

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKJE MEDICINE

Katedra za bolesti papkara



Radiša Prodanović

**INSULINSKA REZISTENCIJA KOD KRAVA
HOLŠTAJN RASE TOKOM PERIODA
ZASUŠENJA I RANE LAKTACIJE**

doktorska disertacija

Beograd, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
Department of ruminants and swine diseases



Radiša Prodanović

INSULIN RESISTANCE IN HOLSTEIN
DAIRY COWS DURING THE DRY PERIOD
AND EARLY LACTATION

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014.

Mentor:

Dr Horea Šamanc, redovni profesor, Bolesti papkara,
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

Dr Milijan Jovanović, redovni profesor,
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Dr Danijela Kirovski, vanredni profesor,
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Dr Goran Korićanac, viši naučni saradnik,
Institut za nuklearne nauke „Vinča“, Univerzitet u Beogradu

Dr Ana Dorđević, naučni saradnik,
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____ 2014.

Beograd

INSULINSKA REZISTENCIJA KOD KRAVA HOLŠTAJN RASE TOKOM PERIODA ZASUŠENJA I RANE LAKTACIJE

REZIME

Cilj istraživanja u okviru ove disertacije je bio da se ispita da li u periodu oko teljenja postoje razlike u stepenu insulinske rezistencije kod visokomlečnih krava različite telesne kondicije. U tu svrhu je, 30. dana pre očekivanog teljenja, odabrano 16 krava holštajn rase različite telesne kondicije. Prvu grupu (kontrolna, $n = 8$) činile su krave optimalne telesne kondicije (OTK = 3,00 do 3,25), a drugu (ogledna, $n = 8$) ugojene životinje (OTK = 4,25 do 4,50). Sve životinje uključene u ogled podvrgnute su intravenskom testu opterećenja glukozom (GTT) četiri puta: 28. i 10. dana pre očekivanog termina teljenja, kao i 14. i 28. dana posle teljenja. Uzorci krvi su uzimani neposredno (0. minut) pre aplikacije rastvora glukoze, kao i 15., 30., 60., 90., 120. i 180. minuta nakon davanja glukoze. U uzorcima uzetim 0. minuta određivane su koncentracije ukupnih proteina, albumina, BHBA, ukupnog bilirubina, uree, Ca i P, dok je u svim uzetim uzorcima krvi određivana koncentracija glukoze, insulina i NEFA. Deset dana pre, kao i 14. dana posle teljenja uzeti su uzorci tkiva jetre, masnog i mišićnog tkiva od svih ispitanih životinja. U uzorcima tkiva jetre određivan je stepen zamašćenja jetre, a u uzorcima masnog tkiva dijametar adipocita. Zastupljenost proteina receptora za insulin i transportnog molekula za glukozu (GLUT 4) ispitana je u mišićnom i masnom tkivu. Za procenu stepena insulinske rezistencije tokom izvođenja GTT korišćeni su matematički izvedeni parametri metabolizma glukoze (k , $T_{1/2}$, Pik_{gluk} i AUC_{gluk}), insulina (ΔMax_{ins} , Pik_{ins} i AUC_{ins}), NEFA (AUC_{NEFA}), kao i RQUICKY indeks. Rezultati su pokazali da antepartalno nije bilo značajne razlike u vrednostima ispitivanih biohemijskih parametara između dve grupe krava, dok je postpartalno utvrđena značajno viša koncentracija ukupnog bilirubina ($p < 0,05$) 14. dana, a značajno niža koncentracija albumina ($p < 0,05$) 28. dana laktacije kod oglednih u odnosu na kontrolne krave. Rezultati dobijeni tokom izvođenja prvog GTT su pokazali da je glikemija bila značajno veća ($p < 0,05$) kod oglednih nego kontrolnih krava jedino 180. minuta, dok se koncentracije insulina

i NEFA nisu značajno razlikovale između dve grupe krava. Trend promena koncentracija glukoze i insulina tokom GTT bio je sličan kod obe grupa krava. Nije bilo razlike u vrednostima AUC_{NEFA} i RQUICKY između dve grupe krava. Rezultati GTT izvedenog deset dana pre teljenja su pokazali da su kod oglednih krava glikemije bile značajno veće 0. i 180. minuta ($p < 0,05$, pojedinačno), a insulinemije 0. i 30. minuta ($p < 0,05$, pojedinačno). Nije bilo značajne razlike u koncentraciji NEFA između dve grupe krava. AUC_{NEFA} i RQUICKY su bili značajno manji ($p < 0,01$, $p < 0,001$, pojedinačno) kod oglednih nego kontrolnih krava. Rezultati GTT izvedenih 14. dana posle teljenja su pokazali da je kod oglednih u odnosu na kontrolne krave glikemija jedino 0. minuta bila značajno veća ($p < 0,05$), dok su koncentracije insulina i NEFA bile veće u svim vremenskim tačkama tokom izvođenja testa, ali značajno za insulin jedino 60. minuta ($p < 0,05$), a za NEFA jedino 30. i 180. minuta ($p < 0,05$, pojedinačno) testa. AUC_{ins} je bio značajno veći ($p < 0,05$), a RQUICKY značajno manji ($p < 0,01$) kod oglednih nego kontrolnih krava. Rezultati dobijeni tokom izvođenja GTT 28. dana laktacije su pokazali odsustvo značajne razlike u glikemijama između dve grupe krava, dok su insulinemije bile značajno više kod oglednih u odnosu na kontrolne krave u svim vremenskim tačkama testa izuzev 180. minuta ($p < 0,05$, $p < 0,05$, $p < 0,05$, $p < 0,001$, $p < 0,05$, $p < 0,05$, pojedinačno). Koncentracije NEFA su bile veće ili jednake kod oglednih u odnosu na kontrolne krave u svim vremenskim tačkama testa, ali je ova razlika bila značajna jedino 0. i 15. minuta ($p < 0,001$ i $p < 0,01$, pojedinačno). AUC_{ins} , ΔMax_{ins} i AUC_{NEFA} su bili značajno veći ($p < 0,05$, $p < 0,05$ i $p < 0,001$, pojedinačno), a RQUICKY značajno manji ($p < 0,01$) kod oglednih krava. Sadržaj ukupnih lipida u hepatocitima 10. dana pre i 14. dana nakon teljenja je bio značajno veći kod oglednih nego kontrolnih krava ($p < 0,01$ i $p < 0,001$, pojedinačno). Dijametar adipocita 10. dana pre teljenja bio je značajno manji kod kontrolnih krava ($p < 0,05$), kod kojih je nakon teljenja ustanovljeno i značajno povećanje dijametara adipocita ($p < 0,05$) u odnosu na antepartalne vrednosti. Zastupljenost proteina insulinskih receptora u mišićnim ćelijama 10. dana pre teljenja je bila značajno manja ($p < 0,05$) kod oglednih nego kontrolnih krava. Ekspresija proteina GLUT 4 molekula u adipocitima je antepartalno bila značajno veća ($p < 0,05$) kod oglednih krava, kod kojih je nakon teljenja ustanovljeno značajno smanjenje nivoa proteina GLUT 4 molekula u

adipocitima. Na osnovu svih ispitivanih parametara koji se mogu smatrati parametrima insulinske rezistencije može se zaključiti da je 10. dana pre očekivanog teljenja kao i tokom rane laktacije kod ugojenih krava smanjena efikasnost insulina u pogledu korišćenja glukoze u perifernim tkivima, kao i prometu masti u telesnim depoima i ćelijama jetre.

Ključne reči: visokomlečne krave, telesna kondicija, insulinska rezistencija, test opterećenja glukozom, insulinski receptor, GLUT 4

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Bolesti papkara

UDK broj: _____

INSULIN RESISTANCE IN HOLSTEIN DAIRY COWS DURING THE DRY PERIOD AND EARLY LACTATION

SUMMARY

The aim of this doctoral dissertation was to examine relationship between insulin resistance and body condition score (BCS) in high-yielding dairy cows. Approximately 30 days before expected calving 16 Holstein cows were scored for body condition and assigned to one of two groups (n = 8 per group), control (BCS = 3.0 to 3.25) and experimental (BCS = 4.25 to 4.50). A total of 16 cows were subjected to glucose tolerance test (GTT) four times: at days -28, -10, 14 and 28 relative to calving. Blood samples were collected at 0, 15, 30, 60, 90, 120 and 180 min relative to infusion of 0.5 g/kg BW glucose, and were analyzed for glucose, insulin and non-esterified fatty acids (NEFA). The concentrations of total protein, albumin, β -hydroxybutyrate (BHBA), total bilirubin, urea, calcium and phosphorus were measured at sampling point 0 min. Besides, adipose tissue, muscle and liver samples were taken from all examined animals at day 10 *ante* and day 14 *post partum*. Determinations of the lipids content in hepatocytes and subcutaneous adipocytes diameter were performed by histopathological analysis. Muscle and adipose tissue insulin receptor (IR) and glucose transporter (GLUT 4) contents were determined by the Western blot procedure. Insulin resistance was estimated by calculating parameters that describe metabolism of glucose (k , $T_{1/2}$, $Peak_{gluc}$ i AUC_{gluc}), insulin (ΔMax_{ins} , $Peak_{ins}$ i AUC_{ins}) and NEFA (AUC_{NEFA}) during GTT. The revised quantitative insulin sensitivity check index (RQUICKI) was also calculated. Selected serum biochemical parameters did not differ between the groups *ante partum*, but experimental cows had greater total bilirubin concentrations ($P < 0.05$) at day 14 and lower albumin concentrations ($P < 0.05$) at day 28 *post partum* compared to those in control group. Results obtained during the first GTT revealed that the blood glucose was significantly higher in experimental compared to control cows only 180 min after infusion, whereas insulin and NEFA concentrations did not significantly differ between the groups. The patterns of blood glucose and insulin during the glucose challenge were similar in both

groups. AUC_{NEFA} and RQUICKY were also similar in both groups. The GTT results at day 10 before parturition showed that glycemia levels were significantly higher at minutes 0 and 180 ($P < 0.05$, respectively), insulinemia at minutes 0 and 30 ($P < 0.05$, respectively) after infusion in experimental cows than in their control counterparts. At the same time, there were no significant differences in NEFA level among the groups, but AUC_{NEFA} and RQUICKY were significantly lower ($P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively) in experimental compared to control cows. Results of the GTT done at day 14 after parturition revealed significantly higher basal blood glucose level ($P < 0.05$) in experimental compared to control cows, while insulin and NEFA levels were numerically higher at all sampling points, but significantly only 60 min for insulin ($P < 0.05$) and 30 and 180 min for NEFA ($P < 0.05$, respectively). AUC_{ins} was significantly higher ($P < 0.05$), whereas RQUICKY was significantly lower ($P < 0.01$) in experimental than in control cows. During the GTT at 28 days of lactation glycemia level did not significantly differ among the groups, while insulinemia were significantly higher in experimental cows compared with those of control cows at all sampling points with exception 180 min after infusion ($P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.001$, $P < 0.05$ and $P < 0.05$, respectively). NEFA level was numerically higher in experimental than in control cows at all sampling points, but significantly only at minutes 0 and 15 ($P < 0.001$ and $P < 0.01$, respectively). AUC_{ins} , ΔMax_{ins} and AUC_{NEFA} were significantly higher ($P < 0.05$, $P < 0.05$ and $P < 0.001$, respectively), whereas RQUICKY was significantly lower ($P < 0.01$) in experimental cows. The content of lipids in hepatocytes before and after onset of lactation were significantly higher in experimental than in control cows ($P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively). Experimental cows had significantly greater adipocytes diameter ($P < 0.05$) *ante partum*, but the increase in diameter of adipocytes ($P < 0.05$) in relation to antepartal values was established in control cows *post partum*. In experimental cows, IR contents in muscle strips *ante partum* were significantly lower ($P < 0.05$) than those in control cows. Control cows had significantly lower GLUT 4 contents in adipocytes ($P < 0.05$) *ante partum* compared to experimental cows, in which significant decrease in GLUT 4 contents *post partum* was established in relation to antepartal values. Taken together, obtained results suggest that experimental cows experienced reduced insulin efficiency in stimulating peripheral glucose utilization, as

well as in fatty acids turnover in body fat depots and the liver cells at 10 days before and after onset of lactation.

Key words: high-yielding dairy cows, body condition, insulin resistance, glucose tolerance test, insulin receptor, GLUT 4

Major Field of Study: Veterinary Medicine

Special Field of Study: Ruminants and Swine Diseases

UDK Number: _____

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	4
2.1. Osobnosti metabolizma visokomlečnih krava	4
2.2. Odlike energetskeg metabolizma krava u peripartalnom periodu.....	7
2.2.1. Pozitivan bilans energije.....	8
2.2.2. Negativan bilans energije.....	10
2.3. Uloga hormona u regulaciji metabolizma krava u peripartalnom periodu	17
2.3.1. Uloga insulina.....	18
2.3.2. Uloga hormona tireoide.....	19
2.3.3. Uloga glukokortikoida.....	22
2.3.4. Uloga hormona rasta.....	23
2.4. Odlike metabolizma i hormonalnog statusa ugojenih krava.....	25
2.5. Patogeneza metaboličkih poremećaja ugojenih krava.....	27
2.5.1. Poremećaji metabolizma masti i ugljenih hidrata.....	28
2.5.2. Masna jetra.....	32
2.6. Uloga insulina u regulaciji metabolizma masti i ugljenih hidrata.....	36
2.7. Mehanizam nastanka insulinske rezistencije.....	39
2.7.1. Metabolički pokazatelji insulinske rezistencije.....	41
2.7.2. Činioci odgovorni za nastanak insulinske rezistencije.....	42
2.7.2.1. Ishrana.....	42
2.7.2.2. Hiperlipidemija.....	45
2.7.2.3. Genetski faktori.....	45
2.7.2.4. Inflamacija.....	49
2.7.3. Uloga receptora u nastanku rezistencije na insulin.....	50
2.7.4. Testovi za utvrđivanje insulinske rezistencije.....	52
3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA	55

4. MATERIJAL I METODE	56
4.1. Mesto istraživanja	56
4.2. Ishrana i način držanja oglednih životinja	56
4.3. Tretman životinja	59
4.4. Metode rada	59
4.4.1. Intravenski test opterećenja glukozom	59
4.4.2. Uzimanje uzoraka krvi.....	59
4.4.3. Uzimanje uzoraka tkiva jetre, masnog i mišićnog tkiva.....	60
4.4.4. Ocena telesne kondicije.....	62
4.4.5. Određivanje koncentracije biohemijskih parametara krvi.....	62
4.4.6. Određivanje koncentracije insulina u krvnom serumu.....	63
4.4.7. Histološka ispitivanja.....	63
4.4.7.1. Određivanje stepena zamašćenja jetre.....	63
4.4.7.2. Određivanje dijametra adipocita.....	64
4.4.8. Matematički modeli za procenu insulinske rezistencije.....	65
4.4.8.1. RQUICKI (Revised Quantitative Insulin Sensitivity Check Index).....	65
4.4.8.2. Parametri vezani za promene koncentracija glukoze, insulina i NEFA tokom GTT.....	65
4.4.9. Određivanje nivoa sadržaja proteina insulinskih receptora i transportnog molekula za glukozu (GLUT4).....	66
4.4.9.1. Priprema ćelijskog lizata masnog i mišićnog tkiva.....	66
4.4.9.2. Određivanje koncentracije proteina BCA metodom.....	66
4.4.9.3. SDS-Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu i Western blot.....	67
4.4.10. Statistička obrada rezultata.....	69
5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA	70
5.1. Koncentracija glukoze, insulina i NEFA tokom testova opterećenja glukozom.....	70

5.1.1. Koncentracija glukoze, insulina i NEFA tokom testa opterećenja glukozom izvedenog 28. dana pre teljenja	70
5.1.2. Koncentracija glukoze, insulina i NEFA tokom testa opterećenja glukozom izvedenog 10. dana pre teljenja	75
5.1.3. Koncentracija glukoze, insulina i NEFA tokom testa opterećenja glukozom izvedenog 14. dana posle teljenja	80
5.1.4. Koncentracija glukoze, insulina i NEFA tokom testa opterećenja glukozom izvedenog 28. dana posle teljenja	85
5.2. Zastupljenost proteina insulinskih receptora u mišićnom i masnom tkivu	90
5.3. Zastupljenost proteina transportnog molekula za glukozu (GLUT 4) u mišićnom i masnom tkivu	92
5.4. Dijametar adipocita.....	94
5.5. Sadržaj ukupnih lipida u jetri	96
5.6. Metabolički profil krava	99
5.6.1. Koncentracija ukupnih proteina.....	99
5.6.2. Koncentracija albumina.....	100
5.6.3. Koncentracija BHBA.....	101
5.6.4. Koncentracija ukupnog bilirubina.....	102
5.6.5. Koncentracija uree.....	103
5.6.6. Koncentracija kalcijuma.....	104
5.6.7. Koncentracija fosfora.....	105
6. DISKUSIJA.....	107
6.1. Testovi opterećenja glukozom kod ugojenih i krava sa optimalnom telesnom kondicijom.....	109
6.2. Zamašćenje jetre i dijametar adipocita.....	116
6.3. Ekspresija proteina insulinskih receptora i transportnih molekula za glukozu u mišićnom i masnom tkivu.....	120
7. ZAKLJUČCI.....	125
8. SPISAK REFERENCI	127

Skraćenice korišćene u tekstu

AcCoA – acetyl coenzyme A

ACTH (Adrenocorticotropic hormone) – adrenokortikotropni hormon

APO – apolipoprotein

BHBA (β hydroxybutyric acid) – β hidroksibuterna kiselina

CAC– ciklus limunske kiseline

CPT – karnitin palmitoil transferaza

DAG – diacilglicerol

DIO – dejodinaza

GH (Growth hormone) – hormon rasta

GLUT 4 – glukozni transporter

GTT (Glucose tolerance test) – test opterećenja glukozom

IGF-I (Insulin like growth factor-I) – insulinu sličan faktor rasta - I

IL-1 (Interleukin-1) – interleukin - 1

IL-6 (Interleukin-6) – interleukin – 6

IR – insulinski receptor

KoA – koenzim A

NEB (Negative energy balance) – negativni bilans energije

NEFA (Nonesterified fatty acid) – neesterifikovane masne kiseline

OTK – ocena telesne kondicije

PA – propionska kiselina

PEB (Positive energy balance) – pozitivan bilans energije

PKC – protein kinaza C

RQUICKI – Revised Quantitative Insulin Sensitivity Check Index

SM – suva materija obroka

TAG – trigliceridi

TNF- α (Tumor necrosis factor- α) – faktor nekroze tumora - α

VLDL (Very low density protein) – proteini vrlo niske gustin

1. UVOD

Tokom poslednjih decenija u govedarstvu su se postavljali sve veći zahtevi u odnosu na intenzitet i kvalitet proizvodnje. Dok su se broj stada i ukupan broj krava u celoj Evropi stalno smanjivali, dotle su proizvodnja mleka i prosečan broj krava po stadu beležili stalni porast. Povećan obim proizvodnje po kravi je rezultat mera intenzivne genetske selekcije, kao i tendencije da se tom cilju prilagode ishrana i način držanja i iskorišćavanja (menadžment) životinja. Smatra se da je učešće genetike u povećanju proizvodnih rezultata kod krava sa visokom proizvodnjom mleka od 33 do 40 posto, dok se ostali deo povećanja proizvodnih sposobnosti pripisuje uticajima menadžmenta i ishrane krava. Radi ilustracije, početkom osamdesetih godina prošloga veka proizvodnja mleka po kravi u našoj zemlji bila je nešto veća od 6000 litara u toku jedne laktacije, a danas, na mnogim farmama sa razvijenom govedarskom proizvodnjom, ona iznosi preko 8500 litara. Dakle, godišnja proizvodnja mleka po kravi se povećala za više od 40 procenta, sa trendom povećanja od 1,4 posto godišnje.

Kao što se može zaključiti, selekcijske mere su tokom poslednjih decenija bile usmerene isključivo na povećanje proizvodnih sposobnosti krava visokomlečnih rasa, što je dodatno dovelo do povećanja potreba u hranljivim materijama, pogotovo tokom laktacionog perioda. Ovakve mere selekcije uticale su istovremeno na sposobnost i stabilnost neuroendokrine regulacije metaboličkih funkcija. Drugim rečima, grla sa većom mlečnošću trpe veće metaboličko opterećenje, a kao posledica toga njihov organizam izložen je izrazito velikim naporima. U takvim uslovima regulatorni mehanizmi mogu da budu opterećeni do krajnjih fizioloških granica, a mogu da budu poremećeni i normalni tokovi fizioloških procesa. Uprkos konstantnom napretku u razumevanju biologije i metabolizma visokomlečnih krava pod takvim zahtevima sve više se javljaju poremećaji metabolizma i reprodukcije, kao veoma značajan zdravstveni i ekonomski problem. To je osnovni razlog što je ekonomska dobit od proizvodnje mleka još uvek u senci visokih troškova lečenja obolelih životinja. Prema podacima iz literature procenjuje se da na farmama visokomlečnih krava na području Srbije prosečni ekonomski gubitak po životinji oboleloj od masne jetre iznosi oko 250 evra godišnje. Dakle, intenzivna govedarska

proizvodnja postavlja velike zahteve i dovodi do sve većih suprotnosti između biološko-fiziološke opterećenosti organizma i zdravlja životinja. Zbog toga, treba da se većim brojem mera, posebno ishranom i pogodnom tehnologijom, ublaže ili neutrališu postojeći disbalansi. Poznavanje funkcionisanja mehanizama i zakonitosti koji posreduju u procesu prilagođavanja u takvim uslovima je od prvostepenog značaja, sa posebnim osvrtom na reakcije nekih endokrinih žlezda i odgovore perifernih tkiva na hormonalne uticaje.

U najvećoj meri, mnogobrojne adaptivne promene koje mogu da imaju ključni uticaj na zdravstveno stanje, proizvodnju i ekonomičnost uzgoja javljaju se od kraja gestacionog perioda (kasni graviditet) i tokom perioda rane laktacije. Zapravo, peripartalni period podrazumeva promenu u aktivnosti skoro svih ćelija u organizmu, da bi se odgovarajućom preraspodelom hranljivih materija obezbedile optimalne potrebe fetusa i mlečne žlezde. To, pre svega, uključuje usklađivanje velikog broja metaboličkih procesa (glukoneogeneza, glikogeneza, glikogenoliza, proteoliza, lipoliza i lipogeneza), istovremeno ukazujući i na značaj mehanizama koji su odgovorni za regulaciju metabolizma u vreme njegovog velikog opterećenja. Stoga, može se reći da je osnovno obeležje ovih fizioloških promena kod svih vrsta sisara da se prvenstveno obezbedi snabdevanje fetusa, odnosno novorođenčadi optimalnom količinom hranljivih materija stavljajući u „drugi plan“ ostale potrebe organizma majki. Da bi se uspostavila ovakva „energetska hijerarhija“, periferna tkiva (mišićno i masno) koriste manje glukoze, ali, isto tako, u njima se intenziviraju procesi lipolize i katabolizma proteina. Ovaj potencijal je najviše ispoljen kod goveda visokomlečnih rasa, što im omogućava da proizvode daleko veće količine mleka. Uporedo sa ovim promenama, metabolička aktivnost jetre se veoma brzo i višestruko povećava u periodu oko teljenja putem povećanja protoka krvi, potrošnje kiseonika i enzimske aktivnosti. Pored toga, jetra preživara mora da se metabolički prilagodi, odnosno prestroji, u prvom redu zbog naglih promena u sastavu prisutnih slobodnih masnih kiselina u krvi, koje se dešavaju u ovom periodu. Imajući u vidu navedene činjenice, jetra se opravdano smatra glavnom „raskrslom“ metaboličkih procesa tokom peripartalnog perioda, jer je njeno funkcionalno stanje od presudnog značaja za prilagođavanje organizma visokomlečnih krava u tranzicionom periodu.

Fiziološki mehanizmi uključeni u proces prilagođavanja organizma u uslovima velikih energetske zahteva veoma su komplikovani za tumačenje i po svemu sudeći ti procesi se odvijaju različito kod svake jedinke. Zbog toga, ostaje kao mogućnost da se utvrde validni činioci koji mogu blagovremeno da ukažu na stepen adaptacije organizma u određenom periodu proizvodnog ciklusa. U takve činioce ubrajaju se danas telesna kondicija krava, parametri metaboličkog profila, koncentracija hormona u krvnoj plazmi i sadržaj organskih sastojaka mleka. U poslednje vreme se sve više preporučuje, kao dodatni pokazatelj, ocena stepena osetljivosti perifernih tkiva na insulin (insulinska rezistencija) da bi se predvidelo nastajanje metaboličkih poremećaja i njihova težina kod životinja čiji je organizam opterećen visokom proizvodnjom mleka.

Imajući u vidu da su literaturni podaci o uticaju stanja uhranjenosti na funkcionalnu aktivnost β -ćelija endokrinog pankreasa i stepen osetljivosti perifernih tkiva na insulin (insulinska rezistencija) tokom perioda zasušenja i u ranoj laktaciji oskudni, smatrali smo da postoji naučna opravdanost za sprovođenjem takvog istraživanja. Na taj način bi se doprinelo daljem razumevanju patogeneze insulinske rezistencije kod visokomlečnih krava, a time i njihove sposobnosti da se adaptiraju u uslovima visoke proizvodnje mleka.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Osobnosti metabolizma visokomlečnih krava

Prelazni period iz kasnog graviditeta u fazu rane laktacije je najrizičniji period u proizvodno-reproduktivnom ciklusu visokomlečnih krava, jer se naglo menjaju potrebe organizma kako u pogledu energije, tako i drugih materija, a praćen je i naglim promenama u neuroendokrinom i metaboličkom statusu (Bell, 1995). Dodatno, u ovom periodu krave treba da se prilagode na mnogobrojne stresogene činioce, kao što su: ambijentalni uslovi držanja, promene u sastavu i režimu ishrane, kao i sa kompeticijom i hijerarhijom između životinja u slobodnom ili poluslobodnom sistemu uzgoja krava. Kutana sluzokoža i mikroflora buraga moraju da se razviju i prilagode ishrani bogatoj energijom, a oskudnom u pogledu strukturnih (sirovih) vlakana. Takođe, u ovom periodu u jetri visokomlečnih krava treba da se intenzivira proces glukoneogeneze i obezbedi optimalno korišćenje dospelih hranljivih materija (Goff i Horst, 1997; Drackley, 1999; Jorritsma i sar., 2001). Budući da se intenziviranjem metaboličkih procesa kod visokomlečnih krava pojavljuje potreba u glukozu i do 4 kg dnevno, jasno ukazuje na visoke zahteve koji se postavljaju pred glukoneogenezu u jetri. Povećanje transkripcije (*mRNK*) i aktivnosti enzima piruvat karboksilaze i fosfoenolpiruvat karboksikinaze u jetri, u tesnoj je vezi sa hormonalnim promenama koje uvode organizam visokomlečnih krava u stanje štednje glukoze od strane perifernih tkiva, a karakterišu se nižim nivoom insulina i povišenom koncentracijom hormona rasta u krvi (Knapp i sar., 1992; Greenfield i sar., 2000; Drackley i sar., 2001). Već je istaknuta važna osobina visokomlečnih krava da se u fazi rane laktacije, u uslovima energetske deficita, favorizuju katabolički procesi u telesnim tkivima sa ciljem adekvatnog snabdevanja mlečne žlezde prekursorima za sintezu organskih sastojaka mleka. Pokretanje procesa mobilizacije masnih kiselina iz telesnih rezervi u uslovima negativnog bilansa energije je hormonski regulisano i smatra se da nizak količnik insulina i glukagona ima veoma važnu ulogu u nastanku i kasnijem održavanju tog procesa (Drackley, 2000; Ingvarstsen i sar., 2003). U tom pogledu, visokomlečne krave moraju da se izbore sa posledicama koje može da prouzrokuje mobilizacija hranljivih materija iz telesnih depoa,

pri čemu dodatno narušavanje energetskeg statusa povećava rizik za nastajanje mnogobrojnih metaboličkih, reproduktivnih i infektivnih bolesti (Bobe, 2004; Šamanc i sar., 2010b, 2011). Nemogućnost visokomlečnih krava da se prilagode na bilo kom navedenom nivou potrebama visoke proizvodnje, ima za posledicu nedovoljno iskorišćavanje energije i dalje produbljanje negativnog energetskeg bilansa. Drugim rečima, raznolikost poremećaja zdravlja koji mogu da se jave u periodu rane laktacije potvrđuje da narušavanje funkcionalne sposobnosti nekih organskih sistema ima primarnu ulogu, odnosno da ovi poremećaji zdravlja imaju zajedničku etiopatogenetsku osnovu. Ipak, i dalje ostaje otvoreno pitanje individualnih razlika u nivou hormonskeg regulisanja metaboličkih procesa, kao i odnosa ovakvog regulisanja prema energetskeg statusu životinje (Kessel i sar., 2008; Hammon i sar., 2009).

Visoka učestalost metaboličkih, infektivnih i reproduktivnih poremećaja zdravlja visokomlečnih krava u peripartalnom periodu predstavlja veliki problem stručne i naučne javnosti širom sveta. Široko usvojena praksa za minimiziranje metaboličkih poremećaja kod krava visokomlečnih rasa počiva na kontroli unosa suve materije obroka u periodu zasušenja sa ciljem da se spreči preterano odlaganje rezervi u telesne depoe (Grummer i sar., 2004). Preciznije rečeno, ograničavanjem unosa energetskeg prekursora na početku zasušenja, smanjuje se količina masnih kiselina dostupnih za mobilizaciju, što ograničava njihov porast u cirkulaciji u peripartalnom periodu, i na taj način znatno smanjuje mogućnost nakupljanja triglicerida i proizvodnje ketonskih tela u jetri (Murondoti i sar., 2004). Međutim, rezultati ispitivanja u pogledu menadžmenta ishrane krava tokom perioda zasušenja nisu konzistentni i u izvesnoj meri su protivurečni. Naime, neke studije su pokazale pozitivan efekat postepenog povećanja unosa energije u prepartalnom periodu, pogotovo u slučajevima kada se stanje uhranjenosti bitno ne menja u tom periodu (Doepel i sar., 2002). S druge strane, postoje podaci koji ukazuju da kontrolisani unos energije u zasušenju može da dovede do povoljnih rezultata u procesu prilagođavanja na početak laktacije (Holcomb i sar., 2001). Ove nedoslednosti sugerišu da su neke pojedinosti oko etiopatogeneze metaboličkih poremećaja kod visokomlečnih krava još uvek nepoznate.

Inflamacija je predložena kao karika koja nedostaje u patologiji metaboličkih poremećaja krava u tranzicionom periodu (Drackey, 1999). Od ranije je poznato da akutna

inflamacija dovodi do metaboličkog efekta (mobilizacija masti i glikogena, nakupljanje triglicerida u jetri) što se u suštini dešava u tranzicionom periodu. Ustanovljeno je da citokini potpomažu proces lipomobilizacije putem smanjenja apetita (Kushibiki i sar., 2003), narušavanjem osetljivosti perifernih tkiva na insulin, i čak direktnom stimulacijom procesa lipolize (Kushibiki i sar., 2001), a što je sve povezano sa nastankom ketoze i masne jetre kod krava (Ingvarsen, 2006). Još više je intrigantan podatak da TNF- α smanjuje proizvodnju glukoze u jetri (Kettelhut i sar., 1987) i podstiče esterifikaciju masnih kiselina u obliku triglicerida (Garcia Ruiz i sar., 2006). Direktni efekti citokina na metabolizam jetre mogu igrati ključnu ulogu u patogenezi metaboličkih poremećaja krava u peripartalnom periodu, naročito onih izloženih inflamaciji ili opterećenih prekomernim količinama masti u telesnim depoima (Ohtsuka i sar. 2001; Ametaj i sar., 2005, Looor i sar., 2006).

U svakom slučaju, poremećaje zdravlja koji se javljaju u periodu oko teljenja ne treba gledati kao izolovane subjekte, već naprotiv, kao događaje koji su isprepleteni i povezani mnogobrojnim međusobnim interakcijama. Najbolji primer za ovakav koncept je činjenica da krave koje imaju veću ocenu telesne kondicije u trenutku teljenja su podložnije razvoju mnogobrojnih poremećaja zdravlja. Pouzdano je utvrđeno da pregojene krave (OTK $\geq 4,0$) imaju smanjen apetit u periodu oko teljenja i predispoziciju da mobilišu više prekursora iz telesnih depoa u odnosu na krave optimalne telesne kondicije (OTK $\leq 3,75$) (Garnsworthy i Topps, 1982; Rukkamsuk i sar., 1999). Pored toga, preobilna ishrana u periodu zasušenja se dovodi u vezu sa razvojem insulinske rezistencije, masne jetre, ketoze (Herdt, 2000; Holtenius i sar., 2003; Bobe i sar., 2004) i hipokalcemije (Horst i sar., 2002). Pregojene krave takođe imaju veću predispoziciju za teška teljenja, zadržavanje posteljice (Gearhart i sar., 1990) i pad imuniteta (Lacetera i sar., 2005). Na kraju se može reći, da bilo koji poremećaj zdravlja u peripartalnom periodu može da pokrene „lavinu“, odnosno čitav niz nekontrolisanih reakcija koje dodatno pogoršavaju energetske status organizma krava i tako nepovoljno utiču na funkcionalnu sposobnost više organskih sistema.

Ipak, ostaje otvoreno pitanje, koji disbalansi su odgovorni za razvoj dugotrajnog kataboličkog stanja kod visokomlečnih krava tokom rane laktacije? Smanjena sposobnost lučenje β -ćelija endokrinog pankreasa, razvoj insulinske rezistencije perifernih tkiva i

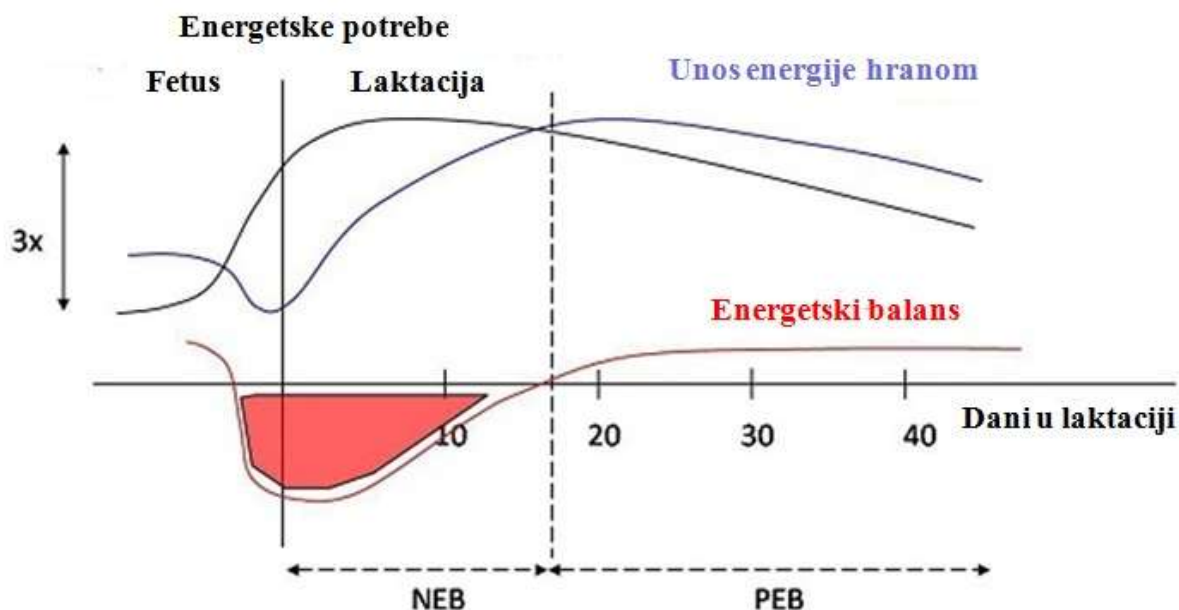
narušena funkcionalna i metabolička sposobnost jetre, su svakako glavne karike za odgovor na pitanje, jer zauzimaju centralno mesto u metabolizmu krava u peripartalnom periodu.

2.2. Odlike energetskeg metabolizma krava u peripartalnom periodu

Energetske potrebe visokomlečnih krava, izražene kao neto energija za laktaciju (NEL), sastoje se od uzdržnih potreba ($0.080 \text{ MCal/kg}^{0.75}$ po danu) i energetske potrebe za proizvodnju mleka (gruba procena 0.40 MCal po kilogramu energetski korigovanog mleka). Energetske potrebe krava u graviditetu do 190. dana su zanemarljive, i za njihovo izračunavanje koristi se formula $(0.0032 \times D - 0.0352)/0.22 \text{ MCal}$ po danu, za tele telesne mase od 45 kg, gde je D = dan graviditeta posle 190. dana. Hipotetički dnevne energetske potrebe za kravu holštajn rase telesne mase od 700 kg tokom zasušenja iznose oko 11,5 MCal NEL u 220. danu graviditeta, i povećavaju se na 13 MCal NEL u 270. danu graviditeta. Međutim, neposredno posle partusa, sa početkom laktacije ukupan promet energije se značajno menja, potrebe za energijom se višestruko povećavaju usled rastuće proizvodnje mleka (Goff i Horst, 1997). Tako, samo nekoliko dana nakon teljenja, potrebe visokomlečnih krava se povećavaju aproksimativno na oko 25 MCal NEL/dnevno za nivo proizvodnje od 20 kg mleka, a utrošak energije kod krava sa najvećom proizvodnjom mleka dostiže i do 45 MCal NEL (National Research Council, 2001). Bell (1995) je utvrdio da energetske potrebe visokomlečnih krava na početku laktacije, samo za nekoliko dana, mogu da porastu 3 puta u odnosu na potrebe za rast fetusa na samom kraju graviditeta (Grafik 1). Međutim, već tokom kasnog graviditeta, dolazi do smanjenja unosa suve materije obroka, i to dvojako: sa jedne strane mehanički, povećanjem zapremine gravidnog uterusa, i sa druge, hormonalno, porastom koncentracije estrogena i glukokortikosteroida u krvi (Ingvarsen i Andersen, 2000; Grummer i sar., 2004). Ustanovljeno je da se unos suve materije smanjuje za 5 posto tokom svakih 20 narednih dana posle 210. dana graviditeta (National Research Council, 2001), odnosno prema gruboj proceni za oko 30 posto tokom poslednje dve nedelje graviditeta (Bertics i sar., 1992; Doepel i sar., 2002). Karakteristično je da je najniži unos suve materije upravo u periodu neposredno oko teljenja. Tome, bez sumnje, najviše doprinose stresogeni činioci kao što su promene u sastavu obroka i/ili

režima ishrane, kompeticija između jedinki, ambijentalni uslovi, kao i sam partus (Grummer i sar., 2004; Drackley, 2005).

Slika 1. Hipotetički prikaz potreba u energiji (plava linija), kapaciteta organa za varenje (crna linija) i bilansa energije (crvena linija) visokomlečnih krava pre i posle teljenja.



NEB = negativan energetski bilans; PEB = pozitivan energetski bilans

2.2.1. Pozitivan bilans energije

Tokom srednje i kasne faze laktacije, kao i ranog perioda zasušenja, unos suve materije obroka (SM) i adaptacija mikroflora buraga su očuvani. U ovom periodu, energetske potrebe se lako zadovoljavaju, a neretko energetski priliv je i veći, što omogućava kravama da višak energije skladište u telesnim depoima u vidu masti, glikogena i proteina (Grummer, 2008). Prema podacima nekih autora, krave na početku zasušenja unose i do 60 posto više hranljivih materija nego što su njihove stvarne potrebe ako se hrane *ad libitum* (Dann i sar., 2006; Douglas i sar., 2006). Zbog toga, u toj fazi proizvodno-reproduktivnog ciklusa kod visokomlečnih krava bilans energije je pozitivan (Bewley i

Schutz, 2008). Metabolizam ugljenih hidrata i masti u visokom graviditetu karakterišu pojačana glukoneogeneza u jetri i smanjenje periferne utilizacije glukoze; nepromenjena ili smanjena utilizacija acetata; umerena mobilizacija masnih kiselina iz telesnih rezervi praćena povećanjem njihove utilizacije u perifernim tkivima (Bell, 1995). Ehrhardt i Bell (1997) utvrdili su da se na membranama ćelija posteljice progresivno povećava ekspresija GLUT 1 i 3 molekula, počevši od sredine pa do kraja graviditeta, favorizujući tako korišćenje glukoze od strane fetalnih tkiva, nezavisno od energetskeg statusa majki. Ovakvim prestrojavanjem metaboličkih procesa treba da se obezbede optimalne količine glukoze i aminokiselina za rast i razvoj ploda, dok je organizam majke preusmeren na korišćenje slobodnih masnih kiselina i ketonskih tela kao izvora energije.

Drackley i sar. (2001) su izneli mišljenje da proces prilagođavanja kod visokomlečnih krava počinje još u poslednjim nedeljama graviditeta. Iako je pri kraju graviditeta bilans energije pozitivan, prilagođavanje organizma započinje promenama u hormonalnoj konstelaciji i mobilizacijom viših masnih kiselina iz telesnih depoa. Zbog toga, koncentracija slobodnih masnih kiselina (NEFA) u krvi počinje da raste pre teljenja, mada, još u tom periodu, među životinjama nastaju velike razlike u stepenu lipomobilizacije (Grummer, 2008). Budući da se uporedo sa povišenjem koncentracije slobodnih masnih kiselina istovremeno povećava i koncentracija glukoze u krvi, smatra se da je u tom periodu očuvana metabolička ravnoteža. Usled smanjene aktivnosti karnitin palmitoiltransferaze-I (CPT-I), transport NEFA u mitohondrije je ograničen, tako da je reesterifikacija i ponovna redistribucija putem lipoproteina vrlo male gustine (VLDL) dominantan metabolički put kojim se rešava sudbina viših masnih kiselina u jetri za vreme pozitivnog energetskeg bilansa (Drackley i sar., 1991, Overton i Waldron, 2004). Pri tome, smatra se da je kapacitet hepatocita za sintezu i sekreciju lipoproteina u periodu zasušenja dovoljan da jetra održi korak sa prispelim višim masnim kiselinama. Međutim, kod nekih životinja upravo u tom periodu počinje proces zamašćenja jetre (Šamanc i sar., 2010a; 2011), što jasno pokazuje da se proces prilagođavanja odvija u neželjenom pravcu pre nego što nastane negativan bilans energije. Kao što je već objašnjeno, tokom kasnog graviditeta, kada je metabolizam pod jakim uticajem insulina i koncentracija hormona rasta je relativno niska, ispoljava se relativna neosetljivost masnog tkiva (insulinska rezistencija) na

aktivnost homeostatskih regulatornih mehanizama (Rhoads i sar., 2007). To ukazuje da se u kasnom graviditetu povećava aktivnost drugih lipolitičkih hormona, koji, isto tako, imaju sposobnost, kao i hormon rasta, da indukuju insulinsku rezistenciju. U tom pogledu, promene u koncentraciji estradiola, progesterona i prolaktina u krvi krava neposredno pre teljenja smatraju se značajnim, jer je pokazano da ovi hormoni mogu da menjaju odgovor adipocita na delovanje insulina i kateholamina (Bell, 1995; McNamara, 1997; Hayirli, 2006; Butler, 2010). Pored toga, koncentracija kateholamina i kortikosteroida se povećava oko teljenja (Edgerton i Hafs, 1973); kateholamini aktiviraju triacil glicerol lipazu (hormon senzitivna lipaza), dok kortikosteroidi povećavaju odgovor (senzitivnost) adipocita na delovanje kateholamina, a dodatno ovi hormoni povećavaju koncentraciju glukoze u krvi tako što u jetri stimulišu glikogenolizu i glukoneogenezu (Lay i sar., 1992; Drackley, 2000). Ove hormonalne promene su kratkotrajne u poređenju sa promenama u koncentraciji hormona rasta i insulina, i njihov relativni doprinos metaboličkom adaptiranju je verovatno limitiran. Ipak, danas preovladava mišljenje da su oni inicijatori insulinske rezistencije i lipolize tokom kasnog graviditeta i rane faze laktacije (Bell, 1995; Bell i Bauman, 1997).

Očigledno je da u procesu prilagođavanja životinja u uslovima pozitivnog bilansa energije učestvuju mnogobrojni mehanizmi, pa je zbog toga veoma teško da se proceni da li se u određenom periodu proizvodnog ciklusa taj proces odvija u fiziološkim okvirima ili ne, ne gubeći iz vida da među životinjama uvek postoje velike razlike.

2.2.2. Negativan bilans energije

Nakon teljenja, količina konzumirane hrane se postepeno povećava, ali nedovoljno brzo da bi se zadovoljilo naglo povećanje potreba u energetske potrebe. S obzirom da se maksimum proizvodnje mleka (pik laktacije) očekuje od 4. do 8. nedelje, a najveći unos suve materije obroka se postiže tek posle 10., pa sve do 22. nedelje posle teljenja (National Research Council, 2001), to ima za rezultat negativan enegetski bilans (NEB) u toj fazi laktacije (Beam i Butler, 1997; Butler, 2000; Jorritsma i sar., 2003; Grummer, 2008). Kod većine visokomlečnih krava NEB je najizraženiji oko 14. dana laktacije, a narušena ravnoteža između mogućnosti unošenja energije preko hrane i energetske potreba

životinja približno traje do 72. dana laktacije (Doepel i sar., 2002; Jorritsma i sar., 2003). Prema navodima Šamanca i sar. (2005), kod visokomlečnih krava u prvim nedeljama laktacije prosečno nedostaje 28,9 MJ NEL. Međutim, intenzitet i trajanje NEB subjektivna je osobina svake jedinke i veoma varira između krava. Danas se smatra da činioci koji utiču na količinu konzumirane hrane, a samim tim i unos energije, kao što su telesna kondicija u trenutku teljenja, puerperalne bolesti, kvalitet hraniva, adaptiranost mikroflore buraga na sastav obroka i kompeticija između samih životinja, imaju daleko veći uticaj, sami po sebi, nego energetske potrebe za proizvodnju mleka (Jorritsma i sar., 2003; Grummer, 2010).

Količina proizvedenog mleka prvenstveno zavisi od stepena sinteze laktoze u ćelijama mlečne žlezde, jer je osmotski aktivna i povlači vodu iz cirkulacije u lumen mlečne žlezde (Zhao i Keating, 2007). Laktoza se sintetiše iz dva molekula galaktoze, poreklom (derivati) od glukoze iz krvi. Pošto se najveći deo ugljenih hidrata razlaže u predželucima delovanjem mikropopulacije do nižih masnih kiselina, resorpcija glukoze iz digestivnog trakta kod preživara je mala (oko 10 do 15 posto) i nedovoljna da podmiri potrebe organizma preživara. Iz tog razloga, preživari i do 90 posto ukupnih potreba organizma u glukozi zadovoljavaju sintezom iz glikogenoplastičnih prekursora procesom glukoneogeneze u jetri (Young, 1977). Utvrđeno je da je za proizvodnju 1 kg mleka neophodno oko 72 g glukoze (Zhao i Keating, 2007), a ukupne dnevne potrebe za glukozom kod pojedinih krava sa izuzetno visokom proizvodnjom mleka mogu da budu i veće od 4 kg (Bell, 1995; Drackley i sar., 2001). Međutim, u prvim nedeljama laktacije deficit glukoze nastao zbog nesklada između potreba uslovljenih laktacijom i mogućnosti da se iz alimentarnih i endogenih izvora obezbede neophodne količine glukoze iznosi i do 500 g dnevno, kako navodi Drackley (2005). Pokušaji da se intenzitet NEB umanju korišćenjem masti u ishrani visokomlečnih krava nisu dali zadovoljavajuće rezultate. Nasuprot tome, dodavanje glikogenoplastičnih jedinjenja imalo je za rezultat ublažavanje intenziteta NEB (van Knegsel i sar., 2005; Grummer, 2008). Ovo saznanje pokazuje da je upravo glukoza jedinjenje koje predstavlja „usko grlo“ za visoku proizvodnju mleka, i da se NEB u suštini može smatrati negativnim bilansom glukoze. Kao posledica toga, visoku proizvodnju mleka kod savremenih rasa goveda sa izrazito velikim proizvodnim potencijalom, uprkos činjenici da konzumiraju manju količinu hrane tokom rane laktacije,

moćuće je ostvariti jedino ako se obezbedi snabdevanje mlećne Źlezde dovoljnim kolićinama glukoze. To praktićno znaći, da se sva raspoloŹiva glukoza kod visokomlećnih krava stavlja na raspolaganje mlećnoj Źlezdi. Da bi se ovo ostvarilo neophodno je ispuniti sledeće uslove: 1) sva periferna, ekstramamarna tkiva (mišićno i masno) treba da se uvedu u stanje Źtednje, odnosno restriktivnog korišćenja glukoze; 2) maksimalno intenziviranje procesa glukoneogeneze u jetri; 3) mobilizacija energetske prekursora iz telesnih depoa kao alternativnih izvora energije za periferna, ekstramamarna tkiva. Ova izmena u preraspodeli i korišćenju energije iz alternativnih izvora je rezultat veoma znaćajnih promena u hormonalnoj konstelaciji i senzitivnosti pojedinih tkiva na njih, prvenstveno jetre, masnog tkiva, skeletnih mišića i mlećne Źlezde, Źto su Bauman i Currie (1980) opisali kao „homeoreza“. Homeoretske promene su ustanovljene kod svih vrsta sisara, a osnovna strategija ovih promena je stvaranje boljih uslova za preŹivljavanje novoroćdenih jedinki. MoŹe se pretpostaviti da su veoma znaćajne dve ćinjenice za adaptaciju metabolizma krava u peripartalnom periodu. To su pad koncentracije insulina u krvi i smanjena senzitivnost i/ili odgovor perifernih tkiva na insulin.

Intracelularni unos glukoze odvija se olakšanom difuzijom pomoću membranski - vezanih transportnih molekula za glukozu (GLUT). Do sada je identifikovano 12 tipova GLUT molekula. Ekspresija razlićitih tkivno-specifićnih GLUT molekula omogućava insulinu da kontroliše preraspodelu hranljivih materija (glukoze) u celom organizmu (Zhao i Keating, 2007). U mišićnom i masnom tkivu ustanovljeno je da su najzastupljeniji insulin zavisni GLUT molekuli tipa 4, dok je prisustvo insulin nezavisnih GLUT 1 molekula, za bazalno snabdevanje ćelija glukozom, samo u tragovima. Nasuprot tome, mlećna Źlezda, fetalna tkiva i jetra uglavnom poseduju insulin nezavisne GLUT molekule tipa 1, 2, i 3 (Duehlmeier i sar., 2005; Nishimoto i sar., 2006; Zhao i sar., 2006; Zhao i Keating, 2007).

