

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

Ljubomir D. Jovanović

**UTICAJ PERORALNE APLIKACIJE  
HROMA NA INSULINSKU OSOVINU I IGF  
SISTEM KOD TELADI HOLŠTAJN-  
FRIZIJSKE RASE**

doktorska disertacija

Beograd, 2017

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Ljubomir D. Jovanović

**EFFECT OF PERORAL CHROMIUM  
ADMINISTRATION ON THE INSULIN  
AXIS AND IGF SYSTEM IN HOLSTEIN  
CALVES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017

**Mentor:**

Dr Danijela Kirovski, redovni profesor  
Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

**Članovi komisije:**

---

Dr Miodrag Lazarević, redovni profesor  
Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

---

Dr Ivan Vujanac, docent  
Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

---

Dr Ivan Jovanović, redovni profesor  
Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

---

Dr Goran Korićanac, naučni savetnik  
Institut za nuklearne nauke „Vinča”, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

Najveću zahvalnost za uspešno okončanje ove doktorske disertacije dugujem svojoj mentorki, profesorki Danijeli Kirovski, koja je od samog početka precizno i pravovremeno vodila istraživanje i pisanje naučnih radova iz kojih je izvedena ova disertacija. Zahvalan sam što je, pored stalne podrške i usmeravanja mog rada, omogućila da izrazim i razvijam svoje mišljenje i formiram sopstveni naučni stil. Zadovoljstvo mi je što sam bio deo tima koji su pored kolega sa Katedre za fiziologiju i biohemiju činile kolege sa Katedre za bolesti papkara i Katedre za porodiljsvo, sterilitet i v.o. Želeo bih da im se zahvalim na svesrdnoj pomoći koju su ukazali pri izradi ove disertacije.

Zahvaljujem se kolegama sa Instituta za primenu nuklearne energije – INEP, a posebno dr Olgici Nedić, dr Romani Masnikosi i dr Dragani Robajac. Zadovoljstvo mi je što sam imao mogućnost da deo analiza uradim u njihovoj laboratoriji.

Zahvaljujem se kolegama sa Instituta za nuklearne nauke „Vinča”, gde je bio izveden deo laboratorijskih analiza. Posebno se zahvaljujem dr Goranu Korićancu, Mariji Pantelić i dr Snežani Tepavčević.

Zahvaljujem se kolegama sa farme „13. maj” koji su omogućili da ogled obavim na njihovoj farmi. Takođe, zahvaljujem se svojim kolegama sa osnovnih studija koji su mi svakodnevno pomagali tokom izvodjenja ogleđa na farmi (Ivanu, Lazi, Milošu, Milanu, Velji i Veselinu).

Veliko hvala mojoj porodici koja je uvek bila uz mene i podržavala me u onome što radim. Na kraju, svoj dosadašnji naučni rad i ovu disertaciju posvećujem svom ocu i dedi sa nadom da ću biti posvećen i odgovoran svojoj profesiji na način na koji su oni bili.

# Uticaj peroralne aplikacije hroma na insulinsku osovinu i IGF sistem kod teladi holštajn-frizijske rase

## KRATAK SADRŽAJ

Hrom je hemijski element čija je biološka aktivnost još uvek predmet izučavanja kod domaćih životinja. Kod ljudi i laboratorijskih životinja je dokazano da hrom utiče na efekte insulina sa posledičnim uticajem na regulaciju metabolizma ugljenih hidrata, proteina i lipida, Ovaj efekat je posebno izražen kod mladih jedinki tokom perioda rasta. Osim uticaja na insulinski signalni put, postoje indicije da hrom može uticati i na IGF sistem, ali u dosadašnjim ispitivanjima, osim uticaja hroma na promene koncentracije IGF-I, uglavnom nije proučavan uticaj hroma na ostale komponente ovog sistema (IGF vezujuće proteine i receptore za IGF molekule).

Cilj ove disertacije je bio da se ispita uticaj peroralnog davanja hroma (organski trovalentni hrom vezan za kvasac) na insulinsku osovinu i IGF sistem kod teladi uzrasta od mesec dana do četiri meseca. Ovaj uzrast je odabran jer je to period kada telad prelazi sa mlečne ishrane na ishranu kabastim i koncentrovanim hranivima, svojstvenu odraslim preživarima i predstavlja period metaboličkog “prestrojavanja”.

Za ogled je izabrano 24 teladi holštajn-frizijske rase uzrasta mesec ( $32 \pm 3$ ) dana, koja su podeljena u dve grupe. Teladi PoCr grupe ( $n=12$ ) je svakodnevno, izazivanjem refleksa sisanja brizgalicom, peroralno aplikovan hrom rastvoren u mleku, dok je kontrolnoj, NCr grupi ( $n=12$ ) u istom periodu aplikovano samo mleko. Tokom ogleada, od obe grupe, su uzimani uzorci mišićnog tkiva 0. i 70. dana, kao i uzorci krvi u intervalima od 10 dana, odnosno 0., 10., 20., 30., 40., 50., 60. i 70. dana, kada je vršeno i merenje telesne mase. Takođe su izvedeni intravenski testovi opterećenja glukozom (IVGTT) četiri puta u toku trajanja ogleada i to 0., 30., 50. i 70 dana ogleada. U uzorcima mišićnog tkiva određivana je zastupljenost proteina signalnog puta insulina i to: insulinskog receptora ( $IR\beta$ ), supstrata insulinskog receptora fosforilisanog na tirozinu 632 (pIRS-1 Tyr<sup>632</sup>), supstrata insulinskog receptora fosforilisanog na serinu 307 (pIRS-1 Ser<sup>307</sup>), protein kinaze B (Akt) fosforilisanog na serinu 473 (pAkt Ser<sup>473</sup>), transportnog molekula za glukozu (GLUT4) i AMP - zavisne protein kinaze (AMPK). U uzorcima krvi određivane su koncentracije biohemijskih parametara: glukoze, NEFA,

BHBA, holesterola, triglicerida, ukupnih proteina, albumina, globulina kao i koncentracije hormona: insulina i kortizola. Dodatno, u uzorcima krvi je određivana koncentracija IGF-I i IGF vezujućih proteina (IGFBP 1,2,3,4).

Peroralna aplikacija hroma izazvala je, kod PoCr u odnosu na NCr grupu, porast zastupljenosti IR $\beta$  (p< 0,05), pIRS-1 Tyr<sup>632</sup> (p< 0,001), pAkt Ser<sup>473</sup> (p< 0,05), GLUT4 (p< 0,05) i AMPK (p< 0,001), dok zastupljenost pIRS-1 Ser<sup>307</sup>, kao negativnog regulatora signalnog puta insulina, nije bila promjenjena.

Rezultati testova opterećenja glukozom sugerišu povećanu insulinsku senzitivnost odnosno bolju utilizaciju glukoze kod grupe kojoj je peroralno aplikovan hrom. Peroralna aplikacija hroma je dovela do nižih vrednosti za T $\frac{1}{2}$  (p< 0,05) i AUC<sub>glukoza</sub> (p< 0,05), Pik<sub>insulin</sub> (p< 0,05) kao i viših k vrednosti (p< 0,05) i vrednosti RQICKI testa (p< 0,05) kod PoCr u odnosu na NCr grupu. Smanjene bazalne koncentracije glukoze i insulina 30. i 70. dana ogleđa (p< 0,05 za glukozu i insulin u oba perioda) ukazuju na moguć energetski deficit teladi kojima je peroralno aplikovan hrom, posebno u periodu nutritivnog prestrojavanja. Peroralna aplikacija hroma teladima dovela je, 50. dana ogleđa, do smanjenja koncentracija IGF-I i IGFBP-3 (p< 0,05, za oba parametra) kod teladi PoCr u odnosu na NCr grupu. Nisu zabeleženi efekti peroralne aplikacije teladi na telesnu masu ni u jednom od ispitivanih perioda.

Dobijeni rezultati ukazuju da peroralno aplikovan hrom značajno utiče na metabolizam teladi, posebno u periodu metaboličkog prestrojavanja, ali da krajnji efekat na performanse teladi (telesnu masu, pre svega) verovatno zavisi od prilagođenosti energetske komponente obroka povećanom sadržaju hroma u organizmu.

Ključne reči: hrom, insulinska osovina, IGF sistem, telad.

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Fiziologija

UDK broj: 619 : 591.147 : 546.76

## **Effect of peroral chromium administration on the insulin axis and IGF system in holstein calves**

### **SUMMARY**

Chromium is a chemical element whose biological activity is still subject of study in domestic animals. In humans and laboratory animals it has been proven that chromium has impact on the effects of insulin, with the consequent effect on the regulation of carbohydrate, protein, and lipid metabolism. This effect is particularly pronounced in young animals during the growth period. In addition to the effects on the insulin signal pathway, there are indications that chromium may also affect the IGF system. Nevertheless, except the influence of chromium on changes in IGF-I concentration, previous studies did not investigate influence of chromium on other components of this system (IGF-binding proteins and receptors for IGF molecules).

The objective of this study was to investigate the effect of peroral chromium (chromium enriched yeast) administration on the insulin axis and IGF system in calves at the age from one to four months. This age was chosen because it is the period when calves are switching from milk feeding to forages and concentrate, characteristic for adult ruminants and represents a period of metabolic turnover.

Twenty-four Holstein-Friesian calves aged 1 month ( $32 \pm 3$  days) were chosen for the study and divided into two groups. The PoCr group ( $n = 12$ ) that perorally received 0.04 mg of Cr/kg of body mass during 70 days. Chromium dissolved in milk was administered to each calf using a syringe that caused suckling reflex. The NCr group ( $n = 12$ ) acted as a control group, and has received milk, by peroral application and with no added Cr during the same period. Muscle tissue samples were taken from both groups on days 0 and 70. Blood samples were taken in the intervals of 10 days, meaning on days 10, 20, 30, 40, 50, 60, and 70, when body mass was also measured. Intravenous glucose tolerance tests (IVGTT) were performed, four times during the experiment, meaning on days 0, 30, 50, and 70. Molecules investigated in the muscle tissue samples were: insulin  $\beta$ -subunit receptor ( $IR\beta$ ), phosphorylation of IRS1 at Tyrosine 632 (pIRS-1 Tyr<sup>632</sup>), phosphorylation of insulin receptor substrate 1 at Serine 307 (pIRS-1

Ser<sup>307</sup>), phosphorylation of Akt at Serine 473 (pAkt Ser<sup>473</sup>), glucose transporter-4 (GLUT4), and AMP-activated protein kinase (AMPK).

The concentrations of biochemical parameters and hormones in blood samples were determined: glucose, NEFA, BHBA, cholesterol, triglycerides, total proteins, albumin, globulin, insulin, and cortisol. In addition, concentration of IGF-I and IGF binding proteins (IGFBP 1,2,3,4) were determined in the blood samples.

Chromium supplementation increased protein content of the IR $\beta$  (p <0.05), pIRS-1 Tyr<sup>632</sup> (p <0.001), pAkt Ser<sup>473</sup> (p <0.05), GLUT4 (p <0.05), and AMPK (p <0.001), while pIRS-1 Ser<sup>307</sup>, as a negative regulator of the insulin signal pathway was not affected by chromium treatment.

The results of glucose tolerance tests suggest increased insulin sensitivity and better glucose utilization in the group that was perorally administered by chromium. Chromium administration resulted in lower values for T<sub>1/2</sub> (p <0.05), AUC<sub>glucose</sub> (p <0.05), and Pik<sub>insulin</sub> (p <0.05), while higher k (p <0.05) and RQICKI values (p <0.05) were observed in PoCr relative to the NCr group. Reduced basal glucose and insulin concentrations on days 30 and 70 (p <0.05 for glucose and insulin, in both periods, respectively) indicate a possible energy deficit in the calves that were perorally administered by chromium, especially during the nutritive turnover period. The peroral application of chromium led to a decrease in the concentration of IGF-I and IGFBP-3 (p <0.05, for both parameters) in the PoCr calves relative to the NCr group on day 50 of the experiment. The effects of peroral chromium administration on body weight were not observed in any of the examined periods.

The results obtained indicate that the perorally administrated chromium significantly affects the metabolism of the calves, especially during the metabolic turnover period, but that the final effect on calves performance (body weight particularly) presumably depends on the adjustment of the energy component of the meal to increased chromium content in the body.

Key words: chromium, insulin axis, IGF system, calves.

Scientific area: Veterinary medicine

Specific scientific field: Physiology

UDK number: 619 : 591.147 : 546.76



# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. PREGLED LITERATURE</b> .....	3
2.1. Hemijske osobine hroma .....	3
2.2. Hemijske forme hroma .....	3
2.3. Bioraspoloživost hroma .....	5
2.4. Biološki značaj hroma .....	7
2.4.1. Uticaj hroma na metabolizam ugljenih hidrata, lipida i nukleinskih kiselina. ....	8
2.4.2. Biološki značaj hroma kod teladi .....	11
2.5. Interakcija hroma sa hormonalnim statusom jedinke .....	12
2.5.1. Interakcija hroma sa signalnim putem insulina .....	12
2.5.1. Interakcija hroma sa IGF sistemom .....	14
<b>3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA</b> .....	18
<b>4. MATERIJAL I METODE RADA</b> .....	20
4.1. Ogledne životinje .....	20
4.2. Merenje telesne mase teladi .....	22
4.3. Uzimanje uzoraka tkiva i krvi .....	22
4.3.1. Uzimanje uzoraka mišićnog tkiva .....	22
4.3.2. Uzimanje uzoraka krvi .....	23
4.4. Određivanje zastupljenosti proteina signalnog puta insulina u mišićnom tkivu .....	23
4.4.1. Priprema ćelijskog lizata mišićnog tkiva .....	23
4.4.2. Određivanje koncentracije proteina u lizatu BCA metodom .....	24
4.4.3. Elektroforeza proteina signalnog puta insulina .....	24
4.4.4. Detekcija proteina signalnog puta insulina Westernblot metodom .....	25
4.5. Određivanje koncentracije biohemijskih parametara krvi .....	26
4.6. Određivanje koncentracije hormona u krvi .....	27
4.7. Intravenski testovi opterećenja glukozom (IVGTT) .....	27
4.7.1. Postupak sprovođenja IVGTT .....	27
4.7.2. Izračunavanja kinetike glukoze i insulina .....	28
4.7.3. Izračunavanje matematičkog pokazatelja insulinske senzitivnosti – RQUICKI .....	29
4.8. Određivanje koncentracije IGF-I i zastupljenosti IGF vezujućih proteina u uzorcima krvi .....	29
4.8.1. Određivanje koncentracije IGF-I u uzorcima krvi .....	29
4.8.2. Priprema uzoraka krvnog seruma za elektroforezu IGF vezujućih proteina .....	29
4.8.3. Elektroforetsko razdvajanje IGF vezujućih proteina i elektrotransfer .....	30
4.8.4. Western blot IGF vezujućih proteina .....	31
4.9. Statistička obrada rezultata .....	32
<b>5. REZULTATI</b> .....	33

5. 1. Zastupljenost proteina signalnog puta insulina u mišićnom tkivu .....	33
5. 1.1.Zastupljenost $\beta$ -subjedinice insulinskog receptora .....	33
5. 1.2.Zastupljenost supstrata insulinskog receptora fosforilisanog na tirozinu 632 .....	34
5. 1.3.Zastupljenost supstrata insulinskog receptora fosforilisanog na serinu 307.....	35
5.1.4.Zastupljenost protein kinaze B (Akt) fosforilisane na serinu 473 .....	36
5. 1.5.Zastupljenost transportnog molekula za glukozu (GLUT4).....	38
5.1.6. Zastupljenost AMP- zavisne protein kinaze (AMPK).....	39
5. 2.Intravenski test opterećenja glukozom .....	40
5. 2.1.Parametri kinetike glukoze .....	40
5. 2.2.Parametri kinetike insulina.....	41
5. 2.3.Vrednosti koncentracije NEFA i RQUICKI test.....	43
5. 3. Koncentracije biohemijskih parametara i hormona u krvi .....	44
5. 4. Koncentracije IGF-I u krvi .....	50
5.5.Zastupljenost IGF vezujućih proteina .....	51
5.5.1.Zastupljenost IGFBP-1.....	51
5.5.2.Zastupljenost IGFBP-2.....	52
5.5.3.Zastupljenost IGFBP-3.....	53
5.5.4.Zastupljenost IGFBP-4.....	54
5. 5.Telesna masa.....	55
<b>6. DISKUSIJA.....</b>	<b>56</b>
6. 1.Zastupljenost proteina signalnog puta insulina u mišićnom tkivu .....	56
6.1.1.Zastupljenost $\beta$ subjedinice insulinskog receptora.....	56
6. 1.2. Zastupljenost supstrata insulinskog receptora fosforilisanog na tirozinu 632 .....	57
6. 1.3.Zastupljenost supstrata insulinskog receptora fosforilisanog na serinu 307 .....	57
6.1.4.Zastupljenost protein kinaze B (Akt) fosforilisane na serinu 473 .....	58
6.1.5.Zastupljenost transportnog molekula za glukozu (GLUT4).....	58
6.1.6.Zastupljenost AMP- zavisne protein kinaze (AMPK).....	59
6.2.Intravenski test opterećenja glukozom .....	60
6.3.Koncentracija glukoze i insulina.....	61
6.4. Koncentracija holesterola, triglicerida, BHBA, NEFA, ukupnih proteina, albumina, globulina i kortizola .....	62
6.5. Koncentracija IGF-I .....	63
6. 6.Zastupljenost IGF vezujućih proteina .....	66
6.7.Telesna masa.....	67
<b>7. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>69</b>
<b>8. LITERATURA.....</b>	<b>71</b>

## ***SPISAK SKRAĆENICA KORIŠĆENIH U TEKSTU***

**AMPK**- AMP- zavisna protein kinaza

**AUC<sub>glukoza</sub>** - površina ispod krive koncentracije glukoze

**AUC<sub>insulin</sub>** - površina ispod krive koncentracije insulina

**BHBA**-  $\beta$ -Hydroxybutyric acid (beta hidroksi buterna kiselina)

**GLUT**- transportni molekul za glukozu

**DNK** – dezoksiribonukleinska kiselina

**IGFBP** - Insulin-like Growth Factor Binding Proteins (vezujući proteini za insulinu-slične faktore rasta)

**IGF-I** - Insulin-Like Growth Factor-I (insulinu-sličan faktor rasta-I)

**IGF-II** - Insulin-Like Growth Factor-II (insulinu-sličan faktor rasta-II)

**iRNK** – informaciona ribonukleinska kiselina

**IR**- insulinski receptor

**IVGTT**- Intravenous glucose tolerance test (intravenski test opterećenja glukozom)

**k** – stepen opadanja koncentracije glukoze tokom IVGTT testa

**$\Delta$ MAX<sub>insulin</sub>** - maksimalni porast insulina

**NEFA**- non-esterified fatty acids (neesterifikovane masne kiseline)

**PEG** – Polyethylenglicol (polietilenglikol)

**PBS** – Phosphate Buffer Solution (fosfatni pufer sa NaCl)

**pAkt Ser<sup>473</sup>**- protein kinaza B (Akt) fosforilisana na serinu 473

**PI-3-K**- fosfatidilinozitol 3 kinaza

**pIRS-1 Tyr<sup>632</sup>** - supstrat insulinskog receptora fosforilisan na tirozinu 632

**pIRS-1 Ser<sup>307</sup>** - supstrat insulinskog receptora fosforilisan na serinu 307

**Pi<sub>glukoza</sub>** .najveća vrednost koncentracije glukoze

**Pi<sub>insulin</sub>** - najveća vrednost koncentracije insulina

**RIA** – Radioimmuno-Assay (radioimunoesej test)

**RQUICKI** - revised quantitative insulin sensitivity check index (matematički pokazatelj insulinske senzitivnosti)

**SDS-PAGE** - Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (natrijum-dodecil sulfat poliakril amid gel elektroforeza)

**T<sub>0glukoza</sub>** - bazalna koncentracija glukoze

**T<sub>0insulin</sub>** - bazalna koncentracija insulina

**T<sub>1/2</sub>** - poluvreme eliminacije glukoze

# 1. UVOD

Uslovi tokom odgoja teladi u intenzivnoj govedarskoj proizvodnji često dovode do stresnih stanja, koja, ne samo da mogu biti uzrok nastanka različitih oboljenja, već se mogu negativno odraziti na različite metaboličke procese, a time i na rast i razvoj teladi. Da bi se ostvarila očekivana ekonomska dobit tokom uzgoja podmlatka, bez negativnih posledica po njihovo zdravlje, od izuzetne je važnosti poznavanje svih mehanizama koji omogućavaju pravilno odvijanje metaboličkih procesa, odnosno rasta i razvoja teladi.

Od ranije je poznato da su insulinska i somatotropna osovina ključne za pravilan rast odnosno deponovanje hranljivih materija kod svih životinjskih vrsta, uključujući i goveda. Insulin je najznačajniji anabolički hormon koji učestvuje u kontroli metabolizma ugljenih hidrata, masti i proteina. Insulinu sličan faktor rasta I (Insulin like growth factor I–IGF-I), kao deo somatotropne osovine, utiče na rast organizma u celini i nalazi se pod kontrolom hormona rasta, u optimalnim fiziološkim uslovima. Međutim, u uslovima energetske deficita, odnosno stresnih stanja, njegova sinteza i biološka dostupnost zavise od aktivnosti insulinske osovine. Stoga se može pretpostaviti da je povećanje efikasnosti biološkog delovanja insulina od ključnog značaja za unapređenje rasta i razvoja, ali i zdravlja mlade teladi, pogotovo u uslovima intenzivnog uzgoja, često praćenog stresnim stanjima, odnosno deficitom energije.

Ranija istraživanja su ukazala na povezanost metabolizma insulina i hroma na način da deficit hroma dovodi do smanjene osetljivosti perifernih tkiva na insulin. Kasnijim ogleđima izvedenim u *in vitro* i *in vivo* uslovima, pretežno kod ljudi i laboratorijskih životinja (pacova i miševa), utvrđeno je da dodavanje hroma pospešuje metaboličke procese regulisane insulinom. Još uvek nisu poznati mehanizmi dejstva hroma na signalni sistem insulina, ali noviji naučni radovi ukazuju na to da efekti hroma mogu biti na nivou broja i/ili afiniteta receptora koji su dostupni insulinu, odnosno na nivou unutarćelijskih signalnih molekula koji se aktiviraju nakon vezivanja hormona za receptor. Od izuzetne je važnosti utvrditi mesto interakcije hroma i elemenata insulinske osovine da bi se na adekvatan način, dodavanjem ovog mikroelementa, mogla izvršiti modulacija metabolizma u cilju adekvatnog rasta i razvoja jedinke. Najčešći način *in vivo* ispitivanja interakcije metabolizma insulina i hroma je putem molekularnih

ispitivanja na nivou mišićnog tkiva dobijenog biopsijom, od jedinke kojoj je aplikovan hrom. Ovakva ispitivanja su vršena kod ljudi i laboratorijskih životinja, ali ne i kod goveda kod kojih se mogu očekivati razlike u odnosu na monogastrične vrste, uzimajući u obzir specifičnost metabolizma ugljenih hidrata.

S druge strane, mali je broj naučnih radova u kojima je ispitivan uticaj hroma na aktivnost somatotropne osovine. Osim uticaja hroma na koncentraciju IGF-I, do sada nisu rađena istraživanja o uticaju hroma na druge komponente IGF sistema (IGF-II, IGF vezujuće proteine i receptore za IGF molekule). Iz literature je poznato da je, za pravilno tumačenje promena u IGF sistemu, pored koncentracije IGF-I neophodno sagledati promene koje se odigravaju na nivou IGF vezujućih proteina (Insulin like growth factor binding proteins - IGF-BPs), koji određuju biološku dostupnost IGF molekula tkivima. Može se pretpostaviti da hrom ostvaruje svoje dejstvo na IGF osovinu interakcijom sa insulinom koji mnogi autori smatraju delom IGF sistema. Naime, s obzirom da receptori za insulin imaju određeni afinitet prema IGF molekulima i da receptori za IGF molekule imaju određeni afinitet prema insulinu, moguće je da se, u uslovima energetske deficita, ostvari zavisnost IGF sistema i insulina. Kontrola insulinske osovine od strane hroma bi se time mogla preneti na IGF sistem. Dodatno, zbog činjenice da insulin može i direktno uticati na pojedine IGF-BP, postoji mogućnost uticaja hroma na koncentraciju samih IGF-BP.

Jedno od najizraženijih stresnih stanja u celokupnom životnom ciklusu goveda je prelazak sa mlečne ishrane na ishranu kabaštim i koncentrovanim hranivima. To je period izraženog metaboličkog prestrojavanja, koje podrazumeva i značajne promene u insulinskoj osovini i IGF sistemu teladi. S obzirom na povoljan uticaj hroma na ova dva sistema u uslovima stresnih stanja, ali i nedostatka literaturnih podataka o mestu interakcije hroma sa metaboličkim putevima insulina i IGF-I, smatrali smo da bi molekularna ispitivanja na nivou mišićnog tkiva teladi kojima je peroralno aplikovan hrom doprinelo, ne samo tumačenju mehanizma delovanja hroma, već i saznanju o tome da li dodavanje hroma kao suplementa u ishranu teladi utiče na umanjenje stresa izazvanog metaboličkim prestrojavanjem prilikom zalučivanja teladi.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. HEMIJSKE OSOBINE HROMA

Elementarni hrom otkrio je, 1798. godine, u rudi krokoitu ( $\text{PbCrO}_4$ ) francuski hemičar i farmakolog Louis Nicolas Vauquelin (Barceloux, 1999). Hrom se proučava od kraja 19. veka, kada je otkriven kancerogeni efekat šestovalentnog hroma, kod radnika koji su radili na proizvodnji pigmenata hroma (Cohen i sar. 1993). Od tada, pa do polovine 20. veka, hrom je proučavan isključivo kao element sa potencijalnom kancerogenom aktivnošću (Teleky, 1936). Tek od 1959. godine, počinju istraživanja o pozitivnom efektu trovalentnog hroma na metabolizam ljudi i životinja (Schwarz i Mertz, 1959).

Hrom je 21. mineral po zastupljenosti na Zemlji i teoretski se može naći u svim oksidacionim stanjima od -2 do +6, ali se najčešće nalazi naelektrisan kao 0, +2, +3 i +6 (Barnhart, 1997). U većini prirodnih jedinjenja hrom se nalazi kao pozitivno trovalentan (+3), dok je iz industrijskih izvora većinom šestovalentan (+6).

Šestovalentni hrom ( $\text{Cr}^{6+}$ ) je snažan oksidans, posebno u kiseloj sredini. Vezan je sa kiseonikom kao hromat ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ) ili dihromat ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ) sa snažnim oksidativnim kapacitetom. Hrom u ovom obliku lako prolazi kroz biološke membrane reagujući sa proteinima i nukleinskim kiselinama unutar ćelije pri čemu se redukuje u  $\text{Cr}^{3+}$ . Ovim reakcijama se oštećuje genetski materijal ćelije i nastupa karcinogeneza (Pechova i Pavlata, 2007).

Trovalentni hrom ( $\text{Cr}^{3+}$ ) je najstabilnije oksidaciono stanje hroma u kome se ovaj element nalazi u živim organizmima. Hrom u ovakvoj formi nema mogućnost da lako prolazi kroz ćelijsku membranu i slabo je reaktivan, što je najznačajnija biološka razlika u poređenju sa šestovalentnim hromom (Mertz, 1992).

### 2.2. HEMIJSKE FORME HROMA

Hemijska forma hroma ima veliki uticaj na njegovu bioraspodivnost, odnosno može značajno uticati na potencijalni odgovor organizma na dodati hrom (Linderman i sar. 2008). Najčešće korišćena neorganska forma hroma u dosadašnjim istraživanjima je hrom hlorid i smatra se da su efekti hrom hlorida slabiji u poređenju sa organskim

jedinjenjima hroma (Mooney i Cromwell 1997, Laschinsky i sar. 2012). Do sada je u istraživanjima korišćen širok sprekar organskih jedinjenja hroma, a najčešće upotrebljavane forme su hrom pikolinat, hrom propionat, hrom metionin, hrom fenilalanin, hrom nikotinat, hrom organski vezan za kvasce i hrom u obliku nanočestica hrom-vezanog hitosana (Page i sar. 1993, Kegley i sar. 1996, Shelton i sar. 2003, Wang i Xu 2004, Wang i sar. 2009, Zhao i sar. 2009, Kim i sar. 2010, Hoffman i sar. 2014, Tian i sar. 2014). Hrom, organski vezan za kvasce, koji je korišćen u našem ispitivanju predstavlja jednu od formi hroma sa najvećom bioraspoloživošću i do sada je korišćen u eksperimentima na govedima (Al-Saiadya i sar. 2004). Za neke forme hroma, kao što je ranije široko korišćeni hrom pikolinat, je dokazano da osim pozitivnog uticaja na organizam mogu imati i štetne efekte. Naime, dokazano je da hrom pikolinat može uzrokovati oksidativno oštećenje DNK i peroksidaciju lipida (Hepburn i sar. 2003).

Efekat hroma može da zavisi od primenjene doze. Tako su Tian i saradnici (2014) došli do zaključka da hrom metionin u dozi od 400 µg/kg telesne mase povećava aktivnost superoksid-dismutaze u krvnom serumu i ukupni antioksidativni kapacitet, dok pri dozi od 800 µg/kg ima suprotne efekte.

Treba naglasiti da se još uvek vode polemike da li se hrom može nazvati esencijalnim mikroelementom s obzirom da nisu dokazane direktne posledice deficita hroma (Stearns 2000). Di Bona i saradnici (2011) su ispitivali uticaj ishrane sa niskim sadržajem hroma kod pacova držanih u specijalno konstruisanim "metal slobodnim" kavezima koji sprečavaju eventualno snabdevanje hromom iz spoljašnje sredine, pri čemu nisu zabeležili simptome deficita hroma. Međutim, bez obzira na izostanak simptoma deficita hroma, naučna javnost je saglasna u tome da primena hroma može imati brojne zdravstvene, nutricionističke i ekonomske pozitivne efekte (Page i sar. 1993, Lindemann i sar. 1995, Wang i Xu 2004, Lien i sar. 2005, Haldar i sar. 2006, Nielsen 2007, Wang i sar. 2007, Uyanik i sar. 2008, Wang i sar. 2013, Wang i sar. 2014)

Na osnovu iznetih podataka može se zaključiti da, prilikom tumačenja rezultata pojedinih istraživanja, treba voditi računa o formi primenjenog hroma, dozi i uzrastu životinja. Pored toga, mnogi rezultati su dobijeni u *in vitro* uslovima, u kojima se efekat može razlikovati od onog dobijenog u *in vivo* uslovima (Pechova i Pavlata, 2007, Hua i sar. 2012).



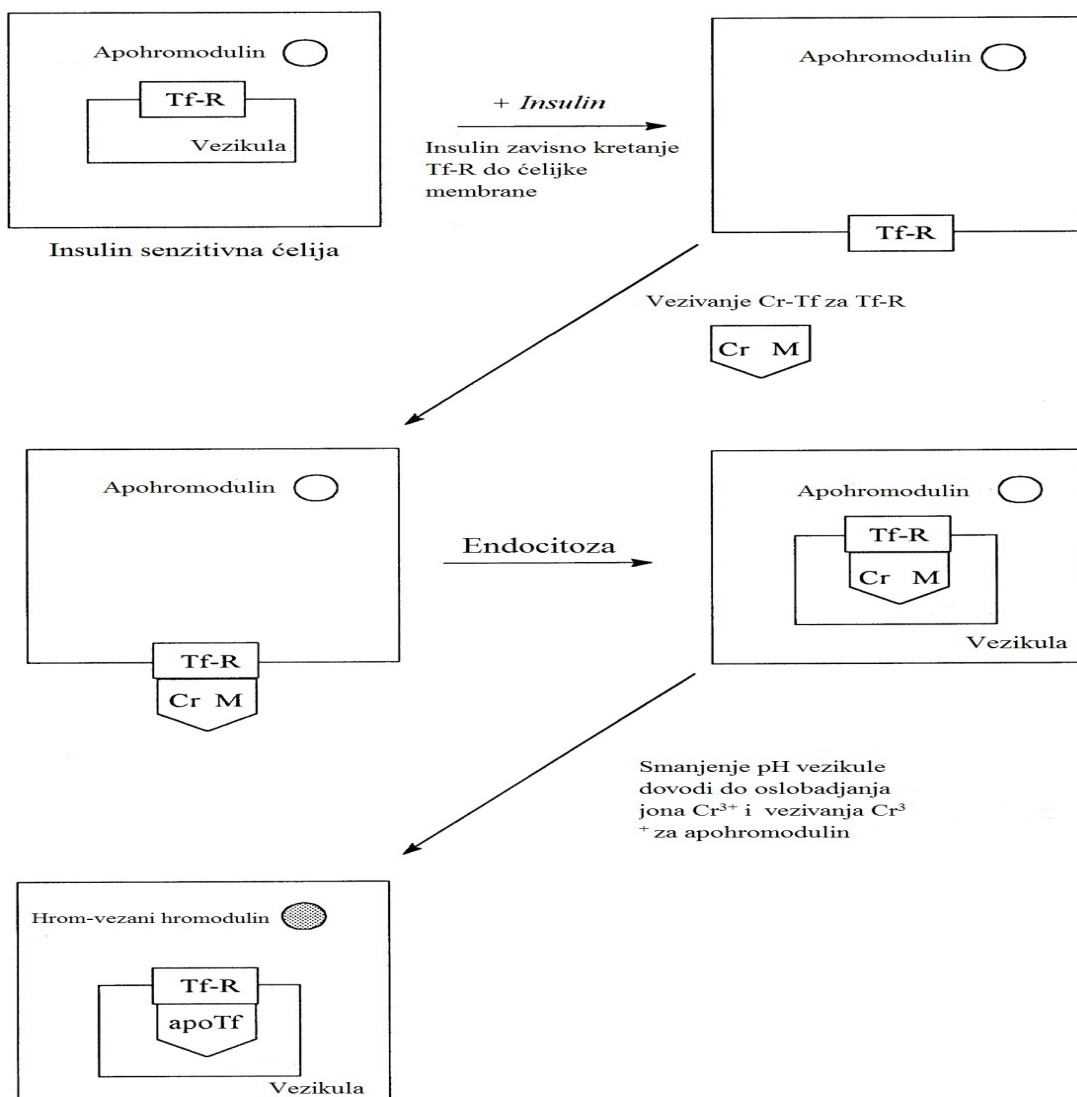
### 2.3. BIORASPOLOŽIVOST HROMA

Hrom se može uneti u organizam u organskom i neorganskom obliku. Elementarni hrom se ne resorbuje iz digestivnog sistema i nema nutritivnu vrednost (Ducros 1992). Šestovalentni hrom dospeva u organizam životinja ili ljudi najčešće putem inhalacije u toku industrijske kontaminacije. Šestovalentna jedinjenja hroma su bolje rastvorljiva od trovalentnih jedinjenja i brže se resorbuju ukoliko se nađu u crevima. Međutim, ukoliko se neko jedinjenje šestovalentnog hroma unese peroralno, veći deo hroma se redukuje u trovalentni oblik pre nego što dođe do mogućnosti da se resorbuje u tankom crevu (Mackenzie i sar. 1959).

