



UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET
DEPARTMAN ZA VETERINARSKU MEDICINU

**PRIMENA KETOPROFENA U KONTROLI AKUTNOG INFLAMATORNOG
ODGOVORA I METABOLIČKOG STRESA KOD KRAVA POSLE TELJENJA
DOKTORSKA DISERTACIJA**

Mentor: prof. dr Dragica Stojanović
doc. dr Marko Cincović

Kandidat: Zorana Kovačević

Novi Sad, 2016. godine

UNIVERZITET U NOVOM SADU

образец 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	Zorana Kovačević
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Dr Dragica Stojanović, redovni profesor Dr Marko Cincović, docent
Naslov rada: NR	Primena ketoprofena u kontroli akutnog inflamatornog odgovora i metaboličkog stresa kod krava posle teljenja
Jezik publikacije: JP	Srpski jezik
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2016.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	21000 Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8

Fizički opis rada: FO	9 poglavlja , 102 stranice, 8 tabela, 28 slika, 280 citiranih referenci
Naučna oblast: NO	Medicina - Veterinarska medicina
Naučna disciplina: ND	Farmakologija i toksikologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	ketoprofen, krava, inflamatorni odgovor, metabolički stres
UDK	636.09:57.017.7:599.735.5(043.3)
Čuva se: ČU	Biblioteka Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu
Važna napomena: VN	/
Izvod: IZ	Tokom perioda rane laktacije brojni unutrašnji i spoljašnji faktori vrše uticaj na produktivnost i zdravlje mlečnih krava. Najznačajniji unutrašnji faktori na početku laktacije su zapaljenski procesi i metabolički stres. S obzirom da su metaboličke i imunološke promene najčešći okidač za nastanak bolesti, neophodno je bilo ispitati da li postoji mogućnost regulisanja ovih promena pomoću nesterodinih antiinflamatornih lekova. Cilj ove doktorske disertacije je bio da se ispita uticaj parenteralne primene ketoprofena na metabolički status, inflamatorne promene, odnos između metaboličkih i inflamatornih promena kod krava posle teljenja, kao i na proizvodnju mleka kod krava u ranoj laktaciji. Za ogled je odabrano 30 krava. Oglednoj grupi od 15 krava je i.m. aplikovan ketoprofen u terapijskoj dozi (3mg/kg telesne mase) tokom tri uzastopna dana nakon teljenja. Kontrolna grupa od 15 krava je predstavljala negativnu kontrolu. Uzorci krvi za analizu su uzimani iz repne vene (<i>vena coccygea</i>) na dan teljenja, u prvoj i drugoj nedelji posle teljenja. Procena inflamacije je vršena na osnovu određivanja koncentracije proteina akutne faze (haptoglobina i fibrinogena) i proinflamatornih citokina (interleukina-1 α , faktora nekroze tumora-alfa i interferona gama), dok je procena

	metaboličkog statusa vršena na osnovu određivanja vrednosti metaboličkih parametara u svim uzorcima krvnog seruma i u svim nedeljama oglada. Ketoprofen primenjivan parenteralno kod krava posle teljenja je ublažio metabolički stres, uticao na smanjenje inflamatornih procesa i na smanjenje međusobne povezanosti i uticaja između metaboličkih i inflamatornih promena kod krava posle teljenja u poređenju sa netretiranim kravama, a imao je i pozitivan uticaj na proizvodnju mleka u ranoj laktaciji.
Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	28.03.2014.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	<p>Predsednik komisije: Prof. dr Milanka Jezdimirović, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Beograd</p> <hr/> <p>Mentor: Prof. dr Dragica Stojanović, redovni profesor, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad</p> <hr/> <p>Mentor: Doc. dr Marko Cincović, docent, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad</p> <hr/> <p>Član: Prof. dr Branislava Belić, redovni profesor, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad</p> <hr/> <p>Član: Prof. dr Radojica Đoković, redovni profesor, Agronomski fakultet, Čačak</p> <hr/>

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	Zorana Kovacevic
Mentor: MN	Dr Dragica Stojanovic, full professor Dr Marko Cincovic, assistant professor
Title: TI	Ketoprofen application in control of acute inflammatory response and metabolic stress in cows after calving
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Autonomous Province of Vojvodina
Publication year: PY	2016.
Publisher: PU	Authors reprint
Publication place: PP	21000 Novi Sad, Dositej Obradović sq. 8

Physical description: PD	9 chapters, 102 pages, 8 tables, 28 pictures, 280 cited references
Scientific field SF	Veterinary medicine
Scientific discipline SD	Pharmacology and Toxicology
Subject, Key words SKW	ketoprofen, cows, inflammatory response, metabolic stress
UC	636.09:57.017.7:599.735.5(043.3)
Holding data: HD	Library at Faculty of Agriculture Novi Sad
Note: N	/
Abstract: AB	<p>During the period of early lactation numerous internal and external factors influence the health and productivity of dairy cows. The most important internal factors at the beginning of lactation are inflammatory processes and metabolic stress. Since the metabolic and immunologic changes are the most common trigger for the disease, it was necessary to examine whether there is a possibility of regulating these changes by using non-steroidal anti-inflammatory drugs. The aim of this doctoral thesis was to investigate the effect of parenteral administration of ketoprofen in the metabolic status, inflammatory changes, the relationship between metabolic and inflammatory changes in cows after calving and milk production in cows in early lactation. This study included 30 cows. Experimental group of 15 cows is treated i.m. ketoprofen administered in a therapeutic dose (3 mg / kg body weight) for three consecutive days after calving. A control group of 15 cows accounted for a negative control. Blood samples for analysis were taken from the tail vein (<i>vena coccygea</i>) on the day of calving, in the first and second week after calving. Evaluation of inflammation was based on the determination of the concentration of acute phase proteins (haptoglobin and fibrinogen) and proinflammatory cytokines (interleukin-1α,</p>

	<p>tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma), and the evaluation of the metabolic status performed on the basis of determining the value of metabolic parameters in a blood sample serum and in all the weeks of the experiment. Ketoprofen administered parenterally in cows after calving eased metabolic stress, had impact on reducing inflammatory processes and the decrease of interconnection and influence between metabolic and inflammatory changes in cows after calving compared with untreated cows, and had a positive impact on milk production in the early lactation.</p>
Accepted on Scientific Board on: AS	28.03.2014.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>President: Dr Milanka Jezdimirovic, full professor, Faculty of Veterinary Medicine, Beograd</p> <p>_____</p> <p>Mentor: Dr Dragica Stojanovic, full professor, Faculty of Agriculture, Novi Sad</p> <p>_____</p> <p>Mentor: Dr Marko Cincovic, assistant professor, Faculty of Agriculture, Novi Sad</p> <p>_____</p> <p>Member: Dr Branislava Belic, full professor, Faculty of Agriculture, Novi Sad</p> <p>_____</p> <p>Member: Dr Radojica Djokovic, full professor, Faculty of Agronomy, Cacak</p> <p>_____</p>

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Metaboličke promene u peripartalnom periodu kod krava	3
2.2. Inflamatorne promene u peripartalnom periodu kod krava	7
2.3. Korelacija metaboličkih i inflamatornih promena u peripartalnom periodu kod krava.....	13
2.4. Faktori koji utiču na inflamatorni odgovor.....	15
2.5. Kontrola inflamatornog i metaboličkog procesa kod krava u ranoj laktaciji.....	16
2.6. Tretman inflamatornog i metaboličkog procesa kod krava u ranoj laktaciji različitim grupama NSAIL	17
2.7. Ketoprofen i njegova farmakološka svojstva	24
2.7.1. Ketoprofen	24
2.7.2. Farmakodinamika ketoprofena	25
2.7.3. Farmakokinetika ketoprofena	26
2.7.4. Neželjena dejstva ketoprofena	29
3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA.....	31
4. MATERIJAL I METODE	33
4.1. Odabir krava, uslovi držanja i nege i etička dozvola	33
4.2. Aplikacija ketoprofena	33
4.4. Određivanje koncentracije proteina akutne faze i citokina.....	34
4.5. Određivanje koncentracije metaboličkih i hematoloških parametara.....	37
4.6. Praćenje proizvodnje mleka.....	39
4.7. Statistička obrada podataka	40
5. REZULTATI.....	41
5.1. Uticaj ketoprofena na metaboličke parametre kod krava u ranoj laktaciji	41
5.2. Uticaj ketoprofena na inflamatorne i hematološke parametre kod krava u ranoj laktaciji	46
5.3. Ispitivanje relacije metaboličkih i inflamatornih parametara u funkciji upotrebe ketoprofena	51
5.4. Uticaj ketoprofena na proizvodnju mleka kod krava.....	58
6. DISKUSIJA	59
6.1. Uticaj ketoprofena na metaboličke promene kod krava u ranoj laktaciji	59
6.2. Uticaj ketoprofena na inflamatorne i hematološke parametre kod krava u ranoj laktaciji	62
6.3. Ispitivanje relacije metaboličkih i inflamatornih parametara u funkciji upotrebe ketoprofena	66
6.4. Uticaj ketoprofena na proizvodnju mleka kod krava.....	73
7. ZAKLJUČCI.....	75
8. LITERATURA	76
9. BIOGRAFIJA (<i>CURRICULUM VITAE</i>) AUTORA	102

1. UVOD

Period od tri nedelje pre do tri nedelje posle teljenja se smatra tranzicionim periodom. Tokom ovog perioda, krave napuštaju period partusa i ulaze u laktacioni period, prolazeći kroz brojna fiziološka prilagođavanja, odnosno endokrine promene usled teljenja i metaboličke promene usled naglog povećanja energetske potrebe koje su neophodne za produkciju mleka (Drackley, 1999; Ingvarstsen, 2006; Mulligan i Dhoerty, 2008). Poznato je da krave u ranoj laktaciji uzimaju manje hrane nego što im je potrebno za proizvodnju mleka, što značajno utiče na promenu energetske i metaboličke statusa (Cincović i sar., 2011; Cincović i sar., 2012). Navedene nagle, a često i drastične promene u periodu rane laktacije, mogu dovesti do pojave metaboličkih i infektivnih oboljenja koja štetno utiču na zdravlje i produktivnost krava.

Većina ovih oboljenja u svojoj osnovi ima poremećaj metabolizma, kao što su sindrom debelih krava (ketoza, masna jetra) ili naglašeni inflamatorni odgovor (mastitis, metritis i ostale upale koje mogu dovesti do pojave sepse ili septičnog šoka). Pojačani inflamatorni odgovor može potencirati nastajanje metaboličkih promena ili obrnuto. S obzirom da su metaboličke i imunološke promene najčešći okidač za nastanak bolesti, neophodno je ispitati da li postoji mogućnost regulisanja ovih promena pomoću određenih farmakološki aktivnih supstanci.

U veterinarskoj medicini postoji široka primena nesteroidnih antiinflamatornih lekova (NSAIL) u terapijske svrhe, jer je poznato da oni pored antiinflamatornog, imaju i antipiretički, analgetički i antiagregacijski efekat. U kliničkim uslovima je dokazano da su krave nakon teljenja podložne razvoju metaboličkih i inflamatornih promena, a da su NSAIL farmakološka grupa lekova koja podjednako utiču na oba procesa. Jedan od predstavnika NSAIL je ketoprofen i u širokoj je upotrebi u veterinarskoj medicini.

Prema podacima iz literature, dosadašnja istraživanja o primeni ketoprofena kod krava se odnose na bezbednost primene (Pyorala i sar. 1999; Singh i sar., 2009; Paresh i sar., 2012) farmakokinetička i farmakodinamska svojstva (Landoni i sar., 1995; Landoni i Less, 1995; Igarza i sar., 2004; Rehman i sar., 2013; Singh i sar., 2014) i uticaj na prinos mleka i plodnost (Richards i sar., 2009; Carpenter i sar., 2016). Takođe, ispitan je uticaj ovog leka na bol (Newby i sar., 2013) i procese inflamacije (Donalisio i sar., 2013; Banting i sar., 2008). Druga

istraživanja kod krava, kao što su kontrola akutnog inflamatornog bola i metaboličkog stresa nedostaju sa ketoprofenom.

Prema navedenim podacima, postoji pretpostavka da primena ketoprofena u periodu rane laktacije kod krava može značajno da ublaži inflamatorne procese i metabolički stres, a samim tim i da smanji rizik od nastanka oboljenja karakterističnih za peripartalni period.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Metaboličke promene u peripartalnom periodu kod krava

Tokom peripartalnog perioda dominiraju procesi homeoreze koji se ogledaju u povećanoj lipidnoj mobilizaciji i ketogenezi, uz povećanu koncentraciju neesterifikovanih masnih kiselina (NEFA) i beta-hidroksibutirata (BHB) u krvi. Tome doprinosi i deponovanje viška energije u vidu masnog tkiva, posebno u periodu kasne laktacije i zasušenja, što može dovesti organizam u stanje metaboličkog prestrojavanja, oksidativnog stresa, imunosupresije i inflamacije (Cincović, 2013). Tokom ovog perioda, organizam mlečnih krava je podložan nastanku infektivnih bolesti, delimično i zbog depresije imunološkog sistema (Goff i Horst, 1997).

Nakon partusa, zbog početka laktacije, krave imaju povećane potrebe za energijom i često, organizam krava nije u stanju da zadovolji ove energetske potrebe putem ishrane, te one ulaze u stanje poznato kao negativni energetski bilans. Pored toga, u tranzicionom periodu se obično javljaju i suboptimalni nivoi minerala (Bell, 1995; Goff, 2006a). Najčešći poremećaji, nastali u ovom periodu, su masna jetra (masna infiltracija i degeneracija ćelija jetre), ketoza, mlečna groznica, acidoza rumena, dislokacija sirišta, metritis i mastitis (Ingvarsen, 2006; Mulligan i Doerti, 2008). Ovi poremećaji su međusobno povezani, tako da krave koje pate od jednog oboljenja imaju veći rizik za nastanak drugog zdravstvenog poremećaja (Bobe i sar., 2004).

Negativan energetski bilans delimično nastaje i smanjenim unosom suve materije u vreme teljenja kao posledica stresa (Grummer i sar., 2004), što dovodi do poremećaja nutritivnog, metaboličkog i energetskog stanja i povećanja predispozicija krava za nastanak metaboličkih poremećaja (Goff i Horst, 1997; Rukkwamsuk i sar., 1999). Takođe, nastalo stanje se može pogoršati povećanim potrebama za proizvodnjom mleka u ranoj laktaciji, što dovodi do promena u homeostazi svih organskih i neorganskih materija u organizmu, a koje predstavljaju potencijalni izvor energije (Bell, 1995; Leroy i sar., 2008). Pre svega, dolazi do pada koncentracije glukoze, pošto se oko 85% glukoze prisutne u organizmu koristi za stvaranje i sekreciju mleka u mlečnoj žlezdi (Bell, 1995; Sordillo i sar., 2009).

Fiziološka koncentracija glukoze u krvi preživara je niža nego kod mladih preživara i nepreživara i iznosi od 2,4 do 4,2 mmol/L (Radostits i sar., 2000; Kaneko i sar., 2008). Kod zdravih krava u različitim fazama proizvodno reproduktivnog ciklusa, tokom visokog graviditeta, teljenja, u puerperijumu i tokom perioda laktacije postoje značajne razlike u glikemiji. Kod zdravih krava, glikemija je tokom visokog graviditeta u fiziološkim granicama i odlika je uravnoteženog energetskog metabolizma sa normalnim odvijanjem procesa glukoneogeneze (Nafikov i Beitz, 2007) i iznosi 2,81 mmol/L (Šamanc i sar., 1993). Za vreme teljenja dolazi do naglog porasta glukoze u krvi, što je najverovatnije posledica stresa koji se dešava usled hormonalnih promena, odnosno povećanja koncentracije glukokortikoida i drugih hormona stresa, a koji podstiču glukoneogenezu i glikogenolizu (Vazguezanon i sar., 1994). Prema Šamanc i sar. (1993), prosečna glikemija posle teljenja iznosi 2,41 mmol/L. Naime, nakon teljenja i u ranoj fazi laktacije koncentracija glukoze je niža kod mlečnih krava u odnosu na period pre teljenja (Šamanc i sar., 2011).

Tokom negativnog energetskog bilansa, kako bi se nadoknadio nedostatak energije, u organizmu krava se više mobilizuju masne kiseline iz masnog tkiva i one se u plazmi oslobađaju kao NEFA. Koncentracija NEFA se povećava pre teljenja, a najviša je tokom prve do treće nedelje posle partusa (Cavestany i sar., 2005). Ustanovljeno je da je koncentracija NEFA značajno veća u ranoj laktaciji u odnosu na period zasušenja, a posledica je intenzivirane lipolize nastale neposredno posle teljenja (Ospina i sar., 2010). Iako je povećanje koncentracije NEFA deo fiziološkog odgovora neophodnog za nadoknadu većih energetskih potreba na početku laktacije, ovo povećanje i njihovo nakupljanje u parenhimatoznim organima u obliku triglicerida može biti štetno ili toksično za periferna tkiva i može negativno da utiče na zdravlje i na plodnost (Adewuyi i sar., 2005). U jetri, NEFA podležu procesu oksidacije do ugljen dioksida i vode, nepotpune oksidacije i stvaranja ketonskih tela ili esterifikacije do triglicerida.

Delimična oksidacija NEFA dovodi do stvaranja ketonskih tela kao što su β -hidroksi buterna kiselina (BHB), acetoacetat i acetat, u koncentracijama višim od fizioloških, koja se oslobađaju iz jetre i služe perifernim tkivima kao izvor energije. Drugi izvor BHB u krvi je buterna kiselina u buragu koja se prilikom apsorpcije kroz zid rumena transformiše u BHB. Prema podacima iz literature (Ospina i sar., 2010), kretanje fizioloških vrednosti koncentracija BHB u krvi kod krava na početku laktacije iznosi od 0,6 mmol/L do 1 mmol/L. Ove vrednosti ukazuju na umerenu mobilizaciju masti iz telesnih rezervi. Kod krava u poslednjem mesecu

graviditeta, kada se rezerve masti održavaju ili čak povećavaju, koncentracija BHB je niža od 0,6 mmol/L i smatra se takođe fiziološkom (Ospina i sar. 2010). Međutim, ukoliko je koncentracija glukoze niska, smanjuje se količina oksalacetata i u jetri se proizvodi više ketonskih tela, kako bi se zadovoljile energetske potrebe organizma. Naime, dokazano je da se koncentracija BHB u krvi povećava posle teljenja i da maksimalan nivo dostiže u periodu od 2 do 4 nedelje posle teljenja (Cavestany i sar., 2005). Povišena koncentracija ketonskih tela u kombinaciji sa niskom koncentracijom glukoze u cirkulaciji kod krava tokom peripartalnog perioda može dovesti do nastanka ketoze (Ingvarstsen, 2006). Krave sa subkliničkom ketozom imaju vrednosti BHB više od 1,2 mol/L (Oetzel, 2004), dok krave sa kliničkim znacima ketoze imaju koncentracije BHB koje su više od 2,6 mmol/L (Duffield, 2000; Oetzel, 2004).

In vitro je utvrđeno da peroksizomi jetre imaju značajan kapacitet za β -oksidaciju (Grum i sar., 1996; Drackley i sar., 2001). Preuzimanje NEFA od strane jetre raste pred teljenje, što je prema nekim podacima iz literature verovatno posledica povećanog protoka krvi (Emery i sar., 1992; Ingvarstsen, 2006). Deo masnih kiselina koje preuzima jetra podležu procesu oksidacije u mitohondrijama ili u peroksizomima. Trigliceridi se potom ili skladište u jetri ili bivaju inkorporirani u lipoproteine vrlo male gustine (VLDL) i na taj način dospevaju iz hepatocita u cirkulaciju. Kada je vezivanje masnih kiselina u jetri veće od sposobnosti jetre da ih oksidiše ili transportuje iz jetre putem VLDL frakcije lipoproteina, trigliceridi se kumuliraju u njoj i razvija se masna jetra. Sinteza VLDL u jetri preživara je veoma ograničena u poređenju sa drugim životinjskim vrstama, što za posledicu ima brže nakupljanje triglicerida u hepatocitima, posebno tokom prve tri nedelje od teljenja. U tom periodu je priliv masnih kiselina u jetri povećan i krave sa najvećom koncentracijom lipida u jetri imaju najnižu koncentraciju lipoproteina u plazmi (Marcos i sar., 1990). Samim tim, koncentracije triglicerida i holesterola u serumu krava tokom peripartalnog perioda se smanjuju zbog kumulacije, odnosno smanjene produkcije VLDL. Prema literaturnim podacima, niska koncentracija holesterola može biti povezana sa metaboličkim poremećajima (Itoh i sar., 1998), masnom jetrom (Bobe i sar., 2004; Grum i sar., 1996), kao i unosom hrane (Janovick Guretzki i sar., 2006). Naime, dokazano je da je koncentracija holesterola niska tokom teljenja i povećava se sporo tokom prvih nedelja od teljenja (Van Kneysel i sar., 2007).

Kod krava sa visokim stepenom lipidne mobilizacije utvrđena je niža koncentracija metabolita u serumu, kao što su glukoza, ukupni proteini, albumini i urea u odnosu na krave sa

niskim stepenom lipomobilizacije (Gonzalez i sar., 2011). Smanjenje koncentracije navedenih metabolita je pokazatelj sekretorne sposobnosti ćelija jetre i mogu biti značajni prilikom postavljanja dijagnoze masne infiltracije jetre i ketoze kod krava (West 1990; Adewuyi i sar., 2005). Prema rezultatima Hilary (1990), usled masne infiltracije jetre dolazi do smanjene sinteze uree putem ornitinskog Krebsovog ciklusa i koncentracija ovog metabolita u krvi posle teljenja je zabeležena u vrednosti od $3,4 \pm 0,36$ mmol/L i niža je u odnosu na period zasušenja ($5,1 \pm 0,47$ mmol/L). Do sličnih rezultata su došli i Celeska i sar. (2015) koji su ustanovili da je 5 dana pre teljenja prosečna koncentracija uree $4,78 \pm 1,83$ mmol/L, 5 dana posle teljenja koncentracija je bila niža i iznosila je $3,90 \pm 1,02$ mmol/L, odnosno 10 i 30 dana posle teljenja te vrednosti su bile povišene i iznosile su $4,09 \pm 2,06$ mmol/L i $4,73 \pm 1,95$ mmol/L.

U ispitivanju funkcionalnog stanja ćelija jetre, veliku važnost imaju intracelularni enzimi kao što su aspartat aminotransferaza (AST), gama-glutamil transferaza (GGT), laktat dehidrogenaza (LDH) i drugi, čije se aktivnosti u krvnom serumu obično povećavaju usled oštećenja ćeliskih membrana hepatocita. Iako se praćenje aktivnosti AST koristi za detekciju patoloških stanja, aktivnost transaminaza može da zavisi i od fiziološkog stanja životinja (graviditeta, partusa i puerperijuma). Naime, Peterson i Waldern (1981) su uočili da aktivnost AST kod krava zavisi od fiziološkog stanja organizma i njegove interakcije sa ishranom, te da tokom graviditeta i zasušenja nastaje pad aktivnosti ovog enzima. Neki autori su uočili da je došlo do povećanja aktivnosti AST (Tainturier i sar., 1984; Jacob i sar., 2001), dok su drugi (Sevinc i sar., 1999) uočili pad aktivnosti ovog enzima tokom postpartalnog perioda kod krava. Prema Kaneko i sar. (1997), aktivnost AST u plazmi mlečnih krava kreće se od 80 do 130 IU/L.

Alanin aminotransferaza (ALT), iako nije enzim specifičan za jetru, koristi se u cilju otkrivanja oštećenja hepatocita kod goveda (Komatsu i sar., 2002; Bobe i sar., 2004). Aktivnost ovog enzima raste u krvi krava tokom peripartalnog perioda, dok je u drugim produkcionim periodima životinja zabeležena neznatna aktivnost (Geishauser i sar., 1999; Cavestany i sar., 2005). Prema Tainturier i sar. (1984), aktivnost ALT se značajno smanjuje u sedmom i osmom mesecu graviditeta i na početku laktacije. U istraživanju Stojević i sar. (2005), najniža aktivnost ALT je izmerena tokom perioda rane laktacije, dok je aktivnost ovog enzima povećana u drugom i trećem periodu laktacije. Aktivnost ALT u periodu zasušenja je smanjena, ali je i dalje statistički značajno viša nego u prvom periodu laktacije i kretala se od 5,24 do 29,68 IU/L.

Takođe, u istraživanju ovih autora zabeležena srednja vrednost AST je bila $14,89 \pm 5,88$ IU/L, dok u istraživanju Kaneko i sar. (1997) je bila 27 ± 14 IU/L.

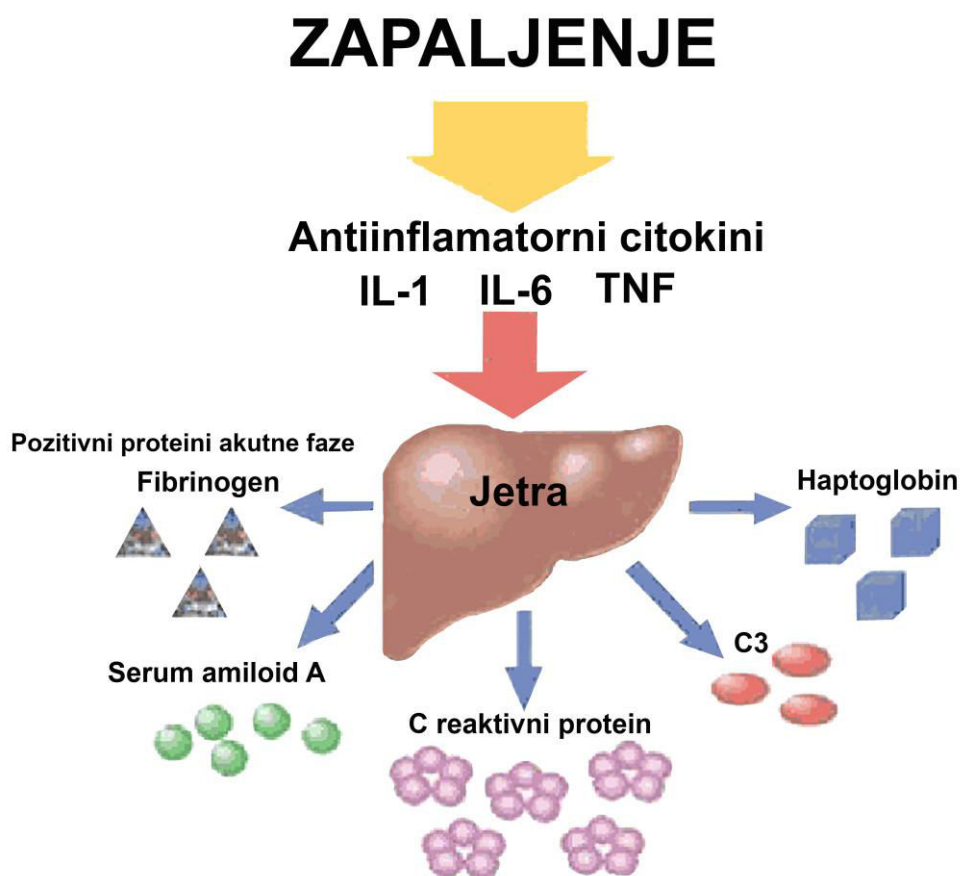
Pored promene u aktivnosti enzima, tokom peripartalnog perioda kod mlečnih krava dolazi i do promena u metabolizmu mineralnih materija, pre svega kalcijuma i fosfora. Prema podacima iz literature, hipokalcemija je posledica povećane aktivnosti mlečne žlezde i smanjene apsorpcije kalcijuma iz digestivnog trakta (Radojčić i sar., 2009). Fiziološke vrednosti koncentracija kalcijuma u krvi krava tokom peripartalnog perioda iznose 2,1 do 2,5 mmol/L (Quiroz-Rocha i sar., 2009; Cincović i sar., 2011). Nastala hipokalcijemija dovodi do povećanja koncentracije paratireoidnog hormona (PTH), koji povećava ekskreciju fosfora sa posledičnom hipofosfatemijom. Peterson i Waldern (1981) su pratili uticaj fiziološkog stanja na koncentraciju fosfora u krvnom serumu i ustanovili da je koncentracija fosfora najniža u puerperijumu (1,62 mmol/L), da se sredinom laktacije (1,79 mmol/L) postepeno povećava, da bi maksimalni nivo dostigla u periodu zasušenja (2,0 mmol/L). Prema drugim literaturnim podacima, tokom peripartalnog perioda zabeležene koncentracije fosfora u krvi su se kretale od 1,3 do 2,6 mmol/L (Goff, 2006a).

2.2. Inflamatorne promene u peripartalnom periodu kod krava

Krave tokom laktirajućeg perioda imaju veoma aktivan imunološki sistem koji ih štiti od raznih mikroorganizama i štetnih stimulusa. Poznato je da imunološki sistem čine urođeni i stečeni imunološki odgovor. Komponente urođenog imunološkog odgovora su leukociti, citokini, eikosanoidi, kao i neimunološke ćelije (epitelne i endotelne) i one obezbeđuju početni, nespecifični odgovor na dejstvo patogena (Sordillo i sar., 2009). Postoji mnogo načina na koje različiti poremećaji tokom peripartalnog perioda kod krava mogu da pokrenu inflamatorni odgovor. Metritis i mastitis pokreću neposredno akutni inflamatorni odgovor u borbi protiv patogena, što ima za posledicu promene u metabolizmu lipida i glukoze (Hardardottir i sar., 1994). Pokretanje akutnog inflamatornog odgovora dovodi do povećanja koncentracije glukoze, a potom sledi hipoglikemija (Kushibiki i sar., 2000), dok pojačana lipoliza u masnom tkivu dovodi do povećanja koncentracije NEFA u plazmi. Visoki nivoi ovih masnih kiselina mogu da pokrenu inflamatorni put nukleranog faktora- κ B (NF- κ B), aktiviraju receptore slične Toll-u (Toll-like receptors, TLR) i ciklooksigenazne puteve što ima za posledicu oslobađanje

proinflammatory citokina. Prema podacima iz literature, inflamatorni put NF- κ B predstavlja vezu između inflamacije i metaboličkih bolesti (Baker i sar., 2011) i direktno je uključen u nastanak insulinske rezistencije (Arkan i sar., 2005). Utvrđeno je da masne kiseline i faktor nekroze tumora- α (TNF- α) aktiviraju kinazu koja fosforiliše inhibicioni protein κ B- β (IKK- β), smanjuju fosforilaciju tirozina putem supstrata receptora za insulin-1 (IRS-1) i utiču na povećanje koncentracije ceramida. Navedene promene dovode do inhibicije aktivacije protein kinaze B i utiču na smanjenje translokacije transportnog molekula za glukozu (GLUT-4), a time dovode i do smanjenja insulinske rezistencije (Shulman, 2000).

Pored TNF- α , u proinflammatory citokine koji su esencijalni za pokretanje sistemskog inflamatornog odgovora spadaju i interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) i interferon- γ (IFN- γ) (Koj, 1996; Kushibiki i sar., 2000). Jedan od efekata citokina je da pokreću sintezu pozitivnih proteina akutne faze (haptoglobin, fibrinogen, C-reaktivni protein i serum amiloid A) (Slika 1), a smanjuju sintezu negativnih proteina akutne faze (albumin, prealbumin, retinol vezujući protein i transferin) (Petersen i sar., 2004; Eckersall i Bell, 2010).



Slika 1. Stimulacija i sinteza proteina akutne faze tokom inflamacije (Hengst J.M., 2003)

Haptoglobin, kao jedan od predstavnika proteina akutne faze čija se koncentracija povećava tokom infekcije (Burtis i Ashwood, 1999), ispoljava bakteriostatski efekat sprečavanjem gubitka gvožđa putem formiranja kompleksa sa hemoglobinom (Wassell, 2000). Kod goveda, povećana koncentracija haptoglobina u plazmi je utvrđena posle traume (Fisher i sar., 2001; Earley i Crowe, 2002), eksperimentalne, lokalne, aseptičke inflamacije (Heegaard i sar., 2000) i posle različitih inflamatornih oboljenja (pneumonija, peritonitis i apces) (Alsemgeest i sar., 1994). Naime, u istraživanju koje su sproveli Nazifi i sar. (2008) koncentracija haptoglobina je bila značajno viša kod krava obolelih od različitih inflamatornih oboljenja ($0,94 \pm 0,1$ mg/L), u odnosu na klinički zdrave životinje ($0,2 \pm 0,3$ mg/L). Dokazano je i da je koncentracija ovog proteina bila povećana u serumu krava obolelih od mastitisa različite etiologije u odnosu na klinički zdrave životinje (Heegaard i sar., 2000; Ohtsuka i sar., 2001). Prema Grönlund i sar. (2003), koncentracija ovog proteina tokom akutnog mastitisa iznosi $0,965$ mg/mL, a tokom hroničnog $0,07$ mg/mL.

Proučavanje koncentracije proteina akutne faze tokom graviditeta, partusa i perioda laktacije predstavlja sve veći predmet interesovanaja istraživača. Još su Uchida i sar. (1993) ustanovili da se kod krava tokom partusa povećavaju koncentracije haptoglobina koje su veće od onih zabeleženih pre i posle partusa. Takođe, i drugi autori (Ametaj i sar., 2005; Kovac i sar., 2009) su ustanovili da su koncentracije haptoglobina i serum amiloida A značajno povećane tokom ranog postpartalnog perioda (do 10 nedelja posle partusa), u poređenju sa kasnijim postpartalnim periodom kod klinički zdravih životinja. Kod krava koje su dobijale intramuskularno (i.m.) lizin acetil-salicilata (LAS) u prvih 5 dana laktacije zabeležena je značajno niža koncentracija proteina akutne faze, haptoglobina i ceruloplazmina, u odnosu na kontrolnu grupu (Bertoni i sar., 2004). Trevisi i sar. (2005) su zabeležili znatno manje povećanje koncentracije haptoglobina u grupi krava koje su tretirane sa 25 g acetil salicilne kiseline/životinja/dan, tokom 5 dana posle partusa, u odnosu na kontrolnu grupu krava.

Fibrinogen, kao i haptoglobin, predstavlja jedan od pozitivnih proteina akutne faze (Hayes, 1994). Pored dobro poznate uloge u procesu hemostaze, dokazano je i njegovo učešće u regulaciji inflamatornog odgovora (McSherry i sar., 1970). Fibrinogen je prekursor fibrina, proteina za koji je dokazano da aktivira neutrofile aktivacijom TLR, dok na funkciju leukocita najverovatnije utiče preko integrin CD11b/CD18 (α M β 2) receptora. Smatra se da aktivacijom

ovih receptora indukuje intracelularnu mobilizaciju kalcijuma, utiče na fosforilaciju, aktivaciju NF- κ B, kao i na oba ćelijska procesa, adheziju i migraciju (Flick i sar., 2004). Već dugi niz godina, zbog svega navedenog, fibrinogen se koristi kod krava za procenu traumatskih i inflamatornih stanja (Hirvonen i sar., 1998). Povećanje koncentracije ovog proteina, pre svega je zabeleženo kod inflamatornih oboljenja, kao što su peritonitis, endokarditis, perikarditis, pneumonija i nefritis (McSherry i sar., 1970).

McSherry i sar. (1970) su ispitujući koncentraciju fibrinogena u plazmi 160 obolelih krava uočili da su mnoge bolesti povezane sa povišenim nivoom, ali i da su kod krava sa perikarditisom i peritonitisom zabeležene približno iste koncentracije fibrinogena. Kod osam krava sa perikarditisom zabeležena koncentracija fibrinogena se kretala u vrednosti od 9,25 do 16,75 g/L, a kod 33 krave (od ukupno 44 obolelih od peritonitisa) utvrđena koncentracija fibrinogena je bila iznad 8,0 g/L (u opsegu 8,4 do 31,25 g/L), odnosno kod 70% životinja koncentracija ovog proteina je bila iznad 10 g/L. Jeremejeva i sar. (2015) su utvrdili da koncentracija fibrinogena kod klinički zdravih krava u prvoj nedelji posle teljenja iznosi 5,8 g/L, dok u drugoj nedelji iznosi 5,6 g/L, odnosno da je koncentracija ovog proteina signifikantno viša kod krava sa akutnim puerperalnim metritisom.