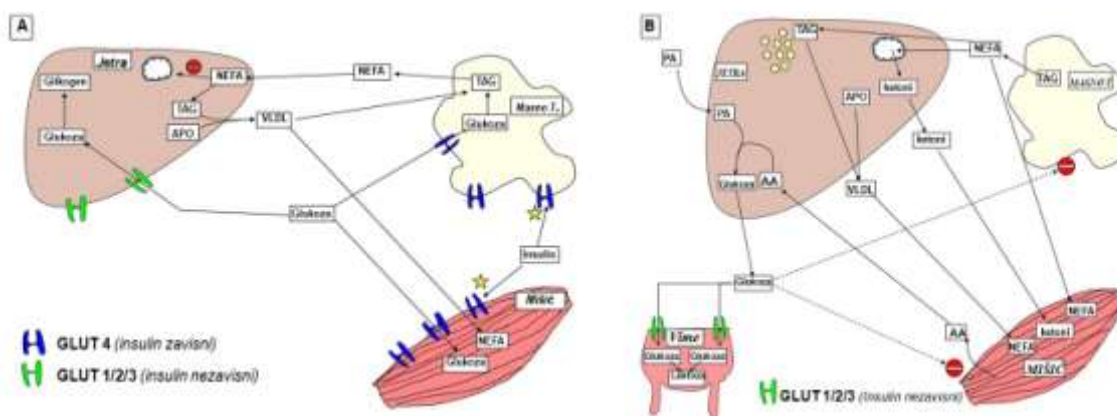
Peripartalni period se karakteriše veoma niskom bazalnom i glukozo-zavisnom sekrecijom insulina od strane β -ćelija endokrinog pankreasa (Lomax, 1979; Sartin i sar., 1985; Bell, 1995; Herzog, 2001; Holtenius i sar, 2003). Iako insulin nema direktan uticaj na proizvodnju mleka, niska koncentracija insulina ima za posledicu izrazito smanjenu ekspresiju GLUT 4 molekula, a time i korišćenje glukoze za potrebe mišićnog i masnog tkiva, Źto povećava raspoloŹivost glukoze za potrebe insulin-nezavisnih tkiva. Kao Źto je

već istaknuto, počevši od sredine pa do kraja graviditeta na membranama ćelija posteljice progresivno se povećava ekspresija GLUT 1 i 3 molekula, povećavajući tako korišćenje glukoze od strane fetalnih tkiva nezavisno od energetskeg statusa majki (Ehrhardt i Bell, 1997). Intenziviranje potrošnje glukoze od strane mlečne žlezde odvija se putem sličnih mehanizama: ekspresija svih transportnih molekula za glukozu u mlečnoj žlezdi, pogotovo insulin nezavisnih GLUT 1 molekula, se povećava za 5 do više od 100 puta na početku laktacije (Zhao i Keating, 2007). Kao rezultat ovih dešavanja priliv glukoze u mlečnu žlezdu je konstantan, dok se koncentracija glukoze u krvi krava kreće u rasponu od 4,4 do 10 mmol/L (Kaneko, 2008), pri čemu vime može da koristi 97 posto energije dobijene iz konzumirane hrane (Bell, 1995; Drackley, 1999) i 85 posto raspoložive glukoze iz krvi (Knight i sar., 1994; Zhao i sar., 1996; Etherton i Bauman, 1998).

Proporcionalno deficitu energije u ranoj laktaciji, visokomlečne krave mobilisu energetske prekurzore iz telesnih depoa, što se ispoljava gubitkom u telesnoj masi životinja. Prosečno smanjenje ocene telesne kondicije (OTK) u periodu neposredno pre teljenja, pa do kraja perioda NEB, se kreće u rasponu od 0,5 do 1 poena, na skali gde se OTK izražava u rasponu od 1 do 5 (Edmondson i sar., 1989; Waltner i sar., 1993; National Research Council, 2001). Kada se ocena telesne kondicije smanji za 1 poen (rani puerperijum : 10-12 nedelje laktacije), računa se da je gubitak u telesnoj masi od 7 do 8 posto, što približno iznosi oko 417 MCal NEL (National Research Council, 2001, Oikawa i Oetzel, 2006). Tako, procenjeno je da visokoproduktivna grla proizvode i do 550 kg mleka po laktaciji korišćenjem upravo izvora energije iz telesnih depoa (Tamminga i sar., 1997). Sa energetskeg gledišta masno tkivo je veoma dinamično i fleksibilno. Depoi masti kod visokomlečnih krava u trenutku teljenja mogu iznositi i preko 100 kg, iz koga, tokom perioda predstojeće laktacije, mogu da budu mobilisane masne kiseline za zadovoljavanje energetskeg potreba (McNamara, 1997). Koncentracija neesterifikovanih masnih kiselina (NEFA) je najčešće povećana nekoliko puta u periodu oko teljenja i može biti veća od 1000 $\mu\text{mol/L}$ tokom nekoliko nedelja (Herzog, 2001; Holtenius i sar., 2003). Opšte je prihvaćeno da je insulin glavni posrednik–medijator procesa mobilizacije masti iz telesnih depoa. Niska koncentracija insulina u krvi povećava aktivnost triacil glicerol lipaze i inhibira ulazak NEFA, glicerola i glukoze u adipocite tako što smanjuje aktivnost lipoprotein lipaze

i ekspresiju-translokaciju GLUT 4 molekula (McNamara, 1997). Insulin ne deluje direktno na katabolizam proteina, zato niska koncentracija insulina snažno smanjuje sintezu proteina, uspostavljajući takvu ravnotežu između anaboličkih i kataboličkih procesa, pri čemu se favorizuje mobilizacija amino-kiselina iz skeletnih mišićima (Bell i Bauman, 1997). Povećani priliv slobodnih amino-kiselina iz poprečno-prugastih mišića doprinosi povećanju koncentracije, odnosno raspoloživosti glukoze, s obzirom na činjenicu da se one uglavnom koriste za glukoneogenezu u jetri. Pored ovoga, niska insulinemija i veća koncentracija glukagona u ranoj laktaciji direktno aktivira enzime glukoneogeneze u jetri (Greenfield i sar., 2000). Shematski prikaz raspodele glukoze i mobilizacije energetskih prekursora iz telesnih depoa tokom zasušenja i laktacije dat je na slici 2.

Slika 2. Energetska raspodela tokom perioda zasušenja (A) i rane laktacije (B).



Lipidni pool krvne plazme uglavnom čine sirćetna i buterna kiselina, dve glavne niže masne kiseline koje nastaju mikrobnim razlaganjem u buragu strukturnih ugljenih-hidrata biljaka, i mobilisane neesterifikovane (više) masne kiselina (NEFA) (Van Knegsel i sar., 2005). Sastav lipida krvne plazme se značajno menja u kvalitativnom i kvantitativnom smislu nakon teljenja, uglavnom zbog intenzivne lipomobilizacije i trenda povećanja proizvodnje mleka (Rukkwamsuk i sar., 2000; Duffield i sar., 2009). Deo masnih kiselina krvne plazme direktno se koristi za sintezu mlečne masti u vimenu ili kao izvor energije za

periferna tkiva (mišićno i masno), ali veliki deo, proporcionalno protoku krvi kroz jetru, biva preuzet od strane hepatocita (Reynolds i sar., 2003; Overton i Waldron, 2004). Jetra, kako za vreme gladovanja tako i u stanju optimalne ishrane životinja, ima sposobnost da iz krvi ekstrahuje oko 30 posto slobodnih masnih kiselina (Mayes, 1989). Pri tome, postoji nekoliko metaboličkih puteva u kojima se određuje sudbina nižih masnih kiselina i NEFA u jetri, od kojih su dva najznačajnija: 1) potpuna oksidacija masnih kiselina u mitohondrijama, i 2) reesterifikacija i ponovna redistribucija putem cirkulacije (VLDL). Međutim, oba ova puta se mogu „blokirati“ neprimerenim prilivom masnih kiselina, pogotovo tokom perioda rane laktacije kada je najintenzivnija mobilizacija NEFA iz masnog tkiva, što je prikazano na slici 3 i detaljno objašnjeno u daljem tekstu.

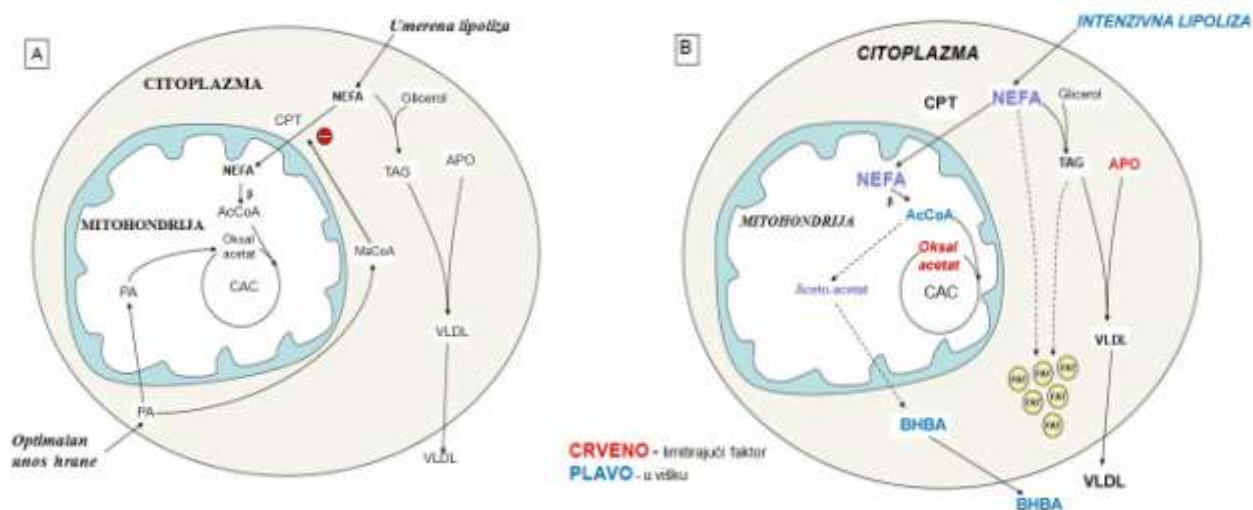
Transport NEFA u mitohondrije je povezan sa energetske statusom putem karnitin palmitoil transferaze transportnog „šatl“ sistema, koji se aktivira delovanjem glukagona, a inhibira od strane insulina, propionata i malonil-CoA (Jesse i sar., 1986; Drackley i sar., 1991). Poslednji u nizu molekula koji inhibiraju transport NEFA u mitohondrije, malonil - CoA, je posrednik ili veza između metabolizma propionata i masnih kiselina i može se smatrati energetske „barometrom“ (Grummer, 1992; Bruss, 2008). Zbog toga je transport NEFA u mitohondrije tokom pozitivnog energetske bilansa ograničen, a nasuprot tome, tokom NEB je olakšan-favorizovan. Nakon ulaska u mitohondrije masne kiseline se procesom β -oksidacije razlažu do acetil CoA. Tokom rane laktacije, zbog intenziviranja procesa glukoneogeneze, raspoloživost oksal acetata (delimično limitirajući činilac ciklusa limunske kiseline) je smanjena, tako da se višak ostataka sa 2 C atoma (acetil CoA), koristi za alternativni energetske put, odnosno sintezu ketonskih tela (Grummer, 1992; Van Knegsel i sar., 2005). Bez obzira na intenzitet NEB, odnos između C2 (poreklom od acetata i butirata koji nastaju u procesima fermentacije sirovih vlakana u buragu) i C3 (poreklom od propionske kiseline koja nastaje varenjem skroba u buragu) energetske prekursora u obroku za pojedine kategorije visokomlečnih krava je predložen kao delom limitirajući mehanizam za potpunu oksidaciju. Dokazana je činjenica da ishrana bogata C3 energetske prekursorima, „glikogena ishrana“, povećava priliv oksalacetata, i uglavnom ima za rezultat pad koncentracije NEFA i ketonskih tela u krvi krava, dok s druge strane „lipogena ishrana“ značajno povećava priliv acetil CoA i dovodi do suprotnog efekta u

intermedijarnom metabolizmu (van Knegsel i sar., 2005). Važno je naglasiti da proces ketogeneze, iako je u energetskeg pogledu nepovoljniji, ne treba smatrati patološkim procesom, već prvenstveno adaptivnim odgovorom i efikasnom strategijom goveda visokomlečnih rasa i drugih sisara, da potpomognu „štednju“ glukoze i ublaže opterećenost hepatocita mastima (Drackley i sar., 2000; Duffield i sar., 2009). U prilog tome je i činjenica da su ketonska tela rastvorljiva u vodi i kao takva mogu da se koriste kao izvor energije u srcu, bubrezima, skeletnim mišićima i drugim tkivima (Drackley i sar., 2001).

Prema podacima nekih autora, u peripartalnom periodu u jetru krava dospeva u proseku 525 g NEFA dnevno od kojih se može sintetisati 583 g triglicerida (Drackley i sar., 2001). S obzirom da je tokom NEB transport NEFA u mitohondrije hepatocita olakšan (favorizovan), aktivnost karnitinskog transportnog „šatl“ sistema ipak nije neograničena. Xu i sar. (2011) su pokazali da porast koncentracije NEFA u krvnoj plazmi krava preko 1.2 $\mu\text{mol/l}$ značajno inhibira aktivnost CPT-I. Dakle, kada je stepen mobilizacije masnih kiselina iz telesnih rezervi veoma intenzivan i njihov priliv prevazilazi oksidativne kapacitete, odnosno potrebe hepatocita, višak masnih kiselina se zadržava u citosolu i ponovo re-esterifikuje u trigliceride (Van den Top i sar., 1995; Drackley i sar., 2000). Pod normalnim, fiziološkim okolnostima reesterifikovani trigliceridi se inkorporišu u lipoproteine vrlo male gustine (VLDL) (Puppione, 1978; Bauchart i sar., 1989). Imajući u vidu da je sadržaj masti u hranivima za preživare nizak, i da je, za razliku od monogastričnih životinja, kod njih masno tkivo glavno mesto lipogeneze, ne čudi što jetra preživara nije predodređena da distribuira veće količine masti, odnosno nema dovoljno razvijen transportni sistem za reesterifikovane masne kiseline. Rezultati brojnih istraživanja su pokazali da je sposobnost jetre preživara za sintezu i sekreciju lipoproteina veoma niska, u poređenju sa monogastričnim sisarima, i tokom rane laktacije ne može da održi korak sa povećanim prilivom NEFA (Katoh, 2002; Piepenbrink i Overton; 2003; Overton i Waldron, 2004; Bruss, 2008). Gruffat i sar. (1997) su ustanovili da se prosečan sadržaj masti u jetri značajno povećava sa 0,35 posto (u sirovom uzorku jetre; u odnosu na masu tkiva jetre) tokom perioda zasušenja, na 4,5 do 10 posto tokom prve i druge nedelje laktacije. Praktično, tokom tranzicionog perioda kod visokomlečnih krava veoma često se javlja određeni stepen zamašćenja jetre (Veenhuizen i sar., 1991; Jorritsma i sar., 2001).

Iako većina krava ne pokazuje kliničke simptome bolesti, deponovanje masti iznad određene granice može da utiče na funkcionalnu sposobnost jetre i ozbiljno ugrozi odvijanje metaboličkih procesa, a samim tim i zdravlje životinja (Bobe i sar., 2004; Overton i Waldron, 2004).

Slika 3. Metabolička sudbina masti u jetri (putevi raspodele) tokom pozitivnog (A) i negativnog energetskeg bilansa (B).



CAC= ciklus limunske kiseline; NEFA= neesterifikovane masne kiseline; APO = apolipoprotein; CPT = karnitin palmitoil transferaza; VLDL = lipoproteini vrlo male gustine; AcCoA = acetyl coenzyme A; PA = propionska kiselina; TAG = trigliceridi.

2.3. Uloga hormona u regulaciji metabolizma krava u peripartalnom periodu

Hormonalni status krava zavisi od fiziološkog stanja i genetske predispozicije za proizvodnju mleka (Bonczek i sar., 1988; Veerkamp i sar., 2003). Opšte je prihvaćeno da endokrine žlezde imaju ključnu ulogu u dinamičnom procesu adaptacije jedinke na uslove spoljašnje sredine, kao i u pravovremenom uspostavljanju neophodne metaboličke ravnoteže kod krava u periodu oko teljenja. Po svemu sudeći, u tim procesima presudna je uloga hipofize i nadbubrežne žlezde, kao i hormona tireoidee i β -ćelija endokrinog

pankreasu, čija se aktivnost usklađuje prema metaboličkim potrebama životinja. Pri tome, sastav obroka može da bude veoma važan činioc od koga zavisi funkcionalna aktivnost nekih endokrinih žlezda, a samim tim i tok metaboličkih procesa u organizmu krava u periodu kada su najviše opterećene potrebama za proizvodnjom mleka (Bobe i sar., 2004; Goff, 2006; Šamanc i sar., 2005, 2011).

2.3.1. Uloga insulina

Koncentracija insulina u krvi preživara, kao i kod monogastričnih životinja, pokazuje znatna kolebanja tokom dana. U odnosu na fazu proizvodno-reproduktivnog ciklusa, insulinemija je niža u poslednje tri nedelje graviditeta i na početku laktacije u odnosu na period zasušenja (Blum i sar., 1973; Smith i sar., 1976; Winkelman i sar., 2008). Pad koncentracije insulina u krvi na početku laktacije dovodi se u vezu sa negativnim bilansom energije koji je prisutan kod mlečnih krava (Kunz i Blum, 1985; Reist i sar., 2002). U skladu sa tim Sartin i sar. (1988) utvrdili su značajno niže vrednosti koncentracija insulina u krvi 30. dana laktacije kod visokomlečnih krava, kod kojih je energetski disbalans izraženiji u odnosu na krave sa niskom proizvodnjom mleka. Veći porast koncentracije insulina u krvnom serumu krava utvrđen je tek u periodu od 4. do 12. nedelje laktacije (Terao i sar., 2010). Od ranije je poznato da stepen insulinskog odgovora zavisi od fiziološkog stanja i stadijuma laktacije u kome se nalaze krave (Sartin i sar., 1985). Kod visokomlečnih krava u laktaciji je ustanovljen slabiji insulinski odgovor na infuziju glukoze u odnosu na visokosteone i krave koje se ne muzu. Za razliku od visokomlečnih krava, kod krava tovnih rasa, odgovor β -ćelija endokrinog pankreasa na stimulaciju glukozom raste tokom laktacije, a zatim opada sve do poslednje faze graviditeta (Shingu i sar., 2002). U poslednje vreme se sve više ističe da elektrohemijska reakcija krvi utiče na aktivnost β -ćelija, samim tim i koncentraciju insulina u krvi (Bigner i sar., 1996).

Insulin ima višestruka delovanja u organizmu sisara. Pored anaboličkog uticaja na metabolizam organskih materija (ugljenih hidrata, masti i proteina) ima značaj i za pravilan rast i razvoj organizma kao celine. Kod monogastričnih životinja glavna uloga insulina je da pospešuje korišćenje glukoze kao izvora energije. Budući da u jetru preživara dospeva

veoma mala količina glukoze iz krvi i digestivnog trakta, uticaj insulina na metabolizam glukoze u jetri preživara je od manjeg značaja nego kod monogastričnih životinja. Kod preživara, međutim, insulin ima daleko veći značaj u regulaciji metabolizma masti (McNamara i sar., 1995; Komatsu i sar., 2005). S obzirom da kod njih glukoza nije glavni izvor energije i da je masno tkivo glavno mesto lipogeneze, aktivnost insulina je usmerena pre svega na periferna tkiva. U ćelijama masnog tkiva insulin smanjuje razlaganje triglicerida, a pospešuje sintezu glicerola i masnih kiselina (Hayirli, 2006). Zato danas preovladava mišljenje da sniženje koncentracije insulina u krvi ispod fizioloških vrednosti u periodu posle teljenja, ima važnu ulogu u mobilizaciji masti iz telesnih depoa, koja za posledicu može da ima nastajanje postpartalnih metaboličkih oboljenja, kao što su masna jetra i ketoza (Bobe i sar., 2004; Šamanc i sar., 2008). Detaljan pregled najvažnijih uloga insulina u regulaciji metabolizam ugljenih hidrata i masti kod krava dat je u poglavlju 2.6.

2.3.2. Uloga hormona tireoidee

Među prvim i najbolje izučenim efektima endokrinog sistema na metabolizam molekula organskih materija bio je uticaj hormona štitaste žlezde na energetski metabolizam životinja i ljudi. Utvrđeno je da na metabolizam ugljenih hidrata utiču tako što dovode do bržeg ulaska glukoze u ćelije, povećanja intenziteta glikolize i glukoneogeneze. S druge strane, pod uticajem hormona tireoidee povećavaju se gotovo svi aspekti katabolizma masti, posebno lipoliza i oksidacija masnih kiselina na nivou ćelije (Huszenicza i sar., 2002). S obzirom na njihovo učešće u regulaciji prometa energije, kao i činjenicu da je najveći procenat poremećaja zdravlja visokomlečnih krava u peripartalnom periodu vezan upravo za poremećaje energetskog metabolizma, tireoidni hormoni zauzimaju posebno mesto u istraživanjima u ovoj oblasti naučno-istraživačkog rada. U tom pogledu, danas je opšte prihvaćeno da aktivnost tireoidee ima značajnu ulogu u patogenezi poremećaja metabolizma krava u peripartalnom periodu, kao i samog toka laktacije. Naime, brojna istraživanja su ukazala na čvrstu vezu između nivoa hormona ove žlezde u krvi i energetskog bilansa s jedne, i proizvodnih sposobnosti životinja s druge strane (Šamanc i sar., 1988; Capuco i sar., 1989; Oldenbroek i sar., 1989; Pezzi i sar., 2003).

Koncentracija hormona tireoidne žlezde tokom graviditeta kod krava je relativno visoka, da bi neposredno pre, a pogotovo nakon teljenja, nastao značajan pad njihove koncentracije u krvnoj plazmi, kada krave ulaze u funkcionalno hipotireoidno stanje (Jovanović i sar., 1988; Stojić i sar., 2001). Smatra se da su niske koncentracije tireoidnih hormona u krvi tokom rane laktacije posledica velikih metaboličkih zahteva zbog rastuće proizvodnje mleka (Nixon i sar., 1988; Capuco i sar., 1989, 1999). Koncentracija tireoidnih hormona u krvi krava podložna je cirkadijalnim i ultradijalnim varijacijama (Bitman i sar., 1994), a na nju utiče niz ambijentalnih i alimentarnih faktora, kao što su temperatura sredine, sastav i unos hranljivih materija obroka (McGuire i sar., 1991; Grum i sar., 1996; Blum i sar., 2000). Takođe, koncentracija tireoidnih hormona uslovljena je i snabdevenošću jodom i selenom (Wichtel i sar., 1996, Awadeh i sar., 1998), kao i prisustvom prirodnih ili sintetskih goitrogena (Browning i sar., 1998, 2000). Tabachnick i Korcek (1986) navode da slobodne masne kiseline inhibiraju vezivanje tiroksina za proteine nosače u krvnom serumu ljudi, što potvrđuje da masne kiseline mogu učestvovati u regulaciji transporta tiroksina u krvi. Ovaj efekat slobodnih masnih kiselina svakako treba uzeti u obzir prilikom razmatranja uticaja intenzivne lipomobilizacije na koncentraciju tireoidnih hormona u sistemskoj cirkulaciji i genezu hipofunkcije tireoidee u postpartalnom periodu. Veći broj autora (Kunz i sar., 1985; Furll i Schafer, 1993; Nikolić i sar., 2000) ustanovio je značajno niže koncentracije trijodtironina i tiroksina u krvi krava u uslovima negativnog bilansa energije i intenzivne lipomobilizacije od fizioloških vrednosti.

Riis i Madsen (1985) smanjenu sekreciju tiroksina smatraju vidom metaboličke adaptacije na negativan bilans energije na početku laktacije i potencijalno ključnim procesom u prilagođavanju perifernih tkiva na povećane metaboličke zahteve mlečne žlezde. Nikolić (1996) smatra da zbog smanjene aktivnosti tireoidnih hormona u krvi dolazi do opadanja prometa energije na sistemskom nivou, kao i nivoa bazalnog metabolizma. Ovaj adaptivni mehanizam omogućava korišćenje energije iz telesnih rezervi masti za potrebe visoke proizvodnje mleka (Squires, 2003). U energetsom pogledu, ovaj mehanizam je koristan, međutim kada se koncentracija tireoidnih hormona spusti ispod kritičnih vrednosti (1,3 nmol/L), on postaje značajan etiopatogenetski faktor u nastanku poremećaja zdravlja. Razlog za to je nekontrolisana lipomobilizacija i nakupljanje masti u

parenhimatoznim organima, prvenstveno jetri. Kovačević i sar. (2005) ustanovili su visoko značajnu pozitivnu korelaciju između koncentracije neesterifikovanih masnih kiselina u krvi i stepena zamašćenja jetre i kod ugojenih i kod kontrolnih krava. Uporedo sa tim, ovi autori su ustanovili negativnu korelaciju između koncentracije trijodtironina i stepena zamašćenja jetre tokom puerperijuma. Navedeni autori su kod 70% ugojenih i 30% krava optimalne telesne kondicije ustanovili hipotireoidizam i visok stepen zamašćenja jetre, što ukazuje da gojaznost nije jedini etiološki faktor koji utiče na pojavu i intenzitet zamašćenja jetre (Kovačević i sar., 2005). Veći broj autora povezuju difuzno zamašćenje hepatocita sa stanjem hipofunkcije štitaste žlezde, tumačeći ga smanjenim kapacitetom mitohondrija hepatocita da oksidišu prispele masne kiseline (Kapp i sar., 1979; Šamanc i sar., 1988). Naime, dobro je poznato da je intenzitet oksidativne fosforilacije u mitohondrijama u direktnoj vezi sa koncentracijom tireoidnih hormona, tako da se smatra da je u uslovima negativnog bilansa energije i intenzivne lipomobilizacije sniženje trijodtironina i tiroksina u krvi važan etiopatogenetski faktor u nastanku zamašćenja jetre. Ove navode potvrđuju i kasniji rezultati Šamanca i sar., (2000, 2005, 2010, 2011) koji su upravo kod krava sa najtežim oblicima zamašćenja jetre ustanovili najniže koncentracije tireoidnih hormona u krvi. Takođe, Šamanc i sar. (2010) ističu naročiti značaj smanjene aktivnosti tireoidne žlezde još u prepartalnom periodu kao faktora rizika za pojavu masne jetre.

Hormoni tireoidee ispoljavaju pozitivan uticaj na lučenje insulina i njegove periferne efekte. Pod uticajem trijodtironina nalazi se transkripcija proteina transportera glukoze koji je transportuju pod dejstvom insulina (Weinstein, 1977). Smanjenje broja receptora za insulin tokom peripartalnog perioda (*down regulation*) slabi odgovor tkiva na insulin, posebno u masnom tkivu, gde zbog izostanka recikliranja receptora izostaje njegov anabolički efekat, a jača lipolitički efekat glukagona i drugih lipolitičkih hormona. Već je istaknuto da hormoni tireoidee pospešuju metabolizam glukoze. Istovremeno, podstiču i degradaciju insulina u jetri, kao i razlaganje glikogena (Sekulić, 1985). Bernal i de Groot (1980) navode da male doze tireoidnih hormona pospešuju sintezu glikogena, dok više dovode do glikogenolize. Isti autori su ustanovili da tireoidni hormoni kontrolišu aktivnost nekih enzima koji učestvuju u metabolizmu ugljenih hidrata, a za indikator indeksa perifernog delovanja ističu alfa-glicerofosfat dehidrogenazu.

2.3.3. Uloga glukokortikoida

Glukokortikoidi ispoljavaju mnogobrojne efekte na metabolizam molekula organskih materija. Neki od ovih efekata su direktni, dok su ostali posledica sinergističkog delovanja sa drugim hormonima na metaboličke procese u ciljnim tkivima. Najjači uticaj imaju na proces glukoneogeneze u jetri, a stimulišu i sintezu glikogena u jetri, aktivirajući glikogen sintetazu, ali istovremeno povećavaju i aktivnost glukozo-6-fosfataze, što izaziva pojačano oslobađanje glukoze iz jetre i porast njene koncentracije u krvi. Ipak, novija saznanja upućuju da kortizol nije glavni kratkoročni regulator homeostaze glukoze, ali jeste važan u procesima dugoročnog snabdevanja tkiva energijom (Šamanc i Kirovski, 2008).

Od ranije je poznato da glukokortikoidi štite organizam od hipoglikemije u stanjima kada je značajno povećana potreba za glukozom kao izvorom energije (Baird, 1982). Dokazana je njihova uloga u obezbeđenju prekursora iz endogenih izvora (aminokiselina) i uticaju na aktivnost enzima glukoneogeneze (Fleig i sar., 1984; Lay i sar., 1992). Pored toga, glukokortikoidi pojačavaju efekat glukagona i epinefrina kada je umanjena dostupnost glukoze ćelijama, i istovremeno inhibiraju efekat insulina na energetski metabolizam. Ovaj antiinsulinski efekat glukokortikoidi ostvaruju smanjenjem afiniteta insulinskih receptora za insulin, čime inhibiraju fosforilaciju glukoze (Šamanc i Kirovski, 2008). Zbog ovoga, dugotrajna administracija glukokortikoida može da dovede do takozvanog steroidnog dijabetesa. S druge strane, životinje kod kojih je nedovoljna aktivnost kore nadbubrežnih zlezda izuzetno su osetljive na insulin. U ćelijama mišićnog i masnog tkiva, glukokortikoidi sprečavaju translokaciju GLUT-1, 4 molekula iz citoplazme u ćelijsku membranu. Time se dodatno smanjuje korišćenje glukoze od strane ćelija mišićnog i masnog tkiva. Glukokortikoidi imaju blag lipolitički efekat (Bell, 1995). Oni mobilišu masne kiseline iz ćelija masnog tkiva i sprečavaju preuzimanje masnih kiselina i sintezu masti u njima. Kao što je već navedeno, glukokortikoidi ispoljavaju permisivno delovanje na proces mobilizacije masnih kiselina, na taj način što pojačavaju efekat glukagona, epinefrina i hormona rasta (Bell i Bauman, 1997). Interesantno je da glukokortikoidi u normalnim koncentracijama pojačavaju efekte insulina na iskorišćavanje glukoze u ćelijama, stimulišu glikogenolizu i lipogenezu (Šamanc i Kirovski, 2008).

Navedeni podaci upućuju na potrebu da se pitanje funkcionalne aktivnosti kore nadbubrega razmatra u kontekstu većeg broja činjenica.

2.3.4. Uloga hormona rasta

Hormon rasta ili somatotropni hormon (STH) se ubraja u grupu hormona sa naj snažnijim homeoretskim delovanjem kod visokomlečnih krava, koji može da utiče na tok metaboličkih procesa i menja aktivnost homeostatskih regulatornih mehanizama (Bauman, 1999). Nivo somatotropina u krvnoj plazmi krava se povećava krajem graviditeta, sa maksimalnom koncentracijom u toku partusa, posle čega dolazi do njegovog sniženja. Za vreme laktacije nivo STH je umereno povišen i smatra se da je kod preživara mnogo važnije njegovo delovanje od dejstva prolaktina na lučenje mleka (Bell, 1995). Naime, važan faktor u održavanju eutireoidnog stanja u mlečnoj žlezdi jeste upravo potencirajući efekat somatotropnog hormona na aktivnost enzima dejodinaze (DIO2) i stepen dejodinacije tiroksina u metabolički aktivniji trijodtironin (Capuco i sar., 1989; Kahl i sar., 1995). Ranu laktaciju karakteriše smanjena hormonom rasta stimulirana sekretorna sposobnost jetre za insulinu-sličan faktor rasta I (IGF-I) i ovaj fenomen je poznat kao „dekuplovanje“ STH–IGF osovine (raskidanje somatotropne osovine) (Radcliff i sar., 2003; Rhoads i sar., 2004, Lucy, 2008). Raskidanje negativne povratne sprege između IGF-I i hipotalamusa ima za rezultat povećanje koncentracije STH u krvi (Doepel i sar., 2002; Zulu i sar., 2002; Rhoads i sar., 2004). Dokazano je da je ponovno uspostavljanje STH-IGF-I osovine tesno povezan sa energetske statusom jedinke, što se smatra direktnom posledicom delovanja insulina: obilna ishrana krmnim smešama ili egzogena aplikacija insulina ima za rezultat povećanje sinteze (mRNK) STH receptora i IGF-I molekula u hepatocitima, porast koncentracije IGF-I, a pad koncentracije somatotropnog hormona u krvi krava (Ingvarsen i sar., 2001; Mashek i sar., 2001; Molento i sar., 2002; Rhoads i sar., 2004; Lucy, 2008). Uporedo sa tim, u ovakvim okolnostima dolazi i do pojačane sinteze (mRNK) receptora za hormon rasta u ćelijama masnog tkiva, što dodatno potencira osetljivost masnog tkiva na stimulatívni uticaj hormona rasta (Butler i sar., 2003). Stoga, sasvim se opravdano smatra da je uloga hormona rasta za održavanje uravnoteženog

energetskog metabolizma od najvećeg značaja u uslovima povećanih zahteva za energetskim prekursorima i/ili njihovog nedovoljnog priliva u odnosu na postojeće potrebe, a što se događa za vreme rane laktacije, odnosno stanja negativnog bilansa energije.

Sve više je jasno, da hormon rasta ima ključnu ulogu u obezbeđenju mlečne žlezde neophodnim količinama prekursora. Efekat STH na proizvodnju mleka je veoma dobro proučen: povećanje proizvodnje mleka za 10 do 20 procenata, izraženiji pik i perzistentnost proizvodnje mleka su ustanovljeni nakon parenteralne aplikacije STH (Davis i sar., 1988; Sechen i sar., 1989; Etherton i Bauman, 1998), pri čemu se ovi efekti mogu pripisati delovanju hormona rasta na mlečnu žlezdu i druge organske sisteme (Bell i Bauman, 1997; Etherton i Bauman, 1998). Hormon rasta pojačava minutni volumen srca i protok krvi kroz mlečnu žlezdu (Davis i sar., 1988), a time povećava njenu sintetsku aktivnost (Knight i sar., 1990; Baldwin i Knapp, 1993). Posebno je značajna činjenica da STH povećava količinu raspoloživih energetskih prekursora za sintezu mleka, bez propratnog povećanja unosa suve materije obroka, što ukazuje da se povećanje proizvodnje mleka ostvaruje na račun hranljivih materija mobilisanih iz telesnih depoa (Bauman i sar, 1988;. Sechen i sar, 1989; 1990). Naime, pouzdano je utvrđeno da više promena u metabolizmu krava u laktaciji tretiranih somatotropinom nastaje zbog izmene osetljivosti perifernih tkiva na insulin i kateholamine, kakve mogu da se sretnu i za vreme peripartalnog perioda (Bauman i Vernon, 1993; Etherton i Bauman, 1998). Ova istraživanja su pokazala da *in vivo* tretman somatotropinom smanjuje stepen lipogeneze i inhibira ključne enzime (acetil-CoA karboksilaza) koji učestvuju u tom procesu u masnom tkivu. Takođe, parenteralna aplikacija STH utiče na porast osetljivosti masnog tkiva prema adrenergičkim agonistima na taj način što povećava broj β -adrenergičkih receptora i/ili smanjuje antilipolitički uticaj adenzina (Houseknecht i Bauman, 1997; Drackley, 2000). Ovi podaci jasno ukazuju na jedan od glavnih efekata hormona rasta da menjajući odgovor masnog tkiva na insulin i kateholamine, pojačava rezistenciju na insulin i/ili stimuliše kataboličke procese u masnom tkivu (Bauman i Vernon, 1993, Bell, 1995, McNamara, 1997). To ima za rezultat intenziviranje procesa lipolize iz telesnih depoa i obezbeđenje mlečne žlezde neophodnim količinama prekursora. Takođe, utvrđeno je da hormon rasta pored toga što stimuliše lipolizu, istovremeno smanjuje ekstramamarno korišćenje glukoze i aminokiselina na račun

povećanog korišćenja viših masnih kiselina, pre svega u mišićnom tkivu (Tyrrell i sar., 1988). U mišićnom i masnom tkivu u *in vitro* uslovima, STH smanjuje ekspresiju i translokaciju GLUT 4 (Zhao i Keating, 2007) i u skladu je sa delovanjem STH koji smanjuje oksidaciju glukoze u organizmu i, tako obezbeđuje adekvatan priliv glukoze u mlečnu žlezdu u *in vivo* uslovima (Bauman i sar., 1988). U jetri, ovaj hormon stimuliše i proces glukoneogeneze posredstvom glicerola koji se oslobađa iz masnog tkiva, a smatra se da tome doprinosi i smanjenjem inhibitornog uticaja insulina na enzime glukoneogeneze (Dunshae i sar., 1992; Knapp i sar., 1992; Bell i Bauman, 1997).

Svi navedeni podaci podržavaju koncept da hormon rasta indukuje promene u senzitivnosti i odgovoru tkiva na insulin. To doprinosi štednji glukoze, intenziviranju procesa glukoneogeneze i lipolize kod krava na početku laktacije.

2.4. Odlike metabolizma i hormonalnog statusa ugojenih krava

Generalno, metabolizam ugljenih hidrata i masti ugojenih krava karakterišu nepromenjena do smanjena glukoneogeneza u jetri uz smanjenje utilizacije glukoze u perifernim tkivima; nepromenjena ili smanjena utilizacija acetata; pojačana mobilizacija masnih kiselina iz telesnih rezervi praćena povećanjem njihovog nakupljanja u jetri i/ili utilizacije u perifernim tkivima (Rukkwamsuk i sar., 1998; 1999).

Iako je dosta ispitivano u pogledu strategije ishrane krava u tranzicionom periodu, ne postoji jedinstvena strategija koja bi se mogla primeniti na sve zapate, mada se danas smatra da je restriktivna ishrana bazirana na kabastim hranivima pouzdan način da se minimizira neizbežan pad unosa suve materije neposredno posle teljenja (Janovick i sar., 2011). Postoji sve više dokaza da ograničavanjem unosa energije preko hrane u periodu zasušenja dovodi do bržeg porasta unosa suve materije obroka posle teljenja, što ima za rezultat uravnoteženiji energetske promet i smanjenu mobilizaciju masnih kiselina iz telesnih rezervi, i sledstveno tome niže vrednosti NEFA i BHBA u krvi (Dann i sar., 2006). Nasuprot tome, primećeno je da krave koje još u periodu zasušenja unose hraniva visoke energetske vrednosti i/ili ugojene krave više gube u telesnoj masi, imaju izraženiju lipomobilizaciju i duže trajanje perioda negativnog bilansa energije u toku rane faze

laktacije (Reid i sar., 1986; Ingvarlsen i sar., 1995). Utvrđeno je da krave koje su bile pregojene u periodu zasušenja, posle teljenja imaju sporiji porast unosa suve materije obroka u odnosu na povećanje potreba za sintezu sastojaka mleka (Treacher i sar., 1986; Hayirli i sar., 2002). Kao rezultat, deficit između unosa energije putem hrane i potreba krava u energetske prekursorima je znatno veći kod ugojenih nego kod krava optimalne telesne kondicije (Rukkwamsuk i sar., 1999, 2000; Agenäs i sar., 2003). Stoga, sasvim je opravdano pretpostaviti da krave koje u periodu zasušenja deponuju više energetskih prekursora u telesne depoe su sklonije jače izraženom negativnom bilansu energije neposredno posle teljenja, sa početkom laktacije. Kao posledica jače izraženog negativnog bilansa energije, intenzivira se mobilizacija masnih kiselina iz telesnih rezervi, što predisponira ove životinje većem stepenu zamašćenja ćelija jetre. Neretko, ovaj proces može da evoluiru u patološko stanje, kada narušavanjem morfološkog i funkcionalnog integriteta hepatocita ima negativne posledice na proizvodne, zdravstvene i reproduktivne pokazatelje životinja (Bobe i sar., 2004; Šamanc i sar., 2005, 2008, 2010, 2011). Ovi nalazi jasno ukazuju da postoje značajne razlike u prometu materija, odnosno energije kod životinja u zavisnosti od fiziološkog i stanja uhranjenosti.

Iako se tačan uzrok smanjenog unosa suve materije obroka kod ugojenih krava još uvek ne zna, danas se smatra da je dobrim delom uslovljen hormonalnim promenama koje se dešavaju u periodu oko teljenja. Budući da je kod ugojenih krava tokom pozitivnog bilansa energije metabolizam pod dugotrajnim i jakim uticajem insulina (Holtenius i sar., 2003), veruje se da insulin može da utiče na potrebu za uzimanjem hrane utičući na metabolizam u jetri (inhibira glukoneogenezu) i raspodelu hranljivih materija (Bradford i Allen, 2007). To je u skladu sa hipotezom po kojoj smanjeno korišćenje propionata u procesu glukoneogeneze posledično dovodi do većeg korišćenja propionata u oksidativne svrhe i smanjenog apetita krava (Allen i sar., 2005). Međutim, potencijalna uloga insulina kao dugoročnog regulatora unosa hranljivih materija je pod znakom pitanja, jer kod goveda ipak nije utvrđena tako čvrsta zavisnost između gojaznosti i insulinemije kao kod nekih drugih vrsta (Polansky i sar., 1988; Meikle i sar., 2004). Za razliku od insulina, visoko značajna pozitivna korelacija je utvrđena između stanja uhranjenosti (veliĉine adipocita) i koncentracije leptina u krvi krava (Ehrhardt i sar., 2000; Chilliard i sar., 2001; Block i sar.,

2003). Stoga, poslednjih godina, posebna pažnja je posvećena rasvetljavanju potencijalne uloge leptina (16-kDa protein koga luče adipociti) u procesima regulisanja unosa hranljivih materija i energetskog metabolizma kod preživara. Na osnovu podataka proisteklih iz eksperimenata na ljudima, pacovima i naročito ovcama, vrlo je verovatno da leptin igra važnu ulogu u regulisanju unosa hrane i kod preživara (Vernon i sar., 2002; Bradford i sar., 2006). Koncentracije drugih hormona takođe se menjaju u krvi krava koje se hrane „pojačano“ za vreme pozitivnog bilansa energije. To su u prvom redu hormoni regulatori reproduktivne funkcije životinja, naročito estrogen, čija koncentracija značajno raste u kasnoj fazi graviditeta kod ugojenih krava. Naime, kod ljudi i većeg broja životinjskih vrsta, uključujući i preživare, dokazano je da masno tkivo u uslovima jače izraženog pozitivnog bilansa energije, pod uticajem insulina ispoljava pojačanu steroidnu aktivnost (Butler i sar., 2004; Peng, 2011).

Ove promene u hormonalnoj konstelaciji odražavaju se u značajnoj meri na sve mehanizme koji su odgovorni za prilagođavanje organizma na uslove negativnog bilansa energije, funkciju mlečne žlezde i reproduktivnih organa.

2.5. Patogeneza metaboličkih poremećaja ugojenih krava

Tokom perioda zasušenja metabolizam je pod jakim uticajem insulina, dominiraju anabolički procesi i postoji velika opasnost da nastane pozitivan bilans energije i suficit proteina, odnosno da dođe do disbalansa između metaboličke aktivnosti i telesne mase tih životinja. Ovaj disbalans energije može da bude više izražen ukoliko udeo smeše u obroku nije prilagođen padu mlečnosti i/ili kada se u zasušenju koriste hraniva bogata energijom, pogotovo kada se životinje hrane *ad libitum* (Dann i sar., 2006; Douglas i sar., 2006). Pri tome, gojenju su naročito sklone junice koje se ne osemenjavaju u optimalno vreme telesnog i polnog razvića, već mnogo kasnije, kao i starije krave kod kojih je produžen servis period. Nastanak suficita energije na kraju perioda laktacije i u zasušenju osnovni je uzrok znatnog povećanja telesne mase životinja, ali isključivo na račun uvećanja depoa masti u telu (Bobe i sar., 2004; Blewey i Schutz, 2008; Šamanc i sar., 2008, 2010). Pri tome, uvećanje masnog tkiva može da se odvija hiperplazijom i hipertrofijom, ali je

naročito kod odraslih preživara promena u veličini adipocita (hipertrofija) dominantan način uvećanja telesnih rezervi masti u periodu zasušenja (Peng, 2011).

Odavno je zapaženo da ishrana visokomlečnih krava u zasušenju i ranoj fazi laktacije ima velikog udela u pojavi mnogobrojnih faktora rizika za nastanak poremećaja u metabolizmu, koji nepovoljno utiču kako na proizvodne rezultate, tako i na reproduktivnu sposobnost životinja (Grummer, 1992; Greenfield i sar., 2000). Brojna istraživanja su nedvosmisleno pokazala da se poremećaji metabolizma u najvećem procentu javljaju u peripartalnom periodu, i u čvrstoj su korelaciji sa energetske statusom životinja koji je najvećim delom uslovljen ishranom u svim fazama proizvodno-reproduktivnog ciklusa (Bell, 1995; Herdt, 2000). Danas je opšte prihvaćeno da su preobilna ishrana i gojaznost krava u periodu zasušenja ($BCS \geq 4.0$) dominantni etiopatogenetski činioci u nastajanju metaboličkih oboljenja, što je usko skopčano sa promenama u aktivnosti neuroendokrinog i imunskog sistema kod tih životinja (Bobe i sar., 2004; Leblanc, 2010; Šamanc i sar., 2010).

2.5.1. Poremećaji metabolizma masti i ugljenih hidrata

Uzrok pojave promena u metabolizmu kod ugojenih krava je višestruk. Opšte je prihvaćeno da regulacija i održivost energetskog metabolizma krava zavisi, u prvom redu, od disbalansa između potreba krava za energijom, s jedne strane, i kapaciteta organa za varenje (mogućnosti unošenja energije preko hrane) i kapaciteta organizma da koristi energiju koja se nalazi deponovana u telesnim rezervama, s druge strane (Jorritsma i sar., 2003; Grummer, 2008). Naime, krave koje su pregojene u periodu pre teljenja imaju slabiji apetit u odnosu na krave optimalnog stanja uhranjenosti. Smanjen apetit kod njih je posledica povećane sekrecije adipocitokina ($TNF\alpha$ i IL-6), ali i visoke koncentracije hormona (leptina i insulina) što deluje inhibitory na unos hrane. Zbog toga je, u periodu odmah nakon teljenja, kada je apetit smanjen, unos energije putem hrane nedovoljan da obezbedi energiju potrebnu za rastuću laktaciju. Ovaj negativan bilans energije (NEB) dovodi do niza promena u metabolizmu koje imaju za posledicu intenziviranje procesa mobilizacije masnih kiselina iz telesnih rezervi. Metabolička sudbina NEFA u jetri je višestruka i zavisi od njihove koncentracije u cirkulaciji, faze proizvodno-reproduktivnog

ciklusa i metaboličkog potencijala svake jedinke. Nezavisno od navedenih faktora, u slučajevima pojačanog priliva NEFA u jetru, značajno je povećana aktivnost enzima uključenih u sintezu triglicerida (Rukkwamsuk i sar., 1999; Xu i sar., 2011), koji se potom u vidu VLDL transportuju iz jetre za potrebe mlečne žlezde. Povećana lipomobilizacija dodatno smanjuje apetit jer porast koncentracije masnih kiselina u krvi inhibira unos hrane kod životinja, zbog posledičnog povećanja nivoa masnih kiselina i njihovih KoA estara u hipotalamusu (Zurek i sar., 1995; Drackley i sar., 2005). S druge strane, odavno je poznato da kod jače izraženog negativnog bilansa energije intenzivna lipomobilizacija može da utiče na funkcionalni integritet hepatocita (Drackley i sar., 1991). Utvrđeno je da je konverzija propionata u glukozu smanjena infiltracijom hepatocita sa lipidima, a takođe je smanjen kapacitet ćelija jetre za ureagenezu (Rukkwamsuk i sar., 1998). U ovakvim okolnostima, za pravilan promet masti i ugljenih hidrata, presudna je uloga piruvat karboksilaze, enzima čija je aktivnost stimulisana prisustvom supstrata (laktat, aminokiseline i propionat), ali je takođe dokazano da neke masne kiseline (stearinska) suprimiraju njenu aktivnost (Donkin, 2011; White i sar., 2012). Stoga, može se pretpostaviti da promene u koncentraciji i profilu masnih kiselina u peripartalnom periodu (Rukkwamsuk i sar., 2000) mogu suprimirati aktivnost ovog enzima u vreme kada su značajno povećani zahtevi za glukoneogenezom i oksidacijom prispelih masnih kiselina u jetri. Pored toga, ugojene krave imaju nižu koncentraciju karnitina u hepatocitima što dodatno smanjuje kapacitet hepatocita za oksidaciju masnih kiselina (Piepenbrink i Overton, 2003). Ovakav razvoj metaboličkih procesa ima za posledicu pojačano nakupljanja triglicerida u hepatocitima i smanjen intenzitet glukoneogeneze koji ne može da zadovolji potrebe za glukozom u vremenu visoke laktacije što se manifestuje nastankom hipoglikemije i intenziviranjem procesa ketogeneze (Herdt, 2000; Šamanc i sar., 2011).

Rezultati istraživanja većeg broja autora su pokazali da izrazito pozitivan bilans energije krava u zasušenju dovodi do narušavanja ravnoteže između anaboličkih i kataboličkih procesa u masnom tkivu još u visokom graviditetu. Međutim, još uvek je nejasno koji mehanizmi obezbeđuju kontrolu procesa mobilizacije masti pri različitim energetskeim zahtevima organizma. Mnoge činjenice ukazuju da je promena u veličini adipocita odgovorna za većinu promena na nivou masnog tkiva (Bobe i sar., 2004; Blewey i

Schutz, 2008). U tom pogledu, utvrđeno je da mnogobrojne promene u metaboličkoj aktivnosti određenih tkiva koje se kod visokomlečnih krava odvijaju tokom zasušenja i rane faze laktacije su posredovane najvećim delom promenama u odgovoru na homeostatske signale koje iniciraju insulin i epinefrin (Bell i Bauman, 1997). Smanjen odgovor ovih tkiva na insulin uzima se uopšteno kao pokazatelj insulinske rezistencije (Hayirly, 2006). Kao što je već navedeno, neki aspekti insulinske rezistencije (vezani za skeletne mišiće) su korisni zbog štednje glukoze za potrebe gravidnog uterusa i mlečne žlezde. S druge strane, veruje se da smanjena osetljivost masnog tkiva na insulin može da doprinese povećanju koncentracije viših masnih kiselina u cirkulaciji i smanjenju unosa suve materije obroka kako se bliži teljenje. Allen i sar. (2005) su izneli hipotezu po kojoj povećanje koncentracije NEFA u krvnoj plazmi tokom perioda zasušenja i posledična oksidacija NEFA u jetri može da bude uzrok smanjenog apetita krava kako se bliži teljenje. Ovi rezultati jasno ukazuju da smanjena osetljivost masnog tkiva na insulin bi predisponirala krave da mobilišu više NEFA, na taj način stvarajući *circulus viciosis* mobilizacije NEFA i smanjenog unosa suve materije obroka tokom kasnog prepartalnog perioda. Takođe, to će pomoći da se sa metaboličkog aspekta objasni zašto ugojene krave imaju slabiji apetit i izraženiji pad unosa suve materije još u prepartalnom perioda negoli krave optimalne ili suboptimalne telesne kondicije (Grummer i sar., 2004).

Novija istraživanja su podržala ranije spekulacije oko povezanosti medijatora zapaljenja i poremećaja metabolizma krava. Ametaj i sar. (2005) su ustanovili povišene koncentracije brojnih markera zapaljenja u krvnoj plazmi krava sa masnom jetrom. Slične rezultate su objavili Ohtsuka i sar. (2001) koji su utvrdili povišenu TNF- α aktivnost kod krava sa umerenim do težim stepenom masnih promena na jetri. Nedavno, mastitis indukovan endotoksinom je doveo do promena u ekspresiji gena važnih za metabolizam, a pogotovo je smanjena bila ekspresija gena uključenih u proces glukoneogeneze (Jiang i sar., 2008). Looor i sar. (2006) su čak ustanovili povećanu ekspresiju gena povezanih sa proinflamatornim citokinima kod krava koje su unosile više energije nego što su stvarne potrebe organizma u periodu zasušenja. Iako značaj inflamacije u tranzicionim poremećajima metabolizma visokomlečnih krava postaje sve jasniji, mogući putevi koji dovode do inflamacije su ipak nedovoljno poznati. Infekcije svakako iniciraju ove

poremećaje kod nekih, ali sigurno ne i kod svih krava, a posebno kod krava sa naglašenom telesnom kondicijom (Morow, 1979). Pored akutnih inflamatornih reakcija, pokazano je da hronična zapaljenja blažeg stepena mogu da igraju ulogu u tranzicionim poremećajima. Početkom 90-ih godina prošloga veka otkriveno je da je masno tkivo imunokompetentan organ, što je kasnije potvrđeno i kod goveda (Mukesh i sar., 2010). Nakon ovih saznanja, na poremećaje metabolizma kod ljudi se sve više gleda kao proizvode inflamacije masnog tkiva blažeg stepena uzrokovane gojaznošću. Danas se masno tkivo smatra važnim generatorom TNF- α u cirkulaciji i dokazano je da je TNF- α povećan kod ugojenih jedinki više vrsta, uključujući ovce (Daniels i sar., 2003). Na osnovu ovih nalaza, jasno je da infekcija nije neophodna u etiologiji poremećaja metabolizma u tranzicionom periodu. U svakom slučaju, blaži stepen inflamacije koji prati stanje ugojenosti može da pomogne u razjašnjavanju sindroma masne jetre krava (Morrow, 1979).