Glavni put unošenja trovalentnog hroma u organizam je preko digestivnog sistema. Najaktivniji u resorpciji hroma kod pacova je jejunum, zatim ileum pa duodenum (Chen i sar. 1973). Mehanizam intestinalne resorpcije hroma još uvek nije u potpunosti razjašnjen, mada autori pojedinih naučnih radova ukazuju na mogućnost pasivne difuzije (Stoecker 1999a). Obim i brzina resorpcije trovalentnog hroma iz neorganskih izvora je obrnuto proporcionalna njegovoj koncentraciji u hrani. Resorpcija hroma iz neorganskih izvora je slaba i kreće se između 0,4 i 2 %, dok je iz organskih izvora preko deset puta veća (Bunker i sar. 1984, Anderson i Kozlowski, 1985, Lyons, 1994). Razlozi slabe biorasploživosti hroma su brojni i u vezi su sa slabom rastvorljivošću oksida hroma, vezivanjem hroma za prirodna helatna jedinjenja i interferencijom sa drugim mineralima (Zn, Fe) (Borel i Anderson, 1984). Resorpcija neorganskog hroma je pojačana u prisustvu aminokiselina, askorbinske kiseline, oksalata i visokog sadržaja ugljenih hidrata dok fitati i antacidi (natrijum bikarbonat i magnezijum hidroksid) redukuju resorpciju i koncentraciju hroma u krvi i tkivima (Hunt i Stoecker, 1996).

Resorbovani hrom cirkuliše u krvi vezan za  $\beta$  globulinsku frakciju proteina i transportuje se do tkiva uglavnom vezan za transferin, ukoliko se nalazi u fiziološkim koncentracijama. Receptori za transferin (Tf-R) su osetljivi na insulin i kada raste koncentracija ovog hormona u krvi, stimuliše se transport receptora za transferin iz vezikula unutar ćelije do ćelijske membrane (Kandror, 1999). Receptori na površini ćelije vezuju za sebe transferin za koji je već vezan hrom, a zatim se endocitozom ovaj kompleks unosi u ćeliju. Radom ATP pumpi smanjuje se pH u novoformiranoj vezikuli

i hrom se odvaja od transferina. Hrom se posle oslobađanja od transferina vezuje za protein apohromodulin i nastaje hrom-vezani hromodulin (Cr M) (Vincent, 2000) (Slika 2.1.). Smatra se da je hromodulin protein koji posreduje u ulozi hroma u metabolizmu, pre svega na metabolizam ugljenih hidrata.



**Slika 2.1.** *Mehanizam prenošenja hroma iz krvi u ćeliju i formiranje hromodulina (preuzeto i prilagođeno iz rada Vincent, 2000). Značenje skraćenica i proces opisani su u tekstu.*

Hrom se iz krvi relativno brzo preuzimaju kosti, a takođe se akumulira u slezini, jetri i bubrezima (Stoecker, 1999b). Metode za analizu količine hroma u organizmu su otkrivene šezdesetih godina prošlog veka i postoji relativno mali broj podataka o sadržaju hroma u različitim tkivima i telesnim tečnostima. Postoji značajna razlika između koncentracije hroma u punoj krvi i krvnom serumu: Koncentracija hroma u krvnom serumu zdravih ljudi je 0,058-0,388  $\mu\text{g/L}$  a u punoj krvi 0,120-0,673  $\mu\text{g/L}$

(Schermaier i sar. 1985). Anderson i saradnici (1985) su objavili da je bazalna koncentracija hroma u krvnom serumu odraslih ljudi  $0,13 \pm 0,02 \mu\text{g/L}$  i da značajno raste ( $0,38 \pm 0,02 \mu\text{g/L}$ ) tokom tromesečnog dodavanja hroma u hrani. Koncentracija hroma u punoj krvi je prosečno 2-3 puta veća u odnosu na koncentraciju u krvnoj plazmi (Wood i sar. 1990). Uprkos ovome, ovi autori ne preporučuju serumske koncentracije hroma kao dobar indikator statusa hroma u ishrani. Kod mlečnih krava, tokom peripartalnog perioda, koncentracija hroma u krvi se kreće u rasponu od 3-5  $\mu\text{g/L}$  i dodatak hroma ishrani u količini od 10 mg po životinji dnevno nema efekta na kretanje koncentracije hroma u krvi (Pechova i sar. 2002). Novija istraživanja ukazuju da određivanje koncentracije hroma u krvi nije dobar indikator statusa hroma u ishrani i ne može se koristiti za dijagnozu eventualnog deficita hroma u organizmu.

Ukupna količina hroma u organizmu čoveka se kreće između 0,4 i 6 mg. Relativna količina hroma u odnosu na telesnu masu je veća kod dece u odnosu na odrasle (Dubois i Belleville, 1991). Trovalentni hrom ima tendencu da se akumulira u epidermalnim tkivima (dlaka), kostima, jetri, bubrezima, slezini, plućima i debelom crevu. Akumulacija u ostalim tkivima, a posebno u mišićnom tkivu, je izuzetno mala ili ne postoji (Wallach 1985). U prilog ovome govori istraživanje u kome je prasadima težine između 30 i 60 kg dodavano 0,3 mg/kg hroma u hranu pri čemu je koncentracija hroma rasla u bubrezima (1,1 prema 2,3  $\mu\text{g/kg}$ ) i u jetri (5,9 prema 8,8  $\mu\text{g/kg}$ ), dok je koncentracija hroma u mišićima ostala ista uprkos dodatom hromu (1,5  $\mu\text{g/kg}$ ) (Anderson i sar. 1997).

Resorbovani hrom se primarno izlučuje preko bubrega putem glomerularne filtracije, međutim mali procenat se može ukloniti i kroz opalu dlaku, znoj i žuč (Durcos, 1992). Minimalna ekskrecija se odvija i putem mleka, što je dokazano u eksperimentima na mlečnim kravama (Pechova i sar. 2002). Ekskrecija hroma, posebno putem urina, se može povećati 10 do 300 puta u stresnim situacijama i kao posledica ishrane bogate ugljenim hidratima (Anderson 1997).

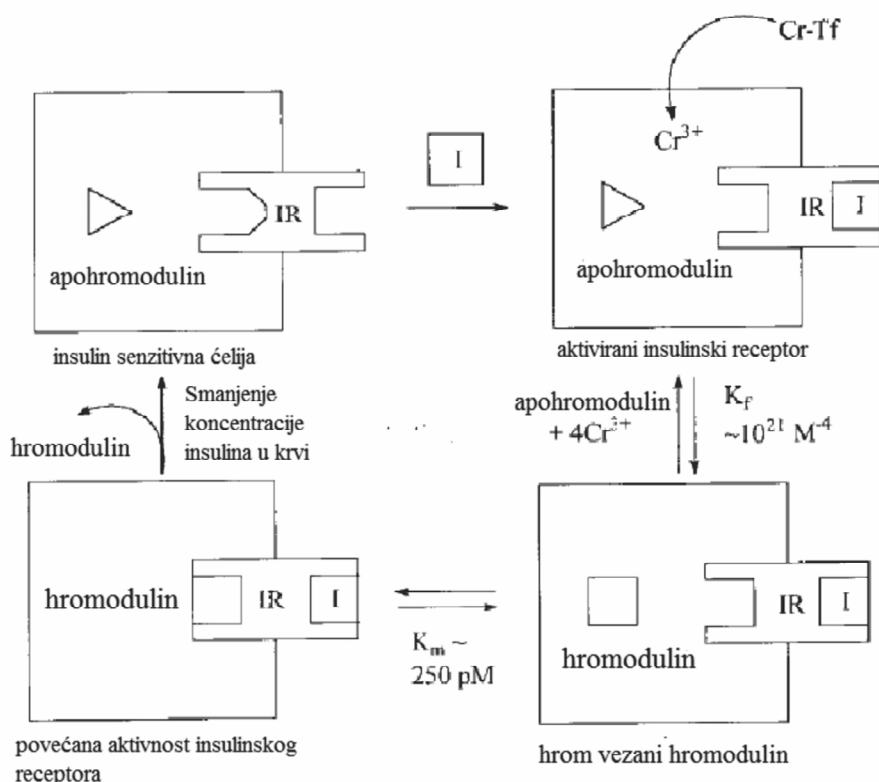
## **2.4. BIOLOŠKI ZNAČAJ HROMA**

Prvi radovi vezani za ulogu hroma kao mikroelementa u organizmu objavljeni su 1959. godine u istraživanju na pacovima (Schwarz i Mertz), a zatim 1977. godine

(Jeejebhoy i sar.) u istraživanju na ljudima. Od tada je objavljen značajan broj radova o ulogama hroma u metabolizmu ljudi, a posebno o povezanosti dejstva hroma i šećerne bolesti. Jeejebhoy i saradnici (1977) su objavili da su se kod žene, koja je hranjena isključivo parenteralno u toku 5 godina, razvili simptomi dijabetesa zajedno sa uočljivom netolerancijom na glukozu i gubitkom telesne težine. Terapija insulinom se pokazala neuspešnom i tek posle dodavanja 250  $\mu$ g hroma stanje pacijentkinje je počelo da se popravlja a dalja terapija insulinom je postala delotvorna. Kasnije studije su takođe potvrdile da se sindrom sličan dijabetes melitusu kod pacijenata značajno poboljšava nakon davanja hroma što je ukazivalo na povezanost između smanjene senzitivnosti perifernih tkiva na insulin i deficita hroma. Takođe, devedesetih godina prošlog veka pojavljuju se radovi koji govore o značaju hroma u stresnim stanjima (Anderson i sar. 1982, 1988, Rabinowitz i sar. 1983). Uticaj hroma na metabolizam ispitan je najpre kod eksperimentalnih životinja i ljudi, a zatim i kod farmških životinja, odnosno svinja, konja, goveda i živine (Amoikon i sar. 1995, Petterson, 2000, Amata, 2013).

#### ***2.4.1. UTICAJ HROMA NA METABOLIZAM UGLJENIH HIDRATA, LIPIDA I NUKLEINSKIH KISELINA***

Sve do 1987. godine, nije se znalo koji je molekul u ćeliji zadužen za metabolizam hroma, ali se pretpostavljalo da on postoji. Yamamoto i saradnici (1987) su prvi izolovali specifičan molekul i nazvali ga ologopeptid male molekulske mase koji vezuje hrom (low-molecular weight chromium-binding substance-LMWC<sub>Cr</sub>). Tačnu strukturu i funkciju ovog molekula opisao je Vincent tek, 2000. godine. Ovaj oligopeptid ima molekulsku masu od 1500 Da, a u njegov sastav ulaze samo četiri različite aminokiseline: glicin, cistein, glutamat i aspartat. Uprkos maloj molekulskoj masi on je sposoban da veže četiri jona hroma. U ćeliji, ukoliko za ovaj oligopeptid nije vezan hrom takva forma se naziva apohromodulin, a po vezivanju hroma nastaje hrom-vezani hromodulin ili holohromodulin. Apohromodulin nema ulogu u ćelijskom metabolizmu i tek po vezivanju hroma prelazi u aktivnu formu odnosno holohromodulin, koji se vezuje za insulinske receptore i učestvuje u metabolizmu. Uloga hromodulina u ćelijskom metabolizmu na način koji je opisao Vinsent (2000), prikazana je na slici 2.2.



**Slika 2.2.** Vezivanje hroma za apohromodulin, nastanak holohromodulina i njegovo vezivanje za insulinski receptor (preuzeto i prilagođeno iz rada Vincent, 2000). Značenje skraćenica i detaljno objašnjenje procesa dati su u tekstu.

Ukoliko se ima u vidu da je insulin jedan od ključnih hormona koji regulišu metabolizam ugljenih hidrata i homeostazu uopšte (Straus 1984, Swenson i sar. 1993), onda se može zaključiti da delovanje hroma na njegove funkcije ima veliki značaj. Još uvek su nepoznati tačni mehanizmi dejstva hroma na metabolizam insulina ali postoje dokazi da on deluje na povećanje broja receptora koji su dostupni insulinu, afinitet receptora prema hormonu i modulaciju signala u ćeliji (Anderson i sar. 1997, Hua i sar. 2012). Konačni efekat uticaja hroma na insulinski signalni put se ispoljava kroz efikasniju potrošnju glukoze, odnosno smanjenje insulinske rezistencije, što je dokazano u eksperimentima na pacovima (Kim i sar. 2004), ljudima (Anderson 2000, Tuzcu i sar. 2004), svinjama (Wenk i sar. 1995), konjima (Ott i Kivipelto 1999) i govedima (Subiyatno i sar. 1996). U *in vivo* eksperimentima, prilikom izvođenja testa tolerancije glukoze, ovaj efekat hroma se ogleda u bržoj eliminaciji glukoze iz krvi odnosno povećanju efikasnosti insulina u ciljnim ćelijama (Subiyatno i sar. 1996).

U pojedinim istraživanjima je takođe dokazano da hrom može imati ulogu u metabolizmu lipida (Abraham i sar. 1982a, 1982b). Delovanje hroma na metabolizam lipida kod pacova i kunića se pre svega ogleda u smanjivanju serumske koncentracije ukupnog holesterola i njegovog udela u ćelijskoj membrani i smanjivanju koncentracije triglicerida (Lefavi i sar. 1993). Takođe, hrom dovodi do smanjenja koncentracije LDL frakcije holesterola i povećanja HDL frakcije. Smatra se da izmenjena konformacija ćelijske membrane u smislu smanjenja koncentracije holesterola može da utiče na povećanje zastupljenosti GLUT (*glucose transporter*) molekula i dovede do povećanog unosa glukoze u ćeliju, pa je i ovo jedan od mogućih mehanizama uticaja hroma na metabolizam (Chen i sar. 2006). Treba imati u vidu da se u ispitivanjima na ljudima, kada je posmatrano dejstvo hroma na smanjenje serumske koncentracije holesterola, dolazilo do različitih i često kontradiktornih nalaza što se pripisuje individualnim varijacijama (Anderson i sar. 1983, Rabinowitz i sar. 1983, Offenbacher i sar. 1985, Potter i sar. 1985, Uusitupa i sar. 1992). U istraživanju McNamara i Valdez (2005), kada je praćen uticaj hrom propionata na lipogenezu i lipolizu u masnom tkivu kod mlečnih krava, zaključeno je da hrom povećava sintezu, a smanjuje razgradnju lipida u masnom tkivu. Ovo se može objasniti uticajem hroma na insulinske receptore, povećanjem ulaska glukoze u adipocite i preusmeravanjem unete glukoze ka sintezi masti.

Postoje indicije da trovalentni hrom utiče i na ekspresiju genetske informacije kod životinja. Vezivanje hroma za nukleinske kiseline je jače u poređenju sa ostalim jonima metala (Okada i sar. 1982). Hrom štiti RNK od toplotne denaturacije. Takođe treba pomenuti da se hrom koncentriše u ćelijskom jedru. Hrom, u *in vitro* uslovima, povećava sintezu RNK u ćelijama miša što potvrđuje tezu da ima efekat na gensku funkciju (Okada i sar. 1983). Smatra se da hrom učestvuje u genskoj ekspresiji vezivanjem za hromatin, uzrokujući inicijaciju na određenim genskim lokusima. O tačnim mehanizmima delovanja hroma na genetski materijal se još uvek ne zna dovoljno (Okada et al., 1989).

#### **2.4.2. BIOLOŠKI ZNAČAJ HROMA KOD TELADI**

Prva istraživanja vezana za hrom kod teladi datiraju iz sredine devedesetih godina prošlog veka. Hrom kod teladi pojačava odgovor perifernog tkiva na insulin, a efekat zavisi od jedinjenja hroma koje je korišćeno u istraživanjima (Bunting i sar. 1994, Kegley i sar. 1996, Spears i sar. 2010). Osim nesumnjivog efekta na metabolizam insulina, pojedina istraživanja kod teladi dokazuju i uticaj hroma na promenu serumskih koncentracija kortizola i trijodtironina (Yari i sar. 2010, Kumar i sar. 2013).

Efekat hroma kod teladi posebno je izučavan pri različitim stresnim stanjima kao što su transportni i temperaturni stres. U eksperimentima sa teladima u kojima se ispitivan uticaj hroma u uslovima toplotnog stresa, utvrđeno je da hrom smanjuje broj udisaja u minuti (Yari i sar. 2010). Dodatno, hrom “prestrojava” metabolizam na način da se energija dobija uglavnom sagorevanjem ugljenih hidrata a ne masti. S obzirom na poznatu činjenicu da se sagorevanjem masti oslobađa veća količina toplotne energije u odnosu na ugljene hidrate, ovakvo “prestrojavanje” metabolizma pod uticajem hroma može biti jedan od mehanizama koji pomaže u ublažavanju efekata toplotnog stresa. Za razliku od utvrđenog uticaja hroma na telad izloženu toplotnom stresu, nisu uočeni efekti hroma pri izloženosti teladi izrazito niskim temperaturama (Kumar i sar. 2013).

Smatra se da hrom ima uticaj kako na ćelijski tako i na humoralni imunski odgovor kod teladi ali tačan mehanizam dejstva još uvek nije poznat (Kegley i sar. 1996). Pretpostavlja se da imunska funkcija može biti izmenjena pod uticajem hroma, delovanjem na aktivnost insulina i/ili kortizola ali i posredstvom određenih citokina, što je nedavno dokazano kod krava (Zhang i sar. 2014). U eksperimentima je dokazano da hrom pojačava ćelijski imunski odgovor kod teladi što se, pored ostalog, ogleda u izraženijoj reakciji na intradermalnu aplikaciju fitohemaglutinina (Uyanik i sar. 2008). Prema rezultatima većeg broja istraživača, kod vakcinisane teladi, je utvrđeno da hrom dodatno povećava titar antitela za određene antigene kao što su antigeni bovine virusne dijareje, dok u isto vreme nema uticaja na povećanje titra antitela za druge antigene kao za antigene infektivnog bovinog rinotraheitisa i parainfluence 3. Na osnovu ovoga se može zaključiti da je uticaj hroma antigenski specifičan, a mehanizam dejstva još uvek nije razjašnjen (Chang i sar. 1996).

U ogledima u kojima je ispitivan uticaj hroma na prirast teladi, dobijeni su kontradiktorni podaci, ali u većini studija oni ne ukazuju na povećan prirast pri dodatku hroma (Uyanik i sar. 2008, Yari i sar. 2010, Ghorbani i sar. 2012). Međutim, s obzirom na izražen uticaj hroma na insulinsku osovinu, odnosno na efekat bolje utilizacije glukoze u perifernim tkivima, može se pretpostaviti da hrom stimuliše metaboličke procese koji dovode do povećanog prirasta teladi, ali verovatno u slučajevima istovremenog povećanja energetske vrednosti ponuđenog hraniva (Jovanović i sar. 2017). Nedavna istraživanja na ovarijektomisanim kravama kojima je dodavan hrom u hranu uz istovremeno povećanje energetske vrednosti hraniva takođe sugerišu takvu mogućnost (Leiva i sar. 2014). Iako je dokazano da hrom utiče na insulinsku osovinu i metabolizam teladi, efekti hroma na molekulskom, odnosno ćelijskom nivou do sada nisu ispitivani, za razliku od drugih životinja i ljudi (Wang i sar. 2005, Wang i sar. 2006, Dong i sar. 2008, Sreejayan i sar. 2008).

## **2.5. INTERAKCIJA HROMA SA HORMONALNIM STATUSOM**

### **JEDINKE**

Hrom je hemijski element koji, nakon unošenja u organizam, interaguje, pre svega sa insulinskom osovinom, ali pretpostavlja se i sa hormonima koju učestvuju u rastu jedinke. Interakcija sa insulinskom osovinom se prevashodno odigrava na nivou signalnog puta insulina, mada samo mesto interakcije kod velikog broja vrsta životinja još uvek nije utvrđeno.

#### **2.5.1. INTERAKCIJA HROMA SA SIGNALNIM PUTEM INSULINA**

Uzimajući u obzir uticaj hroma na insulinsku osovinu, značajno je poznavanje unutarćelijskog signalnog puta insulina. Insulin je jedan od najznačajnijih anaboličkih hormona u organizmu. On učestvuje u kontroli metabolizma ugljenih hidrata, masti i proteina (Salteit i Kahn 2001), a biološki efekti insulina se dele na brze, umereno brze i spore. Uticaj insulina na homeostazu ugljenih hidrata odnosno glukoze je jedan od vitalno značajnih procesa za funkcionisanje organizma i ćelija (Meng i sar. 2013). Insulin se izlučuje iz  $\beta$ -ćelija pankreasa kao odgovor na porast koncentracije glukoze u krvi i dovodi do unosa glukoze u insulin zavisne ćelije. U skeletnim mišićima se odvija 80% insulin zavisnog metabolizma glukoze (Konner i Bruning 2012, Yang i sar. 2016)



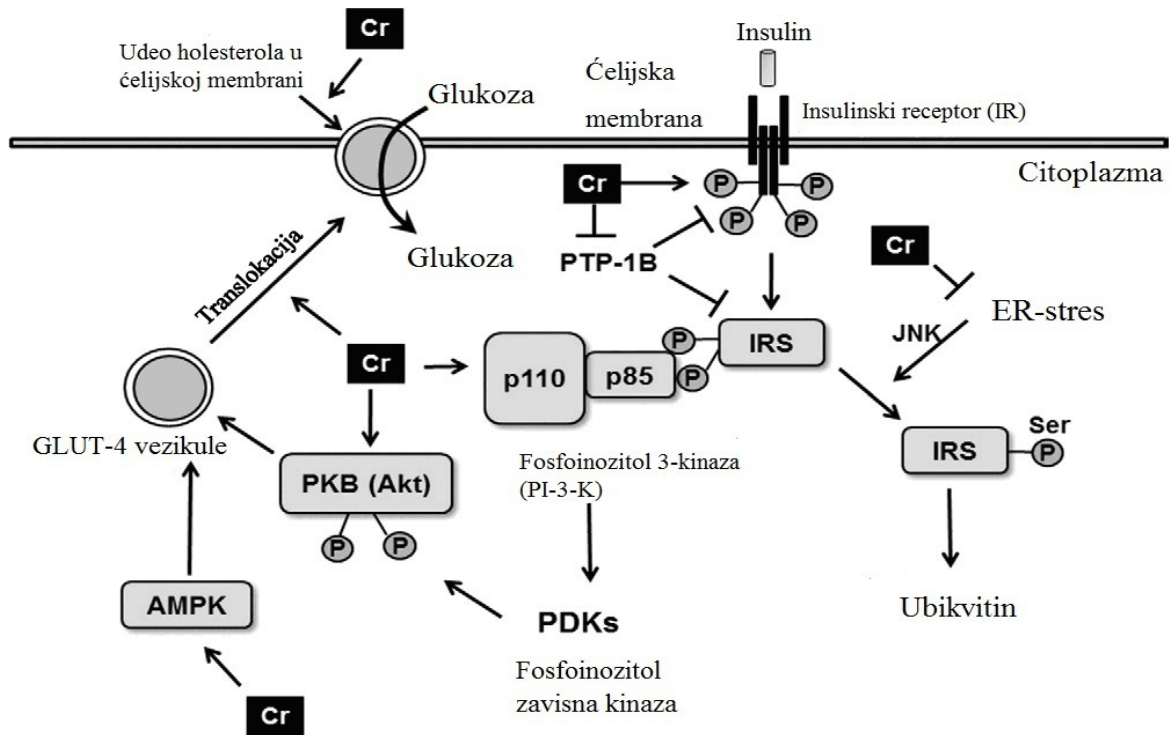
Ulazak glukoze u mišićne ćelije je glavni faktor koji ograničava brzinu iskorišćavanja glukoze u njima (Cline i sar. 1999).

Prvi korak neophodan za dejstvo insulina u ćeliji je njegovo vezivanje za insulinski receptor na ćelijskoj membrani koji se sastoji iz dve subjedinice:  $\alpha$  i  $\beta$ . Različita tkiva poseduju različit broj dostupnih receptora za insulin koji su klasifikovani u dve različite vrste: receptore sa visokim afinitetom i receptore sa niskim afinitetom prema insulinu. Broj i afinitet insulinskih receptora se razlikuju kod različitih tkiva i u različitim uslovima (ishrana, starost, temperatura, bolest). Posle vezivanja insulina za ekstraćelijsku subjedinicu receptora, signal se prenosi u unutrašnjost ciljne ćelije. Prvi korak je aktivacija tirozin kinaznog domena insulinskog receptora i autofosforilacija  $\beta$  subjedinice receptora. Kada se aktivira insulinski receptor, dolazi do katalitičke fosforilacije tirozinskih rezidua na proteinima supstrata insulinskog receptora (IRS proteini 1-2). Ovi proteini su odgovorni za dalje prenošenje signala u ćeliju. Postoje dva osnovna načina za modulaciju uloge IRS proteina u zavisnosti od mesta na kome se izvrši fosforilacija. Generalno, fosforilacija na tirozinu (npr. tirozinu 632) ima aktivirajuće dejstvo na prenos signala. Suprotno ovome, fosforilacija na serinu (npr. serinu 307) suprimira dalji prenos signala. Pored ostalog, mogućnost ovakve modulacije signala na IRS proteinima čini regulaciju prenošenja insulinskog signala dosta kompleksnom (Agurie i sar. 2002). Dalji prenos signala odvija se preko fosforilacije protein kinaze B (Akt) na treoninu 308 i serinu 473, kroz učesće fosfoinozitol 3-kinaze i  $PI_3$ -zavisne kinaze. Aktivirana protein kinaza B dalje fosforiliše nishodne efektore kao što je Rab GTP aktivirajući protein, što u krajnjem koraku dovodi do translokacije GLUT-4 molekula iz vezikula u ćeliji na ćelijsku membranu čime se omogućava ulazak glukoze u ćeliju (Myers i White 1993).

Osim putem insulina, do translokacije GLUT-4 molekula može se doći i drugim, alternativnim, mehanizmima. Najznačajniji alternativni put je preko AMP zavisne kinaze (AMPK). Ovaj heterotrimerni kompleks sastoji se iz jedne katalitičke subjedinice (AMPK  $\alpha$ ) i dve regulatorne subjedinice (AMPK  $\beta$  i AMPK  $\gamma$ ). AMPK predstavlja ćelijski „energetski senzor“ i učestvuje u regulaciji ulaska glukoze u ćeliju (Winder i Hardie 1999). Pored energetskog metabolizma koji utiče na regulaciju AMPK u fiziološkim uslovima, smatra se da regulacija AMPK može biti pod uticajem nekih

hroničnih bolesti, kao što su gojaznost, inflamacija, dijabetes i kancerogena oboljenja (Jeon, 2016).

U istraživanjima, koja su uglavnom izvođena u *in vitro* uslovima, je dokazano da hrom može uticati na više molekula u signalnom putu insulina. Moguća mesta delovanja hroma u signalnom putu insulina prikazana su na slici 2.3. (Hua i sar. 2012).



**Slika 2.3.** *Moguća mesta delovanja hroma na signalni put insulina (preuzeto i prilagođeno iz rada Hua i sar. 2012). Značenje skraćenica i detaljno objašnjenje mogućih mesta delovanja dati su u tekstu.*

### 2.5.1. INTERACIJA HROMA SA IGF SISTEMOM

Kontrola rasta, mitoze, razvoja i diferencijacije ćelija, kao i oporavka tkiva, se odvija pod uticajem sistema faktora rasta sličnih insulinu (IGF - *insulin-like growth factors*), (Salmon i sar. 1957, Zapf i sar., 1978, Poffenbarger i Haberal 1976, Schlupf i sar. 1976, Clemmons i sar. 1981). Ovaj sistem predstavlja celinu koju čine dva peptidna hormona (IGF-I i IGF-II), šest vezujućih proteina (IGFBP-1 do IGFBP-6), receptori (IGF-IR, IGF-IIR, insulinski, IR i hibridni receptor, IR/IGF-IR) i specifične proteaze (Monzavi, 2002).

Za razliku od većine drugih faktora rasta koji deluju samo na određenu vrstu ćelija, IGF-I je značajan za rast organizma u celini. On je, prema “somatomedin hipotezi”, glavni medijator delovanja hormona rasta (Roith i sar. 2001). Pod uticajem

hormona rasta mnoga tkiva sintetišu IGF molekule, a njihov transport, čuvanje i usmeravanje obavljaju IGFBP. U cirkulaciji se nalaze IGF peptidi pretežno poreklom iz jetre, u binarnim i tercijarnim kompleksima sa IGFBP, a u slobodnoj formi je veoma mali deo (oko 1%). Uloga IGF molekula se ostvaruje vezivanjem za receptore na površini ćelija, koji zatim pokreću ćelijske signalne procese. U slobodnoj formi IGF-I i IGF-II su fiziološki aktivni. Dostupnost receptorima, preko kojih ispoljavaju svoje efekte, regulisana je na tri nivoa: koncentracijom određenog IGFBP, mogućnošću prelaska IGFBP kroz određene fiziološke barijere i afinitetom IGFBP (LeRoith 2003, Duan Xu, 2005).

Afinitet IGF vezujućih proteina prema IGF zavisi od primarne strukture IGFBP i post-translacionih modifikacija. Oslobođanje IGF iz kompleksa sa IGFBP događa se kad afinitet IGFBP postane manji od afiniteta receptora za IGF. Ove promene obezbeđuju, u fiziološkim uslovima, proteoliza i druge post-translacione modifikacije IGFBP.

Glavni vezujući protein IGF sistema i glavni nosilac IGF-I/-II molekula u cirkulaciji je IGFBP-3. Zajedno sa IGF ligandom i podjedinicom nestabilnom u kiselini („acid-labile subunit“, ALS) on stvara tercijarne komplekse mase oko 150 kDa. U ovoj vrsti kompleksa se nalazi 70-75% ukupnih IGF-I/-II, što IGFBP-3 čini glavnim regulatorom dejstva IGF. Tercijarni kompleksi su depoi IGF, a kako oni ne mogu izaći van krvnih sudova produžavaju poluživot liganda, štiteći ga od proteaza i transportuju IGF po organizmu. Dokazano je da IGFBP-3 može da interaguje sa pojedinim sastojcima vanćelijskog matriksa (ECM - *extracellular matrix*), omogućavajući usmeravanje i koncentrovanje faktora rasta na mestima povrede ili remodelovanja tkiva. Kako je afinitet IGFBP-3 prema IGF oko sto puta veći od afiniteta receptora, njegova sposobnost „hvatanja“ slobodnih IGF sprečava spontano vezivanje IGF za receptore, što je posebno važno u situacijama kada treba ograničiti aktivnost IGF. Prema tome, IGFBP-3 je glavni inhibitor dejstva IGF kod različitih tumora (Rajaram i sar. 1997, Miljuš, 2015).

Poznato je da povećana koncentracija insulina u krvi stimuliše vezivanje IGF-I za ciljne ćelije (pre svega, adipocite) i time izaziva njihovu hipertrofiju (Oppenheimer i sar. 1983). U istraživanju Daughaday i saradnika (1976) ispitivan je uticaj čistog insulina i smeše insulina sa hormonom rasta na oslobođanje IGF-I iz jetre pacova u *in*

*in vitro* uslovima. Dodavanje insulina izazvalo je značajno povećanje sinteze IGF-I, ali u slučaju kada je insulin dodavan u koncentracijama koje su bile višestruko veće od fizioloških. Međutim, kada je medijumu dodata fiziološka doza insulina zajedno sa hormonom rasta u koncentraciji koja nije bila veća od fiziološke, došlo je do povećanja sinteze IGF-I. Iz ovoga su zaključili da insulin ima uticaj na oslobađanje IGF-I, ali samo kada je prisutan u koncentracijama višim od fizioloških. U fiziološkoj koncentraciji insulin utiče na sintezu IGF-I ali samo u sadejstvu sa hormonom rasta.

