo jih vsaj za 3 ure namočili v metanol. Nato smo jih z ožiganjem posušili. Nanje smo nanесли plast 1% NMP agaroze (80 µL; Ultrapure Agarose Invitrogen; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, ZDA) ter jo pokrili s krovnim stekelcem. Stekelca smo položili v hladilnik, da se je agaroz strdila, nato smo krovna stekelca previdno odstranili. Nato smo zmešali 10 µL EDTA krvi in 1% LMP agarozo (70 µL; Ultrapure LMP Agarose Invitrogen; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, ZDA) ter suspenzijo 70 µL nanесли na prvo plast agaroze ter jo pokrili s krovnim stekelcem. Preparate smo ponovno dali v hladilnik in krovna stekelca odstranili, ko se je druga plast agaroze strdila. Tako pripravljene preparate smo zaščitili pred svetlobo in jih na temperaturi 4 °C čez noč inkubirali v raztopini za liziranje celic.

3.4.6.3.3 Odvijanje DNA in elektroforeza

Stekelca smo naložili v kadičko za elektroforezo in dolili sveže pripravljen, na 4 °C ohlajen elektroforetski pufer (1,25 L). Nato smo 20 min počakali, da poteče alkalna denaturacija DNA. Elektroforeza je potekala 20 min pri napetosti 0,5–1 V/cm pri temperaturi 4 °C.

3.4.6.3.4 Nevtralizacija preparatov

Preparate smo nato nevtralizirali s 15-minutno inkubacijo v hladnem nevtralizacijskem pufru. Preparate smo do računalniške obdelave shranili pri 4 °C in vlažni atmosferi.

3.4.6.3.5 Ovrednotenje poškodb DNA

Naslednji dan smo DNA pobarvali tako, da smo na vsak gel nanесли 20 µL etidijevega bromida (5 µg/mL d.H₂O). Etidijev bromid je agens, ki se vrine med DNA bazne pare in na ta način omogoča vizualizacijo DNA s pomočjo fluorescenčnega mikroskopa.

Preparate smo nato pri 400 x povečavi pregledali s fluorescenčnim mikroskopom (Nikon Eclipse E 800 in Nikon Intensilight C-HGFI; oboje Nikon, Tokio, Japonska) in s pomočjo računalniškega programa za analizo slike Comet Assay IV (Perceptive instruments Ltd., Bury St Edmunds Velika Britanija) ovrednotili poškodbe DNA, tako da smo izmerili odstotek jedrne DNA, ki se je nahajala v repu kometov. Pri vsakem vzorcu smo ovrednotili 150 celičnih jeder.

3.4.7 Preiskave urina

V sterilno odvzetih urinskih vzorcih smo določili specifično gostoto z refraktometrom, opravili kemijsko analizo urina z reagenčnim trakom z urinskim analizatorjem Clinitek status Plus (Siemens, München, Nemčija) ter urin centrifugirali pri 800 × g 10 min na sobni temperaturi.

Nato smo mikroskopsko pregledali urinski sediment in kvantitativno določili koncentracijo beljakovin in kreatinina v supernatantu urina z biokemijskem analizatorjem RX Daytona (Randox, Crumlin, Velika Britanija) ter izračunali razmerje med beljakovinami in kreatininom (UPC).

3.5 STATISTIČNA ANALIZA

V okviru preliminarne raziskave, je statistična analiza vključevala obdelavo podatkov kontrolne skupine mačk in posameznih skupin mačk s CKD (skupine IRIS I do IRIS IV). Rezultate smo analizirali s pomočjo računalniškega programa SPSS (SPSS 17.0 for Windows, IBM, Chicago, Illinois, ZDA). Normalnost porazdelitve podatkov smo ugotavljali s Shapiro Wilkovim testom. Rezultate smo podali kot povprečje $\pm$ standardni odklon (SD, angl. Standard Deviation). Koncentracijo selen v serumu, aktivnost SOD, plazemske in eritrocitne GPX in plazemski nivo TAC smo primerjali med kontrolno skupino in posameznimi skupinami CKD. Pri tem smo uporabili enosmerno analizo variance za neodvisne vzorce (one-way ANOVA) in Tukeyjev HSD post-hoc test. Kot statistično značilne smo opredelili rezultate pri $p < 0,05$.

V okviru klinične raziskave je statistična analiza vključevala primerjavo rezultatov pri vseh mačkah s CKD z rezultati pri kontrolni skupini na začetku raziskave in primerjavo rezultatov pri skupini, ki je prejemale vitamin E s skupino, ki je prejemale placebo. Nadalje smo primerjali rezultate med posameznimi stopnjami CKD na začetku raziskave. Zaradi majhnega števila živali smo paciente v IRIS III in IV obravnavali skupaj. V primeru testa komet smo zaradi majhnega števila živali paciente v IRIS I in II ter paciente v IRIS III in IV obravnavali skupaj. Za dodatno vrednotenje razlik v koncentraciji MDA, smo, na začetku raziskave, paciente v IRIS I in II ter paciente v IRIS III in IV obravnavali skupaj.

Pri rezultatih testa komet smo primerjali IRIS I in II z IRIS III in IV ter s kontrolno skupino.

Seštevek kliničnih znakov (Tabela 14) in koncentracijo vitamina E smo primerjali med posameznimi stopnjami CKD glede na zaporedni odvzem vzorcev in glede na to, ali so mačke prejemale vitamin E ali placebo.

Za vse skupine smo za hematološke in biokemijske parametre, sistolični krvni tlak, specifično gostoto urina, UPC ter za parametre antioksidantnega statusa ter oksidativnega stresa izračunali tudi povprečno vrednost in standardno deviacijo, pri analizi rezultatov testa komet smo uporabili mediano vrednost.

Za analizo podatkov klinične raziskave ter izračun vpliva vitamina E na verjetnost preživetja smo uporabili računalniški program R (R Core Team, 2015).

Del rezultatov klinične raziskave smo analizirali s pomočjo računalniškega programa SPSS (SPSS 22.0 for Windows, IBM, Chicago, Illinois, ZDA). V primeru primerjave parametrov med dvema neodvisnima skupinama (placebo in vitamin E) smo pri vseh skupinah mačk s CKD (IRIS I, II in III+IV) pri posameznih odvzemih uporabili Mann-Whitneyjev test. V primeru primerjave merjenih parametrov med tremi in več skupinami (kontrolna skupina, IRIS I, II in III+IV) smo izvedli Kruskal-Wallisov H test in post-hoc analizo parnih primerjav ter pri tem upoštevali popravljene p vrednosti.

Primerjavo parametrov med začetkom in koncem dajanja placeba oziroma vitamina E (prvi in zadnji odzem vzorcev) smo v posamezni skupini (placebo oziroma vitamin E) pri vseh stopnjah bolezni (IRIS I, IRIS II in IRIS III+IV) vrednotili z Wilcoxonovim testom vsote rangov. Pri tem smo uporabili računalniški program SPSS (SPSS 22.0 for Windows, IBM, Chicago, Illinois, ZDA).

Kot statistično značilne smo opredelili rezultate pri $p \leq 0,05$. Rezultate smo grafično prikazali z okvirji z ročaji, ki zajemajo območje vrednosti med 5 in 95 percentilom, ki je razdeljeno na:

- okvir, ki vključuje vrednosti znotraj 2. in 3. kvartila
- odebeljeno vodoravno črto v sivem okvirju, ki je mediana vrednost in
- ročaje, ki predstavljajo spodnjih in zgornjih 25 % vrednosti.

Točke so vrednosti, ki so izven območja 5 – 95 percentila. Osamelci so prikazani s krožcem oziroma piko (○ ali •).

4 REZULTATI

4.1 PRELIMINARNA RAZISKAVA

Rezultati preliminarne raziskave, z izjemo rezultatov aktivnosti SOD, so objavljeni v članku Krofič Žel in sod. (2014).

Rezultate preliminarne raziskave prikazuje Tabela 6.

Koncentracija selena v serumu, aktivnost eritrocitne GPX in SOD ter nivo plazemske TAC se pri mačkah s CKD pri primerjavi s kontrolno skupino niso značilno razlikovale. Tudi pri primerjavi omenjenih parametrov med posameznimi stopnjami CKD ni bilo značilnih razlik.

Mačke v IRIS IV so imele značilno večjo ($p = 0,025$) aktivnost plazemske GPX kot mačke v kontrolni skupini. Pri primerjavi aktivnosti plazemske GPX med kontrolno skupino in stopnjami CKD I-III ter med posameznimi stopnjami CKD ni bilo značilnih razlik.

Tabela 6: Koncentracija selena v serumu, aktivnost plazemske in eritrocitne GPX ter eritrocitne SOD in plazemska TAC pri mačkah s CKD in kontrolni skupini v preliminarni raziskavi

Table 6: Serum selenium concentration, plasma and erythrocyte GPX activity, plasma TAC, and erythrocyte SOD activity in cats with CKD and in the control group in the preliminary study

	Selen (mg/L)	Plazemska GPX (U/mL)	Eritrocitna GPX (U/gHgb)	TAC (mmol/L)	SOD (U/g Hgb)
IRIS I (n=5)	0,465 ± 0,053	21,86 ± 2,04	591,18 ± 56,74	1,47 ± 0,18	3540,10 ± 302,21
p vrednost (primerjava s kontrolno skupino)	0,807	0,534	1,000	0,990	0,434
p vrednost (primerjava z IRIS II)	0,934	0,913	0,998	1,000	0,982
p vrednost (primerjava z IRIS III)	0,904	1,000	1,000	0,581	0,581
p vrednost (primerjava z IRIS IV)	0,833	0,719	0,960	0,954	0,556
IRIS II (n=9)	0,426 ± 0,042	18,67 ± 1,66	582,51 ± 80,79	1,46 ± 0,16	3364,95 ± 137,09
p vrednost (primerjava s kontrolno skupino)	0,999	0,940	1,000	0,964	0,505
p vrednost (primerjava z IRIS I)	0,934	0,912	0,998	1,000	0,982
p vrednost (primerjava z IRIS III)	1,000	0,912	0,992	0,482	0,734
p vrednost (primerjava z IRIS IV)	0,994	0,175	0,818	0,916	0,705
IRIS III (n=7)	0,419 ± 0,173	20,87 ± 2,56	603,92 ± 64,42	1,30 ± 0,13	2995,84 ± 214,74
p vrednost (primerjava s kontrolno skupino)	1,000	0,464	0,998	0,134	1,000
p vrednost (primerjava z IRIS I)	0,904	1,000	1,000	0,581	0,581
p vrednost (primerjava z IRIS II)	1,000	0,912	0,992	0,482	0,734
p vrednost (primerjava z IRIS IV)	0,991	0,612	0,967	0,232	1,000
IRIS IV (n=5)	0,404 ± 0,077	23,44 ± 6,28	639,81 ± 27,78	1,68 ± 0,40	3002,73 ± 176,98
p vrednost (primerjava s kontrolno skupino)	0,999	0,025*	0,840	0,992	1,000
p vrednost (primerjava z IRIS I)	0,833	0,719	0,960	0,954	0,556
p vrednost (primerjava z IRIS II)	0,994	0,175	0,818	0,916	0,705
p vrednost (primerjava z IRIS III)	0,999	0,612	0,967	0,232	1,000
Kontrolna skupina (n=19)	0,415 ± 0,091	17,51 ± 3,75	591,0 ± 111,21	1,51 ± 0,17	3021,88 ± 143,63

Legenda: * p < 0,05; CKD kronična ledvična odpoved; GPX glutation peroksidaza; SOD superoksidna dismutaza; TAC celokupna antioksidantna kapaciteta; n število mačk

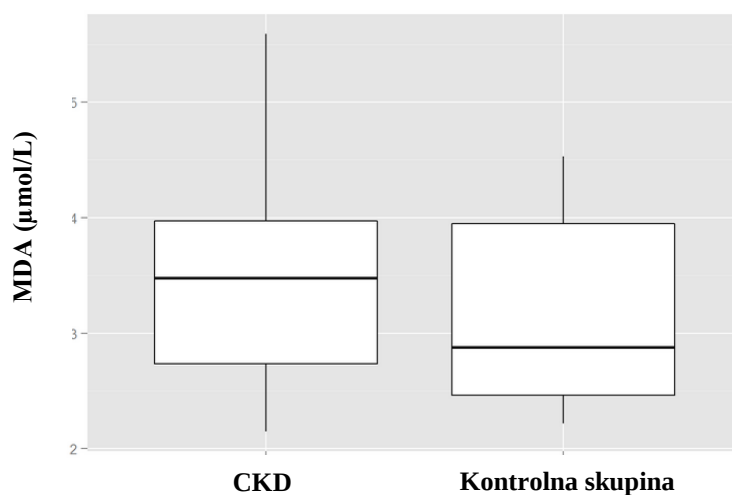
Legend: *p < 0,05; CKD chronic kidney disease; GPX glutathione peroxidase; SOD superoxide dismutase; TAC total antioxidant capacity; n number of cats

4.2 KLINIČNA RAZISKAVA

4.2.1 Parametri oksidativnega stresa in antioksidantnega statusa

4.2.1.1 Malondialdehid

Koncentracija MDA se med mačkami s CKD in kontrolno skupino na začetku raziskave ni značilno razlikovala (Slika 2).



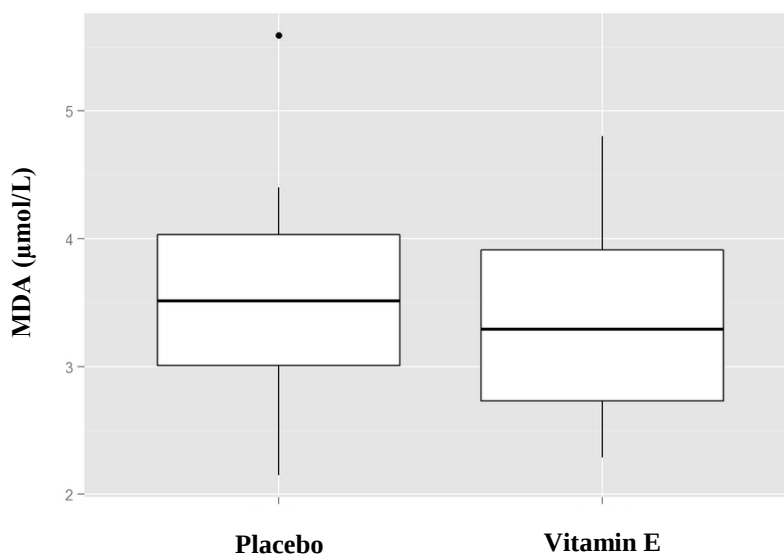
Slika 2: Koncentracija MDA ($\mu\text{mol/L}$) pri mačkah s CKD in kontrolni skupini na začetku raziskave

Figure 2: MDA ($\mu\text{mol/L}$) concentration in cats with CKD and in the control group at the beginning of the study

Legenda: CKD kronična ledvična odpoved, MDA malondialdehid

Legend: CKD Chronic Kidney Disease, MDA Malondialdehyde

Prav tako se koncentracija MDA na začetku raziskave ni značilno razlikovala med mačkami, ki so prejemale vitamin E oziroma placebo (Slika 3).



Slika 3: Koncentracija MDA ($\mu\text{mol/L}$) pri mačkah, ki so prejemale vitamin E oziroma placebo na začetku raziskave
 Figure 3: MDA concentration ($\mu\text{mol/L}$) in the vitamin E and placebo group at the beginning of the study

Legenda: MDA malondialdehid; • osamelec
 Legend: MDA Malondialdehyde; • outlier

Mačke v IRIS III in IV so imele na začetku raziskave nižjo koncentracijo MDA kot tiste v IRIS I in II, vendar razlika ni bila značilna (Slika 4). Razlika je bila značilna ($p = 0,037$), če smo mačke v IRIS I in II ($n = 16$) obravnavali skupaj (Slika 5) pri primerjavi s skupino IRIS III+IV ($n = 9$).

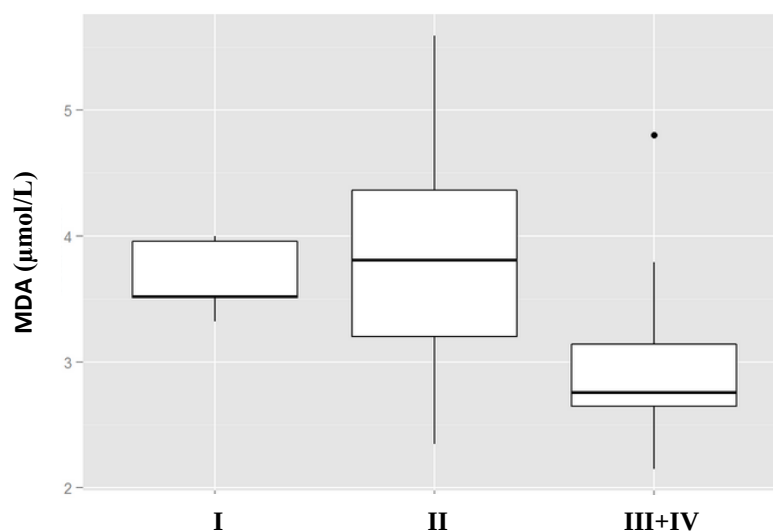
Slika 4: Koncentracija MDA ($\mu\text{mol/L}$) pri mačkah s CKD glede na stopnjo bolezni na začetku raziskave

Figure 4: MDA ($\mu\text{mol/L}$) concentration in cats with CKD according to the stage of the disease at the beginning of the study

Legenda: MDA malondialdehid; • osamelec

Legend: MDA Malondialdehyde; • outlier

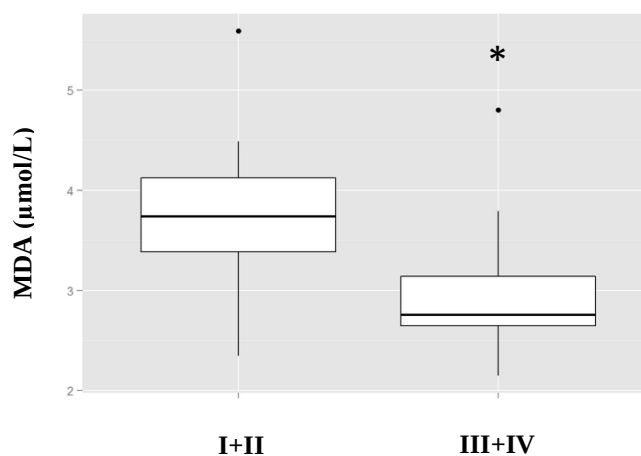
Slika 5: Koncentracija MDA ($\mu\text{mol/L}$) pri mačkah s CKD glede na stopnjo bolezni na začetku raziskave (združeni IRIS I in II v primerjavi z III in IV skupino)

Figure 5: MDA ($\mu\text{mol/L}$) concentration in cats with CKD according to the stage of the disease at the beginning of the study (IRIS I and II together in comparison to III and IV)

Legenda: * $p < 0,05$; MDA malondialdehid; • osamelec

Legend: * $p < 0,05$; MDA Malondialdehyde; • outlier

Pri mačkah s CKD IRIS I, II, III in IV se je v skupini, ki je dobivala placebo, koncentracija MDA v primerjavi med prvim in zadnjim odvzemom vzorcev povečala, in sicer najbolj v skupini IRIS III in IV (na 165 % začetne vrednosti). Razlika ni bila značilna.

Pri mačkah, ki so dobivale vitamin E, se je v I. skupini po IRIS koncentracija MDA zmanjšala za 12 % prvotne vrednosti, pri mačkah v II. skupini po IRIS je ostala nespremenjena, medtem ko se je pri mačkah v III. in IV. skupini po 16 tednih dajanja vitamina E povečala na 118 % začetne vrednosti. Razlike niso bile značilne.

Tudi pri primerjavi vrednosti na koncu raziskave (oziroma po 16 tednih pri skupini IRIS III+IV) med skupinama placebo in vitamin E razlika pri nobeni skupini (IRIS I, II in III+IV) ni bila značilna. Rezultate prikazujejo Tabele 7, 8 in 9.

Tabela 7: Parametri oksidativnega stresa in antioksidantnega statusa (povprečje $\pm$ SD) pri mačkah s CKD IRIS I

Table 7: Parameters of oxidative stress and antioxidant status (mean $\pm$ SD) in cats with CKD IRIS I

Odvzem		plazemska GPX (U/mL)	MDA (μ M)	Proteinski karbonili (nmol/mL)
1	Vitamin E in placebo n=7	21,06 $\pm$ 1,50	3,66 $\pm$ 0,30	33,30 $\pm$ 12,30
2	Vitamin E n=2	20,40 $\pm$ 1,30	4,03 $\pm$ 1,25	33,00 $\pm$ 6,30
	Placebo n=4	20,87 $\pm$ 1,86	2,90 $\pm$ 0,85	24,20 $\pm$ 1,62
3	Vitamin E n=3	21,04 $\pm$ 2,25	4,79 $\pm$ 1,42	26,10 $\pm$ 6,90
	Placebo n=3	21,40 $\pm$ 1,94	3,79 $\pm$ 0,07	28,80 $\pm$ 5,33
4	Vitamin E n=3	20,77 $\pm$ 3,46	3,95 $\pm$ 1,25	37,50 $\pm$ 13,10
	Placebo n=3	20,11 $\pm$ 2,39	2,89 $\pm$ 0,67	43,52 $\pm$ 10,40
5	Vitamin E n=3	21,29 $\pm$ 2,47	3,24 $\pm$ 1,23	30,40 $\pm$ 10,9
	Placebo n=3	21,08 $\pm$ 0,28	3,96 $\pm$ 1,01	26,72 $\pm$ 12,62

Legenda: SD standardna deviacija; GPX glutation peroksidaza; MDA malondialdehid; n število mačk

Legend: SD Standard Deviation; GPX Glutathione Peroxidase; MDA Malondialdehyd; n number of cats

M. Krofič Žel: Vpliv vitamina E na oksidativni stres in potek kronične ledvične odpovedi pri mačkah.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2015. Doktorska disertacija

Tabela 8: Parametri oksidativnega stresa in antioksidantnega statusa (povprečje $\pm$ SD) pri mačkah s CKD IRIS II

Table 8: Parameters of oxidative stress and antioxidant status (mean $\pm$ SD) in cats with CKD IRIS II

Odvzem		plazemska GPX (U/mL)	MDA (μ M)	Proteinski karbonili (nmol/mL)
1	Vitamin E in placebo n=15	19,90 $\pm$ 2,79	3,86 $\pm$ 1,12	35,20 $\pm$ 9,82
2	Vitamin E n=6	22,20 $\pm$ 3,27	3,90 $\pm$ 0,59	35,0 $\pm$ 12,40
	Placebo n=7	19,99 $\pm$ 4,49	3,66 $\pm$ 0,72	34,94 $\pm$ 10,68
3	Vitamin E n=4	21,36 $\pm$ 4,12	3,15 $\pm$ 0,82	33,47 $\pm$ 4,02
	Placebo n=6	20,87 $\pm$ 4,31	4,22 $\pm$ 0,66	32,19 $\pm$ 9,81
4	Vitamin E n=6	21,59 $\pm$ 3,13	3,59 $\pm$ 0,84	31,40 $\pm$ 9,35
	Placebo n=4	17,67 $\pm$ 2,31	3,56 $\pm$ 0,70	40,16 $\pm$ 12,25
5	Vitamin E n=5	22,78 $\pm$ 1,61	3,85 $\pm$ 0,73	30,59 $\pm$ 7,57
	Placebo n=5	22,46 $\pm$ 3,62	4,06 $\pm$ 1,56	44,15 $\pm$ 14,04

Legenda: SD standardna deviacija; GPX glutation peroksidaza; MDA malondialdehid; n število mačk

Legend: SD Standard Deviation; GPX Glutathione Peroxidase; MDA Malondialdehyde; n number of cats

Tabela 9: Parametri oksidativnega stresa in antioksidantnega statusa (povprečje $\pm$ SD; vrednost pri n = 1) pri mačkah s CKD IRIS III in IVTable 9: Parameters of oxidative stress and antioxidant status (mean $\pm$ SD; value if n = 1) in cats with CKD IRIS III and IV

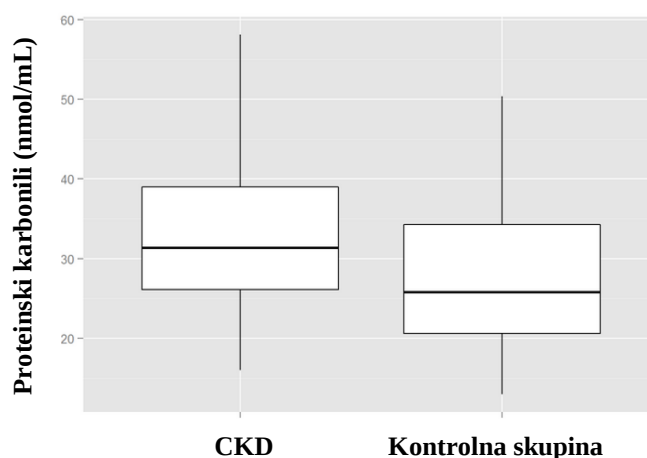
Odvzem		plazemska GPX (U/mL)	MDA (μ M)	Proteinski karbonili (nmol/mL)
1	Vitamin E in placebo n=12	22,76 $\pm$ 7,92	2,76 $\pm$ 0,4	29,11 $\pm$ 8,69
2	Vitamin E n=4	19,61 $\pm$ 0,27	2,82 $\pm$ 0,29	38,52 $\pm$ 9,32
	Placebo n=2	16,24 $\pm$ 2,5	6,12 $\pm$ 3,92	24,11 $\pm$ 8,58
3	Vitamin E n=3	17,5 $\pm$ 3,98	5,0 $\pm$ 0,57	27,9 $\pm$ 11,49
	Placebo n=1	22,9	3,41	39,4
4	Vitamin E n=2	24,52 $\pm$ 3,08	3,25 $\pm$ 0,3	44,86 $\pm$ 12,76
	Placebo n=2	21,21 $\pm$ 0,1	3,98 $\pm$ 0,36	47,85 $\pm$ 21,94
5	Vitamin E n=1	20,52	3,48	58,7
	Placebo n=1	23,73	4,56	37,8

Legenda: SD standardna deviacija; GPX glutation peroksidaza; MDA malondialdehid; n število mačk

Legend: SD Standard Deviation; GPX Glutathione Peroxidase; MDA Malondialdehyde; n number of cats

4.2.1.2 Proteinski karbonili

Koncentracija proteinskih karbonilov je bila na začetku raziskave pri mačkah s CKD večja kot pri mačkah v kontrolni skupini, vendar razlika ni bila značilna (Slika 6).

