



UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET
DEPARTMAN ZA VETERINARSKU MEDICINU

**PATOFIZIOLOŠKA PROCENA
PERIPARTALNOG METABOLIČKOG STRESA
KOD VISOKOPRODUKTIVNIH KRAVA
UPOTREBOM ENDOKRINIH I METABOLIČKIH
KRITERIJUMA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor: Prof. dr Branislava Belić

Kandidat: Marko R. Cincović

Novi Sad, 2013. godine

IZJAVA ZAHVALNOSTI

*Čovek i njegovo kompletno delovanje zavise od
karaktera i intelekta. Karakterne osobine stiču se genetikom,
dok je intelekt svojstvo koje se stiče u
interakciji sa ljudima i poslom koji radimo.*

*Zahvaljujem se mojim roditeljima i porodici od koje sam nasledio
karakterne osobine korisne za bavljenje istraživačkim radom.*

*Zahvaljujem se svim ljudima koji su na najdivniji mogući
način učestvovali u mom privatnom i profesionalnom životu i
širili moje intelektualne horizonte.*

*Zahvaljujem se članovima komisije za ocenu i odbranu
ove doktorske disertacije: prof.dr Branislavi Belić,
prof.dr Slavči Hristov, prof. dr Biljani Radojičić,
prof.dr Radojici Đokoviću i dr Vojinu Ivetiću na efikasnosti,
korisnim savetima i podršci pruženoj na svim poljima
pre, tokom i posle izrade disertacije.*

*Posebno bih se zahvalio mojoj mentorki prof.dr Branislavi Belić
koja tokom rada sa mnom nikada nije odustajala od glavnog principa
a to je čovekoljublje, čime mi je omogućila da živim moj najveći san –
da idem kroz život verujući u ljudsku reč i dogovorene vrednosti.*

*Na posletku bih se zahvalio onima koji su moj glavni
motiv, smisao, radost i podrška – mojoj voljenoj porodici .*

*Ipak, zahvalnost nije izreći ga, zahvalnost je živeti prema tim osećajima
i zato svima vama posvećujem ovaj doktorat.*

Marko R. Cincović

obrazac 5a

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET**

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Marko R. Cincović
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof.dr Branislava Belić, vanredni profesor
Naslov rada: NR	PATOFIZIOLOŠKA PROCENA PERIPARTALNOG METABOLIČKOG STRESA KOD VISOKOPRODUKTIVNIH KRAVA UPOTREBOM ENDOKRINI I METABOLIČKIH KRITERIJUMA
Jezik publikacije: JP	Srpski jezik
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2013.
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	21000 Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8

Fizički opis rada: FO	9 poglavlja (CV autora), 181 strana, 12 tabela, 107 grafikona, 1 slika, 2 šeme i 297 citiranih referenci, izjava zahvalnosti
Naučna oblast: NO	Medicina – Veterinarska medicina
Naučna disciplina: ND	Patološka fiziologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	krave, stres, metabolizam, endokrini status, rana laktacija
UDK	616-092:599.735.5(043.3)
Čuva se: ČU	Biblioteka Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu
Važna napomena: VN	/
Izvod: IZ	Period rane laktacije odlikuje se negativnim energetske bilansom i stanjem metaboličkog stresa. Ovakvo stanje nastaje kao posledica smanjenog unosa hrane, porođaja i započinjanja laktacije. Usled negativnog energetske bilansa organizam povećano troši sopstvene rezerve i ulazi u fazu katabolizma. Cilj ove disertacije je da se ispita metabolička, hematološka, celularna i proizvodna adaptacija krava u funkciji delovanja anaboličkih i kataboličkih indikatora stresa. Katabolički indikatori stresa su: neesterifikovane masne kiseline (čija koncentracija raste kao posledica povećane lipidne mobilizacije) i kortizol (čija vrednost raste usled stresa tokom porođaja). Anabolički indikatori su: insulin (anabolički hormone u organizmu sisara) i IGF-I (indikator anaboličkog delovanja STH). Krave su klasifikovane na osnovu pojedinačnog i kombinovanog delovanja anaboličkih i kataboličkih indikatora stresa. Upotreba četiri odabrana indikatora metaboličkog stresa (insulin, IGF-I, NEFA i kortizol) u prvoj nedelji posle teljenja može pomoći u analizi metaboličkog stresa i produktivnosti krava, što se zaključuje na osnovu delovanja indikatora

	<p>stresa na metabolički profil, krvnu sliku, imunološke i celularne parametre, telesnu kondiciju, proizvodnju mleka i reproduktivnu efikasnost krava. Vrednosti anaboličkih i kataboličkih indikatora se mogu koristiti samostalno ili u kombinaciji, a najbolju mogućnost procene daje upotreba NEFA bilo da se radi o pojedinačnoj ili kombinovanoj upotrebi indikatora. Određivanjem koncentracije navedena četiri indikatora metaboličkog stresa u prvoj nedelji posle teljenja možemo predvideti karakter metabolizma, dubinu metaboličkog stresa i proizvodnju krava u laktaciji koja sledi.</p>
Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	26.10.2012.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	<p>Predsednik komisije: Prof.dr Slavča Hristov, red.prof., Poljoprivredni fakultet, Zemun.</p> <p>Član1: Prof.dr Branislava Belić, vanr.prof., Poljoprivredni fakultet, Novi Sad</p> <p>Član2: Prof.dr Biljana Radojičić, red.prof., Fakultet veterinarske medicine, Beograd</p> <p>Član3: Prof.dr Radojica Đoković, red.prof., Agronomski fakultet, Čačak</p> <p>Član4: Dr Vojin Ivetić, viši naučni saradnik, Naučni institute za veterinarstvo Srbije, Beograd</p>

University of Novi Sad
Faculty
Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Marko R. Cincović
Mentor: MN	Dr Branislava Belić, associate professor
Title: TI	PATHOPHYSIOLOGICAL ASSESSMENT OF PERIPARTURIENT METABOLIC STRESS IN HIGHLY-PRODUCTIVE COWS BY USING A ENDOCRINE AND METABOLIC CRITERIA
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2013
Publisher: PU	Authors reprint
Publication place: PP	21000 Novi Sad, Dositej Obradović sq. 8

Physical description: PD	No of chapters 9 (with CV), No of pages 181, No of tables 12, No of graphs 107, No of shemes 2, No of pictures 1, No of cited references 297, acknowledgments
Scientific field SF	Medicine – Veterinary medicine
Scientific discipline SD	Pathophysiology
Subject, Key words SKW	cows, stress, metabolism, endocrine status, early lactation
UC	616-092:599.735.5(043.3)
Holding data: HD	Library at Faculty of Agriculture Novi Sad
Note: N	/
Abstract: AB	Early lactation period is characterized by negative energy balance and metabolic stress condition. This situation arises as a consequence of reduced food intake, birth and initiation of lactation. Due to negative energy balance increased body using own reserves and is entering to a phase of catabolism. The goal of this dissertation is to examine the metabolic, hematologic, and cellular adaptation of cows in production function and anabolic activity of catabolic stress indicators. Catabolic stress indicators are nonesterified fatty acids - NEFA (whose concentration increases as a result of increased lipid mobilization) and cortisol (the value of which increases due to stress during labor). Anabolic indicators were: insulin (anabolic hormones in mammals) and IGF-I (an indicator of anabolic activity STH). Cows were classified on the basis of individual and combined effects of anabolic and catabolic stress indicators. Using the four selected indicators of metabolic stress (insulin, IGF-I, NEFA and cortisol) in the first week after calving can help in the analysis of metabolic stress and productivity of cows, which

	<p>concludes on the basis of indicators of stress effects on metabolic profile, blood count, and cellular immune parameters, body condition, milk production and reproductive efficiency of cows. Anabolic and catabolic values of indicators may be used singly or in combination, and provides the best opportunity to assess the use of NEFA either a single or combined use of indicators. It is possible to use concentrations of the four indicators of metabolic stress in the first week after calving predict the nature of metabolism, metabolic stress and depth of production in cows in the next lactation.</p>
Accepted on Scientific Board on: AS	26.10.2012.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>President: Dr Slavča Hristov, full prof., Faculty of Agriculture, Zemun.</p> <p>Member1: Dr Branislava Belić, associate prof., Faculty of Agriculture, Novi Sad</p> <p>Member2: Dr Biljana Radojičić, full prof., Faculty of Veterinary Medicine, Beograd</p> <p>Member3: Dr Radojica Đoković, full prof., Faculty of Agronomy, Čačak</p> <p>Member4: Dr Vojin Ivetić, higher sci. associate, Scientific Veterinary institute Serbia, Beograd</p>

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE.....	3
2.1. Smanjen unos hrane, negativni energetske bilans i metabolički stres krava u peripartalnom periodu – opšte karakteristike.....	3
2.2. Endokrina adaptacija krava na peripartalni metabolički stres.....	9
2.2.1. Kortizol.....	9
2.2.2. Somatotropni hormon (STH) i insulinu sličan faktor rasta (IGF-I).....	11
2.2.3. Insulin i insulinska rezistencija.....	14
2.3. Metabolička adaptacija krava na peripartalni metabolički stres.....	18
2.3.1. Metabolički pokazatelji energetskeg statusa	18
2.3.2. Metabolički pokazatelji proteinskog statusa.....	22
2.3.3. Metabolički pokazatelji funkcionalnog statusa jetre.....	24
2.3.4. Metabolički pokazatelji oksidativnog opterećenja.....	27
2.3.5. Metabolizam minerala.....	29
2.4. Hematološka adaptacija i krvna slika u peripartalnom periodu.....	32
2.5. Imunološka adaptacija krava na peripartalni metabolički stres.....	36
2.6. Celularna adaptacija krava na peripartalni metabolički stres (Hsp70).....	38
2.7. Izmena telesne kondicije krava i peripartalni metabolički stres.....	39
2.8. Proizvodna svojstva krava i peripartalni metabolički stres.....	43
2.8.1. Proizvodnja mleka i peripartalni metabolički stres.....	43
2.8.2. Reproaktivne karakteristike krava i peripartalni metabolički stres.....	46
3. HIPOTEZA.....	51

4. MATERIJAL I METODE	53
4.1. Opšti uslovi eksperimenta – krave, ishrana i nega.....	53
4.2. Uzimanje uzoraka krvi.....	54
4.3. Endokrinološka ispitivanja.....	55
4.4. Ispitivanje metaboličkog profila.....	57
4.5. Hematološka ispitivanja.....	60
4.6. Vijabilnost leukocita.....	61
4.7. Koncentracija Hsp70.....	61
4.8. Merenje telesne kondicije krava.....	62
4.9. Ispitivanje mlečnosti krava.....	64
4.10. Ispitivanje reproduktivne efikasnosti krava.....	64
4.11. Opis modela i statistička obrada podataka.....	64
5. REZULTATI	68
5.1. Vrednost ispitivanih parametara u periodu posle teljenja.....	68
5.1.1. Indikatori metaboličkog stresa.....	68
5.1.2. Metabolički profil.....	69
5.1.3. Krvna slika.....	73
5.1.4. Vijabilnost leukocita.....	74
5.1.5. Hsp70.....	75
5.1.6. Telesna kondicija krava.....	75
5.1.7. Proizvodnja mleka.....	76
5.1.8. Reproductivna efikasnost.....	76
5.2. Ispitivanje odnosa između odabranih indikatora metaboličkog stresa – ocena modela klasifikacije krava.....	78
5.3. Procena metaboličkog stresa na osnovu klasifikacije krava prema odabranim indikatorima stresa u okviru različitih modela.....	81
5.3.1. Metabolički profil kod krava klasifikovanih prema indikatorima stresa.....	82
5.3.2. Krvna slika krava klasifikovanih prema indikatorima stresa.....	95
5.3.3. Vijabilnost leukocita kod krava klasifikovanih prema indikatorima stresa.....	97

5.3.4.	Koncentracija Hsp70 kod krava klasifikovanih prema indikatorima stresa.....	98
5.3.5.	Telesna kondicija krava klasifikovanih prema indikatorima stresa.....	99
5.3.6.	Proizvodnja mleka kod krava klasifikovanih prema indikatorima stresa.....	101
5.3.7.	reproduktivna efikasnost krava klasifikovanih prema indikatorima stresa.....	103
5.4.	Faktorska analiza – ekstrakcija informacija o peripartalnom metaboličkom stresu..	106
5.5.	Patofiziološki i klinički značaj odabranih indikatora metaboličkog stresa.....	108
6.	DISKUSIJA	114
6.1.	Vrednosti indikatora metaboličkog stresa u periodu posle teljenja.....	114
6.2.	Vrednost ishodnih varijabli u periodu posle teljenja.....	116
6.3.	Uticaj različitih modela za procenu metaboličkog stresa na vrednosti ishodnih varijabli.....	124
6.4.	Ocena različitih modela za procenu peripartalnog metaboličkog stresa kod krava...	139
7.	ZAKLJUČAK	150
8.	LITERATURA	154
9.	BIOGRAFIJA (CURRICULUM VITAE) AUTORA	181

1.UVOD

Peripartalni period predstavlja period oko teljenja i kod krava se odlikuje brojnim metaboličkim adaptacijama koje nastaju kao posledica graviditeta, partusa i početka laktacije (homeoretski procesi) kao i težnje organizma da sačuva homeostazu. Jačanje homeoretskih procesa na račun procesa homeostaze neminovno dovodi do stresa kod krava. Peripartalni stres kod krava nastaje kao posledica jačanja homeoretskih, kataboličkih procesa i negativnog energetskeg bilansa krava na početku laktacije. Stres koji nastaje kao posledica disbalansa energetskeg metabolizma uz brojne endokrine, biohemijske, hematološke, imunološke i druge adaptacije naziva se metabolički stres.

Uticaj stresa može biti pozitivan i negativan. Pozitivan uticaj stresa ogleda se u razvoju adaptacionih kapaciteta organizma, čime organizam postaje otporan na pojavu ponovljenog stresa. Međutim, kada stres po svom intenzitetu i/ili trajanju prevaziđe adaptacione sposobnosti organizma nastaju brojne promene, koje se kod proizvodnih životinja, kao što su krave pre svega ogledaju u smanjenim proizvodnim karakteristikama i slabijem zdravlju.

Partus i započinjanje laktacije je veoma naporan proces za organizam krava, pa je peripartalni period najkritičniji za njihovo zdravlje i produktivnost. Brojne adaptacije mogu biti takve da dovedu do bolesti (ketoza, masna jetra, dislokacija sirišta, mastitis, metritis, bolesti papaka) ili trajnog pada produktivnosti (značajan gubitak telesne kondicije, pad proizvodnje mleka i slaba perzistencija laktacije, reproduktivne smetnje), čime se nanosi

velika ekonomska šteta. Ipak, pre nastanka ovih dekompenzatornih procesa, u organizmu se pokreće čitav niz kompenzatornih mehanizama kakarakterističnih za peripartalnih period. Sastavni delovi kompenzatornog mehanizma su promene koje se na osnovu laboratorijskih analiza mogu u prvim nedeljama posle partusa uočiti u endokrinom, metaboličkom i celulalrnom profilu. Laboratorijskim analizama se vrlo rano mogu detektovati krave čiji metabolički profil ukazuje na lošu adaptacionu sposobnost, pa se tim kravama mora posvetiti posebna pažnja. Cilj ovog rada je da se ispituju modeli metaboličkog stresa koji su zasnovani na endokrinim i metaboličkim pokazateljima i da se ispita da li parametri anabolizma i katabolizma u prvoj nedelji posle partusa mogu biti od koristi u proceni zdravlja i produktivnosti krava u laktaciji koja sledi.

Na ovaj način ćemo pokušati da znanja iz bazične nauke predstavimo kao aplikativna i da kroz rano planiranje uzroka izbegnemo negativne posledice na farmi, što je imperativ modernog zdravstvenog menadžmenta i održivog zdravlja u veterinarskoj medicini.¹

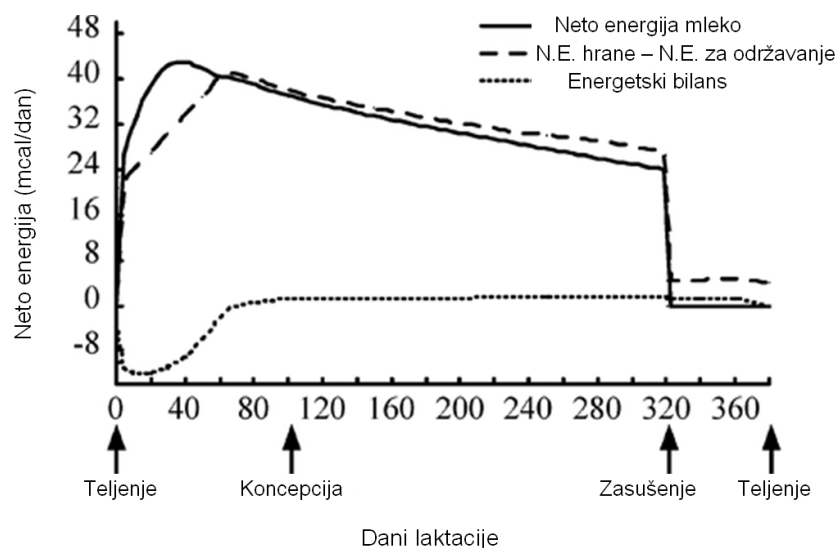
2.PREGLED LITERATURE

Razumevanje metaboličkog stresa kod krava u peripartalnom periodu je veliki i složen proces jer uključuje poznavanje svih elemenata koji čine metabolizam organizma. U ovom poglavlju ćemo izneti osnovne karakteristike metabolizma krava u periodu oko teljenja, sa patofiziološkim objašnjenjem glavnih izmena kao što su smanjen unos hrane i negativni energetske bilans. Potom je ćemo definisati osnovne endokrine promene, koje nastaju u peripartalnom periodu, kao posledica početka i održavanja laktacije i koji su pokazatelji postojanja metaboličkog stresa. Efekti peripartalnih metaboličkih izmena će biti opisani kroz karakteristične promene u metaboličkom profilu, krvnoj slici i imunom statusu krava. Na kraju ćemo opisati uticaj promena u endokrinom i metaboličkom statusu na telesnu kondiciju, proizvodnju mleka i reproduktivnu efikasnost krava u ranoj laktaciji. Analiza metaboličkih pokazatelja će nam omogućiti izbor kvalitetnih kriterijuma za patofiziološku procenu peripartalnog metaboličkog stresa kod krava i postavljanje hipoteze.

2.1.Smanjen unos hrane, negativni energetske bilans i metabolički stres krava u peripartalnom periodu – opšte karakteristike

Jednostrana selekcija krava na proizvodnju mleka dovela je do višestrukog porasta mlečnosti krava u poslednjih nekoliko decenija. Mlečnost krava je kvantitativna genska osobina, što znači da na njeno formiranje utiče više minor-gena, ali da presudnu ulogu u

ispoljavanju i ostvarivanju mlečnosti kao osobine imaju faktori spoljašnje sredine.² U najznačajnije faktore spoljašnje sredine spadaju faktori ishrane i nege. Na početku laktacije značajno su povećane potrebe u hrani i energiji. Međutim, upravo u tom periodu krave ne mogu uneti dovoljne količine hrane koje su potrebne, usled čega se javlja negativan energetske bilans i metabolički stres (Grafikon 1). Ova pojava je posebno izražena kod visoko selekcionisanih krava holštajn-frizijske rase, obzirom da je kod ovih krava naglašena potreba za održavanjem laktacije u odnosu na ostale potrebe organizma.³ U toku graviditeta nastaje postepeni pad unosa hrane, tako da za svaku nedelju graviditeta uzimanje hrane opada za 1,53% (0,17kg) do tri nedelje pre teljenja, dok su noviji modeli pokazali da se negativan trend u unosu hrane nastavlja i posle teljenja.⁴



Kalkulacija energetskog bilansa u graviditetu i laktaciji (N.E. – neto energija) (prema NRC-u, 2001)
 Energetski bilans = N.E. hrane - (N.E. za održavanje + N.E. za gravidnost ili N.E. za laktaciju).
 N.E. za održavanje = $0.08 \times \text{telesna masa}^{0.75}$
 N.E. za gravidnost = $[(0.00318 \times \text{dan graviditeta} - 0.0352) \times (\text{masa teleta}/45)]/0.218$
 N.E. za laktaciju = $[(0.0929 \times \% \text{mlečna mast}) + (0.0547 \times \% \text{mlečni proteini}) + 0.192] \times \text{količina mleka}$

Grafikon 1: Energetski bilans kod krava tokom laktacije

Postoje brojni razlozi zbog kojih dolazi do smanjenog unosa hrane i negativnog energetskeg bilansa. Smanjen unos hrane nastaje kao posledica adaptacije na početak laktacije. Već smo rekli da se neposredno pred partus i u prvim danima laktacije dešavaju metaboličke izmene u cilju podrške laktaciji. Osnovne promene u metabolizmu ugljenih hidrata i masti u periodu oko teljenja i u ranoj laktaciji su: snižena koncentracija glikemije, povećanje glukoneogeneze, smanjena potrošnja glukoze u perifernim tkivima, normalna ili snižena upotreba acetata, povećana lipidna mobilizacija iz masnih depoa uz povišenu koncentraciju neesterifikovanih masnih kiselina i njihovu povećanu upotrebu u perifernim tkivima.⁵ U osnovi ovih procesa leže brojne endokrine adaptacije, a to su pre svega: povišena koncentracija kortizola (koja pomaže lipomobilizaciju i glukoneogenezu), povišena koncentracija hormona rasta (koja omogućuje povećanu upotrebu hranljivih materija u mlečnoj žlezdi i dovodi do pada osetljivosti na insulin), snižena koncentracija insulina (koja nastaje zbog smanjenog unosa hrane i umanjene receptorske osetljivosti) i snižena koncentracija IGF-I (zbog sniženog anaboličkog efekta hormona rasta u perifernom tkivu krava uprkos njegovoj povišenoj koncentraciji). Sve ove promene omogućavaju preusmeravanje glukoze (energije) ka plodu i mlečnoj žlezdi, dok periferna tkiva povećano koriste masti kao izvor energije. Dnevna procena deficita glukoze iznosi oko 500g/dan, pa se povećano mobilisu glukoneoplastične amino-kiseline iz skeletnih mišića i drugih tkiva, što zajedno sa smanjenim kapacitetom za sintezu proteina dovodi do njihovog deficita pada prečnika mišićnih vlakana za 25% neposredno nakon partusa. Da bi zadovoljila potrebe za glukozom, jetra troši i rezerve glikogena, a na mesto glikogena se zbog povećanog metabolisanja masti stvaraju i akumuliraju ketonska tela i trigliceridi, što ukazuje na značajan metabolički stres kod mlečnih krava. Pored navedenog, kod krava u periodu oko teljenja raste koncentracija oksitocina i estradiola i drugih polnih hormona koji omogućuju ponovnu aktivaciju jajnika. Smanjena osetljivost na insulin i homeoretsko delovanje hormona raste,

zajedno sa povećanom koncentracijom neesterifikovanih masnih kiselina i ketona i ostalim opisanim promenama dovode do smanjenog apetita kod krava.⁶ Ostaje otvoreno pitanje da li smanjen apetit krava pokreće metaboličke adaptacije ili metaboličke adaptacije izazvane početkom laktacije i razvojem ploda dovode do smanjenog apetita kod krava.

Sve metaboličke adaptacije nastaju da bi se podržala laktacija, tako da se sve hranljive materije usmeravaju ka mlečnoj žlezdi. Mlečna žlezda koristi glukozu za proizvodnju laktoze, mlečnog šećera, koji je higroskopian, pa povećava volumen proizvedenog mleka, ali i za druge energetske potrebe. Proces stvaranja mlečnih proteina se odvija upotrebom amino-kiselina iz krvi, a masne kiseline utiču na proizvodnju mlečne masti. Negativni energetski bilans kod krava dovodi do povećane koncentracije mlečne masti (zbog povećanog korišćenja masnih metabolita iz krvi) i snižene koncentracije proteina (zbog manjka energije i nedostatka prekursora za proizvodnju dovoljne koncentracije proteina).⁷ Optimalno snabdevanje vimena glukozom je značajno za perzistenciju laktacije. Ako bi se glukoza povećano trošila za potrebe perifernog tkiva, što se recimo dešava tokom toplotnog stresa kod krava, došlo bi do značajnog pada u proizvodnji i kvalitetu mleka.⁸

Mlečna žlezda ima prioritet prilikom upotrebe glukoze u organizmu krava, jer je glukoza značajan prekursor laktoze koji definiše ostale karakteristike mleka. U ovom periodu mlečna žlezda povećano troši glukozu zbog činjenice da je bogata receptorima koji su insulin-nezavisni u procesu usvajanja glukoze u ćelije, dok je ostalo periferno tkivo bogato insulin-zavisnim receptorima čija gustina u laktaciji opada.^{9,10} Ovde možemo uvideti uzrok svih adaptacionih procesa koji nastaju u peripartalnom periodu. Prioriteti mlečne žlezde rastu sa porastom proizvodnje mleka. Negativni energetski bilans se javlja jer je napredovanje u unosu hrane mnogo sporije od napredovanja laktacije, tako da se unos hrane normalizuje tek posle postizanja pika laktacije. Da bi se obezbedila energija u vidu glukoze za vime dolazi do trošenja rezervi glikogena u jetri ali i drugih telesnih rezervi masti i proteina. Tako u

organizmu dominira homeoretska i katabolička osa. Napor organizma da održi metaboličke potrebe naziva se metaboličkim stres. Stres predstavlja svaki proces ili stanje čije delovanje potiče iz spoljašnje ili unutrašnje sredine i koji nanosi ili može naneti štetu organizmu. Negativni energetska bilans i metabolički stres sa sobom povlače poremećaj zdravlja i reproduktivnosti krava i smanjenu dobrobit.^{11,12,13} Zbog preventivnog delovanja veterinara i uzgajivača potrebno je poznavati metabolički stres u peripartalnom periodu kod krava i sve mehanizme adaptacije.

Na posletku treba istaći da postoje brojna istraživanja u kojima su krave hranjene smanjenom količinom hrane ili hranom sa redukovanom energijom u različitim periodima laktacije. Restrikcija hrane u periodu zasušenosti, dakle pre partusa, nije dala konzistentne rezultate, tako da postoje ogledi u kojima restrikcija pokazuje pozitivan efekat na postpartalni unos hrane, proizvodnju mleka i metaboličku adaptaciju, dok su u mnogim ogledima dobijeni suprotni rezultati.^{14,15} Sa druge strane restrikcija hrane tokom laktacije dovodi do pada u proizvodnji mleka i povećane lipidne mobilizacije i ketogeneze uz pad koncentracije glukoze i promenjenu osetljivost na insulin. Faktori kao što su stadijum laktacije i mlečnost pokazali su značajan uticaj na adaptacionu sposobnost krava prilikom restrikcije hrane tokom laktacije.¹⁶

Sve navedeno ukazuje da je peripartalni period vrlo specifičan i da je poznavanje metaboličkih procesa u ovom periodu ključ za analizu celokupnog zdravlja i produktivnosti krava. Zbog toga ćemo na stranama koje slede detaljno opisati adaptacione procese i patofiziološke izmene u sistemima značajnim za prevladavanje peripartalnog metaboličkog stresa.

Metaboličke izmene kod krava u ranoj laktaciji zorno su predstavljene u Tabeli1.

Tabela 1: Metaboličke izmene kod krava u ranoj laktaciji (modifikovano prema Ingvarsten i Andersen, 2000), ↑- raste, ↓- opada.

	Sredina graviditeta	Kasni graviditet	Rana laktacija
Homeoretski hormoni			
Progesteron	↑	↓	-
Placentarni h.	-	↑	-
Estrogeni	-	↑	-
Prolaktin	-	↓	↑
Hormon rasta	-	↓	↑
Homeostatski hormoni			
Insulin	-	↑	↓
Glukagon	-	-	-
Osetljivosti tkiva			
Insulin	↑	↓	↓
Kateholamini	-	↑	↑
Odgovor tkiva			
Insulin	-	↓	↓
Kateholamini	↓	↑	↑
Jetra			
Glukoeneogeneza	-	-	↑
Ketogeneza	-	-	↑
Masno tkivo			
Lipogeneza	↑	↓	↓
Estefikacija masnih kis.	↑	↓	↓
Lipoliza	-	↑	↑
Korišćenje glukoze	-	↓	↓
Skeletna muskulatura			
Sinteza proteina	-	↓	↓
Razgradnja proteina	-	↑	↑
Korišćenje glukoze	-	↓	↓

2.2. Endokrina adaptacija krava na peripartalni metabolički stres

Endokrine promene u peripartalnom periodu su mnogobrojne, a mi ćemo se baviti hormonima, koji imaju uticaj u regulaciji celokupnog metabolizma u peripartalnom periodu i koji su bili predmet istraživanja u ovoj disertaciji. Ti hormoni su kortizol i somatotropni hormon, a uključeni su u homeoretske mehanizme, započinjanje i održavanje laktacije i kataboličke procese u perifernim tkivima (osim vimena) i insulin i insulinu sličan faktor rasta (IGF-I) koji su uključeni u homeostatske mehanizme i imaju anabolički efekat u perifernim tkivima. Koncentracija kortizola i somatotropnog hormona u peripartalnom periodu raste, dok koncentracija insulina i IGF-I opada.⁵

2.2.1. Kortizol

Kortizol je hormon nadbubrežne žlezde koji se stvara u ćelijama zone fascikulate i zone retikularis nadbubrega. Ćelije kore nadbubrežne žlezde proizvode razne kortikosteroide iz holesterola. Holesterol-estri u ćelijskom depou se u mitohondrijama transformišu u holesterol, pa u pregnenolon, koji se u endoplazmatičnom retikulumu transformiše do deoksikortiola, a ovaj po ponovnom ulasku u mitohondrije metaboliše do kortizola, koji potom odlazi ekstracelularno i obavlja svoje biološke funkcije. Kortizol je glukokortikoid, steroid sa 21 ugljenikovim atomom, što znači da pripada grupi pregnena.

Biološka uloga glukokortikoida je u regulisanje metabolizma ugljenih hidrata, masti i proteina, a posebno značajnu ulogu imaju u stresnoj reakciji i procesu zaštite od stresa. Glukokortikoidi štite organizam od hipoglikemije u svim onim stanjima kada postoji povećana potreba za glukozom, što je osnovna karakteristika stresnih reakcija, pa i graviditeta i započinjanja laktacije. Najjači uticaj glukokortikoidi imaju na procese glukoneogeneze u jetri,

kada aktiviraju glikogen-sintetazu i glukozo-6-fosfatazu čime se povećano oslobađa glukoza iz jetre. Pored navedenog, glukokortikoidi inhibiraju efekat insulina na energetske metabolizam, smanjenjem afiniteta insulinskih receptora za insulin, a sprečavaju i ugrađivanje transportnog citoplazmatskog proteina za difuziju glukoze iz citoplazme u membranu ćelija mišićnog i masnog tkiva, čime dodatno smanjuju korišćenje glukoze.¹⁷

Kortizol ispoljava katabolički efekat prema proteinima, obzirom da su aminokiseline potrebne za proces glukoneogeneze. Kod goveda sve amino-kiseline mogu doprineti procesu glukoneogeneze, osim leucina i lizina koji su isključivo ketogeni. U odnosu na sve aminokiseline alanin i glutamin čine 40-60 % ukupnog potencijala aminokiselina za sintezu glukoze.¹⁸ U prvim danima posle partusa odnos 3-metil histidina i kreatinina u urinu, koji pokazuju stepen razgradnje proteina u mišićima, povećava se trostruko, a posle 7-10 dana opada, ali su te vrednosti i dalje dvostruko veće u odnosu na prepartalne.¹⁹ Insulin ima negativan uticaj u procesu glukoneogeneze, jer smanjuje korišćenje laktata, alanina, glutamata i glicerola za te svrhe, te je jasno zbog čega kortizol inhibira delovanje insulina.²⁰ Kortizol ispoljava katabolički efekat i na masti u organizmu. Kao glukokortikoid kortizol ima blag lipolitički efekat, dovodeći do mobilizacije masnog tkiva i sprečavanja sinteze masti. Značajnu ulogu u prestrojavanju metabolizma ka mastima kao izvoru energije glukokortikoidi imaju kada postoji gladovanje ili druge vrste prolongiranog stresa. Posebno je značajno da glukokortikoidi pojačavaju lipolitički efekat glukagona, epinefrina i hormona rasta.²¹ Ovo je posebno interesantno u peripartalnom periodu kada koncentracija kortizola i koncentracija hormona rasta biva višestruko uvećana.

Koncentracija kortizola u krvnom serumu je značajno viša kod krava koje su restriktivno hranjene, u odnosu na krave koje se hrane normalno ad libidum.²² Tako, koncentracija kortizola raste neposredno pred partus pa se u narednih 5-10 dana koncentracija

kortizola vraća na početne vrednosti.^{23,24} Kod visokomlečnih krava koncentracija kortizola je niža prilikom stimulacije sa ACTH, što može navesti na zaključak da je laktacija svojevrsni stres i da iscrpljuje rezerve kortizola u kori nadbubrega.²⁵ Snižena koncentracija kortizola uz sniženu glikemiju ukazuje na rizik za nastanak ketoze kod krava, kao krajnje loše posledice negativnog energetskeg bilansa. Iako snižena koncentracija kortizola nanosi značajnu štetu zbog smanjene adaptacione sposobnosti krava u ranoj laktaciji povišena vrednost kortizola pokazuje brojne negativne efekte. Povišena kortizolemija ima negativan uticaj na funkcionisanje imunih ćelija i odbrambene mehanizme pa se mogu javiti mastitis, metritis i upala papaka, a pošto intefrerira sa putevima kalcijuma može biti u vezi sa kliničkom hipokalcemijom, puerperalnom parezom i dislokacijom sirišta.^{26,27} O ovim promenama biće detaljnije reči kada budemo raspravljali o hematološkim i imunološkim adaptacijama na peripartalni period kod krava.

Zbog svega navedenog kortizol će u našem ogledu biti odabran kao pokazatelj homeoreze, odnosno katabolizma i metaboličkog stresa kod krava.

2.2.2.Somatotropni hormon (STH) i insulinu sličan faktor rasta (IGF-I)

Koncentracija STH u krvnoj plazmi krava raste od kraja graviditeta, sa postizanjem pika koncentracije u momentu partusa, da bi potom njegoa vrednost lagano opadala. Koncentracija STH je viša kod visokoproduktivnih krava u odnosu na krave sa nižom proizvodnjom mleka. Ovo ukazuje da STH ima značajnu ulogu u obezbeđivanju laktacije.^{28,29} Koncentracija STH je tokom laktacije nešto viša, a njegoa uloga kod preživara je veća od uloge prolaktina.³⁰ Hormon rasta je tipičan homeoretski hormon, koji usmerava hranljive materije ka vimenu i omogućava iskorišćavanje lipida u energetske svrhe u perifernom tkivu. Somatotropni hormon umanjuje stepen lipogeneze u perifernom tkivu, a povećava i lipolitički

efekat kateholamina što dovodi do povećanog oslobađanja masnih kiselina.³¹ Tretman somatotropinom kod mlečnih krava izaziva povećanje glukoneogeneze u jetri zahvaljujući umanjenom efektu insulina u peripartalnom metaboličkom stresu.³² Iako je iz fiziologije dobro poznato da hormon rasta omogućuje pozitivan bilans azota zbog njegovog ugrađivanja u proteine tela, ova pojava izostaje u peripartalnom periodu najverovatnije zbog delovanja kortizola koji smo ranije pominjali.

Celularni odgovor na delovanje hormona rasta ogleda se u povišenoj koncentraciji insulinu sličnog faktora rasta (IGF-I). IGF-I kod krava u peripartalnom periodu predstavlja odličan pokazatelj energetskog bilansa i pokazuje sposobnost organizma krava da prevaziđe negativni energetski bilans i uđe u novi reproduktivni ciklus.³³ Optimalni ulazak u novi reproduktivni ciklus obezbeđuje stabilnu proizvodnju mleka, što je od velikog značaja. Takođe, koncentracija IGF-I indirektno pokazuje u zdravstveni status jetre i sklonost ka nastanku masne infiltracije i degeneracije jetre, koja predstavlja veliki ekonomski i zdravstveni problem krava u peripartalnom periodu.³⁴

Zbog svega navedenog je neophodno objasniti osu STH:IGF-I. Kod mlečnih krava IGF-I nastaje u jetri pod uticajem somatotropina.³⁵ Već smo napomenuli da koncentracija hormona rasta počinje da raste nekoliko dana pred partus i ostaje na višem nivou kod visokoproduktivnih krava, ali uprkos navedenom koncentracija IGF-I u peripartalnom periodu opada. Nemogućnost povišenih vrednosti STH da stimulišu stvaranje IGF-I naziva se "rezistencija na STH".³⁶ Novija istraživanja pokazuju da nivo ishrane i koncentracija insulina imaju najznačajniju ulogu u ostvarivanju funkcije ose STH:IGF-I. U hepatocitima insulin kontroliše stvaranje IGF-I pod uticajem STH tako što ima pozitivan uticaj na ekspresiju receptora za STH. Interesantno je reći da u masnom tkivu insulin može ispoljiti kako stimulišuće, tako i inhibirajuće dejstvo. Infuzija insulina u ranom postpartalnom periodu

povećava gustinu receptora za STH i koncentraciju mRNA za IGF-I u jetri, kao i koncentraciju IGF-I u krvi.^{37,38,39} Analizom funkcionalnog statusa ove ose zaključujemo da ona u potpunosti odražava stanje energetskeg metabolizma i pojašnjava peripartalni metabolički stres. Smanjen unos hrane i hipoinsulinemija snižavaju gustinu receptora za STH u jetri, a povećavaju u masnom tkivu. Zato opada koncentracija IGF-I. IGF-I i STH su u negativnoj povratnoj sprezi, pa nedostatak IGF-I dovodi do dodatnog porasta koncentracije cirkulišućeg STH, koji povećava lipidnu mobilizaciju i dovodi do porasta koncentracije neesterifikovanih masnih kiselina u krvi uz povećanje hepatične glukoneogeneze, a oba ova procesa pogoduju proizvodnji mleka u ranoj laktaciji.^{40,41}

Visoko-selekcionisane krave za proizvodnju mleka imaju povišenu koncentraciju STH i redukovanu koncentraciju insulina i IGF-I tokom rane laktacije. Najnovija istraživanja se bave polimorfizmom gena koji regulišu proizvodnju STH i IGF-I. Genotip za ove hormone nije pokazao značajan uticaj na produktivna i reproduktivna svojstva krava, ali postoje značajne promene u endokrinoj i metaboličkoj adaptaciji krava u peripartalnom periodu. Detektovani su geni za STH čije je prisustvo češće kod krava sa nižom koncentracijom neesterifikovanih masnih kiselina i višom koncentracijom IGF-I. Pored navedenog, detektovani su geni za IGF-I čije prisustvo znači nižu koncentraciju neesterifikovanih masnih kiselina, ketonskih tela i višu koncentraciju insulina u peripartalnom periodu, što ukazuje na postojanje mogućnosti da se detektuju krave koje bolje podnose peripartalni metabolički stres. Genski polimorfizam može pokazati uticaj i na reproduktivna svojstva krava.⁴²

Možemo zaključiti da se anabolički efekat somatotropnog hormona na periferno tkivo organizma krava može posmatrati kroz koncentraciju IGF-I iz jetre, a uzimajući u obzir efektorsku funkciju IGF-I, koncentracija IGF-I će biti upotrebljena kao pokazatelj anabolizma u peripartalnom periodu kod krava.

2.2.3. Insulin i insulinska rezistencija

Insulin predstavlja glavni hormon koji se nalazi u centru gotovo svih adaptacionih procesa tokom metaboličkog stresa u peripartalnom periodu kod krava, a izučavanje rezistencije na insulin postalo je težišna tačka u shvatanju peripartalnog metabolizma.

Insulin ima značajan uticaj na preraspodelu hranljivih materija i njihovo usmeravanje ka mlečnoj žlezdi. Ovome svakako doprinosi pad koncentracije insulina nekoliko dana pred partus i njegovo održavanje na niskom nivou u prvih desetak dana laktacije.⁵ Nedostatak insulina pokreće čitav niz homeoretskih procesa jer njegovo delovanje pokreće biološke procese koji su suprotni od onih koji se dešavaju u periodu oko teljenja i ranoj laktaciji. Insulin je antilipolitički i antiketogeni hormon, koji ima značajnu ulogu u centralnoj regulaciji apetita. Po strukturi on je polipeptid sastavljen od amino-kiselinskog niza povezanog disulfidnim vezama, a sekretuju ga beta-ćelije u Langerhansovim ostrvcima pankreasa.⁴³

Insulinska rezistencija se karakteriše smanjenim odgovorom insulina na glukozu tj. smanjenom funkcijom beta ćelija pankreasa (eng., *insulin responsiveness*) i/ili smanjenom osetljivošću glukoze na insulin (eng., *insulin sensitivity*). Rezistencija na insulin u peripartalnom periodu je neophodna kako bi vime, kao organ u kom upotreba glukoze nije zavisna od insulina, dobilo dovoljno hranljivih materija i energije za započinjanje laktacije. Fenomen insulinske rezistencije najjače je izražen posle partusa. Odgovor insulina na glukozu je snižen, dok je klirens glukoze veći u postpartalnom periodu, u odnosu na prepartalni.^{44,45} Tokom laktacije mlečna žlezda krava vrši ekspresiju insulin nezavisnih transportera za glukozu, koja je tri puta veća u odnosu na zasušene krave. Ovi receptori su nađeni u masnom tkivu kod krava u kasnoj laktaciji i zasušenju, ali ne i kod krava u piku laktacije. Pobuđivanje insulin senzitivnih receptora u skeletnim mišićima i masnom tkivu ne menja se sa progresom laktacije ili zasušenog perioda.⁴⁶ Iako je odgovor insulina na glukozu redukovan, senzitivnost

perifernog tkiva na insulin je nepromenjena, ali je nađen veći klirens insulina u sredini laktacije u odnosu na zasušene krave.⁴⁷ Pored navedenog redukovana je i senzitivnost tkiva na insulin, kako je nađeno u jednoj studiji gde je korišćen hiperinsulinemični-euglikemijski model.⁴⁸

Postoje brojni faktori koji utiču na lučenje insulina kod krava. Genska predispozicija i produktivnost krava su značajan faktor koji utiče na nastanak insulinske rezistencije. Visoko selekcionisane krave i krave koje proizvode veće količine mleka pokazuju značajno veću insulinsku rezistenciju, sa sporijim vraćanjem glukoze na početni nivo posle intravenskog opterećenja glukozom.^{49,50}

Stimulatori lučenja insulina su: glukoza, galaktoza, ksilitol, gliceraldehidi, mnoge aminokiseline, masne kiseline, natrijum, kalcijum, gastrointestinalni hormoni (glukagon, pankreasni peptidi, sekretin i holecistokinin), vagusna aktivnost i neki lekovi. Faktori koji vrše supresiju insulina uključuju telesnu kondiciju, gastrointestinalni hormoni (galanin i somatostatin), simpatička aktivnost (adrenergički hormoni), medijatori upale i dr.^{20,43} Mnogi od ovih faktora značajno utiču na lučenje insulina u peripartalnom periodu.

U peripartalnom periodu značajno raste koncentracija neesterifikovanih masnih kiselina (NEFA) u krvi kao posledica lipidne mobilizacije. Povišena koncentracija NEFA je u asocijaciji sa sniženom osetljivošću na insulin kod krava koje nisu u laktaciji ili sa smanjenim klirensom glukoze i insulina posle opterećenja glukozom kod mlečnih krava.^{51,45} Visok nivo koncentracije NEFA inhibira insulinom stimulisanu upotrebu glukoze u skeletnim mišićima i vrši supresiju glukogenolize u jetri.⁴³ Na modelu laboratorijskih miševa pokazan je direktan štetan uticaj NEFA na beta ćelije pankreasa.⁵²

Kao jedan od najznačajnijih faktora koji utiče na pojavu peripartalne rezistencije na insulin je ishrana. Malnutricija i smanjen unos hrane redukuju sekreciju insulina i njegov

odgovor posle aplikacije glukoze.⁵³ Kod krave koje su redukovano hranjenje pokazuju niži odgovor insulina posle aplikacije glukoze čak dve nedelje posle partusa u odnosu na krave hranjene ad libidum.⁵⁴ Hranljivi sastojci, posebno masti mogu uticati na stepen insulinske rezistencije. Tako kratkotrajna hiperlipidemija izazvana intravenskom aplikacijom sterilnog loja povećava bazalnu koncentraciju glukoze i insulina uz umanjen klirens glukoze posle testa opterećenja. Međutim, određene masne kiseline (iz ulja lanenog semena) mogle bi biti od koristi u poboljšanju osetljivosti na insulin i poboljšanju antilipolitičkog efekta insulina u masnom tkivu.^{55,56,57}

Insulinska rezistencija se može dovesti u vezu sa poremećajem zdravlja krava u peripartalnom periodu. Tako na primer krave obolele od ketoze pokazuju značajno nižu koncentraciju insulina posle opterećenja glukozom.⁵⁸ Drugi značajan zdravstveni problem koji se javlja u peripartalnom periodu kao posledica metaboličkog stresa je masna infiltracija hepatocita. Akumulacija lipida u jetri je u direktnoj vezi sa smanjenom insulinskom senzitivnošću, kao i smanjenim odgovorom insulina na stimulaciju.^{59,60} Oslobođanje medijatora upale, kao što je tumor-nekrozis faktor alfa (TNF- α), tokom bolesnih stanja može interferirati sa insulinskom senzitivnošću kod goveda.⁶¹

Telesna građa krava je značajan prediktor u nastajanju insulinske rezistencije. Krave sa većom telesnom kondicijom kao i gojazne krave razvijaju izraženiju insulinsku rezistenciju u peripartalnom periodu. Ovo se može objasniti činjenicom da gojazne krave oslobađaju veću koncentraciju NEFA iz masnih depoa u periodu posle teljenja, što korelira sa oslobađanjem TNF- α .⁶²

Na posletku treba nabrojati metode za procenu insulinske rezistencije. Odgovor insulina i funkcionalni kapacitet beta ćelija pankreasa ispituje se posle unosa standardne koncentracije glukoze, propionata, glukagona ili drugih insulinskih stimulatora. Zlatni standard za ovu procenu je hiperinsulinemijski-euglikemijski klamp test (eng., *hyperinsulinemic-*

euglycemic clamp test - HIEC). U ovom testu se uz aplikaciju insulina vrši aplikacija glukoze, na osnovu tačnih proračuna i pomoću pumpe kako bi se održala euglikemija. Neophodno je ispitati kolika je koncentracija glukoze potrebna da neutrališe povišene vrednosti insulina i održi glikemiju u fiziološkim granicama.⁶³ Ovi testovi nisu najpogodniji za svakodnevne farmske uslove i koriste se isključivo u eksperimentalne svrhe.^{48,37} Mnogo bolji test koji se može koristiti u svakodnevnim uslovima je intravenski test tolerancije glukoze (eng., *Intravenous glucose tolerance test - GTT*), gde se ispituje bazalna koncentracija insulina, pik koncentracije insulina i vreme potrebno da se njegova koncentracija vrati na bazalni nivo, a univerzalni pokazatelj koji se objedinjuje sve ove parametre je površina ispod krive koncentracije insulina (eng., *area under curve - AUC*). Stimulacija se može vršiti svim već navedenim stimulišućim materijama.^{58,64} Ispitivanje insulinske senzitivnosti vrši se pomoću intravenskog testa tolerancije insulina (eng., *Intravenous insulin tolerance test - ITT*), kada se prati odgovor glukoze na aplikaciju egzogenog insulina. U novije vreme kod Holštajn krava se vrši ispitivanje koje se naziva RQUICKI (eng., *Revised quantitative insulin sensitivity check index*). Ovo je test koji se koristi za ispitivanje homeostaze energetskog bilansa i objedinjuje ispitivanje koncentracije glukoze, insulina i NEFA.⁶²

Zbog svega navedenog insulin ćemo u našem ogledu posmatrati kao anabolički hormon, koji je kontraregulatoran peripartalnom katabolizmu i metaboličkom stresu.

2.3. Metabolička adaptacija krava na peripartalni metabolički stres

Endokrina regulacija metabolizma dovodi do brojnih efektorskih promena koji se mogu detektovati u krvi kroz promene u vrednostima brojnih metabolita. Već četrdesetak godina koristi se Komptonov metabolički profil u ispitivanju zdravstvenog statusa krava i zadovoljenja njihovih potreba hranom.^{65,66,67} Metabolički profil je definisan kao serija specifičnih laboratorijskih testova kojima se određuju vrednosti metabolita posle uzimanja krvi kod krava u zasušenom periodu, ranoj laktaciji i piku laktacije. Sa razvojem nauke broj parametara koji se određuje u metaboličkom profilu postajao je sve veći. Danas se metaboliti mogu podeliti na one koji oslikavaju energetske status krava, proteinski status krava, funkcionalni status jetre, status minerala i drugo. Na stranama koje slede biće opisani parametri metaboličkog profila koji su najznačajniji u tumačenju peripartalnog metaboličkog stresa kod mlečnih krava i koji su predmet interesovanja u ovoj disertaciji.

2.3.1. Metabolički pokazatelji energetskog statusa

Peripartalni metabolički stres se odlikuje negativnim energetske bilansom, potrošnjom masti u energetske svrhe perifernog tkiva i potrošnjom glukoze za potrebe vimena i proizvodnju mleka. Ovakvo metaboličko prestrojavanje kao posledicu ima sniženu koncentraciju glukoze i povišenu koncentraciju neesterifikovanih masnih kiselina (NEFA), čija preterana upotreba dovodi do stvaranja ketonskih tela u jetri kada u krvi raste koncentracija beta hidroksibutirata (BHB). Metabolički pokazatelji lošeg energetskog statusa kod krava su: snižena koncentracija glukoze, povišena koncentracija NEFA i povišena koncentracija BHB. Ovakav metabolički profil je tipičan za peripartalni period kod krava, a kod većeg broja krava ovi parametri se nalaze značajno izvan referentnih vrednosti.⁶⁸

Glukoza, NEFA i BHB značajno koreliraju sa negativnim energetske bilansom tokom laktacije. Ipak, njihova koncentracija pre svega zavisi od perioda laktacije, a u manjoj meri od energetske bilansa. Krave hranjene hranom sa smanjenom energijom u različitim periodima laktacije pokazuju sledeće specifičnosti u metabolizmu: energetski deficit je bio više izražen u drugoj tečini laktacije u odnosu na ranu laktaciju, ali koncentracija glikemije bila značajno niža a NEFA i BHB značajno viša u ranoj laktaciji. Ovo navodi na zaključak da koncentracija glukoze, NEFA i BHB u ranoj laktaciji reprezentuje značajno šire metaboličke regulacije, koje pored ostalih elemenata sadrže i negativni energetski bilans.⁶⁹

Snížena glikemija kod krava nastaje kao posledica smanjenog unosa hrane i povećanog usmeravanja glukoze ka mlečnoj žlezdi i gravidnom uterusu.⁷⁰ Vrednost glikemije pokazuje tendenciju akutnog pada u periodu oko partusa. U momentu započinjanja laktacije potebe za glukozom postaju višestruko uvećane. Smatra se da hranom mlečne krave mogu zadovoljiti oko 10% svojih potreba za glukozom, pa glukoneogeneza predstavlja ključni mehanizam održavanja glikemije u organizmu krava.⁵ Homeoretska adaptacija metabolizma glukoze u laktaciji ogleda se u porastu hepatične glukoneogeneze. Pokazano je da u prepartalnom periodu propionat, laktat, alanin i glicerol imaju značajan uticaj na proizvodnju glukoze u jetri. Propionat potiče iz reakcija ruminalne fermentacije, laktat iz Korijevo ciklusa, aminokiseline iz katabolizma proteina, a glicerol iz katabolisanog masnog tkiva. Tokom peripartalnog perioda učešće propionata u neto proizvodnji glukoze je 50-60%, amino-kiselina 20-30%, laktata 15-20% i glicerola 2-4%.⁷¹ Intravenska aplikacija propionata kod zdravih krava dovodi do višestrukog porasta koncentracije glukoze (2-2,5x) kod zdravih krava u prvom satu posle palikacije. Kod postojanja ketoze krava, koja je u vezi sa kompromitovanim zdravljem jetre nađena je značajno slabija produkcije glukoze, što ukazuje na značaj jetre u glukoneogenetskom procesu.⁷² Zbog toga aplikacija propionata može značajno pomoći u optimizaciji metabolizma u peripartalnom periodu.⁷³

Uzimajući u obzir metaboličke regulacije u peripartalnom periodu koncentracija glukoze je obrnuto proporcionalna sa koncentracijom NEFA i BHB. Neesterifikovane, slobodne masne kiseline u cirkulaciji se nalaze u vidu kompleksa sa albuminima i predstavljaju alfa-lipoproteinsku frakciju. Grasnom hromatografijom utvrđeno je da se NEFA u krvi sastoji od 12 slobodnih masnih kiselina među kojima dominiraju palmitinska, stearinska, oleinska i linoleinska.⁷⁴ Hidroliza triglicerida u masnom tkivu se nalazi u osnovi reakcione kaskade koja dovodi do mobilisanja masti i porasta koncentracije masnih kiselina. Na osnovu merenja protoka palmitinske kiseline utvrđeno je da krave u peripartalnom periodu mogu mobilisati i do 2,9 kg masti.⁷⁵ Obezbeđivanje masnih kiselina kao izvora energije predstavlja najznačajniji homeoretski mehanizam u ranoj laktaciji. NEFA u krvi najčešće nastaju kao posledica lipidne mobilizacije usled katabolizma masnog tkiva, koje se dešava zbog niza endokrinih izmena i smanjnog unosa hrane. Smanjen unos hrane sam po sebi nije dovoljan da pokrene postupak lipidne mobilizacije.⁷⁶ Ipak, NEFA može biti vrlo osetljiv indikator snabdevenosti hranljivim materijama, obzirom da postoji diurnalna varijacija NEFA, tako da je njegova koncentracija najviša u noćnim i jutarnjim časovima (jer krave noću ne konzumiraju hranu) a u toplotnom stresu koncentracija NEFA je viša u toplijim delovima dana, kada krave izbegavaju unos hrane.^{77,78}

Neesterifikovane masne kiseline se metabolišu u svim tkivima, ali je centralni organ metabolizma jetra. Metabolički procesi u kojima učestvuje NEFA su: a) potpuna oksidacija masnih kiselina do vode i ugljenik-4-oksida, b) delimična oksidacija do acetil koenzima A i sinteza ketonskih tela (BHB), c) formiranje triglicerida iz NEFA u procesu resinteze i njihov transport iz jetre putem VLDL lipoproteina, d) resinteza triglicerida u jetri, njihova akumulacija i masna degeneracija jetre. Ispitivanja su pokazala da promene na receptorskom i genomskom nivou u jetri dovode do adekvatne ili loše adaptacije koje impliciraju razvoj metaboličkih bolesti.⁷⁹ Zbog svega navedenog jetra predstavlja težišni metabolički organ u

peripartalnom periodu. Stvaranje ketonskih tela i resinteza triglicerida u jetri predstavljaju osnovu za nastanak peripartalnih metaboličkih bolesti kao što su ketoza i masna jetra, koje su povezani sa opštim zdravljem i produktivnošću krava u laktaciji koja sledi.⁵ Negativni uticaj NEFA i BHB na organizam krava biće opisan u poglavljima koja slede.

