

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

Milija R. Palamarević

**UTICAJ POSTPARTALNE APLIKACIJE
KALCIJUMA NA METABOLIČKU ADAPTACIJU
HIPOKALCEMIČNIH KRAVA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2021.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Milija R. Palamarević

**EFFECT OF POSTPARTUM CALCIUM
APPLICATION ON METABOLIC ADAPTATION
OF HYPOCALCEMIC COWS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021.

Mentor:

Dr Ivan Vujanac, vanredni profesor
Fakultet veterinarske medicine Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

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

Dr Željko Sladojević, viši naučni saradnik
JP Veterinarski institut Republike Srpske "dr Vaso Butozan" Banja Luka

Datum odbrane: _____

Uticaj postpartalne aplikacije kalcijuma na metaboličku adaptaciju hipokalcemičnih krava

KRATAK SADRŽAJ

Hipokalcemija je jedan od najučestalijih metaboličkih postpartalnih poremećaja kod krava. Pored klinički vidljive forme, javlja se supklinički oblik koji je teško detektovati zbog izostanka kliničke slike. Pravovremeni tretman ovih jedinki je ključan za održivost proizvodnje i zdravlja krava posle teljenja. Podaci iz literature su neusaglašeni u pogledu ishoda terapije, zbog čega smo smatrali da je značajno ispitati mehanizme koji se nalaze u osnovi terapijskih procesa koji se primenjuju kod hipokalcemičnih krava. Cilj ovog rada je bio da se utvrdi prevalenca supkliničke hipokalcemije i ispita efekat peroralne i parenteralne aplikacije preparata Ca na aktivnost paratireoidne žlezde, metaboličke parametre u postpartalnih krvi krava sa supkliničkom hipokalcemijom. U ispitivanje je uključeno 180 krava od 3. do 7. laktacije, kojima je 5 do 15 sati posle teljenja određena kalcemija. U ogled su uvedene krave (n= 24) sa supkliničkom hipokalcemijom ($1,38 \text{ mmol/l} \leq \text{Ca} \leq 2,0 \text{ mmol/l}$), podeljene u tri grupe: (1) IV-Ca (n=8) jednokratno tretirana intravenskom aplikacijom 500 ml *Calci-kel 300* (12,5 g Ca glukonata, 2,4 g Mg hlorida i borna kiselina), (2) PO-Ca (n=8) dvokratno tretirana (1 l pri dijagnostikovanju oboljenja i 0,5 l 12 sati kasnije) oralnom suspenzijom *Calci Tonica* (helatno vezani joni Ca i Mg, odnosno 41g Ca i 5g Mg po litru), (3) KON (n=8) nije tretirana preparatima Ca i Mg.

Krv je uzorkovana 0. časa (moment dijagnostikovanja supkliničke hipokalcemije, neposredno pre tretmana) kao i 1., 2., 4., 8., 12., 20., 24., 36. i 48. sata. Uzorci urina su uzimani 0., 1., 12., 24., 36. i 48. sata. Kalcemija je određivana u svim uzorcima krvi. Koncentracija parathormona (PTH) u krvi je merena 0., 1., 2., 4., 24. i 48. sata. Koncentracija glukoze, ukupnih proteina, albumina, uree, kreatinina, ukupnog bilirubina, BHBA, anorganskog fosfora, magnezijuma i aktivnost enzima gGT, AST i ALP određivana je u uzorcima krvi uzetim 0., 24., i 48. sata, a koncentracija NEFA samo 0. sata. pH urina je određen u svim uzorcima urina.

Ukupna prevalenca supkliničke hipokalcemije je bila 13%, pri čemu je bila najveća u četvrtoj (42%) i petoj (37%), a najniža u trećoj laktaciji (3,03%).

Pre tretmana nije bilo značajne razlike u kalcemiji između grupa, dok je u odnosu na KON grupu kalcemija bila značajno veća nakon tretmana kod PO-Ca (do 8. časa) i IV-Ca (do 24. časa). Kod PO-Ca grupe fiziološka kalcemija uspostavljena je tokom prva 2 sata nakon tretmana i održavala se do kraja ogleada, dok je kod IV-Ca grupe prva dva sata nakon tretmana došlo do hiperkalcemije, a zatim je uspostavljena normokalcemija do kraja ogleada. Kalcemija KON grupe bila je ispod donje fiziološke granice do 48. sata od početka ogleada.

Pre tretmana nije bilo značajne razlike u koncentraciji PTH, dok su nakon tretmana vrednosti bile značajno niže u odnosu na KON grupu kod IV-Ca prvog i drugog sata a kod obe tretirane grupe (PO-Ca, IV-Ca) četvrtog sata i zatim kod PO-Ca sve do kraja ogleada.

Na osnovu izmerenih početnih vrednosti pH urina, kod svih krava je ustanovljena metabolička alkalozna. Nakon jednog sata kod IV-Ca grupe ustanovljena je acidoza, pri čemu je pH urina kod ove i PO-Ca grupe bio značajno niži nego kod KON grupe. Dvanaest sati nakon tretmana, pH urina PO-Ca i IV-Ca grupe bio je značajno niži nego kod KON grupe. Kod PO-Ca grupe pH urina je bila značajno niža nego kod KON grupe 24. i 36. sata, dok 48. sata između pH urina ispitivanih grupa nije bilo razlike.

Koncentracije glukoze, BHBA, NEFA i kreatinina, kao i aktivnosti enzima GGT i ALP nisu se značajno razlikovale između ispitivanih grupa krava tokom ogleada.

Na početku ogleada kod svih krava je ustanovljena hipofosfatemija. Nakon 48 sati, kod IV-Ca grupe vrednost aP je bila značajno niža nego kod KON grupe, dok se kod PO-Ca grupe nije razlikovala od vrednosti kod KON grupe.

Magnezijemija je kod svih grupa krava na početku ogleda bila u fiziološkim okvirima. Kod IV-Ca grupe koncentracije Mg 24. i 48. sata bile su značajno niže nego kod KON grupe dok su kod PO-Ca grupe održavane na nivou vrednosti utvršenih kod KON grupe.

Početne koncentracije uree, proteina, albumina i bilirubina u krvi krava su bile izjedačene.

Koncentracija uree je 48. sata kod PO-Ca grupe bila značajno niža nego kod KON grupe. Koncentracija proteina je 24. sata kod PO-Ca grupe bila značajno niža nego kod KON i IV-Ca grupe, a 48. sata nije bilo značajne razlike između grupa. Koncentracija albumina je 24. sata kod PO-Ca grupe bila značajno niža nego kod IV-Ca grupe, a 48. sata nije bilo značajne razlike između krava. Koncentracija bilirubina je 24. sata kod PO-Ca i IV-Ca grupe bila značajno niža nego kod KON grupe, a 48 sati posle je kod PO-Ca grupe bila još uvek značajno niža u odnosu na KON grupu. Početna aktivnost enzima AST je kod PO-Ca grupe bila značajno niža nego kod KON grupe, dok je 24. sata kod PO-Ca grupe krava bila značajno niža nego kod KON i IV-Ca grupe, a 48. sata između ispitivanih grupa nije bilo razlike.

Dobijeni rezultati ukazuju da je intravensko, u odnosu na peroralno, davanje kalcijuma dovelo do bržeg izlaska obolelih krava iz stanja hipokalcemije. S druge strane, kontrolni mehanizmi koji su u osnovi regulacije kalcemije kod krava, odnosno koncentracija PTH, ali i odgovor aP i Mg na tretman krava, ukazuju da je intravensko davanje kalcijuma, u odnosu na peroralno, dovelo do većeg iscrpljivnja kontrolnih mehanizama koji ni posle 48. sata od tretmana nisu uspostavili biološku ravnotežu. U skladu sa tim rezultatima, preporučuje se davanje intravenskog kalcijuma u svim slučajevima izrazite hipokalcemije dok u uslovima umerenih hipokalcemičnih stanja ili u cilju preventive u zapahtima sa visokom prevalencom supkliničke hipokalcemije, bolje je opredeliti se za peroralne preparate kalcijuma.

Ključne reči: krave, hipokalcemija, parathormon, terapija

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Bolesti papkara

UDK broj: 636.09:599.735:618.7

Effect of postpartum calcium application on metabolic adaptation of hypocalcemic cows

SUMMARY

Hypocalcemia is one of the most common metabolic postpartum disorders in cows. In addition to the clinically visible form, there is a subclinical form that is difficult to detect due to the absence of a clinical signs. Timely treatment of cows is crucial for the sustainability of production and health of cows after calving. Data from the literature are inconsistent regarding the outcome of therapy, which is why we considered important to examine the mechanisms underlying the therapeutic processes applied in hypocalcemic cows. The aim of this study was to determine the prevalence of subclinical hypocalcemia and to examine the effect of oral and parenteral administration of Ca preparation on the activity of the parathyroid gland, metabolic parameters in blood of postpartum cows with subclinical hypocalcemia. The study included 180 cows from the 3rd to the 7th lactation, from which blood was taken 5 to 15 hours after calving in order to determine the level of blood calcium. Cows (n = 24) with subclinical hypocalcemia ($1.38 \text{ mmol/l} \geq \text{Ca} \leq 2.0 \text{ mmol/l}$) were divided into three groups: (1) IV-Ca (n = 8) treated once by intravenous administration of 500 ml *Calci-kel 300* (12.5 g Ca gluconate, 2.4 g Mg chloride and boric acid), (2) PO-Ca (n = 8) treated twice (11 when diagnosing the disease and 0.5 l 12 hours later) oral suspension of *Calci Tonic* (chelation bounded Ca and Mg ions, respectively 41g Ca and 5g Mg per liter), (3) KON (n = 8) was not treated with Ca and Mg.

Blood was sampled at hour 0 (moment of diagnosis of subclinical hypocalcemia, immediately before treatment) as well as at 1, 2, 4, 8, 12, 20, 24, 36 and 48 hours. Urine samples were taken at 0, 1, 12, 24, 36, and 48 hours. Calcemia was determined in all blood samples. The concentration of parathyroid hormone (PTH) in the blood was measured at 0., 1., 2., 4., 24. and 48 hours. Concentrations of glucose, total proteins, albumin, urea, creatinine, total bilirubin, BHBA, inorganic phosphorus, magnesium and enzyme activity of gGT, AST and ALP were determined in blood samples taken at 0, 24, and 48 hours, and the concentration of NEFA only at hour 0. Urine pH was determined in all urine samples.

The overall prevalence of subclinical hypocalcemia was 13%, with the highest in the fourth (42%) and fifth (37%) and lowest in the third lactation (3.03%).

Before treatment, there was no significant difference in calcemia between the groups, while in relation to the KON group, calcemia was significantly higher after treatment in PO-Ca (up to 8 hours) and IV-Ca (up to 24 hours). In the PO-Ca group, physiological calcemia was established during the first 2 hours after treatment and was maintained until the end of the study, while in the IV-Ca group, hypercalcemia occurred in the first two hours after treatment, and then normocalcemia was established until the end of the study. Calcemia of the KON group was below the lower physiological limit until the hour 48th from the beginning of the experiment.

Before treatment, there was no significant difference in PTH concentrations between groups, while after treatment the values were significantly lower compared to the KON group in IV - Ca during first two hours, and in both treated groups (PO-Ca, IV-Ca) in the fourth hour and then significantly lower PTH was established in PO-Ca, compared to KON, until the end of the study.

Based on the measured initial values of urine pH, metabolic alkalosis was established in all cows. After one hour, acidosis was found in group IV-Ca, with the urine pH in this and PO-Ca groups being significantly lower than in the KON group. Twelve hours after treatment, urine pH of PO-Ca and IV-Ca groups were significantly lower than in KON group. In the PO-Ca group, the pH of urine was significantly lower than in the KON group at 24 and 36 hours, while at hour 48 there was no difference between the pH of urine of the examined groups.

Concentrations of glucose, BHBA, NEFA and creatinine, as well as GGT and ALP enzyme activities did not differ significantly between the examined groups of cows during the study.

At the beginning of the study, hypophosphatemia was established in all cows. After 48 hours, in the IV-Ca group the value of iP was significantly lower than in the KON group, while in the PO-Ca group it did not differ from the value in the KON group.

At the beginning of the study, magnesium level in all groups of cows was in the physiological range. In the IV-Ca group, Mg concentrations at 24 and 48 hours were significantly lower than in the KON group, while in the PO-Ca group they were maintained at the level of the values determined in the KON group.

The initial concentrations of urea, protein, albumin and bilirubin in the blood of the cows were similar.

At hour 48, the urea concentration in the PO-Ca group was significantly lower than in the KON group. The protein concentration was significantly lower in the PO-Ca group at hour 24 than in the KON and IV-Ca groups, and there was no significant difference between the groups at hour 48. Albumin concentration was significantly lower at hour 24 in the PO-Ca group than in the IV-Ca group, and at hour 48 there was no significant difference between cows. The concentration of bilirubin was significantly lower in the PO-Ca and IV-Ca groups at hour 24 than in the KON group, and at hour 48 in the PO-Ca group was still significantly lower than in the KON group. The initial activity of AST enzymes in the PO-Ca group was significantly lower than in the KON group, while at hour 24 in the PO-Ca group of cows was significantly lower than in the KON and IV-Ca groups, and at hour 48 between the examined groups there were no differences.

The obtained results indicate that intravenous, in relation to oral, administration of calcium led to more rapid recover of diseased cows from the state of hypocalcemia. On the other hand, the control mechanisms that underlie the regulation of calcemia in cows, i.e. the concentration of PTH, but also the response of aP and Mg to the treatment of cows, indicate that intravenous calcium administration, compared to oral, led to greater depletion of control mechanisms. Forty eight hours after treatment, no biological balance was established. In accordance with these results, it is recommended to give intravenous calcium in all cases of severe hypocalcemia, while in conditions of moderate hypoglycemic conditions or for prevention at dairy farms with high prevalence of subclinical hypocalcemia, it is better to use oral calcium preparations.

Key words: cows, hypocalcemia, parathyroid hormone, therapy

Scientific area: Veterinary medicine

Specific scientific field: Ruminants and swine disease

UDK number: 636.09:599.735:618.7

Sadržaj

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE.....	3
2.1. OSNOVNE KARAKTERISTIKE METABOLIZMA POJEDINIH MINERALNIH MATERIJA (Ca, Mg, P) KOD VISOKOMLEČNIH KRAVA	3
2.2. SPECIFIČNOSTI METABOLIZMA KALCIJUMA KOD VISOKOMLEČNIH KRAVA.....	5
2.3. ENDOKRINA REGULACIJA METABOLIZMA KALCIJUMA KOD VISOKOMLEČNIH KRAVA.....	8
2.3.1. Uticaj parathormona	8
2.3.2. Uticaj kalcitonina.....	9
2.3.3. Uticaj vitamina D ₃	9
2.3.4. Uticaj polnih hormona (estrogena i progesterona)	10
2.3.5. Uticaj glukokortikosteroida.....	11
2.3.6. Uticaj prolaktina	11
2.3.7. Uticaj serotonina.....	11
2.4. HIPOKALCEMIJA KOD VISOKOMLEČNIH KRAVA	11
2.4.1. Faktori značajni za nastanak hipokalcemije.....	12
2.4.2. Dijagnoza hipokalcemije kod visokomlečnih krava.....	12
2.4.3. Terapija hipokalcemije kod visokomlečnih krava.....	13
2.4.4. Savremeni pristupi u preventivi hipokalcemije visokomlečnih krava.....	13
2.5. HIPOKALCEMIJA KAO FAKTOR RIZIKA ZA DRUGE POREMEĆAJE ZDRAVLJA I REPRODUKCIJU KOD VISOKOMLEČNIH KRAVA.....	14
3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA.....	16
4. MATERIJAL I METODE.....	17
4.1. OGLEDNE ŽIVOTINJE	17
4.2. DIZAJN OGLEDA.....	18
4.3. UZIMANJE UZORAKA KRVI I URINA	19

4.4. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE KALCIJUMA, PARATHORMONA I BIOHEMIJSKIH PARAMETARA U KRVI.....	19
4.5. ODREĐIVANJE PH VREDNOSTI URINA	20
4.6. STATISTIČKA ANALIZA	20
5. REZULTATI	21
5.1. PREVALENCA SUPKLINIČKE HIPOKALCEMIJE.....	21
5.2. KONCENTRACIJA KALCIJUMA U KRVI KRAVA SA SUPKLINIČKOM HIPOKALCEMIJOM	22
5.3. KONCENTRACIJA PTH U KRVI KRAVA SA SUPKLINIČKOM HIPOKALCEMIJOM....	22
5.4. pH VREDNOST URINA KRAVA SA SUPKLINIČKOM HIPOKALCEMIJOM.....	23
5.5. KONCENTRACIJA BIOHEMIJSKIH PARAMETARA U KRVI KRAVA SA SUPKLINIČKOM HIPOKALCEMIJOM PRE I POSLE TRETMANA	24
5.5.1. Procena energetskog statusa.....	24
5.5.2. Procena koncentracije anorganskog fosfora i magnezijuma kod ispitivanih grupa krava....	25
5.5.3. Procena proteinskog statusa kod ispitivanih grupa krava	26
5.5.4. Procena funkcionalnog statusa jetre kod ispitivanih grupa krava	27
6. DISKUSIJA	29
6.1. PREVALENCA SUPKLINIČKE HIPOKALCEMIJE.....	29
6.2. KONCENTRACIJA KALCIJUMA I PTH U KRVI KRAVA SA SUPKLINIČKOM HIPOKALCEMIJOM	30
6.3. pH VREDNOST URINA KRAVA SA SUPKLINIČKOM HIPOKALCEMIJOM.....	32
6.4. KONCENTRACIJA BIOHEMIJSKIH PARAMETARA U KRVI KRAVA SA SUPKLINIČKOM HIPOKALCEMIJOM PRE I POSLE TRETMANA	32
7. ZAKLJUČCI.....	34
8. LITERATURA	36

1. UVOD

Na farmama visokomlečnih krava hipokalcemija je jedan od najčešćih metaboličkih poremećaja koji se javlja neposredno nakon teljenja i može dovesti do smanjenja proizvodnje, poremećaja u reprodukciji pa i prevremenog izlučivanja krava iz stada. Pored kliničke forme, često se javlja i supklinički oblik koji je izuzetno teško detektovati. Naime, klinički oblik se javlja u svega 5 – 7 % slučajeva, dok se u svim drugim slučajevima javlja supklinička forma. Pored deficita kalcijuma, sa ovim oboljenjem je često udružen i poremećaj homeostaze magnezijuma i fosfora, kao i poremećaj regulatornih mehanizama koji su u osnovi metabolizma kalcijuma. Održavanje homeostaze kalcijuma je izuzetno veliki metabolički izazov za visokomlečne krave uzimajući u obzir njihovu genetsku predispoziciju za postizanje proizvodnje preko 30 litara dnevno. Dodatno, uobičajeno je da se krava nalazi u laktaciji 10 meseci i da ostane gravidna između 3. i 4. meseca laktacije. Najčešće, graviditet se završava teljenjem 48 nedelja nakon prestanka prethodne laktacije. Kako laktacija kod visokomlečnih krava traje do kasnog perioda graviditeta, zahtevi za Ca se značajno smanjuju tek nakon prestanka laktacije uprkos povećanim zahtevima ploda za izgradnju skeleta. Ovaj vremesni period, zasušenje, predstavlja i period najnižih zahteva za Ca kod odraslih krava (Horst i sar., 2005). U patogenezi hipokalcemije visokomlečnih krava najznačajnije su promene u metabolizmu kalcijuma koje se dešavaju sa početkom laktacije, jer se velika količina Ca izlučuje putem kolostruma i mleka. Koncentracija Ca u krvi kod krava je 2,5 mmol/L, a visokomlečne krave u piku laktacije mogu izlučivati i do 80 g Ca/dan putem mleka. Upravo zato, glavni uzrok nastanka hipokalcemije predstavlja narušavanje homeostatskih mehanizama koji učestvuju u regulisanju normalne kalcemije u krvi.

Parathormon (PTH) je proteinski hormon koji se skladišti u paratireoidnoj žlezdi, kao mestu njegove sinteze i glavni je regulator, pored kalcitonina i kalcitriola, metabolizma kalcijuma. Pojačano lučenje PTH izaziva porast koncentracije kalcijuma, izazivajući pre svega osteolizu. Za visokomlečne krave je karakteristično da posle teljenja fiziološki dolazi do povlačenja Ca iz kosti u krv. To se dešava pod uticajem PTH koji se pojačano luči zbog gubitka značajnih količina Ca putem mleka. Ova pojava povlačenja Ca iz kosti posle teljenja kod krava se naziva laktaciona osteoliza i smatra se da je fiziološki opravdano da se do 13% kalcijuma iz kosti povuče u krv za zadovoljavanje potreba visokomlečnih krava za proizvodnju mleka. Ukoliko se povuče veća količina kalcijuma dolazi do poremećaja zdravlja. Međutim, mnogo veći problem je nedovoljno povlačenje kalcijuma iz kostija koje se dešava u slučaju kada ne dolazi do pojačanog izlučivanja kalcijuma kao odgovor na hipokalcemiju. Moguća je i rezistencija kosti na PTH koja se ponekad dešava kod krava, a najčešće je posledica nedostatka magnezijuma u krvi jer je ovaj makroelement značajan element signalnog puta ćelije koja odgovara na vezivanje parathormona za receptor.