Kasnija istraživanja (Baxter i sar. 1980) dokazala su da insulin utiče na koncentraciju IGF-I u cirkulaciji tako što menja afinitet receptora za hormon rasta u hepatocitima pacova. Međutim, Johnson i sar. (1989) su dokazali da insulin stimuliše sintezu IGF-I čak i u odsustvu hormona rasta. Insulin takođe pojačava stimulatorni efekat hormona rasta i aminokiselina na sintezu IGF-I (Houston i sar. 1991).

Osim direktnog uticaja na koncentraciju i efekte IGF-I, insulin može uticati i na pojedine IGF vezujuće proteine. Tako, na primer, koncentracija IGFBP-1 u krvi, u velikoj meri, zavisi od koncentracije insulina (Murphy, 1998). Kada je insulinemija niska (na primer prilikom gladovanja životinje) sinteza IGFBP-1 je povećana (Collet-Solberg i sar. 1996, Fottner i sar. 1999, Lewitt i sar. 1992). Smatra se da sintetisani IGFBP-1 vezuje IGF molekul u cirkulaciji i produžava mu poluživot uz istovremeno smanjenje koncentracije slobodnog, fiziološki aktivnog IGF-I koji bi izazvao hipoglikemiju.

Sa druge strane hiperinsulinemija izaziva smanjenu sintezu IGFBP-1 u hepatocitima i ubrzava transport ovog vezujućeg proteina iz krvi u međucelijski prostor (Bar i sar. 1990). Zbog toga, pad koncentracije IGFBP-1, izazvan povećanom koncentracijom insulina, nastupa izuzetno brzo. Današnja saznanja o dinamici promene koncentracije IGFBP-1 u krvi pod uticajem insulina idu u prilog pretpostavci da insulin pre svega utiče na distribuciju a ne na sintezu ovog vezujućeg proteina (Holly, 1991, Kirovski, 2005).

U kontroli rasta i razvoja teladi IGF sistem i pravilna regulacija ovog sistema imaju značajnu ulogu. Koncentracija IGF-I u plazmi teladi može se koristiti kao dobar indikator nutritivnog i zdravstvenog statusa jединke. Ono što, pored ostalog, izdvaja IGF-I kao indikator nutritivnog i zdravstvenog statusa jeste što ima relativno stabilnu koncentraciju u plazmi, odnosno ne menja se u odnosu na obrok i ona je konstantna u

toku dana. U istraživanju Brickell i saradnika, (2009) koje je rađeno na 19 farmi u Engleskoj, a uključivalo je 1079 teladi došlo se do zaključka da telad sa nižom koncentracijom IGF-I i manjom telesnom masom prvog meseca života ima povećan rizik od smrtnosti između 1. i 6. meseca života. Prosečna telesna masa teladi u uzrastu od mesec dana koja su preživela do 6. meseca bila je  $54 \pm 0,6$  kg a koncentracija IGF-I  $43 \pm 1,4$  ng/mL u poređenju sa telesnom masom od  $43 \pm 3$  kg i koncentracijom IGF-I od  $20 \pm 6,2$  ng/mL kod teladi koja su uginula između 1. i 6. meseca starosti. Ovi autori su na osnovu telesne mase podelili telad u dve grupe: telad sa nižom telesnom masom ( $<60$  kg) i telad sa višom telesnom masom ( $>60$  kg) i utvrdili stepen smrtnosti kod obe grupe i koncentraciju IGF-I. Kod teladi iz grupe sa nižom telesnom masom povećana koncentracija IGF-I je smanjivala rizik od smrtnosti. Osnovni uzrok uginuća na farmama u ovom istraživanju su bile infektivne bolesti. Odgovarajući odgovor imunskog sistema predstavlja značajan bioenergetski izazov za organizam, (Fox i sar. 2005) pa se može zaključiti da životinje sa adekvatnim unosom energije i posledično većom koncentracijom IGF- I mogu da ostvare bolji imunski odgovor. Suprotno tome životinje male telesne mase sa nižom koncentracijom IGF-I, odnosno nedovoljnim unosom energije, su podložnije infekcijama i povećanom riziku od uginuća.

Osim istraživanja u kojima je ispitivan uticaj hroma na koncentraciju hormona rasta i IGF-I, nije ispitivano dejstvo hroma na druge komponente IGF sistema (Subiyatno i sar. 1996, Sadri i sar. 2012). S obzirom na usku metaboličku povezanost insulinske osovine i IGF sistema pretpostavljeno je da hrom može imati efekta na više komponenti u okviru IGF sistema (Tian i sar. 2014).

Na osnovu iznesenog može se zaključiti da postoji nedostatak literaturnih podataka o mestu interakcije hroma sa metaboličkim putevima insulina i IGF-I. Molekularna ispitivanja na nivou mišićnog tkiva teladi kojima je peroralno aplikovan hrom doprinela bi, ne samo tumačenju mehanizma delovanja hroma, već i saznanju o tome da li dodavanje hroma kao suplementa u ishranu teladi može da utiče na smanjenje stresa izazvanog metaboličkim „prestrojavanjem“ prilikom zalučivanja teladi.

### 3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Osnovni cilj ove disertacije je bio da se ispita uticaj peroralne aplikacije hroma (organski trovalentni hrom vezan za kvasac) na insulinsku osovinu i IGF sistem kod teladi uzrasta od mesec dana do četiri meseca. Ovaj uzrast je odabran jer je to period kada telad prelaze sa mlečne ishrane na ishranu kabastim i koncentrovanim hranivima, svojstvenu odraslim preživarima, to je period metaboličkog “prestrojavanja” kod teladi.

Radi postizanja postavljenog cilja postavljani su sledeći istraživački zadaci:

1. Izvesti biopsiju mišićnog tkiva, dva puta u toku trajanja oglada 0. i 70. dana, kod kontrolne grupe teladi i grupe kojoj je peroralno aplikovan hrom.
2. U bioptatima mišićnog tkiva odrediti zastupljenost proteina signalnog puta insulina i to: insulinskog receptora ( $IR\beta$ ), supstrata insulinskog receptora fosforilisanog na tirozinu 632 (pIRS-1 Tyr<sup>632</sup>), supstrata insulinskog receptora fosforilisanog na serinu 307 (pIRS-1 Ser<sup>307</sup>), protein kinaze B (Akt) fosforilisane na serinu 473 (pAkt Ser<sup>473</sup>), transportnog molekula za glukozu (GLUT4) i AMP- zavisne protein kinaze (AMPK).
3. Izvesti intravenske testove opterećenja glukozom (IVGTT) četiri puta u toku trajanja oglada i to 0., 30., 50. i 70 dana oglada u kontrolnoj grupi teladi i grupi kojoj je peroralno aplikovan hrom.
4. Na osnovu dobijenih rezultata sa IVGTT, proceniti insulinski odgovor i perifernu utilizaciju glukoze kod kontrolne grupe teladi i grupe kojoj je peroralno aplikovan hrom.
5. Odrediti koncentraciju glukoze i insulina u uzorcima krvnog seruma teladi uzetim u intervalima od 10 dana počevši od uzrasta od mesec dana do četiri meseca, kod kontrolne grupe teladi i grupe kojoj je peroralno aplikovan hrom.
6. Odrediti koncentraciju IGF-I i pojedinih IGF vezujućih proteina (IGFBP 1,2,3,4) u uzorcima krvnog seruma teladi 0., 10., 50. i 70 dana

ogleda, počevši od uzrasta od mesec dana do četiri meseca, kod kontrolne grupe teladi i grupe kojoj je peroralno aplikovan hrom.

7. Odrediti koncentraciju odabranih biohemijskih i hormonskih parametara krvi: NEFA, BHBA, holesterola, triglicerida, ukupnih proteina, albumina, globulina i kortizola u uzorcima krvnog seruma teladi u intervalima od 10 dana počevši od uzrasta od mesec dana do četiri meseca, kod kontrolne grupe teladi i grupe kojoj je peroralno aplikovan hrom.

8. Odrediti telesnu masu teladi u intervalima od 10 dana počevši od uzrasta od mesec dana do četiri meseca, kod kontrolne grupe teladi i grupe kojoj je peroralno aplikovan hrom.

## 4. MATERIJAL I METODE RADA

### 4.1. OGLEDNE ŽIVOTINJE

Eksperimentalni deo oglada izveden je na dvadeset i četiri teleta (15 ženskih i 9 muških), holštajn-frizijske rase, oteljenih i uzgajanih na farmi "13 maj", Zemun, Beograd. Na početku oglada telad je bila uzrasta od mesec ( $32 \pm 3$ ) dana, a njihova prosečna telesna masa je bila  $57 \pm 7$  kg. Sva telad, uključena u ogled, bila su oteljena u periodu od 9. marta do 16. marta 2013. godine. Telad je neposredno nakon teljenja, prebacivana u pojedinačne boksove do 7. dana života nakon čega su odvajana u grupni boks od po 12 teladi u kojima su ostajala do uzrasta od 4 meseca. Telad su napajana mlekom dva puta dnevno u količini od 2 litra do uzrasta od mesec i po dana, a zatim jednom dnevno do zalučenja u uzrastu od 3 meseca. Sa prihranom teladi se počinjalo sedmog dana i to senom lucerke i krmnom smešom po volji. Sastav krmne smeše Pre-calfy (Patent Co) koji je konzumirala telad u ogledu prikazan je u tabeli 4.1.

Na početku oglada telad su podeljena u dve grupe: telad kontrolne grupe (NCr, n=12) koja su dobijala standardan obrok i telad ogledne grupe (PoCr, n=12) koja je, pored standardnog obroka, svakodnevno peroralno dobijala hrom organski vezan za kvasce (Co-Factor III Cr Yeast, Alltech, 0.1 % Cr<sup>+3</sup>). Hrom (0,04 mg po kg TM), rastvoren u 50 mL mleka, je aplikovan pomoću brizgalice izazivanjem refleksa sisanja. Aplikacija je vršena tokom celog perioda trajanja oglada od 70 dana. Doza hroma od 0,04 mg po kg TM koja je upotrebljavana u ogledu utvrđena je na osnovu literaturnih podataka, jer je potvrđeno da ta doza ima određeni uticaj na biološke performanse teladi (Yari i sar. 2010). Doza hroma je prilagođavana svakom teletu nakon merenja telesne mase koje je vršeno u intervalu od 10 dana. Teladi kontrolne grupe je u istom periodu peroralno aplikovano mleko bez dodatka hroma, u istoj količini kao i oglednoj grupi. U uzrastu od 2 meseca, odnosno 30. dana oglada, telad su vakcinisana u okviru redovnog protokola vakcinacije koji se izvodi na farmi, polivalentnom vakcinom protiv infektivnog bovinog rinotraheitisa, bovine virusne dijareje, parainfluenca 3 virusa i bovinog respiratornog sincicijalnog virusa (Cattle master 4, Pfizer, New York, USA). Revakcinacija je izvršena 21 dan od prve vakcinacije.



**Tabela 4.1. Sastav krmne smeše za telad u ogledu**

<b>Hemijski sastav</b>	
Proteini % najmanje	18,00
Vlaga % najviše	13,00
Celuloza % najviše	8,00
Pepeo % najviše	8,00
Kalcijum %	0,60-0,80
Fosfor %	0,40-0,60
Natrijum %	0,20-0,30
Masti % najmanje	5,00
<b>1 kg sadrži najmanje</b>	
Vitamin A	10,000 ij
Vitamin D-3	1,500 ij
Vitamin E	20 mg
Vitamin B-1	1 mg
Vitamin B-2	2 mg
Vitamin B-12	0,01 mg
Nikotinska kiselina	15 mg
Pantotenska kiselina	10 mg
Biotin	0,10 mg
Holin hlorid	100 mg
Bakar	5 mg
Gvožđe	30 mg
Cink	50 mg
Mangan	20 mg
Jod	0,6 mg
Kobalt	0,1 mg
Selen	0,1 mg
Antioksidans (BHT)	100 mg

## **4.2. MERENJE TELESNE MASE TELADI**

Telesna masa teladi obe grupe merena je u intervalima od 10 dana odnosno 0., 10., 20., 30., 40., 50., 60. i 70. dana, sa tačnošću od 0,1 kg. Izmerena telesna masa je korišćena kao osnov za prilagođavanje doze aplikovanog hroma teladi PoCr grupe.

## **4.3. UZIMANJE UZORAKA TKIVA I KRVI**

Tokom oglada uzimani su uzorci mišićnog tkiva 0. i 70. dana, kao i uzorci krvi u intervalima od 10 dana odnosno 0., 10., 20., 30., 40., 50., 60. i 70. dana.

### **4.3.1. UZIMANJE UZORAKA MIŠIĆNOG TKIVA**

Uzorci mišićnog tkiva NCr i PoCr grupe su uzeti perkutanom biopsijom po metodi koju su opisali Al-Trad i saradnici (2009). Biopsija mišićnog tkiva (*m. semitendinosus*) je izvršena dva puta u toku trajanja oglada, odnosno 0. i 70 dana. Pojedinačni bioptati su bili približne težine od 4 g. Biopsija je izvođena pod aseptičnim uslovima, nakon potkožne i intramuskularne primene lokalne infiltrativne anestezije, aplikacijom 5 mL 2% rastvora prokain-hidrohlorida (Lidocaine inj. 2% BP; Rotexmedica, Nemačka) po životinji. Mesta biopsije mišića su odmah zašivena korišćenjem pojedinačnog čvorastog šava (Surgicryl 2, Polyglycolic acid-PGA, Belgija) i zatim tretirana antibiotskim sprejom u cilju sprečavanja infekcije.

Nakon uzorkovanja tkiva, sa dobijenih uzorka mišićnog tkiva je uklonjen višak vezivnog tkiva i potom je tkivo isprano u hladnom fiziološkom rastvoru kako bi se smanjila kontaminacija uzorka krvlju. Po uzimanju uzoraka mišićnog tkiva, oni su obeleženi i duboko zamrznuti u tečnom azotu, a zatim čuvani na  $-80^{\circ}\text{C}$  do izvođenja analiza. Analize su obuhvatale određivanje zastupljenosti proteina uključenih u signalni put insulina: insulinskog receptora ( $\text{IR}\beta$ ), supstrata insulinskog receptora fosforilisanog na tirozinu 632 (pIRS-1 Tyr<sup>632</sup>), supstrata insulinskog receptora fosforilisanog na serinu 307 (pIRS-1 Ser<sup>307</sup>), protein kinaze B (Akt) fosforilisane na serinu 473 (pAkt Ser<sup>473</sup>), transportnog molekula za glukozu (GLUT4) i AMP- zavisne protein kinaze (AMPK).

### **4.3.2. UZIMANJE UZORAKA KRVI**

Uzorci krvi su uzimani punkcijom *v. jugularis* na svakih 10 dana odnosno 0., 10., 20., 30., 40., 50., 60. i 70. dana ogleđa. Nakon spontane koagulacije na sobnoj temperaturi, serum je izdvajan centrifugiranjem na 3000 obrtaja tokom 10 minuta. Dobijeni krvni serum je skladišten na temperaturi od -20°C, sve do izvođenja analiza. U uzorcima dobijenog seruma određivana je koncentracija glukoze, insulina, IGF-I, IGF vezujućih proteina (IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3 i IGFBP-4), NEFA, BHBA, holesterola, triglicerida, ukupnih proteina, albumina, globulina i kortizola.

## **4.4. ODREĐIVANJE ZASTUPLJENOSTI PROTEINA SIGNALNOG PUTA INSULINA U MIŠIĆNOM TKIVU**

### **4.4.1. PRIPREMA ĆELIJSKOG LIZATA MIŠIĆNOG TKIVA**

Homogenizacija i sve ostale faze pripreme tkiva rađene su na ledu (4°C). Uzorci mišićnog tkiva su prvo usitnjeni makazama, a zatim homogenizovani uz dodatak modifikovanog RIPA- pufera za liziranje (pH 7,4) koji je sadržavao 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,2% SDS, 1% Triton X-100, 0,2% natrijum deoksiholat, proteazne inhibitore (2 mM PMSF, 10 µg/mL leupeptin i 10 µg/mL aprotinin), fosfatazne inhibitore (100 mM natrijum fluorid, 10 mM natrijum pirofosfat i 2 mM natrijum ortovanadat) u odnosu 1:4 (m:V) u staklenim kivetama tipa Correx, u UltraTurrax homogenizeru, 3 × 30s. Dobijeni homogenat mišićnog tkiva je zatim centrifugiran na 15.000 × g na 4°C 30 min u Beckman centrifugi.

U dobijenim supernatantima koji predstavljaju ukupni lizat ćelija mišićnog tkiva određivana je koncentracija proteina pomoću BCA (the bicinchoninic acid assay, Pierce, Rockford, IL, USA) metode. Nakon toga, uzorci ćelijskog lizata su pripremljeni za *Western blot* analizu tako što su razblaživani do koncentracije od 10 mg/mL dodavanjem modifikovanog RIPA pufera i zatim do finalnih 5 mg/mL dodavanjem iste zapremine (1:1) Laemmli pufera (100 mM Tris-HCl pH 6,8, 200 mM, β-merkaptoetanol, 4% SDS, 0,2% brom fenol plavo i 20% glicerol). Uzorci su zatim bili izloženi temperaturi 100°C u trajanju od 5 minuta a zatim zamrznuti na -20°C do korišćenja za *Western blot* analizu.

#### **4.4.2. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA U LIZATU BCA METODOM**

Koncentracija proteina u uzorcima mišićnog tkiva je određivana BCA metodom (BCA protein assay reagent, Pierce, Rockford, IL, USA), prema uputstvu proizvođača upotrebom komercijalnog dijagnostičkog kompleta (Smith, 1985). Ovaj reagens je u formi natrijumove soli senzitivn, stabilan i visoko specifičan agens za jone bakra  $\text{Cu}^{1+}$ . Peptidne veze i 4 aminokiseline (cistein, cistin, triptofan i tirozin) su odgovorne za razvijanje boje u proteinskim uzorcima koji su inkubirani sa BCA. Primenjivana metoda predstavlja kombinaciju biuretske reakcije koja podrazumeva redukciju  $\text{Cu}^{2+}$  do  $\text{Cu}^{1+}$  proteinima u alkalnoj sredini i visoko senzitivne i selektivne kolorimetrijske detekcije bakarnih jona pomoću reagensa koji sadrži bicinhoninsku kiselinu. Kao rezultat helacije dva molekula bicinhoninske kiseline i jednog  $\text{Cu}^{1+}$  jona nastaje hidrosolubilan ljubičasto obojen proizvod koji apsorbuje svetlost na 562 nm. Ovo omogućava spektrofotometrijsku kvantifikaciju proteina u opsegu od 20 do 2000  $\mu\text{g/mL}$ . Koncentracija ukupnih proteina je preračunavana sa standardne krive koja je konstruisana na osnovu izmerenih vrednosti apsorbanci poznatih rastućih koncentracija govedeg serumskog albumina (BSA) (0,2; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0  $\text{mg/mL}$ )

#### **4.4.3. ELEKTROFOREZA PROTEINA SIGNALNOG PUTA INSULINA**

U cilju analize ukupnog sadržaja proteina i fosforilacije molekula signalnog puta insulina proteini iz uzorka ukupnog lizata mišićnog tkiva su najpre razdvajani metodom SDS elektroforeze na poliakrilamidnom gelu. Proteini su najpre kuvanjem i anjonskim deterdžentom natrijum dodecil sulfatom (SDS) prevođeni u linearne polipeptidne lance čime je postignuto narušavanje njihove tercijarne strukture i maskirano naelektrisanje koje potiče od aminokiselinskih ostataka. Uzorci ukupnog ćelijskog lizata (75  $\mu\text{g}$  proteina po bazenčiću) su nanošeni na 7,5% ili 10% SDS poliakrilamidni gel i razdvajani pomoću Mini Protean Electrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Elektroforeza se odvijala prvih 15 min na 150V, a zatim još 1h 30 min na 100V. Marker molekulskih masa koji je korišćen sadrži proteine molekulskih masa 10, 15, 25, 35, 55, 70, 100, 130 i 250 kDa (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas, Vilnius, Lithuania).

#### **4.4.4. DETEKCIJA PROTEINA SIGNALNOG PUTA INSULINA WESTERN BLOT METODOM**

Po završetku elektroforeze, izvršen je transfer proteina sa poliakrilamidnog gela na PVDF membranu (Milipore, Bedford, MA; SAD). Membrana je prethodno aktivirana potapanjem u 100% metanol 15 s, a zatim inkubirana 2 min u destilovanoj vodi i na kraju najmanje 5 min u puferu za transfer. Transfer proteina je rađen u puferu za SDS PAGE (0,0025 M Tris pH 8,3, 0,192 M glicin i 0,1% SDS), sa dodatkom metanola (20%) preko noći na 4°C, pri konstantnoj jačini struje od 80 mA u aparatu za mokri transfer (Trans-Blott Cell, Bio-Rad). Posle transfera proteina sa gela, membrane su inkubirane u puferu za blokiranje (5% rastvor BSA u TBST puferu sledećeg sadržaja 25 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween, pH 8,0) 1,5 h na sobnoj temperaturi u cilju smanjenja nespecifičnog vezivanja antitela za membranu. Po isteku tog vremena membrane su isprane 2 × 10 min u TBST, a nakon toga su preko noći inkubirane na 4°C sa primarnim antitelima na IRβ, pIRS-1 Tyr<sup>632</sup>, pIRS-1 Ser<sup>307</sup>, pAkt Ser<sup>473</sup>, GLUT4, AMPK i aktin. U *Western blot* analizi korišćena su sledeća primarna antitela:

Santa Cruz Biotechnology, CA, USA:

- kunićevo poliklonsko anti IR β (sc-711),
- kunićevo poliklonsko anti fosfo-IRS-1 (Tyr<sup>632</sup>) (sc-17196-R),
- kunićevo poliklonsko anti GLUT 4 (sc-7938),
- kunićevo poliklonsko anti-fosfo-Akt (Ser<sup>473</sup>) (sc-7985-R),
- kunićevo poliklonsko anti AMPKα (sc-25792),
- kunićevo poliklonsko anti β-aktin (sc-1616-R) i
- kunićevo poliklonsko anti-fosfo IRS-1 (Ser<sup>307</sup>) (ups. 07-247) proizvođača Millipore, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA

Posle inkubacije sa primarnim antitelima, membrane su ispirane 5 × 5 min u TBST puferu. Nakon toga membrane su inkubirane sa sekundarnim antitelom 1,5 h na sobnoj temperaturi. Kao sekundarno antitelo korišćeno je anti-kunićevo IgG-HRP (sc-2004), konjugovano sa peroksidazom iz rena (HRP, engl. *horse-radish peroxidase*) proizvod firme Santa Cruz Biotechnology, CA, USA. Zatim su membrane ponovo

isprane  $5 \times 5$  min u TBST puferu, a nakon toga inkubirane u mraku 3 min sa hemiluminiscentnim supstratom (ECL, engl. *enhanced chemiluminescence*) koji se dobija mešanjem jednake količine rastvora koji sadrži luminol i rastvora koji sadrži vodonik peroksid. Posle toga membrane su u kaseti za razvijanje inkubirane 3 min sa rendgen filmom (ORTO CP-G-PLUS, AGFA) pri čemu intenzitet signala na filmu odgovara količini proteina koji se detektuje u analiziranim uzorcima. Kvantifikacija dobijenih signala vršena je denzitometrijski korišćenjem softvera ImageJ (NIH; Bethesda, MD, USA). U cilju kontrole jednakog unosa proteina u svim uzorcima ćelijskog lizata, korišćeno je anti-aktin antitelo na  $\beta$ -aktin čija je količina u ćelijama konstantna.

#### **4.5. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE BIOHEMIJSKIH PARAMETARA KRVI**

U uzorcima krvi dobijenim 0., 10., 20., 30., 40., 50., 60. i 70. dana oglada određivana je koncentracija glukoze, beta-hidroksi butirata BHBA, holesterola, triglicerida, ukupnih proteina, albumina i globulina, dok je koncentracija NEFA određivana 0., 30., 50. i 70. dana oglada. Koncentracija glukoze je merena korišćenjem komercijalnih dijagnostičkih kitova (Randox, Crumlin, Velika Britanija). Koncentracije beta-hidroksi butirata (BHBA) su određivane kinetičkom enzimskom metodom i korišćenjem komercijalnog dijagnostičkog kita (Randox, Crumlin, Velika Britanija). Koncentracija holesterola, triglicerida, ukupnih proteina, albumina, globulina krvnog seruma određivana je kolorimetrijski i enzimskim metodama korišćenjem komercijalnih test paketa (BioMereux, Marcy-l'Etoile, France). Koncentracija NEFA određivana je korišćenjem enzimске kolorimetrijske metode uz pomoć komercijalnih dijagnostičkih kitova (Randox, Crumlin, Velika Britanija)

Svi biohemijski parametri izmereni u krvnom serumu su određeni na poluautomatskom biohemijskom analizatoru STAT FAX 3300 AVRENESS TECHNOLOGY INC (SAD).

## **4.6. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE HORMONA U KRVI**

U uzorcima krvi dobijenim 0., 10., 20., 30., 40., 50., 60. i 70. dana oglada određivana je koncentracija insulina i kortizola. Za određivanje koncentracije insulina korišćen je komercijalni RIA test (RIA-insulin INEP, Beograd, Srbija) (Nikolić i sar. 1989). Test je standardizovan prema referentnom materijalu Svetske zdravstvene organizacije: insulin (WHO 53/511). Za taloženje imunih kompleksa korišćen je ovčiji antiserum protiv IgG zamorca u 8% rastvoru PEG-a (polietilenglikola). Radioaktivnost taloga je merena gama-scintilacionim brojačem, u trajanju od 1 minuta. Koncentracija insulina u ispitivanim uzorcima krvnog seruma teladi očitavana je sa kalibracione krive, konstruisane kompjuterskom obradom podataka o stepenu radioaktivnosti istaloženih imunih kompleksa standarda sa poznatim koncentracijama insulina.

Koncentracija kortizola određivana je radioimunološkom metodom korišćenjem komercijalnih test paketa (RIA kortizol, INEP Beograd, Srbija).

## **4.7. INTRAVENSKI TESTOVI OPTEREĆENJA GLUKOZOM (IVGTT)**

### **4.7.1. POSTUPAK SPROVOĐENJA IVGTT**

Intravenski testovi opterećenja glukozom (IVGTT) su izvedeni četiri puta u toku trajanja oglada i to 0., 30., 50. i 70 dana oglada. Test opterećenja glukozom je urađen na ukupno 12 teladi (6 teladi po grupi).

Testovi opterećenja su uvek izvođeni u istom periodu dana i to u 7 časova, odnosno pre jutarnjeg napajanja mlekom, kako bi se izbegao uticaj dnevnog ritma i uzimanje obroka na rezultate analiza. Aplikovan je 50% rastvor glukoze (glukoza 2,78 mol/L wt/vol; Zorka Šabac, Srbija) bolus infuzijom u dozi od 500 mg/kg telesne mase. Infuzija glukoze je vršena u *v. jugularis*. Uzorci krvi su uzimani takođe iz *v. jugularis*, ali na suprotnoj strani vrata. Neposredno pre davanja 50% rastvora glukoze uzorkovana je krv (nulto vreme). Naknadni uzorci krvi su uzimani 15., 30., 60., 90. i 120. minuta nakon davanja glukoze. Koncentracije glukoze i insulina su određene u svim uzorcima,

dok su koncentracije NEFA određivane samo u nultim uzorcima. Koncentracija insulina, glukoze i NEFA je određivana metodama koja je su navedene u odeljku 4.4

#### **4.7.2. IZRAČUNAVANJA KINETIKE GLUKOZE I INSULINA**

Kinetika glukoze tokom testa opterećenja je određena korišćenjem sledećih parametra:  $T_{0\text{glukoza}}$  - bazalna koncentracija glukoze,  $\text{Pik}_{\text{glukoza}}$  - maksimalna koncentracija glukoze,  $k$  - stepen opadanja koncentracije glukoze tokom testa,  $T_{1/2}$  - poluvreme eliminacije glukoze, kao i  $\text{AUC}_{\text{glukoza}}$  - površina ispod krive glukoze tokom testa tolerancije praćena od 0. do 120. minuta.

Kinetika insulina tokom testa opterećenja je određena korišćenjem sledećih parametara:  $T_{0\text{insulin}}$  - bazalna koncentracija insulina,  $\text{Pik}_{\text{insulin}}$  - maksimalna koncentracija insulina,  $\Delta\text{MAX}_{\text{insulin}}$  - maksimalni porast insulina i  $\text{AUC}_{\text{insulin}}$  - površina ispod krive insulina tokom testa tolerancije praćena od 0. do 120. minuta.

Bazalne koncentracije glukoze su određene neposredno pre intravenskog aplikovanja glukoze.  $\text{Pik}_{\text{glukoza}}$  je najveća vrednost koncentracije glukoze koju je izazvala glukoza data u intravenskom testu opterećenja. Stepen opadanja koncentracije glukoze tokom testa ( $k$ ) je određivan iz vrednosti koncentracija glukoze u 15. i 60. minutu, korišćenjem modifikovane metode predložene od strane Kaneka (2008), prema jednačini:  $k = [(\ln_{\text{glukoza}} T_{15} - \ln_{\text{glukoza}} T_{60}) / (T_{60} - T_{15})] * 100$  (% min). Poluvreme eliminacije glukoze ( $T_{1/2}$ ) je određivano prema formuli:  $(T_{1/2}) = 0.693/k * 100$  (min). Vrednost AUC za glukozu je dobijena nakon integrisanja površine ispod krive glukoze tokom 0., 15., 30., 60., 90 i 120. minuta testa opterećenja za svaku pojedinačnu životinju korišćenjem programa Origin 8.1 (OriginLab, Northampton, MA USA).

Bazalne koncentracije insulina su određivane neposredno pre intravenskog aplikovanja glukoze.  $\text{Pik}_{\text{insulin}}$  je najveća vrednost koncentracije insulina koju je izazvala glukoza data u intravenskom testu opterećenja. Vrednost maksimalnog porasta insulina ( $\Delta\text{MAX}_{\text{insulin}}$ ) je dobijena izračunavanjem razlike između maksimalne i bazalne koncentracije insulina.

Vrednost AUC za insulin je dobijena nakon integrisanja površine ispod krive insulina tokom 0., 15., 30., 60., 90 i 120. minuta testa opterećenja za svaku pojedinačnu životinju korišćenjem programa Origin 8.1 (OriginLab, Northampton, MA USA).



### **4.7.3. IZRAČUNAVANJE MATEMATIČKOG POKAZATELJA INSULINSKE SENZITIVNOSTI – RQUICKI**

Za procenu insulinske rezistencije kod teladi je korišćen matematički pokazatelj insulinske senzitivnosti (RQUICKI). Za izračunavanje je korišćena formula koju su opisali Holtenius and Holtenius (2007) a za njeno izračunavanje su korišćene bazalne vrednosti glukoze, insulina i NEFA, po modelu:  $RQUICKI=1/[\log \text{glukoza (mg/dL)} + \log \text{insulin } (\mu\text{U/mL}) + \log \text{NEFA (mM)}]$ . Niska vrednost indeksa označava smanjenu osetljivost na insulin.

## **4.8. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE IGF-I I ZASTUPLJENOSTI IGF VEZUJUĆIH PROTEINA U UZORCIMA KRVI**

### **4.8.1. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE IGF-I U UZORCIMA KRVI**

U uzorcima seruma dobijenim 0., 10., 30., 50. i 70. dana oglada određivana je koncentracija IGF-I. Za određivanje koncentracije IGF-I korišćen je komercijalni RIA IGF-I test (INEP, Zemun) (Nikolić i sar. 1996b). Test je standardizovan prema referentnom materijalu Svetske zdravstvene organizacije: IGF-I (WHO 87/518). U ovom testu, merenje IGF-I je zahtevalo denaturaciju i taloženje IGF vezujućih proteina nakon oslobađanja IGF. U tu svrhu korišćen je etanol-HCl rastvor. Anti-IGF-I antitela su imala reaktivnost koja je bila < 3,00% prema IGF-II i < 0,01% prema humanom insulinu. Za taloženje imunih kompleksa korišćena su antitela na IgG kunića u 8% rastvoru PEG-a (polietilenglikola). Radioaktivnost taloga merena je na gama-scintilacionom brojaču u trajanju od 2 minuta. Koncentracija IGF-I u ispitivanim uzorcima seruma očitavana je sa kalibracione krive, konstruisane kompjuterskom obradom podataka o stepenu radioaktivnosti istaloženih standarda imunih kompleksa sa poznatim koncentracijama IGF-I.

### **4.8.2. PRIPREMA UZORAKA KRVNOG SERUMA ZA ELEKROFOREZU IGF-VEZUJUĆIH PROTEINA**

U uzorcima seruma dobijenim 0., 10., 50. i 70. dana oglada određivana je zastupljenost IGF vezujućih proteina (IGFBP 1,2,3 i 4). Priprema uzoraka i razdvajanje

proteina seruma teladi vršeno je postupkom koji su opisali Hossenlopp i saradnici (1986), Nikolić i saradnici (1998) i Masnikosa i saradnici (2011).