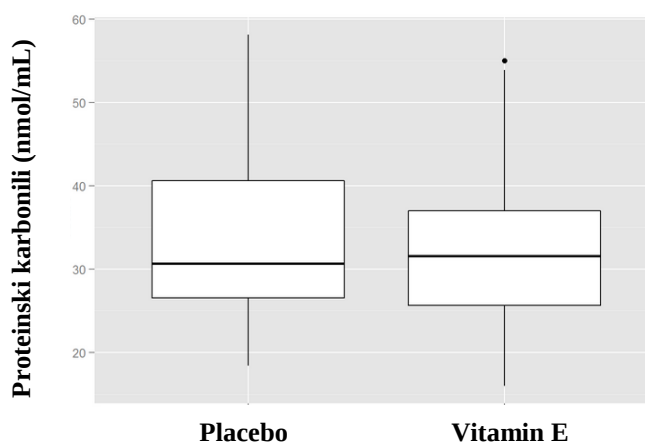


Slika 6: Koncentracija proteinskih karbonilov (nmol/mL) pri mačkah s CKD in kontrolni skupini na začetku raziskave

Figure 6: Protein carbonyl concentration (nmol/mL) in cats with CKD and in the control group at the beginning of the study

Legenda: CKD kronična ledvična odpoved
 Legend: CKD Chronic Kidney Disease

Na začetku raziskave se koncentracija proteinskih karbonilov med mačkami, ki so prejemale vitamin E, in tistimi, ki so prejemale placebo, ni značilno razlikovala (Slika 7).

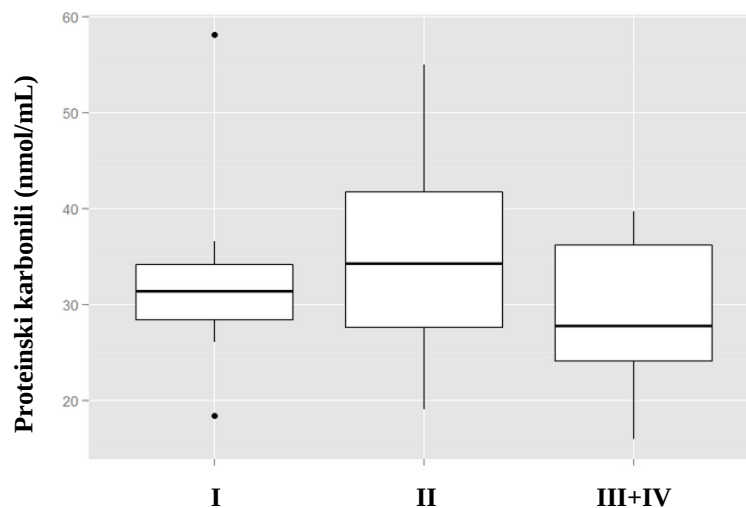


Slika 7: Koncentracija proteinskih karbonilov (nmol/mL) pri mačkah, ki so prejemale placebo oziroma vitamin E na začetku raziskave

Figure 7: Protein carbonyl concentration (nmol/mL) in the placebo and vitamin E group at the beginning of the study

Legenda: • osamelec
 Legend: • outlier

Koncentracija proteinskih karbonilov v plazmi se na začetku raziskave med mačkami v posameznih stopnjah bolezni po IRIS ni značilno razlikovala (Slika 8).



Slika 8: Koncentracija proteinskih karbonilov (nmol/mL) pri mačkah s CKD glede na stopnjo bolezni na začetku raziskave

Figure 8: Protein carbonyl concentration (nmol/mL) in cats with CKD according to the stage of the disease at the beginning of the study

Legenda: • osamelec

Legend: • outlier

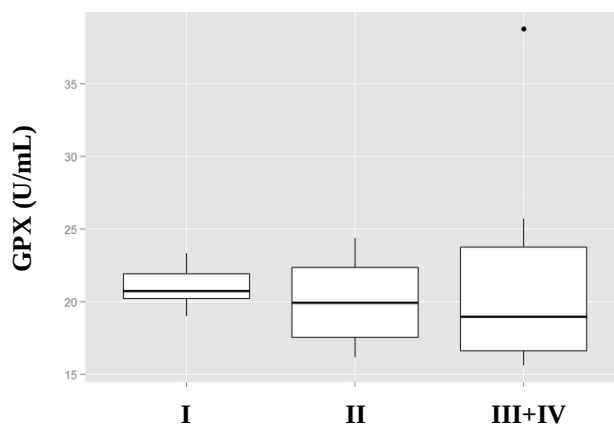
Koncentracija proteinskih karbonilov v plazmi se je pri mačkah v I. skupini po IRIS v placebo skupini 24 tednov po začetku klinične raziskave glede na prvi odvzem zmanjšala za 20 %, medtem ko se je pri mačkah, ki so prejemale vitamin E, zmanjšala za 9 % (Tabela 7). Razlika v nobenem primeru ni bila značilna. Tudi pri primerjavi koncentracije proteinskih karbonilov na koncu raziskave med skupinama placebo in vitamin E razlika ni bila značilna.

Pri mačkah v II. stopnji po IRIS, ki so dobivale placebo, se je po 24 tednih koncentracija proteinskih karbonilov povečala na 125 % začetne vrednosti. Mačke, ki so prejemale vitamin E, so imele na koncu raziskave za 13 % nižjo koncentracijo proteinskih karbonilov kot pri prvem odvzemu vzorcev. Razlika v nobenem primeru ni bila značilna.

Pri mačkah v III. in IV. stopnji po IRIS se je po 16 tednih (pri četrtem odvzemu) koncentracija proteinskih karbonilov povečala pri placebo skupini na 164 % začetne vrednosti, pri mačkah, ki so prejemale vitamin E, pa na 154 % začetne vrednosti. Razlika v nobenem primeru ni bila značilna. Tudi pri primerjavi koncentracije proteinskih karbonilov po 16 tednih med skupinama placebo in vitamin E razlika ni bila značilna. Rezultati so prikazani v Tabeli 9.

4.2.1.3 Aktivnost plazemske glutation peroksidaze

Na začetku raziskave je bila aktivnost plazemske GPX največja pri mačkah z IRIS I in najnižja pri mačkah z IRIS III in IV, vendar razlika ni bila značilna (Slika 9).



Slika 9: Aktivnost plazemske GPX (U/mL) pri mačkah s CKD glede na stopnjo bolezni na začetku raziskave

Figure 9: Plasma GPX activity (U/mL) in cats with CKD according to the stage of the disease at the beginning of the study

Legenda: GPX glutation peroksidaza; • osamelec

Legend: GPX Glutathione Peroxidase; • outlier

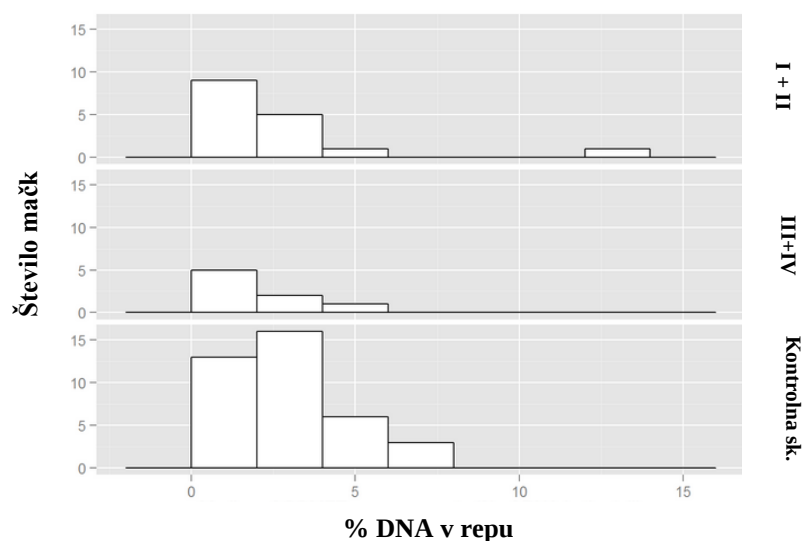
Pri mačkah v IRIS I se aktivnost plazemske GPX v primerjavi med prvim in zadnjim odvzemom (24 tednov po začetku raziskave) ni značilno spremenila niti pri placebo skupini niti pri skupini, ki je prejela vitamin E (Tabela 7). Tudi pri primerjavi aktivnosti plazemske GPX na koncu raziskave med skupinama placebo in vitamin E razlika ni bila značilna.

Pri mačkah v IRIS II se je v primerjavi med prvim in zadnjim odvzemom vzorcev 24 tednov po začetku raziskave aktivnost plazemske GPX povečala. Pri skupini, ki je dobivala placebo, se je aktivnost tega encima povečala na 114 %, in v skupini, ki je prejela vitamin E, na 113 % začetne aktivnosti (Tabela 8). Razlika v nobenem primeru ni bila značilna. Tudi pri primerjavi aktivnosti plazemske GPX na koncu raziskave med skupinama placebo in vitamin E razlika ni bila značilna.

Aktivnost plazemske GPX se je pri mačkah v III. in IV. skupini po IRIS, ki so prejemale placebo, v primerjavi med prvim in četrtem odvzemom vzorcev 16 tednov po začetku raziskave zmanjšala za 17 %. V skupini, ki je prejela vitamin E, se je aktivnost tega encima povečala za 7 % (Tabela 9). Razlika v nobenem primeru ni bila značilna. Tudi pri primerjavi aktivnosti plazemske GPX po 16 tednih med skupinama placebo in vitamin E razlika ni bila značilna.

4.2.1.4 Poškodbe DNA

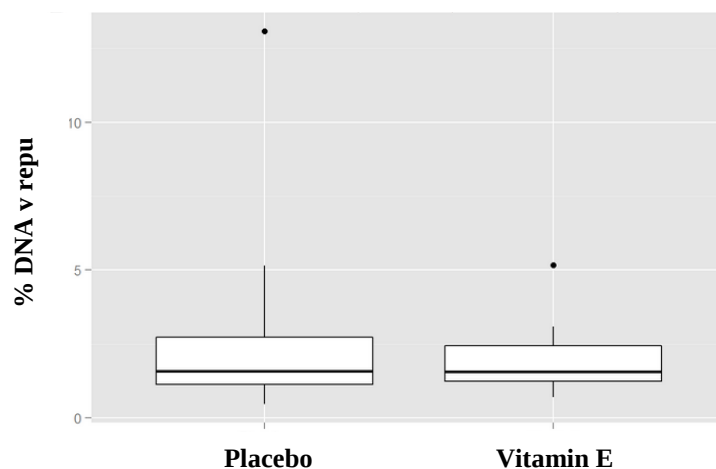
Mačke v kontrolni skupini so imele značilno višji odstotek jedrne DNA v repu kometov kot mačke s CKD ne glede na stopnjo bolezni ($p = 0,05$) (Slika 10).



Slika 10: Odstotek DNA v repu kometov pri mačkah s CKD in kontrolni skupini na začetku raziskave

Figure 10: Percentage of DNA in tail in cats with CKD and in the control group at the beginning of the study

Na začetku raziskave odvzemu ni bilo značilne razlike v odstotku jedrne DNA v repu kometov med skupino mačk, ki so prejemale vitamin E, in tistimi, ki so prejemale placebo (Slika 11).



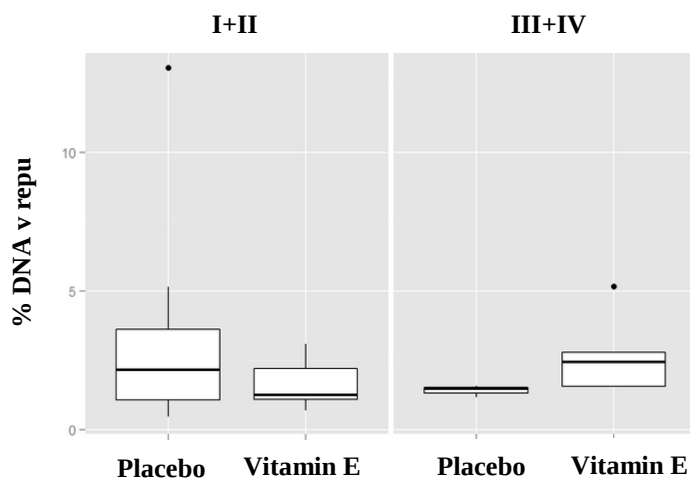
Slika 11: Odstotek DNA v repu kometov pri mačkah, ki so prejemale vitamin E oziroma placebo na začetku raziskave

Figure 11: Percentage DNA in tail in cats in the vitamin E and placebo group at the beginning of the study

Legenda: • osamelec

Legend: • outlier

Mačke v IRIS III in IV so imele nižji odstotek jedrne DNA v repu kometov kot mačke v IRIS I in II, vendar razlika ni bila značilna (Slika 12). Odstotek jedrne DNA v repu kometov se med mačkami, ki so prejemale vitamin E oziroma placebo, znotraj posameznih skupin po IRIS na začetku raziskave ni razlikoval (Slika 12).



Slika 12: Odstotek DNA v repu pri mačkah s CKD, ki so dobivale vitamin E oziroma placebo glede na stopnjo bolezni na začetku raziskave

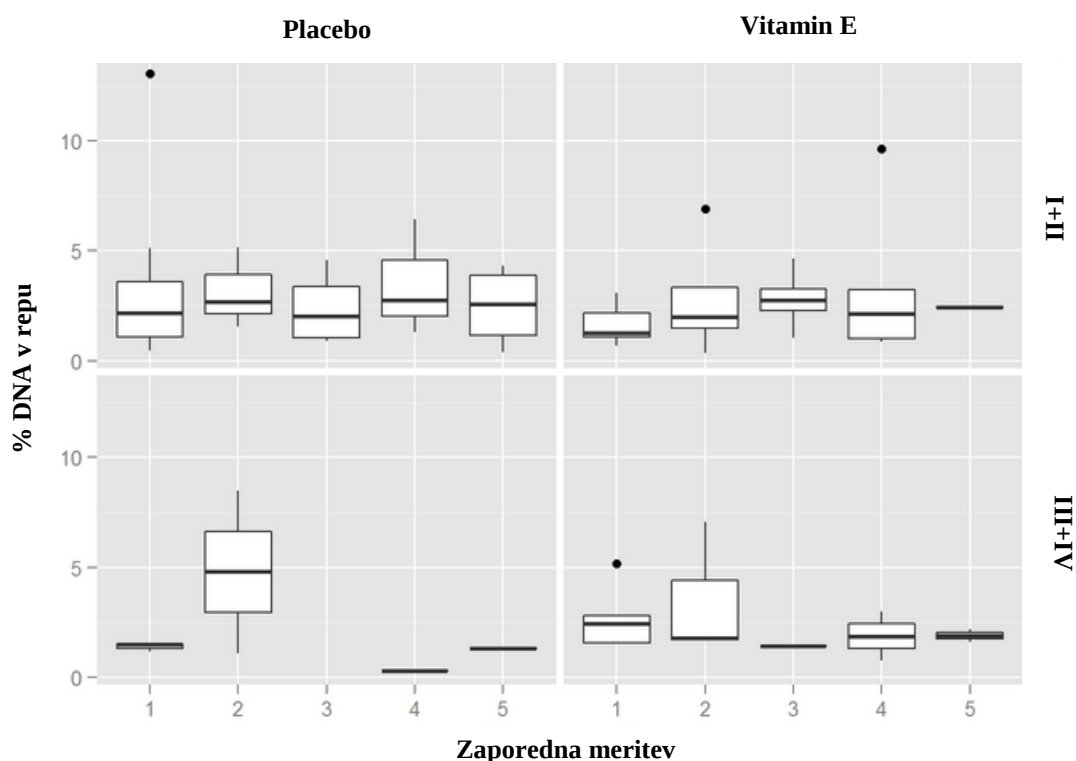
Figure 12: Percentage of DNA in tail in cats with CKD in the vitamin E and placebo group according to the stage of the disease at the beginning of the study

Legenda: • osamelec

Legend: • outlier

Pri primerjavi med prvim in zadnjim odvzemom 24 tednov po začetku raziskave se je pri mačkah s CKD IRIS I in II odstotek DNA v repu kometov povečal v placebo skupini in skupini, ki je prejela vitamin E.

Pri mačkah s CKD IRIS III in IV se je odstotek DNA v repu kometov v primerjavi med prvim in četrtem odvzemom vzorcev 16 tednov po začetku raziskave zmanjšal ne glede na to, ali so prejemale placebo ali vitamin E. Rezultati so prikazani na Sliki 13.



Slika 13: Odstotek DNA v repu kometov izoliranih limfocitov pri mačkah, ki so prejemale vitamin E oziroma placebo glede na stopnjo CKD in zaporedni odvzem vzorcev

Figure 13: Percentage of DNA in comet tail of isolated lymphocytes at different sampling times in vitamin E and placebo group in cats with CKD according to the stage of the disease

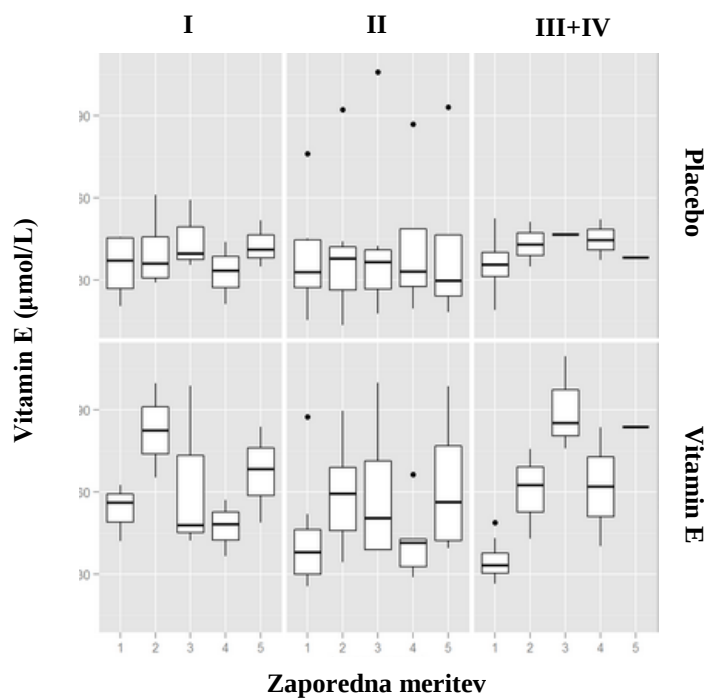
Legenda: • osamelec

Legend: • outlier

4.2.1.5 Vitamin E

Koncentracija vitamina E se na začetku raziskave med kontrolno skupino, placebo skupino in skupino, ki je prejela vitamin E, ni značilno razlikovala. Koncentracija vitamina E v plazmi se je pri vseh skupinah mačk s CKD, ki so prejemale vitamin E, pri vseh vzorčenjih povečala vendar razlike niso bile značilne.

Pri primerjavi koncentracije vitamina E po posameh stopnjah CKD med skupinama placebo in vitamin E pri nobenem odvzemu nismo ugotovili značilnih razlik (Slika 14). Razlika v koncentraciji je bila značilna pri primerjavi med skupino placebo in skupino, ki je prejela vitamin E, če smo združili mačke v vseh stopnjah CKD. Značilni porast koncentracije vitamina E smo ugotovili v skupini, ki je ta vitamin prejela, in sicer sicer štiri ($p = 0,013$) in osem ($p = 0,017$) tednov po začetku dajanja vitamina E. Razlika na koncu raziskave (po 24 tednih) ni bila značilna ($p = 0,074$, Slika 15).