Kao što je već napomenuto, u mnogim istraživanjima je dokazano da su citokini odgovorni za inflamatorne promene i za aktivaciju imunoloških ćelija (Ishikawa i sar., 2004). Kao i ostali citokini, TNF- α nastaje kao odgovor na jake stimulse, kao što su bakterijski, virusni, gljivični, parazitski ili neoplastični agensi (Underhill i Ozinsky, 2002). U istraživanju koje su sproveli Kim i sar. (2005), koncentracija TNF- α u kontrolnoj grupi krava je linearno opadala od prve do četvrte nedelje posle partusa, dok u grupi krava sa endometritisom nije. Prema istraživanju Kasimanickam i sar. (2013), prosečna koncentracija TNF- α u serumu krava sa dijagnostikovanim metritisom je zabeležena u vrednosti od $2,21 \pm 0,11$ ng/mL, sa kliničkim endometritisom $1,99 \pm 0,10$ ng/mL, subkliničkim endometritisom $1,63 \pm 0,08$ ng/mL, dok je vrednost TNF- α u serumu klinički zdravih krava iznosila $0,68 \pm 0,03$ ng/mL. Prema istraživanjima drugih autora (Sacchini i sar., 2012), zabeležene su signifikantno više koncentracije TNF- α kod krava težom kliničkom slikom eksperimentalno izazvane pleuropneumonije, u odnosu na krave kod kojih su bili izraženi blaži klinički simptomi. Takođe, povišene koncentracije TNF- α su zabeležene u plazmi krava sa koliformnim matistisom, u odnosu na plazmu klinički zdravih životinja (Hisaeda i sar., 2001).

In vitro, kod krava je ispitivan antiinflamatorni efekat ketoprofena i fluniksina-meglumina merenjem koncentracije TNF- α , IFN- γ i interleukina-8 (IL-8), posle dodavanja 10 $\mu\text{g/mL}$ lipopolisaharida. U navedenim ispitivanjima, zabeleženo je da testirani lekovi reverzibilno inhibišu oba izooblika enzima ciklooksigenaze (COX), ali značajno više COX-1 (Donalisio i sar., 2013). Takođe, Fischer i sar. (2014) su utvrdili da je ekspresija iRNK za IL-1 β i TNF- α znatno viša kod krava sa subkliničkim ili kliničkim endometritisom u poređenju kontrolnom grupom. Isti autori predlažu da IL-1 β i TNF- α mogu predstavljati potencijalne markere za otkrivanje subkliničkog endometritisa kod krava. Takođe, Ghasemi i sar. (2012) su utvrdili da je kod krava sa subkliničkim endometritisom 20, 30 i više od 50 puta viša ekspresija iRNK za TNF- α , IL-6 i IL-8. U *in vivo* ispitivanjima Heiser i sar. (2015), kod krava u peripartalnom periodu, tokom akutnog inflamatornog odgovora je dokazana ekspresija gena za IFN- γ , TNF- α , IL-17 i IL-10.

Prema podacima iz literature, pored TNF- α , IFN- γ je takođe odgovoran za aktivaciju makrofaga (Schroder i sar., 2004). Dokazano je da je koncentracija IFN- γ u plazmi krava kod kojih je eksperimentalno izazvana pleuropneumonija značajno viša u grupi sa težom kliničkom slikom, u odnosu na grupu kod koje su utvrđeni blaži klinički simptomi ovog oboljenja (Sacchini i sar., 2012). Prema drugim literaturnim podacima (Hisaeda i sar., 2001), sedam dana posle partusa, koncentracija IFN- γ u plazmi krava koje su se oporavile od mastitisa je zabeležena u vrednosti od 48,8 ng/mL, dok je kod eutanaziranih krava obolelih od mastitisa ta vrednost bila 121,9 ng/mL.

Pored TNF- α i IL-1 β , dokazano je da IL-6 ima značajnu ulogu u sintezi proteina akutne faze (Richards i sar., 1991). Prema istraživanju Ishikawa i sar. (2004), povećanje koncentracije ovog citokina kod krava je zabeleženo neposredno pred teljenje, da bi osam dana posle teljenja koncentracije IL-6 bile u okviru fizioloških vrednosti. Kasimanickam i sar. (2013) su zabeležili povećanje koncentracije IL-6 u prvoj nedelji posle teljenja. Isti autori su utvrdili da su koncentracije IL-1 β bile više kod krava koje su imale metritis (2,83 \pm 0,14 ng/mL), klinički (3,01 \pm 0,10 ng/mL) i subklinički endometritis (3,42 \pm 0,17 ng/mL), u poređenju sa kontrolnom grupom kravama (1,51 \pm 0,08 ng/mL). U sličnim ispitivanjima (Herath i sar., 2009), kod krava u prvoj nedelji posle partusa je takođe utvrđen jači proinflamatorni odgovor na bakterijsku infekciju. Naime, kod krava sa endometritisom koje su bile neplodne je zabeležena veća

ekspresiju gena iRNK za proinflamatorni citokin IL-1 (IL-1 α i IL-1 β), kao i za antiinflamatorni citokin IL-10 u odnosu na grupu krava koje su bile plodne.

S druge strane, povećana koncentracija proinflamatornih citokina može u značajnoj mери da utiče na metaboličko preostrojanje u ranoj laktaciji, potencirajući nastanak metaboličkog stresa i lipidne mobilizacije i ketogeneze (Sordillo i sar., 2009). Na laboratorijskim modelima sepse u strogo kontrolisanim uslovima je takođe pokazano da postoje brojne metaboličke i inflamatorne promene, što pored povećanja koncentracija proinflamatornih citokina uključuje i povećanje broja leukocita sa promenom u diferencijalnoj beloј lozi, uz promene u koncentraciji i drugih parametara. Ove promene ukazuju na funkcionalni status jetre i bubrega (Stojanović i sar., 2012; Stojanović i sar., 2013). Takođe, prema istraživanju Contreras i sar., (2010), kod krava u peripartalnom periodu je dokazano da je promena koncentracije lipida u plazmi povezana sa lipidnom mobilizacijom i može uticati na aktivnost leukocita i povećenje incidence bolesti. U sličnim ispitivanjima je dokazano smanjenje ukupnog broja leukocita u peripartalnom periodu ima za posledicu smanjenje odbrambenih sposobnosti organizma (Klinkon i Zadnik, 1999).

Dokazano je da period rane laktacije pored povećanja koncentracije proinflamatornih citokina i proteina akutne faze, karakteriše i smanjenje koncentracije albumina, hemoglobina i holesterola (Ametaj i sar., 2005). Kao što je već spomenuto, koncentracija proteina akutne faze je često povišena tokom ovog perioda i ukazuje na promenjeno zdravlje krava. Međutim, proteini akutne faze i njihove frakcije imaju minimalno učešće u ukupnoj koncentraciji proteina, dok albumini čine većinski deo ukupnih proteina, pa njihovo smanjenje koncentracije ukazuje na smanjenje koncentracije ukupnih proteina. S obzirom da se albumini proizvode u jetri, opterećeni funkcionalni kapacitet jetre može se dovesti u vezu sa sniženom albuminemijom u peripartalnom periodu (Kaneko i sar., 2008; Tóthová i sar., 2008). Naime, sekrecija albumina je smanjena tokom patofizioloških promena koje se razvijaju za vreme inflamatornih ili infektivnih oboljenja (Evans, 2002). Ovaj mehanizam smanjenja sekrecije albumina se objašnjava delovanjem proinflamatornih citokina, kao što su interleukini IL-1 i IL-6, kao i TNF- α . Zbog poznate činjenice da je jetra mesto sinteze albumina, smanjenje koncentracije ukupnih proteina i koncentracije albumina moglo bi biti u vezi sa smanjenom sintezom albumina u jetri tokom inflamacije (Zentella i sar., 2002). U literaturi su opisane različite vrednosti koncentracija albumina kod preživara u zavisnosti od fiziološkog stanja. Đoković i sar. (2007) su ustanovili vrednost albumina kod krava Holštajn frizijske rase u prvoj nedelji posle partusa iznosi

34,39±2,70 g/L. Prema drugim istraživanjima istog autora (Đoković i sar., 2013a; Đoković i sar., 2013b) prosečna vrednost koncentracije albumina tokom perioda rane laktacije je zabeležena u vrednosti 34,61±3,56 g/L, a tokom perioda srednje laktacije ta vrednost je bila 37,57±3,15 g/L (Đoković i sar., 2013a). Otto i sar. (2000) su zabeležili da prosečna vrednost koncentracije albumina kod gravidnih krava iznosi 42,3±2,2 g/L, dok je kod krava u laktaciji ova vrednost iznosi 39,4±2,8 g/L. U ispitivanjima koja su sprovedena kod krava u zasušenju, a kod kojih je utvrđena smanjena koncentracija proteina, zabeležene su i smanjene koncentracije uree (<10 mg/dl, odnosno 7,1 mmol/L), dok su koncentracije albumina bile u granicama fizioloških vrednosti (>35 g/L). Isto tako, kod tek oteljenih krava su utvrđene niske vrednosti uree, ali i niske vrednosti albumina (<25 g/L) (Van Saun, 2004a; Van Saun, 2004b).

Određivanje koncentracije ukupnih proteina u krvi se koristi u dijagnostici i terapiji različitih oboljenja jetre, bubrega, kostne srži, kao i drugih metaboličkih poremećaja. Naime, niže koncentracije ukupnih proteina mogu da ukazuju na postojanje malapsorpcije, neuhranjenosti, hipogamaglobulinemije, glomerulonefritisa, kao i bolesti jetre. U nekim istraživanjima su zabeležene niže koncentracije ukupnih proteina kod krava u periodu posle partusa (Đoković i sar. 2009; Gonzalez i sar., 2011). Pomenuto smanjenje je verovatno posledica prelaska albumina i gama globulina iz krvi u mlečnu žlezdu (Kupczyński i Chudoba-Drozdowska, 2002). Dokazano je i da koncentracija ukupnih proteina ispod 60 g/L povećava rizik za nastanak peripartalnih bolesti (Van Saun, 2004a; Van Saun, 2004b).

2.3. Korelacija metaboličkih i inflamatornih promena u peripartalnom periodu kod krava

Novija istraživanja su potvrdila postojanje veze između inflamatornih medijatora i metaboličkih poremećaja. U ispitivanjima kod ljudi je utvrđeno da visoke koncentracije NEFA u krvi dovode do pojave nižeg stepena inflamacije, a mogu uticati i na smanjeno funkcionisanje imunološkog sistema (Harford i sar., 2011; Linegaard i sar., 2013). Do sličnih rezultata se došlo i u ispitivanjima kod mlečnih krava (Sordillo i sar., 2009; Mirzadeh i sar., 2010; Contreras i sar., 2010; Belic i sar., 2011). Naime, dokazano je da povećana koncentracija NEFA u cirkulaciji može da utiče na smanjenje funkcije limfocita (Lacetera i sar., 2004; Contreras i sar., 2010). Pored navedenog, povećana koncentracija NEFA u krvi kod mlečnih krava predstavlja pozitivan faktor rizika i za nastanak mnogih inflamatornih bolesti (Hotamisligil, 2006; Calder, 2008;

Bernabucci i sar., 2009; Sordillo i sar. 2009). Naime, masne kiseline mogu da se koriste kao prekursori inflamatornih eikosanoida i to je jedan od razloga zašto povećana koncentracija NEFA u ranoj laktaciji može dovesti do nastanka inflamacije i imati uticaja na njen intezitet i trajanje.

U istraživanju Ametaj i sar. (2005) je uočeno povećanje koncentracije indikatora inflamacije (haptoglobina i serum amiloida A) u plazmi krava kod kojih se razvila masna jetra. Takođe, Ohtuska i sar. (2001) su primetili povećanu aktivnost TNF- α u serumu krava sa umerenim do teškim sindromom masne jetre. U nekim istraživanjima je praćen uticaj primene inflamatornih medijatora na nastanak metaboličkih promena. Trevisi i sar. (2009) su potvrdili da oralna primena niskih doza interferona- α (citokin), tokom poslednje 2 nedelje gestacije, dovodi do inflamatornih promena u jetri, uključujući i pojačano oslobađanje proteina akutne faze. U sličnim istraživanjima, Bradford i sar. (2009) su potvrdili da inflamatorne promene dovode do metaboličkih poremećaja. Naime, parenteralna primena TNF- α , tokom 7 dana, kravama u periodu kasne laktacije je dovela do pojave dvostruko viših koncentracija triglicerida i smanjene ekspresije gena odgovornih za sintezu glukoze.

Jedan od kompenzatornih mehanizama jetre na povećanu sintezu NEFA u periodu rane laktacije je povećana oksidacija masnih kiselina u peroksizomima (Grum i sar., 1996), što ima za posledicu povećanu sintezu reaktivnih kiseonikovih jedinjenja (ROS) (Drackley, 1999). Povećana proizvodnja ROS i koncentracija NEFA dovode do stvaranja lipidnih peroksida koji su odgovorni za kaskadnu zapaljensku reakciju, uključujući i inteziviranje metaboličkih promena. Pored toga, dokazano je da ROS prouzrokuje oštećenje ćelija imunološkog sistema i na taj način smanjuje imunološki odgovor (Spears i Weiss, 2008).

U pomenutim istraživanjima je istaknuta uloga inflamacije kod zaraznih bolesti, kao i činjenica da je inflamacija usko povezana sa metaboličkim poremećajima. Pored toga, inflamatorni putevi igraju važnu ulogu u funkcionisanju imuniteta, metabolizma i reprodukcije, te omogućavaju razumevanje patoloških aspekata ovih puteva kod krava tokom tranzicionog perioda. Bolje sagledavanje i rezumevanje navedenih procesa može imati uticaj na sposobnost predviđanja i sprečavanja nastanka tranzicionih poremećaja.

2.4. Faktori koji utiču na inflamatorni odgovor

Kao što je već pomenuto, pokretanje inflamatornog odgovora može imati uticaja na smanjenje funkcionisanja imunološkog sistema. Ključnu ulogu imaju lipidi i oksidativni stres. Iako mehanizam delovanja putem kojeg lipidi pokreću inflamatorni odgovor nije sasvim razjašnjen, u istraživanju na ljudima i različitim životinjskim modelima je potvrđeno da masne kiseline predstavljaju modulatore inflamatorne reakcije (Calder, 2008; Serhan i sar., 2008).

Poznato je da NEFA regulišu lipidni receptor aktiviran peroksizomalnim proliferatorom (PPAR) koji utiče na pokretanje inflamatornog odgovora u mnogim ćelijama, kao što su adipociti (Contreras i Sordillo, 2011). U monocitima, PPAR aktivira određene polinezasićene masne kiseline, kao što su alfa-linoleinska kiselina (ALA) i dokozaheksaenoinska kiselina (DHA) koje mogu izazvati supresiju inflamatornog odgovora (Lee i sar., 2003). Još jedan od načina kako lipidi utiču na receptore je i aktivacija TLR, posebno TLR4 koji je odgovoran za pokretanje inflamatornog odgovora i sintezu proinflamatornih citokina (Sordillo i sar., 2009; Contreras i Sordillo, 2011; Baker i sar., 2011). Dokazano je da se TLR4 vezuje lipopolisaharide u membrani Gram negativnih bakterija (Bannerman i Goldblum, 2003). Serhan i sar. (2008) su dokazali da masne kiseline mogu da pokrenu imunološki i inflamatorni odgovori putem biosinteze medijatora lipida, uključujući eikosanoide, lizofosfolipide, sfingolipide, diacilglicerole, fosfatidnu kiselinu i ceramid (Serhan i sar., 2008). Smatra se da eikonasoidi imaju ključnu ulogu u regulaciji akutne i hronične inflamatorne reakcije. Ovi prekursori nastaju iz polinezasićenih masnih kiselina koje se metabolišu ili putem ciklooksigenaznog (COX) ili lipooksigenaznog puta (Sordillo i sar., 2009).

U ispitivanjima kod krava u peripartalnom periodu je dokazano da ubrzani procesi lipidne peroksidacije mogu dovesti do pojave oksidativnog stresa, što posledično dovodi do smanjenja funkcije imunološkog i inflamatornog odgovora (Bernabucci i sar., 2005; Sordillo i sar., 2007). Isto tako, oksidativni stres može da dovede do povećane osetljivosti krava na različite infektivne agense (Sordillo i Aitken, 2009).

Na osnovu svega navedenog, postaje jasno da kontrola i smanjivanje inflamatornog odgovora, a samim tim i metaboličkog stresa predstavlja imperativ u savremenoj govedarskoj

produktivni, jer mogu imati pozitivne efekte, kako na zdravlje životinja, tako i na povećanje produktivnosti krava tokom laktacije.

2.5. Kontrola inflamatornog i metaboličkog procesa kod krava u ranoj laktaciji

U kontroli inflamatornog i metaboličkog procesa u ranoj laktaciji kod krava, kako bi se prevenirale moguće promene, potencijalna terapija pored NSAIL može da obuhvati antioksidanse, omega-3 masne kiseline, a u novije vreme i imunomodulatorne peptide.

Antioksidansi, kao faktori ishrane imaju ulogu u održavanju dobrog zdravlja životinja, s obzirom da ishrana igra jednu od glavnih uloga u očuvanju zdravlja i poboljšanju proizvodnih i reproduktivnih karakteristika. Naime, poznato je da ova jedinjenja imaju ulogu u neutralizaciji delovanja slobodnih radikala. Dokazano je da je slabljenje antioksidativnog sistema kod mlečnih krava povezano sa poremećajima tokom peripartalnog perioda (Mudron i sar. 1997, LeBlanc i sar., 2004). Najviše proučavani antioksidansi sa aspekta zdravlja mlečnih krava su vitamin E i selen. Oni su važni zbog svoje sposobnosti da doprinesu neutralizaciji slobodnih radikala, čime sprečavaju progresiju inflamacije. Tokom peripartalnog perioda, kod mlečnih krava je zabeležen pad koncentracije vitamina E (Weiss i sar., 1990), a i selena u krvi (Miller i sar., 1995). Prema istraživanju Jukola i sar., (1996), dokazano je da pareneteralna aplikacija vitamina E i selena dovodi do smanjenja broja somatskih ćelija, povećanja produktivnosti i smanjenja učestalosti pojave mastitisa kod mlečnih krava.

Pored antioksidanasa, u kontroli inflamatornog i metaboličkog procesa kod krava u ranoj laktaciji se korise i omega-3 masne kiseline. Tu spadaju ALA, DHD i eikozapentaenoinska kiselina (EPA). Smatra se da antiinflamatorni efekat ovih masnih kiselina nastaje usled činjenice da povećano snabdevanje omega-3 masnim kiselina smanjuje proizvodnju inflamatornih jedinjenja poreklom iz omega-6 masnih kiselina. U istraživanju Simopoulos (2008) je utvrđeno da oralna primena omega-3 masnih kiselina kod sisara, može uticati na sintezu i metabolizam prostaglandina, uglavnom zbog uticaja na smanjenje koncentracije arahidonske kiseline u fosfolipidima. U istraživanjima sprovedenim na ljudima je dokazano da primena omega-3 masnih kiselina utiče na poboljšanje inflamatornog statusa (Mori i Beilin, 2004; Claria i sar., 2011). Naime, ove masne kiseline predstavljaju važne molekule u metabolizmu eikosanoida koji iniciraju kaskadnu reakciju pretvaranja arahidonske kiseline (omega-6 masne kiseline) u veliki

broj molekula uključenih u inflamatorni proces. Dokazano je da G protein vezujući receptor 120 (GPR 120) igra važnu ulogu u metabolizmu omega-3 masnih kiselina (Oh i sar., 2010). Takođe, dokazano je EPA i DHA omega-3-masne kiseline inhibišu efekte lipopolisaharida i TNF- α (Lee i sar., 2003; Solinas i sar., 2007).

Imunomodulatorni peptidi predstavljaju noviju generaciju imunomodulatora na bazi peptida. Ovi lekovi su dizajnirani kako bi oponašali endogene peptide u okviru odbrane domaćina, kako bi se poboljšao imunološki odgovor na neke patogene. Imaju prednosti nad antibioticima zbog toga što ne ostavljaju rezidue u prehrambenim proizvodima. Imunomodulatorni peptidi, kao nova klasa katjonskih peptida, su nastali kako bi se unapredila imunološka funkcija organizma bez inflamatornih efekata na peptide domaćina koji učestvuju u odbrani organizma. Augustyniak i sar. (2012) su zaključili da neuropeptidi mogu da imaju proinflamatorna i antiinflamatorna dejstva, odnosno proinfektivne i antiinfektivni efekte. Dokazano je da neuropeptidi zahvaljujući svojoj imunomodulatornoj ulozi mogu da utiču na veliki broj odbrambenih mehanizama, kao što su privlačenje fagocitnih ćelija na mesto infekcije, aktiviranje proinflamatornih medijatora i regulacija funkcije T ili B ćelija posle antigene stimulacije (Höckfelt i sar., 2000).

Izučavajući ulogu vazoaktivnog intestinalnog peptida (VIP), Smalley i sar. (2009) su dokazali mnoge inhibitorne efekte ovog peptida na funkcijionisanje urođenih imunoloških ćelija, utvrdivši značajan antiinflamatorni potencijal ovog leka. Takođe, dokazano je da jedan takav peptid poboljšava preživljavanje miševa izloženih bilo Gram negativnim ili Gram pozitivnim patogenima, prvenstveno povećanjem efikasnosti makrofaga (Scott i sar., 2007).

2.6. Tretman inflamatornog i metaboličkog procesa kod krava u ranoj laktaciji različitim grupama NSAIL

Upotreba NSAIL u humanoj i veterinarskoj medicini datira još od druge polovine 19. veka. Dugi niz godina korišćeni u terapiji bola, poznato je da ovi lekovi pored antiinflamatornog, imaju antipiretički i analgetički efekat (Green, 2001). Međutim, znatno interesovanje istraživača u novije vreme izaziva uloga ovih lekova u procesu inflamacije. *In vitro* ispitivanjem na izolovanim goveđim neutrofilima (poreklom iz mleka) je utvrđeno da NSAIL mogu imati različite efekte na proces fagocitoze. Tako, u ispitivanju Paape i sar. (1991) je zabeleženo da

acetilsalicilna kiselina ubrzava fagocitozu goveđih neutrofila, dok ibuprofen, paracetamol, benidamin, indometacin i fenilbutazon dovode do supresije. Do sličnih rezultata se došlo i u drugim ispitivanjima (Bas i sar., 1998), kada je utvrđeno da aspirin u *in vitro* uslovima u veoma malim dozama ubrzava proces fagocitoze izolovanih goveđih neutrofila.

Prema podacima iz literature, sintezom derivata salicilne kiseline, pre svega acetilsalicilne kiseline, započinja era primene NSAIL, kako u humanoju, tako i u veterinarskoj medicini, odnosno upotrebom salicilata u vidu dekokta ili drugih farmaceutskih oblika (Vane i Botting, 2003). Još je Diskorides u prvoj poznatoj Farmakopeji u 1. veku pre nove ere opisao lekovita svojstva vrbe preporučujući mešanje listova ovog drveta sa dodatkom bibera i vina u terapiji kolika, kao i pravljenje dekokta od listova i kore za terapiju gihta (Lees i sar., 2004).

Godine 1874., Maclagan je uspešno koristio salicilin, gorki sastojak bele vrbe u snižavanju temperature, ublažavanju bola i zapaljenja kod reumatske groznice. Iste godine, Kolbe i njegovi sar. su sintetisali organsku salicilnu kiselinu za komercijalnu upotrebu. Dvadesetak godina kasnije, 1897. godine, Felix Hoffman je radeći u kompaniji Bayer u Nemačkoj sintetisao acetilovani oblik salicilne kiseline. Ovaj lek, kasnije nazvan Aspirin®, predstavlja najviše korišćen lek svih vremena, imajući u vidu da je široko rasprostranjena njegoova upotreba u humanoju medicini (Vane i Botting, 2003).

Iako je klinička efikasnost NSAIL bila dobro poznata u 19. veku, mehanizam delovanja je bio nepoznanica za naučnike sve do 1971. godine kada je Sir John Vane dokazao da sinteza prostaglandina može biti smanjena pomoću acetilsalicilne kiseline i indometacina. Ovaj naučnik je 1982. godine dobio Nobelovu nagradu za medicinu potvrdivši da je inhibicija ciklooksigenaze putem acetilsalicilne kiseline odgovorna za mehanizam delovanja ovog leka (Green, 2001; Ricciotti i FitzGerald, 2011). Smatra se da se glavni proboj otkrića mehanizma delovanja desio 1960-ih godina sa otkrićem prostaglandina i njihovom karakterizacijom. U isto vreme je otkriven i tromboksan A₂ (TXA₂) (Little, 2007).

Ciklooksigenaza je enzim otkriven 1976. godine i odgovoran za proizvodnju prostaglandina H₂ (PGH₂) iz arahidonske kiseline koja predstavlja ciljno mesto delovanja NSAIL. Poznato je da acetilsalicilna kiselina (uključujući i druge NSAIL) inhibira proizvodnju prostaglandina i tromboksana, ireverzibilnom inhibicijom enzima ciklooksigenaze koji učestvuje u proizvodnji navedenih medijatora. Postoje dva izooblika ciklooksigenaze i to konstitutivna ciklooksigenaza-1 (COX-1) i inducibilna ciklooksigenaza-2 (COX-2) koja je odgovorna za

biosintezu prostaglandina u tkivima zahvaćenim inflamacijom, a može da se aktivira pod dejstvom citokina i drugih medijatora (Smith i Dewitt, 1996; Amann i Peskar 2002). S druge strane, važno je istaći da prostaglandini imaju važnu ulogu u održavanju reproduktivnih performansi, što uključuje period estrusa, graviditeta i samog partusa (Parent i sar., 2003).

Prostaglandini kao lokalni hormoni proizvedeni u krvi imaju i druge efekte u organizmu, kao što je prenos informacija o bolu u mozak, modulaciju hipotalamičkog centra za termoregulaciju, zapaljenjske reakcije, agregaciju i dezagregaciju trombocita. Pored toga, prostaglandini oblažu sluznicu, uključujući i sluznicu želuca, sa čime je povezano i oštećenje želudačne sluznice prilikom primene acetilsalicilne kiseline (i drugih NSAIL) (Straus i sar., 2000; Ghisletti i sar., 2007). Prostaglandini zajedno sa tromboksanima, leukotrienima i lipoksinima pripadaju klasi eikosanoida.

Tabela 1. Pregled prostaglandina i njihovih fizioloških uloga u najvažnijim organskim sistemima (Miller, 2006)

Organski sistemi	Medijatori	Mesto sinteze	Primarni efekat(i)
Kardiovaskularni	Prostaciklin	Endotelne ćelije	Vazodilatacija
	Tromboksan	Trombociti	Vazokonstrikcija
Renalni	Prostaciklin	Srž bubrega	Vazodilatacija
	PGE ₂	Kora bubrega	Izlučivanje soli i vode
Gastrointestinalni	PGE ₂	Želudačna sluznica	Citoprotekcija
Hematološki	Prostaciklin	Endotelne ćelije	Deagregacija trombocita
	Tromboksan	Trombociti	Agregacija trombocita
Respiratorni	Prostaciklin	Endotelne ćelije	Vazodilatacija
Koštano-mišićni	PGE ₂	Osteoblasti	Resorpcija i formiranje kosti
Reproduktivni	PGE ₂	Semene kese	Erekcija, ejakulacija, transport sperme
	PGE ₂ , PGF ₂	Plodove ovojnice Materica (decidua)	Partus/estrusni ciklus, oplodnja, ovulacija
Nervni	PGE ₂	?	Groznica, hiperalgezija

Eikosanoidi su fiziološki aktivni metaboliti arahidonske kiseline, masne kiseline sa 20 ugljenikovih atoma koja se nalazi u ćelijama svih tkiva i sastavni je deo fosfolipida ćelijskih membrana, a oslobađa se po aktivaciji ćelija mehaničkim ili hemijskim stimulusima. Do sada su poznata dva glavna puta metabolizma arahidonske kiseline: ciklooksigenazni put i lipooksigenazni put. U ciklooksigenaznom putu, uz pomoć enzima ciklooksigenaze se stvaraju prostaglandini (PGD_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ i PGE_2), tromboksani (TxA_2 i TxB_2) i prostaciklini (PGI_2P i $\text{PG}_{1\alpha}$), dok se u lipooksigenaznom putu pod dejstvom lipooksigenaza stvaraju leukotrieni (Amann i Peskar, 2002; Miller, 2006; Ricciotti i FitzGerald, 2011). Međutim, farmakološki efekti prostaglandina su brojniji i različiti od ostalih produkata koji nastaju u metabolizmu arahidonske kiseline (Tabela 1). Postoje četiri glavna bioaktivna prostaglandina koji se stvaraju *in vivo*, a to su prostaglandin E_2 (PGE_2), prostaglandin D_2 (PGD_2), prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$) i prostaciklin I_2 (PGI_2) (Ricciotti i FitzGerald, 2011). Od navedenih prostoglandina antiinflamatorno delovanje ispoljavaju prostaglandini $\text{PGF}_{2\alpha}$ i PGE_2 , prostaglandin PGD_2 kao i njegov aktivni metabolit 15-d-PGJ_2 (Miller, 2006; Ricciotti i FitzGerald, 2011).

Inhibicija COX-2 od strane NSAIL je odgovorna za mehanizam delovanja ovih lekova, odnosno odgovorna je za većinu njihovih terapijskih delovanja, kao što su periferna i centralna analgezija, antiinflamatorni efekat, antipiretički efekat i anti-endotoksični efekat, dok inhibicija COX-1 izaziva neželjena delovanja kao što su ulceracija gastrointestinalne mukoze i nefropatija (Fitzpatrick i sar., 2004; Laven i sar., 2011). Manji broj NSAIL, kao na primer diklofenak i indometacina, deluju na lipooksigenazu i sintezu leukotrijena (Brody i sar., 1998).

Antipiretički efekat, NSAIL ispoljavaju inhibicijom sinteze prostaglandina E_2 (PGE_2), koji delujući na hipotalamus dovode do povećanja telesne temperature tokom inflamacije (Dugowson i Gnanashanmugam, 2006). Iako su klasifikovani kao slabi analgetici, NSAIL imaju značajniji efekat na bol koji proizilazi iz povećane periferne senzibilizaciju koja se javlja tokom inflamacije i dovodi do toga da nociceptori reaguju na nadražaje koji su obično bezbolni (Fitzgerald, 2003; Dugowson i Gnanashanmugam, 2006).

Većina NSAIL deluje neselektivno kako na COX-1, tako i na COX-2. Savremena istraživanja, kao i uvođenje novih NSAIL, imaju za cilj da pronađu supstance koja će pokazati veću selektivnost prema COX-2, u odnosu na COX-1. Salicilati kao NSAIL inhibišu oba izooblika COX, ali mogu da inhibišu i NF-kB, što ima za posledicu smanjenu sintezu

proinflamatornih citokina, kao što su TNF- α i IL-1 (Kutuk i Basaga, 2004, Kim i sar. 2005, Mortaz i sar., 2005). Iako je inhibicija NF-kB delovanjem salicilata najviše proučavana, utvrđeno je da fluniksin meglumin, ibuprofen i flurbiprofen takođe imaju isti efekat. Suprotno, ketoprofen, indometacin i ketorolak nemaju uticaja na inhibiciju NF-kB (Tegeder i sar., 2001; Ahn i Aggarwal, 2005).

Utvrđeno je da upotreba različitih NSAIL (aspirina, naproksena, nimesulida i piroksikama) može dovesti do smanjene lipidne mobilizacije i ketogeneze u jetri inhibicijom delovanja adrenalina (Zentella i sar., 2002), kao i potenciranjem delovanja insulina (Vázquez-Meza i sar., 2013). Takođe, upotreba različitih NSAIL dovodi smanjenja lipidne mobilizacije i ketogeneze usled smanjenja koncentracije proinflamatornih citokina (Ohtsuka i sar., 2001; Kushibiki i sar., 2001; Bertoni i sar., 2004; Medzhitov, 2008).

Kod krava koje su tretirane lizin acetil-salicilatom (LAS) u prvih 5 dana laktacije zabeležena je značajno niža koncentracija proteina akutne faze, ali i povećana produkcija mleka u odnosu na kontrolnu grupu (Bertoni i sar., 2004). Takođe, zabeleženi su i drugi pozitivni efekti: povišena koncentracija cinka u krvi tretiranih životinja, a smanjena vrednost haptoglobina, ceruloplazmina, ukupnih proteina i globulina. Negativni efekti primene LAS kod krava u periodu rane laktacije manifestovali su se produženim i smanjenim skorom telesne kondicije, a što je uključivalo i povećanu koncentraciju NEFA, smanjenu koncentraciju glukoze trećeg dana od aplikacije leka i povećanu incidencu metritisa (Bertoni i sar., 2004).

U ispitivanjima drugih autora (Trevisi i Bertoni, 2008) kod krava u ranom puerperijumu je utvrđeno da petodnevna primena aspirina povećava količinu mleka u prva 2 meseca laktacije i poboljšava procenat začeca kod prvog postpartalnog osemenjavanja. Na osnovu izvršenih ispitivanja, autori zaključuju da parenteralna primena aspirina u ranom puerperijumu može da ima pozitivne efekte na inflamatorne procese nastale tokom partusa. U prilog ovoj činjenici da aspirin suprimira inflamaciju idu i rezultati drugih autora (Farney i sar., 2013a; Farney i sar., 2013b) koji su dokazali da oralna primena aspirina u dozi od 1,95 g/L, tokom sedam dana nakon teljenja, dovodi do smanjenja koncentracije TNF- α . Takođe, u plazmi tretiranih životinja je zabeležen porast NEFA i BHB, kao i povećanje negativnog energetskog bilansa u odnosu na kontrolnu grupu.

Rezultati skorašnjih istraživanja pokazuju pozitivan uticaj, starog predstavnika NSAIL, natrijum salicilata na produktivnost krava kada se primeni oralno u periodu rane laktacije

(Carpenter i sar., 2016). U ovom istraživanju je zabeleženo povećanje ukupnog prinosa mleka sa 7 na 9% i to posle trodnevne primene natrijum-salicilata i meloksikama. U drugim istraživanjima (Newby i sar., 2014), primena meloksikama neposredno posle partusa nije prouzrokovala veću incidencu nastanka retencije placente. Naime, nije bilo razlike u pojavi peripartalnih bolesti između grupe krava tretiranih sa meloksikamom i kontrolne grupe.

Prema podacima iz literature, jedan od najčešće testiranih NSAIL u kliničkim uslovima peripartalnog perioda je fluniksin-meglumin, sa različitim rezultatima. Jedno istraživanje pokazuje da je involucija materice ubrzana nakon lečenja puerperalnog metritisa sa fluniksin-megluminom (Amiridis, 2001), dok u drugim ispitivanjima nije pokazao pozitivne sistemske i efekte na reproduktivni sistem (Drillich, 2007). U ispitivanju Shwartz i sar. (2009) je zabeleženo da primena fluniksin-meglumina u prva 3 dana laktacije ima za posledicu smanjen unos hrane i prinos mleka tokom prve nedelje laktacije. Duffield i sar. (2009) su utvrdili da parenteralna primena fluniksin-meglumina prva 2 dana posle teljenja značajno povećava rizik od retencije placente i pojave metritisa. Prema mišljenju autora nastale promene su verovatno posledica inhibicije enzima ciklooksigenaze, odnosno smanjene sinteze prostaglandina koji učestvuju u kontrakciji materice. Suprotno, u ispitivanju Amiridis i sar. (2001) je utvrđeno da fluniksin-meglumin skraćuje interval teljenja i povećava procenat krava sa kompletnom involucijom materice kod akutnog i subakutnog metritisa, nastalih od petog do osmog dana od početka laktacije. Akutni metritis je dijagnostikovao kod krava koje su imale povišenu telesnu temperaturu (40,5–41,5°C), gubitak apetita, smanjene pokrete buraga i produkciju mleka, dok je subakutni metritis dijagnostikovao ustanovljavanjem umereno povišene telesne temperature, smanjenim apetitom, pokretima buraga i proizvodnjom mleka.

