

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

Mr Stefan Đoković

UPOREDNO ISPITIVANJE KONCENTRACIJE  
ATRIJALNOG NATRIJUMURETIČKOG PEPTIDA  
KOD DOMAĆEG BRDSKOG KONJA, ARABERA I  
ENGLSKOG PUNOKRVNJAKA POSLE RAZLIČITIH  
TIPOVA FIZIČKOG OPTEREĆENJA

Doktorska disertacija

Beograd, 2016.

Mentor:

Prof. dr Dragiša Trailović

Komisija za odbranu:

Prof. dr Dragiša Trailović

Doc. dr Predrag Stepanović

Prof. dr Ljubica Spasojević Kosić

# UPOREDNO ISPITIVANJE KONCENTRACIJE ATRIJALNOG NATRIJUMURETIČKOG PEPTIDA KOD DOMAĆEG BRDSKOG KONJA, ARABERA I ENGLESKOG PUNOKRVNJAKA POSLE RAZLIČITIH TIPOVA FIZIČKOG OPTEREĆENJA

## Kratak sadržaj

Insuficijencija srca je jedan od najvažnijih faktora odgovornih za smanjenje radne sposobnosti konja. To se pre svega odnosi na sportska grla, koja su često izložena ekstremnim fizičkim naprezanjima pri kojima se mogu ispoljiti i subklinički oblici bolesti koji se u mirovanju ne mogu utvrditi. Simptomi nalik na insuficijenciju srca pri tome mogu biti isprovocirani prevelikim stepenom opterećenja i kod klinički zdravih konja, naročito ako nisu dobro utrenirani. U humanoj medicini se kao biomarkeri insuficijencije srca koriste atrijalni natrijumuretički peptidi, koji se u većoj količini oslobađaju tokom ubrzanog rada srca i istezanja srčanih šupljina, zbog čega se povećane vrednosti u krvi mogu registrovati i za vreme mirovanja i posle opterećenja.

Iznaženjem laboratorijskih indikatora insuficijencije srca i procenjivanjem njihove povezanosti sa fizičkim opterećenjem i stepenom pripremljenosti za fizičko opterećenje u velikoj meri bi bio pojednostavljen postupak dijagnostikovanja subkliničkih oboljenja i kod konja. U cilju boljeg upoznavanja veze između stepena oslobađanja atrijalnih natrijumuretičkih peptida i opterećenja klinički zdravih konja, ispitivanjem je obuhvaćeno 36 konja rase domaći brdski konj, araber i engleski punokrvnjak, podeljenih u tri ogledne grupe: A, B i C. Grupa A se sastojala od 12 konja rase domaći brdski konj (7 kastrata i 5 kobila), u starosti od 8–12 godina; grupa B se sastojala od 12 arabera: 5 muškog pola (2 pastuva i 3 kastrata) i 7 ženskog pola, u starosti od 6–12 godina, dok se grupa C sastojala od 12 konja rase engleski punokrvnjak, 6 muškog pola (pastuvi) i 6 ženskog pola, u starosti od 3–6 godina. Koncentracija atrijalnog natrijumuretičnog peptida je ispitivana u mirovanju i posle različitih oblika fizičkog opterećenja. Araberi su testirani dugotrajnim aerobnim opterećenjem niskog intenziteta

– u “endjurans” trci na 80 km, engleski punokrvnjaci su bili podvrgnuti kratkotrajnom opterećenju veoma velikog intenziteta – u galopskoj trci na 2000 m, dok su domaći brdski konji bili podvrgnuti opterećenju mešovito – aerobno/anaerobnog tipa umerenog intenziteta i dužine trajanja – u testu iznošenja tovara drva na leđima uzbrdo. Nakon odmora od 24 časa konjima su ponovo uzimani uzorci krvi radi ispitivanja koncentracije atrijskog natrijumuretičkog peptide, kako bi se utvrdila brzina vraćanja povećanih vrednosti ANP-a na bazalni nivo.

Dobijene vrednosti u mirovanju kretale su se u granicama od  $12,38 \pm 1,77$  pg/ml kod engleskog punokrvnjaka i  $15,38 \pm 2,25$  pg/ml kod arabera, do  $17,88 \pm 3,94$  pg/ml kod domaćeg brdskog konja. Nakon opterećenja najveća vrednost je zabeležena kod engleskog punokrvnjaka:  $62,88 \pm 6,36$  pg/ml, nešto manja kod arabera:  $50,35 \pm 3,24$  pg/ml – najmanja kod domaćeg brdskog konja:  $45,74 \pm 7,67$  pg/ml, pri čemu se posle odmora od 24 časa koncentracija ANP-a kod svih ispitanih konja vraća u okvir bazalnih vrednosti.

Stepen utreniranosti ne utiče direktno na koncentraciju ANP-a u krvi konja, kako u mirovanju tako i u opterećenju – fizičko opterećenje dovodi do značajnog povećanja koncentracije ANP-a u krvi konja koje je proporcionalno intenzitetu fizičkog opterećenja i stepenu maksimalnog povećanja frekvencije srčanog rada.

Ključne reči: ANP, konj, srce, puls, opterećenje

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Patologija i terapija životinja

UDK broj: 619:636.1:577.175.3/.7

## **COMPARATIVE STUDY OF NATRIURETIC ATRIAL PEPTIDE CONCENTRATION IN DOMESTIC MOUNTAIN HORSE, ARABIAN HORSE AND ENGLISH THOROUGHBRED HORSE AFTER DIFFERENT TYPES OF WORK LOAD**

### *Summary*

*Heart failure is one of the most important factors responsible for the reduction of working capacity of horses. This is primarily related to sport horses, which are often exposed to extreme physical stress during which they can manifest subclinical forms of the disease which can not be determined during the rest. Symptoms resembling cardiac insufficiency can be provoked with excessive work load in clinically sound horses, especially in untrained ones or not well trained ones. In human medicine, atrial natriuretic peptides are used as biomarkers of cardiac insufficiency and they are released in blood in alleviated quantities during periods of increased heart rate and stretching of cardiocytes in atrial walls, which is the reason we can detect higher levels during rest and work.*

*Finding laboratory indicators of heart failure and assessment of their connection to physical workload, and level of fitness, would lead to a simplified procedure for diagnosing subclinical disease in horses. In order to better understand connection between the release of atrial natriuretic peptide and work load in clinically healthy horses, testing was performed on 36 horses in total, divided in three groups Group A, Group B, and Group C. Group A consisted of 12 arabian horses 5 males ( 2 stallions 3 geldings) and 7 mares, between 6–12 years of age, group B consisted of 12 english thoroughbreds (6 male 6 female) , between 3 and 6 years of age and group C consisted of 12 domestic mountain ponies (7 geldings 5 mares) between 8 and 12 years. All horses were tested for changes in ANP concentrations in blood before workload and after selected workload: Arabian horses were tested in endurance race on 80 km of length (long lasting, aerobic exercise), English thoroughbred horses ran race of 2000 m*

*(short maximal aerobic effort) and domestic mountain ponies were tested in moderate work load (aerobic anaerobic effort of moderate intensity and duration) had to carry logs uphill on steep terrain. After 24 hours of rest, horses went through another sampling to establish basal levels of ANP and speed of recovery.*

*Acquired values before work were between  $12,38 \pm 1,77$  pg/ml in English thoroughbreds,  $15,38 \pm 2,25$  pg /ml in Arabian horses, up to  $17,88 \pm 3,94$  pg/ml in domestic mountain ponies. After work load highest increase in ANP values was recorded in English thoroughbred  $62,88 \pm 6,36^{***}$  pg/m, slightly less  $50,35 \pm 6,36^{***}$  in Arabian horses and  $45,74 \pm 7,67^{***}$  in domestic mountain ponies. After 24h rest, values of ANP in blood of tested horses returned to basal levels in all horses.*

*Fitness levels do not influence directly ANP concentration in blood of horses, both at rest and in exercise – physical exertion leads to a significant increase in ANP concentrations in the blood of horses, which is proportional to the intensity of physical activity and the level of the maximum increase in heart rate.*

*Key words: ANP, horse, heart, pulse, workload*

# SADRŽAJ

1. Uvod	1
2. Pregled literature	3
2.1. Atrijalni natrijumuretični peptidi i njihova funkcija	3
2.1.1. Struktura i biosinteza atrijalnih natrijumuretičnih peptida	5
2.2. Distribucija, otpuštanje i biološka aktivnost atrijalnih natrijumuretičnih peptida	7
2.3. Receptori za natrijumuretične peptide	10
2.4. Metabolizam atrijalnih natrijumuretičkih peptida	12
2.5. Bazalne vrednosti atrijalnog natrijumuretičnog peptida	13
2.6. Efekti opterećenja na lučenje atrijalnog natrijumuretičnog peptida	15
2.7. Kardiovaskularni odgovor na opterećenje	17
2.8. Uticaj opterećenja na pojedine hematološke i biohemijske parametre krvi	19
2.9. Uticaj opterećenja na bilans tečnosti i elektrolita	21
2.10. Uticaj rase na radne i sportske performanse konja	24
3. Cilj i zadaci rada	29
4. Materijal i metode rada	31
4.1. Materijal	31
4.2. Plan i dinamika ispitivanja	31
4.3. Metode ispitivanja	32
4.4. Statistička obrada podataka	33
5. Rezultati	35
5.1. Rezultati kliničkih ispitivanja u mirovanju	35

5.2. Rezultati kliničkih ispitivanja u opterećenju	37
5.3. Rezultati ispitivanja bazalne koncentracije ANP-a u krvnom serumu konja	42
5.4. Rezultati ispitivanja koncentracije ANP-a u krvnom serumu konja posle opterećenja	44
5.5. Rezultati hematoloških ispitivanja kod domaćih brdskih konja, arabera i engleskog punokrvnjaka pre i nakon opterećenja	47
5.6. Rezultati biohemijskih ispitivanja kod domaćih brdskih konja, arabera i engleskog punokrvnjaka pre i nakon opterećenja	56
6. Diskusija	63
7. Zaključak	71
8. Literatura	73
9. Prilozi	93



# 1. UVOD

Ispitivanje funkcionalno stanja kardiovaskularnog sistema i dijagnostika eventualne insuficijencije srca zasniva se na detaljnim kliničkim ispitivanjima, primenom odgovarajućih specijalističkih metoda, kao što su ehokardiografija i elektrokardiografija, koje nisu uvek pristupačne u terenskim uslovima, zbog čega se duži niz godina tragalo za laboratorijskim indikatorima oštećenja srca koji bi bili pristupačniji od navedenih specijalističkih metoda. Polovinom prošlog veka u miocitima pretkomora je uočeno prisustvo specifičnih granula čije je prisustvo dovedeno u vezu sa natriurezom, da bi vrlo brzo posle toga bila utvrđena i struktura prvog peptida iz familije natrijumuretičnih peptida – atrijskog natrijumuretičnog peptida A (ANP). Kako su osnovni efekti ovog peptida natriureza, diureza, vazodilatacija, smanjenje krvnog pritiska i volumena plazme, inhibicija biosinteze i dejstva drugih hormona, poput činilaca renin-angiotenzin-aldosteron sistema, odmah je postavljeno pitanje, da li se pomenute funkcije mogu dovesti u vezu sa koncentracijom atrijskog natrijumuretičkog peptida u krvi, da bi ubrzo zatim ta veza bila potvrđena i atrijski natrijumuretički peptidi prihvaćeni kao humoralni markeri insuficijencije srca, prvo kod ljudi a nešto kasnije i kod pasa.

Insuficijencija srca je jedan od najvažnijih faktora odgovornih za smanjenje radne sposobnosti konja. Upotrebna vrednost konja zavisi od njegove sposobnosti da radi, što je u direktnoj zavisnosti od stanja i snage srca. To se pre svega odnosi na sportske konje, koji su izloženi ekstremnim fizičkim naprezanjima pri kojima se mogu ispoljiti i subklinički oblici bolesti koji se u mirovanju ne mogu utvrditi. Kako su simptomi opterećenjem isprovocirane slabosti srca najčešće nespecifični, njihovo povezivanje sa primarnim oboljenjem srca i/ili insuficijencijom srčanog rada nije jednostavno. Postupak dijagnostikovanja subkliničkih oboljenja kardiovaskularnog sistema bi u velikoj meri bio pojednostavljen iznalaženjem laboratorijskih indikatora insuficijencije

srca. Kao indikator oštećenja srčanog mišića duži niz godina se koristi serumska aktivnost mišićnih enzima poput kreatin kinaze (CK-MB), alfa-hidroksibutirat dehidrogenaze ( $\alpha$ -HBDH), aspartat-aminotransferaze (AST) i laktat-dehidrogenaze (LDH-1), koji, nažlost, ne ukazuju na stanje insuficijencije srca. Da li bi atrijalni natrijumuretični peptid i kod konja mogao da bude indikator srčane insuficijencije? O značaju atrijalnog natrijumuretičkog peptida kod konja ima manje literaturnih podataka, pri čemu se još uvek ne može sa sigurnošću reći u kojoj meri na njegovo oslobađanje utiču dilatacija srca i frekvencija srčanog rada, posebno kod konja selekcioniranih i treniranih za različite tipove fizičkog opterećenja.

Natrijumuretički peptid tip B (BNP) prihvaćen je u humanoj medicini kao biomarker (pokazatelj) srčane insuficijencije. Povećanje koncentracije natrijumuretičkog peptida B često se zapaža kod starijih ljudi bez jasnih simptoma srčane insuficijencije. Ispitivanjem na ljudima dokazan je dijagnostički i prognostički značaj natrijumuretičkih peptida kod srčane insuficijencije, asimptomatske disfunkcije leve komore, dijastolne disfunkcije srca, kao i poremećaja funkcije desne komore.

Natrijumuretički peptid tip B se može smatrati i indikatorom srčane insuficijencije kod pasa. Kod konja, međutim, veću dijagnostičku vrednost ima natrijumuretički peptid tip A (ANP).

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Atrijalni natrijumuretični peptidi i njihova funkcija

Polovinom prošlog veka različiti autori su utvrdili prisustvo sekretornih granula u ćelijama srčanih pretkomora sisara, koje su morfološki podsećale na granule endokrinih ćelija. Kasnije je dokazano da se granuliranost u citoplazmi pretkomornih ćelija menja u zavisnosti od pH citoplazme. Sekretorna funkcija srčanih pretkomora je detaljnije razjašnjena 1981. godine, kada je dokazano da homogenat napravljen od atrijalnih ćelija izaziva snažnu natriurezu kod pacova. Nakon toga je potvrđena veza između granularnog sadržaja ćelija pretkomora i natriureze, da bi vrlo brzo posle toga bila utvrđena i struktura prvog peptida iz familije natrijumuretičnih peptida – atrijalnog natrijumuretičnog peptida A (*engl. atrial natriumuretic peptide – ANP*). Kasnije studije su pokazale da ANP igra važnu ulogu u homeostazi telesnih tečnosti i smanjenju krvnog pritiska zahvaljujući natriurezi, diurezi i posledičnom smanjenju volumena plazme. Posle toga su identifikovani i drugi peptidi slični atrijalnom natrijumuretičnom peptidu A (Richter i sar., 1998; Kokkonen i sar., 2002; Hinchcliff, 2004; Marr, 2010).

Drugi član familije natrijumuretičnih peptida je natrijumuretični peptid tipa B (*engl. brain natriumuretic peptide – BNP*) koji je prvo izolovan 1988. godine u moždanom tkivu svinja. Pored nalaženja u mozgu, BNP se takođe oslobađa i iz srca. Za razliku od ANP-a koji se oslobađa u ćelijama pretkomora, BNP se u srcu sintetiše i oslobađa prvenstveno u ćelijama komora.

Treći član natrijumuretične familije je natrijumuretični peptid tip C (CNP) koji se uglavnom sintetiše u endotelnim ćelijama srca i vaskularnog sistema, kao i u moždanom tkivu. Za razliku od prva dva peptida, CNP se pre smatra parakrinim regulatorom nego kardijačnim hormonom u pravom smislu.

Nešto kasnije je otkriven i četvrti peptid sa hipotenzivnim svojstvima – adrenomedulin (*Dendroaspis natriuretic peptide* – DNP), nazvan po zmiji zelena mamba (*Dendroaspis angusticeps*) iz čijeg otrova je izolovan. DNP je prvobitno izolovan iz ćelija humanog feohromocitoma, i on se takođe opisuje kao srčani hormon (Richter i sar., 1998; Lisy i sar., 2001; Marr, 2010). DNP ima izraženiji vazodilatacioni efekat u odnosu na ANP i BNP, pre svega na arterije (Best, 2002). Kasnije je otkriven i peti član familije natrijumuretičnih peptida nazvan urodilin ili urodilatin, koji, ustvari, predstavlja metabolit preproANP-a. Njegovo prisustvo je otkriveno u bubrezima i on igra značajnu ulogu u reapsorpciji vode i elektrolita.

Osnovni efekti ANP-a i BNP-a su natriureza, diureza, vazodilatacija, smanjenje krvnog pritiska i volumena plazme, inhibicija biosinteze i dejstva drugih hormona, poput čini-laca renin-angiotenzin-aldosteron sistema, ili endotelina i vazopresina (Pösö i sar., 2008). Svoje efekte atrijalni natrijumuretični peptidi ostvaruju preko receptora guanilatne ciklaze koja dovodi do sinteze i akumulacije c-GMP-a (Hamet 1984; Potter, 2011). Prekursor ANP-a koji se oslobađa u cirkulaciju – proANP se nakon sekrecije transformiše – cepa, uz oslobađanje karboksilnog dela od 28 aminokiselina COOH-ANP (ANP<sub>99-126</sub> – ANP) i NT-ANP<sub>1-98</sub>. NT-ANP<sub>1-98</sub> se smatra pouzdanijim pokazateljem funkcije srca (Morita i sar., 1993). Poluživot proANP-a u cirkulaciji iznosi 60 do 120 minuta, što je mnogo duže u poređenju sa COOH-ANP (ANP<sub>99-126</sub>). Leinchbury i sar. (2000) ističu da ANP i BNP imaju pozitivno i negativno inotropno dejstvo, a Horio i sar. (2000) da ANP sprečava hipertrofiju komora in vitro.

Dokazano je, nadalje, da ANP inhibira aktivnost kalcijumovih kanala i na taj način sprečava izlučivanje aldosterona bez obzira koji fiziološki agonista pobuđuju njegovo izlučivanje: angiotenzin II, adrenokortikotropni hormon, ili K<sup>+</sup>. Stimulirajuće dejstvo svakog od navedenih agonista zavisi od protoka kalcijuma kroz voltažno modulisanе kalcijumove kanale. ANP takođe moduliše sopstvenu sekreciju uz pomoć A tipa receptora za natrijumuretički peptid – NPR-A (Leiskinen, 1997). U istraživanjima Vajta i saradnika (1993), nadalje, utvrđeno je da ANP, BNP i CNP ispoljavaju neke od svojih efekata kroz aktivaciju kalijumovih kanala, posredstvom cGMP defosforilacije.

ANP inhibira sintezu DNK, zatim, proliferaciju i sintezu kolagena kardijačnih fibroblasta u kulturi tkiva (Cao i sar., 1995). Prema Lopezu i saradnicima (1995), miševi

kojima je uklonjen receptor NPR-A ili receptor za BNP, razvijali su fibrozu srčanog mišića. Tsuruda i sar. (2002) su, nadalje, utvrdili da BNP smanjuje sintezu kolagena i aktivira srčane matriks metaloproteinaze.

Natrijumuretični peptidi ne samo da regulišu krvni pritisak već imaju antagonistički efekat na renin i angiotenzin II, deluju antimitogeno i inhibiraju miokardijalnu hipertrofiju, utiču na funkciju endotela, rast (obnavljanje) hrskavica, imunitet i mitohondrijalnu biogenezu (Garbers i sar., 2006; Gardner, 2003; Pandey, 2008; Richards, 2007). ANP i BNP se sve više koristi u skriningu i dijagnostikovanju srčanih poremećaja kao što je plitko disanje i kongestivno oboljenje srca u urgentnim stanjima (Vasan i sar., 2002).

### **2.1.1. Struktura i biosinteza natrijumuretičnih peptida**

Ubrzo nakon otkrića ANP-a počela su istraživanja usmerena na otkrivanje strukture i načina biosinteze ANP-a. Struktura ANP-a je utvrđena metodom kloniranja i sekvencioniranja (*cloning and sequencing*) komplementarne DNK i gena koji kodiraju ANP. Geni koji kodiraju ANP su organizovani u tri egzona koji su razdvojeni sa po dva introna (Nakao i sar., 1992; Ruskoaho, 1992). Transkripcijom, informaciona RNA kodira prekursorski molekul, preproANP, koji sadrži između 149 i 153 aminokiselina, u zavisnosti od životinjske vrste koja je testirana (Nakao i sar., 1992; Rusokoaho, 1992; Forsman i sar., 1998). PreproANP se u endoplazmatičnom retikulumu, uz pomoć endoproteaze ugrađuje u signalni peptid i u protohormon koji sadrži 126 aminokiselina – ANP<sub>1-126</sub>, koji se naziva proANP. ProANP ostaje vezan za signalni peptid tokom transporta i u inaktivnoj formi se deponuje u kardiocitima (Forsman i sar., 1983. i 1984; Thibault i sar., 1987; Forsman, 1998). Ovo se smatra jedinstvenom osobinom natriuretičnih peptida, s obzirom da se za vreme transporta do sekretornih granula stvara više peptidnih hormona, koji se deponuju kao bioaktivni hormoni (Ruskoaho 1992).

Biosinteza BNP-a, produkta drugog seta gena, podseća na biosintezu ANP-a, sa izuzetkom što je deponovana forma u kardiocitima zrela forma vezana za nosač (Nakao i sar., 1992). Redosled amino kiselina u proANP-u, koje čine molekul težine 13000 D, je veoma dobro očuvan među sisarima (Kangava i sar., 1985; Ruskoaho, 1992).

Nakon odgovarajućeg stimulusa proANP se cepa na dva dela: karboksilni deo – ANP<sub>99-126</sub>, pravi ANP i amino deo – ANP<sub>1-98</sub>, koji se takođe naziva NT-ANP (Thibault i sar., 1985; Michener i sar., 1986). Ova konverzija se odigrava blizu samog miocita i skoro istovremeno sa sekrecijom, verovatno uz pomoć serin proteaze, iako i neki drugi enzimi takođe mogu biti uključeni u proces (Inagami i sar., 1989; Ruskoaho, 1992).

Biološki aktivni ANP je ustvari peptid sastavljen od 28 aminokiselina (ANP<sub>99-126</sub>) sa cirkularnim delom koji se sastoji od 18 aminokiselina. Cirkularna struktura se formira uspostavljanjem disulfidne veze između cisteinskih rezidua posttranslacijskom modifikacijom i ima molekulsku težinu od otprilike 3000 D (Kanagawa i sar., 1985). Aminokiselinski sastav je gotovo identičan kod svih sisara, izuzev dvanaeste aminokiseline koja je kod većine sisara metionin, dok je kod pacova, miševa i zečeva ugrađena aminokiselina izoleucin. Richter i saradnici su pri tome 1998. godine utvrdili i dokumentovali aminokiselinski sastav ANP-a kod konja.

Struktura BNP-a je slična strukturi ANP-a pošto i BNP sadrži karboksilni terminus sa prstenom od 17 aminokiselina povezanih disulfidnom vezom. Nasuprot ANP-u, BNP je manje homologan unutar vrsta (Maekawa i sar., 1988; Kojima i sar., 1989; Seilhamer i sar., 1989; Ogawa i sar., 1994; Aiken i sar., 1999). Humani BNP i BNP konja se poklapaju u 75 % aminokiselina (Van Der Vekens i sar., 2013). Sličnost između BNP-a svinja i BNP-a konja je jako velika, razlikuju se samo u 3 od 32 amino kiseline (Van Der Vekens i sar., 2013).

NT-ANP sisara se sastoji od 98 aminokiselina. Njegova struktura se više razlikuje između vrsta u odnosu na ANP. Tako na primer, redosled aminokiselina kod ovaca pokazuje 71%, 75% i 79% homolognosti sa redosledom amino kiseline kod čoveka, svinja i goveda (Aitken i sar., 1999). Kod konja, opet, redosled aminokiselina NT-ANP-a pokazuje 80 do 90% sličnosti sa redosledom amino kiseline čoveka, goveda, pacova i miševa (Richter i sar., 1998). Najznačajnije razlike u sekvencama su u amino kiselinama od 1 do 70. Dužina N-terminalnog produžetka BNP-a razlikuje se od ANP-a - sadrži 108 amino kiseline kod ljudi, 106 kod svinja, 105 kod pasa i 96 kod pacova (Seilhamer i sar., 1989).

Struktura ANP-a u nesisara, se dosta razlikuje i na karboksilnom i na amino terminalnom kraju (Ruskoaho, 1992). U srcu pileta, inače, glavni natriumuretični peptid je u tipu BNP-a (Akizuki i sar., 1991).

## **2.2. Distribucija, otpuštanje i biološka aktivnost natrijumuretičnih peptida**

Od otkrića ANP-a, pre više od 40 godina, brojni naučnici su se u svojim studijama bavili mehanizmima sekrecije ovih jedinjenja. Sa fiziološke tačke gledišta najznačajniji faktor koji upravlja sekrecijom ANP-a je mehanički nadražaj, tj. istezanje atrijalnih miocita u pretkomorama. To se normalno dešava kada se zapremina ekstracelularne tečnosti ili krvi poveća. Sposobnost nekih vazodilatatora da povećaju sekreciju ANP-a može da se poveže sa istim mehanizmom – u pitanju je indirektnan odgovor na istezanje atrijalnih miocita zbog povećanja kardijačnog *preloada* – dijastoličnog predopterećenja i *afterloada* – naknadnog, sistoličnog opterećenja.

Utvrđeno je da se atrijalni natrijumuretični peptid prvenstveno stvara, deponuje i izlučuje iz atrijalnih kardiocita. Kardiociti različitih životinjskih vrsta sadrže osmofilne granule sa značajnim stepenom ultrastrukturne i citohemijske sličnosti (Jamieson, Palade 1964; Tomisawa, 1969; Cantin i sar., 1979). Granule sa srčanim natrijumuretičnim peptidom utvrđene su kod ljudi i glodara (de Bold, 1982; Flynn i sar., 1983; Forssmann i sar., 1984; Kanagawa i Matsuo, 1984; Kanagawa i sar., 1985), zatim kod više vrsta domaćih životinja (Mifune i sar., 1991, 1995, 1996; Richter i sar., 1998). Atrijalne granule su pronalazene svuda po sarkoplazmi (Tomisawa, 1969), pri čemu su one koje sadrže ANP locirane prvenstveno u perinuklearnom prostoru ćelija kardiocita (Mifune i sar., 1991; Ruskoaho, 1992). Imunohistohemijskim i imuno-elektronsko-mikroskopskim ispitivanjem utvrđene razlike u distribuciji i prosečnoj veličini ANP-imunoreaktivnih granula kod različitih vrsta. Tako na primer, broj i dijametar granula kod konja bio je manji nego u svinja i goveda (Mifune i sar., 1991). Sličan polimorfizam je već bio uočen u prvim histološkim studijama kod atrijalne granuliranosti (Jamieson i Palade, 1964; Tomisawa, 1969). Funkcionalni značaj ovih razlika nije do danas objašnjen.

Kod odraslih sisara, ANP-imunoreaktivne granule se prvenstveno koncentrišu u kardiocitima pretkomora, dok se kod fetusa i novorođenčadi nalaze i u ćelijama pretkomora i komora (Ruskoaho, 1992). Osim u tkivu srca, ANP specifične mRNA i imunoreaktivnost na proANP i ANP utvrđeni su i u ćelijama drugih tkiva, npr. luku aorte, plućima, centralnom nervnom sistemu, nadbubrežnim žlezdama, žutom telu, koži, bubrezima, gastrointestinalnom traktu, timusu, horioidei i cilijarnom telu, pankreasu, štitastoj žlezdi, slezini, testisima, jetri, pljuvačnim žlezdama, suznim žlezdama itd. (Ruskoaho, 1992). Kim i saradnici, 1992. i Gutkowska i saradnici, 1993. godine, dokazuju da se tokom estrusa određena količina atrijalnog natrijumuretičnog peptida stvara i izlučuje u ovarijumima pacova i svinje. Koncentracije ANP-a u ovim tkivima pri tome ne utiče značajno na koncentraciju plazmatskog ANP-a, jer su njihove količine daleko manje nego u atrijalnim ćelijama (Gutkowska i Nemer, 1989). Peptidi nalik na ANP i njihovi prekursori su opisani i u srcima ne sisara, ali sa značajnim interspecijskim razlikama (Ruskoaho, 1992; Mifune, 1996).

