

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

Željko Ž. Sladojević

**UTICAJ ENERGETSKOG BILANSA NA
ENDOKRINI I METABOLIČKI STATUS
KRAVA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2012.

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE**

Željko Ž. Sladojević

**EFFECT OF ENERGY BALANCE ON
ENDOCRINE AND METABOLIC STATUS
OF COWS**

PhD thesis

Belgrade, 2012.

Mentor:

Prof. dr Danijela Kirovski, vanredni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Članovi Komisije:

Prof. dr Horea Šamanc, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Miodrag Lazarević, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Goran Grubić, redovni profesor

Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Vojislav Trkulja, vanredni profesor

Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Banja Luci

Datum odbrane doktorske disertacije:

Tokom izrade ove doktorske disertacije nesebičnu podršku su mi pružili moji profesori i učitelji

Profesor Danijela Kirovski, koja je odvojila dragoceno vreme za svaki deo našeg rada i prenela veliko praktično i teoretsko iskustvo nesebično i prijateljski.

Profesor Horea Šamanc, koji je pomogao u postavljanju i izvođenju oglada i svojim ogromnim iskustvom u kliničkoj praksi dao praktične smernice u izvođenju oglada koji je zbog toga dobio naučnu i praktično-aplikativnu dimenziju.

Članovima Komisije se zahvaljujem na korisnim savetima i urađenoj recenziji disertacije, a posebno profesoru Miodragu Lazareviću.

Zahvaljujem se kolegama koji su mi pomogli u izvođenju pojedinih zadataka u okviru ove disertacije. Pre svega zahvaljujem se dr Ivanu Vujancu za pomoć pri izvođenju biopsija jetre krava.

Zahvaljujem se svojoj porodici na podršci i razumevanju za vreme provedeno u izradi ove disertacije i za moralnu podršku da u svemu ovom istrajem do završetka.

Napomena: Ova doktorska disertacija je delom finansirana od Ministarstva nauke i tehnologije Vlade Republike Srpske u okviru Projekta pod nazivom *"Uticaj energetskog bilansa tokom peripartalanog perioda na proizvodna i reproduktivna svojstva visokomliječnih krava holštajn rase"*

UTICAJ ENERGETSKOG BILANSA NA ENDOKRINI I METABOLIČKI STATUS KRAVA

REZIME

Cilj ove doktorske disertacije je bio da se ispita uticaj energetskog dodatka na bazi glicerola na metabolički i endokrini status krava u kasnom graviditetu i ranoj laktaciji. Ispitivanja su izvršena na 60 krava odabranih u zasušenju podjeljenih u dve jednake grupe. Obe grupe su dobijale potpuno izmešan obrok dva puta dnevno koji je bio usklađen sa potrebama jedinki u odnosu na fazu proizvodno reproduktivnog ciklusa. Dodatno, krave ogledne grupe su u jutarnjem obroku dobijale energetski dodatak u količini od 250 ml u periodu zasušenja, odnosno od 15. dana pre očekivanog termina teljenja do momenta teljenja, i u količini od 300 ml u periodu rane laktacije, odnosno prvih 60 dana posle teljenja, čime im je obezbeđeno dodatnih 9,30 MJ NEL tokom zasušenja, odnosno 13,95 MJ NEL tokom rane laktacije. Kontrolna grupa krava nije primala energetski dodatak. Telesna kondicija krava određena je 15. dana pre i 7., 30. i 60. dana posle teljenja. Sedmog, tridesetog i šezdesetog. dana nakon teljenja zabeležena je dnevna proizvodnja mleka. Od reproduktivnih pokazatelja registrovani su servis period i indeks osemenjavanja. Uzorci krvi za analizu uzimani su od krava punkcijom *vene jugularis* 15. dana pre, kao i 7. 30 i 60. dana nakon teljenja. U uzorcima krvi određivani su koncentracije glukoze, beta-hidroksi buterne kiseline (BHBA), neesterifikovanih masnih kiselina (NEFA), ukupnih proteina, albumina, uree, ukupnog bilirubina, kalcijuma, fosfora, insulina, trijodtironina, tiroksina, IGF-I i zastupljenost IGFBP-2, -3 i -4. Uzorci tkiva jetre su uzeti 7., 30. i 60. dana laktacije i u njima je određivan sadržaj ukupnih lipida. Računski su dobijeni HOMA (homeostatic model assessment) indeks i odnos T_3 i T_4 .

Krave ogledne grupe su u odnosu na kontrolnu imale značajno višu vrednost ocene telesne kondicije 7 dana nakon teljenja. Proizvodnja mleka kod krava ogledne grupe je bila značajno viša 60. dana laktacije. Krave koje su primale energetski dodatak su imale značajno kraći servis period u odnosu na kontrolnu grupu. Prosečni stepen zamašćenja jetre je 7. dana laktacije kod kontrolne grupe bio srednji a kod ogledne nizak. Tridesetog dana laktacije stepen zamašćenja jetre je bio značajno niži kod ogledne u odnosu na kontrolnu grupu, dok 60. dana ni kod jedne grupe nisu utvrđene

masne kapljice u jetri. Vrednosti biohemijskih parametara i ispitivanih hormona se nisu značajno razlikovale između grupa pre početka ogleda odnosno u zasušenju. Koncentracije glukoze i insulina je bila značajno viša kod ogledne u odnosu na kontrolnu grupu 30. i 60. dana laktacije. Koncentracije BHBA i NEFA su bile značajno niže kod krava ogledne grupe u odnosu na kontrolnu grupu u sva tri postpartalna perioda ispitivanja. Koncentracija ukupnog bilirubina je bila značajno viša kod kontrolne u odnosu na oglednu grupu 7. dana posle teljenja. Koncentracija ukupnih proteina, albumina, IGF-I, kao i zastupljenost IGFBP-3 je bila značajno viša kod ogledne u odnosu na kontrolnu grupu u sva tri perioda postpartalnog ispitivanja dok razlika u koncentraciji uree između dve grupe nije utvrđena. Zastupljenost IGFBP-2 je bila značajno viša u oglednoj u odnosu na kontrolnu grupu 60. dana laktacije dok nije utvrđena značajna razlika u zastupljenosti IGFBP-4 između grupa. Nije bilo razlike u koncentraciji fosfora između grupa dok je kalcemija bila značajno viša kod ogledne u odnosu na kontrolnu grupu 60. dana laktacije. Koncentracije T_3 i T_4 su bile značajno više kod ogledne u odnosu na kontrolnu grupu 7. dana laktacije. Tridesetog dana laktacije krave ogledne grupe su i dalje imale značajno višu koncentraciju T_4 u odnosu na kontrolnu grupu. HOMA indeks je bio značajno viši 30. i 60. dana laktacije, a indeks konverzije T_4 u T_3 značajno niži u puerperijumu i 30. dana laktacije kod krava ogledne grupe u odnosu na kontrolu. Na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da je energetski dodatak povoljno uticao na smanjenje izraženosti postpartalnog NEBa kod krava što je za posledicu imalo manji stepen zamašćenja jetre, veću mlečnost i kraći servis period kod ovih jedinki.

Ključne reči: energetski dodatak, metaboliti, hormoni, krava

Naučna oblast: Morfologija i fiziologija životinja

Uža naučna oblast: Fiziologija visokomlečnih krava

UDK broj: 612.43:636.2

EFFECT OF ENERGY BALANCE ON ENDOCRINE AND METABOLIC STATUS OF COWS

SUMMARY

The aim of this PhD thesis was to examine the effect of glycerol based energy supplementation on metabolic and endocrine status of cows in late pregnancy and early lactation. The study was conducted on a total of 60 cows, selected in dry period and divided into two groups. Both groups of cows were fed with a total mix ratio adjusted to the nutritive needs for pregnancy and lactation. Additionally, each cow in the experimental group was given energy supplement dispersed in the morning feed by sprayer for the period of the experiment in the quantity of 250 mL during last 15 days of pregnancy and 300 mL during first 60 days of lactation. Added glycerol provided additional 9.30 MJ NEL during dry period and additional 13.95 MJ NEL during early lactation period. Control animals did not receive energy supplement. Body condition score was performed at day 15 before and days 7, 30 and 60 after calving. Milking was measured at days 7, 30 and 60 of lactation. Service period and insemination index were determined. Four blood samples were taken by jugular venipuncture from each animal at day 15 before and days 7, 30 and 60 after calving. The blood glucose, beta-hydroxy butirate (BHBA), non-esterified fatty acid (NEFA), total protein, albumin, urea, total bilirubin, Ca, P, insulin, triiodothyronine, thyroxine, IGF-I as well as relative abundance of IGFBP-2, -3 and - were measured. Liver percutaneous biopsies were obtained at days 7, 30 and 60 after calving and total lipid content in hepatocytes was measured.

At day 7 after calving, cows from experimental group had significantly higher values for body condition scores than cows from control group. Experimental group of cows had significantly higher milk production than control group at day 60 of lactation. Energy supplemented cows had significantly shorter service period than control group. At day 7 of lactation, average degree of fatty liver was moderate in cows of control group and mild in cows from experimental group. At day 30 of lactation experimental group of cows had significantly lower fatty liver degree than control group. At day 60 of lactation there was no fat droplets in hepatocytes of cows from both groups. Concentrations of blood measured biochemical and hormone parameters did not

significantly differ between two groups at dry period, meaning before the beginning of experiment. Glucose and insulin concentrations were significantly higher in experimental compared to control group of cows. Concentrations of BHBA and NEFA were significantly lower in experimental compared to control group of cows at all three examined postpartal periods. Total bilirubin concentration was significantly higher in control compared to experimental group at day 7 after calving. Total protein, albumin, IGF-I concentrations as well as relative abundance of IGFBP-3 were significantly higher in experimental than in control group of cows at all three examined postpartal periods, while there was no significant difference in urea concentrations between groups. Relative abundance of IGFBP-2 was significantly higher in experimental than in control group at day 60 of lactation, while there was no significant difference in IGFBP-4 abundance between groups. There was no significant difference in P concentrations between groups, while calcemia was significantly higher in experimental compared to control group at day 60 of lactation. T₃ and T₄ concentrations were significantly higher in experimental than in control group at day 7 of lactation. At day 30 of lactation, experimental group of cows had still higher T₄ concentration than control group. HOMA index was significantly higher at days 30 and 60 of lactation, and index of T₄ to T₃ conversion was significantly lower at days 7 and 30 of lactation in experimental compared to control group of cows.

In conclusion, dietary energy supplementation in peripartal dairy cows improved energy of cows, implicating that these cows probably did not suffer from severe negative energy balance. Consequently, fatty liver degree was depressed, milk production was enhanced and reproductive performance is improved in cows that received dietary energy supplement.

Key words: energy supplement, metabolites, hormones, cow

Scientific field: Animal morphology and physiology

Field of academic expertise: Physiology of cows

UDK number: 612.43:636.2

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. ENERGIJA HRANE KAO IZVOR ENERGIJE ZA KRAVE	3
2.2. OSNOVNE KARAKTERISTIKE ENERGETSKOG METABOLIZMA ...	4
2.3. SPECIFIČNOSTI ENERGETSKOG METABOLIZMA VISOKOMLEČNIH KRAVA	5
2.4. ZNAČAJ METABOLIČKIH I ENDOKRINIH PARAMETARA U PROCENI NEGATIVNOG BILANSA ENERGIJE	10
<i>2.4.1. Značaj koncentracije glukoze u krvi</i>	12
<i>2.4.2. Značaj koncentracije NEFA u krvi</i>	13
<i>2.4.3. Značaj koncentracije BHBA u krvi</i>	14
<i>2.4.4. Značaj koncentracije insulina u krvi</i>	15
<i>2.4.5. Značaj koncentracije tireoidnih hormona u krvi</i>	16
<i>2.4.4. Značaj koncentracije IGF-I u krvi</i>	17
2.5. POSLEDICE NEGATIVNOG BILANSA ENERGIJE NA ZDRAVLJE, PROIZVODNJU I REPRODUKTIVNU AKTIVNOST KRAVA	20
<i>2.5.1. Negativan bilans energije i metaboličke bolesti</i>	20
<i>2.5.2. Negativan bilans energije i imunski status</i>	23
<i>2.5.3. Negativan bilans energije i reproduktivna aktivnost</i>	25
2.6. POTREBE VISOKOMLEČNIH KRAVA U ENERGIJI	29
2.7. ENERGETSKI DODACI U ISHRANI KRAVA	31
3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA	34
4. MATERIJAL I METODE	35
4.1. Ogledne životinje	35
4.2. Određivanje telesne kondicije krava	37
4.3. Utvrđivanje mlečnosti i reproduktivnih pokazatelja	37
4.4. Uzimanje uzoraka od životinja	37
<i>4.4.1. Uzimanje uzoraka krvi</i>	37

4.4.2. Uzimanje uzoraka jetre	38
4.5. Određivanje koncentracije ispitivanih parametara	39
4.5.1. Određivanje koncentracije ispitivanih parametara u krvnom serumu krava	39
4.5.2. Određivanje zastupljenosti ukupnih lipida u tkivu jetre	40
4.6. Indeksi dobijeni računskim putem iz vrednosti pojedinih parametara krvi	40
4.6.1. Homeostatski model za procenu insulinske rezistencije (HOMA indeks)	40
4.6.2. Indeks konverzije tiroksina u trijodtironin (T3/T4)	41
4.7. Statistička obrada rezultata	41
5. REZULTATI	42
5.1. Ocena telesne kondicije krava	42
5.2. Mlečnost krava	45
5.3. Reproductivni pokazatelji	46
5.4. Stepen zamašćenja jetre	46
5.5. Koncentracija biohemijskih parametara u krvi krava	48
5.5.1. Koncentracija glukoze	48
5.5.2. Koncentracija betahidroksi buterne kiseline (BHBA)	49
5.5.3. Koncentracija neesterifikovanih masnih kiselina (NEFA).....	50
5.5.4. Koncentracija ukupnog bilirubina	50
5.5.5. Koncentracija ukupnih proteina (UP)	50
5.5.6. Koncentracija albumina	51
5.5.7. Koncentracija uree	51
5.5.8. Koncentracija kalcijuma	52
5.5.9. Koncentracija fosfora	53
5.6. Koncentracija hormona u krvi krava	53
5.6.1. Koncentracija insulina	53

5.6.2. <i>Koncentracija tiroksina (T₄)</i>	54
5.6.3. <i>Koncentracija trijodtironina (T₃)</i>	55
5.6.4. <i>Koncentracija insulinu-sličnog faktora rasta (IGF-I)</i>	55
5.6.5. <i>Relativna zastupljenost IGFBP-2</i>	56
5.6.6. <i>Relativna zastupljenost IGFBP-3</i>	58
5.6.7. <i>Relativna zastupljenost IGFBP-4</i>	59
5.7. Indeksi dobijeni računskim putem iz vrednosti pojedinih parametara	
krvi	60
5.7.1. <i>HOMA indeks</i>	60
5.7.2. <i>Indeks konverzije tiroksina u trijodtironin</i>	61
6. DISKUSIJA	63
7. ZAKLJUČCI	76
8. LITERATURA	78

1. UVOD

Osnovni cilj govedarske proizvodnje je da se hemijska energija deponovana u organskim sastojcima biljaka iskoristi za proizvodnju mesa i mleka za ljudsku ishranu na najobimniji i najekonomičniji način. Zbog toga je energetska metabolizam goveda centralni problem u istraživačkom radu velikog broja naučnika. Uspešno vođenje i profitabilnost farmi visokomlečnih krava zavisi od njihovog dobrog zdravlja i reproduktivnih performansi. U proizvodno-reproduktivnom ciklusu krava najkritičniji period u održavanju dobrog zdravstvenog stanja je peripartalni period i period rane laktacije. Tokom tog perioda vrši se prestrojavanje metaboličkih puteva i endokrinog sistema krava, u cilju obezbeđivanja uspešne tranzicije iz stanja visokog graviditeta u stanje laktacije. U savremenom sistemu držanja i nege krava vrlo često se pojavljuju metabolički i endokrini disbalansi u organizmu krava zbog nemogućnosti organskih sistema da se prilagode ovoj tranziciji. Učestalost pojavljivanja zdravstvenih problema, u čijoj osnovi su greške u načinu držanja i ishrane kod tek oteljenih krava, je često vrlo visoka na farmama visokomlečnih krava. Najčešće nastaje zamašćenje jetre, praćeno difuznim oštećenjem parenhima, nizom novih metaboličkih oboljenja koja mogu da nastanu u akutnom (mlečna groznica i hepatična koma), subakutnom (dislokacija abomazusa i ketoza) ili hroničnom toku. Različiti oblici mastitisa i promene u reproduktivnom sistemu, koji se javljaju u hroničnom obliku, predstavljaju posebnu opasnost za uspešnu govedarsku proizvodnju. Najčešće se zbog ovih poremećaja pojavljuju značajno smanjenje proizvodnje mleka, anestrija, cistozna degeneracija jajnika i posledično produženje servis perioda i perioda između dva teljenja. S obzirom da su kod obolelih životinja smanjene odbrambene sposobnosti organizma one su podložne virusnim (BVD, BHV) i bakterijskim infekcijama (anaerobne bakterije) i kod njih imunoprolifaktičke mere ne daju očekivane rezultate. To je jedan od razloga što su ove bolesti sve raširenije u populacijama goveda i u budućnosti mogu da predstavljaju veoma značajan zdravstveni problem. Da bi se ostvarila visoka proizvodnja mleka i zadovoljavajući broj teljenja tokom proizvodno-reproduktivnog ciklusa visokomlečnih krava, potrebno je da period između dva uzastopna teljenja bude kraći od 380 dana, odnosno da se ostvari takva dinamika teljenja da se tokom svake kalendarske godine dobije jedno tele po jednoj kravi. To znači da plotkinja mora da ostane steona u 12. nedelji laktacije.

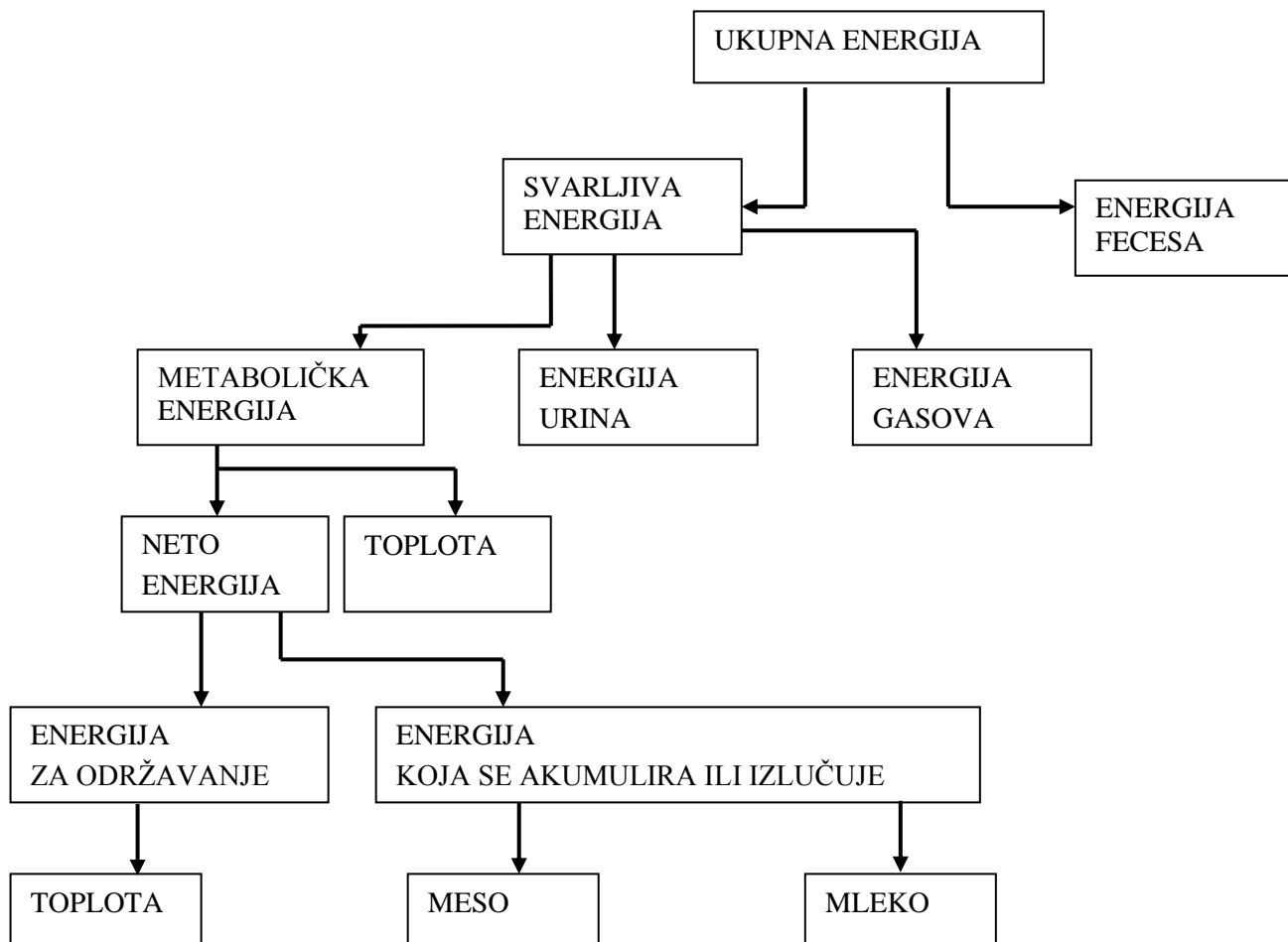
Rešavanje ovih problema je moguće pravilnim načinom držanja i ishrane životinja i redovnom kontrolom zdravstvenog stanja. S obzirom da je poremećaj energetskeg metabolizma tokom peripartalnog perioda najčešći uzrok zdravstvenih problema, smanjene mlečnosti i reproduktivnih problema kod krava, često se njegovim uravnoteženjem prevazilaze ovi problemi. Naime, produbljen negativni bilans energije (NEB) posle teljenja može se umanjiti dodavanjem različitih energetskih dodataka u hrani tokom peripartalnog perioda. Na tržištu postoji veliki broj ovih dodataka i većina je na bazi propilen glikola ili glicerola. Oni su prekursori u procesu glukoneogeneze i time obezbeđuju dovoljno glukoze za sintezu laktoze mleka ali delom direktno obezbeđuju energiju tako što, uključivanjem u različite metaboličke puteve, obezbeđuju određenu količinu molekula ATPa. Poslednjih godina se daje prednost energetskim dodacima na bazi glicerola jer postoji mogućnost da se glicerol, kao sporedni proizvod u proizvodnji biodizela, pojavi na tržištu po ceni koja bi bila prihvatljiva za profitabilnost govedarske proizvodnje. Stoga je cilj ove disertacije bio da se ispita uticaj dodavanja energetskog dodatka na bazi glicerola na metabolički i endokrini status krava i da se na taj način utvrde mehanizmi uticaja glicerola na zdravlje, proizvodni i reproduktivni status goveda.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. ENERGIJA HRANE KAO IZVOR ENERGIJE ZA KRAVE

Hraniva predstavljaju osnovni izvor energije za visokomlečne krave. Energija hrane koju jedinka unosi u organizam predstavlja bruto (ukupnu) energiju hrane. Ona se definiše se kao energija koja može da se oslobodi kao toplota kada se njegova organska materija u celosti oksidiše do ugljen dioksida i vode. Tu energiju životinja ne može u potpunosti da iskoristi. Deo bruto energije hrane se gubi kao energija fecesa (u fecesu se nalazi energija nesvarenog dela hrane i energija nekih proizvoda metabolizma). Energija koja preostaje nakon što se od ukupne energije hrane oduzme energija fecesa naziva se svarljiva energija. Od te energije jedan deo se gubi kao energija gasova (pre svega metana) koji nastaju procesom fermentacije u buragu i kao energija urina (sastoji se od energije koja vodi poreklo od hranljivih materija koje su bile usvojene ali nisu bile iskorišćene u organizmu, energije krajnjih proizvoda metabolizma i endogenih supstanci a odnosi se pretežno na ureu). Preostala energija je metabolička energija. Kako se tokom metabolizma stvara toplota, oduzimanjem toplotne od metaboličke energije dobija se neto energija hrane koja predstavlja produktivnu vrednost hraniva. Neto energija se može izraziti kao neto energija za održavanje (*Net energy for maintenance – NEM*) često nazivane uzdržne potrebe krava, neto energija za prirast (*Net energy for gain – NEG*), neto energija za laktaciju (*Net energy for lactation – NEL*). U našoj zemlji se energetska vrednost hraniva i obroka za ishranu krava izražava u mega džulima neto energetske vrednosti za laktaciju (MJ NEL).

Korišćenje energije u organizmu krava šematski je prikazano na slici 2.1.



Slika 2. 1. Korišćenje energije u organizmu krava (Grubić i Adamović, 2003)

2.2. OSNOVNE KARAKTERISTIKE ENERGETSKOG METABOLIZMA

Najvažniji izvori energije za organizam su molekuli organskih materija, pre svega, ugljeni hidrati i masti. Proces razlaganja ovih jedinjenja se odvija u tri faze. U prvoj fazi katabolizma veliki molekuli hranljivih materija se razgrađuju do svojih osnovnih gradivnih blokova. Tako se ugljeni hidrati razlažu do monosaharida, masti do masnih kiselina i glicerola, a belančevine do amino-kiselina. U drugoj fazi ova jedinjenja se katabolišu do acetil-CoA (uz nekoliko drugih krajnjih proizvoda) uz oslobađanje neznatnih količina hemijske energije osnovnih jedinjenja. U trećoj fazi, koja je najbitnija sa aspekta energetskeg metabolizma, u Krebsovom ciklusu i procesu oksidativne fosforilacije acetil-CoA se oksidiše do ugljen dioksida i vode. Najvažniji

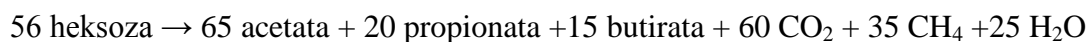
proces u katabolizmu jedinjenja koja služe kao osnovni izvori energije kod sisara je sinteza ATP-a... Naime, stvoreni ATP sadrži energiju deponovanu u fosfatnim vezama i on je prenosilac hemijske energije od kataboličkih reakcija metabolizma u kojima se proizvodi hemijska energija do ćelijskih procesa za čije je obavljanje potrebna energija: biosinteze ćelijskih makromolekula, kontrakcije mišića i drugo. Pri tome se najveća količina ATPa stvara u trećoj fazi katabolizma. Tako, u toku oksidacije glukoze do ugljen dioksida i vode, 34 od 36 neto sintetisanih molekula ATP-a nastaje u procesu oksidativne fosforilacije (32 molekula ATPa) i ciklusu trikarbonskih kiselina (2 molekula ATPa), a svega 2 molekula u procesu glikolize do pirogroždane kiseline. Slično tome, pri oksidaciji masnih kiselina kao što je palmitinska kiselina, osam molekula ATP-a se stvara pri beta-oksidaciji od ukupno 129 molekula ATP-a, koliko nastaje u procesu definitivne oksidacije ovog jedinjenja. U ovim procesima vežnu ulogu imaju enzimski kompleksi, od kojih su najznačajniji NADH i FADH₂ kompleks, koji su nosioci vodonikovih atoma, odnosno elektrona. Za svaki vodonikov atom koji prelazi od NADH na kiseonik sintetišu se po tri molekula ATP-a.

2.3. SPECIFIČNOSTI ENERGETSKOG METABOLIZMA VISOKOMLEČNIH KRAVA

Osnovni cilj govedarske proizvodnje je da se hemijska energija deponovana u organskim sastojcima biljaka iskoristi za proizvodnju mesa i mleka za ljudsku ishranu na najobimniji i najekonomičniji mogući način. Zbog toga i danas energetskei metabolizam goveda predstavlja središnji problem u istraživačkom radu velikog broja naučnih radnika (*Jorristma, 2003; von Sosten i sar., 2012*).

Digestivni trakt preživara se kroz procese evolucije razvijao i osposobio da omogući iskorišćavanje energije, ne samo iz nestrukturnih (skrob), već i iz struktturnih ugljenih hidrata biljaka. Naime, hranljiva vrednost ovih ugljenih hidrata ograničena je β -1,4 – glikozidnom vezom, za koju nema ključnog enzima kod sisara. Međutim, kod preživara mikroflora buraga nadoknađuje ovaj nedostak jer bakterije imaju enzime potrebne za razgradnju ove veze. Stoga, simbioza između mikroflora buraga i preživara može da se smatra najvažnijom biološkom karikom u procesima transformacije i korišćenja energije uskladištene u struktturnim delovima biljaka. Zahvaljujući mikroflori predželudaca, preživari mogu da svare širok spektar ugljenih hidrata, naročito celulozu,

do nižih masnih kiselina (sirćetna, propionska i buterna), koje se nakon resorpcije koriste u organizmu za potrebe metabolizma. Zapravo, prisustvo velikog broja mikroorganizama u sadržaju predželudaca omogućava početak razlaganja takvih jedinjenja. Najveći deo energije ipak ostaje sadržan u molekulima nižih masnih kiselina. Proces razlaganja ugljenih hidrata od monosaharida do nižih masnih kiselina teče na sledeći način :



Na osnovu svega navedenog se zaključuje da su kod preživara, za razliku od monogastričnih životinja, neposredan izvor energije niže masne kiseline, a ne monosaharidi kao što je glukoza. Pri tome, najveći značaj kao izvor energije ima sirćetna kiselina, nešto manji značaj buterna kiselina, dok se propionska kiselina koristi u najvećoj meri u procesu glukoneogeneze.

Iako je opšte prihvaćeno da se najveći deo skroba, kao strukturnog ugljenog hidrata, razlaže u buragu, postoje dokazi da kod krava značajan deo skroba može da izbegne razgradnju u buragu (*McCarthy i sar. 1989*). Takvi podaci donekle osporavaju teoriju da je praktično sva glukoza u organizmu krave nastala u procesu glukoneogeneze. To se naročito dešava pri ishrani značajnom količinom kukuruza. Nekoliko kilograma skroba koji se razloži do glukoze u tankim crevima predstavlja značajan udeo u ukupnoj količini glukoze koja se nalazi u organizmu krave. Ono što je takođe značajno napomenuti je da se pri razgradnji skroba u tankim crevima ne javljaju prilično veliki gubici (u vidu toplote) koji su povezani sa fermentativnim razlaganjem u buragu.

Energetski metabolizam, kao i metabolizam uopšte, kod visokomlečnih krava prolazi kroz najveće izazove tokom peripartalnog perioda. Peripartalni period je period od 3 nedelje pre teljenja do tri nedelje posle teljenja krava i smatra se najkritičnijim u pogledu održavanja metaboličkih procesa u fiziološkim okvirima (*Bell, 1995; Grum i sar., 1996; Drackly i sar., 2001; Overton i Waltron, 2004; LeBlanck, 2010*). U tome periodu jedinka iz stanja graviditeta, kada su metabolički putevi usmereni ka zadovoljenju potreba rastućeg ploda, prelazi u laktaciju, koju karakteriše rastuće proizvodnja mleka. Ukoliko se ta metabolička tranzicija ne obavi na adekvatan način dolazi do smanjenja proizvodnih sposobnosti životinje, poremećaja zdravlja i reproduktivnih sposobnosti.

