



УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ“ – ШТИП

ФАКУЛТЕТ ЗА МЕДИЦИНСКИ НАУКИ

Мајлинда Адеми

**ЕФЕКТОТ НА ЈОНИЗИРАНАТА ВОДА ЗБОГАТЕНА СО ГЛУТАТИОН И
ВИТАМИН Ц ВРЗ АНТИОКСИДАТИВНАТА ЕНЗИМСКА АКТИВНОСТ ПРИ
АКУТЕН ХИПЕРТЕРМИЧКИ СТРЕС КАЈ БЕЛИОТ ЛАБОРАТОРИСКИ
СТАОРЕЦ**

-ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА-

Штип, Февруари 2020 г.

Комисија за оценка и одбрана

Ментори: Проф. д-р Дарко Бошнаковски, интерен ментор
Факултет за медицински науки, Универзитет “Гоце Делчев” – Штип

Проф. д-р Ицко Ѓоргоски, екстерен ментор
Природно математички факултет, Универзитет “Св. Кирил и Методиј” – Скопје

Член: Проф. д-р Татјана Рушковска, Претседател
Факултет за медицински науки, Универзитет “Гоце Делчев” – Штип

Член: Проф. д-р Невенка Величкова
Факултет за медицински науки, Универзитет “Гоце Делчев” – Штип

Член: Проф. д-р Емилија Јаневиќ Ивановска
Факултет за медицински науки, Универзитет “Гоце Делчев” – Штип

За докторската дисертација

Интерен ментор: Проф. д-р Зденка Стојановска
Факултет за медицински науки, Универзитет “Гоце Делчев” – Штип

Екстерен ментор: Проф. д-р Ицко Ѓоргоски
Природно математички факултет, Универзитет “Св. Кирил и Методиј” - Скопје

Членови на Комисијата за оценка и одбрана:

Претседател: Проф. д-р Татјана Рушковска
Факултет за медицински науки, Универзитет “Гоце Делчев” – Штип

Член: Проф. д-р Емилија Јаневиќ Ивановска
Факултет за медицински науки, Универзитет “Гоце Делчев” – Штип

Член: Проф. д-р Невенка Величкова
Факултет за медицински науки, Универзитет “Гоце Делчев” – Штип

Научно поле: Биомедицина
Научна област: Медицински науки

Датум на одбраната: 24.02.2020

Би сакала да му ја изразам својата искрена и голема благодарност на мојот ментор, проф. д-р Ицко Ѓорѓоски , за неговата посветеност и за професионалниот ангажман, за стручните и научните дискусии и за конструктивните забелешки, за покажаните вистински насоки во работата и за неговата безрезервна поддршка во секој сегмент од моите докторски студии. Ви благодарам што прифативте да бидете мој ментор и што имав можност да го почувствувам вашиот ентузијазам и креативен дух, кои ми беа дополнителен стимул во работата. Исто така, им се заблагодарувам на внатрешните ментори проф. д-р Дарко Бошнаковски и проф. д-р Зденка Стојановска за нивниот стручен и професионален ангажман.

Огромна благодарност ѝ должам на проф. д-р Татјана Рушковска за научните и стручните сугестии дадени во процесот на изработка на докторскиот труд.

Воедно, голема благодарност до лаборантите Олга Русимовиќ и Оливер Николовски за укажаната помош при работата, како и за моралната поддршка.

Вистинска благодарност до моето семејство и до моите родители, кои во текот на целиот период на изработката на докторската дисертација несебично ми пружаа љубов и бесконечна морална поддршка.

И на крајот, неограничена и вечна благодарност до мојот сакан сопруг Илберт Адеми, кој како лекар специјалист по урологија, при реализацијата на оваа докторска дисертација неисцрпно ми пружаше професионална и стручна помош, ме охрабруваше и ми даваше поттик и позитивен дух.

ТРУДОВИ

Автор на трудови:

1. Majlinda Ademi, Icko Gjorgoski, Ilbert Ademi (2019). "The impact of ionized water supplemented with glutation and vitamin C during acute hyperthermic exposure on the concentration of total proteins in the blood serum at white laboratory rats". Knowledge – Interntional Journal, Vol.34.4 867-872 (Global Impact & Quality Factor 1,822)
2. Majlinda Ademi, Icko Gjorgoski, Ilbert Ademi. (2018) "The role of oxidative stress on cell metabolism", Medicus Vol. 23 (3) 287-294
3. Мајлинда Адеми, Ицко Ѓоргоски, Илберт Адеми (2019). "Ефектот на јонизираната вода збогатена со глутатион и витамин С врз концентрацијата на триглицериди и холестерол при акутен хипертермички стрес кај белиот лабораториски стаорец", Medicus Vol.24 (1) 29-35.
4. Majlinda Ademi, Mitko Mladenov, Nikola Hadzi-Petrushev, Icko Gjorgoski, Ylber Ademi. (2017). "Angiotensin II is a negative regulator of the serotonin levels in the brain", Medicus Vol 22(3) 320-324.
5. Majlinda Ademi, Icko Gjorgoski, Ilbert Ademi. (2019) "The alterations of the enzymatic antioxidant activity by adding alkaline water on the white laboratory rats after hyperthermic stress". Acta Medica Balkanica, Vol.4/No7-8 79-85.

Коавтор на трудови:

1. Ilbert Ademi, Nevzat Elezi, Bekim Ismaili, Adnan Vrajnko, Majlinda Ademi (2018). "The influence of genitourinary tract infections in sperm culture estimation". Medicus 23 (3) 280-286.
2. Ilbert Ademi, Adnan Vrajnko, Adnan Xhabiri, Nevzat Elezi, Bekim Ismaili, Majlinda Ademi (2019). "Early varicocele detection in prevention of male infertility". Medicus Vol 24 (1) 42-45.
3. Hristijan Spasov, Mire Spasov, Icko Gjorgoski, Majlinda Ademi (2019). "The diagnosis of phleum pretense as alergogen on the immune system in white

laboratory rat". Knowledge – Interntional Journal, Vol.31.4 pp.975-980, (Global Impact & Quality Factor 1,822)

4. Аднан Врајнко, Гафур Мемети, Јакуп Јакупи, Стојан Давидовски, Сали Сефери, Илберт Адеми, Гази Мустафа, Скендер Велији, Наим Исмаили, Садри Зекири, Дашурије Капроли, Аднан Џабири, Гази Селими, Мајлинда Адеми (2019). "Застапеност на вентралната херниа во општина Гостивар во период од 2014-2018 година. Medicus Vol.24 (2) 156-159.

5. Ilbert Ademi, Adnan Vrajnko, Majlinda Ademi (2019). "Acute urinary retention caused by huge urethral caruncle". Knowledge – Interntional Journal, Vol. 34.4 931-934 (Global Impact & Quality Factor 1,822)

6. Ilbert Ademi, Adnan Vrajnko, Majlinda Ademi (2019). "Salvage of the right testicle due to timely determination of testicular torsion. Presentation with a case report". Knowledge – Interntional Journal, Vol. 34.4 931-934 (Global Impact & Quality Factor 1,822)

Презентации од конференции објавени во книга на абстракти

1. Majlinda Ademi, Icko Gjorgoski, Slobodanka Dodeska, Ilbert Ademi.: "The impact of alkaline water on the enzymatic antioxydant activity after hyperthermic stress in the white laboratory rats", 5th International Vet-Istanbul Group Congress & 8th International Scientific Meeting Days of veterinary medicine-2018", Ohrid 2018 (Книга на абстракти, стр.139)

2. Majlinda Ademi, Icko Gjorgoski, Slobodanka Dodeska, Ilbert Ademi.: "The impact of hyperthermic stress on some parameters of protein metabolism-total proteins, urea, creatinine, AST and ALT", 5th International Vet-Istanbul Group Congress & 8th International Scientific Meeting Days of veterinary medicine-2018, Ohrid 2018 (Книга на абстракти стр.141)

3. Majlinda Ademi, Icko Gjorgoski, Nevzat Elezi, Ilbert Ademi. : "Alterations on some parameters of degradation products, proteins and enzymatic metabolism below the hyperthermic stress in white laboratory rats treated with alkaline water, glutathione

and vitamin C”, XXIII Symposium of Professional Medical Meetings, Struga 2018. (Книга на абстракти стр. 68).

4. Majlinda Ademi, Icko Gjorgoski, Selim Cerkezi, Ilbert Ademi.: “ The alterations of the enzymatic antioxidant activity by adding alkaline water on the white laboratory rats after hyperthermic stress”, 3rd International Scientific Conference of the Faculty of Medical Sciences University and 2nd Annual Albanian Congress of Trauma and Emergency Surgery, Ohrid 2018 (книга на абстракти стр. 63).

Учество на стручни конгреси и симпозиуми со сертификати

1. 5th International Vet-Istanbul Group Congress & 8th International Scientific Meeting Days of veterinary medicine-2018”, Ohrid 23-27/09/2018
2. XXIII Symposium of Professional Medical Meetings, Struga 26-28/10/2018.
3. 3rd International Scientific Conference of the Faculty of Medical Sciences University of Tetova and 2nd Annual Albanian Congress of Trauma and Emergency Surgery, Ohrid 08-11/11/2018
4. Fifth Macedonian Congress of Endocrinology with international participation and Third Diabetes Days in Macedonia with international participation, Ohrid 10-13 May 2018
5. Симпозиум: ”Примена на хибридни нуклеарно медицински техники во онкологијата и инфективни состојби”, Скопје 06-07/06/2018
6. Симпозиум: ”Трансплантација на ткива и органи - предизвици и дилеми”, 09/06/2018
7. Стручен состанок: “Терапија на бенигно зголемување на простата, Никсар во терапијата на алергиски ринитис и уртикарија” Скопје 16/05/2018
8. Стручен состанок “Витамини и Минерали – Лекување и Превентива”, Тетово 05/04/2018
9. “Балкански конгрес по урологија”, Ohrid, 5-7/04/2019

10. Работилница на ЗПЛРМ: “Раст и развој на доенче”, Скопје, 30/09/2016
11. Работилница на ЗПЛРМ: “Реанимација”, Скопје, 08/06/2016
12. Работилница на ЗПЛРМ: “Ургентни состојби во ПЗЗ”, Скопје, 16/01/2016
13. Работилница на ЗПЛРМ: “Алцхајмерова болест”, Скопје, 06/04/2019
14. Работилница на ЗПЛРМ: “Синдром на Burn out кај докторите”, Скопје
06/04/2019
15. Работилница на ЗПЛРМ: “Грип – Имунизација”, Скопје, 20/04/2019
16. Работилница на ЗПЛРМ: “Морбус Вилсон”, Скопје 20/04/2019

СОДРЖИНА

АПСТРАКТ	12
ABSTRACT.....	14
1. ВОВЕД.....	16
1.1. Нормална телесна температура кај хомеотермните организми	18
1.1.1 Високата температура како предизвикувач на стрес.....	19
1.2. ROS – основни карактеристики	21
1.2.1 Оксидативен стрес	22
1.2.2 Продукцијата на слободни радикали и оксидативниот стрес	27
1.2.3 Продукција на ROS при хипертермички стрес.....	29
1.3. Ацидо-базна рамнотежа.....	30
1.3.1 Хемиски ацидо-базни пуферни системи.....	31
1.3.2 Респираторен механизам.....	33
1.3.3 Бубрежен механизам.....	33
1.4 Антиоксидативен статус.....	34
1.4.1. Клеточни антиоксидативни системи	35
1.4.2. Митохондријална антиоксидативна заштита	36
1.4.3. Ензимски антиоксиданти.....	39
1.4.3.1. Супероксид дизмутаза – SOD	39
1.4.3.2. Каталаза – CAT	41
1.4.3.3. Глутатион пероксидаза – GPx.....	42
1.4.3.4. Глутатион редуктаза - GR.....	44
1.5 Глутатион.....	45
1.5.1 Функции на глутатионот	48
1.5.2 Глутатион – својства и примена	51
1.6 Витамин Ц – аскорбинска киселина	53
1.6.1 Витаминот Ц како антиоксидант.....	54
1.6.2 Витамин Ц – својства и примена	56
1.7 Јонизирана вода – електрохемиски редуцирана вода (ERW).....	59
1.8 Оксидативни модификации на биолошки важните макромолекули	64
2. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО.....	71
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ.....	73
3.1 Експериментален модел	73
3.2. Експериментален протокол.....	74

3.3. Испитувани параметри	75
3.4. Одредување на концентрацијата на вкупните протеини	76
3.5. Одредување на концентрацијата на албумините	77
3.6. Одредување на концентрацијата на уреата	78
3.7. Одредување на концентрацијата на креатининот	80
3.8. Одредување на активноста на AST	81
3.9. Одредување на активноста на ALT	83
3.10. Одредување на концентрацијата на гликозата во крвниот серум	85
3.11. Одредување на концентрацијата на триглицеридите	86
3.12. Одредување на концентрацијата на холестеролот	86
3.13. Одредување на активноста на супероксид дизмутазата (SOD)	87
3.14. Одредување активноста на каталазата	89
3.15. Одредување на активноста глутатион пероксидазата (GPx)	90
3.16. Одредување на активноста на глутатион редуктазата (GR)	91
3.17. Статистичка анализа.....	92
4. РЕЗУЛТАТИ	93
4.1. Антиоксидативен статус.....	93
4.1.1. Влијание на третманот со јонизирана вода и со јонизирана вода збогатена со глутатион и витамин Ц, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз активноста на супероксид дизмутазата (SOD) во крвниот серум кај стаорци	93
4.1.2. Влијание на третманот со јонизирана вода и со јонизирана вода збогатена со глутатион и витамин Ц, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз активноста на супероксид дисмутазата (SOD) во крвната плазма, црниот дроб и во бубрезите кај стаорци	95
4.1.3. Влијание на третманот со јонизирана вода и со јонизирана вода збогатена со глутатион и витамин Ц, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз активноста на каталазата (CAT) во крвниот серум кај стаорци	97
4.1.4. Влијание на третманот со јонизирана вода и со јонизирана вода збогатена со глутатион и витамин Ц, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз активноста на каталазата (CAT) во крвната плазма, црниот дроб и во бубрезите кај стаорци	99
4.1.5. Влијание на третманот со јонизирана вода и со јонизирана вода збогатена со глутатион и витамин Ц, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз активноста на глутатион пероксидазата (GPx) во крвниот серум кај стаорци	101
4.1.6. Влијание на третманот со јонизирана вода и со јонизирана вода збогатена со глутатион и витамин Ц, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден	

од третманот врз активноста на глутатион пероксидазата (GPx) во крвната плазма, црниот дроб и во бубрезите кај стаорци	104
4.1.7. Влијание на третманот со јонизирана вода и со јонизирана вода збогатена со глутатион и витамин Ц, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз активноста на глутатион редуктазата (GR) во крвниот серум кај стаорци	106
4.1.8. Влијание на третманот со јонизирана вода и со јонизирана вода збогатена со глутатион и витамин Ц, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз активноста на глутатион редуктазата (GR) во крвната плазма, црниот дроб и во бубрезите кај стаорци	108
4.2. Промени во концентрацијата на одредени биохемиски параметри	109
4.2.1. Влијание на третманот со јонизирана вода и со јонизирана вода збогатена со витамин Ц и глутатион, како и со акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз концентрацијата на вкупните протеини во крвниот серум кај стаорци	109
4.2.2. Влијание на третманот со јонизирана вода и со јонизирана вода збогатена со витамин Ц и глутатион, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз концентрацијата на албумините во крвниот серум кај стаорци	111
4.2.3. Влијание на третманот со јонизирана вода и со јонизирана вода збогатена со витамин Ц и глутатион, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз активноста на AST во крвниот серум кај стаорци.....	113
4.2.4. Влијание на третманот со јонизирана вода и со јонизирана вода збогатена со витамин Ц и глутатион, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз активноста на ALT во крвниот серум кај стаорци.....	116
4.2.5. Влијание на третманот со јонизирана вода и со јонизирана вода збогатена со витамин Ц и глутатион, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз концентрацијата на холестеролот во крвниот серум кај стаорци	118
4.2.6. Влијание на третманот со јонизирана вода и со јонизирана вода збогатена со витамин Ц и глутатион, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз концентрацијата на триглицеридите во крвниот серум кај стаорци	120
4.2.7. Влијание на третманот со јонизирана вода и со јонизирана вода збогатена со витамин Ц и глутатион, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз концентрацијата на уреата во крвниот серум кај стаорци.....	122
4.2.8. Влијание на третманот со јонизирана вода и со јонизирана вода збогатена со витамин Ц и глутатион, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз концентрацијата на креатининот во крвниот серум кај стаорци	124
4.2.9. Влијание на третманот со јонизирана вода и со јонизирана вода збогатена со витамин Ц и глутатион, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз концентрацијата на гликозата во крвниот серум кај стаорци	126
4.3 Промена на телесната температура во текот на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот	128

5.ДИСКУСИЈА.....	130
6. ЗАКЛУЧОЦИ.....	146
7. ЛИСТА НА КРАТЕНКИ.....	150
8. КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА.....	153

АПСТРАКТ

Зголемувањето на температурата во средината во која престојуваат организмите која доведува до метаболичка активација комбинирана со покачена консумпција на кислород иницира состојба на т.н. оксидативен стрес. Дури и слабиот оксидативен стрес може да има сериозни разорни ефекти и да предизвика модификација на многу клеточни функции, што може да заврши и со клеточна смрт. Оксидативниот стрес резултира со зголемена продукција на слободни радикали и води до нарушување на нормалниот метаболизам и нормалната физиологија на клетката, особено на црниот дроб и на бубрезите, насочувајќи ја активноста на ензимите, протеините, албумините, уреата и на креатининот во крвниот серум. Како одговор на овие проблеми, клетките изложени на топлотен шок ја зголемуваат антиоксидативната одбрана, посебно активноста на антиоксидативните ензими. Голем број истражувања покажуваат дека изложувањето на хипертермна средина предизвикува оксидативен стрес кој може да резултира со цитотоксичност. Ензимски и неензимски компоненти се вклучени во неутрализирање на продуцираните оксиданти. Модификацијата на антиоксидативниот одбранбен систем во насока на негово зајакнување е поволна можност за поефикасна редукција на слободните радикали и за превенирање на развојот на голем број патолошки состојби. Во таа смисла, јонизираната вода е во фокусот на научниот интерес во последните десетина години поради нејзината способност за алкализација на организмот, како и поради нејзиниот антиоксидативен ефект. Целта на нашето истражување беше да го испитаме ефектот на третманот со јонизирана вода без елементи додадени во неа или збогатена со глутатион и витамин Ц врз промените на концентрацијата на група биохемиски параметри како маркери на протеинскиот метаболизам, липидниот метаболизам, гликозата, трансaminaзите, деградационите продукти, како и врз активноста на одредени антиоксидативни ензими во крвниот серум, крвната плазма, црниот дроб и во бубрезите во однос на третманот и на времето. Експериментот беше изведен врз женски стаорци од сојот *wistar* (*wistar*). Оксидативен стрес беше предизвикан со акутна хипертермичка експозиција. Животните беа поделени во 3 групи составени од по 15 стаорци.

Третманот, аплициран соодветно на секоја група, во периодот на отсуство на хипертермички стрес не предизвика значајна алтерација во концентрацијата на вкупните протеини, албумините, холестеролот, триглицеридите, гликозата и на уреата во крвниот серум. Истата констатација важи и за активноста на каталазата, супероксид дизмутазата, глутатион пероксидазата и глутатион редуктазата во крвниот серум. Што се однесува до активноста на трансминазите и на нивото на креатининот, беше забележано значајно покачување во гореспоменатиот период. Хипертермичката експозиција се покажа како фактор кој значајно ја зголеми активноста на CAT и на GPx, додека во обратен правец дејствуваше на активноста на SOD и на GR во крвниот серум. Активноста на GPx во крвната плазма беше сигнификантно зголемена, додека во црниот дроб и во бубрезите таа беше сигнификантно намалена. Алтерации во однос на сигнификантноста и на растечките/опаѓачките трендови детектиравме во рамките на една група, но и при меѓусебната споредба на групите, во крвната плазма, црниот дроб и во бубрезите во истиот период на стрес. Генерално, нашите резултати ја потврдија поврзаноста помеѓу акутната хипертермија и оксидативниот стрес, како и засилената антиоксидативна одбрана како резултат на третманот со јонизирана вода и нејзиното синергично дејствување со додадените антиоксиданти – глутатион и витамин Ц.

Клучни зборови: хипертермички стрес, антиоксидативна одбрана, јонизирана вода, глутатион, витамин Ц, стаорци вистар (wistar).

ABSTRACT

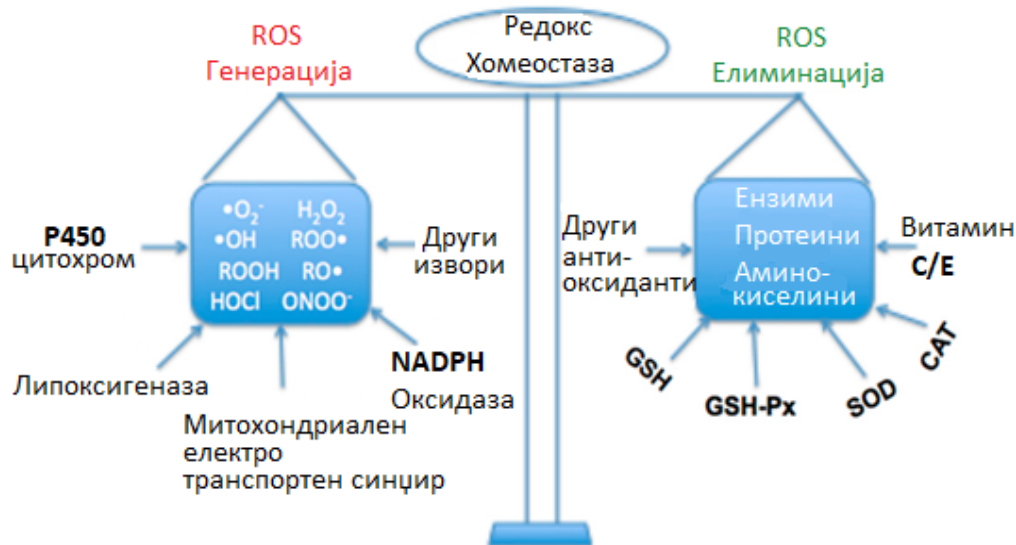
Increasing the temperature in the environment in which the organisms stay, and which leads to metabolic activation combined with elevated oxygen consumption, initiates the state of the so-called oxidative stress. Even poor oxidative stress can have serious destructive effects and cause modification of many cellular functions that can end with cell death. Oxidative stress results with increased production of free radicals and leads to disruption of the normal metabolism and cell physiology, especially of the liver and kidneys, giving direction in the activity of enzymes, proteins, albumin, urea and creatinine in serum. In response to these problems, cells exposed to heat shock increase antioxidant defenses, especially the activity of antioxidant enzymes. A number of studies have shown that exposure to a hyperthermic medium causes oxidative stress that can result in cytotoxicity. Enzymatic and non-enzymatic components are involved in neutralizing the produced oxidants. The modification of the antioxidant defense system in the direction of its strengthening is a favorable opportunity for more efficient reduction of free radicals and prevention of the development of numerous pathological conditions. Ionized water is in the focus of scientific interest in the last ten years, due to its ability to alkalize the organism as well as due to its antioxidant effect. The aim of our research was to investigate the effect of treatment with ionized water, with no additives or enriched with glutathione and vitamin C, on changes in the concentration of a group of biochemical parameters as markers of protein metabolism, lipid metabolism, glucose, transaminases, degradation products as well as the activity of certain antioxidant enzymes in blood serum, blood plasma, liver, and kidneys in the function of treatment and time. The experiment was performed on female Wistar rats. Oxidative stress was caused by acute hyperthermic exposure. The animals were divided into 3 groups consisting of 15 rats. Treatment, applied appropriately to each group, during the absence of hyperthermal stress did not cause significant alteration in the concentration of total proteins, albumin, cholesterol, triglycerides, glucose, and urea in serum. The same conclusion applies to the activity of catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione reductase in serum. As far as the activity of transaminases and creatinine levels was concerned, significant increases were observed in the abovementioned period. Hyperthermic exposure was shown to

be a factor that significantly increase the activity of CAT and GPx, while in the reverse direction it acted on the activity of SOD and GR in serum. The activity of GPx in blood plasma was significantly increased, while in the liver and kidneys it was significantly reduced. Alterations in terms of significance and increasing / decreasing trends were detected within one group, but also in the case of a comparison of the groups, blood plasma, liver and kidneys in the same stress period. In general, our results confirmed the correlation between acute hyperthermia and oxidative stress, as well as the enhanced antioxidant defense as a result of treatment with ionized water and its synergistic action with the added antioxidants, glutathione and vitamin C.

Key words: hyperthermic stress, antioxidant defense, ionized water, glutathione, vitamin C, Wistar rats.

1. ВОВЕД

Хомеостазата означува тенденција на спротивставување на промените со цел да се одржи стабилна, односно релативно константна внатрешна средина. Во суштина, сите ткива и органи во телото учествуваат во одржувањето на постојаноста на хомеостазата. Во услови на изложеност на стресогени фактори од надворешната средина, хомеотермните организми, користејќи различни хомеостатски механизми, настојуваат да ја одржат постојаноста на внатрешната средина на своето тело наречена хомеостаза (слика 1). Клод Бернар (Claude Bernard, 1865 – 1961) истакнал дека значењето на животот е суштински зависно од одржувањето на константноста на нашата внатрешна средина наспроти промените во животната средина. Канон (Cannon, 1929) ова го нарекол *хомеостаза*, додека Селие (Selye, 1956) го искористил терминот *стрес* за да ги претстави ефектите на сето она што сериозно ѝ се заканува на хомеостазата (Schneiderman et al., 2005). Една од првите физиолошки дескрипции на стресот доаѓа од Ханс Селие (Hans Selye), авторот на книгата *Stress of Life*, кој го дефинира стресот како неспецифичен одговор на телото на дадено барање (Locke & Noble, 2002).



Слика 1. Редокс-хомеостаза
Figure 1. The redox homeostasis (researchgate.net)

Од многу големо животно значење за организмите е нивната способност да ги регулираат промените на одредени витални параметри во тесни граници (Boron & Boulpaer, 2016). Посебно значајни при тоа се:

- телесната температура,
- ацидо-базната рамнотежа,
- редокс-хомеостазата,
- нивото на вода и на електролити итн.

Влијанието на различните стресогени фактори, физички и емоционални, доведува до нарушување на хомеостазата и индуциран одговор на самиот организам на дадениот стресоген фактор означен како одговор на стресот.

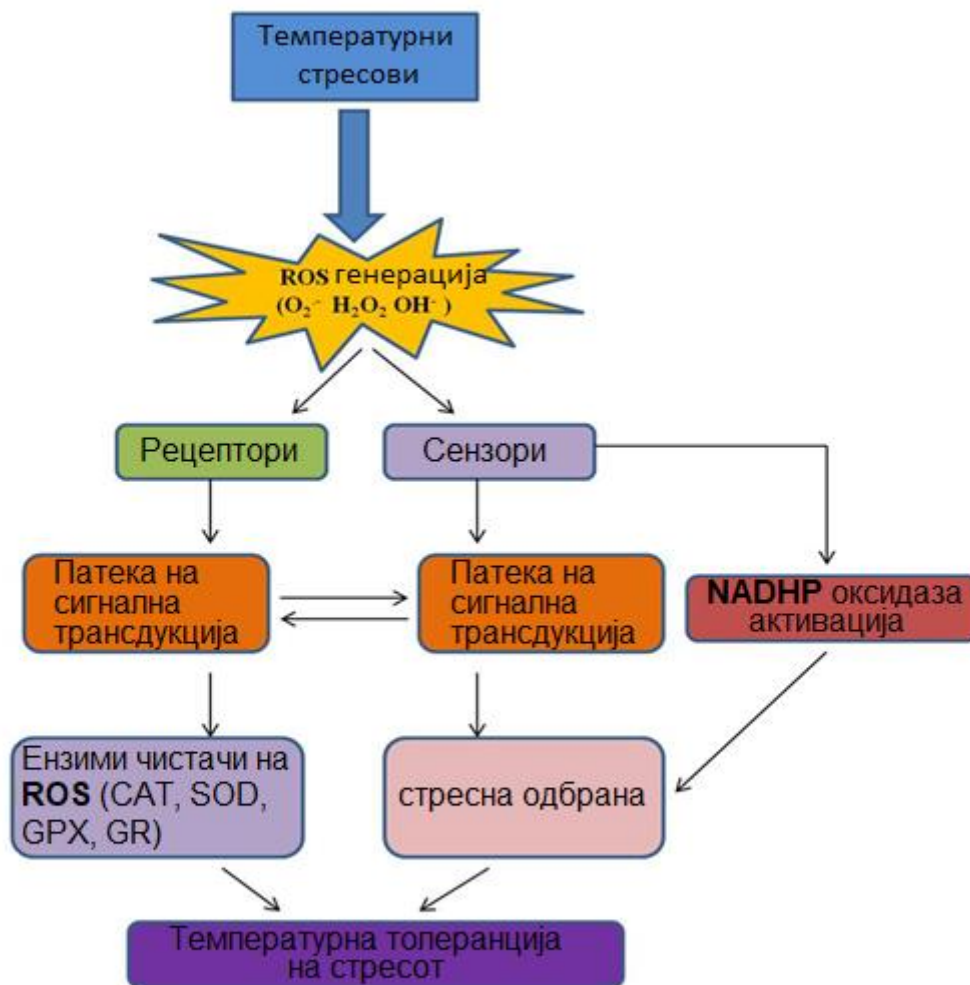
1.1. Нормална телесна температура кај хомеотермните организми

Нормалната телесна температура (нормотермија) претставува важен хомеостатски параметар за нормално функционирање на организмите. Јадрената температура T_c за време на мирување изнесува $36,8\text{ }^\circ\text{C}$, додека температурата на обвивката T_s е повеќе под влијание на нивото на циркулација на крвта во кожата и на промените во надворешната средина (Lim & Mackinnon, 2006). И покрај постојаните промени на температурата во надворешната средина, за организмите е од витално значење да ја одржуваат телесната температура константна бидејќи таа претставува предуслов за правилно функционирање на ензимите и за одвивање на ензимски катализираните метаболички процеси во телото. Со покачување на телесната температура се зголемува брзината на ензимските реакции до одредена граница, но поради протеинската структура на ензимите на повисоки температури, доаѓа до иреверзибилна денатурација и постепена инхибиција на ензимската активност (Straus, 1992).

Хомеотермните организми имаат способност да ја одржуваат својата телесна температура на константно ниво без оглед на температурата на околината. Таквата способност е позната како моќ што терморегулира. Меѓутоа, ако температурата на околината е значително висока, самата температура претставува фактор на стрес чија активност предизвикува промени на сите нивоа на биолошката организација. Кога остануваат подолго во услови на висока амбиентална температура, организмите реагираат соодветно за да ја одржат внатрешната хомеостаза. Во тој случај, водечката улога ја играат процесите на ниво на нервниот, ендокриниот систем, хомеостазата на телесната температура и течностите. Сите овие процеси се случуваат за да се приспособат организмите на новата амбиентална температура. Промените што се јавуваат за време на таквите процеси се зависни од времетраењето и од начинот на изложеност на соодветната термичка средина, од висината на вистинската температура на амбиентот, од полот и од, генерално, физиолошката состојба на организмот (Halliwell & Gutteridge, 2015).

1.1.1 Високата температура како предизвикувач на стрес

Во нормална состојба, промените на телесната температура се одржуваат во многу тесни граници преку балансирање помеѓу нивото на примената и метаболички продуцираната топлина во организмот, од една страна, и оддадената топлина од организмот, од друга (Leon & Helwig, 2010). Во услови на дисбаланс помеѓу овие два процеси, кога телото апсорбира или продуцира повеќе топлина отколку што може да оддаде, настанува покачување на телесната температура, состојба означена како хипертермија (Lugrin et al., 2014). Топлотниот стрес се подразбира како фактор на животната средина за стимулирање на производството на реактивниот кислород (ROS) поради сличноста во одговорите забележани по топлотниот стрес со оние што се јавуваат во состојбата на оксидативен стрес (Ilievska et al., 2016). Меѓу реакциите кои се јавуваат при престој во средини со висока надворешна температура посебно место заземаат: покачувањето на телесната температура, промената на кожната циркулација и загубата на телесна маса, промена на лимфоидните клетки и на лимфоидните органи, т. е. на имунолошкиот систем (Gjorgoski et al., 2008).



Слика 2. Приказ на температурата како предизвикувач на стрес
Figure 2. Statement of the temperature as stress (www.frontiersin.org)

Топлотниот стрес и топлотниот шок претставуваат форми на хипертермија кои се резултат на експонираноста на организмот на висока амбиентална температура (слика 2). При акутен температурен стрес се јавуваат системски и клеточни одговори на организмот со цел да се одржи нормалната телесната температура. Овие одговори вклучуваат: терморегулација (со аклиматизација), акутно-фазен одговор и одговор кој инволвира продукција на *heat shock* протеини – HSP (Leon & Helwig, 2010). Терморегулаторн колапс, претераност на акутно-фазниот одговор и алтерација во експресијата на HSP се фактори кои придонесуваат за прогресија на

топлотниот стрес кон топлотен шок (Moseley & Gisolfi, 1993). Еден од постоечките модели за топлотен шок сугерира дека тој е инициран од циркулаторен и од терморегулаторен колапс и е пропагиран од ендотоксемија (Moseley & Gisolfi, 1993). Терминот *ендотоксемија* се однесува на состојбата на зголемено ниво на грам-негативен бактериски ендотоксин, познат како LPS (липополисахарид), во циркулацијата. Моделот на двојна патека на настанување на топлотниот шок предлага дека шокот е инициран од две посебни, но поврзани патеки. Едната од нив започнува со ендотоксемија. Кога ендотоксемијата може да биде превенирана или толерирана, а изложувањето на хипертермна средина продолжува, втората патека на топлотен шок може да започне преку директното термално дејство на топлината врз клетките, предизвикувајќи оштетување на ткивата. Топлински индуцираното ткивно оштетување може да се случи на телесна температура повисока од 42 °C, кога протеините почнуваат да денатурираат (Bunum et al., 1978). Се претпоставува дека овие две патеки на топлотниот шок коегзистираат, со одреден степен на поклопување во нивната активација (Hadzi-Petrushev, 2010). Навлегувањето на ендотоксинот како PAMP (Pathogen associated molecular pattern) предизвикува инфламаторен одговор, кој, пак, преку различни механизми иницира интрацелуларна продукција на ROS и на RNS. Ослободувањето на ROS е забележано како типична последица од стимулација на имунолошките клетки *in vitro* (Meier et al., 1989; Meier et al., 1990) и, исто така, е истакнато дека и акутната и хроничната инфламација *in vivo* се придружени со сигнификантна алтерација на редокс-еквибриумот како резултат на засилената продукција на оксиданти (Pacher et al., 2007; Roberts et al., 2010; Li et al., 2013; Rochette et al., 2013).

1.2. ROS – основни карактеристики

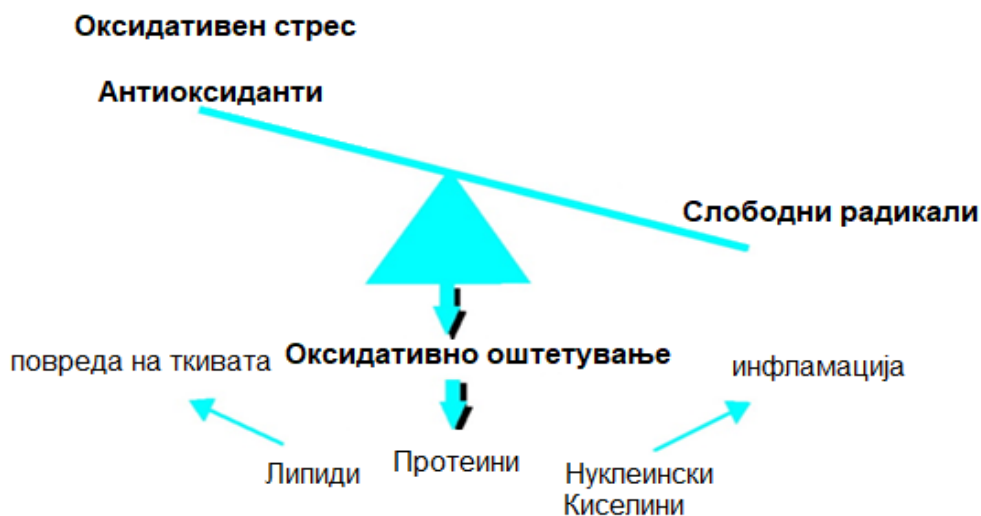
Молекуларниот кислород во својата диатомска, неексцитирана форма ($^3\Sigma_gO_2$ или вообичаено O_2) претставува најважниот оксидант кај аеробните организми. Иако, по дефиниција, се работи за форма на радикал (поседува неспарени електрони), молекуларниот кислород е многу слабо реактивен. Имено, неговите два неспарени електрони се лоцирани во различни

молекулски орбитали и поседуваат паралелни спинови. Како резултат на тоа, за O_2 да прими истовремено два електрони, тие мора да поседуваат антипаралелни спинови во однос на неспарените електрони во кислородот, услов кој не е задоволен од страна на типичен пар на електрони во атомски или во молекулски орбитали. Од тие причини, молекуларниот кислород, преференцијално, еден по еден, прифаќа електрони од други радикали (на пример, транзициони метали со одредена валентност). Во живите организми, типичната редукција на кислородот со два или со четири електрони зависи од присуството на координирани, сериски, ензимски катализирани редукции, со прифаќање на еден електрон. Ензимите што се вклучени во овие реакции обично имаат радикални форми (на пример, железото) во своите активни места. Со едноелектронска редукција на кислородот се добива супероксиден анјон (O_2^-), а со прифаќање два електрони, кислородот *in vivo* преминува во водород пероксид (H_2O_2). Во присуство на слободни јони на транзиционите метали (најчесто бакарот и железото), O_2^- и H_2O_2 заедно го генерираат екстремно реактивниот хидроксилен радикал ($\cdot OH$). Исто така, O_2^- , H_2O_2 , $\cdot OH$ и две енергетски ексцитирани форми на кислородот, $^1\Sigma_g O_2$ и $^1\Sigma_g^+ O_2$, познати како синглетни кислороди (кај кои не постои спин-рестрикцијата во однос на реактивноста), можат да се добијат како резултат на апсорпцијата на енергија (на пример, со ултравиолетово зрачење). Конечно, $\cdot OH$ е р-реактивната кислородна форма одговорна за иницирање на оксидативната деструкција на биомолекулите (Hadzi-Petrusev, 2014).

1.2.1 Оксидативен стрес

Сите оксидативни чекори во катаболизмот на јаглехидратите, липидите и на протеините конвергираат во процесот на оксидативна фосфорилација во митохондриите каде што се синтетизира АТФ и се редуцира O_2 до краен продукт вода. Во физиолошки услови, приближно 2 % од тоталниот флуks на O_2 во митохондриите се трансформира во O_2^- поради неговата нецелосна редукција. Овој мал дел на физиолошки продуцирани оксиданти се редуцира веднаш со помош на антиоксидативните механизми на самата клетка.

Респираторната верига испушта електрони и се создаваат радикални форми кои понатаму вршат оксидација на ДНК, на протеините и на липидите. Примарни извори на ендогено продуцираните ROS се митохондриите, плазма мембраната, ендоплазматичниот ретикулум и пероксизомите (Moldovan & Moldovan, 2004). Различни егзогени стимули, како јонизирачка радијација, ултравиолетови зраци, пушење, инфекција со патогени, токсини и експонираност на хербициди и на инсектициди, се извори на *in vivo* на ROS-продукцијата (Ayala et al., 2014). Нарушување на редокс-хомеостазата настанува во случај на дисбаланс во организмот помеѓу редуцирачките агенци (електрон донорите) и оксидантите (електрон акцепторите), резултирајќи со редукциски стрес или пак оксидативен стрес, кој е почеста форма во биолошките системи (Shao et al., 2012). Кога количината на продуцирани оксидирачки хемиски агенци е поголема од клеточниот редуцирачки капацитет, настанува состојбата на оксидативен стрес, односно нерамнотежа помеѓу прооксидантите и антиоксидантите во корист на прооксидантите.



Слика 3. Приказ на состојба при оксидативен стрес
Figure 3. Statement of oxidative stress (oem.bmj.com)

Оксидативниот стрес (слика 3) е состојба кога продукцијата на слободни радикали го надминува одбранбениот капацитет на клетките за нивно неутрализирање (Sies, 1997). Оксидантите се молекули или фрагменти од

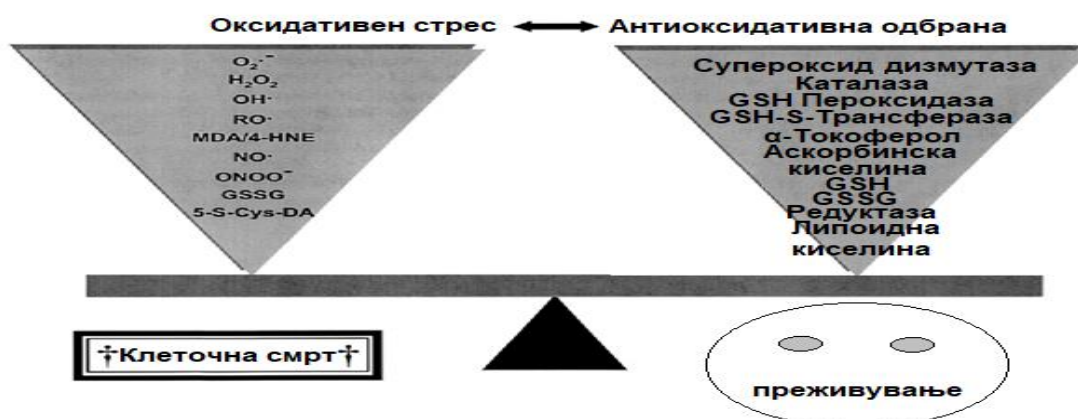
молекули способни за независно постоење, кои имаат еден или повеќе неспарени електрони во надворешната електронска обвивка и поради тоа се високо реактивни форми. Во биолошките системи постојат две големи фамилии оксиданти: реактивни кислородни радикали (ROS) и реактивни азотни радикали (RNS) (Pacher et al., 2007).

Супероксидниот анјонски радикал ($O_2^{\cdot-}$) е примарна ROS-молекула формирана, главно, во митохондриите (Cadenas & Sies, 1998) по ензимски или неензимски пат. Унивалентната редукција на молекуларниот кислород може да биде посредувана од мембрански асоцираните NAD(P)H-оксидази лоцирани на полиморфонуклеарните клетки (макрофаги и ендотелни клетки) (Vignais, 2002) при оксидација на NAD(P)H, како и од цитосолната ксантин оксидаза при процесот на оксидација на ксантинот или на хипоксантинот. Респираторната верига кај комплексот I и комплексот III испушта 1 – 3 % од сите електрони за да се генерира $O_2^{\cdot-}$ наместо да придонесе за редукција на кислородот во вода (Valko et al., 2007). Секундарните ROS-молекули се добиваат со адиција на втор или на трет електрон. Со додавање на уште еден електрон на молекулата на $O_2^{\cdot-}$ и со каталитичкото дејствување на ензимот супероксид дизмутаза (SOD) тој се конвертира во водород пероксид (H_2O_2), кој понатаму може да биде трансформиран во хидроксилен радикал ($\cdot OH$) во Фентонова реакција (Fenton reaction) катализирана од метал (Jomova et al., 2010).

Водород пероксидот не е радикал, туку спаѓа во групата на ROS и е екстремно реактивен и способен да реагира со најголем број од биомолекулите. H_2O_2 може да биде редуциран во пероксизомите со ензимско дејствување на каталаза до H_2O и O_2 , или во цитоплазма со глутатион пероксидаза само до H_2O . Хидроксилниот радикал ($\cdot OH$) се одликува со висока реактивност, поради што претставува многу опасен радикал со краток полуживот од приближно 10^{-9} секунди (Pastor et al., 2000). *In vivo* продуциран, $\cdot OH$ реагира во близина на местото на своето формирање. Глутатионот е редуцирачкиот агенс кој се оксидира во реакција катализирана од глутатион пероксидаза, а повторно се редуцира назад со дејствување на глутатион редуктазата. За секој мол на оксидираната форма (GSSG) да премине во GSH, се троши еден мол на NADPH. Метаболизмот на гликозата преку пентозо-фосфатниот циклус игра значајна улога во обезбедување на NADPH, а со тоа и

во одржување на нормален GSH/ GSSH-однос и редокс-еквилибриум во клетката (Fang et al., 2002).

За да можат клетките правилно да функционираат, мора да постои еквилибриум помеѓу оксидирачките и редуцирачките агенси во организмот (слика 4). Варијациите на нивото на оксиданти се регулираат постојано и во тесни граници од страна на антиоксидативната одбрана на организмот. Клеточните и екстраклеточните пуферни системи, кои вклучуваат мали молекули и пуфери базирани на протеин, како што се редокс-двојките GSH/GSSH (глутатион/глутатион дисулфид), цистеин/цистин и оксидиран/редуциран тиоредоксин, имаат функција во одржувањето на редокс-хомеостазата во организмот (Banerjee, 2012). Балансот на овие пуферни системи го одржуваат клучните антиоксидативни ензими: супероксид дизмутаза, каталаза, селенопротеините глутатион пероксидаза и тиоредоксин редуктаза, како и неензимските антиоксиданти како α -токоферол (витамин E), аскорбат (витамин C), β -каротени и флавоноиди (Steinbrenner & Sies, 2009; Chen et al., 2012). Во групата на ендогените нискомолекуларни антиоксиданти спаѓаат и мочната киселина, продуцирана под дејство на ксантин дехидрогеназа, и билирубинот, продуциран со посредство на хем-оксигеназата (Halliwell & Gutteridge, 2015).