Ispitivani serumi su razblaženi PBS puferom u odnosu 1:25 za IGFBP 1,2 i 4 i 1:50 za IGFBP- 3, a zatim puferom za uzorke u odnosu 1:1. PBS pufer sadržavao je 0.05 M natrijum fosfata, 0.15 M NaCl pri pH 7.5, dok je pufer za uzorke sadržavao 0.125 M Tris-HCl, 4% (w/v) SDS, 20% (v/v) glicerol, 10% (v/v) 2-merkaptoetanol, 0.01% (w/v) i bromofenol plavo pri pH 6,8. Razblaženi uzorci su zatim kuvani 7 minuta. To vreme je bilo neophodno kako bi se IGFBP oslobodili iz kompleksa sa IGF molekulima. Nakon kuvanja uzorci su centrifugovani na  $600 \times g$ , u toku 30 sekundi na  $10^{\circ}C$ , u centrifugi Eppendorf MiniSpin.

#### **4.8.3 ELEKTROFORETSKO RAZDVAJANJE IGF VEZUJUĆIH PROTEINA I ELEKTROTRANSFER**

Proteini su razdvajani SDS PAG elektroforezom (SDS-poliakrilamid gel elektroforeza) na 4% gelu za koncentrovanje za sve IGF vezujuće proteine i 10% gelu za razdvajanje za IGFBP 1, 2, 4 i 12% gelu za razdvajanje za IGFBP-3. U prvo mesto na gelu je nanošen marker (low-range molecular mass markers, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), a u sledeće pripremljeni uzorci seruma u količini od 33  $\mu$ L. Elektroforeza je rađena na uređaju Mini-PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad Laboratories) i tekla u redukujućim uslovima pri naponu od 200 V, dok bromfenol plavo marker nije došao do kraja gela (oko 1 čas). Elektroforeza je rađena u Tris-HCl puferu (25 mM Tris-HCl, 0,19 M glicin, 0,1% SDS (*m/v*), pH 8,3). Nakon završetka elektroforeze proteini na gelovima su podvrgavani elektrotransferu na nitroceluloznu membranu (0.45  $\mu$ m, Whatman Protran, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA, USA), pri uslovima od 20 A i 300 Mv, 1,5 do 2 h. Elektrotransfer je rađen na uređaju Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories) uz korišćenje pufera za transfer (0.025 M Tris-HCl, 0.19 M glicin, 20% (v/v) metanol; pH 8.3). Nakon elektrotransfera proteina na membrane, one su bojene rastvorom Ponceau S boje (0,1% Ponceau S (*m/v*), 5% HAc (*v/v*)), pa su zatim odbojene TBST puferom (10 mM Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 0,1% Tween 20 (*v/v*), pH 7,4). Nitrocelulozne membrane predviđene za *Western blot* blokirane su potapanjem u rastvor mleka (5% mleko u prahu u TBST puferu (*m/v*)), u trajanju od 45 minuta na sobnoj temperaturi uz mućkanje.

#### **4.8.4. WESTERN BLOT IGF VEZUJUĆIH PROTEINA**

Posle blokiranja u rastvoru mleka, nitrocelulozne membrane su inkubirane u rastvoru odgovarajućih primarnih antitela u TBST puferu, preko noći na 4 °C uz mućkanje. Korišćena su sledeća razblaženja primarnih antitela proizvođača Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA):

- Kozje poliklonsko anti IGFBP-1 antitelo (sc-6072) - 1:1000 u 1% mleku u TBST puferu (*m/v*),
- Kozje poliklonsko anti IGFBP-2 antitelo (sc-6002) - 1:1000 u 1% mleku u TBST puferu (*m/v*),
- Kozje poliklonsko anti IGFBP-3 antitelo (sc-6004) - 1:1000 u 1% mleku u TBST puferu (*m/v*),
- Kozje poliklonsko anti IGFBP-4 antitelo (sc-6005) - 1:1000 u 1% mleku u TBST puferu (*m/v*).

Posle 6 ispiranja od po 5 minuta TBST puferom, membrane su inkubirane u rastvoru sekundarnih antitela u TBST puferu, u trajanju od 30 minuta na sobnoj temperaturi uz mućkanje. Korišćena su sledeća razblaženja sekundarnih antitela:

- HRP-konjugovana IgG antitela (svinjska) spram kože (Biosource, Camarillo, USA), 1:10 000 u 1% mleku u TBST puferu (*m/v*)

Nakon ispiranja 6 puta po 5 minuta TBST puferom, i na kraju destilovanom vodom, membrane su inkubirane u rastvoru za hemiluminiscenciju proizvođača GE Healthcare (Little Chalfont, UK) prema uputstvu. Za razvijanje i fiksiranje filmova (Kodak, Paris, France) korišćeni su komercijalni reagensi: razvijanje 5 minuta u razvijaču, ispiranje 1 minut u rastvoru sirćetne kiseline (1% HAc (*v/v*)) i fiksiranje 10 minuta u fiksiru. Filmovi su nakon toga ispirani pod mlazom tekuće vode u trajanju od 10-15 minuta, pa zatim osušeni na vazduhu, pri čemu intenzitet signala na filmu odgovara količini proteina koji se detektuje u analiziranim uzorcima. Kvantifikacija dobijenih signala vršena je denzitometrijski korišćenjem softvera ImageJ (NIH; Bethesda, MD, USA).

## 4.9. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA

Svi rezultati su predstavljeni tabelarno ili grafički korišćenjem parametara deskriptivne statistike: srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Statistička obrada podataka je izvršena korišćenjem programa STATISTICA v.8 (StatSoft, Inc., Tulsa, Ok, USA). Dvosmerna analiza varijanse (eng. Two way ANOVA) je primenjena u cilju određivanja značajnosti između grupa i ispitivanog perioda. Za analizu stepena značajnosti razlika ispitivanih parametara između pojedinih oglednih grupa kao post hoc test korišćen je Studentov "t" test. Statistički značajnim su smatrane p vrednosti  $<0,05$ ,  $<0,01$  i  $<0,001$ , dok su vrednosti  $\leq 0,1$  prikazane kao tendencije promena određenih parametara.

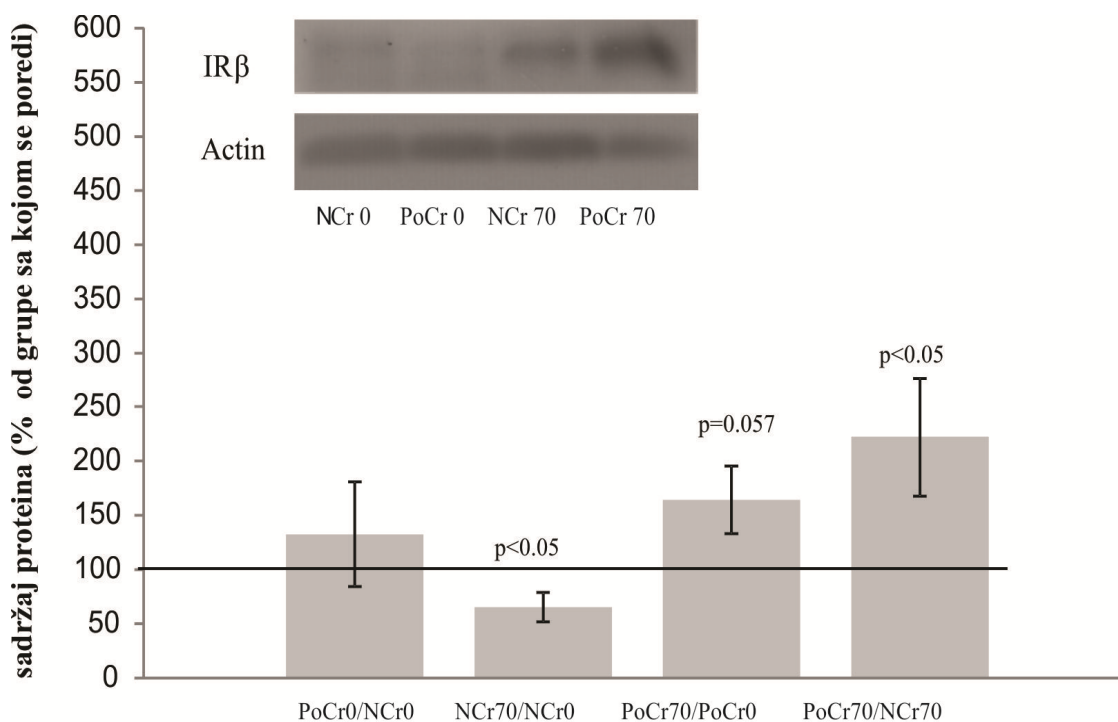
Grafički prikazi rezultata zastupljenosti proteina signalnog puta insulina su predstavljeni kao u radu Jovanovića i saradnika (2017). Vrednosti kinetike glukoze i insulina kao i RQICKI vrednosti su izračunate prema formulama navedenim u odeljcima 4.7.2. i 4.7.3. Za izračunavanje AUC je korišćen program Origin 8.1 (OriginLab, Northampton, MA USA).

## 5. REZULTATI

### 5. 1. ZASTUPLJENOST PROTEINA SIGNALNOG PUTA INSULINA U MIŠIĆNOM TKIVU

#### 5. 1.1. ZASTUPLJENOST $\beta$ - SUBJEDINICE INSULINSKOG RECEPTORA

Na slici 5.1 je prikazana zastupljenost  $\beta$ -subjedinice insulinskog receptora ( $IR\beta$ ) u skeletnim mišićnom tkivu teladi kontrolne (NCr) i grupe kojoj je peroralno aplikovan hrom (PoCr) i to u vidu histograma i reprezentativnog *Western blota*.

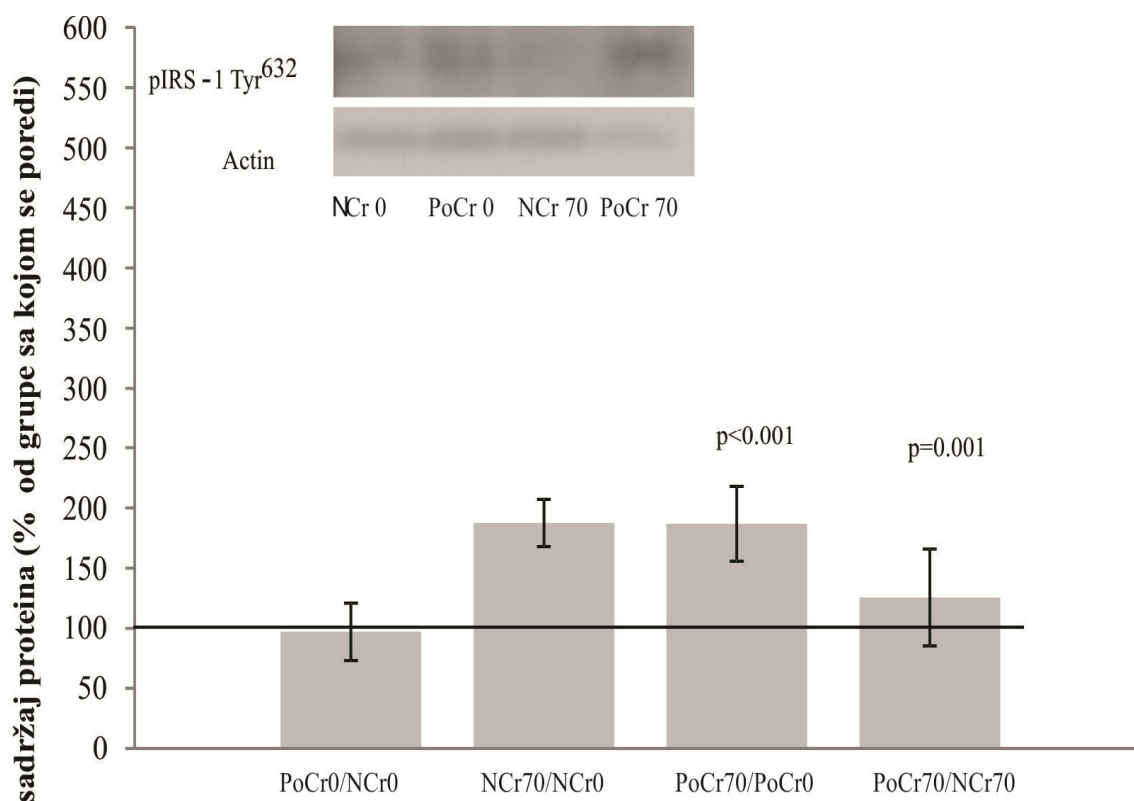


**Slika 5.1.** Zastupljenost  $\beta$ -subjedinice insulinskog receptora ( $IR\beta$ ) u skeletnim mišićima teladi kontrolne (NCr) i grupe kojoj je peroralno aplikovan hrom (PoCr). Sadržaj proteina  $IR\beta$  je određivan u mišićnim ćelijama NCr i PoCr grupe 0. dana (NCr0 i PoCr0) i 70. dana ogleđa (NCr70 i PoCr70), *Western blot* metodom. Reprezentativni blotovi se nalaze iznad histograma. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška, izraženi kao odnos  $IR\beta$  proteina i aktina i predstavljeni kao procenat: PoCr0/NCr0 (uniformnost grupa na početku ogleđa); NCr70/NCr0 (efekat uzrasta); PoCr70/PoCr0 (efekat hroma i uzrasta); PoCr70/NCr70 (efekat hroma). Poređenje grupa je urađeno Studentovim *t* testom.

Iz slike se zapaža da nije bilo statistički značajnih razlika u zastupljenosti IR $\beta$  između NCr i PoCr grupe na početku ogleda, odnosno pre početka peroralne aplikacije hroma. Kod NCr grupe se zapaža da je došlo do statistički značajnog ( $p < 0,05$ ) pada u zastupljenosti IR $\beta$  tokom oglednog perioda, dok PoCr grupa beleži tendenciju porasta ( $p=0.057$ ) zastupljenosti IR $\beta$  tokom oglednog perioda. Takođe se može zapaziti da je 70. dana ogleda zastupljenost IR $\beta$  bila statistički značajno veća ( $p < 0,05$ ) kod PoCr grupe u odnosu na NCr grupu.

### **5. 1.2. ZASTUPLJENOST SUPSTRATA INSULINSKOG RECEPTORA FOSFORILISANOG NA TIROZINU 632**

Na slici 5.2 je prikazana zastupljenost supstrata insulinskog receptora fosforilisanog na tirozinu 632 (pIRS-1 Tyr<sup>632</sup>) u skeletnom mišićnom tkivu teladi kontrolne (NCr) i grupe kojoj je peroralno aplikovan hrom (PoCr) i to u vidu histograma i reprezentativnog *Western blota*. Iz slike se može zapaziti da nije postojalo statistički značajne razlike u zastupljenosti pIRS-1 Tyr<sup>632</sup> između NCr i PoCr grupe na početku ogleda, odnosno pre početka peroralne aplikacije hroma, te se može zaključiti da su grupe bile ujednačene po zastupljenosti pIRS-1 Tyr<sup>632</sup> na početku ogleda. Kod obe ispitivane grupe se zapaža da je došlo do porasta pIRS-1 Tyr<sup>632</sup> u toku oglednog perioda, s tim što je kod PoCr grupe ovaj porast dostigao statističku značajnost ( $p < 0,001$ ). Takođe, na slici se može zapaziti da je 70. dana ogleda zastupljenost pIRS-1 Tyr<sup>632</sup> bila statistički značajno ( $p < 0,001$ ) veća kod PoCr grupe u odnosu na NCr grupu.

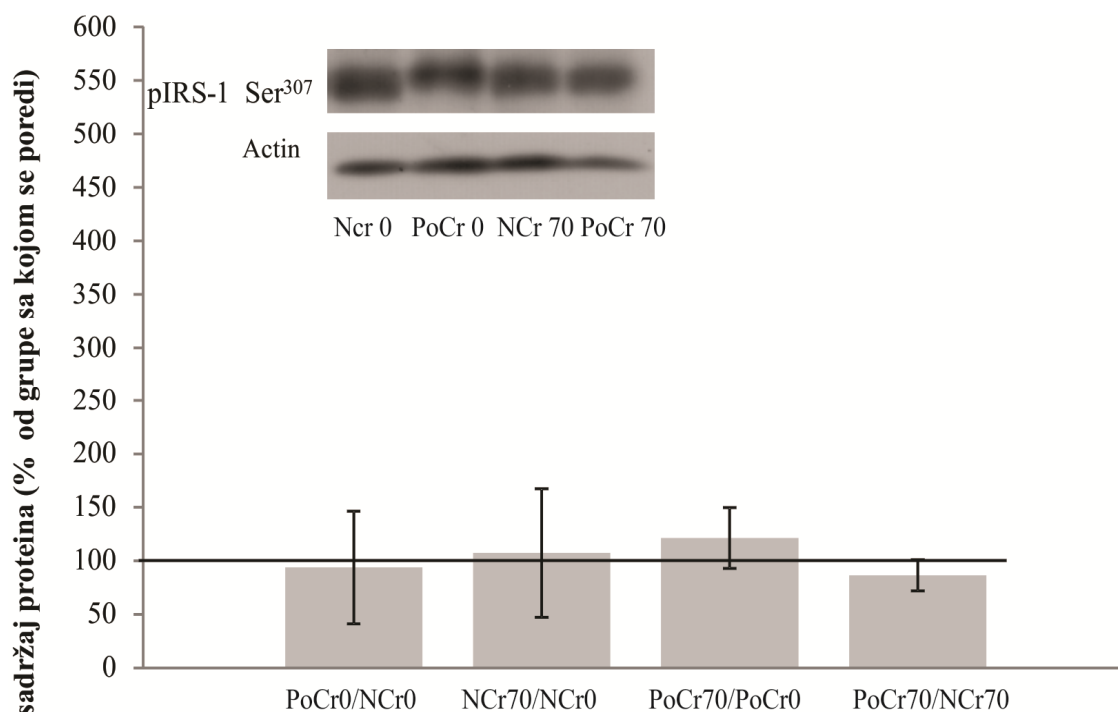


**Slika 5.2.** Zastupljenost supstrata insulinskog receptora fosforilisanog na tirozinu 632 (pIRS-1 Tyr<sup>632</sup>), u skeletnim mišićima teladi kontrolne (NCr) i grupe kojoj je peroralno aplikovan hrom (PoCr). Sadržaj proteina pIRS-1 Tyr<sup>632</sup> je određivan u mišićnim ćelijama NCr i PoCr grupe 0. dana (NCr0 i PoCr0) i 70. dana ogleda (NCr70 i PoCr70), Western blot metodom. Reprezentativni blotovi se nalaze iznad histograma. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška, izraženi kao odnos proteina pIRS-1 Tyr<sup>632</sup> i aktina i predstavljeni kao procenat: PoCr0/NCr0 (uniformnost grupa na početku ogleda); NCr70/NCr0 (efekat uzrasta); PoCr70/PoCr0 (efekat hroma i uzrasta); PoCr70/NCr70 (efekat hroma). Poređenje grupa je urađeno Studentovim t testom.

### 5. 1.3. ZASTUPLJENOST SUPSTRATA INSULINSKOG RECEPTORA FOSFORILISANOG NA SERINU 307

Na slici 5.3 je prikazana zastupljenost supstrata insulinskog receptora fosforilisanog na serinu 307 (pIRS-1 Ser<sup>307</sup>) u skeletnom mišićnom tkivu teladi kontrolne grupe (NCr) i grupe kojoj je peroralno aplikovan hrom (PoCr) i to u vidu histograma i reprezentativnog Western blota. Iz slike se može zapaziti da nije bilo statistički značajnih razlika u zastupljenosti pIRS-1 Ser<sup>307</sup> između NCr i PoCr grupe na početku ogleda, odnosno pre peroralne aplikacije hroma, te se može zaključiti da su grupe bile ujednačene po zastupljenosti pIRS-1 Ser<sup>307</sup> na početku ogleda. Kod obe ispitivane grupe može se zapaziti da nije bilo razlike u zastupljenosti pIRS-1 Ser<sup>307</sup> u

toku oglednog perioda. Takođe, 70. dana ogleđa nije bilo razlike između NCr i PoCr grupe u zastupljenosti pIRS-1 Ser<sup>307</sup>.

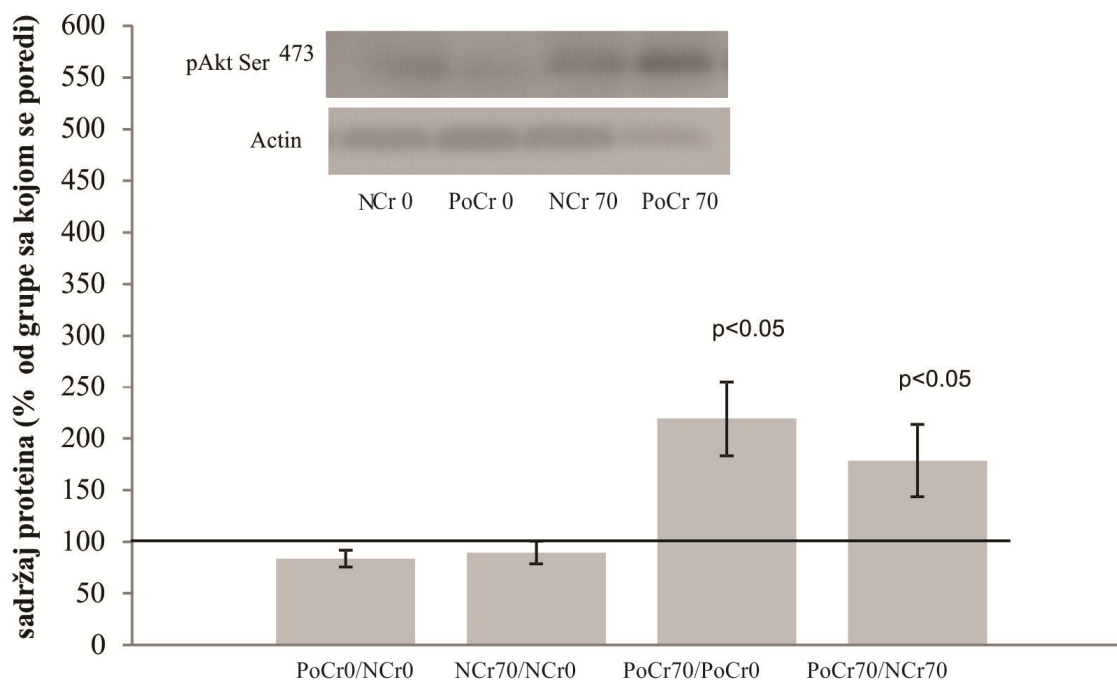


**Slika 5.3.** Zastupljenost supstrata insulinskog receptora fosforilisanog na serinu 307 (pIRS-1 Ser<sup>307</sup>) u skeletnim mišićima teladi kontrolne (NCr) i grupe kojoj je peroralno aplikovan hrom (PoCr). Sadržaj proteina pIRS-1 Ser<sup>307</sup> je određivan u mišićnim ćelijama NCr i PoCr grupe 0. dana (NCr0 i PoCr0) i 70. dana ogleđa (NCr70 i PoCr70), Western blot metodom. Reprerzentativni blotovi se nalaze iznad histograma. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška, izraženi kao odnos proteina pIRS-1 Ser<sup>307</sup> i aktina i predstavljeni kao procenat: PoCr0/NCr0 (uniformnost grupa na početku ogleđa); NCr70/NCr0 (efekat uzrasta); PoCr70/PoCr0 (efekat hroma i uzrasta); PoCr70/NCr70 (efekat hroma). Poređenje grupa je urađeno Studentovim t testom.

#### 5.1.4. ZASTUPLJENOST PROTEIN KINAZE B (AKT) FOSFORILISANE NA SERINU 473

Na slici 5.4 je prikazana zastupljenost protein kinaze B (Akt) fosforilisane na serinu 473 (pAkt Ser<sup>473</sup>) u skeletnom mišićnom tkivu teladi kontrolne (NCr) i grupe kojoj je peroralno aplikovan hrom (PoCr) i to u vidu histograma i reprerzentativnog Western blota.





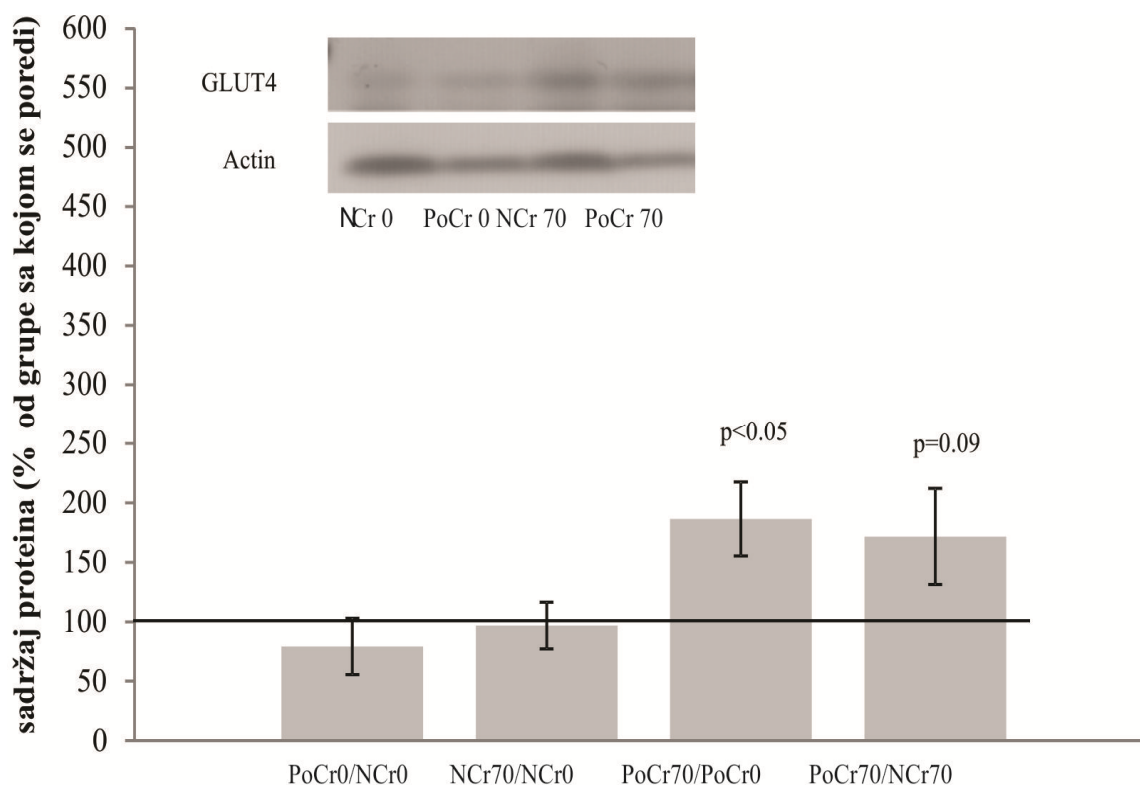
**Slika 5.4.** Zastupljenost protein kinaze B (Akt) fosforilisane na serinu 473 (pAkt Ser<sup>473</sup>), u skeletnim mišićima teladi kontrolne (NCr) i grupe kojoj je peroralno aplikovan hrom (PoCr). Sadržaj proteina pAkt Ser<sup>473</sup> je određivan u mišićnim ćelijama NCr i PoCr grupe 0. dana (NCr0 i PoCr0) i 70. dana ogleđa (NCr70 i PoCr70), Western blot metodom. Reprezentativni blotovi se nalaze iznad histograma. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška, izraženi kao odnos proteina pAkt Ser<sup>473</sup> i aktina i predstavljeni kao procenat: PoCr0/NCr0 (uniformnost grupa na početku ogleđa); NCr70/NCr0 (efekat uzrasta); PoCr70/PoCr0 (efekat hroma i uzrasta); PoCr70/NCr70 (efekat hroma). Poređenje grupa je urađeno Studentovim t testom.

Na slici se može zapaziti da nije bilo statistički značajnih razlika u zastupljenosti pAkt Ser<sup>473</sup> između NCr i PoCr grupe na početku ogleđa, odnosno pre peroralne aplikacije hroma. Kod NCr grupe nije bilo promene u zastupljenosti pAkt Ser<sup>473</sup> u toku ogleđnog perioda, dok je zastupljenost pAkt Ser<sup>473</sup> kod PoCr grupe statistički značajno porasla (p < 0,05). Takođe, se može zapaziti da je 70. dana ogleđa zastupljenost pAkt Ser<sup>473</sup> bila statistički značajno veća (p < 0,05) kod PoCr grupe u odnosu na NCr grupu.

### 5. 1.5. ZASTUPLJENOST TRANSPORTNOG MOLEKULA ZA GLUKOZU (GLUT4)

Na slici 5.5 je prikazana zastupljenost transportnog molekula za glukozu (GLUT4) u skeletnom mišićnom tkivu teladi kontrolne (NCr) i grupe kojoj je

peroralno aplikovan hrom (PoCr) i to u vidu histograma i reprezentativnog *Western blota*.



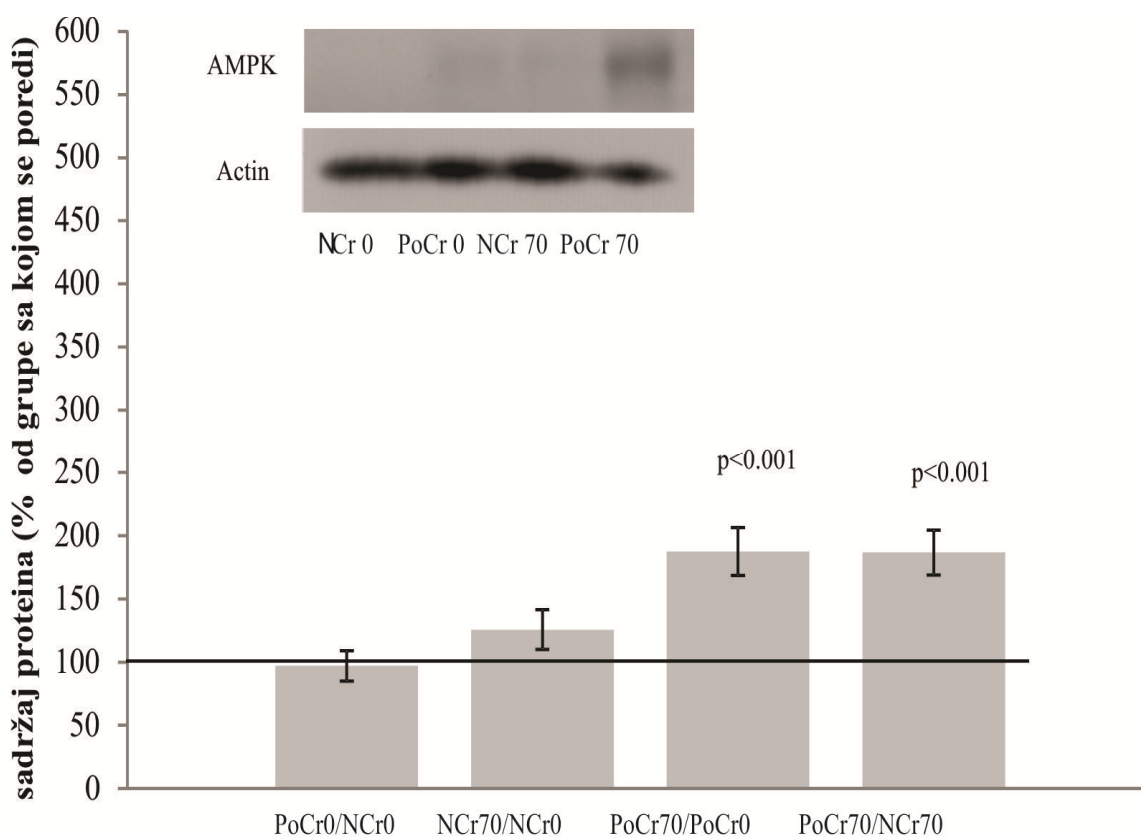
**Slika 5.5.** Zastupljenost transportnog molekula za glukozu (GLUT4) u skeletnim mišićima teladi kontrolne (NCr) i grupe kojoj je peroralno aplikovan hrom (PoCr). Sadržaj proteina GLUT4 je određivan u mišićnim ćelijama NCr i PoCr grupe 0. dana (NCr0 i PoCr0) i 70. dana ogleđa (NCr70 i PoCr70), *Western blot* metodom. Reprezentativni blotovi se nalaze iznad histograma. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška, izraženi kao odnos proteina GLUT4 i aktina i predstavljeni kao procenat: PoCr0/NCr0 (uniformnost grupa na početku ogleđa); NCr70/NCr0 (efekat uzrasta); PoCr70/PoCr0 (efekat hroma i uzrasta); PoCr70/NCr70 (efekat hroma). Poređenje grupa je urađeno Studentovim *t* testom.

Na slici se može zapaziti da nije bilo statistički značajnih razlika u zastupljenosti GLUT4 između NCr i PoCr grupe na početku ogleđa, odnosno pre peroralne aplikacije hroma. Kod NCr grupe se zapaža da nije bilo promene u zastupljenosti GLUT4 u toku ogleđnog perioda, dok je zastupljenost GLUT4 kod PoCr grupe statistički značajno porasla ( $p < 0,05$ ) u toku ogleđnog perioda. Takođe na slici se može zapaziti da je 70.

dana oglada zastupljenost GLUT4 kod PoCr grupe zabeležila tendenciju veće zastupljenosti ( $p=0,09$ ) u odnosu na NCr grupu.

### 5. 1.6. ZASTUPLJENOST AMP- ZAVISNE PROTEIN KINAZE (AMPK)

Na slici 5.6 prikazana je zastupljenost AMP- zavisne protein kinaze (AMPK) u skeletnom mišićnom tkivu teladi kontrolne (NCr) i grupe kojoj je peroralno aplikovan hrom (PoCr) i to u vidu histograma i reprezentativnog *Western blota*.



