



UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET NOVI SAD
DEPARTMAN ZA VETERINARSKU MEDICINU

**INSULINSKA REZISTENCIJA KRAVA U ZASUŠENJU I RANOJ LAKTACIJI I
UTICAJ NA METABOLIČKU ADAPTACIJU POSLE TELJENJA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:

Prof.dr Branislava Belić

Kandidat:

Maja Došenović-Marinković, dr vet.med.

Novi Sad, 2019.

UNIVERZITET U NOVOM SADU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Maja Došenović Marinković
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof.dr Branislava Belić, redovni profesor
Naslov rada: NR	INSULINSKA REZISTENCIJA KRAVA U ZASUŠENJU I RANOJ LAKTACIJI I UTICAJ NA METABOLIČKU ADAPTACIJU POSLE TELJENJA
Jezik publikacije:	Srpski jezik

JP	
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2019.
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	21000 Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8
Fizički opis rada: FO	119 strana, 10 tabela, 74 grafikona, 257 referenci, 2 slike
Naučna oblast: NO	Medicina – Veterinarska medicina
Naučna disciplina: ND	Patologija- Patološka fiziologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Krave, insulinska rezistencija, metabolički profil
UDK	
Čuva se: ČU	Biblioteka Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu
Važna napomena:	/

VN	
Izvod: IZ	<p>Cilj ovog istraživanja je da se ispituju razlike u insulinskoj rezistenciji kod krava u zasušenju i ranoj laktaciji i ispita veza između pokazatelja insulinske rezistencije i parametara metaboličkog profila u ranoj laktaciji. Krave u ranoj laktaciji su imale nižu vrednost RQUICKI indeksa, odnosno pokazivale su veći stepen insulinske rezistencije u periodu posle teljenja u odnosu na period zasušenja. Rezultati istraživanja pokazuju da postoji negativna korelacija između RQUICKI indeksa insulinske rezistencije u zasušenju i periodu posle teljenja. To znači da što su krave bile osetljivije na insulin u periodu zasušenja-pre teljenja, te im je bila jače izražena rezistencija na insulin posle teljenja. U periodu zasušenja postoji pozitivna korelacija između vrednosti insulina i RQUICKI indeksa, dok je ova korelacija negativna u ranoj laktaciji. Kod vrednosti glukoze i NEFA, RQUICKI korelira negativno sa vrednostima glukoze, ali je ova korelacija približna nuli tokom zasušenja, dok je u ranoj laktaciji ona statistički značajna. To znači da će stepen insulinske rezistencije rasti ako je glikemija niža, ali značajno većim intenzitetom u ranoj laktaciji. Kod relacije sa vrednostima NEFA, postoji sličnost, pa je i u periodu zasušenja i u periodu laktacije RQUICKI indeks negativno korelirao sa vrednostima NEFA. Viša vrednost RQUICKI indeksa u periodu zasušenja znači veći pad njegove vrednosti i veću rezistenciju posle teljenja. Što je veća koncentracija insulina u periodu pre teljenja to je niža njegova vrednost u periodu posle teljenja. Kod krava sa višom glikemijom u zasušenju postoji intenzivniji pad vrednosti glukoze u periodu posle teljenja. Viša vrednost NEFA u zasušenju znači nižu vrednost u periodu posle teljenja, kao i manji intenzitet porasta vrednosti ovog metabolita u krvi. Utvrđeno je takođe, da što su krave senzitivnije na insulin u periodu zasušenja (veća RQUICKI vrednost) imaće veći porast NEFA u periodu rane laktacije. PP vrednosti nekog faktora insulinske rezistencije mogu biti determinisani pomoću višestruke (multiple) regresije u čiji sastav ulaze ostali faktori insulinske rezistencije. Tako je dobijeno da PP vrednost jednog od faktora signifikantno zavisi od PP i „delta“ vrednosti ostala tri faktora insulinske rezistencije. Uticaj AP vrednosti nije imao statistički značaj u determinaciji PP vrednosti faktora insulinske rezistencije. Kada se krave klasifikuju na osnovu vrednosti RQUICKI indeksa na one sa najvećim padom vrednosti ovog indeksa (iznad 75 percentila) i na ostale manje rezistentne krave ne bismo dobili statistički značajnu razliku u vrednosti metaboličkih parametara. Međutim, ukoliko bi se klasifikacija napravila na osnovu vrednosti glukoze, NEFA i insulina tako da su najrezistentnije krave one sa najizraženijim padom insulina i glukoze i najvećim porastom NEFA dobili bi značajne razlike u metaboličkoj adaptaciji krava koje se karakterišu: povećanom koncentracijom BHB, bilirubina, AST, ALP, GGT i P i smanjenom koncentracijom holesterola, triglicerida, ukupnih proteina i albumina. Insulinska rezistencija kod krava u ranoj laktaciji može nastati kao kompenzatorni odgovor na povećanu insulinsku senzitivnost tokom perioda zasušenja, što može imati uticaja na metabolički status krava u periodu posle teljenja.</p>

Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	23.06.2015.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status)	<p>Predsednik komisije:</p> <p>Prof.dr Marko Cincović, vanr.prof., Poljoprivredni fakultet Novi Sad</p> <p>Član1:</p> <p>Prof.dr Branislava Belić, red.prof., Poljoprivredni fakultet Novi Sad, mentor</p> <p>Član2:</p> <p>Prof.dr Radojica Đoković, Agronoski fakultet Čačak</p>

University of Novi Sad

Faculty of Agriculture

Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Maja Došenović-Marinković
Mentor: MN	Prof.dr Branislava Belić, Full prof.
Title: TI	INFLUENCE OF INSULIN RESISTANCE IN DAIRY COWS IN DRY PERIOD AND EARLY LACTATION ON METABOLIC ADAPTATION AFTER CALVING
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication:	Serbia

CP	
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2019
Publisher: PU	Authors reprint
Publication place: PP	21000 Novi Sad, Dositej Obradović sq. 8
Physical description: PD	119 pages, 10 tables, 74 graphs, 257 references, 2 pictures
Scientific field SF	Medicine – Veterinary medicine
Scientific discipline SD	Pathology-Pathophysiology
Subject, Key words SKW	Cow, metabolic profile, insulin resistance
UC	
Holding data: HD	Library at Faculty of Agriculture Novi Sad
Note: N	/
Abstract: AB	The aim of this study is to investigate the differences in insulin resistance in cows in drying and early lactation and examined the relationship between the indicators of insulin resistance and metabolic profile parameters in early lactation. Cows in early lactation had a lower value of the RQUICI index, ie they showed a higher degree of insulin resistance in the period after calving compared to the drying period. The results of the study show that there is a negative correlation between the RQUICKI index of

	<p>insulin resistance in rheumatism and after calving. This means that, as the cows were more sensitive to insulin during the period of drying-before calving, this was more pronounced resistance to insulin after calving. During the period of drying there is a positive correlation between the values of the insulin and RQUICKI index, while this correlation is negative in the early lactation. When it comes to glucose and NEFA values, RQUICKI correlates negatively with glucose values, but this correlation is approximately zero during drying, while in early lactation it is statistically significant. This means that the degree of insulin resistance will increase as the glycemic level is lower, but significantly higher intensity in early lactation. When it comes to relation with the NEFA values, there is a similarity, so in the period of dried and in the lactation period the RQUICKI index correlated negatively with the NEFA values. The higher value of the RQUICKI index in the period of driedness means a greater decrease in its value and greater resistance to the weight of the body. The higher the concentration of insulin in the period before calving, the lower its value in the period after calving. In cows with higher glycemia in rich, there is a more intense decline in glucose levels in the period after calving. A higher NEFA value in rich means lower value in the period after calving, as well as a lower intensity of the rise in blood metabolites. It has also been established that the cows more sensitive to insulin in the period of dried (higher RQUICKI value) will have a higher NEFA increase in the period of early lactation. The PP values of an insulin resistance factor can be determined by multiple regression, the composition of which includes other factors of insulin resistance. Thus, the PP value of one of the factors significantly depends on the PP and "delta" values of the remaining three factors of insulin resistance. The effect of AP values was not statistically significant in the determination of PP values of the factor of insulin resistance. When cows are classified on the basis of the RQUICKI index value, those with the highest value decline of this index (above 75 percentiles) and other less resistant cows will not receive a statistically significant difference in the value of metabolic parameters. However, if the classification was based on the glucose, NEFA, and insulin values, the most resilient cows with those with the most pronounced drop in insulin and glucose and the greatest increase in NEFA would receive significant differences in the metabolic adaptation of cows characterized by increased levels of BHB, bilirubin, AST, ALP, GGT and P, and reduced cholesterol, triglyceride, total protein and albumin levels. Insulin resistance in cows in early lactation may result in a compensatory response to increased insulin sensitivity during the period of drying, which may affect the metabolic status of cows in the period after calving.</p>
<p>Accepted on Scientific Board on: AS</p>	<p>23.06.2015.</p>
<p>Defended: DE</p>	

<p>Thesis Defend Board:</p> <p>DB</p>	<p>President:</p> <p>Dr Marko Cincović, assoc. prof., Faculty of Agriculture, Novi Sad</p> <p>Member1:</p> <p>Dr Branislava Belić, full prof., Faculty of Agriculture, Novi Sad , mentor</p> <p>Member2:</p> <p>Dr Radojica Đoković, full prof., Faculty of Agronomy, Čačak</p>
---------------------------------------	---

SADRŽAJ

1.UVOD.....	11
2.PREGLED LITERATURE.....	13
2.1 Insulin i njegove fiziološke uloge u metabolizmu.....	13
2.2 Definicija i mehanizam nastanka insulinske rezistencije.....	16
2.3 Faktori koji utiču na insulinsku rezistenciju.....	17
2.4 Merenje insulinske rezistencije kod krava.....	24
2.5 Metaboličke promene u peripartalnom periodu kod krava.....	27
2.6 Specifičnosti metabolizma i insulinske rezistencije kod pozitivnog i negativnog energetskog bilansa.....	34
3. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA.....	38
4. MATERIJAL I METODE.....	39
5. REZULTATI.....	43
5.1 Deskriptivna statistika za faktore insulinske rezistencije.....	43
5.2 Povezanost faktora insulinske rezistencije u zasušenju i posle teljenja.....	47
5.3 Deskriptivna statistika za metaboličke parametre.....	58
5.4 Povezanost metaboličkih parametara i faktora insulinske rezistencije.....	60
5.5 Razlika u metaboličkoj adaptaciji krava sa najvećim promenama u vrednostima glukoze, insulina, NEFA i RQUICKI u ranoj laktaciji u odnosu na period zasušenja (krave najrezistentnije na insulin).....	73
6. DISKUSIJA.....	74
6.1 Pokazatelji insulinske rezistencije.....	76
6.2 Povezanost pokazatelja insulinske rezistencije.....	79
6.3 Parametri metaboličkog profila u periodu posle teljenja.....	83
6.4 Povezanost pokazatelja insulinske rezistencije sa parametrima metaboličkog profila posle teljenja.....	90
7. ZAKLJUČCI.....	94
8. LITERATURA.....	96
9. BIOGRAFIJA.....	119

1.UVOD

Peripartalni period (obuhvata tri nedelje pre i tri nedelje nakon partusa) predstavlja najkritičniju fazu u produktivnom životu krava, obzirom da se tada u organizmu odigravaju mnogobrojne promene. Ove promene mogu da imaju ključni uticaj na zdravstveno stanje, produkciju mleka, ekonomičnost i rentabilnost proizvodnje. Prelazak iz stanja graviditeta i zasušenja u period laktacije iziskuje izuzetno velike metaboličke napore krava, pa je u odnosu na tu pojavu, incidenca oboljenja kod krava (broj novoobolelih krava od neke bolesti) najveća u ovom periodu. Upravo zato je poznavanje metaboličkih, endokrinoloških i imunoloških promena, koje se odvijaju u peripartalnom periodu u organizmu krava od izuzetnog značaja. U toku peripartalnog perioda, dolazi do promena u aktivnosti skoro svih ćelija u organizmu da bi se odgovarajućom preraspodelom hranljivih materija, obezbedile optimalne potrebe fetusa i mlečne žlezde. Dakle, primarno je obezbediti snabdevanje fetusa, tj., novorođenčeta optimalnom količinom hranljivih materija, dok potrebe majke imaju sekundarni značaj. Upravo iz ovog razloga, periferna tkiva (mišićno i masno) koriste manje glukoze, dok se procesi lipolize i katabolizma proteina u njima intenziviraju. Uporedo sa ovim promenama, metabolička aktivnost jetre se veoma brzo i višestruko povećava u peripartalnom periodu. Metabolička aktivnost se povećava putem povećanja protoka krvi, potrošnje kiseonika i enzimske aktivnosti. Jetra mora da se metabolički prilagodi zbog naglih promena u sastavu prisutnih slobodnih masnih kiselina u krvi koje su prisutne u ovom periodu. Iz ovog razloga, funkcionalno stanje jetre je od presudnog značaja za adaptaciju organizma u peripartalnom periodu. Insulin ima značajan uticaj na preraspodelu hranljivih materija i njihovo usmeravanje ka mlečnoj žlezdi. Ovome doprinosi pad koncentracije insulina nekoliko dana pred partus i njegovo održavanje na niskom nivou u prvih desetak dana laktacije.¹ Nedostatak insulina pokreće čitav niz homeoretskih procesa, jer njegovo delovanje pokreće biološke procese koji su suprotni od onih koji se odvijaju u periodu oko teljenja i ranoj laktaciji. Insulin je antilipolitički i antiketogeni hormon, te ima značajnu ulogu u centralnoj regulaciji apetita. Insulinsku rezistenciju karakteriše smanjen odgovor insulina na glukozu tj. smanjena funkcija beta ćelija pankreasa (eng., *insulin responsiveness*) i/ili smanjena osetljivost

glukoze na insulin (eng., *insulin sensitivity*). Rezistencija na insulin u peripartalnom periodu je neophodna da bi vime, kao organ u kom upotreba glukoze nije zavisna od insulina, dobilo dovoljno hranljivih materija i energije za započinjanje laktacije.

2. PREGLED LITERATURE

Fenomen insulinske rezistencije najjače je izražen posle partusa. Odgovor insulina na glukozu je snižen, dok je klirens glukoze veći u postpartalnom periodu, u odnosu na prepartalni.^{2,3} Tokom laktacije mlečna žlezda krava vrši ekspresiju insulin nezavisnih transportera za glukozu, koja ima tri puta veću koncentraciju u odnosu na zasušene krave. Ovi receptori su nađeni u masnom tkivu kod krava u kasnoj laktaciji i zasušenju, ali ne i kod krava u piku laktacije. Pobuđivanje insulin senzitivnih receptora u skeletnim mišićima i masnom tkivu ne menja se sa progresom laktacije ili zasušenog perioda.⁴ Iako je odgovor insulina na glukozu redukovan, senzitivnost perifernog tkiva na insulin je nepromenjena, ali je nađen veći klirens insulina u sredini laktacije u odnosu na zasušene krave.⁵ Pored navedenog, redukovana je i senzitivnost tkiva na insulin, što je nađeno u jednoj studiji gde je korišćen hiperinsulinemični-euglikemijski model.⁶

2.1. Insulin i njegove fiziološke uloge u metabolizmu

Po strukturi, insulin je polipeptid sastavljen od amino-kiselinskog niza povezanog disulfidnim vezama. Sekretiju insulina vrše beta-ćelije u Langerhansovim ostrvcima pankreasa.⁷ Insulin predstavlja centralni hormon, koji je prisutan u svim adaptacionim procesima tokom metaboličkog stresa u peripartalnom periodu kod krava.

Stimulatori lučenja insulina su: glukozu, galaktozu, ksilitol, gliceraldehidi, mnoge aminokiseline, masne kiseline, natrijum, kalcijum, gastrointestinalni hormoni (glukagon, pankreasni peptidi, sekretin i holecistokinin), vagusna aktivnost i neki lekovi. Faktori koji vrše supresiju insulina uključuju telesnu kondiciju, gastrointestinalni hormoni (galanin i somatostatin), simpatička aktivnost (adrenergički hormoni), medijatori upale i dr. Mnogi od ovih faktora značajno utiču na lučenje insulina u peripartalnom periodu.

Insulin deluje tako što pospešuje ulazak glukoze u ćelije perifernih - ekstrahepatičnih tkiva.⁸ Insulin prevashodno pospešuje ulazak u ćelije mišićnog i masnog tkiva tako što pojačava translokaciju proteina za transport glukoze na površinu membrane ovih ćelija (GLUT 4).^{7,9} Insulin utiče na dalju sudbinu glukoze unutar ćelije tako što stimuliše aktivnost enzima glukokinaze koji fosforiliše glukozu u glukozo-6 fosfat (G6P). Na ovaj način se sprečava izlazak glukoze iz ćelije. Insulin povećava aktivnost glikogen sintaze i na taj način pokreće sintezu glikogena-depoa glukoze. Na aktivnost glikogen fosforilaze ima suprimirajuće dejstvo.¹⁰ Danas se smatra da se inhibitorski efekat insulina na proces glukoneogeneze u jetri prvenstveno odvija indirektnim putem, smanjenjem sposobnosti glukagona da stimuliše ekspresiju enzima fosfoenolpiruvat karboksikinaze.¹¹ Aktivnost insulina je usmerena, pre svega, na periferna tkiva. Obzirom da u jetru preživara dospeva veoma malo glukoze iz krvi i digestivnog trakta, uticaj insulina na metabolizam glukoze u jetri preživara je od manjeg značaja nego kod monogastričnih životinja.^{12,13} Jetra nije insulin senzitivni organ (u odnosu na transport glukoze), jer se na površini hepatocita dominantno nalaze GLUT 2 čija je distribucija i aktivnost nezavisna od prisustva insulina u cirkulaciji. Da bi se odredio uticaj insulina na metabolizam glukoze u organizmu jedinke, mora se uzeti u obzir i koncentracija drugih, antiinsulinskih hormona, čija se koncentracija gotovo trenutno menja sa promenom koncentracije glukoze, koju izaziva insulin. Dakle, uticaj insulina na vrednost glikemije je zavisna od insulina ali i od antiinsulinskih hormona.

U eksperimentima koji su sprovedeni na ovcama zapaženo je da insulin može da smanji sintezu glukoze za samo 15 posto. Uzrok ove pojave je što se u uslovima hipoglikemije povećava kompenzatorna sekrecija glukagona, koji deluje tako da intenzivira proces glukoneogeneze i na taj način održava glikemiju u fiziološkim granicama.¹⁴ Ako se hipoglikemija i posledično povećana koncentracija glukagona u krvi prevenira kontrolisanim parenteralnim davanjem glukoze i insulina, sinteza glukoze i dalje je umanjena samo za oko 15 posto. Smanjena sinteza glukoze u ovom slučaju može da bude posledica inhibiranog procesa glikogenolize ali ne i glukoneogeneze.¹⁴ Razlog za ovu pojavu, može biti ishrana životinja, jer su hranjene obrocima koji zadovoljavaju samo potrebe za održanje života, tako da se proces glukoneogeneze odvija na znatno nižem bazalnom nivou. Insulin u takvim uslovima nema inhibitorski efekat.¹⁴ Istovremeno, sa procesom glikogeneze, insulin stimuliše glikolizu u jetri i mišićima. Insulin stimuliše aktivnost glikolitičkih enzima fosfofruktokinaze i piruvat kinaze, pa se glukoza u ćelijama metaboliše do

piruvata i laktata.¹⁵ Kod preživara insulin stimuliše glikogenezu ali je ona ograničena, obzirom da preživari imaju vrlo slabu aktivnost glukokinaze u hepatocitima.¹⁶ Umesto ovog enzima u tkivu jetre preživara, heksokinaza ima prevashodnu ulogu za dalju sudbinu glukoze.¹⁷ Heksokinaza je nespecifičan enzim koji ima u osnovi niži afinitet (manju K_m vrednost) za glukozu u poređenju sa glukokinazom.¹⁵ Iz tog razloga je u optimalnim fiziološkim uslovima priliv glukoze u jetru preživara mali.

Insulin primarno utiče na ekstrahepatična ili periferna tkiva (mišićno i masno), tako što olakšava ulazak glukoze u ćelije i stimuliše metaboličke procese. Na taj način se povećavaju energetske rezerve organizma.¹⁸ U masnom tkivu insulin pospešuje ulazak glukoze u adipocite preko transportnih molekula GLUT 4.¹⁹ Ovde se glukozu oksidiše do alfa glicerofosfata, koji se koristi za esterifikaciju slobodnih masnih kiselina tokom lipogeneze.²⁰ U adipocitima insulin intenzivira sintezu triglicerida tako što obezbeđuje prekursora za njihovu sintezu i stimuliše aktivnost enzima lipoprotein lipaze.¹⁸ Insulin ima suprimirajući efekat na lipolizu tako što smanjuje nivo cAMP i inhibira aktivnost enzima protein kinaze A i hormon senzitivne lipaze.^{15,14,21} Insulin na taj način dovodi do smanjivanja koncentracije slobodnih masnih kiselina u krvi.²² Ovo je takođe dokazano i kod preživara.^{7,20} Kod preživara insulin inhibira lipolizu i stimuliše sintezu masnih kiselina. Glavni prekursori za lipogenezu u masnom tkivu preživara su sirćetna i buterna kiselina. Insulin ima identičnu ulogu u procesu lipogeneze u jetri, mišićnom i masnom tkivu kod svih domaćih životinja.¹⁶ U jetri, insulin stimuliše sintezu masnih kiselina i triglicerida, a inhibira ketogenezu.^{14,21} Slobodne masne kiseline dospale u jetru se reesterifikuju sa glicerol-3-fosfatom, koji je produkt direktne oksidacije glukoze stimulisane insulinom (heksozomonofosfatni šant), ili sa glicerolom koji nastaje u biohemijskoj reakciji katalizovanoj enzimom glicerolfosfat kinazom. Međutim, acetyl-CoA sintetisan u mitohondrijama u reakciji koju katalizuje piruvat dehidrogenaza transportuje se u citoplazmu i potom pretvara u malonil-CoA uz pomoć enzima acetyl-CoA karboksilaze. Ovaj proces je stimulisan od strane insulina i predstavlja limitirajući činilac lipogeneze u hepatocitima.²⁰

Antiketogeni efekat insulina u jetri preživara je posredovan sličnim mehanizmima kao kod monogastričnih životinja.¹⁶ Svoje antiketogeno delovanje insulin ostvaruje na sledeće načine: favorizovanjem lipogeneze i inhibiranjem lipolize u masnom tkivu, intenzivira korišćenje ketonskih tela od strane perifernih tkiva, snižava aktivnost ketogenih enzima i smanjuje priliv prekursora za sintezu ketonskih tela u jetri.²¹ Direktni antiketogeni efekat insulin ostvaruje tako

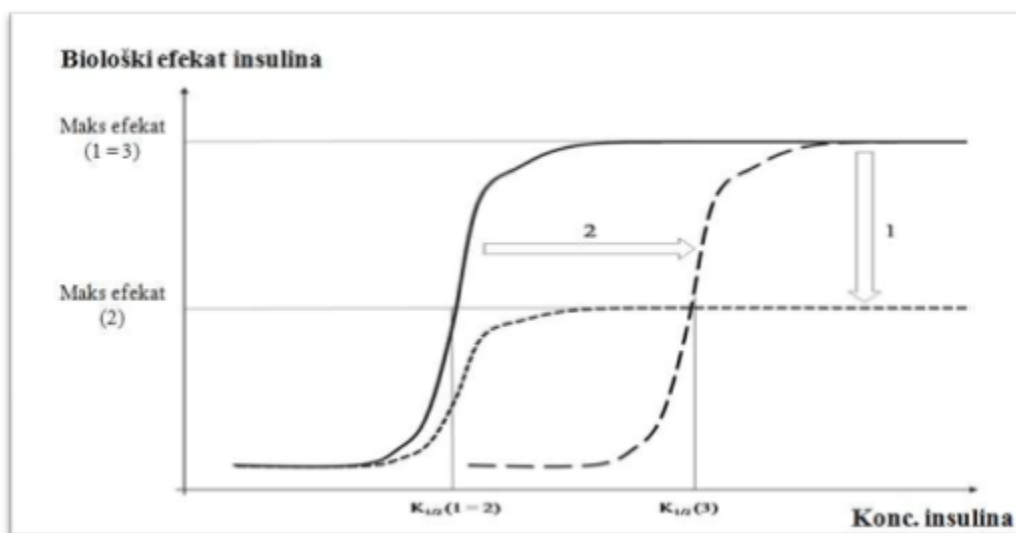
što u jetri smanjuje aktivnost enzima karnitin palmitoiltransferaze-I (CPT-I), a povećava njegov afinitet za malonil-CoA. Osnovna uloga CPT-I u jetri je da reguliše transport masnih kiselina dugih lanaca iz citoplazme u mitohondrije gde podležu procesu esterifikacije ili oksidacije. Insulin stimuliše aktivnost enzima acetyl-CoA karboksilaze, koji katalizuje sintezu malonil-CoA, inhibitora CPT-I, što predstavlja dodatni antiketogeni efekat insulina, kojim se sintetisani acetyl-CoA usmerava u pravcu lipogeneze. Preživari koriste zanemarljivu količinu glukoze za sintezu masti. Oksidacijom glukoze u heksozomonofosfatnom putu nastaju NADPH₂ i α -glicerofosfat, koji su neophodni za sintezu masnih kiselina iz acetata i laktata kod preživara. Digestivni trakt i jetra kod preživara učestvuju svega sa 8 % u ukupnoj lipogenezi organizma, dakle ne predstavljaju primarno mesto sinteze masti. Mobilisane neesterifikovne masne kiseline iz telesnih depoa predstavljaju primarni izvor za sintezu masti u jetri preživara.²²

2.2 Definicija i mehanizam nastanka insulinske rezistencije

Insulinska rezistencija predstavlja stanje pri kome je neophodna veća količina insulina da bi se ostvario normalan fiziološki odgovor, pri čemu se podrazumeva da se insulinska rezistencija može prevazići egzogenom aplikacijom insulina.²³ Ovo stanovište se može prihvatiti samo u slučajevima kada je u pitanju prerceptorska insulinska rezistencija, tj. kada do insulinske rezistencije dolazi usled smanjene sinteze i/ili lučenja insulina. Međutim, aplikovanje egzogenog insulina neće dovesti uvek do normalizacije insulinskog odgovora. To je slučaj kada su promene lokalizovane na receptorskom i postreceptorskom nivou. Insulinska rezistencija se može definisati kao stanje u kome „trenutna koncentracija insulina u krvi proizvodi manji biološki odgovor od normalnog“ i može biti prouzrokovana putem smanjenja maksimalnog insulinskog efekta (smanjen insulinski odgovor), kao i potrebom da se poveća koncentracija insulina da bi se postigla polovina maksimalnog efekta (smanjena insulinska senzitivnost) ili kombinacija oba ova načina (slika 1).²⁴

Naime, smanjena insulinska senzitivnost uslovljena je smanjenim brojem receptora ili smanjenjem njihovog afiniteta za insulin. Smanjenje insulinskog odgovora prate promene na post-receptorskom nivou, kada nastaju greške u transdukciji insulinskog signala, na nivou sekundarnih glasnika i translokacije GLUT molekula na membranama ciljnih ćelija.^{25,26} Iz praktičnih razloga, oba fenomena ćemo nazivati insulinskom rezistencijom ili smanjenim

insulinskim odgovorom. U nekoliko radova zastupljeno je mišljenje da umerena insulinska rezistencija doprinosi povećanju lipolize, glukoneogeneze i uvođenju mišićnog i masnog tkiva krava u stanje štednje glukoze.²⁷ Na osnovu ovih stanovišta, pod insulinskom rezistencijom u širem smislu podrazumevaju se stanja koja uključuju: 1) smanjeno lučenje insulina, 2) smanjen odgovor β -ćelija na akutnu aplikaciju glukoze i 3) smanjen metabolički efekat insulina u ciljnim tkivima.⁷



Slika 1: Dva tipa insulinske rezistencije

2.3 Faktori koji utiču na insulinsku rezistenciju

Umerena insulinska rezistencija tokom graviditeta je ustanovljena kod velikog broja sisara.^{28,29,30} Utvrđeno je da je metabolizam glukoze kod gravidnih ovaca pod slabijim uticajem insulina u odnosu na negravidne ovce. Smanjena konzumacija hrane (restriktivna ishrana) doprinosi razvoju insulinske rezistencije i uzrokuje gubitak u telesnoj masi plotkinja bez ikakvih posledica po masu ploda. Upravo ovo, omogućava adekvatno snabdevanje fetusa energijom na račun promena energetskeg statusa majki.³¹ Inhibitorno delovanje insulina na lipolizu je manje izraženo kod gravidnih u poređenju sa negravidnim ovcama.³² Pored graviditeta, insulinska rezistencija može da se razvije i tokom laktacije. Utvrđeno je da je insulin-zavisan metabolizam glukoze u in vitro uslovima bio smanjen u uzorcima masnog tkiva ovaca u laktaciji u odnosu na ovce koje se nisu muzle.³³

Ishrana - Masno tkivo može da bude refraktarnije na insulin tokom perioda zasušenja nego u postpartalnom periodu. Mnogi radovi na ovu temu su potvrdili da stepen insulinske rezistencije može biti čak i veći u antepartalnom nego u postpartalnom periodu.³⁴ Kao rezultat ovog istraživanja i drugih posrednih dokaza da naglašena insulinska rezistencija tokom perioda zasušenja ima velikog udela u smanjenom unosu suve materije obroka, povećanju NEFA i smanjenju telesne kondicije tokom perioda rane laktacije, istraživači su uspeali da aplikacijom tiazolidona (analoga korišćenih u tretmanu tip 2 dijabetesa kod ljudi) izazovu specifičnu modulaciju insulinske rezistencije u masnom tkivu u antepartalnom periodu. Aplikacija tiazolidona (TZD) imala je tendenciju smanjenja NEFA i povećanja unosa suve materije obroka u periodu 7 dana pre do perioda 7 dana posle teljenja.³⁵ Aplikacija TZD nije uticala na korišćenje (štednju) glukoze od strane perifernih tkiva. Utvrđeno je da aplikacija TZD utiče na poboljšanje energetskog statusa, smanjen stepen gubitka telesne kondicije, i kraći servis period kod tretiranih krava.³⁵ Bez obzira što je modulacija insulinske rezistencije sa farmaceutskim pristupom intrigantna, to je dovelo do logičkog pitanja u vezi sa aspektima ishrane koji mogu da utiču na stepen insulinske rezistencije. Tokom poslednjih nekoliko godina pitanje ishrane krava u pogledu energije tokom perioda zasušenja ponovo je privuklo veliku pažnju i u vezi sa tim postoji saglasnost velikog broja istraživača da ishrana u energetskom pogledu može u značajnoj meri da uzajamno deluje sa stepenom osetljivosti perifernih tkiva na insulin tokom kasnog prepartalnog perioda.³⁶

Da bi se izbegle drastične promene u metabolizmu u peripartalnom periodu, vrši se priprema životinja posebnim merama ishrane. U cilju smanjenja negativnog energetskog bilansa, maksimalno se povećava unos suve materije (SM) u poslednjoj fazi zasušenja, postepenim uvođenjem u obrok manjih količina smeša, istog sastava kao i hraniva, koja se koriste na početku laktacije.^{37,38} Krave sa nižim vrednostima viših masnih kiselina u krvnoj plazmi tokom poslednje dve nedelje gestacionog perioda imaju manju incidencu najvažnijih postpartalnih metaboličkih poremećaja. Ako se uzme u obzir da povećan unos hranljivih materija obično dovodi do nižih vrednosti NEFA u cirkulaciji, povezanost boljeg unosa suve materije iz obroka i poboljšanja zdravstvenog statusa i performansi bi se mogla podrazumevati. Višestruka istraživanja su pokazala da se planiranjem ishrane, naročito unosa energetskih hraniva u peripartalnom periodu, može smanjiti stepen insulinske rezistencije i tako uticati na interakciju između NEFA i apetita krava u prepartalnom periodu. Krave, koje su imale slabiji apetit u antepartalnom periodu,

generalno zbog pojačanog unosa suve materije obroka 3 do 4 nedelje pre očekivanog teljenja, su imale veće postpartalne koncentracije NEFA u krvi i triglicerida u jetri.³⁹ Krave, koje su tokom celog perioda zasušenja konzumirale 80 % od svojih energetske potreba su imale nižu koncentraciju NEFA postpartalno, nižu koncentraciju glukoze i insulina antepartalno i bolji unos suve materije obroka postpartalno u poređenju sa kravama koje su konzumirale 160 % od predviđenih potreba u energiji u istom tom periodu.⁴⁰ Krave podvrgnute restriktivnoj ishrani tokom kasnog prepartalnog perioda su imale blažu krivu NEFA tokom peripartalnog perioda.⁴¹ Krave, koje su u periodu zasušenja unosile 180 % od izračunatih potreba u energiji, su imale više koncentracije insulina i glukoze antepartalno, bolji odgovor β -ćelija endokrinog pankreasa u testu opterećenja glukozom antepartalno, i veću koncentraciju NEFA tokom peripartalnog perioda nego krave hranjene 75 % ili čak 110 % od izračunatih energetske potreba.² Iste krave hranjene sa 128 % od potreba u energiji u periodu zasušenja su imale slabiji apetit i produženi period negativnog bilansa energije tokom postpartalnog perioda u poređenju sa druga dva tretmana ishrane.⁴² Ishrana sa 150 % od potreba u energiji tokom ranog perioda zasušenja može dovesti do pogoršavanja insulinske rezistencije sa približavanjem termina teljenja, što dovodi do povišene koncentracije NEFA i BHBA u krvi i slabijeg apetita tokom prvih 10 dana laktacije.⁴³ Odgovor NEFA tokom izvođenja testa opterećenja glukozom je mnogo refraktarniji kod krava hranjenih obrocima veće energetske vrednosti, što upućuje da ishrana energetski bogatim hranivima tokom perioda zasušenja pojačava stepen insulinske rezistencije u masnom tkivu.⁴⁴ Svi ovi stavovi podržavaju stav da konzumiranje energetski bogate hrane u periodu zasušenja rezultira promenama u metabolizmu krava, koje zauzvrat predisponiraju životinje ka smanjenom unosu suve materije obroka i višim koncentracijama NEFA u krvi neposredno posle teljenja.

Hiperlipidemija – Tokom perioda rane laktacije, odgovor β -ćelija endokrinog pankreasa na intravensku aplikaciju glukoze i propionata značajno je manji u odnosu na period zasušenja.^{2,45} Iako snižavanje koncentracije insulina u krvi ima glavnu ulogu u homeoretskom prilagođavanju, dugotrajno suprimirana sekrecija insulina može prouzrokovati intenzivnu lipolizu. Pored toga, dolazi i do intenzivnije mobilizacije masnih kiselina iz telesnih rezervi, što povećava rizik za pojavu dislokacije sirišta, masne jetre, ketoze i reproduktivnih poremećaja.^{25,46,47} Na osnovu in vitro istraživanja kod ljudi i pacova došlo se do saznanja da

kratkotrajno izlaganje kulture tkiva povišenoj koncentraciji NEFA ima stimulatивно delovanje na povećanje sekrecije insulina.^{48,49,50,51,52}

Dugotrajno izlaganje kulture tkiva povišenoj koncentraciji NEFA, dovodi do smanjene sekretorne sposobnosti β -ćelija i do njihovog potpunog iscrpljivanja (insuficijencije). Kod ljudi dugotrajno hronično povećanje koncentracije NEFA u krvi ima glavnu ulogu za razvoj funkcionalne dekompenzacije pankreasa kod dijabetesa tip II.^{53,54} Ovaj mehanizam, koji je utvrđen kod ljudi i pacova, je verovatno prisutan i kod goveda obzirom na to da se povišena koncentracija NEFA u krvi poklapa sa padom insulinemije i sekretorne sposobnosti endokrinog pankreasa tokom rane laktacije. Smanjen odgovor β -ćelija pankreasa na intravenski aplikovanu glukozu je takođe, utvrđen kod ketoznih krava, koje su gladovale u poređenju sa zdravim životinjama.⁵⁵ Dugotrajna insulinska rezistencija može predisponirati krave za kontinuiranu lipolizu i uticati na povećanje rizika za razvoj peripartalnih poremećaja zdravlja. Tokom laktacije jasno je uočena povezanost insulinske rezistencije i pojave mnogobrojnih poremećaja zdravlja. Poremećaji zdravlja se mogu javiti u vidu dislokacije sirišta.^{27,46,56} Utvrđena je i mogućnost nastanka masne jetre i ketoze.^{25,27,57,58} Zapažena je i pojava cista na jajnicima.⁵⁹ Utvrđena je manja vrednost indeksa za kvantitativnu procenu insulinske senzitivnosti (Revised Quantitative Insulin Sensitivity Check Index - RQUICKI), što ukazuje na veći stepen insulinske rezistencije kod ugojenih u odnosu na krave koje imaju optimalnu telesnu kondiciju.⁶⁰ Pretpostavlja se da je smanjen promet (klirens) glukoze krava u laktaciji koje su hranjene većom količinom krmnih smeša (žitarica) tokom perioda zasušenja, posledica: 1) povišene koncentracije NEFA u krvi (obimna lipomobilizacija), usled izraženog smanjenja količine konzumirane hrane u peripartalnom periodu i 2) hronične-dugotrajne hiperinsulinemije koja tokom perioda zasušenja mehanizmom negativne povratne sprege (down-regulation) reguliše ekspresiju insulinskih receptora.² Dodavanje palmitinske kiseline u fiziološkim koncentracijama u medijum kulture adipocita pacova (in vitro) pokazalo je smanjenje insulin zavisnog transporta glukoze.⁶¹ Ova zapažanja nije bilo moguće objasniti promenama u ekspresiji ili aktivaciji insulinskih receptora, što je ukazivalo na promene i greške u prenošenju insulinskog signala na post-receptorskom nivou.^{54,61} Intraćelijsko nakupljanje međuprodukata metabolizma masnih kiselina može dovesti do prekida normalnog postreceptorskog prenošenja insulinskog signala putem sekundarnih glasnika, što dovodi do smanjenja translokacije GLUT 4 na ćelijskoj membrani i ulaska glukoze u skeletne mišiće. Intracelularno nakupljanje međuprodukata metabolizma masnih kiselina i

smanjenje ekspresije GLUT 4 molekula na membranama poprečnoprugastih mišića je perzistentan nalaz u ranom stadijumu smanjene tolerancije na glukozu kod ljudi.⁵⁴ Neki istraživači, na osnovu sprovedenih istraživanja, pretpostavljaju da promene nastaju pre na post-receptorskom nego na receptorskom nivou.^{27,62,63} Dakle, mehanizmi koji uzrokuju insulinsku rezistenciju kod krava se verovatno mogu uporediti sa onim kod ljudi i pacova.