Lečenje hipokalcemije, pre svega njene kliničke forme se sprovodi odmah po pojavi simptoma, naročito ukoliko krave leže na strani. Dugotrajno ležanje krava na strani dovodi do ishemije mišića i oštećenja nerava koji za posledicu imaju nastanak „sindroma ležeće krave.”

Najbrži i do sada najviše korišćen način za uspostavljanje normokalcemije je intravenska aplikacija rastvora kalcijumovih soli. Za tu svrhu najčešće se koriste soli kalcijum-borogluconata. Komercijalni intravenski preparati koji se koriste u terapiji hipokalcemije mogu da sadrže i izvore Mg, P i glukoze. Intravenski aplikovani preparati Ca podižu vrednosti kalcemije u krvi iznad fizioloških vrednosti u toku 4 časa, a zatim ponovo padaju čak uvodeći životinju i u stanje prolazne hipokalcemije. Zato je značajno ispitati i druge vidove primene kalcijuma u terapiji a posebno ispitati kontrolne mehanizme koji leže u osnovi ovih procesa. Naime, istovremenim praćenjem koncentracija hormona koji regulišu metabolizam kalcijuma moguće je utvrditi na koji način se aktiviraju fiziološki mehanizmi

tokom terapije, odnosno vraćanja nivoa kalcijuma na normalan nivo. Ukoliko terapija dovodi do preteranog iscrpljivanja tih mehanizama onda rezultati mogu da budu kratkotrajni ali da dugotrajno životinja ne uspe da održava homeostazu glavnih makroelemenata potrebnih za proizvodnju mleka na zadovoljavajućem nivou.

U okviru ove doktorske disertacije smo ispitali aktivnost kontrolnih mehanizama odgovornih za homeostazu kalcijuma tokom različitih terapija primenjenih u tretmanu krava kod kojih je odmah posle teljenja dijagnostikovana supklinička hipokalcemija.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. OSNOVNE KARAKTERISTIKE METABOLIZMA POJEDINIH MINERALNIH MATERIJA (Ca, Mg, P) KOD VISOKOMLEČNIH KRAVA

Mineralni elementi su neorganske supstance koje se nalaze u svim tkivima i telesnim tečnostima životinja, gde učestvuju u održavanju brojnih fizičko-hemijskih procesa neophodnih za normalno funkcionisanje organizma (Soetan i sar., 2010). U zavisnosti od količine u kojoj su potrebni organizmu, svi mineralni elementi se mogu svrstati u jednu od dve grupe. Prvu grupu predstavljaju makroelementi, koji su organizmu potrebni u većoj količini i njima pripadaju: kalcijum (Ca), magnezijum (Mg), fosfor (P), natrijum (Na), kalijum (K), hlor (Cl) i sumpor (S). Drugu grupu čine mikroelementi, koji su organizmu potrebni u malim količinama ili u tragovima (*trace elements*, eng.), poput gvožđa (Fe), bakra (Cu), kobalta (Co), joda (J), cinka (Zn), mangana (Mn), molibdena (Mb), fluora (F), hroma (Cr) i selen (Se) (Soetan i sar., 2010; Suttle, 2010).

Mineralni elementi ne predstavljaju izvor energije za životinje, ali imaju brojne uloge, kao strukturnu, fiziološku, katalitičku ili regulatornu (Suttle, 2010). Imajući u vidu široki spektar uloga koje mineralni elementi obavljaju, razumljivo je da neadekvatno (prekomerno ili nedovoljno) snabdevanje njima, može imati posledice po zdravlje svih životinja, uključujući i visokomlečne krave (Drackley i sar., 2005; Soetan i sar., 2010). Međutim, kod visokomlečnih krava se, pored neadekvatnog snabdevanja mineralnim materijama, može izdvojiti još jedan faktor koji ima potencijal da prouzrokuje zdravstvene probleme, a to je neadekvatna adaptacija metabolizma mineralnih materija u pojedinim fazama proizvodnog ciklusa visokomlečnih krava (Drackley i sar., 2005; Goff, 2006). Naime, ukoliko se proizvodni ciklus visokomlečnih krava posmatra iz ugla homeostaze mineralnih materija, peripartalni ili tranzicioni period (vremenski raspon od tri nedelje pre teljenja do tri nedelje nakon teljenja) predstavlja najkritičniju fazu. Tokom ovog perioda neophodno je očuvanje homeostaze mineralnih materija, a na prvom mestu kalcijuma, što zahteva i adekvatnu adaptaciju mineralnog metabolizma (Drackley, 2005; Neves i sar., 2017). Potrebno je napomenuti da izazov u očuvanju homeostaze kalcijuma najviše dobija na značaju sa početkom laktacije, kada se potrebe za ovim makroelementom naglo povećavaju (Goff, 2006). Kao posledica toga, kod visokomlečnih krava može doći do pada koncentracije kalcijuma u krvi (hipokalcemija) i to za veoma kratko vreme, odnosno za 12 – 24 časa nakon porođaja (Seifi i Kia, 2017). Istovremeno, brzom padu koncentracije kalcijuma u krvi i razvoju hipokalcemije kod visokomlečnih krava doprinosi i nizak sadržaj kalcijuma u krvnoj plazmi i ekstracelularnoj tečnosti u odnosu na potrebe za proizvodnju kolostruma. Naime, krvna plazma sadrži 3 g, a celokupna ekstracelularna tečnost ne više od 9 g kalcijuma kod krave telesne mase 600 kg, dok je za proizvodnju kolostruma potrebno između 30 i 40 g kalcijuma svakog dana (Goff, 2004; Seifi i Kia, 2017). Da bi se omogućio obilan priliv kalcijuma u mlečnu žlezdu, uz istovremeno očuvanje njegove homeostaze, neophodno je da se mineralni metabolizam što pre adaptira na novonastale potrebe. Glavnu ulogu u tome imaju parathormon i aktivna forma vitamina D (1,25-dihidroksi-holekalciferol) (Goff, 2008). Pad koncentracije kalcijuma predstavlja stimulus za lučenje parathormona koji, najpre, povećava tubularnu (bubrežnu) reapsorpciju kalcijuma u cilju održavanja njegove koncentracije u krvnoj plazmi u uskim granicama (2,1-2,5 mmol/L ili 8,5-10 mg/dL) (Seifi i Kia, 2017). Međutim, efikasnost ovog mehanizma je vrlo ograničena jer krave, na dnevnom nivou, izlučuju male količine kalcijuma urinom (1 – 2 g). Zbog toga, ukoliko su potrebe za kalcijumom veće,

odnosno ukoliko je nedostatak kalcijuma veći, što se dešava na početku laktacije, ovaj mehanizam neće biti efikasan u očuvanju homeostaze kalcijuma, već moraju da se uključe i drugi mehanizmi (Goff, 2004). Drugi mehanizam koji, takođe, pokreće parathormon je osteoklastna osteoliza, kojom se kalcijum povlači iz kostiju u ekstracelularnu tečnost i krvnu plazmu, ali je za pokretanje ovog mehanizma u punom kapacitetu potrebno više vremena (48 časova) (Goff, 2014, Seifi i Kia, 2017). Dodatno, parathormon u bubrezima stimuliše stvaranje i oslobađanje aktivne forme vitamina D, koji pokreće treći mehanizam – povećanje crevne resorpcije kalcijuma. Ovom mehanizmu je, takođe, potrebno više vremena da bi se aktivirao u potpunosti, a to je uglavnom između 1 i 2 dana (Seifi i Kia, 2017). Upravo, vreme koje je potrebno za aktivaciju opisanih mehanizama je razlog zbog kojeg se hipokalcemija javlja u prvih 24 časa nakon teljenja (Goff, 2014; Martín-Tereso i Martens, 2014).

Literaturni podaci ukazuju da se u najvećem broju slučajeva javlja supklinička hipokalcemija koja nije praćena kliničkim simptomima, dok se u svega 5 – 7 % slučajeva razvija klinički manifestna hipokalcemija, poznatija kao mlečna groznica (DeGaris i Lean, 2009; Mulligan i Doherty, 2008; Goff, 2008). Nađeno je, pri tome, da je pojava supkliničke hipokalcemije kod krava praćena povećanim rizikom od zaostajanja posteljice (Neves i sar., 2017), razvoja metritisa (Martinez i sar., 2012), mastitisa (Goff, 2008) i dislokacije sirišta (Chapinal i sar., 2011). Zbog toga supklinička hipokalcemija doprinosi i učestalijem isključivanju životinja iz proizvodnje (Seifi i sar., 2011). Ukoliko se tome dodaju i rezultati koje su objavili Reinhardt i sar. (2011), koji ukazuju da prevalencija supkliničke hipokalcemije dostiže i 54 % u stadima visokomlečnih krava, jasno je zašto su istraživanja u ovoj oblasti i dalje aktuelna. Međutim, za očuvanje zdravlja i potpuno ispoljavanje genetskog potencijala visokomlečnih krava neophodno je održavanje homeostaze i drugih makroelemenata, kao što su magnezijum, fosfor i kalijum (Martín-Tereso i Martens, 2014; Goff, 2018).

U uslovima fiziološke ravnoteže, koncentracija magnezijuma u krvnoj plazmi krava se održava u granicama od 0,75-1,0 mmol/L (1,8-2,4 mg/dL), čime se obezbeđuju uslovi za normalno odvijanje enzimskih reakcija u ćelijama, sa jedne strane, i očuvanje nervno-mišićne funkcije, sa druge strane (Goff, 2004; Suttle, 2010). S obzirom da je sadržaj magnezijuma u celokupnoj ekstracelularnoj tečnosti krava prilično nizak, početak laktacije udružen sa visokim potrebama za ovim mineralom, može usloviti brzu potrošnju raspoloživog magnezijuma i nastanak hipomagnezijemije. Ovo se, naročito, može očekivati neposredno nakon porođaja kod visokomlečnih krava, čemu doprinose najmanje dve okolnosti (Martens i Schweigel, 2000; Goff, 2004). Prva je da kosti nisu značajan izvor magnezijuma u uslovima hipomagnezijemije, jer status magnezijuma u organizmu ne može da podstakne osteoklastnu osteolizu, pošto je ona uslovljena padom koncentracije kalcijuma i lučenjem parathormona (Goff, 2008). Zbog toga je koncentracija magnezijuma u krvnoj plazmi krava skoro u potpunosti zavisna od unosa ovog makroelementa hranom. Druga okolnost se, upravo, odnosi na smanjeni ili nedovoljni unos hrane, a samim tim i magnezijuma, koji se javlja kod visokomlečnih krava neposredno pre i nakon porođaja, pogovoto ako su u peripartalni period ušle sa visokom ocenom telesne kondicije (Goff, 2008; Grummer i sar., 2014; Reshalaitihan i sar., 2020). Osim navedenim okolnostima, razvoj hipomagnezijemije može biti podstaknut i visokim unosom kalijuma, jer on smanjuje resorpciju magnezijuma na nivou buraga, koji se smatra ključnim mestom za resorpciju magnezijuma kod odraslih preživara (Martens i Schweigel, 2000; Martín-Tereso i Martens, 2014). Nastala hipomagnezijemija ne samo da narušava normalno funkcionisanje organizma, već ozbiljno remeti i homeostazu drugih makroelemenata, u prvom redu kalcijuma. Naime, stanje hipomagnezijemije obara lučenje parathormona i smanjuje odgovor ciljnih tkiva na parathormon zbog nedovoljne sinteze cikličnog AMP (sekundarni glasnik) nakon njegovog vezivanja za receptor (Seifi i Kia, 2017).

Koncentracija fosfora u krvnoj plazmi krava se, pod normalnim uslovima, nalazi u okvirima od 1,3-2,6 mmol/L (4,0-8,0 mg/dL). Slično magnezijumu, koncentracija fosfora u krvnoj plazmi je u velikoj meri zavisna od njegovog unosa hranom ali je, u izvesnoj meri, regulisana i hormonima koji su uključeni u homeostazu kalcijuma (Goff, 2004; Goff, 2008). Pri tome, odnos između fosfora i kalcijuma je interferirajući. Zbog toga, prekomeran unos i resorpcija fosfata u digestivnom traktu, sa posledičnim porastom njegove koncentracije u krvnoj plazmi, doprinose pojavi hipokalcemije (Martín-Tereso i Martens, 2014). Naime, prisustvo fosfora u visokoj koncentraciji u krvnoj plazmi inhibira aktivnost bubrežnog enzima 1 α -hidroksilaze, koji katalizuje reakciju hidroksilacije u kojoj nastaje aktivna forma vitamina D. Posledično, smanjuje se sinteza vitamina D, a samim tim i njime stimulisana resorpcija kalcijuma u crevima, što predisponira krave na hipokalcemiju (Seifi i Kia, 2017). Međutim, kako koncentracija kalcijuma u krvnoj plazmi opada ispod 2,5 mmol/L (10 mg/dL), tako je i paraštitasta žlezda stimulisana na lučenje parathormona. On će povećati koncentraciju kalcijuma u krvnoj plazmi pokretanjem prethodno opisanih mehanizama, ali će povećati i izlučivanje fosfora pljuvačkom i urinom (Wright i sar., 1984) i tako ponovo uspostaviti homeostazu ova dva makroelementa. Ovakav uticaj parathormona na metabolizam kalcijuma i fosfora, objašnjava razlog za pojavu hipofosfatemije kod hipokalcemičnih krava neposredno nakon teljenja, pogotovo ukoliko nastanak hipokalcemije nije bio podstaknut prekomernim unosom fosfata (Goff, 2008). Na kraju, fosfor može direktno stimulisati aktivnost 1 α -hidroksilaze i sintezu aktivne forme vitamina D u bubrežima. Ovo se dešava u slučajevima kada je koncentracija fosfora u krvnoj plazmi izrazito niska (0,3-0,6 mmol/L), pa je direktna stimulacija sinteze vitamina D neophodna kako bi se povećao stepen crevne resorpcije fosfora (Goff, 2008; Goff, 2018).

2.2. SPECIFIČNOSTI METABOLIZMA KALCIJUMA KOD VISOKOMLEČNIH KRAVA

U periodu nakon teljenja, kada sekrecija mleka kod visokomlečnih krava predstavlja metabolički prioritet, svi energetske i mineralni resursi organizma, među kojima je posebno značajan kalcijum, podređeni su proizvodnji mleka (Fleischer i sar., 2001). Zbog toga porast proizvodnje mleka neposredno nakon teljenja diktira velike zahteve u kalcijumu. Kalcijum se tada naglo povlači iz telesnih depoa i pospešuje se njegova resorpcija iz digestivnog trakta, odnosno reapsorpcija iz bubrega. Istovremeno, da bi se osigurala visoka proizvodnja mleka neophodno je glukozu iz cirkulacije usmeriti ka mlečnoj žlezdi za proizvodnju laktoze (Drackley, 1999). Unos glukoze u mlečnu žlezdu kao organ nije zavisna od insulina, a kako bi se to ostvarilo pada osetljivost na insulin perifernih tkiva (mišića i masnog tkiva) u kojima je unos glukoze zavisna od insulina, odnosno javlja se insulinska rezistencija perifernih tkiva. Neposredno nakon teljenja smanjen je unos hrane te se visoke energetske potrebe organizma ne mogu podmiriti. Povećane potrebe u energiji visokomlečnih krava i smanjen unos hrane – naročito suve materije neposredno pred porođaj kao i tokom rane laktacije, dovode do razvoja negativnog energetskeg balansa (NEB) (Gerloff, 2000; Hayirli i sar., 2002). Kao odgovor organizma na deficit energije dolazi do mobilizacije masti (Ingvarsen i sar., 1992; Leblanc S., 2010). Tokom NEB-a, pored mobilizacije masti, razvijaju se i druge metaboličke promene koje treba da olakšaju adaptaciju krava na rastuću proizvodnju mleka. Te promene uključuju povećanje obima glukoneogeneze i glikogenolize, kao i smanjeno korišćenje glukoze i povećano korišćenje masnih kiselina kao izvora energije u telesnim tkivima (Reynolds i sar., 2003). Kao posledica lipolize, raste koncentracija neesterifikovanih masnih kiselina (NEFA) u cirkulišućoj krvi, kao i njihov priliv ka jetri. Veliki priliv NEFA ka jetri vodi povećanom stvaranju triglicerida koji okupiraju hepatocite i mogu uticati na njihove

funkcije. Pri nepotpunoj oksidaciji NEFA u jetri dolazi do stvaranja ketonskih tela (acetona, acetoacetata i betahidroksibutirata–BHBA) u količinama višim od fizioloških (Kida i sar., 2003). Visoka koncentracija ketonskih tela može voditi ka nastanku ketoze koja se može javiti u supkliničkoj i kliničkoj formi (Ospina i sar., 2010).

Istraživanja ukazuju da je primarni faktor u razvoju NEB i poremećaja metabolizma kalcijuma nepravilna ishrana visokomlečnih krava, ali je nastanak poremećaja i genetski determinisan te su krave predodređene na visoku proizvodnju mleka podložnije nastanku poremećaja u tranzicionom periodu (Khan i sar., 2013; Rocco i McNamara, 2013).

S obzirom da se poremećaji u metabolizmu kalcijuma i energetskog metabolizma kod visokomlečnih krava javljaju u istom periodu vršena su istraživanja njihove povezanosti. U istraživanjima je dokazano da su hipokalcemične krave u puerperalnom periodu podložnije razvoju NEB-a u odnosu na normokalcemične krave (Chamberlin et al., 2013). Ovo se odražava kroz više koncentracije NEFA na dan teljenja kod hipokalcemičnih krava ali i povećanoj zastupljenosti masti u hepatocitima 7. i 35. dana nakon teljenja. Veza između metabolizma kalcijuma i metabolizma lipida se može objasniti istraživanjima kod ljudi tokom kojih je uočeno da je u adipocitima koji su stimulisani agonistima receptora za kalcijum došlo do smanjenja bazalne lipolize (Cifuentes i Rojas, 2008). Ovo ukazuje da se lipoliza može povećati u nedostatku kalcijuma. Takođe kalcijum je značajan kao sekundarni glasnik za energetski metabolizam u hepatocitima. Dokazano je da povećanje koncentracije kalcijuma u citosolu dovodi do istovremenog povećanja koncentracije kalcijuma u mitohondrijima i da je ovo važan mehanizam za stimulaciju oksidativnog metabolizma u mitohondrijama (Hajnóczky i sar., 1995). Naime, unos kalcijuma u mitohondrije dovodi do fosforilacije piruvat dehidrogenaze pri čemu nastaje njen aktivni oblik (Denton i sar., 1972), koji zatim pretvara piruvat u acetyl-CoA za ulazak u ciklus trikarboksilne kiseline. Ovaj proces takođe uzrokuje porast NADH, koji je odgovoran za doniranje elektrona tokom oksidativne fosforilacije (Robb-Gaspers i sar., 1998). Dakle, promene u koncentraciji kalcijuma u plazmi mogu uticati na koncentraciju kalcijuma u hepatocitima, i u slučaju nižih koncentracija piruvat dehidrogenaza neće biti efikasno aktivirana. Kao rezultat, metabolizam ugljenih hidrata kroz ciklus trikarboksilne kiseline će se smanjiti, što može rezultirati NEB-om.

Povezanost metabolizma kalcijuma sa energetskim metabolizmom praćena je i kod jatrogeno izazvane hipokalcemije viskomlečnih krava (Martinez i sar., 2014). U ovim istraživanjima je utvrđeno da hipokalcemija dovodi do povećanja koncentracije glukoze i smanjene koncentracije insulina u krvi. Moguće mehanize ovakvog efekata hipokalcemije treba tražiti u značaju kalcijuma za oslobađanje insulina iz B ćelija pankreasa. Naime, na *in vitro* modelima ćelija pankreasa različitih životinjskih vrsta i ljudi dokazano je da ulazak jonskog kalcijuma dovodi do pražnjenja granula sa insulinom iz B ćelija (Witzel i Littledike, 1973; Rorsman i sar., 2012). Ovim se objašnjava pad koncentracije insulina u nedostatku kalcijuma, koji dovodi do smanjenja unosa glukoze u insulin zavisna tkiva i posledično povećanje koncentracije glukoze u krvi. Takođe, jedna od posledica smanjenje koncentracije insulina je smanjenja inhibicija hormon senzitivne lipaze čime se podstiče već opisani efekat povećane lipolize, lipomobilizacije i povećanje koncentracije NEFA u krvi kod hipokalcemije. Opisani mehanizmi imaju uticaj na stepen insulinske rezistencije i mogu biti okidač za izrazito povećanje lipolize i povezanih poremećaja kod krava kao što je masna infiltracija jetre i ketoza (Hayirli, 2006).

