

“Research article”

DOI: 10.30495/JVCP.2020.670410

Evaluation of oxidative status in dairy cattle with subclinical ketosis and clinical endometritis

Balari Mahyari, F.¹, Karimi Dehkordi, M.^{2*}, Nazem, M.R.²

1- D.V.M. Graduate, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

*Corresponding author's email: ma_karimivet58@yahoo.com

(Received: 2019/5/4 Accepted: 2020/1/7)

Abstract

Nowadays, the most important factor in the occurrence of metabolic and reproductive diseases in dairy cattle is the disturbance of natural process in body's cellular-molecular events that occur after the increase of oxidants and the formation of oxidative stress. The aim of this study was to evaluate the possibility of a significant association between the serum concentrations of malondialdehyde (MDA) and total antioxidant capacity (TAC), as oxidative stress indexes, with the incidence of subclinical ketosis and clinical endometritis in dairy cows. 101 Holstein cows were divided into four groups: healthy, subclinical ketosis, clinical endometritis and both subclinical ketosis and clinical endometritis. Serum MDA and TAC levels were measured in one month after parturition. The lowest amount of TAC and the highest amount of MDA in the serum was observed in cows with subclinical ketosis-clinical endometritis. Meanwhile, healthy cows had the highest amount of TAC and the lowest amount of MDA ($p<0.05$). The findings of the present study showed the significant relationship between serum amounts of MDA and TAC with incidence of clinical endometritis and prevalence of ketosis with endometritis, in dairy cows.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Oxidative status, Dairy cattle, Clinical endometritis, Subclinical ketosis.

بررسی وضعیت اکسیداتیو در گاوهای شیری مبتلا به کتوز تحت‌بالینی و آندومتريت بالینی

فرهاد بلاری مهباری^۱، مریم کریمی دهکردی^{۲*}، محمدرضا ناظم^۲

۱- دانش‌آموخته دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۲- استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: ma_karimivet58@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۹۸/۲/۱۴ پذیرش نهایی: ۹۸/۱۰/۱۷)

چکیده

امروزه، مهم‌ترین عامل بروز بیماری‌های متابولیکی و تولیدمثلی در گاوهای شیری را اختلال در روند طبیعی وقایع سلولی-مولکولی بدن که به دنبال افزایش بیش از حد اکسیدان‌ها و شکل‌گیری استرس اکسیداتیو رخ می‌دهد، می‌دانند. هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی احتمال وجود ارتباط آماری معنی‌دار بین سطوح سرمی مالون‌دی‌آلدئید (malondialdehyde; MDA) و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام (total antioxidant capacity; TAC)، به عنوان شاخص‌های استرس اکسیداتیو، با میزان ابتلا به کتوز تحت‌بالینی و آندومتريت بالینی در گاوهای شیری بود. بدین منظور، تعداد ۱۰۱ رأس گاو شیری هلشتاین در ۴ گروه سالم، مبتلا به کتوز تحت‌بالینی، مبتلا به آندومتريت بالینی و مبتلا به هر دو بیماری کتوز تحت‌بالینی و آندومتريت بالینی توزیع شدند. مقادیر سرمی MDA و TAC در گاوهای هر چهار گروه در یک بازه زمانی یک ماهه پس از زایمان اندازه‌گیری شدند. کمترین غلظت سرمی TAC و بیشترین سطح سرمی MDA در گاوهای گروه مبتلا به هر دو بیماری مشاهده شد، این در حالی بود که گروه کنترل (گاوهای سالم) دارای بیشترین مقادیر سرمی TAC و کمترین سطح سرمی MDA بودند ($p \leq 0/05$). همچنین تفاوت آماری معنی‌داری در مقادیر سرمی TAC و MDA بین گروه‌های مبتلا به آندومتريت بالینی و کتوز تحت‌بالینی مشاهده نشد ($p > 0/05$). نتایج مطالعه حاضر وجود یک ارتباط آماری معنی‌دار بین غلظت‌های سرمی MDA و TAC با میزان بروز آندومتريت بالینی و شیوع همزمان کتوز و آندومتريت را در گاوهای شیری نشان داد ($p \leq 0/05$).

کلیدواژه‌ها: وضعیت اکسیداتیو، گاو شیری، آندومتريت بالینی، کتوز تحت‌بالینی.

مقدمه

بروز ناهنجاری‌های متابولیکی و بیماری‌های عفونی در دوره پس از زایش یکی از مهم‌ترین چالش‌ها در سیستم پرورش گاوهای شیری پرتولید است. امروزه علی‌رغم بهبود رژیم‌های تغذیه‌ای و برنامه‌های مدیریتی گله، همچنان نرخ بالینی شیوع بسیاری از بیماری‌های متابولیکی و عفونی در گاوهای شیری بالا می‌باشد (Walsh *et al.*, 2007). بسیاری از محققین، اختلال در روند طبیعی وقایع سلولی-مولکولی بدن که به دنبال افزایش بیش از حد رادیکال‌های واکنش‌پذیر اکسیژن (reactive oxygen species; ROS) و شکل‌گیری استرس اکسیداتیو رخ می‌دهند را مهم‌ترین عامل بروز و پیشرفت این بیماری‌ها می‌دانند (Celi, 2010). در چند دهه اخیر، تحقیقات زیادی به منظور افزایش انرژی جیره‌های دوره خشکی، کاهش تحرک چربی‌ها در بدن، حفظ غلظت کلسیم خون، افزایش سازگاری جمعیت میکروبی شکمبه، تقویت سیستم ایمنی رحم و غیره انجام شده‌است. اگرچه این راهکارها از نظر علمی منطقی به نظر می‌رسند، اما در کاهش میزان بروز بیماری‌های حول و حوش زمان زایمان کارایی لازم را ندارند (Walsh *et al.*, 2007; Celi and Gabai, 2015). امروزه استراتژی‌های درمانی معطوف به شناسایی دقیق مکانیسم‌های ژنتیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ایجادکننده بیماری‌های متابولیکی و عفونی شده‌است و ارتباط مثبت و معنی‌داری بین میزان بروز بیماری‌های متابولیکی-تولیدمثلی با میزان تولید ROS و شکل‌گیری استرس اکسیداتیو در گاوهای شیری نشان داده شده است (Di Trana *et al.*, 2006; Birben *et al.*, 2012; Celi and Gabai, 2015; Bernabucci *et al.*, 2017).