Tokom kasnog graviditeta krave se nalaze u stanju pozitivnog bilansa energije. Životinje u ovom periodu unose veću količinu energije od one koja je potrebna njihovom organizmu, pa se zbog toga višak unete energije deponuje. Ova pojava se prepoznaje po povećanju telesne mase životinja. Kada pozitivan bilans energije potraje duže, kao što je to slučaj kod slabo plodnih krava, sa dugim servis periodom, pozitivan bilans energije ima kao posledicu gojaznost krava u zasušenju. Poželjno je da krave odlažu dovoljne količine masti u telesnim depoima energije, ali ne i da stvaraju višak masnog tkiva kao preteranu rezervu energije koju će trošiti u toku rane laktacije. Suficit u energiji na kraju laktacije i u zasušenju je osnovni razlog za izraženiji pozitivan bilans energije što ima za posledicu tovu kondiciju životinja. Pored toga, višak energije deponovane u telesnim depoima, zbog prekomerne i nekontrolisane lipomobilizacije, predstavlja jedan od osnovnih razloga pojave supkliničkih i kliničkih poremećaja metabolizma (*Oetzel, 2004*).

Prva faza laktacije, koja traje do tri meseca posle porođaja, najkritičnija je faza u proizvodnom ciklusu. Naime, uspostavljanjem laktacije organizam visokomlečnih krava je opterećen do krajnjih fizioloških granica (40 do 60% ukupne proizvodnje mleka proizvede se u prvih 120 dana laktacije). Za ovu fazu laktacije takođe karakteristično da krave fiziološki imaju manji apetit, tako da do druge nedelje posle teljenja mogu dnevno da unose svega 10 do 11 kg suve materije obroka. Potom se unošenje hrane postepeno povećava i dostiže optimum između drugog i trećeg meseca laktacije kada krave unose od 18 do 21 kg suve materije obroka na dan. Zbog toga što su ukupne energetske potrebe daleko veće nego što jedinke mogu da obezbede iz alimentarnih izvora, krave se u prvim nedeljama laktacije nalaze u stanju negativnog energetskeg bilansa (NEB). Pri tome, zbog negativnog energetskeg bilansa, krave u prvoj fazi laktacije značajno gube u telesnoj težini. Procenjeno je da trećina energije koja se gubi izlučivanjem mleka u prvom mesecu laktacije potiče iz telesnih rezervi organizma.

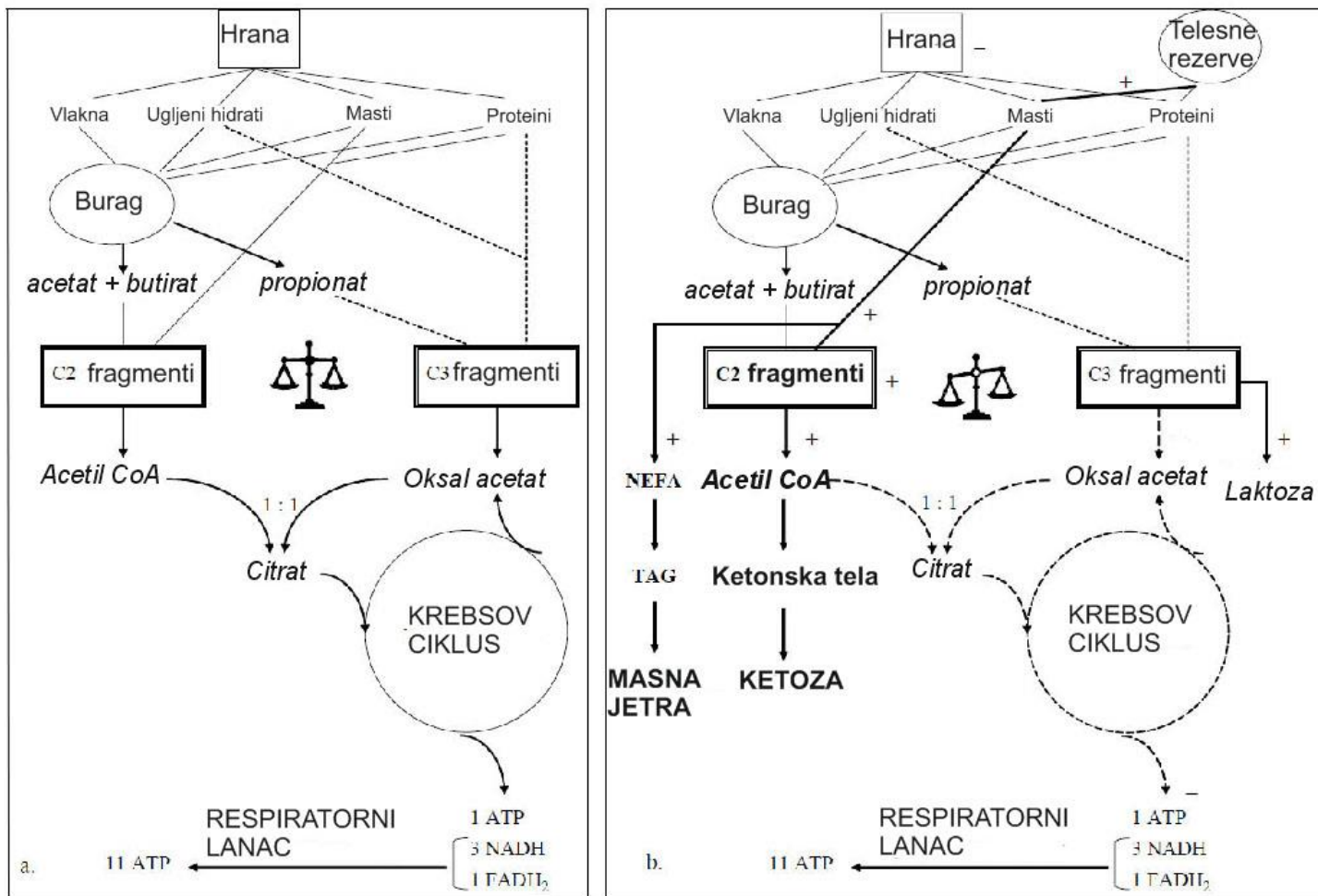
Dok se ne uspostavi ravnoteža između količine unete energije i količine proizvedenog mleka (od 8. do 10. nedelje posle teljenja), nedostatak energije se nadoknađuje iz telesnih rezervi organizma. Zapravo, zahvaljujući kompenzatornim mehanizmima, organizam nastoji da umanjuje energetskeg disbalans procesom mobilizacije masti iz telesnih depoa. Masti su najznačajniji izvor energije koja je neophodno potrebna da bi se u potpunosti ispoljio genetski potencijal životinja. To istovremeno

predstavlja veliku mogućnost za narušavanje metaboličke ravnoteže i nastajanje masne infiltracije i degeneracije ćelija jetre. Izgleda da genetska predispozicija krava na visoku mlečnost može da ima kao posledicu lučenje mleka i u nepovoljnim energetskim uslovima, na račun intenziviranja metabolizma drugih organskih jedinjenja, sve dok ne nastane bolesno stanje.

Unošenje hrane u peripartalnom periodu i u kritičnoj fazi laktacije je činilac od koga direktno zavisi sposobnost životinja da se prilagođavaju na uslove negativnog bilansa energije. Naime, kada se potrebne količine glikogenoplastičnih i energetskih prekursora obezbeđuju iz hranljivih materija preko digestivnog trakta, glavni katabolički i anabolički procesi odvijaju se svojstveno preživarima. U uslovima negativnog bilansa energije zbog intenziviranja procesa lipomobilizacije, pri raspoloživoj ali nedovoljnoj količini glikogenoplastičnih jedinjenja, novonastali odnos u intermedijarnom metabolizmu ima za posledicu nakupljanje ostataka sa dva C-atoma i sledstveno tome, intenziviranje procesa ketogeneze. Deficit energije u prva dva meseca laktacije može da bude jednak količini energije koju ima 50 kg telesne masti i može da se pretpostavi da rezerve energije smeštene u depoima masti treba da su što veće u ranoj fazi laktacije. Međutim, ustanovljeno je da kod krava koje nagomilaju veće rezerve u poslednjoj fazi laktacije i tokom perioda zasušenja, proces lipomobilizacije započinje ranije i odvija se brzo i nekontrolisano. To praktično potvrđuje davno iznetu hipotezu da stepen lipomobilizacije u najvećoj meri zavisi od deponovanih masti. Ukoliko je pozitivan bilans energije u zadnjoj fazi laktacije i zasušenju izraženiji i duže traje, nakupljene količine telesne masti koje mogu da budu izuzetno velike, sve do patoloških razmera, se početkom laktacije mobilisu u mnogo većem stepenu nego što su stvarne potrebe organizma uslovljene negativnim bilansom energije. Krave koje su pregojene u zasušenju imaju značajno manji apetit nego krave normalne telesne kondicije i zato je kod njih NEB produbljeniji a lipomobilizacija intenzivnija (*Grummer i sar., 2008*).

Na slici 2.2. je prikazan energetski metabolizam mlečnih krava u fazi zasušenja i na početku laktacije. Zapaža se da kod obe kategorije krava u buragu procesom fermentacije ugljenih hidrata, masti i proteina nastaju niže masne kiseline (NMK). Najznačajnije NMK su sirćetna i buterna, koje se sastoje od fragmenta sa 2 ugljenikova atoma i pripadaju grupi lipogenih kiselina, dok propionska kiselina, koja se sastoji od 3 ugljenikova atoma (C3 fragmenta) pripada grupi glikogenoplastičnih kiselina. Njihov

završni put oksidacije dovodi do formiranja acetil CoA (2 ugljenikova atoma) i oksalacetata (3 ugljenikova atoma) koji, u međusobnom molekularnom odnosu od 1:1, formiraju citrat. Citrat podleže nizu reakcija unutar Krebsovog ciklusa pri čemu dolazi do oslobađanja ATP, NADH i FADH₂. Energiju u formi ATPa oslobađaju NADPH i FADH₂ u prisustvu kiseonka na respiratornom lancu. Međutim, u stanju negativnog bilansa energije na početku laktacije, deficit se nadoknađuje mobilizacijom masti iz telesnih rezervi, a koje pretežno sastoje od C2 fragmenata (fragmenata sa 2 ugljenikova atoma). Mobilizacija telesnih masti dovodi do porasta koncentracije neesterifikovanih masnih kiselina (NEFA), koje se u jetri ili oksidišu do acetil CoA ili se deponuju u jetri kao triacilglicerol (TAG), što može dovesti do pojave masne jetre. Istovremeno, visoka proizvodnja mleka na početku laktacije zahteva visoku proizvodnju laktoze, a ona se pretežno proizvodi iz jedinjenja koja se sastoje od C3 fragmenata (fragmenata sa 3 ugljenikova atoma). Taj proces neminovno dovodi do smanjenja koncentracije glukoze. Prema tome, u uslovima NEB proizvodnja acetil Co A iz acetata, butirata i masnih kiselina telesnih depoa je visoka a istovremeno je smanjena dostupnost C3 fragmenata koji uglavnom potiču iz glukoze i glikogenoplastičnih prekursora. Samim tim odnos oksalacetata i acetil CoA izlazi iz ravnoteže pa je i količina citrata koji je put ka dobijanju energije u Krebsovom ciklusu smanjena. Na taj način, acetil Co A biva preusmeren ka proizvodnji ketonskih tela, acetona, acetoacetata i BHBA. To može rezultirati pojavom ketoze. Na osnovu izloženog se može zaključiti da je metabolički efekat NEBa disbalans odnosa C2 i C3 fragmenata uz nisku koncentraciju glukoze i visoku koncentraciju NEFA, beta-hidroksibuterne kiseline (BHBA), acetona, acetoacetata i TAG u jetri.



Slika 2.2. Energetski metabolizam kod krava koje nisu u laktaciji (a) i energetski metabolizam krava u stanju negativnog bilansa energije (b) (Webster, 1993).

2.4. ZNAČAJ METABOLIČKIH I ENDOKRINIH PARAMETARA U PROCENI NEGATIVNOG BILANSA ENERGIJE

Pravilna ocena stepena negativnog bilansa energije je veoma važna da bi se predvidelo nastajanje metaboličkih poremećaja i njihova težina kod pojedinih životinja. Naime, negativan bilans energije na početku laktacije je mehanizam adaptacije na visoku proizvodnju mleka i ukoliko se održava u optimalnim okvirima neće dovesti do poremećaja proizvodnje, bolesnih stanja i problema u reprodukciji. Ukoliko je NEB produbljen onda postaje faktor rizika za različite metaboličke bolesti koje se javljaju na

početku laktacije. Zbog toga je veoma značajno utvrditi validne činioce koji mogu blagovremeno da ukažu na stepen adaptacije krava za visoku proizvodnju mleka. U takve činioce se ubrajaju parametri metaboličkog profila, posebno pokazatelji funkcionalnog stanja jetre, koncentracija hormona u krvnoj plazmi i još neki klinički parametri (*Bobe i sar., 2004*). Nekoliko nedelja pre porođaja, neki od ovih parametara mogu da ukažu na opasnost od patofizioloških poremećaja pa je moguće da se određenim merama ublaže posledice negativnog bilansa energije u prvoj fazi laktacije.

Iako proces adaptacije počinje onoga trenutka kada balans energije dobije negativnu vrednost, odnosno od drugog do dvanaestog dana posle partusa, sve je zastupljenije mišljenje da proces prilagođavanja kod visokomlečnih krava počinje u poslednjim nedeljama graviditeta, odnosno još onda kada počinje proces lipomobilizacije. Iako je pri kraju graviditeta bilans energije pozitivan, prilagođavanje organizma započinje još tada promenama u hormonalnoj konstelaciji i mobilizacijom masnih kiselina iz telesnih depoa (*Šamanc i sar., 2010; Šamanc i sar., 2011*). Kod nekih životinja upravo u tom periodu počinje proces zamašćenja jetre, što jasno ukazuju da se pre nego što nastane negativan bilans energije, proces prilagođavanja se odvija u neželjenom pravcu.

Generalno, negativan bilans energije koji karakteriše ranu laktaciju, je praćen sniženim koncentracijom glukoze i insulina u krvi, a povećanom koncentracijom BHBA i NEFA u krvi, što je veoma česta pojava kod krava u ranoj fazi laktacije (*Schwalm i Schultz, 1976; Bonczek i sar., 1988; Nielsen i sar., 1993; Šamanc i sar., 1998; Šamanc i sar., 1999; Šamanc i sar., 2011; Prodanović i sar., 2012*). Zbog negativnog bilansa energije deponovane telesne masti se mobilišu se i utiču na koncentraciju leptina, tako da njegova koncentracija u krvi može da bude veoma pouzdan pokazatelj ovih promena za vreme negativnog bilansa energije (*Houseknecht i sar., 1998; Block i sar., 2001; Accorsi i sar., 2005*). Koncentracije drugih hormona u krvi se menjaju takođe kod krava koje se hrane „restriktivno” za vreme negativnog bilansa energije. To su u prvom redu hormoni tireoidee čija koncentracija značajno opada u ranoj fazi laktacije, slično kao koncentracija insulinu-sličnog faktora rasta-I (IGF-I) (*Bonczek i sar., 1988; Nielsen i sar., 1993; Stojić i sar., 2001; Kirovski i sar., 2012*). Ove promene u hormonalnoj konstelaciji se u značajnoj meri odražavaju na sve mehanizme koji su odgovorni za

prilagođavanje organizma na uslove negativnog bilansa energije, funkciju mlečne žlezde i reproduktivnih organa.

2.4.1 Značaj koncentracije glukoze u krvi

S obzirom na ograničenu količinu glukoze koja se dobija resorpcijom iz digestivnog trakta, proces glukoneogeneze ima izuzetno važnu ulogu u održavanju glikemije u fiziološkim granicama kod krava (*van der Walt i Linington, 1998*). Pored glukoneogeneze izvor glukoze je i glikogenoliza. Naime, glikogen deponovan u ćelijama jetre je značajan izvor energije za krave. Količina glikogena u jetri zavisi pre svega od ishrane i u fiziološkim uslovima je podložna značajnim promenama. Kod krava koje se obilno hrane, jetra može da sadrži i do 6 % glikogena, dok u uslovima gladovanja može da ostane potpuno bez (*Mayes, 1989*). Takođe je utvrđeno da kod krava koje posle teljenja ulaze u stanje izrazitog NEB, brzo dolazi do pražnjenja depoa glikogena u ćelijama jetre. Često se, istovremeno sa tim, povećava sadržaj masti u jetri (*Reid i sar., 1973*). *Veebhuizen i sar (1991)* su utvrdili da se u uslovima NEB prvo iscrpljuju rezerve glikogena a zatim mobilišu masti iz telesnih depoa, da bi se obezbedila nedostajuća energija.

Kao što je naglašeno, jedan deo skroba može da izbegne fermentaciju u buragu i razloži se do glukoze u tankom crevu koja se zatim resorbuje. Ova količina glukoze nije beznačajna u uslovima ishrane obrocima bogatim kukuruzom.

Koncentracija glukoze u krvi preživara je niža nego kod nepreživara i kreće se u rasponu od 2,22 do 3,33 mmol/l. Međutim, postoje značajne razlike kod zdravih krava u visokom graviditetu, za vreme teljenja, u puerperijumu i u toku laktacije. Kod zdravih krava glikemija u visokom graviditetu je u fiziološkim granicama i odraz je uravnoteženog energetskeg metabolizma koji obezbeđuje normalno odvijanje procesa glukoneogeneze (*Nafikov i Beitz, 2007*). Za vreme teljenja dolazi do naglog porasta koncentracije glukoze u krvi, što je najverovatnije posledica stresa koji se dešava usled hormonalnih promena u tom periodu a koji podstiču glukoneogenezu i glikogenolizu (*Vazguezanon i sar., 1994*). Nakon teljenja i u ranoj fazi laktacije koncentracija glukoze je niža kod visokomlečnih krava u odnosu na period pre teljenja (*Šamanc i sar., 2011*). Prema *Šamanc i sar. (1993)* prosečna glikemija u visokom graviditetu visokomlečnih krava iznosu 2,81 mmol/l, dok posle teljenja ona iznosi prosečno 2,41 mmol/l. Isti

autori smatraju da u poslednjoj nedelji graviditeta vrednosti glikemije treba da budu od 2,77 do 3,88 mmol/l. Vrednosti ispod 2,77 u ovoj fazi proizvodno reproduktivnog ciklusa ukazuju na veće opterećenje metabolizma i to je siguran nagoveštaj postpartalnih metaboličkih oboljenja (*Šamanc i sar., 2011*).

Na početku laktacije, odnosno u periodu NEBa, potrebe organizma za glukozom prevazilaze onu količinu glukoze koju organizam može da obezbedi. Smatra se da je mlečna žlezda najvažniji činilac od kog zavisi stabilnost metabolizma i vrednost glikemije. Naime, povećano korišćenje glukoze od strane mlečne žlezde pri smanjenoj sintezi i prilivu glikogenoplastičnih jedinjenja stvara uslove za nastanak hipoglikemije, a vrlo često i poremećaja metabolizma ugljenih hidrata i masti. Stoga bi hipoglikemija na početku laktacije mogla da posluži kao pouzdan pokazatelj NEB kod krava

2.4.2 Značaj koncentracije NEFA u krvi

Neesterifikovane masne kiseline su jedan od najznačajnijih izvora energije za organizam sisara (*Emery et al., 1992*). One nastaju lipolizom u masnom tkivu, a delom nastaju i kao rezultat delovanja lipoprotein lipaze na trigliceride koji iz krvi dospevaju u periferna tkiva. U krvi su NEFA vezane za albumine. Kod krava su koncentracije NEFA značajno veće u ranoj laktaciji nego u zasušenju. Razlog tome je intenziviran proces lipolize odmah nakon teljenja koji se odigrava u uslovima NEBa. Veliki broj autora smatra da je koncentracija NEFA najbolji pokazatelj NEB jer je direktna posledica lipomobilizacije čiji intenzitet zavisi od stepena NEB (*Ospina i sar., 2010*). Fiziološki prihvatljiva koncentracija NEFA u krvi krava je ispod 0,7 mmol/l, pri čemu ona kod krava u poslednjem mesecu graviditeta treba da bude niža od 0,4 mmol/l. Krave sa kliničkim znacima ketoze imaju koncentraciju NEFA veću od 1,5 mmol/l.

Posebni zaključci o energetsom metabolizmu visokomlečnih krava tokom peripartalnog perioda se mogu izvesti posmatranjem odnosa NEFA i glukoze prepartalno odnosno NEFA i triglicerida postpartalno (*Šamanc i sar., 2005*). Naime, utvrđeno je da proces lipolize započinje još u visokom graviditetu i u tom periodu predstavlja fiziološki proces prilagođavanja organizma na nove uslove hormonalne regulacije metabolizma i pripreme za nastupajuću laktaciju. Ukoliko je u visokom graviditetu metabolizam krava uravnotežen, uporedo sa povećavanjem koncentracije NEFA, povećava se i koncentracija glukoze u krvi. To znači da se tada uspostavlja

pozitivna korelacija između glikemije i koncentracije NEFA i to predstavlja siguran pokazatelj energetskog statusa životinja. Vrednosti glikemije niže od 2,77 mmol/l u poslednjoj nedelji graviditeta ukazuju na veće opterećenje metabolizma, i to je siguran podatak koji nagoveštava mogućnost pojavljivanja metaboličkih poremećaja kada počne laktacija. Kod onih životinja kod kojih stanje hipoglikemije koincidira sa povišenom koncentracijom NEFA u krvi, intenzivira se proces ketogeneze i dolazi do kliničke manifestacije poremećaja u metabolizmu na početku laktacije. Postpartalno, koncentracija NEFA, ali i triglicerida raste. Sve dok postoji pozitivna korelacija između koncentracija NEFA i triglicerida u krvi, može da se smatra da se proces adaptacije odvija u željenom pravcu (*Guretzky i sar., 2006*). Kada koncentracija triglicerida u krvi počinje da se smanjuje, a koncentracija NEFA ostaje visoka ili pokazuje tendenciju porasta, znači da je metabolizam masnih kiselina veoma intenzivan i da je u jetri počeo proces zamašćenja. Takve životinje nisu sposobne da se prilagođavaju izmenjenim metaboličkim zahtevima. Sinteza triglicerida u jetri kao odbrambeni mehanizam, sa fizioloske tačke gledišta, sukobljava se sa nekontrolisanim procesom lipolize u masnom tkivu. Ovo je prema tome, kompromisno rešenje. Nakupljanje triglicerida u hepatocitima uzrokuje smanjenje njihovih ključnih funkcija ili njihov prestanak, ako se radi o intenzivnom zamašćenju jetre. Nakupljanje triglicerida u jetri i stalno visoka koncentracija NEFA u krvi ($>1,0$ mmol/l), praćena hipoglikemijom i hipoinsulinemijom, ukazuje da se organizam veoma sporo prilagođava ili je na pragu bolesnog stanja.

2.4.3 Značaj koncentracije BHBA u krvi

Tokom katabolizma masti nastaju NEFA, koje za dalju razgradnju zahtevaju znatne količine glikogena. Ukoliko njega nema, dolazi do preusmeravanja metaboličkog puta slobodnih masnih kiselina i nastajanja ketonskih tela (acetona, acetoacetata i β -hidroksi buterne kiseline) u količinama višim od fizioloških. Koncentracija BHBA u krvi krava od 0,6 mmol/l do 1 mmol/l je fiziološki prihvatljiva za krave na početku laktacije i ona ukazuje na umerenu mobilizaciju masti iz telesnih rezervi. Kod krava u poslednjem mesecu graviditeta, kada se rezerve masti održavaju ili čak povećavaju, koncentracija BHBA je niža od 0,6 mmol/l i smatra se fiziološkom (*Ospina i sar. 2010*)

Prisustvo BHBA u krvi u koncentracijama većim od fizioloških ukazuje na postojanje negativnog bilansa energije i pojačanu mobilizaciju masti iz depoa. Krave sa kliničkim znacima ketoze imaju koncentraciju BHBA višu od 2 mmol/l. Sva stanja organizma koja su praćena oštećenjem funkcije jetre praćena su i povećanom koncentracijom BHBA u krvi. Veoma retko, povećana koncentracija ove kiseline u krvi se zapaža pri ishrani nekvalitetnom silažom koja sadrži visok procenat buterne kiseline i koja se prilikom resorpcije kroz zid rumena transformiše u β -hidroksi buternu kiselinu. U takvim slučajevima hiperketonemija i ketonurija nisu praćene značajnim smanjenjem koncentracije glukoze u krvi (alimentarna ketoza). Smanjenje koncentracije ove kiseline ispod fizioloških vrednosti nema praktično nikakav klinički značaj.

2.4.4 Značaj koncentracije insulina u krvi

Insulin je anabolički hormon koji stimuliše deponovanje energetskih jedinjenja (masti i glikogen) i sintezu proteina. Koncentracija inuslina u krvi krava je u uskoj korelaciji sa ishranom životinja. Za vreme gladovanja njegova koncentracija opada, dok kod normalno hranjenih životinja koncentracija se povećava i to najranije jedan a najkasnije 4 do 6 sati posle hranjenja (*Sutton i sar., 1980*). Razlog ovog povećanja je uticaj nižih masnih kiselina (NMK) resorbovanih iz buraga na aktivnost B ćelija pankreasa. Značajno je naglasiti da kod preživara na aktivnost endokrinog pankreasa mnogo veći uticaj imaju NMK u odnosu na glukozu. Od NMK najizraženije dejstvo imaju butirat i propionat. Propionat se posebno ističe jer se u normalnim uslovima buterna kiselina većinom metaboliše u zidu buraga i tkivu jetre tako da je njena koncentracija u perifernoj krvi niska, pa samim tim i uticaj na sekreciju insulina neznan (*Sartin, 1988*).

Odmah nakon teljenja koncentracija insulina u krvi krava se značajno smanjuje. Ovo smanjenje je posledica smanjenog unosa hrane ali je mehanizam adaptacije na visku proizvodnju mleka (*Nikolić JA, 1996*). Naime, smanjena koncentracija insulina omogućava nesmetano odigravanje lipomobilizacije u perifernim tkivima čime se obezbeđuje dodatna energija za proizvodnju mleka (*Bossaert i sar., 2008*). Poznato je da je ulazak glukoze u ćelije mlečne žlezde tkiva nezavistan od insulina. To nije slučaj sa ulaskom glukoze u periferna tkiva (masno i mišićno). Period rane laktacije karakteriše i insulinska rezistencija (*Chagas i sar., 2009*) odnosno stanje pri kome je

osetljivost perifernih tkiva na insulin smanjena. Time se dodatno sprečava korišćenje glukoze u perifernim tkivima, čime ona postaje dostupne mlečnoj žlezdi kao izvor energije i prekursor u sintezi laktoze.

Pad koncentracije insulina posle teljenja predstavlja mehanizam adaptacije na NEB. Ako je smanjenje koncentracije insulina više nego što je to prihvatljivo doći će do intenziviranja pre svega procesa lipomobilizacije sa posledičnim nastankom masne jetre (*Bobe i sar., 2004*)

2.4.5 Značaj koncentracije tireoidnih hormona u krvi

Tireoidni hormoni (trijodtironin - T_3 i tetrajodtironin, odnosno tiroksin - T_4) imaju ključnu ulogu u regulaciji prometa energije. T_3 je četiri puta aktivniji od T_4 (*Kaneko, 1989*). Pod kontrolom tireoidnih hormona je enzim alfa-glicerofosfat-dehidrogenaza. Aktivnost ovog enzima je vrlo važna u situacijama kada su potrebne velike količine energije, odnosno kada je potrebno pokretanje lanca oksidativne fosforilacije u punom kapacitetu. Procesom oksidativne fosforilacije stvara se oko 90 % energijom bogatog ATPa od ukupno stvorenog ATPa u ćelijama čiji se metabolizam odigrava u prisustvu kiseonika.

Hormoni tireoidee stimulišu resorpciju glukoze iz creva i njeno razlaganje u ekstrahepatičnim tkivima. Osim toga, ubrzavaju tubularnu reapsorpciju glukoze, kao i njen ulazak i iskorišćavanje u ćelijama pojačavajući dejstvo insulina. Značajno je naglasiti da visoke doze tiroksina stimulišu glukoneogenezu iz aminokiselina (*Bergman, 1973*).

Na metabolizam lipida tireoidni hormoni mogu da deluju i katabolički i anabolički. *Grizard i sar. (1995)* ukazuju da trijodtironin i tiroksin zajedno sa glukokortikosteroidima i kateholaminima utiču na razlaganje lipida i proteina u telesnim depovima, što dovodi do porasta slobodnih masnih kiselina i amino kiselina u krvi. Osim toga, tireoidni hormoni, kao i insulin i IGF-I imaju značajnu anaboličku ulogu u metabolizmu masti i proteina. Postoje podaci koji ukazuju da tiroksin posle parenteralne aplikacije smanjuje količinu lipida u hepatocitima. Naime, stimulacijom oksidativnih procesa tireoidni hormoni deluju antilipogenetski u jetri goveda (*Kapp i sar., 1979*).

Kod krava, neposredno oko teljenja, opada koncentracija tireoidnih hormona u krvi (*Stojić i sar., 2001*) u cilju prilagođavanja jedinke na stanje NEBa. To znači da je nivo tiroksina značajno viši u periodu zasušenja u odnosu na period najveće proizvodnje mleka. Međutim, rezultati *Pezzi i sar (2003)* su ukazali da, iako je visokomlečna krava na početku laktacije u stanju fiziološke hipotireoze, mlečna žlezda je zapravo u stanju eutireoze. Naime, pojačana aktivnost dejodinaza u mlečnoj žlezdi na početku laktacije uslovljava preuzimanje veće količine tiroksina iz krvi i njegovo pretvaranje u biološki aktivnu formu koja je neophodna da obezbedi dovoljnu količinu energije za pojačan rad mlečne žlezde.

Prema nalazima *Nikolić JA (1996)*, koncentracija tireoidnih hormona posle teljenja iznosi manje od 1 nmol/l za trijodtironin, odnosno manje od 30 nmol/l za tiroksin. Ukoliko ovo smanjenje koncentracije počne pre no što je to fiziološki opravdano ili se smanji ispod vrednosti donje fiziološke granice, onda postaje faktor rizika za nastanak postpartalnim metaboličkih oboljenja (*Šamanc i sar., 2010*).

2.4.6 Značaj koncentracije IGF-I u krvi

Insulinu slični faktori rasta (IGF-I i IGF-II) su važni učesnici mnogih bioloških procesa, kao što su rast, laktacija, reprodukcija i imunski odgovor (*McGuire i sar., 1992*). Oni imaju značaj u stimulaciji rasta a uticaj na metabolizam im je sličan uticaju insulina. Anaboličko delovanje može biti od dva do sto puta slabije od insulinskog, zavisno od vrste tkiva. Devedest procenata IGF-i prisutnog u krvi se sintetiše u jetri, dok se preostalih 10 % sintetiše u različitim tkivima. Svega 1 % IGF-I u krvi je u slobodnoj formi, koja je biološki aktivna. IGF-I molekuli su u krvi uglavnom vezani za svoje IGF-vezujuće proteine (IGFBP). S obzirom da nemaju svoja spremišta u organima, a vezani su za ove proteine u krvi, krv predstavlja depo IGF-I molekula u organizmu (*Gluckman i sar., 1987*). Postoji 6 IGFBP označenih brojevima od 1 do 6. U normalnim fiziološkim uslovima najveći procenat IGF-I u krvi je vezan za IGFBP-3 koji ne može da prođe kroz membranu kapilara. Najzastupljeniji vezujući protein krvnog seruma je IGFBP-3.. On gradi trokomponentne komplekse sa IGF molekulima koji ne izlaze iz cirkulacije. Zbog toga, ovaj vezujući protein predstavlja relativno stabilan depo IGF peptida (*Barreca i sar. 1995*). Na taj način IGF-I koji se nalazi vezan za ovaj vezujući protein ne može da ostvari svoje delovanje jer je udaljen od receptora na ćelijama (*Hossner i sar., 1997*).

