

DOI 10.7251/VETJSR2201178V

UDK 636.1:[616.15:577.152.1

Оригинални научни рад**АКТИВНОСТ СЕЛЕНОЕНЗИМА *GPx-1* И *GPx-3* У КРВИ РАДНИХ КОЊА НА ТЕРИТОРИЈИ ЦЕНТРАЛНЕ СРБИЈЕ****Оливера ВАЛЧИЋ*, Петар МИЛОСАВЉЕВИЋ, Иван ЈОВАНОВИЋ,
Светлана МИЛАНОВИЋ**

Универзитет у Београду, Факултет ветеринарске медицине, Београд, Србија

* Коресподентни аутор: Оливера Валчић, olja@vet.bg.ac.rs

Сажетак

Глутатион пероксидаза (GPx) је ензим који постоји у 8 изоензимских облика, од којих GPx-1 је облигаторни интрацелуларни ензим, док је GPx-3 активна у екстрацелуларним течностима, посебно у крвној плазми. Основна улога GPx се огледа у заштити ћелија од оксидативног стреса којег индукују слободни кисеонични радикали. Активност GPx се узима као поуздан индикатор статуса селена у организму људи и животиња. Основни пут уноса селена у организам је преко ланца исхране. Унети селен се уграђује у облику селенометионина и селеноцистеина у ткивне протеине, односно ензиме. У Србији су извршена темељна испитивања садржаја селена у хранивима и домаћим животињама, посебно код економски значајних врста као што су живина, свиње, овце и говеда. Међутим, до сада нису детаљно испитани радни хладнокрвни коњи, посебно они који се хране искључиво локално узгајаним хранивима, или су на испаша. Услед специфичног начина држања они су идеални индикатори статуса селена моногастричних биљоједа на датом локалитету.

Циљ нашег истраживања је био да одредимо статус селена на основу активности GPx-1 и GPx-3 у узорцима крви несуплементираних радних коња на територији централне Србије.

У нашем истраживању укупно је испитано 12 узорака крви коња преузетих са локалитета општина Краљево, Зајечар, Ваљево и Димитровград, и то: 12 узорака крвне плазме и 12 узорака испраних еритроцита. Мерење активности GPx-3 и GPx-1 је вршено методом по Гунцлеру на таласној дужини од 366nm. Приликом узорковања за свако грло су евидентирани подаци о полу, старости, вакцинацији и дехелминтизацији, саставу и пореклу датих хранива.

Просечна активност *GPx-1* је $502,02 \pm 91,77 \mu\text{Kat/l}$, а *GPx-3* $3,46 \pm 1,02 \mu\text{Kat/l}$ што указује на постојање маргиналног дефицита селена у популацији несуплементираних радних коња на територији централне Србије.

Кључне речи: *GPx*, коњи, селен, Србија.

УВОД

Метаболизам селена је врло комплексан јер је овај микроелемент за организам есенцијалан, али и потенцијално врло токсичан. Домаће и дивље животиње уносе селен преко хране. Садржај селена у хранивима биљног порекла зависи од бројних фактора међу којима се истичу: састав и карактеристике земљишта, хемијског облика селена у земљишту, количине селена у земљишту, врсте биљке као и фазе раста саме биљке. У свету је дефинисано неколико селендефицирних подручја, а једно од њих је и део Балканског полуострва (Валчић и сар., 2013).

Основна улога селена се огледа у заштити од оксидативног стреса и неутрализацији насталих слободних кисеоничних радикала преко деловања *GPx*. *GPx* се састоји од четири идентичне субјединице чије се појединачне молекулске масе крећу од 18000 до 23000 уз постојање стехиометријског односа од четири грам-атома селена по молу ензима. *GPx* је врло специфична према донару водоника (редуковани глутатион), а неспецифична према супстрату који редукује. Осим у разлагању водоник пероксида, ензим учествује у редукцији хидропероксида различитих органских једињења (масних киселина, нуклеинских киселина, тимина, простагландина, итд.) у одговарајуће алкохоле.