**Slika 5.6.** Zastupljenost AMP- zavisne protein kinaze (AMPK) u skeletnim mišićima teladi kontrolne (NCr) i grupe kojoj je peroralno aplikovan hrom (PoCr). Sadržaj proteina AMPK je određivan u mišićnim ćelijama NCr i PoCr grupe 0. dana (NCr0 i PoCr0) i 70. dana oglada (NCr70 i PoCr70), *Western blot* metodom. Reprezentativni blotovi se nalaze iznad histograma. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška, izraženi kao odnos proteina AMPK i aktina i predstavljeni kao procenat: PoCr0/NCr0 (uniformnost grupa na početku oglada); NCr70/NCr0 (efekat uzrasta); PoCr70/PoCr0 (efekat hroma i uzrasta); PoCr70/NCr70 (efekat hroma). Poređenje grupa je urađeno Studentovim *t* testom.

Iz slike se može zapaziti da nije postojalo statistički značajne razlike u zastupljenosti AMPK između NCr i PoCr grupe na početku oglada, odnosno pre peroralne aplikacije hroma, te se može zaključiti da su grupe bile ujednačene po zastupljenosti AMPK na početku oglada. Kod NCr grupe se zapaža da nije bilo promene u zastupljenosti AMPK u toku oglednog perioda, dok je zastupljenost AMPK kod PoCr grupe statistički značajno porasla ( $p < 0,001$ ). Takođe na slici se može zapaziti da je 70. dana oglada zastupljenost AMPK bila statistički značajno ( $p < 0,001$ ) veća kod PoCr grupe u odnosu na NCr grupu.

## **5. 2. INTRAVENSKI TEST OPTEREĆENJA GLUKOZOM**

### ***5.2.1. PARAMETRI KINETIKE GLUKOZE***

U tabeli 5.1. su prikazane vrednosti parametara kinetike glukoze tokom izvođenja IVGTT. Može se uočiti da je peroralna aplikacija hroma uticala gotovo na sve parametre kinetike glukoze. PoCr grupa je imala statistički značajno niže ( $p < 0,05$ ) bazalne koncentracije glukoze ( $T_{0\text{glukoza}}$ ) u IVGTT izvedenim 30. i 70. dana. Tokom izvođenja IVGTT 50. dana oglada kod PoCr grupe zabeležne su statistički značajno više ( $p < 0,05$ ) k vrednosti ( $1,5 \pm 0,1$  % min) u odnosu na NCr grupu ( $1,0 \pm 0,2$ ), statistički značajno niže ( $p < 0,05$ ) vrednosti za  $T_{1/2}$  ( $47,4 \pm 4,4$  min) u odnosu na NCr grupu ( $73,7 \pm 1,0$ ), kao i statistički značajno niže ( $p < 0,05$ ) vrednosti za  $AUC_{\text{glukoza}}$  ( $705,2 \pm 24,2$ ) u odnosu na NCr grupu ( $820,9 \pm 30,8$ ). Vrednosti za  $Pik_{\text{glukoza}}$  se nisu razlikovale između grupa ni u jednom od izvedenih IVGTT.

**Tabela 5.1.** Parametri kinetike glukoze tokom IVGTT kontrolne grupe (NCr grupa) i grupe kojoj je peroralno aplikovan hrom (PoCr grupa)

Parametar	Grupa	Dan u ogledu			
		0.	30.	50.	70.
T <sub>o</sub> <sub>glukoza</sub> (mM)	NCr (n=6)	4,5±0,5 <sup>a</sup>	4,5±0,2 <sup>a*</sup>	4,8±0,4 <sup>a</sup>	4,8±0,0 <sup>a*</sup>
	PoCr (n=6)	5,0±0,6 <sup>ab</sup>	3,7±0,2 <sup>a</sup>	4,4±0,2 <sup>ab</sup>	4,6±0,1 <sup>b</sup>
Pik <sub>glukoza</sub> (mM)	NCr (n=6)	12,3±1,0 <sup>ab</sup>	12,0±0,5 <sup>a</sup>	10,1±0,2 <sup>b</sup>	10,1±1,7 <sup>ab</sup>
	PoCr (n=6)	13,7±0,4 <sup>a</sup>	11,9±0,2 <sup>b</sup>	10,1±0,4 <sup>cd</sup>	10,6±0,2 <sup>d</sup>
k (% min)	NCr (n=6)	1,5±0,2 <sup>abc</sup>	1,2±0,1 <sup>ab</sup>	1,0±0,2 <sup>b*</sup>	2,3±0,4 <sup>c</sup>
	PoCr (n=6)	1,6±0,2 <sup>abc</sup>	1,2±0,1 <sup>ab</sup>	1,5±0,1 <sup>b</sup>	2,5±0,4 <sup>c</sup>
T ½ (min)	NCr (n=6)	48,9±7,8 <sup>abc</sup>	64,5±9,1 <sup>ab</sup>	73,7±1,0 <sup>b*</sup>	33,4±6,4 <sup>c</sup>
	PoCr (n=6)	46,9±5,4 <sup>abc</sup>	58,7±5,5 <sup>ab</sup>	47,4±4,4 <sup>b</sup>	30,2±5,8 <sup>c</sup>
AUC <sub>glukoza</sub> (mMxmin)	NCr (n=6)	866,1±84,5 <sup>ab</sup>	877,0±42,2 <sup>a</sup>	820,9±30,8 <sup>ab*</sup>	664,9±66,4 <sup>b</sup>
	PoCr (n=6)	926,1±27,2 <sup>a</sup>	825,0±28,2 <sup>b</sup>	705,2±24,2 <sup>cd</sup>	642,4±54,9 <sup>d</sup>

*a, b, c - različita slova iznad vrednosti u redu ukazuju na statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ) unutar grupe (NCr i PoCr grupe, pojedinačno) između različitih dana uzorkovanja, \*- statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između NCr i PoCr grupe u istom danu uzorkovanja*

### 5. 2.2. PARAMETRI KINETIKE INSULINA

U tabeli 5.2. su prikazane vrednosti parametara kinetike insulina tokom izvođenja IVGTT.

**Tabela 5.2.** Parametari kinetike insulina tokom IVGTT kontrolne grupe (NCr grupa) i grupe kojoj je peroralno aplikovan hrom (PoCr grupa)

Parametar	Grupa	Dan u ogledu			
		0.	30.	50.	70.
T <sub>0</sub> <sub>insulin</sub> ( $\mu$ IU/ml)	NCr (n=6)	25,7 $\pm$ 2,9 <sup>ab</sup>	20,3 $\pm$ 1,8 <sup>a*</sup>	20,5 $\pm$ 2,4 <sup>ab</sup>	27,1 $\pm$ 0,7 <sup>b*</sup>
	PoCr (n=6)	23,4 $\pm$ 2,5 <sup>a</sup>	8,3 $\pm$ 1,0 <sup>b</sup>	20,2 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	17,9 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>
Pik <sub>insulin</sub> ( $\mu$ IU/ml)	NCr (n=6)	125,5 $\pm$ 13,3 <sup>a</sup>	86,2 $\pm$ 7,0 <sup>b</sup>	131,9 $\pm$ 16,5 <sup>a</sup>	173,2 $\pm$ 17,1 <sup>a*</sup>
	PoCr (n=6)	129,0 $\pm$ 11,3 <sup>a</sup>	83,1 $\pm$ 10,4 <sup>b</sup>	100,3 $\pm$ 7,6 <sup>ab</sup>	116,9 $\pm$ 15,3 <sup>ab</sup>
$\Delta$ MAX <sub>insulin</sub> ( $\mu$ IU/ml)	NCr (n=6)	101,4 $\pm$ 10,9 <sup>a</sup>	65,9 $\pm$ 7,0 <sup>b</sup>	111,4 $\pm$ 14,4 <sup>ac</sup>	146,1 $\pm$ 17,6 <sup>bc</sup>
	PoCr (n=6)	106,0 $\pm$ 7,1 <sup>a</sup>	74,8 $\pm$ 11,3 <sup>b</sup>	80,1 $\pm$ 7,6 <sup>b</sup>	99,1 $\pm$ 14,8 <sup>ab</sup>
AUC <sub>insulin</sub> (mMxmin)	NCr (n=6)	6759,6 $\pm$ 817,0 <sup>a</sup>	6317,1 $\pm$ 649,8 <sup>a</sup>	6891,5 $\pm$ 663,1 <sup>a</sup>	6490,5 $\pm$ 803,2 <sup>a</sup>
	PoCr (n=6)	7206,6 $\pm$ 859,1 <sup>a</sup>	6102,2 $\pm$ 767,5 <sup>a</sup>	5433,7 $\pm$ 678,5 <sup>a</sup>	4974,6 $\pm$ 83,4 <sup>a</sup>

*a, b, c - različita slova iznad vrednosti u redu ukazuju na statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ) unutar grupe (NCr i PoCr grupe, pojedinačno) između IVGTT izvedenim u različitim danima ogleda \* - statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između NCr i PoCr grupe u IVGTT izvedenim istih dana ogleda*

Iz podataka prikazanih u tabeli 5.2. se može zaključiti da je aplikacija hroma dovela do statistički značajnog smanjenja bazalnih vrednosti za insulin (T<sub>0</sub><sub>insulin</sub>) u IVGTT izvedenim 30. i 70. dana. Tokom izvođenja IVGTT 70. dana ogleda kod PoCr grupe zabeležne su statistički značajno niže ( $p < 0,05$ ) vrednosti za Pik<sub>insulin</sub> (116,9 $\pm$ 15,3  $\mu$ IU/ml) u odnosu na NCr grupu (173,2 $\pm$ 17,1  $\mu$ IU/ml), Iako se vrednosti za  $\Delta$ MAX<sub>insulin</sub> nisu statistički značajno razlikovale između grupa zabeležena je tendencija smanjenja kod PoCr grupe u IVGTT izvedenim 50. i 70. dana. Naime, vrednost  $\Delta$ MAX<sub>insulin</sub> kod PoCr grupe, dobijena u testu izvedenom 50. dana ogleda, iznosila je 80,1 $\pm$ 7,6  $\mu$ IU/mL naspram vrednosti od 111,4 $\pm$ 14,4  $\mu$ IU/mL za NCr grupu ( $p=0,09$ ), vrednost

$\Delta\text{MAX}_{\text{insulin}}$  kod PoCr grupe, dobijena u testu izvedenom 70. dana ogleda, iznosila je  $99,1 \pm 14,8 \mu\text{IU/mL}$  naspram vrednosti od  $146,1 \pm 17,6 \mu\text{IU/mL}$  za NCr grupu ( $p=0.09$ ). Vrednosti za  $\text{AUC}_{\text{insulin}}$  se nisu razlikovale među ispitivanim grupama ni u jednom od izvedenih testova opterećenja.

### 5. 2.3. VREDNOSTI KONCENTRACIJE NEFA I RQUICKI TEST

U tabeli 5.3. prikazane su vrednosti koncentracije NEFA i RQUICKI testa tokom izvodjenja IVGTT.

**Tabela 5.3.** Vrednosti koncentracije NEFA i RQUICKI test tokom IVGTT kontrolne grupe (NCr grupa) i grupe kojoj je peroralno aplikovan hrom (PoCr grupa)

Parametar	Grupa	Dan u ogledu			
		0.	30.	50.	70.
NEFA (mM)	NCr (n=6)	$0,1 \pm 0,1^a$	$0,3 \pm 0,1^a$	$0,3 \pm 0,1^a$	$0,1 \pm 0,0^a$
	PoCr (n=6)	$0,1 \pm 0,1^{ab}$	$0,4 \pm 0,1^a$	$0,1 \pm 0,0^b$	$0,1 \pm 0,0^b$
RQUICKI	NCr (n=6)	$0,4 \pm 0,0^a$	$0,4 \pm 0,0^{ac*}$	$0,4 \pm 0,0^{a*}$	$0,4 \pm 0,0^{bc}$
	PoCr (n=6)	$0,4 \pm 0,1^a$	$0,5 \pm 0,0^{bc}$	$0,5 \pm 0,1^c$	$0,4 \pm 0,0^{ab}$

*a, b, c - različita slova iznad vrednosti u redu ukazuju na statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ) unutar grupe (NCr i PoCr grupe, pojedinačno) između IVGTT izvedenim u različitim danima ogleda \*- statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između NCr i PoCr grupe u IVGTT izvedenim istih dana ogled*

Iz prikazanih podataka u tabeli 5.3. se može zaključiti da nije bilo statistički značajnih razlika u koncentraciji NEFA između ispitivanih grupa ni u jednom od izvedenih testova opterećenja glukozom. Vrednosti za RQUICKI test su bile statistički značajno više ( $p < 0,05$ ) kod PoCr grupe u IVGTT izvedenim 30. i 50. dana ogleda. Naime, vrednost RQUICKI testa izvedenog 30. dana kod PoCr grupe iznosila je  $0,5 \pm 0,0$  prema  $0,4 \pm 0,0$  kod NCr grupe, dok je vrednost RQUICKI testa izvedenog 50. dana kod PoCr grupe iznosila  $0,5 \pm 0,1$  prema  $0,4 \pm 0,0$  kod NCr grupe.

### 5. 3. KONCENTRACIJA BIOHEMIJSKIH PARAMETARA I HORMONA U KRVI

Promene koncentracije glukoze u ispitivanim danima (0., 10., 20., 30., 40., 50., 60. i 70. dana) kod NCr i PoCr grupe prikazane su u tabeli 5.4. U tabeli 5.4. se može zapaziti da je peroralna aplikacija hroma izazvala smanjenje koncentracije glukoze u svim ispitivanim periodima počevši od 20. dana nakon aplikacije, sa statistički značajnom razlikom ( $p < 0.05$ ) 30. i 70. dana. Glikemija je kod NCr grupe 30. dana ogleda bila  $4,5 \pm 0,2$  mM, dok je kod PoCr grupe bila  $3,7 \pm 0,2$  mM. Glikemija je, 70. dana, kod NCr grupe iznosila  $4,8 \pm 0,0$  mM naspram  $4,6 \pm 0,1$  mM koliko je iznosila kod PoCr grupe.

**Tabela 5.4.** Koncentracija glukoze u krvi teladi kontrolne grupe (NCr grupa) i grupe kojoj je peroralno aplikovan hrom (PoCr grupa)

	Parametar	
	Glukoza (mM)	
Dan u ogledu	NCr grupa (n=12)	PoCr grupa (n=12)
0.	$4,5 \pm 0,5^a$	$5,0 \pm 0,6^{abd}$
10.	$5,3 \pm 0,3^a$	$5,4 \pm 0,4^a$
20.	$4,3 \pm 0,22^b$	$3,9 \pm 0,2^{bc}$
30.	$4,5 \pm 0,2^{ab*}$	$3,7 \pm 0,2^{bc}$
40.	$4,4 \pm 0,4^{ab}$	$3,7 \pm 0,1^{ce}$
50.	$4,8 \pm 0,4^{ab}$	$4,4 \pm 0,2^{bd}$
60.	$3,8 \pm 0,3^a$	$3,7 \pm 0,3^{be}$
70.	$4,8 \pm 0,0^{b*}$	$4,6 \pm 0,1^d$

*a, b, c - različita slova iznad vrednosti u koloni ukazuju na statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ) unutar grupe (NCr i PoCr grupe, pojedinačno) između različitih dana uzorkovanja, \*- statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između NCr i PoCr grupe u istom danu uzorkovanja*

Promene u koncentraciji BHBA u ispitivanim danima (0., 10., 20., 30., 40., 50., 60. i 70. dana) kod NCr i PoCr grupe prikazane su u tabeli 5.5. U tabeli 5.5. se može zapaziti da peroralna aplikacija hroma nije dovela do razlika u koncentraciji BHBA ni u jednom od ispitivanih dana.



**Tabela 5.5.** *Koncentracija BHBA u krvi teladi kontrolne grupe (NCr grupa) i grupe kojoj je peroralno aplikovan hrom (PoCr grupa)*

Dan u ogledu	Parametar	
	BHBA (mM)	
	NCr grupa (n=12)	PoCr grupa (n=12)
0.	0,1±0,0 <sup>ab</sup>	0,1±0,0 <sup>a</sup>
10.	0,1±0,0 <sup>a</sup>	0,1±0,0 <sup>a</sup>
20.	0,2±0,1 <sup>bcd</sup>	0,3±0,1 <sup>abd</sup>
30.	0,3±0,1 <sup>acd</sup>	0,2±0,0 <sup>acd</sup>
40.	0,2±0,0 <sup>c</sup>	0,2±0,0 <sup>bc</sup>
50.	0,2±0,0 <sup>bc</sup>	0,2±0,0 <sup>acd</sup>
60.	0,3±0,0 <sup>d</sup>	0,3±0,0 <sup>bd</sup>
70.	0,3±0,0 <sup>d</sup>	0,3±0,0 <sup>bd</sup>

*a, b, c - različita slova iznad vrednosti u koloni ukazuju na statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ) unutar grupe (NCr i PoCr grupe, pojedinačno) između različitih dana uzorkovanja*

Promene u koncentraciji holesterola u ispitivanim danima (0., 10., 20., 30., 40., 50., 60. i 70. dana) kod NCr i PoCr grupe prikazane su u tabeli 5.6.

**Tabela 5.6.** *Koncentracija holesterola u krvi teladi kontrolne grupe (NCr grupa) i grupe kojoj je peroralno aplikovan hrom (PoCr grupa)*

Dan u ogledu	Parametar	
	Holesterol (mM)	
	NCr grupa (n=12)	PoCr grupa (n=12)
0.	3,1±0,2 <sup>ab</sup>	3,3±0,3 <sup>ab</sup>
10.	3,9±0,3 <sup>a</sup>	3,6±0,2 <sup>a</sup>
20.	3,6±0,2 <sup>ac</sup>	3,3±0,3 <sup>ab</sup>
30.	3,1±0,3 <sup>acd</sup>	3,2±0,5 <sup>abc</sup>
40.	3,2±0,3 <sup>ad</sup>	3,5±0,3 <sup>ab</sup>
50.	2,4±0,3 <sup>bd</sup>	3,0±0,3 <sup>ab</sup>
60.	3,0±0,2 <sup>bc</sup>	2,8±0,2 <sup>bc</sup>
70.	2,4±0,2 <sup>bd</sup>	2,3±0,2 <sup>c</sup>

*a, b, c - različita slova iznad vrednosti u koloni ukazuju na statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ) unutar grupe (NCr i PoCr grupe, pojedinačno) između različitih dana uzorkovanja*

U tabeli 5.6. se može zapaziti da peroralna aplikacija hroma nije dovela do razlika u koncentraciji holesterola ni u jednom od ispitivanih dana.

Promene u koncentraciji triglicerida u ispitivanim danima (0., 10., 20., 30., 40., 50., 60. i 70. dana) kod NCr i PoCr grupe prikazane su u tabeli 5.7. U tabeli 5.7. se može zapaziti dastatistički peroralna aplikacija hroma nije dovela do razlika u koncentraciji triglicerida ni u jednom od ispitivanih dana.

**Tabela 5.7.** *Koncentracija triglicerida u krvi teladi kontrolne grupe (NCr grupa) i grupe kojoj je peroralno aplikovan hrom (PoCr grupa)*

Dan u ogledu	Parametar	
	Trigliceridi (mM)	
	NCr grupa (n=12)	PoCr grupa (n=12)
0.	1,0±0,1 <sup>a</sup>	1,0±0,2 <sup>abc</sup>
10.	1,0±0,2 <sup>ab</sup>	0,8±0,2 <sup>abc</sup>
20.	1,0±0,2 <sup>ab</sup>	0,9±0,2 <sup>abc</sup>
30.	0,8±0,1 <sup>ab</sup>	0,9±0,1 <sup>a</sup>
40.	0,8±0,1 <sup>ab</sup>	1,0±0,1 <sup>b</sup>
50.	0,5±0,1 <sup>b</sup>	0,6±0,1 <sup>bc</sup>
60.	0,7±0,2 <sup>ab</sup>	0,6±0,1 <sup>c</sup>
70.	0,8±0,2 <sup>ab</sup>	0,8±0,1 <sup>c</sup>

*a, b, c - različita slova iznad vrednosti u koloni ukazuju na statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ) unutar grupe (NCr i PoCr grupe, pojedinačno) između različitih dana uzorkovanja*

Promene u koncentraciji ukupnih proteina u ispitivanim danima (0., 10., 20., 30., 40., 50., 60. i 70. dana) kod NCr i PoCr grupe prikazane su u tabeli 5.8. U tabeli 5.8. se može zapaziti da peroralna aplikacija hroma nije dovela do razlika u koncentraciji ukupnih proteina ni u jednom od ispitivanih dana.

**Tabela 5.8.** *Koncentracija ukupnih proteina u krvi teladi kontrolne grupe (NCr grupa) i grupe kojoj je peroralno aplikovan hrom (PoCr grupa)*

	Parametar	
	Ukupni proteini (g/L)	
Dan u ogledu	NCr grupa (n=12)	PoCr grupa (n=12)
0.	58,6±1,6 <sup>ab</sup>	64,0±11,5 <sup>ab</sup>
10.	67,4±8,7 <sup>ab</sup>	70,7±6,2 <sup>ab</sup>
20.	63,9±5,1 <sup>ab</sup>	60,8±9,4 <sup>a</sup>
30.	68,2±2,3 <sup>a</sup>	70,2±13,76 <sup>ab</sup>
40.	83,2±8,2 <sup>a</sup>	88,9±7,5 <sup>b</sup>
50.	54,7±5,2 <sup>b</sup>	66,9±4,3 <sup>a</sup>
60.	69,7±5,9 <sup>ab</sup>	68,2±4,6 <sup>a</sup>
70.	64,7±2,7 <sup>ab</sup>	62,6±5,8 <sup>a</sup>

*a, b, c - različita slova iznad vrednosti u koloni ukazuju na statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ) unutar grupe (NCr i PoCr grupe, pojedinačno) između različitih dana uzorkovanja*

Promene u koncentraciji albumina u ispitivanim danima (0., 10., 20., 30., 40., 50., 60. i 70. dana) kod NCr i PoCr grupe prikazane su u tabeli 5.9.

**Tabela 5.9.** *Koncentracija albumina u krvi teladi kontrolne grupe (NCr grupa) i grupe kojoj je peroralno aplikovan hrom (PoCr grupa)*

	Parametar	
	Albumini (g/L)	
Dan u ogledu	NCr grupa (n=12)	PoCr grupa (n=12)
0.	23,5±0,5 <sup>abc</sup>	27,0±2,7 <sup>ab</sup>
10.	28,8±0,6 <sup>d</sup>	28,9±1,2 <sup>a</sup>
20.	28,8±1,2 <sup>ad</sup>	27,3±2,0 <sup>a</sup>
30.	24,6±1,5 <sup>ae</sup>	27,4±3,1 <sup>ab</sup>
40.	27,3±2,2 <sup>adf</sup>	26,3±1,7 <sup>ab</sup>
50.	19,8±2,9 <sup>bef</sup>	20,6±1,9 <sup>b</sup>
60.	29,1±1,4 <sup>cd</sup>	28,9±1,5 <sup>a</sup>
70.	26,3±3,0 <sup>adf</sup>	25,3±1,3 <sup>ab</sup>

*a, b, c - različita slova iznad vrednosti u koloni ukazuju na statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ) unutar grupe (NCr i PoCr grupe, pojedinačno) između različitih dana uzorkovanja*

U tabeli 5.9. može se zapaziti da peroralna aplikacija hroma nije dovela do razlika u koncentraciji albumina ni u jednom od ispitivanih dana.

Promene u koncentraciji globulina u ispitivanim danima (0., 10., 20., 30., 40., 50., 60. i 70. dana) kod NCr i PoCr grupe prikazane su u tabeli 5.10. Iz tabele 5.10. se zapaža da je peroralna aplikacija hroma izazvala statistički značajno povećanje ( $p < 0.05$ ) koncentracije globulina kod PoCr u odnosu na NCr grupu samo 50. dana nakon aplikacije kada je kod NCr grupe iznosila  $34,9 \pm 3,5$  g/L, a kod PoCr grupe  $46,3 \pm 3,0$  g/L.

**Tabela 5.10.** Koncentracija globulina kontrolne grupe (NCr grupa) i grupe kojoj je peroralno aplikovan hrom (PoCr grupa)

	Parametar	
	Globulini (g/L)	
Dan u ogledu	NCr grupa (n=12)	PoCr grupa (n=12)
0.	$35,15 \pm 2,1^a$	$37,0 \pm 5,4^{ab}$
10.	$38,6 \pm 8,5^a$	$42,3 \pm 6,5^{ab}$
20.	$35,1 \pm 4,8^a$	$33,6 \pm 8,5^a$
30.	$43,5 \pm 3,8^a$	$42,3 \pm 6,5^{ab}$
40.	$55,8 \pm 8,6^a$	$62,6 \pm 8,5^b$
50.	$34,9 \pm 3,5^{a*}$	$46,3 \pm 3,0^{ab}$
60.	$40,5 \pm 6,9^a$	$39,3 \pm 4,7^a$
70.	$38,4 \pm 1,1^a$	$37,4 \pm 5,9^a$

*a, b, c - različita slova iznad vrednosti u koloni ukazuju na statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ) unutar grupe (NCr i PoCr grupe, pojedinačno) između različitih dana uzorkovanja, \*- statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između NCr i PoCr grupe u istom danu uzorkovanja*

Promene koncentracije insulina u ispitivanim danima (0., 10., 20., 30., 40., 50., 60. i 70. dana) kod NCr i PoCr grupe prikazane su u tabeli 5.11. U tabeli 5.11. se može zapaziti da je peroralna aplikacija hroma, pored smanjenja koncentracije glukoze, dovela i do smanjenja koncentracije insulina, sa statistički značajnom razlikom ( $p < 0,05$ ) 30. i 70. dana, odnosno istih dana kada je utvrđena značajna razlika u koncentracijama glukoze između grupa. Insulinemija je kod NCr grupe, 30. dana ogleda iznosila  $20,6 \pm 1,8$   $\mu$ IU/mL, dok je kod PoCr grupe iznosila  $8,3 \pm 1,0$   $\mu$ IU/mL.

Insulinemija je, 70. dana, kod NCr grupe bila  $27,0 \pm 4,3 \mu\text{IU/mL}$  prema  $17,9 \pm 1,4 \mu\text{IU/mL}$  koliko je iznosila kod PoCr grupe.

**Tabela 5.11.** *Koncentracija insulina u krvi teladi kontrolne grupe (NCr grupa) i grupe kojoj je peroralno aplikovan hrom (PoCr grupa)*

	Parametar	
	Insulin ( $\mu\text{IU/mL}$ )	
Dan u ogledu	NCr grupa (n=12)	PoCr grupa (n=12)
0.	$25,8 \pm 2,9^{ab}$	$23,4 \pm 2,5^a$
10.	$19,2 \pm 1,7^a$	$17,7 \pm 1,4^{ab}$
20.	$18,3 \pm 1,8^a$	$15,6 \pm 1,0^b$
30.	$20,6 \pm 1,8^a$	$8,3 \pm 1,0^{d*}$
40.	$32,2 \pm 5,3^{ab}$	$23,2 \pm 3,1^a$
50.	$20,5 \pm 2,4^{ab}$	$20,2 \pm 1,2^{ab}$
60.	$22,8 \pm 3,7^{ab}$	$20,7 \pm 2,2^{ab}$
70.	$27,0 \pm 4,3^b$	$17,9 \pm 1,4^{ab*}$

*a, b, c - različita slova iznad vrednosti u koloni ukazuju na statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ) unutar grupe (NCr i PoCr grupe, pojedinačno) između različitih dana uzorkovanja, \*- statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između NCr i PoCr grupe u istom danu uzorkovanja*

Promene u koncentraciji kortizola u ispitivanim danima (0., 10., 20., 30., 40., 50., 60. i 70. dana) kod NCr i PoCr grupe prikazane su u tabeli 5.12. U tabeli 5.12. se može zapaziti da peroralna aplikacija hroma nije dovela do statistički značajnih razlika u koncentraciji kortizola ni u jednom od ispitivanih dana. Međutim, 50. dana ogleda je utvrđena smanjena koncentracija kortizola kod PoCr u odnosu na NCr grupu, koja je bila na granici statističke značajnosti ( $p=0,06$ ).

**Tabela 5.12.** *Koncentracija kortizola u krvi teladi kontrolne grupe (NCr grupa) i grupe kojoj je peroralno aplikovan hrom (PoCr grupa)*

Dan u ogledu	Parametar	
	Kortizol (nM)	
	NCr grupa (n=12)	PoCr grupa (n=12)
0.	11,6±5,5 <sup>abc</sup>	11,3±6,4 <sup>ab</sup>
10.	8,5±2,3 <sup>ac</sup>	9,4±5,0 <sup>ab</sup>
20.	8,5±2,2 <sup>abc</sup>	10,1±3,0 <sup>ab</sup>
30.	14,0±2,9 <sup>ab</sup>	18,4±4,7 <sup>a</sup>
40.	9,6±3,0 <sup>ac</sup>	11,9±2,3 <sup>ab</sup>
50.	31,0±9,2 <sup>b</sup>	12,6±1,9 <sup>ab</sup>
60.	5,4±2,1 <sup>c</sup>	6,2±2,3 <sup>b</sup>
70.	19,3±8,1 <sup>abc</sup>	24,3±16,1 <sup>ab</sup>

*a, b, c - različita slova iznad vrednosti u koloni ukazuju na statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ) unutar grupe (NCr i PoCr grupe, pojedinačno) između različitih dana uzorkovanja*

#### **5. 4. KONCENTRACIJA IGF-I U KRVI**

Promene koncentracije IGF-I u ispitivanim danima (0., 10., 30., 50., i 70, dan) kod NCr i PoCr grupe prikazane su u tabeli 5.13.

**Tabela 5.13.** *Koncentracija IGF-I u krvi teladi kontrolne grupe (NCr grupa) i grupe kojoj je peroralno aplikovan hrom (PoCr grupa)*

Parametar	Grupa	Dan u ogledu				
		0.	10.	30.	50.	70.
IGF (nM)	NCr (n=6)	9,7±0,9 <sup>a</sup>	17,7±1,0 <sup>b</sup>	14,5±2,9 <sup>ab</sup>	28,5±2,1 <sup>c*</sup>	20,8±1,2 <sup>b</sup>
	PoCr (n=6)	8,6±2,6 <sup>a</sup>	20,0±1,0 <sup>b</sup>	8,6±2,6 <sup>ac</sup>	20,2±2,3 <sup>b</sup>	20,0±4,3 <sup>bc</sup>

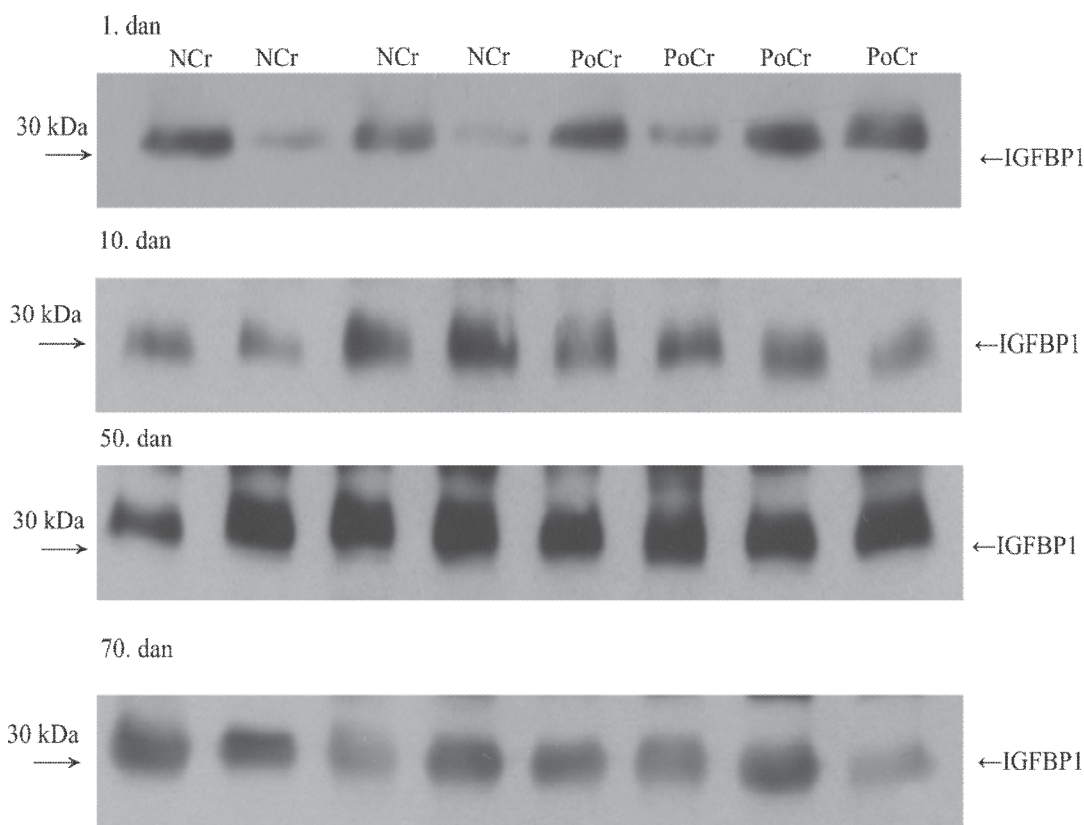
*a, b, c - različita slova iznad vrednosti u redu ukazuju na statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ) unutar grupe (NCr i PoCr grupe, pojedinačno) u različitim danima ogleda \*- statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između NCr i PoCr grupe istih dana ogleda*

Iz tabele 5.13. se može zapaziti da je peroralna aplikacija hroma izazvala statistički značajno smanjenje ( $p < 0,05$ ) koncentracije IGF-I 50. dana ogleđa. Koncentracija kod NCr grupe je 50. dana ogleđa iznosila  $28,5 \pm 2,1$  nM, dok je kod PoCr grupe iznosila  $20,2 \pm 2,3$  nM. Kod obe ispitivane grupe je utvrđen statistički značajan porast ( $p < 0,001$  za obe grupe) koncentracije IGF-I u periodu od 0. do 70. dana ogleđa.