Naime, IGF molekuli imaju veći afinitet za IGFBP-3 nego za IGF receptore, tako da prisustvo vezujućeg proteina može inhibirati reakciju ligand-receptor (Clemmons, 1997).

Međutim, u uslovima NEB smanjuje se koncentracija IGFBP-3 a raste koncentracija IGFBP-1 i IGFBP-2. Koncentracija IGFBP-1 u krvi, u velikoj meri, zavisi od koncentracije insulina (Murphy, 1998). Kada je insulinemija niska (na primer prilikom gladovanja životinje) sinteza IGFBP-1 je povećana (Collet-Solberg i sar. 1996, Fottner i sar. 1999, Lewitt i sar. 1992). Sintetisani IGFBP-1 vezuje IGF molekul u cirkulaciji, produžava mu poluživot i istovremeno smanjuje koncentraciju slobodnog, fiziološki aktivnog IGF-I koji bi izazvao hipoglikemiju. Slična pojava je opisana kod fetusa koji ne dobija dovoljno glukoze putem placente. Tada dolazi do pada insulinemije uz povećanje koncentracije IGFBP-1 koji vezuje slobodan IGF-I i time smanjuje njegovu dostupnost tkivima (Jones i sar. 1995). Hiperinsulinemija izaziva smanjenu sintezu IGFBP-1 u hepatocitima i ubrzava transport ovog vezujućeg proteina iz krvi u međucelijski prostor (Bar i sar. 1990). Zbog toga, pad koncentracije IGFBP-1, izazvan povećanom koncentracijom insulina, nastupa izuzetno brzo. Današnja saznanja o dinamici promene koncentracije IGFBP-1 u krvi pod uticajem insulina idu u prilog pretpostavci da insulin pre svega utiče na distribuciju a ne na sintezu ovog vezujućeg proteina (Holly, 1991). Koncentracija IGFBP-2 u cirkulaciji je zavisna od koncentracije glukoze, lipida i aminokiselina u krvi. Za razliku od IGFBP-1 čija se koncentracija povećava prilikom kratkotrajnog gladovanja, povećanje koncentracije IGFBP-2 se odigrava u slučajevima hronične pothranjenosti jedinke (Clemmons, 1997). Stoga se ovaj vezujući protein smatra indikatorom metaboličkog stresa kod jedinki.

Koncentracija IGF-I u krvotoku zavisi od fiziološkog stanja, ishrane i endokrinog statusa jedinke. Hormon rasta ima glavni stimulativni uticaj na koncentraciju IGF-I u krvnoj plazmi (Scharma i sar., 1994). Međutim, rast koncentracije IGF-I pod uticajem hormona rasta odigrava se jedino ukoliko se jedinka nalazi u stanju pozitivnog bilansa energije (McGuire i sar., 1995). Insulin takođe dovodi do porasta vrednosti IGF-I u krvi i taj porast je nezavisan od hormona rasta (McGuire i sar., 1995). Ishrana takođe ima uticaja na koncentraciju IGF-I. Kod grla koja su dobijala manje količine hrane utvrđen je pad koncentracije IGF-I u krvi (Dawson i sar., 1998).

Grla sa pozitivnim bilansom energije imaju više koncentracije IGF-I, dok je u uslovima NEB njegova koncentracija smanjena. *Bishop (1994)* je utvrdio veće koncentracije IGF-I kod krava koje su tokom zasušenja imale ocenu telesnu kondiciju od 5. Kod njih je, kao posledica smanjenog lučenja IGF-I tokom negativnog bilansa energije posle teljenja, došlo je i do smanjene lutealne aktivnosti.

Na početku laktacije koncentracije IGF-I su najniže a kasnije postepeno rastu i najveće vrednosti dostižu u zasušenju (*Sharma i sar., 1994*). Početak laktacije praćen je velikim gubitkom IGF-I jer on aktivnim putem prelazi iz krvi u kolostrum pa je koncentracija u kolostrumu 20 puta viša nego u krvi (*Hadsell i sar., 1993*).

Interesantna je međuzavisnost insulina i IGF-I u stanju negativnog bilansa energije. Naime, u ovakvim uslovima se dekupluje veza između hormona rasta odnosno somatotropnog hormona (STH) i koncentracija IGF-I postaje primarno zavisna od koncentracije insulina u krvi. Naime, posle teljenja, jetra postaje neosetljiva na delovanje STH (*Vicini i sar., 1991*), što dovodi do izraženog smanjenja koncentracije IGF-I u cirkulaciji. Pad koncentracije IGF-I u cirkulaciji započinje dve nedelje pred partus, kada istovremeno dolazi do sniženja koncentracije insulina. U isto vreme koncentracija hormona rasta u krvi menja se suprotno insulinu i IGF-I (*Bell, 1995*). Pojava da hormon rasta u to vreme ne može stimulisati sintezu i sekreciju IGF-I u jetri naziva se "rezistencija na STH". Poznato je takođe da se broj receptora za STH u jetri nalazi u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom IGF-I u krvnoj plazmi i nivoom ishrane. Izgleda da je koncentracija ovih receptora jedan od važnih regulatornih mehanizama koji određuju aktivnost osovine STH-IGF-I (*Breier, 1999*). Međutim, rezultati istraživanja *Butler-a i sar. (2003)* su ukazali da je insulin glavni regulatorni faktor u sekreciji IGF-I iz jetre. Infuzija insulina u toku perioda negativnog energetskeg bilansa kod krava na početku laktacije dovodi do vrlo izraženog porasta koncentracije IGF-I u krvnoj plazmi, koji je praćen povećanjem broj receptora za STH i iRNK za IGF-I u jetri. Izgleda da insulin direktno utiče na ekspresiju gena za IGF-I u jetri. Istovremeno je smanjena sinteza IGFBP-2, dok je statistički značajno povišena koncentracija IGFBP-3, čime se produžava poluživot IGF-I u cirkulaciji (*Thissen i sar., 1994; Jones i sar., 1995*).

Ukoliko bi modifikovali model koji predlažu *Butler i sar., (2003)* na taj način da on odražava stanje adaptacije energetskeg metabolizma u postpartalnom periodu, onda

bi se kao ključni faktor mogla izdvojiti hipoinsulinemija, koja ima za posledicu smanjenje broja receptora za hormon rasta i ekspresiju gena za IGF-I u jetri. Posledica tog stanja je sniženje koncentracije IGF-I i porast STH u krvnoj plazmi, što u kombinaciji sa povećanim brojem receptora za hormon rasta u masnom tkivu dovodi do lipomobilizacije i većeg preusmeravanja energije prema mlečnoj žlezdi. Odnos insulinemije, STH i IGF-I u periodu negativnog bilansa može da bude dobar pokazatelj stepena prilagođavanja krava na uslove NEBa.

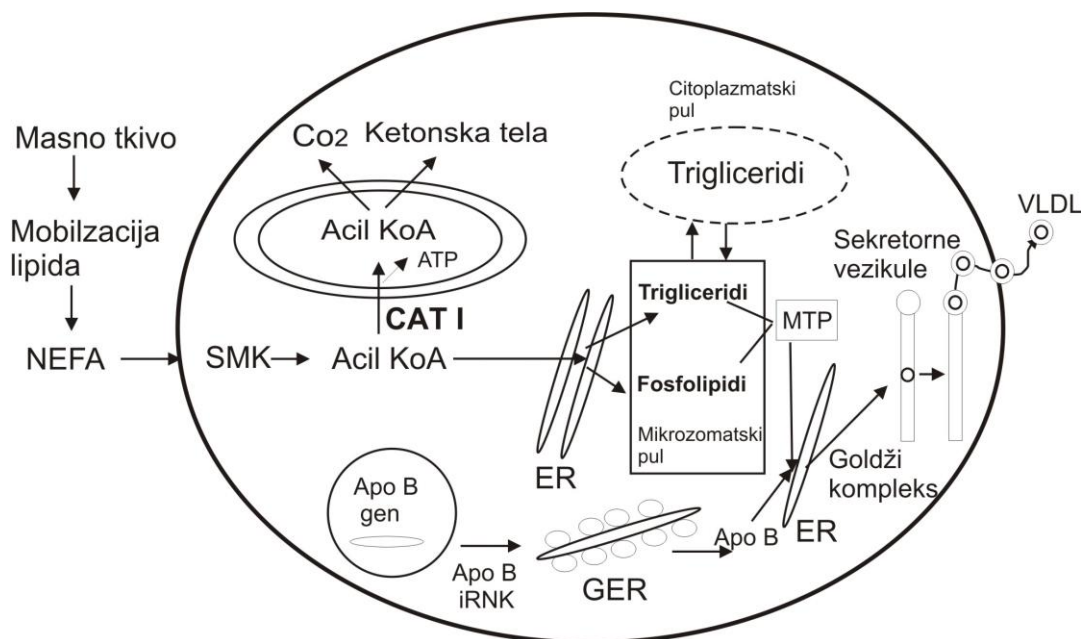
2.5. POSLEDICE NEGATIVNOG BILANSA ENERGIJE NA ZDRAVLJE, PROIZVODNJU I REPRODUKTIVNU AKTIVNOST KRAVA

Ukoliko je negativni bilans energije na početku laktacije više izražen od onoga što je fiziološki opravdano nastaju izrazite negativne posledice na proizvodnju, zdravlje i reproduktivnu aktivnost krava. Promene u metaboličkom i endokrinom statusu jedinke u peripartalnom periodu koje treba da budu mehanizam adaptacije na visoku proizvodnju mleka tada postaju faktor rizika za nastanak različitih poremećaja zdravlja.

2.5.1 Negativan bilans energije i metaboličke bolesti

Na osnovu dosadašnjih saznanja, gojaznost krava u periodu zasušenja je jedan od najvažnijih činilaca koji dovodi do pojave masne jetre. Naime, gojazne životinje imaju smanjen apetit posle teljenja, ulaze u stanje produbljenog NEB i nekontrolisane lipomobilizacije. Razlika koja se neminovno pojavljuje između količine unete i energije koja je potrebna organizmu za laktaciju, treba da se „pokrije“ adekvatnom količinom energetskih jedinjenja koja se mobilisu iz telesnih rezervi organizma. Od toga, u daljem toku u najvećoj meri zavisi sposobnost prilagođavanja organizma i vreme koje je potrebno da se uspostavi metabolička ravnoteža. Proces lipomobilizacije koji se aktivise pre teljenja, a intenzivira posle teljenja, samo do određene granice može da predstavlja fiziološki odgovor organizma na stanje negativnog bilansa energije, jer se u peripartalnom periodu uspostavlja pozitivna korelacija između količine deponovanih masti i intenziteta lipomobilizacije. Kod životinja sa prekomernim količinama energetskih rezervi, mobilisu se znatno veće količine masti iz depoa nego što su stvarne potrebe nametnute proizvodnjom mleka.

Mobilisane NEFA iz masnog tkiva koriste periferna tkiva kao izvor energije (izuzev nervnog tkiva i testisa) ili se ugrađuju u mlečnu mast, ali takođe dospevaju u jetru proporcionalno njihovoj koncentraciji u krvi. Dakle, ulazak masnih kiselina u hepatocite je direktno proporcionalan njihovoj koncentraciji u krvi. Kada NEFA dospeju u hepatocite, imaju trojaku sudbinu: (1) mogu biti potpuno oksidisane do ugljen dioksida, obezbeđujući energiju hepatocitima; (2) mogu biti delimično oksidisane do ketonskih tela ili acetata, koji odlaze u cirkulaciju i služe kao izvor energije ili polazna jedinjenja u anaboličkim procesima u drugim tkivima; (3) mogu biti ponovo esterifikovane, kada formiraju trigliceride ili fosfolipide. Stvoreni trigliceridi se zatim odstranjuju iz tkiva jetre inkorporacijom u lipoproteine vrlo male gustine (VLDL). Na shemi 1 dat je prikaz metabolizma masti u hepatocitima preživara.



Slika 2.3. Metabolizam masnih kiselina u hepatocitima preživara. NEFA-neesterifikovane masne kiseline; SMK-slobodne masne kiseline; CPT I-karnitinaciltransferaza; ER-endoplazmatski retikulum; GER-granulirani endoplazmatski retikulum.

Ukoliko je priliv masnih kiselina u hepatocite veliki, a to se dešava u uslovima produbljenog NEB, onda će, shodno ograničenom kapacitetu oksidacije masnih kiselina, metabolički put masnih kiselina biti usmeren ka sintezi triglicerida, koji se iz jetre ekskretuju uz pomoć lipoproteina vrlo male gustine (VLDL). Razumljivo je da svi

ćinioci koji dodatno ogranićavaju oksidaciju masnih kiselina kao i oni koji remete sintezu VLDL doprinose pojavi masne jetre, jer se na taj naćin uslovljava nakuljanje triglicerida u hepatocitima. Tako oksidacija masnih kiselina se odigrava u mitohondrijama i peroksizomima. Ulazak dugolanćanih masnih kiselina u mitohondrije je zavistan od energetskih zahteva ćelija i moguć je jedino posredstvom karnitina. Reakcija se odvija uz pomoć karnitin aciltransferaze I, koja se nalazi na spoljnoj strani unutrašnje strane membrane mitohondrija, a koja omogućava prenos acil grupa sa KoA na hidroksilnu grupu karnitina, gradeći acil karnitin. Nagrađeni acil karnitin ulazi u unutrašnjost mitohondrija, gde se acil grupa sa karnitina, prenosi na intramitohondrijalni KoA pod uticajem karnitin aciltransferaze II, koja se nalazi sa unutrašnje strane membrane mitohondrija. Oslobođen karnitin se opet vraća u citoplazmu. Ovaj proces je znaćajno poznavati jer nedostatak karnitina moće da smanji kapacitet oksidacije masnih kiselina u mitohondrijama i time doprinese njihovoj većoj reesterifikaciji u trigliceride. S druge strane, dodavanje karnitina u hranu krava povećava njegovu koncentraciju u hepatocitima i pozitivno utiće na oksidaciju masnih kiselina u mitohondrijama. Karnitin se moće sintetisati u organizmu iz lizina posle proteolize. Prva reakcija ovog procesa sinteze je metilovanje lizina uz pomoć S-adenozil metionina. Na osnovu ovoga se moće pretpostaviti da se sinteza karnitina moće modulirati i dodavanjem aminokiselina u hranu. Krave koje su pre teljenja bile ugojene imaju niću koncentraciju karnitina u hepatocitima i time smanjeni kapacitet hepatocita za oksidaciju masnih kiselina. Oko 49 % ukupne oksidacije masnih kiselina u hepatocitima preživara odigrava se u peroksizomima. Ovaj proces nije posredovan karnitinom i, za razliku od procesa u mitohondrijama, nije uslovljen energetskim zahtevima ćelije. On se moće modulirati nutritivnim statusom jedinke, odnosno dodavanjem masti u hranu preživara.

Ponovna esterifikacija masnih kiselina je proces koji se odigrava u hepatocitima i dovodi do deponovanja triglicerida u citoplazmi hepatocita. Poćetna reakcija esterifikacije je katalisana enzimom glicerol 3 fosfat dehidrogenazom, ćiji je koenzim NAD. Kako je hidroliza triglicerida kod preživara ogranićena zbog smanjene aktivnosti lipoprotein i hepaticne lipaze, stvoreni trigliceridi se kod njih, u najvećoj meri, uklanjaju iz hepatocita putem VLDL. Međutim, u odnosu na druge vrste životinja i sinteza VLDL kod preživara je smanjena, što sve doprinosi brćem nakupljanju triglicerida u

hepatocitima, pogotovo tokom prve tri nedelje nakon teljenja, kada je priliv masnih kiselina u jetru povećan.

Iz svega navedenog se zaključuje da prekomerno dopremanje NEFA u jetru može da dovede do prevelikog nakupljanja masti i njenog zamašćenja. Histološke promene u jetri nastaju u prvim danima laktacije i uočava se različit stepen razvoja patoloških promena. Kod blagog stepena masne infiltracije i degeneracije, promene se uočavaju u hepatocitima središnjeg dela režnjića. Veličina hepatocita nije promenjena, a u njihovoj citoplazmi se nalazi veliki broj sitnih kapljica masti. Kod teškog, difuznog oblika zamašćenja jetre, veličina hepatocita je značajno povećana, njihova citoplazma je ispunjena srednjim i velikim kapljicama masti, jedra su oštećena ili potpuno nedostaju. Usled narušenog funkcionalnog i morfološkog integriteta parenhima jetre smanjuje se proizvodnja mleka i nastaje veliki broj poremećaja u aktivnostima reproduktivnog sistema.

2.5.2 Negativan bilans energije i imunski status

Relativno novija oblast istraživanja vezana za problematiku metabolizma krava u peripartalnom periodu je oslabljen imunski odgovor organizma. Pretpostavlja se da negativan bilans energije na početku laktacije utiče imunosupresivno. *Klucinski i sar. (1988)* su ustanovili da je fagocitna sposobnost polimorfonuklearnih leukocita smanjena u uslovima negativnog bilansa energije, kao i da je baktericidna sposobnost ćelija imunskog sistema oslabljena u prisustvu ketonskih tela. Kod ljudi koji su pothranjeni, odnosno u stanju negativnog bilansa energije, leukociti proizvode manju količinu superoksidnog anjona u odnosu na leukocite ljudi koji su normalne telesne težine (*Fukatsu i sar., 1996*). Leukociti krava kultivisani u medijumu kome su dodata ketonska tela stvaraju respiratorni prasak slabijeg intenziteta. Smatra se da je razlog tome uticaj BHB na stvaranje superoksidnog anjona.

Odgovor limfocita krvi i mleka na delovanje mitogena je slabiji kod ketoznih u odnosu na zdrave krave (*Sato i sar., 1995*). *Wentik i sar. (1997)* su utvrdili da krave obolele od masne jetre (oboljenja koje se javlja kao posledica negativnog bilansa energije kod krava) reaguju na imunizaciju tetanusnim toksinom stvaranjem znatno manje količine IgG u odnosu na krave koje nisu imunizovane. Izgleda da negativni bilans energije utiče na proizvodnju opsonina (imunoglobulina G) potrebnih za

fagocitozu. Nakon intramamarne infekcije, bakterije indukuju migraciju leukocita krvi do mesta infekcije i tako utiču na razvoj zapaljenskog procesa. Limfociti ketoznih krava proizvode smanjenu količinu citokina, pre svega interferona, u odnosu na zdrave krave (*Filar i sar., 1992*). Nakon stimulacije lipopolisaharidnim antigenom (LPS), proizvodnja nekih citokina, kao IL-1 β i TNF- α se smanjuje u kulturi dobijenoj od pune krvi ljudi koji su bili u stanju NEBa (*Drenth i sar., 1995*). Limfociti iz krvi ketoznih krava imaju slabiji mitogeni odgovor u odnosu na limfocite zdravih jedinki (*Filar i sar., 1992*). Iz svega navedenog proizilazi zaključak da je stvaranje hemoatraktanata neophodnih za privlačenje leukocita u inficirano područje smanjeno kod krava u stanju negativnog bilansa energije, pogotovo ako je to stanje praćeno porastom koncentracije ketonskih tela u krvi.

Interesantno je napomenuti da su od svih parametara krvi koji se koriste kao pokazatelji negativnog bilansa energije (BHB, glukoza, inuslin i NEFA) samo ketonska tela u izrazitoj korelaciji sa izraženošću kliničkog mastitisa, obraćunatog na osnovu broja bakterija u uzorku mleka (*van Werven i sar., 1997*).

Utvrđeno je da je hemotaksa neutrofilnih granulocita značajno smanjena kod krava u stanju negativnog bilansa energije ili kliničke ketoze (*Kremer i sar., 1993*). Autori koji su došli do ovog zaključka su izveli studiju u kojoj su jasno pokazali međusobnu povezanost stanja negativnog bilansa energije i pojave mastitisa. Oni su ispitivali izraženost eksperimentalno izazvanog mastitisa krava sa *E. coli* (određen na osnovu rasta *E. coli* iz inokulisanih četvrti) u zavisnosti od stepena negativnog bilansa energije koji je izazvan uskraćivanjem hrane. Nakon restrikcije hrane, krave su, na osnovu koncentracije BHBA u krvi podeljene na ketoznu i neketoznu grupu. Dobijeni rezultati su pokazali da je izraženost ekperimentalnog mastitisa u pozitivnoj korelaciji sa stepenom negativnog bilansa energije. Do sličnih rezultata su došli i *VanWeven i sar. (1997)* koji su pokazali da je koncentracija BHBA u krvi u pozitivnoj korelaciji sa izraženošću mastitisa kod krava.

U ogleđima koje su izveli *Duffield i sar., (1998)* ispitivan je uticaj monezina na učestalost pojavljivanja supkliničke ketoze pri čemu su uzorci krvi uzimani 1, 2, 3, 6 i 9 nedelja posle teljenja. Dobijeni rezultati su ukazali da je 15,1 % krava sa supkliničkom ketozom obolelo od kliničke forme mastitisa u odnosu na 10,1 % neketoznih krava koje su obolele od mastitisa. Ova razlika je bila statistički značajna ($p \leq 0,05$). Matematička

analiza podataka je ukazala da krave sa koncentracijom BHBA iznad 1,4 mmol/l postpartalno, imaju značajno veću mogućnost da obole od kliničkog mastitisa u odnosu na krave koje imaju koncentraciju BHBA nižu od ove vrednosti. Autori su takođe utvrdili povezanost između pojave supkliničke ketoze i povišenog broja somatskih ćelija u mleku. Tako je od svih krava koje su imale koncentraciju BHBA u krvi višu od 1,4 mmol/l, 29,4 % imalo povišen nivo SCC, dok je svega 21,4% neketoznih krava imalo viši nivo somatskih ćelija. Ova razlika je bila statistički značajna ($p \leq 0,05$).

Danas se preporučuje da se u peripartalnom periodu imunski odgovor stimuliše peroralnim i parenteralnim davanjem vitamina A i E i oligoelementa selena. Najnovijim ispitivanjima je pokazano da parenteralna aplikacija vitamina E, selena i glukagona kravama tokom peripartalnog perioda može da utiče povoljno na njihovo zdravstveno stanje i proizvodnju mleka. Dokazano je da parenteralna aplikacija vitamina E i selena dovodi do smanjenja broja somatskih ćelija, povećane mlečnosti i smanjena učestalosti pojave mastitisa (*Jukola i sar., 1996*).

2.5.3. Negativan bilans energije i reproduktivna aktivnost

Uspostavljanjem laktacije, organizam visokomlečnih krava je opterećen do krajnjih fizioloških granica. Uspon laktacije, odnosno stanje NEBa, koincidira sa vremenom kada životinje treba ponovo da koncipiraju. Negativan bilans energije na početku laktacije, ukoliko je izraženiji nego što je fiziološki opravdano, je česti uzrok postpartalne anestrije visokomlečnih krava. Dugo vremena nije bio poznat mehanizam koji na molekularnom nivou povezuje negativan bilans energije, odnosno pothranjenost, i reprodukciju životinja. Utvrđeno je da promena koncentracije IGF-I u cirkulaciji, koje vrlo često nastaju kao posledica neadekvatne ishrane, mogu dovesti do poremećaja u funkciji reproduktivnih organa. Stoga se utvrđivanjem koncentracije ovog hormona u serumu može proceniti u kakvom energetsom bilansu se nalazi životinja, ali i predvideti kakve su njene reproduktivne mogućnosti. *Thissen i sar. (1994)* su utvrdili da se u svim slučajevima pothranjenosti, odnosno NEB, smanjuje koncentracija insulina i IGF-I, a povećava koncentracija hormona rasta u krvi. Kako je pad koncentracije IGF-I u cirkulaciji uvek u visokoj pozitivnoj korelaciji sa niskom koncentracijom LH, smatralo se da sekrecija ova dva hormona može biti fiziološki povezana (*Rutter i sar. 1989*). Negativan bilans energije može uzorkovati potpuni izostanak ovulacije, ili

dovesti do smanjenja broja preovulatornih folikula kod multiparnih životinja (kada je ishrana nešto slabija od optimalne).

Kako je ovulacija pod uticajem hormona hipotalamusa i hipofize, pretpostavilo se da koncentracija IGF-I u serumu, koja se menja pod uticajem ishrane, deluje pre svega na njihovu funkciju. Mnogo je manje izraženo direktno delovanje ovog molekula na folikul jajnika, iako ne treba isključiti permisivnu ulogu IGF molekula sintetisanog u jajniku koja je potrebna za pravilan odgovor folikula na prisustvo gonadotropina.

IGF-I se nalazi i u moždanom tkivu, a može biti sistemskog i lokalnog porekla (*Bondy i sar. 1992*). Veći deo IGF-I hipotalamusa potiče iz cirkulacije (*Aguado i sar. 1992*).

U hipotalamusu i hipofizi postoje receptori za IGF-I. Oni se, pored ostalog, nalaze u eminenciji medijani (mestu unutar hipotalamusa gde se oslobađaju gonadoliberini u portalni krvotok hipofize), što jasno navodi na zaključak da ovaj molekul može uticati na oslobađanje gonadorilizing hormona (GnRH) u krvotok.

IGF-I stimuliše sekreciju GnRH iz eminencije medijane, najverovatnije tako što menja osetljivost reproduktivnih centara hipotalamusa na estradiol (*Hiney i sar. 1991*). Dokazano je da IGF-I pojačava oslobađanje LH iz adenohipofize ili slabljenjem negativne sprege estradiola ili povećavanjem osetljivosti hipofize na GnRH (*Adam i sar. 2000*).

Dodatno, IGF-I povećava ekspresiju LH receptora na granuloza ćelijama folikula (*Monget i sar. 1995*). Stoga, smanjenje koncentracije IGF-I u cirkulaciji tokom NEB, pored slabljenja pulzacija LH, uslovljava i smanjenu osetljivost jajnika na stimulaciju sa LH (*Butler, 2000*). U ovom slučaju ne dolazi do proizvodnje dovoljne količine estradiola u jajniku koja je neophodna da bi došlo do ovulacije.

Smanjenje broja ovulacija je posledica poremećaja regulatornih mehanizama u prvoj fazi rasta folikula, a to je rast do prečnika od 200 μm kod pacova, 2 mm kod ovce, 5 mm kod krava i žena. Ova faza folikulogeneze je "gonadotropin-nezavisna", tako da su za njeno pravilno odvijanje posebno značajni intraovarijalni faktori i regulatorni mehanizmi. Kod multiparnih vrsta (ovce, svinje) ishrana značajno utiče na broj ovulacija, dok kod uniparnih vrsta (ljudi, konji) ona modulira trajanje polnog ciklusa, broj folikula u rastu odnosno broj ovulacija koji se odigrava posle tretmana koji

stimuliše ovulaciju. Kod ovaca je dokazano da kratkoročno poboljšanje ishrane pre i tokom parenja povećava broj ovaca koje nose blizance. *Cox i sar. (1987)* su pokazali da nazimice koje se hrane niskoenergetskim hranivima faze imaju manji broj ovulacija u odnosu na one hranjene visoko energetskim hranivima.

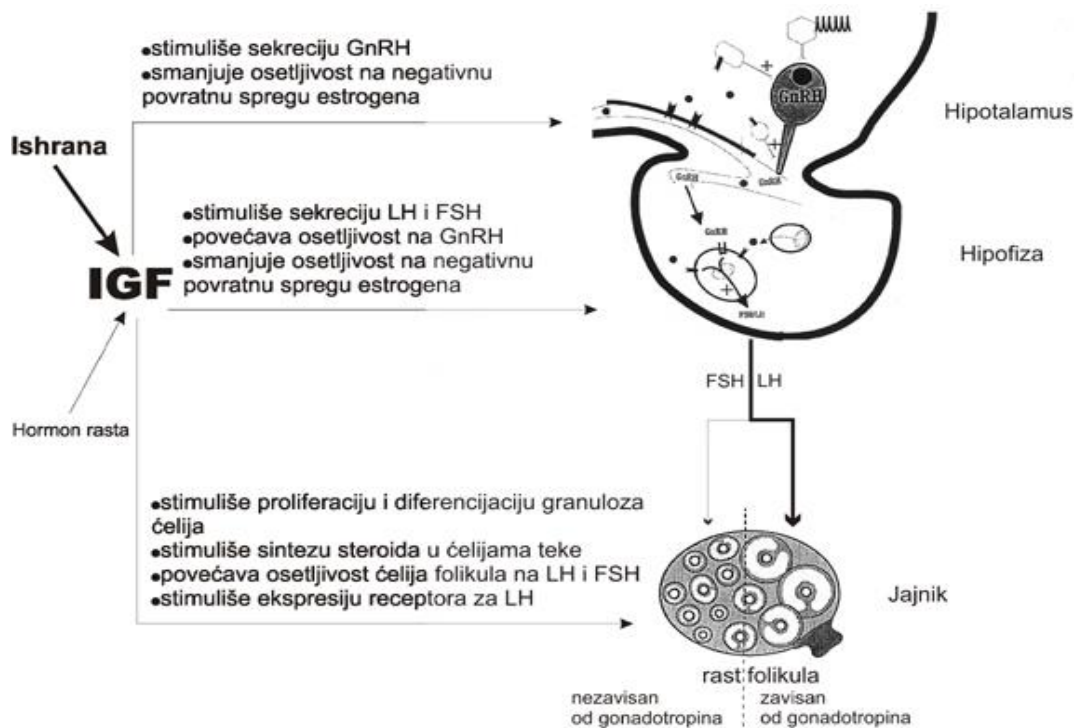
Za razliku od uticaja IGF sistema na pojavu signala za ovulaciju, koja se dešava uglavnom na nivou hipotalamusa i hipofize, uticaj IGF sistema na ranu folikulogenezu ostvaruje se uglavnom na nivou jajnika moduliranjem intraovarijalnih mehanizama regulacije. U folikulu jajnika nalaze se sve komponente IGF sistema. IGF-I stimuliše proliferaciju i diferencijaciju granulosa ćelija, kao i sintezu androgena u ćelijama teke (*Adashi i sar. 1992*). Kod ovaca, IGF-I stimuliše proliferaciju granulosa ćelija uglavnom u malim folikulima (1 do 3 mm dijametra).

Porast koncentracije IGF-I u cirkulaciji uvek dovodi do porasta njegove koncentracije u folikulu jajnika. To potvrđuje da IGF molekuli dokazani u folikulu imaju (pored lokalnog) i endokrino poreklo.

Forsirana ishrana povećava koncentraciju IGF-I u serumu, kao i broj malih folikula, iako nema promene u koncentraciji gonadotropina i estradiola u cirkulaciji. Zbog toga se pretpostavlja da do povećanja broja malih folikula (manjih od 5 mm) dolazi zbog toga što IGF-I seruma povećava njihovu osetljivost na delovanje gonadotropina (*Adam i sar. 2000*).

Kod ovaca i svinja koje se intenzivno hrane u periodu parenja ne postoji pozitivna korelacija između broja ovulacija i koncentracije gonadotropina u cirkulaciji. Nedostatak korelacije je mogući dokaz da je broj ovulacija kontrolisan samo gonadotropin-nezavisnim mehanizmima na nivou jajnika. Treba zapaziti da bi porast broja ovarijalnih folikula koji dovode do sekrecije viška estrogena i inhibina, a koji se osigurava pri navedenim tretmanima, morao da smanji sekreciju gonadotropina mehanizmom negativne povratne sprege. Kako se to ne dešava, može se zaključiti da, prilikom forsirane ishrane, upravo nedostatak pada sekrecije gonadotropina ukazuje na učešće gonadotropne osovine, verovatno kroz smanjenu osetljivost hipotalamusa i hipofize na inhibitorne efekte estradiola u ranoj fazi rasta folikula (*Adam i sar. 2000*).