Genetski faktori – Razlike u ekspresiji GLUT 4 molekula u skeletnim mišićima i tolerancije na glukozu se pojavljuju kod zdrave, mlade i mršave dece čiji roditelji boluju od dijabetesa, dosta ranije nego što se ispolje klinički znaci bolesti. Upravo to upućuje da genetski ili epigenetski činioci, nezavisno od načina života i metabolizma, mogu da imaju značajnu ulogu u razvoju netolerancije na glukozu.⁵⁴ Obzirom da kod ljudi postoji genetska predispozicija za razvoj insulinske rezistencije, sumnja se da je možda genetska sklonost krava prema insulinskoj rezistenciji sekundarna pojava jednostrane višedecenijske selekcije mlečnih rasa goveda na visoku proizvodnju mleka. Ovim stavom bi se mogla objasniti veća sklonost visokomlečnih krava ka nastanku oboljenja. Pokušaji da se u potpunosti eliminiše negativni energetske bilans (NEB) kod visokomlečnih krava određenim manipulacijama u ishrani nisu dali očekivane rezultate.⁶⁴ Krave sa predispozicijom za visoku proizvodnju mleka izgleda da su u stanju da dodatno unete izvore energije usmere direktno ka proizvodnji mleka umesto za poboljšanje njihove telesne kondicije, dok krave koje nemaju predispoziciju za visoku proizvodnju, koriste energetske dodatke da bi ublažili NEB.^{65,66,67} Krave sa visokim selekcionim indeksom za proizvodnju mleka ispoljavaju niži skor telesne kondicije (eng.,BCS) u toku svih faza laktacije u poređenju sa kravama sa nižim selekcionim indeksom. Ovi nalazi su dali povod za koncept genetski determinisanog gubitka BCS kod rasa selekcionisanih na visoku proizvodnju mleka.^{64,68} Brojne studije su otkrile rasne razlike u funkcionisanju somatotropne osovine krava u laktaciji. Na primer, severnoamerički holštajn ispoljava više koncentracije hormona rasta i niže koncentracije IGF-I, povezano sa višim koncentracijama NEFA, gubitkom BCS i usmeravanjem energije ka proizvodnji mleka, u odnosu na manje mlečne Novozelandske sojeve, nezavisno od razlika u insulinu.^{66,67} GH odgovori na izazove GH rilizing faktora bili su mnogo niži kod Japansko crnih u poređenju sa Holštajn kravama u laktaciji, koji se može objasniti njihovim veoma malim prinosom mleka, ali i tokom perioda zasušenja, što ukazuje na GH razlike nezavisno od energetskeg statusa.⁶⁹ Odsustvo razlike u bazalnim ili indukovanim GH

koncentracijama mogli bi biti ustanovljeni u studiji poredeći grupe Holštajn teladi različitog genetskog porekla.⁷⁰

Niska koncentracija insulina i senzitivnost su drugi potencijalni nasledni mehanizmi za genetski uslovljene BCS gubitke. Niže postpartalne koncentracije insulina su utvrđene kod krava poreklom od bikova sa visokim selekcionim indeksom za mlečnost, što je dovelo do procene umerene heritabilnosti (h^2) za postpartalni insulin.⁷¹ Koncentracije insulina bile su niže u krvi krava sa visokim laktacionim potencijalom u poređenju sa kravama nižeg laktacionog potencijala, nezavisno od energetskeg balansa i proizvodnje tokom trajanja ispitivanja.⁷² Japanske Crne krave ispoljavale su mnogo veće bazalne i glukozom indukovane koncentracije insulina u odnosu na Holštajn krave u toku perioda zasušenja i laktacije.⁶⁹ Manji stepeni tolerancije na glukozu posle intravenskog glukoza tolerans testa (IVGTT) su nedavno primećeni kod krava Holštajn rase u laktaciji poreklom iz Severne Amerike u odnosu na krave sa Novog Zelanda, što upućuje na prisutne razlike u insulinskoj senzitivnosti u zavisnosti od genetske konstitucije životinja.⁷³

Inflamatorni odgovor – Inflamacija u peripartalnom periodu kao posledica zadržavanja posteljice ili mastitisa može nepovoljno delovati na energetske status jedinki tako što smanjuje količinu konzumirane hrane i pokreće lipolizu.^{74,75} Inflamatorne procese prati oslobađanje proinflammatoryh citokina (TNF- α , interleukin 1 i 6) iz leukocita. Ovi citokini povećavaju potrošnju energije koja se troši za rast telesne temperature i aktivnosti imunološkog sistema.⁷⁶ Inflamatorni procesi u organizmu mogu da utiču i na insulinski odgovor. Postoji negativna korelacija između insulin zavisnog prometa glukoze i koncentracije tumor nekrotičnog faktora α (TNF- α) kod krava koje su imale masnu jetru.⁵⁷ Citokini u jetri pokreću sintezu pozitivnih proteina akutne faze (+AP) haptoglobin, serum amiloid-A i ceruloplazmin, dok smanjuju sintezu negativnih proteina akutne faze (-AP) kao što su: albumin, transferin, retinol vezujući protein i apolipoproteini.^{77,78,79} Ovaj kaskadni niz je poznat kao akutno fazna reakcija, i smatra se protektivnim reakcijom domaćina na inflamaciju.⁸⁰ Međutim, ona istovremeno može da ima nepoželjan efekat na peripartalni period krava. Na primer, povećana sinteza haptoglobina, ceruloplazmina i serum amiloida-A u jetri je od velikog značaja, jer pospešuje zarastanje i obnovu tkiva, ali može da umanja sintezu drugih apolipoproteina koji su neophodni za transport lipida iz jetre, povećavajući tako rizik za deponovanje masti u hepatocitima.⁸¹

Insulin svoje dejstvo na nivou ciljnih ćelija ostvaruje vezivanjem za specifični receptor. Receptor za insulin je transmembranski heterotetramerni (2 vanćelijske α i 2 transmembranske β subjedinice) proteinski molekul (350 kDa). Ovaj receptor pripada superfamiliji membranskih receptora koji poseduju kinaznu aktivnost.⁸² Iako je zapaženo da insulin ostvaruje maksimalan metabolički efekat vezivanjem za srazmerno mali deo raspoloživih receptora (teorija viška receptora; eng. spare receptors), utvrđeno je da smanjenje broja receptora ipak utiče na fiziološki efekat insulina.⁸³

Receptori za insulin – Zastupljenost receptora za insulin zavisi od vrste tkiva. U jetri i masnom tkivu, na kojima ovaj hormon ima presudan uticaj u procesu korišćenja energetskih prekursora, dostiže i 200000 po ćeliji. Fiziološki prenos insulinskog signala na nivou ciljnih ćelija odvija se određenim redosledom: vezivanje molekula insulina za subjedinicu α dovodi do 51 konformacione promene molekula što dovodi do aktivacije kinazne aktivnosti subjedinice β , koja vrši autofosforilaciju.⁸⁴ Autofosforilacija podstiče interakciju receptora sa proteinima, supstratima receptora za insulin (IRS 1-6) i fosforilaciju tih molekula, koji signal u delovanju insulina usmeravaju uglavnom ka regulaciji metaboličkih procesa u ćelijama.⁸³ Zbog ove pojave se aktivira niz sekundarnih glasnika, uključujući PIP 3 (eng. phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate), koji može da aktivira ili suprimira mnogobrojne enzime i proteine u ciljnim tkivima. Značajan efekat PIP 3 u adipocitima i mišićnim ćelijama je u aktiviranju i translokaciji GLUT 4 molekula iz unutarćelijskih depoa u plazma membranu ovih ćelija.^{85,86} Pored ovog, signalnog puta, insulin može koristiti i drugi-ćelijski put u regulaciji lokalizacije GLUT4, svojstven samo za insulin. On započinje fosforilacijom proteina Cbl od strane receptora za insulin.⁸⁷ Paralelno prenosu signala ka narednim molekulima u signalnom putu, nakon vezivanja insulina dolazi do internalizacije kompleksa ligand-receptor iz plazma membrane u citoplazmu. U endozomima se odvija proces disocijacije i degradacije insulina, a molekuli receptora se defosforilišu i u određenom procentu ponovo integrišu u plazma membranu.⁸⁸ Regulatori aktivnosti receptora su tirozin fosfataze, ali i različite serin-treonin kinaze, koje ga fosforilišu na serinu ili treoninu. Dokazano je da fosforilaciju receptora na brojnim serin-treonin ostacima vrše neke izoforme protein kinaze C (PKC), koje se aktiviraju pri akumulaciji lipida, posredstvom povećanja koncentracije diacilglicerola (DAG) u ćeliji ili u stanju hiperglikemije.⁸⁹ Insulin negativno reguliše broj sopstvenih receptora u ciljnim ćelijama mehanizmom negativne povratne sprege, koja podrazumeva promene u ekspresiji receptorskog gena, uz učešće transkripcionog

regulatora FOXO1 (eng. forkhead box O1). Insulin podstiče internalizaciju i degradaciju sopstvenog receptora. Ovim mehanizmom insulin negativno reguliše i druge molekule svog signalnog sistema.^{90,91} U regulaciji ekspresije i funkcije receptora za insulin učestvuju i hormoni, citokini, hranljivi sastojci, i fizička aktivnost. Hiperglikemija može negativno uticati na aktivnost receptora za insulin.⁸² Fizička aktivnost, nasuprot tome, ima pozitivan efekat na receptorsku funkciju.⁹² Pored smanjenja bazalne i glukozom stimulisane sekrecije β -ćelija endokrinog pankreasa, promene koje dovode do supresije insulin-zavisnih metaboličkih efekata i/ili nastanka insulinske rezistencije mogu da se odvijaju i na nivou perifernih tkiva. Prevažno, alteracije na receptorskom nivou su mogući razlog za smanjenje insulinskog odgovora i/ili smanjenje insulinske senzitivnosti masnog tkiva. Sve više se ističe da su promene na postreceptorskom nivou, tj. promene u signalnim putevima insulina, koji učestvuju u njegovom delovanju, glavni uzrok smanjenog ćelijskog odgovora na stimulaciju insulinom kod preživara.^{93,94}

2.4 Merenje insulinske rezistencije kod krava

Procena stepena insulinske rezistencije je veoma značajna, da bi se moglo predvideti nastajanje poremećaja u energetsom metabolizmu kao i njihova težina kod pojedinih životinja. Krave, koje nemaju izraženu senzitivnost perifernih tkiva na insulin (insulinska rezistencija) su sklonije nastanku masne jetre i drugih poremećaja metabolizma. Za ovakve slučajeve je uobičajen nalaz relativno visokog nivoa glikemije i insulinemije antepartalno, kao i značajno povećanje koncentracija β -hidroksibuterne kiseline i slobodnih viših masnih kiselina u krvi postpartalno. Međutim, poteškoće u proceni insulinske rezistencije nastaju kod preživara u laktaciji u *in vivo* uslovima. Tumačenje rezultata testova za utvrđivanje insulinske rezistencije nije jednostavno, obzirom da se više od 80 % prometa glukoze u organizmu preživara tokom laktacije odvija u insulin nezavisnim metaboličkim putevima.^{31,60} U upotrebi je više testova za ispitivanje funkcionalne aktivnosti β -ćelija endokrinog pankreasa i stepena osetljivosti perifernih tkiva na insulin.⁹⁹ Zlatnim standardom za procenu insulinske rezistencije smatraju se takozvane „klamp-tehnike“.

Hiperinsulinemijski – euglikemijski Klamp test (eng., Hyperinsulinemic Euglycemic Glucose Clamp test- HIEC) - se smatra zlatnim standardom za procenu insulinske rezistencije. U toku hiperglikemijskog klampa, koncentracija glukoze u krvi se održava na određenom nivou

podešavajući količinu parenteralno aplikovane glukoze, što se smatra direktnom funkcijom sekrecije insulina i korišćenja glukoze u perifernim tkivima. Ovaj metod se prvenstveno koristi za kvantitativno ispitivanja funkcionalne sposobnosti β - ćelija pankreasa.¹⁰⁰ Pored ovoga, za procenu osetljivosti perifernih tkiva (insulinska rezistencija) na insulin, koristi se tehnika hiperinsulinemijskog euglikemijskog klampa. Za vreme izvođenja ovog testa, uporedo sa egzogenom aplikacijom insulina vrši se kontrolisana intravenska aplikacija glukoze, sa ciljem održavanja glikemije na bazalnom nivou. U momentu uspostavljanja ravnotežnih odnosa koncentracija insulina i glukoze u krvi, nivo parenteralnog dodavanja glukoze se uzima kao mera stepena insulinske rezistencije, jer ona predstavlja u suštini količinu glukoze iskorišćenu u perifernim tkivima.^{100,101} Ovaj metod se između ostalog smatra komplikovanim, obzirom da zahteva simultanu primenu glukoze i insulina, višekratno uzimanje uzoraka krvi i iskusnog operatera. Po konceptu testa, glukozni klamp test, koji se primenjuje kod životinja jednak je onom koji se primenjuje u humanoj dijagnostici. Nakon gladovanja, preko noći (~15 h), konstanta hiperinsulinemija postiže se konstantnim ubrizgavanjem insulina (15 pmol*kg⁻¹*min⁻¹). Infuzija 20% glukoze se primenjuje za održavanje euglikemije. O primeni glukoznog Klamp-a kod životinja, neophodna su dodatna razmatranja, posebno za glodare.¹⁷ Za razliku od ljudi, glodari nemaju stvarno fiziološko stanje gladovanja. Nametanje nefiziološkog stanja gladovanja dovodi do značajnog smanjenja telesne težine, smanjenje prisustva glikogena u jetri, a poboljšava se osetljivost na insulin. Prema tome, pod tim nefiziološkim gladovanjem, glukoza i nivo insulina u plazmi ne mogu postići stabilno stanje. Upravo iz ovih razloga upotreba tehnike glukoznog Klamp-a kod glodara nije najpouzdanija i precizna kao kod ljudi. Glodari imaju vrlo mali volumen krvi (oko 2 ml kod miševa). Prema tome, ograničena mogućnost uzorkovanja otežava postizanje i rigorozno proveravanje stabilnog stanja kod glukoznog Klamp-a (pogotovo u odnosu na nivo insulina). Osim toga, glukozni klamp je veoma stresnan za miševе (čak i ako se izvodi pod anestezijom). Zbog toga što su „klamp-tehnike“ zahtevne za izvođenje i pre svega skupe, ovi testovi nisu našli široku primenu u praksi, i koriste se uglavnom u eksperimentalne svrhe.⁶

Intravenski testovi tolerancije na glukozu-GTT (glukoza tolerans test) i ITT(insulin tolerans test) – Kod visokomlečnih krava, znatno češće za procenu insulinske rezistencije se koriste intravenski testovi tolerancije na glukozu (GTT) i testovi tolerancije na insulin (ITT), koji se ujedno smatraju „srebrnim standardom“.^{3,102,103,104} Tokom izvođenja GTT specifična količina

rastvora glukoze odgovarajuće koncentracije se intravenski aplikuje recipijentima. To dovodi do naglog porasta glikemije, što je praćeno pojačanom sintezom i lučenjem insulina u krvotok. Nakon dostizanja maksimalnih vrednosti (pika), koncentracije glukoze i insulina se postepeno smanjuju i na kraju stabilizuju na početne (bazalne) vrednosti. Za procenu funkcionalne aktivnosti β -ćelija pankreasa, insulinski odgovor na akutnu aplikaciju glukoze se procenjuje na osnovu vrednosti pika, površine ispod krive (AUC) i brzine eliminacije (ER) i/ili vremena potrebnog za dostizanje polovine vrednosti pika koncentracije insulina (T1/2). Koristeći iste karakteristike dinamike kretanja krive glukoze u GTT, procenjuje se stepen osetljivosti na insulin i/ili utilizacije glukoze u perifernim tkivima.¹⁰⁵ Tokom izvođenja ovih testova može se pratiti i dinamika promene koncentracije NEFA u krvi.^{106,107} Za razliku od „klamp-tehnika“, rezultati prikupljeni u GTT testu nisu jednostavni za interpretaciju. Teško je razgraničiti da li je pojačan stepen uklanjanja glukoze iz krvi posledica pojačanog korišćenja glukoze ili smanjenja njene produkcije. U ovakvim slučajevima se molarni odnos koncentracija glukoze i insulina u krvi ili odnos njihovih brzina uklanjanja smatra pouzdanijim indikatorom tolerancije na glukozu (insulinske rezistencije), nego sama vrednost stepena uklanjanja glukoze iz krvi.^{108,109}

Jedno od ograničenja GTT testa je što nije moguće razgraničiti tip insulinske rezistencije, odnosno u kojoj meri stepen uklanjanja glukoze iz krvi oslikava senzitivnost tkiva na insulin, a u kojoj meri veličinu insulinskog odgovora.^{100,105}

RQUICKI indeks (Revised Quantitative Insulin Sensitivity Check Index) – Danas se RQUICKI indeks smatra relevantnim parametrom za procenu stepena insulinske rezistencije, odnosno osetljivosti perifernih tkiva na insulin kod krava.⁶⁰ Ovo je matematička formula koji se koristi za ispitivanje homeostaze energetskog bilansa i objedinjuje ispitivanje koncentracije glukoze, insulina i NEFA. RQUICKI indeks se izračunava na osnovu bazalnih vrednosti (0. minut testa) za koncentraciju glukoze (Gb), insulina (Ib) i neesterifikovanih masnih kiselina (NEFAb) u krvi, a uz pomoć formule: $RQUICKI = 1 / [\log(\text{glukoza}_0) + \log(\text{insulin}_0) + \log(\text{NEFA}_0)]$. U veterinarskoj medicini ne postoje granične vrednosti RQUICKI indeksa za pojedine uzrasne i proizvodno-reproduktivne kategorije goveda, kao što je to slučaj za neke indekse za procenu insulinske rezistencije u humanoj medicini. Stoga, uopšteno se uzima, da niže vrednosti RQUICKI indeksa ukazuju na veću insulinsku rezistenciju, a ukoliko je dobijena vrednost veća, onda je osetljivost perifernih tkiva na insulin bolja.

HOMA-IR (Homeostasis model assesment) – HOMA je jednostavna metoda za procenu funkcije beta ćelija pankreasa i stepena metaboličke insulinske rezistencije iz bazalnih vrednosti glukoze i koncentracije insulina.¹¹⁰ Međutim, validnost ovih surogata u odnosu na merenje glukoznim Klamp-om nisu opsežno sprovedene kod životinja. Svi surogat indeksi oslanjaju se na pretpostavku da su glukoza i insulin u krvi predstavljeni u bazalnom stabilnom stanju. Dakle, surogat vrednosti dobijene kod glodara ne mogu biti precizne kao i kod ljudi. To je vidljivo iz korelacija između surogata i procene osetljivosti na insulin glukoznim Klamp-om kod pacova.¹¹¹

2.5 Metaboličke promene u peripartalnom periodu kod krava

Peripartalni period predstavlja veoma kritičnu fazu u produktivnom životu krava. Ovaj period karakterišu promene, koje mogu imati ključni uticaj na zdravstveno stanje, produkciju mleka, ekonomičnost a samim tim i rentabilnost proizvodnje. Početak laktacije karakteriše znatno povećanje energetske potrebe. Celokupan metabolizam krave se adaptira na početak laktacije. Međutim, problem se javlja u ovom periodu zato što krave ne mogu unositi neophodne količine hrane, usled čega se javlja negativan energetski bilans. Negativni energetski bilans se javlja upravo zato što je količina unete hrane znatno manja od laktacionih potreba. Ova pojava je naročito izražena kod krava, koje su selekcionisane na visoku proizvodnju mleka, kao što su krave holštajn-frizijske rase. Kod njih je izuzetno naglašena potreba za održavanjem laktacije u odnosu na ostale potrebe organizma.¹¹³ U toku graviditeta dolazi do postepenog smanjenja unosa hrane. Za svaku nedelju graviditeta uzimanje hrane opada za 1,53% (0,17kg), sve do tri nedelje pre teljenja. Nova istraživanja ukazuju da se ovo smanjenje u količini unete hrane nastavlja i nakon teljenja.¹¹⁴ Kao posledica negativnog energetskog bilansa, dolazi do generalizovane mobilizacije masti iz telesnih depoa usled povećane proizvodnje mleka i smanjenog apetita. Telesne rezerve masti se koriste da se nadoknadi nastali energetski deficit u tom periodu.

Osnovne promene u metabolizmu ugljenih hidrata i masti u peripartalnom periodu su: snižena koncentracija glikemije, povećanje glukoneogeneze, smanjena potrošnja glukoze u perifernim tkivima, normalna ili snižena upotreba acetata, povećana lipidna mobilizacija iz masnih depoa uz povišenu koncentraciju neesterifikovanih masnih kiselina i njihovu povećanu upotrebu u perifernim tkivima.¹ U osnovi svih ovih procesa su brojne endokrine adaptacije. To su pre svega: povišena koncentracija kortizola (koja pomaže lipomobilizaciju i glukoneogenezu),

povišena koncentracija hormona rasta (koja omogućuje povećanu upotrebu hranljivih materija u mlečnoj žlezdi i dovodi do pada osetljivosti na insulin), snižena koncentracija insulina (koja nastaje zbog smanjenog unosa hrane i umanjene receptorske osetljivosti) i snižena koncentracija IGF-I (zbog sniženog anaboličkog efekta hormona rasta u perifernom tkivu krava uprkos njegovoj povišenoj koncentraciji).

Ove metaboličke promene omogućavaju da glukoza (energija) bude preusmerena ka plodu i mlečnoj žlezdi. U ovom periodu periferna tkiva povećano koriste masti kao izvor energije. Da bi zadovoljila potrebe za glukozom, jetra troši rezerve glikogena. Kao posledica povećanog metabolisanja masti, stvaraju se i akumuliraju ketonska tela i trigliceridi. U peripartalnom periodu raste koncentracija oksitocina i estradiola i drugih polnih hormona, koji omogućuju ponovnu aktivaciju jajnika. Smanjena osetljivost na insulin i homeoretsko delovanje hormona raste, uz povećanu koncentraciju neesterifikovanih masnih kiselina i ketona dovode do smanjenog apetita kod krava.¹¹⁵ Sve ove metaboličke adaptacije nastaju u cilju podrške laktaciji. Sve hranljive materije se usmeravaju ka mlečnoj žlezdi. Mlečna žlezda koristi glukozu za proizvodnju laktoze, mlečnog šećera, koji je higroskopan, te povećava volumen proizvedenog mleka. Proces stvaranja mlečnih proteina se odvija upotrebom amino-kiselina iz krvi. Masne kiseline utiču na proizvodnju mlečne masti. Negativan energetski bilans kod krava dovodi do povećane koncentracije mlečne masti (zbog povećanog korišćenja masnih metabolita iz krvi) i snižene koncentracije proteina (zbog manjka energije i nedostatka prekursora za proizvodnju dovoljne koncentracije proteina).¹¹⁶ Optimalno snabdevanje vimena glukozom je neophodno za perzistentnu proizvodnju mleka. Kada bi se glukoza povećano trošila za potrebe perifernog tkiva, kao što je slučaj prilikom toplotnog stresa kod krava, došlo bi do znatnog smanjenja u proizvodnji i kvalitetu mleka.¹¹⁷ Mlečna žlezda ima prioritet prilikom upotrebe glukoze u organizmu krava, obzirom da je glukoza značajan prekursor laktoze. Mlečna žlezda u peripartalnom periodu povećano troši glukozu, jer poseduje receptore, koji su insulinnezavisni u procesu usvajanja glukoze u ćelije, u odnosu na ostalo periferno tkivo, koje je bogato insulinzavisnim receptorima čija gustina u laktaciji opada.^{4,118} Upravo je ovo uzrok za nastanak svih adaptacionih procesa, koji su prisutni u peripartalnom periodu. Rađena su istraživanja u kojima restrikcija hrane u periodu zasušenosti, nije pokazala uniformne rezultate. Izvođeni su ogledi u kojima restrikcija pokazuje pozitivan efekat na postpartalni unos hrane, proizvodnju mleka i metaboličku adaptaciju, međutim, u mnogim ogleđima su dobijeni suprotni rezultati.^{39,119}

Restrikcija hrane u periodu laktacije dovodi do pada u proizvodnji mleka i povećane lipidne mobilizacije. Nastaje ketogeneza uz pad koncentracije glukoze i promenjena senzitivost na insulin. Stadijum laktacije i mlečnost značajno utiču na adaptacionu sposobnost krava prilikom restrikcije hrane u toku laktacije.¹²⁰

Rezistencija na insulin je u humanoj populaciji okarakterisana metaboličkom acidozom, hiperglikemijom, smanjenom tolerancijom na glukozu, glukozurijom, ketonemijom, ketonurijom, pojačanom diurezom, hipovolemijom, dehidracijom, polidipsijom i depresijom centralnog nervnog sistema.⁹⁵ Većina ovih poremećaja je uočena i kod preživara u uslovima indukovane ili spontane hepatične lipidoze (masne jetre).^{96,97,98} Zapaženo je da su činioci odgovorni za nastanak insulinske rezistencije kod ljudi, isti ili slični onima, koji se dovode u vezu sa nastankom masne jetre i ketoze kod preživara. Ovi činioci uključuju kasni graviditet, gojaznost, hiperinsulinemiju, ishranu lipidima, hiperlipidemiju, pothranjenost, hormonalnu konstelaciju, genetske faktore i inflamaciju.

Peripartalni period karakteriše negativan energetske bilans, potrošnja masti u energetske svrhe perifernog tkiva i potrošnja glukoze za potrebe vimena i proizvodnju mleka. Sve ovo uslovljava pad koncentracije glukoze i povećanje koncentracije neesterifikovanih masnih kiselina (NEFA). Preterana upotreba neesterifikovanih masnih kiselina dovodi do stvaranja ketonskih tela u jetri dok se u krvi povećava koncentracija beta hidroksibutirata (BHB).

Metabolički pokazatelji lošeg energetskeg statusa krava su: snižena koncentracija glukoze, povišena koncentracija NEFA i povišena koncentracija BHB. Ovakav metabolički profil karakterističan je za peripartalni period kod krava, pri čemu se kod većeg broja krava ovi parametri nalaze znatno preko referentnih vrednosti.¹²¹ Glukoza, NEFA i BHB su u korelaciji sa negativnim energetskeg bilansom tokom perioda laktacije. Hipoglikemija kod krava nastaje usled smanjenog unosa hrane i povećanog usmeravanja glukoze ka mlečnoj žlezdi i gravidnom uterusu.¹²² Vrednost glikemije pokazuje tendenciju akutnog pada u periodu oko partusa. Na početku laktacije potebe za glukozom se povećavaju. Smatra se da hranom krave mogu podmiriti oko 10% svojih potreba za glukozom, pa samim tim glukoneogeneza predstavlja ključni mehanizam održavanja glikemije u organizmu krava.¹ Homeoretsku adaptaciju metabolizma glukoze u laktaciji predstavlja porast hepatične glukoneogeneze. U prepartalnom periodu propionat, laktat, alanin i glicerol u velikoj meri imaju uticaj na proizvodnju glukoze u jetri.

Propionat vodi poreklo iz reakcija ruminalne fermentacije, laktat iz Korijevog ciklusa, aminokiseline potiču od katabolizma proteina, dok glicerol potiče iz katabolisanog masnog tkiva. U peripartalnom periodu njihovo učešće je sledeće: propionat u neto proizvodnji glukoze učestvuje 50-60%, amino-kiseline učestvuju 20-30%, laktat 15-20%, dok glicerol učestvuje 2-4%.¹²³ Intravenskom aplikacijom propionata kod zdravih krava nastaje višestruki porast koncentracije glukoze (2-2,5puta) kod zdravih krava u prvom satu nakon intravenske aplikacije. Kod nekih bolesti krava u kojima biva zahvaćena jetra, kao što je to slučaj kod ketoze, dolazi do značajno slabije produkcije glukoze. Upravo ovo, ukazuje na značaj jetre u glukoneogenetskom procesu.¹²⁴ Upravo iz ovog razloga aplikacija propionata može biti od velike pomoći u optimizaciji metabolizma u peripartalnom periodu.³⁷

U peripartalnom periodu koncentracija glukoze obrnuto je proporcionalna koncentraciji NEFA i BHB. Neesterifikovane, slobodne masne kiseline su u cirkulaciji prisutne u vidu kompleksa sa albuminima. Predstavljaju alfa-lipoproteinsku frakciju. NEFA se sastoji od 12 slobodnih masnih kiselina. Među slobodnim masnim kiselinama su najzastupljenije palmitinska, stearinska, oleinska i linoleinska.¹²⁴ Merenjem protoka palmitinske kiseline utvrđeno je da krave u peripartalnom periodu mogu da mobilišu i do 2,9 kg masti.¹²⁵ Obezbeđivanje masnih kiselina kao izvora energije predstavlja najznačajniji homeoretski mehanizam u ranoj laktaciji. NEFA u krvi uglavnom vode poreklo iz lipidne mobilizacije koja nastaje u procesu katabolizma masnog tkiva, koja se javlja usled endokrinih izmena i smanjnog unosa hrane. Smanjen unos hrane sam po sebi nije dovoljan da pokrene postupak lipidne mobilizacije.¹²⁶ Neesterifikovane masne kiseline mogu da se metabolišu u svim tkivima, stim što je težište na jetri koja je centralni organ metabolizma. Metabolički procesi u kojima učestvuje NEFA su: a) potpuna oksidacija masnih kiselina do vode i ugljenik-4-oksida, b) delimična oksidacija do acetil koenzima A i sinteza ketonskih tela (BHB), c) formiranje triglicerida iz NEFA u procesu resinteze i njihov transport iz jetre putem VLDL lipoproteina, d) resinteza triglicerida u jetri, njihova akumulacija i masna degeneracija jetre. NEFA i BHB su slabo varijabilni i shodno tome pokazuju veliki dijagnostički značaj u proceni metaboličkog i zdravstvenog statusa krava. Koncentracija glukoze je srednje varijabilna vrednost, te shodno tome ima srednju vrednost u dijagnostici. Koncentracija NEFA preko 0.4 mmol/l odnosno 0.8 mmol/l u prvoj nedelji nakon partusa i koncentracija BHB veća od 1,2 mmol/l u prvoj i/ili drugoj nedelji nakon partusa češće je prisutna kod krava kod kojih su prisutne peripartalne bolesti. Koncentracija glukoze se nije pokazala kao statistički značajan

pokazatelj zdravlja i produktivnosti krava obzirom na njenu srednju varijabilnost. Njena orijentaciona vrednost ispod 2.3 mmol/l može da ukaže na nastanak različitih oboljenja.^{127,128,129,130} Adaptacioni kapacitet krava je u korelaciji sa glikemijom i koncentracijom NEFA u ranoj laktaciji. U slučaju da je koncentracija glukoze niska, intenziviraće se hipotalamo-hipofizni odgovor. Visoka koncentracija NEFA usloviće umanjen odgovor nadbubrega na ACTH. Sve navedene činjenice upućuju na zaključak da ovi metaboliti imaju uticaj na adaptacionu sposobnost krava u peripartalnom periodu.¹³¹

Izbalansirana ishrana kojom se obezbeđuje optimalna koncentracija proteina u obroku a potom i u telesnim rezervama veoma je značajna za održavanje zdravstvenog stanja, produktivnih i reproduktivnih karakteristika na odgovarajućem nivou. Proteini u peripartalnom periodu kod krava učestvuju u procesu obezbeđivanja glukoze procesom glukoneogeneze.¹²³ Unos proteina u peripartalnom periodu putem hrane mora biti usklađen sa laktacionim potrebama krava. Njihov deficit će dovesti do smanjenja u količini proizvedenog mleka. Deficit proteina može uticati i na proteinski sastav mleka. U perifernoj muskulaturi, koži i visceralnim organima intenzivira se proces mobilizacije glukoneoplastičnih aminokiselina i njihovog iskorišćavanja u jetri.¹ Glukoneogeneza se odvija u jetri, a osnovna modifikacija, koja omogućava iskorišćavanje amino-kiselina za potrebe glukoneogeneze je povišena aktivnost piruvat karboksilaze i povećana zastupljenost njene iRNK. Aktivnost fosfoenolpiruvat karboksilaze (PEPCK) i njene IRNK se takođe, povećava ali neznatno.¹³²

Detaljno ispitivanje proteinskog statusa krava zahteva veoma složenu metodologiju sa dreniranjem portalnog krvotoka i izračunavanjem fluksa metabolita kroz tkivo.¹³³ Utvrđeno je da je za optimalno iskorišćavanje proteina u organizmu neophodno optimalni prisustvo dugolančanih masnih kiselina. Povećano učešće endogenih dugolančanih kiselina kao što je NEFA ima negativan uticaj.^{98,134} Procena proteinskog statusa je znatno složenija od procene energetskog statusa kod krava u peripartalnom periodu. Teško je odvojiti uticaj energetskog bilansa od proteinskog bilansa zbog njihove zajedničke metaboličke veze. Kao indikatori za procenu proteinskog statusa koriste se: koncentracija ukupnih proteina, albumina, uree u krvi, aktivnost kreatin kinaze i koncentracija kreatinina.