Svi navedeni mehanizmi su značajni za razumevanje povezanosti metabolizma kalcijuma i energetskog metabolizma sa proizvodnjom mleka sa jedne strane i mogućim patološkim stanjima kod

visokomlečnih krava koja se javljaju u puerperijalnom periodu kao što su ketoza, dislokacija sirišta, retencija placente, mastitis i smanjeni reproduktivni parametri.

Istraživanja koja prate povezanost pospartalne koncentracije kalcijuma sa mlečnošću su kontradiktorna. Tako je u istraživanju Neves i saradnika (2018) dokazano da je niža koncentracija kalcijuma ($Ca \leq 1,95$ mmol/L) neposredno nakon teljenja povezana sa povećanom proizvodnjom mleka kod multiparih krava. Ova povezanost nije zapažena kod primiparih krava u istom ogledu. Takodje, u istraživanju Chamberlin i saradnika (2013) nije zapažen uticaj supkliničke hipokalcemije na mlečnost, kada je jonski $Ca < 1,0$ mmol/L.

Povezanost nižih koncentracija kalcijuma nakon teljenja sa višom proizvodnjom mleka treba tražiti u homeostatskim mehanizmima koji regulišu nagli pad kalcijuma nakon teljenja. Na početku laktacije veliki zahtevi za kalcijumom dovode do pada koncentracije kalcijuma u krvi što vodi sinhronizovanoj hormonskoj adaptaciji čiji je cilj održavanje homeostaze kalcijuma i indirektno produkcije mleka. Naime, nagli pad kalcijuma dovodi do lučenja paratiroidnog hormona kao ključnog hormona u homeostazi kalcijuma. U *in vitro* studijama na ćelijama mlečne žlezde dokazano je da ćelije poseduju kalcijum osetljive receptore koji učestuju u regulaciji unosa kalcijuma u ćelije u zavisnosti od koncentracije ekstraćelijskog kalcijuma (VanHouten i sar., 2004). Takođe, dokazano je da smanjena koncentracija serotonina negativno utiče na ove receptore kod miševa (Laporta i sar., 2014), kao i da serotonin stvoren u epitelnim ćelijama mlečne žlezde može parakrino uticati na ekspresiju gena za protein povezan sa paratiroidnim hormonom (Hernandez i sar., 2012). Protein povezan sa paratiroidnim hormonom može izazvati indukciju mobilizacije kalcijuma iz kostiju (Sowers i sar., 1996). Stoga krave sa povećanom proizvodnjom mleka mogu imati povećan unos kalcijuma u ćelije mlečne žlezde što rezultira smanjenom koncentracijom serumskog kalcijuma neposredno nakon teljenja.

Može se zaključiti da je metabolizam kalcijuma u puerperalnom periodu visokomlečnih krava usko povezan sa NEB-om i da krave genetski predodređene za visoku proizvodnju mleka imaju izraziti pad koncentracije kalcijuma neposredno nakon teljenja (prvih 24 časa). Od sposobnosti homeostatskih mehanizama zavisi da li će se koncentracija kalcijuma brzo vratiti na fiziološke vrednosti ili će se zadržati duže od 24 časa i time povećati rizik od nastanka oboljenja karakterističnih za visokomlečne krave.

Ishrana mlečnih krava u visokom graviditetu hranom koja je bogata, natrijumom (Na) i kalijumom (K) povećava učestalost pojavljivanja puerperalne hipokalcemije (Beede, 1992; Oetzel, 1991). Soli natrijum i kalijuma, u vidu bikarbonata ili karbonata, su veoma efikasne u povećavanju vrednosti pH krvi i razvoju alkaloze kod krava jer, kao što je poznato, Na i K se resorbuju sa 100 posto efikasnosti u digestivnom traktu (Littledike i sar., 1983). Daljem povećanju alkalnosti krvi mogu da doprinesu kalcijum (Ca) i magnezijum (Mg) kao snažni katjoni. Goff i Horst (1997) ukazuju da se sa povećanjem udela Na i K u ishrani krava značajno povećava pH krvi i opada koncentracija hidroksiprolina, odnosno smanjena je mobilizacija kalcijuma iz kosti. Njihov zaključak je da ishrana krava u visokom graviditetu bogata kalijumom daleko više doprinosi razvoju hipokalcemije nego suficit Ca. Pored toga, ishrana bogata kalijumom nepovoljno utiče na resorpciju Mg iz buraga i može da bude jedan od glavnih uzroka hipomagnezijemije (Martens i Schweigel, 2000, Goff 2008). Takođe, povišena koncentracija kalijuma u plazmi stimuliše oslobađanje insulina iz pankreasa kod goveda što ima za posledicu u kratkom vremenskom periodu opadanje koncentracije Mg u krvi (Miller i sar., 1980).

Kronqvist i saradnici (2012) su u svojim istraživanjima ustanovili da smanjenje koncentracije Mg snižava koncentraciju Ca u krvi krava. Naime, snižena koncentracija Mg smanjuje proizvodnju PTH, kao i osetljivost tkiva na delovanje PTH (Rude, 1998). Cohr i saradnici (2018) su utvrdili da smanjen unos fosfora putem hrane u periodu kasnog graviditeta povećava resorpciju Ca iz kostiju, dovodeći do porasta kalcemije u periodu oko teljenja.

2.3. ENDOKRINA REGULACIJA METABOLIZMA KALCIJUMA KOD VISOKOMLEČNIH KRAVA

Pod normalnim fiziološkim uslovima koncentracija kalcijuma je regulisana parathormonom, kalcitoninom i vitaminom D, delovanjem pretežno na kosti, bubrege i creva, kao ciljne organe. Neposredno nakon teljenja, krave ulaze u stanje hipokalcemije zbog rastuće proizvodnje mleka koje sadrži visoke koncentracije kalcijuma. U tom periodu je regulacija usmerena uglavnom na podizanje novoa kalcijuma i vraćanje u fiziološki opseg vrednosti. Slično je i tokom kasnog graviditeta kada se kalcijum u velikoj meri gubi zbog formiranja skeleta fetusa.

2.3.1. Uticaj parathormona

Parathormon (PTH) je proteinski hormon koji se skladišti u paratireoidnoj žlezdi, kao mestu njegove sinteze (Kumar i Thompson, 2011). Količina PTH uskladištenog u sekretornim vezikulama u normalnim okolnostima, kod krava, traje 5 do 6 časova, a u slučaju maksimalnih potreba oko 1,5 čas. Poluživot ovog hormona u cirkulaciji je 10 do 20 minuta. Pojačano lučenje PTH izaziva porast koncentracije kalcijuma, uz pad koncentracije fosfora, u krvi a ciljni organi na koje deluje su kost i bubrezi, dok na creva deluje indirektno. Pojačano lučenje PTH, pored porasta kalcemije, izaziva i pad koncentracije fosfora u krvi. PTH na ciljne organe deluje preko specifičnih receptora, vezanih za G proteine, koji nakon vezivanja hormona, aktiviraju cAMP kao sekundarni glasnik.

Na *kosti*, PTH deluje izazivajući mobilizaciju kalcijuma i fosfora iz kostiju. Na kosti PTH ostvaruje efekat kroz dve faze. Prva faza je *osteocitna osteoliza* i karakteriše se vezivanjem PTH za receptore na osteoblastima i osteocitima, dovodeći do povećanjem njihove aktivnosti (Wysolmerski, 2012). Aktiviranjem kalcijumovih pumpi u ćelijskim membranama ovih ćelija, Ca se oslobađa iz organskog matriksa košanog tkiva najpre u vanćelijsku tečnost a zatim i u cirkulaciju. Druga faza je *osteoklastna osteoliza* i odvija se nakon dugotrajne stimulacije povišenim koncentracijama PTH, i u nju su uključeni osteoklasti. S obzirom da osteoklasti ne poseduju receptor za PTH, uticaj PTH na osteoklaste je posredan. Naime, osteoblasti koji imaju receptor za PTH, u kasnoj fazi delovanja, pod uticajem PTH stimulišu aktivaciju osteoklasta koji razgrađuju mineralnu fazu kosti i oslobađaju Ca u cirkulaciju.

Tokom osteolize, pod uticajem osteocita i osteoklasta razlaže se i kolagen, tako da se faktori kao što su piridinolin (PYD), deoksipiridinolin (DPD) i kolagen tip I C telopeptid (CTX) oslobađaju u cirkulaciju (Urena i sar., 1995). Zato se ovi faktori koriste kao biomarkeri oslobađanja Ca iz kostiju ne samo kod ljudi (Eastell i Szulc, 1997) već i kod mlečnih krava (Hamandez-Castellano i sar., 2020).

U *bubrezima* se receptori za PTH nalaze i u tubulocitima proksimalnog i distalnog tubula i nakon vezivanja PTH dolazi do povećane reapsrpcije Ca u bubrežnim kanalićima u distalnim tubulima uz istovremeno smanjuje reapsorpciju fosfora u proksimalnim tubulima. Pored ovoga, PTH u bubregu

dovodi do porasta sinteze kalcitriola, aktivirajući sistem $1\ \alpha$ hidrolazu, odnosno pretvaranje 25 hidroksiholekalciferola (metabolita vitamina D koji nastaje u jetri) u aktivnu formu, odnosno kalcitriol.

Indirektno, PTH deluje na *creva* utičući na resorpciju Ca indirektno, jer PTH stimuliše sintezu kalcitriola u bubrezima koji pospešuje resorpciju Ca u crevima.

Lučenje PTH regulisano je mehanizmom negativne povratne sprege. Hipokalcemija je glavni stimulus za lučenja PTH. Kada vrednost kalcemije opadne do nivoa od 0,5 do 0,7 mmol/L, lučenje PTH je maksimalno. Lučenje PTH je inhibirano padom koncentracije Mg, s obzirom da je Mg neophodan za aktiviranje signalnog puta u ćeliji nakon vezivanja PTH. Nivo P u krvi nema direktni uticaj na sintezu i lučenje PTH.

2.3.2. Uticaj kalcitonina

Kalcitonin je peptid koji sadrži 32 aminokiseline i luče ga parafolikularne (C) ćelije tireoidne žlezde. Poluživot u cirkulaciji mu je oko 10 minuta.

Porast koncentracije kalcitonina u krvi dovodi do smanjenja koncentracije Ca i P u krvi. Značajno je napomenuti da je parathormon glavni hormon značajan za održavanje kalcemije u fiziološkim uslovima, a da kalcitonin prevashodno utiče na sprečavanje hiperkalcemije. On to ostvaruje delovanjem prevashodno na kosti, ali delom i na bubrege i creva.

Primarne ciljne ćelije koje imaju specifične receptore za kalcitonin i na koje ovaj hormon deluje su osteoklasti *kosti*, pri čemu ovaj hormon blokira osteolizu koju vrše ove ćelije. Nakon delovanja kalcitonina osteoklasti se odvajaju od resorptivnih površina kosti i smanjuju broj mikrovila potpuno se odvajajući od površine kosti. Time je onemogućeno osteolitičko delovanje osteoklasta na kosti. Pored toga kalcitonin smanjuje ukupan broj osteoklasta, kočeći diferencijaciju prekursorskih ćelija.

Kalcitonin takođe deluje i na ćelije *bubrega i creva*, s tim da je njegov uticaj na ove organe značajno manji u odnosu na parathormon, jer su značajno više doze ovog hormona od fizioloških potrebne da bi se ostvario efekat na nivou ovih organa. U bubrezima povećava izučivanje Ca i P.

Glavni stimulus za lučenje kalcitonina je, po principu negativne povratne sprege, hiperkalcemija. Takođe, porast koncentracije magnezijuma u krvi takođe izaziva pojačano lučenje ovog hormona.

2.3.3. Uticaj vitamina D₃

Vitamin D iz hrane se resorbuje intestinalnim putem. Međutim, samo polovina vitamina D prisutnog u organizmu se resorbuje u digestivnom traktu, dok se ostatak dobija izlaganjem jedinice sunčevoj svetlosti. Holekalciferol se sintetiše u koži izlaganjem 7-dehidroholesterolu UV zracima. Provitamin D₃ zatim dospeva do unutrašnjih organa. U jetri započinje prvu hidroksilaciju, pri čemu nastaje 25-OH vitamin D koji odlazi do bubrega gde se prevodi u 1,25-(OH)₂ vitamin D₃ odnosno kalcitriol (DeLuca, 1990). Odavde se 1,25-(OH)₂ vitamin D₃ odvodi do kosti i creva gde utiče na metabolizam kalcijuma i fosfora. Proizvodnja 1,25-(OH)₂ vitamin D₃ je regulisana parathormonom koji utiče na aktivnost bubrežne hidroksilaze – 1 obezbeđujući proizvodnju aktivne forme vitamina D.

Vitamin D se u krvi transportuje pomoću vitamin D-vezujućeg proteina, odnosno transkalciferina, koji se sintetisuje u jetri.

Glavna uloga vitamina D je regulacija koncentracije Ca i P u krvi. Aktivna forma vitamina D ima sve karakteristike steroidnog hormona. Naime, ovaj vitamin ulazi u ciljna tkiva gde se vezuje za receptore naslonjenim na molekule DNK u jedru, nakon čega reguliše gensku ekspresiju.

Kalcitriol, odnosno aktivna forma vitamina D (1,25-(OH)₂D₃) podiže koncentraciju Ca u krvi povećavajući resorpciju Ca na nivou *creva*, kao i reapsorpciju Ca u *bubrezima* (Horst i sar., 1994). Na nivou creva utiče na resorpciju Ca pretežno aktivirajući trancelularni prenos Ca ali i povećavajući efikasnost pasivnog paracelularnog transporta Ca. Na nivou bubrega, ovaj vitamin pospešuje reapsorpciju Ca putem aktivnog transcelularnog transporta u distalnim kanalčićima (Hoenderop i sar., 2005a). U *kostima*, vitamin D utiče na mineralizaciju, demineralizaciju i mobilizaciju minerala kosti. Kod mladih životinja, vitamin D utiče na deponovanje minerala u kosti. Međutim, vitamin D ima ulogu i u mobilizaciji Ca iz kostiju (Tucker i sar., 1973).

2.3.4. Uticaj polnih hormona (estrogena i progesterona)

Imajući u vidu činjenicu da neposredno pre teljenja dolazi do promene u koncentraciji kako polnih hormona, tako i prolaktina, kortizola i insulina, ovi hormoni mogu da se uzmu u razmatranje kao etiološki ili predisponirajući faktori u razvoju puerperalne hipokalcemije kod krava. U poslednjoj nedelji graviditeta nivo estrogena (estradiola i estrona) se značajno povećava do trenutka teljenja, a potom naglo opada do bazalnih vredosti (Devkota i sar., 2015). Poznato je da kod pojedinih vrsta estrogen stimuliše prirast koštanog tkiva (Ranney, 1959) i sprečava razgradnju – resorpciju kosti (Manolagas i sar., 1993). Ranney (1959) je u svojim istraživanjima ustanovio da kod miševa estrogen doprinosi uvećanju koštane mase, a da parathormon ima suprotno delovanje i dovodi do remodelacije kosti i mobilizacije kalcijuma. Istovremenom primenom estrogena i parathormona kod miševa, ovaj autor je ustanovio da postoji antagonizam između ovih hormona i pokazao da estrogen umanjuje delovanje parathormona na procese remodelacije kostiju. Nekoliko studija je ukazalo da bi izuzetno visoka koncentracija estrogena u krvi kod krava na teljenju mogla da predisponira krave da obole od porođajne hipokalcemije (Stott, 1968; Hollis i sar., 1981; Pyorala i sar., 1992). Visoke koncentracije estradiola kod krava neposredno pre teljenja inhibiraju remodelaciju kostiju i predisponiraju starije krave ka puerperalnoj parezi (Sechen i sar., 1988). Međutim, postoji i nekoliko istraživanja u kojima nije ustanovljena veza između koncentracije estrogena u krvi i predispozicije za razvoj porođajne hipokalcemije (Edquist i sar., 1974; Sasser i sar., 1979). Do sličnog zaključka došao je i Goff (2000) koji navodi da visok nivo estrogena na teljenju visokomlečnih krava smanjuje brzinu mobilizacije Ca iz kostiju, ali da nije glavni činioc koji predisponira određene životinje da obole od puerperalne hipokalcemije. Horvath i Kutas, (1959) su ustanovili da je parenteralno davanje estrogena kravama imalo za posledicu smanjenje nivoa kalcijuma u krvi. Međutim, nastala hipokalcemija se može pripisati delovanju estrogena na smanjenje apetita i time smanjenog priliva i resorpcije kalcijuma iz digestivnog trakta, a ne njegovom inhibitornom delovanju na mobilizaciju kalcijuma iz kostiju (Muir i sar., 1972, Grummer i sar., 2004). Ne tako davno, sprovedena istraživanja su pokazala da su estrogeni pored veoma snažnog inhibitornog delovanja na resorpciju kosti (Manolagas i sar., 1993; Devkota i sar., 2015) i veoma snažni stimulatori osteoblasta u formiranju nove kostne mase (Christenson, 1997).

Sa druge strane, progesteron sa svojom antiestrogenom aktivnošću može umanjiti efekat estrogena. Paine (1970) je pokazao da se efikasna prevencija porođajne pareze može postići aplikacijom adekvatne doze progesterona.

2.3.5. Uticaj glukokortikosteroida

Glukokortikoidi u povišenim koncentracijama deluju stimulatивно tokom dužeg vremenskog perioda na remodulaciju kostiju i mobilizaciju kalcijuma. Kod krava obolelih od hipokalcemije utvrđena je viša vrednost kortizola koja se tumači kao posledica odgovora na hipokalcemiju, a ne kao direktno ili indirektno delovanje hipokalcemije na porast koncentracije ovog hormona. Takođe postoje dokazi koji sugerišu da kortizol pomaže u oporavku životinja od hipokalcemije verovatno zbog njegovog efekta na smanjenje koncentracije anorganskog fosfora u krvi (Horst i Jorgensen, 1982). Smatra se da glukokortikoidi (kod pacova) u određenim okolnostima imaju efekat sličan kalcitoninu, odnosno snižavaju nivo Ca u krvi, posebno tokom hiperkalcemije (Hirsch i sar., 1998).

2.3.6. Uticaj prolaktina

Prolaktin luče laktotrofne ćelije adenohipofize (Lamberts i Macleod, 1990). Ovaj hormon utiče pre svega na laktogenezu, ali je utvrđeno da utiče i na održavanje homeostaze Ca. Naime, koncentracija prolaktina na početku laktacije raste do 20 puta kod krava (Tong i sar., 2018) i dokazano je da utiče na intestinalni transport Ca kod laboratorijskih životinja i ljudi (Christakos i sar., 2011). Pretpostavlja se i da pospešuje reapsorpciju Ca u bubrezima (Lotinun i sar., 1998). Pored uticaja na creva i bubrege, prolaktin povećava reapsorpciju Ca iz kostiju kod ljudi i pacova (Charoenphandhu i Krishnamra, 2007).

2.3.7. Uticaj serotonina

Serotonin se sintetiše u CNSu i utiče na raspoloženje i apetit. Pored toga, sintetiše se u crevima, plućima, pankreasu, tireoidi, pljuvačnim žlezdama, jetri i mlečnoj žlezdi (Pai i Marshall, 2011). Značajan je u homeostazi Ca kod mlečnih krava (Laporta i sar., 2013). Utvrđeno je da serotonin stimuliše sintezu PTHrP poreklom iz mlečne žlezde (Hernandez i sar., 2012). PTHrP ima istu biološku ulogu kao PTH, sa posebnim dejstvom na kosti, sem što ne utiče na aktivaciju kalcitriola (Strewler, 2000).

2.4. HIPOKALCEMIJA KOD VISOKOMLEČNIH KRAVA

Hipokalcemija se definiše kao smanjenje koncentracija kalcijuma u krvi ispod fiziološke vrednosti koja nastaje neposredno pre ili 24 do 72 časa nakon teljenja. Fiziološka koncentracija ukupnog Ca u krvi krava treba da se održava iznad 2,0 mmol/L (fiziološki opseg 2,0-3,0 mmol/L). U stručnoj literaturi, ova vrednost je opšte prihvaćena kao donja granica normokalcemije (Goff, 2014; Wilms i sar., 2019). U novije vreme, sa povećanjem prosečne proizvodnje mleka po kravi, sve više se upotrebljavaju strožiji kriterijumi za definisanje normokalcemije kod visokomlečnih krava, tako da pojedini autori sugerišu da bi donja granična vrednost trebala da bude 2,1 ili 2,2 mmol/L (Martinez i sar., 2012; Roberts i sar., 2012). U savremenoj farmskoj proizvodnji hipokalcemija visokomlečnih krava je veoma važna sa ekonomskog aspekta jer može da dovode u pitanje rentabilnost ove grane stočarstva. Prema težini ispoljenih kliničkih simptoma, hipokalcemija može da se manifestuje u kliničkom (mlečna groznica ili puerperalna pareza) i supkliničkom obliku. Pored kliničke forme hipokalcemije koja se karakteriše dugotrajnim ležanjem i nemogućnosti ustajanja životinje, sa zdravstvenog aspekta mnogo značajnija je supklinička forma hipokalcemije, koja protiče inaparentno bez jasno vidljivih simptoma bolesti. Ovaj značaj se upravo oslikava u činjenici da su krave sa supkliničkom hipokalcemijom daleko više podložne puerperalnim oboljenjima i reproduktivnim

poremećajima tokom nastupajuće laktacije. Učestalost pojavljivanja kliničke forme hipokalcemije na savremenim farmama visoko mlečnih krava je od 5-7 % (De Garis i Lean, 2008; Goff, 2008), dok se supklinička forma hipokalcemije pojavljuje u mnogo većem procentu od 25-50 % u zavisnosti od laktacije i prosečne proizvodnje mleka (Reindhart i sar., 2011).