Pored pomenutih derivata salicilne kiseline (aspirina), odnosno derivata nikotinske kiseline (fluniksin-meglumin), kao i oksikama (meloksikam) u terapiji inflamatornih oboljenja kod domaćih životinja svoju primenu su našli i derivati propionske kiseline (ketoprofen i karprofen). Prema istraživanju Vangroenweghe i sar. (2005), kod krava u ranom puerperijumu, karprofen u uslovima veštacke infekcije vimena sa *E. coli* pokazuje ograničenu sposobnost u procesu smanjenja inflamacije, ali je utvrđen nezatno bolji efekat na pojačanje kontrakcija buraga. Primena karprofena 14 do 16 dana posle osemenjavanja (Krueger i Heuwieser, 2010) ili pre i posle osemenjavanja (Heuwieser i sar., 2011) nije dovela ni do kakvog efekta na reptoduktivne performanse.

U svojim ispitivanjima Banting i sar. (2008) su zabeležili značajno bolji efekat na inflamatorne procese i kontrakcije buraga nakon oralno primenjene doze od 4 mg/kg t.m. i i.m. primene ketoprofena u dozi od 3 mg/kg t.m. Landoni i sar. (1995), na osnovu izvršenih ispitivanja zaključuju da intravenska (i.v.) primena ketoprofena u dozi od 3mg/kg t.m. dovodi do inhibicije sinteze eikosanoida, odnosno tromboksana B₂ (TxB₂) i prostoglandina (PGE₂). Do sličnih rezultata su došli Singh i sar. (2009). Naime, na osnovu smanjene koncentracije TxB₂ i PGE₂ u serumu tretiranih goveda, autori zaključuju da ketoprofen dovodi do inhibicije oba izooblika COX enzima. U istraživanju koju su sproveli Donalisio i sar. (2013) je utvrđeno da ketoprofen u poređenju sa fluniksin-megluminom ima slične antiinflamatorne efekte kod krava, odnosno *in vitro* je zabeleženo da testirani lekovi reverzibilno inhibišu oba izooblika COX enzima, ali znatno više COX-1. Sintaza citokina je takođe procenjena *in vitro* merenjem koncentracije TNF- α , IFN- γ i IL-8.

Richards i sar. (2009) su u svojim ispitivanjima procenjivali značaj parenteralne primene ketoprofena posle partusa, na prinos mleka i plodnost. Kravama je ketoprofen aplikovan u dozi od 3 mg/kg t.m., neposredno i 24 sata posle telenja. Na osnovu izvršenih ispitivanja, autori zaključuju da ketoprofen smanjuje rizik od zadržavanja posteljice posle partusa, kao i da nije uticao na povećanje prinosa mleka. Takođe, fokus ispitivanja koje su sproveli Newby i sar. (2013) nakon parenteralne primene 3 mg/kg t.m. ketoprofena u tranzicionom periodu kod krava je bio na ublažavanje bola koji nastaje kod distocije i uticaj na prinos mleka i plodnost. Ovi autori su zabeležili brži opravak kod životinja kojima je aplikovan ketoprofen.

U ispitivanju bezbednosti primene ketoprofena kod goveda, Singh i sar. (2009) su zaključili da i.v. primena ketoprofena u predloženoj terapijskoj dozi od 3 mg/kg t.m., tokom 5 dana, ne dovodi do pojave neželjenih reakcija. Isto tako, na osnovu izvršenih ispitivanja autori zaključuju da se ispitivana aktivna supstanca (ketoprofen) može bezbedno primenjivati u lečenju inflamatornih procesa, kao antipiretik i analgetik. U svjim istraživanjima Paresh i sar. (2012) su potvrdili bezbednost primene ketoprofena, nakon i.v. primene 3 mg/kg t.m. ovog leka, tokom 5 dana, u terapiji inflamatornih bolesti, kao antipiretik i analgetik. Bezbednost primene je procenjena na osnovu praćenja hematoloških i biohemijskih parametara krvi.

Na osnovu dostupne literature, može se zaključiti da ketoprofen ima prednost u odnosu na ostale lekove iz grupe NSAIL, a koja se odnosi pre svega na bezbednost primene leka kod

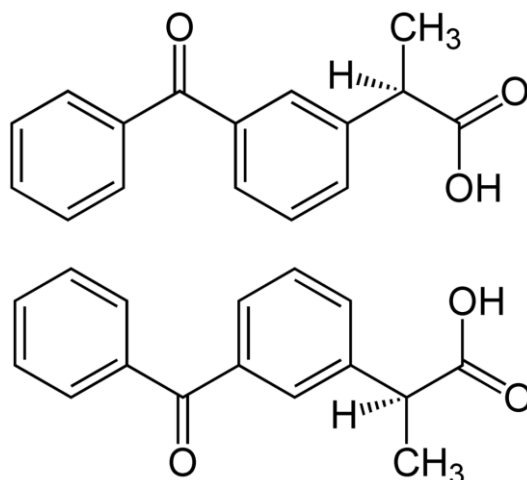
krava u ranom puerperijumu, što će biti predmet daljih istraživanja u okviru ove doktorske disertacije.

2.7. Ketoprofen i njegova farmakološka svojstva

2.7.1. Ketoprofen

Ketoprofen je u širokoj upotrebi u veterinarskoj medicini, jer su poznata njegova snažna analgetička, antipiretička i antiinflamatorna svojstva (Lees, 2009), a dokazano je i da ovaj lek izaziva inhibiciju agregacije trombocita (Katzung, 1995).

Ketoprofen, 2-(3-benzoilfenil)-propionska kiselina (Slika 2), kao NSAID pripada grupi derivata propionske kiseline. Hemijska formula mu je $C_{16}H_{14}O_3$. Molekul ketoprofena je prvi put sintetisan 1967. godine, dok je 1973. prvi put primenjen u humanoj kliničkoj praksi u Francuskoj i Velikoj Britaniji (EMA, 1995). Sadrži jedan asimetričan atom ugljenika, dakle postoje dva enantiomera ovog hemijskog jedinjenja, a to su R (-) ketoprofen i S (+) ketoprofen (Landoni i sar., 1997; Arifah i sar., 2001; Igarza i sar., 2002).



Slika 2. Hemijska struktura ketoprofena

U veterinarskoj medicini dostupni komercijalni oblik je racemska (50:50) smeša, R (-) i S (+) enantiomera (Igarza i sar., 2002). Prema podacima EMA (1995), ketoprofen se u veterinarskoj medicini primenjuje u terapiji inflamatornih i bolnih stanja kostiju i zglobova i

mišićno-zglobnog sistema kod krava, konja, pasa i mačaka, kao i za simptomatsko lečenje kolika kod konja i krava.

U našoj zemlji, za veterinarsku upotrebu su registrovana dva injekciona preparata pod zaštićenim imenima (Kelaprofen® i Mediprofen®) za goveda, svinje i konje, kao ciljne vrste životinja, a njihova indikacija kod goveda je tretman akutnih i bolnih inflamatornih stanja (Nacionalni registar veterinarskih lekova, 2015). Preporučena doza ketoprofena za primenu kod goveda je 3mg/kg t.m., a primenjuje se i.v. ili i.m., jednom dnevno, do tri dana, dok se kod svinja primenjuje u istoj dozi, samo i.m. (Bishop, 2005).

2.7.2. Farmakodinamika ketoprofena

Kao i kod ostalih NSAIL, primarni mehanizam delovanja ketoprofena je reverzibilna inhibicija aktivnosti COX enzima čime ovaj lek utiče na smanjenu biosintezu prostaglandina (PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$) i tromboksana A_2 iz arahidonske kiseline (EMEA, 1995; Katzung, 1995; Garcia i sar., 1998). Ketoprofen inihise obe izoforme COX enzima, iako se smatra selektivnim COX-1 blokatorom (Brideau i sar., 2001; Streppa i sar., 2002). Međutim, ovaj lek je uglavnom neselektivan i inhibira COX-1 nešto jače u odnosu na COX-2 kod nekih životinjskih vrsta, dok kod drugih životinjskih vrsta više inhibira COX-2 (Kay-Mugford i sar., 2000; Arifah i sar., 2001). Takođe, ovaj lek inhibira agregaciju trombocita (Katzung, 1995) i antikoagulantnu aktivnost ispoljava inhibišući proizvodnju tromboksana B_2 (promotora agregacije trombocita) (Arifah, 2001). Utvrđeno je da kod krava ketoprofen inhibira aktivnosti faktora agregacije trombocita (PAF-platelet activating factor), koji je odgovoran za iriverzibilnu agregaciju trombocita (da Silva i sar., 1997; da Silva i sar., 1998). Isto tako, dokazano je da ketoprofen inhibira enzim lipooksigenazu, čime je blokirano stvaranje bradikina (Katzung, 1995; Lees i sar., 2004).

Ketoprofen redukuje inflamaciju smanjujući oslobađanje medijatora inflamacije iz granulocita, bazofila i mastocita, smanjujući osetljivost krvnih sudova na bradikin i histamin, koji utiču na proizvodnju limfokina iz T-limfocita i posledično vazodilataciju (Katzung, 1995). Prostaglandini deluju sinergistički sa medijatorima inflamacije kao što su: histamin i bradikinin, što povećava propustljivost. Ketoprofen antipiretičku aktivnost ispoljava inhibicijom prostaglandina u hipotalamusu. Prostaglandini ne stimulišu nociceptore direktno, ali

poboljšavaju nociceptivne stimuluse proizvedene od strane drugih medijatora inflamacije (serotonin, bradikinin i histamin), čemu se može pripisati analgetsko delovanje ketoprofena (Lees i sar., 2004). Takođe, ketoprofen prolazi kroz krvno-moždanu barijeru zbog čega ima centralno analgetičko dejstvo (Herrero i sar., 1997; Diaz-Reval i sar., 2004).

Nakon upotrebe racemske smeše ketoprofena, kod nekih životinjskih vrsta je dominantna koncentracija R (-) enantiomera u plazmi, dok kod drugih dominiraju koncentracije S (+) enantiomera. U nekim slučajevima koncentracija oba enantiomera u plazmi je ista, što je slučaj i kod krava (Landoni i sar., 1995; Landoni i Lees., 1995). Enantiomer S (+) ketoprofena je potentniji COX inhibitor, ima veći antiinflamatorni potencijal od R (-) enantiomera (Cabre i sar., 1998) i smatra se odgovornim za blokiranje aktivnosti COX enzima i nastanak analgetskog i antiinflamatornog efekta (Arifah i sar., 2001). Odnosno, za inhibiciju izoforme COX-2 je skoro isključivo odgovoran S (+) enantiomer ketoprofena (Suesa i sar., 1993). Međutim, dokazano je da R (-) enantiomer ketoprofena ima potentniji analgetski efekat nego S (+) enantiomer (Ossipov i sar., 2000; Pinardi i sar., 2001).

Hiralna inverzija ovog leka od R (-) ka S (+) enantiomeru se javlja u različitoj meri u zavisnosti od životinjske vrste, npr. u 49% slučajeva kod konja, a u 41 % slučajeva kod krava (Landoni i sar., 1997). Kod mlečnih krava, u istraživanju koje su sprovedi Igarza i sar. (2002) procenat inverzije R (-) enantiomera u S (+) enantiomer se razlikuje u odnosu na fiziološko stanje i bio je veći u ranoj laktaciji nego tokom perioda zasušenja. Odnosno, u ovom istraživanju je utvrđeno da je ovaj procenat inverzije 51% kod teladi, 33% kod krava u ranoj laktaciji i 26% kod krava u graviditetu. Takođe, prilikom inverzije, nije zabeležen uticaj doze na obim ove inverzije (Menzel i sar., 1994; Geisslinger i sar., 1995).

2.7.3. Farmakokinetika ketoprofena

Iako se NSAIL dobro absorbuju u organizmu dati na različite načine, zbog specifičnih fizioloških osobenosti preživara, ketoprofen se kod krava aplikuje parenteralno (Fitzpatrick i sar., 2004). Međutim, veza između farmakokinetike leka i njegove aktivnosti je veoma složena, jer se NSAIL u visokom procentu vezuju za proteine plazme, čak više od 99% u nekim slučajevima (Galbraith i McKellar, 1996). Ovo važi i za ketoprofen, jer se i on sa visokim afinitetom vezuje za proteine plazme kod krava, čak 97% (EMEA, 1995). Sve to može ograničiti prolazak leka iz

plazme u intestinalnu tečnost, ali takođe znači da NSAID ostaju duže vremena u tkivu koje je zahvaćeno inflamacijom i imaju duže delovanje nego što bi se moglo očekivati na osnovu njihove farmakokinetike u plazmi (Landoni i sar., 1996). S obzirom da se ketoprofen u visokom procentu vezuje za proteine plazme, očekuje se da njegova distribucija bude primarno u ekstracelularnim tečnostima. Nakon oralne i i.m. primene ketoprofena postiže se manji prolazak ovog leka u ekstracelularnu tečnost u odnosu na i.v. primenu, što obezbeđuje visoke početne koncentracije u plazmi (Lees i sar., 2004).

Posle i.m. primene, ketoprofen se brzo apsorbuje, a poluvreme eliminacije ($t_{1/2}$) kreće se od 0,15- 0,25 h. Biotransformacija ovog leka se odvija uglavnom u jetri, mada metaboliti mogu da se izlučuju i preko urina (Boothe, 1995). Proces biotransformacije ketoprofena odvija se u tri faze: a) konjugacija do acilglukuronida, b) hidrosilacija aromatičnog prstena benzoeve grupe i c) inverzija R (+) enantiomera u S (+) enantiomer (Mauleón i sar., 1996). Singh i sar. (2014) su ispitivali farmakokinetiku ketoprofena kod krava posle i.v. i i.m. aplikacije u terapijskoj dozi i ustanovili značaj njegove primene u lečenju inflamatornih stanja kod krava. U ovom istraživanju utvrđene vrednosti za prosečno poluvreme eliminacije su bile $1,55 \pm 0,05$ i $3,40 \pm 0,05$ h, za volumen distribucije $0,35 \pm 0,02$ i $0,72 \pm 0,02$ ml/kg, a za ukupni klirens $289,28 \pm 9,31$ i $169,75 \pm 3,51$ ml/h/kg. Biološka raspoloživost ketoprofena posle i.m. primene kod krava iznosila je 77,31%. U ovom ispitivanju je uočeno duže poluvreme eliminacije, viša vrednost volumena distribucije i manji intezitet klirensa nakon i.m. aplikacije ketoprofena, u odnosu na i.v., što je definisalo izbor i.m. aplikacije ketoprofena kod krava. Do sličnih rezultata za ispitivanje vrednosti volumena distribucije kod krava nakon i.m. aplikacije ketoprofena su došli i Igarza i sar. (2004). Naime, ispitujući farmakokinetičke osobine i terapijski režim doziranja ketoprofena kod teladi i krava ovi autori su ustanovili da na režim doziranja utiču uzrast i različita fiziološka stanja (laktacija, gestacija). Prema istraživanju drugih autora (Landoni i sar., 1995), kod teladi nakon i.v. aplikacije 3 mg/kg racemske smeše ketoprofena, zabeležano poluvreme eliminacije je bilo 0,03 h, dok je vrednost volumena distribucije bila niska ($0,20 \pm 0,06$ l/kg za R (-) i $0,22 \pm 0,06$ l/kg za S (+) ketoprofen). Takođe, prema drugim literaturnim podacima, volumen distribucije je nizak za oba enantiomera ketoprofena, bez značajnijih razlika između njih (Landoni i sar., 1995; EMEA, 1996).

Nakon aplikacije, ketoprofen se u organizmu konvertuje u metabolit RP 69400 (2-(fenil 3-alfa-hidroksibenzoil) propionsku kiselinu). Metabolit RP 69400 je pronađen u značajnom

stepenu u plazmi svih životinjskih vrsta, izuzev kod pacova gde je uočen samo u tragu. Posle jednokratne i.m. aplikacije ketoprofena u dozi od 3 mg /kg t.m. sa dodatkom 14C ketoprofena, merenjem koncentracije prisutnih materija u plazmi uočen je dobar odnos između ukupne radioaktivnosti i zbira ketoprofena i metabolita RP 69400 (EMEA, 1995).

Ketoprofen se brzo eliminiše putem bubrega nakon i.v. i i.m. aplikacije (EMEA, 1995). Posle parenteralne primene, manje od 1% ketoprofena se izlučuje u neizmenjenom obliku, a utvrđeno je da se tokom 24 sata izlučuje, uglavnom kao konjugovani metabolit (Katzung, 1995). Posle ponovljene i.m. primene radioobeleženog ketoprofena u istoj dozi tokom tri dana, radioaktivnost može da se meri samo u bubrezima, odnosno 24 sata posle treće injekcije je izmerena koncentracija od $0,19 \pm 0,14 \mu\text{g/g}$ za ketoprofen i $0,24 \pm 0,17 \mu\text{g/g}$ za njegov aktivni metabolit RP 69400. U drugim tkivima, koncentracije nisu mogle da se detektuju ($<0,025 \mu\text{g/g}$ za ketoprofen i $0,05 \mu\text{g/g}$ za metabolit RP 69400) ili su bile niže od granice kvantifikacije ($0,05 \mu\text{g/g}$ za ketoprofen i $0,1 \mu\text{g/g}$ za RP 69400) (EMEA, 1995).

Tabela 2. Preporučena karenca za neke predstavnike NSAIL (Smith i sar., 2008)

Lek	Način aplikacije	Meso Karenca (dana)	Mleko Karenca (dana)
Aspirin	oralno	1	1
Karprofen	i.v. ili s.c.	21	0
Fluniksin meglumin	i.m.	30	3
Ketoprofen	i.v. ili i.m.	7	1
Fenilbutazon	i.m.	55 (samo za goveda)	N/P
Fenilbutazon	oralno	50 (samo za goveda)	N/P
Tolfenaminska kiselina	i.v. (pojedinačna doza)	7	1

N/P = Nije primenljiv

Nakon jednokratne i.m. primene radioaktivno obeleženog ketoprofena u dozi od 3 mg/kg t.m. kod krava, najveći procenat ukupnih rezidua ketoprofena u vrednosti od 56% je utvrđen u mišićima i bubrezima, zatim u masnom tkivu (35%), a najniže vrednosti su zabeležene u jetri (2%). Na mestu aplikacije leka je utvrđeno 85% od aplikovane doze ketoprofena (EMEA, 1995). Smith i sar. (2008) su utvrdili nakon primene ketoprofena u dozi od 3,3 mg/kg, tokom 3 dana, karenca za meso iznosi 7 dana, a za mleko 24 časa. Prema istim podacima, ketoprofen aplikovan

i.m. ili i.v. ima manju karencu za mleko u odnosu na i.m. aplikovan fluniksini-meglumin (Tabela 2) (Smith i sar., 2008).

Suprotno navedenim podacima, dokazano je da se posle primene u terapijskim dozama, ketoprofen i njegov metabolit RP 69400 u mleku nalaze ispod limita detekcije ($<0,025 \mu\text{g/ml}$) (EMEA, 1995). Do sličnih rezultata su došli i drugi autori (De Graves i sar., 1996). Naime, nakon i.v. aplikacije $3,31 \text{ mg/kg}$ ketoprofena kravama, iako je ketoprofen bio detektovan (detekcioni limit $>27 \text{ ng/mL}$) u uzorcima 10-120 minuta posle aplikacije, nije bilo moguće njegovo određivanje, jer je količina ovog leka bila ispod limita kvantifikacije (90 ng/ml).

2.7.4. Neželjena dejstva ketoprofena

Kao što je već spomenuto, većina tipičnih neželjenih efekata NSAIL nastaju kao posledica COX inhibicije, iako se neki od neželjenih efekata ne mogu objasniti ovim mehanizmom (Little i sar., 2007). Najčešći neželjeni efekat NSAIL je oštećenje gastrointestinalne sluznice, koja je uglavnom izazvana COX-1 inhibicijom i ne zavisi od načina primene leka (Wallace, 1997; Lascelles i sar., 2005). Klinička slika prouzrokovana gastrointestinalnom iritacijom i ulceracijom uključuje depresiju, anoreksiju, smanjen apetit, proliv, povraćanje i melenu (Stanton i Bright, 1989; Hinton i sar., 2002). Dokazano je da su obe izoforme COX enzima prisutne u bubrezima (Miller, 2006). Naime, inhibicija bilo koje od izoformi može dovesti do otkazivanja funkcije bubrega (Lascelles i sar., 2005). U ispitivanjima Khan i sar. (1998), dokazano je da dehidracija, hipovolemija i starost predstavljaju predisponirajuće faktore za nastanak neželjenih efekata bubrega.

Prema podacima iz literature, izoforma COX-1 inhibira proizvodnju tromboksana, što može dovesti do produženog krvarenja, dok selektivna COX-2 inhibicija može dovesti do povećanja rizika od nastanka trombogenezе, smanjujući antiagregacijski efekat i vazodilataciju izazvanu prostaglandinima (Miller, 2006).

U istraživanjima kod ljudi, nakon primene NSAIL su utvrđeni i kardiovaskularni neželjeni efekti (srčana insuficijencija, infarkt miokarda i moždani udar). Ovi efekti u velikoj meri zavise od COX-2 inhibicije (Grosser i sar., 2010). Prema drugim literaturnim podacima (Carrillo-Jimenez i Nurnberger, 2000; Chitturi i George, 2002) je dokazano da hepatotoksičnost može biti povezana sa inhibicijom enzima COX. Prijavljena neželjena dejstva kod ljudi nastala

prilikom primene terapijskih doza ketoprofena su gastrointestinalna iritacija i ulceracije, produženo krvarenje i vreme zgrušavanja, kao i oštećenje funkcije bubrega i pojava alergijskih reakcija (Jerussi i sar., 1998).

U istraživanju koje su sprovedli Singh i sar. (2009), terapijska doza od 3 mg/kg racemskog ketoprofen primenjena i.v. u toku 5 uzastopnih dana se dobro toleriše kod teladi. U odnosu na i.m. primenu flunixin meglumina i fenilbutazona kod krava, primena ketoprofena izaziva blažu lokalnu reakciju (Pyorala, 1999). Prilikom ispitivanja toksičnosti je utvrđeno da se ketoprofen dobro toleriše, primenjen kod krava i.m. ili i.v. u pet puta većoj dozi od preporučene terapijske dnevne doze primenjivane u dvostruko do trostruko dužem vremenskom periodu od preporučenog uputstvom za primenu. Takođe, ketoprofen ne ispoljava teratogenost, mutagenost i kancerogenost u istraživanjima koja su do sada sprovedena (EMEA, 1995).

3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA

U periodu rane laktacije zdravlje i produktivnost krava su najosetljiviji postojanjem metaboličkih i inflamatornih procesa koji predstavljaju najčešći okidači za nastanak bolesti, te je neophodno ispitati da li postoji mogućnost da se pravovremenom primenom NSAIL, odnosno ketoprofena utiče na nastanak navedenih poremećaja. Na osnovu činjenica u dostupnoj literaturi definisani su sledeći ciljevi istraživanja:

- a) Dokazati da parenteralna primena ketoprofena može povoljno uticati na metabolički status krava posle teljenja.
- b) Dokazati da parenteralna primena ketoprofena može imati uticaja na inflamatorne procese u periodu kod krava posle teljenja.
- c) Dokazati da parenteralna primena ketoprofena može imati uticaja na odnos između metaboličkih i inflamatornih promena kod krava posle teljenja.
- d) Dokazati da parenteralna primena ketoprofena može imati pozitivan uticaj na proizvodnju mleka.

Rezultati istraživanja ukazaće na neophodnu potrebu primene ketoprofena u kontroli akutnog inflamatornog odgovora i metaboličkog stresa, dok na su osnovu činjenica navedenih u pregledu literature definisani sledeći zadaci:

- a) Ispitati da li će ketoprofen primenjen parenteralno kod krava u periodu posle teljenja redukovati znake metaboličkog stresa, tj. smanjiti lipidnu mobilizaciju, ketogenezu, kumulaciju lipida u jetri, što se dokazuje metaboličkim profilom za jetru koji uključuje praćenje koncentracije NEFA, BHB, glukoze, ukupnih proteina, uree, albumina, AST, ALT, bilirubina, holesterola, triglicerida, kalcijuma i fosfora.
- b) Ispitati da li će ketoprofen primenjen parenteralno smanjiti akutni inflamatorni odgovor kod krava u periodu posle teljenja, tj. smanjiti koncentracije proteina akutne faze (haptoglobina i fibrinogena) i proinflamatornih citokina (TNF- α , IL-1 α i IFN- γ), uz promene u krvnoj slici.
- c) Ispitati da li postoji korelacija između inflamatornog odgovora i metaboličkog statusa kod krava nakon primene ketoprofena u periodu posle teljenja, odnosno da li će primena navedenog leka smanjiti međusobnu povezanost ova dva procesa u organizmu, a samim tim i rizik za nastanak različitih oboljenja.

d) Ispitati da li u periodu posle teljenja parenteralna primena ketoprofena u ranoj laktaciji, osim smanjenja inflamacije i metaboličkog stresa, imati pozitivan uticaj na proizvodnju mleka.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Odabir krava, uslovi držanja i nege i etička dozvola

Ogled je izveden na farmi visoko mlečnih krava Holštajn-frizijske rase lociranih na teritoriji Banata (Banatska Topola). Krave su gajene u slobodnom sistemu, na dubokoj prostirci, ali su tokom tranzicionog perioda u porodilištu bile na vezu. Za ogled je odabrano 30 krava u postpartalnoj fazi, bez kliničkih promena zdravstvenog stanja što je utvrđeno kliničkim pregledom i uvidom u evidenciju podataka o zdravstvenom stanju životinja. Odabrane su krave normalne telesne kondicije (ocena 3,25-3,50), bez blizanačkog graviditeta i mrtvorodenog ploda. Potom je formirana ogledna grupa od 15 krava kojoj je aplikovan ketoprofen i kontrolna grupa od 15 krava koja nije tretirana lekom (negativna kontrola). Krave su imale slobodan pristup vodi za piće (pojljica za goveda), a hranjene su sa potpuno umešanim obrokom (TMR, total mixed ration), koji je baziran na silaži (raž, kukuruz) koncentratu i senu lucerke. Ukupna masa obroka po kravi je bila 47,65 kg.

Etička komisija za zaštitu dobrobiti oglednih životinja Univerziteta u Novom Sadu je dala saglasnost za sve eksperimentalne protokole na oglednim životinjama. Odnosno, ova istraživanja su odobrena odlukom Etičke komisije broj 01-90/11-4. Svi eksperimenti su izvedeni i rukovođeni u saglasnosti sa evropskom legislativom koja pokriva zaštitu životinja u istraživanjima, posebno Direktivom 2010/63/EU od 22.09.2010. godine o zaštiti životinja koje se koriste u naučne svrhe, kao i Zakonom o dobrobiti životinja Republike Srbije od 10.06.2009. godine.

4.2. Aplikacija ketoprofena

Oglednoj grupi krava, ketoprofen (Mediprofen®) je aplikovan i.m. u terapijskoj dozi (3mg/kg t.m.) u prvih par sati nakon teljenja, posle prve jutarnje muže, tokom tri uzastopna dana. Lek je aplikovan u predelu vratne muskulature, u zoni trougla koji je omeđen sa *ligamentum nuche*, jugularni žljebom i kranijalnim delom muskulature lopatice.

4.2. Uzimanje uzoraka krvi

Uzorci krvi za analizu su uzimani iz repne vene (*vena coccygea*) na dan teljenja (3 sata posle teljenja), u prvoj i drugoj nedelji posle teljenja (3 sata posle prvog jutarnjeg hranjenja, oko 12 h). Pre uzimanja uzoraka krvi urađena je dezinfekcija mesta uboda, tako što je koža repa oprana tekućom vodom, obrisana suvom čistom gazom i na kraju očišćena alkoholom, po principu asepse i antiseptice. Na ovaj način je sprečena infekcija mesta prilikom uboda, ali se je sprečavan i prodor fekalnih bakterija u uzorak krvi, koje bi dovele do razvoja brze hemolize i odbacivanja uzorka.

Uzorci krvi za ispitivanje hematoloških parametara su sakupljeni u desetomililitarske vakutajner epruvete (BD Vacutainer® EDTA, BD Plymouth, UK) sa 3,6 ml antikoagulansa K2E (kalijumova so EDTA (etilen diamin tetra sirćetna kiseline)). Uzorci krvi za ispitivanje biohemijskih parametara su sakupljeni u desetomililitarske epruvete sa gel separatorom (BD Vacutainer® SST II Advance, BD Plymouth, UK) koji u sebi sadrži silikon koji je aktivator koagulacije i gel koji predstavlja barijeru između koaguluma i seruma nakon centrifugiranja. Vakutajner epruvete sa gel separatorom su centrifugirane na 4000 obrtaja u trajanju od 10 minuta, kako bi se u potpunosti izdvojio serum. Svaka vakutajner epruveta sa uzorcima krvi je obeležena zbog sledljivosti uzoraka, a potom i zaštićena od direktnog delovanja sunčeve svetlosti, postavljeni na suvi led i transportovani u laboratoriju Departmana za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.

4.4. Određivanje koncentracije proteina akutne faze i citokina

Proteini akutne faze (haptoglobina i fibrinogena) i proinflamatorni citokini (TNF- α , IL-1 α i IFN- γ) su određene pomoću ELISA metode, prema standardnim instrukcijama proizvođača.

Prilikom određivanja koncentracije haptoglobina, fibrinogena i IL-1 α standardne krive su određene merenjem absorbance standarda i njenim poređenjem sa poznatom koncentracijom standarda. Za očitavanje absorbance je korišćen čitač za mikrotitarske ploče. Svi reagensi su pažljivo 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 ovih parametara. Ispiranje i inkubiranje mikrotitar ploča je vršeno prema preporuci proizvođača. Očitavanje je vršeno pomoću mikrotitar čitača (*Rayto RT-2100C*).

Haptoglobin – Određivanje koncentracije haptoglobina je vršeno pomoću sendvič ELISA metode. Mikrotitarska ploča je prethodno obložena sa antitelom specifičnim za haptoglobin. Standardi ili uzorci su zatim dodati u odgovarajuće bazenčiće mikrotitarske ploče sa biotin-konjugovanim antitelom (specifičnim za haptoglobin) i avidinom (konjugovan sa HRP enzimom). Ploče su zatim inkubirane 2 h na 37°C. Preostala tečnost iz bazenčića je aspirirana i dodat je detekcioni reagens A i ploča je zatim inkubirana 1 h na 37°C. Posle toga je sadržaj iz ploča aspiriran i one su isprane 3 puta sa puferom za ispiranje. Nakon toga je dodat detekcioni reagens B i ploča je inkubirana 30 minuta na 37°C. Sadržaj iz ploča je aspiriran i one su isprane 5 puta sa puferom za ispiranje. Zatim je dodat rastvor TMB supstrata u svaki bazenčić. Samo u onim bazenčićima koji su sadržali haptoglobin, biotin-konjugovano antitelo i enzimski konjugovani avidin je došlo do promene u boji. Zatim su ploče inkubirane 15-25 minuta na 37°C. Reakcija enzim-supstrat je prestala dodavanjem stop rastvora (rastvora sumporne kiseline) i promena boje je odmah merena spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 450 nm±10 nm na čitaču za mikrotitarske ploče. Koncentracija haptoglobina u uzorcima je zatim određena upoređivanjem optičke gustine uzoraka sa standardnom krivom. Standardna koncentracija koja se detektuje u opsegu od 15,6-1000 ng/mL. Proizvođač kita je *Cloud-Clone Corp* (N° SEA817Bo).

Fibrinogen – Određivanje koncentracije fibrinogena je vršeno pomoću sendvič ELISA metode. Mikrotitarska ploča je prethodno obložena sa antitelom specifičnim za fibrinogen. Standardi ili uzorci su zatim dodati u odgovarajuće bazenčiće mikrotitarske ploče sa biotin-konjugovanim antitelom (specifičnim za fibrinogen) i avidin (konjugovan sa HRP enzimom). Ploče su inkubirane 2 h na 37°C. Zatim je preostala tečnost iz bazenčića aspirirana, dodat je detekcioni reagens A i ploča je inkubirana 1 h na 37°C. Posle toga je sadržaj iz ploča aspiriran i one su isprane 3 puta sa puferom za ispiranje. Nakon toga je dodat detekcioni reagens B i ploča je inkubirana 30 minuta na 37°C. Sadržaj iz ploča je aspiriran i one su isprane 5 puta sa puferom za ispiranje. Zatim je dodat rastvor TMB supstrata u svaki bazenčić. Samo u onim bazenčićima koji su sadržali fibrinogen, biotin-konjugovano antitelo i enzimski konjugovani avidin je došlo

do promene u boji. Zatim su ploče inkubirane 15-25 minuta na 37°C. Reakcija enzim - supstrat je prestala dodavanjem stop rastvora i promena boje je odmah merena spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 450 nm±10 nm na čitaču za mikrotitarske ploče. Koncentracija fibrinogena u uzorcima je zatim određena upoređivanjem optičke gustine uzoraka sa standardnom krivom. Standardna koncentracija koja se detektuje u opsegu od 15,6-1000 ng/mL. Proizvođač kita je *Cloud-Clone Corp* (N° SEA193Bo).

Interleukina-1 α (IL-1 α) - Određivanje koncentracije IL-1 α je vršeno pomoću sendvič ELISA metode. Mikrotitarska ploča je prethodno obložena sa antitelom specifičnim za IL-1. Standardi ili uzorci su zatim dodati u odgovarajuće bazenčiće mikrotitarske ploče sa biotin - konjugovanim antitelom specifičnim za IL-1 α i avidin (konjugovanim sa HRP enzimom). Ploče su inkubirane 2 h na 37°C. Zatim je preostala tečnost iz bazenčića aspirirana i dodat je detekcioni reagens A i ploča je inkubirana 1 h na 37°C. Posle toga je sadržaj iz ploča aspiriran i one su isprane 3 puta sa puferom za ispiranje. Nakon toga je dodat detekcioni reagens B i ploča je inkubirana 30 minuta na 37°C. Sadržaj iz ploča je aspiriran i one su isprane 5 puta sa puferom za ispiranje. Zatim je dodat rastvor TMB supstrata u svaki bazenčić. Samo u onim bazenčićima koji su sadržali IL-1 α , biotin-konjugovano antitelo i enzimski konjugovani avidin je došlo do promene u boji. Reakcija enzim-supstrat prestaje dodavanjem rastvora sumporne kiseline i promena boje se meri spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 450 nm±10 nm. Zatim su ploče inkubirane 10-20 minuta na 37°C. Reakcija enzim-supstrat je prestala dodavanjem stop rastvora i promena boje je odmah merena spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 450 nm±10 nm na čitaču za mikrotitarske ploče. Koncentracija IL-1 α u uzorcima je zatim određena upoređivanjem optičke gustine uzoraka sa standardnom krivom. Standardna koncentracija koja se detektuje je u opsegu od 15,6-1000 pg/mL. Proizvođač kita je *Cloud-Clone Corp* (N° SEA071Bo).

Za određivanje koncentracije TNF- α i IFN- γ standardne krive su određene merenjem vrednosti relativne svetlosne jedinice (RLU) standarda i njenim poređenjem sa poznatom koncentracijom standarda. Za očitavanje RLU vrednosti je korišćen na aparat Fluoroscan Ascent FL (Thermo Scientific, USA). Svi reagensi su pražljivo pripremljeni po uputstvu proizvođača, a ispiranje i inkubiranje mikrotitar ploča je vršeno takođe prema preporuci proizvođača.