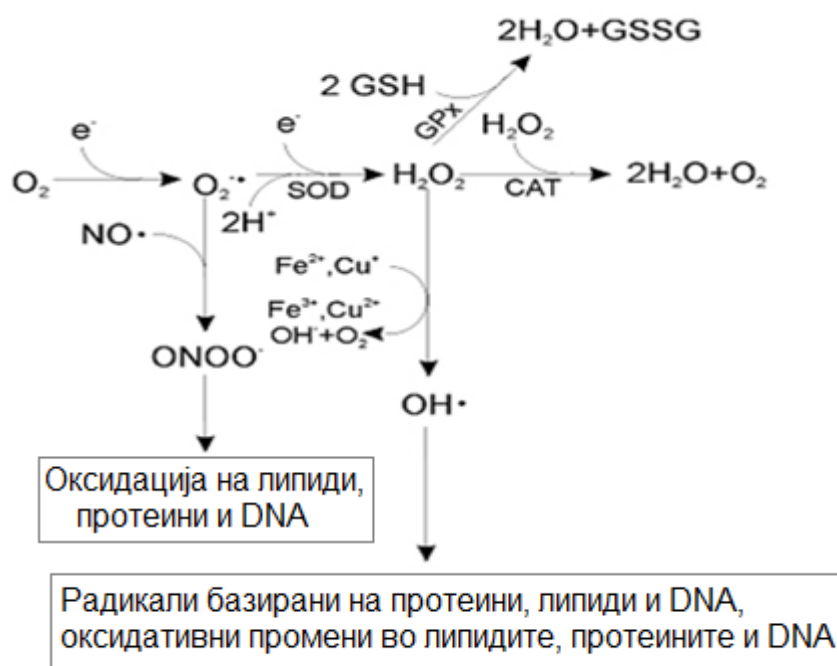


Слика 4. Рамнотежа на ROS-генерацијата и антиоксидативните системи; нерамнотежата на двата система поради прекумерното производство на ROS (лево) или намалена антиоксидантна одбрана (десно) доведува до оксидативен стрес

Figure 4. Balance of ROS generation and antioxidative systems; an imbalance of both systems due to either excessive production of ROS (left) or reduced antioxidant defense (right) leads to oxidative stress (www.febs.onlinelibrary,wiley.com)

SOD се фамилија ензими што се металопротеини и тие ја катализираат реакцијата на дизмутација на супероксидниот анјон во водород пероксид. Испитувањата покажале дека кај еукариотите се карактеризирани три различни форми на супероксид дизмутази: во цитоплазмата е застапена форма која содржи бакар (CuZn-SOD), форма која содржи манган (Mn-SOD), а е локализирана во митохондриите (Slot et al., 1986), и екстрацелуларна форма, која содржи цинк (ECSOD) (Marklund, 1984).

Каталазата е ензим присутен, главно, во пероксизомите на мамалиските клетки. По структура е тетрамерен ензим составен од четири идентични подединици од 60 kDa, при што секоја содржи активен центар со хем група и NADPH (Scibior & Czczot, 2006). Супстрат за каталазата претставува водород пероксидот, а во реакцијата се катализира неговата конверзија до вода и кислород. Каталазата е отсутна во митохондриите (Phung et al., 1994), а таму GSH е посебно важен во одбраната од физиолошки и од патолошки генериран оксидативен стрес (слика 5).



Слика 5. Механизми за продукција на кислородни радикали и антиоксидативни патеки

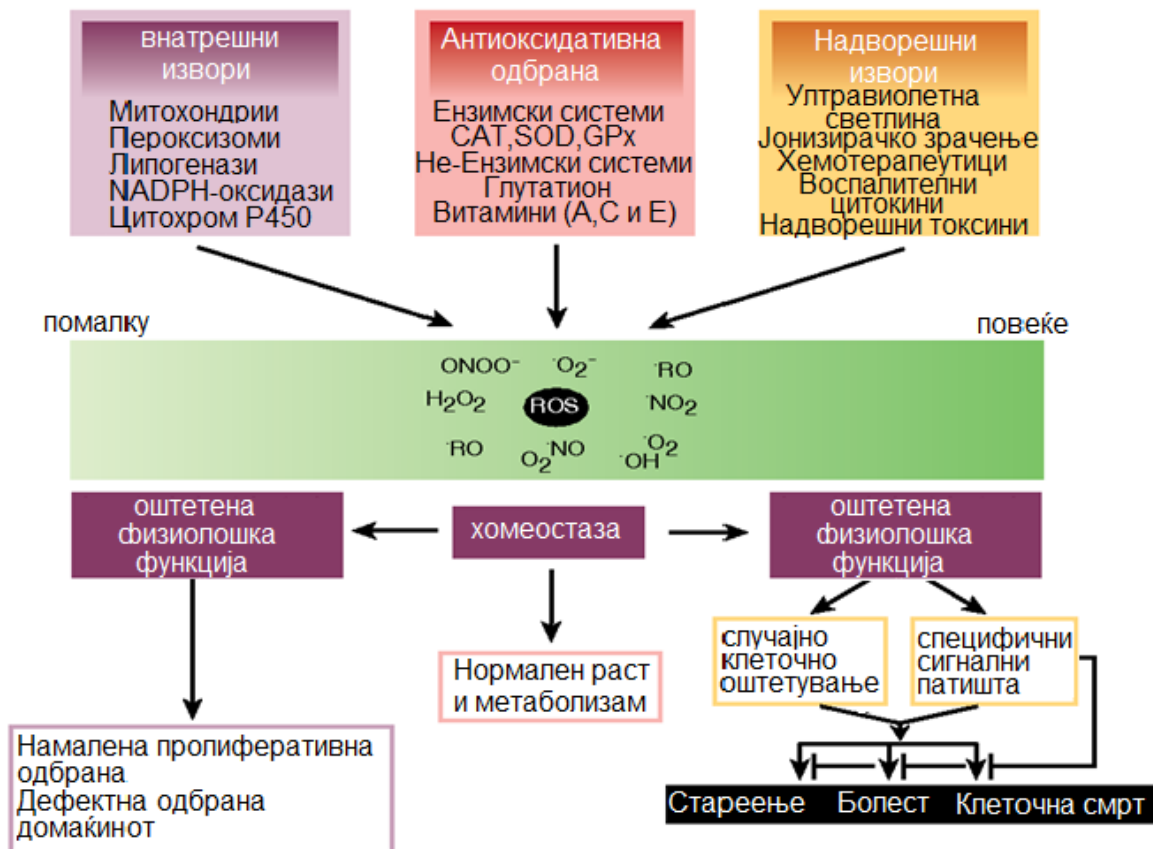
Figure 5. Mechanisms for the production of oxygen radicals and antioxidant pathways (www.researchgate.net)

1.2.2 Продукцијата на слободни радикали и оксидативниот стрес

Оксидативниот стрес резултира со зголемена продукција на слободни радикали и на реактивни кислородни радикали, како и со намалување на антиоксидативната одбрана, што, пак, доведува до оштетување на биолошките макромолекули и до нарушување на нормалниот метаболизам и на нормалната физиологија (Trevisan et al., 2001). Слободните радикали се дефинираат како хемиска форма која содржи неспарен електрон. Можат да се дефинираат и како фрагменти од молекула. Слободните радикали можат да се формираат на три начини: (1) со хемолитичко раскинување на ковалентната врска во нормална молекула, (2) со губење електрон од нормалната молекула, како и (3) со додавање еден електрон на нормалната молекула. Последните два начини, кои вклучуваат електронски трансфер, многу почесто се сретнуваат во биолошките системи во однос на хемолитичката фузија, која, генерално, има потреба од висока енергија, која вклучува и висока температура, UV-светлина или јонизирачко зрачење (Cheeseman and Slater, 1993).

Кога слободните радикали се продуцираат побргу отколку што можат да се неутрализираат со антиоксидативни механизми, се јавува оксидативен стрес (Sies, 1991). Кислородните слободни радикали (ROS) се формираат во многу аеробни клеточни метаболички процеси. Тие вклучуваат, но не се лимитирани на радикали како супероксиди и водород пероксид, кои реагираат со различни интрацелуларни молекули, вклучувајќи и липиди, протеини и ДНК (Cerutti, 1985). Иако ROS се продуцираат за време на нормалниот аеробен метаболизам, биолошкиот ефект на овие ROS на интрацелуларните цели зависи од нивната концентрација. Притоа, зголемена концентрација на радикалите се забележува во услови на оксидативен стрес. Зголемената содржина на ROS е цитотоксична, додека пониската содржина е неопходна за регулација на неколку клучни физиолошки механизми, вклучувајќи и клеточна диференцијација, клеточна пролиферација и регулација на редокс-сензитивните сигнални трансдукциски патишта (Allen et al., 1989, Vaquero et al., 2004, Shibamura et al., 1988, Lo et al., 1996). Во текот на клеточниот метаболизам, некои од ROS нормално се продуцираат со цел да изведат специфични функции. Супероксидниот анјон, водород пероксидот и азотниот

оксид претставуваат три типа на ROS кои се есенцијални за нормалната физиологија, но и одговорни за забрзување на процесот на стареење, а се вклучени во клеточните дегенеративни процеси карактеристични за различни заболувања. Комбинирани, тие продуцираат силно реактивни синглетни кислороди, хидроксилни радикали и пероксинитрити, кои можат да ги нападат комплексните биомолекули (Radi et al., 2002).



Слика 6. Извори и клеточни одговори на реактивните видови кислород (ROS)
 Figure 6. The sources and cellular responses to reactive oxygen species (ROS)
 (www.slideserve.com)

Оксидантите се генерираат како резултат на нормален интрацелуларен метаболизам во митохондриите и во пероксизомите, како и од различни цитоплазматични ензимски системи (слика 6). И покрај тоа, голем број надворешни фактори можат да предизвикаат производство на ROS. Софистицираниот ензимски и неензимски антиоксидативен одбранбен систем, вклучувајќи каталаза (CAT), супероксидна дисмутаза (SOD) и глутатион пероксидаза (GPx), ги неутрализира и ги регулира севкупните нивоа на ROS за одржување на физиолошката хомеостаза. Намалувањето на нивоата на ROS

под хомеостатската поставеност може да ја прекине физиолошката улога на оксидантите во клеточната пролиферација и во одбраната на домаќинот. Слично на тоа, зголемениот ROS може, исто така, да биде штетен и да доведе до смрт на клетките или до забрзување на болестите поврзани со стареењето и со возраста. Традиционално, оштетувањето предизвикано од зголемената ROS се смета дека е резултат на случајно оштетување на протеините, липидите и на ДНК. Покрај овие ефекти, порастот на нивоата на ROS, исто така, може да претставува сигнал за стрес, кој ги активира специфичните патеки на сигнализација кои се чувствителни на редокс-оксид. Откако ќе се активираат, овие различни сигнални патишта можат да имаат или штетни или потенцијално заштитни функции (Finkel & Holbrook, 2000).

1.2.3 Продукција на ROS при хипертермички стрес

Зголемувањето на температурата во амбиенталната средина во која престојуваат организмите, а која доведува до метаболичка активација комбинирана со покачена консумпција на кислород, иницира состојба на т.н. оксидативен стрес (Halliwell & Gutteridge, 1989). Дури и слабиот оксидативен стрес може да има сериозни разорни ефекти и да предизвика модификација на многу клеточни функции, а тоа може да заврши и со клеточна смрт. Како одговор на овие проблеми, клетките изложени на топлотен шок ја зголемуваат антиоксидативната одбрана, посебно активноста на антиоксидативните ензими (Hermes-Lima 2004). Слободните кислородни радикали, кои се токсични за клетката, можат да се продуцираат и при хипертермија. По експозиција на висока надворешна температура, доаѓа до зголемување на нивото на супероксидните анјони, водород пероксидот и на азотните оксиди, како и до зголемување на содржината на продуктите на липидната пероксидација кај различни клетки, вклучувајќи ги и туморските клетки (Gorman et al., 1999, Flanagan et al., 1998, Matsumoto et al., 1999). Во услови на хипертермија, значително се зголемува создавањето на слободни радикали (Hall et al., 1994). Изложувањето на хипертермна средина предизвикува оксидативен стрес кај организмите, што може да резултира со цитотоксичност (Mitchel et al., 1983,

Shrieve et al., 1986, Ohtsuka et al., 1994), а оксидативниот стрес е претходник на иреверзибилното хепатоцелуларно оштетување предизвикано од хипертермијата (Skibba et al., 1991). Ниската концентрација на слободни радикали може да индуцира експресија на гени одговорни за синтеза на антиоксидантни ензими, додека пак високото ниво на слободни радикали предизвикува супресија на овие гени, што дополнително ја компромитира способноста на клетките за инактивација на ROS (Harris, 1992). Различните типови оштетувачки процеси, кои резултираат од нерамнотежата помеѓу продукција на ROS/RNS и клеточната антиоксидативна одбрана, се означуваат со терминот *оксидативен стрес*. Познато е дека малите флукуации во нормалната концентрација на оксидантите можат да имаат улога во интрацелуларната сигнализација (Droge, 2002), но неконтролираното покачување на нивните нивоа може да доведе до верижни реакции посредувани од радикал кои неселективно ги напаѓаат протеините (Stadtman и Levine, 2000), липидите (Rubo et al., 1994), јаглехидратите (Kaur & Halliwell, 1994) и нуклеинските киселини (Richter et al., 1988; Ledoux et al., 1999).

1.3. Ацидо-базна рамнотежа

За нормално функционирање на организмот, потребно е правилно одвивање на сите метаболички процеси. Ензимите се биолошки катализатори на биохемиските реакции чијашто активност, меѓу другото, директно зависи од константноста на рН на средината, односно од прецизната регулација на концентрацијата на H^+ -јоните. Поради протеинската природа на ензимите, промените на рН надвор од оптималните граници доведуваат до нивна структурна алтерација, која резултира со редукција или комплетно стопирање на ензимската активност. Ензимската дисфункција води кон нарушување на нормалната работа главно на срцето и на нервниот систем, како и на другите органи во организмот. Мала промена на концентрацијата на водородни јони може да ја промени стапката на ензимски контролираните метаболички реакции, ја афектира дистрибуцијата на другите јони и ја модифицира хормонската активност (Shier et al., 2009). Оптималната концентрација на H^+ -јоните во екстрацелуларната течност флукуира помеѓу 35 и 45 nmol/L (рН 7,35

– 7,45), додека во интрацелуларната течност рН е нешто пониска (7,0 – 7,3) (Marshall, 2015). При нормалните метаболичките процеси во организмот непрекинато се синтетизираат кисели соединенија, кои во организмот се делумно или целосно дисоцирани, ослободувајќи големи концентрации на H^+ -јони. Мал дел од H^+ -јоните се апсорбираат од дигестивниот тракт, додека поголемата количина потекнува од клеточниот метаболизам (Shier et al., 2009), и тоа:

- при аеробна гликолиза се создава јагленова киселина;
- при анаеробна гликолиза се создава млечна киселина;
- при некомплетна оксидација на масни киселини се продуцираат кисели кетонски тела;
- оксидацијата на аминокиселини кои содржат сулфур резултира со создавање сулфурна киселина;
- хидролизата на органски соединенија кои содржат фосфор завршува со продуцирана фосфорна киселина.

Организмот е така организиран што овозможува одржување на рамнотежа помеѓу киселите и алкалните компоненти, односно одржување на ацидо-базна рамнотежа, и тоа во сосема тесни граници помеѓу 7,35 и -7,45. Вредностите на рН над 7,8 и под 7,0 значат директна опасност за животот и имаат летални последици за човековиот организам (Dzekova-Stojkova, 2006). Бидејќи во текот на метаболичките процеси не се создаваат OH^- -јони кои би ги неутрализирале метаболички создадените и ослободени H^+ -јони, вишокот H^+ -јони кои не се врзуваат со кислород оксидирајќи во вода се отстрануваат од организмот преку неколку механизми (Straus, 1992).

1.3.1 Хемиски ацидо-базни пуферни системи

Најголемо учество во одржувањето на ацидо-базната рамнотежа имаат хемиските пуферните системи, кои ја претставуваат првата линија на одбраната и дејствуваат моментално во делови од секунда. Пуферите се водни раствори од слаба киселина и нејзината конјугирана база или раствор од слаба

база и нејзината конјугирана киселина. Во регулација на рН-вредноста во организмот учествуваат следните физиолошки пуфери:

– **Бикарбонатен пуферски систем**

Бикарбонатниот пуферски систем е составен од смеса на слаба киселина и нејзина алкална сол во однос $\text{H}_2\text{CO}_3 : \text{NaCO}_3 = 1 : 20$ и претставува главен екстрацелуларен пуфер кој се означува како алкална резерва во организмот. Во услови на вишок на H^+ -јони, бикарбонатниот јон реагира со водородниот јон и преку формирање јагленова киселина спречува закиселување на средината. Од друга страна, ако, пак, средината е алкална, H_2CO_3 дисоцира на бикарбонатен и на водороден јон, кој ја снижува рН на средината.

– **Фосфатен пуфер**

Фосфатниот пуферски систем се состои од два фосфатни јони, дихидроген фосфат (H_2PO_4^-) и монохидроген фосфат (HPO_4^-) и е значаен во пуферирање на интраклеточната течност и на реналната тубуларна течност.

– **Протеини**

Плазма-протеините и одредени протеини во клетката, како хемоглобинот во еритроцитите, го сочинуваат овој пуферен систем. Протеините се изградени од низа на аминокиселини чијашто карбоксилна група COOH , во зависност од концентрацијата на H^+ -јоните во средината, може да го оддаде или да го прими H^+ -јонот. CO_2 како краен продукт на аеробниот метаболизам дифундира во еритроцитите, каде што под каталичко дејствување на ензимот карбон анхидраза реагира со вода и создава јагленова киселина, која дисоцира на бикарбонатен и на водороден јон:



Вака синтетизираните водородни јони се пуферирани од страна на хемоглобинот, додека бикарбонатниот јон дифундира надвор од еритроцитите во замена за хлоридните јони. Овој процес е познат уште и како поместување на хлориди (Marshall, 2015).

1.3.2 Респираторен механизам

Интраклеточните метаболички процеси во телото континуирано создаваат CO_2 . По создавањето, CO_2 дифундира од клетките во интерстицијалната течност и во крвта, а со крвотокот се транспортира до белите дробови, каде што со белодробната експирација се исфрла во надворешната средина. Ако брзината на метаболичкото создавање на CO_2 расте, тогаш и парцијалниот притисок на CO_2 ($p\text{CO}_2$) во екстрацелуларната течност се зголемува. Со покачување на концентрацијата на CO_2 , концентрацијата на H_2CO_3 и на H^+ исто така се зголемува, што резултира со намалување на pH на екстраклеточната течност. Оваа состојба ја детектираат хеморецепторите во продолжениот мозок, кој испраќа сигнал до ефекторниот орган, односно до белите дробови да се зголеми алвеоларната вентилација со цел да се исфрли вишокот на CO_2 и да се нормализира pH (Guyton & Hall, 2005). Во случај на зголемена pH во организмот, се стимулира хиповентилација за да се зачува поголема концентрација на CO_2 , која посредно ќе доведе до зголемување на концентрацијата на H^+ -јоните и до нормализирање на pH -вредноста.

1.3.3 Бубрежен механизам

Кога ќе дојде до нарушување на pH на екстрацелуларната течност, бубрезите вршат корекција и нормализирање преку излучување кисела или базна урина. Во услови на ацидоза, бубрезите го реапсорбираат целиот филтриран HCO_3^- и синтетизираат нов бикарбонат, кој се враќа назад во екстрацелуларната течност. Филтрираните HCO_3^- во проксималните бубрежни тубули се реапсорбираат преку титрација со H^+ кој е секретирани во тубуларниот лумен со помош на Na/H -котранспортер (Seifter & Chang, 2017). Вишокот секретирани H^+ -јони се пуферираат со фосфатен и со амонијачен пуфер, механизам во тубулите со кој се создаваат нови бикарбонатни јони. Во основата на компензаторните одговори на алкалоза се наоѓаат механизмите за намалена тубуларна секреција на водородните јони и за зголемено излучување бикарбонатни јони (Halperin et al., 2010).

1.4 Антиоксидативен статус

Кај аеробните организми, кислородот е неопходен за ефикасна продукција на енергија, но парадоксално во однос на тоа е фактот што тој може да предизвика хроничен токсичен стрес во сите клетки. Состојбата на оксидативен стрес се јавува кога продукцијата на ROS го надминува капацитетот за отстранување на овие реактивни форми. Затоа, императив е постоењето на заштитни механизми преку кои ќе се неутрализираат или ќе се отстранат токсичните споредбени продукти од метаболизмот на кислородот. Еволутивно, се развиле многу различни одбранбени механизми кои овозможиле адаптација на оксидативни животни средини. Овие антиоксидативни одбранбени системи се критични за преживувањето и на прокариотските и на еукариотските организми (Hadzi-Petrusev, 2014).

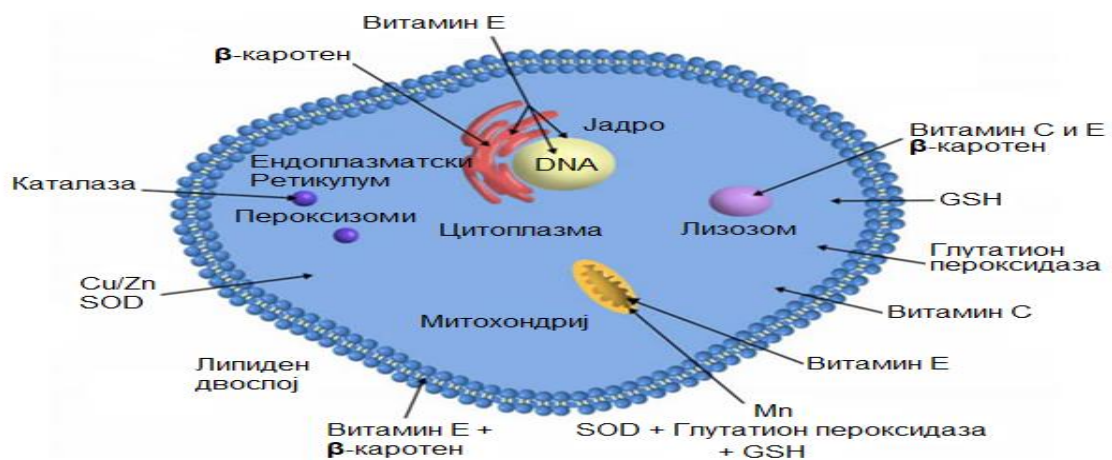
Слободните радикали имаат бројни улоги во физиолошките процеси, па затоа нивното создавање е неопходно. Во однос на нивната потенцијална токсичност, за време на еволуцијата е развиена потребата за воспоставување антиоксидантна заштита. Супероксид дисмутазата, каталазата, глутатион пероксидазата, глутатион редуктазата ја создаваат т.н. прва линија на антиоксидантната заштита, додека неензимските антиоксиданти, глутатионот, витамините С и Е, претставуваат секундарна линија на одбраната (Halliwell & Gutteridge, 1999). Оксидативните реакции што ги разгоруваат различните биохемиски, биофизички и механички функции на аеробните организми се споени со континуирано создавање високореактивни и потенцијално цитотоксични реактивни кислородни видови (ROS). Во нормални услови, ROS произведени во текот на метаболизмот се содржани во природниот антиоксидативен систем што ги штити функционалните и структурните молекули против ROS-посредуваните модификации, со што се спречува цитотоксичноста и оштетувањето на ткивото. Природниот антиоксидативен систем се состои од серија антиоксидантни ензими, како и од голем број ендогени антиоксидантни состојки кои се способни за и со инактивирање на ROS (Vaziri et al., 2003).

Најчесто користени и темелно експериментално проучувани антиоксиданти се витамините, односно аскорбинската киселина, токоферолот и

β -каротинот. Овие агенси се клучни елементи во намалувањето на молекуларното оштетување поради реактивните кислородни и азотни видови и постои обемна литература која ги опишува нивните повеќекратни дејства. Освен што служат за директна детоксикација на слободните радикали, тие, исто така, комуницираат во процесите на рециклирање за да генерираат редуцирани форми на витамини. На пример, токоферолот се реконституира кога аскорбатот го рециклира радикалот на токоферол. Исто така, дехидроаскорбатот, кој се генерира во таа реакција, се рециклира од глутатион – GSH (Reiter et al., 2000).

1.4.1. Клеточни антиоксидативни системи

Различните клетки и ткива имаат различни степени на метаболичка активност, а непосредно со тоа се карактеризираат со различна кислородна потрошувачка. Нивоата на нивните антиоксиданти исто така се разликуваат, на пример, глутатионот и цистеинот се помалку застапени во мозокот отколку во црниот дроб, бубрезите или во мускулното ткиво. Испитувањата на оксидативните одговори кај различни *in vivo* модели сугерираат дека кај комплексните организми, какви што се цицачите, ткивата и органите поседуваат посебни антиоксидативни системи и тоа може да биде основа за различен степен на подложност на токсични влијанија од надворешната средина.



Слика 7. Антиоксидативни ензимски системи
Figure 7. Antioxidant enzyme systems (www.news-medical.net)

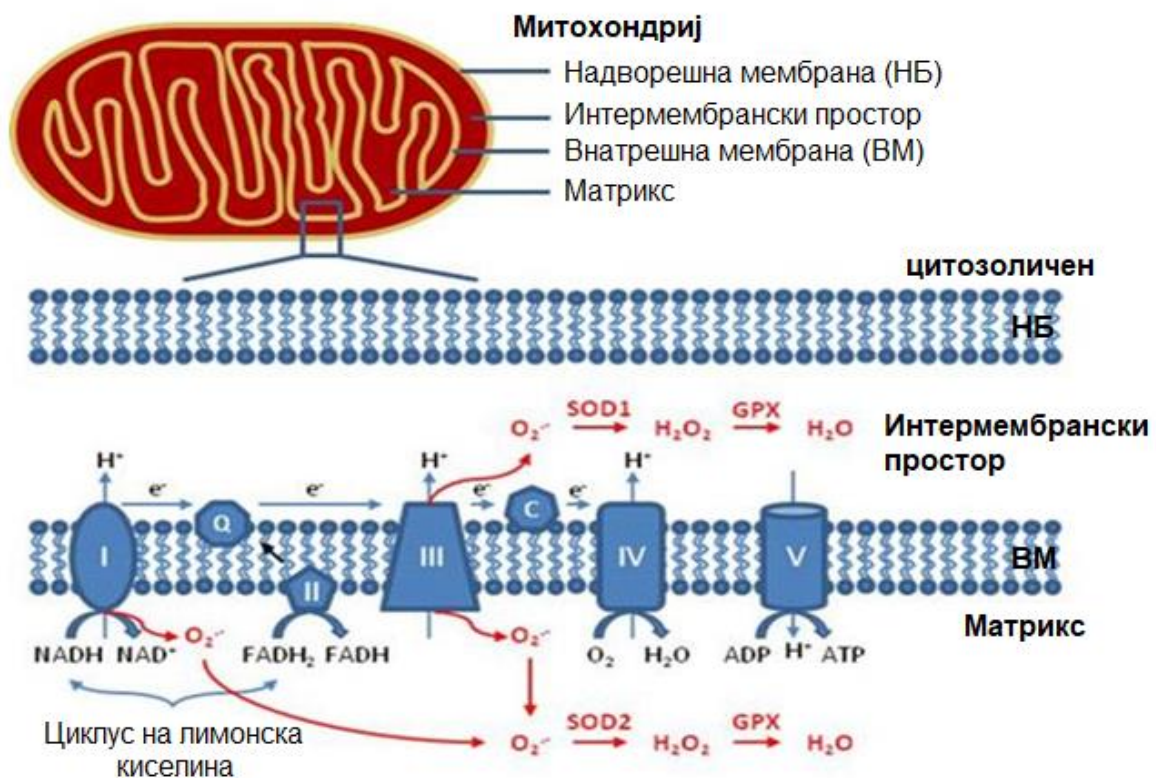
Одбранбените механизми насочени против оксидативното оштетување посредувано со дејство на слободни радикали (слика 7) вклучуваат: каталитичко отстранување на слободните радикали и реактивни форми со помош на ензими како супероксид дигмутаза (SOD), каталаза (CAT), глутатион пероксидаза (GPx) и тиол специфични антиоксиданти; врзување протеини (на пример, трансферин, металотионенин, хаптоглобин, церулоплазмин) за прооксидантни метални јони, како тие на железото и на бакарот; заштита од оштетување на макромолекулите со помош на стрес-протеини или *heat shock* протеини и редукција на слободните радикали со помош на донори на електрони, какви што се GSH, витаминот Е (α -токоферолот), витаминот Ц (аскорбинската киселина), билирубинот и мочната киселина (Halliwell & Gutteridge, 1999).

1.4.2. Митохондријална антиоксидативна заштита

Митохондриите се сметаат за супклеточни компартменти, кои имаат најголем удел во продукцијата на ROS и се непосредно изложени на нивното дејство. Затоа од посебно значење е функционирањето на антиоксидативните системи во рамките на овие органели задолжени за енергетскиот метаболизам. Антиоксидативниот систем на митохондриите е, генерално, сличен на цитоплазматичниот систем. Митохондријалниот матрикс содржи специфична форма на SOD, со манган присутен во активното место (Fridovich, 1995), која ги елиминира супероксидните анјони формирани во матриксот или на внатрешната страна од внатрешната мембрана. Експресијата на Mn-SOD е дополнително индуцирана од страна на агенси кои предизвикуваат оксидативен стрес, како што се радијацијата или хипероксијата, во процес посредуван од оксидативната активација на јадрениот транскрипциски фактор NF- κ B (Tsan et al., 2001, Murley et al., 2001).

Нормалната концентрација на супероксиден анјон во интермембранскиот простор е контролирана од страна на три различни механизми. Најпрво, овој компартмент содржи различна изоформа на SOD (CuZn-SOD)(Okado-Matsumoto & Fridovich, 2001), која е застапена и во цитоплазмата. Второ,

интермембранскиот простор содржи цитохром С, кој може да биде редуциран од страна на супероксиден јон (Butler et al., 1975), регенерирајќи кислород во текот на процесот. Редуцираниот цитохром С може потоа да ги трансферира електроните на терминалната оксидаза. Според тоа, некои од електроните кои го напуштиле респираторниот синџир продуцирајќи супероксиден анјон, на овој начин можат повторно да го редуцираат цитохромот С и да дадат придонес во продукцијата на енергија. На крајот, спонтаната дизмутација на супероксидните анјони во интермембранскиот простор е помогната од пониската рН на средината во овој компартмент, што води потекло од екструзијата на водородни јони врзана за процесот на респирација (Guidot et al., 1995).



Слика 8 . Редокс-баланс во митохондриите
Figure 8. Redox balance in mitochondria (www.wur.nl)

За митохондриите, исто така, е познато дека се главен извор на ROS (слика 8), бидејќи во процесот на оксидативна фосфорилација се генерираат слободни електрони. ROS се високореактивни молекули (на пример, O_2^- и H_2O_2), кои имаат важна физиолошка улога во метаболичката сигнализација.

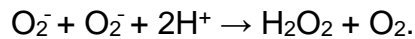
Сепак, високите нивоа на ROS можат да предизвикаат оштетување на ДНК и на клеточно ниво и затоа се силно поврзани со метаболни компликации. Како резултат на тоа, митохондриите се добро опремени со антиоксидантна одбрана. Односот помеѓу GR и GPx, особено кај постари митохондрии, покажува отстранување на оштетениот H_2O_2 од GPx. Можно објаснување за оваа состојба е високата зависност на GPx од глутатион (GSH) за неговата активност, така што намалувањето на хепаталното ниво на GSH со стареењето може делумно да биде одговорно за намалената активност на GPx (Stojkovski et al., 2013).

На ниво на митохондриите, водород пероксидот, како продукт од дизмутацијата на супероксидните анјони, е и главен прекурсор на хидроксилниот радикал (во присуство на редуцирани транзициони метали), а главно се разградува со дејството на ензимот глутатион пероксидаза. Во црниот дроб, околу една третина од клеточната активност на GPx опаѓа на митохондријалната GPx (Chance, 1979). Докажано е и присуството на втор тип глутатион пероксидаза, асоцирана со митохондријалната мембрана и позната како фосфолипид-хидропероксид глутатион пероксидаза. Овој ензим е специфично инволвиран во редуцирањето на липидните пероксиди со потекло од мембраната (Ursini et al., 1999; Nomura et al., 2000). Во физиолошки услови, примарната одбрана против супероксидниот анјон и водород пероксидот во митохондриите кои не содржат каталаза се врши со конзистентно дејство на горенаведената супероксидна дисмутаза и на глутатион пероксидазата. Сепак, и покрај активноста на овие ензими, значителни количини на H_2O_2 можат да дифундираат од митохондриите до цитоплазмата, каде што детоксикацијата се врши преку цитоплазматичната глутатион пероксидаза или со пероксизомната каталаза (Salvi et al., 2007).

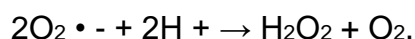
1.4.3. Ензимски антиоксиданти

1.4.3.1. Супероксид дизмутаза – SOD

SOD е ензим кој ја катализира трансформацијата на супероксидниот анјон на радикалите на H_2O_2 и на кислородот и ја претставува првата линија на одбраната од слободните радикали:

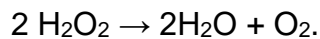


Неутрализацијата на формируваниот водород пероксид понатаму се врши со активност на каталазата или на глутатион пероксидазата. Досега се идентификувани три изоформи на ензимот и сите тие се присутни во еукаритските организми. Бакар-цинк зависната SOD-изоформа (CuZn-SOD) е застапена во цитоплазмата, јадрото и во крвната плазма. Од другата страна, манган зависната SOD-изоформата (Mn-SOD) е примарно лоцирана во митохондриите, додека екстрацелуларната SOD (EC-SOD) е многу слична на бакар-цинк зависна, но е локализирана во екстрацелуларниот простор. Намалената експресија на SOD доведува до намалена концентрација на GSH и зголемен степен на оксидативен стрес (Williams et al., 1998), а комплетниот нокаут на генот за ензимот е летален во рок од неколку дена по раѓањето, како резултат на комплетна дисфункција на бубрезите (Lebovitz et al., 1996). Супероксид дизмутазата е ензим кој помага да се разрушат потенцијално штетните молекули на кислородот во клетките, што може да спречи оштетување на ткивата. Супероксид дизмутазата (SOD) го катализира преносот на еден електрон од една молекула на суперхексидниот анјон во друг. Донорната молекула станува дел од кислородот, додека реципиентот бргу се комбинира со два водородни јони за да формира хидроген пероксид. Иако водород пероксидот не е ROS, тој е моќен и токсичен оксидирачки агенс, кој игра важна улога во кислородната токсичност. Целокупната реакција е следнава:



Водород пероксидот постојано се создава во телото. Двата ензими го обезбедуваат неговото брзо отстранување; едниот е каталазата,

високоспецифичен ензим активен само против водородот, метилот и етил пероксидите. Водород пероксид се сведува на вода, па така:



Глутатион пероксидазата дејствува против многу поширок спектар на пероксиди (ROOH), кои реагираат со глутатион (GSH), па така:



Супероксид дизмутазите (SOD) се група металоензими кои се од суштинско значење за да се заштитат клетките од аеробни услови. Истражувањата покажале дека во биолошките системи, SOD и други протеини се подложни на напади од пероксинитрит (ONOO), кој може да потекнува од реакцијата на азотен оксид со супероксид радикал. ONOO- е силна оксидантска молекула способна за нитратирање на пептидите и на протеините во страничниот синџир на фенил и на остатоците од тирозин (Larrainzar et al., 2008). Ендогените супероксидни дизмутази (SODs) се метални зависни ROS- и RNS-чистачи кои ја спречуваат пероксидацијата на липидите (Stein et al., 2015). SOD се состои од семејство на металопротеини главно класифицирани во четири групи: SOD (Cu/Zn-SOD), кои содржат бакар/цинк, SOD (Mn-SOD) кои содржат манган, SOD (Fe-SOD) кои содржат железо и SOD (Ni-SOD) кои содржат никел. Cu/Zn-SOD е секогаш димер, а Mn-SOD и Fe-SOD се изолирани или како димери или како тетрамери. Генерално, секоја поединица има функционален метален јон и нема докази за силна интеракција помеѓу индивидуалните функционални метални центри (Ferafontova et al., 2005). Супероксид дизмутазите (SODs) се универзални ензими на организмите кои живеат во присуство на кислород. Тие ја катализираат конверзијата на супероксидот во кислород и во водород пероксид. Супероксидните аниони се планирани производи на одредени ензими за сигнализација, како и на споредни производи на неколку метаболички процеси, вклучувајќи го и митохондријалното дишење. Преку својата активност, ензимите на SOD ги контролираат нивоата на различни реактивни видови кислород (ROS) и на реактивни азотни (RNS) видови, со што ја ограничуваат потенцијалната токсичност на овие молекули и контролираат широки аспекти на клеточниот живот кои се регулирани со нивните сигнални функции. Сите аеробни

организми имаат повеќе SOD-протеини насочени кон различни клеточни и супцелуларни локации, како одраз на бавната дифузија и на повеќекратните извори на супстратот супероксид. Оваа поделба, исто така, укажува на потребата за фина локална контрола на ROS-сигнализацијата и на можноста ROS да сигнализира помеѓу одделите на клетките (Wang et al., 2018).

1.4.3.2. Каталаза – CAT

Каталаза спаѓа меѓу најраспространетите ензими во природата. Нејзината основна биолошка улога е разградувањето на токсичниот водород пероксид. Анималните каталази се ензими кои содржат хем-група и го конвертираат водород пероксидот во вода и молекуларен кислород и тие се, главно, локализирани во супцелуларни компартментни од типот на пероксизомите. Митохондриите и ендоплазматичниот ретикулум содржат малку каталаза. Според тоа, интрацелуларниот водород пероксид не може да биде елиминиран освен ако не дифундира до пероксизомите (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Каталаза е уште еден ензим кој има димутазна активност. Таа содржи дел на хем на активната локација и има способност да претвора две молекули на водород пероксид во кислород и вода. Оваа реакција бара присуство на мала количина на хидроген пероксид за да се врзе на активното место со цел да се генерира каталаза комплекс I, која реагира со втората молекула на водород пероксидот (Kehrer et al., 2010).

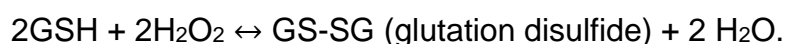
Каталазите се присутни во аеробните организми, вклучувајќи ги и речиси сите ткива на цицачите, но сепак каталазите покажуваат највисока ензимска активност во црниот дроб и во еритроцитите. Во рамките на клетките, каталазите најчесто се наоѓаат во пероксизомите (стратешка локација поради присуството на многу ензими кои произведуваат H_2O_2) и во митохондриите како растворливи и мембрански врзани форми. Каталазите кај цицачите се хомотетрамерни ензими кои содржат ферихем, чија молекулска маса е приближно 240 kDa. Ензимите од различни извори се разликуваат меѓусебно во однос на својата структура и на својствата. Кај еритроцитите, каталазата е првата линија на одбраната од H_2O_2 (Đorđević, 2004).

Каталазата го претвора супероксидот во вода и молекуларен кислород главно во пероксизоми. Ова го спречува неговото претворање во хидроксил радикал и во други токсични ROS. Каталазата се конституира и се активира со супероксид. Купферовите клетки, кои имаат голем број пероксизоми, имаат високо ниво на каталаза. Глутатион пероксидазата, исто така, го неутрализира супероксидот, конвертирајќи го редуцираниот глутатион и супероксид во оксидиран глутатион и вода. Тој е поефективен од каталазата за ниско ниво на супероксид. Хепатоцитите имаат висока содржина на глутатион пероксидаза, која е локализирана во цитоплазмата и во митохондриите. Постојат најмалку пет форми и секоја од нив содржи селен како каталитички метал (Messner et al., 2012). Преодминантните ензимски механизми кои ги регулираат интрацелуларните нивоа на H_2O_2 се посредуваат со каталаза и со глутатион пероксидаза. Тетрамерната каталаза го конвертира H_2O_2 во H_2O и O_2 во пероксизомите. Глутатион пероксидазата го конвертира H_2O_2 во H_2O во реакција која го оксидира GSH во неговата дисулфидна форма (GSSG). Повратно, GSH се регенерира од GSSG со глутатион редуктаза. Регулирањето на H_2O_2 преку редокс-циклусот на глутатионот е посредувано во цитоплазмата и во митохондриите (Cao et al., 2003). Каталазата, исто така, може да ги отстрани органските хидропероксици. Покрај тоа, каталазата го користи H_2O_2 за оксидирање на токсините, вклучувајќи ги фенолите, мравјата киселина, формалдехидот и алкохолите (Naziroğlu, 2012).

1.4.3.3. Глутатион пероксидаза – GPx

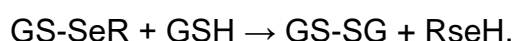
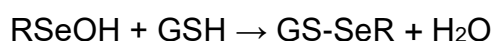
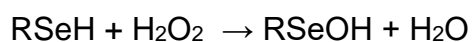
Глутатион пероксидазата е откриена во 1957 година од страна на Г. Милс (Mills, 1957). Глутатион пероксидазата (GPx) или GSH-пероксидаза, селениум глутатионска пероксидаза, е ензим со систематско име глутатион: водород пероксид оксидоредуктаза (Chaudiere & Tappel, 1983; Grossmann & Wendel, 1983; Nakamura et al., 1974).

Главната реакција што ја катализира глутатион пероксидаза е:



Овој протеин содржи селеноцистеински остаток. Механизмот вклучува оксидација на селенолот на селеноцистеински остаток со хидроген пероксид.

Овој процес го дава дериватот со група на селенската киселина (RSeOH). Селенската киселина потоа се враќа назад во селенолот со процес на два чекори, кој започнува со реакција со GSH за да се формира GS-SeR и вода. Втората молекула на GSH го редуцира GS-SeR назад до селенол, ослободувајќи го GS-SG како нуспроизвод. Поедноставено претставување е прикажано подолу (Bhabak & Mugesh, 2010):



Главната биолошка улога на GPx е да го одбрани организмот од оксидативно оштетување. Биохемиската функција на GPx е да ги редуцира липидните хидропероксиди до нивните алкохолни соединенија и да го редуцира слободниот водород пероксид во вода (Bhabak & Mugesh, 2010).

Неколку изоензими се кодирани од различни гени, кои се разликуваат по клеточната локација и по специфичноста на супстратот (табела 1).

Табела 1. Видови изоензими на GPx
Table 1. Types of isoenzymes of GPx (www.wikipedia .org)

Ген	Локус	Ензим
GPx1	Chr. 3 p21,3	Глутатион пероксидаза (цитоплазма кај цицачи)
GPx2	Chr. 14 q24,1	Глутатион пероксидаза (гастроинтестинум)
GPx3	Chr. 5 q23	Глутатион пероксидаза (плазма)
GPx4	Chr. 19 p13,3	Глутатион пероксидаза (редуцирачки ефект)
GPx5	Chr. 6 p21,32	Глутатион пероксидаза (епидидимален андроген врзувачки протеин)
GPx6	Chr. 6 p21	Глутатион пероксидаза (олфакторен)
GPx7	Chr. 1 p32	Глутатион пероксидаза
GPx8	Chr. 5 q11,2	Глутатион пероксидаза (суспектен)

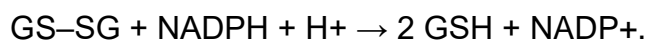
Глутатион пероксидазата е антиоксидативен ензим со капацитет да ги ослободи слободните радикали. На овој начин се помага да се спречи

пероксидацијата на липидите и да се одржи интрацелуларната хомеостаза, како и редокс-балансот (Mulgund et al., 2015).

Глутатион пероксидаза (GPx) е антиоксидантен ензим кој содржи селен, кој, пак, ефикасно ги намалува H₂O₂ и липидните пероксиди во вода и липидните алкохоли, соодветно, а повратно го оксидира глутатионот во глутатион дисулфид. Намалениот глутатион игра главна улога во регулирањето на интрацелуларната редокс-состојба на васкуларните клетки преку обезбедување на намалување на еквивалентите за многу биохемиски патишта. Во отсуство на адекватна активност на GPx или на адекватни нивоа на глутатион, водород пероксидот и липидните пероксиди не се детоксицираат и можат да се претворат во OH-радикали и во липидни пероксилни радикали, соодветно, преку преодни метали (Fe²⁺). Системот GPx/глутатион има силна одбранбена моќ при низок степен на оксидативен стрес (Tabet & Touyz, 2007).

1.4.3.4. Глутатион редуктаза - GR

Глутатион редуктазата (GR) е ензим кој, исто така, е познат како глутатион дисулфид редуктаза (GSR). Овој ензим кај луѓето е кодиран од GSR-генот. Глутатион редуктазата ја катализира редукцијата на глутатион дисулфидот (GSSG) до GSH, со што се одржува интрацелуларното ниво на GSH и односот GSH/GSSG, а со тоа се заштитуваат SH-групите од интрацелуларните протеини и се спречуваат иреверзибилните промени во структурата на клетките (Deponte, 2013; Meister, 1988; Mannervik, 1987). Овој ензим ја катализира редукцијата на GSSG со NADPH:



Природната регенерација на GSH со GSSG е катализирана од GSSG-редуктазата. Поранешните истражувања јасно укажуваат на тоа дека фосфолипидните хидропероксиди не се чувствителни на директна редукција од страна на GPx (Van Kuijk et al., 1987).

Глутатион редуктазата (GR) е хомодимер кој содржи еден FAD (флвопротеин) мономер, кој, пак, ја катализира редукцијата на глутатион дисулфидот (GSSG) во глутатион (GSH). GSSG и GSH играат клучна улога во клеточната редокс-хомеостаза. GSH помага да се детоксицираат реактивните

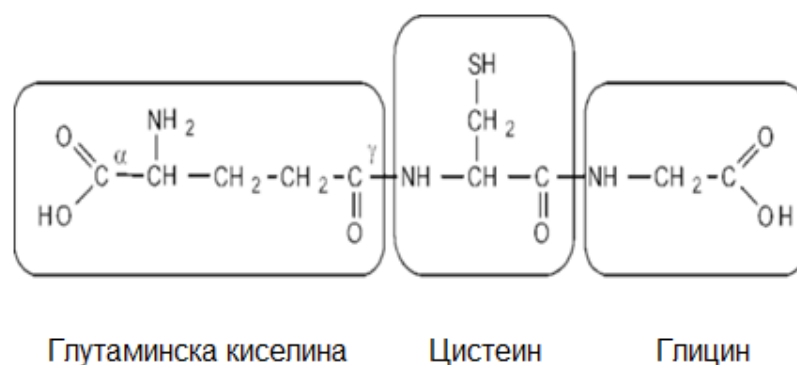
видови кислород со донирање еквиваленти за намалување на глутатион пероксидазата и да се детоксицираат електрофилните ксенобиотици со глутатион S-трансфераза (Fagan & Palfey, 2010).

