

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<sup>1\*</sup>, Јована ЈЕЧМЕНИЦА<sup>1</sup>, Оливера ВАЛЧИЋ<sup>1</sup>,  
Светлана МИЛАНОВИЋ<sup>1</sup>**<sup>1</sup> 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 депозита код њих интензивнија  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -хидроксибутирата у крви јуница, као и активност GPx.

## МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА

У циљу утврђивања утицаја телесне кондиције (ТК) јуница на ниво глукозе и  $\beta$ -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 (ТК=3,75), а у другу групу (n=18) гојазне јунице са оценом ТК  $\geq 4,0$ . 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  $\beta$ -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  $\mu$ l калијум-фосфатног пуфера, 200  $\mu$ l глутатиона (GSH), 50  $\mu$ l глутатион-редуктазе (GR), 10  $\mu$ l пуне крви хемолизоване Драпкиновим реагенсом (разблажење 21 пут) и 490  $\mu$ l редестиловане воде. Затим је извршена преинкубација у термостату на 37°C у трајању од 10 минута, након чега је у епрувету додато 200  $\mu$ l никотинамид аденин динуклеотид-фосфата (NADPH) и 550  $\mu$ 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 % NaHCO<sub>3</sub>. 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 IJ/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.

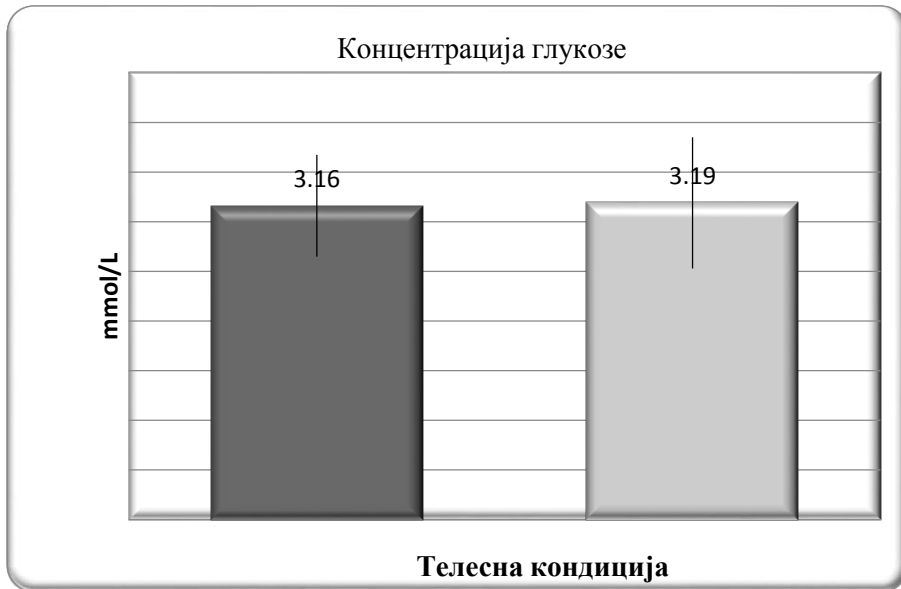
## РЕЗУЛТАТИ

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%.



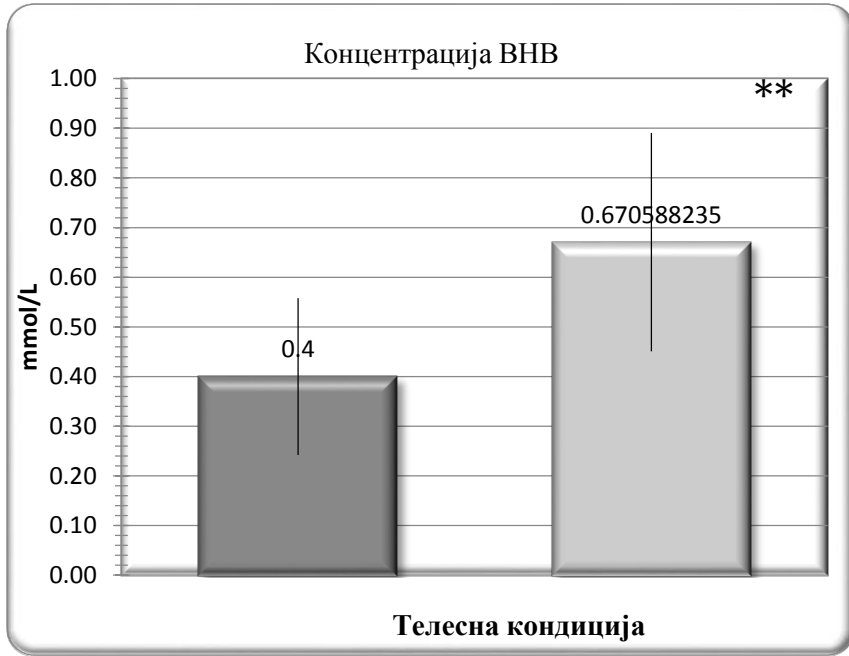
Графикон 1. Вредност концентрације глукозе у крви јуница оптималне и повећане телесне кондиције