Koncentracija uree zavisi od zastupljenosti proteina u hrani u odnosu na njihove potrebe, energetski sastav hrane, svarljivosti proteina i ugljenih hidrata u rumenu, aminokiselinskog sastava hrane, funkcionalnog statusa jetre i bubrega. Kod preživara, amonijak predstavlja glavni

proizvod razlaganja proteina unešenih hranom pod dejstvom mikroflora predželudaca. Mikroflora predželudaca unešene proteine razlaže preko aminokiselina do ketokiselina i amonijaka, koje koriste za sintezu svojih proteina. Da bi se stvoreni amonijak mogao iskoristiti, mikroorganizmi moraju biti snabdeveni dovoljnom količinom lako svarljivih ugljenih hidrata kao izvora energije. Višak amonijaka se kroz ruminalni zid transportuje u jetru gde se konvertuje u ureu, a ona putem krvi ponovo dospeva u rumen i koristi se za bakterijski rast ili se izlučuje putem bubrega.¹³⁵ Produkcija uree se vrši preko amonijaka u procesu metabolizovanja endogenih aminokiselina. Koncentracija albumina ukazuje na dostupnost proteina u dužem vremenskom periodu i pokazuje proteinski status u protekla 2-3 meseca. Obzirom da se proizvodnja albumina odvija u jetri, hipoalbuminemija u peripartalnom periodu može da se javi kao posledica opterećenog funkcionalnog kapaciteta jetre. Albumini čine većinski deo ukupnih proteina, pa se njihovim padom zapaža i pad ukupnih proteina.¹³⁶

Kod tek zasušenih krava kod kojih je prisutna proteinska deficijencija, vrednost uree će biti niska (<10mg/dl odn. 7,1 mmol/l) dok će koncentracija albumina biti normalna (>3.5 g/dl). Zasušene krave u peripartalnom periodu (tri nedelje pred teljenje) imaju nisku do srednju vrednost uree, nižu vrednost albumina i povišenu vrednost kreatin kinaze. Kod tek otečenih krava vrednost uree je niska kao i vrednost albumina (<2.5 g/dl). Koncentracija ukupnih proteina ispod 60g/l dovodi do povećanog rizika za nastanak peripartalnih bolesti.^{137,138}

Jetra predstavlja centralni organ adaptacije u peripartalnom periodu krava. U jetri se odvijaju sledeći procesi: 1) glikogenoliza u cilju potrošnje šećera za započinjanje laktacije; 2) glukoneogeneza, kako bi se iz nešećernih komponenti (masti-NEFA i proteina) stvorila dovoljna količina potrebne glukoze. Smanjena osetljivost jetre na STH, snižena koncentracija IGF-I i odsustvo negativne povratne sprege sa STH povećava koncentraciju STH i potencira njegovu homeoretsku ulogu značajnu za usmeravanje šećera i gradivnih materija ka vimenu, a masti ka jetri. Ovi procesi su često udruženi i dovode do ketoze krava i masne infiltracije jetre.^{1,139} Krave sa indukovanom ketozom imaju slabiji kapacitet za glukoneogenezu i slabiju aktivnost glukozo-6-fosfataze i piruvatkarboksilaze.^{140,141} U kliničkolaboratorijskom radu funkcionalni status jetre se ispituje kroz hepatogram. Hepatogram čini nekoliko jetrinih profila, koji zajedno čine neki od hepatičnih sindroma: sindrom zapaljenske reakcije (parametric krvne slike i protein akutne faze), sindrom bilijarne retencije (bilirubin, žučne kiseline, holesterol, AP, GGT), sindrom insuficijencije hepatocita (koncentracija albumina, koncentracija uree) i sindrom nekroze

hepatocita (alanin aminotransferaze (ALT), asparat aminotransferaze (AST), sorbitol dehidrogenaze (SDH), ornitin-karbamil transferaze (OCT), laktat dehidrogenaze (LDH), alkalna fosfataze (AP) i dr).¹⁴² Kod krava je u peripartalnom periodu povećana koncentracija bilirubina i aktivnost jetrinih enzima. Koncentracija triglicerida i koncentracija holesterola u serumu se smanjuje, kao posledica smanjene produkcije VLDL. Odnos koncentracije NEFA i holesterola se primenjuje kao indirektni pokazatelj masne infiltracije kod krava.¹⁴³ Vrednost mnogih metabolita je u korelaciji sa stepenom masne infiltracije kod krava.¹⁴⁴

U peripartalnom periodu dolazi do promena i u metabolizmu minerala. Najznačajnije je ispitivanje koncentracije kalcijuma (Ca), magnezijuma (Mg) i fosfora (P). Koncentracija Ca kod krava se kreće od 2.1 do 2.5 mmol/l. Međutim, u peripartalnom periodu kod krava dolazi do njegovog opadanja.¹²¹ Opadanje Ca nastaje usled povećane pasaže Ca jona u mleko. Da bi se obezbedila dovoljna koncentracija kalcijuma vrši se njegova mobilizacija iz kostiju. Mobilizacija Ca iz kostiju se odvija pod dejstvom paratireoidnih hormona (PTH). Vitami D deluje tako što povećava apsorpciju Ca iz intestinalnog trakta i smanjuje njegov gubitak kroz bubrege. Faktori koji utiču na homeostazu kalcijuma su: -alkaloza- dovodi do smanjenje osetljivosti koštanog tkiva na PTH, -hipomagnezija- redukuje odgovor PTH na hipokalcemiju i redukuje senzitivnost tkiva na PTH i - hiperfosfatemija- inhibira delovanje D vitamina. Fosfor koji se određuje u krvi je deo neorganskih fosfata. Koncentracija fosfora je od 1.3 do 2.6 mmol/l. Tokom hipokalcemije raste koncentracija PTH koja dovodi do povećanja ekskrecije fosfora. Zbog toga su hipokalcemične krave često i hipofosfatemične. Fosfor ima značajnu ulogu u regulisanju brojnih metaboličkih reakcija. Glavnu ulogu ima u metabolizmu ugljenih hidrata, putem formiranja heksozafosfata, adenzinofosfata i kreatinfosfata; zatim u metabolizmu masti, preko intermedijarnog formiranja lecitina, značajan je konstituent fosfolipida; prisutan je u nukleoproteinima i fosfoproteinima (kazein) a pomaže i u regulisanju acidobazne ravnoteže.¹⁴⁵ Hipokalcemija, hipomagnezija i hipofosfatemija imaju veliki klinički značaj u peripartalnom periodu. Hipokalcemija (manje od 2 mmol/l) i hipomagnezija mogu dovesti do mlečne groznice. Mlečna groznica se odlikuje hipersenzibilnošću, a potom ataksijom i paralizom. Mlečnu groznicu prati prestanak preživljanja i razvoj hipotermije. Javlja najčešće u prvih 24h nakon teljenja.¹⁴⁶ Hipokalcemija se dovodi u vezu sa mastitisom i metritisom, zbog značaja kalcijuma u funkcionisanju imunoloških ćelija.¹⁴⁷ Hipokalcemija dovodi do smetnji u funkcionisanju glatke muskulature digestivnih organa, pa zbog toga, često dolazi do dislokacije

sirišta.¹⁴⁸ Koncentracija kalcijuma ispod 1,8 mmol/l je značajan prediktivni faktor za rano isključivanje krava iz proizvodnje.¹⁴⁹ Hipokalcemija sprečava sekreciju insulina i iskorišćavanje glukoze u perifernom tkivu.¹⁵⁰ Ovakvo stanje povećava lipidnu mobilizaciju. Hipomagneziemija kod krava dovodi do razvoja tetaničnih grčeva, koji su poznati kao pašna tetanija. Grčevi se javljaju kao posledica nedovoljnog unošenja Mg putem zelene trave. Klinički simptomi se mogu zapaziti kada je koncentracija Mg ispod 0.5 mmol/l, uz prisustvo hipokalcemije. Smanjen unos hrane i promene u proizvodnji mleka se vide kada je koncentracija Mg ispod 0.8 mmol/l.¹⁴⁵ Koncentracija fosfora značajno utiče na odgovor krava na terapiju tokom mlečne groznice tako što hipofosfatemija (koncentracija P niža od 0.9 mmol/l) umanjuje terapijski efekat.¹⁵¹ Kod mnogih krava koncentracija fosfora može biti u suboptimalnim koncentracijama, od 0.8 do 1.1 mmol/l, što može imati efekta na glikolizu i funkcionalni status eritrocita, i dovesti do hemoglobinurija.¹⁵² Insulin zavisno smanjenje koncentracije neorganskog fosfora nastaje kao posledica ulaska glukoze u glukolitičke puteve perifernih tkiva. Glukoza za sobom povlači i fosfor. Ovo je regulisano preko insulin-zavisne ekspresije gena za Na/P kotransporter.^{152,153} Kod krava kod kojih se javi ketoza, koncentracija neorganskog fosfora je niža.¹

2.6 Specifičnosti metabolizma i insulinske rezistencije kod pozitivnog i negativnog energetskeg bilansa

Pozitivan bilans energije – U srednjoj i kasnoj fazi laktacije energetske potrebe organizma su zadovoljene. Često se dešava da je u ovom periodu energetski priliv i veći od neophodnog, te se višak energije skladišti u telesnim depovima u vidu glikogena, masti i proteina.¹⁵⁴ Upravo iz ovog razloga se javlja pozitivan energetski bilans. Od sredine pa do kraja graviditeta se na membranama ćelija posteljice povećava ekspresija GLUT-1 i 3 molekula koji su insulin nezavisni te se na taj način povećava upotreba glukoze od strane fetusa, nezavisno od energetskeg statusa majke.¹⁵⁵ Na ovaj način fetus biva obezbeđen neophodnim količinama glukoze i aminokiselina koji su neophodni za rast i razvoj. Organizam majke svoje potrebe u energiji podmiruje korišćenjem slobodnih masnih kiselina i ketonskih tela. Obzirom da je aktivnost karnitinpalmitoiltransferaze-1 (CPT-1) smanjena, transport NEFA u mitohondrije je ograničen. Upravo zato je reesterifikacija i ponovna redistribucija putem lipoproteina vrlo male gustine (VLDL) dominantan metabolički put za metabolizam VMK u jetri.^{37,156} Smatra se da je u periodu

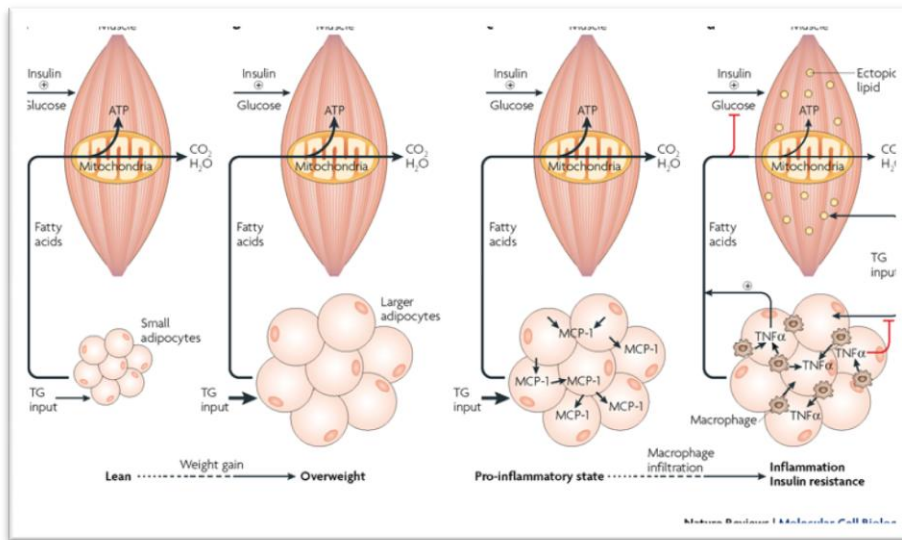
zasušenja kapacitet hepatocita za sintezu i sekreciju lipoproteina dovoljan kako bi se metabolizam VMK u jetri mogao nesmetano odvijati.

Dakle, pozitivan bilans energije karakterišu pojačana glikoneogeneza u jetri, smanjeno periferno korišćenje glukoze, nepromenjeno ili smanjeno korišćenje acetata, umerena mobilizacija MK iz telesnih depoa i povećano korišćenje MK u perifernom tkivu.²⁷ Obzirom da se kod krava u periodu zasušenja javlja pozitivan EB, treba imati u vidu mogućnost nastanka gojaznosti. Naime, kod gojaznih jedinki koje imaju veze sa insulinskom rezistencijom je zapažena povišena koncentracija fibrinogena, proinflammatoryh citokina, TNF-a, CRP, IL-6, inhibitora plazminogena-1(PAI-1).^{157,158,159} U slučaju gojaznosti, funkcija proinflammatoryh citokina se ogleda u inhibiciji adipocita, stimulaciji angiogeneze i potrošnji energije.^{160,161,162,163,164,165,166,167} Ovi procesi su veoma važni prilikom kontrole EB.

Kod gojaznih jedinki je povišena infiltracija makrofagima u masnom tkivu. Makrofagi vode poreklo od monocita i imaju funkciju u kontroli lokalne inflamatorne reakcije u tkivu. Masno tkivo infiltrirano makrofagima je znatno aktivnije od adipocita u proizvodnji TNF i drugih proinflammatoryh citokina.^{168,169,170,171} Citokini deluju tako što blokiraju insulinske signalne puteve u hepatocitima. IL-6 podstiče proliferaciju hepatocita što je veoma važno za njihovu regeneraciju.¹⁷² Kod gojaznih jedinki zapaža se mitohondrijalna disfunkcija. Disfunkcija se ogleda u vidu smanjenog broja mitohondrija, njihovoj gustini ili funkciji. Obzirom da mitohondrije imaju ulogu u oksidaciji i metabolizmu masnih kiselina i glukoze, njihova disfunkcija može dovesti do akumulacije lipida i razvoja insulinske rezistencije.^{173,174,175,176}

Insulinska rezistencija i gojaznost mogu se povezati kroz sledeće četiri faze: A. adipociti skladište trigliceride (TG) koji se mogu mobilisati i koristiti za proizvodnju ATP u mitohondrijama u procesu oksidacije, za potrebe mišićnog tkiva; B. usled pojačane ishrane, dolazi do metaboličkog preopterećenja. Pojačava se ulaz TG pri čemu se adipociti povećavaju kao posledica povećanog skladištenja TG. Proces oksidacije se održava i sprečava se IR; C. dalje preopterećenje sa TG dovodi do hipertrofije adipocita i pojačanog lučenja makrofaga pri čemu dolazi do sekrecije MCP1 od strane monocita, koji mobilišu dodatne makrofage; D. Infiltracija velikim brojem makrofaga koji luče veliku koncentraciju TNF-alfa dovodi do hroničnog inflamatornog stanja usled čega nastaje povećana lipoliza i depozicija TG. Višak TG dospeva u mišiće, gde ometa funkciju mitohondrija u kojima se vrši oksidacija i metabolizam MK i glukoze.

Smatra se da je višak ATP relevantan faktor rizika za nastanak insulinske rezistencije. Veruje se da suzbijanje proizvodnje ATP u mitohondrijama predstavlja ključni pristup u terapiji insulinske rezistencije (IR). Ova mogućnost je potkrepljena činjenicom da je većina lekova senzitivnih na insulin sposobna da inhibira proizvodnju ATP u mitohondrijama.¹⁷⁷ Isti mehanizam na IR je zapažen kod jedinki sa smanjenim energetske bilansom koja dovodi do smanjenja telesne mase, obzirom da se senzitivnost insulina povećava sa smanjenjem telesne mase tj. u slučajevima gde je višak energije manji.



Slika 2: Uticaj gojaznosti na nastanak insulinske rezistencije

Negativan bilans energije – Nakon teljena dolazi do porasta energetske potreba organizma te dolazi do narušavanja ravnoteže organizma i razvoja negativnog energetskeg bilansa (EB). U ovoj fazi veliki uticaj na količinu konzumirane hrane i unos energije imaju: telesna kondicija u momentu teljenja, puerperalne bolesti, kvalitet korišćenog hraniva i adaptiranost mikroflore buraga na njih.^{178,179} Dodavanje glikogenoplastičnih jedinjenja u obrok ublažava intenzitet negativnog EB obzirom da je upravo optimalna koncentracija glukoze ta koja je neophodna da bi se obezbedila adekvatna proizvodnja mleka u fazi rane laktacije.^{154,180} Da bi mlečna žlezda imala na raspolaganju dovoljnu koncentraciju glukoze, neophodno je da sva periferna tkiva (mišićno i masno) restriktivno koriste glukoze, da se intenzivira proces

glukoneogeneze u jetri i da se mobilišu energetske prekursori kao alternativni izviri energije iz telesnih depoa.

Intracelularni unos glukoze se odvija olakšanom difuzijom uz pomoć membranski vezanih transportnih molekula za glukozu (GLUT). Ovi molekuli su tkivno specifični. U mišićnom i masnom tkivu su najzastupljeniji insulin zavisni GLUT-tip 4 molekuli, dok su umlečnoj žlezdi, jetri, i tkivu fetusa najzastupljeniji insulin nezavisni GLUT-tip 1,2, i 3.^{181,182,183,184} Ekspresija ovih tkivno specifičnih molekula omogućava insulinu da kontroliše preraspodelu glukoze u celom organizmu.¹⁸⁴

Period nakon partusa karakteriše niska koncentracija insulina, koji se proizvodi od strane beta ćelija endokrinog pankreasa, što uslovljava smanjenu ekspresiju insulin zavisnog GLUT-4 molekula. Samim tim korišćenje glukoze od strane mišićnog i masnog tkiva se smanjuje a glukoza se ostavlja na raspolaganju insulin-nezavisnim tkivima.^{25,27,45,185} Niska koncentracija insulina u krvi povećava aktivnost triacil glicerol lipaze i inhibira ulazak NEFA, glicerola i glukoze u hepatocite tako što smanjuje aktivnost lipoprotein lipaze i ekspresiju GLUT-4 molekula.¹⁸⁶

Masne kiseline, koje dospeju do hepatocita podležu procesu oksidacije i razlažu se do acetil CoA u mitohondrijama ili se reesterifikuju i ponovo distribuiraju putem cirkulacije u vidu VLDL. I oksidacija i reesterifikacija mogu biti zaustavljene u slučaju velikog priliva masnih kiselina što je naročito slučaj u periodu rane laktacije, obzirom da je tad mobilizacija NEFA iz masnog tkiva izražena u velikoj meri. Proces oksidacije se može inhibirati i od strane malonil CoA, insulina i propionata. Malonil CoA inhibira transport NEFA do mitohondrija i ima ulogu pokazatelja energetskog statusa obzirom da predstavlja vezu između metabolizma propionata i MK. Upravo ovde leži razlog ograničenog transporta NEFA u mitohondrije u slučaju negativnog energetskog bilansa.

3. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je da se ispituju razlike u insulinskoj rezistenciji kod krava u zasušenju i ranoj laktaciji i ispita veza između pokazatelja insulinske rezistencije i parametara metaboličkog profila u ranoj laktaciji.

Postavljene su sledeće hipoteze:

-postoji značajna razlika u insulinskoj rezistenciji kod krava u ranoj laktaciji i zasušenju, zasnovana na razlikama u proizvodnji insulina, odgovoru insulina na glukozu kao i zbog različitog energetskeg bilansa krava

-krave sa izraženijom insulinskom senzitivnošću u zasušenju pokazuju izraženiju insulinsku rezistenciju u ranoj laktaciji zbog trošenja rezervi insulina

-postoji značajna veza između koncentracije insulina, glukoze, NEFA i QUICKI indeksa insulinske rezistencije kod krava u zasušenju i ranoj laktaciji

-postoji značajna veza između pokazatelja insulinske rezistencije i metaboličkog statusa krava u ranoj laktaciji

-ispitivanje mogućnosti da se rano tokom zasušenja prepoznaju krave koje mogu ući u veliku insulinsku rezistenciju u periodu rane laktacije, pa se na njih mora obratiti pažnja i uvesti posebne mere ishrane.

4.MATERIJAL I METODE

Krave i ishrana - Ogled je izvršen na 30 krava Holštajn-frizijske rase u drugoj i trećoj laktaciji, bez znakova poremećaja zdravlja, uz proizvodnju mleka 7500 ± 950 litara. Krave su gajene u slobodnom sistemu, na dubokoj prostirci, ali su u tranzicionom periodu bile u porodilištu, gde je postojao vezani sistem. Krave su hranjene miksovanim obrokom (TMR, total mixed ration) kojim se zadovoljavaju kompletne potrebe krava. U početku je u ogled bilo uključeno 40 krava, ali je 10 krava isključeno usled različitih peripartalnih problema (težak porođaj, inapetenca, ketoza, dugotrajno ležanje posle partusa, problem sa započinjanjem laktacije).

Uzorkovanje krvi – Krv je uzimana venepunkcijom *v.coccigea* kod krava u periodu pre jutarnjeg hranjenja, da bi se izbegao prandijalni efekat na vrednost metabolita. Krv je uzeta 4-6 nedelja pre teljenja (zasušenje) i 1-2 nedelje posle teljenja (rana laktacija). Uzorci krvi za ispitivanje biohemijskih parametara su sakupljeni u desetomililitarske epruvete sa gel separatorom (BD Vacutainer® SST II Advance, BD Plymouth, UK) koji u sebi sadrži silikon koji je aktivator koagulacije i gel koji predstavlja barijeru između koaguluma i seruma nakon centrifugiranja. Vakutajner epruvete sa gel separatorom su centrifugirane na min. 3500 obrtaja u trajanju od 10 minuta, da bi se u potpunosti izdvojio serum. Svaka vakutajner epruveta sa uzorcima krvi je obeležena zbog sledljivosti uzoraka, a potom i zaštićena od direktnog delovanja sunčeve svetlosti. Uzorci su postavljeni na suvi led i transportovani u laboratoriju.

Određivanje parametara u krvi – U uzorcima dobijenim tokom zasušenja određena je koncentracija glukoze, insulina, NEFA i izračunata je vrednost RQUICKI indeksa. U uzorcima krvi uzetim posle teljenja određena je vrednost parametara kao u zasušenju uz određivanje metaboličkog profila. Korišćene su fotometrijske reakcije i fotometar proizvođača *Rayto (RT1904c)*. Fotometriranje je vršeno prema specifikaciji proizvođača. Pre upotrebe svakog novog kita formirana je kalibraciona kriva, prema specifikaciji proizvođača. Korišćeni su standardni

kitovi proizvođača *Randox* (UK) i/ili *Pointe scientific* (USA). U kitovima su obezbeđene prečišćene i standardizovane hemikalije značajne za odvijanje reakcija, koje su opisane u daljem tekstu. Insulin je određen pomoću sendvič ELISA kita proizvođača Cusabio. Korišćen je ELISA čitač marke Rayto.

Neesterifikovane masne kiseline (NEFA) – Reakcija se zasniva na acilaciji koenzima A od strane masnih kiselina u prisustvu dodate acil-CoA sintetaze kao katalizatora. Acil-CoA se oksidiše pod dejstvom dodate acil-CoA oksidaze uz proizvodnju vodonik peroksida. Vodonik peroksid u prisustvu peroksidaze dozvoljava oksidativnu kondenzaciju 3-metil-N-etil-N(β-hidroksietil)-anilina (MEFA) sa 4-aminoantipirinom, što daje ljubičastu boju.

Betahidroksi-butirat (BHB) – Određivanje BHB se bazira na njegovoj oksidaciji do acetoacetata pomoću enzima 3-hidroksibutirat dehidrogenaze. Istovremeno sa ovim, kofaktor NAD^+ se redukuje do NADH, što dovodi do razvoja boje.

Glukoza – Određivanje glukoze vrši se posle njene enzimatske oksidacije u prisustvu glukoza-oksidaze. Dobijeni vodonik-peroksid u ovoj reakciji dalje reaguje sa 4-aminofenazonom i fenolom u prisustvu peroksidaze kao katalizatora. Dobija se crveno-ljubičasta boja čiji se intenzitet meri.

Holesterol – Holesterol se određuje posle enzimatske hidrolize holesterol estera pod dejstvom holesterol esteraze, a dobijaju se holesterol i masne kiseline. Izdvojeni holesterol se oksidiše pod dejstvom dodate holesterol-oksidaze, a formira se vodonik-peroksid. Vodonik peroksid reaguje sa fenolom i 4-aminoantipirinom pod dejstvom peroksidaze dajući obojeni kvinoneimin.

Trigliceridi – Trigliceridi se određuju enzimatskom reakcijom. Trigliceridi pod dejstvom lipaza daju glicerol i masne kiseline. Dobijeni glicerol sa ATP-om pod uticajem glicerol kinaze daje glicerol-3-fosfat, koji dalje oksidiše pod dejstvom dodate glicerol-3-fosfat oksidaze. Produkt ove reakcije je vodonik peroksid, koji sa 4-aminofenazonom i 4-hlorofenolom pod dejstvom peroksidaze daje obojeni kvinoneimin.

Ukupni bilirubin – Bilirubin vezan za proteine se najpre odvoji pod delovanjem deterdženata. Ukupni bilirubin reaguje sa 2,4-dihloroanilin-om u prisustvu hidrohlorne kiseline, dajući obojeni azobilirubin.

AST (Aspartat Aminotransferaza) je enzim koji katalizuje transfer amino-grupe sa L-aspartata na α -ketoglutarat, kada se dobija L-glutamat i oksalacetat. Oksalacetat sa NADH i H pod dejstvom malat-dehidrogenaze kao katalizatora daje obojeni L-malat i NAD^+ .

ALT (alanin Aminotransferaza) je enzim koji katalizuje transfer amino-grupe sa L-alanina na α -oksoglutarat, kada se dobija L-glutamat i piruvat. Piruvat sa NADH i H pod dejstvom laktat-dehidrogenaze kao katalizatora daje obojeni L-laktat i NAD^+ .

GGT (Gama-glutamilttransferaza) je enzim koji katalizuje reakciju između L- γ -glutamil-3-karboksi-4-nitroanilidin-a i glicilglicina, kada se dobija obojeni 5-amino-2-nitrobenzoat.

Ukupni proteini – Proteini u serumu reaguju sa bakarnim jonom i u alkalnom rastvoru daju ljubičasti bojeni kompleks. Intenzitet ljubičaste boje je proporcionalna koncentraciji proteina.

Albumini – Albumini vezani za bromkrezol zeleno daju intenzivno zeleno bojenje proporcionalno koncentraciji albumina.

Urea – Urea u vodi pod dejstvom ureaze daje amonijum jon i ugljenik-četiri oksid. Amonijum jon reaguje sa salicilatom i hipohloritom dajući kompleks zelene boje.

Kalcijum (Ca) – Kalcijumov jon daje ljubičasti kompleks sa O-krezolftalein kompleksom u alkalnoj sredini, na čemu se zasniva reakcija.

Fosfor (P) – Neorganski fosfor reaguje sa amonijum molibdatom u prisustvu sulfurične kiseline i formira obojeni fosfomolibdat kompleks, kada se meri kolorimetrijska reakcija.

Insulin – Određivanje koncentracije insulina vrši se pomoću sendvič ELISA metode. Antitela specifična za insulin nalaze se inkorporirani u sloj kojim je prekrivena mikrotitar ploča. Standard i uzorci bivaju pipetirani u polja. Inkubira se 2 sata na 37°C , a potom se odliva višak tečnosti iz svakog polja bez ispiranja. Zatim se u svako polje dodaju biotinom obeležena antitela i inkubira se 1 sat na 37°C . Po isteku vremena vrši se aspiracija i ispiranje tri puta. Dodaje se enzim HRP-avidin (Horseradish Peroxidase) i inkubira se 1 sat na 37°C . Aspirira se i pere 5 puta. Dodaje se TMB (tetrametilbenzidin) supstrat i inkubira 15-30 minuta na 37°C . U ovom periodu ploča se mora zaštititi od svetlosti, jer se razvija kolorimetrijska reakcija. Potom se dodaje stop rastvor (kiselina) i vrši očitavanje. Intenzitet boje zavisi od količine insulina, koja se vezala za antitela tokom inicijalnih koraka, te obeleženih antitela, koja su se potom vezala za insulin. Očitavanje se vrši u toku 5 minuta.

Izračunavanje indeksa insulinske rezistencije - Ispitivanje insulinske rezistencije određeno je pomoću tri indikatora insulinske rezistencije, a to je RQUICKI indeks: $RQUICKI = 1 / [\log(\text{glukoza mg/dL}) + \log(\text{insulin } \mu\text{U/mL}) + \log(\text{NEFA mmol/l})]$.

Statistika – Deskriptivnom statistikom određeni su pokazatelji distribucije frekvencije za sve ispitane parametre. Povezanost insulinske rezistencije u zasušenju i ranoj laktaciji ispitana je određivanjem korelacije i regresije između vrednosti insulina, glukoze, NEFA i RQUICKI u periodu zasušenja (AP – ante partum) i posle teljenja (PP-post partum). Izračunata je razlika u vrednosti ovih parametara u ranoj laktaciji u odnosu na zasušenje “delta vrednost” koja je takođe ušla u korelaciju. Utvrđena je korelacija između RQUICKI AP i RQUICKI PP da bi utvrdili da li povećana senzitivnost insulina u zasušenju znači i povećanu insulinsku rezistenciju u ranoj laktaciji. Utvrđeno je da li PP vrednosti nekog od sledećih pokazatelja insulinske rezistencije (insulina, glukoze NEFA i RQUICKI) zavisi od apsolutne vrednosti parametara u AP ili PP periodu ili zavisi od relativne promene vrednosti ovih parametara. Ispitana je korelacija i regresija između metaboličkih parametara i AP, PP i delta vrednosti za sve pokazatelje insulinske rezistencije.

Obzirom da je pretpostavka bila da krave koje su u zasušenju najsenzitivnije na insulin postaju najrezistentnije u ranoj laktaciji ispitano je da krave sa najvećim promenama u vrednostima RQUICKI, insulina, glukoze i NEFA (AP-PP razlika) imaju različitu metaboličku adaptaciju u odnosu na krave sa manje intenzivnim promenama ovih parametara. Jedan kriterijum je klasifikovao krave na osnovu promene u vrednosti RQUICKI indeksa tako da su najrezistentnije krave bile one kod kojih je postojala najveća promena u vrednosti RQUICKI indeksa (iznad 75 percentila vrednosti). Drugi kriterijum je vrednost insulina, glukoze i NEFA, koji ulaze u formulu za izračunavanje RQUICKI indeksa, pa su najrezistentnije krave bile one koje su imale najveći pad u vrednosti insulina i glukoze i najveći porast NEFA (iznad 75 percentila vrednosti minimalno za jedan parametar i iznad 50 percentila vrednosti za najviše dva parametra). Razlika u metaboličkim parametrima ispitana je pomoću t-testa.

Korišćen je statistički program *Statgraphic® centurion* (USA).

5.REZULTATI

5.1 Deskriptivna statistika za faktore insulinske rezistencije

Insulinska rezistencija je definisana koncentracijom insulina, glukoze, NEFA i RQUICKI indeksom. Ispitana je vrednost ovih parametara kod krava u zassušenju (AP-antepartum) i posle teljenja (PP-postpartum), a određene su vrednosti razlike ovih parametara u nedelji posle teljenja u odnosu na nedelju pre teljenja. Vrednosti metaboličkih parametara sa merama centralne tendencije i varijacije prikazane su u tabelama 1,2 i 3.

Vrednosti glukoze su bile $3,4\pm 0,35$: $2,42\pm 0,42$ mmol/l (glukozaAP:glukozaPP). Postoji statistički značajna razlika između ovih vrednosti, pa se može reći da je glikemija posle teljenja statistički značajno niža od glikemije pre teljenja ($p<0,01$) (Grafikon 1).

Vrednosti insulina u krvi su iznosile $17,27\pm 3,02$: $10,48\pm 2,33$ μ U/L (insulinAP:insulinPP). Postoji statistički značajna razlika između ove dve vrednosti, pa zaključujemo da je postojala značajno niža insulinemija u nedelji posle teljenja ($p<0,01$) (Grafikon 2).

Vrednosti NEFA su iznosile $0,19\pm 0,08$: $0,6\pm 0,18$ mmol/L (NEFAAP:NEFAPP). Utvrđena je statistički značajna razlika između ove dve vrednosti, pa zaključujemo da je koncentracija NEFA statistički značajno viša u nedelji posle teljenja ($p<0,01$) (Grafikon 3).

Vrednosti RQUICKI indeksa inulinske rezistencije iznosile su $0,44\pm 0,02$: $0,41\pm 0,03$ (RQUICKIAP:RQUICKIPP). Statistička analiza pokazuje da su krave imale nižu vrednost RQUICKI indeksa, odnosno da su pokazivale veći stepen insulinske rezistencije u periodu posle teljenja u odnosu na period zasušenja ($p<0,05$) (Grafikon4).

Relativne promene pokazatelja insulinske rezistencije prikazane su u Tabeli 3. Rezultati pokazuju da je kod krava posle teljenja došlo do opadanja glikemije za $0,99 \pm 0,54$ mmol/l, insulina za $6,79 \pm 4,43 \mu\text{U/L}$ i RQUICKI indeksa za $0,02 \pm 0,04$, dok je vrednot NEFA porasla za $0,42 \pm 0,23$ mmol/l.

Tabela1: Deskriptivna statistika za vrednost faktora insulinske rezistencije pre u zasušenju (AP)

	<i>GlukozaAP</i>	<i>InsulinAP</i>	<i>NEFAAP</i>	<i>RQUICKIAP</i>
Count	30	30	30	30
Average	3,407	17,2746	0,189333	0,44009
Standard deviation	0,351285	3,02021	0,083828	0,0230998
Coeff. of variation	10,3107%	17,4835%	44,2753%	5,24887%
Minimum	2,5	10,6875	0,08	0,4
Maximum	4,3	23,25	0,45	0,488726
Range	1,8	12,5625	0,37	0,0887264
Std. Skewness	-0,093689	-0,655685	3,80812	0,77184
Std. Kurtosis	2,83193	0,354282	3,96047	-0,157579

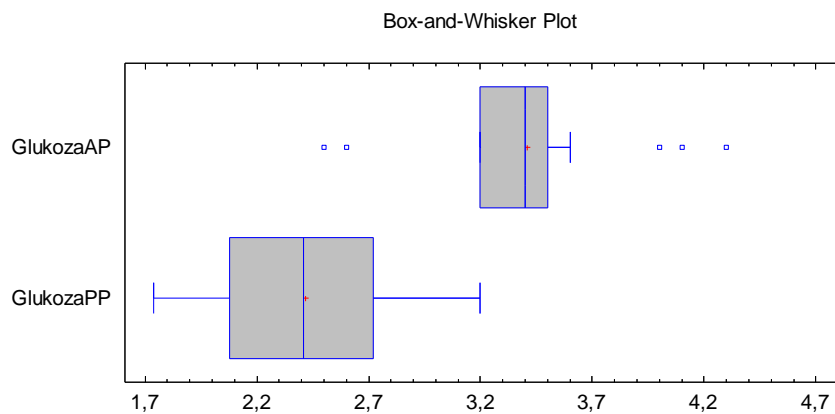
Tabela2: Deskriptivna statistika za vrednost faktora insulinske rezistencije pre posle teljenja (PP)

	<i>GlukozaPP</i>	<i>InsulinPP</i>	<i>NEFAPP</i>	<i>RQUICKIPP</i>
Count	30	30	30	30
Average	2,41767	10,479	0,604613	0,418
Standard deviation	0,423269	2,33232	0,182048	0,0292905
Coeff. of variation	17,5073%	22,2571%	30,1099%	7,00729%
Minimum	1,74	7,22	0,282555	0,36
Maximum	3,2	16,0	1,0925	0,49
Range	1,46	8,78	0,809945	0,13
Std. Skewness	0,589049	0,817431	1,98846	0,0773231
Std. Kurtosis	-0,799416	-0,773796	1,00468	0,19219

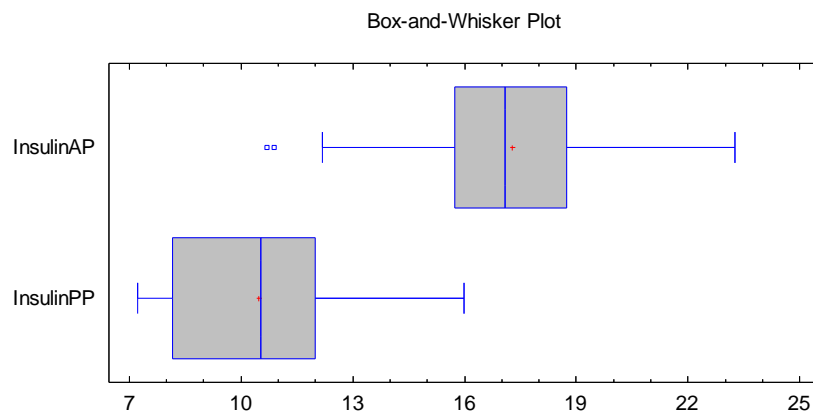
Tabela 3: Promena (delta) vrednosti faktora isnulsinske rezistencije posle teljenja u odnosu na period pre teljenja (iskazane kao apsolutne)

	<i>InsulinDelta</i>	<i>Glukozadelta</i>	<i>NEFAdelta</i>	<i>RQUICKIdelta</i>
Count	30	30	30	30
Average	6,796	0,989667	0,416	0,0216667
Standard deviation	4,43956	0,542488	0,233395	0,0437141
Coeff. of variation	65,3261%	54,8152%	56,1045%	201,757%
Minimum	-3,1	0,0	-0,02	-0,06
Maximum	15,28	2,14	0,98	0,11
Range	18,38	2,14	1,0	0,17
Std. Skewness	-0,595042	0,138012	0,969304	0,27076
Std. Kurtosis	-0,26301	-0,606137	0,209972	-0,853642

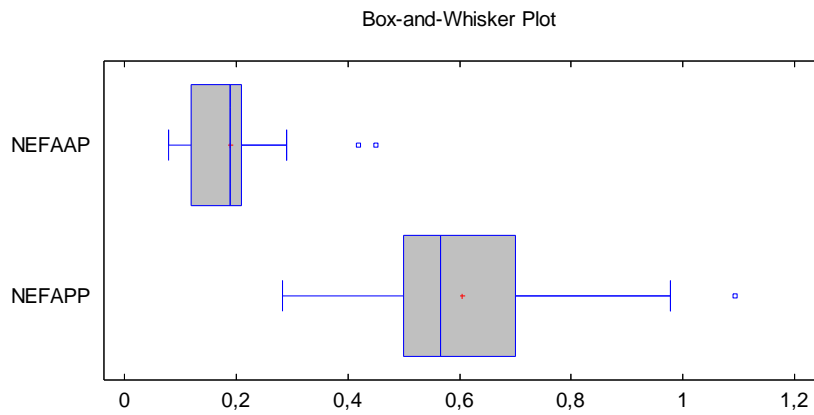
Grafikon 1: Koncentracija glukoze (mmol/l) u periodu zasušenja (AP) i posle teljenja (PP)



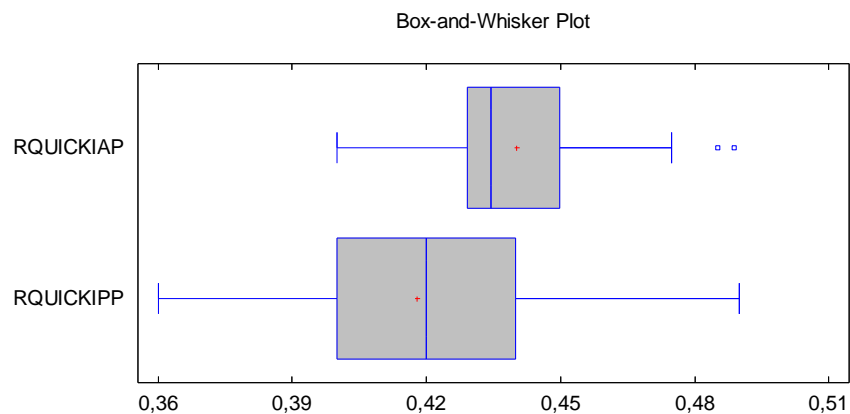
Grafikon 2: Koncentracija insulina ($\mu\text{U/L}$) u periodu zasušenja (AP) i posle teljenja (PP)



Grafikon 3: Koncentracija NEFA mmol/l u periodu zasušenja (AP) i posle teljenja (PP)



Grafikon 4: Vrednost RQUICKI indeksa insulinske rezistencije u periodu zasušenja (AP) i posle teljenja (PP)



5.2 Povezanost faktora insulinske rezistencije u zasušenju i posle teljenja

Međusobne korelacije sa ocenom statističke značajnosti između apsolutnih i relativnih faktora insulinske rezistencije prikazane su u Tabelama 4 i 5, a grafički je prikazan korelacioni matriks svih parametara na Grafikonu 5.

Rezultati istraživanja pokazuju da postoji negativna korelacija između RQUICKI indeksa insulinske rezistencije u zasušenju i periodu posle teljenja ($R^2=0,37$; $p<0,05$). To znači da što su krave bile senzitivnije na insulin u periodu zasušenja-pre teljenja, to im je bila jače izražena rezistencija na insulin posle teljenja (Grafikon 6).

Daljim ispitivanjem korelacije i regresije utvrđeno je da postoji čitav niz specifičnih razlika u insulinskoj rezistenciji u zasušenju pre teljenja i u ranoj laktaciji posle teljenja. U periodu zasušenja postoji pozitivna korelacija između vrednosti isnulina i RQUICKI indeksa, dok je ova korelacija negativna u ranoj laktaciji. U odnosu na vrednosti glukoze i NEFA, RQUICKI korelira negativno sa vrednostima glukoze, ali je ova korelacija približna nuli tokom zasušenja, dok je u ranoj laktaciji ona statistički značajna. To znači da će se stepen insulinske rezistencije

rasti što je glikemija niža, ali značajno većim intenzitetom u ranoj laktaciji. U odnosu na relaciju sa vrednostima NEFA, tu postoji sličnost, pa je i u periodu zasušenja i u periodu laktacije RQUICKI indeks negativno korelirao sa vrednostima NEFA. Viša vrednost RQUICKI indeksa u periodu zasušenja znači veći pad njegove vrednosti i veću rezistenciju posle teljenja. Svi rezultati su prikazani na Grafikonima 7-12.

Interesantne su i korelacije između AP i PP vrednosti faktora insulinske rezistencije kao i korelacije sa vrednostima relativnih promena. Što je veća koncentracija insulina u periodu pre teljenja to je niža njegova vrednost u periodu posle teljenja. Promena vrednosti glukoze (pad glikemije) je u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom glukoze u zasušenju, što znači da će kod krava sa višom glikemijom u zasušenju postojati intenzivniji pad vrednosti glukoze u periodu posle teljenja. Viša vrednost NEFA u zasušenju znači nižu vrednost u periodu posle teljenja, kao i manji intenzitet porasta vrednosti ovog metabolita u krvi. Utvrđeno je, takođe, da što su krave senzitivnije na insulin u periodu zasušenja (veća RQUICKI vrednost) imaće veći porast NEFA u periodu rane laktacije. Rezultati su prikazani na Grafikonima 13-15.

PP vrednosti nekog faktora insulinske rezistencije mogu biti determinisani pomoću višestruke (multiple) regresije u čiji sastav ulaze ostali faktori insulinske rezistencije. Tako je dobijeno da PP vrednost jednog od faktora signifikantno zavisi od PP i „delta“ vrednosti ostala tri faktora insulinske rezistencije. Uticaj AP vrednosti nije imao statistički značaj u determinaciji PP vrednosti faktora insulinske rezistencije. Rezultati su prikazani u Tabeli 6 i na Grafikonima 16-18.