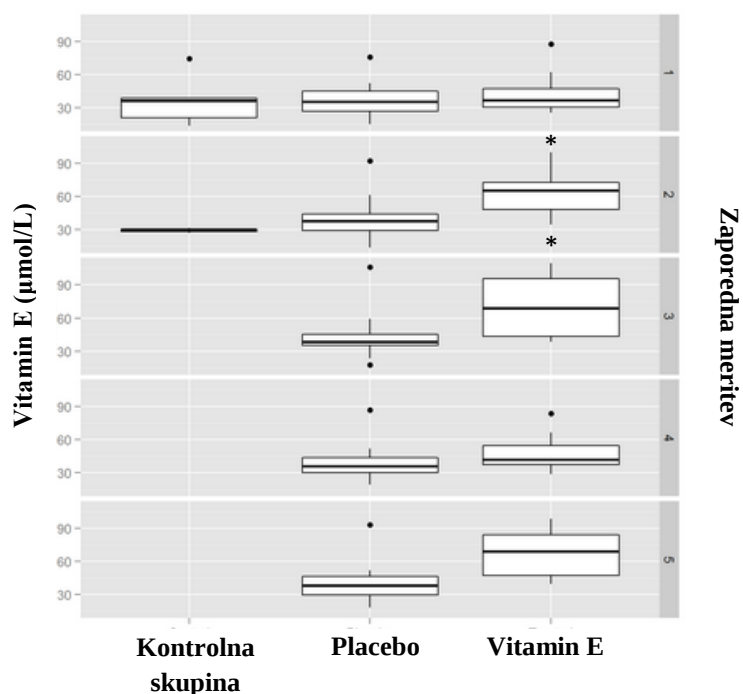


Slika 14: Koncentracija vitamina E v plazmi ($\mu\text{mol/L}$) pri skupini, ki je prejela vitamin E oziroma placebo glede na stopnjo CKD in zaporedni odvzem vzorcev

Figure 14: Plasma vitamin E concentration ($\mu\text{mol/L}$) at different sampling times in vitamin E and placebo group in cats with CKD according to the stage of the disease

Legenda: • osamelec

Legend: • outlier



Slika 15: Koncentracija vitamina E v plazmi ($\mu\text{mol/L}$) pri kontrolni skupini in skupini, ki je prejela vitamin E oziroma placebo glede na stopnjo CKD in zaporedni odvzem vzorcev

Figure 15: Plasma vitamin E concentration ($\mu\text{mol/L}$) at different sampling times in the control group, vitamin E, and placebo group in cats with CKD according to the stage of the disease

Legenda: * $p < 0,05$ (placebo skupina v primerjavi s skupino vitamin E); • osamelec

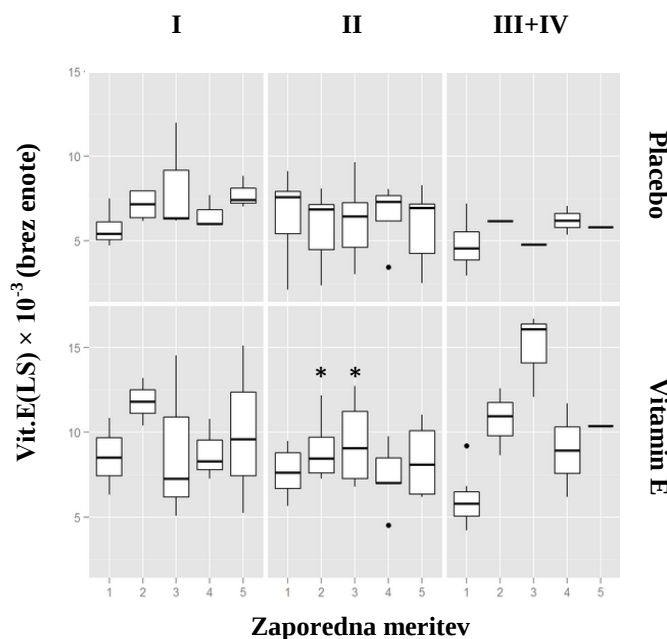
Legend: * $p < 0,05$ (placebo group versus vitamin E group); • outlier

Slika 16 prikazuje plazemsko koncentracije vitamina E, standardizirano na koncentracijo lipidov v serumu pri mačkah, ki so prejemale vitamin E oziroma placebo, glede na stopnjo CKD in zaporedni odvzem vzorcev. Koncentracija vitamina E se na začetku raziskave med placebo skupino in skupino, ki je prejela vitamin E, pri nobeni stopnji ni značilno razlikovala.

Koncentracija lipidno standardiziranega vitamina E v plazmi se je po dajanju vitamina E pri vseh skupinah mačk s CKD, ki so prejemale vitamin E, pri vseh vzorčenjih povečala (Slika 16). Pri primerjavi lipidno standardizirane koncentracije vitamina E po posameh stopnjah CKD med skupino placebo in skupino, ki je prejela vitamin E, smo značilno razliko ugotovili le pri

mačkah v IRIS II štiri ($p = 0,041$) in osem tednov ($p = 0,038$) po začetku dajanja vitamina E. Pri mačkah v IRIS I in IRIS III ter IV nismo ugotovili značilnih razlik med skupinama placebo in vitamin E pri nobenem odvzemu (Slika 16).

Na Sliki 17 je prikazana plazemska koncentracija vitamina E, standardizirana na koncentracijo lipidov pri placebo skupini in skupini, ki je prejela vitamin E, glede na zaporedni odvzem, po tem, ko smo združili mačke v vseh stopnjah CKD. Na začetku raziskave med skupinama placebo in vitamin E ni bilo razlik ($p = 0,069$); značilno razliko med skupinama smo ugotovili štiri tedne ($p = 0,001$) in osem tednov ($p = 0,007$) po začetku dajanja vitamina E. Razlika med skupinama placebo in vitamin E na koncu raziskave (po 24 tednih) je bila na meji značilnosti ($p = 0,077$).

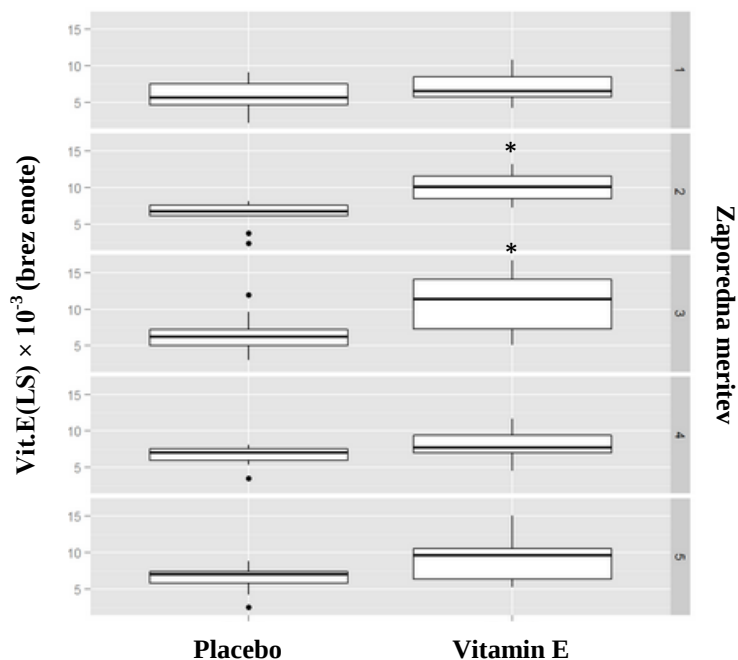


Slika 16: Standardizirana koncentracija vitamina E (Vit.E(LS); brez enote) pri skupini, ki je prejela vitamin E oziroma placebo glede na stopnjo CKD in zaporedni odvzem vzorcev

Figure 16: Standardized plasma vitamin E concentration (unitless) in successive measurements in vitamin E and placebo group according to the stage of the disease

Legenda: Vit.E(LS) lipidno standardizirana koncentracija vitamina E; * $p < 0,05$ (skupina placebo v primerjavi s skupino, ki je prejela vitamin E); • osamelec

Legend: Vit.E(LS) lipid-standardized vitamin E concentration; * $p < 0,05$ (placebo group versus vitamin E group); • outlier



Slika 17: Standardizirana koncentracija vitamina E (Vit.E(LS); brez enote) pri skupini, ki je prejela vitamin E oziroma placebo glede na zaporedni odvzem vzorcev

Figure 17: Standardized plasma vitamin E concentration (unitless) in successive measurements in vitamin E and placebo group

Legenda: * $p < 0,05$ (skupina placebo v primerjavi s skupino, ki je prejela vitamin E); • osamelec

Legend: * $p < 0,05$ (placebo group versus vitamin E group); • outlier

4.2.2 Klinični parametri

4.2.2.1 Ocena izraženosti kliničnih znakov

Pri prvem kliničnem pregledu na začetku klinične raziskave so lastniki pri šestih mačkah v IRIS I počutje svoje živali ocenili kot zelo dobro, pri eni kot srednje dobro. Mačke so bile brez kliničnih znakov ali pa so ti bili blagi (Tabela 10). Nobena mačka ni v obdobju enega meseca pred začetkom raziskave izgubila več kot 5 % telesne mase.

Tabela 10: Stopnja izraženosti kliničnih znakov na začetku raziskave

Table 10: Severity of clinical signs at the beginning of the study

Stopnja CKD	Počutje	Odstotek izgube telesne mase	Dehidracija	Apetit	Slabost, bruhanje	Ulceracije v ustni votlini	Seštevek
I n=7	zelo dobro: 6 srednje: 1 slabo: 0 zelo slabo: 0	≤ 5 %: 7 do 10 %: 0 do 15 %: 0 ≥15 %: 0	≤ 5 %: 7 5 do 10%: 0 ≥10 %: 0	normalen: 6 zmanjšan: 1 neješčnost: 0	ne bruha: 5 občasno: 2 pogosto: 0	0	0–4: 7 5–7: 0 8–10: 0 >10: 0
II n=15	zelo dobro: 13 srednje: 1 slabo: 1 zelo slabo: 0	≤ 5 %: 13 do 10 %: 2 do 15 %: 0 ≥15 %: 0	≤5 %: 14 5 do 10 %: 1 ≥10 %: 0	normalen: 12 zmanjšan: 3 neješčnost: 0	ne bruha: 12 občasno: 3 pogosto: 0	0	0–4: 14 5–7: 1 8–10: 0 >10: 0
III+IV n=12	zelo dobro: 3 srednje: 3 slabo: 5 zelo slabo: 1	≤5 %: 4 do 10 %: 5 do 15 %: 3 ≥15 %: 0	≤5 %: 6 5 do 10 %: 6 ≥10 %: 0	normalen: 3 zmanjšan: 5 neješčnost: 4	ne bruha: 3 občasno: 4 pogosto: 5	1	0–4: 5 5–7: 3 8–10: 4 >10: 0

Legenda: n število mačk, vključenih v skupino; Seštevek kliničnih znakov: 0–4: blagi klinični znaki; 5–7: zaznavni klinični znaki; 8–10: hudi klinični znaki; >10: nesprejemljivi klinični znaki; evtanazija

Legend: n number of included cats; Score: 0–4 mild clinical signs; 5–7: moderate clinical signs; 8–10: severe clinical signs; >10: unacceptable clinical signs; euthanasia

Pri nobeni mački nismo ugotovili dehidracije, ki bi bila večja od 5 %. Ena mačka je imela zmanjšan apetit. Dve mački sta občasno kazali znake slabosti in bruhalo. Nobena ni imela ulceracij v sluznici ustne votline.

Pri mačkah v IRIS II je 13 lastnikov ocenilo počutje kot zelo dobro, eden kot srednje in eden kot slabo (Tabela 10). Pri eni mački smo ugotovili 5 do 10 % dehidracijo, pri dveh do 10 % izgubo telesne mase v enem mesecu pred začetkom raziskave. Tri mačke so imele zmanjšan apetit, tri so občasno bruhalo. Nobena ni imela ulceracij v ustni votlini. Pri 14 mačkah je šlo za blage klinične znake, pri eni mački so bili klinični znaki zaznavni.

Tri mačke v IRIS III in IV so se po oceni lastnika počutile zelo dobro, tri srednje, pet slabo in ena zelo slabo (Tabela 10). Štiri mačke so v zadnjem mesecu izgubile 5 % telesne mase, pet do 10 % in tri do 15 %. Pri šestih mačkah smo ugotovili do 5 %, pri šestih 10 % dehidracijo. Tri mačke so imele normalen apetit, pet zmanjšan, štiri so bile neješče. Štiri mačke so bruhalo občasno, pet pogosto. Ena mačka je imela ulceracije v ustni votlini. Pet mačk je imelo blage klinične znake, tri zaznavne in štiri hude klinične znake.

Mačke v IRIS I, ki so prejemale vitamin E, so bile brez kliničnih znakov. Tiste, ki so prejemale placebo, so bile v času raziskave brez kliničnih znakov ali pa so ti bili blagi. Ena mačka v skupini, ki je prejemale placebo, je izgubila med 5 in 10 % telesne mase, pri eni je lastnik počutje ocenil kot srednje (Tabela 11).

Tabela 11: Stopnja izraženosti kliničnih znakov med klinično raziskavo pri mačkah s CKD IRIS I

Table 11: Severity of clinical signs during clinical study in cats with CKD IRIS I

Zaporedni odvzem		Počutje		Odstotek izgube telesne mase		Dehidracija ≤ 5 %	Apetit		Slabost, bruhanje		Ulceracije v ustni votlini	Seštevek 0–4
		Zelo dobro	Srednje	≤ 5%	5–10%		Normalen	Zmanjšan	Ne bruha	Občasno		
1	Vitamin E (n=3)	3	0	3	0	3	3	0	3	0	0	3
	Placebo (n=4)	3	1	4	0	4	3	1	2	2	0	4
2	Vitamin E (n=2)	2	0	2	0	2	2	0	2	0	0	2
	Placebo (n=4)	3	1	3	1	4	2	2	4	0	0	4
3	Vitamin E (n=3)	3	0	3	0	3	3	0	3	0	1	3
	Placebo(n=3)	2	1	3	0	3	3	0	3	0	0	3
4	Vitamin E (n=3)	3	0	3	0	3	3	0	3	0	0	3
	Placebo(n=3)	3	0	2	1	3	3	0	3	0	0	3
5	Vitamin E (n=3)	3	0	3	0	3	3	0	3	0	0	3
	Placebo (n=3)	3	0	2	1	3	3	0	3	0	0	3

Legenda: n število mačk, vključenih v skupino; Seštevek kliničnih znakov: 0–4: blagi klinični znaki; 5–7: zaznavni klinični znaki; 8–10: hudi klinični znaki; >10: nesprejemljivi klinični znaki; evtanazija

Legend: n number of included cats; Score: 0–4 mild clinical signs; 5–7: moderate clinical signs; 8–10: severe clinical signs; >10: unacceptable clinical signs; euthanasia

Mačke v IRIS II, ki so prejemale vitamin E, so imele blage klinične znake. V manjši meri so bili prisotni izguba telesne mase, slabost in bruhanje. Mačke, ki so prejemale placebo, so v času raziskave imele blage do zmerne klinične znake. Najpogostejši klinični znaki so bili zmanjšan apetit, občasna slabost in bruhanje, dehidracija in izguba telesne mase. Pri eni mački so se lastniki odločili za evtanazijo. Rezultati so prikazani v Tabeli 12.

Tabela 12: Stopnja izraženosti kliničnih znakov med klinično raziskavo pri mačkah s CKD IRIS II

Table 12: Severity of clinical signs during clinical study in cats with CKD IRIS II

Zaporedni odvzem		Počutje			Odstotek izgube telesne mase			Dehidracija			Apetit		Slabost, bruhanje			Ulceracije v ustni votlini	Seštevek	
		Zelo dobro	Srednje	Slabo	≤ 5 %	5–10 %	10–15 %	≤ 5 %	5–10 %	≥ 10 %	Normalen	Zmanjšan	Ne bruha	Občasno	Pogosto		0–4	5–7
1	Vitamin E (n=7)	6	1	0	7	0	0	7	0	0	6	1	7	0	0	0	7	0
	Placebo (n=8)	7	1	0	8	0	0	8	0	0	7	1	5	3	0	0	8	0
2	Vitamin E (n=6)	6	0	0	5	1	0	6	0	0	6	0	6	0	0	0	6	0
	Placebo (n=7)	6	1	0	4	3	0	7	0	0	6	1	7	0	0	0	7	0
3	Vitamin E (n=4)	3	1	0	4	0	0	4	0	0	3	1	3	1	0	0	4	0
	Placebo (n=6)	4	2	0	6	0	0	5	0	1	5	1	2	4	0	0	5	1
4	Vitamin E (n=6)	6	0	0	5	1	0	5	1	0	5	1	6	0	0	0	6	0
	Placebo (n=4)	4	0	0	4	0	0	4	0	0	4	0	2	2	0	0	4	0
5	Vitamin E (n=5)	4	1	0	4	1	0	4	1	0	4	1	4	1	0	1	5	0
	Placebo (n=5)	4	0	1	4	0	1	4	1	0	4	1	4	0	1	1	4	1

Legenda: n število mačk, vključenih v skupino; Seštevek kliničnih znakov: 0–4: blagi klinični znaki; 5–7: zaznavni klinični znaki; 8–10: hudi klinični znaki; >10: nesprejemljivi klinični znaki; evtanazija

Legend: n number of included cats; Score: 0–4 mild clinical signs; 5–7: moderate clinical signs; 8–10: severe clinical signs; >10: unacceptable clinical signs; euthanasia

Na začetku raziskave so imele mačke v IRIS III in IV blage, zmerne ali hude klinične znake CKD. Pri šestih mačkah z zaznavnimi oziroma hudimi kliničnimi znaki so se lastniki nekaj dni po prvem odvzemu odločili za evtanazijo. Pri nadaljnjih odvzemih vzorcev so imele mačke v IRIS III in IV naslednje klinične znake: občasno so bruhaile ter imele zmanjšan apetit. Rezultate prikazuje Tabela 13.

Tabela 13: Stopnja izraženosti kliničnih znakov med klinično raziskavo pri mačkah s CKD IRIS III in IV

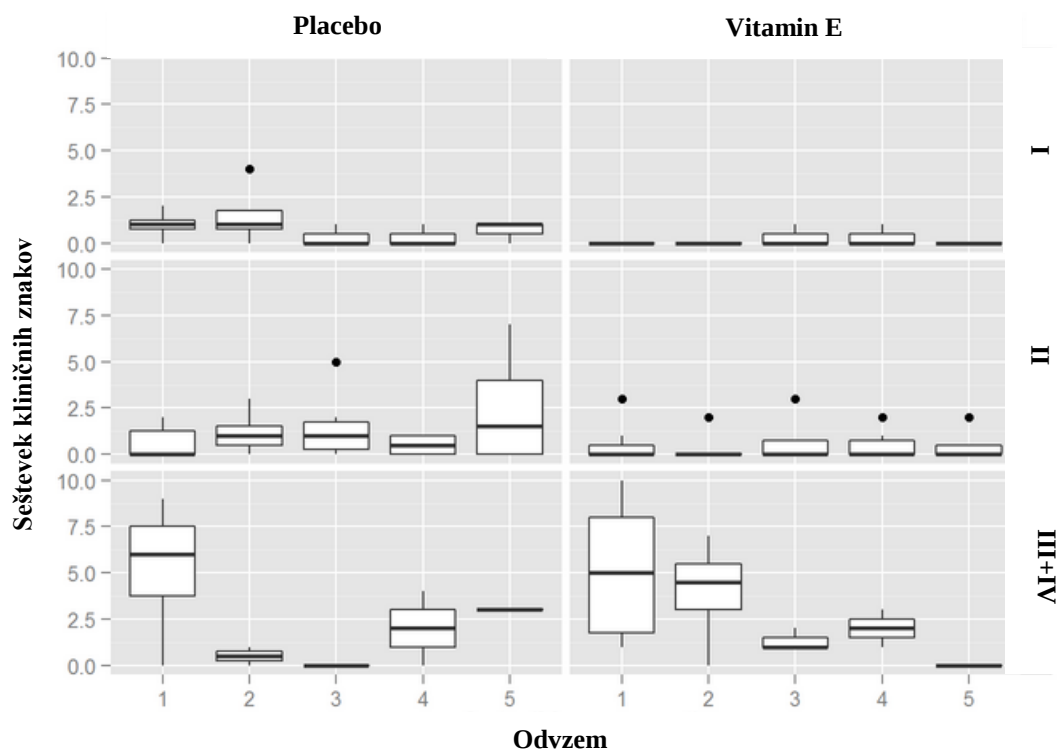
Table 13: Severity of clinical signs during clinical study in cats with CKD IRIS III and IV

Zaporedni odvzem		Počutje				Odstotek izgube telesne mase				Dehidracija			Apetit			Slabost, bruhanje			Ulceracije v ustni votlini	Seštevek		
		Zelo dobro	Srednje	Slabo	Zelo slabo	≤ 5 %	5 – 10 %	10 – 15 %	≥ 15 %	≤ 5 %	5–10 %	≥ 10 %	Normalen	Zmanjšan	Neješčnost	Ne bruha	Občasno	Pogosto		0–4	5–7	8–10
1	Vitamin E (n=8)	2	3	2	1	3	3	2	0	4	4	0	2	3	3	2	2	4	0	4	1	3
	Placebo (n=4)	1	0	3	0	1	2	1	0	2	2	0	1	2	1	1	2	1	1	1	2	1
2	Vitamin E (n=4)	1	3	0	0	1	0	2	1	3	1	0	1	3	0	3	0	1	0	2	2	0
	Placebo (n=2)	2	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	2	0	0	1	1	0	0	2	0	0
3	Vitamin E (n=3)	3	0	0	0	1	2	0	0	3	0	0	1	2	0	3	0	0	0	3	0	0
	Placebo (n=1)	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
4	Vitamin E (n=2)	1	1	0	0	2	0	0	0	2	0	0	1	0	1	1	1	0	0	2	0	0
	Placebo (n=2)	2	0	0	0	1	0	1	0	2	0	0	2	0	0	1	0	1	0	2	0	0
5	Vitamin E (n=1)	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
	Placebo (n=1)	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0

Legenda: n število mačk, vključenih v skupino; Seštevek kliničnih znakov: 0–4: blagi klinični znaki; 5–7: zaznavni klinični znaki; 8–10: hudi klinični znaki; >10: nesprejemljivi klinični znaki; evtanazija

Legend: n number of included cats; Score: 0–4 mild clinical signs; 5–7: moderate clinical signs; 8–10: severe clinical signs; >10: unacceptable clinical signs; euthanasia

Seštevek kliničnih znakov se med skupinama mačk, ki so prejemale vitamin E oziroma placebo, ni značilno razlikoval ne glede na stopnjo bolezni (Slika 18).



Slika 18: Seštevek kliničnih znakov pri skupini, ki je prejela vitamin E oziroma placebo glede na stopnjo CKD in zaporedni odvzem vzorcev

Figure 18: Score of clinical signs severity assessment at different sampling times in vitamin E and placebo group in cats with CKD according to the stage of the disease

Legenda: n število mačk, vključenih v skupino; Seštevek kliničnih znakov: 0–4: blagi klinični znaki; 5–7: zaznavni klinični znaki; 8–10: hudi klinični znaki; > 10: nesprejemljivi klinični znaki; evtanazija; • osamelec

Legend: n number of included cats; Score: 0–4 mild clinical signs; 5–7: moderate clinical signs; 8–10: severe clinical signs; > 10: unacceptable clinical signs; euthanasia; • outlier

4.2.2.2 Koncentracija kreatinina v serumu, specifična gostota urina in razmerje med beljakovinami in kreatininom v urinu

Mačke v IRIS I so imele pred začetkom dajanja vitamina E oziroma placeba (na začetku klinične raziskave) koncentracijo kreatinina pod 140 $\mu\text{mol/L}$ (Tabela 14). Po osmih tednih je pri mačkah, ki so prejemale vitamin E, povprečna koncentracija kreatinina narasla nad 140 $\mu\text{mol/L}$ in se po 16 tednih zmanjšala pod to vrednost. Pri placebo skupini se je povprečna koncentracija kreatinina štiri tedne po začetku klinične raziskave povečala nad 140 $\mu\text{mol/L}$ in ostala nad to vrednostjo do zadnjega odvzema 24 tednov po začetku klinične raziskave. Razlika v koncentraciji kreatinina pri primerjavi med začetkom in koncem raziskave ni bila značilna. Tudi pri primerjavi koncentracije kreatinina na koncu raziskave med skupinama placebo in vitamin E razlika ni bila značilna.