Lipidni peroksidi se takođe pojavljuju kao verovatni medijatori koji povezuju plazma lipide i inflamaciju (Pessayre i sar., 2004). Kao što je poznato, lipidni peroksidi nastaju u reakciji lipida i slobodnih kiseonikovih radikala. Neki radikali kiseonika se stalno proizvode u jetri, međutim, novonastali odnosi u intermedijarnom metabolizmu na početku laktacije doprinose većoj produkciji slobodnih radikala. Naime, visokomlečne krave se adaptiraju na povećan priliv NEFA u jetri na taj način što povećavaju kapacitet ćelija jetre za njihovu oksidaciju u mitohondrijama, ali i u peroksizomima (Piepenbrink i Overton, 2003) kao alternativnom putu oksidacije viših masnih kiselina. Međutim, na ovaj način povećava se oksidativni kapacitet ćelije, ali prvi korak na ovom putu generiše vodonik peroksid umesto NADH (Drackley, 1999). Na osnovu iznetog može se pretpostaviti da životinje koje u peripartalnom periodu imaju naglašeno stanje uhranjenosti imaju veću sklonost ka stvaranju lipidnih peroksida (Bernabucci i sar., 2005). Lipidni peroksidi potom aktiviraju kaskadni niz inflamatornih reakcija koje, kao što je već istaknuto, dovode do gore opisanih promena u metabolizmu (Pessayre i sar., 2004).

Iz napred izloženog proističe da navedena stanja podstiču sistemsku inflamaciju u peripartalnom periodu, narušavajući imunsku funkciju čine krave podložnijim infekciji, usporavaju proces prilagođavanja metabolizma i na taj način povećavaju rizik za nastajanje mnogobrojnih metaboličkih poremećaja krava.

2.5.2. Masna jetra

Masna jetra se najčešće razvija tokom ranog postpartalnog perioda koje karakteriše izražen negativan bilans energije, ali u nekim slučajevima i pre teljenja, odnosno pre ulaska životinja u stanje negativnog bilansa energije (Šamanc, 2009).

Najčešći uzrok pojave masne jetre je preterana gojaznost krava u završnoj fazi graviditeta (Rukkwamsuk i sar., 1998). Dokazana je činjenica da krave čija je ocena telesne kondicije (OTK) 15 dana pre teljenja veća od 4, oboljevaju u znatno većem procentu od masne jetre nego krave koje su u tom periodu u optimalnoj (OTK < 3.75) telesnoj kondiciji (LeBlanc, 2010). Gojaznost krava međutim nije jedini uzrok masne jetre. Na to ukazuje činjenica da se masna jetra ne javlja kod svih pregojenih krava, kao i da se masna jetra javlja i kod krava koje su u poslednjoj fazi graviditeta imale optimalno stanje uhranjenosti (Morrow, 1979; Grummer, 1993; Drackly, 1999; Bobe i sar., 2004; Šamanc i sar., 2010).

Danas se smatra da nepravilno prilagođavanje endokrinog sistema u peripartalnom periodu može biti jedan od ključnih činilaca odgovornih za nastajanje nekontrolisane lipomobilizacije i većeg stepena zamašćenja jetre. Tu se, pre svega, misli na aktivnost endokrinog pankreasa i tireoidee. Smanjenje koncentracije hormona ovih žlezda u krvi krava u peripartalnom periodu, naročito na početku laktacije, omogućava korišćenje i preusmeravanje telesnih rezervi organizma za potrebe mlečne žlezde. Naime, poznato je da tireoidni hormoni usmeravaju slobodne masne kiseline, dospеле u hepatocite nakon lipolize u masnom tkivu, ka potpunoj oksidaciji. U slučaju smanjene koncentracije tireoidnih hormona, kao što je to slučaj odmah nakon teljenja, dolazi do slabljenja intenziteta ovog metaboličkog puta a pojačava se proces reesterifikacije masnih kiselina i sinteze triglicerida u hepatocitima. To je dobar primer metaboličke i hormonalne adaptacije organizma na visoku proizvodnju mleka. Međutim, ukoliko je pad koncentracija tireoidnih hormona izraženiji, to može da bude i uzrok narušavanja metaboličke ravnoteže sa posledničnim nakupljanjem masti u parenhimatoznim organima, pre svega u jetri (Nikolić i sar., 2003). Posebnu opasnost za pojavu masne jetre predstavlja hipotireoza ispoljena još u periodu zasušenja (Šamanc i sar., 2010b). Kao što je već izneto, u peripartalnom periodu u krvi krava nastaju značajne promene i u koncentraciji insulina, koji je jedan od najvažnijih

anaboličkih hormona. Koncentracija insulina u krvi se snižava u poslednjim danima graviditeta i najniže vrednosti dostiže u toku ranog puerperijuma, tako da se smanjuje i inhibitorni uticaj insulina na proces lipolize. Ovo predstavlja još jedan vid endokrine adaptacije na visoku mlečnost. Smatra se da i visoke koncentracije estrogena u krvi krava pre partusa mogu da imaju značajnu ulogu u nastajanju težeg stepena zamašćenja jetre (Grummer, 1993; Bremmer i sar., 1999). Naime, visoke koncentracije estrogena stimulišu enzimske sisteme u hepatocitima koji usmeravaju metabolički put ka reesterifikaciji. Pored toga, povećava se osetljivost masnog tkiva na lipolitičke hormone kao što su kateholamini, najverovatnije zbog porasta koncentracije estrogena, hormona rasta i prolaktina koji je karakterističan za period oko teljenja (McNamara, 1988). U periodu ranog puerperijuma kod visokomlečnih krava postoji veoma širok raspon koncentracija hormona rasta i insulina u krvi što pospešuje proces lipolize u masnom tkivu. Istovremeno je smanjeno stvaranje IGF-I u hepatocitima zbog čega je dodatno pojačano lipolitičko dejstvo hormona rasta. Praktično, uticaj ovih hormona na promet masti u ćelijama jetre je indirektan, i odvija se regulacijom intenziteta lipolize u masnom tkivu i promenom nivoa viših masnih kiselina u krvi (Bines i sar., 1982). Prema tome, može se pretpostaviti da u nastanku masne jetre odnos homeostatskih i homeoretskih hormona ima odlučujuću ulogu, s tim, da od sastava obroka u punoj meri zavisi njihov međusobni odnos.

U etiologiji nastanka zamašćenja jetre određenu ulogu ima i genetska predispozicija za proizvodnju mleka. Bobe i saradnici (2004) su ustanovili masnu infiltraciju i degeneraciju hepatocita većeg stepena kod 66 % krava koje su u prethodnoj laktaciji imale prosečnu proizvodnju mleka od 7400 litara, a svega kod 30 % životinja kod kojih je proizvodnja mleka u prethodnoj laktaciji bila prosečno oko 4000 litara. Pored navedenih etioloških činilaca u nastajanju masne jetre učestvuju i drugi faktori koji svoje puno delovanje ispoljavaju tek u sadejstvu sa gore navedenim faktorima. Tako je Schulze (1985) utvrdio da postpartalna hipofosfatemija ima značajnu ulogu u nastanku masne jetre.

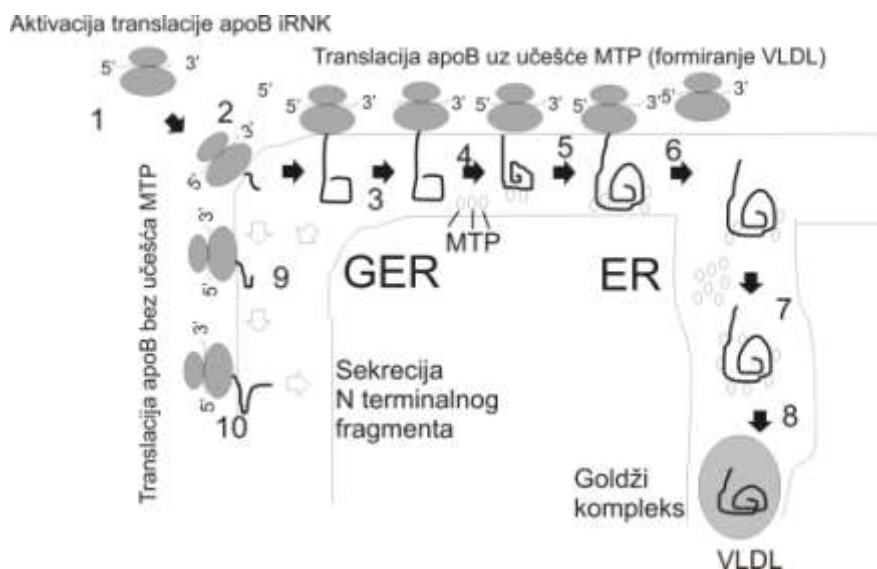
Opšte je prihvaćeno da do pojave masne jetre dolazi kada preuzimanje i/ili *de novo* sinteza masnih kiselina prevaziđe kapacitet njihove oksidacije i sekrecije iz hepatocita. Pri tome treba podsetiti da se kod preživara, za razliku od nepreživara, *de novo* sinteza masnih kiselina gotovo i ne odigrava u jetri (Drackley, 2000). Upravo je zbog toga uzrok masne

jetre kod preživara pojačani priliv masnih kiselina u hepatocite, a ne njihova *de novo* sinteza u većem obimu. S toga, u slučajevima kada je priliv masnih kiselina u hepatocite veliki dominantan metabolički put masnih kiselina je usmeren ka sintezi triglicerida, koji se iz jetre ekskretuju uz pomoć VLDL. Razumljivo je da svi činioci koji dodatno ograničavaju oksidaciju masnih kiselina kao i oni koji remete sintezu VLDL doprinose pojavi masne jetre, jer se na taj način favorizuje nakupljanje triglicerida u hepatocitima

Kao što je poznato oksidacija masnih kiselina se odigrava u mitohondrijama i peroksizomima. Ulazak masnih kiselina dugih lanaca u mitohondrije je zavistan od energetskih zahteva ćelija i moguć je jedino posredstvom karnitina. Reakcija se odvija uz pomoć karnitin aciltransferaze I, koja se nalazi na unutrašnjoj strani spoljne membrane mitohondrija, a koja omogućava prenos acil grupa sa KoA na hidroksilnu grupu karnitina, gradeći acil karnitin. Nagrađeni acil karnitin ulazi u unutrašnjost mitohondrija, gde se acil grupa, prenosi na intramitohondrijalni KoA pod uticajem karnitin aciltransferaze II, koja se nalazi sa unutrašnje strane membrane mitohondrija. Oslobođen karnitin se opet vraća u citoplazmu. Ovaj proces je značajno poznavati jer nedostatak karnitina može da smanji kapacitet oksidacije masnih kiselina u mitohondrijama i time doprinese njihovoj većoj reesterifikaciji u trigliceride. S druge strane, dodavanje karnitina u hranu krava povećava njegovu koncentraciju u hepatocitima i tako, pozitivno utiče na oksidaciju masnih kiselina u mitohondrijama (Dann i Drackley, 2005). Takođe, karnitin može sintetisati u organizmu iz lizina dobijenog proteolizom. Na osnovu ovoga se može pretpostaviti da se sinteza karnitina može modulisati i dodavanjem aminokiselina (lizina i metionina) u hranu (Piepenbrink i Overton, 2003). Oko 49 % ukupne oksidacije masnih kiselina u hepatocitima preživara odigrava se u peroksizomima. Međutim, ovaj proces nije posredovan karnitinom, odnosno nije uslovljen energetskim zahtevima ćelije (Drackley i sar., 1991). Pokazano je da se ovaj proces može modulisati dodavanjem masti u hranu preživara (Drackley, 2000).

Ponovna esterifikacija masnih kiselina je proces koji se odigrava u jetri i dovodi do deponovanja triglicerida u citoplazmi hepatocita. Početnu reakciju esterifikacije katalizuje enzim glicerol 3 fosfat dehidrogenaza, čiji je koenzim NAD. Kako je hidroliza triglicerida kod preživara ograničena zbog smanjene aktivnosti lipoprotein lipaze i hepatične lipaze, stvoreni trigliceridi se kod njih, u najvećoj meri, uklanjaju iz hepatocita putem VLDL

(Piepenbrink i Overton, 2003). Međutim, u odnosu na druge vrste životinja i sinteza VLDL kod preživara je smanjena, što sve doprinosi bržem nakupljanju triglicerida u hepatocitima, pogotovo tokom prve tri nedelje nakon teljenja, kada je priliv masnih kiselina u jetru povećan. Na slici 4. prikazan je proces sinteze VLDL kod preživara.



Slika 4. *Sekrecija VLDL*. 1. Aktivacija translacije iRNK za apoB u citoplazmi. 2. Translacija i transport apoB (apoprotein B-100) u granularni endoplazmatski retikulum. 3. Savijanje N terminalnog kraja apoB. 4. Dodavanje triglicerida i holesterol estara na N terminalni region pomoću MTP (mikrozomalnog transfer proteina za trigliceride). 5. Dalja translacija i transport apoB u lumen. 6. Formiranje pred-lipoproteina. 7. Dalje dodavanje lipida pred-lipoproteinu. 8. Potpuno formirani VLDL. 9-10. Zaustavljen transport apoB i degradacija C-terminalnog kraja, koje dovodi do sekrecije fragmenta od 85 kDa.

Sinteza VLDL, odnosno lipoproteina bogatih trigliceridima, zahteva prisustvo triglicerida, fosfolipida, holesterola i holesterol estara i apoproteina (B-100, C-I, C-II, C-III, E-2, E-3 i E-4). Step en sinteze VLDL je određen količinom prekursora koji su prisutni u ćeliji, tako da nedostatak triglicerida, apoproteina-B 100 i fosfatidilholina može ograničiti sintezu VLDL. Danas se smatra da je nedostatak apoproteina-B 100 glavni faktor koji ograničava sintezu VLDL, a time doprinosi pojavi masne jetre jer je njegova sinteza

smanjena kod krava na početku laktacije (Gruffat i sar., 1997). Pored toga, nakupljanjem triglicerida u hepatocitima stepen sinteze apoproteina B-100 još više opada.

Nedostatak fosfatidil holina olakšava nastanak masne jetre jer je on neophodan za pravilnu konformaciju molekula apoproteina B 100, a time i sekreciju VLDL (shema 2.2). Fosfatidilholin se može sintetisati u organizmu, ali nedostatak holina i metionina uslovljava smanjenu sintezu fosfatidil holina u hepatocitima. Krave koje su debele pred teljenje imaju smanjen apetit, zbog čega je unos ovih prekursora u sintezi fosfolipida smanjen, što dodatno povećava predispoziciju za nastajanje masne jetre. Pored narušene glikolizacije apoproteina B-100, mogući mehanizmi smanjene sekrecije VLDL su smanjen transport VLDL od EPR do Goldži kompleksa, smanjeno stvaranje sekretornih vezikula i smanjena migracija sekretornih vezikula od Goldži kompleksa do ćelijske membrane.

Genetski faktori koji bi mogli da utiču na pojavu masne jetre obuhvataju mutacije koje bi uticale na resorpciju masti, njihov metabolizam u masnom tkivu ili na metabolizam i sekreciju masti u jetri. Do danas nije otkriven specifičan gen koji utiče na povećan nastanak masne jetre (Bobe i sar., 2004).

2.6. Uloga insulina u regulaciji metabolizma masti i ugljenih hidrata

Odavno je poznato da insulin pospešuje ulazak glukoze u ćelije perifernih - ekstrahepatičnih tkiva (Brockman, 1975), prvenstveno mišićnog i masnog tkiva (Jarrett i sar., 1974; Hayirli, 2006), tako što pojačava translokaciju proteina za transport glukoze na površinu membrane ovih ćelija (GLUT 4). Pored toga, insulin utiče na dalju sudbinu glukoze unutar ćelije, stimulišući aktivnost enzima glukokinaze koji fosforiliše glukozu u glukozo-6 fosfat (G6P). Na taj način se sprečava izlazak glukoze iz ćelije. Insulin takođe pokreće sintezu glikogena, depoa glukoze, povećavajući aktivnost glikogen sintaze, a suprimira aktivnost glikogen fosforilaze (O'Brien i Granner, 1990). Insulin suprimira aktivnost ključnih enzima sinteze glukoze u procesu glukoneogeneze: fruktozo-difosfataze, piruvat karboksilaze i fosfoenolpiruvat karboksikinaze (Barthel i Schmoll, 2003). Ipak, danas se smatra da se inhibitorni efekat insulina na proces glukoneogeneze u jetri

prvenstveno odvija indirektnim putem, smanjenjem sposobnosti glukagona da stimuliše ekspresiju enzima fosfoenolpiruvat karboksikinaze (Drackley i sar., 2001)

Kao što se može pretpostaviti, aktivnost insulina je usmerena pre svega na periferna tkiva. Budući da u jetru preživara dospeva veoma malo glukoze iz krvi i digestivnog trakta, uticaj insulina na metabolizam glukoze u jetri preživara je od manjeg značaja nego kod monogastričnih životinja (Faulkner i Pollock, 1990; Besong, 1996). Jetra nije insulin senzitivna organ (u odnosu na transport glukoze) jer se na površini hepatocita dominantno nalaze GLUT 2 čija je distribucija i aktivnost nezavisna od prisustva insulina u cirkulaciji. Ortmeyer i Hansen (1998) su ispitali uticaj insulina na aktivnosti glikogen sintaze i glikogen fosforilaze u tkivu jetre kod insulin-rezistentnih majmuna. U mišićnom tkivu je izostao stimulatívni efekat insulina na glikogen sintazu, kao i inhibirajućí efekat na glikogen fosforilazu. Ovaj efekat je postojao i u jetri insulin-rezistentnih majmuna (Ortmeyer i Hansen, 1998).

Da bi se odredio uticaj insulina na metabolizam glukoze u organizmu jedinke, mora se uzeti u obzir i koncentracija drugih, antiinsulinskih hormona, čija se koncentracija gotovo trenutno menja sa promenom koncentracije glukoze koju izaziva insulin. Zbog toga ti hormoni u sadejstvu sa insulinom utiču na konačnu vrednost glikemije u određenom momentu. U eksperimentima sprovedenim na ovcama utvrđeno je da insulin može da smanji sintezu glukoze za samo 15 posto. Naime, istraživanja su pokazala da se u uslovima hipoglikemije povećava kompenzatorna sekrecija glukagona, koji intenzivira proces glukoneogeneze i tako održava glikemiju u fiziološkim granicama (Brockman, 1978). Ako se hipoglikemija i posledično povećana koncentracija glukagona u krvi prevenira kontrolisanim parenteralnim davanjem glukoze i insulina, sinteza glukoze i dalje je umanjena samo za oko 15 posto. Smanjena sinteza glukoze u ovom slučaju može da bude posledica inhibiranog procesa glikogenolize ali ne i glukoneogeneze (Brockman, 1978). Razlog za ovo može da bude ishrana životinja, jer su hranjene obrocima koji zadovoljavaju samo potrebe za održanje života, tako da se proces glukoneogeneze odvija na znatno nižem bazalnom nivou i insulin u takvim uslovima nema inhibitorni efekat (Brockman, 1978).

Istovremeno sa procesom glikogeneze, insulin stimuliše glikolizu u jetri i mišićima. Isto tako, insulin stimuliše aktivnost glikolitičkih enzima fosfofruktokinaze i piruvat

kinaze, pa se glukoza u ćelijama metaboliše do piruvata i laktata (Berne i Levy, 1993). Kod preživara insulin stimuliše glikogenezu. Međutim, preživari imaju vrlo slabu aktivnost glukokinaze u hepatocitima (Brockman i Laarveld, 1993). Umesto ovog enzima u tkivu jetre preživara, heksokinaza ima glavnu ulogu za dalju sudbinu glukoze (Brockman 1984). Heksokinaza je nespecifičan enzim koji ima u osnovi niži afinitet (manju Km vrednost) za glukozu u poređenju sa glukokinazom (Berne i Levy, 1993). Zbog toga je u optimalnim fiziološkim uslovima priliv glukoze u jetru preživara mali.

Istraživanja Petersona i sar. (1994) i Lewis i sar. (2002) su potvrdila da insulin primarno utiče na ekstrahepatična ili periferna tkiva (mišićno i masno), tako što olakšava ulazak glukoze u ćelije i stimuliše metaboličke procese kojima se povećavaju energetske rezerve organizma. Kao što je već navedeno, u masnom tkivu insulin pospešuje ulazak glukoze u adipocite preko transportnih molekula GLUT 4 (Katzung, 1995), gde se ona oksidiše do alfa glicerofosfata, koji se koristi za esterifikaciju slobodnih masnih kiselina tokom lipogeneze (Drackley, 2000). U adipocitima insulin intenzivira sintezu triglicerida tako što obezbeđuje prekuzore za njihovu sintezu i stimuliše aktivnost enzima lipoprotein lipaze (Lewis i sar., 2002). Dodatno, insulin suprimira lipolizu smanjujući nivo cAMP i inhibira aktivnost enzima protein kinaze A i hormon senzitivne lipaze (Berne i Levy, 1993; Brockman, 1978; 1979). Zbog svega ovog insulin dovodi do smanjivanja koncentracije slobodnih masnih kiselina u krvi (Mayes, 1989), što je dokazano i kod preživara (Drackley, 2000; Hayirly, 2006). Naime, kod preživara insulin inhibira lipolizu i stimuliše sintezu masnih kiselina. Glavni prekursori za lipogenezu u masnom tkivu preživara su sirćetna i buterna kiselina, dok je to glukoza kod monogastričnih životinja. Pored toga što su prekuzori različiti, insulin ima identičnu ulogu u procesu lipogeneze u jetri, mišićnom i masnom tkivu kod svih domaćih životinja (Brockman i Larveld, 1986).

U jetri, insulin stimuliše sintezu masnih kiselina i triglicerida, a inhibira ketogenezu (Brockman, 1978 i 1979). Slobodne masne kiseline dospеле u jetru se reesterifikuju sa glicerol-3-fosfatom koji je produkt direktne oksidacije glukoze stimulisane insulinom (heksozomonofosfatni šant), ili sa glicerolom koji nastaje u biohemijskoj reakciji katalizovanoj enzimom glicerolfosfat kinazom. Međutim, acetyl-CoA sintetisan u mitohondrijama u reakciji koju katalizuje piruvat dehidrogenaza transportuje se u

citoplazmu i potom pretvara u malonil-CoA uz pomoć enzima acetil-CoA karboksilaze. Ovaj proces je stimulisan od strane insulina i predstavlja limitirajući činilac lipogeneze u hepatocitima (Drackley, 2000). Antiketogeni efekat insulina u jetri preživara je posredovan sličnim mehanizmima kao kod monogastričnih životinja (Brockman i Laarveld, 1986). Svoje antiketogeno delovanje insulin ostvaruje: favorizovanjem lipogeneze i inhibiranjem lipolize u masnom tkivu, intenzivira korišćenje ketonskih tela od strane perifernih tkiva, snižava aktivnost ketogenih enzima i smanjuje priliv prekursora za sintezu ketonskih tela u jetri (Brockman, 1979). Direktan antiketogeni efekat insulin ostvaruje tako što u jetri smanjuje aktivnost enzima karnitin palmitoiltransferaze-I (CPT-I), a povećava njegov afinitet za malonil-CoA (Grantham i Zammit, 1988). Kako je već navedeno, glavna uloga CPT-I u jetri je da reguliše transport masnih kiselina dugih lanaca iz citoplazme u mitohondrije gde mogu da se podvrgnu procesu esterifikacije ili oksidacije. Već je napomenuto da insulin stimuliše aktivnost enzima acetil-CoA karboksilaze koji katalizuje sintezu malonil-CoA, inhibitora CPT-I, što predstavlja dodatni antiketogeni efekat insulina kojim se sintetisani acetil-CoA usmerava u pravcu lipogeneze (Zammit, 1981, 1990, 1996).

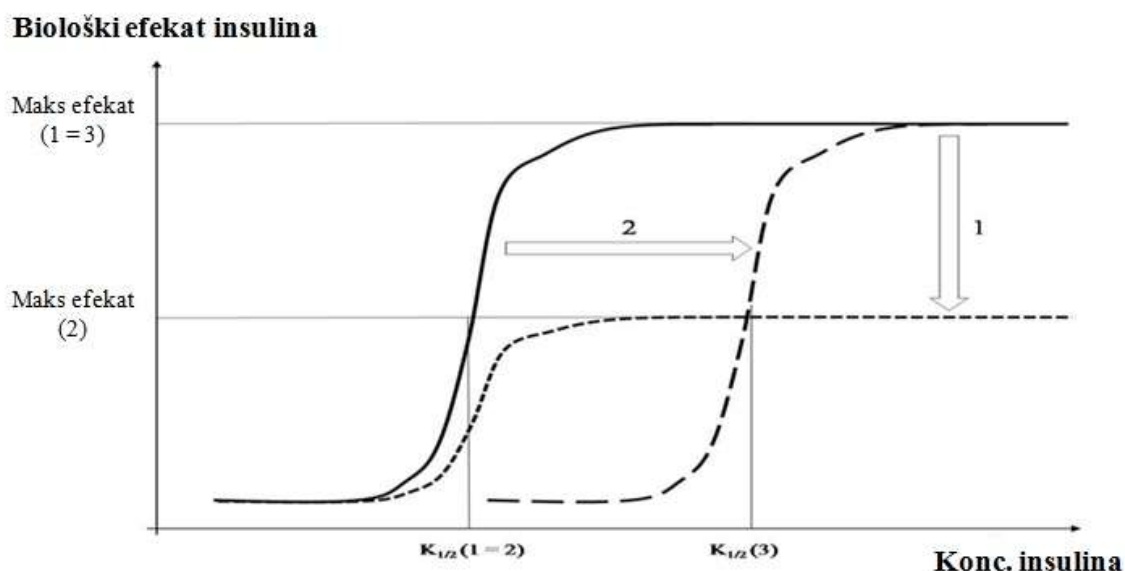
Poznato je da preživari koriste zanemarljivu količinu glukoze za sintezu masti. Oksidacijom glukoze u heksozomonofosfatnom putu nastaju NADPH_2 i α -glicerofosfat koji su neophodni za sintezu masnih kiselina iz acetata i laktata kod preživara (Prior i Scott, 1980). Za razliku od monogastričnih životinja, jetra preživara nije primarno mesto sinteze masti. Digestivni trakt i jetra kod preživara učestvuju svega sa 8 posto u ukupnoj lipogenezi organizma (Ingle i sar., 1972). Osim toga, mobilisane neesterifikovne masne kiseline iz telesnih depoa su primarni izvor za sintezu masti u jetri preživara (Emery i sar., 1992).

2.7. Mehanizam nastanka insulinske rezistencije

Berson i Yalow (1970) su opisali insulinsku rezistenciju kao stanje pri kome je neophodna veća količina insulina da bi se ostvario normalan fiziološki odgovor, pri čemu se podrazumeva da se insulinska rezistencija može prevazići egzogenom aplikacijom insulina. Ovo stanovište se može smatrati tačnim samo u slučajevima kada do insulinske rezistencije dolazi usled smanjene sinteze i/ili lučenja insulina (prereceptorska insulinska

rezistencija). Međutim, aplikovanje egzogenog insulina u nekim slučajevima ne dovodi do normalizacije insulinskog odgovora, kada su promene lokalizovane na receptorskom i postreceptorskom nivou. Prema Kahn-u (1978) insulinska rezistencija se definiše kao stanje u kome „trenutna koncentracija insulina u krvi proizvodi manji biološki odgovor od normalnog“ i može biti prouzrokovana putem smanjenja maksimalnog insulinskog efekta (smanjen insulinski odgovor), kao i potrebom da se poveća koncentracija insulina da bi se postigla polovina maksimalnog efekta (smanjena insulinska senzitivnost) ili kombinacija oba ova načina (Slika 5.) Naime, smanjena insulinska senzitivnost generalno je indukovana smanjenim brojem receptora ili njihovog afiniteta za insulin, a smanjenje insulinskog odgovora praćeno je promenama na post-receptorskom nivou, kada nastaju greške u transdukciji insulinskog signala, na nivou sekundarnih glasnika i translokacije GLUT molekula na membranama ciljnih ćelija. (Herzog, 2001; Kräft, 2004). Iz praktičnih razloga, između smanjenog insulinskog odgovora i senzitivnosti neće se praviti terminološka razlika, već će se oba fenomena nazivati insulinskom rezistencijom ili smanjenim insulinskim odgovorom. U nekoliko revijalnih radova izneto je mišljenje da umerena insulinska rezistencija doprinosi povećanju lipolize, glukoneogeneze i uvođenju mišićnog i masnog tkiva krava u stanje štednje glukoze (Bell, 1995; Bell i Bauman, 1997). Na osnovu ovih stanovišta, Hayirly (2006) je predložio da se pod insulinskom rezistencijom u širem smislu podrazumevaju stanja koja uključuju: 1) smanjeno lučenje insulina, 2) smanjen odgovor β -ćelija na akutnu aplikaciju glukoze i 3) smanjen metabolički efekat insulina u ciljnim tkivima. Takođe, u ovoj disertaciji navedeni kriterijumi će biti korišćeni za interpretaciju dobijenih rezultata.

Slika 5. Shematski prikaz dva tipa insulinske rezistencije



Smanjen insulinski odgovor je uzrokovan smanjenjem maksimalnog insulinskog efekta (pomeranje 1, od pune ka isprekidanoj liniji), dok se smanjena osetljivost na insulin manifestuje povećanjem koncentracije insulina potrebnog da bi se ostvarila polovina maksimalnog biološkog efekta ($K_{1/2}$; pomeranje 2, od pune do isprekidane linije).

2.7.1. Metabolički pokazatelji insulinske rezistencije

Insulinska rezistencija je multifaktorijalan fenomen koji je u humanoj populaciji karakterisan metaboličkom acidozom, hiperglikemijom, smanjenom tolerancijom na glukozu, glukozurijom, ketonemijom, ketonurijom, pojačanom diurezom, hipovolemijom, dehidracijom, polidipsijom i depresijom centralnog nervnog sistema (McCance i Huether, 1994). Mnogi od nabrojanih patofizioloških poremećaja su takođe uočeni i kod preživara u uslovima indukovane ili spontane hepaticne lipidoze (masne jetre) (DeBoer i sar, 1985; Veenhuizen i sar., 1991; Drackley i sar., 1999; Pires i sar., 2007). Preciznije rečeno, uočeno je da su činioci odgovorni za nastanak insulinske rezistencije kod ljudi zapravo isti ili slični onima koji se dovode u vezu sa nastankom masne jetre i ketoze preživara. Ovi činioci uključuju kasni graviditet, gojaznost, hiperinsulinemiju, ishranu lipidima, hiperlipidemiju, pothranjenost, hormonalnu konstelaciju, genetske faktore i inflamaciju (Hayirli, 2006).

2.7.2. Činioci odgovorni za nastanak insulinske rezistencije

Umerena insulinska rezistencija tokom graviditeta je ustanovljena kod velikog broja sisara (Stanley i sar., 1998; Pere i sar., 2000; Johnson, 2008). Tako, ustanovljeno je da je metabolizam glukoze kod gravidnih ovaca pod slabijim uticajem insulina u odnosu na negravidne ovce. Smanjena konzumacija hrane (restriktivna ishrana) doprinosi razvoju insulinske rezistencije i uzrokuje gubitak u telesnoj masi plotkinja bez ikakvih posledica po masu ploda, što jasno oslikava svrhu biološkog postojanja insulinske rezistencije: da obezbedi adekvatno snabdevanje fetusa energijom na račun promena energetskog statusa majki (Pettersson i sar., 1993). Osim toga, inhibitorno delovanje insulina na lipolizu je manje izraženo kod gravidnih u poređenju sa negravidnim ovcama (Pettersson i sar., 1994). Pored graviditeta, insulinska rezistencija može da se razvije i tokom laktacije. Nađeno je da je insulin-zavistan metabolizam glukoze u *in vitro* uslovima bio smanjen u uzorcima masnog tkiva ovaca u laktaciji u odnosu na ovce koje se ne muzu (Vernon i Taylor, 1988).

2.7.2.1. Ishrana

Unazad nekoliko godina, interesovanje velikog broja istraživača je bilo usmereno na dalje razumevanje prirode i vremena pojavljivanja insulinske rezistencije sa posebnim osvrtnom na utvrđivanje mogućnosti manipulisanja interakcije NEFA i stanja apetita krava tokom peripartalnog perioda. Veliki doprinos u ovoj oblasti su dali istraživači iz Amerike. Inicijalna istraživanja stručnjaka sa Univerziteta Cornell su upućivala na to da bi masno tkivo moglo da bude refraktarnije na insulin tokom perioda zasušenja nego u postpartalnom periodu. Takođe, sledeći radovi u ovoj oblasti generalno su podržali koncept da stepen insulinske rezistencije može biti čak i veći u antepartalnom nego u postpartalnom periodu (Smith i sar., 2006). Kao rezultat ovog istraživanja i drugih posrednih dokaza da naglašena insulinska rezistencija tokom perioda zasušenja ima velikog udela u smanjenom unosu suve materije obroka, povećanju NEFA i smanjenju telesne kondicije tokom perioda rane laktacije, istraživači sa Univerziteta Cornell su uspeli da administracijom tiazolidona (analoga korištenih u tretmanu tip 2 diabetesa kod ljudi) izazovu specifičnu modulaciju

insulinske rezistencije u masnom tkivu u antepartalnom periodu. Štaviše, administracija tiazolidona imala je tendenciju smanjenja NEFA i povećanja unosa suve materije obroka u periodu 7 dana pre do perioda 7 dana posle teljenja (Smith i sar. 2007). Važno je naglasiti da se administracija TZD nije odrazila na korišćenje (štednju) glukoze od strane perifernih tkiva. U jednoj sličnoj studiji, ista grupa autora (Smith i sar. 2009), pored već navedenih efekata TZD, utvrdila je i poboljšanje energetskeg statusa, smanjen stepen gubitka telesne kondicije, i kraći servis period kod tretiranih krava. Ovi rezultati su jasno ukazali da specifična modulacija osetljivosti na insulin na nivou masnog tkiva ima veoma pozitivan efekat na promene u metabolizmu krava u peripartalnom periodu. Iako je modulacija insulinske rezistencije koristeći farmaceutski pristup, u svakom slučaju intrigantna, to je dovelo do logičkog pitanja u vezi sa aspektima ishrane koji mogu da utiču na stepen insulinske rezistencije. Tokom poslednjih nekoliko godina pitanje ishrane krava u pogledu energije tokom perioda zasušenja ponovo je zavredelo veliku pažnju (Janovick i sar., 2011) i u vezi sa tim postoji saglasnost velikog broja istraživača da ishrana u energetskom pogledu može u značajnoj meri da uzajamno deluje sa stepenom osetljivosti perifernih tkiva na insulin tokom kasnog prepartalnog perioda.

Da bi se izbegle drastične promene u metabolizmu u periodu oko teljenja i ranoj fazi laktacije, primenjuje se priprema životinja potrebnim merama ishrane. Naime, dugi niz godina, pokušavajući da ublaže negativan bilans energije, tendencija istraživača i stručnjaka iz oblasti govedarstva bila je da se maksimalno moguće poveća unos suve materije (SM) u poslednjoj fazi zasušenja, postepenim uvođenjem u obrok manjih količina smeša, i to, istog sastava kao i hraniva koja se koriste na početku laktacije (Overton i Waldron, 2004; Drackley i Dann, 2005). Ova strategija ishrane je delom podržana istraživanjem koje je pokazalo da su krave sa nižim vrednostima viših masnih kiselina u krvnoj plazmi tokom poslednje dve nedelje gestacionog perioda imale manju incidencu najvažnijih postpartalnih metaboličkih poremećaja (Dik, 1995). Ako se uzme u obzir da povećani unos hranljivih materija obično dovodi do nižih vrednosti NEFA u cirkulaciji, povezanost boljeg unosa suve materije iz obroka i poboljšanja zdravstvenog statusa i performansi bi se mogla podrazumevati. Naše iskustvo sugeriše da su mnoge farme zaista poboljšale zdravstveni status i ekonomičnost proizvodnje primenom ovog koncepta ishrane, pogotovo tokom

kasnog perioda zasušenja. S druge strane, brojna istraživanja su pokazala da se planiranjem ishrane, naročito unosa energetskih hraniva u peripartalnom periodu, može smanjiti stepen insulinske rezistencije i stoga uticati na interakciju između NEFA i apetita krava u prepartalnom periodu. Mashek i Grummer (2003) su naveli da krave koje su imale slabiji apetit u antepartalnom periodu, generalno zbog pojačanog unosa suve materije obroka 3 do 4 nedelje pre očekivanog teljenja, su imale veće postpartalne koncentracije NEFA u krvi i triglicerida u jetri. Još neposrednije dokaze obezbedili su Douglas i sar. (2006) koji su izneli da krave koje su tokom celog perioda zasušenja konzumirale 80 % od svojih energetskih potreba su imale nižu NEFA postpartalno, nižu glukozu i niži insulin antepartalno i bolji unos suve materije obroka postpartalno u poređenju sa kravama koje su konzumirale 160 % od predviđenih potreba u energiji u istom periodu. Slično Holcomb i sar. (2001) su izvestili da krave podvrgnute restriktivnoj ishrani tokom kasnog prepartalnog perioda su imale blažu krivu NEFA tokom peripartalnog perioda. Dodatno Holtenius i sar. (2003) su ustanovili da krave koje su u periodu zasušenja unosile 180 % od izračunatih potreba u energiji, su imale više koncentracije insulina i glukoze antepartalno, bolji odgovor β -celija endokrinog pankreasa u testu opterećenja glukozom antepartalno, i veću koncentraciju NEFA tokom peripartalnog perioda nego krave hranjene 75 % ili čak 110 % od izračunatih energetskih potreba. Dalje, Agenas i sar. (2003) su izneli da iste krave hranjene sa 128 % od potreba u energiji u periodu zasušenja su imale slabiji apetit i produženi period negativnog bilansa energije tokom postpartalnog perioda u poređenju sa druga dva tretmana ishrane. Takođe, Dann i sar. (2006) su pokazali da ishrana sa 150 % od potreba u energiji tokom ranog perioda zasušenja može dovesti do pogoršavanja insulinske rezistencije kako se bliži teljenje, što rezultira u većoj koncentraciji NEFA i BHBA u krvi i slabijem apetitu i energetskoj ravnoteži krava tokom prvih 10 dana laktacije. Još neposrednije, Schoenbreg i Overton (2010) su demonstrirali da je odgovor NEFA tokom izvođenja testa opterećenja glukozom mnogo refraktarniji kod krava hranjenih obrocima veće energetske vrednosti, što jasno ukazuje da ishrana energetski bogatim hranivima tokom perioda zasušenja pojačava stepen insulinske rezistencije u masnom tkivu. Sve u svemu, ovi rezultati podržavaju izraženo stanovište da konzumiranje energetski bogate hrane u periodu zasušenja rezultira promenama u metabolizmu krava, koje zauzvrat

najverovatnije predisponiraju životinje ka smanjenom unosu suve materije obroka i višim koncentracijama NEFA u krvi neposredno posle teljenja.

2.7.2.2. Hiperlipidemija

Tokom perioda rane laktacije, odgovor β -ćelija endokrinog pankreasa na intravensku aplikaciju glukoze i propionata, glavnih insulintropnih supstanci kod visokomlečnih krava (Hayirli, 2006), značajno je manji u odnosu na period zasušenja (Lomax i sar., 1979; Holtenius i sar., 2003). Iako snižavanje koncentracije insulina u krvi ima glavnu ulogu u homeoretskom prilagođavanju, dugotrajno suprimirana sekrecija insulina može imati za rezultat intenzivnu lipolizu, a samim tim i veću mobilizaciju masnih kiselina iz telesnih rezervi, što povećava rizik za pojavu dislokacije sirišta, masne jetre, ketoze (Holtenius i Traven, 1990; Herzog, 2001; Bobe i sar., 2004) i reproduktivnih poremećaja. Zbog toga, izgleda da je prepoznavanje činilaca koji regulišu lučenje insulina kod visokomlečnih krava od prvostepenog značaja. Na osnovu *in vitro* istraživanja kod ljudi (Zhou i Grill, 1995; Grill i Qvigstad, 2000) i pacova (Shimabukuro i sar., 1998; Mason i sar., 1999; Maedler i sar., 2001), izgleda da kratkotrajno izlaganje kulture tkiva povišenoj koncentraciji NEFA ima stimulatívno delovanje i povećava sekreciju insulina. Nasuprot tome, dugotrajno izlaganje kulture tkiva povišenoj koncentraciji NEFA, dovodi do smanjene sekretorne sposobnosti β -ćelija i do njihovog potpunog iscrpljivanja (insuficijencije). U skladu sa napred navedenim, kod ljudi dugotrajno hronično povećanje koncentracije NEFA u krvi igra glavnu ulogu za razvoj funkcionalne dekompenzacije pankreasa kod dijabetesa tip II (Gravena i sar., 2002; Petersen i Shulman, 2006). Mehanizam ustanovljen kod ljudi i pacova, verovatno može da se primeni i kod visokomlečnih krava, s obzirom da povišena koncentracija NEFA u krvi koincidira sa padom insulinemije i sekretorne sposobnosti endokrinog pankreasa tokom rane laktacije. Pored toga, smanjena senzitivnost, odnosno odgovor β -ćelija pankreasa na intravenski aplikovanu glukozu je ustanovljena kod ketoznih krava koje su gladovale u poređenju sa zdravim životinjama (Hove, 1978). U prikazu jednog sporadičnog slučaja, opisana je masna infiltracija i insuficijencija β -ćelija, a navedene patohistološke promene dovedene su u vezu

sa pregojenošću krava u prepartalnom periodu, obimnom lipolizom i masnom jetrom postpartalno (Nazifi i sar., 2004). Međutim, medijatori koji utiču na lučenje insulina i interakcija između NEFA u krvi i funkcije endokrinog pankreasa nisu u potpunosti rasvetljeni kod visokomlečnih krava.

Pored smanjene sekrecije insulina, dugotrajno-hronično smanjenje insulinskog odgovora (insulinska rezistencija) može predisponirati visokomlečne krave za kontinuiranu lipolizu i povećati rizik za razvoj peripartalnih poremećaja zdravlja. Uprkos činjenici da je malo konkretnih podataka o razlikama u insulinskom odgovoru između krava u laktaciji i perioda zasušenja, ipak, tokom laktacije jasno je uočena povezanost insulinske rezistencije i pojave mnogobrojnih poremećaja zdravlja kao što su: dislokacija sirišta (van Meirhage i sar., 1988; Holtenius i Traven, 1990; Kräft, 2004), masna jetra, ketoza (Herzog, 2001; Ohtsuka i sar., 2001; Kräft, 2004; Oikawa i Oetzel, 2006) i pojava cista na jajnicima (Opsomer i sar., 1999). Još jednom treba istaći, da povišena koncentracija NEFA u krvi bilo da je izazvana gladovanjem životinja (Oikawa i Oetzel, 2006) ili intravenoznim davanjem emulzije masnih kiselina (Pires i sar., 2007) nepovoljno utiče na insulin zavistan promet (klirens) glukoze. Holtenius i Holtenius (2007) su ustanovili manju vrednost Indeksa za kvantitativnu procenu insulinske senzitivnosti (Revised Quantitative Insulin Sensitivity Check Index - RQUICKI), ukazujući na veći stepen insulinske rezistencije kod ugojenih u odnosu na krave optimalne telesne kondicije. Pored toga, Holtenius i sar., (2003) su izneli hipotezu da je smanjeni promet (klirens) glukoze krava u laktaciji koje su hranjene većom količinom krmnih smeša (žitarica) tokom perioda zasušenja, posledica: 1) povišene koncentracije NEFA u krvi (obimna lipomobilizacija), koja nastaje zbog izrazitog smanjenja količine konzumirane hrane u peripartalnom periodu i, 2) hronične-dugotrajne hiperinsulinemije koja tokom perioda zasušenja mehanizmom negativne povratne sprege (down-regulation) reguliše ekspresiju insulinskih receptora.

Način, ili bolje rečeno putevi kojima NEFA mogu da ometaju prenošenje insulinskog signala (ćelijska transdukcija) detaljnije je proučavano kod ljudi i pacova. Dodavanje palmitinske kiseline u fiziološkim koncentracijama u medijum kulture adipocita pacova (*in vitro*) imalo je za rezultat smanjenje insulin zavisnog transporta glukoze (Van Epps-Fung i sar., 1997). Ova zapažanja nije bilo moguće objasniti promenama u ekspresiji

ili aktivaciji insulinskih receptora, što je ukazivalo na promene i greške u prenošenju insulinskog signala na post-receptorskom nivou (Van Epps-Fung i sar., 1997; Petersen i Shulman, 2006). Unutarćelijsko nakupljanje međuprodukata metabolizma masnih kiselina može da dovede do prekida normalnog post-receptorskog prenošenja insulinskog signala putem sekundarnih glasnika, što na kraju dovodi do smanjenja translokacije GLUT 4 na ćelijskoj membrani i ulaska glukoze u skeletne mišiće. Zapravo, intracelularno nakupljanje međuprodukata metabolizma masnih kiselina i smanjenje ekspresije GLUT 4 molekula na membranama poprečnoprugastih mišića je perzistentan nalaz u ranom stadijumu smanjene tolerancije na glukozu kod ljudi (Petersen i Shulman, 2006). Međutim, kod preživara još uvek se ne zna kojim putevima NEFA indukuju insulinsku rezistenciju, mada neki istraživači, na osnovu sprovedenih istraživanja, pretpostavljaju da promene nastaju pre na post-receptorskom nego na receptorskom nivou (Debras i sar., 1989; Vernon i sar., 1990; Kräft, 2004). Dakle, mehanizmi koji uzrokuju insulinsku rezistenciju kod visokomlečnih krava se verovatno mogu uporediti sa onim kod ljudi i pacova.

2.7.2.3. Genetski faktori

Razlike u ekspresiji GLUT 4 molekula u skeletnim mišićima i tolerancije na glukozu se pojavljuju kod zdrave, mlade i mršave, dece čiji roditelji boluju od dijabetesa, mnogo ranije nego što se ispolje klinički znaci bolesti. To pokazuje da genetski ili epigenetski činioci, nezavisno od načina života i metabolizma, mogu da imaju značajnu ulogu u razvoju netolerancije na glukozu (Petersen i Shulman, 2006). Imajući u vidu činjenicu da kod ljudi postoji genetska predispozicija za razvoj insulinske rezistencije, navodi nas da postavimo jedno veoma zanimljivo pitanje: da li je možda genetska sklonost krava prema insulinskoj rezistenciji sekundarna pojava jednostrane višedecenijske selekcije mlečnih rasa goveda na visoku proizvodnju mleka? Iako odgovor na ovo pitanje nije u potpunosti rasvetljen, sličnim povezivanjem se dobrim delom može objasniti veća sklonost visokomlečnih krava ka nastanku oboljenja.

Pitanje da li su i u kojoj meri NEB i proces lipolize genetski determinisani, je dalo mnogo povoda istraživačima za razmišljanje. Pokušaji da se u potpunosti izbegne NEB kod

visokomlečnih krava određenim manipulacijama u ishrani nisu dali očekivane rezultate (Ingvartsen i sar., 2003). Krave sa predispozicijom za visoku proizvodnju mleka izgleda da su u stanju da dodatno unete izvore energije usmere direktno ka proizvodnji mleka umesto za poboljšanje njihove telesne kondicije, dok krave koje nemaju predispoziciju za visoku proizvodnju koriste energetske dodatke kako bi ublažili NEB (Veerkamp i Koenen, 1999; Kay i sar., 2009; Lucy i sar., 2009). Krave sa visokim selekcionim indeksom za proizvodnju mleka ispoljavaju niži BCS tokom svih faza laktacije u poređenju sa kravama sa nižim selekcionim indeksom (Berry i sar., 2003). Ovi nalazi su dali povoda za koncept genetski determinisanog gubitka BCS kod rasa selekcionisanih na visoku proizvodnju mleka (Ingvartsen i sar., 2003; Friggens i sar., 2007). Kao što je navedeno od strane Rauw i sar., (1998) genetska predispozicija za visoku proizvodnju je u osnovi „crna kutija“ ako osnovni fiziološki procesi selekcije nisu u dovoljnoj meri poznati. Nije iznenađujuće što su pokušaji da se rasvetle ovi fiziološki procesi uglavnom usmereni na GH-IGF osovinu, koncentraciju insulina i insulinsku senzitivnost.

Brojne studije su otkrile rasne razlike u funkcionisanju somatotropne osovine krava u laktaciji. Severnoamerički holštajn ispoljava više GH i niže IGF koncentracije, povezano sa višim koncentracijama NEFA, gubitkom BCS i usmeravanjem energije ka proizvodnji mleka, u odnosu na manje mlečne Novozelandske sojeve, nezavisno od razlika u insulinu (Kay i sar., 2009; Lucy i sar., 2009). Povećano dodavanje hrane nije rekuplovalo GH-IGF osovinu u visokoproduktivnih rasa, za razliku od krava nižih genetskih sposobnosti (Lucy i sar., 2009). Takođe, GH odgovori na izazove GH oslobađajućeg faktora bili su spektakularno niži u Japansko crnih u poređenju sa Holštajn kravama u laktaciji, koji se može objasniti njihovim veoma malim prinosom mleka, ali i tokom perioda zasušenja, što ukazuje na GH razlike nezavisno od energetskeg statusa (Shingu i sar., 2002). Nasuprot tome, odsustvo razlike u bazalnim ili indukovanim GH koncentracijama mogli bi biti ustanovljeni u studiji poredeći grupe Holštajn teladi različitog genetskog porekla (Baumgard i sar., 2002). Niska koncentracija insulina i senzitivnost su drugi potencijalni nasledni mehanizmi za genetski uslovljene BCS gubitke. Niže postpartalne koncentracije insulina su prijavljene u krava poreklom od bikova sa visokim selekcionim indeksom za mlečnost, što je dovelo do procene umerene heritabilnosti (h^2) za postpartalni insulin

(Swali i Vathes, 2006). Takođe, koncentracije insulina bile su niže u krvi krava sa visokim u poređenju sa kravama nižeg laktacionog potencijala, nezavisno od energetskeg balansa i proizvodnje tokom trajanja ispitivanja (Gutierrez i sar, 2006.). Japanske Crne krave ispoljavale su mnogo veće bazalne i glukozom indukovane koncentracije insulina u odnosu na Holštajn krave u toku perioda zasušenja i laktacije (Shingu i sar, 2002). Nasuprot tome, Kay i sar. (2009) ne navode značajne razlike u koncentracijama insulina u krvi krava različitog genetskog porekla. Hammon i sar. (2007) su pronašli niže glukozom indukovane insulinske odgovore cross-bred junica sa višom mlečnošću u odnosu na junice iste rase koje su imale niže prinose mleka, ali još važnije, ta razlika je bila očigledna samo u toku laktacije. Što se tiče insulinske senzitivnosti, manji stepeni tolerancije na glukozu posle IVGTT su nedavno primećeni kod krava Holštajn rase u laktaciji poreklom iz Severne Amerike u odnosu na krave sa Novog Zelanda, što ukazuje na prisutne razlike u insulinskoj senzitivnosti u zavisnosti od genetske konstitucije životinja (Chagas i sar., 2009).

Sve u svemu, postoje dobri argumenti za pretpostavljanje da je selekcija za visoku proizvodnju uspostavila genetsku sklonost ka dekoplovanju GH-IGF osovine, niskoj koncentraciji insulina i niskoj insulinskoj senzitivnosti. Međutim, podaci dobijeni kod krava u laktaciji mogu biti kompromitovani uslovima držanja, ishrane, produkcijom i zdravstvenim statusom tih životinja. U svakom slučaju, poređenjem ovih mehanizama kod nelaktirajućih životinja, pod sličnim uslovima ishrane, držanja i iskorišćavanja, će omogućiti objektivnije tumačenje pozadina ovih urođenih mehanizama.