Физиолошки ефектори функције селена су селенопротеини, односно селеноензими- глутатион пероксидазе (*GPx*-, *EC 1.11.19*), а поред глутатион пероксидаза селен је присутан у јодтиронин дејодинази која има улогу у конверзији тироксина (Т4) у биолошки активан 3,3', 5-тријодтиронин (Т3). Миодегенерација позната као болест белих мишића (White muscle disease - WMD) је најчешће обољење домаћих животиња, укључујући и коње, које настаје као последица изразитог дефицита селена. Маргинални дефицит код коња доводи до неплодности кобила и успореног раста ждребади (Savage и Lewis, 2002).

У свету и Европи су описана подручја изразитог дефицита овог микроелемента. Познато је да је дефицит селена најизраженији у Кини, северозападу и југоистоку САД, а у Србији на подручју Сјеничко-Пештерске висоравни. Истраживања спроведена у претходне две деценије у Србији (Валчић и сар., 2013) су показала да је просечан садржај селена у

биљним хранивима на подручју Републике Србије у интервалу од маргинално дефицитарног до дефицитарног, при чему је ситуација најповољнија у Војводини.

Статус селена код домаћих животиња може да се процени на основу директног одређивања селена у узорцима крви, или индиректно на основу активности ензима GPx.

GPx-1 је облигатни интрацелуларни ензим док је GPx-3 присутна у ванћелијском простору, посебно у крвној плазми. Бројни аутори су установили да су концентрација селена у крви и активност глутатион пероксидазе у пуној крви у високој корелацији која се креће у интервалу од $r=0,70$ до $r=0,93$ и то код свих врста домаћих животиња храњених хранивима која садрже селен у концентрацијама које су успод токсичних доза (Wolff и сар., 2017; Pavlata и сар., 2000; Maylin и сар., 1980; Blackmore и сар., 1982; Carle и сар., 1978).

Процена статуса селена коња на основу активности GPx у крви сматра се поузданом и осетљивом методом. Селен се уграђује у еритроците током еритропоезе и активност GPx-1 се сматра показатељем дуготрајног уноса селена, док активност плазматске GPx-3 је првенствено индикатор краткорочног статуса селена (Harris, 1998). Досадашња истраживања Maas и сар. (1996) и Blackmore и Brobst (1981) наводе да се могу сматрати физиолошким вредности активности GPx пуне крви коња у интервалу од 300 до 600 $\mu\text{Kat/l}$.

На подручју Србије су вршена само спорадична испитивања статуса селена и активности GPx код пунокрвних спортских коња који су у интензивном узгоју (Михаиловић и сар., 1996). Међутим, до дана данашњег нису спроведена испитивања статуса селена радних несуплементираних коња.

Овај рад представља прво прелиминарно испитивање активности GPx-1 и GPx-3 у циљу одређивања статуса селена радних, несуплементираних, хладнокрвних коња на територији централне Србије.

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ

У истраживању укупно је испитано 12 узорака крви коња из централне Србије (Краљево, Зајечар, Ваљево и Димитровград), и то: 12 узорака крвне плазме и 12 узорака испраних еритроцита. Узорковању крви је предходило клинички преглед, како би у студију била укључена само грла која су здрава и која у предходним месецима нису била под терапијом. Истовремено, одабрана су искључиво грла која нису у протеклих 12 месеци добијала витаминско-минералне суплементе пероралним или парентералним путем, а

храњена су искључиво локално узгајаним хранивима или напасана на локалним пашњацима.

Крвна плазма је издвојена центрифуговањем хепаринисаних узорака крви на 1000 x g у трајању од 20 минута. Узорци испраних еритроцита су добијени из узорака пуне крви након троструког испирања еритроцита физиолошким раствором и троструким центрифугирањем. Узорци су транспортовани у хладном ланцу, а одмах по пријему су складиштени у замрзивачу на -18°C.