Tabela 14: Koncentracija kreatinina v serumu, specifična gostota urina, UPC in sistolični arterijski tlak (povprečje $\pm$ SD) pri mačkah s CKD IRIS ITable 14: Serum creatinine concentration, urine specific gravity, UPC, and arterial blood pressure (mean $\pm$ SD) in cats with CKD IRIS I

Odvzem		Kreatinin ($\mu\text{mol/L}$)	USG	UPC	Sistolični arterijski tlak (mm Hg)
1	Vitamin E n=3	132,00 $\pm$ 5,94	1,059 $\pm$ 0,009	0,19 $\pm$ 0,12	133,00 $\pm$ 29,82
	Placebo n=4	132,00 $\pm$ 5,94	1,047 $\pm$ 0,025	0,14 $\pm$ 0,07	133,25 $\pm$ 24,88
2	Vitamin E n=2	137,98 $\pm$ 0,81	1,030 $\pm$ 0,014	0,14 $\pm$ 0,06	122,00 $\pm$ 11,31
	Placebo n=4	145,36 $\pm$ 12,49	1,044 $\pm$ 0,015	0,11 $\pm$ 0,04	149,25 $\pm$ 36,94
3	Vitamin E n=3	144,52 $\pm$ 21,90	1,053 $\pm$ 0,003	0,22 $\pm$ 0,13	142,33 $\pm$ 10,97
	Placebo n=3	141,04 $\pm$ 15,28	1,031 $\pm$ 0,009	0,14 $\pm$ 0,02	146,50 $\pm$ 13,44
4	Vitamin E n=3	136,30 $\pm$ 36,87	1,051 $\pm$ 0,006	0,23 $\pm$ 0,22	146,50 $\pm$ 13,44
	Placebo n=3	140,39 $\pm$ 42,70	1,046 $\pm$ 0,017	0,21 $\pm$ 0,05	177,00 $\pm$ 12,10
5	Vitamin E n=3	129,17 $\pm$ 11,53	1,068 $\pm$ 0,003	0,12 $\pm$ 0,02	137,33 $\pm$ 4,16
	Placebo n=3	142,08 $\pm$ 35,75	1,027 $\pm$ 0,008	0,16 $\pm$ 0,06	163,00 $\pm$ 12,17*

Legenda: SD standardna deviacija; USG specifična gostota urina; UPC razmerje med beljakovinami in kreatininom v urinu; * p = 0,05 (primerjava med skupinama placebo in vitamin E); n število mačk

Legend: SD Standard Deviation; USG Urine Specific Gravity; UPC Urinary Protein to Creatinine Ratio; * p = 0,05 (placebo group versus vitamin E); n number of cats

Pri mačkah v IRIS II, ki so dobivale vitamin E, je bila povprečna koncentracija kreatinina v serumu (Tabela 15) največja osem tednov po začetku klinične raziskave (204,43 $\mu\text{mol/L}$). Pri četrtem in petem odvzemu vzorcev (po 16 in 24 tednih) je bila povprečna koncentracija kreatinina pod 200 $\mu\text{mol/L}$, vendar večja kot v placebo skupini. Pri mačkah v IRIS II se je v placebo skupini serumska koncentracija kreatinina po štirih in osmih tednih povečala in se po 16

tednih zmanjšala pod 150 $\mu\text{mol/L}$. Razlika v koncentraciji kreatinina pri primerjavi med začetkom in koncem raziskave ni bila značilna niti v skupini placebo niti v skupini, ki je prejela vitamin E. Tudi pri primerjavi koncentracije kreatinina na koncu raziskave med skupinama placebo in vitamin E razlika ni bila značilna.

Tabela 15: Koncentracija kreatinina v serumu, specifična gostota urina, UPC in sistolični arterijski tlak (povprečje $\pm$ SD) pri mačkah s CKD IRIS II

Table 15: Serum creatinine concentration, urine specific gravity, UPC, and arterial blood pressure (mean $\pm$ SD) in cats with CKD IRIS II

Odvzem		Kreatinin ($\mu\text{mol/L}$)	USG	UPC	Sistolični arterijski tlak (mm Hg)
1	Vitamin E n=7	169,70 $\pm$ 19,72	1,050 $\pm$ 0,018	0,20 $\pm$ 0,07	146,00 $\pm$ 22,29
	Placebo n=8	184,89 $\pm$ 34,23	1,044 $\pm$ 0,024	0,42 $\pm$ 0,41	136,71 $\pm$ 23,36
2	Vitamin E n=6	174,12 $\pm$ 32,87	1,039 $\pm$ 0,017	0,20 $\pm$ 0,11	150,83 $\pm$ 40,30
	Placebo n=7	189,08 $\pm$ 56,35	1,040 $\pm$ 0,022	0,49 $\pm$ 0,37	136,29 $\pm$ 14,60
3	Vitamin E n=4	204,43 $\pm$ 41,45	1,028 $\pm$ 0,014	0,18 $\pm$ 0,05	146,50 $\pm$ 47,38
	Placebo n=6	193,57 $\pm$ 95,57	1,045 $\pm$ 0,026	0,25 $\pm$ 0,19	148,67 $\pm$ 23,57
4	Vitamin E n=4	184,62 $\pm$ 43,21	1,018 $\pm$ 0,016	0,36 $\pm$ 0,03	173,00 $\pm$ 21,26
	Placebo n=6	141,36 $\pm$ 14,01	1,064 $\pm$ 0,030	0,23 $\pm$ 0,31	144,25 $\pm$ 18,61
5	Vitamin E n=5	192,22 $\pm$ 61,79	1,047 $\pm$ 0,020	0,18 $\pm$ 0,05	161,67 $\pm$ 31,39
	Placebo n=5	153,77 $\pm$ 9,23	1,045 $\pm$ 0,020	0,27 $\pm$ 0,22	138,40 $\pm$ 21,84

Legenda: SD standardna deviacija; USG specifična gostota urina; UPC razmerje med beljakovinami in kreatininom v urinu; n število mačk

Legend: SD Standard Deviation; USG Urine Specific Gravity; UPC Urinary Protein to Creatinine Ratio; n number of cats

Mačke v IRIS III in IV so imele na začetku klinične raziskave povprečno koncentracijo kreatinina v serumu večjo kot 400 $\mu\text{mol/L}$ (Tabela 16). Pri mačkah v obeh skupinah je bila najnižja povprečna vrednost osem tednov po začetku klinične raziskave. Pri mačkah, ki sta

dobivali vitamin E, se je koncentracija kreatinina po 16 tednih povečala. Razlika v koncentraciji kreatinina pri primerjavi med začetkom raziskave in po 16 tednih ni bila značilna niti v skupini placebo niti v skupini, ki je prejela vitamin E. Tudi pri primerjavi koncentracije kreatinina po 16 tednih med skupinama placebo in vitamin E razlika ni bila značilna.

Tabela 16: Koncentracija kreatinina v serumu, specifična gostota urina, UPC in sistolični arterijski tlak (povprečje $\pm$ SD; vrednost pri $n = 1$) pri mačkah s CKD IRIS III in IV

Table 16: Serum creatinine concentration, urine specific gravity, UPC, and arterial blood pressure (mean $\pm$ SD; value if $n = 1$) in cats with CKD IRIS III and IV

Odvzem		Kreatinin ($\mu\text{mol/L}$)	USG	UPC	Sistolični arterijski tlak (mm Hg)
1	Vitamin E n=8	582,19 $\pm$ 301,14	1,016 $\pm$ 0,008	0,48 $\pm$ 0,28	163,60 $\pm$ 21,59
	Placebo n=4	441,65 $\pm$ 178,58	1,021 $\pm$ 0,06	1,18 $\pm$ 1,47	146,75 $\pm$ 33,06
2	Vitamin E n=4	433,96 $\pm$ 218,90	1,013 $\pm$ 0,001	0,42 $\pm$ 0,41	134,00 $\pm$ 21,65
	Placebo n=2	338,74 $\pm$ 41,81	1,020^a	0,30 $\pm$ 0,18	114,00 $\pm$ 15,61
3	Vitamin E n=3	295,72 $\pm$ 171,73	1,036 $\pm$ 0,034	0,44 $\pm$ 0,50	152,00 $\pm$ 1,41
	Placebo n=1	292,03	1,018	0,53	142,00
4	Vitamin E n=2	382,36 $\pm$ 317,12	1,018 $\pm$ 0,008	0,25 $\pm$ 0,15	133,00 $\pm$ 21,20
	Placebo n=2	281,84 $\pm$ 13,73	1,020 $\pm$ 0,003	1,07 $\pm$ 1,16	159,50 $\pm$ 60,10
5	Vitamin E n=1	537,00	1,010	0,79	118,00
	Placebo n=1	288,80	1,020	0,35	119,00

Legenda: SD standardna deviacija; USG specifična gostota urina; UPC razmerje med beljakovinami in kreatininom v urinu; n število mačk; ^a vrednost izmerjena samo pri eni mački

Legend: SD Standard Deviation, USG Urine Specific Gravity; UPC Urinary Protein to Creatinine Ratio; n number of cats; ^a value measured in one cat

Pri mačkah v IRIS I na začetku raziskave proteinurija ni bila prisotna. Pri mačkah, ki so dobivale vitamin E, je bila pri tretjem in četrtem odvzemu vzorcev proteinurija mejna. Mačke v placebo skupini so imele mejno proteinurijo le pri četrtem odvzemu vzorcev (Tabela 14). Razlika v UPC

primerjavi med začetkom in koncem raziskave v nobenem primeru ni bila značilna. Tudi pri primerjavi UPC na koncu raziskave med skupinama placebo in vitamin E razlika ni bila značilna.

Mačke v IRIS II, ki so dobivale vitamin E, so imele pri vseh odvzemih, razen pri tretjem in petem odvzemu, mejno proteinurijo (Tabela 15). Mačke v placebo skupini so imele pri prvem in drugem odvzemu proteinurijo, pri nadaljnjih odvzemih je bila proteinurija mejna. Razlika v UPC primerjavi med začetkom in koncem raziskave v nobenem primeru ni bila značilna. Tudi pri primerjavi UPC na koncu raziskave med skupinama placebo in vitamin E razlika ni bila značilna.

Na začetku raziskave so imele vse mačke v IRIS III in IV proteinurijo. Mačke, ki so dobivale vitamin E, so imele ves čas raziskave, razen pri četrtem odvzemu vzorcev po 16 tednih, proteinurijo. Pri drugem odvzemu vzorcev so imele mačke v placebo skupini mejno proteinurijo, ki je kasneje napredovala v proteinurijo (Tabela 16). Razlika v UPC primerjavi med začetkom in koncem raziskave ni bila značilna niti v skupini placebo niti v skupini, ki je prejemale vitamin E. Tudi pri primerjavi UPC pri četrtem vzorčenju med skupinama placebo in vitamin E razlika ni bila značilna.

Na začetku klinične raziskave so imele mačke v IRIS I specifično gostoto urina nad 1,035. Pri mačkah, ki so dobivale vitamin E, se je specifična gostota urina pri drugem odvzemu vzorcev zmanjšala pod 1,035, to je pod mejo referenčne vrednosti (IRIS 2013a), in je pri nadaljnjih odvzemih narasla nad 1,050. Razlika ni bila značilna. V placebo skupini se je specifična gostota pri tretjem odvzemu vzorcev zmanjšala pod mejo referenčne vrednosti, se pri četrtem odvzemu povečala in pri petem odvzemu spet zmanjšala pod referenčno vrednost (Tabela 14). Razlika ni bila značilna niti v skupini placebo niti v skupini, ki je prejemale vitamin E. Na koncu raziskave je bila specifična gostota urina pri skupini, ki je prejemale vitamin E precej višja ($1,068 \pm 0,003$) kot v skupini placebo ($1,027 \pm 0,008$), vendar razlika ni bila značilna ($p = 0,083$).

Mačke v IRIS II so imele na začetku raziskave specifično gostoto urina nad 1,035. Mačke, ki so dobivale vitamin E, so imele pri tretjem in četrtem odvzemu hipostenurijo. Pri mačkah, ki so dobivale placebo, se specifična gostota urina ni zmanjšala pod 1,035 (Tabela 15). Razlika v specifični gostoti primerjavi med začetkom in koncem raziskave v nobenem primeru ni bila

značilna. Tudi pri primerjavi specifične gostote urina na koncu raziskave med skupinama placebo in vitamin E razlika ni bila značilna.

Mačke v IRIS III in IV, ki so dobivale vitamin E, so imele ves čas raziskave, razen pri tretjem odvzemu, hipostenurijo. Mačke v placebo skupini so imele ves čas raziskave hipostenurijo. (Tabela 16). Razlika v specifični gostoti primerjavi med začetkom raziskave in pri četrtem vzorčenju po 16 tednih v nobenem primeru ni bila značilna. Tudi pri primerjavi specifične gostote urina pri četrtem vzorčenju med skupinama placebo in vitamin E razlika ni bila značilna.

Na začetku raziskave so imele mačke v IRIS I sistolični arterijski tlak pod 150 mm Hg, torej so bile normotenzivne z minimalnim tveganjem za poškodbo tarčnih organov (IRIS 2013a). Mačke, ki so dobivale vitamin E, so bile ves čas klinične raziskave normotenzivne. Mačke v placebo skupini so imele pri četrtem in petem odvzemu vzorcev zmerno povečan sistolični arterijski tlak (Tabela 14). Razlika med sistoličnim arterijskim tlakom na začetku in koncu raziskave v nobenem primeru ni bila značilna. Na koncu raziskave so imele mačke v placebo skupini značilno višji arterijski krvni tlak ($163,00 \pm 12,17$ mm Hg) kot mačke, ki so prejemale vitamin E ($137,33 \pm 4,16$ mm Hg; $p = 0,05$).

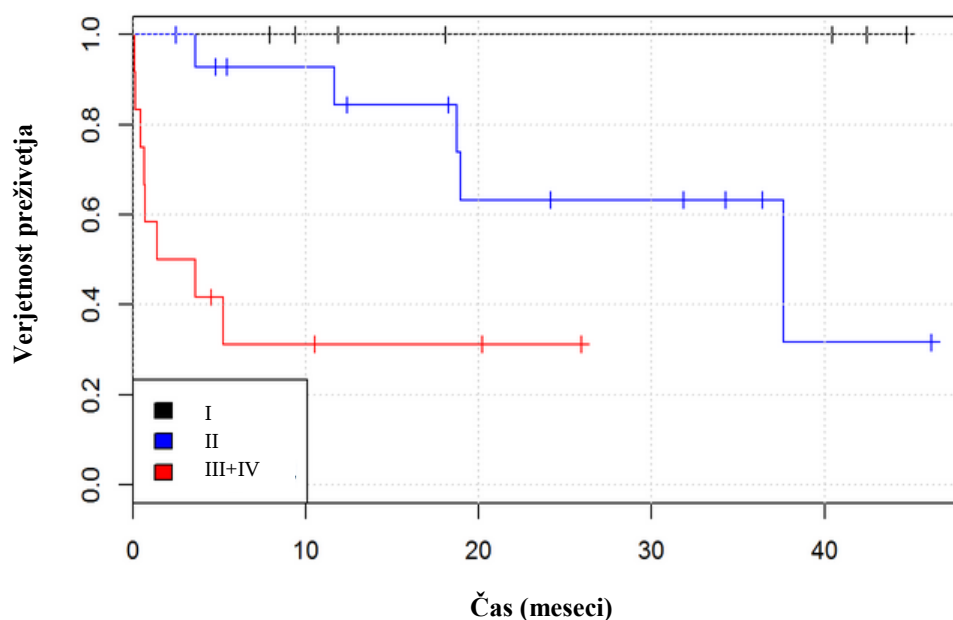
Mačke v II. skupini po IRIS so bile na začetku klinične raziskave normotenzivne. V placebo skupini so bile mačke pri vseh odvzemih normotenzivne, medtem ko so imele mačke, ki so prejemale vitamin E, pri zadnjih dveh odvzemih vzorcev zmerno povečan sistolični arterijski tlak (Tabela 15). Razlika med sistoličnim arterijskim tlakom na začetku in koncu raziskave v nobenem primeru ni bila značilna. Tudi pri primerjavi sistoličnega arterijskega tlaka med skupinama placebo in vitamin E na koncu raziskave razlika ni bila značilna.

Mačke v III. in IV. skupini po IRIS, ki so dobivale placebo, so imele povečan sistolični arterijski tlak pri četrtem odvzemu vzorcev. Mačke, ki so prejemale vitamin E, so imele na začetku raziskave zmerno povečan sistolični arterijski tlak, kasneje so bile normotenzivne (Tabela 16). Razlika v sistoličnem krvnem tlaku pri primerjavi med začetkom raziskave in po 16 tednih ni bila značilna. Tudi pri primerjavi sistoličnega arterijskega tlaka med skupinama placebo in vitamin E po 16 tednih razlika ni bila značilna.

4.2.2.3 Preživetje

Preživetje mačk s CKD je bilo značilno odvisno od stopnje CKD pri prvem odvzemu vzorcev ($p = 0,001$). Mediana vrednost preživetja pri mačkah v IRIS III in IV je bila 2,5 meseca, pri mačkah v IRIS II pa 37,5 mesecev. Pri mačkah v prvi stopnji CKD ni bilo poginov.

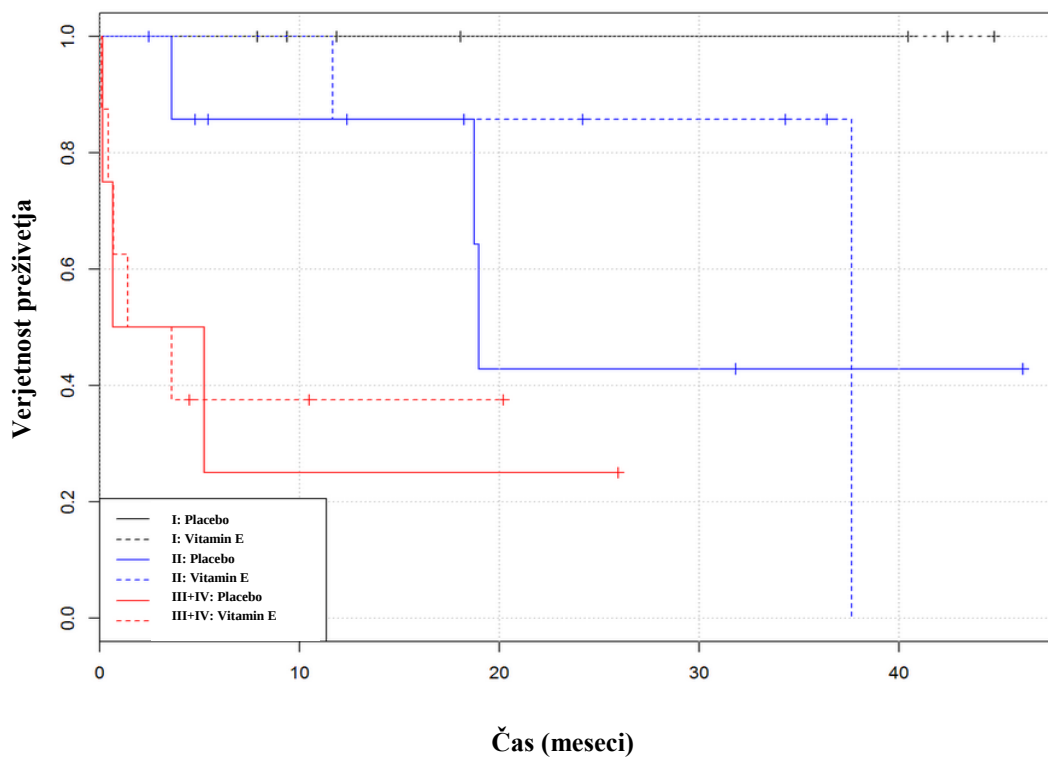
Verjetnost preživetja glede na stopnjo bolezni prikazuje Slika 19. Čas preživetja smo računali od začetka raziskave do pogina, pri tem pa upoštevali stopnjo CKD na začetku raziskave. Paciente smo spremljali do največ 45 mesecev po prvem odvzemu vzorcev. Verjetnost preživetja je bila odvisna od stopnje CKD. Kratke navpične črte označujejo zadnji zabeleženi klinični pregled.



Slika 19: Preživetje mačk s CKD glede na stopnjo bolezni

Figure 19: Survival of cats with CKD according to the stage of the disease

Čas preživetja se med skupinama mačk, ki so prejemale vitamin E oziroma placebo, glede na stopnjo bolezni ni značilno razlikoval (Slika 20).



Slika 20: Preživetje mačk s CKD, ki so prejemale vitamin E oziroma placebo glede na stopnjo bolezni

Figure 20: Survival of cats with CKD in the vitamin E and placebo group according to the stage of the disease

5 RAZPRAVA

Številne raziskave (Ceballos-Picot in sod., 1996; Kamal-Eldin in Appelqvist, 1996; Galle, 2001; Dalle-Donne in sod., 2003; Wardle, 2005; Bhogade in sod., 2008; Priya in Vasudha, 2009) potrjujejo stanje oksidativnega stresa pri ljudeh s CKD. Pri dializnih bolnikih so ugotovili pozitiven učinek dodajanja vitamina E k prehrani. Izboljšalo se je njihovo klinično stanje (Cristol in sod., 1997), pojavnost ateroskleroze in kardiovaskularnih bolezni je bila manjša (Locattelli in sod., 2003; Priya in Vasudha, 2009), obseg poškodb DNA, ocenjenih s testom komet, se je zmanjšal (Kan in sod., 2002), serumska koncentracija MDA je bila nižja ter aktivnost SOD ter CAT znižana v primerjavi s kontrolno skupino (Bhogade in sod., 2008). Podobnih raziskav pri mačkah s CKD še ni bilo izvedenih, zato smo v naši raziskavi preučevali prisotnost oksidativnega stresa pri mačkah s CKD v vseh kliničnih stopnjah bolezni. Oksidativni stres smo ovrednotili s stališča poškodb bioloških molekul in antioksidantnega statusa organizma. Ugotoviti smo želeli, ali dodatek vitamina E k zdravljenju po priporočilih IRIS izboljša klinično stanje in upočasni napredovanje bolezni in v napreduvalih stopnjah podaljša čas preživetja.

Pri mačkah s kronično ledvično odpovedjo nismo ugotovili povečane stopnje lipidne peroksidacije, oksidativnih poškodb beljakovin in DNA; antioksidantni mehanizmi niso iztrošeni. Dodajanje vitamina E ni značilno zmanjšalo stopnje oksidativnih poškodb bioloških molekul in ni značilno pripomoglo k povečanju antioksidantne kapacitete. Prav tako ni podaljšalo preživetja ali zmanjšalo izraženosti kliničnih znakov. Glede na rezultate naše raziskave lahko povzamemo, da dodajanje vitamina E pri mačkah s CKD ni smiselno, saj ne vpliva na klinični potek CKD.

5.1 OKSIDATIVNI STRES IN ANTIOKSIDANTNI STATUS

5.1.1 Malondialdehid

Ugotovljena koncentracija MDA pri zdravih mačkah se nekoliko razlikuje od podatkov iz literature: Todorova in sodelavci (2005) kot referenčno vrednost MDA pri zdravih mačkah za samce navajajo $2,317 \pm 0,376 \mu\text{M}$ in $1,959 \pm 0,336 \mu\text{M}$ za samice, pri čemer ne navajajo, ali so bile mačke kastrirane ali sterilizirane, medtem ko so bile v naši raziskavi izmerjene vrednosti pri kontrolni skupini obeh spolov $3,15 \pm 0,77 \mu\text{M}$. Razlike v izmerjenih vrednostih so najverjetneje posledica uporabe različnih metod za določanje koncentracije MDA. Todorova in sodelavci (2005) so za določanje MDA uporabili metodo TBARS, ki z metodo, uporabljeno v naši raziskavi, ni popolnoma primerljiva. Metoda TBARS je nizko specifična, saj lahko MDA in podobne spojine nastanejo med samim postopkom določanja (Esterbauer in sod., 1991; Draper in sod., 2000; Del Rio in sod., 2005). Metoda določanja MDA s pomočjo derivatizacije z 2,4-DNPH in tekočinsko kromatografijo s tandemsko masno spektroskopijo, ki smo jo uporabili v naši raziskavi, je bolj občutljiva in specifična (Del Rio in sod., 2005).

Rezultati naše raziskave niso pokazali značilne razlike v koncentraciji MDA med kontrolno skupino in mačkami s CKD, kar kaže na to, da pri mačkah s CKD oksidativne poškodbe lipidov kot posledica oksidativnega stresa še niso prisotne. Podobno so ugotovili Yu in Paetau-Robinson (2006) pri mačkah ter Buranakarl in sodelavci (2009) pri psih. Rezultati nakazujejo, da dieta mačk s CKD najverjetneje vsebuje zadostno količino antioksidantov, ki preprečujejo pojav lipidne peroksidacije.

Mačke v IRIS III in IV so imele pri prvem odvzemu vzorcev nižjo koncentracijo MDA ($2,76 \pm 0,4 \mu\text{M}$) kot tiste v IRIS I ($3,66 \pm 0,30 \mu\text{M}$) in II ($3,86 \pm 1,12 \mu\text{M}$). Razlika je bila značilna, če smo skupaj primerjali mačke v IRIS I in II s tistimi v IRIS III in IV ($p = 0,037$). Glede na to, da smo v napredovalih stadijih CKD ugotovili nižjo raven lipidne peroksidacije kot v začetnih

stadijih CKD, lahko sklepamo, da pri mačkah v IRIS III in IV antioksidantni mehanizmi niso iztrošeni oziroma oksidativni stres ni prisoten v taki meri, da bi povzročil značilno povečanje obsega lipidne peroksidacije.