Tabela 4: Korelacija između apsolutnih vrednosti i relativnih promena faktora insulinske rezistencije

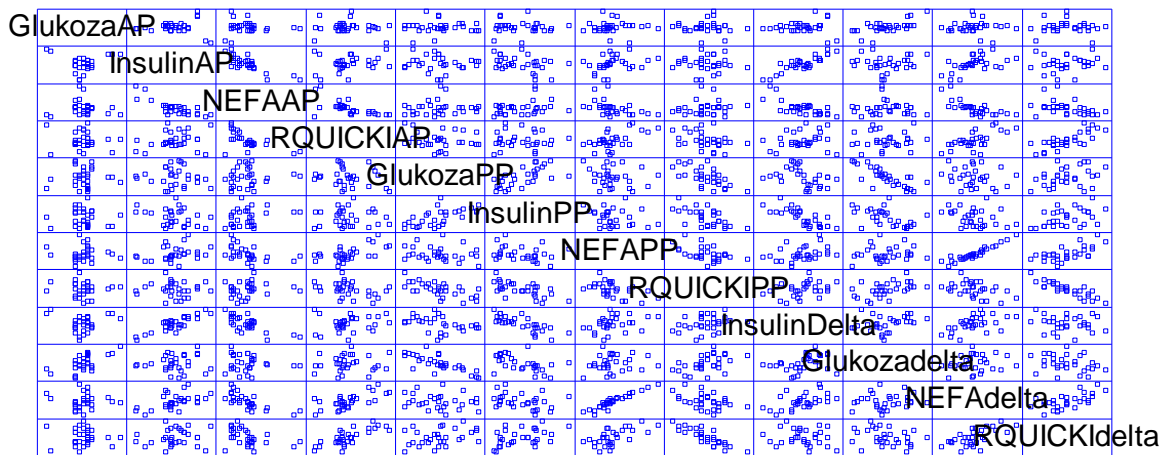
	Glukoza AP	Insulin AP	NEFA AP	RQUICK I AP	Glukoza PP	Insulin PP	NEFA PP	RQUICKI PP
InsulinAP	0,0102 ^a							
	0,9572 ^b							
NEFAAP	-0,0262	-0,8084						
	0,8908	0,0000*						
RQUICKIAP	-0,1024	0,2411	-0,5994					
	0,5903	0,1994	0,0005*					
GlukozaPP	0,0286	-0,0819	0,0913	-0,1397				
	0,8809	0,6670	0,6313	0,4615				
InsulinPP	-0,0293	-0,3654	0,3009	0,0045	0,6238			
	0,8780	0,0470*	0,1062	0,9811	0,0002*			
NEFAPP	-0,0199	0,2949	-0,4575	0,5871	-0,1938	-0,2550		
	0,9168	0,1136	0,0110*	0,0006*	0,3048	0,1739		
RQUICKIPP	-0,0375	-0,0100	0,1315	-0,365	-0,6395	-0,6204	-0,4877	
	0,8442	0,9583	0,4887	0,047*	0,0001*	0,0003*	0,0063*	
InsulinDelta	0,0224	0,8724	-0,7081	0,1617	-0,3833	-0,7739	0,3346	0,3190
	0,9066	0,0000*	0,0000*	0,3934	0,0365*	0,0000*	0,0707	0,0858
Glukozadelta	0,6252	0,0706	-0,0880	0,0423	-0,7622	-0,5060	0,1382	0,4752
	0,0002*	0,7110	0,6436	0,8243	0,0000*	0,0043*	0,4665	0,0080*
NEFAdelta	-0,0074	0,5224	-0,7203	0,6754	-0,1876	-0,3075	0,9463	-0,4274
	0,9691	0,0031*	0,0000*	0,0000*	0,3207	0,0983	0,0000*	0,0185*
RQUICKIdelta	-0,0280	0,1277	-0,3977	0,7679	0,3452	0,4453	0,6313	-0,8672
	0,8834	0,5013	0,0295*	0,0000*	0,0617	0,0137*	0,0002*	0,0000*

a-koeficijent korelacije, b-statistička značajnost, *- statistički značajna korelacija

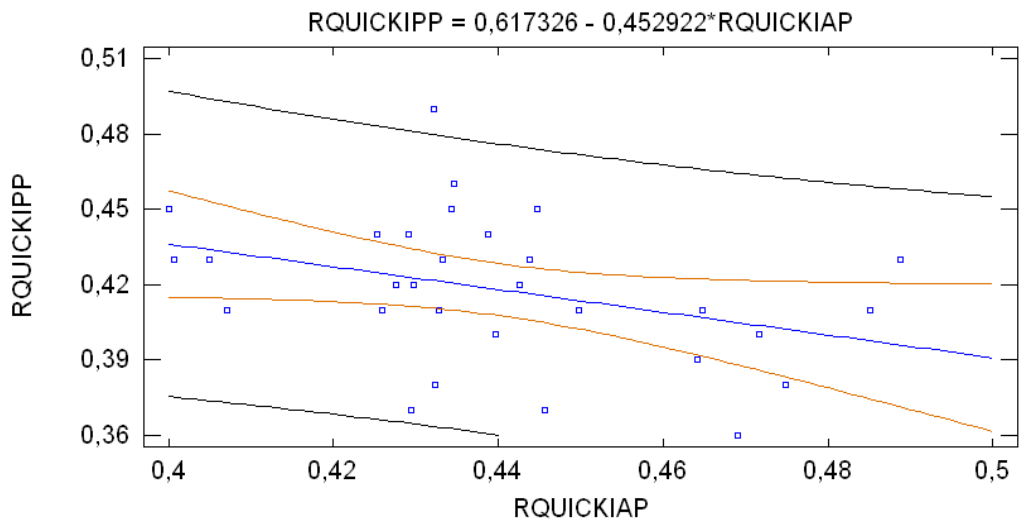
Tabela 5: Korelacija između relativnih promena faktora insulinske rezistencije

	Glukozadelta	NEFAdelta	RQUICKIdelta
InsulinDelta	0,3138	0,5170	-0,1470
	0,0913	0,0034	0,4383
Glukozadelta		0,1415	-0,2879
		0,4558	0,1229
NEFAdelta			0,6368
			0,0002

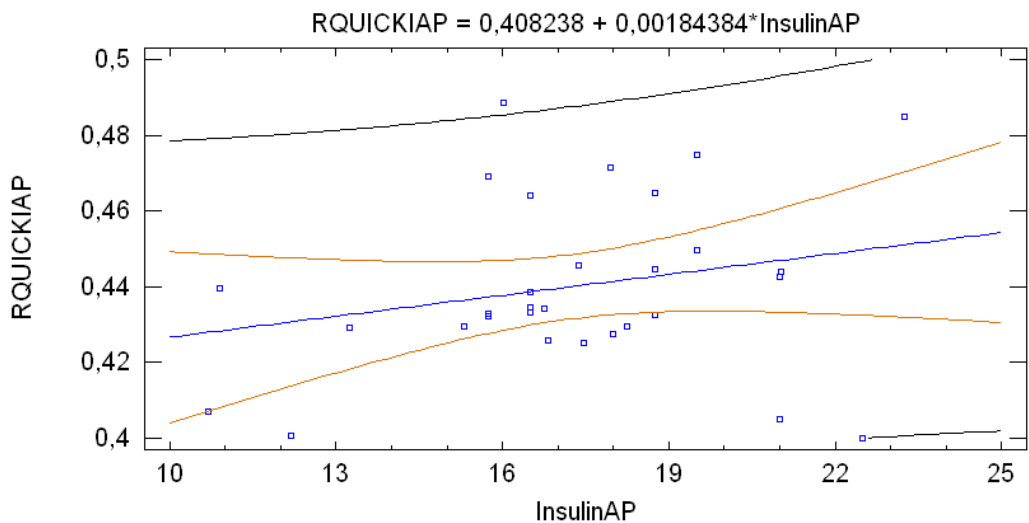
Grafikon 5: Grafički prikaz korelacionog matriksa svih ispitanih parametara insulinske rezistencije



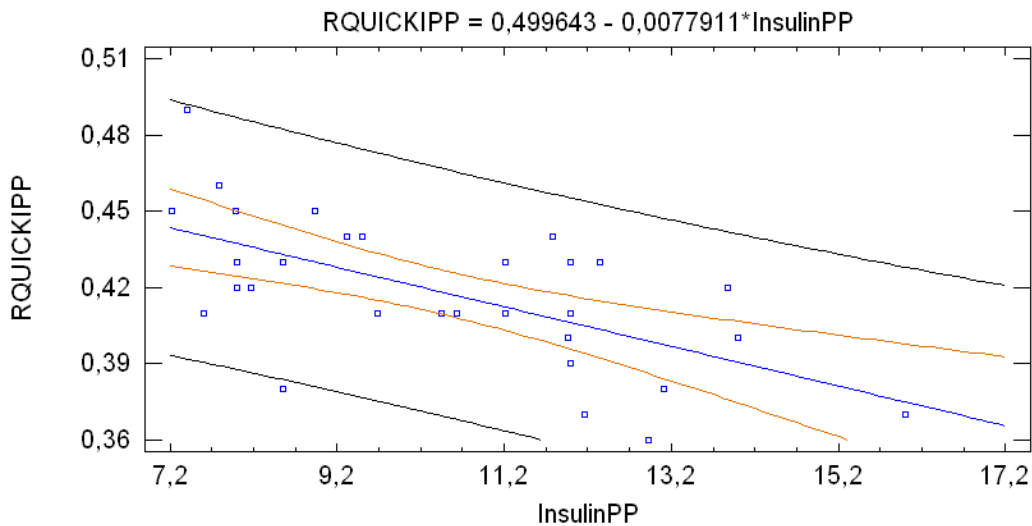
Grafikon 6: Korelacija i regresija između RQUICKIAP-pre teljenja i RQUICKIPP-po teljenju



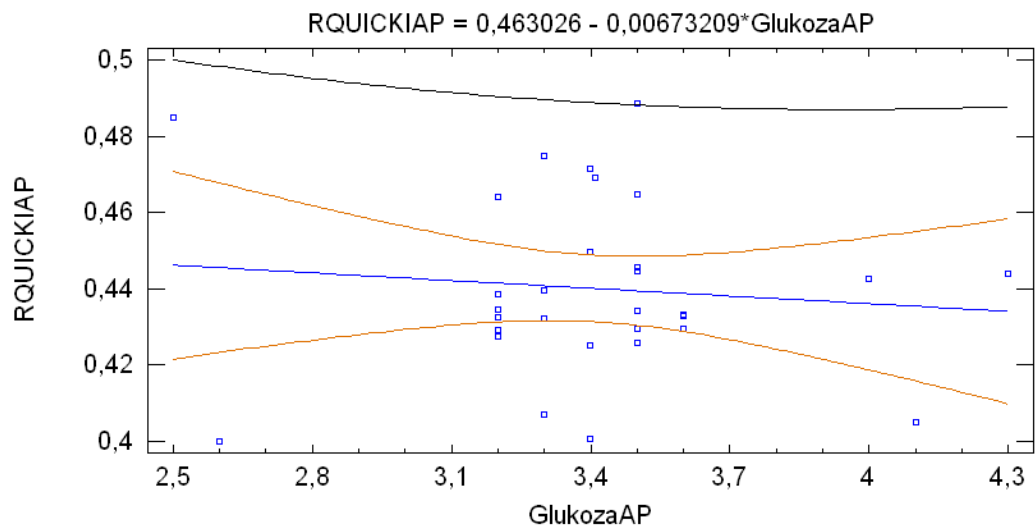
Grafikon 7: Korelacija i regresija između insulina AP i RQUICKIAP



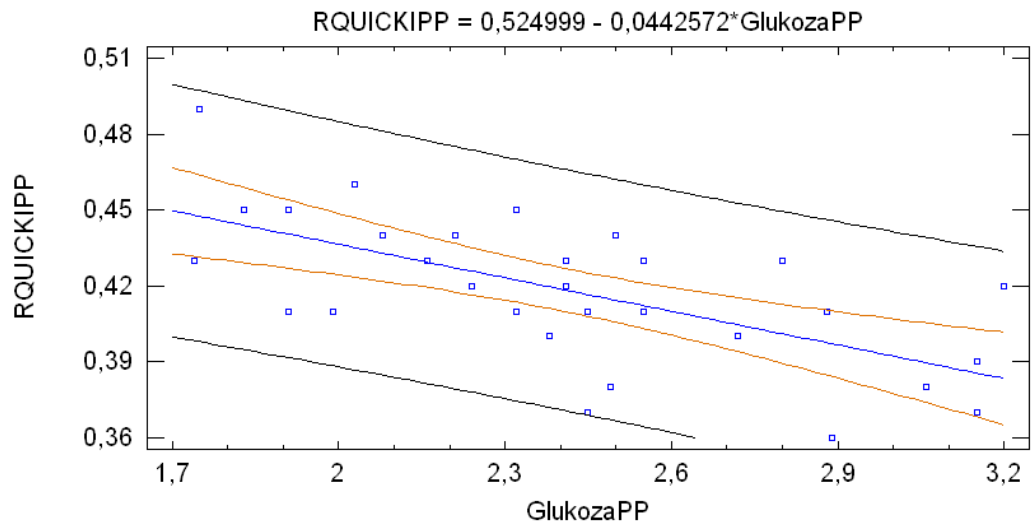
Grafikon 8: Korelacija i regresija između insulina PP i RQUICKIPP



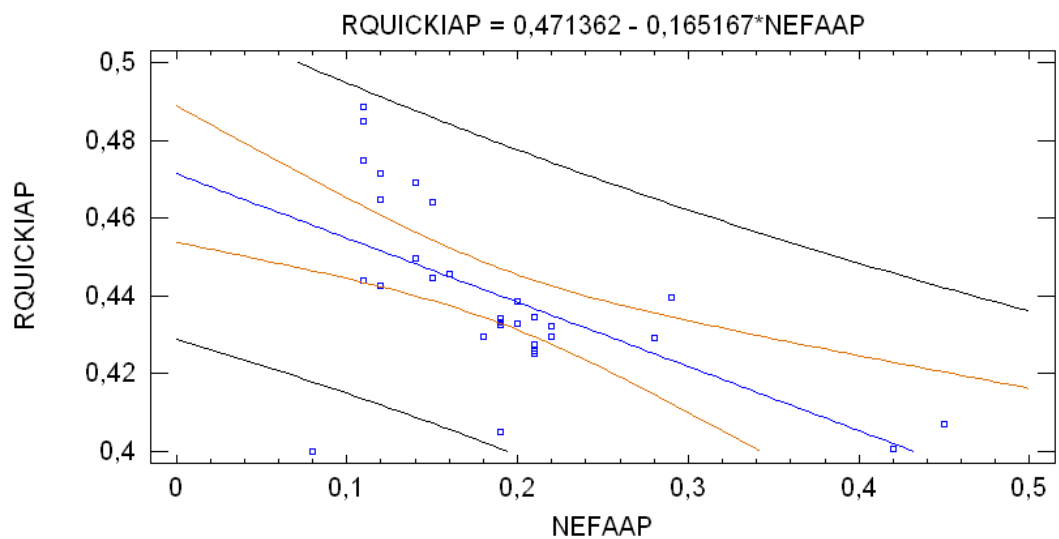
Grafikon 9: Korelacija i regresija između glukoze AP i RQUICKIAP



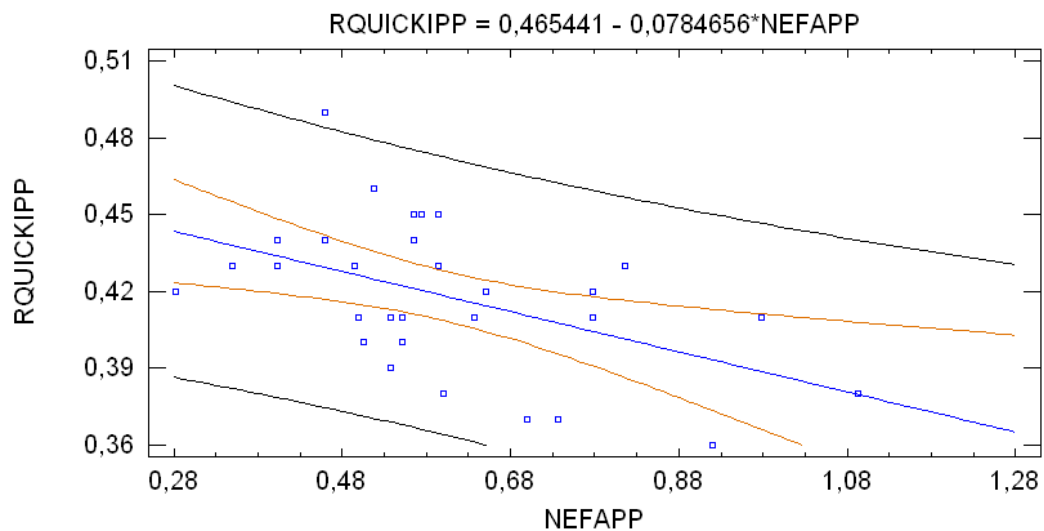
Grafikon 10: Korelacija i regresija između glukoze PP i RQUICKIPP



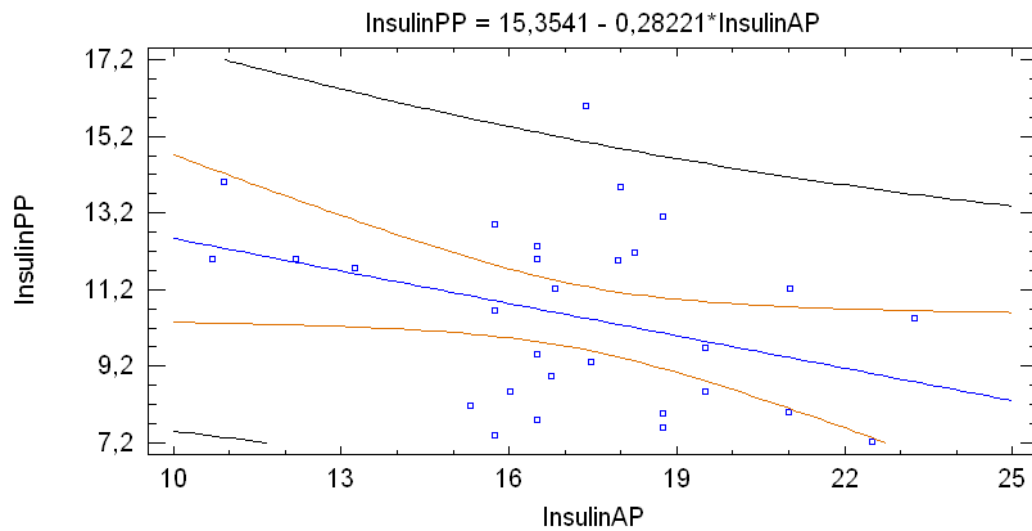
Grafikon 11: Korelacija i regresija između NEFAAP i RQUICKIAP



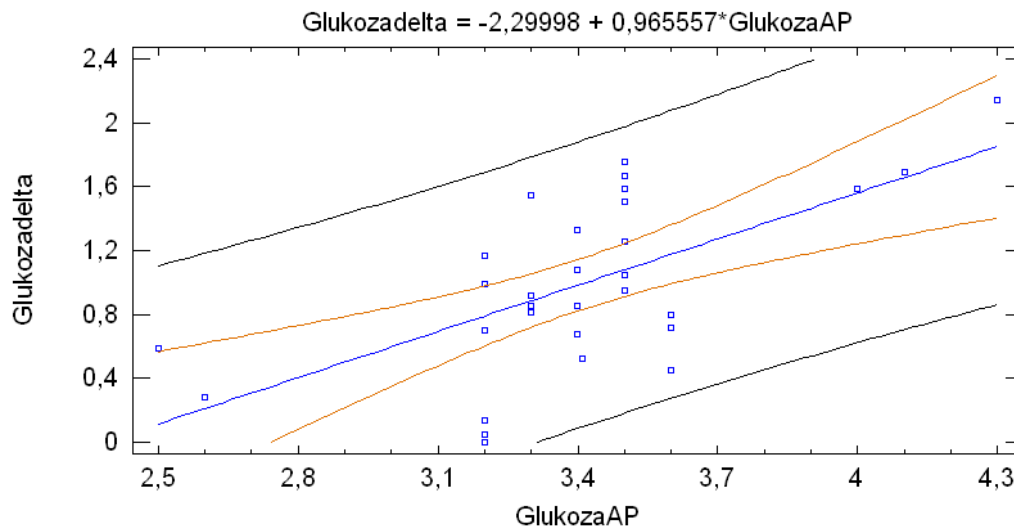
Grafikon 12: Korelacija i regresija između NEFAPP i RQUICKIPP



Grafikon 13: Korelacija i regresija između InsulinAP i InsulinPP



Grafikon 14: Korelacija i regresija između GlukozaAP i pad glukoze - Glukozadelta



Grafikon 15: Korelacija i regresija između RQUICKIAP i porasta vrednosti NEFA – NEFAdelta

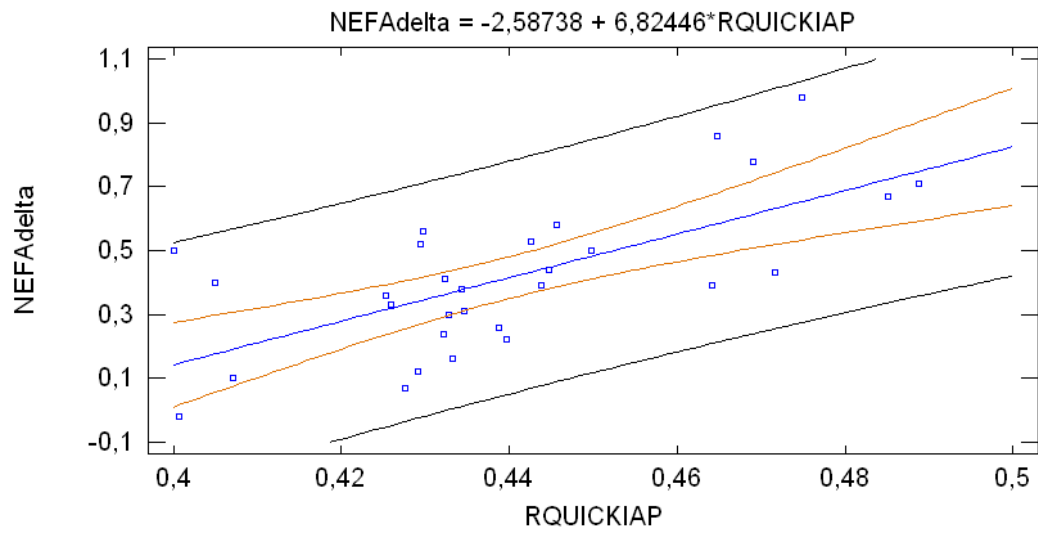
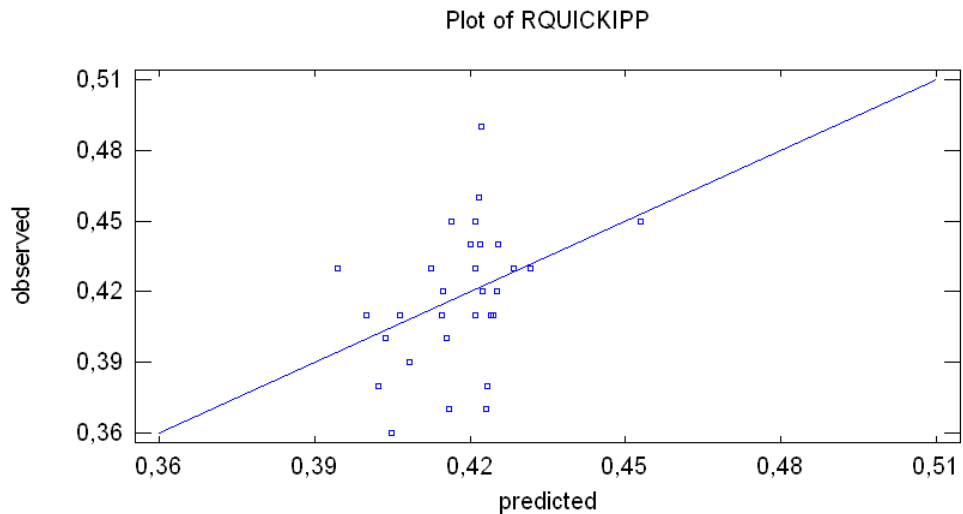


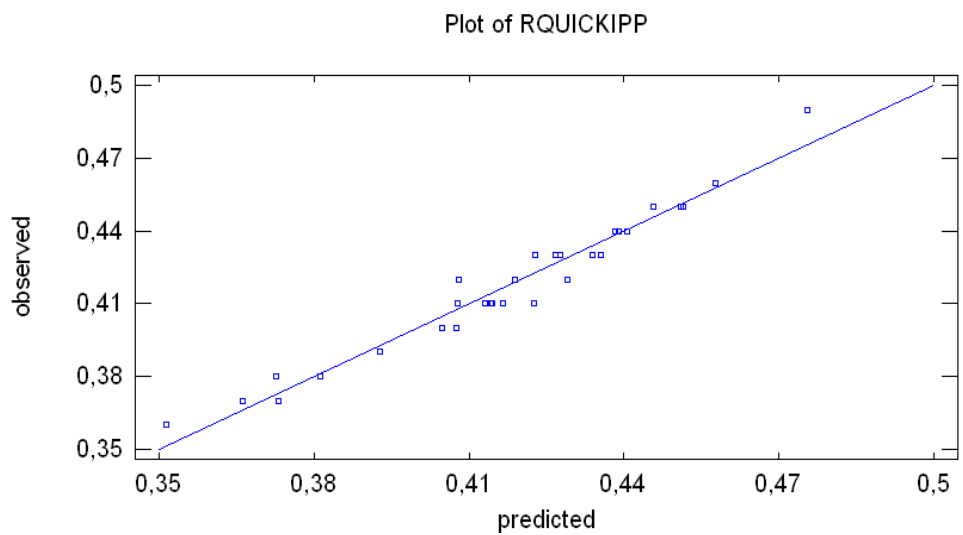
Tabela 6: Višestruka regresija – determinacija PP vrednosti pomoću AP, PP i delta vrednosti faktora insulinske rezistencije

	RQUICKI	
AP	$RQUICKIPP = 0,730538 - 0,00755085 * GlukozaAP - 0,000555772 * InsulinAP - 0,0701394 * NEFAAP - 0,599722 * RQUICKIAP$	$R^2=14,65$ $P=0,39$
PP	$RQUICKIPP = 0,630892 - 0,0313965 * GlukozaPP - 0,00650306 * InsulinPP - 0,113858 * NEFAPP$	$R^2=95,68$ $p<0,005$
delta	$RQUICKIPP = 0,413043 + 0,00146097 * InsulinDelta + 0,0124942 * Glukozadelta - 0,0180734 * NEFAdelta - 0,453164 * RQUICKIdelta$	$R^2=82,86$ $p<0,005$
	Insulin	
AP	$InsulinPP = 2,41225 + 0,00865953 * GlukozaAP - 0,157782 * InsulinAP + 7,29761 * NEFAAP + 21,3165 * RQUICKIAP$	$R^2=15,45$ $p<0,33$
PP	$InsulinPP = 76,9397 - 3,08361 * GlukozaPP - 14,1291 * NEFAPP - 120,725 * RQUICKIPP$	$R^2=87,21$ $p<0,005$
delta	$InsulinPP = 13,7062 - 0,160831 * InsulinDelta - 0,42928 * Glukozadelta - 6,24805 * NEFAdelta + 41,068 * RQUICKIdelta$	$R^2=82,24$ $p<0,005$
	Glukoza	
AP	$GlukozaPP = 4,45799 + 0,00802234 * GlukozaAP - 0,0220759 * InsulinAP - 0,759936 * NEFAAP - 3,50479 * RQUICKIAP$	$R^2=0,65$ $p<0,953$
PP	$GlukozaPP = 15,2591 - 0,125151 * InsulinPP - 2,71562 * NEFAPP - 23,6557 * RQUICKIPP$	$R^2=84,3$ $p<0,005$
delta	$GlukozaPP = 3,05275 + 0,013463 * InsulinDelta - 0,45518 * Glukozadelta - 0,92785 * NEFAdelta + 5,07144 * RQUICKIdelta$	$R^2=66,73$ $p<0,005$
	NEFA	
AP	$NEFAPP = -1,61577 + 0,019011 * GlukozaAP + 0,0109142 * InsulinAP + 0,0603017 * NEFAAP + 4,44376 * RQUICKIAP$	$R^2=37,1$ $p<0,171$
PP	$NEFAPP = 5,14117 - 0,254363 * GlukozaPP - 0,0537122 * InsulinPP - 8,03526 * RQUICKIPP$	$R^2=92,06$ $p<0,005$
delta	$NEFAPP = 0,310012 - 0,0153603 * InsulinDelta - 0,000294741 * Glukozadelta + 1,01451 * NEFAdelta - 1,05021 * RQUICKIdelta$	$R^2=94,6$ $p<0,005$

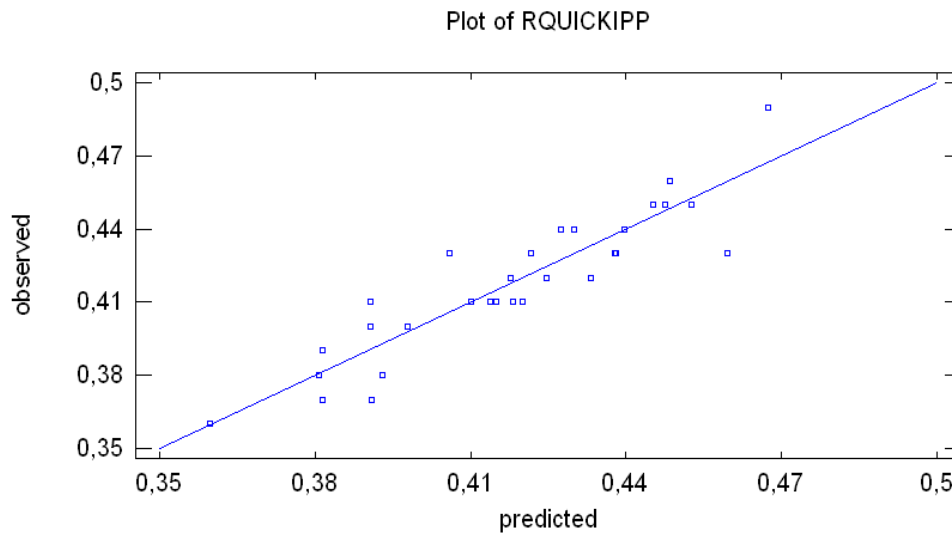
Grafikon 16: Predikcija RQUICKIPP pomoću AP vrednosti insulina, glukoze i NEFA



Grafikon 17: Predikcija RQUICKIPP pomoću PP vrednosti insulina, glukoze i NEFA



Grafikon 17: Predikcija RQUICKIPP pomoću „delta“ vrednosti insulina, glukoze i NEFA



5.3 Deskriptivna statistika za metaboličke parametre

U ranoj laktaciji je određen metabolički profil krava, koji je pored vrednosti insulina, glukoze, NEFA i RQUICKI indeksa podrazumevao i određivanje ostalih metaboličkih parametara, koji ukazuju na energetske status krava, funkcionalni status jetre, metabolizam proteina i makroelemenata. Utvrđene su sledeće srednje vrednosti i standardne devijacije parametara metaboličkog profila: $0,77 \pm 0,17$ mmol/L za BHB; $0,11 \pm 0,01$ mmol/L za trigliceride; $2,18 \pm 0,28$ mmol/l za holesterol; $9,37 \pm 1,95$ μ mol/L za ukupni bilirubin; $111,42 \pm 14,04$ IU/L za AST; $89,45 \pm 21,14$ IU/L za ALP; $19,34 \pm 3,42$ IU/L za GGT; $73,30 \pm 4,47$ g/L za ukupne proteine; $34,76 \pm 5,58$ g/L za albumine; $4,11 \pm 1,17$ mmol/L za ureu; $2,12 \pm 0,27$ mmol/L za Ca i $2,21 \pm 0,27$ mmol/L za P. Svi rezultati prikazani su u Tabeli 6.

Tabela 6: Deskriptivne vrednosti metaboličkih parametara u ranoj laktaciji

	<i>BHBPP</i>	<i>TrigliceridiPP</i>	<i>HolesterolPP</i>	<i>Ukupni bilirubin PP</i>	<i>ASTPP</i>	<i>ALPPP</i>
Count	30	30	30	30	30	30
Average	0,769333	0,106333	2,179	9,37033	111,423	89,452
Standard deviation	0,173641	0,0140156	0,28089	1,95351	14,0413	21,1357
Coeff. of variation	22,5703%	13,1808%	12,8908%	20,8478%	12,6018%	23,6279%
Minimum	0,36	0,08	1,71	5,72	80,6	58,85
Maximum	0,99	0,13	2,58	12,87	143,0	134,82
Range	0,63	0,05	0,87	7,15	62,4	75,97
Std. skewness	-1,51624	-0,385818	0,185272	-0,2057	-0,0195769	0,89373
Std. kurtosis	-0,544073	-0,392522	-1,73221	-0,888903	-0,0130955	-0,746722

Tabela 6: Nastavak

	<i>GGTPP</i>	<i>Ukupni proteini PP</i>	<i>Albumini PP</i>	<i>Urea PP</i>	<i>CaPP</i>	<i>P PP</i>
Count	30	30	30	30	30	30
Average	19,335	73,3027	34,756	4,10933	2,11733	2,213
Standard deviation	3,42416	4,47043	5,58077	1,17117	0,266587	0,273813
Coeff. of variation	17,7096%	6,0986%	16,057%	28,5003%	12,5907%	12,3729%
Minimum	13,8	62,75	25,12	2,09	1,68	1,73
Maximum	25,3	82,06	46,14	7,03	2,57	2,78
Range	11,5	19,31	21,02	4,94	0,89	1,05
Std. skewness	-0,167562	-0,618347	0,677118	1,49722	-0,0476232	0,681176
Std. kurtosis	-1,17043	0,32569	-0,984393	0,158079	-1,36705	-1,08266

5.4 Povezanost metaboličkih parametara i faktora insulinske rezistencije

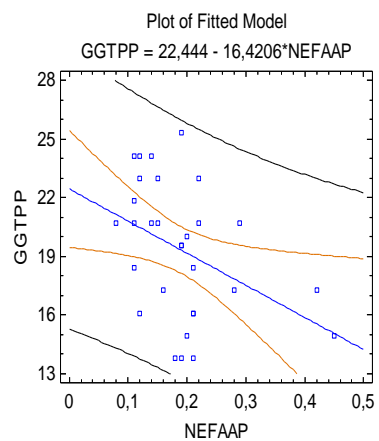
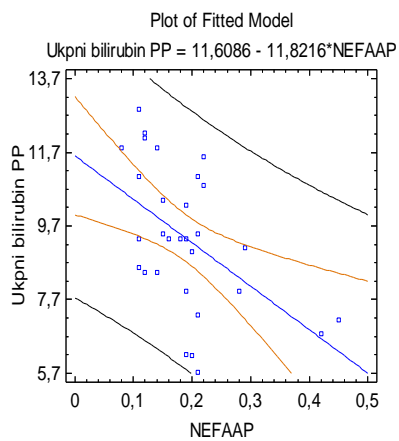
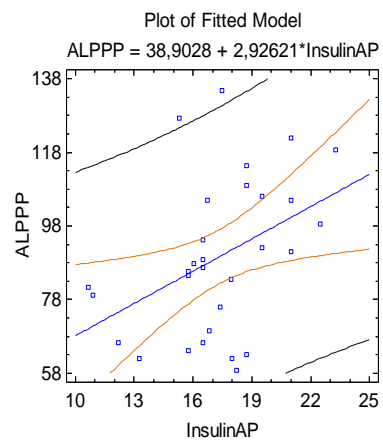
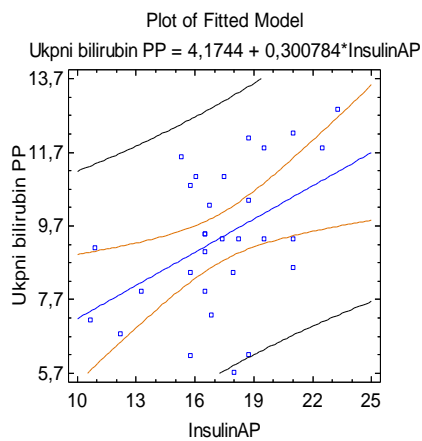
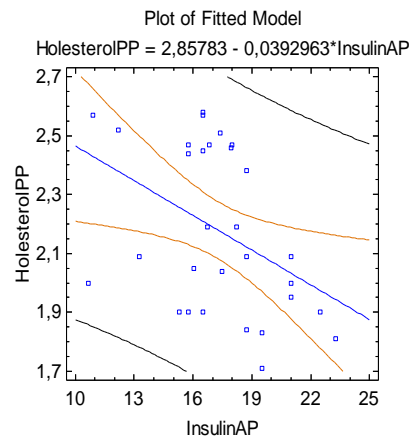
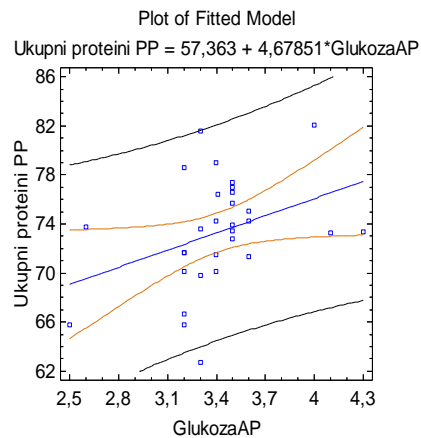
Dobijena je statistički značajna korelacija između metaboličkih parametara i pokazatelja insulinske rezistencije u PP periodu. Metabolička adaptacija krava povezana je i sa intenzitetom promena vrednosti (delta vrednosti) pokazatelja insulinske rezistencije. Međutim, nisu utvrđene značajne korelacije između metaboličkog profila PP i pokazatelja insulinske rezistencija AP. Korelacija između parametara i njihova statistička značajnost prikazane su u tabelama od 7 do 9. Regresione analize (dijagram regresione linije i regresiona jednačina) za sve statistički značajne korelacije prikazane su u grafikonima 18-74. Uopšteno govoreći zaključujemo da PP vrednosti pokazatelja insulinske rezistencije i promena u njihovoj vrednosti (AP-PP) značajno utiču na vrednost metaboličkih parametara. RQUICKI indeks ima vrlo slabu prediktivnu vrednost za metaboličke parametre, dok vrednosti insulina, glukoze i NEFA imaju značajnu prediktivnu vrednost za veliki broj parametara.