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:

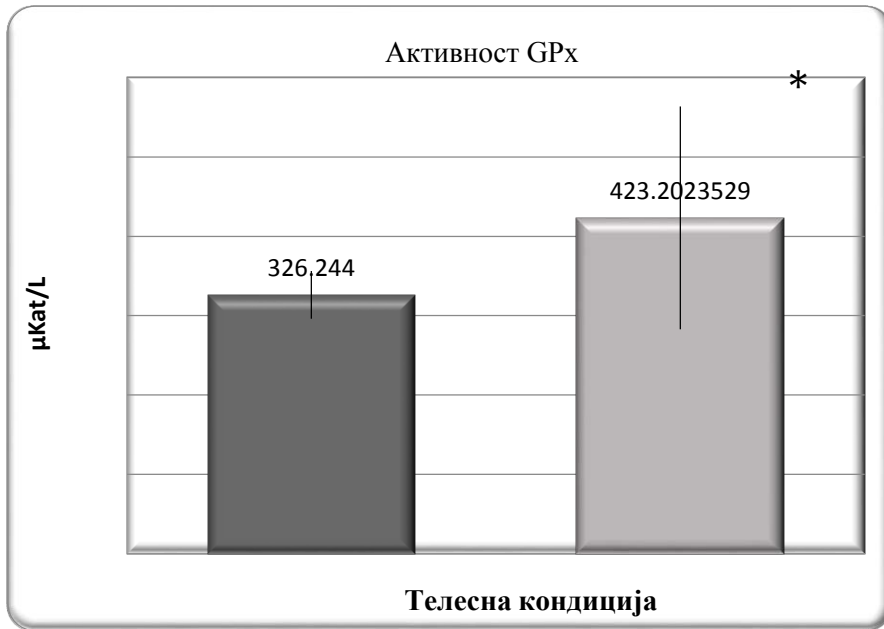
Утицај телесне кондиције јуница на концентрацију глукозе, бета-хидроксибутирата и активност глутатион-пероксидазе



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

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

DOI 10.7251/VETJEN1902258N

UDK 636.2.084.52:636.2.053.083.31

*Original scientific paper***THE EFFECT OF BODY CONDITION SCORE OF HEIFERS ON GLUCOSE AND  $\beta$ -HYDROXYBUTYRATE CONCENTRATIONS AND GLUTATHIONE PEROXIDASE ACTIVITY****Aleksandar NIKŠIĆ<sup>1\*</sup>, Jovana JEČMENICA<sup>1</sup>, Olivera VALČIĆ<sup>1</sup>, Svetlana MILANOVIĆ<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Faculty of Veterinary Medicine University of Belgrade, Serbia

\*Corresponding author: Svetlana Milanović: cecam@vet.bg.ac.rs

**Abstract:** The aim of this study was to establish if there are differences in glucose and  $\beta$ -hydroxybutyrate (BHB) concentrations as well as glutathione peroxidase (GPx) activity related to the body condition in heifers. Based on the body condition (BC), heifers were divided into two groups: 1. BC =3.75 and 2. BC  $\geq$ 4.0. Whole blood samples from 23 heifers, taken between day 1 and day 10 after parturition, were used in the study. Glucose and BHB concentrations were determined immediately after sampling, while GPx activity was determined 24 hours after that. Heifers with higher body condition had significantly higher average BHB concentration and GPx activity. Average glucose concentrations did not differ between groups.

**Key words:** glucose, glutathione peroxidase (GPx), ketone bodies, body condition

**INTRODUCTION**

Intensive livestock production requires use of nutrients of high quality that will completely satisfy basic and productive needs of breeding animals, maximizing the genetic capacity of individuals. Nevertheless, this type of production is associated with many metabolic disturbances in animals. In dairy cows, these disturbances are especially pronounced, since dietary nutrient and energy are primarily used for mammary gland needs and then for the rest of the processes in organisms.

As a consequence of inadequate nutrition in cows, metabolic disturbances occur with ketosis being the most frequent one.