Raziskave pri ljudeh (De Vecchi in sod., 1997; Ozden in sod., 2002; Agarwal, 2002; Priya in Vasudha, 2009) so pokazale nasprotno. V končni stopnji CKD je plazemska koncentracija MDA povečana. Sklepamo lahko, da je potek CKD pri mačkah drugačen in da gre za različno etiologijo in patogenezo. Glede na to, da so dosedanje raziskave pri mačkah, vključno z našo, obravnavale relativno majhno število živali, lahko razlike v ugotovitvah morda pripišemo tudi temu.

5.1.2 Proteinski karbonili

Pri ljudeh s CKD so različni avtorji ugotovili povečano koncentracijo karbonilnih skupin (Himmelfarb in sod., 2000; Mimić-Oka in sod., 2001), tiolnih skupin (Himmelfarb in sod., 2000) in AOPP (Witko-Sarsat in sod., 1998). Do sedaj še ni bilo objav o koncentraciji proteinskih karbonilov pri mačkah s CKD. V naši raziskavi ni bilo značilnih razlik pri primerjavi koncentracije proteinskih karbonilov med mačkami s CKD in kontrolno skupino. Povečane ravni oksidativnih poškodb beljakovin pri mačkah s CKD torej nismo dokazali.

Koncentracija proteinskih karbonilov je bila pri mačkah v IRIS III in IV nekoliko nižja ($29,11 \pm 8,69$ nmol/mL), kot pri mačkah v IRIS I ($33,30 \pm 12,30$ nmol/mL) in II ($35,20 \pm 9,82$ nmol/mL), vendar razlika ni bila značilna. Zaradi majhnega vzorca bi razlika lahko nastala tudi naključno, lahko pa bi šlo tudi za posledico aktivacije antioksidantnih mehanizmov oziroma oksidativni stres pri mačkah v IRIS III in IV ni prisoten v taki meri, da bi povzročil značilno povečanje koncentracije proteinskih karbonilov. Do sedaj še ni bilo objav o vplivu vitamina E na koncentracijo proteinskih karbonilov pri mačkah ali ljudeh s CKD.

5.1.3 Poškodbe DNA

Mačke v kontrolni skupini so imele značilno večji odstotek jedrne DNA v repu kometov kot mačke s CKD, in sicer ne glede na stopnjo bolezni ($p = 0,05$). Vzrok so lahko individualne razlike med preučevanimi živalmi in relativno majhen vzorec. Ker s testom komet ugotavljamo tudi prelome, ki nastanejo kot vmesna stopnja v procesu popravljanja DNA, bi ugotovitev morda lahko pripisali tudi dejstvu, da so pri skupini zdravih mačk popravljalni mehanizmi DNA bolj aktivni kot pri mačkah s CKD (Tice in sod., 2000).

Rezultati naše raziskave se razlikujejo od podatkov iz literature (Yu in Paetau-Robinson, 2006), kjer ne navajajo značilnih razlik med zdravimi mačkami in mačkami s CKD. Omenjeno raziskavo so izvedli na manjšem številu živali, saj so primerjali le deset zdravih mačk in deset mačk z začetno stopnjo CKD. V omenjeni raziskavi so poškodbe DNA ugotavljali tako s testom komet kot tudi z ugotavljanjem koncentracije 8-OHdG v serumu.

V nasprotju z raziskavama pri mačkah so pri ljudeh s CKD z metodo testa komet ugotovili povečano poškodbo genoma, ki se je z napredovanjem bolezni še povečevala (Stopper in sod., 2001; Stoyanova in sod., 2010).

5.1.4 Superoksidna dismutaza

Rezultati preliminarne raziskave pri zdravih mačkah so primerljivi z rezultati, ki jih kot referenčne navajajo Todorova in sodelavci (2005). Pri primerjavi aktivnosti SOD pri mačkah v kontrolni skupini in mačkah s CKD ni bilo značilnih razlik ne glede na stopnjo bolezni. Rezultati so v skladu z objavo Keegana in Webba (2010), ki pri mačkah z uremijo nista ugotovila razlike v aktivnosti tega encima. Pri mačkah s CKD se aktivnost SOD z napredovanjem bolezni ne spremeni.

5.1.5 Eritrocitna glutathion peroksidaza

Pri ljudeh s CKD opisujejo povečano (Ceballos Picot in sod., 1996), zmanjšano (Yoshimura in sod., 1997; Sommerburg in sod., 2002) oziroma nespremenjeno (Ozden in sod., 2002, Zachara in sod., 2004; El-Far in sod., 2005) aktivnost eritrocitne GPX.

V naši preliminarni raziskavi pri mačkah s CKD pri primerjavi z zdravimi mačkami ni bilo značilnih razlik v aktivnosti eritrocitne GPX. Tudi med posameznimi stopnjami bolezni po IRIS ni bilo razlik (Krofič Žel in sod., 2014). Zaključimo lahko, da se aktivnost tega encima pri CKD ne spremeni.

5.1.6 Plazemska glutathion peroksidaza in selen

Raziskave pri ljudeh s CKD kažejo, da je aktivnost plazemske GPX ne glede na stopnjo bolezni znižana (Schiavon in sod., 1994; Ceballos-Picot in sod., 1996; Witko-Sarsat in sod., 1998; Zachara in sod., 2004; El-Far in sod., 2005) in navajajo, da je stopnja aktivnosti tega encima primeren diagnostični in prognostični pokazatelj stopnje bolezni in ledvične funkcije (Schiavon in sod., 1994; Ceballos-Picot in sod., 1996).

V preliminarni raziskavi je bila aktivnost plazemske GPX pri mačkah v IRIS IV v primerjavi s kontrolno skupino značilno povečana ($p = 0,025$, $n = 5$), pri mačkah v ostalih stopnjah CKD pa nespremenjena (Krofič Žel in sod., 2014). Rezultati klinične raziskave niso pokazali značilnih razlik v aktivnosti plazemske GPX med posameznimi stopnjami CKD. V klinični raziskavi smo zaradi premajhnega števila podatke pacientov v IRIS III in IV obravnavali skupaj ($n = 12$), v preliminarni raziskavi pa ločeno, zato rezultati niso popolnoma primerljivi. Razlika v rezultatih obeh raziskav je lahko nastala tudi zato, ker je bila v obe raziskavi vključena relativno majhna skupina živali in so na rezultate vplivale individualne razlike med živalmi. Glede na to, da aktivnost plazemske GPX v nobenem primeru ni bila zmanjšana, lahko zaključimo, da antioksidantni mehanizmi pri mačkah s CKD niso iztrošeni.

Mačke s CKD so bile značilno starejše kot mačke v kontrolni skupini. Pri pregledu literaturnih podatkov nismo našli objavljenih rezultatov raziskav, ki bi preučevale vpliv starosti na aktivnost plazemske GPX pri mačkah. Rezultati raziskav pri ljudeh so si nasprotujoči. Raziskave pri starejših ljudeh večinoma ugotavljajo zmanjšanje aktivnosti plazemske GPX (Guemouri in sod., 1991; Mendoza-Núñez in sod., 2007). Nekateri avtorji so ugotovili tudi povečano (Bolzán in sod., 1997; Inal in sod., 2001; Hübner-Woźniak in sod., 2011) ali nespremenjeno aktivnost plazemske GPX (Andersen in sod., 1997; Kasapoglu in Ozben, 2001). Pri starejših psih so ugotovili povečanje aktivnosti plazemske GPX (Vajdovich in sod., 1997; Stowe in sod., 2006). Vpliva značilne razlike v starosti med mačkami s CKD in kontrolno skupino na aktivnost plazemske GPX v naši raziskavi ne moremo izključiti.

Rezultati preliminarne raziskave (Krofič Žel in sod., 2014) kažejo, da se koncentracija selena v serumu pri mačkah s CKD in zdravih mačkah ne razlikuje. V nasprotju z ugotovitvami pri mačkah so pri ljudeh s CKD ugotovili zmanjšano koncentracijo selena v plazmi in polni krvi. Predvidevajo, da je vzrok za to zmanjšan vnos, ki je posledica dietne hrane z zmanjšano vsebnostjo beljakovin in povečano izločanje selena iz telesa zaradi proteinurije (Ceballos-Picot in sod., 1996; Allan in sod., 1999; Zagrodzki in sod., 2007). Pomanjkanje selena navajajo kot enega izmed vzrokov za znižano aktivnost GPX pri ljudeh s CKD (Zagrodzki in sod., 2007), medtem ko druge raziskave tega niso potrdile (Ceballos-Picot in sod., 1996; Zachara in sod., 2004).

Foster in sodelavci (2001) ter Todd in sodelavci (2012) pri zdravih mačkah niso ugotovili korelacije med aktivnostjo plazemske GPX in koncentracijo selena v plazmi. Tovrstna korelacija je bila zaznavna le eksperimentalno, če so mačke zaužile manj selena, kot je priporočeno. V prehrani mačk je ta mikroelement prisoten v zadostni količini (Foster in sod., 2001; Todd in sod., 2012). Zaključimo lahko, da selen pri mačkah ni omejujoč dejavnik in pri mačkah s CKD pri normalni prehrani ne vpliva na aktivnost plazemske GPX.

5.1.7 Celokupna antioksidantna kapaciteta

V preliminarni raziskavi (Krofič Žel in sod., 2014) nismo ugotovili značilnih razlik v plazemski TAC med zdravimi mačkami in mačkami s CKD ne glede na stopnjo bolezni. Podobne rezultate opisujeta Yu in Paetau-Robinson (2006) pri desetih mačkah z začetno stopnjo CKD, medtem ko sta Keegan in Webb (2010) pri mačkah s CKD ugotovila značilno znižano TAC. Razlike v rezultatih lahko pripišemo dejstvu, da Keegan in Webb v raziskavi nista upoštevala razdelitve po IRIS, individualnim razlikam med preučevanimi živalmi in uporabi reagenčnega kompleta drugega proizvajalca.

Glede na to, da nismo ugotovili razlik v koncentraciji MDA, proteinskih karbonilov in stopnji poškodb DNA, povečane stopnje lipidne peroksidacije, oksidativnih poškodb beljakovin in DNA pri mačkah s CKD nismo dokazali. Nadalje ugotavljamo, da aktivnost antioksidantnih encimov SOD, plazemske in eritrocitne GPX ter TAC niso bili zmanjšani, zato lahko zaključimo, da antioksidantni mehanizmi pri mačkah s CKD niso iztrošeni. Pri preliminarni raziskavi smo ugotovili značilno povečano aktivnost plazemske GPX pri mačkah v IRIS IV, kar lahko kaže na prisotnost kompenzatornih mehanizmov kot odgovor na povečan oksidativni stres v tej stopnji bolezni. Sklepamo, da so mehanizmi pojava in napredovanja CKD pri mačkah drugačni kot pri ljudeh.

5.2 DODAJANJE VITAMINA E

5.2.1 Izbrani klinični in laboratorijski parametri ter preživetje

Pri preučevanih pacientih s CKD so bili najpogostejši ugotovljeni klinični znaki zmanjšan apetit, izguba telesne mase, slabost in bruhanje. Klinični znaki so se z napredovanjem bolezni slabšali, kar je v skladu z že objavljenimi podatki (King in sod., 2007; Krofič Žel in sod., 2014, IRIS,

2013b). Seštevek kliničnih znakov se pri mačkah, ki so prejemale vitamin E, v primerjavi s tistimi, ki so prejemale placebo, na koncu raziskave ni značilno razlikoval.

Po dodajanju vitamina E pri mačkah s CKD se serumska koncentracija kreatinina, UPC in sistolični arterijski tlak kot glavni klinični kazalci za napoved napredovanja bolezni in pogin (King in sod., 2007; Elliott in Watson, 2013; Jepson in sod., 2009) niso izboljšali, razen v IRIS I, kjer je bil sistolični arterijski tlak na koncu raziskave značilno nižji pri mačkah, ki so prejemale vitamin E ($p = 0,05$). Mačke, ki so prejemale vitamin E, so bile ves čas raziskave normotenzivne, medtem ko so mačke v placebo imele zmerno povišan sistolični arterijski tlak, ki predstavlja nizko tveganje za poškodbo tarčnih organov. Nobena mačka v IRIS I v času raziskave ni prejela antihipertenzivov; razliko v sistoličnem arterijskem tlaku bi lahko pripisali učinku dajanja vitamina E.

Pri primerjavi specifične gostote urina smo ugotovili precej višjo vrednost tega parametra pri mačkah, ki so prejemale vitamin E kot pri mačkah v placebo skupini, vendar razlika ni bila značilna ($p = 0,083$).

Čas preživetja mačk s CKD je bil značilno odvisen od stopnje CKD pri prvem odvzemu vzorcev. Pri mačkah v IRIS III in IV je bil čas preživetja 2,5 meseca, pri mačkah v IRIS II pa 37,5 mesecev, kar je v skladu z že objavljenimi podatki (Kuwahara in sod., 2006, King in sod., 2007; Boyd in sod., 2008).

Čas preživetja mačk v skupini, ki je prejela vitamin E, se ni značilno razlikoval od časa preživetja mačk, ki so prejemale placebo. Pri mačkah s CKD sta vpliv kombinacije antioksidantov na oksidativni stres preučevala Yu in Paetau-Robinson (2006) in ugotovila značilno zmanjšanje oksidativnih poškodb DNA, vendar izraženosti kliničnih znakov in časa preživetja nista ugotavljala.

Glede na rezultate klinične raziskave lahko povzamemo, da dodajanje vitamina E pri mačkah s CKD ni smiselno, saj ne vpliva na klinični potek CKD in čas preživetja.

5.2.2 Oksidativni stres in antioksidantni status

Ugotovljena koncentracija vitamina E pri mačkah s CKD na začetku raziskave je primerljiva s podatki iz literature (Yu in Paetau-Robinson, 2006) in se je v skupini, ki je prejela vitamin E, pri vseh stopnjah CKD povečala, medtem ko je v placebo skupini ostala nespremenjena. Pri drugem odvzemu vzorcev se je koncentracija vitamina E pri mačkah v IRIS 1 povečala na 154 %, v IRIS II na 119 % in v IRIS III in IV na 172 % prvotne vrednosti. Pri primerjavi koncentracije vitamina E po posameh stopnjah CKD med skupinama placebo in vitamin E pri nobenem odvzemu nismo ugotovili značilnih razlik. Razlika v koncentraciji je bila značilna, če smo združili mačke v vseh stopnjah CKD. Pri primerjavi s skupino placebo je bila koncentracija vitamina E značilno višja pri skupini, ki je prejela vitamin E, štiri ($p = 0,013$) in osem ($p = 0,017$) tednov po začetku raziskave. Na koncu raziskave po 24 tednih je bila koncentracija vitamina E še vedno višja v skupini, ki je prejela vitamin E kot v placebo skupini, vendar razlika ni bila značilna ($p = 0,074$).

Tudi koncentracija lipidno standardiziranega vitamina E v plazmi se je po dajanju vitamina E pri vseh skupinah mačk s CKD, ki so prejemale vitamin E, v vseh vzorcih povečala. Pri primerjavi lipidno standardizirane koncentracije vitamina E po posameh stopnjah CKD med skupino placebo in skupino, ki je prejela vitamin E, smo značilno razliko ugotovili le pri mačkah v IRIS II štiri ($p = 0,041$) in osem ($p = 0,038$) tednov po začetku dajanja vitamina E. Po tem, ko smo združili mačke v vseh stopnjah CKD, smo značilno razliko med skupinama placebo in vitamin E ugotovili štiri ($p = 0,001$) in osem ($p = 0,007$) tednov po začetku dajanja vitamina E. Razlika med skupinama placebo in vitamin E na koncu raziskave (po 24 tednih) ni bila značilna ($p = 0,077$).

Dejstvo, da smo ugotovili značilno razliko v koncentraciji vitamina E med skupinama placebo in vitamin E šele, ko smo združili mačke v vseh stopnjah CKD, bi lahko pripisali majhnemu številu živali v poskusnih skupinah. Drug razlog, da nismo ugotovili značilnega povečanja koncentracije vitamina E v plazmi pri vseh odvzemih in v vseh stopnjah CKD, bi lahko bilo skladiščenje vitamina E v maščobnem tkivu (Plumb, 2015).

Na začetku raziskave nismo pri nobeni mački ugotovili koncentracije vitamina E pod 8,13 $\mu\text{mol/L}$, kar bi nakazovalo na pomanjkanje tega vitamina (Hendriks in sod., 2002). Nekateri lastniki so poročali, da so bile mačke po uvedbi placeba in vitamina E v hrano zaradi drugačnega okusa in vonja manj ješče. Dva lastnika sta zaradi tega, ker je mačka hrano po dodajanju vitamina E oziroma placeba zavračala, po prvem odvzemu prekinila sodelovanje v raziskavi. Mačke so vitamin E dobivale v obliki olja, pomešanega v hrano, saj je vitamin E na ta način najboljše biorazpoložljiv, hkrati pa je povečana možnost variacij v plazemski koncentraciji zaradi bruhanja in različne resorpcije.

Jewell in sodelavci (2000) navajajo, da je za skupno zmanjšanje alkenalov (MDA in HNE) v serumu zdravih mačk potrebno najmanj 540 IE vitamina E na kilogram suhe snovi hrane. Vitamin E je nizko toksičen. Pri zdravih psih ne priporočajo večjega odmerka od 1000–2000 IE/kg suhe snovi hrane, medtem ko pri mačkah največji varen odmerek ni znan. Za različna bolezenska stanja priporočajo tudi večje odmerke (Zicker in Wedekind, 2010). Različni viri priporočajo naslednje odmerke vitamina E kot antioksidanta za mačke: 30 IE/mačko/dan (Ramsey, 2012; Kuehn, 2013); 10–15 IE/kg/dan (Plumb, 2015); do 10–20 IE/kg/12h (Kuehn, 2013). Pripravljena dietna hrana za mačke ima ne glede na priporočila študij dodano količino vitamina E, ki ustreza dnevni vnosu 30–50 IE/mačko/dan.

Mačke v naši raziskavi so prejemale komercialno hrano z vsebnostjo vitamina E 750 IE/kg suhe snovi (30 IE/mačko/dan) in dodatek 100 IE na dan vitamina E v obliki alfa tokoferola, kar je v zgornjem območju odmerjanja (30 IE/kg/dan), ki ga navajajo prej omenjeni viri. Za ta odmerek smo se odločili, ker je zadostil naši predpostavki, da je pri mačkah tako kot pri ljudeh s CKD oksidativni stres prisoten in da je zaradi tega potreba po vitaminu E povečana.

Koncentracija MDA se je pri mačkah, ki so prejemale placebo, med prvim in zadnjim odvzemom povečala. Pri mačkah v IRIS I, ki so prejemale vitamin E, se je koncentracija MDA zmanjšala, pri mačkah v IRIS II pa je ostala nespremenjena. Pri mačkah v IRIS III in IV, ki so prejemale vitamin E, se je koncentracija MDA povečala v manjši meri kot v placebo skupini. Največji učinek dodajanja vitamina E na zmanjšanje koncentracije MDA smo opazili pri mačkah z začetno stopnjo CKD. V nobenem primeru razlika ni bila značilna. Tudi Yu in Paetau-Robinson (2006)

po dodajanju kombinacije antioksidantov nista ugotovila značilnih sprememb v koncentraciji MDA. Pri skupini mačk, ki so prejemale antioksidante, je bila koncentracija tega parametra na koncu raziskave podobno kot v naši raziskavi nekoliko nižja kot v skupini placebo. V omenjeni raziskavi so sicer spremljali manjše število živali, ki so pretežno imele začetno stopnjo CKD. Mačk niso obravnavali glede na stopnjo bolezni, hkrati pa niso ugotavljali učinka posameznih antioksidantov, zato izsledke obeh raziskav težko primerjamo.

Koncentracija proteinskih karbonilov se je pri mačkah v IRIS I v obeh skupinah nekoliko zmanjšala, medtem ko se je pri mačkah v IRIS III in IV v obeh skupinah povečala. Razlika ni bila značilna. Pri mačkah v IRIS II, ki so prejemale vitamin E, se je koncentracija proteinskih karbonilov glede na prvi odvzem zmanjšala za 13 %, pri placebo skupini pa za 25 % povečala. Na koncu raziskave je bila koncentracija proteinskih karbonilov nižja v skupini, ki je prejemale vitamin E kot v placebo skupini, vendar razlika ni bila značilna ($p = 0,086$). Nižjo koncentracijo proteinskih karbonilov v tej skupini bi morda lahko pripisali antioksidantnemu učinku vitamina E.

Pri mačkah v IRIS I in II se je raven poškodb DNA povečala ne glede na to, ali so prejemale vitamin E ali placebo. V nasprotju z našimi ugotovitvami sta Yu in Paetau-Robinson (2006) po dodajanju kombinacije antioksidantov ugotovila zmanjšanje oksidativnih poškodb DNA. Ker so v omenjeni raziskavi mačkam dodajali kombinacijo vitamina E, vitamina C in β karotena, lahko učinek pripišemo kateremukoli naštetemu antioksidantu ali njihovi kombinaciji, tako da rezultati obeh raziskav niso primerljivi.

Pri mačkah v IRIS III in IV se je odstotek jedrne DNA v repu kometov v primerjavi med prvim in četrtem odvzemom vzorcev zmanjšal ne glede na to, ali so prejemale vitamin E ali placebo. Zmanjšan odstotek poškodovane DNA je lahko odraz dejstva, da je velik delež mačk v IRIS III in IV poginil kmalu po prvem odvzemu vzorcev, le-te pa so imele večji odstotek poškodovane DNA od preživelih.

Pri mačkah v IRIS I in II se aktivnost plazemske GPX v skupini, ki je dobivala vitamin E, ni razlikovala od aktivnosti pri placebo skupini. Pri mačkah v IRIS III in IV se je aktivnost plazemske GPX v skupini, ki je prejemale vitamin E, glede na prvi odvzem GPX povečala za 7

%, pri placebo skupini pa za 17 % zmanjšala. Razlika v nobenem primeru ni bila značilna. Glede na rezultate lahko sklepamo, da dodajanje vitamina E v IRIS I in II ni vplivalo na aktivnost plazemske GPX. Aktivnost plazemske GPX pri mačkah v IRIS III in IV se na koncu raziskave med placebo skupino in mačkami, ki so prejemale vitamin E, ni značilno razlikovala. Sklepamo, da tudi v napredujevali stopnji CKD antioksidantni mehanizmi niso bili iztrošeni.

Iz navedenega lahko povzamemo, da dodajanje vitamina E pri mačkah s CKD ne zmanjša oksidativnih poškodb bioloških molekul in ne pripomore k aktivaciji antioksidantnih mehanizmov. Čas preživetja in stopnja izraženosti kliničnih znakov nista spremenila, zato sklepamo, da dodajanje vitamina E k standardnemu zdravljenju ni smiselno, saj mačke večinoma dobivajo pripravljeno hrano, ki ji je že v osnovi dodana visoka koncentracija vitamina E.

Naša raziskava kot prva obravnava celosten pregled dinamike oksidativnega stresa pri mačkah s CKD ter vpliv vitamina E na potek CKD, pri čemer upošteva razvrstitev glede na klinične stopnje bolezni. Glavna omejitev raziskave je majhen vzorec živali, predvsem v IRIS III in IV, kjer je verjetnost za pogin v enem mesecu največja (Kuwahara in sod., 2006). Iz tega razloga so potrebne nadaljnje raziskave na večjem številu mačk. Smiselno bi bilo raziskati, ali je potrebno dodajati vitamin E pri mačkah, ki uživajo izključno doma pripravljeno hrano z nizko vsebnostjo vitamina E in pri tistih mačkah s CKD, ki se iz različnih vzrokov ne zdravijo.

6 ZAKLJUČKI

1. Oksidativnih poškodb bioloških molekul pri mačkah s CKD nismo dokazali pri nobeni stopnji bolezni.
2. Antioksidantni mehanizmi pri mačkah s CKD niso iztrošeni, saj nismo ugotovili značilnih sprememb parametrov oksidativnega stresa.
3. Dodajanje vitamina E mačkam s CKD ne zmanjša oksidativnih poškodb bioloških molekul in ne pripomore k večji antioksidantni kapaciteti.
4. Dodajanje vitamina E k pripravljeni komercialni dietni hrani za mačke s CKD ob standardnem zdravljenju ni smiselno, saj ne zmanjša izražanja kliničnih znakov in ne podaljša časa preživetja.