ANP i BNP se kontinuirano oslobađaju iz srca, a stepen otpuštanja se povećava kao odgovor na odgovarajući stimulus – u najvećoj meri na istežanje miokarda. U radovima različitih autora (Ruskoaho, 1992; de Bold, 1996; Ruskoaho i sar., 1997; Thibault i sar., 1999; Park 2008), opisani su brojni faktori koji utiču na koncentraciju ANP-a u plazmi ili stimulišu sekreciju ANP-a u srcu. Najznačajniji stimulus koji utiče na sekreciju ANP-a u srcu je pre svega istežanje miokarda, koje nastaje kao posledica povećanja volumena cirkulišuće tečnosti i unošenja natrijuma. Na oslobađanje ANP-a značajan uticaj imaju različiti intracelularni i endotelni faktori – koncentracija  $Ca^{+}$ , Na-K-ATPazni inhibitori, endotelin, azotni oksid, prostaglandini... Svako povećanje pulsa doprinosi povećanoj sekreciji ANP-a, kao i oslobađanje neurohumoralnih i drugih endokrinih faktora poput adrenalina, noradrenalina, acetilholina, vazopresina, glukokortikosteroida, tiroidnih hormona, angiotenzina-2, endogenih opiata itd. U slučajevima stimulacije perifernog i centralnog nervnog sistema, povećanja osmolarnosti, hipoksije i hipokapnije, takođe dolazi do povećanja sekrecije ANP-a. Miokardijalna ishemija i metaboličke promene, zatim starost, cirkardijalne varijacije, rad, izloženost toploti i hladnoći, takođe dovode do povećanog lučenja ANP-a.

Iz svega navedenog jasno proizilazi da je oslobađanje atrijalnih peptida veoma kompleksno. Eksperimentalni rezultati za sada sugerišu da srce endokrinološki različito



reaguje u akutnim, subakutnim i hroničnim stanjima, sa specifičnim promenama u transkripciji, translaciji, post translatornim procesima, deponovanju i otpuštanju ANP-a i BNP-a (de Bold i sar., 1996). Nekoliko studija izvedenih poslednih godina je doprinelo definisanju ćelijskih mehanizama koji regulišu sekreciju ANP-a, u koje su uključeni tzv. *stretch activated jonski kanali*, prostaglandini, citohrom P450, G protein i kalcijum (Dietz, 2005).

Poslednji rezultati, inače, ukazuju na znatno kompleksnije mehanizme za kontrolu otpuštanja ANP-a od i rastezanja mišićnih vlakana miocita. Ovi mehanizmi uključuju brojne endogene parakrine i/ili vazoaktivne faktore, kao što su endotelin 1, azotni oksid i angiotenzin 2 (Dietz, 2005; Bai, 2009; Oh, 2011)

Dva parakrina faktora izdvojena iz endotelinih ćelija igraju važnu ulogu u modulisanju sekrecije ANP. Endotelin, snažan vazokonstriktor, stimuliše i pojačava sekreciju ANP-a povezanu sa istežanjem miocita. Dramatično povećanje sekrecije ANP-a izazvano ishemijskom je delimično modulirano upravo endotelinima. Azotni oksid (NO), vrlo važan vazodilatator, koji se takođe oslobađa u endotelinih ćelijama, inhibira sekreciju ANP-a delujući na ciklični GMP kao ćelijski mesindžer (Chen i sar., 1993). Nekoliko autora (de Bold 1996, Bai 2009) je proučavalo ćelijske mehanizme koji doprinose regulaciji sekrecije ANP-a. To uključuje aktivaciju *stretch activated* jonskih kanala, aktivaciju lučenja prostaglandina, citohroma P450, G proteina i oslobađanje intracelularnog kalcijuma. Uloga kalcijumovih kanala nije tako jasna ali je utvrđeno da aktivacija L-tipa voltažno moduliranih  $Ca^{2+}$  kanala negativno moduliše oslobađanje ANP-a. Oslobađanje ANP-a kod infarkta miokarda je povezano sa oba načina stimulacije – mehaničkim i celularnim.

Raniji eksperimenti su i *in vivo* i *in vitro* potvrdili da tahikardija stimuliše sekreciju ANP-a u srcu (Ruskoaho 1992). Kasnija istraživanja, međutim, negiraju ulogu tahikardije kao primarnog stimulatora ANP-a. U prilog tome govori i činjenicu da je povećana frekvencija srčanog rada *in vivo* najčešće praćena hemodinamskim promenama koje same po sebi mogu da objasne otpuštanje ANP-a. Neke studije, nadalje, pokazuju da se koncentracija ANP-a može povećati u eksperimentalnim uslovima u kojima se prekomorni pritisak povećava istovremeno sa inhibicijom pulsa (Ruskoaho, 1992; Ruskoaho i sar., 1996).

Rezultati istraživanja *in vivo* i *in vitro* su pokazali da se ANP (ANP<sub>99-126</sub>) i NT-ANP zajedno oslobađaju u cirkulaciju u ekvimolarnim količinama (Itoh i sar., 1988; Ruskoaho, 1992). Glavni cirkulišući peptidi, izvedeni iz molekula proANP<sub>1-126</sub> su NT-ANP<sub>1-98</sub> i ANP<sub>99-126</sub>. ANP (ANP<sub>99-126</sub>) je biološki aktivan hormon, dok je široko prihvaćeno da NH<sub>2</sub> terminus ANP-a ne pokazuje biološku aktivnost (Ruskoaho, 1992). Pošto se NT-ANP duže vremena zadržava u cirkulaciji on se uzima kao tačniji pokazatelj insuficijencije srca. Prema Katsubeu i saradnicima (1986), poluživot NT-ANP-a je oko 8–10 puta duži nego poluživot ANP-a. Ipak, neke studije sugerišu da manji fragmenti izolovani iz ljudskog NT-ANP-a cirkulišu i da imaju diuretski i natriuretski efekat. To se, na primer, odnosi na proANP<sub>31-67</sub> kod ljudi (Vesely i sar., 1994), pacova (Martin i sar., 1990), pasa (Habibulah i sar., 1995) i majmuna (Benjamin i Paterson, 1995). Međutim, rezultati laboratorije koja je prva izolovala i hemijski okarakterisala fragmente proANP<sub>1-126</sub> ne podržavaju ovu teoriju (Weir i sar., 1994).

### **2.3. Receptori za natrijumuretične peptide**

Otkriće de Bolde i saradnika 1981. godine da u ekstraktu atrijalnog tkiva postoje specifični peptidi sa vazoaktivnim svojstvima dovela je do identifikacije čitave familije natrijumuretičnih peptida i do serije ispitivanja mehanizama njihovog dejstva. Pošto ANP, BNP, CNP, DNP i urodilatin ispoljavaju svoja dejstva na različitim mestima i tkivima, u brojnim istraživanjima je ispitivana lokalizacija, izgled i način funkcionisanja receptora za atrijalne natrijuuretične peptide. Utvrđeno je da specifični receptori za vezivanje ANP-a postoje u različitim organima i tkivima. Ti receptori su pronađeni u: endotelijalnim ćelijama, vaskularnim glatkomišićnim ćelijama, ćelijama medule bubrega, kao i u plućima, bubrezima, nadbubrežnim žlezdama, jetri i crevima (Gerbes i Vollmar, 1990; Maack, 1992).

Postoje tri različite izoforme receptora za natrijumuretične peptide: NP receptor-A, (ANPA, GCA, NPR-A ili NP-A), NP receptor-B (ANPB, GCB, NPR-B ili NP-B) i NP receptor-C (ANPC, NPR-C). Oba hormona i ANP i BNP aktiviraju NP receptor-A koji svoje dejstvo ispoljava produkcijom sekundarnog glasnika (ciklični-GMP) kao odgovor na vezivanje hormona. CNP aktivira NP receptor-B koji takođe produkuje cGMP. Sva

tri hormona se vezuju bez razlike za NP receptor-C, ali se ovoga puta ne oslobađa cGMP (Koller i Goddel, 1992).

Receptor gnilil ciklaza-A (GC-A, NPRA), je glavni lokus za regulisanje dejstva ANP-a i BNP-a. Razumevanje kompleksnog sistema ANP-NPRA je od presudnog značaja za razumevanje fiziologije receptora i bolesti koje nastaju kao posledica abnormalnih interakcija hormona i receptora. Utvrđeno je da vezivanje ANP-a za ekstracelularni domen receptora dovodi do konformacijskih promena i na taj način prenosi signal na intracelularni domen receptora, koji tada stvara cGMP (Pendey i Singh, 1990).

Receptori ANP-A su značajni za postizanje fiziološkog efekta ANP-a i BNP-a. Na ANP-B receptore se vezuje CNP delujući na rast vaskularnih ćelija i na njihovo remodelovanje (Inagami i sar., 1995). Rezultati Leskinena i sar., (1997) dalje sugerišu da ANP može da moduliše sopstveno otpuštanje putem ANP-A receptora in vivo. ANP-C receptori, koji su različite građe u odnosu na prethodne, odgovorni su za uklanjanje atrialnih peptida iz cirkulacije i na ovaj način imaju ulogu u održavanju homeostaze cirkulišućih peptida (Suga i sar., 1992). Afinitet kardijačnih peptida prema ANP-C receptorima, utvrđen kod ljudi i pacova, najveći je kod ANP-a, nešto manji kod CNP-a i najmanja kod BNP-a (Suga i sar., 1992). U bubrezima, glomerulima, plućnim membranama, adrenalnim zonama glomerularnih ćelija i u endotelijalnim ćelijama aorte kod goveda, većina ANP receptora su ANPC receptori (Gerbes i Volimar, 1990). Postoje podaci da događaji koji menjaju zapreminu i pritisak krvi takođe menjaju koncentraciju ANP-a u plazmi i gustinu ANPC receptora. Mnogi nalazi podržavaju teoriju da smanjen broj ANPC receptora rezultira u povećanju koncentracije ANP-a u plazmi i u relativno većoj količini ANP-a koji se vezuje za ANP-A receptore (Ruskoaho, 1992). Poslednje studije su koncentrisane na utvrđivanje molekularne osnove prirode i načina funkcionisanja GC-A/NPRA. Iako se značajno napredovalo u razumevanju funkcionalnih uloga natrijumuretičkih peptide i njihovih srodnih receptora u renalnoj homeostazi, homeostazi kardiovaskularnog i endokrinog sistema, detaljna istraživanja su i dalje potrebna da se potpuno razjasne potencijalni molekularni ciljevi tokom bolesti. Očekuje se da će studije o natrijumuretičkim peptidima i njihovim receptorima doprineti utvrđivanju novih terapijskih lokusa za kontrolu i tretman hipertenzije i kardiovaskularnih bolesti.

## 2.4. Metabolizam atrijalnih natrijumuretičnih peptida

Različiti fiziološki procesi učestvuju u eliminaciji ANP-a iz cirkulacije. Pre svega to su vezivanje za receptore, unos u ćeliju i metabolizam u ciljnim tkivima, enzimska degradacija, drugi procesi u plazma membrani, kao i i ekskrecija, na primer preko urina, (Ruskoaho, 1992).

Glavni mehanizmi za eliminaciju ANP-a su vezivanje za specifične receptore za vezivanje (*uptake*) i enzimska degradacija neutralnim endopeptidazama (endopeptidaza EC3.4.24.11, takođe poznata kao encefalinaza i atriopeptidaza) ili nekim drugim enzimima (Gerbesi i Vollmar, 1990; Ruskoaho, 1992). Različiti organi, kao što su pluća, jetra, creva i bubrezi, kao i ekstremiteti, takođe doprinose eliminaciji atrijalnih peptida iz cirkulacije (Hollister i sar., 1989; Gerbes i Vollmar, 1990, Potter 2011). Sposobnost pojedinih organa da uklone molekule iz cirkulacije se opisuje stepenom eliminacije, koja se izračunava na osnovu razlike u venskoj i arterijskoj koncentraciji ispitivanog metabolita. Ova, takozvana A/V razlika, pokazuje koliko efikasno određeni organ uklanja ili metaboliše posmatrani molekul. Step en eliminacije ANP-a varira od 20 do 75%, ali je za većinu organa 35%. Protok krvi je promenljiv u različitim organima i zbog toga različiti organi različito doprinose ukupnoj eliminaciji atrijalnih peptida (Gerbes i Vollmar, 1990). Za NT-ANP bubrezi su glavno mesto za degradaciju (Katsube i sar., 1986; Ito i sar., 1988; Potter 2011).

Eliminacija ANP-a iz cirkulacije se obavlja eliminacijom različitih metabolita ANP-a, koji se brže ili sporije izlučuju, pri čemu je deo metabolita koji se sporo eliminišu odgovorna za 90% eliminacije (Nakao i sar., 1992; Yandle i sar., 1986). Poluživot ANP-a u mirovanju je od 16 sekundi do 2,5 minuta kod pacova; 1,2 do 4,7 minuta kod ljudi i 3–4 minuta kod ovaca (Nakao i sar., 1986; Scarborough, 1989; Ruskoaho, 1992; Charles i sar., 1996). Prema Katsubeu i saradnicima (1986), poluživot NT-ANP je oko 8 do 10 puta duži nego poluživot ANP-a.

Farmakokinetika atrijalnih peptida za sada nije obrađena kod konja. Takođe je utvrđeno da starenje dovodi do produženja spore faze eliminacije ANP-a kod ljudi (Ohasi i sar., 1987). Uprkos kratkom životu ANP-a u plazmi, njegova degradacija *in vitro* je značajno sporija (Scarborough, 1989). To se objašnjava pre svega analizama koje su se radile na

starijim, obolelim pacijentima, pa je samim tim postojao čitav niz poremećaja koji je dovodio do brže degradacije i eliminacije.

Postoji više vrednosti koje se pronalaze u literaturi za vreme poluživota ANP-a kod čoveka. Ruskoaho (1992) je utvrdio da je vreme poluživota ANP-a kod čoveka oko 2,5 minuta, dok za vreme poluživota NT-ANP-a nalazimo vrednosti od 55–60 minuta. U slučaju BNP-a i NT-pro BNP-a pronalaze se vrednosti poluživota od 12 do 20 minuta i 60 do 120 minuta (Pemberton, 2000; Kemperman, 2004; Kimura, 2007; Kroll, 2007). Po svojoj građi humani i konjski ANP su potpuno homologni (Van Der Vekens, 2013). Ovo objašnjava zašto je ANP bio uspešno detektovan korišćenjem humanih kitova. Značajna korelacija između koncentracija ANP-a u plazmi i diletacije leve pretkomore su već prikazane u radovima Ghlen-a (2007), Trachsel-a (2012, 2013, 2014). Za razliku od ANP-a, molekularna struktura BNP-a i NT-proBNP-a je mnogo varijabilnija između vrsta (Van Der Vekens, 2013). Nedavno su napravljeni kitovi za uspešno otkrivanje srčanih poremećaja kod pasa i mačaka (Oyama 2007). Međutim BNP kitovi za konje još uvek nisu dostupni.

## **2.5. Bazalne vrednosti atrijalnog natrijumuretičnog peptida**

Bazalna koncentracija ANP-a kod konja kreće se u granicama od 3 do 8 pmol/l u plazmi (McKeever i sar., 1991, 1992; McKeever i Malinowski, 1999). Kod teladi rase džerzej, starih trideset dana, utvrđene su bazalne vrednosti od 2 do 5 pmol/l u plazmi (Wolf i sar., 1991), 5 do 21 pmol/l u koza, 5 do 25 pmol/l kod čoveka, 7 do 29 pmol/l kod ovaca i 11 do 45 pmol/l kod pasa. Kod pacova vrednosti ANP-a su varirale od 20 do 150 pmol/l.

Koncentracije NT-ANP-a u plazmi kod ljudi i pacova su 10 do 50 puta veće nego koncentracija ANP-a (Sundsfjord i sar., 1988; Buckley i sar., 1989; Baker i sar., 1991; Vuolteenaho i sar., 1992; Leskinen i sar., 1994; Arjamaa i sar., 1996; Wijbenga i sar., 1999). Razlike u osnovnim koncentracijama u plazmi je objašnjena razlikom u vremenu eliminacije ovih peptida (Ruskoaho, 1992). Zbog mnogo stabilnije koncentracije u plazmi, NT-ANP se smatra boljom alternativom za merenje nivoa otpuštanja ANP-a

posebno za dijagnostičke i prognostičke svrhe u humanoj medicini (Kettunen i sar., 1994).

Rezultati istraživanja efekata starenja jedinke na koncentraciju ANP-a su kontroverzni. Smatralo se da starenje izaziva povećanje koncentracije ANP-a u krvi, pošto se kod starijih ljudi i pacova pronalaze povećane koncentracije ANP-a (Cugni i sar., 1992; Wu i sar., 1997). Nasuprot ovim rezultatima, McKeever i Malinowski (1999) nisu utvrdili razlike u koncentracijama ANP-a kod konja starih 22 i 5 godina. Clark i sar., (1990) ističu da je koncentracija ANP-a u plazmi mlađih žena (19–42 godine) viša nego kod mlađih muškaraca (19–45 godina). Ovakve razlike nisu zabeležene kod starijih osoba: koncentracija ANP-a kod starijih žena (64–80 godina), nije veća nego kod starijih muškaraca (62–86 godina). Zanimljivo je, pri tome, da je smanjen sadržaj ANP-a registrovan u atrijalnom tkivu i tkivu hipotalamusa kod starijih pacova (Wu i sar., 1997).

Povećane koncentracije natriuretičnog peptida su povezane sa različitim bolestima uključujući povišeni pritisak ili preopterećenje povećanim vaskularnim volumenom srca. (Vesely 1999) Kod ljudi se povećanje koncentracije ANP-a koristi kao prognostički indikator u proceni rizika nakon akutnog infarkta miokarda, kao i marker poremećenog funkcionisanja srca (Vesely, 1999, 2001).

Klinička upotreba natriumuretičnih peptida u veterinarskoj medicini je mnogo manje dokumentovana. Tako su, na primer, Hori i Kikuci, 2009. godine, ispitivali koncentraciju ANP-a kod teladi sa i bez kongenitalnih srčanih oboljenja i utvrdili da dobijene vrednosti koncentracije ANP-a obezbeđuju dodatne informacije korisne za predviđanje hemodinamskih poremećaja. Hori i Ukai (2008) su ispitivali relaciju između protoka krvi kroz pulmonarnu venu i koncentracije ANP-a i utvrdili da postoji jasno izražena veza između brzine protoka krvi kroz pulmonalnu venu, kapilarnog pritiska i koncentracije ANP-a kod klinički zdravih pasa.

Poznato je da ANP izaziva brzu i temeljnu vazodilataciju i izraženu natriurezu. ANP inhibira sekreciju vazopresina, renina i aldosterona i takođe sprečava vezivanje aldosterona za ćelije tubula u bubrezima. U praktičnom smislu ANP je uključen u oslobađanje krvi iz krvnih depoa za vreme rada i u drugim stresnim stanjima. Dokazi za ovaj efekat su pronađeni u dve studije koje pokazuju da se koncentracija ANP-a u

plazmi menja linearno sa povećanjem opterećenja i pulsa i kreće se u granicama od 5 do 10 pg/ml u mirovanju do vrednosti većih od 60 pg/ml u opterećenjima koja su dostizala  $VO_2$ max (Mc Keever, 1995). Srednja vrednost koncentracije ANP-a je bila u korelaciji sa frekvencijom pulsa (McKeever, 1990). U drugoj studiji je utvrđeno da se koncentracija ANP-a u krvi, od 10 pg/ml u mirovanju povećala do 40 pg/ml posle 40 minuta konstantnog submaksimalnog opterećenja (Kokkonen, 1999). Slične vrednosti navodi i Nyman (1998), koji je uočio da koncentracija ANP-a zavisi i od stepena hidracije konja. Konji koji su bili preterano hidrirani imali su najviše vrednosti ANP-a tokom rada, u poređenju sa normohidriranim i konja sa dehidracijom.

Neki istraživači su ispitivali efekte rada na lučenje ANP-a, sa posebnim akcentom na interakciju između količine tečnosti i elektrolita i lučenja vazopresina i kateholamina. Pri tome su utvrdili da koncentracija ANP-a u cirkulaciji ostaje povišena i po prestanku opterećenja, i to kao rezultat odgovora na radom povećanu zapreminu cirkulišuće krvi, a ne na lučenje vazopresina i kateholamina (Kokkonen, 2002).

Promene koncentracije ANP-a tokom dana je takođe značajno pratiti da bi se ustanovila tačna razlika između fizioloških i patoloških promena u koncentracijama.

## **2.6. Efekti opterećenja na lučenje atrijalnog natrijumuretičnog peptida**

Konji su prirodni sportisti predodređeni za velika, pa čak i ekstremna fizička naprezanja. Kardiovaskularni, respiratorni i muskuloskeletalni sistem su specijalizovani za rad u uslovima enormno povećanih potreba za kiseonikom, sa ogromnim adaptacionim sposobnostima i na aerobne i na anaerobne uslove rada. Zahvaljujući tome, konj veoma lako podnosi velika naprezanja, kako tokom najvećih brzina u galopu kada srce radi frekvencom većom od 230/min, tako i u trkama izdržljivosti na 160 kilometara. U kojoj meri ovakva opterećenja utiču na oslobađanje natrijumuretičnih peptida, da li ovako oslobođeni natrijumuretični peptidi utiču na rad srca i radnu sposobnost i, konačno, da li se vrednost natrijumuretičnih peptida može koristiti kao parametar za procenu funkcionalnih rezervi srca nije još uvek razjašnjeno (Kokkonen i sar., 2002).

ANP i BNP se kontinuirano oslobađaju iz srca, pri čemu se stepen oslobađanja povećava uz odgovarajući stimulus. Opisani su brojni faktori koji utiču na oslobađanje ANP-a: istežanje pretkomora, srčana frekvenca, neuroendokrini faktori (adrenalin, noradrenalin, acetilholin, vazopresin, glukokortikosteroidi, tireoidni hormoni, angiotenzin 2, opijati), periferni i nervni sistem, osmolarnost, hipoksija, hipokapnija, ishemija miokarda, metaboličke promene, starost, cirkadijalne varijacije, fizičko opterećenje, izloženost velikim vrućinama i hladnoćama itd (Hinchliff 2000; Gehlen i sar., 2007; Marr, 2010).

Ishrana bogata glutaminom i trening mogu da utiču na količinu ANP-a u sekretornim granulama. Tako na primer, utvrđeno je povećanje broja i dijametra granula u atrijalnim kardiomiocitima kod treniranih miševa i još veće povećanje kod treniranih miševa koji su dodatno hranjeni sa povećanim koncentracijama glutamina u hrani u odnosu na kontrolnu grupu (de Souza, 2015).

Rastežanje miocita se smatra centralnim regulatorom sekrecije atrijalnog natrijumuretičnog peptida. Ipak, mnoga istraživanja ukazuju na kompleksniji mehanizam sekrecije natrijum uretičnih peptida. Rastežanje kardiomiocita može biti posredovano različitim endogenim faktorima kao što su endotelin 1, azotni oksid i angiotenzin 2. Ranija ispitivanja *in vitro* i *in vivo* potvrdila su da tahikardija stimuliše sekreciju ANP-a. Tahikardija, međutim, po svemu sudeći nije primarni stimulator sekrecije ANP-a. Povećana frekvenca srčanog rada *in vivo* dovodi do određenih hemodinamskih promena koje mogu da objasne otpuštanje ANP-a. Neke studije, nadalje, pokazuju da se sa povećavanjem frekvence srčanog rada ne povećava linearno koncentracija ANP-a, te da se povećanje koncentracije ANP-a može izazvati u eksperimentalnim uslovima u kojima se pretkomorski pritisak povećava sa istovremenom inhibicijom pulsa (Kokkonen i sar., 1999; Kokkonen i sar., 2002, Marr, 2010).

Kardiovaskularni sistem konja se prilagođava opterećenju hronotropnim i inotropnim mehanizmima koji se karakterišu povećanjem broja otkucaja srca, povećanjem kontraktilnosti i skraćanjem trajanja sistole. Sve ove vrednosti su pod kontrolom autonomnog nervnog sistema koji ove efekte kontroliše posredstvom kateholamina (Hinchliff 2002, Marr 2010).



Povećanjem frekvencije i kontraktilnosti srca povećava se efektivnost srčanog rada koja je za 2 do 3 puta veća nego kod drugih vrsta životinja ili čoveka. Kod visokog stepena opterećenja kao što je, na primer, test opterećenja na pokretnoj traci (tredmilu) brzinom od 7–9 m/s, tokom 8 minuta dolazi do povećanja pritiska u komorama i povećanja udarnog volumena sa posledičnim oslobađanjem ANP-a. Nasuprot tome, opterećenje niskog intenziteta (test opterećenja na tredmilu brzinom od 4–7 m/s) za 8 minuta se povećava frekvencija i minutni volumen – bez značajnog povećanja udarnog volumena i pritiska u desnoj komori, zbog čega izostaje i oslobađanja ANP-a. Ako drugi parametri nisu poremećeni (temperatura, bilans tečnosti i elektrolita) koncentracija ANP-a se vraća na normalnu vrednost za 30 minuta nakon rada. Utvrđeno je, takođe, da povećanje hematokritske vrednosti kao posledica istiskivanja krvi iz slezine bitno utiče na povećanje pritiska u desnoj komori srca, a samim tim i na oslobađanje ANP-a (Kokkonen i sar., 2002; Hinchcliff, 2004., 2008; Marr, 2010).

## **2.7. Kardiovaskularni odgovor na opterećenje**

Puls se kod konja veoma brzo menja u zavisnosti od opterećenja, tj. od simpatičke aktivnosti i/ili oslobađanja kateholamina. Veoma visoke vrednosti pulsa, iznad submaksimalnih vrednosti, mogu da se izmere na početku rada. Nakon toga srce postepeno smiruje svoj rad do ravnomernog broja otkucaja. Utvrđena je linearna veza između pulsa i submaksimalnog opterećenja kod konja u kasu, galopu ili prilikom plivanja (Seeherman, 1991). Ovaj podatak je dobijen upotrebom pokretne trake (treadmill) sa postupnim povećavanjem opterećenja tj. brzine na svaka 2 minuta. Nakon početnog perioda zagrevanja – 3 minuta kasa, srčani ritam bi se stabilizovao na novoj vrednosti nakon 1 minuta rada na većoj brzini pokretne trake. Takvo povećanje vrednosti opterećenja (brzine pokretne trake) bi išlo linearno sve do postizanja individualnog maksimuma u broju otkucaja srca, kada bi srce postiglo svoj plato bez obzira na povećanje brzine pokretne trake.

Najveće prosečne vrednosti pulsa kod engleskog punokrvnjaka u trci iznosile su 223 otkucaja u minutu, u opsegu od 204 do 241 otkucaja u minuti (Krzywanek, 1970). U drugom eksperimentu kod 8 grla starosti od godinu dana engleske punokrvne rase

srednje vrednosti pulsa su bile 240 otkucaja u minuti, u poređenju sa 220–230 otkucaja u minuti izmerenim kod grla starosti 2–4 godine (Rose, 1990). U sličnom eksperimentu kod progresivnog opterećivanja na pokretnoj traci, izmerene su slične srednje vrednosti: 229–231 otkucaja u minuti, kao i slični opsezi 215–254 otkucaja u minuti (Seeherman, 1991).

U jednoj retrospektivnoj multicentričnoj studiji, (Vincen 2006) starost konja, pol, rasa, namena kao i stepen utreniranosti, u kombinaciji sa testom opterećenja na pokretnoj traci, su pokazali da značajno utiču na individualne razlike za najviše vrednosti pulsa. Sve ukupno prethodno navedene varijable su odgovorne za 41% variranja u maksimalnoj vrednosti pulsa. Starost je uticala sa nekih 13 % , dok zdravstveno stanje i telesna težina nisu uticali na predvidiv način na vrednosti pulsa. Visoka individualna varijabilnost u visini pulsa tokom trke je utvrđena i kod kasača, u opsegu od 210 do 238 otkucaja u minuti, sa srednjom vrednošću od 221 otkucaja u minuti (Asheim, 1970). Utvrđeno je, na primer, da trenirani konji mogu da izvode isti rad kao i netrenirani sa manjim prosečnim vrednostima pulsa. Takođe je utvrđeno da kobile imaju prosečno više vrednosti pulsa pri istom radu u odnosu na muške jedinke – 145 naprema 132 (Mukai, 2003).

U eksperimentu na konjima koji su plivali u bazenu, vrednosti pulsa su varirale značajno od konja do konja, u intervalu od 130 do 180 otkucaja u minuti (Murakami, 1976). I u drugim disciplinama su izmerene različite vrednosti, u zavisnosti od vrste opterećenja koje ta disciplina nosi. U preskakanju prepona, na primer, srednja vrednost pulsa iznosila je  $191 \pm 3$  otkucaja u minuti (Art, 1990). U militariju, nadalje, tokom faza A i C (putevi i staze, pretežno kas, tempo 220 m/min), izmerene vrednosti pulsa su se kretale u opsegu od  $118 \pm 11$  i  $135 \pm 28$  otkucaja u minuti. Tokom faza B i D, (galop sa preponama, tempo 600 m/min) izmerene vrednosti su bile očekivano više – u opsegu od  $175 \pm 23$  i  $171 \pm 19$  (White, 1995).