Tabela 7: Korelacija između vrednosti faktora insulinske rezistencije AP i parametara metaboličkog profila PP

	GlukozaAP	InsulinAP	NEFAAP	RQUICKIAP
BHBPP	0,2312 ^a	0,0545	0,0507	-0,0409
	0,2190 ^b	0,7747	0,7903	0,8301
TrigliceridiPP	0,2379	-0,2828	0,1593	-0,0722
	0,2055	0,1299	0,4005	0,7046
HolesterolPP	0,0586	-0,4225	0,2495	-0,0857
	0,7582	0,0200*	0,1836	0,6526
Ukupni bilirubin PP	-0,1325	0,4650	-0,5073	0,3422
	0,4853	0,0096*	0,0042*	0,0642
ASTPP	-0,0084	0,2603	-0,2570	0,1258
	0,9649	0,1648	0,1703	0,5078
ALPPP	0,0748	0,4181	-0,3586	0,2065
	0,6946	0,0215*	0,0517	0,2735
GGTTP	0,2463	0,3227	-0,4020	0,2580
	0,1895	0,0820	0,0277*	0,1686
Ukupni proteini PP	0,3676	0,3057	-0,2975	0,0849
	0,0456*	0,1004	0,1104	0,6555
Albumini PP	0,0526	-0,3188	0,2689	-0,1374
	0,7825	0,0860	0,1507	0,4691
Urea PP	-0,1292	0,2144	-0,1645	-0,0224
	0,4963	0,2552	0,3851	0,9065
CaPP	-0,0335	0,0182	-0,1254	0,0952
	0,8606	0,9239	0,5092	0,6170
P PP	-0,0400	0,2803	-0,3713	0,3013
	0,8337	0,1335	0,0434*	0,1056

a-koeficijent korelacije, b-statistička značajnost, *- statistički značajna korelacija

Grafikon 18-24: Regresiona analiza povezanost pokazatelja insulinske rezistencije AP i metaboličkih parametara PP



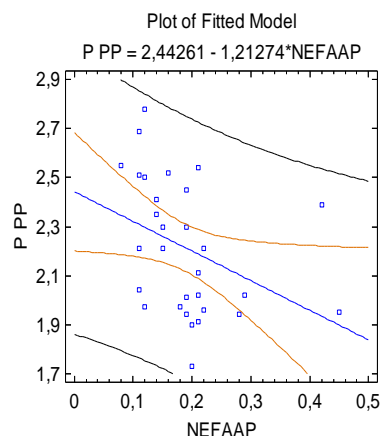
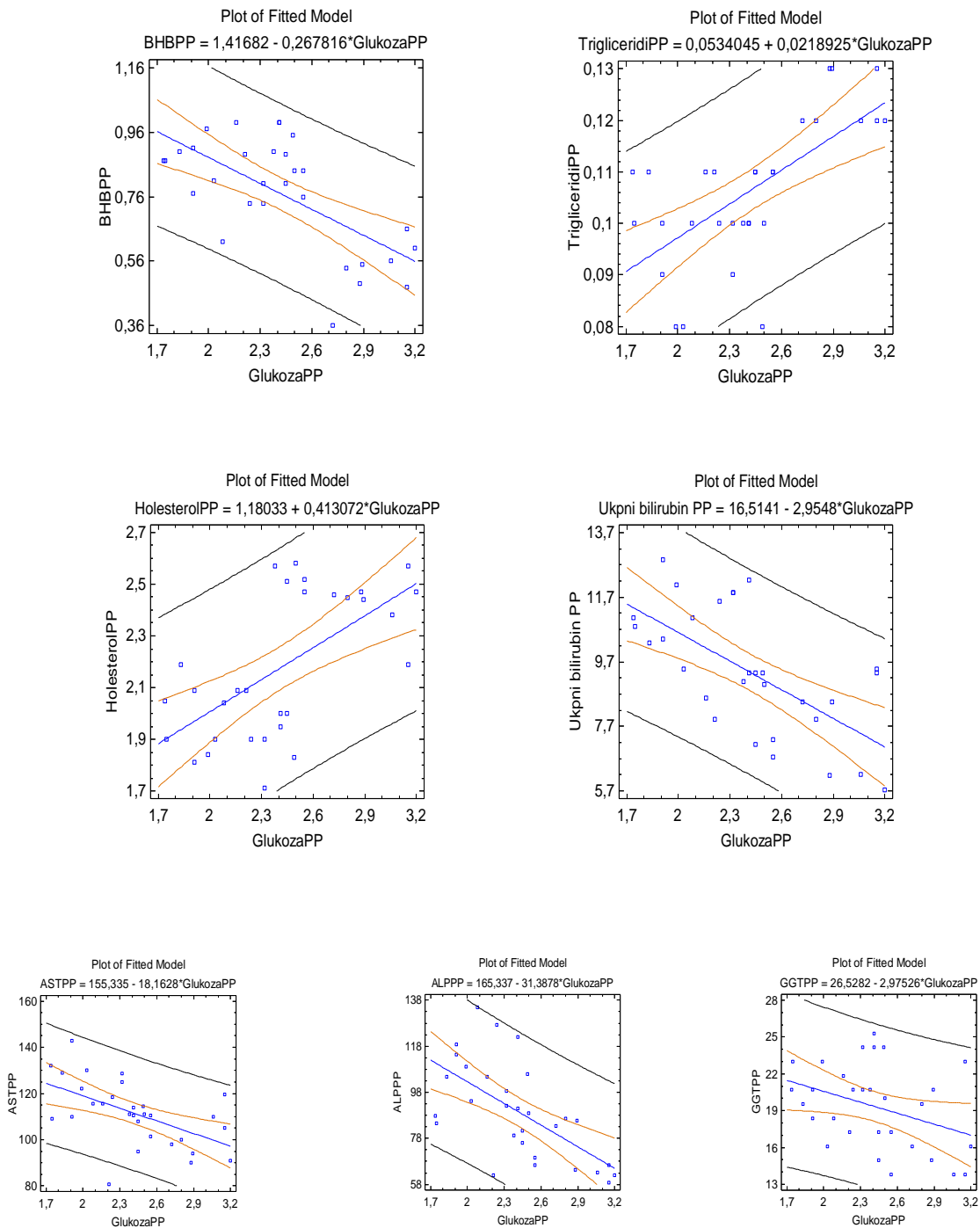


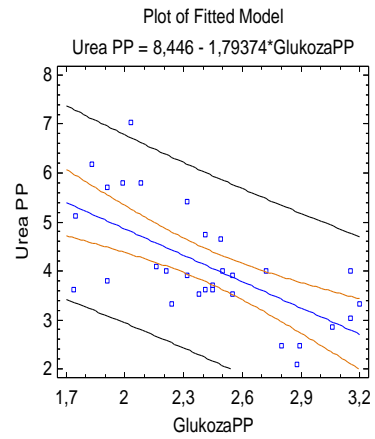
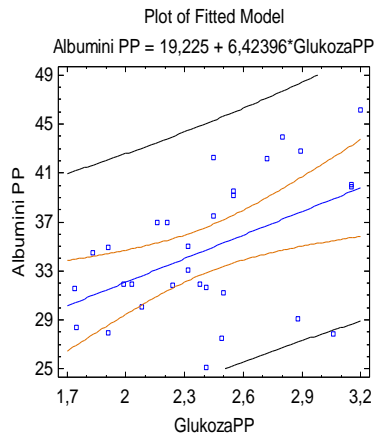
Tabela 8: Korelacija između vrednosti faktora insulinske rezistencije PP i parametara metaboličkog profila PP

	GlukozaPP	InsulinPP	NEFAAP	RQUICKIPP
BHBPP	-0,6528 ^a	-0,4403	0,1841	0,3692
	0,0001 ^{b*}	0,0149*	0,3301	0,0446*
TrigliceridiPP	0,6612	0,6412	-0,3379	-0,3965
	0,0001*	0,0001*	0,0678	0,0301*
HolesterolPP	0,6225	0,7183	-0,4293	-0,3355
	0,0002*	0,0000*	0,0179*	0,0699
Ukupni bilirubin PP	-0,6402	-0,6296	0,4888	0,2372
	0,0001*	0,0002*	0,0061*	0,2070
ASTPP	-0,5475	-0,6428	0,2572	0,3597
	0,0017*	0,0001*	0,1701	0,0509
ALPPP	-0,6286	-0,6288	0,4051	0,3025
	0,0002*	0,0002*	0,0264*	0,1042
GGTPP	-0,3678	-0,5136	0,3361	0,1964
	0,0456*	0,0037*	0,0693	0,2984
Ukupni proteini PP	0,1572	-0,0917	0,3744	-0,2720
	0,4069	0,6297	0,0415*	0,1459
Albumini PP	0,4872	0,5913	-0,3457	-0,2460
	0,0063*	0,0006*	0,0613	0,1900
Urea PP	-0,6483	-0,6288	0,0808	0,5744
	0,0001*	0,0002*	0,6714	0,0009*
CaPP	0,3070	0,2092	0,0067	-0,2590
	0,0989	0,2673	0,9722	0,1669
P PP	-0,3157	-0,2713	0,5217	-0,0293
	0,0893	0,1471	0,0031*	0,8778

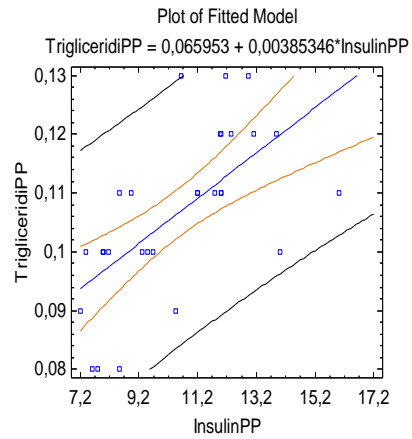
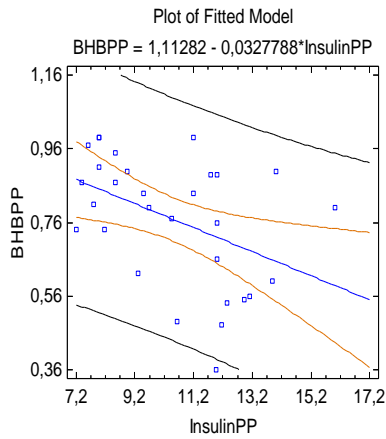
a-koeficijent korelacije, b-statistička značajnost, *- statistički značajna korelacija

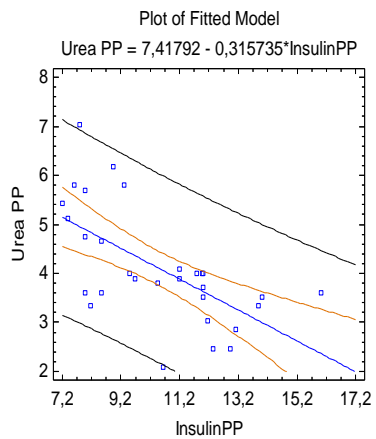
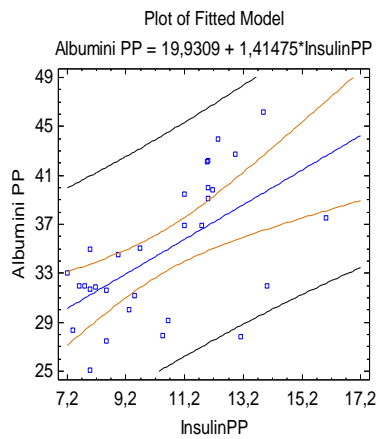
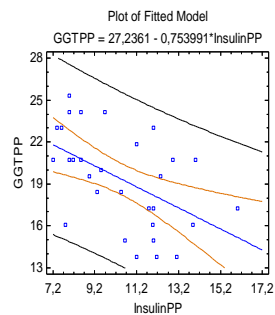
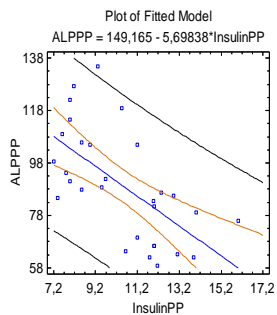
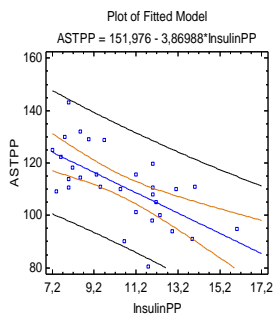
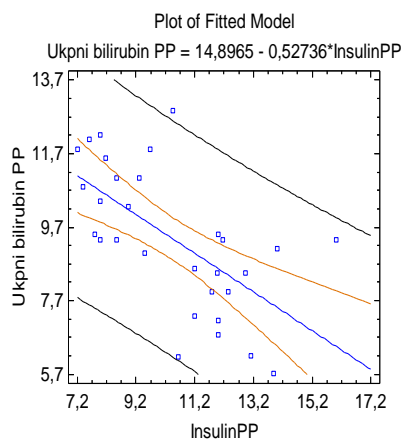
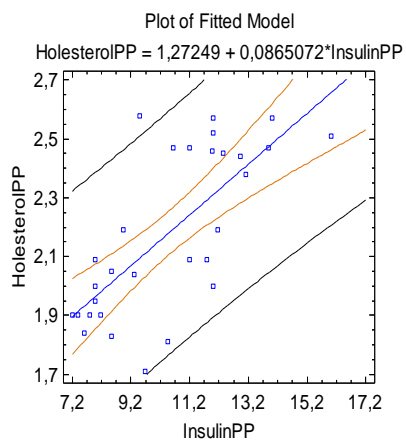
Grafikon 25-33: Regresiona analiza povezanosti glukoze PP sa metaboličkim profilom PP



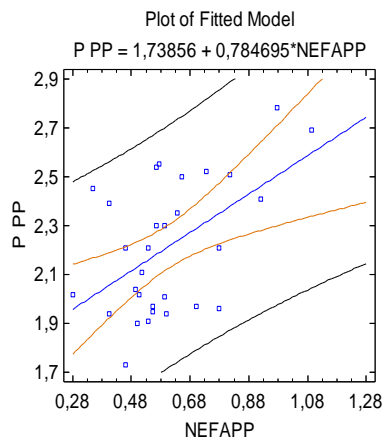
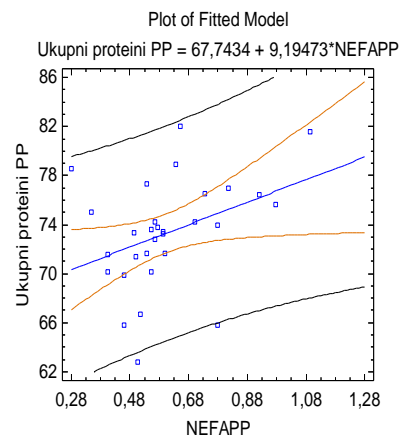
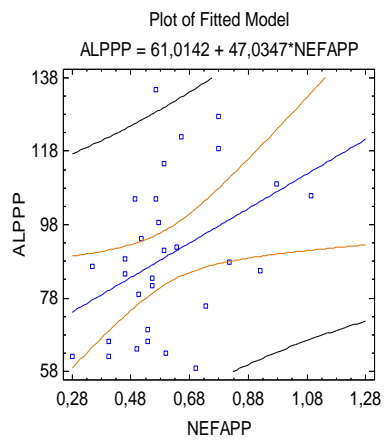
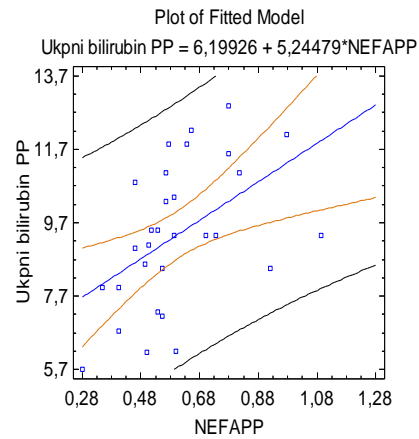
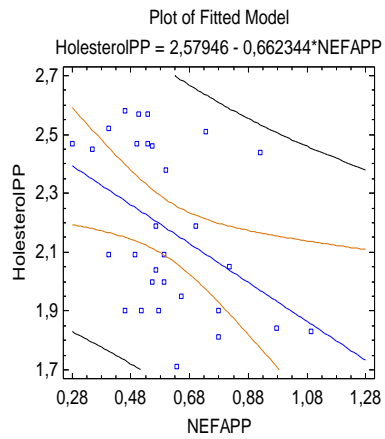


Grafikon 34-42: Regresione linije insulin PP parametara na metaboličke parametre





Grafikon 43-47: Regresiona analiza povezanosti NEFA PP sa metaboličkim profilom PP



Grafikon 48-50: Regresiona analiza povezanosti NEFA PP sa metaboličkim profilom PP

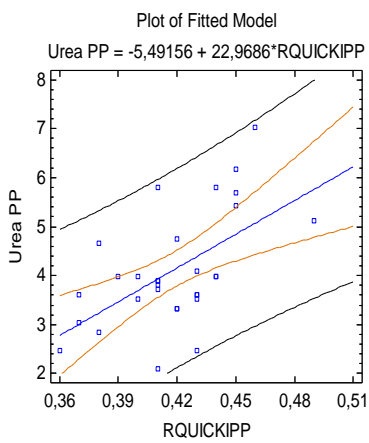
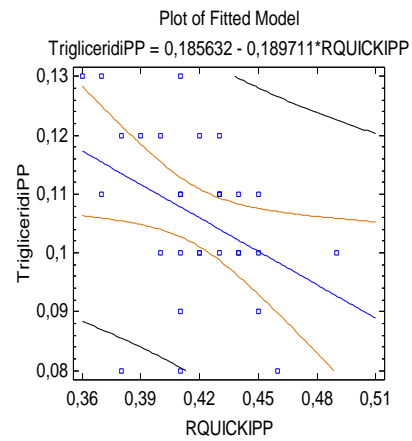
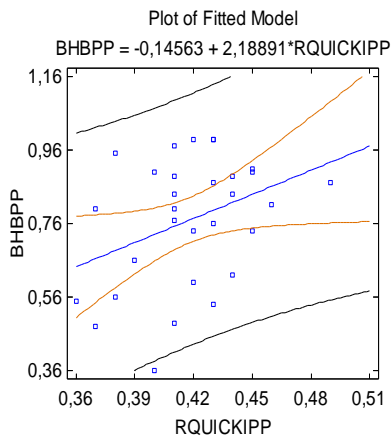
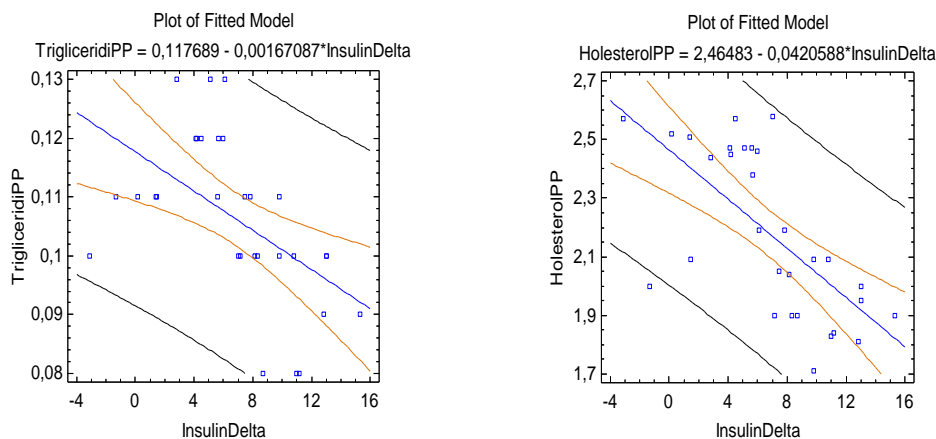


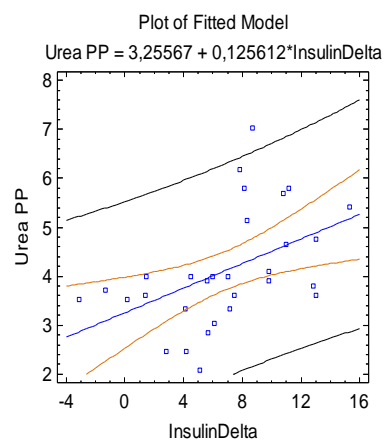
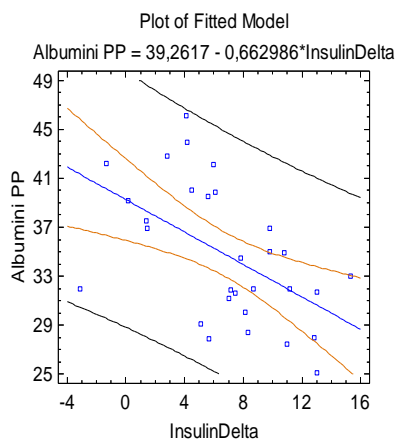
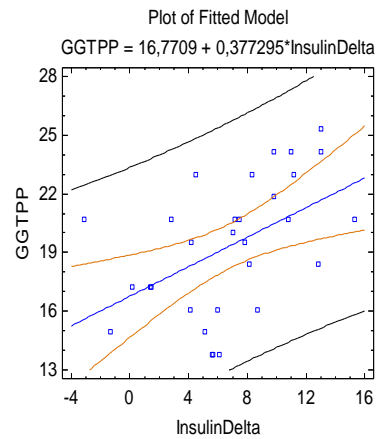
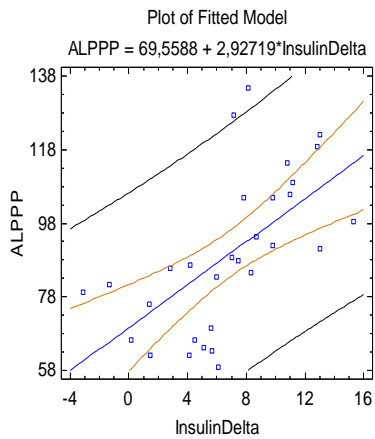
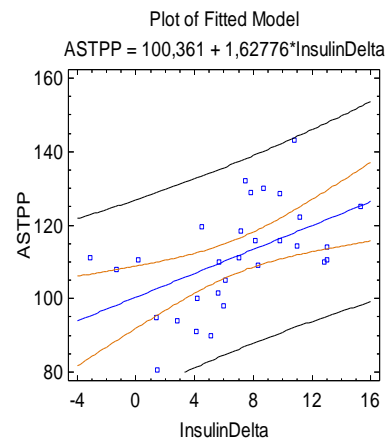
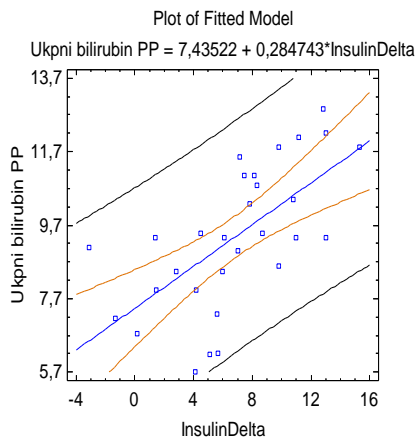
Tabela 9: Korelacija između promene faktora insulinske rezistencije i parametara metaboličkog profila PP

	InsulinDelta	Glukozadelta	NEFAdelta	RQUICKIdelta
BHBPP	0,2683 ^a	0,6585	0,1261	-0,2761
	0,1517 ^b	0,0001*	0,5066	0,1398
TrigliceridiPP	-0,5293	-0,3621	-0,3230	0,2411
	0,0026*	0,0493	0,0817	0,1994
HolesterolPP	-0,6648	-0,4480	-0,4260	0,1869
	0,0001*	0,0130	0,0189	0,3227
Ukpnj bilirubin PP	0,6471	0,4143	0,5688	0,0264
	0,0001*	0,0228*	0,0010*	0,8900
ASTPP	0,5147	0,4220	0,2970	-0,1937
	0,0036*	0,0202*	0,1110	0,3052
ALPPP	0,6149	0,5402	0,4483	-0,0847
	0,0003*	0,0021*	0,0130*	0,6565
GGTTP	0,4892	0,4463	0,4076	-0,0128
	0,0061*	0,0134*	0,0254*	0,9463
Ukupni proteini PP	0,2563	0,1156	0,3979	0,2188
	0,1717	0,5431	0,0294*	0,2453
Albumini PP	-0,5274	-0,3466	-0,3685	0,1065
	0,0027*	0,0606	0,0451*	0,5754
Urea PP	0,4762	0,4231	0,1250	-0,4228
	0,0078*	0,0198*	0,5105	0,0199*
CaPP	-0,0975	-0,2623	0,0529	0,2294
	0,6084	0,1614	0,7812	0,2226
P PP	0,3332	0,2211	0,5432	0,1765
	0,0720	0,2402	0,0019*	0,3509

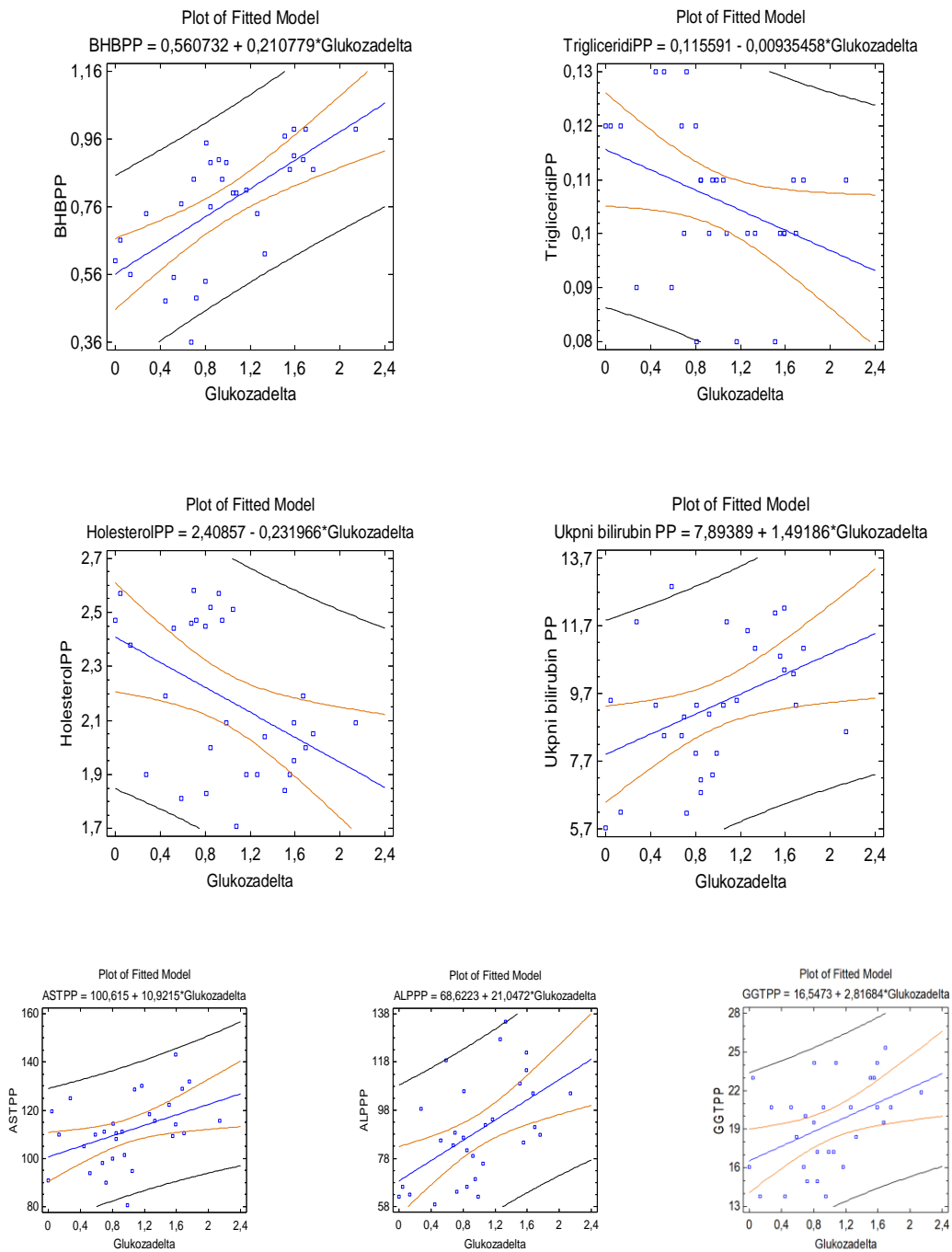
a-koefficient korelacije, b-statistička značajnost, *-statistički značajna korelacija

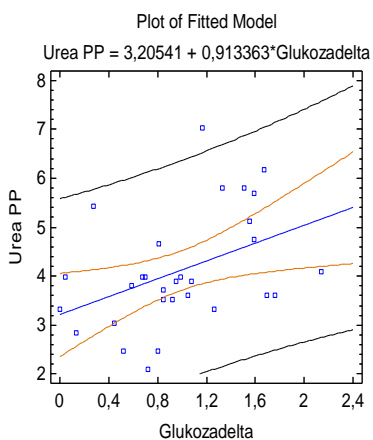
Grafikon 51-58: Regresiona analiza povezanosti promene vrednost insulina (insulin delta) sa metaboličkim profilom PP



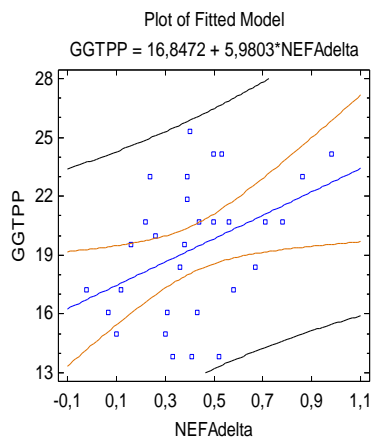
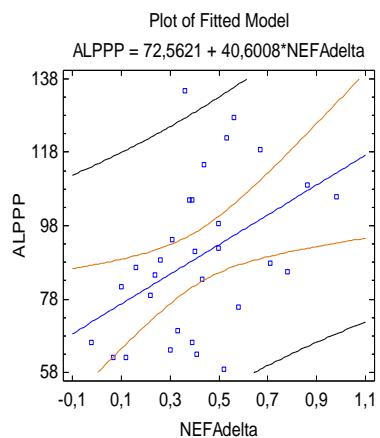
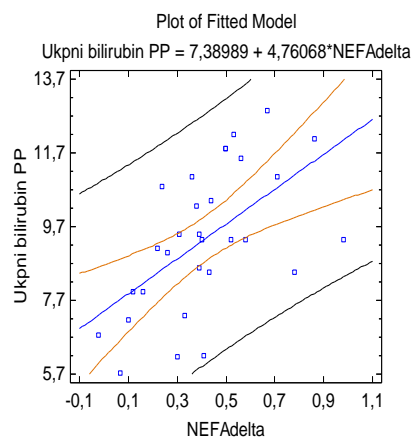
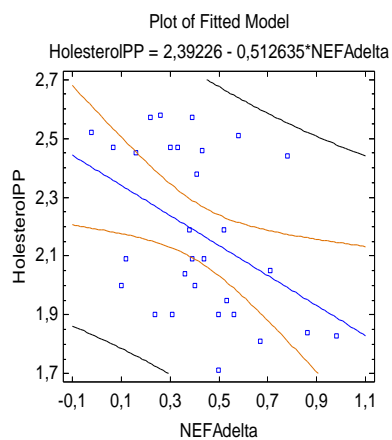


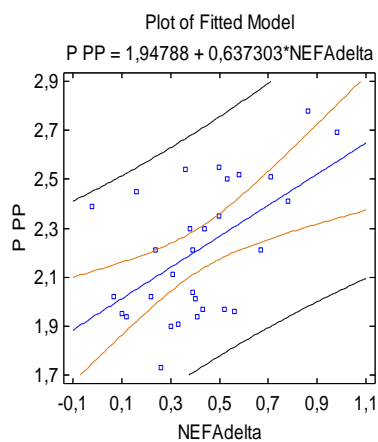
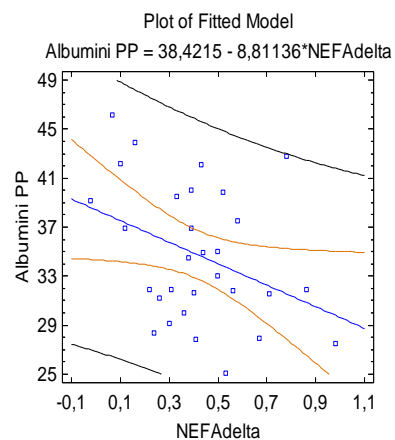
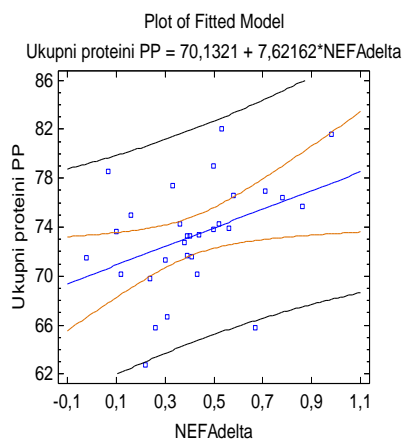
Grafikon 59-66: Regresiona analiza povezanosti promene vrednost glukoze (glukoza delta) sa metaboličkim profilom PP



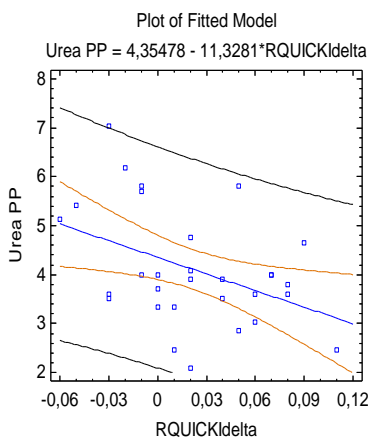


Grafikon 67-73: Regresiona analiza povezanosti promene vrednost NEFA (NEFA delta) sa metaboličkim profilom PP





Grafikon 74: Regresiona analiza povezanosti promene vrednost RQUICKI (RQUICKI delta) sa metaboličkim profilom PP



5.5 Razlika u metaboličkoj adaptaciji krava sa najvećim promenama u vrednosti glukoze, insulina, NEFA i RQUICKI u ranoj laktaciji u odnosu na period zasušenja (krave najrezistentnije na insulin)

U poslednjem koraku utvrđujemo da li postoji razlika u metaboličkoj adaptaciji kod krava, koje su imale najizraženije promene u vrednosti RQUICKI indeksa i indikatora koji ulaze u formulu za njegovo izračunavanje a to su glukoza, insulin i NEFA. Kada se krave klasifikuju na osnovu vrednosti RQUICKI indeksa na one sa najvećim padom vrednosti ovog indeksa (iznad 75 percentila) i na ostale manje rezistentne krave ne bismo dobili statistički značajnu razliku u vrednosti metaboličkih parametara. Međutim, ukoliko bi se klasifikacija napravila na osnovu vrednosti glukoze, NEFA i insulina tako da su najrezistentnije krave one sa najizraženijim padom insulina i glukoze i najvećim porastom NEFA, dobili bi značajne razlike u metaboličkoj adaptaciji krava koje se karakterišu: povećanom koncentracijom BHB, bilirubina, AST, ALP, GGT i P i smanjenom koncentracijom holesterola, triglicerida, ukupnih proteina i albumina. Rezultati su prikazani u tabeli 10.

Tabela 10: Uticaj intenziteta promene vrednosti parametara insulinske rezistencije na vrednost metaboličkih parametara kod krava pose teljenja

	Klasifikacija na osnovu promene glu, ins, nefa		P	Klasifikacija na osnovu promene rquicki		P
	Najrezistentnije	Ostale		Najrezistentnije	Ostale	
BHB PP	0,92±0,11	0,68±0,15	<0,01	0,72±0,15	0,77±0,16	NS
Trigliceridi PP	0,085±0,01	0,115±0,01	<0,01	0,11±0,012	0,12±0,011	NS
Holesterol PP	1,82±0,2	2,23±0,25	<0,01	2,1±0,26	2,05±0,25	NS
Uk.bilirub. PP	10,5±1,6	8,8±1,8	<0,01	9,9±1,9	9,6±1,95	NS
AST PP	115±11,5	91±12,5	<0,01	106,6±12,5	101,7±12,1	NS
ALP PP	111±17,8	83±19,7	<0,01	89,2±19,1	92,4±19,1	NS
GGT PP	22,5±3,4	17,8±3,2	<0,05	20,3±3,1	21,3±3,3	NS
Uk.proteini PP	75,5±3,5	72,1±3,2	<0,05	73,5±3,9	71,5±3,8	NS
Albumini PP	29,8±4,3	35,2±4,5	<0,05	32,2±5,1	33±4,1	NS
Urea PP	4,05±0,9	4,13±0,95	NS	4,11±0,95	4,2±1,05	NS
Ca PP	1,99±0,17	2,11±0,19	NS	2,05±0,22	2,09±0,21	NS
P PP	2,5±0,31	2,2±0,28	<0,05	2,31±0,3	2,24±0,31	NS

6.DISKUSIJA

U peripartalnom periodu krava odvijaju se mnogobrojne metaboličke promene sa ciljom da obezbede odgovarajuću preraspodelu hranljivih materija u organizmu i težnjom da se obezbede optimalne potrebe fetusa i mlečne žlezde. Jedna od glavnih metaboličkih promena podrazumeva višestruko povećanje potreba glukoze od strane mlečne žlezde za sintezu laktoze. Ovaj proces je podržan od strane jetre, pri čemu jetra preuzima proces intenzivne sinteze glukoze.¹²³ Adaptaciju podržavaju i periferna tkiva, jer koriste manje glukoze kao izvor energije, ostavljajući glukozu na raspolaganju mlečnoj žlezdi i uterusu.³¹ Zadovoljavanje energetskih potreba se odvija zahvaljujući intenzivnoj mobilizaciji viših masnih kiselina.³²

Insulinska rezistencija je karakteristična za ovaj period i predstavlja mehanizam, kojim se omogućuje započinjanje laktacije i obezbeđuje neophodna energija za proces laktacije. Odlikuje se smanjenom proizvodnjom insulina ili smanjenom osetljivošću tkiva (prevažodno masnog) na dejstvo insulina. Umerena insulinska rezistencija doprinosi intenziviranju procesa lipomobilizacije sa ciljem zadovoljavanja povećanih energetskih potreba u periodu visokog graviditeta i laktacije.