Коњима је у сврху узимања узорака крви вршена венепункција *v. jugularis* уз пристанак власника и уз поштовање свих мера добре ветеринарске праксе.

Активност цитосолне глутатион пероксидазе (*GPx1*) и глутатион пероксидазе крвне плазме (*GPx3*) одређивана је методом по Günzler и сар. (1984) на спектрофотометру Cecil 2000, са воденим купатилом и термостатом који је одржавао константну температуру од 37°C. Принцип овог мерења је заснован на спектрофотометријском регистровању потрошње NADPH у куплованом ензимском систему.

Састав као и коначне концентрације реагенаса су приказане у Табели 1.

Табела 1 Састав реагенаса који су коришћени 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	6 mmol/L
Глутатион редуктаза (GR)	50	0,375 IU/mL
Узорак крвне плазме	20	
или		
Узорак хемолизата еритроцита*	10	
10 минута преинкубација на 37 °C		
NADPH 3 mmol/L у 0,1% NaHCO ₃	200	0,3 mmol/L
TBH	550	1,575 mmol/L
Редестилована вода	480 (за узорак плазме); 490 (за узорак еритроцита)	-

*Хемолизат се припрема додатком 10µl испраних еритроцита у 200µl Драбкиновог реагенаса

За статистичку обраду података коришћени су програми MS Excel 2007 и GraphPadPrism5.

Резултати су приказани коришћењем параметара дескриптивне статистике (\bar{X} , SD и CV%).

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Активност цитосолне глутатион пероксидазе (*GPx1*) у испраним еритроцитима испитиваних коња се кретала у интервалу од 288,48 до 632,12 $\mu\text{Kat/l}$. Статистички посматрано испитивана група је била хомогена обзиром да је коефицијент варијације износио 21,7%. Просечна активност *GPx1* је била $\bar{X}_{\text{cp}}=502,02 \mu\text{Kat/l}$, а стандардна девијација $SD=108,96$ (Табела 2).

Активност глутатион пероксидазе (*GPx3*) у крвној плазми испитиваних коња била је у интервалу од 2,42 до 5,35 $\mu\text{Kat/l}$. Статистички посматрано испитивана група је била хомогена обзиром да је коефицијент варијације износио <30%. Просечна активност *GPx3* је била $\bar{X}_{\text{cp}}=3,46 \mu\text{Kat/l}$, а стандардна девијација $SD=1,02$ (Табела 2).

Активност *GPx3* је показатељ статуса краткорочног уноса селена у организам. Поред селеноензима у плазми је присутно више од 20 различитих селенопротеина (Круиков и сар., 2003) који по својој функцији могу бити антиоксиданси, регулатори редокс реакција, учесници метаболизма тиреоидних хормона, транспортни протеини итд. Код домаћих животиња више од 98% активности *GPx* је смештено у еритроцитима, што је у складу са нашим резултатима.

Табела 2 Активност *GPx-1* и *GPx-3* у узорцима крви радних коња на подручју централне Србије

	\bar{X}_{sr}	SD	CV%	Iv
<i>GPx-1</i> ($\mu\text{Kat/l}$) (n=12)	502,02	108,96	21,70	288,48-632,12
<i>GPx-3</i> ($\mu\text{Kat/l}$) (n=12)	3,46	1,02	29,50	2,42-5,35

До данас нису успостављене прецизне референтне вредности активности *GPx* у крви животиња. Наиме, у литератури се наводе широки интервали активности *GPx* у крви коња, тако да Maas и сар. (1996) наводе вредности у интервалу од 80 до 500 $\mu\text{Kat/l}$ док Blood и Radostits (1989) сматрају да су референтне физиолошке вредности знатно више и износе од 500 до 2500 $\mu\text{Kat/l}$. Додатни проблем приликом дефинисања препоручених референтних вредности активности *GPx* представља недостатак усаглашености јединица преко којих се одређује активност овог селеноензима, тако да се често активност *GPx* изражава и преко IU (интернационалних јединица), $\mu\text{mol/ml/min}$, Ug/Hb , Ug/prot , итд., што додатно отежава међулабораторијско поређење добијених вредности.