2.4.1. Faktori značajni za nastanak hipokalcemije

Visokomlečne krave se za razliku od drugih vrsta sisara, suočavaju sa jedinstvenim problemom vezanim za održavanje homeostaze kalcijuma. Naime, normalno je da se krava nalazi u laktaciji 10 meseci (305 dana) i da ostane gravidna obično između 3. i 4. meseca laktacije. Graviditet se završava teljenjem obično 8 nedelja nakon prestanka prethodne laktacije (perioda zasušenja). Kako laktacija kod visokomlečnih krava traje do kasnog perioda graviditeta, zahtevi za Ca se značajno smanjuju tek nakon prestanka laktacije uprkos povećanim zahtevima ploda za izgradnju skeleta. Ovaj vremenski period, zasušenje, predstavlja i period najnižih zahteva za Ca kod odraslih krava (Horst i sar., 2005). U patogenezi hipokalcemije visokomlečnih krava najznačajnije su promene u metabolizmu kalcijuma koje se dešavaju sa početkom laktacije, jer se velika količina Ca izlučuje putem kolostruma i mleka. Koncentracija Ca u krvi kod krava je 2,5 mmol/L, a u kolostrumu i mleku je 62-75mmol/l, odnosno 25-30 mmol/l. Visokomlečne krave na piku laktacije mogu izlučivati i do 80 g Ca/dan putem mleka. Iz ovoga proizilazi da ukupna rezerva Ca u krvi koji iznosi od 2-4 g, mora biti 20-30 puta potpuno ispražnjena da bi se zadovoljile potrebe za visokom proizvodnjom mleka (Horst i sar., 2005). Glavni uzrok nastanka hipokalcemije predstavlja narušavanje homeostatskih mehanizama koji učestvuju u regulisanju normalne kalcemije u krvi. Dva faktora koja najviše mogu da utiču na homeostatske mehanizme su metabolička alkalozna i hipomagnezija (Goff, 2006). Na osnovu ovih činjenica može da se izvede zaključak da je nastanak hipokalcemije kod visokomlečnih krava tokom peripartalnog perioda posledica velikog priliva Ca iz krvi u mleko i otkazivanja homeostatskih mehanizama (Goff i sar., 2002). Takođe, faktori koji mogu da doprinesu nastanku hipokalcemije su starost i broj prethodnih laktacija kod krava. Naime, poznato je da krave sa većim brojem prethodnih laktacija imaju nižu koncentraciju Ca u krvi, jer se kod njih smanjuje broj osteoklasta koji mogu da odgovore na porast koncentracije PTH, pa se samim tim smanjuje i mobilizacija Ca iz kostiju (Goff, 2000). Pored toga, sa starošću povećava se i proizvodnja mleka kod krava, a istovremeno se smanjuje aktivni transport Ca u crevima kao i proizvodnja 1,25-dihidroksiholekalciferola.

2.4.2. Dijagnoza hipokalcemije kod visokomlečnih krava

Sumnja na postojanje hipokalcemije visokomlečnih krava postavlja se na osnovu ispoljenosti kliničkih simptoma hipokalcemije, kao što su ležanje i nemogućnost ustajanja neposredno pre ili nakon teljenja, a definitivna dijagnoza se postavlja određivanjem koncentracije ukupnog Ca u krvnom serumu ili jonizovanog Ca u punoj krvi. Kada je koncentracija Ca u krvi ispod granične vrednosti od 2,0 mmol/L ali bez ispoljenih kliničkih simptoma bolesti takvo stanje se definiše kao supklinička hipokalcemija. Nasuprot tome, životinje koje leže i ne mogu da ustanu, a imaju koncentraciju Ca u serumu ispod 2,0 mmol/L definišu se kao krave obolele od kliničke forme hipokalcemije ili puerperalne pareze (Venjakob i sar., 2017). Međutim, uobičajeno je da se klinički oblik hipokalcemije javi kada koncentracija Ca u krvi padne ispod 1,4 mmol/L (Goff, 2014). U poslednje vreme sve je dostupnija i mogućnost određivanja jonskog Ca u krvi (Ca^{2+}) kao biološki aktivnog oblika ovog makroelementa. U dijagnostici hipokalcemije bitno je znati da se fiziološka koncentracija jonskog Ca u krvi kod krava kreće u granicama od 1,0-1,3 mmol/L (Oetzel i sar., 1988).

2.4.3. Terapija hipokalcemije kod visokomlečnih krava

Lečenje hipokalcemije, pre svega njene kliničke forme (puerperalne pareze) treba da bude sprovedeno što je ranije moguće, naročito ukoliko krave leže na strani. Dugotrajno ležanje krava na strani, preko 4 časa, dovodi do ishemije mišića i oštećenja nerava koji za posledicu imaju nastanak „sindroma ležeće krave.” Najbrži način za uspostavljanje normokalcemije je intravenska aplikacija rastvora kalcijumovih soli. Za tu svrhu najčešće se koriste soli kalcijum-borogluconata. Takođe, komercijalni intravenski preparati koji se koriste u terapiji hipokalcemije mogu da sadrže i izvore Mg, P i glukoze. Generalno, ovi intravenski preparati u proseku sadrže od 8,5 do 11,5 g Ca/500 mL rastvora borogluconata. Najbolji efekat u terapiji se postiže kada se aplikuje 2 g Ca/100 kg TM, sporo intravenski brzinom od 1g/minuti. Prebrzo davanje preparata Ca intravenski može dovesti do smrti životinje zbog zastoja u radu srca. Intravenski aplikovani preparati Ca podižu vrednosti kalcemije u krvi iznad fizioloških vrednosti u toku 4 časa, a zatim ponovo padaju čak uvodeći životinju i u stanje prolazne hipokalcemije (Goff, 2008).

2.4.4. Savremeni pristupi u preventivi hipokalcemije visokomlečnih krava

Kako je supklinička forma hipokalcemije na savremenim farmama visokomlečnih krava značajno učestalija u odnosu na kliničku formu ove bolesti, mere prevencije hipokalcemije su usmerene ka različitim postupcima manipulacije i modifikacije obroka za krave u zasušenju, kao i peroralnoj suplementaciji preparatima kalcijuma neposredno pre i nakon teljenja. Poznato je da obroci sa visokim sadržajem katjona u zasušenju smanjuju sposobnost mobilizacije Ca iz kostiju i smanjuju sintezu aktivne forme vitamina D u bubrezima, čime se predisponira nastanak hipokalcemije kod krava u periodu oko teljenja (Goff i sar., 1991; Phillippo i sar., 1994). Iz tog razloga, modifikovanje ishrane za zasušene krave u smislu smanjenja sadržaja Na i K u obroku ili dodavanje u obrok anjonskih soli su jedni od najranije korišćenih principa u prevenciji puerperalne hipokalcemije (Hernández-Castellano i sar., 2020). Prevencija hipokalcemije zasnovan na dodavanju anjonskih soli u miksirane (TMR) obroke za krave u zasušenju može da bude teško izvodljiva u zavisnosti od primenjene tehnologije ishrane i najčešće zahteva značajne izmene u tehnološkom postupku (Goff, 2006).

Noviji pristupi u prevenciji i terapiji hipokalcemije podrazumevaju upotrebu peroralnih preparata kalcijuma. Mnogi istraživači su ispitivali profilaktički i terapijski efekat oralnih preparata Ca kod hipokalcemičnih visokomlečnih krava (Goff i Horst, 1993; Goff i sar., 2002; Oetzel i Miller, 2012; Wilms i sar., 2019). Koncept oralne suplementacije preparatima Ca zasniva se na sposobnosti da velike količine rastvorljivog Ca pasivnim putem prođu iz tankih creva direktno u krvotok i na taj način obezbede održavanje normokalcemije. Peroralni preparati mogu biti u obliku suspenzija, gelova i bolusa što uz koncentraciju Ca i njegov fizički oblik može imati velikog uticaja na stepen i brzinu resorpcije iz creva. Najbolji efekat peroralne profilakse hipokalcemije postiže se aplikacijom oralnih preparata Ca nekoliko dana pre teljenja, a zatim neposredno nakon teljenja uz ponavljanje tretmana u razmaku od 12 do 24 časa (Goff, 2006; Oetzel i Miller, 2012). Prema Goff-u (2006) najbolji rezultati se postižu aplikacijom peroralnih preparata koji sadrže od 50 do 100 g Ca u bolusu. Jedan od najčešće korišćenih peroralnih preparata Ca je kalcijum-hlorid (CaCl_2), koji se već nakon 30 minuta od peroralne aplikacije značajno resorbuje iz creva u krvotok (Oetzel, 2015). Međutim, CaCl_2 ima kaustično dejstvo na sluznicu usne duplje, tako da duža primena i veće doze ovog preparata mogu imati negativne efekte, pre svega na promenu acidobazne ravnoteže i uvođenje životinja u stanje dugotrajne metaboličke acidoze (Oetzel, 2015). Za razliku od CaCl_2 , preparati Ca-karbonata, Ca-propionata i helatno vezani Ca nemaju izraženi kaustični efekat ali imaju nešto manju biološku raspoloživost i sporije povećavaju kalcemiju u krvi. Iz tog razloga, neki autori preporučuju da se u terapiji kliničke hipokalcemije

kombinuje intravenski i peroralni tretman preparatima Ca, tako da se sporo intravenski aplikuje 2 g Ca/100 kg telesne mase uz peroralno davanje nekih od preparata Ca koji se sporije resorbuju kako bi se sprečio ponovni nastanak hipokalcemije (Goff, 2008). Bitno je znati da primena većih doza ili češće davanje peroralnih preparata kalcijuma može imati toksične pa čak i letalne posledice ako se doza rastvorljivog Ca kreće oko 250 grama (Goff i sar., 2002).

2.5. HIPOKALCEMIJA KAO FAKTOR RIZIKA ZA DRUGE POREMEĆAJE ZDRAVLJA I REPRODUKCIJU KOD VISOKOMLEČNIH KRAVA

Razvoj određenog stepena hipokalcemije neposredno nakon teljenja kod visokomlečnih krava predstavlja jedan od ključnih faktora rizika za nastanak poremećaja zdravlja tokom rane laktacije. Koncentracija kalcijuma u krvi je od presudnog značaja kako za kontrakcije glatke i poprečnoprugaste muskulature, tako i za funkciju imunskog sistema (Kimura i sar., 2006). U pojedinim slučajevima veoma niska koncentracija kalcijuma u krvi dovodi do narušavanja neuromišićne funkcije i razvoja kliničke forme puerperalne pareze. Takođe, mnogo češća supklinička hipokalcemija stvara predisponirajuće uslove za razvoj metaboličkih bolesti krava u periodu posle teljenja. Klinička hipokalcemija se dovodi u vezu kao značajan etiološki činilac teških teljenja (Curtis i sar., 1983), prolapsusa materice (Risco i sar., 1984), zadržavanja posteljice, endometritisa, mastitisa i smanjene plodnosti (Borsberry i Dobson, 1989). Verovatnoća za pojavu navedenih poremećaja zdravlja je tri do šest puta veća nego kod normokalcemičnih krava. Primera radi, verovatnoća da hipokalcemične krave imaju zadržanu posteljicu je tri puta veća nego kod krava sa normokalcemijom (Houe i sar., 2001). Kao direktna posledica kliničke hipokalcemije dva puta je veća verovatnoća da krave imaju retenciju posteljice nakon teljenja (Erb i sar., 1985). Korera i sar., (1993) navode indirektan uticaj hipokalcemije na zadržavanje posteljice kod krava, jer se teška teljenja usled hipokalcemije smatraju faktorom rizika za zadržavanje posteljice. U prilog tome je i nalaz koji ukazuje da krave sa retencijom posteljice imaju daleko nižu kalcemiju od onih koje su na vreme odbacile posteljicu nakon teljenja (Melendez i sar., 2004). Pored toga, ustanovljeno je da hipokalcemične krave imaju neutrofile sa smanjenom fagoctnom sposobnošću (Martinez i sar., 2012), kao i smanjenu aktivnost monocita i makrofaga (Kimura i sar., 2006). Dakle, krave sa hipokalcemijom imaju smanjenu funkciju ćelija imunskog sistema što ih predisponira i povećava verovatnoću da imaju zadržavanje posteljice i zapljenje mlečne žlezde (Curtis i sar., 1983). U prilog tome je i činjenica da je kod krava sa hipokalcemijom smanjen tonus i sporije zatvaranje sfinktera sisnih papila nakon muže, čime je dodatno povećan rizik za razvoj mastitisa (Chamberlin i sar., 2013).

Krave sa porođajnom parezom konzumiraju daleko manje količine suve materije nego krave koje imaju normalnu koncentraciju kalcijuma u krvi. Zbog toga je punjenost buraga kao i njegova zapremina kod hipokalcemičnih krava značajno manja. Supklinička hipokalcemija je često udružena sa izraženim NEB i metaboličkim poremećajima zdravlja (Chamberlin i sar., 2013). Incidenca za nastanak ketoze je veoma visoka kod hipokalcemičnih krava tokom prvih sedam dana laktacije (Riberio i sar., 2001). Rizici za nastanak indigestija, dislokacije sirišta i ketoze su tri puta veći (De Garis i Lean, 2008). Supklinička hipokalcemija je u direktnoj vezi sa povećanim rizikom za razvoj dislokacije sirišta (Chapinal i sar., 2012). Rizik za nastanak dislokacije sirišta je pet puta veći kod krava sa supkliničkom hipokalcemijom ((Massey i sar., 1993). Nasuprot ovom mišljenju, Le Blank i sar., (2005) su na

osnovu svojih istraživanja izneli stav da nema korelacije između hipokalcemije krava i incidence za nastanak dislokacije sirišta.

Postoji veliki broj istraživanja koji povezuju poremećaje u metabolizmu kalcijuma i energetsom metabolizmu visokomlečnih krava sa patološkim stanjima i smanjenim reproduktivnim performansama. Međutim i ovde postoje kontradiktorni podaci u literaturi. Tako u istraživanju Neves i saradnika (2018) nisu uočene veze niskih koncentracija kalcijuma u krvnom serumu neposredno nakon teljenja ($\text{Ca} \leq 1,85 \text{ mmol/L}$) sa pojavom retencije placente, metritisa, kliničkog mastitisa ni kod primiparih ni kod multiparih krava, ali je zato uočena povezanost sa pojavom dislokacije sirišta. Nasuprot ovom istraživanju postoje istraživanja koja potvrđuju vezu između nižih koncentracija kalcijuma nakon teljenja sa pojavom metritisa (Martinez i sar., 2012; Rodríguez i sar., 2017). Razlike u navedenim istraživanjima treba tražiti u dužini perioda niskih koncentracija kalcijuma nakon teljenja. Naime, ukoliko period niskih koncentracija traje prvih 24 časa nakon teljenja ovo se smatra fiziološkim odgovorom na povećane zahteve za kalcijumom i krave sa niskim koncentracijama kalcijuma u prvih 24 časa nakon teljenja najčešće neće imati konsekvence na opšte zdravstveno stanje. Naprotiv, ukoliko se niske koncentracije kalcijuma duže vreme održavaju u krvi (više od 24 časa) povećava se rizik od nastanka bolesti. Tako Caixeta i saradnici (2017) uvode pojam hronične subkliničke hipokalcemije kod krava koja se odražava niskim koncentracijama kalcijuma $< 2,15 \text{ mmol/L}$ ($\text{Ca} \leq 8.6 \text{ mg/dL}$) do 3 dana nakon teljenja i povezana je sa negativnim posledicama po reproduktivne parametre visokomlečnih krava. Veza između hipokalcemije i nastanka oboljenja u puerperalnom periodu kod visokomlečnih krava ogleda se u imunosupresivnom efektu niskih koncentracija kalcijuma, odnosno uticaju niskih koncentracija kalcijuma na smanjenu fagocitnu aktivnost neutrofila ali i poremećen antigen stimulisan imunološki odgovor mononukleara (Kimura i sar., 2006). Takođe, niske koncentracije kalcijuma dovode do smanjene aktivnosti glatkih mišića abomazuma i uterusa čime se povećava opasnost od nastanka dislokacije sirišta odnosno retencije placente (Neves i sar., 2018).

U *in vitro* uslovima je dokazano da visoke koncentracije NEFA tokom NEB-a kao i hipokalcemija imaju inhibitorni uticaj na funkcije neutrofila (Scalia i sar., 2006). Ospina i saradnici (2010) povezuju visoke koncentracije NEFA (veće od 0,3 i 0,6 mmol/L) sa povećanim rizikom od zaostajanja posteljice, metritisa, dislokacije abomazuma i kliničke ketoze. Visoke koncentracije NEFA povezane su i sa povećanom incidencom pojave mastitisa (LeBlanc i sar., 2005). Mnoge studije ukazuju i na povezanost NEB-a sa povećanom incidencom neregularnih ciklusa, prolongiranim servis periodom i smanjenom stopom koncepcije kod krava (Wathes, 2003).

3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Cilj ove doktorske disertacije je bio da se utvrdi prevalenca supkličke hipokalcemije kod visokomlečnih krava u intenzivnom uzgoju i ispita efekat peroralne i parenteralne aplikacije preparata kalcijuma na aktivnost paratireoidne žlezde, metaboličke parametre u krvi multiparih krava sa supkličkom hipokalcemijom u ranom puerperijumu.

Shodno postavljenom cilju, pristupilo se rešavanju sledećih istraživačkih zadataka:

1. Određivanje koncentracije kalcijuma u uzorcima krvi sveže oteljenih multiparih krava od pet do petnaest časova nakon teljenja.
2. Merenje koncentracije kalcijuma u krvi krava u određenim vremenskim intervalima tokom 48 časova nakon dijagnostike supkličke hipokalcemije i primenjenih tretmana.
3. Merenje pH vrednosti urina kod krava sa supkličkom hipokalcemijom u određenim vremenskim intervalima tokom 48 časova nakon dijagnostike i primenjenih tretmana.
4. Merenje koncentracije paratireoidnog hormona u krvi krava u određenim vremenskim intervalima tokom 48 časova nakon dijagnostike supkličke hipokalcemije i primenjenih tretmana.
5. Merenje koncentracije glukoze, ukupnih proteina, albumina, uree, kreatinina, ukupnog bilirubina, beta-hidroksi buterne kiseline (BHBA), neesterifikovanih masnih kiselina (NEFA), anorganskog fosfora, magnezijuma i aktivnosti enzima gGT, AST i ALP u krvi krava 0., 24., i 48. časa nakon dijagnostike supkličke hipokalcemije i primenjenih tretmana.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. OGLEDNE ŽIVOTINJE

Ogled je sproveden na komercijalnoj farmi visokomlečnih krava holštajn rase u Jabučkom Ritu („Mladost“ Korporacija PKB – Al Dahra) sa prosečnom proizvodnjom od 7500 L mleka u laktaciji računato na 305 dana. Za ogled su odabrane zdrave krave u visokom graviditetu od treće do sedme laktacije. Tokom perioda zasušenja krave su bile smeštene u zasebnom objektu (objektu za zasušene krave) sve do petnaest dana pred očekivani termin teljenja, kada su preseljavane u porodilište. Odmah nakon teljenja, telad su odvajana od majki. Krave na farmi su mužene dva puta dnevno, a sveže oteljene krave su bile u porodilištu sve do sedmog dana nakon teljenja. Naime, tada je mleko krava smatrano bezbednim za ljudsku upotrebu od rezidua antibiotika usled sprovedenog zasušenja vimena, šezdest dana pre očekivanog termina teljenja, injektorima za zasušene krava. Krave su hranjene potpuno miksiranim obrocima (eng. *total mix ratio*; skr. TMR) dva puta dnevno, formulisanim prema nutritivnim potrebama krava u visokom graviditetu (NRC 2001), bez dodavanja anjonskih soli u ishrani (Tabela 1). Životinje su imale slobodan (*ad libitum*) pristup vodi.