NEFA i BHB su slabo varijabilne vrednosti i pokazuju veliki dijagnostički značaj u proceni metaboličkog i zdravstvenog statusa krava, dok je koncentracija glukoze srednje varijabilna vrednost, pa je njen dijagnostički značaj takođe srednji. Najnovije tendencije u nauci je da se utvrdi koja je to koncentracija glukoze NEFA i BHB i kakva je njihova prediktivna uloga u ranoj proceni zdravlja i produktivnosti krava i rizika za njihovo isključenje iz proizvodnje. Koncentracija NEFA preko 0.4 mmol/l odnosno 0.8 mmol/l u prvoj nedelji posle partusa i koncentracija BHB veća od 1,2 mmol/l u prvoj i/ili drugoj nedelji posle partusa značajno češće postoji kod krava koje su razvile peripartalne bolesti, pa je prediktivna uloga ovih metabolita pokazana. Istraživači su utvrdili da koncentracija NEFA ima kvalitetniju prediktivnu funkciju. Za nastanak subkliničke ketoze optimalna prediktivna vrednost za NEFA je mnogo niža (0.26 mmol/l). Koncentracija glukoze se nije pokazala kao statistički značajan prediktivni pokazatelj zdravlja i produktivnosti krava, ali njena orijentaciona vrednost ispod 2.3 mmol/l može ukazati na nastanak različitih oboljenja.^{80,81,82,83} Prolongirana hiperketonemija i visoka koncentracija NEFA imaju negativan uticaj na brojne aspekte adaptacije mlečnih krava na peripartalni metabolički stres u peripartalnom periodu.^{34,84,85} Poređenja radi treba navesti da koncentracija NEFA u rasponu od 0.3-0.5 mmol/l predstavlja intenzivnu lipidnu mobilizaciju, a vrednost preko 0.7 mmol/l veoma intenzivnu lipidnu mobilizaciju.⁸⁶

Odgovor hipotalamo-hipofizo-nadbubrežne ose, pa samim tim i adaptacioni kapacitet krava nalazi se u korelaciji sa glikemijom i koncentracijom NEFA u ranoj laktaciji. Ukoliko je koncentracija glukoze niska odgovor stresne ose će biti intenzivan i to hipotalamo-hipofizni

odgovor. Visoka koncentracija NEFA dovodi do umanjenog odgovora nadbubrega na ACTH. Tako zaključujemo da ovi metaboliti imaju uticaj na različite delove stresne osovine u organizmu i adaptacionu sposobnost krava na peripartalni stres.⁸⁷

Zbog činjenice da NEFA reprezentuje nivo katabolizma u organizmu krava koje nastaju kao posledica metaboličkih i endokrinih adaptacija i da u povišenim koncentracijama može dovesti do značajnih izmena u ostalim homeostatskim procesima, NEFA će u našem ogledu biti prikazana kao parametar katabolizma i indikator metaboličkog stresa u ranoj laktaciji.

2.3.2. Metabolički pokazatelji proteinskog statusa

Proteini u peripartalnom periodu kod krava imaju značajnu ulogu u procesu obezbeđivanja glukoze kroz proces glukoneogeneze.⁷¹ Unos proteina u peripartalnom periodu punem hrane mora biti povećan u odnosu na preporuke i recepture za krave u laktaciji, jer nedostatak proteina smanjuje količinu proizvedenog mleka a može uticati i na proteinski sastav mleka. U perifernijoj muskulaturi, koži i visceralnim organima dolazi do povećane mobilizacije glukoneoplastičnih aminokiselina i njihovog iskorišćavanja u jetri.⁵ Glukoneogeneza je proces koji se odvija u jetri, a glavna promena koja omogućava iskorišćavanje amino-kiselina za potrebe glukoneogeneze je povišena aktivnost piruvat karboksilaze i povećana zastupljenost iRNK za ovaj enzim. Takođe, neznatno raste i aktivnost fosfoenolpiruvat karboksilaze (PEPCK) i njene iRNK.⁸⁸ Krave mogu mobilisati do 25% proteinskog azota za potrebe podrške ploda i laktacije, što je izraženije kod visokoproduktivnih krava. Pored bilansa azota, istraživanje stepena mobilizacije pojedinih aminokiselina može biti od posebnog značaja za razumevanje proteinskog statusa krava.⁸⁹ Detaljno ispitivanje proteinskog statusa podrazumeva vrlo složenu metodologiju sa

dreniranjem portalnog krvotoka i izračunavanjem fluksa metabolita kroz tkivo.⁹⁰ Nađeno je da za optimalno iskorišćavanje proteina u organizmu mora da postoji adekvatno učešće energetskih komponenti hrane kao što su dugolančane masne kiseline, a da povećano učešće endogenih dugolančanih kiselina kao što je NEFA ima negativan uticaj.^{91,92} Pojedini rezultati ukazuju da postoji korelacija između NEFA i koncentracije uree u ranoj laktaciji, ali da to zavisi od nedelje u kojoj je krv uzorkovana.⁹³

Procena proteinskog statusa je mnogo složenija od procene energetskog statusa kod krava u peripartalnom periodu, a posebno je teško odvojiti uticaj energetskog bilansa od proteinskog bilansa zbog njihove zajedničke metaboličke veze. Kao indikatori za procenu proteinskog statusa koristi se: koncentracija ukupnih proteina, albumina, uree u krvi, aktivnost kreatin kinaze i koncentracija kreatinina.

Koncentracija uree zavisi od učešća proteina u hrani u odnosu na potrebe, energetske karakteristike hrane, svarljivosti proteina i ugljenih hidrata u rumenu, aminokiselinskog sastava hrane, funkcionalnog statusa jetre i bubrega. Ureja se u organizmu stvara detoksikacijom amonijaka u jetri. Kod preživara, amonijak je glavni produkt razlaganja proteina unetih hranom pod dejstvom mikroflora predželudaca. Mikroflora predželudaca unete proteine razlaže preko aminokiselina do ketokiselina i amonijaka, koji koriste za sintezu svojih proteina. Da bi se stvoreni amonijak mogao iskoristiti, mikroorganizmi moraju biti snabdeveni dovoljnom količinom lako svarljivih ugljenih hidrata kao izvora energije. Višak amonijaka se kroz ruminalni zid transportuje u jetru gde se konvertuje u ureu, koja putem krvi ponovo dolazi u rumen i služi za bakterijski rast ili se izlučuje putem bubrega.¹⁷ Produkcija uree se vrši preko amonijaka i u procesu metabolizovanja endogenih aminokiselina. Vrednost koncentracije albumina ukazuje na dostupnost proteina u dužem vremenskom periodu i pokazuje proteinski status u protekla dva do tri meseca. Obzirom da se albumini proizvode u jetri, opterećeni funkcionalni kapacitet jetre može se dovesti u vezu sa sniženom

albuminemijom u peripartalnom periodu. Albumini čine većinski deo ukupnih proteina, pa se njihovim padom uviđa i pad ukupnih proteina. Kreatin kinaza je enzim koji reguliše kataboličke procese u mišićima i najčešće raste kod povreda i drugih metaboličkih opterećenja mišića. Kreatinin pokazuje stepen degradacije proteina u organizmu i zavisi od mišićne mase i funkcionalnog statusa bubrega. Kada se radi o metabolizmu proteina treba uzeti u obzir i gamaglobuline, ali i proteine akutne faze, koji su često povišeni u peripartalnom periodu i pokazuju da se radi o opterećenom zdravlju krava. Međutim, proteini akutne faze i njihove frakcije imaju minimalno učešće u ukupnoj koncentraciji proteina.^{94,95}

Kod proteinskih deficijencija tek zasušenih krava vrednost uree će biti niska (<10mg/dl odn. 7,1 mmol/l) uz normalnu koncentraciju albumina (>3.5 g/dl). Zasušene krave u tranzicionom periodu (tri nedelje pred teljenje) imaju nisku do srednju vrednost uree, nižu vrednost albumina i povišenu vrednost kreatin kinaze. Sveže oteljene krave generalno imaju nisku vrednost uree i nisku vrednost albumina (<2.5 g/dl). Koncentracija ukupnih proteina ispod 60g/l povećava rizik od peripartalnih bolesti.^{96,97}

2.3.3. Metabolički pokazatelji funkcionalnog statusa jetre

Jetra je centralni organ adaptacije i metaboličkog skretanja u peripartalnom periodu krava. Kao što je navedeno u predhodnim delovima teksta, u jetri se odvija: 1) glikogenoliza kako bi se potrošile rezerve šećera za započinjanje laktacije; 2) glukoneogeneza, kako bi se iz nešećernih komponenti (masti - NEFA i proteina) stvorila dovoljna količina potrebne glukoze; 3) umanjena osetljivost jetre na hormona rasta, snižena koncentracija IGF-I i odsustvo negativne povratne sprege sa STH povećava koncentraciju STH i potencira njegovu homeoretsku ulogu značajnu za usmeravanje šećera i gradivnih materija ka vimenu, a masti ka jetri.

Metabolička adaptacija organizma koja se ogleda u intenzivnoj mobilizaciji masti i njihovoj upotrebi u energetske svrhe značajno opterećuje jetru, koja vrlo brzo može ući u dekompenzacione procese. Naime, povišena koncentracija NEFA u peripartalnom periodu završava u jetri gde se iskorišćava u energetske svrhe. Ona se može u potpunosti metabolisati do ugljenik-4-oksida i vode, što obezbeđuje energiju jetri i organizmu za fiziološke funkcije.. Međutim moguće je i skretanje metaboličkih procesa što opterećuje zdravlje jetre i to je: a) parcijalna oksidacija NEFA i produkcija ketonskih tela (posebno BHB) koji odlaze u cirkulaciju i b) reesterifikacija NEFA i formiranje triglicerida koji ostaju u hepatocitima. Ova dva procesa dešavaju se često zajedno i dovode do ketoze krava i masne infiltracije jetre koje predstavljaju veliki problem u proizvodnji i zdravlju krava.^{5,86} Zaključujemo da se u jetri dešavaju suprostravljeni procesi oksidacije masnih kiselina i njihove reesterifikacije i produkcije triglicerida. Ovi procesi su definisani jetrinim enzimima, a njihova funkcija i ekspresija njihove iRNK je značajno izmenjena kod zdravih krava (sa očuvanim oksidacionim procesima) i krava sa ketozom i/ili zamašćenom jetrom. Krave sa indukovanom ketozom imaju slabiji kapacitet za glukoneogenezu i slabiju aktivnost glukozo-6-fosfataze i piruvat-karboksilaze.^{79,98} Još uvek se raspravlja o tome koji su enzimi ključni u metabolizmu masti i njihovom usmeravanju ka oksidaciji odnosno reesterifikaciji. Mitohondrijalne forme glicerol fosfat acil-transferaza (mGPAT) su veoma značajne u sintezi aciglicerida. Jetrin iRNK za mGPAT opada u periodu zasušenosti krava, da bi njena produkcija rasla od partusa do 14. dana laktacije⁹⁹ Slično kretanje je pokazala i mikrozomalna aktivnost enzima diacilglicerol-aciltransferaze (jedini enzim specifičan za sintezu triglicerida u jetri), ali nije pronađena razlika u aktivnosti kod krava sa masnom jetrom i zdrave kontrole.¹⁰⁰ Na osnovu navedenog zaključeno je da u patofiziološkom smislu beta-oksidacija NEFA i stvaranje ketonskih tela ima mnogo veći značaj za funkcionalni status jetre.¹⁰¹ Beta-oksidacija masnih kiselina odigrava se u mitohondrijama hepatocita pod dejstvom karnitil palmitoil-transferaza (CPT-1).

Aktivnost ovog enzima je ingibirana putem malonil koenzima-A, koji nastaje iz metabolizma propionata, a pošto se metabolizma propionata menja u peripartalnom periodu to može objasniti nivo beta-oksidacije i stvaranje ketonskih tela. Aktivnost CPT-1 je značajno viša u prve tri nedelje posle partusa, a njena osetljivost na malonil koenzim-A opada ako su krave hranjene restriktivno, što bi moglo objasniti ketogenezu kod nedovoljno hranjenih krava.¹⁰² Pored enzimatske i receptorske/genomske osnove za akumulaciju lipida i ketogenezu u jetri bitno je napomenuti prirodnu karakteristiku preživara da u krvi sadrže nisku koncentraciju lipoproteina vrlo male gustine (VLDL, eng. *Very Low Density Lipoproteins*), koji imaju značajnu ulogu u transportu triglicerida iz jetre u druga tkiva, a posebno mlečnu žlezdu. U peripartalnom periodu jetra ima ograničenu sposobnost sinteze VLDL, što je posebno izraženo kod izražene lipidne mobilizacije. Transportna uloga VLDL je posebno izražena uzimajući u obzir da kod preživara postoji veoma mala zastupljenost hilomikrona kao transportnog oblika, a poluživot VLDL je vrlo kratak 2-11 minuta, što dodatno ograničava traspost triglicerida.¹⁰³ Promena u transkripciji i postranskripciji proteina koji su sadržani u VLDL utiče na nastanak infiltracije jetre mastima.¹⁰⁴ Povećana mobilizacija lipida i njihovo metabolisanje u jetri uz smanjenu sposobnost jetre da produkuje transportne lipoproteine dovodi do akumulacije lipida u jetri, masne infiltracije i masne degeneracije, što ima negativan uticaj na zdravlje i prduktivnost krava. Najteži oblik ovog poremećaja naziva se hepatična koma, poznata i kao graviditetna toksemija koja najčešće ima letalan ishod.⁵

Obzirom da je hepatična lipidoza u manjoj ili većoj meri uvek prisutna u peripartalnom periodu, značajno je ispitati funkcionalni status jetre. U kliničko-laboratorijskom radu funkcionalni status jetre se ispituje kroz hepatogram. Hepatogram se sastoji od nekoliko jetrinih profila, koji zajedno čine neki od hepatičnih sindroma: sindrom zapaljenske reakcije, sindrom bilijarne retencije, sindrom insuficijencije hepatocita i sindrom nekroze hepatocita. Sindrom zapaljenske reakcije podrazumeva opšte principe za dijagnostiku

zapaljenskog procesa: određivanje leukograma, sedimentacije krvi, gama globulina i dr. Navedeni nalazi su nespecifični. Za dijagnostiku sindroma bilijarne retencije neophodno je određivanje: koncentracije ukupnog i direktnog bilirubina u krvi, koncentracije urobilinogena u krvi, koncentracije žučnih boja u mokraći i fecesu, koncentracije holesterola u krvi, serumska aktivnost AP i GGT (gama-glutamil transferaza) i test ekskrecije bromsulfaleina. Parametri koji ukazuju na smanjenje pojedinih funkcija jetre (sindrom insuficijencije jetre) su: koncentracija albumina u krvi, koncentracija amonijaka/uree u krvi, koncentracija proteinskih faktora koagulacije krvi, protrombinsko vreme, ekskrecija bromsulfaleina i koncentracija holesterola i žučnih kiselina u krvi. Parametri koji ukazuju na nekrozu jetrinog parenhima (sindrom nekroze hepatocita) ogledaju se u aktivnosti sledećih enzima: alanin aminotransferaza (ALT), asparat aminotransferaza (AST), sorbitol dehidrogenaza (SDH), ornitin-karbamil transferaza (OCT), laktat dehidrogenaza (LDH), alkalna fosfataza (AP) i dr.¹⁰⁵ Kod krava u peripartalnom periodu raste koncentracija bilirubina i aktivnost jetrinih enzima. Koncentracija triglicerida i koncentracija holesterola u serumu opada, zbog akumulacije odnosno smanjene produkcije VLDL. Odnos koncentracije NEFA prema holesterolu koristi se kao indirektni pokazatelj zamašćenja jetre kod krava.¹⁰⁶ Vrednost mnogih metabolita korelira sa stepenom zamašćenja jetre kod krava.¹⁰⁷ Zbog činjenice da stepen zamašćenja jetre kod krava u peripartalnom periodu ukazuje na stepen opterećenosti metaboličkim stresom određivanje parametara koji ukazuju na funkcionalni status jetre je neizostavno.

2.3.4. Metabolički pokazatelji oksidativnog opterećenja

Oksidativni stres je stanje u organizmu koje se javlja kada prooksidansi (slobodni radikali) nadvladaju mehanizme antioksidativne zaštite organizma. Najčešće nastaje u

uslovima kada u organizmu postoji povećana produkcija slobodnih radikala i smanjena sposobnost organizma za njihovu neutralizaciju. Za oksidativni stres se može reći da je on normalna pojava. Proces oksidacije je deo regulatornog biohemijskog funkcionisanja naših tela u procesu stvaranja energije koja nam je neophodna za život. Tokom ovih procesa stvaraju se slobodni radikali koji imaju svoje fiziološke pozitivne funkcije. Problem nastaje kada se poremeti fiziološka ravnoteža i kada otkažu prirodni mehanizmi odbrane pa nivo slobodnih radikala počne da prevazilazi kapacitet organizma da ih neutrališe, što menja oksidativni status i telo ulazi u zonu pravog oksidativnog stresa, što je stanje visokog rizika za nastajanje najrazličitijih poremećaja i bolesti. Utvrđivanje stepena oksidativne opterećenosti vrši se merenjem koncentracije odnosno aktivnosti oksidanasa (pro-oksidanasa) i antioksidanasa.^{108,109} Prooksidansi su svi oni metaboliti koji sadrže reaktivni molekul koji u poslednjoj atomskoj orbiti ima jedan nespareni elektron, preko kog ulaze u oksido-redukcione reakcije (eng. *ROM, reactive oxigen metabolites*). Reaktivni molekuli se mogu ugraditi u celularne strukture, genetičke i/ili gradivne gde dovode do značajnih funkcionalnih promena.

Za peripartalni period kod krava najznačajniji su oni reaktivni molekuli koji nastaju u procesu intenzivne lipidne mobilizacije. Neesterifikovane masne kiseline predstavljaju prilično reaktivne molekule koji su skloni oksidaciji i reakciji sa slobodnim radikalima. Masti se smatraju najboljim indikatorom oksidativnog stresa.¹¹⁰ Malondialdehid (MDA) je produkt reakcije između slobodnih radikala i poluzasićenih masnih kiselina. On brzo reaguje sa tiobarbiturnom kiselinom dajući reaktivnu supstancu tiobarbituratne kiseline (eng., *TBARS, thiobarbituric acid reactive substances*). Koncentracija MDA i/ili TBARS značajno je povišena u periodu posle teljenja kod mlečnih krava i pozitivno korelira sa koncentracijom NEFA i BHB.^{111,112}

Antioksidansi kod preživara se dele u tri velike grupe: a) superoksid dizmutaza (SOD) i glutation peroksidaza (GSH-Px), kao intracelularni antioksidansi; b) neenzimski proteinski

antioksidansi u plazmi, kao što su proteini sa tiolskom grupom u okviru albumina i c) neenzimski antioksidansi male molekulske težine kao što su glutation, alfa-tokoferol, beta karotein i drugi. Antioksidativni kapacitet krava u mnogome zavisi od energetske bilansa krava, tako da krave sa ketozom usled negativnog energetske bilansa pokazuju manju antioksidativnu aktivnost i povećanu koncentraciju lipidnih reaktivnih molekula. Antioskidativna zaštita zavisi i od načina ishrane i produkcije mleka kod krava. Uticaj partusa kod krava signifikantno utiče na antioksidativni sistem, tako da koncentracija antioksidativnih supstanci opada u ranoj laktaciji.^{113,114,115}

Oksidativni stres kod krava ima aditivnu ulogu jer zajedno sa metaboličkim stresom može negativno uticati na zdravlje krava, proizvodnju mleka i reprodukciju.

2.3.5. Metabolizam minerala

Metabolizam minerala u peripartalnom periodu značajno je izmenjen, a od posebnog patofiziološkog značaja je ispitivanje koncentracije kalcijuma (Ca), magnezijuma (Mg) i fosfora (P).

Koncentracija Ca kod krava iznosi 2.1-2.5 mmol/l, a u peripartalnom periodu kod krava dolazi do opadanja koncentracije kalcijuma.⁶⁸ Opadanje kalcemije nastaje zbog povećane pasaže ovog jona u mleko. Da bi se obezbedila dovoljna koncentracija kalcijuma vrši se njegova mobilizacija iz kostiju, što je regulisano delovanjem paratireoidnih hormona (PTH). Takođe, delovanjem vitamina D pojačava se apsorpcija Ca iz intestinalnog trakta i smanjuje njegov gubitak kroz bubrege. Međutim, mnogi faktori utiču na homeostazu kalcijuma: alkalozna dovodi do smanjenje osetljivosti koštanog tkiva na PTH., hipomagnezemija koja redukuje odgovor PTH na hipokalcemiju i redukuje senzitivnost tkiva na PTH, hiperfosfatemija infibira delovanje D vitamina. U periodu zasušenosti pribegava se

davanju magnezijumovih soli i hrane koja ima nisku katjonsko-anjonsku razliku (eng., *Dietary cation–anion difference - DCAD*), što omogućuje acidifikaciju krvi i brzu mobilizaciju kalcijuma po partusu. Izračunavanje DCAD (mEq/kg suve materije hrane) se vrši na osnovu formule $(Na+K)-(Cl+S)$, izražen u miliekvivalentima; a koriguje se dodavanjem anjonskih soli (Ca, Mg i amonijumske sulfatne i hloridne soli, kao i HCl). DCAD vrednost je kod zasušenih krava negativna, dok kod krava u laktaciji mora biti pozitivna, pa se anjonske soli ne daju ovoj proizvodnoj kategoriji.

Magnezijum je značajan intracelularni kofaktor mnogih enzimskih reakcija, dok kao ekstracelularni ima funkciju u održavanju impulsa u nervima mišićima i u metabolizmu kostiju. Koncentracija Mg se kreće između 0.75 i 1 mmol/l. U mleku je koncentracija Mg oko pet puta veća i ako ga nema dovoljno u hrani organizam brzo ulazi u stanje hipomagnezemije. Apsorpcija Mg zavisi od njegovog unosa u hrani i postignute koncentracije u rumenu. Unošenje magnezijuma i njegova reapsorpcija u bubrezima se lako održavaju kod goveda, a povećana reapsorpcija Mg iz bubrežnih tubula biva aktivirana pomoću PTH tek kada je koncentracija Mg niža od 0.74 mmol/l. Ako je koncentracija Mg ispod 0.8 mmol/l kod krava 12 sati posle partusa moguć je nastanak hipomagnezemije uz hipokalcemiju, što kasnije negativno utiče na zdravlje i produktivnost krava (mlečna groznica sa komplikacijama). Fosfor koji se određuje u krvi je zapravo deo neorganskih fosfata, a koncentracija fosfora je od 1.3-2.6 mmol/l. Tokom hipokalcemije raste koncentracija PTH koja povećava ekskreciju fosfora, pa su hipokalcemične krave često i hipofosfatemične. Fosfor ima značajnu ulogu u regulisanju brojnih metaboličkih reakcija, a glavnu ulogu u metabolizmu ugljenih hidrata, prekoformiranja heksozafosfata, adenozinfosfata i kreatinfosfata, zatim u metabolizmu masti, preko intermedijarnog formiranja lecitina, značajan je konstituent fosfolipida, prisutan je u nukleoproteinima hromatinske i fosfoproteinima (kazein) a pomaže i u reguliranju acidobazne ravnoteže.¹¹⁶

Hipokalcemija, hipomagnezemija i hipofosfatemija imaju veliki klinički značaj u peripartalnom periodu. Hipokalcemija (manje od 2 mmol/l) i hipomagnezemija dovode do mlečne groznice, koja se odlikuje najpre hipersenzibilnošću, a ubrzo atakcijom i paralizom, uz prestanak preživljanja i razvoj hipotermije. Oboljenje se kod krava javlja najčešće u prvih 24h posle teljenja.¹¹⁷ Hipokalcemija se dovodi u vezu sa mastitisom i metritisom, zbog značaja kalcijuma u funkcionisanju imunoloških ćelija.¹¹⁸ Snižena kalcemija dovodi do smetnji u funkcionisanju glatke muskulature digestivnih organa, pa se kod krava dešava dislokacija sirišta.¹¹⁹ Koncentracija kalcijuma ispod 1,8 mmol/l je značajan prediktivni faktor za rano isključivanje krava iz proizvodnje.¹²⁰ Za ispitivanje relacije između peripartalnog metaboličkog stresa i hipokalcemije treba napomenuti da hipokalcemija sprečava sekreciju insulina i iskorišćavanje glukoze u perifernom tkivu.¹²¹ Ovakvo stanje povećava lipidnu mobilizaciju i pojačava metabolički stres.

Hipomagnezemija kod krava dovodi do razvoja tetaničnih grčeva, poznatijih kao pašta tetanija, koji nastaju kao posledica nedovoljnog unošenja Mg putem zelene trave. Klinički simptomi se mogu videti kada je koncentracija Mg ispod 0.5 mmol/l, a postoji i hipokalcemija. Smanjen unos hrane i promene u proizvodnji mleka se vide kada je koncentracija Mg ispod 0.8 mmol/l.¹¹⁶

Hipofosfatemija prati mnoge poremećaje u peripartalnom periodu krava. Koncentracija fosfora značajno utiče na odgovor krava na terapiju tokom mlečne groznice tako da hipofosfatemija (koncentracija P niža od 0.9 mmol/l) umanjuje terapijski efekat.¹²² Kod mnogih krava koncentracija fosfora može biti u suboptimalnim koncentracijama 0.8-1.1 mmol/l, što može uticati na glukolizu i funkcionalni status eritrocita, pa se javlja hemoglobinurija.¹¹⁶ Insulin zavisno smanjivanje koncentracije neorganskog fosfora nastaje kao posledica ulaska glukoze u glukolitičke puteve perifernih tkiva, koja za sobom povlači i

fosfor, što je regulisano preko insulin-zavisne ekspresije gena za Na/P kotransporter.^{123,124}

Kod ketotičnih krava koncentracija neorganskog fosfora je niža.⁵

Sve navedeno ukazuje da postoji veza između metaboličke adaptacije i koncentracije Ca, P i Mg, pa će njihova koncentracija biti određena kako bi se ispitali modeli za procenu peripartalnog metaboličkog stresa.

2.4. Hematološka adaptacija i krvna slika u peripartalnom periodu

Krvna slika kod mlečnih krava, kao i kod drugih životinjskih vrsta ima velikog značaja u proceni zdravlja. Analiza standardne krvne slike crvene loze podrazumeva: 1. ispitivanje hematološkog statusa (određivanje hematokrita, broja eritrocita, koncentracije hemoglobina, eritrocitnih indeksa); 2. ispitivanje biohemijskog statusa (serumsko gvožđe, feritin, kapacitet vezivanja gvožđa i slobodni transferin); 3. ispitivanje markera hemolize (nekonjugovani bilirubin, hemoglobin u urinu, haptoglobin, hemosiderin u urinu); 4. ispitivanje imunoloških markera (Coombsov test, eritrocitna antitela i sl.). U brojnim anemijama se javlja smanjena koncentracija hemoglobina. Za detaljniju dijagnostiku bitno je odrediti eritrocitne indekse: MCV (eng., *mean cell volume*, srednja vrednost zapremine eritrocita), MCH (eng., *mean cell-corpuscular hemoglobine*, srednja vrednost količine hemoglobina u ćeliji), MCHC (eng., *mean cell-corpuscular hemoglobine concentration*, srednja vrednost koncentracije hemoglobina u eritrocitima). Za potpunu analizu crvene krvne loze potrebno je ispitati i postojanje anizocitoze i poikilocitoze analizom mikroskopskog razmaza.^{105,125}

Kod mlečnih krava brojni faktori imaju uticaj na vrednosti crvene krvne loze. Tako mlečne krave imaju niže vrednosti parametara eritrocitne loze u odnosu na tovne rase, dok u

okviru mlečnih rasa najnižu vrednost hemoglobina ima crno-beli Holštajn. Mlečnost ima značajnu ulogu, tako da sa rastom mlečnosti opada vrednost hemoglobina i hematokrita. U peripartalnom periodu, posebno na sam dan porođaja i u prvim danima laktacije krave imaju manji broj eritrocita i nižu koncentraciju hemoglobina.^{126,127,128,129} Nastanak anemije i snižena koncentracija hemoglobina uz metaboličko opterećenje i povišenu koncentraciju NEFA mogu predisponirati krave ka nastanku periportalne inflamacije uterusa.¹³⁰ Ketoza kod krava u peripartalnom periodu ima uticaja na eritrocitnu lozu koja može pokazati znake anemije.¹³¹ Intenzitet lipolize i ketogeneze u peripartalnom periodu je u negativnoj korelaciji sa vrednostima crvene krvne loze.⁸⁵

Povećan ukupan broj leukocita (leukocitoza) nastaje usled: inflamacije, nekroze tkiva, delovanja kortikosteroida i epinefrina, akutne limfoblasne leukemije, hronične limfocitne leukemije, akutne ili hronične mijeloidne leukemije, limfoma i deficijencije adhezivnih molekula leukocita. Smanjenje ukupnog broja leukocita (leukopenija) se javlja prilikom: jake infekcije, endotoksičnih stanja, aplastične anemije, aleukemičnih akutnih leukemija, infektivnih bolesti, mijelodisplastični sindrom i dr. Pored ukupnog broja leukocita značajno je odrediti i diferencijalnu krvnu sliku sa brojem bazofila, neutrofila, eozinofila, monocita i limfocita. Oni se mogu odrediti pomoću hematološkog brojača. Povećan broj bazofila (bazofilija) ukazuje na hipersenzitivne reakcije, tumor mast ćelija, parazitizam, bazofilnu leukemiju i mijeloproliferativne bolesti. Bazopenija se vrlo teško dijagnostikuje, jer vrednost od nula bazofila kod većine životinjskih vrsta i ljudi ulazi u referentne vrednosti. Eozinofilija se javlja u hipersenzitivnim reakcijama, parazitozama, limfomima, hipoadrenokorticismu, eozinofilnoj leukemiji i dr. Eozinopenija je teška za dijagnostiku, jer nula ulazi u referentnu vrednost, ali hronična eozinopenija ukazuje na insuficijenciju koštane srži. Limfocitoza ukazuje na hroničnu antigensku stimulaciju, nelimfoidne neoplazme, imunski posredovane bolesti, limfocitne i limfoblasne leukemije. Limfopenija nastaje kao posledica delovanja

glukokortikoida, virusnih infekcija, imunosupresije, kod enteropatija sa gubitkom proteina, imunodeficientnih stanja i sl. Monocitoza prati septikemična stanja, hemolize, odgovor na glukokortikoide, nehematopoezne neoplazme i oštećenje kostne srži, dok se monocitopenija teško dijagnostikuje. Neutrofilija se javlja kod inflamacija, kao odgovor na glukokortikoide i epinefrin, zatim kod hronične mijeloidne leukemije i deficijencije adhezionih molekula leukocita. Neutropenija se dešava kod endotoksemija, aplastične anemije, aleukemičnim leukemija, virusnih infekcija, imunoposredovanih stanja i dr. Pored određivanja broja leukocita i diferencijalne krvne slike značajno je odrediti i njihovu starost. Ona se određuje na osnovu prisustva blasta i stepena segmentiranosti njihovog jedra. Ako se u perifernoj krvi javljaju mlađi oblici razvoja granulocitne loze, sa velikim brojem štapastih granulocita i metamijelocita, onda se takva pojava zove skretanje u levo. Skretanje u levo uz leukocitozu govori u prilog aktivnoj produkciji ćelija bele loze, ali je skretanje u levo uz leukopeniju prognostički vrlo loš znak kod mnogih bolesti.^{105,125}

Kod mlečnih krava laktacija ne utiče značajno na parametre bele krvne loze, ali endokrinološke promene, peripartalni stres i razvoj infekcija značajno menjaju krvnu sliku krava u peripartalnom periodu. Od posebnog interesa je određivanje ukupnog broja leukocita, broja neutrofila, limfocita i odnosa broja neutrofila prema broju limfocita (N:L odnos). U peripartalnom priodu dolazi do opadanja ukupnog broja leukocita.^{126,127,128,129} Pad broja leukocita slabi odbrambene sposobnosti organizma, a krave su posebno predisponirane mastitisu ako imaju nisku vrednost eozinofila, odnosno metritisu ako postoji niska vrednost monocita.¹³⁰

Zapaljenske reakcije i diferencijalna bela loza kod krava moraju se drugačije posmatrati, jer postoje specifičnosti krvne slike i to: visok procenat limfocita (60-80%) i slaba ili nikakava rezerva mladih granulocita u kostnoj srži. Tokom zapaljenske reakcije kod goveda dolazi do pada broja neutrofilnih granulocita uz pad ukupnog broja leukocita, pa su

neutropenija i leukopenija prvi znaci u akutnoj upali. Tek nakon nekoliko dana ubrzava se leukopoeza i mladi neutrofilni granulociti izlaze u cirkulaciju, ali je klinički često neprimećen zbog brzog trošenja. U akutnim upalama gnojnog tipa postoji leukopenija, limfopenija i neutropenija sa skretanjem u levo. Ako životinja preživi akutnu fazu dešavaju se kompenzacije u beloju lozi, tako da raste broj neutrofilnih granulocita a broj limfocita opada, pa njihov odnos postaje inverzan.¹³² Ovdse su opisane promene u klasičnoj zapaljenskoj reakciji. Peripartalni period pokazuje određene specifičnosti kada je odnos neutrofila i limfocita u pitanju.

Odnos neutrofila i limfocita (N:L odnos) je značajan pokazatelj zdravlja i stresne opterećenosti životinja.¹³³ Ovaj odnos kod odraslih goveda iznosi približno 0,5:1. U periodu oko teljenja kod krava postoji tipičan stresni leukogram, koji se odlikuje neutrofilijom, limfopenijom, eozinopenijom i varijabilnom monocitozom. Akutni stres i hiperkortizolemija dovode do porasta koncentracije neutrofila povlačenjem ovih ćelija u centralni pul krvotoka, dok limfociti migriraju ka periferiji, tako da dolazi do porasta odnosa neutrofila i limfocita (N:L odnos često preko 1).¹³⁴ Posle adaptacije na stresne uslove N:L odnos se vraća na fiziološki nivo u periodu 2-7 dana.¹³⁵ Manja vrednost N:L odnosa neđena je na farmama sa dobrom negom i dobrim medicinskim tretmanom krava.¹³⁶ Novija istraživanja pokazuju da N/L odnos može biti veći od 1 kod potpuno zdravih krava, pa se upotreba ovog indikatora mora vršiti uz sagledavanje kompletnog zdravlja i metabolizma krava.¹³⁷ Krave kod kojih je 7-15 dana posle teljenja N:L odnos preko fizioloških vrednosti nalaze se u fazi prolongiranog stresa. Prolongirani stres može biti uzrokovan prolongiranim metaboličkim stresom sa povišenim vrednostima NEFA i BHB i sniženom vrednošću glikemije, koji se javlja kod određenog broja krava posle teljenja. Koncentracija ovih metabolita značajno korelira sa N:L odnosom.¹³⁸ Povišene vrednosti stresnih hormona dovode do porasta neutrofila i ulaska u krvotok iz marginalnog pula. U jednom ogledu ispitan je uticaj aplikacije deksametazona na

funkciju limfocita u drugoj nedelji posle partusa. Aplikacija deksametazona dovela je do značajnog porasta N:L odnosa, koji je predhodno bio u okviru fizioloških granica, na račun porasta broja neutrofila. Dakle, veštačkim podražavanjem akutne stresne reakcije dolazi do značajnog porasta broja neutrofila u nedeljama posle partusa.¹³⁹ Vrednost odnosa N:L preko 1 ukazuje da su krave opterećene inflamacijom ili drugim stresorima.¹⁴⁰

Zbog svega navedenog praćenje i analiza hematoloških parametara mogu biti od koristi u proceni adaptacione sposobnosti na peripartalni metabolički stres kod krava.

2.5.Imunološka adaptacija krava na peripartalni metabolički stres

Imunosupresija je jedan od najvećih problema u peripartalnom periodu krava, koja se povezuje sa nastankom brojnih peripartalnih oboljenja i ranim isključenjem krava iz proizvodnje. Visoka koncentracija kortizola, promene u metabolizmu i povećana koncentracija NEFA i BHB, zatim smanjena koncentracija glukoze i kalcijuma, oksidativno opterećenje organizma i negativni energetske bilans koji predstavljaju kompleks metaboličkog stresa kod krava pojedinačno ili zajednički utiču negativno na brojne imunološke funkcije u peripartalnom periodu kod krava.¹⁴¹

In vitro ispitivanja na imunološkim progenitornim ćelijama kostne srži su pokazala da ketonska tela i kortizol imaju uticaj na funkcionalni status ovih ćelija.¹⁴² Endogeni kortizol kod krava može ispoljiti uticaj na imunološke ćelije bez obzira na nagli porast i brz pad njegove koncentracije.¹⁴³ Povišena koncentracija NEFA u peripartalnom periodu dovodi do promena u celularnom imunološkom odgovoru modifikacijom intracelularnih signala, kontrolom ekspresije gena, aktivacijom transkripcionih faktora, indukcijom apoptoze i modifikujući produkciju lipidnih aktivnih medijatora. Promene u sastavu serumskih NEFA

možu direktno da utiču na sastav fosfolipida u leukocitima, što umanjuje njihovu funkciju.¹⁴⁴ Tokom peripartalnog perioda dolazi do povećane mobilizacije lipida posebno kod gojaznih krava. Utvrđeno je da gojazne krave pokazuju značajne znake imunosupresije u peripartalnom periodu, koja se ogleda u negativnoj korelaciji između vrednosti NEFA i funkcionalnog statusa perifernih mononuklearnih ćelija (tako da se proizvodi manja količina imunoglobulina i interferona gama i smanjena je sinteza DNA).¹⁴⁵ Pored mononukleara i polimorfonukleari su osetljivi na povišenu koncentraciju NEFA. Kod neutrofila je pronađeno da in vitro dodavanje NEFA smanjuje njihovu vijabilnost i povećava oksidativno opterećenje.¹⁴⁶ Oksidativni stres dovodi do aktiviranja gena koji definišu proizvodnju proinflammatoryh citokina. Proinflammatory citokini u povećanoj količini dovode do razvoja nespecifičnih inflamatornih procesa u tkivu domaćina, što se može povezati sa metritisom ili mastitisom krava u peripartalnom periodu. Produkti lipidne peroksidacije povećavaju proinflammatory fenotip ćelija.¹⁴¹ Ispoljavanje proinflammatory fenotipa dovodi do apoptoze ćelija i smanjene vijabilnosti, što za posledicu ima umanjeni imunološki odgovor. Apoptoza i snižena vijabilnost nađena je kod mononukleara i kod polimorfonukleara, a u osnovi ovih procesa nalazi se oštećenje strukture DNK.¹⁴⁷

Ispitivanje vijabilnosti leukocita kod krava može biti interesantan opšti indikator imunog statusa, pa će kao takav biti predmet istraživanja u ovoj disertaciji u cilju procene peripartalnog metaboličkog stresa kod krava.

2.6. Celularna adaptacija krava na peripartalni metabolički stres (Hsp70)

Stresni proteini (eng., *Heat shock proteins, Hsp*) su čaperoni neophodni za pravilno formiranje polipeptidnog lanca; odgovorni su i za njegovu translokaciju u ćeliji. Ovi proteini su pronađeni tokom izlaganja toplotnom stresu, kada je njihova koncentracija i ekspresija u ćelijama rasla, čime se objašnjava njihov naziv. Prema molekularnoj masi razlikujemo nekoliko tipova, pa tako npr. postoje: 10 kDa (Hsp10), 20-30 kDa (Hsp27, HspB1), 40 kDa (Hsp40), 60 kDa (Hsp60), 70 kDa (Hsp70, Hsp71, Hsp72, Grp78, Hsx70), 90 kDa (Hsp90, Grp94) i 100 kDa (Hsp104, Hsp110) itd. Kod goveda je identifikovano četiri vrste gena za Hsp70, a iRNK za ovaj protein nađena je u tkivu različitih vrsta ćelija i u krvnoj plazmi.^{148, 149}

Hsp70 u ćelijama pomaže u ponovnom uspostavljanju native konformacije proteina denaturisanih pod dejstvom različitih stresora, sprečavajući njihovu agregaciju i čime čuvaju ćelije od apoptoze i pokazuju antiinflamatorni uticaj. Kada se radi o ekstracelularnom Hsp70, on ima ulogu citokina, imunostimulatornu ulogu (pomaže sintezu proinflamatornih citokina) i poboljšava antitumorski nadzor. Postoje dva načina kako Hsp70 dolazi u cirkulaciju. Jedan mehanizam je pasivan, gde koncentracija Hsp u krvi raste kao posledica nekroze ćelija ili njihove opterećenosti stresom. Drugi mehanizam je aktivan i podrazumeva aktivno lučenje Hsp-a u krvotok od strane različitih ćelija.¹⁴⁹ Još uvek nije poznat udeo Hsp-a koji u krvotok dolazi na jedan odnosno na drugi način, a uloga ekstracelularnog Hsp je kontradiktorna. Naime, koncentracija Hsp raste kod različitih oboljenja, a usled nedostatka Hsp dolazi do metaboličkog sindroma kod ljudi (gojaznost, diabetes, kardiovaskularne bolesti i dislipidemija).^{149,150} Takođe, povećana koncentracija ekstracelularnog Hsp-a znači bolje preživljavanje.¹⁵¹ Hsp70 ima ulogu u stimulanju imunog odgovora, ali i u njegovoj inhibiciji kako previše jak imuni odgovor ne bi doveo do oštećenja tkiva domaćina.

Postoje brojni faktori koji utiču na koncentraciju Hsp70 u serumu krava, kao što su starost i stadijum laktacije. Koncentracija Hsp72 je viša u prvih 60 dana laktacije u odnosu na kasniju laktaciju¹⁵² Međutim, koncentracija Hsp72 je značajno niža kod krava pred partus i u prvim nedeljama posle partusa, da bi potom rasla.¹⁵³ Ovo ukazuje na postojanje određenih specifičnosti u regulaciji ekstracelularnog Hsp72 kod krava u peripartalnom periodu. Kod mlečnih krava postoji pozitivna korelacija između vrednosti ekstracelularnog i intracelularnog Hsp-a 72. Koncentracija NEFA u peripartalnom periodu pokazuju pozitivnu korelaciju sa koncentracijom Hsp72.¹⁵³

Zbog svega navedenog, postoji pretpostavka da indikatori metaboličkog stresa mogu uticati na koncentraciju Hsp70 u serumu krava.

2.7. Izmjena telesne kondicije krava i peripartalni metabolički stres

Kondicija životinja (lat., *conditio* – stanje) predstavlja standard kome odgovara uhranjenost životinje, stanje zdravlja i spoljašnji izgled, te se ona često definiše i kao fiziološko stanje uslovljeno ishranom, negom, zdravstvenim statusom životinja i njihovim iskorišćavanjem. Konstitucija (lat., *constitutio* – građa) je kompleks osnovnih svojstava organizma, koji određuju zahteve u pogledu uslova života, usmerenje produktivnosti i karakter reakcije na pojedine faktore spoljne sredine. Proizvodna kondicija i čvrsta i snažna konstitucija su odlike krava holštajn-frizijske rase.¹⁵⁴

Telesna kondicija krava je indirektan pokazatelj energetskeg metabolizma krava, obzirom da negativni energetski bilans dovodi do slabljenja kondicije sa trošenjem masnog tkiva. Telesna kondicija krava prestavlja dobar pokazatelj lipolize i gubitka masnog depozita tokom peripartalnog metaboličkog stresa i katabolizma. Zbog homeoretskog delovanja hormona rasta, smanjene osetljivosti na insulin i nedovoljnog unosa hrane u peripartalnom

periodu, posebno u ranoj laktaciji dolazi do mobilizacije masti i porasta koncentracije NEFA. Trošenje masnog depozita, posebno u površinskom, potkožnom masnom tkivu dovodi do promene u izgledu krave, pri promeni njene telesne kondicije. Promena telesne kondicije je posebno uočljiva ako se zna da u završnoj fazi laktacije i u periodu visokog graviditeta postoji pozitivan bilans energije, pa se višak energije taloži u vidu masti. Ocenjivanje telesne kondicije vrši se adpsekcijom i palpacijom a posebna pažnja se posvećuje regiji kukova, sednih kvrga, korena repa, sapi i slabinskoj regiji leđa. Pored navedenog, može se meriti i debljina masnog tkiva ultrazvučnom metodom. Postoji signifikantna korelacija između izmerenog masnog depozita i ocene telesne kondicije.

Postoji nekoliko vrsta skala u ocenjivanju telesne kondicije, a najprihvatljivija je skala od 1-5, gde su krave sa konditucijom ispod 2 mršave, a preko 4 ugojene. U zavisnosti od vremena ocenjivanja postoje preporučene vrednosti za telesnu kondiciju: teljenje 3,5 (3,25-3,75); vrh laktacije 2,75 (2,50-3,25); sredina laktacije 3,00 (2,75-3,50); kasna laktacija 3,25 (3,00-3,50) i zasušenje 3,50 (3,25-3,75). Promena jedne jedinice telesne kondicije podrazumeva promenu mase tela od oko 55 kg, odnosno 400 Mcal energije.¹⁵⁴ U zavisnosti od ocene telesne kondicije razlikujemo sledeće vrednosti debljine masnog tkiva na leđima merenih ultrazvukom: ocena kondicije 1, <5mm; ocena kondicije 1-2, 5-10mm; ocena kondicije 2-3, 10-20mm; ocena kondicije 3-4, 20-30mm; ocena kondicije preko 4-5, 30-35mm.¹⁵⁵

Određivanje telesne kondicije krava ima velikog značaja u proceni peripartalnog zdravlja krava i produktivnosti krava. Jedan od glavnih okidača metaboličkih izmena u peripartalnom periodu je smanjen unos suve materije hrane. Utvrđeno je da krave koje imaju veću telesnu kondiciju uzimaju hranu u manjim količinama, čak 2 do 3 nedelje pre i posle partusa.¹⁵⁶ Ovo može imati aditivni efekat na nastanak metaboličkog stresa i pokretanje homeoretskih promena kod krava. Krave sa suviše visokom ili suviše niskom telesnom

kondicijom proizvode manje mleka u odnosu na krave sa optimalnom kondicijom. Promena telesne kondicije od 2 do 3 u ranoj laktaciji utiče povoljno na proizvodnju mleka, dok porast kondicije preko 4 utiče negativno. Krave koje tokom rane laktacije gube na kondiciji za jednu ocenu proizvode više mleka.¹⁵⁷ Iako viša telesna kondicija znači veću proizvodnju mleka, porast telesne kondicije negativno utiče na perzistenciju laktacije.¹⁵⁸ Niža telesna kondicija u periodu pred teljenje pokazuje pozitivan uticaj na proizvodnju mleka u odnosu na višu telesnu kondiciju.¹⁵⁹ Zaštita krava od pregojesnoti u periodu pred teljenje i zaštita krava od velikog gubitka telesne kondicije u ranoj laktaciji predstavlja najznačajniji zadatak veterinara i stočara iz oblasti dijetetike, jer osim što može uticati na proizvodnju mleka, telesna kondicija se dovodi u vezu sa ostalim aspektima života krava. Visoka telesna kondicija u periodu pre teljenja i izražen gubitak telesne kondicije posle teljenja dovodi do subkliničke ili kliničke ketoze. Broj somatskih ćelija u mleku krava je u pozitivnoj korelaciji sa telesnom kondicijom na teljenju. Krave koje značajno gube telesne rezerve češće imaju problema sa infekcijom uterusa i retencijom placente. Šepavost se javlja češće kod krava čije su ocene telesne kondicije izvan optimalnih za period laktacije. U razmatranju uticaja telesne kondicije na zdravlje treba uzeti optimalne ocene za određeni period laktacije, ali i intenzitet gubitka telesne kondicije u ranoj laktaciji, posebno ako je on preko 1. Pored proizvodnje mleka i zdravlja, telesna kondicija u peripartalnom periodu ima uticaja na reproduktivnu efikasnost krava. Značajan gubitak telesne kondicije i nizak negativni pik kondicije je u negativnoj asocijaciji sa postpartalnim anestrusom i kasnijim stepenom konceptije. Smatra se da je optimalna telesna kondicija 3-3,5, na teljenju, uz gubitak niži od 1.¹⁶⁰

Telesna kondicija je indirektni pokazatelj metaboličkog statusa krava. U jednom ogledu krave su podeljene na dve grupe sa po dve podgrupe: grupa gojaznih krava i grupa mršavih krava, a u okviru svake podgrupa koja je gubila i koja nije gubila telesnu kondiciju u peripartalnom periodu. Kod gojaznih krava koje su gubile telesnu kondiciju nađena je najviša

koncentracija NEFA, BHB i bilirubina, a najniža koncentracija glukoze i insulina, koja je bila značajno različita u odnosu na grupu gojaznih krava koja nije gubila na telesnoj kondiciji i grupu mršavih krava. Ovo ukazuje da su gojazne krave značajno podložne insulinskoj rezistenciji, što pored telesne kondicije zavisi i od intenziteta kojim krave gube na telesnoj kondiciji.¹⁶¹ Krave koje gube više od 0.5 jedinica telesne kondicije pokazuju nižu koncentraciju IGF-I u peripartalnom periodu, što govori u prilog izraženom katabolizmu i homeorezi.³⁴ Čak i u uslovima toplotnog stresa, kada osetljivost na insulin raste, krave visoke telesne kondicije će imati viši stepen lipidne mobilizacije, što negativno korelira sa produktivnošću ovih krava u toplotnom stresu.¹⁶² Metabolički parametri koji ukazuju na funkcionalni status jetre (AST, urea, neki lipoproteini) koreliraju sa ocenom telesne kondicije kod krava.¹⁶³

Navedeni podaci ukazuju da promena telesne kondicije krava korelira sa adaptacionim procesima u metabolizmu tokom peripartalnog perioda kod krava. Zato ćemo ispitati da li ocena telesne kondicije zavisi od odabranog modela za procenu peripartalnog metaboličkog stresa.

2.8. Proizvodna svojstva krava i peripartalni metabolički stres

Sa aspekta praktičnog rada u govedarstvu određivanje endokrinih i metaboličkih parametara i modela metaboličkog stresa ima smisla samo ako se utvrdi da li ta metabolička prilagođavanja utiču na osnovna biološka-proizvodna svojstva mlečnih krava a to su proizvodnja mleka i reprodukcija. Proizvodnja mleka i reproduktivna efikasnost su glavni ekonomski motivi za uzgoj mlečnih krava. Ova dva svojstva su međusobno povezana. Poznato je da su dužina servis perioda i proizvodnja mleka u narednoj laktaciji u obrnutoj proporciji, kao i da zdravlje reproduktivnih organa zavisi od zdravstvenog statusa mlečne žlezde.¹⁶⁴ Negativni energetske bilans koji nastaje kao posledica prilagođavanja organizma na početak laktacije može značajno da izmeni i reproduktivnu efikasnost. Postoje brojne špekulacije prema kojima promene u koncentraciji hormona u peripartalnom periodu nastaju kao posledica odlaska hormona u plod i vime, čime se omogućuje adekvatna termoregulacija i metabolizam teladi odnosno vimena, a nastali disbalans hormona/metabolita koji ostaje u organizmu krava može loše uticati na proizvodnost krava. Ipak, na primeru insulina vidimo da se ne radi o prostom odlasku insulina u neka tkiva, već o smanjenom funkcionalnom kapacitetu pankreasa. Hormoni i metaboliti utiču na brojne procese u vimenu i reproduktivnim organima, pa je bitno opisati njihovo delovanje tokom peripartalnog perioda i metaboličkog stresa.

2.8.1. Proizvodnja mleka i peripartalni metabolički stres

Proizvodnja mleka i započinjanje laktacije su glavni pokretač svih metaboličkih adaptacija kod krava u peripartalnom periodu. Proizvodnja mleka se ponaša prema određenoj dinamici koja podrazumeva da proizvodnja mleka neprestano raste u prva dva meseca posle

partusa, da bi potom dostigla vrhunac i plato, posle čega dolazi do opadanja proizvodnje mleka do momenta zasušenja. Brzina porasta u proizvodnji mleka, vrednosti proizvodnje u vrhu laktacije i dinamika opadanja u proizvodnji mleka (perzistencija laktacije) su značajni pokazatelji produktivne vrednosti krava. Zbog toga su osmišljeni brojni matematički modeli kojima je formirana laktaciona kriva kod krava. Modeliranje laktacione krive omogućuje poređenje produktivnosti različitih krava iz različitih stada i različitog pariteta.¹⁶⁵

Mnogi faktori utiču na proizvodnju mleka tokom laktacije, a mi ćemo se bazirati na peripartalne promene u metabolizmu i zdravlju krava.

Negativni energetske bilans ima uticaja na proizvodnju mleka. U jednom ogledu je ispitivana vrednost korelacije negativnog energetske bilansa (ukupni energetske deficit, najniža vrednost energetske deficita, vreme potrebno da se krave vrata u pozitivni energetske bilans) sa svojstvima mleka (proizvodnja mleka, procenat proteina i masti, koncentracija proteina i mati). Rezultati istraživanja su pokazali da postoji negativna korelacija između vrednosti negativnog energetske deficita i proizvodnje mleka. Takođe, što je izraženiji negativni energetske bilans veća je koncentracija masti u mleku, dok je koncentracija proteina niža.¹⁶⁶ Smatra se da postoji negativni energetske bilans ako je koncentracija masti iznad 45g/l, a proteina ispod 32 g/l.⁷

Koncentracija kortizola značajno pozitivno korelira sa proizvodnjom mleka kod krava. Ovo je posebno interesantan podatak kada se zna da koncentracija kortizola raste u periodu pred teljenje. Utvrđeno je i da kontinuirano davanje sintetskih glukokortikoida (flumetazona) stimuliše proizvodnju mleka, sadržaj mlečne masti i ostalih sastojaka mleka. Međutim, davanje sintetskih glukokortikoida koji su više desetina puta jači od prirodnog kortizola (deksametazon i prednizolon) nepovoljno utiče na proizvodnju mleka.²¹ Hormon rasta ima značajan uticaj kako u razvoju mlečne žlezde tako i u održavanju mlečnosti, što se može povezati sa tipičnim homeoretskim efektom hormona rasta na početku laktacije. Proizvodnja

mleka pozitivno korelira sa koncentracijom hormona rasta, ali i sa odnosom hormon rasta: insulin, hormon rasta:NEFA i hormon rasta:BHB, što dodatno potvrđuje značaj hormona rasta u usmeravanju hranljivih materija ka mlečnoj žlezdi.¹⁶⁷ Smatra se da je IGF-I medijator preko kog hormon rasta deluje na produkciju mleka. Ipak, koncentracija između IGF-I i proizvodnje mleka je u peripartalnom periodu negativna, ali je kasnije pozitivna kod multiparnih krava, dok kod primiparnih krava korelacija ne postoji.¹⁶⁸ Koncentracija insulina negativno korelira sa proizvodnjom mleka, zato što insulin stimuliše upotrebu glukoze u perifernim tkivima, pa ona u nedovoljnoj meri dolazi do mlečne žlezde, što umanjuje sintezu laktoze (koja je higroskopna čime se povećava zapremina proizvedenog mleka).⁵ Uticaj kortizola, hormona rasta i insulina na proizvodnju mleka može se ispitati na modelu toplotnog stresa, kada se dešavaju procesi suprotni u odnosu na peripartalni period. Tokom izlaganja toplotnom stresu kod krava opada proizvodnja mleka, a na endokrinoj osnovi se vidi pad koncentracije kortizola i hormona rasta, a porast koncentracija insulina.¹⁶⁹ Tokom toplotnog stresa opada upotreba glukoze u vimenu, a raste upotreba NEFA i BHB, što negativno utiče na proizvodnju mleka.⁸

Mnoga istraživanja pokazuju i asocijaciju između pojedinih metabolita i proizvodnje mleka u ranoj laktaciji. Koncentracija NEFA $\geq 0,5$ mEq/L, BHB ≥ 600 $\mu\text{mol/L}$ i kalcijuma $\leq 2,1$ mmol/L dovodi do pada u proizvodnji mleka za 1,6 do 3,2 kg mleka dnevno u ranoj laktaciji. Visok nivo koncentracije NEFA i BHB u prvoj i drugoj nedelji posle teljenja ($\geq 0,7$ i $\geq 1,0$ mEq/L za NEFA, $\geq 1,400$ i $\geq 1,200$ $\mu\text{mol/L}$ za BHBA), i nizak nivo kalcijuma ($\leq 2,1$ mmol/L) u prve tri nedelje posle teljenja je u asocijaciji sa smanjenom proizvodnjom mleka u ranoj laktaciji.¹⁷⁰ Povećana proporcija krava sa visokom koncentracijom NEFA i BHB u stadu dovodi do umanjenja u produkciji mleka na kraju standardne laktacije od 305 dana.¹⁷¹ Povišena koncentracija NEFA i BHB negativno utiče na zdravlje vimena, što ima veze sa nastankom mastitisa u ranoj laktaciji i dodatnim padom u proizvodnji mleka.^{172,173} Mastitis

može izazvati i promene u endokrinom sistemu krava. Krave obolele od mastitisa imaju višu koncentraciju kortizola i nižu koncentraciju IGF-I, posebno ako je mastitis izazvan gram-negativnim endotoksičnim mikroorganizmima.¹⁷⁴ Peripartalni metabolički stres utiče na imunsku funkciju i apoptozu somatskih ćelija mleka, tako što povećava ekspresiju receptora za kortizol a smanjuje stvaranje protektivnog Hsp70, što uz ostale genske izmene, dovodi do njihove smanjene vijabilnosti i funkcionisanja.¹⁷⁵ Oksidativni stres, koji postoji u peripartalnom periodu, pomaže razvoju mastitisa kod krava u ranoj laktaciji.¹⁷⁶ Ostale peripartalne bolesti mogu da utiču na proizvodnju mleka u ranoj laktaciji, pa tako kod krava sa masnom jetrom postoji značajno niža proizvodnja mleka u prvih trideset dana laktacije.¹⁷⁷

Metabolički stres utiče na proizvodnju mleka u ranoj laktaciji. Zbog toga ćemo ispitivati proizvodnju mleka u funkciji modela za procenu peripartalnog metaboličkog stresa krava.

