

Оливера Валчић, И. Б. Јовановић, Светлана Милановић, Миљан Величковић, Д. Гвоздић<sup>1</sup>

## ЕФЕКАТ ДОДАВАЊА СЕЛЕНА (Promtselen®) НА КОНЦЕНТРАЦИЈУ MDA И УЧЕСТАЛОСТ ЗАОСТАЈАЊА ПОСТЕЉИЦЕ КОД КРАВА КОЈИМА ЈЕ ИНДУКОВАН ПАРТУС

### Кратак садржај

Време око партуса код млечних крава сматра се најосетљивијим периодом са више аспеката, међу којима се посебно истичу престојавање метаболизма у правцу лактације и последично повећање оксидативног стреса организма. Осим тога, индукција порођаја уз помоћ  $PGF_{2\alpha}$  додатно повећава учесталост ретенције постелејце.

У систем одбране од оксидативног стреса укључени су неензимски молекули (витамини С и Е и глутатион) и ензими: супероксид дисмутаза, каталаза и глутатион пероксидаза. Селеноензим глутатион пероксидаза редукује настале хидропероксиде масних киселина, чиме прекида ланчану реакцију оштећења липида ћелијске мембране. Малондиалдехид (MDA), настао неензимским цепањем липидних хидропероксида, може унакрсно да се веже за друге биолошке молекуле, чиме доводи до цитотоксичности и мутагености. Концентрација MDA у крвној плазми представља добар индикатор степена оксидативног оштећења липида у организму.

Циљ нашег рада је био да установимо промене концентрације MDA у крвној плазми током тељења и у перипарталном периоду, 12 сати пре и након партуса, као и успешност избацивања постелејце код крава чији је порођај индукован простагландином.

Оглед је извршен на кравама Холштајн-фризијске расе подељеним у три групе: 1) несуплементирана контролна група (n=9), 2) група третирана са 20 ml (n=11) и 3) са 40 ml (n=13) Promtselena® 30 дана пре партуса. Концентрација MDA у крви је одређивана спектрофотометријски.

Концентрације MDA у плазми крава суплементираних са 20 ml Promtselena 12 часова пре порођаја ( $4,59 \pm 1,20$ ), током порођаја ( $4,44 \pm 0,68$ ) и 12 часова након порођаја ( $4,67 \pm 0,80$ ), биле су значајно ниже у односу на контролну групу. Група третирана са 40 ml Promtselena је од свих посматраних животиња имала најизразитије смањење вредности MDA у плазми 12 сати пре партуса. Третмани са 20 ml и 40 ml Promtselena® резултирали су значајним смањењем учесталости ретенције постелејце (38,2% и 30,8%) у односу на нетретирану групу (66,67%).

Можемо закључити да апликација 20 ml и 40 ml Promtselena 30 дана пре индукције порођаја резултира статистички значајним смањењем MDA у плазми током перипарталног периода, као и значајним смањењем учесталости заостајања постелејце.

**Кључне речи:** краве, ретенција постелејце, MDA.

<sup>1</sup> Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду, Србија.

Olivera Valčić, I. B. Jovanović, Svetlana Milanović, Miljan Veličković, D. Gvozdić<sup>2</sup>

## EFFECTS OF SELENIUM SUPPLEMENTATION (Promtselen®) ON MDA CONCENTRATION AND FREQUENCY OF RETAINED PLACENTA IN COWS WITH INDUCED CALVING

### Abstract

The time close to calving in dairy cows is considered as the most sensitive period from more aspects, among which most relevant are the metabolic shift due to lactation and subsequently increased oxidative stress. Besides, PGF<sub>2α</sub> induction of delivery additionally increases the incidence of retained placenta. The oxidative stress defense mechanisms consist of nonenzymatic molecules (vitamins C and E, glutathione) and enzymes: superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase.

The selenoenzyme glutathione peroxidase reduces the formed fatty acids hydroperoxides, thus interrupting the chain reaction of damage to the cell membrane lipids. Malondialdehyde (MDA), formed by nonenzymatic fission can cross link to other biological molecules which results in cytotoxicity and mutations. The concentration of MDA in blood plasma is a good indicator of the degree of oxidative damage in the organism.

The aim of this study was to determine changes in MDA concentration in the blood plasma during calving and in the peripartal period, 12h before and after calving, as well as the success rate in the expulsion of the placenta in cows with prostaglandin induced delivery.