2.7.2.4. Inflamacija

Zapaljenjski procesi u puerperijumu, kao što su zadržavanje posteljice i mastitis, mogu predstavljati dodatno opterećenje za tranzicioni period, a posebno za funkciju jetre. Kao prvo, inflamatorni procesi u peripartalnom periodu nepovoljno deluju na energetske status jedinki tako što smanjuju količinu konzumirane hrane i pokreću lipolizu povećavajući aktivnost simpatikusa (McNamara, 1997; Urton i sar., 2005). Kao drugo, zapaljenjske procese karakteriše i oslobađanje proinflamatornih citokina (TNF- α , interleukin 1 i 6) iz leukocita. Ovi citokini povećavaju potrošnju energije koja se troši za rast telesne

temperature i aktivnosti imunskog sistema (Johnson i Finck, 2001). Inflamatorni procesi u organizmu mogu da utiču i na insulinski odgovor, na šta ukazuju rezultati istraživanja Ohtsuka i sar. (2001) koji su ustanovili negativnu korelaciju između insulin zavisnog prometa glukoze i koncentracije tumor nekroze faktora α (TNF- α) kod krava koje su imale masnu jetru. Pored toga citokini u jetri na poseban način pokreću sintezu pozitivnih proteina akutne faze (+AP) haptoglobin, serum amiloid-A i ceruloplazmin, dok smanjuju sintezu negativnih proteina akutne faze (-AP) kao što su: albumin, transferin, retinol vezujući protein i apolipoproteini (Gruys i sar., 2005; Bionaz i sar., 2007; Bertoni i sar., 2008). Ovaj niz lančanih događaja poznat je kao akutno fazna reakcija, i generalno se smatra protektivnim reakcijom domaćina na inflamaciju (Petersen i sar., 2004), mada istovremeno može da ima nepoželjan efekat na tranzicioni period krava. Na primer, povećana sinteza haptoglobina, ceruloplazmina i serum amiloida-A u jetri je od velikog značaja, jer pospešuje zarastanje i obnovu tkiva, ali može da umani sintezu drugih apolipoproteina koji su neophodni za transport lipida iz jetre, povećavajući tako rizik za deponovanje masti u hepatocitima (Kato, 2002).

2.7.3. Uloga receptora u nastanku rezistencije na insulin

Svoje efekte na nivou ciljnih ćelija insulin ostvaruje vezivanjem za specifični receptor od koga započinju svi signalni putevi insulina. Receptor za insulin je transmembranski heterotetramerni (2 vanćelijske α i 2 transmembranske β subjedinice) proteinski molekul (350 kDa), koji pripada superfamiliji membranskih receptora koji poseduju kinaznu aktivnost (Youngren, 2007). Iako je zapaženo da insulin ostvaruje maksimalan metabolički efekat vezivanjem za srazmerno mali deo raspoloživih receptora (teorija viška receptora; eng. *spare receptors*), primećeno je da smanjenje broja receptora ipak utiče na fiziološki efekat insulina (De Meyts, 2008). Zastupljenost receptora za insulin zavisi od vrste tkiva, pri čemu u jetri i masnom tkivu, na kojima ovaj hormon ima presudan uticaj u procesu korišćenja energetske prekursora, dostiže i 200000 po ćeliji (White i Kahn, 1994).

Ukratko, normalan, fiziološki prenos insulinskog signala na nivou ciljnih ćelija odvija se sledećim redosledom: vezivanje molekula insulina za subjedinicu α dovodi do

konformacione promene molekula što dovodi do aktivacije kinazne aktivnosti subjedinice β , koja vrši autofosforilaciju (Avruch, 1998). Autofosforilacija podstiče interakciju receptora sa proteinima, supstratima receptora za insulin (IRS 1-6) i fosforilaciju tih molekula (De Meyts, 2008), koji signal u delovanju insulina usmeravaju uglavnom ka regulaciji metaboličkih procesa u ćelijama. To ima za posledicu aktivirane niza sekundarnih glasnika, uključujući PIP 3 (eng. *phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate*), koji može da aktivira ili suprimira mnogobrojne enzime i proteine u ciljnim tkivima. Tako, veoma značajan efekat PIP 3 u adipocitima i mišićnim ćelijama je u aktiviranju i translokaciji GLUT 4 molekula iz unutarćelijskih depoa u plazma membranu ovih ćelija (Thong i sar., 2005; Sale i Sale, 2008). Osim pomenutog signalnog puta, treba istaći da insulin koristi i drugi ćelijski put u regulaciji lokalizacije GLUT4, svojstven samo insulinu, a koji započinje fosforilacijom proteina Cbl od strane receptora za insulin (Saltiel i Pessin, 2003).

Paralelno prenosu signala ka narednim molekulima u signalnom putu, nakon vezivanja insulina dolazi do internalizacije kompleksa ligand-receptor iz plazma membrane u citoplazmu. U endozomima se dešava disocijacija i degradacija insulina, a molekuli receptora se defosforilišu i u određenom procentu ponovo integrišu u plazma membranu (Carpentier, 1994). Regulatori aktivnosti receptora su tirozin fosfataze, ali i različite serin/treonin kinaze koje ga fosforilišu na serinu ili treoninu. Dokazano je da fosforilaciju receptora na brojnim serin/treonin ostacima vrše neke izoforme protein kinaze C (PKC), koje se aktiviraju pri akumulaciji lipida, posredstvom povećanja koncentracije diacilglicerola (DAG) u ćeliji ili u stanju hiperglikemije (Idris i sar., 2001). Takođe, insulin negativno reguliše broj sopstvenih receptora u ciljnim ćelijama mehanizmom negativne regulacije koja podrazumeva i promene u ekspresiji gena za receptor, uz učešće transkripcionog regulatora FOXO1 (eng. *forkhead box O1*). Pored toga, insulin podstiče internalizaciju i degradaciju sopstvenog receptora. Na ovaj način insulin negativno reguliše i druge molekule svog signalnog sistema (Huang i sar., 2002; Puig i Tjian, 2005). U regulaciji ekspresije i funkcije receptora za insulin učestvuju i drugi agensi, kao što su hormoni, citokini, hranljivi sastojci, ali i fizička aktivnost. Na primer, hiperglikemija može negativno uticati na aktivnost receptora za insulin (Youngren, 2007). Fizička aktivnost, nasuprot tome, ima pozitivan efekat na receptorsku funkciju (Youngren i sar., 2001).

Kao što je izneto, pored smanjenja bazalne i glukozom stimulisane sekrecije β -ćelija endokrinog pankreasa, promene koje dovode do supresije insulin-zavisnih metaboličkih efekata i/ili nastanka insulinske rezistencije takođe mogu da se odvijaju i na nivou perifernih tkiva. Na prvom mestu, alteracije na receptorskom nivou su mogući razlog za smanjenje insulinskog odgovora i/ili smanjenjne insulinske senzitivnosti masnog tkiva. Vernon i sar. (1981) su uočili smanjenje *de novo* sinteze masnih kiselina i aktivnosti lipoprotein lipaze u masnom tkivu ovaca u zasušenju i tokom rane laktacije, što je bilo praćeno smanjenjem broja i afiniteta insulinskih receptora. U jednoj drugoj studiji, za vreme laktacije je nađeno smanjenje broja i afiniteta insulinskih receptora na površini adipocita ovaca u poređenju sa periodom zasušenja (Guesnet i sar., 1991). Sličan mehanizam nastanka insulinske rezistencije je ustanovljen i kod ljudi (Pessin i Saltiel, 2000) i nekih drugih životinjskih vrsta (Flores-Riveros i sar., 1993; Brennan i sar., 2004; Suagee i sar., 2011). Međutim, sve više se ističe da su promene na postreceptorskom nivou, tj. promene u signalnim putevima insulina koji učestvuju u njegovom delovanju, glavni uzrok smanjenog ćelijskog odgovora na stimulaciju insulinom kod preživara (Debras i sar., 1989; Sasaki, 2002).

2.7.4. Testovi za utvrđivanje insulinske rezistencije

Pravilna ocena stepena insulinske rezistencije veoma je važna da bi se predvidelo nastajanje poremećaja u energetsom metabolizmu i njihova težina kod pojedinih životinja. Sve krave sa veoma izraženom neosetljivošću perifernih tkiva na insulin (insulinska rezistencija) su sklonije nastanku masne jetre i drugih poremećaja metabolizma, a primena testova koji mogu da ukažu na ova stanja istovremeno može da ukaže i na uslove pod kojima su oni nastali. U ovakvim slučajevima insulinske rezistencije karakterističan je nalaz relativno visokog nivoa glikemije i insulinemije antepartalno, kao i značajno povećanje koncentracija β -hidroksibuterne kiseline i slobodnih viših masnih kiselina u krvi postpartalno. Međutim, poteškoće u proceni insulinske rezistencije nastaju kod preživara u laktaciji u *in vivo* uslovima. Tumačenje rezultata testova za utvrđivanje insulinske rezistencije se komplikuje činjenicom da se više od 80 % prometa glukoze u organizmu

preživara tokom laktacije odvija u insulin nezavisnim metaboličkim putevima (Pettersson i sar., 1993; Holtenius i Holtenius, 2007). Osim toga, tipična klinička slika insulinske rezistencije kod ljudi kao što je hiperinsulinemija sa hiperglikemijom (Petersen i Shulman, 2006), kod krava u laktaciji najverovatnije će izostati, jer ranu laktaciju karakteriše hipoinsulinemija i smanjena koncentracija glukoze što je u direktnoj vezi sa NEB.

Nekoliko testova je u upotrebi za ispitivanje funkcionalne aktivnosti β -ćelija endokrinog pankreasa, i stepena osetljivosti perifernih tkiva na insulin (Monzillo i Hamdy, 2003). Zlatnim standardom za procenu insulinske rezistencije smatraju se takozvane „klamp-tehnike“. U toku hiperglikemijskog klampa, koncentracija glukoze u krvi se održava na određenom nivou podešavajući količinu parenteralno aplikovane glukoze, što se smatra direktnom funkcijom sekrecije insulina i korišćenja glukoze u perifernim tkivima. Ovaj metod se prvenstveno koristi za kvantitativno ispitivanja funkcionalne sposobnosti β -ćelija pankreasa (DeFronzo i sar., 1979). Pored ovoga, za procenu osetljivosti perifernih tkiva (insulinska rezistencija) na insulin, koristi se tehnika hiperinsulinemijskog-euglikemijskog klampa. Za vreme izvođenja ovog testa, uporedo sa egzogenom aplikacijom insulina vrši se kontrolisana intravenska aplikacija glukoze, sa ciljem održavanja glikemije na bazalnom nivou. U momentu uspostavljanja ravnotežnih odnosa koncentracija insulina i glukoze u krvi, nivo parenteralnog dodavanja glukoze se uzima kao mera stepena insulinske rezistencije, jer ona predstavlja u suštini količinu glukoze iskorišćenu u perifernim tkivima (DeFronzo i sar., 1979; Robert, 1995).

Zbog toga što su „klamp-tehnike“ zahtevne za izvođenje i pre svega skupe, ovi testovi nisu našli široku primenu u praksi, i koriste se uglavnom u eksperimentalne svrhe. Kod visokomlečnih krava, znatno češće za procenu insulinske rezistencije se koriste intravenski testovi tolerancije na glukozu (GTT) i testovi tolerancije na insulin (ITT), koji se ujedno smatraju „srebrnim standardom“ (Hammon i sar., 2007; Bossaert i sar., 2008; Šamanc i sar., 2009a; Jaakson i sar., 2010). Tokom izvođenja GTT specifična količina rastvora glukoze odgovarajuće koncentracije se intravenski aplikuje recipijentima. To dovodi do naglog porasta glikemije, što je praćeno pojačanom sintezom i lučenjem insulina u krvotok. Nakon dostizanja maksimalnih vrednosti (pika), koncentracije glukoze i insulina se postepeno smanjuju i na kraju stabilizuju na početne (bazalne) vrednosti. Za procenu

funkcionalne aktivnosti β -ćelija pankreasa, insulinski odgovor na akutnu aplikaciju glukoze se procenjuje na osnovu vrednosti pika, površine ispod krive (AUC) i brzine eliminacije (ER) i/ili vremena potrebnog za dostizanje polovine vrednosti pika koncentracije insulina ($T_{1/2}$). Koristeći iste karakteristike dinamike kretanja krive glukoze u GTT, procenjuje se stepen osetljivosti na insulin i/ili utilizacije glukoze u perifernim tkivima (Kaneko i sar., 1997). Takođe, tokom izvođenja ovih testova može se pratiti i dinamika promene koncentracije NEFA u krvi (Grünberg i sar., 2011; Schoenberg i sar., 2012). Za razliku od „klamp-tehnika“, rezultati prikupljeni u GTT testu nisu tako laki za interpretaciju. Na primer, teško je razgraničiti da li je pojačan stepen uklanjanja glukoze iz krvi posledica pojačane utilizacije glukoze ili smanjene njene produkcije (Hayirli i sar., 2001). U ovakvim slučajevima, molarni odnos koncentracija glukoze i insulina u krvi ili odnos njihovih brzina uklanjanja se smatra pouzdanijim indikatorom tolerancije na glukozu (insulinske rezistencije), nego sama vrednost stepena uklanjanja glukoze iz krvi (Subiyatno i sar., 1996; Terao i sar., 2010). Takođe, jedno od ograničenja GTT testa je što nije moguće razgraničiti tip insulinske rezistencije, odnosno u kojoj meri stepen uklanjanja glukoze iz krvi odslikava senzitivnost tkiva na insulin, a u kojoj meri veličinu insulinskog odgovora (DeFronzo i sar., 1979; Kaneko i sar., 1997).

Danas su sve više u upotrebi različiti matematički modeli za procenu stepena insulinske rezistencije kao što su već pomenuti molarni odnos glukoze i insulina (G/I), zatim HOMA (*Homeostasis Model Assessment*) i QUICKI indeks (*Quantitative Insulin Sensitivity Check Index*) za čije izračunavanje se koriste samo bazalne vrednosti glukoze i insulina (Monzillo i Hamdy, 2003). Vujanac (2010) je ustanovio nižu vrednost HOMA indeksa kod krava u uslovima toplotnog stresa u poređenju sa kravama u optimalnim ambijentalnim uslovima. Kod visokomlečnih krava, RQUICKI indeks (*Revised Quantitative Insulin Sensitivity Check Index*), koji dodatno uključuje vrednosti koncentracija NEFA u krvi (Rabasa-Lhoret i sar., 2003), predložen je kao veoma pouzdan pokazatelj insulinske rezistencije kod ove vrste životinja (Holtenius i Holtenius, 2007).

3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja u okviru ove disertacije je da se doprinese rasvetljavanju značaja insulinske rezistencije u procesu adaptacije krava na visoku proizvodnju mleka praćenjem i poređenjem parametara koji ukazuju na energetske status jedinke i stepena zamašćenja jetre u periodu oko teljenja kod ugojenih i krava optimalne telesne kondicije.

Shodno postavljenom cilju, pristupilo se rešavanju sledećih zadataka:

- ispitivanje funkcionalnog stanja β -ćelija pankreasa i odgovora perifernih tkiva na insulin praćenjem dinamike kretanja koncentracija glukoze, insulina i NEFA u intravenskom testu opterećenja glukozom
- ispitivanje stepena insulinske rezistencije obračunavanjem RQUICKI indeksa
- ispitivanje zastupljenosti proteina insulinskog receptora u uzorcima mišićnog i masnog tkiva uzetih u periodu pre i posle teljenja
- ispitivanje zastupljenosti proteina transportera za glukozu (GLUT 4) u uzorcima mišićnog i masnog tkiva uzetih u periodu pre i posle teljenja
- određivanje antepartalnog i postpartalnog dijametra (površine) adipocita
- određivanje antepartalnog i postpartalnog stepena zamašćenja jetre
- ispitivanje parametara krvi koji ukazuju na energetske status jedinke (koncentracija glukoze, BHBA, NEFA i insulina)

4. MATERIJAL I METODE RADA

4.1. Mesto istraživanja

Ekperimentalni deo istraživanja sproveden je na farmi goveda „Mladost“ u Kovilovu (PKB Korporacija), a laboratorijske analize uzetih uzoraka krvi, tkiva jetre, masnog i mišićnog tkiva u odgovarajućim laboratorijama Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu i Instituta za nuklearne nauke „Vinča“.

4.2. Ishrana i način držanja oglednih životinja

Istraživanje je sprovedeno na ukupno 16 visoko-mlečnih krava holštajn-frizijske rase. Sve životinje uključene u ogled bile su klinički zdrave, što je utvrđeno kliničkim pregledom i uvidom u podatke iz evidencije o zdravstvenom stanju životinja. Takođe, tokom celog perioda istraživanja životinje su bile pod stalnim nadzorom veterinarske službe farme. Životinje su držane u uobičajenim farmskim uslovima, u stajama zatvorenog tipa, na vezu.

Kao kriterijum za odabir životinja za ovaj eksperiment uzeto je stanje uhranjenosti krava u poslednjoj fazi graviditeta, 30 dana pred očekivani termin teljenja. Očekivani datum teljenja je određen na osnovu datuma osemenjavanja. Stanje uhranjenosti procenjeno je na osnovu ocene telesne kondicije (OTK) u navedenom periodu proizvodno-reproduktivnog ciklusa, na osnovu čega su formirane dve grupe od po osam krava. Prvu grupu (kontrolna, n = 8) činile su krave optimalne telesne kondicije (OTK = 3,00 до 3,25), a drugu (ogledna, n = 8) ugojene životinje (OTK = 4,25 до 4,50). Sve odabrane krave bile su od 2. do 4. laktacije. Prosečna telesna masa ogledne grupe krava je bila $630,4 \pm 22,4$ kg, a krava kontrolne grupe $578,7 \pm 25,3$ kg. Obe grupe krava su tokom izvođenja eksperimenta dobijale potpuno izmešani (miksirani) obrok (*Total Mixed Ratio*, TMR), dva puta dnevno, pri čemu su sastav i količina obroka bili usklađeni sa potrebama za datu proizvodno-reproduktivnu fazu, telesnu masu i proizvodnju mleka. Sastav i nutritivna vrednost obroka prikazani su u Tabelama 1. i 2.

Tabela 1. Vrsta i količina hraniva u obroku ispitivanih krava

Sastojak (kg)	Period u odnosu na dan teljenja		
	-60. dan do -14. dan	-14. dan do 0. dan	0.dan do +60. dan
Seno lucerke	-	-	3,43
Seno trava	2,82	1,50	-
Pšenična slama	1,80	0,60	-
Silaža kukuruza, 44% SM	-	-	9,50
Silaža kukuruza, 33% SM	10,00	10,00	-
Silaža kukuruza, 33,94%SM	-	-	9,00
Senaža lucerke, 51,79% SM	5,00	2,50	-
Senaža lucerke, 47,40% SM	-	-	5,00
Pivski trop, 21% SM	-	-	5,00
Zrno kukuruza	0,71	0,98	2,50
Zrno ječma	0,50	0,50	1,50
Sojine ljuspice	-	0,30	1,30
Sojina sačma, 44% N	0,67	1,10	1,13
Pšenično brašno	0,50	0,50	1,30
Rezanci šećerne repe	-	-	1,82
<i>DextroFat SC</i>	-	0,10	0,40
<i>Optigen II, 41% N</i>	-	-	0,14
Dekstroza monohidrat	-	0,04	0,10
Dikalcijum fosfat, 18% P	-	-	0,27
Magnezijum oksid	-	-	0,05
Natrijum bikarbonat	-	-	0,15
Natrijum hlorid, jodirani	-	-	0,07
Kalcijum karbonat	0,03	0,04	0,03
<i>Milkinal trocken, 3%</i>	0,20	0,08	-
Beta karotin	-	0,004	-
Ukupno:	22,23	18,24	42,69

Tabela 2. Hemijski sastav i nutritivna vrednost obroka ispitivanih krava

Nutritivna vrednost	Period u odnosu na dan teljenja		
	-60. dan do -14. dan	-14. dan do 0. dan	0. dan do +60. dan
Suva materija, kg	12,35	9,82	23,63
Neto energija laktacije (NEL), MJ	72,86	65,50	163,03
Sirovi proteini (SP), %	12,50	15,03	16,05
Proteini nerazgradivi u buragu, %	4,09	5,09	5,06
Sirova mast, %	2,60	3,82	4,78
Kisela deterdžentska vlakna, %	32,19	25,31	22,08
Neutralna deterdžentska vlakna, %	49,53	40,59	35,48
Ca, %	0,73	0,64	0,90
P, %	0,44	0,42	0,52
Na, %	0,23	0,13	0,36
Cl, %	0,30	0,17	0,29
Mg, %	0,31	0,27	0,34
K, %	1,42	1,30	1,18
S, %	0,23	0,22	0,22
Mn, ppm	111,56	129,36	82,40
Cu, ppm	33,23	39,81	25,64
Zn, ppm	132,27	168,24	96,90
Co, ppm	0,78	1,03	0,54
J, ppm	2,44	3,06	1,64
Fe, ppm	221,67	228,38	220,53
Se, ppm	0,89	1,14	0,70
Vitamin A, IJ/kg	21 487,26	41 234,28	21 273,58
Vitamin D, IJ/kg	1 574,05	4 487,10	3 445,30
Vitamin E, IJ/kg	83,31	117,79	69,35

4.3. Tretman životinja

Sve životinje uključene u ogled ($n = 16$) podvrgnute su intravenskom testu opterećenja glukozom (GTT) četiri puta u toku trajanja perioda ispitivanja. Ogled je započeo 28. dana pre očekivanog termina teljenja i trajao je do 28. dana laktacije. Testovi opterećenja su izvođeni uvek u istom periodu dana, 4 sata nakon davanja jutarnjeg obroka.

Na početku ogleada, 28 dana pre očekivanog termina teljenja, sproveden je prvi test opterećenja glukozom. Testovi opterećenja glukozom, izvedeni na isti način, ponovljeni su 7 do 10 dana pre očekivanog termina teljenja, kao i 14. i 28. dana laktacije.

Realizaciju istraživanja odobrio je Etički komitet Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, u skladu sa odredbama Zakona o veterinarstvu (Službeni glasnik 91/2005), Zakona o naučno-istraživačkoj delatnosti Republike Srbije (Službeni glasnik 110/2005 i 50/2006) i Evropske konvencije o zaštiti kičmenjaka koji se koriste za ogledne i druge naučne svrhe (ETC 123, 1986).

4.4. Metode rada

4.4.1. Intravenski test opterećenja glukozom

Testovi opterećenja glukozom su izvedeni davanjem 500 mg/kg telesne mase 50 postotnog rastvora glukoze („Hemofarm“, Vršac), infuzijom u venu jugularis. Prosečno vreme trajanja infuzije rastvora glukoze bilo je 6 ± 2 minuta.

4.4.2. Uzimanje uzoraka krvi

Uzimanje uzoraka krvi izvršeno je punkcijom suprotne *v. jugularis*, u koju nije davana infuzija. Uzorci krvi su uzimani neposredno pre aplikacije rastvora glukoze (0. minut), kao i 15., 30., 60., 90., 120. i 180. minuta nakon davanja rastvora glukoze. Kako bi se izbegao uticaj uzimanja obroka na rezultate analiza, uzorkovanje je vršeno uvek u isto vreme, 4 časa nakon jutarnjeg hranjenja. Za određivanje koncentracije glukoze i beta-hidroksi buterne

kiseline (BHBA), korišćena je puna krv (neposredno nakon uzorkovanja), dok je za određivanje koncentracije insulina i odabranih biohemijskih parametara korišćen krvni serum.

Uzorci krvi su uzimani u sterilne vakutajnere bez antikoagulansa. Nakon uzimanja, uzorci su čuvani u ručnom frižideru na ledu da bi se izvršila spontana koagulacija, a zatim centrifugirani na 3,000 g tokom 15 minuta. Dekantirani uzorci krvnih seruma su zamrzavani na -18°C sve do izvođenja analiza.

4.4.3. Uzimanje uzoraka tkiva jetre, masnog i mišićnog tkiva

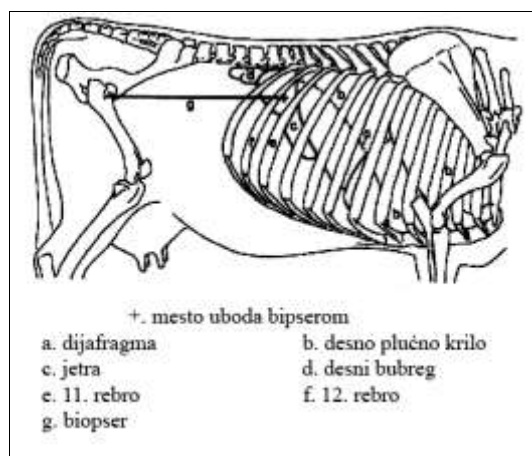
Sedam do deset dana pre očekivanog termina teljenja, kao i četrnaest dana posle teljenja uzeti su uzorci tkiva jetre, masnog i mišićnog tkiva od svih ispitanih životinja. Uzorci tkiva jetre uzeti su perkutanom biopsijom, prema Gaal-ovoj modifikovanoj metodi po Hojcova-Kacafirek (Gaal i sar., 1983). Uzorci mišićnog i masnog tkiva uzeti su perkutanom biopsijom prema metodi koju su opisali Al-Trad i saradnici (2009).

Biopsija je vršena pomoću modifikovanog biopsera za uzimanje uzoraka tkiva jetre koji se sastojao od igle sa vrhom u obliku bodeža duge 20,5 cm, umetnute u čeličnu kanilu (spoljašnji promer ~6 mm, unutrašnji promer ~4 mm). Pribor za izvođenje biopsije, pored opisanog biopsera, sastojao se od brijača, rastvora povidon-jodida, 2% rastvora prokain-hidrohlorida, skalpela i plastičnog šprica sa klipom (slika 6).



Slika 6. Pribor za izvođenje biopsije jetre

Biopsije jetre izvođena je sa desne strane životinje, u 11. međurebarnom prostoru, oko 2 cm ventralno od horizontalne linije kroz *tuber coxae*. Biopsija masnog tkiva je vršena u predelu korena repa, a tkiva mišića na posteriornoj strani regije buta. Nakon fiksacije životinje i pripreme operacionog polja približne veličine 5 x 5 cm (šišanje, brijanje, dezinfekcija rastvorom povidon-jodida, lokalna infiltrativna anestezija sa 5 ml 2% prokain-hidrohlorida), načinjena je incizija kože i supkutisa skalpelom, a zatim su biopserom probijeni međurebarni mišići, peritoneum i kapsula jetre. Prilikom uvođenja biopser je usmeren prema levom olekranonu (kranio-ventralno). Nakon ulaska u tkivo jetre, igla biopsera je izvađena, a na kanilu je postavljen plastični špric koji povlačenjem klipa stvara vakuum. Uzorak tkiva jetre (dijametra 3-4 mm i dužine 3-5 cm) je uzet tako što je istovremeno sa povlačenjem klipa, instrument potiskivan dublje u tkivo jetre uz rotaciju od 180°, čime je isečak tkiva uvučen u lumen kanile. Nakon vađenja kanile sa isečkom tkiva jetre, rana na koži tretirana je antibiotskim praškom.



Slika 7. Šematski prikaz mesta vršenja biopsije jetre

Uzorci masnog i tkiva jetre su po uzimanju podeljeni na dva jednaka dela, od kojih je jedan (za određivanje ekspresije proteina insulinog receptora i GLUT 4 molekula) odmah duboko zamrzavan u tečnom azotu, a zatim čuvan na -80°C, do izvođenja analiza. Druga polovina uzoraka (za određivanje sadržaja masti i dijametra adipocita) konzervisana je u

10% puferizovanom rastvoru formalina i tako čuvana do izvođenja analiza. Uzorci mišićnog tkiva su zamrzavani u tečnom azotu i čuvani na -80°C, do izvođenja analiza (određivanje ekspresije proteina insulinskog receptora i GLUT 4 molekula)

4.4.4. Ocena telesne kondicije

Telesna kondicija svih ispitanih krava ocenjivana je vizuelno, prema sistemu *Elanco Animal Health Bulletin Al 8478* (Šamanc i sar., 2010a) za ocenu telesne kondicije krava u graviditetu i laktaciji, ukupno 4 puta tokom izvođenja oglada, i to 30. i 7. do 10. dana pre očekivanog termina teljenja, kao i 14., i 28. dana pose teljenja.

4.4.5. Određivanje koncentracije biohemijskih parametara krvi

U svim uzorcima krvi uzetih tokom testova opterećenja određene su koncentracije glukoze, neesterifikovanih masnih kiseline (*non-esterified fatty acids, NEFA*) i insulina. Dodatno, u uzorcima krvi uzetih 0. minuta određene su koncentracije ukupnih proteina, albumina, beta-hidroksi buterne kiseline (*β-hydroxy butiric acid, BHBA*), uree, ukupnog bilirubina, kalcijuma i fosfora.

Koncentracije glukoze i BHBA su merene na samoj farmi u punoj krvi, neposredno nakon uzimanja uzoraka krvi. Vrednosti glikemije i ketonemije su određene enzimskom metodom na aparatu Xceed™ (Abbott, USA) upotrebom komercijalnih test traka istog proizvođača. Koncentracije biohemijskih sastojaka krvnog seruma merene su u laboratoriji Katedre za bolesti kopitara, mesojeda, živine i divljači Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, na automatskom veterinarskom biohemijskom analizatoru (Vet Evolution, Italija). Vrednosti odabranih parametara metaboličkog profila su određene kolorimetrijski i upotrebom enzimskih metoda, korišćenjem komercijalnih test paketa (Human, Nemačka).

4.4.6. Određivanje koncentracije insulina u krvnom serumu

Koncentracija insulina određena je u laboratoriji Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ (Beograd, Srbija) upotrebom komercijalnih RIA kitova (INEP, Zemun), prilagođenih za detekciju koncentracije hormona u krvnom serumu goveda, prema metodi koju su opisali Nikolić i saradnici (1996).

Test je standardizovan prema referentnom materijalu Svetske zdravstvene organizacije: insulin (WHO 53/511). U testu je korišćen humani insulin obeležen radioaktivnim izotopom ¹²⁵I. Kao reagens je korišćen kunićev poliklonski antiserum na humani insulin. Kompleksi antitela i insulina su taloženi kombinacijom sekundarnih antitela i polietilen glikola. Radioaktivnost nastalog taloga merena je na gama brojaču 1219 LKB (LKB Wallac 1219 RackBeta). Istovremeno sa uzorcima seruma tretirani su i standardi goveđeg insulina, koji sadrže precizno definisane koncentracije insulina, pomoću kojih se formira standardna (kalibraciona) kriva. Upoređivanjem sa standardnom krivom određivana je koncentracija insulina u uzorcima seruma.

4.4.7. Histološka ispitivanja

Histološka ispitivanja su obavljena u laboratoriji Katedre za patološku morfologiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Stepenu zamašćenja jetre određen je stereometrijskom metodom, na patohistološkim preparatima tkiva jetre, uzetih biopsijom i bojnih hematoksilin-eozinom (HE). Dijametar adipocita određen je morfometrijskom metodom, na patohistološkim preparatima masnog tkiva, uzetih biopsijom i bojnih hematoksilin-eozinom (HE). Histološki preparati su pregledani na optičkom mikroskopu Olypmus Bx51 uz upotrebu uobičajenih uveličanja (20x, 40x, 100x, 200x, 400x i 600x).

4.4.7.1. Određivanje stepena zamašćenja jetre

Deo isečka tkiva dobijen biopsijom jetre fiksiran je u 10 % neutralnom formalinu. Nakon toga tkivo je obrađeno standardnim histološkim tehnikama u automatskom tkivnom

procesoru (dehidratacija kroz seriju alkohola, prosvetljavanje u ksilolu, impregnacija parafinom) i uklopljeno u parafinske blokove. Nakon kalupljenja u parafinu, tkivo je uz pomoć mikrotoma isečeno na listiće debljine 3 - 5 μm , koji su potom obojeni hematoksilin-eozinom (HE). Količina masti u hepatocitima je određivana stereometrijski, izračunavanjem volumenske gustine prema formuli:

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

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

Zapreminska gustina (V_v) je relativna stereološka veličina koja pokazuje koliki deo ukupnog prostora pripada proučavanoj fazi. Dimenzija zapreminske gustine ima eksponent 0, odnosno ona je bez dimenzije (npr. $\text{mm}^3/\text{mm}^3 = 0$). Ukoliko se dobijena vrednost zapreminske gustine ponoži sa 100, u rezultatu se dobija procenat proučavane faze (ukupni lipidi) u jedinici prostora (hepatocit). Zapreminska gustina određena je tako što je se presek proučavane strukture prekrilo testnim sistemom i prebrojane tačke koje su padale na proučavanu fazu (P_f), pa je se taj broj podelio brojem tačaka testnog sistema (P_t). Za brojanje je korišćena mrežica M 100 (Weibel, 1979).

Dobijeni rezultati tumačeni su u skladu sa klasifikacijom koju je predložio Gaal (1993), prema kojoj se na osnovu sadržaja masti u jetri sve krave svrstavaju u grupu onih sa blagim (0-20%), srednjim (20-40%) ili teškim stepenom zamašćenja jetre (preko 40%).

4.4.7.2. Određivanje dijametara adipocita

Za morfometrijsku analizu korišćen je morfometrijski softver Olympus Cell B. U svakom preparatu masnog tkiva, pripremljenih na istovetan način kao i tkiva jetre, meren je dijametar (površina) adipocita. Pomenuto merenje izvršeno je na 100 nasumično odabranih adipocita na uveličanju objektiva 100x.

Nakon određivanja dijametra adipocita izračunata je prosečna vrednost i standardna devijacija za svaku ispitanu grupu i fazu ispitivanja. Fotografije su napravljene digitalnom kamerom Olympus Color View III pomoću optičkog mikroskopa Olympus Bx51

4.4.8. Matematički modeli za procenu insulinske rezistencije

4.4.8.1. RQUICKI (Revised Quantitative Insulin Sensitivity Check Index)

Danas se RQUICKI indeks smatra relevantnim parametrom za procenu stepena insulinske rezistencije, odnosno osetljivosti perifernih tkiva na insulin kod visokomlečnih krava (Holtenius i Holtenius, 2007). RQUICKI indeks je izračunat na osnovu bazalnih vrednosti (0. minut testa) za koncentraciju glukoze (G_b), insulina (I_b) i neesterifikovanih masnih kiselina (NEFA b) u krvi, a uz pomoć formule:

$$RQUICKI = \frac{1}{[\log(G_b) + \log(I_b) + \log(NEFA_b)]}$$

U veterinarskoj medicini ne postoje granične vrednosti RQUICKI indeksa za pojedine uzrasne i proizvodno-reproduktivne kategorije goveda, kao što je to slučaj za neke indekse za procenu insulinske rezistencije u humanoj medicini (Reinehr i Andler, 2004; Mehmet i sar., 2005). Stoga, uopšteno se uzima, da niže vrednosti RQUICKI indeksa ukazuju na veću insulinsku rezistenciju, a ukoliko je dobijena vrednost veća, onda je osetljivost perifernih tkiva na insulin bolja.

4.4.8.2. Parametri vezani za promene koncentracija glukoze, insulina i NEFA tokom GTT

Trend promena koncentracija glukoze, insulina i NEFA tokom izvođenja GTT takođe mogu da ukažu na stepen osetljivosti tkiva na insulin. U te svrhe korišćeni su matematički izvedeni parametri koji bliže opisuju metabolizam glukoze (k , $T_{1/2}$, Pik_{gluk} i

AUC_{gluk}), insulina ($\Delta\text{Max}_{\text{ins}}$, Pik_{ins} i AUC_{ins}) i NEFA (AUC_{NEFA}), a prema metodama proračuna prethodno opisanih od strane Opsomera i saradnika (1999).

4.4.9. Određivanje nivoa sadržaja proteina insulinskih receptora i transportnog molekula za glukozu (GLUT 4)

4.4.9.1. Priprema ćelijskog lizata mišićnog i masnog tkiva

Uzorci mišićnog i masnog tkiva homogenizovani su u modifikovanom RIPA puferu (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,2 % Na-deoksiholat, 0,2 % SDS, 1 mM EDTA) uz dodavanje proteaznih (2 mM PMSF, 10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin i 10 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin) i fosfataznih inhibitora (100 mM natrijum fluorid, 10 mM natrijum pirofosfat i 2 mM natrijum ortovanadat), mišići u odnosu 1:4 Ultra-Turrax homogenizerom, a masno tkivo u odnosu 1:2 sa 6 do 8 zaveslaja u staklo-teflon homogenizeru. Dobijeni homogenat mišića je centrifugiran 30 min na 15000 x g na 4°C. Homogenat masnog tkiva je centrifugiran na 3000 x g 15 min, a zatim je dobijeni internatant centrifugiran 30 min na 15000 x g na 4°C. U dobijenim supernatantima, koji predstavljaju lizate ćelija masnog i mišićnog tkiva određivana je koncentracija proteina BCA metodom. Svi uzorci su potom razblaženi RIPA puferom do 10mg/ml, a zatim je dodat Laemli pufer u odnosu 1:1. Tako pripremljeni uzorci su kuvani 5 min na 95 °C, i čuvani na -20 °C do korišćenja.

4.4.9.2. Određivanje koncentracije proteina BCA metodom

Koncentracija proteina u uzorcima mišićnog i masnog tkiva određivana je kolorimetrijskom metodom, korišćenjem komercijalnog dijagnostičkog kompleta BCA (Smith i sar., 1985). BCA, u formi natrijumove soli, je senzitivan, stabilan i visoko specifičan reagens za jone bakra Cu^{1+} . Peptidne veze i 4 aminokiseline (cistein, cistin, triptofan i tirozin) su odgovorne za razvijanje boje u proteinskim uzorcima inkubiranim sa BCA. BCA proteinski esej kombinuje biuretsku reakciju (protein redukuje Cu^{2+} jone do Cu^{1+} u alkalnoj sredini) sa jedinstvenim karakteristikama BCA. Purpurni reakcioni produkt,

formiran interakcijom dva molekula BCA sa jednim Cu^{1+} jonom, hidrosolubilna je i snažno apsorbira na 562 nm. Ovo omogućava spektrofotometrijsku kvantifikaciju proteina u opsegu koncentracija 20-2000 $\mu\text{g/ml}$. Koncentracija ukupnih proteina je preračunavana sa standardne krive, konstruisane na osnovu izmerenih vrednosti apsorbanca poznatih rastućih koncentracija (0,2, 0,4, 0,8, 1,2, 1,6 i 2 mg/ml) goveđeg serumskog albumina (BSA).

4.4.9.3. SDS-Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu i Western blot

Nivoi ekspresije proteina insulinskog receptora i GLUT 4 molekula određivan je u ukupnim ćelijskim lizatima, metodom SDS-elektroforeze na poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE, engl. *SDS polyacrylamide gel electrophoresis*) i *Western blot*-a.

Proteini su razdvajani po molekularnoj masi na denaturišućoj SDS elektroforezi na poliakrilamidnom gelu, po metodi Laemmli (Laemmli, 1970). Proteini su pomoću SDS-a, anjonskog deterdženta koji disocira i denaturiše proteine, prevedeni u linearne polipeptidne lance. Supernatant kod preparata ćelijskog lizata korišćen je za *Western blot* analize, pri čemu su razblaživani do koncentracije 10 mg/ml odgovarajućim puferom i zatim do finalnih 5 mg/ml dodavanjem iste zapremine 2 x Laemmli pufera (100 mM Tris-HCl pH 6,8, 200 mM ili β -merkaptoetanol, 4% SDS, 0,2% brom fenol plavo i 20% glicerol), kuvani 5 min na 100 °C, hlađeni na sobnoj temperaturi i skladišteni na -20 °C. Uzorci proteina (50 μg ili 75 μg) su nanošeni na 10% poliakrilamidni gel i u tank puferu (0,0025 M Tris pH 8,3, 0,192 M glicin i 0.1% SDS) razdvajani po molekularnoj masi pomoću mini sistema za elektroforezu (Mini Protein Electrophoresis Cell, Bio-Rad). Korišćen je proteinski marker za elektroforezu, koji sadrži 9 proteina različitih molekularnih masa (250, 130, 100, 75, 55, 35, 27, 15 i 10 kDa, Fermentas, Litvanija). Elektroforeza je trajala 2 h pri konstantnom naponu od 100 V. Posle elektroforeze gelovi su korišćeni za *Western blot* analizu.

Western blot, koji prati razdvajanje proteina SDS-PAGE elektroforezom, predstavlja prenos proteina sa poliakrilamidnog gela na poliviniliden fluorid membranu (PVDF, Immobilon-P membrana, veličine pora 0,45 μm , Millipore, USA) i detekciju specifičnih proteina pomoću primarnih i sekundarnih antitela kuplovanih sa enzimom čija

se aktivnost detektuje prisustvom obojenog produkta. Nakon elektroforeze, prenos proteina sa gelova na membrane vršen je pri konstantnoj struji limitiranoj na 0,1 A na 4 °C preko noći, pomoću sistema za mokri transfer (Trans Blott Cell, Bio-Rad). Za transfer je upotrebljavan Transfer pufer (0,0025 M Tris pH 8,3, 0,192 M glicin i 20% metanol). Nakon završenog transfera, nespecifično vezivanje antitela za membrane prevenirano je inkubacijom u TBST puferu (25 mM Tris, 150 mM NaCl i 0,1% Tween, pH 8,0) sa 5% obranim mlekom u prahu ili 5% BSA tokom 1,5 h uz mešanje na sobnoj temperaturi.

Tako tretirane membrane su inkubirane preko noći na 4 °C, sa primarnim antitelima na GLUT4, IR beta ili β -aktin. Razblaženja primarnih antitela bila su u opsegu 1:200 do 1:1000. Po završenoj inkubaciji sa primarnim antitelom, membrane su ispirane 5 x 5 min TBST puferom na sobnoj temperaturi uz blago mešanje. Nakon ispiranja membrane su inkubirane 1,5 h, uz mešanje, sa sekundarnim anti-mišjim (odnosno anti-zečijim) antitelom konjugovanim sa HRP (razblaženje 1:10000, TBST) ili alkalnom fosfatazom (razblaženje 1:5000, TBST). Nakon inkubacije, membrane su ispirane 5 x 5 min u TBST. Radi vizualizacije traka, na membrane je nanošen supstrat za hemiluminiscenciju (ECL, engl. *enhanced chemiluminescence*).

Supstrat za ECL je dobijen mešanjem istih zapremina luminola i rastvora vodonik peroksida, koji u prisustvu HRP enzima na sekundarnom antitelu dovodi do hemijske reakcije (oksidacije luminola) i do oslobađanja energije u obliku svetlosti. Membrane su inkubirane u ECL supstratu 5 min, nakon čega su sušene, pokrivane plastičnom folijom i postavljane u kasete za razvijanje filmova. Na pokrivene membrane je postavljan rendgen film (ORTO CP-G-PLUS, AGFA), pri čemu je dužina ekspozicije varirala od 3–5 min. Intenzitet signala na filmu odgovara količini specifičnog proteina u analiziranim uzorcima.

Posle analize GLUT 4 membrane su *stripovane* 30 min na 50 °C u puferu sledećeg sadržaja: 100 mM β -merkaptetanol, 2% SDS i 62,5 mM Tris pH 6,7. *Stripovanje* membrane podrazumeva njeno izlaganje takvim uslovima sredine, koji sa nje uklanjaju supstrat, primarno i sekundarno antitelo, i vraćaju membranu u isto stanje u kome se nalazila nakon skidanja sa transfera. Nakon ispiranja i blokiranja nespecifičnog vezivanja, membrane su reblotovane sa β -aktinom, kao kontrola unosa uzoraka na gel.

4.4.10. Statistička obrada rezultata

Podaci dobijeni u ovoj disertaciji su obrađeni standardnim statističkim metodama u softverskom paketu STATISTICA v.6. Rezultati istraživanja prikazani su uz pomoć parametara deskriptivne statistike (aritmetička sredina - \bar{X} , standardna devijacija - SD, standardna greška aritmetičke sredine - SE, koeficijent varijacije – CV%, interval varijacije – IV). Statistička značajnost razlika srednjih vrednosti ispitivanih parametara (p) između ogledne i kontrolne grupe krava testirana je uz pomoć Studentovog t-testa. Kao statistički značajne uzete su razlike na nivou značajnosti od $p < 0,05$. Svi dobijeni rezultati su prikazani tabelarno i/ili grafički.

5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

5.1. KONCENTRACIJE GLUKOZE, INSULINA I NEFA TOKOM TESTOVA OPTEREĆENJA GLUKOZOM

Rezultati ispitivanja funkcionalne aktivnosti B ćelija endokrinog pankreasa i stepena osetljivosti perifernih tkiva na insulin prikazani su za sva četiri ispitivana perioda (28. i 10. dana pre teljenja, i 14. i 28. dana posle teljenja) odvojeno, poređenjem rezultata dobijenih kod krava optimalne telesne kondicije (Opt) i ugojenih krava (Deb).

5.1.1. KONCENTRACIJE GLUKOZE, INSULINA I NEFA TOKOM TESTA OPTEREĆENJA IZVEDENOG 28. DANA PRE TELJENJA

5.1.1.1. Koncentracija glukoze

U tabeli 5.1. je prikazana koncentracija glukoze u uzorcima krvi uzetim pre (0. minut) i nakon davanja glukoze (15., 30., 60., 90., 120. i 180. minuta) tokom testa opterećenja izvedenog 28. dana pre teljenja.

Tabela 5.1. Koncentracija glukoze (mmol/L) u uzorcima krvi dobijenim tokom izvođenja testa 28. dana pre teljenja

	0. min		15. min		30. min		60. min		90. min		120. min		180. min	
	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb
X	2,95	3,05	12,52	12,23	9,37	9,95	6,38	5,87	4,87	4,43	3,83	3,75	3,25	3,58*
SD	0,35	0,33	1,24	1,33	0,80	0,85	1,23	1,37	0,91	1,16	0,46	0,89	0,28	0,30
SE	0,12	0,12	0,44	0,47	0,28	0,30	0,43	0,48	0,32	0,41	0,16	0,31	0,09	0,11
CV	11,85	10,77	9,89	10,88	8,59	8,54	19,30	23,29	18,82	26,27	12,12	23,71	8,51	8,50
IV	2,2-	2,4-	10,8-	10,1-	8,0-	8,7-	4,6-	4,7-	3,1-	3,6-	3,1-	3,0-	2,7-	3,1-
	3,3	3,4	14,8	13,9	10,4	11,1	8,5	8,6	6,2	7,2	4,3	5,8	3,6	4,2

*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 u odnosu na vrednost određenu istog minuta u testu opterećenja kod krava optimalne kondicije

Iz rezultata prikazanih u tabeli 5.1. se zapaža da se koncentracija glukoze nije značajno razlikovala između krava optimalne telesne kondicije i ugojenih krava, izuzev 180. minuta nakon aplikacije glukoze kada je kod ugojenih krava koncentracija glukoze bila statistički značajno veća ($p < 0,05$) nego kod krava optimalne telesne kondicije.

5.1.1.2. Koncentracija insulina

U tabeli 5.2. je prikazana koncentracija insulina u uzorcima krvi uzetim pre (0. minut) i nakon davanja glukoze (15., 30., 60., 90., 120. i 180. minuta) tokom testa opterećenja izvedenog 28. dana pre teljenja.

Tabela 5.2. Koncentracija insulina ($\mu\text{IU/mL}$) u uzorcima krvi dobijenim tokom izvođenja testa 28. dana pre teljenja.

	0. min		15. min		30. min		60. min		90. min		120. min		180. min	
	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb
X	25,56	29,36	173,07	153,91	130,89	158,55	80,91	106,62	79,87	73,41	41,39	35,71	24,21	25,01
SD	12,49	11,42	27,49	38,88	30,94	56,25	36,88	43,27	60,75	23,81	32,54	9,80	13,76	4,58
SE	4,41	4,04	9,72	13,74	10,94	9,89	13,04	15,30	21,48	8,42	11,50	3,46	4,86	1,62
CV	48,85	38,91	15,89	25,26	23,63	35,48	45,58	40,59	76,07	32,44	78,60	27,45	56,85	18,32
IV	10,95- 50,6	8,9- 46,46	113,56- 208,87	83,68- 209,61	102,30- 183,98	43,71- 236,34	49,49- 165,17	47,56- 171,50	17,32- 193,16	32,48- 106,22	9,9- 93,64	19,25- 54,70	9,9- 47,11	18,37- 32,88

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ u odnosu na vrednost određenu istog minuta u testu opterećenja kod krava optimalne kondicije

Iz rezultata prikazanih u tabeli 5.2. se zapaža da nema značajne razlike između dobijenih srednjih vrednosti koncentracije insulina u krvi ugojenih krava u odnosu na vrednosti insulinemije određene istog minuta u testu opterećenja kod krava optimalne telesne kondicije.

5.1.1.3. Koncentracija NEFA

U tabeli 5.3. je prikazana koncentracija NEFA u uzorcima krvi uzetim pre (0. minut) i nakon davanja glukoze (15., 30., 60., 90., 120. i 180. minuta) tokom testa opterećenja izvedenog 28. dana pre teljenja.

Tabela 5.3. Koncentracija NEFA (mmol/L) u uzorcima krvi dobijenim tokom izvođenja testa 28. dana pre teljenja.

	0. min		15. min		30. min		60. min		90. min		120. min		180. min	
	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb
X	0,33	0,42	0,38	0,42	0,37	0,40	0,27	0,31	0,23	0,24	0,20	0,23	0,25	0,27
SD	0,08	0,16	0,1	0,18	0,18	0,14	0,08	0,09	0,08	0,05	0,03	0,07	0,05	0,06
SE	0,03	0,06	0,03	0,06	0,06	0,05	0,03	0,03	0,03	0,02	0,01	0,02	0,02	0,02
CV	24,81	37,66	26,09	42,44	49,2	33,83	31,1	27,67	34,85	19,57	14,9	29,57	18,54	20,63
IV	0,20- 0,46	0,25- 0,78	0,23- 0,50	0,19- 0,76	0,15- 0,76	0,21- 0,68	0,11- 0,37	0,19- 0,46	0,11- 0,36	0,19- 0,34	0,16- 0,26	0,13- 0,36	0,18- 0,30	0,19- 0,40

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ u odnosu na vrednost određenu istog minuta u testu opterećenja kod krava optimalne kondicije

Iz rezultata prikazanih u tabeli 5.3. se uočava da nema statistički značajne razlike između koncentracije slobodnih viših masnih kiselina izmerene u krvi ugojenih krava u odnosu na vrednosti NEFA u krvi krava optimalne telesne kondicije.

5.1.1.4. Matematički izračunati i izvedeni parametri testa opterećenja glukozom izvedenog 28. dana pre teljenja

U tabeli 5.4. prikazani su parametri koji opisuju trend promena koncentracije glukoze (k , $T_{1/2}$, Pik_{gluk} i AUC_{gluk}), insulina (ΔMax_{ins} , Pik_{ins} i AUC_{ins}) i NEFA (AUC_{NEFA}) nakon aplikacije glukoze 28. dana pre teljenja.