2.8.2. Reproductivne karakteristike krava i peripartalni metabolički stres

Reproduktivnost krava je veoma značajna produktivna osobina krava, od koje zavise i mnoge druge osobine, kao što je proizvodnja mleka. Postizanje reproduktivne efikasnosti i dobijanje jednog teleta godišnje predstavlja prioritet u govedarskoj proizvodnji. Parametri reproduktivne efikasnosti su: međutelidbeni interval (<13 meseci), broj dana do prvog primećenog estrusa posle teljenja (<40 dana), krave kod kojih je prvi estrus otkriven u prvih 60 dana posle teljenja (>90%), prosečan broj praznih dana do prvog osemenjavanja (45-60 dana), broj osemenjavanja po koncenpciji (<1,7 osemenjavanja) i prosečno trajanje servis perioda – period od partusa do fertilnog osemenjavanja tj. ponovnog uspostavljanja gravidnosti (85-100 dana).¹⁷⁸ Za stočare i veterinare posebno su interesantna tri perioda: postpartum aciklični period (period od partusa do nastanka prve ovarijalne aktivnosti, često

nije praćen kliničkim znacima estrusa, a ne koristi se za osemenjavanje jer involucija materice još nije gotova), interval od partusa do prvog vidljivog estrusa i interval od partusa do fertilnog osemenjavanja (servis perioda).

Negativni energetske bilans u peripartalnom periodu kod krava ima signifikantan uticaj na njihovu plodnost u ranoj laktaciji. Postpartalna lutealna aktivnost je u negativnoj korelaciji sa intenzitetom energetske deficita, tako da krave koje ne pokazuju energetske deficit pokazuju start lutealne aktivnosti na jajniku oko 20-25 dana postpartum, dok krave koje pate od energetske deficita (-125 MJ NEL/dan) započinju lutealnu aktivnost jednu do dve nedelje kasnije.¹⁶⁶ Što je negativni energetske bilans manje izražen, a period od postizanja najniže vrednosti energetske bilans do vraćanja u pozitivno stanje kraći, postoji manji broj praznih dana. Step konceptije od prvog osemenjavanja pozitivno korelira sa energetske bilansom.¹¹

Snižena koncentracija insulina tokom peripartalnog metaboličkog stresa može biti u vezi sa ponovnim uspostavljanjem ovarijalne aktivnosti. Insulin ima značajnu ulogu u uspostavljanju hipotalamo-hipofizo-ovarijalne sprege i stimuliše razvoj struktura u jajniku.^{179,180,181} Koncentracija NEFA se može dovesti u vezu sa postpartalnom ovarijalnom aktivnošću, posebno ako se zna da koncentracija NEFA u krvi oslikava i koncentraciju NEFA u folikularnom fluidu jajnika. Visoka koncentracija NEFA u ovarijalnom folikulu je u negativnoj korelaciji sa produkcijom 17β -estradiola (E2) značajnog za formiranje fizioloških i bihevioralnih znaka estrusa kod krave.^{182,183} Koncentracija IGF-I je takođe značajna u započinjanju postpartalne ovarijalne aktivnosti. Snižena koncentracija insulina koja ima veze sa sniženom koncentracijom IGF-I zajedno dovode do smanjene ovarijalne aktivnosti zbog smanjene osetljivost jajnika na gonadotropine (FSH i LH). Sa druge strane, nađeno je da FSH na granulosa ćelijama folikula stimuliše razvoj receptora za insulin i IGF-I, što dalje omogućava gonadotropinima da utiču na razvoj ovarijalnih folikula.^{184,185,186,187} Prolongirana

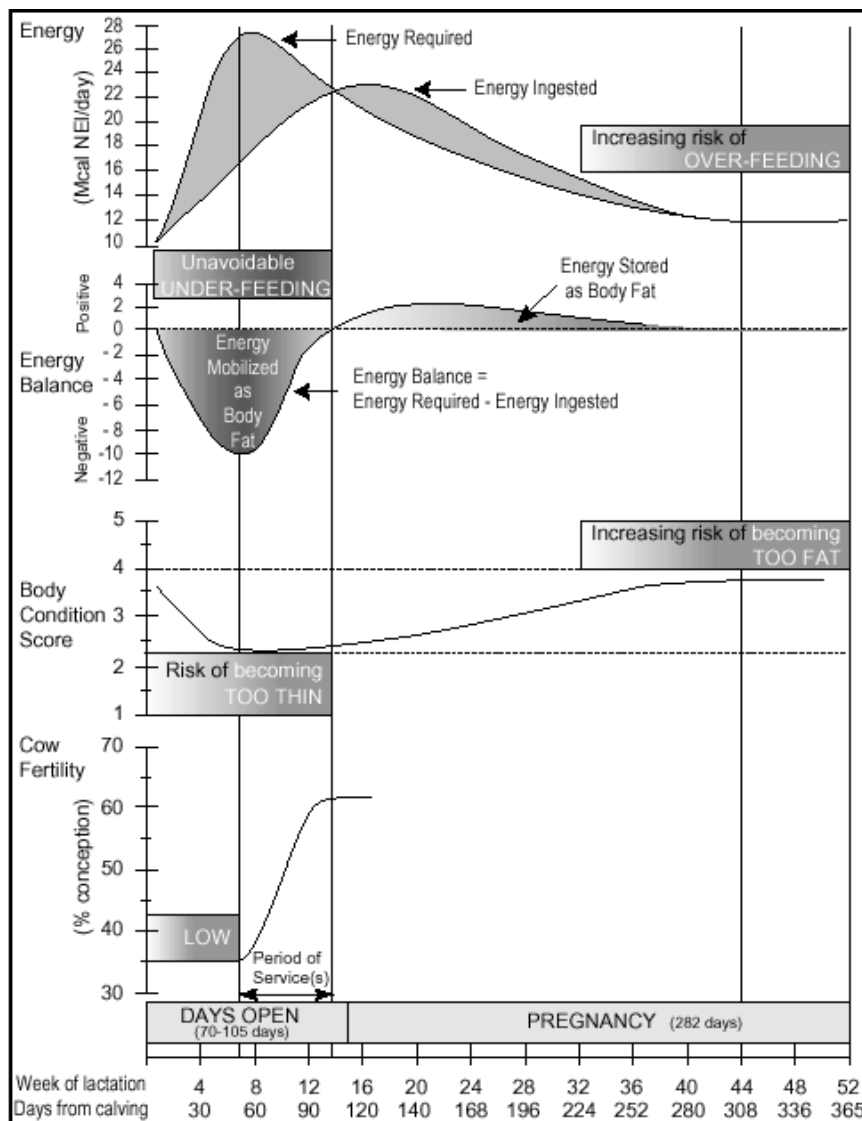
hiperketonemija kod krava u ranoj laktaciji negativno utiče na ovarijalnu aktivnost kod krava.¹⁸⁸ Kortizol, kao hormon stresa ima veliku ulogu u nastanku disfunkcionalnog jajnika usled razvoja ovarijalnih cista. Naime, tokom stresa usled delovanja ACTH raste koncentracija kortizola ali i progesterona. Progesteron iz nadbubrega koči odavanje gonadotropnih hormona iz hipotalamusa, a kortizol smanjuje broj receptora za luteinizirajući hormon na jajniku i sekreciju 17 β -estradiola(E2) iz antralnog folikula. Tako je povratna sprega jajnika i hipotalamusa oslabljena i izostaje preovulatorni pik LH, čime je ovulacija blokirana a jajnik ostaje sa nerazvijenim folikulom iz koga nastaje cista.²¹ Pored navedenog, ovarijalna aktivnost i ulazak u ponovni estrusni ciklus posle partusa kod krava zavisi i od težine porođaja i distokija, involucije uterusa i pojave metritisa u ranoj laktaciji.¹⁸⁹ Metaboličke izmene u smislu povišene koncentracije NEFA i BHB i snižene glikemije umanjuje kapacitet maturacije oocita, a utiče negativno i na koncentraciju estradiola i progesterona, što negativno utiče na fertilitet prilikom osemenjavanja te produžava servis-period.^{190,191}

Pored uticaja NEFA i BHB na reproduktivnu efikasnost krava, mnogi autori su pokazali da promena u koncentraciji holesterola, triglicerida, uree, kalcijuma i fosfora tokom peripartalnog perioda ima uticaja na reproduktivnu efikasnost. Ovi metaboliti su bitni prekursori polnih hormona, pokazuju funkcionalni status jetre koja je bitna za metabolisanje polnih hormona ili su na drugi način uključeni u funkcionalne procese koji su u vezi sa polnih hormonima i promenama na polnim organima, čime se objašnjava njihova veza sa reproduktivnom efikasnošću krava.^{192,193,194}

Krave koje ovuliraju imaju manju koncentraciju triglicerida u jetri i proporciju NEFA u odnosu na krave koje ne ovuliraju.¹⁹⁵ Različite endotoksične infekcije praćene produkcijom citokina (mastitis i metritis) menjaju endokrini profil krava i prolongira vreme prve postpartalne ovulacije, uzrokujući anovulatorne ciste.^{174,196}

Reproduktivna efikasnost zavisi od stepena opterećenosti metaboličkim stresom, pa će u ovom ogledu biti ispitana njihova međusobna relacija.

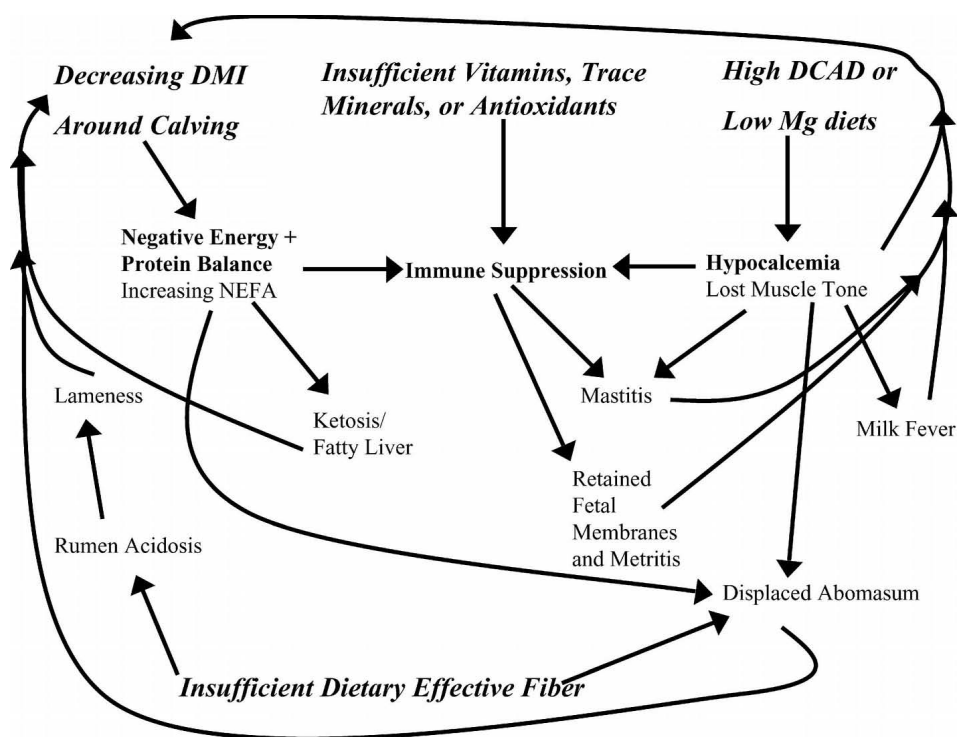
Relacija između energetske bilansa, metaboličkog stresa, telesne kondicije i fertiliteta krava prikazan je na Grafikonu 2.



Grafikon 2: Energija, energetski metabolizam, telesna kondicija i fertilitet kod krava tokom laktacije.

Metaboličke adaptacije koje se javljaju kao posledica negativnog energetskeg bilansa i metaboličkog stresa mogu biti takve da uslovljavaju pojavu različitih zdravstvenih poremećaja tokom rane laktacije. Pojava ovih oboljenja ukazuje na lošu adaptaciju krava na peripartalni metabolički stres. Zbog toga je praćenje metaboličkog profila značajno u proceni opterećenosti metaboličkim stresom.

Šema 1: Negativni energetskeg bilans, funkcionalne izmene i peripartalne bolesti kod krava.²⁹⁸



3.HIPOTEZA

Na osnovu činjenica navedenih u pregledu literature možemo izneti sledeće hipoteze:

- a) Patofiziološka procena peripartalnog metaboličkog stresa kod krava u ranoj laktaciji može zavisi od odnosa vrednosti anaboličkih indikatora (insulin i IGF-I, čija vrednost opada) i kataboličkih indikatora (NEFA i kortizol, čija vrednost raste) u prvoj nedelji posle teljenja.
- b) Uzajamna veza kataboličkih i anaboličkih indikatora može se dokazati testiranjem i najintenzivnija je u prvoj nedelji posle teljenja.
- c) Klasifikacija krava prema kriterijumu vrednosti indikatora metaboličkog stresa (bilo da se radi o pojedinačnom ili kombinovanom uticaju indikatora) u prvoj nedelji posle teljenja daje značajne razlike u vrednostima metaboličkog profila, krvne slike, imunoloških i celularnih adaptacija, proizvodnje mleka i reproduktivne efikasnosti u ranoj laktaciji.
- d) Četiri indikatora metaboličkog stresa imaju visok udeo u ukupnoj varijabilnosti ishodnih varijabli.
- e) Moguće je odrediti granične vrednosti odabranih indikatora metaboličkog stresa u prvoj nedelji laktacije koji sa određenim rizikom vrše odvajanje (diskriminaciju) krava koje će u prvim nedeljama posle teljenja imati vrednosti metaboličkog profila i krvne slike izvan referentnih vrednosti, kao i krave koje će proizvoditi manje mleka u

odnosu na predhodnu laktaciju i krave koje će imati umanjenu reproduktivnu efikasnost.

- f) Ukoliko se dokažu predhodne hipoteze moguće je ponuditi novi patofiziološki model za procenu metaboličkog stresa, ukupnog metaboličkog statusa, proizvodnosti i reproduktivnosti krava u ranoj laktaciji koji se zasniva na međusobnom odnosu anaboličkih i kataboličkih indikatora stresa.

4.MATERIJAL I METODE

4.1.Opšti uslovi eksperimenta – krave, ishrana i nega

Ogled je izvršen na 50 krava Holštajn-frizijske rase u drugoj i trećoj laktaciji, koje nisu pokazale nikakve znake poremećaja zdravlja u predhodnoj laktaciji, a imale su proizvodnju mleka oko 7000 litara. Krave su gajene u slobodnom sistemu, na dubokoj prostirci, ali se u tranzicionom periodu bile u porodilišu, gde je postojao vezani sistem. Ishrana krava je obročna, dok je u porodilištu posle partusa bila po volji.

Krave su hranjene miksovanim obrokom kojim se zadovoljavaju kompletne potrebe krava. Krave uzimaju vodu ad libidum. Pojilice su automatske, tako da uvek postoji dovoljno sveže vode. Obrok sadrži: kukuruznu silažu (oko 20-25kg), seno lucerke (oko 5 kg), reprine rezance (3-5kg), koncentrat (5-7kg) i druge dodatke. Obrok za krave u ranoj laktaciji se pravi da zadovolji sledeće standarde: proteine (17,5-19,5% SM sirovih proteina, 30-33% razgradivih proteina od ukupnih, 35-40% nerazgradivih proteina od ukupnih); ugljene hidrate (ADF minimum 17-21%, NDF minimum 28-31%, NDF iz kabaste hrane minimum 18-23%, nestrukturani ugljeni hidrati 35-42%, nivo suve materije iz kabaste hrane minimum 40-45%); energija (NEL 7-7,4 MJ/kg suve materije obroka) i masti u obroku 5-7%.

Muža se odvijala dva puta dnevno. Postojao je sistem za izmuzanje tipa riblja kost. Između štale i objekta za mužu postoji hodnik sa obezbeđenim podom za prolaz krava i dezbarijerom za dezinfekciju papaka. Vime se pravilno pralo, dezinfikovalo i pripremalo za

mužu. Muža se vršila u zatvorenom vakumskom sistemu, a mleko je zatvorenim vodovima odlazilo u sabirnu cisternu, gde se temperiralo i čuvalo do transporta.

Sprovedene su preventivne mera propisane Zakonom i Pravilnikom o utvrđivanju programa mera zdravstvene zaštite životinja. Obrada papaka vršena je u takvoj dinamici da u toku 6-8 meseci svim kravama budu sređeni papci. Povremeno je vršeno češagijanje kože krava, kako bi se sa nje skinuo višak dlaka i prašine.

Objekti su posedovali ventilatore za rashlađivanje i sistem prskalica. Čišćenje hranidbenog hodnika je vršeno svakodnevno. Na ulazu i izlazu uz štale postojale su dezbarijere koje se ne mogu zaobići.

Krave su opservirane u prvoj, drugoj, četvrtoj i osmoj nedelji posle partusa, ali i kasnije u cilju praćenje reproduktivne efikasnosti krava.

4.2.Uzimanje uzoraka krvi

Uzorci krvi su uzimani u prvoj, drugoj, četvrtoj i osmoj nedelji posle partusa. Vršena je venepunkcija *vene jugularis* kod krava u periodu od 11-14 časova kako bi se izbegla uticaj muže i prandijalni efekat na metabolite kod krava. Krv je uzimana uz minimalno izazivanje stresa kod krava, tako da od momenta pristupa kravi do momenta uzimanja krvi ne prođe više od 2-3 minuta. Ovo je vrlo važno da bi se izbegao akutni stres i pobuđivanje nadbubrežne žlezde. Uzorci krvi su uzimani u vakutajnere (serumske epruvete) i stavljeni u priručni frižider. Dužina perioda od momenta uzimanja uzoraka krvi do njene obrade u laboratoriji (odvajanje seruma) bila je oko 3 sata. Uzorci krvi su odmah korišćeni za hematološku i biohemijsku analizu, a po potrebi serum je bio zamrzavan na -20°C za određene analize na koje je trebalo čekati.

4.3. Endokrinološka ispitivanja

Endokrinološka ispitivanja podrazumevaju ispitivanje koncentracije insulina, IGF-I, kortizola i hormona rasta (STH) u svim nedeljama ogleda za svih 50 krava. Koncentracija hormona je određena ELISA metodom prema standardnim instrukcijama proizvođača. Korišćen je čitač mikrotitar ploča marke *Rayto*. Očitavanje je vršeno na 450 ± 2 nm. Standardne krive su određene merenjem absorbance standarda i njenim poređenjem sa koncentracijom standarda, a formirana je linearna i/ili polinomalna kriva, kako bi se postigla veća preciznost. Svi reagensi su se pražljivo pripremljeni po uputstvu proizvođača. Posle dodavanja enzima formirala se kolorimetrijska reakcija koja daje plavu boju, a koja se menja u žutu posle dodavanja stop rastvora. Kontrolisanje boje u mikrotitar pločama je značajno pre očitavanja koncentracije hormona. Ispiranje se vršilo pravilno, a posle dodavanja komponenti značajnih za inkubaciju vršilo se i lagano mešanje ploče, prema preporuci proizvođača.

Insulin – Određivanje koncentracije insulina vrši se pomoću sendvič ELISA metode. Mikrotitar ploča je prekrivena slojem sa inkorporiranim antitelima specifičnim za insulin. Standard i uzorci su pipetirani u polja mikrotitar ploče koja se inkubirala 2 sata na 37°C , a potom se odlivao višak tečnosti iz svakog polja bez ispiranja. Zatim su se u svako polje dodavala biotinom obeležena antitela i inkubacija je trajala 1 sat na 37°C . Po isteku vremena vršila se aspiracija i ispiranje tri puta. Dodavan je enzim HRP-avidin (Horseradish Peroxidase) i vršena je inkubacija 1 sat na 37°C . Potom je vršena aspiracija i pranje 5 puta. Dodavan je TMB (tetrametilbenzidin) supstrat i inkubiran 15-30 minuta na 37°C . U ovom periodu ploča je zaštićena od svetlosti, zbog razvoja kolorimetrijske reakcije. Potom je dodavan stop rastvor (kiselina) i vršeno je očitavanje. Intenzitet boje zavisi od količine insulina koja se vezala za antitela tokom inicijalnih koraka, te obeleženih antitela koja su se

potom vezala za insulin. Očitavanje je vršeno tokom 5 minuta. Standardna koncentracija koja se detektuje je od 16.5-1000 nIU/ml. Proizvođač kita je *Cusabio*.

Insulinu sličan faktor rasta I (IGF-I) – Određivanje IGF-I vrši se pomoću kompetitivne ELISA-e. Monoklonska antitela specifična za IGF-I nalaze se u mikropločama. Dodati su standardi i uzorci u polja mikrotitar ploče. Dodata su antitela za IGF-I koja su konjugovana sa HRP, mešana i inkubirana 2 sata na 37°C. Ispiranje polja je vršeno tri puta. Dodat je supstrat i inkubacija je vršena 15 minuta na 37°C. U ovom periodu ploča se mora zaštititi od svetlosti, jer se razvija kolorimetrijska reakcija. Dodat je stop rastvor i vršeno je očitavanje tokom 10 minuta. Standardna koncentracija koja se detektuje je 2,4-60 ng/ml. Proizvođač kita je *Cusabio*.

Kortizol – Određivanje kortizola vrši se pomoću kompetitivne ELISA-e. Monoklonska antitela specifična za kortizol nalaze se u mikropločama. Dodat je standard i uzorci u svako polje mikrotitar ploče. Dodat je detekcioni reagens A, promešane su mikroploče i inkubirane 1 sat na 37°C. Potom je izvršeno ispiranje tri puta. Dodat je reagens B i ponovo je vršeno inkubiranje 30 minuta na 37°C. Nakon inkubacije izvršeno je ispiranje pet puta. Potom je dodat supstrat i inkubacija je trajala 15-25 minuta na 37°C. Mikroploča mora biti zaštićena od svetlosti. Potom je dodat stop rastvor i odmah izvršeno očitavanje. Standardna koncentracija koja se detektuje je 12,35-1000 ng/ml. Proizvođač kita je *Usen – Life Science*.

Hormon rasta (STH) – Određivanje STH vrši se pomoću sendvič ELISA metode. U čvrstoj podlozi mikrotitar ploče nalaze se monoklonska antitela. Posle dodavanja standarda i uzoraka dodat je reagens sa enzimom koji se mešao pažljivo tokom 30 minuta i inkubirao na 18-25°C tokom 3 sata. Potom je ispirana inkubaciona mikstura pet puta. Dodat je TMB rastvor i izvršena je inkubacija u trajanju od 20 minuta. Mikrotitar ploča je bila zaštićena od svetlosti. Zatim je dodat stop rastvor da bi se formirala žuta boja od postojeće plave i vršeno

je očitavanje na 450nm. Standardna koncentracija koja se detektuje je 1,25-20 ng/ml. Proizvođač kita je *Endocrine technologies*.

Svi hormoni biće predstavljeni u jedinici ng/ml. Radi lakšeg poređenja sa literaturom treba napomenuti faktore konverzije njihovih vrednosti: insulin 1mIU/L=0,042ng/ml (insulin će biti predstavljen u ng/ml, kao i ostali hormoni); kortizol 1ng/ml x = 2,76 nmol/l.

4.4. Ispitivanje metaboličkog profila

Metabolički profil krava određivan je u svakoj nedelji uzorkovanja krvi. Korišćene su fotometrijske reakcije i fotometar proizvođača *Rayto (RT1904c)*. Fotometriranje je vršeno na talasnoj dužini i u vremenskom intervalu prema specifikaciji proizvođača. Pre upotrebe svakog novog kita formirana je kalibraciona kriva, prema specifikaciji proizvođača. Korišćeni su standardni kitovi proizvođača *Randox (UK)* i/ili *Pointe scientific (USA)*. U kitovima su obezbeđene prečišćene i standardizovane hemikalije značajne za odvijanje reakcija, koje su opisane u pasusima koji slede. Ostale hemikalije koje su bile potrebne, a nisu uključene u kitove su bile od proizvođača *Sigma Aldrich*.

Za procenu energetskeg statusa krava vršeno je ispitivanje koncentracije NEFA, BHB i glukoze. Metabolizam proteina procenjen je kroz koncentraciju ukupnih proteina, albumina, uree i amonijaka. Hepatični profil podrazumeva određivanje holesterol, trigliceridi, ukupni bilirubin, AST, ALT, GGT i AP. Oksidativni stres određen je ispitivanjem aktivnosti SOD i MDA. Profil jona je ispitan merenjem koncentracije Ca, P i Mg.

NEFA – Koncentracija NEFA određivana je kolorimetrijskom reakcijom koja se zasniva na acilaciji koenzima A od strane masnih kiselina u prisustvu dodane acil-CoA sintetaze kao katalizatora. Acil-CoA se oksidiše pod dejstvom dodate acil-CoA oksidaze uz proizvodnju vodonik peroksida. Vodonik peroksid u prisustvu peroksidaze dozvoljava

oksidativnu kondenzaciju 3-methi-N-etil-N(β -hidroksietil)-anilina (MEFA) sa 4-aminoantipirinom, što daje ljubičastu boju.

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

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

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

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

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

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

Trigliceridi – Trigliceridi se određuju enzimatskom reakcijom. Trigliceridi pod dejstvom lipaza daju glicerol i masne kiseline. Dobijeni glicerol sa ATP-om pod uticajem glicerol kinaze daje glicerol-3-fosfat, koji dalje oksidiše pod dejstvom dodate glicerol-3-fosfat

oksidaze. Produkt ove reakcije je vodonik peroksid koji sa 4-aminofenazonom i 4-hlorofenolom pod dejstvom peroksidaze daje obojeni kvinoneimin.

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

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

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

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

AP – Alkalna fosfataza katalizuje hidrolizu p-nitrofenil fosfata, kada se dobija fosfat i p-nitrofenol, koji daje bojenu reakciju.

SOD – Superoksid-dismutaza se određuje zahvaljujući njegovoj sposobnosti da ubrza dismutaciju superoksidnih radikala. Ksantin pod dejstvom ksantin oksidaze daje urat i superoksidni radikal, pod čijim dejstvom 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolium hlorid (skraćenica I.N.T.) formira crveno obojeni formazan. Aktivnost SOD se potom meri kao stepen inhibicije navedene reakcije. SOD je određivan iz lizata eritrocita. 0,5 ml pune krvi se centrifugira 10 minuta na 3000 obrtaja/min, potom se plazma aspirira i eritrociti se ispiraju tri puta sa 3 ml 0,9% NaCl i ponovi se centrifugiranje. Po završenom centrifugiranju dodaje se 2 ml hladne redestilovane vode, meša se i ostavlja na $+4^{\circ}\text{C}$ tokom 15 minuta (frižider). Lizat se razdeđuje sa 0.01 mol/l fosfatnim puferom pH 7,0. Procenat inhibicije iznosi 30-60%.

Razređenje koje se preporučuje kod uzoraka dobijenih od goveda je 50 puta, tako da je finalni dilucioni faktor = 200. Broj jedinica SOD se može predstaviti po mililitru cele krvi (dobijena vrednost pomnožena sa dilucionim faktorom) ili po gramu hemoglobina (vrednost po mililitru podeljenja sa vrednošću hemoglobina g/ml).

Malondialdehid (MDA) – MDA se kvantifikuje u kontrolisanoj kolorimetrijskoj reakciji sa tiobarbiturnom kiselinom, kada se formira obojeni kompleks.

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

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

Magnezijum (Mg) – Magnezijumov jon reaguje sa ksilidin-plavim u alkalnoj sredini i formira purpurno crveni helat. Treba napomenuti da se kalcijum iz reakcije isključuje delovanjem EGTA sa kojim stvara kompleks.

4.5.Hematološka ispitivanja

Hematološka ispitivanja vršena su u svim nedeljama ogleđa i podrazumevala su: određivanje broja eritrocita, određivanje koncentracije hemoglobina, određivanje ukupnog broja leukocita, diferencijalne bele loze i odnosa neutrofila i limfocita. Sve hematološke analize vršene su na hematološkom analajzeru *Hemavet 950* sa softverom za goveda.

4.6. Vijabilnost leukocita

Vijabilnost leukocita se ispituje posle bojenja sa tripan plavim (*eng.*, *trypan blue*), koja je diazo boja. Zbog selektivne propustljivosti membrane, žive ćelije se ne prebojavaju ovom bojom. Međutim, kod mrtvih ćelija i ćelija sa oštećenom membranom ova boja prolazi prebojavajući ćeliju plavo. Korišćena je boja od proizvođača *Sigma Aldrich*, koja je namenjena mikroskopskom posmatranju i brojanju ćelija.

Određena zapremina 0,4% rastvora boje se pomeša sa istom zapreminom leukocita i potom se pažljivo stavlja u hemocitometar. Napunjen hemocitometar se inkubira 1-2 minuta na sobnoj temperaturi, i potom se vrši brojanje. Procenat vijabilnosti se izračunava po formuli: % vijabilnosti = $[1.00 - (\text{broj plavih ćelija} / \text{ukupan broj ćelija})] \times 100$.

4.7. Koncentracija Hsp70

Za potrebe analize celularne adaptacije na peripartalni metabolički stres određena je serumska koncentracija Hsp70. Korišćena je metoda kompetitivne inhibicione ELISA-e. U mikropločama se nalazi sloj obložen antitelima specifičnim za Hsp70. Dodaje se standard i uzorak u propisane bazenčice mikroploče. Potom se dodaje konjugat (osim u slepu probu). Prekriva se i inkubira 1 sat na 37°C. Svako polje se aspirira i ispira tri puta. Potom se dodaje HRP-avidin i inkubira 30 minuta na 37°C. Potom se vrši aspiracija i ispiranje tri puta. Vršiti se dodavanje supstrata i inkubira 15 minuta na 37°C. Temperatura mora biti stabilna, a mikroploča se ne sme izlagati svetlosti. Potom se dodaje stop rastvor i pažljivo meša, da razvijena boja postane uniformna. Boja iz plave prelazi u žutu, a pojava zelenih nijansi znači da se mešanje mora obaviti. Očitavanje optičke gustine se izvrši u toku 30 minuta. Čitač mikroploče mora biti podešen na 450 nm. Formirana je standardna kriva, linearna i/ili

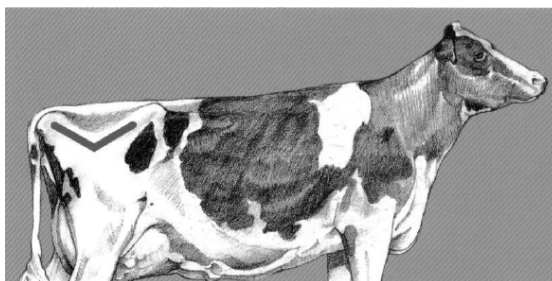
polinomalna. Detekcioni limit je od 1,25-20,0 ng/ml. Korišćen je standardni kit proizvođača *Cusabio*.

4.8.Merenje telesne kondicije krava

Određivanje telesne kondicije krava vršeno je svake nedelje tokom 8 nedelja ogleda. Upotrebljavan je skor od 1 do 5. Korišćene su preporuke iz vodiča *Elanco Animal Health Buletin Al 8478 (Rev.9/96)*, kao i preporuke Edmonson-a i saradnika.¹⁹⁷

Merenje je vršeno adpsekcijom krava i palpacijom istaknutih koštanih delova. Posmatrane su anatomske regije i ocenjene po navedenoj tabeli i slikama. Najmanja jedinica ocene je bila 0,25.

Slika 1: Orijentaciona ocena telesne kondicije pogled sa strane



Linija od sedne kvrge, preko sapi ka kuku u vidu plitkog slova V (kondicija do 3)



Linija od sedne kvrge, preo sapi ka kuku u obliku slova U (kondicija 3,25-4)



Linija od sedne kvrge, preo sapi ka kuku ravna (kondicija 4)

Šema 3: Detaljna ocena telesne kondicije na osnovu adspekcije i palpacije (A-trnasti izdanci, B-od trnastih ka bočnim izdancima, C-slabinski bočni izdanci, D-istaknutost izdanaka preko gladne jame, E- kukovi i sedne kvrge, F-između sednih kvruga i kukova, G-između kukova, H-između korena repa i sednih kvruga).

	Skor	A	B	C	D	E	F	G	H
Izrazito mršava Izgladnela	1.00	Testerasti pojedinačni izdanci	Jako ulegnuće	Vidljivo >1/2 dužine	Slabine istaknute	Oštro, nepokriveno	Irazito ulegnuće bez mesa	Jako ulegn.	Vidne kosti, Ispod repa V ulegnuće
	1.25								
	1.50							Jako ulegn.	
	1.75	Vidni pojedinačni izdanci	Vidno ulegnuće	Vidljivo 1/2 dužine	Slabine istaknute	Štrče	Veliko ulegnuće		Vidne kosti, Ispod repa U ulegnuće
Skelet jasno uočljiv	2.00								
	2.25			Vidljivo 1/2-1/3 dužine					
	2.50	Oštar istaknut greben		1/3-1/4 dužine	Slabine uemreno istaknute		Malo mesa	Jako ulegnuće	Pojava loja
	2.75								
	3.00		Blago konkavna krivina	<1/4 dužine	Blago naglašene	Zaobljeni	Ulegnuće	Umereno ulegnuće	Navidne kosti, plitko ulegnuće
Skelet i potkožno tk. izbalansirani	3.25			Ravan slabinski rub;					
	3.50	Blago istaknut greben, ne vide se izdanci	Blagi pad	Jasan rub, Nevidljivi izd.		Prekriveni	Blagi pad	Blago ulegnuće	
	3.75								
	4.00	Ravan greben, ne vide se izdanci	Skoro ravno	Rub gladak, zaobljen	Ne ističu se	Popunjeni lojem	Kosina	Zaravnjeno	Kosti u loju, Ispunjeno ulegnuće
Skelet slabo vidljiv prekriven lojem	4.25						Zaravnjeno		
	4.50			Rub jedva uočljiv		Uronjeni u loj			Kosti u loju, ulegnuće puno naborano
	4.75			Izdanci uronjeni u loj	Izbočena gladna jama				
Ugojena	5.00	Izdanci uronjeni u loj	Konveksno				Zaobljeno	Zaobljeno	

4.9. Ispitivanje mlečnosti krava

Mlečnost krava ispitivana je analizom mlečnog kartona. Određena je prosečna nedeljna proizvodnja mleka (L) po kravi u prvoj, četvrtoj i osmoj nedelji laktacije.

4.10. Ispitivanje reproduktivne efikasnosti krava

Reproduktivna efikasnost je ispitana praćenjem reproduktivnog kartona. Za potrebe oglada praćen je broj dana od partusa do ispoljavanja prvog vidljivog estrusa i broj dana od partusa do fertilnog osemenjavanja. Ispitan je procenat krava koji je ispoljio estrus do i posle 40. dana laktacije i kod kojih je došlo do fertilnog osemenjavanja do i posle 90. dana laktacije.

4.11. Opis modela i statistička obrada podataka

Odabrani indikatori metaboličkog stresa su: insulin i IGF-I (pokazatelji anabolizma) i kortizol i NEFA (pokazatelji katabolizma). Ispituje se njihov uticaj na opisane ishodne varijable i to: metabolički profil, krvnu sliku, vijabilnost leukocita, celularnu adaptaciju, telesnu kondiciju, proizvodnju mleka i reproduktivnu efikasnost krava.

Najpre će biti ispitano uticaj teljenja na vrednosti odabranih parametara, tako što će se koristiti ANOVA analiza (*repeated* analiza, gde je nedelja uzeta kao ponavljajući efekat) u ispitivanju statističke značajnosti razlike između vrednosti indikatora i ishodnih varijabli u prvoj, drugoj, četvrtoj i osmoj nedelji posle partusa.

Potom će biti određena vrednosti medijane (Me) za insulin, IGF-I, kortizol i NEFA u prvoj nedelji posle teljenja.

Krave će biti klasifikovane prema vrednostima medijane na sledeće grupe: insulin^{Me-}: insulin^{Me+}; IGF-I^{Me-}: IGF-I^{Me+}; NEFA^{Me-}: NEFA^{Me+} i kortizol^{Me-}: kortizol^{Me+}. Razlika u vrednostima ova odabrana četiri indikatora upoređena je između svake Me- i Me+ grupe u svakoj ispitanoj nedelji. Korišćena opšti linearni model i ANOVA analiza (*posthock* LSD test).

Na osnovu dobijenih rezultata o odnosu anaboličkih i kataboličkih indikatora metaboličkog stresa krave će biti klasifikovane na dva načina, u zavisnosti da li ispitujemo uticaj jednog ili više parametara.

Krave je moguće klasifikovati na osnovu vrednosti svakog pojedinačnog indikatora metaboličkog stresa na 4 grupe:

- 1) insulin^{Me-}: insulin^{Me+};
- 2) IGF-I^{Me-}: IGF-I^{Me+};
- 3) NEFA^{Me-}: NEFA^{Me+} i
- 4) kortizol^{Me-}: kortizol^{Me+}.

U drugom slučaju krave možemo klasifikovati na osnovu kombinacije anaboličkih i kataboličkih faktora i to:

- 1) insulin+NEFA,
- 2) insulin+kortizol,
- 3) IGF-I+NEFA i
- 4) IGF-I+kortizol.

U ovom slučaju ćemo porediti krave potencijalno opterećene metaboličkim stresom (kod kojih je vrednost anaboličkih parametara ispod medijane, a katabolički iznad medijane) sa kravama koje bi trebale manje da pate od metaboličkog stresa (kod kojih je vrednost

anaboličkih parametara iznad medijane, a katabolički ispod medijane). Na taj način ispitujemo uticaj kombinacije parametara, ali je mana što se određeni broj životinja iz ogleđa gubi. Taj broj nije veliki obzirom na postojanje inverznog odnosa vrednosti anaboličkih i kataboličkih parametara. Ipak, prednost ovakvog formiranja kriterijuma je mogućnost upoređivanja sa individualnim kriterijumima.

U sledećem koraku će metodom glavne komponente biti ispitano koje su to komponente koje utiču na varijabilnost svih ispitivanih varijabli i da li te komponente sadrže neki od 4 odabrana indikatora metaboličkog stresa. Od posebnog značaja je da se utvrdi koliko je udeo svake komponente u ukupnoj varijaciji svih varijabli, te da li i u kojoj meri glavne komponente koreliraju sa 4 odabrana indikatora metaboličkog stresa. Za ovu svrhu ćemo koristiti faktorsku analizu. Broj faktora biće određene skri metodom skri-testa (eng., *scree*), a opterećenost faktora biće određena pomoću VIRIMAX ortogonalne rotacije matrice.

Na posletku će biti ispitan klinički značaj odabranih indikatora metaboličkog stresa kod krava. Najčešći nalazi kod krava u ranoj laktaciji koji može ukazati na poremećaj zdravlja su: hipoglikemija, hipokalcemija, hiperbilirubinemija, hipoalbuminemija, anemija, stres leukogram, gubitak telesne kondicije za više od 0,5 jedinica, ispoljavanje prvog estrusa posle 40 dana od teljenja i fertilno osemenjavanje posle 90 dana od teljenja. Da bi odredili da li koncentracija insulina, IGF-I, kortizola i NEFA u prvoj nedelji posle teljenja ima prediktivni uticaj na nastanak navedenih promena treba izvršiti frakcionisanje vrednosti ova četiri indikatora. Za svaku koncentraciju ova četiri indikatora treba odrediti sa kojom senzitivnošću i specifičnošću dele krave sa navedenim promenama od krava bez navedenih promena. Za tu potrebu se radi ROC (eng., *Receiver Operating Characteristic*) analiza formiranje ROC krive, koja se dobija od tačaka koje označavaju specifičnost i senzitivnost na dve ose kordinatnog sistema. Ako je vrednosti površine ispod ROC krive preko 0,5 onda ispitivani indikator ima značajnu determinacionu moć. Ako je ta vrednost od 0,7-0,9 postoji veoma značajna

determinaciona moć, a ako je vrednost 1, onda je ona savršena. U drugom koraku se određuje optimalna vrednost indikatora (vrednost indikatora sa najvećom specifičnošću i senzitivnošću) koja determiniše krave sa izmenjenim varijablama od krava koje te promene ne pokazuju. Vrednost indikatora treba izračunati i za 90% specifičnosti. ROC kriva se formira na osnovu dobijenih 200 tačaka (50 krava x 4 nedelje uzorkovanja). Vršiti se sparivanje vrednosti varijabli u svakoj ispitanoj nedelji sa vrednostima indikatora u prvoj nedelji posle teljenja. Na ovaj način ćemo utvrditi koji od četiri indikatora metaboličkog stresa pokazuje značajan uticaj na varijable i koja vrednost indikatora stresa implicira nastanak značajnih promena u vrednostima varijabli u tom nivou da ukazuju na lošu adaptaciju krava na peripartalni stres.

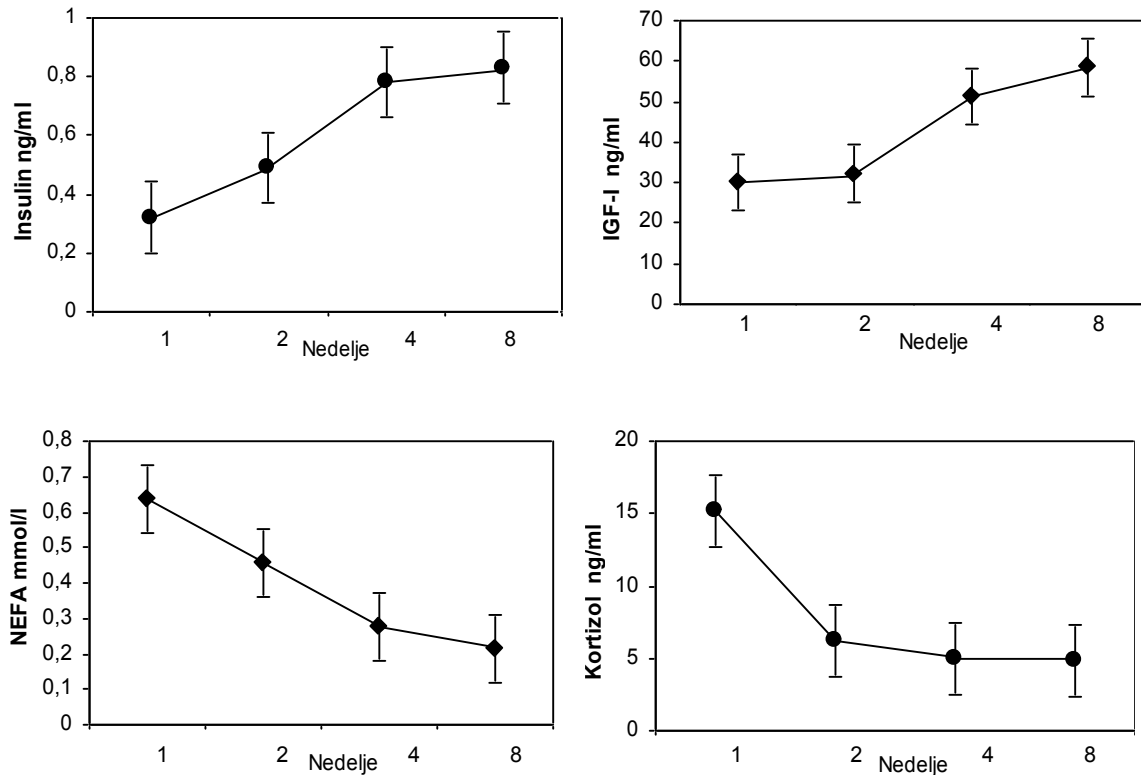
Svi statistički proračuni i izrada tabela i histograma biće izvedeni u programu *Microsoft Excel* za tabele i histograme, *Statgraphic centurion* za generalni linearni model i ostala statistička ispitivanja i *MedCalc* za ROC analizu.

5.REZULTATI

5.1.Vrednost ispitivanih parametara u periodu posle teljenja

Kod krava u prvim nedeljama laktacije postoje značajne promene u vrednostima ispitivanih parametara što se može pripisati uticaju teljenja, kao biološkog čina koji pokreće brojne adaptacione procese i inicira metabolički stres. Zbog toga je uticaj vremena (nedelje) u kom je vršeno merenje odabranih parametara statistički značajan ($p < 0,01$ ili $p < 0,05$) za sve ispitane parametre.

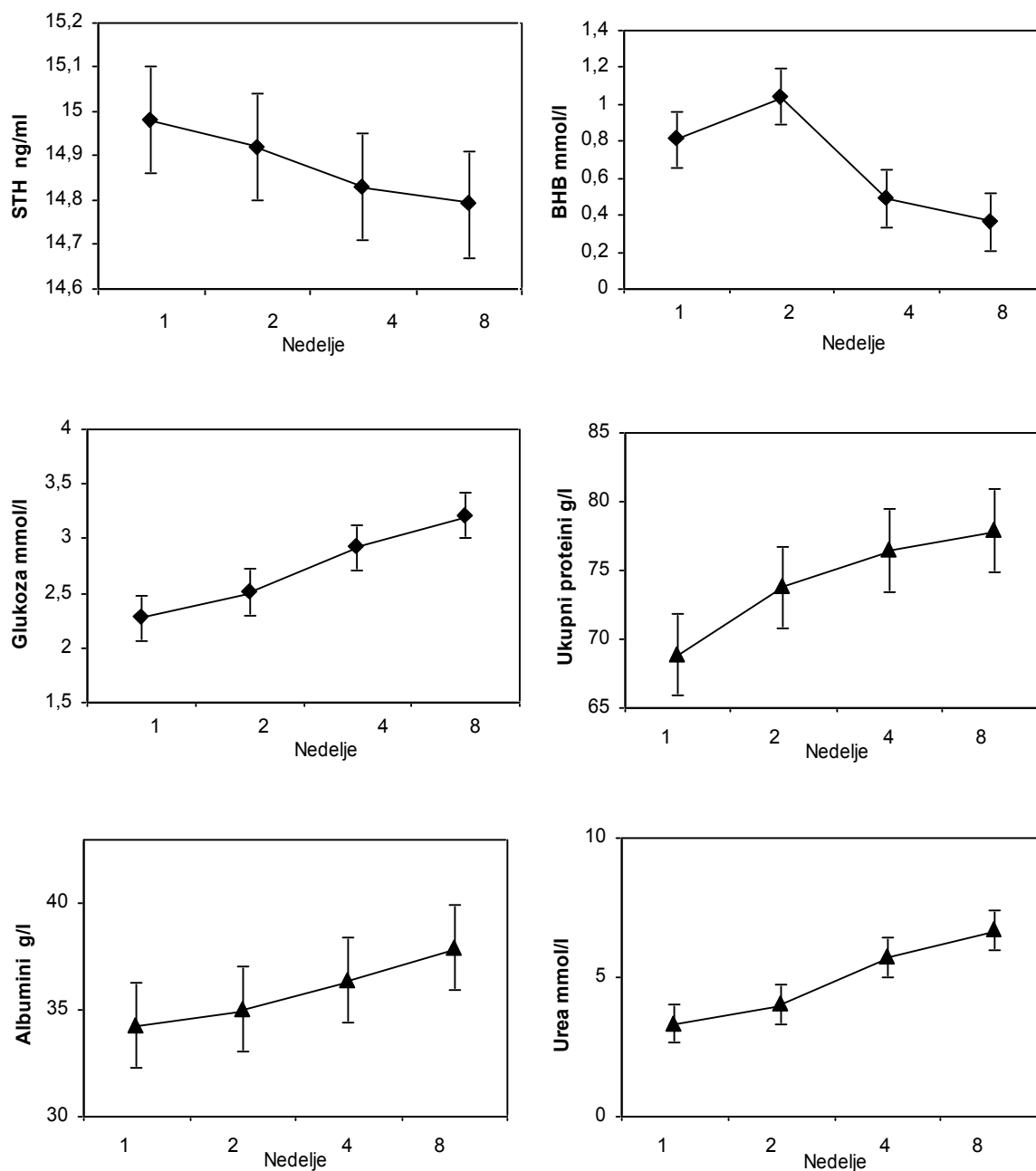
5.1.1. Indikatori metaboličkog stresa – Koncentracija insulina i IGF-I je značajno niža u prvoj i drugoj nedelji posle partusa u odnosu na četvrtu i osmu nedelju. Koncentracija kortizola je statistički značajno viša u prvoj nedelji posle partusa u odnosu na drugu, četvrtu i osmu. Koncentracija NEFA je značajno viša u prvoj i drugoj nedelji posle partusa u odnosu na četvrtu i osmu. Odabrani indikatori anabolizma i katabolizma su u značajnoj inverziji u prvoj nedelji posle teljenja. Pogledati *Grafikon 3-6*.

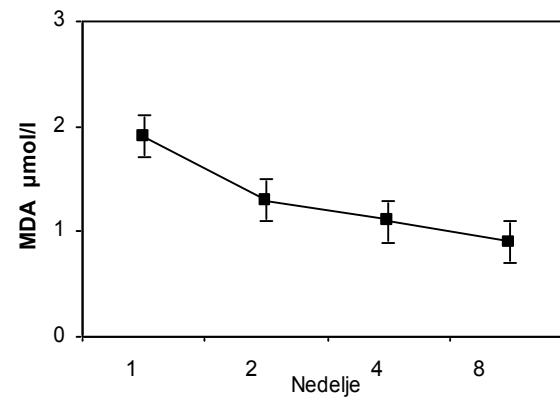
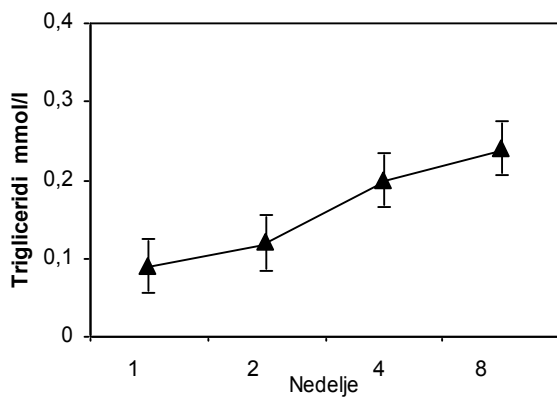
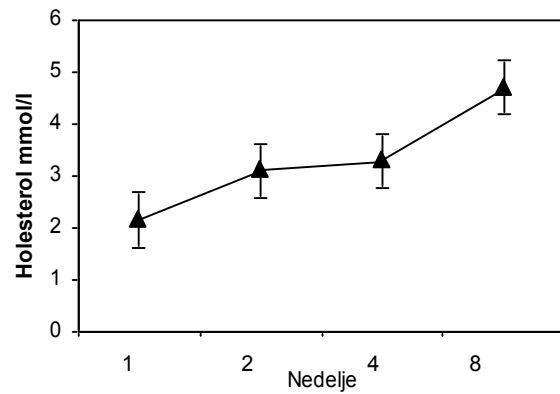
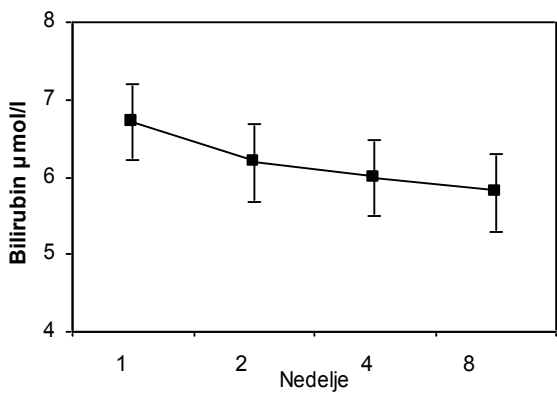
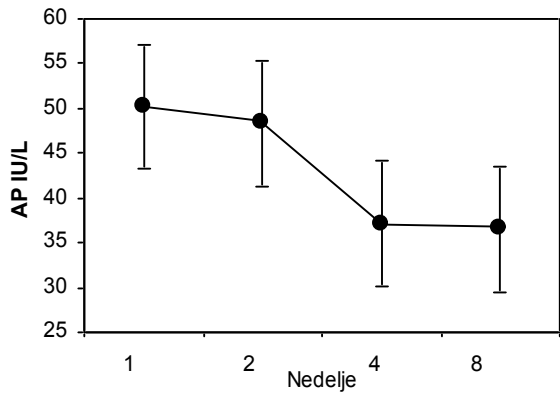
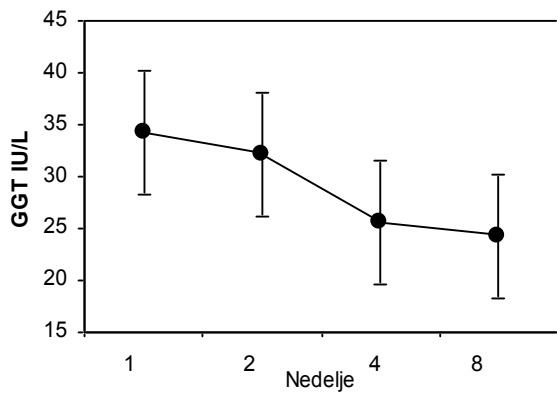
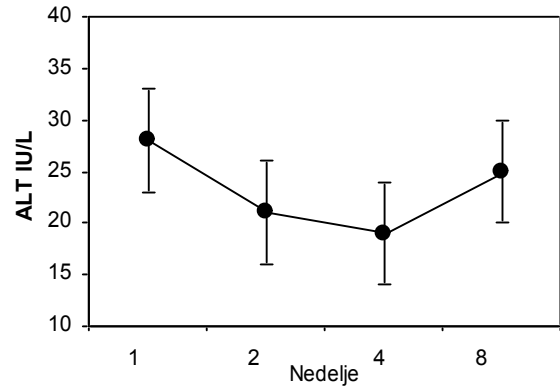
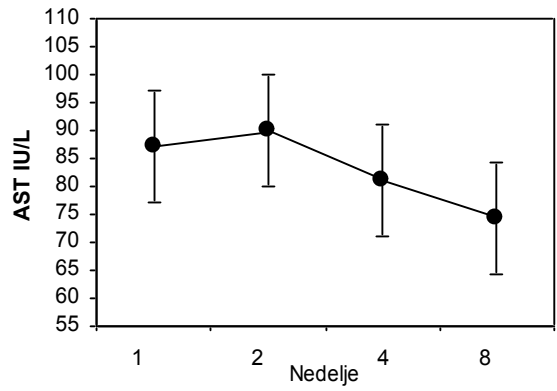


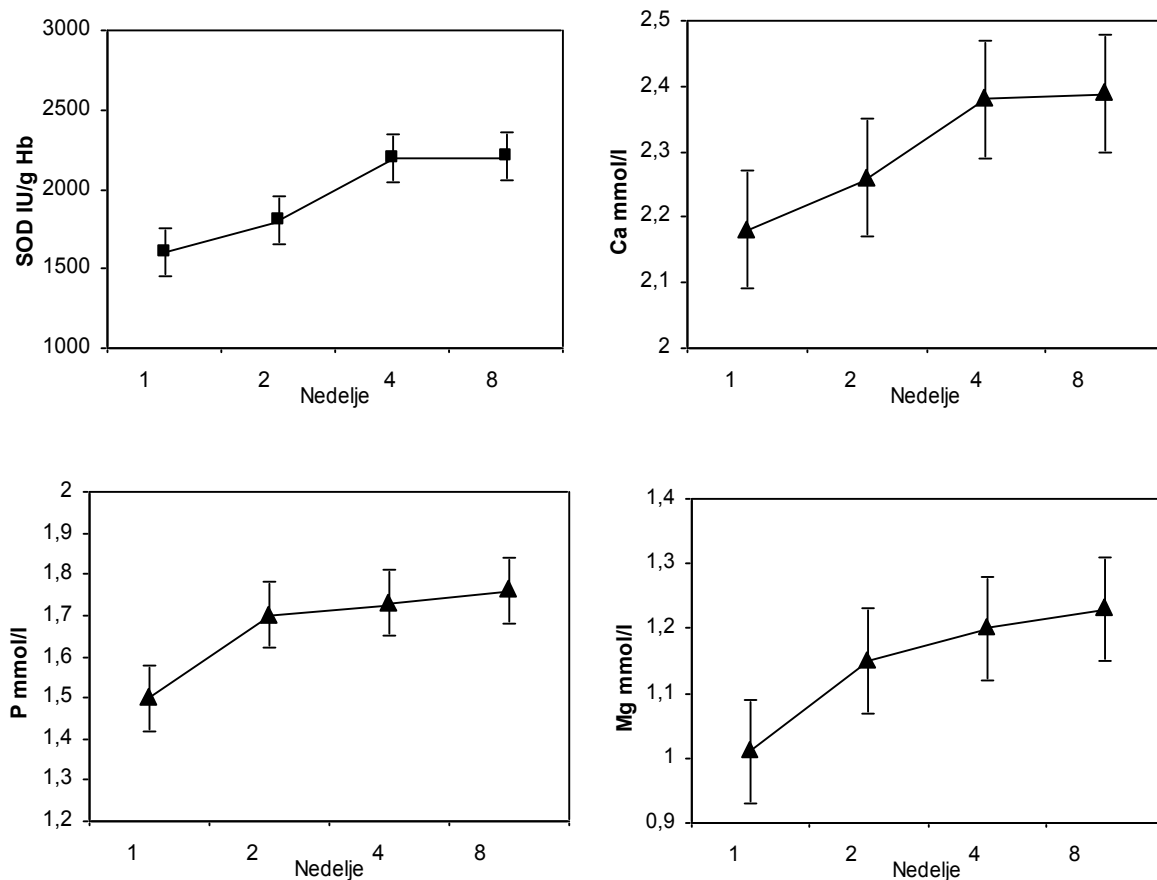
Grafikon 3-6: Koncentracija insulina, IGF-I, NEFA i kortizola tokom eksperimentalnog perioda (srednja vrednost±SD)

5.1.2. Metabolički profil – Koncentracija hormona rasta je najviša u prvoj nedelji posle partusa, da bi lagano opadala do osme. Koncentracija STH je značajno viša u prvoj nedelji posle partusa u odnosu na osmu, dok u ostalim nedeljama nema razlike. Energetski metabolizam kod krava je značajno izmenjen u ranoj laktaciji, tako da je nađena niža koncentracija glukoze i viša koncentracija BHB u prve dve nedelje posle partusa. Ovakav nalaz ukazuje na prisustvo negativnog energetskog bilansa i izraženu ketogenezu. Metabolizam proteina je takođe izmenjen tako da je koncentracija ukupnih proteina, albumina i uree najniža u prvoj nedelji posle partusa, da bi potom lagano rasla. Ovakvo stanje nastaje kao posledica nedovoljne konzumacije hrane, ali i opterećenja funkcije jetre i redukcije njenog sintetskog kapaciteta. To potvrđuje hepatični profil, jer je aktivnosti enzima AST, ALT, GGT, AP i bilirubina značajno viša u ili prvoj i drugoj nedelji posle partusa.