The experiment was done on dairy Holstein Friesian cows allotted into 3 groups: 1) not supplemented control group (n=9), 2) group treated with 20 mL (n=11) and 3) with 40 mL (n=13) Promtselen® 30 days before calving. MDA plasma concentration was measured spectrophotometrically.

Plasma MDA concentrations in cows supplemented with 20 mL Promtselen® 12h before calving were ( $4.59 \pm 1.20$ ), at calving ( $4.44 \pm 0.68$ ) and 12h after delivery ( $4.67 \pm 0.80$ ), were significantly lower compared to the control group. The group treated with 40 mL Promtselen® had the lowest MDA results of all groups at 12h after calving. Treatments with 20 mL and 40 mL Promtselen® resulted in a significant decrease in placenta retention (38.2% and 30.8%) compared with the control group (66.67%).

It can be concluded that application of 20 and 40 mL Promtselen® 30 days before induction of calving resulted in a statistically significant reduction of plasma MDA concentrations during the peripartal period, as well as with a significant reduction in retained placenta.

**Key words:** dairy cows, placenta retention, MDA.

---

<sup>2</sup> Faculty of Veterinary Medicine, Belgrade University, Serbia. This work has been financed by the Ministry of Science and Technology of Serbia. Projects number TR 31050 and TR 31003.

## UVOD

Peripartalni period kod mlečnih krava se smatra jednim od najosetljivijih perioda sa više aspekata, među kojima se posebno ističu prestrojavanje metabolizma u pravcu laktacije, adaptacija mikroflora buraga na promenjeni dijetarni režim i održavanje efikasnog imunskog sistema. Ovakve fiziološke promene rezultiraju posledičnim povećanjem oksidativnog stresa. Činjenica je da je učestalost metaboličkih i infektivnih oboljenja znatno povećana kada su osnovni fiziološki procesi u disbalansu. Najosetljiviji tranzicioni period je u intervalu od tri nedelje pre partusa do 2–3 nedelje nakon istog (Drackley, 1999). Naime, tokom ovog perioda dolazi do prelaska iz graviditeta i zasušenja u negravidno stanje i laktaciju. Tokom ovog perioda, pored pojačanog oksidativnog stresa, značajan je i pad urođenog i stečenog imuniteta (Mallard i sar., 1998).

Zaostajanje posteljice je jedinstvena pojava kod krava i bivolica i javlja se u intervalu od 3% do 39% partusa (Kimura i sar., 2002). Patologija graviditeta i partusa je složena i često se uzročni, kao i nastale posledice, prepliću. Emanuelson i sar. (1993) su potvrdili da otežan partus i retencija posteljice imaju kao čestu posledicu pojavu endometritisa, koji rezultira poremećajima na nivou jajnika i tihog estrusa. Iz svega navedenog, očigledno je da pojava zaostale posteljice predstavlja uzrok velikih ekonomskih gubitaka na farmama mlečnih krava.

Mnogobrojni objavljeni radovi sugerišu da neadekvatan sadržaj antioksidansa u obrocima dodatno povećava stepen oksidativnog stresa, kao i učestalost zaostajanja posteljice kod mlečnih krava. Intenzivna istraživanja koja su se vodila tokom prethodnih decenija potvrdila su da je suplementacija selenom efikasna mera u smanjivanju učestalosti pojave zaostale posteljice (Harrison i Hencock, 1999). Eager i sar. (1985) su, tokom trogodišnje studije sprovedene na preko 600 visokomlečnih krava, ustanovili da je intramuskularna aplikacija Se signifikantno smanjila učestalost zaostajanja posteljice, kako kod prvotelki, tako i kod višetelki. Jakowski (1987) je ispitivao status selena na 102 krave. Grla koja su imala prosečan sadržaj Se u krvi ispod 30 ng/mL su u 21,5% slučajeva imale zaostajanje posteljice nakon partusa, dok su krave koje su imale prosečan sadržaj Se u krvi iznad 30 ng/mL razvile retenciju u svega 5,6% slučajeva. Wentink i sar. (1988) su postigli skoro

istovetne rezultate kod 110 krava ispitivanih na području Holandije.

Selen ispoljava svoju biohemijsku aktivnost preko enzima glutation peroksidaze (GSH-Px) i dejodinaza (ID1, ID2 i ID3). Aktivnost GSH-Px zavisi od statusa Se životinje i definisana je logaritamskom jednačinom.

GSH-Px je jedan od ključnih enzima u odbrani ćelije od oksidativnog stresa. Njen efekat se ogleda u prekidanju kaskadne reakcije peroksidacije lipida time što redukuje nastale hidroperokside masnih kiselina u odgovarajuće manje toksične alkohole.