Ketosis is the metabolic disturbance that appears in high yielding dairy cows, most frequently in early lactation i.e. peripartum period. Due to inadequate carbohydrate and fat metabolism, animal experiences negative energy balance that is characterized by decline of blood

glucose concentration and liver glycogen reserve depletion. All glucose obtained as energy source is redirected to mammary gland for lactose synthesis. Organism tries to compensate the loss of glucose by increasing the degree of liver gluconeogenesis, primarily from oxaloacetate that is the main gluconeogenic precursor. Redirecting of oxaloacetate from citric acid cycle into gluconeogenesis provoke acetyl-CoA accumulation, that originates from  $\beta$  fatty acid oxidation as a consequence of negative energy balance. Because of that, metabolism is mainly redirecting to ketone bodies synthesis (*Mihailović and Jovanović, 2008*). This is especially pronounced in cows with high body condition since in this cows, due to higher fatty depots,  $\beta$  oxidation is more intensive and consequently degree of ketogenesis is increased (*Cincović, 2013*).

In recent studies, more attention is given to the role of oxidative stress in pathogenesis of



Nikšić et al:

**The effect of body condition score of heifers in glucose and  $\beta$ -hydroxybutyrate concentrations and glutathione-peroxidase activity**

different metabolic disturbances typical for peripartum period (*El Deeb and El Bahr*, 2017). It is considered that higher degree of  $\beta$  oxidation of fatty acids affect the increase production of free radicals. The glutathione peroxidase enzyme (GPx) has important role in antioxidative protection and it contains selenium in the form of selenocysteine in its own catalytic center (Forstrom et al., 1978). Glutathione peroxidase

is enzyme that reduces hydrogen peroxide and peroxides of free fatty acids protecting cells from oxidative damages.

Due to all previously mentioned, the aim of this study was to establish the effect of body condition on glucose and  $\beta$ -hydroxybutyrate levels in blood of heifers as well as GPx activity.

### MATERIAL AND METHODS

With the aim to establish effect of body condition (BC) of heifers on glucose and  $\beta$ -hydroxybutyrate levels, as well as glutathione peroxidase activity, estimation of body condition was performed by Virginia system modified by Edmenson, using 1 to 5 scale (Edmenson, 1989). According to that, 23 heifers were classified in one of the two groups. First group (n=5) includes heifers with optimal body condition (BC=3.75), while the second group (n=18) includes obese heifers with the BC score  $\geq 4.0$ . Body condition scoring was performed 3 weeks before expected calving. In order to avoid variations related to the body condition estimation, scoring was performed by 4 persons simultaneously. Average age of calved heifers was 25.5 months.

Collecting and examination of blood samples of heifers was done from day 1 to day 10 after parturition. Blood was obtained by *v. coc-cigea media* puncture. Blood analyses were done using test strips on which blood drop was applied. Glucose and  $\beta$ -hydroxybutyrate concentrations were recorded on apparatus "FREESTYLE PRECISION NEO Blood Glucose and Ketone Monitoring system".

Glutathione peroxidase activity (GPx) from whole blood of cows was determined using

method described by Günzler et al. (1974) on spectrophotometer Cecil 2000. The principle of this measurement is based on spectrophotometric registration of NADPH utilization in coupled enzyme reaction. Method was obtained in a way that 500  $\mu$ l of potassium phosphate buffer, 200  $\mu$ l of glutathione (GSH), 50  $\mu$ l of glutathione reductase (GR), 10  $\mu$ l of whole blood hemolyzed with Drapckin reagent (21 time of dilution) and 490  $\mu$ l of redistilled water was added in mentioned order in each tube. Then a 10-minute pre-incubation in thermostat on 37°C was obtained, followed by addition of 200  $\mu$ l of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) and 550  $\mu$ l of tertial butylhydroperoxide (TBH). After addition of NADPH and TBH, tube content is poured into the cuvette. By placing of cuvette in spectrophotometer, utilization of NADP begins, and the absorbance is recorded in 30 seconds intervals at wavelength of 366 nm.

Solutions of GR, GSH and NADPH are always freshly prepared, with the usage of redistilled water as a solvent for GR and GSH. As a solvent for NADPH, 0.1 % NaHCO<sub>3</sub> was used. Composition and final concentrations of reagents are presented in Table 1.

**Table 1. Composition and volume of reagents used for spectrophotometric determination of GPx activity**

Reagents	Volumen ( $\mu$ l)	Final concentration
Potassium phosphate buffer (400 mmol/L, pH 7)	500	100 mmol/l
GSH (604 mmol/L)	200	4 mmol/L
Glutathione reductase (GR)	50	6 mmol/L
Whole blood (dilution. 21x)	10	0.375 U/mL
NADPH	200	0.3 mmol/L
TBH	550	1.575 mmol/L
Redestilated water	490	

Results obtained in this study are grouped in certain statistical series and processed using certain statistical methods in MS Excel 2007 program. Calculated mean (arithmetic mean – Xmean, relative measures of variability (coefficient of variation – Cv) and absolute measures of

variability (standard deviation – SD) were statistical methods that were used. Analyses of statistical significance were obtained by Student t-test. Obtained results are presented by figures.