بنابراین، تحقیقات وسیعی به منظور شناسایی دقیق علل ایجادکننده بالانس منفی انرژی، تشخیص منابع داخلی و خارجی ROS در بدن، تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن، تعدیل تاثیرات منفی استرس اکسیداتیو بر مسیرهای پیام‌رسان سلولی و ماکرومولکول‌های مهم بدن صورت گرفته‌است (Herd *et al.*, 2000; Di Trana *et al.*, 2006; Lykkesfeldt and Svendsen, 2007). نشان داده‌است که رادیکال‌های واکنش‌پذیر اکسیژن با ایجاد تاثیرات مخرب بر روی ماکرومولکول‌های بدن به‌ویژه DNA، پروتئین‌ها و لیپیدها باعث بروز آسیب‌های غیرقابل بازگشت سلولی و تخریب بافت‌ها می‌گردند. این رادیکال‌ها می‌توانند از طریق وارد نمودن آسیب به بازهای آلی DNA، گسستگی در یک یا هر دو رشته DNA و یا تغییر در پورین و پیریمیدین، باعث بروز تغییرات ساختاری و عملکردی در مولکول DNA شده و با ایجاد جابجایی‌ها، جهش و حذف‌های ژنی و یا شکل‌دهی واکنش‌های متقابل با پروتئین‌ها، باعث آپوپتوز سلول‌ها گردند (Marietta *et al.*, 2002; Caldecott, 2003). از طرف دیگر، ROSها می‌توانند با اکسیداسیون پروتئین‌ها باعث تکه‌تکه شدن زنجیره‌های پپتیدی، تغییر شارژ الکتریکی پروتئین‌ها، کسیداسیون اسیدهای آمینه خاص و افزایش حساسیت به پروتئولیز در اثر تخریب پروتئین‌های خاص شوند. اکسیداسیون گروه‌های سولفیدریل و وجود سیستئین و متیونین در پروتئین‌ها موجب بروز تغییرات سازماندهی شده در پروتئین‌ها، باز شدن زنجیره‌های پروتئینی و تخریب آن‌ها می‌شود (Keck, 1996; Kelly and Mudway, 2003). علاوه بر این، ROSها می‌توانند به لیپیدها که یکی از مهم‌ترین اجزای ساختاری در غشای سلول

بروز متريت، ورم‌پستان، پنومونی، انتریت، آندومتريت و سپتی‌سمی در خوک و گاو می‌شود (Celi, 2010; Baithalu *et al.*, 2017).

افزایش میزان ROS در اسب به‌ویژه در اسب‌های مسابقه نیز موجب بروز بسیاری از بیماری‌های سیستمیک از جمله انسداد برگشت‌پذیر مجاری تنفسی، خونریزی تنفسی ایجاد شده به‌واسطه تمرینات ورزشی شدید، لنگش و انسداد روده می‌گردد (Yaralioglu-Gurgoze, 2005). استرس اکسیداتیو در انسان هم موجب بروز بیماری‌های متعددی از جمله آرترواسکلروز، واکنش‌های التهابی، بسیاری از سرطان‌ها و تسریع روند پیری می‌شود. همچنین به‌نظر می‌رسد که ارتباط معنی‌دار و مثبتی بین افزایش استرس اکسیداتیو با تمامی بیماری‌های التهابی (آرتريت، واسکولیت، گلومرولونفریت، لوپوس اریتماتوز، سندرم بیماری‌های تنفسی بالغین)، بیماری‌های خونی (بیماری‌های قلبی، سکتة مغزی، خونریزی‌های روده‌ای)، اختلالات عصبی (بیماری آلزایمر، بیماری پارکینسون، دیستروفی عضلانی)، هموکروماتوز، سندرم کمبود ایمنی، آمفیژم، زخم معده، فشار خون بالا و پره‌اکلامپسی وجود دارد (Lykkesfeldt and Svendsen, 2007).

با توجه به مطالب ذکر شده به‌نظر می‌رسد که با شناسایی دقیق تاثیرات رادیکال‌های واکنش‌پذیر اکسیژن بر روی ماکرومولکول‌های بدن، بررسی مکانیسم‌های ایجادکننده استرس اکسیداتیو و تلاش در جهت متعادل نگه‌داشتن بالانس انرژی به‌ویژه در دوره خشکی و دوره ابتدایی پس از زایمان، بتوان شیوع بیماری‌های متابولیکی و عفونی را در گاوهای شیری کاهش داد. لذا هدف از انجام مطالعه حاضر بررسی غلظت

هستند نیز آسیب برسانند. اسیدهای چرب غیراستریفیه در اثر اکسیدان‌ها به راحتی اکسیده شده و منجر به شکل‌گیری واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداسیون (پراکسیداسیون لیپیدی) و از بین رفتن یکپارچگی سلول می‌گردند (Poulsen, 2005). مکانیسم‌های دفاعی متعددی برای خنثی سازی رادیکال‌های آزاد تولید شده و جلوگیری از بروز آسیب‌های اکسیداتیو در بدن وجود دارد که شامل سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی (کاتالاز، گلوکاتیون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، Mn-SOD، Cu-Zn-SOD و غیره) و سیستم آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی (گلوکاتیون، بیلیروبین، کاروتنوئید، اسید اوریک و ویتامین‌های E و C و غیره) می‌باشند (Herd, 2000; Lykkesfeldt and Svendsen, 2007). علی‌رغم وجود این سیستم‌های دفاعی در بدن و خنثی سازی رادیکال‌های آزاد تولیدشده، در برخی موارد تعادل بین میزان تولید رادیکال‌های واکنش‌پذیر اکسیژن و فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن به‌هم خورده و بالانس منفی انرژی ایجاد می‌شود. به‌دنبال بهم خوردن این تعادل مهم و سازنده، صدمات زیادی ناشی از آسیب‌های اکسیداتیو در سلول‌ها (آپوپتوز یا نکروز سلولی) و بافت‌های بدن (آسیب ساختاری بافت) ایجاد می‌شود (Herd, 2000; Birben *et al.*, 2012; Celi, 2010; and Gabai, 2015).