Toksični malondialdehid (MDA) koji nastaje neenzimskim cepanjem lipidnih hidroperoksida može unakrsno da se veže za druge biološke molekule, čime dovodi do citotoksičnosti i mutagenosti. Koncentracija MDA u krvnoj plazmi predstavlja dobar indikator stepena oksidativnog oštećenja lipida u organizmu. Interesantni su radovi Brzezinske-Slobodzinske i sar. (1994) i Kankofer (2001), koje navode da sa približavanjem termina teljenja dolazi do porasta koncentracije MDA u posteljici visokomlečnih krava. Bouncuore i sar. (1994) su uočili i uticaj partusa (prirodni vs. carski rez) na stepen oksidativnog stresa majke i mladunčeta. Ahmet i sar. (2009) su potvrdili signifikantno veće vrednosti MDA ( $p < 0,05$ ) u krvi bivolica sa zaostalom posteljicom.

Cilj našeg rada je bio da ustanovimo promene koncentracije MDA u krvnoj plazmi tokom teljenja i u peripartalnom periodu, 12h pre i nakon partusa krava suplementiranih različitim dozama Se (Promtselen®), kao i uspešnost izbacivanja posteljice kod krava čiji je porođaj indukovao prostaglandinom PgF<sub>2α</sub>.

## MATERIJAL I METODE

Ogled je izvršen na ukupno 33 mlečne krave Holštajn-frizijske rase podeljene u tri grupe: 1) nesuplementirana kontrolna grupa (n=9); 2) grupa tretirana sa 20 ml (n=11) i 3) sa 40 ml (n=13) Promtselena® 30 dana pre indukcije partusa. Sastav preparata Promtselen® je: vitamin A-palmitat 50.000 i.j./ml, holekalCIFEROL 25000 i.j./ml, RRR- $\alpha$ -tokoferilacetat 20 mg/ml, natrijum-selenit, pentahidrat 0,5 mg/ml.

Porođaj je indukovao aplikacijom preparata prostaglandina PgF<sub>2α</sub>. Uzorci krvi su uzimani venepunkcijom u heparinisane epruvete 12 časova pre partusa,

tokom partusa i 12 časova nakon teljenja. Kliničkim pregledom je utvrđen status posteljice nakon teljenja. Tokom oglada krave su držane i hranjene u skladu sa standardnom tehnološkom i zootehničkom procedurom koja se primenjuje na farmi. Zdrastveno stanje svih eksperimentalnih životinja je svakodnevno praćeno.

Uzorci pune krvi su centrifugovani na 1500xg tokom 20 minuta nakon čega je izdvojena plazma odливена u minutube. Uzorku od 0,30 ml nehemolizovane plazme je dodato 3,0 ml ortofosforne kiseline (1%), 1 ml rastvora 2-tiobarbiturine kiseline (0,6%) i 0,10 ml rastvora FeSO<sub>4</sub> (28mg FeSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O u 10 ml vode). Uzorci sa svim dodatim reagensima su inkubirani 60 minuta u vodenom kupatilu sa ključalom vodom. Nakon hlađenja dodato je 4,0 ml n-butanola. Uzorci su zatim centrifugovani na 4000 obrtaja/min. tokom 15 minuta. Izdvojeni butanolni sloj je pažljivo propipetom odvajan u prethodno obeležene epruvete. Merena je spektrofotometrijski apsorbansa butanolnog sloja na 535 nm (Eo). Nulta proba je bio rastvor n-butanola. Količina MDA (TBK broj) u plazmi je izračunata iz formule:

$$\text{MDA } (\mu\text{mol/L}) = Eo \times 85,47$$

**Tabela 1.** Vrednosti koncentracije MDA ( $\mu\text{mol/l}$ ) u krvnoj plazmi mlečnih krava

	Xsr±SD	CV%
<b>12 h pre partusa</b>		
Kontrola	5,66±0,95	16,74
20 ml Promtselen	4,60±1,21	26,33
40 ml Promtselen	4,40±1,20*	27,33
<b>Pri partusu</b>		
Kontrola	5,76±0,98	17,05
20 ml Promtselen	4,45±0,71**	16,06
40 ml Promtselen	5,29±0,89	16,66
<b>12 h nakon partusa</b>		
Kontrola	5,74±0,91	15,80
20 ml Promtselen	4,67±0,80	17,14
40 ml Promtselen	6,00±0,44	7,25

