

DOI 10.7251/VETJSR1902251N

UDK 636.2.084.52:636.2.053.083.31

*Оригинални научни рад***УТИЦАЈ ТЕЛЕСНЕ КОНДИЦИЈЕ ЈУНИЦА НА КОНЦЕНТРАЦИЈУ ГЛУКОЗЕ, БЕТА-ХИДРОКСИБУТИРАТА И АКТИВНОСТ ГЛУТАТИОН-ПЕРОКСИДАЗЕ****Александар НИКШИЋ^{1*}, Јована ЈЕЧМЕНИЦА¹, Оливера ВАЛЧИЋ¹,
Светлана МИЛАНОВИЋ¹**¹ Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду, Србија

* Кореспондентни аутор: Светлана Милановић: cecam@vet.bg.ac.rs

Кратак садржај: Циљ овог рада је био да се утврди да ли постоје промене у концентрацији глукозе, бета-хидроксибутирата (ВНВ) и активности глутатион-пероксидазе (GPx) у зависности од телесне кондиције код јуница. Јунице су на основу телесне кондиције (ТК) сврстане у две групе: 1. ТК=3,75 и 2. ТК ≥4,0. У огледу је коришћена пуна крв 23 јунице узета 1–10 дан након партуса. Концентрације глукозе и ВНВ одређиване су одмах по узорковању крви, а активност GPX одређивана је након 24 сата. Јунице са већом телесном кондицијом имале су статистички значајно већу просечну концентрацију ВНВ и активност GPX. Просечна концентрација глукозе у обе групе се није разликовала.

Кључне речи: глукоза, глутатион-пероксидаза (GPx), кетонска тела, телесна кондиција

УВОД

Интензивна сточарска производња намеће употребу квалитетних хранива која ће у потпуности задовољити основне и производне потребе животиња у узгоју, максимално искориштавајући генетске капацитете јединки. Међутим, овај тип производње прате и многи метаболички поремећаји код животиња. Код млечних крава су ови поремећаји нарочито изражени јер се материје и енергија унети храном користе за задовољење потреба млечне жлезде, а потом за остале процесе организма.

Као последица неадекватне исхране крава, јављају се поремећаји метаболизма од којих је најчешћи кетоза.

Кетоза је поремећај метаболизма који се јавља код високомлечних крава, најчешће у раној лактацији односно перипарталном пе-

риоду. Због поремећаја у метаболизму угљених хидрата и масти, животиња улази у негативан енергетски биланс, што се одликује падом концентрације глукозе у крви и искоришћавањем резерви гликогена из јетре. Сва глукоза која се обезбеди као извор енергије преусмерава се у млечну жлезду за синтезу лактозе млека. Организам покушава да надокнади утрошену глукозу повећаним обимом глуконеогенезе у јетри, пре свега из оксалацетата као главне глуконеогене материје. Преусмеравање оксалацетата из циклуса лимунске киселине у глуконеогенезу узрокује накупљање ацетил-КоА настало у циклусу β-оксидације масних киселина, као последице негативног енергетског биланса. Због овога се метаболизам у великој мери преусмерава ка синтези кетонских тела (Јовановић и Михаиловић, 2008). Ово је на-

рочито изражено код крава са високом телесном кондицијом јер је због већих масних депоа код њих интензивнија β -оксидација са повећаним обимом кетогенезе (Цинцаревић, 2013).

У новијим истраживањима, све више се обраћа пажња на улогу оксидативног стреса у патогенези различитих метаболичких поремећаја карактеристичних за перипартални период (*El Deeb u El Bahr*, 2017). Сматра се да повећан обим β -оксидације масних киселина утиче на повећано стварање слободних

радикала. Важну улогу у антиоксидативној заштити организма има ензим глутатион-пероксидаза (GPx) који у свом каталитичком центру садржи селен у виду селеноцистеина (Forstrom и сар., 1978). Глутатион-пероксидаза је ензим који редукује водоник пероксид и пероксиде слободних масних киселина штитећи ћелије од оксидативних оштећења.