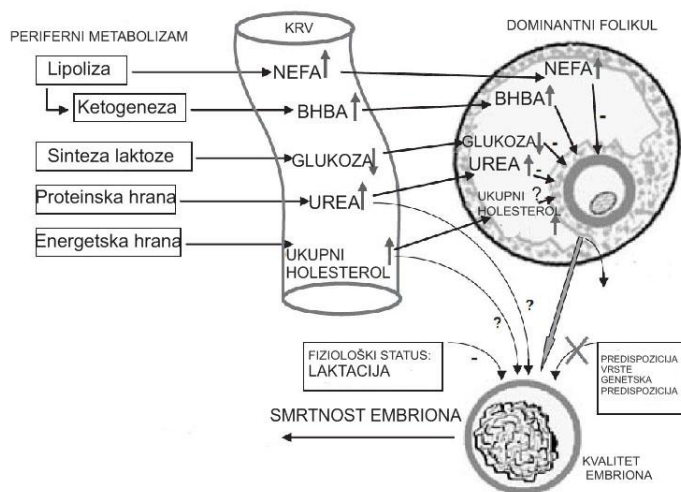
Uticaj IGF molekula na organe reproduktivne osovine prikazan je na slici 2.4.



Slika 2.4. Uticaj IGF-I na organe hipotalamo – hipofizno – ovarijalne osovine

Utvrđeno je da pored IGF-I i drugi molekuli čija se koncentracija značajno menja tokom negativnog bilansa energije mogu usloviti poremećaje u reprodukciji. To se pre svega odnosi na metaboličke promene koje prate NEB kod krava. Postoje jasne indikacije da povišena koncentracija NEFA u krvi deluje toksično na oocite i dovode do smanjene plodnosti visokomlečnih krava (*Jorristma i sar., 2004*). Iako je u početku utvđena veza između visoke koncentracije BHBA, koja prati NEB, i neplodnosti taj efekat nije potvrđen u *in vitro* studijama. Naime, nije utvrđen toksični efekat BHBA na oocite. Smatra se da je nepolodnost koja se javlja kod krava koje imaju visoku koncentraciju BHBA ustvari posledica negativnog efekta hipoglikemije na oocite, s obzirom da je hiperketonemija obično udružena sa hipoglikemijom (*Herdt, 2000*). Ovo je dokazano u *in vitro* ogledima (*Leroy i sar., 2006*). Negativan bilans energije je obično udružen i sa viskom koncentracijom uree zbog pojačanog metabolizma aminokiselina potrebnih za glukoneogenezu ili pri relativnom ili apsolutnom višku proteina u hrani. Urea, zatim, nesmetano iz cirkulacije prelazi u folikularnu tečnost. Porast koncentracije uree u folikularnoj tečnosti deluje toksično na razvoj oocita (*Iwata i sar., 2006*),

verovatno mehanizmom polimerizacije tubulina u mikrotubulima (De Wit i sar., 2001). Povišen nivo ukupnog holesterola u cirkulaciji takođe može oštetiti razvoj velikih folikula (Argov i sar., 2004). Na slici 2.5 prikazani su mogući mehanizmi kojima kvalitet embriona može biti oštećen tokom NEB kod visokomlečnih krava.



Slika 2.5. Mogući mehanizam kojim kvalitet embriona može biti narušen kod visokomlečnih krava (Leroy i sar., 2008)

2.6. POTREBE VISOKOMLEČNIH KRAVA U ENERGIJI

Tokom stanja NEBa obračun uzdržnih potreba krava obavlja se prema telesnoj masti, a proizvodne potrebe se obračunavaju prema količini proizvedenog mleka. Danas se koristi više sistema za obračun ukupnih potreba krava u ranoj laktaciji (NRC u SAD-u, VEM u Holandiji i UFL u Francuskoj).

U poslednjoj trećini graviditeta i sa početkom laktacije potrebe za energijom kod krava su veoma visoke. Tako je izračunato da su 250-og dana graviditeta energetske potrebe fetusa kod gravidnih krava Holštajn rase 2,3 Mcal/dan. Sa početkom laktacije potrebe za energijom rastu na 26 Mcal neto energije za dnevnu proizvodnju mleka od 30 litara (Bell, 1995). Odnos potreba u energiji, proteinima i količini suve materije obroka kod krava u periodu zasušnja i ranoj laktaciji prema preporukama National Research Council-a (2001) prikazani su u tabeli 2.1. Potrebe za energijom i proteinima kod zdravih krava 4 dana nakon partusa, međutim, prevazilaze mogućnost njihovog unosa u proseku za 25%. Dodatno, ukoliko se izvrši preračunavanje potrošnje unetih hranljivih

materija od strane mlečne žlezde, dolazi se do podataka da ona troši 97% od unete energije, i 83% metaboličkih proteina, tako da za zadovoljenje uzdržnih potreba jedinke preostaje veoma malo.

Tabela 2.1. Odnos potreba u energiji i unosa suve materije kod gravidnih krava¹ u zasušenju i krava u ranoj laktaciji (modifikovano prema NRC, 2001)

Parametar	Period zasušenja			Rana laktacija
	240	270	279	
Dan graviditeta/laktacije	240	270	279	11
Telesna masa sa plodom (kg)	730	751	757	680
Unos suve materije (kg)	14,4	13,7	10,1	13,5
Energija (NE _L) (Mcal/dan)	14	14,4	14,5	27,9
Proteini (g/dan)	871	901	810	1643

¹Odrasla krava telesne mase od 680 kg, BCS=3.3, masa teleta 45 kg

Prema podacima iz literature, ukupan promet energije kod krava koje nisu u laktaciji iznosi 41 do 52 MJ ME. Međutim, u toku laktacije ukupan promet energije se značajno menja, a utrošak energije kod krava sa najvećom proizvodnjom mleka dostiže i do 175 MJ ME. Od toga, najveći deo neophodne energije koristi se za potrebe mlečne žlezde, odnosno sintezu najvažnijih sastojaka mleka. Na primer, kod krava kod kojih je prosečna proizvodnja mleka na dan 29,4 litara sa 3,3 % mlečne masti, utroši se oko 77,9 MJ NEL, a kod onih sa većom proizvodnjom mleka i više od 100, pa i 150 MJ NEL.

Potrebe kojima se podmiruje proizvodnja mleka zavise od dnevne količine mleka i njegove energetske vrednosti (tabela 2.2)

Tabela 2.2. Dnevne potrebe u energiji za kravu od 600 kg u zavisnosti od proizvodnje mleka i % mlečne masti (Obračević, 1990)

Mleko kg/dan	Masnoća mleka (%)						
	3,50	3,75	4,00	4,25	4,50	4,75	5,00
0	34,6	34,6	34,6	34,6	34,6	34,6	34,6
10	63,2	64,2	65,6	66,6	68,0	69,0	70,1
20	92,5	94,2	97,3	99,8	102,2	104,6	107,0
30	122,9	126,7	130,1	133,9	137,7	141,5	-
40	154,0	159,1	164,3	169,5	-	-	-

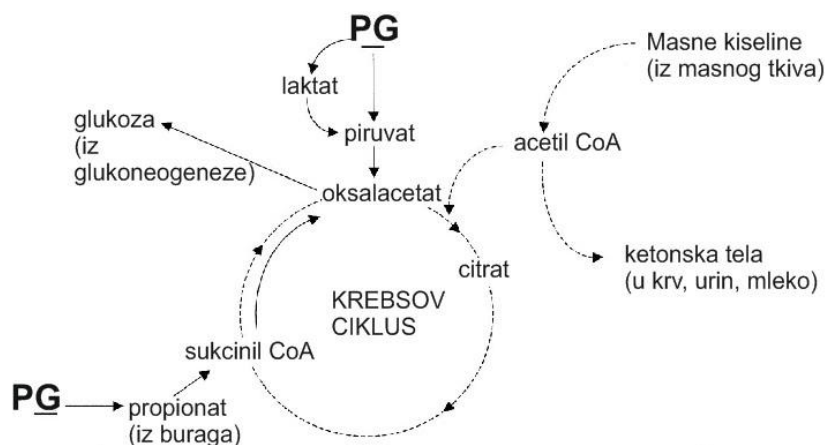
Potrebe u energiji visokomlečnih rasa krava sa dnevnom proizvodnjom od 50 pa čak do 100 l mleka još uvek nisu jasno definisane i predmet su brojnih istraživanja.

Pri ishrani mladih krava koje još nisu završile porast treba obezbediti i energiju za podmirenje tih potreba. Prema *Obarčeviću (1990)* ove potrebe iznose oko 4 MJ NEL/dan u prvoj laktaciji a 2 MJ NEL/dan u drugoj laktaciji

2.7. ENERGETSKI DODACI U ISHRANI KRAVA

Da bi se prevazišao nedostatak energije na početku laktacije često se u ishranu krava dodaju različiti energetske dodaci. Većina njih je zasnovana na prisustvu propilen glikola, propionata i glicerola.

Peroralno unet propilen glikol (PG) se potpuno resorbuje iz lumena buraga unutar tri sata od momenta davanja i to putem resorpcije, fermentacije ili, u manjem stepenu, direktnom pasażom u creva (*Clapperton i Czerkowski, 1972*). Glavni proizvod fermentacije PG u buragu su propanol i propionat. Na taj način PG smanjuje odnos propionata i acetata u buragu. On, prema nekim autorima, dovodi i do značajnog smanjenja koncentracije butirata (*Grummer i sar., 1994*) a u nekim studijama nije utvrđen uticaj PG na koncentraciju butirata (*Cozzi i sar., 1996*). Deo PG koji se resorbuje iz buraga se metaboliše u jetri do glukoze karboksilacijom piruvata u oksalacetat. Kako se deo PG pretvara u buragu u propionat to pretpostavlja drugi način kojim PG posredno preko propionata ulazi u proces glukoneogeneze. Metabolizam PG u jetri goveda prikazan je na slici 2.6.

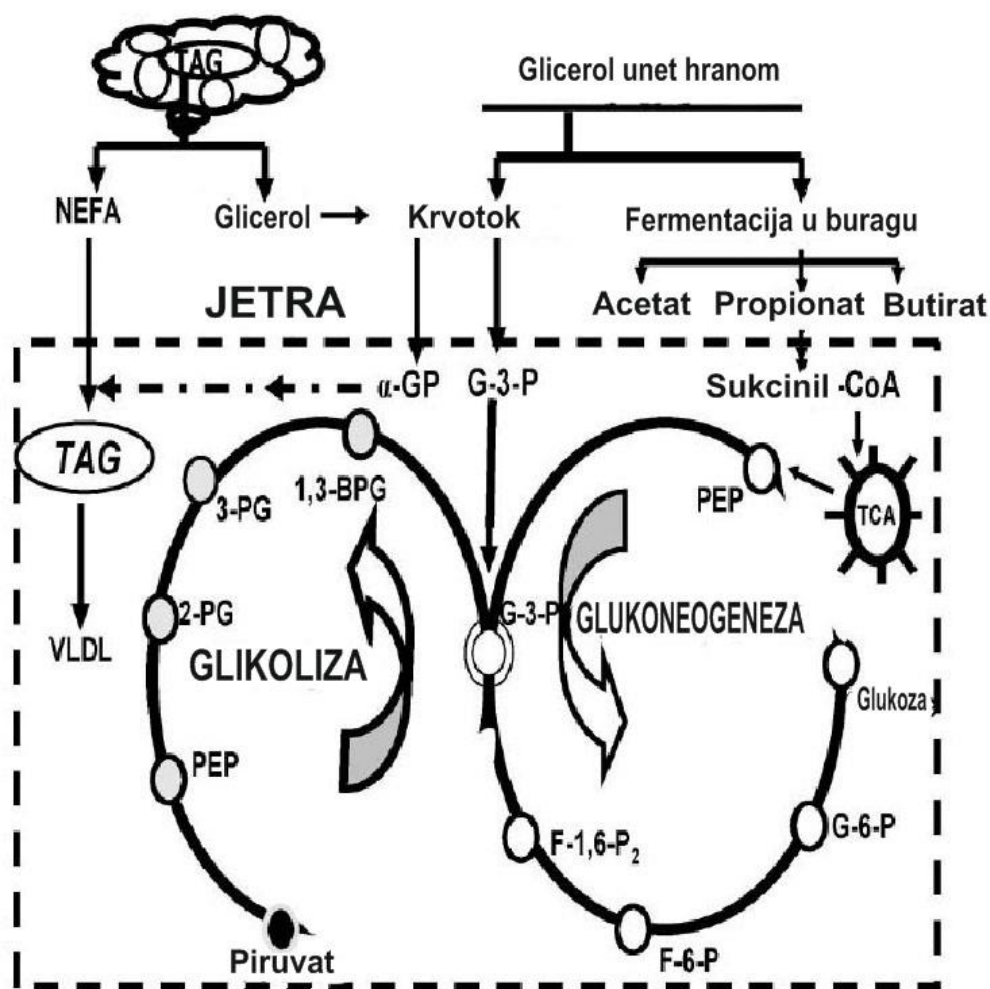


Slika 2.6. Metabolizam propilen glikola u jetri goveda.

Glicerol se poslednjih godina sve više preporučuje kao dodatak u ishrani visoko mlečnih krava. On je prekursor glukoneogeneze kod preživara i posebno je značajan u

uslovima pojačane lipomobilizacije, koja se odigrava naročito u periodu rane laktacije. *Bell (1995)* je utvrdio da četvrti dan postpartalno, u uslovima pojačane mobilizacije masnog tkiva, koja je bila 3,2 kg/dan, glicerol može maksimalno da obezbedi 15 do 20 % od ukupne količine glukoze koja je tada jedinki potrebna. Iz podataka u literaturi potpuno je jasno da doprinos glicerola procesu glukoneogeneze zavisi od količine masnog tkiva koja se mobiliše tokom peripartalnog perioda. Onda kada se nivo mobilizacije masti ograniči na vrednosti tipične za stanja koja nisu praćena izrazitim negativnim bilansom energije, učešće glicerola u procesu glukoneogeneze je svega 2 do 5 % od ukupnih potreba za glukozom. Prema tome, promene u ishrani koje uslovljavaju povećanu ili smanjenu mobilizaciju masnog tkiva mogu da utiču na stepen korišćenja glicerola u procesu glukoneogeneze tokom rane laktacije.

Glicerol dodat u hranu se transformiše u 1,3 – difosfoglicerat koji, kada se uključi u proces glikolize obezbeđuje izvesnu količinu piruvata i energije u obliku ATPa. Zbog povećanog stvaranja molekula ATP smanjuje se potreba za glukozom kao izvorom energije. Na taj način se glukoza čuva za potrebe mlečne žlezde u sintezi laktoze. *Osman i sar. (2008)* su utvrdili da dodavanje glicerola u hranu smanjuje koncentracija glukagona u krvi krava. Ako se glicerol daje u kombinaciji sa glukagonom (*Goff i Horst, 2001*) on se transformiše u fruktozo 1,6 bifosfat, koji obezbeđuje nove količine glukoze kroz proces glukoneogeneze. Sudbina glicerola u metaboličkim putevima visokomlečnih krava je prikazana na slici 2.7.



α -GP = α -glicerofosfat; G-3-P = gliceralhid-3-fosfat; F-1,6-P₂ = fructozo-1,6-bifosfat; F-6-P = fruktozo-6-fosfat; G-6-P = glukoza-6-fosfat; 1,3-BPG = 1,3-bifosfoglicerat; 3-PG = 3-fosfoglicerat; 2-PG = 2-fosfoglicerat; PEP = fosfoenolpiruvat; TAG = triacilglicerol; VLDL = lipoproteini vrlo niske gustine.

Slika 2.7. Sudbina glicerola u metaboličkim putevima kod visokomlečnih krava

3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Cilj ove doktorske disertacije je ispitivanje uticaja energetskeg bilansa krava na hormonalni i metabolički status krava tokom perioda kasnog graviditeta i rane laktacije.

Radi postizanja navedenog cilja postavljani su sledeći istraživački zadaci:

1. Ishrana krava obrocima sa različitim sadržajem energije u periodu od 15. dana pre teljenja do 60. dana posle teljenja.
2. Određivanje telesne kondicije krava 4 puta tokom ispitivanog perioda, odnosno 15. dana pre teljenja, kao i 7., 30. i 60. dana posle teljenja.
3. Utvrđivanje mlečnosti krava 7., 30. i 60. dana laktacije.
4. Utvrđivanje servis perioda i indeksa osemenjavanja kod ispitivanih krava
5. Određivanje stepena zamašćenja. jetre u uzocima uzetim od krava perkutanom biopsijom 7., 30 i 60. dana posle teljenja.
6. Određivanje koncentracije glukoze, beta-hidroksi buterne kiseline (BHBA), neesterifikovanih masnih kiselina (NEFA), ukupnog bilirubina, ukupnih proteina, albumina, uree, kalcijuma, fosfora, insulina, tiroksina, trijodtironina, insulinu-sličnog faktora rasta I i relativne zastupljenosti njegovih vezujućih proteina (IGFBP-2, IGFBP-3 i IGFBP-4) u uzorcima krvi uzetim 15. dana pre teljenja, kao i 7., 30. i 60. dana laktacije
7. Računsko određivanje HOMA indeksa i indeksa konverzije tiroksina u trijodtironin

4. MATERIJAL I METODE RADA

4.1. OGLEDNE ŽIVOTINJE

Ispitivanja su izvršena na 60 krava odabranih u fazi zasušenja, trideset do četrdeset dana pre očekivanog termina teljenja. Životinje su odabrane na osnovu ujednačenosti u telesnoj kondiciji, dužini servis perioda i proizvodnji mleka obračunatoj na osnovu proizvodnje ostvarene tokom 305 dana prethodne laktacije. Sve krave su podeljene u 2 grupe od po trideset krava. Obe grupe su do teljenja dobijale potpuno izmešan obrok dva puta dnevno, pri čemu su sastav i količina obroka bili usklađeni sa proizvodno reproduktivnom ciklusom krava (tabela 4.1).

Dodatno, krave ogledne grupe su u jutarnjem obroku dobijale energetski dodatak u količini od 250 ml u periodu zasušenja, odnosno u periodu od 15. dana pre teljenja do momenta teljenja, i 300 ml u periodu rane laktacije, odnosno tokom prvih 60 dana nakon teljenja, čime im je obezbeđeno dodatnih 9,30 MJ NEL tokom zasušenja, odnosno 13,95 MJ NEL tokom rane laktacije. Sastav energetskog dodatka je bio sledeći: glicerol (60 %), sirovi protein (3,4 %), sirova mast (0,8 %), sirovi pepeo (4,4 %), ugljeni hidrati, NfE, (14,7 %), voda (16,7 %), natrijum hlorid (0,1 %), uz dodatak betaina (30 g/kg), propionske kiseline (50 g/kg) i limunske kiseline (50 g/l) kao aditiva (*Energy Top, Biochem GMBH, Germany*). Kontrolna grupa krava nije primala energetski dodatak.

Tabela 4.1. Sastav i hranljiva vrednost obroka krava

Sastav obroka (kg/dan)		
	Zasušenje	Rana laktacija
Seno lucerka	3,50	3,00
Pšenična slama	-	2,60
Senaža lucerke	3,50	1,00
Silaža cele biljke kukuruza	17,50	10,00
Ekstrudirana punomasna soja	2,00	-
Melasa šećerne repe	0,30	-
Suvi repin rezanac	0,75	-
Prekrupa zrna kukuruza	3,79	1,45
Gnječeno zrno ječma	0,90	0,27
Suncokretova sačma	3,51	0,85
Pšenično stočno brašno	0,90	0,50
Dikalcijum fosfat	0,10	0,04
Stočna kreda	0,24	0,04
Stočna so	0,13	0,02
Vitaminsko mineralni premiks	0,10	0,03
Hranljiva vrednost obroka		
NEL (MJ/dan)	148,21	72,01
SM (kg/dan)	22,10	11,80
RDP (g/dan)	2743	1110
RUP (g/dan)	1025	388
NDF (% SM)	33,20	44,70
NDF iz kabaste hrane (%SM)	20,60	39,20
ADF (% SM)	22,00	29,90
Nestrukturani ugljeni hidrati (%SM)	39,30	35,00
Sirova mast (% SM)	4,70	2,60
MP (g/dan)	2142	940
Ca (g/dan)	66	41
P (g/dan)	25	32
K (g/dan)	88	161

4.2. ODREĐIVANJE TELESNE KONDICIJE KRAVA

Telesna kondicija krava je ocenjivana 15. dana pre očekivanog termina teljenja kao i 7., 30. i 60. dana nakon teljenja. Ocena telesne kondicije (OTK) je izvršena prema sistemu *Elanco Animal Health Buletin Al 8478*. Za ocenu telesne kondicije korišćene su metode palpacije i adspekcije pet najvažnijih anatomskih regija: slabinska regija, regija korena repa, regija sednih kvrga, regija sapi i regija kukova. Prema ovom sistemu, ocena telesne kondicije životinja izražava se numerčki od 1 do 5 poena. Pri tome, svaka promena u telesnoj kondiciji za jedan poen, podrazumeva promenu telesne mase od 55 do 75 kilograma. Na osnovu dobijenih podataka se zatim izračunavaju prosečne vrednosti kao i odstupanja u odnosu na fiziološke vrednosti za pojedine faze proizvodno reproduktivnog ciklusa. Fiziološke vrednosti OTK za krave u zasušenju su 3,25-4,00, za puerperalni period 3,25-3,75, dok su za period rane laktacije 2,50-3,25. Takođe je obračunata i razlika u OTK između perioda zasušenja i puerperijuma i ona se smatrala fiziološki prihvatljivom do vrednosti 0,7.

4.3. UTVRĐIVANJE MLEČNOSTI I REPRODUKTIVNIH POKAZATELJA KRAVA

Muža krava je sprovedena dvokratno, ujutro i uveče, na polustacionarnom sistemu opreme za mužu (*DeLaval*). Sedmog, tridesetog i šezdesetog dana teljenja zabeležena je dnevna proizvodnja mleka uveče, odnosno ujutro i registrovane vrednosti su zbirno zabeležene. Uvidom u evidenciju podataka zabeležena je i mlečnost krava u prethodnoj laktaciji. Od reproduktivnih pokazatelja utvrđivani su servis period i indeks osemenjavanja.

4.4. UZIMANJE UZORAKA OD ŽIVOTINJA

Od životinja uključenih u ogled uzimani su uzorci krvi, mleka i tkiva jetre.

4.4.1. UZIMANJE UZORAKA KRVI

Uzorci krvi za analizu uzimani su od krava punkcijom *vene jugularis* 15. dana pre očekivanog termina teljenja, kao i 7. 30 i 60. dana nakon teljenja. Nakon spontane

koagulacije, izdvojen je krvni serum centrifugiranejm na 3000 obrtaja u minuti u trajanju od 10 minuta. Uzorci su čuvani na -20°C do izvođenja analiza.

4.4.2. UZIMANJE UZORAKA JETRE

Uzorci tkiva jetre uzimani su 7. 30. и 60. dana laktacije od 10 reprezentativnih krava iz svake grupe biopsijom, koristeći Gaal-ovu modifikaciju metode po Hojovcova-Kacafirex-u (1967). Za biopsiju je korišćen biopser sačinjen od kanile (igle) dužine 20 cm, promera 4 mm, sa vrhom u obliku bodeža, koja je umetnuta u čelični mandren sa nazubljenom oštricom.

Pored instrumenta za biopsiju, za izvođenje perkutane biopsije jetre su potrebni brijlač, rastvor joda, 2 % rastvor prokaina, skalpel i brizgalica sa klipom .

Uzimanje uzoraka jetre vršeno je na stojećoj životinji u 11. međurebarnom prostoru, 20 do 30 cm od dorzalne linije spinalnih nastavaka torakalnih pršljanova, odnosno u liniji sedne kvrge -*tuber ishii*. Uzorci su uzeti 7., 30. i 60. dana laktacije.

Operaciono polje dimenzija 5 x 5 cm je obrijano i dezinfikovano 70 % alkoholnim rastvorom i rastvorom joda. Lokalna infiltrativna anestezija, data u cilju otklanjanja bola ali i smanjenja mogućnosti slučajne punkcije nekog drugog organa koja bi se desila zbog reakcije krave na bol, izvedena je aplikacijom 5 ml 2% rastvora prokaina. Incizija kože i potkožnog tkiva sve do mišića u dubini 1 do 1,5 cm paralelno sa rebarnim lukom, izvršena je vrhom skalpela sa ciljem da se olakša uvođenje biopsera. Zatim je biopsionim instrumentom probijen trbušni zid u smeru ka levom olekranonu (kranio-ventralno). Nakon što je vrh instrumenta zaboden u tkivo jetre 1 do 2 cm, igla je izvučena a na spoljni deo instrumenta (mandren) postavljena je brizgalica koja, povlačenjem klipa, stvara vakuum. Istovremeno sa povlačenjem klipa, instrument je potiskivan dublje u tkivo jetre uz rotaciju od 180 stepeni. Na taj način je isečeni komadić jetre uvučen u lumen instrumenta. Nakon izvlačenja instrumenta u kome je tkivo jetre, na ranu je aplikovan antibiotski prašak. Prosečna veličina biosijom izvađenog uzorka tkiva jetre je bila dužine 3 do 5 cm i promera 3 do 4 mm.

Uzorci tkiva dobijeni biopsijom jetre su odmah nakon uzorkovanja fiksirani u 10% puferizovanom rastvoru formalina, a zatim korišćeni za morfometrijsko određivanje zastupljenosti masti u hepatocitima.

4.5. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE ISPITIVANIH PARAMETARA

U uzorcima krvnog seruma, mleka i jetre određivani su pojedini izabrani parametri kao pokazatelji endokrinog i metaboličkog statusa krave.

4.5.1. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE ISPITIVANIH PARAMETARA U KRVNOM SERUMU KRAVA

U svim uzorcima krvnog seruma određivana je koncentracija glukoze, beta-hidroksi buterne kiseline (BHBA), neesterifikovanih masnih kiselina (NEFA), ukupnih proteina, albumina, uree, ukupnog bilirubina, kalcijuma, fosfora, insulina, trijodtironina, tiroksina, insulinu-sličnog faktora rasta I i njegovih vezujućih proteina (IGFBP-2, IGFBP-3 i IGFBP-4).

Koncentracija glukoze u krvi krava je određivana odmah posle uzimanja krvi punkcijom vene jugularis. Za određivanje koncentracije glukoze korišćene su komercijalne test trake (Precision – Xtra plus), a očitavanje intenziteta boje i kvantitativno određivanje koncentracije glukoze vršeno je na glukometru. Istovremeno su uzorci krvi čuvani u epruvetama sa Na-fluoridom kao antikoagulansom. Nakon centrifugiranja u krvnoj plazmi je određena koncentracija glukoze korišćenjem komercijalnih test paketa (Bio Merieux) na aparatu RAYTO-1904c.

Koncentracije BHBA, NEFA, ukupnog bilirubina, ukupnih proteina, albumina, uree, kalcijuma i fosfora su određivane korišćenjem komercijalnih test paketa (Bio Merieux) na aparatu RAYTO-1904c.

Koncentracija insulina, trijodtironina, tiroksiona i IGF-I određivana je RIA metodom uz upotrebu komercijalnih kitova proizvodnje INEP Zemun.

Detekcija IGF vezujućih proteina (IGFBP-2, IGFBP-3 i IGFBP-4) u krvnom serumu krava izvršena je ECL (enhanced chemiluminescence) metodom u osam reprezentativnih uzoraka iz svake grupe. Princip metode se sastoji u tome da se primarno antitelo vezuje za određeni IGFBP koji je elektrotransferom prenet sa gela na nitroceluloznu membranu. Pre dodavanja antitela blokiraju se preostala vezujuća mesta na membrani upotrebom rastvora bovinog serum albumin (BSA). Nakon završene inkubacije sa primarnim antitelom, dodaju se sekundarna antitela konjugovana sa enzimom HRP (horse raddish peroxidase) a zatim i supstrat. Supstrat se u kontaktu sa

HRP transformiše emitujući zračenje. Naime, transformisani supstrat luminol odaje zračenje koje registruje rentgen film. Između svakog od ovih koraka je vršeno intenzivno ispiranje nitrocelulozne membrane.

4.5.2. ODREĐIVANJE ZASTUPLJENOSTI UKUPNIH LIPIDA U TKIVU JETRE

Stepen zamašćenja jetre, odnosno koncentracija ukupnih lipida u hepatocitima procenjivan je histopatološki, morfometrijskim određivanjem stepena zamašćenja tkiva jetre uz primenu mrežastog sistema A-100 (*Weibel, 1979*). Naime, deo isečka tkiva dobijen biopsijom jetre fiksiran je u 10 % neutralnom puferisanom formalinu. Nakon toga tkivo je tretirano u automatskom tkivnom procesoru pri čemu je izvršena dehidracija i impregnacija tkiva u parafinu. Nakon kalupljenja u parafinu, tkivo je sečeno na mikrotomu na listiće debljine 5 µm. Parafinski isečci su bojani hematoksilin-eozinom. Količina masti u hepatocitima je određivana stereometrijski, izračunavanjem volumenske gustine prema formuli:

$$V_{vf} = \frac{P_f}{P_t} \times 100$$

gde je: V_{vf} – volumenska gustina faze; P_f – tačke koje padaju na fazu; P_t – tačke testnog sistema.

Za brojanje je korišćena mrežica M 100 (*Weibel, 1979*).

4. 6. INDEKSI DOBIJENI RAČUNSKIM PUTEM IZ VREDNOSTI POJEDINIH PARAMETARA KRVI

Od obračunatih indeksa iz parametara krvi koji mogu da posluže za bolje objašnjenje dobijenih rezultata prikazani su HOMA indeks i indeks konverzije tiroksina u trijodtirozin.

4.6.1 Homeostatski model za procenu insulinske rezistencije (HOMA indeks)

Za procenu insulinske rezistencije, odnosno stepena osetljivosti tkiva na insulin, korišćen je HOMA indeks (HOMA-IR). HOMA indeks je izračunat na osnovu vrednosti za koncentraciju glukoze i insulina u krvi, a uz pomoć formule:

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{Glukoza (mmol/l)} \times \text{Insulin (mIU/l)}}{22,5}$$

Ukoliko je vrednost HOMA-IR veća insulinska senzitivnost je smanjena, a ukoliko je dobijena vrednost manja, onda je senzitivnost tkiva na insulin veća.

4.6.2. Indeks konverzije tiroksina u trijodtironin (T3/T4)

Za procenu konverzije tiroksina u trijodtironin korišćen je indeks konverzije koji je dobijen uz pomoć formule:

$$\text{T3/T4} = \frac{\text{Trijodtironin (mmol/l)} \times 10}{\text{Tiroksin (mmol/l)}}$$

Ukoliko je vrednost T3/T4 veća znači da je stepen konverzije veći a ukoliko je manji to ukazuje na manju konverziju.

4.7 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Dobijeni podaci su obrađeni deskriptivnim statističkim parametrima od kojih su tabelarno prikazani aritmetička sredina (\bar{X}) i standardna devijacija (SD). Za analizu stepena značajnosti razlika ispitivanih parametara između pojedinih oglednih grupa korišćen je Studentov "t" test. Rezultati su obrađeni u statističkom programu STATISTICA 6 (StatSoft, USA).

5. REZULTATI

Radi bolje preglednosti, rezultati dobijeni u okviru ove disertacije podeljeni su u sledeća podpoglavlja: ocena telesne kondicije krava, mlečnost krava, stepen zamašćenja jetre, koncentracija biohemijskih parametara u krvi, koncentracija hormona u krvi krava indeksi dobijeni računskim putem iz vrednosti pojedinih parametara krvi.

5.1. OCENA TELESNE KONDICIJE KRAVA

U tabeli 5.1. prikazana je OTK telesne kondicije kod krava kontrolne i ogledne grupe i statistička značajnost razlike između i unutar grupa krava.