مشخص شده که استرس اکسیداتیو در شروع یا پیشرفت بیماری‌های متعددی از جمله پنومونی، انواع سرطان‌ها، سپتی‌سمی، انسداد مجاری تنفسی، اختلالات متابولیکی و بیماری‌های خودایمن در دام‌ها نقش مهمی را ایفا می‌کند (Amira, 2010). تحقیقات صورت گرفته نشان می‌دهد که شکل‌گیری استرس اکسیداتیو موجب

مالون‌دی‌آلدئید (malondialdehyde; MDA) و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام (total antioxidant capacity; TAC) در سرم گاوهای شیری مبتلا به کتوز تحت‌بالینی و آندومتريت بالینی بود. همچنین در این مطالعه، احتمال وجود ارتباط آماری معنی‌دار بین سطوح سرمی این متابولیت‌ها با میزان بروز بیماری‌های مذکور در گاوهای شیری هلشتاین بررسی شد چرا که در صورت وجود این ارتباط، احتمالاً با تغییر غلظت این متابولیت‌ها و کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از آنها، بتوان شیوع و صدمات پاتولوژیکی ناشی از کتوز تحت‌بالینی و آندومتريت بالینی را در گاوهای شیری کاهش داد.

مواد و روش‌ها

- جمعیت مورد مطالعه و توزیع گروه‌ها: این مطالعه در یک بازه زمانی ۶ ماهه، از بهار تا پاییز ۹۷ روی ۱۰۱ راس گاو شیری نژاد هلشتاین در یک گاوداری صنعتی استان اصفهان انجام شد. گاوهای شیری مورد مطالعه در ۴ گروه شامل گاوهای سالم، مبتلا به آندومتريت بالینی، مبتلا به کتوز تحت‌بالینی و مبتلا به هر دو بیماری کتوز تحت‌بالینی و آندومتريت بالینی قرار گرفتند.

بیماری آندومتريت بالینی توسط دستگاه سونوگرافی (B-mode, Mini-scan, BCF technology, بریتانیا) بر اساس وجود یا عدم وجود مایعات اکوژنیک یا هایپو‌اکوژنیک و افزایش قطر آندومتريوم رحم تشخیص داده شد. بیماری کتوز تحت‌بالینی نیز با اندازه‌گیری سطح بتا‌هیدروکسی‌بوتیرات در سرم شناسایی و تایید شد. غلظت ترکیب مذکور با استفاده از دستگاه اتوآنالایزر BT-3000 (Italy, Biotechnica Instruments, Biotechnica) و به

کمک کیت‌های (Randox, Randox) Randox (United Kingdom, Laboratories Ltd) اندازه‌گیری شد. لازم به ذکر است که گاوهایی که غلظت بتا‌هیدروکسی‌بوتیرات در آنها بیش از ۱۲۰۰ میکرومول برلیتر بود، به‌عنوان گاوهای مبتلا به کتوز تحت‌بالینی در نظر گرفته شدند (Andersson, 1988).

- نمونه‌گیری: خون‌گیری از تمامی گاوهای شیری هر ۴ گروه مورد مطالعه، در بازه زمانی یک ماه پس از زایمان انجام شد. برای این منظور، از هر گاو میزان ۱۰ میلی‌لیتر خون از سیاهرگ وداجی اخذ گردید. نمونه‌های خون بلافاصله با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده (اروم تجهیز، اروم تجهیز گستر، ایران) و سرم آنها در کنار یخ به آزمایشگاه دامپزشکی رویان‌پژوه شهرکرد ارسال گردید. سرم‌های دریافت‌شده تا زمان انجام آزمایشات مربوطه در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری شدند. در صورت همولیز شدن نمونه‌های سرم، نمونه‌گیری از سیاهرگ وداجی مجدداً تکرار می‌گردید.

- اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید (MDA) و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی سرم (TAC): غلظت سرمی MDA با استفاده از روش میهارا و یوشیما اندازه‌گیری شد (Mihara and Uchiyama, 1978). همچنین، سطح سرمی TAC نیز به کمک روش بنزی و همکاران اندازه‌گیری شد (Benzie et al., 1996).

در این مطالعه از روش TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) یا ترکیبات واکنش‌دهنده با تیوباربیتوریک اسید برای اندازه‌گیری غلظت سرمی MDA استفاده شد. اساس واکنش اتصال یک مولکول مالون‌دی‌آلدئید با دو مولکول تیوباربیتوریک اسید و

یافته‌ها

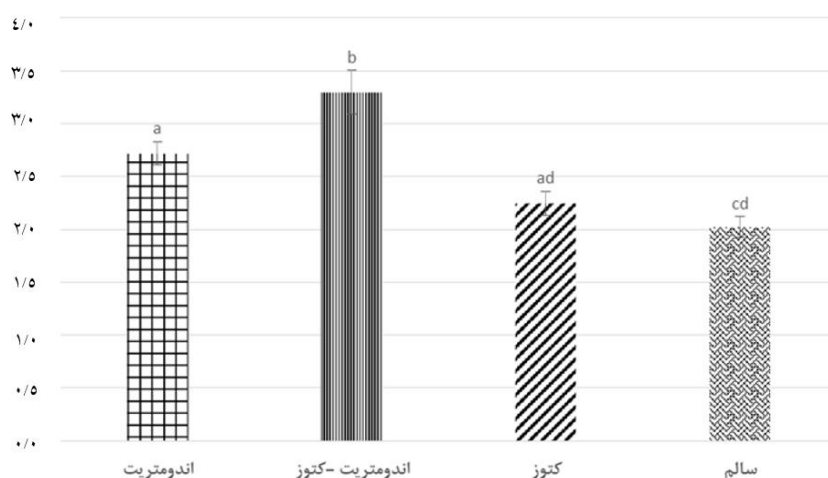
- فراوانی شیوع آندومتریت بالینی و کتوز تحت‌بالینی در جمعیت مورد مطالعه: میزان ابتلا به آندومتریت بالینی و کتوز تحت‌بالینی در جمعیت گاوهای شیری مورد بررسی به ترتیب ۹/۹ و ۲۷/۷۲ درصد بود. همچنین از تعداد کلی ۱۰۱ رأس گاو شیری مورد مطالعه، ۳۴ رأس گاو (۳۳/۶۶ درصد) به‌صورت همزمان دارای بیماری‌های آندومتریت بالینی و کتوز تحت‌بالینی بودند.