Tokom dugotrajnog submaksimalnog opterećenja sa konstantnim inenzitetom rada zabeleženo je postupno povećanje pulsa, iako je opterećenje ostalo isto (kardiovaskularni drift). Nakon tridesetominutnog rada vrednosti pulsa su se povećale od početnih 154 otkucaja u minuti do završnih 173 okucaja u minuti (Thomas, 1990). Ovo skretanje (drift) se dešavalo sa sinhronim povećanjem potrošnje kiseonika, kao i

povećanjem minutnog volumena dok je udarni volumen ostao isti. U isto vreme koncentracija laktata je porasla, a parcijalni pritisci kiseonika i ugljen dioksida su ostali isti. U drugoj studiji, opet, konji koji su radili na 55–60% od individualnih maksimalnih vrednosti pulsa imali su minimalne promene pulsa nakon 60 minuta rada (Hinchcliffe, 1990).

Promena pulsa za vreme dužeg opterećenju se tumači gubitkom tečnosti i uticajem sredine, kao i zamorom. U ogledu u kome su testirani normohidrirani konji, konji sa izotoničnom dehidracijom (4 časa nakon aplikacije furosemida u dozi od 1,0 mg/kg), i konji sa hipertoničnom dehidracijom (nakon 30 sati uzdržavanja od vode), najveći drift se odigrao upravo kod dehidriranih konja. Nakon 30 minuta rada puls je kod dehidriranih konja bio značajno veći nego kod kontrolne grupe normohidriranih konja. Vreme oporavka je takođe bilo duže kod obe grupe dehidriranih konja (Naylor, 1993).

## **2.8. Uticaj opterećenja na pojedine hematološke i biohemijske parametre krvi**

Tokom rada dolazi do adaptacije organizma i kardiovaskularnog sistema na novonastalo opterećenje. Kardiovaskularni sistem se prilagođava brzim hronotropnim i inotropnim dejstvom, kojae se karakteriše ubrzanjem srčanog rada, pojačanjem snage kontrakcije srca i skraćanjem vremena trajanja sistole. Takođe, kontrakcijom trabekula u slezini oslobađa se velika količina eritrocita iz slezine. Količina oslobođene krvi iz slezine zavisi od rada, starosti, pola i stepena utreniranosti i može dostići čak 12 litara. Posledično dolazi do povećanja vrednosti hematokrita za 15% i više. Povećanje zapremine cirkulišuće krvi, zajedno sa pokretima mišića i povećanim intratorakalnim pritiskom, povećava se vensko punjenje srca, što dovodi do povećanja pritiska u pretkomorama i povećanog rastezanja miokardijalnih vlakana. Rose i Hodgson (1994) iznose podatak da slezina može da uskladišti i do 50% ukupnih eritrocita. Oni smatraju da postoji linearno povećanje hematokrita sa intenzitetom rada, dok intenzitet ne dostigne 3/4 brzine. Na osnovu njihovih ispitivanja kod odraslih sportskih konja maksimalna hematokritska vrednost iznosi 0,60–0,65 l/l, sa srednjim nivom od 0,61 l/l. Oni takođe smatraju da je većina ovih poremećaja vezana za oslobađanje eritrocita iz

slezine, ali da povećanje hematokritske vrednosti nastaje i usled redistribucije tečnosti tokom vežbanja.

Ovakva adaptacija je pod kontrolom autonomnog – vegetativnog nervnog sistema, koji postiže svoje efekte uz pomoć oslobađanja kateholamina iz simpatičkih vlakana i iz srži nadbubrega. Direktni rezultat povećavanja frekvencije srca i volumena krvi je povećanje minutnog volumena srca (Stephenson, 1997; Marr i Bowen, 2010). Utvrđena je pri tome linearna korelacija između broja otkucaja srca i submaksimalnog napora. Dalje povećanje opterećenja ne dovodi do povećanja frekvencije srca već konj radi na sopstvenom maksimumu – platou frekvencije rada srca (Rose, 1994).

Periferni otpor se smanjuje tokom rada, pokazujući da se značajan deo skeletnih mišića uključuje u rad (Stephenson, 1997). Nervni faktori, hipoksija i lokalni vazoaktivni metaboliti koji se oslobađaju tokom mišićnog rada utiču na vazodilataciju i povećan protok krvi do mišića i kože. Eksperimentalno je pri tome utvrđeno da ANP ima vazorelaksantni uticaj i da se plazma koncentracija ANP-a povećava tokom rada (McKeever, 1991; McKeever i Malinowski, 1999).

Nemi Jain (1986) je ispitala efekte napornog rada kod engleskog punokrvnjaka na parametre krvne slike. Konjima je uzimana krv pre i neposredno posle trke na jednu milju, uz upoređivanje dobijenih vrednosti broja eritrocita, koncentracije hemoglobina i hematokrita. Tako je hematokrit pre trke iznosio 0,36–0,47, a posle trke 0,50–0,56, što pokazuje da je povećanje iznosilo od 15% do 37%. Broj eritrocita se pre trke kretao u rasponu  $7,9\text{--}11,02 \times 10^{12}/l$ , a posle trke u rasponu od  $9,42\text{--}11,40 \times 10^{12}/l$ . Promene su zabeležene i u koncentraciji hemoglobina i ova vrednost se kretala od 133 do 158 g/l pre trke, i 170 do 186 g/l posle trke. Nemi Jain smatra da do povećanja ovih vrednosti dolazi usled kontrakcija slezine tokom opterećenja i istovremene redukcije volumena plazme.

U toku intenzivnog rada i opterećenja dolazi i do promena vrednosti eritrocitnih indeksa MCV, MCH, MCHC. Smith (1989) navodi da kod konja posle napornog rada dolazi do povećanja MCV i smanjenja MCHC i MCH. I drugi autori su ispitali promene eritrocitnih indeksa, uz konstataciju da je vrednost MCV značajna za procenu njihovih trkačkih sposobnosti. Cornelia Detlef (1985) i Nemi Jain (1986) naglašavaju da se kod vrhunskih konja mogu očekivati vrlo uske granice vrednosti MCV. Vrednosti iznad 47

fl su odraz nedovoljne utreniranosti, a vrednosti ispod 39 fl znak su iscrpljenosti usled napornog rada.

## **2.9. Uticaj opterećenja na bilans tečnosti i elektrolita**

Konji su sposobni za rad visokog intenziteta – pri punoj brzini u galopskoj trci, brzina metabolizma se može povećati i 60 puta iznad vrednosti bazalnog metabolizma (Guthrie i Lund, 1996). Nagli porast metaboličke aktivnosti dovodi do ogromnog povećanja u potražnji i potrošnji kiseonika, oslobađanja različitih metaboličkih nusprodukata i potrebe za njihovim uklanjanjem, zatim do stvaranja i oslobađanja toplote (Mc Cuchan 1999). Tokom maksimalnog opterećenja konja dolazi do velikih gubitaka tečnosti iz ekstracelularnog prostora, sa posledičnim povećanjem koncentracije ukupnih proteina i albumina. Stepem gubitka tečnosti dovodi se u vezu sa trajanjem intenzivnog rada. Prema Trailoviću (1992) porast vrednosti ukupnih proteina veći je u trkama dužim od 1600 m nego u trkama na 1200 do 1400 metara. Promene u bilansu tečnosti su u većini slučajeva prolazne i kratkotrajne, pri čemu u roku od 30 minuta posle rada dolazi do normalizacije i vraćanja na početne vrednosti.

Kod većine trkačkih konja stepen gubitka tečnosti putem znoja je relativno mali, prvenstveno zato što trka traje kratko, maksimalno 3–4 minuta, tako da se nakon trka u proseku izgubi 5–10 kg telesne mase. Međutim kod konja koji se pre trke transportuju u uslovima visokih spoljašnjih temperatura, može nastati obimniji gubitak putem znojenja, koji se prvenstveno dovodi u vezu sa transportom. Ovi gubici se mogu povećati kada su konji razdraženi – pod stresom, kada se otpušta veća količina kateholamina (Rose, i Hodgson, 1993).

U testovima izdržljivosti, kao što su endjurans trke, dolazi do značajnih gubitaka tečnosti, uz smanjenje telesne mase od 5–8%, što predstavlja gubitak tečnosti od 25 do 40 litara. Stepem gubitka tečnosti zavisi od spoljašnje temperature i vlažnosti vazduha. Najveći gubici u tečnostima i elektrolitima su upravo zabeleženi u uslovima povišene spoljašnje temperature i vlažnosti. Kerr i Snow (1982) su ispitivali obim gubitka znoja tokom rada u uslovima povišene spoljašnje temperature vazduha i zaključili da u trkama izdržljivosti prosečna stopa gubitka telesne mase iznosi 1,5% po času rada. Zanimljivo

je napomenuti da su u nizu studija o trkama izdržljivosti uočeni značajni gubici tečnosti i tokom ranih faza rada, pri čemu je povećanje vrednosti ukupnih proteina i albumina u plazmi bilo mnogo veće u periodu od početka do sredine rada, nego od sredine do završetka rada. Smanjenje stope gubitka tečnosti tokom kasnijih faza rada verovatno nastaje zbog smanjenja brzine produkcije znoja (Rose i Hodgson, 1991, Santos 2001).

Prema istim autorima (Rose i Hodgson 1991), tokom kratkotrajnih opterećenja visokog intenziteta dolazi do prolaznih promena u koncentracijama mnogih sastojaka krvnog seruma ili plazme, u prvom redu elektrolita i acidobaznog statusa. Nakon istrčane trke na distancama od 1200 do 1400 m, na primer, uz disbalans elektrolita može doći do akumulacije kiselih metabolita sa odgovarajućim acidobaznim poremećajima. Kao posledica gubitka ekstracelularne tečnosti dolazi do zadržavanja i povećavanja koncentracije natrijuma. Pri tome se povećava i koncentracija kalijuma, ponekad sa vrednostima od 10 i više mmola/l. Smatra se da je povećanje koncentracije kalijuma dodatno uslovljeno akumulacijom jona vodonika u aktivnom mišiću. Kao posledica disbalansa vodonika i kalijuma, pri tome dolazi do oštećenja  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATP-azne pumpe, koja je uzrok daljih poremećaja homeostaze.

Povećanje koncentracije kalijuma u plazmi je prolaznog karaktera i u većini studija u kojima su uzorci krvi uzeti nekoliko minuta nakon maksimalnog opterećenja kalijemija je bila u okvirima normalnih vrednosti za konje u mirovanju. Međutim, veći broj autora smatra da je smanjeni potencijal mišićne membrane, uslovljen smanjenjem koncentracije intracelularnog kalijuma i povećanjem koncentracije kalijuma u ekstracelularnoj tečnosti, bitan faktor koji doprinosi zamoru tokom ekstremnih fizičkih naprezanja (Rose i Hodgson, 1993).

U većini studija koje su za cilj imale ispitivanje efekata opterećenja visokog intenziteta nisu ustanovljena bitnija odstupanja u hloremiji, uprkos povećanju koncentracije natrijuma i ukupnih proteina u plazmi, koje je prvenstveno uslovljeno kretanjem ekstracelularne tečnosti. Razlog tome bi moglo biti veliko povećanje vrednosti još jednog jakog anjona – laktata, koji je odgovoran za razmenu hlorida (Baggot, 1993).

Koncentracija bikarbonata ili ukupnog ugljen-dioksida smanjuje se nakon trke za 5–10 mmol/l. Ovo opadanje vrednosti bikarbonata odigrava se istovremeno sa velikim porastom koncentracije jona vodonika, pri čemu se pH vrednost venske krvi smanjuje

na ispod 7,0. Međutim, ubrzani metabolizam laktata posle rada uzrokuje brzo povećanje pH vrednosti i bikarbonata, tako da se vrednosti pH vraćaju na normalu do 90 minuta nakon rada.

Efekti produženog opterećenja niskog intenziteta se razlikuju od efekata opterećenja visokog intenziteta. Testovi izdržljivosti uzrokuju znatne gubitke elektrolita putem znojenja, zato što je koncentracija elektrolita u znoju konja velika – konjski znoj je hipertoničan u odnosu na plazmu. Tokom testova izdržljivosti u uslovima visokih temperatura vazduha konj može da izgubi između 5 i 10% svoje telesne mase, prvenstveno znojenjem. Intenzivno znojenje, pri tome, pored gubitka vode, dovodi do značajnih promena u koncentraciji elektrolita u plazmi.

Koncentracija natrijuma u plazmi može ostati nepromenjena, može se smanjiti ili povećati, u zavisnosti od uslova i trajanja testa izdržljivosti. Tako je prilikom jednog istraživanja utvrđeno povećanje koncentracije  $\text{Na}^+$  u krvnoj plazmi sa 140 na 148 mmol/l, bez obzira na procenjeni gubitak natrijuma preko znoja od preko 5900 mmol. Umereno opadanje vrednosti koncentracija kalijuma u plazmi ili serumu takođe je zabeleženo nakon trka izdržljivosti, iako su registrovani i manji porasti. Uprkos umerenim promenama vrednosti kalijuma u plazmi ili serumu, smanjenje ukupnog sadržaja kalijuma u organizmu će se verovatno dogoditi u slučajevima znatnog znojenja, iako pomenuti pad vrednosti iznosi verovatno samo 25–50% od pada vrednosti ukupnog razmenljivog natrijuma (Rose i Hodgson, 1982).

Gubici hlorida tokom vežbi izdržljivosti mogu biti znatni, zato što se putem znoja gubi glavni ekstracelularni anjon. Najveći broj istraživača je u testovima izdržljivosti zabeležio pad vrednosti hlorida u plazmi ili serumu, neretko za 10 do 15 mmol/l u odnosu na normalne vrednosti. Gubitak hlorida pri tom može da dovede do zadržavanja bikarbonata u bubrezima i nastanka metaboličke alkaloze. Maksimalno povećanje koncentracije bikarbonata obično varira za 3 do 5 mmol/l. Ova istraživanja su dovela do zaključka da je primena bikarbonata, intravenski ili kroz hranu, kontraindikovana kod konja u trkama izdržljivosti (Rose i Hodgson, 1982).

## 2.10. Uticaj rase na radne i sportske performanse konja

Moderne rase konja vode poreklo od različitih predaka, pri čemu se prema stepenu nasleđa od arapskog ili engleskog punokrvnog konja svrstavaju u tri osnovna tipa konja: punokrvne, toplokrvne (polukrvne) i hladnokrvne. Iako se svi mogu koristiti za različite vrste rada, između ovih tipova postoje velike razlike. Neki su predodređeni za opterećenja visokog intenziteta, u velikim brzinama, koja traju veoma kratko, drugi za opterećenja niskog intenziteta koja traju dugo, treći za opterećenja u kojima dominira smaga. U želji da ispitamo korelaciju između ova tri tipa opterećenja i oslobađanja natriuretičkih peptida, izdvojili smo tri rase konja: engleskog punokrvnjaka, arabera i domaćeg brdskog konja. I engleski punokrvnjak i araber su dobro poznati – na njima su definisani stavovi o adaptaciji organizma na kratkotrajna opterećenja visokog intenziteta i dugotrajna opterećenja niskog intenziteta. O domaćem brdskom konju se zna mnogo manje – on se koristi kao tovarna životinja koja je u stanju da na svojim leđima ponese ogroman teret krećući se na velikim uzbrdicama. O adaptaciji organizma na ovakva opterećenja se veoma malo zna.

Domaći brdski konj je autohtona rasa koja je nastala na prostorima zapadnog Balkana, na teritoriji Srbije, Bosne i Hercegovine, Crne Gore, Makedonije i Dalmacije. Populacije domaćeg brdskog konja pripada velikoj grupi autohtonih ponija koji nastanjuju Balkansko poluostrvo (Trailović, 2009). Domaći brdski konj zapadnog Balkana nije planski uzgajan, osim u Bosni i Hercegovini. Prema Ogrizeku i Hrasnici (1952), poreklo domaćeg brdskog konja je difiletsko: on je nastao od tarpana (*Equus ferus*) i prževalskog (*Equus Przewalskii*).

U pojedinim zabačenim planinskim područjima do danas se sačuvao originalni tip brdskog konja sa zapadnog Balkana. Ovaj konj je snažnog do grubog kostura, teške glave, kratkih kompaktnih leđa. Telo ovih grla je pokriveno dosta grubom i dugom dlakom, naročito zimi, koža je debela, mišići snažni gotovo vretenasti, mirnog temperamenta i ujednačenog hoda. Boja kože i dlake ne može služiti za karakterizaciju rase. Domaći brdski konj je najčešće dorat, kulaš ili vranac, ređe zelenko ili svetli alat, ali se pojavljuju krem konji i izabeli. Mnoga grla imaju jeguljastu prugu duž leđa, a na plečkama i sapima i duž ekstremiteta se uočavaju tamne pruge. Ima i grla kod kojih je



dlaka na stomaku svetlija. Glava je najčešće ravna, često gruba, a format gotovo kvadratast. Leđa ovih grla su kratka, naročito lumbalni deo, građa zbijena, ekstremiteti čvrsti, a kopita mala, pigmentirana i čvrsta.

Stav zadnjih nogu je često sabljast što je posledica evolutivne adaptacije na strme terene. Malog je rasta, mada ima lokaliteta gde su grla krupnijeg formata. Divergencija je eksterijerno uočljiva pojava, naročito između populacija koje su bile pod uočljivim i/ili planskim uticajem orijentalnih konja koje nalikuju bosansko-brdskom konju, i populacija u geografski izolovanim lokalitetima gde nisu uočljivi uticaji arabera.

Domaći brdski konj je veoma prilagođen ekstremnim sezonskim promenama i uslovima oskudne ispaše. Visok je oko 120 cm. Nije obuhvaćen evidencijom i nije detaljno opisan niti su definisani tipovi. Na prostorima Srbije i Crne Gore, prisutno je više biogeografski izolovanih populacija domaćeg brdskog (jugoslovenskog brdskog konja).

Ovo je idealan tovarni konj, izuzetno prilagođen terenu u staništu, koji može služiti u zaprezi i kao jahaći konj, a gotovo je nezamenjiv u uslovima planinskog regiona. Domaći brdski konj je kasnostasan, kobile se prvi put ždrebe u starosti 5–6 godina, ali su dugovečne, a reproduktivni vek im se proteže i do 30 godina. Ovaj konj se može kretati brzinom od 13 m/s u galopu, kasom uz planinu dostiže 20 km/h, a može da izdrži velike distance i težak teret na samaru (oko 200 kg). Tradicionalno, domaći brdski konj se gaji u sistemu slobodnog držanja, te direktno zavisi od klimatskih uslova, nepogoda i predatora.

Monitoring različitih populacija domaćeg brdskog konja otkriva veliku interpopulacijsku varijabilnost i odličnu prilagođenost strmim terenima i surovom lokalnom, planinskom mikroklimatu na različitim planinama Srbije i Crne Gore (Trailović i sar., 2003). Ispitivanja funkcionalnog polimorfizma biohemijskih markera su pokazala da je autohtona populacija domaćeg brdskog konja izvan područja Bosne i Hercegovine značajno divergirala u odnosu na selekcioniranog bosansko brdskog konja (Trailović, 2009).

Arapski konj, arapski punokrvni konj ili araber je jedna od najstarijih, najlepših i najčistijih rasa konja na svetu. Nastao je na prostorima današnjeg Arapskog poluostrva (visoravan Neđev), selekcijom u izuzetno teškim uslovima, u veoma sušnoj klimi i prirodi koja je oskudevala u hrani. Proto-arapski konji su domestifikovani od strane

nativnog stanovništva arapskog poluostrva – Beduina, pre 4000–5000 godina, nakon što su domestifikovane kamile. Pustinjska sredina je uticala na uspostavljanje veze između konja i ljudi, jer su ljudi omogućavali konjima da prežive. Kada nije bilo hrane i vode Beduini su svoje konje hranili urmama i kamiljim mlekom da bi opstali. Takođe selekcija konja je bila na izdržljivost, brzinu i inteligenciju jer su to bile osobine koje su omogućile opstanak i ljudi i konja. Visina grebena se kreće od 145 cm do 155 cm. Iako se za granicu poni rasa uzima 147cm araber se i dalje smatra za rasu konja. Masa im je od 400 do 450 kg. Glava je konkavnog – arapskog profila, skladna, krupnih očiju i širokih nozdrva. Telo je kvadratičnog formata, kratkih i ravnih sapi, visoko nasadenog repa. To su konji izuzetne čvrstoće i izdržljivosti, stabilnog temperamenta i velike snage. Takođe poseduju još jednu specifičnost a to je da imaju 17 pari rebara i 5 slabinskih pršljenova za razliku od drugih konja koji imaju 18 pari rebara i 6 slabinskih pršljenova. Zastupljene su sve boje ali je najčešća bela (siva), dorata, alata i vrana. Upotreba im je prvenstveno za jahanje i nošenje tereta na velikim udaljenostima. Njihovi rezultati na takmičenjima u endjursu su zaista neverovatni. Rekord na 160 km je 5 časova 45 minuta i 44 sekunde, koji je postigao takmičar Al Belushi na grlu Jazhal Schazal 20 marta 2010. godine.

Araberi se na prostoru Balkanskog poluostrva javljaju sa povratkom vitezova iz krstaških ratova, koji su arapske konje uzimali kao ratni plen. Novi priliv arapskog konja se vezuje za dolazak Turaka i opsadu Budimpešte i Beča, kada je velika Turska konjica dovela i dosta konja arapskog porekla. U novije vreme su osnivane ergele: Borike u Bosni i Hercegovini, 1895. godine, Kabijuk-Šumen u Bugarskoj, 1864. godine, Babolna u Mađarskoj, 1789. godine, i Mangalia u Rumuniji – iz ovih ergela potiče većina arapskih konja na ovim prostorima.

Engleski punokrvnjak je, pored arapskog konja, najpoznatija i najispitanija rasa konja. Počeci rase sežu u 18. vek, na područje Engleske, kada je počelo plansko ukrštanje engleskih domaćih kobilica za trke i tri orijentalna pastuva. Prvi je Beyerly Turk, arapski punokrvnjak oždrebljen 1689. godine u okolini Zaječara, zaplenjen od strane kapetana Beyerlija tokom opsade Budimpešte 1686. godine; drugi je Dairly Arabian, takođe arapski punokrvnjak, oždrebljen 1705. godine i treći Godolphyn Arabian, arapski punokrvnjak, oždrebljen 1728. godine. Od tri navedena pastuva, koji se smatraju rodonačelnicima rase, nastale su tri linije konja: Eclipse, Matchem i Herod. Potomstvo

ovih konja se detaljno prati od 1793. godine, kada je osnovan engleski studbuk (General Stud Book). Istraživanje DNK modernih engleskih punokrvnjaka pokazuje da 95% današnjih konja potiče od Darley Arabiana (Pickarel, 2005).

Engleski punokrvnjak je konj skladne građe, visine u grebenu od 160 do 165 cm, a težine od 400 do 500 kg. Kako je selekcija išla u pravcu razvijanja što brže jedinke cela pojava konja to odslikava. To je rasa gracilnih konja, fine glave sa širokim nozdrvama, dugačkog vrata, širokih grudi, finih nogu sa jasno izraženim tetivama i zglobovima, čvrstih leđa i jakih sapi. Uzgaja se u čistoj krvi i koristi kao meliorator drugih populacija konja. Engleski punokrvnjak predstavlja jednu od najsvestranijih rasa konja na svetu. Koristi se prvenstveno za galopske trke i jahanje (preskakanje prepona i militari). Odlikuje ga plemenitost, ekstremna brzina, hrabrost i izdržljivost. Brzine koje postiže su fantastične : rekord na 1000 metara od 53,75 sekunde postigao konj Starfish Bay 2010 godine, na 2000 metara 1,55,2 konj Spectacular bid 1980, godine a na 2400m rekord i dalje drži čuveni Sekretarijat iz 1973 godine sa 2 minuta 24 sekundi .Najčešće boje su alata, dorata i siva. Na prostorima Balkana i Srbije javlja se krajem 19. veka kada su uvožena grla za trke iz Engleske u Austrougarsku, pa u Srbiju. Ergele se osnivaju početkom 20. veka i ostaju nosici odgoja sve do 90-ih godina, kad primat preuzimaju konji iz uvoza.



### 3. CILJ I ZADACI RADA

Ekstremni napori kojima su izloženi konji često su praćeni brzim zamaranjem i ubrzanim i/ili oteženim disanjem, koji ponekad podsećaju na simptome primarnih oboljenja respiratornog i kardiovaskularnog sistema. Takvi simptomi se najčešće dovode u vezu sa nedovoljnom treniranošću grla. Ipak, sumnja na primarno oboljenje mora biti ispitana.

Dijagnostika insuficijencije kardiovaskularnog sistema se zasniva na detaljnim ispitivanjima primenom odgovarajućih, mahom specijalističkih metoda kao što su elektrokardiografija i ehokardiografija, koje nisu pristupačne u terenskim uslovima. Iznalaženjem laboratorijskih indikatora insuficijencije srca u velikoj meri bi bio pojednostavljen postupak dijagnostikovanja subkliničkih oboljenja.

U humanoj medicini se poslednjih godina kao biomarker insuficijencije srca koriste atrijalni natrijumuretički peptidi, do čijeg oslobađanja u prvom redu dolazi kao posledica istežanja kardiomiocita. Kako do sličnih efekata može doći i za vreme većih fizičkih naprezanja, za pravilnu interpretaciju rezultata ispitivanja natrijumuretičkih peptida je pored poznavanja normalnih fizioloških vrednosti u mirovanju važno i poznavanje vrednosti uslovljenim određenim stepenom opterećenja.

U cilju bližeg poznavanja fizioloških vrednosti natrijumuretičkih peptida kod konja različitih rasa i namene, i procenjivanja njihove vrednosti u dijagnostici srčane insuficijencije, postavljeni su sledeći zadaci:

1. Da se utvrde bazalne vrednosti atrijalnog natrijumuretičkog peptida kod klinički zdravih domaćih brdskih konja, arabera i engleskih punokrvnjaka u mirovanju;

2. Da se ispita stepen oslobađanja atrijskog natrijumuretčkog peptida pri aerobnim opterećenjima niskog intenziteta kod konja u daljinskom jahanju;
3. Da se ispita stepen oslobađanja atrijskog natrijumuretčkog peptida pri anaerobnim opterećenjima visokog intenziteta kod konja u galopskoj trci;
4. Da se ispita stepen oslobađanja atrijskog natrijumuretčkog peptida pri mešovitim, anaerobnim i aerobnim opterećenjima kod tovarnih konja za izvlačenja drva;
5. Da se ispita uticaj frekvencije srčanog rada i dijametra srčanih šupljina na oslobađanje atrijskog natrijumuretčkog peptida A i
6. Da se proceni značaj atrijskog natrijumuretčkog peptida u ispitivanju funkcionalnog stanja kardiovaskularnog sistema kod sportskih i radnih konja.

## 4. MATERIJAL I METODE RADA

### 4.1. Materijal

Ispitivanjem je obuhvaćeno ukupno 36 konja rase araber, engleski punokrvnjak i domaći brdski konj, podeljenih u tri ogledne grupe: A, B i C. Grupa A se sastojala od domaćih brdskih konja (7 kastrata i 5 kobila), u starosti od 8–12 godina; grupa B se sastojala od 12 konja rase araber, 5 muškog pola (2 pastuva i 3 kastrata) i 7 ženskog pola, u starosti od 6–12 godina; dok se grupa C sastojala od 12 konja rase engleski punokrvnjak, 6 muškog pola (pastuvi) i 6 ženskog pola, u starosti od 3–6 godina.

Svi konji su bili klinički zdravi, u odgovarajućem treningu. Engleski punokrvnjaci su bili u treningu na hipodromu „Beograd“, u tekućoj sezoni pre planiranog ispitivanja imali su najmanje po jednu trku; araberi su nekoliko godina korišćeni u takmičenjima u endjuransu širom Srbije, dok su brdski konji „samaraši“ korišćeni za izvlačenje drva na području Javora i Golije (Ivanjica).