Tabela 1. Sastav i hemijska analiza obroka za krave u zasušenju

Komponente	Obrok	
	60-21 dan teljenja	do 20 dana do teljenja
Seno lucerke, kg/dan SM	2,09	1,74
Kukuruzna silaža, kg/dan SM	4,51	3,76
Senaža lucerke, kg/dan SM	1,39	0,93
Melasa, kg/dan SM		0,39
Kukuruz, kg/dan SM	0,44	1,15
Ječam, kg/dan SM		0,30
Sojina pogača (42%SP) , kg/dan SM		0,16
Sojina sačma (44%SP) , kg/dan SM		0,02
Suncokretova sačma (34%CP) , kg/dan SM	0,21	0,87
Mekinje, kg/dan SM	1,85	0,66
Kalcijum karbonat, kg/dan SM	0,73	0,05
Monokalcijum fosfat, kg/dan SM	0,03	0,02
NaCl, kg/dan SM	0,02	0,05
Natrijum bikarbonat, kg/dan SM		0,01
Vitaminsko mineralni dodatak, kg/dan SM	0,07	0,08
Hemijski sastav		
Energija		
Nel (Mcal/dan SM)	1,4	1,57
Protein SP(%SM)	12,2	14
RDP (%SP)	9,2	11
RUP (%SP)	3,0	3,0
MP (g/kg)	76,36	81,76
NDF (% SM)	47,7	38,2
ADF (% SM)	30,5	23,6
NFC (% SM)	33,5	40,7
Etarski ekstrakt(% SM)	2,1	2,5
Ca (% SM)	0,7	0,7
P (% SM)	0,4	0,4
DCAD (mEq/kg)	196	249

DCAD-katjonsko-anjonska razlika obroka (eng. *dietary cation anion difference*)

4.2. DIZAJN OGLEDA

Sve životinje uključene u ogled bile su klinički pregledane i uvidom u podatke sa farme evidentirano je zdravstveno stanje životinja u prethodnim laktacijama. Na dan teljenja kravama od treće do sedme laktacije u periodu od 5 do 15 sati posle porođaja određivana je koncentracija kalcijuma u uzorcima krvnog seruma. Životinje kod kojih je utvrđena supklinička hipokalcemija (koncentracija

kalcijuma u krvi između 1,38 i 2,0 mmol/L) uvedene su u ogled. Ukupno je testirano 180 životinja i za ogled odabrano 24 krave u stanju supkliničke hipokalcemije. Metodom slobodnog izbora krave sa dijagnostikovanom supkliničkom hipokalcemijom podeljene su u tri grupe. Prva ogledna grupa (IV-Ca, n=8) tretirana je jednokratnom aplikacijom sporo intravenski (oko 15 minuta) u *venu jugularis* sa 500 mL preparata Calci-kel 300 (KELA Laboratoria N.V., Hoogstraten, Belgija) koji sadrži 12,5 g kalcijum glukonata, 2,4 g magnezijum hlorida i bornu kiselinu. Druga ogledna grupa (PO-Ca, n=8) je peroralno dobijala preparat sa helatno vezanim jonima kalcijuma i magnezijuma. Aplikovanje ovog preparata u količini od jednog litra obavljano je nakon dijagnostikovanja supkliničke hipokalcemije, a potom i dvanaest časova nakon prve aplikacije u količini od pola litara. Oralna suspenzija Calci Tonic, (Biochem, Lohne, Nemačka) kojom su tretirane krave druge ogledne grupe, sadrži 41g kalcijuma i 5g magnezijuma u jednom litru preparata. Ukupna količina peroralno aplikovanog Ca u dva davanja iznosila je 61,5 grama. Treća kontrolna grupa krava sa supkliničkom hipokalcemijom (KON, n=8) nije tretirana sa preparatima kalcijuma i magnezijuma.

4.3. UZIMANJE UZORAKA KRVI I URINA

Uzorci krvi su uzimani punkcijom repne vene (*v. cocigea*) u vakutajnere bez antikoagulansa (Vacutainer, Becton Dickinson Co., Franklin Lakes, NJ), 0. časa (dijagnostika supkliničke hipokalcemije, a neposredno pre tretmana) kao i 1., 2., 4., 8., 12., 20., 24., 36. i 48. časa kod svih oglednih životinja. Nakon spontane koagulacije na sobnoj temperaturi (oko 20 minuta), serum je izdvajan centrifugovanjem na 1500 obrtaja/minuti u trajanju od 15 minuta. Dobijeni krvni serum je skladišten na temperaturi od – 20°C, do izvođenja analiza.

Uzorci urina od oglednih životinja su uzimani kateterizacijom mokraćne bešike sterilnim urinarnim kateterom (oko 50 ml urina) u plastične čaše za urin, neposredno nakon dijagnostikovanja supkliničke hipokalcemije, 0. časa, kao i 1., 12., 24., 36. i 48. časa posle.

4.4. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE KALCIJUMA, PARATHORMONA I BIOHEMIJSKIH PARAMETARA U KRVI

Merenje početnih koncentracija kalcijuma (0. čas), kao i merenje koncentracije kalcijuma u vremenskim intervalima 1., 2., 4., 8., 12., 20., 24., 36. i 48. časa posle, obavljeno je na portabilnom – prenosnom hemijskom analajzeru Spotchem EZ SP-4430(Arkay, Inc., Kyoto, Japan) metodom optičkog merenja intenziteta refleksije reagensa, uz korišćenje originalnih test traka od istog proizvođača.

Koncentracija parathormona (PTH), je merena u uzorcima krvnog seruma uzetim 0., 1., 2., 4., 24. i 48. časa, metodom autoimunoeseja (AIA) na automatskom aparatu (AIA-360, Tosoh Bioscience, Inc., South San Francisco, USA) uz korišćenje komercijalnih testova od istog proizvođača.

Koncentracija glukoze, ukupnih proteina, albumina, uree, kreatinina, ukupnog bilirubina, beta-hidroksi buterne kiseline (BHBA), anorganskog fosfora, magnezijuma i aktivnost enzima gGT, AST i ALP određivana je u krvnim serumima uzorkovanim 0., 24., i 48. časa, na automatskom biohemijskom

analizatoru BioSystems A15 (BioSystems, Barselona, Španija), spektrofotometrijom i enzimskim metodama uz upotrebu originalnih reagenasa od istog proizvođača.

Koncentracija NEFA određivana je u uzorcima krvnog seruma 0. časa, enzimsko kolorimetrijskim metodom na automatskom biohemijskom analizatoru BioSystems A15 (BioSystems, Barselona, Španija) pomoću komercijalnog dijagnostičkog kita (Randox, Crumlin, Velika Britanija).

4.5. ODREĐIVANJE pH VREDNOSTI URINA

Određivanje pH vrednosti urina je obavljeno je neposredno nakon uzimanja uzorka urina pH metrom 330i (WTW GmbH, Nemačka).

4.6. STATISTIČKA ANALIZA

Svi podaci su analizirani pomoću komercijalnog programa za statističku obradu podataka STATISTICA v. 8. (StatSoft , Inc., Tulsa, OK, SAD). Normalnost raspodele podataka testirana je pomoću Shapiro-Wilk W testa, gde rezultati sa nivoom značajnosti $p < 0,05$ nisu imali normalnu raspodelu.

Za podatke koji su imali normalnu raspodelu, vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SE (standardna greška), a za podatke koji nisu imali normalnu raspodelu vrednosti su predstavljene kao medijana i gornji i donji kvartil.

Svi prikazani rezultati, osim rezultata za koncentraciju parathormona imali su normalnu raspodelu podataka ($p > 0,05$).

Efekat različitih tretmana hipokalcemije na koncentraciju Ca u krvi između grupa testiran je pomoću ANOVA testa sa ponovljenim merenjima (eng. *repeated measure ANOVA test*). Kada je "F" vrednost za tretman, vreme i interakciju pokazivala statističku značajnost ($p < 0,05$), razlike između rezultata srednjih vrednosti su testirane Fišerovim *post hoc* testom. Rezultati ostalih biohemijskih parametara kao i rezultati analiza pH urina testirane su na isti način. Postojanje statističke značajnosti između prosečnih laktacija i prosečne mlečnosti u prethodnoj laktaciji testirana je pomoću *t*-testa za nezavisne uzorke.

Postojanje statističke značajnosti između grupa u rezultatima za koncentraciju parathormona u krvi (podaci koji nisu imali normalnu raspodelu) testirana je neparametrijskim Kruskal-Wallis ANOVA i mediana testom.

Prevalenca hipokalcemije na oglednoj farmi izračunata je kao % hipokalcemičnih krava od ukupnog broja testiranih krava na datoj farmi u trenutku sprovođenja oglada.

Statistički značajnim su smatrane p vrednosti $< 0,05$ i $< 0,01$.

5. REZULTATI

Radi bolje preglednosti, rezultati dobijeni u okviru ove disertacije podeljeni su u sledeća podpoglavlja: prevalencije supkliničke hipokalcemije, koncentracija kalcijuma u krvi krava sa supkliničkom hipokalcemijom pre i posle tretmana, koncentracija PTH u krvi krava sa supkliničkom hipokalcemijom pre i posle tretmana, pH vrednost urina krava sa supkliničkom hipokalcemijom pre i posle tretmana i koncentracija biohemijskih parametara u krvi krava sa supkliničkom hipokalcemijom pre i posle tretmana.

5.1. PREVALENCA SUPKLINIČKE HIPOKALCEMIJE

U tabeli 2 prikazana je prevalencije supkliničke hipokalcemije, izražena kao % hipokalcemičnih krava od ukupnog broja testiranih krava na datoj farmi u trenutku sprovođenja oglada.

Tabela 2. Prevalenca supkliničke hipokalcemije

Broj krava	Broj laktacije					Ukupno
	3.	4.	5.	6.	7.	
Broj krava sa izmerenom kalcemijom (nCa)	33	84	43	14	6	180
Broj (%) hipokalcemičnih krava u odnosu na nCa	1 (3,03)	9 (10,7)	10 (23,26)	3 (21,43)	1 (16,66)	24 (13,33)

Rezultati prikazani u tabeli 2 pokazuju da je kod krava u 3. laktaciji (nCa=33 krave) 3,03% krava bilo u stanju supkliničke hipokalcemije, u 4. laktaciji (nCa=84 krave) 10,07% krava je bilo u stanju supkliničke hipokalcemije, u 5. laktaciji (nCa=43 krave) 23,26% krava bilo je u stanju supkliničke hipokalcemije, u 6. laktaciji (nCa=14 krava) 21,23% krava bilo je u stanju supkliničke hipokalcemije, dok je u 7. laktaciji (nCa=6 krava) 16,66% krava bilo u stanju supkliničke hipokalcemije.

Od ukupnog broja ispitivanih životinja (n = 180) supklinička hipokalcemija je dijagnostikovana kod 24 krave, tako da je ustanovljena prevalenca bila 13%.

Dodatno, izračunato u odnosu na ukupan broj od 24 krave kod kojih je utvrđena supklinička hipokalcemija, a koje su bile od treće do sedme laktacije, po jedna krava odnosno po 4% je bilo u 3. odnosno 7. laktaciji, dok je 9 krava odnosno 42% bilo u 4. laktaciji, 10 krava odnosno 37% u 5. laktaciji, odnosno 13% krava je bilo u 6. laktaciji. Stoga, kada se uporede rezultati prema broju laktacije u kojoj su bile krave sa supkliničkom hipokalcemijom, prevalenca je najveća u četvrtoj (42%) i petoj (37%) laktaciji, dok je najniža ustanovljena kod krava u trećoj laktaciji (3,03%).

5.2. KONCENTRACIJA KALCIJUMA U KRVI KRAVA SA SUPKLINIČKOM

HIPOKALCEMIJOM

U tabeli 3 prikazana je koncentracija kalcijuma u krvi krava sa supkliničkom hipokalcemijom pre i posle tretmana.

Tabela 3. Koncentracija kalcijuma u krvi krava pre i posle tretmana

Vreme (h)	Koncentracija Ca u krvi (mmol/L)		
	KON	PO-Ca	IV-Ca
0	1,71 ± 0,03 ^a	1,63 ± 0,07 ^a	1,75 ± 0,05 ^a
1	1,60 ± 0,07 ^a	2,13 ± 0,12 ^b	3,02 ± 0,14 ^c
2	1,54 ± 0,09 ^a	2,06 ± 0,12 ^b	2,84 ± 0,30 ^c
4	1,48 ± 0,08 ^a	1,97 ± 0,09 ^b	2,56 ± 0,23 ^c
8	1,53 ± 0,11 ^a	1,87 ± 0,10 ^b	2,32 ± 0,26 ^b
12	1,48 ± 0,13 ^a	1,79 ± 0,08 ^a	2,41 ± 0,15 ^b
20	1,55 ± 0,15 ^a	1,93 ± 0,14 ^{a,b}	2,16 ± 0,10 ^b
24	1,60 ± 0,16 ^a	1,98 ± 0,14 ^{a,b}	2,20 ± 0,07 ^b
36	1,84 ± 0,19 ^a	2,10 ± 0,11 ^a	2,16 ± 0,11 ^a
48	2,14 ± 0,18 ^a	2,34 ± 0,06 ^a	2,41 ± 0,04 ^a

a,b,c-Različita mala slova između grupa u istim redovima predstavljaju statistički značajnu razliku ($P < 0,05$)

KON-kontrolna grupa, bez suplementacije kalcijuma; *PO-Ca*-grupa sa peroralnom suplementacijom kalcijuma; *IV-Ca*-grupa sa intravenskom suplementacijom kalcijuma

Iz tabele 3 zapaža se da između formiranih grupa krava nije bilo statistički značajne razlike u prosečnim koncentracijama Ca u krvi izmerenim pre primenjenih tretmana. Nakon tretmana, prosečna koncentracija Ca u krvi bila je statistički značajno veća kod PO-Ca i IV-Ca u odnosu na KON grupu krava, do osmog časa kod PO-Ca i do dvadeset četvrtog časa kod IV-Ca grupe. Fiziološka koncentracija kalcijuma u krvi kod PO-Ca grupe krava uspostavljena je tokom prva dva časa nakon primenjenog tretmana i održavala se u sličnom opsegu sve do kraja oglada. Kod IV-Ca grupe krava zapaža se porast koncentracije Ca do hiperkalcemije prvog sata nakon tretmana, a nakon toga se smanjuje do fizioloških vrednosti i u tom okviru ostaje sve do kraja oglada. Koncentracija Ca u krvi kod KON grupe bila je ispod donje fiziološke granice i kretala se u opsegu vrednosti supkliničke hipokalcemije sve do četrdeset osmog časa od početka oglada.

5.3. KONCENTRACIJA PTH U KRVI KRAVA SA SUPKLINIČKOM HIPOKALCEMIJOM

U tabeli 4 prikazana je koncentracija PTH u krvi krava sa supkliničkom hipokalcemijom pre i posle tretmana.

Tabela 4. Koncentracija parathormona u krvi krava pre i posle tretmana

Vreme (h)	Koncentracija PTH u krvi predstavljena kao mediana i kvartili (LQ-UQ)		
	KON	PO-Ca	IV-Ca
0	59,00 (58,50-63,30) ^a	69,00 (56,25-90,50) ^a	55,80 (52,25-57,10) ^a
1	61,00 (57,10-62,80) ^a	5,90 (2,70-30,65) ^{a,b}	1,00 (1,00-11,00) ^b
2	54,30 (53,10-55,70) ^a	18,25 (5,45-56,10) ^{a,b}	1,00 (1,00-15,65) ^b
4	55,20 (54,70-57,00) ^a	18,25 (15,30-46,80) ^b	25,20 (21,00-39,45) ^b
24	59,70 (53,60-64,80) ^a	22,70 (18,50-36,00) ^b	51,80 (37,85-58,45) ^{a,b}
48	52,80 (51,50-60,00) ^a	15,20 (10,60-19,50) ^b	47,65 (32,35-51,40) ^{a,b}

^{a,b}- Različita mala slova između grupa u istim redovima predstavljaju statistički značajnu razliku ($P < 0,05$)

LQ-donji kvartil, UQ-gornji kvartil; Kruskal-Wallis ANOVA i mediana test

KON-kontrolna grupa, bez suplementacije kalcijuma; PO-Ca-grupa sa peroralnom suplementacijom kalcijuma; IV-Ca-grupa sa intravenskom suplementacijom kalcijuma

Iz tabele 4 zapaža se da između ispitivanih grupa nije bilo statistički značajne razlike između početnih vrednosti koncentracija PTH izmerenih pre tretmana. Kod IV-Ca grupe izmerene vrednosti koncentracije PTH bile su statistički značajno niže ($P < 0,05$) prvog i drugog časa nakon tretmana u odnosu na izmerene vrednosti PTH kod KON grupe. Četvrtog časa kod obe tretirane grupe (PO-Ca, IV-Ca) koncentracija PTH bila je značajno niža ($P < 0,05$) u odnosu na koncentraciju PTH kod KON grupe. Koncentracija PTH kod PO-Ca grupe bila je statistički značajno manja ($P < 0,05$) u odnosu na vrednosti KON grupe sve do kraja ogleada.

5.4. pH VREDNOST URINA KRAVA SA SUPKLINIČKOM HIPOKALCEMIJOM

U tabeli 5 prikazana je vrednost pH urina krava sa supkliničkom hipokalcemijom pre i posle tretmana.

Tabela 5. pH urina kod krava pre i posle tretmana

pH Urina			
Vreme (h)	KON	PO-Ca	IV-Ca
0	8,22±0,19 ^{ab}	8,01±0,14 ^a	8,34±0,06 ^b
1	8,20±0,12 ^a	7,52±0,23 ^b	6,63±0,30 ^c
12	8,25±0,07 ^a	7,59±0,10 ^b	7,99±0,07 ^c
24	8,06±0,21 ^a	6,38±0,18 ^b	8,07±0,05 ^a
36	7,73±0,19 ^a	6,35±0,15 ^b	7,95±0,08 ^a
48	7,71±0,23 ^a	7,08±0,38 ^a	7,72±0,13 ^a

^{a,b,c}- Različita mala slova između grupa u istim redovima predstavljaju statistički značajnu razliku ($P < 0,05$)

KON-kontrolna grupa, bez suplementacije kalcijuma; PO-Ca-grupa sa peroralnom suplementacijom kalcijuma; IV-Ca-grupa sa intravenskom suplementacijom kalcijuma

Na osnovu izmerenih početnih vrednosti pH urina kod svih grupa ustanovljena je metabolička alkalozna, a izmerena prosečna vrednost pH urina IV-Ca grupe bila je statistički značajno veća ($P < 0,05$) u odnosu na vrednost PO-Ca grupe krava. Nakon prvog časa od tretmana kod IV-Ca grupe krava ustanovljena je acidoza, a prosečna vrednost pH urina bila je statistički značajno niža ($P < 0,05$) od prosečne vrednosti pH urina KON grupe. Takođe, kod PO-Ca grupe krava prvog sata nakon tretmana prosečna vrednost pH urina bila je statistički značajno manja ($P < 0,05$) od vrednosti pH urina KON grupe. Dvanaest časova nakon tretmana, prosečna pH vrednost urina PO-Ca i IV-Ca grupe krava bila je još uvek statistički značajno manja ($P < 0,05$) u odnosu na KON grupu. Kod PO-Ca grupe krava pH vrednost urina je nakon druge aplikacije preparata kalcijuma u kontinuitetu opadala, tako da su izmeren vrednosti dvadeset četvrtog i trideset šestog časa bile statistički značajno manje ($P < 0,05$) od vrednosti pH urina KON i IV-Ca grupe. Na kraju oglada, 48. časa, između prosečnih vrednosti pH urina kod ispitivanih grupa nije bilo razlike.

5.5. KONCENTRACIJA BIOHEMIJSKIH PARAMETARA U KRVI KRAVA SA SUPKLINIČKOM HIPOKALCEMIJOM PRE I POSLE TRETMANA

Od biohemijskih parametara u krvi su određivani koncentracija glukoze, betahidroksi buterne kiseline (BHBA), neesterifikovanih masnih kiselina (NEFA), anorganskog fosfora, magnezijuma, uree, kreatinina, ukupnih proteina, albumina, ukupnog bilirubina, kao i aktivnost gama glutamiltransferaze (GGT), aspartat aminotransferaze (AST) i alkalne fosfataze (ALP).

Rezultati su prikazani u odvojenim podpoglavljima: procena energetskog statusa, procena koncentracije anorganskog fosfora i magnezijuma, procena proteinskog statusa i procena funkcionalnog statusa jetre.

5.5.1. Procena energetskog statusa

U tabeli 6 prikazani su rezultati koncentracija biohemijskih parametara (glukoze, BHBA i NEFA) u krvi krava za procenu energetskog statusa pre i nakon tretmana supkličke hipokalcemije.

Tabela 6. Koncentracije biohemijskih parametara (glukoze, BHBA i NEFA) u krvi krava (srednja vrednost \pm SE)

VREME (h)	KON	PO-Ca	IV-Ca
Glukoza (mmol/L)			
0	4,04 \pm 0,40 ^a	4,52 \pm 0,49 ^a	4,22 \pm 0,44 ^a
24	2,89 \pm 0,39 ^a	3,52 \pm 0,31 ^a	2,87 \pm 0,11 ^a
48	3,22 \pm 0,16 ^a	3,65 \pm 0,34 ^a	2,94 \pm 0,25 ^a
BHBA (mmol/L)			
0	0,64 \pm 0,07 ^a	0,74 \pm 0,10 ^a	0,64 \pm 0,10 ^a
24	0,92 \pm 0,11 ^a	0,67 \pm 0,05 ^a	1,03 \pm 0,20 ^a
48	1,00 \pm 0,12 ^a	0,98 \pm 0,16 ^a	1,10 \pm 0,21 ^a
NEFA (mmol/L)			
0	0,84 \pm 0,07 ^a	0,93 \pm 0,07 ^a	0,83 \pm 0,09 ^a

a,b,c- Različita mala slova između grupa u istim redovima predstavljaju statistički značajnu razliku ($P < 0,05$) KON-kontrolna grupa, bez suplementacije kalcijuma; PO-Ca-grupa sa peroralnom suplementacijom kalcijuma; IV-Ca-grupa sa intravenskom suplementacijom kalcijuma

Iz tabele 6 se zapaža da je koncentracija glukoze kod svih grupa krava pre tretmana bila izjedačena, a izmerene vrednosti su bile veće od gornje fiziološke granice, odnosno veće od 4 mmol/L. Nakon sprovedenih tretmana supkličke hipoklacemije, odnosno 24. i 48. sata, prosečne koncentracije glukoze u krvi PO-Ca i IV-Ca grupe nisu se razlikovale od prosečne koncentracije glukoze kod KON grupe krava.