Tabela 5.1. Prosečne vrednosti OTK ($X \pm SD$) krava

	OTK		Fiziološke vrednosti
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	
Zasušenje	3,51 \pm 0,37	3,42 \pm 0,33	3,25 – 4,00
Puerperijum	2,76 \pm 0,38 ^{aaa}	2,98 \pm 0,22 ^{**aaa}	3,25 – 3,75
30. dan laktacije	3,07 \pm 0,30 ^{aaabbb}	2,96 \pm 0,19 ^{aaa}	2,50 – 3,25
60. dan laktacije	3,12 \pm 0,25 ^{aaabbb}	3,01 \pm 0,17 ^{aaa}	2,50 – 3,25

^{**}p<0,001 u odnosu na vrednosti određene kod kontrolne grupe krava; ^{aa}p<0,01 u odnosu na vrednosti određene u zasušenju (15. dana pre teljenja) kod iste grupe krava; ^{aaa}p<0,001 u odnosu na vrednosti određene u zasušenju (15. dana pre teljenja) kod iste grupe krava; ^{bbb}p<0,001 u odnosu na vrednosti određene u puerperijumu (7. dan laktacije) kod iste grupe krava;

Iz tabele 5.1. se zapaža da nije bilo značajne razlike u OTK između dve ispitivane grupe krava u zasušenju (15. dana pre teljenja), 30. i 60. dana laktacije. Jedino su krave ogledne grupe u puerperijumu, odnosno 7. dana laktacije, imale višu vrednost OTK u odnosu na krave kontrolne grupe ($p < 0,05$). Kod obe grupe krava je odmah nakon teljenja došlo do značajnog smanjenja telesne kondicije ($p < 0,001$, pojedinačno) koja je bila značajno niža u odnosu na period zasušenja i 30. ($p < 0,001$, pojedinačno). i 60. dan laktacije ($p < 0,001$, pojedinačno). Kod krava kontrolne grupe je u odnosu na puerperalni period OTK bila značajno viša 30. dana ($p < 0,001$) i 60. dana laktacije ($p < 0,001$).

U tabeli 5.2 prikazane su razlike u prosečnoj oceni telesne kondicije između zasušenja (15. dana pre teljanja) i puerperijuma (7. dana laktacije) kod obe grupe krava.

Tabela 5.2. Razlike u oceni telesne kondicije između zasušenja (15. dana pre teljanja) i puerperijuma (7. dan laktacije)

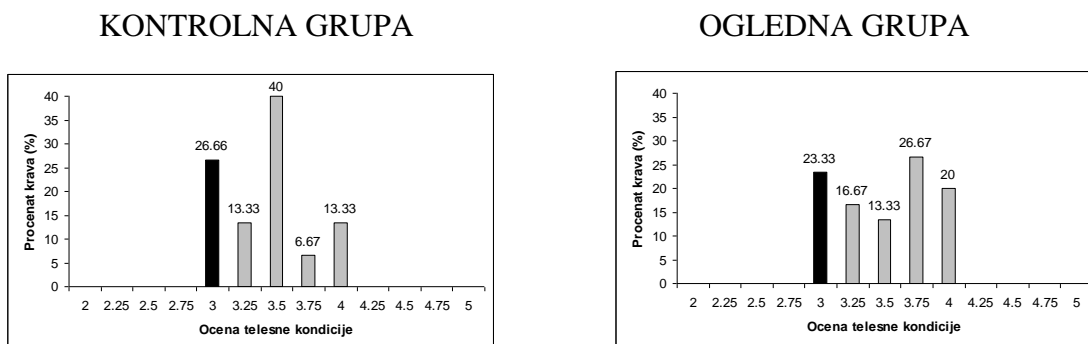
	Razlika u OTK		Fiziološka vrednost
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	
Zasušenje/Puerperijum	0,80 ± 0,51	0,43 ± 0,34***	< 0,7

***p<0,001 u odnosu na vrednost određene kod kontrolne grupe krava;

Iz rezultata prikazanih u tabeli 5.2 zapaža se da je razlika u OTK između perioda zasušenja i puerperijuma kod ogledne grupe krava bila u okviru fizioloških vrednosti, dok je kod kontrolne grupe ova razlika bila veća od fiziološki dozvoljenih vrednosti između zasušenja i puerperijuma.

Radi bolje preglednosti distribucija OTK unutar grupa, vrednosti su prikazane grafički na grafikonima 5.1 do 5.9. Na grafikonu 5.1. prikazana je distribucija pojedinačnih OTK unutar grupa u zasušenju, odnosno 15. dana pre očekivanog termina teljenja.

Grafikon 5.1. Procentualna zastupljenost krava različite telesne kondicije 15 dana pre očekivanog teljenja

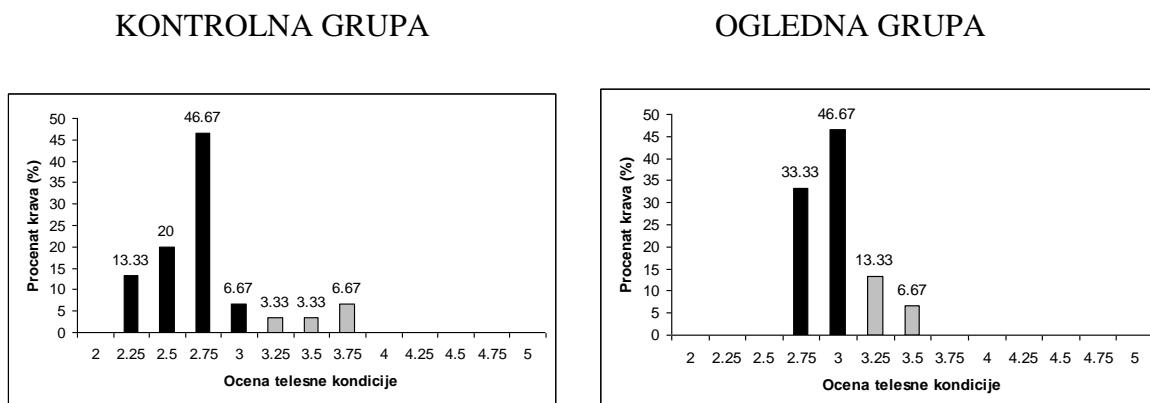


NAPOMENA: crni pravougaonici označavaju ocene telesne kondicije van opsega fizioloških vrednosti za ovaj period proizvodno reproduktivnog ciklusa

Na grafikonu 5.1 se zapaža da je kod obe grupe krava većina jedinki u periodu zasušenja imala optimalnu telesnu kondiciju. Kod kontrolne grupe je 26,33 % jedinki imalo telesnu kondiciju nižu od fiziološki dozvoljene dok je kod ogledne grupe ta vrednost iznosila 23,33%.

Na grafikonu 5.2. je prikazana distribucija pojedinačnih OTK unutar grupa u puerperijumu, 7. dana laktacije.

Grafikon 5.2. Procentualna zastupljenost krava različite telesne kondicije 7 dana posle teljenja

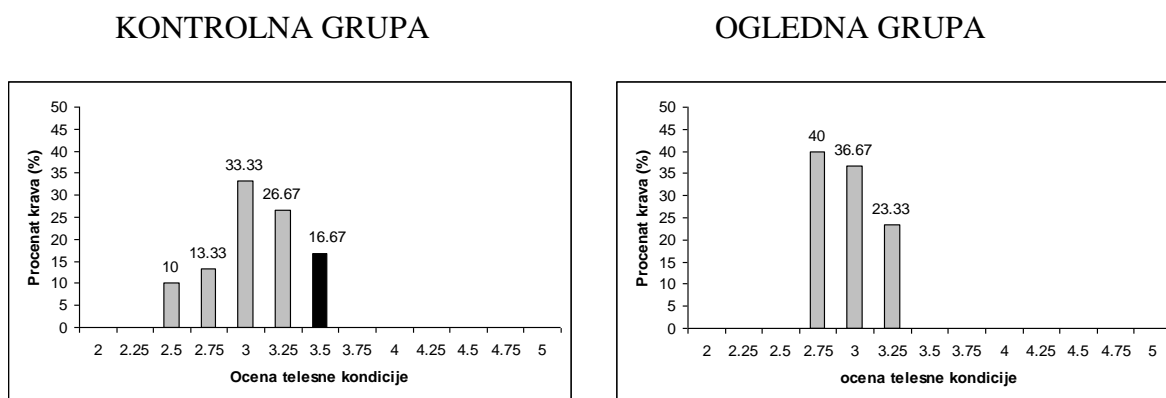


NAPOMENA: crni pravougaonici označavaju ocene telesne kondicije van opsega fizioloških vrednosti za ovaj period proizvodno reproduktivnog ciklusa

Na grafikonu 5.2. se zapaža da je 86,47 % krava kontrolne grupe imalo telesnu kondiciju ispod fiziološki dozvoljenog opsega vrednosti za period puerperijuma, dok je u oglednoj grupi ta vrednost 80 %. Dodatno, u oglednoj grupi krava nijedna jedinka nije imala OTK nižu od 2,75 dok je kod kontrolne grupe 30,33 % krava imalo vrednosti OTK 2,5 odnosno 2,25.

Na grafikonu 5.3. je prikazana distribucija pojedinačnih OTK unutar grupa 30. dana laktacije.

Grafikon 5.3. Procentualna zastupljenost krava različite telesne kondicije 30 dana posle teljenja

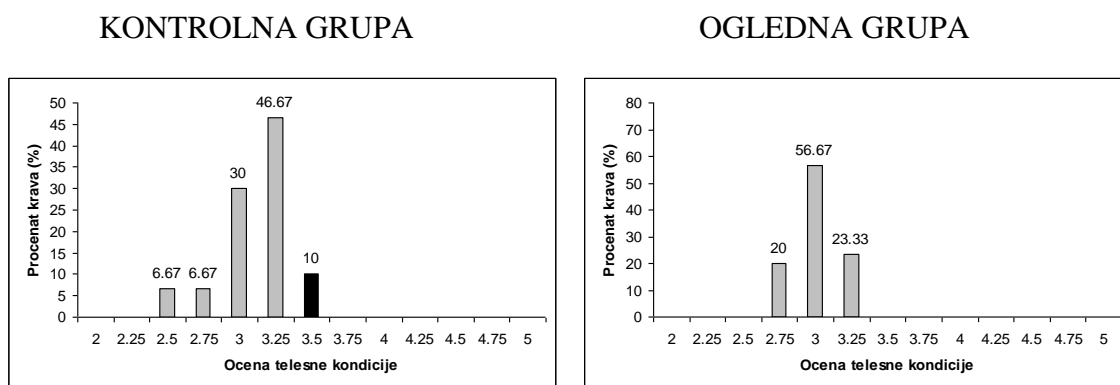


NAPOMENA: crni pravougaonici označavaju ocene telesne kondicije van opsega fizioloških vrednosti za ovaj period proizvodno reproduktivnog ciklusa

Na grafikonu 5.3. se zapaža da su sve krave ogledne grupe imale OTK unutar fiziološkog opsega vrednosti, dok je kod ogledne grupe 16,67 % krava imalo OTK veću od 3,25.

Na grafikonu 5.4. je prikazana distribucija pojedinačnih OTK unutar grupa 60. dana laktacije.

Grafikon 5.4. Procentualna zastupljenost krava različite telesne kondicije 60 dana posle teljenja



NAPOMENA: crni pravougaonici označavaju ocene telesne kondicije van opsega fizioloških vrednosti za ovaj period proizvodno reproduktivnog ciklusa

Na grafikonu 5.4. se zapaža da su sve krave ogledne grupe imale OTK unutar fiziološkog opsega vrednosti, dok je kod ogledne grupe 10 % krava imalo OTK veću od fiziološki prihvatljivih vrednosti za ovaj period.

5. 2. MLEČNOST KRAVA

U tabeli 5.3 su prikazani rezultati za proizvodnju mleka kod krava kontrolne i ogledne grupe tokom prethodne laktacije, kao i 7., 30. i 60. dana laktacije.

Tabela 5.3. Dnevna proizvodnja mleka ($X \pm SD$)

	Mlečnost (l)		
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	Značajnost razlike
Prethodna laktacija	30,00 ± 3,51	30,80 ± 5,73	NZ
7. dan laktacije	36,90 ± 5,34	37,53 ± 5,34	NZ
30. dan laktacije	39,40 ± 4,31 ^a	40,97 ± 6,30 ^{aa}	NZ
60. dan laktacije	38,16 ± 6,19	41,70 ± 3,84 ^{aaa}	p < 0,05

^{aa}p<0,01 u odnosu na vrednosti određene 7. dana laktacije kod iste grupe krava; ^{aaa}p<0,001 u odnosu na vrednosti određene 7. dana laktacije kod iste grupe krava;

Iz tabele se zapaža da između grupa nije bilo značajne razlike u mlečnosti u prethodnoj laktaciji. Takođe, nije bilo značajne razlike u mlečnosti 7. i 30. dana laktacije. Šezdesetog dana laktacije utvrđeno je da je ogledna grupa imala značajno veću prosečnu dnevnu proizvodnju mleka u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,05$). Takođe, kod ogledne grupe krava je mlečnost bila značajno veća 30. dana u odnosu na 7. dan laktacije ($p < 0,01$), kao i 60. dana u odnosu na 7. dan laktacije ($p < 0,001$), dok je kod kontrolne grupe mlečnost značajno povećana jedino kada se uporede vrednosti registrovane 7. i 60 dana laktacije ($p < 0,05$). Značajno je zapaziti da je najviša proizvodnja mleka postignuta kod kontrolne grupe 30. dana, a kod ogledne 60. dana laktacije.

5. 3. REPRODUKTIVNI POKAZATELJI

U tabeli 5.4 prikazani su rezultati osnovnih reproduktivnih pokazatelja kod krava ogledne i kontrolne grupe.

Tabela 5.4. Servis period i indeks osemenjavanja krava ($X \pm SD$)

	Reproduktivni parametri		
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	Značajnost razlike
Servis period	125,96 \pm 37,45	102,76 \pm 36,38*	$p < 0,05$
Indeks osemenjavanja	1,80 \pm 1,22	1,84 \pm 1,07	NZ

Servis period je kod kontrolne grupe krava bio statistički značajno duži ($p < 0,05$) nego kod ogledne grupe. Nije utvrđena statistički značajna razlika u vrednosti indeksa osemenjavanja između dve grupe krava.

5. 4. STEPEN ZAMAŠĆENJA JETRE

U tabeli 5.5. su prikazane prosečne vrednosti za stepen zamašćenja jetre, odnosno sadržaj ukupnih lipida u hepatocitima izabranih krava iz svake grupe.

Tabela 5.5. Sadržaj ukupnih lipida ($X \pm SD$) u hepatocitima

	Sadržaj ukupnih lipida u hepatocitima (%)		
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	Značajnost razlike
Puerperijum	25,20 \pm 10,82	18,89 \pm 9,11	NZ
30. dan laktacije	12,54 \pm 8,97 ^a	5,30 \pm 3,37 ^{aa}	p < 0,05
60. dan laktacije	0,00 \pm 0,00 ^{aaabb}	0,00 \pm 0,00 ^{aaabbb}	NZ

^{aa}p<0,01 u odnosu na vrednosti određene 7. dana laktacije kod iste grupe krava; ^{aaa}p<0,001 u odnosu na vrednosti određene 7. dana laktacije kod iste grupe krava; ^{bb}p<0,01 u odnosu na vrednosti određene određene 30. dana laktacije kod iste grupe krava; ^{bbb}p<0,001 u odnosu na vrednosti određene u 30. dana laktacije kod iste grupe krava;

U tabeli 5.6. prikazana je procentualna zastupljenost krava sa niskim (sadržaj lipida u hepatocitima < 20 %), srednjim (sadržaj lipida u hepatocitima 20-40 %) i visokim stepenom zamašćenja jetre (sadržaj lipida u hepatocitima > 40 %).

Tabela 5.6. Procentualna zastupljenost krava sa različitim stepenom zamašćenja jetre unutar grupa

Stepen zamašćenja jetre	Procenat krava (%)					
	Kontrolna grupa			Ogledna grupa		
	7. dan	30. dan	60. dan	7. dan	30. dan	60. dan
Nizak (< 20 % lipida)	30	80	100	70	100	100
Srednji (20-40% lipida)	60	20	0	30	0	0
Visok (> 40 % lipida)	10	0	0	0	0	0

Iz tabele 5.6. se zapaža da je 7. dana laktacije kod kontrolne grupe u tom periodu 60 % krava imalo srednji a 10 % krava visok stepen zamašćenja jetre, dok je kod ogledne grupa svega 30 % krava imalo srednji a nijedna krava nije imala visok stepen zamašćenja jetre. Tridesetog dana laktacije 100 % krava ogledne grupe je imalo nizak stepen zamašćenja jetre dok je kod kontrolne grupe još uvek 20 % krava imalo srednji stepen zamašćenja jetre. Šezdesetog dana laktacije nije bilo zamašćenja jetre niti kod jedne krave iz obe grupe.

5. 5. KONCENTRACIJA BIOHEMIJSKIH PARAMETARA U KRVI KRAVA

Od biohemijskih parametara u krvi su određivani koncentracija glukoze, betahidroksi buterne kiseline (BHBA), neesterifikovanih masnih kiselina (NEFA), ukupnog bilirubina, ukupnih proteina, albumina, uree, kalcijuma i fosfora u krvi krava. Rezultati su prikazani u odvojenim podpoglavljima za svaki parametar pojedinačno.

5.5.1. Koncentracija glukoze

U tabeli 5.7 prikazani su rezultati koncentracije glukoze u krvi krava.

Tabela 5.7. Koncentracija glukoze ($X \pm SD$) u krvi krava

	Koncentracija glukoze (mmol/l)		
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	Značajnost razlike
Zasušenje	$2,89 \pm 0,37$	$2,86 \pm 0,45$	NZ
Puerperijum	$2,58 \pm 0,62^a$	$2,70 \pm 0,44$	NZ
30. dan laktacije	$2,80 \pm 0,22^b$	$3,05 \pm 0,34^{bb}$	$p < 0,01$
60. dan laktacije	$2,70 \pm 0,33^a$	$3,43 \pm 0,39^{aaabbbccc}$	$p < 0,001$

^a $p < 0,05$ u odnosu na vrednosti određene u zasušanju kod iste grupe krava; ^{aaa} $p < 0,001$ u odnosu na vrednosti određene u zasušanju kod iste grupe krava; ^b $p < 0,05$ u odnosu na vrednosti određene u puerperijumu kod iste grupe krava; ^{bb} $p < 0,01$ u odnosu na vrednosti određene u puerperijumu kod iste grupe krava; ^{bbb} $p < 0,001$ u odnosu na vrednosti određene u puerperijumu kod iste grupe krava; ^{ccc} $p < 0,001$ u odnosu na vrednosti određene u 30. dana laktacije kod iste grupe krava;

Iz tabele 5.7. se zapaža da je koncentracija glukoze kod krava obe grupe 15. dana pre teljenja bila izjednačena. Nakon teljenja došlo je do statistički značajnog pada koncentracije glukoze ($p < 0,05$) kod kontrolne grupe. Iako je i kod ogledne grupe koncentracija glukoze posle teljenja smanjena, ovaj pad nije bio statistički značajan. I pored toga, nije bilo statistički značajne razlike u glikemiji između dve grupe krava. Koncentracija glukoze je bila kod ogledne grupe, u odnosu na kontrolnu grupu, značajno viša 30. dana ($p < 0,01$) i 60. dana laktacije ($p < 0,001$).

5.5.2. Koncentracija betahidroksibuterne kiseline (BHBA)

U tabeli 5.8 prikazani su rezultati za koncentraciju BHBA u krvi krava.

Tabela 5.8. Koncentracija BHBA ($X \pm SD$) u krvi krava

	Koncentracija BHBA (mmol/l)		
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	Značajnost razlike
Zasušenje	$0,37 \pm 0,20$	$0,34 \pm 0,12$	NZ
Puerperijum	$0,82 \pm 0,38^{aaa}$	$0,59 \pm 0,36^{aa}$	$p < 0,05$
30. dan laktacije	$0,62 \pm 0,16^{aaab}$	$0,50 \pm 0,17^{aaa}$	$p < 0,01$
60. dan laktacije	$0,51 \pm 0,12^{aabbbcc}$	$0,34 \pm 0,12^{bbbcc}$	$p < 0,001$

^{aa} $p < 0,01$ u odnosu na vrednosti određene u zasušanju kod iste grupe krava; ^{aaa} $p < 0,001$ u odnosu na vrednosti određene u zasušanju kod iste grupe krava; ^b $p < 0,05$ u odnosu na vrednosti određene u puerperijumu kod iste grupe krava; ^{bbb} $p < 0,001$ u odnosu na vrednosti određene u puerperijumu kod iste grupe krava; ^{cc} $p < 0,01$ u odnosu na vrednosti određene u 30. dana laktacije kod iste grupe krava;

Iz tabele 5.8 se zapaža da u zasušanju nije bilo značajne razlike u koncentraciji BHBA između dve grupe krava. Kod obe grupe je nakon teljenja došlo do značajnog porasta koncentracije BHBA ali je tokom puerperijuma koncentracija bila značajno manja kod ogledne nego kod kontrolne grupe ($p < 0,05$). U ostala dva ispitivana perioda, 30. i 60. dana laktacije, koncentracija BHBA je bila značajno niža kod ogledne u odnosu na kontrolnu grupu krava ($p < 0,001$ i $p < 0,01$, pojedinačno).

5.5.3. Koncentracija neesterifikovanih masnih kiselina (NEFA)

U tabeli 5.9 su prikazani rezultati za koncentraciju NEFA u krvi krava.

Tabela 5.9. Koncentracija NEFA ($X \pm SD$) u krvi krava

	Koncentracija NEFA (mmol/l)		
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	Značajnost razlike
Zasušenje	$0,21 \pm 0,17$	$0,15 \pm 0,11$	NZ
Puerperijum	$0,72 \pm 0,38^{aaa}$	$0,40 \pm 0,35^{aa}$	$p < 0,01$
30. dan laktacije	$0,52 \pm 0,16^{aaab}$	$0,40 \pm 0,17^{aaa}$	$p < 0,01$
60. dan laktacije	$0,41 \pm 0,12^{aabbbcc}$	$0,25 \pm 0,11^{aabcc}$	$p < 0,001$

^{aa} $p < 0,01$ u odnosu na vrednosti određene u zasušanju kod iste grupe krava; ^{aaa} $p < 0,001$ u odnosu na vrednosti određene u zasušanju kod iste grupe krava; ^b $p < 0,05$ u odnosu na vrednosti određene u puerperijumu kod iste grupe krava; ^{bbb} $p < 0,001$ u odnosu na vrednosti određene u puerperijumu kod iste grupe krava; ^{ccc} $p < 0,01$ u odnosu na vrednosti određene u 30. dana laktacije kod iste grupe krava;

Iz tabele 5.9 se zapaža da u zasušanju nije bilo značajne razlike u koncentraciji NEFA između dve grupe krava. Kod obe grupe je nakon teljenja došlo do značajnog porasta koncentracije NEFA ali je tokom puerperijuma koncentracija bila značajno manja kod ogledne nego kod kontrolne grupe ($p < 0,01$). U ostala dva ispitivana

perioda, 30. i 60. dana laktacije, koncentracija NEFA je bila značajno niža kod ogleadne u odnosu na kontrolnu grupu krava ($p < 0,01$ i $p < 0,001$, pojedinačno).

5.5.4. Koncentracija ukupnog bilirubina

U tabeli 5.10. su prikazani rezultati za koncentraciju ukupnog bilirubina u krvi krava.

Tabela 5.10. Koncentracija ukupnog bilirubina ($X \pm SD$) u krvi krava

	Koncentracija ukupnog bilirubina ($\mu\text{mol/l}$)		
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	Značajnost razlike
Zasušenje	$5,96 \pm 1,38$	$5,76 \pm 1,69$	NZ
Puerperijum	$8,78 \pm 1,62^{aaa}$	$7,70 \pm 1,62^{aaa}$	$p < 0,05$
30. dan laktacije	$8,85 \pm 2,34^{aaa}$	$7,77 \pm 2,45^{aaa}$	NZ
60. dan laktacije	$8,64 \pm 1,93^{aaa}$	$8,45 \pm 1,34^{aaa}$	NZ

^{aaa} $p < 0,001$ u odnosu na vrednosti određene u zasušanju kod iste grupe krava

Koncentracija ukupnog bilirubina se nije značajno razlikovala između grupa na početku ogleada. Ona je kod obe grupe značajno porasla odmah nakon teljenja, a zatim se održavala na približno istom nivou do 60. dana laktacije kod obe ispitivane grupe. Između dve grupe utvrđena je značajna razlika u koncentraciji ukupnog bilirubina 7. dana laktacije kada je kod ogleadne grupe bila značajno manja ($p < 0,05$).

5.5.5. Koncentracija ukupnih proteina (UP)

U tabeli 5.11 su prikazani rezultati za koncentraciju ukupnih proteina u krvi krava.

Tabela 5.11. Koncentracija ukupnih proteina ($X \pm SD$) u krvi krava

	Koncentracija ukupnih proteina (g/l)		
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	Značajnost razlike
Zasušenje	$67,41 \pm 9,05$	$69,66 \pm 8,79$	NZ
Puerperijum	$73,07 \pm 4,77^{aa}$	$79,64 \pm 8,22^{aaa}$	$p < 0,001$
30. dan laktacije	$79,66 \pm 10,99^{aaabb}$	$85,72 \pm 8,99^{aaab}$	$p < 0,05$
60. dan laktacije	$78,02 \pm 4,52^{aaabbb}$	$87,99 \pm 4,30^{aaabbb}$	$p < 0,001$

^{aa} $p < 0,01$ u odnosu na vrednosti određene u zasušanju kod iste grupe krava; ^{aaa} $p < 0,001$ u odnosu na vrednosti određene u zasušanju kod iste grupe krava; ^b $p < 0,05$ u odnosu na vrednosti određene u puerperijumu kod iste grupe krava; ^{bb} $p < 0,01$ u odnosu na vrednosti određene u puerperijumu kod iste grupe krava; ^{bbb} $p < 0,001$ u odnosu na vrednosti određene u 30. dana laktacije kod iste grupe krava;

Koncentracija ukupnih proteina se nije značajno razlikovala između grupa na početku oglada ali je posle teljenja u sva tri ispitivana perioda koncentracija proteina bila značajno veća kod ogledne u odnosu na kontrolnu grupu krava ($p < 0,001$ u periodu puerperijuma; $p < 0,05$ 30. dana i $p < 0,001$ 60. dana laktacije). Koncentracija ukupnih proteina je kod obe grupe značajno porasla odmah nakon teljenja ($p < 0,01$ za kontrolnu i $p < 0,001$ za oglednu grupu krava), a zatim je unutar grupa i dalje značajno rasla između svih ispitivanih perioda postpartalno.

5.5.6. Koncentracija albumina

U tabeli 5.12. su prikazani rezultati za koncentraciju albumina u krvi krava.

Tabela 5.12. Koncentracija albumina ($X \pm SD$) u krvi krava

	Koncentracija albumina (g/l)		
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	Značajnost razlike
Zasušenje	28,22 ± 6,06	30,26 ± 4,94	NZ
Puerperijum	30,86 ± 5,25 ^a	37,35 ± 5,04 ^{aaa}	$p < 0,001$
30. dan laktacije	33,72 ± 7,47 ^{aa}	38,81 ± 7,13 ^{aaa}	$p < 0,01$
60. dan laktacije	36,16 ± 4,56 ^{aaaabb}	39,29 ± 4,39 ^{aaa}	$p < 0,01$

^a $p < 0,05$ u odnosu na vrednosti određene u zasušanju kod iste grupe krava; ^{aa} $p < 0,01$ u odnosu na vrednosti određene u zasušanju kod iste grupe krava; ^{aaa} $p < 0,001$ u odnosu na vrednosti određene u zasušanju kod iste grupe krava; ^{bbb} $p < 0,001$ u odnosu na vrednosti određene u 30. dana laktacije kod iste grupe krava;

Koncentracija albumina se nije značajno razlikovala između grupa na početku oglada ali je posle teljenja u sva tri ispitivana perioda bila značajno veća kod ogledne u odnosu na kontrolnu grupu krava ($p < 0,001$ u periodu puerperijuma; $p < 0,01$ 30. dana i $p < 0,01$ 60. dana laktacije). Koncentracija albumina je kod obe grupe značajno porasla odmah nakon teljenja ($p < 0,05$ za kontrolnu i $p < 0,001$ za oglednu grupu), a zatim je samo kod kontrolne grupe značajno povećana od 7. do 60. dana laktacije ($p < 0,001$). Kod ogledne grupe koncentracija albumina se nije značajno menjala poređenjem tri ispitivana perioda posle teljenja.

5.5.7. Koncentracija uree

U tabeli 5.13. su prikazani rezultati za koncentraciju uree u krvi krava.

Tabela 5.13. Koncentracija uree ($X \pm SD$) u krvi krava

	Koncentracija uree (mmol/l)		
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	Značajnost razlike
Zasušenje	4,44 ± 0,81	4,60 ± 0,85	NZ
Puerperijum	6,90 ± 0,68 ^{aaa}	6,72 ± 0,83 ^{aaa}	NZ
30. dan laktacije	6,68 ± 1,08 ^{aaa}	6,50 ± 0,61 ^{aaa}	NZ
60. dan laktacije	6,28 ± 0,65 ^{aaabb}	6,48 ± 1,04 ^{aaa}	NZ

^{aaa}p<0,001 u odnosu na vrednosti određene u zasušanju kod iste grupe krava; ^{bb}p<0,01 u odnosu na vrednosti određene 7. dana laktacije kod iste grupe krava;

Koncentracija uree se nije značajno razlikovala između grupa ni u jednom ispitivanom periodu. Koncentracija uree je kod obe grupe bila značajno veća u sva tri perioda nakon teljenja u odnosu na zasušanja. Kod kontrolne grupe došlo je do značajnog pada koncentracije uree između 7. i 60. dana laktacije ($p < 0,01$), što nije bio slučaj kod jedinki ogledne grupe.

5.5.8. Koncentracija kalcijuma

U tabeli 5.14 su prikazani rezultati za koncentraciju kalcijuma u krvi krava.

Tabela 5.14. Koncentracija kalcijuma ($X \pm SD$) u krvi krava

	Koncentracija kalcijuma (mmol/l)		
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	Značajnost razlike
Zasušenje	2,28 ± 0,42	2,45 ± 0,37	NZ
Puerperijum	2,09 ± 0,39	2,36 ± 0,21	NZ
30. dan laktacije	2,55 ± 0,28 ^{aaabbb}	2,69 ± 0,30 ^{aabb}	NZ
60. dan laktacije	2,60 ± 0,34 ^{abbb}	2,76 ± 0,27 ^{aabb}	$p < 0,05$

^ap<0,05 u odnosu na vrednosti određene u zasušanju kod iste grupe krava; ^{aa}p<0,01 u odnosu na vrednosti određene u zasušanju kod iste grupe krava; ^{bb}p<0,01 u odnosu na vrednosti određene 7. dana laktacije kod iste grupe krava; ^{bbb}p<0,001 u odnosu na vrednosti određene 7. dana laktacije kod iste grupe krava;

Dobijeni rezultati ukazuju da se koncentracija kalcijuma nije značajno razlikovala između grupa pre početka oglada, kao i 7. i 30. dana laktacije, dok je 60. dana laktacije koncentracija kalcijuma u oglednoj grupi bila značajno viša nego u kontrolnoj grupi ($p < 0,05$). Tridesetog i šezdestog dana laktacije je koncentracija kalcijuma bila značajno viša nego u zasušanju, odnosno 7. dana laktacije u obe grupe.