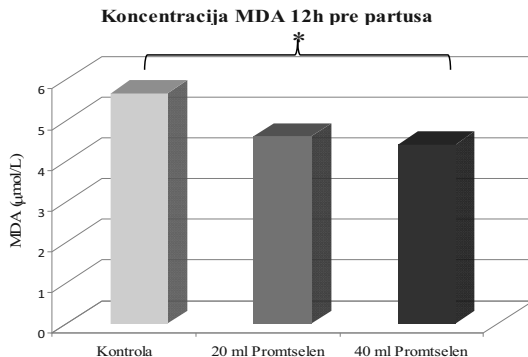
\*p<0,05, \*\*p<0,01

## РЕЗУЛТАТИ

Zaostala posteljica nakon teljenja je ustanovljena kod krava kontrolne netretirane grupe u 66,67% slučajeva (6/9). Krave tretirane 30 dana pre teljenja sa 20 ml Promtselena imale su zaostalu posteljicu u 36,36% slučajeva (4/11). Najniža učestalost, 30,79% zaostajanja posteljice, bila je kod krava tretiranih sa 40 ml Promtselena (4/13).

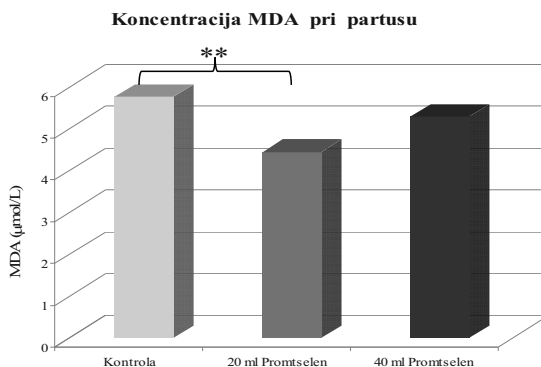
Vrednosti koncentracije MDA ( $\mu\text{mol/l}$ ) u krvnoj plazmi mlečnih krava (tabela 1) su određivane 12 časova pre partusa, tokom partusa i 12 časova nakon partusa. Koncentracija MDA u plazmi krava suplementiranih sa 20 ml Promtselena 12 časova pre porođaja bile su 4,60±1,21  $\mu\text{mol/l}$ . Vrednosti MDA tokom porođaja (4,45±0,71  $\mu\text{mol/l}$ ) i 12 časova nakon porođaja (4,67±0,80  $\mu\text{mol/l}$ ) bile su statistički značajno niže u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu. Grupa tretirana sa 40 ml Promtselena je od svih posmatranih životinja imala najizrazitije smanjenje vrednosti MDA u plazmi 12 časova pre partusa (grafikoni 1, 2. i 3).

