

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 предходио 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 (X_{cp} , 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 $X_{cp}=502,02 \mu\text{Kat/l}$, 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 $X_{cp}=3,46 \mu\text{Kat/l}$, 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

	Xsr	SD	CV%	Iv
GPx-1 ($\mu\text{Kat/l}$) (n=12)	502,02	108,96	21,70	288,48-632,12
GPx- 3 ($\mu\text{Kat/l}$) (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. Оваквав 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, ендопаразитоза 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.

DOI 10.7251/VETJEN2201186V

UDK 636.1:[616.15:577.152.1

Original Scientific Paper**ACTIVITY OF SELENENZYMES GPx-1 AND GPx-3 IN THE BLOOD OF WORKING HORSES IN THE TERRITORY OF CENTRAL SERBIA****Olivera VALČIĆ*, Petar MILOSAVLJEVIĆ, Ivan JOVANOVIĆ, Svetlana MILANOVIĆ**

University of Belgrade, Faculty of Veterinary Medicine, Belgrade, Serbia

* Corresponding author: Olivera Valčić, olja@vet.bg.ac.rs.

Summary

Glutathione peroxidase (GPx) is an enzyme that has 8 isoenzyme forms, of which GPx-1 is an obligatory intracellular enzyme, while GPx-3 is active in extracellular fluids, especially in blood plasma. The main role of GPx is the protection of cells from oxidative stress induced by free oxygen radicals. GPx activity is taken as a reliable indicator of selenium status in the human and animal organism. Selenium is introduced in organism mainly through the food chain. Ingested selenium is incorporated in the form of selenomethionine and selenocysteine into tissue proteins, i.e. enzymes. Detailed investigation related to the content of selenium in feed and domestic animals were carried out in Serbia, especially in economically significant species such as poultry, pigs, sheep and cattle. However, working cold-blooded horses, especially those that are fed exclusively with locally grown feed, or are on pasture, have not been examined in detail so far. Due to their specific way of breeding, they are ideal indicators of the selenium status of monogastric herbivores in a given locality.

The goal of our study was to determine the status of selenium based on the activity of GPx-1 and GPx-3 in blood samples of non-supplemented working horses in the territory of central Serbia.

In our study, a total of 12 samples of horse blood taken from the localities of the municipalities of Kraljevo, Zaječar, Valjevo and Dimitrovgrad were tested as follows: 12 samples of blood plasma and 12 samples of washed erythrocytes. Measurement of GPx-3 and GPx-1 activity was carried out using the Guncler method at a wavelength of 366 nm. For each animal, during sampling, data on gender, age, vaccination and deworming, composition and origin of the given nutrients were recorded.

The average activity of GPx-1 was 502.02 ± 91.77 μ Kat/l, and GPx-3 3.46 ± 1.02 μ Kat/l, which indicates the existence of a marginal selenium deficit in the population of unsupplemented working horses in the territory of central Serbia.

Keywords: GPx, horses, selenium, Serbia.

INTRODUCTION

The metabolism of selenium is very complex because this trace element is essential for the organism, but also potentially very toxic. Domestic and wild animals ingest selenium through food. The content of selenium in nutrients of plant origin depends on numerous factors, among which stand out: the composition and characteristics of the soil, the chemical form of selenium in the soil, the amount of selenium in the soil, the type of plant and the growth phase of the plant itself. Several selenium deficient areas have been defined in the world, and one of them is part of the Balkan Peninsula (Valčić et al., 2013).

The main role of selenium is the protection against oxidative stress and the neutralization of the generated free oxygen radicals through the action of GPx. GPx consists of four identical subunits whose individual molecular masses range from 18,000 to 23,000 with a stoichiometric ratio of four gram-atoms of selenium per mole of enzyme. GPx is very specific towards the hydrogen donor (reduced glutathione) and non-specific towards the reducing substrate. In addition to the decomposition of hydrogen peroxide, the enzyme participates in the reduction of hydroperoxides of various organic compounds (fatty acids, nucleic acids, thymine, prostaglandins, etc.) into the corresponding alcohols.

Physiological effectors of selenium function are selenoproteins, or selenoenzymes - glutathione peroxidase (GPx-, EC 1.11.19), and in addition to glutathione peroxidase, selenium is present in iodothyronine deiodinase, which plays a role in the conversion of thyroxine (T₄) into biologically active 3,3',5 - triiodothyronine (T₃). Myodegeneration known as White muscle disease (WMD) is the most common disease of domestic animals, including horses, which occurs as a result of a pronounced selenium deficiency. Marginal deficiency in horses leads to infertility in mares and slower growth in foals (Savage and Lewis, 2002).