Period laktacije ima značajan uticaj na energetski bilans i insulinsku rezistenciju kod krava. U ranoj laktaciji postoji negativni energetski bilans, koji karakteriše: snižena koncentracija glukoze i insulina i povećana insulinska rezistencija masnog tkiva, koja dovodi do lipolize i povećane koncentracije NEFA. Od pika laktacije ka zasušenju koncentracija glukoze i insulina raste, opada insulinska rezistencija i nivo lipolize, a telesna kondicija krava raste.²⁴²

Tokom rane laktacije najveći deo glukoze se troši na proizvodnju mleka, jer su GLUT receptori u vimenu insulin-nezavisni. Sa druge strane, masno tkivo je insulin zavisno, pa manjak insulina dovodi do povećane vrednosti NEFA, koja je potrebna da bi se zadovoljile energetske potrebe organizma.^{181,184,243} U ogledu gde je tokom 670 dana laktacije korišćen insulin tolerans

test, pokazano je da se sa razvojem laktacije odgovor masnog tkiva na insulin menja, tako da se stvaraju bolji uslovi za nastanak telesnih rezervi.²⁴⁴ Insulin ima dokazano lipogeno dejstvo.²⁴⁵

Zahvaljujući lipogenom dejstvu, mogu se povećati masne rezerve organizma.²⁴⁵ Krave sa velikim masnim rezervama u zasušenju mnogo intenzivnije gube kondiciju posle teljenja, mobilisući veliku količinu lipida.^{246,247} Visoka lipomobilizacija menja insulinom-stimulisan metabolizam ugljenih hidrata i lipida, a smanjuje unos hrane što dodatno produbljuje negativni energetske bilans u ranoj laktaciji i može narušiti zdravstveno stanje.^{248,254} Kao posledica povećanog metabolisanja lipida i smanjene glikemije javlja se ketoza kod krava. U ketozi postoji insulinska rezistencija, koju karakteriše smanjen odgovor insulina na glukozu i smanjen odgovor masnog tkiva na insulin. Veza bazalnih i dinamičkih promena vrednosti insulina, glukoze i NEFA regulisana je RQUICKI-BHB indeksom insulinske rezistencije.²⁵⁵ Poznato je da povećan unos hrane u zasušenju dovodi do povećane lipogeneze, a nakon teljenja do povećane lipomobilizacije. Restrikcija obroka u kasnom zasušenju periodu smanjuje lipomobilizaciju i povećava senzitivnost na insulin.^{18,19}

Insulinska senzitivnost/rezistencija predstavlja glavni mehanizam prilagođavanja metabolizma ugljenih hidrata i lipida na laktaciju, jer omogućuje preusmeravanje glukoze u mlečnu žlezdu i korišćenje masnog tkiva za energetske potrebe.⁴ Insulinska rezistencija se karakteriše smanjenim odgovorom insulina na glukozu tj. smanjenom funkcijom beta ćelija pankreasa i/ili smanjenom osetljivošću glukoze na insulin.⁷ U ovom radu smo se bazirali na vrednost RQUICKI surogat indeksa insulinske rezistencije. RQUICKI indeks je surogat indeks izračunat iz bazalnih vrednosti insulina, glukoze i NEFA.⁶⁰ RQUICKI indeks je niži kod krava sa negativnim energetskim bilansom, koje su ograničeno hranjene usled čega dolazi do porasta koncentracije NEFA^{120,256}. Koncentracija NEFA objašnjava najveći procenat varijacije vrednosti RQUICKI indeksa.¹⁹¹

Cilj ovog rada je da utvrdimo da li očekivana povećana insulinska senzitivnost u sredini perioda zasušenja kompenzatorno dovodi do povećane insulinske rezistencije posle teljenja, putem analize povezanosti između vrednosti insulina, glukoze, NEFA, RQUICKI indeksa i magnitude promene u periodu zasušenja i periodu rane laktacije.

6.1 Pokazatelji insulinske rezistencije

Merenje insulinske rezistencije se vrši različitim testovima. Veliku važnost ima određivanje indeksa insulinske senzitivnosti kao što je RQUICKI, koji se bazira na vrednostima insulina, glukoze i NEFA. Glikemija kod zdravih krava varira između 2,2 i 3,3 mmol/l.¹⁸⁷ Najniža izmerena vrednost glukoze u prepartalnom periodu se nalazi u okviru referentnih vrednosti. Maksimalna izmerena vrednost glukoze u ovom periodu se nalazi iznad gornje granice referentnih vrednosti, a prosečna vrednost glukoze se nalazi takođe iznad gornje granice ovih vrednosti. Ovo nije slučaj i sa koncentracijom glukoze u postpartalnom periodu, budući da je najniža izmerena vrednost glukoze bila ispod donje granice referentnih vrednosti; maksimalna izmerena vrednost glukoze se nalazila u okviru granica, dok se prosečna vrednost koncentracije glukoze post partum nalazila u okvirima graničnih vrednosti. Ovi rezultati nam ukazuju da se vrednosti glikemije postpartalno menjaju, pri čemu su prosečne i maksimalne izmerene vrednosti pre teljenja iznad referentnih vrednosti u odnosu na period posle teljenja, kada se nalaze u okviru graničnih vrednosti. Dakle, postoji statistički značajna razlika između ovih vrednosti pa možemo reći da je glikemija posle teljenja statistički značajno niža od glikemije pre teljenja. Ove vrednosti su u skladu sa rezultatima koje su dobili i drugi istraživači.¹⁸⁸ Naime, kod zdravih krava glikemija u visokom graviditetu se održava u fiziološkim granicama zahvaljujući uravnoteženom energetskom metabolizmu koji obezbeđuje nesmetano odvijanje procesa glukoneogeneze.¹⁸⁹ Mlečna žlezda sa otpočinjanjem laktacije, troši značajne rezerve glukoze iz krvi majke pri čemu njena koncentracija u krvi opada.¹⁹⁰ U postpartalnom periodu glukoza kao vid energije biva preusmerena ka mlečnoj žlezdi, za razliku od perifernog tkiva, koje svoje potrebe u energiji podmiruje korišćenjem masti. Obzirom da potrebe za glukozom sve više rastu i da dolazi do njenog deficita, dolazi i do mobilizacije glukoneoplastičnih aminokiselina iz mišića. Iskorišćavanje glukoze u mlečnoj žlezdi je insulin-nezavisan proces. Potenciranje insulin-nezavisnog iskorišćavanja glukoze nastaje i kao posledica smanjene osetljivosti organizma na insulin, pa se glukoza usmerava na mlečnu žlezdu koja poseduje insulin-nezavisne receptore neophodne za usvajanje glukoze. Od velikog je značaja da mlečna žlezda u ovom periodu ima podmirene potrebe za glukozom, obzirom da je koristi za proizvodnju laktoze, koja povećava volumen proizvedenog mleka. Pad vrednosti glukoze nakon partusa nastaje između ostalog i kao posledica smanjenog unosa hrane. Hipoglikemija na početku laktacije se smatra pouzdanim pokazateljem NEB.¹⁸⁷ Kod subkliničkih ketoznih stanja glikemija se kreće od 1,7 do 2,7 mmol/l,

a kod krava sa kliničkim simptomima bolesti je redovno manja od 1,9 mmol/l. ^{127,128,129,130} Obzirom da je u istraživanju najmanja izmerena vrednost glukoze bila ispod ove vrednosti, možemo reći da su se određena grla nalazila u nekom stanju subkliničke-kliničke ketoze.

Referentne vrednosti insulina se kreću od 3,65 do 11,34 $\mu\text{mol/l}$. U sprovedenom istraživanju najniža izmerena vrednost insulina pre teljenja bila je u okviru graničnih referentnih vrednosti, dok je najviša izmerena vrednost izvan referentnih graničnih vrednosti. Srednja izmerena vrednost je, takođe, veća od referentnih graničnih vrednosti. Vrednosti insulina posle partusa opadaju u odnosu na period pre teljenja. Najniža izmerena vrednost insulina posle teljenja se nalazila u okviru graničnih vrednosti, dok je najviša izmerena vrednost insulina iznad granica referentnih vrednosti. Prosečna izmerena vrednost se nalazi u referentnim granicama. Postoji statistički značajna razlika između prosečne vrednosti insulina pre i posle teljenja pa zaključujemo da je postojala statistički značajno niža insulinemija u nedelji posle teljenja. Dakle, koncentracija insulina post partum opada, što se poklapa sa rezultatima drugih istraživača.¹ Insulin ima značajan uticaj na preraspodelu hranljivih materija i njihovo usmeravanje ka mlečnoj žlezdi, čemu doprinosi pad koncentracije insulina koji nastaje nekoliko dana pred partus, dok se njegova niska koncentracija održava u prvih desetak dana laktacije.¹

Rezistencija na insulin u peripartalnom periodu je neophodna da bi vime dobilo neophodnu količinu hranljivih materija i energije za početak laktacije, obzirom da upotreba glukoze od strane mlečne žlezde nije zavisna od insulina. Insulinska rezistencija je najviše izražena posle partusa. Odgovor insulina na glukozu je snižen u postpartalnom periodu.^{2,3} Tokom laktacije mlečna žlezda krava vrši ekspresiju insulin nezavisnih transportera za glukozu. Ekspresija ovih receptora za glukozu je tri puta veća u odnosu na zasušene krave. Ovi receptori su prisutni u masnom tkivu kod krava u kasnoj laktaciji i zasušenju, dok nisu prisutni kod krava u piku laktacije. Dugotrajna insulinska rezistencija može predisponirati krave za kontinuiranu lipolizu i povećati rizik za razvoj peripartalnih poremećaja.^{25,27,46,56,57}

Referentne vrednosti za NEFA kreću se od 0,01 do 0,79 mmol/l. Nastaju jednim delom u procesu lipolize u masnom tkivu a drugim delom kao posledica dejstva lipoprotein lipaze na trigliceride, koji iz krvi dospevaju u periferna tkiva. U krvi se nalaze u vidu kompleksa sa albuminima. U sprovedenom istraživanju, najniža izmerena vrednost NEFA pre teljenja je u okviru referentnih graničnih vrednosti. Maksimalna izmerena vrednost se takođe nalazi u okviru

graničnih vrednosti, kao i dobijena prosečna vrednost u periodu pre teljenja. U periodu posle teljenja, najniža izmerena vrednost se nalazi u okvirima referentnih vrednosti, za razliku od maksimalno izmerene vrednosti, koja je daleko izvan granica referentnih vrednosti. Prosečna vrednost NEFA u periodu posle teljenja se nalazi u referentnim granicama. Dakle, koncentracija NEFA raste postpartalno. Utvrđena je statistički značajna razlika između prosečne vrednosti NEFA pre i posle teljenja pa zaključujemo da je koncentracija NEFA statistički značajno viša u periodu posle teljenja. Ovi rezultati se poklapaju sa rezultatima drugih istraživača.^{121,122}

Koncentracija NEFA značajno raste u periodu posle teljenja kao posledica negativnog energetskog bilansa i upravo je zavisna od nivoa lipidne mobilizacije-katabolizma proteina i stresne opterećenosti u ranoj laktaciji. Obzirom da je organizam prinuđen da svoje energetske potrebe zadovolji sagorevanjem masti, posledično raste koncentracija NEFA. Smatra se da je koncentracija NEFA najbolji pokazatelj stanja EB, obzirom da nastaje kao direktna posledica lipomobilizacije izazvane NEB.¹²⁸ Smatra se da vrednost NEFA preko 0,5 mmol/l povećava rizik za nastanak peripartalnih bolesti.¹²⁹ Konzumiranje hrane bogate energijom u periodu zasušenja dovodi do promena u metabolizmu i do smanjenja u unosu suve materije obroka, što dovodi do porasta u koncentraciji NEFA postpartalno. Kratkotrajno povećanje koncentracije NEFA ima stimulativan efekat na sekreciju insulina, dok dugotrajno povećanje koncentracije NEFA dovodi do insuficijencije beta ćelija pankreasa i njihove dekompenzacije. Visok nivo koncentracije NEFA inhibira insulinom stimulisanu upotrebu glukoze u skeletnim mišićima i vrši supresiju glukogenolize u jetri.⁷ Sudbina NEFA u organizmu može biti usmerena u jedan od tri pravca. NEFA koje se oslobađaju iz depoa masti u procesu lipomobilizacije dospevaju u jetru i podležu procesu parcijalne oksidacije pri čemu nastaje ugljendioksid i obezbeđuje se energija. Ukoliko je lipomobilizacija intenzivna, što je slučaj u stanjima izraženog NEB, prevazilazi se kapacitet hepatocita jer nastaju velike količinama acetyl Co-A u procesu oksidacije masnih kiselina. U tom slučaju dolazi do konverzije acetyl Co-A u ketonska tela, pre svega BHB. Proces stvaranja ketonskih tela je naročito intenziviran kod jedinki kod kojih je hipoglikemija udružena sa povišenim koncentracijama NEFA u krvi. NEFA mogu biti esterifikovane do triglicerida, čija se akumulacija odvija u jetri, i dostižu svoju maksimalnu koncentraciju u krvi 7-13 dana posle teljenja. Obzirom da je NEFA slabo varijabilna vrednost, ona pokazuje velik dijagnostički značaj u proceni metaboličkog statusa.

Vrednost RQUICKI indeksa se dobija objedinjavanjem vrednosti glukoze, insulina i NEFA a dobijena vrednost nas upućuje u stanje energetskog bilansa. Vrednosti indeksa insulinske rezistencije su više u periodu pre teljenja u odnosu na period posle teljenja, što ukazuje da su krave posle teljenja pokazivale veći stepen insulinske rezistencije u odnosu na krave u periodu zasušenja . Ovi rezultati su analogni onima, koje su dobili drugi istraživači.¹⁹¹ Međutim, postoje i istraživanja u kojima su rezultati takvi da u njima ne postoji značajna razlika vrednosti RQUICKI indeksa u zavisnosti od perioda laktacije.⁶⁰ Peripartalni period upravo karakteriše negativan energetski bilans, potrošnja masti u energetske svrhe perifernog tkiva i potrošnja glukoze za potrebe mlečne žlezde i proizvodnju mleka. Ovakvo prestrojavanje metabolizma ima za posledicu sniženu koncentraciju glukoze i povišenu koncentraciju neesterifikovanih masnih kiselina-NEFA.¹²¹ Rezultati našeg istraživanja pokazuju da kod krava postpartalno dolazi do pada u koncentraciji glukoze, insulina kao i RQUICKI indeksa, dok koncentracija NEFA raste.

6.2 Povezanosti pokazatelja insulinske rezistencije

Postoji inverzna relacija između vrednosti insulina, glukoze, NEFA i RQUICKI indeksa u periodu zasušenja i ranoj laktaciji. Dobijeni rezultati mogu se objasniti metaboličkim statusom krava u periodu zasušenja i ranoj laktaciji. U srednjoj i kasnoj fazi laktacije energetske potrebe organizma su zadovoljene. Često se dešava da je u ovom periodu energetski priliv veći od neophodnog, te se višak energije skladišti u telesnim depoima u vidu glikogena, masti i proteina.¹⁵⁴ Od sredine pa do kraja graviditeta se na membranama ćelija posteljice povećava ekspresija GLUT-1 i 3 molekula koji su insulin nezavisni te se na taj način povećava upotreba glukoze od strane fetusa, nezavisno od energetskog statusa majke.¹⁵⁵ Na ovaj način fetus biva obezbeđen neophodnim količinama glukoze i aminokiselina koji su neophodni za rast i razvoj. Organizam majke svoje potrebe u energiji podmiruje korišćenjem slobodnih masnih kiselina i ketonskih tela. Obzirom da je aktivnost karnitinpalmoiltransferaze-1 (CPT-1) smanjena, transport NEFA u mitohondrije je ograničen. Upravo zato je reesterifikacija i ponovna redistribucija putem lipoproteina vrlo male gustine (VLDL) dominantan metabolički put za metabolizam MK u jetri.³⁷ Smatra se da je u periodu zasušenja kapacitet hepatocita za sintezu i sekreciju lipoproteina dovoljan da bi se metabolizam VMK u jetri mogao nesmetano odvijati. Pozitivan bilans energije karakterišu pojačana glikoneogeneza u jetri, smanjeno periferno

korišćenje glukoze, nepromenjeno ili smanjeno korišćenje acetata, umerena mobilizacija MK iz telesnih depoa i povećano korišćenje MK u perifernom tkivu.²⁷ Nakon teljenja dolazi do porasta energetske potrebe organizma te dolazi do narušavanja ravnoteže organizma i razvoja negativnog energetskog bilansa (EB). U ovoj fazi veliki uticaj na količinu konzumirane hrane i unos energije imaju: telesna kondicija u momentu teljenja, puerperalne bolesti, kvalitet korišćenog hraniva i adaptiranost mikroflore buraga na njih.^{178,257} Da bi mlečna žlezda imala na raspolaganju dovoljnu koncentraciju glukoze, neophodno je da sva periferna tkiva (mišićno i masno) restriktivno koriste glukozu, da se intenzivira proces glukoneogeneze u jetri i da se mobilišu energetske prekursori kao alternativni izvori energije iz telesnih depoa. Intracelularni unos glukoze se odvija olakšanom difuzijom uz pomoć membranski vezanih transportnih molekula za glukozu (GLUT). Ovi molekuli su tkivno specifični. U mišićnom i masnom tkivu su najzastupljeniji insulin zavisni GLUT-tip 4 molekuli, dok su u mlečnoj žlezdi, jetri, i tkivu fetusa najzastupljeniji insulin nezavisni GLUT-tip 1,2, i 3. Ekspresija ovih tkivno specifičnih molekula omogućava insulinu da kontroliše preraspodelu glukoze u celom organizmu. Period nakon partusa karakteriše niska koncentracija insulina koji se proizvodi od strane beta ćelija endokrinog pankreasa, što uslovljava smanjenu ekspresiju insulin zavisnog GLUT-4 molekula. Samim tim korišćenje glukoze od strane mišićnog i masnog tkiva se smanjuje a glukoza se ostavlja na raspolaganju insulin-nezavisnim tkivima. Ove rezultate dobili su i drugi autori.^{181,182,184}

Postoji negativna korelacija u vrednosti insulina u periodu AP i PP, kao i pozitivna korelacija sa insulinom delta. Insulin negativno korelira sa vrednostima NEFA pre teljenja sa vrednostima glukoze posle teljenja. Više vrednosti insulina govore u prilog pozitivnom energetskom bilansu.^{1,2} Porast vrednosti insulinemije može nastati kao kompenzacija zbog postojanja rezistencije na insulin. Međutim, naši rezultati pokazuju da je odnos insulin:glukoza i insulin:NEFA niži u periodu pre teljenja u odnosu na period posle teljenja, što znači da postoji bolja senzitivnost na insulin. U ranoj laktaciji dolazi do značajnog opadanja insulina i glukoze, a njihova vrednost pozitivno korelira u periodu posle teljenja. Smanjen unos hrane u periodu oko teljenja smanjuje koncentraciju glukoze.¹²⁰ *Per os* unos glukoze ili unos hrane predstavlja mnogo jači stimulus za lučenje insulina u odnosu na glukozu datu intravenski, a glukoza u velikoj meri reguliše gene za sintezu insulina.²⁴⁵ Sve navedeno objašnjava postojanje značajne korelacije insulina i glukoze u periodu posle teljenja.

Insulin i NEFA pokazuju negativnu korelaciju, koja je bila statistički značajna u periodu zasušenja, a ova korelacija nije statistički značajna posle teljenja. Visoke koncentracije NEFA smanjuju klirens glukoze zbog smanjene osetljivosti tkiva na insulin, promena u sekreciji insulina i promena u klirensu insulina.^{107,248} Na modelu laboratorijskih miševa pokazan je direktan štetan uticaj NEFA na beta ćelije pankreasa.⁵² U periodu rane laktacije je prisutno gladovanje, uz porođajni stres koji povećava koncentraciju epinefrina i kortizola. Tokom gladovanja se smanjuje antilipolitički efekat insulina, a lipoliza izazvana epinefrinom je mnogo efikasnija.²⁴⁹ Zapaženo je da postoji povezanost NEFA i insulinske rezistencije kod krava, dovođenjem krava u stanje hiperlipidemije aplikacijom emulzije loja.²⁵⁰ Navedeni rezultati mogu objasniti izostanak signifikantne korelacije između insulina i NEFA u ranoj laktaciji.

RQUICKI indeks je indirektan pokazatelj insulinske senzitivnosti kod krava. Njegova vrednost je niža u ranoj laktaciji u odnosu na period zasušenja.¹⁹¹ Upravo ovaj parametar pokazuje značajnu povezanost sa metaboličkim i endokrinološkim parametrima u ranoj laktaciji.²⁵¹

RQUICKI negativno korelira sa vrednostima insulina, glukoze i NEFA u PP periodu, dok u AP periodu RQUICKI signifikantno korelira samo sa vrednostima NEFA. Negativna korelacija RQUICKI vrednosti i insulina zapažena je u ogledu drugih autora¹⁶ RQUICKI je odličan pokazatelj antilipolitičkog delovanja insulina.²⁰ Rezultati istraživanja u kom su korišćeni modeli, koji su prekomerno hranjeni i imaju visok energetske unos u zasušenju, pokazali su da postoji opadanje vrednosti indeksa insulinske senzitivnosti i porasta vrednosti insulina u odnosu na normalno hranjene krave, a često se dešava da posle teljenja nema razlike u insulinskoj senzitivnosti ili je ona pak bolja.^{16,219,252} Upotreba RQUICKI indeksa u proceni insulinske rezistencije može se vršiti samo između krava istog metaboličkog statusa te je direktno poređenje naših rezultata sa ostalim istraživačkim protokolima otežano.²⁵³

Insulinska senzitivnost posle teljenja izražena kroz vrednost RQUICKI indeksa zavisi od dinamičkih promena insulina, glukoze i NEFA na prelazu AP-PP. Promene u vrednosti insulina i NEFA su bile mnogo značajnije od promena u glikemiji (uporediti t-vrednosti), što potvrđuje da RQUICKI indeks ukazuje na antilipolitički efekat insulina u ovom ogledu. Korelacije između ispitivanih parametara pokazuju da promena u sekreciji insulina i vrednosti lipida imaju značajnu ulogu u stvaranju insulinske rezistencije u ranoj laktaciji. Negativna korelacija između RQUICKI_AP i PP kontrolisana je promenom u intenzitetu lipolize. NEFA u plazmi negativno

korelira sa insulin AUC i veličinom pik ne utičući na parameter glukoze tokom IVGTT kod krava u postpartalnom periodu.³

Koncentracija glukoze u krvi opada u postpartalnom periodu usled aktivacije rada mlečne žlezde.¹⁹⁰ Obzirom da potrebe mlečne žlezde za glukozom u početnoj fazi laktacije prevazilaze mogućnosti glukoneogeneze, kao krajnji ishod se javlja trošenje rezervi glikogena iz jetre, snižavanja glikemije i povećanje koncentracije neesterifikovanih masnih kiselina (NEFA) i ketonskih tela u krvi.¹⁹² Izraženo povećanje koncentracije NEFA ima negativno dejstvo na beta ćelije pankreasa, tako što smanjuje proizvodnju insulina. U skladu sa ovim su i tvrdnje drugih istraživača, koji navode da povišene koncentracije NEFA u cirkulaciji mogu da poremete glukozom indukovanu sekreciju insulina u pankreas.³ Obzirom da je koncentracija insulina u krvi krava zavisina i od ishrane, koja je smanjena nakon partusa, koncentracija insulina dodatno opada.¹⁹³ Usled smanjene produkcije insulina u pankreasu smanjuje se iskorišćavanje glukoze u insulin zavisnim tkivima (masno i mišićno tkivo).¹¹ Niska koncentracija insulina smanjuje ekspresiju GLUT 4 molekula, a time i njeno korišćenje za potrebe mišićnog i masnog tkiva, što povećava raspoloživost glukoze za insulin - nezavisna tkiva. Pad koncentracije insulina posle teljenja predstavlja mehanizam adaptacije na negativan energetski bilans (NEB). U slučajevima izražene insulinske rezistencije proces lipomobilizacije se intenzivira i može imati za posledicu nastanak masne jetre.⁴⁷ Osim smanjenja koncentracije insulina uzrokovanog ishranom, smanjenje koncentracije insulina u krvi nastaje i kao rezultat mehanizma adaptacije na visoku proizvodnju mleka. Reč je o homeoretskom procesu, koji ima za cilj da obezbedi dovoljno glukoze neophodne za nesmetan proces laktacije pri čemu se on odvija zahvaljujući transportu glukoze u ćelije tkiva mlečne žlezde koji je nezavisan od insulina. Ovo međutim nije slučaj i sa ulaskom glukoze u periferna tkiva (masno i mišićno). Osetljivost perifernih tkiva na insulin je znatno smanjena. Ovaj mehanizam sprečava korišćenje glukoze u perifernim tkivima, dok glukoza biva dostupna mlečnoj žlezdi kao izvor energije i prekursor u sintezi laktoze. Dakle, stanje uhranjenosti životinja u periodu oko teljenja u značajnoj meri uzajamno deluje sa stepenom osetljivosti tkiva na insulin i/ili sposobnosti krava da se adaptiraju na laktaciju koja sledi. Nakon partusa se povećava koncentracija somatotropnog hormona, koji izaziva rezistenciju perifernih tkiva na insulin, stimuliše lipolizu i sintezu glukoze u jetri i na taj način obezbeđuje dodatnu energiju za sintezu laktoze u mlečnoj žlezdi.^{2,4,194} Obzirom da insulin stimuliše ekspresiju receptora za hormone rasta u adipocitima, kod gojaznih krava postoji veća mogućnost da nastanu promene u

senzitivnosti i odgovoru tkiva na insulin pod dejstvom STH. Što je veća koncentracija insulina pre teljenja, to je njegova vrednost niža posle teljenja. Rezultati istraživanja pokazuju da postoji negativna korelacija između RQUICKI indeksa IR u periodu pre i posle teljenja. Naime, što su krave bile senzitivnije na insulin u periodu pre teljenja, to im je rezistencija na insulin bila više izražena u periodu posle teljenja. U periodu pre teljenja postoji pozitivna korelacija između vrednosti insulina i RQUICKI indeksa, dok je ona posle teljenja negativna.

RQUICKI indeks korelira negativno sa vrednostima glukoze, a ova je korelacija približno nuli tokom perioda pre teljenja, dok je u periodu posle teljenja statistički značajna. To nam ukazuje da će stepen insulinske rezistencije rasti što je glikemija niža, i to znatno većim intenzitetom u periodu posle teljenja, tj. u ranoj laktaciji. RQUICKI indeks korelira negativno sa vrednostima NEFA i pre i posle teljenja. Viša vrednost RQUICKI indeksa u periodu pre teljenja znači veći pad njegove vrednosti i veći stepen insulinske rezistencije posle teljenja. Što su krave senzitivnije na insulin u periodu pre teljenja (veća RQUICKI vrednost) imaće izraženiji porast NEFA u periodu posle teljenja. Relativne promene pokazatelja insulinske rezistencije pokazuju da je kod krava posle teljenja došlo do opadanja glikemije za $0,99 \pm 0,54$ mmol/l, insulina za $6,79 \pm 4,43$ μ /l i RQUICKI indeksa za $0,02 \pm 0,04$, dok je vrednost NEFA porasla za $0,42 \pm 0,23$ mmol/l

6.3 Parametri metaboličkog profila u periodu posle teljenja

Betahidorksibutirat – BHB nastaje u procesu parcijalne oksidacije NEFA i značajan je pokazatelj energetskog statusa. U postpartalnom periodu njegova koncentracija predstavlja veoma osetljiv indikator. Dozvoljena koncentracija BHB u krvi po Merck-u je za krave u zasušenju do 0,7 mmol/l, dok je za krave posle partusa i do 1,2 mmol/l. Po Radostis-u sve vrednosti ispod 1.0 mmol/l su fiziološke, bez obzira na fazu proizvodnje. Smatra se da je koncentracija BHB na početku laktacije od 0,6 do 1 mmol/l fiziološki prihvatljiva i da ukazuje na umerenu lipomobilizaciju. Najniža izmerena vrednost u periodu posle teljenja se nalazi ispod referentnih graničnih vrednosti, dok je maksimalna izmerena vrednost iznad referentnih graničnih vrednosti. Prosečna dobijena vrednost u postpartalnom periodu se nalazi u referentnim okvirima. Međutim, ako dobijenu maksimalnu vrednost poredimo sa referentnim vrednostima po Merck-u

ili Radostis-u, onda je i ona u fiziološkim granicama. Kao posledica povećane koncentracije NEFA usled deficita glikogena koji je neophodan za njihovu razgradnju, dolazi do skretanja metaboličkog puta masnih kiselina i nastanka ketonskih tela kao što je BHB. Ovo je upravo karakteristično za peripartani period i negativan energetske bilans, koji je zastupljen u njemu.^{121,195,196} Pored povećanja koncentracije BHB usled negativnog stanja metabolizma, njeno povećanje u krvi se može zapaziti i pri ishrani nekvalitetnom silažom koja sadrži visok procenat buterne kiseline, koja se prilikom resorpcije kroz zid rumena transformiše u β -hidroksi buternu kiselinu.¹⁹⁷ U tom slučaju, porast BHB nije udružen sa hipoglikemijom.¹⁹⁸ BHB je veoma značajan indikator i on ima primenu u dijagnostici ketoze kod krava. Ketoza je jedno od najznačajnijih dekompenzovanih stanja metabolizma, koje se javlja u periodu rane laktacije. Optimalna granica za postavljanje subkliničke ketoze je koncentracija BHB od 1,2 mmol/l.
128,129,130

Trigliceridi – U ranoj laktaciji krave ulaze u stanje negativnog energetskog bilansa, što za posledicu ima trošenje sopstvenih energetskih rezervi i izmenu metabolizma. Organizam prevashodno troši rezerve glikogena, koji se deponuju u jetri. Pored glikogena, troše se i masti i proteini. Mobilizacija masti iz telesnih depoa je najznačajniji proces kojim se kompenzuje nedostatak energije u organizmu. Međutim, visoka mobilizacija masti može premašiti sposobnosti jetre da izvrši njihovu oksidaciju i transportovanje. U ovom slučaju se javlja taloženje lipida u hepatocitima u vidu triglicerida. U zavisnosti od procentualne zastupljenosti triglicerida u jetri, masna jetra može biti blaga (<5%, centrolobularna infiltracija hepatocita), umerena (5-10%, masna infiltracija u svim hepatocitima) i izražena (>10%, nekroza, gubitak strukture), a normalne vrednosti su ispod 1%. Promene u vrednostima metabolita u ranoj laktaciji se mogu javiti kako kod krava sa izraženom masnom infiltracijom, tako i kod krava sa blagom i umerenom akumulacijom triglicerida u hepatocitima.¹⁹ Povišena koncentracija triglicerida u hepatocitima može dovesti do promena u metaboličkom profilu krvi u vidu: povećane koncentracije bilirubina (kao posledica zastoja u protoku žuči), snižene koncentracije triglicerida i holesterola (kao posledica smanjene produkcije transportnih proteina koji ulaze u sastav VLDL i LDL lipoproteina, tj. smanjene stabilnosti transpornih vezikula), povišene aktivnost jetrinih enzima (kao posledica oštećenja hepatocita).^{192,193,194,195,196} Prosečna vrednost triglicerida postpartno, kod krava koje su činile našu eksperimentalnu grupu je iznosila $0,11 \pm 0,01$ mmol/l.

Holesterol – je najzastupljeniji sterol u životinjskom organizmu a vodi poreklo iz hrane ili se sintetiše iz acetil-koenzima A. Sinteza holesterola je delom pod kontrolom samog holesterola.¹⁹⁹ U slučajevima kada je količina holesterola u hrani smanjena povećava se njegova sinteza u jetri, i obrnuto. Kada se hranom unosi veća količina holesterola, njegova sinteza u jetri se smanjuje i može potpuno prestati. Snižena koncentracija triglicerida i holesterola u krvi može uputiti na masnu infiltraciju jetre. Naime, masti u hepatocitima mogu pokrenuti nastanak masne infiltracije ili bivaju transportovane iz jetre u kompleksu sa lipoproteinima. Koncentracija triglicerida i holesterola opada zato što dolazi do pada sposobnosti jetre da sintetiše lipoproteine veoma male gustine koji predstavljaju proteine nosače za transportne forme lipoproteina. Koncentracija vrednosti triglicerida i holesterola je u saglasnosti sa rezultatima, koje su dobili drugi istraživači.^{200,201} Taloženje lipida na samom početku laktacije opterećuje hepatocite i dovodi do menjanja njihove ultrastrukture. Samim tim, lakše otpuštaju enzime u krvotok, te se koncentracija hepaticnih enzima povećava sa porastom opterećenja hepatocita.²⁰²

Ukupni bilirubin (UB) – Određivanje koncentracije ukupnog bilirubina pruža uvid u funkcionalno stanje jetre obzirom da poremećaji metabolizma mogu dovesti do poremećaja ekskretorne funkcije jetre, što dovodi do povećanja koncentracije bilirubina u krvi krava.^{47,202} Koncentracija UB posredno pruža uvid u energetski status jedinke. Fiziološke vrednosti za koncentraciju ukupnog bilirubina u literaturi su različite. Prema Rosenberger-u (1979), koncentracija može biti povećana do 6,84 $\mu\text{mol/l}$ kod zdrave jetre, usled raznih metaboličkih opterećenja jetre (gladovanje, visoki graviditet, puerperium i laktacija). Koncentracija ukupnog bilirubina se kreće u fiziološkom intervalu od 0,7- 8,55 $\mu\text{mol/l}$. Kada pređe granicu od 8,55 $\mu\text{mol/l}$, ona predstavlja patološki nalaz i ukazuje na masnu infiltraciju jetre. Posledično se smanjuje njena ekskretorna moć.²⁰³ Prema nalazu većine autora fiziološke vrednosti bilirubnemijekod goveda se kreću između 0,85-6,84 $\mu\text{mol/l}$. Kada ove rezultate uporedimo sa našim prosečnim rezultatima, možemo reći da je dobijena prosečna vrednost ukupnog bilirubina znatno veća od prosečnih referentnih vrednosti, što nas upućuje na stanje u kom je zamašćena jetra i opterećeni žučni putevi. Kada uporedimo najmanju izmerenu vrednost ukupnog bilirubina, ona se nalazila u fiziološkim granicama, dok je najviša izmerena vrednost iznad gornje fiziološke granice. Ovaj nalaz je u skladu sa podacima koji su naveli prethodni istraživači a rezultat je velikog opterećenja jetre u prvim danima laktacije.¹⁴⁴ Ovo veliko opterećenje jetre najverovatnije

nastaje kao posledica neadekvatne ishrane. Koncentracija ukupnog bilirubina iznad fizioloških granica označava poremećaj funkcije jetre, pri čemu biva oslabljena i njena ekskretorna funkcija.^{105,203} Sve ovo ima za posledicu težu adaptaciju i izlaženje iz negativnog energetskog bilansa. Koncentracija ukupnog bilirubina u krvnom serumu predstavlja značajan parametar za ocenu metaboličkog profila krava i smatra se da predstavlja nezaobilazan test za ispitivanje funkcionalnog stanja jetre.

AST (aspartataminotransferaza) – referentne vrednosti po Merck-u za ovaj enzim su 60-125 U/l. AST je prisutna u različitim tkivima. Ima ulogu katalizaora u metabolizmu aminokiselina i ugljenih hidrata. Promena njene vrednosti u krvi može biti rezultat njene povećane aktivnosti u ćelijama (prevashodno jetri) ali i odraz ćelijske degeneracije ili nekroze obzirom da je lokalizovana u citoplazmi i mitohondrijama. Osim u jetri, visoku aktivnost ima i u srcu i skeletnoj muskulaturi i jetri. Zbog toga, ne mora uvek da ukazuje na oštećenje jetre. Do njenog porasta dolazi čak i u subkliničkim stanjima oštećenja jetre, dakle veoma je osetljiv pokazatelj.^{234,235} Ukoliko je aktivnost AST viša od 100IU/L, kao što je slučaj u našem istraživanju (gde je dobijena prosečna vrednost 111,42±14,04 IU/l), to može da ukaže na određeni stepen oštećenja jetre, i to najverovatnije usled masne infiltracije.²⁰⁴ Porast vrednosti AST na početku laktacije su utvrdili i drugi istraživači.²³⁶ Međutim, postoje i istraživanja u kojima su dobijeni drugačiji rezultati, gde je zapaženo povećanje AST u periodu zasušenja- 6 nedelja pred teljenje.²³⁷

ALP (alkalna fosfataza) – Referentne vrednosti ALP po Merck-u su 18-153 U/l. ALP je enzim, koji je prisutan u crevima, jetri, bubrezima i kostima. U dijagnostičke svrhe se njegova koncentracija koristi kao pokazatelj oštećenja jetre i u dijagnostici osteoartritisa, pri čemu se njena aktivnost povećava.²³⁶ Vrednosti ALP se menjaju tokom perioda laktacije pri čemu dostižu najveću vrednost u piku laktacije, dok su joj vrednosti smanjene na samom početku laktacije. Rezultati, koje smo mi dobili se nalaze u granicama referentnih vrednosti u saglasnosti su sa rezultatima drugih istraživača.^{47,236}

GGT (gamaglutamiltransferaza) – je enzim koji ima najveću aktivnost u epitelu žučnih puteva i bubrezima. Prisutan je u membrani ćelija a njeno povećanje se može zapaziti kod oštećenja ćelijske strukture hepatocita.^{238,239} Povišena vrednost u krvnom serumu se zapaža u

slučajevima holestaze i oštećenja žučnih puteva. Naši rezultati su slični onima, koje su dobili drugi istraživači.⁴⁷

Obzirom da masna infiltracija i degeneracija ćelija jetre dovode do oštećenja ćelijske bembrane hepatocita i oslobađanja enzima kao što su AST i GGT, u krvi se može zapaziti upravo njihov porast u ovakvim stanjima.^{239,240,241}

Ukupni protein – u serumu predstavljaju zbir svih proteina u krvotoku. Njihova koncentracija zavisi od stanja ravnoteže između njihove sinteze i razgradnje. Proteini kod krava imaju veoma važnu ulogu u procesu glukoneogeneze, da bi se obezbedile dovoljne količine glukoze.¹²³ Nedostatak proteina može loše uticati na kvalitet i količinu mleka. Da bi iskoristljivost proteina bila adekvatna, neophodno je obezbediti dovoljnu količinu energije putem ishrane.^{98,134} Najniže vrednosti koncentracije ukupnih proteina zapažaju se u u periodu oko teljenja. Smanjenje ukupnih proteina nastaje kao posledica aktivnosti mlečne žlezde u pripremanju kolostruma za laktaciju koja sledi. Puerperalni poremećaji, kao što su npr. endometritis, ne prouzrokuju značajnije promene u koncentracijama ukupnih proteina, osim što se kod bolesnih krava zapaža tendencija porasta gamaglobulina. Fiziološki interval koncentracije ukupnih proteina u krvi po Merck-u za krave je 67-75 g/l, dok je po Radostis-u od 58-81 g/l. U sprovedenom istraživanju, prosečna vrednost proteina se nalazila u fiziološkim okvirima. Međutim, najniža vrednost ukupnih proteina je ispod fizioloških referentnih vrednosti ako upoređujemo sa referentnim vrednostima po Mercku, dok se po Radostis-u nalazi u granicama referentnih vrednosti. Maksimalna dobijena vrednost se nalazi izvan fizioloških referentnih vrednosti, u poređenju sa vrednostima po Mercku kao i po Radostis-u. Koncentracija ukupnih proteina ispod 60g/l može da poveća rizik od nastanka bolesti.¹³⁷ Razgradnja proteina se odvija u predžellicima pod dejstvom predželudačne mikroflore, pri čemu nastaju amonijak i ketokiseline, koje se koriste za sintezu proteina. Višak amonijaka transportuje se u jetru gde nastaje urea. Urea se potom transportuje u rumen putem krvi i koristi se za bakterijski rast ili se eliminiše putem bubrega.¹³⁵

Albumini – Sinteza albumina se odvija u jetri i oni su najzastupljeniji proteini krvne plazme.¹⁰⁵ Čine 35-50% ukupnih proteina seruma. Prema navodima drugih autora odnos albumina i globulina je kod goveda skoro jednak ili čak i nešto veći u korist globulina.²⁰⁵ Razgradnja albumina se odvija u jetri, mišićnim tkivima, bubrežima i koži. U cirkulaciji albumini imaju

dvostruku ulogu: učestvuju u regulaciji koloidno-osmotskog pritiska i imaju ulogu kao transportni proteini tj. nosači jer poseduju mogućnost reverzibilnog vezivanja mnogih organskih jedinjenja.^{206,207} Albumini su indikatori metaboličkog statusa i imaju usku vezu sa telesnom masom i ishranom.²⁰⁸ Sekretija albumina je stimulisana padom osmotskog pritiska.²⁰⁹ Inhibitorni efekat na sekreciju albumina imaju određena patofiziološka stanja, koja se odvijaju u toku inflamatornih oboljenja. Ovaj mehanizam nastaje pod dejstvom prinflamatornih citokina kao što su interleukini (IL-1, IL-6) i tumor nekrotičnog faktora alfa (TNF α). Fiziološki interval koncentracije albumina u krvi po Merck-u za krave je 25-38 g/l, dok je po Radostis-u od 21-40 g/l, bez obzira na fazu proizvodnje. Neki istraživači smatraju da krave kod kojih je koncentracija albumina u serumu ≥ 35 g/l imaju manje rizike za nastanak postporođajnih bolesti. Ako poredimo najmanju dobijenu vrednost sa referentnim vrednostima, ona se nalazi u fiziološkim granicama. Dok se najviša dobijena vrednost nalazi izvan granica referentnih vrednosti. Srednja vrednost albumina se nalazi u granicama referentnih vrednosti.