Faktora nekroze tumora-alfa (TNF- α) – Određivanje koncentracije TNF- α je vršeno pomoću hemilumiscentne imunotest ELISA metode. Mikrotitarska ploča je prethodno obložena sa antitelom specifičnim za TNF- α . Standardi ili uzorci su zatim dodati u odgovarajuće

mikrotitarske ploče bazenčiče sa biotin-konjugovanim poliklonalnim antitelom specifičnim za TNF- α i avidin (konjugovan sa HRP enzimom) dodat u svaki bazenčić mikrotitar ploče. Ploče inkubirane 2 h na 37°C. Zatim je preostala tečnost iz bazenčića aspirirana i dodat je detekcioni reagens A i ploča je inkubirana 1 h na 37°C. Posle toga je sadržaj iz ploča aspiriran i one su isprane 3 puta sa puferom za ispiranje. Nakon toga je dodat detekcioni reagens B i ploča je inkubirana 30 minuta na 37°C. Sadržaj iz ploča je aspiriran i one su isprane 5 puta sa puferom za ispiranje. Zatim je dodata smeša supstrata A i B za generisanje kinetike emisije svetlosti. Nakon dodatka ove smeše ploča je inkubirana 10 minuta na 37°C, a zatim je izmeren RLU. Koncentracija TNF- α u uzorcima je zatim određena upoređivanjem optičke gustine uzoraka sa standardnom krivom. Nakon razvijanja ploče, izmeren je intenzitet emitovane svetlosti koji je proporcionalna nivou TNF- α u uzorku ili standardu. Standardna koncentracija koja se detektuje je u opsegu od 1,37-1000 pg/mL. Proizvođač kita je *Cloud-Clone Corp* (N° SCA133Bo).

Interferona gama (IFN- γ) - Određivanje koncentracije IFN- γ je vršeno pomoću hemilumiscentne imunotest ELISA metode. Mikroploča je obložena sa antitelom specifičnim za IFN- γ . Standardi ili uzorci su dodati u odgovarajuće bazenčiče mikroploče sa biotin konjugovanim antitelom (specifičnim za IFN- γ) i inkubirani 2 h na 37 °C. Preostala tečnost iz bazenčića je aspirirana i dodat je detekcioni reagens A i ploča je inkubirana 1 h na 37°C. Posle toga, sadržaj ploča je aspiriran i one su isprane 3 puta sa puferom za ispiranje, a zatim je dodat detekcioni reagens B. Ploča je inkubirana 30 minuta na 37°C, sadržaj iz ploča je aspiriran i one su isprane 5 puta sa puferom za ispiranje. Zatim je dodata smeša supstrata A i B za generisanje kinetike emisije svetlosti. Nakon dodatka ove smeše, ploča je inkubirana 10 minuta na 37°C, a zatim je izmeren RLU. Koncentracija IFN- γ u uzorcima je zatim određena upoređivanjem optičke gustine uzoraka sa standardnom krivom. Nakon razvoja ploče, izmeren je intenzitet emitovane svetlosti koji je proporcionalna nivou IFN- γ u uzorku ili standardu. Standardna koncentracija koja se detektuje je u opsegu od 1,37-1000 pg/mL. Proizvođač kita je *Cloud-Clone Corp* (N° SCA049Bo).

4.5. Određivanje koncentracije metaboličkih i hematoloških parametara

Hematološki parametri (broj leukocita, uključujući i diferencijalnu krvnu sliku, koncentracija hemoglobina, broja eritrocita, trombocita, uključujući i zapreminu trombocita) su

određeni pomoću hematološkog analizatora sa softverom za goveda (Hemavet 950, Drew Scientific Group, Nemačka). Metabolički parametri (NEFA, BHB, glukoza, ukupni proteini, urea, albumini, AST, ALT, bilirubin, holesterol, trigliceridi, kalcijum i fosfor) su određeni pomoću standardnih fotometrijskih metoda, upotrebom biohemijskih kitova. Korišćen je spektrofotometar Rayto RT1904c. Fotometriiranje je vršeno na talasnoj dužini i u vremenskom intervalu prema specifikaciji proizvođača. Pre upotrebe svakog novog kita formirana je kalibraciona kriva, takođe prema specifikacijama 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.

NEFA – Koncentracija NEFA je određena kolorimetrijskom reakcijom koja se zasniva na acilaciji koenzima A od strane masnih kiselina u prisustvu dodate acil-CoA sintetaze, kao katalizatora. Acil-CoA se oksidiše pod dejstvom dodate acil-CoA oksidaze uz proizvodnju vodonik peroksida. Vodonik peroksid u prisustvu peroksidaze omogućava oksidativnu kondenzaciju 3-metil-N-etil-N(β-hidroksietil)-anilina (MEFA) sa 4-aminoantipirinom, što dovodi do nastanka ljubičaste boje.

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

Glukoza – Određivanje glukoze vrši se posle njene enzimske oksidacije, u prisustvu glukoza-oksidaze. Dobijeni vodonik-peroksid u ovoj reakciji dalje reaguje sa 4-aminofenazonom i fenolom u prisustvu peroksidaze, kao katalizatora. Dobija se crvenoljubičasta 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 obojenje proporcionalno koncentraciji albumina.

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⁺.

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

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

Kalcijum – Određivanje kalcijumovog jona se zasniva na hemijskoj reakciji u kojoj ovaj jon daje ljubičasti kompleks sa O-krezolftalein kompleksom u alkalnoj sredini.

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.

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 laktatdehidrogenaze, kao katalizatora daje obojeni L-laktat i NAD⁺.

Trigliceridi - Trigliceridi se određuju enzimskom 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 dodatog glicerol-3-fosfata.

Fosfor - Neorganski fosfor reaguje sa amonijum molibdatom u prisustvu sulfurične kiseline i formira obojeni fosfomolibdat kompleks, pri čemu koncentracija ovog metabolita određuje kolorimetrijsom reakcijom.

4.6. Praćenje proizvodnje mleka

Proizvodnja mleka je praćena kod ogleadne i kontrolne grupe krava tokom standardnog laktacionog perioda (305 dana) pomoću kompijuterskog softvera na farmi. Muža se odvijala dva puta dnevno. Postojao je sistem za izmuzanje tipa riblja kost. Između štale i objekta za mužu je postojao 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.

4.7. Statistička obrada podataka

Uticaj ketoprofena na inflamatorni i metabolički status krava u ranoj laktaciji je određen ispitivanjem statistički značajnih razlika prećenih inflamatornih, metaboličkih i hematoloških parametara, između ogledne i kontrolne grupe u svakoj nedelji oglada. Takođe je ispitana razlika u dinamici promena vrednosti indikatora metaboličkog i inflamatornog stanja za oglednu i kontrolnu grupu posebno. Korišćena je dvofaktorska ANOVA analiza sa naknadnim LSD testom. U narednom koraku je ispitano da li aplikacija ketoprofena smanjuje proporciju krava koje pokazuju povećanu lipidnu mobilizaciju i ketogenezu kao znake metaboličkog stresa, što je učinjeno upotrebom 2x2 tabela i Hi-kvadrat testom. Utvrđeno je koliko je puta veći rizik da se desi povećana lipidna mobilizacija i ketogeneza u kontrolnoj grupi, u odnosu na oglednu grupu krava. Prema podacima iz literature (Ospina i sar., 2010; Chapinal i sar., 2012) kao granična vrednost za povećanu lipolizu uzeta je vrednost NEFA preko 0,6 mmol/L, dok je za povećanu ketogenezu uzeta vrednost BHB preko 1,2 mmol/L.

Linernost veze između inflamacije, stepena lipidne mobilizacije i ketogeneze je ispitana određivanjem koeficijenta korelacije i regresionog parametra b u formuli $Y=a+bX_i$ između: a) inflamatornih parametara, NEFA i BHB b) metaboličkih parametara, NEFA i BHB i c) inflamatornih i metaboličkih parametara, kako u kontrolnoj tako i u oglednoj grupi krava. Ispitana je i razlika u koeficijentu korelacije i regresionom parametru b u kontrolnoj i oglednoj grupi krava, kako bi se utvrdilo da li aplikacija ketoprofena utiče na jačinu i tip veze između inflamatornih i metaboličkih parametara.

Ispitana je ukupna proizvodnja mleka kod krava u standardnoj laktaciji (305 dana), kao i celokupna proizvodnja mleka do sledećeg zasušenja. Statistička značajnost razlike u proizvodnji mleka u kontrolnoj i oglednoj grupi krava je ispitana Studentovim t-testom.

Za potrebe statističke analize korišćen je statistički softver Statgraphic Centurion kao i Microsoft Excel program.

5. REZULTATI

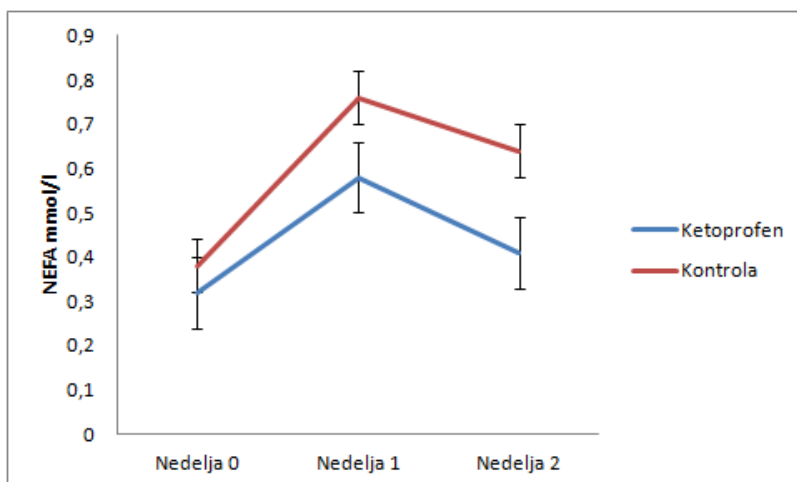
5.1. Uticaj ketoprofena na metaboličke parametre kod krava u ranoj laktaciji

Rezultati ovih istraživanja su pokazali da primena ketoprofena ima značajan uticaj na vrednost metaboličkih parametara kod krava u ranoj laktaciji. Slike od 3 do 15 prikazuju koncentracije ispitivanih parametara (NEFA, BHB, glukoze, ukupnih proteina, albumina, AST, holesterola, ukupnog bilirubina, kalcijuma, uree, ALT, triglicerida i fosfora) u funkciji vremena i aplikacije ketoprofena. U odnosu na kontrolnu grupu krava, u oglednoj grupi su zabeležene signifikantno niže vrednosti ($p < 0,01$) NEFA, BHB, ukupnog bilirubina, kao i AST ($p < 0,05$), odnosno značajno više vrednosti ($p < 0,05$) glukoze, ukupnih proteina, holesterola, kao i albumina ($p < 0,01$) (Tabela 3). Statistički značajne razlike u koncentraciji kalcijuma, fosfora, uree, triglicerida i ALT nisu zabeležene nakon primene ketoprofena (Tabela 3). Isto tako, nakon teljenja (3h) signifikantne promene u koncentraciji između ogledne i kontrolne grupe krava nisu utvrđene za NEFA, BHB, glukoza, ukupni pteine, albumine i AST. U odnosu na posmatrane parametre kontrolne i ogledne grupe, za holesterol i ukupni bilirubin je utvrđen inverzan odnos (Slika 9 i 10).

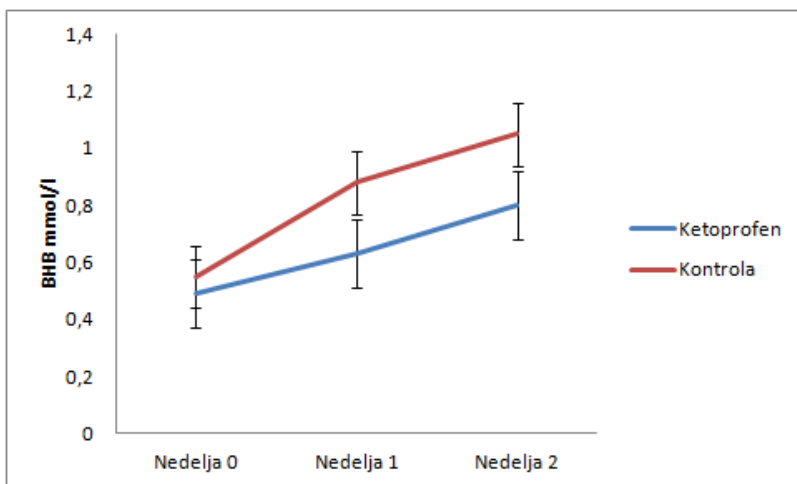
Tabela 3. Rezultati dvofaktorske ANOVA analize sa ponavljanjem – statistička značajnost uticaja nedelje, davanja ketoprofena i njihove interakcije na vrednost metaboličkih parametara

	Uticaj ketoprofena	Uticaj nedelje	Interakcija ketoprofen×nedelja
NEFA	<0,01	<0,01	<0,01
BHB	<0,01	<0,01	<0,01
Glukoza	<0,05	<0,05	<0,01
Ukupni proteini	<0,05	<0,05	<0,05
Albumin	<0,01	<0,05	<0,05
AST	<0,05	<0,05	<0,05
Holesterol	<0,05	<0,01	<0,01
Ukupni bilirubin	<0,01	<0,01	<0,01
Kalcijum	NS*	NS*	NS*
Urea	NS*	<0,05	NS*
ALT	NS*	NS*	NS*
Trigliceridi	NS*	NS*	NS*
Fosfor	NS*	<0,05	NS*

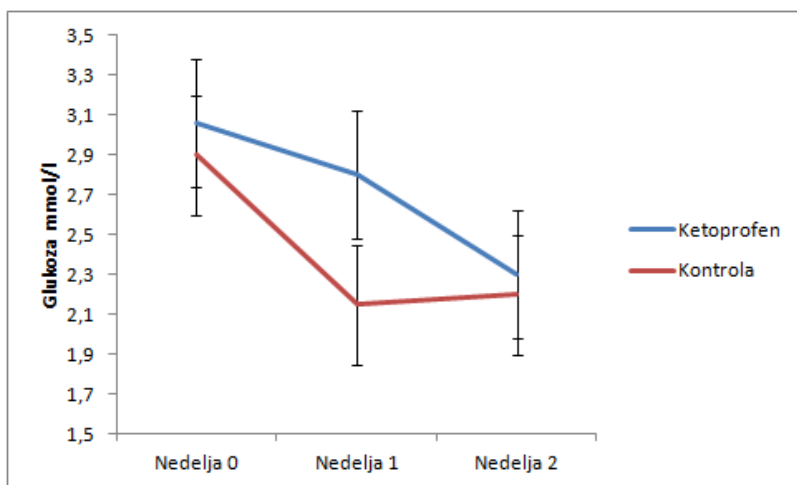
* relacija nije statistički značajna



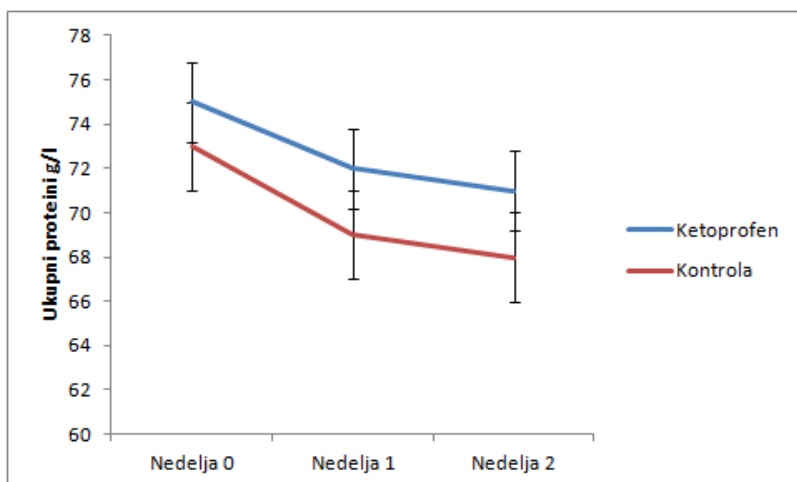
Slika 3. Uticaj ketoprofena na koncentraciju NEFA u krvi



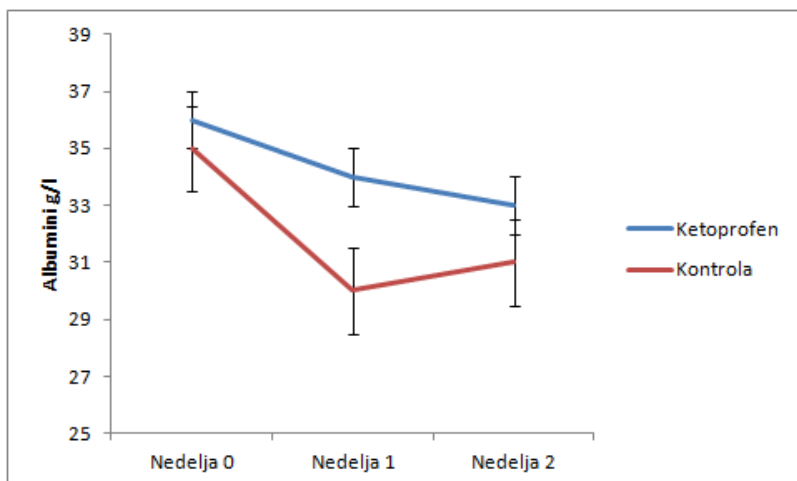
Slika 4. Uticaj ketoprofena na koncentraciju BHB u krvi



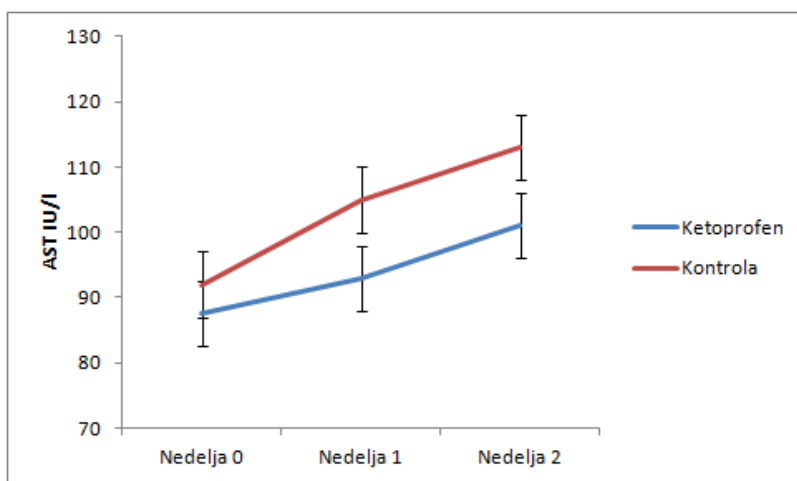
Slika 5. Uticaj ketoprofena na koncentraciju glukoze u krvi



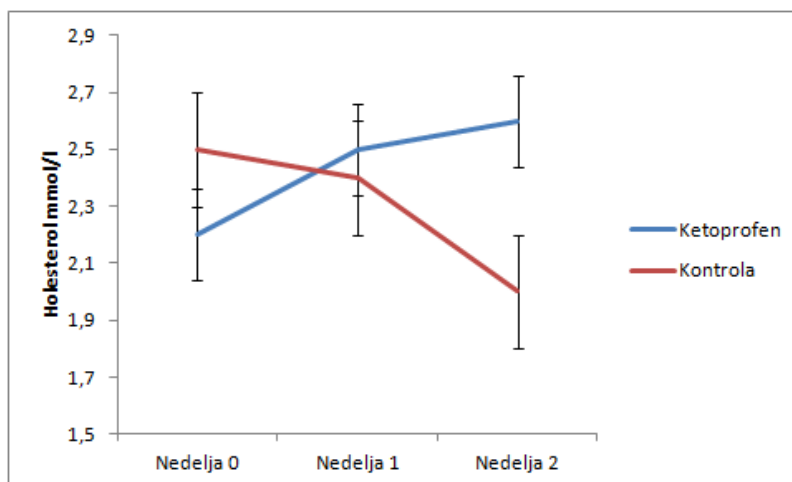
Slika 6. Uticaj ketoprofena na koncentraciju ukupnih proteina u krvi



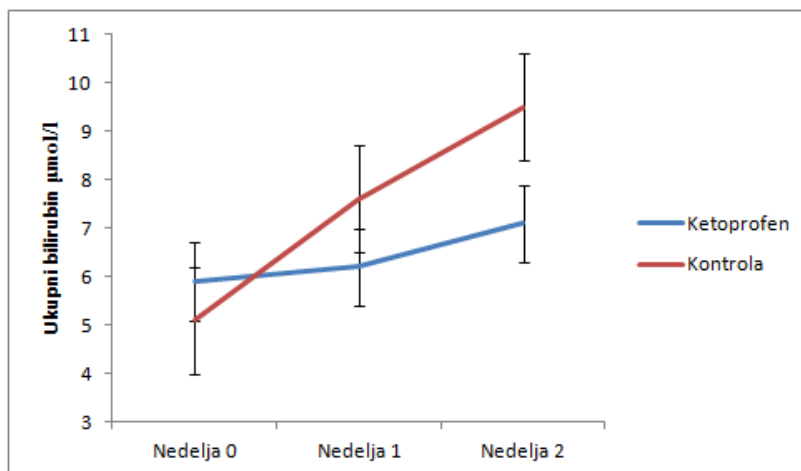
Slika 7. Uticaj ketoprofena na koncentraciju albumina u krvi



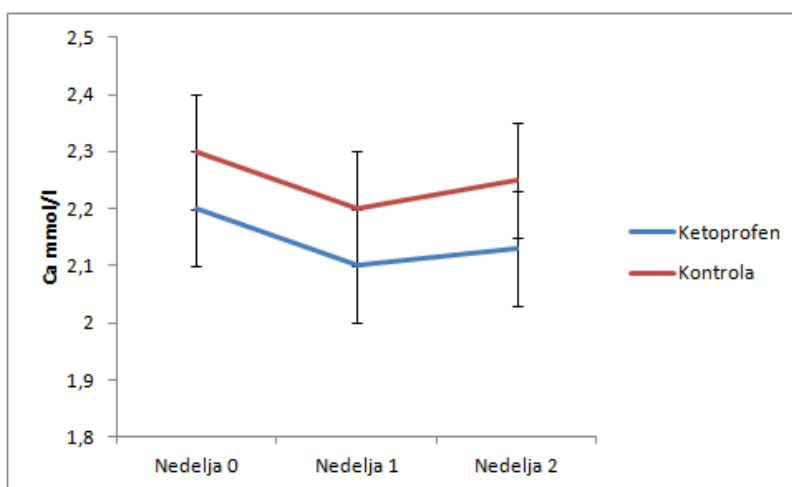
Slika 8. Uticaj ketoprofena na aktivnost AST u krvi



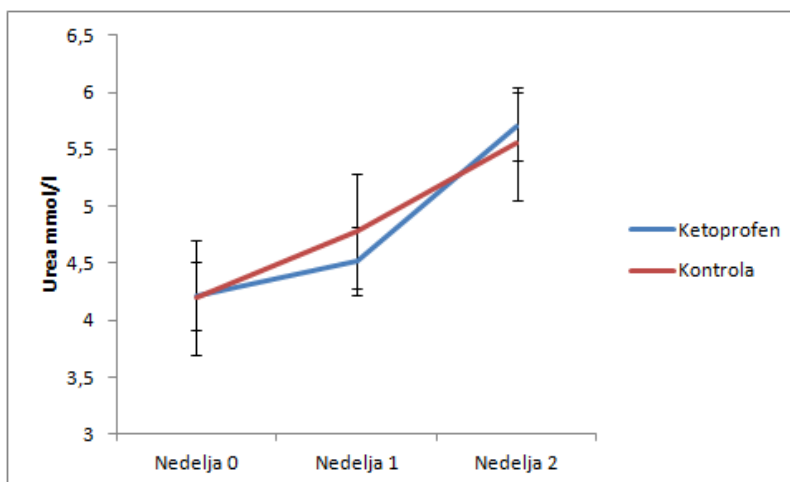
Slika 9. Uticaj ketoprofena na koncentraciju holesterolu u krvi



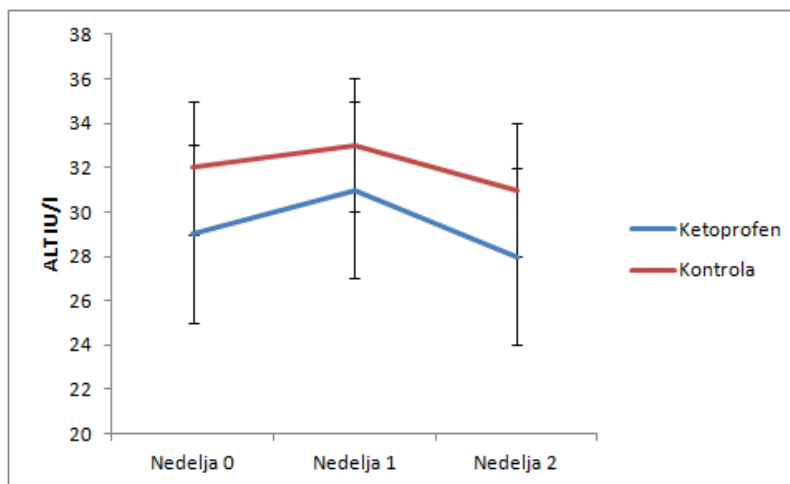
Slika 10. Uticaj ketoprofena na koncentraciju ukupnog bilirubina u krvi



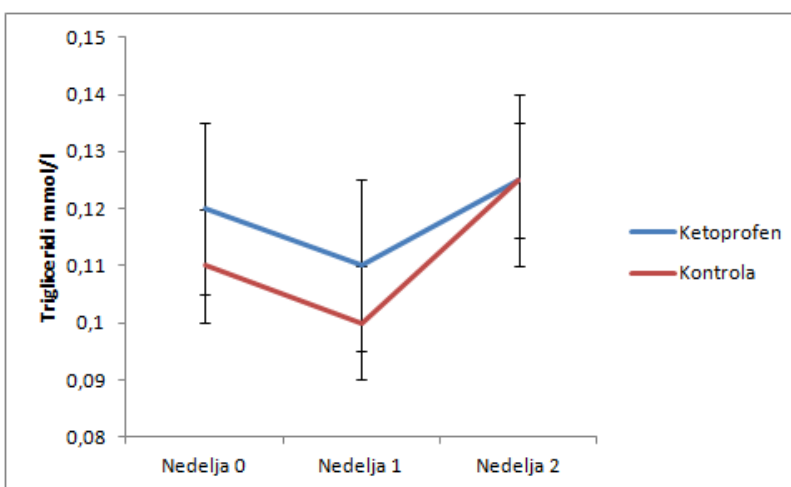
Slika 11. Uticaj ketoprofena na koncentraciju kalcijuma u krvi



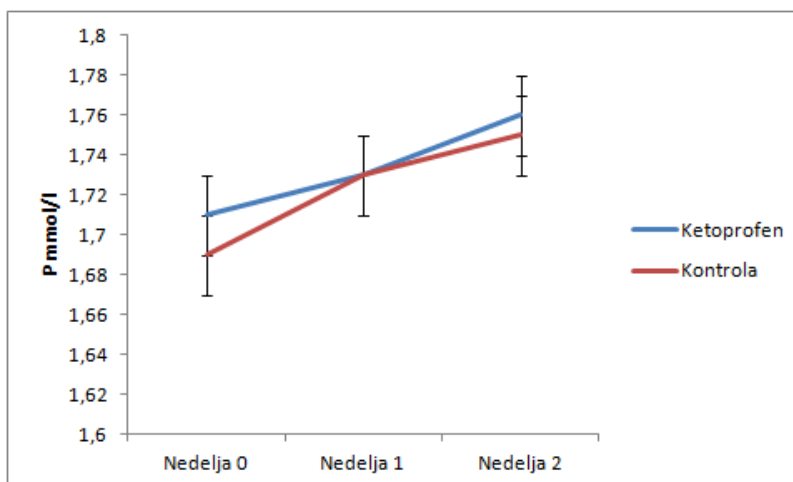
Slika 12. Uticaj ketoprofena na koncentraciju uree u krvi



Slika 13. Uticaj ketoprofena na aktivnost ALT u krvi



Slika 14. Uticaj ketoprofena na koncentraciju triglicerida u krvi



Slika 15. Uticaj ketoprofena na koncentraciju fosfora u krvi

5.2. Uticaj ketoprofena na inflamatorne i hematološke parametre kod krava u ranoj laktaciji

Rezultati ovih istraživanja su pokazali da primena ketoprofena ima značajan uticaj na vrednost hematoloških parametara kod krava u ranoj laktaciji. Slike od 16 do 22 prikazuju koncentracije ispitivanih parametara (hemoglobin, broj eritrocita, leukocita, limfocita, neutrofila i trombocita, kao i srednju zapreminu trombocita) u funkciji vremena i primene ketoprofena. U odnosu na kontrolnu grupu krava, u oglednoj grupi su zabeležene signifikantno niže vrednosti ($p < 0,01$) broja neutrofila i limfocita, odnosno značajno više vrednosti broja eritrocita ($p < 0,05$) i koncentracije hemoglobina ($p < 0,01$) (Tabela 4). Stastistički značajne razlike u broju leukocita i trombocita nisu zabeležene nakon primene ketoprofena (Tabela 4).

Rezultati ovih istraživanja su pokazali i da primena ketoprofena ima značajan uticaj na vrednost inflamatornih parametara kod krava u ranoj laktaciji. Slike od 23 do 27 prikazuju vrednosti inflamatornih parametara (haptoglobin, fibrinogen, IL-1 α , IFN- γ i TNF- α) u funkciji vremena i primene ketoprofena. U oglednoj grupi krava, u odnosu na kontrolnu grupu su zabeležene signifikantno niže vrednosti ($p < 0,01$) haptoglobina (prva i druga nedelja), IL-1 α (prva i druga nedelja), TNF- α (prva i druga nedelja) i IFN- γ (prva i druga nedelja), kao i značajno niže ($p < 0,05$) vrednosti fibrinogena (druga nedelja).

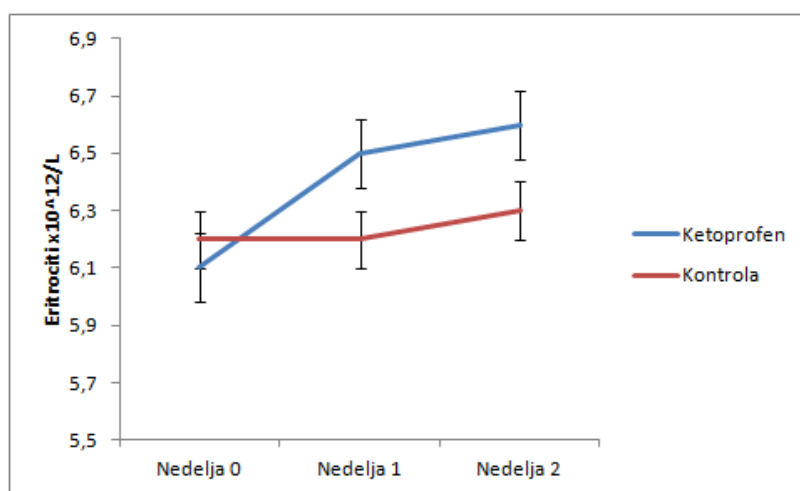
Tri sata nakon teljenja, signifikantne promene u koncentraciji između ogledne i kontrolne grupe krava nisu utvrđene za hemoglobin, limfocite, srednju zapreminu trombocita, haptoglobin i TNF- α . U odnosu na posmatrane parametre kontrolne i ogledne grupe, za broj eritrocita,

neutrofila i trombocita, kao i za koncentraciju IFN- γ je utvrđen inverzan odnos (Slika 16, 20, 21 i 27), dok je divergentan odnos zabeležen kod koncentracija fibrinogena i IL-1 α (Slika 24 i 25).