**Grafikon 1.** Vrednosti koncentracije MDA ( $\mu\text{mol/l}$ ) u krvnoj plazmi mlečnih krava 12 časova pre partusa



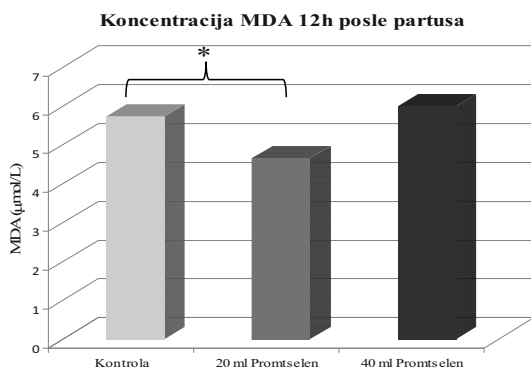
\* $p < 0,05$

**Grafikon 2.** Vrednosti koncentracije MDA ( $\mu\text{mol/l}$ ) u krvnoj plazmi mlečnih krava tokom partusa



\*\* $p < 0,01$

**Grafikon 3.** Vrednosti koncentracije MDA ( $\mu\text{mol/l}$ ) u krvnoj plazmi mlečnih krava 12 časova nakon partusa



\* $p < 0,05$

## DISKUSIJA

Finklestein i sar. (1992) su eksperimentalnim putem na preko 50 Holštajn krava ustanovili da istovremena aplikacija 50 mg natrijum selenita i 600 µg vitamina E dovodi do smanjenja učestalosti pojave zaostajanja posteljice za 7%, vremena involucije uterusa za 23% i skraćivanja servis perioda za 16,3 dana. Ove vrednosti su znatno niže od onih koje je prethodno objavio Ivandija (1987), koji navodi značajno smanjenje retencije sa 51,2% na 8,8% nakon peroralne aplikacije 0,1 mg/kg preparata selenita i vitamina E (1g/grlu). Naši rezultati su između navedenih literaturnih podataka. Zaostala posteljica nakon teljenja je ustanovljena kod krava kontrolne netretirane grupe u 66,67% slučajeva (6/9). Krave tretirane 30 dana pre teljenja sa 20 ml Promtselena imale su zaostalost posteljicu u 36,36% (4/11) slučajeva. Najniža učestalost, 30,79% zaostajanja posteljice, bila je kod krava tretiranih sa 40 ml Promtselena (4/13). Očigledan je trend smanjenja učestalosti pojave zaostajanja posteljice sa porastom količine suplementiranog selenita.

Međutim, dvogodišnja studija koju su sproveli Schingoethe i sar. (1982) jasno ukazuje na to da efekti suplementacije selenom na učestalost zaostajanja posteljice zavise od statusa selenita kod krava, tako da suplementacija data kravama koje su bile adekvatno snabdevene ovim mikroelementom nije proizvela efekte na promenu učestalosti retencije.

Neznatne promene koncentracije MDA u plazmi krava koje su suplementirane sa 40 ml Promtselena u odnosu na 20 ml Promtselena su verovatno posledica postignutog platoa aktivnosti GSH-Px (EC 1.11.1.9) i njene antioksidativne zaštite. Erisir i sar. (2006) ispitivali su promene koncentracije MDA u krvnoj plazmi krava koje su se otelile prirodnim putem ili carskim rezom, kao i u slučajevima prolapsusa uterusa i retencije posteljice. Autori su ustanovili statistički značajan porast ( $p < 0,001$ ) koncentracije MDA (nmol/ml) u krvnoj plazmi krava koje su oteljene carskim rezom ( $5,47 \pm 0,30$ ) ili bolovale od prolapsusa uterusa ( $5,10 \pm 0,25$ ) u odnosu na kontrolnu grupu ( $3,81 \pm 0,21$ ). Interesantno je da navedena grupa autora nije ustanovila statistički značajnu promenu koncentracije MDA u krvnoj plazmi krava sa zaostalost posteljicom ( $3,33 \pm 0,17$ ).

Rezultati oglada koji smo izveli na ukupno 33 krave Holštajn-frizijske rase ukazuju na to da se tokom peripartalnog i partalnog perioda (12 časova

pre teljenja, tokom teljenja i 12 časova nakon teljenja), prosečne vrednosti koncentracije MDA u krvnoj plazmi krava kontrolne grupe i krava suplementiranih sa 20 ml Promtselena ne menjaju, što je u skladu sa nalazima Erisira i sar. (2006). Međutim, uočljivo je da su netretirane krave u našem ogledu imale veće prosečne vrednosti MDA (tabela 1), što je posledica manje antioksidativne zaštite i intenzivnije peroksidacije lipida.

Kankofer (2001) je ispitivala direktni sadržaj MDA u placentomima posteljice i ustanovila povećanje koncentracije metabolita peroksidacije lipida u placenti krava sa retencijom posteljice. Štaviše, detaljnija istraživanja su potvrdila da je tokom peripartalnog perioda aktivnost GSH-Px u placenti signifikantno viša kod krava sa retencijom. Navedena ispitivanja su ukazala na to da se eventualni disbalans između proizvodnje i neutralizacije reaktivnih kiseoničnih radikala javlja oko termina porođaja.

## ZAKLJUČCI

Navedeni rezultati upućuju na sledeće zaključke:

1. Suplementacija mlečnih krava sa 20 ml i 40 ml preparata Promtselen® dovodi do značajnog smanjenja učestalosti pojave retencije posteljice kod krava kojima je indukovana porođaj aplikacijom PgF2 $\alpha$ .
2. Aplikacija Promtselena® 30 dana pre partusa dovodi do smanjenja koncentracije MDA u krvnoj plazmi. Ovo smanjenje je signifikantno ( $p < 0,05$ ) za dozu od 40 ml 12 sati pre porođaja.
3. Aplikacija 20 ml Promtselena® 30 dana pre partusa je rezultirala signifikantnim smanjenjem koncentracije MDA u plazmi na porođaju ( $p < 0,01$ ) i 12 sati nakon porođaja (0,05).

Ovaj rad je podržan od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Srbije, projekti TR 31050 i TR 31003.