Koncentracija holesterola i triglicerida u krvi je značajno niža u prvoj i drugoj nedelji posle partusa, u odnosu na četvrtu i osmu. Oksidativno opterećenje krava u ranoj laktaciji je potvrđeno time što je koncentracija MDA značajno viša u prvoj i drugoj nedelji posle partusa, a aktivnost SOD značajno niža u istom periodu. Koncentracije Ca, P i Mg je značajno niža u prvoj nedelji posle partusa, da bi postepeno rasla. Pogledati *Grafikon 7-25*.

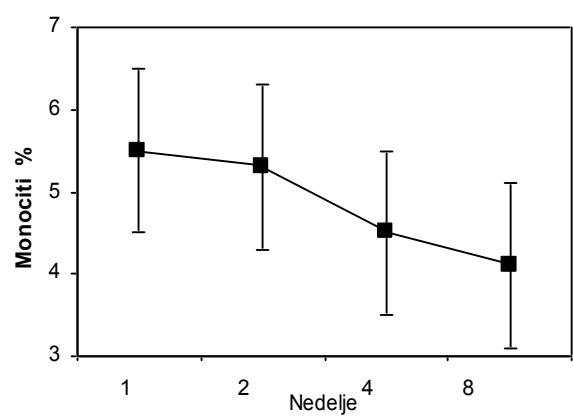
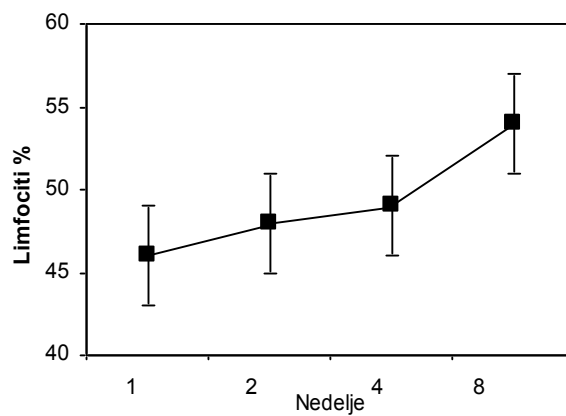
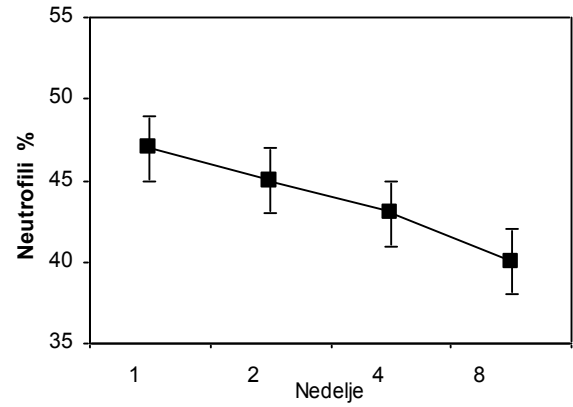
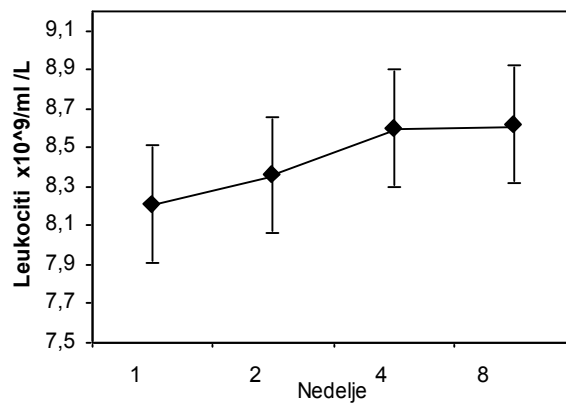
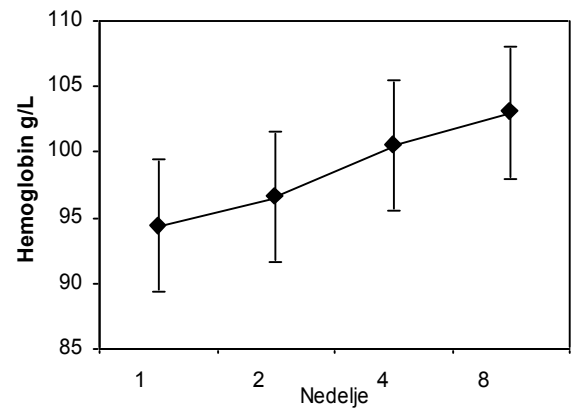
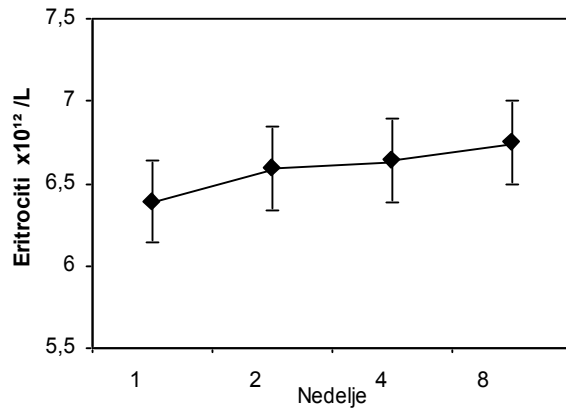


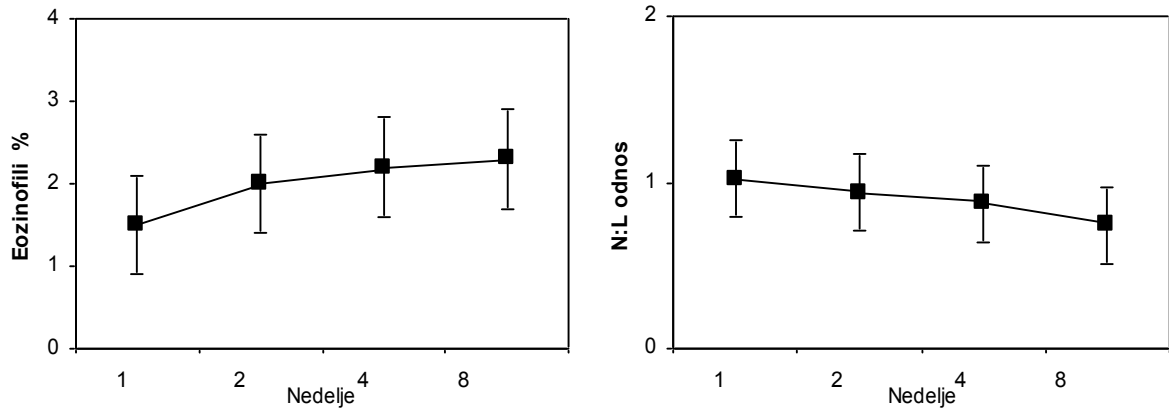




Grafikon 7-25: Koncentracija metaboličkih pokazatelja energetskog bilansa, metabolizma proteina, funkcionalnog statusa jetre, oksidativnog statusa i mineralnog profila kod krava u tokom eksperimentalnog perioda (srednja vrednost \pm SD)

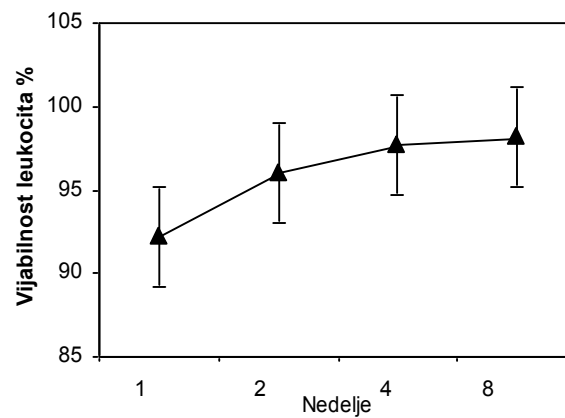
5.1.3. Krvna slika – Parametri krvni slike takođe zavise od vremena uzimanja uzoraka krvi, tako da je broj eritrocita i koncentracija hemoglobina niža u prvim nedeljama posle partusa. Ovo ukazuje na sklonost ka anemiji u ranoj laktaciji. Broj leukocita je značajno veći u prvim nedeljama posle partusa i raste na uštrb neurofila, pa je zato i odnos neutrofila prema limfoctiima veći u nedeljama neposledno posle partusa. Broj monocita je viši, a broj eozinofila niži u prvim nedeljama posle partusa. Ovakav nalaz ukazuje na tipičan stres leukogram. Pogledati *Grafikon 26-33*.





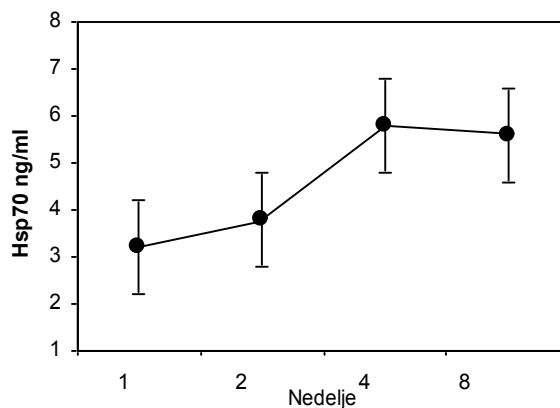
Grafikon 26-33: Krvna slika krava u oglednom periodu (eritrociti, hemoglobin, leukociti, diferencijalna bela loza i odnos N:L)

5.1.4. Vijabilnost leukocita – Vijabilnost leukocita je značajno niža u prvoj i drugoj nedelji posle partusa u odnosu na četvrtu i osmu. Pogledati *Grafikon 34*.



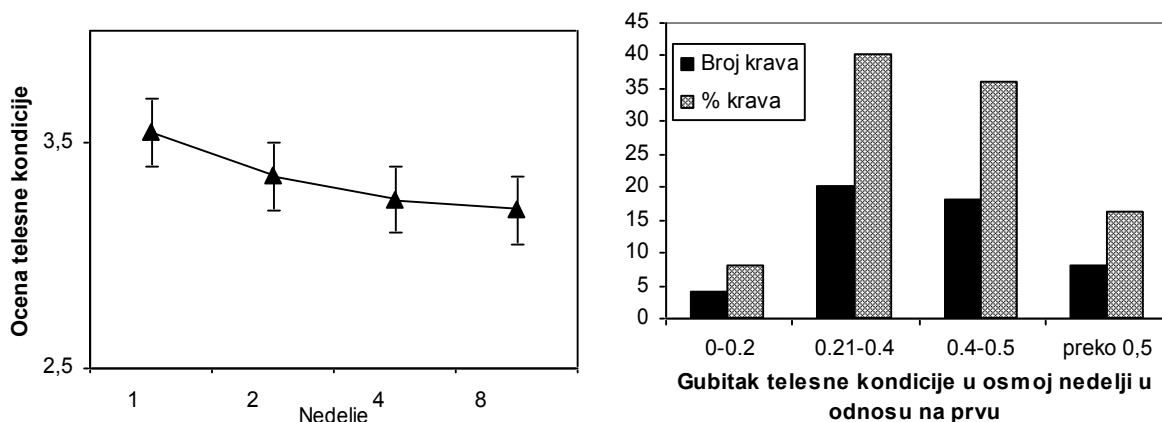
Grafikon 34: Vijabilnost leukocita u oglednom periodu

5.1.5. Hsp70 – Koncentracija serumskog Hsp70 je značajno niža u prvoj i drugoj nedelji u odnosu na četvrtu i osmu. Kod dve od 50 krava koncentracija Hsp70 u prvoj nedelji posle partusa je bila ispod detekcionog limita. Pogledati *Grafikon 35*.



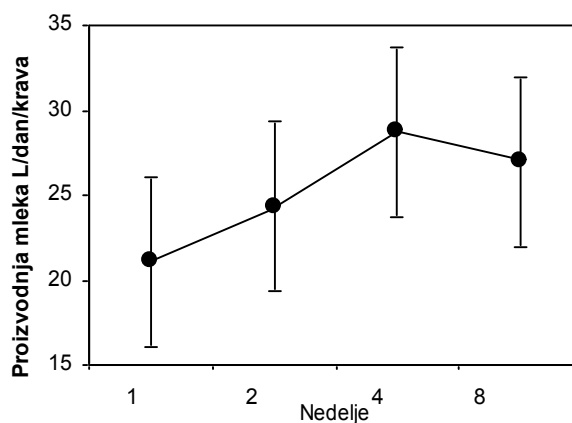
Grafikon 35: Koncentracija Hsp70 u oglednom periodu

5.1.6. Telesna kondicija – Telesna kondicija krava opada posle porođaja pa sve do osme nedelje posle partusa tako da kumulativno krave izgube oko 0,55 jedinica telesne kondicije posle osam nedelja. Vrednost ocene telesne kondicije je statistički značajno niža u osmoj nedelji u odnosu na ostale, a značajan pad kondicije (za prosečno 0,3 jedinice) se opaža veoma rano, u drugoj nedelji pa teljenju. Takođe je ispitan ukupan gutitak telesne kondicije krava. Pogledati *Grafikon 36-37*.



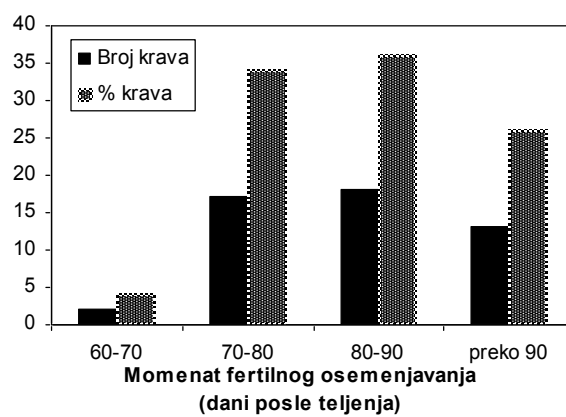
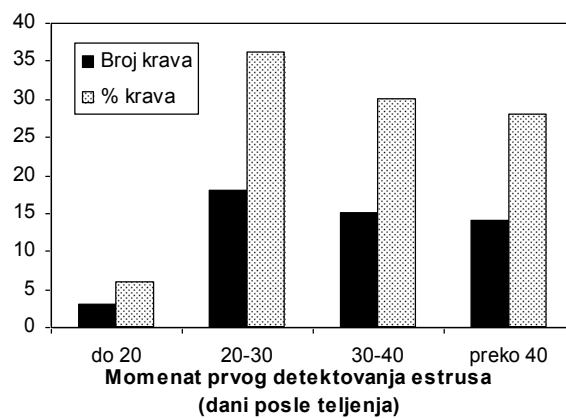
Grafikon 36-37: Telesna kondicija krava u oglednom periodu

5.1.7. Proizvodnja mleka – Proizvodnja mleka (L/krava/dan) raste kod svih krava u ispitivanom periodu. Rana laktacija je period intenzivnog rasta proizvodnje mleka koja pri kraju prvog ili tokom drugog meseca doseže svoje najviše vrednosti, da bi se potom ustalila i lagano opadala do zasušenja. Pogledati *Grafikon 38*.



Grafikon 38: Proizvodnja mleka (L/dan/krava) u ogleđnom periodu

5.1.8. Reproductivna efikasnost – Reproductivne perofrmanse krava biće predstavljene kao distribucija frekvencija krava u funkciji momenta pojave prvog vidljivog estrusa i momenta fertilnog osemenjavanja. Prvi vidljivi estrus se može primetiti do 20 dana kod 3 krave (6%), od 20-30 dana kod 18 krava (36%), od 30-40 dana kod 15 krava (30%), dok je posle 40 dana prvi estrus detektovan kod 14 krava (28%). Drugi značajan pokazatelj reproductivne efikasnosti je momenat od teljenja do fertilnog osemenjavanja. Dve krave (4%) su bile fertilno osemenjavanje u periodu 60-70 dana posle teljenja, 17 krava (34%) je osemenjeno u periodu 70-80 dana, 18 krava (36%) u periodu 80-90 dana, dok se kod 13 krava (26%) nije došlo do fertilnog osemenjavanja do 90 dana posle teljenja. Pogledati *Grafikon 39-40*.



Grafikon 39-40: Reproductivna efikasnost krava tokom oglednog perioda

5.2. Ispitivanje odnosa između odabranih indikatora metaboličkog stresa – ocena modela klasifikacije krava

Kao indikatore metaboličkog stresa odabrali smo insulin i IGF-I, kao pokazatelje anabolizma, odnosno NEFA i kortizol kao pokazatelje katabolizma. Obzirom da ovi metaboliti učestvuju u fiziološki suprotnim procesima očekujemo da će njihova odnos njihovih vrednosti biti inverzan. Ako bi se pogledale vrednosti ovih parametara dobijenih tokom osam oglednih nedelja možemo zaključiti da postoji inverzija, jer je u prvim nedeljama posle teljenja vrednost kataboličkih indikatora viša, a anaboličkih indikatora niža u odnosu na kasniji period. Ovo ukazuje na značajno kataboličko opterećenje i postojanje metaboličkog stresa u ranoj laktaciji. Predpostavka je da ovako inverzan odnos između anaboličkih i kataboličkih parametara postoji i u okviru svake nedelje. Da bismo to odredili izvršili smo klasifikaciju krava prema medijalnim vrednostima insulina, IGF-I, NEFA i kortizola.

Izračunate medijalne vrednosti date su *Tabeli 2*. Izračunate medijalne vrednosti su približne srednjim vrednostima, što ukazuje da je postojala simetrična distribucija frekvencije parametara i ujednačenost podataka.

Tabela 2: Vrednosti medijane za odabrane indikatore metaboličkog stresa

Indikator/Nedelja	1	2	4	8
Insulin (ng/ml)	0,37	0,4	0,82	0,81
IGF-I (ng/ml)	0,32	0,3	0,48	0,57
NEFA (mmol/l)	0,66	0,47	0,33	0,29
Kortizol (ng/ml)	16,01	7,4	7	7,1

Najintenzivnije promene u metabolizmu krava se dešavaju u prvoj nedelji posle teljenja. Zbog toga je od najvećeg značaja odrediti odnos između indikatora metaboličkog stresa u prvoj nedelji posle teljenja. U prvoj nedelji posle partusa postoji značajno opterećenje krava katabolizmom što se vidi na osnovu rezultata datih u *Tabeli 3*. Tako kod krava koje imaju vrednost insulina i IGF-I ispod medijane postoji značajno viša koncentracija kataboličkih parametara (kortizola i NEFA), kao i *vice versa*. Ovo ukazuje da je odabir indikatora i klasifikacija koja je izvršena dobra, te da bi mogla biti potencijalno upotrebljiva za procenu celokupnog metaboličkog stresa u ranoj laktaciji.

Tabela 3: Odnos između indikatora metaboličkog stresa u prvoj nedelji posle teljenja

Ispitivani indikator	Indikator na koji utiče	p	Kako utiče	
			Me+	Me-
Insulin	IGF-I	<0,01	↑	↓
Me ⁺ 23	NEFA	<0,01	↓	↑
Me ⁻ 27	Kortizol	<0,05	↓	↑
IGF-I	Insulin	<0,01	↑	↓
Me ⁺ 24	NEFA	<0,01	↓	↑
Me ⁻ 26	Kortizol	<0,05	↓	↑
NEFA	Insulin	<0,01	↓	↑
Me ⁺ 28	IGF-I	<0,01	↓	↑
Me ⁻ 22	Kortizol	<0,05	↑	↓
Kortizol	Insulin	<0,05	↓	↑
Me ⁺ 26	IGF-I	<0,05	↓	↑
Me ⁻ 24	NEFA	<0,05	↑	↓

Na osnovu navedenih kriterijuma krave se može izvršiti nekoliko klasifikacija krava u ogleđnoj grupi. Krave je moguće klasifikovati na osnovu vrednosti svakog pojedinačnog indikatora metaboličkog stresa na 4 grupe: 1) insulin^{Me-}: insulin^{Me+}; 2) IGF-I^{Me-}: IGF-I^{Me+}; 3) NEFA^{Me-}: NEFA^{Me+} i 4) kortizol^{Me-}: kortizol^{Me+}.

U drugom slučaju krave možemo klasifikovati na osnovu kombinacije anaboličkih i kataboličkih faktora i to: 1) insulin+NEFA, 2) insulin+kortizol, 3) IGF-I+NEFA i 4) IGF-I+kortizol. U ovom slučaju ćemo porediti krave potencijalno opterećene metaboličkim stresom (kod kojih je vrednost anaboličkih parametara ispod medijane, a katabolički iznad medijane) sa kravama koje bi trebale manje da pate od metaboličkog stresa (kod kojih je vrednost anaboličkih parametara iznad medijane, a katabolički ispod medijane). Broj krava čije ćemo vrednosti porediti prema ovom, kombinovanom kriterijumu dat je u *Tabeli 4*.

Tabela 4: Broj krava koje ulaze u ispitivanje na osnovu procene opterećenosti metaboličkim stresom upotrebom dva kriterijuma

	NEFA ^{Me+}	NEFA ^{Me-}	Kortizol ^{Me+}	Kortizol ^{Me-}
Insulin ^{Me+}		A ^{ana} 22		C ^{ana} 18
Insulin ^{Me-}	A ^{kat} 19		C ^{kat} 21	
IGF-I ^{Me+}		B ^{ana} 20		D ^{ana} 19
IGF-I ^{Me-}	B ^{kat} 22		D ^{kat} 17	

^{kat}-opterećene katabolizmom, ana-neopterećene, A-D kombinacije koje se porede

Zaključujemo da ćemo vršiti upoređivanje varijabli kod krava prema zadatim klasifikacijama, tako da ćemo upoređivati krave za koje očekujemo da su opterećene katabolizmom - stresom (indikator anabolizma^{Me-}: indikator katabolizma^{Me+}) i krave koje služe kao kontrola, odnosno za koje očekujemo da su u manjoj meri pogođene katabolizmom i stresom (indikator anabolizma^{Me+}: indikator katabolizma^{Me-}).

5.3. Procena metaboličkog stresa na osnovu klasifikacije krava prema odabranim indikatorima stresa u okviru različitih modela

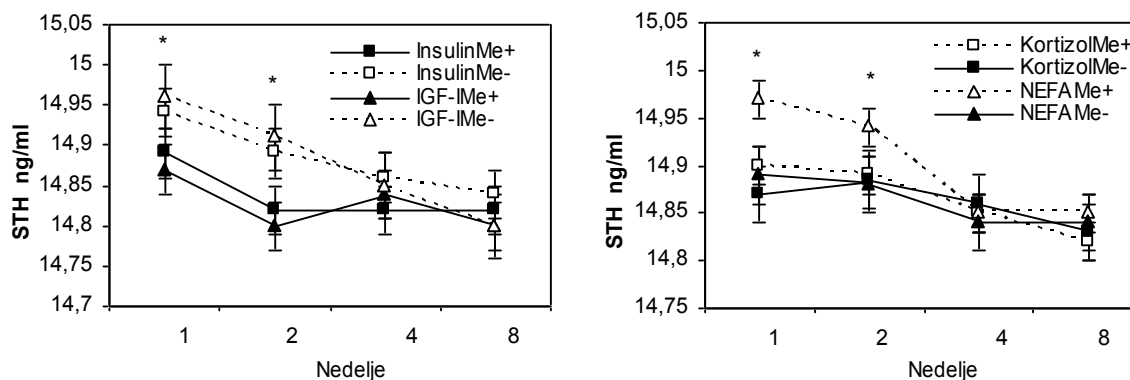
Testiranje u razlici između ispitanih varijabli u cilju procene metaboličkog stresa izvršen je za sve indikatore i modele. Opšti rezultati o uticaju klasifikacije krava na formiranje razlike u vrednosti ispitanih varijabli u okviru različitih modela dat je u *Tabeli 5*, a detaljan uticaj klasifikacija i modela prikazan je u poglavljima koje slede.

Tabela 5: Uticaj modela za procenu stresa na vrednost ispitivanih varijabli

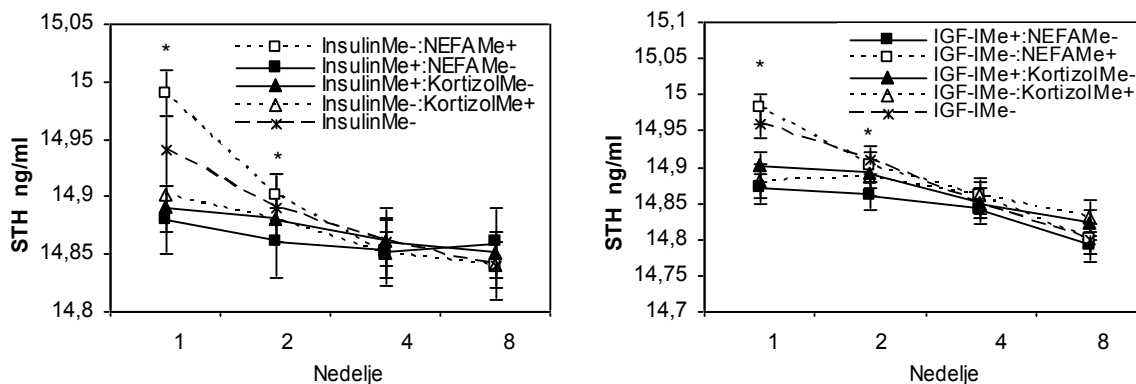
	Insulin	IGF-I	NEFA	Kortizol	Insulin + NEFA	IGF-I + NEFA	Insulin + kortizol	IGF-I + kortizol
STH	<0,01	<0,01	<0,01	NS	<0,01	<0,01	NS	NS
Glukoza	NS	<0,01	<0,05	<0,01	NS	<0,05	NS	NS
BHB	<0,01	<0,01	<0,01	<0,05	<0,01	<0,01	NS	NS
Uk.prot.	NS	<0,05	<0,05	NS	NS	<0,01	NS	NS
Albumini	NS	<0,05	<0,01	NS	NS	<0,01	NS	NS
Urea	NS	NS	<0,05	<0,05	NS	NS	NS	NS
AST	NS	NS	<0,01	NS	NS	<0,01	NS	NS
ALT	NS	NS	<0,01	NS	NS	<0,01	NS	NS
GGT	NS	NS	<0,05	NS	NS	<0,01	NS	NS
AP	NS	NS	<0,01	NS	NS	<0,01	NS	NS
Bilirubin	NS	NS	<0,01	NS	NS	<0,01	NS	NS
Holesterol	<0,01	<0,01	<0,01	NS	<0,01	<0,01	NS	NS
Trigliceridi	<0,01	<0,01	<0,01	NS	<0,05	<0,01	NS	NS
MDA	NS	NS	<0,01	NS	NS	NS	NS	NS
SOD	NS	NS	<0,01	<0,05	NS	NS	NS	NS
Ca	NS	NS	<0,01	<0,01	NS	NS	NS	NS
P	NS	NS	NS	NS	<0,01	NS	NS	NS
Mg	NS	NS	<0,05	<0,05	NS	NS	NS	NS
Eritrociti	NS	NS	<0,05	NS	NS	NS	NS	NS
Hemoglobin	NS	NS	<0,05	NS	NS	NS	NS	NS
Leukociti	NS	NS	<0,01	NS	NS	NS	NS	NS
Neutrofili	NS	NS	<0,01	<0,01	NS	NS	NS	NS
Limfociti	NS	NS	NS	<0,01	NS	NS	NS	NS
Monociti	NS	NS	NS	<0,01	NS	NS	NS	NS
Eozinofili	NS	NS	NS	<0,01	NS	NS	NS	NS
N:L odnos	NS	NS	<0,01	<0,01	NS	NS	NS	NS
Vijabilnost leukocita	NS	NS	<0,01	<0,01	NS	NS	NS	NS
Hsp70	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,05	<0,05	NS	NS
Tel.kond.	<0,01	<0,01	<0,01	NS	<0,05	<0,05	NS	NS
Mleko	<0,01	NS	<0,01	<0,01	<0,05	<0,05	<0,05	NS
Prvi estrus	NS	<0,01	<0,01	NS	NS	0,05	NS	NS
Fertilno V.O.	NS	<0,01	<0,01	NS	NS	0,05	NS	NS

5.3.1. Metabolički profil kod krava klasifikovanih prema indikatorima stresa

Hormon rasta (STH) – Klasifikacija krava prema kriterijumu zasnovanom na pojedinačnim kriterijumima pokazuje značajan uticaj na vrednosti hormona rasta, tako da krave u grupi koja je opterećena katabolizmom (insulin^{Me-}, IGF-I^{Me-} i NEFA^{Me+}) imaju značajno višu koncentraciju STH u prvoj i drugoj nedelji posle partusa (*Grafikon 41-42*). Ako bi posmatrali koncentraciju STH kod krava kod kojih je metabolički stres definisan sa dva indikatora zaključujemo da viša koncentracija STH postoji kod krava opterećenih metaboličkim stresom u grupi insulin^{Me-}+NEFA^{Me+} i IGF-I^{Me-}+NEFA^{Me+} u istom periodu. Interesantan je nalaz da krave u grupi insulin^{Me-}+NEFA^{Me+} imaju značajno višu koncentraciju STH u prvoj nedelji posle teljenja u odnosu na grupu insulin^{Me-} (*Grafikon 43-44*). Ovakav nalaz bi mogao biti objašnjen činjenicom da STH i NEFA značajno pozitivno koreliraju u ranoj laktaciji. Kortizol nije pokazao značajan uticaj. Odabrani indikatori metaboličkog stresa mogu biti upotrebljivi u proceni vrednosti STH. Krave opterećene metaboličkim stresom pokazuju višu vrednosti STH. Ovakav nalaz se slaže sa fiziološkim delovanjem STH koji u ranoj laktaciji utiče pozitivno na proizvodnju mleka, ali tako što omogućuje katabolizam i trošenje telesnih rezervi za potrebe mlečne žlezde.

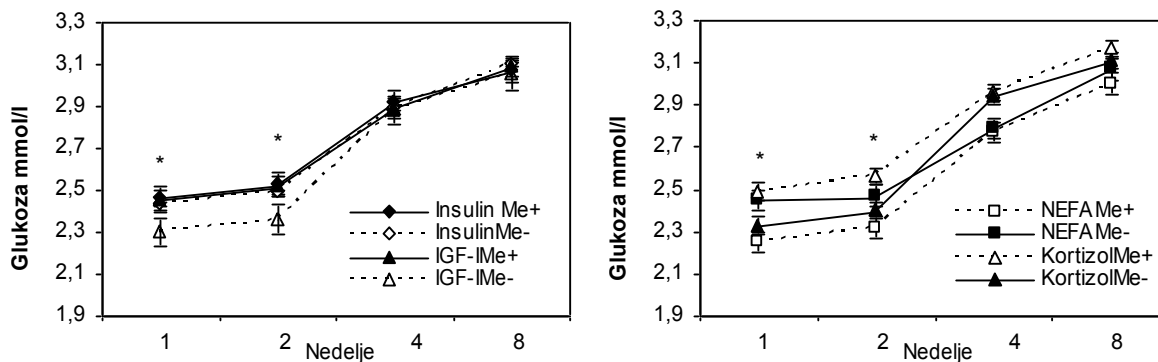


Grafikon 41-42: Pojedinačni uticaj indikatora metaboličkog stresa na vrednost STH

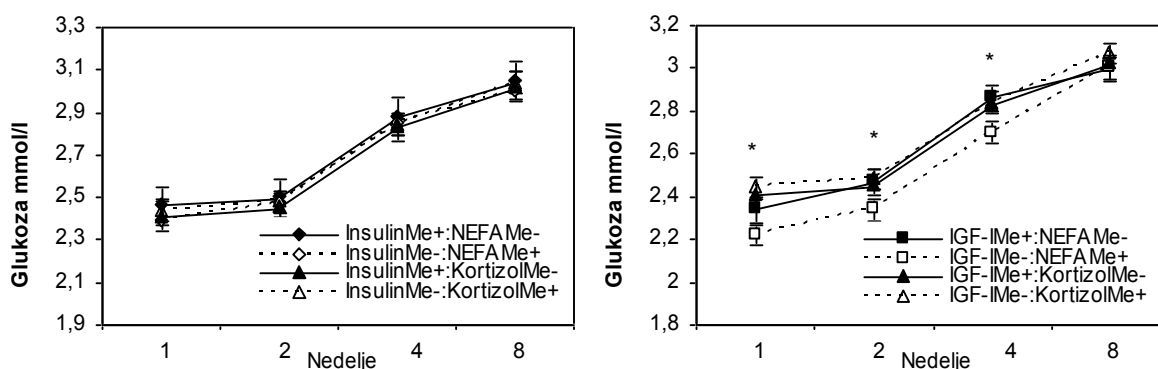


Grafikon 43-44: Kombinovani uticaj indikatora metaboličkog stresa na STH

Glukoza – Energetski metabolizam krava takođe može biti procenjen na osnovu odabranih indikatora metaboličkog stresa. Koncentracija glukoze je značajno niža kod krava koje su opterećene katabolizmom, tako da je glikemija u prvoj i drugoj nedelji niža kod krava u IGF-I^{Me-} i NEFA^{Me+} grupi. Vrednost insulinemije nije pokazala značajan uticaj na koncentraciju glukoze. Međutim, rezultati istraživanja pokazuju da je glikemija u prvoj i drugoj nedelji laktacije viša kod krava sa višom koncentracijom kortizola - kortizol^{Me+} grupa (Grafikon 45-46). Ovim se potvrđuje da kortizol ima velikog značaja u regulisanju glikemije u prvim danima laktacije. Kada se radi o uticaju dva indikatora anabolizma i katabolizma nađena je značajno niža vrednost glikemije u prvoj, drugoj i četvrtoj nedelji kod krava u grupi IGF-I^{Me-}+NEFA^{Me+} (Grafikon 47-48). Ostale kombinacije nisu dale statistički značajnu razliku. Odabrani indikatori metaboličkog stresa mogu biti korisni u proceni glikemije kod krava, posebno u ranoj laktaciji.



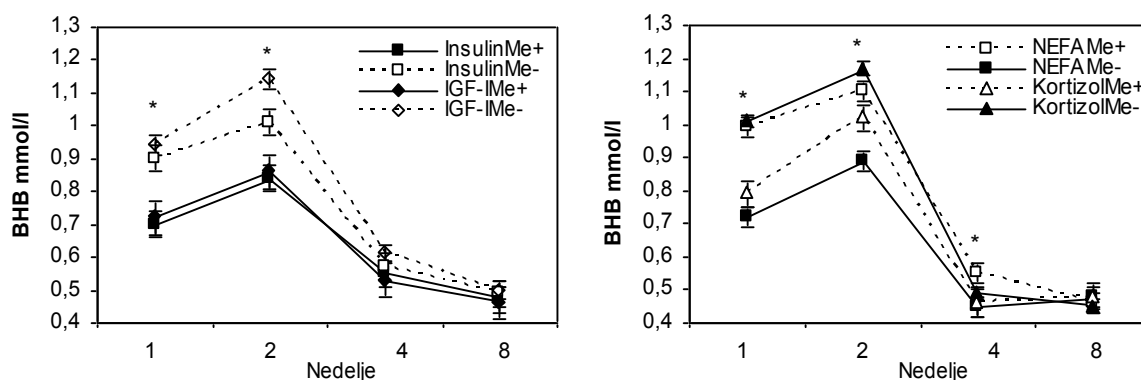
Grafikon 45-46: Pojedinačni uticaj indikatora metaboličkog stresa na vrednost glikemije



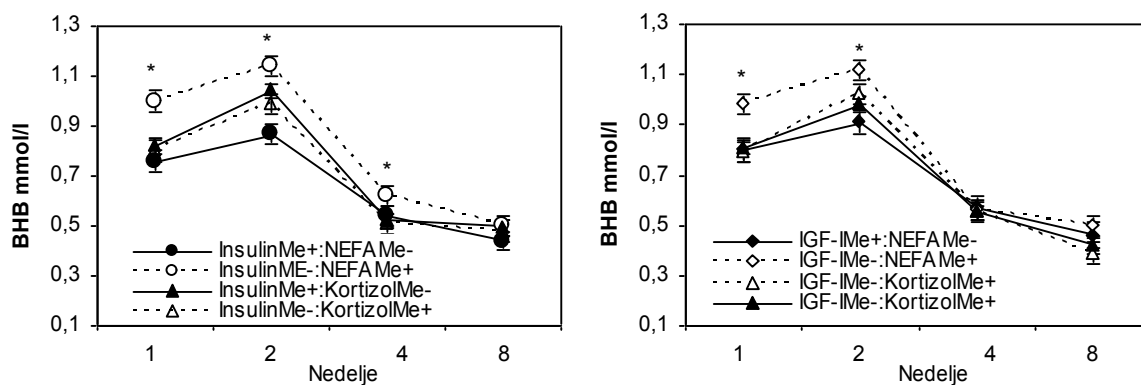
Grafikon 47-48: Kombinovani uticaj indikatora metaboličkog stresa na vrednost glikemije

BHB – Klasifikovanje krava na osnovu indikatora stresa može pomoći u praćenju vrednosti BHB. Tako kod krava opterećenih metaboličkim stresom (insulin^{Me-}, IGF-I^{Me-} i NEFA^{Me+}) imaju veću vrednost BHB u nedeljama posle teljenja. Interesantan nalaz je da krave koje pripadaju grupi kortizol^{Me-}, iako spadaju u grupu krava koje prema kriterijumu kortizola nisu opterećene metaboličkim stresom, imaju značajno višu koncentraciju BHB u prvoj, drugoj i četvrtoj nedelji posle teljenja (Grafikon 49-50). Ovakav rezultat se može objasniti činjenicom da nedostatak kortizola onemogućuje adekvatnu glukoneogenezu, pa manjak glukoze dodatno povećava ketogenezu. Sa druge strane prekursor kortizola je holesterol, a koncentracija proteinskih nosača holesterola se smanjuje u ranoj laktaciji upravo zbog smanjene funkcionalnosti jetre koja može biti u vezi sa povećanom akumulacijom triglicerida i BHB u hepatocitima. Kada krave klasifikujemo na osnovu kombinacije

anaboličkih i kataboličkih indikatora metaboličkog stresa dobijamo da krave opterećene katabolizmom imaju višu vrednost BHB i to krave u grupi IGF-I+NEFA i insulin+NEFA. Klasifikacija sa kortizolom nije pokazala statistički značajnu razliku (*Grafikon 51-52*). Indikator IGF-I je posebno značajan jer se proizvodi u jetri, a smanjena proizvodnja IGF-I može biti u vezi opterećenja jetre ketonima odnosno BHB.

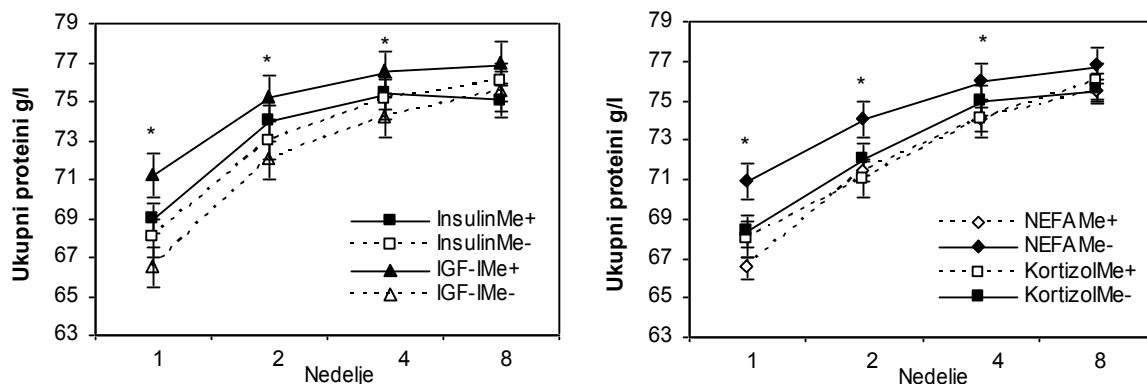


Grafikon 49-50: Pojedinačni uticaj indikatora metaboličkog stresa na vrednost BHB

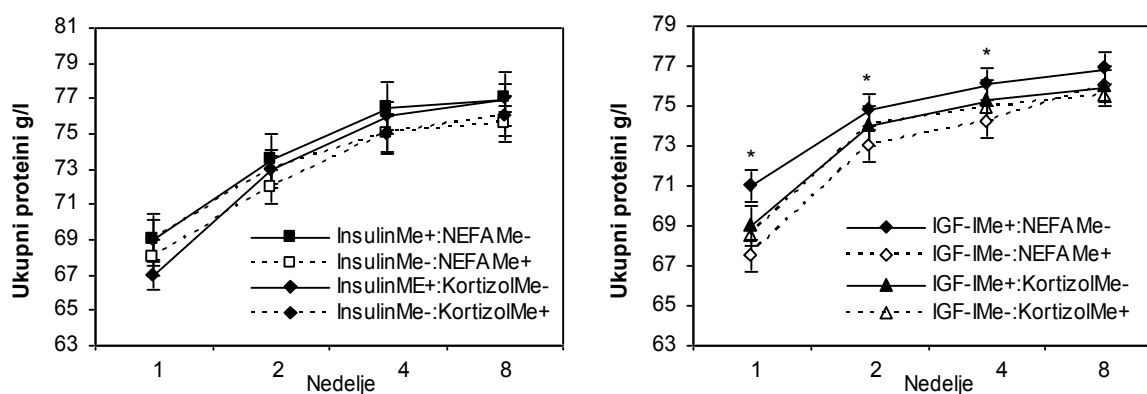


Grafikon 51-52: Kombinovani uticaj indikatora metaboličkog stresa na vrednost BHB

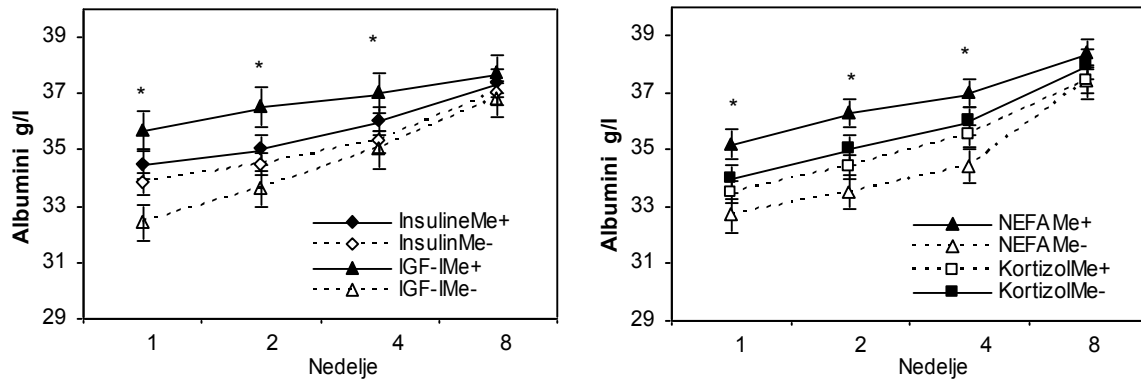
Ukupni proteini i albumini – Koncentracija ukupnih proteina i albumina je značajno niža u prvoj i drugoj nedelji posle partusa u grupi krava koja je opterećena katabolizmom ($IGF-I^{Me-}$, $NEFA^{Me+}$ i $IGF-I^{Me-}+NEFA^{Me+}$) (Grafikon 53-54 i 57-58). Klasifikacija na osnovu NEFA, IGF-I i NEFA+IGF-I je pokazala statističku značajnost (Grafikon 55-56 i 59-60). Upoređivanje vrednosti prema ostalim klasifikacijama nije dala statistički značajne rezultate. Nedovoljan unos hrane (koji dovodi do oaktiviranja lipomobilizacije i povećane vrednosti NEFA), ali i smanjen biosintetski kapacitet jetre (IGF-I) mogu biti razlozi za ovakav nalaz.



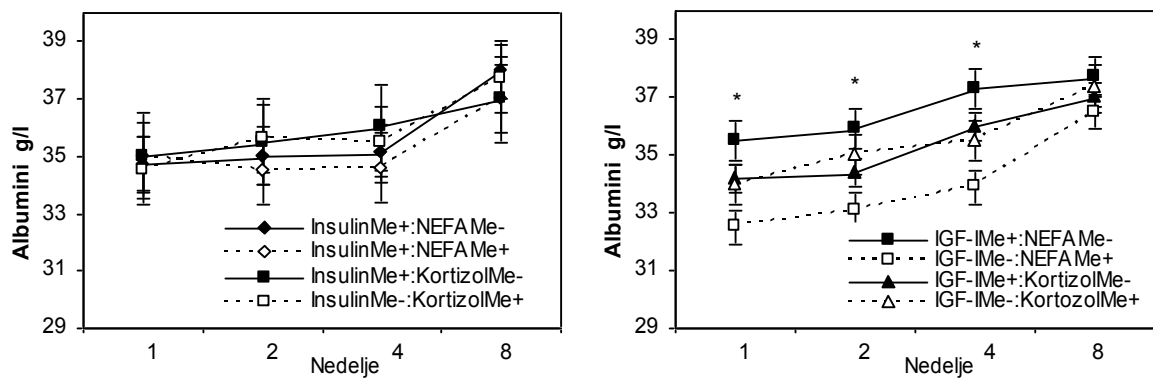
Grafikon 53-54: Pojedinačni uticaj indikatora metaboličkog stresa na vrednost ukupnih proteina



Grafikon 55-56: Kombinovani uticaj indikatora metaboličkog stresa na vrednost ukupnih proteina

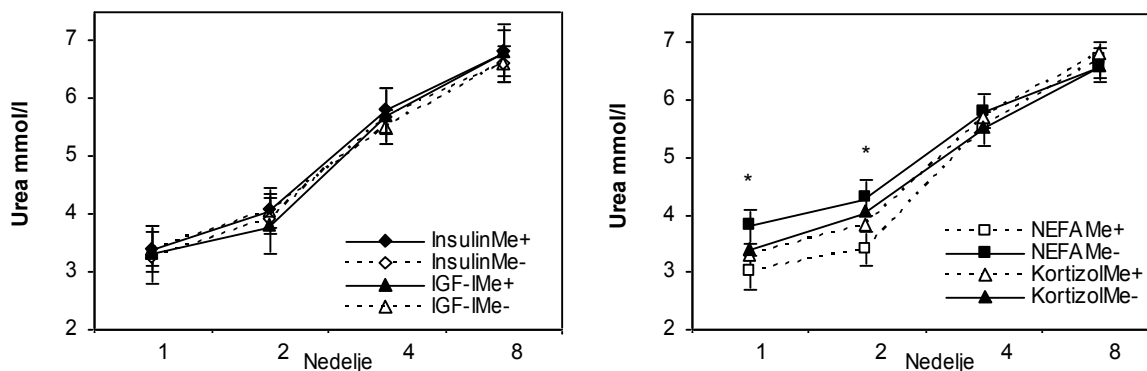


Grafikon 57-58: Pojedinačni uticaj indikatora metaboličkog stresa na vrednost albumina

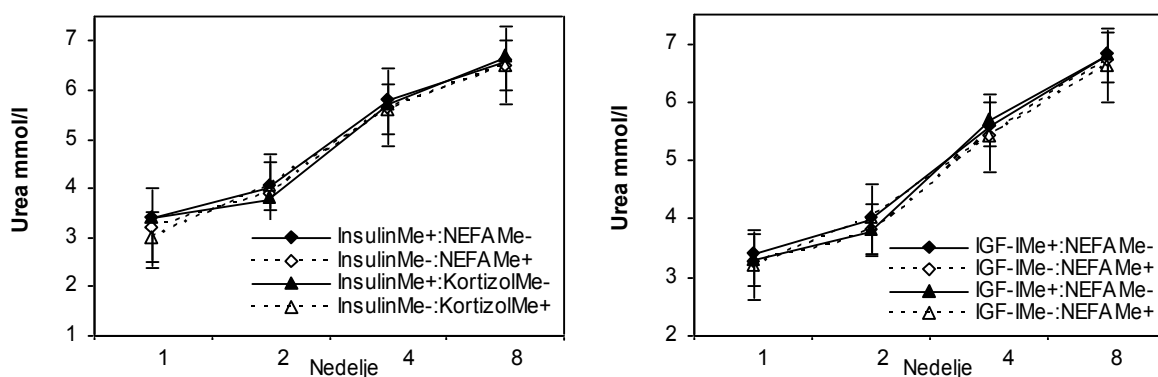


Grafikon 59-60: Kombinovani uticaj indikatora metaboličkog stresa na vrednost albumina

Urea – Odabrani indikatori metaboličkog stresa, osim NEFA, nemaju značaja u proceni koncentracije uree. Krave opterećene metaboličkim stresom (NEFA^{Me+}), klasifikovane prema vrednosti NEFA, pokazuju nižu koncentraciju uree u prvoj i drugoj nedelji posle teljenja u odnosu na grupu NEFA^{Me-}. Ostali indikatori ni kombinacije nisu dale statistički značajne razlike (*Grafikon 61-62 i 63-64*). Ovakav nalaz ukazuje da visoke vrednosti NEFA mogu nepovoljno uticati na iskorišćavanje proteina iz telesnih depoa u procesu glukoneogeneze, što dodatno produbljuje metabolički stres zbog nemogućnosti obezbeđivanja glukoze/energije iz nešećernih izvora.

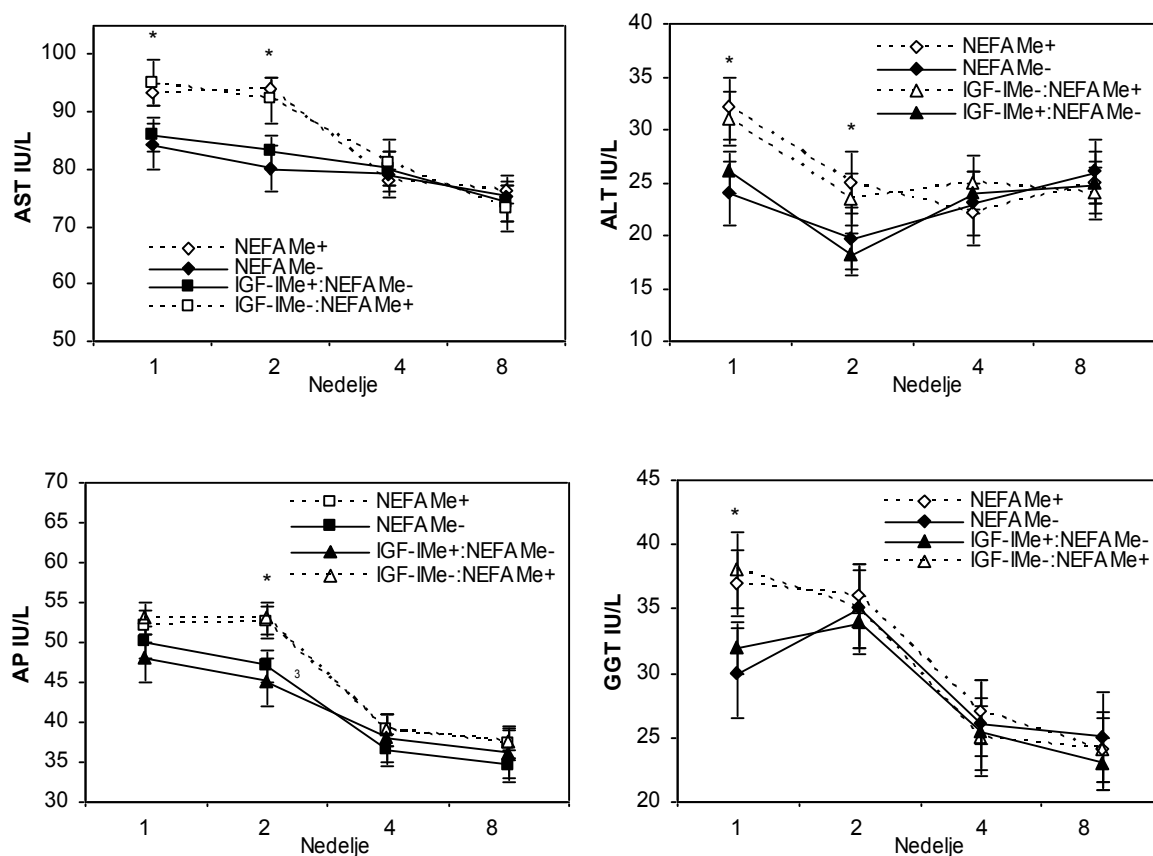


Grafikon 61-62: Pojedinačni uticaj indikatora metaboličkog stresa na vrednost uree



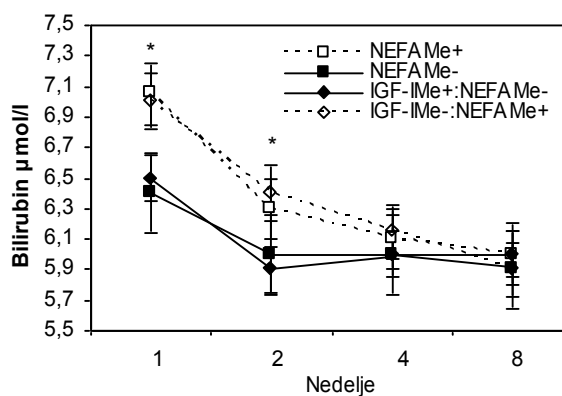
Grafikon 63-64: Kombinovani uticaj indikatora metaboličkog stresa na vrednost uree

Jetrini enzimi – Jetrini enzimi i njihova aktivnost u serumu mogu se predvideti na osnovu indikatora metaboličkog stresa. Krave klasifikovane prema modelima NEFA, IGF-I i NEFA+IGF-I pokazuju značajan uticaj, tako da krave koje u opterećene katabolizmom ($NEFA^{Me+}$ i $IGF-I^{Me-}+NEFA^{Me+}$) imaju značajno višu aktivnost ovih enzima u prvoj i/ili drugoj nedelji posle teljenja (*Grafikon 65-68*, prikazani samo grafikoni sa signifikantnim razlikama). Povišena koncentracija NEFA dovodi do povećanog nagomilavanja ketonskih tela u jetri koji mogu opteretiti hepatocite. U prilog opterećenju funkcionalnog statusa jetre govori i snižena vrednost IGF-I koji u kombinaciji sa NEFA predstavlja značajan faktor koji utiče na aktivnost enzima.