### 4.2. Plan i dinamika ispitivanja

Pred početak ispitivanja, 2–3 dana pre opterećenja, svi konji su podvrgnuti detaljnom kliničkom pregledu, uz poseban naglasak na stanje kardiovaskularnog sistema (opšti klinički pregled, EKG i ehokardiografija), u cilju isključivanja eventualnih patoloških poremećaja. Pre samog testa opterećenja su, pri tome, u mirovanju registrovane bazalne vrednosti kardio-pulmonalnih pokazatelja (frekvencija pulsa i disanja), da bi potom bili uzeti uzorci krvi za planirana hematološka i biohemijska ispitivanja (početne vrednosti

u mirovanju). Pregled brdskih konja i arabera u mirovanju i prvo uzorkovanje krvi obavljeno je u periodu od 2–3 časa pre opterećenja, za razliku od punokrvnih galopera koji su pregledani ujutro na dan trke oko 4–6 časova pre opterećenja. U uzorcima krvi ispitane su vrednosti osnovnih hematoloških parametara (broj eritrocita, koncentracija hemoglobina i hematokrit, MCV, MCH i MCHC, broj leukocita), koncentracija atrijalnog natrijumuretičnog peptida, ukupnih proteina, albumina, ureje, kreatinina, glukoze, natrijuma, kalijuma, kalcijuma, hlorida i bikarbonata, zatim aktivnost AST, LDH i CK.

Konji su bili podvrgnuti testu opterećenja u skladu sa njihovom namenom: punokrvni konji u galopskoj trci na 2000 m, araberi u endjuransu na 80 km i domaći brdski konji u testu izvlačenja drva na uzbrdici.

Domaći brdski konji su testirani na planini Javor iznad Ivanjice, tokom izvlačenja drva na samaru. Konji su na samaru nosili po 0,3 m<sup>3</sup> sirovog bukovog drveta (specifična težina sirove bukve je 720–1070 kg/m<sup>3</sup>), na putu od 300 m u vazdušnoj liniji, sa visinskom razlikom od 80 m.

Konji za endjurans su testirani na takmičenju održanom u Pančevu u maju 2015. godine na stazi od 80 km. Praćeno je ukupno 12 konja od kojih je trku završilo 8 – 4 konja su isključena iz takmičenja zbog nemogućnosti oporavka (preveliki puls) ili hramanja.

Engleski punokrvnjaci su testirani na trkačkoj stazi u trci dužine 2000 m – u Beogradu i Šapcu, tokom sezone trke 2015. godine.

Tokom opterećenja je registrovana frekvencija srčanog rada, da bi nakon opterećenja konji ponovo bili klinički pregledani i od svakog uzeti uzorci krvi za planirana hematološka i biohemijska ispitivanja, uz praćenje vremena oporavka tokom narednih 60 minuta. Poslednje uzorkovanje krvi je obavljeno posle odmora od 24 časa.

### **4.3. Metode ispitivanja**

Krv je uzimana punkcijom v. jugularis. Za punkciju vene korišćena je igla za vakuum sistem Monoject™ 21x1/2. Za hematološka ispitivanja krv je uzimana u vakuum epruvete – VENOJECT® u kojima se kao antikoagulans nalazio EDTA. Za biohemijska



ispitivanja krvi je uzimana u sterilne vakuum epruvete VacutainerR koji, je sadržavao SST gel aktivator zgrušavanja, iz kojih je kasnije u laboratoriji izdvajan serum. Za određivanje koncentracije ANP-a u serumu konja korišćene su vakuum epruvete sa inhibitorom proteaza – aprotininom: BD Vacutainer Aprotinin 250

Hematološka ispitivanja (eritrociti, hematokritska vrednost, hemoglobin, MCV, MCH, MCHC, leukociti i trombociti) izvedena su na automatskom analajzeru Diatron Abacus Vet, u programu za konje, dok su biohemijška ispitivanja (koncentracija ukupnih proteina, albumina, ureje, kreatinina, glukoze, natrijuma, kalijuma, kalcijuma i hlorida, zatim serumska aktivnost AST i CK obavljena spektrofotometrijski, primenom odgovarajućih komercijalnih test kitova, na biohemijškom analizatoru BSI Vet Evolution Automatic Analyser Screen Master 3000.

Koncentracija atrijalnog natrijumuretičkog peptida u serumu konja ispitivana je primenom ELISA testa za konjski ANP (*ELISA kit for equine atrial natriuretic peptide, Ucsn Life Science*).

Frekvencija pulsa tokom opterećenja bila je registrovana telemetrijskim pulsomerom za konje (Polar Equine RS8000CX science). Za ehokardiografski pregled srca konja korišćen je aparat Carewell Cus 9618 – plus sa konveksnom sondom od 3.5 MHZ u M-modu.

#### **4.4. Statistička obrada podataka**

Dobijeni rezultati su obrađeni primenom standardnih metoda statističke obrade, uz registrovanje osnovnih mera varijacije (aritmetička sredina, standardna devijacija, standardna greška, koeficijent varijacije i interval varijacije), uz procenu značajnosti razlika srednjih vrednosti primenom analize varijanse i Studentovog t-testa, korišćenjem programskog paketa Statistica 10.



## 5. REZULTATI

Kao što je u prethodnom poglavlju navedeno, ispitivanja su izvedena na 36 klinički zdravih konja rase domaći brdski konj, araber i engleski punokrvnjak, oba pola, koji su bili izloženi odgovarajućem testu opterećenja u skladu sa njihovom namenom i stepenom treniranosti: domaći brdski konji u nošenju tovara sirovog drveta na samaru, na planinskoj stazi od 300 m, uzbrdicom od 20°, araberu u daljinskom jahanju na stazi od 80 km, a engleski punokrvni galoperi u galopskoj trci na 2000 m.

### 5.1. Rezultati kliničkih ispitivanja u mirovanju

Detaljan klinički pregled je izveden u mirovanju, dva dana pre planiranog testiranja. Pregled se sastojao iz fizičkog pregleda (adspekcija, pregled kože, dlačnog pokrivača, sluzokoža, zglobova i potkova, ispitivanje trijasa, auskultacija srca i pluća, palpacija pulsa), da bi se nakon toga pristupilo elektrokardiografiji i ehokardiografiji.

Pregledom domaćih brdskih konja kod svih je registrovan veći broj povreda mekih tkiva u predelu samara i po nogama, kod tri konja naprsline na rožini kopita. Svi su bili u relativno dobroj telesnoj kondiciji, raščupani repovi su ukazivali na prisustvo parazita (oksiuroza), pri čemu su ostali nalazi bili normalni.

Za razliku od domaćih brdskih konja, pregledom galopera i arabera nisu ustanovljeni nikakvi znaci bolesti niti povreda koji mogu da se dovedu u vezu sa njihovom random sposobnošću. Konji obe rase su bili u regularnom treningu, galoperi su od početka trkačke sezone imali najmanje jednu trku – većina više od dve, dok su araberu učestvovali u više trka u endjuransu. Galoperi su pri tome trenirali svakodnevno, za razliku od arabera koji su skoro dva meseca bili u laganom treningu – prethodno takmičenje u kome su učestvovali održano je 60 dana ranije.



*Slika 1. Karakteristične povrede mekih tkiva i naprsnuća kopita kod tovarnih grla  
domaćih brdskih konja*

Vrednosti trijasa su kod svih bile u granicama normale, auskultatorni nalaz uredan. Elektrokardiografijom je kod svih pregledanih konja utvrđen sinusni ritam sa sinusnom aritmijom kod dva grla domaćeg brdskog konja, jednog arabera i dva engleska punokrvnjaka (koja se smatra normalnom za konje), pri čemu su ehokardiografijom utvrđeni dijometri srčanih šupljina u skladu sa fiziološkim vrednostima: promer leve komore u dijastoli kod domaćeg brdskog konja je iznosio  $8,93 \pm 1,42$  cm,  $9,27 \pm 1,82$  cm kod arabera i  $11,92 \pm 0,76$  cm kod engleskog punokrvnjaka, da bi na kraju sistole iznosio  $5,78 \pm 0,95$  cm kod domaćeg brdskog konja,  $6,98 \pm 1,08$  cm kod arabera i  $7,45 \pm 0,61$  cm kod engleskog punokrvnjaka. Debljina zida leve komore je kod svih konja bila u fiziološkim granicama (tabela 1). Na taj način je kod svih konja isključeno postojanje insuficijencije srca pre očekivanog opterećenja.

*Tabela 1. Rezultati ehokardiografskih ispitivanja konja u mirovanju*

Ispitivani parametar	Domaći brdski konji	Araberi	Engleski punokrvnjaci
Promer leve komore na kraju dijastole (cm)	8,93±1,42	9,27±1,82	11,92±0,76
Promer leve komore na kraju sistole (cm)	5,78±0,95	6,98±1,08	7,45±0,61
Debljina zida leve komore u dijastoli (cm)	2,21±0,54	2,45±0,47	2,32±0,38
Debljina zida leve komore u sistoli (cm)	2,73±0,96	3,8±0,34	3,85±0,41

## **5.2. Rezultati kliničkih ispitivanja u opterećenju**

Kao što je u prethodnom odeljku istaknuto, domaći brdski konji su ispitivani tokom iznošenja tovara sirovih drva na samaru na veoma strmoj uzbrdici. Konji su posle uzimanja uzoraka krvi za ispitivanje koncentracije ANP-a i drugih hematoloških i biohemijskih parametara korakom dovedeni do šume, udaljene oko 3 km od štale. Pre utovara konjima je postavljen pulsomer, kojim je registrovan puls tokom jednog radnog ciklusa koji uključuje utovar (oko 15 minuta), iznošenje tovara do puta udaljenog 300 m (oko 15 minuta), istovar (oko 5 minuta) i odmor uz lagani hod korakom nazad do mesta utovara (oko 60 minuta).

Natovareni konji su veoma lagano, sami korakom išli uzbrdo do mesta za istovar, gde ih je čekao radnik, koji bi jednim potezom odvezivao uže kojima je tovar bio vezan, uz posledično obrušavanje cepanica na zemlju, neretko po nogama konja. Većina konja je u hodu uzbrdo i na cilju ujednačeno disala, bez vidnih znakova zamora, premda je pulsomer pokazivao značajan porast frekvencije pulsa. Tri konja su pokazala veći stepen zamora uz kraće „duvanje“ na cilju, da bi se posle tridesetak minuta smirili. Na cilju su, inače, odmah nakon istovara uzeti uzorci krvi za ispitivanje koncentracije ANP-a i ostalih hematoloških i biohemijskih parametara.

Maksimalno povećanje pulsa je, inače, postignuto relativno brzo, posle nepunih 50 m hoda uzbrdo, da bi se zadržao na radnom platou između 150 i 170 sve do cilja i vratio se na prethodni nivo posle 5 minuta. Konji koji su imali veći puls su, kao što se i očekivalo jače duvali na cilju i njima je bilo potrebno duže vreme za smirivanje.

Neposredno nakon istovara nije bilo moguće uraditi ehokardiografski pregled zbog izuzetne uznemirenosti i nervoze. Posle nešto više od 40 minuta urađen je ehokardiografski pregled kod dva konja, uprkos cimanju i otimanju, s tim što su u oba slučaja utvrđene gotovo identične vrednosti onim koje su dobijene merenjem u mirovanju.

Brdski konji su, inače, u istom ritmu radili ceo dan, i izneli uzbrdo još 6 do 7 tovara, sa jednom pauzom za hranjenje i napajanje, da bi uveče bili odvedeni u štalu, gde su nahranjeni. Treći uzorak krvi je uzet naredno jutro – 24 časa posle prethodnog uzorkovanja (16 časova od povratka u štalu).

*Tabela 2. Uticaj opterećenja na frekvencu pulsa (u/min) kod domaćih brdskih konja*

Frekvencija pulsa (X±1 SD)			
Mere varijacije	Pre opterećenja	Neposredno posle opterećenja	Posle 24-časovnog odmora
X	37,00	170,92	38,00
SD	4,34	13,77	2,49
Cv	11,47%	8,06%	6,54%
IV	31–42	150–191	33–43

Araberi su testirani na stazi dužine 80 km. Kako je takmičenje održano u Pančevu, konji koji su učestvovali u trci transportovani su iz različitih mesta na takmičenje dan ranije i prenoćili u štali pre starta trke. Klinički pregled je obavljen ujutru, sat vremena pre starta trke, gde su uzimani osnovni klinički parametri i uzorci krvi za hematološke i biohemijske analize. Tokom veterinarskog pregleda proveravani su klinički parametri kao što su puls, boja i kvalitet sluzokoža, vreme vraćanja kožnog nabora, motilitet

creva kao i provera na hramanja. Konji su takođe bili pregledani na prisustvo bolnih mesta, uboja, povreda ili rana u predelima gde se nalazi oprema kao što su greben, leđa, plećke, predeo kolana kao i distalni delovi nogu. Izmerena vrednost pulsa u mirovanju, pre trke, kod arabera je bila  $38,83 \pm 3,49$  otkucaja u minutu. Neposredno pre starta konjima je postavljan pulsomer i praćen je puls tokom trke. Maksimalno povećanje pulsa i maksimalne zabeležene vrednosti pulsa, su upravo zabeležene na samom početku trke, u prva 2–3 minuta nakon starta kada su i konji i jahači bili uzbuđeni zbog početka trke i snažnije terali konje. Nakon tog prvobitnog povećanja puls se kretao u okviru 120–160 otkucaja u minute i održavao se tokom trke u okviru tih vrednosti.

Tokom trke četiri konja su isključena. Na kraju prve etape, nakon 40 km svi konji izgledali relativno dobro, bez vidnih znakova iscrpljenosti i dehidracije. Veterinarska komisija je uprkos tome isključila dva konja zbog hramanja. Na završnoj veterinarskoj kontroli, pri tome, još 2 konja su isključena zbog previsoke frekvencije pulsa u cilju: (više od 64 otkucaja). Drugo uzorkovanje krvi je obavljeno jedan čas po završetku trke (od svih 12 konja), a treće naredno jutro – 24 časa posle prethodnog uzorkovanja – kada je izmerena prosečna vrednost pulsa od  $35,17 \pm 3,88$  otkucaja u minuti.

*Tabela 3. Uticaj opterećenja na frekvencu pulsa (u/min) kod arabera*

Frekvencija pulsa ( $X \pm 1$ SD)			
Mere varijacije	Pre opterećenja	Neposredno posle opterećenja	Posle 24-časovnog odmora
X	38,83	168,90	35,17
SD	3,49	14,20	3,88
Cv	8,98%	8,40%	11,03%
IV	32–43	142–192	32–42

Detaljan klinički pregled, auskultacija grudnog koša i ehokardiografija urađeni su po okončanju veterinarskog pregleda, 60–90 minuta po ulasku u cilj. Ehokardiografskim pregledom, pri tome, nisu utvrđene nikakve razlike u odnosu na vrednosti izmerene u mirovanju.

Engleski punokrvnjaci su testirani na trci od 2000 m. Ukupno je testirano 12 konja u više trka, od toga 6 pastuva i 6 kobila. Svi konji su klinički pregledani u svojim štalama oko 2 h pre početka trke kada su im uzimani uzorci krvi za ispitivanje koncentracije ANP-a i drugih hematoloških i biohemijskih parametara. Pre polaska na stazu im je stavljan pulsomer i nakon šetnje od nekih 20 minuta konji su upućivani na start. Frekvencija pulsa u start mašini je bila između 130 i 140 da bi sa odmah nakon starta popela na preko 200 i dosegla svoj maksimum nakon 30 sekundi od  $223,00 \pm 13,10$  otkucaja u minuti i održavala u tim okvirima sve do kraja trke.

Po završetku trke, nekih 5 minuta koliko je vremena potrebno da se zaustave i rasedlaju konji, uziman je drugi uzorak za hematološke pretrage. Konji su klinički praćeni sat vremena kasnije. Većina konja je respiraciju vratila u okvire normalnih vrednosti nakon 25 minuta šetnje od završetka trke. Dva konja su nakon 30 minuta imali i dalje ubrzano disanje i tragove krvi na nozdrvama što ukazuje na postojanje opterećenjem izazvanog krvarenja u plućima. Neposredno po završetku trke nije bilo moguće uraditi ehokardiografski pregled. Nakon potpunog smirivanja – sat vremena posle trke urađen je ehokardiografski pregled kod tri konja i dobijene vrednosti slične vrednostima izmerenim u mirovanju. Sutradan, 24 sata nakon opterećenja, ponovo je uzorkovana krv i izmerena vrednost pulsa koja je bila  $34,20 \pm 3,20$  otkucaja u minuti.

*Tabela 4. Uticaj opterećenja na frekvencu pulsa (u/min) kod engleskog punokrvnjaka*

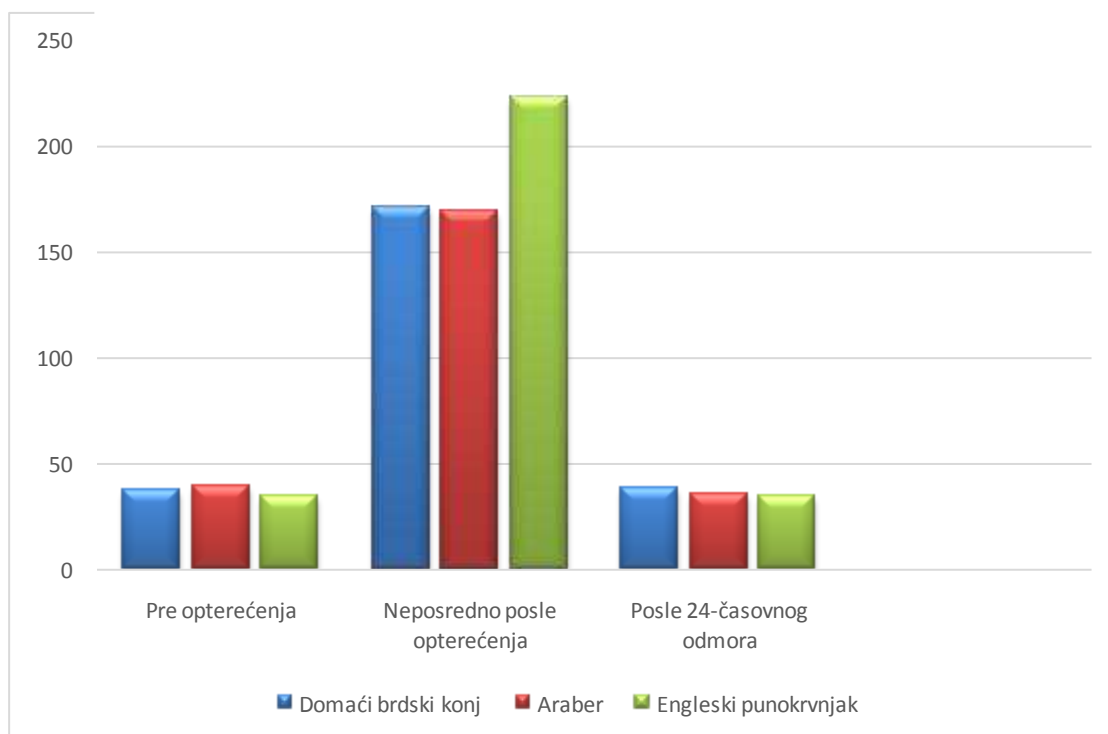
Frekvencija pulsa ( $X \pm 1$ SD)			
Mere varijacije	Pre opterećenja	Neposredno posle opterećenja	Posle 24-časovnog odmora
X	34,00	223,00	34,20
SD	2,13	10,73	2,82
Cv	6,27%	4,82%	8,26%
IV	31–38	207–235	32–39



Ako pogledamo zbirni prikaz uticaja opterećenja na frekvenciju pulsa (tabela 5), očigledno je da je u galopskoj trci dominirao anaerobni tip opterećenja, za razliku od arabera i domaćih brdskih konja kod kojih je puls bio na granici između aerobnog i anaerobnog tipa opterećenja. Step en varijacije je u svim grupama relativno mali, što olakšava ovakvo zaključivanje.

*Tabela 5. Zbirni prikaz uticaja opterećenja na frekvencu pulsa (u/min) kod domaćih brdskih konja, arabera i engleskih punokrvnjaka*

Frekvencija pulsa (X±1 SD)			
Ogledne grupe	Pre opterećenja	Neposredno posle opterećenja	Posle 24-časovnog odmora
A	37,00±4,24	170,92±13,77	38,00±2,49
B	38,83±3,49	168,90±14,20	35,17± 3,88
C	34,00±2,13	223,00±10,73	34,20±2,82



*Grafikon 1. Zbirni prikaz uticaja opterećenja na frekvenciju srčanog rada kod domaćih brdskih konja, arabera i engleskih punokrvnjaka*

### 5.3. Rezultati ispitivanja bazalne koncentracije ANP-a u krvnom serumu konja

S obzirom na oskudne podatke o normalnim vrednostima atrijalnih natrijumuretičnih peptida kod konja, pre testa opterećenja je posebna pažnja posvećena utvrđivanju bazalnih vrednosti ANP-a u krvnom serumu konja sve tri rase, oba pola. Uzorci krvi za ovo ispitivanje uzeti su u mirovanju, 1–2 dana po završetku kliničkih ispitivanja, u ranim jutarnjim satima pre hranjenja na dan kada je održan test opterećenja (par sati pre testa opterećenja domaćih brdskih konja i arabera, a 4–6 sati pre opterećenja engleskih punokrvnih galopera).

Dobijene vrednosti atrijalnog natrijumuretičnog peptida A su se nalazile u okviru granica normalnih vrednosti koje su navodili i drugi autori, ali uz statistički značajne razlike između tri rase. Najveće vrednosti su zabeležene kod domaćeg brdskog konja:  $17,88 \pm 3,94$  pg/ml, nešto manje kod arabera:  $15,38 \pm 2,25$  pg/ml, najmanje kod engleskog punokrvnjaka:  $12,38 \pm 1,77$  pg/ml. Stepem varijabilnosti je nešto veći kod domaćeg brdskog konja ( $Cv = 22,03\%$ ), dok je kod punokrvnih galopera najmanji ( $Cv = 14,29\%$ ).

Između polova se ne zapažaju značajne razlike. Kod domaćeg brdskog konja i engleskog punokrvnjaka pastuvi i kastrati imaju nešto veće vrednosti od kobila istih rasa, za razliku od arabera kod kojih kobile imaju nešto više vrednosti nego pastuvi. Međutim, ove razlike nisu ni u jednom slučaju statistički značajne.

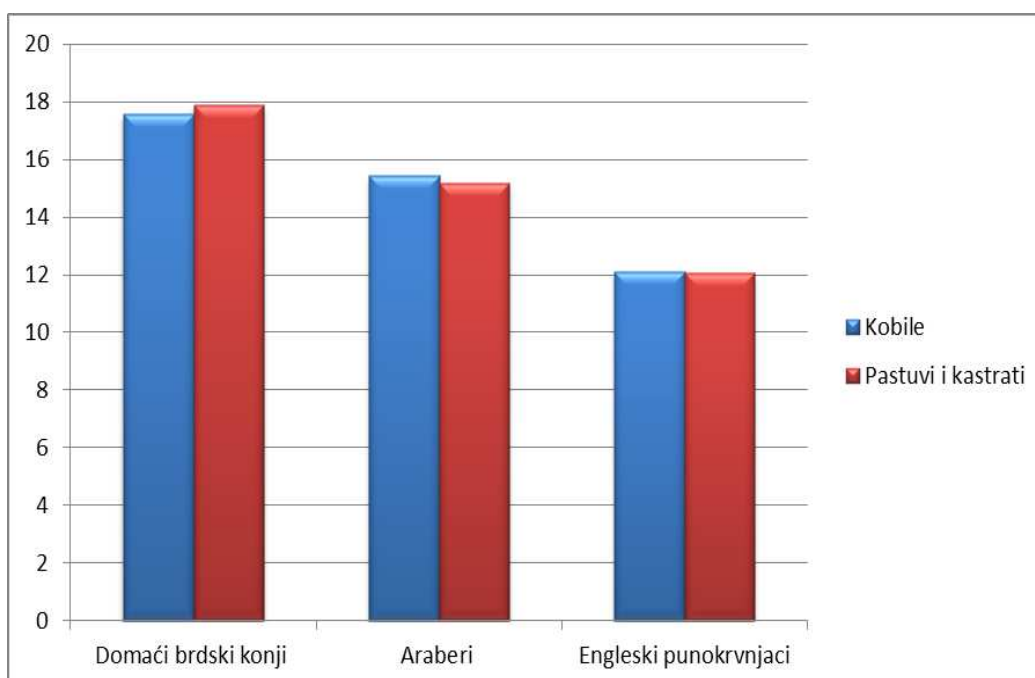
Pojedinačne vrednosti ANP-a kod konja oba pola svih rasa prikazane su u tabeli 6.

Tabela 6. Bazalne vrednosti ANP-a (pg/ml) kod domaćih brdskih konja, arabera i engleskih punokrvnjaka

Pojedinačne životinje	Domaći brdski konj	Araber	Engleski punokrvnjak
Kobile			
1	18,11	13,14	12,35
2	19,12	14,91	13,71
3	15,64	15,73	10,38
4	17,14	17,05	13,11
5	17,79	14,83	11,56
6		19,07	11,49
7		13,27	
X	17,56	15,43	12,10
SD	1,29	2,10	1,21
SG	0,58	0,79	0,49
Cv	7,34%	13,62%	9,98%
IV	15,64–19,12	13,14–19,07	10,38–13,71
Pastuvi i kastrati			
1	15,93	15,10	12,06
2	17,56	14,78	14,42
3	18,81	13,57	10,79
4	19,33	16,58	13,65
5	17,09	15,91	10,48
6	21,16		11,68
7	15,38		
X	17,89	15,19	12,18
SD	2,02	1,15	1,57
SG	0,76	0,51	0,64
Cv	11,29%	7,54%	12,86%
IV	15,38–21,16	13,57–16,58	10,48–14,42

Tabela 6. Bazalne vrednosti ANP-a (pg/ml) kod domaćih brdskih konja, arabera i engleskih punokrvnjaka (nastavak)

Pojedinačne životinje	Domaći brdski konj	Araber	Engleski punokrvnjak
Prosečne vrednosti za oba pola			
X	17,88	15,38	12,38
SD	3,94	2,25	1,77
Cv	22,03%	14,63%	14,29%



Grafikon 2. Bazalna koncentracija atrijalnog natrijumuretičkog peptida kod domaćih brdskih konja, arabera i engleskih punokrvnjaka

#### 5.4. Rezultati ispitivanja koncentracije ANP-a u krvnom serumu konja posle opterećenja

Bazalna koncentracija ANP-a u krvnom serumu domaćih brdskih konja je bila veća nego kod arabera i engleskog punokrvnjaka (tabela 5), pri čemu je opterećenje dovelo do brzog skoka za 2,5 puta ( $45,74 \pm 7,67$  pg/ml), uz vraćanje na prethodni nivo posle odmora od 24 časa (tabela 6). Stepen varijacije je nešto veći nego kod druge dve rase

konja, ali to ne dovodi u pitanje mogućnost zaključivanja s obzirom na veliku statističku značajnost između bazalne koncentracije i koncentracije posle opterećenja ( $p < 0,001$ ).

Kod arabera je bazalna koncentracija ANP-a bila nešto manja nego kod domaćih brdskih konja, uz znatno manji stepen varijabilnosti (Cv 14,6% u odnosu na 22% kod brdskih konja), pri čemu opterećenje dovodi do statistički veoma značajnog povećanja za 3,2 puta u odnosu na bazalnu vrednost, da bi posle odmora došlo do vraćanja u okvir bazalnih vrednosti. Za razliku od brdskih konja i arabera, kod engleskog punokrvnjaka je zabeležena najniža vrednost ANP-a ( $12,38 \pm 1,77$ ), i u isto vreme najveće povećanje  $62,88 \pm 6,36$  – pet puta veća vrednost od bazalne. Posle odmora od 24 časa, pri tome, i kod punokrvnih galopera dolazi do vraćanja u okvire normalnih vrednosti (tabela 7).

Ako se koncentracija ANP-a uporedi sa frekvencijom pulsa, uočava se linearna zavisnost – sa većom frekvencijom pulsa dobija se i veće povećanje koncentracije ANP-a u krvnom serumu. Kod galopera je, na primer, maksimalna vrednost pulsa iznosila  $223,00 \pm 13,10$  i u isto vreme utvrđena maksimalna koncentracija ANP-a ( $62,88 \pm 6,36$ ), dok je kod domaćeg brdskog konja i arabera maksimalna vrednost pulsa bila znatno manja, uz proporcionalno manje povećanje koncentracije ANP-a (tabela 7).