Нивоата на глутатион се модулираат преку NADPH, глутатион редуктаза и глутатион синтетаза. Гранулоцитите со глутатион редуктаза или со дефицит на глутатион синтетаза имаат нормално рано респираторно распаѓање, додека последователното континуирано производство на токсични кислородни производи, со кои вообичаено се справува глутатионот, резултираат со автооксидативно оштетување и дефектна микробицидна активност (Hill et al., 2013).

Глутатион редуктазата е еден дел од синџирот на ензими што служи за одржувањето на глутатионот во редуцирана форма. *In vitro*, овој ензим може да функционира со NADH и/или со NADPH како водороден донор. Сепак, *in vivo*, само NADPH е ефективен (Beutler, 1972).

1.5 Глутатион

Трипептидот глутатион (L-γ-глутамил-L-цистеинил-глицин; GSH) претставува широко распространета физиолошки активна компонента изградена од аминокиселините глутамат, цистеин и глицин.



Слика 9. Хемиска структура на глутатионот
Figure 9. Chemical structure of glutathione (www.researchgate.net)

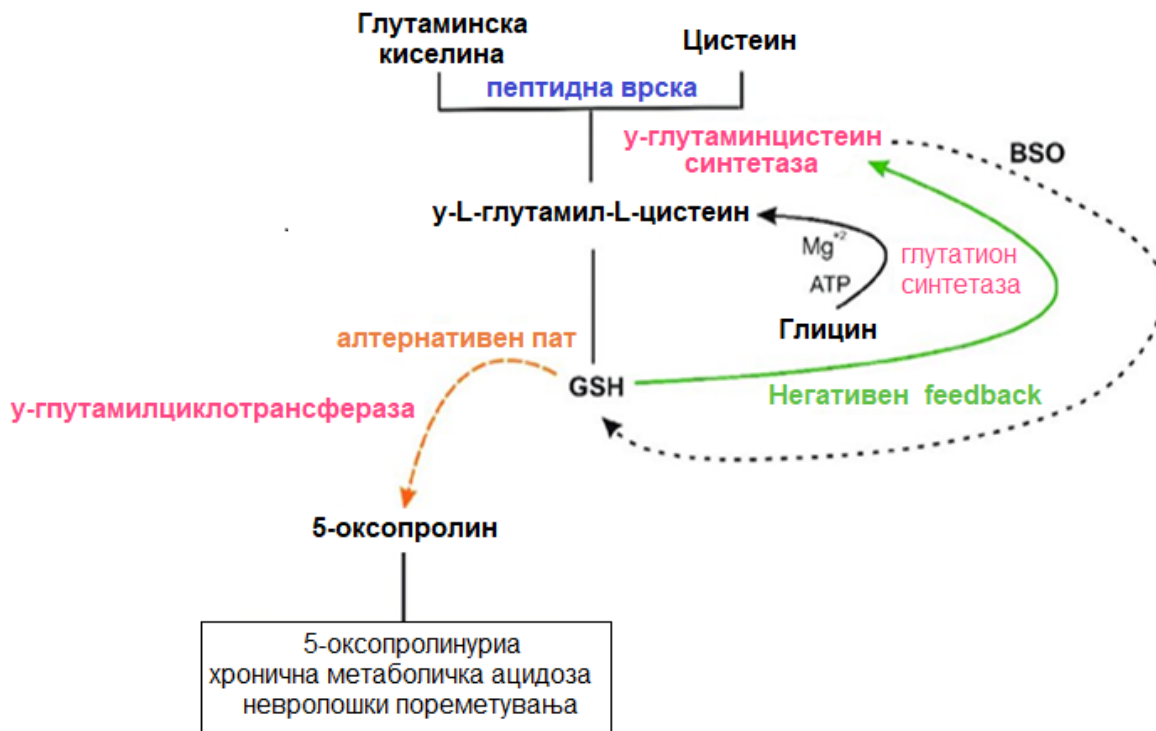
Наместо типичната α -врска меѓу првите две аминокиселини, во структурата на глутатионот има γ -врска (слика 9), која му овозможува отпорност кон деградација од интрацелуларните пептидази, додека присуството на C-терминален глицин го заштитува од дејството на интрацелуларните γ -глутамилциклотрасферази (Franco et al., 2007). Глутатионот претставува најдоминантниот нискомолекуларен тиол, во кој SH-групата од цистеинската резидуа ја претставува неговата активна група. Поради присуството на цистеинска резидуа, GSH под дејство на електрофилни супстанции (како ROS/RNS) неензимски се оксидира во GSSH. Ефлуксот на GSSH од клетката придонесува за нето-загуба на интрацелуларните концентрации на GSH. Во анималните ткива е застапен во концентрација од 1 до 2 mM, додека во хепатоцитите, како главни GSH-експортери, достигнува најголема концентрираност од околу 10 mM (Halliwell, 1988). Во крвната плазма е присутен во микромоларни концентрации (2 – 20 $\mu\text{mol/L}$) (Jones, 2002). GSH е 80 – 95 % слободно распределен во цитоплазмата, но по неговата интрацелуларна синтеза може да биде складиран во различни органели, и тоа околу 10 % во митохондриите и мал процент во ендоплазматичниот ретикулум (Meredith & Reed, 1982; Hwang et al., 1992).

Може да се сретне во две форми: тиол редуцирана (GSH) мономерна и дисулфид оксидирана (GSSH) димерна форма (Kaplowitz et al., 1985; Meister, 1991; DeLeve & Kaplowitz, 1991). Односот GSH/GSSH претставува индикатор за клеточната редокс-состојба на клетката (Nogueira et al., 2004; Schafer & Buettner, 2001) и во нормални физиолошки услови е поголем од 10 (Griffith, 1999). Доколку е ингестирана протеинска храна, GSH може да биде делумно апсорбиран од тенкото црево, но, исто така, може de novo да се синтетизира, поради што тој претставува и егзоген и ендеген антиоксидант. Синтезата на глутатионот се одвива во цитоплазмата на сите анимални клетки, меѓу кои хепатоцитите се извојуваат со најголема активност (слика 10). Митохондриите не ги поседуваат ензимите потребни за синтеза на GSH и поради тоа митохондријалната концентрација на GSH се одржува константна преку транспорт од цитоплазмата. Прекурсорните аминокиселини за негова синтеза се глутаматот, цистеинот и глицинот и таа е секвенционално катализирана од два ATP-зависни цитоплазматични ензими, γ -глутамилцистеин синтетаза (GCS)

и GSH-синтетаза, во серија од шест ензимско катализирани реакции означени како γ -глутамил циклус (Meister & Anderson, 1983).

Во речиси сите аероби, редоксната состојба на клетките е зависна од одржувањето на глутатионот во редуцирана форма, односно како GSH. GSH е најзастапен интрацелуларен тиол и неговата концентрација се движи до 10 mM. Освен што функционира како директен чистач на слободните радикали, GSH служи како кофактор за многу ензими и формира коњугати со ендо- и егзобиотици/ксенобиотици. Понатаму, GSH функционира како косупстрат за глутатион пероксидазата, антиоксидативниот ензим, кој ја катализира редукцијата на H_2O_2 , и липидниот хидропероксид, при што се оксидира до неговата дисулфидна форма, GSSG. Нормалниот сооднос на GSH : GSSG е 99 ± 1 %. Ако овој сооднос се промени малку во корист на GSSG, влијанието врз клетките е многу штетно. Цитозолниот ензим глутатион редуктаза (GR) е од клучно значење за регенерација на GSH од GSSG (Reiter et al., 2000).

Оваа биохемиска патека егзистира во речиси сите типови клетки, при што најголем дел од глутатионот присутен во крвната плазма потекнува од црниот дроб, кој има централна улога во хомеостазата на GSH преку експортирање на целиот синтетизиран глутатион во крвната плазма и во жолчката (Griffith, 1999). Црниот дроб има главен придонес во *de novo* синтезата на глутатионот и ја контролира дистрибуцијата на глутатионот до периферните органи (Ookhtens & Kaplowitz, 1998). Бубрезите, белите дробови и тенкото црево се главните комсументи на GSH испорачан од црниот дроб (Lu, 2000).



Слика 10. Биосинтеза на глутатионот
Figure 10. Biosynthesis of glutathione (www.research gate.net)

1.5.1 Функции на глутатионот

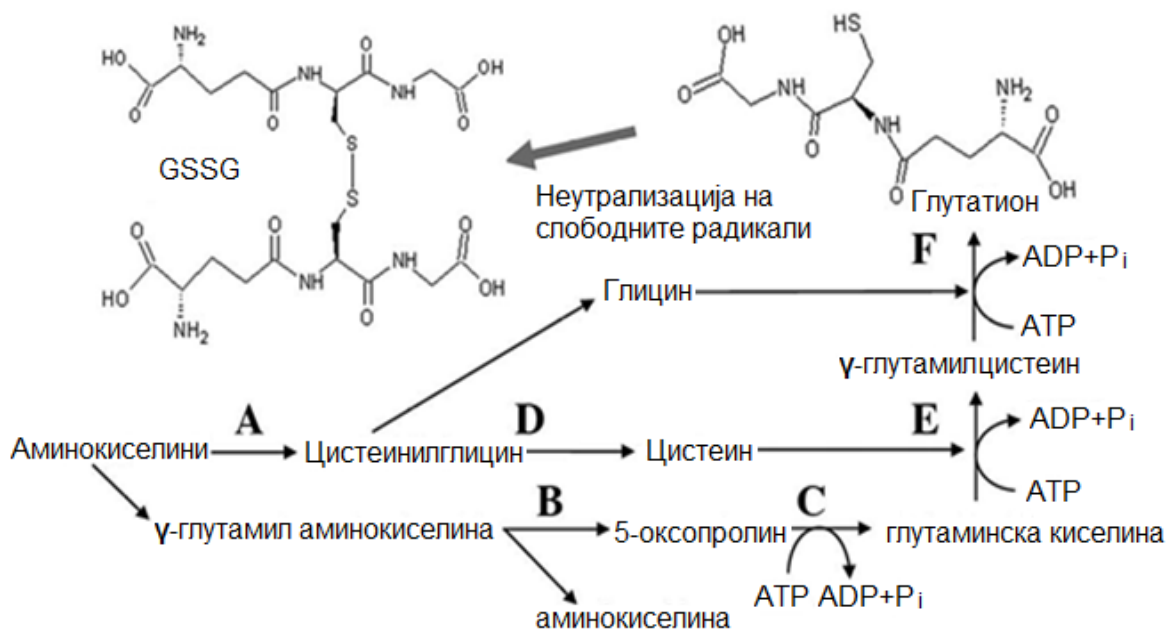
Хемиската структура и широката дистрибуција на GSH се рефлектираат на неговите значајни биолошки функции. Реакциите на редукција на слободните радикали, детоксификацијата на електрофилите и интеракциите со неензимските антиоксиданти се сметаат за три најважни групи функции на GSH.

Како носител на активна тиол-група во форма на цистеинска резидуа, GSH ефективно ги инактивира слободните радикали дејствувајќи директно како донор на електрон или пак индиректно преку учество во ензимски реакции (Cooper et al., 2011). Глутатионот е силен редуцирачки агенс кој може директно да ги неутрализира водородните и липидните радикали. Ваквата редуцирачка способност на GSH е асоцирана со формирање ·GS-радикал, кој доколку не се инактивира ефикасно (на пример, со аскорбат), може да доведе до

прооксидативни реакции (Włodek, 2002). Два ·GS-радикали можат понатаму да реагираат и да формираат GSSH-молекула. Во ваквите реакции GSH неензимски се оксидира до GSSG, кој повторно се редуцира назад до редуцирана форма преку каталитичко дејствување на NADH-зависна GSH-редуктаза (Wu et al., 2004). Друг ензим, глутатион пероксидазата (селен зависен ензим), ја катализира GSH-зависната редукција на H₂O₂. GSH е посебно важен во митохондриите каде што е отсутна каталазата и е критичен во одбраната од физиолошки и патолошки генериран оксидативен стрес (Fernández-Checa et al., 1997; Garcia-Ruiz & Fernandez-Checa, 2006).

GSH врши детоксификација на ендогени и на егзогени токсини од електрофилна природа (Lushchak, 2012), на физиолошки метаболити (естроген, простагландини, леукотриени) и на ксенобиотици (бромобензен и ацетаминофен), при што формира меркапурати излачени преку урината или преку фецесот (Fang et al., 2002). Овие реакции се иницирани од глутатион-S-трансфераза (GST). GSH служи како супстрат на формалалдехид дехидрогеназата, ензим кој ја катализира реакцијата на синтеза на S-формил-глутатионот од формалдехид и од GSH како реактанти (Townsend et al., 2003). Оваа реакција е од физиолошко значење бидејќи формалдехидот претставува моќен карциноген. GSH е потребен за конверзија на простагландинот H₂ (метаболит на арахидонската киселина) во простагландини D₂ и E₂. Оваа реакција е катализирана од ензимот ендопероксид изомераза (Lu, 2000).

Глутатионот има способност да ги регенерира неензимските антиоксиданти, витаминот Ц и витаминот Е, назад до нивните активни редуцирани форми (слика 11). GSH може директно да го редуцира токоферол-радикалот или индиректно преку редукција на семидехидроаскорбатот до аскорбат (Pastore et al., 2003).

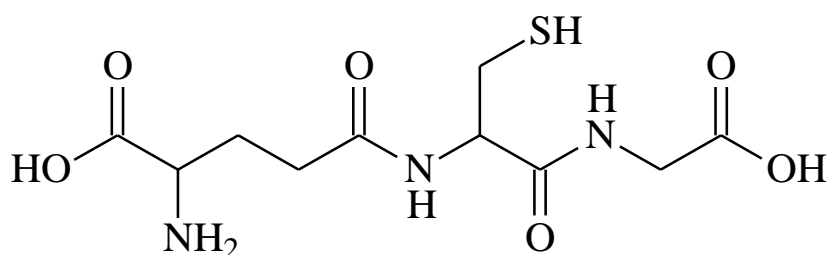


Слика 11. Глу татионот како антиоксидант
 Figure 11. Glutathione as antioxidant (www.spandidos-publications.com)

Освен во овие реакции, GSH е инволвиран во голем број други функции во организмот: есенцијален е за активација на Т-лимфоцитите и на полиморфонуклеарните леукоцити и за синтеза на цитоксините, поради што е одговорен за успешен имунолошки одговор кога домаќинот е имунолошки предизвикан; учествува во транспортот на аминокиселините низ клеточната мембрана; претставува транспортна форма на аминокиселината цистин (Kaplowitz et al., 1985; Meister & Anderson, 1983; DeLeve & Kaplowitz, 1991; Suthanthiran et al., 1990); учествува во одржувањето на хомеостазата на NO (Hogg, 2002); ја модулира активноста на протеините со посттранслациона модификација (протеинска S-глутатионилација) (Pompella et al., 2003); ја модулира активноста на рецепторите за невротрансмитери (Oja et al., 2000); се одликува со способност за врзување на слободните метални јони како цинк, железо и бакар (Gow et al., 2000; Maher & Schubert, 2000; Loft & Poulsen, 2000; Thannickal & Fanburg, 2000; Deng et al., 2004).

1.5.2 Глутатион – својства и примена

Глутатионот, често среќаван и под кратенката GSH, како што веќе споменавме, е трипептид составен од аминокиселините глутамин, цистеин и глицин поврзани на таков начин што резултатното име на пептидот би било следново: глутамилцистеинилглицин. Поточно, аминокиселината глутамин учествува во формирањето на амидната врска со својот карбоксилен дел, додека глицинот со својот амински дел. Ова е прикажано на слика 12.

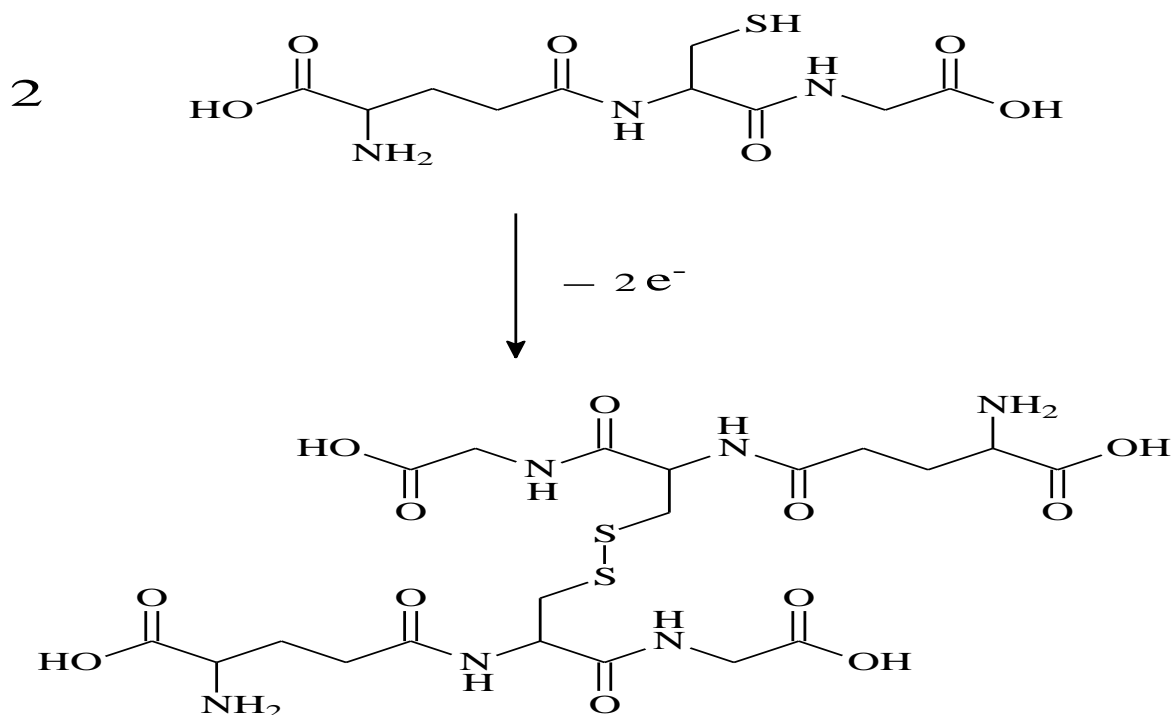


Слика 12. Структурна формула на глутатионот
Figure 12. Structural formula of glutathione (www.mcgill.ca)

Голем дел од редокс-својствата на глутатионот се должат на присуството на тиолна група (со потекло од аминокиселината цистеин) која може да се оксидира до дисулфид. Имено, потребни се две молекули од редуциран глутатион, а полуреакцијата вклучува оддавање на 2 електрони од 2 мола глутатион. Овој процес е прикажан на слика 13. Токму поради неговите антиоксидациски својства, глутатионот е важна биоактивна молекула за заштита на клетките од реактивните кислородни радикали, како што се перокси радикалите, но и други оксидирачки средства присутни во фотохемискиот смог, прашина и во некои крупни честички во воздухот, при што неговата молекула преминува во својата оксидирана форма.

Познато е дека откако глутатионот ќе биде оксидиран, живите организми се способни да го вратат повторно во форма на редуциран глутатион со помош на глутатион редуктазата, во присуство на NADPH како донор на електрони. На овој начин, во клетките секогаш постои хемиска рамнотежа во која учествуваат редуцираниот глутатион и неговата дисулфидна оксидирана форма. Концентрацискиот однос на овие две форми е важен параметар во

определувањето на способноста на клетките да се справат со оксидативниот стрес.



Слика 13. Полуреакција на оксидација на глутатионот
 Figure 13. Half-reaction of glutathione oxidation (www.chem.libretexts.com)

Покрај споменатите, глутатионот има и голем број други важни функции во живите организми, а речиси сите се поврзани со редокс-особините на тиолната функционална група, кои можат да се групираат на следниот начин:

(1) Глутатионот во голема мера влијае врз намалување на негативните ефекти од стареењето, имајќи предвид дека оксидативниот стрес и слободните радикали се највлијателната променлива која се одразува на стареењето. Поточно, со текот на времето целокупното количество на редуциран глутатион во клетките опаѓа, а со тоа опаѓа и нејзиниот антиоксидативен статус. Додавањето глутатион не само што ги подобрува клеточните функции туку може и да ја поправи штетата предизвикана од долгогодишната акумулација на слободни радикали.

(2) Антивоспалителните карактеристики на глутатионот се манифестираат со намалување на бројот на слободните радикали, кои, пак, се генерираат при хронични заболувања, цироза на црниот дроб и при други воспаленија.

(3) Глутатионот помага во спречување на оксидативните оштетувања на нервните клетки. Токму во черепниот мозок на пациентите болни од Алцхајмерова болест се најдени знаци на оксидативно оштетување на клетките, дури и пред да станат видливи знаците на болеста.

(4) Нивото на глутатион директно влијае врз нормалното функционирање на црниот дроб. Конкретно, ефектот може да биде илустриран со метаболизмот на различните лекови (на пр., ацетаминофен) кои се редуцираат во овој орган, притоа зголемувајќи го количеството на оксидиран глутатион.

(5) Глутатионот служи и како средство кое ја спречува оксидацијата на клетките од кожата при контакт со слободните радикали и со слични токсини. Имено, глутатионот е склон да стапи во редокс-реакција со токсините пред тие да стапат во реакција со кожата, па така кожата останува заштитена од различните оксидирачки влијанија.

(6) Глутатионот стапува во реакции со другите антиоксиданти (витаминот С, различни нуклеотиди и сл.), со што ги регенерира. Така, на пример, ги регенерира и молекулите кои се битни за подобрување на општата имунолошка состојба на организмот.

(7) Тој е една од најважните молекули кои учествуваат во репарацијата, експресијата и во синтезата на ДНК, а таа е одговорна за развојот на сите други клетки, па оттука произлегува дека глутатионот индиректно влијае врз здравјето на сите клетки.

1.6 Витамин Ц – аскорбинска киселина

Хидросолубилниот витамин Ц по структура е лактон изграден од 6 С-атоми. Неговата биосинтеза се одвива по различни патеки кај растенијата и кај одредени видови цицачи. Гликозата е појдовно соединение за *de novo* синтеза

на витаминот Ц во црниот дроб кај повеќето видови цицачи, но не и кај луѓето, приматите и кај заморчињата, бидејќи во текот на еволуцијата се случила инактивациска мутација на ензимот глуконолактон оксидаза (Nishikimi et al., 1994). Витаминот Ц дејствува како кофактор на ензимите кои ги катализираат биосинтетските патеки за синтеза на колагенот, карнитинот и на невротрансмитерите (Arrigoni & De Tullio, 2002; Gershoff, 1993; Levine, 1986), а исто така има придонес во синтезата на NO во васкуларните ендотелни клетки и на тој начин посредува во вазодилатацијата (Smith et al., 2002). Не помалку е важно неговото учество во конверзија на инактивните прекурсори во активни хормони и има улога во катаболизмот на тирозинот. Витаминот Ц е важен регулатор на интестиналната апсорпција на железото бидејќи се јавува како донор на електрон кој врши редукција на фери Fe^{3+} -форма во феро Fe^{2+} -форма, која е погодна за апсорпција.

1.6.1 Витаминот Ц како антиоксидант

Витаминот Ц е моќен неензимски антиоксидант способен да реагира со широк спектар на биолошки оксиданти и тој ги инхибира создавањето липидна и протеинска пероксидација (Carr & Frei, 1999) и консеквентното оштетување на ДНК (Fraga et al., 1991). Диетите богати со витамин Ц го намалуваат оксидативното оштетување (McCall & Frei, 1999) и ја редуцираат фреквенцијата на заболувањата и на патолошките состојби поврзани со стареењето (Barja, 1996). Антиоксидативните својства на витаминот Ц се должат на неговата способност да оддаде два електрони и затоа е силен редуцирачки агенс. OH-групите на 2-C и 3-C атомите можат да ги оддадат водородните атоми на широк спектар оксиданти како ROS, RNS, пероксидите (Buettner & Jurkiewicz, 1993). Електроните што ги оддава аскорбинската киселина ги примаат слободните радикали, се редуцираат и се спречува други клеточни компоненти како липидите, протеините, ДНК да бидат оксидирани. Честичката која се формира кога аскорбинската киселина ќе оддаде еден електрон се нарекува семидехидроаскорбинска киселина, монодехидроаскорбинска киселина или аскорбил радикал и таа поседува еден неспарен електрон.

Оваа честичка, исто така, претставува слободен радикал, но во споредба со другите слободни радикали, семидехидроаскорбинската киселина е многу понереактивна, релативно стабилна со полуживот од 10^{-5} секунди и може да биде детектирана и во 10 nM концентрација во биолошките течности (Coassin et al., 1991; Mehlhorn, 1991; Buettner & Jurkiewicz, 1993). Кога аскорбил радикалот ќе оддаде и втор електрон, се формира честичка наречена дехидроаскорбинска киселина, чија стабилност зависи од температурата и од pH (Насиџевки, 2012). Формирањето на аскорбил радикалот и на дехидроаскорбинската киселина е условено од широкиот спектар оксиданти во биолошките системи. Со дејствување на редуцирачките агенси во биолошките системи како што се GSH, NADH и NADPH, аскорбил радикалот и дехидроаскорбинската киселина можат да бидат повторно редуцирани во аскорбинска киселина. Кај човекот постои само парцијална редукција до аскорбинска киселина и речиси целата оксидирана аскорбинска киселина не се редуцира повторно. Ако дехидроаскорбинската киселина не се редуцира повторно до аскорбинска киселина, иреверзибилно се хидролизира до 2,3-дикетогулонска киселина, која понатаму се метаболизира до ксилоза и оксалат. Аскорбинската киселина како донор на електрони може да редуцира и некои од другите антиоксиданти и со тоа да врши нивна регенерација. Пример за ова е регенерацијата на α -токоферолот како антиоксидант во биолошките системи, при што аскорбинската киселина му донира водороден атом на α -токоферолот (слика 14):



Слика 14. Регенерација на токоферолот со аскорбинска киселина
Figure 14. Regeneration of tocopherol with ascorbic acid (www.researchgate.net)

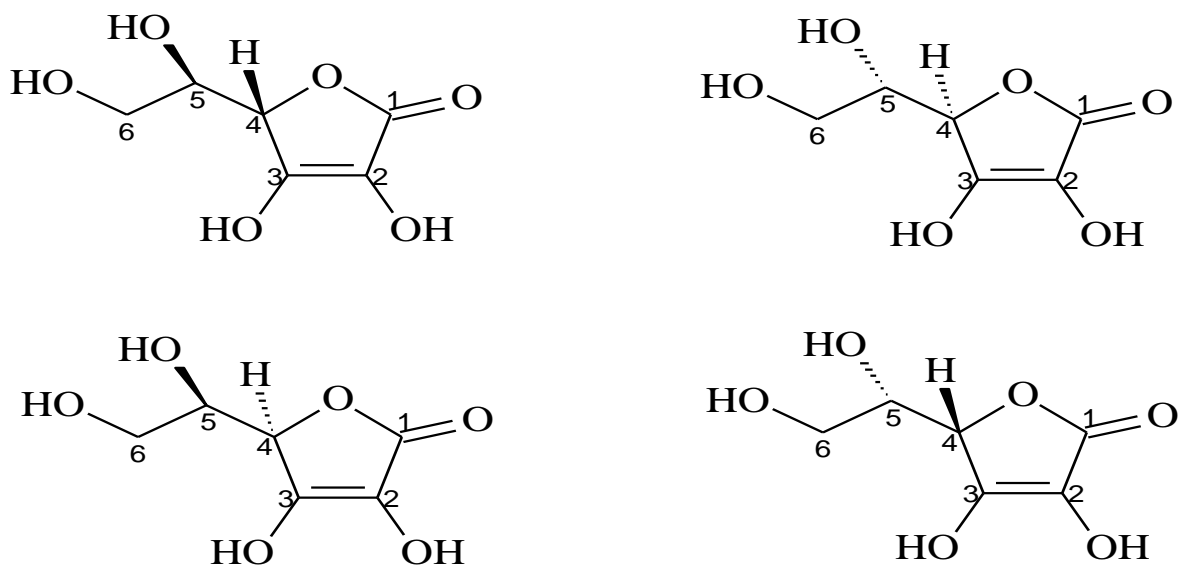
Витамином Ц го регенерира витаминот Е директно, а тиолните антиоксиданти, каков што е глутатионот (GSH), го регенерираат индиректно преку дејствување на витаминот Е.

1.6.2 Витамин Ц – својства и примена

Голем број истражувања покажуваат дека аскорбинската киселина е важна антиоксидативна молекула. Аскорбинската киселина, почесто среќавана како витамин С, содржи ендиолна група вградена во рамките на петчлениот лактонски хетеропрстен.

Важно е да се прегледаат сите енантиомерни форми на ова соединение (слика 15). Конкретно, само два од четирите можни стереоизомери ги нарекуваме аскорбинска киселина (SR и RS). Преостанатите две комбинации даваат соединение наречено изоаскорбинска киселина. Логично е постоењето на четири стереоизомери (претставени на слика 15), имајќи предвид дека во структурата се содржани два стереогени центри:

- L – аскорбинска киселина (4S,5R), претставена на слика 2 горе лево;
- D – аскорбинска киселина (4R,5S), претставена на слика 2 горе десно;
- L – изоаскорбинска киселина (4S,5S), претставена на слика 2 долу лево;
- D – изоаскорбинска киселина (4R,5R), претставена на слика 2 долу десно.



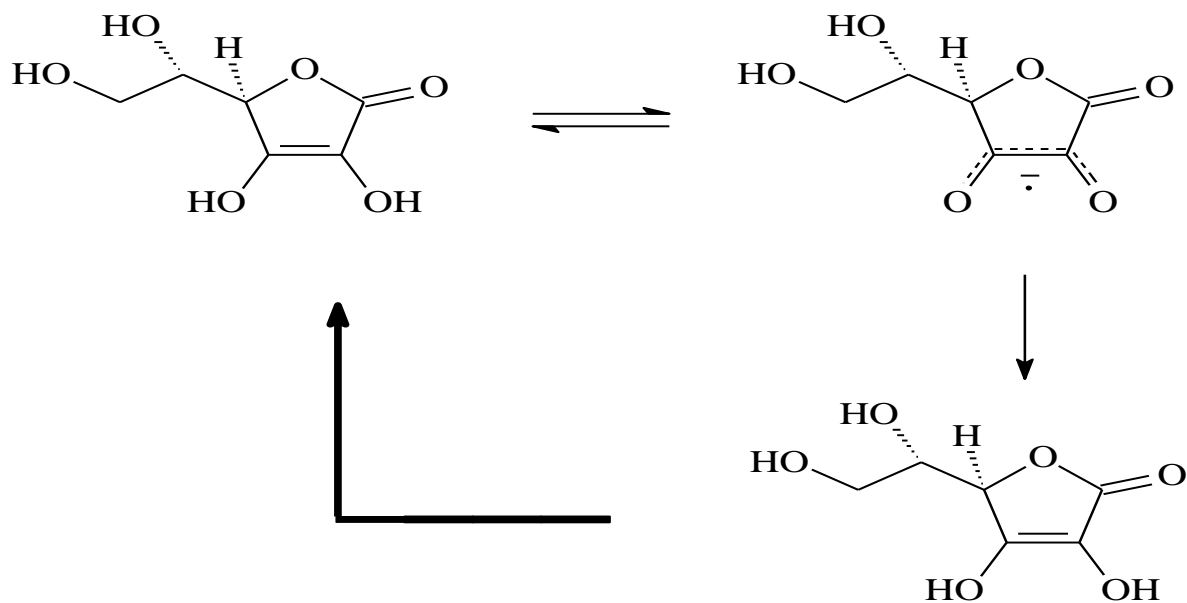
Слика 15. Четирите стереоизомери на аскорбинската киселина
 Figure 15. The four stereoisomers of ascorbic acid (www.drrathresearch.org)

Слично на глутатионот, аскорбинската киселина содржи редокс-активни центри во својата структура, поточно ендиолната група која лесно може да премине во својот дикето аналог – дехидроаскорбинската киселина (слика 16).



Слика 16. Структурна формула на аскорбинската киселина (лево) и на дехидроаскорбинската киселина (десно)
 Figure 16. Structural formula of ascorbic acid (left) and dehydroascorbic acid (right) (www.en.wikipedia.com)

Всушност, оксидацијата на аскорбинската киселина се одвива во два еднелектронски чекори преку аскорбатен радикал како интермедиер (слика 17).

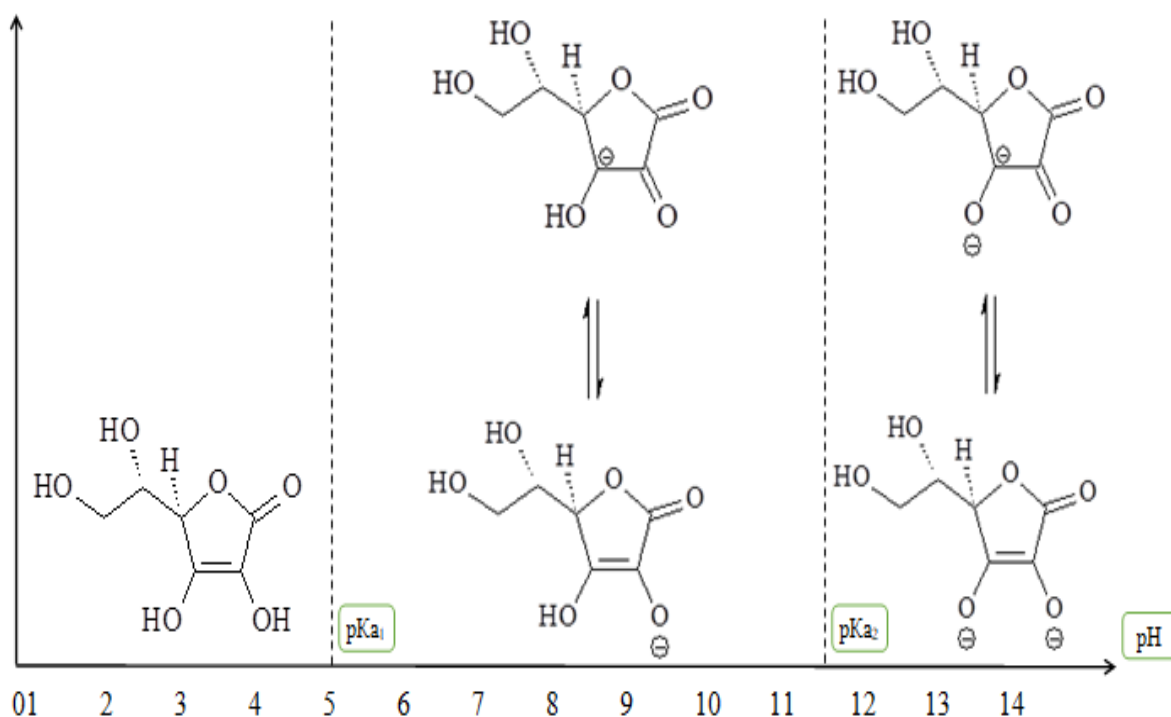


Слика 17. Редокс-процеси кои се случуваат со аскорбинската киселина
 Figure 17. Redox reactions that occur with ascorbic acid (www.researchgate.net)

Кога веќе се наоѓа во оксидираната форма, витаминот С може да биде вратен во својата редуцирана форма со помош на редуктори посилни од него. Глутатионот ги задоволува овие услови.

Наведените редокс-особини на аскорбинската киселина ја прават да се употребува и во други сфери од оние наведени кај глутатионот. Имено, постојат наоди кои говорат за успешното влијание на аскорбинската киселина врз растењето и развојот на растенијата, а главниот претпоставен механизам се базира на надоместување на антиоксидативните резерви кои се трошат во растението при допир со оксидантите од фотохемискиот смог (Foyer & Shigeoka, 2002).

Аскорбинската киселина поседува два кисели протони, односно дисоцира во два чекори, во зависност од рН на средината во која се наоѓа. Од слика 18 може да се види дека при физиолошка рН, доминантна форма е хидроген аскорбатот. Независно од рН на средината, и аскорбинската киселина, и аскорбатот, и хидрогенаскорбатот се редокс-активни.



Слика 18. Различни облици на аскорбинската киселина при различна вредност на pH

Figure 18. Different forms of ascorbic acid at different pH values (www.researchgate.net)

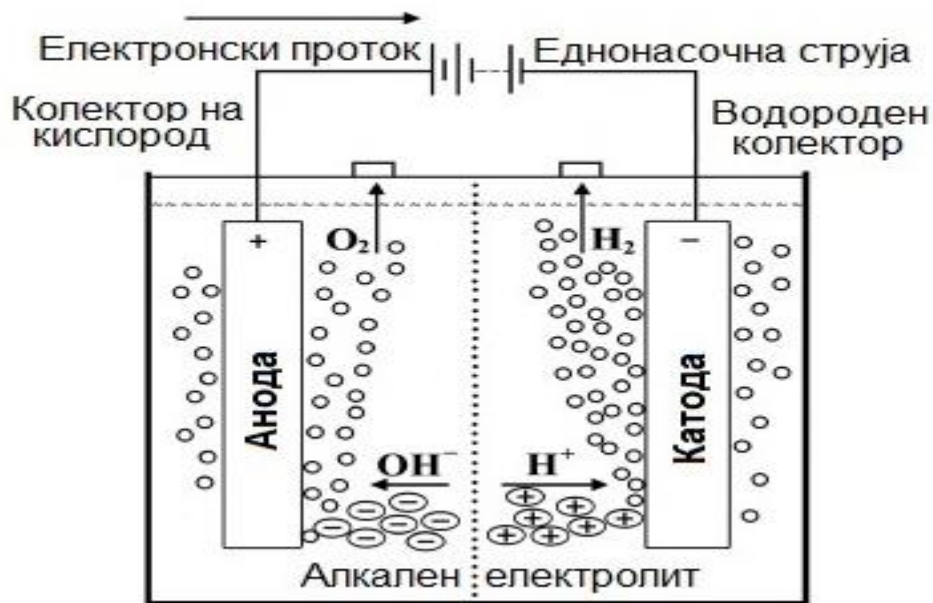
1.7 Јонизирана вода – електрохемиски редуцирана вода (ERW)

Јонизираната вода, односно електрохемиски редуцираната вода (англ. назив: electrochemically reduced water – ERW) е релативно стар, но недоволно истражен продукт. Првите истражувања во врска со добивањето и својствата на ERW датираат уште од далечната 1931 година, кога во Јапонија се правеле напори за испитување на нејзината активност како редуктор. Малку подоцна, околу 1960 година започнува и употребата во сферата на здравствената заштита, а во 1966 Министерството за здравство на Јапонија ја прогласува за ефективна против дијареја, проблеми со дигестијата, желудочни киселини, дијабетес и сл., со што таа за првпат станува и комерцијален продукт (Arrigoni & De Tullio, 2002). ERW не се среќава секаде под истото име, па често се употребуваат и називите: алкална вода, алкализирана редуцирана вода, алкална јонска вода, алкална катодна течност – католит и електролизирана редуцирана вода.

Според релативно поновите трудови (Guyton & Hall, 2005), ERW поседува алкална рН-вредност во интервалот од 8 до 10, има негативен стандарден редокс-потенцијал и е богата со редуцирани водородни формации од видот на молекуларен водород, водородни атоми и метални хидриди. Поради присуството на редуирачки својства, електрохемиски редуцираната вода покажува значителна активност во елиминирањето на реактивните кислородни радикали со кои доаѓа во контакт, како што се хидрокси радикалот, пероксидните радикали, па и некои супероксидни честички.

Кога беше споменато, ERW се среќава и под името алкална вода. Притоа, битно е да се напомене дека ваквиот назив не е сосема прецизен и може да доведе до забуни. Имено, ERW, покрај алкалната рН, содржи и многу редуирачки особини, т. е. има изразени редокс-својства, па не може ниту приближно да биде споредена со простите алкални раствори од неорганската хемија (на пример, NaOH(aq)).

Јонизирана или редуцирана вода претставува електрохемиски активирана вода со рН-вредност поголема од 7. Електрохемиски редуцираната вода (ERW) се продуцира во близина на анодата, додека електрохемиски оксидираната вода т.н. кисела вода, се создава во близина на катодата (Shirahata et al., 2012a). Електрохемиската активација на водата се врши со посебен вид електролиза (слика 19), во чијашто основа се наоѓа движењето на OH⁻-анјоните од водата кон позитивно наелектризираната електрода (анодата) и движењето на H⁺-катјоните кон негативно наелектризираната електрода (катода). Страничен продукт на електрохемиската активација на водата, покрај алкалната вода која е особено препорачлива за консумирање, се добива т.н. кисела вода, која има антибактерицидни својства. Таа не е погодна за пиење, но е особено корисна за надворешна употреба поради нејзините особини на стерилизатор (Bari et al., 2003).



Слика 19. Приказ на процесот на добивање електрохемиски редуцирана вода
 Figure 19. An overview of the process of obtaining electrochemically reduced water
 (www.researchgate.net)

Еден од механизмите на генерирање на ERW (Shirahata et al., 2018) сугерира потреба од висок приложен напон помеѓу анодата и катодата (во интервал од 110 до 250 волти) во услови кога водата не содржи електролити. Ваквата поставеност овозможува генерирање на силно електрично поле околу електродите, кое генерира голем број позитивно наелектризирани честички во регионот околу катодата, а вишок негативни честички во растворот околу анодата. За споредба, доколку во водата се наоѓаат растворени електролитни супстанции, тогаш не би настанала поларизација на растворот, туку би се случувала само обична електролиза. Во регионот околу катодата, високиот приложен електроден напон доведува до редукција на водородните јони, при што се генерираат споменатите водородни молекули, атоми и хидриди. Со оглед на тоа што приносот на водородниот гас е мал (визуелна перцепција), се претпоставува дека уделот на генерираните молекули на H_2 е значително помал отколку оној на генерираните водородни атоми и хидриди. Со цел да се издвои ERW од преостанатата смеса, се поставува физичка препрека во регионот околу катодата и се собира течноста додека растворот е сè уште поларизиран, т. е. додека е воспоставен електричниот напон. Поради тоа што се генерира околу катодата, ERW ја среќаваме и под името католит.

Оригинален механизам на генерирање ERW претставуваат авторите Погорелови (Pogorelov, 2018), според кои, за да се добијат редуцирачките честички со поголем принос, потребно е катодата да биде изработена од титаниум обложен со платина. Во услови на висок приложен напон, дел од платината преоѓа во растворот во вид на колоидни наночестички, кои понатаму служат како депо на кое се нафаќаат генерираните редуцирачки водородни видови. Големiot сооднос гранична површина : волумен на диспергираните платински наночестички дозволува голем број нафатени редуцирачки видови по единица волумен раствор. На овој начин, ERW поседува значително количество на антиоксидативни честички, кои понатаму имплицираат примена во голем број здравствени сегменти. Како и да е, сè уште не се доволно познати интеракциите на ERW со клеточните сидови, па во некои ткива е можно да не се манифестира целосно редокс-ефектот.

Во својот труд, Погорелови покажуваат дека електрохемиски редуцираната вода придонесува за делумно компензирање на ефектите од оксидативниот стрес предизвикан со додавање водород пероксид на испитуваните ткива. Тие го истражуваат дејствувањето на ERW при различни рН-вредности, со користење различни пуфери. Така, при различни вредности за рН на средината, индексот на оксидативната активност на растворот (rH_2) може да биде точно пресметан со емпириски изведената релација:

$$rH_2 = A (E + \Delta) + 2pH,$$

каде што E е измерениот потенцијал на катодата, Δ е фактор на корекција во однос на референтната електрода (200 mV за Ag, AgCl-електрода во заситен KCl). A претставува коефициент на пропорционалност, а во случајов изнесува 0,026 mV⁻¹, за индексот на оксидативна активност да биде бездимензионална величина. Од релацијата директно се воочува дека поголема активност ќе имаат оние раствори со алкална рН-вредност, и тоа за неколку единици во однос на соодветните кисели раствори.

Примената на ERW веќе може да се претпостави имајќи ги предвид наведените својства и механизми на добивање. Поради својот негативен стандарден редокс-потенцијал и богатството од редуцирани водородни видови, ERW се покажала како ефикасен третман во спречувањето и во лекувањето

проблеми поврзани со оксидативниот статус на организмот. На овој начин, електрохемиски редуцираната вода е многу ефективна во елиминирањето на слободните кислородни радикали, кои во контакт со ткивата предизвикуваат штети, како што се оштетување на ДНК, формирање локализирани депозити од оксиданти, иницирање рак, но и инхибирање на брзината на мултипликација на канцерогените клетки (Ye et al., 2008).

Проблемот што настанува кога реактивните кислородни радикали ќе дојдат во контакт со ткивата не е предизвикан само од директната штета што ја нанесуваат тие, туку и од индиректното формирање секундарни радикали во другите делови од телото, кои, пак, можат да оштетат и други органи. Болестите како Алцхајмерова болест, Паркинсонова болест, артериосклероза, висок крвен притисок и проблемите со срцето се предизвикани од нападите на секундарните радикали. Така, со внесување на ERW човекот уште на почетокот ја намалува количината на реактивните кислородни радикали, а со тоа и количината на генерираните секундарни радикали.

Електрохемиски активираната вода е во фокусот на научниот интерес во последниве десетина години поради нејзината способност за алкализација на човечкиот организам, како и поради нејзиниот антиоксидациски ефект, а оттука се мисли дека има и висок потенцијал за заштита од најтешките канцерогени заболувања (Shirahata et al., 2012b; Yan et al., 2011). Алкалната редуцирана вода се смета за главна безбедносна стратегија во справувањето со експериментално индуцираната метаболичка ацидоза кај животни (Abol-Enien et al., 2009). ERW има хепатопротективно дејство во CCl₄-индуцираното оштетување на црниот дроб кај стаорци (Tsai et al., 2009). Клиничките податоци сугерираат дека ERW ја подобрува состојбата кај болестите поврзани со оксидативниот стрес, како што се канцерот, дијабетесот, атериосклерозата, неуродегенеративните болести итн. (Hayashi & Kawamura, 2002). Исто така, докажано е дека ERW ги неутрализира ROS и го инхибира ROS-индуцираното оштетување на ДНК *in vitro* (Shirahata et al., 1997). ERW го супресира растот на канцерогените клетки и на микроорганизмите (Hamasaki et al., 2005; Komatsu et al., 2001).

Друга сериозна придобивка од употребата на ERW е превенцијата и третманот на дијабетес. Во истражувањата на Ширахата (Shirahata et al., 2012a) се истакнува дека електрохемиски редуцираната вода дејствува ефикасно во намалување на нивото на гликоза во крвта, а други истражувања велат дека покрај тоа што ги намалува количините на гликоза во крвта, ERW ги нормализира и другите параметри од крвта, како, на пример, триглицеридите и вкупниот холестерол.