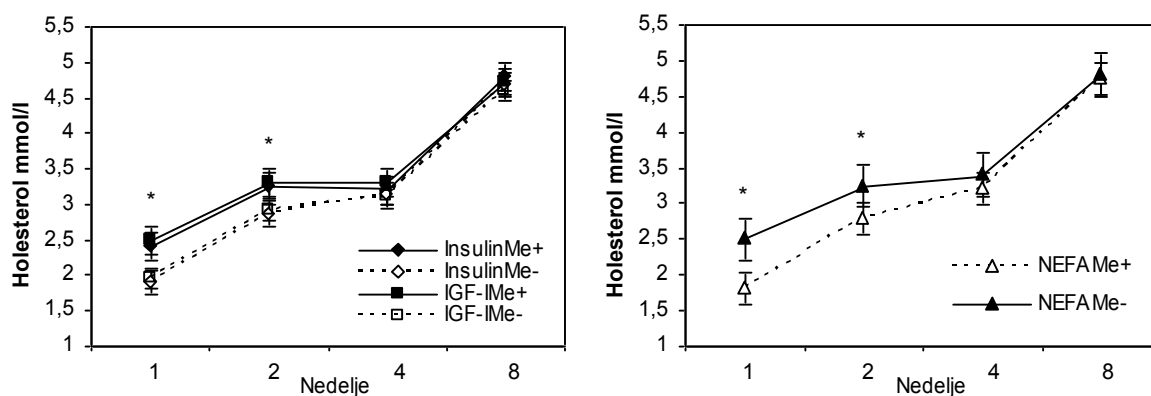
Grafikon 65-68: Srednja vrednost enzima kod krava klasifikovanih prema modelima značajnih indikatora NEFA, NEFA+IGF-I

Bilirubin – Pored jetrinih enzima, bilirubin je značajan pokazatelj funkcionalnog statusa jetre kod krava. Krave klasifikovane prema modelima NEFA i NEFA+IGF-I pokazuju značajan uticaj, tako da krave koje su opterećene katabolizmom (NEFA^{Me+} i IGF-I^{Me-}+NEFA^{Me+}) imaju značajno višu vrednost bilirubina u prvoj i drugoj nedelji posle teljenja (Grafikon 69).

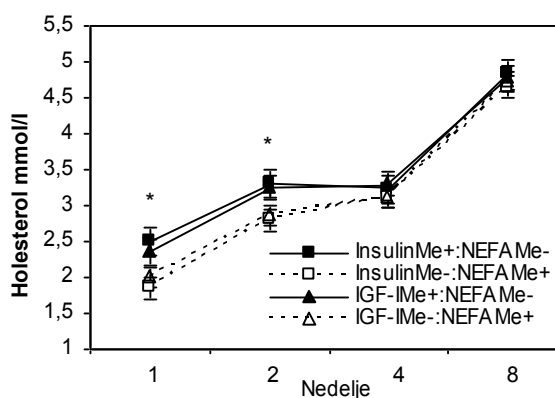


Grafikon 69: Vrednost bilirubina kod krava klasifikovanih prema signifikantnim indikatorima

Holesterol – Koncentracija holesterola zavisi od NEFA, IGF-I i insulina, dok uticaj kortizola nije bio signifikantan. Kod krava opterećenih metaboličkim stersom postoji značajno niža koncentracija holesterola (grupe insulin^{Me-}, IGF-I^{Me-} i NEFA^{Me+}) u prvoj i drugoj nedelji posle teljenja (*Grafikon 70-71*). Ovakav uticaj pojedinih indikatora stresa postoji i kada se krave klasifikuju prema modelima sa dva indikatora, pa u grupi krava insulin^{Me-}+NEFA^{Me+} i IGF-I^{Me-}+NEFA^{Me+} postoji niže koncentracija holesterola (*Grafikon 72*).

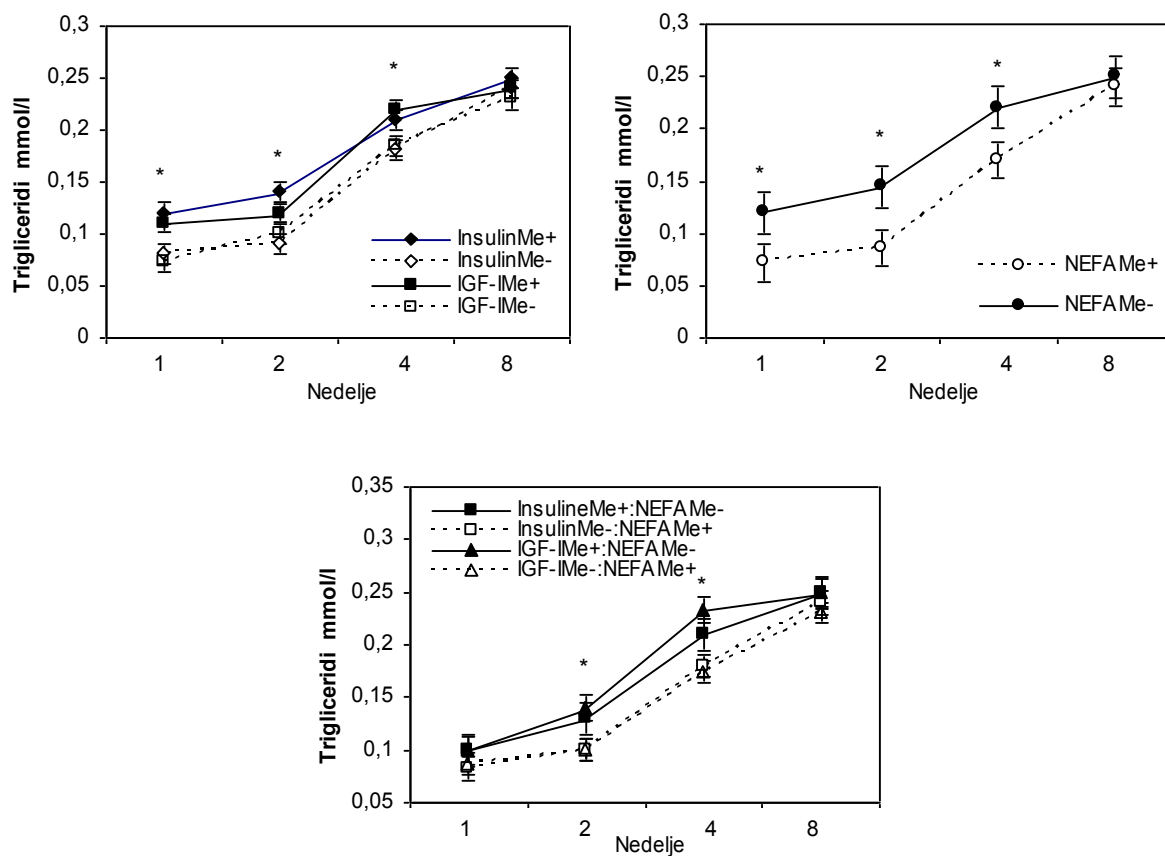


Grafikon 70-71: Uticaj pojedinačnih indikatora metaboličkog stresa na koncentraciju holesterola



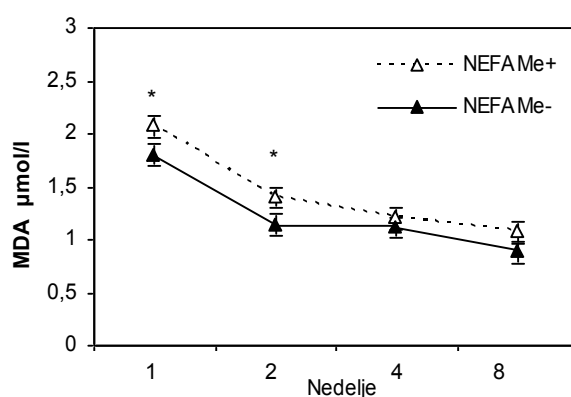
Grafikon 72: Kombinovani uticaj indikatora metaboličkog stresa na koncentraciju holesterola

Trigliceridi – Koncentracija triglicerida u krvi opada u ranoj laktaciji. Stepenn opadanja zavisi od stepena njegovog zadržavanja u hepatocitima, a ova dva procesa su u obrnutoj proporciji. Svi navedeni indikatori stresa, osim kortizola, imaju značajan uticaj na koncentraciju triglicerida u krvnom serumu krava, bilo da se radi o klasifikaciji krava upotrebom jednom ili dva kriterijuma. Tako krave opterećene metaboličkim stresom - katabolizmom (grupe $\text{insulin}^{\text{Me-}}$, $\text{IGF-I}^{\text{Me-}}$, $\text{NEFA}^{\text{Me+}}$, $\text{insulin}^{\text{Me-}}+\text{NEFA}^{\text{Me+}}$, $\text{IGF-I}^{\text{Me-}}+\text{NEFA}^{\text{Me+}}$), imaju značajno nižu koncentraciju triglicerida u prvoj, drugoj ili četvrtoj nedelji posle partusa u zavisnosti od tipa klasifikacije životinja (*Grafikon 73-75*).

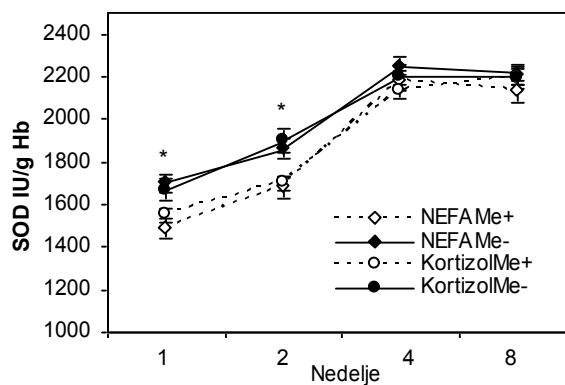


Grafikon 73-75: Prosečna vrednost koncentracije triglicerida u krvnom serumu krava na osnovu klasifikacije krava prema indikatorima metaboličkog stresa

Oksidativni status krava – Vrednost MDA je veća u grupi NEFA^{Me+} u prvoj i drugoj nedelji posle teljenja, dok klasifikacija krava prema ostalim kriterijumima nije dala značajne rezultate (*Grafikon 76*). Vrednost SOD je značajno niža kod krava u grupi NEFA^{Me+} i kortizol^{Me+} u prve dve nedelje laktacije (*Grafikon 77*). Povećana lipidna mobilizacija i opšta stresna reakcija čiji je reprezent kortizol utiče na lipidnu peroksidaciju, odnosno smanjenje antioksidativne aktivnosti kod krava u ranoj laktaciji.

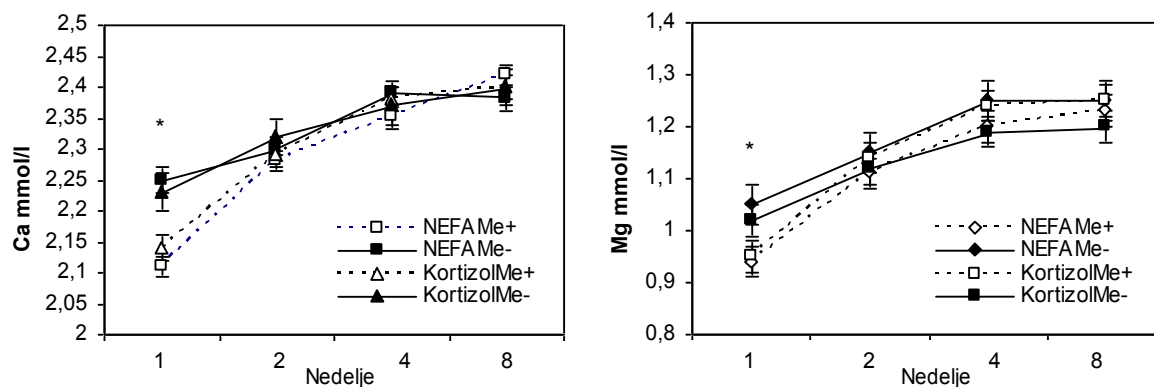


Grafikon 76: Prosečna vrednost kod krava klasifikovanih prema NEFA

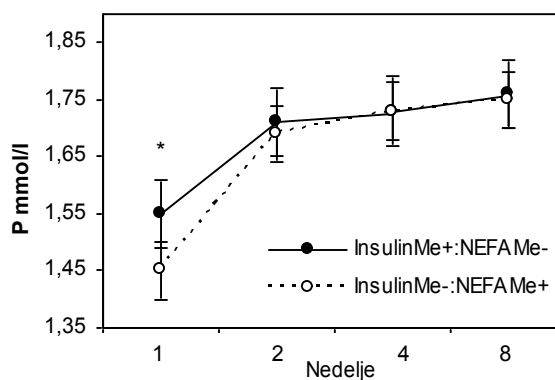


Grafikon 77: Prosečna vrednost SOD kod krava klasifikovanih prema NEFA i kortizolu

Minerali – Ispitani indikatori metaboličkog profila pokazuju uticaj na vrednost koncentracije Ca, P i Mg u prvoj nedelji laktacije. Koncentracija ovih jona je značajno niža kod krava opterećenih metaboličkim stresom, tako da je razlika u koncentraciji vidljiva kod krava klasifikovanih prema vrednosti NEFA i kortizola (za Ca i Mg) (*Grafikon 78-79*) odnosno prema insulin+NEFA klasifikaciji (za P) (*Grafikon 80*).



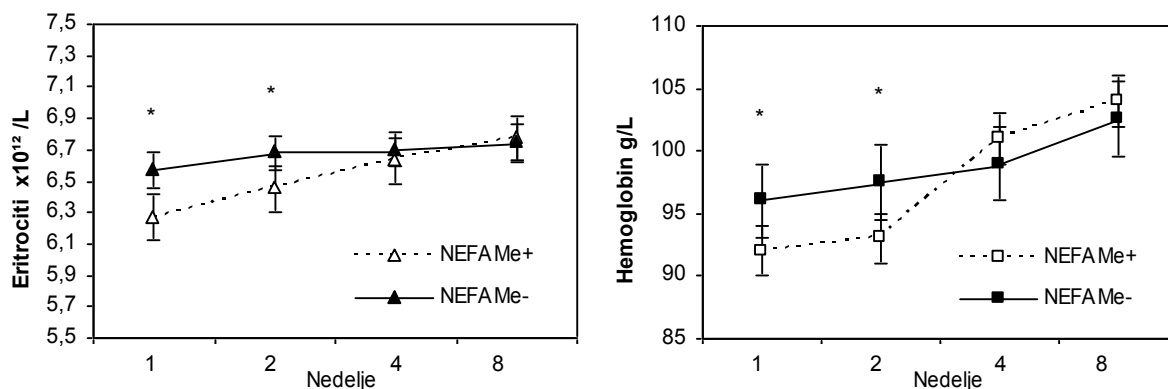
Grafikon 78-79: Srednja vrednost Ca i Mg kod krava klasifikovanih prema kriterijumu NEFA i kortizol



Grafikon 80: Srednja vrednost P kod krava klasifikovanih prema kriterijumu insulin+NEFA

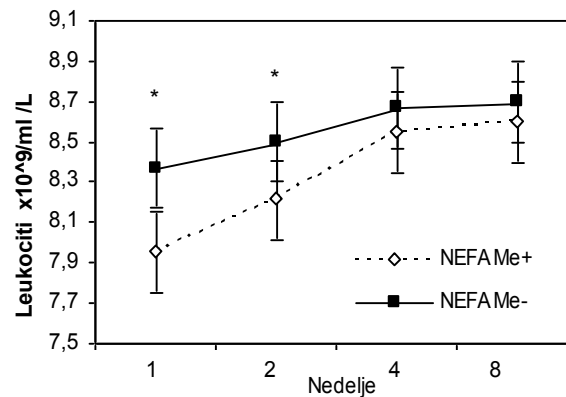
5.3.2. Krvna slika krava klasifikovanih prema indikatorima stresa

U ispitivanju uticaja indikatora metaboličkog stresa na vrednost parametara krvne slike nađeno je da klasifikacija krava prema vrednostima NEFA i kortizola daje signifikantne razlike u crvenoj i beloj krvnoj lozi. Krave koje pripadaju NEFA^{Me+} grupi pokazuju manji broj eritrocita (*Grafikon 81*), nižu koncentraciju hemoglobina (*Grafikon 82*), manji broj leukocita (*Grafikon 83*), veći broj neutrofila (*Grafikon 84*) i veći odnos N:L (*Grafikon 85*) u prvoj i drugoj nedelji posle partusa u odnosu na krave NEFA^{Me-} grupe. Krave koje pripadaju kortizol^{Me+} grupi pokazuju tipičan stresni leukogram u prvoj nedelji posle teljenja, pa one imaju veći broj neutrofila (*Grafikon 84*), manji broj limfocita, manji broj eozinofila i veći broj monocita (*Grafikon 86-88*), kao i veći N:L odnos (*Grafikon 85*). Klasifikacija prema kombinovanom uticaju anaboličkih i kataboličkih indikatora stresa nije dala signifikantne razlike.

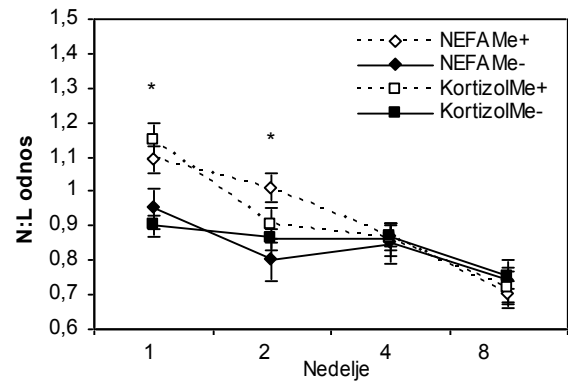
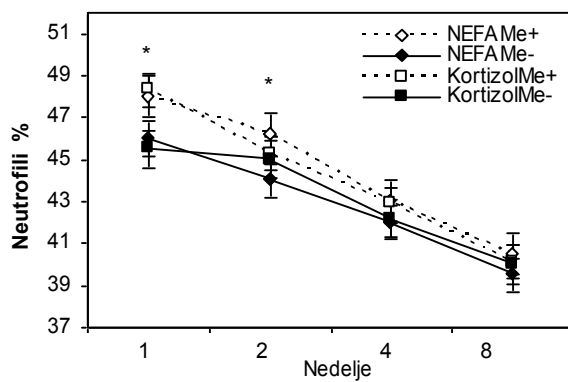


Grafikon 81: Prosečan broj eritrocita kod krava klasifikovanih prema NEFA kriterijumu

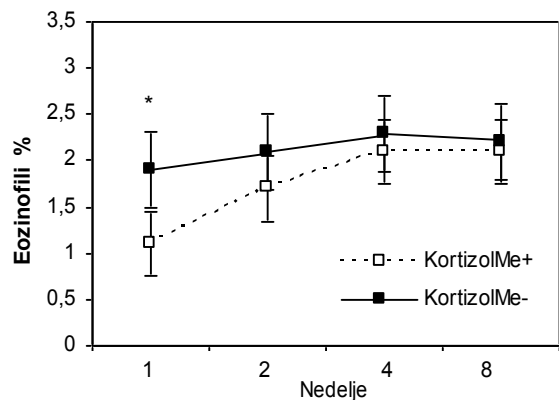
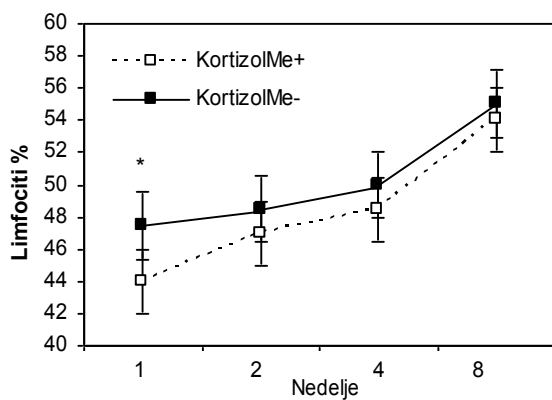
Grafikon 82: Prosečna koncentracija hemoglobina kod krava klasifikovanih prema NEFA kriterijumu

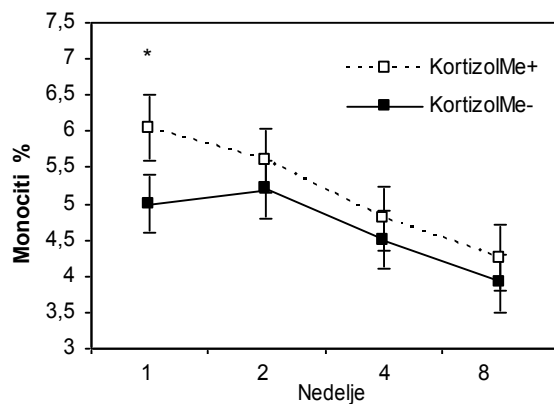


Grafikon 83: Prosečan broj leukocita kod krava klasifikovanih prema NEFA kriterijumu



Grafikon 84-85: Prosečan % neutrofila i vrednost odnosa N:L kod krava klasifikovanih prema kriterijumima NEFA i kortizol

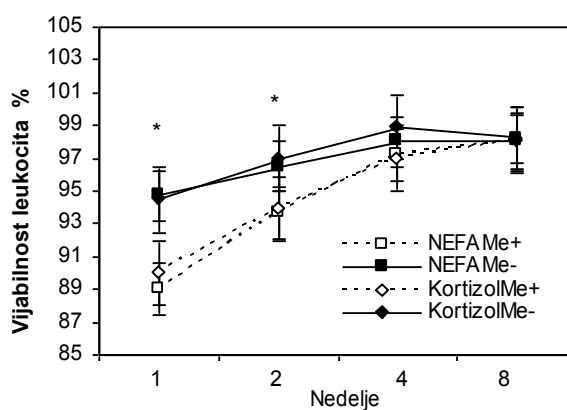




Grafikon 86-88: Prosečna % zasutpljenost limfocita, eozinofila i monocita kod krava klasifikovanih prema kriterijumu kortizol

5.3.3. Vijabilnost leukocita kod krava klasifikovanih prema indikatorima stresa

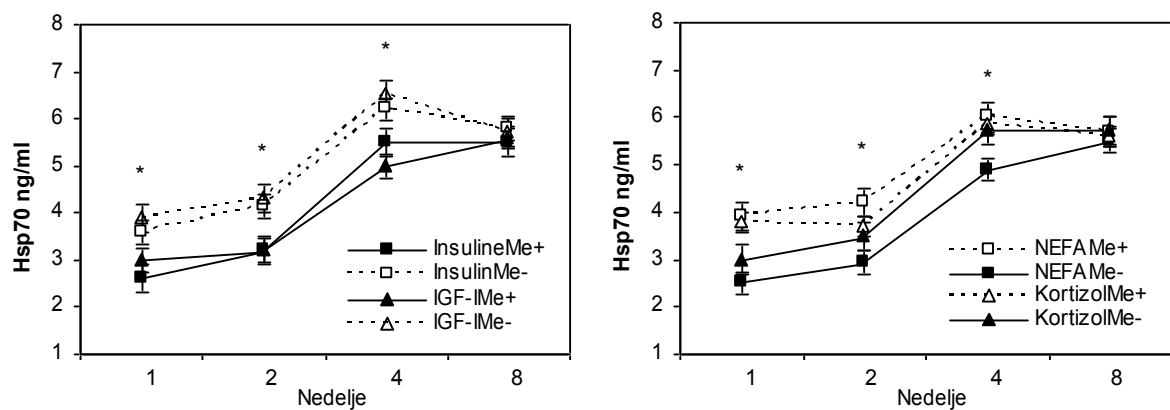
Pored signifikantnog uticaja NEFA i kortizola na krvnu sliku i diferencijalnu belu lozu, isti uticaj postoji i kada je u pitanju vijabilnost leukocita. Kod krava opterećenih metaboličkim stresom (NEFA^{Me+} i kortizol^{Me+}) postoji niža vijabilnost leukocita u prvoj i drugoj nedelji posle teljenja u odnosu na krave iz grupe NEFA^{Me-} i kortizol^{Me-} (Grafikon 89).



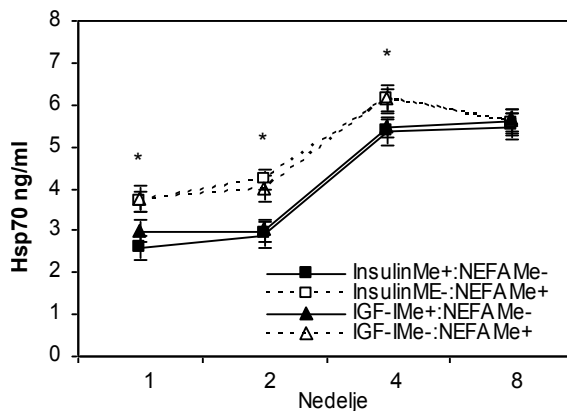
Grafikon 89: Prosečna vijabilnost leukocita (%) kod krava klasifikovanih prema kriterijumu NEFA i kortizol

5.3.4. Koncentracija Hsp70 kod krava klasifikovanih prema indikatorima stresa

Ispitivanje koncentracije Hsp70 kod krava pokazuje da koncentracija Hsp zavisi od odabranih indikatora metaboličkog stresa. Tako je nađeno da krave opterećene stresom (grupe insulin^{Me-}, IGF-I^{Me-}, NEFA^{Me+} i kortizol^{Me+}) imaju višu koncentraciju Hsp70 u prvoj, drugoj i/ili četvrtoj nedelji posle teljenja osim za kortizol gde je razlika postojala samo u prvoj nedelji (*Grafikon 90-91*). Podela krava prema kriterijumu zajedničkog uticaja anaboličkih i kataboličkih indikatora metaboličkog stresa pokazuje ista svojstva kao i klasifikacija prema jednom indikatoru u grupama insulin^{Me+}+ NEFA^{Me+} i IGF-I^{Me-}+NEFA^{Me+} (*Grafikon 92*). Upotreba odabranih indikatora metaboličkog stresa može biti od značaja za procenu celularnog odgovora na stres kod krava.



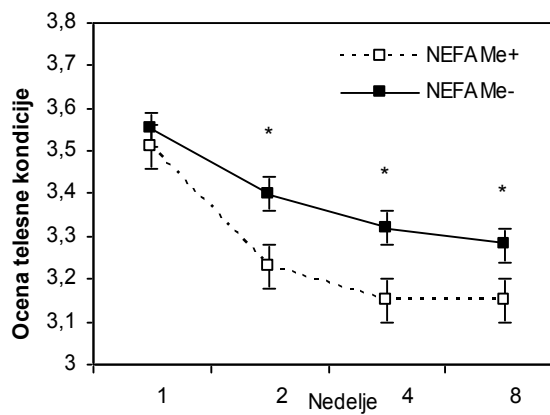
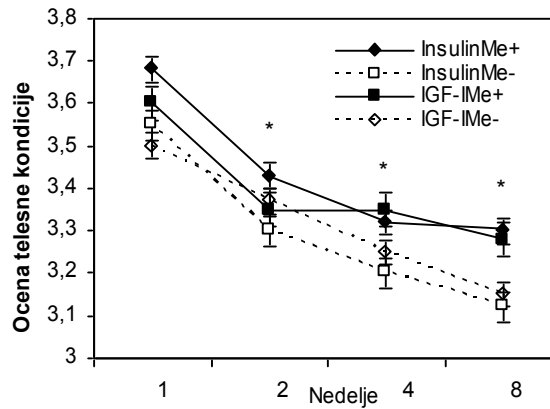
Grafikon 90-91: Pojedinačni uticaj indikatora stresa na koncentraciju serumskog Hsp70



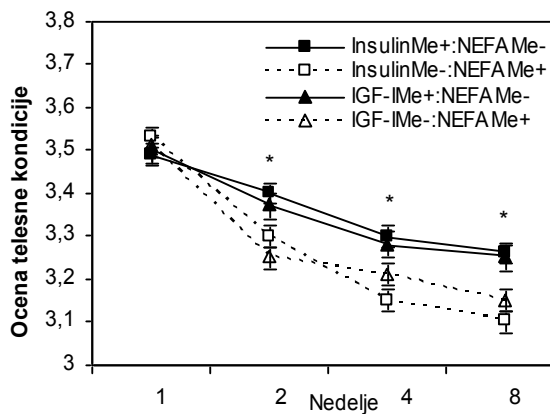
Grafikon 92: Kombinovani uticaj indikatora stresa na koncentraciju serumskog Hsp70

5.3.5. Telesna kondicija kod krava klasifikovanih prema indikatorima stresa

Gubitak telesne kondicije u ranoj laktaciji je fiziološka pojava, koja nastaje kao posledica negativnog energetskog bilansa usled velike proizvodnje mleka i usled stresa izazvanog teljenjem. Na metaboličkom nivou postoji značajan uticaj klasifikacije krava prema vrednosti insulina, IGF-I i NEFA. Telesna kondicija značajnije opada kod krava u metaboličkom stresu koje su izložene katabolizmu, odnosno kod krava u grupi insulin^{Me-} i IGF-I^{Me-} (Grafikon 93), NEFA^{Me+} (Grafikon 94), insulin^{Me+} + NEFA^{Me+} i IGF-I^{Me+}+NEFA^{Me+} (Grafikon 95). Razlika u oceni telesne kondicije je nađena u drugoj, četvrtoj i osmoj nedelji laktacije, odnosno četvrtoj i osmoj za krave podeljene po kriterijumu IGF-I.



Grafikon 93 i 94: Srednja ocena telesne kondicije kod krava podjeljenih prema kriterijumu insulin, IGF-I i NEFA



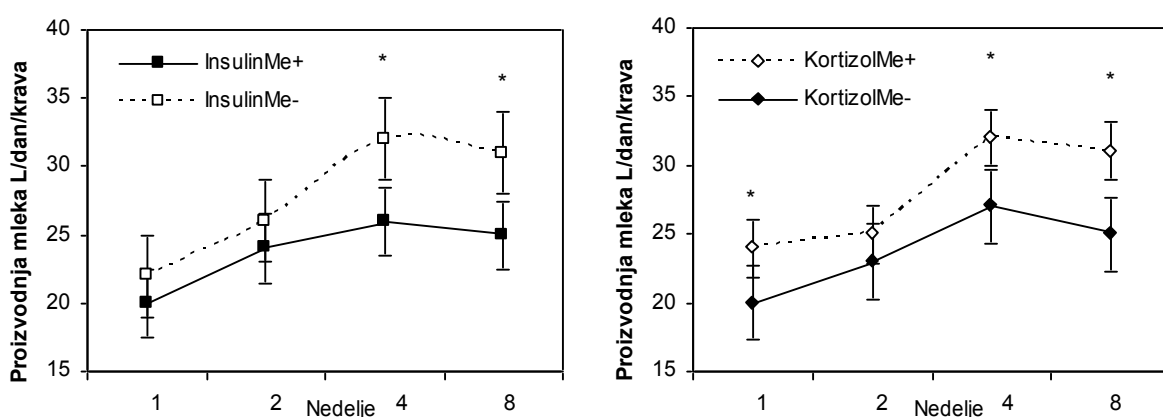
Grafikon 95: Srednja ocena telesne kondicije kod krava podjeljenih prema kriterijumu insulin+NEFA i IGF-I+NEFA

U grupi krava koje su izgubile 0,4-0,5 jedinica telesne kondicije za osam pospartalnih nedelja dominiraju krave koje se nalaze u grupi koja je opterećena metaboličkim stresom (12/18, ~67%). Kod krava koje su izgubile više od 0,5 jedinica telesne kondicije njih 87,5% (7/8) pripada grupi koja je opterećena stresom. Sa druge strane krave koje su gubile do 0,4 jedinice telesne kondicije za osam nedelja najviše pripadaju grupi krava koje nisu opterećene stresom (20/24, ~83%). Krave opterećene metaboličkim stresom, bilo da su podeljene prema jednom ili dva kriterijuma za procenu metaboličkog stresa, znatno više gube na telesnoj kondiciji u ranoj laktaciji. Upotreba odabranih indikatora metaboličkog stresa može biti od koristi u proceni telesne kondicije krava i njenog kretanja u ranoj laktaciji.

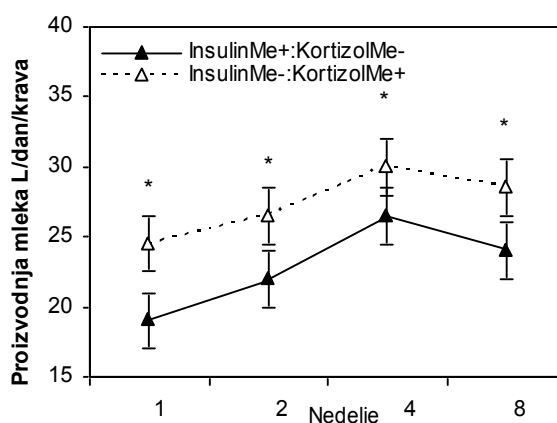
5.3.6. Proizvodnja mleka kod krava klasifikovanih prema indikatorima stresa

Proizvodnja mleka i započinjanje laktacije predstavlja glavni pokretač svih metaboličkih izmena koje nastaju u peripartalnom periodu i ranoj laktaciji. Predstavnicima anaboličke ose organizma opadaju u svojoj koncentraciji, kako bi se omogućio katabolički efekat kortizola i hormona rasta i usmeravanje tako dobijenih elementarnih hranljivih materija ka vimenu. Tako je nađeno da krave koje pripadaju grupi čiji je metabolizam opterećen i pod stresom (insulin^{Me-} grupa) daju veću količinu mleka u četvrtoj i osmoj nedelji laktacije, odnosno ako se radi o kortizol^{Me+} grupi u prvoj četvrtoj i osmoj nedelji (*Grafikon 96-97*). Klasifikacija prema kriterijumu insulin+kortizol pokazuje da krave u insulin^{Me-}+kortizol^{Me+} daju značajno veću količinu mleka u svim ispitivanim nedeljama (*Grafikon 98*). Ovaj rezultat je u ezi sa činjenicom da nedostatak insulina omogućuje kretanje hranljivih materija (glukoze) ka vimenu, a kortizol značajno pomaže u njegovom dalje korišćenju u mlečnoj žlezdi krava. Klasifikacija krava prema kriterijumima NEFA i IGF-I nije pokazala statistički značajne razlike. Klasifikacija prema kriterijumu insulin+NEFA pokazuje da krave u grupi

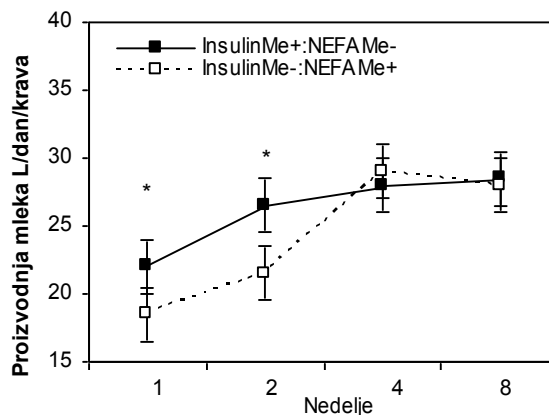
insulin^{Me-}+ NEFA^{Me+} daju manju količinu mleka u ranoj laktaciji (tokom prve dve nedelje) (*Grafikon 99*). Dakle, izražena insulinska rezistencija (smanjen funkcioanlni status beta-ćelija pankreasa) i jača lipoliza mogu negativno uticati na ranu proizvodnju mleka. Ovakav rezultat može dovesti u pitanje mišljenja da proizvodnja mleka u ranoj laktaciji zavisi isključivo od mobilizacije telesnih rezervi, uzimajući u obzir da se insulinska rezistencija dešava zbog smanjenog unosa energije i suve materije hrane. Za razumevanje ovih rezultata potrebna su dodatna istraživanja.



Grafikon 96-97: Prosečna proizvodnja mleka kod krava klasifikovanih prema kriterijumu insulin i kortizol



Grafikon 98: Prosečna proizvodnja mleka kod krava klasifikovanih prema kriterijumu insulin+kortizol



Grafikon 99: Prosečna proizvodnja mleka kod krava klasifikovanih prema kriterijumu insulin+NEFA

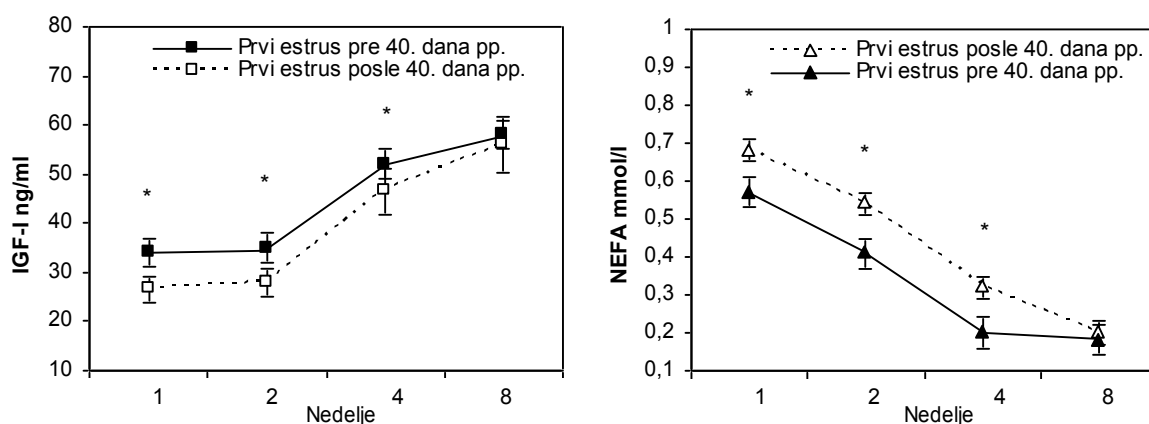
5.3.7. Reproductivna efikasnost kod krava klasifikovanih prema indikatorima stresa

Reproductivna efikasnost krava posmatra se kroz mnogobrojne parametre, a za naše istraživanje odabrana su dva najkarakterističnija: 1) rano reuspostavljanje ovarijalne aktivnosti i pojava prvog vidljivog estrusa i 2) vreme od teljenja do fertilnog osemenjavanja (servis period). Kod krava kod kojih je dijagnostikovao prvi vidljivi estrus do 40-og dana posle teljenja koncentracija NEFA je značajno niža, a koncentracija IGF-I značajno viša u prvoj, drugoj i četvrtoj nedelji posle teljenja (*Grafikon 100-101*). Isti rezultat je pronađen kod krava koje su fertilno osemenjene do 90-og dana posle teljenja (*Grafikon 102-103*). Koncentracija NEFA se nalazi ispod generalnog proseka ispitivanih krava, dok se koncentracija IGF-I nalazi ispod generalnog proseka ispitivanih krava. Ovo ukazuje da krave koje su manje opterećene metaboličkim stresom imaju bolju reproductivnu efikasnost.

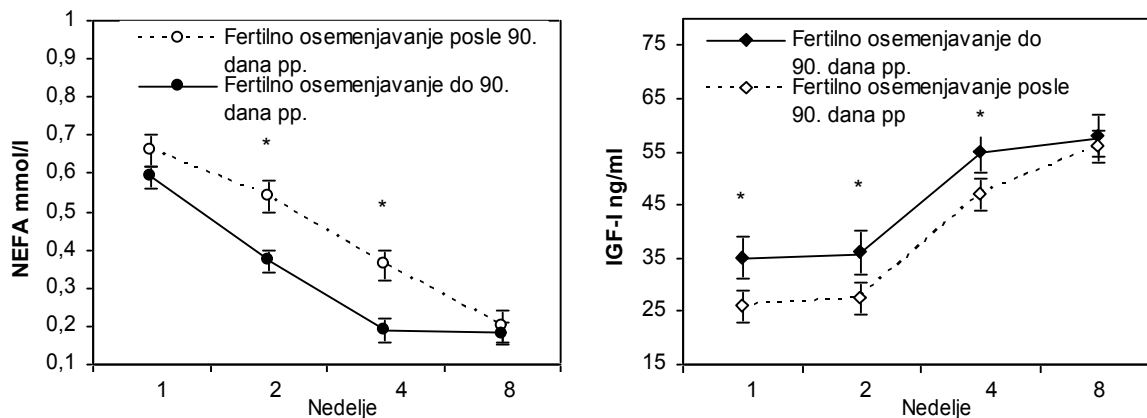
Postavlja se pitanje da li klasifikacija krava prema kriterijumima koje smo odredili može biti u vezi sa reproductivnom efikasnošću krava. Rezultati pokazuju da u grupi krava

čija je reproduktivna efikasnost bolja (prvi vidljivi estrus pre 40. dana, fertilno osemenjavanje pre 90. dana) postoji značajno veća proporcija krava koje pripadaju NEFA^{Me-} i IGF-I^{Me+} grupi, kao i IGF-I^{Me+}:NEFA^{Me-}. Takođe, kod krava koje su imale slabiju reproduktivnu efikasnost postoji suprotan nalaz. Kada se ovakav rezultat primeni u 2x2 tabeli kontigencije i izračuna se Hi-kvadrat test možemo zaključiti da postoji signifikantna veza između reproduktivne efikasnosti i odabranih indikatora metaboličkog stresa kod krava (*Tabela 6 i 7*).

Klasifikacija krava prema vrednostima NEFA i IGF-I daje značajne razlike u reproduktivnoj efikasnosti, pa zaključujemo da su ovi indikatori metaboličkog stresa korisni u proceni reproduktivne efikasnosti krava.



Grafikon 100-101: Koncentracija IGF-I i NEFA kod krava sa vidljivim estrusom do 40. dana posle teljenja i potom



Grafikon 102-103: Koncentracija IGF-I i NEFA kod krava koje su fertilno osemnjene do 90. dana posle teljenja i nakon tog perioda

Tabela 6: Razlika u zastupljenosti krava (klasifikovanih prema kriterijumu NEFA, IGF-I i NEFA+IGF-I) prema momentu ispoljavanja prvog vidljivog estrusa

Estrus	Do 40.dana	Preko 40.dana	Hi kvadrat (p)
NEFA+	8	20	<0,01
NEFA -	17	5	
IGF-I+	18	6	<0,01
IGF-I-	6	20	
NEFA+IGF-I-	7	15	<0,05
NEFA-IGF-I+	13	7	

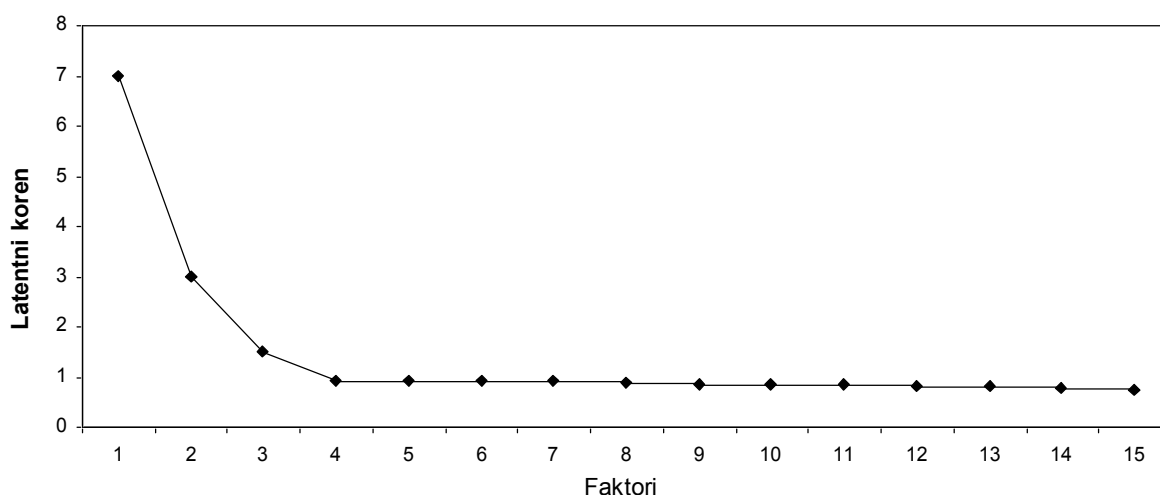
Tabela 7: Razlika u zastupljenosti krava (klasifikovanih prema kriterijumu NEFA, IGF-I i NEFA+IGF-I) prema momentu fertilnog osemnjavanja

Fertilno v.o.	Do 90. dana	Preko 90. dana	Hi kvadrat (p)
NEFA+	9	19	<0,01
NEFA -	17	5	
IGF-I+	19	5	<0,01
IGF-I-	8	18	
NEFA+IGF-I-	9	13	~0,05
NEFA-IGF-I+	14	6	

5.4. Faktorska analiza – ekstrakcija informacija o peripartalnom metaboličkom stresu

U ovom radu vršeno je poređenje velikog broja podataka, a njihov pojedinačno poređenje, ispitivanje korelacija i interpretacija međusobnih odnosa je prilično složen proces. Zbog toga je potrebno izvršiti ekstrakciju informacija iz ovako velike baze podataka, kako bi dobili setove srodnih varijabli ili kako bi se odredila jedna kompozitna mera koja predstavlja čitav set srodnih varijabli. Na ovaj način ćemo pokušati da bolje razumemo strukturu podataka i pokušaćemo da simplifikujemo sve analize varijabli koje smo koristili u korist zaminskih kompozitnih varijabli.

Rezultati istraživanja pokazuju da se može izdvojiti tri faktora, posle izračunavanja latentnih korenova, metodom glavne komponente. Upotrebom tri navedena faktora se može objasniti 88,9% variranja svih varijabli (*Grafikon 104*). Ovi faktori imaju svojstvene vrednosti, koje su odvojene od vrednosti drugih faktora. Obzirom da je inicijalna faktorska matrica (nije prikazana) pokazala faktorsko opterećenje da velikim brojem varijabli izvršeno je pojednostavljenje Varimax rotacijom. Posle rotacije dobijamo precizniju preraspodelu faktorskih opterećenja i jednostavnije tumačenje faktora (*Tabela 8*).



Grafikon 104: Faktori i njihovo učešće u varijaciji posle Scree testa

Tabela 8: Opterećenje faktora posle Varimax rotacije

	Faktor 1 61,7%	Faktor 2 20,2%	Faktor 3 7%
Insulin	0,987		
IGF-I	0,931		
NEFA	0,969		
STH	0,982		
Glukoza	0,939		
BHB		0,963	
AST		0,952	
Trigliceridi		0,912	
Holesterol		0,899	
Proizvodnja mleka			0,966

Dobijena tri faktora omogućuju bolje razumevanje peripartalnog metabolizma i razvoja metaboličkog stresa kod krava. Faktor 1 daje objašnjenje 61,7% varijacije i on visoko korelira sa vrednostima insulina, IGF-I, STH, NEFA i glukoze. Faktor 2 objašnjava 20,2% varijacije i on visoko korelira sa BHB, AST, trigliceridima i holesterolom. Faktor 3 koji objašnjava 7% varijacije varijabli korelira sa proizvodnjom mleka kod krava.

5.5. Patofiziološki i klinički značaj odabranih indikatora metaboličkog stresa

Prikazali smo da odabrani indikatori metaboličkog stresa mogu biti upotrebljeni u proceni metaboličkog stresa (na osnovu uticaja indikatora na parametre metaboličkog profila, krvne slike, imunološke i celularne adaptacije) i bioloških osobina koje su za njega vezane (telesna kondicija krava, proizvodnja mleka, reproduktivna efikasnost i dr.).

U svakodnevnom radu na farmi vrši se uzorkovanje krvi i analiza metaboličkog profila i krvne slike, ocenjuje telesna kondicija, prati proizvodnja mleka i reproduktivna efikasnost krava u ranoj laktaciji. Kod krava u ovom periodu često se mogu dobiti rezultati koji ukazuju na značajno opterećenje metabolizma i produktivnosti krava kao što su: hipoglikemija, hiperketonemija, hipoalbuminemija, hipokalcemija, hiperbilirubinemija, anemija, stresni leukogram, gubitak telesne kondicije preko 0,5 jedinica u prvih nekoliko nedelja, nekonzistentna laktaciona kriva i projektovana manja proizvodnja mleka u laktaciji koja sledi u odnosu na predhodnu (posebno ako su krave u prvih 5 laktacija), slaba ispoljenost estrusa i dug servis period krava. Cilj ovog dela istraživanja je da se ispita da li je nastanak navedenih promena u metabolizmu i produktivnosti krava u vezi sa vrednostima odabranih indikatorima metaboličkog stresa u prvoj nedelji posle partusa i da li se na osnovu vrednosti odabranih indikatora metaboličkog stresa može odrediti rizik da se kod krava ispolji neka od navedenih promena. Tako će biti ispitano da li odabrana četiri kriterijuma peripartalnog metaboličkog stresa (insulin, IGF-I, NEFA i kortizol) imaju dijagnostički značaj u proceni budućeg metaboličkog statusa i produktivnosti krava.

Na osnovu vrednosti odabranih indikatora metaboličkog stresa u prvoj nedelji posle teljenja moguće je razdvojiti krave koje imaju značajne promene u metaboličkom profilu i produktivnosti od onih koje imaju očuvanu adaptacionu sposobnost. Klinički značaj odabranih indikatora u proceni metaboličkog stresa kod krava prikazana je u *Tabeli 9, 10 i 11.*

U tabelama je prikazana vrednost površine ispod ROC krive (*eng.*, *area under curve*, AUC) i optimalna koncentracija indikatora koja deli krave sa metaboličkim i produktivnim promenama od onih koje te promene nemaju. Tumačenje rezultata se vrši na sledeći način: ako bi slučajno odabrali hipoglikemičnu kravu u 95% slučajeva (prema AUC 0,95) ta krava bi imala vrednost NEFA preko 0,65 mmol/l u prvoj nedelji laktacije. U interpretaciji rezultata treba uzeti u obzir da što je površina ispod ROC krive (AUC) veća, veća je i diskriminatorska moć testa. Drugi podatak koji treba uzeti u razmatranje je vrednosti indikatora metaboličkog stresa koja optimalno diskriminiše krave. Tako npr. nastanak hipoglikemije, hiperketonemije ili hiperbilirubinemije u ranoj laktaciji je moguć kada postoji uobičajna vrednost NEFA za taj period u odnosu na granične vrednosti za nastanak anemije ili hipoalbuminemije koje su prilično visoke. Na taj način možemo da shvatimo kojom dinamikom fiziološki mehanizmi ulaze u dekompenzaciju sa porastom stepena katabolizma i intenziteta metaboličkog stresa. Poređenjem između dve ROC krive možemo odrediti koji testovi daju najbolju diskriminaciju krava koje su pod rizikom. Rezultati pokazuju da najbolju diskriminacionu sposobnost ima NEFA (kod pojedinih promena samo NEFA pokazuje signifikantnu AUC), a signifikantno veći značaj ima kada je u pitanju diskriminacija krava sa hiperketonemijom, hiperbilirubinemijom i krava kod kojih nije vidljiv estrus do 40. dana posle teljenja (izgled ROC krive u ovim slučajevima prikazan na *Grafikonu 105-107*). U poslednjem koraku treba ispitati koliko puta češće su vrednosti indikatora veće/manje od izračunatih graničnih vrednosti kod krava sa poremećajem metabolizma i produktivnosti u odnosu na krave koje ne pokazuju takve nalaze. Tako je prikazano da kod krava sa poremećajima u metabolizmu i produktivnosti najčešće postoji viša koncentracija NEFA u odnosu na izračunatu graničnu vrednost, ali je rizik veći od 1 kada su u pitanju i vrednosti ostalih parametara (*Tabela 12*).

Na osnovu analize ROC krive zaključujemo da odabrani indikatori metaboličkog stresa mereni u prvoj nedelji posle teljenja mogu ukazati na rizik da kod krava nastanu

značajne promene u metaboličkom profilu i produktivnosti kao posledica dekompenzacije fizioloških procesa, čime potvrđujemo klinički značaj odabranih indikatora za procenu metaboličkog stresa kod krava u ranoj laktaciji.