Због свега наведеног, циљ овог рада био је да утврдимо утицај телесне кондиције на ниво глукозе и β -хидроксибутирата у крви јуница, као и активност GPx.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА

У циљу утврђивања утицаја телесне кондиције (ТК) јуница на ниво глукозе и β -хидроксибутирата, као и активности глутатион-пероксидазе, вршена је процена телесне кондиције коришћењем Вирцинија система модификованим по Едменсону, по скали од 1 до 5 (Edmenson, 1989), на основу које је 23 јунице сврстано у две групе. У прву групу (n=5) су сврстане јунице оптималне телесне кондиције (TK=3,75), а у другу групу (n=18) гојазне јунице са оценом TK \geq 4,0. Оцена телесне кондиције вршена је 3 недеље пре предвиђеног партуса. Да би се избегла варирања у смислу процене телесне кондиције, оцењивање су вршиле истовремено четири особе. Просек старости отелених јуница је био 25,5 месеци.

Прикупљање и испитивање узорака крви јуница спроведено је од 1. до 10. дана након партуса. Крв је добијена пункцијом из *v. coccigea media*. Анализе крви су рађене по систему тест-трака на које је наносена кап узорковане крви. Вредност концентрације глукозе и β -хидроксибутирата очитавана је на апарату „FREESTYLE PRECISION NEO Blood Glucose and Ketone Monitoring system“.

Активност глутатион-пероксидазе (GPx) из пуне крви крава одређивана је методом по

Günzler и сар. (1974) на спектрофотометру Cecil 2000. Принцип овог мерења је заснован на спектрофотометријском регистровању потрошње NADPH у куплованој ензимској реакцији. Метода је изведена тако што је у епрувету редом додато 500 μ l калијум-фосфатног пуфера, 200 μ l глутатиона (GSH), 50 μ l глутатион-редуктазе (GR), 10 μ l пуне крви хемолизоване Драпкиновим реагенсом (разблажење 21 пут) и 490 μ l редестиловане воде. Затим је извршена преинкубација у термостату на 37°C у трајању од 10 минута, након чега је у епрувете додато 200 μ l никотинамид аденин динуклеотид-фосфата (NADPH) и 550 μ l терцијалног бутилхидропероксида (TBH). Након додавања NADPH и TBH, садржај епрувете је изливен у кивету. Стављањем кивете у спектрофотометар започиње и регистровање потрошње NADPH, а у интервалима од 30 секунди на таласној дужини од 366 nm, бележи се апсорбанца.

Раствори GR, GSH и NADPH су увек свеже припремани, уз употребу редестиловане воде као растварача за GR и GSH. Као растварач за NADPH коришћен је 0,1 % NaHCO₃. Састав, као и коначне концентрације реагенаса, приказане су у табели 1.

Никшић и сар:

Утицај телесне кондиције јуница на концентрацију глукозе, бета-хидроксибутирата и активност глутатион-пероксидазе

Табела 1. Састав и количина реагенаса коришћених за спектрофотометријско одређивање активности GPx

Реагенси	Запремина (μl)	Коначна концентрација
Калијум-фосфатни пуфер (400 mmol/L, pH 7)	500	100 mmol/l
GSH (604 mmol/L)	200	4 mmol/L
Глутатион-редуктаза (GR)	50	6 mmol/L
Пуна крв (разбл. 21x)	10	0,375 IU/mL
NADPH	200	0,3 mmol/L
TBN	550	1,575 mmol/L
Редестилована вода	490	

Резултати добијени у овом огледу су груписани у одговарајуће статистичке серије и обрађени уз примену одређених статистичких метода у програму MS Excel 2007. Од статистичких метода, коришћене су израчунате средње вредности (аритметичка средина – $\bar{X}_{\text{ср}}$), релативне мере варијабилитета

(коэффициент варијације – K_v) и апсолутне мере варијабилитета (стандардна девијација – S_D). Анализе статистичке сигнификантности извршене су студентовим т-тестом. Добијени резултати су приказани у виду графика.