Areas of pronounced deficit of this microelement have been described in the world and in Europe. It is known that the selenium deficit is most pronounced in China, the North-West and South-East of the USA, and in Serbia in the area of the Sjenica-Pešter Plateau. Research conducted in the previous two decades in Serbia (Valčić et al., 2013) showed that the average content of selenium in plant foods in the territory of the Republic of Serbia is in the interval from marginally deficient to deficient, where the situation is most favorable in Vojvodina.

Selenium status in domestic animals can be assessed based on the direct determination of selenium in blood samples, or indirectly based on the activity of the enzyme GPx.

GPx-1 is an obligatory intracellular enzyme, while GPx-3 is present in the extracellular space, especially in the blood plasma. Numerous authors have established that the concentration of selenium in the blood and the activity of glutathione peroxidase in whole blood are highly correlated, ranging from $r=0.70$ to $r=0.93$, in all types of domestic animals fed with feed containing selenium in concentrations below toxic doses (Wolff et al., 2017; Pavlata et al., 2000; Maylin et al., 1980; Blackmore et al., 1982; Caple et al., 1978).

Assessment of selenium status of horses based on GPx activity in blood is considered a reliable and sensitive method. Selenium is incorporated into erythrocytes during erythropoiesis and GPx-1 activity is considered an indicator of long-term selenium intake, while plasmatic GPx-3 activity is primarily an indicator of short-term selenium status (Harris, 1998). Previous research by Maas et al. (1996) and Blackmore and Brobst (1981) state that physiological values of GPx activity in horse whole blood can be considered in the range of 300 to 600 $\mu\text{Kat/l}$.

In the territory of Serbia, only sporadic tests of selenium status and GPx activity were performed in thoroughbred sports horses that are intensively bred (Mihailović et al., 1996). However, to date, no tests have been conducted on the selenium status of non-supplemented working horses.

This work represents the first preliminary examination of GPx-1 and GPx-3 activity in order to determine the selenium status of working, non-supplemented, cold-blooded horses in the territory of central Serbia.

MATERIALS AND METHODS

In the study, a total of 12 horse blood samples from central Serbia (Kraljevo, Zaječar, Valjevo and Dimitrovgrad) were tested, as follows: 12 blood plasma samples and 12 washed erythrocyte samples. A clinical examination was obtained before the blood sampling, so that only animals that were healthy and that had not been under therapy in the previous months were included in the study. At the same time, only those animals that did not receive vitamin-mineral supplements orally or parenterally in the past 12 months were selected, and were fed exclusively with locally grown feed or grazed on local pastures.

Blood plasma was separated by centrifugation of heparinized blood samples at $1000 \times g$ for 20 minutes. Samples of washed erythrocytes were obtained from whole blood samples after triple washing of erythrocytes with physiological

solution and triple centrifugation. The samples were transported to the laboratory in a cold chain, and immediately stored in a freezer at -18°C .

In order to take blood samples, horses were subjected to venipuncture of the jugular vein with the owner's consent and in compliance with all measures of good veterinary practice.

The activity of cytosolic glutathione peroxidase (GPx1) and blood plasma glutathione peroxidase (GPx3) was determined by the method of Günzler et al. (1984) on a Cecil 2000 spectrophotometer, with a water bath and a thermostat that maintained a constant temperature of 37°C . The principle of this measurement is based on the spectrophotometric recording of NADPH consumption in the coupled enzyme system.

The composition and final concentrations of the reagents are shown in Table 1.

Table 1 Composition of reagents used for spectrophotometric determination of GPx activity

Reagents	Volume (μl)	Final concentration
Potassium phosphate buffer (400 mmol/L, pH 7)	500	100 mmol/L
GSH (604 mmol/L)	200	6 mmol/L
Glutathione reductase (GR)	50	0.375 IJ/mL
Blood plasma sample	20	
or		
Erythrocyte hemolysate sample*	10	
10 minutes preincubation on 37°C		
NADPH 3 mmol/L in 0,1% NaHCO_3	200	0.3 mmol/L
TBH	550	1.575 mmol/L
Redistilled water	480 (for a plasma sample); 490 (for a erythrocyte sample)	-

* Hemolysate is prepared by adding 10 μl of washed erythrocytes to 200 μl of Drabkin's reagent.

MS Excel 2007 and GraphPadPrism5 programs were used for statistical data processing.

Results are presented using descriptive statistics parameters (Mean, SD and CV%).

RESULTS AND DISCUSSION

The activity of cytosolic glutathione peroxidase (GPx1) in the washed erythrocytes of the tested horses ranged from 288.48 to 632.12 $\mu\text{Kat/l}$. Statistically, the examined group was homogeneous, given that the coefficient of variation was 21.7%. The average activity of GPx1 was Mean=502.02 $\mu\text{Kat/l}$, and the standard deviation SD=108.96 (Table 2).