## 5.5. ZASTUPLJENOST IGF VEZUJUĆIH PROTEINA

### 5.5.1. ZASTUPLJENOST IGFBP-1

Na slici 5.7. su prikazani reprezentativni *Western blotovi* za IGFBP-1 u ispitivanim danima ogleđa (0., 10., 50., i 70. dan).

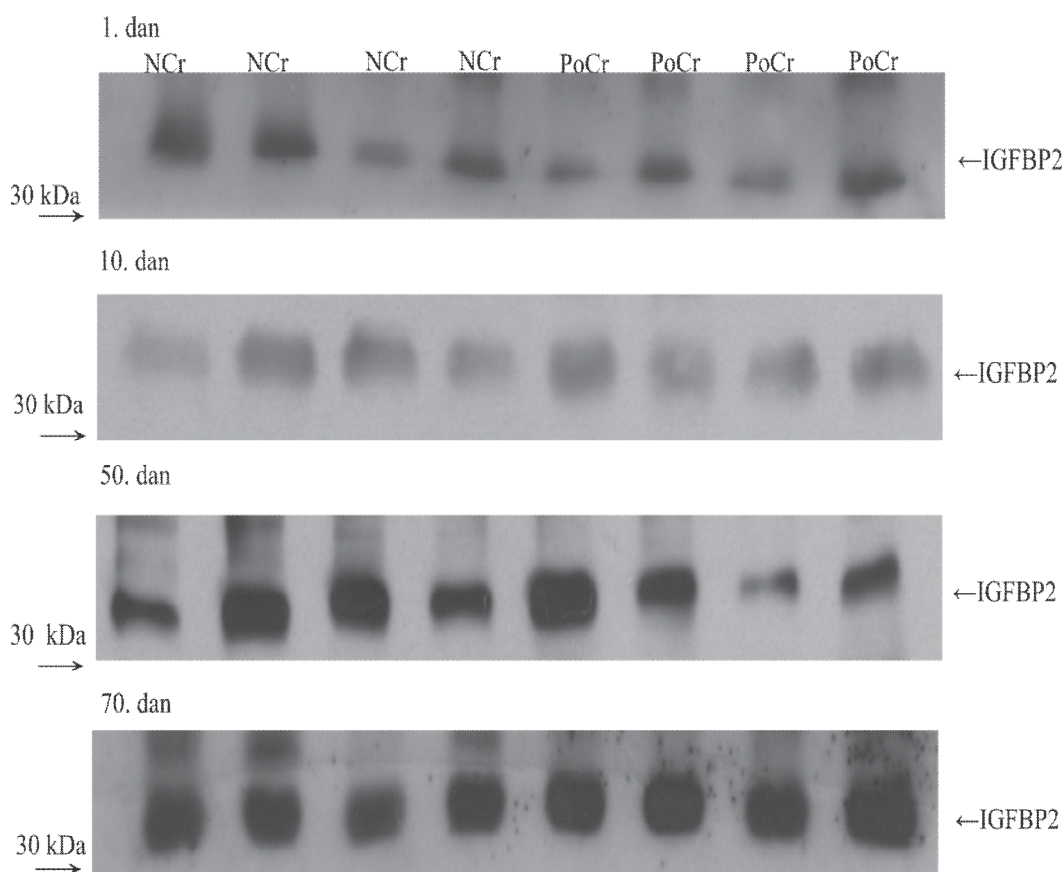


**Slika 5.7.** Reprezentativni *Western blotovi* za IGFBP-1, kontrolne grupe (NCr) i grupe kojoj je peroralno aplikovan hrom (PoCr). Uzorci seruma teladi NCr i PoCr grupe su uzimani 0., 10., 50. i 70. dana ogleđa i razdvojeni SDS-PAG elektroforezom, u redukujućim uslovima na 10% gelu. Korišćena su anti-IGFBP-1 antitela (razblaženje 1:1000). Marker mase označen je strelicama sa strane.

Na osnovu podataka iz literature (Shimasaki i Ling 1991, Masnikosa i sar. 2011) detektovane su imunogene trake koje odgovaraju molekulskoj masi monomera IGFBP-1 od 32-34 kDa. Statističkom obradom denzitometrijskih podataka sa dobijenih blotova nisu zabeležene razlike između ispitivanih grupa ni u jednom od ispitivanih dana.

### 5.5.2. ZASTUPLJENOST IGFBP-2

Na slici 5.8. su prikazani reprezentativni Western blotovi za IGFBP-2 u ispitivanim danima ogleđa (0., 10., 50., i 70. dan). Na osnovu podataka iz literature (Yang i Rechler 1993, Masnikosa i sar. 2011) detektovane su imunogene trake koje odgovaraju molekulskoj masi monomera IGFBP-2 od 34 kDa. Statističkom obradom denzitometrijskih podataka sa dobijenih blotova nisu zabeležene razlike između ispitivanih grupa ni u jednom od ispitivanih dana.

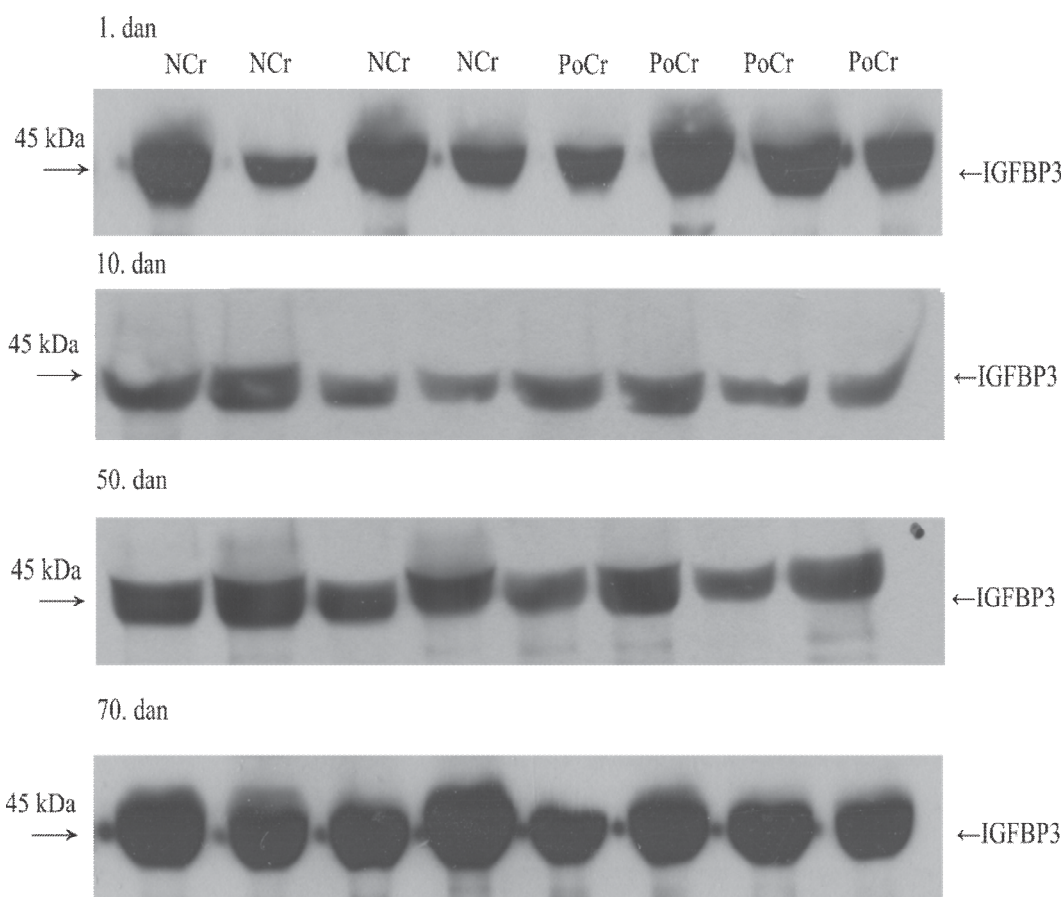


**Slika 5.8.** Reprezentativni Western blotovi za IGFBP-2, kontrolne grupe (NCr) i grupe kojoj je peroralno aplikovan hrom (PoCr). Uzorci seruma teladi NCr i PoCr grupe su uzimani 0., 10., 50. i 70. dana ogleđa i razdvojeni SDS-PAG elektroforezom, u redukujućim uslovima na 10% gelu. Korišćena su anti-IGFBP-2 antitela (razblaženje 1:1000). Marker mase označen je strelicama sa strane.



### 5.5.3. ZASTUPLJENOST IGFBP-3

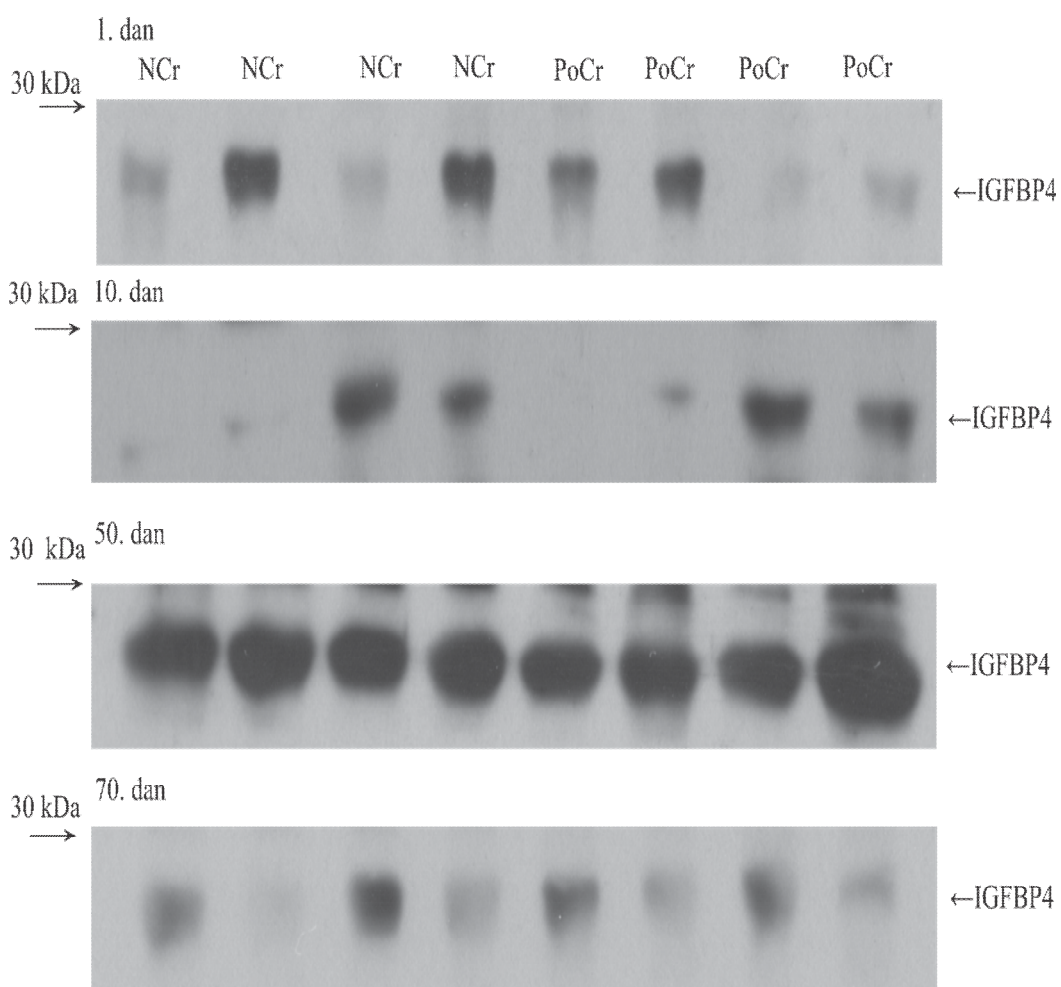
Na slici 5.9. su prikazani reprezentativni Western blotovi za IGFBP-3 u ispitivanim danima (0., 10., 50., i 70. dan). Na osnovu podataka iz literature (Skaar i sar. 1991, Masnikosa i sar. 2011) detektovane su imunogene trake na položaju koji odgovara molekulskej masi IGFBP-3 od 45 kDa. Traka odgovara glikozilovanoj formi IGFBP-3 i po literaturnim podacima se kod goveda detektuje kao pojedinačna traka (Masnikosa i sar. 2011) za razliku od humanog IGFBP-3 koji se *Western blotom* detektuje kao dublet od 40-45 kDa (Firth i Bahter 1999). Statističkom obradom denzitometrijskih podataka sa dobijenih *Western blotova*, utvrđeno je da je 50. dana ogleda PoCr grupa imala statistički značajno manju ( $p < 0,05$ ) zastupljenost IGFBP-3 u odnosu na NCr grupe. Ostalih ispitivanih dana nisu zabeležene razlike između ispitivanih grupa.



**Slika 5.9.** Reprezentativni Western blotovi za IGFBP-3, kontrolne grupe (NCr) i grupe kojoj je peroralno aplikovan hrom (PoCr). Uzorci seruma teladi NCr i PoCr grupe su uzimani 0., 10., 50. i 70. dana ogleda i razdvojeni SDS-PAG elektroforezom, u redukujućim uslovima na 12% gelu. Korišćena su anti-IGFBP-3 antitela (razblaženje 1:1000). Marker mase označen je strelicama sa strane.

#### 5.5.4. ZASTUPLJENOST IGFBP-4

Na slici 5.10. su prikazani reprezentativni *Western blotovi* za IGFBP-4 u ispitivanim danima oglada (0., 10., 50., i 70. dan). Na osnovu podataka iz literature (Masnikosa i sar. 2011) IGFBP-4 je detektovan na položaju koji odgovara molekulskoj masi od 24 kDa, gde se nalazi na SDS-PAG elektroforezi kao neglikozilovana forma proteina. Statističkom obradom denzitometrijskih podataka sa dobijenih blotova nisu zabeležene razlike između ispitivanih grupa ni u jednom od ispitivanih dana.



Slika 5.10. Reprezentativni *Western blotovi* IGFBP-4. kontrolne grupe (NCr) i grupe kojoj je peroralno aplikovan hrom (PoCr). Uzorci seruma teladi NCr i PoCr grupe su uzimani 0., 10., 50. i 70. dana oglada i razdvojeni SDS-PAG elektroforezom. u redukujućim uslovima na 10% gelu. Korišćena su anti-IGFBP-4 antitela (razblaženje 1:1000). Marker mase označen je strelicama sa strane.

## 5. 5. TELESNA MASA

Promene telesne mase teladi u ispitivanim danima (0., 10., 20., 30., 40., 50., 60. i 70. dana) kod NCr i PoCr grupe prikazane su u tabeli 5.14. U tabeli 5.14. se može zapaziti da peroralna aplikacija hroma nije dovela do statistički značajnih razlika u telesnoj masi ni u jednom od ispitivanih dana.

**Tabela 5.14.** Telesna masa kontrolne grupe (NCr grupa) i grupe kojoj je peroralno aplikovan hrom (PoCr grupa)

Dan u ogledu	Parametar	
	Telesna masa (kg)	
	NCr grupa (n=12)	PoCr grupa (n=12)
0.	58,2±1,0 <sup>a</sup>	56,3±4,3 <sup>a</sup>
10.	67,5±1,2 <sup>b</sup>	67,0±4,2 <sup>ab</sup>
20.	76,8±2,8 <sup>c</sup>	74,9±3,8 <sup>bc</sup>
30.	86,3±4,4 <sup>cd</sup>	83,7±3,4 <sup>cd</sup>
40.	98,6±6,0 <sup>de</sup>	95,0±4,7 <sup>d</sup>
50.	111,9±7,7 <sup>ef</sup>	110,8±4,9 <sup>e</sup>
60.	128,7±8,2 <sup>fg</sup>	125,5±5,7 <sup>e</sup>
70.	147,1±8,4 <sup>g</sup>	145,0±6,1 <sup>f</sup>

*a, b, c - različita slova iznad vrednosti u koloni ukazuju na statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ) unutar grupe (NCr i PoCr grupe, pojedinačno) između različitih dana uzorkovanja.*

## **6. DISKUSIJA**

### **6. 1. ZASTUPLJENOST PROTEINA SIGNALNOG PUTA INSULINA U MIŠIĆNOM TKIVU**

#### **6.1.1. ZASTUPLJENOST – $\beta$ SUBJEDINICE INSULINSKOG RECEPTORA**

Malo je podataka u dostupnoj literaturi vezanih za promene u zastupljenosti insulinskog receptora kod teladi u periodu u kome je vršeno naše ispitivanje. Blagi pad ekspresije informacione RNK (iRNK) za insulinski receptor zabeležili su Ebara i saradnici (2013), u uzrastu teladi od 1,5 do 10 meseci. Naši rezultati su u saglasnosti sa rezultatima navedenih autora i ukazuju da je tokom ogleda došlo do statistički značajnog pada u zastupljenosti IR $\beta$  u skeletnim mišićima teladi NCr grupe. U našem istraživanju zapaža se da je hrom doveo do statistički značajnog povećanja zastupljenosti insulinskog receptora kod PoCr grupe u oglednom periodu, te da je 70. dana ogleda zastupljenost insulinskog receptora bila veća kod PoCr grupe u odnosu na NCr grupu. Ranija istraživanja (Chen i sar. 2009) su ukazivala da hrom ima izraženo dejstvo na postreceptorski signalni put insulina, ali za razliku od našeg istraživanja, nije utvrđeno da hrom može da poveća zastupljenost insulinskih receptora. Međutim, novija istraživanja na prasadima (Liu i sar. 2016) su u saglasnosti sa našim rezultatima, navedeni autori su utvrdili da hrom dodat u obliku nanočestica hrom-vezanog hitosana u dozi od 100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{TM}$  dovodi do povećanja zastupljenosti iRNK za insulinski receptor. Razlike u rezultatima navedenih istraživanja moguće je protumačiti kroz razlike u eksperimentalnim modelima, s obzirom da su ranija istraživanja vršena uglavnom u *in vitro* uslovima dok je naše istraživanje i istraživanje Liu i saradnika (2016) vršeno u *in vivo* uslovima. Prema do sada dostupnim podacima u literaturi može se zaključiti da naši nalazi prvi put direktno potvrđuju da hrom povećava zastupljenost IR $\beta$  u skeletnim mišićima teladi u *in vivo* uslovima.

### **6. 1.2. ZASTUPLJENOST SUPSTRATA INSULINSKOG RECEPTORA FOSFORILISANOG NA TIROZINU 632**

Osim povećanja zastupljenosti insulinskog receptora naši rezultati ukazuju i na povećanu aktivnost insulinskog receptora. U rezultatima se može zapaziti da je hrom izazvao povećanje zastupljenosti supstrata insulinskog receptora fosforilisanog na tirozinu 632 koji je direktno regulisan kinaznom aktivnošću insulinskog receptora (Gual i sar. 2005). Naše istraživanje na teladima je u saglasnosti sa dosadašnjim istraživanjima koja su ukazivala da hrom može da utiče na povećanu kinaznu aktivnost insulinskog receptora (Wang i sar. 2005). Takođe, peroralna aplikacija sintetskog trifenilalanin-hrom kompleksa leptin-deficitnim, gojaznim miševima dovela je do povećanog unosa glukoze u ćelije, ublažavanja poremećaja u metabolizmu lipida i pojačavanja insulin zavisne fosforilacije insulinskog receptora u jetri i mišićima miševa (Yang i sar. 2005, Yang i sar.2006, Sreejayan i sar. 2008).

### **6. 1.3. ZASTUPLJENOST SUPSTRATA INSULINSKOG RECEPTORA FOSFORILISANOG NA SERINU 307**

Fosforilacija supstrata insulinskog receptora na serinu 307 dovodi do značajnog smanjenja signala u signalnom putu insulina (Aguirre i sar. 2000). Fosforilacija supstrata insulinskog receptora na serinu 307 sprečava vezivanje supstrata insulinskog receptora za  $\beta$  subjedinicu insulinskog receptora na tirozin vezujućem domenu. Ovim se sprečava insulin zavisna aktivacija PI-3-kinaze što dovodi do slabljenja insulinskog signala u ćeliji (Sykiotis i Papavassiliou 2001). Dodatno, fosforilacija supstrata insulinskog receptora na serinu 307 povećava razlaganje supstrata insulinskog receptora u ubikvitin-proteozom zavisnom procesu čime se takođe slabi dalji prenos insulinskog signala (Rui i sar. 2001). Promene u regulaciji supstrata insulinskog receptora na serinu 307 se smatraju jednim od ključnih mehanizama uključenih u razvoj insulinske rezistencije (Aguirre i sar. 2002). Gojazni miševi sa insulinskom rezistencijom imaju povećanu zastupljenost pIRS-1 Ser<sup>307</sup> u hepatocitima, u odnosu na miševe normalne telesne mase, bez insulinske rezistencije (Sreejayan i sar. 2008). U navedenom istraživanju je zaključeno da dodati hrom može da oslabi fosforilaciju supstrata insulinskog receptora na serinu 307 kod gojaznih miševa sa insulinskom rezistencijom i

time ublaži stanje insulinske rezistencije. Chen i saradnici (2009) su takođe došli do sličnog zaključka u istraživanjima koja su sprovedli na skeletnim mišićima gojaznih, insulin rezistentnih miševima. Navedena istraživanja nisu u saglasnosti sa našim rezultatima koja ukazuju da hrom ne izaziva promene u zastupljenosti pIRS-1 Ser<sup>307</sup> u skeletnim mišićima teladi. Osnovni razlog ovakvih razlika se najverovatnije nalazi u činjenici da smo mi tretirali hromom zdravu telad, bez insulinske rezistencije, dok su u pomenutim eksperimentima tretirane gojazne životinje sa insulinskom rezistencijom. Stoga naši rezultati ukazuju da hrom nema uticaja na pIRS-1 Ser<sup>307</sup> kod zdrave teladi odnosno u fiziološkim uslovima.

#### ***6.1.4. ZASTUPLJENOST PROTEIN KINAZE B (AKT) FOSFORILISANE NA SERINU 473***

Fosforilacija protein kinaze B (Akt) na serinu 473 se smatra pozitivnim regulatorom signalnog puta insulina (Bayascas i Alessi 2005). Rezultati dosadašnjih istraživanja dokazuju su da hrom može uticati na molekule u signalnom putu insulina distalno od insulinskog receptora i supstrata insulinskog receptora kome pripadaju Akt i PI-3-kinaza, što je dokazano na različitim ćelijskim i životinjskim modelima (Wang i sar. 2006). Dokazano je da sintetski trifenilalanin-hrom kompleks dovodi do pojačavanja insulin zavisnog unosa glukoze u kulturi adipocita pojačavanjem fosforilacije Akt (Yang i sar. 2006). U studijama nutritivnog modela insulinske rezistencije u kojima su miševi hranjeni obrokom sa visokim sadržajem saharoze (Dong i sar. 2008) ili visokim sadržajem masti (Kandadi i sar. 2011), tretman hromom je dovodio do povećane fosforilacije Akt-a i smanjenja aktivnosti PI-3-kinaze. Treba naglasiti da su sva navedena istraživanja sprovedena na insulin rezistentnim, gojaznim životinjama, dok naši rezultati ukazuju da hrom može ispoljiti svoje delovanje mehanizmom pojačane fosforilacije protein kinaze B na serinu 473 i kod zdravih, mladih životinja.

### **6. 1.5. ZASTUPLJENOST TRANSPORTNOG MOLEKULA ZA GLUKOZU (GLUT4)**

Postnatalni razvoj GLUT molekula kod preživara se razlikuje u odnosu na druge vrste, odnosno ljude i glodare. Naime, kod ljudi i glodara zastupljenost GLUT4 molekula je niska pri rođenju i raste naglo nakon rođenja odnosno tokom razvoja novorođenčadi (Castello i sar. 1994). Najzastupljenija izoforma GLUT molekula je GLUT1, tokom fetalnog i ranog nenatalnog perioda, a zatim se progresivno smanjuje tokom odrastanja. Nasuprot ovome, zastupljenost GLUT4 molekula u skeletnom mišićnom tkivu preživara se smanjuje u prvih 12 meseci života dok se sadržaj GLUT1 molekula ne menja značajno (Abe i sar. 2001). Razlog ovakvih promena u sadržaju GLUT molekula kod preživara sa jedne strane i ljudi i glodara sa druge, može se protumačiti različitim načinom ishrane. Naime, glavni izvor energije kod obe grupe pre zalučenja su trigliceridi mleka, dok je nakon zalučenja kod ljudi i glodara to skrob (glukoza), a kod preživara niže masne kiseline koje nastaju u procesu fermentacije u buragu (Leng, 1970). Naši rezultati ukazuju da je kod PoCr grupe tokom oglednog perioda došlo do povećanja zastupljenosti GLUT4 molekula. Ovaj nalaz je u suprotnosti sa nalazima promena GLUT4 molekula kod netretirane teladi u eksperimentima drugih autora (Abe i sar. 2001) i ukazuje na to da hrom ne samo da sprečava pad u zastupljenosti GLUT4 molekula, već dovodi do porasta njihove zastupljenosti. Lokalizacija GLUT4 molekula u okviru ćelije je ključna za njegovu funkciju (Chen i sar. 2009). U našem istraživanju je rađena samo ukupna zastupljenost GLUT4 molekula u ćeliji a ne zastupljenost u pojedinim kompartmanima ćelije (ćelijskoj membrani i citoplazmi). Naša istraživanja su u saglasnosti sa nalazom Quao i saradnika (2009) koji su utvrdili da hrom može dovesti do povećanja ekspresije iRNK za GLUT4 u ćelijama skeletnih mišića pacova i nalazom Liu i saradnika (2016) koji su dokazali da hrom dovodi do povećanja zastupljenosti GLUT4 molekula u skeletnim mišićima prasadi. Smatra se da hrom može da dovede do povećane translokacije GLUT4 molekula iz vezikula u ćeliji na ćelijsku membranu preko signalnog puta insulina, ali i insulin nezavisnim putem povećanjem fluidnosti ćelijske membrane (Chen i sar. 2006). Krajnji efekat hrom-indukovane sinteze i translokacije na ćelijsku membranu GLUT4 molekula bi trebao da dovede do bolje utilizacije glukoze u perifernim tkivima što je i dokazano u našem eksperimentu, a o čemu će biti reči u odeljku 6.2.

### **6. 1.6. ZASTUPLJENOST AMP- ZAVISNE PROTEIN KINAZE (AMPK)**

Rezultati naših ispitivanja su ukazali da je PoCr grupa imala veću zastupljenost AMPK 70. dana ogleđa u odnosu na NCr grupu. To je u saglasnosti sa rezultatima drugih autora (Liu i sar. 2016) koji su ustanovili da hrom u obliku nanočestica hrom-vezanog hitosana dovodi do povećanja zastupljenosti AMPK u skeletnim mišićima prasadi. Pojedini autori (Penumathsa i sar. 2009, Zhao i sar. 2009) nisu utvrdili da hrom dodat u obliku sintetskog trifenilalanin-hrom kompleksa i niacin-vezanog hroma dovodi do promena u zastupljenosti AMPK u izolovanim srčanim i skeletnim mišićnim ćelijama, što je u suprotnosti sa našim rezultatima. Međutim, navedeni autori su dobili rezultate koji ukazuju da hrom može delovati na povećanu fosforilaciju AMPK. Razlike između istraživanja se mogu objasniti različitim formama primenjenog hroma, ali i njegovim tkivno specifičnim delovanjem. Povećana zastupljenost AMPK se može dovesti u vezu sa povećanom zastupljenosti i translokacijom na ćelijsku membranu GLUT 4 molekula (Richter i Hargreaves, 2013).

### **6.2. INTRAVENSKI TEST OPTEREĆENJA GLUKOZOM**

U saglasnosti sa nalazima na molekularnom nivou, intravenski testovi opterećenja glukozom ukazuju da je peroralna aplikacija hroma dovela do bolje utilizacije glukoze u perifernim tkivima. Mnogi autori (Horvath i sar. 2008, Chen i sar. 2009) su utvrdili da hrom smanjuje potrebu tkiva za insulinom boljom utilizacijom glukoze u perifernim tkivima. Naši rezultati su ukazali da je peroralna aplikacija hroma značajno uticala na promene u kinetici glukoze tokom izvođenja IVGTT posebno 50. dana ogleđa kada je došlo do statistički značajnog smanjenja  $T_{1/2}$  i  $AUC_{glukoza}$  kod PoCr grupe uz istovremeno smanjenje  $k$  vrednosti, a što ukazuje na bolju utilizaciju glukoze kod PoCr grupe. Generalno, kinetika insulina nije bila značajno promenjena peroralnom aplikacijom hroma kao kinetika glukoze. Međutim, numerički niže vrednosti za  $AUC_{insulin}$  u svim testovima opterećenja nakon početka aplikacije hroma zajedno sa nižim vrednostima  $AUC_{glukoza}$  ukazuju na povećanu insulinsku senzitivnost PoCr grupe. Dodatno, statistički značajno povećana RQUICKI vrednost kod PoCr grupe u poređenju sa NCr grupom u IVGTT izvedenim 30. i 70. dana ogleđa direktno ukazuje na povećanu insulinsku senzitivnost PoCr grupe teladi, kao što je objašnjeno u radu Holteniusa i



Holteniusa (2007). Još uvek postoje razmimoilaženja u literaturnim podacima vezanim za uticaj hroma na parametre kinetike glukoze i insulina tokom izvođenja IVGTT kod goveda (Bunting i sar. 1994, Hayrili i sar. 2001, Bryan i sar. 2004). Za razliku od našeg istraživanja, pojedini autori nisu utvrdili da hrom utiče na parametre kinetike glukoze kod teladi u tovu i mlečnih krava (Bunting i sar. 1994, Hayrili i sar. 2001). Značajno je napomenuti da je u našim ranijim istraživanjima na kravama (Pantelić i sar. 2017) dokazno da hrom može imati suprotan efekat na kinetiku glukoze i insulina u različitim energetske stanjima mlečnih krava. Stoga se objašnjenja razlike u uticaju hroma mogu potražiti u različitom energetske stanju životinja u ogledu.

Uticaj hroma na bazalne vrednosti koncentracije insulina i glukoze će biti diskutovan u okviru odeljka 6.3.

### **6.3. KONCENTRACIJA GLUKOZE I INSULINA**

Naši rezultati su ukazali da peroralna aplikacija hroma dovodi do pada bazalne koncentracije glukoze i insulina i to sa statističkom značajnošću 30. i 70. dana. Ovi rezultati nisu u saglasnosti sa rezultatima drugih autora dobijenim u ogledima na teladima (Yari i sar. 2010, Ghorbani i sar. 2012), ali su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u ogledima izvedenim na miševima (Chen i sar. 2009). Razlike u dobijenim rezultatima se mogu dovesti u vezu sa različitim uzrastima životinja uključenih u ogledu i različitim formama hroma upotrebljavanim u ogledima. Naime, mi smo koristili hrom organski vezan za kvasce dok je u ispitivanjima Yari i saradnika (2010) i Ghorbani i saradnika (2012) korišćen organski hrom-metionin.

Treba naglasiti da su statistički značajno niže bazalne vrednosti glukoze i insulina zabeležene 10 dana nakon prelaska teladi sa jednog na dva obroka kao i 10 dana nakon zalučenja, a ne u ostalim ispitivanim periodima kada nije bilo intenzivnog nutritivnog prestrojavanja teladi, odnosno nutritivnog stresa. U ispitivanjima pojedinih autora dokazano je da količina zamene za mleko u ishrani teladi može da utiče na bazalne vrednosti insulina i glukoze (Kamiya i sar 2009). Tako, ishrana teladi smanjenom količinom zamene za mleko (prosečno 0,63 kg suve materije/dnevno) dovodi do smanjenja bazalnih koncentracija glukoze i insulina kada se ova telad poredi sa teladi hranjenom povećanom količinom zamene za mleko (prosečno 1,15 kg suve materije/dnevno). U istraživanjima Maccari i saradnika (2015) takođe je zaključeno da

telad sa smanjenim unosom energije ima manje bazalne vrednosti glukoze i insulina. Na osnovu navedenog se može spekulirati da su telad PoCr grupe imala nedovoljan unos energije, posebno u periodima nutritivnog prestonjavanja.

Ishrana teladi povećanom količinom zamene za mleko sa većim sadržajem masti, tokom perioda sisanja može imati efekat na metabolizam odnosno na povećani prirast teladi (Matsubara i sar. 2015). Međutim, telad hranjena povećanom količinom zamene za mleko pokazuje poremećaje u regulaciji metabolizma glukoze u fazi tova (Hocquette 2010). Ishrana povećanom količinom zamene za mleko u periodu sisanja može dovesti do insulinske rezistencije tokom kasnijih faza uzgoja teladi inhibicijom ekspresije iRNK za GLUT4 molekul. Moguće je da bi dodatak hroma kod ovakve teladi prevenirao nastanak insulinske rezistencije i doveo do maksimalnog iskorišćavanja zamene za mleko i/ili mleka bez štetnih posledica u kasnijim fazama uzgoja teladi. U prilog ovome govore istraživanja (Levia i sar. 2014) u kojima je hrom propionat prevenirao nastanak insulinske rezistencije kod krava van laktacije, sa povećanim unosom energije.