Tabela 5.4. Parametri testa opterećenja izvedenog 28. dana pre teljenja ($X \pm SD$)

	Optimalne krave	Debele krave
	Bazalna _{glukoza} (mmol/L)	2,95±0,35
k (%/min)	1,52±0,38	1,67±0,46
$T_{1/2}$ (min)	48,06±12,03	44,58±12,95
Pik_{gluk}	12,52±1,24	12,23±1,33
AUC_{gluk}	1028,12±100,27	1015,3±145,65
Bazalni _{ins} (µIU/mL)	25,56±12,49	29,36±11,42
ΔMax_{ins} (µIU/mL)	147,51±31,90	116,95±26,62*
Pik_{ins} (µIU/mL)	173,07±27,49	158,55±56,25
AUC_{ins}	13145,51±5369,06	13854,19±3785,03

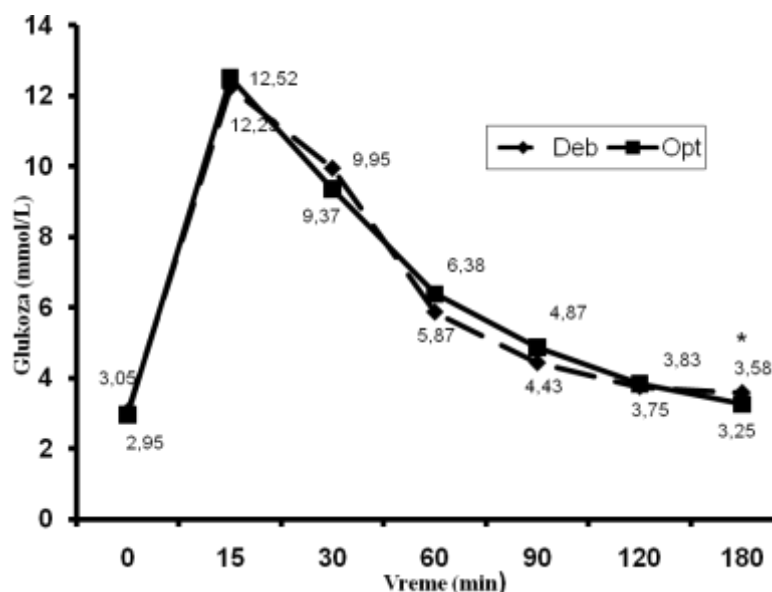
Bazalna _{NEFA}	0,33±0,08	0,42±0,16
AUC _{NEFA}	-12,39±7,57	-17,04±7,49
RQUICKY	0,39±0,03	0,38±0,04

*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 u odnosu na vrednost određenu istog minuta u testu opterećenja kod krava optimalne kondicije

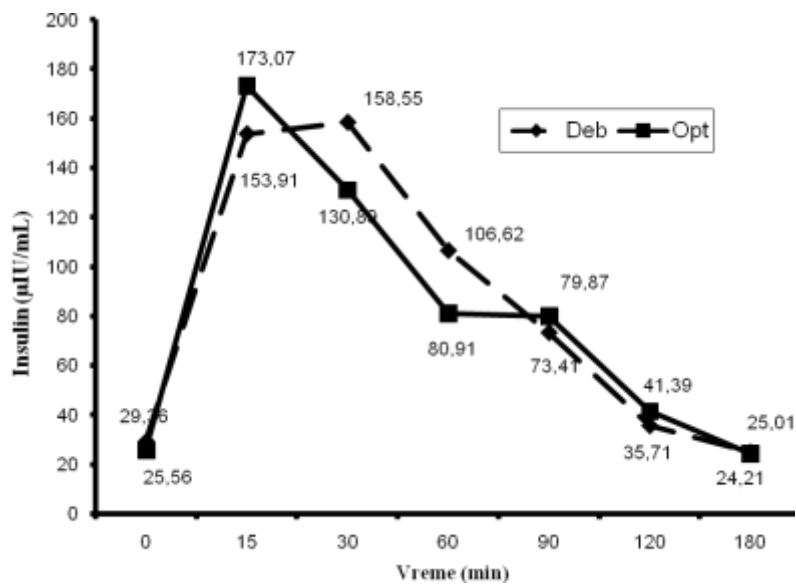
Iz tabele 5.4. kao i priloženih grafikona se može videti da je trend promena koncentracije glukoze tokom testa opterećenja bio sličan kod obe grupa krava. S druge strane, dok je kod krava optimalne kondicije insulinemija dosegla vrednost pika već 15. minuta nakon aplikacije glukoze, kod ugojenih krava najviša vrednost koncentracije insulina tokom testa je utvrđena tek 30. minuta nakon davanja glukoze. Iz tog razloga je kod ugojenih krava $\Delta\text{Max}_{\text{ins}}$ bio značajno niži (p < 0,05) nego kod krava optimalne kondicije. Nije bilo razlike u vrednostima AUC_{NEFA} između dve grupe krava, kao ni u vrednosti RQUICKY indeksa.

Na grafikonima 1, 2 i 3 prikazane su koncentracije glukoze, insulina i NEFA tokom testa opterećenja izvedenog 28. dana pre teljenja uporedo kod ugojenih i krava optimalne telesne kondicije u cilju lakšeg praćenja kretanja parametara u testu.

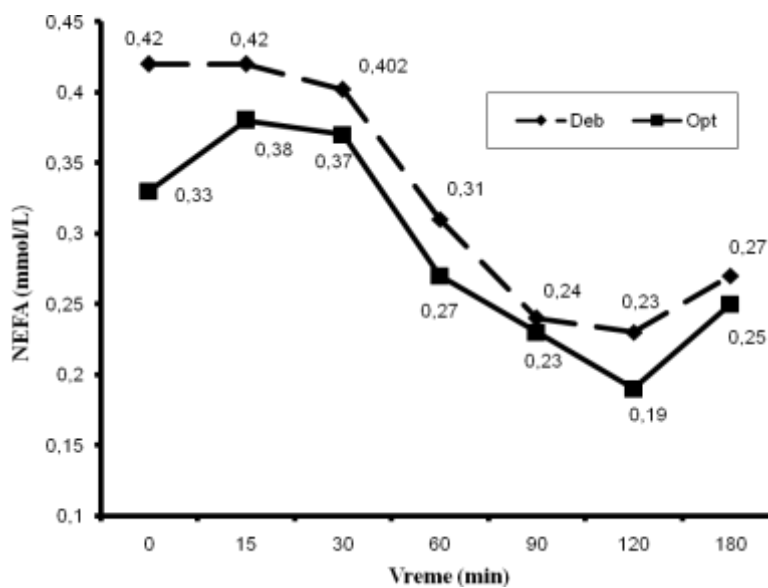
Grafikon 1. Koncentracija glukoze (mmol/L) u uzorcima krvi dobijenim tokom izvođenja testa 28. dana pre teljenja



Grafikon 2. Koncentracija insulina (mmol/L) u uzorcima krvi dobijenim tokom izvođenja testa 28. dana pre teljenja



Grafikon 3. Koncentracija NEFA (mmol/L) u uzorcima krvi dobijenim tokom izvođenja testa 28. dana pre teljenja



5.1.2. KONCENTRACIJE GLUKOZE, INSULINA I NEFA TOKOM TESTA OPTEREĆENJA IZVEDENOG 10. DANA PRE TELJENJA

5.1.2.1. Koncentracija glukoze

U tabeli 5.5. je prikazana koncentracija glukoze u uzorcima krvi uzetim pre (0. minut) i nakon davanja glukoze (15., 30., 60., 90., 120. i 180. minuta) tokom testa opterećenja izvedenog 10. dana pre teljenja.

Tabela 5.5. Koncentracija glukoze (mmol/L) u uzorcima krvi dobijenim tokom izvođenja testa 10. dana pre teljenja

	0. min		15. min		30. min		60. min		90. min		120. min		180. min	
	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb
X	2,62	3,18*	11,67	10,97	8,17	8,23	5,23	5,32	3,68	3,88	3,18	3,08	2,67	2,98*
SD	0,50	0,20	0,86	1,12	0,99	0,51	0,89	0,89	0,72	0,76	0,37	0,21	0,52	0,25
SE	0,18	0,07	0,30	0,40	0,35	0,18	0,31	0,32	0,25	0,27	0,14	0,07	0,18	0,09
CV	19,31	6,38	7,34	10,22	12,24	6,25	17,05	16,83	19,55	19,68	11,68	6,81	20,71	8,29
IV	1,8-	2,9-	9,9-	9,6-	6,1-	7,1-	3,7-	3,8-	2,8-	2,6-	2,7-	2,8-	2,1-	2,6-
	3,4	3,6	12,8	12,7	9,4	8,8	6,4	6,8	5,2	4,9	3,9	3,4	3,6	3,4

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ u odnosu na vrednost određenu istog minuta u testu opterećenja kod krava optimalne kondicije

Iz rezultata prikazanih u tabeli 5.5. se zapaža da su koncentracije glukoze u krvi ugojenih krava bile statistički značajno veće u odnosu na vrednosti izmerene kod krava optimalne telesne kondicije jedino na početku i kraju testa opterećenja glukozom, odnosno 0. i 180. minuta ($p < 0.05$, pojedinačno).

5.1.2.2. Koncentracija insulina

U tabeli 5.6. je prikazana koncentracija insulina u uzorcima krvi uzetim pre (0. minut) i nakon davanja glukoze (15., 30., 60., 90., 120. i 180. minuta) tokom testa opterećenja izvedenog 10. dana pre teljenja.

Tabela 5.6. Koncentracija insulina ($\mu\text{IU/mL}$) u uzorcima krvi dobijenim tokom izvođenja testa 10. dana pre teljenja

	0. min		15. min		30. min		60. min		90. min		120. min		180. min	
	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb
X	10,24	17,33*	112,39	131,6	102,19	134,9*	53,72	94,51	19,25	29,11	20,84	13,63	13,49	13,64
SD	5,04	4,90	51,66	45,98	21,32	31,41	40,34	61,80	8,78	15,48	17,42	4,24	6,09	6,72
SE	1,78	1,73	18,26	16,26	7,54	11,10	14,26	21,85	3,10	5,47	6,16	1,50	2,15	2,37
CV	49,19	29,25	45,96	37,84	20,87	23,49	75,08	66,92	45,63	51,03	83,60	31,01	45,14	48,06
IV	2,85- 17,53	10,44- 24,22	14,16- 175,46	33,99- 177,48	70,48- 145,95	90,94- 176,79	6,22- 137,82	23,96- 195,15	5,93- 34,75	10,58- 63,68	4,25- 60,58	8,15- 22,04	8,34- 27,58	7,89- 29,33

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ u odnosu na vrednost određenu istog minuta u testu opterećenja kod krava optimalne kondicije

Iz tabele 5.6. se zapaža da je početna koncentracija insulina, kao i koncentracija insulina 30. minuta nakon davanja glukoze kod ugojenih krava bila statistički značajno veća ($p < 0,05$) u odnosu na vrednosti insulinemije izmerene istog minuta u testu opterećenja kod krava optimalne telesne kondicije.

5.1.2.3. Koncentracija NEFA

U tabeli 5.7. je prikazana koncentracija NEFA u uzorcima krvi uzetim pre (0. minut) i nakon davanja glukoze (15., 30., 60., 90., 120. i 180. minuta) tokom testa opterećenja izvedenog 10. dana pre teljenja.

Tabela 5.7. Koncentracija NEFA (mmol/L) u uzorcima krvi dobijenim tokom izvođenja testa 10. dana pre teljenja

	0. min		15. min		30. min		60. min		90. min		120. min		180. min	
	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb
X	0,46	0,43	0,39	0,44	0,33	0,42	0,26	0,27	0,29	0,32	0,29	0,35	0,36	0,35
SD	0,20	0,14	0,25	0,14	0,19	0,15	0,15	0,06	0,19	0,14	0,22	0,11	0,16	0,10
SE	0,07	0,05	0,09	0,05	0,07	0,05	0,05	0,02	0,07	0,05	0,08	0,04	0,06	0,04
CV	44,26	33,34	63,59	31,81	58,11	36,32	56,72	22,92	67,10	42,64	75,64	32,29	46,25	29,33
IV	0,22- 0,87	0,24- 0,7	0,19- 0,95	0,21- 0,58	0,09- 0,66	0,2- 0,67	0,09- 0,56	0,17- 0,34	0,08- 0,65	0,17- 0,59	0,11- 0,82	0,18- 0,51	0,18- 0,68	0,2- 0,54

*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 u odnosu na vrednost određenu istog minuta u testu opterećenja kod krava optimalne kondicije

Iz rezultata prikazanih u tabeli 5.7. se uočava da nema statistički značajne razlike između koncentracija NEFA izmerenih u krvi ugojenih i krava optimalne telesne kondicije.

5.1.2.4. Matematički izračunati i izvedeni parametri testa opterećenja glukozom izvedenog 10. dana pre teljenja

U tabeli 5.8. prikazani su parametri koji opisuju trend promena koncentracije glukoze (k, $T_{1/2}$, Pik_{gluk} i AUC_{gluk}), insulina (ΔMax_{ins} , Pik_{ins} i AUC_{ins}) i NEFA (AUC_{NEFA}) nakon aplikacije glukoze 10. dana pre teljenja.

Tabela 5.8. Parametri testa opterećenja izvedenog 10. dana pre teljenja ($X \pm SD$)

	Optimalne krave	Debele krave
Bazalna _{glukoza} (mmol/L)	2,62±0,5	3,18±0,2*
k (%/min)	1,80±0,46	1,63±0,33
$T_{1/2}$ (min)	41,22±13,51	44,12±8,9
Pik_{gluk}	11,67±0,85	10,97±1,12
AUC_{gluk}	869,12±69,77	877,87±79,21
Bazalni _{ins} (μIU/mL)	10,24±5,04	17,33±4,90*
ΔMax_{ins} (μIU/mL)	102,15±49,72	116,95±26,62
Pik_{ins} (μIU/mL)	112,39±51,66	134,9±31,41
AUC_{ins}	7593,87±2679,90	9604,36±3534,44
Bazalna _{NEFA}	0,46±0,20	0,43±0,14
AUC_{NEFA}	-25,50±11,80	-10,97±1,37**
RQUICKY	0,46±0,04	0,39±0,02***

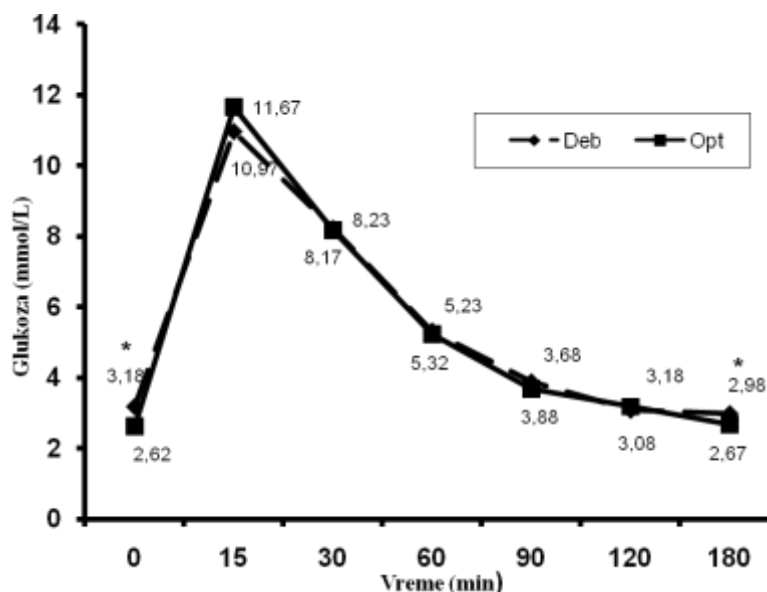
*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 u odnosu na vrednost određenu istog minuta u testu opterećenja kod krava optimalne kondicije

Na osnovu izračunatih i izvedenih parametara testa opterećenja glukozom izvedenog 10. dana pre teljenja može se zapaziti da, iako nema statistički značajnih razlika u trendu promena koncentracija glukoze i insulina između dve grupe krava, dobijeni rezultati, za razliku od prvog testa opterećenja, ipak ukazuju na nešto brži promet glukoze kod krava optimalne kondicije. Pored toga važno je naglasiti da je površina ispod krive insulina,

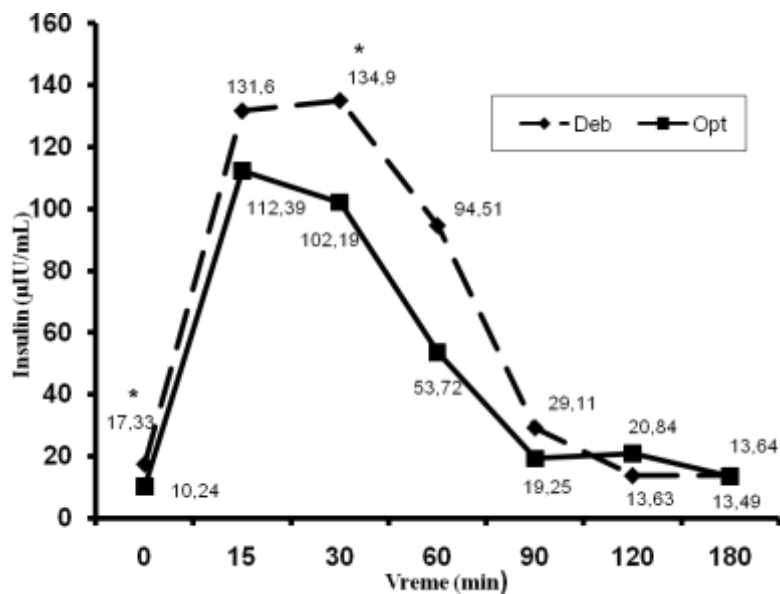
slično kao i u prvom testu, bila veća kod ugojenih krava, ali ne statistički značajno. AUC vrednost za koncentracije NEFA tokom izvođenja testa je bila značajno manja ($p < 0,01$) kod ugojenih u odnosu na krave optimalne telesne kondicije. Vrednost RQUICKY indeksa, obračunata na osnovu bazalnih koncentracija glukoze, insulina i NEFA, bila je značajno viša ($p < 0,001$) kod krava optimalne telesne kondicije ukazujući na smanjenu osetljivost perifernih tkiva na insulin kod ugojenih krava u tom periodu.

Na grafikonima 4, 5 i 6 prikazane su koncentracije glukoze, insulina i NEFA tokom testa opterećenja izvedenog 10. dana pre teljenja uporedo kod ugojenih i krava optimalne telesne kondicije u cilju lakšeg praćenja kretanja parametara u testu.

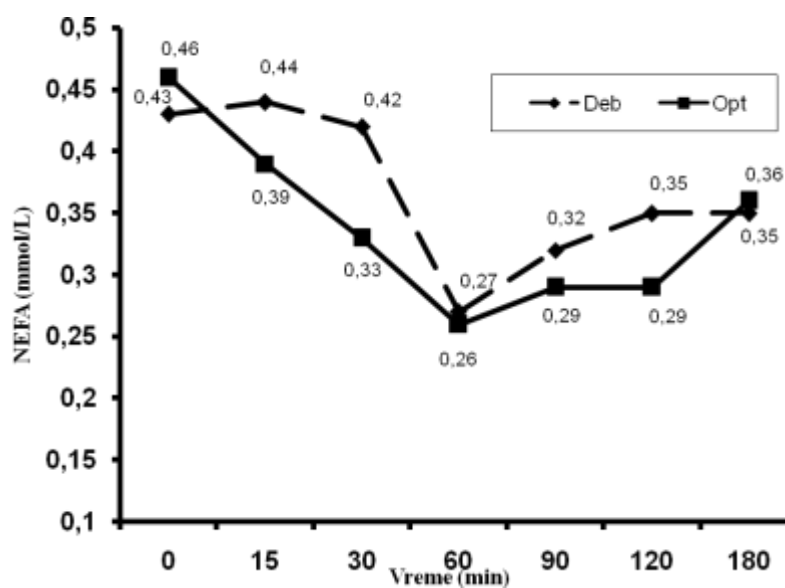
Grafikon 4. Koncentracija glukoze (mmol/L) u uzorcima krvi dobijenim tokom izvođenja testa 10. dana pre teljenja



Grafikon 5. Koncentracija insulina ($\mu\text{IU}/\text{mL}$) u uzorcima krvi dobijenim tokom izvođenja testa 10. dana pre teljenja



Grafikon 6. Koncentracija NEFA (mmol/L) u uzorcima krvi dobijenim tokom izvođenja testa 10. dana pre teljenja



5.1.3. KONCENTRACIJE GLUKOZE, INSULINA I NEFA TOKOM TESTA OPTEREĆENJA IZVEDENOG 14. DANA POSLE TELJENJA

5.1.3.1. Koncentracija glukoze

U tabeli 5.9. je prikazana koncentracija glukoze u uzorcima krvi uzetim pre (0. minut) i nakon davanja glukoze (15., 30., 60., 90., 120. i 180. minuta) tokom testa opterećenja izvedenog 14. dana posle teljenja.

Tabela 5.9. Koncentracija glukoze (mmol/L) u uzorcima krvi dobijenim tokom izvođenja testa 14. dana posle teljenja

	0. min		15. min		30. min		60. min		90. min		120. min		180. min	
	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb
X	2,81	3,38*	12,22	12,02	8,97	8,18	4,66	4,47	3,27	3,4	2,91	3,22	2,82	3,17
SD	0,26	0,64	0,91	1,30	1,29	1,35	1,11	1,25	0,62	0,73	0,45	0,51	0,59	0,63
SE	0,09	0,23	0,32	0,46	0,46	0,48	0,39	0,44	0,22	0,26	0,16	0,18	0,21	0,22
CV	9,33	18,99	7,49	10,80	14,39	16,56	23,77	28,0	19,15	21,5	15,50	15,80	21,02	20,01
IV	2,4- 3,1	2,3- 4,3	10,70- 13,60	10,0- 14,4	6,60- 10,30	6,9- 11,1	2,60- 5,40	3,0- 6,6	2,3- 3,9	2,4- 4,6	2,2- 3,6	2,3- 4,0	2,1- 4,1	2,3- 4,2

*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 u odnosu na vrednost određenu istog minuta u testu opterećenja kod krava optimalne kondicije

Iz rezultata prikazanih u tabeli 5.7. se vidi da je jedino na početku testa opterećenja (0. minuta) koncentracija glukoze u krvi ugojenih krava bila statistički značajno veća (p < 0,05) u odnosu na glikemiju određenu kod krava optimalne telesne kondicije.

5.1.3.2. Koncentracija insulina

U tabeli 5.10. je prikazana koncentracija insulina u uzorcima krvi uzetim pre (0. minut) i nakon davanja glukoze (15., 30., 60., 90., 120. i 180. minuta) tokom testa opterećenja izvedenog 14. dana posle teljenja.

Tabela 5.10. Koncentracija insulina (μIU/mL) u uzorcima krvi dobijenim tokom izvođenja testa 14. dana posle teljenja

	0. min		15. min		30. min		60. min		90. min		120. min		180. min	
	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb
X	9,59	14,39	122,08	138,67	105,87	120,84	32,88	59,58*	23,03	33,09	17,16	19,41	10,79	13,04
SD	2,89	7,82	26,16	30,42	38,17	34,16	10,59	24,23	10,99	19,01	2,00	9,60	4,36	5,40
SE	1,02	2,77	9,25	10,76	13,49	12,08	3,74	8,57	3,89	6,72	0,71	3,39	1,54	1,91
CV	30,1	54,39	21,43	21,94	36,05	28,27	32,19	40,68	47,76	57,43	11,68	49,48	40,38	41,41
IV	5,07- 13,4	4,99- 29,95	72,58- 155,65	102,22- 179,38	53,11- 147,99	68,61- 170,62	16,38- 49,17	32,62- 104,75	13,50- 46,31	9,83- 70,96	13,66- 20,30	8,34- 36,85	6,59- 20,92	6,35- 24,22

*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 u odnosu na vrednost određenu istog minuta u testu opterećenja kod krava optimalne kondicije

Iz rezultata prikazanih u tabeli 5.8. se zapaža da su koncentracije insulina bile više kod ugojenih u odnosu na krave optimalne kondicije u svim vremenskim tačkama tokom izvođenja testa opterećenja glukozom, ali je jedino 60. minuta nakon aplikacije glukoze ova razlika bila statistički značajna (p < 0,05).

5.1.3.3. Koncentracija NEFA

U tabeli 5.11. je prikazana koncentracija NEFA u uzorcima krvi uzetim pre (0. minuta) i nakon davanja glukoze (15., 30., 60., 90., 120. i 180. minuta) tokom testa opterećenja izvedenog 14. dana posle teljenja.

Tabela 5.11. Koncentracija NEFA (mmol/L) u uzorcima krvi dobijenim tokom izvođenja testa 14. dana posle teljenja

	0. min		15. min		30. min		60. min		90. min		120. min		180. min	
	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb
X	0,66	0,78	0,47	0,62	0,37	0,52*	0,35	0,43	0,38	0,41	0,41	0,51	0,47	0,62*
SD	0,19	0,37	0,15	0,25	0,04	0,18	0,17	0,17	0,14	0,15	0,11	0,21	0,08	0,14
SE	0,07	0,12	0,05	0,09	0,02	0,06	0,06	0,06	0,05	0,05	0,04	0,08	0,03	0,05
CV	28,70	47,98	31,86	40,01	11,43	34,37	48,39	40,0	35,33	35,64	27,59	42,18	18,01	23,24
IV	0,30- 0,85	0,3- 1,58	0,24- 0,79	0,29- 1,12	0,30- 0,43	0,30- 0,78	0,23- 0,75	0,25- 0,78	0,25- 0,62	0,23- 0,71	0,29- 0,63	0,25- 0,96	0,37- 0,63	0,42- 0,91

*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 u odnosu na vrednost određenu istog minuta u testu opterećenja kod krava optimalne kondicije

Iz rezultata prikazanih u tabeli 5.11. se zapaža da su koncentracije NEFA bile više kod ugojenih u odnosu na krave optimalne kondicije u svim vremenskim tačkama tokom izvođenja testa opterećenja glukozom, ali je ova razlika bila statistički značajna jedino 30. i 180. minuta nakon aplikacije glukoze ($p < 0,05$, pojedinačno).

5.1.3.4. Matematički izračunati i izvedeni parametri testa opterećenja glukozom izvedenog 14. dana posle teljenja

U tabeli 5.12. prikazani su parametri koji opisuju trend promena koncentracije glukoze (k , $T_{1/2}$, Pik_{gluk} i AUC_{gluk}), insulina (ΔMax_{ins} , Pik_{ins} i AUC_{ins}) i NEFA (AUC_{NEFA}) nakon akutne aplikacije glukoze 14. dana posle teljenja.

Tabela 5.12. Parametri testa opterećenja izvedenog 14. dana posle teljenja ($X \pm SD$)

	Optimalne krave	Debele krave
Bazalna _{gluk} (mmol/L)	2,81±0,26	3,38±0,64*
k (%/min)	2,26±0,54	2,21±0,48
$T_{1/2}$ (min)	32,50±5,77	32,31±8,21
Pik_{gluk}	12,22±0,91	12,02±1,30
AUC_{gluk}	859,70±113,77	865,5±113,93
Bazalni _{ins} (μIU/mL)	9,59±2,89	14,39±7,83
ΔMax_{ins} (μIU/mL)	107,68±20,48	129,07±24,63
Pik_{ins} (μIU/mL)	122,08±26,16	138,67±30,42
AUC_{ins}	7058,74±1388,01	8951,39±2291,37*
Bazalna _{NEFA}	0,66±0,19	0,78±0,37
AUC_{NEFA}	-51,69±21,98	-40,31±10,82
RQUICKY	0,41±0,02	0,37±0,02**

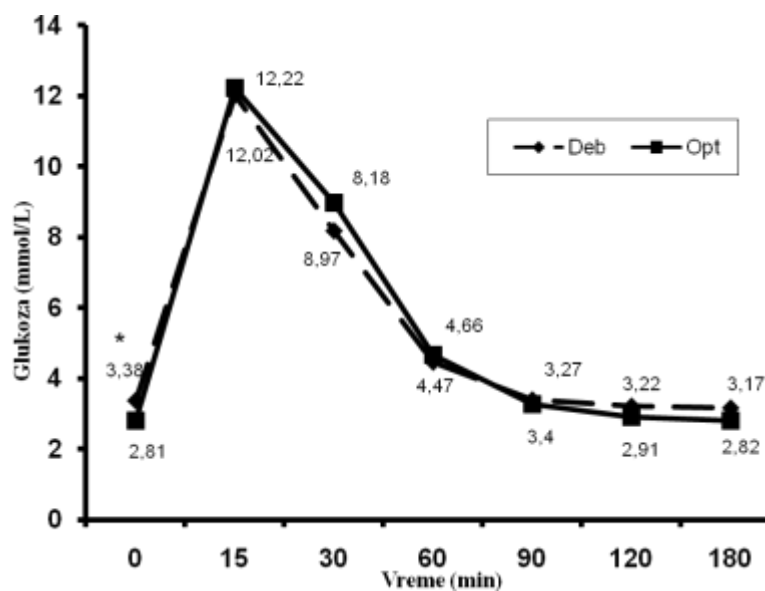
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ u odnosu na vrednost određenu istog minuta u testu opterećenja kod krava optimalne kondicije

Trend promena koncentracija glukoze i insulina u testu opterećenja glukozom izvedenog 14. dana posle teljenja pokazala je sličnu tendenciju kao i tokom drugog testa opterećenja. Međutim, iako je koncentracija insulina kod ugojenih, kao i kod krava optimalne kondicije, dosegla vrednost pika 15. minuta nakon aplikacije glukoze, površina ispod krive bila je statistički značajno veća ($p < 0,05$) kod ugojenih nego kod krava optimalne kondicije. Iako

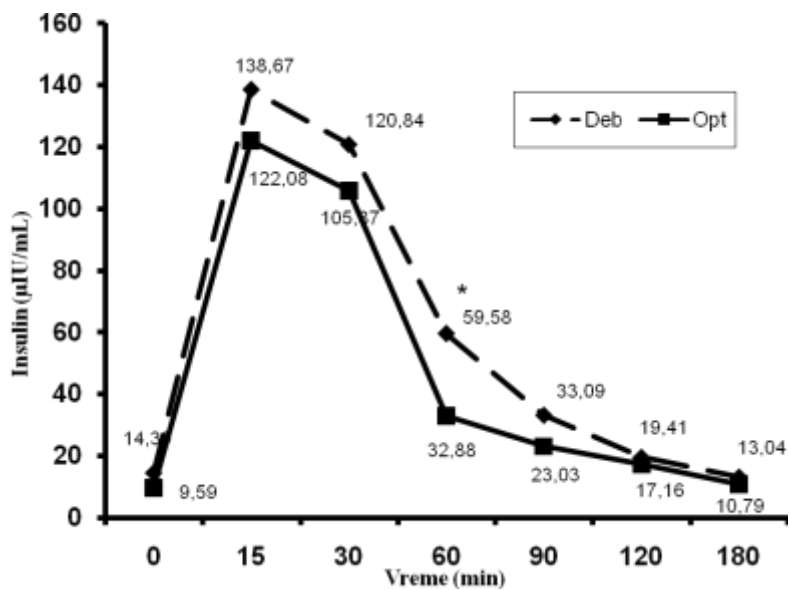
je AUC za NEFA bio niži kod ugojenih u odnosu na krave optimalne kondicije ova razlika nije bila statistički značajna. Takođe, obračunati RQUICKY indeks je bio značajno manji ($p < 0,01$) kod ugojenih u odnosu na krave optimalne kondicije.

Na grafikonu 7, 8 i 9 prikazane su koncentracije glukoze, insulina i NEFA tokom testa opterećenja izvedenog 14. dana posle teljenja uporedo kod ugojenih i krava optimalne telesne kondicije u cilju lakšeg praćenja kretanja parametara u testu.

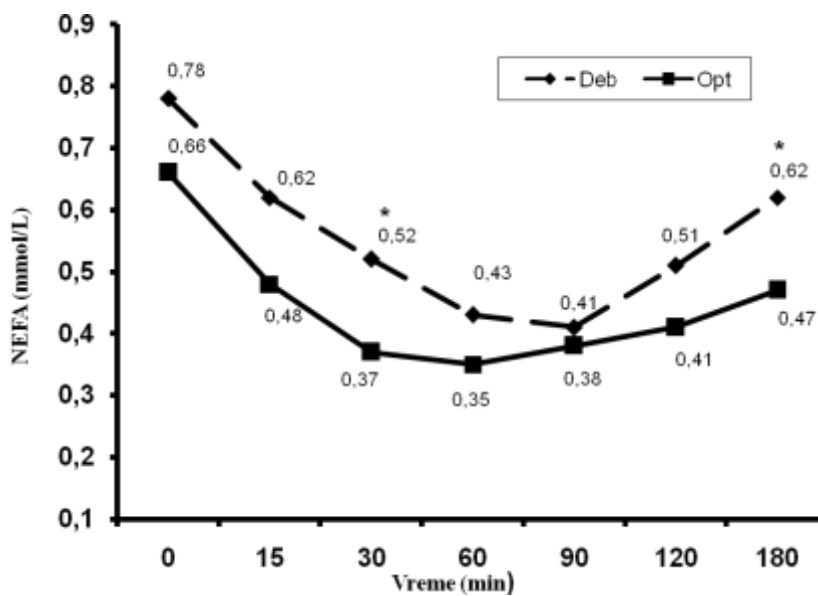
Grafikon 7. Koncentracija glukoze (mmol/L) u uzorcima krvi dobijenim tokom izvođenja testa 14. dana posle teljenja



Grafikon 8. Koncentracija insulina ($\mu\text{IU}/\text{mL}$) u uzorcima krvi dobijenim tokom izvođenja testa 14. dana posle teljenja



Grafikon 9. Koncentracija NEFA (mmol/L) u uzorcima krvi dobijenim tokom izvođenja testa 14. dana posle teljenja



5.1.4. KONCENTRACIJE GLUKOZE, INSULINA I NEFA TOKOM TESTA OPTEREĆENJA IZVEDENOG 28. DANA POSLE TELJENJA

5.1.4.1. Koncentracija glukoze

U tabeli 5.13. je prikazana koncentracija glukoze u uzorcima krvi uzetim pre (0. minut) i nakon davanja glukoze (15., 30., 60., 90., 120. i 180. minuta) tokom testa opterećenja izvedenog 28. dana posle teljenja.

Tabela 5.13. Koncentracija glukoze (mmol/L) u uzorcima krvi dobijenim tokom izvođenja testa 28. dana posle teljenja

	0. min		15. min		30. min		60. min		90. min		120. min		180. min	
	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb
X	3,21	3,42	12,17	11,73	7,71	8,28	3,89	4,35	3,17	3,42	3,44	3,22	3,17	3,08
SD	0,45	0,56	1,31	1,26	1,26	1,93	1,19	1,39	0,67	0,73	0,43	0,54	0,36	0,40
SE	0,16	0,20	0,46	0,44	0,44	0,68	0,42	0,49	0,24	0,26	0,15	0,19	0,12	0,14
CV	14,20	16,36	10,77	10,72	16,31	23,28	30,57	32,06	21,23	21,41	12,40	16,73	11,35	12,91
IV	2,70- 4,20	2,6- 4,2	9,10- 13,20	9,1- 13,4	4,80- 9,0	4,8- 11,9	1,40- 5,30	1,40- 6,40	2,10- 4,0	2,20- 4,70	2,60- 4,10	2,30- 4,10	2,50- 3,80	2,50- 3,80

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ u odnosu na vrednost određenu istog minuta u testu opterećenja kod krava optimalne kondicije

Iz rezultata prikazanih u tabeli 5.13. se vidi da nema statistički značajne razlike između dobijenih srednjih vrednosti koncentracija glukoze u krvi ugojenih krava u odnosu na vrednosti glikemije određene istog minuta u testu opterećenja kod krava optimalne telesne kondicije.

5.1.4.2. Koncentracija insulina

U tabeli 5.14. je prikazana koncentracija insulina u uzorcima krvi uzetim pre (0. minut) i nakon davanja glukoze (15., 30., 60., 90., 120. i 180. minuta) tokom testa opterećenja izvedenog 28. dana posle teljenja.

Tabela 5.14. Koncentracija insulina ($\mu\text{IU/mL}$) u uzorcima krvi dobijenim tokom izvođenja testa 28. dana posle teljenja

	0. min		15. min		30. min		60. min		90. min		120. min		180. min	
	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb
X	13,14	* 21,59	138,9	* 178,31	120,43	* 173,82	32,16	*** 73,16	21,35	* 31,10	12,91	** 33,66	15,74	22,57
SD	6,17	9,66	28,36	41,37	37,08	53,54	10,98	17,56	4,41	10,86	3,56	17,48	3,95	17,14
SE	2,18	3,12	10,03	14,63	13,11	18,93	3,88	6,21	1,56	3,84	1,26	6,18	1,40	6,06
CV	46,55	44,72	20,42	23,20	30,79	30,80	34,15	24,01	20,65	34,91	27,59	51,92	25,11	75,95
IV	7,32- 27,21	11,62- 39,75	89,02- 183,08	113,82- 230,75	45,83- 159,50	110,37- 290,42	16,48- 49,27	48,67- 100,71	11,94- 27,89	18,79- 50,95	8,12- 19,69	11,0- 60,33	10,89- 24,66	8,31- 59,41

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ u odnosu na vrednost određenu istog minuta u testu opterećenja kod krava optimalne kondicije

Iz tabele 5.14. se zapaža da su koncentracije insulina bile statistički značajno više kod ugojenih u odnosu na krave optimalne kondicije u svim vremenskim tačkama tokom izvođenja testa opterećenja osim 180. minuta posle aplikacije glukoze kada je insulinemija kod ugojenih krava i dalje bila viša nego kod krava optimalne kondicije ali ne značajno.

5.1.4.3. Koncentracija NEFA

U tabeli 5.15. je prikazana koncentracija NEFA u uzorcima krvi uzetim pre (0. minut) i nakon davanja glukoze (15., 30., 60., 90., 120. i 180. minuta) tokom testa opterećenja izvedenog 28. dana posle teljenja.

Tabela 5.15. Koncentracija NEFA (mmol/L) u uzorcima krvi dobijenim tokom izvođenja testa 28. dana posle teljenja

	0. min		15. min		30. min		60. min		90. min		120. min		180. min	
	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb	Opt	Deb
X	0,29	*** 0,57	0,28	** 0,42	0,26	0,31	0,21	0,22	0,23	0,26	0,29	0,29	0,28	0,32
SD	0,06	0,17	0,05	0,10	0,07	0,05	0,06	0,02	0,06	0,05	0,04	0,03	0,04	0,05
SE	0,02	0,06	0,02	0,04	0,03	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02	0,01	0,01	0,02	0,02
CV	19,75	29,48	18,80	24,38	28,33	16,81	29,71	5,04	27,74	19,80	14,39	9,58	16,31	15,48
IV	0,19- 0,40	0,37- 0,95	0,20- 0,39	0,30- 0,65	0,15- 0,41	0,23- 0,42	0,14- 0,35	0,20- 0,24	0,14- 0,37	0,21- 0,38	0,24- 0,36	0,23- 0,32	0,19- 0,36	0,28- 0,43

*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 u odnosu na vrednost određenu istog minuta u testu opterećenja kod krava optimalne kondicije

Iz tabele 5.15. se uočava da su koncentracije NEFA bile više ili jednake kod ugojenih u odnosu na krave optimalne kondicije u svim vremenskim tačkama tokom izvođenja testa opterećenja glukozom, ali je ova razlika bila statistički značajna jedino 0. i 15. minuta nakon davanja glukoze (p < 0,001 i p < 0,01, pojedinačno).

5.1.4.4. Matematički izračunati i izvedeni parametri testa opterećenja glukozom izvedenog 28. dana posle teljenja

U tabeli 5.16. prikazani su parametri koji opisuju trend promena koncentracije glukoze (k, T_{1/2}, Pik_{gluk} i AUC_{gluk}), insulina (ΔMax_{ins}, Pik_{ins} i AUC_{ins}) i NEFA (AUC_{NEFA}) nakon akutne aplikacije glukoze 28. dana pre teljenja.

Tabela 5.16. Parametri testa opterećenja izvedenog 28. dana posle teljenja (X±SD)

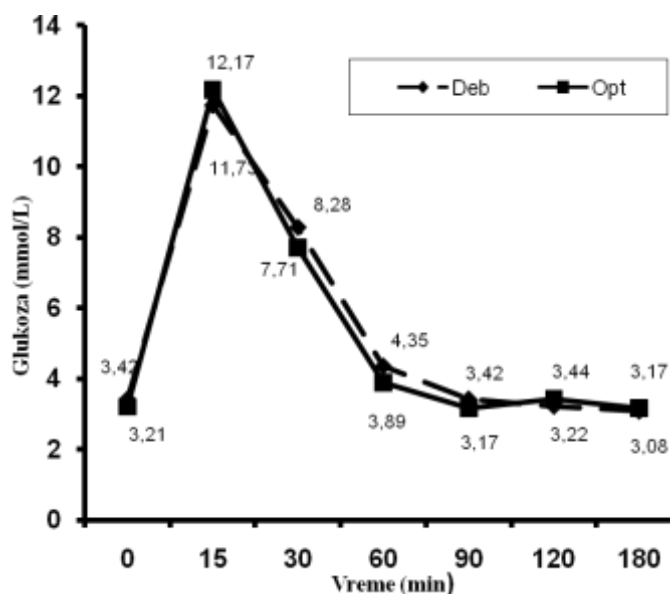
	Optimalne krave	Debele krave
Bazalna _{gluk} (mmol/L)	3,21±0,45	3,42±0,56
k (%/min)	2,65±0,71	2,35±0,76
T _{1/2} (min)	27,42±5,66	31,48±7,19
Pik _{gluk}	12,17±1,31	11,73±1,26
AUC _{gluk}	842,11±111,84	858,25±124,94
Bazalni _{ins} (μIU/mL)	13,14±6,17	21,59±9,66*
ΔMax _{ins} (μIU/mL)	117,31±25,85	165,06±40,15*
Pik _{ins} (μIU/mL)	138,9±28,36	178,31±41,37*
AUC _{ins}	7550,36±1544,87	12067,20±2689,16***
Bazalna _{NEFA}	0,29±0,06	0,57±0,17***
AUC _{NEFA}	-4,62±1,88	-29,33±4,11***
RQUICKY	0,45±0,08	0,34±0,03**

*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 u odnosu na vrednost određenu istog minuta u testu opterećenja kod krava optimalne kondicije

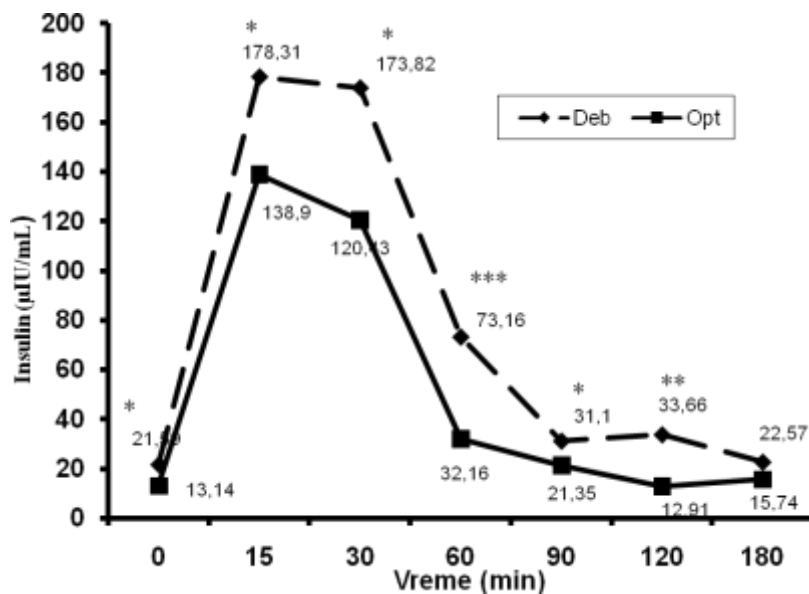
Izračunati i izvedeni parametri testa opterećenja izvedenog 28. dana posle teljenja su pokazali da nema statistički značajnih razlika u trendu promena koncentracija glukoze između dve grupe krava, iako dobijeni rezultati takođe ukazuju na brži promet glukoze kod krava optimalne kondicije. Značajne razlike su ustanovljene u funkcionalnoj aktivnosti B ćelija endokrinog pankreasa i stepenu osetljivosti perifernih tkiva na insulin, budući da su izmerene bazalne i vrednosti insulinemije nakon aplikacije glukoze bile statistički značajno veće ($p < 0,05$, pojedinačno) kod ugojenih krava u odnosu na krave optimalne kondicije. Takođe, površine ispod krive insulina i NEFA je bila značajno veća ($p < 0,001$, pojedinačno) kod ugojenih krava. Vrednost RQUICKY indeksa ukazivala je na smanjenu osetljivost perifernih tkiva na insulin kod ugojenih krava u tom periodu, jer je obračunata značajno manja vrednost ($p < 0,01$) u odnosu na krave optimalne telesne kondicije.

Na grafikonu 10, 11 i 12 prikazane su koncentracije glukoze, insulina i NEFA tokom testa opterećenja izvedenog 28. dana posle teljenja uporedo kod debelih i krava optimalne telesne kondicije u cilju lakšeg praćenja kretanja parametara u testu.

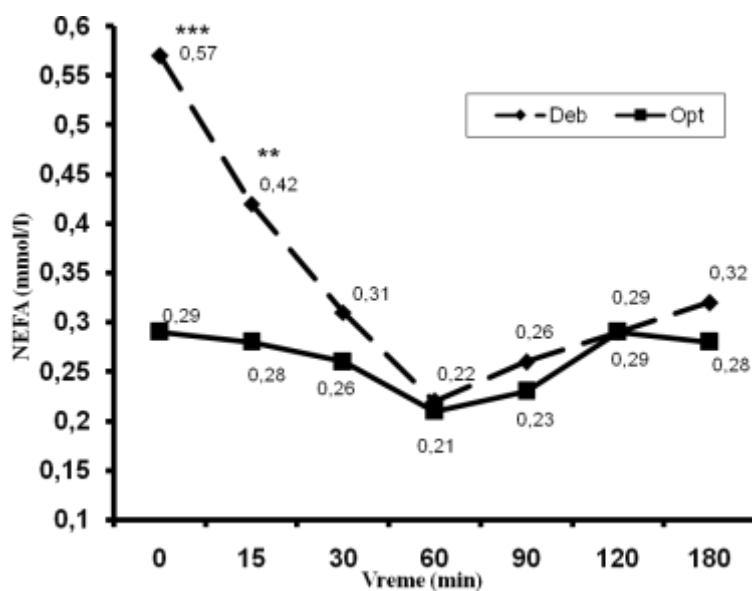
Grafikon 10. Koncentracija glukoze (mmol/L) u uzorcima krvi dobijenim tokom izvođenja testa 28. dana posle teljenja



Grafikon 11. Koncentracija insulina ($\mu\text{IU/mL}$) u uzorcima krvi dobijenim tokom izvođenja testa 28. dana posle teljenja

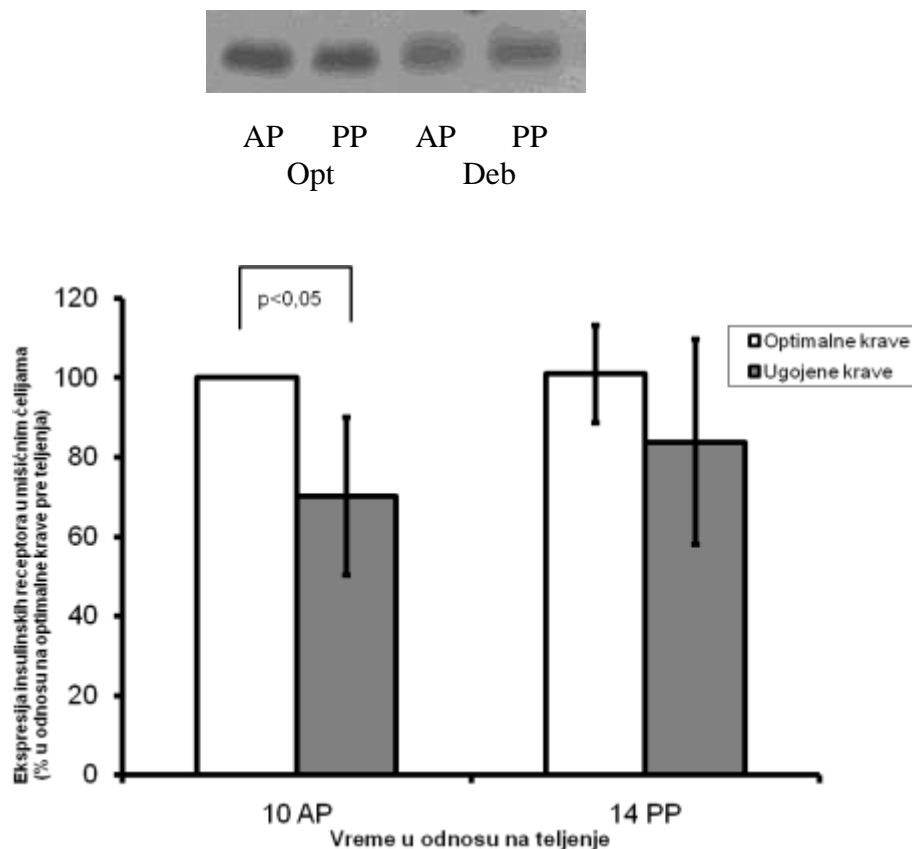


Grafikon 12. Koncentracija NEFA (mmol/L) u uzorcima krvi dobijenim tokom izvođenja testa 28. dana posle teljenja



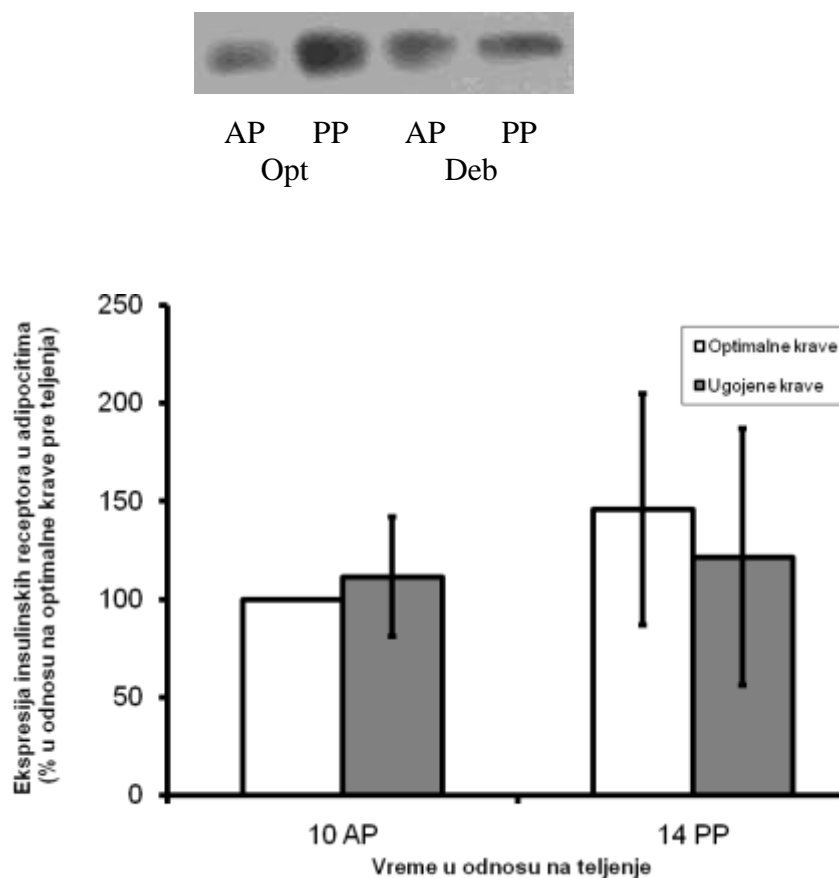
5.2. ZASTUPLJENOST PROTEINA INSULINSKIH RECEPTORA U MIŠIĆNOM I MASNOM TKIVU

Grafikon 13. Nivoi ekspresije proteina insulinskih receptora u mišićnim ćelijama (%) kod obe grupe krava 10. dana pre teljenja (AP) i 14. dana nakon teljenja (PP)



Sa grafikona 13. se zapaža da je prosečna vrednost nivoa proteina insulinskih receptora u mišićnim ćelijama, utvrđena Western blot analizom mišićnih tkiva uzetih biopsijom 10. dana pre teljenja, bila statistički značajno manja ($p < 0,05$) kod ugojenih u odnosu na krave optimalne telesne kondicije. Iako se 14. dana nakon teljenja kod ugojenih krava zapaža trend povećanja u odnosu na antepartalne vrednosti, izmereni nivo ekspresije proteina insulinskih receptora u mišićnim ćelijama i dalje je bio manji nego kod krava optimalne telesne kondicije, ali ne značajno.