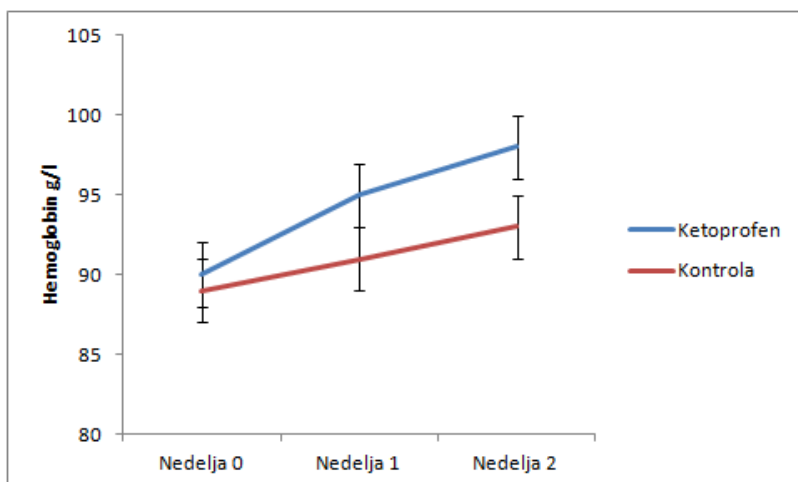
Tabela 4. Rezultati dvofaktorske ANOVA analize sa ponavljanjem–statistička značajnost uticaja nedelje, davanja ketoprofena i njihove interakcije na vrednost hematoloških i inflamatornih parametara

	Uticaj ketoprofena	Uticaj nedelje	Interakcija ketoprofen \times nedelja
Eritrociti	<0,01	<0,05	<0,01
Hemoglobin	<0,01	<0,05	<0,01
Lekociti	NS*	<0,01	NS*
Neutrofil	<0,01	<0,01	<0,01
Limfociti	<0,01	<0,01	<0,01
Trombociti	NS*	NS*	NS*
Sr. zap. trombocita	<0,01	NS	<0,01
Haptoglobin	<0,01	<0,01	<0,01
Fibrinogen	<0,05	NS*	<0,05
IL-1α	<0,01	<0,01	<0,01
TNF-α	<0,01	<0,01	<0,01
IFN-γ	<0,01	<0,01	<0,01

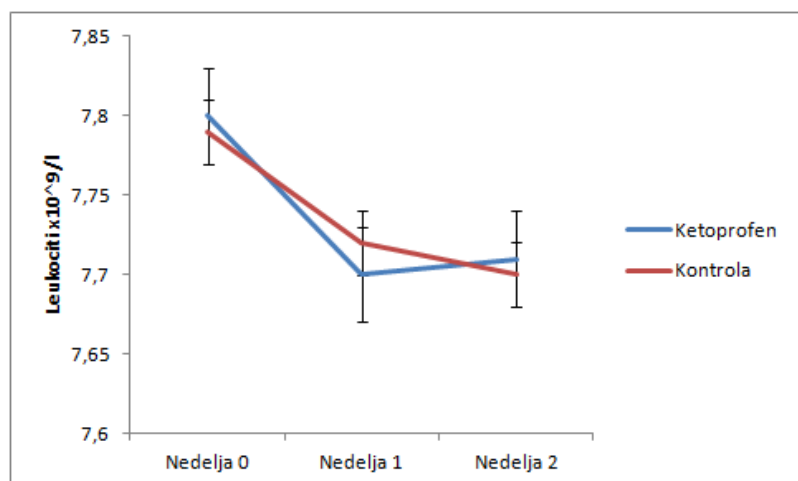
* relacija nije statistički značajna



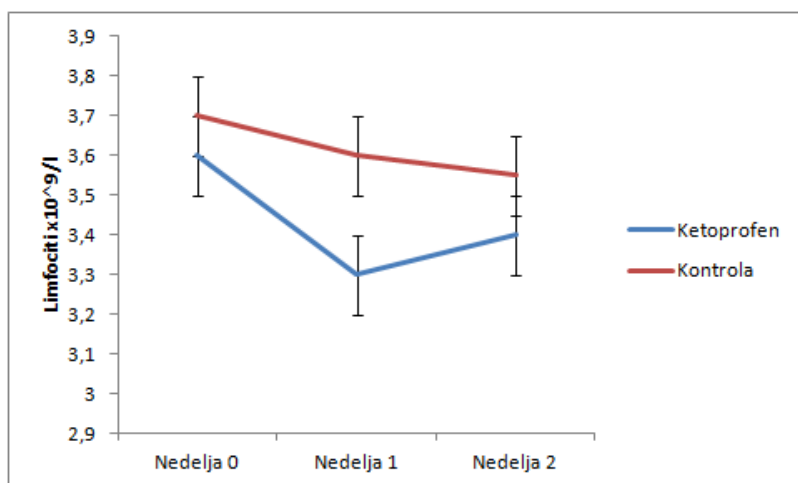
Slika 16. Uticaj ketoprofena na broj eritrocita u krvi



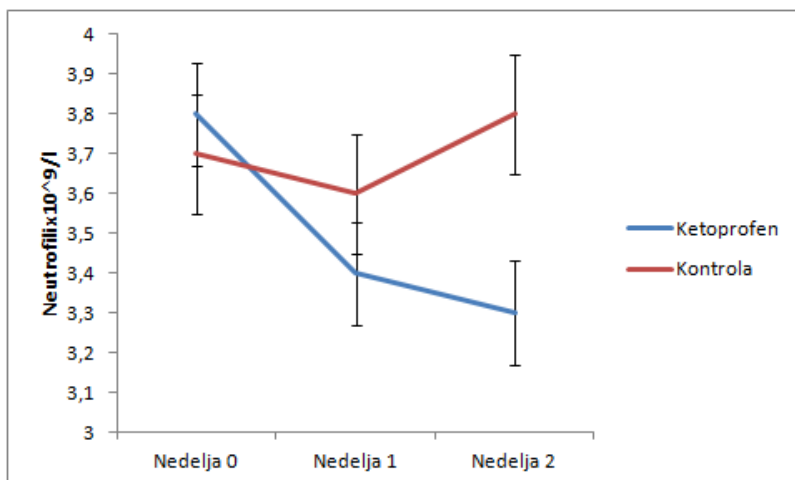
Slika 17. Uticaj ketoprofena na koncentraciju hemoglobina u krvi



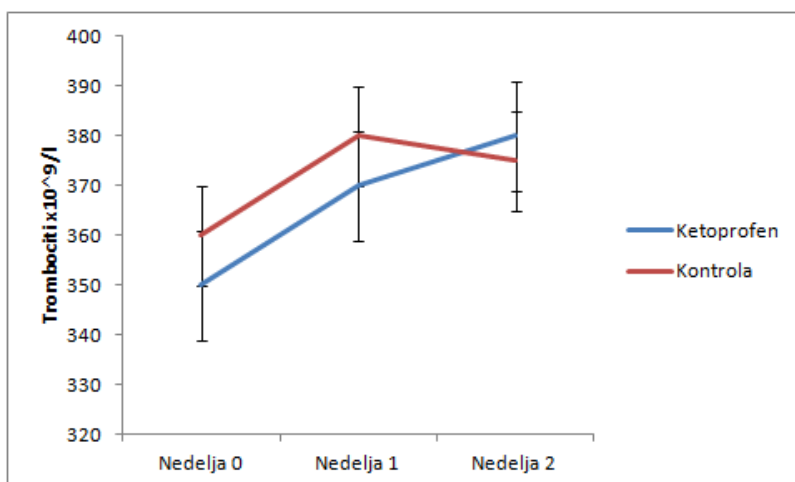
Slika 18. Uticaj ketoprofena na ukupan broj leukocita u krvi



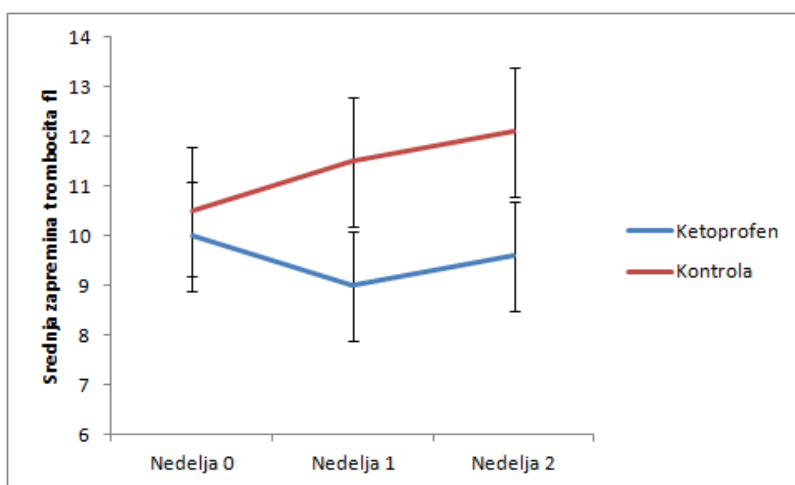
Slika 19. Uticaj ketoprofena na broj limfocita u krvi



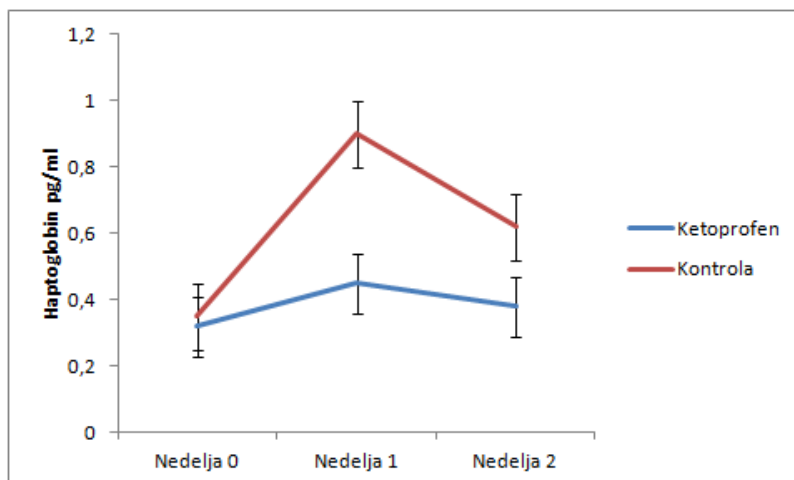
Slika 20. Uticaj ketoprofena na broj neutrofila u krvi



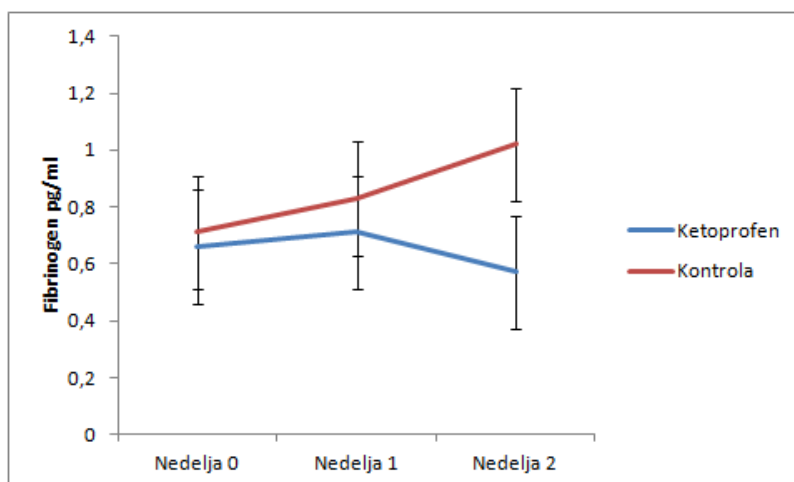
Slika 21. Uticaj ketoprofena na broj trombocita u krvi



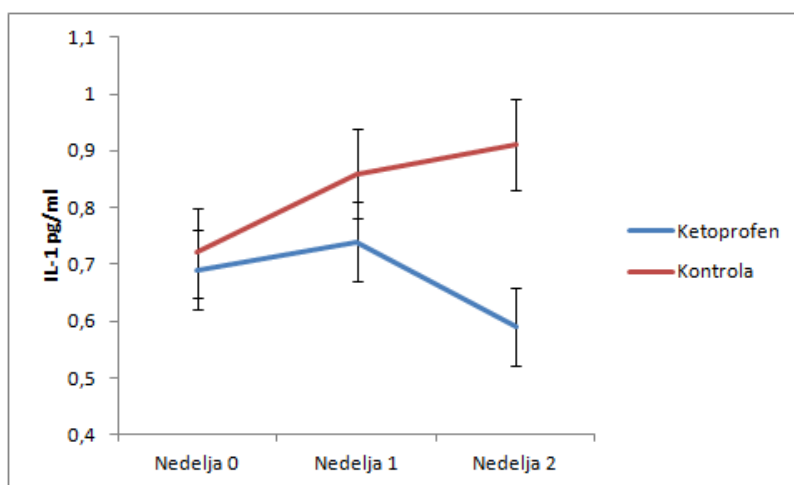
Slika 22. Uticaj ketoprofena na srednju zapreminu trombocita u krvi



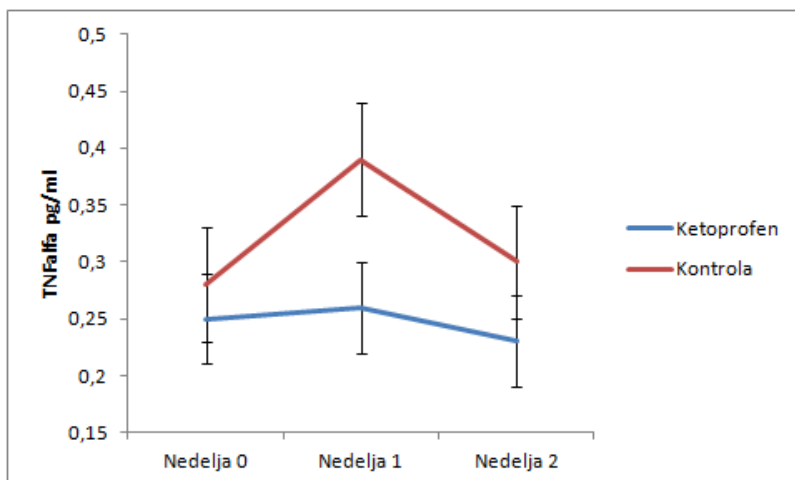
Slika 23. Uticaj ketoprofena na koncentraciju haptoglobina u krvi



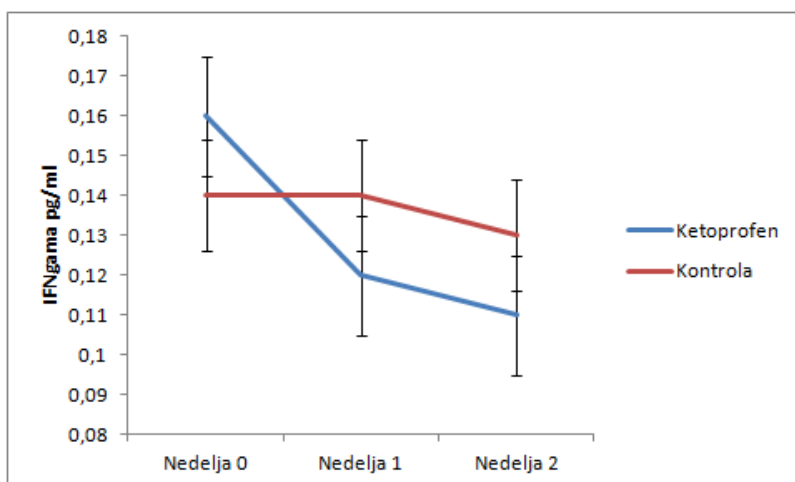
Slika 24. Uticaj ketoprofena na koncentraciju fibrinogena u krvi



Slika 25. Uticaj aplikacije ketoprofena na koncentraciju IL-1 α u krvi



Slika 26. Uticaj aplikacije ketoprofena na koncentraciju TNF- α u krvi



Slika 27. Uticaj aplikacije ketoprofena na koncentraciju IFN- γ u krvi

5.3. Ispitivanje relacije metaboličkih i inflamatornih parametara u funkciji upotrebe ketoprofena

Rezultati ovih istraživanja su pokazali da je primena ketoprofena kravama tokom perioda rane laktacije signifikantno uticala ($p < 0,01$) na učestalost nastanka intenzivne lipidne mobilizacije i ketogeneze. Kod tretiranih krava, pojava intenzivne lipidne mobilizacije je bila 2,4 puta manja, a ketogeneze 2 puta manja, u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Naime, u kontrolnoj grupi životinja intenzivna lipidna mobilizacija i ketogeneza je nastala u 66,7% slučajeva (Tabela 5). Na osnovu izvršenih ispitivanja, u oglednoj grupi krava, u odnosu na kontrolnu su utvrđene signifikantno niže ($p < 0,01$) korelacije koncentracija NEFA sa BHB,

glukozom, ukupnim bilirubinom, uključujući i značajno niže ($p < 0,05$) korelacije sa AST, kalcijumom i trigliceridima (Tabela 6). Međutim, primena ketoprofena nije dovela do signifikantnih promena korelacije NEFA sa ukupnim proteinima, albuminom, ureom, ALT i fosforom (Tabela 6).

Tabela 5. Povezanost primene ketoprofena i intenziteta lipidne mobilizacije i ketogeneze

		<u>Aplikacija ketoprofena</u>		χ^2 (p)	Pozitivna prediktivna vrednost (PPV)	Odnos verovatnoća (LR)
		Da (Ketoprofen)	Ne (Kontrola)			
Intenzitet lipidne mobilizacije	Visok NEFA $\geq 0,6$mmol/L	11	21	16,2 (p<0,01)	66,7%	2,4
	Fiziološki NEFA $< 0,6$mmol/L	34	14			
Intenzitet ketogeneze	Visok BHB $\geq 1,1$mmol/L	15	18	10,0 (p<0,01)	66,7%	2,0
	Fiziološki BHB $< 1,1$mmol/L	30	17			

Primena ketoprofena nije signifikantno uticala na modelovanje regresije koncentracija NEFA sa ukupnim proteinima, ureom, ALT, kalcijumom, fosforom i trigliceridima. Interesantno, u ogleđnoj grupi krava postoji statistički značajna ($p < 0,01$) pozitivna korelacaija koncentracije NEFA i holesterola, dok je ta korelacija negativna u kontrolnoj grupi. Identičan rezultat je zabeležen u regresionoj analizi (Tabela 6).

Rezultati ovih istraživanja pokazuju da je u ogleđnoj grupi krava u odnosu na kontrolnu je zabeležena statistički značajno ($p < 0,01$) niža korelacija koncentracija BHB sa glukozom, ukupnim bilirubinom, AST, holesterolom i trigliceridima, kao što je bila i signifikantno ($p > 0,05$) niža u odnosu na albumin i ALT.

Tabela 6. Uticaj ketoprofena na intenzitet korelacije i regresiju između NEFA ili BHB sa metaboličkim parametrima

		Korelacija		Regresija	
		NEFA	BHB	NEFA	BHB
BHB	Ketoprofen	0,62	/	0,33±0,11	/
	Kontrola	0,86	/	1,03±0,42	/
	p	<0,01	/	<0,01	/
Glukoza	Ketoprofen	-0,52	-0,59	-0,49±0,18	-2,2±0,29
	Kontrola	-0,81	-0,84	-2,01±0,63	-1,9±0,35
	p	<0,01	<0,01	<0,01	NS
Ukupni proteini	Ketoprofen	0,19*	0,27*	-22,5±6,2	-30,4±5,1
	Kontrola	0,25*	0,29*	-25,1±4,8	-32,2±5,2
	p	NS	NS	NS	NS
Albumini	Ketoprofen	0,26*	0,43	-5,9±2,2	-8,5±2,4
	Kontrola	0,22*	0,64	-13,5±3,7	-11,5±2,6
	p	NS	<0,05	<0,01	<0,05
AST	Ketoprofen	0,49	0,51	12,3±3,2	41,1±2,9
	Kontrola	0,76	0,81	40,1±7,8	43,2±4,2
	p	<0,05	<0,01	<0,01	NS
Holesterol	Ketoprofen	0,37	0,51	0,93±0,24	1,2±0,3
	Kontrola	-0,56	-0,74	-0,53±0,21	-0,9±0,4
	p	<0,05	<0,01	<0,01	<0,01
Ukupni bilirubin	Ketoprofen	0,32	0,49	0,36±0,22*	3,9±0,89
	Kontrola	0,65	0,82	8,21±1,14	8,7±1,02
	p	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Ca	Ketoprofen	-0,26*	-0,26*	-0,36±0,1	-0,29±0,09
	Kontrola	-0,48	-0,33	-0,32±0,1	-0,34±0,11
	p	<0,05	NS	NS	NS
Urea	Ketoprofen	0,30*	0,26*	1,25±0,3	1,9±0,5
	Kontrola	0,28*	0,24*	1,45±0,4	1,8±0,4
	p	NS	NS	NS	NS
ALT	Ketoprofen	0,32*	0,31	7,7±2,4	-1,1±0,9*
	Kontrola	0,41	0,55	8,1±2,3	-1,12±0,9
	p	NS	<0,05	NS	NS
P	Ketoprofen	0,30*	0,22*	-0,92±0,11	-0,78±0,1
	Kontrola	0,29*	0,19*	-0,88±0,09	-0,81±0,1
	p	NS	NS	NS	NS
Trigliceridi	Ketoprofen	-0,53	-0,77	-0,03±0,005	-
	Kontrola	-0,35	-0,52	-0,03±0,006	0,04±0,005
	p	<0,05	<0,01	NS	-
					0,05±0,006 <0,05

*korelacija/regresija nije statistički značajna

Primena ketoprofena nije statistički značajno uticala na korelaciju koncentracija BHB sa ukupnim proteinima, albuminom, ureom, kalcijumom i fosforom. Isto tako, primena ketoprofena nije statistički značajno uticala na modelovanje regresije koncentracija BHB sa glukozom, ukupnim proteinima, ureom, AST, ALT, kalcijumom i fosforom. Međutim, u regresionoj analizi je zabeleženo da je sa porastom koncentracije BHB intenzitet porasta koncentracije ukupnog bilirubina značajno niži ($p > 0,01$) u ogleđnoj grupi krava, u odnosu na kontrolnu. U ogleđnoj grupi krava je utvrđeno signifikantno niže ($p > 0,05$) smanjenje vrednosti albumina i triglicerida u funkciji porasta BHB, u odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 6).

Rezultati ovih istraživanja pokazuju da postoji pozitivna korelacija ($p > 0,01$) koncentracija NEFA sa haptoglobinom, TNF- α , brojem neutrofila i limfocita i ta korelacija je značajno niža u ogleđnoj, u odnosu na kontrolnu grupu krava. Međutim, u kontrolnoj grupi krava je zabeležena pozitivna korelacija ($p > 0,05$) koncentracije NEFA i srednje zapremine trombocita, dok je u ogleđnoj grupi krava ova korelacija negativna. (Tabela 7). Nije zabeležena statistički značajna korelacija koncentracija NEFA i fibrinogena, IL-1 α i hemoglobina, dok je korelacija koncentracija NEFA sa IFN- γ neznatno pozitivna, ali nema razlike u ogleđnoj i kontrolnoj grupi krava.

Pozitivna korelacija ($p > 0,01$) je zabeležena između koncentracije BHB sa haptoglobinom i TNF- α , kao i sa sa brojem neutrofila ($p > 0,05$), dok je sa koncentracijom hemoglobina utvrđena negativna korelacija ($p > 0,01$). Ove međusobne korelacije su bile mnogo slabije u ogleđnoj grupi, čak i obrnuto proporcionalne, kao što je slučaj sa koncentracijom TNF- α . Poređenjem ogleđne i kontrolne grupe krava, nije zabeležena statistički značajna korelacija koncentracija BHB sa koncentracijama fibrinogena, IL-1 α i IFN- γ , kao i sa brojem eritrocita i limfocita, a i sa srednjom zapreminom trombocita.

Kod tretirane grupe krava je zabeležen signifikantno ($p > 0,01$) slabiji rast koncentracije haptoglobina i slabiji pad hemoglobina u funkciji koncentracije BHB, u odnosu na krave kontrolne grupe. U kontrolnoj grupi krava, utvrđeno je signifikantno smanjenje ($p > 0,01$) koncentracije TNF- α sa porastom BHB, dok u ogleđnoj grupi krava ova veza bila direktno proporcionalna (pozitivna korelacija; $p > 0,01$). Regresiona analiza za veze između ostalih parametara nije dovela do statistički značajnih promena (Tabela 7). Zabeležena je negativna korelacija ($p > 0,01$) koncentracije albumina sa haptoglobinom i IL-1 α , kao što je negativna korelacija ($p > 0,05$) zabeležena i sa TNF- α . Naime, ova korelacija je manje izražena u grupi

krava kojima je aplikovan ketoprofen. Regresiona analiza pokazuje intenzivniji pad vrednosti koncentracije albumina u funkciji koncentracija haptoglobina, IL-1 α i TNF- α u ogleđnoj grupi krava (Tabela 7).

Tabela 7. Uticaj ketoprofena na intenzitet korelacije i regresiju između NEFA ili BHB sa inflamatornim i hematološkim parametrima

		Korelacija		Regresija	
		NEFA	BHB	NEFA	BHB
Haptoglobin	Ketoprofen	0,37	0,45	0,49 \pm 0,15	0,53 \pm 0,11
	Kontrola	0,69	0,71	1,38 \pm 0,27	1,44 \pm 0,3
	p	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Fibrinogen	Ketoprofen	0,41	0,22*	0,48 \pm 0,15	0,52 \pm 0,13
	Kontrola	0,52	0,25*	0,45 \pm 0,14	0,51 \pm 0,13
	p	NS	NS	NS	NS
IL-1α	Ketoprofen	0,33	0,28*	0,28 \pm 0,16	0,33 \pm 0,35*
	Kontrola	0,35	0,30*	0,42 \pm 0,14	0,43 \pm 0,52*
	p	NS	NS	NS	NS
TNF-α	Ketoprofen	0,74	-0,81	0,05 \pm 0,01	-0,05 \pm 0,01
	Kontrola	0,55	0,62	0,25 \pm 0,02	0,07 \pm 0,01
	p	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
IFN-γ	Ketoprofen	0,36	0,21*	0,015 \pm 0,01*	0,017 \pm 0,01*
	Kontrola	0,35	0,27*	0,021 \pm 0,01*	0,019 \pm 0,01*
	p	NS	NS	NS	NS
Eritrociti	Ketoprofen	-0,26*	0,30*	1,1 \pm 1,25*	1,2 \pm 1,3*
	Kontrola	-0,29*	0,26*	0,9 \pm 1,1*	1,1 \pm 1,5*
	p	NS	NS	NS	NS
Hemoglobin	Ketoprofen	0,21*	-0,52	12,14 \pm 14,3*	-25,5 \pm 5,6
	Kontrola	0,22*	-0,31	13,12 \pm 12,4*	-7,7 \pm 5,4
	p	NS	<0,01	NS	<0,01
Neutrofili	Ketoprofen	0,24*	0,32	0,4 \pm 0,32	0,6 \pm 0,32
	Kontrola	0,54	0,49	1,3 \pm 0,3	0,8 \pm 0,29
	p	<0,01	<0,05	<0,01	NS
Limfociti	Ketoprofen	0,31*	0,29*	1,1 \pm 0,9*	1,3 \pm 1*
	Kontrola	0,49	0,23*	0,9 \pm 0,27	1,1 \pm 1,2*
	p	<0,01	NS	NS	NS
Srednja zapremina trombocita	Ketoprofen	-0,42	0,29*	-3,08 \pm 1,2	2,4 \pm 2,5*
	Kontrola	0,32	0,22*	3,02 \pm 1,9	2,4 \pm 2,6*
	p	<0,05	NS	<0,01	NS

*korelacija/regresija nije statistički značajna

Tabela 8 prikazuje da su ukupni bilirubina i AST bili u pozitivnoj korelaciji ($p > 0,05$) sa haptoglobinom i TNF- α , dok je korelacija aktivnosti AST sa koncentracijom TNF- α bila

statistički značajna ($p > 0,01$), samo u ogleđnoj grupi krava. Regresiona analiza pokazuje značajno slabiji porast nabrojanih zavisnih promenljivih sa porastom vrednosti koncentracija haptoglobina i TNF- α kod krava kojima je aplikovan ketoprofen, odnosno promene su intenzivnije kod krava u kontrolnoj grupi. Takođe, zabeležena je negativna korelacija ($p > 0,01$) koncentracije holesterola i triglicerida sa TNF- α . U odnosu na kontrolnu grupu krava, regresiona analiza tretiranih životinja je pokazala signifikantno niže ($p > 0,01$) opadanje vrednosti holesterola i triglicerida u funkciji koncentracije TNF- α .

Negativna korelacija ($p > 0,05$) koncentracije glukoze sa koncentracijom IL-1 α i TNF- α je bila manje izražena u ogleđnoj grupi krava, u odnosu na kontrolnu grupu. Takođe, u odnosu na kontrolnu grupu, regresiona analiza opadanja koncentracije glukoze u funkciji koncentracije TNF- α je bila signifikantno niža ($p > 0,01$), kao i u funkciji koncentracije IL-1 α ($p > 0,05$) (Tabela 8).

Pozitivna korelacija ($p > 0,05$) koncentracije uree je utvrđena sa TNF- α , a promena koncentracije uree u funkciji TNF- α je manje izražena u ogleđnoj grupi, u odnosu na kontrolnu grupu krava. Takođe, postoji pozitivna korelacija ($p > 0,01$) koncentracije kalcijuma sa IL-1 α i IFN- γ . Regresiona analiza pokazuje da sa porastom koncentracije kalcijuma statistički značajno raste IL-1 α ($p > 0,01$), ali i TNF- α ($p > 0,05$) (Tabela 8).

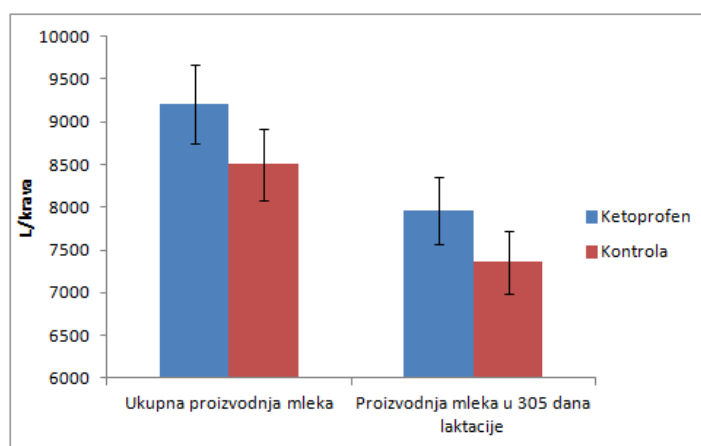
Tabela 8. Uticaj ketoprofena na intenzitet korelacije i regresiju između proteina akutne faze i citokina sa biohemijskim parametrima

	korelacija						regresija					
	Hapto globin	Fibri nogen	IL-1 α	TNF- α	IFN- γ	Hapto globin	Fibri nogen	IL-1 α	TNF- α	IFN- γ		
Glukoza												
Ketoprofen	0,16*	0,11*	-0,49	-0,34	-0,11*	0,04 \pm 0,04*	0,03 \pm 0,02*	-3,2 \pm 1,4	-3,5 \pm 1,7	0,21 \pm 0,2*		
Kontrola	0,14*	0,13*	-0,31	-0,52	-0,17*	0,05 \pm 0,04*	0,04 \pm 0,03*	-5,1 \pm 1,7	-7,9 \pm 2,1	0,11 \pm 0,1*		
p	NS	NS	<0,05	<0,05	NS	NS	NS	<0,05	<0,01	NS		
Albumini												
Ketoprofen	-0,44	-0,29*	-0,36	-0,44	-0,29*	-9,1 \pm 3,2	-7,7 \pm 3,1	-5,2 \pm 2,8	-20,9 \pm 4,2	-5,9 \pm 3,3		
Kontrola	-0,69	-0,30*	-0,51	-0,69	-0,30*	-14,4 \pm 3,1	-8,9 \pm 3,3	-8,6 \pm 2,9	-32,1 \pm 4,1	-6,1 \pm 2,4		
p	<0,01	NS	<0,05	<0,01	NS	<0,01	NS	<0,05	<0,01	NS		
AST												
Ketoprofen	0,78	0,28*	0,29*	0,21*	0,15*	37,2 \pm 12,1	9,9 \pm 9,4*	15,6 \pm 10,1	-82 \pm 21	10,1 \pm 9,8*		
Kontrola	0,56	0,28*	0,28*	0,42	0,26*	23,4 \pm 13,1	8,7 \pm 8,1*	18,1 \pm 9,3	45 \pm 18	15,4 \pm 10,3		
p	<0,01	NS	NS	<0,01	NS	<0,05	NS	NS	<0,01	NS		
Holesterol												
Ketoprofen	-0,11*	0,26*	-0,19*	-0,71	0,11*	-0,1 \pm 0,2*	0,9 \pm 0,4	0,6 \pm 0,4	-5,7 \pm 2,1	1,2 \pm 0,7		
Kontrola	-0,18*	0,24*	-0,18*	-0,51	0,13*	-0,2 \pm 0,1*	0,8 \pm 0,3	0,4 \pm 0,3*	-3,1 \pm 1,4	1,4 \pm 1,2*		
p	NS	NS	NS	<0,01	NS	NS	NS	NS	<0,01	NS		
Ukupni bilirubin												
Ketoprofen	0,52	0,26*	0,26*	0,77	0,26*	1,9 \pm 0,7	0,7 \pm 0,6*	0,7 \pm 0,65*	2,3 \pm 1,1	0,4 \pm 0,3*		
Kontrola	0,71	0,22*	0,22*	0,52	0,25*	4,5 \pm 1,1	0,5 \pm 0,35	0,8 \pm 45	5,7 \pm 1,8	0,6 \pm 0,4*		
p	<0,01	NS	NS	<0,01	NS	<0,01	NS	NS	<0,01	NS		
Ca												
Ketoprofen	0,11*	0,09*	0,53	-0,26*	0,57	0,23 \pm 0,18*	0,54 \pm 0,43*	0,8 \pm 0,2	0,32 \pm 0,22	1,3 \pm 0,3		
Kontrola	0,12*	0,13*	0,31	-0,23*	0,33	0,21 \pm 0,15*	0,81 \pm 0,54	1,17 \pm 0,2	0,51 \pm 0,4*	1,7 \pm 0,25		
p	NS	NS	<0,01	NS	<0,01	NS	NS	<0,01	NS	<0,05		
Urea												
Ketoprofen	-0,18*	0,19*	-0,21*	0,63	0,19*	-1,1 \pm 0,9*	0,9 \pm 0,8*	0,8 \pm 0,8*	3,2 \pm 1,4	1,4 \pm 1,5*		
Kontrola	-0,18*	0,15*	-0,17*	0,41	0,12*	-1,5 \pm 1,1*	1,1 \pm 0,6	1,2 \pm 0,8	6,1 \pm 2,2	1,4 \pm 0,9		
p	NS	NS	NS	<0,01	NS	NS	NS	NS	<0,05	NS		
Trigliceridi												
Ketoprofen	-0,21*	0,14*	0,28*	-0,52	0,28*	0,01 \pm 0,01*	0,09 \pm 0,08*	0,07 \pm 0,1*	-0,3 \pm 0,09	0,09 \pm 0,07		
Kontrola	-0,14*	0,11*	0,29*	-0,32	0,27*	0,01 \pm 0,01*	0,1 \pm 0,09*	0,06 \pm 0,1*	-	*		
p	NS	NS	NS	<0,01	NS	NS	NS	NS	0,14 \pm 0,01	0,12 \pm 0,06		
									<0,01	NS		

*korelacija/regresija nije statistički značajna

5.4. Uticaj ketoprofena na proizvodnju mleka kod krava

Primena ketoprofena kod krava tokom rane laktacije je dovela do značajnog povećanja proizvodnje mleka. Krave kojima je aplikovan ketoprofen, tokom tri dana posle teljenja, u laktirajućem periodu od 305 dana su dale prosečno 7960 ± 470 L mleka, što je značajno više u odnosu na kontrolnu grupu (7350 ± 480 L) (Slika 28). Poređenjem ukupne proizvodnje mleka ogleadne i kontrolne grupe krava ustanovljeno je da je ovaj parametar veći kod krava tretiranih ketoprofenom (9300 ± 495 L mleka) u odnosu na netretirane krave (8550 ± 490 L mleka). Odnosno, ketoprofen povećava količinu mleka za 8,3% u poređenju sa količinom dobijenom tokom standardne laktacije kod tretiranih krava (Slika 28).



Slika 28. Uticaj ketoprofena na količinu proizvedenog mleka

6. DISKUSIJA

6.1. Uticaj ketoprofena na metaboličke promene kod krava u ranoj laktaciji

U nedelji posle partusa dolazi do povećanja koncentracije NEFA i BHB u krvi kao rezultat energetske deficita i promena u hormonskom statusu kod krava (Bertoni i sar., 1998; Drackley i sar., 2005). Ove promene dovode do povećanja lipogeneze i ketogeneze u jetri, dok visoke koncentracije BHB u krvi smanjuju stopu β -oksidacije i glukoneogeneze (Bobe, 2004). Povećana lipidna mobilizacija i ketogeneza tokom perioda rane laktacije dovode do brojnih promena u metaboličkoj adaptaciji kod krava i do nastanka različitih peripartalnih bolesti. Ključni parametri su granične vrednosti koncentracije NEFA (0,5-0,7 mmol/L) i BHB (0,9-1,2 mmol/L), iznad kojih značajno raste rizik za smanjenu metaboličku adaptaciju i nastanak bolesti (Ospina i sar., 2010; Chapinal i sar., 2012).

U našim istraživanjima je nađen značajan porast koncentracije NEFA i BHB kod krava u prvoj i drugoj nedelji posle partusa, ali su značajno niže vrednosti zabeležene kod krava kojima je aplikovan ketoprofen. U prvoj nedelji posle partusa, koncentracije NEFA ogledne i kontrolne grupe su utvrđene u vrednosti od $0,58 \pm 0,08$ mmol/L i $0,76 \pm 0,1$ mmol/L, a u drugoj nedelji te vrednosti su bile $0,49 \pm 0,09$ mmol/L i $0,6 \pm 0,12$ mmol/L (Slika 3). Zabeležene vrednosti BHB ogledne i kontrolne grupe u prvoj nedelji posle teljenja su $0,63 \pm 0,15$ mmol/L i $0,88 \pm 0,12$ mmol/L, a u drugoj nedelji te vrednosti su $0,86 \pm 0,14$ mmol/L i $1,05 \pm 0,13$ mmol/L (Slika 4). Poznato je da je lipidna mobilizacija najintenzivnija u prvoj nedelji posle partusa, a ketogeneza u drugoj nedelji, što je saglasno rezultatima naših istraživanja (Herdt, 2000; Contreras i Sordillo, 2011; Nowroozi i sar., 2011) (Slika 3 i 4). Nastale promene potvrđuju nižu mobilizaciju masnog tkiva kod krava tretiranih sa NSAIL i u skladu su sa rezultatima drugih autora (Trevisi i sar., 2005). U istraživanju Zentella i sar. (2002) je dokazano da NSAIL u izolovanim adipocitima pacova inhibiše stimulisani lipolizu, smanjenim oslobađanjem masnih kiselina iz adipoznog tkiva. Isti autori zaključuju da su nastale promene posledica inhibicije lipolize koja je stimulisana epinefrinom, čime se objašnjava uticaj NSAIL na koncentracije NEFA i BHB.