#### **6.4. KONCENTRACIJA HOLESTEROLA, TRIGLICERIDA, BHBA, NEFA, UKUPNIH PROTEINA, ALBUMINA, GLOBULINA I KORTIZOLA**

U našim rezultatima nije utvrđen uticaj hroma na koncentraciju holesterola, triglicerida i NEFA, što je u saglasnosti sa rezultatima pojedinih autora (Shelton i sar. 2003, Tian i sar. 2014, Wang i sar. 2014). Međutim, postoje istraživanja koja ukazuju na uticaj hroma na metabolizam navedenih parametara, a koje se uglavnom ogleda u smanjenju njihove koncentracije u krvi (Lien i sar. 2001, Cefalu i sar. 2002, Lien i sar. 2005, Yari i sar. 2010, Ghorbani i sar. 2012). Uticaj hroma na metabolizam lipida kod krava može zavistiti od trenutnog energetskeg statusa organizma, a efekti mogu biti i lipoliza i lipogeneza u zavisnosti od trenutnog energetskeg bilansa (McNamara i Valdez, 2005, Pantelić i sar. 2017). S obzirom na smanjene bazalne koncentracije glukoze i insulina i moguć energetskeg deficit teladi u našem ogledu, verovatno je da hrom nije ispoljio efekat na metabolizam lipida u takvom stanju.

Koncentracija BHBA kod teladi zavisi od stepena fermentacije u buragu s obzirom da raste sa unosom koncentrata, ali i od periferne utilizacije ove kiseline (Quigley i sar. 1991). Uticaj hroma na promenu koncentracije BHBA treba posmatrati

kroz moguće povećanje unosa hrane, koje, sa jedne strane, izaziva povećanje koncentracije BHBA. Međutim, smatra se da hrom može da utiče i na bolju perifernu utilizaciju BHBA, što posledično dovodi do smanjena koncentracije BHBA. Dakle, objašnjenje razlike u rezultatima dobijenim u različitim istraživanjima treba tražiti u podacima vezanim za uticaj hroma na konzumaciju hrane koji su kontradiktorni i o čemu će biti reči u odeljku 6.7. (Ghorbani i sar. 2012, Tian i sar. 2014).

Peroralna aplikacija hroma nije dovela do promena u koncentraciji ukupnih proteina i albumina što je u saglasnosti sa rezultatima Page i saradnika (1993), Yari i saradnika (2010) i Tian i saradnika (2014). U navedenim istraživanjima takođe nije utvrđen uticaj hroma na prirast. Statistički više vrednosti koncentracije globulina kod PoCr grupe 50. dana ogleda najverovatnije ukazuju na pozitivan uticaj hroma na imunski odgovor nakon vakcinacije (Chang i sar. 1996, Kegley 1996, Bernhard i sar. 2012). Takođe, 50. dana ogleda zabeležena je tendencija smanjenja koncentracije kortizola kod PoCr grupe. Jedan od mogućih mehanizama uticaja hroma na imunski odgovor ostvaruje se upravo smanjenjem koncentracije kortizola koju on izaziva (Kegley i Spears, 1995). Naime, kortizol može da utiče na imunski odgovor smanjivanjem fagocitne sposobnosti i sposobnosti produkcije antitela (Martin i Crump, 2003). Tendencija smanjenja koncentracije kortizola kod teladi kojoj je aplikovan hrom je u saglasnosti sa rezultatima drugih autora u ogledima izvedenim na teladima (Kegley i Spears, 1995, Ghorbani i sar. 2012). Treba napomenuti da pojedini autori nisu utvrdili uticaj hroma na koncentraciju kortizola kod teladi (Depew i sar. 1998, Yari i sar. 2010). Takođe je, u ogledima na kravama, utvrđeno da hrom dodat u hranu može dovesti do povećanja koncentracije kortizola (Pechova i sar. 2002). Uticaj hroma na imunski odgovor i koncentraciju kortizola zahteva dodatna istraživanja.

## **6.5. KONCENTRACIJA IGF-I**

Naši rezultati su ukazali na porast koncentracije IGF-I kod obe ispitivane grupe, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima koji se odnose na telad našeg uzrasta i režima ishrane (Blanco i sar. 2009). Naime, treba napomenuti da na promenu koncentracije IGF-I kod teladi u uzrastu koji smo mi ispitivali, uticaj ima pre svega vreme zalučenja i režim ishrane. Tako je kod teladi koja su kasnije zalučena (150. dana) i nisu imala koncentrovani deo obroka zabeležen pad u koncentraciji IGF-I u uzrastu od

30. do 150. dana. Za razliku od njih, kod teladi koja su ranije zalučena (90. dana) i imala koncentrovani deo obroka, u istom periodu (30. do 150. dana) je zabeležen porast u koncentraciji IGF-I, što je u saglasnosti sa našim rezultatima (Blanco i sar. 2010). Pik u koncentraciji IGF-I, ranije zalučena telad sa dodatkom koncentrovanog hraniva, dostižu 180. dana. Smatra se da kod teladi koja su ranije zalučena i hranjena koncentrovanim delom obroka, dolazi do pojačanog unosa energije i proteina i to uslovaljava rast koncentracije IGF-I (Schoonmaker i sar. 2002). Suprotno ovome, kod teladi koja su kasnije zalučena i nisu imala koncentrovani deo obroka, ishrana mlekom je nedovoljna da potkrepi energetske zahteve teladi što dovodi do pada koncentracije IGF-I (Hayden i sar. 1993, Yambayamba i sar. 1996, Hornick i sar. 1998, Renaville i sar. 2000). Nakon prelaska na ishranu koncentratom, *ad libitum* 150. dana, kod kasnije zalučene teladi, dolazi do porasta koncentracije IGF-I, ali pik u koncentraciji se dostiže mesec dana kasnije u odnosu na ranije zalučenu telad. Zanimljivo je napomenuti da rasa teladi nema uticaja na promenu koncentracije IGF-I, pa se tako u oglecima došlo do zaključka da dve rase različitih proizvodnih tipova (tovni i kombinovani tip) držane pod istim režimom ishrane i zalučene u isto vreme, ne pokazuju značajne razlike u koncentraciji IGF-I (Blanco i sar. 2009, 2010).

Iz naših rezultata se može zapaziti da je PoCr grupa, 50. dana ogleada, imala statistički značajno niže vrednosti koncentracije IGF-I u odnosu na NCr grupu. Rezultati vezani za uticaj hroma na serumsku koncentraciju IGF-I ali i hormona rasta su kontradiktorni i do sada su najviše ispitivani na prasadima. Evock-Clover i saradnici (1993) su u eksperimentima izvedenim na prasadima došli do rezultata koji ukazuju da je hrom-pikolinat dodat u hranu doveo do povećanja serumske koncentracije hormona rasta, ali bez promena u koncentraciji IGF-I. Za razliku od navedenih autora, Amoiken i saradnici (1995) nisu utvrdili da hrom-pikolinat utiče na koncentraciju hormona rasta kod prasadi, neposredno nakon aplikacije somatotropnog oslobađajućeg hormona. Pojedina istraživanja (Wang i sar. 2007, Wang i sar. 2014) ukazuju da hrom u obliku nanočestica hrom-vezanog hitosana kod prasadi u dozi od 200 µg/kg dovodi do povećanja serumske koncentracije IGF-I, dok uticaj na koncentraciju hormona rasta nije zabeležen. Tian i saradnici (2014) su utvrdili da hrom-metionin u rastućim dozama (100-800 µg/kg) kod prasadi dovodi do linearnog smanjenja koncentracije IGF-I i hormona rasta, što je u saglasnosti sa našim rezultatima. Ako se posmatra uticaj hroma

na koncentraciju IGF-I kod goveda u istraživanjima Subiyatno i saradnika (1996) utvrđena je tendencija porasta koncentracije IGF-I kod mlečnih krava tretiranih hromom, dok Sadri i saradnici (2012) nisu utvrdili efekat hrom-metionina na IGF-I kod krava u puerperalnom periodu. Ghorbani i saradnici (2012) takođe nisu utvrdili da hrom-metionin ima uticaja na koncentraciju IGF-I kod teladi holštajn rase u uzrastu od 3 dana do 8 nedelja. Ovo je jedan od retkih oglada gde je praćena koncentracija IGF kod teladi i najpribližniji je našem ogledu. Međutim, razlike u uticaju hroma na koncentraciju IGF-I se mogu pripisati različitim koncentracijama primenjenog hroma, različitim oblicima primenjenog hroma kao i različitom uzrastu teladi.

Uopšteno, niske vrednosti IGF-I kod teladi PoCr grupe nisu dovele ni do kakvih promena u telesnoj masi kod teladi u našem ogledu, o čemu će biti reči u odeljku 6.7. Takođe iz brojnih literaturnih podataka se zna da hrom ima isključivo pozitivan uticaj na imunski sistem (Chang i sar. 1996, Kegley 1996, Bernhard i sar. 2012). Mehanizam dejstva hroma na IGF-I sistem je do sada nerazjašnjen (Tian i sar. 2014) i osim uticaja hroma na koncentraciju IGF-I uglavnom nisu istraživani drugi faktori koji su značajni za funkcionisanje IGF-sistema kao što su receptori za IGF-I i IGF-vezujući protein (Breier i Sauerwein, 1995). U *in vitro* istraživanju (Peng i sar. 2010) koje je sprovedeno na kulturi mišićnih ćelija pacova utvrđeno je da hrom u obliku hroma vezanog za male peptide dovodi do povećane ekspresije gena za IGF-I receptor. U istom eksperimentu hrom u obliku hrom hlorida i hrom pikolinata nije doveo do povećane ekspresije pomenutog gena. Međutim, ukoliko se u medijum ćelijske kulture pored tri pomenuta oblika hroma (hroma vezanog za male peptide, hrom horida i hrom pikolinata) doda insulin dolazi do povećane ekspresije gena za IGF-I receptor u sva tri slučaja. Za sada ne postoje istraživanja koja ukazuju na uticaj hroma na zastupljenost i aktivnost IGF-I receptora. S obzrom na visoku homologiju receptora za insulin i receptora za IGF-I (LeRoith i sar. 1995) i na utvrđenu povećanu zastupljenost i aktivnost receptora za insulin kod PoCr grupe u našem ogledu možemo pretpostaviti da je hrom mogao da ima sličan efekat i na receptor za IGF-I. Stoga, smanjene koncentracije IGF-I kod teladi PoCr grupe nisu dovele do razlika u telesnoj masi jer je efekat IGF-I na nivou tkiva verovatno bio pojačan kod PoCr grupe.

## 6. 6. ZASTUPLJENOST IGF VEZUJUĆIH PROTEINA

Osim razlike u zastupljenosti IGFBP-3 nisu primećene razlike u zastupljenosti drugih IGF vezujućih proteina kod ispitivanih grupa teladi. Prema dosadašnjim istraživanjima koncentracija IGFBP-3 u cirkulaciji je desetostruko veća u odnosu na druge vezujuće proteine, tako da je oko 75% IGF molekula u cirkulaciji vezano za ovaj protein (Baxter, 1994), a poluživot IGFBP-3 u cirkulaciji iznosi 15-20 sati. U serumu goveda je IGFBP-3 prisutan u najvišoj koncentraciji, a za njim slede IGFBP-2 i IGFBP-1 (McGuire i sar. 1992). S obzirom da je molarna koncentracija IGFBP u serumu za 50% viša od IGF molekula, svega 1% IGF molekula se nalazi u slobodnom obliku. Ispitivanja krvnog seruma ljudi su pokazala pozitivnu korelaciju između koncentracije IGF-I i koncentracije IGFBP-3. Kod PoCr teladi u našem eksperimentu zabeležen je pad zastupljenosti IGFBP-3 50. dana oglada kada je zabeležen i statistički značajan pad u koncentraciji IGF-I. Za razliku od IGFBP-1 i 2, koncentracija IGFBP-3 se ne menja brzo i njegova koncentracija u krvi se povećava tokom postnatalnog rasta jedinki većine vrsta životinja (Jull i sar. 1995). On gradi trokomponentne komplekse sa IGF molekulima koji ne izlaze iz cirkulacije. Zbog toga, ovaj vezujući protein predstavlja relativno stabilan depo IGF peptida (Barreca i sar. 1995). IGFBP-3 može da ima i inhibitorni i stimulatorni uticaj na delovanje IGF molekula, a njegov efekat može biti IGF zavisan i IGF nezavisan. Naime, IGF molekuli imaju veći afinitet za IGFBP-3 nego za IGF receptore, tako da prisustvo vezujućeg proteina može inhibirati reakciju ligand-receptor (Clemmons, 1997). U nekim eksperimentima je, međutim, uočeno stimulatívno dejstvo IGFBP-3 koje je verovatno posledica vezivanja kompleksa za ciljnu ćeliju i sporog otpuštanja IGF-I/II. Postepenim otpuštanjem IGF molekula, povećava se stabilnost liganda.

Do sada ne postoje literaturni podaci koji se bave uticajem hroma na IGF vezujuće proteine. Pored objašnjenja vezanog za moguću modulaciju na nivou IGF receptora, izostanak efekta smanjene koncentracije IGF-I kod teladi PoCr grupe na prirast, ali i koncentraciju ukupnih proteina, triglicerida i holesterola, možemo objasniti i smanjenjem koncentracije IGFBP-3 u našem ogledu. Naime, moguće je da je smanjenje IGFBP-3 dovelo do povećane biorasploživosti IGF-I i posledičnog većeg vezivanja za

receptore, čime su sprečeni negativni efekti niskih koncentracija IGF-I. Treba napomenuti da IGFBP-3 može delovati i samostalno vezivanjem za sopstvene receptore u tkivima, a Rutanen i saradnici (1990) su dokazali inhibitorno delovanje IGFBP-3 na sintezu DNK.

## **6.7. TELESNA MASA**

Naši rezultati ukazuju da peroralna aplikacija hroma nije dovela do promene telesne mase koji bi bio različit u odnosu na promenu kod kontrolne grupe, što je u saglasnosti sa pojedinim literaturnim podacima koji se odnose na telad (Mathison i Engstrom, 1995, Swanson i sar. 2000, Yari i sar. 2010). Međutim, pojedini autori su zabeležili povećanje telesne mase kod teladi kojoj je aplikovan hrom (Moonsie-Shageer i Mowat 1993, Kegley i sar. 1997, Ghorbani 2012). Kada se tumači uticaj hroma na prirast teladi treba imati u vidu uslove eksperimenta, odnosno u kom uzrastu je počela aplikacija hroma i na koji način je vršena. Naime, značajno različiti rezultati su dobijeni zavisno od toga da li je hrom dodavan u kolostrum i/ili mleko ili u koncentrovani deo obroka kod starije teladi. U eksperimentu Yari i saradnika (2010) hrom metionin je dodavan u mleko od četvrtog dana života teladi do zalučenja i nisu utrdene promene u telesnoj masi. S druge strane kada je hrom metionin dodavan u kolostrum od prvog dana života, a dodavanje je nastavljeno u mleko do osam nedelja starosti, uočeno je povećanje prirasta kod teladi (Ghorbani i sar. 2012). Zaključeno je da hrom može uticati na resorpciju nutritivno značajnih komponenti kolostruma koje mogu imati dugotrajne sistemske efekte na metabolizam i endokrini sistem teladi (Blum, 2006).

Uticaj hroma na prirast najviše je praćen kod prasadi, ali su i u tim istraživanjima dobijeni kontradiktorni rezultati. Boleman i saradnici (1995) i Matthews i saradnici (2001) su zabeležili pad u prirastu i konzumaciji hrane kod prasadi u tovu kojima je u hranu dodavan hrom pikolinat i hrom propionat. Za razliku od njih, Li i saradnici (2013) beleže porast u prirastu i dnevnoj konzumaciji hrane kod prasadi u tovu koja su dobijala hrom metionin. Takođe, postoje istraživanja u kojima nije zabeležen uticaj hroma na prirast i dnevni unos hrane (Amoikon i sar. 1995, Wang i sar. 2004). Navedene varijacije u uticaju hroma na prirast mogu se pririsati različitim formama hroma korišćenim u eksperimentima kao i različitim periodima tokom odgoja kada je aplikovan hrom. Najčešće je u eksperimentima u kojima je je dokazan uticaj dodatog

hroma na promenu u telesnoj masi utvrđeno i postojanje promena u koncentraciji proteina (ukupnih proteina i albumina) u krvi (Tian i sar. 2014). U našem eksperimentu nisu utvrđene promene proteinemije. Treba naglastiti da je u istraživanju na prasadima Tian i saradnika (2014), zabeležen pad koncentracije IGF-I kao u našem istraživanju, ali takođe nisu pronađene razlike u telesnoj masi.



## 7. ZAKLJUČCI

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

1. Aplikovani hrom je imao pozitivan efekat na zastupljenost ispitivanih molekula, pozitivnih regulatora signalnog puta insulina u biopotatima mišićnog tkiva teladi. Naime, zabeležen je značajan porast zastupljenosti insulinskog receptora ( $IR\beta$ ), supstrata insulinskog receptora fosforilisanog na tirozinu 632 (pIRS-1 Tyr<sup>632</sup>), protein kinaze B (Akt) fosforilisane na serinu 473 (pAkt Ser<sup>473</sup>), transportnog molekula za glukozu (GLUT4) i AMP- zavisne protein kinaze (AMPK). Peroralno aplikovani hrom nije imao efekta na zastupljenost supstrata insulinskog receptora fosforilisanog na serinu 307 (pIRS-1 Ser<sup>307</sup>), kao negativnog regulatora signalnog puta insulina.
2. U skladu sa nalazima na molekularnom nivou, intravenski testovi opterećenja glukozom ukazuju na povećanu insulinsku senzitivnost odnosno bolju utilizaciju glukoze kod grupe kojoj je peroralno aplikovan hrom. Parametri kinetike glukoze koji idu u prilog navedenom zaključku su značajno niže vrednosti za  $T_{1/2}$  i  $AUC_{glukoza}$ , kao i značajno više  $k$  vrednosti kod grupe kojoj je aplikovan hrom. Parametri kinetike insulina su bili u manjoj meri promenjeni pod uticajem aplikacije hroma ali su zabeležene značajno niže vrednosti za  $Pik_{insulin}$  kod grupe kojoj je aplikovan hrom. Takođe, vrednosti za RQICKI su bile statistički značajno više kod grupe kojoj je peroralno aplikovan hrom.
3. Kod grupe kojoj je aplikovan hrom zabeležene su značajno niže vrednosti bazalnih koncentracija glukoze i insulina 30. i 70. dana ogleđa, što ukazuje na postojanje energetske deficita kod teladi kojoj je peroralno aplikovan hrom, posebno u periodu nutritivnog prestrojanja.
4. Peroralna aplikacija hroma teladi dovela je, 50. dana ogleđa, do smanjenja koncentracije IGF-I i IGFBP-3, koje su bile značajno niže nego kod teladi koja nije dobijala hrom, čime je po svemu sudeći povećana bioraspoloživost IGF-I, odnosno izbegnuti su negativni efekti smanjene koncentracije IGF-I.

5. Nisu zabeleženi efekti peroralne aplikacije hroma na telesnu masu teladi ni u jednom od ispitivanih perioda.
6. Dobijeni rezultati ukazuju da peroralno aplikovan hrom značajno utiče na metabolizam teladi, posebno u periodu metaboličkog prestrojavanja, ali da krajnji efekat na performanse teladi (telesnu masu, pre svega) može zavistiti od prilagođenosti energetske komponente obroka povećanom sadržaju hroma u organizmu.

## 7. LITERATURA

1. Abe H, Kawakita Y, Hodate K, Saito M, 2001, Postnatal development of glucose transporter protein in bovine skeletal muscle and adipose tissue, *J Vet Med Sci*, 63: 1071–75.
2. Abraham AS, Sonnenblick M, Eini M, 1982a, The action of chromium on serum lipids and on atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits, *Atherosclerosis*, 42, 185–95.
3. Abraham AS, Sonnenblick M, Eini M, 1982b, The effect of chromium on cholesterol induced atherosclerosis in rabbits, *Atherosclerosis*, 42, 371–72.
4. Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF, 2000, The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307), *J Biol Chem*, 275:9047–54.
5. Aguirre V, Werner ED, Giraud J, Lee YH, Shoelson SE, White MF, 2002, Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with insulin receptor and inhibits insulin action, *J Biol Chem*, 277: 1531–37.
6. Al-Saiadya MY, Al-Shaikh MA, Al-Mufarreja SI, Al-Showeimia TA, Mogawera HH, Dirrara A, 2004, Effect of chelated chromium supplementation on lactation performance and blood parameters of Holstein cows under heat stress, *Anim Feed Sci Tech*, 117: 223–33.
7. Al-Trad B, Reisberg K, Wittek T, Penner GB, Alkaassem A, Gäbel G, Fürll M, Aschenbach JR, 2009, Increasing intravenous infusions of glucose improve body condition but not lactation performance in midlactation dairy cows, *J Dairy Sci*, 92: 5645–58.
8. Amata, IA, 2013, Chromium in Livestock Nutrition: A Review Glo. Adv. Res, *J. Agric. Sci*, Vol. 2(12) pp. 289-306.
9. Amoikon, EK, Fernandez, JM, Southern, LL, Thompson, DL J., Ward, TL, Olcott, BM, 1995, Effect of chromium tripicolinate on growth, glucose tolerance, insulin sensitivity, plasma metabolites, and growth hormone in pigs, *J. Anim. Sci*, 73:1123–30.

10. Anderson RA, 1997, Chromium as an essential nutrient for humans, *Regul toxicol pharm*, 26, 35–41.
11. Anderson RA, 2000, Chromium in the prevention and control of diabetes, *Diabetes-metab res*, 26, 22–27.
12. Anderson RA, Bryden NA, Polansky MM, Deuster PA, 1988, Exercise effects on chromium excretion of trained and untrained men consuming a constant diet, *J Appl Physiol*, 64, 249–52.
13. Anderson RA, Kozłowski AS, 1985, Chromium intake, absorption and excretion of subjects consuming self-selected diets, *Am J Clin Nutr*, 41, 571–77.
14. Anderson RA, Polansky MM, Bryden NA, Patterson KY, Veillon C, Glinsmann WH, 1983, Effects of chromium supplementation on urinary Cr excretion of human subjects and correlation of Cr excretion with selected clinical parameters, *J Nutr*, 113, 276–81.
15. Anderson RA, Polansky MM, Bryden NA, Roginski EE, Patterson KY, Reamer DC, 1982, Effects of exercise (running) on serum glucose, insulin, glucagon and chromium excretion, *Diabetes*, 32, 212–16.
16. Baxter RC, Bryson JM, Turtle JR, 1980, Somatogenic receptors of rat liver: regulation by insulin, *Endocrinol*, 107, 1176 – 81.
17. Baxter RC, 1994, Insulin-like growth factor binding proteins in the human circulation:a review, *Hor Res*, 42, 140-4.
18. Bar RS, Boes M, Clemmons DR, Busby WH, Sandra A, Dake BL, Booth BA, 1990, Insulin differentially alters transcapillary movement of intravascular IGFBP-1, IGFBP-2 and endothelial cell IGF-binding proteins in the rat heart, *Endocrinol*, 127, 497-9.
19. Barceloux DG, 1999, Chromium, *Clin Toxicol*, 37, 173–94.
20. Barnhart J, 1997, Occurrences, uses, and properties of chromium, *Regul Toxicol Pharm*, 26, 3–7.
21. Barreca A, Ponzani P, Arvigo M, Giordano G, Minuto F, 1995, Effect of the acid-labile subunit on the binding of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 to (<sup>125</sup>J)IGF-I, *J Clin Endocrinol Metabol*, 80, 1318-24.

22. Bayascas, JR and Alessi, DR, 2005. Regulation of Akt/PKB Ser473 phosphorylation, *Mol cell*, 18(2), pp.143-45.
23. Bernhard, BC, Burdick, NC, Rounds, W, Rathmann RJ, Carroll JA, Finck DN, Jennings MA, Young TR and Johnson BJ, 2012, Chromium supplementation alters the performance and health of feedlot cattle during the receiving period and enhances their metabolic response to a lipopolysaccharide challenge, *J anim sci*, 90(11), pp.3879-888.
24. Blanco M, Casasús I, Villalba D, 2010, A spline polynomial model to describe serum IGF-I concentration from birth to slaughter in calves: effects of weaning age, pre-weaning concentrate feeding and breed, *Domest Anim Endocrin*, 38, 157–67
25. Blanco M, Villalba D, Ripoll G, Sauerwein H, Casasús I, 2009, Effects of early weaning and breed on calf performance and carcass and meat quality in autumn-born bull calves, *Livest Sci*, 120:103–15
26. Blum JW, 2006, Nutritional physiology of neonatal calves, *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl.)* 90:1–11.
27. Boleman SL, Boleman SJ, Bidner TD, Southern LL, Ward TL, Pontif JE, Pike MM, 1995, Effect of chromium picolinate on growth, body composition, and tissue accretion in pigs. *J Anim Sci* 73(7):2033–42
28. Borel JS, Anderson RA, 1984, Chromium, In: Frieden E. (ed.): *Biochemistry of the Essential Ultratrace Elements*. Plenum Press, New York. 175–99.
29. Breier BH, Sauerwein H, 1995, Regulation of growth in ruminants by the somatotrophic axis. In: von Engelhardt W, Leonhard-Marek S, Breves G, Giesecke D, editors. *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction*. Stuttgart, Germany: F. Enke Verlag, p. 451–74.
30. Brickell JS, McGowan MM, Pfeiffer DU and Wathes DC, 2009, Mortality in Holstein-Friesian calves and replacement heifers, in relation to body weight and IGF-I concentration, on 19 farms in England, *Animal*, 3(8), pp.1175-82.

31. Bryan MA, Socha MT, Tomlinson DJ, 2004, Supplementing intensively grazed late-gestation and early lactation dairy cattle with chromium, *J Dairy Sci*, 87, 4269–77.
32. Bunker W, Lawson MD, Delves HT, Clayton BE, 1984, The up take and excretion of chromium by the elderly, *Am J Clin Nutr*, 39, 799–802.
33. Bunting LD, Fernandez JM, Thompson DL, Southern LL, 1994, Influence of chromium picolinate on glucose usage and metabolic criteria in growing Holstein calves, *J Dairy Sci*, 72: 1591-99.
34. Castello A, Rodriguez-Manzaneque JC, Camps M, Perez-Castillo A, Testar X, Palacin M, Santos A, Zorzano A, 1994, Perinatal hypothyroidism impairs the normal transition of GLUT4 and GLUT1 glucose transporters from fetal to neonatal levels in heart and brown adipose tissue. Evidence for tissue-specific regulation of GLUT4 expression by thyroid hormone, *J Bio Chem*, 269: 5905–12.
35. Cefalu WT, Wang ZQ, Zhang XH, Baldor LC, Russell JC, 2002, Oral chromium picolinate improves carbohydrate and lipid metabolism and enhances skeletal muscle GLUT4 translocation in obese, hyperinsulinemic (JCR-LA corpulent) rats, *J Nutr* 132(6):1107–14
36. Chang, GX, Mallard BA, Mowat DN and Gallo GF, 1996, Effect of supplemental chromium on antibody responses of newly arrived feeder calves to vaccines and ovalbumin, *Can j vet res*, 60(2), p.140.
37. Chen G, Liu P, Pattar GR, 2006, Chromium activates glucose transporter 4 trafficking and enhances insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes via a cholesterol-dependent mechanism, *Mol Endocrinol*, 20, 857-70.
38. Chen NSC, Tsai A, Duer IA, 1973, Effects of chelating agents on chromium absorption in rats, *J Nutr*, 103, 1182–86.
39. Chen WY, Chen CJ, Liu CH, Mao FC, 2009, Chromium supplementation enhances insulin signalling in skeletal muscle of obese KK/HIJ diabetic mice, *Diabetes Obes Metab*, 11: 293–303.
40. Clemmons DR, Klibanski A, Underwood LE, McArthur JW, Ridgway EC, Beitins IZ, Van Wyk JJ, 1981, Reduction of plasma

immunoreactive somatomedin C during fasting in humans, *J Clin Endocrinol Metab*, 53:1247–50.

41. Clemmons DR, 1997, Insulin-like growth factor binding proteins and their role in controlling IGF actions, *Cytokine Growth Factor Rev*, 8, 45-62.

42. Cline GW, Petersen KF, Krssak M et al, 1999, Impaired glucose transport as a cause of decreased insulin-stimulated muscle glycogen synthesis in type 2 diabetes, *N Engl J Med*, 341:240–46.

43. Cohen MD, Kargacin B, Klein CB, Costa M, 1993, Mechanisms of chromium carcinogenicity and toxicity, *Crit Rev Toxicol*, 23, 255–81.

44. Collett-Solberg PF, Cohen P, 1996, The role of insulin-like growth factor binding proteins and the IGFBP proteases in modulating IGF action, *Endocrinol Metab lin North Am*, 25, 591-614.

45. Daughaday WH, Phillips LS, Mueller MC, 1976, The effects of insulin and growth hormone on the release of somatomedin by the isolated rat liver, *Endocrinol*, 98, 1214-9.

46. Depew CL, Bunting LD, Fernandez JM, Thompson DL, Adkinson RW, 1998, Performance and Metabolic Responses of Young Dairy Calves Fed Diets Supplemented with Chromium Tripicolinate<sup>1</sup>, *J Dairy Sci*, 1;81(11): 2916-23.

47. Di Bona KR, Love S, Rhodes NR, McAdory D, Sinha SH, Kern N, Kent J, Strickland J, Wilson A, Beaird J, Ramage J, Rasco JF, Vincent JB, 2011, Chromium is not an essential trace element for mammals: effects of a “low-chromium” diet, *J Biol Inorg Chem*, 16(3):381–90. doi:10.1007/s00775-010-0734-y.

48. Dong F, Kandadi MR, Ren J, Sreejayan N, 2008, Chromium (D-phenylalanine)<sub>3</sub> supplementation alters glucose disposal, insulin signaling, and glucose transporter-4 membrane translocation in insulin-resistant mice, *J Nutr*, 138: 1846–51.

49. Duan C, Xu Q, 2005, Roles of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins in regulating IGF actions, *Gen Comp Endocr*, 142:44–52.

50. Dubois F, Belleville F, 1991, Chromium – physiological role and implications for human disease, *Pathol Biol*, 39, 801–8.

51. Ducros V, 1992, Chromium metabolism, *Biol Trace Elem Res*, 32, 65–77.
52. Ebara F, Inada S, Morikawa M, Asaoka SH, Isozaki Y, Saito A, Etoh T, Shiotsuka Y, Wegner J, Gotoh T, 2013, Effect of nutrient intake on intramuscular glucose metabolism during the early growth stage in cross-bred steers (Japanese Black male • Holstein female), *J Anim Physiol An*, N 97: 684–93.
53. Evock-Clover CM, Polansky MM, Anderson RA, Steele NC, 1993, Dietary chromium supplementation with or without somatotropin treatment alters serum hormones and metabolites in growing pigs without affecting growth performance, *J Nutr*, 123(9):1504–12.
54. Firth, SM, Baxter RC, 1999, Characterisation of recombinant glycosylation variants of insulin-like growth factor binding protein-3, *J Endocrinol*, 160: 379-87.
55. Fottner C, Engelhardt D, Weber MM, 1999, Characterization of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) secreted by bovine adrenocortical cells in primary culture:regulation by insulin-like growth factors (IGFs) and adrenocorticotropin (ACTH), *Horm Met Res*, 31, 203-8.
56. Fox CJ, Hammerman PS and Thompson CB, 2005, Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response, *Nat Rev Immunol*, 5, 844–52.
57. Ghorbani A, Sadri H, Alizadeh AR, Bruckmaier RM, 2012, Performance and metabolic response of Holstein calves to supplemental chromium in colostrum and milk, *J Dairy Sci*, 95: 5760–69.
58. Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF, 2005, Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation, *Biochimie*, 87: 99-109.
59. Haldar S, Ghosh TK, Pakhira MC, De K, 2006, Effects of incremental dietary chromium (Cr<sup>3+</sup>) on growth, hormone concentrations and glucose clearance in growing goats (*Capra hircus*), *J Agr Sci*, 144: 269–80. doi:10.1017/S0021859606006113.