Između početnih vrednosti koncentracija BHBA kod ispitivanih grupa krava nije bilo značajne razlike. Nakon dvadeset četvrtog časa od početka oglada kod PO-Ca grupe krava prosečna koncentracija BHBA bila je numerički niža od prosečnih koncentracija KON i IV-Ca grupe krava, ali ove razlike nisu bile statistički značajne. Prosečne koncentracije BHBA kod ispitivanih grupa krava na kraju oglada, odnosno četrdeset osmog časa, nisu se značajno razlikovale. Posle tretmana, numerički najviša prosečna vrednoast BHBA utvrđena je kod IV-Ca grupe i bila je neznatno niža od donje granične vrednosti supkličke ketoze.

Između izmerenih prosečnih vrednosti NEFA na početku oglada kod ispitivanih grupa nije bilo značajne razlike. Zapaža se da su kod svih grupa krava prosečne vrednosti ujednačene i veće od gornje fiziološke granice za dati proizvodno – reproduktivni period (NEFA > 0,6 mmol/L).

5.5.2. Procena koncentracije anorganskog fosfora i magnezijuma kod ispitivanih grupa krava

U tabeli 7 prikazani su rezultati koncentracija anorganskog fosfora i magnezijuma u krvi krava pre i nakon tretmana supkličke hipokalcemije.

Tabela 7. Koncentracija anorganskog fosfora i magnezijuma u krvi krava (srednja vrednost \pm SE)

VREME (h)	KON	PO-Ca	IV-Ca
Anorganski fosfor (mmol/L)			
0	1,05 \pm 0,14 ^a	0,67 \pm 0,09 ^b	0,85 \pm 0,11 ^{a,b}
24	1,07 \pm 0,17 ^{a,b}	0,79 \pm 0,15 ^a	1,32 \pm 0,20 ^b
48	1,59 \pm 0,16 ^a	1,29 \pm 0,20 ^{a,b}	1,14 \pm 0,13 ^b
Magnezijum (mmol/L)			
0	1,09 \pm 0,04 ^a	1,11 \pm 0,04 ^a	1,15 \pm 0,14 ^a
24	1,06 \pm 0,05 ^a	0,99 \pm 0,07 ^{a,b}	0,84 \pm 0,06 ^b
48	1,01 \pm 0,05 ^a	0,91 \pm 0,12 ^{a,b}	0,74 \pm 0,08 ^b

^{a,b,c}- Različita mala slova između grupa u istim redovima predstavljaju statistički značajnu razliku ($P < 0,05$)

KON-kontrolna grupa, bez suplementacije kalcijuma; PO-Ca-grupa sa peroralnom suplementacijom kalcijuma; IV-Ca-grupa sa intravenskom suplementacijom kalcijuma

Na osnovu izmerenih početnih vrednosti anorganskog P kod svih grupa ustanovljena je hipofosfatemija, a izmerena prosečna vrednost kod PO-Ca grupe bila je statistički značajno manja ($P < 0,05$) u odnosu na vrednost KON grupe krava. Nakon dvadeset četiri časa od tretmana kod IV-Ca grupe krava izmerena prosečna vrednost anorganskog P bila je statistički značajno veća ($P < 0,05$) od prosečne vrednosti kod PO-Ca grupe. Na kraju oglada, odnosno četrdeset osmog časa nakon tretmana, prosečna vrednosti anorganskog P kod IV-Ca grupe bila je statistički značajno manja ($P < 0,05$) u odnosu na KON grupu krava.

Prosečne koncentracije magnezijuma u krvi kod svih grupa bile su u fiziološkim okvirima. Kod IV-Ca grupe krava prosečna koncentracija magnezijuma dvadeset četvrtog i četrdeset osmog časa bila je statistički značajno manja ($P < 0,05$, pojedinačno) od magnezijemije kod KON grupe krava.

5.5.3. Procena proteinskog statusa kod ispitivanih grupa krava

U tabeli 8 prikazani su rezultati koncentracija biohemijskih parametara u krvi krava za procenu proteinskog statusa pre i nakon tretmana supkličke hipokalcemije.

Tabela 8. Koncentracija uree, kratinina, ukupnih proteina i albumina u krvi krava (srednja vrednost \pm SE)

VREME (h)	KON	PO-Ca	IV-Ca
Urea (mmol/L)			
0	4,30 \pm 0,51 ^a	3,76 \pm 0,41 ^a	4,53 \pm 0,77 ^a
24	5,03 \pm 0,47 ^a	4,11 \pm 0,52 ^a	5,04 \pm 0,71 ^a
48	4,74 \pm 0,76 ^a	2,85 \pm 0,37 ^b	4,11 \pm 0,69 ^{a,b}
Kreatinin (μmol/L)			
0	96,86 \pm 5,56 ^a	102,00 \pm 7,65 ^a	104,25 \pm 8,60 ^a
24	93,86 \pm 5,76 ^a	89,13 \pm 5,13 ^a	93,75 \pm 7,28 ^a
48	89,43 \pm 6,21 ^a	87,75 \pm 2,75 ^a	86,75 \pm 3,91 ^a
Ukupni proteini (g/L)			
0	74,66 \pm 1,87 ^a	70,18 \pm 3,26 ^a	72,43 \pm 3,39 ^a
24	72,48 \pm 3,12 ^a	61,76 \pm 4,10 ^b	72,71 \pm 3,10 ^a
48	71,93 \pm 3,27 ^a	71,61 \pm 2,39 ^a	74,28 \pm 1,54 ^a
Albumin (g/L)			
0	33,83 \pm 1,25 ^a	32,59 \pm 1,53 ^a	34,21 \pm 2,15 ^a
24	32,30 \pm 0,72 ^{a,b}	27,76 \pm 1,94 ^b	35,36 \pm 1,87 ^a
48	32,04 \pm 1,44	31,81 \pm 1,62 ^a	35,74 \pm 1,37 ^a

^{a,b,c}- Različita mala slova između grupa u istim redovima predstavljaju statistički značajnu razliku ($P < 0,05$)

KON-kontrolna grupa, bez suplementacije kalcijuma; PO-Ca-grupa sa peroralnom suplementacijom kalcijuma; IV-Ca-grupa sa intravenskom suplementacijom kalcijuma

Prosečna početna koncentracija uree u krvi kod svih ispitivanih grupa krava bila je izjedačena. Nakon tretmana, odnosno četrdeset osmog časa, prosečna koncentracija uree u krvi PO-Ca grupe bila je statistički značajno manja ($P < 0,05$) od uremije utvrđene kod KON grupe krava.

Između izmerenih prosečnih vrednosti koncentracije kreatinina u krvi ispitivanih grupa krava nije bilo razlika, kako na početku, tako i dvadeset četvrtog i četrdeset osmog časa oglada. Izmerene vrednosti su bile ujednačene tokom čitavog perida ispitivanja.

Prosečna koncentracija ukupnih proteina u krvi kod svih grupa krava pre tretmana bila je izjedačena. Nakon tretmana, dvadeset četvrtog časa, prosečna koncentracija ukupnih proteina u krvi PO-Ca grupe krava bila je statistički značajno manja ($P < 0,05$) od proteinemija kod KON i IV-Ca grupe krava. Na kraju oglada, odnosno četrdeset osmog časa, nije bilo značajne razlike između prosečnih vrednosti proteinemija kod ispitivanih grupa.

Prosečne koncentracije albumina u krvi kod ispitivanih grupa krava na početku oglada bile su ujednačene. Nakon tretmana, dvadeset četvrtog časa, prosečna koncentracija albumina kod PO-Ca grupe bila je statistički značajno manja od albuminemije IV-Ca grupe krava. Na kraju oglada, odnosno četrdeset osmog časa, nije bilo značajne razlike između prosečnih koncentracija albumina u krvi ispitivanih grupa krava.

5.5.4. Procena funkcionalnog statusa jetre kod ispitivanih grupa krava

U tabeli 9 prikazani su rezultati koncentracija biohemijskih parametara u krvi krava za procenu funkcionalnog statusa jetre kod ispitivanih grupa krava.

Tabela 9. Koncentracija bilirubina, aktivnost enzima GGT, AST i ALP u krvi krava (srednja vrednost \pm SE)

VREME (h)	KON	PO-Ca	IV-Ca
Bilirubin (mmol/L)			
0	5,42 \pm 0,60 ^a	3,88 \pm 0,61 ^a	3,53 \pm 0,69 ^a
24	6,43 \pm 0,58 ^{a,A}	3,22 \pm 0,85 ^{B,b}	3,90 \pm 0,91 ^b
48	6,03 \pm 0,89 ^a	3,41 \pm 0,57 ^b	4,17 \pm 0,61 ^{a,b}
gGT (U/L)			
0	19,07 \pm 1,61 ^a	21,49 \pm 1,66 ^a	23,76 \pm 1,65 ^a
24	21,26 \pm 2,51 ^a	20,23 \pm 1,68 ^a	23,09 \pm 1,83 ^a
48	20,57 \pm 1,77 ^a	22,46 \pm 2,45 ^a	22,16 \pm 2,11 ^a
AST (U/L)			
0	71,03 \pm 5,49 ^a	55,00 \pm 3,54 ^b	60,3 \pm 2,68 ^{a,b}
24	87,66 \pm 7,71 ^{a,A}	59,71 \pm 1,67 ^{b,B}	76,16 \pm 5,63 ^{a,A}
48	100,64 \pm 14,85 ^a	71,84 \pm 3,39 ^a	85,39 \pm 8,31 ^a
ALP (U/L)			
0	37,57 \pm 4,91 ^a	26,38 \pm 2,67 ^a	31,25 \pm 2,96 ^a
24	34,14 \pm 3,51 ^a	27,75 \pm 2,82 ^a	26,75 \pm 3,23 ^a
48	35,71 \pm 3,93 ^a	27,63 \pm 2,75 ^a	26,75 \pm 3,91 ^a

^{a,b,c} - Različita mala slova između grupa u istim redovima predstavljaju statistički značajnu razliku ($P < 0,05$)

^{A,B} - Različita velika slova između grupa u istim redovima predstavljaju statistički značajnu razliku ($P < 0,01$)

KON-kontrolna grupa, bez suplementacije kalcijuma; PO-Ca-grupa sa peroralnom suplementacijom kalcijuma; IV-Ca-grupa sa intravenskom suplementacijom kalcijuma

Prosečna početna koncentracija bilirubina u krvi ispitivanih grupa krava bila je ujednačena. Nakon tretmana, dvadeset četvrog časa, izmerene prosečne vrednosti koncentracija bilirubina u krvi kod PO-Ca i IV-Ca grupe bile su statistički značajno manje od prosečne koncentracije utvrđene kod KON grupe krava ($P < 0,01$; $P < 0,05$, pojedinačno). Četrdeset osmog časa nakon tretmana, prosečna vrednost bilirubina PO-Ca grupe krava bila je još uvek statistički značajno manja ($P < 0,05$) u odnosu na KON grupu.

Između izmerenih prosečnih vrednosti aktivnosti enzima GGT i ALP u krvi kod ispitivanih grupa krava nije bilo razlika, kako na početku, tako i dvadeset četvrtog i četrdeset osmog časa oglada. Izmerene vrednosti za aktivnost ovih enzima bile su ujednačene tokom čitavog perida ispitivanja.

Na osnovu izmerenih početnih vrednosti za aktivnost enzima AST zapaža se da je vrednost kod PO-Ca grupe bila statistički značajno manja ($P < 0,05$) u odnosu na vrednost kod KON grupe krava. Nakon dvadeset četvrog časa od tretmana kod PO-Ca grupe krava prosečna aktivnost AST bila je statistički značajno manja ($P < 0,01$) od prosečnih aktivnosti AST kod KON i IV-Ca grupe. Na kraju oglada, četrdeset osmog časa, između prosečnih vrednosti za aktivnost AST kod ispitivanih grupa nije bilo razlike.

6. DISKUSIJA

Homeostatski mehanizmi odgovorni za kontrolu koncentracije kalcijuma (Ca) u krvi visokomlečnih krava često nisu u stanju da odgovore na nagli porast potrebe za Ca neposredno nakon teljenja. Naime, velika potražnja za Ca od strane mlečne žlezde nakon porođaja predisponira visokomlečne krave za nastanak hipokalcemije. Pretpostavlja se da ako je koncentracija Ca u serumu visokomlečnih krava niža od 1,38 mmol/L, krave razvijaju kliničku formu hipokalcemije. Nasuprot tome, supklinička forma hipokalcemije visokomlečnih krava se definiše ako je ukupan serumski Ca između 1,38 do 2,0 mmol/L (Goff, 2014a, Goff, 2008). Prema istraživanju sprovedenom u SAD-u, klinički oblik hipokalcemije na farmama visokomlečnih krava se javlja kod 5% životinja (Mc Laren i sar., 2006; NAHMS, 2002).

Krave koje tokom prvih 48 sati nakon teljenja obole od kliničke forme hipokalcemije (mlečne groznice, puerperalne pareze) pokazuju značajna odstupanja od fizioloških vrednosti biohemijskih parametara u krvi. Takođe, ove jединke inkliniraju ka drugim poremećajima zdravlja, kao što su mastitisi, zadržavanja posteljice, dislokacije sirišta i ketoze (Horst i sar., 2004; Borsberry i Dobson, 1989; Curtis i sar., 1983). U uslovima izrazite hipokalcemije višestruko se povećava koncentracija kortizola u krvi (Horst i sar., 1982) koja može dodatno da potencira već postojeću immunosupresiju u periodu oko teljenja (Kimura 2006; Goff 2008). Kod kliničke hipokalcemije krava smanjena je i sekrecija insulina (Littledike i sar., 1968), kao i korišćenje glukoze od strane perifernih tkiva, a intenzivira se mobilizacija masnih kiselina iz telesnih depoa (Horst i sar., 2004). Iako je težina kliničkih simptoma veća kod puerperalne pareze, supklinička hipokalcemija krava je veoma značajna, jer se daleko teže dijagnostikuje, nema jasne kliničke manifestacije, a može da ugrozi dugovečnost i produktivnost krava (Goff, 2008; Murrai et al., 2008). Chamberlin i saradnici (2013) su u svom istraživanju dokazali da su hipokalcemične krave u ranom puerperijumu podložnije razvoju NEB-a u odnosu na normokalcemične krave.

U poslednjih nekoliko godina interesovanje velikog broja istraživača je bilo usmereno na ispitivanje značaja supkliničke hipokalcemije visokomlečnih krava u etiopatogenezi drugih poremećaja zdravlja tokom ranog perioda laktacije (Martinez i sar., 2012; Seifi i sar., 2011; De Garis i Lean, 2008), kao i na njihove proizvodne i reproduktivne sposobnosti (Caixeta i sar., 2017; Chapinal i sar., 2012).

6.1. PREVALENCA SUPKLINIČKE HIPOKALCEMIJE

Prevalenca supkliničke hipokalcemije kod visokomlečnih krava u periodu oko teljenja još uvek nije dovoljno ispitana i varira u širokom rasponu. Na ovu varijabilnost utiče laktacija u kojoj se krave nalaze kao i broj ispitanih životinja po laktaciji. Rezultati istraživanja Reinhardta i saradnika (2011) sprovedena na velikom uzorku, ukazuju da je na farmama visokomlečnih krava, supklinička hipokalcemija zastupljena kod multiparih krava (od 2. do 6. laktacije) oko 50%, a kod primiparnih oko 25%. Ustanovljena prevalenca hipokalcemije u našem istraživanju je 13% i u saglasnosti je sa rezultatima do kojih su došli Oetzel i Miller (2012) a koji su utvrdili prevalencu od 14,2 %, ali je manje saglasna sa rezultatima istraživanja do kojih su došli Reinhardt i saradnici (2011), koji su ustanovili

prevalencu od 50%, da Silva i saradnici (2019), koji su ustanovili prevalencu od 40%, Venjakob i saradnici (2017) koji su ustanovili prevalencu od 55%, i Horst i saradnici (2003), koji su ustanovili prevalencu od 50%. Međutim, dobijeni rezultati ispitivanja prevalencije supkliničke hipokalcemije u odnosu na laktaciju su potpuno u saglasnosti sa rezultatima napred navedenih autora i pokazuju da je supklinička hipokalcemija najzastupljenija kod krava koje su u 4., 5. i 6. laktaciji. Ovi rezultati potvrđuju činjenicu da se prevalenca hipokalcemije povećava sa povećanjem broja laktacija i većom proizvodnjom mleka (Vijaiakumar i sar., 2017).

6.2. KONCENTRACIJA KALCIJUMA I PTH U KRVI KRAVA SA SUPKLINIČKOM HIPOKALCEMIJOM

Peroralna aplikacija Ca dovela je do porasta koncentracije Ca u krvi, tako da su vrednosti kalcemije u PO-Ca grupi bile značajno veće u poređenju sa vrednostima kod kontrolnom grupe, ali ne tokom svih ispitivanih perioda. Podaci iz literature koji se odnose na promene koncentracije Ca nakon peroralne primene Ca su neusaglašeni. Vilms i saradnici (2019) nisu utvrdili značajan porast kalcemije u prvim satima nakon peroralnog davanja preparata kalcijuma, dok su Blanc i saradnici (2014) ustanovili značajan porast koncentracije Ca prvog sata nakon peroralne primene Ca, koji se održao na istom nivou do kraja studije. Kalcemija utvrđena u našem istraživanju je slična onoj koje su utvrdili Blanc i saradnici (2014), jer su koncentracije Ca bile u fiziološkom opsegu tokom prvih 4 sata nakon tretmana, a zatim su se polako smanjivale do 12 časa. Tada se, nakon drugog tretmana, koncentracija Ca povećala približno do fiziološke vrednosti. Ove razlike u promeni koncentracije Ca nakon peroralne primene a koje su utvrđene u različitim studijama, mogu se objasniti različitim statusom hipokalcemije kod krava kao različitim sadržajem Ca u oralnim dodacima. U poređenju sa početnim vrednostima kalcemije koju su utvrdili Blanc i saradnici, (2014), početne vrednosti kalcemije utvrđene u našem istraživanju bile su niže za 0,24 mmol /L, a dodatak koji smo mi koristili za peroralnu primenu sadržao je 24,5 g manje Ca. Ovi rezultati potvrđuju tvrdnju Goffa (2008) da u slučaju davanja velikih količina vrlo rastvorljivog Ca oralno, moguće je preusmeriti resorpciju Ca u digestivnom traktu ka pasivnoj difuziji koja se odvija između epitelnih ćelija creva, a ne kroz njih. Isti autor je zaključio da se najbolji rezultati kod krava postižu u slučaju davanja 50 i 125 g Ca po dozi. U našoj studiji, intravenski tretman Ca povećao je doveo do povećanja kalcemije Ca iznad fiziološkog opsega oko 4 sata nakon aplikacije, a što je u skladu sa rezultatima koje je dobio Goff (2008). Nakon toga, odnosno 8 do 48 sati nakon tretmana, koncentracija Ca u IV-Ca grupi krava je ostala ostala u fiziološkom opsegu. Ovi rezultati nisu u skladu sa rezultatima koje su dobili Braun i saradnici (2009) i Vilms i saradnici (2019), koji su utvrdili da krave 4. i 24. sata nakon intravenske primene Ca ulaze u prolaznu hipokalcemiju bez mogućnosti održavanja normalne kalcemije. Blanc i saradnici (2014) su objasnili da kratkotrajna hiperkalcemija prouzrokovana intravenskim davanjem Ca može promeniti sposobnost životinje da održi homeostazu Ca smanjenjem koncentracije PTH u krvi. U našoj studiji, visoke vrednosti PTH u krvi, utvrđene 4 sata nakon intravenske aplikacije preparata kalcijuma, su verovatno prouzrokovale održavanje normalne koncentracije Ca nakon intravenskog tretmana.