Tabela 9: Optimalna koncentracija indikatora metabolita i površina ispod ROC krive (AUC) koja izdvaja (diskriminiše) krave čije su vrednosti metaboličkog profila izvan referentnih

	Insulin<	IGF-I<	NEFA>	Kortizol>
Hipoglikemija				
<i>AUC</i>	0,9	0,87	0,93	NS
<i>Koncentracija</i>	0,25	27,3	0,65	NS
Hiperketonemija (preko 1 nmol/l)				
<i>AUC</i>	0,86	0,82	0,94*	NS
<i>Koncentracija</i>	0,28	28,1	0,57	NS
Hipoalbuminemija				
<i>AUC</i>	NS	0,78	0,76	NS
<i>Koncentracija</i>	NS	0,2	0,77	NS
Hipokalcemija				
<i>AUC</i>	NS	NS	0,69	NS
<i>Koncentracija</i>	NS	NS	0,62	NS
Hiperbilirubinemija				
<i>AUC</i>	0,7	0,86	0,93*	NS
<i>Koncentracija</i>	0,31	0,3	0,57	NS
Anemija				
<i>AUC</i>	NS	NS	0,82	NS
<i>Koncentracija</i>	NS	NS	0,7	NS
N:L>1				
<i>AUC</i>	NS	NS	0,81	0,94
<i>Koncentracija</i>	NS	NS	0,57	16,1

*-pogledati ROC krivu, grafik 105 i 106

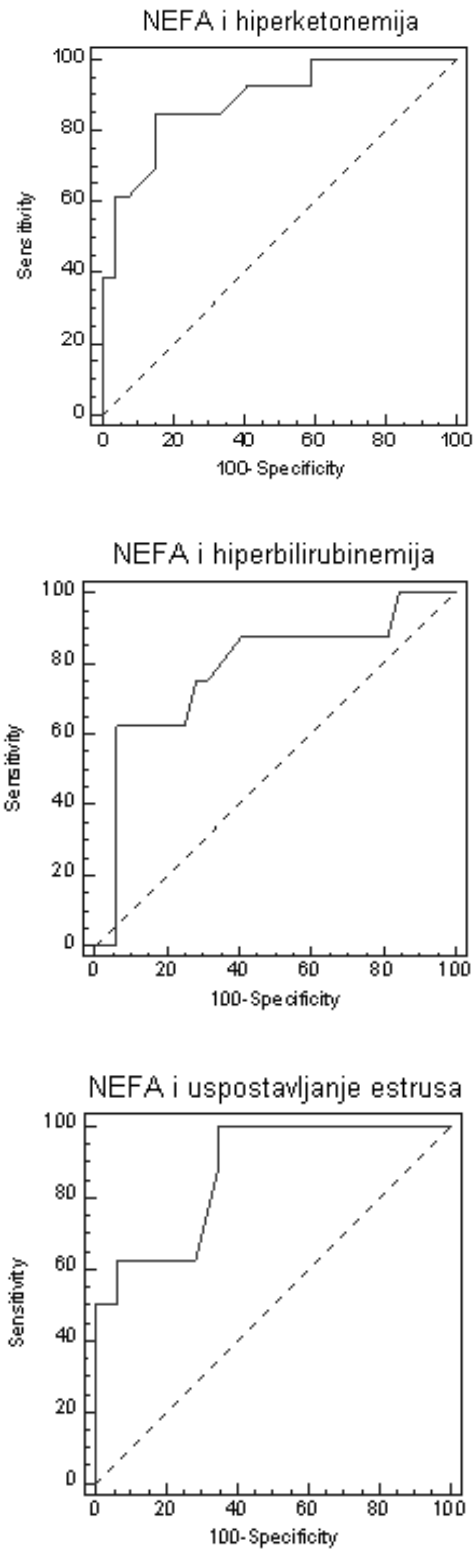
Tabela 10: Optimalna koncentracija indikatora metabolita i površina ispod ROC krive (AUC) koja diskriminiše krave sa značajnim gubitkom telesne kondicije

	Insulin<	IGF-I<	NEFA>	Kortizol>
Gubitak telesne kondicije preko 0,5 jedinica				
<i>AUC</i>	0,77	0,82	0,89	NS
<i>Koncentracija</i>	0,3	0,36	0,52	NS

Tabela 11: Optimalna koncentracija indikatora metabolita i površina ispod ROC krive (AUC) koja diskriminiše krave sa umanjnim produktivnim karakteristikama

	Insulin<	IGF-I<	NEFA>	Kortizol>
Manja proizvodnja mleka nego u predhodnoj laktaciji				
<i>AUC</i>	0,73	NS	0,88	NS
<i>Koncentracija</i>	0,36	NS	0,7	NS
Uspostavljanje estrusa posle 40. dana od teljenja				
<i>AUC</i>	NS	0,83	0,9*	NS
<i>Koncentracija</i>	NS	0,31	0,68	NS
Fertilno osemenjavanje posle 90. dana od teljenja				
<i>AUC</i>	NS	0,79	0,83	NS
<i>Koncentracija</i>	NS	0,25	0,73	NS

*-pogledati ROC krivu, grafik 107



Grafikon 105-107: ROC kriva za diskriminacioni značaj NEFA u nastanku hiperketonemije, hiperbilirubinemije i reuspostavljanja estrusnog ciklusa do 40. dana posle teljenja

Tabela 12: Odnos verovatnoća da će se naći pomenute granične vrednosti kod krava koje imaju poremećaj metabolizma i produktivnosti nego kod onih koje nemaju takve osobine

	Insulin	IGF-I	NEFA	Kortizol
Hipoglikemija				
LR+	/	/	3,1	/
Hiperketonemija (preko 1 nmol/l)				
LR+	1,5	1,7	3,5	/
Hipoalbuminemija				
LR+	/	1,6	1,8	/
Hipokalcemija				
LR+	/	/	1,6	/
Hiperbilirubinemija				
LR+	1,8	1,5	2,9	/
Anemija				
LR+	/	/	1,4	/
N:L>1				
LR+	/	/	2,2	2,6
Gubitak telesne kondicije preko 0,5 jedinica				
LR+	1,6	1,8	2	/
Manja proizvodnja mleka nego u predhodnoj laktaciji				
LR+	1,6	/	1,3	/
Uspostavljanje estrusa posle 40. dana od teljenja				
LR+	/	1,9	2,6	/
Fertilno osemenjavanje posle 90. dana od teljenja				
LR+	/	1,5	1,6	/

6.DISKUSIJA

6.1.Vrednosti indikatora metaboličkog stresa u periodu posle teljenja

Teljenje i početak laktacije dovodi do niza promena u metaboličkom profilu, krvnoj slici, telesnoj kondiciji i produktivnosti. Metaboličke promene u ranoj laktaciji su od posebnog značaja, jer od njih zavise i produktivne osobine krava u ranoj laktaciji i kasnije.

Posle partusa krave su izložene metaboličkom stresu. U prilog ovome govori nalaz u vezi sa odabranim indikatorima metaboličkog stresa. U ranoj laktaciji dolazi do smanjenja koncentracije insulina i IGF-I i povećanja koncentracije kortizola i NEFA, što je slika koja pokazuje dominaciju kataboličke ose organizma nad anaboličkom.

Koncentracija insulina je niža u prvoj i drugoj nedelji posle teljenja u odnosu na četvrtu i osmu nedelju (0,35 i 0,48 prema 0,79 i 0,8 ng/ml). Koncentracija insulina značajno zavisi od dana laktacije. Ovakav rezultat je potvrđen od strane drugih autora kroz linearni model koji dokazuje da postoji značajno opadanje insulina koji se održava na niskom nivou u prve četiri nedelje posle teljenja, da bi posle četvrte nedelje koncentracija insulina rasla.¹⁶⁸ Naši rezultati su u skladu sa dobijenim vrednostima većine istraživača, mada vrednost insulinemije kod krava u ranoj laktaciji značajno varira od 0,38 do 1,38 ng/ml.⁵ Stariji rezultati pokazuju da je prosečna vrednost insulina kod mlečnih krava 14,58 mIU/L (oko 0,58 ng/ml) što se slaže sa našim dobijenim opštim prosekom.¹⁹⁸ Kod negativnog energetskog bilansa nivo insulina je gotovo bez izuzetka bio niži od 12 mIU/L (0,5 ng/ml), međutim kod

krava sa pozitivnim bilansom energije koncentracija insulina varira od 6-50 mIU/L (0,25-2,1 ng/ml).¹⁹⁹

Koncentracija IGF-I je niža u prve dve nedelje posle teljenja u odnosu na četvrtu i osmu nedelju (30,5 i 31,2 prema 50 i 58 ng/ml). Niža koncentracija IGF-I je dobro dokumentovana u radovima velikog broja istraživača, a formiran je i linearni model koji opisuje uticaj momenta posle teljenja na vrednost IGF-I kod krava.¹⁶⁸ U istraživanjima kod goveda nađena je različita koncentracija IGF-I. Tako kod krava u ranoj laktaciji postoji koncentracija IGF-I na nivou oko 39 ng/ml, dok je kod tovnih junica u porastu ta koncentracija oko 157 ng/ml, a koncentracija kod bikova simentalske rase je oko 516 ng/ml. Koncentracija IGF-I kod mlečnih krava iznosi oko 45 ng/ml posle partusa, da bi potom lagano rasla u udvostručila se pri kraju laktacije i nastavila rast tokom perioda zasušenosti (~110 ng/mL).^{168,200,201} Navedeni rezultati se slažu sa rezultatima koje smo dobili.

Koncentracija NEFA je veća u prvoj i drugoj nedelji posle teljenja u odnosu na četvrtu i osmu nedelju (0,65 i 0,45 prema 0,29 i 0,21 mmol/L). Rezultati pokazuju da postoji umerena do jaka lipidna mobilizacija u ranoj laktaciji (NEFA preko 0,3-0,7 mmol/L) u odnosu na kasniji period kada je lipidna mobilizacija bila u okviru fizioloških vrednosti (NEFA ispod 0,3 mmol/L). Ovakav nalaz je dobro dokumentovan kod velikog broja istraživača. Koncentracija NEFA počinje da raste u nedeljama pre partusa, da bi u prvoj i drugoj nedelji posle partusa ta vrednost bila najveća i potom opada na početni nivo. Tako je napravljen regresioni model gde je koncentracija NEFA ispitana u odnosu na moment kada se uzorkuje krv kod krava.¹⁶⁸ Koncentracija NEFA značajno raste u periodu posle teljenja, a vrednost NEFA u populaciji pokazuje skretanje u desno.^{68,202,203} Koncentracija NEFA zavisi od nivoa lipidne mobilizacije i stresne opterećenosti u ranoj laktaciji, a smatra se da vrednost NEFA preko 0,5 mmol/L povećava rizik za nastanak peripartalnih bolesti.^{34,82,84}

Koncentracija kortizola je značajno viša u prvoj nedelji posle teljenja (15 ng/ml), da bi potom značajno opala i održavala se na niskom nivou (oko 5 ng/ml). Lučenje kortizola prati lučenje ACTH, sa jednim časom zakašnjenja. ACTH raste kao posledica porođajnog stesa. U ranoj laktaciji kortizol veoma brzo raste i vraća se na bazalni nivo, a smatra se da umanjena koncentracija kortizola dovodi do razvoja ketoze, verovatno zbog njegovog značaja u održavanju glikemije.²⁶ Koncentracija kortizola u krvnoj plazmi kod krava se kreće u vrlo širokom rasponu: od 3,1 nmol/l do 43,5 nmol/l.^{204,205} Koncentracija kortizola nakon teljenja kreće se u rasponu od 10,48 do 34,59 nmol/l.^{5,206} Interesantno je napomenuti da su nađene koncentracije kortizola u ranijim radovima niže u odnosu na koncentraciju koju su nalazili autori u novije vreme, što se može povezati sa dugogodišnjom selekcijom krava na proizvodnju mleka, koja je u značajnoj korelaciji sa vrednostima kortizola. Vrednost koncentracije kortizola zavisi od starosti životinja, tako da je kortizolemija najniža kod junadi.²⁰⁷

6.2. Vrednost ishodnih varijabli u periodu posle teljenja

Metabolički profil – Koncentracija STH kretala se od $14,97 \pm 0,15$ ng/ml u prvoj nedelji posle teljenja, da bi potom opadala i u osmoj nedelji iznosila $14,76 \pm 0,12$ ng/ml. Ovi rezultati su u duhu ranije dobijenih, ali su vrednosti STH više u odnosu na istraživače koji su dobijali vrednosti na nivou oko 10 ng/ml u prvim danima laktacije.²⁰⁸

Vrednosti glikemije su niže u prvim danima laktacije da bi sa vremenom rasle. Ove vrednosti su u skladu sa predhodno dobijenim rezultatima i ukazuju na metabolički stres u ranoj laktaciji. Koncentracija glukoze u krvi preživara je relativno niža nego kod monogastričnih životinja i kreće se u rasponu od 2,2 do 3,3 mmol/L. Utvrđeno je da glikemija

prosečno iznosi 2,71 mmol/L na 10 do 15 dana do teljenja, 2,40 mmol/L do 10 dana posle teljenja, 2,60 mmol/L u drugom mesecu laktacije i 2,70 mmol/L u petom mesecu laktacije. Glikemija kod zdravih krava varira između 2,3 i 3,3 mmol/L. Kod subkliničkih ketoznih stanja glikemija se kreće od 1,7 do 2,7 mmol/L, a kod krava sa kliničkim simptomima bolesti je redovno manja od 1,9 mmol/L. Određeni procenat uzoraka pokazao je vrednosti glukoze ispod referentnih, a taj procenat je opadao u kasnijim nedeljama posle teljenja.^{97,106,209}

Koncentracija BHB je drugi značajan pokazatelj energetskeg bilansa i njegova koncentracija je varirala od $0,8 \pm 0,14$ mmol/l u prvoj nedelji do $0,39 \pm 0,16$ mmol/l u osmoj nedelji ispitivanja. Povišena koncentracija BHB u ranoj laktaciji nastaje kao posledica povećane upotrebe masti u energetske svrhe, kada se dobija višak acetil koenzima-A čijim spajanjem nastaju ketonska tela, a među njima i BHB. BHB je veoma značajan indikator i koristi se za dijagnostiku ketoze kod krava. Ketoza je jedno od najznačajnijih dekompenzovanih stanja metabolizma u ranoj laktaciji. Obzirom da je optimalna granica za postavljanje subkliničke ketoze 1,2 mmol/l²¹⁰, možemo reći da je populacija krava u ogledu bila zdrava, mada je nekoliko krava (tri) kratkoročno u drugoj nedelji laktacije pokazao koncentraciju BHB u rasponu 1,35 do 1,45 mmol/l. Interesantno je da najveće odstupanje vrednosti BHB nije u prvoj nedelji posle partusa, što se primećuje kod većine drugih biohemijskih parametara. Ovaj podatak se slaže sa rezultatima drugih autora²¹¹ i može objasniti činjenicom da vrednost BHB u krvi raste tek onda kada se akumulira dovoljno acetil koenzima A u hepatocitima i tkivima.

Metabolički profil koji ukazuje na metabolizam proteina govori u prilog smanjenom unosu hrane i povećanoj glukoneogenezi, kao i smanjenom kapacitetu jetre da proizvede proteine. Zbog toga je kod krava u ranoj laktaciji koncentracija proteina, albumina i uree značajno niža u odnosu na osmu nedelju laktacije. Ispitivana je koncentracija ukupnih proteina i proteinskih frakcija u krvnom serumu krava u visokom graviditetu i puerperijumu.

Najniže vrednosti koncentracija krvnih proteina nađene su neposredno pre porođaja (70,09 g/l) i 4. do 9. dana posle porođaja (68,90 g/l), dok su između 38. i 40. dana posle porođaja vrednosti bile veće i prosečno iznosile 72,30 g/l. Autori su zaključili da su najniže vrednosti koncentracija ukupnih proteina u periodu oko teljenja verovatno posledica aktivnosti mlečne žlezde u pripremanju kolostruma za nastupajuću laktaciju. Pri tome, ukazuju na činjenicu da puerperalni poremećaji, kao npr. endometritis, ne prouzrokuju značajnije promene u koncentracijama ukupnih proteina, osim što je kod bolesnih krava zapažena tendencija porasta gamaglobulina. Prema podacima, prosečna vrednost koncentracije ukupnih proteina u krvi zasušenih krava je 79,0 g/l, krava u puerperijumu 79,0 g/l, u drugom mesecu laktacije 80,0 g/l i u petom mesecu laktacije 80,30 g/l. Sa ovim podacima se slažu i naši rezultati. Koncentracija ureje u periodu oko teljenja kreće u rasponu od 2,0 do 5,0 mmol/l, a tokom laktacije uremija može da dostigne i nešto veću vrednost (6,0 mmol/l). Ustanovljeno je da prosečna vrednost koncentracije ureje u krvi na 10 do 15 dana pred teljenje iznosi 3,1 mmol/l, u ranom puerperijumu 2,4 mmol/l, u drugom mesecu laktacije 2,9 mmol/l i u petom mesecu laktacije 3,1 mmol/l. Autori nisu utvrdili značajnije razlike u prosečnim vrednostima uremije kod krava u zasušenju, ranom puerperijumu i laktaciji (4,86: 4,68: 4,04 mmol/l). Međutim, značajne razlike postoje između pojedinih kategorija krava sa različitih farmi. Tako je utvrđeno, da je uremija povišena u onim slučajevima kada postoji relativan suficit proteina u obroku u odnosu na količinu energije. U takvim slučajevima koncentracija ureje u krvi je najčešće na gornjoj fiziološkoj granici ili preko te granice (preko 5 mmol/l). Autori na osnovu rezultata zaključuju da je visoka uremija posledica suficita proteina i deficita energije ili suficita proteina i suficita energije u obrocima krava. Pojava ekstremno visokih vrednosti uree ukazuju na oštećenje bubrega, a značajno smanjenje vrednosti ukazuje na deficit proteina. Pojedinačne niske vrednosti uremije kod ispitivanja metaboličkog profila ukazuju na to da kod tih životinja postoji smanjeno uzimanje hrane.^{212,213,214}

Postoji veliki broj parametara koji ukazuju na metaboličko opterećenje i hepatocelularno oštećenje jetre u ranoj laktaciji. Povišena koncentracija bilirubina i aktivnost AP u prvoj nedelji laktacije ukazuje na opterećenje žučnih puteva kod krava, dok na hepatocelularnu nekrozu i metaboličke izmene na nivou metabolita ukazuju povišene vrednosti transaminaza. Ove promene nastaju kao posledica akumulacije lipida u hepatocitima. Akumulacija lipida nastaje usled povećane upotrebe masti u energetske svrhe tokom peripartalnog metaboličkog stresa, a navedena promena se laboratorijski ispoljava sniženom koncentracijom holesterola i triglicerida u serumu krava. Jetra je glavni organ koji učestvuje u adaptaciji na metabolički stres kod krava, pa izmenjene vrednosti ovih indikatora ukazuje na metaboličko opterećenje krava.⁵ Vrednosti ispitanih parametara je u okviru dosada dobijenih vrednosti.⁹⁴ Koncentracija ukupnog bilirubina u krvnom serumu predstavlja veoma značajan parametar za ocenu metaboličkog profila krava. Navodi se da određivanje koncentracije bilirubina u krvi krava predstavlja nezaobilazan test za ispitivanje funkcionalnog stanja jetre. Vrednosti bilirubinemije do 6,84 $\mu\text{mol/l}$ se nalaze kod krava za vreme gladovanja ili u periodu oko teljenja kada se pojavljuje blagi oblik masne infiltracije hepatocita. Ovaj autor daje kao gornju fiziološku vrednost koncentraciju bilirubina od 5,58 $\mu\text{mol/l}$, a vrednosti preko 8,55 $\mu\text{mol/l}$ smatra da su patološke. Drugi autori, koji su se bavili ovom problematikom, saglasni su da između nivoa bilirubinemije i različitih patoloških stanja u jetri postoje korelativne veze.^{107,216} Utvrđeno je da prosečne vrednosti bilirubinemije kod krava 10 do 15 dana pre teljenja iznose 4,7 $\mu\text{mol/l}$, do 10. dana posle teljenja su nešto veće (5,4 $\mu\text{mol/l}$), u drugom mesecu laktacije (4,0 $\mu\text{mol/l}$), i u petom mesecu laktacije (3,9 $\mu\text{mol/l}$) pokazuju tendenciju opadanja.²⁰⁹ Kod prvotelkinja Holštajn rase u puerperijumu ustanovljena je veća prosečna koncentracija ukupnog bilirubina u krvnom serumu (6,59 $\mu\text{mol/l}$) nego što je bila u poslednjoj nedelji graviditeta (4,85 $\mu\text{mol/l}$).²¹⁷ U nekim slučajevima vrednosti bilirubinemije su se kretale i do 20,4 $\mu\text{mol/l}$. Drugi značajan znak koji ukazuje na infiltraciju

hepatocita mastima je snižena koncentracija triglicerida i holesterola u krvi. Kao što je rečeno koncentracija ovih lipidnih frakcija opada jer opada sposobnost jerte da stvara proteine nosače za transportne forme lipoproteina. Koncentracija i dinamika kretanja vrednosti triglicerida i holesterola bila je u saglasnosti sa ranijim rezultatima.^{218,219} Akumulacija lipida u ranoj laktaciji opterećuje hepatocite što menja njihovu ultrastrukturu, pa lakše otpuštaju enzime u krvotok, tako da koncentracija hepatičnih enzima raste sa porastom opterećena hepatocita.²²⁰

Oksidativni stres krava u ranoj laktaciji prati opšte metaboličke promene. Tako u prvoj nedelji laktaciji postoji povišena vrednost MDA i snižena vrednosti SOD, koji je antioksidans. Nađena koncentracija MDA kod krava u ranoj laktaciji iznosi od zdravlja krava i vrste ishrane, a njene vrednosti variraju od 0,5 do preko 20 $\mu\text{mol/l}$ što se slaže sa našim rezultatima.²¹⁵ SOD je značajan redoks-marker, pa snižene vrednosti ukazuju na oksidativni stres. Aktivnost SOD počinje da raste u nedeljama pred partus, da bi posle porođaja naglo opala. Aktivnost SOD koju smo dobili slaže se rezultatima vodećih autora.¹¹²

U okviru ispitivanja metaboličkog profila određena je koncentracija jona Ca, P i Mg. Rezultati pokazuju značajno nižu kalcemiju, magnezemiju i fosfatemiju u prvoj nedelji posle teljenja, da bi te vrednosti u drugoj nedelji rasle i na tom nivou se održavale do kraja ogleda. Proporcija životinja sa hipokalcemijom je bila najveća u prvoj nedelji posle teljenja, da bi vremenom opadala. Koncentracija Ca, P i Mg je u međusobnoj korelaciji i zavisi od metabolizma kostiju i aktivnosti PTH, kao i kvaliteta ishrane i odnosa dijetarnih anjona i katjona. Kretanje vrednosti jona je u skladu sa ranije dobijenim rezultatima.^{117,221,222}

Krvna slika – Crvena krvna loza krava u ranoj laktaciji odlikuje se hipohromnim promenama u eritrocitima i smanjenim brojem eritrocita. Snižena koncentracija hemoglobina se dovodi u vezu sa proizvodnjom mleka, obzirom da je kod junica (koje prirodno nisu u laktaciji) nađena veća koncentracija hemoglobina. Broj neutrofila bio je najveći u prvoj nedelji posle partusa, dok je broj limfocita bio najniži u istom periodu, tako da je indeks

neutrofili:limfociti bio najviši upravo u ovom periodu. Broj eozinofila je blago rastao tokom ogleđnog perioda, dok je broj monocita bio najveći u prvoj nedelji da bi potom opadao. Ovakve promene u diferencijalnoj beloj lozi nastaju kao posledica delovanja akutnog stresa i naglog skoka koncentracije kortizola koji je pokazao svoj uticaj na imune ćelije. Drugi bitan faktor je u vezi sa velikim izmenama u uterusu i vimenu koje se dešavaju posle partusa i u ranoj laktaciji, gde imunološke ćelije odlaze kako bi zaštitile ove vrlo osetljive organe. Rezultati krvne slike su u skladu sa ranije dobijenim rezultatima.^{128,132,137}

Vijabilnost leukocita – Vijabilnost leukocita je bila smanjena u prvim nedeljama i iznosi $92\pm 2,9\%$ u prvoj nedelji odnosno $96\pm 3,3\%$ u drugoj nedelji, da bi se u četvrtoj i osmoj nedelji taj procenat je porastao na oko 97%. Vrednosti za vijabilnost leukocita u prvoj nedelji su nešto niže od normalnih vrednosti koje bi trebale da budu preko 95%. Ovakav nalaz se može dovesti u vezu sa povećanom koncentracijom NEFA u ranoj laktaciji, jer je nađena dozno-zavisna vijabilnost leukocita u odnosu na koncentraciju NEFA.¹⁴⁶ Postoji pozitivan trend vrednosti leukocitne vijabilnosti posle porođaja. Ovakav rezultat se slaže sa ranijim rezultatima.²²³ Promene u vijabilnosti leukocita su posebno izražene na modelu ispitivanja polimorfonukleara u mleku, kada je kod multiparih krava vijabilnost leukocita u mleku bila značajno niža u prvim danima posle teljenja. Ovaj nalaz potvrđuje da se vijabilnost u ranoj laktaciji menja, što je u duhu rezultata koji smo dobili.²²³

Koncentracija Hsp70 – Celularna adaptacija na peripartalni metabolički stres kod krava ogleda se u promenjenoj koncentraciji čaperona Hsp70 u serumu krava. Koncentracija Hsp70 iznosila je $3,2\pm 0,93$ ng/ml u prvoj nedelji, odnosno $3,7\pm 0,88$ u drugoj nedelji, da bi u četvrtoj i osmoj nedelji bila oko 5,5 ng/ml. Ove vrednosti kao i njihov trend slažu se sa vrednostima i trendom ranijih istraživača.¹⁵³ Nešto više vrednosti dobili su Kristensen i sar.¹⁵², koji su potvrdili da period laktacije ima uticaj na koncentraciju Hsp70. Međutim, ovi autori su kao ranu laktaciju definisali mnogo širi vremenski okvir i krv su uzimali tokom prvog

trimestra laktacije, pa su samim tim i rezultati viši u odnosu na ranu laktaciju u užem smislu koja podrazumeva prvih nekoliko nedelja.

Telesna kondicija – Sledećna bitna ishodna varijabla koja pokazuje stepen metaboličke opterećenosti je telesna kondicija krava u ranoj laktaciji. U ovom ogledu du korišćene krave ujednačene telesne kondicije. Ujednačenost kondicije je bio preduslov za izvođenje ogleda, jer je poznato da gojazne krave pokazuju intenzivniju lipidnu mobilizaciju i prolongiranu ketogenezu u ranoj laktaciji, što je povezano sa brojnim zdravstvenim rizicima, dok metabolizam hranljivih materija kod mršavih krava može biti značajno kompromitovan partusom i početkom lučenja mleka. Ujednačenost telesne kondicije se vidi iz opšteg proseka telesne kondicije koja je bila na nivou $3,5 \pm 0,15$. Telesna kondicija je vremenom opadala, što je uslovljeno smanjenim unosom hrane, metaboličkim stresom i povećanim lučenjem mleka, tako da je u osmoj nedelji bila $3,1 \pm 0,2$. Prosečan pad telesne kondicije bio je 0,5 jedinica, a krave su i dalje pokazivale odličnu kondiciju za kategorije muznih krava. Pad vrednosti telesne kondicije preko 0,5 jedinica je nađen kod osam od pedeset krava, što se smatra značajnim gubitkom telesne kondicije.¹⁵⁴ Rezultati ispitivanja govore da se radi o zdravim kravama sa umerenom lipomobilizacijom.

Proizvodnja mleka – Proizvodnja mleka kod krava se odvijala u skladu do sada poznatih modela laktacionih krivi²²⁴ i iznosila je od 21 ± 6 litara dnevno u prvoj nedelji do 27 ± 7 litara u četvrtoj odnosno osmoj nedelji laktacije. Očuvanje laktacione krive ukazuje na dobar odabir krava za potrebe ovog ogleda, a to su zdrave visokoproduktivne krave.

Reproduktivna efikasnost – Reprodukativna efikasnost pored proizvodnje mleka je jedna od praktičnih ishodnih varijabli koja pokazuje upotrebljivost našeg modela u svakodnevnom radu. Reprodukativna efikasnost krava se meri pomoću različitih parametara, a za potrebe našeg ogleda odabrali smo one koji su najlakše merljivi pa samim tim i najviše upotrebljivi u svakodnevnom kliničkom radu i to: momenat prvog detektovanog estrusa posle

teljenja i momentat fertilnog osemenjavanja (izražen u danima posle teljenja). Ako uporedimo optimalne vrednosti reproduktivnih parametara i vrednosti koje smo dobili kod oglednih krava možemo zaključiti da krave u ogledu pokazuju nešto slabiju reproduktivnu efikasnost u ranoj laktaciji koja je u vezi sa izmenama u reuspostavljanju ovarijalne aktivnosti.¹⁷⁸ Prosečan broj dana do prvog primećenog estrusa je 42, a optimalna vrednost je ispod 40 dana po teljenju. Optimalno bi bilo da do 60. dana posle teljenja kod više od 90% krava bude otkriven prvi estrus, a u našem ogledu je estrus otkriven kod nešto više od 70% krava. Ipak, servis period kod krava je bio u okviru optimalne vrednosti (85-110 dana). Smanjena fertilnost koja se iskazuje u smanjenom ispoljavanju prvog postpartalnog estrusa je detaljno ispitana, kako bi se isključile infekcije uterusa i druge promene koje mogu značajno uticati na krvne parametre. Pokazalo se da veliki broj krava ima aplastične i glatke jajnike, nedovoljnu razvijenost dominantnog folikula, kod nekoliko krava su nađene ciste koje su tretirane i kod nekoliko krava su nađene blaže serozne upale uterusa sa dilatacijom cerviksa. Optimalan servis period koji postoji kod ovih krava u vezi je sa činjenicom da na farmi postoji dobro seme, dobra tehnika osemenjavanja i izostanak povadañanja.

6.3. Uticaj različitih modela za procenu metaboličkog stresa na vrednosti ishodnih varijabli

Metabolički profil

STH i modeli za procenu stresa – Rezultati pokazuju da postoji viša koncentracija STH u grupi krava koje su opterećene metaboličkim stresom. Između vrednosti STH i IGF-I postoji negativna povratna sprega, tako da snižene vrednosti IGF-I objašnjavaju povišene vrednosti STH u grupi krava opterećenih katabolizmom (gde je vrednost IGF-I niža).^{40,41} Posebno je interesantan odnos insulina i STH. Insulin i STH se mogu smatrati kontraregulatornim hormonima, jer je po svojoj prirodi insulin anaboličkih i homeostatski hormon a STH u potpunosti ispunjava uslove homeoretskog hormona (stimuliše proizvodnju mleka, stimuliše lipolizu itd.). Ovaj inverzan odnos se javlja i zato što umanjene vrednosti insulina u ranoj laktaciji dovode do smanjenja receptora za STH i smanjenja koncentracije IGF-I, pa izostaje negativna povratna sprega. Ovi adaptacioni procesi zavise od perioda laktacije.²³⁹ Veoma širok raspon insulina i STH nalazimo kod krava sa visokom proizvodnjom mleka i kod krava kod kojih je naročito izražen energetska deficit u ranoj laktaciji.²⁴⁰ NEFA kao katabolički indikator je upravo proporcionalan koncentraciji STH. Ovakav nalaz je logičan, obzirom da je napomenuto da STH potencira lipolizu. U jednom ogledu krave su kontinuirano tretirane sa STH i praćene su karakteristike metaboličkog odgovora kada se aplikuju insulin i epinefrin. Nađeno je da posle tokom aplikacije STH postoji veća koncentracija NEFA i niža koncentracija glukoze. Odgovor na epinefrin je bio uvećan, pa je rasla koncentracija NEFA, dok je odgovor na insulin bio umanjen što se manifestovalo u manjem padu vrednosti NEFA posle aplikacije insulina. Vrednosti glikemije se nisu menjale kod krava tretiranih sa STH u odnosu na kontrolnu netretiranu grupu. Tako je

zaključeno da STH ometa homeostatske signale koji se odnose na metabolizam lipida.²⁴¹ Negativni energetske bilans i metabolički stres povećavaju koncentraciju STH.²⁴² Selekcija krava na visoku proizvodnju mleka dovela je do povećanja koncentracije STH ali i do prolongiranja postpartalne redukcije koncentracije IGF-I²⁴³, što ukazuje da visokoproduktivne krave, koje su korišćene i u našem ispitivanju, imaju izraženiju homeorezu i više su opterećene metaboličkim stresom.

Energetski, proteinski, lipidni status, funkcija hepatocita i modeli za procenu metaboličkog stresa – Tumačenje metaboličkih izmena kod krava u ranoj laktaciji kroz odvojeno praćenje energetske, proteinske i lipidnog metabolizma je izuzetno teško, zbog homeoreze i prestrojavanja metabolizma u ranoj laktaciji. Ova prestrojavanja se vrše u cilju podržavanja laktacije, a centar metaboličke adaptacije u ranoj laktaciji je jetra, pa će zajedno sa metaboličkim profilom biti prodiskutovan i funkcionalni status hepatocita.

Glikemija akutno opada u ranoj laktaciji, dok vrednost BHB raste. Pad vrednosti glikemije nastaje kao posledica smanjenog unosa hrane i iskorišćavanja glukoze u mlečnoj žlezdi, što je insulin-nezavisan proces. Potenciranje insulin-nezavisnog iskorišćavanja glukoze nastaje i kao posledica smanjene osetljivosti organizma na insulin, pa se glukoza usmerava na mlečnu žlezdu. Ostatak organizma je prinuđen da svoje energetske potrebe zadovolji sagorevanjem masti, pa tako raste koncentracija NEFA, čijom neadekvatnom oksidacijom nastaje BHB kao međuprodukt.⁵ Zato je koncentracija glukoze značajno niža, a koncentracija BHB značajno viša kod krava koje su opterećene metaboličkim stresom. Niža vrednost glukoze u IGF-I^{Me-} grupi može se objasniti činjenicom da vrednost insulina, koji reguliše stvaranje IGF-I u jetri opada. Izostanak IGF-I gasi povratnu spregu sa STH, čija koncentracija raste, što dodatno utiče na proizvodnju mleka i potrošnju glukoze. To bi mogao biti razlog pojave značajno uticaja IGF-I kao indikatora stresa, ali ne i insulina na koncentraciju glukoze. Veza između insulina i STH je dobro poznata i služi kao zajednički

imenitelj u izučavanju dijabetesa kod ljudi i metaboličkog stresa kod krava u ranoj laktaciji.²⁴⁴ Izostanak uticaja insulina na glikemiju kod krava mogao bi se objasniti pojavom da je kod krava korelacija između insulinemije i glikemije niska u ranoj laktaciji (0,34 kod zdravih krava i 0,014 kod krava u ketozi – krave koje su pod značajnim metaboličkim stresom).²⁴⁵

Povećana koncentracija kortizola predstavlja klasičan stresni odgovor. Međutim, kod krava u ranoj laktaciji kortizol ima značajnu ulogu u regulisanju glikemije i koncentracije BHB. U ranoj laktaciji glukoza se troši za proces stvaranja laktoze, odnosno za potrebe laktacije, a nedostatak glukoze je potrebno nadoknaditi procesom glukoneogeneze. Glukoneogeneza se odvija pod dejstvom glukokortikoida koji omogućuju održavanje nivoa glikemije, ali u slučaju insuficijencije nadbubrega, iscrpljivanja stresom ili povećang odlaska kortizola u mlečnu žlezdu, vrednost kortizola opada, često ispod detektabilnog nivoa, pa izostaje glukoneogenetski efekat. Tada se povećano troše masti, a povećana upoterba masnih kiselina u energetske svrhe dovodi do gomilanja BHB tj. ketonskih tela. Kada koncentracija ketonskih tela pređe fiziološke granice nastaje ketoza kod krava, sa brojnim negativnim posledicama na zdravlje i produktivnost u laktaciji koja sledi. Postoji veliki broj rezultata koji pokazuju vezu između nastanka ketoze i hipokorticisma u ranoj laktaciji.^{26, 246} Ovakva uloga kortizola objašnjava pojavu da krave u grupi kortizol^{Me+} imaju višu vrednost glikemije i manji stepen ketogeneze iako je povišena koncentracija kortizola klasična stresna reakcija. Poređenje rezultata iz našeg modela sa patogenkim osnovama ketoze kod krava ima smisla, jer se u ketozi krava dešava upravo ono što se dešava kod krava opterećenih metaboličkim stresom u našem modelu, a to je snižena vrednost IGF-I, snižena vrednost insulina i povišena vrednost NEFA.^{188, 247}

Proteinski status kod krava u ranoj laktaciji zavisi od odabranih indikatora metaboličkog stresa i to NEFA i IGF-I. Snižene vrednosti proteinemije, albuminemije i koncentracije uree nastaju kao posledica nedovoljnog unosa hrane (koji je u vezi sa višom

koncentracijom NEFA) i smanjenog biosintetskog kapaciteta jetre (niža vrednost IGF-I). Kada je urea u pitanju značajan uticaj je imala samo vrednost NEFA. Ovi rezultati su u skladu sa ranije dobijenim rezultatima, gde je nađeno da kod krava sa izraženom lipidnom mobilizacijom postoji niža koncentracija ukupnih proteina, albumina i uree.^{107,231} Detaljne proteomiks analize hepatocita na dvodimenzionalnoj elektroforezi koju su izveli *Xu i sar.* daju objašnjenje šta se dešava u hepatocitima kod krava koje se nalaze u metaboličkom stresu tokom ketoze, a nađeno je da kod krava sa kliničkom formom ketoze postoji smanjena proizvodnja proteina jer nedostaju faktori za elongaciju proteina iz aminokiselina.²⁴⁸ Uticaj IGF-I na sintezu proteina je dobro ispitan kada su u pitanju proteini muskulature, gde je nađeno da IGF-I utiče pozitivno na sintezu proteina u ovim tkivima čak i posle njegove jednokratne aplikacije.²⁴⁹ Koncentracija uree u krvi je značajan pokazatelj sposobnosti jetre da detoksikuje organizam od amonijaka, koji je indirektni pokazatelj nivoa glukoneogeneze (zbog deaminacije aminokiselina). Snižena koncentracija uree kod krava opterećenih metaboličkim stresom (NEFA^{Me+}) govori da jetra ima umanjenu sposobnost detoksikacije organizma i/ili da je nivo glukoneogeneze umanjen. Ovakvo tumačenje se slaže sa rezultatima *Li-a i sar.* koji su pokazali da visoka koncentracija NEFA inhibira glukoneogenezu u hepatocitima.²⁵⁰ U ranoj laktaciji koncentracija amonijaka pozitivno korelira sa stepenom masne degeneracije hepatocita. Amonijak smanjuje sposobnost jetre da konvertuje propionat u glukozu, što je veza između akumulacije lipida u jetri i glukoneogeneze.^{251,252} Visoka koncentracija amonijaka smanjuje stepen ureageneze u masno infiltriranim hepatocitima ako oni nisu opskrbljeni dovoljnim količinama aminokiselina. Ukoliko su hepatociti opskrbljeni dovoljnim količinama aminokiselina ukida se uticaj akumulacije triglicerida na ureagenezu čak i kada postoje visoke koncentracije amonijaka.^{253,254} Detoksikacija amonijaka zavisi od prisustva aminokiselina u hepatocitima, što je limitirano stepenom masne infiltracije

hepatocita i ishranom. Smanjen unos hrane, što fiziološki prati ranu laktaciju dovodi do pada koncentracije uree kod krava bez obzira na period laktacije.²⁵⁵

Funkcionalni status hepatocita u ranoj laktaciji je u tesnoj vezi sa lipidnom profilom, pa se ova dva parametra ne mogu odvojeno posmatrati. U ranoj laktaciji krave ulaze u negativni energetski bilans, što za posledicu ima trošenje sopstvenih energetskih potencijala i izmenu metabolizma. Organizam najpre troši rezerve glikogena (čiji je depo jetra), zatim masti, a nakon toga i proteina. Mobilizacija masti iz telesnih depoa je naznačajniji proces kojim se kompenzuje nedostatak energije u organizmu, što se vidi iz podataka da krave u ranoj laktaciji iz telesnih tkiva oslobode oko 40g proteina, 120g vode i 840g masti.⁸⁶ Visoka mobilizacija lipida može premašiti sposobnosti jetre da izvrši njihovu oksidaciju i transportovanje, kada se javlja taloženje lipida u hepatocitima u vidu triglicerida. Na osnovu procentualne zastpljenosti triglicerida u jetri, masna jetra može biti blaga (<5%, centrolobularna infiltracija hepatocita), umerena (5-10%, masna infiltracija u svim hepatocitima) i izražena (>10%, nekroza, gubitak strukture), a normalne vrednosti su ispod 1%. Dobijeni rezultati pokazuju da u ranoj laktaciji umeren stepen infiltracije hepatocita pokazuje 30-40% krava, a da 5-10% krava ima izraženu akumulaciju triglicerida.²⁵⁶ Međutim i krave sa blagom i umerenom akumulacijom triglicerida u hepatocitima mogu pokazati promene u vrednostima metabolita u ranoj laktaciji.²⁵⁷

Povišena koncentracija triglicerida u hepatocitima dovodi do sledećih promena u metaboličkom profilu krvi: povećana koncentracija bilirubina (kao posledica zastoja u protoku žuči), snižena koncentracija triglicerida i holesterola (kao posledica smanjene produkcije transportnih proteina koji ulaze u sastav VLDL i LDL lipoproteina, odnosno smanjene stabilnosti transpornih vezikula), povišena aktivnost jetrinih enzima (kao posledica oštećenja hepatocita).^{100,258,259,260,261} Rezultati koje smo dobili u ranoj laktaciji, tokom prve dve nedelje u odnosu na četvrtu i osmu nedelju posle teljenja, su u duhu predhodno navedenih

rezultata. Iako u našem ogledu nije merena koncentracija triglicerida u hepatocitima, dobijeni rezultati kao i činjenica da se kod velikog broja visokoproduktivnih krava javlja zamašćenje hepatocita sa posledičnim metaboličkim izmenama omogućava da lipidni profil i funkcionalni status hepatocita protumačimo sa aspekta patofiziologije masne jetre u ranoj laktaciji. To potvrđuju i rezultati o uticaju indikatora metaboličkog stresa na lipidni profil i parametre funkcionalnog statusa hepatocita. Rezultati pokazuju da krave sa višim vrednostima NEFA, nižim vrednostima insulina i nižim vrednostima IGF-I imaju nižu koncentraciju holesterola i u prvoj i drugoj nedelji posle teljenja i nižu vrednost triglicerida u krvi u drugoj i četvrtoj nedelji. Koncentracija bilirubina i aktivnost jetrinih enzima je veća kod krava sa višim vrednostima NEFA i nižim vrednostima IGF-I. Ovakav nalaz je u skladu sa dosadašnjim saznanjima o nastanku masne infiltracije hepatocita u ranoj laktaciji. Koncentracija NEFA je viša, a koncentracija insulina i IGF-I niža kod krava sa masnom infiltracijom hepatocita.^{5,256,262,263} Smanjene vrednosti insulinemije uz smanjenu glikemiju u ranoj laktaciji dovode do povećane upotrebe lipida u metaboličke svrhe i povećanu akumulaciju lipida u hepatocitima. Pored navedenog bitan je i uticaj STH. Naši rezultati pokazuju da krave opterećene metaboličkim stresom imaju i višu vrednost STH, koji pomaže lipolizu, a znak izostanka pozitivnog anaboličkog i povećanog lipolitičkog delovanja STH ogleda se u sniženoj koncentraciji IGF-I. Vrednost STH je povišena kod krava sa masnom jetrom.²⁶² Zbog pada klirensa hormona u hepatocitima opterećenih trigliceridima, mogli bi očekivati da koncentracija hormona raste, ali koncentracija hormona je niža, pa možemo reći da je smanjena produkcija hormona odnosno njihova koncentracija u patofiziološkoj osnovi opterećenja hepatocita. Ovakav nalaz potvrđuje da su indikatori kao što je insulin ili IGF-I u krvi dobar pokazatelj opterećena hepatocita u ranoj laktaciji.

Oksidativni status krava – Kod krava sa povećanom lipidnom mobilizacijom i povećanim vrednostima NEFA postoji viša vrednost malinildialdehida (MDA).

Antioksidativna aktivnost superoksid-dizmutaze, ona je niža kod krava sa višim vrednostima NEFA i kortizola. MDA se koristi kao opšti pokazatelj metaboličkog stresa u oglelima, dok je SOD pokazatelj zaštite organizma od povećane oksidativne aktivnosti.²⁶⁴ Akutni stres i povećanje koncentracije kortizola značajno utiče na koncentraciju pro-oksidanasa.²⁶⁵ U ogledu sa akutnim stresom koji je izazvan estrusom aplikacija antioksidanasa došlo je do smanjenja koncentracije kortizola i povećanja koncentracije SOD.²⁶⁶ Smanjen unos hrane i negativni energetski bilans (koji se prirodno javlja u ranoj laktaciji) utiču na pojavu oksidativnog stresa.²⁶⁷ Kod krava u peripartalnom periodu raste koncentracije pro-oksidativnih materija i pada koncentracije antioksidanasa, što je u vezi sa stepenom lipidne mobilizacije. Tako je nađeno da NEFA negativno korelira sa aktivnošću SOD i pozitivno sa TBARS (koji je u vezi sa MDA).¹¹² Povećana koncentracija NEFA sa povećanom akumulacijom triglicerida u hepatocitima u ranoj laktaciji dovodi do nastanka masne jetre. Kod krava sa masnom jetrom postoji viša koncentracija MDA i niža koncentracija alfa-tokoferola.²⁶⁸ Sve potvrđuje da krave opterećene metaboličkim stresom lako ulaze u oksidativni stres, sa kojim je u međusobnoj vezi.

Metabolizam minerala – Kod krava koje su opterećene metaboličkim stresom postoji niža koncentracija Ca, Mg i P u prvoj nedelji posle teljenja. Indikatori metaboličkog stresa koji su pokazali značajan uticaj su NEFA i kortizol za Ca i Mg, odnosno kombinovani uticaj insulin i NEFA za P. Ovakvi nalazi se slažu sa rezultatima predhodnih istraživanja. Kod krava u ranoj laktaciji koje su bile hipokalcemične postojala je viša koncentracija kortizola. Indukovana hipokalcemija u drugom ogledu dovela je do porasta koncentracije kortizola. U trećem eksperimentu je dat egzogeni kortizol, a životinje su slabije odgovarale na veštački izazvanu hipokalcemiju i brže su se vraćale u normokalcemično stanje, što su autori pripisali hipofosfatemičnom efektu kortizola. Ovi rezultati pokazuju da postoji uzročno-posledična veza između Ca i kortizola kod preživara.²⁶⁹ Hipokalcemične zdrave krave u ranoj laktaciji

imaju veću koncentraciju kortizola u odnosu na krave sa normalnom kalcemijom, što se slaže sa našim rezultatima.²⁷⁰ Kod krava sa koncentracijom Ca preko 2 mmol/l postoji niža koncentracija NEFA u ranoj laktaciji, što pokazuju rezultati dobijeni u našem modelu.²⁷¹ Snižena koncentracija Ca uz povišene vrednosti NEFA u ranoj laktaciji povećavaju rizik da krave budu isključene iz proizvodnje u laktaciji koja sledi.⁸⁰ Hipokalcemija kod krava povećava odgovor paratireoidne žlezde, a snižene vrednosti Mg umanjuju njihovu povratnu spregu. Kostu nisu dobar izvor Mg u organizmu krava pa se manjak Mg pre svega vezuje za smanjen unos hrane.¹¹⁶ Koncentracija neorganskog fosfora je nađena kod krava sa nižom koncentracijom insulina i višom koncentracijom NEFA. Ovakav nalaz postoji kod ketotičnih krava, gde posle testa opterećenja propionatom postoji značajno slabiji odgovor endokrinog pankreasa, a koncentracija fosfora je značajno niža.⁷² Kod ljudi sa hipofosfatemijom postoji smanjena osetljivost na insulin posle oralnog glukoza tolerans testa. Ove promene nastaju zbog činjenice da neorganski fosfor ima značajnu ulogu u iskorišćavanju glukoze u ćelijama.^{272,273} Takođe, postoje rezultati koji ukazuju na pojavu da povećana potrošnja fosfata smanjuje sekreciju insulina iz pankreasnih ostrvaca.²⁷⁴ Smanjena osetljivost na insulin kod krava ogleda se u njegovoj smanjenoj koncentraciji i smanjenom odgovoru na insulin-stimulišuće materije u ranoj laktaciji, pa se naš model koji pokazuje da viša koncentracija NEFA i niža koncentracija insulina vezuje za nižu koncentraciju P slaže sa rezultatima predhodnih autora.

Krvna slika i vijabilnost leukocita

Rezultati istraživanja pokazuju da katabolički indikatori stresa kao što su kortizola i NEFA utiču na hematološke vrednosti i vijabilnost leukocita. Krave sa višim vrednostima NEFA imaju manji broj eritrocita i nižu koncentraciju hemoglobina u prve dve nedelje posle

teljenja. Kod krava u ranoj laktaciji kortizol ima značajnu ulogu u započinjanju laktacije, a viša koncentracije NEFA je u vezi sa smanjenim unosom hrane. Mlečnost krava je u inverznom odnosu prema vrednostima hemoglobina i hematokrita. U peripartalnom periodu, posebno na sam dan porođaja i u prvim danima laktacije krave imaju manji broj eritrocita i nižu koncentraciju hemoglobina.^{126,127,128,129} Uhranjenost krava (telesna kondicija) u peripartalnom periodu pozitivno korelira sa vrednostima hemoglobina, MVC, MCH i hematokrita.²⁷⁵ Uticaj lučenja mleka i smanjen unos hrane u ranoj laktaciji mogu biti u vezi sa smanjenim brojem eritrocita i koncentracijom hemoglobina.

Kod bele loze NEFA kao indikator metaboličkog stresa dovodi do pada ukupnog broja leukocita, a krave klasifikovane prema kriterijumu NEFA i kriterijumu kortizola pokazuju povećan procenat neutrofila, smanjen procenat limfocita, povećan N:L odnos, smanjen procenat eozinofila i povećan procenat monocita. Uticaj kortizola na parametre krvne slike samo u prvoj nedelji nastaje jer koncentracija kortizola naglo poraste, a potom i naglo opadne u prvih nekoliko dana po teljenju, dok se koncentracija NEFA penje lagano i često je perzistentna u prvim nedeljama laktacije, što ukazuje na negativni energetske bilans. Glukokortikoidi dovode do tipičnog stresnog leukograma tako što izazivaju umanjenu blastogenezu leukocita, povećan broj neutrofila preko L-selektina i $\beta 2$ -integrina, što smanjuje mogućnost neutrofila da napuste cirkulaciju ili dovode do povećanog slanja neutrofila iz kostne srži u krvotok.¹³⁹ Negativni energetske bilans menja genetičke karakteristike imunoloških ćelija dovodeći do brojnih izmena u ekspresiji gena koji umanjuju njihov funkcionalni status.²⁷⁶ Kod krava sa metritisom neutrofili imaju manju koncentraciju glikogena, što se takođe može povezati sa negativnim energetske bilansom i metaboličkim stresom čiji su indikatori u našem modelu NEFA i kortizol.²⁷⁷ Metabolički stres u ranoj laktaciji se karakteriše smanjenom koncentracijom insulina i IGF-I. Izlaganje neutrofila ovim hormonima povećava njihovu kompetencu i učinak.²⁷⁸ Insulin utiče na transportere za glukozu

u leukocitima, pa tokom infekcije može pomoći da se glukoza usmeri ka energetskim potrebama leukocita, što omogućuje da imunološke ćelije prežive.²⁷⁹ Smanjen unos hrane, koji je u vezi sa peripartalnim metaboličkim stresom i predhodi mu takođe kompromituje funkciju neutrofila. Kao posledica negativnog energetskog bilansa raste koncentracija NEFA, a u *in vivo* eksperimentu utvrđeno je da koncentracija NEFA preko 0,5 mmol/l smanjuje fagocitnu i oksidativnu aktivnost neutrofila.¹⁴⁶ Ovoj koncentraciji odgovara i koncentracija medijalne vrednosti NEFA u našem modelu, što dodatno objašnjava da je vijabilnost leukocita, kao generalni pokazatelj funkcionalnog statusa umanjena u ranoj laktaciji tokom prve dve postpartalne nedelje. Tokom rane laktacije u krvi krava postoji značajno veći broj polimorfonukleara koji su u apoptozi u odnosu na srednji stadijum laktacije, dok se procenat nekrotičnih polimorfonukleara ne razlikuje u početku i na sredini laktacije.²⁸⁰ Ovakav nalaz se vezuje za niži procenat vijabilnih leukocita u ranoj laktaciji dobijenih u našem ogledu.

Celularna adaptacija i Hsp70

Rezultati istraživanja pokazuju da krave opterećene metaboličkim stresom imaju višu koncentraciju Hsp70 u krvnom serumu u prvoj drugoj i četvoroj nedelji posle teljenja, a svi odabrani indikatori metaboličkog stresa imaju značajan uticaj. Hsp70 i mehanizam njeogog delovanja je dobro izučen na intracelularnom nivou. Poznato je da izlaganje različitim vrstama stresa dovodi do porasta koncentracije Hsp70. Nema puno podataka koji govore o koncentraciji Hsp70 kod krava u ranoj laktaciji. Koncentracija Hsp70 je niža kod krava u prve dve nedelje posle teljenja u odnosu na kasniji period laktacije, što ukazuju i naši rezultati, bez obzira na model stresne opterećenosti. Iz ovog rezultata se može zaključiti da metabolički stres u ranoj laktaciji dovodi do pada koncentracije Hsp72 u serumu krava. Međutim, krave opterećene metaboličkim stresom imaju višu koncentraciju Hsp70 u drugoj, četvrtoj i osmoj

nedelji posle teljenja. Hsp70 u serumu potiče iz ćelija koje vrše aktivno lučenje ovog čaperona u krvotok, ali i pasivno iz nekrotičnih ćelija. Još uvek nema pouzdanih rezultata koji bi rekli koji je to udeo Hsp70 koji potiče od aktivnog ili pasivnog mehanizma.¹⁴⁹

Smanjena vrednost Hsp70 u krvnom serumu bi se mogla dovesti u vezu sa smanjenim unosom hrane kod krava. Rezultati istraživanja pokazuju da smanjen unos kalorija dovodi do smanjene ekspresije mRNA za Hsp70 u somatskim ćelijama mleka, ali da nema značajnih promena u leukocitima krvi.²⁸¹ Imunološke ćelije su značajan izvor ekstracelularne Hsp70, bilo da se radi o aktivnom ili pasivnom putu njihovog ulaska u krvotok.²⁸² Naši rezultati su pokazali da krave opterećene metaboličkim stresom imaju manji procenat vijabilnih leukocita u ranoj laktaciji, pa bi ovakav nalaz mogao biti u vezi sa negativnim trendom Hsp70 u istom periodu. Smanjena koncentracija Hsp70 u peripartalnom periodu može biti u vezi sa nastankom insulinske rezistencije, što je potvrđeno na modelu diabetesa. Međutim, kod dijabetesa tipa 2 postoji povećana koncentracija ekstracelularnog Hsp70. Ovakav nalaz je izražen kod gojaznih pacijenata, a u vezi je sa proinflamatornom ulogom masnog tkiva i upotrebom masnog tkiva u energetske metabolizmu.²⁸³ Dostupnost glukoze ćelijama može uticati na koncentraciju Hsp70, tako da prisustvo glukoze smanjuje odgovor Hsp70 na stres.²⁸⁴ Kod krava u ranoj laktaciji opada koncentracija glukoze i posledično koncentracija insulina, uz povećanu lipidnu mobilizaciju. Glukoza odlazi u mlečnu žlezdu i koristi se za proizvodnju mleka, u čemu značajnu ulogu igra kortizol. Izmena metabolizma glukoze bi mogla da objasni zašto krave opterećene metaboličkim stresom (insulin^{Me-}, NEFA^{Me+} i kortizol^{Me+}) imaju višu koncentraciju Hsp70 u ranoj laktaciji uprkos negativnom trendu vrednosti Hsp70 u ovom periodu. Povećane vrednosti Hsp70 bi mogle biti u vezi sa funkcijom hepatocita i indirektno IGF-I. Naime, kod životinja gde je pomoću toplotnog stresa indukovana proizvodnja intracelularnog Hsp70 dolazi do ublažavanja insulinske rezistencije i smanjene akumulacije lipida u hepatocitima.²⁸⁵ Povećano učešće masti u metabolizmu

hepatocita indukuje stvaranje Hsp70.²⁸⁶ Krave opterećene metaboličkim stresom pokazuju negativni trend koncentracije serumskog Hsp70 kao i krave koje prema našoj klasifikaciji ne spadaju u stresom opterećenu grupu, ali je njegova koncentracija veća kod stresom opterećenih krava što je svojevrsni kompenzatorni, verovatno protektivni, celularni odgovor na nastalu stresnu reakciju u peripartalnom periodu.