7 POVZETEK

Kronična ledvična odpoved (CKD) je med najpogostejšimi vzroki pogina pri mačkah. Pri ljudeh in psih s CKD je dokazano stanje oksidativnega stresa, ki pomembno sodeluje pri napredovanju bolezni, saj povzroči stanje kroničnega vnetja, oksidativne poškodbe membranskih in plazemskih lipidov, beljakovin in DNA. Dodajanje antioksidantov, predvsem vitamina E, dokazano zmanjša oksidativni stres, izboljša antioksidantne parametre, zmanjša poškodbe bioloških molekul in izboljša klinično stanje ljudi s CKD.

Pri mačkah s CKD je področje oksidativnega stresa slabo raziskano, zato je bil namen naše raziskave preučiti prisotnost oksidativnega stresa pri mačkah s CKD na vseh kliničnih stopnjah bolezni. Oksidativni stres smo želeli ovrednotiti s stališča poškodb bioloških molekul in antioksidantnega statusa organizma. Končno smo želeli ugotoviti, ali dodatek vitamina E k zdravljenju po priporočilih IRIS izboljša klinično stanje in upočasni napredovanje bolezni.

V preliminarni raziskavi smo pri mačkah s CKD in kontrolni skupini z enkratnim odvzemom krvi določili celokupno antioksidantno kapaciteto (TAC), aktivnost superoksidne dismutaze (SOD), plazemske in eritrocitne glutation peroksidaze (GPX) ter koncentracijo selen v serumu.

V klinični raziskavi smo mačkam s CKD in zdravim mačkam določali koncentracijo malondialdehida (MDA) in proteinskih karbonilov v plazmi, stopnjo poškodbe jedrne DNA limfocitov, aktivnost plazemske GPX in koncentracijo vitamina E v plazmi. Mačke s kronično ledvično odpovedjo smo zdravili v skladu s smernicami IRIS in jim dodajali vitamin E oziroma placebo. Izbrane klinične, hematološke in biokemijske parametre ter parametre oksidativnega stresa in antioksidantnega statusa smo določili pred začetkom zdravljenja in 4, 8, 16 in 24 tednov po začetku zdravljenja.

Pri mačkah s CKD v primerjavi s kontrolno skupino nismo ugotovili razlik v koncentraciji MDA, proteinskih karbonilov in stopnji poškodb DNA. Povečane stopnje lipidne peroksidacije,

oksidativnih poškodb beljakovin in DNA pri mačkah s CKD torej nismo dokazali. Nadalje smo ugotovili, da aktivnost SOD in TAC pri mačkah s CKD v primerjavi z zdravimi živalmi ni bila spremenjena. Tudi koncentracija selen se pri mačkah s CKD v primerjavi z zdravimi živalmi ni razlikovala. V preliminarni raziskavi smo pri mačkah v IRIS IV ugotovili značilno povečano aktivnost plazemske GPX, medtem ko v klinični raziskavi pri primerjavi aktivnosti tega encima pri mačkah v IRIS III in IV z IRIS I in II te razlike ni bilo. Zaključimo lahko, da antioksidantni mehanizmi pri mačkah s CKD niso iztrošeni in da selen ni omejujoč dejavnik.

Pri mačkah v IRIS III in IV smo ugotovili nižjo koncentracijo MDA ($2,76 \pm 0,4 \mu\text{M}$) kot pri mačkah z začetno stopnjo bolezni ($3,66 \pm 0,30 \mu\text{M}$ pri mačkah v IRIS I in $3,86 \pm 1,12 \mu\text{M}$ pri mačkah v IRIS II). Razlika je bila značilna, če smo skupaj primerjali mačke v IRIS I in II s tistimi v IRIS III in IV ($p = 0,037$). Tudi koncentracija proteinskih karbonilov je bila pri mačkah v IRIS III in IV nekoliko nižja ($29,11 \pm 8,69 \text{ nmol/mL}$), kot pri mačkah v IRIS I ($33,30 \pm 12,30 \text{ nmol/mL}$) in II ($35,20 \pm 9,82 \text{ nmol/mL}$), vendar razlika ni bila značilna. Pri primerjavi stopnje poškodb DNA po posameznih stopnjah bolezni nismo ugotovili razlik. Zaključimo lahko, da antioksidantni mehanizmi pri mačkah v napredovalih stopnjah CKD niso iztrošeni.

Dodajanje vitamina E je v primerjavi s placebo skupino v vseh stopnjah CKD nekoliko zmanjšalo nastajanje MDA, vendar razlika ni bila značilna. Dodajanje vitamina E ni imelo vpliva na stopnjo poškodb DNA. Pri mačkah v IRIS II se je po dajanju vitamina E koncentracija proteinskih karbonilov zmanjšala za 13 %, v placebo skupini pa povečala na 125 % začetne vrednosti, vendar razlika ni bila značilna ($p = 0,086$). Povzamemo lahko, da je dodajanje vitamina E ni značilno zmanjšalo oksidativnih poškodb bioloških molekul.

Aktivnost plazemske GPX se je po dodajanju vitamina E pri mačkah v IRIS III in IV povečala za 7 % prvotne vrednosti, vendar razlika ni bila značilna. Mačke v IRIS I, ki so prejemale vitamin E, so imele na koncu raziskave značilno nižji tlak od mačk v skupini placebo ($p = 0,05$). Dodajanje vitamina E ni podaljšalo časa preživetja in ni zmanjšalo izraženosti kliničnih znakov, zato menimo, da ni smiselno.

8 SUMMARY

Chronic kidney disease (CKD) is one of the most common reasons for mortality in cats. Oxidative stress has been identified as an important factor in the progression of the disease in dogs and human patients. It is an important mediator of chronic inflammation and causes oxidative damage to membrane and plasma lipids, proteins and DNA. Antioxidant supplementation decreases oxidative stress, increases antioxidant defence mechanisms, decreases the oxidative damage of biological molecules, and enhances the clinical status in human CKD patients.

The purpose of this study was to test the hypotheses that oxidative stress is present in all clinical stages of feline CKD and that the activity of antioxidant enzymes is lowered. The authors also intended to study whether vitamin E supplementation enhances clinical and antioxidant parameters and reduces oxidative stress in cats with CKD.

In the preliminary study, 28 cats with chronic kidney disease and 30 healthy controls were included. Total antioxidant capacity (TAC), superoxide dismutase (SOD) activity, plasma and erythrocyte glutathion peroxidase (GPX) activity and serum selenium concentration were measured.

A total of 34 cats with chronic kidney disease and 38 healthy controls were included in the clinical study. Plasma malondialdehyde (MDA), protein carbonyls, DNA damage of peripheral lymphocytes, plasma GPX activity, and vitamin E concentration were measured. Cats with CKD were treated according to IRIS guidelines. In addition to standard therapy, they received vitamin E or a placebo. Selected clinical, haematological, biochemical, and antioxidant parameters as well as parameters of oxidative stress were measured at the beginning of the study and after they had been treated for 4, 8, 16, and 24 weeks.

There were no differences in plasma MDA concentration, protein carbonyl concentration or DNA damage in cats with CKD in comparison to the control group. A greater degree of lipid peroxidation and oxidative damage to proteins and DNA was not confirmed in cats with CKD.

Furthermore, there was no difference in SOD and TAC in cats with CKD in comparison to the control group. Serum selenium was not found to be a limiting factor in feline CKD. Plasma GPX activity was found to be significantly increased in cats in IRIS IV in the preliminary study. However, no difference was found in plasma GPX activity in cats with IRIS III and IV compared to cats in IRIS I and II in the clinical study. To conclude, antioxidant parameters were not lowered; therefore, antioxidant defence mechanisms may not be exhausted in feline CKD.

Cats in IRIS III and IV had a lower MDA concentration ($2,76 \pm 0,4 \mu\text{M}$) than cats in IRIS I ($3,66 \pm 0,30 \mu\text{M}$) and II ($3,86 \pm 1,12 \mu\text{M}$). The difference was significant if cats in IRIS I and II were grouped together ($p = 0,037$). Moreover, plasma protein carbonyl concentration in cats with IRIS III and IV ($29,11 \pm 8,69 \text{ nmol/mL}$) was lower than in cats with IRIS I ($33,30 \pm 12,30 \text{ nmol/mL}$) and II ($35,20 \pm 9,82 \text{ nmol/mL}$). The difference was not significant. No difference in DNA damage in peripheral lymphocytes was found. Therefore, antioxidant defence mechanisms may not be exhausted in feline CKD.

Vitamin E supplementation decreased MDA production to some extent, but the difference was not significant. Vitamin E supplementation had no effect on the extent of DNA damage. At the end of the study, protein carbonyl concentration was 13 % lower in the vitamin E group in cats with IRIS II when compared to the values at the beginning of the study. In contrast, there was a 25 % increase of the same parameter in the placebo group. However, the difference was not significant ($p = 0,086$). To sum up, vitamin E supplementation did not significantly decrease oxidative damage to biological molecules.

Furthermore, vitamin E supplementation increased plasma GPX activity in cats with IRIS III and IV to some extent, but the difference was not significant. At the end of the study, cats in IRIS I that received vitamin E had significantly lower systolic blood pressure than cats in the placebo group ($p = 0,05$).

M. Krofič Žel: Vpliv vitamina E na oksidativni stres in potek kronične ledvične odpovedi pri mačkah.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2015. Doktorska disertacija

In general, vitamin E supplementation had no effect on the course of the disease, clinical signs or survival.

9 ZAHVALE

Iskrena hvala mentorici **izr. prof. dr. Alenki Nemec Svete** za vso podporo, vzpodbudo, potrpljenje in požrtvovalnost. Hvala za vaš čas in zaupanje. S svojim znanjem in zagonom dajete zgled, da tudi nemogoče situacije postanejo rešljive.

Iskrena hvala somentorici **prof. dr. Nataši Tozon** za vzpodbudo in pomoč ter za vse kreativne predloge glede raziskovalnega in kliničnega dela. Cenim, da so vaša vrata vedno na stežaj odprta in da najdete prost trenutek, kadarkoli potrebujem vaš nasvet.

Doc. dr. Bojani Žegura za potrpljenje, pomoč in neizčrpno dobro voljo. Vesela sem, da sem lahko sodelovala z vami.

Prof. dr. Tomažu Vovku za pomoč pri določanju malondialdehida in proteinskih karbonilov.

Dr. Gabrijeli Tavčar Kalcher za določanje vitamina E v vzorcih.

Barbari Celinšek, dr. vet. med. in Aleksandru Jenku za pomoč pri obdelavi vzorcev.

Zahvaljujem se veterinarskim tehnikom **Biljani Grubišić, Mojci Juvan, Editi Okršlar, Katarini Ramljak** in **Renati Šušnjara** za oporo in kreativni pristop pri rokovanju z ne vedno kooperativnimi mačjimi pacienti.

Doc. dr. Lari Lusa za pomoč pri statistični analizi podatkov.

Hvala **Juretu, Vesni** in ostalim družinskim članom, saj ste me razvedrili in mi stali ob strani tudi v najbolj stresnih trenutkih. Hvala, ker ste ves čas verjeli, da zmorem.

Mag. Mateji Gaber za lektoriranje disertacije in **Terryju Troyu Jacksonu** za lektoriranje besedila v angleškem jeziku.

Mag. Giti GreCs Smole za pomoč pri citiranju literature.

10 LITERATURA

Aejmelaeus RT, Holm P, Kaukinen U, et al. Age-related changes in the peroxyl radical scavenging capacity of human plasma. *Free Radic Biol Med* 1997; 23(1): 69–57.

Agarwal R. Proinflammatory effects of oxidative stress in chronic renal disease: role of additional angiotensin II blockade. *Am J Renal Physiol* 2003; 284: F863–9.

Allan CB, Lacourciere GM, Stadtman TC. Responsiveness of selenoproteins to dietary selenium. *Annu Rev Nutr* 1999; 19: 1–16.

Allen TA, Polzin DJ, Adams LG. Renal disease. In: Hand MS, Thatcher CD, Remillard RL, Roudebush P eds. *Small animal clinical nutrition*. 4th ed, Topeka: Mark Norris Institute, 2000: 536–604.

Andersen HR, Nielsen JB, Nielsen F, Grandjean P. Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clin Chem* 1997; 43: 562–8.

Arthur JR. The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57: 1825–35.

Avissar N, Ornt D, Yagil Y, et al. Human kidney proximal tubules are the main source of plasma glutathione peroxidase. *Am J Physiol* 1994; 266: C367–75.

Arata S, Ohmi A, Mizukoshi F, Baba K, Setoguchi A, Tsujimoto H. Urinary transforming growth factor- β 1 in feline chronic renal failure. *J Vet Med Sci* 2005; 67(12): 1253–5.

Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 1997; 272(33): 20313–6.

Bhogue RB, Suryakar AN, Joshi NG, Patil RY. Effect of vitamin E supplementation on oxidative stress in hemodialysis patients. *Indian J Clin Biochem* 2008; 23(3): 233–7.

Bolzán AD, Bianchi MS, Bianchi NO. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in human blood: influence of sex, age and cigarette smoking. *Clin Biochem* 1997; 30: 449–54.

Brown SA. Oxidative stress and chronic kidney disease. *Vet Clin Small Anim* 2008; 38: 157–66.

Buranakarl C, Trisiriroj M, Pondeenana S, Tungjitpeanpong T, Jarutakanon P, Panchome R. Relationship between oxidative stress and red blood cell characteristics in renal azotemic dogs. *Res Vet Sci* 2009; 86(2): 309–13.

Ceballos-Picot I, Witko-Sarsat V, Merad-Boudia M, et al. Glutathione antioxidant system as a marker of oxidative stress in chronic renal failure. *Free Radic Biol Med* 1996; 21: 845–53.

Chakrabarti S, Syme HM, Brown CA, Elliott J. Histomorphometry of feline chronic kidney disease and correlation with markers of renal dysfunction. *Vet Pathol* 2012; 50(1):147–55.

Cristol JP, Bosc JY, Badiou S, et al. Erythropoietin and oxidative stress in haemodialysis: beneficial effects of vitamin E supplementation. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12:2312–7.

Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 2003; 3291: 23–38.

Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule nad biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005; 15: 316–28.

De Vecchi AF, Bamonti F, Novembrino C, et al. Free and total plasma malondialdehyde in chronic renal insufficiency and in dialysis patients *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 2524–9.

DiBartola SP, Bateman S. Introduction to fluid therapy. In: DiBartola SP, ed. *Fluid, electrolyte, and acid-base disorders in small animal practice*. 4th ed, St Louis: Saunders, 2012: 331–350.

Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I. Lipid peroxidation cannot be used as a universsal criterion of oxidative stress. *Prog Lipid Res* 2004; 43: 200–27.

Draper HH, Csallany AS, Hadley M. Urinary aldehydes as indicators of lipid peroxidation in vivo. *Free Radical Biol Med* 2000; 29: 1071–7.

Elliott J, Watson ADJ. Overview of the IRIS staging system for CKD. Basel: Novartis, 2013: 4 str.
<http://www.iris-kidney.com/education/staging-system.shtml> (20.mar.2015)

El-Far M, Bakr MA, Farahat SE, El-Fattah EA. Glutathione peroxidase activity in patients with renal disorders. *Clin Exp Nephrol* 2005; 9: 127–31.

Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner Helmward. Chemistry aand biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991; 11: 81–128.

Frantar B. Uporaba infuzijskih raztopin med anestezijo. In: Butinar J, Vintar N, Frantar B, Podgornik D, Seliškar A. *Osnove anestezije malih živali*. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 1997: 87–99.

Foster DJ, Thoday KL, Arthur JR, et al. Selenium status of cats in four regions of the world and comparison with reported incidence of hyperthyroidism in cats in those regions. *Am J Vet Res* 2001; 62: 934–7.

Galle J. Oxidative stress in chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 2135–7.

Geddes RF, Finch NC, Elliott J, Syme HM. Fibroblast growth factor 23 in feline chronic kidney disease. *J Vet Intern Med* 2013; 27: 234–1.

Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med* 2000; 29(11): 1106–14.

Grauer GF. Measurement, interpretation, and implications of proteinuria and albuminuria. *Vet Clin N Am Small Pract* 2007; 37: 283–95.

Greene JP, Lefebvre SL, Wang M, Yang M, Lund EM, Polzin DJ. Risk factors associated with the development of chronic kidney disease in cats evaluated at primary care veterinary hospitals. *J Am Vet Med Assoc* 2014; 244(3): 320–7.

Guemouri L, Artur Y, Herbeth B, Jeandel C, Cuny G, Siest G. Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clin Chem* 1991; 37: 1932–7.

Habenicht LM, Webb TL, Clauss LA, Dow SW, Quimby JM. Urinary cytokine levels in apparently healthy cats and cats with chronic kidney disease. *J Feline Med Surg* 2013; 15(2): 99–104.

Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol Biochem* 2006; 141: 312–22.

Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Clin Pharmacol* 2004; 142: 231–55.

Hendriks WH, Wu YB, Shields RG. Vitamin E requirement of adult cats increases slightly with high dietary intake of polyunsaturated fatty acids *J Nutr* 2002; 132(6 Suppl. 2): 1613S–5S.

Himmelfarb J, McMonagle E, Mc Menamin. Plasma thiol oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure. *Kidney Int* 2000; 58: 2571–78.

Huang D, Ou B, Prior R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 1841–56.

Hübner-Woźniak E, Okecka-Szymańska J, Stupnicki R, Malara M, Kozdroń E. Age-related blood antioxidant capacity in men and women. *J Med Biochem* 2011; 30:103–8.

International Renal Interest Society. IRIS staging of CKD. Basel: Novartis, 2013a:8 str.
<http://www.iris-kidney.com/guidelines/staging.shtml> (20.mar.2015)

International Renal Interest Society: CKD Treatment guidelines. Basel: Novartis, 2013b:14 str.
<http://www.iris-kidney.com/guidelines/recommendations.shtml> (20.mar.2015)

Inal ME, Kanbak G, Sunal E. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. *Clin Chim Acta* 2001; 305: 75–80.

M. Krofič Žel: Vpliv vitamina E na oksidativni stres in potek kronične ledvične odpovedi pri mačkah.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2015. Doktorska disertacija

Jepson RE, Brodbelt D, Vallance C, Syme HM, Elliott J. Evaluation of predictors of the development of azotemia in cats. *J Vet Intern Med* 2009; 23: 806–13.

Jewell DE, Toll PW, Wedekind KJ, Zicker SC. Effect of increasing antioxidants on concentrations of vitamin E and total alkenals in serum of dogs and cats. *Vet Ther* 2000; 4(1): 264–72.

Kan E, Undeger U, Bali M, Basaran N. Assessment of DNA strand breakage by the alkaline COMET assay in dialysis patients and the role of vitamin E supplementation. *Mutat Res* 2002; 26(1/2): 151–9.

Kamal-Eldin A, Appelqvist LÅ. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 1996; 31(1): 671–701.

Kargin F, Fidanci UR. Kidney diseases and antioxidative metabolism in dogs. *Turk J Vet Anim Sci* 2001; 25(4): 607–13.

Kasapoglu M, Ozben T. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative stress markers in aging. *Exp Gerontol* 2001; 36(2): 209–20.

Keegan RF, Webb CB. Oxidative stress and neutrophil function in cats with chronic renal failure. *J Vet Intern Med* 2010; 24: 514–9.

King JN, Tasker S, Gunn-Moore DA, Stehlau G, BENRIC Study Group. Prognostic factors in cats with chronic kidney disease. *J Vet Intern Med* 2007; 21: 906–16.

Korman R, White J. Feline CKD. Current therapies-what is achievable? *J Feline Med Surg* 2013; 15(Suppl. 1): 29–44.

Krofič Žel M, Tozon N, Nemec Svete A. Plasma and erythrocyte glutathione peroxidase activity, serum selenium concentration, and plasma total antioxidant capacity in cats with IRIS stages I-IV chronic kidney disease. *J Vet Intern Med* 2014; 28(1): 130–6.

Kuehn NF: North American companion animal formulary. (online) 10th ed. Port Huron: North American Compendiums, 2013: Vitamin E (2 str.) <https://vsh.nacaf.naccvp.com> (19. jun. 2015)

Kuwahara Y, Ohba Y, Kitoh K, Kuwahara N, Kitagawa H. Association of laboratory data and death within one month in cats with chronic renal failure. *J Small Anim Pract* 2006; 47: 446–50.

Lawler DF, Evans RH, Chase K, et al. The aging feline kidney: a model mortality antagonist? *J Feline Med Surg* 2006; 8: 363–71.

Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, et al. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1994; 233: 346–57.

Locatelli F, Canaud B, Eckardt KU, Stenvinkel P, Wanner C, Zoccali C. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 1272–1280.

M. Krofič Žel: Vpliv vitamina E na oksidativni stres in potek kronične ledvične odpovedi pri mačkah.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2015. Doktorska disertacija

Mates JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *J Toxicol* 2000; 153: 83-104.

McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1969; 244(22): 6049–55.

Mendoza-Núñez VM, Ruiz-Ramos M, Sánchez-Rodríguez MA, Retana-Ugalde R, Muñoz-Sánchez JL. Aging-related oxidative stress in healthy humans. *Tohoku J Exp Med* 2007; 213: 261–8.

Miller NJ, Rice–Evans CA, Davies MJ, et al. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci* 1993; 84: 407–12.

Mitani S, Yabuki A, Sawa M, Chang HS, Yamato O. Intrarenal distributions and changes of angiotensin-converting enzyme and angiotensin-converting enzyme 2 in feline and canine chronic kidney disease. *J Vet Med Sci* 2014; 76(1): 45–50.

Mimić-Oka J, Simić T, Plješa M, Stupar N, Turković S. Oxidative modifications of plasma proteins in different stages of chronic renal failure. *FU Med Biol* 2001; 8(1): 1–5.

Mizuiru S, Ohashi Y. ACE and ACE 2 in kidney disease. *World J Nephrol* 2015; 4(1): 74–82.

Östling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 123: 291–8.

Ozden M, Maral H, Akaydin D, et al. Erythrocyte glutathione peroxidase activity, plasma malondialdehyde and erythrocyte glutathione levels in hemodialysis and CAPD patients. *J Clin Chem Clin Biochem* 2002; 35: 269–73.

Paglia, DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158–69.

Pilz J, Meineke I, Gleiter C. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. *J Chromatogr B* 2000; 742: 315–25.

Plumb DC. Plumb's veterinary drug handbook. (online) Ames: Wiley Blackwell, 2015: Vitamin E (3 str.) <https://www.plumbsveterinarydrugs.com> (19.jun. 2015)

Polzin DJ. Evidence-based step-wise approach to managing chronic kidney disease in dogs and cats. *J Vet Emerg Crit Care* 2013; 23(2): 205–15.

Priya R, Vasudha KC. Antioxidant vitamins in chronic renal failure. *Int J Biomed Res* 2009; 20(1): 67–70.

Pryor WA, Stanley JP. A suggested mechanism for the production of malondialdehyde during the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. Nonenzymatic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation. *J Org Chem* 1975; 40: 3615–7.

M. Krofič Žel: Vpliv vitamina E na oksidativni stres in potek kronične ledvične odpovedi pri mačkah.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2015. Doktorska disertacija

R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing 2015.<http://www.R-project.org/>(15. jun. 2015)

Ramsey I, ed. Small animal formulary. 7th ed. Quedgely: British Small Animal Veterinary Association, 2012:Vitamin E (1 str.)
<http://www.vin.com/members/cms/project/defaultadv1.aspx?pId=286>(19.jun. 2015)

Roudebush P, Polzin DJ, Ross SJ, Towell TL, Adams LG, Forrester SD. Therapies for feline chronic kidney disease, What is the evidence? *J Feline Med Surg* 2009; 11: 195–210.