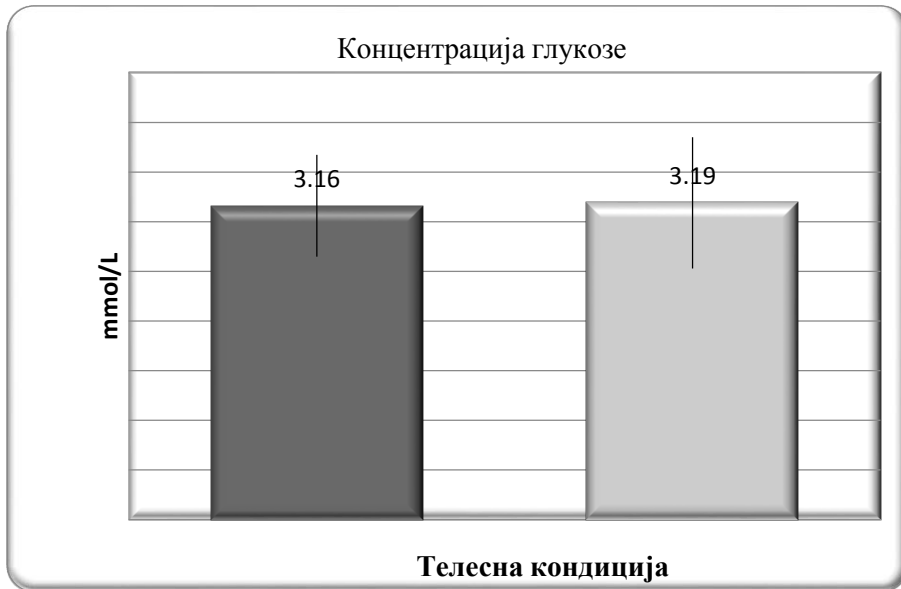
РЕЗУЛТАТИ

Испитиване су концентрације глукозе, ВНВ и одређивана активност GPx, са циљем да се упореде резултати између јуница оптималне телесне кондиције и гојазних јуница.

Приликом испитивања гликемије, није пронађена значајна разлика ($p=0,71$) између средњих вредности концентрација глукозе добијених код јуница оптималне телесне кондиције и гојазних јуница (Графикон 1).

Код јединки оптималне телесне кондиције, средња вредност концентрације глукозе била је $3,16 \pm 0,51$ mmol/L са интервалом вредности 2,8 – 3,9 mmol/L и коэффициентом варијације 16%.

Код гојазних јединки, средња вредност концентрације глукозе је била $3,19 \pm 0,66$ mmol/L, са интервалом вредности 1,5 – 4,6 mmol/L и коэффициентом варијације 20%.



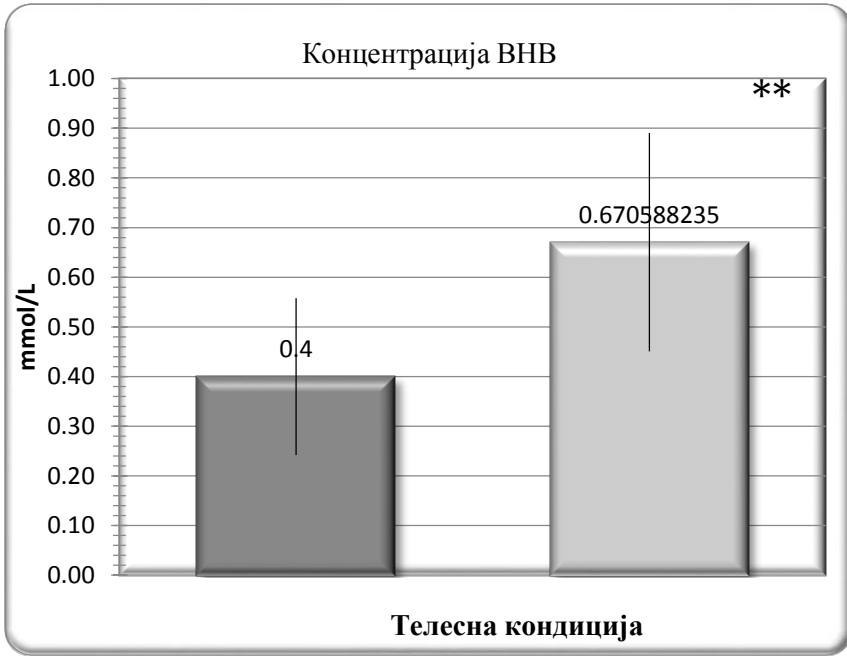
Графикон 1. Вредност концентрације глукозе у крви јуница оптималне и повећане телесне кондиције

Код јединки оптималне телесне кондиције, средња вредност концентрације ВНВ је била $0,4 \pm 0,16$ mmol/L, са интервалом вредности 0,2 – 0,6 mmol/L. Код гојазних јуница, средња вредност концентрације ВНВ је била $0,67 \pm 0,22$ mmol/L, са интервалом вредности 0,4 – 1,1 mmol/L. Испитивањем статистичке

значајности, пронађена је значајна разлика ($p=0,01$) између средњих вредности концентрација ВНВ јуница оптималне телесне кондиције и гојазних. Гојазне јунице су имале значајно вишу средњу вредност концентрације ВНВ (Графикон 2).