Telesna kondicija

Ocena telesne kondicije u ranoj laktaciji je u funkciji vrednosti indikatora metaboličkog stresa, tako da krave opterećene metaboličkim stresom (insulin^{Me-}, IGF-I^{Me-}, NEFA^{Me+}) imaju nižu telesnu kondiciju u drugoj, četvrtoj i osmoj nedelji posle teljenja, bez obzira da li se radi o klasifikaciji krava prema pojedinačnom ili kombinovanom uticaju indikatora stresa. Kod krava opterećenih metaboličkim stresom dominiraju krave koje su u posmatranom periodu izgubile više od 0,5 jedinica telesne kondicije, što se smatra kritičkom vrednošću za nastanak različitih peripartalnih oboljenja kod krava i kompromituje reproduktivnu efikasnost i produktivnost krava. Ovi rezultati su u najdirektnijoj vezi sa metaboličkim stresom i katabolizmom masti u peripartalnom priodu.¹⁶⁰ Kao posledica smanjenog unosa hrane, smanjene osetljivosti na insulin i povećanih energetskih potreba kod krava dolazi do prestrojavanja metabolizma kada organizam krava počinje da troši sopstvene rezerve i to pre svega masti. Usled katabolizma masnog tkiva dolazi do povećanja koncentracije neesterifikovanih masnih kiselina. Ova poznata patogeneza metaboličkog stresa u ranoj laktaciji objašnjava zašto krave koje su u grupi insulin^{Me-} i NEFA^{Me+} gube značajnije telesnu kondiciju u prvim nedeljama laktacije. Insulin je antagonist lipolitičkog efekta hormona rasta, a lipolitički efekat STH zavisi od odnosa koncentracije STH:insulin. U ranoj laktaciji opada koncentracija insulina i raste STH, što povećava lipolizu masnog tkiva.

Kataboličko dejstvo je potvrđeno i našim modelom, jer kod krava sa većom koncentracijom NEFA postoji i veća koncentracija STH, kao i niža vrednost insulina. Izostajanje anaboličkog efekta STH vidi se na osnovu smanjene koncentracije IGF-I, obzirom da IGF-I nastaje kao posledica anaboličkog dejstva STH na jetru. Ovakav podatak objašnjava zašto kod krava sa nižim vrednostima IGF-I (IGF-I^{Me}) postoji značajniji gubitak telesne kondicije. Ova jaka patogenska veza koja je po prirodi i funkcionalna i kauzalna objašnjava zašto u slučaju kombinovanja dva indikatora metaboličkog stresa nalazimo intenzivniji pad telesne kondicije kod krava u metaboličkom stresu.

Telesna kondicija se ocenjuje na osnovu adspekcije regije kuka, leđa i repa, kao što je već opisano u materijalu i metodama. Ultrazvučnim merenjem leđnog potkožnog masnog tkiva prikazano je da se masti iz ove regije troše u periodu posle teljenja i nađeno je smanjenje debljine za preko 10mm u prvih dva meseca laktacije.⁸⁴ Određivanje telesne kondicije metodom bodovanja i adspekcijom je korisno i u funkciji je katabolizma masti, što dodatno objašnjava značaj našeg modela za procenu stresa koji je pokazao značajan uticaj na kretanje telesne kondicije krava posle teljenja. Metabolički indikatori u ranoj laktaciji su u relaciji sa primenom telesne kondicije. Koncentracija IGF-I i insulina pozitivno korelira sa vrednostima telesne kondicije, dok signifikantna korelacija sa vrednostima NEFA izostaje.¹⁶⁸ Kod krava koje značajno gube telesnu kondiciju (preko 0,5 jedinica) postoji značajno viša koncentracija NEFA i niža koncentracija insulina, a sa opadanjem vrednosti telesne kondicije opada i vrednosti IGF-I.^{161,287,288} Svi ovi rezultati se slažu sa rezultatima dobijenim upotrebom našeg stresnog modela na osnovu vrednosti indikatora u prvoj nedelji posle teljenja.

Proizvodnja mleka

Rezultati u proizvodnji mleka pokazuju da indikatori homeoreze u ranoj laktaciji vrše homeorezu kako bi održali nadolazeću laktaciju. Tako krave sa nižim vrednosti insulina (insulin^{Me-}) i višim vrednostima kortizola (kortizol^{Me+}) imaju veću proizvodnju mleka. Postoji negativna korelacija između koncentracije insulina i proizvodnje mleka, dok takav rezultat nije pronađen za vrednosti NEFA.¹⁶⁸ Obzirom da su ove krave prema klasifikaciji one koje su opterećene metaboličkim stresom, ovim rezultatom se potvrđuje da metabolički stres nastaje kao odgovor na započinjanje laktacije. Kada se krave klasifikuju prema parametrima NEFA i insulin, rezultat pokazuje da krave opterećene metaboličkim stresom imaju nižu proizvodnju mleka u prve dve nedelje posle teljenja. Rezultat ukazuje da odnos laktacije i nastanak metaboličkog stresa nije jednosmeran, tj. da metabolički stres nastaje kao posledica adaptacije na započinjanje laktacije, ali i da efikasnost u proizvodnji mleka zavisi od intenziteta metaboličkog stresa krava. Sa druge strane nađeno je da koncentracija NEFA ≥ 0.5 odnosno 0.7mEq/L (mmol/l) utiče negativno na proizvodnju mleka u ranoj laktaciji.¹⁷⁰ Ovakvi rezultati su u vezi sa rezultatima dobijenim u našim modelima. Kod krava sa višom proizvodnjom mleka odgovor insulina na intravensku aplikaciju glukoze je niži u odnosu na manje produktivne krave ili junice van laktacije.²⁸⁹ Stresni odgovor krava i metabolička adaptacija na smanjen unos hrane u različitim periodima laktacije upravo zavisi od količine proizvedenog mleka.¹⁶ Smanjena koncentracija insulina u ranoj laktaciji omogućuje da mlečna žlezda kao insulin-nezavisno tkivo iskoristi glukozu iz krvi za nastanak laktoze, koja direktno utiče na proizvodnju mleka. Preuzimanje glukoze iz krvi u mlečnu žlezdu korelira sa stepenom vezivanja kortizola u mlečnoj žlezdi, pa se može reci da viša koncentracija kortizola omogućuje bolje iskorišćavanje glukoze u mlečnoj žlezdi. Glavna funkcija kortizola u mlečnoj žlezdi je indukcija alveolarnog sistema mlečne žlezde i obezbeđivanje uticaja

prolaktina. On obezbeđuje sekreciju proteina u mleku (kazeina i laktoalbumina).^{290,291} Ovi rezultati objašnjavaju zašto krave sa višom koncentracijom kortizola imaju veću proizvodnju mleka.

Reproduktivna efikasnost

Kod krava sa zadovoljavajućom reproduktivnom efikasnošću (ispoljen estrus do 40. dana i fertilno osemenjene do 90. dana posle teljenja) postoji viša koncentracija IGF-I i niža koncentracija NEFA u prvoj, drugoj i četvrtoj nedelji posle teljenja. Hi-kvadrat testom je pokazana veza između vrednosti NEFA i IGF-I i navedena dva pokazatelja reproduktivne efikasnosti. Proporcija krava koje su ispoljile vidljiv estrus do 40. dana posle teljenja značajno je veća u IGF-I^{Me+} i NEFA^{Me-} grupi, a isto važi i za prvo fertilno oselenjavanje. Signifikantna vrednost Hi-kvadrat testa nađena je i kombinovanjem ova dva faktora. Ovi rezultati su u duhu ranije dobijenih rezultata. U toku rane laktacije dolazi do rezistencije na insulin i opadanja vrednosti ovog hormona. IGF-I u jetri nastaje upravo pod dejstvom insulina. Visoke vrednosti insulina i IGF-I su u vezi sa nastankom ovulacije na jajniku.^{33,292} IGF-I iz jetre je odraz zadovoljenja energetske potrebe kod krava, a ima ulogu u razvoju dominantnog folikula u prvom ovatijalnom ciklusu posle teljenja. Cirkulišuća IGF-I je značajno viša kod krava koje ovuliraju u prvom ovarijalnom talasu posle teljenja, dok je kod anovulatornih krava koncentracija IGF-I niža bez obzira na ciklus po redu.^{185, 293,294} Najnoviji rezultati pokazuju da krave koje su ovulirale do 45. dana posle teljenja i koje su fertilno osmenjene do 100. dana posle teljenja imaju značajno višu koncentraciju IGF-I.²⁹⁵ Krave koje značajno gube telesnu kondiciju što je u vezi sa metaboličkim stresom i povećanom mobilizacijom lipida imaju značajno manji stepen koncepcije od jednog osemenjavanja i povećani rizik za gubitak embriona i povraćanje posle osemenjavanja.²⁹⁶ Koncentracija NEFA u krvi kao indikator metaboličkog stresa i zdravlja krava može pomoći u proceni rane reproduktivne efikasnosti.²⁹⁷

Kod krava sa vrednostima NEFA preko 0,7 mmol/l procenat fertilnog osemenjavanja je manji za 16%. Procenat gravidnih krava posle osemenjavanja opada za 0,9% u zaptima kod kojih u više od 15% uzoraka krvnog seruma (odnosno krava) postoji koncentracije NEFA >0,7 mmol/l.^{81,171} Navedeni rezultati potvrđuju zašto su indikatori metaboličkog stresa kao što su NEFA i IGF-I dobri indikatori reproduktivne efikasnosti kod krava u ranoj laktaciji.

6.4. Ocena različitih modela za procenu peripartalnog metaboličkog stresa kod krava

Adaptacioni procesi u organizmu krava u poslednjoj fazi graviditeta, tokom partusa i u ranoj laktaciji su izuzetno kompleksni i uključuju veliki broj mehanizama za održavanje homeostaze. Zbog toga se u literaturi sreće izuzetno veliki broj činilaca koji se koriste u proceni zdravlja metabolizma krava u ranoj laktaciji. Ipak, razvoj metodologije je pokazao koji su to indikatori najvažniji za procenu peripartalnog metaboličkog stresa i kako njihove vrednosti dobijene u ranoj laktaciji upotrebiti u proceni kompenzatornog kapaciteta metaboličkih i drugih aktivnosti, kao i u proceni budućeg zdravlja i produktivnosti krava u laktaciji koja sledi. Veliki broj modela je tokom poslednjih godina nastao, a razvoj statistike u biomedicini omogućio je da se kvalitetno ispituju najznačajniji parametri.

Uticaoj perioda laktacije i distribucija frekvence parametara u proceni metaboličkog stresa – Metabolički profil kod krava ustanovljen je pre četrdesetak godina kao laboratorijska metodologija za ispitivanje uhranjenosti krava i njihove sklonosti ka produktivnim bolestima. Ovaj test se nazivao Komptonov metabolički test.⁶⁵ Najpre je bilo neophodno odrediti referentne vrednosti za mlečne krave, obzirom da se i tada znalo da je laktacija izvestan stresogen kod krava. Tako je u prve metaboličke analize uzet period laktacije kao model za određivanje vrednosti metabolita. Tako je nađeno da kod krava u ranoj laktaciji postoji povećana koncentracija NEFA, BHB i bilirubina, a snižena koncentracija glukoze, proteina,

albumina i Ca. Hepatični profil pokazuje povećane vrednosti bilirubina, ALT i AST što ukazuje na hepatocelularnu nekrozu i sindrom bilijarne retencije. Izrađeni su i linearni modeli gde je koncentracija metabolita mogla da se odredi u zavisnosti od dana laktacije.¹⁶⁸ Pored povišenih srednjih vrednosti ispitivanje distribucije frekvencije krava prema vrednostima metabolita pokazuje da veliki broj krava ima metaboličke vrednosti izvan referentnih upravo za navedene parametre.⁶⁸ Dalja ispitivanja metaboličkog profila podrazumevala su ispitivanje osobina distribucije frekvencije vrednosti metabolita, kako bi se preciznim utvrđivanjem normalnosti i drugih osobina distribucije utvrdile mogućnosti statističke obrade dobijenih podataka te dinamika kretanja metabolita u ranoj laktaciji. Nađeno je da metaboliti u ranoj laktaciji pokazuju normalnu raspodelu, osim za magnezijum, aspartat aminotransferazu i kreatin fosfokinazu, što omogućuje primenu statističkih modela procene za normalne distribucije tokom ispitavanja, a za navedena tri parametra se uvek mora proveriti normalnost distribucije tokom rada. Ovo je bitno za procenu vrednosti u populaciji krava i za sve vrste istraživačkog rada.²²⁵ Ocena simetričnosti distribucije je od posebnog značaja za procenu populacije, posebno kada se distribucija poredi sa zadatom srednjom vrednošću, koja zapravo predstavlja srednju referentnu vrednost. Tako skretanje u desno podrazumeva da veći broj jedinki ima vrednosti ispod srednje referentne, odnosno iznad ako je skretanje u levo. U okviru ispitivanja distribucije frekvence značajno je bilo odrediti procenat krava koje imaju vrednosti izvan referentnih. Nađeno je da u grupi krava koje su sklone ka produktivnim bolestima u ranoj laktaciji postoji značajno veći procenat krava čije su vrednosti izvan referentnih. Ispitivanja distribucije frekvencije krava prema vrednostima metabolita poslužila je da se detektuju populacije krava koje su pod rizikom za nastanak peripartalnih bolesti. Ovakve rizične populacije zahtevaju detaljnije ispitivanja svake pojedinačne krave.^{171,226}

Međusobna povezanost metabolita i njihova veza sa drugim biološkim osobinama krava – Međusobni odnos metabolita može se opisati kroz ispitivanje međusobne korelacije i

regresije. Veza između metabolita u zdravlju i bolesti može pomoći u razjašnjenju određenih procesa. Tako je nađeno da koncentracije NEFA, BHB, glukoze, uree i bilirubina i jetrinih enzima značajno koreliraju sa stepenom infiltracije hepatocita mastima u ranoj laktaciji.^{107,231} Njihova međusobna veza kod zdravih i ketotičnih krava se razlikuje. Pozitivna korelacija između NEFA i triglicerida može se naći kod zdravih krava, dok kod ketotičnih krava ta korelacija postaje negativna zbog povećane akumulacije lipida u jetri.²¹⁹ Model koji uključuje međusobni odnos metabolita je vrlo koristan i kliničkom radu i iznalaženju novih relacija. Pozitivna odnosno negativna korelacija između metabolita je prilično stabilna tokom laktacije i retko kada jedna vrsta veze prelazi u drugi. Jednom uspostavljene veze između metabolita su prilično stabilne tokom laktacije. Ipak, kod multiparih krava statistička značajnost pojedinih veza (insulin:IGF-I) se umanjuje ili potpuno izostaje sa vremenom.¹⁶⁸ Vrednost metabolita kao pokazatelja metaboličkog stresa se ispituje i u funkciji proizvodnje mleka. Ovakvi nalazi su posebno interesantni kada se analizira razlika između visokoproduktivnih krava i krava sa manjom produkcijom.^{167,230} U model se može uključiti i ocena telesne kondicije krava, gde je nađeno da veća telesna kondicija i veći gubitak telesne kondicije u ranoj laktaciji dovodi do značajnih izmena u koncentraciji NEFA, BHB, glukoze, bilirubina i insulina.¹⁶¹ Ispitivanja hipofizo-adrenalne ose kao glavne komponente u stresu i adaptaciji, u vezi sa metaboličkim profilom, proizvodnjom mleka i energetske bilansom takođe su dali novi pogled na modeliranje peripartalnog metaboličkog stresa kod krava.²⁵ Ispitivanje metaboličkog profila u funkciji negativnog energetske bilansa takođe daje interesantne modele za procenu metaboličkog stresa. Međutim, pokazano je da promene u metaboličkom profilu kod negativnog energetske bilansa zavise od perioda laktacije, tako da su najintenzivnije tokom peripartalnog perioda, što treba uzeti u obzir kada se modelira metabolički stres pomoću ovog indikatora.⁶⁹

Obzirom da se uticaj vremena uzimanja krvi pokazao značajnim, postavilo se pitanje da li se pomoću koncentracije metabolita dobijenih u jednom momentu može proceniti njihova koncentracija u narednom i da li postoji veza između pojedinih metabolita. *Slosarkova* i sar. su pronašli visok determinacijski indeks modela kojim se određuje koncentracije NEFA i BHB desetog dana posle teljenja pomoću koncentracije NEFA, BHB, holesterola i Ca prvog dana posle teljenja.²²⁷

Veza između metabolita se može ispitati i klusterskom analizom. Klusterska analiza nam omogućava da odredimo koji su to metaboliti koji po svom karakteru čine jednu grupaciju svrstanu u jedan klaster. To su metaboliti između kojih postoji jedan određen tip konekcije čiju prirodu treba objasniti. Nađeno je da period laktacije, telesna kondicija, koncentracija NEFA, glukoze, pH urina i energetske bilans pripadaju istoj konekcionalnoj grupi.²²⁸ Ta konekcija između njih zapravo jeste metabolički stres u ranoj laktaciji kod krava.

Model faktorske analize je još jedan značajan model koji se koristi da opiše relaciju između metabolita. Faktorska analiza od velikog broja metabolita izvlači nekoliko najznačajnijih faktora koji koreliraju sa jednim ili više metabolita. Umesto da se koristi veliki broj metabolita u proceni zdravlja može se koristiti manji broj optimalno odabranih faktora. Faktorska analiza omogućava da se utvrdi da li određeni metabolit pokazuje grupni efekat ili individualni u grupi životinja koje se ispituju, što ima veliki praktični značaj. Naime, ako vršimo grupnu dijagnostiku i ocenu rizika da određeni metabolički stres pređe u metaboličko opterećenje koristićemo samo one metabolite koji pokazuju grupni efekat, što smanjuje nedoumice u odlučivanju.^{85,229}

Modeli u vezi sa osetljivošću na insulin – Rezultati dugogodišnjih ispitivanja kod mlečnih krava doveli su do otkrivanja osnovnih patofizioloških mehanizama koji dovode do razvoja metaboličkog stresa. Tako je nađeno da smanjena osetljivost na insulin i posledično povećana lipoliza i ketogeneza predstavljaju osnovne mehanizme preko kojih se razvija

metabolički stres kod krava u ranoj laktaciji. Insulin ima ulogu u iskorišćavanju glukoze u perifernom tkivu i reguliše proces glukoneogeneze u jetri. Pored navedenog insulin ima ulogu u lipidnoj mobilizaciji, ketogenezi i iskorišćavanju ovih metabolita u perifernom tkivu. Kod preživara u ranoj laktaciji glukoza je neophodna za proizvodnju mleka, a mlečna žlezda ima prioritet kada je u pitanju potrošnja glukoze i ona je insulinski nezavisna. Odlazak glukoze u mlečnu žlezdu dovodi do pada koncentracije glukoze i potom insulina. Koncentracija insulina je dozno zavisna prema glukozi. Tako se razvija insulinska rezistencija koja podrazumeva smanjen odgovor insulina posle stimulacije glukozom i inhibiciju stepena glukoneogeneze. U tom periodu krave brzo odgovaraju pojačanom lipidnom mobilizacijom i ketogenezom. Na osnovu ove fiziološke pojave razvijeno je više modela koji su se pokazali interesantnim za procenu metaboličkog stresa i to su: intravenski glukoza-tolerans test (IVGTT) i test kvantitativne insulinske senzitivnosti kod ruminata (RQUICKI). Posle intravenske aplikacije glukoze kod krava i sukcesivnog uzimanja uzoraka krvi posle aplikacije glukoze može se primetiti porast koncentracije glukoze, insulina i smanjena koncentracija NEFA. Magnituda promene koncentracije ova tri metabolita daju informaciju o proizvodnje insulina u pankreasu, iskorišćavanju glukoze i insulinski zavisna depresija koncentracije NEFA. Ovi parametri koje se dobijaju tokom izvođenja IVGTT se stavljaju u funkciju koncentracijem drugih metabolita ili ekspresije gena za regulaciju metabolizma čime se dokazuje metabolički stres kod krava.^{232,233} Drugi test koji se koristi je RQUICKI test, koji je koristan jer se ne vrši stimulacija glukozom i ne mora se sukcesivno uzimati krv, već se iz postojećeg uzorka računa senzitivnost na insulin prema formuli: $RQUICKI = 1 / [\log(\text{Glucose (mg/dL)}) + \log(\text{Insulin } (\mu\text{U/mL}) + \log(\text{NEFA (mmol/L)})]$. Određivanje ovog indeksa je korisno u proceni metaboličkom disbalansa usled smanjenog unosa hrane, posebno ako se zna da njegova vrednost korelira sa telesnom kondicijom kod krava.^{62,234} Međusobnim poređenjem

ova dva testa, istraživači su došli do određenih korelacija između parametara dobijenih u IVGTT i RQUICKI, mada rezultati nisu konzistentni kroz različita istraživanja.^{235,236}

Modeli zasnovani na lipolizi i ketogenezi – Iz svega navedenog može se zaključiti da u organizmu krava postoje anabolički i katabolički parametri u ranoj laktaciji. Anabolički parametri su insulin, IGF-I, STH i gradivni elementi iz hrane, dok bi katabolički pokazatelji bili NEFA, BHB, gubitak telesne kondicije, kortizol, epinefrin i dr.

Klasičan stresni odgovor u ranoj laktaciji koji podrazumeva aktivaciju hipotalamo-nadbubrežne osovine može pomoći u modeliranju metaboličkog stresa kod krava. Kortizol ispoljava katabolički efekat i na masti u organizmu dovodeći do lipolize uz sprečavanje sinteze masti.²¹ Kortizol igra značajnu ulogu u prestrojavanju metabolizma ka mastima u ranoj laktaciji. Povećane vrednosti kortizola tokom IVGTT dovode do manjeg opadanja koncentracije NEFA u odnosu na krave kod kojih nisu nađene veće koncentracije kortizola. Sa druge strane povišene vrednosti kortizola smanjuju stepen masne infiltracije lipida hepatocita i smanjuju rizik za nastanak ketoze.²³⁷ Postoji veliki broj ogleda gde se posle aplikacije deksametazona procenjuje metabolički profil, imuna funkcija, reaktivnost na stres i drugo.

Ketonska tela su dobar indikator individualne adaptacije krava na peripartalni metabolički stres. Hiperketonemija kod krava u zavisnosti od koncentracije i dinamike kretanja BHB može da se klasifikuje kao: rana hiperketonemija u prvoj nedelji posle teljenja, kasna hiperketonemija kada posle normoketonemičnog perioda koncentracija BHB raste u četvrtoj ili petoj nedelji posle teljenja, povremena hiperketonemija i prolongirana hiperketonemija. Kao granica za hiperketonemiju uzeta je koncentracije BHB od 1 mmol/l. Pokazano je da krave sa prolongiranom hiperketonemijom imaju višu koncentraciju NEFA, kao i sniženu koncentraciju glukoze, insulina, IGF-I i tireoidnih hormona.¹⁸⁸ U odvojenom ogledu gde je koncentracija BHB od 1 mmol/l takođe uzeta kao granica, pokazano je da

hiperketonemične krave proizvode manje mleka, sa manje mlečne masti i proteina, uz značajniji gubitak telesne mase, nižu glikemiju i nižu koncentraciju IGF-I, dok je koncentracija NEFA i aktivnost jetrinih enzima bila viša kod hiperketonemičnih krava.⁸⁴ Ovim je potvrđeno da je koncentracija BHB može koristiti kao odličan indikator individualne adaptabilnosti krava na peripartalni metabolički stres.

*Hachenberg i sar.*³⁴ su predložili model za procenu metaboličkog stresa koji podrazumeva međusobni uticaj anaboličkih i kataboličkih faktora na imunološke parametre. Krave su klasifikovane kao one koje su opterećene stresom i one koje nisu opterećene stresom, a na osnovu koncentracije NEFA, BHB, IGF-I, leptina kao i na osnovu vrednosti telesne kondicije. U obzir je uzeta vrednost odabranih parametara u periodu posle teljenja, kao i magnituda promena vrednosti navedenih parametara u odnosu na period pre teljenja. Kao ishodne varijable odabrani su koncentracija haptoglobina, progesterona, broj leukocita, broj polimorfonukleara i aktivnost GLDH. Pored pojedinačnog uticaja odabranih indikatora stresa ispitano je i kombinovano delovanje indikatora. Rezultati su pokazali da su uticaj NEFA, IGF-I i NEFA+IGF-I najbolji pokazatelji metaboličkog stresa jer daje signifikantne razlike u vrednostima ishodnih varijabli. Ovo je jedan od kompleksnijih modela za procenu metaboličkog stresa.

Klinički modeli – Veliki broj analiza i spoznaja patofiziološkog mehanizma peripartalnog metaboličkog stresa izdvojio je nekoliko metabolita čija je upotrebljivost velika prilikom kliničkog rada. Poznato je da koncentracija NEFA, albumina, proteina i jona pokazuje malu varijabilnost i ima veliki dijagnostički značaj. Srednji dijagnostički značaj ima BHB, glukoza, urea, holesterol, a enzimi zbog svoje varijabilnosti imaju mali dijagnostički značaj.¹⁰⁶ Dijagnostika bolesti se u klasičnom smislu zasniva na nalazu u kom je vrednost određenih metabolita izvan referentnih vrednosti. Međutim, ovakva vrsta dijagnostike je moguća kada se bolest već pojavi. Moderna dijagnostika i mlečnom govedarstvu

podrazumeva da se izvrši procena rizika za nastanak peripartalnih bolesti i kompromitovanja proizvodnje kod krava na osnovu vrednosti koncentracije metabolita u periodu neposredno pre ili posle teljenja, a svakako što ranije na početku laktacije. Rezultati brojnih autora pokazuju da se NEFA, BHB i glukoza mogu prilično pouzdano koristiti u proceni zdravlja, produktivnosti i metaboličke kompromitovanosti krava u ranoj laktaciji.^{81,82,83,85} U kliničkim modelima vrši se određivanje senzitivnosti i specifičnosti upotrebe određenog indikatora u dijagnostičkom postupku, a određuju se i granične vrednosti indikatora zdravlja kod pacijenata koji obavezno ukazuju na prisustvo bolesti.

Naš model i njegove specifičnosti– Već smo rekli da je model Hachenberg-a i sar.³⁴ jedan od kvalitetnijih modela koji uključuje veliki broj indikatora stresa, u širokom vremenskom periodu (pre i posle teljenja). Ovaj model je bio motiv da formiramo sopstveni model za procenu peripartalnog metaboličkog stresa. Specifičnost našeg modela ogleda se u tome što su za pokazatelje anaboličkog dela metabolizma uzeti su insulin i IGF-I, dok su kao katabolički faktori uzeti NEFA i kortizol. Model je zasnovan na vrednostima navedenih indikatora stresa u prvoj nedelji posle teljenja, dok su ishodne varijable praćene u četiri vremenske tačke, tj., prve, druge, četvrte i osme nedelje po teljenju. Na taj način smo hteli da ispitamo i mogućnost predviđanja metaboličkog statusa i produktivnosti krava na osnovu što ranije dobijenih uzoraka. Insulin je uključen u model zbog teorije insulinske rezistencije koja je u vezi sa metaboličkim stresom kod krava, IGF-I ukazuje na zdravstveno stanje hepatocita, govori o delovanju STH na periferna tkiva i u vezi je sa reproduktivnom efikasnošću krava. Kao katabolički pokazatelji uzeti su kortizol i NEFA. Koncentracija kortizola značajno raste u momentu porođaja što je deo klasičnog stresnog odgovora kod svih životinja. Poznato je da povišene koncentracije kortizola u stresu mogu imati dugotrajne negativne posledice na organizam. Sa druge strane veliko trošenje kortizola iz nadbubrega neposledno posle partusa dovodi do insuficijencije nadbubrega sa posledičnim izostankom glukoneogeneze i rizikom za

nastanak ketoze i masne jetre. U dosadašnjim istraživanjima NEFA se pokazao kao najznačajniji indikator katabolizma, obzirom da porast masnih kiselina predstavlja ishodni odgovor na metaboličku adaptaciju u ranoj laktaciji. Navedeni indikatori anabolizma i katabolizma su odabrani na osnovu njihovog fiziološkog delovanja kod krava u ranoj laktaciji, ali je njihova kontraregulatorna veza morala da bude potvrđena ispitivanjem kroz hi-kvadrat test, kako bi u startu dobili najoptimalniju kombinaciju anaboličkih i kataboličkih pokazatelja.

Druga specifičnost našeg modela je što je testiran isključivo na osnovu vrednosti ova četiri indikatora stresa u prvoj nedelji laktacije (dakle dovoljno je jedno uzimanje uzoraka krvi), kako bi vrlo rano mogli da predvidimo kretanje metabolizma i produktivnosti kod krava.

Treća specifičnost je u tome što smo uzeli veliki broj ishodnih varijabli, kako metaboličkih tako i hematoloških i zdravstveno-produktivnih kako bi videli u kojim okolnostima su odabrani indikatori metaboličkog stresa primenljivi. Klasifikacija krava kombinovanjem dva kriterijuma (anaboličkog i kataboličkog) daje slične rezultate u razlici ishodnih varijabli kao i prilikom delovanja jednog kriterijuma. Za procenu energetske, proteinske i lipidne statusa, celularnog odgovora, telesne kondicije, pojave prvog estrusa i fertilnog osemenjavanja uputno je koristiti i kataboličke i anaboličke indikatore, jer oni pojedinačno i u kombinaciji značajno utiču na ove ishodne varijable. Oksidativno opterećenje krava, jonski status, hepatski profil i krvna slika prevažno zavise od kataboličkih indikatora stresa. Razlike u vrednosti ishodnih varijabli postaju vidljive ukoliko se snižena vrednost anaboličkih indikatora kombinuje sa povišenim vrednostima kataboličkih indikatora, pre svega NEFA, pa zaključujemo da nedostatak anaboličkih indikatora ne znači nužno i nastanak metaboličkog stresa, ukoliko taj nedostatak nije izazvao kataboličke procese u organizmu koji se ogledaju u višim vrednostima NEFA.

Četvrta specifičnost leži u dodatnim ispitivanjima koja smo vršili kako bi potvrdili da se neki od ova četiri indikatora mogu praktično koristiti. U dodatna istraživanja spadaju istraživanja na polju faktorske analize podataka kako bi se pokazalo da li odabrana četiri indikatora imaju opšti efekat na metabolizam kod krava ili bi taj efekat mogao da se svede pod parcijalan i pojedinačni. Na osnovu faktorske analize zaključujemo da u analizi peripartalnog metaboličkog stresa moramo uzeti tri značajna faktora: 1) kataboličko opterećenje (koga reprezentuje Faktor 1 i on korelira sa odabranim indikatorima metaboličkog stresa dajući najveće učešće u variranju parametara), 2) funkcionalni status jetre (koga reprezentuje Faktor 2) i 3) proizvodnju mleka (koga reprezentuje Faktor 3). Tako smo iz velikog broja parametara izdvojili tri najznačajnija faktora kojima se može objasniti celokupan peripartalni metabolički stres. Zaključujemo da je najznačajniji aspekt peripartalnog metaboličkog stresa zapravo vezan za kataboličko opterećenje i indikatore koje smo modelom odabrali. U daljoj analizi metaboličkog stresa kod krava može se koristiti odabranih 10 varijabli sadržanih u sva tri faktora (insulin, NEFA, IGF-I, STH, glukoza, BHB, AST, trigliceridi, holesterol, proizvodnja mleka). Na ovaj način smo pokazali da su odabrani endokrini i metabolički indikatori sadržani u faktoru koji ima najveći značaja u celokupnoj proceni peripartalnog metaboličkog stresa kod krava, što potvrđuje njihovu upotrebljivost. Klinički značaj odabranih indikatora metaboličkog stresa podrazumeva određivanje graničnih vrednosti indikatora metaboličkog stresa u prvoj nedelji posle teljenja iznad/ispod kojih nastaju značajne promene u metaboličkom profilu, krvnoj slici i produktivnosti. Određivanje optimalne koncentracije ovih indikatora, daje jedinstvenu brojčanu vrednost koja omogućuje precizno detektovanje krava čiji je metabolizam i produktivnost pod rizikom usled delovanja peripartalnog metaboličkog stresa. Ovi rezultati pokazuju da je NEFA najbolji indikator metaboličkog stresa. Takođe, rezultati pokazuju da određene metaboličke promene nastaju pri nižim vrednostima NEFA (hiperketonemija, hipoglikemija, odnos N:L>1, gubitak telesne

kondicije preko 0,5 jeidnica), a neke pri višim (hipoalbuminemija, anemija, smanjenje proizvodnje mleka i slabija reproduktivna efikasnost), pa je moguće utvrditi kauzalnu i hijerarhijsku vezu između adaptacionih procesa u organizmu, što zahteva dodatna ispitivanja.

Upotrebom opšteg linearnog modela (GLM) sa naknadnom (posthock) ANOVA analizom ispoštovani su svi uzusi reproducibilnog statističkog modeliranja, što je značajno kako bi se izbegle greške u zaključivanju i omogućilo ponavljanje ogleda. Upotreba specifičnih statističkih modela za ponovljena merenja objašnjena je u radu *Littell*-a i sar. koji je objavljen u vodećem svetskom časopisu i čija se primena može smatrati zlatnim standardom u statističkom modelovanju.²³⁸

Navedeni rezultati objašnjavaju da odabrani model za procenu peripartalnog metaboličkog stresa omogućuje da veoma rano tokom laktacije steknemo uvid u metabolički status krava i njihovu buduću produktivnost i reproduktivnost, što je veoma značajno sa aspekta racionalne farmske proizvodnje i preventivnog veterinarskog delovanja.

7.ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata možemo izvući sledeće zaključke:

1. Patofiziološka procena peripartalnog metaboličkog stresa kod krava u ranoj laktaciji ogleda se u odnosu anaboličkih (insulin i IGF-I) i kataboličkih (NEFA i kortizol) indikatora metaboličkog stresa u prvoj nedelji posle teljenja.
2. Teljenje pokazuje značajan uticaj na odabrane indikatore metaboličkog stresa, tako da indikatori katabolizma imaju višu vrednost, dok anabolički indikatori imaju nižu vrednost u prvom nedeljama posle teljenja u odnosu na kasniji period. Njihova uzajamna veza potvrđena je testom, pa su odabrani indikatori korisni u formiranju modela.
3. Teljenje pokazuje značajan uticaj na sve ishodne varijable (metabolički profil, krvna slika, imunološki status, celularni odgovor, telesna kondicija i produktivna svojstva) u ranoj laktaciji. Ishodne varijable su dobro odabrane.
4. Ishodne varijable pokazuju značajno variranje u vrednosti posle klasifikacije na osnovu anaboličkih i kataboličkih indikatora metaboličkog stresa.
5. Klasifikacija krava prema kriterijumu insulina pokazuje da krave opterećene metaboličkim stresom (krave sa nižm vrednostima insulina u prvoj nedelji po teljenju) imaju višu koncentraciju STH, BHB, Hsp70, nižu koncentraciju glukoze, holesterola i triglicerida, značajniji pad telesne kondicije i nižu proizvodnju mleka.

6. Klasifikacija krava prema kriterijumu IGF-I pokazuje da krave opterećene metaboličkim stresom (krave sa nižim vrednostima IGF-I u prvoj nedelji po teljenju) imaju višu koncentraciju STH, BHB i Hsp70 i nižu koncentraciju glukoze, ukupnih proteina, albumina, telesna kondicija značajnije opada, a reproduktivna efikasnost je slabija.
7. Klasifikacija krava prema kriterijumu kortizola pokazuje da krave opterećene metaboličkim stresom imaju nižu koncentraciju uree, SOD, Ca i Mg uz stresni leukogram, smanjenu vijabilnost leukocita, dok je povećana koncentracija Hsp70. Krave opterećene metaboličkim stresom – sa višim koncentracijama kortizola imaju višu glikemiju i manju koncentraciju BHB, što najstaje kao posledica delovanja kortizola na proces glukonegeneze. Iz istog razloga kortizol pozitivno utiče na proizvodnju mleka.
8. Klasifikacija krava prema kriterijumu NEFA pokazuje da krave opterećene metaboličkim stresom (krave sa višim vrednostima NEFA u prvoj nedelji po teljenju) imaju višu koncentraciju STH, BHB, AST, ALT, GGT, AP, bilirubina, MDA, Hsp70, a nižu koncentraciju ukupnih proteina, albumina, uree, holesterola, triglicerida, SOD, Ca, P, Mg, uz znake anemije, stres leukogram i smanjenu vijabilnost leukocita. Krave sa višim vrednostima NEFA gube značajnije na telesnoj kondiciji, proizvode manje mleka i imaju slabiju reproduktivnu efikasnost.
9. Klasifikacija krava kombinovanjem dva kriterijuma (anaboličkog i kataboličkog) daje slične rezultate u kretanju ishodnih varijabli kao i prilikom delovanja jednog kriterijuma. Za procenu energetske, proteinske i lipidne statusa, celularnog odgovora, telesne kondicije, pojave prvog estrusa i fertilnog osemenjavanja uputno je koristiti i kataboličke i anaboličke indikatore, jer oni pojedinačno i u kombinaciji značajno utiču na ove ishodne varijable. Oksidativno opterećenje krava, jonski status,

hepatični profil i krvna slika prevashodno zavise od kataboličkih indikatora stresa. Ako je klasifikacija krava vršena samo prema anaboličkim indikatorima stresa često nisu dobijene značajne razlike u vrednostima ishodnih varijabli između krava opterećenih metaboličkim stresom i onih koje to nisu. Razlike u vrednosti ishodnih varijabli postaju vidljive ukoliko se snižena vrednost anaboličkih indikatora kombinuje sa povišenim vrednostima kataboličkih indikatora, pre svega NEFA, pa zaključujemo da nedostatak anaboličkih indikatora ne znači nužno i nastanak adaptacije u metabolizmu, proizvodnji i produktivnosti krava, posebno ukoliko njihov nedostatak nije izazvao kataboličke procese u organizmu koji se ogledaju u višim vrednostima NEFA.

10. Faktorska analiza omogućuje izdvajanje tri glavna faktora kojim se može objasniti 88,9% variranja svih ispitanih parametara. Prvi faktor objašnjava 61,7% varijacije i on visoko korelira sa vrednostima insulina, IGF-I i NEFA, što potvrđuje značajan uticaj odabranih indikatora stresa na ishodne varijable i favorizuje njihovu upotrebu u proceni peripartalnog metabolizma, zdravlja i produktivnosti krava umesto velikog broja pokazatelja, čime bi se mogo pojednostaviti i pojeftiniti laboratorijski skrining zdravlja krava u ranoj laktaciji. Tri izdvojena faktora se mogu okarakterisati kao: faktori metaboličkog stresa, faktor funkcionalnog statusa hepatocita i faktor proizvodnje mleka.
11. Odabrani indikatori metaboličkog stresa mogu dovesti do značajnih suficitarnih/deficitarnih stanja u uzorcima krvi, kao i do smanjene reproduktivne efikasnosti i proizvodnje mleka ukoliko se pređe određeni prag njihove koncentracije. Ove granične vrednosti indikatora metaboličkog stresa u prvoj nedelji posle teljenja pomažu da vrlo rano posle teljenja detektujemo krave čiji metabolizam ili proizvodnja

- mogu biti pod značajnim rizikom. Najveću diskriminacionu sposobnost ima koncentracija NEFA.
12. Upotreba četiri odabrana indikatora metaboličkog stresa (insulin, IGF-I, NEFA i kortizol) u prvoj nedelji posle teljenja može pomoći u analizi metaboličkog stresa i produktivnosti krava, što se zaključuje na osnovu delovanja indikatora stresa na metabolički profil, krvnu sliku, imunološke i celularne parametre, telesnu kondiciju, proizvodnju mleka i reproduktivnu efikasnost krava. Vrednosti anaboličkih i kataboličkih indikatora se mogu koristiti samostalno ili u kombinaciji, a najbolju mogućnost procene daje upotreba NEFA bilo da se radi o pojedinačnoj ili kombinovanoj upotrebi indikatora.
 13. Na osnovu navedenog preporučujemo novi patofiziološki model za procenu peripartalnog metaboličkog stresa, proizvodnje mleka i reproduktivne efikasnosti krava koji se zasniva na određivanju koncentracije insulina, IGF-I, NEFA i kortizola u prvoj nedelji posle teljenja.

8.LITERATURA

1. Belić B., Cincović M.R.: *Održivi razvoj u mlečnom govedarstvu – definisanje indikatora*. Zbornik Agrosym, 155-159, 2010.
2. Vidović V.: *Principi i metodi oplemenjivanja životinja*. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, 1993.
3. Coffey M.P., Simm G., Oldham J.D., Hill W.G., Brotherstone S.: *Genotype and diet effects on energy balance in the first three lactations of dairy cows*. J. Dairy Sci. 87: 4318–4326, 2004.
4. Ingvarlsen K.L., Andersen H.R., Foldager J.: *Effect of sex and pregnancy on feed intake capacity of growing cattle*. Acta Agric. Scand., Sect. A, Anim. Sci. 42:40–46, 1992.
5. Đoković R.D.: *Endokrini status mlečnih krava u peripartalnom periodu*. Agronomski fakultet, Čačak, 2010.
6. Ingvarlsen K.L., Andersen H.R.: *Integration of Metabolism and Intake Regulation: A Review Focusing on Periparturient Animals*. J.Dairy Sci., 83: 1573-1597, 2000.
7. Šamanc H., Kirovski D., Dimitrijević B., Vujanac I., Damnjanović Z., Polovina M.: *Procena energetskeg statusa krava u laktaciji određivanjem koncentracije organskih sastojaka mleka*. Veterinarski glasnik, 60(5-6): 283-297, 2006.
8. Belić B., Cincović M.R., Popović-Vranješ Anka, Pejanović R., Krajinović M.: *Metaboličke promjene i iskorištavanje metabolita u proizvodnji mlijeka kod krava u toplinskom stresu*. Mljekarstvo, 61(4): 309-318, 2011.
9. Cant J.P., Trout D.R., Qiao F., Purdie N.G.: *Milk synthetic response of the bovine mammary gland to an increase in the local concentration of arterial glucose*. J. Dairy Sci., 85, 494–503, 2002.
10. Komatsu T., Itoh F., Kushibiki S., Hodate K.: *Changes in gene expression of glucose transporters in lactating and nonlactating cows*. J. Anim Sci., 83:557-564, 2005.

11. Reist M., Erdin D.K., von Euw D., Tschumperlin K.M., Leuenberger H., Mammon H.M., Morel C., Philipona C., Zbinden Y., Kunzi N., Bluhm J.W.: *Postpartum reproductive function: Association with energy, metabolic and endocrine status in high yielding dairy cows*. Theriogenology 59:1707–1723, 2003.
12. Collard B.L., Boettcher P.J., Dekkers J.C.M., Peticlerc D., Schaeffer L.R.: *Relationships between energy balance and health traits of dairy cattle in early lactation*. J. Dairy Sci. 83:2683–2690, 2000.
13. Nielson B.L.: *Perceived welfare issues in dairy cattle, with special emphasis on metabolic stress*. Br. Soc. Anim. Sci. Occ. Publ. 24:1–8, 1999.
14. Dann H.M., D.E. Morin, G.A. Bollero, M. R. Murphy, J.K. Drackley: *Prepartum Intake, Postpartum Induction of Ketosis, and Periparturient Disorders Affect the Metabolic Status of Dairy Cows*. J. Dairy Sci., 88:3249–3264, 2005.
15. Janovick N.A., Boisclair Y.R., Drackley J.K.: *Prepartum dietary energy intake affects metabolism and health during the periparturient period in primiparous and multiparous Holstein cows*. J. Dairy Sci., 94:1385-1400, 2011.
16. Bjerre-Harpøth V., Friggens N.C., Thorup V.M., Larsen T., Damgaard B.M., Ingvarsten K.L., Moyes K.M.: *Metabolic and production profiles of dairy cows in response to decreased nutrient density to increase physiological imbalance at different stages of lactation*. J. Dairy Sci, 95(5): 2362-2380, 2012.
17. Popović M.: *Biohemija životinja*. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, 2008.
18. Bergman F.N., Haitmann R.N.: *Metabolic of amino acids by the gut, liver, kidneys and peripheral tissues*. Fed Proc, 37:1228-1382, 1978.
19. Overton T.R., Drackley J.K., Douglas G.N., Emmert L.S., Clarck J.H.: *Hepatic gluconeogenesis and whole-body protein metabolism of periparturient dairy cows as affected by source of energy and intake of the prepartum diet*. J. Dairy Sci., 81, Supl.1, 295, 1998.
20. Pierzynowski S.G., Zabielski R.: *Biology of the Pancreas in Growing Animals*. Elsevier health science, 1999.
21. Šamanc H.A., Kirovski D.: *Adrenokortikalni sistem goveda*. Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd, 2008.
22. Moyes K.M., Drackley J.K., Salak-Johnson J.L., Morin D.E., Hope J.C., Loor J.J.: *Dietary-induced negative energy balance has minimal effects on innate immunity during a Streptococcus uberis mastitis challenge in dairy cows during midlactation*. J. Dairy Sci., 92:4301-4316, 2009.

23. Goff J.P., Kehrli M.E. Jr, Horst R.L.: *Periparturient hypocalcemia in cows: prevention using intramuscular parathyroid hormone*. J. Dairy Sci., 72: 1182-1187, 1989.
24. Patel O.V., Takahashi T., Takenouchi N., Hirako M., Sasaki N., Domeki I.: *Peripheral cortisol levels throughout gestation in the cow: effect of stage of gestation and foetal number*. Br Vet J, 152: 425-32, 1996.
25. Beerda B., Kornalijnslijper J.E., Werf J.T., Noordhuizen-Stassen E.N., Hopster H.: *Effects of milk production capacity and metabolic status on HPA function in early postpartum dairy cows*. J Dairy Sci, 87:2094-102, 2004.
26. Forslund K.B., Ljungvall O.A., Jones B.V.: *Low cortisol levels in blood from dairy cows with ketosis: a field study*. Acta Veterinaria Scandinavica, 51/21, 1-6, 2010.
27. Hristov S.V., Bešlin R.M.: *Stres domaćih životinja*. Poljoprivredni fakultet, Beograd, 1991.
28. Hart I.C., Bines J.A., Morant S.V., Ridley J.L.: *Endocrine control of energy metabolism in the cow: comparison of the level of hormones (prolactin, growth hormone, insulin and thyroxine) and metabolites in tje plasma of high- and low-yielding cattle at various stages of lactation*. J Endocrinol, 77(3): 333-345, 1978.
29. Sartin J.L., Kemppainen R.J., Cummins K.A., williams J.C.: *Plasma concentrations of metabolic hormones in high and low producing dairy cows*. J.Dairy Sci., 71: 650-647, 1988.
30. Bauman D.E., Vernon R.G.: *Effects of exogenous bovine somatotropin on lactation*. Annu Rev Nutr, 13: 437-461, 1993.
31. Sechen S.J., Dunshea F.R., Bauman D.E.: *Somatotropin in lactating cows: Effect on response to epinephrine and insulin*. Am J Physiol, 258(4): E582-E588, 1990.
32. Knapp J.R., Freetly H.O., Reis B.L., Calvert C.O., Baldwin R.: *Effects of somatotropin and substrates on patterns of liver metabolism in lacting dairy cattle*. J. Dairy Sci., 75(4): 1025-1035, 1992.
33. Gong G.: *Influence of metabolic hormones and nutrition on ovarian follicle development in cattle: practical implication*. Dom Anim Endocrinol, 23(1-2): 229-241, 2002.
34. Hachenberg S., Weinkauff C., Hiss S., Sauerwein H.: *Evaluation of classification modes potentially suitable to identify metabolic stress in healthy dairy cows during the peripartal period*. J.Anim. Sci., 85: 1923-1932, 2007.

35. Jones J.I., Clemmons D.R.: *Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions*. Endocrine Reviews, 16:3-34, 1995.
36. Donaghy A.J., Baxter R.C.: *Insulin-like growth factor bioactivity and its modification in growth hormone resistant states*. Bailliere's Clin Endocrinol Metab, 10:421-446, 1996.
37. Butler S.T., Marr A.L., Pelton S.H., Radcliff R.P., Lucy M.C., Butler R.W.: *Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A*. J. Endocrinol. 176: 205-217, 2003.
38. Rhoads R.P., Kim J.W., Leury B.V., Baumguard L.H., Segole N., Frank S.J., Bauman D.E., Boisclair Y.R.: *Insulin increases the abundance of the growth hormone receptor in liver and adipose tissue of periparturient dairy cows*. J. Nutr., 134: 1020-1027, 2004.
39. Kim J.W., Rhoads R.P., Block S.S., Overton T.R., Frank S.J., Boisclair R.Y.: *Dairy cows experience selective reduction of the hepatic growth hormone receptor during the periparturient period*. J. Endocrinol, 181: 281–290, 2004.
40. Lucy M. C.: *Functional differences in the growth-hormone and insulin-like growth factor axis in cattle and pigs: implications for post-partum nutrition and reproduction*. Repr. Dom. Anim. 43(Suppl.2): 31-39, 2008.
41. Drackley J.K., Overton T.R., Douglas G.N.: *Adaptations of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period*. J.Dairy Sci, 84(Suppl.):100-112, 2001.
42. Rupprechter G., Carriquiry M., Ramos J.M., Pereira I., Ana M.: *Metabolic and endocrine profiles and reproductive parameters in dairy cows under grazing conditions: effect of polymorphisms in somatotropic axis genes*. Acta Veterinaria Scandinavica, 53:35, 2011.
43. Hayirli A.: *The role of exogenous insulin in the complex of hepatic lipodosis and ketosis associated with insulin resistance phenomenon in postpartum dairy cattle*. Vet. Res. Commun., 30: 749–774, 2006.
44. Holtenius K., Agena S., Delavaud C., Chilliard Y.: *Effects of feeding intensity during the dry Period. 2. Metabolic and hormonal responses*. J Dairy Sci., 86: 883–891, 2003.

45. Bossaert P., Leroy J.L., De Vliegher S., Opsomer G.: *Interrelation between glucose-induced insulin response, metabolic indicators, and the time of first ovulation in high-yielding dairy cows*. J. Dairy Sci., 91: 3363-3371, 2008.
46. Komatsu T., Itoh F., Mikawa S., Hodate K.: *Changes in gene expression of glucose transporters in lactating and nonlactating cows*. J. Anim. Sci., 83: 557-564, 2005.
47. Sano H., Narahara S., Kondo T., Takahashi A., Terashima Y.: *Insulin responsiveness to glucose and tissue responsiveness to insulin during lactation in dairy cows*. Dom. Anim. Endocrinol., 10: 191-197, 1993.
48. Mashek D.G., Ingvarlsen K.L., Andersen J.B., Vestergaard M., Larsen T.: *Effects of a fourday hyperinsulinemic-euglycemic clamp in early and mid-lactation dairy cows on plasma concentrations of metabolites, hormones, and binding proteins*. Dom. Anim. Endocrinol., 21:169-185, 2001.
49. Chagas L.M., Lucy M.C., Back P.J., Blache D., Lee J.M., Gore P.J.S., Sheahan A.J., Roche J.R.: *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, 2009.
50. Swali A., Wathes D.C.: *Influence of the dam and sire on size birth and subsequent growth, milk production and fertility in dairy heifers*. Theriogenology, 66: 1173-1184, 2006.
51. Oikawa S., Oetzel G.R.: *Decreased insulin response in dairy cows following a four-day fast to induce hepatic lipidosis*. J. Dairy Sci., 89: 2999-3005, 2006.
52. Maedler K., Spinas G.A., Dyntar D., Moritz W., Kaiser N., Donath M.Y.: *Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on β -cell turnover and function*. Diabetes, 50: 69-76, 2001.
53. Reis M.A., Carnerio E.M., Mello M.A., Boschero A.C., Saad M.J., Velloso L.A.: *Glucose induced insulin secretion is impaired and insulin-induced phosphorylation of the insulin receptor and insulin receptor substrate-1 are increased in protein deficient rats*. J. Nutr., 127:403-410, 1997.
54. Chagas L.M., Gore P.J.S., Graham G., Macdonald K.A., Blache D.: *Effect of restricted feeding and monopropylene glycol postpartum on metabolic hormones and postpartum anestrus in grazing dairy heifers*. J. Dairy Sci., 91:1822-1833, 2008.
55. Pires J.A.A., Pescara J.B., Brickner A.E., del Rio S.N., Cunha A.P., Grummer R.R.: *Effects of abomasal infusion of linseed oil on responses to glucose and insulin in Holstein cows*. J. Dairy Sci., 91: 1378-1390, 2008.

56. Pires J.A.A., Pescare J.B., Grummer R.R.: *Reduction of plasma NEFA concentration by nicotinic acid enhances the response to insulin in feed-restricted Holstein cows*. J.Dairy Sci., 90: 4635-4642, 2007a.
57. Pires J.A.A., Souza A.H., Grummer R.R.: *Induction of hyperlipidemia by intravenous infusion of tallow emulsion causes insulin resistance in Holstein cows*. J. Dairy Sci., 90: 2735–2744, 2007b.
58. Đoković R., Šamanc H., Ilić Z., Kurćubić V.: *Changes in blood values of glucose, insulin and inorganic phosphorus in healthy and ketotic cows after intravenous infusion of glucose solution*. Acta Veterinaria Brno, 78: 385-389, 2009.
59. Ohtsuka H., Koiwa M., Hatsugaya A., Kudo K., Hoshi F., Itoh N., Yokota H., Okada H., Kawamura S.: *Relationship between serum tumor necrosis factor-alpha activity and insulin resistance in dairy cows affected with naturally occurring fatty liver*. J Vet Med Sci., 63: 1021-1025, 2001.
60. Oikawa S., Oetzel G.R.: *Decreased insulin response in dairy cows following a four-day fast to induce hepatic lipodosis*. J. Dairy Sci., 89: 2999–3005, 2006.
61. Kushibiki S., Hodate K., Shingu H., Ueda Y., Mori Y., Itoh T., Yokomizo Y.: *Effect of longterm administration of recombinant bovine TNF alpha on glucose metabolism and hormone secretion in Holstein steers*. Am. J. Vet. Res., 62: 794–798, 2001.
62. Holtenius P., Holtenius K.: *A model to estimate insulin sensitivity in dairy cows*. Acta Veterinaria Scandinavica, 49: 29-31, 2007.
63. DeFronzo R.A., Tobin J.D., Andres R.: *Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance*. Am J Physiol, 237(3): E214–223, 1979.
64. Šamanc H.A., Stojić V., Kirovski D., Pudlo P., Vujanac I.: *Glucose tolerance test in the assessment of endocrine pancreatic function in cows before and after surgical correction of left displaced abomasum*. Acta Veterinaria (Beograd), 59(5-6): 513-523, 2009.
65. Payne J.M., Dew S.M., Manston R., et al.: *The use of a metabolic profile test in dairy herds*. Vet Rec, 87:150, 1970.
66. Rowlands G.J., Payne J.M., Dew S.M. et al.: *A potential use of metabolic profiles in the selection of superior cattle*. Vet Rec, 93(2): 48-49, 1973.
67. Ingraham R.H., Kappel L.C.: *Metabolic profile testing*. Veterinary Clinics of North America:Food Animal Practice, 4(2): 391, 1988.

68. Cincović M.R., Belić B., Vidović B., Krčmar L.J.: Reference values and frequency distribution of metabolic parameters in cows during lactation and in pregnancy. *Contemporary agriculture*, 60(1-2): 175-182, 2011.
69. Gross J., van Dorland H.A., Bruckmaier R.M., Schwarz F.J.: *Performance and metabolic profile of dairy cows during a lactational and deliberately induced negative energy balance with subsequent realimentation*. *J.Dairy Sci.*, 94:1820-1830, 2011.
70. Bell A., Bauman D.: *Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation*. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 2(3): 265-278, 1997.
71. Reynolds C.K., Aikman P.C., Lupoli B., Humphries D.J., Beever D.E.: *Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation*. *J. Dairy Sci.*, 86:1201–1217, 2003.
72. Đoković R., Šamanc H., Nikolić Z., Bošković-Bogosavljević S.: *Changes in blood values of glucose, insulin and inorganic phosphorus in healthy and ketotic cows after intravenous infusion of propionate solution*. *Acta Veterinaria Brno*, 76:533-539, 2007.
73. Overton T.R., Waldron M.R.: *Nutritional Management of Transition Dairy Cows: Strategies to Optimize Metabolic Health*. *J.Dairy Sci.*, 87:(E.Suppl.): E105–E119, 2004.
74. Husvéth F., Karsai F., Gaal T.: *Peripartal fluctuations of plasma and hepatic lipid components in dairy cows*. *Acta Vet Acad Sci Hung*, 30(1-3): 97-112, 1982.
75. König B.A., Parker D.S., Oldham J.D.: *Acetate and palmitate kinetic in lactating dairy cows*. *Ann Res Vet*, 10: 368-372, 1979.
76. Friggens N.C.: *Body lipid reserves and the reproductive cycle: towards a better understanding*. *Livest. Prod. Sci.*, 83: 219-236, 2003.
77. Bertoni G., Lombardelli R., Piccioli-Cappelli F., Blum J.: *Basal levels and diurnal variations of some hormones and metabolites in blood of dairy cows treated daily with rbST in early and late lactation*. *Ital. J. Anim. Sci.*, 1: 127-141, 2002.
78. Cincović M.R., Belić B., Stevančević M., Lako B., Toholj B., Potkonjak A.: Diurnal variation of blood metabolite in dairy cows during heat stress. *Contemporary agriculture*, 59(3-4): 300-305, 2010.
79. Loor J.J., Everts R.E., Bionaz M., Dann H.M., Morin D.E., Oliveira R., Rodriguez-Zas S.L., Drackley J.K., Lewin H.A.: *Nutrition-induced ketosis alters metabolic and signaling gene networks in liver of periparturient dairy cows*. *Physiol Genomics*, 32: 105–116, 2007.