60. Hayden JM, Williams JE, Collier RJ, 1993, Plasma growth hormone, insulin-like growth factor, insulin, and thyroid hormone association with body protein and fat accretion in steers undergoing compensatory gain after dietary energy restriction, *J Anim Sci*, 71:3327–38.
61. Hayirli, A, Bremmer DR, Bertics SJ, Socha MT, Grummer RR, 2001, Effect of chromium supplementation on production and metabolic parameters in periparturient dairy cows, *J Dairy Sci*, 84, 1218–30.
62. Hepburn DD, Burney JM, Woski SA, Vincent JB, 2003, The nutritional supplement chromium picolinate generates oxidative DNA damage and peroxidized lipids in vivo, *Polyhedron*, 22(3): 455-63.
63. Hocquette FL, 2010, Endocrine and metabolic regulation of muscle growth and body composition in cattle, *Animal*, 4: 1797–809.
64. Hoffman NJ, Penque BA, Habegger KM et al, 2014, Chromium enhances insulin responsiveness via AMPK, *J Nutr Biochem*, 25: 565–72.
65. Holly JMP, 1991, The physiological role of IGFBP-1, *Acta Endocrinologica (Copenh)*, 124, 55-62.
66. Holtenius K, Agenäs S, Delavaud C, Chilliard Y, 2003, Effects of feeding intensity during the dry period, Metabolic and hormonal responses, *J Dairy Sci*, 86: 883-91.
67. Holtenius P, Holtenius K, 2007, A model to estimate insulin sensitivity in dairy cows, *Acta Vet Scand*, 49: 29.
68. Hornick JL, Van Eenaeme C, Diez M, Minet V, Istasse L, 1998, Different periods of feed restriction before compensatory growth in Belgian blue bulls: II Plasma metabolites and hormones, *J Anim Sci*, 76:260–71.
69. Horvath EM, Tackett L, McCarthy AM, Raman P, Brozinick JT, Elmendorf JS, 2008 Antidiabetogenic effects of chromium mitigate hyperinsulinemia-induced cellular insulin resistance via correction of plasma membrane cholesterol imbalance, *Mol Endocrinol*, 22: 937-50.
70. Hossenlop P, Seurin D, Segovia-Quinson B, Hardouin S, Binoux M, 1986, Analysis of serum insulin-like growth hormone binding proteins using Wester blotting: use of the method for titration of the binding proteins and competitive binding studies, *Anal Chem*, 154, 138-43.

71. Houston B, O'Neill IE, 1991, insulin and growth hormone act synergistically to stimulate insulin-like growth factor – I production by cultured chicken hepatocytes, *J Endocrinol*, 128, 389 – 93.
72. Hua Y, Clark S, Ren J, Sreejayan N, 2012, Molecular mechanisms of chromium in alleviating insulin resistance, *J Nutri Bioch*, 23: 313–319.
73. Hunt CD, Stoecker BJ, 1996, Deliberations and evaluations of the approaches, endpoints and paradigms for boron, chromium and fluoride dietary recommendations, *J Nutr*, 126, 2441S–51S.
74. Jeebhoy KN, Chu RC, Marliss EB, Greenberg GR, Bruce-Robertson A, 1977, Chromium deficiency, glucose intolerance and neuropathy reversed by chromium supplementation in a patient receiving longterm total parenteral nutrition, *Am J Clin Nutr*, 30, 531–38.
75. Jeon S.M, 2016, Regulation and function of AMPK in physiology and diseases, *Exp mol med*, 48(7), p.e245.
76. Johnson TR, Blossey BK, Denko CW, 1989, Expression of insulin-like growth factor – I in cultured rat hepatocytes: effects of insulin and growth hormone, *Mol Endocrinol*, 3, 580 – 7.
77. Jovanović Lj, Pantelić M, Prodanović R, Vujanac I, Đurić M, Tepavčević S, Vranješ-Đurić S, Korićanac G and Kirovski D, 2017, Effect of Peroral Administration of Chromium on Insulin Signaling Pathway in Skeletal Muscle Tissue of Holstein Calves, *Biol Trace Elem Res*, pp.1-10.
78. Jull A, Dalgaard P, Blum WF, Bang P, Hall K, Michaelsen KF, Muller J, Skakkebaek NE, 1995, Serum levels of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 (IGFBP-3) in healthy infants, children, and adolescents: the relation to IGF-I, IGF-II, IGFBP-1, IGFBP-2, age, sex, body mass index, and pubertal maturation, *J Clin Endocrinol Metab*, 80, 2534-42.
79. Kamiya M, Matsuzaki M, Orito H, Kamiya Y, Nakamura YN, Tsuneishi E, 2009, Effects of feeding level of milk replacer on body growth, plasma metabolite and insulin concentrations, and visceral organ growth of suckling calves, *Anim Sci*, J 80: 662–8.

80. Kandadi MR, Unnikrishnan MK, Warriar AK, Du M, Ren J, Sreejayan N, 2011, Chromium (D-phenylalanine)<sub>3</sub> alleviates high fat-induced insulin resistance and lipid abnormalities, *J Inorg Biochem*, 105:58–62.
81. Kandrór KV, 1999, Insulin regulation of protein traffic in rat adipocyte cells, *J Biol Chem*, 274, 25210–17.
82. Kegley EB, Spears JW, 1995, Immune response, glucose metabolism, and performance of stressed feeder calves fed inorganic or organic chromium, *J Anim Sci*, 73(9):2721-6.
83. Kegley, EB, Spears JW, and Brown TT, 1996, Immune Response and Disease Resistance of Calves Fed Chromium Nicotinic Acid Complex or Chromium Chloride<sup>1</sup>, *J Dairy Sci*, 79(7), 1278-83.
84. Kegley EB, Spears JW, Brown TT, 1997, Effect of shipping and chromium supplementation on performance, immune response, and disease resistance of steers, *J Anim Sci*, 75(7), 1956-64.
85. Kim BG, Lindemann MD, Cromwell GL et al, 2010, The effects of dietary chromium (III) picolinate on growth performance, vital signs, and blood measurements of pigs during immune stress, *Biol Trace Elem Res*, 135:200–10.
86. Kim DS, Kim TW, Kang JS, 2004, Chromium picolinate supplementation improves insulin sensitivity in Goto-Kakizaki diabetic rats, *J Trace Elem Med Bio*, 17, 243–7.
87. Kirovski D, 2005, Uticaj peroralne aplikacije insulina i glukoze na koncentraciju insulinu-sličnog faktora rasta (IGF)–I i zastupljenost pojedinih IGF vezujućih proteina u krvnom serumu teladi u neonatalnom periodu, Doktorska teza, Univerzitet u Beogradu
88. Konner AC, Bruning JC, 2012, Selective insulin and leptin resistance in metabolic disorders, *Cell Metab*, 16:144–52.
89. Kumar M, Kaur H, Tyagi AK, Kewalramani NJ, Mani V, Deka RS, Sharma VK, Chandra G, Dang AK, 2013, Effect of feeding inorganic chromium on growth performance, endocrine variables, and energy metabolites in winter-exposed buffalo calves (*Bubalus bubalis*), *Biol Trace Elem Res*, 155(3): 352-60.

90. Laschinsky N, Kottwitz K, Freund B, Dresow B, Fischer R, Nielsen P, 2012, Bioavailability of chromium(III)-supplements in rats and humans, *Biometals*, 25(5):1051–60.
91. Lefavi RG, Wilson GD, Keith RE, Blessing DL, Hames CG, McMillan JL, 1993, Lipid-lowering effect of a dietary chromium (III)-nicotinic acid complex in male athletes, *Nutr Res*, 13, 239–49.
92. Leiva T, Cooke RF, Aboin AC, Drago FL, Gennari R, Vasconcelos JLM, 2014, Effects of excessive energy intake and supplementation with chromium propionate on insulin resistance parameters in nonlactating dairy cows, *J Anim Sci*, 92: 775-82.
93. Leng RA, 1970, Fermentation and production of volatile fatty acid in the rumen. In, Philipson AT, Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant, pp. 406-21. *Oriel Press Ltd. Newcastle upon Tyne, England*.
94. LeRoith D, 2003, The Insulin-Like Growth Factor System, *Exp Diabetes Res*, 4:205–12.
95. LeRoith D, Werer H, Beitner-Johnson D, Roberts CTJr, 1995, Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor receptor, *Endocrine Rev*, 16,143-63.
96. Lewitt MS, Saunders H, Baxter RC, 1992, Regulation of rat insulin-like growth factor-binding protein-1: The effects of insulin-induced hypoglycemia, *Endocrin*, 131, 2357-64.
97. Li YS, Zhu NH, Niu PP, Shi FX, Hughes CL, Tian GX, Huang RH, 2013, Effects of dietary chromium methionine on growth performance, carcass composition, meat colour and expression of the colour-related gene myoglobin of growing-finishing pigs, *Asian Austral J Anim*, 26(7):1021–29.
98. Lien TF, Wu CP, Wang BJ, Shiao MS, Shiao TY, Lin BH, Lu JJ, Hu CY ,2001, Effect of supplemental levels of chromium picolinate on the growth performance, serum traits, carcass characteristics and lipid metabolism of growing-finishing pigs, *Anim Sci*, 72:289–96.
99. Lien TF, Yang KH, Lin KJ, 2005, Effects of chromium propionate supplementation on growth performance, serum traits and immune response in weaned pigs, *Asian Austral J Anim*, 18(3):403–8.

100. Lindemann MD, Cromwell GL, Monegue HJ, Purser KW, 2008, Effect of chromium source on tissue concentration of chromium in pigs, *J Anim Sci*, 86(11):2971–8. doi:10.2527/jas.2008-0888.
101. Lindemann MD, Wood CM, Harper AF, Kornegay ET, Anderson RA, 1995, Dietary chromium picolinate additions improve gain/feed and carcass characteristics in growing-finishing pigs and increase litter size in reproducing sows, *J Anim Sci*, 73(2):457–65.
102. Liu L, Wang B, He Y, Tao W, Liu Z, Wang M, 2016, Effects of Chromium-Loaded Chitosan Nanoparticles on Glucose Transporter 4, Relevant mRNA, and Proteins of Phosphatidylinositol 3-Kinase, Akt2-Kinase, and AMP-Activated Protein Kinase of Skeletal Muscles in Finishing Pigs, *Biol Trace Elem Res*, 174: 1-8.
103. Lyons TP, 1994, Biotechnology in the feed industry: 1994 and beyond. In: Proceedings of Alltech's 10th Annual Symposium, Biotechnology in the Feed Industry, Lyons P, Jacques KA (eds.), *Nottingham University Press, UK*, 1–50.
104. Maccari P, Wiedemann S, Kunz HJ, Piechotta M, Sanftleben P, Kaske M, 2015, Effects of two different rearing protocols for Holstein bull calves in the first 3 weeks of life on health status, metabolism and subsequent performance, *J Anim Physiol An*, N 99: 737-46.
105. Mackenzie RD, Answar R, Byerrum RU, Hoppert C, 1959, Absorption and distribution of <sup>51</sup>Cr in the albino rat, *Archives of Biochemistry (Arch Biochem Biophys)*, 79, 200–5.
106. Mackowiak P, Krejpcio Z, Sassek M, Kaczmarek P, Hertig I, Chmielewska J, Wojciechowicz T, Szczepankiewicz D, Wieczorek D, Szymusiak H, Nowak WK, 2010, Evaluation of insulin binding and signaling activity of newly synthesized chromium(III) complexes in vitro, *Mol Med*, 3, 347-53.
107. Martin PA, Crump MH, 2003, The adrenal gland, 165–200 in McDonald's Veterinary Endocrinology, Pineda MH, ed. *Iowa State University Press, Ames*.

108. Masnikosa R, Baricevic I, Lagundzin D and Nedic O, 2011, Immunodetection of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) in the sera of different animal species, *Turk J Vet Anim Sci*, 35(6), pp.443-52.
109. Mathison GW, Engstrom DF, 1995, Chromium and protein supplements for growing-finishing beef steers fed barley-based diets, *Can. J Anim Sci* 75:549–58.
110. Matsubara A, Takahashi H, Saito A, Nomura A, Sithyphone K, McMahan CD, Fujino R, Shiotsuka Y, Etoh T, Furuse M, Gotoh T, 2015, Effects of a high milk intake during the pre-weaning period on nutrient metabolism and growth rate in Japanese Black cattle, *Anim Sci*, J 86: 1-7.
111. Matthews JO, Southern LL, Fernandez JM, Pontif JE, Bidner TD, Odgaard RL, 2001, Effect of chromium picolinate and chromium propionate on glucose and insulin kinetics of growing barrows and on growth and carcass traits of growing-finishing barrows, *J Anim Sci* 79(8):2172–8.
112. McGuire MA, Vicini JL, Bauman DE, Veenhuizen JJ, 1992, Insulin-like growth factors and binding proteins in ruminants and their nutritional regulation, *J Anim Sci*, 70, 2901-10.
113. McNamara JP, Valdez F, 2005, Adipose tissue metabolism and production responses to calcium propionate and chromium propionate, *J Dairy Sci*, 88, 498–507.
114. Meng SX, Cao JM, Feng Q et al, 2013, Roles of chlorogenic acid on regulating glucose and lipids metabolism: a review, *Evid-Based Compl Alt*, ID 801457.
115. Mertz W, 1992, Chromium: history and nutritional importance, *Biol Trace Elem Res*, 32, 3–8.
116. Miljuš G, 2015, Izolovanje, karakterizacija i uloga kompleksa transferina sa vezujućim proteinom 3 za faktore rasta slične insulin, Doktorska teza, Univerzitet u Beogradu
117. Monzavi R, 2002, IGFs and IGFBPs: role in health and disease, *Best Practise Res Clin Endocrinol Metab*, 16, 433-47.

118. Mooney KM, Cromwell GL, 1997, Efficacy of chromium picolinate and chromium chloride as potential modifiers in swine, *J Anim Sci*, 73:3351–7.
119. Moonsie-Shageer S, Mowat DN, 1993, Effect of level of supplemental chromium on performance, serum constituents and immune status of stress feeder calves, *J Anim Sci*, 71:232–8.
120. Murphy LJ, 1998, Insulin-like growth factor binding proteins: functional diversity or redundancy?, *Jf Mol Endocrinol*, 21, 97-107.
121. Myers Jr MG, White MF, 1993, The new elements of insulin signaling. Insulin receptor substrate-1 and proteins with SH2 domains, *Diabetes*, 42: 643–50.
122. Nielsen FH, 2007, Summary: the clinical and nutritional importance of chromium—still debated after 50 years of research. In: Vincent JB (ed) *The nutritional biochemistry of chromium(III)*, Elsevier, Amsterdam, pp 265–76
123. Nikolić JA, Nedić O, Gavrović M, Stojanović D, Živković B, 1998, Different serum insulin-like growth factor-I (IGF-I) binding characteristics accompany reduced growth associated with low thyroid hormone and/or low total IGF-I status in young pigs, *Acta Vet*, 48, 3-18.
124. Nikolić JA, Ratković M, Nedić O, 1996b, Determination of insulin-like growth factor – I by radioimmunoassay, *J Serb Chem Soc*, 61, 1149-57.
125. Offenbacher EG, Rinko C, Pi-Sunyer FX, 1985, The effects of inorganic chromium and brewer's yeast on glucose tolerance, plasma lipids, and plasma chromium in elderly subjects, *Am J Clin Nutr*, 42, 454–61.
126. Okada S, Susuki M, Ohba H, 1983, Enhancement of ribonucleic acid synthesis by chromium (III) in mouse liver, *J Inorg Biochem*, 19, 95–103.
127. Okada S, Taniyama M, Ohba H, 1982, Mode of enhancement in ribonucleic acid synthesis directed by chromium (III)-bound deoxyribonucleic acid, *J Inorg Biochem*, 17, 41–49.
128. Okada S, Tsukada H, Tezuka M, 1989, Effect of chromium (III) on nuclear RNA-synthesis, *Biol Trace Elem Res*, 21, 35–9.

129. Oppenheimer CL, Pessin JE, Massaque J, Gitomer W, Czech MP, 1983, Insulin action rapidly modulates the apparent affinity of the insulin-like growth factor-I receptor, *J Biol Chem*, 258, 4824-30.
130. Ott EA, Kivipelto J, 1999, Influence of chromium tripicolinate on growth and glucose metabolism in yearling horses, *J Anim Sci*, 77, 3022–30.
131. Page TG, Southern LL, Ward TL et al, 1993, Effect of chromium picolinate on growth and serum and carcass traits of growing finishing pigs, *J Anim Sci*, 71:656–62.
132. Pantelić M, Jovanović Lj, Prodanović R, Vujanac I, Đurić M, Čulafić T, Vranješ-Đurić S, Korićanac G, Kirovski D, 2017, The impact of the chromium supplementation on insulin signalling pathway in different tissues and milk yield in dairy cows, *J Anim Physiol Anim Nutr*, doi:10.1111/jpn.12655
133. Pechova A, Pavlata L, 2007, Chromium as an essential nutrient: a review *Vet Med-Czech*, 52: 1–18.
134. Pechova A, Podhorsky A, Lokajova E, Pavlata L, Illek J, 2002, Metabolic effects of chromium supplementation in dairy cows in the periparturient period, *Acta Vet Brno*, 71, 9–18.
135. Peng, Zhongli, Wei Qiao, Zhisheng Wang, Qiuzhong Dai, Jianhua He, Chunhua Guo, Jun Xu, and Anguo Zhou, 2010, Chromium improves protein deposition through regulating the mRNA levels of IGF-1, IGF-1R, and Ub in rat skeletal muscle cells, *Biol trace elem res*, 137: 226-34.
136. Penumathsa SV, Thirunavukkarasu M, Samuel SM, Zhan L, Maulik G, Bagchi M, Bagchi D, Maulik N, 2009, Niacin bound chromium treatment induces myocardial GLUT4 translocation and caveolar interaction via Akt, AMPK and eNOS phosphorylation in streptozotocin induced diabetic rats after ischemia-reperfusion injury, *Biochem Biophys Acta*, 1792: 39-48.
137. Petterson SW, 2000, Effect of chromium on milk production and plasma insulin concentration in dairy cows, *Proc N.Z. Soc Anim Prod*, 60:307-17.
138. Poffenbarger PL, Haberal MA, 1976, Role of serum nonsuppressible insulin-like activity (NSILA) in wound healing. I. Influence of



thyroparathyroidectomy on serum NSILA and wound healing in the rat, *Surgery*, 80:608–16.

139. Potter JF, Levin P, Anderson RA, Freiberg JM, Andres R, 1985, Glucose metabolism in glucose-intolerant older people during chromium supplementation, *Metabolism*, 34, 199–204.

140. Qiao W, Peng Z, Wang Z, Wei J, Zhou A, 2009, Chromium improves glucose uptake and metabolism through upregulating the mRNA levels of IR, GLUT4, GS, and UCP3 in skeletal muscle cells, *Biol Trace Elem Res*, 131: 133-42.

141. Quigley JD, Caldwell LA, Sinks GD, Heitmann RN, 1991, Changes in blood glucose, non-esterified fatty acids, and ketones in response to weaning and feed intake in young calves, *J Dairy Sci* 74:250–7.

142. Rabinowitz MB, Gonick HC, Levine SR, Davidson MB, 1983, Clinical trial of chromium and yeast supplements on carbohydrate and lipid metabolism in diabetic men, *Biol Trace Elem Res*, 5, 449–66.

143. Rajaram S, Baylink DJ, Mohan S, 1997, Insulin-Like Growth Factor-Binding Proteins in Serum and Other Biological Fluids: Regulation and Functions, *Endocr Rev*, 18:801–31.

144. Renaville R, Van Eenaeme C, Breier BH, Vleurick L, Bertozzi C, Gengler N, Hornick JL, Parmentier I, Istasse L, Haezenbroeck V, Massart S, Portetelle D, 2000, Feed restriction in young bulls alters the onset of puberty in relationship with plasma insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins, *Domest Anim Endocrinol*, 18:165–76.

145. Riales R, Albrink JM, 1981, Effect of chromium chloride supplementation on glucose tolerance and serum lipids including high density lipoprotein of adult men, *Am J Clin Nutr*, 34, 2670–8.

146. Richter EA, Hargreaves M, 2013, Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake, *Physiol Rev*, 93: 993-1017.

147. Roith DL, Bondy C, Yakar S, Liu JL, Butler A, 2001, The somatomedin hypothesis, *Endo Rev*, 22, 53-74.

148. Rui L, Fisher TL, Thomas J, White MF, 2001, Regulation of insulin/insulin-like growth factor-1 signaling by proteasome-mediated degradation of insulin receptor substrate-2, *J Biol Chem*, 276:40362–7.
149. Rutanen E, Pekonen F, 1990, Insulin-like growth factors and their binding proteins, *Acta Endocrinol (Copenh)*, 23, 7-13.
150. Sadri H, Rahmani HR, Khorvash M, Ghorbani GR, Bruckmaier RM, 2012, Chromium supplementation and substitution of barley grain with corn: Effects on metabolite and hormonal responses in periparturient dairy cows, *J Anim Physiol Anim Nutr*, 96(2): 220-7.
151. Salmon WD Jr, Daughaday WH, 1957, A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro, *J Lab Clin Med* 49:825–36.
152. Saltiel AR, Kahn CR, 2001, Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism, *Nature*, 414: 799–806.
153. Schermaier AJ, O’Conor LH, Pearson KH, 1985, Semi-automated determination of chromium in whole blood and serum by Zeeman electrothermal atomic absorption spectrophotometry, *Clin Chem*, 152, 123–34.
154. Schlumpf U, Heimann R, Zapf J, Froesch ER, 1976, Non-suppressible insulin-like activity and sulphatone activity in serum extracts of normal subjects, acromegalics and pituitary dwarfs, *Acta Endocrinol. (Copenh.)*, 81:28–42.
155. Schoonmaker JP, Loerch SC, Fluharty FL, Turner TB, Moeller SJ, Rossi JE, Dayton WR, Hathaway MR, Wulf DM, 2002, Effect of an accelerated finishing program on performance, carcass characteristics, and circulating insulin-like growth factor I concentration of early-weaned bulls and steers, *J Anim Sci*, 80:900–10.
156. Schwarz K, Mertz Z, 1959, Chromium (III) and glucose tolerance factor, *Arch Biochem Biophys*, 85, 292–5.
157. Shelton JL, Payne RL, Johnston S et al, 2003, Effect of chromium propionate on growth, carcass traits, pork quality, and plasma metabolites in growing-finishing pigs, *J Anim Sci*, 81:2515–24.

158. Shimasaki, S, Ling N, 1991, Identification and molecular characterization of insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBP-1, -2, -3, -4, -5, and -6), *Prog Growth Factor Res*, 3: 243-66.
159. Skaar TC, Vega JR, Pyke SN, Baumrucker CR, 1991, Changes in insulin-like growth factor binding proteins in mammary secretions associated with pregnancy and parturition, *J Endocrinol*, 131, 127-33.
160. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goetze NM, Olson BJ, Klenk DC. 1985, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal Biochem*, Oct;150(1):76-85.
161. Spears JW, Whisnant CS, Huntington GB, Lloyd KE, Krafka K, Lamptey A, 2010, Effects of dietary chromium propionate on glucose metabolism and insulin sensitivity in growing cattle, *J Dairy Sci*, 93, 780.
162. Sreejayan N, Dong F, Kandadi MR, Yang X, Ren J, 2008, Chromium alleviates glucose intolerance, insulin resistance, and hepatic ER stress in obese mice, *Obesity (Silver Spring)*, 16: 1331-7.
163. Stearns DM, 2000, Is chromium a trace essential metal, *Biofactors*, 11(3):149-62.
164. Stoecker BJ, 1999a, Chromium. In: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC (eds.): *Modern Nutrition in Health and Disease*. 9th ed, *Williams & Wilkins*. 277-82.
165. Stoecker BJ, 1999b, Chromium absorption, safety, and toxicity, *J Trace Elem Exp Med*, 12, 163-9.
166. Straus DS, 1984, Growth-stimulatory actions of insulin in vitro and in vivo, *Endocr Rev*, 5, 356-69.
167. 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, 1436-45
168. Swanson KC, Harmon DL, Jacques KA, Larson BT, Richards CJ, Bohnert DW, Paton SJ, 2000, Efficacy of chromium-yeast supplementation for growing beef steers, *Anim Feed Sci Technol*, 86:95-105.

169. Swenson MJ, Reece WO, 1993, *Dukes Physiology of Domestic Animals. Eleventh edition.*
170. Sykiotis GP, Papavassiliou AG, 2001, Serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1: a novel target for the reversal of insulin resistance, *Mol Endocrinol*, 15:1864–9.
171. Teleky L, 1936, Krebs bei chromarbeitern, *Deutsche medizinische Wochenschrift*, 62, 1353.
172. Tian YY, Zhang LY, Dong B, Cao J, Xue JX and Gong LM, 2014, Effects of chromium methionine supplementation on growth performance, serum metabolites, endocrine parameters, antioxidant status, and immune traits in growing pigs, *Biol trace elem res*, 162(1-3), pp.134-41.
173. Tuzcu A, Bahceci M, Dursun M, Parmaksiz Y, Ertem M, Dalgic A, Turgut C, Kale E, 2004, Can long-term exposure to chromium improve insulin sensitivity in chromium mine workers, *J Trace Elem Exp Med*, 17, 55–63.
174. Uusitupa MIJ, Mykkanen L, Siitonen O, Laakso M, Sarlund H, 1992, Chromium supplementation in impaired glucose tolerance of elderly: effects on blood glucose, plasma insulin, C-peptide, and lipid levels, *Brit J Nutr*, 68, 209–16.
175. Uyanik F, Guclu BK, Sahna KC, Dagalp SB, Erdem O, 2008, Effects of chromium picolinate on weight gain, selected blood metabolites, leptin and immunity in calves, *J Anim Vet Adv*, 7(5):564–69.
176. Vincent JB, 2000, Elucidating a biological role for chromium at a molecular level, *Acc Chem Res*, 33, 503-10.
177. Wallach S, 1985, Clinical and biochemical aspects of chromium deficiency, *J Am Coll Nutr*, 4, 107–20.
178. Wang H, Kruszewski A, Brautigan DL, 2005, Cellular chromium enhances activation of insulin receptor kinase, *Biochemistry*, 44: 8167–75.
179. Wang L, Shi Z, Jia Z, Su B, Shi B, Shan A, 2013, The effects of dietary supplementation with chromium picolinate throughout gestation on productive performance, Cr concentration, serum parameters, and colostrum composition in sows, *Biol Trace Elem Res*, 154(1):55–61. doi:10.1007/s12011-013-9699-3

180. Wang MQ, Wang C, Du YJ, Li H, Tao WJ, Ye SS, He YD, Chen SY, 2014, Effects of chromium-loaded chitosan nanoparticles on growth, carcass characteristics, pork quality, and lipid metabolism in finishing pigs, *Livest Sci*, 161:123–29.
181. Wang MQ, Xu ZR, 2004, Effect of chromium nanoparticle on growth performance, carcass characteristics, pork quality and tissue chromium in finishing pigs, *Asian-Australas J Anim Sci* 17:1118–22.
182. Wang MQ, Xu ZR, Li WF et al, 2009, Effect of chromium nanocomposites supplementation on growth hormone pulsatile secretion and mRNA expression in finishing pigs, *J Anim Physio Anim Nutr*, 93:520–5.
183. Wang MQ, Xu ZR, Zha LY, Lindemann MD, 2007, Effects of chromium nanocomposite supplementation on blood metabolites, endocrine parameters and immune traits in finishing pigs, *Anim Feed Sci Tech*, 139(1–2):69–80.
184. Wang ZQ, Zhang XH, Russell JC, Hulver M, Cefalu WT, 2006 Chromium picolinate enhances skeletal muscle cellular insulin signaling in vivo in obese, insulin resistant JCR:LA-cp rats, *J Nutr*, 136: 415–20.
185. Wenk C, Gebert S, Pfirter H, 1995, Chromium supplements in the feed for growing pigs: influence on growth and meat quality, *Arch Anim Nutr*, 48, 71–81.
186. Winder WW, Hardie DG, 1999, AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes, *Am J Phys*, 277:E1–E10.
187. Wood R, Mills PB, Knobel GJ, Hurlow WE, Stokol JM, 1990, Acute dichromate poisoning after use of traditional purgatives a report of 7 cases, *Samj Afr Med J*, 77, 640–2.
188. Yamamoto A, Wada O, Ono T, 1987, Isolation of a biologically active low-molecular-mass chromium compound from rabbit liver, *Eur J Biochem*, 165, 627–31.
189. Yambayamba ESK, Price MA, Foxcroft GR, 1996, Hormonal status, metabolic changes, and resting metabolic rate in beef heifers undergoing compensatory growth, *J Anim Sci*, 74:57–69.

190. Yan L, Zhihua Y, 2005, uses for chrome leather waste: chromium-enriched brewers yeast, *J Soc Leath Tech Ch*, Vol. 90 p.14.
191. Yang JJ, Xu YY, Qian K et al, 2016, Effects of chromium-enriched *Bacillus subtilis* KT 260179 supplementation on growth performance, caecal microbiology, tissue chromium level, insulin receptor expression and plasma biochemical profile of mice under heat stress, *Br J Nutr*, 115:774–81.
192. Yang X, Li SY, Dong F, Ren J, Sreejayan N, 2006, Insulin-sensitizing and cholesterol-lowering effects of chromium (D-phenylalanine), *J Inorg Biochem*, 100: 1187–93.
193. Yang X, Palanichamy K, Ontko AC, Rao MN, Fang CX, Ren J, et al, 2005, A newly synthetic chromium complex — chromium(phenylalanine)<sub>3</sub> improves insulin responsiveness and reduces whole body glucose tolerance, *FEBS Lett*, 579: 1458–64.
194. Yang YWH, Rechler MM, 1993, Identification and characterization of insulin-like growth factor-binding proteins. In: de Pablo F, Scanes CG, Weintraub BD, Eds. *Techniques in Endocrine Research*. Academic Press, New York, 181-204.
195. Yari M, Nikkiah A, Alikhani M, Khorvash M, Rahmani H., Ghorbani GR, 2010, Physiological calf responses to increased chromium supply in summer, *J Dairy Sci*, 93, 4111–20.
196. Zapf J, Rinderknecht E, Humbel RE, Froesch ER, 1978, Nonsuppressible insulin-like activity (NSILA) from human serum: Recent accomplishments and their physiologic implications, *Metabolism*, 27:1803–28.
197. Zhang FJ, Weng XG, Wang JF, Zhou D, Zhang W, Zhai CC, Hou YX, Zhu YH, 2014, Effects of temperature–humidity index and chromium supplementation on antioxidant capacity, heat shock protein 72, and cytokine responses of lactating cows, *J Anim Sci*, 92(7): 3026-34.
198. Zhao P, Wang J, Ma H, Xiao Y, He L, Tong C, Wang Z, Zheng Q, Dolence EK, Nair S, Ren J, Li J, 2009, A newly synthetic chromium complex—chromium (D-phenylalanine)<sub>3</sub> activates AMP-activated protein kinase and stimulates glucose transport, *Biochem Pharmacol*, 77: 1002-10.

## **Biografija**

Ljubomir Jovanović je rođen 5. septembra 1987. godine u Zaječaru. Osnovnu školu i gimnaziju završio je u Sokobanji, kao đak generacije i nosilac Vukove diplome. Školske 2006/07 godine upisao je Fakultet veterinarke medicine, Univerziteta u Beogradu koji je završio školske 2011/12 godine sa prosečnom ocenom 9,62. Tokom osnovnih studija bio je stipensista Univerzitetske stipendije Zadužbine Dragoljuba Marinkovića i stipendije Ministarstva prosvete Republike Srbije.

Po završetku osnovnih studija, upisuje doktorske akademske studije na Fakultetu veterinarke medicine, Univerziteta u Beogradu, na kojima je položio sve ispite predviđene studijskim programom sa prosečnom ocenom 9,88. Od 2013. godine je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja kao student doktorskih akademskih studija, na projektu „Molekularno-genetička i ekofiziološka istraživanja u zaštiti autohtonih animalnih genetičkih resursa, očuvanju dobrobiti, zdravlja i reprodukcije gajenih životinja i proizvodnji bezbedne hrane“.

Od 2015. godine zaposlen je kao asistent na Katedri za fiziologiju i biohemiju, Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu. Učestvovao je u bilateralnom projektu sa Slovenijom pod nazivom “Identifikacija novih biomarkera značajnih za ranu dijagnostiku zamašćenja jetre kod krava” i projektu “Procjena stresa kod krava utvrđivanjem koncentracije glukokortikosteroida iz bioloških uzoraka dobijenih neinvazivnim tehnikama“, koji je finansiran od strane Ministarstva nauke i tehnologije Republike Srpske. U okviru Tempus projekta boravio je na usavršavanju na Veterinarskom univerzitetu u Beču u trajanju od 2 nedelje. Do sada je objavio 14 naučno-istraživačkih radova od čega 4 u časopisima međunarodnog značaja (M 22 i M 23 kategorije).

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани \_\_\_\_\_ Љубомир Д. Јовановић \_\_\_\_\_  
број индекса \_\_\_\_\_ 16/3 \_\_\_\_\_

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Утицај пероралне апликације хрома на инсулинску осовину и ИГФ систем  
код телади холштајн-фризијске расе**

---

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

У Београду, 13. 09. 2017

Потпис докторанда

  
\_\_\_\_\_



Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Љубомир Д. Јовановић \_\_\_\_\_  
Број индекса \_\_\_\_\_ 16/3 \_\_\_\_\_  
Студијски програм \_\_\_\_\_ докторске академске студије \_\_\_\_\_  
Наслов рада Утицај пероралне апликације хрома на инсулинску осовину и ИГФ систем код телади холштајн-фризијске расе \_\_\_\_\_  
Ментор \_\_\_\_\_ др Данијела Кировски \_\_\_\_\_

Потписани \_\_\_\_\_ Љубомир Д. Јовановић \_\_\_\_\_


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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 13. 03. 2017

  
\_\_\_\_\_

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**Утицај пероралне апликације хрома на инсулинску осовину и ИГФ систем  
код телади холштајн-фризијске расе**

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

**3. Ауторство – некомерцијално – без прераде**

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

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

У Београду, 13. 09. 2017

Потпис докторанда