- سطح سرمی مالون‌دی‌آلدئید (MDA) در گاوهای شیری: مقادیر سرمی MDA در گاوهای شیری مورد مطالعه در نمودار ۱ نشان‌دهنده شده‌است. مطابق نتایج به‌دست آمده، کمترین میزان MDA در گاوهای سالم ($2/02 \pm 0/1$) میکرومول بر لیتر) و بیشترین میزان آن مربوط به گاوهای مبتلا به کتوز تحت‌بالینی - آندومتریت بالینی ($3/0 \pm 3/21$) میکرومول بر لیتر) بود. همچنین مشخص گردید که ابتلای گاوهای شیری به آندومتریت بالینی باعث افزایش معنی‌دار سطح سرمی MDA نسبت به میزان آن در گاوهای گروه سالم شد ($p \leq 0/05$). در گاوهای مبتلا به کتوز تحت‌بالینی نیز مقدار سرمی MDA تا حدودی افزایش یافته و به $2/25$ میکرومول بر لیتر رسید، هرچند این تفاوت از نظر آماری با گروه سالم معنی‌دار نبود ($p > 0/05$). از طرف دیگر تفاوت آماری معنی‌داری در سطح سرمی MDA بین گاوهای مبتلا به کتوز تحت‌بالینی و دام‌های مبتلا به آندومتریت بالینی مشاهده نشد (به ترتیب $2/25 \pm 0/11$ میکرومول بر لیتر در مقابل $2/72 \pm 0/11$ میکرومول بر لیتر).

تشکیل کمپلکس مالون‌دی‌آلدئید-تیوباربی‌توریک اسید قرمز رنگ می‌باشد. جذب نوری کمپلکس تشکیل‌شده در طول موج ۵۳۲ اندازه‌گیری شد. سپس غلظت تیوباربی‌توریک اسید در مقایسه با منحنی استاندارد مالون‌دی‌آلدئید محاسبه شد.

ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی سرم نیز با استفاده از روش FRAP (ferric reducing-antioxidant power) اندازه‌گیری شد. در این روش توانایی سرم در احیای یون‌های فریک (Fe^{3+}) در حضور آنتی‌اکسیدان‌ها اندازه‌گیری می‌شود. با احیای یون‌های فریک (Fe^{3+}) و تبدیل آن به یون‌های فرو (Fe^{2+}) در pH اسیدی و در حضور تری‌پری‌دیل‌اس‌تریازین (TPTZ)، کمپلکس Fe-TPTZ تشکیل می‌شود که رنگ آن آبی است. سپس حداکثر جذب نوری کمپلکس $Fe^{2+}+TPTZ$ در طول موج ۵۹۳ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد.

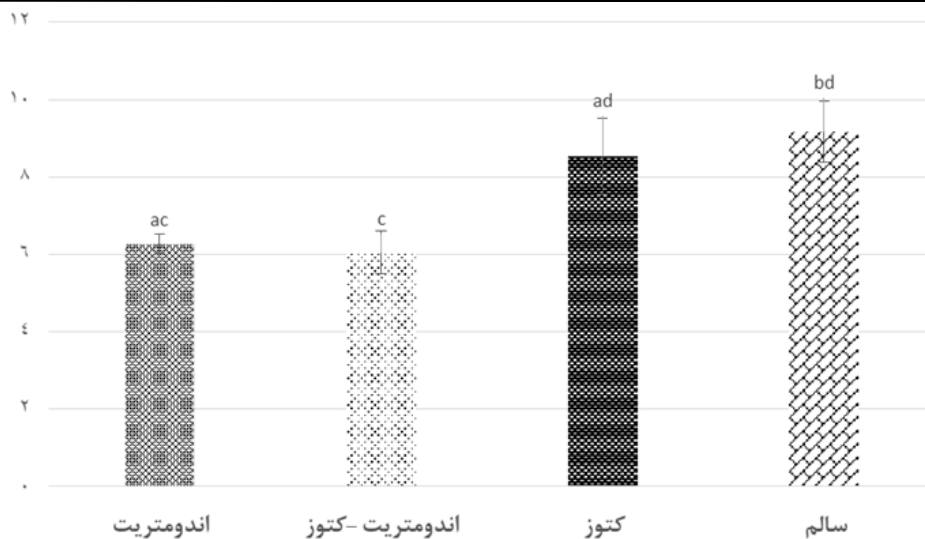
- تحلیل آماری داده‌ها: داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش ۱۹ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. به‌منظور مقایسه میانگین پارامترهای مورد مطالعه در گاوهای مورد آزمایش در هر گروه با گاوهای سالم، از روش آماری t-test استفاده گردید. همچنین سطح اطمینان ۹۵ درصد از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد ($p \leq 0/05$).



نمودار ۱- غلظت سرمی مالون‌دی‌آلدئید در سرم گاوهای شیری مورد مطالعه (میکرومول بر لیتر).
abcd: در گروه‌هایی که دارای حروف مشابه نیستند، اختلاف آماری معنی‌دار وجود دارد ($p \leq 0.05$).

(به ترتیب 0.27 ± 0.06 میکرومول بر لیتر و 0.67 ± 0.05 میکرومول بر لیتر، $p > 0.05$). اما تفاوت آماری معنی‌داری در سطح سرمی TAC در گاوهای مبتلا به کتوز تحت‌بالینی و گاوهای مبتلا به آندومتريت بالینی مشاهده نشد ($p > 0.05$). از طرف دیگر سطح سرمی TAC در گاوهایی که همزمان مبتلا به کتوز تحت‌بالینی و آندومتريت بالینی بودند، به‌طور معنی‌داری کمتر از سطح آن در سرم گاوهای مبتلا به کتوز تحت‌بالینی بود (0.67 ± 0.05 در مقابل 0.54 ± 0.08 میکرومول بر لیتر، $p \leq 0.05$).