Приликом тумачења добијених вредности у нашем истраживању треба имати у виду да смо активност GPx-1 одређивали у узорцима испраних еритроцита, а не у узорцима пуне крви као што се често приказује у литератури, те је неопходно екстраполирати резултате на вредности пуне крви на основу хематокрита крви коња. Оваквav прилаз је у потпуности оправдан уколико имамо у виду да је учешће крвне плазме у активности GPx изузетно ниско (<1%) и да нема значајан утицај на укупну активност GPx у крви. Сва грла која су била укључена у наше истраживање су била клинички здрава, без знакова анемије, дехидратације, ендopаразитоза и других здравствених проблема који би могли да указују на евентуално постојање поремећаја хематокрита (хеморагије, дехидратација и сл.). Узимајући у обзир да је просечан физиолошки хематокрит крви одраслих коња 0,35 (Salamari и сар., 2009) можемо да на основу постављене математичке пропорције изведемо закључак да се вредности GPx у пуној крви коња на подручју централне Србије крећу у интервалу од 101-221 $\mu\text{Kat/l}$, што јасно указује да се радни коњи на подручју централне Србије налазе у зони маргиналног дефицита овог микроелемента.

Слични резултати су забележени и на подручју Републике Чешке где је у узорцима пуне крви 159 одраслих коња измерена активност GPx износила 286,43 $\mu\text{Kat/l}$ (Ludvikova и сар., 2005). У наведеном истраживању аутори су одредили постојање високог коефицијента корелације ($r= 0,84$) између измерених активности GPx и концентрације селена у крви, чиме се додатно потврђује валидност мерења активности GPx у циљу одређивања статуса селена коња. Истовремено, горе поменута група аутора је испитивала линеарност односа и корелацију између активности GPx и концентрације селена у циљу одређивања граничних вредности активности које указују на статус дефицита селена. Утврдили су да се вредности активности GPx које превазилазе 200 $\mu\text{Kat/l}$ могу сматрати адекватним, као и да се оне постижу при садржају селена у пуној крви >75 $\mu\text{g/l}$ вредности у интервалу од 100 до 200 $\mu\text{Kat/l}$ маргиналним, а вредности активности GPx <100 $\mu\text{Kat/l}$ аутори су дефинисали као неадекватним тј. дефицитарним.

Интересантно је овом приликом напоменути да су сви коњи који су били укључени у наше испитивање били несуплементирани радни коњи који су били редовно изложени одређеном степену физичког напора, било у раду под самаром, или као рекреативни или запрежни коњи. Бројни аутори (Ott и сар., 2022; Mami и сар., 2019; Gondim и сар., 2009) истичу да је физички напор један од окидача оксидативног стреса посебно код коња који су изложени интензивном напору приликом такмичења у издржљивости (ендјуранс трке). Једна од основних предности нашег истраживања се огледа

у чињеници да смо испитали статус GPx у категорији коња која до сада није проучавани у нашем поднебљу, а то су несуплементирани радни коњи који су храњени искључиво локално узгајаним хранивима, што нам омогућава увид у реално стање на терену. Свакако да би испитивања требало проширити на остала подручја у циљу обезбеђивања меродавних података на основу којих ћемо моћи да дамо препоруке о евентуалној суплементацији селеном радних коња на територији Републике Србије.

Захвалница

Рад је подржан средствима Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (Уговор број 451-03-68/2022-14/200143).

Изјава о сукобу интереса: Аутори изјављују да не постоји сукоб интереса.