80. Roberts T., Chapinal N., LeBlanc S.J., Kelton D.F., Dubuc J., Duffield T.F.: *Metabolic parameters in transition cows as indicators for early-lactation culling risk*. J. Dairy Sci., 95(6): 3057-3063, 2012.
81. Ospina P.A., Nydam D.V., Stokol T., Overton T.R.: *Associations of elevated nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate concentrations with early lactation reproductive performance and milk production in transition dairy cattle in the northeastern United States*. J. Dairy Sci., 93(4): 1596-1603, 2010.
82. Ospina P.A., Nydam D.V., Stokol T., Overton T.R.: *Evaluation of nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases*. J. Dairy Sci., 93(20): 546-554, 2010.
83. Nowroozi Asl A., Nazifi S., Rowshan Ghasrodashti A., Olyaei A.: *Prevalence of subclinical ketosis in dairy cattle in the Southwestern Iran and detection of cutoff point for NEFA and glucose concentrations for diagnosis of subclinical ketosis*. Prev. Vet. Med., 100(1): 38-43, 2011.
84. Kessel S., Stroehl M., Meyer H.H.D., Hiss S., Sauerwein H., Schwarz F.J., Bruckmaier R.M.: *Individual variability in physiological adaptation to metabolic stress during early lactation in dairy cows kept under equal conditions*. J. Anim. Sci., 86: 2903-2912, 2008.
85. Cincović M.R., Belić B., Radojčić B., Hristov S., Đoković R.: *Influence of lipolysis and ketogenesis to metabolic and hematological parameters in dairy cows during periparturient period*. Acta veterinaria (Beograd), 62(4): 429-444, 2012.
86. Šamanc H.A.: *Bolesti organa za varenje goveda*. Beograd, 2009.
87. Beerda B., Kornalijnslijper J.E., van der Werf J.T.N., Noordhuizen-Stassen E.N., Hopster H.: *Effects of Milk Production Capacity and Metabolic Status on HPA Function in Early Postpartum Dairy Cows*. J. Dairy Sci., 87: 2094–2102, 2004.
88. Greenfield R.B., Cecava M.J., Donkin S.S.: *Changes in mRNA expression for gluconeogenic enzymes in liver of dairy cattle during the transition to lactation*. J. Dairy Sci., 83: 1228-1236, 2002.
89. Friggens N.C., Andersen J.B., Larsen T., Aaes O., Dewhurst R.J.: *Priming the dairy cow for lactation: a review of dry cow feeding strategies*. Anim. Res. 53: 453–473, 2004.
90. Martineau R., D. Sauvant , D.R. Ouellet , C. Côrtes , J. Vernet , I. Ortigues-Marty , H. Lapierre: *Relation of net portal flux of nitrogen compounds with dietary*

- characteristics in ruminants: A meta-analysis approach. *J. Dairy Sci.*, 94 :2986–3001, 2011.
91. Drackley J.L.: *Biology of Dairy Cows During the Transition Period: the Final Frontier?* *J. Dairy Sci.*, 82:2259–2273, 1999.
92. Reynolds C.K., Huntington G.B., Tyrrell H.F., Reynolds P.J.: *Net portal-drained visceral and hepatic metabolism of glucose, L-lactate, and nitrogenous compounds in lactating Holstein cows.* *J. Dairy Sci.*, 71: 1803–1812, 1998.
93. Rastani R.R., Lobos N.E., Aguerre M. J., Grummer R.R., Wattiaux M A.: *Relationships between blood urea nitrogen and energy balance or measures of tissue mobilization in Holstein cows during the periparturient period.* *The Professional Animal Scientist*, 22: 382–385, 2006.
94. Kaneko J.J., Harvey J.W., Bruss M.: *Clinical biochemistry of domestic animals.* Ed. 6th, Academic Press, 2008.
95. Tóthová CS., Nagy O., Seidel H., Konvičná J., Farkašová Z., Kováč G.: *Acute Phase Proteins and Variables of Protein Metabolism in Dairy Cows during the Pre- and Postpartal Period.* *Acta Vet. Brno*, 77: 51–57, 2008.
96. Van Saun R.J.: *Assessing Nutritional and Health Status of Transition Cows.* 8 pp., In: *Proceedings Mid-Atlantic States Conference for Bovine Practitioners*, Frederick, Maryland, March 25-26, 2004.
97. Van Saun R.J.: *Metabolic Profiling and Health Risk in Transition Cows*, pp. 212-213, In: *Proceedings 37th Annual American Association of Bovine Practitioners Convention.* Ft. Worth, Texas, September 23-25, 2004.
98. Murondoti A., Jorritsma R., Beynen A.C., Wensing T., Geelen M.: *Activities of the enzymes of hepatic gluconeogenesis in periparturient dairy cows with induced fatty liver.* *J. Dairy Res.* 71: 129-134, 2004.
99. Loor J.J., Dann H.M., Everts R.E., Oliveira R., Green C.A., Janovick Guretzky N.A., Rodriguez S.L., Lewin H.A., Drackley J.K.: *Temporal gene expression profiling of liver from periparturient dairy cows reveals complex adaptive mechanisms in hepatic function.* *Physiol. Genomics*, 23: 217-226, 2005.
100. Van Den Top A.M., Geelen M.J.H., Wensing T., Wentink, G.H., Van't Klooster A.T., Beynen A.C.: *Higher postpartum hepatic triacylglycerol concentrations in dairy cows with free rather than restricted access to feed during the dry period are associated with lower activities of hepatic glycerolphosphate acyltransferase.* *J. Nutr.*, 126: 76-85, 1996.

101. Drackley J.K., Dann H.M., Douglas G.N., Janovick Guretzky N.A., Litherland N.B., Underwood J.P., Loor J.J.: Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. *Ital.J.Anim.Sci.*, 4: 323-344, 2005.
102. Dann H.M., Drackley J.K.: *Carnitine palmitoyltransferase I in liver of periparturient dairy cows: effects of prepartum intake, postpartum induction of ketosis, and periparturient disorders*. *J. Dairy Sci.* 88: 3851-3859, 2005.
103. Yamamoto O., Oikawa S., Katoh N.: *Enzyme-linked immunosorbent assay for serum apolipoprotein B-100, a major triglyceride-transport protein in dairy cows*. *Am J Vet Res.*, 56(11):1413-7, 1995.
104. Bernabucci U., Basiricò L., Pirazzi D., Rueca F., Lacetera N., Lepri E., Nardone A.: *Liver apolipoprotein B₁₀₀ expression and secretion are down-regulated early postpartum in dairy cows*. *Livestock Science*, 125(2/3): 169-176, 2009.
105. Belić Branislava, Cincović M.R.: *Praktikum iz patološke fiziologije*. Poljoprivredni fakultet Novi Sad, Departman za veterinarsku medicinu, 2012.
106. Van Saun R.J.: *Metabolic Profiling: Assessing nutritional status of the transition cow*. Washington State VMA Annual Scientific Proceedings, str.1-8, 2000.
107. Đoković R., Ilić Z., Kurćubić V., Petrović M., Dosković V.: *Functional and morphological state of the liver in Simmental dairy cows during transitional period*. *Revue Méd. Vét.*, 162(12): 574-579, 2011.
108. Miller J.K., Brzezinska-Slebodzinska E., Madsen F.C.: *Oxidative stress, antioxidants and animal function*. *J.Dairy Sci.*, 76: 2812–2823, 1993.
109. Lykkesfeldt J., Svendsen O.: *Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals*. *The Veterinary Journal* 173: 502–511, 2007.
110. Georgieva, N.V.: *Oxidative stress as a factor of disrupted ecological oxidative balance in biological systems – a review*. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 8: 1–11, 2005.
111. Bernabucci U., Ronchi B., Lacetera N., Nardone A.: *Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season*. *J.Dairy Sci.*, 85: 2173–2179, 2002.
112. Bernabucci U., Ronchi B., Lacetera N., Nardone A.: *Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows*. *J.Dairy Sci.*, 88: 2017–2026, 2005.

113. Zhang Z.G., Li X.B., Gao L., Li Y.F., Liu G.W., Wang H.B., Wang Z.: *Serum antioxidant capacity of dairy cows with subclinical ketosis*. Vet Rec, 168(1): 22, 2011.
114. Pedernera M., Celi P., García S.C., Salvin H.E., Barchia I., Fulkerson W.J.: *Effect of diet, energy balance and milk production on oxidative stress in early-lactating dairy cows grazing pasture*. The Veterinary Journal, 186: 352–357, 2010.
115. Adela P., Zinveliu D., Pop R.Al., Andrei S., Kiss E.: *Antioxidant status in dairy cows during lactation*. Buletin USAMV-CN, 63: 130-135, 2006.
116. Goof J.P.: *Macromineral physiology and application to the feeding of the dairy cow for prevention of milk fever and other periparturient mineral disorders*. Animal Feed Science and Technology 126: 237–257, 2006.
117. Starič J., Zadnik T.: *Biochemical markers of bone metabolism in dairy cows with milk fever*. Acta veterinaria (Beograd), 60(4): 401-410, 2010.
118. Kimura K., Reinhardt T.A., Goff J.P.: *Parturition and Hypocalcemia Blunts Calcium Signals in Immune Cells of Dairy Cattle*. J. Dairy Sci. 89:2588–2595, 2006.
119. Massey C.D., Wang C., Donovan G.A., Beede D.K.: *Hypocalcemia at parturition as a risk factor for left displacement of the abomasums in dairy cows*. J. Am. Vet. Med. Assoc., 203: 852-853, 1993.
120. Duffield T., LeBlanc S., Leslie K.: *Impact of subclinical metabolic disease on early lactation culling*. J.Dairy Sci., 88(Supl.1): 199, 2005.
121. Littledike, E. T., S. C. Whipp, D. A. Witzel, and A. L. Baetz: *Insulin, corticoids, and parturient paresis*. Academic Press, New York, NY, 1970. Citirano u: Goof J.P., Horst R.L.: *Physiological Changes at Parturition and Their Relationship to Metabolic Disorders*. J.Dairy Sci., 80(7): 1260-1268, 1997.
122. Ménard L., Thompson A.: *Milk fever and alert downer cows: Does hypophosphatemia affect the treatment response?* Can Vet J., 48(5): 487–491, 2007.
123. Grünberg W., Morin D.E., Drackley J.K., Constable P.D.: *Effect of rapid intravenous administration of 50% dextrose solution on phosphorus homeostasis in postparturient dairy cows*. J.Vet. Intern. Med., 20: 1471–1478, 2006.
124. Li H., Ren P., Onwochei M., Ruch R.J., Xie Z.: *Regulation of rat Na/Pi cotransporter-1 gene expression: The roles of glucose and insulin*. Am. J. Physiol. 271:E1021–E1028, 1996.
125. Radojičić Biljana: *Opšta klinička dijagnostika kod domaćih papkara*. Fakultet veterinarske medicine, Beograd, 2008.

126. Klinkon M., Zadnik T.: *Dynamics of red and white blood picture in dairy cows during the periparturient period*. Comparative Hematology International, 9: 156-161, 1999.
127. Sattar A., Mirza R.H.: *Haematological parameters in exotic cows during gestation and lactation under subtropical conditions*. Pakistan Vet J, 29(3): 129-132, 2009.
128. Mirzadeh K.H., Tabatabaei S., Bojarpour M., Mamoei M.: *Comparative study of hematological parameters according strain, age, sex, physiological status and season in Iranian cattle*. Journal of Animal and Veterinary Advances, 9(16): 2123-2127, 2010.
129. Belić B., Cincović M.R., Krčmar L.J., Vidović B.: *Reference values and frequency distribution of hematological parameters in cows during lactation and in pregnancy*. Contemporary agriculture, 60: 145-151, 2011.
130. Belić B., Cincović M.R., Davidov I., Lako B., Potkonjak A., Stančić I.: *Periparturient hematological finding in dairy cows with uterus and udder inflammation*. Contemporary agriculture, 61(1-2): 112-118, 2012.
131. Belić B., Cincović M.R., Stojanović D., Kovačević Z., Vidović B.: *Morphology of erythrocyte and ketosis in dairy cows with different body condition*. Contemporary agriculture, 59: 306-311.
132. Kovačević Filipović M.: *Osobenosti krvne slike goveda tokom njihovog rasta i razvoja*. Zbornik Poremećaj zdravlja krava u puerperijumu i zdravstveni status teladi, 85-100, 2007.
133. Davis A.K., Maney D.L., Maerzl J.C.: *The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists*. Functional Ecology, 22, 760-772, 2008.
134. Tornquist S.J., Rigas J.: *Interpretation of Ruminant Leukocyte Responses*. In: Schalm's veterinary hematology. 6th edition, Wiley-Blackwell, 307-313, 2010.
135. Lynch E.M., Earley B., McGee M., Doyle S.: *Characterisation of physiological and immunological responses in beef cowsto abrupt weaning and subsequent housing*. BMC Veterinary Research, 6:37, 2010.
136. Bertoni G., Trevisi E., Ferrari A., Archetti I.: *Preliminary studies on compatibility between high yield levels and the well-being of dairy cows*. Vet Res Commun, 27(Suppl 1): 639-641, 2003.
137. George J.W., Snipes J., Lane V.M.: *Comparison of bovine hematology reference intervals from 1957 to 2006*. Vet Clin , 39 (2): 138-148, 2010.

138. Belić B., Cincović M.R., Stevančević M., Toholj B.: *Parameters of negative energy balance (NEFA, BHB and glucose) and neutrophil to lymphocyte ratio in cows after calving – comparison of two indicators of stress*. 12th Middle European Buiatric Congress, Pula, Croatia, May 18-22, 281-284, 2011.
139. Thanasak J., Jorritsma R., Hoek A., Noordhuizen J., Rutten V., Müller K.E.: *The effects of a single injection of dexamethasone-21-isonicotinate on the lymphocyte functions of dairy cows at two weeks post partum*. *Vet. Res.*, 35: 103–112, 2004.
140. Latimer K.S., Prasse K.W.: *Leukocytes*. In: Duncan and Prasse's *Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology*. 4th ed. Ames, IA: Iowa State Press, 46–79, 2003.
141. Sordillo L.M., Contreras G. A., Aitken S.L.: *Metabolic factors affecting the inflammatory response of periparturient dairy cows*. *Animal Health Research Reviews*, 10(1): 53–63, 2009.
142. Hoeben D., Burvenich C., Massart-Leën A.M., Lenjou M., Nijs G., Van Bockstaele D., Beckers J.F.: *In vitro effect of ketone bodies, glucocorticosteroids and bovine pregnancy-associated glycoprotein on cultures of bone marrow progenitor cells of cows and calves*. *Vet Immunol Immunopathol.*, 68(2-4):229-240, 1999.
143. Cebra C.K., Heidel J.R., Crisman R.O., Stang B.V.: *The Relationship between Endogenous Cortisol, Blood Micronutrients, and Neutrophil Function in Postparturient Holstein Cows*. *J Vet Intern Med*, 17: 902–907, 2003.
144. Contreras G.A., O'Boyle, Herdt T.H., Sordillo L.M.: *Lipomobilization in periparturient dairy cows influences the composition of plasma nonesterified fatty acids and leukocyte phospholipid fatty acids*. *J.Dairy Sci.*, 93(6):2508-2516, 2010.
145. Lacetera N., Scalia D., Bernabucci U., Ronchi B., Pirazzi D., Nardone A.: *Lymphocyte Functions in Overconditioned Cows Around Parturition*. *J. Dairy Sci.* 88:2010–2016, 2005.
146. Scalia D., Lacetera N., Bernabucci U., Demeyere K., Duchateau L., Burvenich C.: *In Vitro Effects of Nonesterified Fatty Acids on Bovine Neutrophils Oxidative Burst and Viability*. *J.Dairy Sci.* 89:147-154, 2006.
147. Tharwat M., Endoh D., Oikawa S.: *DNA damage in peripheral blood mononuclear cells and neutrophils of dairy cows during the transition period*. *Open Veterinary Journal*, 2: 65-68, 2012.

148. Agnew L.L., Colditz I.G.: *Development of a method of measuring cellular stress in cattle and sheep*. Veterinary Immunology and Immunopathology , 123: 197–204, 2008.
149. Asea A.: *Mechanisms of HSP72 release*. J. Biosci., 32(3): 579–584, 2007.
150. Chung J., Anh-Khoi N., Darren C. Et al.: *HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance*. PNAS, 105(5): 1739-1744, 2008.
151. Pittet J.F., Lee H., Morabito D., Howard M.B., Welch W.J., Mackersie R.C.: *Serum levels of Hsp 72 measured early after trauma correlate with survival*. J Trauma, 52: 611–617, 2002.
152. Kristensen T.N., Løvendahl P., Berg P., Loeschcke V.: *Hsp72 is present in plasma from Holstein-Friesian dairy cattle, and the concentration level is repeatable across days and age classes*. Cell Stress & Chaperones, 9(2): 143–149, 2004.
153. Catalani E., Amadori M., Vitali A., Bernabucci U., Nardone A., Lacetera N.: *The Hsp72 response in peri-parturient dairy cows: relationships with metabolic and immunological parameters*. Cell Stress & Chaperones, 15(6): 781-790, 2010.
154. Milovanović A., Jovičin M., Šamanc H.: *Ocenjivanje telesne kondicije krava holštajn-frizijske rase*. Veterinarska komora Srbije, Beograd, 2005.
155. Schroder U.J., Staufenbiel R.: *Invited review: Methods to determine body fat reserves in the dairy cow with special regard to ultrasonographic measurement of backfat thickness*. J. Dairy Sci., 89(1): 1-14, 2006.
156. Hayirli A., Grummer R.R., Nordheim E.V., Crump P.M.: *Animal and dietary factors affecting feed intake during the prefresh transition period in Holsteins*. J. Dairy Sci., 85(12): 3430-3443, 2002.
157. Waltner S.S., McNamara J.P., Hillers. J.K.: *Relationships of body condition score to production variables in high producing Holstein dairy cattle*. J. Dairy Sci. 76(11): 3410-3419, 1993.
158. Berry D.P., Buckley F., Dillon P.: *Body condition score and live-weight effects on milk production in Irish Holstein- Friesian dairy cows*. Animal, 1(9): 1351-1359, 2007.
159. Contreras L.L., Ryan C.M., Overton T.R.: *Effects of dry cow grouping strategy and prepartum body condition score on performance and health of transition dairy cows*. J. Dairy Sci., 87(2): 517-523, 2004.

160. Roche J.R., Friggens N.C., Kay J.K., Fisher M.W., Stafford K.J., Berry D.P.: *Invited review: Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare*. J.Dairy Sci., 92: 5769–5801, 2009.
161. Busato A., Faissler D., Kupfer U., Blum J.W.: *Body condition scores in dairy cows: Associations with metabolic and endocrine changes in healthy dairy cows*. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med., A49: 455-460, 2002.
162. Cincović M.R., Belić B., Toholj B., Potkonjak A., Stevančević M., Lako B., Radović I.: *Metabolic acclimation to heat stress in farm housed Holstein cows with different body condition scores*. African Journal of Biotechnology, 10(50): 10293-10303, 2011.
163. Aktas M.S., Ozkanlar S., Ucar o., Ozkanlar Y., Kaynar O., Aytekin I.: *Relationships between Body Condition Score and some metabolic blood parameters in early lactating dairy cows*. Revue Méd. Vét., 162(12): 586-592, 2011.
164. Stančić B.L., Veselinović S.: *Reprodukcija domaćih životinja*. Poljoprivredni fakultet Novi Sad, 2002.
165. Grossman M., Koops W.J.: *Modeling extended lactation curves of dairy cattle: a biological basis for the multiphasic approach*. J. Dairy Sci., 86(3): 988-998, 2003.
166. De Vries M.J., Veerkamp R.F.: *Energy Balance of Dairy Cattle in Relation to Milk Production Variables and Fertility*. J. Dairy Sci., 83: 62–69, 2000.
167. Hart C.I., Bines J.A., Morant S.V.: *Endocrine control of energy metabolism in the cow: correlations of hormones and metabolites in high and low yielding cows for stages of lactation*. J. Dairy Sci., 62: 270-277, 1979.
168. Wathes D.C., Cheng Z., Bourne N., Taylor V.J., Coffey M.P., Brotherstone S.: *Differences between primiparous and multiparous dairy cows in the inter-relationships between metabolic traits, milk yield and body condition score in the periparturient period*. Domestic Animal Endocrinology, 33(2): 203-225, 2007.
169. Wheelock J.B., Rhoads R.P., VanBaale M.J., Sanders S.R., Baumgard L.H.: *Effects of heat stress on energetic metabolism in lactating Holstein cows*. J. Dairy Sci. 93 :644–655, 2010.
170. Chapinal N., Carson M.E., LeBlanc S.J., Leslie K.E., Godden S., Capel M., Santos J.E.P., Overton M.W., Duffield T.F.: *The association of serum metabolites in the transition period with milk production and early-lactation reproductive performance*. J.Dairy Sci., 95(3): 1301-1309, 2012.

171. Ospina P.A., Nydam D.V., Stokol T., Overton T.R.: *Association between the proportion of sampled transition cows with increased nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate and disease incidence, pregnancy rate, and milk production at the herd level*. J. Dairy Sci. 93: 3595–3601, 2010.
172. Holtenius K., Persson Waller K., Essén-Gustavsson B., Holtenius P., Hallén Sandgren C.: *Metabolic parameters and blood leukocyte profiles in cows from herds with high or low mastitis incidence*. Vet J., 168(1): 65-73, 2004.
173. Suriyasathaporn W., Heuer C., Noordhuizen-Stassen E., Schukken Y.H.: *Hyperketonaemia and the impairment of udder defense: a review*. Vet. Res. 31, 397–412, 2000.
174. Huszenicza G., Jánosi S., Gáspárdy A., Kulcsár M.: *Endocrine aspects in pathogenesis of mastitis in postpartum dairy cows*. Animal Reproduction Science, 82–83: 389–400, 2004.
175. Moyes K.M., Drackley J.K., Morin D. E., Rodriguez-Zas S.L., Everts R.E., Lewin H.A., Loor J.J.: *Mammary gene expression profiles during an intramammary challenge reveal potential mechanisms linking negative energy balance with impaired immune response*. Physiol Genomics, 41: 161–170, 2010.
176. Sordillo L.M., Aitken S.L.: *Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle*. Vet Immunol Immunopathol., 128(1-3):104-109, 2009.
177. Šamanc H., Kirovski D., Stojić V., Vujanac I., Prodanović R., Bojković-Kovačević S.: *Application of the metabolic profile test in the prediction and diagnosis of fatty liver in Holstein cows*. Acta veterinaria Beograd, 61(5-6): 543-553, 2011.
178. Stančić B., Košarčić D.: *Reprodukcija goveda*. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, 2007.
179. Bucholtz D.C., Chiesa A., Pappano W.N., Nagatani S., Tsukamura H., Maeda K.I., Foster D.L.: *Regulation of pulsatile luteinizing hormone secretion by insulin in the diabetic male lamb*. Biol. Reprod., 62: 1248–1255, 2000.
180. Armstrong D.G., Gong J.G., Gardner J.O., Baxter G., Hogg C.O., Webb R.: *Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of short-term changes in dietary intake*. Reproduction, 123: 371-378, 2002.
181. Gong J.G., Lee W.J., Garnsworthy P.C., Webb R.: *Effect of dietary-induced increases in circulating insulin concentrations during the early postpartum period reproductive function in dairy cows*. Reproduction, 123: 419–427, 2002.

182. Leroy J.L.M.R., Vanholder T., Van Knegsel A.T.M., Garcia-Ispierto I., Bols P.E.J. (2008): *Nutrient prioritization in dairy cows early post partum: Mismatch between metabolism and fertility?* *Reprod. Dom. Anim.*, 43(Suppl.2): 96-103, 2008.
183. Jorritsma R., Wensing T., Kruip T.A.M., Vos P.L.A.M., Noordhuizen J.P.T.M.: *Metabolic changes in early lactation and impaired reproductive performance in dairy cows.* *Vet. Res.*, 34: 11-26, 2003.
184. Butler S.T., Pelton S.H., Butler W.R.: *Energy balance, metabolic status, and the first postpartum ovarian follicle wave in cows administered propylene glycol.* *J. Dairy Sci.*, 89:2938-2951, 2006.
185. Kawashima C., Fukihara S., Maeda M., Kaneko E., Montoya C.A., Matsui M., Shimizu T., Matsunaga N., Kida K., Miyake Y., Schams D., Miyamoto A.: *Relationship between metabolic hormones and ovulation of dominant follicle during the first follicular wave post-partum in high-producing dairy cows.* *Reproduction*, 133: 155-163, 2007.
186. Shimizu T., Murayama C., Sudo N., Kawashima C., Tetsuka M., Miyamoto A.: *Involvement of insulin and growth hormone (GH) during follicular development in the bovine ovary.* *Anim. Reprod. Sci.*, 106: 143-152, 2008.
187. Sudo N., Shimizu T., Kawashima C., Kaneko E., Tetsuka M., Miyamoto A.: *Insulin-like growth factor-I (IGF-I) system during follicle development in the bovine ovary: Relationship among IGF-I, type 1 IGF receptor (IGFR-1) and pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A).* *Mol. Cell. Endocrinol.*, 264:197-203, 2007.
188. Huszenicza G.Y., Kulcsar M., Korodi P., Bartyk J., Rudas P., Ribiczei-Szabo P., Nikolić Judith A., Šamanc H., Ivanov I., Gvozdić D.: *Adrenocortical and thyroid function, hormone and metabolite profiles and the onset of ovarian cyclicity in dairy cows suffering from various forms ketosis.* *Acta Veterinaria Beograd*, 56(1): 25-36, 2006.
189. Crowe M.A.: *Resumption of ovarian cyclicity in post-partum beef and dairy cows.* *Reprod. Domest. Anim.*, 43(Suppl.5): 20-28, 2008.
190. Leroy J.L.M.R., Vanholder T., Opsomer G., Van Soom A., de Kruif A.: *The in vitro development of bovine oocytes after maturation in glucose and beta-hydroxybutyrate concentrations associated with negative energy balance in dairy cows.* *Reprod. Dom. Anim.* 41: 119-123, 2006.
191. Vanholder T., Leroy J.L.M.R., Dewulf J., Duchateau L., Coryn M., de Kruif A., Opsomer G.: *Hormonal and metabolic profiles of highyielding dairy cows prior to*

- ovarian cyst formation or first ovulation post partum*. *Reprod. Domest. Anim.*, 40: 460–467, 2005.
192. Guedon L., Saumande J., Dupron F., Couquet C., Desbals B.: *Serum cholesterol and triglycerides in postpartum beef cows and their relationship to the resumption of ovulation*. *Theriogenology*, 51(7): 1405-1415, 1999.
193. Kumar S., Saxena A., Ramsagar: *Comparative studies on metabolic profile of anestrus and normal cyclic murrah buffaloes*. *Buffalo Bulletin*, 29(1): 7-11, 2010.
194. Seifi H.A., Farzaneh N., Mohri M.: *Relationships between fertility, serum calcium and inorganic phosphorus in dairy cows*. *Iran J Vet Res*, 6 (2, Seria 12): 74-76, 2005.
195. Marr A.L., Piepenbrink M.S., Overton T.R., Lucy M.C., Butler W.R.: *The somatotrophic axis and lipid metabolism in transition dairy cows in relation to timing of first postpartum ovulation*. *J. Dairy Sci.* 85 (Suppl. 1): 66, 2002.
196. Földi J., Kulcsár M., Pécsi A., Huygheb B., de Sab C., Lohuis J.A.C.M., Cox P., Huszenicza Gy.: *Bacterial complications of postpartum uterine involution in cattle*. *Anim. Reprod. Sci.*, 96: 265-281, 2006.
197. Edmonson A.J., Lean I.J., Weaver L.D., Farver T., Webster G.: *A Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows*. *J. Dairy Sci.*, 72: 68-78, 1989.
198. Mitin V., Mijić B.: *Razine insulina u krvnom serumu goveda*. *Veterinarski arhiv*, 51(5): 189-196, 1981.
199. Kunz P. L., Blum J. W., Hart I.C., Bickel H., Landis J.: *Effects of different energy intakes before and after calving on food intake, performance, and blood hormones and metabolites in dairy cows*. *Anim. Prod.*, 40: 219-231, 1985.
200. Nikolić J. A., Nedić O., Šamanc H., Aleksić S., Mišćević B., Kulcsar M.: *Peripheral circulating insulin-like growth factor I and II in cattle*. *Acta Vet Hung*, 49: 53-63, 2001.
201. Abribat T., Lapierre H., Dubreuil P., Pelletier G., Gaudreau P., Brazeau P., Petitclerc D.: *Insulin-like growth factor-I concentration in holstein female cattle: Variations with age, stage of lactation and growth hormone-releasing factor administration*. *Domest Anim Endocrinol*, 7: 93-102, 1990.
202. Kovačević M., Šamanc H., Damjanović Z., Košarčić, S.: *Koncentracija triglicerida i NEFA u krvi krava u visokom graviditetu i posle teljenja*. *Savremena poljoprivreda*, 51(3-4): 111-113, 2002.

203. Krnić J., Pašić-Juhas E., Kanački Z., Hodžić A., Hamamdžić M.: *Uticaj nepovoljnih uslova ishrane na karakteristike metaboličkog profila krava*. Savremena poljoproverda, 55(3-4):136-142, 2006.
204. Šamanc H., Nikolić J.A., Bugarski D., Kulcsar M., Ivanov I., Huszenicza G.: *Glycemia, glucocorticoids and adrenocortical reserve in postpartal dairy cows*. Acta veterinaria (Beograd), 49 (5-6): 281-288, 1999.
205. Hristov S., Đurđević Đ., Grubić G., Bogdanović V., Vidić R., Bokan L.: *Koncentracija kortizola u krvnom serumu goveda*. Veterinarski glasnik, 48 (10): 853-859, 1994.
206. Blom A.K., Halse K.: *Corticosteroids in nocturnal blood plasma of cows in the field related to stage of lactation and plasma acetoacetate*. Acta Endocrinol, 78: 306-315, 1975.
207. Radojičić B., Šamanc H., Pejcin I.: *Concentration of cortisol, insulin, glucose and lipids in the blood of calves at various ages*. Acta Veterinaria (Beograd), 57(2-3): 191-198, 2007.
208. Radcliff R.P., McCormac B.L., Crooker B.A., Lucy M.C.: *Plasma Hormones and Expression of Growth Hormone Receptor and Insulin-Like Growth Factor-I mRNA in Hepatic Tissue of Periparturient Dairy Cows*. J Dairy Sci, 86: 3920-3926, 2003.
209. Jovanović, M. J, Stamatović, S, Šamanc, H. et al.: *Prilog proučavanju metaboličkog profila krava u laktaciji*. Vet. Glasnik, 41(6): 449-454, 1987.
210. Asl A.N., Nazifi S., Ghasrodashti A.R., Olyae A.: *Prevalence of subclinical ketosis in dairy cattle in the Southwestern Iran and detection of cutoff point for NEFA and glucose concentrations for diagnosis of subclinical ketosis*. Prev Vet Med., 100(1): 38-43, 2011.
211. Doepel L., Lapierre H., Kennelly J.J.: *Peripartum performance and metabolism of dairy cows in response to prepartum energy and protein intake*. J. Dairy Sci., 85:2315–2334, 2002.
212. Šamanc H., Damjanović Z., Nikolić Judith A., Radojičić B., Anđelković M., Lekić N. *Endokrina regulacija metaboličkih procesa kod krava u graviditetu i laktaciji*. Vet. Glasnik, 47(4-5): 319, 1993.
213. Pestevšek U., Klemenc N., Vospernik P., Žust J.: *Serumske proteinske frakcije kod krava u visokoj gravidnosti i puerperijumu*. Vet. Glasnik, 346: 555-561, 1980.

214. Kupezinski R., Chudoba-Drozdovska B.: Values of selected biochemical parameters of cows blood during their drying-off and the beginning of lactation. *Elec.Jour.of P.Agric.Unive*, (1), electronic paper.
215. Sharma N., Singh N.K., Singh O.P., Pandey V., Verma P.K.: *Oxidative Stress and Antioxidant Status during Transition Period in Dairy Cows*. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 24(4): 479 – 484, 2011.
216. Reid I.M.: *Incidence and severity of fatty liver in dairy cows*. *Vet. Rec.*, 107: 281-284, 1980.
217. Šamanc H.A, Jovanović M., Damjanović Z., Ivanov I.: *Koncentracija aminokiselinskog azota i ukupnog bilirubina u krvnom serumu visokogravidnih i tek oteljenih junica istočno-frizijske i holštajn rase*. *Vet. Glasnik*, 46(7-8): 377-381, 1992.
218. Sevinç M., Başoğlu A., Güzelbektaş H.: *Lipid and lipoprotein levels in dairy cows with fatty liver*. *Turk J Vet Anim Sci*, 27:295-299, 2003.
219. Đoković R. Šamanc H., Bojkovski J., Fratrić N.: *Blood concentrations of thyroid hormones and lipids of dairy cows in transitional period*. *Lucrări științifice medicină veterinară*, 43(2): 34-40, 2010.
220. Pechova A., Llek J., Halouzka R.: *Diagnosis and control of the development of hepatic lipidosis in dairy cows in the peri-parturient period*. *Acta Vet Brno*, 66: 235-243, 1997.
221. Gašperlin B, Zadnik T, Jazbec I, Žust J, 2002, Effects of dietary cation-anion differences on serum calcium, phosphorus and magnesium concentrations in periparturient dairy cows, *Slov Vet Res*, 39, 3/4, 215-25.
222. Larsen T, Møller G, Bellio R, 2001, Evaluation of clinical and clinical-chemical parameters in periparturient cows, *J Dairy Sci*, 84, 7, 1749-58.
223. Mehrzad J., Duchateau L., Pyörälä S., Burvenich C.: *Blood and Milk Neutrophil Chemiluminescence and Viability in Primiparous and Pluriparous Dairy Cows During Late Pregnancy, Around Parturition and Early Lactation*. *J Dairy Sci*, 89: 147-154, 2006.
224. Fathi Nasri M.H., France J., Odongo N.E., Lopez S., Bannink A., Kebreab E.: *Modelling the lactation curve of dairy cows using the differentials of growth functions*. *Journal of Agricultural Science*, 146: 633–641, 2008.
225. Mašek T., Mikulec Ž., Valpotić H., Pahović S.: *Blood biochemical parameters of crossbred Istrian x East Friesian dairy ewes: relation to milking period*. *Ital. J. Anim. Sci.*, 6: 281-288, 2007.

226. Kida, K.: *The metabolic profile test: Its practicability and assessing feeding management and periparturient disease in high yielding commercial dairy herds*. J Vet Med Sci, 64: 557-563, 2002.
227. Slosarkova S., Fleischer P., Marek J., Penkava O., Skrivanek M.: Prediction of non-esterified fatty acids (Nefa) and beta-hydroxybutyrate (Bhb) in blood of dairy cows from values of selected biochemistry parameters on day one post partum. 12th Middle European buiatric congress, Book of proceedings, pp.166-170, 2011.
228. Gergáč Z., Báder E., Szűcs E.: *Critical point in the feeding of high yielding dairy cows*. International symposium of animal breeding in the context of modern agriculture from science to practice, www.welanimal.aku.edu.tr, 2009.
229. Gergáč Z., Szűcs E.: *Critical point in the feeding of high yielding dairy cows in association with BCS and metabolic profile test*. *Lucrări științifice Zootehnie și Biotehnologii*, 42(2):568-580, 2009.
230. Joźwik A., Strzałkowska N., Bagnicka E., Grzybek W., Krzyżewski J., Poławska E., Kołataj A., Horbańczuk J.O.: *Relationship between milk yield, stage of lactation, and some blood serum metabolic parameters of dairy cows*. Czech J. Anim. Sci., 57(8): 353–360, 2012.
231. González F.D., Muiño R., Pereira V., Campos R., Benedito J.L.: *Relationship among blood indicators of lipomobilization and hepatic function during early lactation in high-yielding dairy cows*. J. Vet. Sci., 12(3): 251-255, 2011.
232. Grünberg W., Donkin S.S., Constable P.D.: *Periparturient effects of feeding a low dietary cation-anion difference diet on acid-base, calcium, and phosphorus homeostasis and on intravenous glucose tolerance test in high-producing dairy cows*. J. Dairy Sci. 94: 727–745, 2011.
233. Schoenberg K.M., Overton T.R.: *Effects of plane of nutrition and 2,4-thiazolidinedione on insulin responses and adipose tissue gene expression in dairy cattle during late gestation*. J. Dairy Sci., 94: 6021–6035, 2011.
234. Bjerre-Harpøth V., Friggens N.C., Thorup V.M., Larsen T., Damgaard B.M., Ingvarsen K.L., Moyes K.M.: *Metabolic and production profiles of dairy cows in response to decreased nutrient density to increase physiological imbalance at different stages of lactation*. J Dairy Sci., 95(5): 2362-2380, 2012.
235. Balogh O., Szepes O., Kovacs K., Klucsar M., Reiczigel J., Alcazar J.A., Keresztes M., Febel H., Bartyik J., Fekete S.G., Fesus L., Huszenicza G.: *Interrelationship of growth hormone *AluI* polymorphism, insulin resistance, milk production and*

- reproductive performance in Holstein-Friesian cows*. Veterinarni Medicina, 53: 604-616, 2008.
236. Kerestes M., Faigl V., Kulcsar M., Balogh O., Foldi J., Febel H., Chilliard Y., Huszenicza G.: *Periparturient insulin secretion and whole-body insulin responsiveness in dairy cows showing various forms of ketone pattern with or without puerperal metritis*. Domest Anim Endocrinol, 37: 250-261, 2009.
237. Kusenda M., Kaske M., Piechotta M., Locher L., Starke A., Huber K., Rehage J.: *Effects of a single dose of dexamethasone-21-isonicotinate on the peripheral insulin action of dairy cows in early lactation*. Journal of veterinary internal medicine, DOI: 10.1111/jvim.12010, 2012.
238. Littell R.C., Henry P.R., Ammerman C.B.: *Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures*. J Anim Sci, 76: 1216-1231, 1998.
239. Gross J., van Dorland H.A., Schwarz F.J., Bruckmaier R.M.: *Endocrine changes and liver mRNA abundance of somatotropic axis and insulin system constituents during negative energy balance at different stages of lactation in dairy cows*. J Dairy Sci, 94(7): 3484-3494, 2011.
240. Bines J.A., Hart I.C.: *Metabolic limits to milk production, especially, roles of growth hormone and insulin*. J Dairy Sci, 65: 1375-1378, 1982.
241. Sechen S.J., McCutcheon S.N., Bauman D.E.: *Response to metabolic challenges in early lactation dairy cows during treatment with bovine somatotropin*. Domest Anim Endocrinol, 6(2):141-154, 1989.
242. Bradford B.J., Allen M.S.: *Negative energy balance increases peripheral ghrelin and growth hormone concentrations in lactating dairy cows*. Domest. Anim. Endocrinol, 34:196-203, 2008.
243. Weber W.J., Wallace C.R., Hansen L.B., Chester-Jones H., Crooker B.A.: *Effects of Genetic Selection for Milk Yield on Somatotropin, Insulin-Like Growth Factor-I, and Placental Lactogen in Holstein Cows*. J Dairy Sci, 90(7): 3314-3325, 2007.
244. Lucy M.C.: *Mechanisms linking the somatotropic axis with insulin: Lessons from the postpartum dairy cow*. Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production, 64: 19-23, 2004.
245. Schwalm J.W., Schultz L.H.: *Relationship of insulin concentration to blood metabolites in the dairy cow*. J Dairy Sci, 59(2):255-61, 1976.
246. Sahinduran S., Sezer K., Buyukoglu T., Koray Albay M., Cagri Karakurum M.: *Evaluation of Some Haematological and Biochemical Parameters Before and After*

- Treatment in Cows with Ketosis and Comparison of Different Treatment Methods.* Journal of Animal and Veterinary Advances, 9(2): 266-271, 2010.
247. Panousis N.: *Types, diagnosis and treatment of ketosis in dairy cows.* Veterinarski žurnal R.Srpske, 2: 107-115, 2008.
248. Chuang Xu, Zhe Wang, Guowen Liu, Xiaobing Li, Guanghong Xie, Cheng Xia, Hong you Zhang: *Metabolic Characteristic of the Liver of Dairy Cows during Ketosis Based on Comparative Proteomics.* Asian-Aust. J. Anim. Sci., 21(7):1003-1010, 2008.
249. Bark T.H., McNurlan M.A., Lang C.H., Garlick P.J.: *Increased protein synthesis after acute IGF-I or insulin infusion is localized to muscle in mice.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 275:E118-E123, 1998.
250. Xinwei Li, Xiaobing Li, Ge Bai, Hui Chen, Qinghua Deng, Zhaoxi Liu, Liang Zhang, Guowen Liu, Zhe Wang: *Effects of non-esterified fatty acids on the gluconeogenesis in bovine hepatocytes.* Mol Cell Biochem, DOI 10.1007/s11010-011-1032-x, 2011.
251. Zhu L.H., Armentano L.E., Bremmer D.R., Grummer R.R., Bertics S.J.: *Plasma concentration of urea, ammonia, glutamine around calving, and the relation of hepatic triglyceride, to plasma ammonia removal and blood acid-base balance.* J Dairy Sci, 83: 734-740, 2000.
252. Overton T.R., Drackley J.K., Ottemann-Abbamonte C.J., Beaulieu A.D., Emmert L.S., Clark J.H.: *Substrate utilization for hepatic gluconeogenesis is altered by increased glucose demand in ruminants.* J Anim Sci, 77: 1940-1951, 1999.
253. Strang B.D., Bertics S.J., Grummer R.R., Armentano L.E.: *Effect of long-chain fatty acids on triglyceride accumulation, gluconeogenesis, and ureagenesis in bovine hepatocytes.* J Dairy Sci, 81:728–739, 1998a.
254. Zhu L.H., Strang B.D., Armentano L.E.: *Effects of triglyceride accumulation on induction of urea synthesis by glucagon and dexamethasone in monolayer cultures of bovine hepatocytes.* J Anim Sci, 78: 1659-1666, 2000.
255. Bjerre-Harpøth V., Friggens N.C., Thorup V.M., Larsen T., Damgaard B.M., Ingvarsen K.L., Moyes K.M.: *Metabolic and production profiles of dairy cows in response to decreased nutrient density to increase physiological imbalance at different stages of lactation.* J Dairy Sci, 95: 2362-2380, 2012.
256. Bobe G., Young J.W., Beitz D.C.: *Invited Review: Pathology, Etiology, Prevention, and Treatment of Fatty Liver in Dairy Cows.* J. Dairy Sci, 87: 3105–3124, 2004.

257. Hippen A.R., She P., Young J.W., Beitz D.C., Lindberg G.L., Richardson L.F., Tucker R.W.: *Alleviation of fatty liver in dairy cows by 14-day intravenous infusions of glucagon*. J Dairy Sci, 82: 1139–1152, 1999.
258. West H.J.: *Effect on liver function of acetonaemia and the fat cow syndrome in cattle*. Res.Vet. Sci., 48:221–227, 1990.
259. Reid I.M., Roberts C.J., Treacher R.J., Williams L.A.: *Effect of body condition at calving on tissue mobilization, development of fatty liver and blood chemistry of dairy cows*. Anim. Prod., 43: 7–15, 1986.
260. Herdt T.H., Liesman J., Gerloff B., Emery R.: *Reduction of serum triacylglycerol-rich lipoprotein concentrations in cows with hepatic lipidosis*. Am. J. Vet. Res. 44:293–296, 1983.
261. Katoh N.: *Relevance of apolipoproteins in the development of fatty liver and fatty liver-related peripartum diseases in dairy cows*. J. Vet. Med. Sci. 64:293–307, 2002.
262. de Boer G., Trenkle A., Young J.W.: *Secretion and clearance rates of glucagon in dairy cows*. J Dairy Sci, 69: 721–733, 1986.
263. Formigoni, A., M. C. Cornil, A. Prandi, A. Merdenti, A. Rossi, D. Portetelle, and R. Renaville: *Effect of propylene glycol supplementation around parturition on milk yield, reproduction performance, and some hormonal and metabolic characteristics in dairy cows*. J. Dairy Res, 63: 11–24, 1996.
264. Bouwstra R.J., Goselink R.M.A., Dobbelaar P., Nielen M., Newbold J.R., van Werven T.: *The Relationship Between Oxidative Damage and Vitamin E Concentration in Blood, Milk, and Liver Tissue from Vitamin E Supplemented and Nonsupplemented Periparturient Heifers*. J Dairy Sci, 91:977–987, 2008.
265. Fidan A.F., Pamuk K., Ozdemir A., Saritaş Z.K., Tarakci U.: *Effects of dehorning by amputation on oxidantantioxidant status in mature cattle*. Revue Méd. Vét., 161(11): 502-508, 2010.
266. Megahed G.A., Anwar M.M., Wasfy S.I., Hammadeh M.E.: *Influence of heat stress on the cortisol and oxidant-antioxidants balance during oestrous phase in buffalo-cows (Bubalus bubalis): thermo-protective role of antioxidant treatment*. Reprod Domest Anim., 43(6): 672-7, 2008.
267. Pedernera M., Celi P., Garcia C.S., Salvin H.E., Barchia I., Fulkerson W.J.: *Effect of diet, energy balance and milk production on oxidative stress in early-lactating dairy cows grazing pasture*. The Veterinary Journal, 186: 352-357, 2010.

268. Mudron P., Rehage J., Qualmann K., Sallmann H.P., Scholz H.: *A study of lipid peroxidation and vitamin E in dairy cows with hepatic insufficiency*. Zentralbl Veterinarmed A., 46(4): 219-24, 1999.
269. Horst R.L., Jorgensen N.A.: *Elevated Plasma Cortisol During Induced and Spontaneous Hypocalcemia in Ruminants*. J Dairy Sci 65:2332-2337, 1982.
270. Waage S., Sjaastad O.V., Blom A.K.: *Plasma concentrations of cortisol in cows with hypocalcaemia in relation to their responses to treatment with calcium*. Res Vet Sci, 36(2): 164-168, 1984.
271. Reinhardt T.A., Lippolis J.D., McCluskey B.J., Goof J.P., Horst R.L.: *Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds*. Vet J., 188(1): 122-124, 2011.
272. Haap M., Heller E., Thamer C., Tschritter O., Stefan N., Fritsche A.: *Association of serum phosphate levels with glucose tolerance, insulin sensitivity and insulin secretion in non-diabetic subjects*. Eur J Clin Nutr., 60(6): 734-739, 2006.
273. DeFronzo R.A., Lang R.: *Hypophosphatemia and glucose intolerance: evidence for tissue insensitivity to insulin*. N Engl J Med., 303(22): 1259-1263, 1980.
274. Xin-Jin Zhou, Fadda G.Z., Perna A.F., Massry S.G.: *Phosphate depletion impairs insulin secretion by pancreatic islets*. Kidney International, 39: 120—128, 1991.
275. Rafia S., Taghipour-Bazargani T., Khaki Z., Bokaie S., Sattari Tabrizi S.: *Effect of body condition score on dynamics of hemogram in periparturient Holstein cows*. Comparative Clinical Pathology, 21(5): 933-943, 2012.
276. Morris D.G., Waters S.M., McCarthy S.D., Patton J., Earley B., Fitzpatrick R., et al: *Pleiotropic effects of negative energy balance in the postpartum dairy cow on splenic gene expression: repercussions for innate and adaptive immunity*. Physiol. Genomics, 39: 28-37, 2009.
277. Galvão K.N., Flaminio M.J.B.F., Brittin S.B., Sper R., Fraga M., Caixeta L., Ricci A., Guard C.L., Butler W.R., Gilbert R.O.: *Association between uterine disease and indicators of neutrophil and systemic energy status in lactating Holstein cows*. J Dairy Sci, 93: 2926-2937, 2010.
278. Nielsen L., Røntved C.M., Nielsen M.O., Norup L.R., Ingvarsen K.L.: *Short Communication: Leukocytes from heifers at different ages express insulin and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptors*. Domest. Anim. Endocrin., 25: 231-238, 2003.
279. Maratou E., dimitriadis G., Kollias A., Boutati E., Lambadiari V., Mitrou P., Raptis S.A.: *Glucose transporter expression on the plasma membrane of resting and activated white blood cells*. Eur J Clin Invest, 37(4): 282-290, 2007.

280. Van Oostveldt K., Vangroenweghe F., Dosogne H., Burvenich C.: *Apoptosis and necrosis of blood and milk polymorphonuclear leukocytes in early and midlactating healthy cows*. Vet. Res., 32: 617–622, 2001.
281. Eitam H., Brosh A., Orlov A., Izhaki S.A.: *Caloric stress alters fat characteristics and HSP70 expression in somatic cells of lactating beef cows*. Cell Stress Chaperones, 14:173–182, 2009.
282. Calderwood S.K., Mambula S.S., Gray P.J. Jr: *Extracellular heat shock proteins in cell signaling and immunity*. Ann NY Acad Sci, 1113:28–39, 2007.
283. Rodrigues-Krause J., Krause M., O'Hagan C., De Vito G., Boreham C., Murphy C., Newsholme P., Colleran G.: *Divergence of intracellular and extracellular HSP72 in type 2 diabetes: does fat matter?* Cell Stress and Chaperones, 17:293–302, 2012.
284. Febbraio M.A., Mesa J.L., Chung J., Steensberg A., Keller C., Nielsen H.B., Krstrup P., Ott P., Secher N.H., Pedersen B.K.: *Glucose ingestion attenuates the exercise-induced increase in circulating heat shock protein 72 and heat shock protein 60 in humans*. Cell Stress Chaperones 9:390–396, 2004.
285. Morino S., Kondo T., Sasaki K., Adachi H., Suico M.A., Sekimoto E., Matsuda T., Shuto T., Araki E., Kai H.: *Mild electrical stimulation with heat shock ameliorates insulin resistance via enhanced insulin signalling*. PLoS ONE, 3(12): e4068, 2008.
286. Ribas V., Nguyen M.T., Henstridge D.C., Nguyen A.K., Beaven S.W., Watt M.J., et al.: *Impaired oxidative metabolism and inflammation are associated with insulin resistance in ER alpha-deficient mice*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 298:E304-319, 2010.
287. León H.V., Hernández-Cerón J., Keislert D.H., Gutierrez C.G.: *Plasma concentrations of leptin, insulin-like growth factor-I, and insulin in relation to changes in body condition score in heifers*. J Anim Sci, 82(2): 445-451, 2004.
288. Kupczyński R., Adamski M., Falta D., Chládek G., Kruszyński W.: *The influence of condition on the metabolic profile of Czech Fleckvieh cows in the perinatal period*. Archiv Tierzucht 54(5): 456-467, 2011.
289. Hammon H.M., Bellmann O., Voigt J., Schneider F., Kühn C.: *Glucose-Dependent Insulin Response and Milk Production in Heifers Within a Segregating Resource Family Population*. J Dairy Sci, 90: 3247–3254, 2007.
290. Paterson J.Y.F., Linzell J.L.: *Cortisol secretion rate, glucose entry rate, and the mammary uptake of cortisol and glucose during pregnancy and lactation in dairy cows*. J. Endocrinol. 62: 371-383, 1974.

291. Ray D.B., Jansen R.W., Horst I.A., Mills N.C., Kowal J.: Complex noncoordinate regulation of α -lactalbumin and 25 K β -casein by corticosterone, prolactin, and insulin in long term cultures of normal rat mammary cells. *Endocrinology* 118: 393-407, 1986.
292. Armstrong D.G., Gong J.G., Webb R.: *Interactions between nutrition and ovarian activity in cattle: physiological, cellular and molecular mechanisms*. *Reprod Suppl.*, 61: 403-414, 2003.
293. Beam S.W., Butler W.R.: *Energy balance, metabolic hormones, and early postpartum follicular development in dairy cows fed prilled lipid*. *J Dairy Sci*, 81(1): 121-131, 1998.
294. Kawashima C., Sakaguchi M., Suzuki T., Sasamoto Y., Takahashi Y., Matsui M., Miyamoto A.: *Metabolic profiles in ovulatory and anovulatory primiparous dairy cows during the first follicular wave postpartum*. *J Reprod Dev.*, 53(1): 113-120, 2007.
295. Kadivar A., Ahmadi M.R., Gheisari H.R., Nazifi S.: *Assessment of IGF-I as a factor influencing postpartum reproductive performance and ovarian condition in dairy cattle*. *Comparative Clinical Pathology*, 21(5): 589-596, 2012.
296. Santos J.E.P., Rutigliano H.M., Sá Filho M.F.: *Risk factors for resumption of postpartum cyclicity and embryonic survival in lactating dairy cows*. *Anim Reprod Sci*, 110: 207-221, 2009.
297. Ribeiro E.S., Lima F.S., Ayres H., Greco L.F., Bisinotto R.S., Favoreto M., Marsola R.S., Monteiro A.P.A., Thatcher W.W., Santos J.E.P.: *Effect of postpartum diseases on reproduction of grazing dairy cows*. *J Dairy Sci*, 94(E-Suppl. 1):63 (Abstr.), 2011.
298. Goff J.P.: *Major Advances in Our Understanding of Nutritional Influences on Bovine Health*. *J Dairy Sci*, 89: 1292-1301, 2006.

9.BIOGRAFIJA (*CURRICULUM VITAE*) AUTORA

Marko R. Cincović, rođen u Priboju na Limu, 07.09.1984. godine. Posle preseljenja, osnovnu školu završio u Mramorku 1999. godine, a četiri godine kasnije srednju veterinarsku školu u Pančevu, kao učenik generacije. Školske 2003/04 upisao Veterinarsku medicinu na Departmanu za veterinarsku medicinu Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu. Diplomirao u roku, sa prosečnom ocenom 9,29. Nagrađivan od Poljoprivrednog fakulteta i Univerziteta u Novom Sadu za izrađene naučne temate. Školske 2006/07 proglašen za najboljeg studenta Poljoprivrednog fakulteta. Školske 2009/10 upisao doktorske studije u istoj instituciji i položio sve ispite sa prosečnom ocenom 10,00. Bio stipendista Ministarstva nauke R.Srbije kao istraživač-doktorant. Od 2010. godine zaposlen na Departmanu za veterinarsku medicinu Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu na užoj oblasti Patologija – predmet Patološka fiziologija. Stručni ispit položio 2011. godine pred komisijom Uprave za veterinu Ministarstva poljoprivrede R.Srbije. Autor ili koautor više desetina radova i saopštenja domaćeg i međunarodnog karaktera, jedne monografije i dva pomoćna udžbenika iz oblasti u kojoj je biran u nastavno zvanje. Obavio nekoliko studijskih boravaka i kurseva u zemlji i inostranstvu. Učestvovao na projektima finansiranim od strane Ministarstva nauke R. Srbije i pokrajinskog sekretarijata za nauku AP Vojvodine. Specijalističke studije upisao na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu školske 2012/13 godine. Oženjen, sa suprugom Kićom ima ćerku Mionu i dalje planove.