- مقادیر سرمی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام (TAC) در گاوهای شیری مورد مطالعه: مقادیر سرمی TAC در گاوهای سالم، مبتلا به آندومتريت بالینی و کتوز تحت‌بالینی در نمودار ۲ نشان‌دهنده شده است. مطابق نتایج به‌دست آمده، کمترین سطح سرمی TAC در گاوهای شیری مبتلا به کتوز تحت‌بالینی - آندومتريت بالینی (0.67 ± 0.05 میکرومول بر لیتر) و بیشترین میزان آن در گاوهای سالم (0.18 ± 0.09 میکرومول بر لیتر) مشاهده شد. همچنین مشخص گردید که مقادیر سرمی TAC در گاوهای مبتلا به آندومتريت بالینی و نیز گاوهایی که همزمان مبتلا به کتوز تحت‌بالینی و آندومتريت بالینی بودند، به‌طور معنی‌داری کاهش یافت



نمودار ۲- غلظت‌های ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام در سرم گاوهای شیری مورد مطالعه (میکرومول بر لیتر).

abcd: در گروه‌هایی که دارای حروف مشابه نیستند، اختلاف آماری معنی‌دار وجود دارد ($p \leq 0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، ارتباط معنی‌داری بین میزان شیوع آندومتريت بالینی در گاوهای شیری و مقادیر سرمی MDA نشان داده شد ($p=0.04$)، به طوری که غلظت آن در گاوهای شیری مبتلا به آندومتريت بالینی کاهش یافت (نمودار ۱). بیشترین سطح سرمی MDA هم در گاوهای مبتلا به کتوز تحت‌بالینی-آندومتريت بالینی مشاهده شد ($p=0.02$). همچنین، تفاوت آماری معنی‌داری در غلظت سرمی MDA در گاوهای مبتلا به کتوز تحت‌بالینی و دام‌های مبتلا به آندومتريت بالینی مشاهده نشد. در تأیید نتایج مطالعه حاضر، کریمی و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که افزایش سطح MDA در گاوهای شیری مبتلا به آندومتريت بالینی بیانگر سطح بالای تولید اکسیدان‌ها در لکوسیت‌ها در طی روند التهاب می‌باشد. اکسیدان‌ها منجر به افزایش سطح MDA در سرم شده و پاسخ سیستم ایمنی بدن را با وارد کردن آسیب به سلول‌های ایمنی محدود می‌کنند (Karimi et al., 2015). علاوه بر این، حیدرپور و

همکاران نیز در سال ۲۰۱۲ گزارش نمودند که سطح سرمی MDA در گاوهای شیری مبتلا به آندومتريت بالینی و تحت‌بالینی به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. در این مطالعه، غلظت MDA در سرم گاوهای مبتلا به آندومتريت بالینی ($36/45 \pm 12/44$ میکرومول بر لیتر) و تحت‌بالینی ($29/76 \pm 12/36$ میکرومول بر لیتر) به طور معنی‌دار بیشتر از سطح سرمی آن در گاوهای سالم ($17/03 \pm 4/83$ میکرومول بر لیتر) گزارش شده است. این محققین نشان دادند که درمان موفق گاوهای شیری مبتلا به آندومتريت به مدت ۷ روز می‌تواند غلظت سرمی MDA را به طور معنی‌دار کاهش داده و به محدوده نرمال خود نزدیک کند، این در حالی بود که عدم پاسخ گاوهای مبتلا به پروسه درمان آندومتريت تغییر آماری معنی‌داری را در سطح سرمی MDA ایجاد نکرد (Heidarpour et al., 2012). در مطالعه مشابه صورت گرفته توسط محمد در سال ۲۰۰۸ نیز سطح بالای میزان MDA در سرم شترهای مبتلا به آندومتريت بالینی نسبت به شترهای سالم نشان داده شده است. این

در گاوهای مبتلا به متريت، میزان MDA در روزهای ۷ و ۲۱ قبل از زایمان و نیز در زمان زایمان بطور معنی‌دار بیشتر از گاوهای سالم گزارش شده‌است. در گاوهای مبتلا به آندومتريت بالینی نیز غلظت سرمی MDA در روزهای ۷ و ۲۱ قبل از زایمان و نیز روزهای ۷ و ۳۵ پس از زایمان به‌طور معنی‌دار بیشتر از گاوهای سالم بود. در این مطالعه، ارتباط معنی‌داری بین سطوح سرمی MDA و اکسید نیتريك با میزان بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بافت آندومتر مشاهده شد. همچنین این محققین نشان دادند که غلظت سرمی پایین TAC، سطح بالای MDA و اکسید نیتريك در دوره قبل از زایمان می‌تواند میزان بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی رحم را تحت تاثیر قرار داده و ملاک‌های ارزشمندی برای تشخیص احتمال ابتلای دام به عفونت‌های رحمی باشند (Baithalu *et al.*, 2016). از طرف دیگر، بررسی‌ها نشان داده‌است که غلظت سرمی MDA با افزایش شدت و وخامت آندومتريت افزایش می‌یابد. این افزایش احتمالاً به‌علت تولید بیش از حد رادیکال‌های هیدروکسیل (OH) است که موجب آسیب مولکول‌های DNA و غشای سیتوپلاسمی سلول در طی روند شکل‌گیری عفونت می‌شود (Yaralioglu-Gurgoze *et al.*, 2005). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که غلظت MDA در گاوهای شیری مبتلا به کتوز بالینی نیز تا حدودی افزایش یافته و به ۲/۲۵ میکرومول بر لیتر می‌رسد، هرچند این تغییر از نظر آماری با مقدار این ترکیب در گاوهای گروه کنترل تفاوت آماری معنی‌داری نداشت. در تایید نتایج مطالعه حاضر، افزایش غلظت سرمی MDA در بیماری هیپرکتونمی در انسان (Jain *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2006)، گاو (Sahoo *et al.*,

محقق با بررسی وضعیت استرس اکسیداتیو و میزان آنتی‌اکسیدان‌ها در شترهای دوکوهانه مبتلا به آندومتريت بالینی گزارش نمود که افزایش غلظت رادیکال‌های آزاد اکسیژن، شکل‌گیری استرس اکسیداتیو و افزایش میزان MDA و سایر متابولیت‌های حاصله از پرکسیداسیون لیپیدی موجب مستعد شدن دام به بیماری‌های تولیدمثلی نظیر آندومتريت می‌شود. در این بررسی، غلظت MDA در سرم شترهای دوکوهانه سالم و مبتلا به آندومتريت بالینی به ترتیب $30/44 \pm 2/89$ میکرومول بر لیتر و $36/24 \pm 2/44$ میکرومول بر لیتر گزارش شد (Mohamed, 2008). حنفی و همکاران نیز در سال ۲۰۰۸ نتایج مطالعه حاضر مبنی بر افزایش معنی‌دار سطح سرمی MDA در گاوهای شیری مبتلا به آندومتريت بالینی (نمودار ۱) را تایید نمودند. این محققین با بررسی تاثیر آندومتريت بالینی بر روی فعالیت‌های تخمدانی و استرس اکسیداتیو در بوفالوهای مصری نشان دادند که غلظت MDA در سرم بوفالوهای مبتلا به آندومتريت بالینی به‌طور معنی‌دار بیشتر از غلظت آن در بوفالوهای سالم است (Hanafi *et al.*, 2008). علاوه بر این، بایتالو و همکاران نیز در سال ۲۰۱۶ وجود ارتباط معنی‌دار بین سطح سرمی MDA و بروز عفونت‌های رحمی در گاوهای نژاد زبو را تایید نمودند. این محققین به بررسی فراوانی رونوشت برداری آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی اندومتريوم و میزان آنزیم‌های موجود در خون در گاوهای مبتلا به عفونت رحمی پرداختند و غلظت MDA را در خون محیطی گاوهای سالم و مبتلا به متريت و آندومتريت بالینی در روزهای ۷ و ۲۱ روز قبل از زایمان، در زمان زایمان و نیز ۷، ۲۱ و ۳۵ روز پس از زایمان اندازه‌گیری نمودند.