Urea – Koncentracija uree u krvi je značajan pokazatelj snabdevenosti azotom i energijom putem obroka ali i pokazatelj sposobnosti jetre da detoksikuje organizam od amonijaka. Koncentracija uree u krvi upućuje na stanje energetskog metabolizma jer višak proteina u hrani u nedostatku energije dovodi do prestrojavanja metabolizma proteina i dovodi do sinteze uree. Koncentracija uree u organizmu zavisi od ishrane, a kao dijagnostički pokazatelj može uputiti na bolest bubrega. Fiziološke referentne vrednosti za ureu kod krava po Merck-u su 3,6-8,9 mmol/l, dok su po Radostis-u 2,0-6,8 mmol/l u svim proizvodnim fazama i starosnim kategorijama. Ako naše rezultate poredimo sa referentnim vrednostima po Mercku, onda zapažamo da se minimalna dobijena vrednost nalazi ispod referentnih vrednosti dok se maksimalna vrednost koncentracije uree nalazi u fiziološkim granicama. Ako rezultate poredimo sa referentnim vrednostima po Radostis-u onda zapažamo da se minimalna dobijena vrednost nalazi u okviru referentnih vrednosti dok je maksimalna dobijena vrednost, iznad granice referentnih vrednosti. Dobijena srednja vrednost uree nalazi se u okviru referentnih vrednosti. Snižena koncentracija uree kod krava upućuje da jetra ima umanjenu sposobnost detoksikacije organizma i/ili da je nivo glukoneogeneze umanjen. Uremija je povišena u onim slučajevima kada postoji relativan suficit proteina u obroku u odnosu na količinu energije. Visoka uremija je posledica suficita proteina i deficita energije ili suficita proteina i energije u obrocima krava. Pojava ekstremno visokih vrednosti uree ukazuju na oštećenje bubrega, a značajno smanjenje

vrednosti ukazuje na deficit proteina. Pojedinačne niske vrednosti uremije kod ispitivanja metaboličkog profila ukazuju na to da kod tih životinja postoji smanjeno uzimanje hrane.^{210,211,212} Smanjen unos hrane dovodi do pada koncentracije uree bez obzira na period laktacije.²¹³ Amonijak je indirektni pokazatelj nivoa glukoneogeneze (zbog deaminacije aminokiselina).

Koncentracija Ca – Ca je važan za aktivaciju brojnih enzima i hormona. On učestvuje u koagulaciji krvi kao i u stimulaciji nerava. Optimalna koncentracija Ca u krvi po Merck-u za krave je od 2,0 do 2,8 mmol/l, dok je po Radostis-u od 2,0 do 3,0 mmol/l, bez obzira na fazu proizvodnje. Dobijena najniža vrednost koncentracije Ca u istraživanju se nalazi ispod referentnih vrednosti dok je maksimalna dobijena vrednost u okviru fizioloških granica referentnih vrednosti. Prosečna dobijena vrednost koncentracije Ca se nalazi u fiziološkim okvirima. Kretanje vrednosti jona Ca je u skladu sa ranije dobijenim rezultatima.^{145,146} U ranoj laktaciji regulatorni mehanizmi za Ca i P prilagođavaju njihovu koncentraciju visokim potrebama mlečne žlezde. Da bi se obezbedila homeostaza, Ca se mobilize iz kostiju i apsorbuje iz digestivnog trakta. Resorpcija kalcijuma se odvija u želucu pod dejstvom želudačnih sokova pri čemu nastaju kalcijumhlorid i kalcijumfosfat. U ovom obliku se može resorbovati preko sluznice creva, putem kalcijumovih kanala. Krave u toku graviditeta imaju potrebe u Ca od 2 do 3,5g/kg SM po obroku, dok se ove potrebe u toku laktacije povećavaju do 5,5 g/kg SM. Opadanje koncentracije jona Ca nakon partusa nastaje usled njegovog pojačanog prelaska u mleko.¹⁴⁵ U cilju podmirivanja optimalne koncentracije Ca, dolazi do njegove mobilizacije iz kostiju pod dejstvom paratireoidnog hormona (PTH). Vitamin D potencira resorpciju Ca iz creva. Hipokalcemija može dovesti do poremećaja u vidu mlečne groznice koja se najčešće javlja u prvih 24 časa nakon partusa.¹⁴⁶ Kao posledica hipokalcemije, može se javiti mastitis obzirom da dolazi do smanjenja intenziteta kontrakcije svih mišića pa tako i sisnih sfinktera.²¹⁴ Može nastati dislokacija sirišta obzirom da deficit Ca smanjuje pokretljivost zida buraga i sirišta.^{147,148} Hipokalcemija je naročito izražena kod starijih krava. Kod ove kategorije životinja broj visoko diferenciranih receptora (VDR) u crevima opada. Oni pomažu resorpciju Ca u crevima, te u slučaju njihovog nedostaka posledično dolazi do smanjene resorpcije Ca iz digestivnog trakta, a samim tim i manje koncentracije Ca u krvi. Kod starijih krava, takođe, u kostima opada broj osteoblasta, ćelija na kojima se nalaze receptori za parathormon pri čemu se smanjuje mogućnost mobilizacije Ca iz kostiju.²¹⁵ Niska koncentracija Ca u krvi ima negativan uticaj na fagocitozu i funkciju polimorfonuklearnih leukocita-granulocita.²¹⁶

Koncentracija P – Optimalna koncentracija P u krvi krava po Merck-u za krave je od 1,8-2,6 mmol/l, dok je po Radostis-u 1,4-2,7 mmol/l, nezavisno od faze proizvodnje. Najniža dobijena vrednost P u ogledu se prema Mercku nalazi ispod donje granice referentnih vrednosti, dok je maksimalna dobijena vrednost iznad granica referentnih vrednosti. Prosečna vrednost P se nalazi u okvirima referentnih vrednosti. Neorganski fosfor ima važnu ulogu u anaboličkim procesima, učestvuje u procesima fosforilacije, utiče na acidobaznu ravnotežu je utvrdio da postpartalna hipofosfatemija ima značajnu ulogu u nastanku masne jetre.²¹⁷ Nedovoljan unos P može smanjiti laktacione i reproduktivne performanse. Hipofosfatemija nastaje najčešće pri ishrani hranivima lošijeg kvaliteta deficitarnim P, kao što je na primer kabasta hrana koja potiče sa zemjišta siromašnih u P, ili povećanog izlučivanja fosfata urinom (kod ishrane sa prekomernom količinom energetski bogatih hraniva). Ipak, hipofosfatemija se retko javlja kod ishrane energetski bogatim hranivima, jer su takva hraniva obično bogata fosforom.²¹⁸ Poremećaj metabolizma mineralnih materija neposredno posle teljenja dovodi najčešće do tipične hipokalcemije, ali neretko i do atipične puerperalne pareze, kod koje je dominantan pad nivoa fosfora.

6.4. Povezanost pokazatelja inaulinake rezistencije sa parametrima metaboličkog profila posle teljenja

Sve promene koje su prisutne u metaboličkoj adaptaciji krava nastaju kao posledica njihove genetske predispozicije, telesne kondicije, ishrane i sastava hraniva u obroku. U periodu oko teljenja, veliku važnost ima stanje uhranjenosti krava odnosno telesna kondicija. Stanje uhranjenosti u značajnoj meri deluje uzajamno sa stepenom osetljivosti tkiva na insulin i/ili sposobnost krava da se adaptiraju na buduću laktaciju. Poremećaji energetskog metabolizma krava su najčešće posledica neadekvatne pripremljenosti životinja u periodu zasušenja na ono što sledi, a to je porast u proizvodnji mleka uslovljen početkom laktacije. Ovo se prevashodno odnosi na pozitivan bilans energije i preteranu gojaznost krava u prepartlnom periodu.²¹⁹ Gojaznost se veoma često dovodi u vezu sa sposobnošću krava da se adaptiraju na povećane energetske potrebe na početku laktacije obzirom da se kod ugojenih krava smanjuje osetljivost tkiva na insulin.²¹⁹ Gojazne krave imaju smanjen apetit u periodu oko teljenja.²²⁰ U takvim uslovima negativnog energetskog bilansa nedostatak energije se nadoknađuje iz sopstvenih rezervi,

prevashodno lipomobilizacijom. Smanjenje apetita se dalje produbljuje, obzirom da sa porastom lipomobilizacije raste i koncentracija NEFA. Nekontrolisana mobilizacija masnih kiselina iz telesnih depoa može postati samoodrživ proces kada NEFA počne uticati na sekreciju insulina u beta ćelijama pankreasa i na insulinsku senzitivnost. Njihova oksidacija deluje na centar za glad. Centar za glad dobija signal da je jetra dobro snabdevena energijom iako se organizam nalazi u stanju negativnog energetskeg bilansa, koji pokušava kompenzovati mobilizacijom telesnih rezervi.²²¹ Obzirom da se maksimalno konzumiranje hrane uspostavlja tek nakon 10 do 15 dana od teljenja, period rane laktacije upravo karakteriše negativan bilans energije i posledično slabljenje kondicije i smanjenje masnog tkiva. Dakle, smanjena ili suprimirana funkcija beta ćelija pankreasa je jedan od uzroka koji može izazvati razistenciju. Promene na nivou receptora takođe mogu biti uzrok smanjenja inulinskog odgovora ali i promene na postreceptorskom nivou, kad nastaju greške u transdukciji insulinskog signala i/ili translokaciji GLUT molekula na membranama ciljnih ćelija.^{2,222} Insulin je pozitivan regulator procesa transkripcije i translokacije GLUT 4 molekula u insulin zavisnim tkivima.⁴ Razlika u nivou ekspresije GLUT 4 molekula na membranama mišićnih ćelija različitih jedinki nastaje upravo kao posledica razlike u vrednosti insulina u krvi. Kod gojaznih krava se zapaža znatno veća koncentracija glukoze u krvi, što ukazuje na poremećaje na nivou translokacije GLUT 4 molekula na membranama mišićnih ćelija kod ovih jedinki. Ovakav nalaz se može zapaziti i kod ljudi obolelih od dijabetesa tip 2.²²³ On je primarni razlog smanjene senzitivnosti tkiva na insulin.¹⁸¹ Smanjena efikasnost insulina u procesu stimulanja iskorišćavanja glukoze od strane perifernih tkiva se tumači time da se kod krava koje su u periodu zasušenja hranjene većom količinom krmnih smeša i / ili ugojenih krava poremećaji metabolizma glukoze posledica dugotrajne hiperinsulinemije koja u toku perioda zasušenja mehanizmom negativne povratne sprege reguliše ekspresiju protein insulinskih receptora. Više masne kiseline i inflamatorni citokini (TNF alfa i IL-6) su na početku laktacije kod gojaznih krava prisutni u većim koncentracijama u krvi i mogu uticati na prenošenje insulinskog signala, samim tim i na regulaciju metaboličkih procesa u ćelijama.^{224,225} Masno tkivo infiltrirano makrofagima je znatno aktivnije u proizvodnji TNF-alfa i drugih proinflamatornih citokina.^{168,169,170,171} Citokini blokiraju insulinske signalne puteve u hepatocitima. Kod gojaznih jedinki se proces lipomobilizacije odvija intenzivnije u odnosu na stvarne energetske potrebe u uslovima NEB. Ovakav slučaj je i kod ljudi obolelih od dijabetesa tip 2.²²⁶ U uslovima insulinske rezistencije, smanjena je mogućnost korišćenja nepotrebno

mobilisanih većih količina masnih kiselina u telesnim tkivima, prvenstveno mišićnom. Zato se suvišne masne kiseline usmeravaju ka jetri koja je odgovorna za regulaciju energetskeg metabolizma i prometa masnih kiselina. Ovo ima za posledicu smanjeno iskorišćavanje energije i pojačavanje NEB.²²⁷ Ovo je razlog veće mogućnosti za nastanak masne infiltracije jetre kod gojaznih krava. Promene vrednosti glukoze posle teljenja u vidu njenog pada, je u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom glukoze pre teljenja. Ovo nam ukazuje da će kod krava sa višom glikemijom u periodu pre teljenja, biti intenzivniji pad posle teljenja. Obzirom da ketonska tela predstavljaju alternativni izvor energije za organe, njihov blagi porast u krvi predstavlja normalan mehanizam adaptacije na NEB u ranoj laktaciji.²²⁸ BHBA predstavlja dominantnu formu ketonskih tela, i njegova koncentracija u krvi predstavlja indeks oksidacije masnih kiselina.²²⁹ Kao posledica smanjenja energije a prisustva veće koncentracije proteina u obroku, dolazi do povećanja koncentracije uree. Usled energetskeg deficita dolazi i do povećane mobilizacije masnih kiselina koje dospevaju u jetru i uzrokuju njeno metaboličko opterećenje praćeno porastom koncentracije ukupnog bilirubina. Hipoglikemija, hipoalbuminemija i hipoholesterolemija ukazuju na smanjenu sintetsku sposobnost jetre, dok znatno povećanje koncentracije ukupnog bilirubina i aktivnost AST u serumu ukazuje na oštećenje jetre i narušen morfološki integritet hepatocita.^{124,188,230} Ove promene se javljaju kao posledica akumulacije lipida u hepatocitima koja je proizvod povećane upotrebe masti u energetske svrhe usled neadekvatne ishrane i negativnog energetskeg bilansa. Jetra je glavni organ koji učestvuje u adaptaciji metabolizma pa izmenjene vrednosti ovih parametara upravo upućuju na metaboličko opterećenje krava.¹ Usled promena u metabolizmu kao posledica smanjenog unosa proteina putem hrane i pojačanog katabolizma proteina, dolazi do smanjenja ukupnih proteina u serumu sveže otejenih krava. Albumini se tokom puerperijuma prevashodno koriste za sintetske procese, te je njihova koncentracija u krvi u tom periodu smanjena ²³¹. Koncentracija albumina u krvi često prati koncentraciju proteina.²³² U ranoj laktaciji se povećava unošenje proteina putem hrane, što posledično utiče na porast koncentracije albumina. Porast albumina nije odmah značajan nakon porasta proteinemije kod krava, obzirom da je za sintezu proteina potrebno izvesno vreme. Zato se smatra da urea predstavlja trenutni pokazatelj unosa proteina hranom a albumini su pokazatelj ne trenutnog, nego dugoročnog proteinskog statusa krava.¹⁰⁵ U periodu posle teljenja se kao posledica povećanja koncentracije parathormona i povećane osetljivosti kostiju na njegovo dejstvo odvija povećana mobilizacija Ca iz kostiju pri čemu on biva

transportovan u mleko. U istraživanju je dobijena očekivano niža vrednost koncentracije Ca koja je upravo uslovljena smanjenim unosom hranljivih materija na početku laktacije i smanjenom resorpcijom Ca u crevima, kao i izlučivanjem putem mleka. Dakle, koncentracija Ca u krvi opada sa otpočinjanjem laktacije, što su utvrdili i drugi istraživači.²³³ Pad koncentracije triglicerida i porast koncentracije NEFA u krvi su znak intenzivnog metabolizma masnih kiselina koji dovodi do posledičnog zamašćenja jetre. Ukoliko je nakupljanje triglicerida intenzivno, oni ometaju i potpuno blokiraju rad hepatocita. Dakle, upravo je energetski bilans taj koji je ključ adaptacije metabolizma u peripartalnom periodu. S toga ishranu u ovom periodu treba prilagoditi energetskim potrebama jedinki sa hranivima, koja omogućavaju lako usvajanje energije i sprečiti njen pad nakon partusa da bi metabolizam bio izbalansiran.

7.ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata istraživanja dobijenih u ogledu iznosimo sledeće zaključke:

1. U periodu posle teljenja krave su imale nižu vrednost RQUICKI indeksa, odnosno pokazivale su veći stepen insulinske rezistencije u odnosu na period zasušenja.
2. Rezultati istraživanja pokazuju da postoji negativna korelacija između RQUICKI indeksa insulinske rezistencije u zasušenju i periodu posle teljenja. To znači da što su krave bile senzitivnije na insulin u periodu zasušenja-pre teljenja, to im je bila jače izražena rezistencija na insulin posle teljenja.
3. U periodu zasušenja postoji pozitivna korelacija između vrednosti insulina i RQUICKI indeksa, dok je ova korelacija negativna u ranoj laktaciji. U odnosu na vrednosti glukoze i NEFA, RQUICKI korelira negativno sa vrednostima glukoze, ali je ova korelacija približna nuli tokom zasušenja, dok je u ranoj laktaciji ona statistički značajna. To znači da će se stepen insulinske rezistencije rasti što je glikemija niža, ali značajno većim intenzitetom u ranoj laktaciji. U odnosu na relaciju sa vrednostima NEFA, tu postoji sličnost, pa je i u periodu zasušenja i u periodu laktaciji RQUICKI indeks negativno korelirao sa vrednostima NEFA. Viša vrednost RQUICKI indeksa u periodu zasušenja znači veći pad njegove vrednosti i veću rezistenciju posle teljenja.
4. Što je veća koncentracija insulina u periodu pre teljenja to je niža njegova vrednost u periodu posle teljenja. Kod krava sa višom glikemijom u zasušenju postoji intenzivniji pad vrednosti glukoze u periodu posle teljenja. Viša vrednost NEFA u zasušenju znači nižu vrednost u periodu posle teljenja, kao i manji intenzitet porasta vrednosti ovog metabolita u krvi. Utvrđeno je da što su krave senzitivnije na insulin u periodu zasušenja (veća RQUICKI vrednost) imaće veći porast NEFA u periodu rane laktacije.
5. PP vrednosti nekog faktora insulinske rezistencije mogu biti determinisani pomoću višestruke (multiple) regresije u čiji sastav ulaze ostali faktori insulinske rezistencije. Tako je dobijeno da PP vrednost jednog od faktora signifikantno zavisi od PP i „delta“

vrednosti ostala tri faktora insulinske rezistencije. Uticaj AP vrednosti nije imao statistički značaj u determinaciji PP vrednosti faktora insulinske rezistencije.

6. Dobijena je statistički značajna korelacija između metaboličkih parametara i pokazatelja insulinske rezistencije u PP periodu. Metabolička adaptacija krava povezana je i sa intenzitetom promena vrednosti (delta vrednosti) pokazatelja insulinske rezistencije. Međutim, nisu utvrđene značajne korelacije između metaboličkog profila PP i pokazatelja insulinske rezistencija AP. PP vrednosti pokazatelja insulinske rezistencije i promena u njihovoj vrednosti (AP-PP) značajno utiču na vrednost metaboličkih parametara. RQUICKI indeks ima vrlo slabu prediktivnu vrednost za metaboličke parametre, dok vrednosti insulina, glukoze i NEFA imaju značajnu prediktivnu vrednost za veliki broj parametara.
7. Kada se krave klasifikuju na osnovu vrednosti RQUICKI indeksa na one sa najvećim padom vrednosti ovog indeksa (iznad 75 percentila) i na ostale manje rezistentne krave ne bismo dobili statistički značajnu razliku u vrednosti metaboličkih parametara. Međutim, ukoliko bi se klasifikacija napravila na osnovu vrednosti glukoze, NEFA i insulina tako da su najrezistentnije krave one sa najizraženijim padom insulina i glukoze i najvećim porastom NEFA dobili bi značajne razlike u metaboličkoj adaptaciji krava koje se karakterišu: povećanom koncentracijom BHB, bilirubina, AST, ALP, GGT i P i smanjenom koncentracijom holesterola, triglicerida, ukupnih proteina i albumina.
8. Insulinska rezistencija kod krava u ranoj laktaciji može nastati kao kompenzatorni odgovor na povećanu insulinsku senzitivnost tokom perioda zasušenja, što može imati uticaja na metabolički status krava u periodu posle teljenja.

8. LITERATURA

1. Đoković R.D.: Endokrini status mlečnih krava u peripartalnom periodu. Agronomski fakultet, Čačak, 2010.
2. Holtenius K., Agenas S., Delavaud C., Chilliard Y.: Effects of feeding intensity during the dry Period. 2. Metabolic and hormonal responses. *J Dairy Sci.*, 86: 883–891, 2003.
3. Bossaert P., Leroy J.L., De Vliegher S., Opsomer G.: Interrelation between glucose induced insulin response, metabolic indicators, and the time of first ovulation in highyielding dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 91: 3363-3371, 2008.
4. Komatsu T., Itoh F., Mikawa1 S., Hodate K.: Changes in gene expression of glucose transporters in lactating and nonlactating cows. *J. Anim. Sci.*, 83: 557–564, 2005.
5. Sano H., Narahara S., Kondo T., Takahashi A., Terashima Y.: Insulin responsiveness to glucose and tissue responsiveness to insulin during lactation in dairy cows. *Dom. Anim. Endocrinol.*, 10: 191–197, 1993.
6. Mashek D.G., Ingvarsten K.L., Andersen J.B., Vestergaard M., Larsen T.: Effects of a fourday hyperinsulinemic-euglycemic clamp in early and mid-lactation dairy cows on plasma concentrations of metabolites, hormones, and binding proteins. *Dom. Anim. Endocrinol.*, 21:169–185, 2001.
7. Hayirli A.: The role of exogenous insulin in the complex of hepatic lipidosis and ketosis associated with insulin resistance phenomenon in postpartum dairy cattle. *Vet. Res. Commun.*, 30: 749–774, 2006.
8. Brockman RP. 1975. Studies on glucagon and insulin and their roles in the regulation of gluconeogenesis in sheep. PhD thesis. Cornell University, Ithaca, New York.
9. Jarrett IG, Filsell OH, and Ballard FJ. 1974. Metabolic and endocrine interrelationships in normal and diabetic sheep. In: *Lipid Metabolism, Obesity and Diabetes Mellitus: Impact on Atherosclerosis, Horm Metab Res Suppl, Series 4:111–116.*

10. O'Brien RM, Granner DK. 1990. PEPCK gene as a model of inhibitory effects of insulin on gene transcription. *Diabetes Care* 13:327–334.
11. Drackley JK, Overton TR, Douglas GN. 2001. Adaptations of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. *J Dairy Sci* 84:100–112.
12. Faulkner A, Pollock HT. 1990. Metabolic responses to euglycaemic hyperinsulinaemia in lactating and non-lactating sheep in vivo. *J Endocrinol* 124:59–66.
13. Besong SA. 1996. Influence of supplemental chromium picolinate on the concentrations of hepatic triglyceride and blood metabolites in dairy cattle. PhD. Dissertation, Univ. Kentucky, Lexington, KY.
14. Brockman RP. 1978. Roles of Glucagon and Insulin in the Regulation of Metabolism in Ruminants. *Can Vet J* 19 (3):55–62.
15. Berne RM, Levy MN. 1993. Hormones of the pancreatic islets. *Physiology*, 3rd edn, (Mosby Year Book, St Louis, MO), 851–875.
16. Brockman RP, Laarveld B. 1986. Hormonal regulation of metabolism in ruminants. *Live Prod Sci*, 14, 313–334.
17. Brockman RP. 1984. Pancreatic and adrenal hormonal regulation of metabolism. In: *Control of Digestion and Metabolism in Ruminants*, Proc 6th Int Symp on Ruminant Physiology, Banff, Canada, (Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ), pp. 405–419.
18. Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A. 2002. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev* 23:201–229.
19. Katzung BG. 1995. Pancreatic hormones and antidiabetic drugs, *Basic and Clinical Pharmacology*, 6th edn. (Appleton and Lange, Norwalk, CT), pp. 637–654.
20. Drackley J K. 2000. Lipid metabolism. In: D'Mello JPF (Ed) *Farm animal metabolism and nutrition*. CAB International, New York, pp. 97–119.
21. Brockman RP. 1979. Roles for insulin and glucagon in the development of ruminant ketosis. *Can Vet J* 20:121–126.
22. Mayes P. 1989. *Harperov pregled biohemije*. Beograd.
23. Berson SA, Yalow RS. 1970. Insulin antagonist and insulin resistance. In: Ellenberg M, Rifkin H, (eds) *Diabetes mellitus: Theory and practice*, (McGraw-Hill, NY), pp. 388–412.

24. Kahn CR. 1978. Insulin resistance, insulin sensitivity, and insulin unresponsiveness: a necessary distinction, *Metabolism* 27:1893–1902.
25. Herzog K. 2001. Versuche zur pankreatischen Insulin-Response von trockenstehenden und laktierenden Kühen sowie Kühen mit Leberverfettung mittels intravenösem Glucosetoleranztest und hyperglykämischer Clamp-Technik. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Veterinärmedizin (Dr. Med. Vet.) durch die Tierärztliche Hochschule Hannover.
26. Kräft S. 2004. Charakterisierung der peripheren Insulin-Response und Insulin- Sensitivität bei trockenstehenden, laktierenden und leberverfetteten Milchkühen ohne und mit Ketose mittels hyperinsulinämischer, euglycämischer Clamps. Academic Dissertation Tierärztliche Hochschule, Hannover.
27. Bell AW. 1995. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J AnimSci* 73:2804–2819.
28. Pere MC, Etienne M, Dourmad JY. 2000. Adaptations of glucose metabolism in multiparous sows: effects of pregnancy and feeding level. *J Anim Sci* 78:2933–2941.
29. Pessayre D, Fromenty B, Mansouri A. 2004. Mitochondrial injury in steatohepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 6(11):1095–105.
30. Johnson CA. 2008. Glucose homeostasis during canine pregnancy: Insulin resistance, ketosis, and hypoglycemia. *Theriogenology* 70:1418–1423.
31. Petterson JA, Dunshea FR, Ehrhardt RA, Bell AW. 1993. Pregnancy and undernutrition alter glucose metabolic responses to insulin in sheep. *J Nutr* 123:1286–1295.
32. Petterson JA, Slepatis R, Ehrhardt RA, Dunshea FR, Bell AW. 1994. Pregnancy but not moderate undernutrition attenuates suppression of fat mobilization in sheep. *J Nutr* 124:2431–2436.
33. Vernon RG, Taylor E. 1988. Insulin, dexamethasone and their interactions in the control of glucose metabolism in adipose tissue from lactating and nonlactating sheep. *Biochem J* 256:509–514.
34. Smith KL, Rauf AK, Benefield BC, Bell AW, Overton TR. 2006. Responses of tissues to insulin as affected by homeorhetic state in dairy cattle. *J Dairy Sci* 89 (Suppl. 1):352.
35. Smith KL, Stebulis SE, Waldron MR, Overton TR. 2007. Prepartum 2,4- thiazolidinedione alters metabolic dynamics and dry matter intake of dairy cows. *J Dairy Sci* 90:3660–3670.

36. Janovick NA, Boisclair YR, Drackley JK. 2011. Prepartum dietary energy intake affects metabolism and health during the periparturient period in primiparous and multiparous Holstein cows. *J Dairy Sci* 94:1385–1400.
37. Overton TR, Waldron MR. 2004. Nutritional management of transition dairy cows: strategies to optimize metabolic health. *J Dairy Sci* 87:(E.Suppl.):E105–E119.
38. Drackley JK, Dann HM, Douglas GN, Janovick Guretzky NA, Litherland NB, Underwood JP, Loor JJ. 2005. Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders (invited review). *Ital J Anim Sci* 4:323–344.
39. Mashek DG, Grummer RR. 2003. The ups and downs of feed intake in prefresh cows. *Proc Four-State Nutr Conf LaCrosse, WI. MidWest Plan Service publication MWPS- 4SD16.* pp. 153–158.
40. Douglas GN, Overton TR, Bateman HG, Dann HM, Drackley JK. 2006. Prepartal plane of nutrition, regardless of dietary energy source, affects periparturient metabolism and dry matter intake in Holstein cows. *J. Dairy Sci* 89:2141–2157.
41. Holcomb CS, Van Horn HH, Head HH, Hall MB, Wilcox CJ. 2001. Effects of prepartum dry matter intake and forage percentage on postpartum performance of lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 84:2051–2058.
42. Agenas S, Burstedt E, Holtenius K. 2003. Effects of feeding intensity during the dry period. Feed intake, body weight, and milk production. *J Dairy Sci* 86:870–882.
43. Dann HM, Litherland NB, Underwood JP, Bionaz M, D'Angelo A, McFadden JW, Drackley JK. 2006. Diets during far-off and close-up dry periods affect periparturient metabolism and lactation in multiparous cows. *J Dairy Sci* 89:3563–3577
44. Schoenberg KM, Overton TR. 2010. The changing roles of insulin during the transition period. Pages 175–185 in *Proc. Cornell Nutrition Conf., East Syracuse, NY. Cornell Univ, Ithaca, NY. (Abstr.)*.
45. Lomax MA, Baird GD, Mallinson CB, Symonds HW. 1979. Differences between lactating and non-lactating dairy cows in concentration and secretion rate of insulin. *Biochem J* 180:281–289.

46. Holtenius P, Traven M. 1990. Impaired glucose tolerance and heterogeneity of insulin responses in cows with abomasal displacement. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A* 37:445–451.
47. Bobe G, Young JW, Beitz DC. 2004. Invited Review: Pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. *J Dairy Sci* 87:3105–3124.
48. Zhou YP, Grill V. 1995. Long term exposure to fatty acids and ketones inhibits β -cell functions in human pancreatic islets of Langerhans. *J Clin Endocrinol Metab* 80:1584–1590.
49. Grill V, Qvigstad E. 2000. Fatty acids and insulin secretion. *Brit J Nutr* 83:79–84.
50. Shimabukuro S, Zhou YP, Levi M, Unger RH. 1998. Fatty acid-induced β cell apoptosis: A link between obesity and diabetes. *Proc Natl Acad Sci* 95:2498–2502
51. Mason TM, Goh T, Tchipashvili V, Sandhu H, Gupta N, Lewis GF, Giacca A. 1999. Prolonged elevation of plasma free fatty acids desensitizes the insulin secretory response to glucose in vivo in rats. *Diabetes* 48:524–530.
52. Maedler K, Spinas GA, Dyntar D, Moritz W, Kaiser N, Donath MY. 2001. Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on β -cell turnover and function. *Diabetes* 50:69–76.
53. Gravena C, Mathias PC, Ashcroft SJ. 2002. Acute effects of fatty acids on insulin secretion from rat and human islets of Langerhans. *J Endocrinol* 173:73–80.
54. Petersen KF, Shulman GI. 2006. Etiology of insulin resistance. *Am J Med* 119:10–16.
55. Hove K. 1978. Insulin-secretion in lactating cows: Responses to glucose infused intravenously in normal, ketonemic, and starved animals. *J Dairy Sci* 61:1407–1413.
56. Van Meirhaeghe H, Deprez P, Van Den Hende C, Muylle E. 1988. Plasma glucose clearance and insulin response in cows with abomasal displacement. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A* 21:221–228.
57. Ohtsuka H, Koiwa M, Hatsugaya A, Kudo K, Hoshi F, Itoh N, Yokota H, Okada H, Kawamura S. 2001. Relationship between serum TNF activity and insulin resistance in dairy cows affected with naturally occurring fatty liver. *J Vet Med Sci* 63(9):1021–1025.
58. Oikawa S, Oetzel GR. 2006. Decreased insulin response in dairy cows following a four-day fast to induce hepatic lipidosis. *J Dairy Sci* 89:2999–3005.

59. Opsomer G, Wensing T, Laevens H, Coryn M, de Kruif A. 1999. Insulin resistance: The link between metabolic disorders and cystic ovarian disease in high yielding dairy Cows. *Anim Reprod Sci* 56:211–222.
60. Holtenius P, Holtenius K. 2007. A model to estimate insulin sensitivity in dairy cows. *Acta Vet Scand* 49:29–31.
61. Van Epps-Fung M, Williford J, Wells A, Hardy RW. 1997. Fatty acid-induced insulin resistance in adipocytes. *Endocrinol* 138:4338–4345.
62. Debras E, Grizard J, Aina E, Tesseraud S, Champredon C, Arnal M. 1989. Insulin sensitivity and responsiveness during lactation and dry period in goats. *Amer J Physiol* 256:295–302.
63. Vernon RG, Faulkner A, Hay WW, Calvert DT, Flint DJ. 1990. Insulin resistance of hind-limb tissues in vivo in lactating sheep. *Biochem J* 270:783–786.
64. Ingvarlsen KL, Dewhurst RJ, Friggens NC. 2003. On the relationship between lactational performance and health: Is it yield or metabolic imbalance that causes production diseases in dairy cattle? A position paper. *Livestock Prod Sci* 83:277–308.
65. Veerkamp RF, Koenen EPC. 1999. Genetics of food intake, live weight, condition score and energy balance. *BSAS Occasional Publications* 24:63–73.
66. Kay JK, Phyn CVC, Roche JR, Kolver ES. 2009. Extending lactation in pasture-based dairy cows. II: Effect of genetic strain and diet on plasma hormone and metabolite concentrations. *J Dairy Sci* 92:3704–3713.
67. Lucy MC, Verkerk GA, Whyte BE, Macdonald KA, Burton L, Cursons RT, Roche JR, Holmes CW. 2009. Somatotropic axis components and nutrient partitioning in genetically diverse dairy cows managed under different feed allowances in a pasture system. *J Dairy Sci* 92:526–539.
68. Friggens NC, Berg P, Theilgaard P, Korsgaard IR, Ingvarlsen KL, Løvendahl PL, Jensen J. 2007. Breed and parity effects on energy balance profiles through lactation: Evidence for genetically driven body reserve change. *J Dairy Sci* 90:5291–5305.
69. Shingu H, Hodate K, Kushibiki S, Ueda Y, Watanabe A, Shinoda M, Matsumoto M. 2002. Breed differences in growth hormone and insulin secretion between lactating Japanese Black cows (beef type) and Holstein cows (dairy type). *Comp Biochem Physiol Part C: Toxicol Pharmacol* 132:493–504.

70. Baumgard LH, Weber WJ, Kazmer GW, Zinn SA, Hansen LB, Chester-Jones H, Crooker BA. 2002. Effects of selection for milk yield on growth hormone response to growth hormone releasing factor in growing Holstein calves. *J Dairy Sci* 85:2529–2540.
71. Swali A, Wathes DC. 2006. Influence of the dam and sire on size at birth and subsequent growth, milk production and fertility in dairy heifers. *Theriogenol* 66:1173-184.
72. Gutierrez CG, Gong JG, Bramley TA, Webb R. 2006. Selection on predicted breedingvalue for milk production delays ovulation independently of changes in follicular development, milk production and body weight. *Anim Reprod Sci* 95:193–205.
73. Chagas LM, Lucy MC, Back PJ, Blache D, Lee JM, Gore PJS, Sheahan AJ, Roche JR. 2009. Insulin resistance in divergent strains of Holstein-Friesian dairy cows offered fresh pasture and increasing amounts of concentrate in early lactation. *J Dairy Sci* 92:216–222.
74. McNamara JP. 1997. Adipose tissue metabolism during lactation: where do we go from here?. *P Nutr Soc* 56:149–167.
75. Urton G, von Keyserlingk MAG, Weary DM. 2005. Feeding behavior identifies dairy cows at risk for metritis. *J Dairy Sci* 88:2843–2849.
76. Johnson RW, Finck BN. 2001. Tumor necrosis factor- α and leptin: Two players in an animals metabolic and immunologic responses to infection. *J Anim Sci* 79:118–127.
77. Gruys E, Toussaint MJM, Niewold TA, Koopmans SJ. 2005. Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci* 6:1045–1056.
78. Bionaz M, Trevisi E, Calamari L, Librandi F, Ferrari A, Bertoni G. 2007. Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows. *JDairy Sci* 90:1740–1750.
79. Bertoni G, Trevisi E, Han X, Bionaz M. 2008. Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows. *J Dairy Sci* 91:3300-3310.
80. Petersen HH, Nielsen JP, Heegaard PMH. 2004. Application of acute phase protein measurement in veterinary clinical chemistry. *Vet Res* 35:163–187.
81. Katoh N. 2002. Relevance of apolipoproteins in the development of fatty liver and fatty liver-related peripartum diseases in dairy cows. *J Vet Med Sci* 64:293–307.
82. Youngren JF. 2007. Regulation of insulin receptor function. *Cell Mol Life Sci* 63(7- 8):873–891.