Со оглед на тоа што ERW содржи помали кластери од водни молекули во однос на обичната вода, логично е да се претпостави и дека ERW поефективно дејствува на хидратацијата на организмот. Малите кластери од водни молекули полесно патуваат низ организмот и лесно се апсорбираат. Подетално, истражувањата покажуваат дека ERW содржи кластери кои содржат 4 до 6 молекули вода, наспроти обичната вода, чишто кластери содржат 12 до 14 молекули вода. Така, електрохемиски редуцираната вода веќе станува дел од голем број успешни диети за слабеење, хидратација и за детоксикација на организмот.

1.8 Оксидативни модификации на биолошки важните макромолекули

Слободно може да се каже дека при различни видови индуцирани оксидативни стресни состојби, како што, во нашиот случај, е хипертермичкиот стрес, се предизвикуваат и некои оксидативни модификации на биолошки важните макромолекули како што се протеините, албумините, трансминазите, јаглехидратите, триглицеридите и холестеролот.

Оксидацијата на протеините се дефинира како ковалентна модификација на молекулата индуцирана директно од страна на ROS или индиректно преку реакција со секундарни продукти на оксидативниот стрес. Постојат различни типови на документирани оксидативни модификации на протеините, вклучувајќи оксидација на сулфхидрилните групи, редукција на дисулфидите, оксидативна адукција на аминокиселинските остатоци во рамките на метал-

врзувачките места, реакции со алдехиди, протеин-протеин вкрстени врзувања и фрагментација на пептидите (Stadtman & Levine, 2000).

Протеините се најраспространетата класа на органски соединенија, сочинувајќи повеќе од половина од сувата клеточна маса на телото. Терминот *протеин* доаѓа од латинскиот збор *primarius* или од грчкиот збор *proteus*, кои во превод значат 'го зазема првото место' (Whitford, 2005). Протеините претставуваат високомолекуларни полимери на 20 различни L- α -аминокиселини поврзани ковалентно меѓу себе со пептидни врски. Нивната структура е определена од последователната инкорпорација на аминокиселини, чијшто редослед е детерминиран од секвенца на нуклеотиди од кореспондирачки сегмент на ДНК (Rostom & Shine, 2018). Одреден број аминокиселини можат да бидат синтетизирани во телото (неесенцијални аминокиселини), спротивно на другата група аминокиселини (есенцијални аминокиселини) кои мора да бидат внесени преку исхраната (Emery, 2012).

Бројните биолошки функции кои ги вршат протеините се должат на нивната примарна, секундарна, терцијална и квартерна структура (Lodish, 2008). Протеините имаат голем диверзитет на функции во организмот (Feher, 2017): структурна (клеточна мембрана, кератин, колаген), каталитичка (ензими), заштитна (имуноглобулини), транспортна (хемоглобин, трансферин, албумини), регулаторна (хормони), контрактилна (актин и миозин). Поголемиот дел од своите функции протеините ги вршат циркулирајќи во крвта. Концентрацијата на вкупните протеини во крвната плазма ја опфаќа концентрацијата на специфични протеини со исклучок на фибриногенот и на факторите на коагулација (Naschek et al., 2017). Околу 35 до 50 % од вкупните серумски протеини спаѓаат на албумините и 75 % од колоидната активност ѝ се припишува, исто така, на оваа протеинска фракција. Рамнотежата помеѓу производството на ROS и антиоксидативната одбрана го одредува степенот на оксидативен стрес. Последиците од овој стрес вклучуваат модификација на клеточните протеини, липиди и ДНК. Најшироко проучуваната модификација на протеините предизвикана од оксидативниот стрес е формирањето карбонилни деривати. Ова може да се случи преку различни механизми, вклучувајќи и директна оксидација на страничните синџири на аминокиселините и расцепувањето предизвикано од оксидација. Иако сите органи и сите протеини

потенцијално можат да се модифицираат со оксидативен стрес, одредени ткива и специфични протеински цели можат да бидат особено чувствителни. Една неодамнешна студија покажа дека протеинот со ваков дефект, независно од состојбата на рефлексивната на клетките, ја зголемува протеинската карбонилација (Finkel & Holbrook, 2000).

Албумините се главните модулатори на осмотскиот притисок помеѓу интраваскуларната и екстраваскуларната течност, придонесувајќи приближно 70 до 80 % во вкупниот онкотски притисок на крвната плазма (Caraceni et al., 2013). Тие претставуваат протеин-носач за Ca^{2+} , билирубинот, жолчните киселини (Bertholf, 2014), но и на егзогени супстанции (токсини, лекови), транзициони метали, NO со консеквентна импликација на нивната солубилност, транспорт, метаболизам и детоксикација (Fanali et al., 2012). Продукти од дигестијата и од апсорпцијата на протеините ингестирани од гастроинтестиналниот тракт се најголемиот дел аминокиселините кои преку вена порта се транспортираат до црниот дроб, како главен орган каде што се одвива интензивен метаболизам на аминокиселините. Овие аминокиселини делумно се искористуваат за синтеза на сопствените телесни протеини или понатаму се катаболизираат. Азотот од аминокиселините се преведува во уреа и се излучува преку урината, додека јаглеродородниот синџир подлежи на оксидација до компоненти кои влегуваат во циклус на трикарбонски киселини (TCA) за конечна оксидација до CO_2 и вода. Основна задача на сите метаболички патишта на аминокиселините е да се претворат во интермедиерно соединение погодно за влез во TCA-циклусот и преку тој процес ќе се генерира енергија во форма на ATP. Околу 20 катаболички патишта конвергираат за да формираат 6 главни продукти кои ќе влезат во TCA-циклусот (Lehninger, 2008): ацетил CoA, α -кетоглутарат, сукцинил CoA, фумарат, оксалоацетат и пируват. Аминокиселините што се разградуваат до ацетил CoA се кетогени бидејќи од нив можат да се синтетизираат кетонски тела, додека аминокиселините што се разградуваат до пируват или директно во некој интермедиер на циклусот на лимонската киселина се гликогени бидејќи се конвертираат во гликоза и гликоген преку процесот на глуконеогенеза (Ligthart-Melis & Deutz, 2011).

Се смета дека целокупното количество на слободни аминокиселини дистрибуирани во крвта и во другите телесни течности, како и во клетките (интрацелуларно), формираат „аминокиселинска резерва или фонд“ (pool). Во овој фонд аминокиселините непрекинато се додаваат и од него се користат, т. е. се трошат, така што се задржуваат на релативно константно ниво, при што аминокиселините не се складираат во организмот (Dzekova-Stojkova, 2006). Главните патишта за снабдување на фондот се: аминокиселините ресорбирани од дигестивниот тракт по дигестија на протеинска храна, синтезата на неесенцијални аминокиселини и аминокиселини добиени при разградба на синтетизираните протеини. Метаболичката судбина на апсорбираните аминокиселини може да биде (Dzekova-Stojkova, 2006):

I. Учество во анаболички процеси, односно биосинтеза на:

1. структурни и на функционални протеини и пептиди (трипептидот GSH);
2. јаглехидрати преку процесот на глуконеогенеза користејќи го јаглеродородниот скелет на аминокиселините;
3. липиди преку искористување на ацетилните остатоци на некои аминокиселини;
4. непротеински азотни соединенија (уреа, креатинин, креатин, пурини, пиримидини, хормони, неуротрансмитери, ниацин итн.).

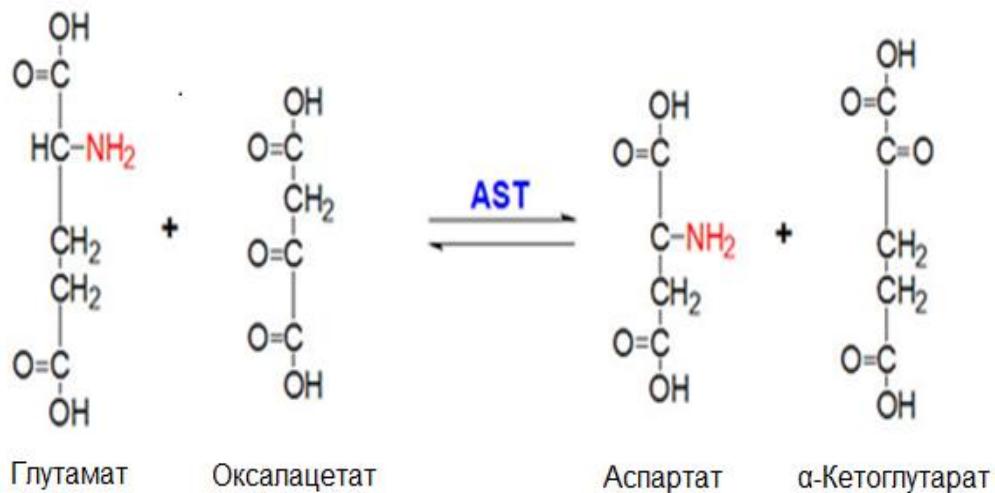
Синтезата на креатинот се одвива супсеквентно во црниот дроб, бубрезите и во панкреасот и бара достапност на аминокиселините глицин, аргирин и метионин. Креатинот и креатин фосфатот неензимски се конвертираат во креатинин во мускулните клетки (Brosnan et al., 2011).

II. Катаболизам на самите аминокиселини преку процесите на:

1. декарбоксилација – процес на одвојување на карбоксилната група во форма на CO₂;
2. трансаминација – процес на пренос на amino-група од аминокиселини како донатори на α-кето киселини како акцептори, при што се формираат нови аминокиселини.

Реакциите на трансаминација се реверзибилни во организмот, важни за интерконверзија на аминокиселините и за синтеза на неесенцијалните аминокиселини. Процесот е катализиран со ензимите аминотрансферази, кои

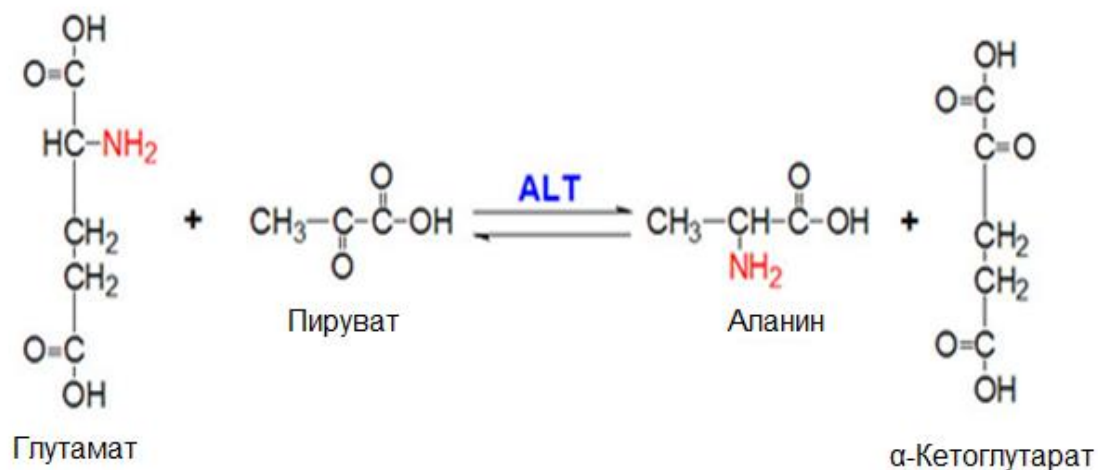
како коензим содржат пиридоксал фосфат. Во организмот, две најраспространети трансферази се аспартат аминотрасфераза (AST) и аланин аминотрансфераза (ALT). AST (L-аспартат-2-оксоглутарат-аминотрансфераза), ја катализира реверзибилната реакција на трансминација помеѓу L-аспаргинската киселина и 2-оксоглутарната киселина (слика 20):



Слика 20. Реверзибилна деаминација на L-аспарагинската киселина
Figure 20. Reversible deamination of L-aspartic acid (www.bionfo.org)

AST го има најмногу во црниот дроб, срцевиот мускул и во скелетните мускули. Во помали каталитички концентрации е застапен во низа други ткива и телесни течности. AST го нема единствено во коските и во забите. Ензимот во клетките е локализиран околу 40 % во цитоплазмата и 60 % во митохондриите.

ALT (L-аланин-2-оксоглутарат-аминотрансфераза) ја катализира реверзибилната реакција на трансминација помеѓу L-аланинот и 2-оксоглутарната киселина (слика 21):



Слика 21. Реверзибилна трансминација на 2-оксоглутарна киселина
 Figure 21. Reversible transamination of 2-oxoglutaric acid (www.bionfo.org)

Овој ензим е локализиран во цитоплазмата на клетките, а се наоѓа речиси во сите клетки и ткива со исклучок на коските и на забите. Најмногу го има во црниот дроб, а потоа во скелетните мускули, срцето, бубрезите, панкреасот, еритроцитите итн.

3. Дезаминација (оксидативна и неоксидативна) – процес на ослободување на азотот од α-амино-групата во форма на амонијак.

Поради големата токсичност, амонијакот во крвта мора да се одржува во трагови. Копнените животни го детоксицираат амонијакот преку конверзија во уреа, соединение кое се излучува со урината во процес наречен Кребс-Хеселајтов (Krebs-Henseleit) орнитински циклус за синтеза на уреа, кој се одвива во митохондриите и во цитоплазмата на хепатоцитите (Berg et al., 2002). Во текот на овој циклус уреата се синтетизира од две молекули амонијак и една молекула CO₂. Уреата претставува краен метаболички продукт на катаболизмот на протеините и на аминокиселините, односно краен производ на азотниот метаболизам.

Гликозата е најефикасното клеточно гориво со чие оксидациско разложување се продуцираат повеќе АТФ-молекули на mol O₂ во споредба со другите енергетски ресурси (липиди и протеини). Освен тоа, таа е и уникатен супстрат поради фактот што и при клеточен дефицит на O₂, со нејзиното разложување може да се продуцира доволно АТФ за нормално одвивање на

животните процеси во клетката (Bouche, 2004). Се покажа дека хиперпродукцијата на ROS под високи услови на гликоза резултира со слабеење на антиоксидантните механизми во ендотелните и на мезангијалните клетки. Високото ниво на гликоза ја намалува дозата на глутатион на GPx и ја вклучува редукцијата на активноста на гама-глутамилцистеин синтетаза, како и намалувањето на NADPH-снабдувањето со редокс-циклусот на глутатионот. Додавањето антиоксиданти го менува негативното дејство на високите нивоа на гликоза врз протеините на екстрацелуларниот матрикс и врз клеточниот раст (Tanaka et al., 2002).

Како резултат на бис-алилните структури на полинезаситените масни киселини, липидите се една од најосетливите цели на радикалниот напад посредуван од ROS, познат како процес на липидна пероксидација. Секогаш кога ќе биде инициран, овој самопропагирачки процес се одвива во континуитет сè дури не бидат продуцирани терминирачки продукти или дури тој не се запре со дејство на антиоксиданти (Gutteridge and Halliwell, 1990). Ако зголемувањето на слободните радикали е поголемо од способноста за нивно неутрализирање, радикалите ќе ги напаѓаат клеточните компоненти, особено липидите. Нападот врз липидите иницира верижна реакција наречена липидна пероксидација, што доведува до генерирање повеќе радикали и ROS, кои можат да им наштетат и на другите клеточни компоненти (Urso & Clarkson, 2003).

2. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО

Според голем број досегашни истражувања и сознанија, утврдено е дека киселата средина на телесните течности во организмот е главната причина за многу заболувања, како и за канцерот. Д-р Ото Варбург (Otto Warburg), добитник на Нобелова награда во 1931 година за откритија поврзани со канцерот, истакнал дека ниедна болест, вклучувајќи го и канцерот, не може да опстои во алкална средина и во средина богато снабдена со кислород, но, од друга страна, во кисела средина и во средина слабо снабдена со кислород канцерот многу добро се развива. Со алкализација на организмот се придонесува за подобро функционирање на сите клетки и за подобро одвивање на метаболичките процеси.

Целите на нашето истражување произлегоа од нашите претпоставки дека преку консумирање јонизирана, односно електрохемиски редуцирана вода ќе се збогати алкалната резерва во организмот. Акцентот на ваквото својство на јонизираната вода, односно на електрохемиски редуцираната вода (ERW) го ставивме во услови на изложеност на организмот на висока надворешна температура како стресоген фактор. Во литературата постојат многубројни студии кои ги објаснуваат механизмите на генерирање оксидативен стрес во организмот во услови на нивно хипертермичко експонирање. Нашите очекувања беа базирани на податокот дека јонизираната вода (ERW), со своето дејствување како антиоксидант, ќе ја зголеми ефективноста во редуцирање на оксидативниот стрес и ќе ја засили термотолерантноста на самиот организам.

Користејќи три групи стаорци (контролна група, група третитана со јонизирана вода и група третирана со јонизирана вода, глутатион и витамин Ц), нашата цел беше да ги испитаме, во однос на третманот и на времето, следните параметри:

1. Клеточниот антиоксидативен потенцијал кај сите стаорци преку определување на промените на активноста на ензимите:
 - супероксид дизмутаза,
 - каталаза,
 - глутатион пероксидаза,

- глутатион редуктаза,

во однос на видот и на времетраењето на третманот, како и во зависност од акутното хипертермичко експонирање на експерименталниот модел во крвниот серум, крвната плазма, црниот дроб и во бубрезите.

2. Да го испитаме ефектот на соодветниот третман кај секоја група во нормална и во хипертермна средина врз концентрацијата на група биохемиски параметри: вкупните протеини, албумините, AST, ALT, холестеролот, триглицеридите, уреата, креатининот и гликозата во крвниот серум.
3. Временскиот интервал за кој стаорците ќе почнат да влегуваат во фаза на секундарна хипертермија при експозиција на висока амбиентална температура.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

3.1 Експериментален модел

Сите експериментални процедури беа изведени во согласност со Прирачникот за грижа и употреба на лабораториски животни одобрен од страна на македонскиот Центар за биоетика. Протоколите беа одобрени од страна на Етичкиот комитет за животни на Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје, според препораките за биомедицински истражувања кои вклучуваат животни издадени од страна на Советот на интернационални организации за медицински науки. Анестетиците беа аплицирани во согласност со препораките дадени во упатството од Директивата на Европската комисија за благостостојба 86/609/ЕЕС.

Како експериментален модел беа користени бели лабораториски стаорци од сојот *wistar* од женски пол, со телесна тежина од 180 до 220 грама, поделени во три групи (по 15 животни, $n = 45$) за аплицирање на соодветен третман. За време на експериментот животните претстојуваа на собна температура 20 ± 2 °C, при светлосен режим 12 : 12 часа. На сите животни вклучени во експериментот им беше давана стандардна лабораториска храна и вода *ad libitum*.

Третираните стаорци беа поделени во 3 различни групи. Првата група ја сочинуваа стаорци кои пиеја комерцијална минерална вода, втората група стаорци пиеја електрохемиски редуцирана вода со $pH = 9,4$ (мерено веднаш пос активирањето на водата), додека третата група стаорци пиеја електрохемиски редуцирана вода ($pH = 9,4$) во која по активирањето на водата се додадени водни раствори на аскорбинска киселина и на глутатион со тоа што крајната концентрација на овие биомолекули во водата изнесуваше 10^{-5} mol/dm^3 ($c(\text{AA}) = 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{GSH}) = 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$). Активирањето на водата се правеше со алкализер од компанијата „Burbuliukas ir CO“ LTD.

Експерименталните групи од по 15 животни беа организирани и обележани на следниот начин:

1. Прва група животни (КПМ) – тие во текот на целиот експериментален период беа под горенаведените услови и во понатамошниот текст ќе бидат споменувани како контролна група која ќе прима само вода.
2. Втора група животни (ТАД) - тие во текот на целиот експериментален период беа под горенаведените услови и беа третирани со јонизирана вода.
3. Трета група животни (ТАМ) – тие беа одгледувани под истите експериментални услови и беа третирани со јонизирана вода збогатена со глутатион и витамин Ц.

3.2. Експериментален протокол

Трите групи стаорци во експериментален период во времетраење од 21 ден, секојдневно во утринските часови беа третирани со соодветно модифицирана природна вода. Контролната група во наведениот период добиваше само природна вода. Двете други групи, соодветно, примаа јонизирана вода (ERW, алкална вода) и јонизирана вода со додадени глутатион и витамин Ц. Ваквиот вид функционална вода беше подготвувана во порции на секои три дена во Институтот за хемија при Природно-математичкиот факултет во Скопје. Водата беше аплицирана интрагастрално во волумени од по 2 ml. Примероците за анализа на одбраните параметри беа земени на 7., 14. и 21. ден од третманот. Потребната крв за анализа на 7. и на 14. ден беше земена од опашката на стаорците и беше колекционирана во соодветно обележани епендорфи. Крвниот серум за анализа се добиваше по 5 минути центрифугирање на 1 500 rpm и тој беше замрзнат на -80 °C за потребните анализи.

Пет часа по добивањето на соодветниот третман на 21. ден, животните од соодветните групи беа изложени на хипертермна средина до постигнување на фазата на секундарна хипертермија (телесна температура од 43 °C).

Експозицијата се изведуваше индивидуално во клима-комори на 40 ± 1 °C во времетраење од 80 минути. За време на хипертермичката експозиција беше следена и ректалната температура. Телесната температура беше мерена на секои 20 минути, а 10 минути по последното мерење животните беа жртвувани преку поткожно аплицирање на 3 ml тиопентал. Крвта беше земена од абдоминалната аорта. Добиениот крвен серум понатаму беше аликвотиран и замрзнат на -80 °C до понатамошните анализи.

3.3. Испитувани параметри

Во рамките на ова истражување беа испитувани следните параметри:

- активноста на SOD во крвниот серум, крвната плазма, црниот дроб и во бубрезите;
- активноста на CAT во крвниот серум, крвната плазма, црниот дроб и во бубрезите;
- активноста на GPx во крвниот серум, крвната плазма, црниот дроб и во бубрезите;
- активноста на GR во крвниот серум, крвната плазма, црниот дроб и во бубрезите;
- концентрацијата на вкупните протеини во крвниот серум;
- концентрацијата на албумините во крвниот серум;
- активноста на AST во крвниот серум;
- активноста на ALT во крвниот серум;
- концентрацијата на уреата во крвниот серум;
- концентрацијата на креатининот во крвниот серум;
- концентрацијата на холестеролот во крвниот серум;
- концентрацијата на триглицеридите во крвниот серум;
- концентрацијата на гликозата во крвниот серум;
- промената на телесната температура во текот на акутната хипертермичка експозиција.

3.4. Одредување на концентрацијата на вкупните протеини

Принцип на методата

Колориметриското одредување на вкупните протеини се базира на биуретната метода. Азотните атоми инволвирани во пептидните врски на протеините во алкален медиум се врзуваат за Cu^{2+} -јоните, при што тие се редуцираат до Cu^+ и се формира виолетов хелат. Интензитетот на виолетовото обојување апсорбирано на 540 nm е пропорционално со концентрацијата на протеини во примерокот. Формирањето на Cu^+ -протеинскиот комплекс бара присуство на најмалку две пептидни врски и затоа биуретната метода е негативна за дипептидите кои содржат една пептидна врска. Методата на Лори (Lowry) е модификација на биуретната метода со повисока сензитивност за детекција на пониски концентрации на протеини во примерокот. Првиот чекор од методата на Лори е идентичен со оној од биуретната метода, додека во втората етапа се додава оксидирачкиот агенс Folin-Ciocalteu. Двете ароматични аминокиселини тирозин и триптофан, цистеинот и Cu^+ -јонот подлежат на оксидација и го редуцираат реагенсот Folin до сино обојување, чиј интензитет може да се прочита на бранова должина од 650 до 750 nm.

Тест-процедура

На порциите крвен серум се додава биуретен раствор А (0,027% $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ и 2-процентна Na_2CO_3 во 0,1 mol NaOH и на тоа се додава 1 ml 1-процентна $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). По точно 10 минути се додава раствор В (реагенс Folin-Ciocalteu разреден во сооднос 1 : 1 со дејонизирана вода). Интензитетот на обојување се мери на бранова должина од 660 nm. Како стандарден раствор се користи говедскиот серум албумин (BSA), од кој се прават серија разредувања со цел да се формира стандардна крива.

Во епруветите се пипетира според следната шема:

	Слепа проба	Стандард	Анализа
Биуретен реагенс	1000 μ l	1000 μ l	1000 μ l
Стандарден раствор	-	20 μ l	-
Примерок	-	-	20 μ l

Се меша и се инкубира 10 минути на 20 до 25 °C. Апсорбанцата на анализата и стандардот се мерат наспроти слепата проба.

3.5. Одредување на концентрацијата на албумините

Принцип на методата

Албумините од примерокот во кисел медиум реагираат со бромокресол зелено и формираат обоен комплекс кој може спектрофотометриски да се мери.

Состав на реагенсот

Реагенс 1: ацетатен пуфер 100 mmol/L, бромокресол зелено 0,27 mmol/L, pH = 4,1.

Реагенс 2: албумин стандард со дадена концентрација, BSA.

Тест-процедура

Пипетирањето се прави според следната шема:

	Стандард	Анализа
Работен раствор	1000 µl	1000 µl
Стандарден раствор	10 µl	-
Примерок	-	10 µl

За слепа проба се прави отчитување на чист реагенс 1. Откако ќе се стават реагенсите во киветата, се промешува и се чита апсорбанцата на 630 nm.

Калкулација

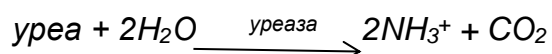
Концентрацијата на албумини се пресметува со користење на следната генерална формула:

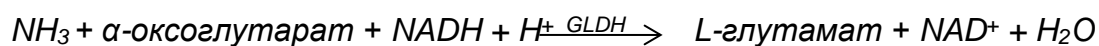
$$A_{\text{примерок}} / A_{\text{стандард}} \times C_{\text{стандард}} = C_{\text{примерок}}$$

3.6. Одредување на концентрацијата на уреата

Принцип на методата

Уреазата ја катализира хидролизата на уреата, при што се формира амонијак и јаглерод диоксид. Амонијакот во присуство на NADH реагира со α -оксоглутаратот, во реакција која е катализирана од ензимот глутамат дехидрогеназа (GLDH) сè до формирање глутамат. При оваа реакција еквимоларно количество на NADH се оксидира, при што намалувањето на апсорбанцата на 340 nm е директно пропорционално со концентрацијата.





Тест-постатка

Работниот раствор се подготвува на тој начин што се мешаат 4 волумени раствор 1 и 1 волумен раствор 2. Растворот 1 содржи 6 mmol/L α -оксоглутарат и уреаза (75 U/L) растворени во трис-пуфер (Tris) со pH 7,8. Раствор 2 претставува ензимски реагенс кој содржи GLDH (60 U/L) и 0,32 mmol/L NADH. Како стандард се користи раствор на уреа со концентрација од 8,3 mmol/L. Од стандардот се прават серија разредувања за формирање стандардна крива.

Во анализата и стандардот се пипетира според следнава шема:

	Стандард	Анализа
Стандарден раствор	30 μ l	-
Примерок	-	30 μ l
Работен раствор	1000 μ l	1000 μ l

Откако ќе се стават реагенсите во киветата, се помешува и се чита апсорбанцата на 340 nm по 30 секунди (A_1) и по 90 секунди (A_2). За слепа проба се користи отчитување наспроти воздух.

Калкулација

Се пресметува $\Delta A = A_1 - A_2$

$\Delta A_{\text{примерок}} / \Delta A_{\text{стандард}} \times C_{\text{стандард}} = C_{\text{примерок}}$

3.7. Одредување на концентрацијата на креатининот

Принцип на метада

Креатининот реагира со алкален пикрат, при што се формира комплекс од портокалово-црвена боја кој апсорбира светлина на 492 nm. Интензитетот на обојувањето е пропорционален со концентрацијата на креатининот во примерокот.

Тест-постапка

Се меша 1 волумен на 35 mmol/L пикринска киселина со 1 волумен на 0,32 mol/L натриум хидроксид. Од стандардниот раствор се прават серија разредувања со цел да се формира стандардна крива. Се пипетира според следнава шема:

	Стандард	Анализа
Работен раствор	1000 µl	1000 µl
Стандарден раствор	100 µl	-
Примерок	-	100 µl

За слепа проба се прави отчитување наспроти дестилирана вода. Откако ќе се стават реагенсите во киветата, се промешува и се чита апсорбанцата на 492 nm точно по 20 секунди (A_1). По 80 секунди од првото отчитување се мери A_2 .

Калкулација

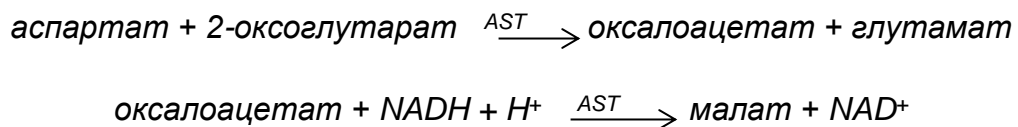
Се пресметува $\Delta A = A_1 - A_2$

$\Delta A_{\text{примерок}} / \Delta A_{\text{стандард}} \times C_{\text{стандард}} = C_{\text{примерок}}$

3.8. Одредување на активноста на AST

Принцип на методата

AST го катализира трансферот на аминокислотата од L-аспартатот на 2-оксоглутаратот, што резултира со формирање оксалоацетат и L-глутамат. Потоа оксалоацетатот се редуцира под дејство на малат дехидрогеназата, при што истовремено се извршува оксидација на NADH во NAD⁺. Оксидацијата на NADH предизвикува пад во апсорбанцата на 340 nm, при што таа промена на апсорбанцата е пропорционална со ензимската активност. LDH е додаден во реагенсите со цел да се спречи интерференција од ендогениот пируват кој во серумските примероци го има нормално во мали концентрации.



Состав на реагенсот

- Реагенс 1 (пуфер/супстрат):
 - трис-пуфер 80 mmol/L, pH 7,8
 - L-аспартат 200 mmol/L.
- Реагенс 2 (ензим/коензим/ α -оксоглутарат)
 - α -оксоглутарат
 - MDH 500U/L
 - LDH 800U/L
 - NADH 0.18mmol/L.

Подготовка на работниот реагенс

Да се раствори целиот волумен на реагенсот 2 во соодветен волумен од реагенсот 1 во пропорција 4 ml реагенс 1 + 1 ml реагенс 2.

Тест-процедура

Метода

кинетички

Бранова должина	340 nm
Прединкубација	1 min
Температура	37° C
Читање	на секои 60 секунди во период од 3 минути
Кивета	1 cm светлински пат
Слепа проба	воздух или H ₂ O

Реакциона температура **37 °C**

Примерок **0,1 ml**

Работен раствор **1,0 ml**

Калкулација

$$\frac{\Delta A}{\text{min}} \times 10^6 \times TV = \Delta A/\text{min} \times F = U/L$$

$$6,3 \times 10^3 \times 1 \times V$$

ΔA – промена на апсорбанцата

min – минути

$6,3 \times 10^3$ – моларна апсорбанца на NADH на 340 nm

10^6 – конверзија на mol во μmol

1 – пат на светлината во cm

TV – тотален волумен на реакцијата во ml

V – волумен на примерокот во ml

$$\Delta A_{340\text{nm}}/\text{min} \times 1746 = U/L \text{ AST (ALT)}$$

$$\Delta A_{334\text{nm}}/\text{min} \times 1780 = U/L \text{ AST (ALT)}$$

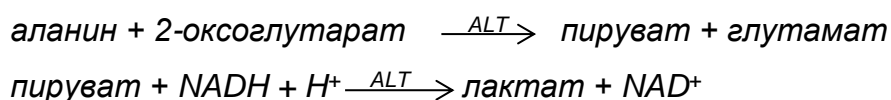
$$\Delta A_{365\text{nm}}/\text{min} \times 3235 = U/L \text{ AST (ALT)}$$

$$U/L \times 16,67 = \text{ncat/L}$$

3.9. Одредување на активноста на ALT

Принцип на методата

Принципот на методата за одредување на концентрацијата на ALT е аналоген на тој за одредување на AST, со тоа што трансферот на аминокрупата се одвива од L-аланинот на 2-оксоглутаратот, така што аминокиселината присутна во реагенсот 1 е L-аланин. Продуктите на ALT-катализираната реакција се оксалацетат и L-пируват. Мерената величина е повторно падот на апсорбанцата на 340 nm, кој, исто како и во случајот на одредување на AST, е резултат на редукцијата на оксалацетатот, при што NADH се оксидира во NAD.



Состав на реагенсот

- Реагенс 1 (пуфер/супстрат):
 - трис-пуфер 80 mmol/L, pH 7,8
 - L-аланин 200 mmol/L.
- Реагенс 2 (ензим/коензим/ α -оксоглутарат):
 - α -оксоглутарат
 - MDH 500U/L
 - LDH 800U/L
 - NADH 0,18mmol/L.

Подготовка на работниот реагенс

Да се раствори целиот волумен на реагенсот 2 во соодветен волумен од реагенсот 1 во пропорција 4 ml реагенс 1 + 1 ml реагенс 2.

Тест-процедура

Метода	кинетички
Бранова должина	340 nm
Прединкубација	1 min
Температура	37 °C
Читање	на секои 60 секунди во период од 3 минути
Кивета	1 cm светлински пат
Слепа проба	воздух или H ₂ O

Реакциона температура **37°C**

Примерок **0,1 ml**

Работен раствор **1,0 ml**

Калкулација

$$\Delta A/\text{min} \times 10^6 \times TV = \Delta A/\text{min} \times F = U/L$$

$$6,3 \times 10^3 \times 1 \times V$$

ΔA – промена на апсорбанцата

min – минути

$6,3 \times 10^3$ – моларна апсорбанца на NADH на 340 nm

10^6 – конверзија на mol во μmol

1 – пат на светлината во cm

TV – тотален волумен на реакцијата во ml

V – волумен на примерокот во ml

$$\Delta A_{340\text{nm}}/\text{min} \times 1746 = U/L \text{ AST (ALT)}$$

$$\Delta A_{334\text{nm}}/\text{min} \times 1780 = U/L \text{ AST (ALT)}$$

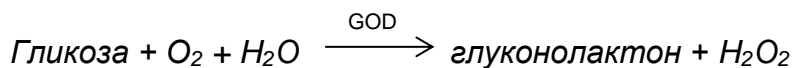
$$\Delta A_{365\text{nm}}/\text{min} \times 3235 = U/L \text{ AST (ALT)}$$

$$U/L \times 16,67 = \text{nkatal/L}$$

3.10. Одредување на концентрацијата на гликозата во крвниот серум

Принцип на методата

Методата на определување на концентрацијата на гликозата во крвниот серум се заснова на ензимски катализирана оксидација на гликозата до глуконолактон и водород пероксид под дејство на гликоза оксидаза (GOD). Водород пероксидот создаден под дејство на пероксидаза (POD) и на акцептори на електрони го оксидира безбојниот фенол-4-аминофеназон (PAP) од реакционата смеса во обоено соединение. Интензитетот на обојувањето на растворот е правопрпорционален со содржината на присутната гликоза, а се определува спектрофотометриски бранова должина од 505 nm. Контролата на температурата за ензимските реакции не е значајна, така што тоа дозволува овие реакции во киветите да бидат мониторирани на собна температура.



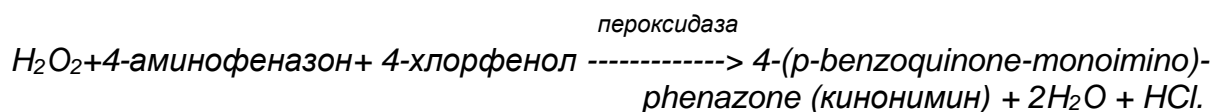
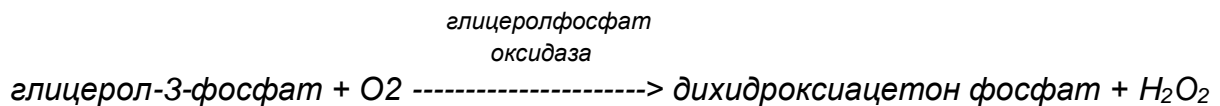
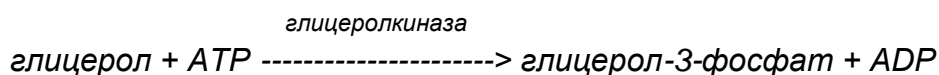
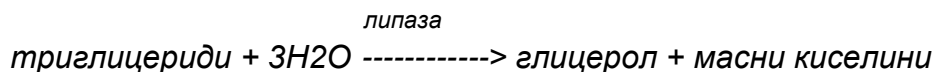
Тест-постапка

Реакционата смеса содржи 200 mmol/l фосфатен пуфер, pH 7,5, кој содржи гликоза оксидаза >11 U/ml; пероксидаза > 0,02 U/ml; фенол-4-аминофеназон 0,77 mmol/l; фенол 11 mmol/l.

$$\text{гликоза (mmol/l)} = \frac{\text{апсорпција}_{\text{ примерок}}}{\text{апсорбција}_{\text{ стандард}}} \times 10,0 \text{ mmol/l}$$

3.11. Одредување на концентрацијата на триглицеридите

Триглицеридите присутни во крвниот серум за анализа под дејство на липаза се хидролизират до глицерол и слободни масни киселини. Глицеролот ослободен во реакцијата катализирана од глицеролкиназа и во присуство на АТР се фосфорилира до глицерол фосфат. Глицерол фосфатот под дејство на глицеролфосфат оксидаза дава дихидроксиацетон фосфат и H_2O_2 . Создадениот H_2O_2 реагира со хлорфенол и 4-аминофеназон во присуство на пероксидаза и дава обоен продукт кинонимин [4-(p-benzoquinone-monoimino)-phenazone]. Интензитетот на обојувањето на ова соединение е пропорционално на концентрацијата на триглицеридите во крвниот серум. Апсорпцијата е измерена на бранова должина од 500 nm.

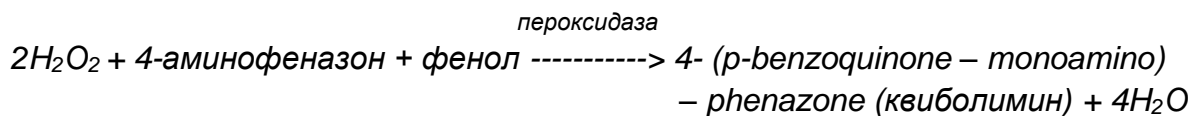
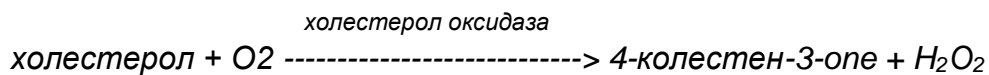
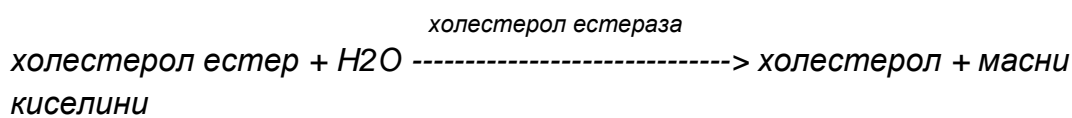


За определување на овој параметар беше користен автоматизиран биохемиски анализатор (спектрофотометар „Cobas Integra 700“).

3.12. Одредување на концентрацијата на холестеролот

Принципот на оваа метода се базира на ослободување на холестерол и на неговите естри од липопротеините со помош на детергенти. Ослободените

естри се хидролизираат под влијание на холестерол естераза до холестерол и масни киселини. Во понатамошниот тек на процесот холестеролот реагира со кислородот во присуство на холестерол оксидаза, при што како продукти се јавуваат 4-колестен-3-one и H₂O₂. Во присуство на пероксидаза, H₂O₂ се оксидира до 4-аминоантипиридин, при што се формира обоено соединение квинолимин, чиј интензитет на обојување е пропорционален со нивото на холестеролот во крвниот серум. Апсорпција е измерена на бранова должина од 500 nm.



За определување на овој параметар беше користен автоматизиран биохемиски анализатор (спектрофотометар „Cobas Integra 700“).

3.13. Одредување на активноста на супероксид дизмутазата (SOD)

Ензимот супероксид дизмутаза е дел од антиоксидативните механизми насочени против дејството на слободните радикали и ја катализира дизмутацијата на супероксидниот анјон O²⁻ во водород пероксид и кислород.

Принцип на методата

Методата за определување на активноста на супероксид дизмутазата е опишан од С. Марклунд и М. Марклунд (Marklund S. и Marklund G., 1974). Оваа метода се базира на способноста на ензимот да ја инхибира автооксидацијата на пирогалолот. Автооксидацијата на пирогалолот во алкална средина, рН =

8,2, е 50 % и се мери со линеарното зголемување на апсорбанцата на 420 nm во тек на неколку минути. Принципот на оваа метода се базира на конкуренција помеѓу пирогалол автооксидацијата предизвикана од O_2^- и неговата дизмутација од SOD. Додавањето на SOD ја инхибира автооксидацијата на пирогалолот преку претварање на O_2^- во H_2O_2 и O_2 и со блокирање на зголемувањето на апсорбанцата на 420 nm.

Тест-постапка

Реакционата смеса содржи 50 mM Tris-HCl, pH = 8,2, 1 mM диетиленетриамин пентаоцетна киселина и соодветен примерок на крвен серум. Текот на реакцијата започнува со додавање на пирогалол (концентрација од 0,2 mM). Инхибицијата на автооксидацијата на пирогалолот се случува во присуство на SOD, при што апсорпцијата се мери на бранова должина од 420 nm на температура од 25 °C во период од 3 минути. Спектрофотометарот се подесува да чита слепа проба трис-пуфер. Контролата и примероците за тестирање беа пипетирани по следната шема:

Реагенси	Тест (µl)	Контрола (µl)
Серум	50	-
трис-пуфер	1000	1000
DW	-	50
Пирогалол	1000	1000

Активноста на SOD се изразува во единици U/mL. Една единица на активноста на SOD се дефинира како количина на ензим потребен да предизвика 50 % инхибиција на пирогалол автооксидацијата.

Калкулација на активноста на SOD

процентот на инхибиција на пирогалол автооксидацијата = $\Delta A_{\text{тест}} / \Delta A_{\text{контрола}} \times 100 \%$

активноста на SOD (U/mL) = процентот на инхибиција на пирогалол автооксидацијата / 50 %

3.14. Одредување активноста на каталазата

Каталазата претставува антиоксидативен ензим кој ја катализира разградбата на водород пероксидот до вода и кислород. Нејзината активност беше одредувана од крвна плазма и ткивни хомогенати.

Принцип на методата

Оваа метода се базира на спектрофотометриско определување на водород пероксидот како резултат на формирањето на стабилен комплекс со жолта боја помеѓу H_2O_2 и амониум молибдат (Góth, 1991). Се мери апсорбанцата на 405 nm.

Тест-процедура

0,2 ml плазма се инкубира со 1,0 ml супстрат (65 $\mu\text{mol/ml}$ H_2O_2 во 60 mmol/l натриум-калиум-фосфатен пуфер, pH 7,4) на 37 °C за време од 60 секунди. Ензимската реакција се стопира со 1,0 ml на 32,4 mmol/L амониум молибдат ($(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$) и апсорбанцата на жолто обоениот комплекс се мери на 405 nm наспроти слепата проба 3.

$$\text{CAT (U/l)} = \frac{A(\text{примерок}) - A(\text{слепа проба 1})}{A(\text{слепа проба 2}) - A(\text{слепа проба 3})} \times 271$$

Во слепите проби се додаваат реагенсите според табелата:

	Слепа проба 1	Слепа проба 2	Слепа проба 3
Супстрат	1,0 ml	1,0 ml	/
Плазма	0,2 ml	/	/
Молибдат	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
Пуфер	/	0,2 ml	1,2 ml

Една единица на каталаза разградува 1 μmol на H_2O_2 за време од 1 минута на 37 °C.

3.15. Одредување на активноста глутатион пероксидазата (GPx)

Глутатион пероксидазите се група ензими кои се сретнуваат во клетките на цицачите и помагаат во спречувањето на липидната пероксидација на мембраните преку разградување на слободните пероксиди во клетката. Ензимот дејствува врз липидните хидропероксиди, холестерол хидропероксидот, а може да го хидролизира и водород пероксидот при негови ниски концентрации. Како кофактор го користи глутатионот и функционира во систем со глутатион редуктазата.

Принцип на методата

Активноста на GPx беше одредувана според методата на Лоренс и Бурк (Lawrence and Burk, 1976), со одредени модификации. Таа вклучува следење на оксидацијата на NADPH на бранова дожина од 340 nm во текот на 3 min (25 °C) и во присуство на GR и на GSH. Реакционата смеса содржи 50mM калиум фосфатен пуфер, pH 7,0, 1 mM натриум азид, 2 mM GSH, 0,2 mM NADPH, 1 U/ml GR, 1,5 mM кумен хидропероксид и примерок. Апсорпцијата е следена во текот на 5 минути на 25 °C.

Тест-процедура

Реакцијата започна со додавање кумен хидропероксид. Една единица на ензимска активност е дефинирана како количина на ензим потребна да катализира оксидација на еден μmol NADPH за време од 1 минута при горенаведените услови. Крјаните резултати се изразени како U/mg-протеини.

$$\text{активност на GPx (U/mg)} = \frac{\text{правец на кривата}}{0,5433*6220*(\text{mg/m протеин})*10^6}$$

3.16. Одредување на активноста на глутатион редуктазата (GR)

Глутатион редуктазата ја катализира редукцијата на оксидираниот глутатион до неговата редуцирана форма. Овој ензим им овозможува на клетките да одржуваат адекватни нивоа на редуциран глутатион.

Принцип на методата

Активноста на глутатион редуктазата беше одредувана во примероци од крвна плазма и од ткивни хомогенати. Стапката на оксидација на NADPH со учество на GSSG како кофактор и при температура од 30 °C беше користена како стандардна мерка за активноста на GR (Racker, 1955).