The activity of glutathione peroxidase (GPx3) in the blood plasma of the examined horses was in the interval from 2.42 to 5.35 $\mu\text{Kat/l}$. Statistically, the examined group was homogeneous considering that the coefficient of variation was <30%. The average activity of GPx3 was Mean=3.46 $\mu\text{Kat/l}$, and the standard deviation SD=1.02 (Table 2).

GPx3 activity is an indicator of the status of short-term selenium intake in the organism. In addition to selenoenzymes, more than 20 different selenoproteins are present in the plasma (Kryukov et al., 2003), which, according to their function can be antioxidants, regulators of redox reactions, participants in the metabolism of thyroid hormones, transport proteins, etc. In domestic animals, more than 98% of GPx activity is located in erythrocytes, which is consistent with our results.

Table 2 Activity of GPx-1 and GPx-3 in blood samples of working horses in central Serbia

	Mean	SD	CV%	Iv
GPx-1 ($\mu\text{Kat/l}$) (n=12)	502.02	108.96	21.70	288.48-632.12
GPx- 3 ($\mu\text{Kat/l}$) (n=12)	3.46	1.02	29.50	2.42-5.35

To date, precise reference values for GPx activity in animal blood have not been established. Namely, the literature indicates wide intervals of GPx activity in horse blood, as Maas et al. (1996) gave values in the interval from 80 to 500 $\mu\text{Kat/l}$, while Blood and Radostits (1989) believe that the reference physiological values are significantly higher and amount to 500 to 2500 $\mu\text{Kat/l}$. An additional problem when defining the recommended reference values of GPx activity is the lack of conformity of the units through which the activity of this selenoenzyme is determined, so that GPx activity is often expressed through IU (international units), $\mu\text{mol/ml/min}$, Ug/Hb, Ug/prot, etc., which further complicates the inter-laboratory comparison of the obtained values.

When interpreting the values obtained in our study, it should be considered that GPx-1 activity was determined in washed erythrocyte samples, not in whole blood samples as is often shown in the literature, and it is necessary to extrapolate the results to whole blood values based on blood hematocrit in a horse. This approach is fully justified if we understand that the participation of blood plasma in GPx

activity is extremely low (<1%) and that it has no significant effect on the overall activity of GPx in the blood. All the animals that were included in our study were clinically healthy, without signs of anemia, dehydration, endoparasitosis and other health problems that could indicate the possible existence of hematocrit disorders (hemorrhages, dehydration, etc.). Taking into account that the average physiological hematocrit of the blood of adult horses is 0.35 (Calamari et al., 2009), we can conclude, based on the set mathematical proportion, that GPx values in the whole blood of horses in central Serbia range from 101 to 221 $\mu\text{Kat/l}$, which clearly indicates that working horses in the area of central Serbia are in the zone of marginal deficit of this microelement.

Similar results were recorded in the territory of the Czech Republic, where the GPx activity measured in whole blood samples of 159 adult horses was 286.43 $\mu\text{Kat/l}$ (Ludvikova et al., 2005). In the aforementioned study, the authors determined the high correlation coefficient ($r= 0.84$) between measured GPx activity and blood selenium concentration, which further confirms the validity of measuring GPx activity in order to determine the selenium status of horses. At the same time, the aforementioned group of authors examined the linearity of the relationship and the correlation between GPx activity and selenium concentration in order to determine the limit values of activity that indicate the status of selenium deficiency. They determined that GPx activity values exceeding 200 $\mu\text{Kat/l}$ can be considered adequate, as well as that they are achieved with selenium content in whole blood $>75 \mu\text{g/l}$. According to those authors, values in the interval from 100 to 200 $\mu\text{Kat/l}$ are marginal, and GPx activity values $<100 \mu\text{Kat/l}$ are inadequate, i.e. deficient.

It is interesting to note that all the horses that were included in our study were non-supplemented working horses that were regularly exposed to a certain degree of physical effort, either in work under saddle, or as recreational or harness horses. Numerous authors (Ott et al., 2022; Mami et al., 2019; Gondim et al., 2009) point out that physical effort is one of the triggers of oxidative stress, especially in horses that are exposed to intense effort during endurance competitions i.e. endurance races. One of the main advantages of our study is the fact that we examined the status of GPx in a category of horses that has not been studied so far in our climate, namely non-supplemented working horses that are fed exclusively with locally grown feed, which allows us to understand the real situation in the field. Certainly, the tests should be extended to other areas in order to provide more reliable data on the basis of which we will be able to make recommendations on possible selenium supplementation of working horses on the territory of the Republic of Serbia.

Acknowledgments

The study is supported by the funds of the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (Contract number 451-03-68/2022-14/200143).

Conflict of interest statement: The authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

- 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.

Paper received: 27.07.2022.

Paper accepted: 29.08.2022.