*Tabela 7. Uticaj opterećenja na koncentraciju ANP-a (pg/ml) kod domaćih brdskih konja (A), arabera (B) i engleskih punokrvnjaka (C)*

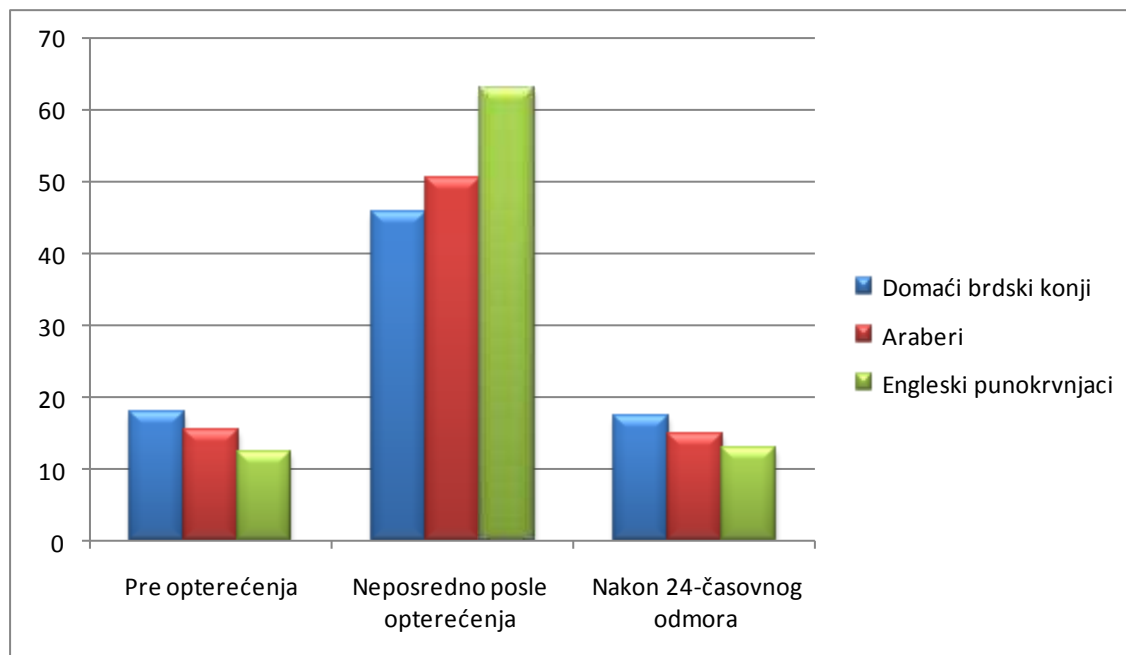
Koncentracija ANP-a ( $X \pm 1$ SD)			
Ogledne grupe	Pre opterećenja	Neposredno posle opterećenja	Posle 24-časovnog odmora
A	$17,88 \pm 3,94$	$45,74 \pm 7,67^{***}$	$17,38 \pm 2,33$
B	$15,38 \pm 2,25$	$50,35 \pm 6,36^{***}$	$14,88 \pm 1,25$
C	$12,38 \pm 1,77$	$62,88 \pm 6,36^{***}$	$13,05 \pm 2,31$

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

Tabela 8. Uporedni prikaz povezanosti frekvencije pulsa sa koncentracijom ANP-a kod domaćeg brdskog konja, arabera i engleskog punokrvnjaka

Ispitivani parametri	Vreme ispitivanja		
	Pre opterećenja	Neposredno posle opterećenja	Posle 24-časovnog odmora
Domaći brdski konj			
ANP (pg/ml)	17,88±3,94	45,74±7,67***	17,38±2,33
Puls (o/min)	37±4,34	170,92±13,77	38±2,45
Araber			
ANP (pg/ml)	15,38±2,25	50,35±6,36***	14,88±1,25
Puls (o/min)	38,83±3,49	168,9±14,2	35,17±3,88
Engleski punokrvnjak			
ANP (pg/ml)	12,38±1,77	62,88±6,36***	13,05±2,31
Puls (o/min)	34±2,15	223±13,1	34,2±3,2

\*p<0,05; \*\*p<0,01;\*\*\* p<0,001



*Grafikon 3. Koncentracija atrijalnog natrijumuretičkog peptida u krvi domaćeg brdskog konja, arabera i engleskog punokrvnjaka pre i nakon opterećenja*

### **5.5. Rezultati hematoloških ispitivanja kod domaćih brdskih konja, arabera i engleskog punokrvnjaka pre i nakon opterećenja**

Uzorci krvi za hematološka ispitivanja su uzimani u mirovanju – pre opterećenja, neposredno posle opterećenja i 24 časa kasnije. Dobijeni rezultati su pri tome uglavnom u granicama očekivanih vrednosti, bar kada je u pitanju uticaj opterećenja.

U mirovanju su bile očigledne razlike između rasa. Najmanje vrednosti parametara crvene krvne slike (broj eritrocita, koncentracija hemoglobina i hematokritska vrednost) registrovane su kod domaćeg brdskog konja. Tako na primer, broj eritrocita kod brdskih konja u mirovanju je iznosio  $7,53 \pm 0,52$ , za razliku od arabera kod kojih je iznosio  $9,97 \pm 1,33$  ili engleskih punokrvnjaka kod kojih je bio najveći ( $10,84 \pm 0,68$ ). Isti odnos je primetan i kod koncentracije hemoglobina i hematokritske vrednosti (tabela 8).

Opterećenje – iznošenje predviđenog tereta na samara dovodi do povećanja broja eritrocita za 24,4% ( $9,37 \pm 1,48$ ), da bi nakon odmora od 24 časa došlo do pada na nivo neznatno ispor početnog:  $6,97 \pm 0,86$ . Stepen varijabilnosti je nešto veći posle opterećenja, u poređenju sa vrednostima dobijenim u mirovanju i posle 24-časovnog

odmora. Opterećenje arabera u endjuransu dovodi do povećanja broja eritrocita za 9% (sa  $9,97 \pm 1,33$  na  $10,94 \pm 1,43$ ), uz očekivani pad posle 24-časovnog odmora na  $9,76 \pm 1,41$ . Identičan odnos se zapaža kod koncentracije hemoglobina i hematokritske vrednosti, sa sličnim stepenom varijabilnosti. Na kraju, kao što se i očekivalo, najveće povećanje broja eritrocita, koncentracije hemoglobina i hematokrita zapaža se kod punokrvnih galopera. Broj eritrocita se sa  $10,84 \pm 0,68$  u mirovanju posle trke na 2000 m povećava na  $14,31 \pm 0,53$  (25%), da bi se posle 24 časa dobile vrednosti slične onim u mirovanju ( $10,40 \pm 0,72$ ). Koeficijent varijacije je pri tome znatno manji nego kod brdskih konja i arabera, posebno posle opterećenja (3,7%). Identičan trend prate koncentracija hemoglobina i hematokrit (tabela 9), zbog čega su razlike dobijenih vrednosti ova tri parametra statistički značajne, kako između tri rase konja, tako i između pojedinih faza opterećenja.

Vrednosti eritrocitnih indeksa su bile očekivanje, one odražavaju odnos između broja eritrocita, koncentracije hemoglobina i hematokritske vrednosti, zbog čega se u opterećenju ne zapažaju bitna odstupanja. MCV varira u granicama od  $40,70 \pm 0,51$  do  $45,28 \pm 2,36$ . Najveća vrednost je zabeležena kod domaćeg brdskog konja ( $45,28 \pm 2,36$ ), nešto manja kod arabera ( $42,02 \pm 2,74$ ) – najmanje kod engleskih punokrvnih galopera ( $40,70 \pm 0,51$ ). Isti odnosi se primećuju i neposredno posle opterećenja i posle 24-časovnog odmora.

MCH varira u granicama od  $15,74 \pm 0,89$  kod domaćeg brdskog konja, do  $14,07 \pm 0,97$  kod arabera, odnosno  $14,55 \pm 0,25$  kod engleskog punokrvnjaka. Opterećenje ni u ovom slučaju ne dovodi do značajnih odstupanja, što je logično, s obzirom na proporcionalnost u povećanju broja eritrocita, hematokritske vrednosti i koncentracije hemoglobina kod sve tri rase konja. Isto važi i za MCHC, koji varira između  $354,25 \pm 9,53$  kod engleskih punokrvnih galopera,  $347 \pm 6,76$  kod domaćeg brdskog konja i  $325,1 \pm 6,83$  kod arabera. Kako je povećanje vrednosti parametara crvene krvne slike najveće kod engleskog punokrvnjaka, kod ove rase se uočavaju i statistički značajna odstupanja eritrocitnih indeksa MCH i MCHC (tabela 9).



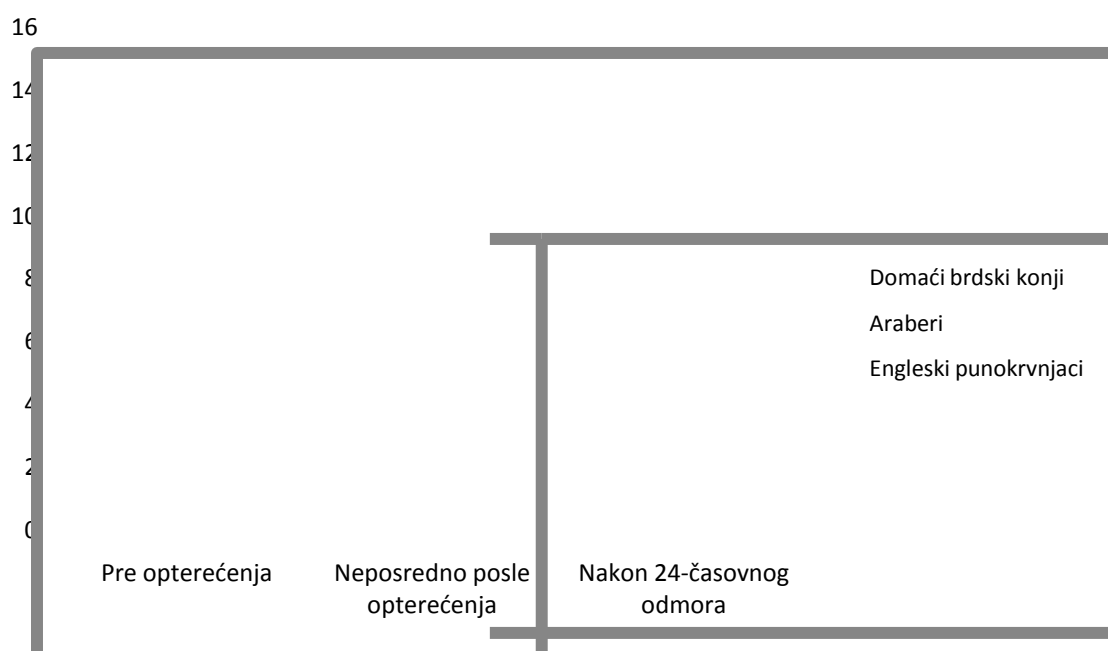
*Tabela 9. Broj eritrocita, koncentracija hemoglobina, hematokritska vrednosti i vrednosti eritrocitnih indeksa kod domaćih brdskih konja, arabera i engleskog punokrvnjaka pre i nakon opterećenja*

Ispitivani parametri	Vreme ispitivanja		
	Pre opterećenja	Neposredno posle opterećenja	Posle 24-časovnog odmora
Domaći brdski konj			
Eritrociti ( $\times 10^{12}/l$ )	7,53 $\pm$ 0,52	9,37 $\pm$ 1,48**	6,97 $\pm$ 0,86
Hemoglobin (g/l)	123,57 $\pm$ 10,45	135 $\pm$ 14,39	119,5 $\pm$ 11,48
Hematokrit (%)	38,89 $\pm$ 8,16	43,81 $\pm$ 1,55	35,34 $\pm$ 2,37
MCV (fl)	45,28 $\pm$ 2,36	43,57 $\pm$ 2,93	43,33 $\pm$ 3,08
MCH (pg)	15,74 $\pm$ 0,89	15,94 $\pm$ 1,41	15,33 $\pm$ 1,06
MCHC (g/l)	347,00 $\pm$ 6,76	343,01 $\pm$ 3,31	348,83 $\pm$ 12,42
ANP (pg/ml)	17,88 $\pm$ 3,94	45,74 $\pm$ 7,67***	17,38 $\pm$ 2,33
Puls (o/min)	37,00 $\pm$ 4,34	171,00 $\pm$ 13,61	38,00 $\pm$ 2,45
Araber			
Eritrociti ( $\times 10^{12}/l$ )	9,97 $\pm$ 1,33	10,94 $\pm$ 1,43*	9,76 $\pm$ 1,41
Hemoglobin (g/l)	140,53 $\pm$ 23,63	160,67 $\pm$ 21,04	137,78 $\pm$ 24,22
Hematokrit (%)	42,99 $\pm$ 7,18	47,13 $\pm$ 8,80	41,04 $\pm$ 7,38
MCV (fl)	43,00 $\pm$ 2,40	43,89 $\pm$ 2,52	42,02 $\pm$ 2,74
MCH (pg)	14,07 $\pm$ 0,97	14,38 $\pm$ 0,81	14,03 $\pm$ 0,90
MCHC (g/l)	325,10 $\pm$ 6,83	325,88 $\pm$ 4,45	337,33 $\pm$ 13,33*
ANP (pg/ml)	15,38 $\pm$ 2,25	50,35 $\pm$ 6,36***	14,88 $\pm$ 1,25
Puls (o/min)	38,83 $\pm$ 3,49	168,90 $\pm$ 14,20	35,17 $\pm$ 3,88

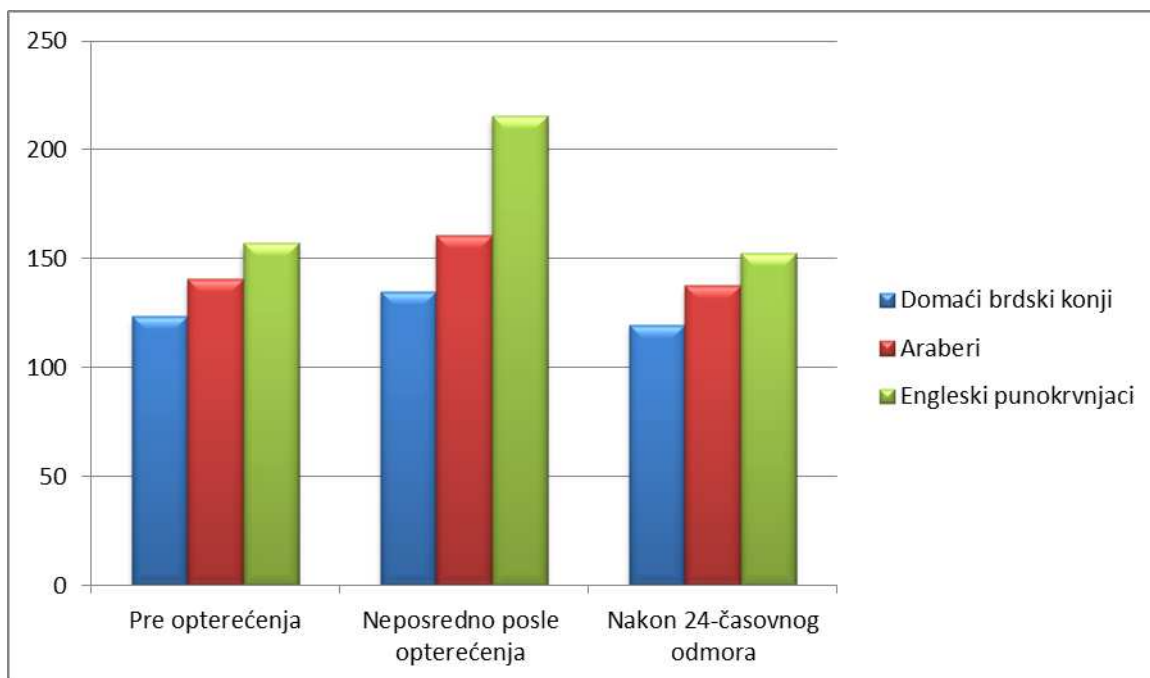
Tabela 9. Broj eritrocita, koncentracija hemoglobina, hematokritska vrednosti i vrednosti eritrocitnih indeksa kod domaćih brdskih konja, arabera i engleskog punokrvnjaka pre i nakon opterećenja (nastavak)

Ispitivani parametri	Vreme ispitivanja		
	Pre opterećenja	Neposredno posle opterećenja	Posle 24-časovnog odmora
Engleski punokrvnjak			
Eritrociti ( $\times 10^{12}/l$ )	10,84 $\pm$ 0,68	14,31 $\pm$ 0,53***	10,40 $\pm$ 0,72
Hemoglobin (g/l)	157,25 $\pm$ 11,95	215,5 $\pm$ 11,45***	152,35 $\pm$ 9,44
Hematokrit (%)	47,38 $\pm$ 2,20	58,35 $\pm$ 3,43***	46,92 $\pm$ 2,10
MCV (fl)	40,75 $\pm$ 0,50	41,25 $\pm$ 0,95	40,70 $\pm$ 0,51
MCH (pg)	14,55 $\pm$ 0,25	15,05 $\pm$ 0,34**	14,41 $\pm$ 0,26
MCHC (g/l)	354,25 $\pm$ 9,53	369,25 $\pm$ 7,59**	353,27 $\pm$ 6,81
ANP (pg/ml)	12,38 $\pm$ 1,77	62,88 $\pm$ 6,36***	13,05 $\pm$ 2,31
Puls (o/min)	34,00 $\pm$ 2,15	223,00 $\pm$ 13,10	34,20 $\pm$ 3,20

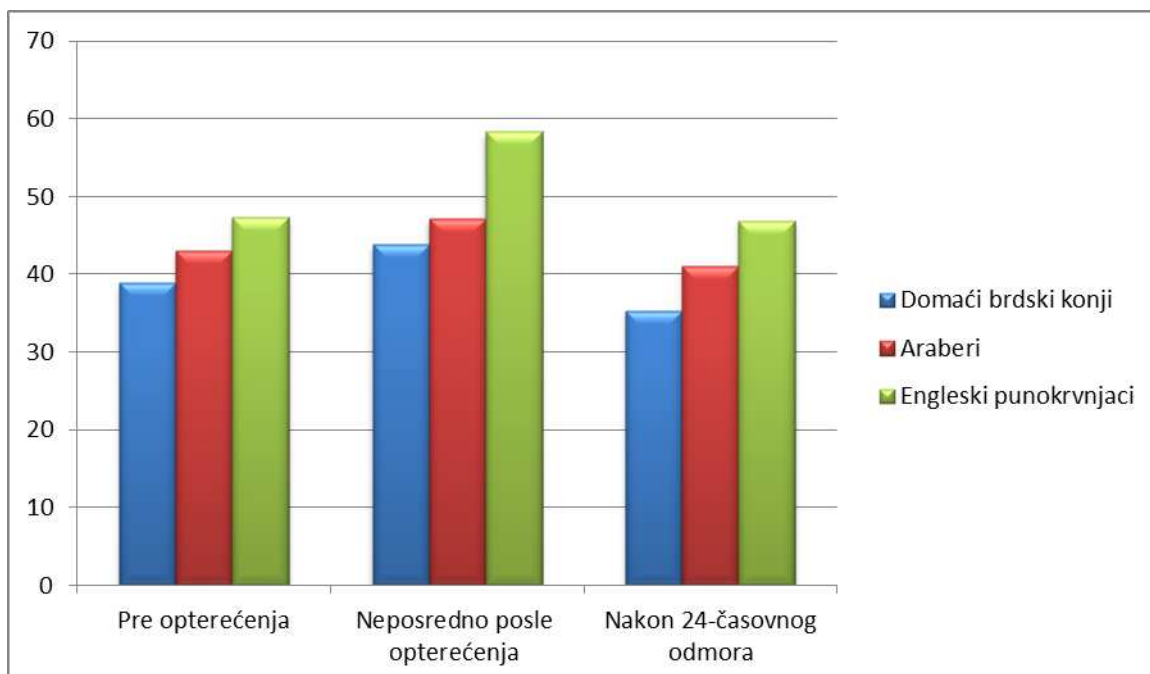
\*p<0,05; \*\*p<0,01;\*\*\* p<0,001



Grafikon 4. Uticaj opterećenja na broj eritrocita kod domaćih brdskih konja, arabera i engleskog punokrvnjaka



*Grafikon 5. Uticaj opterećenja na koncentraciju hemoglobina kod domaćih brdskih konja, arabera i engleskog punokrvnjaka*



*Grafikon 6. Uticaj opterećenja na hematokritsku vrednost kod domaćih brdskih konja, arabera i engleskog punokrvnjaka*

Očekivane su i promene u broju leukocita. Kod domaćih brdskih konja ukupan broj leukocita u mirovanju iznosi  $8,77 \pm 1,95$  ( $\times 10^9/l$ ), neposredno posle opterećenja zabeležena je najveća vrednost ( $9,63 \pm 1,70$ ), da bi se nakon odmora od 24 časa došlo do pada na nivo malo iznad početne vrednosti ( $9,10 \pm 2,31$ ). Slični nalazi su registrovani kod arabera, bar u mirovanju: broj leukocita je iznosio  $8,10 \pm 1,19$ , nakon opterećenja je pri tome došlo do mnogo većeg – statistički veoma značajnog povećanja ( $p < 0,001$ ) na  $14,01 \pm 2,36$ , da bi se nakon odmora od 24 časa broj leukocita spustio na  $10,22 \pm 1,24$ . Kod punokrvnih galopera broj leukocita u mirovanju iznosi  $9,13 \pm 2$ , posle trke  $12,6 \pm 3,27$ , da bi nakon 24-časovnog odmora pao na  $9,47 \pm 0,14$  (tabela 10).

Do povećanja ukupnog broja leukocita kod arabera dolazi zbog povećanja broja neutrofilnih granulocita, uz istovremeni pad broja limfocita, za razliku od engleskih punokrvnjaka kod kojih se povećava broj limfocita. Kod domaćih brdskih konja je takođe prisutan manji pad broja limfocita uz istovremeno manje povećanje broja neutrofilnih granulocita (tabela 10). Neutrofilija sa limfopenijom i eozinopenijom su karakteristika stresnog leukograma.

Da se kod arabera i brdskih konja radi o stresnom leukogramu, vidi se iz N/L količnika, koji je kod ovih rasa povećan (pre svega kod arabera), za razliku od galopera kod kojih se ovakav efekat ne primećuje.

Tabela 10. Broj leukocita i leukocitarna formula kod domaćih brdskih konja, arabera i engleskog punokrvnjaka pre i nakon opterećenja

Ispitivani parametri	Vreme ispitivanja		
	Pre opterećenja	Neposredno posle opterećenja	Posle 24-časovnog odmora
Domaći brdski konj			
Leukociti ( $10^9/l$ )	8,77±1,95	9,63±1,70	9,47±0,14
Limfociti ( $10^9/l$ )	2,60±0,42	2,3±0,94	3,75±0,31***
Neutrofilii ( $10^9/l$ )	6,15±1,76	7,30±1,05	5,20±0,17*
Monociti ( $10^9/l$ )	0,27±0,15	0,30±0,52	0,52±0,24**
N/L količnik	2,36±0,59	3,17±0,79	1,38±0,42
ANP (pg/ml)	17,88±3,94	45,74±7,67***	17,38±2,33
Puls (o/min)	37,00±4,34	171,00±13,61	38,00±2,45
Araber			
Leukociti ( $10^9/l$ )	8,10±1,19	14,01±2,36***	10,22±1,24**
Limfociti ( $10^9/l$ )	3,49±0,70	2,15±0,87**	3,93±2,43*
Neutrofilii ( $10^9/l$ )	4,38±1,24	11,44±2,45***	5,99±2,69
Monociti ( $10^9/l$ )	0,24±0,14	0,44±0,21*	0,33±0,25
N/L količnik	1,25±0,36	5,32±1,52	2,88±0,80
ANP (pg/ml)	15,38±2,25	50,35±6,36***	14,88±1,25
Puls (o/min)	38,83±3,49	168,9±14,2	35,17±3,88

Tabela 10. Broj leukocita i leukocitarna formula kod domaćih brdskih konja, arabera i engleskog punokrvnjaka pre i nakon opterećenja (nastavak)

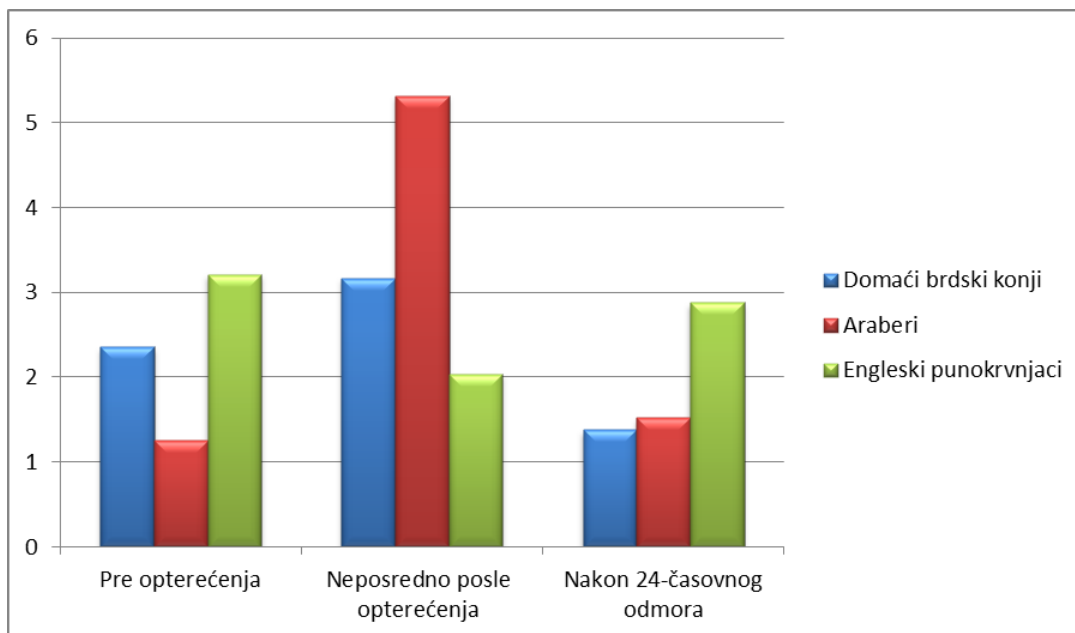
Ispitivani parametri	Vreme ispitivanja		
	Pre opterećenja	Neposredno posle opterećenja	Posle 24-časovnog odmora
Engleski punokrvnjak			
Leukociti ( $10^9/l$ )	9,13±2,03	12,60±3,27*	9,10±2,31
Limfociti ( $10^9/l$ )	2,12±0,61	4,00±1,20**	2,26±0,55
Neutrofili ( $10^9/l$ )	6,81±2,10	8,19±2,91	6,52±2,09
Monociti ( $10^9/l$ )	0,19±0,17	0,99±0,49***	0,32±0,18
N/L količnik	3,21±0,80	2,04±0,68	2,88±0,86
ANP (pg/ml)	12,38±1,77	62,88±6,36***	13,05±2,31
Puls (o/min)	34,00±2,15	223,00±13,10	34,20±3,20

\*p<0,05; \*\*p<0,01;\*\*\* p<0,001

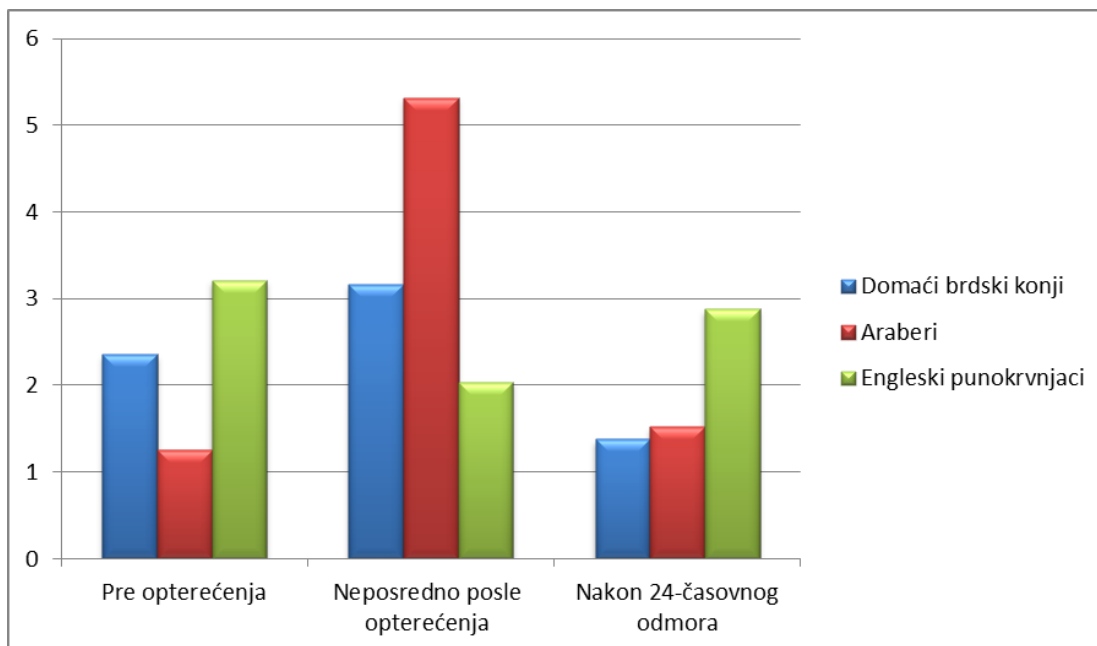
Za razliku od njih, kod arabera je početna vrednost N/L količnika normalna (1,25±0,36), posle opterećenja se povećava na 5,32±1,52, da bi se i nakon 24 časa zadržala iznad nivoa normalnih vrednosti (2,88±0,80), što ukazuje na odloženo stanje stresa. Kod engleskog punokrvnjaka se posle opterećenja zapaža smanjenje N/L količnika (sa 3,21±0,80 na 2,04±0,68), što je i logično s obzirom da se kod njih povećanje ukupnog broja leukocita javlja kao posledica povećanja broja limfocita. Veće početne vrednosti i kod njih ukazuju na hronično stanje stresa, s obzirom na intenzitet treninga kome su podvrgnuti svakog dana. Između koncentracije ANP-a i broja leukocita, uključujući N/L količnik, ne uočava se jasna povezanost.