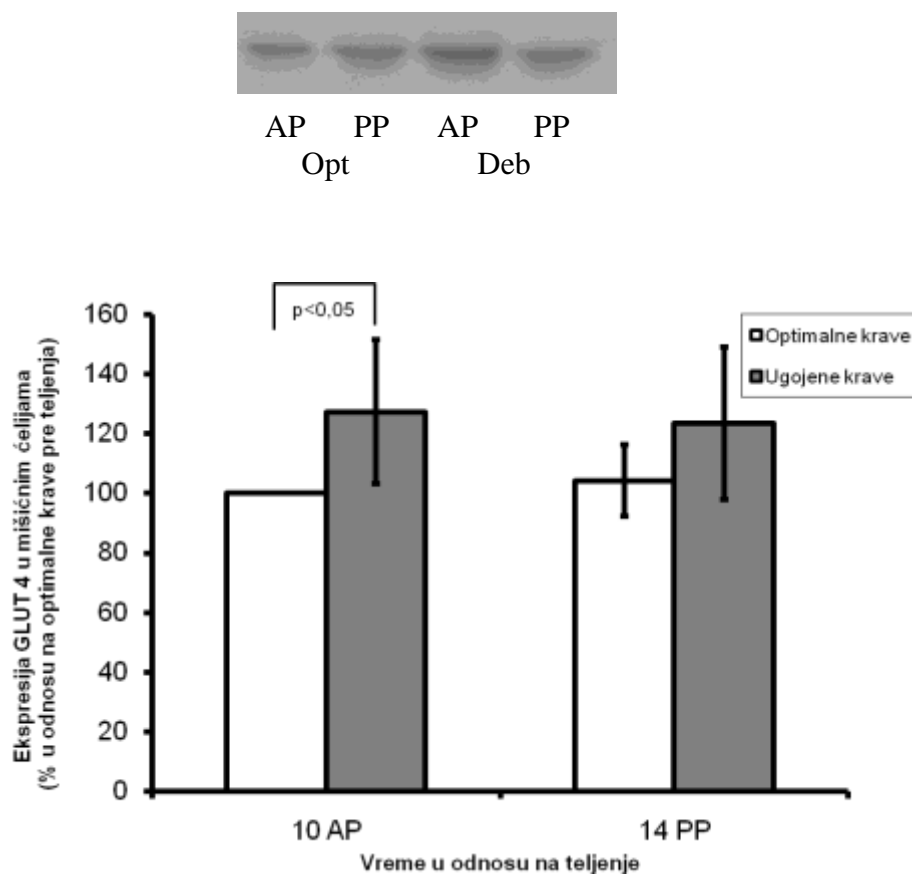
Grafikon 14. Nivoi ekspresije proteina insulinskih receptora u adipocitima (%) kod obe grupe krava 10. dana pre teljenja (AP) i 14. dana nakon teljenja (PP)



Sa grafikona 14. se zapaža da je za razliku od antepartalnih vrednosti, 14. dana posle teljenja kod krava optimalne telesne kondicije utvrđen viši nivo ekspresije proteina insulinskih receptora u adipocitima, i bio je veći nego kod ugojenih krava. Međutim, prosečne vrednosti nivoa proteina insulinskih receptora u adipocitima nisu se značajno razlikovale između dve grupe niti unutar ispitivanih grupa krava.

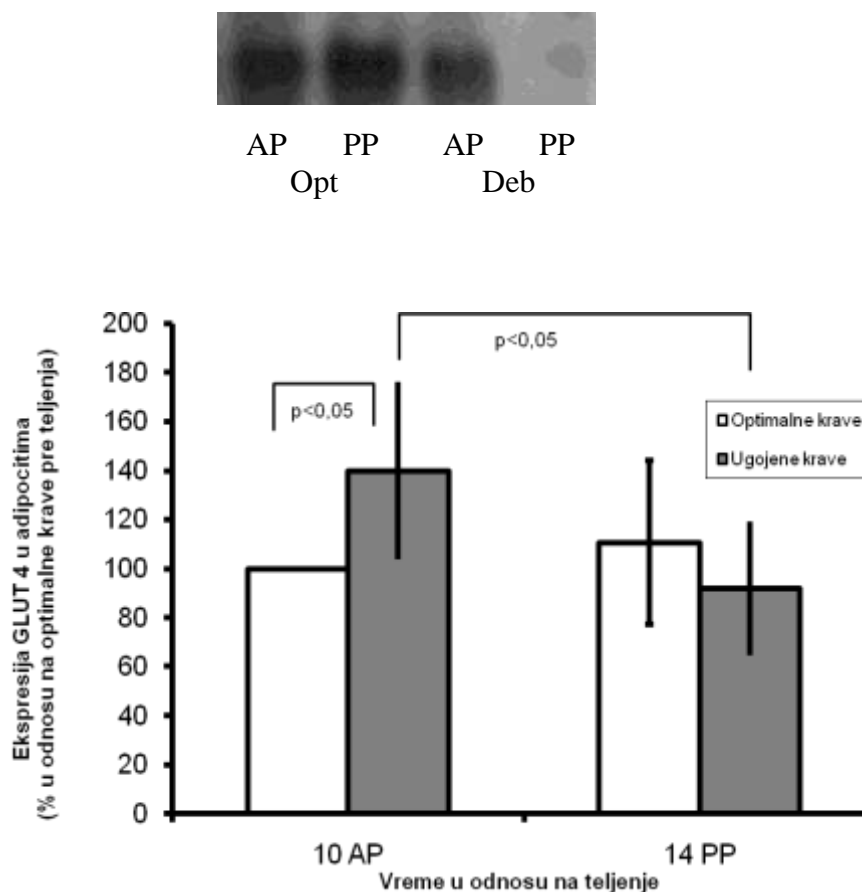
5.3. ZASTUPLJENOST PROTEINA TRANSPORTNOG MOLEKULA ZA GLUKOZU (GLUT 4) U MIŠIĆNOM I MASNOM TKIVU

Grafikon 15. Nivoi ekspresije proteina GLUT 4 molekula u mišićnim ćelijama (%) kod obe grupe krava 10. dana pre teljenja (AP) i 14. dana nakon teljenja (PP)



Sa grafikona 15. se zapaža da je prosečna vrednost nivoa proteina GLUT 4 molekula u mišićnim ćelijama, utvrđena Western blot analizom mišićnih tkiva uzetih biopsijom 10. dana pre i 14. dana posle teljenja, bila viša kod ugojenih u odnosu na krave optimalne telesne kondicije tokom oba ispitivana perioda, ali je samo 10. dana pre teljenja ova razlika bila statistički značajna ($p < 0,05$).

Grafikon 16. Nivoi ekspresije proteina GLUT 4 molekula u adipocitima (%) kod obe grupe krava 10. dana pre teljenja (AP) i 14. dana nakon teljenja (PP)



Sa grafikona 16. se zapaža da je antepartalno izmerena vrednost nivoa proteina GLUT 4 molekula u adipocitima bila statistički značajno veća ($p < 0,05$) kod ugojenih krava, dok je 14. dana posle teljenja bila viša, ali ne statistički značajno, kod krava koje su imale optimalnu telesnu kondiciju. Nakon teljenja kod ugojenih krava se zapaža trend smanjenja, a kod krava optimalne kondicije povećanja zastupljenosti GLUT 4 molekula u adipocitima. Promena u zastupljenosti proteina GLUT 4 molekula u adipocitima bila je statistički značajna ($p < 0,05$) samo unutar grupe ugojenih krava.

5.4. DIJAMETAR ADIPOCITA

Rezultati ispitivanja dijametra adipocita u subkutanom masnom tkivu kod obe grupe krava prikazani su u tabeli 5.17. i grafikonu 17.

Tabela 5.17. Dijametar adipocita krava 10. dana pre teljenja (AP) i 14. dana nakon teljenja (PP) (μm^2)

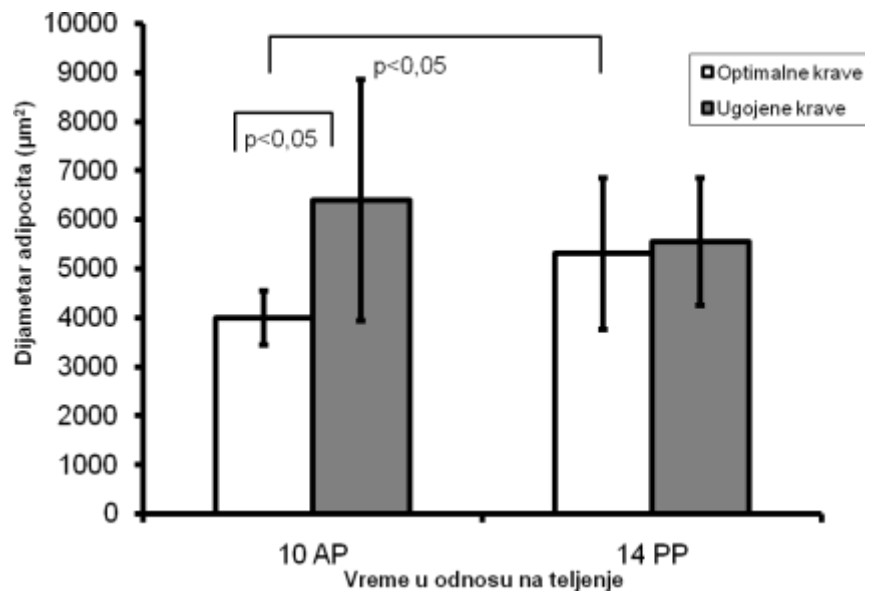
	Krave optimalne telesne kondicije		Ugojene krave	
	10 AP	14 PP	10 AP	14 PP
X	3987,17	5306,90 ^a	6393,03*	5551,55
SD	551,30	1542,41	2464,20	1297,42
SE	194,91	545,32	871,23	458,71
CV	13,83	29,04	38,54	23,37
IV	3297,84- 5143,0	2498,02- 7918,42	3014,27- 10880,47	3201,01- 7097,54

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ u odnosu na vrednost kod krava optimalne telesne kondicije istog dana ispitivanja

^a $p < 0,05$; ^{aa} $p < 0,01$; ^{aaa} $p < 0,001$ u odnosu na vrednost kod krava iz iste grupe antepartalno

Iz dobijenih rezultata se može videti da je prosečna vrednost dijametra adipocita, utvrđena morfometrijskom analizom subkutanog masnog tkiva uzetih biopsijom 10. dana pre teljenja iznosila $3987,17 \pm 551,30 \mu\text{m}^2$ kod krava optimalne telesne kondicije, odnosno $6393,03 \pm 2464,20 \mu\text{m}^2$ kod ugojenih krava. Razlika u antepartalnom dijametru adipocita između dve grupe krava je bila statistički značajna ($p < 0,05$). Četnaestog dana nakon teljenja kod krava iz grupe optimalne telesne kondicije ustanovljeno je statistički značajno povećanje dijametra adipocita ($p < 0,05$) u odnosu na antepartalne vrednosti. Međutim, za razliku od krava optimalne telesne kondicije, postpartalno izmeren prosečan dijametar adipocita kod ugojenih krava bio je manji, ali ne statistički značajno, u odnosu na antepartalne vrednosti.

Grafikon 17. Dijametar adipocita krava 10. dana pre teljenja (AP) i 14. dana nakon teljenja (PP)



5.5. SADRŽAJ UKUPNIH LIPIDA U JETRI

Rezultati ispitivanja sadržaja ukupnih lipida u jetri kod obe grupe krava prikazani su u tabeli 5.18. i grafikonu 18.

Tabela 5.18. Sadržaj ukupnih lipida u jetri krava 10. dana pre teljenja (AP) i 14. dana nakon teljenja (PP) ($\mu\text{m}^3/100\mu\text{m}^3$ u %).

	Krave optimalne telesne kondicije		Ugojene krave	
	10 AP	14 PP	10 AP	14 PP
X	0,62	3,75 ^{aa}	2,63***	18,62 ^{aaa***}
SD	0,52	2,87	1,06	8,78
SE	0,18	1,01	0,37	3,01
CV	82,81	76,42	40,41	47,15
IV	0 – 1,0	0 – 8,0	1 – 4,0	5,0 – 32,0

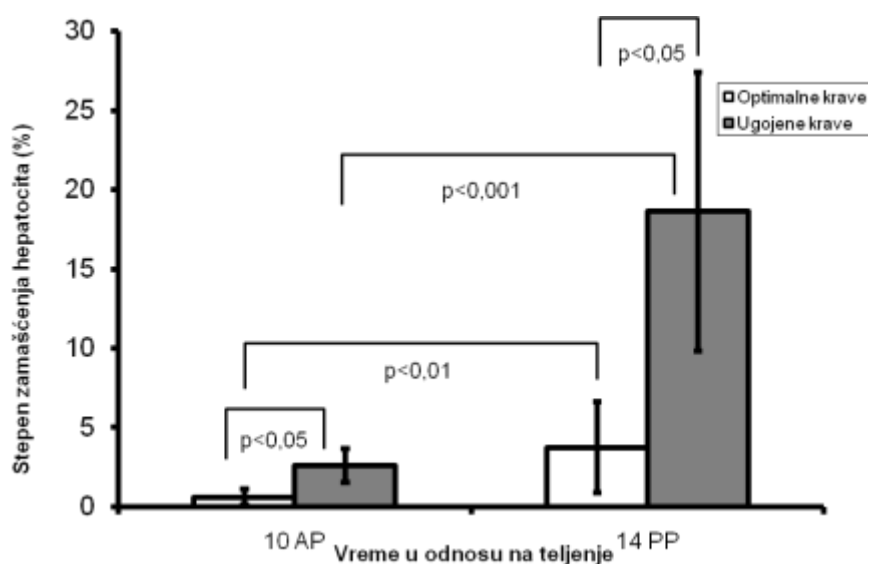
*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 u odnosu na vrednost kod krava optimalne telesne kondicije istog dana ispitivanja

^ap < 0,05; ^{aa}p < 0,01; ^{aaa}p < 0,001 u odnosu na vrednost kod krava iz iste grupe antepartalno

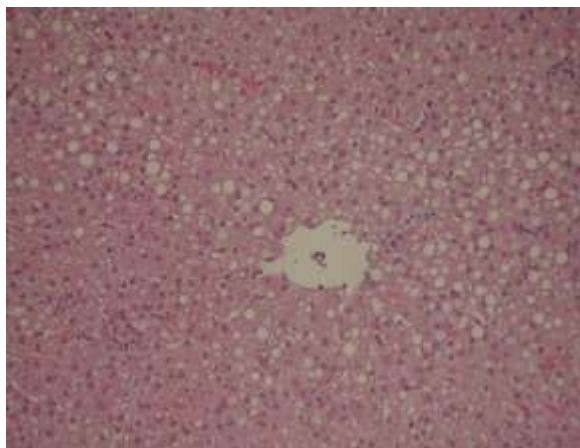
Iz dobijenih rezultata se može videti da je prosečna vrednost sadržaja ukupnih lipida u hepatocitima, utvrđena stereometrijskom analizom tkiva jetre uzetih biopsijom 10. dana pre teljenja iznosila $0,62 \pm 0,52\%$ kod krava optimalne telesne kondicije i kretala se od minimalnih 0% do maksimalnih 1% masti, odnosno $2,63 \pm 1,06\%$ kod ugojenih krava sa intervalom varijacije od 1 do 4%. Razlika u stepenu antepartalnog zamašćenja jetre između dve grupe krava je bila statistički značajna ($p < 0,001$). Četrnaestog dana nakon teljenja kod obe grupe krava ustanovljeno je statistički značajno povećanje ($p < 0,01$ i $p < 0,001$, pojedinačno) količine masti u hepatocitima u odnosu na antepartalne vrednosti, pri čemu je kod krava optimalne telesne kondicije prosečna vrednost sadržaja ukupnih lipida iznosila $3,75 \pm 2,87\%$, odnosno $18,62 \pm 8,78\%$ kod ugojenih krava. Takođe, razlika u stepenu postpartalnog zamašćenja jetre između dve grupe krava je bila statistički značajna ($p < 0,001$). Pored toga, značajno je naglasiti da unutar grupe krava koje su imale optimalnu telesnu kondiciju ni kod jedne krave postpartalno nije utvrđen umeren stepen zamašćenja

jetre, i da je kod svih životinja sadržaj masti u hepatocitima bio manji od 10%. Nasuprot tome, u grupi ugojenih krava, 50% životinja je imalo umeren stepen zamašćenja jetre (20, 21, 26, 32%; pojedinačno).

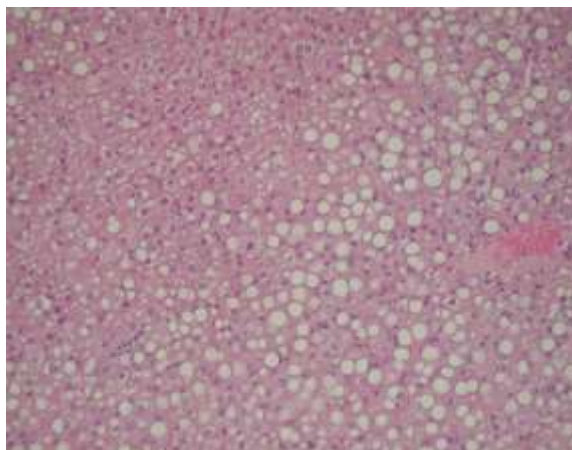
Grafikon 18. Sadržaj ukupnih lipida u jetri krava 10. dana pre teljenja (AP) i 14. dana nakon teljenja (PP)



Histopatološki nalaz je varirao, ali je bio u korelaciji sa sadržajem masti u tkivu jetre. Za blaži stepen zamašćenja jetre je bilo karakteristično centrolobularno nakupljanje sitnijih masnih kapljica (slika 5.1). Sa povećanjem stepena zamašćenja jetre broj i veličina masnih kapljica unutar hepatocita, kao i broj infiltriranih ćelija jetre, se povećavao (slike 5.1 i 5.2).



Slika 5.1. Blago zamašćenje jetre (18% masti, HE, 20x) kod krave prekomerne OTK



Slika 5.2. Umereno zamašćenje jetre (32% masti, HE, 20x) kod krave prekomerne OTK

5.6. METABOLIČKI PROFIL KRAVA

5.6.1. Koncentracija ukupnih proteina

Rezultati ispitivanja koncentracije ukupnih proteina kod obe grupe krava prikazani su u tabeli 5.19.

Tabela 5.19. Koncentracija ukupnih proteina (g/L) u krvi krava tokom ispitivanih perioda

	Krave optimalne kondicije				Ugojene krave			
	28 AP	10 AP	14 PP	28 PP	28 AP	10 AP	14 PP	28 PP
X	79,41	79,46	76,21	81,58	76,91	75,29	81,59	83,91
SD	4,62	2,82	5,71	6,17	8,32	6,19	10,89	10,29
SE	1,63	0,99	2,02	2,18	2,94	2,19	3,85	3,64
CV	5,81	3,55	7,49	7,56	10,82	8,22	13,35	12,27
IV	68,97- 90,12	74,19- 83,06	69,23- 87,68	68,97- 90,12	69,23- 95,36	65,77- 84,68	69,87- 106,04	71,92- 105,84

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ u odnosu na vrednost kod krava optimalne telesne kondicije istog dana ispitivanja

Iz rezultata prikazanih u tabeli 5.19. može se uočiti da između dobijenih srednjih vrednosti koncentracije ukupnih proteina u krvi ugojenih krava nisu utvrđene statistički značajne razlike u odnosu na vrednosti proteinemije kod krava optimalne telesne kondicije istog dana ispitivanja.

Značajnost razlika u koncentraciji ukupnih proteina unutar ispitivanih grupa prikazana je u tabeli 5.20.

Tabela 5.20. Značajnost razlike unutar grupe krava optimalne telesne kondicije i ugojenih krava

Krave optimalne telesne kondicije				Ugojene krave			
	28 AP	10 AP	14 PP		28 AP	10 AP	14 PP
28 PP	NZ	NZ	NZ	28 PP	NZ	$p < 0,05$	NZ
14 PP	NZ	NZ		14 PP	NZ	NZ	
10 AP	NZ			10 AP	NZ		

Testiranjem statističkih značajnosti razlika dobijenih srednjih vrednosti koncentracije ukupnih proteina u krvi unutar ispitivanih grupa krava, utvrđena je statistička razlika na

nivou značajnosti od $p < 0,05$ između vrednosti proteinemija 10. i 28. dana posle teljenja kod ugojenih krava.

5.6.2. Koncentracija albumina

Rezultati ispitivanja koncentracije albumina kod obe grupe krava prikazani su u tabeli 5.21.

Tabela 5.21. Koncentracija albumina (g/L) u krvi krava tokom ispitivanih perioda

	Krave optimalne kondicije				Ugojene krave			
	28 AP	10 AP	14 PP	28 PP	28 AP	10 AP	14 PP	28 PP
X	35,53	36,99	34,18	33,55	37,66	37,98	35,67	32,53
SD	2,62	3,49	3,61	4,09	2,68	2,84	6,28	5,06
SE	0,93	1,23	1,28	1,44	0,95	1,00	2,22	1,79
CV	7,38	9,43	10,57	12,19	7,11	7,48	17,61	15,56
IV	31,16- 40,62	32,30- 44,61	28,57- 39,38	26,85- 41,62	31,94- 41,12	34,84- 43,99	27,57- 47,60	24,85- 40,0

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ u odnosu na vrednost kod krava optimalne telesne kondicije istog dana ispitivanja

Iz rezultata prikazanih u tabeli 5.21. može se uočiti se da između dobijenih srednjih vrednosti koncentracije albumina u krvi ugojenih krava nisu utvrđene statistički značajne razlike u odnosu na vrednosti albuminemije kod krava optimalne telesne kondicije istog dana ispitivanja.

Značajnost razlika u koncentraciji albumina unutar ispitivanih grupa prikazana je u tabeli 5.22.

Tabela 5.22. Značajnost razlike unutar grupe krava optimalne telesne kondicije i ugojenih krava

Krave optimalne telesne kondicije				Ugojene krave			
	28 AP	10 AP	14 PP		28 AP	10 AP	14 PP
28 PP	NZ	NZ	NZ	28 PP	$p < 0,05$	$p < 0,05$	NZ
14 PP	NZ	NZ		14 PP	NZ	NZ	
10 AP	NZ			10 AP	NZ		

Testiranjem statističkih značajnosti razlika dobijenih srednjih vrednosti koncentracije albumina u krvi unutar ispitivanih grupa krava, ustanovljeno je statistički značajno smanjenje koncentracije albumina ($p < 0,05$) u krvi 28. dana posle teljenja u odnosu na prosečne vrednosti albuminemije 28. i 10. dana pre teljenja kod ugojenih krava.

5.6.3. Koncentracija BHBA

Rezultati ispitivanja koncentracije BHBA kod obe grupe krava prikazani su u tabeli 5.23.

Tabela 5.23. Koncentracija BHBA (mmol/L) u krvi krava tokom ispitivanih perioda

	Krave optimalne kondicije				Ugojene krave			
	28 AP	10 AP	14 PP	28 PP	28 AP	10 AP	14 PP	28 PP
X	0,39	0,45	0,71	0,61	0,41	0,55	1,00	0,53
SD	0,06	0,12	0,16	0,23	0,18	0,17	0,53	0,22
SE	0,02	0,04	0,05	0,08	0,06	0,05	0,19	0,08
CV	16,54	26,56	21,79	37,47	43,82	30,73	53,18	42,89
IV	0,30- 0,50	0,30- 0,60	0,50- 1,00	0,20- 1,00	0,20- 0,80	0,40- 0,90	0,30- 2,00	0,20- 0,80

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ u odnosu na vrednost kod krava optimalne telesne kondicije istog dana ispitivanja

Iz rezultata prikazanih u tabeli 5.23. može se zapaziti da, iako je koncentracija BHBA kod ugojenih krava bila viša 28. i 10. dana pre i 14. dana posle teljenja, nisu utvrđene statistički značajne razlike u koncentracijama BHBA između dve grupe krava.

Značajnost razlika u koncentraciji BHBA unutar ispitivanih grupa prikazana je u tabeli 5.24

Tabela 5.24. Značajnost razlike unutar grupe krava optimalne telesne kondicije i ugojenih krava

Krave optimalne telesne kondicije				Ugojene krave			
	28 AP	10 AP	14 PP		28 AP	10 AP	14 PP
28 PP	$p < 0,05$	NZ	NZ	28 PP	NZ	NZ	$p < 0,05$
14 PP	$p < 0,001$	$p < 0,01$		14 PP	$p < 0,01$	$p < 0,05$	
10 AP	NZ			10 AP	NZ		

Unutar ispitivanih grupa, statističkom obradom razlika dobijenih srednjih vrednosti

koncentracije BHBA uočava se visoko značajno povećanje koncentracija BHBA u krvi 14. dana posle teljenja u odnosu na prosečne vrednosti BHBA 28. dana ($p < 0,001$ i $p < 0,01$), kao i 10. dana ($p < 0,01$ i $p < 0,05$) pre teljenja kod obe grupe krava. Takođe, vidi se da je 28. dana posle teljenja došlo do smanjenja koncentracije BHBA u krvi obe grupe krava, pri čemu je smanjenje značajno kod ugojenih krava ($p < 0,05$).

5.5.4. Koncentracija ukupnog bilirubina

Rezultati ispitivanja koncentracije ukupnog bilirubina kod obe grupe krava prikazani su u tabeli 5.25.

Tabela 5.25. Koncentracija ukupnog bilirubina ($\mu\text{mol/L}$) u krvi krava tokom ispitivanih perioda

	Krave optimalne kondicije				Ugojene krave			
	28 AP	10 AP	14 PP	28 PP	28 AP	10 AP	14 PP	28 PP
X	5,09	5,46	5,82	4,84	5,18	5,75	7,58*	5,63
SD	1,66	1,24	1,58	1,04	1,12	0,97	1,67	1,81
SE	0,40	0,34	0,59	0,64	0,40	0,34	0,59	0,64
CV	32,62	22,73	27,10	21,51	21,68	16,92	22,06	32,19
IV	2,98- 7,94	3,68- 7,46	3,97- 8,93	2,65- 6,00	3,97- 7,26	4,30- 7,56	4,30- 9,67	3,31- 9,30

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ u odnosu na vrednost kod krava optimalne telesne kondicije istog dana ispitivanja

Iz rezultata prikazanih u tabeli 5.24. može se uočiti se da je dobijena vrednost prosečne koncentracije ukupnog bilirubina u krvi ugojenih krava bila viša nego kod krava optimalne kondicije tokom celog perioda ispitivanja, ali je ova razlika bila značajna jedino 14. dana posle teljenja ($p < 0,05$).

Značajnost razlika u koncentraciji ukupnog bilirubina unutar ispitivanih grupa prikazana je u tabeli 5.26.

Tabela 5.26. Značajnost razlike unutar grupe krava optimalne telesne kondicije i ugojenih krava

Krave optimalne telesne kondicije				Ugojene krave			
	28 AP	10 AP	14 PP		28 AP	10 AP	14 PP
28 PP	NZ	NZ	NZ	28 PP	NZ	NZ	p < 0,01
14 PP	NZ	NZ		14 PP	p < 0,01	p < 0,05	
10 AP	NZ			10 AP	NZ		

Unutar ispitivanih grupa, može se zapaziti trend povećanja vrednosti koncentracije ukupnog bilirubina u krvi do 14. dana posle teljenja kod obe grupe krava. Najviša vrednost bilirubinemije kod obe grupe krava utvrđena je 14. dana posle teljenja. Međutim, za razliku od krava optimalne telesne kondicije, ustanovljena prosečna koncentracije ukupnog bilirubina u krvi ugojenih krava 14. dana posle teljenja bila je statistički značajno viša u odnosu na vrednosti bilirubinemija 28. i 10. dana pre teljenja ($p < 0,01$ i $p < 0,05$, pojedinačno), kao i 28. dana posle teljenja ($p < 0,01$).

5.6.5. Koncentracija uree

Rezultati ispitivanja koncentracije uree kod obe grupe krava prikazani su u tabeli 5.27.

Tabela 5.27. Koncentracija uree (mmol/L) u krvi krava tokom ispitivanih perioda

	Krave optimalne kondicije				Ugojene krave			
	28 AP	10 AP	14 PP	28 PP	28 AP	10 AP	14 PP	28 PP
X	4,28	5,44	5,12	5,23	4,50	3,57*	5,89	5,89
SD	0,46	0,34	0,98	0,73	0,55	0,30	0,56	0,53
SE	0,16	0,12	0,34	0,30	0,20	0,11	0,20	0,19
CV	10,67	6,22	19,10	14,06	12,33	8,55	9,48	9,00
IV	3,78- 5,12	4,76- 5,93	3,34- 6,52	4,25- 6,71	3,79- 5,58	3,14- 4,02	5,35- 6,91	5,22- 6,82

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ u odnosu na vrednost kod krava optimalne telesne kondicije istog dana ispitivanja

Iz rezultata prikazanih u tabeli 5.27. može se uočiti da je dobijena vrednost prosečne koncentracije uree u krvi ugojenih krava 10. dana pre teljenja bila statistički značajno manja u odnosu na prosečnu vrednost uremije kod krava optimalne telesne kondicije istog dana ispitivanja ($p < 0,05$), dok je u ostalim periodima ispitivanja bila viša, ali ne statistički značajno, kod ugojenih nego krava optimalne kondicije.

Značajnost razlika u koncentraciji uree unutar ispitivanih grupa prikazana je u tabeli 5.28.

Tabela 5.28. Značajnost razlike unutar grupe krava optimalne telesne kondicije i ugojenih krava

Krave optimalne telesne kondicije				Ugojene krave			
	28 AP	10 AP	14 PP		28 AP	10 AP	14 PP
28 PP	p < 0,01	NZ	NZ	28 PP	p < 0,001	p < 0,001	NZ
14 PP	p < 0,05	NZ		14 PP	p < 0,001	p < 0,001	
10 AP	p < 0,001			10 AP	p < 0,001		

Unutar ispitivanih grupa, statističkom obradom razlika dobijenih srednjih vrednosti koncentracije uree može se videti da su koncentracije uree u krvi krava optimalne telesne kondicije bile statistički značajno niže 28. dana pre teljenja u odnosu na prosečne vrednosti uremije 10. dana pre teljenja (p < 0,001), kao i 14. i 28. dana (p < 0,01 i p < 0,05) posle teljenja. Za razliku od krava optimalne telesne kondicije, najniža vrednost koncentracije uree u krvi ugojenih krava utvrđena je 10. dana pre teljenja i bila je statistički značajno niža u odnosu na sve ostale vremenske tačke merenja tokom ogloda.

5.6.6. Koncentracija kalcijuma

Rezultati ispitivanja koncentracije kalcijuma kod obe grupe krava prikazani su u tabeli 5.29.

Tabela 5.29. Koncentracija kalcijuma (mmol/L) u krvi krava tokom ispitivanih perioda

	Krave optimalne kondicije				Ugojene krave			
	28 AP	10 AP	14 PP	28 PP	28 AP	10 AP	14 PP	28 PP
X	2,43	2,44	2,39	2,45	2,39	2,59	2,49	2,55
SD	0,12	0,19	0,27	0,22	0,18	0,18	0,16	0,22
SE	0,04	0,07	0,09	0,09	0,06	0,05	0,05	0,08
CV	5,20	7,88	11,35	9,10	7,71	7,12	6,45	8,83
IV	2,19- 2,57	2,09- 2,74	2,03- 2,89	2,00- 2,78	2,17- 2,69	2,20- 2,82	2,22- 2,79	2,23- 2,93

*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 u odnosu na vrednost kod krava optimalne telesne kondicije istog dana ispitivanja

Iz rezultata prikazanih u tabeli 5.29. može se zapaiti se da između dobijenih srednjih vrednosti koncentracije kalcijuma u krvi ugojenih krava nisu utvrđene statistički značajne razlike u odnosu na vrednosti kalcemije kod krava optimalne telesne kondicije istog dana ispitivanja.

Značajnost razlika u koncentraciji kalcijuma unutar ispitivanih grupa prikazana je u tabeli 5.30.

Tabela 5.30. Značajnost razlike unutar grupe krava optimalne telesne kondicije i ugojenih krava

Krave optimalne telesne kondicije				Ugojene krave			
	28 AP	10 AP	14 PP		28 AP	10 AP	14 PP
28 PP	NZ	NZ	NZ	28 PP	NZ	NZ	NZ
14 PP	NZ	NZ		14 PP	NZ	NZ	
10 AP	NZ			10 AP	p < 0,05		

Testiranjem statističkih značajnosti razlika dobijenih srednjih vrednosti koncentracije kalcijuma u krvi unutar ispitivanih grupa krava, ustanovljeno je da je kalcemija izmerena 28. dana pre teljenja bila statistički značajno manja nego koncentracija kalcijuma određena 10. dana pre teljenja kod ugojenih krava.

5.6.7. Koncentracija fosfora

Rezultati ispitivanja koncentracije fosfora kod obe grupe krava prikazani su u tabeli 5.31.

Tabela 5.31. Koncentracija fosfora (mmol/L) u krvi krava tokom ispitivanih perioda

	Krave optimalne kondicije				Ugojene krave			
	28 AP	10 AP	14 PP	28 PP	28 AP	10 AP	14 PP	28 PP
X	1,50	1,54	1,41	1,62	1,47	1,67	1,55	1,56
SD	0,29	0,37	0,26	0,23	0,14	0,24	0,26	0,09
SE	0,10	0,14	0,09	0,08	0,05	0,09	0,09	0,03
CV	19,14	23,91	18,77	14,03	9,33	14,58	16,89	5,56
IV	1,15- 2,12	1,08- 2,30	1,03- 1,80	1,15- 1,96	1,33- 1,78	1,23- 2,11	1,24- 2,04	1,37- 1,66

*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 u odnosu na vrednost kod krava optimalne telesne kondicije istog dana ispitivanja

Iz rezultata prikazanih u tabeli 5.31. može se videti da između dobijenih srednjih vrednosti koncentracije fosfora u krvi ugojenih krava nisu utvrđene statistički značajne razlike u odnosu na vrednosti fosfatemije kod krava optimalne telesne kondicije istog dana ispitivanja.

Značajnost razlika u koncentraciji fosfora unutar ispitivanih grupa prikazana je u tabeli 5.32.

Tabela 5.32. Značajnost razlike unutar grupe krava optimalne telesne kondicije i ugojenih krava

Krave optimalne telesne kondicije				Ugojene krave			
	28 AP	10 AP	14 PP		28 AP	10 AP	14 PP
28 PP	NZ	NZ	NZ	28 PP	NZ	NZ	NZ
14 PP	NZ	NZ		14 PP	NZ	NZ	
10 AP	NZ			10 AP	p < 0,05		

Testiranjem statističkih značajnosti razlika dobijenih srednjih vrednosti koncentracije fosfora u krvi unutar ispitivanih grupa krava, utvrđeno je da je fosfatemija izmerena 28. dana pre teljenja bila statistički značajno manja nego koncentracija fosfora određena 10 dana pre teljenja kod ugojenih krava.

6.0. DISKUSIJA

Goveda visokomlečnih rasa izložena su značajnim promenama u regulaciji energetskeg metabolizma tokom kasne faze zasušenja i u ranoj laktaciji. Mehanizmi adaptacije, uključeni u kontrolu toka i prometa hranljivih materija, dešavaju se u različitim tkivima, a prevashodno uključuju promene u odgovoru perifernih tkiva (mišićno i masno) na homeostatske signale koje iniciraju insulin i epinefrin (Bauman i Currie, 1980; Bell, 1995). Jedna od glavnih adaptivnih promena podrazumeva višestruko povećanje zahteva u glukozu od strane mlečne žlezde, što je, u svakom slučaju, podržano intenziviranjem sinteze glukoze u jetri (Reynolds i sar., 2003). Istovremeno periferna tkiva koriste manje glukoze kao izvor energije, štedeći je na taj način za potrebe gravidnog uterusa i mlečne žlezde (Bauman i Elliot, 1983; Petterson i sar., 1993). Takođe, pojačana mobilizacija viših masnih kiselina, dodatno olakšana promenama u metabolizmu masnog tkiva, doprinosi zadovoljavanju povećanih sveukupnih potreba u energiji na početku laktacije (Petterson i sar., 1994). Rezultat ovih adaptivnih promena je koordinisana podrška potrebama fetusa i proizvodnoj aktivnosti mlečne žlezde kako bi se nadomestio smanjeni i/ili nedovoljan unos hranljivih materija iz alimentarnih izvora tokom zasušenja i rane faze laktacije.

Poseban značaj u istraživanjima vezanim za fiziologiju i metabolizam visokomlečnih krava pridaje se ispitivanju endokrinog i metaboličkog statusa krava tokom zasušenja, kao pripremnog perioda za predstojeću laktaciju (Holtenius i sar., 2003; Douglas i sar., 2006; Grummer i sar., 2010). Razlog tome je činjenica da promene u hormonalnom statusu koje se dešavaju tokom ovog perioda predstavljaju mehanizam adaptacije krava na izrazito povećane energetske potrebe koje prate rastuću proizvodnju mleka nakon teljenja (Bell, 1995; Bell i Bauman, 1997). U literaturi se najčešće spominje da je ugojenost krava u zasušenju jedan od najznačajnijih činilaca koji utiče na sposobnost krava da se adaptiraju na predstojeću laktaciju (Morrow, 1979; Reid i sar., 1986; Rukkwamsuk i sar., 1998; Šamanc i sar., 2008, 2010a). Pri tome je mnogo kritičniji period početak laktacije, kada, u odnosu na period zasušenja, nastaju drastične promene u energetskeg statusu životinja (Herdt i sar., 2000; Ingvarsen, 2006). Dokaz za to je svakako veća učestalost metaboličkih poremećaja posle teljenja, smanjena proizvodnja mleka, kao i reproduktivni problemi kod

ovakvih jedinki (Holcomb i sar., 2001; Ingvarlsen, 2006; LeBlanc, 2010; Janovick i sar., 2011). Patogeneza metaboličkih poremećaja kod ugojenih krava je u mnogim pojedinostima poznata, ali je još uvek predmet mnogobrojnih istraživanja (Bobe i sar., 2004; Bradford i sar., 2006; Allen i sar., 2009; Jaakson i sar., 2013). Zbog toga se sasvim opravdano smatra da je upoznavanje promena koje nastaju u metabolizmu i endokrinom statusu ugojenih životinja u peripartalnom periodu od ključnog značaja u iznalaženju rešenja za njihovo adekvatno preveniranje.

Danas se smatra da funkcionalna aktivnost B ćelija endokrinog pankreasa i osetljivost tkiva na insulin imaju ključnu ulogu u procesu adaptacije krava na visoku proizvodnju mleka (Fenwick i sar., 2008; Schoenberg i Overton, 2010). Sa početkom laktacije smanjuje se koncentracija insulina u krvi (Blum i sar., 1973; Jaakson i sar., 2007), kao i odgovor B ćelija na intravensku aplikaciju glukoze (Opsomer i sar., 1999), a masno tkivo postaje refraktarnije na lipogeni uticaj insulina (Rukkwamsuk i sar., 1999). Insulinska rezistencija se definiše kao stanje pri kome trenutna koncentracija insulina u krvi proizvodi manji biološki odgovor od normalnog (Kahn, 1978). Umerena insulinska rezistencija je ustanovljena tokom graviditeta kod velikog broja sisara, takođe i kod krava visokomlečnih rasa, pogotovo u najranijoj fazi laktacije. Ona doprinosi intenziviranju procesa lipomobilizacije u cilju zadovoljavanja rastućih potreba u energiji u uslovima velikih metaboličkih opterećenja, odnosno za vreme visokog graviditeta i laktacije (Regnault i sar., 2004). Međutim, nekontrolisana mobilizacija masnih kiselina iz telesnih depoa može da postane samoodrživ proces kada NEFA počne da utiče na sekreciju insulina u B ćelijama pankreasa i insulinsku senzitivnost (Pires i sar., 2007; Kokkonen i sar., 2009). Pored mnogobrojnih, genetskih i paragenetskih faktora, pretpostavlja se da telesna kondicija krava u periodu zasušenja može da utiče na stepen insulinske rezistencije, a time i na sposobnost krava da se prilagode na negativan bilans energije koji nastaje u ranoj fazi laktacije (Holtenius i sar., 2003; Oikawa i Oetzel, 2006; Jaakson i sar., 2013).

Danas se za ispitivanje funkcionalnog stanja B ćelija endokrinog pankreasa kao i senzitivnosti tkiva na insulin kod preživara najčešće koristi određivanje koncentracije glukoze, NEFA i insulina tokom testa intravenskog opterećenja glukozom (Šamanc i sar., 2009; Schoenberg i sar., 2012). Dodatno se rezistencija perifernih tkiva na insulin ispituje i

određivanjem zastupljenosti receptora za insulin i transportnih molekula za glukozu u uzorcima telesnih tkiva, pogotovo na kojima ovaj hormon ima presudan uticaj u procesu raspodele i korišćenja energetskih prekursora (Komatsu i sar., 2005; Sadri i sar., 2010; Kuhla i sar., 2011). I najzad, za utvrđivanje stepena adaptacije krava na promene u energetskom statusu u peripartalom periodu koriste se parametri metaboličkog profila i stepen zamašćenja tkiva jetre (Reist i sar., 2002; Fenwick i sar., 2008; Šamanc i sar., 2011; Prodanović i sar., 2012).

6.1. Testovi opterećenja glukozom kod ugojenih i krava sa optimalnom telesnom kondicijom

Poslednjih nekoliko godina, interesovanje velikog broja istraživača je bilo usmereno na ispitivanje uticaja hranidbenog statusa tokom perioda zasušenja na proces prilagođavanja organizma visokomlečnih krava u tranzicionom periodu (Holcomb i sar., 2001; Agenas i sar., 2003; Holtenius i sar., 2003; Dann i sar., 2006; Janovick i sar., 2011; Schoenberg i sar., 2012; Jaakson i sar., 2013). U tom pogledu, posebna pažnja istraživača je bila usmerena u pravcu daljeg razumevanja patogeneze poremećaja u metabolizmu krava koje još u periodu zasušenja unose hraniva visoke energetske vrednosti i/ili ugojenih krava. U okviru ove doktorske disertacije testom opterećenja glukozom ispitivana je funkcionalna aktivnost B ćelija endokrinog pankreasa i stepen osetljivosti perifernih tkiva na insulin kod ugojenih i krava sa optimalnom telesnom kondicijom dva puta u antepartalnom periodu i dva puta u najranijoj fazi laktacije. Naime, iz literature je poznato (Schoenberg i Overton, 2010) da se sa napredovanjem graviditeta, a pogotovo u najranijoj fazi laktacije, značajno menja uloga insulina u preraspodeli energetskih prekursora između različitih tkiva organizma krave. Polazna pretpostavka u ovom istraživanju je bila da stanje uhranjenosti krava u periodu zasušenja utiče na stepen insulinske rezistencije, a time i na sposobnost da se adaptiraju na negativan bilans energije u uslovima visoke proizvodnje mleka. Drugim rečima, očekuje se da poremećaji vezani za sekreciju insulina i odgovor perifernih tkiva na insulin kod ugojenih krava mogu dovesti do neadekvatne adaptacije životinja na visoku

mlečnost, a time biti i značajan etiopatogenetski faktor u nastanku mnogobrojnih poremećaja zdravlja u peripartalnom periodu (Opsomer i sar., 1999; Herzog, 2001; Kräft, 2004; Oikawa i Oetzel, 2006).

Rezultati ispitivanja su pokazali da veoma rano, tokom sredine perioda zasušenja, kod ugojenih krava nastaje blagi stepen rezistencije tkiva na insulin. Naime, kod njih, za razliku od krava sa optimalnom telesnom kondicijom 180. minuta tokom izvođenja testa opterećenja glukozom je ustanovljena značajno veća koncentracija glukoze u krvi. Sa druge strane, u koncentraciji insulina nisu ustanovljene značajne razlike kako na početku ispitivanja tako i u toku izvođenja testa, ali je interesantno da je koncentracija NEFA na samom početku izvođenja testa, iako ne statistički, bila numerički veća kod ugojenih krava u poređenju sa kravama koje su imale optimalnu telesnu kondiciju. I to bi mogao da posluži kao pokazatelj blagog stepena rezistencije tkiva na insulin (Hayirli, 2006). Matematički izračunati i izvedeni pokazatelji testa opterećenja nisu ukazivali na razlike u stepenu osetljivosti tkiva na insulin u sredini perioda zasušenja. Iako dobijeni rezultati govore u prilog inicijalnih naznaka poremećaja u senzitivnosti tkiva na insulin kod ugojenih krava već tokom sredine perioda zasušenja, ipak mora se naglasiti da kod obe grupe krava regulatorni mehanizmi uspevaju da očuvaju metaboličku ravnotežu, na šta ukazuju i rezultati ispitivanja metaboličkog profila iz ovog perioda. Do sličnih rezultata su u svojoj studiji došli Winkelman i saradnici (2008a).

Daleko značajnije promene u vrednostima ispitivanih parametara prilikom izvođenja testa opterećenja glukozom su ustanovljene na deset dana pre teljenja. Naime, koncentracija glukoze u krvi krava kako na početku tako i na kraju izvođenja testa opterećenja glukozom je bila značajno veća kod ugojenih krava u poređenju sa kravama optimalne telesne kondicije. To isto je ustanovljeno i za koncentraciju insulina pre aplikacije glukoze, što jasno ukazuje na smanjenu efikasnost insulina u pogledu stimulisanja utilizacije glukoze od strane perifernih tkiva kod ugojenih krava u ovom periodu. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima drugih autora (Dann i sar., 2006; Douglas i sar., 2006; Richards i sar., 2009; Janovick i sar., 2011). Navedeni autori su u svojim ispitivanjima kod krava koje su tokom zasušenja forsirano hranjene, uprkos izmerenim većim vrednostima insulinemija, utvrdili značajno veće koncentracija glukoze u

krvi u periodu kasnog graviditeta. Imajući u vidu značajne razlike u vrednostima izvedenih parametara testa opterećenja između dve ispitivane grupe krava (AUC_{NEFA} i RQUICKY) može da se kaže da u poslednjim danima graviditeta kod ugojenih krava je sve izraženija rezistencija tkiva na insulin. Mada samo na osnovu rezultata testa opterećenja glukozom nije moguće sa sigurnošću govoriti o tipu insulinske rezistencije, promene u metabolizmu glukoze kod ugojenih krava mogu nastati zbog veće proizvodnje glukoze i/ili promena u broju i afinitetu receptora za insulin, budući da između dve grupe krava tokom testa opterećenja nisu ustanovljene značajne razlike u brzini eliminacije (ER i $T_{1/2}$) glukoze (Holtenius i sar., 2003; Schoenberg i sar., 2012). I u jednom i u drugom slučaju ishod može da bude kompenzatorna hiperinsulinemija. Očito je da se sa približavanjem partusa i pre početka laktacije kod ugojenih krava smanjuje osetljivost tkiva na insulin. Samim tim stvaraju se uslovi da proces mobilizacije energetskih prekursora izmakne kontroli (Rukkwamsuk i sar., 1999), na što ukazuju promene u koncentraciji NEFA u krvi nakon izvođenja testa opterećenja glukozom. Naime, iako u koncentraciji NEFA nisu ustanovljene značajne razlike na početku testa opterećenja, što se može smatrati da je s jedne strane posledica nižeg nivoa hormona rasta u krvi (Winkelman i sar., 2008b), ali isto tako i viših bazalnih insulinemija kod ugojenih krava (Rukkwamsuk i sar., 1998), odgovor NEFA tokom izvođenja testa opterećenja glukozom je bio značajno refraktarniji kod ugojenih u poređenju sa kravama koje su imale optimalnu telesnu kondiciju. To može da ukaže na smanjeno korišćenje mobilisanih viših masnih kiselina u perifernim tkivima i/ili narušenu anaboličku ulogu insulina u metabolizmu masti kod ugojenih krava (Drackley, 2000). Po svemu sudeći u antepartalnom periodu ne nastaju značajne promene u stepenu aktivnosti B ćelija endokrinog pankreasa, ali promene nastaju u pogledu osetljivosti perifernih tkiva na insulin. Pored promene u korišćenju glukoze, koja se smatra dominantnim načinom ispoljavanja smanjene osetljivosti tkiva na insulin kod preživara u visokom graviditetu (Debras i sar., 1989; Guesnet i sar., 1991; Hayirli, 2006), kod ugojenih krava se već u ovom periodu javljaju i promene u prometu masnih kiselina. U svakom slučaju, rezultati ispitivanja govore u prilog navedenom gledištu da hranidbeni status krava u značajnoj meri uzajamno deluje sa stepenom osetljivosti perifernih tkiva na insulin tokom kasnog prepartalnog perioda (Janovick i Drackley, 2010).

Rezultati ispitivanja testa opterećenja glukozom u postpartalnom periodu su pokazali da se kod ugojenih krava dodatno narušava osetljivost perifernih tkiva na insulin i na taj način praktično pojačava stepen insulinske rezistencije. Naime, pod uticajem promena u hormonalnoj konstelaciji nastaju izrazite promene u metabolizmu masnog tkiva praćene porastom koncentracije masnih kiselina u cirkulaciji, što u uslovima njihovog nedovoljnog korišćenja predstavlja opasnost po morfološki i funkcionalni integritet tkiva, pre svega jetre. Kod njih je 14. dana posle teljenja koncentracija glukoze u krvi pre izvođenja testa i dalje bila značajno veća nego kod krava optimalne telesne kondicije. Takav trend je prisutan i kada je u pitanju koncentracija insulina, a pogotovo koncentracija NEFA u krvi. Takođe, u prilog gore navedenoj tvrdnji o pojačanom stepenu insulinske rezistencije kod ugojenih krava u ovom periodu, govore i vrednosti izračunatih i izvedenih parametara testa opterećenja glukozom (AUC_{ins} , ΔMax_{ins} i RQUICKY). S obzirom da se kod visokomlečnih krava promet glukoze u fazi rane laktacije dominantno odvija u insulin-nezavisnim metaboličkim putevima (Subiyatno i sar., 1996), veće početne vrednosti glikemija kod ugojenih krava mogu se tumačiti smanjenom sposobnosti insulina da suprimira proces glukoneogeneze u jetri (Hayirli, 2006). Zato se i smatra značajnim faktorom u nastanku kompenzatorne hiperinsulinemije kod ovakvih jedinki (Kumashiro i sar., 2011). U svakom slučaju, ovaj nalaz se uzima kao pokazatelj rezistencije na nivou tkiva jetre, i skoro redovno se dijagnostikuje kod ljudi obolelih od diabetesa tipa 2 i/ili sa masnom jetrom (Gastaldelli i sar., 2007). Imajući u vidu podatke iz literature (Lonardo i sar., 2005), kao i rezultate postignute u ovom radu (AUC_{ins}), nastalo patofiziološko stanje može da doprinese daljem produbljivanju rezistencije tkiva na insulin putem smanjenja klirensa insulina iz portalne krvi. Praktično rečeno trend promena koncentracije glukoze i insulina u testu opterećenja glukozom 14. dana posle teljenja pokazuje istovetnu tendenciju kao i tokom izvođenja testa deset dana pre teljenja. Pri tome je veoma značajno da je, i pored većih vrednosti insulinemija, koncentracija NEFA u krvi ugojenih krava na početku testa, kao i površina ispod krive NEFA tokom testa (AUC_{NEFA}), iako ne statistički, veća u poređenju sa vrednostima dobijenim kod krava optimalne telesne kondicije. Ovi podaci mogu da ukažu da rezistencija tkiva na insulin, pored toga što ima nepovoljan uticaj na promet NEFA i njihovo korišćenje u organizmu, u postpartalnom periodu kao značajan

mehanizam uključuje i narušenu antilipolitičku ulogu insulina. Prema podacima pojedinih autora, više masne kiseline i inflamatorni citokini (TNF- α i IL-6), koji su na početku laktacije kod ugojenih krava prisutni u većim koncentracijama u krvi (Ohtsuka i sar., 2001; Looor i sar., 2006), mogu da ometaju prenošenje insulinskog signala i tako utiču na regulaciju metaboličkih procesa u ćelijama (Oikawa i Oetzel, 2006; Pires i sar., 2007). S druge strane, na početku laktacije, pri širokom rasponu odnosa između koncentracija hormona rasta i insulina u krvi, postoje sve pogodnosti da nastupi izražena mobilizacija masti iz telesnih depoa i da kod krava nastane “masna” jetra (Drackley, 2000). Naime, dobro je poznato da je jedan od glavnih efekata hormona rasta da, menjajući odgovor masnog tkiva na insulin i kateholamine, pojačava rezistenciju na insulin i/ili stimuliše kataboličke procese u masnom tkivu (Bauman i Vernon, 1993, Bell, 1995, McNamara, 1997). Antiinsulinsku ulogu hormon rasta ostvaruje posredstvom svojih receptora i interakcijom (negativnom regulacijom) sa molekulima insulinskog signalnog sistema (Dominici i sar., 2005). To može da ima kao posledicu smanjenje ekspresije i translokacije GLUT 4 molekula na ciljnim ćelijama (Lewis i sar., 2002; Zhao i Keating, 2007). Pored toga, dokazano je da se u ovakvim okolnostima pojačava aktivnost hormon senzitivne lipaze uz istovremeno smanjenje aktivnosti lipoprotein lipaze i transportera masnih kiselina na membranama ćelija (Lewis i sar., 2002; Van den Top i sar., 2005; Locher i sar., 2011). Drugim rečima, s obzirom da insulin stimuliše ekspresiju receptora za hormon rasta u adipocitima (Butler i sar., 2003; Rhoads i sar., 2004), kod ugojenih krava je veća mogućnost da nastanu promene u senzitivnosti i odgovoru tkiva na insulin pod uticajem hormona rasta.