5.5.9. Koncentracija fosfora

U tabeli 5.15 su prikazani rezultati za koncentraciju neorganskog fosfora u krvi krava.

Tabela 5.15. Koncentracija neorganskog fosfora ($X \pm SD$) u krvi krava

	Koncentracija neorganskog fosfora (mmol/l)		
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	Značajnost razlike
Zasušenje	2,37 ± 0,28	2,38 ± 0,35	NZ
Puerperijum	2,06 ± 0,46 ^{aa}	2,20 ± 0,32 ^a	NZ
30. dan laktacije	2,22 ± 0,44	2,33 ± 0,51	NZ
60. dan laktacije	2,49 ± 0,19 ^{bbbcc}	2,61 ± 0,28 ^{aabbcc}	NZ

^ap<0,05 u odnosu na vrednosti određene u zasušanju kod iste grupe krava; ^{aa}p<0,01 u odnosu na vrednosti određene u zasušanju kod iste grupe krava; ^{bbb}p<0,001 u odnosu na vrednosti određene 7. dana laktacije kod iste grupe krava; ^{cc}p<0,01 u odnosu na vrednosti određene u 30. dana laktacije kod iste grupe krava;

Koncentracija neorganskog fosfora se nije značajno razlikovala između grupa pre početka oglada, kao ni 7., 30. i 60. dana laktacija. Smanjenje koncentracije fosfora kod krava kontrolne grupe odmah nakon teljenja bilo je izraženije ($p < 0,01$) nego kod krava kontrolne grupe ($p < 0,05$). Takođe, porast koncentracije fosfora od 30. do 60. dana laktacije je bio značajan jedino kod ogledne grupe ($p < 0,01$).

5. 6. KONCENTRACIJA HORMONA U KRVI KRAVA

Od hormona su, u krvi krava, određivani insulin, tiroksin (T_4), trijodtironin (T_3) i IGF-I. Pored toga, određivana je i relativna zastupljenost vezujućih proteina za IGF-I (IGFBP-2, IGFBP-3 i IGFBP-4). Rezultati su prikazani u odvojenim podpoglavljima za svaki parametar pojedinačno.

5.6.1. Koncentracija insulina

U tabeli 5.16 su prikazani rezultati za koncentraciju insulina u krvi krava.

Tabela 5.16. Koncentracija insulina ($X \pm SD$) u krvi krava

	Koncentracija insulina ($\mu\text{IU/l}$)		
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	Značajnost razlike
Zasušenje	13,44 \pm 4,19	13,04 \pm 3,21	NZ
Puerperijum	8,31 \pm 3,30 ^{aaa}	11,55 \pm 1,73 ^a	NZ
30. dan laktacije	11,56 \pm 3,72 ^{bb}	14,25 \pm 4,46 ^{bb}	p < 0,05
60. dan laktacije	14,11 \pm 6,08 ^{bbb}	17,80 \pm 6,08 ^{aaabbbcc}	p < 0,05

^ap < 0,05 u odnosu na vrednosti određene u zasušanju kod iste grupe krava; ^{aaa}p < 0,001 u odnosu na vrednosti određene u zasušanju kod iste grupe krava; ^{bb}p < 0,01 u odnosu na vrednosti određene u puerperijumu kod iste grupe krava; ^{bbb}p < 0,001 u odnosu na vrednosti određene u puerperijumu kod iste grupe krava; ^{cc}p < 0,01 u odnosu na vrednosti određene 30. dana laktacije kod iste grupe krava;

Koncentracija insulina se nije značajno razlikovala između grupa na početku ogleada ali je posle teljenja bila viša u oglednoj nego u kontrolnoj grupi. Ova razlika je bila statistički značajna jedino 30. dana laktacije (p < 0,05). Posle teljenja je koncentracija insulina kod obe grupe značajno smanjena (p < 0,001 za kontrolnu i p < 0,05 za oglednu grupu), a zatim se kod kontrolne grupe 60. dana vratila na nivo koji je bio približan vrednosti utvrđenoj pre teljenja, dok je kod ogledne grupe koncentracija insulina određena 60. dana laktacije bila značajno veća od vrednosti utvrđene antepartalno (p < 0,001).

5.6.2. Koncentracija tiroksina (T_4)

U tabeli 5.17 prikazani su rezultati za koncentraciju T_4 u krvi krava.

Tabela 5.17. Koncentracija T_4 ($X \pm SD$) u krvi krava

	Koncentracija T_4 (mmol/l)		
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	Značajnost razlike
Zasušenje	58,47 \pm 8,39	58,87 \pm 8,17	NZ
Puerperijum	25,97 \pm 15,03 ^{aaa}	43,00 \pm 17,48 ^{aaa}	p < 0,001
30. dan laktacije	44,63 \pm 8,18 ^{aaabbb}	60,37 \pm 16,90 ^{bbb}	p < 0,001
60. dan laktacije	58,82 \pm 11,83 ^{bbbccc}	59,23 \pm 7,74 ^{aaabbb}	NZ

^{aaa}p < 0,001 u odnosu na vrednosti određene u zasušanju kod iste grupe krava; ^{bbb}p < 0,001 u odnosu na vrednosti određene 7. dana laktacije kod iste grupe krava; ^{ccc}p < 0,001 u odnosu na vrednosti određene 30. dana laktacije kod iste grupe krava;

Koncentracija T_4 se nije značajno razlikovala između grupa na početku ogleada ali je posle teljenja bila značajno viša u oglednoj nego u kontrolnoj grupi i to 7. i 30.

dana laktacije ($p < 0,001$, pojedinačno). Posle teljenja se koncentracija T_4 kod obe grupe značajno smanjena, a zatim se kod ogledne grupe 30. dana vratila na nivo približan vrednosti pre teljenja. Kod kontrolne grupe, koncentracije tiroksina se tek 60. dana laktacije vratila na nivo približan vrednosti pre teljenja.

5.6.3. Koncentracija trijodtironina (T_3)

U tabeli 5.18 prikazani su rezultati za koncentraciju T_3 u krvi krava.

Tabela 5.18. Koncentracija T_3 ($X \pm SD$) u krvi krava

	Koncentracija T_3 (mmol/l)		
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	Značajnost razlike
Zasušenje	$2,88 \pm 0,78$	$2,93 \pm 0,38$	NZ
Puerperijum	$1,77 \pm 0,75^{aaa}$	$2,38 \pm 0,37^{aaa}$	$p < 0,001$
30. dan laktacije	$2,25 \pm 0,51^{aabbb}$	$2,42 \pm 0,31^{aaa}$	NZ
60. dan laktacije	$2,57 \pm 0,47^{bbbccc}$	$2,58 \pm 0,23^{aaabbc}$	NZ

^{aa} $p < 0,01$ u odnosu na vrednosti određene u zasušanju kod iste grupe krava; ^{aaa} $p < 0,001$ u odnosu na vrednosti određene u zasušanju kod iste grupe krava; ^{bb} $p < 0,01$ u odnosu na vrednosti određene 7. dana laktacije kod iste grupe krava; ^{bbb} $p < 0,001$ u odnosu na vrednosti određene 7. dana laktacije kod iste grupe krava; ^{cc} $p < 0,01$ u odnosu na vrednosti određene 30. dana laktacije kod iste grupe krava; ^{ccc} $p < 0,001$ u odnosu na vrednosti određene 30. dana laktacije kod iste grupe krava;

Koncentracija T_3 se nije značajno razlikovala između grupa na početku oglada ali je posle teljenja bila značajno viša kod ogledne nego kod kontrolne grupe i to 7. dana laktacije ($p < 0,001$). Posle teljenja je koncentracija T_3 kod obe grupe značajno smanjena ($p < 0,001$, pojedinačno).

5.6.4. Koncentracija insulinu sličnog faktora rasta I (IGF-I)

U tabeli 5.19 prikazani su rezultati za koncentraciju IGF-I u krvi krava.

Tabela 5.19. Koncentracija IGF-I ($X \pm SD$) u krvi krava

	Koncentracija IGF-I (mmol/l)		
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	Značajnost razlike
Zasušenje	31,73 ± 5,30	29,39 ± 7,85	NZ
Puerperijum	11,86 ± 11,47 ^{aaa}	14,28 ± 3,47 ^{aaa}	p < 0,001
30. dan laktacije	16,42 ± 2,51 ^{aaabbb}	18,67 ± 3,80 ^{aaabbb}	p < 0,05
60. dan laktacije	17,80 ± 4,69 ^{aaabbb}	24,39 ± 7,86 ^{aaabbbccc}	p < 0,01

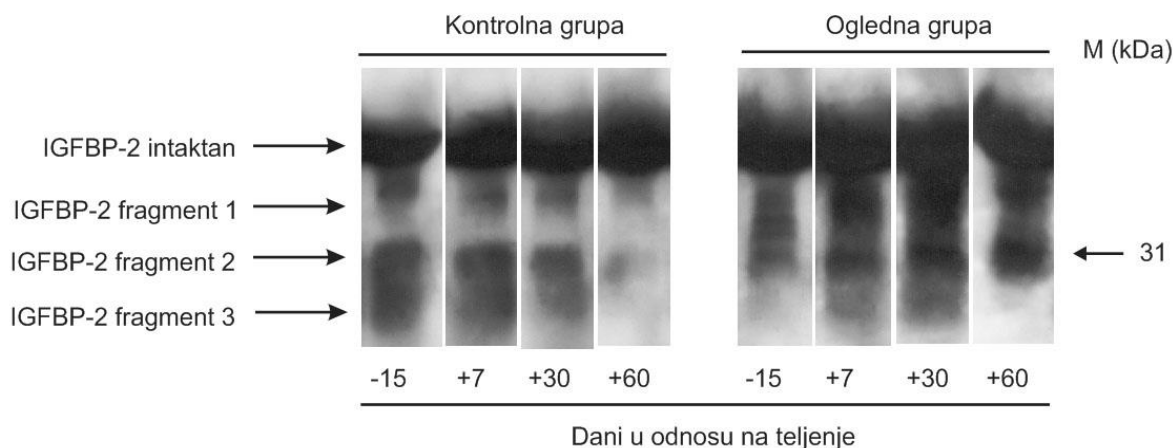
^{aaa}p<0,001 u odnosu na vrednosti određene u zasušanju kod iste grupe krava; ^{bbb}p<0,001 u odnosu na vrednosti određene 7. dana laktacije kod iste grupe krava; ^{ccc}p<0,001 u odnosu na vrednosti određene 30. dana laktacije kod iste grupe krava;

Koncentracija IGF-I se nije značajno razlikovala između grupa na početku oglada ali je posle teljenja bila značajno viša u oglednoj nego u kontrolnoj grupi i to u sva tri ispitivana perioda (p < 0,001 za 7. dan laktacije; p < 0,05 za 30. dan laktacije i p < 0,01 za 60. dan laktacije). Posle teljenja je koncentracija IGF-I kod obe grupe značajno smanjena (p < 0,001, pojedinačno). Kod ogledne grupe je koncentracija IGF-I nakon teljenja rasla tako da je razlika u vrednosti IGF-I određene između sva tri perioda ispitivanja postpartalno bila značajna. Kod kontrolne grupe, međutim, nije utvrđen značajan porast u koncentraciji IGF-I između 30. i 60. dana laktacije.

5.6.5. Relativna zastupljenost IGFBP-2

Relativna zastupljenost IGFBP-2 u krvnom serumu reprezentativnih uzoraka unutar grupe prikazana je na slici 5.1.

Slika 5.1. Autoradiogram imunoblota za serumski IGFBP-2 određenog 15. dana pre i 7., 30. i 60. dana posle teljenja kod kontrolne i ogledne grupe krava



Na slici se zapaža da je imunoblotom u svim uzorcima krvnog seruma utvrđen jedan intaktan molekul i tri fragmenta.

U tabeli 5.20. su prikazane prosečne vrednosti relativne zastupljenosti IGFBP-2 u krvnom serumu krava.

Tabela 5.20. Relativna zastupljenost IGFBP-2 ($X \pm SD$) u krvi krava

	Relativna zastupljenost IGFBP-2 (ADU/10 μ l)		
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	Značajnost razlike
Zasušenje	12,44 \pm 1,19	12,88 \pm 1,91	NZ
Puerperijum	14,26 \pm 1,71 ^a	14,90 \pm 1,88 ^a	NZ
30. dan laktacije	14,86 \pm 2,17 ^a	16,65 \pm 1,93 ^{aaabb}	NZ
60. dan laktacije	11,28 \pm 2,11 ^c	14,08 \pm 2,11 ^c	p < 0,05

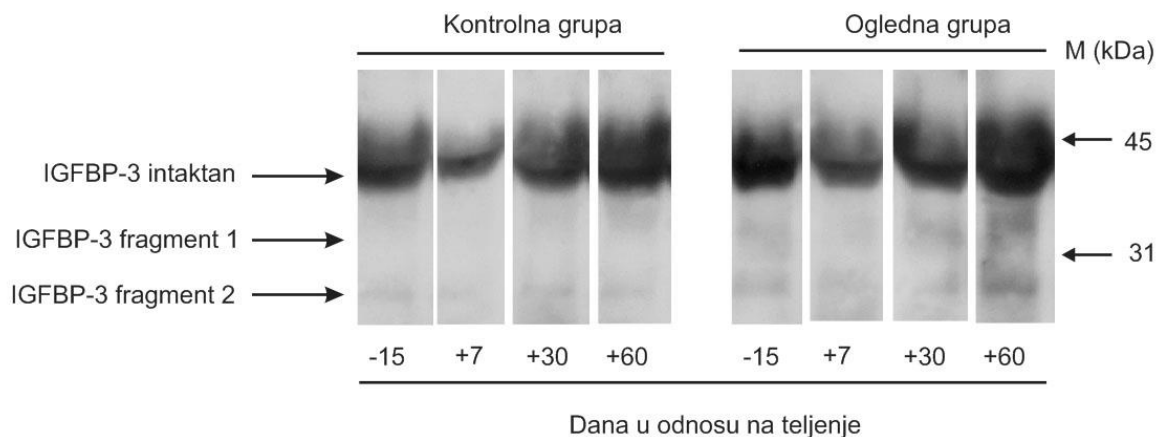
^ap < 0,05 u odnosu na vrednosti određene u zasušanju kod iste grupe krava; ^{aaa}p < 0,001 u odnosu na vrednosti određene u zasušanju kod iste grupe krava; ^bp < 0,05 u odnosu na vrednosti određene u puerperijumu kod iste grupe krava; ^{bbb}p < 0,001 u odnosu na vrednosti određene 7. dana laktacije kod iste grupe krava; ; ^cp < 0,05 u odnosu na vrednosti određene 30. dana laktacije kod iste grupe krava;

Relativna zastupljenost IGFBP-2 u krvnom serumu krava različitih grupa se nije značajno razlikovala u periodu zasušanja. Kod obe grupe je posle teljenja došlo do značajnog povećanja relativne zastupljenosti IGFBP-2 (p < 0,05, pojedinačno). Jedino je 60. dana laktacije postojala značajna razlika u relativnoj zastupljenosti IGFBP-2 između dve grupe jer je njegova zastupljenost kod ogledne grupe bila značajno veća (p < 0,05).

5.5.5. Relativna zastupljenost IGFBP-3

Relativna zastupljenost IGFBP-3 u krvnom serumu reprezentativnih uzoraka unutar grupe prikazana je na slici 5.2.

Slika 5.2. Autoradiogram imunoblota za serumski IGFBP-3 određenog 15. dana pre i 7., 30. i 60. dana posle teljenja kod kontrolne i ogledne grupe krava



Na slici se zapaža da je imunoblotom u svim uzorcima krvnog seruma utvrđen jedan intaktan molekul i dva fragmenta.

U tabeli 5.21. prikazane su prosečne vrednosti relativne zastupljenosti IGFBP-3 u krvnom serumu krava.

Tabela 5.21. Relativna zastupljenost IGFBP-3 ($X \pm SD$) u krvi krava

	Relativna zastupljenost IGFBP-3 (ADU/10 μ l)		
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	Znčajnost razlike
Zasušenje	8,26 \pm 1,39	8,67 \pm 1,75	
Puerperijum	5,84 \pm 2,02 ^{aa}	8,13 \pm 1,59	p < 0,01
30. dan laktacije	8,61 \pm 1,25 ^{aaabbb}	11,33 \pm 1,85 ^{aaabbb}	p < 0,00
60. dan laktacije	13,50 \pm 2,06 ^{aaabbbc}	17,05 \pm 2,03 ^{aaabbbccc}	p < 0,05

^{aa}p<0,01 u odnosu na vrednosti određene u zasušanju kod iste grupe krava; ^{aaa}p<0,001 u odnosu na vrednosti određene u zasušanju kod iste grupe krava; ^{bbb}p<0,001 u odnosu na vrednosti određene 7. dana laktacije kod iste grupe krava; ^{ccc}p<0,001 u odnosu na vrednosti određene 30. dana laktacije kod iste grupe krava;

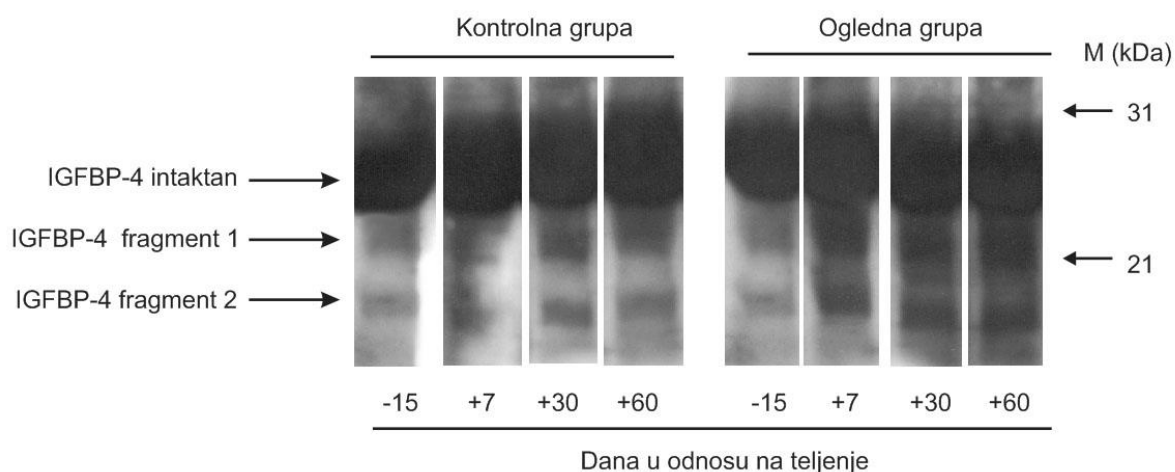
Relativna zastupljenost IGFBP-3 u krvnom serumu krava različitih grupa se nije značajno razlikovala u periodu zasušanja. Kod obe grupe je posle teljenja došlo do smanjenja relativne zastupljenosti IGFBP-3, pri čemu je ono bilo značajno samo kod kontrolne grupe (p < 0,01). Kod obe grupe krava relativna zastupljenost IGFBP-3 je već

30. i 60. dana bila značajno veća nego u zasušenju. Kod ogledne grupe je relativna zastupljenost IGFBP-3 bila značajno veća u odnosu na kontrolnu grupu 30. i 60. dana laktacije.

5.5.6. Relativna zastupljenost IGFBP-4

Relativna zastupljenost IGFBP-4 u krvnom serumu reprezentativnih uzoraka unutar grupe prikazana je na slici 5.3.

Slika 5.3. Autoradiogram imunoblota za serumski IGFBP-4 određenog 15. dana pre i 7., 30. i 60. dana posle teljenja kod kontrolne i ogledne grupe krava



Na slici se zapaža da je imunoblottom u svim uzorcima utvrđen jedan intaktan molekul i dva fragmenta.

U tabeli 5.22. su prikazane prosečne vrednosti relativne zastupljenosti IGFBP-4 u krvnom serumu krava.

Tabela 5.22. Relativna zastupljenost IGFBP-4 ($X \pm SD$) u krvi krava

	Relativna zastupljenost IGFBP-4 (ADU/10 μ l)		
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	Značajnost razlike
Zasušenje	14,70 \pm 2,25	14,58 \pm 1,89	NZ
Puerperijum	15,02 \pm 2,56	17,48 \pm 2,27 ^{aaa}	NZ
30. dan laktacije	17,57 \pm 2,49 ^a	20,95 \pm 3,25 ^{aa}	p < 0,05
60. dan laktacije	18,13 \pm 2,25 ^{ab}	21,29 \pm 3,16 ^{aab}	p < 0,05

^{aaa}p<0,001 u odnosu na vrednosti određene u zasušanju kod iste grupe krava; ^bp<0,05 u odnosu na vrednosti određene u puerperijumu kod iste grupe krava; ^{bb}p<0,01 u odnosu na vrednosti određene u puerperijumu kod iste grupe krava; ^{bbb}p<0,001 u odnosu na vrednosti određene u puerperijumu kod iste grupe krava;

Relativna zastupljenost IGFBP-4 u krvnom serumu krava različitih grupa se nije značajno razlikovala u periodu zasušanja. Kod obe grupe je posle teljenja došlo do porasta relativne zastupljenosti IGFBP-4, pri čemu je ono bilo značajno samo kod ogledne grupe (p < 0,001). Ovaj značajan porast relativne zastupljenosti IGFBP-4 nastavljen je kod ogledne grupe do kraja ispitivanog perioda. Relativna zastupljenost IGFBP-4 je bila značajno veća u krvnom serumu ogledne u odnosu na kontrolnu grupu krava 30. i 60. dana laktacije (p < 0,05, pojedinačno).

5. 6. INDEKSI DOBIJENI RAČUNSKIM PUTEM IZ VREDNOSTI POJEDINIH PARAMETARA KRVI

U cilju boljeg tumačenja dobijenih rezultata izračunati su HOMA i indeks konverzije tiroksina u trijodtironin.

5.6.1. HOMA indeks

Na osnovu dobijenih vrednosti za koncentraciju insulina i glukoze u krvi krava obračunat je HOMA indeks koji je prikazan u tabeli 5.23.

Tabela 5.23. HOMA indeks

	HOMA indeks		
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	Značajnost razlike
Zasušenje	1,63 ± 0,34	1,60 ± 0,26	NZ
Puerperijum	1,49 ± 0,56	1,38 ± 0,28 ^{aa}	NZ
30. dan laktacije	1,31 ± 0,27 ^{aaa}	1,92 ± 0,60 ^{abbb}	p < 0,001
60. dan laktacije	1,39 ± 0,52 ^a	2,71 ± 0,99 ^{aaabbbccc}	p < 0,001

^ap<0,05 u odnosu na vrednosti određene u zasušenju kod iste grupe krava; ^{aa}p<0,01 u odnosu na vrednosti određene u zasušenju kod iste grupe krava; ^{aaa}p<0,001 u odnosu na vrednosti određene u zasušenju kod iste grupe krava; ^{bbb}p<0,001 u odnosu na vrednosti određene u puerperijumu kod iste grupe krava; krava ^{bbb}p<0,001 u odnosu na vrednosti određene 30. dana laktacije kod iste grupe krava;

Iz tabele se zapaža da se vrednost HOMA indeksa između grupa nije značajno razlikovala pre teljenja kao i 7. dana laktacije dok je 30. i 60. dana laktacije bila značajno viša kod ogledne grupe ukazujući da je kod ogledne grupe postojala insulinska rezistencija. Takođe, 7. dana laktacije, HOMA indeks se više smanjio kod ogledne nego kod kontrolne grupe u odnosu na zasušenje (p < 0,01 između zasušenja i puerperijuma kod ogledne grupe) ukazujući da je kod ogledne grupe u tom periodu smanjena rezistencija tkiva na insulin.

5.6.2. Indeks konverzije tiroksina u trijodtironin

Na osnovu vrednosti za koncentraciju tiroksina i trijodtironina u krvi krava obračunat je indeks konverzije (T₃ / T₄) prikazan u tabeli 5.24.

Tabela 5.24. Indeks konverzije T₃ u T₄

	T ₃ / T ₄		
	Kontrolna grupa	Ogledna grupa	Značajnost razlike
Zasušenje	0,50 ± 0,17	0,51 ± 0,12	NZ
Puerperijum	0,79 ± 0,31 ^{aaa}	0,72 ± 0,52	p < 0,01
30. dan laktacije	0,51 ± 0,11 ^{bbb}	0,42 ± 0,09 ^{abb}	p < 0,01
60. dan laktacije	0,44 ± 0,06 ^{bbcc}	0,44 ± 0,06 ^{aabb}	NZ

^ap<0,05 u odnosu na vrednosti određene u zasušenju kod iste grupe krava; ^{aa}p<0,01 u odnosu na vrednosti određene u zasušenju kod iste grupe krava; ^{aaa}p<0,001 u odnosu na vrednosti određene u zasušenju kod iste grupe krava; ^{bb}p<0,01 u odnosu na vrednosti određene u puerperijumu kod iste grupe krava; ^{bbb}p<0,001 u odnosu na vrednosti određene u puerperijumu kod iste grupe krava; ^{cc}p<0,01 u odnosu na vrednosti određene 30. dana laktacije kod iste grupe krava;

Iz tabele se zapaža da su vrednosti T₃/T₄ bile značajno niže kod ogledne grupe krava 7. i 30. dana laktacije u odnosu na kontrolnu grupu (p < 0,01, pojedinačno). Posle

teljenja je jedino kod kontrolne grupe došlo do značajnog povećanja vrednosti T_3/T_4 ($p < 0,001$ između perioda zasušenja i puerperijuma). Kasnije od 7. do 30. odnosno 7. do 60. dana laktacije vrednosti T_3/T_4 su značajno smanjene kod obe grupe krava.

6. DISKUSIJA

Korišćenje energetske dodataka u ishrani visokomlečnih krava ima za cilj da ublaži nedostatak u energiji u najranijoj fazi laktacije kada životinje ne mogu da unose putem hrane dovoljne količine energije koja je potrebna da bi se podmirile povećane potrebe organizma radi povećane aktivnosti mlečne žlezde. Kao najpogodnija jedinjenja za tu namenu se smatraju ona koja istovremeno mogu da služe kao izvor energije i da, zavisno od potreba organizma, budu i prekursori za sintezu glukoze u jetri. Takva jedinjenja su propilen glikol (*Miyoshi i sar., 2001*) i glicerol (*DeFrain i sar., 2004; Šamanc i sar., 2010a; Kirovski i sar., 2012*). Njihova primena ima najveći značaj u peripartalnom periodu jer se na taj način predupređuje rani nastanak lipomobilizacije i sa druge strane, ublažuju posledice negativnog bilansa energije na početku laktacije. Naime, poznato je da je period oko teljenja najkritičniji za pravilnu funkciju regulatornih mehanizama zbog naglog prelaska iz stanja pozitivnog bilansa energije karakterističnog za period visokog graviditeta u stanje negativnog bilansa energije karakterističnog za početak laktacije (*Jorristma, 2003; LeBlanc, 2010*). Jedinjenja koju mogu da posluže kao neposredan izvor energije omogućavaju regulatornim mehanizmima da usklade lipomobilizaciju kao fiziološki proces sa aktivnošću organa od kojih zavisi iskorišćavanje masnih kiselina i njihov promet u organizmu (*Burns KN, 1963; Vaughn i sar., 1993*).

Telesna kondicija krava je jedan od kliničkih pokazatelja prometa energije i energetske statusa jedinke (*Šamanc i sar., 2008; Roche i sar., 2009; Thorup i sar., 2012*). Najznačajnije promene u telesnoj kondiciji nastaju u peripartalnom periodu ali se smatra da gubitak u telesnoj masi u tom periodu ne bi trebalo da bude veći od 10 do 12 %, odnosno, izraženo u oceni telesne kondicije 0,5 odnosno 0,7 poena (*Šamanc i sar., 2010b*). Rezultati dosadašnjih ispitivanja su ukazali da telesna kondicija krava u peripartalnom periodu ima presudnu ulogu u procesu hormonalnog i metaboličkog prilagođavanja krava u ranoj fazi laktacije (*Morrow., 1976; Brugere-Picoux J and Brugere H., 1985; Šamanc i sar., 2010b; Šamanc i sar., 2010c*). U zasušenju krave mogu da budu u tojnoj kondiciji, mada se i kada im je telesna kondicija u optimalnim granicama, rezerve masti mogu koristiti kao dopunski izvor energije. Stepenu korišćenja telesnih rezervi može da bude daleko veći nego što su nastale energetske potrebe i ne retko se zbog toga životinje teže prilagođavaju na negativan bilans energije. U retkim

slučajevima kao posledica nastaju bolesna stanja, krave naglo mršave sve do iscrpljivanja pa i uginuća (*Morrow, 1976*). Ako se analiziraju rezultati ispitivanja telesne kondicije krava uključenih u ovaj ogled onda se uočavaju jasne razlike između vrednosti dobijenih kod krava ogledne u odnosu na krave kontrolne grupe. Naime, kod obe grupe krava u antepartalnom periodu prosečne vrednosti za OTK su bile približno iste i sa veoma malim individualnim varijacijama. Posle partusa, prosečna ocena OTK se značajno smanjila u odnosu na vrednosti dobijene u antepartalnom periodu. Ovo smanjenja je kod krava kontrolne grupe bilo prosečno 0,80 poena. To je više od preporučene razlike i značajno više nego kod krava ogledne grupe kod kojih je smanjenje prosečne vrednosti OTK od antepartalnog perioda do puerperijuma iznosilo 0,43 poena. Takođe, kod krava ogledne grupe nisu ustanovljene veće varijacije u vrednostima OTK 30. i 60. dana laktacije, što nije bio slučaj kod krava kontrolne grupe. To se može još jasnije zapaziti na grafikonima gde su prikazane distribucije vrednosti OTK unutar grupa u različitim fazama proizvodno reproduktivnog ciklusa (Grafikoni 5.1 do 5.4). Imajući u vidu rezultate ocene telesne kondicije krava može se smatrati da je korišćenje energetskog dodatka imalo uticaj na proces prilagođavanja energetskog metabolizma u peripartalnom periodu, čime su stvoreni uslovi da se životinje brže oporave posle teljenja i osposobe za nastupajuću laktaciju.

Kod visokomlečnih krava najznačajnije promene u energetskom metabolizmu nastaju upravo u periodu oko teljenja, odnosno u peripartalnom periodu. S obzirom da kod preživara glukoza nije glavni izvor energije, u tu svrhu se najviše koriste masne kiseline (*Nafikov i Beitz, 2007*). To je razlog što se u uslovima povećanih energetskih potreba kao alternativni izvor energije koriste masne kiseline iz telesnih depoa masti. S obzirom da jetra ima ključnu ulogu u regulaciji metabolizma masti, sasvim je jasno da intenziviranje procesa lipomobilizacije uvek predstavlja opasnost za nastajanje manjeg ili većeg stepena zamašćenja jetre (*Breukink i Wensing, 1997; Bobe i sar., 2004*)

Danas se smatra da je masna jetra jedno od najznačajnijih patoloških stanja kod visokomlečnih krava. U uslovima blagog stepena lipomobilizacije sadržaj lipida u ćelijama jetre je zanemarljiv. Međutim, kada je lipomobilizacija veoma intenzivna, zbog nakupljanja većih količina triglicerida može doći i do difuznog zamašćenja tkiva jetre. U takvim slučajevima nastaju značajne promene u zdravstvenom stanju pa se zbog toga obolele životinje veoma dugo oporavljaju posle teljenja, zbog čega su njihovi

proizvodni rezultati značajno smanjeni (*Šamanc i sar., 2011*). Nije retko da kod takvih krava nastanu i problemi u reprodukciji (*Suriyasathaporn, 2000; Jorristma, 2003; Chagas i sar, 2007*).