## LITERATURA

1. Ahmet, W. M., Amal, R., Abd El Hameed, El Khadrawy, H. H., and Hanafi, E.M. (2009). *Investigations on retained placenta in Egyptian Buffaloes*, Global Veterinaria, 3, 120–124.
2. Bounocore, G., Gioia, D., De Filippo, M., Piccoloni, E., and Bracci, R. (1994). *Superoxide anion release by polymorphonuclear leucocytes*

- in whole blood of newborns and mothers during the periparturient period.* *Pediatric Res*, 36, 619–622.
3. Brezinska-Slebodzinska, E., Miller, J. K., Quigley, J. D., Moore, J. R., and Madsen, F. C. (1994). *Antioxidant status of Dairy cows supplemented prepartum with vitamin E and selenium.* *Journal of Dairy Science*, 77, 3087–3095.
  4. Drackley, J. K. (1999). ADSA Foundation Scholar Award. *Biology of dairy cows during the transition period. The final frontier?* *Journal of Dairy Science*, 82, 2259–2273.
  5. Eger, S., Dori, D., Kadoori, I., Miller, N., Schindler, H. (1985). *Effects of selenium and vitamin E on incidence of retained placenta,* *Journal of Dairy Science*, 68, 2119–2122.
  6. Emanuelson, U., Oltenacu, P. A., and Grohn, Y. T. (1993). *Nonlinear mixed model analysis of five production disorders of dairy cattle,* *Journal of Dairy Science*, 76, 2765–2772.
  7. Erisir, M., Akar, Y., Gurgoze, Y and Yuksel, M.. (2006). *Changes in plasma malondialdehyde concentration and some erythrocyte antioxidant enzymes in cows with prolapsus uteri, caesarean section, and retained placenta,* *Revue. Med. Vet.*, 157, 2, 80–83.
  8. Finkelstein, E., Lewis, M. J., Gillespie, B. E., Ingle, T. L. Miller, J. K., and Oliver, S.P. (1992). *Health of periparturient cows associated with vitamin E and selenium administration during the non lactating period.* *Journal of Dairy Science*, 75 suppl., p. 195.
  9. Harrison, H. J. and Hancock, D. D. (1999). *The role of selenium and vitamin E deficiency in postpartum reproductive disease of the bovine.* *Proc. Of Alvin Loyd Moxon lectures on selenium and vitamin E.* Ed. Hogan J., The Ohio State University, Ohio Agricultural Research and Development Centre, Wooster, pp. 85–95.
  10. Ivandija, L. (1987). *Interrelationships between adequate intake of vitamin E and selenium and prevalence of reproductive disorders and intramammary infections of dairy cows,* *Krmiva* 29, 175–180.
  11. Jakowski, J. M. (1987). *Time of placenta expulsion and serum contents of selenium and vitamin E in cows before calving.* *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 30–31, 112–116.
  12. Kankofer, M. (2001). *Antioxidative defence mechanisms against reactive oxygen species in bovine retained and not retained placenta: activity of glutathione peroxidase, glutathione transferase, catalase and superoxide dismutase.* *Placenta*, 22, 5, 466–472.
  13. Kankofer, M. (2001). *The levels of lipid peroxidation products in bovine retained and not retained placenta,* *Prostaglandins, Leucotrienes and Essential Fatty Acids*, 64, 33–36.
  14. Kimura, K., Goff, J. P., Kehrl, M. E. and Reinhart, T. A. (2002). *Decreased neutrophil function as a cause of retained placenta in dairy cattle.* *Journal of Dairy Science*, 85, 259–263.
  15. Mallard, D. A., Dekkers, J. C., Ireland, M. J., Leslie, K. E., Sharif, S., Wancampen, C. L., Wagter, L. and Wilkie, B. N. (1998). *Alteration in immune responsiveness during the periparturient period and its ramification on dairy cow and calf health.* *Journal of Dairy Science*, 81, 585–595.
  16. Schiongoethe, D. J., Kirkbride, C. A., Palmer, I. S., Owens, M. J., Tucker, W. L. (1982). *Response of cows consuming adequate selenium to vitamin E and selenium supplementation prepartum.* *Journal of Dairy Science*, 65, 2338–2344.
  17. Wentinik, G. H., Duivelshof, J. A., and Counotte, G. H. (1988). *Selenium deficiency as a cause of secondary retention of the placenta in a herd of dairy cattle.* *Tijdschr Diergeneeskd* 113, 624–626.