Ako zanemarimo fiziološke vrednosti parametara crvene krvne slike kod domaćeg brdskog konja, arabera i engleskog punokrvnjaka u mirovanju, povećanje broja eritrocita, koncentracije hemoglobina i hematokrita posle opterećenja je proporcionalno

povećanju koncentracije atrijalnog natrijumuretičkog peptida i frekvenciji srčanog rada. Promene u broju leukocita, međutim, ne pokazuju nikakav paralelizam niti sa promenama u koncentraciji ANP-a niti sa frekvencijom srčanog rada.



*Grafikon 7. Uticaj opterećenja na ukupan broj leukocita kod domaćih brdskih konja, arabera i engleskog punokrvnjaka*



*Grafikon 8. Uticaj opterećenja vrednost neutrofilno limfocitnog količnika kod domaćih brdskih konja, arabera i engleskog punokrvnjaka*

## 5.6. Rezultati biohemijskih ispitivanja kod domaćih brdskih konja, arabera i engleskog punokrvnjaka pre i nakon opterećenja

Biohemijskim ispitivanjem krvnog seruma obuhvaćeni su ukupni proteini i albumini, ukupni bilirubin, AST, CK, natrijum, kalijum, kalcijum, hloridi i bikarbonati. Očekivane su promene u koncentraciji ukupnih proteina i albumina, prvenstveno povećanje, kao posledica dehidracije. Takva promena je, međutim, izostala tamo gde je najviše očekivana: kod arabera. Zbog relativno visoke početne vrednosti ( $77,98 \pm 8,61$ ) posle opterećenja dolazi do smanjenja koncentracije ukupnih proteina na  $66,18 \pm 4,46$ , uz još veće smanjenje posle 24-časovnog odmora ( $59,89 \pm 4,08$ ). Sličan efekat postoji i kod domaćih brdskih konja – prosečna koncentracija ukupnih proteina u mirovanju iznosi  $70,28 \pm 7,31$  (g/l), posle iznošenja prvog tovara pada na  $68,78 \pm 4,65$  (ova promena nije statistički značajna), da bi posle odmora od 24 časa bila zabeležena najmanja vrednost ( $64,35 \pm 4,12$ ). Jedino se kod engleskog punokrvnjaka zapaža diskretno povećanje koncentracije ukupnih proteina neposredno posle opterećenja (tabela 11). Oscilacije u koncentraciji albumina su manje izražene, i kod domaćeg brdskog konja i kod arabera – jedino se kod punokrvnih galopera posle trke uočava veće povećanje. U svim slučajevima se pri tome, posle 24-časovnog odmora zapažaju vrednosti slične početnim. Inače, promene u koncentraciji ukupnih proteina i albumina ne pokazuju vidan paralelizam sa promenama koncentracije atrijalnog natrijumuretičkog peptida A i frekvencijom pulsa.

*Tabela 11. Koncentracija ukupnih proteina i albumina kod domaćih brdskih konja, arabera i engleskog punokrvnjaka pre i nakon opterećenja*

Ispitivani parametri	Vreme ispitivanja		
	Pre opterećenja	Neposredno posle opterećenja	Posle 24-časovnog odmora
Domaći brdski konj			
U. proteini (g/l)	$70,28 \pm 7,31$	$68,78 \pm 4,65$	$64,35 \pm 4,12$
Albumini (g/l)	$29,76 \pm 1,36$	$29,82 \pm 2,86$	$28,97 \pm 2,13$
ANP (pg/ml)	$17,88 \pm 3,94$	$45,74 \pm 7,67^{***}$	$17,38 \pm 2,33$
Puls (o/min)	$37,00 \pm 4,34$	$171,00 \pm 13,61$	$38,00 \pm 2,45$



*Tabela 11. Koncentracija ukupnih proteina i albumina kod domaćih brdskih konja, arabera i engleskog punokrvnjaka pre i nakon opterećenja*

Ispitivani parametri	Vreme ispitivanja		
	Pre opterećenja	Neposredno posle opterećenja	Posle 24-časovnog odmora
Araber			
U. proteini (g/l)	77,98±8,61	66,18±4,46**	59,89±4,08***
Albumini (g/l)	39,86±3,11	38,82±2,87	39,11 ±1,78
ANP (pg/ml)	15,38±2,25	50,35±6,36***	14,88±1,25
Puls (o/min)	38,83±3,49	168,90±14,20	35,17± 3,88
Engleski punokrvnjak			
U. proteini (g/l)	62,80±3,19	70,20±3,66 ***	61,82±4,18
Albumini (g/l)	32,54±0,95	37,02±1,61 ***	33,12 ±1,98
ANP (pg/ml)	12,38±1,77	62,88±6,36***	13,05±2,31
Puls (o/min)	34,00±2,15	223,00±13,10	34,20 ± 3,20

\*p<0,05; \*\*p<0,01;\*\*\* p<0,001

Opterećenje ne dovodi do značajnih promena u koncentraciji ukupnog bilirubina, niti su razlike između tri ispitivane rase konja značajne. Doduše, kod arabera se zapaža skoro dvostruko povećanje srednje vrednosti ukupnog bilirubina, međutim velike individualne varijacije (Cv = 29%) ne dozvoljavaju potvrdu o statističkoj značajnosti ove razlike (tabela 12).

Zanimljivo je, inače, da je koncentracija ukupnog bilirubina vidno veća kod engleskog punokrvnjaka – u mirovanju iznosi 31,04 ±4,76, što je više nego kod domaćeg brdskog konja posle opterećenja, pri čemu se posle trke na 2000 m koja traje nešto više od 2

minuta povećava na  $39,11 \pm 8,37$  (za 25%), uz još veću vrednost posle 24-časovnog odmora ( $41,18 \pm 6,92$ ), što navodi na zaključak da su intenzitet opterećenja i frekvencija pulsa u direktnoj korelaciji sa povećanjem koncentracije bilirubina i destrukcijom eritrocita, koju potvrđuje dodatno povećanje koncentracije ukupnog bilirubina posle opterećenja.

*Tabela 12. Koncentracija ukupnog bilirubina kod domaćih brdskih konja, arabera i engleskog punokrvnjaka pre i nakon opterećenja*

Ispitivani parametri	Vreme ispitivanja		
	Pre opterećenja	Neposredno posle opterećenja	Posle 24-časovnog odmora
Domaći brdski konj			
U. bilirubin ( $\mu\text{mol/l}$ )	$23,50 \pm 4,43$	$24,93 \pm 2,49$	$24,60 \pm 2,84$
ANP (pg/ml)	$17,88 \pm 3,94$	$45,74 \pm 7,67^{***}$	$17,38 \pm 2,33$
Puls (o/min)	$37 \pm 4,34$	$171 \pm 13,61$	$38 \pm 2,45$
Araber			
U. bilirubin ( $\mu\text{mol/l}$ )	$19,4 \pm 3,23$	$34,08 \pm 9,98$	$26,56 \pm 7,57$
ANP (pg/ml)	$15,38 \pm 2,25$	$50,35 \pm 6,36^{***}$	$14,88 \pm 1,25$
Puls (o/min)	$38,83 \pm 3,49$	$168,9 \pm 14,2$	$35,17 \pm 3,88$
Engleski punokrvnjak			
U. bilirubin ( $\mu\text{mol/l}$ )	$31,04 \pm 4,76$	$39,11 \pm 8,37$	$41,18 \pm 6,92$
ANP (pg/ml)	$12,38 \pm 1,77$	$62,88 \pm 6,36^{***}$	$13,05 \pm 2,31$
Puls (o/min)	$34,00 \pm 2,15$	$223,00 \pm 13,10$	$34,20 \pm 3,20$

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

Promene u koncentraciji ukupnog bilirubina ne pokazuju vidan paralelizam sa promenama koncentracije atrijskog natrijumuretičkog peptida.

Serumska aktivnost mišićnih enzima se posle opterećenja povećava, s tim što i u ovom slučaju veći stepen individualnih varijacija dovodi u sumnju značajnost ovakvog povećanja (tabela 13). Serumska aktivnost AST je u mirovanju najveća kod engleskog punokrvnjaka:  $286 \pm 83,11$  ( $Cv = 29\%$ ), dostruko manja kod domaćeg brdskog konja i arabeta, pri čemu se kod svih zapaža trend povećanja neposredno po završenom testu opterećenja koji ni u jednom slučaju nije statistički značajan. Za razliku od serumske aktivnosti AST, aktivnost CK u krvnom serumu arabera je značajno povećana neposredno posle istrčanog endžuransa ( $p < 0,05$ ). Kod brdskih konja i punokrvnih galopera ovo povećanje nije statistički značajno. U mirovanju, inače, serumska aktivnost je takođe najveća kod engleskog punokrvnjaka (tabela 13).

Inače, promene u aktivnosti AST i CK ne pokazuju nikakav paralelizam sa promenama koncentracije atrijskog natrijumuretičkog peptida A i frekvencijom srčanog rada.

*Tabela 13. Serumska aktivnost AST i CK kod domaćih brdskih konja, arabera i engleskog punokrvnjaka pre i nakon opterećenja*

Ispitivani parametri	Vreme ispitivanja		
	Pre opterećenja	Neposredno posle opterećenja	Posle 24-časovnog odmora
Domaći brdski konj			
AST (IU/l)	$129,61 \pm 34,53$	$176,48 \pm 81,41$	$144,34 \pm 62,53$
CK (IU/l)	$98,00 \pm 31,85$	$114,20 \pm 26,33$	$69,11 \pm 18,62$
ANP (pg/ml)	$17,88 \pm 3,94$	$45,74 \pm 7,67^{***}$	$17,38 \pm 2,33$
Puls (o/min)	$37,00 \pm 4,34$	$171,00 \pm 13,61$	$38,00 \pm 2,45$

Tabela 13. Serumska aktivnost AST i CK kod domaćih brdskih konja, arabera i engleskog punokrvnjaka pre i nakon opterećenja (nastavak)

Ispitivani parametri	Vreme ispitivanja		
	Pre opterećenja	Neposredno posle opterećenja	Posle 24-časovnog odmora
Araber			
AST (IU/l)	126,42 ±45,18	196,68 ±124,41	138,32 ±53,47
CK (IU/l)	79,67 ±35,58	245,67 ±216,20*	88,56 ±23,63
ANP (pg/ml)	15,38 ±2,25	50,35±6,36***	14,88±1,25
Puls (o/min)	38,83±3,49	168,9±14,20	35,17± 3,88
Engleski punokrvnjak			
AST (IU/l)	286 ±83,11	357,6 ±255,14	277,72 ±65,41
CK (IU/l)	210 ±65,81	290,34 ±92,73	186,58 ±83,31
ANP (pg/ml)	12,38±1,77	62,88±6,36***	13,05±2,31
Puls (o/min)	34,00±2,15	223,00±13,1	34,20±3,20

\*p<0,05; \*\*p<0,01;\*\*\* p<0,001

Kako je znojenje relativno česta pojava kod konja u opterećenju, očekivane su i određene promene u koncentraciji pojedinih elektrolita, prvenstveno kod arabera koji se testirani u endjuransu na 80 km, međutim, očekivanih promena nije bilo. Opterećenje ni u jednoj grupi ne dovodi do statistički značajnih promena u koncentraciji natrijuma. Kod domaćeg brdskog konja je koncentracija natrijuma u mirovanju na donjoj granici normalnih vrednosti (131,61±11,20), a kod arabera nešto veća (136,59±1,63), za razliku od engleskog punokrvnjaka kod kojih se nalazi u optimalnim granicama (140,4 ±2,27 mmol/l). Pad koncentracije natrijuma posle opterećenja kod domaćeg brdskog konja nije statistički značajan, s tim što se kod arabera i engleskog punokrvnjaka nikakav pad ne primećuje, štaviše, vrednosti posle opterećenja su veće, ali to nije statistički značajno (tabela 14).

Isto se odnosi i na koncentraciju kalijuma. Najniža vrednost u mirovanju zabeležena je kod domaćeg brdskog konja ( $3,83 \pm 0,58$ ), nešto veća kod arabera i u okviru optimalnih fizioloških granica kod engleskog punokrvnjaka ( $4,08 \pm 0,45$ ). Navedene razlike između ovih rasa nisu statistički značajne, kao ni razlike u zavisnosti od faze opterećenja.

Hloridi se kod domaćeg brdskog konja takođe nalaze na donjoj granici normalnih vrednosti, u istom odnosu prema araberima i engleskim punokrvnjacima kao natrijum i kalijum, bez statistički značajnih odstupanja u zavisnosti od opterećenja. Jedino se koncentracija kalcijuma u svim grupama nalazi na gornjoj granici normalnih vrednosti, takođe bez statistički značajnih promena, ni između rasa niti u zavisnosti od opterećenja. Navedene vrednosti elektrolita ne pokazuju nikakvu zavisnost u odnosu na koncentraciju atrijskog natrijumuretličkog peptide i frekvenciju srčanog rada.

*Tabela 14. Koncentracija natrijuma, kalijuma, kalcijuma i hlorida kod domaćih brdskih konja, arabera i engleskog punokrvnjaka i pre i nakon opterećenja*

Ispitivani parametri	Vreme ispitivanja		
	Pre opterećenja	Neposredno posle opterećenja	Posle 24-časovnog odmora
Domaći brdski konj			
Na <sup>+</sup> (mmol/l)	131,61±11,20	123,45 ±13,11	128 ±16,45
K <sup>+</sup> (mmol/l)	3,83±0,58	3,99±0,93	3,57±3,67
Ca <sup>+</sup> (mmol/l)	3,23±0,20	2,91 ±0,31	2,81±0,12
Cl <sup>-</sup> (mmol/l)	98,73±15,39	87,68 ±11,39	92,10±14,74
ANP (pg/ml)	17,88±3,94	45,74±7,67***	17,38±2,33
Puls (o/min)	37,00±4,34	171,0±13,61	38,00±2,45

Tabela 14. Koncentracija natrijuma, kalijuma, kalcijuma i hlorida kod domaćih brdskih konja, arabera i engleskog punokrvnjaka i pre i nakon opterećenja (nastavak)

Ispitivani parametri	Vreme ispitivanja		
	Pre opterećenja	Neposredno posle opterećenja	Posle 24-časovnog odmora
Araber			
Na <sup>+</sup> (mmol/l)	136,59±1,63	140,07±5,31	136,03±4,20
K <sup>+</sup> (mmol/l)	3,89±0,56	4,08±0,45	4,58 ±1,42
Ca <sup>+</sup> (mmol/l)	3,15±0,22	3,06±0,18	3,21±0,24
Cl <sup>-</sup> (mmol/l)	101,22±1,22	99,81±6,03	98,86±3,43
ANP (pg/ml)	15,38±2,25	50,35±6,36***	14,88±1,25
Puls (o/min)	38,83±3,49	168,90±14,2	35,17± 3,88
Engleski punokrvnjak			
Na <sup>+</sup> (mmol/l)	140,40±2,27	144,80±5,89	139,76±4,72
K <sup>+</sup> (mmol/l)	4,08±0,45	4,14±1,16	4,33±0,54
Ca <sup>+</sup> (mmol/l)	3,14±0,31	3,10±1,02	3,98±0,43
Cl <sup>-</sup> (mmol/l)	104,00±2,78	102,48±4,56	97,20±3,91
ANP (pg/ml)	12,38±1,77	62,88±6,36***	13,05±2,31
Puls (o/min)	34,00±2,15	223,00±13,10	34,20±3,20

\*p<0,05; \*\*p<0,01;\*\*\* p<0,001

## 6. DISKUSIJA

Atrijalni natrijumuretični peptid, natrijumuretični faktor ili atriopoetin je poslednjih godina pobudio veliko interesovanje u svetu zbog mogućnosti da se koristi kao pokazatelj srčane slabosti u humanoj i veterinarskoj medicine. Saznanje da se sa istezanjem srčanih šupljina pojačava lučenje atrijalnog natriuretičnog peptida pobudilo je nadu mnogih kliničara u mogućnost njihovog korišćenja kao biomarkera srčane insuficijencije. Ova hipoteza je relativno brzo potvrđena u humanoj medicini, a nešto kasnije i u veterinarskoj, pre svega kod pasa (Rieger, 1987). Kasnija zapažanja da do proširenja srčanih šupljina dolazi i tokom velikih fizičkih naprezanja, uz istovremeno povećanje frekvence srčanog rada koja takođe podstiče oslobađanje natriumuretičnih peptida, nametnula su i mogućnost njihovog korišćenja u proceni treniranosti sportista. Ova ideja je posebno interesantna kod konja, nažalost, do sada ovo nije na adekvatan način i dokumentovano. Kako se konji koriste u različitim diciplinama konjičkog sporta koje se međusobno razlikuju, prvenstveno u zahtevima organizma sportskog konja za kiseonikom i energijom, odlučili smo da ispitamo stepen oslobađanja atrijalnog natriumuretičkog peptida kod konja u tri različita tipa opterećenja: kratkotrajnom brzinskom opterećenju visokog intenziteta koje se prvenstveno oslanja na anaerobne mehanizme iskorišćavanja energije, dugotrajnom opterećenju niskog intenziteta koje se isključivo oslanja na aerobne mehanizme iskorišćavanja energije i mešovitom opterećenju u kome dominira snaga. Naravno, za to smo bili prinuđeni da odaberemo tri različite rase konja: arabela poznatog po izdržljivosti, koji se pokazao najboljim u daljinskom jahanju na stazama dugim od 40 do 160 km, engleskog punokrvnjaka – najbržeg konja na svetu koji se koristi u galopskim trkama na stazama od 1000–3200 m i domaćeg brdskog konji – neverovatno otpornog i izdržljivog konja koji je u stanju da na svojim leđima ponese teret maltene ravan svojoj težini.

Bazalne vrednosti atrijalnog natriuretičkog peptide su kod sve tri rase konja bile u granicama normalnih vrednosti za konje (Gehlen, 2007, Trachsely, 2012), uz izvesne

varijacije koje se ne mogu zanemariti. Tako je kod arabera bazalna koncentracija ANP-a u serumu iznosila  $15,38 \pm 0,8$  pg/ml; kod engleskog punokrvnjaka je bila nešto niža –  $12,14 \pm 1,77$  pg/ml, a kod domaćeg brdskog konja najveća –  $17,88 \pm 3,94$  pg/ml. Prema različitim istraživačima bazalna koncentracija ANP-a kod konja generalno se kreće u granicama od 9 do 24 pg/ml u plazme (McKeever i sar., 1991 i 1992; McKeever i Malinowski, 1999; Gehlen, 2007), pri čemu nešto širi opseg navodi Trachsely (2012) – 7,2–34 pg/ml. Razlike u dobijenim vrednostima se, između ostalog, pripisuju razlikama u načinu i vremenu uzimanja uzoraka krvi, načinu skladištenja uzoraka i metodologiji ispitivanja – različitoj osetljivosti kitova za dokazivanje ANP-a.

Opterećenje dovodi do statistički veoma značajnog povećanja koncentracije ANP-a, koje je linearno povećanju frekvence pulsa. Najveće povećanje je zabeleženo kod galopera ( $62,88 \pm 6,36$  – 507% u odnosu na bazalne vrednosti), nešto manje kod arabera ( $50,35 \pm 6,36$  – 327% u odnosu na bazalne vrednosti), najmanje kod domaćeg brdskog konja:  $50,35 \pm 6,36$  – 256% u odnosu na bazalne vrednosti. Kao što se u tabeli 4 vidi, frekvencija pulsa je najveća upravo kod engleskog punokrvnjaka ( $223 \pm 13,1$ ), znatno manja kod arabera ( $168,9 \pm 14,2$ ) i domaćeg brdskog konja ( $171 \pm 13,61$ ). Manje povećanje koncentracije ANP-a kod domaćeg brdskog konja se može objasniti i kraćim trajanjem rada. Domaćem brdskom konju za iznošenje jednog tovara drva potrebno je oko 30 minuta, uključujući i vreme potrebno za utovar i istovar, za razliku od arabera koji su stazu od 80 km prelazili za 4–5 časova. Frekvencija srčanog rada se pri tom najočiglednije dovodi u vezu sa oslobađanjem ANP-a: kod galopera koji su trku prelazili za 2,5–3 minuta frekvencija srčanog rada je iznosila  $223 \pm 13,1$ , što je značajno iznad anaerobnog praga, za razliku od arabera i brdskih konja koji su radili sa frekvencijom srčanog rada na gornjoj granici aerobnog praga. Posle odmora od 24 časa pri tome, kod svih konja – i kod galopera i kod arabera i kod tovarnih brdskih konja koncentracija ANP-a se vraća u okvire bazalnih vrednosti.

Povezanost frekvencije pulsa sa koncentracijom atrijalnog natriuretičnog peptida se, pri tome, zapaža i u mirovanju. Kod engleskog punokrvnjaka, na primer, utvrđena je najniža frekvencija pulsa u mirovanju ( $34 \pm 2,15$ ) i u isto vreme najmanja koncentracija ANP-a ( $12,14 \pm 1,77$  pg/ml), za razliku od arabera kod kojih je puls iznosio  $38,83 \pm 3,49$  otkucaja u minutu a koncentracija ANP-a  $15,38 \pm 0,8$  pg/ml. Isto važi i za brdske konje – puls je iznosio  $37 \pm 4,34$  otkucaja u minuti, a koncentracija ANP-a  $17,88 \pm 3,94$  pg/ml.



Linearnu povezanost frekvencije pulsa sa koncentracijom ANP-a potvrđuju i drugi autori (Ruskoaho, 1992). Međutim, frekvencija pulsa nije jedini faktor koji utiče na oslobađanje ANP-a – značajnu ulogu imaju i drugi faktori kao što su pritisak u pretkomorama, istežanje zida pretkomora, koncentracija natrijuma i sl. (de Bold, 1996; Kokkonen, 2002). Uostalom, na frekvenciju pulsa utiču i drugi faktori, kao što su strah, bol, uzbuđenje (Rose i Hodgson, 1982). Značajnu ulogu u tumačenju rezultata ima priprema za trku tj. rad, jer su i araber i engleski punokrvnjaci u pripremnom periodu već prilično stresirani treningom što kod domaćeg brdskog konja nije slučaj. Oni rade svakodnevno identičan posao i za njih je mnogo veći stres predstavljala veterinarska manipulacija u odnosu na arabere i engleske punokrvnjake. Sportski konji su naviknuti na konstantno uzimanje uzoraka kao i na konstantnu aplikaciju lekova pa im iz tog razloga uzorkovanje krvi nije predstavljalo gotovo nikakav stres. Neke studije kažu da prosečan engleski punokrvnjak u periodu od deset dana pre trke dobije između 8 i 14 injekcija (Scheinman, 2003). U najlošijoj situaciji od sve tri grupe konja su upravo domaći brdski konji koji uprkos tome što rade težak posao žive u najlošijim uslovima i najmanje sarađuju sa različitim ljudima ili veterinarima. Pojava novih ljudi u njihovoj neposrednoj blizini je dovoljna da izazove burnu reakciju i strah.

Koncentracija ANP-a posle rada značajno je veća kod sve tri kategorije konja, u skladu sa vrstom opterećenja, maksimalnom frekvencijom pulsa i stepenom hidracije. I kod ljudi i kod životinja je potvrđeno da se koncentracija atrijalnog natriuretičnog peptida sa opterećenjem povećava (McKeever, 1992, 1993; Miller, 1990; Baker, 1991; Vuolteenaho, 1992; Mäntymaa, 1994). Povezanost stepena oslobađanja ANP-a i frekvence pulsa pri tome ne isključuju prvu hipotezu po kojoj je istežanje kardiomiocita glavni regulator lučenja atrijalnih natriuretičkih peptida. Neurološki i hormonski mehanizmi kontrole srca su znatno složeniji – opterećenje, na primer, inicira pojačan rad srca uz ubrzanje srčanog rada i zbog otpuštanja deponovane krvi iz slezine, koja značajno povećava volumen cirkulišuće tečnosti i automatski dovodi i do istežanja zida pretkomora i komora (Ruskoaho, 1992, de Bold, 1996). Ovi nalazi su potvrđeni u istraživanjima *in vitro* i *in vivo* (Dietz, 1984; Lang, 1985).

Povećanje volumena cirkulišuće krvi kod konja, kao posledica rada i istiskivanja krvi iz depoa, ima značajnu modulišuću (stimulišuću) ulogu u oslobađanju ANP-a (Erickson, 1993), koja je posebno izražena kod konja, dok kod ljudi ima manji značaj, upravo zbog

procentualno manjeg povećanja volumena cirkulišuće krvi (Green, 1984, Laub, 1993). Poznato je, nadalje, da konji u poređenju sa drugim životinjskim vrstama imaju veliku zapreminu creva, neretko preko 200 litara, koja s jedne strane predstavlja veliki balast i opterećenje, a sa druge veliki rezervoar tečnosti koji obezbeđuje izohidraciju organizma distribucijom tečnosti iz creva u tkiva. Između 9 i 21% ukupne telesne mase konja je voda „zarobljena“ u crevima – tzv. transcelularnom prostoru, i ona sigurno utiče na lučenje ANP-a (Hinchclif, 2002; Sneddon, 2006), naročito tokom produženih fizičkih aktivnosti i perioda nedostupnosti vode (Sneddon, 1998). Najbolji primer dugotrajnog aerobnog opterećenja je endjurans, i to mora da se uzme u obzir prilikom tumačenja rezultata ispitivanja koncentracije ANP-a kod arabera.

Pored fizičkog opterećenja i/ili istežanja pretkomora i ubrzanja srčang rada, pojačano lučenje ANP-a mogu stimulisati i mnogobrojni neuroendokrini faktori (adrenalin, noradrenalin, acetilholin, vazopresin, glukokortikosteroidi, tireoidni hormoni, angiotenzin 2, opijati), periferni nervni sistem, osmolarnost, hipoksija, hipokapnija, ishemija miokarda, metaboličke promene, starost, izloženost velikim vrućinama i hladnoćama itd. (Kula i sar., 2001; Gehlen i sar., 2007; Marr, 2010). ANP pri tome izaziva brzu i temeljnu vazodilataciju i izraženu natriurezu, inhibira sekreciju vazopresina, renina i aldosterona i sprečava vezivanje aldosterona za ćelije tubula u bubrezima. Vezivanje ANP-a za NPRA receptore povećava ekskreciju vode i natrijuma, stepen glomerularne filtracije i protok krvi kroz bubrege (Brenner i sar., 1990; Levin i sar., 1998; Pandey, 2008).

Adaptacija kardiovaskularnog sistema na opterećenje karakteriše se povećanjem minutnog volumena kao rezultat kombinovanog dejstva simpatičkog i parasimpatičkog odgovora (Stephenson, 1997). Simpatička aktivacija srca i oslobođeni kateholamini utiču na funkciju srca povećavanjem brzine otkucaja srca, a snaga kontrakcije se povećava skraćivanjem trajanja sistole, koji čuva dijastoličko vreme punjenja (Stephenson, 1997). Simpatička aktivacija uzrokuje i kontrakciju kapsule slezine i vazokonstrikciju slezinskih kapilara, što dovodi do oslobađanja deponovane krvi iz slezine u krvotok (Davies i Withrington, 1973), te na taj način, značajno doprinosi porastu hematokritske vrednosti. Tako je opterećenje dovelo do povećanja broja eritrocita za 11% kod arabera, 32% kod engleskog punokrvnjaka i 24% kod domaćeg brdskog konja. Rose i Hodgson (1994) navode da slezina može da uskladišti i do 50%

ukupnih eritrocita. Oni smatraju da postoji linearno povećanje hematokrita sa intenzitetom rada dok intenzitet ne dostigne 3/4 brzine. Na osnovu njihovih ispitivanja kod odraslih sportskih konja maksimalna hematokritska vrednost iznosi 60–65%, sa srednjim nivom od 61%. Oni takođe smatraju da je većina ovih poremećaja vezana za oslobađanje eritrocita iz slezine, ali da povećanje hematokritske vrednosti nastaje i usled redistribucije tečnosti tokom rada. Povećan venski priliv uz povećanje komornog dijastolnog punjenja (*preload*) doprinosi povećanju krajnjeg dijastoličkog volumena i udarnog volumena mehanizmom Starlingovog zakona (Stephenson, 1997). Povećanje frekvence srčanog rada za vreme opterećenja konja u skladu je sa značajnim hemodinamičkim promenama, uključujući povećanje pritiska u pretkomorama, što takođe dovodi do dodatne stimulacije lučenja ANP-a (Hopper, 1991; McKeever, 1993; Marlin, 1996).