Kod visoko mlečnih krava tokom prve faze laktacije, kao posledica lipidne mobilizacije, može doći do oštećenja jetre (Bobe i sar., 2004), praćeno smanjenjem koncentracije pojedinih

parametara u krvi, kao što su ukupni proteini, albumini, glukoza i urea (West, 1990; Đoković i sar., 2011). Bertoni i sar. (2008) zaključuju da su kod krava u peripartalnom periodu, niže koncentracije negativnih proteina akutne faze, uključujući i albumina, povezane sa smanjenom funkcijom jetre. Prema istraživanjima drugih autora (Sevinc i sar., 2003), uočeno je da je nivo albumina povezan sa oštećenjem funkcije jetre, odnosno da je značajno smanjen kod krava sa umerenim i teškim stepenom zamašćenja jetre, u odnosu na životinje sa blagim stepenom zamašćenja, kao i u odnosu na kontrolnu grupu krava. Tóthová i sar. (2008) su ispitujući koncentracije albumina u krvi krava u periodu od četiri nedelje pre do četiri nedelje posle partusa, zaključili da su koncentracije ovog proteina bile niže u periodu posle partusa, u odnosu na period pre partusa. Nasuprot ovim istraživanjima, Pechova i sar. (2002) su ispitivali koncentracije albumina u krvi krava u periodu dve nedelje pre do pet nedelja nakon partusa. U ispitivanom periodu, zabeležene koncentracije albumina su bile ujednačene i u granicama fizioloških vrednosti.

Singh i sar. (2009) su i.v. aplikovali ketoprofen kravama u dozi od 3mg/kg, tokom pet dana, posle partusa u cilju praćanja bezbednosti primene ketoprefena. Koncentracije biohemijjskih parametara su praćene na sam dan partusa i u narednih pet dana. U ispitivanom periodu nisu zabeležene signifikantne promene u koncentraciji albumina, nakon primene ketoprofena. U istim eksperimentalnim uslovima, do sličnih rezultata su došli Paresh i sar. (2012), kada nisu utvrđene signifikantne promene u koncentraciji albumina ogleđne i kontrolne grupe krava. U našim eksperimentima, zabeležene povišene koncentracije albumina u krvi krava tretiranih sa ketoprofenom, takode tokom prve nedelje posle partusa nisu dostizale stepen statističke znaćajnosti (Slika 7). Tokom druge nedelje posle partusa, u ogleđnoj grupi krava je došlo do signifikantnog smanjenja koncentracije albumina ($32 \pm 1,8$ g/L), u odnosu na kontrolnu grupu ($31 \pm 1,7$ g/L) (Slika 7). Nalazi koncentracije albumina u krvi kontrolne grupe krava su u skladu sa nalazima drugih autora (Otto i sar., 2000; Đoković i sar., 2013a; Đoković i sar., 2013b). Shodno navedenom, smanjenje koncentracije ukupnih proteina i koncentracije albumina bi se moglo povezati sa smanjenom sintezom albumina u jetri tokom inflamacije (Zentella i sar. 2002). Nasuprot rezultatima navedenih autora, u ovom istraživanju je došlo do povećanja nivoa albumina u krvi krava tretiranih ketoprofenom, što bi se moglo potencijalno povezati sa antiinflamatornim efektom ketoprofena.

Rezultati naših istraživanja pokazuju da koncentracija ukupnih proteina nije značajno odstupala u grupi krava koja je primala ketoprofen u odnosu na kontrolu grupu. Ipak, primećuje se da kod krava koje su primale ketoprofen postoji viša koncentracija ukupnih proteina (Slika 6). Tumačenje koncentracije ukupnih proteina u funkciji inflamacije je veoma složeno, jer se u obzir mora uzeti odnos pojedinih frakcija i koncentracija proteina akutne faze, što će biti diskutovano u narednim poglavljima.

Prema podacima iz literature, u peripartalnom periodu se beleži povećana koncentracija bilirubina (Djokovic i sar., 2014) i smanjena koncentracija holesterola (Itoh i sar., 1998). Naime, povišena koncentracija bilirubina se može pripisati ketozi nastaloj tokom puerperijuma (Moshage i sar., 1987), dok je smanjena koncentracija holesterola nastaje kao posledica metaboličkih poremećaja (Djokovic i sar., 2014) i hepatičke lipidoze (Bobe i sar., 2004). U ispitivanju kod pacova je utvrđeno da NSAID mogu imati uticaj na eksperimentalno indukovanu hiperlipidemiju, odnosno ovi lekovi značajno smanjuju koncentraciju ukupnog holesterola, triglicerida i lipoproteina male gustine (LDL) u plazmi (Kourounakis i sar., 2002). Rezultati naših istraživanja pokazuju da ketoprofen prouzrokuje povećanje koncentracije holesterola (Slika 9) i smanjenje koncentracije bilirubina (Slika 10) u drugoj nedelji posle partusa, u poređenju sa kontrolom. Ovi rezultati su verovatno posledica manjeg dotoka NEFA i BHB u jetru, kao rezultat nižeg stepena zamašćenja jetre, što se verovatno može pripisati uticaju ketoprofena. U našim istraživanjima, aplikacija ketoprofena nije imala uticaj na koncentraciju triglicerida (Slika 14).

Prema podacima iz literature, niska aktivnost AST i ALT se beleži u krvi zdravih životinja, dok je u periodu oko teljenja značajno viša (Geishauser i sar., 1999; Cavestany i sar., 2005). Prema drugim literaturnim podacima (Tainturier i sar., 1984; Jacob i sar., 2001) takođe je uočeno povećanje aktivnosti AST tokom postpartalnog perioda kod krava, saglasno rezultatima naših istraživanja (Slika 8). Nastale promene aktivnosti AST u ogleđnoj grupi krava ukazuju da usled manjeg dotoka NEFA i BHB u jetri, kao rezultat nižeg stepena zamašćenja jetre, dolazi do smanjenja aktivnosti AST u prvoj i drugoj nedelji posle partusa, u odnosu na kontrolnu grupu krava. Dobijene vrednosti za ogleđnu i kontrolnu grupu krava su u okviru referentnih vrednosti, koje se prema Kaneko i sar. (1997) u plazmi mlečnih krava za AST kreću u intervalu od 80-130 IU/L, odnosno za ALT 27 ± 14 IU/L što je u skladu sa rezultatima ovog istraživanja (Slika 8 i 13). Utvrđeno je da aplikacija ketoprofena nije uticala na promenu koncentracije ALT kod krava (Slika 13).

Kod krava sa visokim stepenom mobilizacije masti je utvrđena niža koncentracija metabolita u serumu, kao što su glukoza, ukupni proteini, albumini i urea u odnosu na krave sa niskim stepenom lipomobilizacije (Gonzalez i sar., 2011). Promene navedenih parametara su pokazatelj funkcionalnog stanja jetre, a mogu biti i indikator masne infiltracije kod životinja sa visokim stepenom lipomobilizacije (West 1990; Adewuyi i sar., 2005). Naime, usled masne infiltracije dolazi do smanjene sinteze uree, što što ima za posledicu smanjenu koncentraciju uree u krvi krava posle teljenja (Hilary, 1990). Shodno navedenom, rezultati naših istraživanja su u saglasnosti sa rezultatima drugih autora (Hilary, 1990; Celeska i sar., 2015) (Slika 12).

U našim istraživanjima, u svim ispitivanim terminima, kod tretiranih krava su zabeležene više vrednosti glukoze, signifikantno više u prvoj nedelji posle partusa ($2,65 \pm 0,49$ mmol/L), u odnosu na kontrolnu grupu ($2,15 \pm 0,43$ mmol/L) (Slika 5). Prema Šamanc i sar. (1993) prosečna glikemija posle teljenja iznosi 2,41 mmol/L. Bertoni i sar. (2004) su utvrdili da aplikacija lizin acetil-salicilata tokom prvih 5 dana laktacije dovodi do smanjenja koncentracije glukoze, što je prema istim autorima verovatno posledica iskorišćavanja glukoze od strane tkiva, pogotovo mlečne žlezde. Do sličnih rezultata su došli i Farney i sar. (2013a), kada je primena salicilata dovela do smanjenja koncentracije glukoze u krvi tretiranih životinja. Nastale promene autori pripisuju smanjenju insulinske rezistencije i povećanom iskorišćavanju glukoze od strane ćelija.

Rezultati naših istraživanja pokazuju da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji jona kalcijuma i fosfora između ogledne i kontrolne grupe krava (Slika 11 i 15).

6.2. Uticaj ketoprofena na inflamatorne i hematološke parametre kod krava u ranoj laktaciji

U dosadašnjoj literaturi, ispitivanje antiinflamatornog delovanja ketoprofena je vršeno kod krava u različitim uslovima. Dokazano je da primena ketoprofena prilikom hirurškog zahvata fistule kod krava olakšava postoperativni tok (Nathalie i sar., 2014). U istraživanju drugih autora (Banting i sar., 2008) je potvrđen antiinflamatorni efekat posle oralne i i.m. primene ketoprofena kod krava sa mastitisom izazvanog endotoksinom. U sličnim istraživanjima (Shpigel i sar., 1994; Drackley, 1999), kod mlečnih krava je utvrđen značajno poboljšan oporavak kod kliničkog mastitisa nakon primene ketoprofena, ukazujući da ovaj lek suzbija zapaljenske procese.

Dokazano je da se koncentracija haptoglobina, kao inflamatornog indikatora kod goveda (Skinner i sar., 1991) povećava tokom akutne infekcije (Burtis i Ashwood, 1999) ili posle traume (Fisher i sar., 2001; Earley i Crowe, 2002), tokom mastitisa (Heegaard i sar., 2000; Ohtsuka i sar., 2001; Grönlund i sar., 2003), kao i posle različitih inflamatornih oboljenja (pneumonija, peritonitis i apces) (Aalsemgeest i sar., 1994; Heegaard i sar., 2000). Takođe, utvrđeno je da su koncentracije haptoglobina značajno povećane tokom ranog postpartalnog perioda (do 10 nedelja posle partusa) u poređenju sa kravama u kasnijem postpartalnom periodu (Ametaj i sar., 2005; Kovac i sar., 2009). Do sličnih rezultata su došli i drugi autori (Uchida i sar., 1993; Ametaj i sar., 2005; Kovac i sar., 2009), koji su zabeležili povećanje koncentracije haptoglobina i serum amiloida A tokom perioda rane laktacije. Takođe, Uchida i sar. (1993) uočili da se kod krava na samom partusu javljaju više koncentracije haptoglobina, nego pre i posle partusa.

S obzirom da je u tranzicionom periodu česta pojava inflamacije, upotreba NSAID u cilju suprimiranja ovog procesa je ispitana od strane mnogih autora (Bertoni i sar., 2004; Trevisi i Bertoni, 2008; Farney i sar., 2013a; Farney i sar., 2013b; Priest i sar., 2013). U našim istraživanjima je zabeleženo da aplikacija ketoprofena kravama tokom tri dana posle partusa dovodi do signifikantnog smanjenja koncentracije haptoglobina u ogleđnoj grupi krava u odnosu na kontrolnu, u prvoj i drugoj nedelji posle partusa (Slika 23). Naime, rezultati naših istraživanja su u skladu sa rezultatima drugih autora (Bertoni i sar., 2004; Trevisi i sar., 2005). U istraživanjima navedenih autora je utvrđeno smanjenje koncentracije haptoglobina nakon i.m. primene lizin acetil-salicilata (LAS), odnosno acetilsalicilne kiseline, 5 dana posle partusa.

Fibrinogen, kao i haptoglobin, predstavlja jedan od pozitivnih proteina akutne faze. Koncentracija ovog proteina se povećava tokom odgovora u akutnoj fazi (Hayes, 1994), odnosno tokom inflamacije (McSherry i sar., 1970). Jeremejeva i sar. (2015), tokom prve i druge nedelje posle partusa kod krava sa akutnim puerperalnim metritisom su zabeležili povećanje koncentracije fibrinogena, u odnosu na klinički zdrave životinje. Aplikacija ketoprofena u našim istraživanjima je dovela do značajnog smanjenja koncentracije fibrinogena u drugoj nedelji posle partusa, što se može pripisati antiinflamatornom efektu leka (Slika 24).

Povećana koncentracija proinflamatornih citokina karakteristična za period rane laktacije može u značajnoj meri da utiče na metaboličko prestrojavanje, potencirajući nastanak metaboličkog stresa, lipidne mobilizacije i ketogeneze (Sordillo i sar., 2009). U mnogim

istraživanjima je dokazano da su citokini odgovorni za aktivaciju imunoloških ćelija, kao i da predstavljaju indikatore inflamatornih promena u organizmu (Ishikawa i sar., 2004).

Kao i ostali citokini i TNF- α nastaje kao odgovor na invazivne stimulse (Underhill i Ozinsky, 2002). Dokazano je povećanje koncentracije TNF- α u serumu tokom mnogih inflamatornih oboljenja dijagnostikovanih kod krava u postpartalnom periodu (Hisaeda i sar., 2001; Kim i sar., 2005; Sacchini i sar., 2012; Kasimanickam i sar., 2013). Ghasemi i sar. (2012) su utvrdili veću ekspresiju iRNK za TNF- α kod krava sa inflamatornim oboljenjima. Do sličnih rezultata su došli Fischer i sar. (2014), kada je zabeležena ekspresija gena za IL-1 β i TNF- α bila značajno viša kod krava sa inflamatornim oboljenjem. U istraživanju Franey i sar., (2013a; 2013b) je zabeleženo da oralna aplikacija aspirina u dozi od 1,95 g/L, sedam dana posle partusa, dovodi do smanjenje koncentracije TNF- α . Do sličnih rezultata se došlo i u našim istraživanjima, kada je utvrđeno da je aplikacija ketoprofena dovela do značajnog smanjenja koncentracije TNF- α u prvoj i drugoj nedelji posle partusa (Slika 26).

Prema podacima iz literature, osim povećanja koncentracije TNF- α , kod krava sa različitim inflamatornim oboljenjima je utvrđeno povećanje koncentracije IL-1 β (Kasimanickam i sar. 2013). Do sličnih rezultata su došli Herath i sar. (2009), kada su tokom početne faze inflamacije zabeležene povišene koncentracije proinflamatornih citokina (IL-1 α ili IL-1 β). Takođe, u našim istraživanjima se beleže signifikantno više vrednosti IL-1 β u kontrolnoj grupi krava u prvoj i drugoj nedelji posle partusa, u odnosu na tretiranu grupu krava, što potvrđuje antiinflamatorni efekat ispitivanog leka (Slika 25).

U ranoj fazi inflamatornog odgovora, pored povećane koncentracije TNF- α i IL-1, (Herath i sar., 2009), beleže se i povećane koncentracije IFN- γ (Hisaeda i sar., 2001; Sacchini i sar., 2012), a što uključuje i period rane laktacije kod krava (Schroder i sar., 2004). Heiser i sar. (2015) su utvrdili da tokom perioda rane laktacije postoji povećana ekspresija gena za TNF- α i IFN- γ . U našim istraživanjima, antiinflamatorni efekat ketoprofena je potvrđen smanjenom koncentracijom IFN- γ u prvoj i drugoj nedelji posle partusa (Slika 27).

Pored uticaja aplikacije ketoprofena na prethodno navedene parametre, u našim istraživanjima, praćen je i uticaj na hematološke parametre. Prema podacima iz literature (Klinkon i Zadnik, 1999; Sattar i Mirza 2009; Mirzadeh i sar., 2010; Belic i sar., 2010; Belic i sar., 2011), kod krava kao odgovor na inflamaciju tokom peripartalnog perioda je smanjen broj eritrocita i koncentracija hemoglobina (Morceau i sar., 2009). Shodno rezultatima naših

istraživanja, vrednosti navedenih parametara su nakon primene NSAID signifikantno više u prvoj i drugoj nedelji posle partusa (Slika 16 i 17) (Trevisi i sar., 2005).

Dokazano je da trombociti imaju višestruku ulogu u procesu hemostaze i tromboze, kao i u drugim fiziološkim ili patološkim procesima uključujući inflamaciju, malignitet i imunološki odgovor (McNicol i Israels, 2008). Povećane vrednosti srednje zapremine trombocita su utvrđene kod životinja sa akutnim peritonitisom (Kamal, 2011). U našim istraživanjima je zabeležen pad u koncentraciji srednje zapremine trombocita kod tretiranih krava, što se može povezati sa antiinflamatornim efektom ketoprofena (Slika 22).

Prema podacima iz literature, krave sa povećanom lipidnom mobilizacijom i ketogenezom, kao i smanjenom koncentracijom glukoze, imaju znatno više vrednosti inflamatornih medijatora, poput neutrofila i limfocita (Mirzadeh i sar., 2010; Belic i sar., 2011).

In vitro je dokazano da acetilsalicilna kiselina ima stimulatívno delovanje na imunološki sistem, odnosno čak i u veoma niskim koncentracijama ubrzava procese fagocitoze govedih neutrofila (Paape i sar. 1991; Bas i sar., 1998). U našim eksperimentima, antiinflamatorni efekat ketoprofena u prvoj i drugoj nedelji posle partusa je potvrđen smanjenjem broja neutrofila (Slika 20) i limfocita (Slika 19).

Poznato je da tokom procesa inflamacije, na mesto infekcije prvi dospevaju neutrofilni granulociti (Girard, 2003). Apoptoza neutrofila ima važnu ulogu u eliminaciji neutrofila sa mesta inflamacije (Kam i Ferch, 2000). Nemogućnost neutrofila da se podvrgnu ovom obliku ćelijske smrti dovodi do povećanog oštećenja tkiva i smanjenog inflamatornog odgovora. *In vitro*, dokazano je da primena aspirina dovodi do smanjenja broja neutrofila i inhibicije apoptoze (Vasilev i sar., 2006). U našem istraživanju, primena ketoprofena je dovela do pada broja neutrofilnih granulocita u drugoj nedelji posle partusa, što se može pripisati antiinflamatornom efektu ovog leka, kao i inhibiciji apoptoze (Slika 20).

6.3. Ispitivanje relacije metaboličkih i inflamatornih parametara u funkciji upotrebe ketoprofena

Prema podacima iz literature (Goff, 2006b; Calder, 2008; Tóthová i sar., 2014a) povišene koncentracije NEFA predstavljaju rizik za nastanak mnogih inflamatornih oboljenja u peripartalnom periodu kod mlečnih krava. Prema nekima autorima (Bernabucci i sar., 2005; Sordillo i sar., 2009), povišene koncentracije NEFA su u direktnoj vezi sa povišenom incidencom sistemskih inflamatornih stanja, odnosno sa nastankom zdravstvenih poremećaja tokom tranzicionog perioda. Usled povećanja akumulacije masti u jetri kod krava tokom postpartalnog perioda javlja se odgovor proteina akutne faze (Ametaj i sar., 2005). Dokazano je da je viša koncentracija NEFA, koja ukazuje na viši stepen mobilizacije lipida, povezana sa povećanom koncentracijom haptoglobina kod krava tokom ovog perioda (Kato and Nakagawa, 1999; Stengärde i sar., 2008; Kovac i sar., 2009; Tóthová i sar., 2014a). U našim istraživanjima, aplikacija ketoprofena kravama utiče na slabljenje veze između lipidne mobilizacije (koncentracija NEFA) i procesa inflamacije (koncentracija haptoglobina) (Tabela 7).

Pored NEFA, utvrđeno je i da postoji snažna veza između koncentracije BHB i proteina akutne faze, kod krava posle teljenja (Tóthová i sar., 2014a). Kovac i sar. (2009) su uočili da postoji pozitivna korelacija između koncentracija BHB i haptoglobina, kod krava tokom perioda rane laktacije. Rezultati ovih autora idu u prilog činjenici da se kod krava tokom ovog perioda postoji odgovor proteina akutne faze, odnosno da postoji veza između medijatora inflamatornog odgovora i indikatora energetskeg metabolizma. Rezultati naših istraživanja su potvrdili pozitivnu korelaciju između pokazatelja ketogeneze (koncentracija BHB) i procesa inflamacije (koncentracija haptoglobina). Međutim, korelacija između ovih parametara je značajno slabija u ogleđnoj u odnosu na kontrolnu grupu krava (Tabela 7).

Contreras i sar. (2010) ukazuju da promene u koncentraciji i sastavu plazme direktno utiču na funkciju leukocita zbog promene sastava ćelijske membrane krvnih ćelija. Prema tome, niže koncentracije leukocita kod krava sa višim koncentracijama NEFA u istraživanju ovih autora, mogu biti uzrokovane promenama u sadržaju lipida u krvi tokom perioda lipidne mobilizacije. Promene u funkciji leukocita tokom peripartalnog perioda su povezane sa istim metaboličkim i endokrinim peripartalnim događajima, kao što su promena koncentracije NEFA i

holesterola u serumu (Gilbert i sar., 1993; Kaneene i sar., 1997). Ovi autori su zaključili da stepen peripartalnih promena u koncentraciji NEFA direktno ili indirektno zavisi od stepena smanjenja funkcije leukocita. Naime, utvrđeno je da krave sa prekomernom lipidnom mobilizacijom i ketogenezom (NEFA i BHB) imaju znatno veću vrednost inflamatornih medijatora, poput neutrofila i limfocita (Mirzadeh i sar., 2010; Belic i sar., 2011). Suprotno, Hoeben i sar. (2000) su kod krava u peripartalnom periodu, utvrdili negativnu korelaciju između leukocita i koncentracije BHB i NEFA. U našim istraživanjima je utvrđena pozitivna korelacija koncentracije NEFA i broja leukocita u oglednoj i kontrolnoj grupi krava. Intezitet ove veze opada usled primene ketoprofena (Tabela 7). Isto tako, rezultati naših istraživanja ukazuju na postojanje pozitivne korelacije između koncentracije BHB i broja leukocita. Intezitet ove relacije signifikantno opada u oglednoj grupi krava, u odnosu na kontrolnu. Dobijeni rezultati ukazuju na činjenicu da sa aplikacijom ketoprofena smanjuje intezitet lipidne mobilizacije, kao i ketogeneze, što ima za posledicu i smanjenje inteziteta inflamacije.

Sattar i Mirza (2009) su utvrdili da krave tokom peripartalnog perioda imaju smanjenje koncentracije hemoglobina i smanjen broj eritrocita. Prema drugim literaturnim podacima značajno niže koncentracija hemoglobina su utvrđene i u krvi ketoznih krava (Belic i sar, 2010). Saglasno rezultatima naših istraživanja, utvrđeno je da postoji negativna korelacija između koncentracije BHB i hemoglobina u oglednoj i kontrolnoj grupi krava (Tabela 7).

Kushibiki i sar. (2002) navode da primena TNF- α kod eksperimentalnih životinjama, dovodi do povećane proizvodnje proteina akutne faze, ali i povećanog oslobađanjem NEFA iz masnog tkiva u cirkulaciju. Prema tome, više koncentracije NEFA u krvi se mogu povezati sa aktivacijom imunološkog sistema, što je u saglasnosti sa rezultatima naših istraživanja. Shodno navedenom, u našim ispitivanjima je zabeležena pozitivna korelacija između koncentracije TNF- α i NEFA u oglednoj i kontrolnoj grupi krava. Naime, intezitet ove korelacije je jače izražen u grupi krava kojoj je aplikovan ketoprofen u odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 7).

Seifi i sar. (2007) su ustanovili da kod krava posle teljenja postoji pozitivna korelacija između koncentracije NEFA i BHB, odnosno da sa povećanjem inteziteta lipidne mobilizacije dolazi do povećanja inteziteta procesa ketogeneze. Međutim, u našim istraživanjima je sa porastom koncentracije NEFA došlo do manjeg porasta koncentracije BHB usled aplikacije ketoprofena, odnosno povećanjem inteziteta lipomobilizacije je došlo do smanjenja inteziteta procesa ketogeneze (Tabela 6). Rezultati naših istraživanja su pokazali da je primena

ketoprofena kravama tokom perioda rane laktacije signifikantno uticala na učestalost nastanka intenzivne lipidne mobilizacije i ketogeneze. Kod tretiranih krava, pojava intenzivne lipidne mobilizacije je bila 2,4 puta manja, a ketogeneze 2 puta, u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Naime, u kontrolnoj grupi životinja intenzivna lipidna mobilizacija i ketogeneza je nastala u 66,7% slučajeva (Tabela 5).

Prema podacima iz literature, kod krava sa intenzivnom mobilizacijom masti je dokazana smanjena sinteza IFN- γ (Szuster-Ciesielska i sar., 1995). Do sličnih rezultata su došli i drugi autori (Lacetera i sar., 2005), kada je u peripartalnom periodu kod krava utvrđeno da povišene koncentracije NEFA mogu imati uticaja na funkciju limfocita, odnosno smanjenu sintezu IgM i IFN- γ . U našim istraživanjima je utvrđeno da u oglednoj grupi krava između koncentracija NEFA i IFN- γ postoji neznatno pozitivna korelacija. Takođe, signifikantne korelacije pomenutih parametara nisu utvrđene između ogledne i kontrolne grupe krava (Tabela 7).

Seifi i sar. (2007) su ustanovili da kod krava posle teljenja postoji pozitivna korelacija između koncentracija NEFA i triglicerida. Međutim, u našim istraživanjima je dokazano da intezitet ove veze slabi usled primene ketoprofena (Tabela 6). Prema rezultatima istraživanja Khovidhunkit i sar. (2004), dokazano je da TNF- α može dovesti do smanjenja koncentracije BHB u postpartalnom periodu kod krava. U našim istraživanjima je u oglednoj grupi krava između pomenutih parametara utvrđena negativna korelacija, čime se potvrđuje antiinflamatorni efekat leka (Tabela 7).

U istraživanju Gonzalez i sar. (2011) je dokazano da krave sa višom lipidnom mobilizacijom imaju niže vrednosti ukupnih proteina, albumina, kao i uree u odnosu na krave sa nižom lipidnom mobilizacijom. Do sličnih rezultata su došli i drugi autori (Tóthová i sar.; 2014b) koji su ustanovili da promene u metabolizmu proteina karakterišu snižene vrednosti ukupnih proteina i albumina kod krava sa višom koncentracijom NEFA. Nastale promene autori pripisuju metaboličkim adaptacijama jetre u periodu rane laktacije. Naime, i drugi autori (Bertoni i sar., 2008) su ustanovili da su niže koncentracije negativnih proteina akutne faze, uključujući i albumin, povezane sa smanjenom funkcijom jetre. U našim istraživanjima nije utvrđen značajan uticaj aplikacije ketoprofena na korelaciju između koncentracije NEFA sa koncentracijama ukupnih proteina i albumina (Tabela 6).

West (1990) u svom radu navodi da masna infiltracija u jetri može da utiče na koncentracije pojedinih komponenti krvi, uključujući smanjenje koncentracije glukoze, ukupnih

proteina, albumina i uree. Međutim, korelacija koncentracije NEFA i glukoze u našim istraživanjima značajno slabi prilikom aplikacije ketoprofena. Naime, sa porastom koncentracije NEFA intenzitet opadanja vrednosti glukoze i albumina značajno je niži kod krava ogledne grupe (Tabela 6).

Adewuyi i sar. (2005) su utvrdili da pored koncentracije proteina akutne faze, glukoze i uree, u indikatore hepaticne funkcije su uključeni i enzimi. Utvrđeno je postoji negativna korelacija između aktivnosti AST i koncentracije NEFA (stepena lipomobilizacije) (Gonzales i sar., 2011), dok drugi autori ističu postojanje pozitivne korelacije između pomenuta dva parametra (Đoković i sar., 2013b). U našim istraživanjima je utvrđena pozitivna korelacija NEFA i AST. Naime, ova korelacija značajno slabi prilikom aplikacije ketoprofena što govori o povezanosti između stepena lipidne mobilizacije i indikatora hepaticne funkcije (Tabela 6).

U cilju određivanja incidence postaportalnih bolesti, kako bi se odredila povezanost između koncentracija NEFA, BHB, holesterola, kalcijuma i postaportalnih bolesti, utvrđeno je postojanje negativne korelacije između NEFA i kalcijuma tokom prve i druge nedelje posle partusa (Sepúlveda-Varas i sar., 2015). U našim istraživanjima korelacija između navedenih parametara je takođe negativna, odnosno značajno slabi prilikom aplikacije ketoprofena što je prikazano u Tabeli 6.

U istraživanju koje su sprovedi Tóthová i sar. (2014b) je dokazano je da su metaboličke promene povezane sa energetske disbalansom i mobilizacijom masti, odnosno povezane sa promenama u metabolizmu proteina i funkcionalnim statusom imunološkog sistema. Rezultati ovih istraživanja govore o jakoj vezi između koncentracije NEFA, odnosno BHB i ukupnih proteina i albumina tokom perioda rane laktacije. Takođe, utvrđeno je postojanje negativne korelacije između koncentracije BHB i glukoze kod krava tokom perioda rane laktacije (Gonzales i sar., 2011; Đoković i sar., 2013b). U našim istraživanjima sa povećanjem koncentracije BHB intenzitet veze sa koncentracijom glukoze je značajno manji prilikom aplikacije ketoprofena (Tabela 6).

U istraživanju Đoković i sar. (2013b) je utvrđeno postojanje negativne korelacije između BHB i triglicerida. Koncentracija triglicerida u serumu je značajno niža kod ketoznih krava. Naime, usled akumulacije triglicerida u jetri dolazi do snižavanja njihove koncentracije u krvi. Prema drugim istraživanjima Đoković i sar. (2012), koncentracija triglicerida, ukupnog holesterola i albumina je u negativnoj korelaciji sa koncentracijama NEFA i BHB. Prema nekim

autorima se povećana kumulacija triglicerida i holesterola u hepatocitima ketoznih krava može pripisati smanjenoj sintezi VLDL (Holtenius, 1989; Sevinc i sar., 2003). U našim istraživanjima je zabeležena pozitivna korelacija između koncentracija NEFA i BHB sa koncentracijama ukupnog holesterola u grupi krava kojima je aplikovan ketoprofen, dok su ove korelacije bile negativne u kontrolnoj grupi (Tabela 6). Takođe, rezultati naših istraživanja potvrđuju negativnu korelaciju između triglicerida i BHB. Naime, opadanje vrednosti koncentracije triglicerida je značajno manje u funkciji porasta BHB kod krava ogledne grupe (Tabela 6).

Prema podacima iz literature, u tranzicionom periodu je koncentracija albumina niža kod ketoznih krava u odnosu na zdrave životinje. Nastale promene autori pripisuju smanjenoj sintezi albumina usled masne infiltracije jetre (Jorritsma i sar., 2001; Lubojacka i sar., 2005). Do sličnih rezultata su došli i drugi autori, kada je zabeležena negativna korelacija između koncentracije BHB i albumina (Đoković i sar., 2012). Suprotno, u našim istraživanjima je zabeležena pozitivna korelacija kako u oglednoj, tako i u kontrolnoj grupi krava. Naime, aplikacija ketoprofena je uticala da je opadanje vrednosti koncentracije albumina u funkciji porasta BHB značajno manje kod krava ogledne u odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 6).

U istraživanju West-a (1990) je utvrđena pozitivna korelacija između količine lipida u jetri i koncentracije ukupnog bilirubina u serumu. Đoković i sar. (2012) su potvrdili pozitivnu korelaciju koncentracija ukupnog bilirubina ne samo sa hepatičnom steatozom, već i sa koncentracijama NEFA i BHB. Takođe, u ranoj laktaciji kod krava je utvrđena pozitivna korelacija između koncentracije NEFA i ukupnog bilirubina (Đoković i sar., 2013b), što je u saglasnosti sa rezultatima naših istraživanja. Međutim, intezitet navedene korelacije je značajno slabiji kod krava tretiranih ketoprofenom (Tabela 6).

Dokazano je da je tokom perioda rane laktacije koncentracija haptoglobina značajno viša kod krava sa višim koncentracijama IL-1 β (Trevisi i sar., 2015). U istom istraživanju je zabeležen jači odgovor proteina akutne faze kod krava kod kojih su zabeležene više vrednosti IL-1 β . Tabela 8 pokazuje da je u našim istraživanjima utvrđena negativna korelacija između koncentracija haptoglobina i albumina u kontrolnoj i oglednoj grupi krava.

U istraživanju Avki i sar. (2004), utvrđeno je povećanje koncentracije TNF- α u serumu mlečnih krava sa dislokacijom sirišta, a zabeležena je i albuminurija. S obzirom da je etiologija dislokacije sirišta povezana sa inflamatornim procesima, rezultate ovih autora možemo povezati sa vrednostima dobijenih parametara u našim istraživanjima. Naime, zabeležena je negativna

korelacija između koncentracija TNF- α i albumina, odnosno pad vrednosti albumina u funkciji koncentracije TNF- α je intenzivniji u kontrolnoj grupi u našim istraživanjima (Tabela 8).

Kod krava u peripartalnom period sa dijagnostikovanom dislokacijom sirišta je utvrđen porast aktivnosti AST, kao i povećanje koncentracije haptoglobina (Klevenhusen i sar., 2015). Tabela 8 pokazuje da je u našim istraživanjima takođe utvrđena pozitivna korelacija između navedenih parametra. U istraživanju Devrim i sar. (2012) je utvrđena pozitivna korelacija između koncentracija TNF- α i AST u plazmi krava kod kojih je dijagnostikovana dislokacija sirišta. Prema istraživanju Zadnik-a (2003), nastale promene se mogu pripisati hepatičkoj lipidozi, endotoksemiji i oštećenju hepatocita. Pozitivna korelacija između TNF- α i AST je zabeležena i u našim istraživanjima kod kontrolne grupe krava, dok se ta veza gubi u grupi krava kojoj je aplikovan ketoprofen (Tabela 8).

Calamari i sar. (2014) su utvrdili da se u plazmi krava sa kraćim vremenom preživljanja beleže niže koncentracije haptoglobina, ali i više vrednosti ukupnog bilirubina, u odnosu na krave sa dužim vremenom preživljanja. Isti autori zaključuju da procesi inflamacije u peripartalnom periodu mogu imati uticaja na koncentracije navedenih parametara. U našim istraživanjima je utvrđena pozitivna korelacija između koncentracije haptoglobina i ukupnog bilirubina, značajno više izražena u kontrolnoj u odnosu na oglednu grupu (Tabela 8).

Prema podacima iz literature, pozitivna korelacija između koncentracija TNF- α i ukupnog bilirubina je zabeležena u ispitivanjima kod ljudi, sa dijagnostikovanim hepatitisom C (Ren i sar., 2009) i B (Wang i sar., 1999). U našim istraživanjima, koncentracija TNF- α i ukupnog bilirubina je u pozitivnoj korelaciji, koja je bila više izražena kod krava kojima je aplikovan ketoprofen (Tabela 8).

U istraživanju Bradford i sar. (2009) je utvrđeno da je subkutana aplikacija TNF- α , tokom 7 dana, dovela do pojave dvostruko viših vrednosti triglicerida u jetri kod krava u periodu kasne laktacije. Na osnovu izvršenih ispitivanja autori zaključuju da TNF- α ima važnu ulogu u patogenezi nastanka masne jetre kod krava. U ranijim ispitivanjima kod glodara je dokazano da je primena TNF- α povezana sa povećanjem triglicerida u jetri (Feingold i sar., 1989). Do sličnih rezultata su došli i drugi autori (Pappo i sar., 1995), kada je utvrđeno da primena TNF- α monoklonskih antitela dovodi do smanjenja koncentraciju ukupnih lipida, kao i triglicerida u jetri. Shodno rezultatima prethodno navedenih autora, u našim istraživanjima je

zabeležena negativna korelacija između koncentracija TNF- α i triglicerida, odnosno intezitet ove korelacije slabi kod krava kojima je aplikovan ketoprofen (Tabela 8).

Dokazano je da se tokom tranzicionog perioda kod krava mogu javiti simptomi slični dijabetesu tipa 2 usled rezistencije na insulin, što se karakteriše povišenim koncentracijama NEFA, proteina akutne faze i citokina (pre svega TNF- α), ali i smanjenjem koncentracije albumina, hemoglobina i holesterola (Ametaj i sar., 2005). Isti autori su zabeležili da kod krava u peripartalnom periodu postoji negativna korelacija između koncentracija TNF- α i holesterola, što je u saglasnosti sa našim istraživanjima, odnosno intezitet ove korelacije je slabiji u ogleđnoj grupi životinja (Tabela 8).