## RESULTS

Glucose, BHB concentrations and GPx activity were determined with the aim to compare results between heifers of optimal body condition and obese heifers.

By determination of glycemia, no significant difference was observed ( $p=0.71$ ) between glucose concentration means obtained in heifers with optimal body condition and obese heifers (Figure 1).

In heifers with optimal body condition, mean value of glucose concentration was  $3.16 \pm 0.51$  mmol/L with interval of values from 2.8-3.9 mmol/L and coefficient of variation 16%.

In obese heifers, mean value for glucose concentrations was  $3.19 \pm 0.66$  mmol/L, with interval of values from 1.5-4.6 mmol/L and coefficient of variation 20%.

Nikšić et al:

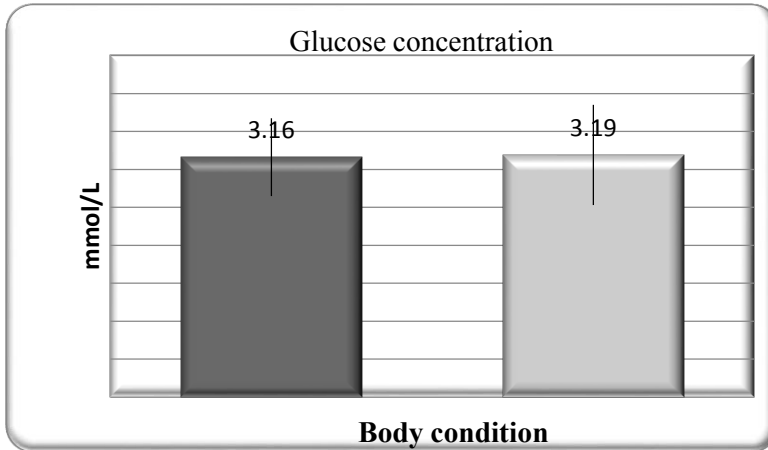
**The effect of body condition score of heifers in glucose and  $\beta$ -hydroxybutirate concentrations and glutathione-peroxidase activity**

Figure 1. Values of glucose concentrations in blood of heifers of optimal and increased body condition

In heifers with optimal body condition, mean value of BHB concentration was  $0.4 \pm 0.16$  mmol/L, with interval of values from 0.2-0.6 mmol/L. In obese heifers, mean value for BHB concentrations was  $0.67 \pm 0.22$  mmol/L, with interval of values from 0.4-1.1 mmol/L. By determining the statistically significant difference,

significant difference was established ( $p=0.01$ ) between mean values of BHB concentrations in heifers with optimal body condition and obese ones. Obese heifers had significantly higher mean BHB values (Figure 2).

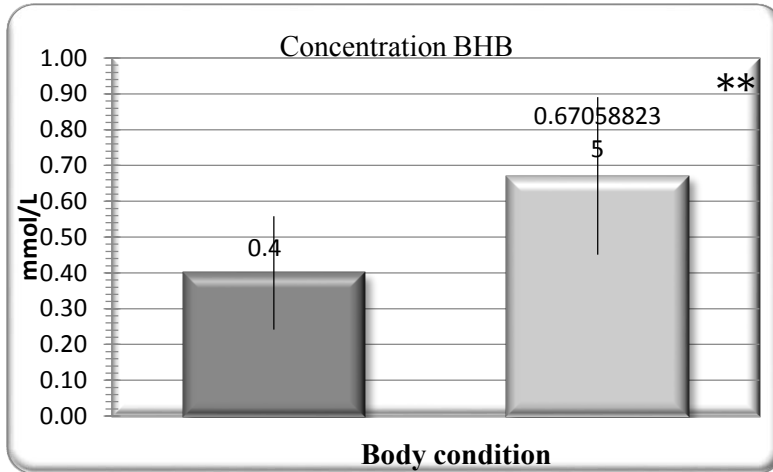


Figure 2. Values of  $\beta$  hydroxybutirate (BHB) concentrations in the blood of heifers of optimal body condition and increased body condition (\*\*  $p=0.01$ )

In heifers with optimal body condition, average GPx activity was  $326 \pm 30$   $\mu$ Kat/L, with intervals of values from 292-361  $\mu$ Kat/L. In obese heifers, average GPx activity was  $423 \pm 140$   $\mu$ Kat/L, with intervals of values from 225-687  $\mu$ Kat/L.