Schiavon R, Guidi GC, Biasioli S, De Fanti E, Targa L. Plasma glutathione peroxidase activity as an index of renal function. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1994; 32: 759–65.

Silva AC, de Almeida BF, Soeiro CS, Ferreira WL, de Lima VM, Ciarlini PC. Oxidative stress, superoxide production, and apoptosis of neutrophils in dogs with chronic kidney disease. *Can J Vet Res* 2013; 77(2): 136–41.

Singh D Kaur R, Chander V, Chopra K. Antioxidants in the prevention of renal disease. *J Med Food* 2006; 9(4): 443–50

Singh N, McCoy MT, Tice RR, Schneider L. A simple technique for quantitation of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; 175: 184–91.

Sivertsen T, Øvernes G, Østerås O, Nymoen Uand T. LunderT. Plasma vitamin E and blood selenium concentrations in norwegian dairy cows: regional differences and relations to feeding and health. *Acta Vet Scand* 2005; 46(4): 177–91.

Sommerburg O, Grune T, Ehrich JH et al. Adaptation of glutathione-peroxidase activity to oxidative stress occurs in children but not in adult patients with end-stage renal failure undergoing hemodialysis. *Clin Nephrol* 2002; 58(1): 31–6.

Stopper, H, Boullay F, Heidland A, Vienken J, Bahner U. Comet-assay analysis identifies genomic damage in lymphocytes of uremic patients. *Am J Kidney Dis* 2001; 38(2): 296–301.

Stowe HD, Lawler DF, Kealy RD. Antioxidant status of pair-fed labrador retrievers is affected by diet restriction and aging. *J Nutr* 2006; 136: 1844–1848.

Stoyanova E, Sandoval SB, Zuniga LA, et al. Oxidative DNA damage in chronic renal failure patients. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25(3): 879–85.

Sung CC, Hsu YC, Chen CC, Lin YF, Wu CC. Oxidative stress and nucleic acid oxidation in patients with chronic kidney disease. *Oxid Med Cell Longev* 2013; 2013:e301982. (15 str.)<http://dx.doi.org/10.1155/2013/301982> (20.mar.2015)

Syme H. Proteinuria in cats. Prognostic marker or mediator? *J Feline Med Surg* 2009; 11: 211–8.

Syme HM, Markwell PJ, Pfeiffer D, Elliott J. Survival of cats with naturally occurring chronic renal failure is related to severity of proteinuria. *J Vet Intern Med* 2006; 20: 528–35.

M. Krofič Žel: Vpliv vitamina E na oksidativni stres in potek kronične ledvične odpovedi pri mačkah.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2015. Doktorska disertacija

Todd SE, Thomas DG, Bosch G, et al. Selenium status in adult cats and dogs fed high levels of dietary inorganic and organic selenium. *J Anim Sci* 2012; 90: 2549–455.

Todorova I, Simeonova G, Kyuchkova D, Dinev D, Gadjeva V. Reference values of oxidative stress parameters (MDA, SOD, CAT) in dogs and cats. *Comp Clin Pathol* 2005; 13: 190–4.

Thurnham DI, Davies JA, Crump BJ, Situnayake RD, Davis M. The use of different lipids to express serum tocopherol:lipid ratios for the measurement of vitamin E status. *Ann Clin Biochem* 1986; 23: 514–20.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 2000; 35: 206–21.

Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohé R, et al. Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol* 1995; 252: 38–53.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44–84.

Vajdovich P, Gaál T, Szilágyi A, Harnos A. Changes in some red blood cell and clinical laboratory parameters in young and old Beagle dogs. *Vet Res Commun* 1997; 21: 463–70.

Vaziri ND, Dicus M, Ho ND, Boroujerdi-Rad L, Sindhu RK. Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency. *Kidney Int* 2003; 63: 179–85.

Wardle EN. Cellular oxidative processes in relation to renal disease. *Am J Nephrol* 2005; 25: 13–22.

Whitin JC, Bhamre S, Tham DM, Cohen HJ. Extracellular glutathione peroxidase is secreted basolaterally by human renal proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 283: F20–8.

Winbauer AN, Pingree SS, Nuttall KL. Evaluating serum α -tocopherol (vitamin E) in terms of a lipid ratio. *Ann Clin Lab Sci* 1999; 29(3): 185–91.

Witko-Sarsat W, Friedlander M, Khoa TN, et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure 1,2. *J Immunol* 1998; 161: 2524–32.

Yabuki A, Mitani S, Fujiki M, et al. Comparative study of chronic kidney disease in dogs and cats: Induction of myofibroblasts. *Res Vet Sci* 2010; 88: 294–9.

Yoshimura S, Suemizu H, Nomoto Y, et al. Plasma glutathione peroxidase deficiency caused by renal dysfunction. *Nephron* 1996; 73(2): 207–11.

Yu S, Paetau-Robinson I. Dietary supplements of vitamins E and C and β -carotene reduce oxidative stress in cats with renal insufficiency. *Vet Res Commun* 2006; 30: 403–13.

Zachara B, Gromadzinska J, Wasowicz W, Zbrog Z. Red blood cell and plasma glutathione peroxidase activities and selenium concentration in patients with chronic kidney disease: a review. *Acta Biochim Pol* 2006; 53(4): 663–77.

Zagrodzki P, Barton H, Walas S, et al. Selenium status indices, laboratory data, and selected biochemical parameters in end-stage renal disease patients. *Biol Trace Elem Res* 2007; 116: 29–41.

Zhao B, Tham SY, Lu J, Lai MH, Lee LK, Moolchala SM. Simultaneous determination of vitamins C, E and beta-carotene in human plasma by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *J Pharm Biomed Sci*. 2004; 7(2): 200–4.

Zicker SC, Wedekind KJ. Antioxidants. In: Hand MS, Thatcher CD, Remillard RL, Roudebush P, Novotny BJ, eds. *Small animal clinical nutrition*. 5th ed. Topeka: Mark Norris Institute, 2010: 149–55.

11 PRILOGE

11.1 VPRAŠALNIK

1. Ali je vaša mačka redno cepljena?

DA

NE

2. Ali je kastriran/sterilizirana?

DA

NE

3. Katero hrano dobiva (znamka, oblika)?

4. Katere dodatke k hrani je dobila v zadnjem mesecu?

5. Ali je vaša mačka v zadnjem mesecu dobila zdravila?

DA

NE

Če ste odgovorili z »da«, katera?

6. Kdaj je vaša mačka nazadnje jedla?

7. Kdaj je nazadnje pila?

8. Ali vsakodnevno dobiva zdravila?

DA

NE

Če ste odgovorili z »da«, katera?

9. Ali normalno odvaja blato?

DA

NE

10. Kako pogosto odvaja vodo?

NORMALNO

POGOSTO

11. Koliko vode popije?

OBIČAJNO VEČ MANJ

Ocena količine popite vode:

12. Ali je vaša mačka v zadnjem mesecu kazala katere od naštetih znakov bolezni? (ustrezno obkrožite)

Neješčnost Hujšanje Bruhanje Driska Kihanje Kašelj Izcedek iz nosu
ali oči

11.2 PRIPOMOČEK ZA OCENO IZRAŽENOSTI KLINIČNIH ZNAKOV

Tabela 17: Ključ za oceno izraženosti kliničnih znakov

Table 17: Key for severity of clinical signs assessment

Počutje (ocena lastnika)	Odstotek izgube telesne mase	Dehidracija	Apetit	Slabost, bruhanje	Ulceracije v ustni votlini
0 (zelo dobro)	0 (do 5 %)	0 (do 5 %)	0 (normalen)	0 (ne bruha)	0 (niso prisotne)
1 (srednje)	1 (do 10 %)	1 (5 do 10 %)	1 (zmanjšan)	1 (občasno)	1 (prisotne)
2 (slabo)	2 (do 15 %)	2 (>10 %)	2 (neješčnost)	2 (pogosto)	
3 (zelo slabo)	3 (>15 %)				

Legenda: Seštevek točk: 0–4: blagi klinični znaki; 5–7: zaznavni klinični znaki; 8–10: hudi klinični znaki; >10: nesprejemljivi klinični znaki, evtanazija

Legend: Score: 0–4 mild clinical signs; 5–7: moderate clinical signs; 8–10: severe clinical signs; >10: unacceptable clinical signs; euthanasia

M. Krofič Žel: Vpliv vitamina E na oksidativni stres in potek kronične ledvične odpovedi pri mačkah.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2015. Doktorska disertacija

11.3 IZBRANI HEMATOLOŠKI IN BIOKEMIJSKI PARAMETRI PRI MAČKAH S CKD, KI SO BILE VKLJUČENE V RAZISKAVO

Tabela 18: Izbrani hematološki parametri pri mačkah s CKD (povprečje $\pm$ SD) pri prvem odvzemu vzorcev

Table 18: Selected haematological parameters in cats with CKD (mean $\pm$ SD) at the beginning of the study

Stopnja CKD	WBC ($\times 10^9/L$)	neut ($\times 10^9/L$)	lym ($\times 10^9/L$)	mono ($\times 10^9/L$)	eos ($\times 10^9/L$)	baso ($\times 10^9/L$)	luc ($\times 10^9/L$)	RBC ($\times 10^{12}/L$)	Hgb (g/L)	HCT (1/1)	PLT ($\times 10^9/L^1$)	ret (%)	ret ($\times 10^{12}/L$)
I n=7	4,92 $\pm 2,16$	3,03 $\pm 1,69$	1,55 $\pm 0,70$	0,1 $\pm 0,03$	0,59 $\pm 0,29$	0,02 $\pm 0,04$	0,01 $\pm 0,01$	8,72 $\pm 0,82$	121,83 $\pm 11,89$	0,40 $\pm 0,03$	211,33 $\pm 85,00$	0,43 $\pm 0,31$	0,039 $\pm 0,026$
II n=15	7,36 $\pm 3,01$	5,00 $\pm 3,55$	2,33 $\pm 2,23$	0,18 $\pm 0,10$	0,55 $\pm 0,01$	0,01 $\pm 0,01$	0,01 $\pm 0,01$	8,90 $\pm 1,40$	121,57 $\pm 18,25$	0,40 $\pm 0,06$	324,50 $\pm 178,55$	0,35 $\pm 0,24$	0,038 $\pm 0,022$
III+IV n=12	10,24 $\pm 3,75$	8,2 $\pm 3,45$	1,47 $\pm 0,34$	0,29 $\pm 0,20$	0,41 $\pm 0,36$	0,00 $\pm 0,00$	0,02 $\pm 0,03$	6,89 $\pm 1,17$	100,58 $\pm 20,07$	0,33 $\pm 0,06$	340,42 $\pm 115,04$	0,22 $\pm 0,13$	0,024 $\pm 0,040$

Legenda: CKD kronična ledvična odpoved; SD standardna deviacija; WBC levkociti; neut nevtrofilni granulociti; lym limfociti; mono monociti; eos eozinofilni granulociti; baso bazofilni granulociti; luc velike peroksidazno neaktivne celice; RBC eritrociti; Hgb hemoglobin; HCT hematokrit; PLT trombociti; ret retikulociti; n število mačk

Legend: CKD Chronic Kidney Disease; SD Standard Deviation; WBC White Blood Cells; neut Neutrophils; lym Lymphocytes; mono Monocytes; eos Eosinophils; baso Basophils; luc Large Unstained Cells; RBC Red Blood Cells; HgbHemoglobin; HCT Hematocrit; PLT Platelets; ret reticulocytes; n number of cats

M. Krofič Žel: Vpliv vitamina E na oksidativni stres in potek kronične ledvične odpovedi pri mačkah.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2015. Doktorska disertacija

Tabela 19: Izbrani biokemijski parametri (povprečje $\pm$ SD) pri mačkah s CKD pri prvem odvzemu vzorcev

Table 19: Selected biochemical parameters (mean $\pm$ SD) in cats with CKD at the beginning of the study

Stopnja CKD	Na (mmol/L)	K (mmol/L)	Cl (mmol/L)	Ca (mmol/L)	aP (mmol/L)	Sečnina (mmol/L)	Kreatinin (μ mol/L)	AP (U/L)	ALT (U/L)	TP (g/L)	Albumini (g/L)	Holesterol-skupni (mmol/L)	Trigliceridi (mmol/L)
I n=7	154,71 $\pm$ 2,62	4,33 $\pm$ 0,37	121,93 $\pm$ 2,49	2,50 $\pm$ 0,15	1,36 $\pm$ 0,23	10,44 $\pm$ 3,17	133,24 $\pm$ 6,53	22,36 $\pm$ 5,73	49,16 $\pm$ 10,81	75,02 $\pm$ 5,55	33,45 $\pm$ 2,02	5,43 $\pm$ 1,56	0,94 $\pm$ 0,67
II n=15	155,06 $\pm$ 5,74	4,47 $\pm$ 0,61	122,37 $\pm$ 5,24	2,60 $\pm$ 0,15	1,40 $\pm$ 0,31	11,83 $\pm$ 4,47	178,38 $\pm$ 29,01	24,70 $\pm$ 9,11	46,69 $\pm$ 16,30	75,56 $\pm$ 4,90	32,53 $\pm$ 4,21	5,16 $\pm$ 1,86	0,62 $\pm$ 0,34
III+IV n=12	150,56 $\pm$ 3,45	4,75 $\pm$ 1,03	116,93 $\pm$ 3,72	2,56 $\pm$ 0,22	3,75 $\pm$ 1,36	51,52 $\pm$ 15,01	703,47 $\pm$ 225,92	14,53 $\pm$ 5,24	71,31 $\pm$ 35,27	83,01 $\pm$ 7,37	32,65 $\pm$ 3,65	5,99 $\pm$ 2,71	0,90 $\pm$ 0,25

Legenda: CKD kronična ledvična odpoved; SD standardna deviacija; Na natrij; K kalij; Cl klorid; Ca kalcij; aP anorganski fosfat; AP alkalna fosfataza; ALT alanin-aminotransferaza; TP skupne beljakovine; n število mačk

Legend: CKD Chronic Kidney Disease; SD Standard Deviation; Na Sodium; K Potassium; Cl Chloride; Ca Calcium; aP Inorganic Phosphate; AP Alkaline Phosphatase; ALT Alanine Aminotransferase; TP Total Proteins; n number of cats

M. Krofič Žel: Vpliv vitamina E na oksidativni stres in potek kronične ledvične odpovedi pri mačkah.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2015. Doktorska disertacija

Tabela 20: Izbrani hematološki parametri (povprečje $\pm$ SD) pri mačkah s CKD IRIS I

Table 20: Selected hematological parameters (mean $\pm$ SD) in cats with CKD IRIS I

Odvzem		WBC ($\times 10^9/L$)	neut ($\times 10^9/L$)	lym ($\times 10^9/L$)	mono ($\times 10^9/L$)	eos ($\times 10^9/L$)	baso ($\times 10^9/L$)	luc ($\times 10^9/L$)	RBC ($\times 10^{12}/L$)	Hgb (g/L)	HCT	PLT ($\times 10^9/L$)	ret (%)	ret ($\times 10^{12}/L$)
1	Vitamin E n=3	5,19 $\pm 2,58$	3,39 $\pm 1,96$	1,52 $\pm 1,01$	0,11 $\pm 0,04$	0,50 $\pm 0,14$	0,00 $\pm 0,00$	0,00 $\pm 0,01$	8,40 $\pm 1,05$	116,67 $\pm 14,36$	0,39 $\pm 0,05$	157,33 $\pm 70,19$	0,43 $\pm 0,25$	0,039 $\pm 0,021$
	Placebo n=4	4,64 $\pm 2,18$	2,67 $\pm 1,71$	1,59 $\pm 0,45$	0,09 $\pm 0,02$	0,68 $\pm 0,45$	0,03 $\pm 0,06$	0,01 $\pm 0,01$	9,04 $\pm 0,5$	127 $\pm 8,19$	0,41 $\pm 0,02$	265,33 $\pm 69,29$	0,43 $\pm 0,42$	0,040 $\pm 0,04$
2	Vitamin E n=1	3,86 -	2,19 -	1,28 -	0,11 -	0,27 -	0,01 -	0,01 -	7,77 -	114,00 -	0,36 -	265,00 -	0,10 -	0,011 -
	Placebo n=4	4,94 $\pm 0,88$	2,89 $\pm 0,48$	1,56 $\pm 0,92$	0,10 $\pm 0,03$	0,38 $\pm 0,34$	0,00 $\pm 0,01$	0,01 $\pm 0,02$	9,31 $\pm 0,55$	132,33 $\pm 9,29$	0,43 $\pm 0,03$	174,00 $\pm 65,14$	0,37 $\pm 0,29$	0,033 $\pm 0,026$
3	Vitamin E n=3	5,51 $\pm 2,71$	2,63 $\pm 1,47$	2,23 $\pm 1,27$	0,09 $\pm 0,02$	0,55 $\pm 0,15$	0,00 $\pm 0,01$	0,01 $\pm 0,01$	8,87 $\pm 1,19$	118,33 $\pm 10,97$	0,40 $\pm 0,04$	207,67 $\pm 66,40$	0,53 $\pm 0,45$	0,052 $\pm 0,048$
	Placebo n=3	4,83 $\pm 2,19$	2,80 $\pm 1,49$	1,33 $\pm 0,74$	0,13 $\pm 0,10$	0,55 $\pm 0,15$	0,01 $\pm 0,02$	0,00 $\pm 0,01$	8,77 $\pm 0,20$	127,00 $\pm 2,00$	0,40 $\pm 0,02$	218,00 $\pm 66,16$	0,50 $\pm 0,61$	0,042 $\pm 0,050$
4	Vitamin E n=3	5,32 $\pm 1,73$	2,68 $\pm 1,02$	1,94 $\pm 1,01$	0,13 $\pm 0,06$	0,56 $\pm 0,09$	0,00 $\pm 0,00$	0,01 $\pm 0,01$	8,63 $\pm 1,64$	109,00 $\pm 16,52$	0,38 $\pm 0,06$	242,67 $\pm 66,21$	0,30 $\pm 0,20$	0,027 $\pm 0,023$
	Placebo n=3	5,58 $\pm 2,38$	3,49 $\pm 1,99$	1,39 $\pm 0,99$	0,14 $\pm 0,10$	0,55 $\pm 0,27$	0,01 $\pm 0,01$	0,01 $\pm 0,02$	9,21 $\pm 0,56$	123,00 $\pm 7,55$	0,40 $\pm 0,04$	211,00 $\pm 95,17$	0,30 $\pm 0,10$	0,027 $\pm 0,007$
5	Vitamin E n=3	5,54 $\pm 1,59$	3,19 $\pm 1,05$	2,01 $\pm 1,20$	0,11 $\pm 0,01$	0,22 $\pm 0,03$	0,00 $\pm 0,00$	0,01 $\pm 0,00$	9,18 $\pm 0,76$	118,00 $\pm 6,08$	0,38 $\pm 0,01$	142,67 $\pm 87,96$	0,40 $\pm 0,36$	0,040 $\pm 0,04$
	Placebo n=3	5,43 $\pm 1,72$	2,88 $\pm 0,45$	1,92 $\pm 1,08$	0,09 $\pm 0,01$	0,64 $\pm 0,22$	0,00 $\pm 0,01$	0,01 $\pm 0,01$	8,59 $\pm 0,98$	115,33 $\pm 13,87$	0,38 $\pm 0,03$	210,33 $\pm 78,01$	0,37 $\pm 0,23$	0,030 $\pm 0,020$

Legenda: SD standardna deviacija; WBC levkociti; neut nevtrofilni granulociti; lym limfociti; mono monociti; eos eozinofilni granulociti; baso bazofilni granulociti; luc velike peroksodazno neaktivne celice; RBC eritrociti; Hgb hemoglobin; HCT hematokrit; PLT trombociti; ret retikulociti; n število mačk

Legend: SD Standard Deviation; WBC White Blood Cells; neut Neutrophils; lym Lymphocytes; mono Monocytes; eos Eosinophils; baso Basophils; luc Large Unstained Cells; RBC Red Blood Cells; Hgb Hemoglobin; HCT Hematocrit; PLT Platelets; ret reticulocytes; n number of cats

M. Krofič Žel: Vpliv vitamina E na oksidativni stres in potek kronične ledvične odpovedi pri mačkah.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2015. Doktorska disertacija

Tabela 21: Izbrani hematološki parametri (povprečje $\pm$ SD) pri mačkah s CKD IRIS II

Table 21: Selected hematological parameters (mean $\pm$ SD) in cats with CKD IRIS II

Odvzem		WBC ($\times 10^9/L$)	neut ($\times 10^9/L$)	lym ($\times 10^9/L$)	mono ($\times 10^9/L$)	eos ($\times 10^9/L$)	baso ($\times 10^9/L$)	luc ($\times 10^9/L$)	RBC ($\times 10^{12}/L$)	Hgb (g/L)	HCT	PLT ($\times 10^9/L$)	ret (%)	ret ($\times 10^{12}/L$)
1	Vitamin E n=7	7,11 $\pm 4,02$	3,43 $\pm 1,19$	3,02 $\pm 3,39$	0,15 $\pm 0,06$	0,49 $\pm 0,32$	0,01 $\pm 0,01$	0,02 $\pm 0,02$	8,91 $\pm 1,76$	120,67 $\pm 17,45$	0,40 $\pm 0,06$	316,50 $\pm 167,28$	0,19 $\pm 0,16$	0,029 $\pm 0,020$
	Placebo n=8	7,56 $\pm 2,26$	5,99 $\pm 4,32$	1,81 $\pm 0,54$	0,21 $\pm 0,12$	0,59 $\pm 0,31$	0,01 $\pm 0,02$	0,01 $\pm 0,01$	8,90 $\pm 1,19$	122,25 $\pm 19,99$	0,40 $\pm 0,06$	330,50 $\pm 197,80$	0,46 $\pm 0,23$	0,04 $\pm 0,02$
2	Vitamin E n=6	5,81 $\pm 2,46$	3,11 $\pm 1,36$	1,59 $\pm 0,39$	0,12 $\pm 0,07$	0,97 $\pm 1,91$	0,00 $\pm 0,01$	0,02 $\pm 0,02$	9,53 $\pm 1,27$	130,80 $\pm 11,95$	0,42 $\pm 0,04$	251,80 $\pm 142,14$	0,32 $\pm 0,25$	0,032 $\pm 0,028$
	Placebo n=7	10,64 $\pm 6,02$	7,75 $\pm 5,94$	1,90 $\pm 0,70$	0,28 $\pm 0,29$	0,68 $\pm 0,45$	0,00 $\pm 0,01$	0,02 $\pm 0,04$	8,94 $\pm 1,06$	121,43 $\pm 17,70$	0,40 $\pm 0,04$	370,57 $\pm 208,09$	0,24 $\pm 0,14$	0,021 $\pm 0,012$
3	Vitamin E n=4	7,42 $\pm 4,50$	2,62 $\pm 0,82$	4,00 $\pm 3,48$	0,14 $\pm 0,06$	0,66 $\pm 0,37$	0,00 $\pm 0,00$	0,01 $\pm 0,01$	9,37 $\pm 0,59$	135,00 $\pm 12,49$	0,43 $\pm 0,04$	233,00 $\pm 30,79$	0,30 $\pm 0,17$	0,025 $\pm 0,015$
	Placebo n=6	7,50 $\pm 1,81$	4,74 $\pm 1,48$	1,80 $\pm 0,55$	0,25 $\pm 0,15$	0,70 $\pm 0,39$	0,00 $\pm 0,01$	0,02 $\pm 0,02$	8,84 $\pm 1,12$	118,33 $\pm 17,55$	0,39 $\pm 0,05$	321,33 $\pm 142,21$	0,32 $\pm 0,21$	0,027 $\pm 0,019$
4	Vitamin E n=6	5,47 $\pm 2,37$	2,78 $\pm 0,89$	2,17 $\pm 1,30$	0,12 $\pm 0,04$	0,39 $\pm 0,43$	0,00 $\pm 0,01$	0,01 $\pm 0,01$	8,71 $\pm 0,79$	119,40 $\pm 14,84$	0,39 $\pm 0,04$	256,40 $\pm 37,71$	0,28 $\pm 0,18$	0,023 $\pm 0,016$
	Placebo n=4	7,77 $\pm 2,76$	3,91 $\pm 2,41$	2,87 $\pm 0,53$	0,22 $\pm 0,17$	0,76 $\pm 0,43$	0,00 $\pm 0,00$	0,01 $\pm 0,01$	9,16 $\pm 1,29$	120,25 $\pm 19,59$	0,41 $\pm 0,07$	288,75 $\pm 149,36$	0,55 $\pm 0,39$	0,052 $\pm 0,037$
5	Vitamin E n=5	4,97 $\pm 0,52$	2,86 $\pm 0,37$	1,50 $\pm 0,40$	0,13 $\pm 0,04$	0,46 $\pm 0,34$	0,00 $\pm 0,01$	0,01 $\pm 0,01$	9,27 $\pm 2,02$	124,80 $\pm 19,99$	0,41 $\pm 0,06$	262,40 $\pm 80,61$	0,26 $\pm 0,17$	0,03 $\pm 0,01$
	Placebo n=5	10,04 $\pm 3,60$	6,43 $\pm 3,94$	2,74 $\pm 1,18$	0,30 $\pm 0,24$	0,53 $\pm 0,27$	0,01 $\pm 0,01$	0,02 $\pm 0,02$	9,13 $\pm 0,64$	124,00 $\pm 9,41$	0,41 $\pm 0,04$	271,40 $\pm 156,08$	0,32 $\pm 0,11$	0,03 $\pm 0,01$