Od ranije je poznato da u peripartalnom periodu nastaju značajne promene u koncentraciji insulina, glukoze i NEFA u krvi krava visokomlečnih rasa. Smanjenje glikemije i insulinemije, kao i odgovora B ćelija pankreasa na intravensku aplikaciju glukoze u postpartalnom periodu treba da je u korelaciji sa stepenom aktivnosti mlečne žlezde, odnosno dnevnom količinom proizvedenog mleka. To je pokazano u nekoliko istraživanja (Sartin i sar., 1985; Bonczek i sar., 1988; Grum i sar., 1996; Shingu i sar., 2002; Hammon i sar., 2007; Gross i sar., 2011). Međutim, kod ugojenih krava je, kako ovi rezultati pokazuju, obrnuto, što stvara povoljne uslove da se proces lipomobilizacije odvija

intenzivnije nego što su stvarne energetske potrebe krava u uslovima negativnog bilansa energije. Istovetni rezultati se uobičajeno dijagnostikuju kod ljudi obolelih od diabetesa tipa 2 (Jin i sar., 2005). Po svemu sudeći, u masnom tkivu se intenzivira proces lipomobilizacije koji je, iako pod uticajem regulatornih mehanizama, istovremeno i u skladu sa količinom deponovanih masti u telesnim depoima (Rukkwamsuk i sar., 1999; Šamanc i sar., 2008; Peng, 2011). Sa druge strane u uslovima rezistencije na insulin smanjuje se mogućnost korišćenja nepotrebno mobilisanih većih količina masnih kiselina u telesnim tkivima, pre svega u mišićnom tkivu (Blaak, 2003). Zbog toga se suvišne količine masnih kiselina usmeravaju sve više u pravcu tkiva jetre kao organa lipogeneze odgovornog za regulaciju energetskeg metabolizma i prometa masnih kiselina. To ima za posledicu smanjeno iskorišćavanje energije i dalje produbljivanje negativnog energetskeg bilansa, što predstavlja dodatno opterećenje za regulatorne mehanizme kod ugojenih krava (Holcomb i sar., 2001; Holtenius i sar., 2003, Schoenberg i sar., 2012). To je svakako jedan od razloga što kod ugojenih krava postoji veća mogućnost za nastajanje zamašćenja jetre o čemu će biti više reči u jednom od narednih podpoglavlja.

Rezultati ispitivanja testa opterećenja glukozom 28. dana posle teljenja, dobrim delom potvrđuju one dobijene u prethodnim ispitivanjima. Međutim, u ovoj fazi ispitivanja jedino vrednosti glikemije se nisu značajno razlikovale između dve grupe krava, i to, kako na početku ispitivanja tako i u toku izvođenja testa opterećenja. Ovaj nalaz se može objasniti korišćenjem glukoze za potrebe mlečne žlezde, imajući u vidu da je ona kod visokomlečnih krava glavni korisnik glukoze i da se njena aktivnost u kontinuitetu povećava od teljenja pa do kraja rane faze laktacije. Pri tome treba dodati da ćelije mlečne žlezde imaju insulin-nezavisne transportere za glukozu pa zbog toga korišćenje glukoze nije limitirano delovanjem insulina. Za razliku od koncentracije glukoze, koncentracija insulina je bila značajno viša kod ugojenih u odnosu na krave optimalne telesne kondicije, i to u svim intervalima u toku testa opterećenja glukozom. Veoma je interesantno da je u skladu sa tim koncentracija NEFA kod ugojenih krava pre intravenske aplikacije glukoze bila dvostruko veća nego kod krava optimalne telesne kondicije. Približno isti nalaz je ustanovljen i 15. minuta nakon aplikacije glukoze, što upućuje na razlike u osetljivosti masnog tkiva na antilipolitički uticaj insulina između dve grupe krava u ovom periodu.

Drugim rečima, dobijeni rezultati ispitivanja tokom testa opterećenja glukozom jasno ukazuju da je kod ugojenih krava smanjena osetljivost tkiva na insulin, što potvrđuju i skoro svi matematički izvedeni parametri testa opterećenja (AUC_{ins} , ΔMax_{ins} i RQUICKY). Ipak, kada je u pitanju funkcionalna aktivnost B ćelija endokrinog pankreasa, dobijeni rezultati su u izvesnoj meri neočekivani. Naime, kako je predložio Hayirli (2006), smanjen odgovor B ćelija na intravensku aplikaciju glukoze, koji je čest nalaz kod visokomlečnih krava u najranijoj fazi laktacije, se može uzeti kao pokazatelj insulinske rezistencije. Ovakva reakcija B ćelija uslovljena je bržim prometom glukoze (Hammon i sar., 2007), ali i inhibitornim uticajem povišenih koncentracija NEFA u krvi u ovoj fazi proizvodnog ciklusa (Pires i sar., 2007; Bossaert i sar., 2008; Prodanović i sar., 2013). S druge strane, Hayirli i sar. (2001) i Holtenius i sar. (2003) su u svojim ispitivanjima ustanovili bolji odgovor B ćelija pankreasa nakon intravenske aplikacije glukoze, kako u antepartalnom, tako i ranom postpartalnom periodu, kod grupe krava kod kojih je istovremeno utvrđen veći stepen rezistencije tkiva na insulin. Treba naglasiti da su izmereni nivoi NEFA u krvi ispitivanih grupa krava bili u granicama fizioloških vrednosti u obe navedene studije. Pored toga, Jaakson i sar. (2013) su utvrdili visoko značajnu pozitivnu korelaciju između stanja uhranjenosti životinja u trenutku izvođenja testa opterećenja glukozom i funkcionalne aktivnosti B ćelija pankreasa. U skladu sa napred navedenim, bolji odgovor B ćelija pankreasa kod ugojenih nego kod krava optimalne kondicije je verovatno posledica odsustva inhibitornog uticaja visokih koncentracija NEFA u krvi, za koje je dokazano da, kada se u krvi nalaze u granicama fizioloških vrednosti, deluju stimulatивно na sekretornu sposobnost B ćelija (Mason i sar., 1999; Maedler i sar., 2001). I to bi moglo da posluži kao objašnjenje zašto između dve grupe krava nisu ustanovljene značajnije razlike u brzini eliminacije glukoze iz krvi u sva četiri perioda ispitivanja (Oikawa i Oetzel, 2006; Pires i sar., 2007; Schoenberg i sar., 2012) Takođe, nije isključeno da je ovakav rezultat dobrim delom posledica i sporije eliminacije insulina iz cirkulacije (AUC_{ins}) i/ili smanjene osetljivosti tkiva na insulin kod ugojenih jedinki (Hayirli i sar., 2001, 2006; Bossaert i sar., 2008; Terao i sar., 2010).

Izgleda da rezistencija tkiva na insulin kod ugojenih krava ima različit uticaj na koncentraciju glukoze i NEFA u krvi u antepartalnom i postpartalnom periodu. U

antepartalnom periodu taj uticaj se ispoljava kako na koncentraciju glukoze tako i NEFA u krvi, dok u postpartalnom periodu, kako napreduje laktacija, taj uticaj se ispoljava samo na koncentraciju NEFA u krvi. Neki istraživači su ranije istakli da insulin kod preživara, za razliku od monogastričnih životinja, prvenstveno reguliše metabolizam masti (Faulkner i Pollock, 1990; Besong, 1996; Hayirli, 2006). To potvrđuju i ovi rezultati, s obzirom, da smanjena osetljivost tkiva na insulin kod ugojenih krava ne utiče na korišćenje glukoze kada to postaje prioritetna potreba mlečne žlezde. Sve u svemu, ovi rezultati dobrim delom podržavaju polaznu pretpostavku da gojaznost krava u periodu zasušenja utiče na promene u osetljivosti tkiva na insulin koje time najverovatnije predisponiraju životinje ka smanjenom unosu suve materije obroka i višim koncentracijama NEFA u krvi neposredno posle teljenja. Na taj način nepovoljno utiču i na sposobnost krava da se adaptiraju na negativan bilans energije u uslovima visoke proizvodnje mleka.

6.2. Zamašćenje jetre i dijametar adipocita

U ispitivanjima koja su obavljena u proteklom periodu dokazano je da, kod visokomlečnih krava, pre svega, holštajn rase, u peripartalnom periodu nastaju veoma značajne promene u energetsom metabolizmu (Bell, 1995; Drackley, 1999; Ingvarsten, 2006). Naročito se ističu izrazite promene u metabolizmu masnog tkiva, koje dovode do povećanja koncentracije masnih kiselina u krvnoj plazmi, kao i nakupljanja masti u ćelijama jetre (McNamara, 1995; Vernon, 2005). Sve to ukazuje na pojačanu mobilizaciju masti iz telesnih depoa, koje treba da posluže kao dopunski izvor energije u periodu oko teljenja (Drackley i sar., 2001; Reynolds i sar., 2003). Kada je količina energije koja je potrebna za uzdržne potrebe i proizvodnju mleka jednaka količini energije iz hraniva i telesnih depoa, uspostavlja se fiziološki negativan bilans energije. U slučaju da je potrebno više energije, nego što se dobija iz hrane i telesnih rezervi, nastaje patološki negativan bilans energije (Jorritsma i sar., 2003). Krajnji rezultat patološkog negativnog bilansa energije je prekomerno nakupljanje masti u ćelijama jetre, što, neretko, predstavlja uzrok bolesnih stanja koja su obeležje peripartalnog perioda (Grummer, 1993; Šamanc i sar.,

2011). Međutim, još uvek je otvoreno pitanje zašto u slučaju izrazitog nedostatka energije organizam visokomlečnih krava, iako raspolaže značajnim količinama jedinjenja bogatih energijom, nije u mogućnosti da ih koristi, već se ona mobilišu iz primarnog depoa (masno tkivo) i transportuju u druga telesna tkiva (jetra, bubrezi, mišići i drugo) stvarajući alternativne depoe štetne po zdravlje životinja. Upravo je ova nepoznanica bila predmet istraživanja u okviru ove doktorske disertacije kako bi se što je moguće više doprinelo rasvetljavanju složene etiopatogeneze ovog fenomena.

Uzroci zamašćenja jetre su kompleksni i mnogobrojni (Morrow, 1979; Reid i sar., 1986; Bobe i sar., 2004; Šamanc i sar., 2010b). Čini se da od svih do sada poznatih činilaca gojaznost krava u zasušenju predstavlja jedan od najznačajnijih. To je prvenstveno zbog toga što je kod takvih životinja intenzitet lipomobilizacije u pozitivnoj korelaciji sa količinom masti u telesnim depoima, dok je kod krava optimalne telesne kondicije to skoro uvek u korelaciji sa energetske potrebama (Rukkwamsuk i sar., 1999; Dann i sar., 2006; Douglas i sar., 2006; Šamanc i sar., 2008). Za ovo postoji više tumačenja, ali se najviše ističe da se prilikom enormnog povećanja količine masnog tkiva istovremeno i proporcionalno povećava i veličina masnih ćelija (Rosen i MacDougald, 2006; Hausman i sar., 2009). To može da bude razlog što se u kritičnom periodu oko teljenja pojačava lipolitička aktivnost i/ili osetljivost ovih ćelija na delovanje lipolitičkih činilaca (McNamara i Hillers, 1986; Peng, 2011), a smanjuje prema glukozu i insulinu (Rukkwamsuk i sar., 1999). Ako se ima u vidu činjenica da je uloga adipocita u lučenju leptina i proinflamatornih citokina (Ehrhardt i sar., 2000; Chilliard i sar., 2001; Ohtsuka i sar., 2001; Looor i sar., 2006) depo specifična, a za koje se zna da utiču inhibitorno na apetit i osetljivost tkiva na insulin, onda postaje jasnije zašto kod ugojenih krava izostaje puna kontrola mobilizacije masti iz telesnih depoa i lipogeneze u ćelijama jetre.

Rezultati ispitivanja dijametra adipocita u subkutanom masnom tkivu kod ugojenih i krava sa optimalnom telesnom kondicijom dobijeni u ovom istraživanju su najbolja potvrda napred iznetih shvatanja. Kod ugojenih krava u antepartalnom periodu dijametar adipocita je bio skoro dvostruko veći u poređenju sa vrednostima dobijenim kod krava optimalne telesne kondicije. Međutim, u postpartalnom periodu dijametar adipocita je bio približno isti, s tim da je kod ugojenih krava došlo do smanjenja dijametra u odnosu na

antepartalni period, a kod krava optimalne telesne kondicije dijametar se značajno povećao. Ovi rezultati zaslužuju posebnu pažnju kako sa teorijskog tako i praktičnog aspekta jer ukazuju na razlike u regulaciji prometa masti kod krava u periodu oko teljenja u zavisnosti od stanja uhranjenosti, kao što su u svojim eksperimentima pokazali i drugi autori (Schoenberg i sar., 2012). Može se reći da je paradoksalno što je kod krava optimalne telesne kondicije dijametar adipocita značajno veći postpartalno u odnosu na vrednosti u antepartalnom periodu, jer je to potpuno u suprotnosti u odnosu na njihov energetske status. Po svemu sudeći kod krava optimalne telesne kondicije adipociti imaju sposobnost da mogu da akumuliraju manje ili veće količine lipida, i tako igraju aktivnu ulogu u regulaciji prometa ovih jedinjenja, pogotovo u uslovima kada nastaju izrazite promene u energetskom metabolizmu. Ako se u obzir uzmu nivoi ekspresije proteina insulinskog receptora i transportnih molekula za glukozu u telesnim tkivima dobijenim u istim fazama ispitivanja, onda se može proceniti da kod krava optimalne telesne kondicije nema ograničenja u pogledu korišćenja energetskih prekursora. Takođe, u prilog gore navedenoj tvrdnji o očuvanoj anaboličkoj ulozi insulina u metabolizmu masti kod krava optimalne kondicije u ovom periodu, govore i vrednosti izračunatih i izvedenih parametara testa opterećenja glukozom (AUC_{NEFA}). Kod ugojenih krava kod kojih se adipociti još u antepartalnom periodu ispune mastima do krajnjih granica, značajno je povećana ekspresija gena za apoptozu (Peng, 2011) o čemu svedoči i njihova masovna destrukcija (adipoliza) u ranom postpartalnom periodu. Zbog toga njihova uloga se isključivo svodi na nekontrolisano otpuštanje masnih kiselina. Nasuprot tome, kod krava optimalne kondicije, adipociti u tom istom periodu imaju presudnu ulogu u postizanju adekvatne ravnoteže između intenziteta lipogeneze i lipolize, ali ne samo u odnosu na trenutne energetske potrebe, već i mogućnosti jetre i drugih tkiva da masne kiseline koriste kao izvor energije. U svakom slučaju, dobijeni rezultati upravo potvrđuju nalaze nekih autora da, promene u veličini adipocita koje su kod visokomlečnih krava najvećim delom uslovljene ishranom i/ili energetskim statusom životinja, su odgovorne za regulaciju metabolizma lipida na nivou masnog tkiva u peripartalnom periodu (McNamara, 1991; Rukkwamsuk i sar., 1999; Chilliard i sar., 2001; Peng, 2011).

U vezi sa ovim mogu se razmatrati i rezultati ispitivanja sadržaja ukupnih lipida u ćelijama jetre. Kao što je već poznato jetra je organ u kome se odvija proces lipogeneze pa zbog toga u peripartalnom periodu ima ključnu ulogu u regulaciji energetskeg metabolizma. Da bi ostvarila ove i mnogobrojne druge funkcije, veoma je važno da u ovom periodu bude očuvan njen morfološki integritet (Šamanc i sar., 2008; Hammon i sar., 2009; Kreipe i sar., 2011). Kod visokomlečnih krava masna infiltracija i degeneracije hepatocita je jedini patološki proces koji narušava njihovu funkcionalnu sposobnost u periodu oko teljenja. Kao što je već navedeno, od velikog broja mogućih etioloških činilaca, čini se da je gojaznost krava u periodu zasušenja jedan od najvažnijih. U svetlu rezultata dobijenih u ovom radu jasno se vidi da su ugojene krave daleko podložnije nastajanju poremećaja od kojih je centralni i najvažniji problem zamašćenje jetre. Kod ugojenih krava uključenih u ovaj ogled u najužem periodu oko teljenja je ustanovljen značajno veći stepen zamašćenja jetre u poređenju sa nalazom kod krava optimalne telesne kondicije dobijenog u istom periodu ispitivanja. To jasno pokazuje da se kod ugojenih krava proces prilagođavanja odvija u neželjenom pravcu. U prilog tome mogu da posluže i vrednosti albuminemije i bilirubinemije dobijene u istim fazama ispitivanja kod ovakvih jedinki (Prodanović i sar., 2010; Šamanc i sar., 2011). Imajući u vidu da u tom periodu (od 10. dana antepartalno do 14. dana postpartalno) nije ustanovljena značajna razlika u koncentraciji NEFA u krvi ispitivanih krava ipak kod obe grupe je došlo do porasta njihove koncentracije u krvi. Kod ugojenih u proseku značajno više (za 0,35 mmol/L) nego kod krava optimalne telesne kondicije (0,2 mmol/L). Opet malo je verovatno da je samo razlika u intenzitetu lipomobilizacije uzrok većeg stepena zamašćenja jetre kod ugojenih krava. Verovatno da postoje i drugi razlozi za to. U prvom podpoglavlju je na osnovu rezultata testova opterećenja glukozom iznet stav da je kod ugojenih krava smanjena osetljivost perifernih tkiva na insulin. Ako se posmatraju bazalne vrednosti insulinemije u sva četiri perioda ispitivanja onda se može videti da kod svih krava uključenih u ogled dobijene vrednosti slede očekivani fiziološki trend, ali su one kod ugojenih krava značajno veće sem 28. dana antepartalno, kada razlika nije statistički značajna. Ako se u obzir uzimaju vrednosti glikemije dobijene u istim fazama ispitivanja kao i ekspresija proteina insulinskih receptora u telesnim tkivima onda se može proceniti da je kod ugojenih krava korišćenje energetskeg

prekursora ograničeno. To neminovno dovodi do toga da iz sistemske cirkulacije u ćelijama jetre pristižu veće količine NEFA, pogotovo onda kada je njihova koncentracija u krvi značajno veća od fiziološke vrednosti (Drackley i sar., 2001). Međutim, to isto može da se dogodi i kada je koncentracija NEFA u granicama fizioloških vrednosti. Tako na primer, na deset dana antepartalno kada je koncentracija NEFA približno ista kod obe grupe krava, kod ugojenih krava još u ovom periodu je ustanovljen veći stepen zamašćenja jetre nego što je to bio slučaj kod krava optimalne telesne kondicije. U isto vreme kod ugojenih krava je ustanovljena značajno veća koncentracija insulina i glukoze u krvi, što potvrđuje tezu da kod ugojenih krava zbog rezistencije tkiva na insulin postoje svi uslovi da značajno veće količine NEFA mogu da pristižu i prekomerno opterete ćelije jetre. To neminovno dovodi do zastoja u prometu masti i njihovog progresivnog nakupljanja u ćelijama jetre.

Po svemu sudeći, prekomerno nakupljanje masti u telesnim depoima, o čemu svedoči značajno veći dijametar adipocita kod ugojenih krava, predstavlja poremećaj koji može da bude odgovoran za nekontrolisanu mobilizaciju masti u ranom postpartalnom periodu. Ako se tome doda i podatak da kod ugojenih krava postoji određen stepen rezistencije perifernih tkiva na insulin, onda postaje jasnije zašto se kod ovih životinja u masnom tkivu postpartalno intenzivnije odvija proces lipolize, a u ćelijama jetre NEFA dospevaju u količinama koje prevazilaze njihov metabolički kapacitet. Praktično rečeno, po sredi su dva povezana mehanizma. Prvo, adipociti kod ugojenih krava postpartalno veoma malo mogu da doprinose uravnoteženju prometa masti, a sa druge strane, zbog prisutne rezistencije tkiva na insulin značajno veće količine ovih jedinjenja dospevaju u ćelije jetre.

6.3. Ekspresija proteina insulinskih receptora i transportnih molekula za glukozu u mišićnom i masnom tkivu

Insulinska rezistencija se definiše kao stanje u kome „trenutna koncentracija insulina u krvi proizvodi manji biološki odgovor od normalnog“ (Kahn, 1978). Biološki efekti insulina razlikuju se u zavisnosti od tkiva na kojima ovaj hormon deluje, ali je opšte prihvaćeno da se u stanju insulinske rezistencije smanjuje lipogeneza i korišćenjenje

glukoze u perifernim tkivima, uz istovremeno povećanje lipolize i koncentracije glukoze u krvi (Bell i Bauman, 1997; Cunningham i Klein, 2007). Veliki broj studija je izvestio o smanjenoj osetljivosti tkiva na insulin u visokom graviditetu i ranoj laktaciji kod krava, pogotovo visokomlečnih rasa (Shingu i sar., 2002; Dann i sar., 2006; Hammon i sar., 2007; Terao i sar., 2010). Ovaj fenomen se smatra jednim od glavnih obeležja procesa prilagođavanja organizma krave u uslovima povećanih potreba u energetske prekursore. Prema podacima iz literature, kao i rezultata postignutim u ovom radu, stanje uhranjenosti životinja u periodu oko teljenja u značajnoj meri uzajamo deluje sa stepenom osetljivosti tkiva na insulin i/ili sposobnosti krava da se adaptiraju na predstojeću laktaciju. Preciznije rečeno, kod ugojenih životinja zbog jače izražene neosetljivosti tkiva na insulin to može da bude predisponirajući faktor u nastajanju bolesnih stanja koje karakteriše narušen morfološki i funkcionalni integritet mnogobrojnih organa i organskih sistema (Holtenius i sar., 2003; Ingvarsen, 2006; Jaakson i sar., 2013). Etiopatogeneza insulinske rezistencije goveda je još uvek nedovoljno rasvetljena i u nekim pojedinostima nepoznata (Hayirli, 2006). Tako, mehanizam koji preovladava često nije moguće sa sigurnošću utvrditi, ali se generalno smatra da su poremećaji na više nivoa odgovorni za razvoj ovog patofiziološkog stanja. Prvo, smanjena i/ili suprimirana funkcionalna sposobnost B ćelija pankreasa je u svakom slučaju jedan od činilaca koji može da dovede do ovog poremećaja (Ingvarsen i Andersen, 2000; Pires i sar., 2007). Alteracije na nivou receptora su takođe mogući razlog za smanjenje insulinskog odgovora i/ili senzitivnosti tkiva na insulin (Vernon i sar., 1981; Holtenius i sar., 2003). Neretko, dolazi do promena na post-receptorskom nivou, kada nastaju greške u transdukciji insulinskog signala i/ili translokaciji GLUT molekula na membranama ciljnih ćelija (Herzog, 2001; Kräft, 2004; Sadri i sar., 2010). U okviru ove doktorske disertacije u najužem periodu oko teljenja ispitivana je zastupljenost proteina receptora za insulin i glukoznog transportera (GLUT 4) u ćelijama mišićnog i masnog tkiva sa ciljem boljeg razumevanja mehanizama insulinske rezistencije kod visokomlečnih krava sa različitim stanjem uhranjenosti.

Rezultati ispitivanja zastupljenosti proteina receptora za insulin i GLUT 4 molekula u mišićnom i masnom tkivu na deset dana pre teljenja i 14. dana posle teljenja dobrim delom objašnjavaju one dobijene tokom izvođenja testova opterećenja glukozom, kao i

ispitivanja dijametra adipocita i sadržaja ukupnih lipida u jetri. Dobijeni rezultati su pokazali da su razlike u stepenu osetljivosti perifernih tkiva na insulin između ispitivanih grupa krava posledica pre svega promena na receptorskom nivou. Naime, kod ugojenih krava, za razliku od krava sa optimalnom telesnom kondicijom, je ustanovljena značajno manja količina proteina insulinskog receptora u ćelijama mišićnog tkiva na deset dana pre teljenja. Sa druge strane, može se reći da su iznenađujući rezultati kada je u pitanju zastupljenost proteina GLUT 4 molekula u mišićnim ćelijama kod ugojenih krava, jer su u suprotnosti u odnosu na njihov receptorski status. Naime, kod njih je u ovom periodu ustanovljen značajno veći nivo ekspresije glukoznog transportera, pri čemu je istovremeno važno naglasiti da je koncentracija glukoze, kako na početku ispitivanja, tako i na kraju izvođenja testa opterećenja, bila značajno veća u poređenju sa kravama koje su imale optimalnu telesnu kondiciju. Iako između dve grupe krava nisu ustanovljene statistički značajne razlike, ekspresija proteina insulinskog receptora i glukoznog transportera u mišićnim ćelijama 14. dana posle teljenja pokazuje istovetnu tendenciju kao i deset dana pre teljenja. U skladu sa napred navedenim, može da se zapazi da rezultati ispitivanja vezani za ekspresiju insulinskog receptora i GLUT 4 molekula u mišićnim ćelijama u potpunosti korespondiraju sa vrednostima koncentracije insulina u krvi krava u istim fazama ispitivanja. Drugim rečima, kako je insulin pozitivan regulator procesa transkripcije i translokacije GLUT 4 molekula u insulin-zavisnim tkivima (Komatsu i sar., 2005; Kuhla i sar., 2011), razlika u nivou ekspresije GLUT 4 molekula u mišićnim ćelijama između ispitivanih grupa krava može se objasniti razlikama u vrednosti insulinemija u ovom periodu. Međutim, kako je već istaknuto, u isto vreme kod ugojenih krava uključenih u ovaj ogled je ustanovljena značajno veća koncentracija glukoze u krvi što može da ukaže na poremećaje na nivou translokacije GLUT 4 molekula na membranama mišićnih ćelija kod ovakvih jedinki. Istovetni nalazi se dijagnostikuju i kod ljudi obolelih od dijabetesa tipa 2 (Zierath i sar., 1998), što je u skladu sa već navedenim gledištem da je ovo patofiziološko stanje zapravo glavni razlog inače smanjene senzitivnosti (relativne neosetljivosti) tkiva na insulin kod preživara (Duhlmeier i sar., 2005). U svakom slučaju, smanjena efikasnost insulina u pogledu stimulisanja utilizacije glukoze od strane perifernih tkiva kod ugojenih krava u ovom periodu može da se tumači rezultatima dobijenim ispitivanjem ekspresije

proteina receptora za insulin. Upravo ovaj nalaz potvrđuje hipotezu da, kod krava koje su tokom perioda zasušenja hranjene većom količinom krmnih smeša i/ili ugojenih krava, poremećaji u metabolizmu glukoze u periodu oko teljenja su posledica hronične-dugotrajne hiperinsulinemije koja tokom perioda zasušenja mehanizmom negativne povratne sprege (down-regulation) reguliše ekspresiju proteina insulinskih receptora (Holtenius i sar., 2003; Jaakson i sar., 2013).

U vezi sa ovim mogu se razmatrati i rezultati ispitivanja ekspresije proteina insulinskog receptora i GLUT 4 molekula u ćelijama subkutanog masnog tkiva. Od ranije je poznato da se tranzicioni period karakteriše pojavom izrazitih promena u metabolizmu masnog tkiva koje se ogledaju u smanjenju senzitivnosti i/ili insulinskog odgovora, suprimiranoj lipogenezi i intenzivnoj lipolizi (Drackley, 2000; Vernon, 2005). Danas se smatra da su promene u veličini adipocita odgovorne za navedene promene u metabolizmu lipida i tesno su povezane sa mnogobrojnim poremećajima metabolizma kao što su insulinska rezistencija i masna jetra (Chilliard i sar., 2001; Peng, 2011). Kao što je već navedeno, od velikog broja mogućih faktora čini se da je energetski status krava, koji je najvećim delom uslovljen ishranom krava u periodu zasušenja, jedan od najvažnijih. Mnoge strategije ishrane visokomlečnih krava su upravo osmišljene da regulišu metabolizam masnog tkiva sa ciljem da povećaju produktivnost, a smanje učestalost poremećaja metabolizma (Holcomb i sar., 2001; Agenas i sar., 2003; Holtenius i sar., 2003; Dann i sar., 2006; Janovick i sar., 2011; Schoendberg i sar., 2012). U svetlu dobijenih rezultata u ovom radu jasno se vidi da je kod ugojenih krava uključenih u ovaj ogled u antepartalnom periodu očuvana senzitivnost masnog tkiva na insulin, koja je verovatno odgovorna za razlike u dijametru adipocita između dve grupe krava. Naime kod njih je na deset dana pre teljenja ustanovljen značajno veći nivo ekspresije proteina GLUT 4 molekula u poređenju sa nalazom kod krava optimalne telesne kondicije. U isto vreme između ispitivanih grupa krava nisu ustanovljene značajne razlike u nivou ekspresije proteina receptora za insulin. U tom pogledu, opravdano je spekulirati da je status glukoznog transportera regulisan dodatnim mehanizmom, verovatno dostupnošću supstrata, budući da je značajno veća koncentracija glukoze u krvi ustanovljena kod ovakvih jedinki. Međutim sa početkom laktacije nastaje dijametralno suprotna situacija kod ugojenih krava.

Naime, kod njih je 14. dana posle teljenja ustanovljena značajno manja ekspresija GLUT 4 molekula, pri čemu je receptorski status bio približno isti kao i deset dana pre teljenja. Danas se smatra da je masno tkivo jedno od najvažnijih mesta homeoretske kontrole u peripartalnom periodu, i da se hormonalne promene u periodu oko teljenja u mnogome odražavaju i na metabolizam masnih kiselina, utilizaciju glukoze i osetljivost na homeostatske i homeoretske uticaje (Bell i Bauman, 1997; Ingvarstsen, 2006; Cunningham i Klein, 2007). Stoga, imajući u vidu rezultate dobije za vrednosti NEFA u krvi ispitivanih grupa krava, ovaj nalaz se može objasniti antiinsulinskim efektom hormona rasta na metabolizam lipida i utilizaciju glukoze u ćelijama masnog tkiva, mehanizmima koji su već navedeni u podpoglavlju 6.1. Takođe nije isključeno da su promene u ekspresiji GLUT 4 molekula kod ugojenih krava u najužem periodu oko teljenja posledica endokrine i uloge adipocita u lučenju proinflamatornih citokina, za koje je dokazano da su depo specifične (Chilliard i sar., 2001; Looor i sar., 2006; Peng, 2011). U svakom slučaju, ovim nalazom mogu se tumačiti razlike u intenzitetu lipomobilizacije između ispitivanih grupa krava u postpartalnom periodu. Naime, iako glukoza nije primarni supstrat u procesu lipogeneze kod preživara, ona je neophodna za reesterifikaciju prispelih i/ili masnih kiselina mobilisanih u adipocitima (Rukkwamsuk i sar., 1999; Drackley, 2000).

Iako se može smatrati da se u osnovi rezistencije tkiva na insulin kod ugojenih krava nalazi stanje hiperinsulinemije, izgleda da ovaj fenomen pokazuje tkivno specifičnu i lokalizacijsku distribuciju u antepartalnom i postpartalnom periodu kod ovakvih jedinki. Po svemu sudeći inicijalne promene u senzitivnosti tkiva na insulin nastaju u ćelijama mišićnog tkiva, o čemu svedoči značajno manja zastupljenost proteina insulinskog receptora kod ugojenih krava u antepartalnom periodu. Sa druge strane, ekspresija GLUT 4 molekula može da bude odgovorna za metaboličke događaje u ćelijama masnog tkiva u peripartalnom periodu kod ugojenih krava.

7.0. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobijenih u ovom radu mogu da se izvedu sledeći zaključci:

1. Ugojenost krava u periodu zasušenja i stepen osetljivosti tkiva na insulin pre i posle teljenja, imaju ključni uticaj na sposobnost krava da se prilagode na negativan bilans energije koji nastaje na početku laktacije.
2. Sa približavanjem partusa kod ugojenih krava smanjuje se osetljivost tkiva na insulin. Blagi stepen rezistencije nastaje na sredini perioda zasušenja, a najizraženija odstupanja nastaju u poslednjim danima graviditeta i neposredno posle partusa kada se pojačava stepen insulinske rezistencije. Sve to dovodi do neadekvatne adaptacije životinja na visoku mlečnost.
3. U antepartalnom periodu ne nastaju značajne promene u aktivnosti B-ćelija pankreasa, već promene nastaju u pogledu osetljivosti perifernih tkiva na insulin (mišićno i masno tkivo). Pored promena u korišćenju glukoze, nastaju izrazite promene u metabolizmu masnog tkiva praćene porastom koncentracije masnih kiselina u cirkulaciji što predstavlja neposrednu opasnost za morfološki i funkcionalni integritet jetre.
4. Promene u insulinskoj regulaciji metaboličkih funkcija kod ugojenih krava stvaraju povoljne uslove da se proces lipomobilizacije odvija intenzivnije nego kod krava optimalne telesne kondicije i u skladu sa količinom masti u telesnim depoima, a ne stvarnim energetske potrebama organizma.
5. Kod ugojenih krava zbog prekomernog nakupljanja masti u telesnim depoima istovremeno i proporcionalno se povećava i veličina masnih ćelija. To je razlog što se u kritičnom periodu oko teljenja pojačava lipolitička aktivnost i osetljivost ovih ćelija na delovanje lipolitičkih hormona. Zbog toga izostaje puna kontrola mobilizacije masti iz telesnih depoa i lipogeneze u ćelijama jetre.

6. Zastupljenost proteina receptora za insulin i transportera glukoze (GLUT 4) u ćelijama mišićnog i masnog tkiva pokazuju da razlike u stepenu osetljivosti na insulin između ugojenih i krava optimalne telesne kondicije su pre svega posledica promena na receptorskom nivou.

7. Prekomerno nakupljanje masti u telesnim depoima i nastala rezistencija tkiva na insulin imaju za posledicu intenziviranje procesa lipolize i prilikom priliva slobodnih viših masnih kiselina u ćelijama jetre koji prevazilazi njihov metabolički kapacitet. Kao posledica toga nastaje veći stepen zamašćenja jetre, što se posebno ispoljava u ranom postpartalnom periodu.

8.0. SPISAK REFERENCI

1. Al-Trad B, Reisberg K, Wittek T, Penner BG, Alkaassem A, Gäbel G, Fürll M. 2009. Increasing intravenous of glucose improve body condition but not lactation performance in midlactation dairz cows, *J Dairy Sci* 92, 11, 5645–5658.
2. Agenas S, Burstedt E, Holtenius K. 2003. Effects of feeding intensity during the dry period. Feed intake, body weight, and milk production. *J Dairy Sci* 86:870–882.
3. Allen MS, Bradford BJ, Harvatine KJ. 2005. The cow as a model to study food intake regulation. *Annu Rev Nutr* 25:523–547.
4. Allen MS, Bradford BJ, Oba M. 2009. The hepatic oxidation theory of the control of feed intake and its application to ruminants. *J Anim Sci* 87:3317–3334.
5. Ametaj BN, Bradford BJ, Bobe G, Nafikov RA, Lu Y, Young JW, Beitz DC. 2005. Strong relationships between mediators of the acute phase response and fatty liver in dairy cows. *Can J Anim Sci* 85(2):165–175.
6. Avruch J. 1998. Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Mol Cell Biochem* 182:31–48.
7. Awadeh FT, Kincaid RL, Johnson KA. 1998. Effect of level and source of dietary selenium on concentrations of thyroid hormones and immunoglobulins in beef cows nd calves. *J Anim Sci* 76:1204–1215.
8. Baird GD. 1982. Primary ketosis in the high-prodcing dairy cows: clinical and subclinical disorders, treatment prevention and outlook. *J Dairy Sci* 65(1):1–10.
9. Baldwin RL, Knapp JR. 1993. Recombinant bovine somatotropin's effects on patterns of nutrient utilization in lactating dairy cows. *Am J Clin Nutr* 58:282–286.
10. Barthel A, Schmoll D. 2003. Novel concepts in insulin regulation of gluconeogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285(4):E685–92.
11. Bauchart D, Durand D, Laplaud PM, Forgez P, Goulinet S, Chapman MJ. 1989. Plasma lipoproteins and apolipoproteins in the preruminant calf, *Bos spp*: density distribution, physicochemical properties, and the in vivo evaluation of the contribution of the liver to lipoprotein homeostasis. *J Lipid Res* 30:1499–1514.

12. Bauman DE, Currie WB. 1980. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *J Dairy Sci* 63(9):1514–1529.
13. Bauman DE, Elliot JM. 1983. Control of nutrient partitioning in lactating ruminants. In *Biochemistry of Lactation*. T. B. Mepham (ed.). Elsevier Science Publishers, Amsterdam, NL, pp. 437–468.
14. Bauman DE, Peel CJ, Steinhour WD, Reynolds PJ, Tyrrell HF, Brown ACG, Haaland GL. 1988. Effect of bovine somatotropin on metabolism of lactating dairy cows: Influence on rates of irreversible loss and oxidation of glucose and nonesterified fatty acids. *J Nutr* 118:1031–1040.
15. Bauman DE, Vernon RG. 1993. Effects of exogenous bovine somatotropin on lactation. *Ann Rev Nutr* 13:437–461.
16. Bauman DE. 1999. Bovine somatotropin and lactation: from basic science to commercial application. *Domes Anim Endocrinol* 17:101–116.
17. Baumgard LH, Weber WJ, Kazmer GW, Zinn SA, Hansen LB, Chester-Jones H, Crooker BA. 2002. Effects of selection for milk yield on growth hormone response to growth hormone releasing factor in growing Holstein calves. *J Dairy Sci* 85:2529–2540.
18. Beam SW, Butler WR. 1997. Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. *Biol Reprod* 56:133–142.
19. Bell AW, Bauman DE. 1997. Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2:265–278.
20. Bell AW. 1995. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J AnimSci* 73:2804–2819.
21. Bernabucci U, Ronchi B, Lacetera N, Nardone A. 2005. Influence of body condition score on relationship between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. *J Dairy Sci* 88:2017–2026.
22. Bernal J, De Groot LJ. 1980. Mode of action of thyroid hormones. In: "The thyroid gland" (DeVisscher M. Ed.), Raven Press, New York, pp. 123–143.

23. Berne RM, Levy MN. 1993. Hormones of the pancreatic islets. *Physiology*, 3rd edn, (Mosby Year Book, St Louis, MO), 851–875.
24. Berson SA, Yalow RS. 1970. Insulin antagonist and insulin resistance. In: Ellenberg M, Rifkin H, (eds) *Diabetes mellitus: Theory and practice*, (McGraw-Hill, NY), pp. 388–412.
25. Bertics SJ, Grummer RR, Cadorniga-Valino C, Stoddard EE. 1992. Effect of prepartum dry matter intake on liver triglyceride concentration and early lactation. *J Dairy Sci* 75:1914–1922.
26. Bertoni G, Trevisi E, Han X, Bionaz M. 2008. Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows. *J Dairy Sci* 91:3300-3310.
27. Besong SA. 1996. Influence of supplemental chromium picolinate on the concentrations of hepatic triglyceride and blood metabolites in dairy cattle. PhD. Dissertation, Univ. Kentucky, Lexington, KY.
28. Bewley JM, Schutz MM. 2008. An interdisciplinary review of body condition scoring for dairy cattle. *Prof Anim Scient* 24: 507–529.
29. Bigner DR, Goff JP, Faust MA, Burton JL, Tyler HD, Horst RL. 1996. Acidosis effects on insulin response during glucose tolerance tests in Jersey cows. *J Dairy Sci* 79:2182-2188.
30. Bines JA, Hart IC. 1982. Metabolic limites to higher milk production with special reference to the roles of growth hormone and insulin. *J Dairy Sci.* 65:1375.
31. Bionaz M, Trevisi E, Calamari L, Librandi F, Ferrari A, Bertoni G. 2007. Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows. *J Dairy Sci* 90:1740–1750.
32. Bitman J, Kahl S, Wood DL, Lefcourt AM. 1994. Circadian and ultradian rhythms of plasma thyroid hormone concentrations in lactating dairy cows. *Am J Physiol* 266:1797–1803.
33. Blaak EE. 2003. Fatty acid metabolism in obesity and type 2 diabetes mellitus. *Proc Nutr Soc* 62:753–760.
34. Block SS, Rhoads RP, Bauman DE, Ehrhardt RA, McGuire MA, Crooker BA, Griinari JM, Mackle TR, Weber WJ, Van Amburgh ME, Boisclair YR. 2003. Demonstration of a role for insulin in the regulation of leptin in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 86:3508-3515.

35. Blum JW, Bruckmaier RM, Vacher PY, Münger A, Jans F. 2000. Twenty-four-hour patterns of hormones and metabolites in week 9 and 19 of lactation in high-yielding dairy cows fed triglycerides and free fatty acids. *J Vet Med A* 47:43–60.
36. Blum JW, Wilson R B, Kronfeld DS. 1973. Plasma insulin concentrations in parturient cows. *J Dairy Sci* 56:459–464.
37. Bobe G, Young JW, Beitz DC. 2004. Invited Review: Pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. *J Dairy Sci* 87:3105–3124.
38. Bonczek RR, Young CW, Wheaton JE, Miller KP. 1988. Responses of somatotropin, insulin, prolactin and thyroxine to election for milk yield in Holsteins. *J Dairy Sci* 71:2470–2479.
39. Bossaert P, Leroy JLMR, De Vliegher S, Opsomer G. 2008. Interrelations between glucose-induced insulin response, metabolic indicators, and time of first ovulation in high-yielding dairy cows. *J Dairy Sci* 91:3363–3371.
40. Bradford BJ, Allen MS. 2007. Depression in feed intake by a highly fermentable diet is related to plasma insulin concentration and insulin response to glucose infusion. *J Dairy Sci* 90:3838–3845.
41. Bradford BJ, Oba M, Ehrhardt RA, Boisclair YR, Allen MS. 2006. Propionate is not an important regulator of plasma leptin concentration in dairy cattle. *Domest Anim Endocrinol* 30:65–75.
42. Bremmer DR, Christensen JO, Grummer RR, Rasmussen FE, Wiltbank MC. 1999. Effects of induced parturition and estradiol on feed intake, liver triglyceride concentration, and plasma metabolites of transition dairy cows. *J Dairy Sci* 82:1440–1448.
43. Brennan CL, Hoenig M, Ferguson DC. 2004. GLUT4 but not GLUT1 expression decreases early in the development of feline obesity. *Domest Anim Endocrinol* 26:291-301.
44. Brockman RP, Laarveld B. 1986. Hormonal regulation of metabolism in ruminants. *Live Prod Sci*, 14, 313–334.
45. Brockman RP. 1975. Studies on glucagon and insulin and their roles in the regulation of gluconeogenesis in sheep. PhD thesis. Cornell University, Ithaca, New York.
46. Brockman RP. 1978. Roles of Glucagon and Insulin in the Regulation of Metabolism in Ruminants. *Can Vet J* 19 (3):55–62.

47. Brockman RP. 1979. Roles for insulin and glucagon in the development of ruminant ketosis. *Can Vet J* 20:121–126.
48. Brockman RP. 1984. Pancreatic and adrenal hormonal regulation of metabolism. In: *Control of Digestion and Metabolism in Ruminants, Proc 6th Int Symp on Ruminant Physiology, Banff, Canada, (Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ), pp. 405–419.*
49. Browning R, Gissendanner SJ, Wakefield T. 2000. Ergotamine alters plasma concentration of glucagon, insulin, cortisol, and triiodothyronine in cows. *J Anim Sci* 78:690–698.
50. Browning R, Leite-Browning ML, Smith HM, Wakefield T. 1998. Effect of ergotamine and ergonovine on plasma concentration of thyroid hormones and cortisol in cattle. *J Anim Sci* 76:1644–1650.
51. Bruss M L. 2008. Lipids and Ketones. In: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals. Sixth Edition, Elsevier, London, UK, pp. 81–115.*
52. Butler ST, Marr AL, Pelton SH, Radcliff RP, Lucy MC, Butler WR. 2003. Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A. *J Endocrinol* 176:205–217.
53. Butler ST, Pelton SH, Butler WR. 2004. Insulin increases 17 beta estradiol production by the dominant follicle of the first postpartum follicle wave in dairy cows. *Reprod* 127(5): 537–545.
54. Butler WR. 2000. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim Reprod Sci* 60-61:449–457.
55. Butler WR. 2010. Metabolismo energetico ed insulinoresistenza nella bovina da latte. *Large Anim Rev* 16:301–304.
56. Capuco AV, Kahl S, Jack LJW, Bishop JO, Wallace H. 1999. Prolactin and growth hormone stimulation of lactation in mice requires thyroid hormones. *Proc Soc Exp Biol Med* 221:345–351.
57. Capuco AV, Keys JE, Smith JJ. 1989. Somatotrophin increases thyroxine-5 monodeiodinase activity in lactating mammary tissue of the cow. *J Endocrinol* 121:205–11.
58. Carpentier JL. 1994. Insulin receptor internalization: molecular mechanisms and physiopathological implications. *Diabetologia* 37:(Suppl. 2):S117–124.

59. Chagas LM, Lucy MC, Back PJ, Blache D, Lee JM, Gore PJS, Sheahan AJ, Roche JR. 2009. Insulin resistance in divergent strains of Holstein-Friesian dairy cows offered fresh pasture and increasing amounts of concentrate in early lactation. *J Dairy Sci* 92:216–222.
60. Chilliard Y, Bonnet M, Delavaud C, Faulconnier Y, Leroux C, Djiane J, Bocquier F. 2001. Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. *Domest Anim Endocrinol* 21:271–295.
61. Cunningham JC, Klein BG. 2007. Fetal and Neonatal Oxygen Transport. In: *Textbook of Veterinary Physiology*, Fourth Ed. Saunders Elsevier, St. Louis, MO, USA, pp. 620–626.
62. Daniels JA, TH Elsasser, CD Morrison, DH Keisler, BK Whitlock, B Steele, D Pugh, JL Sartin. 2003. Leptin, tumour necrosis factor- α (TNF), and CD14 in ovine adipose tissue and changes in circulating TNF in lean and fat sheep. *J Anim Sci* 81:2590–2599.
63. Dann HM, Drackley JK. 2005. Carnitine palmitoyltransferase I in liver of periparturient dairy cows: effects of prepartum intake, postpartum induction of ketosis, and periparturient disorders. *J Dairy Sci* 88(11):3851–3859.
64. Dann HM, Litherland NB, Underwood JP, Bionaz M, D'Angelo A, McFadden JW, Drackley JK. 2006. Diets during far-off and close-up dry periods affect periparturient metabolism and lactation in multiparous cows. *J Dairy Sci* 89:3563–3577.
65. Davis SR, Collier RJ, McNamara JP, Head HH, Sussman W. 1988. Effects of thyroxine and Growth Hormone treatment of dairy cows on milk yield, cardiac output and mammary blood flow. *J Anim Sci* 66:70–79.
66. De Meyts P. 2008. The insulin receptor: a prototype for dimeric, allosteric membrane receptors? *Trends Biochem Sci* 33(8):376–384.
67. DeBoer G, Trenkle A, Young JW. 1985. Glucagon, insulin, growth hormone and some blood metabolites during energy restriction ketonemia of lactating cows. *J Dairy Sci* 68:326–337.
68. Debras E, Grizard J, Aina E, Tesseraud S, Champredon C, Arnal M. 1989. Insulin sensitivity and responsiveness during lactation and dry period in goats. *Amer J Physiol* 256:295–302.
69. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. 1979. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 237(3):E214–223.

70. Doepel L, Lapierre H, Kennelly JJ. 2002. Peripartum performance and metabolism of dairy cows in response to prepartum energy and protein intake. *J Dairy Sci* 85:2315–2334.
71. Dominici FP, Argentino DP, Muñoz MC, Miquet JG, Sotelo AI, Turyn D. 2005. Influence of the crosstalk between growth hormone and insulin signalling on the modulation of insulin sensitivity. *Growth Horm IGF Res* 15(5):324–336.
72. Donkin SS. 2012. The role of liver metabolism during transition on postpartum health and performance. *Florida Ruminant Nutrition Conference Proceedings*. pp. 97–107.
73. Douglas GN, Overton TR, Bateman HG, Dann HM, Drackley JK. 2006. Prepartal plane of nutrition, regardless of dietary energy source, affects periparturient metabolism and dry matter intake in Holstein cows. *J. Dairy Sci* 89:2141–2157.
74. Drackley J K. 2000. Lipid metabolism. In: D'Mello JPF (Ed) *Farm animal metabolism and nutrition*. CAB International, New York, pp. 97–119.
75. Drackley JK, Beitz DC, Young JW. 1991. Regulation of in vitro metabolism of palmitate by carnitine and propionate in liver from dairy cows. *J Dairy Sci* 74:3014–3024.
76. Drackley JK, Dann HM, Douglas GN, Janovick Guretzky NA, Litherland NB, Underwood JP, Loor JJ. 2005. Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders (invited review). *Ital J Anim Sci* 4:323–344.
77. Drackley JK, Dann HM. 2005. New concepts in nutritional management of dry cows. *Advances in dairy Technology* 17:11–23.
78. Drackley JK, Overton TR, Douglas GN. 2001. Adaptations of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. *J Dairy Sci* 84:100–112.
79. Drackley JK. 1999. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? *J Dairy Sci* 82:2259–2273.
80. Duehlmeier R, Sammet K, Widdel A, von Engelhardt W, Wernery U, Kinne J, Sallmann HP. 2007. Distribution patterns of the glucose transporters GLUT4 and GLUT1 in skeletal muscles of rats (*Rattus norvegicus*), pigs (*Sus scrofa*), cows (*Bos taurus*), adult goats, goat kids (*Capra hircus*), and camels (*Camelus dromedarius*). *Comp Biochem Physiol* 146:274–282.

81. Duffield TF, Lissemore KD, McBride B, Leslie KE. 2009. Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *J Dairy Sci* 92:571–580.
82. Dunshea FR, Bauman DE, Boyd RD, Bell AW. 1992. Temporal response of circulating metabolites and hormones during somatotropin treatment of growing pigs. *J Anim Sci* 70:123–131.
83. Edgerton LA, Hafs HD. 1973. Serum luteinizing hormone, prolactin, glucocorticoid and progesterin in dairy cows from calving to gestation. *J Dairy Sci* 56:451–458.
84. Edmondson AJ, Lean D, Weaver ID, Farver T, Webster G. 1989. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J Dairy Sci* 72:68–78.
85. Ehrhardt RA, Bell AW. 1997. Developmental increases in glucose transporter concentration in the sheep placenta. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 273:1132–41.
86. Ehrhardt RA, Slepatis RM, Siegal-Willott J, Van Amburgh ME, Bell AW, Boisclair YR. 2000. Development of a specific radioimmunoassay to measure physiological changes of circulating leptin in cattle and sheep. *J Endocrinol* 166:519–528.
87. Etherton TD, Bauman DE. 1998. Biology of Somatotropin in Growth and Lactation of Domestic Animals *Physiol Rev* 78:745–761.
88. Faulkner A, Pollock HT. 1990. Metabolic responses to euglycaemic hyperinsulinaemia in lactating and non-lactating sheep in vivo. *J Endocrinol* 124:59–66.
89. Fenwick MA, Fitzpatrick R, Kenny DA, Diskin MG, Patton J, Murphy JJ, Wathes DC. 2008. Interrelationships between negative energy balance (NEB) and IGF regulation in liver of lactating dairy cows. *Domest Anim Endocrinol* 34:31–44.
90. Fleig WE, Noether-Fleig G, Roeben H, and Ditschuneit H. 1984. Hormonal regulation of key gluconeogenic enzymes and glucose release in cultured hepatocytes: effects of dexamethasone and gastrointestinal hormones on glucagon action. *Arch Biochem Biophys* 229:368–378.
91. Flores-Riveros JR, McLenithan JC, Ezaki O, Lane MD. 1993. Insulin down-regulates expression of the insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) gene: effects on transcription and mRNA turnover. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 90:512–516.