Poznato je da tokom akutnog inflamatornog odgovora dolazi do kratkotrajne hiperglikemije, a potom sledi dugotrajna hipoglikemija (Kushibiki i sar., 2000). U ispitivanju kod junica sa dijagnostikovanim mastitisom je zabeležena promena u ekspresiji gena koji su odgovorni za metaboličke procese u jetri, uključujući i smanjenu ekspresiju gena odgovornih za sintezu glukoze (Jiang i sar., 2008). Dokazano je da TNF- α direktno utiče na metaboličke procese u jetri, pre svega na smanjenu proizvodnju glukoze (Kettelhut i sar., 1987). Heiser i sar. (2015) su dokazali da tokom perioda rane laktacije postoji povećana ekspresija gena kako za TNF- α , tako i za IFN- γ . U našim istraživanjima je utvrđena negativna korelacija između koncentracije glukoze i proinflamatornih citokina (IL-1 i TNF- α). Međutim, intezitet ove korelacije slabi usled aplikacije ketoprofena (Tabela 8).

Hilary (1990) je ustanovio da je smanjena sinteza uree u peripartalnom periodu posledica masne infiltracije jetre. *In vitro* je dokazano da masna infiltracija umanjuje sposobnost kultivisanih hepatocita da vrše detoksikaciju amonijaka do uree (Strang i sar., 1998). U sličnim ispitivanjima je dokazano da amonijak smanjuje sposobnost jetre da pretvara propionat u glukozu (Overton i sar., 1999). U istraživanjima Drackley i sar. (2001) masna infiltracija jetre je povezana sa procesom smanjene glukoneogeneze. Do sličnih rezultata su došli i drugi autori u ispitivanju kod pacova, kada se povišene koncentracije TNF- α dovode u vezu sa masnim tkivom, odnosno procesi inflamacije se mogu povezati sa prekomernom ishranom i infekcijom /stresom (Morin i sar., 1998). Zhu i sar. (2000) su zabeležili u ispitivanju kod krava, neposredno posle teljenja, da je koncentracija amonijaka u krvi u pozitivnoj korelaciji sa stepenom akumulacije masti u jetri. Shodno navedenim literaturnim podacima, u našim istraživanjima je takođe

utvrđena pozitivna korelacija između TNF- α i uree kako u kontrolnoj, tako i oglednoj grupi krava. Intezitet nastalih promena je više izražen u kontrolnoj grupi krava (Tabela 8).

Goff i sar. (1992) su dokazali da aplikacija IL-1 β kravama može dovesti do promene metabolizma osteoklasta, odnosno mobilizacija kalcijuma iz koštanog tkiva može biti stimulisana sa ovim interleukinom. U istraživanjima drugih autora (Kimura i sar., 2006; Bertoni i sar., 2008), kod krava u tranzicionom periodu sa težim inflamatornim stanjem su dokazane niže koncentracije kalcijuma u plazmi. U sličnim ispitivanjima, Trevisi i sar. (2015) takođe bleže niže koncentracije kalcijuma u plazmi u grupi krava sa težim inflamatornim stanjem, odnosno najviše koncentracije IL-1 β su zabeležene 35 dana pred partus. U našim istraživanjima je utvrđena pozitivna korelacija između koncentracija kalcijuma i IL-1 β , posebno u oglednoj grupi krava (Tabela 8). Shodno navedenim literaturnim podacima, pozitivna korelacija se može dovesti u vezu sa povećanom sintezom IL-1 β , odnosno pojačanom mobilizacijom kalcijuma.

U ispitivanju kod ljudi je dokazano da IFN dovodi do hiperkalcemije. Isti autori navode da je IFN- β odgovoran za mobilizaciju kalcijumovih jona iz ekstracelularnih depoa, dok IFN- γ dovodi do mobilizacije kako intracelularnog kalcijuma, tako i do mobilizacije kalcijuma iz ekstracelularnih depoa (Miyake i sar., 1989). U ispitivanjima kod krava tokom perida rane laktacije (Kimura i sar., 2006; Bertoni i sar., 2008; Trevisi i sar., 2015) je dokazano smanjenje koncentracije kalcijuma, odnosno povećanje koncentracije IFN- γ . U našim istraživanjima je uočena pozitivna korelacija između ova dva parametra, odnosno kod krava tretiranih sa ketoprofenom su zabeležene značajno više vrednosti kalcijuma sa porastom koncentracije IFN- γ (Tabela 8).

6.4. Uticaj ketoprofena na proizvodnju mleka kod krava

Tokom perioda rane laktacije, u plazmi mlečnih krava su utvrđene povećane koncentracije NEFA i citokina, što se može dovesti u vezu sa inflamatornim odgovorom u jetri. Shodno navedenom, pojačana sinteza masnih kiselina je usmerena prema sintezi triglicerida i može dovesti do smanjene glukoneogeneze i kontinuirane mobilizacije masnog tkiva (Bradford i sar., 2009). Metaboličke promene mogu ograničiti snabdevanje mlečne žlezde neophodnim materijama, smanjiti prinos mleka, odnosno uticati na produktivnost krava tokom laktacionog perioda. Naime, Bertoni i sar. (2008) su ustanovili da inflamatorni procesi tokom perioda rane

laktacije mogu imati uticaj na smanjenje funkcije jetre, kao i produktivnih i reproduktivnih performansi. Cao i sar. (2001) su utvrdili da inflamatorni medijatori utiču na razvoj mlečne žlezde i mogu dovesti do smanjene produkcije mleka, tokom perioda laktacije. Beaton i sar., (2003) napominju da je inflamatorni put NF- κ B udružen sa smanjenim odgovorom na prolaktin i smanjenom proizvodnjom β -kazeina.

Prema podacima iz literature, i.v. aplikacija flunixin-meglumina, 2 i 24h posle partusa (Duffield i sar., 2009), odnosno tokom tri dana posle partusa (Shwartz i sar., 2009), nije imala uticaja na produkciju mleka. U sličnim istraživanjima, Mainau i sar. (2014) su takođe zaključili da parenteralna primena meloksikama i karprofen posle partusa nema uticaja na produkciju mleka. Isto tako, Priest i sar. (2013) su utvrdili da aplikacija karprofena od 21. do 31. dana posle teljenja nije uticala na produkciju mleka, a nastalu promenu autori odloženoj aplikaciji leka.

Utvrđeno je da primena lizin acetil-salicilata u prvih 5 dana laktacije dovodi do povećanja prinosa mleka (Bertoni i sar., 2004). Do istih rezultata su došli i drugi autori (Trevisi i Bertoni, 2008), posle primena aspirina, tokom pet dana nakon teljenja. Suprotno navedenim ispitivanjima, primena natrijum-salicilata tokom prve nedelje laktacije nije dovela do povećane produkcije mleka u posmatranom terminu od sedam dana. Naime, povećana produkcija mleka je zabeležena 21. dana laktacije (Farney i sar., 2013b).

Dokazano je da i.m. primena ketoprofena u dozi od 3 mg/kg t.m., neposredno i 24 sata posle partusa nema uticaja na prinos mleka, dok primena istog leka tri dana posle teljenja dovodi do povećane produkcije mleka (Richards i sar., 2009). Isto tako, Newby i sar. (2013) su nakon parenteralne primene ketoprofena u dozi od 3 mg/kg t.m., tokom tranzicionoog perioda, zabeležili veći prinos mleka. U istraživanju Carpenter i sar. (2016), trodnevna primena natrijum salicilata i meloksikama tokom perioda rane laktacije je dovela do povećanja prinosa mleka sa 7 na 9%. Dobijeni rezultati su slični rezultatima naših istraživanja, gde je tokom perioda standarde laktacije grupi krava koja je tretirana sa ketoprofenom zabeležena produkcija mleka bila viša za 8,3%, u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 28).

7. ZAKLJUČCI

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

1. Ketoprofen primenjivan parenteralno kod krava posle teljenja ublažava metabolički stres, tako što značajno smanjuje koncentraciju NEFA, BHB, ukupnog bilirubina i aktivnost AST, u poređenju sa netretiranim kravama.

2. Ketoprofen primenjivan parenteralno značajno smanjuje inflamatorne procese tokom perioda rane laktacije kod krava u poređenju sa netretiranim, što je utvrđeno kroz značajno smanjenje koncentracije proteina akutne faze (haptoglobin, fibrinogen), proinflamatornih citokina (TNF- α , IL-1 α i IFN- γ), broja neutrofila i limfocita i povećanje broj eritrocita i koncentracije hemoglobina.

3. Ketoprofen primenjivan parenteralno signifikantno smanjuje intezitet veze između metaboličkih i inflamatornih promena kod krava posle teljenja.

4. Ketoprofen primenjivan parenteralno kod krava posle teljenja ima pozitivan uticaj na proizvodnju mleka, odnosno zabeležen je za 8,3% veći prinos mleka u standardnoj laktaciji u poređenju sa netretiranim kravama.

Dobijeni rezultati istraživanja ukazuju da primena ketoprofena prvog, drugog i trećeg dana posle teljenja kod krava povoljno utiče na metaboličke i inflamatorne promene nastale tokom prve dve nedelje laktacije, tako da primena ketoprofena može biti indikovana u kontroli inflamatornog odgovora tokom perioda rane laktacije.

8. LITERATURA

1. Adewuyi A.A., Gruys E. and van Eerdenburg F.J.C.M. *Non esterified fatty acids (NEFA) in dairy cattle. A review.* Veterinary Quarterly. 27 (3): 117–126, 2005.
2. Ahn K.S. and Aggarwal B.B. *Transcription factor NF- κ B: A sensor for smoke and stress signals.* Ann NY Acad. Sci. 1056: 218–233, 2005.
3. Alsemgeest S.P., Kalsbeek H.C., Wensing T., Koeman J.P., van Ederen A.M., Gruys E. *Concentrations of serum amyloid-A (SAA) and haptoglobin (HP) as parameters of inflammatory diseases in cattle.* Vet Q. 16 (1): 21-23, 1994.
4. Ametaj B.N., Bradford B.J., Bobe G., Nafikov R.A., Young J.W., Beitz D.C. *Strong relationships between mediators of the acute phase response and fatty liver in dairy cows.* Canadian Journal of Animal Science. 85 (2): 165-175, 2005.
5. Amann R. and Peskar B.A. *Anti-inflammatory effects of aspirin and sodium salicylate.* Eur. J. Pharmacol. 447: 1-9, 2002.
6. Amiridis G.S., Leontides L., Tassos E., Kostoulas P. and Fthenakis G.C. *Flunixin meglumine accelerates uterine involution and shortens the calving-to-first-oestrus interval in cows with puerperal metritis.* J. Vet. Pharmacol. Ther. 24: 365-367, 2001a.
7. Arifah A., Landoni M.F., Frean S.P. and Lees P. *Pharmacodynamics and pharmacokinetics of ketoprofen enantiomers in sheep.* American Journal of Veterinary Research. 62: 77-86, 2001.
8. Arkan M. C., Hevener A. L., Greten F. R., Maeda S., Li Z., Long J. M., Wynshaw-Boris A., Poli G., Olefsky J. and Karin M. *IKK- β links inflammation to obesity-induced insulin resistance.* Nat. Med. 11:191-198, 2005.
9. Augustyniak D., Nowak J. and Lundy F.T. *Direct and Indirect Antimicrobial Activities of Neuropeptides and their Therapeutic Potential.* Current Protein and Peptide Science, 13: 723-738, 2012.
10. Avki S., Simsek A., Turutoglu H., Ileri-Buyukoglu T., Yigitarslan K., Temizsoylu M.D. *Serum tumor necrosis factor- α activity in dairy cows with abomasal displacement: the potential for anti-cytokine therapy.* Vet. Cer. Derg. 10: 28-32, 2004.

11. Baker R.G., Hayden M.S. and Ghosh S. *NF- κ B, inflammation, and metabolic disease*. Cell Metab. 13: 11-22, 2011.
12. Banting A., Banting S., Heinonen K. and Mustonen K. *Efficacy of oral and parenteral ketoprofen in lactating cows with endotoxin-induced acute mastitis*. Vet. Rec. 163: 506-509, 2008.
13. Bannerman D.D. and Goldblum S.E. *Mechanisms of bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial apoptosis*. American Journal of Physiology. 284: 899–914, 2003.
14. Bas A.L., Tras B., Elmas M., Keskin E. and Yazar E. *The effects of acetylsalicylic acid on the phagocytic function of bovine neutrophils in vitro*. Rev. Med. Vet. 149: 857-862, 1998.
15. Beaton A., Broadhurst M. K., Wilkins R. J. and Wheeler T. T. *Suppression of beta-casein gene expression by inhibition of protein synthesis in mouse mammary epithelial cells is associated with stimulation of NF-kappaB activity and blockage of prolactin-Stat5 signaling*. Cell Tissue Res. 311: 207–215, 2003.
16. Belic B., Cincovic M.R., Stojanovic D., Kovacevic Z., Vidovic B. *Morphology of erythrocyte and ketosis in dairy cows with different body condition*. Contemporary agriculture. 59: 306-311, 2010.
17. Belic B., Cincovic M.R., Krcmar Lj. and Vidovic B. *Reference values and frequency distribution of hematological parameters in cows during lactation and in pregnancy*. Contemporary agriculture. 60: 145-51, 2011.
18. Bell A.W. *Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation*. Journal of Animal Science. 73 (9): 2804–2819, 1995.
19. Bernabucci U., Ronchi B., Lacetera N. and Nardone A. *Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows*. J. Dairy Sci. 88 (6): 2017-2026, 2005.
20. Bertoni G., Trevisi E., Calamari L., Lombardelli R. *Additional energy and protein supplementation of dairy cows during early lactation: milk yield, metabolic-endocrine status and reproductive performances*. Zoot Nutr Anim. 24: 17-29, 1998.
21. Bertoni G., Trevisi E. and Piccioli-Cappelli F. *Effects of acetyl-salicylate used in postcalving of dairy cows*. Vet. Res. Commun. 28 Suppl. 1: 217-219, 2004.

22. Bertoni G., Trevisi E., Han X. and Bionaz M. *Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows*. J. Dairy Sci. 91 (9): 3300-3310, 2008.
23. Bishop Y. *The Veterinary Formulary, 6th Edition*. Pharmaceutical Press, London, UK. 344, 2005.
24. Bobe G., Young J.W. and Beitz D.C. *Invited review: Pathology, etiology, prevention and treatment of fatty liver in dairy cows*. J. Dairy Sci. 87: 3105-3124, 2004.
25. Boothe D.M. *The analgesic-antipyretic-anti-inflammatory drugs*. In: Adams R.H, editor. *Veterinary pharmacology and therapeutics*. 7th ed. Ames, IA: Iowa University Press; 432-449, 1995.
26. Bradford B.J., Mamedova L.K., Minton J.E., Drouillard J.S., and Johnson B.J. *Daily injection of tumor necrosis factor- α increases hepatic triglycerides and alters transcript abundance of metabolic genes in lactating dairy cattle*. J. Nutr. 139 (8): 1451-1456, 2009.
27. Brideau C., Van Staden C., Chan C.C. *In vitro effects of cyclooxygenase inhibitors in whole blood of horses, dogs, and cats*. American Journal of Veterinary Research 62: 1755-1760, 2001.
28. Brody T., Larner J. and Minneman K. *Human pharmacology*. - Mosby, Third edition, chapter 31, St. Louis, 1998.
29. Burtis C.A. and Ashwood E.R. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, 3rd edn, Saunders Company, London. 494-497, 1999.
30. Cabre F., Fernandez M.F., Calvo L., Ferrer X., Garcia M.L., Mauleon D. *Analgesic, antiinflammatory and antipyretic effects of S(+)-ketoprofen in vivo*. Journal of clinical pharmacology. 38: 3S-10S, 1998.
31. Calamari L., Soriani N., Panella G., Petrera F., Minuti A., Trevisi E. *Rumination time around calving: an early signal to detect cows at greater risk of disease*. J Dairy Sci. 97 (6): 3635-3647, 2014.
32. Calder P.C. *The relationship between the fatty acid composition of immune cells and their function. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 79: 101–108, 2008.
33. Cao Y., Bonizzi G., Seagroves T. N., Greten F. R., Johnson R., Schmidt E. V., and Karin M. *IKK α provides an essential link between RANK signaling and cyclin D1 expression during mammary gland development*. Cell. 107: 763–775, 2001.

34. Carpenter A.J., Ylloja C.M., Vargas C.F., Mamedova L.K., Mendonca L.G., Coetzee J.F., Hollis L.C., Bradford B.J. *Hot topic: Early postpartum treatment of commercial dairy cows with nonsteroidal antiinflammatory drugs increases whole-lactation milk yield.* Journal of Dairy Science. 99 (1): 672-679, 2016.
35. Carrillo-Jimenez R., Nurnberger M. *Celecoxib-induced acute pancreatitis and hepatitis: a case report.* Archives of Internal Medicine. 160: 553-554, 2000.
36. Cavestany D., Blanc J.E., Kulcsar M., Uriarte G., Chilbroste P., Meikle A., Febel H., Ferraris A. and Krall E. *Studies of the Transition Cow Under a Pasturebased Milk Production System: Metabolic Profiles.* Journal of veterinary medicine A. 52 (1): 1–7, 2005.
37. Celeska I., Janevski A., Džadzovski I., Ulchar I., Kirovski D. *The dynamics of biochemical parameters in blood of clinically healthy Holstein cows from day 5 before to day 60 after calving.* Mac Vet Rev. 38 (2): 189-193, 2015.
38. 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.
39. Chitturi S., George, J. *Hepatotoxicity of commonly used drugs: nonsteroidal anti-inflammatory drugs, antihypertensives, antidiabetic agents, anticonvulsants, lipid-lowering agents, psychotropic drugs.* Seminars in liver disease. 22: 169-183, 2002.
40. Cincović M.R., Belić B., Vidović B., Krčmar Lj. *Reference values and frequency distribution of metabolic parameters in cows during lactation and in pregnancy.* Contemporary agriculture. 60 (1-2): 175-182, 2011.
41. Cincović M.R., Belić B., Radojčić B., Toholj B., Stančić I., Stevančević M. *Periparturient metabolic profile, blood picture and body condition score in healthy cows and cows with associated periparturient disease.* Contemporary agriculture. 61 (3-4): 205-220, 2012.
42. Cincović M.R. *Patofiziološka procena peripartalnog metaboličkog stresa kod visokoproduktivnih krava upotrebom endokrinih i metaboličkih kriterijuma (doktorska disertacija).* Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet – Departman za veterinarsku medicinu., 2013.
43. Claria, J., A. González-pérez, C. López-vicario, B. Rius, and E. Titos. *New insights into the role of macrophages in adipose tissue inflammation and fatty liver disease: Modulation by*

- endogenous omega-3 fatty acid-derived lipid mediators*. *Front.Immunol.* 2: 1–8, 2011.
44. Contreras G.A., O'Boyle N.J., Herdt T.H. and Sordillo L.M. *Lipomobilization in periparturient dairy cows influences the composition of plasma nonesterified fatty acids and leukocyte phospholipid fatty acids*, *Journal of Dairy Science.* 93: 2508–2516, 2010.
 45. Contreras G. A. and Sordillo L. M. *Lipid mobilization and inflammatory responses during the transition period of dairy cows*. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 34: 281-289, 2011.
 46. da Silva M.B., Herion F., Raskinet R., David J.L., Gustin P., Lekeux P. *Combined effect of Web 2086 (Paf antagonist) and ketoprofen (Nsaid) on Paf-induced ex vivo platelet aggregation in bovine*. *Zentralbl Veterinarmed A.* 44 (2): 65-71, 1997.
 47. da Silva M.B., Gustin P., Herion F., David J.L., Van de Weerd M.L., Lekeux P. *Effect of ketoprofen on PAF-induced bovine platelet aggregation*. *Vet J.* 155 (2): 201-3, 1998.
 48. De Graves F.J., Riddell M.G. and Schumacher J. *Ketoprofen concentrations in plasma and milk after intravenous administration in dairy cattle*. *American Journal of Veterinary Research.* 57: 1031-1033, 1996.
 49. Devrim A. K., Sözmen M., Yiğitarıslan K., Sudağidan M., Kankavi O., Atabay H. İ. *Assessment of TNF- α and leptin gene expression by RT-PCR in blood of cows with left abomasal displacement*. *Revue Méd. Vét.* 163 (7): 368-372, 2012.
 50. Diaz-Reval M.I., Ventura-Martinez R., Deciga-Campos M., Terron J.A., Cabre F., Lopez-Munoz F.J. *Evidence for a central mechanism of action of S-(+)-ketoprofen*. *European journal of pharmacology.* 483: 241-248, 2004.
 51. Djokovic R., Cincovic M., Kurcubic V., Petrovic M., Lalovic M., Jasovic B. and Stanimirovic Z. *Endocrine and Metabolic Status of Dairy Cows during Transition Period*. *Thai J Vet Med.* 44 (1): 59-66, 2014.
 52. Drackley J.K. *Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier?* *Journal of Dairy Science.* 82 (11): 2259–2273, 1999.
 53. Drackley J.K., Overton T.R. and Douglas G.N. *Adaptations of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period*. *Journal of Dairy Science.* 84: 100–112, 2001.
 54. Drackley J.K., Dann H.M., Douglas G.N., Janovick Guretzky N.A., Litherland N.B., Underwood J.P. et al. *Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may*

- increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. Ital J Anim Sci. 4: 323-44, 2005.*
55. Donalisio C., Barbero R., Cuniberti B., Vercelli C., Casalone M.Re.G. *Effects of flunixin meglumine and ketoprofen on mediator production in ex vivo and in vitro models of inflammation in healthy dairy cows. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 36 (2): 130-139, 2013.*
56. Drillich M., Voigt D., Forderung D. and Heuwieser W. *Treatment of acute puerperal metritis with flunixin meglumine in addition to antibiotic treatment. J. Dairy Sci. 90: 3758-3763, 2007.*
57. Dugowson C.E. i Gnanashanmugam P. *Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. Phys Med. Rehabil. Clin. N. Am. 17: 347–354, 2006.*
58. Duffield T. *Subclinical ketosis in lactating dairy cattle. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice 16: 231–253, 2000.*
59. Duffield T.F., Putnam-Dingwell H., Weary D., Skidmore A., Neuder L., Raphael W., Millman S., Newby N. and Leslie K.E. *Effect of flunixin meglumine treatment 26 following parturition on cow health and milk production. J. Dairy Sci. 92: 117, (Abstr.), 2009.*
60. Earley B., Crowe M.A. *Effects of ketoprofen alone or in combination with local anesthesia during the castration of bull calves on plasma cortisol, immunological and inflammatory responses, J. Anim. Sci. 80: 1044–1052, 2002.*
61. Eckersall P.D. and Bell R. *Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. Vet J 185: 23-27, 2010.*
62. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Veterinary Medicines Evaluation Unit (EMEA/MRL/020/95): Committee for Veterinary Medicinal Products (Ketoprofen), Summary Report. London, UK, 1995. Dostupan na: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500014541.pdf (06.03.2016.)
63. Emery R.S., Liesman J.S. and Herdt T.H. *Metabolism of long-chain fatty-acids by ruminant liver. J. Nutr. 122:832-837, 1992.*
64. Evans T.W. *Review article: albumin as a drug: biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure. Aliment. Pharmacol. Therap. 16 (5): 6-11, 2002.*

65. Farney J.K., Mamedova L.K., Coetzee J.F., Kukanich B., Sordillo L.M., Stoakes S.K., Minton J.E., Hollis L.C., and Bradford B.J. *Anti-inflammatory salicylate treatment alters the metabolic adaptations to lactation in dairy cattle*. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 305:R110-7, 2013a.
66. Farney J.K., Mamedova L.K., Coetzee J.F., Minton J.E., Hollis L.C., Bradford B.J. *Sodium salicylate treatment in early lactation increases whole-lactation milk and milk fat yield in mature dairy cows*. J. Dairy Sci. 96:7709-7718, 2013b.
67. Feingold K. R., Serio M. K., Adi S., Moser A. H. and Grunfeld, C. Tumor necrosis factor stimulates hepatic lipid synthesis and secretion. Endocrinology. 124: 2336–2342, 1989.
68. Fisher A.D., Knight T.W., Cosgrove G.P., Death A.F., Anderson C.B., Duganzich D.M., Matthews L.R. *Effects of surgical or banding castration on stress responses and behavior of bulls*. Aust. Vet. J. 79: 279–284, 2001.
69. Fitzgerald G.A. *COX-2 and beyond: approaches to prostaglandin inhibition in human disease*. Nat Rev Drug Discov. 2: 879–90, 2003.
70. Flick M. J., Du X. Degen J. L. *Fibrin(ogen)-alpha M beta 2 interactions regulate leukocyte function and innate immunity in vivo*. Exp. Biol. Med. 229: 1105-1110, 2004.
71. Fitzpatrick J.L., Nolan A.M., Lees P., May S.A. *Inflammation and pain*. In bovine medicine, Second Ed. Blackwell Publishing, Oxford, UK. 1045-1066, 2004.
72. Đoković R., Šamanc H., Bojkovski J., Borožan S., Bošković-Bogosavljević S. *Morfološko i funkcionalno stanje ćelija jetre kod mlečnih krava u ranoj laktaciji*. Savremena poljoprivreda. Novi Sad. 56: 92 -97, 2007.
73. Đoković R., Ilić Z., Kurčubić V., Jevtić S. *Funkcionalno stanje ćelija jetre kod mlečnih krava u tranzicionom periodu i tokom laktacije*. Acta agriculturae Serbica. 14 (27): 53-61, 2009.
74. Đoković R., Ilić Z., Kurčubić V., Petrović M., Dosković V. *Functional and morphological state of the liver in Simmental dairy cows during transitional period*. Rev. Med. Vet. 162: 574-579, 2011.
75. Đoković R., Šamanc H., Petrović M. D., Ilić Z., Kurčubić V. *Relationship among blood metabolites and lipid content in the liver in transitional dairy cows*. Biotechnology in Animal Husbandry. 28 (4): 705-714, 2012.

76. Đoković R., Kurćubić V., Ilić Z., Cincović M., Fratrić N., Stanimirović Z., Petrović M.D and Petrović M.P. *Evaluation of the metabolic status of Simental dairy cows in early and mid lactation*. Animal Science Papers and Reports. 31 (2): 101-110, 2013a.
77. Đoković R., Kurćubić V., Ilić Z., Cincovic M., Fratric N, Petrović M. and Jašović B. *Evaluation of metabolic status in Simmental dairy cows during late pregnancy and early lactation*. Veterinararski arhiv Zagreb. 6 (83): 593-502, 2013b.
78. Garcia M.L., Tost D., Vilageliu J. *Bioavalbility of S (+)-ketoprofen after oral administration of different mixtures of ketoprofen enantiomers to dogs*. J. Clin. Pharmacol. 38 (12 Suppl): 22S-26S, 1998.
79. Galbraith E.A., McKellar Q.A. *Protein binding and in vitro serum tromboxane B2 inhibition by flunixin meglumine and meclofenamic acid in dog, goat and horse blood*. Research in Veterinary Science. 61: 78-81, 1996.
80. Geisslinger G., Menzel S., Wissel K., Brune K. *Pharmacokinetics of ketoprofen enantiomers after different doses of the racemate*. British journal of clinical pharmacology. 40: 73-75, 1995.
81. Geishauser T., Leslie K.E. and Duffield T.F. *Prevention and prediction of displaced abomasum in dairy cows*. In: Proceedings of American Associations of Bovine Practitioners 1999. 203–207, 1999.
82. Gilbert R.O., Grohn Y.T., Miller P.M. and Hoffman D.J. *Effect of parity on periparturient neutrophil function in dairy cows*. Veterinary Immunology and Immunopathology. 36: 75-82, 1993.
83. Girard D. *Activation of human polymorphonuclear neutrophils by environmental contaminants*. Rev Environ Health. 18 (2): 77-93, 2003.
84. Green G.A. *Understanding NSAIDs: from aspirin to COX-2*. Clin. Cornerstone. 3 (5): 50-60, 2001.
85. Grum D.E., Drackley J.K., Hansen L.R. and Cremin J.D. *Production, digestion, and hepatic lipid metabolism of dairy cows fed increased energy from fat or concentrate*. J. Dairy Sci. 79: 1836-1849, 1996.
86. Grosser T., Yu Y., Fitzgerald G.A. *Emotion recollected in tranquility: lessons learned from the COX-2 saga*. Annual Review of Medicine. 61: 17-33, 2010.

87. Grönlund U. Hallen Sandgren C. and Persson Waller K. *Haptoglobin and serum amyloid A in milk from dairy cows with chronic sub-clinical mastitis*. Veterinary Research, 36 (2): 191-198, 2005.
88. Ghasemi F., Gonzalez-Cano P., Griebel P.J. and Palmer C. *Proinflammatory cytokine gene expression in endometrial cytobrush samples harvested from cows with and without subclinical endometritis*. Theriogenology. 78 (7): 1538-1547, 2012.
89. Ghisletti S., Huang W., Ogawa S., Pascual G., Lin M. E., Willson T. M., Rosenfeld M. G. and Glass C. K. *Parallel SUMOylation-dependent pathways mediate gene- and signalspecific transrepression by LXRs and PPAR gamma*. Mol. Cell. 25: 57-70, 2007.
90. Goff J.P., Naito Y., Kehrl M.E. Jr, Hayes P., Daley M. *Physiologic effects of administration of interleukin 1 beta in cows*. Am J Vet Res. 53 (11): 1983-1987, 1992.
91. Goff J.P., Horst R.L. *Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders 1, 2*. Journal of Dairy Science. 80 (7): 1260–1268, 1997.
92. Goff 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 (3-4): 237–257, 2006a.
93. Goff J.P. *Major advances in our understanding of nutritional influences on bovine health*. J Dairy Sci. 89: 1292–1301, 2006b.
94. Gonzalez 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.
95. Grummer, R.R., Mashek, D.G. and Hayirli, A. *Dry matter intake and energy balance in the transition period*. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. 20 (3): 447–470, 2004.
96. Hardardottir I., Grunfeld C. and Feingold K. R. *Effects of endotoxin and cytokines on lipid metabolism*. Curr. Opin. Lipid. 5: 207-215, 1994.
97. Harford K.A., Reynolds C.M., McGillicuddy F.C. and Roche H.M. *Fats, inflammation and insulin resistance: insights to the role of macrophage and T-cell accumulation in adipose tissue*. Proceedings of the Nutrition Society. 70: 408–417, 2011.

98. Heuwieser W., Iwersen M. and Goetze L. *Efficacy of carprofen on conception rates in lactating dairy cows after subcutaneous or intrauterine administration at the time of breeding*. J. Dairy Sci. 94: 146–151, 2011.
99. Hayes M.A. *Functions of cytokines and acute phase proteins in inflammation*. Vith Congress of the International Society for Animal Clinical Biochemistry, Proceedings of the Congress-international society for animal clinical biochemistry, University of Guelph, Canada. 1-7, 1994.
100. Hengst J.M. *The Role of C-Reactive Protein in the Evaluation and Management of Infants With Suspected Sepsis*. Adv Neonatal Care. 3 (1): 3-13, 2003.
101. Heiser A., McCarthy A., Wedlock N., Meier S., Kay J., Walker C., Mallory A., Murray C., Mitchell D., Morgan S., Watkins K., Looor J.J. and Roche J.R. *Grazing dairy cows had decreased interferon- γ , tumor necrosis factor, and interleukin-17, and increased expression of interleukin-10 during the first week after calving*. J. Dairy Sci. 98: 937–946, 2015.
102. Herath S., Lilly S.T., Santos N.R., Gilbert R.O., Goetze L., Bryant C.E., White J.O., Cronin J. and Sheldon I.M. *Expression of genes associated with immunity in the endometrium of cattle with disparate postpartum uterine disease and fertility*. Reproductive Biology and Endocrinology. 7 (55): 1-13, 2009.
103. Herdt T.H. *Ruminant adaptation to negative energy balance. Influences on the etiology of ketosis and fatty liver*. Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice. 16: 215–230, 2000.
104. Herrero J.F., Parrado A., Cervero F. *Central and peripheral actions of the NSAID ketoprofen on spinal cord nociceptive reflexes*. Neuropharmacology. 36: 1425-1431, 1997.
105. Hilary J.W. *Liver Function in Dairy Cows in: Late Pregnancy and Early Lactation*. The Bovine Practitioner. 25: 127-130, 1990.
106. Hinton L.E., McLoughlin M.A., Johnson S.E., Weisbrode S.E. *Spontaneous gastroduodenal perforation in 16 dogs and seven cats (1982-1999)*. Journal of the American Animal Hospital Association. 38: 176-187, 2002.
107. Hirvonen J., Pyörälä S., Jousimies-Somer H. *Acute phase response in heifers with experimentally induced mastitis*, J. Dairy Res. 63: 351–360, 1996.

108. Hisaeda K., Hagiwara K., Eguchi J., Yamanaka H., Kirisawa R., Iwai H. *Interferon- γ and tumor necrosis factor- α levels in sera and whey of cattle with naturally occurring coliform mastitis*. J Vet Med Sci. 63: 1009–1011, 2001.
109. Hoeben D., Monfardini E., Opsomer G., Burvenich C., Dosogne H., De Kruif A. and Beckers J. F. *Chemiluminescence of bovine polymorphonuclear leucocytes during the periparturient period and relation with metabolic markers and bovine pregnancy-associated glycoprotein*. J. Dairy Sci. 67: 249–259, 2000.
110. Holtenius P. *Plasma lipids in normal cows around partus and in cows with metabolic disorders with and without fatty liver*. Acta Veterinaria Scandinavica. 30: 441-445, 1989.
111. Hotamisligil G. S. *Inflammation and metabolic disorders*. Nature. 444: 860-867, 2006.
112. Hökfelt T., Broberger Ch., Xu Z-Q.D., Sergejev V. Ubink R., Diez M. *Neuropeptides - an overview*. Neuropharmacology. 39: 1337-1356, 2000.
113. Igarza L., Soraci A., Auza N., Zeballos H. *Chiral inversion of (R)-Ketoprofen. Influence of age and differing physiological status in dairy cattle*. Veterinary Research Communication. 26: 29-37, 2002.
114. Igarza L., Soraci A., Auza N., Zeballos H. *Some pharmacokinetic parameters of R(-)- and S-(+)-ketoprofen: the influence of age and differing physiological status in dairy cattle*. 28 Veterinary Research Communication. (1): 81-87, 2004.
115. Ingvarstsen K. L. *Feeding- and management-related diseases in the transition cow*. Anim. Feed Sci. Technol. 126: 175-213, 2006.
116. Ishikawa Y., Nakada K., Hagiwara K., Kirisawa R., Iwai H., Moriyoshi M., Sawamukai Y. *Changes in interleukin-6 concentration in peripheral blood of pre- and post-partum dairy cattle and its relationship to postpartum reproductive diseases*. J Vet Med Sci. 66: 1403-1408, 2004.
117. Itoh N., Koiwa M., Hatsugaya A., Yokota H., Taniyama H., Okada H. and Kudo K. *Comparative analysis of blood chemical values in primary ketosis and abomasal displacement in cows*. Journal of Veterinary Medicine Series A-Physiology Pathology Clinical Medicine. 45 (5): 293–298, 1998.
118. Jacob S.K., Ramnath V., Philomina P.T., Raghunandhanan K.V., Kanan A. *Assessment of physiological stres in perparturient cows and neonatal calves*. Indian J Physiol Pharmacol. 45: 233-238, 2001.