Тест-процедура

Реакциониот систем содржи: 1mM GSSG, 0,1 mM NADPH, 0,5 mM EDTA, 100 mM калиум фосфатен пуфер, pH 7,5 и соодветна количина на примерокот. Апсорцијата беше следена на бранова дожина од 340 nm и за секој примерок беа направени 11 отчитувања во интервали од 10 секунди, со почетно одложување од 10 секунди. Оксидацијата на 1 μmol NADPH за време од 1 минута беше дефинирана како единица за активноста на глутатион редуктазата. Специфичната активност беше изразена како U/mg протеини.

$$\text{активност на GR (U/mg)} = \frac{\text{правец на крива}}{0,5433*6220*(\text{mg/m протеин})*10^6}$$

3.17. Статистичка анализа

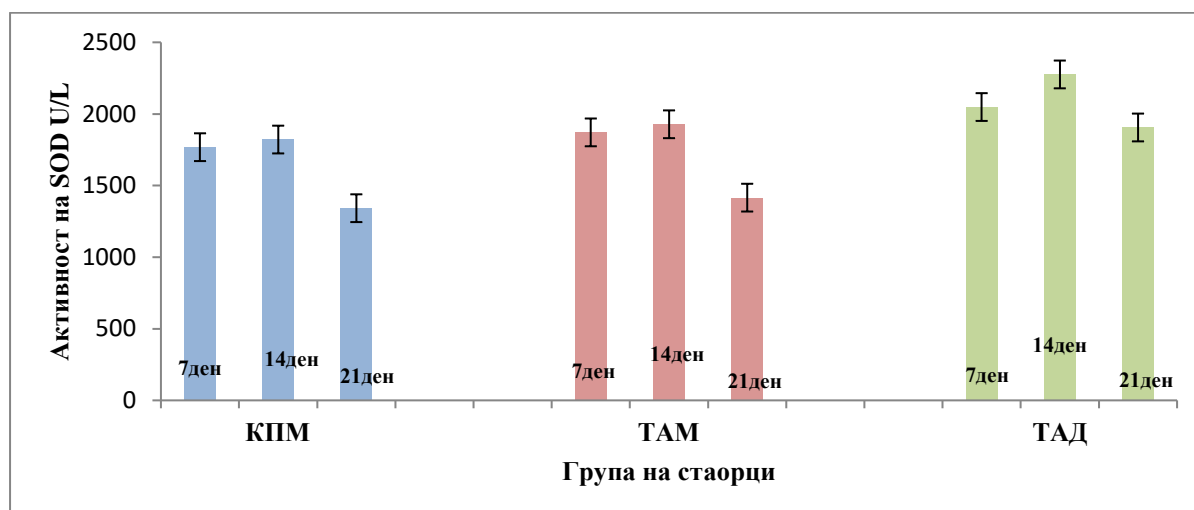
Статистичката обработка на резултатите добиени во текот на експериментот беше извршена со статистичката програма „InStat“. Резултатите се претставени како средни вредности со стандардна грешка (SEM). Ефектот од индивидуалниот третман со алкална вода, како и со додавање витамин Ц и GSH во неа, во комбинација со хипертермичко изложување на експерименталниот модел, беше утврден со примена на One-way analysis of variance (ANOVA). Присуството на статистички значајна разлика беше утврдено во рамките на поединечна група, како и при споредба на комбинација од три дадени групи. Сигнификантноста на разликите при споредби во рамките на иста група стаорци во однос на времето беше утврдена со Repeated measures ANOVA, додека при споредбите на различни групи животни беше искористена Ordinary ANOVA. Како сигнификантни промени беа забележани вредностите на $p < 0,001$.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Антиоксидативен статус

4.1.1. Влијание на третманот со јонизирана вода и со јонизирана вода збогатена со глутатион и витамин Ц, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз активноста на супероксид дизмутазата (SOD) во крвниот серум кај стаорци

Резултатите од нашето истражувањето за влијанието на третманот со јонизирана вода, без и со додавање на соодветните антиоксиданти во неа, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз активноста на SOD се прикажани на слика 22.



Слика 22. Активност на SOD во крвниот серум
Figure 22. SOD activity in blood serum

Легенда: КПМ – контролна група третирана со природна вода; ТАМ – група третирана со јонизирана вода; ТАД – група третирана со јонизирана вода со додадени глутатион и витамин Ц.

Табела 2. Резултати од статистичката анализа на податоците за активноста на SOD во крвиот серум

Table 2. Results of the statistical analysis of data on the activity of SOD in serum

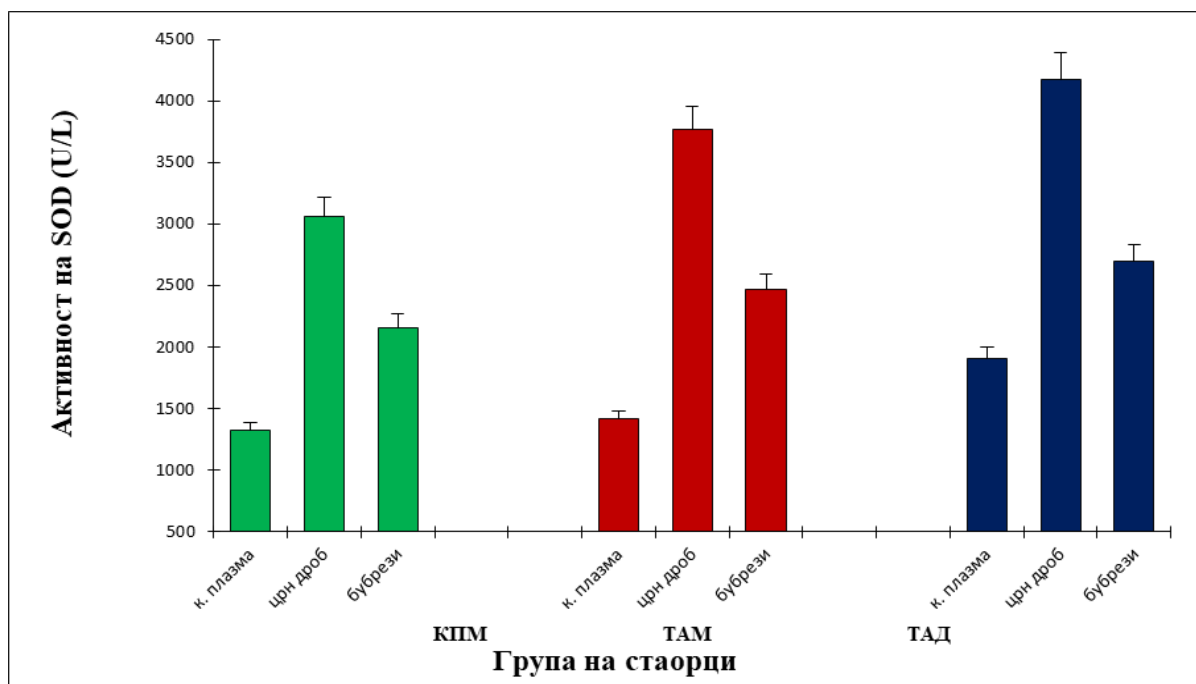
Статистичка анализа – активност на SOD				
Споредувани групи			Резултат	
КПМ 7	vs	КПМ 14	$p > 0,05$	Ns
КПМ 7	vs	КПМ 21	$p < 0,001$	***
КПМ 14	vs	КПМ 21	$p < 0,001$	***
ТАМ 7	vs	ТАМ 14	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 7	vs	ТАМ 21	$p < 0,001$	***
ТАМ 14	vs	ТАМ 21	$p < 0,001$	***
ТАД 7	vs	ТАД 14	$p > 0,05$	Ns
ТАД 7	vs	ТАД 21	$p > 0,05$	Ns
ТАД 14	vs	ТАД 21	$p < 0,01$	**
КПМ 7	vs	ТАМ 7	$p > 0,05$	Ns
КПМ 7	vs	ТАД 7	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 7	vs	ТАД 7	$p > 0,05$	Ns
КПМ 14	vs	ТАМ 14	$p > 0,05$	Ns
КПМ 14	vs	ТАД 14	$p < 0,001$	***
ТАМ 14	vs	ТАД 14	$p < 0,01$	**
КПМ 21	vs	ТАМ 21	$p > 0,05$	Ns
КПМ 21	vs	ТАД 21	$p < 0,001$	***
ТАМ 21	vs	ТАД 21	$p < 0,001$	***

Третманот аплициран соодветно на секоја група во периодот на отсуство на хипертермичка експозиција не влијаеше значајно во правец на покачување или намалување на ензимската активност на SOD. За разлика од оваа состојба, изложеноста на животните на висока амбиентална температура предизвика сигнификантна разлика кај сите три групи во активноста на SOD во однос на периодот на нејзиното отсуство. Акутното хипертермичко експонирање на 21. ден кај групите КПМ и ТАМ значајно ($p < 0,001$) ја намали активноста на SOD во однос на резултатите добиени за истата ензимска активност на 14. и на 7. ден од третманот. Отстапка од ваквиот генерален заклучок е групата третирана со збогатена алкална вода, која покажа незначајна разлика во активноста на SOD помеѓу 7. и 21. ден спротивно на статистички значајната разлика ($p < 0,01$) која се регистрира кај истата група само во периодот од 14. до 21. ден од третманот. Резултатите од анализите

добиени на 7. ден од истражувањето укажуваат на статистички незначајни разлики во активноста на SOD во споредбата направена помеѓу дадени две комбинации на групи од вкупно трите вклучени во експериментот. Идентичен е случајот со компарацијата на активноста на SOD помеѓу групите КПМ и ТАМ на 14. ден и КПМ и ТАМ на 21. ден од третманот. Аналогната споредба помеѓу преостанатите парови на групи направена како на 14. така и на 21. ден покажа статистички значајна разлика во активноста на SOD помеѓу споредуваните групи.

4.1.2. Влијание на третманот со јонизирана вода и со јонизирана вода збогатена со глутатион и витамин Ц, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз активноста на супероксид дисмутазата (SOD) во крвната плазма, црниот дроб и во бубрезите кај стаорци

На слика 23 се прикажани резултатите од нашето истражувањето за влијанието на третманот со јонизирана вода, без и со додавање на соодветните антиоксиданти во неа, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз активноста на SOD во крвната плазма, црниот дроб и во бубрезите.



Слика 23. Активност на супероксид дисмутаза во крвната плазма, црниот дроб и во бубрезите кај стаорци
 Figure 23. Superoxide dismutase activity in blood plasma, liver and kidney in rats

Легенда: КПМ – контролна група третирана со природна вода; ТАМ – група третирана со јонизирана вода; ТАД – група третирана со јонизирана вода со додадени глутатион и витамин Ц

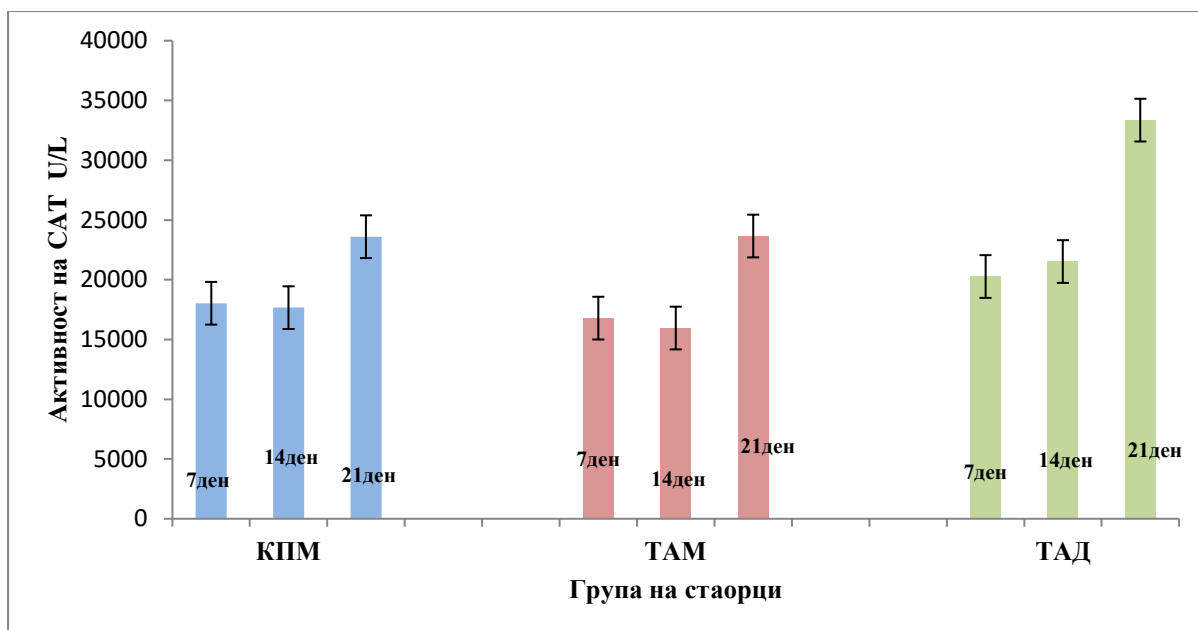
Табела 3. Резултати од статистичката анализа на податоците за активноста на SOD во крвната плазма, црниот дроб и во бубрезите
 Table 3. Results from the statistical analysis of data on the activity of SOD in blood plasma, liver and kidneys

Статистичка анализа – активност на супероксид дисмутаза				
Споредувани групи			Резултат	
КПМ к. плазма	vs	ТАМ к. плазма	$p > 0,05$	Ns
КПМ к. плазма	vs	ТАД к. плазма	$p < 0,01$	**
ТАМ к. плазма	vs	ТАД к. плазма	$p < 0,01$	**
КПМ црн дроб	vs	ТАМ црн дроб	$p < 0,01$	**
КПМ црн дроб	vs	ТАД црн дроб	$p < 0,001$	***
ТАМ црн дроб	vs	ТАД црн дроб	$p < 0,01$	**
КПМ бубрези	vs	ТАМ бубрези	$p > 0,05$	Ns
КПМ бубрези	vs	ТАД бубрези	$p > 0,05$	Ns
ТАМ бубрези	vs	ТАД бубрези	$p > 0,05$	Ns

Третманот аплициран соодветно на секоја група во периодот на хипертермичка експозиција предизвика сигнификантна разлика ($p < 0,001$) кај двете групи во ензимската активност на SOD во крвната плазма и во црниот дроб. Акутното хипертермичко експонирање на 21. ден кај групите КПМ и ТАД за крвната плазма има статистички значајна разлика ($p < 0,01$) во однос на групите КПМ и ТАМ кај кои нема статистички значајна разлика ($p > 0,05$). Акутното хипертермичко експонирање на 21. ден за активноста на SOD кај групите КПМ и ТАМ за црниот дроб има статистички значајна разлика ($p < 0,001$); исто така значајна разлика ($p < 0,001$) има и помеѓу групите КПМ и ТАД, а особено кај групата третирана со јонизирана вода со додадени глутатион и витамин Ц има покачена активност на SOD во црниот дроб. Хипертермичката експозиција доведе до намалување на активноста на SOD во бубрезите. Акутното хипертермичко експонирање на 21. ден кај групите КПМ и ТАМ за активност на SOD во бубрезите не предизвика сигнификантна разлика ($p > 0,05$); исто така и за групите ТАМ и ТАД за активноста на SOD во бубрезите не предизвика сигнификантна разлика ($p > 0,05$).

4.1.3. Влијание на третманот со јонизирана вода и со јонизирана вода збогатена со глутатион и витамин Ц, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз активноста на каталазата (CAT) во крвниот серум кај стаорци

Цел на нашето истражување беше и одредување на активноста на каталазата. Притоа, резултатите добиени од нашето истражување за влијанието на третманот со јонизирана вода, без и со додавање на соодветните антиоксиданти во неа, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз активноста на CAT се прикажани на слика 24.



Слика 24. Активност на САТ во крвниот серум
Figure 24. CAT activity in blood serum

Легенда: КПМ – контролна група третирана со природна вода; ТАМ – група третирана со јонизирана вода; ТАД – група третирана со јонизирана вода со додадени глутатион и витамин Ц

Табела 4. Резултати од статистичката анализа на податоците за активноста на САТ во крвниот серум

Table 4. Results of the statistical analysis of data on the activity of CAT in serum

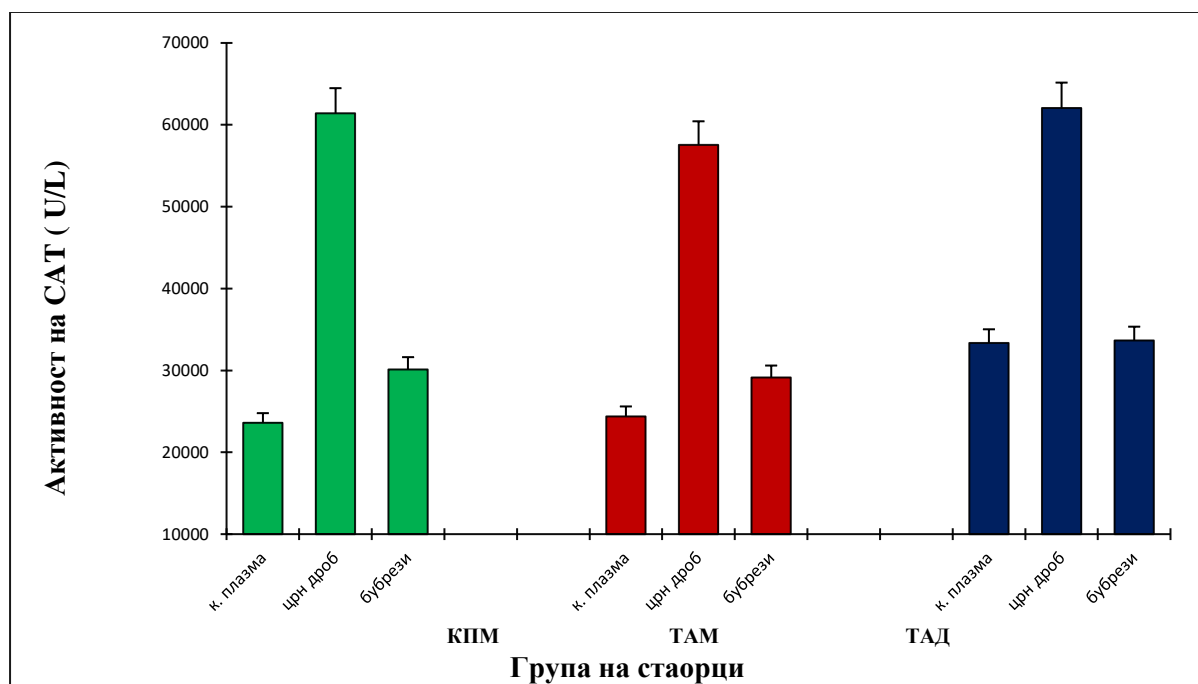
Статистичка анализа – активност на САТ				
Споредувани групи			Резултат	
КПМ 7	vs	КПМ 14	$p > 0,05$	Ns
КПМ 7	vs	КПМ 21	$p < 0,001$	***
КПМ 14	vs	КПМ 21	$p < 0,001$	***
ТАМ 7	vs	ТАМ 14	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 7	vs	ТАМ 21	$p < 0,001$	***
ТАМ 14	vs	ТАМ 21	$p < 0,001$	***
ТАД 7	vs	ТАД 14	$p > 0,05$	Ns
ТАД 7	vs	ТАД 21	$p < 0,001$	***

ТАД 14	vs	ТАД 21	$p < 0,001$	***
КПМ 7	vs	ТАМ 7	$p > 0,05$	Ns
КПМ 7	vs	ТАД 7	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 7	vs	ТАД 7	$p > 0,05$	Ns
КПМ 14	vs	ТАМ 14	$p > 0,05$	Ns
КПМ 14	vs	ТАД 14	$p < 0,01$	**
ТАМ 14	vs	ТАД 14	$p < 0,001$	***
КПМ 21	vs	ТАМ 21	$p > 0,05$	Ns
КПМ 21	vs	ТАД 21	$p < 0,001$	***
ТАМ 21	vs	ТАД 21	$p < 0,001$	***

Сите три групи во однос на соодветниот третман што секоја од нив индивидуално го доби и на времето на неговата апликација не покажуваат статистички значајна разлика во активноста на САТ, и тоа во периодот 7. – 14. ден, кога стаорците не беа експонирани на висока амбиентална температура. Акутното хипертермичко експонирање предизвика значајно покачување ($p < 0,001$) во активноста на САТ кај сите три групи. Од статистичката анализа на споредуваните групи на 7. ден од третманот се забележува дека нема значајна разлика во гореспоменатата ензимска активност. Ваквата констатација е идентична и за споредбата направена во однос на групите КПМ и ТАМ на 14. и на 21. ден од експериментот, што е спротивно на разликата во активноста на САТ помеѓу преостанатите групи споредувани во текот на тие денови, која се покажа како статистички значајна.

4.1.4. Влијание на третманот со јонизирана вода и со јонизирана вода збогатена со глутатион и витамин Ц, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз активноста на каталазата (САТ) во крвната плазма, црниот дроб и во бубрезите кај стаорци

Активноста на САТ во крвната плазма, црниот дроб и во бубрезите беше, исто така, цел на нашето истражување. Резултатите од ова истражување за влијанието на третманот со јонизирана вода, без и со додавање на соодветните антиоксиданти во неа, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот се прикажани на слика 25.



Слика 25. Активност на каталазата во крвната плазма, црниот дроб и во бубрезите кај стаорци

Figure 25. Catalase activity in blood plasma, liver and kidney in rats

Легенда: КПМ – контролна група третирана со природна вода; ТАМ – група третирана со јонизирана вода; ТАД – група третирана со јонизирана вода со додадени глутатион и витамин Ц

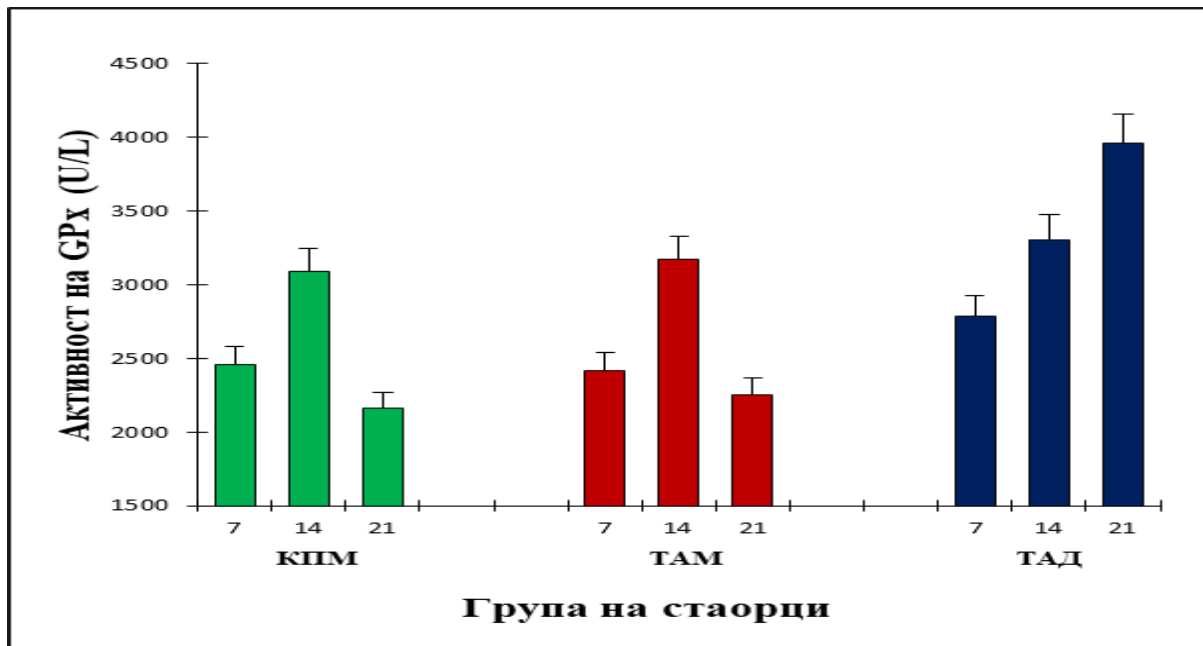
Табела 5. Резултати од статистичката анализа на податоците за активноста на САТ во крвната плазма, црниот дроб и во бубрезите
Table 5. Results from the statistical analysis of data on the activity of CAT in blood plasma, liver and kidneys

Статистичка анализа – активност на САТ				
Споредувани групи			Резултат	
КПМ к. плазма	vs	ТАМ к. плазма	$p > 0,05$	Ns
КПМ к. плазма	vs	ТАД к. плазма	$p < 0,01$	**
ТАМ к. плазма	vs	ТАД к. плазма	$p < 0,01$	**
КПМ црн дроб	vs	ТАМ црн дроб	$p > 0,05$	Ns
КПМ црн дроб	vs	ТАД црн дроб	$p > 0,05$	Ns
ТАМ црн дроб	vs	ТАД црн дроб	$p > 0,05$	Ns
КПМ бубези	vs	ТАМ бубрези	$p > 0,05$	Ns
КПМ бубрези	vs	ТАД бубрези	$p > 0,05$	Ns
ТАМ бубрези	vs	ТАД бубрези	$p > 0,05$	Ns

Третманот аплициран соодветно на секоја група во периодот на хипертермичка експозиција предизвика сигнификантна разлика во активноста на САТ во крвната плазма кај трите групи. Активноста на САТ во црниот дроб е зголемена кај трите групи. Третманот за време од 21 ден кај сите три групи доведе до намалување на активноста на САТ во крвната плазма и во бубрезите. Акутното хипертермичко експонирање на 21. ден кај групите КПМ и ТАД за крвната плазма има статистички значајна разлика ($p < 0,01$). Исто така, и кај групите ТАМ и ТАД има статистички значајна разлика ($p < 0,01$) во активноста на САТ, што е спротивно на разликата во активноста на САТ во црниот дроб и во бубрезите помеѓу преостанатите споредувани групи, која се покажа како статистички незначајна.

4.1.5. Влијание на третманот со јонизирана вода и со јонизирана вода збогатена со глутатион и витамин Ц, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз активноста на глутатион пероксидазата (GPx) во крвниот серум кај стаорци

Резултатите од нашето истражувањето за влијанието на третманот со јонизирана вода, без и со додавање на соодветните антиоксиданти во неа, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз активноста на GPx се прикажани на слика 26.



Слика 26. Активност на глутатион пероксидазата во крвниот серум
 Figure 26. Glutathione peroxidase activity in blood serum

Легенда: КПМ – контролна група третирана со природна вода; ТАМ – група третирана со јонизирана вода; ТАД – група третирана со јонизирана вода со додадени глутатион и витамин Ц

Табела 6. Резултати од статистичката анализа на податоците за активноста на GPx во крвниот серум

Table 6. Results of the statistical analysis of data on the activity of GPx in serum

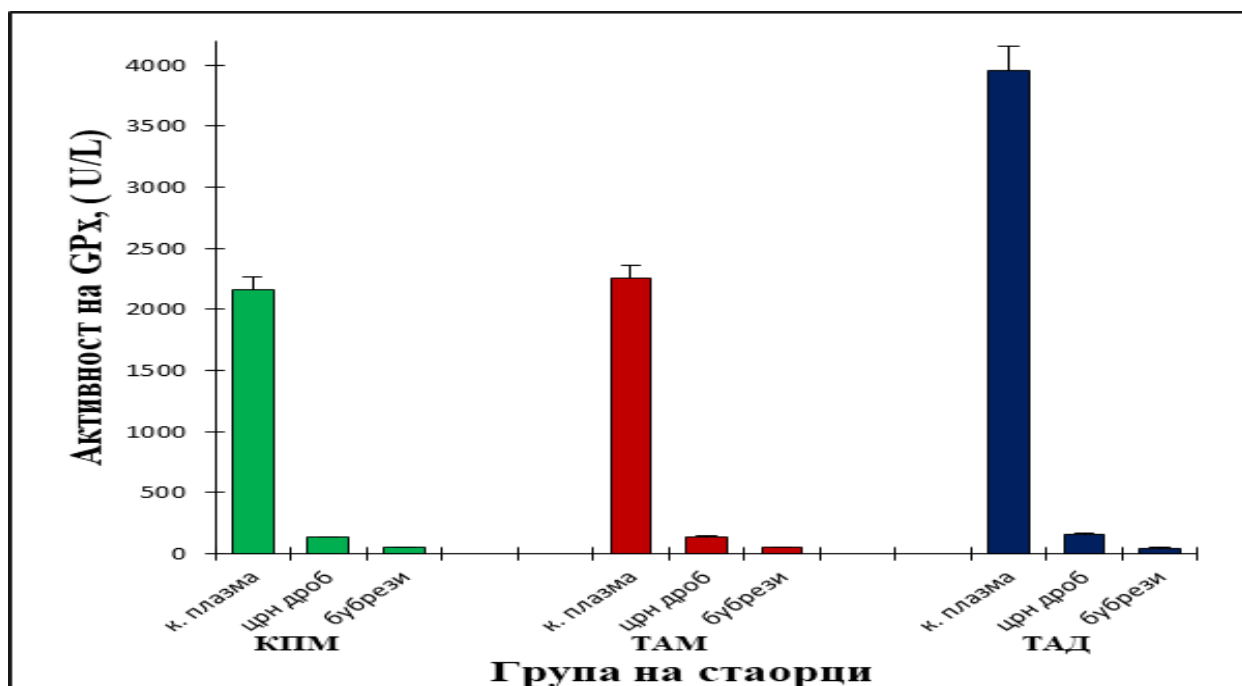
Статистичка анализа – активност на GPx				
Споредувани групи			Резултат	
КПМ 7	vs	КПМ 14	p < 0,001	***
КПМ 7	vs	КПМ 21	p < 0,01	**
КПМ 14	vs	КПМ 21	p < 0,001	***
ТАМ 7	vs	ТАМ 14	p < 0,01	**
ТАМ 7	vs	ТАМ 21	p < 0,001	***

ТАМ 14	vs	ТАМ 21	$p > 0,05$	Ns
ТАД 7	vs	ТАД 14	$p < 0,01$	**
ТАД 7	vs	ТАД 21	$p < 0,001$	***
ТАД 14	vs	ТАД 21	$p < 0,01$	**
КПМ 7	vs	ТАМ 7	$p > 0,05$	Ns
КПМ 7	vs	ТАД 7	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 7	vs	ТАД 7	$p > 0,05$	Ns
КПМ 14	vs	ТАМ 14	$p > 0,05$	Ns
КПМ 14	vs	ТАД 14	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 14	vs	ТАД 14	$p > 0,05$	Ns
КПМ 21	vs	ТАМ 21	$p > 0,05$	Ns
КПМ 21	vs	ТАД 21	$p < 0,001$	***
ТАМ 21	vs	ТАД 21	$p < 0,001$	***

Сите три групи во однос на соодветниот третман што секоја од нив индивидуално го доби и на времето на неговата апликација покажуваат статистички значајна разлика во активноста на GPx, и тоа во периодот 7. – 14. ден, кога стаорците се не беа експонирани на висока амбиентална температура. Кај контролната група третирана со природна вода во текот на 14. ден се забележува зголемена активност на GPx, која при хипертермичка експозиција во истата група се намалува. Активноста на GPx при хипертермичка експозиција се намалува и кај втората група третирана со јонизирана вода. Кај третата група третирана со јонизирана вода со додадени глутатион и витамин Ц беше регистрирана повисока ативноост на GPx. Акутното хипертермичко експонирање предизвика значајно покачување ($p < 0,001$) на активноста на GPx кај третата група. Во периодот 7. – 14. ден, кога стаорците не беа експонирани на висока амбиентална температура, КПМ7 и КПМ14 покажуваат статистички значајна разлика во активноста на GPx ($p < 0,001$); исто така ТАМ7 и ТАМ14 покажуваат статистички значајна разлика во активноста на GPx ($p < 0,01$). Акутното хипертермичко експонирање предизвика значајно покачување ($p < 0,001$) на активноста на САТ кај групата ТАД во 21. ден.

4.1.6. Влијание на третманот со јонизирана вода и со јонизирана вода збогатена со глутатион и витамин Ц, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз активноста на глутатион пероксидазата (GPx) во крвната плазма, црниот дроб и во бубрезите кај стаорци

На слика 27 се прикажани резултатите од нашето истражувањето за влијанието на третманот со јонизирана вода, без и со додавање на соодветните антиоксиданти во неа, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз активноста на GPx во крвната плазма, црниот дроб и во бубрезите.



Слика 27. Активност на глутатион пероксидазата во крвната плазма, црниот дроб и во бубрезите кај стаорци

Figure 27. Glutathione peroxidase activity in blood plasma, liver and kidney in rats

Легенда: КПМ – контролна група третирана со природна вода; ТАМ – група третирана со јонизирана вода; ТАД – група третирана со јонизирана вода со додадени глутатион и витамин Ц

Табела 7. Резултати од статистичката анализа на податоците за активноста на GPx во крвната плазма, црниот дроб и во бубрезите

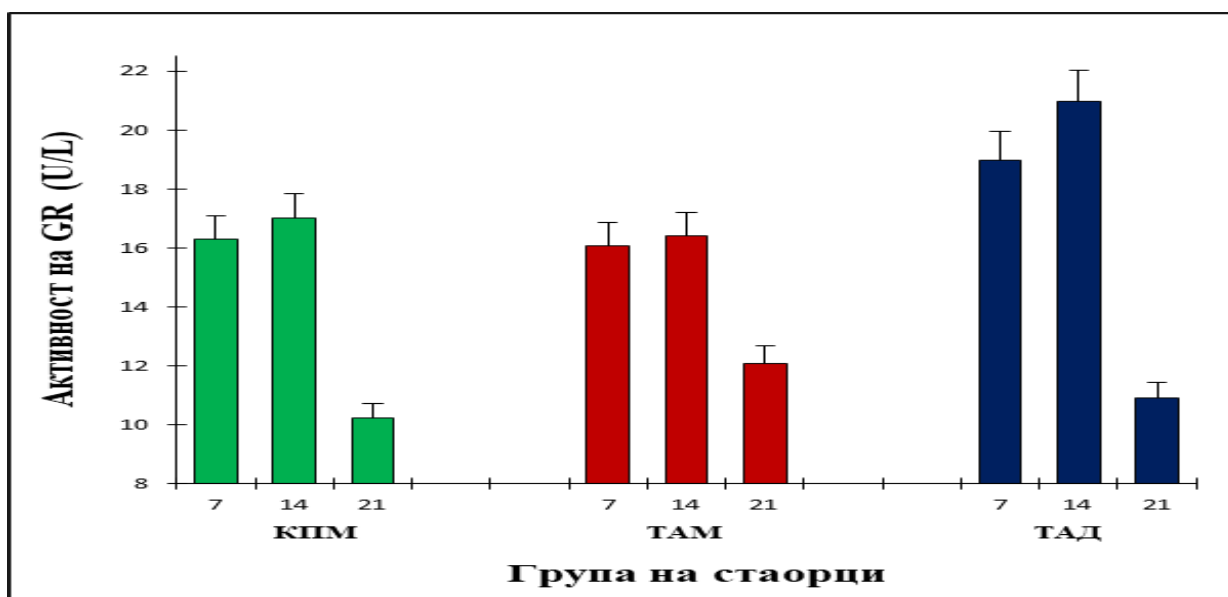
Table 7. Results of the statistical analysis of data on the activity of GPx in blood plasma, liver and kidneys

Статистичка анализа – активност на глутатион пероксидазата				
Споредувани групи			Резултат	
КПМ к. плазма	vs	ТАМ к. плазма	$p > 0,05$	Ns
КПМ к. плазма	vs	ТАД к. плазма	$p < 0,001$	***
ТАМ к. плазма	vs	ТАД к. плазма	$p < 0,001$	***
КПМ црн дроб	vs	ТАМ црн дроб	$p > 0,05$	Ns
КПМ црн дроб	vs	ТАД црн дроб	$p > 0,05$	Ns
ТАМ црн дроб	vs	ТАД црн дроб	$p > 0,05$	Ns
КПМ бубрези	vs	ТАМ бубрези	$p > 0,05$	Ns
КПМ бубрези	vs	ТАД бубрези	$p > 0,05$	Ns
ТАМ бубрези	vs	ТАД бубрези	$p > 0,05$	Ns

Третманот аплициран соодветно на секоја група во периодот на хипертермичка експозиција предизвика сигнификантна разлика во активноста на GPx во крвната плазма кај трите групи. Акутното хипертермичко експонирање на 21. ден кај групите КПМ и ТАД за крвната плазма има статистички значајна разлика ($p < 0,001$); исто така, и кај групите ТАМ и ТАД за крвната плазма има статистички значајна разлика ($p < 0,001$), што е спротивно на разликата во активноста на GPx во црниот дроб и во бубрезите помеѓу преостанатите споредувани групи, која се покажа како статистички незначајна.

4.1.7. Влијание на третманот со јонизирана вода и со јонизирана вода збогатена со глутатион и витамин Ц, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз активноста на глутатион редуказата (GR) во крвниот серум кај стаорци

Цел на нашето истражување беше и одредување на активноста на глутатион редуказата. Притоа, резултатите добиени од ова истражување за влијанието на третманот со јонизирана вода, без и со додавање на соодветните антиоксиданти во неа, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз активноста на GR се прикажани на слика 28.



Слика 28. Активност на глутатион редуказата во крвниот серум
Figure 28. Glutathione reductase activity in blood serum

Легенда: КПМ – контролна група третирана со природна вода; ТАМ – група третирана со јонизирана вода; ТАД – група третирана со јонизирана вода со додадени глутатион и витамин Ц

Табела 8. Резултати од статистичката анализа на податоците за активноста на GR во крвниот серум

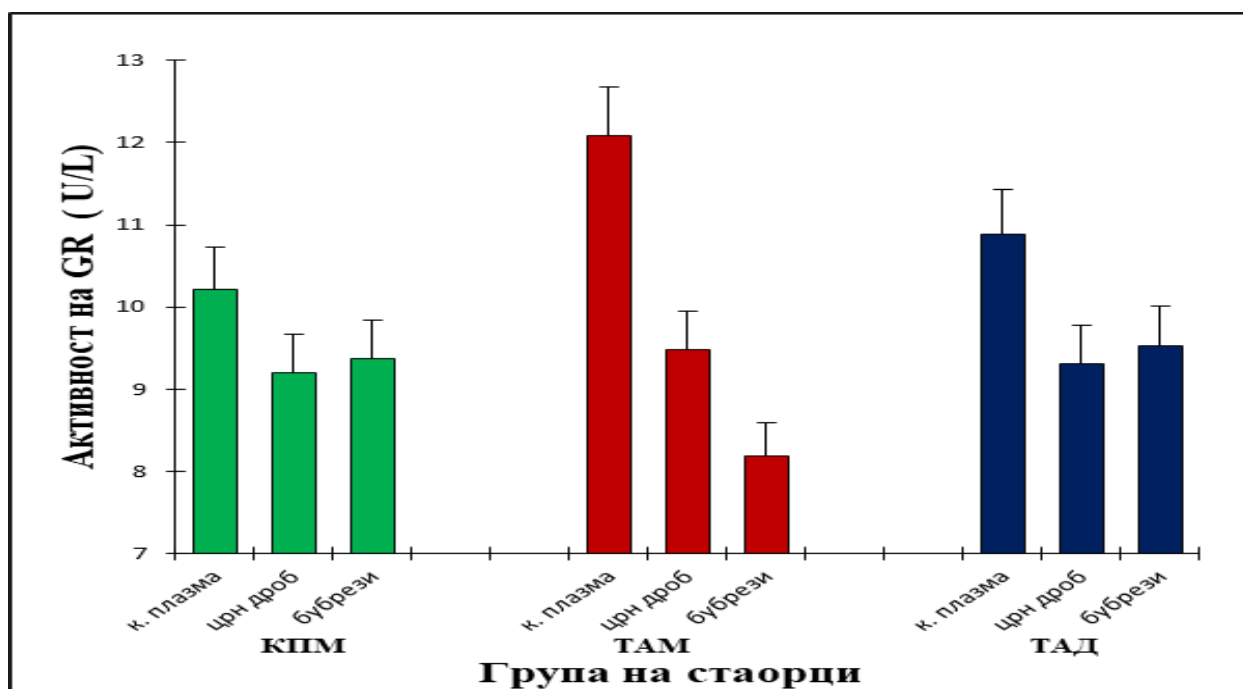
Table 8. Results of the statistical analysis of data on the activity of GR in serum

Статистичка анализа – активност на GR				
Споредувани групи			Резултат	
КПМ 7	vs	КПМ 14	$p > 0,05$	Ns
КПМ 7	vs	КПМ 21	$p < 0,001$	***
КПМ 14	vs	КПМ 21	$p < 0,001$	***
ТАМ 7	vs	ТАМ 14	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 7	vs	ТАМ 21	$p < 0,001$	***
ТАМ 14	vs	ТАМ 21	$p < 0,001$	***
ТАД 7	vs	ТАД 14	$p < 0,01$	**
ТАД 7	vs	ТАД 21	$p < 0,001$	***
ТАД 14	vs	ТАД 21	$p < 0,01$	**
КПМ 7	vs	ТАМ 7	$p > 0,05$	Ns
КПМ 7	vs	ТАД 7	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 7	vs	ТАД 7	$p < 0,01$	**
КПМ 14	vs	ТАМ 14	$p < 0,01$	**
КПМ 14	vs	ТАД 14	$p < 0,001$	***
ТАМ 14	vs	ТАД 14	$p > 0,05$	Ns
КПМ 21	vs	ТАМ 21	$p > 0,05$	Ns
КПМ 21	vs	ТАД 21	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 21	vs	ТАД 21	$p > 0,05$	Ns

Сите три групи во однос на соодветниот третман што секоја од нив индивидуално го доби и времето на неговата апликација покажуваат статистички значајна разлика ($p < 0,001$) кај КПМ7 и КПМ21 во активноста на GR; исто така, статистички значајна разлика ($p < 0,001$) во активноста на GR покажуваат КПМ14 и КПМ21. ТАМ7 и ТАМ21 покажуваат статистички значајна разлика ($p < 0,001$) во активноста на GR; исто така, и ТАМ14 и ТАМ21 покажуваат статистички значајна разлика ($p < 0,001$) во активноста на GR. Акутно хипертермичко експонирање предизвика значајно намалување ($p < 0,001$) во активноста на GR кај сите три групи.

4.1.8. Влијание на третманот со јонизирана вода и со јонизирана вода збогатена со глутатион и витамин Ц, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз активноста на глутатион редуказата (GR) во крвната плазма, црниот дроб и во бубрезите кај стаорци

Активноста на глутатион редуказата во крвната плазма, црниот дроб и во бубрезите беше, исто така, цел на нашето истражување. Резултатите од нашето истражувањето за влијанието на третманот со јонизирана вода, без и со додавање на соодветните антиоксиданти во неа, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот се прикажани на слика 29.



Слика 29. Активност на глутатион редуказата во крвната плазма, црниот дроб и во бубрезите кај стаорци

Figure 29. Glutathione reductase activity in blood plasma, liver and kidney in rats

Легенда: КПМ – контролна група третирана со природна вода; ТАМ – група третирана со јонизирана вода; ТАД – група третирана со јонизирана вода со додадени глутатион и витамин Ц

Табела 9. Резултати од статистичката анализа на податоците за активноста на GR во крвната плазма, црниот дроб и во бубрезите
 Table 9. Results of the statistical analysis of data on the activity of GR in blood plasma, liver and kidneys

Статистичка анализа – активност на GR				
Споредувани групи			Резултат	
КПМ к. плазма	vs	ТАМ к. плазма	$p < 0,01$	**
КПМ к. плазма	vs	ТАД к. плазма	$p < 0,01$	**
ТАМ к. плазма	vs	ТАД к. плазма	$p > 0,05$	Ns
КПМ црн дроб	vs	ТАМ црн дроб	$p > 0,05$	Ns
КПМ црн дроб	vs	ТАД црн дроб	$p > 0,05$	Ns
ТАМ црн дроб	vs	ТАД црн дроб	$p > 0,05$	Ns
КПМ бубрези	vs	ТАМ бубрези	$p < 0,001$	***
КПМ бубрези	vs	ТАД бубрези	$p > 0,05$	Ns
ТАМ бубрези	vs	ТАД бубрези	$p < 0,001$	***

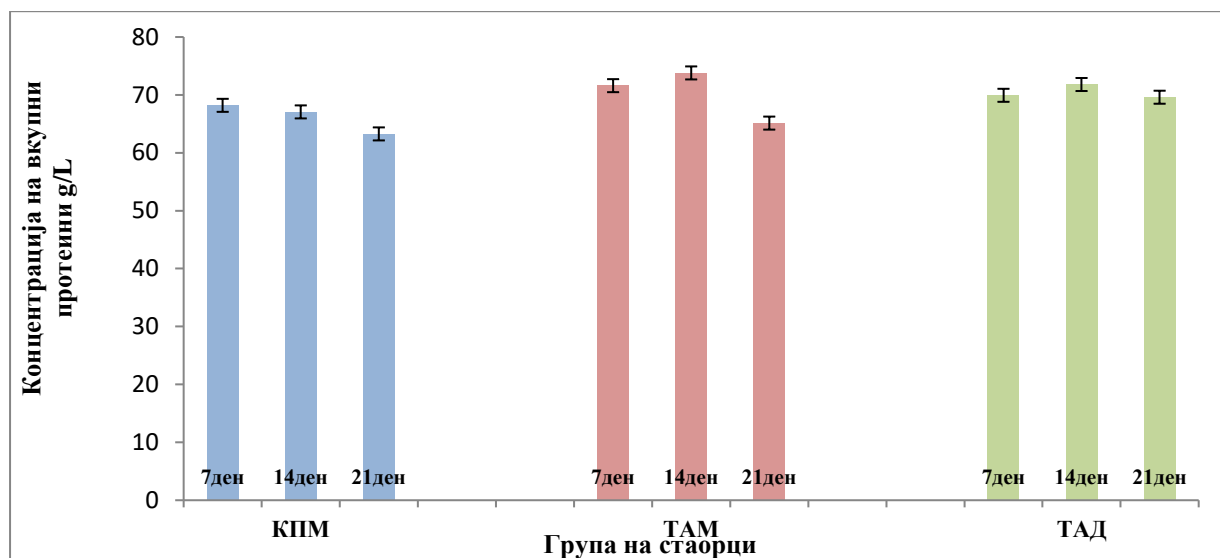
Третманот аплициран соодветно на секоја група во периодот на хипертермичка експозиција предизвика сигнификантна разлика ($p < 0,01$) во активноста на GR во крвната плазма кај трите групи. Акутното хипертермичко експонирање на 21. ден кај групите КПМ и ТАМ за бубрезите предизвика сигнификантна разлика ($p < 0,001$) во активноста на GR ; исто така, и кај групите ТАМ и ТАД предизвика сигнификантна разлика ($p < 0,001$) во активноста на GR во бубрезите, што е спротивно на разликата во активноста на GR во црниот дроб помеѓу преостанатите споредувани групи, која се покажа како статистички незначајна.