ترانسفراز، اسیدهای چرب آزاد غیراستریفیه و MDA در گاوهای شیری مبتلا به کتوز نسبت به گاوهای سالم بیشتر است. این محققین تایید نمودند که بیومارکرهای استرس اکسیداتیو و به‌ویژه میزان MDA می‌توانند به‌عنوان بیومارکرهای امیدوارکننده برای پیشگویی کتوز در گاوهای شیری در دوره پس از زایمان باشند. همچنین در این مطالعه، درمان کتوز با استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها توانست غلظت متابولیت‌های اکسیداتیو را در سرم تعدیل کند (EL-Bahr and EL-Deeb, 2017).

از طرف دیگر در مطالعه حاضر، مقدار سرمی TAC در گاوهای مبتلا به آندومتريت بالینی و نیز گاوهای مبتلا به کتوز تحت‌بالینی-آندومتريت بالینی به‌طور معنی‌داری نسبت به مقدار آن در سرم گاوهای گروه کنترل (سالم) کاهش یافت ($p=0/001$). کمترین سطح سرمی TAC در گروه مبتلا به کتوز تحت‌بالینی آندومتريت بالینی و بیشترین میزان آن هم مربوط به گاوهای سالم بود. تفاوت آماری معنی‌داری نیز در میزان TAC بین گاوهای مبتلا به کتوز تحت‌بالینی و گروه مبتلا به آندومتريت بالینی مشاهده نشد. در تایید نتایج مطالعه حاضر، محمد در سال ۲۰۰۸ نشان داد که غلظت سرمی TAC در سرم شترهای دوکوهانه مبتلا به آندومتريت بالینی به‌طور معنی‌دار کمتر از شترهای سالم است. در این تحقیق، غلظت TAC در سرم شترهای مبتلا به آندومتريت بالینی و سالم به ترتیب $0/156 \pm 0/004$ میلی‌مول در لیتر و $0/201 \pm 0/006$ میلی‌مول در لیتر گزارش شده‌است (Mohamed, 2008). در تحقیقی مشابه، حنفی و همکاران نیز در سال ۲۰۰۸ گزارش نمودند که غلظت TAC در سرم

(2009)، بوفالو (Youssef *et al.*, 2010) و میش (Al-Qudah, 2011) نشان داده شده‌است. کریمی و همکاران در سال ۲۰۱۵ با بررسی عناصر کمیاب، میزان استرس اکسیداتیو و شیوع کتوز در دوره انتقالی گاوهای شیری نشان دادند که بالاترین غلظت سرمی MDA و بتاهیدروکسی‌بوتیرات در هفته اول پس از زایمان مشاهده می‌شود. این محققین بیان نمودند که ارتباط معکوس و معنی‌داری بین غلظت سرمی روی پس از زایمان با سطح سرمی MDA وجود دارد. همچنین، غلظت سرمی MDA پس از زایمان نیز ارتباط مثبت و معنی‌داری با میزان بتاهیدروکسی‌بوتیرات داشت. این محققین بیان نمودند که افزایش غلظت MDA در یک هفته پس از زایمان می‌تواند خطر ابتلا به کتوز تحت‌بالینی را افزایش دهد (Karimi *et al.*, 2015). در مطالعه دیگر، لی و همکاران در سال ۲۰۱۵ تایید نمودند که ارتباط معنی‌دار و مستقیمی بین سطوح استرس اکسیداتیو با غلظت اسیدهای چرب غیراستریفیه، MDA و میزان بتاهیدروکسی‌بوتیرات در گاوهای شیری مبتلا به کتوز وجود دارد. نتایج این مطالعه نشان داد که گاوهای مبتلا به کتوز دچار کاهش معنی‌دار آسپاراتات آمینوترانسفراز، کاتالاز، ظرفیت رادیکال هیدروکسیل و ویتامین‌های C و E می‌باشند و غلظت‌های سرمی پراکسید هیدروژن و MDA نیز در آن‌ها بیشتر از گاوهای سالم است. این محققین، ارتباط معنی‌دار و مستقیمی را بین میزان اسیدهای چرب غیرضروری پلاسما و آلانین آمینوترانسفراز، آسپاراتات آمینوترانسفراز، LDH و MDA گزارش نمودند (Li *et al.*, 2015). ال‌باهر و ال‌دیب نیز در سال ۲۰۱۷ نشان دادند که سطح آسپاراتات آمینوترانسفراز، گاما گلوتامیل

نظیر اندومتريوز را افزایش دهد (Heidarpour *et al.*, 2012). از طرف دیگر در مطالعه حاضر سطح TAC در سرم گاوهای شیری مبتلا به کتوز نیز تا حدودی کمتر از میزان آن در سرم گاوهای گروه کنترل (سالم) بود (نمودار ۲)، هرچند این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود. در تایید این یافته، امیدي و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان دادند که افزایش غلظت سرمی MDA در حول و حوش زمان زایمان همزمان و به موازات کاهش سطح سرمی TAC پیش خواهد رفت. به‌عبارت دیگر، افزایش فرایندهای متابولسمی و سرعت تولید اکسیدان‌ها در حول و حوش زمان زایمان در گاوها بسیار سریع‌تر از ظرفیت سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن می‌باشد. همچنین این محققین گزارش نمودند که افزایش تولید شیر در دوره ابتدایی پس از زایمان باعث افزایش شدت و وخامت کتوز، تشدید بالانس منفی انرژی و شکل‌گیری سایر بیماری‌های متابولیک می‌گردد. در این مطالعه، کمترین غلظت سرمی TAC در دوره ابتدایی پس از زایمان و به‌ویژه در گاوهای پرتولید گزارش شده‌است. این در حالی بود که بیشترین غلظت سرمی TAC مربوط به گاوها در دوران خشکی بود (Omidi *et al.*, 2017). در سایر مطالعات نیز اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی خون به‌ویژه سطح سرمی TAC به‌عنوان نشانگر دقیق و ارزشمندی برای تعیین میزان احتمال بروز بیماری‌های متابولیکی به‌ویژه کتوز در دام‌ها تعیین شده‌است (Mandebvu *et al.*, 2003; Zdunczyk *et al.*, 2006; Macrae *et al.*, 2006; Castillo *et al.*, 2006; Albera and Kankofer, 2010; Celi, 2010; Bernabucci *et al.*, 2017).