Upravo zbog ovih saznanja danas se posebna pažnja posvećuje mogućnosti korišćenja energetske dodatka u ishrani visokomlečnih krava. U ogledu koji je sproveden energetski dodatak je antepartalno, poslednje dve nedelje pre očekivanog termina teljenja, korišćen u dnevnoj dozi od 250 ml po kravi, dok je postpartalno, odnosno do 60. dana laktacije, korišćen u dnevnoj dozi od 300 ml po kravi. Uzorci tkiva jetre uzimani su u ranom puerperijumu, 30. i 60. dana laktacije. Višekratno uzimanje uzoraka tkiva jetre je imalo za cilj da se utvrdi stepen zamašćenja kod obe grupe krava i, što je još važnije, utvrdi vreme koje je u postpartalnom periodu potrebno da se jetra oslobodi viška masti i ponovo uspostavi morfološki i funkcionalni integritet. Kao što se može zapaziti iz dobijenih rezultata u ranom puerperijumu, iako postoji razlika u stepenu zamašćenja jetre između dve grupe krava, ona nije statistički značajna. Na osnovu toga se može pretpostaviti da primenjena doza nije bila dovoljna da spreči intenzivnije odvijanje procesa lipomobilizacije, pa je zbog toga kod pojedinih životinja došlo do blagog ili srednjeg stepena zamašćenja jetre. To je razlog što se danas, od strane jednog broja istraživača, preporučuje da se antepartalno koriste dvostruko veće doze energetskog dodatka u odnosu na postpartalni period od 30. do 60. dana laktacije (*DeFrain i sar., 2004; Donkin i sar., 2009*). Međutim, rezultati ukazuju da je kod ogledne grupe stepen zamašćenja jetre 30. dana laktacije bio vrlo nizak u odnosu na kontrolnu grupu krava. Ovo jasno ukazuje da je kod tretiranih krava stepen lipomobilizacije bio daleko manje izražen nego kod krava kontrolne grupe. To potvrđuju i rezultati dobijeni određivanjem koncentracije NEFA u krvi obe grupe krava.

Istraživanja *Urbenecka i Rossowa (1963)* su ukazala da se krave kod kojih nastaje veći stepen zamašćenja jetre u puerperalnom periodu veoma dugo oporavljaju (30 do 60 dana) do ponovnog uspostavljanja morfološkog i funkcionalnog integriteta. To su kasnije u svojim istraživanjima potvrdili i drugi autori (*Reid, 1973; Gróhn i Rossow, 1963*). Izgleda da se jetra veoma sporo oslobađa suvišnih količina masti, što se dobrim delom reperkutuje na njene funkcije (*Geelen i Wensing, 2006*). Međutim, *Gróhn i sar. (1963)* ističu da je, ako se kod ketoznih krava pravovremeno primenjuju mere terapije, moguće skratiti period odmašćivanja jetre. U takvim slučajevima brže dolazi

do uspostavljanja normalnog funkcionalnog stanja jetre. Nalaze ovih autora potvrđuju i nalazi dobijeni u ovom radu. Kod krava ogledne grupe je utvrđen dvostruko manji procenat životinja sa umerenim stepenom zamašćenja jetre u ranom puerperijumu. Istovremeno je 30. dana laktacije, 100 % životinja imalo zanemarljiv stepen zamašćenja jetre. To nije bio slučaj kod krava kontrolne grupe kod kojih je u istom periodu 20 % krava imalo srednji stepen zamašćenja.

U cilju dijagnostikovanja poremećaja metabolizma kod krava koriste se parametri metaboličkog profila (*Kida, 2003; Šamanc i sar., 2011; Gross i sar., 2011*). U tom smislu poseban značaj se pridaje parametrima koji ukazuju na stanje energetskeg metabolizma i funkcionalno stanje jetre (koncentracija glukoze, albumina, NEFA-e, BHBA-e i ukupnog bilirubina u krvi). Rezultati postignuti u ovom radu ukazuju da u periodu oko teljenja nisu ustanovljene značajne razlike u koncentraciji glukoze između dve grupe krava, ali su značajne razlike utvrđene između vrednosti za koncentracije NEFA i BHBA. Koncentracija NEFA je kod obe grupe grava antepartalno bila relativno niska i u skladu sa podacima iz literature (*Ospina i sar., 2010*). Međutim, postpartalno, pogotovo u ranom puerperijumu, kod krava kontrolne grupe koncentracija NEFA je bila u okviru fizioloških vrednosti, dok je kod krava kontrolne grupe bila značajno viša. Ta razlika je uočena i u daljem toku laktacije (30. i 60. dana laktacije). Prema tome je kod krava kontrolne grupe lipomobilizacija u ranom periodu puerperijuma bila intenzivnija nego kod krava ogledne grupe, i što je još važnije, porast koncentracije NEFA 60. dana laktacije ukazuje da kod njih još nije uspostavljena energetska ravnoteža (energetska stabilnost) pa se jedan deo energije i dalje koristi iz telesnih depoa. To donekle objašnjava činjenicu da je kod krava ogledne grupe koncentracija glukoze 30. i 60. dana laktacije značajno veća nego kod krava kontrolne grupe. Drugim rečima, životinje koje su hranom unosile energetske dodatak su uspostavile ravnotežu između priliva energetskeg prekursora iz telesnih depoa i stepena glukoneogeneze. Može se zaključiti da su krave ogledne grupe već 30. dana laktacije izašle iz stanja NEB jer su se „prestrojile“ na korišćenje energije iz alimentarnih izvora, a ne iz sopstvenih telesnih depoa. Uzimajući u obzir iste parametre moglo bi se zaključiti da su krave kontrolne grupe tek 60. dana izašle is stanja NEBa. Slična zapažanja iznose i drugi istraživači (*Vaugh i sar., 1993*)

Ranija ispitivanja su ukazala da između koncentracije glukoze i NEFA postoji visok stepen negativne korelacije (*Schwalm i Schultz, 1976*). Jedino je u antepartalnom periodu moguće da se uspostavi pozitivna korelacija između ova dva parametra i ona uvek govori o optimalnom unosu glukogenoplastičnih i energetske prekursora. Koncentracija BHBA u krvi se uvek menja u zavisnosti od energetske statusa životinje, odnosno u korelaciji je sa stepenom lipomobilizacije (*Ospina i sar., 2010*). Prosečna koncentracija BHBA u krvi krava u antepartalnom periodu se nije značajno razlikovala između dve ispitivane grupe krava. Međutim, u ranom puerperijumu kod krava kontrolne grupe je ustanovljen značajno veći porast u odnosu na vrednosti dobijene antepartalno i u odnosu na vrednosti dobijene kod krava ogledne grupe. Porast koncentracije BHBA u krvi krava kontrolne grupe i značajno veća koncentracija 30. i 60. dana laktacije ukazuju da je kod krava kontrolne grupe bio izraženiji negativan bilans energije tokom prvih 60 dana laktacije i da se zbog toga, kod ovih životinja, u većoj meri koriste deponovane masne kiseline kao izvor energije.

Značajno je zapaziti da koncentracija ukupnog bilirubina nije značajno varirala u krvi krava u postpartalnom periodu i da su prosečne vrednosti kod obe grupe krava u postpartalnom periodu bile na gornjoj fiziološkoj granici. One su kod ogledne grupe krava bile značajno niže nego kod krava kontrolne grupe. Veoma je interesantno da su vrednosti za koncentraciju bilirubina 60. dana laktacije kod obe grupe bile visoke. Taj rezultat, udružen sa visokom koncentracijom NEFA i BHBA, u tom periodu se objašnjava stresom krava prolaznog karaktera u uslovima visoke proizvodnje mleka i ovo je zabeleženo u literaturi upravo kao metaboličko obeležje stresa kod krava na vrhuncu laktacije (*Kessel i sar., 2008*).

Rezultati ispitivanja koncentracija ukupnih proteina i albumina ukazuju da se vrednosti ovih parametara značajno razlikuju između dve grupe krava. Proteinemija i albuminemija mogu da budu dobri pokazatelji stepena hidratacije organizma, ali i pokazatelji sintetske aktivnosti hepatocita. Kod oglednih životinja, kod kojih je utvrđena značajno viša koncentracija ukupnih proteina i albumina nego kod kontrolne grupe u sva tri postpartalna perioda ispitivanja, došlo je do brzog uspostavljenja optimalne aktivnosti hepatocita što se manifestovalo intenzivnom glukoneogenezom i pojačanim procesom sinteze proteina odnosno albumina. Poznato je iz literature da posle prestanka degenerativnih procesa u jetri najpre dolazi do porasta koncentracije albumina u krvi

kao pokazatelje ubrzane regeneracije i ponovnog uspostavljanja morfološkog integriteta tkiva jetre (*Piccione i sar., 2011*).

Hormoni tireoidee, a naročito T_3 koji je četiri puta aktivniji od T_4 , imaju važnu ulogu u regulisanju energetskeg metabolizma. Smanjenje njihove koncentracije u krvi u peripartalnom periodu, naročito na početku laktacije, omogućava korišćenje i preusmeravanje telesnih rezervi organizma za potrebe nametnute visokom proizvodnjom mleka. To znači da se pri relativno nižoj koncentraciji hormona tireoidee smanjuje i stepen korišćenja energije u telesnim tkivima čime se omogućava da se, što je moguće više prekursora, stavlja na raspolaganje mlečnoj žlezdi. Međutim, to vrlo često može da bude uzrok narušavanja metaboličke ravnoteže i nekontrolisane mobilizacije masti iz telesnih depoa, koje ne samo što se ne koriste za podmirivanje dela energetskeg potreba organizma, već se zadržavaju u parenhimatoznim organima (jetra) narušavajući njihov morfološki i funkcionalni integritet (*Morrow, 1976*).

Rezultati ispitivanja koncentracije hormona tireoidee kod krava u periodu zasušenja i do 60. dana laktacije su u saglasnosti sa iznetim dosadašnjim saznanjima (*Stojić i sar., 2001*). Koncentracija tiroksina se nije značajno razlikovala između grupa krava u periodu zasušenja, odnosno na početku ogleđa. Posle teljenja koncentracija tiroksina u krvi obe grupe krava se značajno smanjila, ali kod krava kontrolne grupe značajno više nego kod krava ogleđne grupe. Zatim, 30. dana laktacije kod obe grupe došlo do porasta koncentracije tiroksina, ali samo kod krava ogleđne grupe se ta vrednost vratila na onu pre teljenja. Kod krava kontrolne grupe koncentracija tiroksina je bila niža u odnosu na dobijenu vrednost u zasušenju i vrednost kod krava ogleđne grupe u istom periodu ispitivanja. Kod kontrolne grupe, koncentracija tiroksina se tek 60. dana laktacija vratila na nivo približan onom pre teljenja odnosno skoro se izjednačila sa vrednošću koja je dobijena kod krava ogleđne grupe. Koncentracija T_3 se nije značajno razlikovala između grupa na početku ogleđa ali je posle teljenja bila značajno veća u ogleđnoj nego u kontrolnoj grupi krava. Međutim, ako se porede vrednosti T_3 u toku celog perioda ispitivanja onda se vidi da su nastale promene u koncentraciji T_3 skoro identične sa promenama koje su ustanovljene za koncentraciju tiroksina u krvi ispitivanih krava. Po svemu sudeći, promene u koncentraciji hormona tireoidee u antepartalnom i postpartalnom periodu u potpunosti odražavaju promene u energetskeg statusu životinje. Osim toga, jasno se vidi da je aktivnost hormona

tireoidee kao i koncentracija T_3 u krvi u korelaciji sa intenzitetom energetskih procesa u telesnim tkivima. U prilog tome govori podatak da su promene u dinamici nivoa hormona potpuno iste, a jedina razlika postoji u apsolutnim vrednostima koncentracije tiroksina, odnosno trijodtironina. Ranija ispitivanja su ukazala da je smanjivanje koncentracije hormona tireoidee od 7 dana pre do 7 dana posle teljenja redovan nalaz pri endokrinoj kontroli metabolizma krava u peripartalnom periodu.

Stepen smanjenja u tom periodu je u korelaciji sa energetskim statusom životinje. Što je veći raspon u energetskom statusu krava između antepartalnog i postpartalnog perioda (više od 0,7 poena) izrazitije je smanjenje koncentracije hormona tireoidee u ranom puerperijumu u odnosu na period zasušenja. Rezultati dobijeni u ovom radu to jasno potvrđuju imajući u vidu da je kod krava kontrolne grupe razlika u telesnoj kondiciji u najužem periodu oko teljenja bila 0,75 poena, a kod krava kontrolne grupe 0,44 poena. Osim toga, kod krava ogledne grupe je u toku 60 dana laktacije koncentracija tiroksina i trijodtironina bila značajno veća u poređenju sa vrednostima dobijenim kod krava kontrolne grupe. Sve to ukazuje da je energetski dodatak imao uticaj na energetski status tretiranih krava i samim tim i na hormonalni status životinja. Na osnovu ovih činjenica može da se pretpostavi da za pravilno odvijanje metaboličkih procesa uticaj pojedinih hormona ima odlučujući značaj, i da taj uticaj zavisi od energetskog statusa.

Na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da hormonalni status krava zavisi od fiziološkog stanja (graviditet i laktacija) odnosno energetskog statusa životinja u različitim fazama proizvodno reproduktivnog ciklusa. Stepem lipomobilizacije kao i zamašćenje jetre u uskoj su korelaciji sa koncentracijom hormona tireoidee i endokrinog pankreasa u peripartalnom periodu. Što je veća razlika u energetskom statusu veća je opasnost od nastanka intenzivne lipomobilizacije sa negativnim posledicama po zdravstveno stanje životinja.

Servis period krava predstavlja vremenski period od teljenja do nastanka ponovne koncepcije i kreće se u rasponu od 60 do 120 dana zavisno od rase, uzrasta, mlečnosti, ishrane i puerperalnih poremećaja. Prema podacima Vibarta i sar. (2012) trajanje servis perioda u mnogome zavisi od sadržaja proteina u obroku krava u ranoj fazi laktacije i metaboličkih poremećaja u ranom puerperijumu koji u velikoj meri utiču

na morfološki i funkcionalni integritet reproduktivnoih organa, pre svega materice, ali utiču i na aktivnost jajnika i pojavu prvog fertilnog estrusa posle partusa,

Laktaciju i graviditet karakterišu veoma intenzivni metabolički procesi i za njih je neophodno pravilno snabdevanje energetskim prekurzorima, proteinima, mineralima i vitaminima. To je glavni razlog što se pravilnom optimiziranju obroka i snabdevanju energijom i proteinima pridaje veliki značaj u intenzivnoj govedarskoj proizvodnji. Mnogobrojna istraživanja su ukazala da je u zaptima gde je učestalost metaboličkih poremećaja zanemarljiva, servis period skraćen u proseku za 54 dana u poređenju sa zaptima u kojima su dominantni poremećaji metabolizma u puerperijumu, zaostajanje posteljice i endometritisi. Pored servis perioda kao pokazatelj reprodukcija aktivnosti jedinki se koristi i indeks osemenjavanja, koji predstavlja prosečan broj osemenjavanja po steonoj kravi (plotkinji).

Prema podacima nekih ranijih istraživanja hormoni tireoidee imaju veoma važan uticaj na funkciju jajnika, uključujući i uticaj hormona IGF sistema. Kod dugotrajnog deficita energije je ustanovljena smanjena aktivnost tireoidee i usporeno uspostavljanje ciklične aktivnosti jajnika. Osim toga, postoji značajna negativna korelacija između nivoa IGF I u prvoj nedelji posle teljenja i dužine trajanja postpartalnog perioda aciklija.

Rezultati ispitivanja reproduktivnih pokazatelja kod krava uključenih u ovaj ogled potvrđuju ranije nalaze drugih istraživača (*Castañeda-Gutiérrez i sar., 2009*). Naime kod krava kontrolne grupe servis period je prosečno iznosio oko 125 dana dok je kod krava ogledne grupe bio kraći i prosečno iznosio 102 dana. Prema tome, servis period je kod kontrolne grupe krava bio produžen za onoliko koliko je duže trajao NEB. Krave kontrolne grupe su (a to pokazuju koncentracije BHBA, NEFA, pre svega) izašle iz NEBa 60. dana laktacije a krave ogledne grupe već 30. dana. Veoma je značajno naglasiti da je kod 40 % krava kontrolne grupe krava servis period bio kraći od 120 dana a kod krava ogledne grupe čak kod 60 % plotkinja. Takođe, značajno je zapaziti da je indeks osemenjavanja bio skoro isti kod obe grupe krava što ukazuje da je kod krava kontrolne grupe duže trajao period mirovanja jajnika pa je zbog toga pri dužem trajanju servis perioda u odnosu na oglednu grupu indeks osemenjavanja bio približno isti.

U peripartalnom periodu nastaju najznačajnije promene u energetskom statusu krava, ovaca, koza i drugih vrsta životinja, ali su te promene najizraženije kod krava visokomlečnih rasa. U nekim slučajevima, razlika u energetskim potrebama između

perioda zasušenja i rane faze laktacije se kreće u rasponu od 100 do 150 MJ NEL. Zbog toga kod krava na početku laktacije nastaje veoma izražen negativan bilans energije, koji ne retko dovodi i do bolesnih stanja. U vezi sa tim, u tom kritičnom periodu nastaju i promene u aktivnosti regulatornih mehanizama. U poslednje vreme se sve više ističe da nedovoljno prilagođavanje endokrinog sistema u peripartalnom periodu predstavlja jedan od ključnih činilaca u narušavanju metaboličke ravnoteže i nastanku supkliničkih i kliničkih poremećaja zdravlja. Tu se pre svega misli na aktivnosti endokrinog pankreasa i tireoidee. U peripartalnom periodu nastaju u krvi krava značajne promene u koncentraciji insulina. Insulin je jedan od najvažnijih anaboličkih hormona, koji pored uloge u regulisanju metabolizma ugljenih hidrata, stimuliše proces lipogeneze u masnom tkivu. Insulinemija ima velika variranja u toku dana, što pre svega zavisi od režima ishrane i sastava obroka. Kako se insulinemija smanjuje pri kraju graviditeta i doseže najniži nivo u prvim nedeljama laktacije, smanjuje se i inhibitorni uticaj na proces lipolize. Zbog toga se uporedo sa smanjenjem insulinemije naglo povećava koncentracija slobodnih masnih kiselina u krvi. Time se stvara mogućnost da se stavljaju na raspolaganje dodatne količine energetskih prekurzora i tako pokriva deo nedostajuće energije iz alimentarnih izvora.

Rezultati ispitivanja koncentracije insulina u krvi krava uključenih u ovaj ogled ukazuju da je kod obe grupe krava insulinemija u periodu zasušenja bila približno ista. U ranom puerperijumu su ustanovljene znatno niže vrednosti koncentracije insulina u odnosu na vrednosti dobijene u antepartalnom periodu. Pri tome je kod krava koje su dobijale energetski dodatak smanjenje insulinemije bilo daleko manje izraženo nego kod krava kontrolne grupe. Već 30. dana laktacije je kod krava ogledne grupe ustanovljen značajan porast insulinemije i to, u većoj meri nego kod krava kontrolne grupe. Promene u koncentraciji insulina kako 30., tako i 60. dana laktacije ukazuju da su krave koje su dobijale energetski dodatak već 30. dana laktacije imale povoljniji energetski bilans, i da su 60. dana uspostavile energetsku ravnotežu između proizvodnih potreba i priliva energije iz alimentarnih izvora. Kod krava kontrolne grupe je isti nivo insulinemije (koji je kod krava ogledne grupe utvrđen 30. dana) utvrđen 60. dana laktacije, odnosno sa 30 dana zakašnjenja. To ukazuje da je korišćenje dodatnog izvora energije doprinelo bržem prilagođavanju organizma u uslovima negativnog bilansa energije i da je već 30. dana kod krava ogledne grupe došlo do uspostavljanja

energetske ravnoteže. Tome u prilog govore i rezultati dobijeni ispitivanjem koncentracija slobodnih masnih kiselina i BHBA. U prilog tome su i vrednosti HOMA indeksa, s obzirom da se kod krava ogledne grupe povećala osetljivost tkiva na insulin, pa je samim tim smanjena mogućnost korišćenja masnih kiselina iz telesnih izvora. Drugim rečima, koncentracije insulina, masnih kiselina i BHBA i vrednosti HOMA indeksa ukazuju da je kod krava ogledne grupe već 30. dana posle teljenja došlo do smanjenja intenziteta lipolize. Kod ovih jedinki su bile smanjene potrebe da u energetske svrhe koriste masne kiseline kao izvor energije.

Negativni bilans energije na početku laktacije je obično udružen sa niskom koncentracijom IGF-I koja je posledica smanjenje sinteze IGF-I u jetri goveda (*Sharma i sar., 1994*). U našem radu je kod obe grupe krava došlo do značajnog smanjenja koncentracije IGF-I u periodu od zasušenja do početka laktacije. Ipak, sedmog dana laktacije, prosečna koncentracija IGF-I je bila značajno veća kod krava koje su dobijale energetski dodatak u odnosu na kontrolnu grupu krava. Tretman glicerolom je takođe doveo do mnogo ranijeg porasta IGF-I postpartalno, što je verovatno povezano sa povoljnijim energetskim statusom ovih krava. Poznato je da IGF cirkuliše vezan za nekoliko IGF vezujućih proteina (IGFBP). Rezultati o prisustvu IGFBP u krvi krava u našem ogledu su u saglasnosti sa rezultatima *Cochick i sar. (1992)*. Glavni IGFBP u krvi je IGFBP-3, koji obično vezuje preko 75 % IGF-I. Vezivanje IGF-I za ovaj vezujući protein povećava njegov poluživot, u odnosu na slobodnu formu, i utiče na dostupnost IGF molekula različitim tkivima (*Kostecka i Blahovec, 2002*). U skladu sa rezultatima *Sharma i sar. (1994)* i *Formigoni i sar. (1996)* i naši rezultati su ukazali da je zastupljenost IGFBP-3, isto kao i IGF-I, najniža nakon teljenja, dok se zastupljenost IGFBP-2 i IGFBP-4 povećava u to vreme. Tridesetog dana posle teljenja zastupljenost IGFBP-2 i IGFBP-4 je bila i dalje povećana, a koncentracija IGFBP-3 je tada počela da raste. Šezdesetog dana posle teljenja zastupljenost IGFBP-3 se značajno povećala, dok je zastupljenost IGFBP-2 počela da pada a zastupljenost IGFBP-4 se nije promenila. Dodavanje glicerola u hranu je uslovalo raniji porast IGFBP-3. To je u saglasnosti sa rezultatima *Formigoni i sar (1996)*. Od 7. do 60. dana laktacije zastupljenost IGFBP-2 nije bila značajno niža u grupi koja je primala energetski dodatak, što bi bilo očekivano prema podacima iz literature (*Formigoni i sar., 1996*). Naime, IGFBP-2 u cirkulaciji bi trebao da bude u negativnoj korelaciji sa IGF-I (*Sharma i sar., 1994*) i očekivalo se da

zastupljenost IGFBP-2 padne u većoj meri kod grupe koja je primala energetske dodatke u odnosu na kontrolnu grupu od 7. do 60. dana laktacije. Niža koncentracija IGFBP-2 je obično udružena sa pozitivnim energetske bilansom krava. Veća zastupljenost IGFBP-2 kod ogledne grupe u odnosu na kontrolnu 60. dana laktacije verovatno ukazuje na povećanu sintezu IGFBP u jetrinim ćelijama uslovljenu energetskim dodatkom.

Poznato je da različite ćelije proizvode različite IGFBP. Tako IGFBP-3 proizvode Kupferove i endotelne ćelije, IGFBP-2 hepatociti a IGFBP-4 uglavnom hepatociti. IGFBP-2 se dodatno sintetiše u mnogim drugim tkivima kao u osteoblastima. Može se očekivati da energetske dodatke deluje različito na različite ćelije. Sinteza IGF-I i njegovih vezujućih proteina je modulirana hormonima na različitim nivoima. Insulin deluje inhibitorno na sintezu IGFBP-2 u jetri ali ne i osteoblastima (*Boni-Schnetzler i sar., 1990*). Trijodtironin utiče pozitivno na ekspresiju IGFBP-2 iRNK u hepatocitima kao i ekspresiju gena za enzima fosfoenolpiruvat karboksikinazu (PEPCK) u ćelijskim linijama odraslih pacova (*Pan i sar., 1990*). Ovaj enzim određuje stepen odigravanja glukoneogeneze u jetri i njegovu aktivnost smanjuje insulin. Iz ovoga se može zaključiti da je regulacija ekspresije iRNK za IGFBP-2 i PEPCK možda povezana. Podataka o zastupjenosti IGFBP-4 u krvi krava za sada nema u literaturi. Porast koncentracije ukupnih proteina može biti posledica povećane sinteze u jetri ili povećanog unosa proteina. S obzirom da su i ogledna i kontrolna grupa krava primale istu količinu proteina putem hrane, može se pretpostaviti da je viša koncentracija ukupnih proteina i albumina, kao i IGFBP-2 i IGFBP-4 u oglednoj grupi rezultat povećane sinteze u jetri.

U protekle dve decenije je došlo do značajnog povećanja proizvodnje mleka kod mlečnih krava, ali je to istovremeno u velikoj meri poremetilo reproduktivnu aktivnost visokomlečnih rasa. Nutritivna osnova ovog problema je bazirana na činjenici da su potrebe visokomlečnih krava na početku laktacije, kada se prinos mleka naglo povećava, veoma izražene pa zbog toga nastaje negativan bilans energije koji traje sve do osme odnosno dvanaeste nedelje laktacije.

Negativan postpartalni bilans energije može da prouzrokuje značajne endokrine promene koje su važni regulatorni mehanizmi procesa lipomobilizacije. U suštini lipomobilizacija je fiziološki proces koji, ukoliko se odigrava nekontrolisano, može da rezultira mnogobrojnim poremećajima u metabolizmu i reprodukciji životinja. U periodu do četiri nedelje posle teljenja negativan bilans energije je u visokoj korelaciji

sa prinosom mleka i intervalom do prve ovulacije. Danas postoje sigurni dokazi da broj ovulatomnih ćelija i estrusnih ciklusa, koji prethode osemenjavanju, utiču na rezultate koncepcije, tako da dužina postpartalnog perioda do prve ovulacije može da posluži kao važan parametar za procenu efekta negativnog bilansa energije na reproduktivne rezultate (Butler, 2000). Na osnovu bibliografskih podataka se može zapaziti da je kod krava kod kojih nastaju nagle i velike promene u telesnoj kondiciji u prvim nedeljama laktacije odložen estrus. Odložena pojava cikličnosti se u metaboličkom i hormonalnom pogledu karakteriše nižom koncentracijom glukoze, ukupnog holesterola, insulina, IGF-I i T₃ u krvi, a višom koncentracijom NEFA i BHBA u poređenju sa kravama koje ovuliraju do šeste nedelje laktacije. Rezultati ispitivanja u okviru ove doktorske disertacije govore u prilog rezultatima do kojih su došli drugi istraživači (Castañeda-Gutiérrez i sar., 2009). Naime, krave ogledne grupe koje su uspostavile energetska ravnotežu oko 30. dana laktacije su imale kraći servis period i značajan broj je koncipirao od 60. do 100. dana laktacije. Ovaj podatak ukazuje da, kako se kod krava popravljaju energetska bilansa tako se stvaraju mogućnosti da se ranije pojavljuje prvi postpartalni folikularni talas.

Po svemu sudeći, potencijalni metabolički signali za osovinu hipotalamus-prednji režanj hipofize – jajnik su biohemijski sastojci krvne plazme (NEFA i glukoza) i neki hormoni (hormon rast, insulin i IGF-I). Što se tiče NEFA i glukoze postoje kontradiktorna mišljenja, ipak postoje rezultati koji ukazuju da poremećaj metabolizma koji nastaje u periodu oko teljenja mogu da budu uzrok kvalitativnih promena oocita čiji razvoj počinje u ovom periodu. Pretpostavlja se da osim stanja negativnog bilansa energije i drugi činioci mogu da utiču nepovoljno na razvoj oocita u toku prve faze njihovog razvića. To su u prvom redu hipoglikemija, hiperketonemija i povećana koncentracije NEFA u krvi. U tom pogledu svakako je veoma značajna očuvanost funkcije jetre. Prema nekim podacima kod krava kod kojih je stepen zamašćenja jetre u ranom puerperalnom periodu 10 %, servis period je 140 dana, pri zamašćenju od 20 do 40 % je 187 dana, a kod krava sa zamašćenjem jetre preko 40 % servis period je najduži i prosečno iznosi 206 dana (Castañeda-Gutiérrez i sar., 2009). Izgleda da sposobnost životinja da što pre uspostave energetska ravnotežu utiče presudno kako na proizvodne rezultate tako i na reproduktivnu funkciju u ranoj fazi laktacije. Korišćenje energetska prekursora ima povoljan uticaj na proces prilagođavanja jer, sa jedne strane, to utiče na stepen lipomobilizacije i koncentraciju metabolita koji nepovoljno utiču na

sazrevanje jajnih ćelija a sa druge strane, na stimulaciju osovine za pravovremenu aktivaciju jajnika i prvu postpartalnu ovulaciju.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata istraživanja sprovedenih u okviru ove doktorske disertacije mogu se formulisati sledeći zaključci:

1. Kod krava koje su primale energetske dodatak tokom peripartalnog perioda postpartalni negativan bilans energije bio je slabije izražen. Naime, gubitak u telesnoj kondiciji u periodu od pre teljenja do posle teljenja kod ogledne grupe krava bio je u fiziološki prihvatljivim okvirima i značajno manji nego kod kontrolne grupe, dok je koncentracija NEFA 7. dana nakon teljenja bila značajno niža kod krava koje su dobijale energetske dodatak u odnosu na one koje nisu. To znači da je lipomobilizacija, kao mehanizam kojim se nadoknađuje negativan bilans energije kod krava tokom rane laktacije, bila umerenija.
2. Koncentracija insulina, tireoidnih hormona, IGF-I i njegovog glavnog vezujućeg proteina (IGFBP-3) je u krvi krava koje su primale energetske dodatak bila značajno viša posle teljenja, što dodatno ukazuje da su jedinke koje su primale dodatak bile u povoljnijem energetske statusu u odnosu na krave koje nisu dobijale dodatak.
3. Koncentracija ukupnog bilirubina kao pokazatelja funkcionalnog stanja jetre je 7. dana posle teljenja bila značajno niža kod krava koje su primale energetske dodatak u odnosu na krave koje ga nisu primale. Posledično su krave koje su primale dodatak imale nizak stepen zamašćenja jetre, dok su krave koje nisu primale dodatak imale srednji stepen zamašćenja jetre.
4. Parametri koji su odraz sintetske sposobnosti hepatocita (ukupni proteini, albumini, IGFBP-2 i -4) su bili značajno viši kod krava koje su primale dodatak u odnosu na krave koje nisu primale dodatak 7. dana posle teljenja.
5. Koncentracija IGF-I je u periodu od 7. do 60. dana posle teljenja bila značajno viša kod krava koje su primale energetske dodatak, što se može dovesti u vezu sa boljom reproduktivnom aktivnošću krava kod koje su dobijale energetske dodatak. Naime, servis period je kod njih bio značajno kraći nego kod krava koje nisu dobijale dodatak.
6. Koncentracija insulina, glukoze i ukupnih proteina je bila značajno viša a koncentracija BHBA i NEFA značajno niža 60. dana posle teljenja ukazujući da

su krave koje su primale dodatak brže izašle iz stanja negativnog bilansa. Posledično krave koje su dobijale energetski dodatak su imale značajno višu mlečnost 60. dana laktacije u odnosu na krave koje nisu dobijale dodatak.