4.2. Промени во концентрацијата на одредени биохемиски параметри

4.2.1. Влијание на третманот со јонизирана вода и со јонизирана вода збогатена со витамин Ц и глутатион, како и со акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз концентрацијата на вкупните протеини во крвниот серум кај стаорци

Резултатите од нашето истражување за влијанието на третманот со јонизирана вода, без и со додавање на соодветните антиоксиданти во неа, како

и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз нивото на вкупните протеини се прикажани на слика 30.



Слика 30. Концентрација на вкупните протеини во крвниот серум
Figure 30. Concentration of total protein in blood serum

Легенда: КПМ – контролна група третирана со природна вода; ТАМ – група третирана со јонизирана вода; ТАД – група третирана со јонизирана вода со додадени глутатион и витамин Ц

Табела 10. Резултати од статистичката анализа на податоците за концентрацијата на вкупните протеини во крвниот серум
Table 10. Results from statistical analysis of data on the concentration of total protein in serum

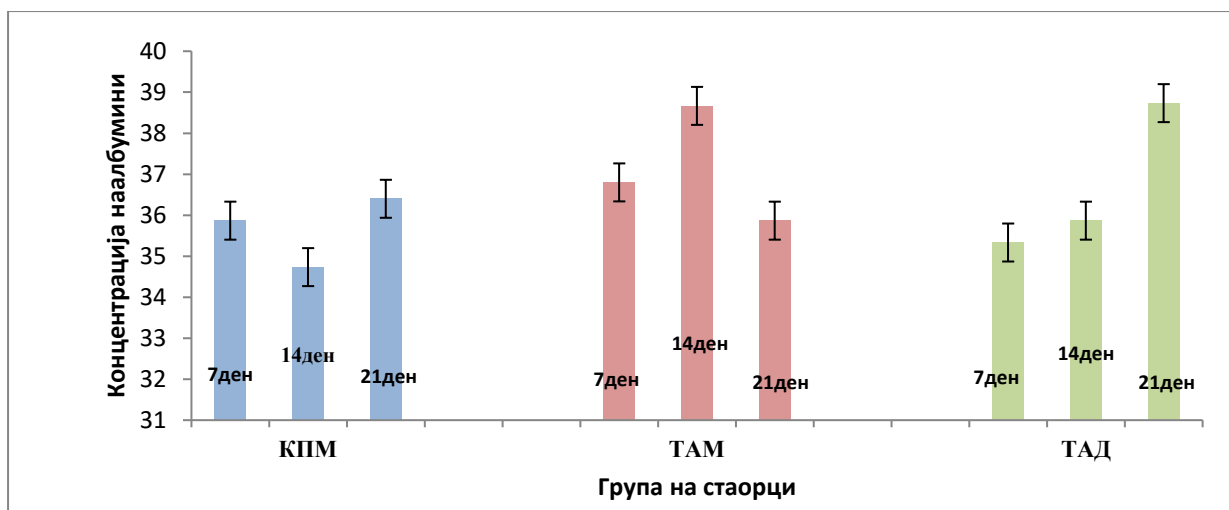
Статистичка анализа – концентрација на вкупните протеини				
Споредувани групи			Резултат	
КПМ 7	vs	КПМ 14	$p > 0,05$	Ns
КПМ 7	vs	КПМ 21	$p < 0,01$	**
КПМ 14	vs	КПМ 21	$p < 0,05$	*
ТАМ 7	vs	ТАМ 14	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 7	vs	ТАМ 21	$p < 0,001$	***
ТАМ 14	vs	ТАМ 21	$p < 0,01$	***
ТАД 7	vs	ТАД 14	$p > 0,05$	Ns
ТАД 7	vs	ТАД 21	$p > 0,05$	Ns
ТАД 14	vs	ТАД 21	$p > 0,05$	Ns
КПМ 7	vs	ТАМ 7	$p > 0,05$	Ns
КПМ 7	vs	ТАД 7	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 7	vs	ТАД 7	$p > 0,05$	Ns
КПМ 14	vs	ТАМ 14	$p < 0,01$	**
КПМ 14	vs	ТАД 14	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 14	vs	ТАД 14	$p > 0,05$	Ns
КПМ 21	vs	ТАМ 21	$p > 0,05$	Ns

КПМ 21	vs	ТАД 21	$p < 0,05$	*
ТАМ 21	vs	ТАД 21	$p > 0,05$	Ns

Сите три групи во периодот кога не беа изложени на висока температура како стресоген фактор, поточно во временскиот интервал од 7. ден, кога првпат се направени испитувања на зададените параметри, до 14. ден од третманот, не покажаа статистички значајна разлика во однос на концентрацијата на вкупните протеини во крвниот серум. Акутната хипертермичка експозиција предизвика значајна разлика во концентрацијата на вкупните протеини помеѓу 7. и 14. ден, земени како појдовни точки, и 21. ден од третманот, односно на денот на хипертермичко експонирање на стаорците. Ваквата значајна разлика се регистрира кај групите КПМ и ТАМ ($p < 0,001$), додека групата ТАД е исклучок и во неа во истиот период не се забележува статистички значајна разлика ($p > 0,05$). Животните третирани со јонизирана вода на 14. ден покажаа значајно повисока концентрација на вкупните протеини ($p < 0,01$) во споредба со групата која примала само природна вода, што е во согласност со констатацијата добиена од компарацијата направена помеѓу групите КПМ и ТАД на 21. ден, каде што разликата е, исто така, статистички значајна ($p < 0,05$).

4.2.2. Влијание на третманот со јонизирана вода и со јонизирана вода збогатена со витамин Ц и глутатион, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз концентрацијата на албумините во крвниот серум кај стаорци

На слика 31 се прикажани резултатите од нашето истражувањето за влијанието на третманот со јонизирана вода, без и со додавање на соодветните антиоксиданти во неа, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз нивото на албумините.



Слика 31. Концентрација на албумините во крвниот серум
Figure 31. Concentration of albumins in blood serum

Легенда: КПМ – контролна група третирана со природна вода; ТАМ – група третирана со јонизирана вода; ТАД – група третирана со јонизирана вода со додадени глутатион и витамин Ц

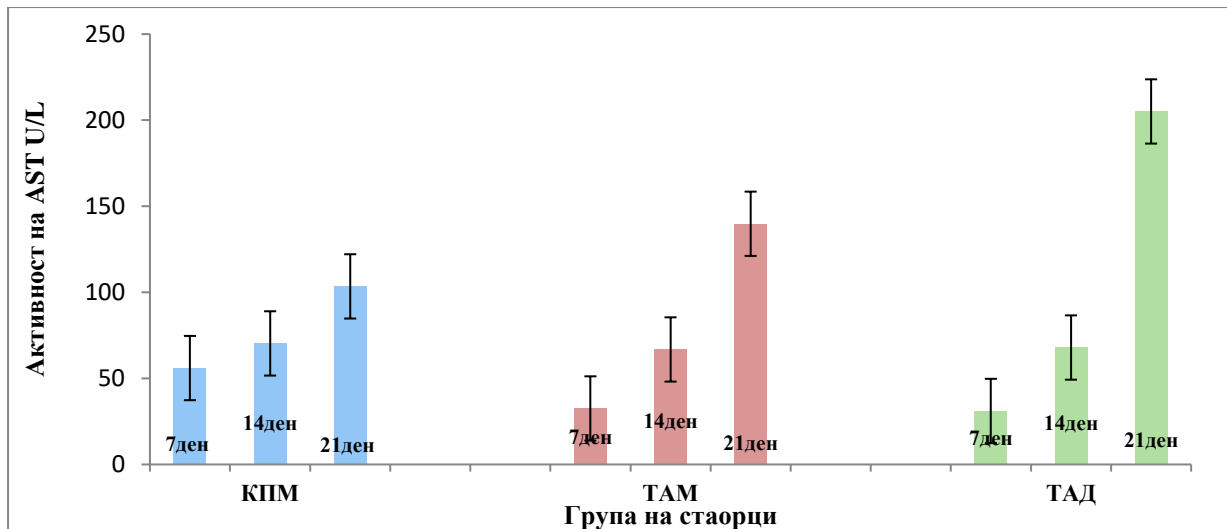
Табела 11. Резултати од статистичката анализа на податоците за концентрацијата на вкупните албумини во крвниот серум
Table 11. Results from statistical analysis of data on the concentration of albumins in serum

Статистичка анализа – концентрација на албумини				
Споредувани групи			Резултат	
КПМ 7	vs	КПМ 14	$p > 0,05$	Ns
КПМ 7	vs	КПМ 21	$p > 0,05$	Ns
КПМ 14	vs	КПМ 21	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 7	vs	ТАМ 14	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 7	vs	ТАМ 21	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 14	vs	ТАМ 21	$p > 0,05$	Ns
ТАД 7	vs	ТАД 14	$p > 0,05$	Ns
ТАД 7	vs	ТАД 21	$p < 0,01$	**
ТАД 14	vs	ТАД 21	$p < 0,05$	*
КПМ 7	vs	ТАМ 7	$p > 0,05$	Ns
КПМ 7	vs	ТАД 7	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 7	vs	ТАД 7	$p > 0,05$	Ns
КПМ 14	vs	ТАМ 14	$p < 0,05$	*
КПМ 14	vs	ТАД 14	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 14	vs	ТАД 14	$p > 0,05$	Ns
КПМ 21	vs	ТАМ 21	$p > 0,05$	Ns
КПМ 21	vs	ТАД 21	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 21	vs	ТАД 21	$p > 0,05$	Ns

Третманот со јонизирана вода, како и со јонизирана вода збогатена со витамин Ц и GSH нè доведе до статистички значајна разлика во однос на концентрацијата на албумините во крвниот серум кај третираниот експериментален модел во периодот од 7. до 14. ден од третманот. Истиот заклучок за горенаведениот период и анализиран параметар може да се изведе и за контролната група, односно за групата која примала само природна вода. Групите КПМ и ТАМ и по аплицирање на акутен температурен стрес не покажаа статистички значајна разлика ($p > 0,05$) во концентрацијата на албумините во периодот 7. – 21. ден и 14. – 21. ден од соодветниот третман. Исклучок од ваквото констатирање е групата ТАД, која покажа статистички значајна разлика во однос на концентрацијата на албумините во горенаведените периоди, $p < 0,01$ и соодветно $p < 0,05$. Значајна разлика ($p < 0,05$) во однос на споменатиот параметар е регистрирана само помеѓу групите КПМ и ТАМ на 14. ден од третманот, додека статистичките споредби помеѓу преостанатите групи во деновите од третманот кога се анализирани сите параметри се незначајни, односно $p > 0,05$ е забележано кај сите случаи.

4.2.3. Влијание на третманот со јонизирана вода и со јонизирана вода збогатена со витамин Ц и глутатион, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз активноста на AST во крвниот серум кај стаорци

Активноста на AST во крвниот серум беше, исто така, цел на нашето истражување. Резултатите од нашето истражување за влијанието на третманот со јонизирана вода, без и со додавање на соодветните антиоксиданти во неа, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз активноста на AST се прикажани на слика 32.



Слика 32. Активност на AST во крвниот серум
Figure 32. AST activity in blood serum

Легенда: КПМ – контролна група третирана со природна вода; ТАМ – група третирана со јонизирана вода; ТАД – група третирана со јонизирана вода со додадени глутатион и витамин Ц

Табела 12. Резултати од статистичката анализа на податоците за активноста на AST во крвниот серум

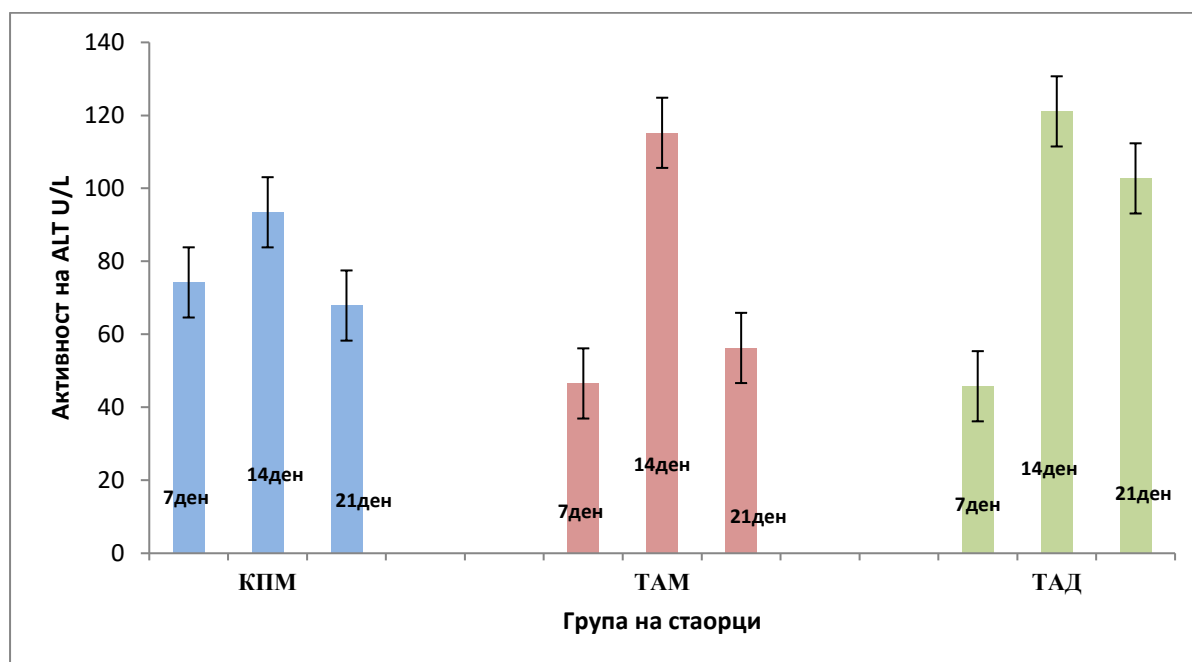
Table 12. Results from statistical analysis of data on the activity of AST in serum

Статистичка анализа – активност на AST во крвниот серум				
Споредувани групи			Резултат	
КПМ 7	vs	КПМ 14	$p > 0,05$	Ns
КПМ 7	vs	КПМ 21	$p > 0,05$	Ns
КПМ 14	vs	КПМ 21	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 7	vs	ТАМ 14	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 7	vs	ТАМ 21	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 14	vs	ТАМ 21	$p > 0,05$	Ns
ТАД 7	vs	ТАД 14	$p > 0,05$	Ns
ТАД 7	vs	ТАД 21	$p < 0,01$	**
ТАД 14	vs	ТАД 21	$p < 0,05$	*
КПМ 7	vs	ТАМ 7	$p > 0,05$	Ns
КПМ 7	vs	ТАД 7	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 7	vs	ТАД 7	$p > 0,05$	Ns
КПМ 14	vs	ТАМ 14	$p < 0,05$	*
КПМ 14	vs	ТАД 14	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 14	vs	ТАД 14	$p > 0,05$	Ns
КПМ 21	vs	ТАМ 21	$p > 0,05$	Ns
КПМ 21	vs	ТАД 21	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 21	vs	ТАД 21	$p > 0,05$	Ns

Сите три групи стаорци, во однос на времето на третман, покажаат индивидуален тренд на зголемување на активноста на AST во крвниот серум. Овој растечки тренд беше детектиран независно од тоа дали животните се под влијание на висока температура како предизвикувач на стрес или пак не се под во хипертермички амбиентални услови. Контролната група и групата третирана со збогатена јонизирана вода во периодот од 7. до 14. ден не манифестираа сигнификантно покачување на ензимската активност на AST. Оваа констатација е спротивна на онаа што може да се изведе за групата TAM, која во гореспоменатиот период бележи значајно покачување ($p < 0,01$) на активноста на AST. Акутната хипертермичка експозиција на 21. ден, во однос на претходниот период на третман кога отсуствува, предизвика маркантно зголемена активност на AST во крвниот серум со значајна разлика ($p < 0,001$) кај сите три групи. На 14. ден од третманот, разликите во активноста на AST помеѓу кои било две групи земени за споредба се незначајни ($p > 0,05$). Идентичен е случајот и со разликата во оваа ензимска активност на 7. ден помеѓу двете третирани групи, како и разликата помеѓу групите КПМ и TAM на 21. ден. Статистички значајна разлика ($p < 0,001$) во активноста на AST се забележува на 7. ден во споредбата направена помеѓу групата КПМ поединечно со секоја третирана група. Идентично на тоа, сигнификантна разлика е забележана на 21. ден повторно помеѓу контролната група и групата третирана со јонизирана вода. Разликата во активноста на AST помеѓу третираните групи на 21. ден повторно е значајна и изнесува $p < 0,05$.

4.2.4. Влијание на третманот со јонизирана вода и со јонизирана вода збогатена со витамин Ц и глутатион, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз активноста на ALT во крвниот серум кај стаорци

Цел на нашето истражување беше и одредувањето на активноста на ALT во крвниот серум. Притоа, резултатите од нашето истражување за влијанието на третманот со јонизирана вода, без и со додавање на соодветните антиоксиданти во неа, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз активноста на ALT се прикажани на слика 33.



Слика 33. Активност на ALT во крвниот серум
Figure 33. ALT activity in blood serum

Легенда: КПМ – контролна група третирана со природна вода; ТАМ – група третирана со јонизирана вода; ТАД – група третирана со јонизирана вода со додадени глутатион и витамин Ц

Табела 13. Резултати од статистичката анализа на податоците за активноста на AST во крвниот серум

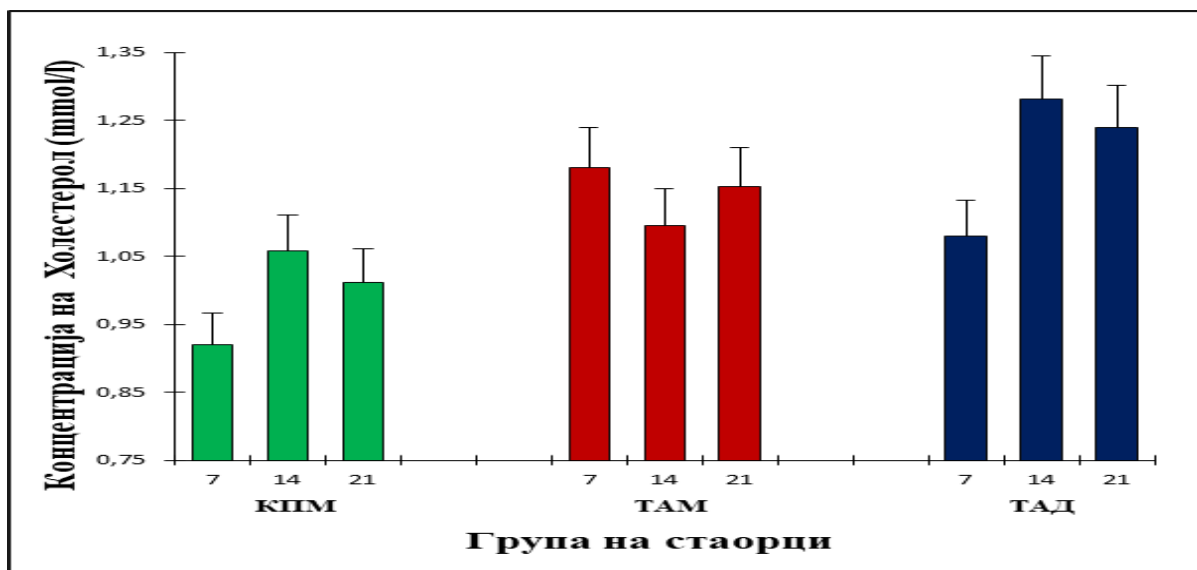
Table 13. Results from statistical analysis of data on the activity of AST in serum

Статистичка анализа – активност на AST во крвниот серум				
Споредувани групи			Резултат	
КПМ 7	vs	КПМ 14	$p > 0,05$	Ns
КПМ 7	vs	КПМ 21	$p > 0,05$	Ns
КПМ 14	vs	КПМ 21	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 7	vs	ТАМ 14	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 7	vs	ТАМ 21	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 14	vs	ТАМ 21	$p > 0,05$	Ns
ТАД 7	vs	ТАД 14	$p > 0,05$	Ns
ТАД 7	vs	ТАД 21	$p < 0,01$	**
ТАД 14	vs	ТАД 21	$p < 0,05$	*
КПМ 7	vs	ТАМ 7	$p > 0,05$	Ns
КПМ 7	vs	ТАД 7	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 7	vs	ТАД 7	$p > 0,05$	Ns
КПМ 14	vs	ТАМ 14	$p < 0,05$	*
КПМ 14	vs	ТАД 14	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 14	vs	ТАД 14	$p > 0,05$	Ns
КПМ 21	vs	ТАМ 21	$p > 0,05$	Ns
КПМ 21	vs	ТАД 21	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 21	vs	ТАД 21	$p > 0,05$	Ns

Ензимската активност на ALT во периодот од 7. до 14. ден бележи растечки тренд со статистички значајна разлика кај сите три групи стаорци. Акутното експонирање на висока амбиентална температура предизвикува опаѓање на активноста на ALT повторно кај сите три групи, но разликата во ова намалување е значајна ($p < 0,001$) само кај групата ТАМ во периодот од 7. до 14. ден и кај групата ТАД во периодот од 7. до 21. ден. Разликата во активноста на на ALT на 7. ден од третманот е статистички значајна ($p < 0,001$) помеѓу контролната група споредена засебно со секоја третирана група, додека меѓусебната компарација на двете третирани групи не покажа значајна разлика во однос на истата ензимска активност. Несигнификантна разлика во активноста на ALT беше забележана на 14. ден од третманот, и тоа помеѓу кои било две групи земени за споредба. Ваквиот заклучок е ист и за разликата во активноста на ALT помеѓу групите КПМ и ТАМ и групите КПМ и ТАД на 21. ден од третманот. Разликата во гореспомената ензимска активност на 21. ден е значајна ($p < 0,01$) само помеѓу двете третирани групи.

4.2.5. Влијание на третманот со јонизирана вода и со јонизирана вода збогатена со витамин Ц и глутатион, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз концентрацијата на холестеролот во крвниот серум кај стаорци

Резултатите од нашето истражување за влијанието на третманот со јонизирана вода, без и со додавање на соодветните антиоксиданти во неа, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз нивото на холестеролот се прикажани на слика 34.



Слика 34. Концентрација на холестеролот во крвниот серум
Figure 34. Concentration of cholesterol in blood serum

Легенда: КПМ – контролна група третирана со природна вода; TAM – група третирана со јонизирана вода; TAD – група третирана со јонизирана вода со додадени глутатион и витамин Ц

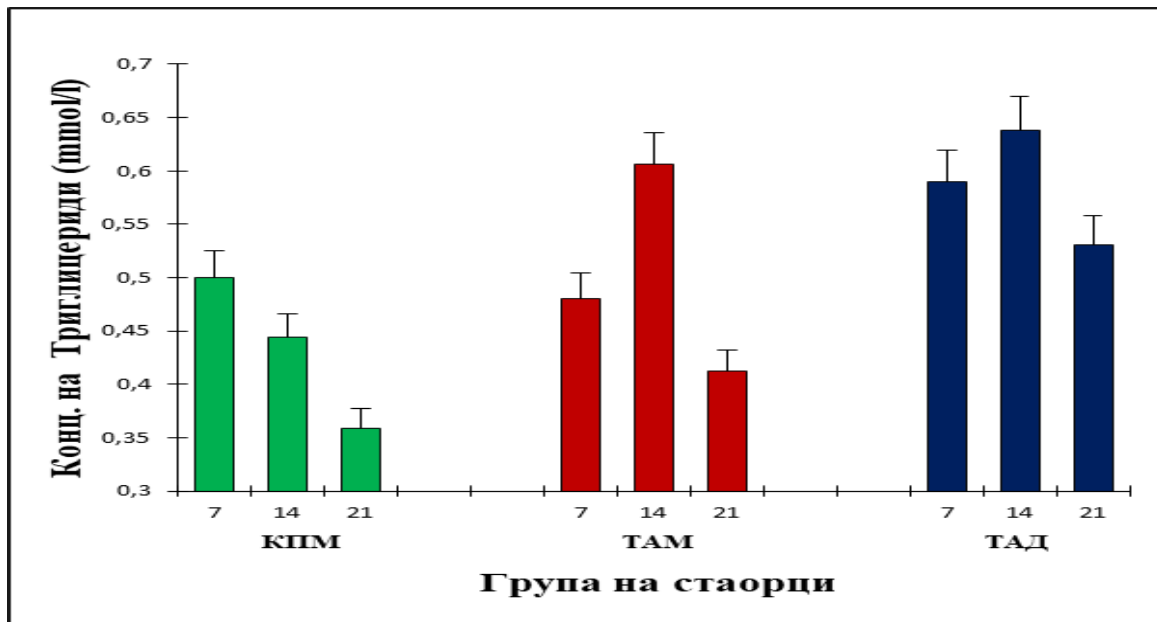
Табела 14. Резултати од статистичката анализа на податоците за концентрацијата на холестеролот во крвниот серум
 Table 14. Results from statistical analysis of data on the concentration of cholesterol in serum

Статистичка анализа – концентрација на холестерол				
Споредувани групи			Резултат	
КПМ 7	vs	КПМ 14	$p > 0,05$	Ns
КПМ 7	vs	КПМ 21	$p > 0,05$	Ns
КПМ 14	vs	КПМ 21	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 7	vs	ТАМ 14	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 7	vs	ТАМ 21	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 14	vs	ТАМ 21	$p > 0,05$	Ns
ТАД 7	vs	ТАД 14	$p > 0,05$	Ns
ТАД 7	vs	ТАД 21	$p < 0,01$	**
ТАД 14	vs	ТАД 21	$p < 0,05$	*
КПМ 7	vs	ТАМ 7	$p > 0,05$	Ns
КПМ 7	vs	ТАД 7	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 7	vs	ТАД 7	$p > 0,05$	Ns
КПМ 14	vs	ТАМ 14	$p < 0,05$	*
КПМ 14	vs	ТАД 14	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 14	vs	ТАД 14	$p > 0,05$	Ns
КПМ 21	vs	ТАМ 21	$p > 0,05$	Ns
КПМ 21	vs	ТАД 21	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 21	vs	ТАД 21	$p > 0,05$	Ns

Контролната група во поглед на временскиот период на истражувањето покажа значајна разлика во однос на концентрацијата на холестеролот. Кај групите КПМ7 и КПМ14 беше забележана значајна статистичка разлика ($p < 0,001$); исто така, и кај КПМ7 и КПМ21 беше забележана статистичка разлика ($p < 0,01$). Третманот со јонизирана вода аплициран на групата ТАМ не доведе до значајна разлика ($p > 0,05$). Третманот на групата ТАД со јонизирана вода збогатена со GSH и витамин Ц доведе до значајна разлика ($p < 0,001$) во однос на концентрацијата на холестеролот во временскиот период кога стаорците не беа хипертермички експонирани. Исто така, овој третман доведе и до значајна разлика ($p < 0,001$) помеѓу ТАД7 и ТАД21 (хипертермички експонирани стаорци). Акутното хипертермичко експонирање на експерименталните животни во однос на третманот со јонизирана вода, со или без елементи додадени во неа, доведе до значајна разлика ($p < 0,001$) во концентрацијата на холестеролот кај сите три групи.

4.2.6. Влијание на третманот со јонизирана вода и со јонизирана вода збогатена со витамин Ц и глутатион, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз концентрацијата на триглицеридите во крвниот серум кај стаорци

На сликата 35 се прикажани резултатите од нашето истражување за влијанието на третманот со јонизирана вода, без и со додавање на соодветните антиоксиданти во неа, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз нивото на триглицеридите.



Слика 35. Концентрација на триглицеридите во крвниот серум
Figure 35. Concentration of triglycerides in blood serum

Легенда: КПМ – контролна група третирана со природна вода; ТАМ – група третирана со јонизирана вода; ТАД – група третирана со јонизирана вода со додадени глутатион и витамин Ц

Табела 15. Резултати од статистичката анализа на податоците за концентрацијата на триглицеридите во крвниот серум
 Table 15. Results from statistical analysis of data on the concentration of triglycerides in serum

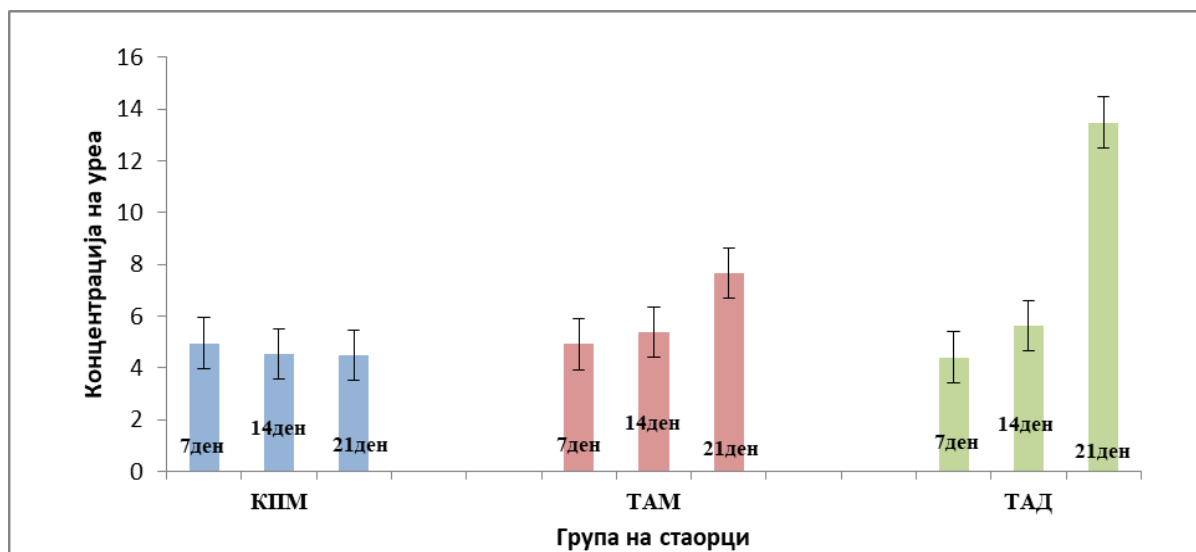
Статистичка анализа – концентрација на триглицериди				
Споредувани групи			Резултат	
КПМ 7	vs	КПМ 14	$p > 0,01$	Ns
КПМ 7	vs	КПМ 21	$p < 0,01$	**
КПМ 14	vs	КПМ 21	$p < 0,01$	**
ТАМ 7	vs	ТАМ 14	$p < 0,001$	***
ТАМ 7	vs	ТАМ 21	$p < 0,001$	***
ТАМ 14	vs	ТАМ 21	$p < 0,001$	***
ТАД 7	vs	ТАД 14	$p > 0,05$	Ns
ТАД 7	vs	ТАД 21	$p < 0,01$	**
ТАД 14	vs	ТАД 21	$p < 0,001$	***
КПМ 7	vs	ТАМ 7	$p > 0,05$	Ns
КПМ 7	vs	ТАД 7	$p < 0,001$	***
ТАМ 7	vs	ТАД 7	$p < 0,001$	***
КПМ 14	vs	ТАМ 14	$p < 0,01$	**
КПМ 14	vs	ТАД 14	$p < 0,01$	**
ТАМ 14	vs	ТАД 14	$p > 0,05$	Ns
КПМ 21	vs	ТАМ 21	$p < 0,01$	**
КПМ 21	vs	ТАД 21	$p < 0,001$	***
ТАМ 21	vs	ТАД 21	$p < 0,001$	***

Контролната група КПМ во текот на целиот третман од 21 ден покажа значајна статистичка разлика ($p < 0,01$), односно намалување на концентрацијата на триглицеридите. Третманот со јонизирана вода аплициран на групата ТАМ и третманот на групата ТАД со јонизирана вода збогатена со GSH и витамин Ц доведоа до значајна разлика ($p < 0,001$) во однос на концентрацијата на триглицериди во временскиот период кога стаорците не беа хипертермички експонирани. Акутното хипертермичко експонирање на експерименталните животни во однос на третманот со јонизирана вода, со или без елементи додадени во неа, доведе до значајна разлика ($p < 0,001$) во концентрацијата на триглицеридите во однос на периодот кога не беше аплицирана висока температура. Статистички значајна разлика беше констатирана при компарацијата на кои било две групи на 7., 14. и на 21. ден од соодветниот третман. Ваквата значајна разлика е највоочлива на 21. ден, кога

има вредност $p < 0,001$ добиена при сите направени споредби. Отстапка од ваквиот заклучок прават разликите помеѓу групите КПМ и ТАД на 7. ден, како и разликата помеѓу третираните групи ТАМ и ТАД исто така на 7. ден, кои ги детектиравме како статистички незначајни ($p > 0,05$).

4.2.7. Влијание на третманот со јонизирана вода и со јонизирана вода збогатена со витамин Ц и глутатион, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз концентрацијата на уреата во крвниот серум кај стаорци

Резултатите добиени од нашето истражување за влијанието на третманот со јонизирана вода, без и со додавање на соодветните антиоксиданти во неа, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз нивото на уреата се прикажани на слика 36.



Слика 36. Концентрација на уреата во крвниот серум
Figure 36. Concentration of urea in blood serum

Легенда: КПМ – контролна група третирана со природна вода; ТАМ – група третирана со јонизирана вода; ТАД – група третирана со јонизирана вода со додадени глутатион и витамин Ц

Табела 16. Резултати од статистичката анализа на податоците за концентрацијата на уреата во крвниот серум
 Table 16. Results from statistical analysis of data on the concentration of urea in serum

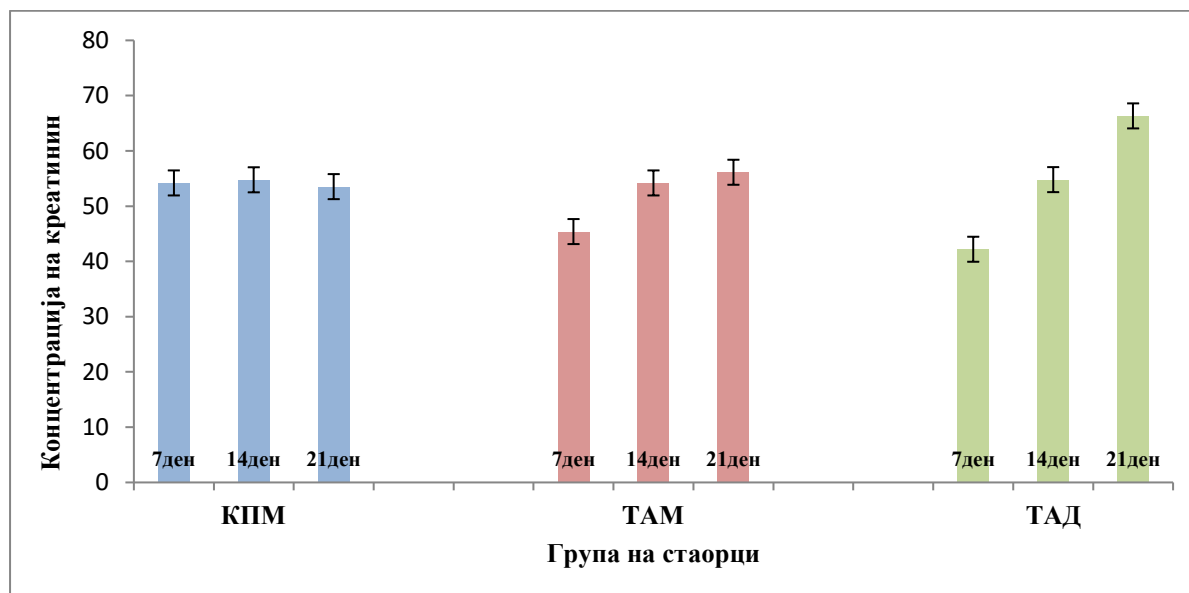
Статистичка анализа – концентрација на уреа во крвниот серум				
Споредувани групи			Резултат	
КПМ 7	vs	КПМ 14	$p > 0,05$	Ns
КПМ 7	vs	КПМ 21	$p > 0,05$	Ns
КПМ 14	vs	КПМ 21	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 7	vs	ТАМ 14	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 7	vs	ТАМ 21	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 14	vs	ТАМ 21	$p > 0,05$	Ns
ТАД 7	vs	ТАД 14	$p > 0,05$	Ns
ТАД 7	vs	ТАД 21	$p < 0,01$	**
ТАД 14	vs	ТАД 21	$p < 0,05$	*
КПМ 7	vs	ТАМ 7	$p > 0,05$	Ns
КПМ 7	vs	ТАД 7	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 7	vs	ТАД 7	$p > 0,05$	Ns
КПМ 14	vs	ТАМ 14	$p < 0,05$	*
КПМ 14	vs	ТАД 14	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 14	vs	ТАД 14	$p > 0,05$	Ns
КПМ 21	vs	ТАМ 21	$p > 0,05$	Ns
КПМ 21	vs	ТАД 21	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 21	vs	ТАД 21	$p > 0,05$	Ns

Третманот со јонизирана вода аплициран на групата ТАМ и третманот на групата ТАД со јонизирана вода збогатена со GSH и витамин Ц не доведе до значајна разлика ($p > 0,05$) во однос на концентрацијата на уреата во временскиот период кога стаорците беа хипертермички експонирани. Истата статистички незначајна разлика се забележува и кај групата што не беше третирана со јонизирана вода, односно контролната група која примаше само природна вода. Акутното хипертермичко експонирање на експерименталните животни во однос на третманот со јонизирана вода, со или без елементи додадени во неа, доведе до значајна разлика ($p < 0,001$) во концентрацијата на уреата во однос на периодот кога не беше аплицирана висока температура. Исклучок од ваквата констатација е групата КПМ, кај која периодот на хипертермичка експозиција не доведе до значајна разлика во однос на концентрацијата на уреата. Статистички значајна разлика беше констатирана

при компарацијата на кои било две групи на 7., 14. и на 21. ден од соодветниот третман. Ваквата значајна разлика е највоочлива на 21. ден и таа има вредност $p < 0,001$ добиена при сите направени споредби. Отстапка од ваквиот заклучок прават разликите помеѓу групите КПМ и ТАД на 7. ден, како и разликата помеѓу третираните групи ТАМ и ТАД на 14. ден, кои ги детектиравме како статистички незначајни ($p > 0,05$).

4.2.8. Влијание на третманот со јонизирана вода и со јонизирана вода збогатена со витамин Ц и глутатион, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз концентрацијата на креатининот во крвниот серум кај стаорци

Врз основа на резултатите добиени од нашето истражување за влијанието на третманот со јонизирана вода, без и со додавање на соодветните антиоксиданти во неа, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз нивото на креатининот се прикажани на слика 37.



Слика 37. Концентрација на креатининот во крвниот серум
Figure 37. Concentration of creatinine in blood serum

Легенда: КПМ – контролна група третирана со природна вода; ТАМ – група третирана со јонизирана вода; ТАД – група третирана со јонизирана вода со додадени глутатион и витамин Ц

Табела 17. Резултати од статистичката анализа на податоците за концентрацијата на креатининот во крвниот серум
 Table 17. Results from statistical analysis of data on the concentration of creatinine in serum

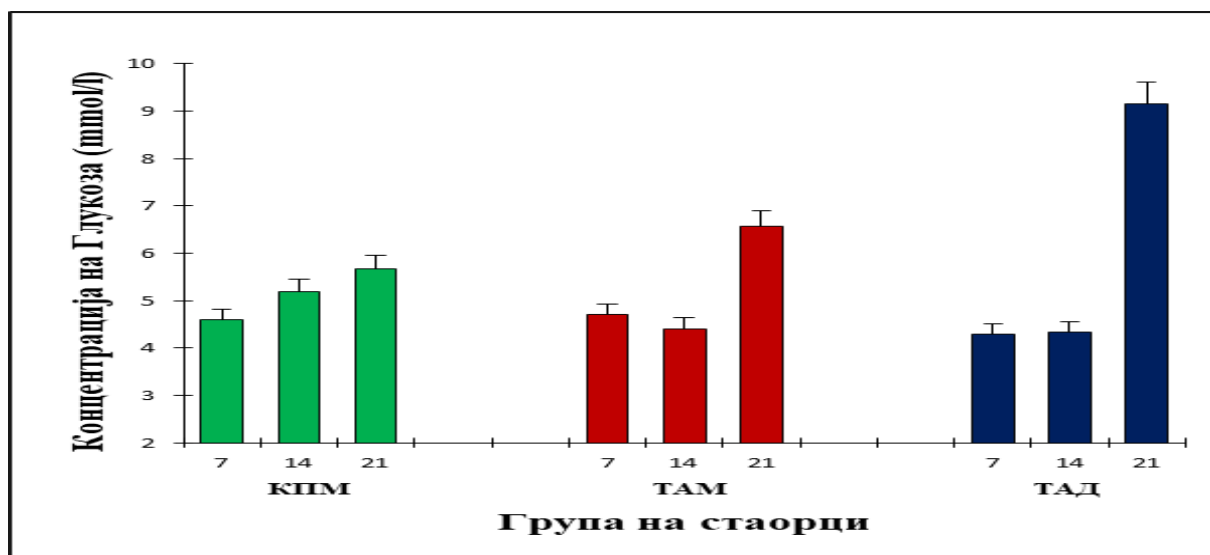
Статистичка анализа – концентрација на креатинин во крвниот серум				
Споредувани групи			Резултат	
КПМ 7	vs	КПМ 14	$p > 0,05$	Ns
КПМ 7	vs	КПМ 21	$p > 0,05$	Ns
КПМ 14	vs	КПМ 21	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 7	vs	ТАМ 14	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 7	vs	ТАМ 21	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 14	vs	ТАМ 21	$p > 0,05$	Ns
ТАД 7	vs	ТАД 14	$p > 0,05$	Ns
ТАД 7	vs	ТАД 21	$p < 0,01$	**
ТАД 14	vs	ТАД 21	$p < 0,05$	*
КПМ 7	vs	ТАМ 7	$p > 0,05$	Ns
КПМ 7	vs	ТАД 7	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 7	vs	ТАД 7	$p > 0,05$	Ns
КПМ 14	vs	ТАМ 14	$p < 0,05$	*
КПМ 14	vs	ТАД 14	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 14	vs	ТАД 14	$p > 0,05$	Ns
КПМ 21	vs	ТАМ 21	$p > 0,05$	Ns
КПМ 21	vs	ТАД 21	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 21	vs	ТАД 21	$p > 0,05$	Ns

Контролната група во поглед на временскиот период на истражувањето не покажа значајна разлика во однос на концентрацијата на креатининот. Двете третирани групи, ТАМ и ТАД, манифестираа растечки тренд во концентрацијата на гореспоменатиот параметар, и тоа во однос на времето на третирање како во периодот на отсуство така и во оној на присуство на воведениот хипертермички стрес. Статистички значајна разлика се забележува кај групата ТАМ помеѓу 7. ден како појдовна точка и 14. и 21. ден од третманот, додека помеѓу 14. и 21. ден кај истата група не е регистрирана значајна разлика. Воочлива статистички значајна разлика со вредност $p < 0,001$ имаат споредбите направени во рамките на групата ТАД помеѓу деновите од третманот земени за анализа на сите параметри. Значајна разлика во концентрацијата на креатининот меѓу кои било две групи од вкупно трите групи

вклучени во истражувањето не беше забележана на 14. ден од третманот. Идентичен случај беше регистрира во концентрацијата на истата анализа меѓу двете третирани групи на 7. ден, како и помеѓу групите КПМ и ТАМ на 21. ден од третманот. Преостанатите можни споредби помеѓу дадени две групи на 7. и на 21. ден од истражувањето покажаа статистички значајна разлика со вредности $p < 0,01$ и $p < 0,001$.

4.2.9. Влијание на третманот со јонизирана вода и со јонизирана вода збогатена со витамин Ц и глутатион, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз концентрацијата на гликозата во крвниот серум кај стаорци

Прикажаните резултати од нашето истражување за влијанието на третманот со јонизирана вода, без и со додавање на соодветните антиоксиданти во неа, како и на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот врз нивото на гликозата се прикажани на слика 38.