یافته‌های مطالعه حاضر تغییرات وضعیت اکسیداتیو گاوهای شیری پس از زایمان را در ارتباط با بیماری

بوفالوهای مصری مبتلا به آندومتريت بالینی ($0/45 \pm 0/05$ میلی‌مول در لیتر) به‌طور معنی‌دار کمتر از غلظت آن در سرم بوفالوهای سالم ($1/43 \pm 0/08$ میلی‌مول در لیتر) بود. همچنین در این مطالعه، شیوع آندومتريت بالینی در بوفالوهای مورد مطالعه $16/73$ درصد و در دام‌های مبتلا به نارسایی تخمدان $70/59$ درصد گزارش شده‌است. اندازه‌گیری مارکرهای اکسیدانی و آنتی‌اکسیدانی موجود در خون بوفالوهای مبتلا به عفونت‌های رحمی هم نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار میزان MDA، کاهش غلظت آنزیم کاتالاز و اسید آسکوربیک، کاهش گلوکوتیون و نیز کاهش TAC بود. این محققین تایید نمودند که با افزایش شدت و وخامت آندومتريت، سطح سرمی TAC در دام‌های مبتلا کاهش می‌یابد (Hanafi *et al.*, 2008). علاوه بر این، نتایج مطالعه حاضر مبنی بر کاهش معنی‌دار سطح TAC (نمودار ۲) توسط حیدرپور و همکاران نیز در سال ۲۰۱۲ تأیید شده‌است. این محققین نشان دادند که سطح سرمی TAC در گاوهای مبتلا به آندومتريت بالینی و تحت‌بالینی به‌طور معنی‌دار کاهش می‌یابد. در این مطالعه، غلظت سرمی TAC در گاوهای مبتلا به آندومتريت بالینی و تحت‌بالینی به ترتیب $3/55 \pm 1/14$ میلی‌مول بر لیتر و $3/67 \pm 1/22$ میلی‌مول بر لیتر گزارش شده‌است که از نظر آماری کمتر از غلظت آن در سرم گاوهای گروه کنترل ($4/65 \pm 0/97$ میلی‌مول بر لیتر) بود. همچنین درمان دام‌های مبتلا به آندومتريت به مدت ۷ روز توانست مقادیر سرمی TAC را افزایش داده و به $4/64$ میلی‌مول بر لیتر برساند. این محققین نشان دادند که کاهش سطح سرمی TAC و عناصر کمیاب (مس و روی) می‌تواند حساسیت دام به بیماری‌های تولیدمثلی

آنتی‌اکسیدان‌های مختلف به‌عنوان درمان کمکی برای تسکین استرس اکسیداتیو ناشی از این بیماری‌ها ارزیابی گردد.

سپاسگزاری

نویسندگان از آقای دکتر محمد قاسمی مدیر محترم آزمایشگاه رویان پژوه شهرکرد، به جهت همکاری در انجام آزمایشات تحقیق حاضر، تقدیر و تشکر می‌نمایند. مقاله مربوط به نتایج پایان‌نامه آقای فرهاد بلاری دانش‌آموخته دکترای حرفه‌ای دامپزشکی می‌باشد (کد پایان‌نامه: ۱۳۳۱۰۵۰۱۹۷۱۰۱۱).

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی ندارند.

کتوز و آندومتریت نشان داد و مشخص گردید که مقادیر سرمی پائین TAC و مقادیر بالای MDA می‌تواند سبب افزایش ابتلا به عفونت‌های رحمی و کتوز پس از زایمان در گاوهای شیری گردد. باتوجه به این که همکاری بین آنتی‌اکسیدان‌ها سبب محافظت بدن در مقابل حملات رادیکال‌های فعال اکسیژن تولیدی در روند التهاب ناشی از آندومتریت و بیماری‌های متابولیکی می‌گردد، لذا به نظر می‌رسد که با تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی گاوها در دوره خشکی و پس از زایمان، می‌توان از استرس اکسیداتیو و متعاقب آن از بروز بسیاری از بیماری‌های متابولیکی و تولید مثلی در گاوهای شیری پیشگیری نمود. همچنین درمان با آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند در درمان این بیماری‌ها در گاو در دوره پس از زایمان مفید باشد. البته در این رابطه مطالعات بیشتری لازم است تا اثر

منابع

- Adly, A.A. (2010). Oxidative stress and disease: An updated review. *Research Journal of Immunology*, 3(2): 129-145.
- Albera, E. and Kankofer, M. (2010). The comparison of antioxidative/oxidative profile in colostrum, milk and blood of early post-partum cows during their first and second lactation. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(6): 417-25.
- Al-Qudah, K. (2011). Oxidant and antioxidant profile of hyperketonemic ewes affected by pregnancy toxemia. *Veterinary Clinical Pathology*, 40(1): 60-65.
- Andersson, L. (1988). Subclinical ketosis in dairy cows. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 4(2): 233-251.
- Baithalu, R.K., Singh, S.K., Kumaresan, A., Mohanty, A.K., Mohanty, T.K., Kumar, S., *et al.* (2017). Transcriptional abundance of antioxidant enzymes in endometrium and their circulating levels in Zebu cows with and without uterine infection. *Animal Reproduction Science*, 177: 79-87.
- Benzie, I.F. and Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1): 70-76.
- Bernabucci, U., Ronchi, B., Lacetera, N. and Nardone, A. (2017). Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 88(6): 2017-2026.

- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S. and Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1): 9-19.
- Caldecott, K.W. (2003). Protein-protein interactions during mammalian DNA single-strand break repair. *Biochemical Society Transactions*, 31(1): 247-251.
- Castillo, C., Hernandez, J., Valverde, I., Pereira, V., Sotillo, J., Alonso, M.L., *et al.* (2006). Plasma malonaldehyde (MDA) and total antioxidant status (TAS) during lactation in dairy cows. *Research in Veterinary Science*, 80(2): 133-139.
- Celi, P. (2010). The role of oxidative stress in small ruminant health and production. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39: 348-363.
- Celi, P. and Gabai, G. (2015). Oxidant/antioxidant balance in animal nutrition and health: the role of protein oxidation. *Frontiers in Veterinary Science*, 2(48): 1-13.
- Di Trana, A., Celi, P., Claps, S., Fedele, V. and Rubino, R. (2006). The effect of hot season and nutrition on the oxidative status and metabolic profile in dairy goats during mid-lactation. *Animal Science*, 82(5): 717-722.
- EL-Bahr, S.M. and EL-Deeb, W.M. (2017). Oxidative stress and cardiac biomarkers in lambs affected with enzootic ataxia: the diagnostic and prognostic significance. *Veterinarski Arhiv*, 87(3): 259-271.
- Hanafi, E.M., Ahmed, W.M., Abd El Moez, S.I., El Khadrawy, H.H. and Abd El Hameed, A.R. (2008). Effect of clinical endometritis on ovarian activity and oxidative stress status in Egyptian buffalo-cows. *Journal of Agricultural, Food and Environmental Sciences*, 4(5): 530-536.
- Heidarpour, M., Mohri, M., Fallah-Rad, A.H., Shahreza, F.D. and Mohammadi, M. (2012). Oxidative stress and trace elements before and after treatment in dairy cows with clinical and subclinical endometritis. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 163(12): 628-633.
- Herdt, T.H. (2000). Ruminant adaptation to negative energy balance. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 16(2): 215-230.
- Jain, S.K., McVie, R. and Bocchini, J.A. (2006). Hyperketonemia (ketosis), oxidative stress and type 1 diabetes. *Pathophysiology*, 13(3): 163-70.
- Karimi, N., Mohri, M., Seifi, H.A., Azizzadeh, M. and Heidarpour, M. (2015). Relationships between trace elements, oxidative stress and subclinical ketosis during transition period in dairy cows. *International Journal of Veterinary Science and Technology*, 7(2): 46-56.
- Keck, R.G. (1996). The use of t-butyl hydroperoxide as a probe for methionine oxidation in proteins. *Analytical Biochemistry*, 236(1): 56-62.
- Kelly, F.J. and Mudway, I.S. (2003). Protein oxidation at the air-lung interface. *Amino Acids*, 25(3-4): 375-96.
- Li, Y., Ding H.Y., Wang, X.C., Feng, X.B., Li, X.B., Wang, Z., *et al.* (2016). An association between the level of oxidative stress and the concentrations of NEFA and BHBA in the plasma of ketotic dairy cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 100(5): 844-851.
- Lykkesfeldt, J. and Svendsen, O. (2007). Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. *The Veterinary Journal*, 173(3): 502-511.
- Macrae, A.I., Whitaker, D.A., Burrough, E., Dowell, A. and Kelly, J.M. (2006). Use of metabolic profiles for the assessment of dietary adequacy in UK dairy herds. *Veteran Records*, 159(20): 655-661.
- Mandebvu, P., Castillo, J. B., Steckley, D.J. and Evans, E. (2003). Total antioxidant capacity: a tool for evaluating the nutritional status of dairy heifers and cows. *Canadian Journal of Animal Science*, 83(3): 605-608.
- Marietta, C., Gulam, H. and Brooks, P.J. (2002). A single 8, 50-cyclo-20-deoxyadenosine lesion in a TATA box prevents binding of the TATA binding protein and strongly reduces transcription in vivo. *DNA Repair (Amst)*, 1(11): 967-975.
- Mihara, M. and Uchiyama, M. (1978): Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry* 86(1): 271-278.

- Mohamed, H.E. (2008). Antioxidant status and the degree of oxidative stress in demedary (*Camelus dromedaries*) with or without endometritis. *Veterinary Research*, 2(1): 1-2.
- Niehaus Jr, W.G. and Samuelsson, B. (1968). Formation of malonaldehyde from phospholipid arachidonate during microsomal lipid peroxidation. *European Journal of Biochemistry*, 6(1): 126-30.
- Omid, A., Fathi, M.H. and Parker, M.O. (2017). Alterations of antioxidant status markers in dairy cows during lactation and in the dry period. *Journal of Dairy Research*, 84(1): 49-53.
- Poulsen, H.E. (2005). Oxidative DNA modifications. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 57(1): 161-169.
- Sahoo, S.S., Parta, R.C., Behera, P.C. and Swarup, D. (2009). Oxidative stress indices in the erythrocytes from lactating cows after treatment for subclinical ketosis with antioxidant incorporated in the therapeutic regime. *Veterinary Research Communications*, 33(3): 281-290.
- Shen, X.P., Zou, S.B., Wu, H.J. and Zhang, Y. (2009). The relationship between serum level of leptin and oxidative stress in patients with hyperglycemia crisis. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*, 21(6): 353-356.
- Walsh, R.B., Walton J.S., Kelton D.F., LeBlanc S.J., Leslie K.E., *et al.* (2007). The effect of subclinical ketosis in early lactation on reproductive performance of postpartum dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 90(6): 2788-2796.
- Yaralioglu-Gurgoze, S., Cetin, H., Cen, O., Yilmaz, S. and Atli, M.O. (2005). Changes in malondialdehyde concentrations and glutathione peroxidase activity in purebred Arabian mares with endometritis. *Veterinary Journal*, 170(1): 135-137.
- Youssef, M.A., El-Khodery, S.A., El-deeb, W.M. Abou and El-Amaiem, W.E.A. (2010). Ketosis in buffalo (*Bubalus bubalis*): clinical findings and the associated oxidative stress level. *Tropical Animal Health and Production*, 42(8): 1771-1777.
- Zdunczyk, Z., Flis, M., Zielinski, H., Wróblewska, M., Antoszkiewicz, Z. and Juszkiewicz, J. (2006). In vitro antioxidant activities of barley, husked oat, naked oat, triticale, and buckwheat wastes and their influence on the growth and biomarkers of antioxidant status in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(12): 4168-4175.