Никшић и сар:

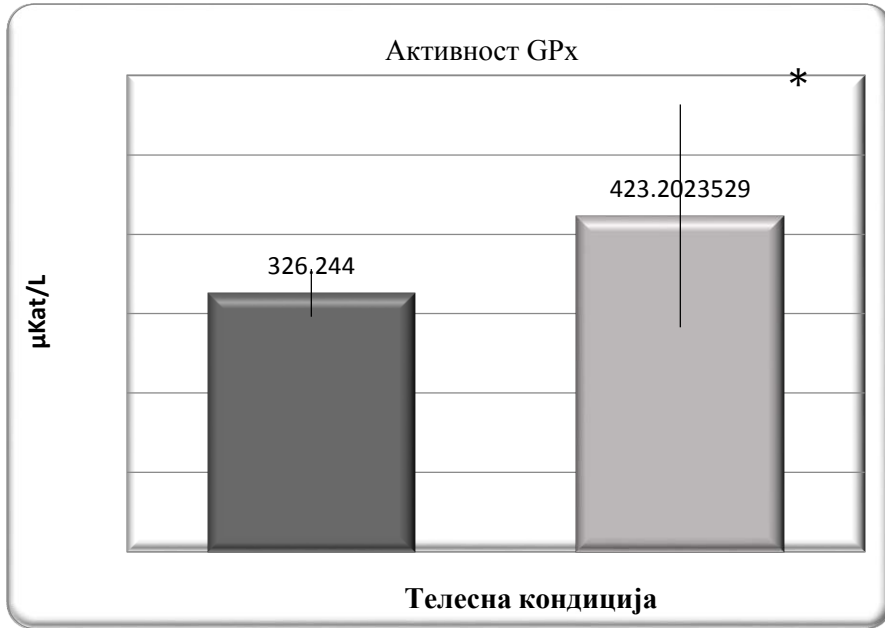
Утицај телесне кондиције јуница на концентрацију глукозе, бета-хидроксибутирата и активност глутатион-пероксидазе



Графикон 2. Вредност концентрације β -хидроксибутирата (ВНВ) у крви јуница оптималне и повећане телесне кондиције (** $p=0,01$)

Код јединки оптималне телесне кондиције, просечна активност GPx је била 326 ± 30 $\mu\text{Kat/L}$, са интервалом вредности 292–361 $\mu\text{Kat/L}$. Код гојазних јединки средња вредност за активност GPx је била 423 ± 140 $\mu\text{Kat/L}$, са интервалом вредности 225–687 $\mu\text{Kat/L}$.

Испитивањем статистичке значајности, утврђена је значајна разлика ($p=0,02$) између средњих вредности активности GPx јуница оптималне телесне кондиције и гојазних јуница. Код гојазних јуница је постојала значајно већа активност GPx (Графикон 3).



Графикон 3. Активност GPx у пуној крви јуница оптималне и повећане телесне кондиције (* $p=0,02$)

ДИСКУСИЈА

Кетоза представља чест метаболички поремећај код високомлечних крава. Узроци који доприносе настанку кетозе могу бити неадекватна исхрана у односу на период лактације, хормонски дисбаланс, лоша телесна кондиција, висока млечност и многи други.