By determining the statistically significant difference, significant difference was established ( $p=0.02$ ) between average values of GPx activity of heifers with optimal body condition and obese heifers. In obese heifers, there was significantly higher GPx activity (Figure 3).

Nikšić et al:

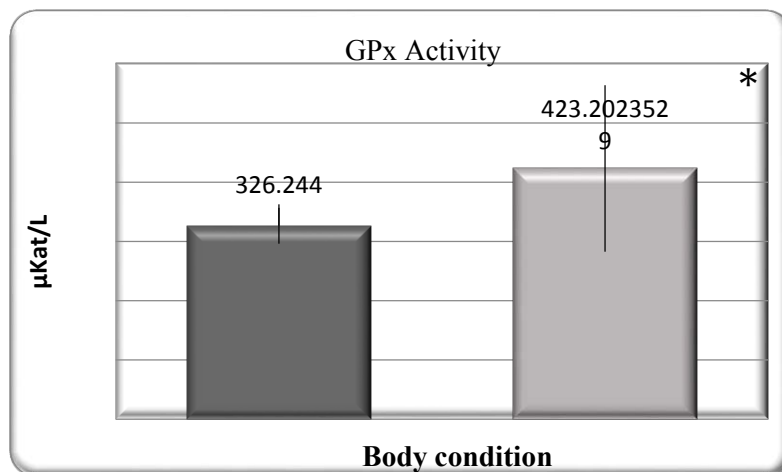
The effect of body condition score of heifers in glucose and  $\beta$ -hydroxybutyrate concentrations and glutathione-peroxidase activity

Figure 3. GPx activity in whole blood in heifers with optimal body condition and increased body condition (\*  $p=0.02$ )

## DISCUSSION

Ketosis is a common metabolic disturbance in high yielding dairy cows. Causes that contribute to the appearance of ketosis might include inadequate nutrition related to lactation phase, hormone disbalance, poor body condition, high milking and many others.

Body condition scoring is obtained in all phases of productive and reproductive cycles, and favorable score in calving period is 3.25-3.75. Over-conditioned cows in calving and early lactating period, characterized by negative energy balance, are more exposed to the risk of ketosis appearance, due to the release of free fatty acids and acetyl CoA deposition. In order to avoid these risks, it is necessary to maintain body condition of cows in certain range, meaning 3.25-3.75 at calving, 2.5-3.25 in early lactation, 2.5-3.5 in mid lactation, 3-3.5 in late lactation and 3.25-3.75 in dry period (Edmenson, 1989). As reported by Gillund et al. (2001), appearance of ketosis stage in obese cows after parturition is common. Based on our results, it is

rare and can be explained by lower milk production in first calving cows. Due to less milk production, negative energy balance is less pronounced than in cows who achieved maximum milking.

Danger of ketosis stage appearance increases with increased age of first calving cows. It is speculated that first calving cows younger than 20 months of age belong to group with the lowest risk. Since average age of examined heifers was 25.5 months, they can be classified in moderate risk group (Van Der Drift, 2013).

In animals with an optimal body condition, average glucose concentration value was 3.16 mmol/L, while in obese heifers was 3.19 mmol/L. Both values are within reference range that is 2.3-3.5 mmol/L (Stojić, 2010).

BHB value over 0.7 mmol/L two weeks after calving, combined with higher concentration of free fatty acids in blood, indicates on negative energy balance (Celeska et al., 2010). Values of BHB concentrations in examined heifers with

optimal body condition were within reference range, while in obese heifers, six animals (33.3%) had increased values. In this period, negative energy balance starts to develop, with consequently increased ketone body synthesis. In these 6 animals lower glucose concentration was also observed.

There is no data within available literature that related to relationship between ketone bodies level and glutathione peroxidase enzyme activity, as well as explanation for its increased activity in heifers with higher BHB levels. This result can indicate that studying oxidative stress and antioxidative capacity in animals with negative energy balance need more attention.

## REFERENCES

1. Cincović M. (2013): *Patofiziološka procena peripartalnog metaboličkog stresa kod visokoproduktivnih krava upotrebom endokrinih i metaboličkih kriterijuma*. Doktorska teza, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
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 Biochemy 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. Mihailović M. i Jovanović I.B. (2007): *Biohemija*. Naučna KMD, Beograd.
9. Stojić V. (2010): *Veterinarska fiziologija*. Naučna KMD, Beograd.
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.

Article received: 13.11.2019.

Article accepted: 21.12.2019.