8. LITERATURA

1. Accorsi PA, Govoni N, Gaiani R, Pezzi C, Seren E, Tamanini C, 2005, Leptin, GH, insulin and metabolic parameters throught the dry period and lactation in dairy cows, *Reprod Domest Anim*, 40, 217-23.
2. Adam CL, Gadd TS, Findlay PA, Wathes DC, 2000, IGF-I stimulation of luteinizing hormone secretion, IGF-binding proteins (IGFBPs) and expression of mRNAs for IGFs, IGF receptors and IGFBPs in the ovine pituitary gland. *J Endocrinol*, 166, 247-54.
3. Adashy EY, Resnick CE, Hurwitz A, 1992, The intra-ovarian IGF system. *Growth Regul*, 2, 10-15.
4. Aguado F, Fernandez T, Martinez-Murillo R, 1992, Immunocytochemical localization of insulin-like growth factor I in the hypothalamo-hypophyseal system of the adult rat, *Neuroendocrinology*, 56, 415-418.
5. Argov N, Arav A and Sklan D, 2004, Number of oocytes obtained from cows by OPU in early, but not late lactation increased with plasma insulin and estradiol concentrations and expression of mRNA of the FSH receptor in granulosa cells, *Theriogenology*, 61, 947-962.
6. Bar RS, Boes M, Clemmons DR, Busby WH, Sandra A, Dake BL, Booth BA, 1990, Insulin differentially alters transcapillary movement of intravascular IGFBP-1, IGFBP-2 and endothelial cell IGF-binding proteins in the rat heart, *Endocrinol*, 127, 497-9.
7. Barreca A, Ponzani P, Arvigo M, Giordano G, Minuto F, 1995, Effect of the acid-labile subunit on the binding of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 to (¹²⁵J)IGF-I, *J Clin Endocrinol Metabol*, 80, 1318-1324.
8. Bell AW, 1995, Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation, *J Anim Sci*, 73, 2804-2819.
9. Bergman EN, 1973, Glucose metabolism in ruminants as related to hypoglycemia and ketosis, *Corell Vet*, 221, 586-589.

10. Bishop DK, Watterman RP, Spicer LJ, 1994, Body energy reserves influence the onset of luteal activity after early weaning of beef cows, *J Anim Sci*, 72, 2703-2708.
11. Block SS, Butler WR, Ehardt RA, Bell AW, Van Amburgh ME, Boisclair YR, 2001, Decreased concentration of plasma leptin in periparturient dairy cows is caused by negative energy balance, *J Endocrinol*, 171, 2, 339-348.
12. Bobe G, Young JW, Beitz DC, 2004, Invited review: pathology, etiology and treatments of fatty liver in dairy cows, *J Dairy Sci*, 87, 3105-3124.
13. Bonczek RR, Young CW, Wheaton JE, Miller KP, 1988, Responses of somatotropin, insulin, prolactin and thyroxine to selection for milk yield in holsteins, *J Dairy Sci*, 71, 2470-2476.
14. Bondy C, Werner H, Roberts CT, LeRoith D, 1992, Cellular pattern of type-I insulin-like growth factor receptor gene expression during maturation of the rat brain: comparison with insulin-like growth factor I and II, *Neuroscience*, 46, 909-923.
15. Böni-Schnetzler M, Schmid C, Mary JL, Zimmerli B, Meier PJ, Zapf J, Schwander J, Froesch ER, 1990, Insulin regulates the expression of the insulin-like growth factor binding protein 2 mRNA in rat hepatocytes, *Mol Endocrinol*, 4, 1320-1326.
16. Bossaert P, Leroy JL, De Vliegher S, Opsomer G, 2008, Interrelationship between glucose-induced insulin response, metabolic indicators, and time of first ovulation in high-yielding dairy cows, *J Dairy Sci*, 91, 3363-3371.
17. Breier BH, 1999, Regulation of protein and energy metabolism by the somatotrophic axis, *Domestic Animal Endocrinology*, 17, 209-218.
18. Breukink HJ, Wensing TH, 1997, Pathophysiology of the liver in high yielding dairy cows and its consequences for health and production, *Israel J Vet Med*, 52, 2-3, 66-72.
19. Brugere-Picoux J, Brugere H, 1985, Le syndrome de la vache grasse, *Rec Med Vet*, 156, 3, 195-200.
20. Burns KN, 1963, A comparison of the glucogenic effects of some compounds used in the treatment of ketosis, *Veterinary Record*, 75, 30, 763-768.
21. Butler ST, Marr AL, Pelton SH, Radcliff RP, Lucy MC, Butler WR. 2003, Insulin restores GH responsiveness during lactation induced negative energy balance in

- dairy cattle: effect on expression of IGF-I and GH receptor 1A, *J Endocrinol*, 176, 205-17.
22. Butler WR, 2000, Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle, *Anim Reprod Sci*, 60, 449-57.
 23. Castañeda-Gutiérrez E, Pelton SH, Gilbert RO, Butler WR, 2009, Effect of peripartum dietary energy supplementation of dairy cows on metabolites, liver function and reproductive variables, *Anim Reprod Sci*, 112, 301-315.
 24. Chagas LM, Bass JJ, Blache D, Burke CR, Kay JK, Lindsay DR, Lucy MC, Martin GB, Meier S, Rhodes FM, Roche JR, Thatcher WW, Webb R, 2007, Invited review: New perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows, *J Dairy Sci*, 90, 4022-4032.
 25. Chagas LM, Lucy MC, Back PJ, Blache D, Lee JM, Gore PJ, 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.
 26. Clapperton JL, Czerkawski JW, 1972, Metabolism of propane-1:2-diol infused into the rumen of sheep, *Br J Nutr* 27, 553-560.
 27. Clemmons DR, 1997, Insulin-like growth factor binding proteins and their role in controlling IGF actions, *Cytokine Growth Factor Rev*, 8, 45-62.
 28. Cohick WS, McGuire MA, Clemmons DR, Bauman DE, 1992, Regulation of insulin-like growth factor-binding proteins in serum and lymph of lactating cows by somatotropin, *Endocrinology*, 130, 1508-1514.
 29. Collett-Solberg PF, Cohen P, 1996, The role of insulin-like growth factor binding proteins and the IGFBP proteases in modulating IGF action, *Endocrinol Metabol North Am*, 25, 591-614.
 30. Cox NM, Stuart MJ, Althen TG, 1987, Enhancement of ovulation rate in gilts by increasing dietary energy and administering insulin during follicular growth, *J Anim Sci*, 64, 507-516.
 31. Cozzi G, Berzaghi P, Gottardo F, Gabai G, Andrighetto I, 1996, Effect of feeding propylene glycol to mid-lactation dairy cows, *Anim Feed Sci Technol*, 64, 43-51.

32. Dawson JM, Greathead HM, Craigon J, Hachey DL, Reeds PJ, Pell JM, Buttery PJ, 1998, The interaction between nutritional status and growth hormone in young cattle; differential responsiveness of fat and protein metabolism, *Br J Nutr*, 79, 275-286.
33. De Wit AAC, Cesar MLF , Kruip TAM, 2001, Effect of urea during in vitro maturation on nuclear maturation and embryo development of bovine cumulus-oocyte-complexes, *J Dairy Sci*, 84, 1800–1804.
34. DeFrain JM, Hippen AR, Kalscheuer KF, Jardon PW, 2004, Feeding glycerol to transition dairy cows: effects on blood metabolites and lactation performance, *J Dairy Sci*, 87, 4195-4206.
35. Donkin SS; Koser SL, White HM, Doane PH, Cecava MJ, 2009, Feeding value of glycerol as a replacement for corn grein in rations fed to lactating dairy cows, *J Dairy Sci*, 92, 5111-5119.
36. Drackley JK, Overton TR, and Douglas GN, 2001, Adaptations of glucose and long –chain fatty acids metabolism in liver of dayri cows during the periparturient period, *J Dairy Sci*, 84 (E: Supl) E100-E112.
37. Drenth JP, van Uum SH, van Deuren M, Pesman GJ, van der Ven Jongekrijg J, van der Meer JW, 1995, Endurance run increases circulating IL-6 and IL-1ra but downregulates ex vivo TNF-alpha and IL-1 beta production, *J Appl Physiol* 79, 1497-1503.
38. Duffield TF, Sandals D, Leslie KE, Lissemore K, McBride BW, Lumsden JH, Dick P, Bagg R, 1998, Effect of prepartum administration of monensin in a controlledrelease capsule on postpartum energy indicators in lactating dairy cows, *J Dairy Sci*, 81, 2354-2361.
39. Emery RS, Liesman JS, Herdt TH, 1992, Metabolism of long chain fatty acids by ruminant liver, *J Nutr*, 122, 832-837.
40. Filar J, Kandefor-Szerszen M, Szuster-Ciesielska A, Rzeski W, 1992, Effects of cold treatment and ketosis induced by starvation on interferon production in leukocytes of lactating cows, *Dtsch Tieraerztl Wochenschr*, 99, 210-213.
41. Formigoni A, Cornil MC, Prandi A, Mordentu A, Rossi A, Portetelle d, Ranaville R, 1996, Effect of propiylene glycol supplementation around parturition on milk yield,

reproduction performance and some hormonal and metabolic characteristics in dairy cows, *J Dairy Res*, 63, 11-24.

42. Fottner C, Engelhardt D, Weber MM, 1999, Characterization of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) secreted by bovine adrenocortical cells in primary culture: regulation by insulin-like growth factors (IGFs) and adrenocorticotropin (ACTH), *Horm Met Res*, 31, 203-8.
43. Fukatsu A, Sato N, Shimizu H, 1996, Fifty-mile walking race suppresses neutrophil bactericidal function by inducing increases in cortisol and ketone bodies, *Life Sci*, 58, 2337-2343.
44. Geelen MJ, Wensing T, 2006, Studies on hepatic lipidosis and coinciding health and fertility problems of high-producing dairy cows using the „Utrecht fatty liver model of dairy cows“. A review, *Vet Q*, 28, 90-104.
45. Gluckman PD, Breier BH, Davis SR, 1987, Physiology of the somatotrophic axis with particular reference to the ruminant, 70, 442-466.
46. Goff JP, Horst RL, 2001, Oral glycerol as an aid in the treatment of ketosis/fatty liver complex, *J Dairy Sci*, 84 (Suppl 1), 153-154 (Abst).
47. Grubić G, Adamović M, 2003, *Ishrana visokoproduktivnih krava*, Beograd.
48. Griyard J, Dardeved D, Papet I, Massoni L, Mirand P, Attaix D, Tauveron I, Bonin D, Arnal M, 1995, Nutrient regulation of skeletal muscle protein metabolism in animals. The involvement of hormones and substrates, *Nutr Res Rev*, 8, 67-97.
49. Gróhn Y, Rossow N, 1963, Ultrastructural changes of the liver in spontaneously ketotic cows, *J Comp Path*, 93, 443-452.
50. Gross J, van Dorland HA, Bruckmaier RM, Schwarz FJ, 2011, Performance and metabolic profile of dairy cows during a lactational and deliberately induced negative energy balance with subsequent realimentation, *J Dairy Sci*, 94, 4, 1820-30.
51. Grum DE, Drackley JK, Younker RS, LaCount DW, Veenhuizen JJ, 1996, Nutrition during the dry period and hepatic lipid metabolism of periparturient cows, *J Dairy Sci*, 79, 1850-1864.
52. Grummer RR, 2008, Nutritional and management strategies for the prevention of fatty liver in dairy cattle, *Vet J*, 176, 10-20.

53. Grummer RR, Winkler JC, Bertics SJ, Studer VA, 1994, Effect of propylene glycol dosage during feed restriction on metabolites in blood in prepartum Holstein heifers, *J Dairy Sci*, 77, 3618-3623.
54. Guretzky NA, Carlson DB, Garrett JE, Drackley JK, 2006, Lipid metabolite profiles and milk production in Holstein and Jersey cows fed rumen-protected choline during the peripartal period, *J Dairy Sci*, 89, 188-200.
55. Hadsell DL, Baumrucker CR, Kensinger RS, 1993, Effects of elevated blood insulin-like growth factor-I (IGF-I) concentrations during the colostrum phase, *J Endocrinol*, 137, 223-230.
56. Herdt TH, 2000, Ruminant adaptation to negative energy balance, *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 16, 215–230.
57. Hiney JK, Ojeda SR, LesDees W, 1991, Insulin-like growth factor I: possible metabolic signal involved in the regulation of female puberty, *Neuroendocrinology*, 54, 420-423.
58. Hojovcova M, Kacafirek A, 1967, Liver biopsy in cattle, *Acta Universitatis Agriculture*, 36, 513-520.
59. Holly JMP, 1991, The physiological role of IGFBP-1, *Acta Endocrinologica (Copenh)*, 124, 55-62.
60. Hossner KL, Yemm R, Vierck J, Dodson MV, 1997, Insulin-like growth factor (IGF)-I and -II and IGFBP secretion by ovine satellite cell strains grown alone or in coculture with 3T3-L1 preadipocytes, *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 33, 791-795.
61. Houseknecht KL, Baile CA, Matteri RL, Spurlock ME, 1998, The biology of leptin: a review, *J Anim Sci*, 76, 1405-1420.
62. Iwata H, Inoue J, Kimura K, Kuge T, Kuwayama T, Monji Y, 2006, Comparison between the characteristics of follicular fluid and the developmental competence of bovine oocytes, *Animal Reproduction Science*, 91, 215–223.
63. Jones JI, Clemmons DR, 1995, Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions, *Endocrine Reviews*, 16, 3–34.
64. Jorristma R, 2003, Negative energy balance in dairy cows related to fertility, PhD thesis, Utrecht.

65. Jorritsma R, Cesar ML, Hermans JT, Kruitwagen CLJJ, Vos PLAM, Kruip TAM, 2004, Effects of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cells and developmental potential of oocytes in vitro, *Animal Reproduction Science*, 81, 225–235.
66. Jukola E, Hakkarainen J, Saloniemi H, Sankari S, 1996, Blood selenium, vitamin E, vitamin A and beta-carotene concentrations and udder health, fertility treatments and fertility, *J Dairy Sci*, 79, 838-845.
67. Kaneko JJ, 1989, *Clinical biochemistry of domestic animals*, Acad Pres Inc, New York.
68. Kapp P, Pethes Gy, Zsiros M, Chuster Z, 1979, Data on the pathogenesis of fatty liver disease in high producing dairy cows, *Magyar Allatorvosok Lapja*, 34, 458-461.
69. Kessel S, Stroehl M, Meyer HH, Hiss S, Sauerwein H, Schwarz FJ, Bruckmaier RM, 2008, Individual variability in physiological adaptation to metabolic stress during early lactation in dairy cows kept under equal conditions, *J Anim Sci*, 86, 2903-2912.
70. Kida K, 2003, Relationship of metabolic profiles to milk production and feeding in dairy cows, *J vet Med Sci*, 65, 6, 671-677.
71. Kirovski D, Sladojević Ž, Stojić V, Vujanac I, Lazarević M, Radovanović A, Savić Đ, Nedić O, 2012, Effect of peripartum dietary energy supplementation on thyroid hormones, insulin-like growth factor-I and its binding proteins in early lactation dairy cows, *Acta Veterinari Beograd*, 62, 403-414.
72. Klucinski W, Degorski W, Miernik-Degorska E, Targowski S, Winnicka A, 1988, Effect of ketone bodies on the phagocytic activity of bovine milk macrophages and polymorphonuclear leukocytes, *J Vet Med A*, 35, 632-639.
73. KostECKA Z, Blahovec J, 2002, Animal insulin-like growth factor binding proteins and their biological functions, *Vet Med-Czech*, 47, 75-84.
74. Kremer WDJ, Burvenich C, Noordhuizen-Stassen EN, Grommers FJ, Schukken YH, Littledike ET, Whipp SC, Witzel DA, Baetz AL, 1993, *Insulin, corticoids, and parturient paresis*, Academic Press, New York, NY.

75. LeBlanck S, 2010, Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period, *J Reprod Dev*, 56, S29-S35.
76. Leroy JLMR, Soom AV, Opsomer G, Bols PEJ, 2008, The consequences of metabolic changes in high-yielding dairy cows on oocyte and embryo quality, *Animal*, 1120-1127.
77. Leroy JLMR, Vanholder T, Opsomer G, van Soom A, de Kruif A, 2006, The invitro development of bovine oocytes after maturation in glucose and hydroxybutyrate concentrations associated with negative energy balance in dairy cows, *Reproduction in Domestic Animals*, 41, 119–123.
78. Lewitt MS, Saunders H, Baxter RC, 1992, Regulation of rat insulin-like growth factor-binding protein-1: The effects of insulin-induced hypoglycemia, *Endocrin*, 131, 2357-2364.
79. Mayes PJ, 1989, Harperov pregled biohemije, Beograd.
80. McCarthy RD Jr, Klusmeyer TH, Vicini JL, Clark JH, Nelson DR, 1989, Effect of source of protein and carbohydrate on ruminal fermentation and passage of nutrients to the small intestine of lactating cows, *J Dairy Sci*, 72, 2002-16.
81. McGuire MA, Vicini JL, Bauman DE, Veenhuizen JJ, 1992, Insulin-like growth factors and binding proteins in ruminants and their nutritional regulation, *J Anim Sci*, 70, 2901-2910.
82. McGuire MA, Bauman DE, Dwyer DA, Cohick WS, 1995, Nutritional modulation of the somatotropin/insulin-like growth factor system: response to feed deprivation in lactating cows, *J Nutr*, 125, 493-502.
83. Miyoshi S, Pate JL, Palmquist DL, 2001, Effects of propylene glycol drenching on energy balance, plasma glucose, plasma insulin, ovarian function and conception in dairy cows, *Animal Reproduction Science*, 68, 29-43.
84. Monget P, Monniaux D, 1995, Growth factors and the control of folliculogenesis, *J Reprod Fertil*, 49 (Suppl), 321-333.
85. Morrow DA, 1976, Fat cow syndrome, *J Dairy Sci*, 59, 9, 1625-1632.
86. Murphy LJ, 1998, Insulin-like growth factor binding proteins: functional diversity or redundancy?, *J Mol Endocrinol*, 21, 97-107.

87. Nafikov RA, Beitz DC, 2007, Carbohydrate and lipid metabolism in dairy cows, *J Nutr*, 137, 702-705.
88. Nielsen MO, Riis PH, 1993, Somatotropin, Insulin-like growth Factor-I and the mammary gland in regulation of nutrient and Energy metabolism during early lactation, *Acta Vet Scand, Suppl*, 89, 47-54.
89. Nikolić JA, 1996, Hormonalna regulacija prometa energije u peripartalnom periodu krava, *Zbornik radova 2. simpozijuma „Ishrana, reprodukcija i zaštita zdravlja goveda“*, 92-106.
90. NRC, 2001, *Nutrient Requirements of Dairy Cattle. Seventh Revised Edition*, National Academy Press, Washington DC.
91. Obračević Č, 1990, *Ishrana goveda*, Beograd.
92. Oetzel GR, 2004, Monitoring and testing dairy herds for metabolic diseases, *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 20, 651-674.
93. Osman MA, Allen PS, Mehyar NA, Bobe G, Coetzee JF, Koehler KJ, Beitz DC, 2008, Acute metabolic responses of postpartal dairy cows to subcutaneous glucagons injections, oral glycerol, or both, 91, 3311-3322.
94. Ospina PA, Nydam DV, Stokol T, Overton TR, 2010, Evaluation of nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: critical thresholds for prediction of clinical diseases, *J Dairy Sci*, 93, 546-54.
95. Overton TR, Waldron MR, 2004, Nutritional management of transition dairy cows: , *J Dairy Sci*, E. Suppl strategies to optimize metabolic health. E105-E119.
96. Pan CJ, Hoepfner W, Chou JY, 1990, Effect of thyroid status on insulin-like growth factor-I, growth hormone and insulin are modified by food intake, *Biochemistry*, 29, 10883-10888.
97. Pezzi C, Accorsi PA, Vigo D, Govoni N, Gaiani R, 2003, 5'-deiodinase activity and circulating thyronines in lactating cows, *J Dairy Sci*, 86, 152-8.
98. Piccone G, Messina V, Schembari A, Casella S, Giennetto C, Alberghina D, 2011, Pattern of serum protein fraction of dairy cows during different stages of gestation and lactation, *J Dairy Res*, 78, 421-5.

99. Prodanović R, Kirovski D, Šamanc H, Vujanac I, Ivetić V, Savić B, Kureljušić B, 2012, Estimation of herd-basis energy status in clinically healthy Holstein cows: practical implications of body condition scoring and shortened metabolic profiles, *African Journal of Agricultural Research*, 7, 3, 418-425
100. Reid IM, 1973, An ultrastructural and morphometric study of the liver of the lactating cows in starvation ketosis, *Experimental and Molecular Pathology*, 18, 316-330.
101. Roche JR, Friggens NC, Kay JK, Fisher MW, Stafford KJ, Berry DP, 2009, Invited review: Body condition score and its association with dairy cows productivity, health, and welfare, *J Dairy Sci*, 92, 12, 5769-5801.
102. Rutter LM, Snopce R, Manns JG, 1989, Serum concentrations of IGF-I in postpartum beef cows, *J Anim Sci*, 67, 2060-2066.
103. Stojić V, Gvozdić D, Kirovski D, Nikolić JA, Huszenicza Gy, Šamanc H, Ivanov I. 2001, Serum thyroxine and triiodothyronine concentrations prior to and after delivery in primiparous Holstein cows, *Acta Veterinaria Beograd*, 51, 3-8.
104. Šamanc H, Damnjanović Z, Nikolić JA, Radojičić B, Anđelković M, Lekić N, 1993, Endokrina regulacija metaboličkih procesa kod krava u graviditetu i laktaciji, *Veterinarski glasnik*, 47, 319-327.
105. Šamanc H, Kirovski D, Jovanović M, Vujanac I, Bojković-Kovačević S, Jakić-Dimić D, Prodanović R, Stajković S, 2010b, New insights into body condition score and its association with fatty liver in Holstein dairy cows, *Acta veterinaria Beograd*, 60, 525-540.
106. Šamanc H, Kirovski Danijela, Stojić V, Stojanović D, Vujanac I, Prodanović R, Bojković-Kovačević S, 2011, Application of metabolic profile test in the prediction and diagnosis of fatty liver in Holstein cows, *Acta Veterinaria Beograd*, 61, 6, 543-553
107. Šamanc H, Sinovec Z, Cernescu H, 2005, Osnovi poremećaja prometa energije visoko-mlečnih krava, *Zbornik radova „Isхранa, reprodukcija i zdravlje goveda“*, Subotica.

108. Šamanc H, Stojić V, Kirovski D, Jovanović M, Cernescu H, Vujanac I, Prodanović R, 2008, Uticaj telesne kondicije krava na učestalost i stepen zamašćenja jetre, Veterinarski glasnik, 62, 3-12.
109. Šamanc H, Nikolić JA, Bugarski D, Kulcsar M, Ivanov I, Huszenica Gy, 1999, Glycemia, glucocorticoids and adrenocortical reserve in postpartal dairy cows, Acta Veterinaria Beograd, 49, 5-6, 281-288.
110. Šamanc H, Nikolić JA, Gall T, Đoković R, Ivanov I, 1998, Peripheral concentrations of circulating insulin, insulin-like growth factor-I, lipids and glucose in healthy and ketotic cows a few days post partuum, 10th International Conference on Production Diseases in Farm Animals, Utrecht, Abstracts.
111. 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.
112. Šamanc H, Kirovski D, Adamović M, Vujanac I, Prodanović R., Radivojević JM, Nikić D, Tulcan C, 2010a, Uticaj dodavanja energetskog dodatka u hrani na zdravstveno stanje i proizvodne rezultate visokomlečnih krava, Veterinarski glasnik, 64, 197-206.
113. Šamanc H, Kirovski D, Jovanović M, Vujanac I, Bojković-Kovačević S, Jakić-Dimić D, Prodanović R, Stajković S, 2010c, New insights into body condition score and its association with fatty liver in Holstein dairy cows, Acta veterinaria Beograd, 60, 525-540.
114. Sartin JL, Kempainen RJ, Cummis KA, Williams JC, 1988, Plasma concentrations of metabolic hormones in high and low production dairy cows, J Dairy Sci, 71, 650-657.
115. Sato S, Suzuki T, Okada K, 1995, Suppression of mitogenic response of bovine peripheral blood lymphocytes by ketone bodies, J Vet Med Sci, 57, 183-185.
116. Scharma BK, Vandehaar MJ, Ames NK, 1994, Expression of insulin-like growth factor at different stages of lactation and in late lactation cows treated with somatotropin, J Dairy Sci, 77, 2232-2241.

117. Schwalm W, Schultuz L, 1976, Relationship of insulin concentration to blood metabolites in the dairy cows, *J Dairy Sci*, 59, 255-261.
118. Sharma BK, Vandehaar MJ, Ames NK, 1994, Expression of insulin-like growth factor-I in cows at different stages of lactation and in late lactation cows treated with somatotropin, *J Dairy Sci*, 77, 2232-41.
119. Suriyasathaporn W, 2000, Energy balance in postpartum dairy cows: its effect on clinical mastitis and reproduction performance, PhD thesis, Utrecht.
120. Sutton DJ, Oldham DJ, Hart CI, 1980, Product of digestion, hormones and energy utilization in milking cows given concentrates containing varying proportions of barley or maize, *Energy Metabolism, Proceeding of Eight Symposium on Energy Metabolism*, Butterworths, London.
121. Thissen JP, Ketelslegers JM, Underwood LE, 1994, Nutritional regulation of the insulin-like growth factors, *Endocrine Review*, 15, 80-101.
122. Thorup VM, Edwards D, Friggens NC, 2012, On-farm estimation of energy balance in dairy cows using only frequent body weight measurements and body condition score, *J Dairy Sci*, 95, 4, 1784-1793.
123. Urbaneck D, Rossow N, 1963, Zum Ablauf der pathologischen Leberveränderungen bei der Azetonurie des Rindes, *Mh Med Vet*, 18, 167-172.
124. van der Walt JG, Linington MJ, 1989, A review of energy metabolism in producing ruminants. Part 1: Metabolism of energy substrates, *J S Afr Vet Assoc*, 60, 4, 223-227.
125. VanWerven T, Noordhuizen-Stassen EN, Daemen AJ, Schukken YH, **Brand A**, Burvenich C, 1997, Preinfection in vitro chemotaxis, phagocytosis, oxidative burst, and expression of CD11/CD18 receptors and their predictive capacity on the outcome of mastitis Relation between metabolic status around parturition and the outcome of an experimentally induced *Escherichia coli* mastitis in dairy cows, *J Dairy Sci*, 80, 67-74.
126. Vaughn A, Studer RC, Grummer R, Bartics S, 1993, Effects of prepartum propylene glycol administration on periparturient fatty liver in dairy cows, *J Dairy Sci*, 2931-2939.

127. Vazguezanon M, Bertices S, Luck M, Grummer R, 1994, Peripartum liver triglyceride and plasma metabolites in dairy cows, *J Dairy Sci*, 77, 1521-1528.
128. Veenhuizen JJ, Drackley JK, Richard MJ, Sanderson TP; Miller LD, Joung JW, 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.
129. Vibart RE, Washburn SP, Green JT Jr, Benson GA, Williams CM, Pacheco D, Lopez-Villalobos N, 2012, Effects of feeding strategy on milk production, reproduction, pasture utilization, and economics of autumn-calving dairy cows in eastern North Carolina, *J Dairy Sci*, 95, 997-1010.
130. Vicini JL, Buonomo FC, Veenhuizen JJ, Miller MA, Clemmons DR, Collier RJ, 1991, Nutrient balance and stage of lactation affect responses of insulin, insulin-like growth factors-I and II, and insulin-like growth factor-binding protein 2 to somatotropin administration in dairy cows, *J Nutrition*, 121, 1656–1664.
131. von Sosten D, Meyer U, Piechotta M, Flachowsky G, Dänicke S, 2012, Effect of conjugated linoleic acid supplementation on body composition, body fat mobilization, protein accretion, and energy utilization in early lactation dairy cows, *J Dairy Sci*, 95, 1222-1239.
132. Webster J, 1993, *Understanding the dairy cow*, 2nd Edition, Blackwell Science, Oxford, United Kingdom.
133. Weibel ER, 1979, *Stereological Methods. 1. Practical Methods for Biological Morphometry*, Academic Press, London.
134. Wentik GH, Rutten VP, van den Ingh TS, Hoek A, Muller KE, Wensing T, 1997, Impaired specific immunoreactivity in cows with hepatic lipidosis, *Vet Immunol Immunopathol*, 56, 77-83.

BIOGRAFIJA

Željko (Žarko) Sladojević rođen je 23. novembra 1969. godine u Gradišci, Bosna i Hercegovina. Po završetku Osnovne škole u Novoj Topoli, 1984. godine upisao je Poljoprivrednu školu u Banja Luci i stekao zvanje vetrinarski tehničar. Veterinarski fakultet upisao je 1988. godine u Sarajevu, a diplomirao 22.09.1994. godine u Beogradu na odseku veterinarska medicina sa prosečnom ocenom 8,42. U periodu od 01.10.1994. do 01.09.1997. godine je radio u VSC Krnjača u Beogradu. Od 01.09.1997. godine bio je zaposlen u AD Veterinarska stanica Gradiška. Privatnu veterinarsku praksu započeo je 2001. godine, a od 2006. godine poslove veterinarske delatnosti obavlja u sastavu D.O.O. Veterina - sistem Sladojević.

Doktorske akademske studije na Fakultetu vetrinarske medicine Univerziteta u Beogradu upisao je 2008/09 godine i položio sve ispite sa prosečnom ocenom 9,00. Kao autor ili koautor do sada je objavio 10 naučnih radova, od koji je jedan rad iz doktorske disertacije objavljen u časopisu sa SCi liste (*Kirovski D, Sladojević Željko, Stojić V, Vujanac I, Lazarević M, Radovanović A, Savić Đ, Nedić O, 2012, Effect of peripartum dietary energy supplementation on thyroid hormones, insulin-like growth factor-I and its binding proteins in early lactation dairy cows, Acta Veterinaria Beograd, 62, 403-419*). Aktivni je učesnik domaćih i regionalnih naučnih i stručnih skupova iz oblasti veterinarske medicine i poljoprivrede. Trenutno je učesnik u realizaciji jednog naučno-istraživačkog projekata finansiranog od strane Ministarstva nauke i tehnologije Vlade Republike Srpske.

Stručni ispit za doktora veterinarske medicine položio je 2000. godine. Posедуje licencu za samostalan rad. Član je Izvršnog odbora Veterinarske komore Republike Srpske i na funkciji potpredsednika od 2008. godine.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани: Жељко Сладојевић

број уписа _____

Изјављујем

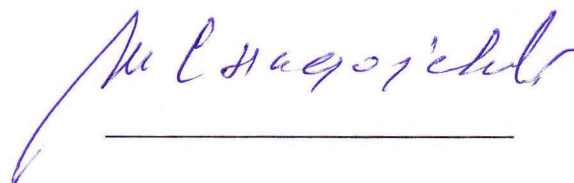
да је докторска дисертација под насловом

Утицај енергетског биланса на ендокрини и метаболички статус крвава

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду,



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Жељко Сладојевић

Број уписа _____

Студијски програм: Докторске академске студије

Наслов рада: Утицај енергетског биланса на ендокрини и метаболички статус
крава

Ментор: Проф. др Данијела Кировски

Потписани: Жељко Сладојевић

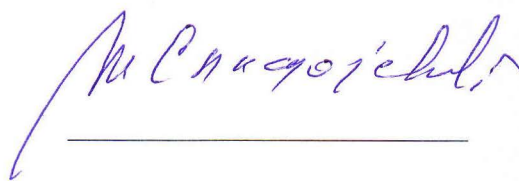
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду,



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом: Утицај енергетског биланса на ендокрини и метаболички статус крва која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду,