83. De Meyts P. 2008. The insulin receptor: a prototype for dimeric, allosteric membrane Receptors. *Trends Biochem Sci* 33(8):376–384.
84. Avruch J. 1998. Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Mol Cell Biochem* 182:31–48.
85. Thong FS, Bilan PJ, Klip A. 2007. The Rab GTPase-activating protein AS160 integrates Akt, protein kinase C, and AMP-activated protein kinase signals regulating GLUT4 traffic. *Diabetes* 56:414–423.
86. Sale EM, Sale GJ. 2008. Protein kinase B: signalling roles and therapeutic targeting. *Cell Mol Life Sci* 65:113–127.
87. Saltiel AR, Pessin JE. 2003. Insulin signaling in microdomains of the plasma membrane. *Traffic* 4(11):711-716.
88. Carpentier JL. 1994. Insulin receptor internalization: molecular mechanisms and physiopathological implications. *Diabetologia* 37:(Suppl. 2):S117–124.
89. Idris I, Gray S, Donnelly R. 2001. Protein kinase C activation; isozyme specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. *Diabetol* 44:659-673.
90. Huang B, Wu P, Bowker-Kinley MM, Harris RA. 2002. Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase expression by peroxisome proliferator-activated receptor-alpha ligands, glucocorticoids and insulin. *Diabetes* 51:276–283.
91. Puig O, Tjian R. 2005. Transcriptional feedback control of insulin receptor by dFOXO/FOXO1. *Genes Dev* 19:2435–2446.
92. Youngren JF, Keen S, Kulp JL, Tanner CJ, Houmard JA, Goldfine ID. 2001. Enhanced muscle insulin receptor autophosphorylation with short-term aerobic exercise training. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E528–533
93. Debras E, Grizard J, Aina E, Tesseraud S, Champredon C, Arnal M. 1989. Insulin sensitivity and responsiveness during lactation and dry period in goats. *Amer J Physiol* 256:295–302.
94. Sasaki S. 2002. Mechanism of insulin action on glucose metabolism in ruminants. *Anim Sci J* 73:423–433.
95. McCance KL, Huether SE. 1994. Alterations of hormonal regulations. *Pathophysiology* 2nd edn., Mosby, St Louis, pp. 674–692.
96. DeBoer G, Trenkle A, Young JW. 1985. Glucagon, insulin, growth hormone and some blood metabolites during energy restriction ketonemia of lactating cows. *J Dairy Sci* 68:326–337.

97. Veenhuizen JJ, Drackley JK, Richard MJ, Sanderson TP, Miller LD, Young WJ. 1991. Metabolic changes in blood and liver during development and early treatment of experimental fatty liver and ketosis in cows. *J Dairy Sci* 74:4238–4253.
98. Drackley JK. 1999. Biology of dairy cows during the transition period: the final Frontier. *J Dairy Sci* 82:2259–2273.
99. Monzillo LU, Hamdy O. 2003. Evaluation of insulin sensitivity in clinical practice and in research settings. *Nutr Rev* 61(12):397–412.
100. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. 1979. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 237(3):E214–223.
101. Robert JJ. 1995. Methods for the measurement of insulin resistance. Hyperinsulinemic euglycemic clamp. *Presse Med* 24(15):730–734.
102. Hammon HM, Bellmann O, Voigt J, Schneider F, Kühn C. 2007. Glucose-dependent insulin response and milk production in heifers within a segregating resource family population. *J Dairy Sci* 90:3247–3254.
103. Šamanc H, Stojić V, Kirovski D, Pudlo P, Vujanac I. 2009a. Glucose tolerance test in the assessment of endocrine pancreatic function in cows before and after surgical correction of left displaced abomasums. *Acta Vet-Beograd* 59:513–523.
104. Jaakson H, Ling K, Samarütel J, Ilves A, Kaart T, Kärt O. 2010. Field trial on glucoseinduced insulin and metabolite responses in Estonian Holstein and Estonian Red dairy cows in two herds. *Acta Vet Scand* 52:4.
105. Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. 1997. *Clinical biochemistry of domestic animals*, 5th Edition. Academic Press, San Diego, California, pp. 932.
106. Grünberg W, Donkin SS, Constable PD. 2011. Periparturient effects of feeding a low dietary cation-anion difference diet on acid-base, calcium, and phosphorus homeostasis and intravenous glucose tolerance test in highproducing dairy cows. *J Dairy Sci* 94:727–745.
107. KM, Ehrhardt RM, Overton TR. 2012. Effects of plane of nutrition and feed deprivation on insulin responses in dairy cattle during late gestation. *J Dairy Sci* 95:670–682.
108. Subiyatno A, Mowat DN, Yang WZ. 1996. Metabolite and hormonal responses to glucose or propionate infusions in periparturient dairy cows supplemented with chromium. *J Dairy Sci* 79:1436–1445.

109. Terao H, Fulita M, Tsumagari A, Sugino T, Bungo T. 2010. Insulin dynamics in transition dairy cows as revealed by intravenous glucose tolerance testing. *J Anim Vet Adv* 9(18):2333–2337.
110. Mathevs D.R., Hosker J.P., Rudenski A.S. Homeostasis model assessment: Insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28: 412-9, 1985.
111. Trann T.T., Gupta N., Goh T., Naigamwalla D., Chia M.C., Koohestani N., Mehrotra S., McKeown-Eyssen G., Giacca A., Bruce W.R. Direct measure of insulin sensitivity with the hyperinsulinemic-euglycemic clamp and surrogate measures of insulin sensitivity with the oral glucose tolerance test: correlation with aberrant crypt foci promotion in rats. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 12: 47-56, 2003.
112. Mihajlović M.B., Jovanović I.B.: *Biohemija*. Beograd, 2008, str.562.
113. Coffey M.P., Simm G., Oldham J.D., Hill W.G., Brotherstone S.: Genotype and diet effects on energy balance in the first three lactations of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87: 4318–4326, 2004.
114. Ingvarlsen K.L., Andersen H.R., Foldager J.: Effect of sex and pregnancy on feed intake capacity of growing cattle. *Acta Agric. Scand., Sect. A, Anim. Sci.* 42:40–46, 1992.
115. Ingvarlsen K.L., Andersen H.R.: Integration of Metabolism and Intake Regulation: A Review Focusing on Periparturient Animals. *J.Dairy Sci.*, 83: 1573-1597, 2000.
116. Šamanc H., Kirovski D., Dimitrijević B., Vujanac I., Damnjanović Z., Polovina M.: Procena energetskeg statusa krava u laktaciji određivanjem koncentracije organskih sastojaka mleka. *Veterinarski glasnik*, 60(5-6): 283-297, 2006.
117. Belić B., Cincović M.R., Popović-Vranješ Anka, Pejanović R., Krajinović M.: Metaboličke promjene i iskorištavanje metabolita u proizvodnji mlijeka kod krava u toplinskom stresu. *Mljekarstvo*, 61(4): 309-318, 2011.
118. Cant J.P., Trout D.R., Qiao F., Purdie N.G.: Milk synthetic response of the bovine mammary gland to an increase in the local concentration of arterial glucose. *J. Dairy Sci.*, 85, 494–503, 2002.
119. Dann H.M., D.E. Morin, G.A. Bollero, M. R. Murphy, J.K. Drackley: Prepartum Intake, Postpartum Induction of Ketosis, and Periparturient Disorders Affect the Metabolic Status of Dairy Cows. *J. Dairy Sci.*, 88:3249–3264, 2005.

120. Bjerre-Harpøth V., Friggens N.C., Thorup V.M., Larsen T., Damgaard B.M., Ingvarsen K.L., Moyes K.M.: Metabolic and production profiles of dairy cows in response to decreased nutrient density to increase physiological imbalance at different stages of lactation. *J. Dairy Sci.*, 95(5): 2362-2380, 2012.
121. Cincović M.R., Belić B., Vidović B., Krčmar LJ.: Reference values and frequency distribution of metabolic parameters in cows during lactation and in pregnancy. *Contemporary agriculture*, 60(1-2): 175-182, 2011.
122. Bell A., Bauman D.: Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 2(3): 265-278, 1997.
123. Reynolds C.K., Aikman P.C., Lupoli B., Humphries D.J., Beever D.E.: Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation. *J. Dairy Sci.*, 86:1201–1217, 2003.
124. Đoković R., Šamanc H., Nikolić Z., Bošković-Bogoslavjević S.: Changes in blood values of glucose, insulin and inorganic phosphorus in healthy and ketotic cows after intravenous infusion of propionate solution. *Acta Veterinaria Brno*, 76:533-539, 2007.
125. Husvéth F., Karsai F., Gaal T.: Peripartal fluctuations of plasma and hepatic lipid components in dairy cows. *Acta Vet Acad Sci Hung*, 30(1-3): 97-112, 1982.
126. Friggens N.C.: Body lipid reserves and the reproductive cycle: towards a better understanding. *Livest. Prod. Sci.*, 83: 219-236, 2003.
127. Roberts T., Chapinal N., LeBlanc S.J., Kelton D.F., Dubuc J., Duffield T.F.: Metabolic parameters in transition cows as indicators for early-lactation culling risk. *J. Dairy Sci.*, 95(6): 3057-3063, 2012.
128. Ospina P.A., Nydam D.V., Stokol T., Overton T.R.: Associations of elevated nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate concentrations with early lactation reproductive performance and milk production in transition dairy cattle in the northeastern United States. *J. Dairy Sci.*, 93(4): 1596-1603, 2010.
129. Ospina P.A., Nydam D.V., Stokol T., Overton T.R.: Evaluation of nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. *J. Dairy Sci.*, 93(20): 546-554, 2010.
130. Nowroozi Asl A., Nazifi S., Rowshan Ghasrodashti A., Olyaei A.: Prevalence of subclinical ketosis in dairy cattle in the Southwestern Iran and detection of cutoff point for NEFA and

- glucose concentrations for diagnosis of subclinical ketosis. *Prev.Vet. Med.*, 100(1): 38-43, 2011.
131. Beerda B., Kornalijnslijper J.E., van der Werf J.T.N., Noordhuizen-Stassen E.N., Hopster H.: Effects of Milk Production Capacity and Metabolic Status on HPA Function in Early Postpartum Dairy Cows. *J. Dairy Sci.*, 87: 2094–2102, 2004.
 132. Greenfield R.B., Cecava M.J., Donkin S.S.: Changes in mRNA expression for gluconeogenic enzymes in liver of dairy cattle during the transition to lactation. *J. Dairy Sci.*, 83: 1228-1236, 2002.
 133. Martineau R., D. Sauvant , D.R. Ouellet , C. Côrtes , J. Vernet , I. Ortigues-Marty , H. Lapierre: Relation of net portal flux of nitrogen compounds with diet characteristics in ruminants: A meta-analysis approach. *J. Dairy Sci.*, 94 :2986–3001, 2011.
 134. Reynolds C.K., Huntington G.B., Tyrrell H.F., Reynolds P.J.: Net portal-drained visceral and hepatic metabolism of glucose, L-lactate, and nitrogenous compounds in lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, 71: 1803–1812, 1998.
 135. Popović M.: Biohemija životinja. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, 2008.
 136. Tóthová CS., Nagy O., Seidel H., Konvičná J., Farkašová Z., Kováč G.: Acute Phase Proteins and Variables of Protein Metabolism in Dairy Cows during the Pre- and al Period. *Acta Vet. Brno*, 77: 51–57, 2008.
 137. Van Saun R.J.: Assessing Nutritional and Health Status of Transition Cows. 8 pp., In: Proceedings Mid-Atlantic States Conference for Bovine Practitioners, Frederick, Maryland, March 25-26, 2004.
 138. Saun R.J.: Metabolic Profiling and Health Risk in Transition Cows, pp. 212-213, In: Proceedings 37th Annual American Association of Bovine Practitioners Convention. Ft. Worth, Texas, September 23-25, 2004.
 139. Šamanc H.A.: Bolesti organa za varenje goveda. Beograd, 2009.
 140. Loor J.J., Everts R.E., Bionaz M., Dann H.M., Morin D.E., Oliveira R., Rodriguez- Zas S.L., Drackley J.K., Lewin H.A.: Nutrition-induced ketosis alters metabolic and signaling gene networks in liver of periparturient dairy cows. *Physiol Genomics*, 32: 105–116, 2007.
 141. Murondoti A., Jorritsma R., Beynen A.C., Wensing T., Geelen M.: Activities of the enzymes of hepatic gluconeogenesis in periparturient dairy cows with induced fatty liver. *J. Dairy Res.* 71: 129-134, 2004.

142. Belić B., Cincović M.R.: Praktikum iz patološke fiziologije. Poljoprivredni fakultet Novi Sad, Departman za veterinarsku medicinu, 2012.
143. Van Saun R.J.: Metabolic Profiling: Assessing nutritional status of the transition cow. Washington State VMA Annual Scientific Proceedings, str.1-8, 2000.
144. Đoković R., Ilić Z., Kurćubić V., Petrović M., Dosković V.: Functional and morphological state of the liver in Simmental dairy cows during transitional period. *Revue Méd. Vét.*, 162(12): 574-579, 2011. milk fever. *Acta veterinaria (Beograd)*, 60(4): 401-410, 2010
145. Goof J.P.: Macromineral physiology and application to the feeding of the dairy cow for prevention of milk fever and other periparturient mineral disorders. *Animal Feed Science and Technology* 126: 237–257, 2006
146. Starič J., Zadnik T.: Biochemical markers of bone metabolism in dairy cows with milk fever. *Acta veterinaria (Beograd)*, 60(4): 401-410, 2010.
147. Kimura K., Reinhardt T.A., Goff J.P.: Parturition and Hypocalcemia Blunts Calcium Signals in Immune Cells of Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* 89:2588–2595, 2006.
148. Massey C.D., Wang C., Donovan G.A., Beede D.K.: Hypocalcemia at parturition as a risk factor for left displacement of the abomasums in dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 203: 852-853, 1993.
149. Duffield T., LeBlanc S., Leslie K.: Impact of subclinical metabolic disease on early lactation culling. *J.Dairy Sci.*, 88(Supl.1): 199, 2005.
150. Littledike, E. T., S. C. Whipp, D. A. Witzel, and A. L. Baetz: Insulin, corticoids, and parturient paresis. Academic Press, New York, NY, 1970. Citirano u: Goof J.P., Horst R.L.: Physiological Changes at Parturition and Their Relationship to Metabolic Disorders. *J.Dairy Sci.*, 80(7): 1260-1268, 1997.
151. Ménard L., Thompson A.: Milk fever and alert downer cows: Does hypophosphatemia affect the treatment response? *Can Vet J.*, 48(5): 487–491, 2007.
152. Grünberg W., Morin D.E., Drackley J.K., Constable P.D.: Effect of rapid intravenous administration of 50% dextrose solution on phosphorus homeostasis in postparturient dairy cows. *J.Vet. Intern. Med.*, 20: 1471–1478, 2006.
153. Li H., Ren P., Onwochei M., Ruch R.J., Xie Z.: Regulation of rat Na/Pi cotransporter-1 gene expression: The roles of glucose and insulin. *Am. J. Physiol.* 271:E1021–E1028, 1996.

154. Grummer RR. 2008. Nutritional and management strategies for the prevention of fatty liver in dairy cattle. *Vet J* 176:10–20.
155. Ehrhardt RA, Bell AW. 1997. Developmental increases in glucose transporter concentration in the sheep placenta. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 273:1132–41.
156. Drackley JK, Beitz DC, Young JW. 1991. Regulation of in vitro metabolism of palmitate by carnitine and propionate in liver from dairy cows. *J Dairy Sci* 74:3014–3024.
157. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993; 259(5091):87–91. [PubMed: 7678183]
158. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89(6): 2548–2556. [PubMed: 15181022]
159. Halberg N, Wernstedt-Asterholm I, Scherer PE. The adipocyte as an endocrine cell. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2008; 37(3):753–768. x–xi. [PubMed: 18775362]
160. Xing H, Northrop JP, Grove JR, Kilpatrick KE, Su JL, Ringold GM. TNF α -mediated inhibition and reversal of adipocyte differentiation is accompanied by suppressed expression of PPAR γ without effects on Pref-1 expression. *Endocrinology*. 1997; 138(7):2776–2783. [PubMed: 9202217]
161. Ruan H, Hacohen N, Golub TR, Van Parijs L, Lodish HF. Tumor necrosis factor- α suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor- κ B activation by TNF- α is obligatory. *Diabetes*. 2002; 51(5):1319–1336.
162. Suzawa M, Takada I, Yanagisawa J, Ohtake F, Ogawa S, Yamauchi T, Kadowaki T, Takeuchi Y, Shibuya H, Gotoh Y, Matsumoto K, Kato S. Cytokines suppress adipogenesis and PPAR- γ function through the TAK1/TAB1/NIK cascade. *Nat Cell Biol*. 2003; 5(3):224–230. [PubMed: 12598905]
163. Anforth HR, Bluth RM, Bristow A, Hopkins S, Lenczowski MJ, Luheshi G, Lundkvist J, Michaud B, Mistry Y, Van Dam AM, Zhen C, Dantzer R, Poole S, Rothwell NJ, Tilders FJ, Wollman EE. Biological activity and brain actions of recombinant rat interleukin-1 α and interleukin-1 β . *Eur Cytokine Netw*. 1998; 9(3):279–288. [PubMed: 9831177]

164. García MC, Wernstedt I, Berndtsson A, Enge M, Bell M, Hultgren O, Horn M, Ahrén B, Enerback S, Ohlsson C, Wallenius V, Jansson JO. Mature-onset obesity in interleukin-1 receptor I knockout mice. *Diabetes*. 2006; 55(5):1205–1213. [PubMed: 16644674]
165. Wallenius V, Wallenius K, Ahrén B, Rudling M, Carlsten H, Dickson SL, Ohlsson C, Jansson JO. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat Med*. 2002; 8(1):75–79. [PubMed: 11786910]
166. Xu H, Hirosumi J, Uysal KT, Guler AD, Hotamisligil GS. Exclusive action of transmembrane TNF α in adipose tissue leads to reduced adipose mass and local but not systemic insulin resistance. *Endocrinology*. 2002; 143(4):1502–1511. [PubMed: 11897709]
167. Pamir N, McMillen TS, Kaiyala KJ, Schwartz MW, LeBoeuf RC. Receptors for tumor necrosis factor- α play a protective role against obesity and alter adipose tissue macrophage status. *Endocrinology*. 2009; 150(9):4124–4134. [PubMed: 19477937]
168. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*. 2003; 112(12):1821–1830. [PubMed: 14679177]
169. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003; 112(12):1796–1808. [PubMed: 14679176]
170. Di Gregorio GB, Yao-Borengasser A, Rasouli N, Varma V, Lu T, Miles LM, Ranganathan G, Peterson CA, McGehee RE, Kern PA. Expression of CD68 and macrophage chemoattractant protein-1 genes in human adipose and muscle tissues: association with cytokine expression, insulin resistance, and reduction by pioglitazone. *Diabetes*. 2005; 54(8):2305–2313. [PubMed: 16046295]
171. Fain JN. Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells. *Vitam Horm*. 2006; 74:443–477. [PubMed: 17027526]
172. Clavien PA. IL-6, a key cytokine in liver regeneration. *Hepatology*. 1997; 25(5):1294. [PubMed: 9141458]
173. Lowell BB, Shulman GI. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science*. 2005; 307(5708):384–387. [PubMed: 15662004]

174. Holloszy JO. Skeletal muscle “mitochondrial deficiency” does not mediate insulin resistance. *Am J Clin Nutr.* 2009; 89(1):463S–466S. [PubMed: 19056574]
175. Pagel-Langenickel I, Bao J, Pang L, Sack MN. The role of mitochondria in the pathophysiology of skeletal muscle insulin resistance. *Endocr Rev.* 2010; 31(1):25–51. [PubMed: 19861693]
176. Muoio DM. Intramuscular triacylglycerol and insulin resistance: guilty as charged or wrongly accused? *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1801(3):281–288. [PubMed: 19958841]
177. Zhang Y, Ye J. Mitochondrial inhibitor as a new class of insulin sensitizer. *Acta Pharmaceutica Sinica B.* 2012; 2(4):341–349. [PubMed: 23710432]
178. Jorritsma R, Wensing T, Kruip TAM, Vos PLAM, Noordhuizen JPTM. 2003. Metabolic changes in early lactation and impaired reproductive performance in dairy cows. *Vet Res* 34:11–26.
179. Grummer RR, Wiltbank MC, Fricke PM, Watters RD, Silva-Del-Rio N. 2010. Management of dry and transition cows to improve energy balance and reproduction. *J Reprod Dev* 56 Suppl: S22–28.
180. Van Knegsel ATM, van den Brand H, Dijkstra J, Tamminga S, Kemp B. 2005. Effect of dietary energy source on energy balance, production, metabolic disorders and reproduction in lactating dairy cattle. *Reprod Nutr Devel* 45:665–688.
181. Duehlmeier R, Sammet K, Widdel A, von Engelhardt W, Wernery U, Kinne J, Sallmann HP. 2007. Distribution patterns of the glucose transporters GLUT4 and GLUT1 in skeletal muscles of rats (*Rattus norvegicus*), pigs (*Sus scrofa*), cows (*Bos taurus*), adult goats, goat kids (*Capra hircus*), and camels (*Camelus dromedarius*). *Comp Biochem Physiol* 146:274–282.
182. Nishimoto H, Matsutani R, Yamamoto S, Takahashi T, Hayashi KG, Miyamoto A, Hamano S, Tetsuka M. 2006. Gene expression of glucose transporter (GLUT) 1, 3 and 4 in bovine follicle and corpus luteum. *J Endocrinol* 188:111–119.
183. Zhao FQ, Moseley WM, Tucker HA, Kennelly JJ. 2006. Regulation of glucose transporter gene expression in mammary gland, muscle, and fat of lactating cows by administration of bovine growth hormone and bovine growth hormone-releasing factor. *J Anim Sci* 74:183–189.

184. Zhao FQ, Keating AF. 2007. Expression and regulation of glucose transporters in the bovine mammary gland. *J Dairy Sci* 90:76–86.
185. Sartin JL, Cummins KA, Kemppainen RJ, Marple DN, Rahe CH, Williams JC. 1985. Glucagon, insulin and growth hormone responses to glucose infusion in lactating dairy Cows. *Am J Physiol* 248:108–114.
186. McNamara JP. 1997. Adipose tissue metabolism during lactation: where do we go from here?. *P Nutr Soc* 56:149–167.
187. Sladojević Ž. 2012, Uticaj energetskog bilansa na endokrini i metabolizam, Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu
188. Šamanc H, Kirovski D, Stojić V, Stojanović D, Vujanac I, Prodanović R, Bojković Kovačević S, 2011, Application of metabolic profile test in prediction and diagnosis of fatty liver in Holstein cows. *Acta Veterinaria Beograd*, 61(6): 543-553
189. Nafikov RA, Beitz DC, 2007, Carbohydrate and lipid metabolism in dairy cows. *J Nutr*, 137: 702-705
190. Stamatović S, Šamanc H, Jovanović M, 1983, Uporedo ispitivanje koncentracije glikoze u krvi v. auricularis magna i v. subcutanea abdominis mlečnih krava. *Vet glasnik*, 37(4): 273-256
191. Cincović M.R., Belić B., Đoković R., Toholj B., Hristovska T., Delić B., Došenović M. (2014): Insulin resistance in cow during dry period and early lactation. *Contemporary agriculture*, 63 (1-2): 98-105.
192. Šamanc H, Sinovec Z, Adamović M, Grubić G, 2005, Uloga ishrane u etiopatogenezi poremećaja metabolizma visoko-mlečnih krava. Zbornik radova 4. simpozijuma Ishrana, reprodukcija i zaštita zdravlja goveda – Etiopatogeneza i dijagnostika poremećaja metabolizma reprodukcije goveda, Subotica, 3-19
193. Prodanović R, Kirovski D, Jakić-Dimić D, Vujanac I, Kureljušić B, 2010, Telesna kondicija i pokazatelji energetskog statusa krava u visokom graviditetu i ranoj fazi laktacije. *Veterinarski glasnik*, 64 (1-2):43-52
194. Kim J.W. (2014) Modulation of the somatotropic axis in periparturient dairy cows. *AsianAustralasian Journal of Animal Science*, 27, 147-154.
195. Kida K, 2003, Relationship of metabolic profiles to milk production and feeding in dairy cows. *J Vet Med Sci*, 65(6): 671-677

196. Kirovski D, Šamanc H, Fratrić N, Gvozdić D, Hristov S, Sladojević Ž, Mircu C, Tulcan C, 2009, Koncentracija kortizola, insulina sličnog faktora rasta – I i imunoglobulina G klase u krvi neonatalne teladi različite telesne mase na rođenju, Veterinarski glasnik, 63: 321-329.
197. Grubić G, Adamović M, 2003, Ishrana visokoproduktivnih krava. Beograd
198. Dhiman T.R., Kleinmans J., Tessmann N.J., Radloff H.D., Van Evert P., Satter L.D. (1991) Effect of dietary forage:grain ratio on blood constituents in dairy cows. Journal of Dairy Science, 74, 2691-2695.
199. Stojić V.: Veterinarska fiziologija. Beograd, 2004.
200. Sevinc M., Basoglu A., Güzelbektaş H.: Lipid and lipoprotein levels in dairy cows with fatty liver. Turk J Vet Anim Sci, 27:295-299, 2003.
201. Đoković R. Šamanc H., Bojkovski J., Fratrić N.: Blood concentrations of thyroid hormones and lipids of dairy cows in transitional period. Lucrări științifice medicina veterinară, 43(2): 34-40, 2010.
202. Šamanc H, Stojić V, Kirovski D, Jovanović M, Cernescu H, Vujanac I, 2010, Thyroid hormones concentrations during the mid-dry period: an early indicator of fatty liver in Holstein-Friesian dairy cows. Journal of Thyroid Research, 1: 897602
203. Rosenberger G, 1995, Clinical Examination of Cattle. Blackwell Science Ltd.
204. González FD, Muiño R, Pereira V, Campos R and Benedito JL, 2011, Relationship among blood indicators of lipomobilization and hepatic function during early lactation in high-yielding dairy cows. J Vet Sci, 12: 251 – 255
205. Swenson MJ. Dukes: Physiology of domestic animals, 11th ed., Cornell Univ. Press. Itaca and London . 1993;41-43.
206. Gurr MI, Harwood JL, Frayn KN. Lipid iochemistry, 5th ed. Blackwell Science, Oxford, 2002;19-70.
207. Jovanović, M. J, Stamatović, S, Šamanc, H. et al.: Prilog proučavanju metaboličkog profila krava u laktaciji. Vet. Glasnik, 41(6): 449-454, 1987.
208. Roil MR, Suckling GW, Mattingley J. Serum total protein and albumin levels in grazing sheep. N.Z. Vet. J. 1974;22:232-236.
209. Evans TW. Review article: albumin as a drug: biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure. Aliment.Pharmacol. Therap. 2002;16:6-11.

210. Šamanc H., Damjanović Z., Nikolić Judith A., Radojičić B., Anđelković M., Lekić N. Endokrina regulacija metaboličkih procesa kod krava u graviditetu i laktaciji. *Vet. Glasnik*, 47(4-5): 319, 1993
211. Pestevšek U., Klemenc N., Vospernik P., Žust J.: Serumske proteinske frakcije kod krava u visokoj gravidnosti i puerperijumu. *Vet. Glasnik*, 346: 555-561, 1980.
- 212.. Kupezinski R., Chudoba-Drozdovska B.: Values of selected biochemical parameters of cows blood during their drying-off and the beginning of lactation. *Elec.Jour.of P.Agric.Unive*, (1), electronic paper.
- 213.. Katoh N.: Relevance of apolipoproteins in the development of fatty liver and fatty liver-related peripartum diseases in dairy cows. *J. Vet. Med. Sci.* 64:293–307, 2002.
- 214.. Goff JP, 2008, The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. *The Veterinary Journal*, 176: 50–57
- 215.. Braak E., van de Klooster T., Matestein A.: *Vet. Quarterly* 8, 24-37, 1986.
- 216.. Ducusin R.J., Uzuka Y., Satoh E., Otani M., Nishimura M., Tanabe S., Sarashina T. (2003) Effects of extracellular Ca²⁺ on phagocytosis and intracellular Ca²⁺ concentrations in polymorphonuclear leukocytes of postpartum dairy cows. *Research in Veterinary Science*, 75, 27-32
- 217.. Schulze H, 1985, Behaviour of mineral balance parameters of cows with postpartum fatty degeneration of liver. *Mh Vet Med*, 40:849 – 850
- 218.. Beede DK, Pilbean TE, Puffenbarger SM, Tempelman RJ, 2001, Peripartum responses of Holstein cows and heifers fed graded concentrations of calcium (calcium carbonate) and anion (chloride) 3 weeks before calving. *J Dairy Sci*, 84: 83
- 219.. Rukkwamsuk T, Wensing T, Geelen M J, 1998, Effect of overfeeding during the dry period on regulation of adipose tissue metabolism in dairy cows during the periparturient period. *J Dairy Sci*, 81:2904–2914
220. Ingvarstsen KL, Andersen JB. 2000. Integration of metabolism and intake regulation: a review focusing on periparturient animals. *J Dairy Sci*, 83: 1573–1597
221. Emery RS, Liesman JS, Herdt TH, 1992, Metabolism of long chain fatty acids by ruminant liver. *J Nutr*, 122: 832-837
222. Vernon RG., Clegg RA., Flint DJ., 1981. Metabolism of sheep adipose tissue during pregnancy and lactation. *Adaptation and regulation. Biochem. J.* 200:307-314.

223. Zierath JR, Krook A., Wallberg-Henriksson H. 1998. Insulin action in skeletal muscle from patients with NIDDM. *Mol Cell Biochem* 182:153-160
224. Oikawa S., Oetzel GR. 2006 Decreased insulin response in dairy cows following a four day fast to induce hepatic lipidosis. *J Dairy Sci* 89:2999-3005.
225. Pires JAA, Souza H, Grummer RR. 2007. Induction of hiperlipidemia by intravenous infusion of tallow emulsion causes insulin resistance in Holstein cows. *J Dairy Sci* 90:2735-2744.
226. Jin HB, Gu ZY, Yu CH, Li YM. 2005. Association of nonalcoholic fatty liver disease with type -2 diabetes: clinical features and independent risk factors in diabetic fatty liver patients. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 4:389-392.
227. Blaak EE, 2003. Fatty acid metabolism in obesity and type 2 diabetes mellitus. *Proc Nutr Soc* 62: 753-760.
228. McArt, J.A.A, Nydam D.V, Oetzel G.R, 2012c. Dry and parturient predictors of early lactation of hyperketonemia in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 96:198-209.
229. Puppel K., Kuczyńska B. (2016) Metabolic profiles of cow's blood; a review. *Journal of Science of Food and Agriculture*, doi: 10.1002/jsfa.7779.
230. Kalaitzakis E, Roubies N, Panousis N, Pourliotis K, Kaldrymidou E, Karatzias H, 2006. Evaluation of ornitin carbamoyl transferase and other serum and liver-derive analytes in diagnosis of fatty liver and postsurgical outcome of left –displaced abomasums in dairy cows, *J. Am Vet Med Assoc.* 229, 1463-71.
231. Lofthammer K.H. Posledice neizbalansiranog obroka na zdravlje I reprodukciju krava (Einfusse und Folgen unausgeglichener Fütterung auf Gesundheit und Fruchtbarkeit des Milchrindes). *Zbornik predavanja XX seminara za inovacije znanja veterinarara* , 71-120 Beograd, 1991.
232. Kaneko J.J., Harvey J.W., Bruss M.: *Clinical biochemistry of domestic animals*. Ed. 6th, Academic Press, 2008.
233. Goff, J. P., R. L.. Horst (1997): Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J. Dairy Sci.* 80, 1260-1268.
234. Kaupinen, K. (1984): ALAT, AP, ASAT, GGT, OCT, activities and urea and total bilirubin concentrations in plasma of normal and ketotic dairy cows. *Zbl. Vet. Med. A*, 31, 567-576.

235. Meyer, D. J., J. W. Harwey (1998): Evaluation of hepatobiliary system and skeletal muscle and lipid disorders. In: *Veterinary Laboratory Medicine. Interpretation and Diagnosis.* (Meyer, D. J., Z. Stojević et al.: Activities of AST, ALT and GGT in clinically healthy dairy cows during lactation and in the dry period
236. Kaneko, J. J., W. Harwey, M. L. Bruss (1997): *Clinical Biochemistry of Domestic Animals.* 5th edition Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto. Appendix VIII: Blood analyse reference values in large animals. pp. 890-894.
237. El-Ghou, W., W. Hoffman, Y. Khamis, A. Hassanein (2000): Beziehungen zwischen Klauenerkrankungen und peripartalen Zeitraum bei Milchrindern. *Prakt. Tierarzt* 82, 862-868.
238. Kupczynski R., Chudoba-Drozdowski B. (2002): Values of selected biochemical parameters of cows blood during their drying-off and the beginning of lactation. *Electronic Journal of Polish Agriculture University*, 55, 225-231.
239. Lubojacka V., Pechova A., Dvorak, R., Drastiich P., Kummer V., Poul J. (2005): Liver steatosis following supplementation with fat in dairy cows diets. *Acta Veterinaria Brno*, 74, 217-224.
240. Pechova., Llek J., Halouzka R. (1997): Diagnosis and control of the development of hepatic lipidosis in dairy cows in the peri-parturient period. *Acta Veterinaria Brno*, 66, 235-243.
241. Stojević Z., Pirsljin J., Milinković-Tur S., Zdelar-Tuk M., Ljubić B.B. (2005): Activities of AST, ALT and GGT in clinically healthy dairy cows during lactation and in the dry period. *Veterinarski Arhiv*, 75, 67–75.
242. Allen M.S. and Piantoni P., 2014, Carbohydrate Nutrition- Managing Energy Intake and Partitioning Through Lactation. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice* , Volume 30 , Issue 3 , 577 – 597.
243. Baumgard L.H. and Rhoads R.P: Effects of Heat Stress on Postabsorptive Metabolism and Energetics. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 2013. 1:311–337.
244. Marett L.C. M. J. Auldist, W. J. Wales, K. L. Macmillan, F. R. Dunshea, B. J. Leury, 2017, Responses of plasma glucose and nonesterified fatty acids to intravenous insulin tolerance tests in dairy cows during a 670-day lactation. *J. Dairy Sci.* 100:3272–3281 <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11985>.

245. Baumgard L.H., Hausman G.J., Sanz Fernandez M.V., 2016, Insulin: pancreatic secretion and adipocyte regulation. *Domestic Animal Endocrinology* 54, 76–84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.domaniend.2015.07.001>
246. Šamanc H., Gvozdić D., Fratrić N., Kirovski D., Djoković R., Sladojević Ž., Cincović M., 2015, Body condition score loss, hepatic lipidosis and selected blood metabolites in Holstein cows during transition period. *Animal Science Papers and Reports*, 33, 1, 1-13
247. Chapel JM, Muiño R, Pereira V, Castillo C, Hernández J and Benedito JL, 2017. Relationship of BCS prepartum with reproductive performance and lipomobilization in Holstein dairy cows. *Pak Vet J*, 37(2): 215-219
248. Salin, S., J. Taponen, K. Elo, I. Simpura, A. Vanhatalo, R. Boston, and T. Kokkonen. 2012. Effects of abomasal infusion of tallow or camelina oil on responses to glucose and insulin in dairy cows during late pregnancy. *J. Dairy Sci.* 95:3812–3825.
249. Jensen M D, Haymond M W, Gerich J E, Cryer P E, and Miles J M: Lipolysis during fasting. Decreased suppression by insulin and increased stimulation by epinephrine. *J Clin Invest.* 1987 Jan; 79(1): 207–213, doi: 10.1172/JCI112785.
250. Pires JAA, Pescara JB and Grummer RR, 2007b. Reduction of plasma NEFA concentration by nicotinic acid enhances the response to insulin in feed-restricted Holstein cows. *J Dairy Sci* 90:4635-42.
251. Cincović M, Kirovski D, Vujanac I, et al., 2017. Relationship between the indexes of insulin resistance and metabolic status in dairy cows during early lactation. *Acta veterinaria (Belgrade)* 67:57-70.
252. Salin S, Vanhatalo A, Elo K, Taponen J, Boston RC, Kokkonen T: Effects of dietary energy allowance and decline in dry matter intake during the dry period on responses to glucose and insulin in transition dairy cows. *J Dairy Sci.* 2017 Jul;100(7):5266-5280. doi: 10.3168/jds.2016-11871.
253. Schoenberg, K.M., Overton, T.R., 2011. Effects of plane of nutrition and 2,4-thiazolidinedione on insulin responses and adipose tissue gene expression in dairy cattle during late gestation. *J. Dairy Sci.* 94, 6021–6035.
254. Janovick, N. A., and J. K. Drackley. 2010. Prepartum dietary management of energy intake affects postpartum intake and lactation performance by primiparous and multiparous Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 93:3086–3102.

255. Djoković R., Dosković V., Cincović M., Belić B., Fratrić N., Jašović B., Lalović M., 2017, Estimation of Insulin Resistance in Healthy and Ketotic Cows during an Intravenous Glucose Tolerance Test. *Pak Vet J*, in press.
256. Gross J, van Dorland HA, Schwarz FJ, Bruckmaier RM: Endocrine changes and liver mRNA abundance of somatotrophic axis and insulin system constituents during negative energy balance at different stages of lactation in dairy cows. *J. Dairy Sci* 2011, 94:3484–3494.
257. Grummer RR, Wiltbank MC, Fricke PM, Watters RD, Silva-Del-Rio N. 2010. Management of dry and transition cows to improve energy balance and reproduction. *J Reprod Dev* 56 Suppl: S22–28.

9. BIOGRAFIJA AUTORA

Maja (Rade) Došenović Marinković je rođena u Novom Sadu 25.11.1984. godine. Završila je Osnovnu školu "Zdravko Čelar" u Čelarevu. Četiri godine kasnije, završila je Srednju poljoprivrednu školu u Futogu, smer veterinarski tehničar, sa odličnim uspehom. Školske 2003/04. godine upisala Veterinarsku medicinu na Departmanu za veterinarsku medicinu Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu. Diplomirala je sa prosečnom ocenom 8,08 u maju 2009.godine. Školske 2009/10. godine upisala je master studije i iste završila sa prosečnom ocenom 8,17 i ocenom 10 na odbrani završnog rada. U istom periodu je stažirala u Veterinarskoj ambulanti „Sremska Kamenica“ u Sremskoj Kamenici. Stručni ispit položila je pred komisijom Uprave za veterinu Ministarstva prosvete Republike Srbije 2011. godine. Školske 2011/2012 godine je upisala doktorske studije na Departmanu za Veterinarsku medicinu Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu i položila sve ispite predviđene nastavnim planom i programom sa prosečnom ocenom 9,87. Od aprila 2011. do oktobra 2015. godine je zaposlena u Veterinarskoj stanici „Šabac“ A.D. kao veterinar u veterinarskoj ambulanti. Osim rada u Veterinarskoj ambulanti, svoju ljubav prema nauci je iskazala kroz rad na Visokoj poljoprivrednoj školi u Šapcu gde je bila angažovana kao saradnik u nastavi za stručnu naučnu oblast veterinarske nauke. Na ovo radno mesto birana je dva puta. Od aprila 2017. godine osnivač je i direktor privatnog preduzeća Agrominos DOO. Od septembra iste godine, angažovana je i kao profesor veterinarske grupe predmeta u Mačvanskoj srednjoj školi u Bogatiću. Autor je i koautor više radova domaćeg i međunarodnog karaktera. Udata, sa suprugom Ivanom ima sinove Slobodana i Dušana.