Krave u kontrolnoj grupi bile su u stanju hipokalcemije do 36 sati nakon početka ogleada, a zatim su se spontano oporavile u 48 sati. Ovi rezultati pokazuju da su krave u kontrolnoj grupi bile u hroničnoj supkliničkoj hipokalcemiji, jer su imali nisku koncentraciju Ca tokom tri dana nakon teljenja (Caixeta i sar., 2017). Ipak, u cilju prevazilaženja ovog izazova, krave su najverovatnije aktivirale neke

mehanizme koji uključuju pojačanu resorpciju Ca iz hrane, povećanu mobilizaciju kalcijuma iz kostiju i pojačanu bubrežnu reapsorpciju Ca (DeGaris i Lean, 2009; Goff, 2008). Verujemo da je u našoj studiji ključni faktor za prevazilaženje hipokalcemije bila visoka vrednost PTH, koja se održala dva dana nakon teljenja, čime se potvrđuje teza da je 48 sati stimulacije sa PTH potrebno za povećanu mobilizaciju Ca iz kosti (Goff i sar., 1986).

Podaci iz literature o koncentraciji PTH kod postpartalnih krava su različiti. Koncentracije PTH u našoj studiji bile su od 55,46 do 68,49 pg/ml pri teljenju, odnosno u skladu sa podacima koje su izneli drugi autori (Abd-Allah i Bakr, 2015; Špakauskas i Klimiene, 2007). Kurek i Stec (2005) su utvrdili niže vrednosti PTH, koje su bile slične i kod kliničkih hipokalcemičnih (19,61 pg/ml) i kod zdravih krava (19,84 pg/ml), ali nešto veće kod krava sa subkliničkim hipokalcemijom (25,09 pg/ml). Suprotno ovim podacima, Vieira-Neto i saradnici (2017) su utvrdili značajno veću koncentraciju PTH (475,00 pg/ml) kod krava sa supkliničkim hipokalcemijom. U našoj studiji se očekivalo smanjenje koncentracije PTH prvih sati nakon intravenske primene Ca, jer je povećana koncentracija Ca stimulisala oslobađanje kalcitonina, kontrahormona u PTH (Kurek i Stec, 2005). Nakon početnog smanjenja, brzo povećanje koncentracije PTH tokom sledeća 4 sata bilo je neočekivano, jer je koncentracija Ca bila u fiziološkom opsegu do kraja studije. Jedan od razloga za ovakav rezultat može biti koncentracija jonizovanog Ca (iCa) u krvi, koja u našem radu nije merena, ali bi mogla imati značajan uticaj na koncentraciju PTH. Kao što su izneli Sjaastad i saradnici (2003) kada je koncentracija iCa u vanćelijskoj tečnosti između 1,0 i 1,25 mmol/l, PTH se izlučuje stalno umerenom brzinom. Prema Vilms i saradnicima (2019) i Ballantine i Herbein (1991), koncentracija iCa je predstavljena kao 54-57% ukupnog Ca pri teljenju. Verujemo da je brzo smanjenje ukupne koncentracije Ca nakon intravenskog tretmana dovelo i do smanjenja iCa, što je izazvalo porast koncentracije PTH. Drugi mogući razlog za povećanu koncentraciju PTH može biti hipoalbuminemija kod krava u peripartumu. Poznato je da se kod ljudi koncentracije PTH povećavaju sa smanjenjem koncentracije albumina u krvnom serumu (Besarab i Caro, 1981). Verujemo da ove teze treba detaljnije istražiti u sledećim studijama.

Manje izražena promena koncentracije PTH nakon peroralne primene Ca verovatno je bila rezultat manjeg povećanja koncentracije Ca nakon peroralne aplikacije. Kao što je ranije pomenuto, oralno primenjeni vrlo rastvorljivi Ca može preusmeriti Ca na resorpciju iz creva pasivnom difuzijom (Goff, 2008). To znači da se PTH smanjuje u prvom satu nakon tretmana verovatno zbog pasivne difuzije Ca koja povećava koncentraciju Ca u krvi, dok se kasnije, bez takvog uticaja Ca, koncentracija PTH odmah povećala. Dvadeset četiri do četrdeset osam sati nakon početka ogleđadošlo je do smanjenja koncentracija PTH koje se može objasniti povećanom resirpcijom Ca iz creva pod uticajem 1,25-dihidroksivitamina D. Za ovu resorpciju potrebna su 24 sata od prethodne stimulacije sa 1,25-dihidroksivitaminom D (Reindhart i sar., 1988). Visoke koncentracije PTH do kraja studije u kontrolnoj grupi su u skladu sa rezultatima Abd-Alaha i Bakra (2015) koji su potvrdili visoku vrednost PTH i do sedam dana nakon porođaja. Visoka koncentracija PTH u kontrolnoj grupi uticala je na povećanu koncentraciju Ca u kontrolnoj grupi, jer je za značajno povećanje resorpcije kosti potrebno 48 sati stimulacije PTH (Reindhart et al., 1988).

6.3. pH VREDNOST URINA KRAVA SA SUPKLINIČKOM HIPOKALCEMIJOM

Visoke vrednosti pH urina u ispitivanim grupama na početku našeg istraživanja rezultat su velike katjon-anion razlike (DCAD) u obroku za ishranu zasušenih krava. Alkalozna može uticati na pojavu hipokalcemije. Ferneborg (2010) je ukazao da krave sa vrednošću pH urina iznad 8,25 imaju najveći rizik od razvoja hipokalcemije. Istovremeno, konformacija PTH receptora se menja tokom alkaloze zbog čega su tkiva manje osetljiva na PTH (Goff, 2008). Međutim, alkalozna smanjuje, ali ne uklanja u potpunosti osetljivost tkiva na PTH. Dugotrajno izlaganje visokim nivoima PTH, indukovano ishranom sa niskim sadržajem Ca, prevazilazi smanjenu osetljivost tkiva na PTH (Goff, 2008).

Procena efekta tretmana na nivo pH urina pokazuje da je peroralni tretman imao najpovoljniji efekat na smanjenje alkaloze, održavajući pH blizu fiziološkog opsega za krave holštajn rase (6,2-6,8) (Goff i sar., 2005). Intravenski tretman je uticao na prolazno smanjenje vrednosti pH urina kao rezultat primenjene borne kiseline, dodane kao solubilizatorski agens upotrebljenog intravenskog rastvora Ca. Iste rezultate su predstavili Blanc i sar. (2014). Visoke vrednosti pH urina u kontrolnoj grupi mogu uticati na smanjenje osetljivosti tkiva na PTH (Goff, 2008).

Dakle, jedan od pozitivnih efekata intravenske primene Ca je smanjenje pH urina pod uticajem borove kiseline iz infuzije. Naime, nakon intravenske infuzije, pH urina bio je ispod granične vrednosti do kraja ispitivanja, što bi moglo imati pozitivan uticaj na održavanje koncentracije Ca u fiziološkom opsegu.

6.4. KONCENTRACIJA BIOHEMIJSKIH PARAMETARA U KRVI KRAVA SA SUPKLINIČKOM HIPOKALCEMIJOM PRE I POSLE TRETMANA

Hipofosfatemija ustanovljena u našim istraživanjima je u skladu sa podacima koje su objavili Starič i Zadnik (2010) kao i Venjakob i saradnici (2017). Izražena hipofosfatemija kod krava je verovatno povezana sa povećanim lučenjem PTH tokom hipokalcemije. Naime, PTH povećava izlučivanje P putem bubrega i pljuvačke, što može nepovoljno da utiče na održavanje normalne koncentracije iP u krvi (Goff, 2000).

Od parametara za procenu energetskeg statusa krava koje su korišćene u našem istraživanju, pre i nakon tretmana supkliničke hipokalcemije, korišćeni su glukoza, BHBA i NEFA.

Glukoza je veoma značajan izvor energije za visokomlečne krave, pogotovo na početku laktacije kada se potrebe za glukozom povećavaju zbog njenog preusmeravanja za sintezu kolostruma i laktoze mleka. Međutim, imajući u vidu činjenicu da se potrebe za glukozom kod preživara uglavnom zadovoljavaju procesom glukoneogeneze i da je njena koncentracija u krvi regulisana snažnim homeostatskim mehanizmima, smatra se da ona nije najpouzdaniji pokazatelj za procenu energetskeg statusa organizma visokomlečnih krava (Reynolds i sar., 2003). Rezultati dobijeni u ovom istraživanju pokazuju da je koncentracija glukoze kod svih grupa krava pre tretmana bila ujednačena, a izmerene početne vrednosti su bile veće od gornje fiziološke granice. Nakon sprovedenih tretmana prosečne koncentracije glukoze u krvi PO-Ca i IV-Ca grupe nisu se razlikovale od prosečne koncentracije glukoze kod kontrolne grupe krava. Dobijeni rezultati glikemija su u saglasnosti sa rezultatima drugih

istraživača koji su ustanovili da se vrednosti glikemija kod krava sa supkliničkom hipokalcemijom nisu razlikovale od glikemija normokalcemičnih krava (Chamberling i sar., 2013; Martinez i sar., 2012). Međutim, postoje i istraživanja koja ukazuju da su izmerene vrednosti glikemije kod krava sa indukovanom supkliničkom hipokalcemijom bile veće od glikemija normokalcemičnih krava, uz istovremenu hipoinsulinemiju (Martinez i sar., 2014). Kao što je poznato iz literature, kod spontane kliničke hipokalacemije krava smanjeno je lučenje insulina (Littledike i sar., 1968). Povišene koncentracije glukoze u krvi kod svih grupa krava na početku oglada mogle bi da se tumače kao posledica smanjene sekrecije insulina od strane beta ćelija endokrinog pankreasa (Rorsman i sar., 2012), odnosno smanjenom sintezom i posledično nižom koncentracijom insulina u krvi (Hayirli, 2006). Pored toga, hiperglikemija može biti posredovana povećanim nivoom kortizolola u krvi krava u periodu oko teljenja i postpartalnom insulinskom rezistencijom (Galvao i sar., 2010). Takođe je poznato da visoka koncentracija PTH hormonu u krvi tokom hipokalcemije, suprimira signalni put insulina u adipocitima i smanjuje transport glukoze (Chang i sar., 2009) što u određenoj meri doprinosi povećanju koncentracije glukoze u krvi. Na osnovu dobijenih rezultata može da se izvede zaključak da primenjeni tretmani peroralne i intravenske suplementacije preparatima kalcijuma nisu imali uticaja na koncentraciju glukoze u krvi PO-Ca i IV-Ca grupe krava. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima istraživanja i drugih autora koji su ustanovili izrazit prolazan porast koncentracije glukoze u krvi krava na teljenu (Weber et al., 2016; Martinez i sar., 2016; Janovick et al., 2011). Takođe je utvrđeno da su krave sa višom koncentracijom glukoze u krvi pokazivale trend smanjenja kalcemije, što je u saglasnosti sa rezultatima Larsona i sar., (2001).

Koncentracija NEFA i BHBA u krvi visokomlečnih krava predstavljaju parametre za procenu energetskog statusa, ali i stepena lipomobilizacije kao odgovor na negativan bilans energije. Martinez i saradnici (2012) su ustanovili da krave sa supkliničkom hipokalcemijom imaju povišenu koncentraciju NEFA i BHBA u krvnom serumu nakon teljenja. Takođe je ustanovljeno da krave sa supkliničkom hipokalcemijom držane na paši imaju povišene koncentracije NEFA i BHBA u krvi tokom prvih sedam dana laktacije (Ribeiro i sar., 2013). Povećanje koncentracije NEFA u krvi kod krava započinje u poslednje dve nedelje graviditeta (Veber i sar., 2013) i traje dva do tri dana pre teljenja (LeBlanc i sar., 2005). Najviša koncentracija NEFA u krvi krava se javlja u periodu oko teljenja, a nakon teljenja postepeno opada sa povećanjem količine konzumirane hrane (Grummer, 1993; Ingvarsten i Andersen, 2000; LeBlanc i sar., 2005).

Na osnovu izmerenih vrednosti NEFA u našem ogledu, može se reći da su ispitivane grupe krava sa supkliničkom hipokalcemijom na dan teljenja bile u izrazitom negativnom bilansu energije. Dobijeni rezultati koncentracije NEFA su u saglasnosti sa rezultatima do kojih su došli i drugi autori u svojim istraživanjima (Martinez i sar., 2012 i 2014; Chamberling i sar., 2013; Reinhardt i sar., 2011; Horst i sar., 2003; Spain i sar., 2004). Primenjeni tretmani suplementacije preparatima kalcijuma nisu imali uticaja na koncentraciju BHBA u krvi PO-Ca i IV-Ca grupe krava. U našem ogledu, nakon aplikacije preparata kalcijuma ustanovljen je porast koncentracije BHBA u krvi hipokalcemičnih krava što je u saglasnosti sa rezultatima Martineza i sar., (2016).

Ostali biohemijski parametri ispitani u ovom istraživanjima nisu ukazivali na zavisnost od načina tretmana hipokalcemičnih krava.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata istraživanja sprovedenih u okviru ove doktorske disertacije izvedeni su sledeći zaključci:

1. Prevalenca supkliničke hipokalcemije kod ispitivanih krava je bila 13 %. Nazastupljenija prevalenca utvrđena je kod krava u 4. i 5. a najniža kod krava u 3. laktaciji.
2. U odnosu na krave sa supkliničkom hipokalcemijom koje nisu tretirane, kalcemija je bila značajno viša do 8. časa nakon aplikacije kod krava koje su peroralno tretirane kalcijumom, odnosno do 24. časa nakon aplikacije kod krava koje su intravenski tretirane kalcijumom. Dodatno, kod krava koje su peroralno tretirane kalcijumom fiziološka kalcemija uspostavljena je tokom prva dva časa od primenjenog tretmana i održavala se do kraja oglada, odnosno 48. sata, na donjoj granici fizioloških vrednosti, dok je kod krava koje su intravenski tretirane kalcijumom, prvog i drugog sata nakon tretmana ustanovljena hiperkalcemija, a zatim normokalcemija do kraja oglada. Kalcemija je kod hipokalcemičnih krava koje nisu tretirane dostigla fiziološke vrednosti tek četrdeset osmog časa od početka oglada.
3. Koncentracija PTH je u krvi krava koje su intravenski tretirane kalcijumom bila značajno niža prvog i drugog časa nakon tretmana u odnosu na vrednosti PTH kod kontrolne grupe krava, dok kod krava koje su peroralno tretirane kalcijumom u ovom periodu nije utvrđena razlika u koncentraciji PTH u odnosu na krave koje nisu tretirane kalcijumom. Četvrtog časa nakon kako intravenskog tako i peroralnog tretmana koncentracija PTH je bila značajno niža u odnosu na vrednosti kod hipokalcemičnih krava koje nisu tretirane, ali su kasnije značajno niže vrednosti PTH u odnosu na grupu koja nije tretirana kalcijumom ostale samo kod grupe koja je peroralno dobijala kalcijum.
4. Sve hipokalcemične krave su na početku oglada, po vrednostima određenim za pH urina, bile u stanju metaboličke alkaloze. Peroralna i intravenska suplementacija kalcijuma dovela je do razvoja metaboličke acidoze, usled naglog pada vrednosti pH urina koji je bio značajno niži u odnosu na pH urina hipokalcemičnih krava koje nisu tretirane, počevši od prvog do dvanaestog časa oglada. Kod hipokalcemičnih krava peroralno tretiranih kalcijumom, 24. i 36. sata od početka tretmana pH urina je bio značajno niži nego kod hipokalcemičnih krava koje nisu tretirane i koje su intravenski tretirane kalcijumom, ukazujući na dugotrajnu metaboličku acidozu kod ovih krava.
5. Primenjeni tretmani suplementacije kalcijuma nisu imali značajan uticaj na energetske bilans krava. Pokazatelji energetskog statusa krava, odnosno koncentracije NEFA i BHBA, su imale vrednosti više od fizioloških, što ukazuje na postojanje negativnog bilansa energije kod hipokalcemičnih krava.
6. Kod svih hipokalcemičnih krava ustanovljena je hipofosfatemija na početku oglada. Na kraju oglada vrednosti aP kod grupe koja nije tretirana su bile izjednačene sa vrednostima kod grupe koja je peroralno primila kalcijum dok su vrednosti kod grupe koja je intravenski primila kalcijum bile značajno niže u odnosu na netretiranu grupu. Na isti način, magnezijemija je na

kraju oglada bila izjednačena kod grupe koja nije tretirana i one koja je peroralno primila kalcijum dok je kod grupe koja je intravenski primila kalcijum bila značajno niža nego kod netretirane grupe.

7. Dobijeni rezultati ukazuju da je intravensko, u odnosu na peroralno, davanje kalcijuma dovelo do bržeg oporavka obolelih krava. S druge strane, kontrolni mehanizmi koji su u osnovi regulacije kalcemije kod krava, odnosno koncentracija PTH, ali i odgovor aP i Mg na tretman krava, ukazuju da je intravensko davanje kalcijuma, u odnosu na peroralno, dovelo do većeg iscrpljivnja kontrolnih mehanizama koji ni posle 48. sata od tretmana nisu uspostavili biološku ravnotežu. U skladu sa tim rezultatima, preporučuje se davanje intravenskog kalcijuma u svim slučajevima izrazite hipokalcemije dok u uslovima umerenih hipokalcemičnih stanja ili u cilju preventive u zapaćima sa visokom prevalencom supkličke hipokalcemije, bolje je opredeliti se za peroralne preparate kalcijuma.

8. LITERATURA

1. *Beede DK*, 1992, Dietary cation-anion difference: preventing milk fever, *Feed Management*, 43, 28.
2. *Borsberry S, Dobson H*, 1989, Periparturient diseases and their effect on reproductive performance in five dairy herds, *Veterinary Record*, 124, 217-219.
3. *Caixeta, LS., Ospina, PA., Capel, MB, Nydam, DV*, 2017, Association between subclinical hypocalcemia in the first 3 days of lactation and reproductive performance of dairy cows, *Theriogenology*, 94, 1-7.
4. *Chamberlin WG, Middleton JR, Spain JN, Johnson GC, Ellersieck MR, Pithua P*, 2013, Subclinical hypocalcemia, plasma biochemical parameters, lipid metabolism, postpartum disease, and fertility in postparturient dairy cows, *Journal of dairy science*, 96, 11,7001-7013.
5. *Chapinal N, Carson M, Duffield TF, Capel M., Godden S, Overton M, LeBlanc SJ*, 2011, The association of serum metabolites with clinical disease during the transition period, *Journal of dairy science*, 94, 10, 4897-903.
6. *Charoenphandhu N, Krishnamra N*, 2007, Prolactin is an important regulator of intestinal calcium transport. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 85, 569–581.
7. *Christakos S, Dhawan P, Porta A, Mady LJ, Seth T*, 2011, Vitamin D and intestinal calcium absorption, *Mol Cell Endocrinol*, 347, 1-2.
8. *Christenson RH*, 1997, Biochemical markers of bone metabolism: an overview, *The Clinical Biochemist Reviews*, 30, 573-93.
9. *Cifuentes M, Rojas CV*, 2008, Antilipolytic effect of calcium-sensing receptor in human adipocytes, *Molecular and cellular biochemistry*, 319, 1, 17-21.
10. *Cohrs I, Wilkens MR, Grünberg W*, 2018, Short communication: Effect of dietary phosphorus deprivation on late gestation and early lactation on the calcium homeostasis of periparturient dairy cows, *Journal Dairy Science*, 101, 19, 9591-9598.
11. *Correa MT, Erb H, Scarlett, J*, 1993, Path analysis for seven postpartum disorders in Holstein cows, *Journal of Dairy Science*, 76, 1305-1312.
12. *Curtis CR, Erb HN, Sniffen CJ, Smith RD, Powers PA, Smith MC, White ME, Hillman RB, Pearson EJ*, 1983, Association of parturient hypocalcaemia with eight periparturient disorders in Holstein cows, *Journal of the American Veterinary Association*, 183, 559-561.
13. *Curtis CR, Erb HN, Sniffen CJ, Smith RD, Powers PA, Smith MC, White ME, Hillman RB, Pearson EJ*, 1983, Association of parturient hypocalcemia with eight periparturient disorders in Holstein cows, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 183, 559–561.
14. *DeGaris PJ, Lean IJ*, 2009, Milk fever in dairy cows: a review of pathophysiology and control principles, *The Veterinary Journal*, 176, 58–69.