Na povećanje vrednosti izmerenog pulsa tokom opterećenja utiču i potencijalni bolni procesi pojačani opterećenjem – hramanje ili bilo koje drugo stanje koje izaziva bol, (loše podešena oprema, uboji od sedla, samara, loše jahanje, nestabilan teret itd.). U toplim, vlažnim uslovima poseban značaj ima dehidracija, zatim, nedovoljna utreniranost ili neodgovarajući trening, respiratorni poremećaji ili bolesti, u prvom redu kardiovaskularne bolesti i anemija (Hinchliff, 2000; Evans, 2010).

To praktično znači da na maksimalnu vrednost pulsa kod domaćih brdskih konja, koja je veća nego kod arabera, utiče veličina tereta, bol koji izaziva loša oprema, uboji od samara i veličina uspona koji konji moraju da savladaju, strah i anticipacija uslovljena očekivanim istovarom, kada se natovarena drva obrušavaju na njihove noge. Pri tome, poput brdskih konja, i trkački konji (araberi i engleski punokrvnjaci) reaguju stresno na mnogobrojne faktore, u prvom redu na nepovoljne ambijentalne uslove.

Kod svih kategorija konja je zabeležen pad u vrednostima hematoloških parametara u odnosu na prvo uzorkovanje. Verovatno je količina akumuliranog stresa (i oslobođenog kortizola) konja koji su pripremani za trke bila veoma značajna te je dala nešto veće vrednosti početnih hematoloških parametara. Kod domaćih brdskih konja su te razlike najmanje, jer je i njihova svakodnevnica značajno uravnoteženija u odnosu na arabere i punokrvnjake. To se može videti poredeći neutrofilno-limfocitarni količnike koji je najviši kod arabera nakon istrčanog endjuransa (5,32).

Kod arabera je opterećenje dovelo do značajnog povećanja broja leukocita što se moglo i očekivati. Pojačana simpatikusna aktivnost sama po sebi može da utiče na povećanje broja leukocita u cirkulaciji. Leukociti se nalaze u intravaskularnom prostoru u cirkulaciji i u marginalnim bazenima (kapilarna ležišta u slezini). Ovi bazeni su u dinamičkoj ravnoteži tako, da faktori koji utiču na otvaranje kapilara i kontrakcije slezine dovode i do mobilizacije ćelija iz marginalnih bazena. Ovakav efekat ispoljava kortizol. Pri tome, neutrofili u cirkulaciju dospevaju uglavnom iz krvi kapilara slezine, a limfociti dolaze iz slezine i pojačanim dotokom limfe (Snow, 1983).

Snow i saradnici (1983) su ustanovili da odmah nakon treninga galopom i nakon trke dolazi do smanjenja N/L odnosa, zbog oslobađanja većeg broja limfocita. Ovo je bilo očigledno kod engleskih punokrvnjaka, kod kojih je N/L količnik sa 3,21 pao na 2,04, za razliku od arabera kod kojih je efekat bio drugačiji: N/L količnik se sa 1,25 popeo na čak 5,3. To je efekat dugotrajnog opterećenja velikim delom posredovan kortizolom, koji se pripisuje povlačenje neutrofila, uz potiskivanje limfocita i eozinofila (neutrofilija, limfopenija i eozinopenija). Ovakvo stanje može da traje 48 časova, u ekstremnim stresnim stanjima i mnogo duže (Snow, 1992).

Za razliku od arabera i engleskih punokrvnih konja, kod domaćih brdskih konja nisu utvrđene značajne promene u broju leukocita, što se može pripisati manjem stepenu opterećenja u toku jednog iznošenja drva ili hroničnom sresu, pošto ovi konji u toku jednog dana isto opterećenje ponavljaju više puta. Veći N/L količnik u svim kontrolama može upravo da ukaže na ovakav zaključak.

Serumska aktivnosti enzima CK i AST ne pokazuje značajna odstupanja, osim kod arabera, što se može pripisati dobroj utreniranosti svih konja. Isto se odnosi i na vrednosti ostalih biohemijskih parametara. Posle opterećenja se zapaža blago povećanje koncentracije  $\text{Na}^+$  kod arabera i engleskih punokrvnjaka, uz vraćanje u normalne okvire tokom odmora od 24 časa. Povećana koncentracija  $\text{Na}$  može biti jedan od faktora koji indirektno utiču na povećano lučenje ANP-a, kao i povećanje volumena cirkulišuće krvi zbog pražnjenja depoa eritrocita u slezini. Koncentracije  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , i  $\text{Cl}^-$  su bile u fiziološkim granicama i nisu se značajno menjale nakon opterećenja ili odmora.

Značajno povećanje koncentracije ukupnih proteina u krvi se javlja kod engleskog punokrvnjaka što je karakteristična pojava nakon galopske trke. Snow i saradnici (1992)

su ispitivali promene biohemijskih parametara kod punokrvnih trkačkih konja 10 minuta posle trke na distancama 1000–2400 m i upoređivali ih sa vrednostima pre trke. Registrovali su povećanje koncentracije ukupnih proteina koje je raslo sa intenzitetom opterećenja. Ovo povećanje su povezali sa padom zapremine krvne plazme, koji nastaje usled pomeranja tečnosti iz vaskularnog sistema u tkiva kao i gubitkom tečnosti preko pluća i znojenjem. Posle endjuransa kod arabera je zabeležen pad koncentracije ukupnih proteina, što se opet objašnjava pojenjem tokom trke i nakon trke. Grosskof (1982) i Grosskof i Van Rensburg (1982) su ispitivali koncentraciju ukupnih proteina kod konja posle velikih opterećenja 80 km – u toku ispitivanja pojedini konji su posle pređenih izvesnih distanci napajani vodom i kod njih su koncentracije proteina bile manje, što potvrđuje pretpostavku da do smanjenja koncentracije proteina može doći kao posledica napajanja.

Odmor od 24 časa je u gotovo svim slučajevima doveo do normalizacije svih ispitivanih parametara i vraćanja na bazalni nivo. Kako je vreme poluživota ANP-a u cirkulaciji relativno kratko – 2 do 30 minuta, razumljivo je da će do stabilizacije doći za kratko vreme nakon eliminacije faktora koji je stimulisao pojačano oslobađanje ANP-a. U eliminaciju ANP-a uključeni su različiti fiziološki procesi – vezivanje za receptore, unos u ćelije i metabolizam u ciljnim tkivima, enzimska degradacija i ekskrecija (Ruskoaho, 1992). Glavni mehanizam eliminacije ANP-a se svodi na vezivanje za specifične receptore i enzimsku degradaciju neutralnim endopeptidazama i drugim enzimima (Gerbes, 1990; Ruskoaho, 1992). Različiti organi, kao što su pluća, jetra, creva i bubrezi, takođe doprinose eliminaciji atrijskih peptida iz cirkulacije (Hollister i sar., 1989; Gerbes, 1990).

Sa otklanjanjem radom isprovocirane hipervolemije otklanja se i stimulus za oslobađanje atrijskog natriuretičnog peptide. Brzo smanjivanje koncentracije kateholamina u plazmi i smanjivanje frekvencije pulsa su dokazi da se simpatička aktivnost i dejstvo na srce smanjuje (Kokkonen, 2002), što za posledicu ima i smanjenje koncentracije ANP-a.

Za razliku od ljudi, kod kojih se frekvencija pulsa brzo vraća na početne vrednosti (Somers i sar., 1986), kod konja blago povećanje pulsa može da se zadrži i duže od 30 minuta nakon rada. Međutim tako malo povećanje pulsa ne doprinosi dovoljno

povećanim koncentracijama ANP-a u cirkulaciji (Kokkonen, 2002). Usporena korekcija hipervolemije, međutim, može da uspori normalizaciju koncentracije ANP-a (Nyman, 1998). Hemodinamske promene u bubrezima kao dodatni faktor samo delimično objašnjava zadržavanje produženog vremena lučenja ANP-a nakon rada (Kokkonen, 2002). Eksperimenti sa smanjenjem volumena cirkulišuće tečnosti i pritiska doveli su do povećanja broja receptora za ANP-C na glomerularnim ćelijama i na taj način uticali na smanjenu koncentraciju ANP-a u cirkulaciji (Kollenda, 1990; Ruskoaho, 1992)

Navedeni podaci otvaraju prostor za dodatna istraživanja uloge atrijalnog natrijum-uretičnog peptida u održavanju homeostaze telesnih tečnosti, natriureze, diureze i sl. Njegova upotreba kao pokazatelja stepena utreniranosti ili spremnosti konja je diskutabilna, međutim upotreba kao pokazatelja slabosti srca i hipertenzije ostaje, s tim što su za definisanje određenih standarda u dijagnostici neophodna dalja istraživanja.

## 7. ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvući sledeći zaključci:

1. Bazalna koncentracija aatrijalnog natrijumuretičkog peptida A (ANP) se kod svih ispitanih konja nalazi u okviru fizioloških vrednosti za konje. Najveće vrednosti su pri tome zabeležene kod domaćeg brdskog konja ( $17,88 \pm 3,94$  pg/ml), nešto manje kod arabera ( $15,38 \pm 2,50$  pg/ml) i najmanje kod engleskog punokrvnjaka ( $12,38 \pm 1,77$  pg/ml). Razlike između navedenih vrednosti ANP-a kod ispitivanih rasa konja nisu statistički značajne. Između životinja ženskog i muškog pola takođe nema statistički značajnih razlika – ni unutar pojedinih rasa niti ukupno posmatrano.
2. Opterećenje dovodi do statistički veoma značajnog povećanja koncentracije ANP-a, koje je najveće kod grla rase engleski punokrvnjak posle istrčane galopske trke na 2000 m ( $62,88 \pm 6,36$  pg/ml), nešto manje kod arabera posle istrčane trke u daljinskom jahanju na 80 km ( $50,35 \pm 6,36$  pg/ml) i najmanje kod domaćih brdskih konja posle iznošenja tereta na leđima ( $45,74 \pm 7,67$  pg/ml).
3. Stepenn povećanja koncentracije ANP-a ne zavisi od dužine trajanja opterećenja već od intenziteta. Najveće povećanje je zabeleženo kod konja u opterećenju anaerobnog tipa (galopska trka na 2000 m), znatno manje kod konja u opterećenju aerobnog i mešovitog aerobnog i anaerobnog tipa.
4. Povećanje koncentracije ANP-a je proporcionalno maksimalnom povećanju frekvencije srčanog rada. Najveće vrednosti su zabeležene kod konja posle istrčane galopske trke, u kojoj je maksimalna frekvencija srčanog rada iznosila  $223,00 \pm 13,10$  otkucaja u minuti, a nešto manje kod arabera za vreme trke u daljinskom jahanju, kod kojih je maksimalna frekvencija srčanog rada iznosila

168,90±14,20 i domaćih brdskih konja posle iznošenja tereta na samaru, kod kojih je maksimalna frekvencija srčanog rada bila 170,92±13,77.

5. Posle opterećenjem izazvanog povećanja koncentracije ANP-a, kod svih konja u svim tipovima opterećenja dolazi do vraćanja na bazalni nivo za manje od 24 sata.
6. Opterećenje dovodi do očekivanih promena vrednosti ispitivanih hematoloških i biohemijskih parametara, koje zavise od vrste i intenziteta opterećenja. Ne postoji jasna povezanost između povećanja koncentracije ANP-a i odstupanja drugih hematoloških i biohemijskih parametara krvi. Isto tako, ne postoji jasna veza između koncentracije ANP-a i stanja stresa, kako u mirovanju tako i u opterećenju.
7. Koncentracija ANP-a u mirovanju i opterećenju ne zavisi od stepena treniranosti grla. Između najbolje i najlošije plasiranih grla u galopskim trkama i daljinskom jahanju ne postoje statistički značajne razlike u koncentraciji ANP-a
8. Na oslobođenje ANP-a za vreme fizičkog napora najočiglednije utiče povećanje frekvencije srčanog rada. U ispitivanim testovima opterećenja pri tome nije potvrđena veza između koncentracije ANP-a i povećanja dijametra srčanih šupljina.
9. Koncentracija ANP-a u krvnom serumu konja može biti koristan indikator funkcionalnog stanja kardiovaskularnog sistema, posebno akutnih stanja praćenih velikim povećanjem frekvencije srčanog rada.



## 8. LITERATURA

1. Aitken GD, Raizis AM, Yandle TG, George PM, Espiner EA, Cameron VA, 1999, The characterization of ovine genes for atrial, brain, and C-type natriuretic peptides, *Dom Anim En*, 16 (2), 115-121.
2. Akizuki N, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H, 1991, Cloning and sequence analysis of complementary DNA encoding a precursor for chicken natriuretic peptide, *FEBS letters*, 280, 357-362.
3. Arjamaa O, Karlquist K, Vainionpää V, Leppäluoto J, Vuolteenaho O, 1996, Atrial plasma ANP and NH<sub>2</sub>-terminal proANP during right atrial pressure increase in humans, *Acta Physiol Scand*, 157, 481-485.
4. Art T, Amory H, Desmecht D, Delogne O, Buchet M, Leroy P, Lekeux P, 1990, A field study of post-exercise values of blood biochemical constituents in jumping horses: relationship with score, individual and event, *Zentralbl Veterinarmed A*, 37, (3), 231-239.
5. Asheim A, Knudsen O, Lindholm A, 1970, Heart rates and blood lactate concentrations of Standardbred horses during training and racing, *J Am Vet Med Assoc*;157, 304–312.
6. Atlas SA, Laragh JH, 1987, Physiological actions of atrial natriuretic factor. In: Mulrow PJ, Schrier R (eds), *Atrial hormones and other natriuretic factors*, American Physiological Society, Bethesda, pp 53-76.
7. Baggott J, 1993, Gas transport and pH regulation. In: Devil TM (ed), *Textbook of biochemistry with clinical correlations*, Willey Ziss, New York.
8. Bai G, Gao S, Shah A, Yuan K, Park WH, Kim SH, 2009, Regulation of ANP secretion from isolated atria by prostaglandins and cyclooxygenase-2, *Peptides*, 30, (9), 1720-1728, doi: 10.1016/j.peptides.2009.06.011. Epub 2009 Jun 17.

9. Baker BJ, Wu WCL, Winters CJ, Dinh H, Wyeth R, Sallman AL, Vesely DL, 1991, Exercise increases the circulating concentration of the N-terminus of the atrial natriuretic factor prohormone in normal individuals, *Am Heart J*, 122, 1395-1402.
10. Bartels CF, Bukulmez H, Padayatti P, Rhee DK, van Ravenswaaij-Arts C, Pauli RM, Mundlos S, Chitayat D, Shih LY, Al-Gazali LI, 2004, Mutations in the transmembrane natriuretic peptide receptor NPR-B impair skeletal growth and cause acromesomelic dysplasia, type Maroteaux, *Am J Hum Genet*, 75, 27–34.
11. Benjamin BA, Peterson TV, 1995, Effect of proANF-(31-67) on sodium excretion in conscious monkeys, *Am J Physiol*, 269, R1351-R1355.
12. Bensimon M, Chang AI, De Bold ML, Ponce A, Carreras D, De Bold AJ, 2004, Participation of G proteins in natriuretic peptide hormone secretion from heart atria, *Endocrin*, 145, (11), 5313–5321.
13. Best Patricia, Burnett JC, Wilson S, Holmes D, Lerman A, 2002, Dendroaspis natriuretic peptide relaxes isolated human arteries and veins, *Cardiovascular Research*, 55, 375–384.
14. Braunwald E, 2008, Biomarkers in heart failure, *N Engl J Med*, 358, 2148-2159.
15. Brenner BM, Ballermann BJ, Gunning ME, Zeidel ML, 1990, Diverse biological actions of atrial natriuretic peptide, *Physiol Rev*, 70, (3), 665–699.
16. Calderone A, Thaik CM, Takahashi N, Chang DL, Colucci WS, 1998, Nitric oxide, atrial natriuretic peptide, and cyclic GMP inhibit the growth-promoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts, *J Clin Invest*, 101, 812-818.
17. Cantin M, Timm-Kennedy M, El-Khatib E, Huet M, Yunge L, 1979, Ultrastructural histochemistry of atrial muscle cells. VI. Comparative study of specific granules in right and left atrium of various animal species, *Anat Rec*, 193, 55-70.
18. Cao L, Gardner DG, 1995, Natriuretic peptides inhibit DNA synthesis in cardiac fibroblasts, *Hypertension*, 25, 227-234.
19. Charles CJ, Espiner EA, Richards AM, Nicholl MG, Yandle TG, 1996, Comparative bioactivity of atrial, brain, and C-type natriuretic peptides in conscious sheep, *Am J Physiol Physiol*, 270, R1324-R1331.

20. Chen BN, Rayner TE, Menadue MF, McLennan PL, Oliver JR, 1993, Effect of ischaemia and role of eicosanoids in release of atrial natriuretic factor from rat heart, *Cardiovasc Res*, 27, 9, 1576–1579.
21. Clark BA, Elahi D, Epstein FH, 1990, The influence of gender, age, and the menstrual cycle on plasma atrial natriuretic peptide, *J Clin Endocrinol Metab*, 70, 349-352.
22. Cugini P, Lucia P, Di Palma L, Re M, Canova R, Gasbarrone L, Cianetti A, 1992, Effect of aging on circadian rhythm on atrial natriuretic peptide, plasma renin activity, and plasma aldosterone, *J Gerontol*, 47, B214-B219.
23. Davies BN, Withrington PG, 1973, The actions of drugs on the smooth muscle of the capsule and blood vessels of the spleen, *Pharmacol Rev*, 25, 373-413.
24. de Bold AJ, Bruneau BG, de Bold ML, 1996, Mechanical and neuroendocrine regulation of the endocrine heart, *Cardiovasc Res*, 31, 7–18.
25. de Souza RR, Vieira Caldeira Cleomara Angélica, Carbone Patrícia Oliva, Pianca E V, 2015, Influence of glutamine on the effect of resistance exercise on cardiac ANP in rats, *Revista Brasileira de Ciências do Esporte*, In Press, Corrected Proof, Available online 27 January 2015.
26. Detlef C, 1985, Untersuchungen über das rote blutbild und der eisenvorsorgungsanzeigenden parameter bei stuten und deren fohlen im peripartalen abschnitt unter besonderer berucksichtigung einer eisensubstitution, Inaugural dissertation zur erlangung des doktorgrades bei dem fachbereich, Veterinarmedizin und Tierzucht der Justus-Liebig-Universität zu Gießen.
27. Diety RJ, 2005, Mechanisms of atrial natriuretic peptide secretion from the atrium, *Cardiovasc Research*, 68, 1, 8-17.
28. Dietz JR, 1984, Release of natriuretic factor from rat heart-lung preparation by atrial distension, *Am J Physiol*, 247, R1093-R1096.
29. Dietz JR, 2005, Mechanisms of atrial natriuretic peptide secretion from the atrium, *Cardiovasc Res*, 68, 1, 8-17.

30. Divers TJ, Kraus MS, Radcliffe RM, 2010, Measurement and clinical use of cardiac troponin I (cTnI) in horses, Proceedings of the Annual Convention of the AAEP – Baltimore.
31. Erickson HH, 1993, Exercise physiology. In: Swenson MJ, Reece WO (eds), Duke's Physiology of Domestic Animals, 11th ed, Cornell University Press, Ithaca, pp 303-324.
32. Evans D, Young L, 2010, Cardiac responses to exercise and training. In: Marr C, Bowen M, Cardiology of the horse, Saunders Elsevier, St. Louis, pp 35-47.
33. Evans DL, Rose RJ, 1988, Determination and repeatability of maximal oxygen consumption and other cardiorespiratory measurements in the exercising horse, Equine Vet J, 20, 94–98.
34. Flynn TG, de Bold ML, de Bold AJ, 1983, The amino acid sequence of atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties, Biochem Biophys Res Commun, 117, 859-865.
35. Forssmann K, Hock D, Herbst F, Schultz-Knappe P, Talartschik J, Scheler F, Forssmann WG, 1984, Isolation and structural analysis of circulating human cardiodilatin (alpha-ANP), Klin Wochenschr, 64, 1276-1280.
36. Forssmann WG, Richter R, Meyer M, 1998, The endocrine heart and natriuretic peptides: histochemistry, cell biology, and functional aspects of the renal urodilatin system, Histochem Cell Biol, 110, 4, 335-357.
37. Fujisaki H, Ito H, Hirata Y, Tanaka M, Hata M, Lin M, Adachi S, Akimoto H, Marumo F, Hiroe M, 1995, Natriuretic peptides inhibit angiotensin II-induced proliferation of rat cardiac fibroblasts by blocking endothelin-1 gene expression, J Clin Invest, 96, 1059-1065.
38. Garbers DL, Chrisman TD, Wiegand P, Katafuchi T, Albanesi JP, Bielinski V, 2006, Membrane guanylyl cyclase receptors: an update, Trends Endocrinol Metab, 17, 6, 251–258.
39. Garbers DL, 1992, Guanylyl cyclase receptors and their endocrine, paracrine, and autocrine ligands, Cell, 71, 1, 1–4.

40. Gardner DG, 2003, Natriuretic peptides: markers or modulators of cardiac hypertrophy? *Trends Endocrinol Metab*, 14, 9, 411–416.
41. Gehlen H, Sundermann T, Rohn K, Stadler P, 2007, Plasma atrial natriuretic peptide concentration in Warmblood horses with heart valve regurgitations, *J Vet Cardiol*, 9, 99–101.
42. Gerbes AL, Vollmar AM, 1990, Degradation and clearance of atrial natriuretic factors (ANF), *Life Sci*, 47, 1173-1180.
43. Gillies AH, Crozier IG, Nicholls MG, Espiner EA, Yandle TG, 1987, Effect of posture on clearance of atrial natriuretic peptide from plasma, *J Clin Endocrinol Metabol*, 65, 1095-1097.
44. Green HJ, Thomson JA, Ball ME, Hughson RL, Houston ME, Sharratt MT, 1984, Alterations in blood volume following short-term supramaximal exercise, *J Appl Physiol*, 56, 145-149.
45. Grosskopf WFJ, Van Rensburg JJ, 1982, Some observations on the haematology and blood biochemistry of horses competing in 80 km endurance rides. In: Snow HD, Person BGS, Rose JR (eds), *Equine Exercise Physiology Proceedings of the First International Conference*, Oxford.
46. Grosskopf WFJ, Van Rensburg JJ, Bertschinger JH, 1982, Haematology and blood biochemistry of horses during a 210 km endurance ride. In: Snow HD, Person BGS, Rose JR (eds), *Equine Exercise Physiology Proceedings of the First International Conference*, Oxford.
47. Gutkowska J, Paquette A, Wang D, Lavoie JM, Jankowski M, 2007, Effect of exercise training on cardiac oxytocin and natriuretic peptide systems in ovariectomized rats, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 293, 1, R267-R275.
48. Gutkowska J, Tremblay J, Antakly T, Meyer R, Mukaddam-Daher S, Nemer M, 1993, The atrial natriuretic peptide system in rat ovaries, *Endocrinology*, 132, 2, 693-700.
49. Habibullah AA, Villarreal D, Freeman RH, Dietz JR, Vesely DL, Simmons JC, 1995, Atrial natriuretic peptide fragments in dogs with experimental heart failure, *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 22, 130-135.

50. Hamet P, Tremblay J, Pang SC, Garcia R, Thibault G, Gutkowska J, Cantin M, Genest J, 1984, Effect of native and synthetic atrial natriuretic factor on cyclic GMP, *Biochem Biophys Res Commun*, 123, 515-527.
51. Hinchcliff KW, Geor RJ, Kaneps AJ, 2000, *Equine Exercise Physiology*, Elsevier.
52. Hinchcliff KW, Kaneps AJ, Geor RJ, 2004, *Equine sports medicine and surgery - basic and clinical sciences of the equine athlete*, Elsevier.
53. Hinchcliff KW, Lauderdale MA, Dutson J, Geor RJ, Lacombe VA, Taylor LE, 2002, High intensity exercise conditioning increases accumulated oxygen deficit of horses, *Equine Vet J*, 34, 9-16.
54. Hinchcliff KW, Geor RJ, 2008, The horse as an athlete: a physiological overview. In: Hinchcliff KW, Geor RJ, Kaneps AJ (eds), *Equine Exercise Physiology*, Saunders Elsevier, Philadelphia, pp 2-11.
55. Hollister AS, Rodeheffer RJ, White FJ, Potts JR, Imada T, Inagami T, 1989, Clearance of atrial natriuretic factor by lung, liver, and kidney in human subjects and the dog, *J Clin Invest*, 83, 623-628.
56. Hopper MK, Pieschl RL, Pelletier NG, Erickson HH, 1991, Cardiopulmonary effects of acute blood volume alteration prior to exercise. In: Persson SGR, Lindholm A, Jeffcott LB (eds), *Equine Exercise Physiology 3*, ICEEP Publications, Davies, pp 9-16.
57. Hori Y, Ukai Y, Uechi M, Hoshi F, Higuchi S, 2008, Relationships between velocities of pulmonary venous flow and plasma concentrations of atrial natriuretic peptide in healthy dogs, *J Vet Res*, 69, 4, 465-470. doi: 10.2460/ajvr.69.4.465.
58. Hori Y, Kikuchi M, Nakagawa A, Yonezawa T, Miura H, Ohnami Y, 2009, Plasma atrial natriuretic peptide in healthy calves and calves with congenital heart disease. *J Vet Intern Med*, 23, 3, 653-656.
59. Horio T, Nishikimi T, Yoshihara F, Matsuo H, Takishita S, Kangawa K, 2000, Inhibitory regulation of hypertrophy by endogenous atrial natriuretic peptide in cultured cardiac myocytes, *Hypertension*, 35, 19-24.

60. Inagami T, Naruse M, Hoover R, 1995, Endothelium as an endocrine organ, *Ann Rev Physiol*, 57, 171-189.
61. Inagami T, Takayanagi R, Imade T, Maki M, Naruse M, 1989, Biosynthesis of atrial natriuretic factor. In: Brenner BM, Stein JH (eds), *Atrial natriuretic peptides*, Churchill Livingstone Inc, New York, pp 25-44.
62. Ito T, Toki Y, Siegel N, Gierse JK, Needleman P, 1988, Manipulation of stretch-induced atriopeptin prohormone release and processing in the perfused rat heart, *Proc Natl Acad Sci USA*, 85, 21, 8365–8369.
63. Jain CN, 1986, Schalm,s *Veterinary Hematology*, 4th ed., Lea&Febiger, Philadelphia.
64. Jamieson JD, Palade GE, 1964, Specific granules in atrial muscle cells, *J Cell Biol*, 25, 151-172.
65. Jesty S, Gelzer A, Soderholm LV, 1973, Standardisierter Belastung als Maß für die Leistungsfähigkeit von Pferden, *Zentralbl Vet Med*, 20, 188–208.
66. Kangawa K, Matsuo H, 1984, Purification and complete amino acid sequence of  $\alpha$ -human atrial natriuretic polypeptide ( $\alpha$ -hANP), *Biochem Biophys Res Commun*, 118, 131-139.
67. Kangawa K, Fukuda A, Matsuo H, 1985, Structural identification of  $\beta$ - and  $\gamma$ -human atrial natriuretic polypeptides, *Nature*, 313, 397-400.
68. Kettunen R, Leppäluoto J, Jounela A, Vuolteenaho O, 1994, Plasma N-terminal fragment of proatrial natriuretic peptide in acute myocardial infarction, *Am Heart J*, 127, 1449-1455.
69. Kim SH, Cho K, Hwang YH, Oh SH, Seul KH, Koh GY, Kim SJ, 1992, Ovarian atrial natriuretic peptide during the rat estrous cycle, *Life Sciences*, 51, 16, 1291-1299.
70. Kimura K, Yamaguchi Y, Horii M, Kawata H, Yamamoto H, Uemura S, Saito Y, 2007, ANP is cleared much faster than BNP in patients with congestive heart failure, *Eur J Clin Pharmacol*, 63, 699–702.