Слика 38. Концентрација на гликозата во крвниот серум
Figure 38. Concentration of glucose in blood serum

Легенда: КПМ – контролна група третирана со природна вода; ТАМ – група третирана со јонизирана вода; ТАД – група третирана со јонизирана вода со додадени глутатион и витамин Ц

Табела 18. Резултати од статистичката анализа на податоците за концентрацијата на гликозата во крвниот серум
 Table 18. Results from statistical analysis of data on the concentration of glucose in serum

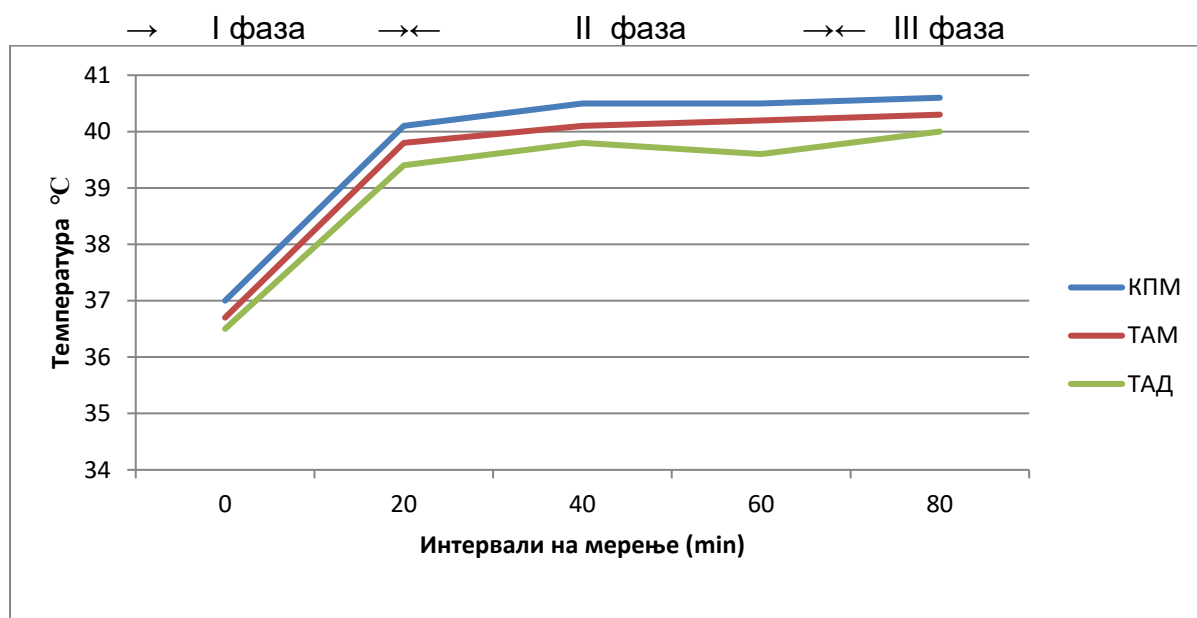
Статистичка анализа – концентрација на гликоза во крвниот серум				
Споредувани групи			Резултат	
КПМ 7	vs	КПМ 14	$p > 0,05$	Ns
КПМ 7	vs	КПМ 21	$p > 0,05$	Ns
КПМ 14	vs	КПМ 21	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 7	vs	ТАМ 14	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 7	vs	ТАМ 21	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 14	vs	ТАМ 21	$p > 0,05$	Ns
ТАД 7	vs	ТАД 14	$p > 0,05$	Ns
ТАД 7	vs	ТАД 21	$p < 0,01$	**
ТАД 14	vs	ТАД 21	$p < 0,05$	*
КПМ 7	vs	ТАМ 7	$p > 0,05$	Ns
КПМ 7	vs	ТАД 7	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 7	vs	ТАД 7	$p > 0,05$	Ns
КПМ 14	vs	ТАМ 14	$p < 0,05$	*
КПМ 14	vs	ТАД 14	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 14	vs	ТАД 14	$p > 0,05$	Ns
КПМ 21	vs	ТАМ 21	$p > 0,05$	Ns
КПМ 21	vs	ТАД 21	$p > 0,05$	Ns
ТАМ 21	vs	ТАД 21	$p > 0,05$	Ns

Испитувајќи го влијанието на акутниот хипертермички стрес врз концентрацијата на гликозата во крвниот серум констатиравме значајно зголемување ($p < 0,001$) во текот на 21. ден кај трите третирани групи. Контролната група во поглед на временскиот период на истражувањето КПМ7 и КПМ14 не покажа значајна разлика ($p > 0,01$) во однос на концентрацијата на гликозата. Кај КПМ7 и КПМ 21 се покажа значајна разлика ($p > 0,01$). Третманот со јонизирана вода аплициран на групата ТАМ, односно на ТАМ7 и на ТАМ14, не покажаа значајна разлика ($p > 0,05$), додека ТАМ7 и ТАМ21 покажаа значајна разлика ($p < 0,001$); исто така, ТАМ14 и ТАМ21 покажаа значајна разлика ($p < 0,001$) во концентрацијата на гликозата. Сите три групи во временски интервал од 7 дена не покажаа значајна разлика ($p > 0,05$) во концентрацијата на

гликозата. Во временскиот интервал од 14 дена кај сите три групи не се покажа разлика ($p < 0,01$) во концентрацијата на гликозата.

4.3 Промена на телесната температура во текот на акутната хипертермичка експозиција воведена на 21. ден од третманот

На слика 39 се прикажани промените на телесната температура (ТТ) кај соодветните групи животни (КПМ, ТАМ, ТАД) во текот на акутната хипертермичка експозиција. Во зависност од времетраењето на експозицијата, можат да се забележат три фази во динамиката на промените на температурата. Првата фаза се одликува со покачување на нормалното ниво за 2 до 3 °C; втората фаза, позната како температурно плато, вклучува мали флукуации околу нововоспоставеното ниво условени од активноста на механизмите за терморегулација; третата фаза, или секундарна хипертермија, доведува до понатамошното покачување на телесната температура и може да заврши летално.



Слика 39. Промена на телесната температура при акутна хипертермичка експозиција кај трите групи

Figure 39. Change in body temperature during acute hyperthermic exposure in the three groups

Легенда: КПМ – контролна група третирана со природна вода; ТАМ – група третирана со јонизирана вода; ТАД – група третирана со јонизирана вода со додадени глутатион и витамин Ц

Од добиените резултати констатиравме статистички промени во ТТ кај трите експериментални групи. Промените станаа забележливи од 0. минута, кога првата група имаше средна вредност на ТТ од 37 °С, втората група средна вредност на ТТ од 36,7°С и третата група средна вредност на ТТ од 36,4°С. При сите следни мерења во различните временски интервали ТТ континуирано беше различно покачена кај трите групи. Првата група имаше повисоко покачена ТТ во споредба со другите две групи. Кај втората група имаше покачување на ТТ, но со вредност пониска за 0,6 °С од онаа на првата група, а нешто повисока, за 0,4 °С, од третата група. Кај третата група, исто така, имаме покачени вредности на ТТ, но со вредности пониски за 0,8 °С од оние на првата група, а за 0,4 °С пониски од тие на втората група.

5.ДИСКУСИЈА

Еукариотските клетки користат енергија главно во форма на АТР, соединение кое се синтетизира во процесот на оксидативна фосфорилација во митохондриите, при што настанува редукција на молекуларниот кислород до вода. Како последица на ваквото искористувањето на кислородот во метаболизмот, сите аеробни организми се подложни на одредено ниво на физиолошки оксидативен стрес, односно на продукција главно на кислородни радикали, кои во ниски или умерени концентрации во организмот се инволвирани во нормалните клеточни процеси (Valko et al., 2007). Во физиолошки услови, околу 2 до 4 % од вкупната кислородна консумација се конвертира во супероксиден радикален анјон во митохондриите. Механизмите преку кои дејствуваат ензимските и неензимските антиоксиданти се одговорни за неутрализирање на вишокот слободни радикали продуцирани во организмот, и тоа пред тие да почнат да го изразуваат своето штетно дејство. Процесот на стареење и многубројните дегенеративни болести се поврзуваат со нивото на патолошки генерираниот оксидативен стрес. Овој податок води кон констатацијата дека степенот на оксидативно оштетување на биомолекулите зависи од големината на антиоксидативниот капацитет на самиот организам.

Електрохемиски активираната вода (редуцирана, алкална вода) се вбројува меѓу природните агенси со кои може да се засили антиоксидативната одбрана на организмот. Посебен вид електролиза е една од методите што се користи за добивање функционална вода која претставува активирана вода со способност за вршење специфични и различни функции во споредба со неактивираната вода. Во групата функционални води, електролизираната вода е најмногу проучувана. Електрохемиски редуцираната вода (ERW) се продуцира во близина на катодата, а електрохемиски оксидираната вода (EOW) се добива во близина на анодата (Shirahata et al., 2012). Електролизата на водата создава силни редуцирачки услови во близина на катодата поради продукцијата на водородни атоми (активен водород) и на молекуларен водород (Shirahata et al., 2012). Минералните наночестички формирани во текот на електролизата манифестираат каталитичко дејство во конверзијата на

молекуларниот водород до неговата атомска форма. ERW покажува алкална рН-вредност поради продуцираните ОН-јони, ниска концентрација на растворен кислород, висока сатурација со молекули на водород (H₂) и на активен водород, како и негативен оксидациско-редукциски потенцијал (Shirahata et al., 2007). Постојат одреден број истражувања кои го потврдуваат податокот дека ERW има особини на антиоксидант благодарение на присуството на водород во неа. Хуанг и група автори (Huang et al., 2010) во своето истражување тврдат дека протективното дејство на ERW се должи на присуството на молекуларниот водород, кој има силни редуцирачки својства. Ширата и соработниците (Shirahata et al.), пак, сугерираат дека функцијата на ERW слична на SOD и на CAT не се должи на растворениот молекуларен водород, туку на активниот атомски водород, кој поседува повисока редуцирачка способност. Активниот водород во ERW може да се смета за идеален „чистач“ на ROS бидејќи по редуцијата не продуцира оксидирани молекули, како што е случајот со органските антиоксиданти (витамините Ц и Е и полифенолите) (Li et al., 2002).

Многу истражувања покажуваат дека третманот со ERW индиректно, преку своето антиоксидативно влијание, може да ги подобри или да ги превенира болестите поврзани со оксидативниот стрес кај глодарите и кај луѓето. Јанагихара и соработниците (Yanagihara et al., 2005) покажале дека пиенето електролизирана H₂-сатурирана вода покажало антиоксидативна активност кај стаорци. Нагата (Nagata et al., 2009) и соработниците во своето истражување откриле дека молекуларниот водород растворен во водата за пиене ги превенира попречувањата во процесот на учење индуцирани од стрес. Консумацијата на ERW се поврзува со подобрувањето на гликозниот и на липидниот метаболизам кај пациентите со дијабетес тип 2 (Kajiyama et al., 2008), со ретардацијата на развојот и со прогресијата на Паркинсоновата болест кај стаорци како експериментален модел (Fu et al., 2009), како и со превенцијата на оштетувањета на хепарот индуцирани од оксидативен стрес (Tsai et al., 2009). Неколку студии директно индицираат дека ERW има антиоксидативно дејство, односно особина на силен антиоксидант кој ги штити ДНК, РНК и протеините од оксидативното дејство на слободните радикални форми во организмот (S. Shirahata et al., 1997; Lee et al., 2006). Механизмите со кои ERW како антиоксидант ги штити биомолекулите од оксидација се,

всушност, оние преку кои индиректно се спречуваат развојот и појавата на голем број болести кои произлегуваат од патолошки генерираниот оксидативен стрес во организмот.

Антиоксидативниот статус на клетката е значаен во хипертермички услови, кога продукцијата на слободни радикали е интензивирани. Кога клетките се експонирани на оксидативен стрес, ја зголемуваат експресијата и активноста на антиоксидативните ензими како компензаторен механизам за подобра заштита од оштетувањата индуцирани од ROS. Одреден број студии укажуваат на податокот дека умерени нивоа на токсични реактивни радикали индуцираат експресија на гени кои се одговорни за синтеза на антиоксидативните ензими и за нивната активност, додека многу високи нивоа ја редуцираат истата ензимска активност како резултат на оштетувањата на молекуларната машинерија потребна за индукција на овие ензими (Wei & Lee, 2002; Gechev et al., 2002). Истражувањето на Јо и соработниците (Yoo et al., 1999) покажува дека H_2O_2 спаѓа во групата индуцибилни регулаторни елементи на експресијата на SOD1-генот за синтеза на SOD-ензимот како протективен адаптивен одговор на оксидативниот стрес. Резултатите од студијата на Франко и соработниците (Franco et al., 1999) покажуваат зголемување на експресијата на специфични антиоксидативни гени во мускули експонирани на оксидативен стрес. Најголеми индукции биле регистрирани во нивоата на GRx и на CAT mRNA, додека CuZnSOD and MnSOD покажале само умерени зголемувања. Гените кои ја кодираат синтезата на Mn-SOD во својот промотор-регион имаат сензитивни елементи и на двата транскрипторни фактори – AP-1 и NFkB. Како антиоксидативен ензим, SOD може да биде и индуциран и конструиран во услови на оксидативен стрес (Cherubini et al., 2005).

Овие податоци од релевантната литература делумно се поклопуваат со нашите експериментални резултати. Имено, на крајот од нашиот експеримент, кај сите групи забележавме растечки тренд и значајно повисока разлика во активноста на CAT на 21. ден, кога стаорците беа изложени на хипертермички стрес, во споредба со периодот кога немаше услови кои предизвикуваат стрес, додека спротивен тренд на најниска активност на SOD забележавме во истиот период кога не беа изложени на стрес. Акутното хипертермичко експонирање предизвика значајно покачување на активноста на CAT кај сите три групи. Можен механизам за редукција на активноста на антиоксидативните ензими е

инактивацијата предизвикана од вишок слободни радикали (Schmatz et al., 2012). Најверојатно поради зголеменото ослободување на слободни радикали во услови на хипертермија, SOD, како прв ензим кој се вклучува во мрежата на антиоксидативната одбрана, интензивно се троши за да продуцира H_2O_2 . Понатаму, водород пероксидот може да биде детоксициран преку CAT, GRx или пак да влезе во Фентонова реакција за создавање OH. Алтернативната судбина за декомпозиција на H_2O_2 води кон заклучокот дека не троши само CAT за негово неутрализирање, поради што се регистрира повисока концентрација на CAT отколку на SOD како единствен ензим за дизмутација на O_2^- . Студијата на Јашке и Бензик (Jaeschke & Benzick, 1992) дава податок дека каталазата придонесува само со 20 % во неутрализацијата на H_2O_2 . Како и да е, мора да се има предвид и влијанието на ROS врз протеинската структура на самите антиоксидативни ензими кои се подложни на оксидативна модификација и оштетувања кои би завршиле во правец на намалување на нивната активност, како што е случајот со SOD во нашиот експеримент.

Јонизираната вода дејствува како силен антиоксидант во организмот, манифестирајќи активност слична на SOD и на CAT. Се смета дека се комплицирани механизмите со кои ERW, дејствувајќи слично како антиоксидативен ензим, ги неутрализира ROS. Водородните молекули и активниот водород можат да се нови редокс-регулаторски фактори кои можат да индуцираат генска експресија на антиоксидативните ензими. H_2 -молекулите можат да бидат конвертирани до активен водород со каталитичко дејство на металните наночестички кои претставуваат H-донори и придонесуваат за моќна редуцибилност на ERW (Shirahata et al., 2012). Истражувањата на Франческели и соработниците (Franceschelli et al., 2016) се во согласност со оние на Ширахата (Shirahata) и неговите соработници, кои евидентирале дека ERW има способност за неутрализирање на ROS во процес сличен на дејството на ензимите на CAT и на SOD. Резултатите од студијата на Цаи и група автори (Tsai et al., 2009), исто така, покажуваат дека ERW има силна антиоксидативна активност преку неутрализирање радикалите на O_2^- и на H_2O_2 .

Резултатите од нашите истражувања покажуваат слични вредности. На мислење сме дека ваквите својства на ERW како антиоксидативен ензим со слична активност на SOD и на CAT кај групата TAM на 7., 14. и на 21. ден

покажуваат повисока активност на истите ензими споредено со контролната група. Кај групата ТАД забележавме највисока активност на SOD и на CAT во споредба со претходните две групи, бидејќи кај оваа група, покрај присуството на ERW, воведовме и висока температура како стресоген фактор, кој, според погоре изнесените објаснувања, индиректно, преку оксидативниот стрес, може да индуцира транскрипција на гени одговорни за синтеза на антиоксидативните ензими. Третманот аплициран соодветно на секоја група во периодот на хипертермичка експозиција предизвика сигнификантна разлика во ензимската активност на SOD во крвната плазма и во црниот дроб кај двете групи КПМ и ТАД. Акутното хипертермичко експонирање на 21. ден кај групите КПМ и ТАМ за активноста на SOD во бубрезите не предизвика сигнификантна разлика. Иако сметаме дека аплицираниот протокол за хипертермички стрес не вклучуваше екстремно долго време на експозиција, што би индуцирало голема продукција на супероксидни анјони, кои би го надминале капацитетот на механизмите задолжени за нивна неутрализација (Ђорђевиќ et al., 2010), сепак тоа сугерира дека може да се иницира зголемен оксидативен стрес под дејство на употребената хипертермичка експозиција, посебно ако супсеквентниот заштитен ензим глутатион пероксидаза (GPx) не функционира во секвенца со SOD или со Mn-SOD.

Според резултатите што ги добивме од нашите истражувања, кај контролната група КПМ, третирана со природна вода, во текот на 14. ден забележавме зголемена активност на GPx, која при хипертермичка експозиција во истата група се намалува. Активноста на GPx при хипертермичка експозиција се намалува и кај втората група ТАМ третирана со јонизирана вода. Кај третата група ТАД, третирана со јонизирана вода со додадени глутатион и витамин Ц, беше регистрирана повисока активност на GPx. Акутното хипертермичко експонирање предизвика значајно покачување на активноста на GPx во крвниот серум кај третата група. Антиоксидативните ензими се сметаат за одбрана која ги штити макромолекулите од оксидативно оштетување. SOD бргу го конвертира O_2 во помалку опасниот H_2O_2 , кој потоа под дејство на CAT и на GPx се конвертира во вода. Третманот аплициран соодветно на секоја група во периодот на хипертермичка експозиција предизвика сигнификантна разлика во активноста на GPx само во крвната плазма кај трите групи. Акутното хипертермичко експонирање на 21. ден кај

групите КПМ и ТАД за крвната плазма има статистички значајна разлика; исто така, и кај групите ТАМ и ТАД има статистички значајна разлика во однос на крвната плазма, што е спротивно на разликата кај преостанатите споредувани групи во однос на црниот дроб и на бубрези, во кои имаме значително намалена активност на GPx. CAT го препознава само H₂O₂ како супстрат и има многу низок афинитет (Gohen & Hochstein, 1963). Така, таа се активира само кога H₂O₂ е во повисока концентрација од физиолошката, а овие услови можат бидат исполнети кога има оксидативен стрес. Од друга страна, GPx метаболизира и пероксицирани органски молекули исто како и H₂O₂ со релативно висок афинитет и ги катализира овие молекули дури и при нормални физиолошки концентрации (Izawa et al., 1996). Оттука, активност на GPx се смета дека ја претставува основната заштита на клетката, која ја доведува концентрацијата до нормалните физиолошки вредности.

Другиот ензим од редокс-циклусот на глутатионот, односно GR, покажа пад во активност во поглед на хипертермичката експозиција во крвниот серум. Сите три групи во однос на соодветниот третман што секоја група индивидуално го добила и во однос на времето на неговата апликација покажуваат статистички значајна разлика во активност на GR кај КПМ 7 и кај КПМ 21; исто така, КПМ 14 и КПМ 21 покажуваат статистички значајна разлика во активност на GR, при што на 21. ден имаме намалување на активност на GR. И ТАМ 7 и ТАМ 21 покажуваат статистички значајна разлика во активност на GR, како и ТАМ 14 и ТАМ 21. Акутното хипертермичко експонирање предизвика значајно намалување во активност на GR кај сите три групи. Кај крвна плазма, кај групите третирани со глутатион и витамин Ц добивме зголемување на активност на GR во споредба со првата група која е третирана со природна вода. Во црниот дроб кај сите три групи нема сигнификантна разлика во активност на GR, а исто како и во бубрезите.

Најважниот механизам преку кој настанува оксидативна модификација на протеините е метал-катализираната оксидација (Berlett & Stadtman, 1997). Водород пероксидот е редуциран до хидроксилен радикал во присуство на јон на транзиционен метал (Fe²⁺, Cu²⁺) со примена на Хабер-Вајсовата (Haber-Weiss) или на Фентоновата реакција (Halliwell & Gutteridge, 1989). Понатаму, овој радикал дејствува врз протеините. Сите аминокиселини се осетливи на оштетување од страна на хидроксилен радикал (Хаџи Петрушев, 2010). Во

присуство на Fe^{2+} и H_2O_2 , модификација на протеинот се случува на аминокиселинските странични синџири кои поседуваат метал-врзувачки места. Оксидираните протеини се супстрати за протеолитичка дигестија во клетката (Dröge, 2002). Иако во литературата можат да се најдат истражувања кои ги објаснуваат механизмите за поволните влијанија на ERW врз липидниот и врз гликозниот метаболизам (Kajiyama et al., 2008; Kim & Kim, 2006), сепак само неколку студии говорат за поврзаноста помеѓу ERW и концентрацијата на вкупните протеини. Истражувањата на Ширахата и соработниците (Shirahata et al., 1997) и на Ли и соработниците (Lee et al., 2006) го покажуваат супресивното дејствување на ERW врз протеинската деградација, односно врз оксидативната модификација на протеините и на ензимите како биомолекули со протеинска структура. Ширахата и соработниците (Shirahata et al., 1997) дошле до сознание дека ERW може да ги неутрализира O_2^- и H_2O_2 манифестирајќи активност слична на SOD и на CAT. Покрај своето цитотоксично дејство, O_2^- и H_2O_2 во ниски концентрации вршат важни физиолошки функции како регулаторни сигнални молекули инволвирани во каскади на сигнална трансдукција и во регулација на биолошки процеси како апоптоза, клеточна пролиферација и диференцијација (Sauer et al., 2001). Поради ова, цитотоксичните ОН. мора да бидат неутрализирани без компромитирачко дејство врз другите, физиолошки важни ROS. Осава и соработниците (Ohsawa et al., 2007) посочуваат дека H_2 растворен во ERW има селективно антиоксидативно дејство врз ОН. без да ги засегне другите ROS.

Нашето истражување, во временскиот период пред воведување на хипертермичкиот стрес, поточно од 7. до 14. ден, покажа незначајна разлика на вкупните протеини во крвниот серум кај животните третирани со јонизирана вода и со јонизирана вода со додадени глутатион и витамин Ц, како и кај контролната група. На 21. ден од третманот, кога воведовме хипертермички стрес како причинител на оксидативен стрес кај стаорците, кај контролната група и кај групата TAM констатиравме статистички значајна пониска концентрација на протеини во однос на претходниот период на третман како резултат на високата концентрација на ROS кои интензивно оксидативно ги оштетуваат овие макромолекули. Претпоставуваме дека концентрација на вкупните протеини на ова ниво на експериментот, кога животните се изложени на силен хипертермички стрес кој предизвика значајна елевација на

оксидативниот стрес во организмот, би била уште пониска доколку отсутствува третманот со ERW кај групата третирана со неа. Степенот на оксидативно оштетување на протеините треба да зависи од јачината на антиоксидативната одбрана кај секоја група стаорци. Поради тоа, очекувано, кај групата ТАД немаше значајно намалување на концентрацијата на вкупните протеини бидејќи третманот со збогатената алкална вода ја превенирал нивната оксидација. Веруваме дека и во нашата студија, како и во гореспоменатите студии на Ширата и соработниците (Shirahata et al., 1997) и на Ли и соработниците (Lee et al., 2006), беше во функција на веќе дискутираниот механизам за заштитно дејствување на ERW врз оксидативното цепање на протеините и врз нивната супсеквентна протеолитичка деградација. Иако оваа наша констатација е во согласност со одредени истражувања претставени во релевантната литература, сепак тие не можат да се споредат со резултатите што ги добивме, бидејќи разликата во концентрацијата на вкупните протеини помеѓу групите КПМ и ТАМ на 21. ден е незначајна и покрај тоа што кај контролната група не беше аплициран третман со ERW.

Албумините, најзастапените циркулирачки протеини во крвната плазма, имаат комплексна структура и се одговорни за вршење голем број биолошки функции во организмот. Освен како детерминанти на онкотскиот притисок на плазмата, тие манифестираат и неонкотски особини, кои се должат на лиганд-врзувачкиот капацитет, претставувајќи депо и носач за многу ендогени и егзогени компоненти (Fanali et al., 2012). Концентрацијата на албумините во нашето истражување, во временскиот интервал кога отсутствува хипертермичкиот стрес, го следи истиот тренд како и концентрацијата на вкупните протеини со нивна незначајна разлика во периодот 7. – 14. ден од третманот. Поради фактот што албумините претставуваат релативно стабилни протеински молекули, претпоставуваме дека горедискутираните механизми поврзани со концентрацијата на вкупните протеини се, исто така, во функција и на концентрацијата на албумините во крвниот серум. Само кај групата ТАД се забележува значајно повисока концентрација на албумините на 21. ден во споредба со претходниот период на третман каде што, најверојатно, условите за оштетување на ROS се неутрализирани со силната антиоксидативна активност на присутната ERW и на додавањето на антиоксидантите витамин Ц и GSH. Студијата на Ли и група автори (Lee et al., 2006) покажува стимулативно

влијание на ERW врз антиоксидативната активност на витаминот Ц. Веруваме дека овој синергизам меѓу присутните антиоксиданти условува силно протективно дејство врз оксидативната модификација на албумините. Како резултат на високата амбиентална температура, стаорците почнуваат да ја зголемуваат и својата телесна температура. Во рамките на ограничен температурен интервал, брзината на ензимски катализираните реакции расте со зголемувањето на температурата. Пониската концентрација на протеини на 21. ден кај групите КПМ и ТАМ може да се објасни и со забрзаните катаболички реакции кои се должат на повисоката телесна температура како фактор кој ја афектира, односно ја забрзува ензимската активност.

Многу податоци од литературата го потврдуваат податокот дека инфламацијата води кон генерирање оксидативен стрес, но и дека ROS и RNS се медијатори во механизмите кои се инволвирани во пропагирање на инфламацијата. Сите три групи стаорци покажаа значајна разлика во концентрацијата на AST и на ALT во периодот од 7. до 14. ден, со исклучок на групите КПМ и ТАД, кои покажаа статистички незначајна разлика само во однос на концентрацијата на AST. Веруваме дека и во текот на нашиот експеримент стаорците беа изложени на варијабилно ниво на емоционален стрес поради човечкиот фактор искористен како начин за секојдневно аплицирање на третманот. Претпоставуваме дека хипергликемијата индуцирана од стрес довела до активирање на патеката инфламација – оксидативен стрес во две повратни насоки, поради што настанала лиза на хепатоцитите и следствено, елевација на серумските концентрации на трансaminaзите.

Уреата и креатининот претставуваат деградациони продукти од катаболизмот на протеините во организмот. Интензивираната разградба на протеините ја објаснува статистички значајната висока концентрација на уреата и на креатининот на 21. ден кај третираните групи споредено со периодот од третманот каде што отсуствува хипертермичкиот стрес. Акутното хипертермичко експонирање на експерименталните животни во однос на третманот со јонизирана вода, со или без елементи додадени во неа, доведе до значајна разлика во концентрацијата на уреата во однос на периодот кога не им беше аплицирана висока температура. Исклучок од ваквата констатација е групата КПМ, кај која периодот на хипертермичка експозиција не доведе до значајна разлика во однос на концентрацијата на уреата. Двете третирани групи,

ТАМ и ТАД, манифестираа тренд на пораст во концентрацијата на креатининот, и тоа во поглед на времето на третирање како при отсуство така и при присуство на воведениот хипертермички стрес. Статистички значајна разлика се забележува кај групата ТАМ помеѓу 7. ден како појдовна точка и 14. и 21. ден од третманот, додека помеѓу 14. и 21. ден кај истата група не е регистрирана значајна разлика. Воочлива статистички значајна разлика со вредност $p < 0,001$ имаат споредбите направени во рамките на групата ТАД меѓу деновите од третманот земени за анализа на сите параметри. На 14. ден од третманот не беше забележана значајна разлика во концентрацијата на креатининот меѓу кои било две од вкупно трите групи вклучени во истражувањето. Споредбите во разликата на концентрацијата на уреата и на креатининот направени во текот на целиот третман кај контролната група не покажаа статистичка сигнификантност.

Сите живи организми одржуваат комплексен динамичен еквилибриум или хомеостаза, која е константно експонирана на интерни и на екстерни неповолни фактори означени како стресогени фактори (Chrousos et al., 1988). Под овој поим се подразбира долга листа на потенцијално штетни фактори кои можат да предизвикаат стрес во организмот од физичка или од емоционална природа. Организмите развиле невроендокрин систем (хипоталамус, питуитарна и адренална жлезда, ХПА-оска) како адаптивен систем за стрес за справување со широкиот спектар на стимули на стрес. Крајните ефектори од стимулирање на ХПА-оската се кортизолот од кората на адреналната жлезда и епинефринот и норепинефринот од нејзината срцевина. ХПА-оската и адреналната оска на симпатикусот индиректно, преку ослободувањето на хормоните на стресот, дејствуваат синергистички во индукцијата на хипергликемија од стрес. Невроендокриниот одговор на стресот се карактеризира со прекумерна глуконеогенеза, гликолиза и инсулинска резистенција. Метаболичкото дејство на кортизолот, како и на норепинефринот и на епинефринот вклучуваат покачување на серумската концентрација на гликозата преку активирање на клучните ензими инволвирани во хепаталната глуконеогенеза и гликогенолиза (Dungan et al., 2009). Финалната патека на адаптивниот одговор на стрес е неконтролиран катаболизам и создавање отпорност кон анаболичките сигнали како што е инсулинот со цел да се обезбедат доволни количества гликоза до виталните органи кои немаат

можност за користење други енергетски супстрати во услови на стрес (Preiser et al., 2014). Високата концентрација на гликоза во крвта спаѓа во групата на DAMPS (алармини) (Tack et al., 2012), кои ги активираат NLRP3-сензорите во организмот, чија, пак, активација води кон иницирање инфламаторен одговор.

Во нашиот експеримент беше истражувана и концентрацијата на гликозата во крвниот серум со оглед на нејзината улога на енергетски ресурс за сите видови клетки, особено во состојба на стрес, кога потребата за енергија е значително зголемена заради одржување на нормалната клеточна функција. Податоците добиени од ова истражување укажуваат на значителен пораст на концентрацијата на гликозата за време на хипертермичкиот стрес, особено на 21. ден кај групата ТАД, која е третирана со јонизирана вода, глутатион и витамин Ц. Контролната група во однос на временскиот период на истражувањето КПМ 7 и КПМ 14 не покажа значајна разлика во однос на концентрацијата на гликозата. Кај КПМ 7 и КПМ 21 покажа значајна разлика во зголемување на концентрацијата на гликоза. Третманот со јонизирана вода аплициран на групата ТАМ, односно на ТАМ 7 и ТАМ 14, не доведе до значајна разлика, додека кај ТАМ 7 и ТАМ 21 покажа значајна разлика во зголемувањето на концентрацијата на гликозата. Исто така, меѓу ТАМ 14 и ТАМ 21 се покажа значајна разлика во зголемувањето на концентрацијата на гликозата. Кај сите три групи во временскиот интервал од 7 дена не се покажа значајна разлика. Во временскиот интервал на 14 дена кај сите три групи третирани со природна вода, со јонизирана вода и со јонизирана вода збогатена со витамин Ц и глутатион не се покажа сигнификантна разлика во концентрацијата на гликозата. Констатираната состојба укажува на фактот дека хипертермичкиот стрес на организмот дополнително ја зголемува концентрацијата на гликозата во крвниот серум.

Терминот оксидативен стрес се користи за да се индицира крајниот резултат од оксидативното оштетување на биолошки релевантните молекули како што се нуклеинските киселини, протеините, липидите и јаглехидратите. Ова се случува кога концентрацијата на молекулите поврзани со оксидативниот стрес генерирани екстрацелуларно или внатре во клетката ја надминува антиоксидативната одбрана. Оваа состојба е поврзана, главно, со потенцијалните цитотоксични последици од оксидативниот стрес (Parola & Robino, 2001). Липидната пероксидација е еден од главните механизми на

ROS-посредувана клеточна смрт (Jaeschke, 2011). Липидната пероксидација е процес при кој настанува оксидативна деградација на полинезаситените масни киселини кои потекнуваат од клеточните мембрани. Тој резултира со формирање радикал на масната киселина ($L\cdot$) кој рапидно врзува кислород и се добива пероксил радикал ($LOO\cdot$) (Yin et al., 2011). Иницијатор и пропагатор на липидната пероксидација е $OH\cdot$, кој неспецифично ги напаѓа сите биомолекули. Овој процес е сериска реакција, која еднаш активирана, продолжува автокаталитички во прогресивна насока, водејќи кон структурна и функционална промена на супстратот. Пероксидативната деструкција на мембранските липиди има директно дејство врз структурниот интегритет на клеточните мембрани и како таква, може да ги уништи хепатоцитите многу бргу (Jaeschke, 2011).

Како резултат на својата висока реактивност, ROS/RNS можат да иницираат липидна пероксидација, да предизвикаат оштетување на двојниот хеликс на ДНК и без дискриминација да ги оксидираат сите макромолекули во биолошките мембрани и ткива, резултирајќи со нарушен структурен интегритет и функционалност. Црниот дроб е главниот орган што може да биде нападнат од ROS (Sanchez-Valle et al., 2012). Оксидативниот стрес предизвикува оштетување на црниот дроб преку индукција на иреверзибилни алтерации на ДНК-та, протеините и на липидите во клетката. Истражувањата на Конде де ла Роса и на група автори (Conde de la Rosa et al., 2006) покажуваат дека O_2 и H_2O_2 индуцираат лиза на хепатоцитите преку различни механизми. Резултатите од оваа студија дека O_2 преку активација на каспаза се индуцира апоптоза се поклопуваат со оние од други истражувања (B. E. Jones et al., 2000). Овој експеримент покажува и дека O_2 ја активира JNK-патека за проапоптозата, што не е случај кога станува збор за H_2O_2 . Акутното експонирање на хепатоцити од стаорци на H_2O_2 предизвикало нивна некроза (Nieminen et al., 1997). Може да се заклучи дека процесот на липидна пероксидација, апоптоза и некроза се главните механизми на ROS-посредувана смрт на сите клетки, меѓу кои и на хепатоцитите. Аминотрансферазите AST и ALT се интрацелуларни ензими главно застапени во црниот дроб, чија активност во крвиот серум се регистрира само во случај на претходна лиза на хепатоцитите од одредени деструктивни фактори. Горедискутираните механизми за хепатално оштетување, како и директното

цитотоксично дејство на високата температура можат да ја објаснат високата концентрација на AST на 21. ден кај трите групи споредено со периодот без хипертермичен стрес. Спротивно на ваквиот тренд, во нашата студија забележавме најниска концентрација на ALT на 21. ден кај сите три групи.

Претпоставуваме дека во овој случај аплицираните антиоксиданти (ERW, витамин Ц и GSH) преку својата антиоксидативна активност манифестирале протективно дејство врз оксидативното оштетување на протеините и на липидите во клеточната мембрана на хепатоцитите и на тој начин индиректно спречиле нивно лизирање. Оваа наше тврдење е поткрепено од студијата на Ејб и соработниците (Abe et al., 2010) за супресивното дејство на ERW врз процесот на липидна пероксидација врз мембраните. GSH ја претставува првата линија на одбраната од ROS бидејќи има способност за нивно директно неутрализирање. Ензимите зависни од GSH ја претставуваат втората линија на одбраната. Глутатионот не само што ја штити клеточната мембрана од оксидативно оштетување туку помага и да се одржат сулфхидрилните групи на многу протеини во нивната редуцирана форма, што е услов за нивно нормално функционирање (Pastore et al., 2003). GSH директно ги неутрализира хидроксилните радикали и синглет кислородот, додека преку каталитичкото дејствување на GPx ги детоксицира водород пероксидот и липидните пероксиди. Глутатионот е способен да го регенерира и неензимскиот антиоксидант витаминот Ц до неговата редуцирана форма погодна да донира електрони и да врши неутрализирање на ROS.

Паралелно со промените на ниво на клучните ензими, во ова истражување ги проследивме и промените на холестеролот и на триглицеридите за време пред и при експонирање на хипертермички стрес. Од добиените резултати може да се заклучи дека имаме зголемување на концентрацијата на холестеролот кај групите ТАМ и ТАД и во период на неекспонирање на висока температура, значи во текот на 7. и на 14. ден. Третманот на групата ТАД со јонизирана вода збогатена со GSH и витамин Ц доведе до значајна разлика во однос на зголемувањето на концентрацијата на холестеролот кај стаорци во временскиот период пред експонирање на хипертермички стрес. Исто така, тоа доведе и до значајна разлика помеѓу ТАД 7 и ТАД 21 (хипертермички експонирани стаорци). Акутното хипертермичко експонирање на експерименталните животни во однос на третманот со

јонизирана вода, со или без елементи додадени во неа, доведе до значајна разлика во концентрацијата на холестеролот кај сите три групи, што укажува на дополнително влијание на хипертермичкиот стрес врз зголемувањето на нивната синтеза и на намален транспорт во адипозното ткиво. Сепак, карактеристично е тоа што е изразена концентрацијата на триглицеридите во крвниот серум. Третманот со јонизирана вода аплициран на групата ТАМ и третманот на групата ТАД со јонизирана вода збогатена со GSH и витамин Ц доведе до значајна разлика во однос на зголемувањето на концентрацијата на триглицеридите во временскиот период кога стаорците не беа хипертермички експонирани. Акутното хипертермичко експонирање на експерименталните животни во врска со третманот со јонизирана вода, со или без елементи додадени во неа, доведе до значајна разлика во намалувањето на концентрацијата на триглицеридите во однос на периодот кога не беа експонирани на висока температура.

Како резултат на експонирањето на стаорците на висока амбиентална температура се создава термален градиент, што резултира со можноста животните да ја апсорбираат топлината од околината сè до изедначување на нивната телесна температура со температурата на околината. Животните почнуваат да ја покачуваат својата телесна температура влегувајќи во состојба на хипертермија. Дополнително на ова, повисоката телесна температура води кон повисока активност на ензимите и до интензивирање на метаболизмот, што резултира со продуцирана метаболичка топлина, која придонесува за додатно покачување на телесната температура. Топлотниот стрес е првичната состојба на хипертермија, а во случај на терморегулаторен колапс се создаваат услови за прогресија кон топлотен шок, состојба при која телесната температура достигнува над 40 °C и завршува со синдром на мултиорганска дисфункција. Експозицијата на акутен температурен стрес доведува до иницирање на терморегулаторните механизми кај стаорците со цел да се одржи температурната хомеостаза. Овие адаптивни одговори на изложеноста на високата амбиентална температура вклучуваат клеточни и системски одговори. Промените во кардиоваскуларниот, ендокриниот и во нервниот систем се системските одговори кои се јавуваат кај сите цицачи уште на почетокот од хипертермичката експозиција (Hutter et al., 1996). Покачувањето на телесната температура ја детектираат периферните топлинските рецептори и оние во

хипоталамусот (Maskowiak, 1997), кои испраќаат сигнал до терморегулаторниот центар во хипоталамусот, што резултира со еферентна команда до потните жлезди и до циркулаторниот систем.

Активната симпатетична кутанеусна вазодилатација го зголемува крвотокот во кожата со цел да се зголеми допирната површина со надворешната средина и да се оддаде вишокот на топлина од организмот (Rowell, 1983). Зголемената телесна температура предизвикува и тахикардија, покачување на вентилациониот волумен и на минутниот срцев волумен (Bouchama & Knochel, 2002). Оваа циркулаторна адаптација дозволува поголем волумен од крвта да протече низ периферната циркулација, со што би се изгубила топлина (Rowell, 1974), но настанува редукција на крвотокот до гастроинтестиналниот тракт и црниот дроб. Како резултат на намалената гастроинтестинална перфузија, достапноста на O_2 како краен акцептор на електрони во процесот на оксидативна фосфорилација е лимитирана, а со тоа и синтезата на високото енергетско соединение АТФ. Функцијата на мембранските АТФ-зависни пумпи е алтерирани, фаворизирајќи го инфлуксот на Na^+ , Ca^{++} и на H_2O во клетката, што резултира со цитотоксична едема (Maltepe & Saugstad, 2009). Цревниот епител функционира како физичка бариера која ги одвојува септичките услови во цревниот простор од асептичките услови во циркулацијата. Овие механизми го објаснуваат нарушувањето на интегритетот на клетките на цревниот епител и се промовира навлегувањето на грам-негативни бактерии (ендотоксини, липополисахариди, LPS) во порталната циркулација, состојба означена како ендотоксемија (Yeh et al., 2013; Lambert et al., 2002). Црниот дроб е способен до одредено ниво да ги неутрализира и да ги отстрани протечените LPS, но прекумерното оптоварување на органот доведува до протекување на LPS во централната циркулација. Клетките на вродениот и на стекнатиот имунолошки систем го детектираат и одговараат на ендотоксинот (преку Toll-like рецептори, TLR) и стимулираат продукција на цитокини и на други имунолошки модулатори, иницирајќи процес на инфламација (Leon & Helwig, 2010).

Како одговор на активацијата на TLR, се иницира продукција на оксиданти (ROS и RNS) во организмот. Формирањето на ROS претставува есенцијална патека во TLR-зависното сигнализирање во имунолошки и неимунолошки клетки, кое се случува, главно, преку активација на неколку

NOX-изоформи (Gill et al., 2010). Може да се заклучи дека хипоксијата, индуцирана од акутниот температурен стрес, води кон оксидативен стрес во организмот преку горедискутираните механизми. Интересно е да се истакне дека и намалената и зголемената целуларна достапност на O₂ водат кон продукција на ROS (Maltepe & Saugstad, 2009). Акутниот температурен стрес ги интензивира метаболичките процеси, односно постои состојба на зголемена консумација на O₂, на која се надоврзува зголемен флукс на O₂ во митохондријалната респираторна верига, која повторно води кон создавање на ROS. На ниво на сите клетки, топлотниот стрес продуцира кислородни радикали како резултат на зголемениот проток на кислород низ митохондријалната верига за транспорт на електрони (Tsong & Su, 1999). Веруваме дека и во нашето истражување, кај стаорците беа во функција на горенаведените механизми за патеката температурен стрес – оксидативен стрес и со сигурност можеме да кажеме дека стаорците на 21. ден од третманот, кога беа подложена на акутен температурен стрес, следствено беа изложени и на силен оксидативен стрес.

6. ЗАКЛУЧОЦИ

- Акутната експозиција на висока температура предизвикува оксидативен стрес на сите нивоа во организмот.
- Акутната хипертермичка експозиција доведува до зголемена продукција на индикаторите на оксидативен стрес, како и до намалување на активноста на антиоксидативните ензими. Експозицијата на висока температура доведува до засилена продукција на ROS, што резултира со оксидативни повреди.
- Третманот со јонизирана вода, без додадени антиоксиданти или пак со нивна комбинација, не доведе до значајни промени во активноста на SOD и на CAT во крвниот серум во периодот на отсуство на висока амбиентална температура.
- Умерените нивоа на слободни радикали индуцираат зголемена експресијата на гени за синтеза на антиоксидативните ензими како компензаторен механизам за подобра заштита од оштетувањата индуцирани од ROS. Овој податок ја објаснува повисоката активност на CAT во периодот на хипертермички стрес во крвниот серум, но исто така и зголемувањето на активноста на CAT и во бубрезите.
- Во услови на многу високи концентрации на слободни радикали, оштетувањата на молекуларната машинерија потребна за индукција на овие антиоксидативни ензими во комбинација со нивното влијание врз оксидативното оштетување на протеинската структура на самите антиоксидативни ензими, би се движеле во правец на намалување на антиоксидативната активност, како што е случајот со SOD во нашето истражување.
- Во однос на ензимите кои му припаѓаат на редокс-циклусот на глутатионот, третманот со јонизирана вода со додавање глутатион

- и витамин Ц при хипертермички стрес доведе до повисока активност на GPx и до пад на активноста на GR во крвниот серум.
- Акутната хипертермичка експозиција доведува до намалување на активноста на GPx и на GR, а исто така и до намален ензимски антиоксидативен капацитет во црниот дроб и во бубрезите.
 - Акутната апликација на третманот со јонизирана вода, без или во комбинација со други антиоксиданти, во периодот кога отсуствува хипертермичкиот стрес не доведува до значајна алтерација во концентрацијата на протеините и на албумините.
 - Хипертермичката експозиција ја интензивира продукцијата на кислородни радикали и можноста за оксидативна модификација на протеините и на молекулите со протеинска структура. Индивидуалното дејствување на јонизираната вода, како и синергизмот со додадените антиоксиданти условуваат високо протективно дејство врз оксидативното оштетување. Поради ова, ефектот на оксидативно лепење е помалку изразен кај стаорците третирани со јонизирана вода и антиоксиданти бидејќи кај нив има посилна антиоксидативна одбрана која ги заштитува протеините, албумините и сите биомолекули во организмот од оксидативна модификација.
 - Акутниот температурен стрес, освен што резултира со оксидативен стрес, условува и забрзани катаболички реакции во организмот. Повисоката концентрација на уреата и креатининот во периодот на хипертермичко експонирање се должи на интензивираната разградба на протеините. Во вакви услови, концентрациите на уреата и на креатининот не претставуваат последица од аплицираниот третман.
 - Емоционалниот стрес преку хипергликемијата индуцирана од стрес, како иницијатор на инфламација, резултира со генерирање оксидативен стрес. Слободните радикали формирани на овој

начин, во периодот кога нема хипертермичка експозиција, преку процесите на липидна пероксидација, апоптоза и на некроза водат кон лиза на хепатоцитите и следствено, до елевација на серумската активност на AST и на ALT.

- Значајно повисоката ензимска активност на AST и на ALT во периодот на стрес повторно се должи на лиза на хепатоцитите од горенаведените процеси, но во овој случај оксидативниот стрес е резултат од комбинираното дејствување на емоционалниот стрес и на хипоксијата и/или хипероксијата индуцирани од покачената телесна температура.
- Горедискутираните механизми за хепатално оштетување, како и директниот цитотоксично дејство на високата температура можат да ја објаснат високата концентрација на AST и на ALT во периодот на хипертермичка експонираност споредено со периодот без хипертермичен стрес.
- Аплицираните антиоксиданти (ERW, витаминот Ц и GSH) преку својата антиоксидативна активност манифестираат протективно дејство врз оксидативното оштетување на протеините и на липидите во клеточната мембрана на хепатоцитите и на тој начин индиректно го спречуваат нивно лизирање. Претпоставуваме дека серумските концентрации на AST и на ALT би биле уште повисоки во случај на отсуство на третманот.
- Третманот со јонизирана вода, без или во комбинација со други антиоксиданти, во периодот кога отсуствува хипертермичкиот стрес не доведува до значајно зголемување на концентрацијата на холестеролот и на триглицеридите во крвниот серум.
- Значајно повисока концентрација на холестеролот и на триглицеридите во крвниот серум добивме при хипертермички стрес.

- Значајно зголемена концентрација на гликозата во крвниот серум добивме кај групата третирана со јонизирана вода, глутатион, витамин Ц под влијание на хипертермичкиот стрес.

Антиоксидативниот капацитет има посебно значајна улога во околности на изложеност на организмот на стресни услови. Стресогените фактори, од емоционална и/или од физичка природа, завршуваат во правец на генерирање слободни радикали во организмот. Нивната успешна инактивација значи спречување на оксидативната модификација на биолошките макромолекули, а воедно и превенција од развојот на голем број болести, меѓу кои и на канцерот. Затоа е есенцијално да се работи на засилување на антиоксидативната одбрана на организмот. Во нашето истражување, оваа цел ја постигнавме преку суплементација на експерименталниот модел со јонизирана вода, глутатион и витамин Ц. Вкупниот антиоксидативен капацитет е детерминиран не само од концентрацијата/активноста на индивидуалните антиоксиданти туку и од степенот на нивното синергистичко дејство во насока и со цел да ја одржат клеточната редокс-хомеостаза. Одржување на варијабилноста на хомеостазата на ниско ниво значи нормално функционирање на целиот организам, со исклучок на условите поволни за појава и развој на патолошки состојби.