92. Friggens NC, Berg P, Theilgaard P, Korsgaard IR, Ingvarsen KL, Løvendahl PL, Jensen J. 2007. Breed and parity effects on energy balance profiles through lactation: Evidence for genetically driven body reserve change. *J Dairy Sci* 90:5291–5305.
93. Furll M, Schafer M. 1993. Niacinwirkung bei milchkuhenwahrend futterrntzug. *Mh Vet Med* 48:13–15.
94. Gaal T, Reid IM, Collins RA, Roberts CJ, Pike BV. 1983. Comparison of biochemical and histological methods of estimating fat content of liver of dairy cows. *Res Vet Sci* 34:245–8.
95. García-Ruiz I, Rodríguez-Juan C, Díaz-Sanjuan T, del Hoyo P, Colina F, Muñoz-Yagüe T, Solís-Herruzo JA. 2006. Uric acid and anti-TNF antibody improve mitochondrial dysfunction in ob/ob mice. *Hepatology* 44(3):581–591.
96. Garnsworthy PC, Topps JH. 1982. The effect of body condition of dairy cows at calving on their food intake and performance when given complete diets. *Anim Prod* 35:113–119.
97. Gastaldelli A, Cusi K, Pettiti M, Hardies J, Miyazaki Y, Berria R, Buzzigoli E, Sironi AM, Cersosimo E, Ferrannini E, Defronzo RA. 2007. Relationship between hepatic/visceral fat and hepatic insulin resistance in nondiabetic and type 2 diabetic subjects. *Gastroenterology* 133:496–506.
98. Gearhart MA, Curtis CR, Erb HN, Smith RD, Sniffen CJ, Chase LE, Cooper MD. 1990. Relationship of changes in condition score to cow health in Holsteins. *J Dairy Sci* 73:3132–3140.
99. Goff JP, Horst RL. 1997. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J Dairy Sci* 80: 1260–1268.
100. Goff JP. 2006. Major advances in our understanding of nutritional influences on bovine health. *J Dairy Sci* 89:1292–1301.
101. Gravena C, Mathias PC, Ashcroft SJ. 2002. Acute effects of fatty acids on insulin secretion from rat and human islets of Langerhans. *J Endocrinol* 173:73–80.
102. Greenfield RB, Cecava MJ, Donkin SS. 2000. Changes in mRNA expression for gluconeogenic enzymes in liver of dairy cattle during the transition to lactation. *J Dairy Sci* 83:1228–1236.

103. Grill V, Qvigstad E. 2000. Fatty acids and insulin secretion. *Brit J Nutr* 83:79–84.
104. Gross J, van Dorland HA, Bruckmaier RM, Schwarz FJ. 2011. Milk fatty acid profile related to energy balance in dairy cows. *J Dairy Res* 78:479–488.
105. Gruffat D, Durand D, Chilliard Y, Williams P, Bauchart D. 1997. Hepatic gene expression of apolipoprotein B100 during early lactation in underfed, high producing dairy cows. *J Dairy Sci* 80:657–666.
106. Grum DE, Drackley JK, Hansen LR, Cremin JD. 1996. Production, digestion and hepatic lipid metabolism of dairy cows fed increased energy from fat or concentrate. *J Dairy Sci* 79:1836–1849.
107. Grummer RR, Mashek DG, Hayirli A. 2004. Dry matter intake and energy balance in the transition period. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 20:447–470.
108. Grummer RR, Wiltbank MC, Fricke PM, Watters RD, Silva-Del-Rio N. 2010. Management of dry and transition cows to improve energy balance and reproduction. *J Reprod Dev* 56 Suppl: S22–28.
109. Grummer RR. 1993. Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. *J Dairy Sci* 76:3882–3896.
110. Grummer RR. 2008. Nutritional and management strategies for the prevention of fatty liver in dairy cattle. *Vet J* 176:10–20.
111. Grünberg W, Donkin SS, Constable PD. 2011. Periparturient effects of feeding a low dietary cation-anion difference diet on acid-base, calcium, and phosphorus homeostasis and intravenous glucose tolerance test in highproducing dairy cows. *J Dairy Sci* 94:727–745.
112. Gruys E, Toussaint MJM, Niewold TA, Koopmans SJ. 2005. Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci* 6:1045–1056.
113. Guesnet PM, Massoud MJ, Demarne Y. 1991. Regulation of adipose tissue metabolism during pregnancy and lactation in the ewe: the role of insulin. *J Anim Sci* 69:2057–2065.
114. Gutierrez CG, Gong JG, Bramley TA, Webb R. 2006. Selection on predicted breedingvalue for milk production delays ovulation independently of changes in follicular development, milk production and body weight. *Anim Reprod Sci* 95:193–205.

115. Hammon HM, Bellmann O, Voigt J, Schneider F, Kühn C. 2007. Glucose-dependent insulin response and milk production in heifers within a segregating resource family population. *J Dairy Sci* 90:3247–3254.
116. Hammon HM, Stürmer G, Schneider F, Tuchscherer A, Blum H, Engelhard T, Genzel A, Staufenbiel R, Kanitz W. 2009. Performance and metabolic and endocrine changes with emphasis on glucose metabolism in high-yielding dairy cows with high and low fat content in liver after calving. *J Dairy Sci* 92(4):1554–1566.
117. Hausman GJ, Dodson MV, Ajuwon K, Azain M, Barnes KM, Guan LL, Jiang Z, Poulos SP, Sainz RD, Smith S, Spurlock M, Novakofski J, Fernyhough ME, Bergen WG. 2009. Board-invited review: the biology and regulation of preadipocytes and adipocytes in meat animals. *J Anim Sci* 87:1218–1246.
118. Hayirli A, Bremmer DR, Bertics SJ, Socha MT, Grummer RR. 2011. Effect of chromium supplementation on production and metabolic parameters in periparturient dairy cows. *J Dairy Sci* 84:1218–1230.
119. Hayirli A, Grummer RR, Nordheim EV, Crump PM. 2002. Animal and dietary factors affecting feed intake during the prefresh transition period in Holsteins. *J Dairy Sci* 85:3430–3443.
120. Hayirli A. 2006. The role of exogenous insulin in the complex of hepatic lipodosis and ketosis associated with insulin resistance phenomenon in postpartum dairy cattle. *Vet Res Commun* 30:749–774.
121. Herdt TH. 2000. Ruminant adaptation to negative energy balance. Influences on the etiology of ketosis and fatty liver. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 16:215–230.
122. Herzog K. 2001. Versuche zur pankreatischen Insulin-Response von trockenstehenden und laktierenden Kühen sowie Kühen mit Leberverfettung mittels intravenösem Glucosetoleranztest und hyperglykämischer Clamp-Technik. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Veterinärmedizin (Dr. Med. Vet.) durch die Tierärztliche Hochschule Hannover.
123. Holcomb CS, Van Horn HH, Head HH, Hall MB, Wilcox CJ. 2001. Effects of prepartum dry matter intake and forage percentage on postpartum performance of lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 84:2051–2058.

124. Holtenius K, Agenäs S, Delavaud C, Chilliard Y. 2003. Effects of feeding intensity during the dry period. 2. Metabolic and hormonal responses. *J Dairy Sci* 86:883–891.
125. Holtenius P, Holtenius K. 2007. A model to estimate insulin sensitivity in dairy cows. *Acta Vet Scand* 49:29–31.
126. Holtenius P, Traven M. 1990. Impaired glucose tolerance and heterogeneity of insulin responses in cows with abomasal displacement. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A* 37:445–451.
127. Horst RL, Goff JP, Reinhardt TA, Buxton DR. 2002. Strategies for preventing milk fever in dairy cattle. *J Dairy Sci* 80:1269–1280.
128. Houseknecht KL, Bauman DE. 1997. Regulation of lipolysis by somatotropin: functional alteration of adrenergic and adenosine signaling in bovine adipose tissue. *J Endocrinol* 152:465–475.
129. Hove K. 1978. Insulin-secretion in lactating cows: Responses to glucose infused intravenously in normal, ketonemic, and starved animals. *J Dairy Sci* 61:1407–1413.
130. Huang B, Wu P, Bowker-Kinley MM, Harris RA. 2002. Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase expression by peroxisome proliferator-activated receptor-alpha ligands, glucocorticoids and insulin. *Diabetes* 51:276–283.
131. Huszenica G, Kulcsar M, Rudas P. 2002. Clinical endocrinology of thyroid gland function in ruminants. *Vet Med Czech* 47(7):199–210.
132. Idris I, Gray S, Donnelly R. 2001. Protein kinase C activation; isozyme specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. *Diabetol* 44:659-673.
133. Ingvarsten KL, Aaes O, Andersen JB. 2001. Effects of pattern of concentrate allocation in the dry period and early lactation on feed intake and lactational performance in dairy cows. *Livestock Prod Sci* 71(2-3):207–221.
134. Ingvarsten KL, Andersen JB. 2000. Integration of metabolism and intake regulation: a review focusing on periparturient animals. *J Dairy Sci* 83:1573–1597.
135. Ingvarsten KL, Danfær A, Andersen PH, J Foldager. 1995. Prepartum feeding of dairy cattle: a review of the effect on parturition metabolism, feed intake, production and health. Pages 83 in Book of Abstracts of the 46th Annual Meeting of the EAAP, Prague. J.A.M.

136. Ingvarstsen KL, Dewhurst RJ, Friggens NC. 2003. On the relationship between lactational performance and health: Is it yield or metabolic imbalance that causes production diseases in dairy cattle? A position paper. *Livestock Prod Sci* 83:277–308.
137. Ingvarstsen KL. 2006. Feeding- and management-related diseases in the transition cow: Physiological adaptations around calving and strategies to reduce feeding-related diseases. *Anim Feed Sci Technol* 126(3-4):175–213.
138. Jaakson H, Ling K, Kaldmäe H, Samarütel J, Kaart T, Kärt O. 2007. Influence of prepartum feeding on periparturient metabolic status in Estonian Holstein cows. *Veterinarija ir Zootehnika* 40:14–21.
139. Jaakson H, Ling K, Samarütel J, Ilves A, Kaart T, Kärt O, Ots M. 2013. Blood glucose and insulin response during the glucose tolerance test in relation to dairy cow body condition and milk yield. *Vet Med Zoot* 62(84):28–35.
140. Jaakson H, Ling K, Samarütel J, Ilves A, Kaart T, Kärt O. 2010. Field trial on glucose-induced insulin and metabolite responses in Estonian Holstein and Estonian Red dairy cows in two herds. *Acta Vet Scand* 52:4.
141. Janovick NA, Boisclair YR, Drackley JK. 2011. Prepartum dietary energy intake affects metabolism and health during the periparturient period in primiparous and multiparous Holstein cows. *J Dairy Sci* 94:1385–1400.
142. Janovick NA, Drackley JK. 2010. Prepartum dietary management of energy intake affects postpartum intake and lactation performance by primiparous and multiparous Holstein cows. *J Dairy Sci* 93:3086–3102.
143. Jarrett IG, Filsell OH, and Ballard FJ. 1974. Metabolic and endocrine interrelationships in normal and diabetic sheep. In: *Lipid Metabolism, Obesity and Diabetes Mellitus: Impact on Atherosclerosis*, Horm Metab Res Suppl, Series 4:111–116.
144. Jesse BW, Emery RS, Thomas JW. 1986. Control of bovine hepatic fatty acid oxidation. *J Dairy Sci* 69:2290–2297.

145. Jiang L, Sorensen P, Rontved C, Vels L, Ingvarsten KL. 2008. Gene expression profiling of liver from dairy cows treated intramammary with lipopolysaccharide. *BMC Genomics* 9:443.
146. Jin HB, Gu ZY, Yu CH, Li YM. 2005. Association of nonalcoholic fatty liver disease with type-II diabetes: clinical features and independent risk factors in diabetic fatty liver patients. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 4:389–392.
147. Johnson CA. 2008. Glucose homeostasis during canine pregnancy: Insulin resistance, ketosis, and hypoglycemia. *Theriogenology* 70:1418–1423.
148. Johnson RW, Finck BN. 2001. Tumor necrosis factor- α and leptin: Two players in an animal's metabolic and immunologic responses to infection. *J Anim Sci* 79:118–127.
149. Jorritsma R, Jorritsma H, Schukken YH, Bartlett PC, Wensing T, Wentink GH. 2001. Prevalence and indicators of post partum fatty infiltration of the liver in nine commercial dairy herds in the Netherlands. *Livestock Prod Sci* 68:53–60.
150. Jorritsma R, Wensing T, Kruijff TAM, Vos PLAM, Noordhuizen JPTM. 2003. Metabolic changes in early lactation and impaired reproductive performance in dairy cows. *Vet Res* 34:11–26.
151. Jovanović M, Stojić V, Đurđević Đ, Sinadinović J. 1988. Puerperal changes of thyroxine and triiodothyronine serum levels in dairy cows. XIX Annual meeting of ESNA, 29. Aug.-2. Sept., Book of abstracts, pp. 111.
152. Kahl S, Jack LJW, Capuco AV. 1993. Characterization of thyroxine-5'-deiodinase in mammary tissue of the cow, sow and rat. *Livest Prod Sci* 35:177–178.
153. Kahn CR. 1978. Insulin resistance, insulin sensitivity, and insulin unresponsiveness: a necessary distinction, *Metabolism* 27:1893–1902.
154. Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. 1997. *Clinical biochemistry of domestic animals*, 5th Edition. Academic Press, San Diego, California, pp. 932.
155. Kaneko JJ. 2008. *Carbohydrate Metabolism and its Diseases*. In: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Sixth Edition, Elsevier, London, UK, pp. 45–80.
156. Kapp P, Pethes Gy, Zsiros M, Chuster Z. 1979. Data on the pathogenesis of fatty liver disease in high-producing dairy cows. *Magy Allatorvosok* 34(7):458–461.

157. Katoh N. 2002. Relevance of apolipoproteins in the development of fatty liver and fatty liver-related peripartum diseases in dairy cows. *J Vet Med Sci* 64:293–307.
158. Katzung BG. 1995. Pancreatic hormones and antidiabetic drugs, *Basic and Clinical Pharmacology*, 6th edn. (Appleton and Lange, Norwalk, CT), pp. 637–654.
159. Kay JK, Phyn CVC, Roche JR, Kolver ES. 2009. Extending lactation in pasture-based dairy cows. II: Effect of genetic strain and diet on plasma hormone and metabolite concentrations. *J Dairy Sci* 92:3704–3713.
160. Kessel S, Stroehl M, Meyer HHD, Hiss S, Sauerwein H, Schwarz FJ, Bruckmaier RM. 2008. Individual variability in physiological adaptation to metabolic stress during early lactation in dairy cows kept under equal conditions. *J Anim Sci* 86:2903–2912.
161. Kettelhut IC, Fiers W, Goldberg AL. 1987. The toxic effects of tumor necrosis factor in vivo and their prevention by cyclooxygenase inhibitors. *PNAS* 84(12):4273–4277.
162. Knapp JR, Freetly HC, Reis BL, Calvert CC, Baldwin RL. 1992. Effects of somatotropin and substrates on patterns of liver metabolism in lactating dairy cattle. *J Dairy Sci* 75:1025–1035.
163. Knight CH, Fowler PA, Wilde CJ. 1990. Galactopoietic and mammogenic effects of long-term treatment with bovine growth hormone and thrice daily milking in goats. *J Endocrinol* 127:129–138.
164. Knight CH, Fowler PA, Wilde CJ. 1990. Galactopoietic and mammogenic effects of long-term treatment with bovine growth hormone and thrice daily milking in goats. *J Endocrinol* 127:129–138.
165. Knight CH, France J, Beever DE. 1994. Nutrient metabolism and utilization in the mammary gland. *Livestock Prod Sci* 39:129–137.
166. Kokkonen T, Salin S, Taponen J, Vanhatalo A, Elo K. 2009. Effects of abomasal infusion of tallow and camelina oil on responses to glucose and insulin in dairy cows during late pregnancy. In: Chilliard Y et al. (Eds.). *Proceedings of the XIth International Symposium on Ruminant Physiology. Ruminant physiology: digestion, metabolism, and effects of nutrition on reproduction and welfare: 6–9 September 2009. Clermont-Ferrand. Wageningen Academic Publishers. 2009. P. 440–441.*

167. Komatsu T, Itoh F, Kushibiki S, Hodate K. 2005. Changes in gene expression of glucose transporters in lactating and nonlactating cows. *J Anim Sci* 83:557–64.
168. Kovačević M, Šamanc H, Nikolić JA, Bugarski D, Jovičin M, Košarčić S. 2005. Hormonalni status i uhranjenost melčnih krava u peripartalnom periodu. Zbornik radova 4. Simpozijuma - Ishrana, reprodukcija i zaštita zdravlja goveda – Etiopatogeneza i dijagnostika poremećaja metabolizma reprodukcije goveda, Subotica, str. 139–146.
169. Kräft S. 2004. Charakterisierung der peripheren Insulin-Response und Insulin-Sensitivität bei trockenstehenden, laktierenden und leberverfetteten Milchkühen ohne und mit Ketose mittels hyperinsulinämischer, euglycämischer Clamps. Academic Dissertation Tierärztliche Hochschule, Hannover.
170. Kreipe L, Vernay MCMB, Oppliger A, Wellnitz O, Bruckmaier RM, van Dorland HA. 2011. Induced hypoglycemia for 48 hours indicates differential glucose and insulin effects on liver metabolism in dairy cows. *J Dairy Sci* 94:5435–5448.
171. Kuhla B, Nurnberg G, Albrecht D, Gors S, Hammon HM, Metge CC. 2011. Involvement of skeletal muscle protein, glycogen, and fat metabolism in the adaptation on early lactation of dairy cows. *J Proteome Res* 10:4252–4262.
172. Kumashiro N, Eriona DM, Zhang D, Kahn M, Beddow SA, Chu X, Still CD, Gerhardt GS, Han X, Dziura J, Petersen KF, Samuel VT, Shulman G. 2011. Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *PNAS* 108:16381–385.
173. Kunz P, Blum JW. 1981. Effect of pre and post-parturient energy intake on blood plasma levels of hormones and metabolites. In: *Metabolic Disorders on production disease in farm animals*, Fakultät der Universität, Munhen.
174. Kunz PL, Blum JW, Hart IC, Bickel H, Landis J. 1985. Effects of different energy intakes before and after calving on food intake, performance and blood hormones and metabolites in dairy cows. *Anim Prod* 40:219–31.
175. Kushibiki S, Hodate K, Shingu H, Obara Y, Touno E, Shinoda M, Yokomizo Y. 2003. Metabolic and lactational responses during recombinant bovine tumor necrosis factor-alpha treatment in lactating cows. *J Dairy Sci* 86:819–827.

176. Kushibiki S, Hodate K, Shingu H, Ueda Y, Mori Y, Itoh T, Yokomizo Y. 2001. 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(5):794–798.
177. Lacetera N, Scalia D, Bernabucci U, Ronchi B, Pirazzi D, Nardone A. 2005. Lymphocyte functions in overconditioned cows around parturition. *J Dairy Sci* 88:2010–16.
178. Lay DC Jr, Friend TH, Randel RD, Bowers CL, Grissom KK, Jenkins OC. 1992. Behavioral and physiological effects of freeze or hot-iron branding on crossbred cattle. *J Anim Sci* 70:330–336.
179. LeBlanc S. 2010. Challenges and opportunities for technology to improve dairy health management. *J Reprod Dev* 56 (Suppl.):S29–35.
180. Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A. 2002. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev* 23:201–229.
181. Locher LF, Meyer N, Weber EM, Rehage J, Meyer U, Dänicke S, Huber K. 2011. Hormone-sensitive lipase protein expression and extent of phosphorylation in subcutaneous and retroperitoneal adipose tissues in the periparturient dairy cow. *J Dairy Sci* 94:4514–4523.
182. Lomax MA, Baird GD, Mallinson CB, Symonds HW. 1979. Differences between lactating and non-lactating dairy cows in concentration and secretion rate of insulin. *Biochem J* 180:281–289.
183. Lonardo A, Lombardini S, Ricchi M, Scaglioni F, Loria P. 2005. Hepatic steatosis and insulin resistance. *Aliment Pharmacol Ther* 22(Suppl.2):64–70.
184. Loor JJ, Dann HM, Janovick Guretzky NA, Everts RE, Oliveira R, Green CA, Litherland NB, Rodriguez-Zas SL, Lewin HA, Drackley JK. 2006. Plane of nutrition prepartum alters hepatic gene expression and function in dairy cows as assessed by longitudinal transcript and metabolic profiling. *Physiol Genomics* 27:29–41.
185. Lucy MC, Verkerk GA, Whyte BE, Macdonald KA, Burton L, Cursons RT, Roche JR, Holmes CW. 2009. Somatotropic axis components and nutrient partitioning in genetically diverse dairy cows managed under different feed allowances in a pasture system. *J Dairy Sci* 92:526–539.

186. Lucy MC. 2008. Functional differences in the growth hormone and insulin-like growth factor axis in cattle and pigs: Implications for postpartum nutrition and reproduction. *Reprod Domest Anim* 43:31–39.
187. Maedler K, Spinas GA, Dyntar D, Moritz W, Kaiser N, Donath MY. 2001. Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on β -cell turnover and function. *Diabetes* 50:69–76.
188. Mashek DG, Grummer RR. 2003. The ups and downs of feed intake in prefresh cows. *Proc Four-State Nutr Conf LaCrosse, WI. MidWest Plan Service publication MWPS-4SD16*. pp. 153–158.
189. Mashek DG, Ingvarsten KL, Andersen JB, Vestergaard M, Larsen T. 2001. Effects of a four-day hyperinsulinemic-euglycemic clamp in early and mid-lactation dairy cows on plasma concentrations of metabolites, hormones, and binding proteins. *Domest Anim Endocrinol* 21:169–185.
190. Mason TM, Goh T, Tchipashvili V, Sandhu H, Gupta N, Lewis GF, Giacca A. 1999. Prolonged elevation of plasma free fatty acids desensitizes the insulin secretory response to glucose in vivo in rats. *Diabetes* 48:524–530.
191. Mayes P. 1989. *Harperov pregled biohemije*. Beograd.
192. McCance KL, Huether SE. 1994. Alterations of hormonal regulations. *Pathophysiology* 2nd edn., Mosby, St Louis, pp. 674–692.
193. McGuire MA, Beede DK, Collier RJ, Buonomo FC, DeLorenzo MA, Wilcox CJ. 1991. Effects of acute thermal stress and amount of feed intake on concentrations of somatotropin, insulin-like growth factor (IGF) – I, and IGF-II, and thyroid hormones in plasma of lactating Holstein cows. *J Anim Sci* 69:2050–2056.
194. McNamara J P. 1995. Role and regulation of adipose tissue metabolism during lactation. *J Nutr Biochem* 6:120–129.
195. McNamara JP, Hillers JK. 1986. Regulation of bovine adipose tissue metabolism during lactation. 2. Lipolysis response to milk production and energy intake. *J Dairy Sci* 69:3042–3050.
196. McNamara JP. 1988. Regulation of bovine adipose tissue metabolism during lactation. 4. Dose-responsiveness to epinephrine as altered by stage of lactation. *J Dairy Sci* 71:643-9.

197. McNamara JP. 1991. Regulation of adipose tissue metabolism in support of lactation. *J Dairy Sci* 74:706–719.
198. McNamara JP. 1997. Adipose tissue metabolism during lactation: where do we go from here?. *P Nutr Soc* 56:149–167.
199. Meikle A, Kulcsar M, Chilliard Y, Febel H, Delavaud C, Cavestany D, Chilbroste P. 2004. Effects of parity and body condition at parturition on endocrine and reproductive parameters of the cow. *Reproduction* 127:727–737.
200. Molento CF, Block E, Cue RI, Petitclerc D. 2002. Effects of insulin, recombinant bovine somatotropin, and their interaction on insulin-like growth factor-I secretion and milk protein production in dairy cows. *J Dairy Sci* 85:738–747.
201. Monzillo LU, Hamdy O. 2003. Evaluation of insulin sensitivity in clinical practice and in research settings. *Nutr Rev* 61(12):397–412.
202. Morrow DA, Hillman D, Dade AW, Kitchen H. 1979. Clinical investigation of a dairy herd with a fatty cow syndrome. *JAVMA* 174:161–167.
203. Mukesh M, Bionaz M, Graugnard DE, Drackley JK, Looor JJ. 2010. Adipose tissue depots of Holstein cows are immune responsive: inflammatory gene expression in vitro. *Domest Anim Endocrinol* 38(3):168–178.
204. Murondoti A, Jorritsma R, Beynen AC, Wensing T, Geelen MJ. 2004. Activities of the enzymes of hepatic gluconeogenesis in periparturient dairy cows with induced fatty liver. *J Dairy Sci* 71:129–134.
205. National Research Council. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. Seventh Revised Edition.
206. Nikolić JA, Kulcsár M, Kátai L, Nedić O, Jánosi S, Huszenicza G. 2003. Periparturient endocrine and metabolic changes in healthy cows and in cows affected by mastitis. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 50:22–29.
207. Nikolić Judith A, Šamanc H, Kovačević M, Đoković R, Bugarski D. 2000. Hormonal status in cows during the peripartal period. *Lucrari Stiintifice* 33:1–18.
208. Nikolić Judith A. 1996. Hormonalna regulacija prometa energije u peripartalnom periodu krava. Zbornik radova 2. simpozijuma "Ishrana, reprodukcija i zaštita goveda", Svilajnac, str. 92–106.

209. Nishimoto H, Matsutani R, Yamamoto S, Takahashi T, Hayashi KG, Miyamoto A, Hamano S, Tetsuka M. 2006. Gene expression of glucose transporter (GLUT) 1, 3 and 4 in bovine follicle and corpus luteum. *J Endocrinol* 188:111–119.
210. Nixon DA, Akasha MA, Anderson RR. 1988. Free and total thyroid hormones in serum of Holstein cows. *J Dairy Sci* 71(5):1152–1160.
211. O'Brien RM, Granner DK. 1990. PEPCCK gene as a model of inhibitory effects of insulin on gene transcription. *Diabetes Care* 13:327–334.
212. Ohtsuka H, Koiwa M, Hatsugaya A, Kudo K, Hoshi F, Itoh N, Yokota H, Okada H, Kawamura S. 2001. Relationship between serum TNF activity and insulin resistance in dairy cows affected with naturally occurring fatty liver. *J Vet Med Sci* 63(9):1021–1025.
213. Oikawa S, Oetzel GR. 2006. Decreased insulin response in dairy cows following a four-day fast to induce hepatic lipidosis. *J Dairy Sci* 89:2999–3005.
214. Oldenbroek JK, Garssen GJ, Forbes AB, Jonker LJ. 1989. The effect of treatment of dairy cows of different breeds with recombinantly derived bovine somatotropin in a sustained delivery vehicle. *Livest Prod Sci* 21:13–24.
215. Opsomer G, Wensing T, Laevens H, Coryn M, de Kruif A. 1999. Insulin resistance: The link between metabolic disorders and cystic ovarian disease in high yielding dairy cows? *Anim Reprod Sci* 56:211–222.
216. Ortmeyer HK, Hansen BC. 1998. Lack of defect in insulin action on hepatic glycogen synthase and phosphorylase in insulin-resistant monkeys, *Am J Physiol* 274:1005–1010.
217. Overton TR, Waldron MR. 2004. Nutritional management of transition dairy cows: strategies to optimize metabolic health. *J Dairy Sci* 87:(E.Suppl.):E105–E119.
218. Peng JI. 2011. Transcriptional adaptation of adipose tissue in dairy cows in response to energy overfeeding. Dissertation. Urbana, Illinois.
219. Pere MC, Etienne M, Dourmad JY. 2000. Adaptations of glucose metabolism in multiparous sows: effects of pregnancy and feeding level. *J Anim Sci* 78:2933–2941.
220. Pessayre D, Fromenty B, Mansouri A. 2004. Mitochondrial injury in steatohepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 6(11):1095–105.
221. Pessin JE, Saltiel AR. 2000. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest* 106:165–169.

222. Petersen HH, Nielsen JP, Heegaard PMH. 2004. Application of acute phase protein measurement in veterinary clinical chemistry. *Vet Res* 35:163–187.
223. Petersen KF, Shulman GI. 2006. Etiology of insulin resistance. *Am J Med* 119:10–16.
224. Petterson JA, Dunshea FR, Ehrhardt RA, Bell AW. 1993. Pregnancy and undernutrition alter glucose metabolic responses to insulin in sheep. *J Nutr* 123:1286–1295.
225. Petterson JA, Slepatis R, Ehrhardt RA, Dunshea FR, Bell AW. 1994. Pregnancy but not moderate undernutrition attenuates suppression of fat mobilization in sheep. *J Nutr* 124:2431–2436.
226. Pezzi C, Accorsi PA, Vigo D, Govani N, Gaiani R. 2003. 5' deiodinase activity and circulating thyronines in lacting cows. *J Dairy Sci* 86:152–158.
227. Piepenbrink MS, Overton TR. 2003. Liver metabolism and production of cows fed increasing amounts of rumen-protected choline during the periparturient period. *J Dairy Sci* 86:1722–1733.
228. Pires JAA, Souza H, Grummer RR. 2007. Induction of hiperlipidemia by intravenous infusion of tallow emulsion causes insulin resistance in Holstein cows. *J Dairy Sci* 90:2735–2744.
229. Polonsky KS, Given BD, Hirsch L, Shapiro ET, Tillil H, Beebe C, Galloway JA, Frank BH, Karrison T, Van Cauter E. 1988. Quantitative study of insulin secretion and clearance in normal and obese subjects. *J Clin Invest* 81:435–441.
230. Prodanović R, Kirovski D, Jakić-Dimić D, Vujanac I, Kureljušić B. 2010. Telesna kondicija i pokazatelji energetskeg statusa krava u visokom graviditetu i ranoj fazi laktacije. *Veterinarski glasnik* 64 (1-2):43-52.
231. Prodanović R, Kirovski D, Šamanc H, Vujanac I, Ivetić V, Savić B, Kureljušić B. 2012. Estimation of herd-basis energy status in clinically healthy Holstein cows: practical implications of body condition scoring and shortened metabolic profiles. *African J Agricultural Res* 7:418–425.
232. Prodanović R, Kirovski D, Vujanac I, Đurić M, Korićanac G, Vranješ-Đurić S, Ignjatović M, Šamanc H. 2013. Insulin responses to acute glucose infusions in Buša and Holstein-Friesian cattle breed during peripartum period: comparative study. *Acta Veterinaria-Beograd* 63 (4):373–384.

233. Puig O, Tjian R. 2005. Transcriptional feedback control of insulin receptor by dFOXO/FOXO1. *Genes Dev* 19:2435–2446.
234. Puppione DL. 1978. Implications of unique features of blood lipid transport in the lactating cow. *J Dairy Sci* 61:651–659.
235. Rabasa-Lhoret R, Bastard JP, Jan V, Ducluzeau PH, Andreelli F, Guebre F, Bruzeau J, Louche-Pellissier C, Maitrepierre C, Peyrat, J, Chagne J, Vidal H, Laville M. 2003. Modified quantitative insulin sensitivity check index is better correlated to hyperinsulinemic glucose clamp than other fasting-based index of insulin sensitivity in different insulin-resistant states. *J Clin Endocrinol Metabol* 88:4917–4923.
236. Radcliff RP, McCormack BL, Crooker BA, Lucy MC. 2003. Growth hormone (GH) binding and expression of GH receptor 1A mRNA in hepatic tissue of periparturient dairy cows. *J Dairy Sci* 86:3933–3940.
237. Rauw WM, Kanis E, Noordhuizen-Stassen EN, Grommers FJ. 1998. Undesirable side effects of selection for high production efficiency in farm animals: A review. *Livest Prod Sci* 56:15–33.
238. Reid IM, Roberts CJ, Treacher RJ, Williams LA. 1986. Effect of body condition at calving on tissue mobilization, development of fatty liver, and blood chemistry of dairy cows. *Anim Prod* 43:7–15.
239. Reist M, Erdin D, von Euw D, Tschuemperlin K, Leuenberger H, Chilliard Y, Hammon H M, Morel C, Philipona C, Zbinden Y, Kuenzi N, Blum JW. 2002. Estimation of energy balance at individual and herd level using blood and milk traits in high-yielding dairy cows. *J Dairy Sci* 85:3314–3327.
240. Reynolds CK, Aikman PC, Lupoli B, Humphries DJ, Beever DE. 2003. Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation. *J Dairy Sci* 86:1201–1217.
241. Rhoads RP, Kim JW, Leury BJ, Baumgard LH, Segole N, Frank SJ, Bauman DE, Boisclair YR. 2004. Insulin increases the abundance of the growth hormone receptor in liver and adipose tissue of periparturient dairy cows. *J Nutrition* 134: 1020–1027.

242. Rhoads RP, Kim JW, Van Amburgh ME, Ehrhardt RA, Frank SJ, Boisclair YR. 2007. Effect of nutrition on the GH responsiveness of liver and adipose tissue in dairy cows. *J Endocrinol* 195:49–58.
243. Richards BF, Janovick NAA, Moyes KM, Beever DE, Drackley JK. 2009. Comparison of a controlled-energy high-fiber diet fed throughout the dry period to a two-stage of far-off and close-up dietary strategy. *J Dairy Sci* 92(E. Suppl. 1):140(Abstr.).
244. Riis PM, Madsen A. 1985. Thyroxine concentrations and secretion rates in relation to pregnancy, lactation and energy balance in goats. *J Endocrinol* 107(3):421–427.
245. Robert JJ. 1995. Methods for the measurement of insulin resistance. Hyperinsulinemic euglycemic clamp. *Presse Med* 24(15):730–734.
246. Rosen ED, MacDougald OA. 2006. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev mol Cell Biol* 7(12):885–896.
247. Rukkwamsuk T, Geelen MJH, Kruip TAM, Wensing T. 2000. Interrelation of fatty acid composition in adipose tissue, serum, and liver of dairy cows during the development of fatty liver postpartum. *J Dairy Sci* 83:52–59.
248. Rukkwamsuk T, Wensing T, Geelen M J. 1998. Effect of overfeeding during the dry period on regulation of adipose tissue metabolism in dairy cows during the periparturient period. *J Dairy Sci* 81:2904–2914.
249. Rukkwamsuk T, Wensing T, Geelen M J. 1999. Effect of overfeeding during the dry period on the rate of esterification in adipose tissue of dairy cows during the periparturient period. *J Dairy Sci* 82:1164–1169.
250. Sadri H, Bruckmaier RM, Rahmani HR, Ghorbani GR, Morel I, vanDorland HA. 2010. Gene expression of tumour necrosis factor and insulin signalling-related factors in subcutaneous adipose tissue during the dry period and in early lactation in dairy cows. *J Anim Physiol Anim Nutr* 94:e194–e202.
251. Sale EM, Sale GJ. 2008. Protein kinase B: signalling roles and therapeutic targeting. *Cell Mol Life Sci* 65:113–127.
252. Saltiel AR, Pessin JE. 2003. Insulin signaling in microdomains of the plasma membrane. *Traffic* 4(11):711–716.

253. Sartin JL, Cummins KA, Kemppainen RJ, Marple DN, Rahe CH, Williams JC. 1985. Glucagon, insulin and growth hormone responses to glucose infusion in lactating dairy cows. *Am J Physiol* 248:108–114.
254. Sasaki S. 2002. Mechanism of insulin action on glucose metabolism in ruminants. *Anim Sci J* 73:423–433.
255. Schoenberg KM, Ehrhardt RM, Overton TR. 2012. Effects of plane of nutrition and feed deprivation on insulin responses in dairy cattle during late gestation. *J Dairy Sci* 95:670–82.
256. Schoenberg KM, Overton TR. 2010. The changing roles of insulin during the transition period. Pages 175–185 in *Proc. Cornell Nutrition Conf.*, East Syracuse, NY. Cornell Univ, Ithaca, NY. (Abstr.).
257. Schulze H. 1985. Behaviour of mineral balance parameters of cows with postpartum fatty degeneration of liver. *Mh Vet Med* 40:849 – 850.
258. Sechen SJ, Bauman DE, Tyrrell HF, Reynolds PJ. 1989. Effect of somatotropin on kinetics of nonesterified fatty acids and partition of energy, carbon and nitrogen in lactating cows. *J Dairy Sci* 72:59–67.
259. Sechen SJ, Dunshea FR, Bauman DE. 1990. Somatotropin in lactating cows: effect on response to epinephrine and insulin. *Am J Physiol* 258:582–588.
260. Sekulić M. 1985. Štitaste žlezde pacova i svinja neonatalno tretiranih polnim steroidima. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Veterinarski fakultet.
261. Shimabukuro S, Zhou YP, Levi M, Unger RH. 1998. Fatty acid-induced β cell apoptosis: A link between obesity and diabetes. *Proc Natl Acad Sci* 95:2498–2502.
262. Shingu H, Hodate K, Kushibiki S, Ueda Y, Watanabe A, Shinoda M, Matsumoto M. 2002. Breed differences in growth hormone and insulin secretion between lactating Japanese Black cows (beef type) and Holstein cows (dairy type). *Comp Biochem Physiol Part C: Toxicol Pharmacol* 132:493–504.
263. Smith G, Hansel W, Coppock C. 1976. Plasma growth hormone and insulin during early lactation in cows fed silage based diets. *J Dairy Sci* 59:135–140.
264. Smith KL, Butler WR, Overton TR. 2009. Effects of prepartum 2,4-thiazolidinedione on metabolism and performance in transition dairy cows. *J Dairy Sci* 92:3623–3633.

265. Smith KL, Rauf AK, Benefield BC, Bell AW, Overton TR. 2006. Responses of tissues to insulin as affected by homeorhetic state in dairy cattle. *J Dairy Sci* 89 (Suppl. 1):352.
266. Smith KL, Stebulis SE, Waldron MR, Overton TR. 2007. Prepartum 2,4-thiazolidinedione alters metabolic dynamics and dry matter intake of dairy cows. *J Dairy Sci* 90:3660–3670.
267. Stanley K, Fraser R, Bruce C. 1998. Physiological changes in insulin resistance in human pregnancy: longitudinal study with the hyperinsulinaemic euglycaemic clamp test. *Brit J Obstetr Gynaecol* 105:756–759.
268. Stojić V, Gvozdić D, Kirovski D, Judith Nikolić A, Huszenicza Gy, Šamanc H, Ivanov I. 2001. Serum thyroxine and triiodothyronine concentrations prior to and after delivery in primiparous Holstein cows. *Acta Vet-Beograd* 51(1):3–8.
269. Suagee JK, Corl BA, Hulver MW, McCutcheon LJ, Geor RJ. 2011. Effects of hyperinsulinemia on glucose and lipid transporter expression in insulin-sensitive horses. *Domest Anim Endocrinol* 40:173–181.
270. Subiyatno A, Mowat DN, Yang WZ. 1996. Metabolite and hormonal responses to glucose or propionate infusions in periparturient dairy cows supplemented with chromium. *J Dairy Sci* 79:1436–1445.
271. Swali A, Wathes DC. 2006. Influence of the dam and sire on size at birth and subsequent growth, milk production and fertility in dairy heifers. *Theriogenol* 66:1173-184.
272. Šamanc H, Jovanović M, Kovačević M, Đoković R, Jovičin M, Ivanov I. 1988. Relation between levels of particular hormones in blood and histological changes in the liver of recently calved healthy and ketotic cows. In *Proceeding of X Middle-European Buiatrics congress*, May 21-23, Siofok, Hungary, pp. 266–270.
273. Šamanc H, Kirovski D, Jovanović M, Vujanac I, Bojković-Kovačević S, Jakić-Dimić D, Prodanović R, Stajković S. 2010a. New insights into body condition score and its association with fatty liver in Holstein dairy cows, *Acta Vet-Beograd* 60, 5-6, 525–540.
274. Šamanc H, Kirovski D, Jovanović, M, Vujanac I, Prodanović R, Kuruc A, Pudlo P. 2008. Mogućnost preveniranja masne jetre u peripartalnom periodu. *Vet glasnik* 62, 1-2, 13-24.

275. Šamanc H, Kirovski D, Stojić V, Stojanović D, Vujanac I, Prodanović R, Bojković-Kovačević S. 2011. Application of the metabolic profile test in the prediction and diagnosis of fatty liver in Holstein cows. *Acta Vet-Beograd* 61, 5-6, 543-553.
276. Šamanc H, Kirovski D. 2008. Adrenokortikalni sistem goveda. Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd.
277. Šamanc H, Nikolić J A, Đoković R, Kovačević M, Damjanović Z, Ivanov I, Bojkovski J. 2000. Relation between peripheral hormone levels and liver morphology in health and ketotic cows. *Lucrarile stintifice, Medicina Veterinaria* 33:25–28.
278. Šamanc H, Sinovec Z, Cernescu H. 2005a. Osnovi poremećaja prometa energije visoko-mlečnih krava. Zbornik radova 4. Simpozijuma - Ishrana, reprodukcija i zaštita zdravlja goveda – Etiopatogeneza i dijagnostika poremećaja metabolizma reprodukcije goveda, Subotica, str. 89–101.
279. Šamanc H, Stojić V, Kirovski D, Jovanović M, Cernescu H, Vujanac I. 2010b. Thyroid hormones concentrations during the mid-dry period: an early indicator of fatty liver in Holstein – Friesian dairy cows. *J Thyroid Res* Vol 2010, ID 897602.
280. Šamanc H, Stojić V, Kirovski D, Pudlo P, Vujanac I. 2009a. Glucose tolerance test in the assessment of endocrine pancreatic function in cows before and after surgical correction of left displaced abomasums. *Acta Vet-Beograd* 59:513–523.
281. Šamanc H, Stojić V, Kovačević B, Vujanac I. 2005b. Hormonalni status visokomlečnih krava, Zbornik radova 4. simpozijuma Ishrana, reprodukcija i zaštita zdravlja goveda – Etiopatogeneza i dijagnostika poremećaja metabolizma reprodukcije goveda, Subotica, str. 277–284.
282. Šamanc H. 2009b. Bolesti organa za varenje goveda. Naučna KMD, Beograd.
283. Tabachnick M, Korcek L. 1986. Effect of long-chain fatty acids on the binding of thyroxine and triiodothyronine to human thyroxine-binding globuline, *Biochem Biophys Acta* 881(2):292–296.
284. Tamminga S, Luteijn PA, Meijer RGM. 1997. Changes in composition and energy content of liveweight loss in daily cows with time after parturition. *Livest Prod Sci* 52:31–38.

285. Terao H, Fulita M, Tsumagari A, Sugino T, Bungo T. 2010. Insulin dynamics in transition dairy cows as revealed by intravenous glucose tolerance testing. *J Anim Vet Adv* 9(18):2333–2337.
286. Thong FS, Bilan PJ, Klip A. 2007. The Rab GTPase-activating protein AS160 integrates Akt, protein kinase C, and AMP-activated protein kinase signals regulating GLUT4 traffic. *Diabetes* 56:414–423.
287. Treacher RJ, Reid IM, Roberts CJ. 1986. Effect of body condition at calving on the health and performance of dairy cows. *Anim Prod* 43:1–6.
288. Tyrrell HF, Brown ACG, Reynolds PJ, Haaland GL, Bauman DE, Peel CJ, Steinhour WD. 1988. Effect of bovine somatotropin on metabolism of lactating dairy cows: energy and nitrogen utilization as determined by respiration calorimetry. *J Nutr* 118:1024–1030.
289. Urton G, von Keyserlingk MAG, Weary DM. 2005. Feeding behavior identifies dairy cows at risk for metritis. *J Dairy Sci* 88:2843–2849.
290. Van Den Top AM, Wensing T, Geelen MJH, Wentink GH, Van 't Klooster AT, Beynen AC. 1995. Time trends of plasma lipids and enzymes synthesizing hepatic triacylglycerol during postpartum development of fatty liver in dairy cows. *J Dairy Sci* 78:2208–2220.
291. Van Epps-Fung M, Williford J, Wells A, Hardy RW. 1997. Fatty acid-induced insulin resistance in adipocytes. *Endocrinol* 138:4338–4345.
292. Van Knegsel ATM, van den Brand H, Dijkstra J, Tamminga S, Kemp B. 2005. Effect of dietary energy source on energy balance, production, metabolic disorders and reproduction in lactating dairy cattle. *Reprod Nutr Devel* 45:665–688.
293. Van Knegsel ATM, van den Brand H, Graat EAM, Dijkstra J, Jorritsma R, Decuyper E, Tamminga S, Kemp B. 2007. Dietary energy source in dairy cows in early lactation: metabolites and metabolic hormones. *J Dairy Sci* 90:1477–1485.
294. Van Meirhaeghe H, Deprez P, Van Den Hende C, Muylle E. 1988. Plasma glucose clearance and insulin response in cows with abomasal displacement. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A* 21:221–228.

295. Veenhuizen JJ, Drackley JK, Richard MJ, Sanderson TP, Miller LD, Young WJ. 1991. Metabolic changes in blood and liver during development and early treatment of experimental fatty liver and ketosis in cows. *J Dairy Sci* 74:4238–4253.
296. Veerkamp RF, Beerda B, van der Lende T. 2003. Effects of genetic selection for milk yield on energy balance, levels of hormones, and metabolites in lactating cattle, and possible links to reduced fertility. *Livestock Prod Sci* 83:257–75.
297. Veerkamp RF, Koenen EPC. 1999. Genetics of food intake, live weight, condition score and energy balance. *BSAS Occasional Publications* 24:63–73.
298. Vernon RG, Clegg RA, Flint DJ. 1981. Metabolism of sheep adipose tissue during pregnancy and lactation. Adaptation and regulation. *Biochem J* 200:307–314.
299. Vernon RG, Denis RG, Sorensen A, Williams G. 2002. Leptin and the adaptations of lactation in rodents and ruminants. *Horm Metab Res* 34(11-12): 678–685.
300. Vernon RG, Faulkner A, Hay WW, Calvert DT, Flint DJ. 1990. Insulin resistance of hind-limb tissues in vivo in lactating sheep. *Biochem J* 270:783–786.
301. Vernon RG, Taylor E. 1988. Insulin, dexamethasone and their interactions in the control of glucose metabolism in adipose tissue from lactating and nonlactating sheep. *Biochem J* 256:509–514.
302. Vernon RG. 2005. Lipid metabolism during lactation: a review of adipose tissue-liver interactions and the development of fatty liver. *J Dairy Res* 72:460–469.
303. Vujanac I. 2010. Ispitivanje funkcionalnog stanja endokrinog pankreasa kod visokomlečnih krava u različitim uslovima spoljašnje temperature. Doktorska disertacija. Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu.
304. Waltner S, McNamara JP, Hillers JK. 1993. Relationships of body condition score to production variables in high producing holstein dairy cattle. *J Dairy Sci* 76:3410–3419.
305. Weinstein I. 1997. Effects of oestryl estradiol on incorporation of (¹⁴C)oleate into triglyceride and ketone bodies by the liver. *Bioch Pharmacol* 26(1):77–80.
306. White HM, Donkin SS, Lucy MC, Grala TM, Roche JR. 2012. Genetic differences between New Zealand and North American dairy cows alter milk production and gluconeogenic enzyme expression. *J Dairy Sci* 95:455–459.

307. Wichtel JJ, Thompson KG, Craigie AL, Williamson NB. 1996. Effects of selenium and iodine supplementation on the growth rate, mohair production, and thyroid status of Angora goat kids. *New Zealand J Agric Res* 39:111–115.
308. Winkleman LA, Elsasser TH, Reynolds CK. 2008a. Limit-feeding a high-energy diet to meet energy requirements in the dry period alters plasma metabolite concentrations but does not affect intake or milk production in early lactation. *J Dairy Sci* 91:1067–1079.
309. Winkleman LA, Lucy MC, Elsasser TH, Pate JL, Reynolds CK. 2008b. Suppressor of cytokine signaling-2 mRNA increases after parturition in the liver of dairy cows. *J Dairy Sci* 91:1080–1086.
310. Xu C, Wang Z, Zhang RH, Zhang HY, Fu SX, Xia C. 2011. Effect of NEFA and glucose levels on CPT-I mRNA expression and translation in cultured bovine hepatocytes. *J Vet Med Sci* 73:97–101.
311. Young JW. 1977. Gluconeogenesis in cattle: significance and methodology. *J Dairy Sci* 60:1–15.
312. Youngren JF, Keen S, Kulp JL, Tanner CJ, Houmard JA, Goldfine ID. 2001. Enhanced muscle insulin receptor autophosphorylation with short-term aerobic exercise training. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E528–533.
313. Youngren JF. 2007. Regulation of insulin receptor function. *Cell Mol Life Sci* 63(7-8):873–891.
314. Zhao F, Dixon WT, Kennelly JJ. 1996. Localization and gene expression of glucose transporters in bovine mammary gland. *Comp Biochem Physiol* 115:127–134.
315. Zhao FQ, Keating AF. 2007. Expression and regulation of glucose transporters in the bovine mammary gland. *J Dairy Sci* 90:76–86.
316. Zhao FQ, Moseley WM, Tucker HA, Kennelly JJ. 2006. Regulation of glucose transporter gene expression in mammary gland, muscle, and fat of lactating cows by administration of bovine growth hormone and bovine growth hormone-releasing factor. *J Anim Sci* 74:183–189.
317. Zhou YP, Grill V. 1995. Long term exposure to fatty acids and ketones inhibits β -cell functions in human pancreatic islets of Langerhans. *J Clin Endocrinol Metab* 80:1584–1590.

318. Zierath JR, Krook A, Wallberg-Henriksson H. 1998. Insulin action in skeletal muscle from patients with NIDDM. *Mol Cell Biochem* 182:153–160.
319. Zulu VC, Samawukai Y, Nakada K, Kida K, Moriyoshi M. 2002. Relationship among insulin-like growth factor-I, blood metabolites and postpartum ovarian function in dairy cows. *J Vet Med Sci* 64:879–85.
320. Zurek E, Foxcroft GR, Kennelly JJ. 1995. Metabolic status and interval to first ovulation in postpartum dairy cows. *J Dairy Sci* 78:1909–1920.

BIOGRAFIJA

Radiša Prodanović rođen je 01. februara 1981. godine u Ljuboviji. Osnovnu školu završio je u Bratuncu, a srednju (Gimnazija) u Ljuboviji. Studije veterinarske medicine u Beogradu upisao je 1999. godine a diplomirao u oktobru 2007. godine sa prosečnom ocenom 8,84. Sledeće godine upisao je doktorske akademske studije na Fakultetu veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu, na kojima je položio sve ispite predviđene nastavnim planom i programom sa prosečnom ocenom 9,73. Septembra 2012. godine, prijavio je temu za doktorsku disertaciju „Insulinska rezistencija kod krava holštajn rase tokom perioda zasušenja i rane laktacije“

Posle upisivanja doktorskih akademskih studija, 2008. godine zaposlio se u Naučnom institutu za veterinarstvo Srbije u Beogradu, gde je radio do septembra 2011. godine. Iste godine izabran je za asistenta na Katedri za bolesti papkara na Fakultetu veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu, gde je i danas zaposlen.

Učestvovao je na velikom broju naučno-stručnih simpozijuma u zemlji i inostranstvu, kao i na dva naučno-istraživačka projekta finansirana od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja.

IZJAVA O AUTORSTVU

Potpisani Radiša Prodanović

Broj upisa:

Izjavljujem

Da je doktorska disertacija pod naslovom „Insulinska rezistencija kod krava holštajn rase tokom perioda zasušenja i rane laktacije“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu,

Potpis doktoranda:

2014. godine

IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE DOKTORSKOG RADA

Ime i prezime autora : Radiša Prodanović

Broj upisa:

Studijski program: doktorske akademske studije

Naslov rada: Insulinska rezistencija kod krava holštajn rase tokom perioda zasušenja i rane laktacije

Mentor: Prof. Dr Horea Šamanc

Potpisani Radiša Prodanović

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao za objavljivanje na portalu Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu,

Potpis doktoranda:

2014. godine

IZJAVA O KORIŠĆENJU

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom „Insulinska rezistencija kod krava holštajn rase tokom perioda zasušenja i rane laktacije“ koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio.

1. Autorstvo
2. Autorstvo – nekomercijalno
- ③. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

U Beogradu,

Potpis doktoranda:

2014. godine