Оцена телесне кондиције крава врши се у свим периодима производног и репродуктивног циклуса, а пожељна оцена телесне кондиције у периоду тељења је 3,25 – 3,75. Прегојене краве у периоду тељења и на почетку лактације, за који је карактеристичан негативни енергетски биланс, имају повећан ризик од настанка кетозе због ослобађања слободних масних киселина и нагомилавања ацетил-КоА. Како би се ови ризици избегли, неопходно је одржавати телесну кондицију крава у одређеном опсегу и то 3,25 – 3,75 на

порођају, 2,5 – 3,25 у току ране лактације, 2,5 – 3,5 током средине лактације, 3 – 3,5 у касној лактацији и 3,25 – 3,75 при засушењу (Edmenson, 1989). Како наводе Gillund и сар. (2001), настанак кетозног стања код гојазних крава након партуса је честа појава. На основу резултата које смо добили, код јуница је ово ређа појава, што се може објаснити мањом производњом млека првотелки. Због мање производње млека, негативан биланс енергије је мањи него код крава које су достигле своју максималну млечност.

Опасност од настанка кетозног стања расте са старошћу приликом првог тељења. Сматра се да првотелке млађе од 20 месеци спадају у најмање ризичну групу. С обзиром на то да је просек испитиваних јуница био

Никшић и сар:

Утицај телесне кондиције јуница на концентрацију глукозе, бета-хидроксибутирата и активност глутатион-пероксидазе

25,5 месеци, сврстане су у средње ризичну групу (Van Der Drift, 2013).

Код јединки оптималне телесне кондиције, средња вредност концентрације глукозе била је 3,16 mmol/L, а код гојазних јединки 3,19 mmol/L, што је у оквиру референтних вредности које износе 2,3–3,5 mmol/L (Стојић, 2010).

Вредност ВНВ преко 0,7 mmol/L две недеље након телења, заједно са вишом концентрацијом слободних масних киселина у крви, указују на негативан енергетски биланс (Celeska и сар., 2010). Вредности концентрације ВНВ испитиваних јуница са оптималном телесном кондицијом су биле у оквиру референтних вредности, док је код гојазних, шест

јединки (33,3%) имало повишене вредности. У овом периоду почиње да се развија негативан енергетски биланс, што за последицу има повећан обим синтезе кетонских тела. Код ових 6 јединки, забележена је нешто нижа просечна концентрација глукозе.

У доступној литератури нисмо нашли повезаност нивоа кетонских тела са активношћу ензима глутатион-пероксидазе, као ни објашњење зашто би била повећана њена активност код јуница са вишим нивоом ВНВ. Овај резултат указује на то да са већом пажњом треба приступити проучавању оксидативног стреса и антиоксидативног капацитета јединки са негативним енергетским билансом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Цинцовић М. (2013): *Патофизиолошка процена перипарталног метаболичког стреса код високопродуктивних крава употребом ендокриних и метаболичких критеријума*. Докторска теза, Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду.
2. Celeska I., Ulčar I., Stojkovski V., Dovenski T., Mitrov D., Džadžovski I. (2010): *Effect of lactation on energy metabolism in dairy cows from different categories*. Mac Vet Rev 33(2):15–21.
3. Edmenson A.J., Lean I.J., Weaver L.D., Farver T., Webster G. (1989): *A body condition scoring chart for Holstein dairy cows*. Journal of Dairy Science 72:68–78.
4. El Deeb W.M., El Bahr S.M. (2017): *Biochemical Markers of Ketosis in Dairy Cows at Postparturient Period: Oxidative Stress Biomarkers and Lipid Profile*. Am J of Biochem Mol Biol 7(2): 86–90.
5. Forstrom J.W., Zakowski J.J., Tappel A.L. (1978): *Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine*. Biochemistry 17:2639–2644.
6. Gillund P., Reksen O., Grohn Y.T., Karlberg K.J. (2001): *Body Condition Related to Ketosis and Reproductive Performance in Norwegian Dairy Cows*. Dairy Sci 84:1390–1396.
7. Günzler W.A., Steffens G.J., Grossman A., Kim S.M.A., Otting F., Wendel A., Flohe L., (1974): *The aminoacid sequence of a bovine glutathione peroxidase*. Physiol Chem 365:195.
8. Михаиловић М. и Јовановић И.Б. (2007): *Биохемија*. Научна КМД, Београд.
9. Стојић В. (2010): *Ветеринарска физиологија*. Научна КМД, Београд.
10. Van Der Drift S.G.A. (2013): *Ketosis In Dairy Cows: Etiologic Factors, Monitoring, Treatment. Dissertation*. Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, the Netherlands.

Рад примљен: 13.11.2019.

Рад прихваћен: 21.12.2019.