7. ЛИСТА НА КРАТЕНКИ

$^3\Sigma_gO_2$ – молекуларен кислород

$^1\Sigma_gO_2$ – синглетна форма на кислородот

$^1\Sigma_g^+O_2$ – синглетна форма на кислородот

ROS – реактивни кислородни радикали

RNS – реактивни азотни радикали

ATP – аденозин трифорфат

ДНК – дезоксирибонуклеинска киселина

O_2^- – супероксиден анјон

NADPH – никотин аденин динуклеотид фосфат во редуцирана форма

SOD – супероксид дизмутаза

CAT – каталаза

H_2O_2 – водород пероксид

$\cdot OH$ – хидроксилен радикал

GSSG – дисулфид оксидирана форма на глутатион

GSH – тиол редуцирана форма на глутатион

H^+ – водородни јони

H_2CO_3 – јагленова киселина

$NaCO_3$ – натриум карбонат

H_2PO_4 – дихидроген фосфат

HPO_4 – монохидроген фосфат

HCO_3 – бикарбонатен јон

GCS – γ -глутамилцистеин синтетаза

NO – азот моноксид

TCA – циклус на трикарбонски киселини

AST – аспартат аминотрансфераза

ALT – аланин аминотрансфераза

ERW – електрохемиски редуцирана вода

EOW – електрохемиски оксидирана вода

PHK – рибонуклеинска киселина

NLRP₃ – фамилија на интрацелуларни NOD-рецептори за PAMPs

LPS – липополисахарид

TLR – толни (toll-like) рецептори

NOX – NADPH-оксидази
L· – радикал на масната киселина
LOO· – пероксил радикал
JNK – Jun-аминотерминални кинази
GPx – глутатион пероксидаза
GR – глутатион редуктаза
NFkB – нуклеарен фактор kB
AP₁ – активатор протеин 1
mRNA- информациона рибонуклеинска киселина
SH – тиолна група
NAD(P)H – никотинамид аденин динуклеотид (фосфат) во редуцирана форма
CuZn-SOD – бакарна и цинкова форма на супероксид дизмутаза
Mn-SOD – манганова форма на супероксид дизмутаза
ECSOD – екстрацелуларна форма на супероксид дизмутаза која содржи цинк
GPx – глутатион пероксидаза
GR – глутатион редуктаза
pH (potentia hydrogenii) – водороден капацитет
COOH – карбоксилна киселина
CO₂ – јаглерод диоксид
pCO₂ – парцијален протисок на јаглерод диоксидот
H₂O – вода
R-OOH – пероксид
RSeOH – селенска киселина
GSR – глутатион дисулфид редуктаза
FAD – флавопротеин
NADH – никотинамид аденин динуклеотид
NaOH – натриум хидроксид
CCl₄ – јаглерод тетрахлорид
Ag – сребро
AgCl – сребро хлорид
KCl – калиум хлорид
CoA – коензим А
КПМ – контролна група на животни
ТАД – животни третирани со јонизирана вода

TAM – животни третирани со јонизирана вода збогатена со глутатион и витамин

Ц

GLDH – глутамат дехидрогеназа

NAD⁺ – никотинамид аденин динуклеотид оксидирана форма

LDH – лактат дехидрогеназа

GOD – гликоза оксидаза

POD – пероксидаза

PAP – фенол-4-аминофеназон

EDTA – етилен диамин тетраоцетна киселина

PAMP – ендотоксин (pathogen associated molecular pathern)

BSA – говедски серум албумин

PAMPs – патогенски асоцирани молекули

8. КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

Abe, M., Sato, S., Toh, K., Hamasaki, T., Nakamichi, N., Teruya, K., Katakura, Y., Morisawa, S., Shirahata, S. (2010). Suppressive Effect of ERW on Lipid Peroxidation and Plasma Triglyceride Level. *In Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects pp. 315–321.*

Abol-Enein, H., Gheith, O.A., Barakat, N., Nour, E., Sharaf, A. (2009). Ionized alkaline water: new strategy for management of metabolic acidosis in experimental animals. *Therapeutic Apheresis and Dialysis 13(3):220–224 International Society for Apheresis*

Allen, R.G. and Balon, A.K. (1989). Oxidative influence in development and differentiation: an overview of a free radical theory of development. *Free Radic. Biol. Med. 6: 631-661.*

Arrigoni, O., & De Tullio, M. C. (2002). Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochimica Et Biophysica Acta, 1569(1–3), 1–9.*

Arrigoni, O., De Tullio, M.C. (2002). Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochim. Biophys Acta 1569, 1–9.*

Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev. Vol.2014(6): 360438.*

Banerjee, R. (2012). Redox outside the box: linking extracellular redox remodeling with intracellular redox metabolism. *The Journal of Biological Chemistry, 287(7), 4397–4402.*

Bari, M.L., Sabina, Y., Isobe, S., Uemura, T., Isshiki, K. (2003). Effectiveness of electrolyzed acidic water in killing *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*, and *Listeria monocytogenes* on the surface of tomatoes, *Journal of Food Protection, 66 pp. 542-548*

- Barja, G. (1996). Ascorbic Acid and Aging. *In Subcellular Biochemistry pp. 157–188.*
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L., Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). *Biochemistry (5th ed.)*. W. H. Freeman.
- Berlett, B. S., & Stadtman, E. R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(33), 20313–20316.
- Bertholf, R. L. (2014). Proteins and Albumin. *Laboratory Medicine*, 45(1), e25–e41.
- Beutler, E. (1972). Disorders Due to Enzyme Defects in the Red Blood Cell. *Advances in Metabolic Disorders Vol. 6, p. 131-160*
- Bhabak, K.P., Mugesh, G. (2010). Functional mimics of glutathione peroxidase: bioinspired synthetic antioxidants. *Accounts of Chemical Research*. 43 (11): 1408–19
- Boron, W. F., & Boulpaep, E. L. (2016). *Medical physiology. 3rd Edition*
- Bouchama, A., & Knochel, J. P. (2002). Heat stroke. *The New England Journal of Medicine*, 346(25), 1978–1988.
- Bouche, C., Serdy, S., Kahn, C.R., Goldfine, A.B. (2004). The cellular Fate of Glucose and Its Relevance in Type 2 Diabetes. *Endocrine Reviews* 25: 807-830
- Bozidar, S. (1992). *Medicinska Biokemija str.413*
- Brosnan, J. T., da Silva, R. P., & Brosnan, M. E. (2011). The metabolic burden of creatine synthesis. *Amino Acids*, 40(5), 1325–1331.
- Buettner, G. R., & Jurkiewicz, B. A. (1993). Ascorbate free radical as a marker of oxidative stress: an EPR study. *Free Radical Biology & Medicine*, 14(1), 49–55.
- Bynum, G. D., Pandolf, K. B., Schuette, W. H., Goldman, R. F., Lees, D. E., Whang-Peng, J., Atkinson, E.R., Bull, J. M. (1978). Induced hyperthermia in sedated humans and the concept of critical thermal maximum. *The American Journal of Physiology*, 235(5), R228-236.
- Cadenas, E., & Sies, H. (1998). The lag phase. *Free Radical Research*, 28(6), 601–609.

- Cao, Ch., Leng, Y., Kufe, D. (2003). Catalase Activity Is Regulated by c-Abl and Arg in the Oxidative Stress Response. *J Biol Chem. Vol. 278, No. 32, pp. 29667–29675*
- Caraceni, P., Tufoni, M., & Bonavita, M. E. (2013). Clinical use of albumin. *Blood Transfusion, 11(Suppl 4), s18–s25.*
- Carr, A., & Frei, B. (1999). Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *The FASEB Journal, 13(9), 1007–1024.*
- Cerutti, P.A. (1985). Prooxidant states and cancer. *Science 227, 375-381*
- Chance, B., Sies, H., Boveries, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev, 59, 527-605.*
- Chaudiere, J. & Tappel, A.L. (1983). Purification and characterization of selenium-glutathione peroxidase from hamster liver. *Arch. Biochem. Biophys. 226: 448-457.*
- Chen, A. F., Chen, D.-D., Daiber, A., Faraci, F. M., Li, H., Rembold, C. M., & Laher, I. (2012). Free radical biology of the cardiovascular system. *Clinical Science (London, England: 1979), 123(2), 73–91.*
- Chen, A.J., Gole, Q.M., Themistocleous, M., Lee, V. M., & Ischiropoulos, H. (2000). Two distinct mechanisms of nitric oxide-mediated neuronal cell death show thiol dependency. *American Journal of Physiology. Cell Physiology, 278(6), C1099-1107.*
- Cherubini, A., Ruggiero, C., Polidori, M. C., & Mecocci, P. (2005). Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radical Biology & Medicine, 39(7), 841–852.*
- Cheesman, K.H. & Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin, Vol. 49, No 3, pp. 481-493.*
- Chrousos, G. P., Loriaux, D. L., & Gold, P. W. (1988). Mechanisms of Physical and Emotional Stress. *Springer US.*
- Coassin, M., Tomasi, A., Vannini, V., & Ursini, F. (1991). Enzymatic recycling of oxidized ascorbate in pig heart: one-electron vs two-electron pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics, 290(2), 458–462.*

- Conde de la Rosa, L., Schoemaker, M. H., Vrenken, T. E., Buist-Homan, M., Havinga, R., Jansen, P. L. M., & Moshage, H. (2006). Superoxide anions and hydrogen peroxide induce hepatocyte death by different mechanisms: Involvement of JNK and ERK MAP kinases. *Journal of Hepatology*, *44*(5), 918–929.
- Cooper, A. J., Pinto, J. T., & Callery, P. S. (2011). Reversible and irreversible protein glutathionylation: biological and clinical aspects. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, *7*(7), 891–910.
- DeLeve, L. D., & Kaplowitz, N. (1991). Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacology & Therapeutics*, *52*(3), 287–305.
- Deng, W., Wang, H., Rosenberg, P. A., Volpe, J. J., & Jensen, F. E. (2004). Role of metabotropic glutamate receptors in oligodendrocyte excitotoxicity and oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(20), 7751–7756.
- Deponte, M. (2013). Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*. *1830* (5): 3217-66
- Djordjevic, J., Djordjevic, A., Adzic, M., Niciforovic, A., Radojic, B. A. (2010). Chronic stress differentially affects antioxidant enzymes and modifies the acute stress response in liver of Wistar rats. *Physiol Res*, *51*, 729-736
- Djordjević, V.B. (2004). Free Radicals in Cell Biology. *Int Rev Cytol*. *237*:57-89
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, *82*(1), 47–95.
- Dungan, K. M., Braithwaite, S. S., & Preiser, J.-C. (2009). *Stress hyperglycaemia*. *Lancet (London, England)*, *373*(9677), 1798–1807.
- Dzekova-Stojkova, S.A., Korneti, P.G., Todorova, B.B., Trajkovska, S.K. (2006) *Biohemija 2 ed.*
- Emery, P. W. (2012). Basic metabolism: protein. *Surgery (Oxford)*, *30*(5), 209–213.
- Fagan, R.L., & Palfey, B.A. (2010). Flavin-Dependent Enzymes. *Comprehensive Natural Products II, Chemistry and Biology Vol. 7*, p. 37-113

Fanali, G., di Masi, A., Trezza, V., Marino, M., Fasano, M., & Ascenzi, P. (2012). Human serum albumin: from bench to bedside. *Molecular Aspects of Medicine*, 33(3), 209–290.

Fang, Y.-Z., Yang, S., & Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 18(10), 872–879.

Feher, J. J. (2017). Quantitative human physiology: 2nd Edition: an introduction.

Ferapontova, E.E., SergeyShleev, Sh., Ruzgas, T., Stoica, L., Christenson, A., Tkac, J., Yaropolov, A.I., Gorton, L. (2005). Direct Electrochemistry of Proteins and Enzymes. *Perspectives in Bioanalysis Vol.1*, p. 517-598

Fernández-Checa, J. C., Kaplowitz, N., García-Ruiz, C., Colell, A., Miranda, M., Marí, M., Ardite, E., Morales, A. (1997). GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect. *The American Journal of Physiology*, 273(1 Pt 1), G7-17.

Finkel, T., Holbrook, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 408(6809):239-47

Flanagan, S. W., Moseley, P. L., Buettner, G.R. (1998). Increased flux of free radicals in cells subjected to hyperthermia: detection by electron paramagnetic resonance spin trapping. *FEBS Lett.*; 431: 285-286.

Foyer, C.H., Shigeoka, S. (2002). Understanding oxidative stress and antioxidant functions in order to enhance photosynthesis. *Plant physiology, Am Soc Plant Biol*

Fraga, C. G., Motchnik, P. A., Shigenaga, M. K., Helbock, H. J., Jacob, R. A., & Ames, B. N. (1991). Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(24), 11003–11006.

Franceschelli, S., Gatta, D. M. P., Pesce, M., Ferrone, A., Patruno, A., de Lutiis, M. A., Grilli, A., Felaco, M., Croce, F., Speranza, L. (2016). New Approach in Translational Medicine: Effects of Electrolyzed Reduced Water (ERW) on NF- κ B/iNOS Pathway in U937 Cell Line under Altered Redox State. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9).

Franco, A. A., Odom, R. S., & Rando, T. A. (1999). Regulation of antioxidant enzyme gene expression in response to oxidative stress and during differentiation of mouse skeletal muscle. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(9–10), 1122–1132.

Franco, R., Schoneveld, O. J., Pappa, A., & Panayiotidis, M. I. (2007). The central role of glutathione in the pathophysiology of human diseases. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 113(4–5), 234–258.

Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.*, 64, 97-112.

Fu, Y., Ito, M., Fujita, Y., Ito, M., Ichihara, M., Masuda, A., Suzuki, Y., Maesawa, S., Kajita, Y., Hirayama, M., Ohsawa, I., Ohta, S., Ohno, K. (2009). Molecular hydrogen is protective against 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal degeneration in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, 453(2), 81–85.

Garcia-Ruiz, C., & Fernandez-Checa, J. C. (2006). Mitochondrial glutathione: hepatocellular survival-death switch. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 21 Suppl 3, S3-6.

Gechev, T., Gadjev, I., Van Breusegem, F., Inzé, D., Dukiandjiev, S., Toneva, V., & Minkov, I. (2002). Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 59(4), 708–714.

Gershoff, S. N. (1993). Vitamin C (ascorbic acid): new roles, new requirements? *Nutrition Reviews*, 51(11), 313–326.

Gill, R., Tsung, A., & Billiar, T. (2010). Linking oxidative stress to inflammation: Toll-like receptors. *Free Radical Biology & Medicine*, 48(9), 1121–1132.

Gjorgoski, I., Spasov, M., Mladenov, M., Hadzi-Petrusev, N., Dimovska, J., Ovnarska, V., and Rtovski, D. (2008). Ефектот на високата надворешна температура во интраутериниот и раниот постнатален период врз масата протеините и нуклеинските киселини во тимусот кај белиот лабораториски стаорец. *Biol. Macedonica*, 59/60: 51-66

- Gorman, A.M., Heavey, B., Creagh, E., Cotte, T.G. and Samali, A. (1999). Antioxidant-mediated inhibition of the heat shock response leads to apoptosis. *FEBS Lett.* 445, 98-102
- Griffith, O. W. (1999a). Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radical Biology & Medicine*, 27(9–10), 922–935.
- Griffith, O. W. (1999b). Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radical Biology & Medicine*, 27(9–10), 922–935.
- Grossmann, A. & Wendel, A. (1983). Non-reactivity of the selenoenzyme glutathione peroxidase with enzymatically hydroperoxidized phospholipids. *Eur. J. Biochem.* 135: 549-552.
- Gutteridge, J.M., Halliwell, B. (1990) The measurement mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem. Sci.*, 15, 129-135
- Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2005). Textbook of medical physiology. *Philadelphia: W.B. Saunders.*
- Guyton, A.C., Hall, J.E. (2005). *Medical Physiology*, 11ed.
- Hacisevki, A. (2009). An overview of ascorbic acid biochemistry. *J. Fac. Pharm, Ankara* 38 (3) 233-255
- Hadzi-Petrusev, N. (2010). *Magisterski trud*
- Hadzi-Petrushev, N. (2014). *Doktorska distertacija*
- Hall, D. M., Buettner, G. R., Matthes, R. D., Gisolfi, C. V. (1994). Hyperthermia stimulates nitric oxide formation: electron paramagnetic resonance detection of NO-heme in blood. *J. Appl. Physiol.*, 77, 548-553.
- Halliwell, B. (1988). The Liver, Biology and Pathobiology (Second Edition): Edited by I.M. Arias, W.B. Jacoby, D. Schacter and D.A. Shafritz *Raven Press; New York*, 239(2), 382–383.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1989). Free radicals in biology and medicine. *Oxford: Clarendon Press. p. 543*

Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1999). Free radicals in biology and medicine. *Oxford University Press, New York, 105-245*

Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. Oxford University Press. (2015). Free radicals in biology and medicine. *Oxford: Oxford University Press.*

Halperin, M. L., Goldstein, M. B., Kamel, K. S. (2010). Fluid, electrolyte, and acid-base physiology a problem-based approach. *Philadelphia, PA*

Hamasaki, T., Kashiwagi, T., Aramaki, S., Imada, T., Komatsu, T., Li, Y., Teruya, K., Katakura, Y., Kabayama, S., Otsubo, S., Morisawa, S., Shirahata., S. (2005). Suppression of cell growth by platinum nanocolloids as scavengers against reactive oxygen species. *Animal cell technology meets genomics, Springer, Dordrecht pp. 249-251.*

Harris, E. D. (1992). Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J.*, 6, 2674-2678.

Haschek, W. M., Bolon, B., Rousseaux, C. G., & Wallig, M. A. (2017). Fundamentals of Toxicologic Pathology.

Hayashi, H., Kawamura, M. (2002). Clinical application of electrolyzed-reduced water. *Animal cell technology: Basic & applied aspects, Vol. 12, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht pp. 31-3*

Hermes-Lima, M. (2004). Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey KB, editor. *Functional metabolism: regulation and adaptation. John Wiley & Sons; New Jersey: pp. 319-368.*

Hill, H.R., Kumanovics, A., Young, K.D. (2013). Disorders of Leukocyte Function. *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical. Genetics (Sixth Edition), p. 1-29*

Hogg, N. (2002). The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 42, 585–600.*

Huang, K.-C., Hsu, S.-P., Yang, C.-C., Ou-Yang, P., Lee, K.-T., Morisawa, S., Otsubo, K., Chien, C. T. (2010). Electrolysed-reduced water dialysate improves T-cell damage in end-stage renal disease patients with chronic haemodialysis. *Nephrology Dialysis Transplantation, 25(8), 2730–2737.*

Hutter, J. J., Mestril, R., Tam, E. K., Sievers, R. E., Dillmann, W. H., & Wolfe, C. L. (1996). Overexpression of heat shock protein 72 in transgenic mice decreases infarct size in vivo. *Circulation*, *94*(6), 1408–1411.

Hwang, C., Sinskey, A. J., Lodish, H. F. (1992). Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science (New York, N.Y.)*, *257*(5076), 1496–1502.

Ilievska, J., Cicimov, V., Antova, E., Gjorgoski, I., Hadzi-Petrushev, N., Mladenov, M. (2016). Heat-induced oxidative stress and inflammation in rats in relation to age. *Research in Physical Education, Sport & Health. Vol.5, No 2:pp.123-130.*

Jaeschke, H. (2011). Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, *26 Suppl 1*, 173–179.

Jaeschke, H., & Benzick, A. E. (1992). Pathophysiological consequences of enhanced intracellular superoxide formation in isolated perfused rat liver. *Chemico-Biological Interactions*, *84*(1), 55–68.

Jomova, K., Vondrakova, D., Lawson, M., Valko, M. (2010). Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *345*(1–2), 91–104

Jones, B. E., Lo, C. R., Liu, H., Pradhan, Z., Garcia, L., Srinivasan, A., Valentino, K.L., Czaja, M. J. (2000). Role of caspases and NF-kappa B signaling in hydrogen peroxide- and superoxide-induced hepatocyte apoptosis. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *278*(5), G693-699.

Jones, D. P. (2002). Redox potential of GSH/GSSG couple: Assay and biological significance. *Methods in Enzymology*, *Vol. 348*, pp. 93–112

Kajiyama, S., Hasegawa, G., Asano, M., Hosoda, H., Fukui, M., Nakamura, N., Kitawaki, J., Imai, S., Nakano, S., Ohta, M., Adachi, T., Obayashi, H., Yoshikawa, T. (2008). Supplementation of hydrogen-rich water improves lipid and glucose metabolism in patients with type 2 diabetes or impaired glucose tolerance. *Nutrition Research (New York, N.Y.)*, *28*(3), 137–143.

Kaplowitz, N., Aw, T. Y., Ookhtens, M. (1985). The regulation of hepatic glutathione. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 25, 715–744.

Kaur, H., Halliwell, B. (1994). Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation: nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Lett*, 350, 9-12

Kehrer, J.P., Robertson, J.D., Smith, C.V. (2010). Free Radicals and Reactive Oxygen Species. *Comprehensive Toxicology (Second Edition) Vol. 1*, 2010, p. 277-307

Kim, M. J., & Kim, H. K. (2006). Anti-diabetic effects of electrolyzed reduced water in streptozotocin-induced and genetic diabetic mice. *Life Sciences*, 79(24), 2288–2292.

Komatsu, T., Kabayama, S., Hayashida, A., Nogami, H., Teruya, K., Katakura, Y., Kazumiti, O., Morisawa, Sh., Shirahata, S. (2001). Suppressive effect of electrolyzed reduced water on the growth of cancer cells and microorganisms. *Animal cell technology: From target to market, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht pp. 220-223*

Lambert, G. P., Gisolfi, C. V., Berg, D. J., Moseley, P. L., Oberley, L. W., Kregel, K. C. (2002). Selected contribution: Hyperthermia-induced intestinal permeability and the role of oxidative and nitrosative stress. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, 92(4), 1750–1761; discussion 1749.

Larrainzar, E., Urarte, E., Auzmendi, I., Ariz, I., Arrese-Igor, C., González, E.M., Moran, J.F. (2008). Use of Recombinant Iron-Superoxide Dismutase as A Marker of Nitritative Stress. *Methods in Enzymology. Vol. 437: p. 605-618*

Lebovitz, R.M., Zhang, H., Vogel, H., Cartwright, J., Dionne, L., Lu, N., Huang, S., Matzuk, M.M. (1996). Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 9782-9787

Ledoux, S.P., Driggers, W.J., Hollensworth, B.S., Wilson, G.L. (1999). Repair of alkylation and oxidative damage in mitochondrial DNA. *Mutat Res*, 434, 149-159

- Lee, M. Y., Kim, Y. K., Ryoo, K. K., Lee, Y. B., Park, E. J. (2006). Electrolyzed-reduced water protects against oxidative damage to DNA, RNA, and protein. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 135(2), 133–144.
- Lehninger, A., C., Michael, M., David, L. N. (2008). Lehninger Principles of Biochemistry & Absolute Ultimate Guide. *W.H. Freeman & Company*.
- Leon, L. R., & Helwig, B. G. (2010a). Heat stroke: role of the systemic inflammatory response. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, 109(6), 1980–1988
- Leon, L. R., & Helwig, B. G. (2010b). Heat stroke: role of the systemic inflammatory response. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, 109(6), 1980–1988
- Levine, M. (1986). New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. *The New England Journal of Medicine*, 314(14), 892–902.
- Li, Y., Nishimura, T., Teruya, K., Maki, T., Komatsu, T., Hamasaki, T., Kashiwagi, T., Kabayama, S., Shim, S.Y., Katakura, Y., Osada, K., Kawahara, T., Otsubo, K., Morisawa, S., Ischii, Y., Gadek, Z., Shirahata, S. (2002). Protective mechanism of reduced water against alloxan-induced pancreatic β -cell damage: Scavenging effect against reactive oxygen species. *Cytotechnology*, 40(1–3), 139–149.
- Ligthart-Melis, G. C., & Deutz, N. E. P. (2011). Is glutamine still an important precursor of citrulline? *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 301(2), E264–E266.
- Lim, C. L., & Mackinnon, L. T. (2006). The roles of exercise-induced immune system disturbances in the pathology of heat stroke : the dual pathway model of heat stroke. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)*, 36(1), 39–64.
- Lo, Y. Y. C., Wong, J. M. S. and Cruz, T. F. (1996). Reactive oxygen species mediate cytokine activation of c- Jun NH₂- terminal kinases. *J. Biol. Chem.* 271, 15703-15707
- Locke, M., & Noble, E. G. (2002). Exercise and Stress Response: The Role of Stress Proteins, CRC Press 220.
- Lodish, H. F. (2008). Molecular cell biology. New York: W.H. Freeman and Company.

- Loft, S., & Poulsen, H. E. (2000). Antioxidant intervention studies related to DNA damage, DNA repair and gene expression. *Free Radical Research*, 33 Suppl, S67-83.
- Lu, S. C. (2000). Regulation of glutathione synthesis. *Current Topics in Cellular Regulation*, 36, 95–116.
- Lugrin, J., Rosenblatt-Velin, N., Parapanov, R., & Liaudet, L. (2014). The role of oxidative stress during inflammatory processes. *Biological Chemistry*, 395(2), 203–230.
- Lumb, A.B. (2017). Oxygen Toxicity and Hyperoxia. *Nunn's Applied Respiratory Physiology (Eighth Edition)*, p. 341-356.
- Lushchak, V. I. (2012). Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions. *Journal of Amino Acids*, 26 Pages.
- Mackowiak, P. A. (1997). Fever: basic mechanisms and management. *Philadelphia: Lippincott-Raven*.
- Maher, P., & Schubert, D. (2000). Signaling by reactive oxygen species in the nervous system. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 57(8–9), 1287–1305.
- Maltepe, E., & Saugstad, O. D. (2009). Oxygen in Health and Disease: Regulation of Oxygen Homeostasis-Clinical Implications. *Pediatric Research*, 65(3), 261–268.
- Mannervik, B. (1987). The enzymes of glutathione metabolism: an overview. *Biochem. Soc. Trans.* 15 (4): 717–8
- Marklund, S. L. (1984). Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. *The Journal of Clinical Investigation*, 74(4), 1398–1403.
- Marshall, W. J. (2015a). Clinical biochemistry: metabolic and clinical aspects. *Edinburgh [etc.: Churchill Livingstone*.
- Marshall, W. J. (2015b). Clinical biochemistry: metabolic and clinical aspects. *Edinburgh [etc.: Churchill Livingstone*.
- Matsumoto, H., Hayashi, S., Hatashita, M., Ohnishi, K., Ohtsubo, T., Kitai, R., Shioya, H., Ohnishi, T. and Kano, E. (1999). *Cancer Res.* 59, 3239-3244

McCall, M. R., & Frei, B. (1999). Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radical Biology & Medicine*, 26(7–8), 1034–1053.

Mehlhorn, R. J. (1991). Ascorbate- and dehydroascorbic acid-mediated reduction of free radicals in the human erythrocyte. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(5), 2724–2731.

Meier, B, Radeke, H. H., Selle, S., Younes, M., Sies, H., Resch, K., & Habermehl, G. G. (1989). Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor-alpha. *Biochemical Journal*, 263(2), 539–545.

Meier, Beate, Radeke, H. H., Selle, S., Raspe, H.-H., Sies, H., Resch, K., & Habermehl, G. G. (1990). Human Fibroblasts Release Reactive Oxygen Species in Response to Treatment with Synovial Fluids from Patients Suffering from Arthritis. *Free Radical Research Communications*, 8(3), 149–160.

Meister, A. (1988). Glutathione metabolism and its selective modification. *J. Biol. Chem.* 263 (33): 17205-8

Meister, A. (1991). Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; applications in research and therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, 51(2), 155–194.

Meister, A., & Anderson, M. E. (1983). Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, 52, 711–760.

Meredith, M. J., & Reed, D. J. (1982). Status of the mitochondrial pool of glutathione in the isolated hepatocyte. *The Journal of Biological Chemistry*, 257(7), 3747–3753.

Messner, D.J., Murray, K.F., Kowdley, K.V. (2012). Mechanisms of Hepatocyte Detoxification. *Physiology of the Gastrointestinal Tract (Fifth Edition) Vol. 2*, p.1507-1527

Mills, G.C (1957). Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *The Journal of Biological Chemistry*. 229 (1): 189–97

- Mills, G.C (1957). Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *The Journal of Biological Chemistry*. 229 (1): 189–97
- Mitchell, J.B., Russo, A. (1983). Thiols, thiol depletion and thermosensitivity. *Radiat. Res.*, 95, 471-485.
- Moldovan, L., & Moldovan, N. I. (2004). Oxygen free radicals and redox biology of organelles. *Histochemistry and Cell Biology*, 122(4), 395–412.
- Moseley, P. L., & Gisolfi, C. V. (1993). New Frontiers in Thermoregulation and Exercise. *Sports Medicine*, 16(3), 163–167.
- Mulgund, A., Doshi, S., Agarwall, A. (2015). The Role of Oxidative Stress in Endometriosis. *Handbook of Fertility; Nutrition, Diet, Lifestyle and Reproductive Health*, p. 273-281
- Murley, J. S., Kataoka, Y., Hallahan, D. E., Roberts, J. C., Grdina, D. J. (2001). Activation of NFkappaB and MnSOD gene expression by free radical scavengers in human microvascular endothelial cells. *Freeradical Biol Med*, 30, 1426-1439.
- Nagata, K., Nakashima-Kamimura, N., Mikami, T., Ohsawa, I., & Ohta, S. (2009). Consumption of molecular hydrogen prevents the stress-induced impairments in hippocampus-dependent learning tasks during chronic physical restraint in mice. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 34(2), 501–508.
- Nakamura, W., Hosoda, S. and Hayashi, K. (1974). Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta*. 358: 251-261
- Nazırođlu, M. (2012). Molecular role of catalase on oxidative stress-induced Ca²⁺ signaling and TRP cation channel activation in nervous system. *J Recept Signal Transduct Res*. 32(3):134-41
- Nieminen, A. L., Byrne, A. M., Herman, B., & Lemasters, J. J. (1997). Mitochondrial permeability transition in hepatocytes induced by t-BuOOH: NAD(P)H and reactive oxygen species. *The American Journal of Physiology*, 272(4 Pt 1), C1286-1294.

Nishikimi, M., Fukuyama, R., Minoshima, S., Shimizu, N., & Yagi, K. (1994). Cloning and chromosomal mapping of the human nonfunctional gene for L-gulono-gamma-lactone oxidase, the enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in man. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(18), 13685–13688.

Nogueira, C. W., Zeni, G., & Rocha, J. B. T. (2004). Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chemical Reviews*, 104(12), 6255–6285.

Nomura, K., Imai, H., Komura, T., Kobayashi, T., Nakagawa, Y. (2000). Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathion peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycemia-induced apoptosis. *Biochem J*, 351, 183-193.

Ohsawa, I., Ishikawa, M., Takahashi, K., Watanabe, M., Nishimaki, K., Yamagata, K., Katsura, K., Katayama, Y., Asoh, S., Ohta, S. (2007). Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nature Medicine*, 13(6), 688–694.

Ohtsuka, Y., Yabunaka, N., Fujisawa, H., Watanabe, I., Agishi, Y. (1994). Effects of thermal stress on glutathione metabolism in human erythrocytes. *E J App Phys Volume 68, Number 1*.

Oja, S. S., Janáky, R., Varga, V., & Saransaari, P. (2000). Modulation of glutamate receptor functions by glutathione. *Neurochemistry International*, 37(2–3), 299–306.

Okado-Matsumoto, A, Fridovich, I. (2001). Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem*. 276(42):38388-93

Ookhtens, M., & Kaplowitz, N. (1998). Role of the liver in interorgan homeostasis of glutathione and cyst(e)ine. *Seminars in Liver Disease*, 18(4), 313–329.

Pacher, P., Beckman, J. S., & Liaudet, L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews*, 87(1), 315–424.

Parola, M., & Robino, G. (2001). Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *Journal of Hepatology*, 35(2), 297–306.

Pastor, N., Weinstein, H., Jamison, E., & Brenowitz, M. (2000). A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. *Journal of Molecular Biology*, 304(1), 55–68.

Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., & Piemonte, F. (2003a). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 333(1), 19–39.

Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., & Piemonte, F. (2003b). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 333(1), 19–39.

Phung, C. D., Ezieme, J. A., & Turrens, J. F. (1994). Hydrogen peroxide metabolism in skeletal muscle mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 315(2), 479–482.

Pogorelov, A.G., Pogorelova, V.N., Pogorelova, M.A. (2018).] Electrochemically Reduced Water: Modification of the Incubation Medium and Oxidative Activity. *Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino*

Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V., & Casini, A. F. (2003). The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochemical Pharmacology*, 66(8), 1499–1503.

Preiser, J.-C., Ichai, C., Orban, J.-C., & Groeneveld, A. B. J. (2014). Metabolic response to the stress of critical illness. *BJA: British Journal of Anaesthesia*, 113(6), 945–954.

Radi, R., Cassina, A., Hodara, R., Quijano, C., Castro, L., (2002). Peroxynitrite reaction and formation in mitochondria. *Free Radic Biol Med*, 33, 1451-1464.

Reiter, R.J., Tan, D. X., Osuna, C., Gitto, E. (2000). Actions of Melatonin in the Reduction of Oxidative Stress. *J Biomed Sci; vol.7:444–458*

Richter, C., Park, J. W., Ames, B.N. (1988). Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85, 6465-6467

Rostom, H., & Shine, B. (2018). Basic metabolism: proteins. *Surgery (Oxford)*, 36(4), 153–158.

Rowell, L. B. (1974). Human cardiovascular adjustments to exercise and thermal stress. *Physiological Reviews*, 54(1), 75–159.

Rowell, L. B. (1983). Cardiovascular aspects of human thermoregulation. *Circulation Research*, 52(4), 367–379.

Rubbo, H., Radi, R., Trujillo, M., Telleri, R., Kalyanaraman, B., Barnes, S., Kirk, M., Freeman, B. A. (1994). Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem*, 269, 26066-26075.

Salvi, M., Battaglia, V., Brunati, A. M., La Rocca, N., Tibaldi, E., Pietrangeli, P., Marcocci, L., Mondovì, B, Rossi, C. A., Toninello, A. (2007). Catalase Takes Part in Rat Liver Mitochondria Oxidative Stress Defense. *J Biol Chem*. Vol.282(33):24407-15.

Sanchez-Valle, V., C. Chavez-Tapia, N., Uribe, M., & Mendez-Sanchez, N. (2012). Role of Oxidative Stress and Molecular Changes in Liver Fibrosis: A Review. *Current Medicinal Chemistry*, 19(28), 4850–4860.

Sauer, H., Wartenberg, M., & Hescheler, J. (2001). Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 11(4), 173–186.

Schafer, F. Q., & Buettner, G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology & Medicine*, 30(11), 1191–1212.

Schmatz, R., Perreira, L. B., Stefanello, N., Mazzanti, C., Spanevello, R., Gutierrez, J., Bagatini, M., Martins, C.C., Abdalla, F.H., Daci da Silva Serres, J., Zanini, D., Vieira, J. M., Cardoso, A. M., Schetinger, M. R., Morsch, V. M. (2012). Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochimie*, 94(2), 374–383.

- Schneiderman, N., Ironson, G., Siegel, S. D. (2005). STRESS AND HEALTH: Psychological, Behavioral, and Biological Determinants. *Annual Review of Clinical Psychology, 1*, 607–628.
- Scibior, D., & Czeczot, H. (2006). [Catalase: structure, properties, functions]. *Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej, 60*, 170–180.
- Seifter, J. L., & Chang, H.-Y. (2017). Extracellular Acid-Base Balance and Ion Transport Between Body Fluid Compartments. *Physiology, 32*, 367–379.
- Shao, D., Oka, S., Brady, C. D., Haendeler, J., Eaton, P., & Sadoshima, J. (2012). Redox modification of cell signaling in the cardiovascular system. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 52*(3), 550–558.
- Shibanuma, M., Kuroki, T. & Nose, K. (1988). Induction of DNA replication and expression of proto-oncogenes c-myc and c-fos in quiescent Balb/ 3T3 cells by xanthine/ xanthine oxidase. *Oncogene 3*, 17-21.
- Shier, D., Butler, J., Lewis, R., & McGraw-Hill Higher Education (Firm). (2009). Hole's Human anatomy & physiology. New York, N.Y.: McGraw-Hill Higher Education.
- Shirahata, S., Hamasaki, T., Teruya, K. (2012a). Advanced research on the health benefit of reduced water. *Trends in Food Science & Technology, 23*(2), 124–131.
- Shirahata, S., Hamasaki, T., Teruya, K. (2012b). Advanced research on the health benefit of reduced water. *Trends in Food Science & Technology, 23*(2), 124–131.
- Shirahata, S., Hamasaki, T., Teruya, K. (2018). Newest Research on the Health Benefit of Electrochemically Reduced Water. *Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Kyushu*.
- Shirahata, S., Kabayama, S., Nakano, M., Miura, T., Kusumoto, K., Gotoh, M., Hayashi, H., Otsubo, K., Morisawa, S., Katakura, Y. (1997). Electrolyzed-reduced water scavenges active oxygen species and protects DNA from oxidative damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications, 234*(1), 269–274.

Shirahata, S., Li, Y., Hamasaki, T., Gadek, Z., Teruya, K., Kabayama, S., Otsubo, K., Morisawa, S., Ischii, Y., Katakura, Y. (2007). Redox Regulation by Reduced Waters as Active Hydrogen Donors and Intracellular ROS Scavengers for Prevention of type 2 Diabetes. In R. Smith (Ed.), *Cell Technology for Cell Products* pp. 99–101

Shrieve, D.C., Li, G.C., Astromoff, A., Harris, J. W.(1986). Vellular glutathione, thermal sensitivity, and thermotolerance in Chinese hamster fibroblastes and their teat resistant variants. *Cancer Res.*, 46, 1684-1687

Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82(2), 291–295.

Sies, H. 1991. Oxidative stress: *Oxidants and antioxidants*. Academic press, San Diego, CA

Sies, H. and Jones, D. (2007). Oxidative stress. In: *Encyclopaedia of Stress*, G. Fink, ed. (San Diego, CA: Elsevier), pp. 45–48.

Skibba, J. L., Powers, R. H., Stadnicka, A., Cullinane, D. W., Almagro, U. A., Kalbfleisch, J. H. (1991). Oxidative stress as a precursor to the irreverzibile hepatocelular injury caused by hyperthermia. *Int J Hyperthermia*, 5, 749-761.

Slot, J. W., Geuze, H. J., Freeman, B. A., & Crapo, J. D. (1986). Intracellular localization of the copper-zinc and manganese superoxide dismutases in rat liver parenchymal cells. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 55(3), 363–371.

Smith, A. R., Visioli, F., & Hagen, T. M. (2002). Vitamin C matters: increased oxidative stress in cultured human aortic endothelial cells without supplemental ascorbic acid. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(9), 1102–1104.

Spasov, M., Gjorgoski, I., Stojmirov, M., Spasova, V. (2015). The impact of intermittent exposure to ambient temperature of 40 °C, at different development stages, on the blood picture of albino lab rat. *Wulfenia Journal*, 22(3).pp.198-211

Stadtman, E.R., Levine, R.L. (2000). Protein oxidation. *ANN N Y Acad, Sci* 899, 191-208

- Stein, D.G., Geddes, R.I., Sribnick, E.A. (2015). *Handbook of Clinical Neurology*
- Steinbrenner, H., & Sies, H. (2009). Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1790(11), 1478–1485.
- Stojkovski, V., Hadzi-Petrushev, N., Ilieski, V., Sopi, R., Gjorgoski, I., Mitrov, D., Jankulovski, N., Mladenov, M. (2013). Age and heat exposure-dependent changes in antioxidant enzymes activities in rat's liver and brain mitochondria: role of alpha-tocopherol. *Physiol Res*. 62(5):503-10
- Suthanthiran, M., Anderson, M. E., Sharma, V. K., & Meister, A. (1990). Glutathione regulates activation-dependent DNA synthesis in highly purified normal human T lymphocytes stimulated via the CD2 and CD3 antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(9), 3343–3347.
- Tabet, F., & Touyz, R.M. (2007). Reactive Oxygen Species, Oxidative Stress, and Vascular Biology in Hypertension. *Comprehensive Hypertension*, p. 337-347
- Tack, C. J., Stienstra, R., Joosten, L. A. B., & Netea, M. G. (2012). Inflammation links excess fat to insulin resistance: the role of the interleukin-1 family. *Immunological Reviews*, 249(1), 239–252.
- Tanaka, Y., Tran, P.O, Harmon, J., Robertson, R. P. (2002). A role for glutathione peroxidase in protecting pancreatic cells against oxidative stress in a model of glucose toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A vol. 99 no. 19 p.12363–12368*
- Thannickal, V. J., & Fanburg, B. L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279(6), L1005-1028.
- Townsend, D. M., Tew, K. D., & Tapiero, H. (2003). The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 57(3–4), 145–155.
- Trevisan, M.,R. Browne, M. Ram, P. Muti, J. Freudenheim, A. N. Carosella, and D. Armstrong. 2001. Correlates of markers of oxidative status in the general population. *Am. J. Epidemiol.* 154: 348-356.

Tsai, C.-F., Hsu, Y.-W., Chen, W.-K., Chang, W.-H., Yen, C.-C., Ho, Y.-C., & Lu, F.-J. (2009). Hepatoprotective effect of electrolyzed reduced water against carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 47(8), 2031–2036.

Tsai, C.F., Hsu, Y.W., Chen, W.K., Chang, W.H., Yen, C.C., Ho, Y.C., Lu, F.J. (2009). Hepatoprotective effect of electrolyzed reduced water against carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. *Food Chem Toxicol.* 47(8):2031-6.

Tsai, C.-F., Hsu, Y.-W., Chen, W.-K., Ho, Y.-C., & Lu, F.-J. (2009). Enhanced Induction of Mitochondrial Damage and Apoptosis in Human Leukemia HL-60 Cells Due to Electrolyzed-Reduced Water and Glutathione. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73(2), 280–287.

Tsan, M. F., Clark, R. N., Goyert, S. M., White, J. E. (2001). Induction of TNF- α and Mn-SOD by endotoxin: role of membrane CD14 and Toll-like receptor-4. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280, C1422-1430

Tsong, T. Y., & Su, Z. D. (1999). Biological effects of electric shock and heat denaturation and oxidation of molecules, membranes, and cellular functions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 888, 211–232.

Ursini, F., Heim, S., Kiess, M., Maiorino, M., Roveri, A., Wissing, J., Flohel, L. (1999). Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science*, 285, 1393-1396.

Urso, M. L., Clarkson, P. M. (2003). Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology.* 189(1-2):41-54

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007a). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44–84.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007b). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44–84.

- Van Kuijk, F.J.G.M., Sevanian, A., Handelman, G.J., Dratz, E.A. (1987). *Trends Biochem.Sci.* 12,31-34
- Vaquero, E.C., Edderkaoui, M., Pandol, S.J., Gukovsky, I. & Gukovskaya, A.S. (2004). Reactive oxygen species produced by NAD(P)H oxidase inhibit apoptosis in pancreatic cancer cells. *J.Biol. Chem.*27, 34643-34654.
- Vaziri, N. D., Dicus, M., Ho, N. D., Boroujerdi-Rad, L., Sindhu, R. K. (2003). Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency. *Kidney Int. Vol.*63(1):179-85.
- Vignais, P. V. (2002). The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 59(9), 1428–1459.
- Wang, Y. Branicky, R. Noë, A. Hekimi, S. (2018). Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *Journal of Cell Biology* 217 (6): 1915
- Wei, Y.-H., & Lee, H.-C. (2002). Oxidative Stress, Mitochondrial DNA Mutation, and Impairment of Antioxidant Enzymes in Aging <sup/>. *Experimental Biology and Medicine*, 227(9), 671–682.
- Whitford, D. (2005). Proteins: structure and function. *Hoboken, NJ: J. Wiley & Sons.*
- Williams, M.D., Van Remmen, H., Conrad, C. C., Huang, T.T., Epstein, C.J., Richardson, A. (1998). Increased oxidative damage is correlated to altered mitochondrial function in heterozygous manganese superoxide dismutase knockout mice. *J Biol Chem*, 273, 28510-28515
- Włodek, L. (2002). Beneficial and harmful effects of thiols. *Polish Journal of Pharmacology*, 54(3), 215–223.
- Wu, G., Fang, Y.-Z., Yang, S., Lupton, J. R., & Turner, N. D. (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. *The Journal of Nutrition*, 134(3), 489–492.

Yan, H., Kashiwaki, T., Hamasaki, T., Kinjo, T., Teruya, K., Kabayama, S., Shirahata, S. (2011). The neuroprotective effects of electrolyzed reduced water and its model water containing molecular hydrogen and Pt nanoparticles, *BMC Proceedings* 5 (Suppl 8):P69,

Yanagihara, T., Arai, K., Miyamae, K., Sato, B., Shudo, T., Yamada, M., & Aoyama, M. (2005). Electrolyzed hydrogen-saturated water for drinking use elicits an antioxidative effect: a feeding test with rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69(10), 1985–1987.

Ye, J., Li, Y., Hamasaki, T., Nakamichi, N., Komatsu, T., Kashiwagi, T., Teruya, K., Nishikawa, R., Kawahara, T., Osada, K., Toh, K., Abe, M., Tian, H., Kabayama, S., Otsubo, K., Morisawa, S., Katakura, Y., Shirahata, S. (2008). Inhibitory effect of electrolyzed reduced water on tumor angiogenesis. *Biol Pharm Bull.* 31(1):19-26.

Yeh, Y. J., Law, L. Y. L., & Lim, C. L. (2013). Gastrointestinal response and endotoxemia during intense exercise in hot and cool environments. *European Journal of Applied Physiology*, 113(6), 1575–1583.

Yin, H., Xu, L., & Porter, N. A. (2011). Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chemical Reviews*, 111(10), 5944–5972.

Yoo, H. Y., Chang, M. S., & Rho, H. M. (1999). The Activation of the Rat Copper/Zinc Superoxide Dismutase Gene by Hydrogen Peroxide through the Hydrogen Peroxide-responsive Element and by Paraquat and Heat Shock through the Same Heat Shock Element. *Journal of Biological Chemistry*, 274(34), 23887–23892.

Мајлинда Адеми

**ЕФЕКТОТ НА ЈОНИЗИРАНАТА ВОДА ЗБОГАТЕНА СО ГЛУТАТИОН И
ВИТАМИН Ц ВРЗ АНТИОКСИДАТИВНАТА ЕНЗИМСКА АКТИВНОСТ ПРИ
АКУТЕН ХИПЕРТЕРМИЧКИ СТРЕС КАЈ БЕЛИОТ ЛАБОРАТОРИСКИ
СТАОРЕЦ**

УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ“ – ШТИП