ЛИТЕРАТУРА

- Blackmore D. J., Brobst D. (1981): Biochemical values in equine medicine. *The Animal Health Trust*, 108.
- Blackmore D. J., Campbell C., Dant C., Holden J. E., Kent J. E. (1982): Selenium status of thoroughbreds in the United Kingdom. *Equine Vet J.*, 14:139-143.
- Blood D.C., Radostits O. M. (1989): Veterinary medicine. A textbook of the disease of cattle, sheep, pigs and horses. 7th ED. Book Society/Balliere Tindall, 1502.
- Calamari L., Ferrari A., Bertin G. (2009): Effect of Selenium Source and Dose on Selenium Status of Mature Horses. *J. Anim. Sci.*, 87:167-178.
- Caple I. W., Edwards S. J. A., Forsyth W. M., Whiteley P., Selth R. H., Fulton L. J. (1978): Blood glutathione peroxidase activity in horses in relation to muscular dystrophy and selenium nutrition. *Aust Vet J.*, 54:57-60.
- Gondim F. J., Zoppi C. C., Silveira L. R., Silva D. P., Macedo D. V. (2009): Possible Relationship Between Performance and Oxidative Stress in Endurance Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 29(4):206-212.
- Günzler W. A., Steffens G. J., Grossman A., Kim S. M. A., Otting F., Wendel A., Flohe L. (1984): The aminoacid sequence of a bovine glutathione peroxidase. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.*, 365(2):195-212.
- Harris A. P. (1998): Musculoskeletal Disease. In: Equine internal medicine. Eds. Reed S. M., Bayly W. M., W. B. Saunders Company, 371-426.
- Kryukov G. V., Castellano S., Novoselov S., Lobanov A., Zehtab O., Guigo R., Gladyshev V. (2003): Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*, 300(5624):1439-43.
- Ludvikova E., Pavlata L., Vyskočil M., Jahn P. (2005): Selenium Status of Horses in the Czech Republic. *Acta Vet. Brno*, 74:369-375.
-

- Maas J., Parish S. M., Hodgson D. R., Valberg S. J. (1996): Nutritional myodegeneration. In: Large animal internal medicine. Eds. Smith B. P., Mosby, 1513-1518.
- Mami S., Khoje G., Sharishiori A., Goozaninejad S. (2019): Evaluation of Biological Indicators of Fatigue and Muscle Damage in Arabian Horse after Race. *Journal of Equine Veterinary Science*, 78:74-78.
- Maylin G. A., Rubin D. S., Lein D. H. (1980): Selenium and vitamin E in horses. *Cornell Vet.*, 70(3):272-289.
- Mihailovic M., Ilić V., Lindberg P. (1996): Blood glutathione peroxidase activity, selenium and vitamin E concentrations of race horses in Serbia. *Acta Vet Beograd*, 46:27-32.
- Ott E. C., Cavinder C. A., Wang S., Smith., Lemley O. C., Dinh T. T. N. (2022): Oxidative stress biomarkers and free aminoacid concentrations in the blood plasma of moderately exercised horses indicate adaptive response to prolonged training. *Journal of Animal Science*, 100(4):skac 086.
- Pavlata L., Pechova A., Illek J. (2000): Direct and indirect assessment of status in cattle – a comparison. *Acta Vet Brno*, 69:281-287.
- Savage C. J., Lewis L. D. (2002): Selenium. In: Adams lameness in horses. Eds. Stashak T. S., Lippincott Williams & Wilkins, 380-382.
- Valčić O., Jovanović I., Milanović S., Gvozdić D. (2013): Selenium status of feedstuffs and grazing ewes in Serbia. *Acta veterinaria*, 63(5-6):665-675.
- Wolff F., Moschos A., Koller G., Bauer A., Vervuert I. (2017): Serum selenium concentration and whole blood glutathione peroxidase activity in healthy adult horses. *Tierarztl Prx Ausg G Grosstiere Nutztiere*, 45(6):332-369.

Рад примљен: 27.07.2022.

Рад прихваћен: 29.08.2022.