119. Janovick Guretzky N.A., Carlson D.B., Garrett J.E. and Drackley J.K. *Lipid metabolite profiles and milk production for Holstein and Jersey cows fed rumenprotected choline during the periparturient period.* Journal of Dairy Science. 89(1): 188–200, 2006.
120. Jeremejeva J., Orro T., Kask K. *Relationship between acute phase proteins and subsequent fertility of dairy cows after postpartum uterine inflammation and healthy cows.* Veterinarija ir zootechnika (Vet Med Zoot). T. 70 (92): 37-41, 2015.
121. Jerussi T.P., Caubet J.F., McCray J.E., Handley D.A. *Clinical endoscopic evaluation of the gastroduodenal tolerance to (R)-ketoprofen, (R)-flurbiprofen, racemic ketoprofen, and paracetamol: a randomized, single-blind, placebo-controlled trial.* Journal of clinical pharmacology. 38: 19S-24S, 1998.
122. Jorritsma R.H., Jorritsma Y.H., Schukken P.C., Wenting G. *Relationships between fatty liver and fertility and some peri-parturient diseases in commercial Dutch dairy herds.* Theriogenology. 54: 1065-1075, 2000.
123. Jukola E., Hakkarainen J., Saloniemi H., Sankari S., *Blood selenium, vitamin E, vitamin A and beta-carotene concentrations and udder health, fertility treatments and fertility.* J Dairy Sci. 79: 838-845, 1996.
124. Kasimanickam R. K. Kasimanickam V. R., Olsen J. R., Jeffress E. J., Moore D. A. and John Kastelic P. *Associations among serum pro- and anti-inflammatory cytokines, metabolic mediators, body condition, and uterine disease in postpartum dairy cows.* Reproductive Biology and Endocrinology. 11: 103, 2013.
125. Kam P.C.A., Ferch N.I. *Apoptosis: mechanisms and clinical implications.* Anaesthesia. 55: 1081-93, 2000.
126. Kamal M.A. *Evaluation of Hemogram, Haptoglobine and Clotting Factors Indices in Cattle Affected with Acute and Chronic Peritonitis.* Journal of Animal and Veterinary Advances. 10 (1): 11-17, 2011.
127. Katoh N., Nakagawa H. *Detection of haptoglobin in the high-density lipoprotein and the very high-density lipoprotein fractions from sera of calves with experimental pneumonia and cows with naturally occurring fatty liver.* J Vet Med Sci. 61: 119–124, 1999.
128. Kaneko J.J., Harvey W.J., Bruss M.L. *Clinical biochemistry of domestic animals*, Fifth edition, Academic Press, San Diego, California, 1997.

129. Kaneko J.J., Harvey, J.W. and Bruss M. L. (Eds.) *Clinical biochemistry of Domestic Animals*. London: Academic Press Limited. 356–358, 883–895, 2008.
130. Kaneene J.B., Miller R.A., Herdt T.H., Gardiner J.C. *The association of serum nonesterified fatty acids and cholesterol, management and feeding practices with peripartum disease in dairy cows*. *Prev Vet Med*. 31: 59-72, 1997.
131. Kay-Mugford P., Benn S.H., LaMarre J. *In vitro effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on cyclooxygenase activity in dogs*. *Am.J. Vet. Res.* 61 (7): 802-10, 2000.
132. Kettelhut I. C., Fiers W. and Goldberg A. L. *The toxic effects of tumor necrosis factor in vivo and their prevention by cyclooxygenase inhibitors*. *PNAS* 84: 4273-4277, 1987.
133. Katzung B.G. *Basic and Clinical Pharmacology Sixth Edition*. Appleton and Lange, Norwalk, Connecticut, USA. 460-477, 1995.
134. Khan K.N., Venturini C.M., Bunch R.T., Brassard J.A., Koki A.T., Morris D.L., Trump B.F., Maziasz T.J., Alden C.L. *Interspecies differences in renal localization of cyclooxygenase isoforms: implications in nonsteroidal antiinflammatory drug-related nephrotoxicity*. *Toxicologic pathology*. 26: 612-620, 1998.
135. Khovidhunkit W., Kim M.S., Memon R.A., Shigenaga J.K., Moser A.H., Feingold K.R., Grunfeld C. *Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host*. *Journal of Lipid Research*. 45: 1169–1196, 2004.
136. Kim K. M., Song J. J., An J. Y., Kwon Y. T. and Lee Y. J. *Pretreatment of acetylsalicylic acid promotes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by down-regulating BCL-2 gene expression*. *J. Biol. Chem.* 280: 41047-41056, 2005.
137. 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.
138. Klevenhusen F., Humer E., Metzler-Zebeli B., Podstatzky-Lichtenstein L., Wittek T. and Zebeli Q. *Metabolic Profile and Inflammatory Responses in Dairy Cows with Left Displaced Abomasum Kept under Small-Scaled Farm Conditions*. *Animals (Basel)*. 5 (4): 1021–1033, 2015.
139. 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.
140. Koj A. *Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines*. *Biochim. Biophys. Acta*. 1317: 84-94, 1996.

141. Komatsu Y., Itoh N., Taniyama H., Kitazawa T., Yokota H., Koiwa M., Ohtsuka H., Terasaki N., Maeno K., Mizoguchi M., Takeuchi Y., Tanigawa M., Nakamura T., Watanabe H., Matsuguchi Y., Kukino T. and Honma A. *Classification of abomasal displacement in cows according to histopathology of the liver and clinical chemistry*. Journal of Veterinary Medicine, Series A. 49 (9): 482–486, 2002.
142. Kourounakis A.P., Victoratos P., Peroulis N., Stefanou N., Yiangou M., Hadjipetrou L., Kourounakis P.N. *Experimental Hyperlipidemia and the Effect of NSAIDs*. Exp Mol Pathol. 73 (2): 135-138, 2002.
143. Kovac G., Tothova C., Nagy O., Seidel H., Konvicna J. *Acute phase proteins and their relation to energy metabolites in dairy cows during the pre- and postpartal period*. Acta Veterinaria Brno. 78: 441-447, 2009.
144. Krueger X. and Heuwieser W. *Effect of flunixin meglumine and carprofen on pregnancy rates in dairy cattle*. J. Dairy Sci. 93: 5140–5146, 2010.
145. Kupczyński R., Chudoba-Drozdowska B. *Values of selected biochemical parameters of cows blood during their drying-off and the beginning of lactation*. Electr. J. Po.l Agr. Univ.Vet. Med. 5 (1), 2002.
146. Kushibiki, S., Hodate, K., Ueda, Y., Shingu, H., Mori, Y., Itoh, T., Yokomizo, Y. *Administration of recombinant bovine tumor necrosis factor-alpha affects intermediary metabolism and insulin and growth hormone secretion in dairy heifers*. J. Anim. Sci. 78 (8): 2164-2171, 2000.
147. Kushibiki S., Hodate K., Shingu H., Ueda Y., Mori Y., Itoh T. and Yokomizo Y. *Effects of long-term administration of recombinant bovine tumor necrosis factor-alpha on glucose metabolism and growth hormone secretion in steers*. Am. J. Vet. Res. 62: 794-798, 2001.
148. Kushibiki S., Hodate K., Shingu H., Hayashi T., Touno E., Shinoda M., Yokomizo Y. *Alterations in lipid metabolism induced by recombinant bovine tumor necrosis factor-alpha administration to dairy heifers*. J Anim Sci. 80: 2151–2157, 2002.
149. Kutuk O. and Basaga H. *Aspirin inhibits TNF alpha- and IL-1-induced NF-kappa B activation and sensitizes HeLa cells to apoptosis*. Cytokine. 25: 229-237, 2004.
150. Lacetera N., Scalia D., Franci O., Bernabucci U., Ronchi B. and Nardone A. *Effects of Nonesterified Fatty Acids on Lymphocyte Function of Dairy Heifers*. Journal of Dairy Science. 87: 1012-1014, 2004.

151. Lacetera N., Scalia D., Bernabucci U., Ronchi B., Pirazzi D. and Nardone A. *Lymphocyte Functions in Overconditioned Cows Around Parturition*. J. Dairy Sci. 88: 2010–2016, 2005.
152. Landoni M.F., Cunningham, F.M., Lees P. *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ketoprofen in calves applying PK/PD modeling*. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 18 (5): 315-324, 1995.
153. Landoni M.F., Lees P. *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ketoprofen enantiomers in calves*. Chirality. 7: 586-597, 1995.
154. Landoni M.F., Cunningham F.M., Lees P. *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of tolfenamic acid in calves*. Research in Veterinary Science. 61: 26-31, 1996.
155. Landoni M.F., Soraci A.L., Delatour P. and Lees P. *Enantioselective behaviour of drugs used in domestic animals: a review*. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 20: 1-16, 1997.
156. Laven R., Chambers P., Stafford K. *Using non-steroidal anti-inflammatory drugs around calving: Maximizing comfort, productivity and fertility*. The Veterinary Journal. 192: 8-12, 2012.
157. Lascelles B.D., McFarland J.M., Swann H. *Guidelines for safe and effective use of NSAIDs in dogs*. Veterinary Therapeutics. 6: 237-251, 2005.
158. LeBlanc S. J., Herdt T. H., Seymour W. M., Duffield T. F. and Leslie K. E. *Peripartum serum vitamin E, retinol, and beta-carotene in dairy cattle and their associations with disease*. J. Dairy Sci. 87 (3): 609-619, 2004.
159. Lee J. Y., Plakidas A., Lee W. H., Heikkinen A., Chanmugam P., Bray G. and Hwang D. H. *Differential modulation of toll-like receptors by fatty acids: preferential inhibition by n-3 polyunsaturated fatty acids*. J. Lipid Res. 44: 479-486, 2003.
160. Lees P., Landoni M.F., Giraudel J., Toutain P.L. *Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest*. Journal of veterinary pharmacology and therapeutics. 27: 479-490, 2004.
161. Lees P. *Analgesics, antiinflammatory, antipyretic drugs*. In: Riviere JE, Papich MG (eds) Veterinary pharmacology and therapeutics. 9th edn. Wiley, USA. 457–492, 2009.
162. Leroy J.L., Vanholder T., Van Kneysel A.T., Garcia-Ispierto I. and Bols P.E. *Nutrient prioritization in dairy cows early postpartum: mismatch between metabolism and fertility?* Reproduction in Domestic Animals. 43: 96–103, 2008.

163. Linegaard B., Ditlevesen S., Plomgaard P., Mittendorfer B. and Pedersen B.K. *Acute reduction of lipolysis reduces adiponectin and IL-18: evidence from an intervention study with acipimox and insulin*. Diabetologia. 56 (9): 2034–2043, 2013.
164. Little D., Jones S.L. and Blikslager A.T. *Cyclooxygenase (COX) inhibitors and the intestine*. J. Vet. Intern. Med. 21: 367-377, 2007.
165. Lubojacka V., Pechova A., Dvorak R., Drastich P., Kummer V. Poul J. *Liver steatosis following supplementation with fat in dairy cows diets*. Acta Veterinaria Brno. 74: 217-224, 2005.
166. Marcos E., Mazur A., Cardot P. and Rayssiguier Y. *Serum apolipoprotein-B and apolipoprotein-A-I and naturally occurring fatty liver in dairy cows*. Lipids. 25: 575-577, 1990.
167. Mainau E., Cuevas A., Ruiz-de-la-Torre J. L., Abbeloos E., Manteca X. *Effect of meloxicam administration after calving on milk production, acute phase proteins, and behavior in dairy cows*. J. Vet. Behav. 9: 357–363, 2014.
168. Mauleón D., Artigas R., García M.L., Carganico G. *Preclinical and clinical development of dexketoprofen*. Drugs. 52 Suppl, 5: 24-45, 1996.
169. McNicol A. and Israels S.J. *Beyond Hemostasis: The Role of Platelets in Inflammation, Malignancy and Infection*. Cardiovascular and Haematological Disorders-Drug Target. 8: 99-117, 2008.
170. McSherry B.J. Horney F.D. and deGroot J.J. *Plasma fibrinogen levels in normal and sick cows*. Canadian Journal of comparative Medicine. 34 (3): 191-197, 1970.
171. Medzhitov R. *Origin and physiological roles of inflammation*. Nature. 454: 428–435, 2008.
172. Menzel S., Sauernheimer C., Brune K., Geisslinger G. *Is the inversion from R- to S-ketoprofen concentration dependent? Investigations in rats in vivo and in vitro*. Biochemical pharmacology. 47: 1267-1270, 1994.
173. Miller G.Y., Bartlett P.C., Erskine R.J. and Smith K.L. *Factors affecting serum selenium and vitamin E concentration in dairy cows*. JAVMA. 206: 1369-1373, 1995.
174. Miller S. B. *Prostaglandins in health and disease: an overview*. Seminars in Arthritis and Rheumatism. 36 (1): 37-49, 2006.

175. Mirzadeh K.H., Tabatabei S., Bojarpour M. and Mamoei M. *Comparative study of hematological parameters according strain, age, sex, physiological status and season in Iranian cattle*. Journal Animal Veterinary Advances. 9 (16): 2123-7, 2010.
176. Miyake M., Fuchimoto S., Orita K. *Differences in intracellular calcium mobilization by interferon-beta and interferon-gamma in RPMI-4788 cells*. Exp Cell Biol. 57(2): 67-72, 1989.
177. Mudron P., Rehage J., Sallmann H. P., Mertens M., Scholz H. and Kovac G. *Plasma and liver alpha-tocopherol in dairy cows with left abomasal displacement and fatty liver*. Zentralbl. Veterinarmed. 44 (2): 91-97, 1997.
178. Mulligan F. J. and Doherty M. L. *Production diseases of the transition cow*. Vet. J. 176: 3-9, 2008.
179. Morceau F., Dicato M. and Diederich M. *Pro-Inflammatory Cytokine-Mediated Anemia: Regarding Molecular Mechanisms of Erythropoiesis*. Mediators of Inflammation. 2009.
180. Mori T. A., Beilin L. J. *Omega-3 fatty acids and inflammation*. Curr. Atheroscler. Rep. 6: 461–467, 2004.
181. Morin C.L., Gayles E.C., Podolin D.A., Wei Y., Xu M., Pagliassotti M.J. *Adipose tissue derived tumor necrosis factor activity correlates with fat cell size but not insulin action in aging rats*. Endocrinology. 139: 4998-5005, 1998.
182. Mortaz E., Redegeld F. A., Nijkamp F. P. and Engels F. *Dual effects of acetylsalicylic acid on mast cell degranulation, expression of cyclooxygenase-2 and release of proinflammatory cytokines*. Biochem. Pharmacol. 69: 1049-1057, 2005.
183. Moshage H.J., Janssen J.A., Franssen J.H., Hafkenschied J.C. and Yap S.H. *Study of the molecular mechanism of decreased liver synthesis of albumin in inflammation*. J Clin Invest. 79 (6): 1635–1641, 1987. (06.03.2016.)
184. Nacionalni registar veterinarskih lekova, 2015. Dostupan na: <http://www.alims.gov.rs/ciril/files/2015/05/NRLvet2015-korekcija.pdf> (06.03.2016.)
185. Nakayama T., Sonada S., Urano T., Yamada T., Okada M. *Monitoring both serum amyloid protein A and C-reactive protein as inflammatory markers in infectious diseases*, Clin. Chem. 39 293–297, 1993.

186. Nathalie C.N., Tucker C.B., Pearl D.L., LeBlanc S.J., Leslie K.E., von Keyserlingk M.A.G. and Duffield T.F. *An investigation of the effects of ketoprofen following rumen fistulation surgery in lactating dairy cows*. Can Vet J, 55 (5): 442–448, 2014.
187. Nafikov R.A., Beitz D.C. Carbohydrate and lipid metabolism in dairy cows, J Nutr. 137: 702-705, 2007.
188. Nazifi S., Rezakhani A., Koohimoghadam M., Ansari-Lari M. and Esmailnezhad Z. *Evaluation of serum haptoglobin in clinically healthy cattle and cattle with inflammatory diseases in Shiraz, a tropical area in southern Iran*. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine 11 (2): 95–101, 2008.
189. Newby N.C., Pearl D.L., LeBlanc S.J., Leslie K.E., Keyserlingk M.A.G., Duffield T.F. *The effect of administering ketoprofen on the physiology and behavior of dairy cows following surgery to correct a left displaced abomasum*. Journal of Dairy Science. 96 (3): 1511-1520, 2013.
190. Newby N.C., Renaud D., Tremblay R. and Duffield T.F. *Evaluation of the effects of treating dairy cows with meloxicam at calving on retained fetal membranes risk*. Can. Vet. J. 55: 1196–1199, 2014.
191. Nowroozi A.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.
192. Oetzel G.R. *Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease*. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. 20: 651–674, 2004.
193. Oh D. Y., Talukdar S., Bae E. J., Imamura T., Morinaga H., Fan W., Li P., Lu W. J., Watkins S. M. and Olefsky J. M. *GPR120 Is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects*. Cell. 142 (5): 687-698, 2010.
194. Ohtsuka H., Koiwa M., Hatsugaya A., Kudo K., Hoshi F., Itoh N., Yokota H., Okada H. and Kawamura S.. *Relationship between serum TNF activity and insulin resistance in dairy cows affected with naturally occurring fatty liver*. J. Vet. Med. Sci. 63: 1021-1025, 2001.
195. Ossipov M.H., Jerussi T.P., Ren K., Sun H., Porreca F., *Differential effects of spinal (R)-ketoprofen and (S)-ketoprofen against signs of neuropathic pain and tonic nociception:*

- evidence for a novel mechanism of action of (R)-ketoprofen against tactile allodynia. *Pain*. 87: 193-199, 2000.
196. Ospina P.A., Nydam D.V., Stokol T. i Overton T.R. *Evaluation of nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases*. *Journal of Dairy Science*, 93 (2): 546–554, 2010.
197. Otto F., Baggasse P., Bogin E., Harun M. and Vilela F. *Biochemical blood profile of Angoni cattle in Mozambique*. *Israel J. Vet. Med.* 55: 1-9, 2000.
198. 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.
199. Paape M. J., Miller R. H. and Ziv G. *Pharmacologic enhancement or suppression of phagocytosis by bovine neutrophils*. *Am. J. Vet. Res.* 52: 363-366, 1991.
200. Pappo I., Bercovier H., Berry E., Gallilly R., Feigin E. and Freund H. R. *Antitumor necrosis factor antibodies reduce hepatic steatosis during total parenteral nutrition and bowel rest in the rat*. *J. Parenter. Enteral Nutr.* 19: 80–82, 1995.
201. Parent J., Villeneuve C. and Fortier M. A. *Evaluation of the contribution of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 to the production of PGE2 and PGF2 alpha in epithelial cells from bovine endometrium*. *Reprod.* 126: 539-547, 2003.
202. Paresh B., Ratndeesingh, Vria R.D., Patel J. H., Patel U. D., Bhavsar S. K. and Thaker A. M. *Impact of Multiple Intravenous Administrations of Ketoprofen on Blood Profile in Cow Calves*. *International Journal of Veterinary Science*. 1(1): 33-35, 2012.
203. Pinardi G., Sierralta F., Miranda H.F. *Interaction between the antinociceptive effect of ketoprofen and adrenergic modulatory systems*. *Inflammation* 25: 233-239, 2001.
204. Pechova A., Podhorský A., Lokajová E., Pavlata L., Illek J. *Metabolic effects of chromium supplementation in dairy cows in the peripartal period*. *Acta Vet Brno* 71: 9-18, 2002.
205. Petersen H. H., Nielsen J. P., and Heegaard P. M. *Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry*. *Vet. Res.* 35: 163-187, 2004.
206. Peterson R.G., Waldern D.E. *Repeatabilities of serum Constituents in Holstein-Frisians Affected by Feeding, Age, Lactation, and Pregnancy*. *J Dairy Sci.* 64 (5): 822-831, 1981.

207. Priest N. V., McDougall S., Burke C. R., Roche J. R., Mitchell M., McLeod K. L., Greenwood S. L., Meier S. *The responsiveness of subclinical endometritis to a nonsteroidal anti-inflammatory drug in pasture-grazed dairy cows*. J. Dairy Sci. 96: 4323–4332, 2013.
208. Pyorala S., Laurila T., Lehtonen S., Leppä S., Kaartinen L. *Local tissue damage in cows after intramuscular administration of preparations containing phenylbutazone, flunixin, ketoprofen and metamizole*. Acta Veterinaria Scandinavica. 40: 145-150, 1999.
209. Quiroz-Rocha G.F., LeBlanc S., Duffield T., Wood D., Leslie K.E. and Jacobs R.M. *Reference limits for biochemical and hematological analytes of dairy cows one week before and one week after parturition*. Can Vet J. 50 (4): 383–388, 2009.
210. Radojčić B., Matarugić D., Savić Đ., Kasagić D., Despotović D. *Preveniranje proizvodnih bolesti visokomlečnih krava*. Agroznanje. 10 (4): 159-169, 2009.
211. Radostits, O. M., D. C. Blood, C. C. Gay, K. W. Hinchcliff. *Veterinary Medicine. A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses*. Ninth Edition W.B. Saunders Company Ltd London, New York, Philadelphia, San Francisco, St. Louis, Sydney, 2000.
212. Rehman Z.U., Ashraf M., Khan M. A., Jabbar M. A., Abbas M. and Khan A. M. *Pharmacokinetics of ketoprofen in healthy buffalo calves in Pakistan*. The Journal of Animal and Plant Sciences. 23 (2): 416-419, 2013.
213. Ren Y., Duan Z.H., Meng Q.H., Li Z., Li J. *Relationship between the level of serum TNF- α of patients with chronic hepatitis C and treatment with interferon- α and the influencing factors*. Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi. 23 (2): 129-131, 2009.
214. Ricciotti E. i FitzGerald G.A. *Prostaglandins and Inflammation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 31 (5): 986–1000, 2011.
215. Richards C., Gauldie J., Baumann H. *Cytokine control of acute phase protein expression*. Eur Cytokine Netw, 2: 89–98, 1991.
216. Richards B.D., Black D.H., Christley R.M., Royal M.D., Smith R.F., Dobson H. *Effects of the administration of ketoprofen at parturition on the milk yield and fertility of Holstein-Friesian cattle*. Veterinary Record. 165: 102 -106, 2009.

217. Rukkwamsuk T., Kruij T.A. and Wensing T. *Relationship between overfeeding and overconditioning in the dry period and the problems of high producing dairy cows during the postparturient period.* The Veterinary Quarterly, 21 (3): 71–77, 1999.
218. Sacchini F., Luciani M., Salini R., Scacchia M., Pini A., Lelli R., Naessens J., Poole J. and Jores J. *Plasma levels of TNF- α , IFN- γ , IL-4 and IL-10 during a course of experimental contagious bovine pleuropneumonia.* BMC Veterinary Research. 8:44, 2012.
219. 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.
220. Seifi H.A., Gorji-Dooz M., Mohri M., Dalir-Naghaden B., Farzaneh N. *Variations of energy-related biochemical metabolites during transition period in dairy cows.* Comp Clin Pathol. 16: 253–258, 2007.
221. Sepúlveda-Varas P., Weary D. M., Noro M., and von Keyserlingk M.A.G. *Transition Diseases in Grazing Dairy Cows Are Related to Serum Cholesterol and Other Analytes.* PLoS One. 10 (3): e0122317, 2015.
222. Sevinc M., Basoglu A., Birdane F., Gokcen M., Kucukfindik M. *The changes of metabolic profile in dairy cows during dry and after.* Tr J Vet Anim Sci. 23: 475-478, 1999.
223. Sevinc M., Basoglu A., Guzelbektes H., Boydak M. *Lipid and lipoprotein levels in dairy cows with fatty liver.* Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences. 27: 295-299, 2003.
224. Serhan C.N., Chiang N. and Van Dyke T.E. *Resolving inflammation: dual antiinflammatory and pro-resolution lipid mediators.* Nat. Rev. Immunol. 8: 349-361, 2008.
225. Scott M. G., Dullaghan E., Mookherjee N., Glavas N., Waldbrook M., Thompson A., Wang A., Lee K., Doria S., Hamill P., Yu J.J., Li Y., Donini O., Guarna M.M., Finlay B.B., North J.R., and Hancock R.E.W. *An anti-infective peptide that selectively modulates the innate immune response.* Nat Biotech. 25 (4): 465-472, 2007.
226. Simopoulos A. P. *The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases.* Exp. Biol. Med. 233: 674–688, 2008.
227. Singh R.D., Devi S., Gondaliya S.R., Bhavsar S.K. and Thaker A.M. *Safety of Ketoprofen in Cow calves following repeated intravenous administration.* Veterinary World. 2 (3): 105-107, 2009.

228. Singh R., Bhavsar S.K., Patel J.H., Varia R.D., Patel U.D. and Thaker A.M. *Pharmacokinetics and bioavailability of ketoprofen after single dose intravenous and intramuscular administration in cattle*. Wayamba Journal of Animal Science. 820-823, 2014.
229. Shulman G. I. *Cellular mechanisms of insulin resistance*. J. Clin. Invest. 106:171-176, 2000.
230. Skinner J. G., Brown R. A. L. and Roberts L. *Bovine haptoglobin response in clinically defined field conditions*. The Veterinary Record. 128: 147-149, 1991.
231. Sordillo L.M., O'Boyle N., Gandy J.C., Corl C.M. and Hamilton E. *Shifts in thioredoxin reductase activity and oxidant status in mononuclear cells obtained from transition dairy cattle*. Journal of Dairy Science. 90: 1186–1192, 2007.
232. Sordillo L.M., Contreras G.A. and Aitken S.L.. *Metabolic factors affecting the inflammatory response of periparturient dairy cows*. Anim. Health Res. Rev. 10: 53-63, 2009.
233. Sordillo L.M. and Aitken S.L. *Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle*. Veterinary Immunology and Immunopathology. 128: 104–109, 2009.
234. Schroder K., Hertzog P.J., Ravasi T., Hume D.A. *Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions*. Journal of Leukocyte Biology. 75: 163-189, 2004.
235. Shwartz G., Hill K.L., VanBaale M.J. and Baumgard L.H. *Effects of flunixin meglumine on pyrexia and bioenergetic variables in postparturient dairy cows*. J. Dairy Sci. 92: 1963-1970, 2009.
236. Smalley S.G.R., Barrow P.A., and Foster N. *Immunomodulation of innate immune responses by vasoactive intestinal peptide (VIP): its therapeutic potential in inflammatory disease*. Clin. Exp. Immunol. 157 (2): 225–234, 2009.
237. Smith W.L. and Dewitt D.L. *Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2*. Adv. Immunol. 62: 167-215, 1996.
238. Smith G.W., Davis J.L., Tell L.A., Webb A.I., and Riviere J.E. *Extralabel use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in cattle*. Farad Digest. JAVMA, 232 (5): 697-701, 2008.
239. Solinas G., Vilcu C., Neels J.G., Bandyopadhyay G.K., Luo J.L., Naugler W., Grivennikov S., Wynshaw-Boris A., Scadeng M., Olefsky J.M. and Karin M. *JNK1 in hematopoietically*

- derived cells contributes to diet-induced inflammation and insulin resistance without affecting obesity.* Cell Metab. 6: 386-397, 2007.
240. Spears J.W. and Weiss W.P.: *Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows.* Vet. J. 176: 70-76, 2008.
241. Shpigel N.Y., Chew R., Winkler M., Saran A., Ziv G. and Lono F. *Anti-inflammatory ketoprofen in the treatment of field cases of bovine mastitis.* Research in Veterinary Science. 56: 62-68, 1994.
242. Stanton M.E., Bright R.M. *Gastroduodenal ulceration in dogs. Retrospective study of 43 cases and literature review.* Journal of veterinary internal medicine 3: 238-244, 1989.
243. Stengärde L., Tråvén M., Emanuelson U., Holtenius K., Hultgren J., Niskanen R. *Metabolic profiles in five high-producing Swedish dairy herds with a history of abomasal displacement and ketosis.* Acta Vet Scand. 50: 31–41, 2008.
244. Stojanović D., Velhner M., Stojanov I., Petrović J., Ašanin J., Kovačević Z. *Biochemical parameters in rats with an applied model of sepsis (cecal ligation and puncture) with pure and mixed bacterial culture.* Acta Veterinaria. 62 (5-6): 543-551, 2012.
245. Stojanović D., Kovačević Z., Žekić M, Ašanin J., Ratajac R., Petrović J., Petrović T., Stojanov I., Velhner M. *Examination of enzymes concentration in the rats blood with sepsid caused by mixed and pure bacterial cultures,* Acta Veterinaria. 63 (5-6): 609-620, 2013.
246. Stojević Z., Piršljin J., Milinković-Tur S., Zdelar-Tuk M., Beer Ljubić B. *Activities of AST, ALT and GGT in clinically healthy dairy cows during lactation and in the dry period.* veterinarski arhiv. 75 (1): 67-73, 2005.
247. 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, 1998.
248. Straus D.S., Pascual G.M. Li, Welch J.S., Ricote M., Hsiang C.H., Sengchanthalangsy L. L., Ghosh G. and Glass C.K. *15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97: 4844-4849, 2000.
249. Streppa H.K., Jones C.J., Budsberg S.C., *Cyclooxygenase selectivity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in canine blood.* American Journal of Veterinary Research. 63: 91-94, 2002.

250. Suesa N., Fernandez M.F., Gutierrez M., Rufat M.J., Rotllan E., Calvo L., Mauleon D., Carganico G. Stereoselective cyclooxygenase inhibition in cellular models by the enantiomers of ketoprofen. *Chirality*. 5: 589-595, 1993.
251. Szuster-Ciesielska A., Filar J., and Kandefler-Szerszen M.. *Depression of interferon production in leukocytes of cows with fat mobilization syndrome*. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 43: 61–65, 1995.
252. Šamanc H., Damnjanović Z., Nikolić J.A., Radojičić B., Anđelković M., Lekić N. *Endokrina regulacija metaboličkih procesa kod krava u garviditetu i laktaciji*. *Veterinarski glasnik*. 47: 319-327, 1993.
253. Šamanc H., Kirovski D., Stojić V., Stojanović D., Vujanac I., Prodanović R., Bojković-Kovačević S. *Application of metabolic profile test in the prediction and diagnosis of fatt liver in Holstein cows*, *Acta Veterinaria Beograd*. 61 (6): 543-553, 2011.
254. Tainturier D.J., Braun P., Rico A.G., Thouvenot J. P. *Variation in blood composition in dairy cows during pregnancy and after calving*. *Res Vet Sci*. 37: 129-131, 1984.
255. Tegeder I., Pfeilschifter J., Geisslinger G. *Cyclooxygenaseindependent actions of cyclooxygenase inhibitors*. *FASEB J*. 15: 2057–2072, 2001.
256. Tóthová C.S., 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.
257. Tóthová C., Nagy O. and Kováč G. *Changes in the concentrations of selected acute phase proteins and variables of energetic profile in dairy cows after parturition*. *J Appl Anim Res*. 42 (3): 278-283, 2014a.
258. Tóthová C., Nagy O. and Kováč G. *Relationship between some variables of protein profile and indicators of lipomobilization in dairy cows after calving*. *Archiv Tierzucht* 57. 19: 1-9, 2014b.
259. Trevisi E., Ferrari A., Archetti I. and Bertoni G. *Anti-inflammatory treatments in calving dairy cows: effects on haematological and metabolic profiles*. *Italian Journal of Animal Science*. 4 (2): 203-205, 2005.
260. Trevisi E. and Bertoni G.: *Attenuation with acetylsalicylate treatments of inflammatory conditions in periparturient dairy cows. Aspirin and Health Research Progress*. P. I. Quinn, ed. Nova Science Publishers. 22-37, 2008.

261. Trevisi E., Amadori M., Bakudila A. M. and Bertoni G.. *Metabolic changes in dairy cows induced by oral, low-dose interferon-alpha treatment*. J. Anim Sci. 87 (9): 3020-3029, 2009.
262. Trevisi E., Jahan N., Bertoni G., Annarita Ferrari and Minut A. *Pro-Inflammatory Cytokine Profile in Dairy Cows: Consequences for New Lactation*. Italian Journal of Animal Science. 14 (3): 285-292, 2015.
263. Uchida E., Katoh N. and Takahashi K. *Appearance of haptoglobin in serum from cows at parturition*. J. Vet. Med. Sci. 55: 893-894, 1993.
264. Underhill D.M., Ozinsky A. *Phagocytosis of microbes: complexity in action*. Annu. Rev. Immunol. 20: 825–852, 2002.
265. Vázquez-Meza H., de Zentella P.M., Pardo J.P., Riveros-Rosas H., Villalobos-Molina R., Piña E. *Non-steroidal anti-inflammatory drugs activate NADPH oxidase in adipocytes and raise the H₂O₂ pool to prevent cAMP-stimulated protein kinase a activation and inhibit lipolysis*. BMC Biochem. 14: 13, 2013.
266. Van Knegsel A.T.M., Van Den Brand H., Graat E.A.M., Dijkstra J., Jorritsma R., Decuypere E., Tamminga S. and Kemp B. *Dietary energy source in dairy cows in early lactation: Metabolites and metabolic hormones*. Journal of Dairy Science. 90 (3): 1477–1485, 2007.
267. Van Saun R.J. *Assessing Nutritional and Health Status of Transition Cows*. In: Proceedings Mid-Atlantic States Conference for Bovine Practitioners, Frederick, Maryland, March 25-26, 8, 2004a.
268. Van Saun R.J. *Metabolic Profiling and Health Risk in Transition Cows*. In: Proceedings 37th Annual American Association of Bovine Practitioners Convention. Ft. Worth, Texas, September 23-25, 212-213, 2004b.
269. Vane J.R. i Botting R.M. *The mechanism of action of aspirin*. Thrombosis Research. 110: 255–258, 2003.
270. Vangroenweghe F., Duchateau L., Boutet P., Lekeux P., Rainard P., Paape M. J. and Burvenich C. *Effect of carprofen treatment following experimentally induced Escherichia coli mastitis in primiparous cows*. J. Dairy Sci. 88: 2361-2376, 2005.
271. Vasilev S., Majstorovic I., Gasic S., Vučević D., Vasilijic S., Cupic V. et al. *The effects of aspirin on apoptosis of neutrophil granulocytes*. Acta Veterinaria. 56 (5-6): 413-21, 2006.

272. Vazguezanon M., Bertices S., Luck M., Grummer R. *Peripartum liver triglyceride and plasma metabolites in dairy cows*. J. Dairy Sci. 77: 1521-1528, 1994.
273. Wallace J.L. *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and gastroenteropathy: the second hundred years*. Gastroenterology. 112: 1000-1016, 1997.
274. Wang J.Y., Wang X.L., Liu P. *Detection of serum TNF-alpha, IFN-beta, IL-6 and IL-8 in patients with hepatitis B*. World J Gastroenterol. 5 (1): 38-40, 1999.
275. Wassell J. *Haptoglobin: function and polymorphism*. Clin. Lab. 46: 547-552, 2000.
276. Weiss W. P., Hogan J. S., Smith K. L., and Hoblet K. H. *Relationships among selenium, vitamin E and mammary gland health in commercial dairy herds*. J. Dairy Sci. 73 (2): 381-390, 1990.
277. West H.J. *Effect on liver function of acetonaemia and the fat cow syndrome in cattle*. Res.Vet. Sci. 48: 221–227, 1990.
278. Zadnik T. *A comparative study of the hematobiochemical parameters between clinically healthy cows and cows with displacement of the abomasum*. Acta Vet. Beograd. 53: 297-309, 2003.
279. Zentella P.M., Vázquez-Meza H., Piña-Zentella G., Pimentel L., Piña E. *Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit epinephrine- and cAMP-mediated lipolysis in isolated rat adipocytes*. J Pharm Pharmacol. 54 (4): 577-82, 2002.
280. Zhu L.H., Armentano L.E., Bremmer D.R., Grummer R.R., Bertices 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.

9. BIOGRAFIJA (*CURRICULUM VITAE*) AUTORA

Zorana R. Kovačević, rođena 19.02.1981. godine u Novom Sadu. Osnovnu školu “Đura Jakšić” završila u Kaću, a Srednju medicinsku školu ”7. April” završila 2000. godine u Novom Sadu. Iste godine upisala odsek Farmacija na Medicinskom fakultetu, Univerziteta u Novom Sadu. Posle završenih osnovnih studija radila u privrednom sektoru od 2007. do 2012. godine u nekoliko različitih farmaceutskih kompanija. Školske 2009/10 godine upisala doktorske studije na Departmanu za veterinarsku medicinu, Poljoprivrednog fakuteta Univerziteta u Novom Sadu i položila sve ispite predviđene nastavnim palnom i programom sa prosečnom ocenom 9,88. Od 2012. godine zaposlena na Departmanu za veterinarsku medicinu, Poljoprivrednog fakuteta Univerziteta u Novom Sadu kao asistent u okviru uže naučne oblasti Farmakologija sa toksikologijom. Autor ili koautor više desetina naučnih radova i saopštenja domaćeg i međunarodnog karaktera.