Legenda: SD standardna deviacija; WBC levkociti; neut nevtrofilni granulociti; lym limfociti; mono monociti; eos eozinofilni granulociti; baso bazofilni granulociti; luc velike peroksidazno neaktivne celice RBC eritrociti; Hgb hemoglobin; HCT hematokrit; PLT trombociti; ret retikulociti; n število mačk

Legend: SD Standard Deviation; WBC White Blood Cells; neut Neutrophils; lym Lymphocytes; mono Monocytes; eos Eosinophils; baso Basophils; luc Large Unstained Cells; RBC Red Blood Cells; Hgb Hemoglobin; HCT Hematocrit; PLT Platelets; ret reticulocytes; n number of cats

M. Krofič Žel: Vpliv vitamina E na oksidativni stres in potek kronične ledvične odpovedi pri mačkah.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2015. Doktorska disertacija

Tabela 22: Izbrani hematološki parametri (povprečje $\pm$ SD; vrednost pri n = 1) pri mačkah s CKD IRIS III in IV

Table 22: Selected hematological parameters (mean $\pm$ SD; value if n = 1) in cats with CKD IRIS III and IV

Odvzem		WBC ($\times 10^9/L$)	neut ($\times 10^9/L$)	lym ($\times 10^9/L$)	mono ($\times 10^9/L$)	eos ($\times 10^9/L$)	baso ($\times 10^9/L$)	luc ($\times 10^9/L$)	RBC ($\times 10^{12}/L$)	Hgb (g/L)	HCT	PLT ($\times 10^9/L^1$)	ret (%)	ret ($\times 10^{12}/L$)
1	Vitamin E n=8	11,34 $\pm 3,70$	9,03 $\pm 3,43$	1,47 $\pm 0,35$	0,35 $\pm 0,22$	0,46 $\pm 0,42$	0,00 $\pm 0,00$	0,03 $\pm 0,03$	7,03 $\pm 1,32$	103,00 $\pm 24,45$	0,34 $\pm 0,07$	368,38 $\pm 110,49$	0,16 $\pm 0,10$	0,010 $\pm 0,010$
	Placebo n=4	8,49 $\pm 2,93$	6,54 $\pm 3,28$	1,48 $\pm 0,36$	0,16 $\pm 0,07$	0,31 $\pm 0,22$	0,00 $\pm 0,00$	0,00 $\pm 0,01$	6,62 $\pm 0,89$	95,75 $\pm 5,91$	0,31 $\pm 0,03$	284,50 $\pm 117,41$	0,33 $\pm 0,10$	0,050 $\pm 0,070$
2	Vitamin E n=4	8,22 $\pm 5,27$	6,01 $\pm 3,47$	1,69 $\pm 1,46$	0,24 $\pm 0,15$	0,27 $\pm 0,26$	0,00 $\pm 0,00$	0,00 $\pm 0,00$	7,56 $\pm 0,35$	108,67 $\pm 14,98$	0,34 $\pm 0,05$	350,00 $\pm 186,66$	0,13 $\pm 0,06$	0,011 $\pm 0,007$
	Placebo n=2	9,50 $\pm 3,27$	6,94 $\pm 2,31$	2,21 $\pm 0,81$	0,19 $\pm 0,18$	0,17 $\pm 0,02$	0,00 $\pm 0,00$	0,01 $\pm 0,01$	7,32 $\pm 0,47$	99,50 $\pm 6,36$	0,33 $\pm 0,01$	280,00 $\pm 11,31$	0,25 $\pm 0,07$	0,018 $\pm 0,006$
3	Vitamin E n=3	6,51 $\pm 3,01$	4,13 $\pm 2,31$	1,78 $\pm 1,22$	0,22 $\pm 0,08$	0,38 $\pm 0,22$	0,00 $\pm 0,00$	0,00 $\pm 0,01$	7,97 $\pm 1,83$	113,67 $\pm 34,31$	0,37 $\pm 0,11$	176,33 $\pm 186,74$	0,30 $\pm 0,10$	0,025 $\pm 0,012$
	Placebo n=1	7,25 -	4,69 -	2,01 -	0,10 -	0,42 -	0,01 -	0,02 -	7,67 -	107,00 -	0,34 -	274,00 -	0,40 -	0,031 -
4	Vitamin E n=2	11,34 $\pm 9,64$	8,49 $\pm 9,52$	1,97 $\pm 0,05$	0,42 $\pm 0,36$	0,45 $\pm 0,17$	0,00 $\pm 0,00$	0,01 $\pm 0,01$	7,41 $\pm 2,22$	107,50 $\pm 43,13$	0,35 $\pm 0,13$	317,50 $\pm 27,58$	0,25 $\pm 0,07$	0,018 $\pm 0,009$
	Placebo n=2	7,54 $\pm 1,56$	5,41 $\pm 2,02$	1,69 $\pm 0,23$	0,14 $\pm 0,11$	0,29 $\pm 0,36$	0,01 $\pm 0,01$	0,02 $\pm 0,02$	7,69 $\pm 0,35$	108,00 $\pm 4,24$	0,35 $\pm 0,01$	248,00 $\pm 28,28$	0,25 $\pm 0,07$	0,021 $\pm 0,008$
5	Vitamin E n=1	12,69 -	8,69 -	2,89 -	0,27 -	0,83 -	0,02 -	0,00 -	4,78 -	64,00 -	0,20 -	73 -	0,40 -	0,021 -
	Placebo n=1	7,86 -	5,66 -	1,36 -	0,14 -	0,69 -	0,00 -	0,01 -	7,21 -	101,00 -	0,33 -	295,00 -	0,10 -	0,010 -

Legenda: CKD kronična ledvična odpoved; SD standardna deviacija; WBC levkociti; neut nevtrofilni granulociti; lym limfociti; mono monociti; eos eozinofilni granulociti; baso bazofilni granulociti; luc velike peroksidazno neaktivne celice; RBC eritrociti; Hgb hemoglobin; HCT hematokrit; PLT trombociti; ret retikulociti; n število mačk

Legend: CKD Chronic Kidney Disease; SD Standard Deviation; WBC White Blood Cells; neut Neutrophils; lym Lymphocytes; mono Monocytes; eos Eosinophils; baso Basophils; luc Large Unstained Cells; RBC Red Blood Cells; Hgb Hemoglobin; HCT Hematocrit; PLT Platelets; ret reticulocytes; n number of cats

M. Krofič Žel: Vpliv vitamina E na oksidativni stres in potek kronične ledvične odpovedi pri mačkah.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2015. Doktorska disertacija

Tabela 23: Izbrani biokemijski parametri (povprečje $\pm$ SD; vrednost pri n = 1) pri mačkah s CKD IRIS I

Table 23: Selected biochemical parameters (mean $\pm$ SD; value in n = 1) in cats with CKD IRIS I

Odvzem		Na (mmol/L)	K (mmol/L)	Cl (mmol/L)	Ca (mmol/L)	aP (mmol/L)	Sečnina (mmol/L)	Kreatinin (μmol/L)	AP (U/L)	ALT (U/L)	TP (g/L)	Albumini (g/L)	Holesterol kupni (mmol/L)	Trigliceridi (mmol/L)
1	Vitamin E n=3	155,43 ± 3,33	4,35 ± 0,47	120,55 ± 2,32	2,45 ± 0,20	1,45 ± 0,27	10,85 ± 4,39	132,00 ± 5,94	25,23 ± 5,40	50,85 ± 14,76	76,78 ± 5,19	34,74 ± 0,99	5,21 ± 2,16	1,19 ± 0,83
	Placebo n=4	155,43 ± 3,33	4,35 ± 0,47	120,55 ± 2,32	2,45 ± 0,20	1,45 ± 0,27	10,85 ± 4,39	132,00 ± 5,94	25,23 ± 5,40	50,85 ± 14,76	76,78 ± 5,19	34,74 ± 0,99	5,21 ± 2,16	1,19 ± 0,83
2	Vitamin E n=2	150,70 -	4,29 -	120,30 -	2,50 ± 0,01	1,30 ±0,18	8,47 ± 0,47	137,98 ± 0,81	19,05 ± 8,13	48,10 ± 4,24	71,34 ± 0,37	32,75 ± 2,19	6,50 ± 0,75	0,41 ± 0,16
	Placebo n=4	155,60 ± 2,12	4,62 ± 0,27	121,20 ± 1,49	2,48 ± 0,18	1,54 ± 0,07	9,18 ± 3,35	145,36 ± 12,49	28,60 ± 5,25	51,38 ± 25,32	77,65 ± 9,25	34,00 ±0,82	4,83 ± 1,27	0,85 ± 0,44
3	Vitamin E n=3	153,10 ± 1,56	4,43 ± 0,20	121,33 ± 0,98	2,44 ± 0,04	1,31 ± 0,19	10,47 ± 1,67	144,52 ± 21,90	21,13 ± 3,37	47,77 ± 11,79	72,59 ± 11,49	31,75 ± 0,22	6,31 ± 0,49	0,93 ± 0,43
	Placebo n=3	156,00 ± 2,12	4,53 ± 0,13	122,10 ± 0,14	2,58 ± 0,25	1,43 ± 0,19	10,11 ± 3,81	141,04 ± 15,28	23,20 ± 16,53	44,80 ± 6,36	77,1 ± 6,01	32,62 ± 1,25	4,90 ± 0,35	0,73 ± 0,39
4	Vitamin E n=3	152,63 ± 1,39	4,06 ± 0,39	122,63 ± 0,90	2,43 ± 0,04	1,40 ± 0,08	9,15 ± 0,69	136,30 ± 36,87	24,03 ± 4,43	49,63 ± 8,28	71,65 ± 10,20	31,98 ± 1,32	4,91 ± 1,11	0,52 ± 0,17
	Placebo n=3	155,73 ± 2,40	4,47 ± 0,47	121,53 ± 1,77	2,62 ± 0,08	1,53 ± 0,18	9,74 ± 2,22	140,39 ± 42,70	21,60 ± 7,99	43,40 ± 1,95	71,27 ± 2,21	32,85 ± 1,60	4,24 ± 1,50	0,69 ± 0,33
5	Vitamin E n=3	153,20 ± 0,78	4,09 ± 0,24	121,37 ± 0,75	2,55 ± 0,10	1,26 ± 0,25	10,02 ± 0,82	129,17 ± 11,53	26,23 ± 8,31	45,17 ± 6,62	71,29 ± 6,01	31,87 ± 0,99	5,77 ± 0,63	1,57 ± 1,65
	Placebo n=3	154,23 ± 2,50	4,47 ± 0,51	121,33 ± 1,44	2,48 ± 0,09	1,61 ± 0,07	9,95 ± 3,65	142,08 ± 35,75	18,40 ± 5,03	37,87 ± 6,60	75,84 ± 7,12	33,35 ± 1,06	4,59 ± 0,34	0,88 ± 0,53

Legenda: CKD kronična ledvična odpoved; SD standardna deviacija; Na natrij; K kalij; Cl klorid; Ca kalcij; aP anorganski fosfat; AP alkalna fosfataza; ALT alanin-aminotransferaza; TP skupne beljakovine; n število mačk

Legend: CKD Chronic Kidney Disease; SD Standard Deviation; Na Sodium; K Potassium; Cl Chloride; Ca Calcium; aP Inorganic Phosphate; AP Alkaline Phosphatase; ALT Alanine Aminotransferase; TP Total Proteins; n number of cats

M. Krofič Žel: Vpliv vitamina E na oksidativni stres in potek kronične ledvične odpovedi pri mačkah.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2015. Doktorska disertacija

Tabela 24: Izbrani biokemijski parametri (povprečje $\pm$ SD) pri mačkah s CKD IRIS II

Table 24: Selected biochemical parameters (mean $\pm$ SD) in cats with CKD IRIS II

Odvzem		Na (mmol/L)	K (mmol/L)	Cl (mmol/L)	Ca (mmol/L)	aP (mmol/L)	Sečnina (mmol/L)	Kreatinin (μ mol/L)	AP (U/L)	ALT (U/L)	TP (g/L)	Albumini (g/L)	Holesterol- skupni (mmol/L)	Trigliceridi (mmol/L)
1	Vitamin E n=7	157,50 $\pm$ 7,13	4,72 $\pm$ 0,62	125,72 $\pm$ 4,80	2,61 $\pm$ 0,21	1,32 $\pm$ 0,13	9,57 $\pm$ 1,31	169,70 $\pm$ 19,72	28,26 $\pm$ 12,97	37,22 $\pm$ 15,39	75,52 $\pm$ 4,86	32,52 $\pm$ 2,90	5,22 $\pm$ 1,95	0,48 $\pm$ 0,08
	Placebo n=8	153,24 $\pm$ 4,00	4,28 $\pm$ 0,56	119,86 $\pm$ 4,22	2,59 $\pm$ 0,11	1,45 $\pm$ 0,40	13,52 $\pm$ 5,31	184,89 $\pm$ 34,23	22,48 $\pm$ 5,62	52,61 $\pm$ 14,70	75,59 $\pm$ 5,27	32,53 $\pm$ 5,19	5,12 $\pm$ 1,91	0,73 $\pm$ 0,43
2	Vitamin E n=6	153,93 $\pm$ 1,48	4,45 $\pm$ 0,49	122,23 $\pm$ 2,34	2,60 $\pm$ 0,14	1,34 $\pm$ 0,25	11,11 $\pm$ 4,09	174,12 $\pm$ 32,87	32,38 $\pm$ 13,41	74,20 $\pm$ 66,02	76,77 $\pm$ 4,35	32,11 $\pm$ 1,88	5,75 $\pm$ 1,31	0,63 $\pm$ 0,11
	Placebo n=7	153,76 $\pm$ 1,95	4,35 $\pm$ 0,61	121,86 $\pm$ 2,02	2,56 $\pm$ 0,09	1,42 $\pm$ 0,34	12,66 $\pm$ 3,87	189,08 $\pm$ 56,35	26,06 $\pm$ 11,35	61,52 $\pm$ 10,34	74,69 $\pm$ 4,87	30,77 $\pm$ 4,75	5,71 $\pm$ 2,53	0,94 $\pm$ 0,90
3	Vitamin E n=4	153,70 $\pm$ 1,43	4,38 $\pm$ 0,60	120,43 $\pm$ 1,84	2,55 $\pm$ 0,21	1,41 $\pm$ 0,23	14,35 $\pm$ 8,73	204,43 $\pm$ 41,45	21,98 $\pm$ 9,32	72,00 $\pm$ 66,64	76,42 $\pm$ 7,51	33,33 $\pm$ 3,24	5,58 $\pm$ 1,18	0,64 $\pm$ 0,32
	Placebo n=6	154,37 $\pm$ 1,97	4,79 $\pm$ 0,73	123,35 $\pm$ 2,42	2,51 $\pm$ 0,10	1,32 $\pm$ 0,25	15,35 $\pm$ 10,58	193,57 $\pm$ 95,57	22,05 $\pm$ 7,63	59,10 $\pm$ 7,48	75,26 $\pm$ 5,90	31,09 $\pm$ 4,24	6,01 $\pm$ 2,42	0,71 $\pm$ 0,44
4	Vitamin E n=6	152,10 $\pm$ 2,98	4,39 $\pm$ 0,69	122,00 $\pm$ 2,27	2,56 $\pm$ 0,09	1,31 $\pm$ 0,15	11,27 $\pm$ 5,04	184,62 $\pm$ 43,21	21,24 $\pm$ 5,25	66,98 $\pm$ 32,60	75,53 $\pm$ 4,00	32,75 $\pm$ 2,68	5,07 $\pm$ 1,29	0,64 $\pm$ 0,32
	Placebo n=4	152,93 $\pm$ 2,15	4,41 $\pm$ 0,43	121,80 $\pm$ 3,20	2,55 $\pm$ 0,15	1,44 $\pm$ 0,42	11,63 $\pm$ 5,19	141,36 $\pm$ 14,01	22,98 $\pm$ 3,28	54,05 $\pm$ 11,35	72,82 $\pm$ 8,92	32,87 $\pm$ 6,25	5,70 $\pm$ 3,54	1,15 $\pm$ 1,35
5	Vitamin E n=5	151,33 $\pm$ 3,55	4,46 $\pm$ 0,63	124,30 $\pm$ 2,79	2,62 $\pm$ 0,24	1,35 $\pm$ 0,29	12,99 $\pm$ 6,23	192,22 $\pm$ 61,79	26,00 $\pm$ 13,76	51,48 $\pm$ 32,33	74,89 $\pm$ 7,46	31,20 $\pm$ 1,27	5,90 $\pm$ 1,60	0,81 $\pm$ 0,45
	Placebo n=5	154,48 $\pm$ 4,34	4,28 $\pm$ 0,54	125,08 $\pm$ 6,06	2,62 $\pm$ 0,18	1,40 $\pm$ 0,26	11,51 $\pm$ 4,60	153,77 $\pm$ 9,23	24,62 $\pm$ 7,46	131,04 $\pm$ 155,63	76,59 $\pm$ 8,20	32,65 $\pm$ 4,30	6,38 $\pm$ 2,75	0,72 $\pm$ 0,52

Legenda: CKD kronična ledvična odpoved; SD standardna deviacija; Na natrij; K kalij; Cl klorid; Ca kalcij; aP anorganski fosfat; AP alkalna fosfataza; ALT alanin-aminotransferaza; TP skupne beljakovine; n število mačk

Legend: CKD Chronic Kidney Disease; SD Standard Deviation; Na Sodium; K Potassium; Cl Chloride; Ca Calcium; aP Inorganic Phosphate; AP Alkaline Phosphatase; ALT Alanine Aminotransferase; TP Total Proteins; n number of cats

M. Krofič Žel: Vpliv vitamina E na oksidativni stres in potek kronične ledvične odpovedi pri mačkah.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2015. Doktorska disertacija

Tabela 25: Izbrani biokemijski parametri (povprečje $\pm$ SD; vrednost pri n = 1) pri mačkah s CKD IRIS III in IV

Table 25: Selected biochemical parameters (mean $\pm$ SD; value in n = 1) in cats with CKD IRIS III and IV

Odvzem		Na (mmol/L)	K (mmol/L)	Cl (mmol/L)	Ca (mmol/L)	aP (mmol/L)	sečnina (mmol/L)	kreatinin (μ mol/L)	AP (U/L)	ALT (U/L)	TP (g/L)	albumini (g/L)	holesterol- skupni (mmol/L)	trigliceridi (mmol/L)
1	Vitamin E n=8	151,48 $\pm$ 3,22	4,69 $\pm$ 0,96	118,95 $\pm$ 3,63	2,57 $\pm$ 0,15	3,12 $\pm$ 1,6	41,61 $\pm$ 19,81	582,19 $\pm$ 301,14	17,14 $\pm$ 5,3	56,24 $\pm$ 14,87	79,67 $\pm$ 9,55	32,01 $\pm$ 4,3	5,06 $\pm$ 0,87	0,85 $\pm$ 0,29
	Placebo n=4	152,33 $\pm$ 4,12	4,58 $\pm$ 0,67	118,1 $\pm$ 4,13	2,64 $\pm$ 0,27	2,67 $\pm$ 1,3	36,88 $\pm$ 16,99	441,65 $\pm$ 178,58	12,9 $\pm$ 6,37	76,73 $\pm$ 49,72	80,95 $\pm$ 9,04	30,93 $\pm$ 2,79	7,22 $\pm$ 3,28	0,52 $\pm$ 0,21
2	Vitami E n=4	154,90 $\pm$ 1,01	4,94 $\pm$ 0,69	120,17 $\pm$ 5,08	2,50 $\pm$ 0,30	1,65 $\pm$ 0,71	20,02 $\pm$ 12,81	433,96 $\pm$ 218,90	30,67 $\pm$ 12,55	37,80 $\pm$ 10,94	73,65 $\pm$ 14,21	32,42 $\pm$ 0,84	4,79 $\pm$ 1,11	0,82 $\pm$ 0,06
	Placebo n=2	155,10 -	4,48 -	119,10 -	2,48 -	1,59 -	23,47 $\pm$ 2,31	338,74 $\pm$ 41,81	6,60 -	40,10 -	75,02 -	27,27 -	7,84 -	0,46 -
3	Vitamin E n=3	156,37 $\pm$ 2,22	4,58 $\pm$ 0,33	122,57 $\pm$ 2,27	2,63 $\pm$ 0,08	1,26 $\pm$ 0,42	12,21 $\pm$ 8,74	295,72 $\pm$ 171,73	33,80 $\pm$ 10,13	81,27 $\pm$ 36,97	71,63 $\pm$ 9,45	33,02 $\pm$ 3,14	5,15 $\pm$ 0,88	0,90 $\pm$ 0,29
	Placebo n=1	152,80 -	4,10 -	122,70 -	2,71 -	2,86 -	29,03 -	292,03 -	5,60 -	34,80 -	83,24 -	28,94 -	8,92 -	0,81 -
4	Vitamin E n=2	156,05 $\pm$ 6,43	4,59 $\pm$ 0,38	122,60 $\pm$ 6,51	2,63 $\pm$ 0,07	1,49 $\pm$ 0,49	24,65 $\pm$ 24,11	382,36 $\pm$ 317,12	21,55 $\pm$ 14,78	45,25 $\pm$ 1,77	77,15 $\pm$ 3,05	33,01 $\pm$ 5,53	5,78 $\pm$ 0,76	1,06 $\pm$ 0,30
	Placebo n=2	154,75 $\pm$ 1,77	4,73 $\pm$ 0,23	122,10 $\pm$ 2,69	2,62 $\pm$ 0,21	1,50 $\pm$ 0,17	20,33 $\pm$ 0,07	281,84 $\pm$ 13,73	11,60 $\pm$ 4,81	53,75 $\pm$ 34,15	80,51 $\pm$ 3,87	29,56 $\pm$ 2,03	6,82 $\pm$ 0,26	0,36 $\pm$ 0,04
5	Vitamin E n=1	152,4 -	4,67 -	115,7 -	3,05 -	2,72 -	34,2 -	537,0 -	18,1 -	52,8 -	88,6 -	34,7 -	7,2 -	0,90 -
	Placebo n=1	157,40 -	3,99 -	124,10 -	2,51 -	2,01 -	25,45 -	288,80 -	7,30 -	37,50 -	78,02 -	29,44 -	6,09 -	0,49 -

Legenda: CKD kronična ledvična odpoved; SD standardna deviacija; Na natrij; K kalij; Cl klorid; Ca kalcij; aP anorganski fosfat; AP alkalna fosfataza; ALT alanin-aminotransferaza; TP skupne beljakovine; n število mačk

Legend: CKD Chronic Kidney disease; SD Standard deviation; Na Sodium; K Potassium; Cl Chloride; Ca Calcium; aP Inorganic Phosphate; AP Alkaline Phosphatase; ALT Alanine Aminotransferase; TP Total Proteins; n number of cats