15. Denton RM, Randle PJ, Martin BR, 1972, Stimulation by calcium ions of pyruvate dehydrogenase phosphate phosphatase, *Biochemical Journal*, 128, 1, 161.
16. Drackley JK, 1999, Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier?, *Journal of dairy science*, 82, 11, 2259-2273.
17. Drackley JK, Dann HM, Douglas N, Guretzky N A J, Litherland NB, Underwood J P, Looor J J, 2005, Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders, *Italian Journal of Animal Science*, 4, 4, 323-44.
18. Edquist LE, Ekman L, Guslafsson B, Lindell J-O, 1974, Estrone and progesterone plasma levels of normal cows and cows with parturient paresis, *Acta Veterinaria Scandinavica* 15, 587.
19. Erb HN, Smith RD, Oltenacu PA, Guard CL, Hilman RB, Powers PA, Smith MC, White ME, 1985, Path model of reproductive disorders and performance, milk fever, mastitis, milk yield and culling in Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 68, 3337-3349.
20. Estell R., Szulc P, 2017, Use of bone turnover biomarkers in postmenopausal osteoporosis, *Diabetes Endocrinol*, 5, 11, 908-923.
21. Fleischer P, Metzner M, Beyerbach M, Hoedemaker M, Klee W, 2001, The relationship between milk yield and the incidence of some diseases in dairy cows, *Journal of dairy science*, 84, 9, 2025-2035.
22. Gerloff BJ, 2000, Dry cow management for the prevention of ketosis and fatty liver in dairy cows, *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 16, 283–292.
23. Goff JP, 2000, Pathophysiology of calcium and phosphorus disorders, *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 16, 319-37.
24. Goff JP, 2006, Macromineral physiology and application to the feeding of the dairy cow for prevention of milk fever and other periparturient mineral disorders, *Animal feed science and technology*, 126, 3-4, 237-57.
25. Goff JP, 2008, The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows, *The veterinary journal*, 176, 1, 50-7.
26. Goff JP, 2014, Calcium and Magnesium Disorders, *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 30, 359–381.
27. Goff JP, 2018, Invited review: Mineral absorption mechanisms, mineral interactions that affect acid–base and antioxidant status, and diet considerations to improve mineral status, *Journal of Dairy Science*, 101, 4, 2763-813.
28. Goff JP, Brown TR, Stokes SR, Brawley CL, Valdez FR, 2002, Titration of the proper dose of calcium propionate (NutroCAL) to be included in an oral drench for fresh cows, *Journal of Dairy Science*, 85, Suppl. 1, 189.

29. Goff JP, Hors RL, Mueller FJ, Miller JK, Kiess GA, Dowlen HH, 1991, Addition of chloride to a prepartal diet high in cations increases 1,25-dihydroxyvitamin D response to hypocalcemia preventing milk fever, *Journal of Dairy Science* 74, 3863–3871.
30. Goff JP, Horst RL, 1993, Oral administration of calcium salts for treatment of hypocalcemia in cattle, *Journal of Dairy Science*, 76, 101-108.
31. Goff JP, Kimura K, Horst RL, 2002, Effect of mastectomy on milk fever, energy, and vitamins A, E, and β -carotene status at parturition *Journal of Dairy Science*, 85, 1427-1436.
32. Goff JP., Horst RL, 1997, Effects of the addition of potassium or sodium, but not calcium, to repartum ratios on milk fever in dairy cows, *Journal of Dairy Science* 80, 176–186.
33. Grummer RR, Mashek DG, Hayirli A, 2004, Dry matter intake and energy balance in the transition period. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 20, 3, 447-70.
34. Hajnóczky G, Robb-Gaspers LD, Seitz MB, Thomas AP, 1995, Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria, *Cell*, 82, 3, 415-424.
35. Hayirli A, 2006, The Role of Exogenous Insulin in the Complex of Hepatic Lipidosis and Ketosis Associated with Insulin Resistance Phenomenon in Postpartum Dairy Cattle, *Veterinary Research Communications*, 30, 749–774.
36. Hernandez LL, Gregerson KA, Horseman ND, 2012, Mammary gland serotonin regulates parathyroid hormone-related protein and other bone-related signals, *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 302, E1009–E1015.
37. Hernandez-Castellanop LE, Hernandez LL, Bruckmaier RM, 2020, Review: Endocrine pathways to regulate calcium homeostasis around parturition and prevention of hypocalcemia in periparturient dairy cows, *Animal*, 14, 2, 330-338.
38. Hirsch PF, Imai Y, Hosoya Y, Ode H, Maeda S, 1998, Glucocorticoids possess calcitoninlike antihypercalcemic properties in rats, *Endocrine*, 8, 29–36.
39. Hollis BW, Draper HH, Burton JH, Etches RJ, 1981, A hormonal assessment of bovine parturient paresis: Evidence for a role of oestrogen, *Journal of Endocrinology*, 88, 161.
40. Horst RL, Goff JP, McCluskey BJ, 2004, Prevalence of subclinical hypocalcemia in U.S. dairy operations, *International Conference on Production Diseases in Farm Animals*.
41. Horst RL, Goff JP, Reinhardt TA, 1994, Calcium and vitamin D metabolism in the dairy cow, *Journal of Dairy Science* 77, 1936–1951.
42. Horst RL, Goff JP, Reinhardt TA, 2005, Adapting to the transition between gestation and lactation: differences between rat, human and dairy cow, *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 10, 2, 141-56.
43. Horst RL, Jorgensen NA, 1982, Elevated plasma cortisol during induced and spontaneous hypocalcemia in ruminants, *Journal of Dairy Science*, 65, 2332- 2337.

44. Horvath G, Kutas F, 1959, Effects of large doses of oestrogen on the calcium and inorganic phosphate levels of the serum in domestic animals, *Acta veterinaria Academica Scientiarum Hungaricae*, 9, 183-187.
45. Houe H, Ostergaard S, Thilsing-Hansen T, Jorgensen RJ, Larsen T, Sorensen JT, Agger JF, Blom JY, 2001, Milk fever and subclinical hypocalcaemia – an evaluation of parameters on incidence risk, diagnosis, risk factors and biological effects as input for a decision support system for disease control, *Acta Veterinaria Scandinavica*, 42, 1-29.
46. Ingvarstsen KL, Dewhurst RJ, Friggens NC, 2003, On the relationship between lactational performance and health: is it yield or metabolic imbalance that cause production diseases in dairy cattle? A position paper, *Livestock Production Science*, 73, 277–308.
47. Khan MJ, Hosseini A, Burrell S, Rocco SM, McNamara JP, Looor JJ, 2013, Change in subcutaneous adipose tissue metabolism and gene network expression during the transition period in dairy cows, including differences due to sire genetic merit, *Journal of Dairy Science*, 96, 4, 2171-2182.
48. Kida K, 2003, Relationship of metabolic profiles to milk production and feeding in dairy cows, *The Journal of Veterinary Medical Science*, 65, 671-677.
49. Kida K, 2003, Relationship of metabolic profiles to milk production and feeding in dairy cows, *The Journal of Veterinary Medical Science*, 65, 671-677.
50. Kimura K, Reinhardt TA, Goff JP, 2006, Parturition and hypocalcemia blunts calcium signals in immune cells of dairy cattle, *Journal of dairy science*, 89, 7, 2588-2595.
51. Kronqvist C, Emanuelson U, Traven M, Sporndly R, Holtenius K, 2012, Relationship between incidence of milk fever and feeding of minerals during the last 3 weeks of gestation, *Animal*, 6, 1316–1321.
52. Kumar R, Thomson JR, 2011, The regulation of parathyroid hormone secretion and synthesis, 2011, *JASN*, 22, 2, 216-224.
53. Lamberts SW, Macleod RM, 1990, Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph, *Physiologica Review*, 70, 2, 279-318.
54. Laporta J, Keil KP, Vezina CM, Hernandez LL, 2014, Peripheral serotonin regulates maternal calcium trafficking in mammary epithelial cells during lactation in mice. *PLOS One*, 9, 10, p.e110190.
55. Laporta J, Moore SA, Peters MW, Peters TL, Hernandez LL, 2013, Short communication: Circulating serotonin (5-HT) concentrations on day 1 of lactation as a potential predictor of transition-related disorders, *Journal of Dairy Science*, 96, 5146–5150.
56. LeBlanc S, 2010, Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period, *Journal of Reproduction and Development*, 56, 29-35.

57. *Littledike ET, Studemann JA, Wilkinson SR, Horst RL*, 1983, Grass tetany syndrome, 173 in *Role of Magnesium in Animal Nutrition*. Fontenot JP, Bunce GE, Webb KE, Allen VG, ed. *Virginia Polytechnic Inst. State Univ., Blacksburg, VA*.
58. *Littledike ET, Witzel DA, Whipp SC*, 1968, Insulin: Evidence for inhibition of release in spontaneous hypocalcemia, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 129, 135–139.
59. *Lotinun S, Limlomwongse L, Krishnamra N*, 2007, The study of physiological significance of prolactin in the regulation of calcium metabolism during pregnancy and lactation in rats, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 76, 2, 218-228.
60. *Manolagas SC, Jilka RL, Girasole G, Passeri G, Bellido T*, 1993, Estrogen, cytokines, and the control of osteoclast formation and bone resorption in vitro and in vivo, *Osteoporosis International*, S1, S114.
61. *Martens H, Schweigel M*, 2000, Pathophysiology of grass tetany and other hypomagnesemias: implications for clinical management, *Veterinary clinics of North America: Food animal practice*, 16, 2, 339-68.
62. *Martens H, Schweigel M*, 2000, Pathophysiology of grass tetany and other hypomagnesemias. Implications for clinical management, *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 16, 339–368.
63. *Martinez N, Risco CA, Lima FS, Bisinotto RS, Greco LF, Ribeiro ES, Maunsell F, Galvão K, Santos JEP*, 2012, Evaluation of peripartal calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease, *Journal of dairy science*, 95, 12, 7158-72.
64. *Martinez N, Sinedino LDP, Bisinotto RS, Ribeiro ES, Gomes GC, Lima FS, Greco LF, Risco CA, Galvão KN, Taylor-Rodriguez D, Driver JP*, 2014, Effect of induced subclinical hypocalcemia on physiological responses and neutrophil function in dairy cows, *Journal of Dairy Science*, 97, 2, 874-887.
65. *Martín-Tereso J, Martens H*, 2014, Calcium and magnesium physiology and nutrition in relation to the prevention of milk fever and tetany (dietary management of macrominerals in preventing disease), *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 30, 3, 643-70.
66. *Massey CD, Wang C, Donovan GA, Beede DK*, 1993, Hypocalcemia at parturition as a risk factor for left displacement of the abomasums in dairy cows, *The Journal of American Veterinary Medical Association*, 203, 852–853.
67. *McLaren CJ, Lissemore KD, Duffield TF, Leslie KE, Kelton DF, Grexton B*, 2006, The relationship between herd level disease incidence and a return over feed index in Ontario dairy herds, *Canadian Veterinary Journal*, 47, 767–773.
68. *Melendez P, Donovan GA, Risco CA, Goff JP*, 2004, Plasma mineral and energy metabolite concentrations in dairy cows fed an anionic prepartum diet that did or did not have retained fetal membranes after parturition, *American Journal of Veterinary Research*, 65, 1071-7076.

69. Miller JK, Madsen FC, Lentz DE, Wong WO, Ramsey N, Tyslnger CE, Hansard SL, 1980, Blood plasma magnesium, potassium, glucose, and immunoreactive insulin changes in cows moved abruptly from barn feeding to early spring pasture. *Journal of Dairy Science*, 63, 1073-1079.
70. Muir LA, Hibbs JW, Conrad HR, Smith KL, 1972, Effect of estrogen and progesterone on feed intake and hydroxyproline excretion following induced hypocalcemia in dairy cows, *Journal of Dairy Science*, 55, 613–620.
71. Mulligan FJ, Doherty ML, 2008, Production diseases of the transition cow, *The Veterinary Journal*, 176, 1,3-9.
72. NAHMS (National Animal Health Monitoring Service): Part I: Reference of dairy health and management in the United States. USDA-APHIS-VS. Accessed Oct. 12, 2016. https://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/dairy/downloads/dairy02/Dairy02_dr_PartI_1.pdf
73. Neves RC, Leno BM, Curler MD, Thomas MJ, Overton TR, McArt JAA, 2018, Association of immediate postpartum plasma calcium concentration with early-lactation clinical diseases, culling, reproduction, and milk production in Holstein cows, *Journal of dairy science*, 101, 1, 547-555.
74. Neves RC, Leno BM, Stokol T, Overton TR, McArt JAA, 2017, Risk factors associated with postpartum subclinical hypocalcemia in dairy cows, *Journal of Dairy Science*, 100, 5, 3796-804.
75. Oetzel GR, Fettman MJ, Hamar DW, Olson JD, 1991, Screening of anionic salts for palatability: effects on acid-base status and urinary calcium excretion in dairy cows, *Journal of Dairy Science*, 74, 96.
76. Oetzel GR, Miller BE, 2012, Effect of oral calcium bolus supplementation on early lactation health and milk yield in commercial dairy herds, *Journal of Dairy Science*, 95, 7051–7065.
77. Ospina PA, Nydam DV, Stokol T, Overton TR, 2010, Evaluation of nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: critical thresholds for prediction of clinical diseases, *Journal of Dairy Science*, 93, 546-548.
78. Pai VP, Marshall AM, 2011, Intraluminal volume homeostasis: a common serotonergic mechanism among diverse epithelia, *Communicative and Integrative Biology*, 4, 5, 532-537.
79. Payne JM, 1970, Some recent work on the pathogenesis and prevention of milk fever, parturient hypocalcemia, *Academic Press*, 1-13.
80. Phillippo M, Reid GW, Nevison IM, 1994, Parturient hypocalcemia in dairy cows: Effects of dietary acidity on plasma minerals and calciotropic hormones, *Research in Veterinary Science*, 56, 303–309.
81. Pyorala E, Pyorala S, Merom M, Adlercreutz H, 1992, Oestrogens and milk fever-- is there a link? *Acta Veterinaria Scandinavica*, 33, 335.

82. Ranney RE, 1959, Antagonism between estrone and parathyroid extract in their effects upon bone accretion, *Endocrinology*, 65, 594.
83. Reinhardt TA, Lippolis JD, McCluskey BJ, Goff JP, Horst RL, 2011, Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds, *The Veterinary Journal*, 188, 1, 122-124.
84. Reshalaitihan M, Wynn S, Teramura M, Sato T, Hanada M, 2020, Effect of parity number on the dry matter intake of dairy cows during the first week after calving, *Animal Science Journal*, 91, 1, e13314.
85. Reynolds CK, Aikman PC, Lupoli B, Humphries DJ, Beever DE, 2003, Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation. *J. Dairy Sci.* 86, 1201-1217 11.
86. Riggs BL, Jowsey J, Kelly PJ, Jones JD, Maher FT, 1969, Effect of sex hormones on bone in primary osteoporosis, *Journal of Clinical Investigation*, 48, 1065.
87. Risco CA, Reynolds JP, Hird D, 1984, Uterine prolapsed and hypocalcaemia in dairy cows, *Journal of the American Veterinary Association*, 185, 1517-1519.
88. Robb-Gaspers LD, Burnett P, Rutter GA, Denton RM, Rizzuto R, Thomas AP, 1998, Integrating cytosolic calcium signals into mitochondrial metabolic responses, *The EMBO journal*, 17, 17, 4987-5000.
89. Rocco SM, McNamara JP, 2013, Regulation of bovine adipose tissue metabolism during lactation. 7. Metabolism and gene expression as a function of genetic merit and dietary energy intake, *Journal of Dairy Science*, 96, 5, 3108-3119.
90. Rodríguez EM, Arís A, Bach, A, 2017, Associations between subclinical hypocalcemia and postparturient diseases in dairy cows, *Journal of dairy science*, 100, 9, 7427-7434.
91. Rorsman P, Braun M, Zhang Q, 2012, Regulation of calcium in pancreatic α - and β -cells in health and disease, *Cell Calcium*, 51, 3-4, 300-308.
92. Sasser RG, Falk DE, Ross RH, 1979, Estrogen in Plasma of Parturient Paretic and Normal Cows, *Journal of Dairy Science*, 62, 551-556.
93. Scalia D, Lacetera N, Bernabucci U, Demeyere K, Duchateau L, Burvenich C, 2006, In vitro effects of nonesterified fatty acids on bovine neutrophils oxidative burst and viability, *Journal of Dairy Science*, 89, 1, 147-154.
94. Sechen SJ, Bremel RD, Jorgensen NA, 1988, Prolactin, estradiol, and progesterone changes in paretic and nonparetic cows during the periparturient period, *American Journal of Veterinary Research*, 49, 3, 411-6.
95. Seifi HA, Kia S, 2017, Subclinical Hypocalcemia in Dairy Cows: Pathophysiology, Consequences and Monitoring, *Iranian Journal of Veterinary Science and Technology*, 9, 2, 1-15.

96. Seifi HA, LeBlanc SJ, Leslie KE, Duffield TF, 2011, Metabolic predictors of post-partum disease and culling risk in dairy cattle, *The Veterinary Journal*, 188, 2, 216-20.
97. Soetan KO, Olaiya CO, Oyewole OE, 2010, The importance of mineral elements for humans, domestic animals and plants-A review, *African Journal of Food Science*, 4, 5, 200-22.
98. Sowers MF, Hollis BW, Shapiro B, Randolph J, Janney CA, Zhang D, Schork MA, Crutchfield M, Stanczyk F, Russell-Aulet M, 1996, Elevated parathyroid hormone-related peptide associated with lactation and bone density loss, *JAMA*, 276, 7, 549-554.
99. Stott GH, 1968, Dietary influence on the incidence of parturient paresis, *Federation Proceedings*, 27, 156.
100. Strewler GJ, 2000, The parathyroid hormone-related protein, *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 29, 3, 629-645.
101. Suttle NF, 2010, Mineral Nutrition of Livestock. 4th Edition, CABI, Cambridge.
102. Tong JJ, Thompson IM, Zhao X, Lacasse P, 2018, Effect of the concentration of circulating prolactin on dairy cows' responsiveness to domperidone injection, *Journal of Dairy Science*, 101, 3, 2579-2587.
103. Tucker G, Gagnon, RE, Hassler, MR, 1973, Vitamin D3-25-hydroxylase: tissue occurrence and apparent lack of regulation, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 155, 47-57.
104. Urena P, Ferreira A, Kung VT, Morieux C, Simon P, Ang KS, Souberbielle JC, Segre GV, Drueke TB, Devernejoul MC, 1995, Serum pyridinoline as a specific marker of collagen breakdown and bone metabolism in hemodialysis-patients, *Journal of Bone and Mineral Research*, 10, 932-939.
105. VanHouten J, Dann P, McGeoch G, Brown EM, Krapcho K, Neville M, Wysolmerski JJ, 2004, The calcium-sensing receptor regulates mammary gland parathyroid hormone-related protein production and calcium transport, *The Journal of Clinical Investigation*, 113, 4, 598-608.
106. Venjakob L, Borchardt S, Heuwieser W, 2017, Hypocalcemia—Cow-level prevalence and preventive strategies in German dairy herds, *Journal of Dairy Science*, 100, 9258-9266.
107. Wathes DC, Taylor VJ, Cheng Z, Mann GE, 2003, Follicle growth, corpus luteum function and their effects on embryo development in the postpartum cow, *Reproduction Supplement*, 61, 219-37.
108. Wilms J, Wang G, Doelman J, Jacobs M, Martin-Tereso J, 2019, Intravenous calcium infusion in a calving protocol disrupts calcium homeostasis compared with an oral calcium supplement, *Journal of Dairy Science*, 102, 6056-6064.
109. Witzel DA, Littledike ET, 1973, Suppression of insulin secretion during induced hypocalcemia, *Endocrinology*, 93, 4, 761-766.

110. Wright RD, Blair-West JR, Nelson JF, Tregear GW, Rosenblatt M, 1984, Evaluation of the biological properties of parathyroid hormone and analogues in a vascularly isolated parotid gland-based assay, *Journal of endocrinology*, 102, 3, 375-9.
111. Wysolmerski JJ, 2012, Osteocytic osteolysis: time for a second look?, *Bonekey Reports*, 1, 229.

Biografija

Milija R. Palamarević je rođen 09.10.1988. godine u Kragujevcu. Osnovnu školu „Rada Šubakić“ završio je u Guberevcu. Srednju poljoprivrednu školu „dr Đorđe Radić“ završio je u Kraljevu. Fakultet Veterinarske Medicine u Beogradu upisao je 2006/2007 godine a diplomirao je 13.09.2012. godine sa prosečnom ocenom 9,61, čime stiče zvanje doktora veterinarske medicine.

Doktorske studije upisao je 2012/2013 godine na fakultetu veterinarske medicine u Beogradu. Položio je sve ispite koji su predviđeni planom i programom sa prosečnom ocenom 9,4. Tokom 2013. i 2014. Godine bio je uključen u rad na projektu kojim je rukovodio dr Zoran Stanimirović. Do sada kao koautor objavio je dva naučna rada u časopisima M20 kategorije.

Zaposlen je kao doktor veterinarske medicine od 2014. godine. Radno iskustvo iz oblasti velikih životinja sticao je je tokom pet godina u veterinarskoj ambulanti u Vitkovcu. Trenutno je zaposlen u veterinarskoj stanici „UNIVET“ u Ratini.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Милица Паламаревић

број уписа 2012/5005

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај постпарталне апликације калцијума на метаболичку адаптацију хипокалцемичних крва

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

Потпис докторанда

У Београду, 22.08.2021.

Паламаревић Милица

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Милија Паламаревић

Број уписа 2012/5005

Студијски програм докторске академске студије

Наслов рада Утицај постпарталне апликације калцијума на метаболичку адаптацију хипокалцемичних крва

Ментор проф. Др Иван Вујанац

Потписани Милија Паламаревић

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, 22.09.2021.

Паламаревић Милија

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Утицај постпарталне апликације калцијума на метаболичку адаптацију хипокалцемичних крва

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 22.09.2021.

Марија Орешковић Мунџа

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.