71. Kojima K, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H, 1989, Cloning and sequence analysis of cDNA encoding a precursor for rat brain natriuretic peptide, *Biochem Biophys Res Commun*, 159, 1420-1426.
72. Kokkonen UM, Pösö AM, Hyyppä S, Huttunen P, Leppäluoto J, 2002, Exercise-Induced Changes in Atrial Peptides in Relation to Neuroendocrine Responses and Fluid Balance in the Horse, *J Vet Med, A*, 49, 3, 144–150.
73. Kokkonen UM, Pösö AR, Hyyppä S, Huttunen P, Leppäluoto J, 2002, Exercise-induced changes in atrial peptides in relation to neuroendocrine responses and fluid balance in the horse, *Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 49, 3, 144-150.
74. Kollenda MC, Vollmar AM, McEnroe GA, Gerbes AL, 1990, Dehydration increases the density of C receptors for ANF on rat glomerular membranes, *Am J Physiol*, 258, R1084-R1088.
75. Koller KJ, Goddel DV, 1992, Molecular biology of the natriuretic peptides and their receptors, *Circulation*, 86, 1081–1088.
76. Krzywanek H, Wittke G, Bayer A, Borman P, 1970, The heart rates of Thoroughbred horses during a race, *Equine Vete J*, 2, 3, 115–117.
77. Lainchbury JG, Burnett JcJr, Meyer D, Redfield MM, 2000, Effects of natriuretic peptides on load and myocardial function in normal and heart failure dogs, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 278, H33-H40.
78. Lang RE, Thölken H, Ganten D, Luft FC, Ruskoaho H, Unger T, 1985, Atrial natriuretic factor – a circulating hormone by volume loading, *Nature*, 314, 264-266.
79. Laub M, Hvid-Jacobsen K, Hovind P, Kanstrup IL, Christensen NJ, Nielsen SL, 1993, Spleen emptying and venous hematocrit in humans during exercise, *J Appl Physiol*, 74, 1024-1026.
80. Leskinen H, Vuolteenaho O, Ruskoaho H, 1997, Combined inhibition of endothelin and angiotensin II receptors blocks volume load-induced cardiac hormone release, *Circ Res*, 80, 1, 114-123.



81. Leskinen H, Vuolteenaho O, Toth M, Ruskoaho H, 1997, Atrial natriuretic peptide (ANP) inhibits its own secretion via ANP(A) receptors: altered effect in experimental hypertension, *Endocrinology*, 138, 5, 1893-1902.
82. Levin ER, Gardner DG, Samson WK, 1998, Natriuretic peptides, *N Engl J Med*, 339, 5, 321–328.
83. Lew RA, Baertschi AJ, 1989, Mechanisms of hypoxia-induced atrial natriuretic factor release from rat hearts, *Am J Physiol*, 257, H147–H156.
84. Lindholm A, Saltin B, The physiological and biochemical response of Standardbred horses to exercise of varying speed and duration, *Acta Vet Scand*, 1974;15(3):310-24.
85. Lisy O, Lainchbury JG, Leskinen Hanna, Burnett JCJr, 2001, Therapeutic actions of a new synthetic vasoactive and natriuretic peptide, Dendroaspis natriuretic peptide. In: Experimental severe congestive heart failure, Hypertension, *J Am Heart Assoc*, 37, 1089-1094.
86. Lopez MJ, Wong SK, Kishimoto I, Dubois S, Mach V, Friesen J, Garbers DL, Beuve A, 1995, Salt-resistant hypertension in mice lacking the guanylyl cyclase-A receptor for atrial natriuretic peptide, *Nature*, 378, 65-68.
87. Lund RJ, Guthrie AJ, Mostert HJ, Travers CW, Nurton JP, Adamson DJ, 1996, Effect of three different warm-up regimens on heat balance and oxygen consumption of Thoroughbred horses, *J Appl Physiol*, 80, 2190–2197.
88. Maack T, 1992, Receptors of atrial natriuretic factor, *Ann Rev Physiol*, 54, 11-27.
89. Maekawa K, Sudoh T, Furusawa M, Minamino N, Kangawa K, Chkubo H, Nakanishi S, Matsuo H, 1988, Cloning and sequence analysis of cDNA encoding a precursor for porcine brain natriuretic peptide, *Biochem Biophys Res Commun*, 157, 410-416.
90. Magga J, Puhakka M, Hietakorpi S, Punnonen K, Uusimaa P, Risteli J, Vuolteenaho O, Ruskoaho H, Peuhkurinen K, 2004, Atrial natriuretic peptide, B-type natriuretic peptide, and serum collagen markers after acute myocardial infarction, *J Appl Physiol*, 96, 4, 1306-1311.

91. Mangat H, de Bold AJ, 1993, Stretch-induced atrial natriuretic factor release utilizes a rapidly depleting pool of newly synthesized hormone. *Endocrinology*,133,1398–1403.
92. Mäntymaa P, Arokoski J, Pörsti I, Perhonen M, Arvola P, Helminen HJ, Takala TES, Leppäluoto J, Ruskoaho H, 1994, Effect of endurance training on atrial natriuretic peptide in normal and hypertrophied hearts, *J Appl Physiol*, 76, 1184-1194.
93. Marlin DJ, Scott RC, Schrotter RC, Mills PC, Harris RC, Harris PA, Orme CE, Roberts CA, Marr CM, Dyson S, Barrelet F, 1996, Physiological responses in nonheat acclimated horses performing treadmill exercise in cool (20°C/40%RH), hot dry (30°C/40% RH) and hot humid (30°C /80%RH) conditions, *Equine vet J*, Suppl 22, 70-84.
94. Martin DR, Pevahouse JB, Trigg DJ, Vesely DL, Buerkert JE, 1990, Three peptides from the ANP prohormone NH(2)-terminus are natriuretic and/or kaliuretic, *Am J Physiol*, 258, F1401-F1408.
95. McCutcheon LJ, Geor RJ, Hinchcliff KW, 1999, Effects of prior exercise on muscle metabolism during sprint exercise in horses, *J Appl Physiol*, 87, 5, 1914-1922.
96. McKeever KH, Hinchcliff KW, Reed S, Hamlin RL, 1993, Splenectomy alters blood pressure response to incremental treadmill exercise in horses, *Am J Physiol*, 265, R404-R413.
97. McKeever KH, Hinchcliff KW, Schmall LM, Muir WW, 1991, Renal tubular function in horses during submaximal exercise, *Am J Physiol*, 261, R553-R560.
98. McKeever KH, Hinchcliff KW, 1995, Neuroendocrine control of blood volume, blood pressure, and cardiovascular regulation in horses, *Equine Vet J*, Suppl 18, *Equine Exercise Physiology (Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Conference on Equine Exercise Physiology)*, 77-81.
99. McKeever KH, Malinowski K, 1999, Endocrine responses to exercise in young and old horses, *Equine vet J*, Suppl, 30, 561-566.

100. McKeever KH, Hinchcliff KW, Cooley JL, Lamb DR, Muir III WW, 1992a, Arterial-venous difference in atrial natriuretic peptide concentration during exercise in horses, *Am J Vet Res*, 53, 2174-2177.
101. McKeever KH, Hinchcliff KW, Schmall LM, Reed SM, Lamb DR, Muir III WW, 1992b, Plasma renin activity and aldosterone and vasopressin concentrations during incremental treadmill exercise in horses, *Am J Vet Res*, 53, 1290-1293.
102. Meulemans AL, Sipido KR, Sys SU, Brutsaert DL, 1988, Atriopeptin III induces early relaxation of isolated mammalian papillary muscle, *Circ Res*, 62, 1171-1174.
103. Michener ML, Gierse JK, Seetharam R, Fok KF, Olins PO, Mai MS, Needleman P, 1986, Proteolytic processing of atriopeptin prohormone, *Mol Pharmacol*, 30, 6, 552-557.
104. Mifune H, Richter R, Forrsmann WG, 1995, Detection of immunoreactive atrial and brain natriuretic peptides in the equine atrium, *Anat Embryol*, 192, 117-121.
105. Mifune H, Suzuki S, Noda Y, Mohri S, Mochizuki K, 1991, Fine structure of atrial natriuretic peptide (ANP) granules in the atrial cardiocytes in the pig, cattle and horse, *J Vet Med Sci*, 53, 561-568.
106. Mifune H, Suzuki S, Nokihara K, Noda Y, 1996, Distribution of immunoreactive atrial and brain natriuretic peptides in the heart of the chicken, quail, snake and frog, *Exp Anim*, 45, 125-133.
107. Miller TD, Rogers PJ, Bauer BA, Burnett Jr JC, Bailey KA, Bove AA, 1990, What stimulates atrial natriuretic factor release during exercise, *J Lab Clin Med*, 116, 487-491.
108. Miller TD, Rogers PJ, Bauer BA, Burnett JC, Bailey KA, Bove AA, 1990, What stimulates atrial natriuretic factors release during exercise, *J Lab Clin Med*, 116, 4, 479-486.
109. Mitchell LM, Ducharme NG, 2010, Measurement and clinical use of cardiac troponin I (cTnI) in horses, *Proceedings of the Annual Convention of the AAEP – Baltimore*.

110. Mukai K, Takahashi T, Hada T, Eto D, Kusano K, Yokota S, Hiraga A, Ishida N, 2003, Influence of gender and racing performance on heart rates during submaximal exercise in Thoroughbred racehorses, *J Equine Sci*, 14, 3, 93-96.
111. Murakami M, Imahara T, Inui T, Amada A, Senta T, Takagi S, 1976, Swimming exercises in horses, *Exp Rep Equine Hlth Lab*, 13, 27-49.
112. Nakao K, Ogawa Y, Suga S, Imura H, 1992, Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. 1. Natriuretic peptides, *J Hypertens*, 10, 907-912.
113. Naylor JR, Bayly WM, Gollnick PD, 1993, Effects of dehydration on thermoregulatory responses of horses during low-intensity exercise, *J Appl Physiol*, 75, 2, 994-1001.
114. Neyses L, Vetter H, 1989, Action of atrial natriuretic peptide and angiotensin II on the myocardium: studies in isolated rat ventricular cardiomyocytes, *Biochem Biophys Res Commun*, 163, 1435-1443.
115. Nyman S, Kokkonen UM, Dahlborn K, 1998, Changes in plasma atrial natriuretic peptide concentration in exercising horses in relation to hydration status and exercise intensity, *Am J Vet Res*, 59, 4, 489-494.
116. Ogawa Y, Itoh H, Tamura N, Suga S, Yoshimasa T, Uehira M, Matsuda S, Shiono S, Nishimoto H, Nakao K, 1994, Molecular cloning of the complementary DNA and gene that encode mouse brain natriuretic peptide and generation of transgenic mice that overexpress the brain natriuretic peptide gene, *J Clin Invest*, 93, 1911-1921.
117. Ogawa T, Vatta M, Bruneau BG, de Bold AJ, 1999, Characterization of natriuretic peptide production by adult heart atria, *Am J Physiol*, H1977-H1986.
118. Oh YB, Gao S, Shah A, Kim JH, Park WH, Kim SH, 2011, Endogenous angiotensin II suppresses stretch-induced ANP secretion via AT1 receptor pathway, *Peptides*, 32, 2, 374-381. doi: 10.1016/j.peptides.2010.10.031. Epub 2010 Nov 4.
119. Oliver PM, Fox JE, Kim R, Rockman HA, Kim HS, Reddick RL, Pandey KN, Milgram SL, Smithies O, and Maeda N, 1997, Hypertension, cardiac hypertrophy, and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A, *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 14730-14735.

- 120.Oyama MA, Sisson DD, Solter PF, 2007, Prospective screening for occult cardiomyopathy in dogs by measurement of plasma atrial natriuretic peptide, B-type natriuretic peptide, and cardiac troponin-I concentrations, *Am J Vet Res*, 68, 1, 42-47.
- 121.Pandey KN, 2008, Emerging roles of natriuretic peptides and their receptors in pathophysiology of hypertension and cardiovascular regulation, *J Am Soc Hypertens*, 2, 4, 210–226.
- 122.Pandey KN, 2008, Emerging roles of natriuretic peptides and their receptors in pathophysiology of hypertension and cardiovascular regulation, *J Am Soc Hypertens*, 2, 4, 210–226.
- 123.Park K, Itoh H, Yamahara K, Sone M, Miyashita K, Oyamada N, 2008, Therapeutic potential of atrial natriuretic peptide administration on peripheral arterial diseases. *Endocrinology*, 149, 2, 483–491.
- 124.Persson SGB, 1967, On blood volume and working capacity in horses, *Acta Vet Scand, Suppl*, 19, 1–189.
- 125.Pickrell J, 2005, 95% of Thoroughbreds linked to one superstud, *New Scientist*, September 2005, Dublin.
- 126.Potter LR, 2011, Natriuretic peptide metabolism, clearance and degradation, *FEBS J*, 278, 1808–1817. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08082.x).
- 127.Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM, 2006, Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions, *Endocr Rev*, 27, 47–72.
- 128.Pösö AR, Hyypä S, Geor RJ, 2008, Metabolic responses to exercise and training. In: Hinchcliff KW, Geor RJ, Kaneps AJ (eds), *Equine Exercise Physiology*, Saunders Elsevier, Philadelphia, 248-272.
- 129.Redondo J, Bishop JE, Wilkins MR, 1998, Effect of atrial natriuretic peptide and cyclic GMP phosphodiesterase inhibition on collagen synthesis by adult cardiac fibroblasts, *Br J Pharmacol*, 124, 1455-1462.

130. Richards AM, 2007, Natriuretic peptides: update on peptide release, bioactivity, and clinical use, *Hypertension*, 50, 1, 25–30.
131. Richards AM, Nicholls MG, Yandle TG, Ikram H, Espiner EA, Turner JG, Buttimore RC, Lainchbury JG, Elliott JM, Frampton C, Crozier IG, Smyth DW, 1999, Neuroendocrine prediction of left ventricular function and heart failure after acute myocardial infarction, *Heart*, 81, 2, 114-120.
132. Richter R, Mägert HJ, Mifune H, Schulz-Knappe P, Forrsmann WG, 1998, Equine cardiodilatin/atrial natriuretic peptide. Primary structure and immunohistochemical localization in auricular cardiocytes, *Acta Anat*, 162, 185-193.
133. Riegger GA, Kromer EP, Wild S, Hofbauer H, Klug ML, Kochsiek K, 1987, Atrial natriuretic factor in acute and chronic cardiac failure, *J Cardiovasc Pharmacol*, Suppl, 6, S161-S165.
134. Rose JR, Hodgson RD, 1993, *Manual of equine practice*, Saunders, Philadelphia.
135. Rose JR, Hodgson RD, 1994, An overview of performance and sports medicine. In: Hodgson RD, Rose JR (eds), *The Athletic Horse - Principles and Practice of Equine Sports Medicine*, Saunders, Philadelphia.
136. Rose JR, Hodgson RD, 1994, Hematology and Biochemistry. In: Hodgson RD, Rose JR (eds), *The Athletic Horse - Principles and Practice of Equine Sports Medicine*, Saunders, Philadelphia.
137. Rose RJ, Hendrickson DK, Knight PK, 1990, Clinical exercise testing in the normal Thoroughbred racehorse, *Aust Vet J*, 67, 345–348.
138. Rose RJ, Hodgson DR, 1982, Haematological and plasma biochemical parameters in endurance horses during training, *Equine vet J*, 14, 144-148.
139. Ruskoaho H, 1992, Atrial natriuretic peptide: synthesis, release, and metabolism, *Pharmacol Rev*, 44, 479-602.
140. Saegusa N, Sato T, Saito T, Tamagawa M, Komuro I, Nakaya H, 2005, Kir6.2-deficient mice are susceptible to stimulated ANP secretion: KATP channel acts as a negative feedback mechanism? *Cardiovasc Res*, 67, 60–68.

- 141.Santos SA, 2001, Alterações séricas de proteína total e eletrólitos em cavalo Pantaneiro durante exercício de longa distância, *Arq Bras Med Vet Zootec* [online], 53, 351-357.
- 142.Scarborough RM, 1989, Metabolism of atrial natriuretic peptide. In: Brenner BM, Stein JH (eds), *Atrial natriuretic peptides*, Churchill Livingstone Inc, New York, pp 45-77.
- 143.Scheinman J, 2003, Horses, Drugs are racing's daily double; No uniform policy in industry," *The Washington Post* 27 Apr. 2003.
- 144.Scotland RS, Ahluwalia A, Hobbs AJ, 2005, C-type natriuretic peptide in vascular physiology and disease, *Pharmacol Ther*, 105, 2, 85-93.
- 145.Seeherman HJ, Morris EA 1991, Comparison of yearling, two-year-old and adult Thoroughbreds using a standardised exercise test, *Equine Vet J*, 23, 175-184.
- 146.Seilhamer JJ, Arfsten A, Miller JA, Lindquist P, Scarborough RM, Lewicki JA, Porter G, 1989, Human and canine gene homologs of porcine brain natriuretic peptide, *Biochem Biophys Res Commun*, 165, 650-658.
- 147.Smith JE, Erickson HH, Debowes RM, 1989, Changes in circulating equin erythrocytes induced by brief, high-speed exercise, *Equine vet J*, 21:444.
- 148.Sneddon JC, 1994, Effects of dehydration and rehydration on the intravascular space in horses, *J Physiol*, 479P, 122
- 149.Sneddon JC, Argenzio RA, 1998, Feeding strategy and water homeostasis in equids - the role of the hind gut, *J Arid Environ*, 38, 3, 493-509.
- 150.Sneddon JC, Boomker E, Howard CV, 2006, Mucosal surface area and fermentation activity in the hind gut of hydrated and chronically dehydrated working donkeys, *J Anim Sci*, 84, 1, 119-124.
- 151.Snow DH, Harris RC, MacDonald IA, Forster CD, Marlin DJ, 1992, Effects of high-intensity exercise on plasma catecholamines in Thoroughbred horse, *Equine vet J*, 24, 462-467.
- 152.Snow DH, Kerr MG, Nimmo MA, 1982, Alterations in blood, sweat, urine and muscle composition during exercise in the horse, *Vet Rec*, 100, 377-384.

153. Snow DH, Ricketts SW, Mason DK, 1983, The haematological response to racing and training exercise in Thoroughbred horses, with particular reference to the leucocyte response, *Equine Vet J*, 15, 149-154.
154. Somers VK, Anderson JV, Conway J, Sleight P, Bloom SR, 1986, Atrial natriuretic peptide is released by dynamic exercise in man, *Horm Metabol Res*, 18, 871-872.
155. Stephenson RB, 1997, *Cardiovascular Physiology*. In: Gunningham JG (ed), *Textbook of Veterinary Physiology*, 2nd ed, Saunders, Philadelphia, pp 127-260.
156. Stewart GA, Riddle CA, Salmon PW, 1977, Haematology of the racehorse, *Aust Vet J*, 53, 353-359.
157. Suga S, Nakao K, Hosoda K, Mukoyama M, Ogawa Y, Shirakami G, Arai H, Saito Y, Kambayashi Y, Inouye K, Imura H, 1992, Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide and C-type natriuretic peptide, *Endocrinology*, 130, 229-239.
158. Tamura N, Doolittle LK, Hammer RE, Shelton JM, Richardson JA, Garbers DL, 2004, Critical roles of the guanylyl cyclase B receptor in endochondral ossification and development of female reproductive organs, *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 17300–17305.
159. Thibault G, Amiri F, Garcia R, 1999, Regulation of natriuretic peptide secretion by the heart, *Annu Rev Physiol*, 61, 193-217
160. Thibault G, Garcia R, Gutkowska J, Bilodeau J, Lazure C, Seidah N, Chretien M, Genest J, Cantin M, 1987, The propeptide of Asn1-Tyr126 is the storage form of rat atrial natriuretic factor, *Biochem J*, 241, 265-272.
161. Thomas DP, Fregin GF, 1974, Cardiorespiratory and metabolic responses to treadmill exercise in to exercise of varying speed and duration, *Acta Vet Scand*, 15, 310–324.
162. Thomas DP, Fregin GF, 1990, Cardiorespiratory drift during exercise in the horse. *Equine Vet J, Suppl*, 9, 61–65.
163. Thomas DP, Fregin GF, Gerber NH, 1980, Cardio-respiratory adjustments to tethered swimming in the horse, *Pflugers Arch*, 385, 65–70.



164. Tomisawa M, 1969, Atrial specific granules in various mammals, *Arch Histol Jap* 30, 449-465.
165. Trachsel DS, Grenacher B, Weishaupt MA, Schwarzwald CC, 2012, Plasma atrial natriuretic peptide concentrations in horses with heart disease: A pilot study 2012, *Vet J*, 192, 166-170.
166. Trailović D, Epštajn A, Stojanović D, Nikolovski Stevanović Z, Đurđević D, 1992, Uporedo ispitivanje trijasa i osnovnih hematoloških i biohemijskih parametara u galopera kasača i preponaša tokom testa opterećenja, *Zbornik radova prvog simpozijuma o sportskoj medicini konja*, Subotica.
167. Tsuji T, Kunieda T, 2005, A loss-of-function mutation in natriuretic peptide receptor 2 (Npr2) gene is responsible for disproportionate dwarfism in *cn / cn* mouse, *J Biol Chem*, 280, 14288–14292.
168. Tsuruda T, Boerrigter G, Huntley BK, Noser JA, Cataliotti A, Costello-Boerrigter LC, Chen HH, Burnett JC Jr, 2002, Brain natriuretic peptide is produced in cardiac fibroblasts and induces matrix metalloproteinases, *Circ Res* 91, 1127-1134.
169. Van Der Vekens N, Decloedt A, De Clercq D, Ven S, van Loon G, 2015, Equine BNP measurement using a porcine BNP enzyme-linked immunoassay: a pilot study, *Vlaams Diergen Tijds*, 84, 80-87.
170. Van Der Vekens N, Decloedt A, De Clercq D, Verheyen T, van Loon G, 2012, The use of cardiac biomarkers in veterinary medicine: the equine perspective. *Vlaams Diergen Tijds*, 81, 319-327.
171. Van Der Vekens N, Hunter I, Goetze JP, Decloedt A, De Clercq D, Van Loon G, 2013, Human and equine cardiovascular biomarkers: beware to compare. *Cardiovascular Endocrin*, 2, 4, 67-76
172. Vasan RS, Benjamin EJ, Larson MG, Leip EP, Wang TJ, Wilson PW, 2002, Plasma natriuretic peptides for community screening for left ventricular hypertrophy and systolic dysfunction: the Framingham heart study, *JAMA*, 288, 10, 1252–1259.

173. Vesely DL, Douglass MA, Dietz JR, 1994, Three peptides from the atrial natriuretic factor prohormone amino terminus lower blood pressure and produce diuresis, natriuresis, and/or kaliuresis in humans, *Circulation*, 90, 1129–1140.
174. Vesely DL, 2001, Atrial natriuretic peptides in pathophysiological diseases. *Cardiovasc Res*, 51, 647-658.
175. Vesely DL, 1999, Atrial natriuretic peptides in the diagnosis and treatment of congestive heart failure, *Congestive Heart Failure*, 5, 171–179.
176. Vincen TL, Newton JR, Deaton CM, Franklin SH, Biddick T, McKeever KH, McDonough P, Young LE, Hodgson DR, Marlin DJ, 2006, Retrospective study of predictive variables for maximal heart rate (HRmax) in horses undergoing strenuous treadmill exercise, *Equine Vet J Suppl*, 36, 146-152.
177. Vuolteenaho O, Koistinen P, Martikkala V, Takala T, Leppäluoto J, 1992, Effect of physical exercise in hypobaric conditions on atrial natriuretic peptide secretion, *Am J Physiol*, 263, R647-R652.
178. Weir ML, Honrath U, Flynn TG, Sonnenberg H, 1994, Lack of biological activity or specific binding of amino-terminal pro-ANP segments in the rat, *Regul Pept*, 53, 111-122.
179. White RE, Lee AB, Shcherbatko AD, Schonbrunn A, Armstrong DL, 1993, Potassium channel stimulation by natriuretic peptides through cGMP-dependent dephosphorylation, *Nature*, 361, 263–266.
180. White SL, Williamson LH, Maykuth P, 1995, Heart rate response and plasma lactate concentrations of horses competing in the cross-country phase of combined training events, *Equine Vet J Suppl*, 20, 47-51.
181. Wijbenga JAM, Balk AHMM, Boomsma F, Veld AJ, Hall J, 1999, Cardiac peptides differ in their response to exercise, *Eur Heart J*, 20, 1424-1428.
182. Wolf JP, Davicco MJ, Giry J, Barlet JP, 1991, Diurnal change in plasma atrial natriuretic factor and arginine vasopressin in young jersey calves, *J Develop Physiol*, 16, 363-366.
183. Wu SQ, Kwan CY, Tang F, 1997, The effect of aging on ANP levels in the plasma, heart, and brain of rats, *J Gerontol*, 52, B250-254.

184. Yandle TG, Richards AM, Nicholls MG, Cuneo R, Espiner EA, Livesey JH, 1986, Metabolic clearance rate and plasma half life of alpha-human atrial natriuretic peptide in man, *Life Sci*, 38, 1827-1833.



## PRILOZI

*Tabela 1. Pojedinačne vrednosti koncentracije ANP-a (pg/ml) u krvi ispitivanih konja pre opterećenja*

Pojedinačne životinje	Domaći brdski konj	Araber	Engleski punokrvnjak
1	18,11	13,14	12,35
2	19,12	14,91	13,71
3	15,64	15,73	10,38
4	17,14	17,05	13,11
5	17,79	14,83	11,56
6	15,93	19,07	11,49
7	17,56	13,27	12,06
8	18,81	15,10	14,42
9	19,33	14,78	10,79
10	17,09	13,57	13,65
11	21,16	16,58	10,48
12	15,38	15,91	11,68

*Tabela 2. Pojedinačne vrednosti koncentracije ANP-a (pg/ml) u krvi ispitivanih konja posle opterećenja*

Pojedinačne životinje	Domaći brdski konj	Araber	Engleski punokrvnjak
1	45,84	50,44	55,48
2	47,51	52,53	67,85
3	54,58	57,48	65,34
4	37,85	40,12	59,45
5	61,83	60,42	70,22
6	46,54	48,81	59,11
7	53,62	55,18	68,83
8	42,77	40,77	73,24
9	39,09	51,53	54,63
10	41,83	41,33	65,09
11	40,37	56,36	59,06
12	37,05	49,19	56,26

*Tabela 3. Pojedinačne vrednosti koncentracije ANP-a (pg/ml) u krvi ispitivanih konja posle odmora od 24 časa*

Pojedinačne životinje	Domaći brdski konj	Araber	Engleski punokrvnjak
1	14,11	15,23	13,36
2	15,22	16,30	14,73
3	15,09	15,86	10,29
4	16,17	16,63	14,65
5	15,31	15,09	10,48
6	19,48	16,23	10,18
7	18,81	15,31	15,86
8	17,42	13,82	15,63
9	20,34	13,52	12,09
10	16,23	13,45	16,23
11	19,57	13,38	11,31
12	20,84	13,61	11,82

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а \_\_\_\_\_ Стефан Ђоковић \_\_\_\_\_

број уписа \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

УПОРЕДНО ИСПИТИВАЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ АТРИЈАЛНОГ  
НАТРИЈУМУРЕТИЧКОГ ПЕПТИДА КОД ДОМАЋЕГ БРДСКОГ КОЊА, АРАБЕРА И  
ЕНГЛЕСКОГ ПУНОКРВЊАКА ПОСЛЕ РАЗЛИЧИТИХ ТИПОВА ФИЗИЧКОГ  
ОПТЕРЕЋЕЊА

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_26.05.2016.\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Стефан Ђоковић \_\_\_\_\_

Број уписа \_\_\_\_\_

Студијски програм : Клиничка патологија и терапија животиња

Наслов рада : УПОРЕДНО ИСПИТИВАЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ АТРИЈАЛНОГ  
НАТРИЈУМУРЕТИЧКОГ ПЕПТИДА КОД ДОМАЋЕГ БРДСКОГ КОЊА, АРАБЕРА И  
ЕНГЛЕСКОГ ПУНОКРВЊАКА ПОСЛЕ РАЗЛИЧИТИХ ТИПОВА ФИЗИЧКОГ  
ОПТЕРЕЋЕЊА\_

Ментор \_\_\_\_\_ Проф.др Драгиша Траиловић \_\_\_\_\_

Потписани \_\_\_\_\_ Стефан Ђоковић \_\_\_\_\_

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_26.05.2016. године\_

\_\_\_\_\_

**Прилог 3.**

## **Изјава о коришћењу**

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

УПОРЕДНО ИСПИТИВАЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ АТРИЈАЛНОГ НАТРИЈУМУРЕТИЧКОГ ПЕПТИДА КОД ДОМАЋЕГ БРДСКОГ КОЊА, АРАБЕРА И ЕНГЛЕСКОГ ПУНОКРВЊАКА ПОСЛЕ РАЗЛИЧИТИХ ТИПОВА ФИЗИЧКОГ ОПТЕРЕЋЕЊА

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
- ✳. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

**Потпис докторанда**

У Београду, 26.05.2016. године

---

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.